

frequency of *de novo* t(11;22)s in sperm samples (Kato et al. 2006, Tong et al. 2010). Here we demonstrate that the size and symmetry of PATRRs reflect their secondary structure propensity. It has been suggested that polymorphic variations affect translocation frequency and induce genomic instability leading to translocation susceptibility. We recently established a model system for generating the t(11;22) using human somatic cell lines [30]. In this system, the endogenous PATRR11 and PATRR22 do not generate t(11;22)s, but two co-transfected plasmids containing a PATRR11 and a PATRR22 generate translocation-like rearrangements only when transfected as cruciform-extruding plasmids. This supports the hypothesis that palindrome-mediated recurrent translocations are facilitated through cruciform extrusion of the two PATRRs.

In our data, the percentage of cruciform DNA for the L-PATRR11 was found to be high, while the translocation frequency was relatively low. One possibility is that we performed these experiments under the conditions that favored for cruciform extrusion to see the

difference in cruciform propensity clearly among the PATRR11 variants. It is possible that only a small proportion of PATRRs actually extrude a cruciform in living cells. Another possibility is that the longevity of a cruciform might be transient in living cells. Cruciform extrusion requires strong free negative supercoiling, which could be easily resolved by topoisomerase activity prior to translocation formation.

Among the AS-PATRR11s, only the 434 bp PATRR11 produces translocations, although the cruciform forming propensity of the 434 bp PATRR11 is the lowest. The 434 bp PATRR11 was the longest in length among the AS-PATRR11s we examined in this study. In our previous study, size and symmetry of the PATRR are the important determinants for translocation frequency [28,29]. Size might affect the stability of a cruciform once it forms, or, a cruciform-specific nuclease might more readily recognize and digest a larger cruciform leading to translocation formation.

Although a DNA cruciform is likely to be etiologic for palindrome-mediated translocations, the existence of

DNA cruciforms in living cells is still controversial and no direct evidence has yet demonstrated the presence of such a configuration in the context of eukaryotic chromatin [31-34]. Such an energetically unfavorable structure would require sufficient negative superhelicity to stabilize the structure. However, the existence of such a level of negative supercoiling has not yet been proved. Nonetheless, the data in this study indirectly, but strongly imply that PATRRs extrude cruciform structures in living cells. Thus, the question to be answered is when and where such a structure forms and induces a translocation.

We have previously reported sperm-specific occurrence of the t(11;22) translocation in humans [22,35], suggesting that a physiological event during spermatogenesis might be involved in the mechanism of cruciform extrusion and/or structure-dependent instability [36,37]. One way to account for these observations is to postulate that translocations arise during DNA replication. Spermatogenesis engenders a greater number of replications than occur in other somatic tissues or oocytes. The majority of non-recurrent translocations are of paternal origin and *de novo* non-recurrent translocations are often associated with increased paternal age, despite the fact that an age-dependent increase was not observed for the occurrence of the t(11;22) in sperm [38-40]. One possibility is that translocations might occur late in spermatogenesis, when male-specific dynamic changes of chromatin structure take place [41].

In this study, we estimated the ΔG that reflects secondary structures formed by single-stranded DNA. These can be formed within long single-stranded regions of DNA on the lagging-strand template during DNA synthesis. Our data indicate that, similar to the PATRR22, the secondary structure forming propensity of the PATRR11 estimated by its ΔG does not correlate with its translocation frequency [29]. These observations suggest that DNA replication may not significantly contribute to *de novo* translocation formation. This is consistent with the observation that deletions within the PATRR appear to be caused by replication errors, but translocations are not [42,43]. On the other hand, a significant correlate of translocation frequency is observed with the *in vitro* cruciform propensity of PATRR-containing plasmids under torsional constraint. During spermatogenesis standard histones are removed and replaced with protamines at a majority of chromosomal regions. The removal of histones might provide sufficient negative superhelicity to induce cruciform extrusion *in vivo* [44,45]. Such chromatin-remodeling-induced genomic instability deserves further investigation in studies designed to elucidate the mechanism and timing of gross chromosomal rearrangements.

Conclusions

In this study, a significant association between *de novo* translocation frequency and *in vitro* cruciform forming propensity of the polymorphic alleles of the PATRR11 is observed. Our results indirectly but strongly suggest that the PATRR adopts unstable cruciform structures during spermatogenesis that act as a translocation hot-spot in humans.

Materials and methods

PCR amplification and cloning of the PATRR

All of the data related to PATRR11 genotype and *de novo* t(11;22) translocation frequency in sperm from normal healthy males have been previously reported [28]. Samples were collected from 2 males who were heterozygous for the L- and SS-PATRR11, while 3 samples were obtained from males heterozygous for L- and AS-PATRR11. Samples from two SS/AS heterozygotes and from one AS/AS heterozygote are also included. All of the donors provided informed consent for further analysis. This study protocol was approved by the Ethical Review Board for Clinical Studies at Fujita Health University.

The PATRR11s were amplified from genomic DNA of the donors by PCR using primers described previously [28]. The plasmids containing the polymorphic PATRR11s were constructed as previously described [26] by TA cloning the PATRR11 PCR products into pT7-blue (Novagen, Madison, WI). The SURE strain (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), whose relevant genotype concerning DNA rearrangement and deletion (*recB*, *recJ*, *sbcC*, *umuC::Tn5*, *uvrC*), is known to show increased stability for palindromic sequences, and was used for cloning and propagation of plasmids.

In silico analysis for secondary structure

Potential secondary structure formed within single-stranded DNA was determined by entering PATRR sequence into the m-fold server <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>. A free energy value (G_{STRUC}) was obtained. Similarly, free energy values for the same sequence annealed to its complementary strand (G_{DS}) were obtained and then halved. Free energy for the formation of secondary structure (ΔG) is calculated as the $G_{DS} - G_{STRUC}$ difference [19].

In vitro cruciform extrusion assay

The cruciform-free plasmids were obtained by a denaturation-free, triton-lysis method as previously described [25]. In brief, the *E. coli* cells from a 50 ml culture were dissolved with 10 ml lysis buffer of 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5% sucrose, 1.5 mg/ml lysozyme, 0.1 M EDTA, 25 μ g/ml RNase A and 0.75% Triton X-100. The

plasmids were extracted without the use of phenol, and purified using an ion-exchange column (QIAGEN, Valencia, CA). The plasmid DNA was precipitated in aliquots with 2-propanol and stored at -30°C until used in an experiment. All of the procedures were performed at 4°C in a cold room to avoid spontaneous cruciform formation during the procedure. To induce cruciform formation, the plasmids were incubated for 30 min at 37°C in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA and 100 mM NaCl [27]. The plasmids were cooled on ice before electrophoresis at 50V for approximately 4 hours in a 0.9% agarose gel at 4°C. The gel was stained with ethidium bromide and photographed using the Image-Master VDS system (GE Healthcare, Diegem, Belgium). Band intensities were quantified using NIH image 1.62 software.

To examine the cruciform conformation in linear DNA, DNA crosslinking was performed by a method similar to that previously described [25]. In brief, plasmid DNA was dissolved in a solution of 4, 5', 8-trimethylpsoralen (100 µg/ml) and exposed to UV light at 365 nm for 5 min. The DNA was digested with the appropriate restriction enzymes to excise the PATRR-containing fragments, purified, and then divided into two aliquots. One half was used for observation by AFM, and the other half was subjected to 2% agarose gel electrophoresis. To confirm that the shifted bands are the result of cruciform extrusion, the plasmid DNA was treated with 5 units of T7 endonuclease I (New England Biolabs, Beverly, MA). Digestion was performed in 20 µl of NEB2 buffer for 40 min. The reaction was performed on ice so as to minimize additional cruciform extrusion during digestion.

Statistical analyses

Intergroup comparison was performed by one-way analysis of variance, followed by the Mann-Whitney test. Correlations were evaluated with linear straight line regression. In significant difference tests, *P*-values of <0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements and Funding

The authors wish to thank Dr. Anthony L. Gotter for helpful discussion and Ms. E. Hosoba and M Suzuki for technical assistances. These studies were supported by a grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, by a grant-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare, and by a grant from Daiko Foundation (H.K.). The studies were supported by Award Number R01CA039926 from the National Cancer Institute (BSE). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Cancer Institute or the National Institutes of Health. The studies were also supported by funds from the Charles E.H. Upham Chair (B.S.E.). One of the authors was supported by JSPS Postdoctoral Fellowships for Reseach Abroad (T.K.).

Author details

¹Division of Molecular Genetics, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan. ²Division of Human

Genetics, The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA 19104 USA. ³Department of Pediatrics, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA 19104, USA.

Authors' contributions

TK - Participated in the design of the study, carried out the molecular biology work, and drafted the manuscript. HI - Participated in the design of the study, carried out the molecular biology work. MT - Participated in the design of the study, carried out the molecular biology work. HKO - Participated in the design of the study, carried out the molecular biology work. TO - Participated in the design of the study, carried out the molecular biology work. KY - Participated in the design of the study, carried out the molecular biology work. MT - Participated in the design of the study, carried out the molecular biology work. BSE - Coordinated and conceived the study, being involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content. HKU - Coordinated and conceived the study, participated in the design of the study, drafted the manuscript, being involved in the critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 11 June 2011 Accepted: 8 September 2011

Published: 8 September 2011

References

1. Wells RD: Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. *Trends Biochem Sci* 2007, **32**:271-278.
2. Mirkin SM: Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 2007, **447**:932-940.
3. Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD: Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 2005, **6**:729-742.
4. Raghavan SC, Swanson PC, Wu X, Hsieh CL, Lieber MR: A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature* 2004, **428**:88-93.
5. Raghavan SC, Chastain P, Lee JS, Hegde BG, Houston S, Langen R, Hsieh CL, Haworth IS, Lieber MR: Evidence for a triplex DNA conformation at the bcl-2 major breakpoint region of the t(14;18) translocation. *J Biol Chem* 2005, **280**:22749-22760.
6. Bacolla A, Jaworski A, Larson JE, Jakupciak JP, Chuzhanova N, Aboysinghe SS, O'Connell CD, Cooper DN, Wells RD: Breakpoints of gross deletions coincide with non-B DNA conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:14162-14167.
7. Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS: The constitutional t(11;22): implications for a novel mechanism responsible for gross chromosomal rearrangements. *Clin Genet* 2010, **78**:299-309.
8. Shaffer LG, Lupski JR: Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 2000, **34**:297-329.
9. Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, et al: Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 2001, **68**:874-883.
10. Kurahashi H, Bolor H, Kato T, Kogo H, Tsutsumi M, Inagaki H, Ohye T: Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities. *J Hum Genet* 2009, **54**:253-260.
11. Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P, Roe BA, Emanuel BS, Budarf ML: Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). *Hum Mol Genet* 2000, **9**:1665-1670.
12. Edelman L, Spiteri E, Koren K, Pulijal V, Bialer MG, Shanske A, Goldberg R, Morrow BE: AT-rich palindromes mediate the constitutional t(11;22) translocation. *Am J Hum Genet* 2001, **68**:1-13.
13. Tapia-Paez I, Kost-Alimova M, Hu P, Roe BA, Blennow E, Fedorova L, Imreh S, Dumanski JP: The position of t(11;22)(q23;q11) constitutional translocation breakpoint is conserved among its carriers. *Hum Genet* 2001, **109**:167-177.
14. Kurahashi H, Shaikh TH, Zackai EH, Celle L, Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS: Tightly clustered 11q23 and 22q11 breakpoints permit PCR-

- based detection of the recurrent constitutional t(11;22). *Am J Hum Genet* 2000, **67**:763-768.
15. Kurahashi H, Emanuel BS: Long AT-rich palindromes and the constitutional t(11;22) breakpoint. *Hum Mol Genet* 2001, **10**:2605-2617.
 16. Kehrer-Sawatzki H, Haussler J, Krone W, Bode H, Jenne DE, Mehnert KU, Tummers U, Assum G: The second case of a t(17;22) in a family with neurofibromatosis type 1: sequence analysis of the breakpoint regions. *Hum Genet* 1997, **99**:237-247.
 17. Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS: The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats. *Am J Hum Genet* 2003, **72**:733-738.
 18. Nimmakayalu MA, Gotter AL, Shaikh TH, Emanuel BS: A novel sequence-based approach to localize translocation breakpoints identifies the molecular basis of a t(4;22). *Hum Mol Genet* 2003, **12**:2817-2825.
 19. Gotter AL, Shaikh TH, Budarf ML, Rhodes CH, Emanuel BS: A palindrome-mediated mechanism distinguishes translocations involving LCR-B of chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet* 2004, **13**:103-115.
 20. Gotter AL, Nimmakayalu MA, Jalali GR, Hacker AM, Vorstman J, Conforto Duffy D, Medne L, Emanuel BS: A palindrome-driven complex rearrangement of 22q11.2 and 8q24.1 elucidated using novel technologies. *Genome Res* 2007, **17**:470-481.
 21. Sheridan MB, Kato T, Haldeman-Englert C, Jalali GR, Milunsky JM, Zou Y, Klaes R, Gimelli G, Gimelli S, Gemmill RM, et al: A palindrome-mediated recurrent translocation with 3:1 meiotic nondisjunction: the t(8;22)(q24.13;q11.21). *Am J Hum Genet* 2010, **87**:209-218.
 22. Kurahashi H, Emanuel BS: Unexpectedly high rate of de novo constitutional t(11;22) translocations in sperm from normal males. *Nat Genet* 2001, **29**:139-140.
 23. Tanaka H, Bergstrom DA, Yao MC, Tapscott SJ: Widespread and nonrandom distribution of DNA palindromes in cancer cells provides a structural platform for subsequent gene amplification. *Nat Genet* 2005, **37**:320-327.
 24. Kurahashi H, Inagaki H, Hosoba E, Kato T, Ohye T, Kogo H, Emanuel BS: Molecular cloning of a translocation breakpoint hotspot in 22q11. *Genome Res* 2007, **17**:461-469.
 25. Kurahashi H, Inagaki H, Yamada K, Ohye T, Taniguchi M, Emanuel BS, Toda T: Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. *J Biol Chem* 2004, **279**:35377-35383.
 26. Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Yamada K, Kowa H, Shaikh TH, Emanuel BS, Kurahashi H: Palindromic AT-rich repeat in the NF1 gene is hypervariable in humans and evolutionarily conserved in primates. *Hum Mutat* 2005, **26**:332-342.
 27. Kogo H, Inagaki H, Ohye T, Kato T, Emanuel BS, Kurahashi H: Cruciform extrusion propensity of human translocation-mediating palindromic AT-rich repeats. *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:1198-1208.
 28. Kato T, Inagaki H, Yamada K, Kogo H, Ohye T, Kowa H, Nagaoka K, Taniguchi M, Emanuel BS, Kurahashi H: Genetic variation affects de novo translocation frequency. *Science* 2006, **311**:971.
 29. Tong M, Kato T, Yamada K, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Wang J, Emanuel BS, Kurahashi H: Polymorphisms of the 22q11.2 breakpoint region influence the frequency of de novo constitutional t(11;22)s in sperm. *Hum Mol Genet* 2010, **19**:2630-2637.
 30. Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Kato T, Bolor H, Taniguchi M, Shaikh TH, Emanuel BS, Kurahashi H: Chromosomal instability mediated by non-B DNA: cruciform conformation and not DNA sequence is responsible for recurrent translocation in humans. *Genome Res* 2009, **19**:191-198.
 31. Lobachev KS, Gordenin DA, Resnick MA: The Mre11 complex is required for repair of hairpin-capped double-strand breaks and prevention of chromosome rearrangements. *Cell* 2002, **108**:183-193.
 32. Lemoine FJ, Degtyareva NP, Lobachev K, Petes TD: Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase a model for chromosome fragile sites. *Cell* 2005, **120**:587-598.
 33. Zhang H, Freudenreich CH: An AT-rich sequence in human common fragile site FRA16D causes fork stalling and chromosome breakage in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 2007, **27**:367-379.
 34. Cote AG, Lewis SM: Mus81-dependent double-strand DNA breaks at in vivo-generated cruciform structures in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 2008, **31**:800-812.
 35. Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Macville MV, Medne L, Zackai EH, Emanuel BS, Kurahashi H: Paternal origin of the de novo constitutional t(11;22)(q23;q11). *Eur J Hum Genet* 2010, **18**:783-787.
 36. Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Kato T, Emanuel BS: Chromosomal translocations mediated by palindromic DNA. *Cell Cycle* 2006, **5**:1297-1303.
 37. Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Kato T, Emanuel BS: Palindrome-mediated chromosomal translocations in humans. *DNA Repair (Amst)* 2006, **5**:1136-1145.
 38. Thomas NS, Morris JK, Baptista J, Ng BL, Crolla JA, Jacobs PA: De novo apparently balanced translocations in man are predominantly paternal in origin and associated with a significant increase in paternal age. *J Med Genet* 2010, **47**:112-115.
 39. Templado C, Donate A, Giraldo J, Bosch M, Estop A: Advanced age increases chromosome structural abnormalities in human spermatozoa. *Eur J Hum Genet* 2011, **19**:145-151.
 40. Kato T, Yamada K, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Emanuel BS, Kurahashi H: Age has no effect on de novo constitutional t(11;22) translocation frequency in sperm. *Fertil Steril* 2007, **88**:1446-1448.
 41. Ward WS: Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010, **16**:30-36.
 42. Kato T, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Yamada K, Emanuel BS, Kurahashi H: Two different forms of palindrome resolution in the human genome: deletion or translocation. *Hum Mol Genet* 2008, **17**:1184-1191.
 43. Kurahashi H, Inagaki H, Kato T, Hosoba E, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Bolor H, Tong M, Emanuel BS: Impaired DNA replication prompts deletions within palindromic sequences, but does not induce translocations in human cells. *Hum Mol Genet* 2009, **18**:3397-3406.
 44. Kovtun IV, McMurray CT: Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair. *Nat Genet* 2001, **27**:407-411.
 45. Laberge RM, Boissonneault G: Chromatin remodeling in spermatids: a sensitive step for the genetic integrity of the male gamete. *Arch Androl* 2005, **51**:125-133.

doi:10.1186/1755-8166-4-18

Cite this article as: Kato et al.: DNA secondary structure is influenced by genetic variation and alters susceptibility to de novo translocation. *Molecular Cytogenetics* 2011 **4**:18.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



綜 説

Emanuel 症候群の臨床像と遺伝

おお え たま え
大江 瑞恵*

くらはし ひろ き
倉橋 浩樹*

Key words

Emanuel 症候群
11/22 混合トリソミー
t(11;22)(q23;q11)
染色体転座
均衡型転座保因者

要旨 Emanuel 症候群は特異顔貌，口蓋裂，小顎症，先天性心疾患，精神運動発達遅滞を呈する先天性奇形症候群である。両親のいずれかが t(11;22) の均衡型染色体転座をもつ無症状の保因者で，その 22 番派生染色体を 47 本目の染色体として過剰にもつことが本疾患の原因である。分子遺伝学研究の進歩により，本疾患の発生頻度が予想外に高いことがわかってきた。本稿では Emanuel 症候群の臨床症状やあまり知られていない自然歴と遺伝について述べる。過剰 22 番派生染色体症候群，11/22 混合トリソミーなどとよばれていた本疾患になじみやすい名称がついたことで，医療従事者の間での疾患認知度が高まり，患者や家族へのケアが向上することが期待される。

はじめに

Emanuel 症候群は，常染色体が 1 本過剰にあることにより起因する先天異常症候群で，特異顔貌，大小の奇形，重度の発達障害を呈する。染色体核型は 47,XX または XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11) で，過剰な染色体は 11 番染色体と 22 番染色体の相互転座に由来する染色体である (図 1-a)。この症候群は 1960 年代から 1970 年代にかけて，複数の症例報告がなされている。ただ，「トリソミー 22 症候群」，「部分トリソミー 22 症候群」，「11/22 混合トリソミー」，「混合トリソミー 22 症候群」，「11/22 不均型転座」，「過剰 22 番派生染色体症候群」と染色体の状態を示すさまざまな名称でよばれていたため，臨床医にはなじみがうすい疾患であった。2004 年にカナダと米国の患者サポートグループ (Chromosome 22 Central : <http://www.c22c.org/>) の働きかけにより，この症候群に対して，本疾患の染色体レベルでの研究に大きく貢献したフィラデルフィア小児病院の

Emanuel BS 博士の名前にちなんで Emanuel 症候群として命名された (OMIN#609029)。

Emanuel 症候群は両親のいずれかが無症状の均衡型染色体転座保因者のとき，その子どもとして出生するが，近年の分子遺伝学的研究の進歩により，この転座保因者の一般集団での頻度がこれまで考えられていた以上に高いであろうことが示唆されている。そのため，本症候群は小児科医が日々の診療で遭遇する可能性が十分にある疾患と予想される。ところが，これまで疾患の認知度が低かったこともあり，その臨床経過や自然歴についてはほとんど知られていない。本稿では，Emanuel 症候群の臨床症状と自然歴，そして遺伝的な問題点について，これまでに明らかになった知見を整理してみた。

I Emanuel 症候群の臨床症状と自然歴

Emanuel 症候群の臨床症状については，1980 年代に多数の患者を解析した報告により^{1)~4)} 100 例以上の症例が報告されたが，それ以来まとまった報告が発表されていない。また，これまでの報告は低年齢の患者に関する症例がほと

* 藤田保健衛生大学総合医科学研究所分子遺伝学研究部門
〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田舎ヶ窪 1-98

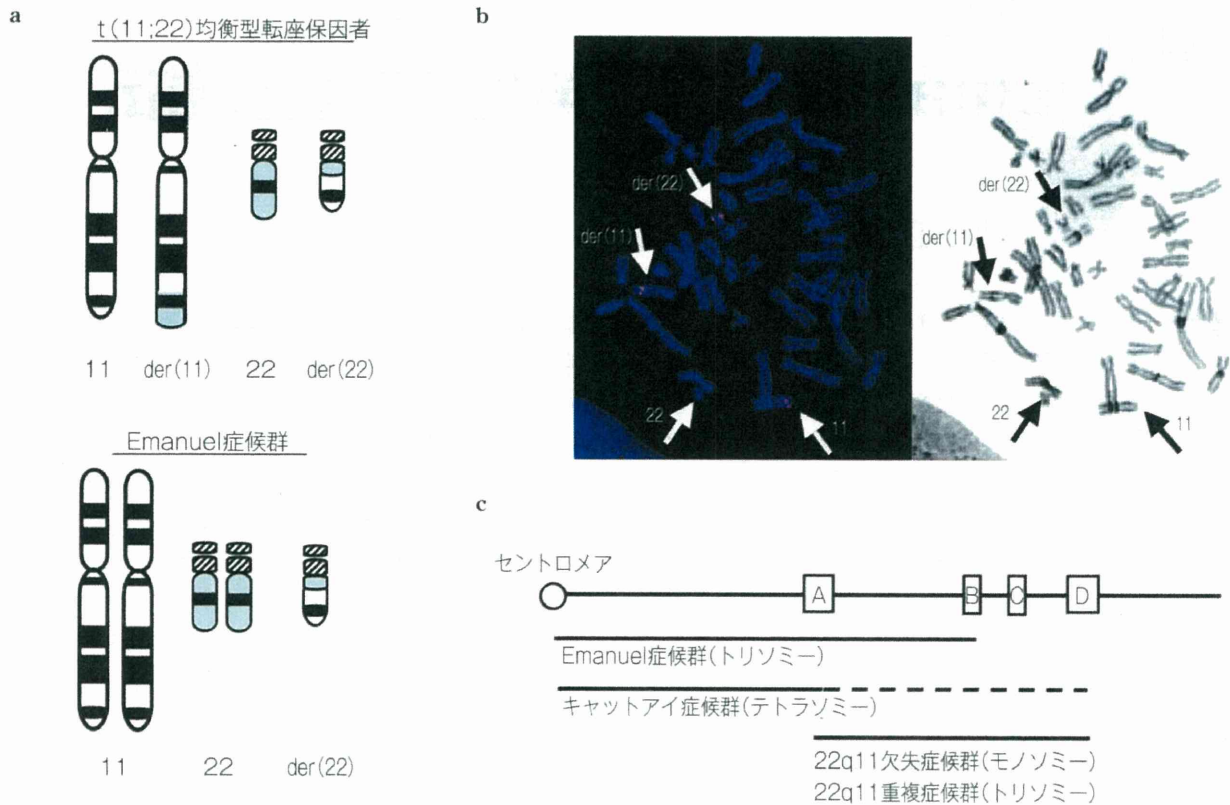


図1 Emanuel 症候群の染色体

- a : t(11;22) 転座保因者と Emanuel 症候群の 11 番染色体 (白) と 22 番染色体 (青)。Emanuel 症候群では 22 番派生染色体を 1 本過剰にもつ。der (11) は 11 番派生染色体, der (22) は 22 番派生染色体を示す。
- b : t(11;22) 転座保因者の FISH 像。赤は 11 番染色体の切断点をまたぐ BAC プローブのシグナル。右図は同じ核板のギムザ染色。
- c : 22q11 関連疾患とその責任領域。染色体を線で示し、切断点が集積する低頻度重複配列を A~D で示した。その下に 22q11 上の染色体のコピー数の増減により生じる疾患の責任領域を示した。

んどであり、患者の長期間の自然歴は不明であった。2009 年、Carter らが 33 歳に至るまでの種々の年齢層の患者に関して、その臨床的問題点や発達の経過について詳細に報告した⁵⁾。本稿ではその報告を中心に解説する。

Emanuel 症候群の児の出生体重は平均 2.7 kg でやや低い。新生児期の入院期間は多くが 1 週間以上を必要とし、筋緊張低下、哺乳困難、外科的手術、酸素療法、黄疸、けいれん、感染症のために少数ではあるが長期入院を必要とすることもある。また、人工呼吸器の装着を必要とした児も少なくない。

Emanuel 症候群のすべての患児はなんらか

の先天性疾患を有している。その中で、口蓋の異常の頻度は高く、Pierre Robin 連鎖、完全口蓋裂、軟口蓋裂などといったさまざまな異常がみられる。とくに Pierre Robin 連鎖は小下顎、舌根沈下と相まって初期の呼吸障害の大きな原因となるため、きわめて重要な臨床所見である。一方、口唇裂の報告はない。先天性心疾患は心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存が多い。まれに他の重篤な先天性心疾患を合併する場合があります。大動脈縮窄、肺動脈狭窄、総肺静脈還流異常などが報告されているが、そのほとんどが非チアノーゼ性である。横隔膜ヘルニア、横隔膜弛緩症もみられる。泌尿生殖器系では完全

表 Emanuel 症候群の患者の発達マイルストーンの達成年齢

発達マイルストーン	平均年齢 (月齢)	範囲 (月齢)	最頻値 (月齢)
顎定	8	2~28	5~8
笑う	7	2~36	2~4
補助なしで座る	20	8~36	13~24
ハイハイする*	34	20~51	20~24
補助なしで立ち上がる	71	24~150	24~48
補助ありで歩く	61	18~120	37~48
補助なしで歩く	84	41~150	97~150

* : 83%はハイハイができなかった。

(Carter M et al, 2009⁵⁾)

な先天性腎無形成からさまざまな程度の腎形成不全がみられ、男性の場合には小陰茎や停留辜丸といった性器発育不全も頻度が高い。先天性股関節脱臼、脊柱側弯、仙尾部のくぼみ、鎖肛もよくみられる。頭蓋内の病変に関しては、脳室拡大、萎縮、脳梁欠損または形成不全、白質異常、Dandy-Walker 奇形、Chiari 奇形が報告されている。

顔貌の特徴は、耳介の小孔や耳介前部の小突起などの耳介の奇形、半開きの目、窪んだ目、眼裂斜上、低く垂れた鼻柱、小顎症、一方の眼瞼下垂のための顔の非対称、広い下顎骨のために四角い顔のラインになる傾向がある。しかし、年齢とともに顔が長くなり小顎症をはじめとする特徴的な顔貌は目立たなくなる。

新生児、乳児期を過ぎると新たにさまざまな問題が生じてくる。軽度から中等度の聴力障害は多くの年長の患者でみられる。中耳炎を繰り返したり、鼓膜切開やチューブの挿入を必要とする場合が多いことから、伝音性難聴の可能性が高い。筆者らの症例でも中耳炎を経験した児の頻度は高く、知っておくべき重要な合併症と考えている。視力に関しては正常であるという文献や、近視、斜視がみられるといった報告がある。けいれんも頻度が高く、難治性のけいれんもみられ薬剤を投与される。また感染症にかかりやすく、中耳炎、肺炎、副鼻腔炎などを繰り返す。

消化器系の問題としては、摂食障害の頻度が

高く、患者の 40%は年齢相当の食事をしているが、40%は流動食、20%は胃チューブにより栄養を摂取している。歯牙萌出遅延、胃食道逆流、よだれ、便秘も頻度が高い。そのため、身長と体重の増加は同年代の児に比べて下回り、62%が成長障害と診断されている。筆者らが経験した患者でも大半が発育不良であったが、そのなかに、哺乳瓶ではミルクを飲むことができるが、スプーンを用いるといやがり、離乳食を取ることができないといった触覚防御反応の存在を想定させる患者もいた。発育障害は、胃食道逆流、嚥下障害、慢性便秘などの消化管の問題や感染症の治療により改善する。一方、2次性徴に関しては、女性患者の多くは9~18歳の間で月経が開始している。

運動発達遅延はすべての患者に共通する所見で、しかも重篤である。ほとんどの発達に関するマイルストーンは遅れ、多くの患者は1歳をすぎても立ち上がることができない。ただ、70%の患児は5歳を超えると補助があれば歩くことができ、なかには独歩ができる患者もいる(表)。

精神発達遅延もすべての患者に共通する。程度は中度から重度であり、言葉によるコミュニケーションは難しい。はじめて単語を発語するのに15カ月から8年かかり、患者の多くは身振り手振りによりコミュニケーションをとっている。Carterらは、患者は発語が難しいようだが、聞いた言葉についてはよく理解していると

感じている両親が多いといっている。衣類の脱着はほとんどの患者は独力では難しいが、なかにはチャックを閉めることができる患者もある。食事は介助が必要であるが、32%はスプーンやフォークを使うことができる。トイレの自立については、5歳以上では36%が自立できている。

就学については、海外のアンケート調査の結果ではあるが、多くが身体障害者向けのクラスや学校に通い、自宅教育、個人授業を受けている学童もいる。行動の問題では、頻度は低いが精神不安定、叫び、自傷、接触防衛反応がみられることがある。しかし、性格はいたって明るく、社会的であり、音楽を楽しみ、周囲の人と一緒にいることを好みユーモアのセンスがある。実際の生活については、患者の家族が作製したブログがいくつか公開されており、日々の生活や発達について記載されているので参照していただきたい(たくま時間：http://blogs.yahoo.co.jp/cosmos_san_san, 蕾とともに…：http://blogs.yahoo.co.jp/nohohon_mammy7)。

Emanuel 症候群の診断は、染色体検査によってなされる(図 1-b)。核型は、47,XX または XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11) であり、11 番染色体の 11q23 より遠位側(テロメア側)と 22 番染色体の 22q11 より近位側(セントロメア側)がトリソミーとなっている。この部位にある遺伝子の量的効果、おそらく過剰発現がこの症候群の本体であろうと予想される。本症候群と類似の疾患にキヤットアイ症候群(猫の目症候群)がある。キヤットアイ症候群は idic(22)(pter→q11.2::q11.2→pter) の過剰染色体をもち、22 番染色体の部分テトラソミーになっており、Emanuel 症候群と 22 番の過剰染色体部分がほとんどオーバーラップする(図 1-c)。両症候群では共通して、耳介の異常、先天性心疾患、直腸肛門奇形がみられる。実際、われわれは総肺静脈還流異常を伴う Emanuel 症候群を 1 例経験したが、総肺静脈還流異常はキヤッ

トアイ症候群で合併頻度が高いことが知られている。しかし、キヤットアイ症候群の主症状である虹彩欠損は Emanuel 症候群ではみられず、逆に、キヤットアイ症候群では精神発達遅滞は軽度かほとんどみられない。このような臨床的違いには、Emanuel 症候群の過剰染色体の 11 番染色体部分が関与していると考えられる。

Emanuel 症候群の症例報告は、ほとんどが海外からのものである。日本からもいくつか報告がされているがその数は少なく^{6)~9)}、日本人患者の臨床像の特徴はまだ不明な点が多い。筆者らは、日本での患者の臨床経過や発達状況を調べるためのアンケート調査をしており、ご協力していただける場合はホームページに詳細を記載しているので、ご覧になって是非連絡をいただきたい(<http://www.fujita-hu.ac.jp/genome/11&22>)。

II Emanuel 症候群と遺伝

Emanuel 症候群の 99% 以上はその両親のいずれかが 46,XX または XY,t(11;22)(q23;q11) の核型を示す均衡型転座保因者である。90% 以上の高率で母親が保因者である。均衡型転座保因者は無症状であるが、子どもをもうけようとする際には、一般の均衡型転座保因者と同様に、無精子症による男性不妊、習慣流産や染色体不均衡の児、すなわち、Emanuel 症候群の児の出生といった問題が発生する。

一般に、転座染色体をもつ配偶子形成過程に不都合が生じる。精子や卵子は、卵母細胞や精母細胞がいったん染色体の複製を行ったのち、2 回の減数分裂を経て染色体数が半分の配偶子として形成される。第一減数分裂の際には、両親からそれぞれ由来した相同染色体同士が対合し 2 価染色体となり、次いで、相同染色体はそれぞれ 2 つの細胞に分配される(図 2-a)。転座保因者の場合、対合を行う際に正常な染色体と転座染色体が対合することになる。つ

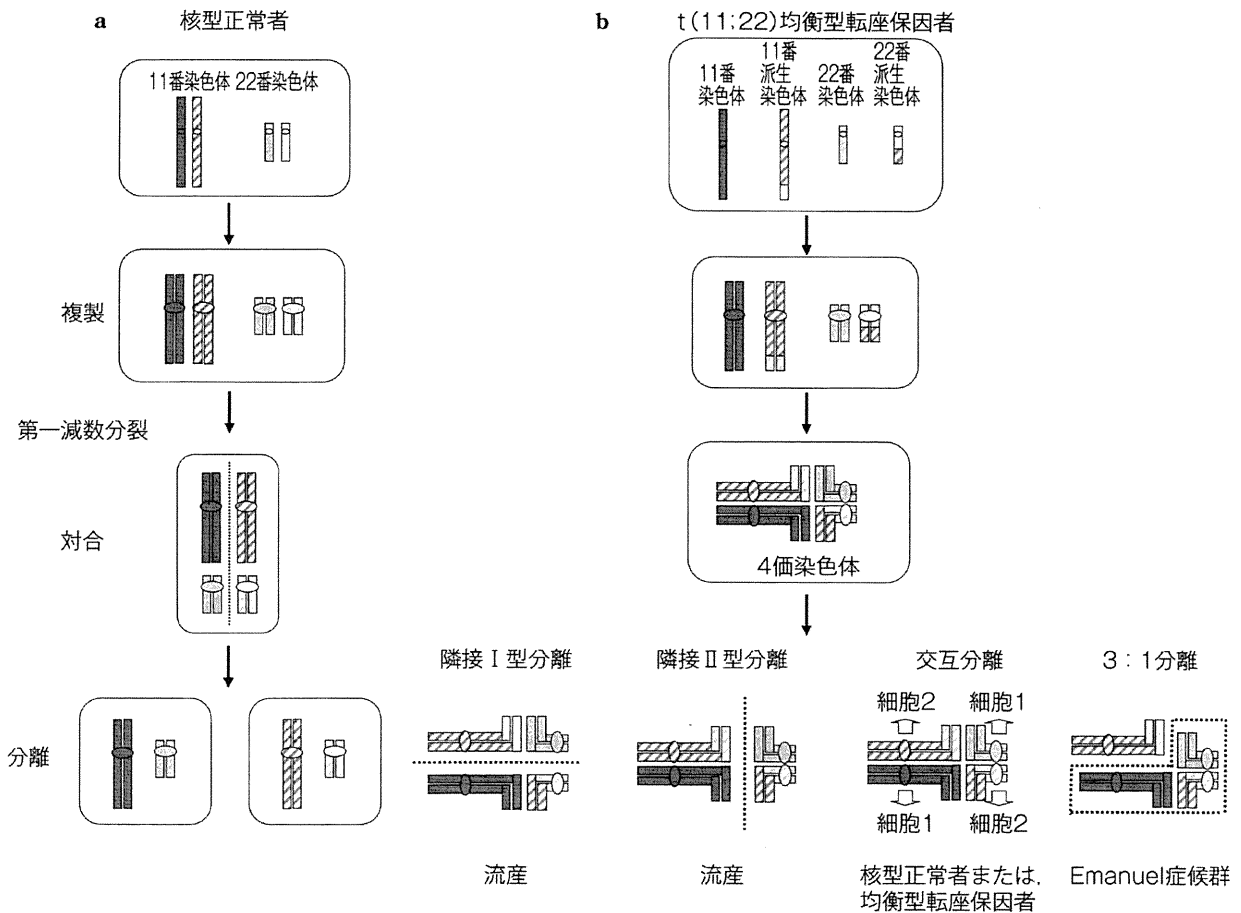


図2 第1減数分裂時の染色体の対合と分離

- a : 核型正常者の染色体の対合と分離。濃いアミは11番染色体、薄いアミは22番染色体を示す。それぞれの染色体は複製後、相同染色体間で対合が行われる。その後、相同染色体同士が2つの細胞に分配される。
- b : t(11;22) 均衡型転座保因者の染色体の対合と分離。2つの正常染色体と2つの派生染色体が4価染色体として対合する。その後、さまざまな分離方式により染色体は分配されるが、t(11;22) の場合、生児として出産されるのは、交互分離による核型正常者もしくは均衡型転座保因者または3:1分離により生じた Emanuel 症候群である。

まり、11番、22番、11番派生染色体、22番派生染色体の4つの染色体の対合により、4価染色体という特殊な対合状態となる(図2-b)。そして染色体が2つの細胞に分配される際に、隣り合った染色体同士が同じ細胞に分配された場合(隣接分離)には、部分トリソミー・部分モノソミーとなり、胎児は早期に子宮内で死亡し、流産という転帰をとる。一方、対角線の染色体同士が同じ細胞に分配された場合(交互分離)、正常染色体もしくはt(11;22) 均衡型転座をもつ健常児が出生する。そして3:1に分離

する場合もあり、そのうち22番派生染色体を多くもった場合だけが胎生期を生き延びることができ、Emanuel 症候群の児として出生する。それらの頻度については、保因者の性別によって少し異なることがわかっている。生児が Emanuel 症候群を発症するのは、女性が保因者の場合5.7~6.1%、男性が保因者の場合は2.2~5.0%であり、児が均衡型転座保因者となるのは、それぞれ55.4%、41.2%である。その他の分離に由来する転座染色体をもった胎児は出生することができず流産となるが、その頻度

は23~37%である。Emanuel 症候群の児を出産するリスクのある妊婦については、希望があれば絨毛診断か羊水検査による出生前診断が可能である。

一方が均衡型転座保因者であるカップルは、着床前診断の恩恵を受ける可能性がある。着床前診断は、顕微授精した受精卵の8細胞期胚から得た1細胞を試料として遺伝子・染色体診断を行う技術で、複数の受精卵の中から正常と診断された胚を子宮内に移植する。着床前診断は、欧米では20年近くの歴史があり、日本では2004年に重篤な遺伝性疾患に限り承認されてきたが、2006年からその適応が拡大され、習慣もしくは反復流産の既往がある均衡型転座保因者にも行うことができるようになった。それ以来、急激に着床前診断の総数が増えており、現在は、着床前診断の85%ほどが転座保因者によるケースとなっている。現在は、流産を経験した転座保因者というしほりがあるが、将来的には一般の転座保因者に適応が拡大される可能性が高い。ところが、着床前診断による生児獲得率は必ずしも高いとはいえず、妊娠が成功するのは20~30%ほどといわれている。さらに、検査の精度、倫理、経済的、児の長期的な予後などといった未解決の課題が数多く、いまだ研究段階といわざるをえない。

III Emanuel 症候群の頻度

t(11;22) 転座は、生殖細胞系列の染色体転座では、Robertson 転座以外で唯一反復してみつかる染色体転座である。核型正常の両親から新生転座保因者も発生するので、1人の創始者の転座染色体が遺伝しているのではなく、新生転座が繰り返して発生していると考えられる。筆者らは、この反復性 t(11;22) の転座切断点には特殊な配列が存在するという仮定のもとに、t(11;22) の転座切断点の解析を行った。その結果、転座切断点は両染色体ともに、数百塩基か

らなる AT 含量の高いパリンδροーム (回文) 配列, Palindromic AT-Rich Repeat (PATRR) の中に位置していた。パリンδροーム配列とは相補的な配列が隣り合って逆向きに並んでいる配列のことをいい、このような配列はある条件下で十字架型の DNA を形成する可能性があり (図 3-a), このゲノム不安定性が転座を反復して発生する原因であると考えている¹⁰⁾。

非血縁の t(11;22) 転座保因者 40 人を調べると、切断点は数塩基ずつ異なるが、すべて PATRR 内に集中している¹¹⁾。よって、すべての t(11;22) 転座は簡単な転座特異的 PCR によって検出することが可能である (図 3-b)。Emanuel 症候群や t(11;22) 均衡型転座保因者の診断は、G バンドの核型解析を行わずとも、この転座特異的 PCR によって数時間で簡便に行うことが可能である (図 3-c)。この方法は今後、出生前診断や着床前診断などに応用されてゆく可能性のある技術である。

この PCR を用いて、核型正常者の精子中での転座染色体の検出を試みたところ、 $1/10^4$ から $1/10^5$ の頻度で転座染色体が検出された¹²⁾。このことは、核型正常者の精子中で常に新生転座が発生していることを示し、前項で解説したような頻度で t(11;22) 転座染色体が淘汰されていくことを計算に入れても、日本人の中に転座保因者が 1,000~10,000 人は存在すると推定される。一方、筆者らの行ったアンケート調査の結果、現在までに同定されている t(11;22) 転座保因者の数はさほど多くはない。これらの転座保因者の多くは、子どもが Emanuel 症候群と診断されたことがきっかけで検査を受けて診断されている。すなわち、そうではない t(11;22) 転座保因者が一般集団の中に実は数多く存在し、潜在的な Emanuel 症候群の患者数も予想以上に高いであろうことを、この計算上の頻度は示していると考えている。

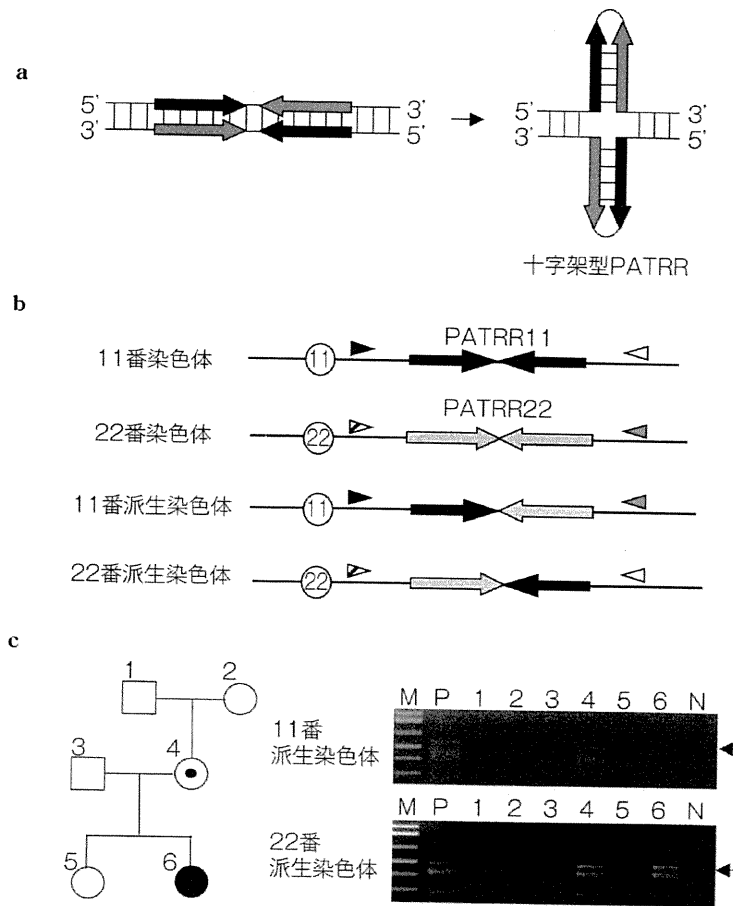


図3 t(11;22) 転座特異的 PCR (Kurahashi et al, 2000¹¹⁾より改図)

- a : 11 番, 22 番染色体の転座切断点にあるパリンドローム配列 (PATRR)。PATRR は不安定な十字架型構造をとりやすい。
- b : t(11;22) 転座特異的 PCR のプライマーの位置。11 番, 22 番染色体上の PATRR 近傍に設計したプライマー (矢頭) の組み合わせにより, 派生染色体を PCR により増幅することができる。
- c : t(11;22) 家系での転座特異的 PCR。均衡型転座保因者 (#4) では 11 番派生染色体と 22 番派生染色体, Emanuel 症候群 (#6) では 22 番派生染色体のみの PCR が陽性となる (矢印は転座産物)。
M : サイズマーカー, P : 陽性コントロール, N : 陰性コントロール

おわりに

Emanuel 症候群は 30 年前から報告されていたにもかかわらず, 疾患としての認知度の低さのために患者やその家族に十分な情報提供がされていなかったかもしれない。インターネットが普及したこの時代においても, 疾患名の不統一は致命的にその情報ソースを限定していたで

あろう。本疾患になじみのある名称がついたことをきっかけにして, これまで分散していた医療情報が一元化され, 統合的なネットワーク作りができれば, 患者やその家族によりよい医療を提供することができるだろう。そのためにはまず, この疾患を多くの医療従事者が知り, そして理解することが重要だと思われる。

協力していただいた東オンタリオ小児病院の Carter 先生, フィラデルフィア小児病院の Emanuel 博士, Chromosome 22 Central を運営されている St. Pierre 氏, そして Emanuel 症候群の患者様ならびにご家族様に深謝いたします。本稿は, 厚生労働省・難治性疾患克服研究事業の支援を受けています。

文献

- 1) Zackai EH, Emanuel BS : Site-specific reciprocal translocation, t(11 ; 22) (q23 ; q11), in several unrelated families with 3 : 1 meiotic disjunction. *Am J Med Genet* 1980 ; 7 : 507-521
- 2) Fraccaro M et al : The 11q ; 22q translocation : A European collaborative analysis of 43 cases. *Hum Genet* 1980 ; 56 : 21-51
- 3) Schinzel A et al : Incomplete trisomy 22. I. Familial 11/22 translocation with 3 : 1 meiotic disjunction. Delineation of a common clinical picture and report of nine new cases from six families. *Hum Genet* 1981 ; 56 : 249-262
- 4) Lin AE et al : Congenital heart disease in supernumerary der(22), t(11 ; 22) syndrome. *Clin Genet* 1986 ; 29 : 269-275
- 5) Carter MT et al : Phenotypic delineation of Emanuel syndrome (supernumerary derivative 22 syndrome) : Clinical features of 63 individuals. *Am J Med Genet A* 2009 ; 149A : 1712-1721
- 6) 西久保敏也ほか : der(22)t(11 ; 22) (q23 ; q11) を有する児の両親への遺伝カウンセリングの特殊性. *日本遺伝カウンセリング学会誌* 2007 ; 27 : 69-72
- 7) 今高城治ほか : SKY 法を用いて診断し遺伝カウンセリングを施行した 11/22 混合トリソミーの 1 例. *日本遺伝カウンセリング学会誌* 2004 ; 25 : 1-4
- 8) 中井博史, 山本佳史, 黒木良和 : 均衡転座染色体をもつ母及び母方祖父に由来した 22q-トリソミーの 1 症例. *先天異常* 1977 ; 17 : 430-431
- 9) Toyoshima M et al : Vertebral fusion in a patient with supernumerary-der(22)t(11 ; 22) syndrome. *Am J Med Genet A* 2009 ; 149A : 1722-1726
- 10) Kurahashi H et al : Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11 ; 22). *Hum Mol Genet* 2000 ; 9 : 1665-1670
- 11) Kurahashi H et al : Tightly clustered 11q23 and 22q11 breakpoints permit PCR-based detection of the recurrent constitutional t(11 ; 22). *Am J Hum Genet* 2000 ; 67 : 763-768
- 12) Kurahashi H, Emanuel BS : Unexpectedly high rate of de novo constitutional t(11 ; 22) translocations in sperm from normal males. *Nat Genet* 2001 ; 29 : 139-140

【症例報告】

絨毛検査で偶然見つかかり切断点の解析を必要とした 胎児 t(11;22) 新生転座

大江瑞恵¹⁾, Livija Medne²⁾, Beverly S. Emanuel²⁾, 倉橋浩樹¹⁾

Detailed analysis of translocation breakpoints helped a couple feel relieved in *de novo* t(11;22) pregnancy

Tamae Ohye¹⁾, Livija Medne²⁾, Beverly S. Emanuel²⁾, Hiroki Kurahashi¹⁾

要旨

近年、出生前染色体検査の施行件数の増加に伴い、胎児に偶然に均衡型染色体異常が同定され、表現型との関連の説明に苦慮するケースが散見される。今回、私たちが経験したイタリア人のクライアントは、胎児の染色体トリソミーの診断を目的に行った絨毛染色体検査で、偶然に新生 t(11;22) (q23;q11) 均衡型染色体転座が同定された。胎児が表現型異常を示す可能性があることを主治医から説明され、不安になったクライアントはアレイ CGH 解析を希望し、ゲノムの過不足がないことを確認したが、それでもなお不安が払拭されず、より詳細な情報を求め当科に問い合わせた。t(11;22) は頻度の高い転座で、標準的な症例の場合は切断点に遺伝子が存在せず、表現型は正常である。そこで、私たちは胎児の転座染色体の切断点を転座特異的 PCR 法により調べた結果、胎児は標準的な t(11;22) であった。クライアントの強い不安は緩和され、妊娠継続を決定し、元気な健常児を出産した。t(11;22) は核型正常男性の精子中で、約 10^4 分の1の高頻度で新生転座が発生しており、今後、このようなケースに遭遇する頻度が増加する可能性がある。その際には、この転座特異的 PCR による切断点の同定がリスク算定に有用になると思われた。

As the incidence of prenatal karyotype screening is gradually increasing, *de novo* balanced rearrangements are occasionally identified. Here we report an Italian pregnant woman carrying fetus with *de novo* t(11;22)(q23;q11), which was identified by chance in prenatal trisomy screening by chorionic villus sampling (CVS). Although the balanced carrier of t(11;22) is generally with no phenotype, the client suffered from strong anxiety. Our PCR analysis for the translocation breakpoint revealed the t(11;22) of the fetus was the standard t(11;22), which did not disrupt any genes. Then, the client was relieved, decided to continue the pregnancy, and gave birth of healthy boy. Since t(11;22) is the recurrent translocation with the *de novo* incidence of $\sim 10^4$, determination of breakpoint by PCR using CVS samples can be a rapid and helpful method for the client with strong anxiety.

キーワード：均衡型染色体転座 balanced translocation、新生 t(11;22) *de novo* t(11;22)、出生前診断 prenatal diagnosis、PCR、転座切断点 translocation breakpoint

1) 藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・分子遺伝学
Division of Molecular Genetics, Institute for Comprehensive
Medical Science, Fujita Health University,
2) Division of Human Genetics, Children's Hospital of

Philadelphia
平成22年9月21日受付
平成22年11月15日修正受付
平成22年11月22日受理

〈緒言〉

母体の高齢化に伴う羊水検査施行件数の増加により、胎児に多様な染色体異常が見つかるケースが増加している。その結果、トリソミーやモノソミー、部分欠失や重複のような染色体の数的不均衡がある場合は、胎児に何らかの表現型の異常が発生するリスクが高く、そのリスクを両親へ説明する必要がある。一方、均衡型染色体転座のような数的不均衡がないタイプの染色体構造異常が同定された場合には、表現型異常の有無に関して確定できないことが多く、遺伝カウンセリングの場で問題となる。その両親が同じ均衡型転座保因者の場合は、胎児も無症状である可能性が高いという説明が可能である。ところが、胎児の転座が新生転座の場合には、たとえ均衡型であっても、(1) 転座に伴い、切断点近傍に微小欠失や重複を伴うケースがあること、(2) 転座切断点が遺伝子内にあり、遺伝子を分断して機能を破壊している場合があることなどから、表現型に異常をきたす可能性があることを考慮しなければならない。新生均衡型転座が何らかの表現型の異常を伴う頻度は、1991年に Warburton が、バイアスの比較的少ない出生前スクリーニングのデータの統計として6.1%という値を報告し、今日までよく遺伝カウンセリングの場で用いられている¹⁾。

t(11;22)(q23;q11)は、生殖細胞系列の転座ではロバートソン型転座に次いで頻度の高い転座である。遺伝性的のものに加えて新生転座症例も散見され、ひとりの創始者から代々伝わったものではなく、繰り返し新生転座が発生していると考えられる。転座切断点は個々の症例で異なるが、共通して11番と22番染色体上に位置する数百塩基対のパリンドローム配列 (Palindromic AT-rich region; PATRR) にあり、PATRR のゲノム不安定性により繰り返し発生していると考えられている (図1A,B)²⁾。両染色体のPATRRは遺伝子内に位置しておらず、転座による遺伝子の破壊はなく、また、PATRR同士で再結合されるために均衡型染色体転座ではゲノムの過不足が生じず、保因者は無症状である^{2) 3) 4)}。このように、t(11;22) 転座は切断点が極めて狭い範囲に集積している事から、転座特異的PCRによって診断することが可能である。

本症例は、胎児のスクリーニング検査でトリソミー21の高いリスクを指摘され、絨毛による染色体検査を行ったところ、偶然、胎児に新生 t(11;22) 均衡型染色体転座が見つかったカップルで、胎児の異常のリスクを提示されて、強い不安に陥った。しかし、t(11;22) 転座特異的PCRを用いた切断点の同定により、胎児が無症状である可能性が高いことを示されたことにより妊娠継続の意志を決定したので、ここに報告するとともに、PCRによる診断の有用性を考察した。

〈症例〉

クライアント: 女性34歳、男性33歳のイタリア在住のカップル。妊娠19週。

当院連絡までの経緯: 妊娠12週時にイタリアで施行した Bi-test の結果、Nuchal Translucency 1.4mm、PAPP-A 0.220 MoM、 β -hCG 1.871 MoM で、トリソミー21のリスクは1/46と判定された。希望により絨毛採取を行い染色体核型検査が施行され、胎児のトリソミー21は否定されたが、胎児の核型は46,XY,t(11;22)(q23;q11) で、t(11;22) 均衡型染色体転座であることが判明した。主治医は、カップルの一方が t(11;22) 均衡型転座保因者であれば、その転座染色体が受け継がれたものと考えられ、胎児は両親と同様に無症状であるが、もし、胎児の t(11;22) が新生転座であれば、約5%の確率で何らかの症状を呈する可能性があるというクライアントに説明した。カップルは、染色体検査を施行し、ともに正常核型であったため、胎児の t(11;22) は新生転座であると判定された。胎児に転座に起因する何らかの異常がある可能性に対して不安となったカップルは、胎児のアレイCGH解析 (75kb) を希望し、ゲノムの過不足がない事を確認している。ところが、それでもなお不安が払拭できないクライアントは、この転座について情報を提供している当方を知り、さらなる詳細な分子遺伝学的検査を希望して、問い合わせしてきた。

〈所見・経過〉

私たちは、クライアントとの話し合いのなかで、t(11;22)(q23;q11) 均衡型転座保因者は一般に無症状であることや、アレイCGHで転座切断点を含めてゲノム全体の過不足が見つからないことから、現時点でも、胎児が無症状である可能性は高いと考えられることを説明した。しかし、クライアントは不安が払拭されず、中絶という選択肢を考慮しているようであった。ある程度の基礎的な知識を持っているクライアントは、現時点で行うことができる事として、胎児の切断点を調べて、他の無症状の t(11;22) 保因者の切断点と DNA 塩基レベルで一致すれば、さらに胎児が表現型の異常を持つリスクが軽減するという選択肢に同意した。そこで、私たちはこの胎児の絨毛サンプルを用いて、t(11;22) 転座特異的PCRによる転座切断点の DNA 塩基レベルでの解析を行った。

標準的な t(11;22) 転座切断点は、11番、22番染色体上の PATRR 内の中心付近に位置している (図1B)。PATRR 配列は数百塩基対であるために、11番染色体上の PATRR11 と 22番染色体上の PATRR22 の両端にプライマーを設計し、der(11) の結合部位を PATRR11 のセントロメア側と PATRR22 のテロメア側に設計したプライマーセットを用いてPCRにより増幅をおこなった。同様

に der(22) 側の増幅に関しては、逆側のプライマーセットを使用した (図1B) ⁵⁾。その後、PCR 産物の塩基配列を確認した。

初めに、このPCRが転座結合部位を特異的に増幅しているかどうかを確かめるために、私たちは、複数の核型正常人と標準的な t(11;22) 転座保因者の血液から抽出したDNAを用いてPCRをおこなった。その結果、核型正常人では der(11)、der(22) を示すPCR産物は検出されなかったが、保因者では両派生染色体が検出された。この事は、このPCRによる t(11;22) 転座結合部位の増幅は特異的であり、標準的な t(11;22) 転座保因者の切断点を増幅していることを示した。

次に、イタリア人クライアント家族の夫、妻の血液、胎児の絨毛から抽出したDNA各5ngを用いて、t(11;22) 転座切断点の解析を行った。その結果、夫、妻どちらも、両派生染色体に由来する産物は増幅されなかったが、胎児のDNAでは、der(11)、der(22) ともに増幅された (図1C)。この結果により、染色体検査で示されていたように、胎児の t(11;22) が新生転座であることが確認された。さらに、胎児の t(11;22) 転座は標準型の t(11;22) と同様に PATRR を介して転座が発生していることが確認され、胎児の転座は遺伝子を破壊しておらず、転座結合点での微小欠失や重複もないことが示唆された。最終的には、PCR産物のDNA塩基配列の決定により PATRR 配列内に切断点がある事を確認した。

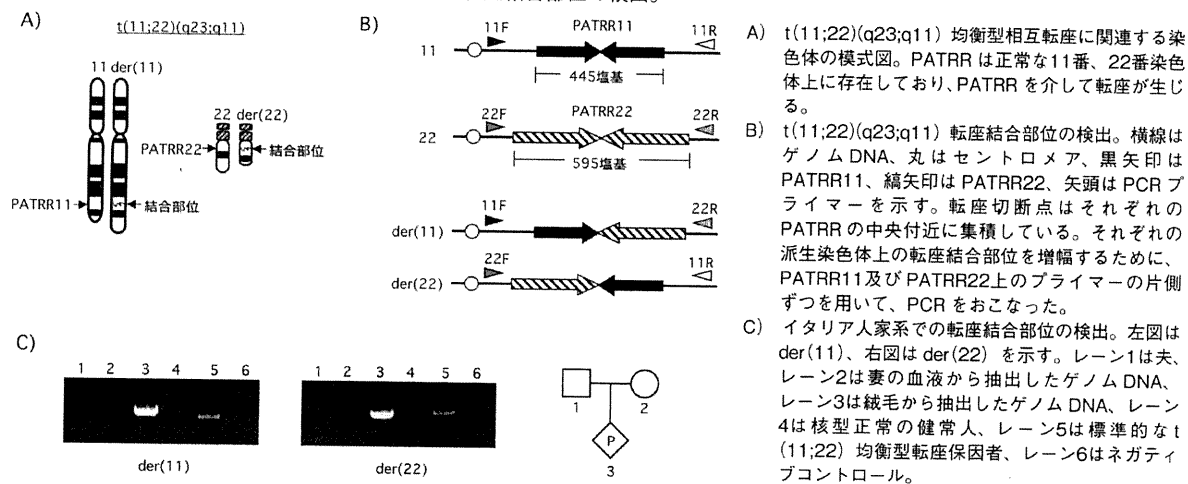
転座切断点の解析の結果、胎児の転座染色体の切断点が標準型の t(11;22) と一致したことをクライアントに伝えたところ、クライアントは妊娠継続を決定し、その後、健康な児を無事出産した。出産後、児にはさらなる検査や特別なケアの必要はなく、通常に育てるべきこと、しかし、生殖年齢に達した時または成人した際には遺伝カウンセリングが必要になることを伝えた。

〈考察〉

左合らは、本国の1998-2002年の出生前診断の動向を調査し、母体血清マーカーテストは1998年から2000年にかけては徐々に減少し、羊水染色体検査総数は横這い状態であることを報告している⁶⁾。ところが、2003-2008年の調査では、2008年に施行された羊水染色体検査総数は2002年と比較すると、31%も増加しており、羊水FISH検査においては2倍の増加、母体血清マーカーテストも2008年では漸増してきたという、近年の出生前検査数の増加を日本産科婦人科学会で発表している (佐々木ほか、学会抄録2010)。増加の理由は、母体の高齢化に生殖補助技術の進歩が相俟ったためと考えられる。これらの出生前診断は、主にトリソミー21、13、18、X、Yの染色体の数の異常についての診断を目的としているが、羊水検査数の増加に伴い、それら以外の染色体異常の検出頻度も増加することが考えられる。よって、羊水検査により1/2000の頻度で見つかった新生転座保因者の頻度も増加することが考えられる¹⁾。

Warburtonは新生均衡型転座の6.1%が先天異常を合併することを1991年に報告したが、この頻度は、現在でも遺伝カウンセリングの場においてよく使われている。近年、アレイCGHが導入され、ゲノム全領域の遺伝子の過不足が高感度に解析できるようになり、Gバンドでは判明できなかった微細な欠失や重複についても同定できるようになり、実際、均衡型転座でも微細なゲノムの過不足を伴うことが多いことがわかってきた。Gribbleらは、最低550-600バンドレベルの解析により判定された新生均衡型転座のうち、何らかの表現型異常を呈した8例についてアレイCGHとFISH解析を行った結果、2例で転座切断点近傍の欠失を検出している⁷⁾。またDe Gregoriらの報告では、同様の新生均衡型転座27例を解析し、11例にゲノムの不均衡が検出され、そのうち、7例は切断

図1. t(11;22)(q23;q11) 均衡型相互転座による転座結合部位の検出。



点やその近傍の欠失であった⁸⁾。Gバンド解析により、新生転座が均衡型転座と診断された場合でも、表現型に異常を及ぼす微細な構造変化を伴っている可能性が否定できない。また、アレイを行っても表現型の原因をつかめない例が半数以上あり^{9) 10)}、遺伝カウンセリングでは注意が必要である。

t(11;22)(q23;q11)は、頻度が高い染色体転座であるというだけでなく、繰り返し新生転座として発生しているため、出生前診断で新生転座が偶然に見つかってくる可能性の高い転座であると考えられる。t(11;22)転座保因者は一般に無症状であり、一生気がつくことなく過ごすこともあるが、リプロダクションに問題が生じ、多くの場合は習慣流産、不妊、不均衡型染色体を持つ児(エマヌエル症候群)の出生により、そのカップルの一方がt(11;22)均衡型転座保因者であることに気づく。こうした経緯の中で新生転座が見つかってくる場合もあるが、実際には多くの新生転座は本症例のように出生前診断で偶然みつける¹¹⁾。私たちは、核型健常男性の精子中でt(11;22)の新生転座の発生頻度をt(11;22)転座特異的PCRにより測定したところ、数万分の1という高い頻度で発生していることを示した¹²⁾。よって、羊水検査施行数の増加により、予期せぬ新生t(11;22)が偶然に見られる頻度も増加することが考えられる。

t(11;22)(q23;q11)のほとんどすべてのケースはPATRR11とPATRR22内に転座切断点があり、t(11;22)転座特異的PCRで診断が付き¹²⁾、PCRが陽性であるような典型例での表現型異常の出現する頻度は、染色体異常と無関係に一般頻度と同程度であると伝えることができる。実際、私たちは、出生前診断を含む10名の新生t(11;22)(q23;q11)について、転座特異的PCRによる切断点の解析を行った結果、全ての保因者の両派生染色体上の切断点は、PATRR内に位置していた¹¹⁾。しかし、以前にGバンドによりt(11;22)(q23;q11)であると確認した保因者40数名でFISHをおこなった研究によると、大多数は切断点がPATRR内に位置している典型的t(11;22)転座であり、t(11;22)転座特異的PCRが陽性であったが、1例のみは切断点が典型的t(11;22)転座とは異なる位置に同定された⁵⁾(未発表データ)。つまり、Gバンドによりt(11;22)(q23;q11)と診断された場合でも、切断点が典型的t(11;22)転座とは異なり、表現型異常をきたすケースを含んでいる可能性は否定できない。とくに、今回のケースのように不安の強いクライアントの場合は、転座特異的PCRによる切断点の解析は有用であると考えられる。

クライアントから初めに私たちに、送られてきたメールでは、“I'M REALLY VERY DESPERATE”と大文字で書かれており、中絶を考慮していたと思われる失意の中にいる状態を示していた。クライアントが12週でおこ

なったBi-Testでは、トリソミー21の可能性が2.2%(1/46)であると告げられていたが、それが、新生転座が同定されたことにより、胎児が異常を呈するリスクが5%に増加し、さらなる失意に陥っていった。加えて、児が出生するまではっきりしないリスクをかかえての妊娠が、クライアントに極度な不安を発生させたと考えられる。そして、切断点同定の結果を知らせた後は、“I hope my pregnancy will be more peaceful and quiet from now on.”というように、初めの文面とは正反対の安堵の文章が綴られていた。出生前の絨毛や羊水染色体検査によってトリソミーなどの染色体の数的異常が同定された場合は、多くのエビデンスに基づいた遺伝カウンセリングが可能であるが、新生転座が同定された場合は、漠然としたリスクの数字を提示できるだけで、それ以上のオプションがほとんどないのが現状である。前述のようにアレイCGH解析は、さらなる情報源としての有用性に疑いはないが、現時点では、同定された欠失や重複が表現型に影響するかどうか不明な場合が多く、出生前遺伝カウンセリングに応用できるケースは限られると思われ、今後のデータの蓄積が不可欠である。しかし、今回のクライアントのように不安の強いクライアントが、安定した妊娠期間を過ごすために、何らかの付加的検査を提示していくことは、遺伝カウンセリングをおこなっていくうえで有用であると考えられる。

t(11;22)(q23;q11)均衡型染色体転座の場合は、新生転座であっても転座に起因する異常はないと考えられるが、出生前検査で胎児にみつかった場合の両親の動揺は大きい。十分なカウンセリングを行い、それでもなお、不安が払拭できないクライアントには、転座特異的PCRによる切断点の解析は有用になると考えられる。

新生転座症例とその両親のゲノム解析は、藤田保健衛生大学 ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会(No.60、平成20年3月25日承認)の承認を得ておこなった。

〈謝辞〉

本研究は、科学研究費補助金(基盤研究B、基盤研究C)と厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)の支援を受けて行った。

文献

- 1) Warburton D: De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet*, 49: 995-1013, 1991
- 2) Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P. et al: Regions of

- genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). *Hum Mol Genet*, 9: 1665-1670, 2000
- 3) Kurahashi H, Emanuel BS: Long AT-rich palindromes and the constitutional t(11;22) breakpoint. *Hum Mol Genet*, 10: 2605-2617, 2001
 - 4) 大江瑞恵, 倉橋浩樹: エマヌエル症候群の臨床像と遺伝. *小児科*, 51: 443-450, 2010
 - 5) Kurahashi H, Shaikh TH, Zackai EH et al: Tightly clustered 11q23 and 22q11 breakpoints permit PCR-based detection of the recurrent constitutional t(11;22). *Am J Hum Genet*, 67: 763-768, 2000
 - 6) 左合治彦, 鈴木薫, 上原茂樹 他: わが国における出生前診断の動向 (1998~2002). *日本周産期・新生児医学会雑誌*, 41: 561-564, 2005
 - 7) Gribble SM, Prigmore E, Burford DC et al: The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet*, 42: 8-16, 2005
 - 8) De Gregori M, Ciccone R, Magini P et al: Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet*, 44: 750-762, 2007
 - 9) Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M et al: Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. *Mol Cytogenet*, 1:15, 2008
 - 10) Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D et al: Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet*, 52:291-296, 2009
 - 11) Ohye T, Inagaki H, Kogo H et al: Paternal origin of the de novo constitutional t(11;22) (q23;q11). *Eur J Hum Genet*, 18:783-787, 2010
 - 12) Kurahashi H, Emanuel BS: Unexpectedly high rate of de novo constitutional t(11;22) translocations in sperm from normal males. *Nat Genet*, 29:139-140, 2001

