

Table 3 Sixty-three cases with CNV in the 2nd screening

Case	Gender	Clinical diagnosis	Remarkable clinical features	CNV Position	WGA-4500 ^b	FISH ^b	Base position and size of the identified CNV ^a					Protein- CNV		Corresponding gene(s)		
							Start (max)	Start (min)	End (min)	End (max)	Size (min)	Size (max)	Parental coding analysis		assess- or candidate ment ^d	
1	M	MCA/MR		del 1p36.23p36.22	arr cgh 1p36.23p36.22 (RP11-81J7→RP11-199O1)x1	ish del(1)(p36.23p36.22) (RP11-462M3+, RP11-106A3-, RP11-28P4+)dn	8 585 127	8 890 860	10 561 097	11 143 717	1 670 237	2 558 590	dn	32	P	
2	M	MCA/MR		del 1q41q42.11	arr cgh 1q41 (RP11-135J2→RP11-239E10)x1	ish del(1)(q41q42.11) (RP11-706L9+, RP11-224O19-, RP11-367O4-)dn	215 986 492	216 532 600	221 534 398	222 467 931	5 001 798	6 481 439	dn	35	P	
3	F	MCA/MR	Epilepsy	del 1q44	arr cgh 1q44 (RP11-156E8)x1	ish del(1)(q44) (RP11-56O19+, RP11-156E8-)	241 996 973	243 177 632	243 251 660	244 141 010	74 028	2 144 037		11	P	
4	F	MCA/MR		del 2q22	arr cgh 2q23.1 (RP11-72H23)x1	ish del(2)(q23.1) (RP11-375H16-)	147 651 472	147 688 255	149 855 826	149 879 891	2 167 571	2 228 419		7	P	
5	F	MCA/MR		del 14q12q13.2	arr cgh 14q12q13.2 (RP11-369O9→RP11-26M6)x1	ish del(14)(q13.2) (RP11-831F6-)	28 768 137	29 297 829	34 689 412	35 489 337	5 391 583	6 721 200		25	P	
6	M	MCA/MR	CHD	del 15q26.2	arr cgh 15q26.2q26.3 (RP11-79C10→RP11-80F4)x1	ish del(15)(q26.2) (RP11-308P12-)	93 199 415	93 214 053	96 928 421	96 942 334	3 714 368	3 742 919		6	P	
7	M	MCA/MR	CHD	del 16p12.1p11.2	arr cgh 16p12.1p11.2 (RP11-309I14→RP11-150K5)x1	ish del(16)(p11.2) (RP11-75J11-)dn	25 795 340	27 008 538	29 825 404	31 443 492	2 816 866	5 648 152	dn	138	P	
8	M	MCA/MR	CHD	del 16p11.2	arr cgh 16p12.1p11.2 (RP11-360L15→RP11-150K5)x1	ish del(16)(p11.2) (RP11-360L15-, RP11-388M20+, RP11-75J11+)dn	27 184 508	28 873 631	29 825 404	31 443 492	951 773	4 258 984	dn	134	P	
9	F	MCA/MR		del 16p11.2	arr cgh 16p11.2 (RP11-368N21→RP11-499D5)x1	ish del(16)(p11.2) (RP11-388M20-, RP11-75J11-)	28 873 841	29 408 698	32 773 200	34 476 095	3 364 502	5 602 254		125	P	
10	M	MCA/MR		del 7p14.2p13	arr cgh 7p14.2p13 (RP11-138E20→RP11-52M17)x1	ish del(7)(p14.1p13) (RP11-258I11+, RP11-2J17-, RP11-346F12-)dn	35 621 006	36 470 190	44 657 334	45 508 196	8 187 144	9 887 190	dn	70	P	GLI3
11	F	MCA/MR	Corneal opacity	del 14q22.1q22.3	arr cgh 14q22.1q22.3 (RP11-122A4→RP11-172G1)x1	ish del(14)(q22.1) (RP11-122A4-, RP11-316L15+)dn	51 964 774	51 983 834	54 730 496	55 054 754	2 746 662	3 089 980	dn	18	P	BMP4
12	M	MCA/MR	Idiopathic leukodystrophy	del 17q13.3	arr cgh 17p13.3 (RP11-294J5→RP11-357O7)x1	ish del(17)(p13.3) (RP11-4F24-, RP11-26N6+)dn	1 008 128	1 146 211	2 077 151	2 026 967	930 940	1 018 839	dn	22	P	YWHAE
13	M	MCA/MR		del Xp11.4p11.3	arr cgh Xp11.3p11.4 (RP11-1069J5→RP11-245M24)x1	ish del(X)(p11.4p11.3) (RP11-95C16-, RP11-829C10-)dn	41 392 291	41 385 453	45 419 624	45 495 709	4 034 171	4 103 418	dn	9	P	CASK

Table 3 Continued

Case	Gender	Clinical diagnosis	Remarkable clinical features	CNV Position	WGA-4500 ^b	FISH ^b	Base position and size of the identified CNV ^a						Protein- CNV		Corresponding
							Start (max)	Start (min)	End (min)	End (max)	Size (min)	Size (max)	Parental coding analysis	genes ^c assess- or candidate ^d	
14	M	MCA/MR		del 6q12q14.1	arr cgh 6q12q14.2(RP11-502L6→ RP11-232L4)x1	ish del(6)(q13) (RP11-28P18-)dn	69029871	69731888	83926178	85101718	14194290	16071847	dn	56	P
15	M	ZLS		del 6q14.1	arr cgh 6q14.1 (RP11-343P23→ RP11-217L13)x1	ish del(6)(q14.1) (RP11-5N7-,RP11-990K4-,RP11-116+)	75484004	76145436	79474428	79851528	3328992	4367524		10	P
16	F	MCA/MR	CHD	del 10p12.1p11.23	arr cgh 10p12.1p11.23 (RP11-89D1→ 91A23)x1	ish del(10) (p12.1p11.23) (RP11-164A7-, RP11-110B21-)	27045285	27054002	29057401	29088950	2003399	2043665		18	P
17	M	MCA/MR		del 10p12.1p11.23	arr cgh 10p12.1p11.23 (RP11-218D6→ RP11-RP11-181111)x1	ish del(10)(p11.23) (RP11-15H10-)	28121596	28131608	30559024	30577807	2427416	2456211		12	P
18	M	MCA/MR	CHD	del 10q24.31q25.1	arr cgh 10q24.31q25.1 (RP11-108L7→ RP11-108L7)x1	ish del(10)(q24.33) (RP11-416N2-)dn	102560783	102568462	105914057	105929608	3345595	3368825	dn	66	P
19	M	MCA/MR		del 10q24.32q25.1	arr cgh 10q24.32q25.1 (RP11-21N23→ RP11-99N20)x1	ish del(10)(q24.33) (RP11-416N2-)dn	103917900	103928189	106005827	106011522	2077638	2093622	dn	41	P
20	F	MCA/MR		del 3p21.31p21.2	arr cgh 3p21.31p21.2 (RP11-24F11→ RP11-89F17)x1	ish del(3)(p21.31) (RP11-3B7-)	46150261	46359965	51390597	52571544	5030632	6421283		175	P
21	M	MCA/MR		del 7p22.1	arr cgh 7p22.1 (RP11-90J23→ RP11-2K20)x1	ish del(7)(p22.1) (RP11-2K20-)dn	3185609	5892225	6233987	6409277	341762	3223668	dn	28	P
22	F	MCA/MR	Corneal opacity, CHD	dup 14q11.2	arr cgh 14q11.2 (RP11-152G22→ RP11-84D12)x3	ish dup(14)(q11.2) (RP11-152G22++)	20070731	20306624	20534929	21264945	228305	1194214		>30	P
23	M	MCA/MR		del 17q24.1q24.2	arr cgh 17q24.1q24.2 (RP11-89L7→ RP11-79K13)x1	ish del(17) (q24.1q24.2) (RP11-93E5-, RP11-89L7-, RP11-79K13-)	60576365	60936391	64592701	64587782	3656310	4011417		29	P
24	M	SMS susp.		del 19p13.2	arr cgh 19p13.2 (RP11-19704→ RP11-164D24)x1	ish del(19)(p13.2) (91021-)	9248377	10248853	11968772	12553279	1719919	3304902	dn		P
25	M	MCA/MR	Epilepsy	dup 2q11.2q13	arr cgh 2q11.2q13 (RP11-90G13→ RP11-79K7)x3	ish dup(2)(q11.2) (RP11-542D13++)	88273220	91696986	109869691	112714666	18172705	24441446		>30	P
26	M	MCA/MR	CHD	dup 4p16.1	arr cgh 4p16.1 (RP11-17I9)x3	ish dup(4)(p16.1) (RP11-30I110++)	8202790	8520479	9793705	10638054	1273226	2435264		17	P

Table 3 Continued

Case	Gender	Clinical diagnosis	Remarkable clinical features	CNV Position	WGA-4500 ^b	FISH ^b	Base position and size of the identified CNV ^a					Protein- CNV		Corresponding gene(s)		
							Start (max)	Start (min)	End (min)	End (max)	Size (min)	Size (max)	Parental coding analysis		assess- or candidate genes ^c ment ^d	
27	F	MCA/MR		del 7q22.1q22.2	arr cgh 7q22.1q22.2 (RP11-10D8→RP11-72J24)x1	ish del(7)(q22.1q22.2) (RP11-124G15+,RP11-188E1-,RP11-95P19-)	97 314 215	98 261 079	105 604 920	106 451 506	7 343 841	9 137 291	135	P		
28	F	MCA/MR	Epilepsy	del 12q13.13	arr cgh 12q13.13 (RP11-74I8→RP11-624J6)x1	ish del(12)(q13.13) (RP11-624J6-)	50 987 232	51 016 427	51 956 291	52 180 088	939 864	1 192 856	44	P		
29	M	MCA/MR		dup 16q22.3	arr cgh 16q22.3 (RP11-90L19→RP11-89K4)x3	ish dup(16)(q22.3) (RP11-115E3++,RP11-90L19++)	70 355 260	70 848 592	72 328 913	73 785 124	1 480 321	3 429 864	25	P		
30	M	RTS susp.		dup 16q24.1	arr cgh 16q24.1 (RP11-140K16→RP11-442O1)x3	ish dup(16)(q24.1) (RP11-770B4++,RP11-140K16++)	82 699 729	82 797 548	83 749 375	84 123 857	951 827	1 424 128	16	P		
31	M	MCA/MR	Epilepsy	del 2q24.2q24.3	arr cgh 2q24.2 (RP11-89L13→RP11-79L13)x1	ish del(2)(q24.2) (RP11-638N12-)	160 407 234	161 072 815	162 883 584	166 923 475	1 810 769	6 516 241	28	P	TBR1	
32	M	MCA/MR		del 3p26.2	arr cgh 3p26.2 (RP11-32F23)x1	ish del(3)(p26.2) (RP11-32F23-)	3 943 353	4 016 797	4 198 468	4 329 970	1 816 71	3 866 17	2	P	SUMF1	
33	M	MCA/MR	IgA deficiency	del 7q21.11	arr cgh 7q21.11 (RP11-22M18)x1	ish del(7)(q21.11) (RP11-115M2+,RP11-353O4-,RP11-22M18-)	83 597 839	83 601 541	84 549 609	84 788 160	948 068	1 190 321	3	P	SEMA3A	
34	M	MCA/MR		dup 14q32.2	arr cgh 14q32.2 (RP11-128L1)x3	ish dup(14)(q32.2) (RP11-177F8++)	99 330 486	99 337 358	99 841 558	99 845 472	504 200	514 986	7	P	EML1, YY1	
35	M	MCA/MR	Epilepsy	dup 16p13.3	arr cgh 16p13.3 (RP11-349I11)x3	ish dup(16)(p13.3) (RP11-349I11++)	4 851 459	5 678 447	5 906 909	6 165 923	228 462	1 314 464	9	P	A2BP1	
36	M	MCA/MR		dup Xp22.2p22.13	arr cgh Xp22.2p22.13 (RP11-2K15→RP11-115I10)x3	not performed (X-tiling array)	16 874 735	16 952 121	17 596 600	17 638 351	644 479	763 616	2	P		
				dup Xp21.3	arr cgh Xp21.3 (RP11-438J7)x3	not performed (X-tiling array)	28 704 076	28 704 076	28 868 075	28 868 075	163 999	163 999	1	P	IL1RAPL1	
37	F	MCA/MR		del 1p34.3	arr cgh 1p34.3 (RP11-89N10→RP11-416A14)x1	ish del(1)(p34.2) (RP11-195A8+,RP11-166F21-)dn	37 830 131	38 338 265	39 466 349	39 583 645	1 128 084	1 753 514	dn	7	P	
38	M	MCA/MR	Hyper IgE	dup 1q25.2	arr cgh 1q25.2 (RP11-177A2→RP11-152A16)x3	ish dup(1)(1q25.2) (RP11-177A2++,RP11-152A16++)	177 088 480	177 196 858	177 535 659	177 859 828	338 801	771 348	dn	9	P	
39	M	MCA/MR		del 2p24.1p23.3	arr cgh 2p24.1p23.3 (RP11-80H16→RP11-88F6)x1	ish del(2)(p23.3) (RP11-88F6-,RP11-373D23+)dn	20 037 821	23 094 244	26 815 794	28 414 457	3 721 550	8 376 636	dn	86	P	
40	F	MCA/MR	CHD	del 3p26.1p25.3	arr cgh 3p26.1p25.3 (RP11-128A5→RP11-402P11)x1	ish del(3)(p26.1p25.3) (RP11-936E1-,RP11-402P11-,RP11-1079H21+) dn	8 190 557	8 497 949	9 930 973	10 026 217	1 433 024	1 835 660	dn	18	P	

Table 3 Continued

Case	Gender	Clinical diagnosis	Remarkable clinical features	CNV Position	WGA-4500 ^b	FISH ^b	Base position and size of the identified CNV ^a						Protein- CNV		Corresponding gene(s)
							Start (max)	Start (min)	End (min)	End (max)	Size (min)	Size (max)	Parental coding analysis	assess- or candidate genes ^c ment ^d	
41	M	MCA/MR		del 3p22.1p21.31	arr cgh 3p22.1p21.31 (RP11-241P3→ RP11-88B8)x1	ish del(3)(p22.1) (RP11-61H16+, RP11-241P3-, RP11-78010+)dn	41 365 663	42 284 365	48 177 538	49 198 542	5 893 173	7 832 879	dn	123	P
42	M	MCA/MR	Corneal opacity	del 3p14.3p14.2	arr cgh 3p14.3p14.2 (RP11-80H18→ RP11-79J9)x1	ish del(3)(p14.2) (RP11-79J19-, RP11-230A22+)mat	57 370 434	58 149 199	58 742 633	58 887 574	5 934 34	1 517 140	mat	11	B
				del 8q21.11q21.13	arr cgh 8q21.11q21.13 (RP11-225J6→ RP11-214E11)x1	ish del(8) (q21.11q21.13) (RP11-225J6-, RP11-48B3+)dn	75 722 961	75 821 163	81 110 557	81 493 446	5 289 394	5 770 485	dn	12	P
43	M	MCA/MR		del 3q26.31q26.33	arr cgh 3q26.31-q26.33 (RP11-292L5→ RP11-355N16)x1	ish del(3)(q26.32) (RP11-300L9+, RP11-105L6-)dn	175 650 310	176 531 688	180 613 203	181 653 281	4 081 515	6 002 971	dn	12	P
44	M	MCA/MR	CHD	del 13q13.2q13.3	arr cgh 13q13.2 (RP11-269G10→ 90F5)x1	ish del(13)(q13.2) (RP11-142E9+, RP11-381E21-, RP11-98D3+)dn	33 451 136	33 895 560	34 813 379	34 909 905	9 178 19	14 587 69	dn	1	P
				del 22q11.21	arr cgh 22q11.21 (RP11-155F20→ 54C2)x1	ish del(22)(q11.21) (RP11-155F20-, RP11-590C5-, RP11-54C2-)pat	19 310 307	19 310 307	19 590 642	19 590 642	280 335	280 335	pat	15	B
45	F	aRS		del 18q21.2	arr cgh 18q21.2 (RP11-89B14)x1	ish del(18)(q21.2) (RP11-159D14+, RP11-186B13-, RP11-111C17-)dn	48 218 621	49 166 752	51 288 665	51 861 143	2 121 913	3 642 522	dn	9	P
46	M	MCA/MR		dup 19p13.3	arr cgh 19p13.3 (RP11-49M3→ RP11-268O21)x3		1 095 485	2 418 857	3 499 581	4 460 252	10 807 24	3 364 767	dn	113	P
47	F	MCA/MR	Autism	del 19p13.3	arr cgh 19p13.3 (RP11-30F17→ RP11-330I7)x1	ish del(19)(p13.3) (RP11-330I7-)dn	4 844 383	6 043 505	6 859 584	6 881 792	8 160 79	2 037 409	dn	23	P
48	M	MCA/MR		del Xp11.3	arr cgh Xp11.3 (RP11-151G3→ RP11-48J14)x0	ish del(X)(p11.3) (RP11-203D16-)mat	44 403 077	44 433 162	46 795 584	46 795 588	2 362 422	2 392 511	mat	18	P
49	M	MCA/MR		dup 3p26.3	arr cgh 3p26.3 (RP11-630I)x3	ish dup(3)(p26.3) (RP11-630I++)pat	2 377 366	2 443 357	2 619 407	2 628 216	176 050	250 850	pat	1	B
50	M	MCA/MR		dup 5p14.3	arr cgh 5p14.3 (RP11-91A5)x3	ish dup(5)(p14.3) (RP11-91A5++)pat	19 046 234	19 485 530	19 656 108	20 798 445	170 578	1 752 211	pat	1	B
51	M	MCA/MR		dup 5q13.3	arr cgh 5q13.1 (RP11-40N8→ RP11-91C10)x3	ish dup(5)(q13.1) (RP11-105A11++)mat	66 417 271	66 481 371	67 501 700	67 838 977	1 020 329	1 421 706	mat	3	B

Table 3 Continued

Case	Gender	Clinical diagnosis	Remarkable clinical features	CNV Position	WGA-4500 ^b	FISH ^b	Base position and size of the identified CNV ^a						Protein- CNV		Corresponding gene(s)
							Start (max)	Start (min)	End (min)	End (max)	Size (min)	Size (max)	Parental coding analysis	assess- or candidate ^d	
52	M	MCA/MR		dup 7p22.3	arr cgh 7p22.3 (RP11-23D23)x3	ish dup(7)(p22.3) (RP11-23D23++, RP11-1133D5+)mat	1	954 016	954 584	1 101 944	568	1 101 943	mat	12	B
53	F	MCA/MR		dup 8p23.2	arr cgh 8p23.2 (RP11-79I19→ RP11-89I12)x3	ish dup(8)(p23.2) (RP11-89I19++, RP11-89I12++)pat	3 324 954	3 726 061	4 564 671	5 973 493	838 610	2 648 539	pat	1	B
54	M	MCA/MR		dup 9q33.1	arr cgh 9q33.1 (RP11-150L1)x3	ish dup(9)(q33.1) (RP11-150L1++)pat	118 980 752	119 452 372	119 614 984	120 011 559	162 612	1 030 807	pat	2	B
55	F	MCA/MR		dup 10q22.3	arr cgh 10q22.3 (RP11-79M9)x3	ish dup(10)(q22.3) (RP11-79M9++)mat	77 356 915	77 718 484	77 873 148	78 230 039	154 664	873 124	mat	1	B
56	M	MCA/MR	ELBW, hepato-blastoma	dup 12q21.31	arr cgh 12q21.31 (RP11-91C4)x3	ish dup(12)(q21.31) (RP11-91C4++, RP11-142L2+)pat	80 924 954	82 678 148	82 830 190	85 768 388	152 042	4 843 434	pat	3	B
57	M	GS		del Xp11.23	arr cgh Xp11.23 (RP11-876B24) x0 mat	not performed (X-tiling array)	47 752 808	47 747 918	47 852 109	47 868 412	104 191	115 604	mat	3	B
58	M	MCA/MR		dup 8q11.23	arr cgh 8q11.23 (RP11-221P7)x3	ish dup(8)(q11.23) (RP11-221P7++, RP11-26P22++)	53 665 974	53 717 675	54 235 229	54 576 654	517 554	910 680		3	VOUS
59	F	MCA/MR	Micro-cephaly	dup 10q11.21	arr cgh 10q11.21 (RP11-178A10)x3	ish dup(10)(q11.21) (RP11-178A10++)	41 986 946	42 197 693	42 320 775	43 603 027	123 082	1 616 081		15	VOUS
60	M	MCA/MR		dup 11p14.2p14.1	arr cgh 11p14.2p14.1 (RP11-1L12)x3	ish dup(11) (p14.2p14.1) (RP11-1L12++)	26 723 462	27 033 270	27 213 374	27 445 504	180 104	722 042		4	VOUS
61	F	MCA/MR		dup 12p11.1	arr cgh 12p11.1 (RP11-88P4)x3	ish dup(12)(p11.1) (RP11-472A10++)	33 333 493	33 359 944	33 572 956	33 572 956	213 012	239 463		2	VOUS
62	F	aRS		dup 12q21.31	arr cgh 12q21.31 (RP11-91I24→ RP11-91C4)x3	ish dup(12)(q21.31) (RP11-91C4++, RP11-142L2++)	79 949 648	82 172 368	83 968 319	85 768 388	1 795 951	5 818 740		12	VOUS
63	F	MR	Congenital myopathy	dup Xq12	arr cgh Xq12 (RP11-90P17→ RP11-383C12)x3	Not performed (X-tiling array)	66 212 661	66 216 353	66 921 699	66 948 538	705 346	735 877		1	VOUS

Abbreviations: aRS, atypical Rett syndrome; B, benign; CNV, copy-number variant; *dn*: *de novo* CNV observed in neither of the parents; ELBW, extremely low birth weight; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; GS, Gillespie syndrome; *mat*: CNV identified also in mother; P, pathogenic; *pat*: CNV identified also in father; RTS, Rubinstein-Taybi syndrome; SMS, Smith-Magenis syndrome; VOUS, variant of uncertain clinical significance; ZLS, Zimmermann-Laband syndrome.

^aThe sizes were estimated by WGA-4500, X-array, FISH or Agilent Human Genome CGH microarray 244K.

^bThe notation systems is based on ISCN2005.³⁶

^cThe number of protein-coding genes contained in the respective CNVs.

^dThe result of CNV assessment.

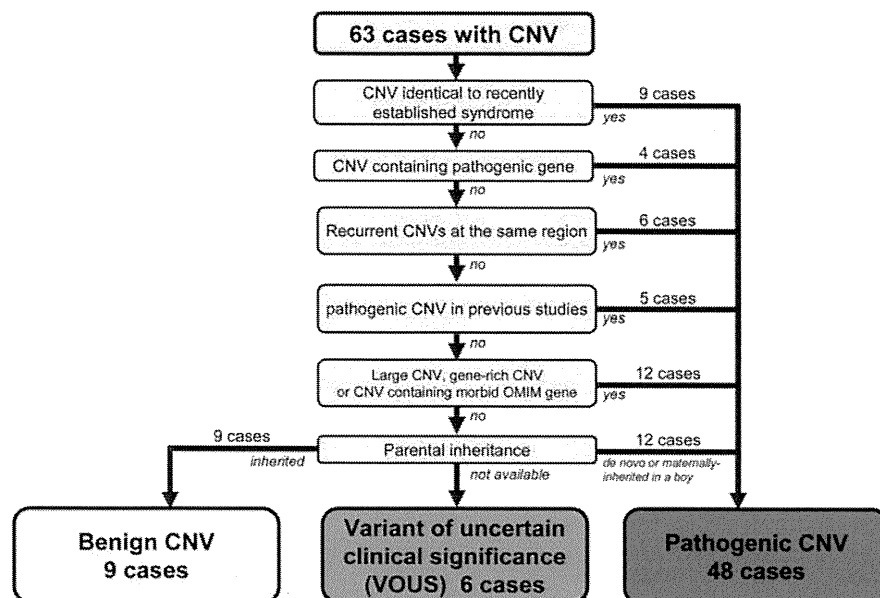


Figure 2 A flowchart of the assessment of CNVs detected in the second screening.

from several aspects. A CNV that contains abundant genes or is large (> 3 Mb) has a high possibility to be pathogenic.²¹ The CNVs in cases 25–30 probably correspond to such CNVs. Also, we judged a CNV containing a morbid OMIM gene as pathogenic.²¹ *TBR1* (OMIM: *604616) in case 31,⁵⁶ *SUMF1* (OMIM: *607939) in case 32,^{57,58} *SEMA3A* (OMIM: *603961) in case 33,⁵⁹ *EML1* (OMIM: *602033) and/or *YY1* (OMIM: *600013) in case 34,^{60,61} *A2BP1* (OMIM: *605104) in case 35⁶² and *ILIRAP1* (OMIM: *300206) in case 36.⁶³ Several previous reports suggest that these genes are likely to be pathogenic, although at present no evidence of a direct association between these genes and phenotypes exists.

CNVs de novo or X maternally inherited. Among the remaining 27 cases, 12 cases had CNVs considered pathogenic as their CNVs were *de novo* (cases 37–47) or inherited del(X)(p11.3) from the mother (case 48). In the second screening we performed FISH for 36 CNVs of the 34 cases whose parental samples were available to confirm that 24 cases had *de novo* CNVs, which were probably pathogenic. A CNV in case 48, a boy with a nullizygous deletion at Xp11.3 inherited from his mother, was also probably relevant to his phenotype (Tables 3 and 4). Meanwhile, although case 57 was a boy with a deletion at Xp11.23 inherited from his mother, he was clinically diagnosed with Gillespie syndrome (OMIM: #206700) that was reported to show an autosomal dominant or recessive pattern,⁶⁴ thus we judged that the deletion was not relevant to his phenotype. As a result, cases 49–57 had only CNVs inherited from one of their parents which are likely to be unrelated to the phenotypes; that is, bCNV (Table 4).

As a result, we estimated that 48 cases among 349 analyzed (13.8%) had pCNV(s) in the second screening (Table 3; Figure 2). The CNVs of the remaining six cases, cases 58–63, were not associated with previously reported pathogenicity and their inheritance could not be evaluated, thus we estimated they were variants of uncertain clinical significance (VOUS).³⁸

DISCUSSION

Because aCGH is a high-throughput technique to detect CNVs rapidly and comprehensively, this technique has been commonly used for

analyses of patients with MCA and/or MR.^{38,65–68} However, recent studies of human genomic variation have uncovered surprising properties of CNV, which covers 3.5–12% of the human genome even in healthy populations.^{18–20,69} Thus analyses of patients with uncertain clinical phenotypes need to assess whether the CNV is pathogenic or unrelated to phenotypes.²¹ However, such an assessment may diminish the rapidness or convenience of aCGH.

In this study, we evaluated whether our in-house GDA can work well as a diagnostic tool to detect CNVs responsible for well-established syndromes or those involved in subtelomeric aberrations in a clinical setting, and then explored candidate pCNVs in cases without any CNV in the first GDA screening. We recruited 536 cases that had been undiagnosed clinically and studied them in a two-stage screening using aCGH. In the first screening we detected CNVs in 54 cases (10.1%). Among them, 40 cases had CNV(s) at subtelomeric region(s) corresponding to the well-established syndromes or the already described disorders and the other 14 cases had CNVs in the regions corresponding to known disorders. Thus about three quarters of cases had genomic aberrations involved in subtelomeric regions. All the subtelomeric deletions and a part of the subtelomeric duplications corresponded to the disorders, indicating that especially subtelomeric deletions had more clinical significance compared to subtelomeric duplications, although the duplication might result in milder phenotypes and/or function as a modifier of phenotypes.⁷⁰ Moreover, parental analysis in three cases with two subtelomeric aberrations revealed that two of them were derived from the parental balanced translocations, indicating that such subtelomeric aberrations were potentially recurrent and parental analyses were worth performing. Recently several similar studies analyzed patients with MCA/MR or developmental delay using a targeted array for subtelomeric regions and/or known genomic disorders and detected clinically relevant CNVs in 4.4–17.1% of the patients.^{28,65,70,71} Our detection rate in the first screening was equivalent to these reports. Although such detection rates depend on the type of microarray, patient selection criteria and/or number of subjects, these results suggest that at least 10% of cases with undiagnosed MCA/MR and a normal karyotype would be detectable by targeted array.

Table 4 Parental analysis of 34 cases in the second screening

Case	Gender	Clinical diagnosis	CNV		Size of CNV (bp)		Protein-coding genes	Parental analysis	Pathogenicity
			del/dup	Position	Min.	Max.			
1	M	MCA/MR	del	1p36.23p36.22	1 670 237	2 558 590	32	<i>de novo</i>	P
2	M	MCA/MR	del	1q41q42.11	5 001 798	6 481 439	35	<i>de novo</i>	P
7	M	MCA/MR	del	16p12.1p11.2	2 816 866	5 648 152	138	<i>de novo</i>	P
8	M	MCA/MR with CHD	del	16p11.2	951 773	4 258 984	134	<i>de novo</i>	P
10	M	MCA/MR	del	7p14.2p13	8 516 513	9 421 233	70	<i>de novo</i>	P
11	F	MCA/MR	del	14q22.1q22.3	2 746 662	3 089 980	18	<i>de novo</i>	P
12	M	MCA/MR	del	17q13.3	930 940	1 018 839	22	<i>de novo</i>	P
13	M	MCA/MR	del	Xp11.4p11.3	4 034 171	4 103 418	9	<i>de novo</i>	P
14	M	MCA/MR	del	6q12q14.1	14 194 290	16 071 847	56	<i>de novo</i>	P
18	M	MCA/MR	del	10q24.31q25.1	3 345 595	3 368 825	66	<i>de novo</i>	P
19	M	MCA/MR	del	10q24.32q25.1	2 077 638	2 093 622	41	<i>de novo</i>	P
21	M	MCA/MR	del	7p22.1	341 762	3 223 668	28	<i>de novo</i>	P
24	M	SMS susp.	del	19p13.2	1 719 919	3 304 902	23	<i>de novo</i>	P
37	F	MCA/MR	del	1p34.3	1 128 084	1 753 514	7	<i>de novo</i>	P
38	M	MCA/MR	dup	1q25.2	338 801	771 348	9	<i>de novo</i>	P
39	M	MCA/MR	del	2p24.1p23.3	3 721 550	8 376 636	86	<i>de novo</i>	P
40	F	MCA/MR	del	3p26.1p25.3	1 433 024	1 835 660	18	<i>de novo</i>	P
41	M	MCA/MR	del	3p22.1p21.31	5 893 173	7 832 879	123	<i>de novo</i>	P
42 ^a	M	MCA/MR	del	8q21.11q21.13	5 289 394	5 770 485	12	<i>de novo</i>	P
42 ^a	M	MCA/MR	del	3p14.3p14.2	593 434	1 517 140	11	Maternal	B
43	M	MCA/MR	del	3q26.31q26.33	4 081 515	6 002 971	12	<i>de novo</i>	P
44 ^b	M	MCA/MR	del	13q13.2q13.3	917 819	1 458 769	1	<i>de novo</i>	P
44 ^b	M	MCA/MR	del	22q11.21	917 819	1 458 769	15	Paternal	B
45	F	Rett syndrome	del	18q21.2	2 121 913	3 642 522	9	<i>de novo</i>	P
46	M	MCA/MR	dup	19p13.3	2 041 395	2 404 096	113	<i>de novo</i>	P
47	F	MCA/MR	del	19p13.3	816 079	2 037 409	23	<i>de novo</i>	P
48 ^c	M	MCA/MR	del	Xp11.3	2 362 422	2 392 511	18	Maternal	P
49	M	MCA/MR	dup	3p26.3	176 050	250 850	1	Paternal	B
50	M	MCA/MR	dup	5p14.3	170 578	1 752 211	1	Paternal	B
51	M	MCA/MR	dup	5q13.3	1 020 329	1 421 706	3	Maternal	B
52	M	MCA/MR	dup	7p22.3	568	1 101 943	12	Maternal	B
53	F	MCA/MR	dup	8p23.2	838 610	2 648 539	1	Paternal	B
54	M	MCA/MR	dup	9q33.1	162 612	1 030 807	2	Paternal	B
55	F	MCA/MR	dup	10q22.3	154 664	873 124	1	Maternal	B
56	M	MCA/MR	dup	12q21.31	152 042	4 843 434	3	Paternal	B
57	M	Gillespie syndrome	del	Xp11.23	104 191	115 604	3	Maternal	B

Abbreviations: B, benign; CNV, copy-number variant; F, female; M, male; MCA/MR, multiple congenital anomalies and mental retardation; P, pathogenic.

^aTwo CNVs were detected in case 42.

^bTwo CNVs were detected in case 44.

^cNullizygous deletion inherited from his mother probably affected the phenotype.

Another interesting observation in the first screening was that subtelomeric rearrangements frequently occurred even in patients with MCA/MR of uncertain whose karyotype had been diagnosed as normal. This result may be consistent with a property of subtelomeric regions whose rearrangements can be missed in conventional karyotyping,⁷² and in fact other techniques involving subtelomeric FISH or MLPA also identified subtelomeric abnormalities in a number of patients with MCA and/or MR in previous reports.^{70,73,74} Our result may support the availability of prompt screening of subtelomeric regions for cases with uncertain congenital disorders.

In the second screening we applied WGA-4500 to 349 cases to detect 66 candidate pCNVs in 63 cases (18.1%), and subsequently assessed the pathogenicity of these CNVs. The pCNVs included nine

CNVs overlapping identical regions of recently recognized syndromes (cases 1–9; deletion at 1p36.23–p36.22, 1q41–q42.11, 1q43–q44, 2q23.1, 14q12, 15q26–qter and 16p11.2–p12.2, respectively), four CNVs containing disease-associated genes (cases 10–13; *GLI3*, *BMP4*, *YWHAE* and *CASK*, respectively), three pairs of CNVs of recurrent deletions (cases 14, 15: at 6q12–q14.1 and 6q14.1; case 16, 17: at 10p12.1–p11.23 and case 18, 19: at 10q24.31–q25.1 and 10q24.32–q25.1), five CNVs identical to pCNVs in previous studies (cases 20–24), six large and/or gene-rich CNVs (cases 25–30) and six CNVs containing a morbid OMIM gene (cases 31–36). For the remaining cases, we estimated the pathogenicity of the CNVs from a parental analysis (Table 4). We judged the 11 *de novo* CNVs (cases 37–47) and 1 CNV on chromosome Xp11.3 inherited from

the mother (case 48) as probably pathogenic. And nine inherited CNVs (cases 49–57) were probably benign. The clinical significance of CNVs in the other six cases, cases 58–63, remains uncertain (VOUS). As a result we estimated CNVs as pathogenic in 48 cases among 349 cases (13.8%) analyzed in the second screening. None of the pCNVs corresponded to loci of well-established syndromes. This may suggest that our two-stage screening achieved a good balance between rapid screening of known syndromes and investigation of CNV of uncertain pathogenicity.

Among the cases with parental analyses, the 25 pCNVs had larger sizes and contained more protein-coding genes (average size, 3.1 Mb at minimum to 4.4 Mb at maximum; average number of genes, 44) as compared with the 11 inherited bCNVs that were probably unrelated to phenotypes (average size, 0.39 Mb at minimum to 1.5 Mb at maximum; average number of genes, 5) (Table 5). Although all of the 25 pCNVs except 2 were deletions, about three quarters (8 of 11 cases) of the inherited bCNVs were duplications (Table 5). These findings are consistent with previously reported features of pCNVs and bCNVs.^{21,38}

We also compared our current study with recent aCGH studies meeting the following conditions: (1) a microarray targeted to whole genome was applied; (2) patients with MCA and/or MR of uncertain etiology, normal karyotype and the criteria for patients selection were clearly described; (3) pathogenicity of identified CNVs were assessed. On the basis of the above criteria, among studies reported in the past 5 years, we summarized 13 studies (Table 6).^{10,14,15,17,54,55,75–81} Diagnostic yield of pCNVs in each study was 6.3–16.4%, and our current diagnostic yield of the second screening was 13.8%. Though cases with subtelomeric aberration detected in the first screening had been excluded, our diagnostic yield was comparable to those of the reported studies. It is not so important to make a simple comparison between diagnostic yields in different studies as they would depend on the conditions of each study, for example, sample size or array resolution,^{38,82} however it seems interesting that the higher resolution of a microarray does not ensure an increase in the rate of detection of pCNVs. One recent study showed data that may explain the discrepancy between the resolution of microarray and diagnostic yield.^{54,83} The authors analyzed 1001 patients with MCA and/or MR using one

Table 5 Summary of parental analyses

	Average size (bp)		The average number of protein-coding genes
	Min.	Max.	
Pathogenic CNVs^a			
del	23	3 309 267	43
dup	2	1 190 098	61
Total	25	3 139 733	44
Benign CNVs^b			
del	3	538 481	10
dup	8	334 432	3
Total	11	390 082	5

Abbreviation: CNV, copy-number variant.
^aTwenty-four *de novo* CNVs and case 48.
^bEleven inherited CNVs other than case 48.

Table 6 Previous studies of analyzing patients with MCA and/or MR using aCGH targeted to whole genome

Author (year)	Applied array			Patients		Pathogenic CNV	
	Type	Number ^a	Distribution ^b	Number	Type of disorders	Number	%
Schoumans <i>et al.</i> ⁷⁵	BAC	2600	1.0 Mb*	41	MCA and MR	4	9.8
de Vries <i>et al.</i> ⁷⁶	BAC	32 477	Tiling	100	MCA and/or MR	10	10.0
Rosenberg <i>et al.</i> ⁷⁷	BAC	3500	1.0 Mb*	81	MCA and MR	13	16.0
Krepischi-Santos <i>et al.</i> ⁷⁸	BAC	3500	1.0 Mb*	95	MCA and/or MR	15	15.8
Friedman <i>et al.</i> ¹⁴	SNP	Affymetrix 100K	23.6 kb**	100	MR	11	11.0
Thuresson <i>et al.</i> ⁷⁹	BAC		1.0 Mb*	48	MCA and MR	3	6.3
Wagenstaller <i>et al.</i> ⁸⁰	SNP	Affymetrix 100K	23.6 kb**	67	MR	11	16.4
Fan <i>et al.</i> ⁵⁵	Oligo	Agilent 44K	24 kb–43 kb**	100 ^c	MCA and MR, Autism	15 ^d	15.0
Xiang <i>et al.</i> ¹⁵	Oligo	Agilent 44K	24 kb–43 kb**	40 ^e	MR, DD and autism	3	7.5
Pickering <i>et al.</i> ¹⁰	BAC	2600	1 Mb*	354 ^f	MCA and/or MR	36 ^g	10.2
McMullan <i>et al.</i> ¹⁷	SNP	Affymetrix 500K	2.5 kb–5.8 kb**	120	MCA and/or MR	18	15.0
Bruno <i>et al.</i> ⁸¹	SNP	Affymetrix 250K	2.5 kb–5.8 kb**	117	MCA and/or MR	18	15.4
Buysse <i>et al.</i> ⁵⁴	BAC	3431	1 Mb*	298	MCA and/or MR	26	8.7
	Oligo	Agilent 44K	24 kb–43 kb**	703	MCA and/or MR	74	10.5
Our current study	BAC	4523	0.7 Mb	349	MCA and MR	48	13.8
Total				2613		305	11.7

Abbreviations: BAC, bacterial artificial chromosome; CNV, copy-number variant; DD, developmental delay; MCA, multiple congenital anomalies; MR, mental retardation; SNP, single nucleotide polymorphism.

*The number of clones or name of array is described.

^bEach distribution referred to each article (*) or manual of each manufacturer (**).

^cAll cases were analyzed by both a targeted array and a genome-wide array.

^dIn five cases, CNVs were also identified by a targeted array.

^eTen cases with an abnormal karyotype were excluded.

^fOnly cases studied with an array throughout the genome are described. Ninety-eight cases were also analyzed by a targeted array.

^gSeventeen cases with an abnormal karyotype were excluded.

of two types of microarray, BAC array and oligonucleotide array. The BAC array was applied for 298 patients to detect 58 CNVs in 47 patients, and among them 26 CNVs (8.7%) were determined to be causal (pathogenic). Conversely, the oligonucleotide arrays were applied for 703 patients to detect 1538 CNVs in 603 patients, and among them 74 CNVs (10.5%) were determined to be pathogenic. These results may lead to the following idea: a lower-resolution microarray detects a limited number of CNVs likely to be pathogenic, because such CNVs tend to be large, and a higher-resolution microarray detects an increasing number of bCNVs or VOUS.³⁸ Indeed, in studies using a high-resolution microarray, most of the CNVs detected were smaller than 500 kb but almost all pCNVs were relatively large.^{54,81,83} Most of the small CNVs were judged not to be pathogenic, and the percentage of pCNVs stabilized at around 10%. This percentage may suggest a frequency of patients with MCA/MR caused by CNV affecting one or more genes, other than known syndromes and subtelomeric aberrations. The other patients may be affected by another cause undetectable by genomic microarray; for example a point mutation or microdeletion/duplication of a single gene, aberration of microRNA, aberration of methylation states, epigenetic aberration or partial uniparental disomy.

As recently hypothesized secondary insult, which is potentially another CNV, a mutation in a phenotypically related gene or an environmental event influencing the phenotype, may result in clinical manifestation.⁸⁴ Especially, in two-hit CNVs, two models have been hypothesized: (1) the additive model of two co-occurring CNVs affecting independent functional modules and (2) the epistatic model of two CNVs affecting the same functional module.⁸⁵ It also suggests difficulty in selecting an optimal platform in the clinical screening. Nevertheless, information on both pCNVs and bCNVs detected through studies using several types of microarrays is unambiguously significant because an accumulation of the CNVs will create a map of genotype-phenotype correlation that would determine the clinical significance of each CNV, illuminate gene function or establish a new syndrome.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ayako Takahashi and Rumi Mori for technical assistance. This study was supported by the Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University. This work was also supported by grants-in-aid for Scientific Research on Priority Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan; a grant from Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of the Japan Science and Technology Corporation (JST); a grant from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO); and in part by Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (17390099, 20390301) of Japan Society for the Promotion of Science (JSPS); Health and Labour Sciences Research Grants for Research on information system of undiagnosed diseases (H21-nanchi-ippan-167) and Research on policy for intractable diseases (H22-nanchi-shitei-001) from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

- 1 Roeleveld, N., Zielhuis, G. A. & Gabreëls, F. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev. Med. Child Neurol.* **39**, 125–132 (1997).
- 2 Hunter, A. G. Outcome of the routine assessment of patients with mental retardation in a genetics clinic. *Am. J. Med. Genet.* **90**, 60–68 (2000).
- 3 Smith, D. W. & Bostian, K. E. Congenital anomalies associated with idiopathic mental retardation. *J. Pediatr.* **65**, 189–196 (1964).
- 4 Gustavson, K. H., Hagberg, B., Hagberg, G. & Sars, K. Severe mental retardation in a Swedish county. II. Etiologic and pathogenetic aspects of children born 1959–1970. *Neuropadiatrie* **8**, 293–304 (1977).
- 5 Fryns, J. P., Kleczkowska, A., Kubiñ, E. & Van den Berghe, H. Cytogenetic findings in moderate and severe mental retardation. A study of an institutionalized population of 1991 patients. *Acta. Paediatr. Scand. Suppl.* **313**, 1–23 (1984).

- 6 Gustavson, K. H., Holmgren, G. & Blomquist, H. K. Chromosomal aberrations in mildly mentally retarded children in a northern Swedish county. *Ups. J. Med. Sci. Suppl.* **44**, 165–168 (1987).
- 7 Schreppers-Tijdink, G. A., Curfs, L. M., Wiegers, A., Kleczkowska, A. & Fryns, J. P. A systematic cytogenetic study of a population of 1170 mentally retarded and/or behaviourally disturbed patients including fragile X-screening. The Hondsberg experience. *J. Genet. Hum.* **36**, 425–446 (1988).
- 8 van Karnebeek, C. D., Koevoets, C., Sluijter, S., Bijlisma, E. K., Smeets, D. F., Redeker, E. J. *et al.* Prospective screening for subtelomeric rearrangements in children with mental retardation of unknown aetiology: the Amsterdam experience. *J. Med. Genet.* **39**, 546–553 (2002).
- 9 Visser, L. E., de Vries, B. B., Osoegawa, K., Janssen, I. M., Feuth, T., Choy, C. O. *et al.* Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 1261–1270 (2003).
- 10 Pickering, D. L., Eudy, J. D., Olney, A. H., Dave, B. J., Golden, D., Stevens, J. *et al.* Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations. *Genet. Med.* **10**, 262–266 (2008).
- 11 Bauters, M., Van Esch, H., Marynen, P. & Froyen, G. X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes. *Eur. J. Med. Genet.* **48**, 263–275 (2005).
- 12 Hayashi, S., Honda, S., Minaguchi, M., Makita, Y., Okamoto, N., Kosaki, R. *et al.* Construction of a high-density and high-resolution human chromosome X array for comparative genomic hybridization analysis. *J. Hum. Genet.* **52**, 397–405 (2007).
- 13 Kok, K., Dijkhuizen, T., Swart, Y. E., Zorgrader, H., van der Vlies, P., Fehrmann, R. *et al.* Application of a comprehensive subtelomeric array in clinical diagnosis of mental retardation. *Eur. J. Med. Genet.* **48**, 250–262 (2005).
- 14 Friedman, J. M., Baross, A., Delaney, A. D., Ally, A., Arbour, L., Armstrong, L. *et al.* Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 500–513 (2006).
- 15 Xiang, B., Li, A., Valentin, D., Nowak, N. J., Zhao, H. & Li, P. Analytical and clinical validity of whole-genome oligonucleotide array comparative genomic hybridization for pediatric patients with mental retardation and developmental delay. *Am. J. Med. Genet.* **146A**, 1942–1954 (2008).
- 16 Shen, Y., Irons, M., Miller, D. T., Cheung, S. W., Lip, V., Sheng, X. *et al.* Development of a focused oligonucleotide-array comparative genomic hybridization chip for clinical diagnosis of genomic imbalance. *Clin. Chem.* **53**, 2051–2059 (2007).
- 17 McMullan, D. J., Bonin, M., Hehir-Kwa, J. Y., de Vries, B. B., Dufke, A., Rattenberry, E. *et al.* Molecular karyotyping of patients with unexplained mental retardation by SNP arrays: a multicenter study. *Hum. Mutat.* **30**, 1082–1092 (2009).
- 18 Iafrate, A. J., Feuk, L., Rivera, M. N., Listewnik, M. L., Donahoe, P. K., Qi, Y. *et al.* Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.* **36**, 949–951 (2004).
- 19 Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., Lundin, P. *et al.* Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. **305**, 525–528 (2004).
- 20 Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D. *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**, 444–454 (2006).
- 21 Lee, C., Iafrate, A. J. & Brothman, A. R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat. Genet.* **39**, S48–S54 (2007).
- 22 Inazawa, J., Inoue, J. & Imoto, I. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci.* **95**, 559–563 (2004).
- 23 Hayashi, S., Kurosawa, K., Imoto, I., Mizutani, S. & Inazawa, J. Detection of cryptic chromosome aberrations in a patient with a balanced t(1;9)(p34.2;p24) by array-based comparative genomic hybridization. *Am. J. Med. Genet.* **139**, 32–36 (2005).
- 24 Shrimpton, A. E., Braddock, B. R., Thomson, L. L., Stein, C. K. & Hoo, J. J. Molecular delineation of deletions on 2q37.3 in three cases with an Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype. *Clin. Genet.* **66**, 537–544 (2004).
- 25 Rauch, A. & Dör, H. G. Chromosome 5q subtelomeric deletion syndrome. *Am. J. Med. Genet. C* **145C**, 372–376 (2007).
- 26 Horn, D., Tönnies, H., Neitzel, H., Wahl, D., Hinkel, G. K., von Moers, A. *et al.* Minimal clinical expression of the holoprosencephaly spectrum and of Currarino syndrome due to different cytogenetic rearrangements deleting the Sonic Hedgehog gene and the HLXB9 gene at 7q36.3. *Am. J. Med. Genet. A* **128A**, 85–92 (2004).
- 27 Tatton-Brown, K., Pilz, D. T., Orstavik, K. H., Patton, M., Barber, J. C., Collinson, M. N. *et al.* 15q overgrowth syndrome: a newly recognized phenotype associated with overgrowth, learning difficulties, characteristic facial appearance, renal anomalies and increased dosage of distal chromosome 15q. *Am. J. Med. Genet. A* **149A**, 147–154 (2009).
- 28 Lu, X., Shaw, C. A., Patel, A., Li, J., Cooper, M. L., Wells, W. R. *et al.* Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One* **2**, e327 (2007).
- 29 Fernandez, T. V., García-González, I. J., Mason, C. E., Hernández-Zaragoza, G., Ledezma-Rodríguez, V. C., Anguiano-Alvarez, V. M. *et al.* Molecular characterization of a patient with 3p deletion syndrome and a review of the literature. *Am. J. Med. Genet. A* **146A**, 2746–2752 (2008).
- 30 Jones, K. L. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*, 6th edn. (Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006).
- 31 Striano, P., Malacarne, M., Cavani, S., Pierluigi, M., Rinaldi, R., Cavaliere, M. L. *et al.* Clinical phenotype and molecular characterization of 6q terminal deletion syndrome: five new cases. *Am. J. Med. Genet. A* **140**, 1944–1949 (2006).

- 32 Lindstrand, A., Malmgren, H., Verri, A., Benetti, E., Eriksson, M., Nordgren, A. *et al.* Molecular and clinical characterization of patients with overlapping 10p deletions. *Am. J. Med. Genet. A* **152A**, 1233–1243 (2010).
- 33 Elbracht, M., Roos, A., Schönherr, N., Busse, S., Damen, R., Zerres, K. *et al.* Pure distal trisomy 2q: a rare chromosomal abnormality with recognizable phenotype. *Am. J. Med. Genet. A* **149A**, 2547–2550 (2009).
- 34 Lukusa, T. & Fryns, J. P. Pure *de novo* 17q25.3 micro duplication characterized by micro array CGH in a dysmorphic infant with growth retardation, developmental delay and distal arthrogyposis. *Genet. Couns.* **21**, 25–34 (2010).
- 35 Fukami, M., Kirsch, S., Schiller, S., Richter, A., Benes, V., Franco, B. *et al.* A member of a gene family on Xp22.3, VCX-A, is deleted in patients with X-linked nonspecific mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 563–573 (2000).
- 36 Shaffer, L. G. & Tommerup, N. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005)* (Karger, Basel, 2005).
- 37 Koolen, D. A., Pfundt, R., de Leeuw, N., Hehir-Kwa, J. Y., Nillesen, W. M., Neefs, I. *et al.* Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum. Mutat.* **30**, 283–292 (2009).
- 38 Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., Carter, N. P. *et al.* Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* **86**, 749–764 (2010).
- 39 Shaffer, L. G., Theisen, A., Bejjani, B. A., Ballif, B. C., Aylsworth, A. S., Lim, C. *et al.* The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic era: review of the methodology and characterization of a new 14q14q2 microdeletion syndrome. *Genet. Med.* **9**, 607–616 (2007).
- 40 van Bon, B. W., Koolen, D. A., Borgatti, R., Magee, A., Garcia-Minaur, S., Rooms, L. *et al.* Clinical and molecular characteristics of 1qter microdeletion syndrome: delineating a critical region for corpus callosum agenesis/hypogenesis. *J. Med. Genet.* **45**, 346–354 (2008).
- 41 van Bon, B. W., Koolen, D. A., Brueton, L., McMullan, D., Lichtenbelt, K. D., Adès, L. C. *et al.* The 2q23.1 microdeletion syndrome: clinical and behavioural phenotype. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 163–170 (2010).
- 42 Mencarelli, M. A., Kleefstra, T., Katzaki, E., Papa, F. T., Cohen, M., Pfundt, R. *et al.* 14q12 microdeletion syndrome and congenital variant of Rett syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* **52**, 148–152 (2009).
- 43 Rump, P., Dijkhuizen, T., Sikkema-Raddatz, B., Lemmink, H. H., Vos, Y. J., Verheij, J. B. *et al.* Drayer's syndrome of mental retardation, microcephaly, short stature and absent phalanges is caused by a recurrent deletion of chromosome 15(q26.2→qter). *Clin. Genet.* **74**, 455–462 (2008).
- 44 Ballif, B. C., Hornor, S. A., Jenkins, E., Madan-Khetarpal, S., Surti, U., Jackson, K. E. *et al.* Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Nat. Genet.* **39**, 1071–1073 (2007).
- 45 Shinawi, M., Liu, P., Kang, S. H., Shen, J., Belmont, J. W., Scott, D. A. *et al.* Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioral problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J. Med. Genet.* **47**, 332–341 (2010).
- 46 Kang, S. H., Scheffer, A., Ou, Z., Li, J., Scaglia, F., Belmont, J. *et al.* Identification of proximal 1p36 deletions using array-CGH: a possible new syndrome. *Clin. Genet.* **72**, 329–338 (2007).
- 47 Johnston, J. J., Olivos-Glander, I., Killoren, C., Elson, E., Turner, J. T., Peters, K. F. *et al.* Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 609–622 (2005).
- 48 Johnston, J. J., Olivos-Glander, I., Turner, J., Aleck, K., Bird, L. M., Mehta, L. *et al.* Clinical and molecular delineation of the Greig cephalopolysyndactyly contiguous gene deletion syndrome and its distinction from acrocallosal syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* **123A**, 236–242 (2003).
- 49 Hayashi, S., Okamoto, N., Makita, Y., Hata, A., Imoto, I. & Inazawa, J. Heterozygous deletion at 14q22.1-q22.3 including the BMP4 gene in a patient with psychomotor retardation, congenital corneal opacity and feet polysyndactyly. *Am. J. Med. Genet. A* **146A**, 2905–2910 (2008).
- 50 Hayashi, S., Mizuno, S., Migita, O., Okuyama, T., Makita, Y., Hata, A. *et al.* The CASK gene harbored in a deletion detected by array-CGH as a potential candidate for a gene causative of X-linked dominant mental retardation. *Am. J. Med. Genet. A* **146A**, 2145–2151 (2008).
- 51 Toyo-oka, K., Shionoya, A., Gambello, M. J., Cardoso, C., Leventer, R., Ward, H. L. *et al.* 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat. Genet.* **34**, 274–285 (2003).
- 52 Mignon-Ravix, C., Cacciagli, P., El-Waly, B., Moncla, A., Milh, M., Girard, N. *et al.* Deletion of YWHAE in a patient with periventricular heterotopias and marked corpus callosum hypoplasia. *J. Med. Genet.* **47**, 132–136 (2010).
- 53 Haldeman-Englert, C. R., Gai, X., Perin, J. C., Ciano, M., Halbach, S. S., Geiger, E. A. *et al.* A 3.1-Mb microdeletion of 3p21.31 associated with cortical blindness, cleft lip, CNS abnormalities, and developmental delay. *Eur. J. Med. Genet.* **52**, 265–268 (2009).
- 54 Buysse, K., Delle Chiaie, B., Van Coster, R., Loeys, B., De Paepe, A., Mortier, G. *et al.* Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur. J. Med. Genet.* **52**, 398–403 (2009).
- 55 Fan, Y. S., Jayakar, P., Zhu, H., Barbouth, D., Sacharow, S., Morales, A. *et al.* Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum. Mutat.* **28**, 1124–1132 (2007).
- 56 Hevner, R. F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S. *et al.* Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron* **29**, 353–366 (2001).
- 57 Cosma, M. P., Pepe, S., Annunziata, I., Newbold, R. F., Grompe, M., Parenti, G. *et al.* The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell* **113**, 445–456 (2003).
- 58 Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L. V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M. *et al.* Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell* **113**, 435–444 (2003).
- 59 Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., Schoen, F. J. & Fishman, M. C. Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* **383**, 525–528 (1996).
- 60 Eudy, J. D., Ma-Edmonds, M., Yao, S. F., Talmadge, C. B., Kelley, P. M., Weston, M. D. *et al.* Isolation of a novel human homologue of the gene coding for echinoderm microtubule-associated protein (EMAP) from the Usher syndrome type 1a locus at 14q32. *Genomics* **43**, 104–106 (1997).
- 61 He, Y. & Casaccia-Bonelli, P. The Yin and Yang of YY1 in the nervous system. *J. Neurochem.* **106**, 1493–1502 (2008).
- 62 Martin, C. L., Duvall, J. A., Ilkin, Y., Simon, J. S., Arreaza, M. G., Wilkes, K. *et al.* Cytogenetic and molecular characterization of A2BP1/FOX1 as a candidate gene for autism. *Am. J. Med. Genet.* **144B**, 869–876 (2007).
- 63 Tabolacci, E., Pomponi, M. G., Pietrobono, R., Terracciano, A., Chiurazzi, P. & Neri, G. A truncating mutation in the IL1RAPL1 gene is responsible for X-linked mental retardation in the MRX21 family. *Am. J. Med. Genet.* **140**, 482–487 (2006).
- 64 Nelson, J., Flaherty, M. & Grattan-Smith, P. Gillespie syndrome: a report of two further cases. *Am. J. Med. Genet.* **71**, 134–138 (1997).
- 65 Shaffer, L. G. & Bejjani, B. A. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet. Genome Res.* **115**, 303–309 (2006).
- 66 Shaffer, L. G., Bejjani, B. A., Torchia, B., Kirkpatrick, S., Coppinger, J. & Ballif, B. C. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **145C**, 335–345 (2007).
- 67 Bejjani, B. A. & Shaffer, L. G. Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **9**, 71–86 (2008).
- 68 Edelmann, L. & Hirschhorn, K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann. NY Acad. Sci.* **1151**, 157–166 (2009).
- 69 de Ståhl, T. D., Sandgren, J., Piotrowski, A., Nord, H., Andersson, R., Menzel, U. *et al.* Profiling of copy number variations (CNVs) in healthy individuals from three ethnic groups using a human genome 32K BAC-clone-based array. *Hum. Mutat.* **29**, 398–408 (2008).
- 70 Shao, L., Shaw, C. A., Lu, X. Y., Sahoo, T., Bacino, C. A., Lalani, S. R. *et al.* Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am. J. Med. Genet. A* **146A**, 2242–2251 (2008).
- 71 Lu, X., Phung, M. T., Shaw, C. A., Pham, K., Neil, S. E., Patel, A. *et al.* Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* **122**, 1310–1318 (2008).
- 72 Xu, J. & Chen, Z. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **117C**, 15–24 (2003).
- 73 Ravnani, J. B., Tepperberg, J. H., Papenhausen, P., Lamb, A. N., Hedrick, J., Eash, D. *et al.* Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J. Med. Genet.* **43**, 478–489 (2006).
- 74 Ahn, J. W., Ogilvie, C. M., Welch, A., Thomas, H., Madula, R., Hills, A. *et al.* Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med. Genet.* **8**, 9 (2007).
- 75 Schoumans, J., Ruivenkamp, C., Holmberg, E., Kyllerman, M., Anderlid, B. M. & Nordenskjöld, M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J. Med. Genet.* **42**, 699–705 (2005).
- 76 de Vries, B. B., Pfundt, R., Leisink, M., Koolen, D. A., Vissers, L. E., Janssen, I. M. *et al.* Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 606–616 (2005).
- 77 Rosenberg, C., Knijnenburg, J., Bakker, E., Vianna-Morgante, A. M., Sloos, W., Otto, P. A. *et al.* Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J. Med. Genet.* **43**, 180–186 (2006).
- 78 Krepischi-Santos, A. C., Vianna-Morgante, A. M., Jehee, F. S., Passos-Bueno, M. R., Knijnenburg, J., Szuhai, K. *et al.* Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet. Genome Res.* **115**, 254–261 (2006).
- 79 Thureson, A. C., Bondeson, M. L., Edeby, C., Ellis, P., Langford, C., Dumanski, J. P. *et al.* Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation. *Cytogenet. Genome Res.* **118**, 1–7 (2007).
- 80 Wagenstaller, J., Spranger, S., Lorenz-Depiereux, B., Kazmierczak, B., Nathrath, M., Wahl, D. *et al.* Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 768–779 (2007).

- 81 Bruno, D. L., Ganesamoorthy, D., Schoumans, J., Bankier, A., Coman, D., Delatycki, M. *et al.* Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J. Med. Genet.* **46**, 123–131 (2009).
- 82 Sagoo, G. S., Butterworth, A. S., Sanderson, S., Shaw-Smith, C., Higgins, J. P. & Burton, H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet. Med.* **11**, 139–146 (2009).
- 83 Wincent, J., Anderlid, B. M., Lagerberg, M., Nordenskjöld, M. & Schoumans, J. High-resolution molecular karyotyping in patients with developmental delay and/or multiple congenital anomalies in a clinical setting. *Clin. Genet.* (e-pub ahead of print 8 May 2010).
- 84 Girirajan, S., Rosenfeld, J. A., Cooper, G. M., Antonacci, F., Siswara, P., Itsara, A. *et al.* A recurrent 16p12.1 microdeletion supports model for severe developmental delay. *Nat. Genet.* **42**, 203–209 (2010).
- 85 Veltman, J. A. & Brunner, H. G. Understanding variable expressivity in microdeletion syndromes. *Nat. Genet.* **42**, 192–193 (2010).

両側前庭水管拡大症の確実例とボーダーライン例の *SLC26A4* 遺伝子変異および臨床所見の特徴

岡本康秀¹⁾, 松永達雄²⁾, 泰地秀信³⁾, 守本倫子³⁾, 坂田英明⁴⁾, 安達のどか⁵⁾,
貫野彩子¹⁾, 山口聡子⁶⁾, 仲野敦子⁷⁾, 高木 明⁸⁾, 加我君孝²⁾, 小川 郁⁹⁾

¹⁾稲城市立病院 耳鼻咽喉科

²⁾国立病院機構東京医療センター 耳鼻咽喉科

³⁾国立成育医療センター 耳鼻咽喉科

⁴⁾目白大学クリニック

⁵⁾埼玉県立小児医療センター 耳鼻咽喉科

⁶⁾横浜市立市民病院 耳鼻咽喉科

⁷⁾千葉県こども病院 耳鼻咽喉科

⁸⁾静岡県立総合病院 耳鼻咽喉科

⁹⁾慶應義塾大学病院 耳鼻咽喉科

要旨: 前庭水管拡大症 (EVA: enlargement of the vestibular aqueduct) は最も頻度の高い内耳奇形である。EVA が認められる疾患としては、先天性で発症し進行する難聴やめまいを呈し、ヨード有機化障害による甲状腺腫を伴う Pendred 症候群が知られている。また Pendred 症候群以外の症候群性難聴や非症候性難聴で認められる場合もある。Pendred 症候群の原因としては *SLC26A4* 遺伝子変異が報告されている。これまで画像検査による前庭水管拡大の程度と Pendred 症候群に関連する臨床的特徴についての関係はまだ確立されていない。今回我々は両側性難聴を、画像検査による前庭水管拡大の程度から確実例とボーダーライン例とに分類し、*SLC26A4* 遺伝子変異を含む Pendred 症候群に関連する検査所見を比較検討した。拡大確実例群において遺伝子変異が89%で認められ、ボーダーライン例群では33%であった。Mondini 奇形は確実例群で67%に認められたが、ボーダーライン例群では33%であった。めまい症状は確実例群で33%に認め、ボーダーライン例の17%であった。甲状腺腫は確実例群で22%に認め、ボーダーライン群で17%であった。甲状腺機能低下は確実例群の成人例で1例を認めるのみであった。サイログロブリン (TG) の上昇は、両群ともに検査症例中約50%に認め、その全例に *SLC26A4* 遺伝子変異が認められた。以上の結果は前庭水管拡大の確実例群とボーダーライン群では、確実例群に遺伝子変異と強い相関を認め症例の病態の構成が異なることが予想されたが、臨床症状には明らかな有意な差は認められなかった。

キーワード

前庭水管拡大症, Pendred 症候群, *SLC26A4*, 特発性難聴, 先天性難聴

はじめに

前庭水管拡大症 (EVA: enlargement of the vestibular aqueduct) は、常染色体劣性遺伝で非症候群性難聴の DFNB4 および Pendred 症候群で高い頻度で認められ¹⁾、DFNB4 と Pendred 症候群の原因としては *SLC26A4* 遺伝子変異が報告されている²⁻⁴⁾。EVA の臨床的特徴的な症状としては、1. 先天性難聴、2. 変動する高音漸傾型感音難聴、3. 進行性難聴、4. 低音域の A-B gap、5. 回転性めまい、6. 甲状腺腫が知られている。前庭水管拡大における *SLC26A4* 遺伝子変異や臨床像との関係が報告されているが、未だ明らかになっていない部分も多い⁵⁻⁹⁾。そして前庭水管大の診断基準は様々で^{5,10-12)} 前庭水管拡大の判断に苦慮する症例が存在する。Madden ら⁵⁾ は前庭水管拡大の基準にボーダーラインという範囲をもうけることで聴力予後の検討を行い有意な臨床的な差があるという報告をしている。

そこで今回 CT 画像による前庭水管拡大を診断に苦慮する症例 (ボーダーライン症例) と拡大が確実な症例とに分けて、遺伝的な背景や臨床像について比較検討した。その結果遺伝子変異の頻度、難聴の程度やめまいの頻度、甲状腺疾患の早期診断や早期発見など、遺伝子カウンセリングなどに有用な情報が得られたため報告する。

対 象

対象は両側進行性感音難聴 (特発性難聴) あるいは両側先天性難聴の症例で CT 検査において前庭水管の拡大を認め、本研究への参加に同意を得られた 15 例とした。前庭水管拡大の確実例は側頭骨 CT で前庭水管中間径 (内リンパ嚢と前庭の中間部径) が 1.5mm 以上とし、ボーダーライン例は 1mm 以上 1.4mm 以下とした。一側が 1.5mm 以上でも一側が 1mm 以上 1.4mm 以下の場合はボーダーライン例とした。それぞれの症例に対して病歴・臨床所見をカルテより得た。遺伝子解析には静脈血採血後 DNA を抽出し、*SLC26A4* 遺伝子の全エクソンおよびエクソン・イントロン境界領域のイントロン10塩基をシーケンス解析した。遺伝子解析は、独立行政法人東京医療センター・感覚器センターにおいて行われ、本研究参加施設の倫理委員会承認を受けて行われた。また統計学的有意差の解析にはフィッシャー直接確率試験 (Fisher exact probability) を用いた。

結 果

今回の検討における前庭水管拡大確実例とボーダーライン例の側頭骨ターゲット CT 画像の 1 例を図 1 a, b に提示する。検討症例は全 15 例で、両側前庭水管拡大確実例 9 例、ボーダーライン例 6 例であった。

両側前庭水管拡大確実例の各症例の *SLC26A4* 遺

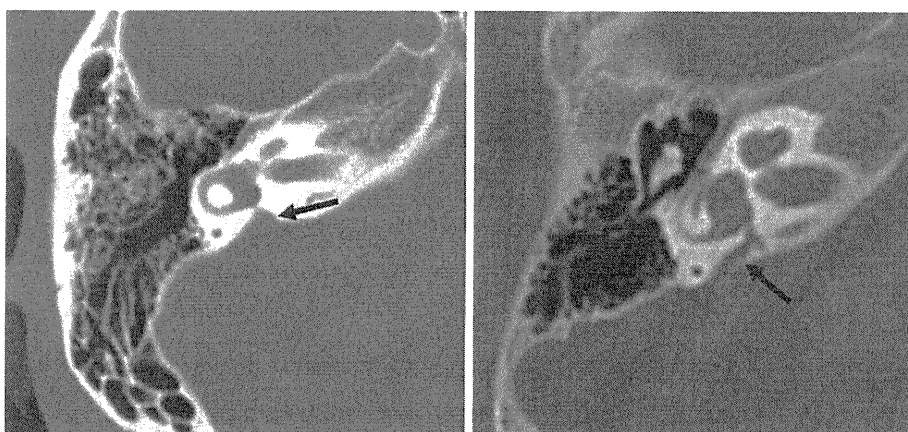


図 1 a

図 1 b

図 1 a 前庭水管拡大確実例。矢印は前庭水管を示す。

図 1 b 前庭水管ボーダーライン例。矢印は前庭水管を示す。

伝子解析結果と Pendred 症候群に関連する臨床所見を表1に示す。年齢は1歳から37歳で、20歳以上の成人症例は4例であった。性別は男性2例、女性7例であった。確実例9例中8例で先天性もしくは乳幼児期に難聴診断を受けており、遺伝子変異は9例中8例(89%)に2アレルで *SLC26A4* 遺伝子変異を認めた。2168A>Gを全アレルの34%に認め最多であった。純音聴力検査では中等度難聴から高度難聴を認めた。CORが実施された症例(症例8, 9)でも同様に中等度以上の難聴を認めた。前庭水管拡大に伴う蝸牛奇形としては6症例(67%)に蝸牛低形成、特に頂回転と第二回転の癒合を認める Mondini 型の奇形を伴い、全例 *SLC26A4* 遺伝子変異を有していた。めまいの既往は、3例(33%)で認められた。症例2は成人以降に急性感音難聴発

作に伴う回転性めまいを認め、症例4は体動時の回転性めまいを認めた。症例5はめまいの詳細は不明であった。甲状腺に関しては、20歳以上の2例(症例2, 4)に甲状腺腫を認めた。症例4は20歳で巨大甲状腺腫に対して甲状腺全摘術を施行され、現在甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモンの補充療法を行っている。その他の7症例では甲状腺腫は認めなかった。検査データの得られた5症例のうち甲状腺機能低下を認めた症例は1例(症例2)の成人症例のみであった。TGはデータの得られた3例中2例(67%)に上昇を認めいずれも成人症例であった。

両側前庭水管拡大ボーダーライン例の各症例を表2に示す。年齢は1歳から59歳で、性別は男性2例、女性4例であった。ボーダーライン例6例の全

表1 前庭水管拡大確実例の9例。未は未検査を示す。

症例	難聴診断	採血年齢	患側	性別	allele 1	allele 2	平均聴力(右/左 dB)	蝸牛奇形	めまい	甲状腺腫	甲状腺機能	TG
1	20歳	37歳	両	女	-	-	55/55	-	-	-	未	未
2	0歳	35歳	両	女	IVS5-1G>A	1229C>T	81/68	Mondini	22歳から回転性	+	低下	上昇
3	0歳	33歳	両	女	1652insT	2168A>G	95/95	Mondini	-	-	正常	上昇
4	3歳	32歳	両	女	IVS5-1G>A	2168A>G	95/55	Mondini	体動時	巨大(全摘)	(不明)	(不明)
5	0歳	13歳	両	女	1229C>T	2168A>G	110/110	Mondini	+	-	正常	未
6	0歳	12歳	両	女	1229C>T	2168A>G	115/95	Mondini	-	-	正常	未
7	0歳	7歳	両	男	2168A>G	2168A>G	スケールアウト	-	-	-	未	未
8	0歳	4歳	両	女	306A>G	IVS15+5G>A	65/65	Mondini	-	-	正常	正常
9	1歳	1歳	両	男	1115C>T	1226G>A	90	Mondini	-	-	未	未

表2 前庭水管拡大ボーダーライン例の6例。未は未検査を示す。

症例	難聴診断	採血年齢	患側	性別	allele 1	allele 2	平均聴力(右/左 dB)	蝸牛奇形	めまい	甲状腺腫	甲状腺機能	TG
1	0歳	59歳	両	女	-	-	スケールアウト/70	-	-	-	未	未
2	0歳	47歳	両	女	-	-	スケールアウト/60	-	疲労時	-	正常	未
3	3歳	25歳	両	女	-	-	95/95	-	-	あり(片葉切除既往)	正常	正常
4	3歳	13歳	両	男	1667A>G	1579A>C	80/80	未確	-	-	正常	上昇
5	2歳	2歳	両	女	1229C>T	IVS14+1G>A	50	Mondini	-	-	正常	上昇
6	0歳	1歳	両	男	-	-	75	Mondini	-	-	正常	正常

例が生後から乳児期に難聴診断をされていた。症例 1-4 は特発性難聴の診断で経過観察されていた。*SLC26A4* 遺伝子変異は 2 例 (34%) (症例 4, 5) で 2 アレルの変異を認めた。純音聴力検査では全例で中等度難聴から高度難聴を呈していた。随伴する蝸牛奇形としては 2 例 (34%) (症例 5, 6) で Mondini 奇形を認めた。前庭症状は、1 例 (17%) (症例 2) のみ疲労時のふらつきを訴えているが、難聴に伴う回転性めまいは伴っていなかった。甲状腺腫は 1 例 (17%) (症例 3) に認め、甲状腺腫に対して甲状腺片葉切除術を受けていた。甲状腺機能は検査症例全例で正常であったが、症例 3 の術前の結果は不明であった。また 2 アレルに *SLC26A4* 遺伝子変異を認めた 2 症例 (症例 4, 5) では TG 値の上昇が認められた。

考 察

前庭水管拡大の診断基準についてはさまざまな報告がされている。そのため CT 検査で前庭水管拡大症とするかの判断に苦慮する場合がある。Madden ら⁵⁾ は前庭水管の幅と蝸牛・前庭症状との比較から、このような判断に苦慮する症例に対してボーダーラインを定義し臨床像を検討した。そこでは前庭水管中間部 1.0mm-1.4mm をボーダーライン、1.5mm 以上を確実例とした結果、ボーダーライン群にも前庭水管拡大確実例と同様の難聴進行例があると報告した。そこで今回我々は前庭水管拡大を確実例と、ボーダーライン例とに分類し、それぞれの遺伝的背景と臨床所見について検討した。

まず前庭水管拡大の程度と *SLC26A4* 遺伝子変異について検討した。Madden ら⁵⁾ は *SLC26A4* 遺伝子の変異アレル数が増えるほど両側前庭水管の中間径の平均は大きいことを報告し、前庭水管拡大の大きさと変異アレル数には明らかな相関関係があったと述べている。本検討では 1.5mm 以上の確実例では約 90% に 2 アレル変異を認めるが、中間径が 1.0mm から 1.4mm のボーダーライン例では 34% に 2 アレル変異を認め、前庭水管拡大と遺伝子変異に強い相関が見られた ($P = 0.004$)。今回の結果から確実例では、高頻度で遺伝子変異があると想定される。しかしボーダーライン例でも 2 アレル変異を持つ症例があることより、確実例と同様に遺伝的背

景をある程度念頭において診療を行う必要性があると考えられる。

変異アレル数が増えるほど最終聴力が悪化しやすいという報告⁸⁾¹³⁾もある。例えば Madden らの変異数と最終聴力の検討では、2 アレル変異は 80.6 dB、1 アレル変異は 64.4 dB、変異なしは 49.4 dB と変異数と最終聴力にも明らかな相関関係があると述べている。*SLC26A4* ノックアウトマウスによる動物実験¹⁶⁾では、内耳における Cl⁻/HCO₃⁻交換系の障害の他に、蝸牛外側壁の中間細胞障害による K リサイクルの障害による蝸牛内電位の低下が難聴を生じると報告がされている。我々の変異アレル数と聴力との検討では 2 アレル変異の聴力は中等度から高度難聴症例が中心で、変異なしでは中等度難聴で変異アレル数が多いほど高度になる傾向があると考えられる。

遺伝子変異の種類について見てみると、Suzuki らの報告¹⁴⁾では日本人では 2168A>G 変異が 39 症例中 28 症例 (71.8%) に認めているが、本確実例においては 15 症例中 5 症例 (33%) と少ない。今後日本人の変異の特徴についてさらなる検討が必要と考える。

前庭水管拡大に伴う内耳奇形としては Mondini 奇形が特徴的である。Azaiz による報告⁷⁾では前庭水管拡大に Mondini 奇形を合併する例は、前庭水管拡大で *SLC26A4* 変異が確認された症例中 50% の頻度であったとしている。今回の検討では確実例・ボーダーライン例併せて 2 アレル変異を持つ 10 症例中 7 症例 (70%) で Mondini 奇形を合併していたが、それぞれの群には有意差は見られなかった ($P = 0.266$)。Mondini 奇形は蝸牛形成後期の障害で発生するが、*SLC26A4* 遺伝子変異が前庭水管拡大に Mondini 奇形が合併するはっきりとした理由はまだ分かってない。

前庭水管拡大症では前庭障害によるめまい症状は合併しやすい。Suzuki ら¹⁴⁾は 0 歳から 76 歳の 39 症例で 70.6% にめまいを合併したと報告している。Azaiz らの報告⁷⁾ではめまい症状の合併の頻度は 50-70% 程度としているが、Madden ら⁸⁾は 6 ヶ月から 23 歳の 77 症例中 3 例 (4%) と非常に少ないとしており、報告により違いがある。めまい症状としては Meniere 病に似た回転性めまいが特徴で、聴力悪化

に伴ってめまい発作を発症すると報告¹⁵⁾がされている。頭部への衝撃などによる脳圧の変化によって内リンパ嚢から拡大した前庭水管を通り前庭や蝸牛へ高浸透圧性のリンパ液の流入によって引き起こされるとする説¹⁰⁾や、*SLC26A4* ノックアウトマウスによる動物実験での前庭の変性や奇形による前庭機能障害が生じるという報告¹⁶⁾がある。本検討でのめまい症状は確実例の症例2では感音難聴の急性増悪に伴う強い回転性めまいを反復して認め典型と考えられる。しかし症例全体で見ると確実例では33%でボーダーライン例では17%と少なく、それぞれの群で有意差は認められなかった ($P=0.604$)。また、一般には頭部外傷によるめまいの増悪や難聴発作を起こすことがいわれているが、本症例中には明らかな頭部外傷によるめまいや聴力悪化を認めた症例は認めなかった。今回のめまい発作の頻度が少ない理由として乳幼児期の症例が多く、詳細なめまいの聴取が出来ないことがめまいの既往の率を下げている可能性があり、今後成長と共に経過を詳細にかつ注意して見ていく必要があると考えられる。

Pendred 症候群を含めた前庭水管拡大症の遺伝子解析の報告がされるようになってきた。Choi ら⁹⁾は2アレル変異を持つものは Pendred 症候群を発症しやすく、1アレルのものは非症候群性を呈しやすといった報告や、Madco ら¹⁷⁾は PDT (Parchlorate discharge test) を Pendred 症候群に対して行ったところ2アレル変異を認める症例に高率に PDT 陽性が認められたとしている。また、この前庭水管拡大に対して甲状腺エコーを行ったところ変異のない群に比べて2アレル変異をもつ群の方が幼小児期から甲状腺体積が大ききことを報告した。本検討では成人4症例(症例1-4)中2例(症例2, 4)で甲状腺腫を持つ症例を Pendred 症候群と診断したが、Pendred 症候群の甲状腺腫は一般には思春期以降に発症するとされており、今回検討した小児症例については今後発症してくる可能性がある。PDT は Pendred 症候群の診断に必要なが、放射線被曝の問題や施行できる施設に限られる点で普及していない。今後は *SLC26A4* 遺伝子検査で代用可能な場合が増すと考えられる。加えて甲状腺体積測定も有用になる可能性があり今後試みていきたい。一方 Iwasaki らの報告¹⁸⁾では幼小児期の

TG 値上昇が Pendred 症候群を予測出来る可能性を指摘している。今回の検討でも成人症例は不明を含めると75%にTG値の上昇を認めた。TG値と *SLC26A4* 遺伝子検査、画像検査により Pendred 症候群の早期発見や早期対応が可能となることが示唆された。

まとめ

近年前庭水管拡大と遺伝子変異との関係やその臨床的特徴がある程度分かってきた。我々の今回の検討では、前庭水管拡大確実例ではボーダーライン例に比較して *SLC26A4* 遺伝子が強く相関することが分かった。Mondini 奇形は伴う症例が多いが、それぞれの群での有意差は見られなかった。前庭症状は確実例とボーダーライン例とで発症に有意な差はみられなかった。甲状腺の検討でもそれぞれの群に有意な差は見られなかった。しかし甲状腺腫は2アレル変異をもつ成人症例には伴いやすいが、13歳以下の症例ではTGの上昇を示す例があり、特にこのような症例は今後の甲状腺機能低下や甲状腺腫に注意が必要であると考えられた。

これらの結果は今後の遺伝カウンセリングにおいて用いることで聴力予後、めまいの説明や、甲状腺疾患の早期診断と早期発見にも有用であるため、今後も引き続き症例を増やしてさらに検討を加えていきたい。

(第54回日本聴覚医学会総会・学術講演会で口演した。)

Mutations of *SLC26A4* are associated with the clinical features in patients with bilateral enlargement of the vestibular aqueduct

Yasuhide Okamoto¹⁾, Tatsuo Matsunaga²⁾, Hide-nobu Taiji³⁾, Noriko Morimoto³⁾, Hideaki Sakata⁴⁾, Nodoka Adachi⁵⁾, Ayako Kanno¹⁾, Satoko Ymaguchi⁶⁾, Atsuko Nakano⁷⁾, Akira Takagi⁸⁾, Kimitaka Kaga²⁾, Kaoru Ogawa⁹⁾

¹⁾Department of Otorhinolaryngology, Inagi Municipal Hospital

²⁾Department of Otorhinolaryngology, National Hospital Organization Tokyo Medical Center

³⁾Department of Otorhinolaryngology, National Center for Children and Development

⁴⁾Department of Otorhinolaryngology, Mejiro University Clinic

⁵⁾Department of Otorhinolaryngology, Saitama childrens Medical Center

⁶⁾Department of Otorhinolaryngology, Yokohama Municipal Citizens Hospital

⁷⁾Department of Otorhinolaryngology, Chiba Children's Hospital

⁸⁾Department of Otorhinolaryngology, Shizuoka General Hospital

⁹⁾Department of Otorhinolaryngology, Keio University Hospital

Enlargement of the vestibular aqueduct (EVA) is an inner ear malformation associated with both non-syndromic and syndromic forms of sensorineural hearing loss and dizziness, including Pendred's syndrome. Mutation of *SLC26A4* has been found in many patients with EVA, although the mechanism by which this mutation gives rise to the malformation is still unclear. In this study, we subclassified fifteen patients with bilateral EVA into an 'enlarged' or 'borderline' group based on axial CT imaging, and examined the correlation of the *SLC26A4* genotype with the clinical features. Two mutant *SLC26A4* alleles were found in 89% of the 'enlarged' cases and 33% of the 'borderline' cases. Mondini's dysplasia was detected in 67% of the 'enlarged' cases and 33% of the 'borderline' cases. Episodes of dizziness occurred in 33% of the 'enlarged' cases and 17% of the 'borderline' cases, and goiter was present in 22% of the 'enlarged' cases and 17% of the 'borderline' cases. Serum thyroglobulin levels were elevated in 50% of patients with either mutant allele. Mutational analysis of *SLC26A4* may facilitate the diagnosis of Pendred's syndrome and non-syndromic recessive deafness in patients with EVA.

参考文献

- 1) Smith SD, Harker LA : Singlegene influences on radiologically-detectable malformation of the inner ear. *J Commun Disord* **31** : 391-410, 1998
- 2) Phelps PD, Coffey RA, Trembath RC, et al : Radiological malformations of the ear in Pendred syndrome. *Clin Radiol* **53** : 268-273, 1998
- 3) Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al : Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* **17** : 411-22, 1997
- 4) Usami S, Abe S, Weston MD, et al : Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum Genet* **104** : 188-92, 1999
- 5) Madden C, Halsted M, Benton C, et al : Enlarged vestibular aqueduct syndrome in the pediatric population. *Otol Neurotol* **24** : 625-32, 2003
- 6) Pryor SP, Madeo AC, Reynolds JC, et al : *SLC26A4*/PDS genotype phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA) : evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet* **42** : 159-165, 2005
- 7) Azaiez H, Yang T, Prasad S, et al : Genotype-phenotype correlations for *SLC26A4*-related deafness. *Hum Genet* **122** : 451-457, 2007
- 8) Madden C, Halsted M, Meinzen-Derr J, et al : The influence of mutations in the *SLC26A4* gene on the temporal bone in a population with enlarged vestibular aqueduct. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **133** : 162-8, 2007
- 9) Choi Byung, Andrew K, Stewart, et al : Hypo-Functional *SLC26A4* Variants Associated with Nonsyndromic Hearing Loss and Enlargement of the Vestibular Aqueduct : Genotype-Phenotype Correlation or Coincidental Polymorphisms? *Human Mutation* **30** : 599-608. 2009
- 10) Levenson MJ, Parisier SC, Jacobs M, et al : The large aqueduct syndrome in children ; A review of 12 case and the description of a new clinical

- cal entity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **115**: 54-58, 1989
- 11) Okumura T, Takahashi H, Honjo I, et al: Sensorineural hearing loss in patients with large vestibular aqueduct. *Laryngoscope* **105**: 289-294, 1995
- 12) 松本真吏子, 星野知木, 木倉幹乃, 他: 側頭骨CTにおける前庭水管拡大の診断基準 ボーダーライン症例についての検討。 *Otology Japan* **15**: 633-638, 2005
- 13) Colvin IB, Beale T, Katherine Harrop-Griffiths, et al: Long-Term Follow-up of Hearing Loss in Children and Young Adults With Enlarged Vestibular Aqueducts: Relationship to radiologic findings and Pendred Syndrome diagnosis. *Laryngoscope* **116**: 2027-2036, 2006
- 14) Suzuki H, Oshima A, Usami S, et al: Clinical characteristics and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients with SLC26A4 mutations. *Acta Oto-Laryngologica* **127**: 1292-1297, 2007
- 15) Stinckens C, Huygen PL, Joosten FB, et al: Fluctuant, progressive hearing loss associated with Menière like vertigo in three patients with the Pendred syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **61**: 207-15, 2001
- 16) Wangemann P, Nakaya K, Wu T, et al: Loss of cochlear HCO₃-secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**: 1345-53, 2007
- 17) Madeo AC, Manichaikul A, Reynolds AC, et al: Evaluation of the Thyroid in Patients With Hearing Loss and Enlarged Vestibular Aqueducts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **135**: 670-676, 2009
- 18) Iwasaki S, Tsukamoto K, Usami S, et al: Association of SLC26A4 mutations with clinical features and thyroid function in deaf infants with enlarged vestibular aqueduct. *J Hum Genet* **51**: 805-810, 2006

(原稿受付 平成22. 3. 30)

別冊請求先: 〒206-0801

東京都稲城市大丸1171

稲城市立病院 耳鼻咽喉科

岡本 康秀

Reprint request:

Yasuhide Okamoto

206-0801 Department of Otorhinolaryngology, Inagi Municipal Hospital, 1171 Omaru, Inagi-shi, Tokyo 206-0801, Japan

■ ■ 8. 遺伝性難聴と遺伝カウンセリング ■ ■

●はじめに

遺伝性難聴は、補聴器、人工内耳といったリハビリテーション手段により大きな機能回復と言語獲得を期待できる点が特徴である。これは他の遺伝性疾患では原因が判明しても機能の改善を得る手段がほとんどないのとは大きく異なり、遺伝性難聴の遺伝カウンセリングの重要性が高い理由となっている。

しかし、今から15年前までは遺伝性難聴は遺伝形式などから漠然とその存在が知られている状況で、遺伝カウンセリングに耳鼻科医が関与するということはほとんどなかった。その後間もなく難聴遺伝子が次々と発見され出してから、それまで原因がわからなかった目の前の多くの患者の難聴の原因や病態がわかるようになり、状況が一変した。現在では、難聴の遺伝カウンセリングは一部の医療施設で臨床の場に定着し、より多くの施設に広がりつつある。一方で、臨床に即した遺伝性難聴の研修機会はまだまだ乏しく、情報が不足して実践を躊躇する場合も多いようである。そこで本稿にはそのような臨床の現場に必要な内容を記した。

■ 遺伝カウンセリングの具体的内容 ■

遺伝性難聴の遺伝カウンセリングは、遺伝子解析(検査)を実施することで、より正確に行うことが可能となる。そのため遺伝子解析と遺伝カウンセリングは通常はセットで行われる。多数ある遺伝性難聴の遺伝子解析を十分に実施できる専門施設は限られているので、実施する場合にはその施設に検体(血液)を送り、遺伝子解析結果の報告を受けることになる。あるいは患者を専門施設に紹介して、遺伝カウンセリングも含めてそちらで実施される場合もある。遺伝カウンセリングには、遺伝子解析前に行う事前カウンセリングと遺伝子解析結果を報告する際に行う事後カウンセリングがあり、筆者の施設での所要時間としては、事前カウンセリングは15~30分、事後カウンセリングは結果によって異なるが30~60分である。

事前カウンセリングの内容は、ほぼ全国共通の項目が定められた遺伝子解析用のインフォームド・コンセントを使用して、遺伝子の説明から始まり、どのような解析が行われ、どのような結果が得られ、関連して何が生じたり、わかったりする可能性があるのかなどを知ってもらうものである。事後カウンセリングの内容は、遺伝子解析の内容や結果によって大きく異なり、また施設によってもかなり違いがあると考えられる。筆者らの施設で実施している内容の典型例を表1にまとめた。「1. 難聴の遺伝的原因について」から「7. 劣性遺伝の保因者について」まで、各項目を順番に話す。また、各項目を話す前には、クライアント

表 1 ● 難聴の遺伝カウンセリングの具体的内容と順序

1. 難聴の遺伝的原因について
 - a. 遺伝子解析結果の簡潔な報告
 - b. 小児難聴や遺伝性難聴の概略(原因、頻度、遺伝形式など)の説明
 - c. 難聴者(児)の背景と各原因との関連の確認
 - d. 解析した遺伝子の選択の理由と解析結果
 - e. 難聴者(児)で見つかった遺伝子変異についての模式図を用いた理解しやすい説明
 - f. 原因遺伝子の働きと難聴となる理由についての模式図を用いた理解しやすい説明
2. 難聴の特徴の予測と予後について(程度、周波数別の閾値、今後の経過など)
3. 難聴の予防について(薬剤の使用、頭部への衝撃など)
4. 合併症の予防と早期発見について(糖尿病、腎臓病、甲状腺腫など)
5. 治療の選択について(補聴器、人工内耳の適応について)
6. 再発リスクについて
 - a. 既に生まれている同胞の場合
 - b. 次の妊娠・出産の子どもの場合
 - c. 難聴児が将来授かる子どもの場合
7. 劣性遺伝の保因者について

筆者の施設で難聴の遺伝子解析結果報告の際に行う典型的な遺伝カウンセリングの内容とその順番を一例として示した。

(カウンセリングを受ける人)が聞くことを希望するかどうかを確認する。話の間でも随時質疑などに答えるが、各項目終了後にも必ず質疑を確認する。最後に、耳鼻科医が対応する遺伝性難聴の大部分を占める劣性遺伝の難聴遺伝子の保因者(ほとんどは先天性難聴児の両親)に対しては、すべての人が8つほどあるいはそれ以上の劣性遺伝性疾患遺伝子の保因者であり、難聴児の両親が特別な遺伝的体質というわけではないこと、両親が偶然同じ遺伝子の保因者である場合に子どもに症状が出現しうること、そのためどの両親にも一定の確率で劣性遺伝性疾患の子どもが生まれうることを説明する。

カウンセリングでは、あくまでも難聴者あるいは難聴児の両親の自発的な意思決定を促すように対応する。重篤な合併症を呈しうる症候群性難聴の出生前診断など、遺伝に関するより専門的な検討を要する相談を受ける場合も時としてあるが、このような場合は原則的に各地域の遺伝医療の専門医師(主に遺伝科、産婦人科、小児科など)に紹介する。より詳細な遺伝カウンセリングの内容に関しては筆者の総説を参照されたい¹⁾。

■ 遺伝性難聴に対する医療者の対応 ■

最近では、一部の難聴者あるいは難聴児の両親はインターネットなどの情報から難聴遺伝子検査を知り、それを希望して受診される場合もある。しかし、まだ大半の方は遺伝性難聴に関して十分な情報をもたず、医療者から話を出さなければそれ以上は遺伝的原因の診断は進まない。一方、難聴診療にかかわる医療者には、遺伝性難聴の頻度が比較的高いこと、原因を知ることが診療に役立つこと、国内でも調べることが可能であることなどの情報が徐々に普及している。初めは最も関係の深い小児難聴を専門とする医師へ普及し、次いで難聴を専門とする医師へ、そしてそれ以外の耳鼻咽喉科医師や小児科医師へという順に少しずつ