

表 1. 2012 年 3 月末までに CGX アレイを用いてゲノムアレイ解析した WHS 患者の結果.
4 番染色体短腕の欠失範囲の詳細と 4 番染色体短腕以外の染色体端部に認めたゲノムコピー数増加領域, および以上から明らかにされた 4 番染色体構造異常の種類.

WHS 症例	性別	4 番染色体短腕のゲノムアレイ結果			4 番染色体短腕以外に検出した他染色体端部のゲノムコピー数増加領域 [サイズ]	4 番染色体構造異常の種類
		欠失バンド	欠失範囲	欠失サイズ [Mb]		
1	F	4p16.3	63075-2061942	2.06	10q26.3(ter) :134481006-135253240 [0.8 Mb]	unbalanced translocation
3	F	4p16.3	63075-2934119	2.93	4q31.22-q35.2(ter) :14557372 9-191133858 [45.6 Mb]	rearranged
4	F	4p16.3-4p16.2	63075-3453423	3.45		terminal deletion
5	F	4p16.3-4p16.1	63075-5259705	5.26		terminal deletion
6	F	4p16.3-4p16.1	33860-5488869	5.49		terminal deletion
7	F	4p16.3-4p16.1	33860-6920095	6.92		terminal deletion
8	M	4p16.3-4p16.1	63075-7509074	7.51		terminal deletion
9	F	4p16.3-4p16.1	63075-8089462	8.09		terminal deletion
10	M	4p16.3-4p16.1	63075-8772114	8.77		terminal deletion
11	F	4p16.3-4p16.1	33860-8772114	8.77	8p23.3-p23.1(ter): 192262-6907722 [2.03 Mb]	unbalanced translocation
12	F	4p16.3-4p16.1	33860-8772114	8.77		terminal deletion
13	F	4p16.3-4p16.1	1370178-10219850	8.85		interstitial deletion
14	F	4p16.3-4p15.33	63075-11105238	11.11		terminal deletion
23	M	4p16.3-4p15.33	33860-12006591	12.01		mos terminal deletion * confirmed by metaphase FISH
15	F	4p16.3-4p15.33	33860-12331994	12.33		terminal deletion
16	F	4p16.3-4p15.33	841095-14467735	13.63		interstitial deletion
17	F	4p16.3-4p15	63075-15700625	15.70		terminal deletion
18	M	4p16.1-4p15.32	5776985-17810150	12.03		interstitial deletion
19	F	4p16.3-4p15.31	63075-18616970	18.62		terminal deletion
20	F	4p16.3-4p15.31	63075-20992651	21.00	11q25(ter): 133160796-134434130 [1.3 Mb]	mos terminal deletion/ unbalanced translocation * confirmed by metaphase FISH
21	F	4p16.3-4p15.1	33860-28348051	28.35		terminal deletion
22	M	4p16.3-4p15.1	63075-29416450	29.42		terminal deletion

表 2. 既知の染色体異常患者のゲノムアレイ解析結果

症例	既知染色体異常	分類	アレイ解析により判明した ゲノムコピー数異常	ゲノムアレイ解析の効果・限界
1	add(2)(q37.3)	ub	loss 2qter [2.3Mb], gain 12qter [32.9Mb]	欠失範囲詳細同定, 過剰部分由来・詳細同定
2	t(3;7)(q26.3 ; q31.2)	b	<i>susp bCNV only</i>	ゲノム量的均衡確認
3	add(5)(p15.3)	ub	loss 5pter [2.4Mb], gain 12pter [28Mb]	欠失範囲詳細同定, 過剰部分由来・詳細同定
4	del(5)(p14)	ub	loss 5pter [21.4Mb]	欠失範囲詳細同定
5	del(5)(p15.1)	ub	loss 5pter [18Mb]	欠失範囲詳細同定
6	?dup(5)(q13.1q13.2)	ub	gain 5q31.2-5q32 [7.7Mb], loss 7p11.2 [872kb]	重複範囲詳細同定 correct, 独立した別領域の新規異常疑い(要両親検査)
7	del(6)(p25)	ub	loss 6pter [7.4Mb], gain 10qter [170kb *bCNV?]	欠失範囲詳細同定, 不均衡型転座 or bCNV? (要両親検査)
8	t(6;15)(q22.3;q21.3)	b	<i>susp bCNV only</i>	ゲノム量的均衡確認
9	add(7)(q36)	ub	gain 5pter [24.7Mb], loss 7qter [5.0Mb]	欠失範囲詳細同定, 過剰部分由来・詳細同定
10	der(9)t(4;9)(p15;p23)	ub	gain 4pter [25.5Mb], loss 9pter [13.4Mb]	欠失範囲詳細同定, 過剰部分詳細同定
11	del(10)(q26.?)	ub	loss 10qter [5.9Mb]	欠失範囲詳細同定
12	ish del(10)t(10;16)(qter,pter)	ub	loss 10qter [10.1Mb]	欠失範囲詳細同定, サブテロメア FISH による不均衡転座確認できず
13	der(11)t(4;11)(p15;q24)	ub	gain 4pter [28.4Mb], loss 11qter [10.2 kb]	欠失範囲詳細同定, 過剰部分詳細同定
14	del(14)(q13q21)	ub	loss 10p14 [4.0Mb], loss 14q13.3-q21.3 [8.3Mb]	欠失範囲詳細同定, 独立した別領域の新規異常判明
15-18	ish del(15)(q11.2q11.2)	ub	loss 15q11.2-q13 [4.92Mb]	欠失範囲詳細同定
19	ish del(15)(q11.2q11.2)	ub	loss 15q11.2-q13 [5.8Mb]	欠失範囲詳細同定
20	inv17(q11.2q12)	b	<i>susp bCNV only</i>	ゲノム量的均衡確認
21	del(18)(q22) dn	ub	loss 18qter [12.8Mb]	欠失範囲詳細同定
22	add(18)(q21.3).ish del(18)(qter)	ub	loss 18qter [17.5Mb]	欠失範囲詳細同定
23	der(19)t(2;19)(p23;q13.4)	ub	gain 10qter [16.0Mb]	SKY 法結果訂正, 過剰部分由来・詳細同定
24	add(21)(q22.2).ish der(21)t(4q;21q)	ub	gain 4qter [29.1Mb], loss 21qter [6.5Mb]	欠失範囲詳細同定, 過剰部分詳細同定
25	dup (22q)	ub	gain 22q11.2 [4.0Mb]	重複範囲詳細同定
26	dup (22q)	ub	gain 22q11.1-22q12.1 [9.2Mb]	重複範囲詳細同定
27	ish del(X)(p22.3)(SHOX-)	ub	loss Xp22.33 [366kb]	欠失範囲詳細同定
28	45,X/46,X,del(Y)(q12)	ub	loss X/Yqter [1.7Mb]	欠失範囲詳細同定
29	+mar	ub	<i>susp bCNV only</i>	marker 染色体 由来同定できず
30	+mar	ub	gain 8qter [20.7Mb], gain 22q11 [2.7Mb]	marker 染色体 由来同定・詳細同定
31	mos +mar	ub	gain 22q 11.2 [1.1Mb]	過剰部分由来+詳細同定

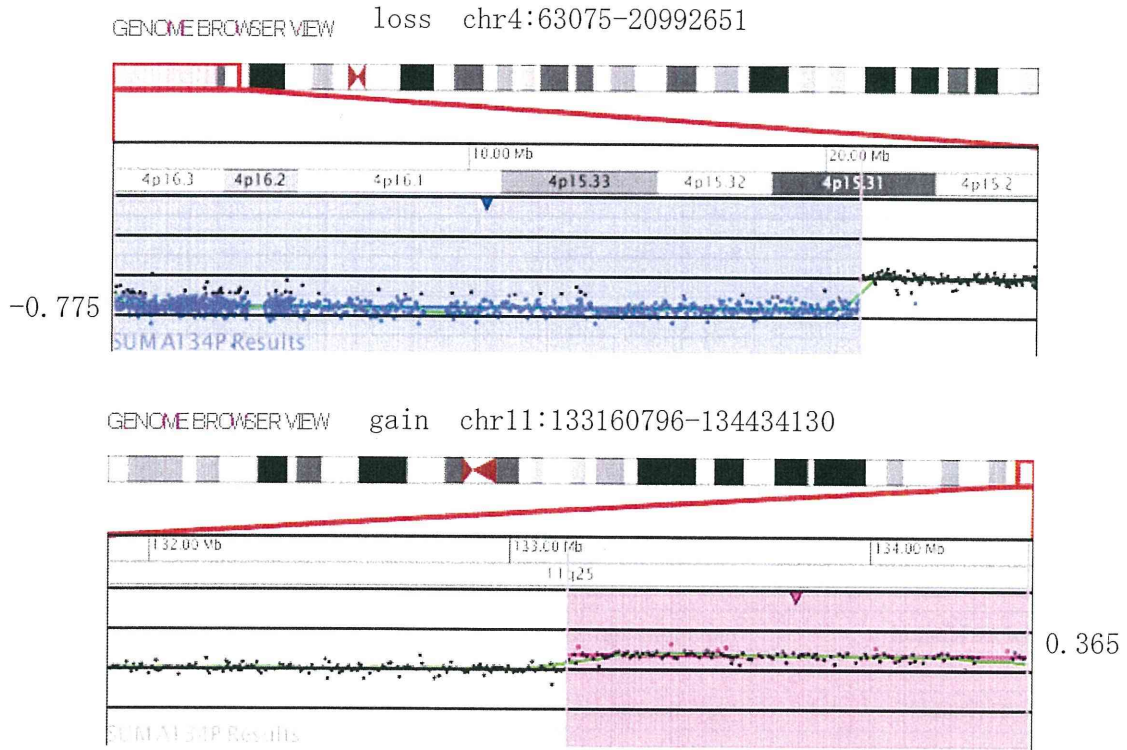
表3. 原因不明のMCA/MR患者のゲノムアレイ解析により、臨床的に影響のあるあるいは可能性が高いと考えられたゲノムコピー数異常が明らかにされた症例の結果

症例	アレイ解析により判明したゲノムコピー数異常	判明した染色体再構成 (分類)	臨床的影響の評価
1	loss 1p35-p34 [4Mb]	1p interstitial deletion	Clinically significant
2	gain 1p32 [449kb]	1p interstitial duplication	susp Clinically significant
3	loss 1q21 [1.2Mb]	1q interstitial deletion	Clinically significant
4	loss 2q33 [1.7Mb]	2q interstitial deletion	Clinically significant
5	gain 3p26 [464kb]	susp complex abnormality of chr3	Unclear clinically significance
6	gain 3p26 [464kb]	susp complex abnormality of chr3	Unclear clinically significance
7	loss 6q36 [450kb]	6q interstitial deletion	Unclear clinically significance
8	loss 7p21-p15 [1.7Mb]	7p interstitial deletion	susp Clinically significant
9	loss 10q21.3 [258kb]	10q interstitial deletion	Unclear clinically significance
10	loss 10q21 [260kb]	10q interstitial deletion	Unclear clinically significance
12	loss 13qter [7.4Mb], gain 7qter [4.8Mb]	susp der(13)t(7;13)	Clinically significant
13	loss 14q12 [2.2Mb]	14q interstitial deletion	Clinically significant
14	gain 14q32-qter [10Mb]	susp der(14)t(14;?) or dup(14q)	Clinically significant
15	loss 15q11.2-q13 [4.92Mb]	15q interstitial deletion, * susp PWS or AS	Clinically significant
16	loss/gain 16pter [362kb/1.4Mb]	susp complex abnormality of chr16	Clinically significant
17	gain 6p25-p24 [554kb], gain 17p13 [847kb]	6p interstitial duplication, and susp complex abnormality of chr17	Unclear clinically significance
11	loss 18q22-q23 [912kb]	18q interstitial deletion	Unclear clinically significance

図1 a. モザイク構造異常を有する WHS 患者のゲノムアレイ解析結果と metaphase FISH 解析結果

WHS症例20

ゲノムアレイ解析結果 概要



Metaphse FISH 解析結果 概要

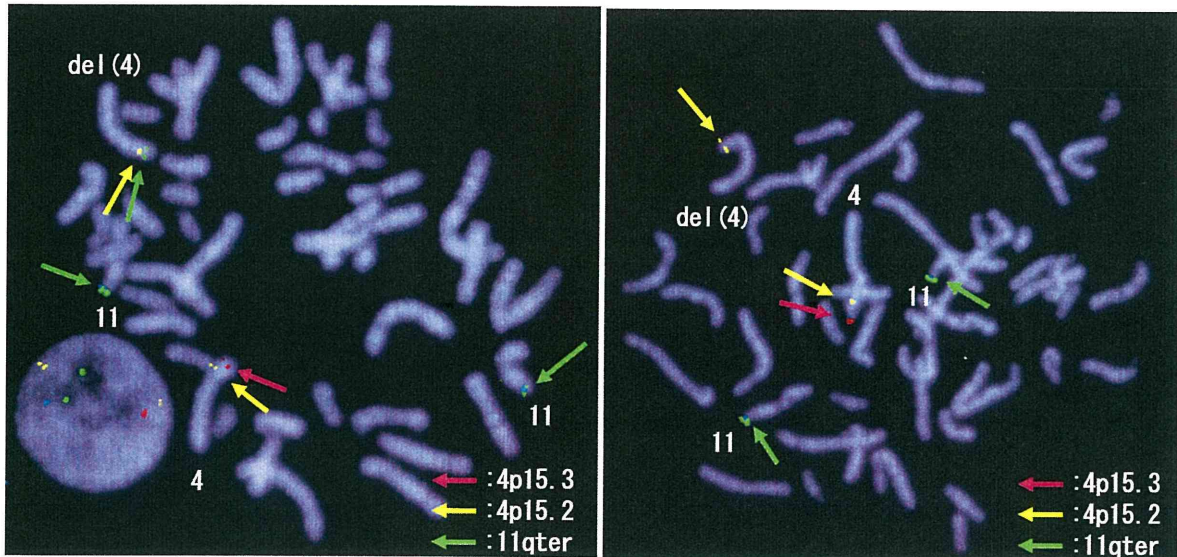
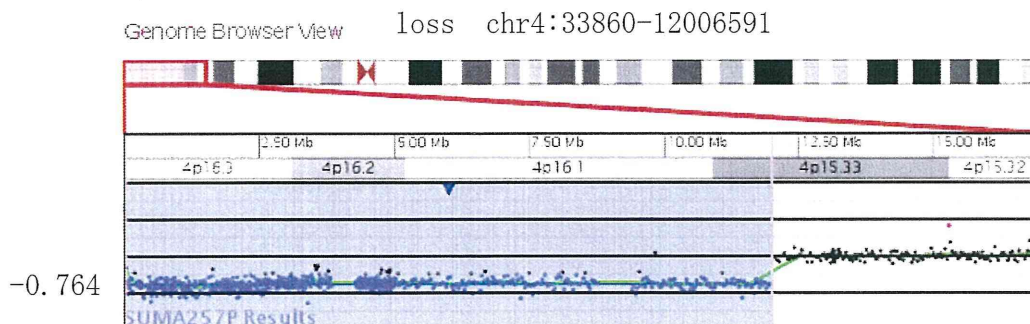


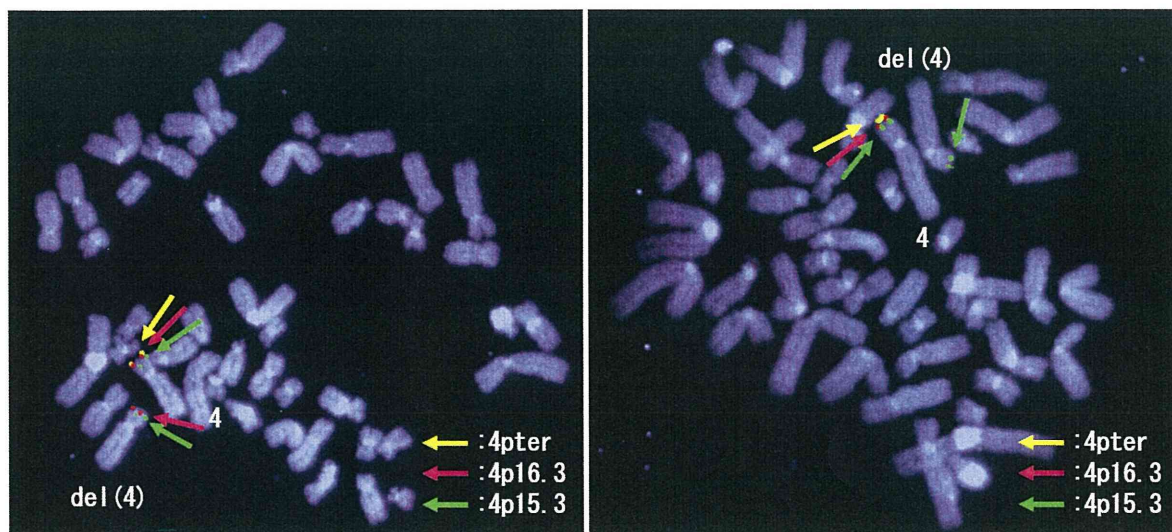
図 1 b. モザイク構造異常を有する WHS 患者のゲノムアレイ解析結果と metaphase FISH 解析結果

WHS症例23

ゲノムアレイ解析結果 概要



Metaphse FISH 解析結果 概要



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

研究要旨

昨年度より続くウォルフヒルシュホーン症候群の日本人症例におけ欠失領域と表現型の相関解析において、2012年2月末までに解析を終えた22例においてゲノムアレイ解析を施行し、15例につき臨床症状を検討した。4pの欠失サイズは2.0Mb～29.42Mb（中央値8.77Mb）と幅があり、単純欠失18例、不均衡転座3例、派生4番染色体1例でその割合は従来の報告と類似していた。さらに欠失サイズにより、1. 5Mb以下、2. 5～15Mb、3. 15Mb以上、の3群に分類し臨床症状との相関を検討した。腎臓、眼、骨格症状などの身体合併症は欠失サイズが大きいほど頻度、重症度ともに増加傾向であった。けいれんの発症頻度は12/15(80%)であり、うち83%(10/12)に重責もしくは群発を認めたが、多くは3歳前後で改善傾向になっており、また臭化ナトリウム/カリウムが奏功する例を複数認めた。ウォルフヒルシュホーン症候群における早期のゲノムアレイ解析がその後の合併症管理の有用な情報につながるようさらなる症例の蓄積が重要である。そのためにも、患者・家族への情報提供および継続的支援が必要である。

研究協力者

清水健司（埼玉県立小児医療センター遺伝科）

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)は4番染色体短腕(4p)の部分欠失をもち、特徴的顔貌所見、成長障害、精神運動発達遅滞、けいれんを主徴とする染色体異常症候群である。近年ゲノムアレイ解析技術の発展とともに個々の4p欠失領域と表現型の蓄積がなされ、WHSの主要所見の責任領域(WHSCR)に関する知見が進んでいるが、遺伝型と表現型の関連については未だ不明な点が多く、また日本人WHSにおける網羅的な調査については報告がない。昨年5症例における解析をまとめたが、ここでは2012年2月末までに解析を終えた22症例のゲノムアレイ解析(マイクロアレイ染色体検査)結果と、内15例の詳細な臨床症状をまとめ、遺伝型と表現型の相関を検討した。また、患者・家族への情報提供およびフォローアップとして、集団外来を企画した。

B.研究方法

1. 遺伝型表現型相関解析

1) ゲノムアレイ解析による遺伝型の評価

複数施設からの解析症例22例中、21例はNimbleGen CGX array 135K(Roche)、1例(症例2)はHuman Genome CGH Microarray Kit 244k(Agilent)を用いたオリゴアレイ解析を施行した。いずれもG分染法では検出できない解像度(数kb～数十kb)をもつ高密度アレイであり、詳細な欠失領域と欠失サイズの同定が可能であった。解析事由は、①G分染法、FISH法、臨床所見から既にWHSと診断されており、詳細な欠失領域の解析を施行した20例、②G分染法正常で非典型的な合併症をもち、診断目的に解析を施行した1例、③WHSの表現型を示さずG分染法、FISH法で4pの中間部欠失を示し、詳細解析を施行した1例であった。

全例において4pの詳細な欠失サイズの評価と、4p以外の領域のコピー数異常の有無の評価も行った。また親の欠失もしくは均衡転座の有無を確認するために6例において両親のmetaphase FISH解析を施行した。

2)表現型の評価

ゲノムアレイ解析を施行した 22 例のうち、現在まで詳細な臨床所見につき調査しえた 15 例につき表現型の検討を行った。主な身体所見と神経所見の 2 つに分類し、以下の項目につき評価した。

① 主な身体所見

成長評価(身長・体重)に加え、顔貌特徴については、小頭、ギリシャ戦士の兜様の所見、眼間解離など 12 の minor anomalies の有無から典型例、軽症、非典型例に分類した。また栄養摂取方法として経口、チューブ栄養、胃瘻の有無を調査した。身体合併症では、心臓、腎・泌尿器、骨格、眼、難聴、その他についてその詳細を評価した。

② 神経所見

WHS の主要な合併症であるけいれんについては、1. けいれんの有無、2. 重積・群発の有無、3. けいれんの治療・経過に分類し評価した。また中枢奇形の有無、粗大運動発達経過や IQ、DQ などを基に発達遅滞の程度についても重症度分類した。

2. 情報提供

4p モノソミー症候群集団外来の開催時に、「マイクアレイ検査でわかる欠失範囲と症状との関連」をテーマに勉強会を開催した。

(倫理面への配慮)

ゲノムアレイ解析は、信州大学医学部で承認をうけた「ヒト遺伝子解析」計画書に記された説明、同意文書とともに、また埼玉県立小児医療センターの倫理委員会で承認をうけた遺伝学的検査の説明と同意に基づいて行われた。

C.研究結果

1. 遺伝型表現型相関解析

1) ゲノムアレイ解析結果(表 1 参照)

22 例における男女比は 4 人:18 人であり、4p 欠失サイズ (Mb) は平均±SD=10.97±7.47Mb であった。同じ切断点(8.77Mb)を示した症例が 3 例あり、切断点近傍は嗅覚受容体遺伝子クラスターを含んだ座位であった。このうち 1 例は 8 番染色体の同座位との不均衡転座であり、過去にも繰り返して起きている転座切断点であることが判明した。欠失の分類では、単純欠失 18 人(82%)、不均衡転座 3 人(14%)、派生 4 番染色体(腕間逆位に伴う) 1 人(5%)であっ

た。単純欠失 18 人の分類では、端部欠失 14 人(68%)、中間部欠失 3 人(14%)となった。22 例中 21 例は、4p 端部から約 1.8-1.9Mb 領域に存在する約 300-600kb の WHS 責任領域 (WHSCR) を含んだ欠失であったが、1 例はこの領域を含まない中間部欠失であった。両親解析をしえた 7 例においては、de novo の 6 例はすべて単純欠失であり、不均衡転座 der(4)t(4;8) の 1 例において母由来の均衡転座を認めた。また、従来法 (G 分染法) との比較においては、ゲノムアレイ解析で 6Mb を超える欠失(6.92Mb~29.42Mb)を示した 19 例(73%)では先行する G 分染法でも異常を認めたが、5Mb 台以下(2.06Mb-5.49Mb)の症例では G 分染法では異常を認めなかった。

2) 臨床所見と欠失サイズとの関連

前述した解析例 22 例のうち詳細な臨床症状を調査しえた 15 例の結果につき、以下の表 2、表 3 に示した。欠失サイズにより、分類 1. G 分染法で診断困難な小さい欠失サイズ (~5Mb)、分類 2. 一般的な欠失サイズ(6~15Mb)、分類 3. 大きな欠失サイズ (16Mb~) の 3 群に便宜的に分類し、各欠失サイズにおける主な身体合併症や、けいれんを中心とした神経合併症の状況を調べた。

成長(身長・体重)においては欠失サイズによる明らかな差異は認めなかった。栄養摂取法においては、分類 1 では経口摂取が中心であったのに対し、分類 2 においてはチューブ栄養の割合が増加し、分類 3 では 3 例中 1 例がチューブ栄養、2 例で胃瘻の増設が必要であり、欠失サイズの増加に伴い補助が必要な傾向が認められた。主な身体合併症においては、心疾患については従来の報告よりその頻度が高く 13/15(87%)、その内訳はほとんどが心房中隔欠損症(ASD)や動脈管開存症 (PDA) など、経過観察可能な比較的軽症例がほとんどあり、欠失サイズによる頻度、重症度による差異は認めなかった。

一方、口唇口蓋裂、腎泌尿器合併症、眼合併症、難聴などにおいては、欠失サイズの増加と共にその頻度が増加傾向となっていた。また分類 3 においては、腎の形態異常を示した 3 例中全員が腎不全となっており、また 3 例中 2 例で眼コロボーマをきたすなど、欠失サイズの大きな例では、合併症の重症度も高くなる傾向があった(表 3)。その他、高コレステロールを合併する症例が比較的多いこと、稀な合併症として症例 2 における多発性骨軟骨腫や症例 17 における矢状縫合早期癒合症が認められた。

神経所見においては、けいれんのない 1 例は調査

時 7 ヶ月であり評価困難であったため除外し、残り 14 例中 12 例(86%)にけいれんを認めた。またけいれん出現 12 例中 10 例(83%)と高率に重積もしくは群発を認めた。初発年齢は、分類 2 と分類 3 においてはほとんどが乳児期発症(2 ヶ月～14 ヶ月)であったが、欠失サイズが小さい分類 1 における発症年齢は 2 歳台と遅く、重積、群発は認めなかった。またけいれんを認めなかった 2 例では、1 例が 6 歳で欠失サイズが最少の 2.06Mb、もう一例では 12 歳であり

欠失サイズは 8.85Mb と平均的な大きさであったが、4p 端部の約 1.4Mb は保たれている中間部欠失であった。また治療においては全例多剤併用において対応されていたが、3 歳前後を境に軽快する例が多くみられた。近年その有用性が報告されている臭化ナトリウム/カリウム (Na/KBr) においては今回の調査においても有用な例が複数認められた。

2. 情報提供

平成 23 年 7 月 12 日(火)に埼玉県立小児医療センターにおいて開催した 4p モノソミー症候群集団外来時に、「マイクロアレイ検査でわかる欠失範囲と症状との関連」として、染色体・遺伝子、症候群の基礎知識とともに、①4p モノソミーの診断方法、②マイクロアレイでの解析状況、③4p 欠失範囲と臨床症状との関連、についてスライドにて説明した(別添資料)。

すでに 4 番染色体短腕欠失が判明している 12 名のうち 9 名の患者とその家族 13 名が参加した。

D. 考察

今回解析した本邦 WHS22 例のゲノムアレイ解析と 15 例の遺伝型・臨床型相関解析では、従来の報告 [Zollino et al.,2008] と同様に欠失サイズが大きいほど主な身体合併症の頻度、重症度は増加傾向であった。特に欠失サイズが 15Mb を超える症例では腎不全を伴う腎低形成や腎奇形、眼コロボーマなどの重度の合併症が高くなるため、これらに注意した合併症評価とフォローが必要と考えられた。また症例 2 (多発性骨軟骨腫)や症例 17(矢状縫合早期癒合)では今まで報告のない合併症を認めたが、これらの症例においてはゲノムアレイ解析で特記すべき他領域の CNV は認めなかった。原因として、正常アレルの 4p 領域に存在する劣性遺伝子の変異やその他領域の修飾因子による可能性も推察される。一方 15 例中 2 例において、10q26.3→ter 領域(772kb)と 8p23.2

→pter(8.15Mb)領域にそれぞれ重複を認める不均衡型転座を認めたが、特記すべき合併症や重症度の変化は認められず、これらの重複が WHS の表現型に与える影響は少ないと考えられた。

けいれんにおいては、既知の報告 [Battaglia et al.,2008] と同様にけいれん合併頻度、重積頻度ともに高かったが、年齢依存性に軽快する傾向は本研究でも認められており、およそ 3 歳までの重積をいかに軽減するかが健康管理の課題である。近年、臭化ナトリウムが抗けいれん薬の効果として特に重積の予防に有用であるという報告があり [Kagitani-Shimono et al.,2005]、本研究においても多剤併用の中での臭化ナトリウム/カリウムの使用が有効な例を複数認め、WHS に有効なけいれん治療として更なる症例の蓄積が望まれる。また欠失領域とけいれんとの関連については興味深い知見がある。WHS のけいれん浸透率は 90%前後であり、責任領域 (WHSCR2) 内にけいれん発症に最も関連のある *LETM1* 遺伝子が存在する。一方、この領域を含まない遠位部約 1.4Mb の欠失例におけるけいれん症例が存在する [South et al.,2008] ことから、遠位の領域にもけいれん発症の修飾因子が存在する可能性が考えられる。今回評価しえた非けいれん例の 2 例のうち、症例 1 は最少欠失(2.06Mb)例であったが、症例 13 は、欠失サイズ 8.9Mb であるものの遠位約 1.4Mb を残した中間部欠失例であった。このことは遠位 1.4Mb の中にけいれん発症の修飾因子が存在することをさらに強調するものであり、この領域の更なる研究が、WHS におけるけいれん発症のメカニズムや重症度の予測につながる可能性がある。

WHS のみならず、頻度の低い先天奇形症候群の研究には患者情報の蓄積が欠かせなく、また研究成果を患者・家族に還元するためにも、家族同士の情報交換の場としても、先天異常患者が多く受診する医療機関における集団外来は、有効な取り組みと考えられた。

E. 結論

WHS 日本人症例において、ゲノムアレイ解析を用いた 22 症例の詳細な遺伝型の解析と、15 症例における表現型との相関解析を行った。身体合併症の頻度や重症度と欠失サイズとの関連や、けいれんの頻度、重責頻度、治療効果、発症と欠失領域との関連を示した。ゲノムアレイ解析による詳細な遺伝型の同定が個々の健康管理に生かせるようにさらなる症例の蓄積と検討が重要である。そのためには、患

者・家族への情報提供や継続的支援も欠かせない。

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

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

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

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

H.知的財産権の出願・登録状況

7. 特許取得

なし

8. 実用新案登録

なし

9. その他

なし

表 1 ゲノムアレイ解析結果

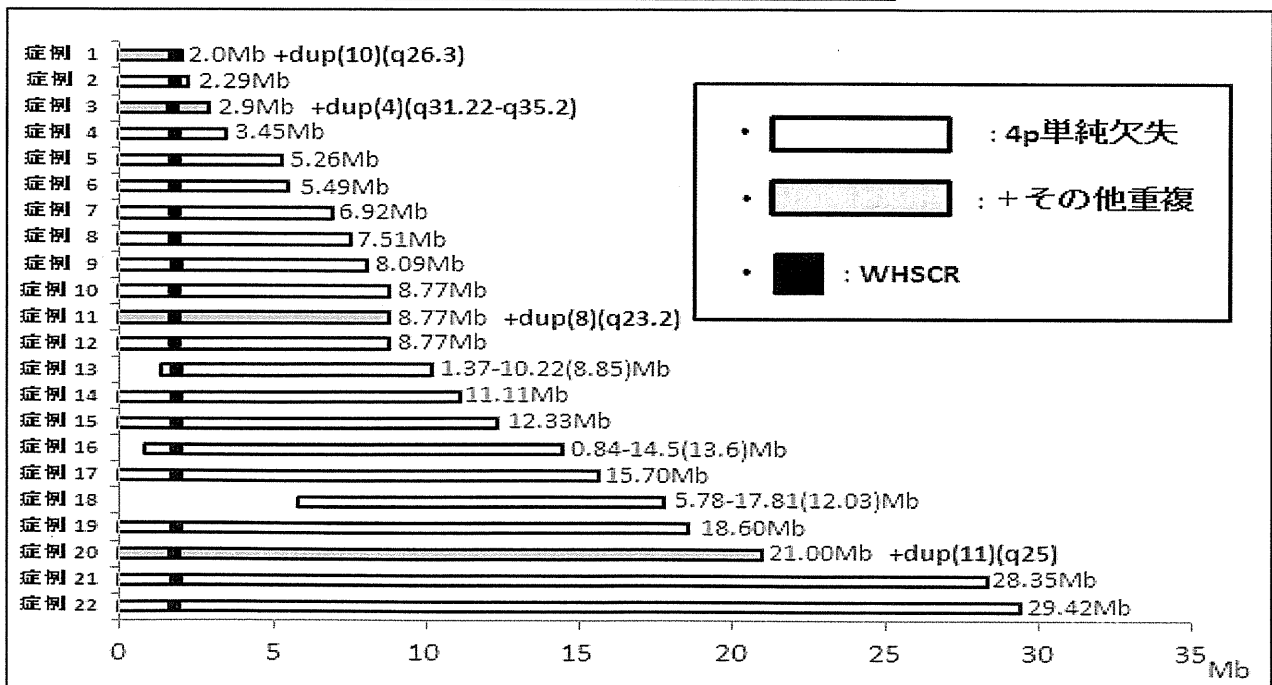


表2 主な身体所見の結果

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・泌尿器合併症	骨格所見	眼	難聴	その他特記合併症
1	6y / F	2.06	dup10q:772kb	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	-	-
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:8.15Mb	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
17	3y / F	15.70		typical	-5.6 / -4.0	Tube	-	PS/ASD	腎低形成・腎不全	矢状縫合早期癒合	両側コロポーマ	-	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・頸椎異常	-	高度	誤嚥強(喉頭気管分枝術施行)
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・コロポーマ	高度	-

4p欠失サイズにより3群に分類
 分類1 ~5Mb (3例)
 分類2 6Mb~15Mb(9例)
 分類3 >15Mb (3例)

表3 欠失サイズとの関連

	分類1 (~5Mb)	分類2 (6~15Mb)	分類3 (>15Mb)
先天性心疾患	2/3	8/9	3/3
口唇・口蓋裂	0/3	5/8	2/3
腎・泌尿器(腎不全)	0/2 (0)	4/9 (3)	3/3 (3)
骨格合併症	1/2	4/7	2/3
眼合併症(コロポーマ)	1/3 (0)	3/6 (0)	2/3 (2)
難聴(高度難聴)	0/3 (0)	3/9 (1)	2/3 (2)

表4 神経所見の結果

症例	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	-	-	-	-	中等度(DQ41) 独歩2y3m
2	2y6m	-	VPA 最終発作8歳	-	重度(IQ23) 独歩7y
6	2y1m	-	発熱時のDZP・8歳頃消失	-	重度 独歩7歳
7	6m (West)	+	VPA/KBr/VltB6 発作数年なし	-	重度(IQ≤10) 独歩7y
8	7m	+	VPA/PB/CBA 3歳よりKBr KBr開始後発作改善	-	重度 寝返り1y5m
10	-(7ヶ月現在)	-	-	-	評価難 定額未
11	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	7m	+	VPA/PHT 重責頻回 最終発作4歳	-	重度 独歩不可
13	-	-	-	-	中等度 独歩2y3m
14	9m	+	VPA/KBr	-	重度 独歩不可
15	9m	+	VPA/LGT/CZP 発作頻回	脳梁非薄化 脳幹・小脳萎縮	重度(DQ30) 定額9ヶ月
16	12m	+	発作時のみ 発作数年なし	脳梁低形成	重度(IQ≤10) 独歩5y
17	14m	+	VPA/KBr/CZP	-	重度 定額のみ
21	11m	+	TPM/CLB 2歳頃より発作なし	大脳萎縮	重度
22	2m	+	VPA/ESM/PB 発作頻回	脳梁低形成・白質容量減少	DQ≤10 定額不可

4p欠失サイズにより3群に分類
 分類1 ~5Mb (3例)
 分類2 6Mb~15Mb(9例)
 分類3 >15Mb (3例)

4pモノソミー症候群集団外来

～マイクロアレイ検査でわかる
欠失範囲と症状との関連～

2011.7.12 遺伝科

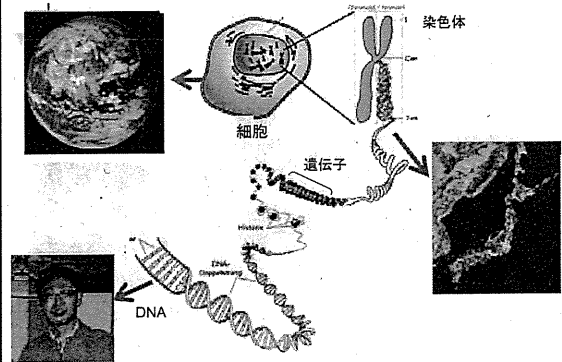
今回の内容

- 新たな診断技術(マイクロアレイ法)により先天性疾患のお子さんのより細やかな原因の診断が可能になってきました。これらの解析技術を生かして検討することにより、疾患に有用な情報が得られることが期待されます。
- 4pモノソミー症候群をもつお子さんにおいても、マイクロアレイ法の解析と臨床症状との関連を調査中であり、その経過についてお伝えします

項目

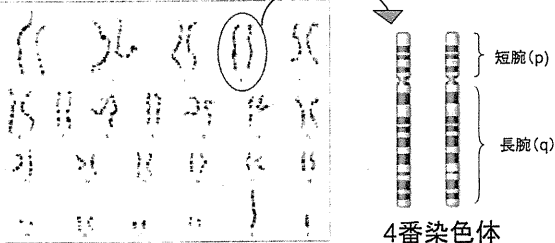
1. 4pモノソミーの診断方法
従来行っている診断検査
マイクロアレイ検査との違い
2. マイクロアレイでの解析状況
4pモノソミー症候群をもつ20人の調査
3. 4p欠失範囲と臨床症状との関連
よりよい健康管理にむけて

遺伝情報の大きさ比較



4番染色体の場所

染色体検査 (G分染法)

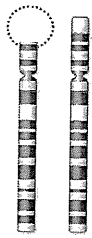


上記情報は1つの細胞の中に

4pモノソミー症候群

- 4番染色体短腕(4p)の部分欠失が原因
- 1961年に初めて報告
Wolf-Hirschhorn (ウオルフ・ヒルシュホルン) 症候群ともよばれる
- 出生約2万人に1人の頻度 男:女=1:2
- 成長障害、発達遅滞、けいれん(てんかん)が主な合併症
- 欠失している範囲は個々により幅があり、大きさと症状との関連が近年注目されている

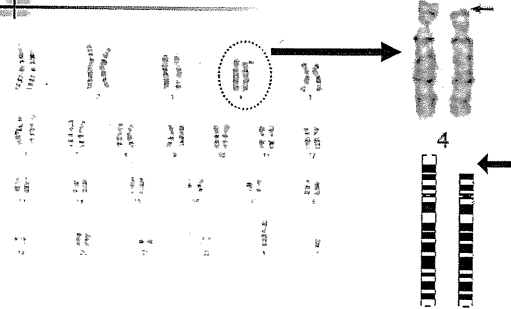
4pモノソミー症候群の診断



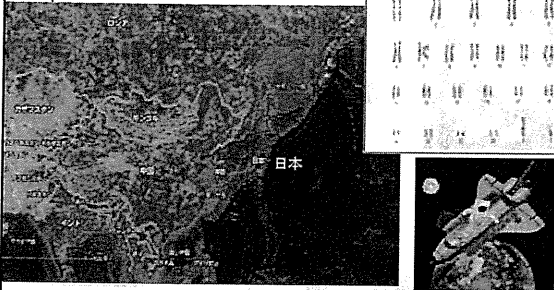
4番染色体

- 短腕 (p)
 - どのような検査で欠失を見分ける？
 - 欠失が小さい場合も見分けられる？
 - 欠失の大きさは調べられる？

診断(1) G分染法



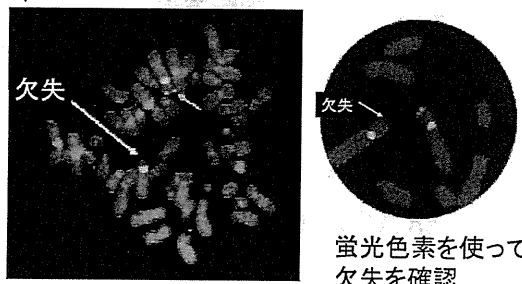
G分染法



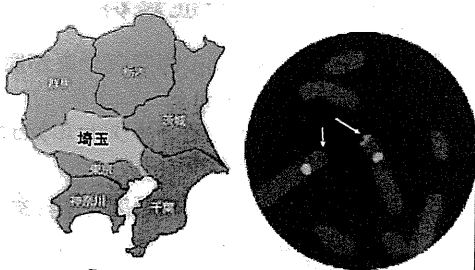
スペースシャトルから見る日本、韓国、中国(各染色体)世界全体(遺伝情報全体)を見渡せるが詳細は不明

診断(2) FISH法

(より小さな場所を調べられる)



FISH法



世界の中で埼玉県があるかどうか調べたい
埼玉県があれば光る(特定の場所の有無を調べる)

検査の比較

- G分染法: 幅広く、大まかにみる検査
 - 4pの大きな欠失がある場合はわかる
 - 小さい欠失はわからない
- FISH法: 小さな領域をピンポイントで調べる検査
 - 4pの小さな欠失の有無がわかる
 - 幅広くみることができない

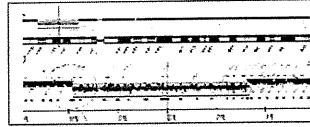
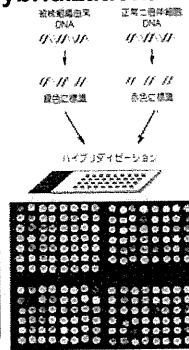
そこで……

細かく、かつ幅広く見ることができる
検査方法があれば……

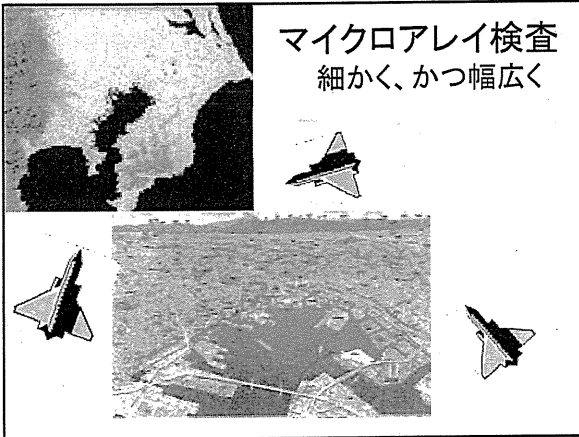
- 様々な大きさの4p欠失を調べられる
- 欠失範囲を比べることも可能
- 4p以外の場所の変化も一緒にわかる
- 症状との関係がわかってくる可能性

マイクロアレイCGH法 (Comparative Genomic Hybridization)

- 染色体全体を詳細に、幅広く調べる検査
- 例えるなら、飛行機で低空飛行しながら様々な都市を調べるのに似ている



マイクロアレイ検査 細かく、かつ幅広く



マイクロアレイ検査を使って 何を調べることができるのか

- 4pモノソミーをもつ複数の患者さんに対してマイクロアレイを施行、4pの欠失範囲や遺伝情報を細かく調べる
- ↓
- 各々に対し臨床症状を詳しく調査
- ↓
- 原因と症状との関係性を調べる

どのように役立てられるか？

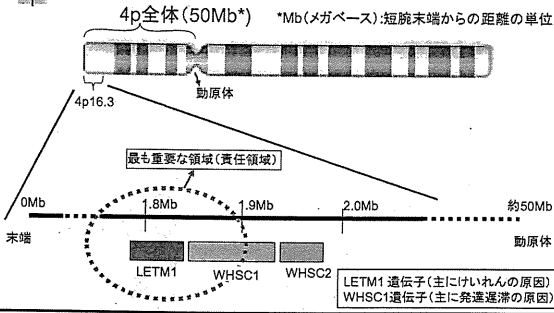
- 欠失サイズや欠失場所と各症状(けいれんなど)との関係がわかることで、あらかじめアレイ検査で原因を細かく特定しておくことにより、その後の健康管理に役立てられる可能性がある

(例) アレイ検査での欠失範囲が○○なら
□□の症状が強くなるため早期に薬が必要
欠失範囲が××なら□□の症状は心配ない

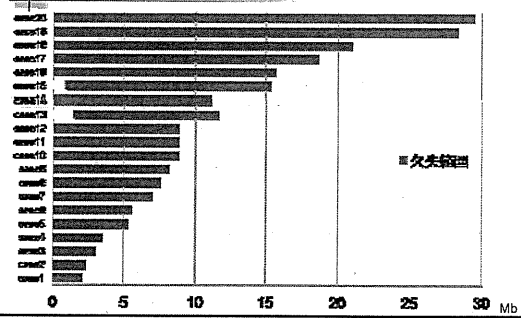
現在までの日本における 4pモノソミー症候群のお子さん マイクロアレイ解析状況

厚生労働省科学研究難治性疾患克服研究事業
信州大学遺伝子診療部(研究代表者:福島義光)

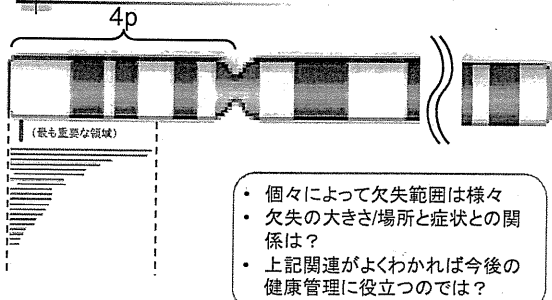
4pの中で最も重要な場所は？



日本人20人のマイクロアレイ解析での4p領域の欠失範囲



4番染色体との位置関係



欠失の大きさと症状との関連を調査

臨床症状 “けいれん”について

- ほぼ全員に発症し、健康管理上最も重要な合併症の1つ
- 主に乳児期(平均9-11ヶ月)に発症し、その後重責(30分以上持続する強いけいれん)をおこすことがある
- 海外の報告では50%(36/72人)が3歳までに重積状態を経験
- けいれんの重症度は後の神経症状や発達にも影響するため、その対応がとても重要

けいれんの調査項目

- 初めて起こった年齢
- 重責(強い発作 > 30分) 経験
- 治療の経過
- けいれんの経過(最終発作)

結果(1) 欠失サイズとけいれんとの関係

匿名化 (性別)	4p欠失の サイズ (Mb)	けいれん			
		初発	重責 >30分	経過 (最終発作)	治療
1(女性)	2.3	2歳	なし	脳波異常のみ 最終発作8歳	バルプロ酸
2(女性)	5.5	2歳	なし	3歳頃より軽快 最終発作10歳	ジアゼパム
3(男性)	7.5	7ヶ月	あり	3歳頃より内服変更 徐々に改善	バルプロ酸 臭化ナトリウム
4(女性)	8.8	7ヶ月	あり	1歳まで重責頻回 5歳以降改善	バルプロ酸 フェニトイン
5(男性)	8.8	6ヶ月	あり	1歳時重責 2歳頃より改善	バルプロ酸 フェノバル

その他合併症の調査項目

- 心臓疾患
- 口唇・口蓋裂
- 腎臓疾患
- 骨格症状
- 発達の経過(寝返り、座位、独歩)

結果(2) 欠失サイズと他合併症との関係

匿名化 (性別)	4p欠失の サイズ (Mb)	身体所見				発達
		先天性 心疾患	口蓋疾患	腎臓疾患	骨格症状	
1(女性)	2.3	あり	なし	なし	あり	独歩7歳
2(女性)	5.5	なし	なし	なし	なし	独歩7歳
3(男性)	7.5	なし	なし	なし	なし	寝返り
4(女性)	8.8	あり	あり	あり	あり	寝返り
5(男性)	8.8	あり	あり	なし	なし	座位

5名での調査経過から

- 欠失サイズが約5Mb以下の比較的
小さい2例ではけいれん重責がなかった
が7Mbを超える2例で重責を経験して
いた。欠失サイズが大きいほど重責する
傾向が強い？
- 欠失サイズが大きいほど、腎臓や口蓋異
常などの合併症をきたす例が増える傾向
にあった

今後の方向性

- さらに多い人数において臨床症状と
欠失サイズ、欠失領域中の遺伝情報
との関連について調査していく
- 新たな知見が判明すれば、それが4p
モノソミー健康症候群の健康管理に
どのように生かせるか(合併症評価や
治療法など)について検討していく

資料3. 4pモノソミー症候群集団外来 勉強会資料

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

研究要旨

ゲノムコピー数異常を伴う先天異常症候群のひとつに22q11.2欠失症候群がある。ウォルフヒルシュホーン症候群と同様に臨床的に認識可能な先天奇形症候群である。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微小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。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。

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) と同様にゲノムコピー数異常を伴う先天異常症候群のひとつである 22q11.2 欠失症候群 (以下, 22q11DS) は, 3000~6000 出生にひとりの頻度で認める最も頻度の高いゲノムコピー数異常症である。本症候群は, 従来から, DiGeorge 症候群, 口蓋心臓顔 (velocardiofacial) 症候群, また高尾症候群 (円錐動脈管心疾患異常顔貌症候群: conotruncal anomalous face syndrome) などと呼ばれていた。その臨床症状の幅, 多様性は著しいが, 多くの場合, 円錐動脈幹異常に起因する先天性心疾患, 口蓋異常 (明らかな口蓋裂から, 粘膜下口蓋裂, 鼻咽腔閉鎖不全, 二分口蓋垂) 特徴的な顔貌, 血液学的のみから臨床的に有意な症状を呈する免疫異常, 摂食障害, 学習障害, 時に精神遅滞を有する症候群である。

臨床的に本症候群を有すると疑われる 85%に, 22q11.2 領域の約 3Mb の微小欠失を有する。この欠失は, LCR (low copy repeat) 配列を介した欠失で, その切断点は共通している。その他, 約 10%は, 小

が知られている。臨床的には, 本症候群を疑った際に, FISH 法にて約 95%に本領域での欠失を認めて診断が可能である。

しかしながら, 臨床的に本症候群を疑いながらも欠失を認めない場合には, 以下の 3 つに分類可能である。1) 22q11.2 の責任領域に座位する *TBX1* の微小欠失や点変異, 2) 他の異なった先天異常症候群の phenocopy, 例えば, CHARGE 症候群, OpitzG/BBB 症候群, VATER 連合, 眼・耳介・椎体異常 (oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS) : Goldenhar syndrome), 3) 他のゲノムコピー数異常症である。この 3) においては, 従来, 16p11.2, 1q21.1, 10p13, 5q35, 19p13, 6p24, 9p24, 15q24 におけるゲノムコピー数異常が報告されている。

今回, 我々は, 臨床的に 22q11DS が疑われて, 通常の FISH 検査にて欠失を認めない症例における他のゲノムコピー数異常の有無を検討し, その症例の診断, そして健康管理のために役立つ目奥的に, ゲノムアレイ解析にて解析をおこなったので報告する。

B.研究方法

[症例]

11歳女児。健康な両親の第1子。家族歴には、先天性心疾患や口蓋裂などの先天奇形、精神遅滞など特記すべきことなし。出生時、口蓋裂を認め、その後外科的に修復を受けた。発達の遅れを認め、3歳6か月時の発達検査では、DQ40。初診時の診察所見では、身長は-2SD、顔貌は特徴的で、顔面中央部の低形成、軽度の眼間開離、軽度の眼瞼下垂を認めた。口腔内には、口蓋裂術後で、歯列不整を認めた。手指は、スレンダーで細長い。中等度の精神遅滞を認めるが、言語理解は良好にて、2語文は可能でコミュニケーション可能。有意な筋緊張低下を認めた。先天性心疾患はなく、また低Ca血症の既往もなし。通常のG分染法では、46,XXであった。

臨床的に口蓋裂、精神遅滞、そして特徴的な顔貌から、22q11DSを疑い、FISH法(TUPLE1プローブ)を行うが欠失は認めなかった。

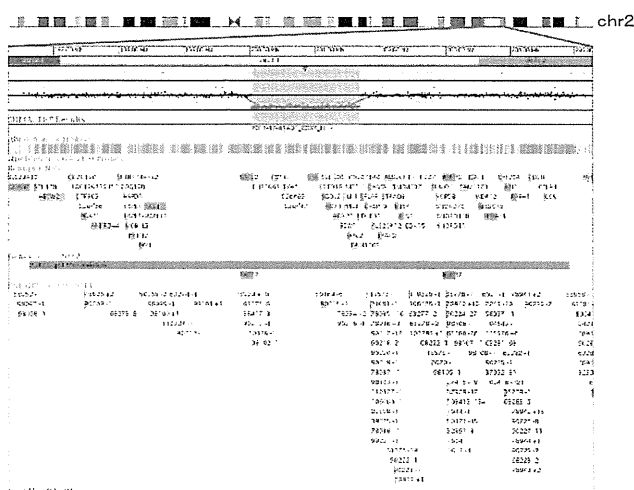
(倫理面への配慮)

ゲノムアレイ解析は、信州大学医学部で承認を受けた「ヒト遺伝子解析」計画書に記載された説明を行い、文書にて家族の同意を得ておこなった。

C.研究結果

ゲノムアレイ解析でも、22q11DSの責任領域には、コピー数異常は認めなかった。一方、染色体2番q33.1(chr2:200019926-201686578)に約1.7Mbの単一コピー数の減少(欠失)を認めた(下図)。

この欠失領域には、口蓋裂と精神遅滞(OMIM#119540)の責任遺伝子である*STAB2*遺伝子(OMIM*608148)を含んでいた。両親には、同領域の欠失は認めなかった。



D.考察

今回、臨床的に22q11DSが疑われたが、通常のFISH検査にて欠失を認めない症例に対してゲノムアレイ解析を行い、その欠失領域には、臨床症状の説明が可能な責任遺伝子が存在し、かつOMIMにて2007年に口蓋裂と精神遅滞として表現型の登録があり、診断が確定した症例を経験した。

2q33.1の微細欠失は、2003年にBACアレイ検査にてVan Buggenhoutらによって初めて臨床的に認識可能な症候群の可能性として報告された。現在まで、本研究班で用いているオリゴアレイを含むマイクロアレイ解析により、世界で約10症例の報告がみられる新規の症候群である。その欠失の領域やサイズは、各症例によって様々にて、22q11DSのようにLCRや共通欠失はない。今回の症例の臨床症状は、それまでの過去の報告例と合致する。

最近のBalasubramanianらの報告(2010)においても、本症例と同様の22q11DSが疑われた症例の報告があり、また論文に掲載されている患児の臨床写真からも本症候群と22q11DSの表現型、特に顔貌の特徴などの共通性は明らかにて、その類似性が確認された。従って、22q11DSの鑑別疾患として非常に重要であることが判明した。

2q33.1領域の*SATB2*遺伝子は、いわゆる単独口蓋裂(isolated cleft palate)の責任遺伝子として、de novoの転座症例から同定されたが、その後2007年には、症候群性口蓋裂の症例に*SATB2*遺伝子の変異が認められて、本遺伝子の変異のみでも症候群性の口蓋裂の原因になることが示唆されている。従って*SATB2*遺伝子の遺伝子内変異によるハプロ不全のみでも、22q11DSと類似する可能性があり、22q11DSが疑われた症例のなかにも*SATB2*遺伝子異常症が存在する可能性が考えられた。

E.結論

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において、ゲノムコピー数異常の検討をおこなった。2q33.1領域のゲノムコピー数異常を異常が認められ、その領域の遺伝子の状況から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、本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。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(演題登録済み, 2012年6月, Oral presentation 予定)

Hiroshi Kawame, Mika Iwamura, Yoshimitsu Fukushima, Keiko Wakui. Differential Diagnosis of 22q11.2DS: 2q33.1 Microdeletion Syndrome.. The 8th Biennial International 22q11.2 Deletion Syndrome Conference, Florida.

H.知的財産権の出願・登録状況

10. 特許取得

なし

11. 実用新案登録

なし

12. その他

なし

I.謝辞

都立北療育医療センター小児科の岩村美佳先生の協力を得ました。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (英文)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, <u>Kosho T</u> , Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, <u>Wakui K</u> , <u>Fukushima Y</u> , Matsumoto, N, Koike K,	Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizures and review of literature	Am J Med Gene	158(A)	861-868	2012
<u>Narumi Y</u> , Shiohara M, <u>Wakui K</u> , Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, <u>Kosho T</u> , <u>Fukushima Y</u>	Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome.	Am J Med Gene Part A	158A	412-416	2011
Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, <u>Kosho T</u> , <u>Fukushima Y</u> , 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	56(2)	110-124	2011
Nishimura-Tadaki A, Wada T, Bano G, Gough K, Warner J, <u>Kosho T</u> , Ando N, Hamanoue H, Sakakibara H, Nishimura G, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, <u>Wakui K</u> , Saitsu H, <u>Fukushima Y</u> , Hirahara F, Matsumoto N	Breakpoint determination of X:autosome balanced translocations in four patients with premature ovarian failure	J Hum Genet	56(2)	156-160	2011