

201128095A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフ  
ヒルシュホーン症候群を含む）の診断法の確立と  
患者数の把握に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福嶋 義光

平成24（2012）年 5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン-----1  
症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究  
研究代表者： 福嶋義光（信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座・教授）

（資料1）Wolf-Hirschhorn 症候群 患者情報調査表

（資料2）WHS15例の遺伝型-表現型結果

## II. 分担研究報告

1. ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン-----10  
症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究  
-症例検討・情報提供-  
研究分担者 古庄知己 信州大学医学部附属病院 講師  
鳴海洋子 信州大学医学部 助教

2. ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン-----13  
症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究  
-ゲノムアレイ解析とmetaphase FISH解析-  
研究分担者 涌井敬子 信州大学医学部 助教

3. ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン-----24  
症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究  
-マイクロアレイ染色体検査によるWolf-Hirschhorn症候群22例の遺伝型表現  
型相関解析と情報提供-  
研究分担者 大橋博文 埼玉県立小児医療センター遺伝科 科長兼部長  
研究協力者 清水健司 埼玉県立小児医療センター遺伝科

（資料3）2011年 4pモノソミー症候群集団外来 勉強会資料

4. ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン-----30  
症候群を含む）の診断法の確立と患者数の把握に関する研究  
-マイクロアレイ法が有用であった22q11.2欠失症候群が疑われた症例-  
研究分担者 川目 裕 お茶の水女子大学大学院遺伝カウンセリングコース 教授

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----33

IV. 研究成果の刊行物，等-----35

## ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の 診断法の確立と患者数の把握に関する研究

研究代表者 福嶋義光 信州大学医学部 教授

### 研究要旨

ウォルフヒルシュホーン症候群を含む先天奇形症候群の診断精度を向上させ、染色体の量的変化と臨床症状との関連を明らかにするために、ゲノム上のコピー数の変化を網羅的に検出するゲノムアレイ解析法を用いて、昨年引き続き次の研究を行った。

- 1) ウォルフヒルシュホーン症候群の欠失範囲と臨床症状との関係を明らかにする。
- 2) 原因不明の先天奇形症候群とゲノムコピー数異常の関係を明らかにする。
- 3) ゲノムアレイ解析で問題となる CNV (copy number variation) について、日本人のデータを集積し、精度の高いゲノムアレイ解析法を確立する。

ゲノムアレイ解析を行ったウォルフヒルシュホーン症候群 22 症例では、欠失範囲が大きくなるにつれ、合併症や精神遅滞の程度が重症化する傾向がみられた。また、原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群 (MCA/MR syndrome) 84 例を対象にゲノムアレイ解析を行い、全例に何らかのゲノムコピー数の変化が認められた。ゲノムデータベース・過去の事例との比較を行い、少なくとも 17 例 (20%) は臨床症状と関連があるコピー数異常の可能性が高いと考えられた。既知の染色体異常例 31 例の解析では、ゲノムの欠失・重複範囲を詳細に特定すると同時に、複雑な染色体再構成の評価に有用であった。ゲノムアレイ解析は先天奇形症候群の診断に有用であるが、適切にゲノムコピー数の変化を評価するためには、必要に応じて患者および両親の metaphase FISH 解析を実施するなど追加解析を行う必要がある。また、臨床症状に直接関係しないコピー数多型 (CNV) に関して今後さらに日本人を対象としたデータベース構築が必要である。

### 研究分担者

涌井敬子 (信州大学医学部)  
古庄知己 (信州大学医学部附属病院)  
鳴海洋子 (信州大学医学部)  
大橋博文 (埼玉県立小児医療センター)  
川目 裕 (お茶の水女子大学)

### A. 研究目的

従来、先天奇形症候群の診断は、臨床症状の組み合わせを根拠に主観的になされることが多く、診断精度は限られたものであった。ウォルフヒルシュホーン症候群 (Wolf-Hirschhorn syndrome, 4 番染色体短腕欠失症候群, 4pモノソミー症候群; WHS) は 4 番染色体短腕に位置する遺伝子群の欠失により引き起こされる疾患であり、重度精神遅滞、成長障害、難治性てんかん、多発奇形を主徴とする疾患で、頻度は約 5 万人に 1 人と推定されているが、正確な発生頻度は明らかにされていない。本症候群の一部は染色体検査により 4 番染色体短腕の部分欠失を検

出できる場合があるが、顕微鏡観察により行われる染色体検査では明らかな異常を検出できない症例も数多く存在する。近年、ゲノム上のコピー数の変化を網羅的に検出するゲノムアレイ解析 (マイクロアレイ染色体検査) 法が開発され、数多くの先天奇形症候群とゲノムコピー数異常との関係が明らかにされつつある。本研究の目的は、WHSを含む先天奇形症候群のゲノムアレイ解析技術を用いた診断法を確立し、この方法を用いて、わが国における診断未確定の先天奇形症候群患者を解析し、ゲノムコピー数異常を有する患者の頻度を明らかにすることにより、わが国の WHS を含む先天奇形症候群の患者数を把握することである。

### B. 研究方法

#### ① 解析対象症例の集積とサンプル収集

前年度に引き続き、信州大学医学部附属病院遺伝子診療部と埼玉県立小児医療センター遺伝科を受診した症例を中心に、日本小児遺伝学 Dismorphology

のタベ実行委員会委員が所属する施設などから、WHSと診断された症例および疑いのある症例、既知の染色体構造異常を有する症例、原因不明の先天奇形症候群症例、および協力の得られた親から試料を収集した。

## ② ゲノムアレイ解析

Roche NimbleGen CGX array (134829 oligo probes, hg18) を用いて、以下の疾患群について、収集した症例および協力の得られた親のゲノムアレイ解析を実施し、解析ソフトGenoglyphixを用いて結果を解析した。

- 1) WHS患者
- 2) WHS以外の既知の染色体異常患者
- 3) 原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群 (MCA/MR syndrome) 患者

## ③ FISH解析による染色体再構成の確認

ゲノムアレイ解析によってゲノムコピー数異常 (CNV) が検出された症例のうち、染色体再構成の確認が可能かつ必要な症例と親について、順次、32k DNA cloneライブラリーから染色体再構成の確認に適したBAC cloneを選択してプローブとしFISH解析を実施した。

## ④ WHS患者の遺伝型・表現型相関解析

2012年3月末までに収集した試料について、ゲノムアレイ解析により4番染色体短腕欠失を認めた患者22例について、主治医宛にWHSとして留意すべき臨床症状について詳細なアンケート調査(資料1)を実施し、これまでに情報の得られた15例について遺伝型・表現型相関解析を実施した。

## ⑤ WHSについての情報提供と情報収集

- 1) 遺伝情報サイトであるGeneReviews Japan <<http://grj.umin.jp/>>や、集団外来時の勉強会を利用した情報提供を企画した。

## ⑥ ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群の詳細な解析

既知のゲノムコピー数異常症である22q11.2欠失症候群の臨床症状が認められたが、22q11.2の微細欠失が確認できない一例について、ゲノムアレイ解析を行った。

(倫理面への配慮)

信州大学の倫理委員会の承認を得た研究計画に基づき、主治医より患者家族からインフォームド・コ

ンセントを得たうえで実施した。

## C. 研究結果

### ① 解析対象症例の集積とサンプル収集

本研究により、2011年4月から2012年3月末までに、新規に115家系117名の患者および83名の親からの試料を受け付けた。研究開始時からの累計では、計264家系266名の先天奇形症候群患者 [WHS患者22例、WHS以外の既知の染色体異常患者58例、原因不明の多発奇形/精神遅滞(MCA/MR)患者186例]、および6計241名の患者の親の試料が収集された。

ほとんどは血液試料から直接DNA抽出するとともに、染色体検査用固定細胞を準備した。一部はすでにDNA抽出された試料を用いたため、染色体検査用固定細胞を得られていないものもあった。

### ② ゲノムアレイ解析結果

#### 1) WHS患者

これまでに解析した4番染色体短腕欠失を認めた患者22例については、すべての患者の4番染色体短腕の欠失範囲を詳細に特定するとともに、4番染色体短腕構造異常に伴う別領域のゲノムコピー数異常についても明らかにした。

症例の4番染色体短腕欠失サイズ(Mb)は、2Mbから29.4Mbと非常に幅広く、切断点は3例を除き症例ごとに異なっていた。欠失サイズ(Mb)の平均値±SDが10.97±7.47(中央値:8.77)であり、欠失の分類は、単純欠失:18例(82%)、不均衡転座:3例(14%) [+8pter, +10qter, +11qter]、腕間逆位に伴う派生4番染色体1例(5%)であった。両親解析が可能だった7例のうち、単純欠失だった6例はすべてde novoで、不均衡型転座der(4)t(4:8)の1例が母の均衡型転座に由来していたことを確認した。5Mb台以下の欠失サイズを有した症例は、G分染法では異常を検出できていなかった。

#### 2) WHS以外の既知の染色体異常患者

既知のWHS以外の染色体異常31例についてゲノムアレイ解析を実施し、核型分析あるいはFISH解析にて検出されていた構造異常部位の詳細を確認した。

G分染法あるいはFISH法で不均衡型構造異常が判明していた22症例および過剰マーカー染色体が検出されていた3症例のうち、過剰マーカー染色体が検出されていた1症例以外は、異常染色体に関連したゲノムコピー数異常が同定できた。一部に報告されていた核型から予想されたコピー数異常が検出

されない症例があり、ゲノムアレイ解析のみでは正確な細胞遺伝学的診断に結びつかない症例があることを再認識した。さらに、一部は、構造異常が確認されていた染色体領域とは異なる染色体領域のゲノムコピー数減少も検出され、独立した複数の異常を同じに有する症例も少なくないことが確認された。

ほとんどの症例が、判明したゲノムコピー数異常の情報をもとに選択したプローブを用いて、metaphase FISH 解析による染色体再構成の確認が必要であった。

### 3) 原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群 (MCA/MR syndrome) 患者

2011 年度に収集した原因不明の MCA/MR 患者 84 例に実施したゲノムアレイ解析の結果、臨床症状への影響がある「clinically significant」、あるいは影響している可能性が高いけれど確実とはいえない「unclear clinically significance」なゲノムコピー数異常が 17 例 (20%) に検出された。ただし、昨年に引き続き本年度の解析でも、これまでに収集・アレイ解析した原因不明の MCA/MR 患者 187 名に診断されていない WHS 症候群は含まれていなかった。

中間部欠失を想定するコピー数減少を検出した 10 症例のうち 1 症例、微細欠失症候群として既知の領域の欠失であった。2 症例は、マイクロアレイ解析が普及して症候群として確立してきた症候群領域と一致あるいはオーバーラップしていた。

臨床的影響がない領域と考えられるにも関わらず、ほとんどの領域が既知の遺伝子を含んで、あるいはオーバーラップしていた。DGV や ISCA などの公開されているゲノムコピー数データベースに登録されていない、日本人特有と考えられるゲノムコピー数異常もあった。

評価の精度を高めるため、両親の検索と metaphase FISH 解析による解析を可能な限り進めるとともに、文献的考察を加え、各患者の臨床症状との関連についてさらに評価してゆくことが必要であった。

検出されたゲノムコピー数異常が患者の臨床症状と関連があるかどうかの判断を以下の基準を設けて行った。

i) clinically significant (患者の臨床症状と関連がある) : 検出されたゲノムコピー数変化領域が、ISCA で病的変異である可能性が高い目安とした 200kb 以上のコピー数減少か 400kb 以上のコピー数増加であり、かつ、1) 既知の奇形症候群の責任領域とし

て知られている、2) 臨床症状と関連するあるいは関連が示唆されるゲノムコピー数異常として Genoglyphix® や、公開されている Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER\*) や The International Standards for Cytogenomic Arrays (ISCA\*\*) に登録されている、あるいは論文として複数の既報告がある、3) 臨床症状との関連が知られている責任遺伝子が座位している領域であることを確認した場合に評価した。

ii) unclear clinically significance (患者の臨床症状との関連は不確定) : 1) と 3) ととも確定できない場合

iii) thought to be benign (患者の臨床症状には影響していない可能性が高い) : 1) 本研究に協力いただいた患者の親に実施したゲノムアレイ解析結果 (現時点で日本人 100 例以上) を蓄積した一般成人のデータにおいて、異なる 5 家系以上に認めた同じコピー数変化である場合、2) 臨床症状のない親から伝達したことが判明した場合、3) コピー数変化領域の大きさが ISCA で病的変異である可能性が低い目安とした 200kb 以下のコピー数減少か 400kb 以下のコピー数増加であり、かつ、(1) 領域内に臨床症状と関連することが知られているあるいは関連が示唆される遺伝子が含まれておらず、かつ (2) Genoglyphix®, ISCA, Database of Genomic Variants (DGV\*\*\*) に bCNVs あるいは多型として登録されている領域と一致あるいはオーバーラップしている場合とした。を当研究室における現時点の bCNVs とし、患者に認めた同領域のゲノムコピー数変化は「thought to be benign」とした。

<URL>

\*DECIPHER: <http://decipher.sanger.ac.uk/>

\*\*ISCA: <https://www.iscaconsortium.org/>

\*\*\*DGV: <http://projects.tcag.ca/variation/>

### ③ Metaphase FISH 解析による染色体再構成の確認

ゲノムアレイ解析の結果、その情報をもとに追加の metaphase FISH 解析が有用な症例について、各症例の異常領域ごとに、適切な DNA クロームをデータベースから選択しプローブとして、ゲノムコピー数異常に伴う染色体再構成について分子細胞遺伝学的に確認を進めている。

特に、ゲノムコピー数増加領域は、アレイの解析結果のみでは、重複断片がどの染色体のどの部位に付加したのか確定できないため、metaphase FISH 解析による再構成の確認が必須である。

#### ④ WHS患者のゲノムアレイ解析と遺伝型・表現型 相関解析

WHSの典型的症状として、特徴的顔貌所見、成長障害、精神運動発達遅滞、けいれん（脳波異常）などがあるが、それらを中心にアンケート結果により得られた情報を、欠失の大きさで大きく3つに分類して比較検討した（別表1）。

主な身体合併症としては、欠失サイズが大きいほど、主な身体合併症の頻度は増加する傾向にあった。また15Mbを超える大きな欠失では腎臓、眼、難聴などの重症度も大きい傾向にあった。一方、心臓合併症の頻度は従来の報告より高く（13/15, 87%）、重症度は欠失サイズに関わらずASD, PDAなど比較的軽症なものが多かった。その他特記すべき合併症として、症例2において、多発性骨軟骨腫の合併症を認めた。他に有意なCNVは存在せず、また既知の責任遺伝子（*EXT1/EXT2*）には変異やエクソン単位の異常は認めなかった。劣性遺伝形式での新たな骨軟骨腫の責任遺伝子が4p欠失領域に存在する可能性が示唆された（別表1a）。

患者のQOL向上に留意が必要な症状であるけいれんとの関連については、発症頻度は12/14（86%）であり、うち83%（10/12）に重積もしくは群発を認めた。非重積例は2例とも5Mb以下の欠失サイズであり、初発も2歳代と遅い傾向を認めた。重積例は全例多剤併用にてコントロールされていたが、3歳をすぎると重積は改善傾向にあった。また臭化ナトリウム/カリウム（Na/KBr）の使用が奏功している例が複数見られた。本調査での非けいれん症例のうち、症例13は*LETMI*を含むものの遠位約1.4Mbを含まない約8.8Mbの中間部欠失例であった。これとは逆の遠位約1.4Mbのみの欠失例でけいれんの報告が過去に2例ある[South et al., 2008]ことから、*LETMI*の他に、WHS CRより遠位の領域（*FGFRL1*など）を含む複数の因子がけいれんの浸透率に影響を及ぼしている可能性を示唆した（別表1b）。

#### ⑤ WHSについての情報提供と情報収集

1) 遺伝情報サイトであるGeneReviews Japan <<http://grj.umin.jp/>>に昨年、WHSに関する最新情報（疾患の特徴、頻度、診断・検査、鑑別診断、臨床像、合併症、マネージメント、遺伝カウンセリング等）の記載を翻訳・改訂、継続して掲載したのに引き続き、本年度、ゲノムコピー数異常を伴う可能性のある遺伝性疾患も複数追加掲載した。

2) 埼玉県立小児医療センターにおいて集団外来を開催した。

#### ⑥ ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群の詳細な解析

22q11.2欠失症候群において、通常のFISH法にて欠失が見いだせない症例が、約5%に認められる。それらのFISH検査にて欠失を認めなかった症例について、ゲノムコピー数異常の検討をおこなった。今回、2q33.1領域のゲノムコピー数異常を異常が認められ、その領域内の遺伝子、および近縁の報告例より、表現型の原因と判明し診断が確定された。22q11.2欠失症候群の鑑別疾患として、特にovertな口蓋裂と有意な遅れを認める場合には、2q33.1微細欠失症候群を考える必要があり、22q11.2欠失症候群の鑑別症候群として重要な疾患であることが判明した。

既知の微細欠失症候群は臨床症状から疑い責任領域に含まれるプローブを用いたFISH検査を実施しなければ確定診断に至らない場合が多いが、先天異常患者を多くみている分担研究者・研究協力者であっても、症状から確定診断できない症例があることが裏付けられた。欧米先進国で進めているように、昨年度はソトス症候群、本年度はアンジェルマン症候群と一致するゲノムコピー数異常が検出された。ゲノムコピー数の解析は、従来の先天奇形症候群の鑑別診断にも有用であることが確認されたと考えられる。「Genotype First」として、確定診断できない先天異常患者に対して最初に実施すべき臨床検査はゲノムアレイ解析であるという提言がなされたことを鑑み、わが国においても臨床検査としてゲノムアレイ解析が実施できる体制整備することの必要性を強く訴えたい。WHSのみならず、確定診断されていない頻度の低い難治性疾患患者は、臨床情報の蓄積が不十分であり、臨床情報の蓄積には正確な診断がまず必要だからである。

#### D. 考察

昨年度、多くの染色体異常症や先天奇形症候群患者が定期的フォローアップのために受診している全国の小児遺伝医療の中核的専門施設におけるWHS患者数とダウン症候群患者数の比から、WHSの出生率は、約31,000出生にひとりであり、毎年35名程度のWHS患者がわが国では生まれていると推定した。WHS患者・家族、および対応する医師にとって、合併症の重症度、自然歴などの予後予測に関する情報は極めて重要であり、本年、臨床症状とゲノムコピー数異常部位との関連を詳細に検討するための症例

蓄積を進められることを期待したが、本年度新たに収集されたWHS患者は2症例のみであった。昨年度までに複数のWHS患者・家族の試料提供に協力してくれた施設からは、本年度新規患者の試料提供はなく頻度の低さの顕れと考えられた。診断されていないWHS症例はまだ潜在的にいると考えられる。本研究で主に呼びかけた小児遺伝の専門医がいない重症心身障害児（者）施設などでフォローされていることが考えられるため、さらなる患者の蓄積には、今後異なるアプローチが必要と考えた。

WHSを含む既知の微細欠失症候群は臨床症状から疑い責任領域に含まれるプローブを用いたFISH検査を実施しなければ確定診断に至らない場合が多いが、先天異常患者を多くみている分担研究者・研究協力者から提供されたMCA/MR患者飼料の解析において、昨年度はソトス症候群、本年度はアンジェルマン症候群と一致するゲノムコピー数異常が検出され、専門家であっても症状から確定診断できない症例があることの顕れと考えられた。欧米先進国で進めているように、「Genotype First」として、一般小児科医が臨床症状から容易に確定診断できないWHSを含む稀少遺伝性疾患を疑う患者に対して、まずゲノムアレイ解析を実施することで、ゲノムコピー数異常を伴う疾患を確定診断することは、まだまだ臨床情報の蓄積が不十分な多くの先天奇形症候群の患者の臨床情報蓄積を促し、疾患ごとに適切な医療に結びつけ、対象療法や合併症の予防法を確立し患者のフォローアップを充実させてゆくためにも、さらには基礎医学の発展に寄与するためにも、わが国で臨床検査としてゲノムアレイ解析（染色体マイクロアレイ検査）を実施できる体制の整備が是非とも必要である。

また、ゲノムアレイ解析を行うことにより、他の微細欠失症候群と異なり、WHSにおいては、共通の構造異常を来しやすいホットスポットが存在しないことが明らかにされた点は細胞遺伝学的に興味深い。

先天奇形症候群の診断は主観的判断によって行われたり、染色体検査ではその一部しか検出することができないため、診断されない例が数多く存在すると想定される。

先天性の疾患で、診断がなされない状態は、両親の不安が大きく、診断されるまでに数多くの無用な検査がなされることになる。本研究の推進により、先天奇形症候群の診断方法を確立することは、診断未確定症例を解消させ、無用な検査費用の削減につながる。さらに、ゲノムコピー数異常の原因が、親由来のもので次子も同様の状態になる可能性があるものなのか、de novo（突然変異）によるもので次

子には影響を与えないものであるのかを明確にすることができ、両親の不安を軽減することができると思われる。ゲノムアレイ解析は先天異常症の医療には欠かすことのできない技術であることを明らかにすることができた。

WHSのゲノムアレイ解析の結果、欠失範囲が大きくなるにつれ、合併症や精神遅滞の程度が重症化する傾向があることが明らかとなった。WHSは重度精神遅滞、成長障害、難治性てんかん、多発奇形のために、長期にわたる治療・ケアが必要であり、患者や家族の負担は大きい。将来予測についての情報は、両親の不安の軽減に役立つ。

WHSに関する情報提供としては、昨年度に引き続き、遺伝情報サイトGeneReviews Japanに継続して最新情報を掲載するほか、今年度は、系統的レビューのための文献検索を開始した。計82件の論文が検索できたので、今後、詳細に解析し、逐次、患者・家族・医療者向けに情報提供を行う予定である。

ゲノムアレイ解析は先天奇形症候群の診断に大変有用であるが、適切な臨床的評価には、必要に応じて実施する追加解析の結果もあわせて総合的に解釈することが必要である。特に、ゲノムコピー数異常の大きさ、異常領域に含まれる遺伝子、および病気の原因とは直接関係のないbCNVかどうか、の3点に留意して評価する必要がある。さらにゲノムコピー数異常に伴う染色体再構成についても確認する必要がある。ゲノムアレイ解析技術を適切に臨床応用するために、日本人CNVデータベースを構築する必要がある。本研究実施により、一般健常成人においても複数のゲノムコピー数変化を観察しており、日本人症例を対象にゲノムアレイ解析を実施する際の留意点を示すことができた。本研究はWHSばかりではなく、他の先天奇形症候群の診断にも役立てられるものであると考えられる。

## E. 結論

ゲノムアレイ解析は、従来の染色体検査では検出できない微細なゲノムコピー数異常を検出可能とする今後の医療に必須となる大変有用な診断法である。ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群の診断にゲノムアレイ技術は極めて有効であるが、正確な結果の解釈のため、さらに日本人のCNVに関する情報の集積が必要である。さらに、欧米先進国なみのゲノムアレイ解析（マイクロアレイ染色体検査）を臨床検査として実施する体制としては、稀少疾患患者の解析結果を集められるよう、全国規模で精度の高い検査を担う実施施設を定めるとともに、その施設



で染色体分析技術を有する細胞遺伝学の専門家を継続的に育成してゆくための教育体制もあわせて整備することが重要と考える。

#### F. 健康危険情報

本研究課題では健康危機に関わる問題は生じない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto, N, Koike K, Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizures and review of literature 2012.

Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y: Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A* 158A: 412-416, 2011

Nishimura-Tadaki A, Wada T, Bano G, Gough K, Warner J, Kosho T, Ando N, Hamanoue H, Sakakibara H, Nishimura G, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Wakui K, Saito H, Fukushima Y, Hirahara F, Matsumoto N. Breakpoint determination of X:autosomal balanced translocations in four patients with premature ovarian failure. *J Hum Genet.* 2011 56(2):156-60.

Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* 2011;56:110-124.

#### 2. 学会発表

涌井敬子, 古庄知己, 高田史男, 福嶋義光. 染色体端部欠失患者の両親のメタフェーズ解析の必要性 -染色体端部欠失パターンを示す患者の親に認めた均衡型構造異常からの考察-. 第34回日本小児遺伝学会学術集会, 横浜

鳴海洋子, 古庄知己, 福山哲広, 西村貴文, 松浦宏樹, 涌井敬子, 福嶋義光. 13番長腕中間部欠失症候群の1例. 第34回日本小児遺伝学会学術集会, 横浜

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 清水健司, 大橋博文, 福嶋義光. Cytogenetic Array解析により検出された一般成人のゲノムコピー数変化. 遺伝医学合同学術集会2011(第35回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 第18回日本遺伝子診療学会大会, 第17回日本家族性腫瘍学会学術集会), 京都

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 大橋博文, 清水健司, 岡本伸彦, 水野誠司, 黒澤健司, 高田史男, 川目裕, 福嶋義光. 染色体構造異常およびMCA/MR患者を対象としたマイクロアレイ染色体検査とmetaphase FISH法による臨床細胞遺伝学的解析結果, 日本人類遺伝学会第56回大会, 千葉

清水健司, 黒田友紀子, 糸見和也, 服部重人, 西尾公男, 水野誠司, 岡本伸彦, 川目裕, 鳴海洋子, 古庄知己, 涌井敬子, 大橋博文, 福嶋義光. マイクロアレイ染色体検査によるWolf-Hirschhorn症候群22例の遺伝型-表現型相関解析, 日本人類遺伝学会第56回大会, 千葉

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし



Wolf-Hirschhorn症候群 患者情報調査表

所属施設名:

匿名化番号(信州大学解析番号): SUMA

*Clinical features of WHS*

項目 所見

生年月日 西暦            年            月            日

最終診察年齢 / 性別 歳    ヶ月    /    男 ・ 女

出生時

在胎週数 \_\_\_\_\_

出生体重 (g) \_\_\_\_\_

出生身長 (cm) \_\_\_\_\_

頭囲 (cm) \_\_\_\_\_

最終診察時の計測値

体重(g) \_\_\_\_\_

身長(cm) \_\_\_\_\_

頭囲 (cm) \_\_\_\_\_

Feeding

哺乳・摂食障害(有の場合以下へ) 有 ・ 無

胃ろう 有(開始:                    終了                    )・無

チューブ栄養 有(開始:                    終了                    )・無

経口摂取開始時期 \_\_\_\_\_

チューブ・胃ろうの理由  
(GER、消化管合併症等) \_\_\_\_\_

Craniofacial(+ or -で記載)

microcephaly \_\_\_\_\_

craniofacial asymmetry \_\_\_\_\_

Greek warrior helmet appearance \_\_\_\_\_

high forehead \_\_\_\_\_

prominent glabella \_\_\_\_\_

prominent eyes \_\_\_\_\_

epicanthus \_\_\_\_\_

eyelid ptosis \_\_\_\_\_

malformed ears \_\_\_\_\_

preauricular tag/pit \_\_\_\_\_

short philtrum \_\_\_\_\_

downturned corners of mouth \_\_\_\_\_

micrognathia \_\_\_\_\_

精神発達遅滞 重度 ・ 中等度 ・ 軽度 [IQ(DQ):                    歳 ヶ月時施行]

言語発達・ADL(自由記載) \_\_\_\_\_

粗大運動 (years, months)

定頸 \_\_\_\_\_

座位 \_\_\_\_\_

伝え歩き \_\_\_\_\_

独歩 \_\_\_\_\_

continued

項目	所見
けいれん発作	有 ・ 無
初発年齢(月齢)	
発作型 (発熱の有無、部分・全般、強直・間代、Westなど)	発熱(有 ・ 無)[ ]
重積(30分以上、反復、意識障害)の有無と発症時期・経過	有( ) ・ 無
最終発作年齢	
脳波異常	有( ) ・ 無
投薬内容	
発作のコントロール状況	
他神経所見	
筋緊張低下	有( ) ・ 無
脳奇形 (画像評価)	有( ) ・ 無
眼科所見(斜視、屈折異常など)	有( ) ・ 無
難聴	有(ABR rt. dB/lt. dB) ・ 無
口唇・口蓋裂	有( ) ・ 無
先天性心疾患	有( ) ・ 無
骨格所見	
内反足	有( ) ・ 無
側彎・後彎	有( ) ・ 無
椎体異常	有( ) ・ 無
others	
腎・泌尿器	
腎異形成・低形成	有( ) ・ 無
腎不全	有( ) ・ 無
膀胱尿管逆流	有( ) ・ 無
停留精巣(male)	有( ) ・ 無
尿道下裂(male)	有( ) ・ 無
others	
Cytogenetic tests	
G-banding, FISH	
array results	

注)評価できている場合は有か無に必ず○をしてください。有の場合( )内に具体的内容わかれば記載をお願いします

上記以外の合併症や特記すべき所見あれば記載をお願いします

資料 2

表 1a. WHS15 例の遺伝型-表現型結果 主な身体所見

分類	症例	年齢/性	4p欠失サイズ(Mb)	その他 異常領域	顔貌特徴	身長/体重 (SD)	栄養	口唇・口蓋裂	心臓	腎・泌尿器	骨格所見	眼合併症	聴覚	その他特記合併症	
1 (~5Mb)	1	6y / F	2.06	dup10q: 0.77(Mb)	mild	-2.4 / -2.0	経口	-	ASD	-	-	-	-		
	2	13y / F	2.29		typical	-5.4 / -3.5	-	-	ASD	N.I.	側彎(軽度)	-	-	多発性骨軟骨腫	
	6	16y/F	5.49		typical	-4.9 / -3.0	-	-	-	-	N.I.	内斜視	-		
2 (6~15Mb)	7	18y/F	6.92		typical	-5.1 / -2.5	経口	-	PS	腎低形成・腎不全	扁平足	N.I.	中等度	高Cho, 高尿酸	
	8	2y/M	7.51		typical	-4.7 / -4.5	-	N.I	-	-	N.I	N.I	-		
	10	7m/M	8.77		typical	-4.5 / -3.9	Tube	+(lt,CP)	PDA	-	-	-	-		
	11	8y8m/F	8.77	dup8p: 8.15(Mb)	typical	-4.1 / -3.3	Tube	+(SMCP)	AR	-	-	N.I.	斜視 鼻涙管閉塞	-	
	12	16y3m/F	8.77		typical	-11.7 / -5.3	-	+(CL/CP)	PS	腎低形成・腎不全	側彎(軽度)	外斜視	高度		
	13	12y/F	8.85 (1.37-10.22)		mild	-3.0 / -2.3	Tube	-	VSD	-	-	-	-	-	
	14	5y/F	11.11		typical	-5.2 / -4.0	経口	+	ASD	-	-	-	-	中等度	
	15	1y11/F	12.33		typical	-3.4 / -2.7	Tube	+(SMCP)	PDA/ASD	水腎/尿管	内反足	外斜視 鼻涙管狭窄	-		
16	18y/F	13.6 (0.84-14.5)		typical	-5.3 / -3.8	経口	-	ASD	腎低形成・腎不全	左臼蓋形成不全	N.I.	-	高Cho		
3 (>15Mb)	17	3y/F	15.7		typical	-5.6 / -4.0	Tube	-	PS/ASD	腎低形成・腎不全	矢状縫合早期癒合	両側口ポーマ	-	高Cho	
	21	2y10m/F	28.35		typical	-2.3 / -3.1	胃瘻	+(CP)	PDA/ASD	腎盂尿管移行部狭窄・腎不全	左内反足・頭椎異常	-	高度	誤嚥強 (喉頭気管分離術施行)	
	22	6y/M	29.42		typical	-1.3 / -1.4	胃瘻	+	ASD	腎異形成・腎不全 停留精巣・尿道下裂	-	白内障 口ポーマ	高度		

表 1 b. WHS15 例の遺伝型-表現型結果 神経所見

分類	症例	年齢/性	4p欠失サイズ(Mb)	その他 異常領域	けいれん初発	重症・群発	けいれん治療・経過	中枢奇形	精神運動発達遅滞
1 (~5Mb)	1	6y / F	2.06	dup10q: 0.77(Mb)	-	-	-		中等度(DQ41)、独歩2y3m
	2	13y / F	2.29		2y6m	-	VPA・最終発作6歳		重度(IQ23)、独歩7y
	6	16y/F	5.49		2y1m	-	発熱時のDZP・8歳頃消失		重度、独歩7歳
2 (6~15Mb)	7	18y/F	6.92		6m (West synd)	+	VPA/KBr/VitB6・発作数年なし		重度(IQ≤10)、独歩7y
	8	2y/M	7.51		7m	+	VPA/PB/CBA 3歳よりKBr・KBr開始後発作改善		重度、寝返り1y5m
	10	7m/M	8.77		-(7ヶ月現在)	-	-		評価難、定頭未
	11	8y8m/F	8.77	dup8p: 8.15(Mb)	6m	+	VPA/PB・2歳頃より改善、最終発作6歳	-	重度(DQ≤10)、独歩不可
	12	16y3m/F	8.77		7m	+	VPA/PHT・重責頻回、最終発作4歳		重度、独歩不可
	13	12y/F	8.85 (1.37-10.22)		-	-	-		中等度、独歩2y3m
	14	5y/F	11.11		9m	+	VPA/KBr		重度、独歩不可
	15	1y11/F	12.33		9m	+	VPA/LGT/CZP・発作頻回	脳梁非薄化、脳幹・小脳萎縮	重度(DQ30)、定頭9ヶ月
16	18y/F	13.6 (0.84-14.5)		12m	+	発作時のみ・発作数年なし	脳梁低形成	重度(IQ≤10)、独歩5y	
3 (>15Mb)	17	3y/F	15.7		14m	+	VPA/KBr/CZP		重度、定頭のみ
	21	2y10m/F	28.35		11m	+	TPM/CLB・2歳頃より発作なし	大脳萎縮	重度
	22	6y/M	29.42		2m	+	VPA/ESM/PB・発作頻回	脳梁低形成、白質容量減少	重度(DQ≤10)、定頭不可

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の  
診断法の確立と患者数の把握に関する研究

— 症例検討・情報提供 —

研究分担者 古庄知己 信州大学医学部附属病院 講師  
研究分担者 鳴海洋子 信州大学医学部 助教

研究要旨

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群の診断方法を確立するために、対象となる症例を収集し、詳細に臨床症状を検討した。患者・家族への適切な情報提供のために、遺伝情報サイトであるGeneReviews Japan <<http://grj.umin.jp/>> にウォルフヒルシュホーン症候群に関する最新情報（疾患の特徴、頻度、診断・検査、鑑別診断、臨床像、合併症、マネジメント、遺伝カウンセリング等）を継続して掲載した。

研究協力者

岡本伸彦（大阪府立母子保健総合医療センター）  
水野誠司（愛知県心身障害者コロニー中央病院）  
糸見和也（あいち小児保健医療総合センター）  
西尾公男（聖隷浜松病院）  
服部重人（群馬大学医学部）  
加古結子（昭和大学病院）  
佐村 修（呉医療センター）  
櫻井晃洋（信州大学医学部）

A. 研究目的

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群の診断方法を確立するために、対象となる症例について、詳細に臨床症状を検討するとともに、患者・家族への適切な情報提供を行う。

B. 研究方法, C. 研究結果, およびD. 考察

①対象症例の収集と臨床症状の検討

昨年度に引き続き、ゲノムアレイ解析（マイクロアレイ染色体検査）が有用なウォルフヒルシュホーン症候群（Wolf-Hirschhorn syndrome, 4番染色体短腕欠失症候群, 4pモノソミー症候群; WHS）を含む既知の染色体構造異常を有する、あるいは原因不明で確定診断に至っていない先天奇形症候群患者と、協力の得られた患者の親から、末梢血（ヘパリン採血あるいはEDTA採血）をサンプル試料として収集した。

2011年4月から2012年3月末までに、新規に115家系117名の患者および83名の親から試料提供を

受けた。研究開始時からの累計では、計264家系266名の先天奇形症候群患者〔WHS患者22例、WHS以外の既知の染色体異常患者58例、原因不明の多発奇形/精神遅滞（MCA/MR）患者186例〕、および計241名の患者の親の試料を収集したことになる。

WHS患者は本年度新たに2症例が追加収集され、計22例となった。昨年度までに複数のWHS患者・家族の試料提供に協力してくれた施設からは、本年度新規患者の試料提供はなく頻度の低さの顕れと考えられた。その他、MCA/MRとして収集された患者のうちWHS疑いの患者が1名いたが、ゲノムアレイ解析でも4番染色体短腕の欠失は検出されず、WHS患者としては追加されなかった。

ゲノムアレイ解析したWHS患者のうち3症例は、G分染法による染色体検査では4p欠失が確認されておらず、症状から同疾患を疑った臨床遺伝を専門とする主治医が、WHS症候群責任領域のプロープによるFISH解析あるいは全サブテロメアプロープによるFISH法あるいはBACプロープを用いたターゲットアレイ解析を実施し、4番染色体短腕の微細欠失を確認されていた患者であることを考慮すると、診断されていないWHS症例はまだ潜在的にいと考えられる。本研究で主に呼びかけた小児遺伝の専門医がいない重症心身障害児（者）施設などでフォローされていることが考えられるため、さらなる患者の蓄積には、今後異なるアプローチが必要と考えた。近年、欧米先進国においては「Genotype

First』として、確定診断できない先天異常患者に対して最初に実施すべき臨床検査はゲノムアレイ解析であるという提言がなされたことを鑑み、わが国においても臨床検査としてゲノムアレイ解析が実施できる体制整備することの必要性を強く訴えたい。WHS のみならず、確定診断されていない頻度の低い難治性疾患患者は、臨床情報の蓄積が不十分であり、臨床情報の蓄積には正確な診断がまず必要だからである。

## ②情報提供

GeneReviews Japan<<http://grj.umin.jp/>> は、遺伝性疾患の症状や診断、遺伝学的検査（遺伝子検査など）、遺伝カウンセリングなどについて、専門家による解説が参照できる医療スタッフ向けの遺伝性疾患情報サイトである。米国の臨床遺伝医学に関する総合情報サイト GeneTests <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/>> の中から重要性の高いと思われる項目を中心に、許可を得て日本語訳し、発信している。このサイトは事務局を信州大学医学部附属病院遺伝子診療部におき、全国の遺伝医学の専門家によって運営されている。昨年、WHSについての記載を翻訳・改訂したのに引き続き、本年度、ゲノムコピー数異常を伴う可能性のある遺伝性疾患も複数追加掲載した。

## E. 結論

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群の診断方法を確立するために、対象となる症例を収集するとともに、詳細に臨床症状を検討した。さらに患者・家族への適切な情報提供を行った。

## F. 健康危険情報

本研究課題では健康危機に関わる問題は生じない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K, Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizures and review of literature 2012.

Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y: Myelodysplastic syndrome in a

child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A* 158A: 412-416, 2011

Nishimura-Tadaki A, Wada T, Bano G, Gough K, Warner J, Kosho T, Ando N, Hamanoue H, Sakakibara H, Nishimura G, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Wakui K, Saito H, Fukushima Y, Hirahara F, Matsumoto N. Breakpoint determination of X:autosomal balanced translocations in four patients with premature ovarian failure. *J Hum Genet.* 2011 Feb;56(2):156-60.

Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet.* 2011 Feb;56(2):110-24.

## 2. 学会発表

涌井敬子, 古庄知己, 高田史男, 福嶋義光. 染色体端部欠失患者の両親のメタフェーズ解析の必要性 —染色体端部欠失パターンを示す患者の親に認めた均衡型構造異常からの考察—. 第34回日本小児遺伝学会学術集会, 横浜

鳴海洋子, 古庄知己, 福山哲広, 西村貴文, 松浦宏樹, 涌井敬子, 福嶋義光. 13番長腕中間部欠失症候群の1例. 第34回日本小児遺伝学会学術集会, 横浜

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 清水健司, 大橋博文, 福嶋義光. Cytogenetic Array解析により検出された一般成人のゲノムコピー数変化. 遺伝医学合同学術集会2011(第35回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 第18回日本遺伝子診療学会大会, 第17回日本家族性腫瘍学会学術集会), 京都

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 大橋博文, 清水健司, 岡本伸彦, 水野誠司, 黒澤健司, 高田史男,

川目裕，福嶋義光．染色体構造異常および MCA/MR 患者を対象としたマイクロアレイ染色体検査と metaphase FISH 法による臨床細胞遺伝学的解析結果，日本人類遺伝学会第 56 回大会，千葉

清水健司，黒田友紀子，糸見和也，服部重人，西尾公男，水野誠司，岡本伸彦，川目裕，鳴海洋子，古庄知己，涌井敬子，大橋博文，福嶋義光．マイクロアレイ染色体検査による Wolf-Hirschhorn 症候群 22 例の遺伝型-表現型相関解析，日本人類遺伝学会第 56 回大会，千葉

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群（ウォルフヒルシュホーン症候群を含む）の  
診断法の確立と患者数の把握に関する研究

— ゲノムアレイ解析とmetaphase FISH解析 —

研究分担者 涌井敬子  
信州大学医学部 助教

研究要旨

ゲノムコピー数異常を伴う可能性のある、ウォルフヒルシュホーン症候群を含む先天奇形症候群を対象として実施したゲノムアレイ解析（マイクロアレイ染色体検査）を通して、臨床応用のための標準化を視野に、解析方法および結果の評価方法について検討した。ゲノムアレイ解析は、頻度の低いウォルフヒルシュホーン症候群を含むゲノムコピー数異常を伴う奇形症候群を疑う患者に対して最初に実施する臨床検査とすることで、確定診断されていない稀少難治性疾患患者を減らすことを可能とする、今後の医療に必須の診断法であり、早急に検査体制を整備することが求められる。しかし、臨床検査として適切に実施してゆくためには、日本人のゲノムコピー数多型（CNVs）に関する正確な情報をさらに蓄積してゆくことが必要である。そのためにも、検出されたゲノムコピー数の変化に応じて両親のアレイ解析や患者および両親のmetaphase FISH解析による染色体再構成の検証を実施できる体制は欠かせない。精度の高い解析を進めるために、最新の分子遺伝学的解析に関する技術と知識に加え、従来の染色体核型分析技術と知識も有し、かつ結果を分子細胞遺伝学的に総合的に解釈することができる、臨床細胞遺伝学の専門家を継続的に育成してゆくための教育体制もあわせて整備することが重要課題である。

A. 研究目的

ウォルフヒルシュホーン症候群（Wolf-Hirschhorn syndrome, 4番染色体短腕欠失症候群, 4pモノソミー症候群；WHS）を含む既知の染色体構造異常を有する、あるいは原因不明で確定診断に至っていない先天奇形症候群患者と、協力の得られた患者の親にゲノムアレイ解析（マイクロアレイ染色体検査）を実施し、臨床検査としてゲノムアレイ解析を実施する際の標準化を視野に、具体的な方法および結果の評価方法について検討する。

B. 研究方法

① 試料処理

昨年度に引き続き、本研究目的に収集された、ゲノムアレイ解析が有用なWHSを含む既知の染色体構造異常を有する、あるいは原因不明で確定診断に至っていない先天奇形症候群患者と、協力の得られた患者の親の末梢血（ヘパリン採血あるいはEDTA採血）をサンプル試料とした。

サンプル試料は、一部をゲノムアレイ解析目的に Gentra Puregene Blood Kit（Qiagen）を用いてゲ

ノム DNA を抽出、250~1000ng/ $\mu$ l 濃度に調整・冷蔵保存し、一部を染色体分裂像による染色体構成の確認が必要になった場合に備え、phytohemagglutinin を添加した 10%FBS 加 RPMI1604 培養液にて 3~4 日間培養後、培養終了 1 時間前にコルセミドを添加、遠心して得た沈査を 0.075M 塩化カリウム溶液にて低調処理後、酢酸メタノール溶液にて固定処理を行い染色体固定液として冷凍保存した。染色体固定液は、一部の患者・親については、本ゲノムアレイ解析前に染色体検査を実施した施設で保存されていたものの残りを送付してもらい利用した。

② ゲノムアレイ解析

昨年度に引き続き、NimbleGen CGX array（SignatureChipOS™）（134829 oligo probes, hg18）（Roche）を用いた。

収集した患者および協力の得られた親のゲノム DNA をサンプル DNA と、性別の一致したレファレンス DNA をそれぞれ Cy5 と Cy3 の異なる蛍光色素にてランダムプライム法にて標識、ラベル化産



物を等量混合・調整した溶液をCGX arrayに播種、2～3日間ハイブリダイズさせたのち洗浄・乾燥させた。MS200 Microarray Scanner (Roche)を用いてアレイ上の各プローブの蛍光シグナルイメージを取り込み、NimbleScanソフトによりGGXファイルに変換し、専用の解析ソフトGenoglyphix®を利用して、ゲノムコピー数変化を解析した。

#### <解析結果の評価>

患者に検出されたゲノムコピー数変化を、細胞遺伝学の専門家である担当者が、1)患者の臨床症状と関連がある (clinically significant)、2)患者の臨床症状との関連は不確定 (unclear clinically significance)、3)患者の臨床症状には影響していない可能性が高い (thought to be benign)、のいずれに相当するかについて、基本的に下記を基準として評価した。

主に異常領域に含まれる遺伝子とその機能、ゲノムコピー数変化の大きさ、および病気の原因とは直接関係のない多型 (benign copy number variations: bCNVs) として登録のある領域かどうかを考慮し、

「clinically significant」は、検出されたゲノムコピー数変化領域が、ISCAで病的変異である可能性が高い目安とした200kb以上のコピー数減少か400kb以上のコピー数増加であり、かつ、1)既知の奇形症候群の責任領域として知られている、2)臨床症状と関連するあるいは関連が示唆されるゲノムコピー数異常としてGenoglyphix®や、公開されている Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER\*) やThe International Standards for Cytogenomic Arrays (ISCA\*\*)に登録されている、あるいは論文として複数の既報告がある、3)臨床症状との関連が知られている責任遺伝子が座位している領域であることを確認した場合に評価した。

「thought to be benign」の評価は、1)本研究に協力いただいた患者の親に実施したゲノムアレイ解析結果 (現時点で日本人100例以上) を蓄積した一般成人のデータにおいて、異なる5家系以上に認めた同じコピー数変化である場合、2)臨床症状のない親から伝達したことが判明した場合、3)コピー数変化領域の大きさがISCAで病的変異である可能性が低い目安とした200kb以下のコピー数減少か400kb以下のコピー数増加であり、かつ、(1)領域内に臨床症状と関連することが知られているあるいは関連が示唆される遺伝子が含まれておらず、かつ(2)Genoglyphix®, ISCA, Database of Genomic

Variants (DGV\*\*\*) にbCNVsあるいは多型として登録されている領域と一致あるいはオーバーラップしている場合とした。を当研究室における現時点のbCNVsとし、患者に認めた同領域のゲノムコピー数変化は「thought to be benign」とした。

上記基準で「clinically significant」とも「thought to be benign」とも評価を確定できないゲノムコピー数異常については、「unclear clinically significance」と評価した。

公開データベースのURLを以下に示す。

\*DECIPHER: <http://decipher.sanger.ac.uk/>

\*\*ISCA: <https://www.iscaconsortium.org/>

\*\*\*DGV: <http://projects.tcag.ca/variation/>

#### ③ metaphase FISH 解析

患者のゲノムアレイ解析で検出したゲノムコピー数変化のうち、上記の1)「clinically significant」、2)「unclear clinically significance」と評価した異常については、検証にFISH解析が適さない場合を除き、基本的に染色体再構成の確認のため metaphase FISH解析を実施することとし、優先順位の高い症例から検討した。

metaphase FISH解析実施に際しては、まず症例ごとに検出されたゲノムコピー数異常から想定される染色体再構成の確認に必要なプローブとして、コピー数異常のある領域内にターゲットプローブ、同一染色体上のコピー数異常のない領域にコントロールプローブを“Human 32K BAC Re-Array (BACPAC Resources Center at Children's Hospital Oakland Research Institute, United States)”のDNAライブラリーから選択した。各クローンを培養後アルカリミニプレップ法にてDNAを抽出した。目的に応じて、2～4種類のDNAクローンをそれぞれ異なる波長の蛍光色素 (SpectrumGreen/Red/Aqua/Gold (Abbott)) を用いてニックトランスレーション法により標識した。調整したプローブミックス溶液を、スライドグラス上に展開した染色体標本にアプライ、ディネーチャー後一晩ハイブリダイズ、洗浄・後染色し、蛍光顕微鏡 (Zeiss) で染色体分裂像あるいは間期細胞核上に表出されたシグナルを観察し、ゲノムコピー数異常に伴う染色体再構成について評価した。

(倫理面への配慮)

信州大学の倫理委員会に申請し承認されたゲノムアレイ解析研究として、ゲノムアレイ解析および metaphase FISH解析を実施した。各症例の解析結果は主治医に報告した。

## C. 研究結果

### ① 解析対象試料

2011年4月から2012年3月末までに、新規に115家系117名の患者および83名の親からの試料を受け付けた。研究開始時からの累計では、計264家系266名の先天奇形症候群患者〔WHS患者22例、WHS以外の既知の染色体異常患者58例、原因不明の多発奇形/精神遅滞(MCA/MR)患者186例〕、および計241名の患者の親の試料が収集された。

採血後DNA抽出処理開始までの間、適切に保存されていなかったり、凝固・溶血していた血液が数件あり、それらから抽出したゲノムDNAを用いたアレイ解析は、プローブのプロットのStandard Deviationが高かったり、回収できたDNA量が少なかったものは、アーチファクトのコピー数異常が多数検出されるなど解析に適しておらず、試料の再採取が必要であった。本研究室のアレイ解析においては、質の高いゲノムDNAを準備することが重要であった。

### ② ゲノムアレイ解析

2012年3月末までに試料提供を受けたすべての患者と一部の親についてゲノムアレイ解析を実施した。患者の親については、患者に検出されたゲノムコピー数変化について結果解釈上の必要性の高い家系から優先的に実施している。

これまでに解析した患者を、WHS患者、WHS以外の既知の染色体異常患者、原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群(MCA/MR syndrome)患者に分類し、それぞれについて結果をまとめた。

#### a. WHS患者

WHS患者22症例のゲノムアレイ解析結果を別添資料の表1に示した。本年度追加解析した2症例は、G分染法で端部欠失と報告されていた表1-WHS症例16と、G分染法で中間部欠失と正常核型とのモザイクと考えられていた表1-WHS症例23で、表1-WHS症例16は、12.3Mbの端部欠失と矛盾なかったが、表1-WHS症例23は、アレイ解析の結果は端部欠失パターンであり、核型分析結果と異なる結果であった。アレイ解析結果からはモザイクを示唆する所見は認めなかった。

*\*WHS症例23は、解析が2012年3月以降となったため、研究分担者の大橋の分担研究報告書の遺伝型表現型関連解析の対象に加わっていない。*

#### b. WHS以外の既知の染色体異常患者

ゲノムアレイ解析前に、G分染法あるいはFISH

法による染色体検査において染色体異常が判明している、染色体異常に伴うゲノムの欠失・重複範囲の詳細な特定や染色体再構成の再確認が有用と考えられたWHS以外の31症例について、ゲノムアレイ解析結果を別添資料の表2に示した。

G分染法あるいはFISH法で不均衡型構造異常が判明していた22症例および過剰マーカー染色体が検出されていた3症例のうち、過剰マーカー染色体が検出されていた表2-症例29以外は、異常染色体に関連したゲノムコピー数異常が同定できた。ただし、そのうち表2-症例13は、全サブテロメアFISH法にて同定された派生10番染色体に16pterサブテロメアが転座しているという染色体検査結果から、アレイ解析で検出されると考えられていた10qterのゲノム欠失と16pterのゲノムコピー数増加のうち、16pterの異常は検出されなかった。また、表2-症例23は、派生19番染色体の不均衡型転座に関わっている染色体は2番と判定されていたが、19番染色体のゲノムコピー数減少も2番染色体のゲノムコピー数増加も観察されず、検出されたのは10番染色体端部の16Mbものコピー数増加であった。

さらに、2症例(表2-症例11,14)には、構造異常が確認されていた染色体とは独立した領域のゲノムコピー数減少も臨床症状と関係する可能性があると考えられた。

過剰マーカー染色体が8番染色体由来と報告されていた1例(表2-症例30)は、8番染色体長腕端部のみならず22番染色体長腕セントロメア近傍のゲノムコピー数増加も検出された。

均衡型構造異常の3例(表2-症例2,9,20)には、症状に影響すると考えられるゲノムコピー数変化は検出されなかった。

臨床的にPrader-Willi症候群と診断され、すでに責任領域に座位する1プローブをターゲットプローブとしたmetaphase FISH解析により15q11.2領域の欠失を確認しており、欠失範囲の大きさの確認目的にアレイ解析が依頼された4症例(表2-症例15~18)以外は、判明したゲノムコピー数異常の情報をもとに選択したプローブを用いて、metaphase FISH解析による染色体再構成の確認が必要と考えられた。

#### 4) 原因不明のMCA/MR患者

2011年度に収集した原因不明のMCA/MR患者84例に実施したゲノムアレイ解析の結果、臨床症状への影響がある「clinically significant」、あるいは影響している可能性が高いけれど確実とはいえない「unclear clinically significance」なゲノムコピー

数異常を検出した 17 症例を表 3. に示した. 昨年に引き続き本年度の解析でも, これまでに収集・アレイ解析した原因不明の MCA/MR 患者 185 名に診断されていない WHS 症候群はいなかった.

17 症例のゲノムコピー数異常の内訳は, 中間部欠失を想定するコピー数減少を検出した 10 症例, 中間部重複を想定するコピー数増加を検出した 1 症例, 端部重複あるいは不均衡型転座を示唆するコピー数増加を検出した 1 症例, 不均衡型転座を示唆する染色体端部のコピー数減少と別染色体端部のコピー数増加を検出した 1 症例, 複雑な染色体再構成を示唆する同一染色体腕端部の近接する領域にゲノムコピー数減少とコピー数増加を認めた 1 症例, やはり複雑な染色体再構成を示唆する同一染色体の近接する領域に 2 箇所のゲノムコピー数増加を認めた 3 症例であった. 中間部欠失を想定するコピー数減少を検出した 10 症例のうち 1 症例 (表 3-症例 15) は, 微細欠失症候群として既知の領域の欠失であった. 表 3-症例 3,4 は, マイクロアレイ解析が普及して症候群として確立してきた症候群領域と一致あるいはオーバーラップしていた. 表 3-症例 4 の詳細は本報告書の川目の報告に解説されている.

評価の精度を高めるため, 両親の検索と metaphase FISH 解析による解析を可能な限り進めるとともに, 文献的考察を加え, 各患者の臨床症状との関連についてさらに評価してゆく予定である.

#### d. 一般成人に認めたゲノムコピー数変化

我々の解析条件でこれまでに解析した患者の親 (一般成人) 100 名のゲノムアレイ解析において, 異なる家系の 5 名以上に共通した以下の計 18 ヶ所: 1q44 (37kb), 5q35.3 (190kb), 6p25.3 (110kb), 7p22.3 (26kb), 7q36.2 (122kb), 8p23.2 (244kb), 8p23.2 (2.2Mb), 8p11.23 (125kb), 8p11.1 (257kb), 8q11.1 (264kb), 10q11.22 (168kb), 10q26.3 (150kb), 12p13.31 (107kb), 12q24.11 (142kb) 16p12.1 (76kb), 19p12 (81/97kb), Xp22.33 (102kb), Xq28 (103kb) のゲノムコピー数変化領域を, 現時点での当研究室における確実な benign CNVs (bCNVs) と考えた. 最も大きかったのは 8p23.2 に認めた 2.2Mb であった. 200kb 以上のゲノムコピー数減少 (染色体欠失), あるいは 400kb 以上のゲノムコピー数増加 (染色体重複) は患者の臨床症状に影響している可能性が高いと考えられているが, 本研究の一般成人の解析結果において, 単独の検出も含めると 200kb 以上のゲノムコピー数減少が 10 領域, 400kb 以上のゲノムコピー数増加が 8 領域に検出されたことは, まだまだ一般成人のデータ蓄積が必要と考え

られた.

患者に 1Mb 以上の OMIM gene を含むゲノムコピー数変化が検出され, 公開データベースに bCNVs の登録もないため, 当初病的変異を疑ったが, その後に実施した症状のない両親の追加解析で, 片親が同じ変化を有していることが確認された領域も複数あり, 評価には両親の解析が重要で, さらに日本人の CNVs に関する正確な情報をさらに蓄積してゆくことの必要性が強く示唆された.

#### ③ Metaphase FISH 解析

ゲノムアレイ解析の結果, その情報をもとに追加の metaphase FISH 解析が有用な症例について, 各症例の異常領域ごとに, 適切な DNA クロームをデータベースから選択しプローブとして, 順次ゲノムコピー数異常に伴う染色体再構成について分子細胞遺伝学的に確認を進めている.

特に, ゲノムコピー数増加領域は, アレイの解析結果のみでは, 重複断片がどの染色体のどの部位に付加したのか確定できないため, metaphase FISH 解析による再構成の確認が必須である.

本年度 metaphase FISH 解析を実施した症例のうち, 染色体分裂像を実際に確認しながら異常染色体の再構成を確認することが大変有用であった解析例の一部を下記に示す.

##### a. WHS 症候群

4 番染色体短腕端部欠失を含む構造異常のモザイクであることが確認できた 2 症例を示す.

<表 1-WHS 症例 20>

G 分染法で端部欠失を指摘されていたが, ゲノムアレイ解析で 4 番染色体短腕端部欠失に加え, 11 番染色体長腕端部のゲノムコピー数増加を認めた. しかしながら, 11 番染色体長腕端部のゲノムコピー数増加は通常欠失で認められるアレイプロットの log ratio より低いことに気づいた. 4 番染色体短腕端部と 11 番染色体長腕端部に座位するプローブを用いた metaphase FISH 解析により, 4 番染色体短腕端部欠失のみの染色体構成の細胞と, 欠失のある 4 番染色体に 11 番染色体長腕端部が不均衡型転座している染色体構成を有する細胞とのモザイクであることが確認された (図 1 a WHS 症例 20) .

<表 1-WHS 症例 23>

G 分染法で正常核型と中間部欠失のモザイクを指摘されていたが, ゲノムアレイ解析結果は端部欠失パターンであり, しかもモザイクを疑わせる所見はなかった. しかし, 欠失領域の遠位部と近位部切断

点付近に座位するプローブを用いた metaphase FISH 解析により、主となる染色体構成は 12Mb 程度の 4 番短腕の端部欠失であり、正常核型とおもわれていた頻度の少ない染色体構成の細胞は 2.5Mb 程度の 4 番短腕の端部欠失と確認された (図 1 b WHS 症例 23)。

b. 既知の染色体構造異常症例  
<表 2・症例 30>

G 群染色体程度の大きさの過剰マーカー染色体が 8 番染色体由来と報告されていたが、アレイ解析の結果、8 番染色体長腕端部のみならず 22 番染色体長腕セントロメア近傍のゲノムコピー数増加も検出された。マーカー染色体の形態から端部着糸型染色体由来と推測していたため、22 番染色体長腕セントロメア近傍のゲノムコピー数増加という情報から、長腕端部が欠失している 22 番染色体に 8 番長腕端部が付加した異常染色体の可能性が高いと考えた。しかしながら、22 番染色体長腕セントロメア近傍は単独の重複も比較的高頻度に検出される異常であるため、22 番の重複領域と 8 番染色体の長腕端部のプローブを用いて metaphase FISH 法を実施し、22 番長腕端部に 8 番長腕端部が不均衡転座した構造異常であることを確認した。マーカー染色体は通常突然変異により生じるが、このような異常は、片親が均衡型構造異常保因者であり、配偶子形成時に 3 : 1 分離が生じた配偶子が受精したことが原因となっている可能性が示唆される。その場合、次子にも再発リスクがあるため、主治医が遺伝カウンセリングの過程で両親の染色体検査を勧めたところ、片親に均衡型転座が確認された。

c. 原因不明の MCA/MR 症例  
<表 3 - 症例 12>

通常の染色体検査では異常は認めなかったが、ゲノムアレイ解析で、7 番染色体長腕端部のコピー数増加と、13 番染色体長腕端部のコピー数減少を合併していた。長腕端部欠失した 13 番に 7 番染色体長腕端部が転座した不均衡型構造異常である可能性を考慮し、metaphase FISH 法の準備を進めるとともに、主治医を通じて両親の染色体検査を勧めている。

<表 3 - 症例 12>

16 番染色体短腕端部が 360kb 程度コピー数減少しており、その切断点より近位の 1.4Mb がコピー数増加しているというアレイ解析結果から、16 番染色体短腕の複雑な染色体再構成が示唆されたため、metaphase FISH 法の準備を進めている。

D. 考察

ゲノムコピー数異常を伴う可能性のある、WHS 症候群を含む先天奇形症候群 149 症例と一部の親について、NimbleGen CGX array を用いてゲノムアレイ解析を行った結果をまとめた。一連の解析を通して、臨床応用のための標準化を視野に、解析方法および結果の評価方法などについて検討した。

ゲノムアレイ解析は、全ゲノムを対象として数十 kb 程度の微細なゲノムコピー数変化の検出を可能とした精度の高い染色体不均衡を検出できるすぐれた方法である。しかしながら、検出されたコピー数異常は、必ずしも患者の症状に関係しているとはいえない。1 Mb 以上の大きさのゲノムコピー数異常であれば、通常はなんらかの影響があると考えられるが、コピー数異常領域に遺伝子が含まれていて、公開データベースに登録のない bCNVs であっても、両親の解析により片親が同じコピー数異常を有していることが判明した領域を本研究期間にも複数経験した。Genoglyphix, DGV, ISCA に登録されている数万件のデータ蓄積をもってしてもまだ把握し切れていないということであり、今後もデータの蓄積が必要である。特に、公開データベースの対象は欧米人であることを鑑み、やはり日本人のデータベース構築が求められる。

WHS 症候群は 4 番染色体短腕の端部欠失例が多いが、中間部欠失、微細な不均衡型転座や再構成、モザイクといった症例も含まれており、アレイ解析技術がなければ同定できない異常もあったが、アレイ解析では同定できず、染色体分裂像での確認をしなければ詳細を明らかにできない異常も少なくなかった。患者の確定診断のみならず、家族の遺伝カウンセリングにも役立てられる可能性があるため、アレイ解析とその後の追加 metaphase FISH 法は大変重要である。さらに、構造異常染色体の再構成を明らかにすることは、構造異常の発生メカニズムの研究にも結びつく可能性がある。構造異常は染色体レベルだけの問題ではなく、遺伝子レベルでも同様に起きていると考えられるため、DNA ライブラリーをプローブに用いて metaphase FISH 解析を実施して、どのような染色体再構成が起こりうるかの確認をすすめることは、今後の遺伝子変異の発生メカニズム研究にも重要な知見となると期待する。

今後アレイ解析を普及させてゆくためには、検査体制の整備のみならず、データベース構築、さらには、精度の高い解析を進めるために、最新の分子遺伝学的解析に関する技術と知識に加え、検出されたゲノムコピー数の変化に応じて両親のアレイ解析や患者および両親の metaphase FISH 解析による染

染色体再構成の検証を実施できるよう、従来の染色体核型分析技術と知識も有し、かつ結果を分子細胞遺伝学的に総合的に解釈することができる、臨床細胞遺伝学の専門家を継続的に育成してゆくための教育体制もあわせて整備することが重要課題である。

## E. 結論

ゲノムアレイ解析（マイクロアレイ染色体検査）は、従来の染色体検査では検出できない微細なゲノムコピー数異常を検出可能とする今後の医療に必須となる大変有用な診断法であり、ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群の診断に極めて有効である。しかしながら、正確な結果解釈には、必要に応じて両親のアレイ解析追加や患者および両親の metaphase FISH 解析による染色体再構成の検証を実施できる体制が欠かせない。

臨床症状から容易に確定診断できない、頻度の低い WHS を含むゲノムコピー数異常を伴う奇形症候群を疑う患者に対して、まずゲノムアレイ解析を実施することで、確定診断されていない稀少遺伝性疾患患者を減らすことを可能とする、欧米先進国並みの医療体制の整備が求められる。そして、基盤となる精度の高い解析を進めるために、最新の遺伝学的解析に関する技術と知識に加え、従来の染色体分析技術と知識も有する細胞遺伝学の専門家を継続的に育成してゆくための教育体制もあわせて整備することが重要課題である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K, Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizures and review of literature 2012.

Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y: Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A* 158A: 412-416, 2011

Nishimura-Tadaki A, Wada T, Bano G, Gough K, Warner J, Kosho T, Ando N, Hamanoue H, Sakakibara H, Nishimura G, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Wakui K, Saitsu H,

Fukushima Y, Hirahara F, Matsumoto N. Breakpoint determination of X:autosome balanced translocations in four patients with premature ovarian failure. *J Hum Genet.* 2011 Feb;56(2):156-60.

### 2. 学会発表

涌井敬子, 古庄知己, 高田史男, 福嶋義光. 染色体端部欠失患者の両親のメタフェーズ解析の必要性 -染色体端部欠失パターンを示す患者の親に認めた均衡型構造異常からの考察-. 第 34 回日本小児遺伝学会学術集会, 横浜

鳴海洋子, 古庄知己, 福山哲広, 西村貴文, 松浦宏樹, 涌井敬子, 福嶋義光. 13 番長腕中間部欠失症候群の 1 例. 第 34 回日本小児遺伝学会学術集会, 横浜

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 清水健司, 大橋博文, 福嶋義光. Cytogenetic Array 解析により検出された一般成人のゲノムコピー数変化. 遺伝医学合同学術集会 2011 (第 35 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 第 18 回日本遺伝子診療学会大会, 第 17 回日本家族性腫瘍学会学術集会), 京都

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 大橋博文, 清水健司, 岡本伸彦, 水野誠司, 黒澤健司, 高田史男, 川目裕, 福嶋義光. 染色体構造異常および MCA/MR 患者を対象としたマイクロアレイ染色体検査と metaphase FISH 法による臨床細胞遺伝学的解析結果, 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 千葉

清水健司, 黒田友紀子, 糸見和也, 服部重人, 西尾公男, 水野誠司, 岡本伸彦, 川目裕, 鳴海洋子, 古庄知己, 涌井敬子, 大橋博文, 福嶋義光. マイクロアレイ染色体検査による Wolf-Hirschhorn 症候群 22 例の遺伝型-表現型相関解析, 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 千葉

## H. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得  
なし

5. 実用新案登録  
なし

6. その他  
なし