

201128202A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

Coffin-Siris症候群の遺伝要因の解明

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 直通

(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成24(2012)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
Coffin-Siris 症候群の遺伝要因の解明 松本直通 (資料) 研究全体の流れと進行状況	-----	1
II. 分担研究報告		
1. Coffin-Siris syndromeの6例の臨床像 岡本伸彦	-----	9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	17

Coffin-Siris症候群の遺伝要因の解明

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

Coffin-Siris 症候群(以下 CSS と称す)は、軽度～中等度の精神遅滞・中等度以上の低緊張・てんかん・粗な顔貌と手足第5指の低形成などの奇形兆候を特徴と多発奇形・精神遅滞症候群の一つである。稀な疾患でその頻度や遺伝要因の解明は進んでいない。本研究は、CSS を対象に近年の技術革新によって可能となったヒト全遺伝子のエクソン領域（全エクソーム）の解析を行いその遺伝的原因を明らかにすることを目的とした。集積した CSS23 症例のうち典型例 5 例を対象に全エクソーム解析を行った。このうち 2 例で遺伝子 CSS1 の de novo 異常を同定した。集積した全ての CSS 症例で CSS1 異常の有無を確認し、CSS1 異常は 20 例で確認され (87%)、CSS1 異常が CSS の主要な原因であることが明らかとなった。

分担研究者

岡本伸彦・大阪府立母子保健総合療センター

A. 研究目的

Coffin-Siris 症候群(以下 CSS と称す)は、軽度～中等度の精神遅滞・中等度以上の低緊張・てんかん・粗な顔貌と手足第5指の低形成などの奇形兆候を特徴と多発奇形・精神遅滞症候群の一つである。稀な疾患でその頻度や遺伝要因の解明は進んでいない。研究代表者・松本は、CSS の染色体微細構造異常・病的 Copy Number Variation (CNV) の有無をマイクロアレーで精査したが、異常は同定されなかった。申請する本研究は、CSS を対象に近年の技術革新によって可能となったヒト全遺伝子のエクソン領域（全エクソーム）の解析を行いその遺伝的原因を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

I. 症例集積（岡本・松本）

研究分担者・岡本を中心に、臨床遺伝ネットワーク等を通じて全国の小児科医・遺伝専門医から CSS 症例の集積を行っている。研究開始時点で既に CSS 症例が 17 例集積している。詳細な臨床情報を得られる症例群で、世界的にも質の高い貴重な研究リソースである。研究期間を通じてさらに集積を目指す予定である。

II. 全エクソーム解析（松本）

Agilent 社の SureSelect を用いてヒトゲノム全遺伝子のエクソン領域のみを分画し、Illumina 社 GAIIX を用いてペアエンドシーケンスを行う。現行試薬における GAIIX のシーケンス産出キャパシティーは、101 bp ペアエンドシーケンス法で 1 ラン 50-60 Gb（8 レーンの合計）であり、1 レーンにつき 1 サンプルで十分なエクソーム解析が可

能となる。

III. 次世代シーケンスデータ解析 (松本)
研究代表者・松本は、次世代シーケンス算出データから遺伝子変異を効率的に同定する MAQ を基盤とした解析フローを開発した。さらに市販の次世代シーケンスデータ解析ソフトウェア NextGENE を併用して研究室内で効率よく遺伝子変異を同定することが可能である。

IV. トリオを用いた de novo 検証 (松本)
CSS の想定発症モデルは責任遺伝子の de novo 変異による常染色体優性遺伝モデルである。可能な限り症例の両親を集積し同定した遺伝子変異の de novo 確認を行う。少なくとも 2 例以上で de novo 変異を同定できたら疾患遺伝子と確定できる。

V. 遺伝子変異と臨床病型連関の検討 (岡本・松本)

本研究で変異が明らかになった症例毎に詳細な臨床情報を分析し、遺伝子変異が惹起する臨床病型を明らかにする。

(倫理面への配慮)

申請する研究はヒトゲノム解析研究であり生命倫理・安全対策に対する取組として以下の措置を講じる。解析に用いる疾患患者試料は、全て第一群試料提供者によるものとする。試料等提供者に対する倫理的配慮として (1) 研究対象者の拒否権の尊重：患者・および親権者 (両親) が自由に同意・拒否できるように配慮し、(2) インフォームドコンセント：本研究の主旨、方法、危

険性の有無などを十分に説明した後、文書による同意を得て提供された試料を研究に用い、(3) 知る権利・知らないでいる権利の尊重：保護者が希望すれば、研究結果は原則的に伝える (連結可能)。患者は各研究協力機関で匿名化されて集積されるため、個人情報漏洩の可能性は極めて低い。以上から倫理面において問題がないと判断している。本研究計画は、三省のヒトゲノム解析研究に関する共通指針 (2001 年・2004 年および 2005 年改訂) を遵守して組織された横浜市立大学医学部倫理委員会において、本研究の申請・承認を得たうえで、承認された研究計画を遵守し研究を遂行する。個人情報保護法に十分留意しながら研究を施行していく。

C. 研究結果

I. 症例集積 (岡本・松本)

平成23年11月28日時点で、CSS23例を集積した。

II. 全エクソーム解析 (松本)

CSS5例に対して全エクソーム解析を施行した。3例については両親を加えたトリオ解析を行った。

III. 次世代シーケンスデータ解析 (松本)

MAQ と NextGENE を併用して効率よく遺伝子変異を同定するシステムを構築した。本プロトコルを用いた変異候補をゲノムを鋳型にした PCR シーケンス検証を行うとおよそ 70-80% で true positive であった。

IV. トリオを用いた *de novo* 検証 (松本)
2 例で *de novo* 変異を呈した CSS1 (未発表のため仮称とする) の同定に成功した。CSS23 症例中 CSS1 の異常に関連した症例は 20 例であった (87%)。

V. 遺伝子変異と臨床病型連関の検討 (岡本・松本)

本研究で変異が明らかになった症例毎に詳細な臨床情報を分析し、遺伝子変異が惹起する臨床病型が明らかとなった。神経発達異常・外胚葉系異常・顔貌異常・骨格系・消化管系異常・その他と多彩な臨床症状を呈していた(論文投稿中)。特に第 5 指の爪低形成は診断上重要な所見であった。

D. 考察

当初目的としていた CSS の責任遺伝子単離に成功しその成果を現在投稿中である。CSS の責任遺伝子を利用した疾患遺伝子の検証法で特許出願した。CSS の正確な遺伝子診断が可能になった。本研究を通じて次世代シーケンサーによる全エクソン領域 (エクソーム) 解析の解析系の有効性が明示された。

E. 結論

これまで遺伝的原因が全く不明であった CSS の原因遺伝子を明らかにすることができた。遺伝子異常によって CSS と診断された症例の多彩な臨床症状が明らかになった。

F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tadaki H, Saitsu H, Nishimura-Tadaki A, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Miyake N, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, *Matsumoto N. *De novo* 19q13.42 duplications involving *NLRP* gene cluster in a patient with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *J Hum Genet* 56 (5): 343-347, 2011.

*Miyake N, Yamashita S, Kurosawa K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Matsumoto N. A novel homozygous mutation of *DARS2* may cause a severe LBSL variant. *Clin Genet* 80(3): 293-296, 2011.

Tadaki H, Saitsu H, Kanegane H, Miyake N, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Nishimura A, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, *Matsumoto N. Exonic deletion of *CASP10* in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa. *Int J Immunogenet* 38 (4): 287-293, 2011

Tsurusaki Y, Osaka H, Hamanoue H, Shimbo H, Tsuji M, Doi H, Saitsu H, *Matsumoto N, *Miyake N. Rapid detection of a mutation causing X-linked leukodystrophy by exome

sequencing. *J Med Genet* 48 (9): 606-609, 2011.

*Narumi Y, Shiihara T, Yoshihara H, Sakazume S, van der Knaape MS, Nishimura-Tadaki A, Matsumoto N, Fukushima Y. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC) in an infant with Down syndrome. *Clin Dysmorphol* 20 (3): 166-167, 2011

Dai J, Kim O-K, Cho T-J, Miyake N, Song H-R, Karasugi T, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Nagai T, Matsumoto N, Ohashi H, Kamatani N, Nishimura G, Furuichi T, Takahashi A, *Ikegawa S. A founder mutation of *CANT1* common in Korean and Japanese Desbuquois dysplasia. *J Hum Genet* 56(5): 398-400, 2011.

*Saito H, Matsumoto N. Genetic commentary: *De novo* mutations in epilepsy. *Dev Med Child Neurol* 53 (9):806-807, 2011.

Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, *Kosho T. Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet* 155(8): 1949-1958, 2011

*Saito H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama N, Nishimura A,

Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N. Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (*SRGAP2*). *Am J Med Genet* 158A (1):199-205, 2011

Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy. *Clin Genet* 80 (2): 161-166, 2011

Hannibal MC#, Buckingham KJ#, Ng SB#, (# denotes equal contribution) Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura KI, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, *Bamshad MJ. Spectrum of *MLL2* (*ALR*) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 155 (7): 1511-1516, 2011.

*Kosho T, Miyake N, Mizumoto S, Hatamochi A, Fukushima Y, Sugahara K, Matsumoto N. A response to: Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (*D4ST1/CHST14*) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, "Dermatan sulfate-deficient adducted thumb-clubfoot syndrome". Which name is

appropriate, “Adducted thumb–clubfoot syndrome” or “Ehlers–Danlos syndrome”?
Hum Mut 32(12):1507-1509, 2011

*Saitsu H[#], Kato M[#] ([#] denotes equal contribution), Shimono M, Senju A, Tanabe S, Kimura T, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Association of genomic deletions in the *STXBPI* gene with Ohtahara syndrome. Clin Genet (in press)

*Saitsu H, Igarashi N, Mitsuhiro Kato M, Okada I, Shimokawa O, Sasaki Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Hayasaka K, Matsumoto N. *De novo* 5q14.3 translocation 121.5-kb upstream of *MEF2C* in a patient with severe mental retardation and early-onset epileptic encephalopathy. Am J Med Genet (in press)

*Saitsu H, Kato M, Matsumoto N. Haploinsufficiency of *STXBPI* and Ohtahara syndrome. Jasper’s basic mechanism of the epilepsies, 4th edition, edited by Noebels J, Avoli M, Rogawski M, Olsen RW, and Delgado-Escueta AV. Oxford University Press (in press)

*Hamdan FF[#], Saitsu H[#] ([#] denotes equal contribution), Masuko K, Gauthier J, Dobrzaniecka S, Spiegelman D, Lacaille JC, Décarie JC, Matsumoto N, Rouleau GA, Michaud JL. Mutations in *SPTANI* in intellectual disability and pontocerebellar

atrophy. Eur J Hum Genet (in press).

*Saitsu H, Osaka H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N. A girl with early-onset epileptic encephalopathy associated with microdeletion involving *CDKL5*. Brain Dev (in press)

Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki T, Saitsu H, Miyake N, Masuda M, *Matsumoto N. Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing. Hum Genet (in press)

Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Nishiyama K, Tsurusaki T, Doi H, Miyake N, Ryoo N-K, Kim JH, Yu KS, *Matsumoto N. A family of oculofaciocardiodental syndrome (OFCD) with a novel *BCOR* mutation and genomic rearrangements involving *NHS*. J Hum Genet (in press)

Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, *Matsumoto N. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of *NFLX* cause Sotos-like syndrome. J Hum Genet (in press)

*Abdel-Salam GMH, Miyake N, Eid MM, Abdel-Hamid MS, Hassan NA, Eid OM,

Effat LK, El-Badry TH, El-Kamah GY, El-Darouti M, *Matsumoto N. A homozygous Mutation in *RNU4ATAC* as a cause of microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I (MOPD I) with associated pigmentary disorder. Am J Med Genet (in press)

Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, *Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A Variant of *RNF213* Predicts Early-Onset and Severe Form of Moyamoya Disease. Neurology (in press)

*Saitsu H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, *Matsumoto N. Mutations in *POLR3A* and *POLR3B* encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. Am J Hum Genet (in press)

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

review of literature. Am J Med Genet (in press)

2. 学会発表

講演会「次世代シーケンサーを用いた最先端研究」・松本直通「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」(徳島・徳島大学医学部臨床第一講堂 8月26日)

第一回サイトジェノミクスセミナー・松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーによる疾患研究の最前線」(三菱化学メディエンス志村事業所・東京9月17日)

第46回産婦人科研究会(順天堂大学) 松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(順天堂大学医学部・東京9月20日)

第18回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会・松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(佐賀大学医学部・佐賀10月1日)

日本人類遺伝学会第56回大会・松本直通「ヒト遺伝性疾患の原因解明を目指して」学会賞受賞講演(於・幕張メッセ11月11日)

日本人類遺伝学会第56回大会「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」松本直通(シンポジスト)シンポジウム11(超高速シーケンサーによる疾患ゲノム解析)(於・幕張メッセ11月12日)

国立精神・神経医療研究センターTMC 棟／
クラスター研究棟開棟記念講演会「遺伝
性神経疾患のエクソーム解析」松本直通
(招待講演)(国立精神・神経医療研究セ
ンター11月22日)

The 34th annual meeting of the molecular
biology society of Japan・Next generation
sequencing technology enables a large scale
medical genomic research (symposium)
「Disease genome analysis using next
generation sequencer」Naomichi
Matsumoto (Invited speaker)(Dec 14, 2011
at Yokohama, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願2012-136 松本直通／鶴崎美徳／三宅紀
子・コフィンーシリス症候群の検出方
法・平成24年1月4日

研究全体の流れと進行状況

研究代表・松本 研究分担・岡本

横浜市立大学倫理審査委員会の承認・各検体供与機関での適切な倫理手続きと配慮

23
年度

症例集積
細胞株化

岡本
松本

詳細な
臨床病型
の情報収集

異常CNVを伴わない症例の全エクソーム解析

次世代シーケンサー解析: MAQ/BWA/NextGENE

トリオ(両親と症例)を用いたde novo検証

24
年度

現時点

疾患診断法・バイオマーカー開発・治療への展開

25
年度

診断基準の確立と提案・社会への発信

Coffin-Siris Syndrome 6例の臨床像

研究分担者 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科 岡本伸彦

研究要旨

Coffin-Siris Syndrome は稀少な多発先天異常/精神遅滞症候群のひとつである。特徴的顔貌と第V指の爪低形成が診断に参考になる。Fifth Digit Syndrome ともよばれる。その他にも多彩な臨床所見を呈する。本症候群の国内報告例は少なく、実態は不明の点が多い。大阪府立母子保健総合医療センターは大阪府の小児医療の中心的な医療機関であり、多くの先天異常症候群が集積している。遺伝子解析で変異が確定した Coffin-Siris Syndrome 6 症例をまとめた。

共同研究者

大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科
池川敦子、大町和美、三島祐子、山本悠斗

A.研究目的

Coffin-Siris Syndrome (CSS) は稀少な多発先天異常/精神遅滞症候群のひとつである。特徴的顔貌、第V指の爪低形成がみられる。Fifth Digit Syndrome ともよばれる。Coffin and Siris (1970)は精神遅滞と第V指趾の爪と末節骨低形成を伴う3女児例を報告した。同胞例の報告が複数あり、遺伝形式は常染色体劣性遺伝と考えられた時期があった。Haspeslagh et al. (1984)は、23例の報告例を分析し、女性が4:1で多いと報告した。McPherson et al. (1997)らは、均衡型転座 $t(1;7)(q21.3;q34)$ を報告した。McGhee et al. (2000)らも均衡型転座 $t(7;22)(q32;q11.2)$ 例を報告した。これらの結果から、7q32-q34 にCSSの遺伝子座位が示唆された。

Swillen et al. (1995)らは12例の発達状況をまとめた。精神遅滞は3例が軽度で9例が中度であった。言語発達は重度であった。5例は広汎性発達障害であった。Fleck et al. (2001)らは過去の報告をまとめ、発達遅滞、粗野な顔貌、多毛、第V指末節骨低形成は最小限の診断基準であると報告した。表1に主要症状をまとめた。

子宮内発育は遅延し、低出生体重児のことが多い。生後も哺乳障害がめだち、体重増加不良である。哺乳栄養障害が強い場合はチューブ栄養も考慮する場合もある。乳幼児期に上気道感染を反復しやすい。しかし、一般的な検査では特に免疫系の異常は認めない。筋緊張は低く、関節弛緩もある。運動発達は遅延する。精

神発達も遅延し、全般的な発達遅延となる。発達遅滞の程度は中度から重度が多い。

CSSの最大の身体的特徴は指趾末節部および爪の低形成である。特に第V指趾が低形成のことが多く、典型例では爪は痕跡的である。Fifth digit syndromeの由来となっている。第II指趾も低形成のことが多い。

顔貌も特徴的である。幅広い鼻、広い口、濃い眉、長い睫毛、鼻根部平低、前向きの鼻孔、幅広い鼻、大きな口、厚い口唇を認める。全身的に多毛であるが、頭髪は疎である。Dysmorphology 的に診断のめやすがつく例が多い。

CSSは国内の報告例は非常に少ないが、当センターでフォロー中の6例(男児4例 女児2例)について臨床的検討を行った。本研究班ではCSSの責任遺伝子解明を行ったが、6例とも遺伝子レベルで変異が確定した。

B.研究方法

大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科受診中のCSS 6症例について臨床所見や検査データを分析した。

遺伝子解析については別項で詳述されるので本項では省略する。

表1 Coffin-Siris 症候群の主要症状

低出生体重
哺乳障害

乳幼児期に上気道感染反復
筋緊張低下
運動発達遅滞
中度から中度の精神遅滞
関節弛緩
第V指が短く、低形成で爪が欠損している。
骨年齢遅延
低身長
小頭症
粗野な顔貌 幅広い鼻 広い口 濃い眉 長い睫毛
多毛であるが、頭髪は疎

C.研究結果

6例の臨床所見および主要な検査結果を整理した。

症例1

20歳男性。家族歴に特記事項なし。在胎40週、子宮内発育遅延であった。生後喉頭軟化症で呼吸障害、哺乳障害を認めた。両側性感音性難聴、舌小帯短縮症、先天性鼻涙管閉鎖症、両眼眼瞼下垂、近視を認めた。爪低形成や特徴的顔貌から、CSSと臨床的に診断した。精神運動発達は遅延した。現在までてんかん発作はない。

頑固な便秘と夜尿で酸化マグネシウムとトフラニールを内服中である。体温のコントロールも不良である。身体発育：20歳で、体重60kg、身長156cmとこがら。頭囲51.2cm(-3.8SD)。

発達状況：支援学校を卒業して、作業所に勤めている。療育手帳A判定。聴覚障害。視覚障害。体幹機能障害を合併する。有意語に乏しいが、簡単な理解は可能。健康状態は良好である。

症例2

13歳男児。家族歴に特記事項なし。満期産、正出生体重。周産期に問題なし。乳児期より発達は遅滞した。哺乳障害、体重増加不良、易感染性を認めた。アトピー性皮膚炎、扁平足、乳歯脱落遅延も認めた。哺乳障害、嘔吐が顕著であったが、3歳ごろから摂食機能が改善した。学童期には多動傾向であった。長い睫毛、やや粗野な顔貌、爪・指遠位低形成(特に第5指)などの身体所見かたら、CSSと診断した。

染色体G-bandは、46,XYで、マイクロアレイでも異常は認められなかった。

身体発育 13歳で、身長150cm(-1.4SD)、体重44kg(-0.5SD)、頭囲55cm(0.7SD)で体格は小柄である。発達状況：乳児期より運動発達促進のための理学療法を受けた。現在特別支援学校に通っている。易感染性はない。二次性徴も認める。指先の細かい動きは難しい。発声は乏しいが、筆談で意思表示可能である。STによる言語訓練を受けている。

症例3

11歳男児。家族歴に特記事項なし。満期産で正出生体重であった。先天性甲状腺機能低下症で治療を受けた。乳児期より発達遅滞を認めた。低身長、停留精巣、側弯を認めた。特徴的顔貌、身体所見よりCSSと診断した。心肺、腹部所見に異常は認められなかった。時に嘔吐発作を認めた。

身体発育：11歳で、身長142cm(-2.4SD)、体重30kg(-0.5SD)、頭囲51cm(-1.1SD)で、体格は徐々に改善してきている。

発達状況：小学校では特別支援教育をうけているが、発達は比較的良好である。

症例4

3歳男児。満期産で正出生体重。生後、頻回の嘔吐が見られた。幽門狭窄症の診断で手術をうけた。乳児期は哺乳障害、体重増加不良が顕著であった。そのため経鼻チューブ栄養をうけた。多毛、左右の眉毛の結合、長い睫毛、厚い口唇、短い人中など特徴的顔貌を認めた。第V趾爪低形成を認めた。精神運動発達は顕著に遅れ、3歳でははいはいまでで歩行獲得できず、有意語もなかった。呼吸器感染症を反復した。2歳で身長83.4cm(-2.2SD)、頭囲43cm(-3.3SD)と小頭症であった。

発達状況：重度精神運動発達遅滞である。

症例5

16歳女児。家族歴に特記事項なし。満期産正出生体重。幼少期より発達の遅れと左聴覚障害があった。易感染性、摂食障害、便秘を認めた。心肺と腹部所見に異常は見られず、原因不明の精神遅滞として経過観察されていた。

第5趾の爪低形成、爪の反り、第5指低形成、眉毛結合、長い睫毛、厚い口唇、短い人中、疎な頭髪、な

どの身体所見から臨床的に CSS を疑った。

身体発育：16 歳で、身長 148 cm (-1.9SD)、体重 39 kg (-1.9SD)、頭囲 52 cm (-2/3SD) である。

発達状況：療育手帳 A 判定。特別支援学校に通っている。少しの会話はできる。生活の多くの面で介助は必要である。

症例 6

7 歳女児。家族歴に特記事項なし。子宮内発育遅延であった。羊水過少であった。出産時、気管内挿管で蘇生。肺出血でサーファクタントを使用した。てんかん（複雑部分発作）、脳梁低形成、小顎症、外斜視、精神遅滞、運動発達遅滞、皮膚の色素沈着を認めた。高度難聴であった。摂食障害が強く、胃瘻を必要とした。頭部 MRI で脳梁部分欠損を認めた。染色体 G-band は、46,XX で、マイクロアレイでも異常は認められなかった。

身体発育：7 歳で、身長 97 cm (-4.5SD)、体重 12 kg (-3.0SD)、頭囲 44 cm (-5.1SD) であった。

発達状況：7 歳で座位ができず、寝返りで移動している。有意語なく、重度精神遅滞で療育をうけている。

6 例のまとめ

表 2 にまとめを示した。

6 例中、低出生体重児は 2 例であった。

栄養摂取状況：生後も哺乳障害がめだち、体重増加不良である。哺乳栄養障害が強く、チューブ栄養を要する例があった。胃瘻が必要な例もあった。

感染症：乳幼児期に上気道感染を反復しやすかった。しかし、一般的な検査では白血球数、IgG 値など特別な免疫系の異常は認めなかった。

発達状況：筋緊張は低く、関節弛緩もある。運動発達は遅延する。CSS では 3 歳以降に歩行開始となる例が多いが、7 歳で歩行未獲得の例もあった。

精神発達も遅延し、全般的な発達遅延となる。発達遅滞の程度は中度から重度が多い。特に言語表出の遅延は顕著であり、有意語獲得はできていない例もあった。難聴の例は言語発達がより遅延する傾向がある。身体所見：第 V 指趾を 6 例全例で認めた。第 II 指趾も低形成の例があった。レントゲン上も末節骨の低形成を認めた。

顔貌：全例において特徴的な粗野な顔貌を認めた。幅

広い鼻、広い口、濃い眉、長い睫毛、鼻根部平低、前向きの鼻孔、幅広い鼻、大きな口、厚い口唇などは共通した所見であった。

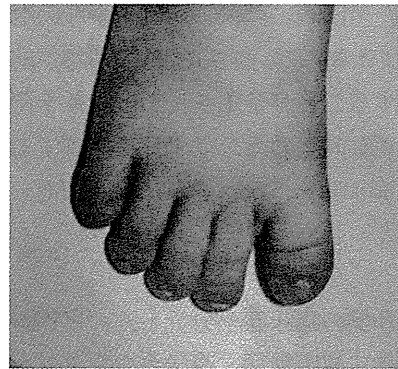
神経系：一例でてんかんの合併を認めた。頭部 MRI で脳梁低形成の例が多かった。

循環器系：先天性心疾患を含め、大きな問題はなかった。

消化器系：GERD の例が多かった。便秘の例が多かった。

整形外科：指趾低形成の他、側彎を認める例が多かった。

図 CSS 典型例の爪低形成



D. 考察

CSS の典型症例は身体所見や発達経過から疑いを持つことは可能である。染色体検査では異常は認めない。CSS の鑑別診断は 胎児性ヒダントイン症候群、Nicolaidis-Baraitser 症候群などである。BOD 症候群と CSS は Allelic な疾患であるという報告もある。BOD 症候群は爪の低形成は手よりも足に顕著であること、発達遅滞が軽度であることが鑑別点である。

提示した 6 例中、2 例が低出生体重であったが、他の例も出生体重はやや小さめで、生後も成長障害を認めた。哺乳障害も多かった。乳児期より発達遅延が顕著であった。全例、中度から重度の精神運動発達遅滞を認めた。一部の例は年長でも歩行獲得が困難であった。有意語を認めない例もあった。難聴の例があり、聴力検査は重要である。身体所見も特徴的であった。爪低形成と特徴的顔貌が診断の契機となる。幼少期には気道感染を反復する例が多い。

確定診断としては遺伝子解析が可能になった。確定

診断の過程と平行して、可能性のある合併症について精査し、治療をすすめる必要がある。診断が確定すれば正確な遺伝カウンセリングも実施可能となる。

CSS の遺伝形式については議論があった。複数の同胞例や近親婚例の報告が、常染色体劣性遺伝と考えた。Haspelslagh et al. (1984)らは、親に部分的な症状を認め、表現系に差のある優性遺伝を考えた。自験例6例中、同胞例はなく、親に症状を認めた例はなかった。本研究班の大きな成果として次世代シーケンサー解析でCSSの責任遺伝子同定が行われた。その結果、両親を検索した範囲では全員新規突然変異であった。過去の同胞例は性腺モザイクが考えられる。

CSSの日本人例は少ないが、1医療機関で6例の経験していることから、全国的には未診断例が少ないないと思われる。今後は日本においてもCSSの理解が進み、研究がより進展することが予想される。CSSを持つ患者の発達支援、QOL向上のために研究を継続する予定である。

E. 結論

Coffin-Siris 症候群の6例の臨床像を分析した。早期からの正確な診断により、健康管理、遺伝カウンセリングを行うことが可能である。

文献

Fleck BJ, Pandya A, Vanner L, Kerkerling K, Bodurtha J. Coffin-Siris syndrome: review and presentation of new cases from a questionnaire study. *Am J Med Genet.* 2001 ;99:1-7.

Haspelslagh M, Fryns JP, van den Berghe H. The Coffin-Siris syndrome: report of a family and further delineation. *Clin Genet.* 1984 ;2:374-8.

McPherson EW, Laneri G, Clemens MM, Kochmar SJ, Surti U. Apparently balanced t(1;7)(q21.3;q34) in an infant with Coffin-Siris syndrome. *Am J Med Genet.* 1997 ;71:430-3.

McGhee EM, Klump CJ, Bitts SM, Cotter PD, Lammer EJ. Candidate region for Coffin-Siris syndrome at 7q32-->34. *Am J Med Genet.* 2000 ;93:241-3.

Swillen A, Glorieux N, Peeters M, Fryns JP. The Coffin-Siris syndrome: data on mental development, language, behavior and social skills in 12 children. *Clin Genet.* 1995 ;48:177-82.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Sasaki K, Okamoto N, Kosaki K, Yorifuji T, Shimokawa O, Mishima H, Yoshiura KI, Harada N. Maternal uniparental isodisomy and heterodisomy on chromosome 6 encompassing a CUL7 gene mutation causing 3M syndrome. *Clin Genet.* (in press)

Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Kosho T. Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet A.* (in press).

Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takanashi JI, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. Novel intragenic duplications and mutations of CASK in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH). *Hum Genet.* (in press)

Kawazu Y, Inamura N, Kayatani F, Okamoto N, Morisaki H. Prenatal complex congenital heart disease with Loeys-Dietz syndrome *Cardiology in the Young* (in press)

Naike M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N. MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESH ECK syndrome *Am J Med Genet* (in press)

Filges I, Shimojima K, Okamoto N, Röthlisberger B, Weber P, Huber AR, Nishizawa T, Datta AN, Miny P, Yamamoto T. Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome. *J Med Genet.* 48:117-122, 2011.

Waga C, Okamoto N, Ondo Y, Fukumura-Kato R, Gotō YI, Kohsaka S, Uchino S. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr Genet.* 21:208-211, 2011.

Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet A.* 155:409-414, 2011.

Okamoto N, Hatsukawa Y, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PHPV. *Am J Med Genet A.* 155:1568-1573, 2011.

Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy. *Clin Genet.* 80:161-166, 2011

Okamoto N, Tamura D, Nishimura G, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay. *Am J Med Genet A.* 155:2997-3001, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表2 Coffin-Siris 症候群6例のまとめ

	1:20歳男児	2:13歳男児	3:9歳男児	4:3歳男児	5:16歳女児	6:5歳女児
発達 神経系						
発達遅滞の程度	重度	重度	中度	重度	重度	重度
筋緊張低下	+	+	+	+	+	+
頭囲SD値	-3.8SD	-1.1SD	-1.1SD	-3.3SD	-2.3SD	-3.6SD
小脳低形成	-	-	-	-	-	+
てんかん発作	-	-	-	-	-	+
Dandy-Walker奇形	-	-	-	-	-	-
中枢神経系	+	脳梁低形成	-	脳梁低形成	脳梁低形成	脳梁部分欠損
視覚障害	-	-	-	-	+	+
難聴	両側難聴	-	-	-	左難聴	両側高度難聴
外胚葉系						
第V指し 爪欠損/低形成	+	+	+	+	+	+
多毛症	+	+	+	+	+	+
疎な頭髮	+	+	+	+	-	+
濃い眉毛	+	+	+	+	+	+
長い睫毛	+	+	+	+	+	+
生歯異常 遅延	+	+	+	+	?	+
涙管機能不全	+	?	?	+	?	+
顔面						
粗野な顔貌	+	+	+	+	+	+
鼻根部平低	-	+	+	-	+	+
広い鼻	+	+	+	+	+	+
大きな口	+	+	+	+	+	+
厚い口唇	+	+	+	+	+	+
耳介異常	+	+	+	+	+	+
高口蓋	+	+	+	+	+	+
眼瞼下垂	+	-	-	+	-	+
巨舌	-	-	-	-	-	+
長い人中	long	long	-	long	+	long
骨格系						
第V指末節骨欠損/低形成	+	+	+	?	+	?
第Vし末節骨欠損/低形成	+	+	+	?	+	?
低身長	-3SD	-1.4SD	-2.7SD	-2.2SD	-1.6SD	-4.2SD
脊椎異常		-	mild scoliosis	-	scoliosis	mild scoliosis
骨年齢遅延		?	-	?	?	?
消化器系						
摂食障害	GERD	+	+	GERD幽門狭窄	+	GERD 胃瘻
哺乳障害	+	+	+	+	+	+
その他						
頻回感染	+	+	+	+	+	+
IUGR	-	-	-	-	-	+
関節弛緩	+	+	+	+	+	+
心疾患	-	-	-	+	-	-
外性器異常	-	-	停留精巣	+	-	-
鼠径ヘルニア	-	-	-	+	-	+
腎異常	-	-	-	-	-	-

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saitsu H, et al., Matsumoto N.	Paternal mosaicism of a <i>STXBPI</i> mutation in Ohtahara syndrome.	Clin Genet	80 (5)	484-488	2011
Hiraki Y, et al., Matsumoto N.	A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty.	Am J Med Genet Part A	152(2)	409-414	2011
Tonoki H, et al., Matsumoto N, Iizuka S.	Axenfeld-Rieger anomaly and Axenfeld-Rieger syndrome: clinical, molecular-cytogenetic, and DNA array analyses on three patients with chromosomal defects at 6p25.	Am J Med Genet Part A	155 (12)	2925-2932	2011
Tsurusaki Y, et al., Matsumoto N, Miyake N.	Rapid detection of a mutation causing X-linked leukodystrophy by exome sequencing.	J Med Genet	48 (9)	606-609	2011
Narumi Y, et al., Matsumoto N, Fukushima Y.	Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC) in an infant with Down syndrome.	Clin Dysmorphol	20 (3)	166-167	2011
Saitsu H, Matsumoto N.	Genetic commentary: <i>De novo</i> mutations in epileptics.	Dev Med Child Neurol	53 (9)	806-807	2011
Tsurusaki Y, et al., Matsumoto N.	Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy.	Clin Genet	80 (2)	161-166	2011

Okamoto et al.	Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CNET Part A ADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PH1PV	Am J Med Genet	155	1568-1573	2011
Filges I, et al., Okamoto N, et al.	Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome.	J Med Genet.	48	117-122	2011



Short Report

Paternal mosaicism of an *STXBPI* mutation in OS

Saitsu H, Hoshino H, Kato M, Nishiyama K, Okada I, Yoneda Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kubota M, Hayasaka K, Matsumoto N. Paternal mosaicism of an *STXBPI* mutation in OS.

Clin Genet 2011; 80: 484–488. © John Wiley & Sons A/S, 2010

Ohtahara syndrome (OS) is one of the most severe and earliest forms of epilepsy. We have recently identified that the *de novo* mutations of *STXBPI* are important causes for OS. Here we report a paternal somatic mosaicism of an *STXBPI* mutation. The affected daughter had onset of spasms at 1 month of age, and interictal electroencephalogram showed suppression-burst pattern, leading to the diagnosis of OS. She had a heterozygous c.902+5G>A mutation of *STXBPI*, which affects donor splicing of exon 10, resulting in 138-bp insertion of intron 10 sequences in the transcript. The mutant transcript had a premature stop codon, and was degraded by nonsense-mediated mRNA decay in lymphoblastoid cells derived from the patient. High-resolution melting analysis of clinically unaffected parental DNAs suggested that the father was somatic mosaic for the mutation, which was also suggested by sequencing. Cloning of PCR products amplified with the paternal DNA samples extracted from blood, saliva, buccal cells, and nails suggested that 5.3%, 8.7%, 11.9%, and 16.9% of alleles harbored the mutation, respectively. This is a first report of somatic mosaicism of an *STXBPI* mutation, which has implications in genetic counseling of OS.

Conflict of interest

None of the authors has any conflict of interest to disclose.

**H Saitsu^a, H Hoshino^b,
M Kato^c, K Nishiyama^a,
I Okada^a, Y Yoneda^a,
Y Tsurusaki^a, H Doi^a,
N Miyake^a, M Kubota^b,
K Hayasaka^c and
N Matsumoto^a**

^aDepartment of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Fukuura 3-9, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan, ^bDivision of Neurology, National Center for Child Health and Development, Okura 2-10-1, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan, and ^cDepartment of Pediatrics, Yamagata University Faculty of Medicine, Iida-nishi 2-2-2, Yamagata 990-9585, Japan

Key words: HRM analysis – OS – somatic mosaicism – *STXBPI*

Corresponding author: Dr Hiroto Saitsu, Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan.
Tel.: +81-45-787-2606;
fax: +81-45-786-5219;
e-mail: hsaitso@yokohama-cu.ac.jp

Received 8 August 2010, revised and accepted for publication 30 September 2010

Ohtahara syndrome (OS), also known as early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst, is one of the most severe and earliest forms of epilepsy (1). It is characterized by early onset of seizures, typically frequent epileptic spasms, seizure intractability, characteristic suppression-burst patterns on electroencephalogram (EEG), and poor outcome with severe psychomotor retardation (2, 3). Brain malformations such as cerebral dysgenesis or hemimegalencephaly are often associated with OS, but cryptogenic or idiopathic OS is found in a subset

of OS patients, in whom genetic aberrations might be involved (4). Mutations in *ARX* gene have been found in several male patients with OS (5–8). We have recently found *de novo* mutations in *STXBPI* (encoding syntaxin binding protein 1, also known as MUNC18-1) in individuals with cryptogenic OS (9). A microdeletion involving *STXBPI* and various kinds of point mutations including missense, frameshift, nonsense, and splicing mutations have been found in about one-third of Japanese cases with cryptogenic OS (10). We have showed that both missense mutations and

a splicing mutation result in haploinsufficiency of *STXBPI*: degradation of STXBPI proteins with missense mutations and nonsense-mediated mRNA decay (NMD) associated with an aberrantly spliced mRNAs (10).

Here we describe a family with an affected daughter with an *STXBPI* mutation and healthy parents. Parental analysis indicates that the father is somatic mosaic for the mutation. Detailed molecular analysis is presented.

Materials and methods

Patient and her parents

The 1-year-old girl is a product of unrelated healthy parents. There is no history of epilepsy in her parents. She was born at term without asphyxia after an uneventful pregnancy. Her physical and neurological findings were normal until vomiting, which was supposed to be a pre-symptomatic event of seizures, was observed at 25 days of age, and her seizures started at 37 days of age, consisting of brief tonic spasms, occasionally in cluster, followed by vomiting and subtle seizures, such as head extension, upward eye gazing, and vocalization, with increased muscle tone of her extremities for a few seconds. According to suppression-burst pattern on EEG (Fig. 1a,b), she was diagnosed as OS. Brain magnetic resonance imaging (MRI) showed normal brain structure (Fig. 1c–f). Seizures were refractory to antiepileptic drugs, such as high-dose phenobarbital, phenytoin, zonisamide, pyridoxal phosphate, valproic acid, ketogenic diet, and potassium bromide. Injection of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) was partially effective. She was hypertonic and could not control her head or smile. At 6 months of age, a mild rigospastic quadriplegia was noted. Developmental milestones were profoundly delayed.

DNA samples

Peripheral blood leukocytes from the patient and her parents as well as other tissues from the father were used for this study. Genomic DNA from whole blood, saliva, buccal cells, and nails were isolated using a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Tokyo, Japan), an Oragene DNA kit (DNA Genotek, Ottawa, Canada), an ISOHAIR kit (Nippon Gene, Toyama, Japan), and a Gentra Puregene Buccal Cell Kit (Gentra, Minneapolis, MN), respectively. Experimental protocols were approved by Institutional Review Boards for Ethical Issues at Yokohama City University School of Medicine and Yamagata University Faculty of Medicine. Informed consent was obtained

Paternal mosaicism of *STXBPI* mutation in OS

from the patient's parents in agreement with the requirements of Japanese regulations.

Mutation analysis and TA cloning

Mutation screening of *STXBPI* by high-resolution melting (HRM) analysis using RotorGene-6200 HRM (Corbett Life Science, Brisbane, Australia) was performed as previously described (10). Parentage was confirmed by microsatellite analysis (9). For measurement of the ratio of wild-type and mutant alleles, PCR products using paternal DNA as a template were subcloned into pCR4-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cloned fragments were amplified with PCR mixture containing 1 × ExTaq buffer, 0.2 mM each dNTP, 0.5 μM each primer, and 0.375 U Ex TaqHS polymerase (Takara Bio, Ohtsu, Japan). M13 forward (5'-TAAAACGACGGCCAGTGAAT-3') and M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGACCATGA-3') primers were used for amplification, and an ex10-F (5'-AGCTGAAGAGGGTTCGATGA-3') primer was used for sequencing.

RNA analysis

RNA analysis using lymphoblastoid cells (LCL) was performed essentially as previously described (10). Briefly, after incubation with dimethyl sulfoxide (as vehicle control) or 30 μM cycloheximide (Sigma, Tokyo, Japan) for 4 h, total RNA was extracted using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan). Two micrograms total RNA was subjected to reverse transcription, and 1 μl cDNA was used for PCR. Primer sequences are ex9-F (5'-CCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTT-3') and ex12-R (5'-CTGAGGCATCTTCTC AGCATCTGG-3'). Inhibition of NMD was estimated according to the density ratios of lower normal and upper aberrant bands with/without 30-μM cycloheximide treatments in the culture of the patient's LCL. Two separately extracted RNA samples were used for duplicated experiments, respectively. Data were averaged and the standard deviation was calculated. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's *t*-test (two-tailed). DNA of each PCR band purified by QIAEXII Gel extraction kit (Qiagen, Tokyo, Japan) was sequenced.

Results

Through the screening for *STXBPI* mutations in individuals with cryptogenic OS, we found a patient harboring heterozygous c.902+5G>A mutation. To examine whether the mutation