

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

DHPLCを用いた多発性奇形症候群包括的診断システムの構築に関する研究

分担研究者 小崎里華

独立行政法人国立成育医療研究センター 器官病態系内科部 遺伝診療科 医長

### 研究要旨

遺伝子診断による確定診断は有意義である。しかしながら、広く利用されている遺伝子診断技術すなわち、シーケンシング法を用いた解析法は高価格であるために、臨床応用することは難しい。われわれは CHD7 遺伝子変異をスクリーニングする検査方法を開発し、国内からの遺伝子診断の要望に応じている。これまでに解析した日本人患者の CHD7 変異陽性患者における遺伝子変異について網羅的に記載した。

### 研究協力者

小崎健次郎 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター  
鳥居千春 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター

#### A. 研究目的

CHARGE症候群は複数箇所に先天異常を認める疾患群で、先天異常の組合せによって疾患単位が形成される。本研究班の検討によれば、発生頻度は1/30000程度で、先天異常症候群としては比較的頻度が高く、小児科領域の遺伝性疾患中で重要な位置を占める。

CHARGE症候群の原因遺伝子は2004年に明らかになり、遺伝子診断が可能となった。診断基準は過去に報告され、当研究班においても改定を行ったが、症状が多彩であるために、正確な臨床診断は容易ではないため、遺伝子診断による確定診断は有意義である。

しかしながら、広く利用されている遺伝子診断技術すなわち、シーケンシング法を用いた解析法は高価格であるために、臨床応用することは難しい。当研究班では、熱変性高速液体クロマトグラフィー法を利用して、遺伝子変異をスクリーニングする検査方法を開発し、全国の小児科医が利用しうるシステムを運用している。

本研究の目的は、これまでにわが国で同定された CHARGE症候群症候群の遺伝子変異のスペクトラムを明らかにすることにある。

#### B. 研究方法

CHARGE 症候群の原因遺伝子である CHD7 について熱変性高速液体クロマトグラフィーを用いた遺伝子診断プロトコルを最適化し、全国の主要小児診療施設からの検査依頼に応じて、遺伝子診断システムを運用した。

#### C. 研究結果

(1)検査プロトコルの標準化と公開

標準化検査プロトコルを使用した。ウェブサイト <http://www.dhplc.jp> を立ち上げ、全プロトコルを公開している。

(2)遺伝子検査の検査の実施

全国の主要小児診療施設からの検体を受け入れた。変異陽性例を付表に示す。

大部分の症例で、ナンセンス変異ないしフレームシフト変異を認めた。ミスセンス変異(変化)については、病的意義を確定するためには両親の解析を行い、両親に変異が無いことを確認する必要がある。しかし、両親によっては確認を好まないことがあり、この場合、病的な変異なのか中立的な変化であるのか、決定することは出来ない。

両親の解析によって、両親の解析によって、1) 両親がいずれも当該アミノ酸置換もたず病的な変化と確定できたアミノ酸置換、2) 両親のいずれかが当該アミノ酸置換を有していた、病的な意義が無い変化と確定できたアミノ酸置換、についてデータベース化し、広く公開することが有効と考えられた。

また、両親が解析を望まない場合、多人数の正常人集団における頻度の推定が有効となる。多人数の多型解析には、患者検体の解析と同程度の費用が必要となり、わが国独自の疾患別遺伝子変異・多型のデータベースを構築・公開する必要性が示された。

(倫理面への配慮)

慶應義塾大学医学部倫理委員会・国立成育医療研究センターの承認を受けて解析を実施した。全例に対して遺伝カウンセリングを行った。

#### D. 考察

熱変性高速液体クロマトグラフィーによる分析を行った。ほとんどの変異は CHD7 のタンパクの全長の合成をさまたげる truncating mutation であった。

本研究班のメンバーが開発した解析プロトコルは、ヨーロッパ(フランス)のグループによりそのまま利用され、最近、ガイドラインとして出版され、その有用性が国際的に認められたと云える。

Bilan F, et al. Complete screening of 50 patients with CHARGE syndrome for anomalies in the CHD7 gene using a denaturing high-performance liquid chromatography-based protocol: new guidelines and a proposal for routine diagnosis. *Mol Diagn.* 14:46-55, 2012

当該分析法を用いれば、他の小児領域の遺伝性疾患(神経疾患・血液疾患・内分泌疾患・免疫疾患等)においても、臨床サービスとしての遺伝子診断システムを構築しうると期待される。ミスセンスアミノ酸置換の病的意義を集積するデータベースの必要性が示唆された。

## E. 結論

熱変性高速液体クロマトグラフィーを利用すれば、全国の小児科臨床医の検査依頼に応えうる臨床サービスとしての遺伝子診断システムの構築が可能である。ただし臨床応用のためにはミスセンス置換のデータベースの整備が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

小崎里華 CHARGE症候群 大関武彦他  
今日の小児の治療指針 医学書院 東京 2011  
190

Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M, Shimizu H A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing. *Exp Dermatol* 20(1) 74-6 2011

Shimizu H, Migita O, Kosaki R, Kasahara M, Fukuda A, Sakamoto S, Shigeta T, Uemoto S, Nakazawa A, Kakiuchi T, Arai K

Living-related liver transplantation for siblings with progressive familial intrahepatic cholestasis 2, with novel genetic findings. *Am J Transplant.* 11(2) 394-8 2011

Kosaki R, Fujita H, Ueoka K, Torii C, Kosaki K. Overgrowth of prenatal onset associated with submicroscopic 9q22.3 deletion. *Am J Med Genet A.* 155(4) 903-5 2011

Kondoh T, Kanno A, Itoh H, Nakashima M, Honda R, Kojima M, Noguchi M, Nakane H, Nozaki H, Sasaki H, Nagai T, Kosaki R, Kakee N, Okuyama T, Fukuda M, Ikeda M, Shibata Y, Moriuchi H. Donepezil significantly improves abilities in daily lives of female Down syndrome patients with severe cognitive impairment: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial *Int J Psychiatry Med* 41(1) 71-89 2011

Kosaki K, Saito H, Kosaki R, Torii C, Kishi K, Takahashi T Branchial arch defects and 19p13.12 microdeletion: defining the critical region into a 0.8 M base interval. *Am J Med Genet A* 155A(9) 2212-4 2011

Numabe H, Sawai H, Yamagata Z, Muto K, Kosaki R, Yuki K, Kosaki K. Reproductive success in patients with Hallermann-Streiff syndrome *Am J Med Genet A* 155A(9) 2311-3 2011

Tsutsumi Y, Kosaki R, Itoh Y, Tsukamoto K, Matsuoka R, Shintani M, Nosaka S, Masaki H, Iizuka Y Vein of Galen Aneurysmal Malformation Associated With an Endoglin Gene Mutation. *Pediatrics* 128(5) 1307-10 2011

Tonoki H, Harada N, Shimokawa O, Yosozumi A, Monzaki K, Satoh K, Kosaki R, Sato A, Matsumoto N, Iizuka S Axenfeld-Rieger anomaly and Axenfeld-Rieger syndrome: Clinical, molecular-cytogenetic, and DNA array analyses of three patients with chromosomal defects at 6p25. *Am J Med Genet A* 155A(12) 2925-32 2011

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

Tsutsumi Y, Kosaki R, Itoh Y, Tsukamoto K, Matsuoka R, Shintani M, Nosaka S, Masaki H, Iizuka Y Vein of Galen Aneurysmal Malformation Associated With an Endoglin Gene Mutation. *Pediatrics* 128(5) 1307-10 2011

### 2. 学会発表

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

付表

変異のタイプ 変異

Frame shift ex2 1295delA fs462X  
Frame shift ex2 1412-1415 delTGAC fs X474  
Frame shift ex2 640 delT fs304X  
Frame shift ex3 1683delC fs563X  
Frame shift ex3 1957-1958 delCC fs674X  
Frame shift ex8 2500-2504 delTCTTA fs848X  
Frame shift ex8 2500-2504delTCTTA fs848X  
Frame shift ex8 2504-2508 delATCTT Thy835SerfsX14  
Frame shift ex8 2504-2508 delATCTT Thy835SerfsX14  
Frame shift ex13 3225-3226 insT fs1076X  
Frame shift ex17 4171 del C 1391fs X1403  
Frame shift ex18 4226-4227delTG V1409Efs1420X  
Frame shift ex18 4319-4320 insA fs1475X  
Frame shift ex21 c.4723\_4724insG p.Glu1575GlyfsX8  
Frame shift ex26 c.5433\_5434insT p.Asp1812X  
Frame shift ex28 5638-5639 ins G fs 1893X  
Frame shift ex29 5676-5677insT fs1893X  
Frame shift ex29 5711 delC fs1909X  
Frame shift ex31 6228 del G fs2143X  
Frame shift ex31 c.6326delT p.Val2109AlafsX35  
Frame shift ex31 c.6745\_6746insG p.Asp2249GlyfsX2  
Frame shift ex33 6998 delC P2333 fs2334X  
Frame shift ex34 7486-7487insGC fs2503X  
Frame shift ex35 7802-7803 insA Y2601X  
Frame shift ex37 8058-8059 insT D2687X  
Frame shift ex38 8738 del T fs2916X  
Frame shift ex38 8962 dupG fsX2989

Nonsense ex2 1036A>T R346X  
Nonsense ex2 1480C>T R494X  
Nonsense ex2 469C>T R157X  
Nonsense ex2 550C>T Q184X  
Nonsense ex2 550C>T Q184X  
Nonsense ex2 604C>T Q202X  
Nonsense ex2 934C>T R312X  
Nonsense ex2 c.1480C>T p.Arg494X  
Nonsense ex2 c.490C>T p.Gln164X  
Nonsense ex4 2101A>T K701X  
Nonsense ex4 2180T>G L727X  
Nonsense ex10-11 2839C>T R947X  
Nonsense ex10-11 2839C>T R947X  
Nonsense ex11 2839C>T R947X  
Nonsense ex12 2959C>T R987X  
Nonsense ex12 3106C>T R1036X  
Nonsense ex12 3106C>T R1036X  
Nonsense ex12 c.3059delT p.Leu1020X  
Nonsense ex13 3205C>T R1069X  
Nonsense ex15 3655C>T R1219X

変異のタイプ 変異

Nonsense ex15 3655C>T R1219X  
Nonsense ex16 c.3907A>T p.Lys1303X  
Nonsense ex17 4015C>T R1339X  
Nonsense ex17 4015C>T R1339X  
Nonsense ex17 4036C>T Q1346X  
Nonsense ex18 4336G>T E1446X  
Nonsense ex19 4393C>T R1465X  
Nonsense ex19 4393C>T R1465X  
Nonsense ex19 4480C>T R1494X  
Nonsense ex19 4480C>T R1494X  
Nonsense ex22 4947C>A Y1649X  
Nonsense ex25 5338G>T E1780X  
Nonsense ex25 5355G>A W1785X  
Nonsense ex25 5355G>A W1785X  
Nonsense ex26 5458C>T R1820X  
Nonsense ex30 5982G>A W1994X  
Nonsense ex30 6070C>T R2024X  
Nonsense ex30 6070C>T R2024X  
Nonsense ex31 c.6157C>T p.Arg2053X  
Nonsense ex31a 6148C>T R2050X  
Nonsense ex33 6991A>T K2331X  
Nonsense ex33 7027C>T Q2343X  
Nonsense ex33 7153C>T Q2385X  
Nonsense ex34 7282C>T R2428X  
Nonsense ex34 7367C>G S2456X  
Nonsense ex34 7400T>A L2467X  
Nonsense ex36 7873C>T Q2625X  
Nonsense ex36 7879C>T R2627X  
Nonsense ex36 7879C>T R2627X  
Nonsense ex36 7879C>T R2627X  
Nonsense ex36 7891C>T R2631X  
Nonsense ex38 8803G>T E2935X

Splice site ex18 IVS18+1G>T  
Splice site ex20 IVS20-2 A>G  
Splice site ex22 IVS21-2A>G splice site  
Splice site ex24 c.5300+1G>A  
Splice site ex26 IVS25-7G>A  
Splice site ex26 IVS26+1G>T  
Splice site ex27 IVS26-16 · IVS26-5 del ins AATT

## CHARGE 症候群の内分泌学的合併症

研究分担者 岡本 伸彦  
大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科

### 研究要旨

CHARGE 症候群では性腺機能低下は重要な合併症である。低ゴナドトロピン性性腺機能低下の状態である。性腺機能低下と無嗅覚を伴うため、Kallmann 症候群との関連が注目されている。最初の症状としては男児においては停留精巣、小陰茎で気づかれることが多い。女児では原発性無月経の例が多い。骨成熟が遅れるために思春期以降も身長増加が継続する例がある。甲状腺機能低下症の例もある。CHARGE 症候群の内分泌学的合併症（甲状腺、ゴナドトロピン）について検討を行った。

### 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

CHARGE 症候群（以下 CS）は *CHD7* 遺伝子変異により成長発達の遅れ、視聴覚障害、内臓疾患を伴う先天異常症候群である。本研究班において、日本における CS の有病率は出生 2 万から 3 万人に 1 人で、全国では年間 30-50 名程度の CS 児が出生していると推測された。

CS ではさまざまな合併症があり、多くの診療科の関与が長期にわたって必要な疾患である。新生児期、乳児期、幼児期、学童期、成人期と問題点も変遷する。長期的な面ではまだ不明な点も少なくない。今回、内分泌学的合併症について焦点をあてた。

Kallmann 症候群は低ゴナドトロピン性性腺機能低下と嗅覚障害を認める。CS でも類似した病態を呈する。臨床的に Kallmann 症候群と診断された症例に対して *CHD7* 遺伝子解析を行ったところ、変異陽性例が見つかったという報告がある。CS 軽症例は Kallmann 症候群と診断されている可能性が存在する。

### B. 研究目的

当研究班で集積されたデータ、研究分担者が勤務する大阪府立母子保健総合医療センターでフォロー中の CS 児についての検査データ、診療録をまとめた。CS の内分泌学的合併症の状況を明らかにすることが目的である。対象は 3 歳以上の 19 症例とした。今回は主に甲状腺ホルモン、性腺刺激ホルモン、テストステロンの値を調べた。GH については今回は検討していない。

### C. 研究結果

CS 患児に対して、健康状態、栄養状態の評価目的で採血を実施している。その際、内分泌学的評価も行った。検査結果は表にまとめた。3 歳以上の男女 19 例全例で LH FSH ともに感度以下であった。男性

ではテストステロンを測定した例では全例低値を示した。感度以下の例もあった。今回検査した CS 全例が低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を伴っていると考えられた。

3 例で甲状腺機能低下症を認め、補充療法を実施した。

特に長期間にわたって経過を観察できた CS2 例を提示する。

図 1 は 23 歳の CS 女性の成長曲線である。後鼻孔閉鎖、口唇口蓋裂、先天性食道閉鎖症、先天性心疾患、眼底コロボーマ、難聴、精神運動発達遅滞など CS の主要な症状をすべて満たしていた。小児期は -2SD を下回る成長障害を認めた。現在は作業所に通っており、生活の多くの面は自立できている。LH、FSH は低値であり、低ゴナドトロピン性性支援機能低下症の状態であった。骨端線閉鎖が遅延した。成長曲線は特徴的であり、思春期以降も身長が増加し続けている。

図 2 は CS 典型例 20 歳男児である。コロボーマ、クレチン症、先天性心疾患（大動脈弓離断）術後、両側高度難聴、精神運動発達遅滞あり。CS の症状を持っていた。LH、FSH はともに感度以下、テストステロンも低値で低ゴナドトロピン性性腺機能低下症であった。思春期をすぎても身長は増加傾向で、162cm を超えている。

この 2 例はともに *CHD7* 遺伝子変異を有していた。

### D. 考察

CS では脳下垂体から分泌される性腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン：LH と FSH）が低値である。このため、男児では小陰茎、停留精巣となる。女児では陰唇低形成で子宮や膣の内腔が未発達である。CS では思春期になってから二次性徴の遅れや、欠如がみられる。原発性無月経となる。

CS では下垂体ホルモンを含む内分泌学的検査が重要である。特に甲状腺刺激ホルモン（TSH）の分泌不全があれば治療を早急に開始する必要がある。必要に応じて成長ホルモン（GH）、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）の分泌を検査する。低身長で GH 分泌不全があれば、GH 補充療法を行う。

CS のほとんどの例では二次性徴は遅延する。女児

13歳、男児14歳で思春期発来の徴候がなければ、中枢性の性腺機能低下症の可能性を考慮して、骨年齢や視床下部-下垂体-性腺機能を調べる。性腺機能低下症が明確であれば、治療（男児はテストステロン療法、女児も女性ホルモン療法）を行う。思春期を誘発させて維持することが目標である。性ホルモンの不足は骨粗鬆症と関連する。

CSは乳幼児期の身長は-2SD以下であっても性腺機能低下のために二次性徴の出現がなく、骨端線の閉鎖が遅延して成人身長は-2SDを上回る例がある。成長曲線は非常に特徴的なものとなる。CSの妊孕性については詳細な報告がない。親子例が報告されているので、軽症例では妊孕性は存在すると考えられる。内分泌学的な治療に関しては成人期以降も必要な場合が多い。しかし、治療に対する長期予後に関しては不明な点が多く、今後の課題である。

#### E. 結論

CSの内分泌学的合併症についてまとめた。成人2例では特徴的な成長曲線を認めた。CSでは性成熟の経過を観察し、LH、FSHの検査を実施する必要がある。適宜、ホルモン補充療法について検討を行う必要がある。

#### 参考文献

Wheeler PG, Quigley CA, Sadeghi-Nejad A, Weaver DD. Hypogonadism and CHARGE association. *Am J Med Genet.* 2000;94:228-31.

Kim HG, Kurth I, Lan F, Melicani I, et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;83:511-19.

Jongmans MC, Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, et al. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome—the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet* 2009;75:65-71.

#### F. 研究発表

##### 発表論文

1) Waga C, Okamoto N, Ondo Y, Fukumura-Kato R, Goto YI, Kohsaka S, Uchino S. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr Genet.* 2011;21:208-11.

2) 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.* 2010 Nov 20. On line  
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.* 2011;155:409-14.

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.* 2011;155:1568-73.

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.* 2011 Jul 7. [Epub ahead of print]

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.* 2011;80:161-6

Misako Naiki, Seiji Mizuno, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Reiko Kimura, Makoto Oshiro, Nobuhiko Okamoto, Yoshio Makita, Mariko Seishima, and Nobuaki Wakamatsu MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome *Am J Med Genet* 2011 on line

10) 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.* 2011;155:2997-3001.

#### G. 知的財産権の出願・登録 なし

図1 症例1の成長曲線 成人女性例

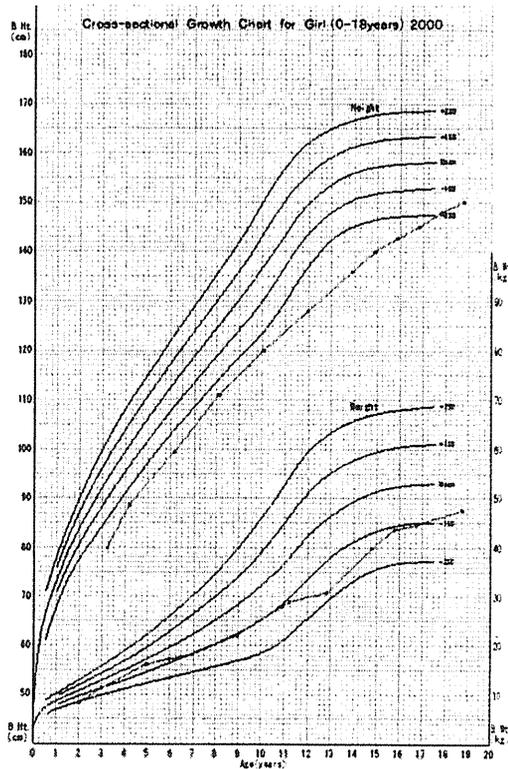


図2 症例2の成長曲線 成人男性例

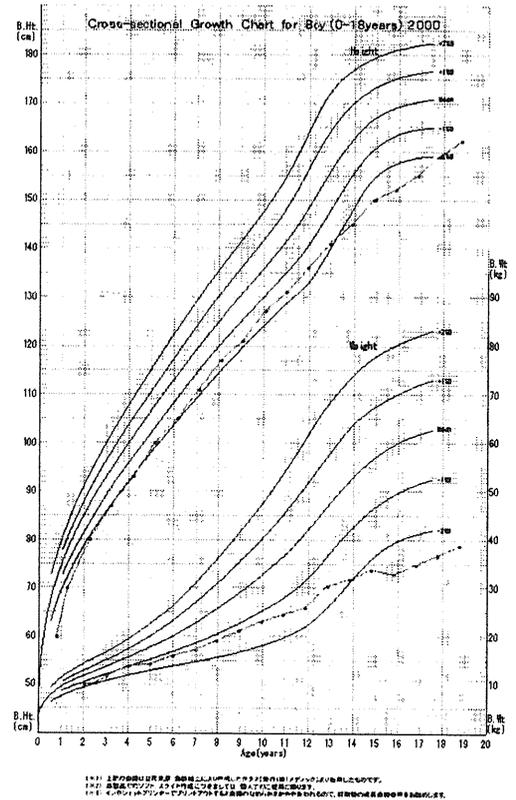


表1 内分泌学的検査所見のまとめ

性別	年齢	LH	FSH	テストステロン	甲状腺機能低下
M	3	感度以下	感度以下	5.2	
M	4	感度以下	感度以下	感度以下	
M	4	感度以下	感度以下	10	
M	5	感度以下	感度以下		
M	6	感度以下	感度以下	感度以下	
M	9	感度以下	感度以下	感度以下	+
M	11	感度以下	感度以下	感度以下	+
M	12	感度以下	感度以下	感度以下	
M	12	感度以下	感度以下	37	
M	12	感度以下	感度以下	11	
M	20	感度以下	感度以下	17	+
F	5	感度以下	感度以下		
F	6	感度以下	感度以下		
F	6	感度以下	感度以下		
F	7	感度以下	感度以下		
F	13	感度以下	感度以下		
F	20	感度以下	感度以下		
F	23	感度以下	感度以下		
F	25	感度以下	感度以下		

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書  
CHARGE 症候群類縁と考えられる男児同胞例の臨床像に関する研究  
研究分担者 水野誠司  
愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部長

**研究要旨**

CHARGE 症候群は 1981 年にその特徴所見の頭文字を取って命名された先天奇形症候群であり、従来その診断は複数の臨床的所見の評価による診断基準を元に行われていたが、2004 年にその原因遺伝子として CHD7 が同定された以後は診断が確実になり、患者の臨床像や医学的および生活的な問題点がより明確にされた。CHARGE 症候群はその合併症が多岐にわたるために診療が臓器別に偏りやすく成長発達を含めた包括的な情報が得られにくい。

昨年度に患者家族への最新情報の提供および患者家族間の交流を目的とする取り組みとして、愛知県心身障害者コロニー中央病院に通う CHARGE 症候群患者及び近隣の医療施設に案内を送付して、対象患者を集めてグループ外来を開催したところ、CHARGE 症候群の同胞例と診断されていた患者が参加した。発達遅滞の程度や顔貌から明らかに CHD7 変異例とは異なる同胞例につきその臨床像を検討した。

研究協力者

小崎健次郎

慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター

**A. 研究目的**

CHARGE 症候群は虹彩欠損 (Coloboma of iris)、先天性心疾患 (Heart disease)、後鼻孔閉鎖 (Atresia choanae) 成長障害及び精神遅滞 (Retarded growth and mental development)、性器低形成 (Genital hypoplasia)、耳介奇形と難聴 (Ear anomalies and deafness) を特徴とする、1981 年にその頭文字を取って命名された先天奇形症候群である。従来その診断は複数の臨床的所見の評価による診断基準を元に行われていたために、CHARGE 症候群と診断されていた患児には後に他の染色体異常や奇形症候群と考えられる症例も含まれていたが、2004 年にその原因遺伝子として CHD7 が同定された以後は遺伝子診断により遺伝学的に同質な症例が集積されるようになった。

CHARGE 症候群の患児家族への支援は、その診断に基づいた科学的な情報による治療と健康管理が最重要であり、また稀少な疾患をもつ子どもの両親の不安や戸惑いに対する心理的な支援も同様に重要である。昨年度は愛知県の心身障害者総合施設である心身障害者コロニー中央病院に通院する CHARGE 症候群の患児と家族に対してグループ外来を開催し、家族への医学的情報の提供の他、家族同士の交流の場を提供し、遺伝性疾患の家族支援の一形態と位置づけた。近隣医療施設にも開催情報を提供したところ、グループ外来参加者の中に従来の CHARGE 症候群の診断基準を満たす同胞例の患者を認めた。発達遅滞の程度や顔貌から明らかに CHD7 変異例とは異なる同胞例について検討し、C

HD7 陽性例とのその臨床像の異同について検討した。

(倫理面への配慮)

対象患児は未成年でありかつ知的障害を有するため、情報の収集に際しては代理人である両親に対して、同意なく個人情報流出することのないように説明を行い個人情報の保護に配慮した。

**B. 研究方法**

CHARGE 症候群を疑う男児同胞例について、画像データを含む医療記録について検討した。一部は直接患児の保護者に聞き取り調査を行いその臨床像について検討した。

**C. 研究結果**

症例 1. 8 歳男児 (兄)

近親婚のない 29 歳の母と 30 歳の父から、在胎 42 週出生時体重 2790g、身長 51cm、頭囲 35cm で出生。新生児期に小眼球症、動脈管開存症を認める。嚥下性肺炎の反復を呈し経管栄養を開始した。PDA による心不全で 1 歳で動脈管結紮術施行。6 歳時熱性痙攣 1 回。以下項目別に記載。

【眼】左小眼球症 眼底コロボーマ

【耳科】両側高度難聴 耳小骨両側奇形  
耳介奇形 (対耳輪の形成が弱い)

【循環器】症候性動脈管開存症、心不全

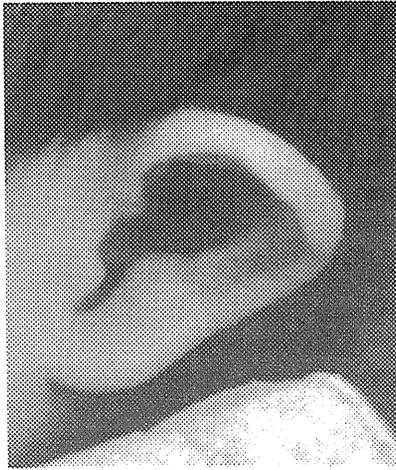
【顔貌】顔面非対象、長円形の輪郭

【摂食】7 歳半まで経管栄養

【成長】現在身長 - 6 SD

【運動発達】7 歳で坐位が可能

【精神発達】IQ < 10



症例1の耳介 Dysmorphicな耳介であり対耳輪の形成が弱く、耳輪の折れ曲がり認められない。Blakeの診断基準では、本児の耳介をCharacteristic CHARGE syndrome earとした場合に、3major + 3 minorで基準を満たす。

#### Major Characteristics

- Ocular coloboma
- Choanal atresia or stenosis
- Cranial nerve dysfunction or anomaly
- Characteristic CHARGE syndrome ear

#### Minor Characteristics

##### Genital hypoplasia

- Developmental delay
- Cardiovascular malformation
- Growth deficiency

##### Orofacial cleft

##### Tracheoesophageal (TE) fistula

##### Distinctive facial features

研究班の診断基準では、  
必発症状

- 耳介奇形を伴う両側性難聴
- 低身長
- 発達遅滞

#### 大症状

- 眼コロボーマ（種類を問わない）  
「後鼻孔閉鎖または口蓋裂」
- 顔面神経麻痺または非対称な顔

#### 小症状

- 心奇形
  - 食道気管支奇形
  - 矮小陰茎または停留精巣（男児）
- 上記にて診断基準を満たす

#### 症例2. 2歳男児（弟）

同じく在胎39週で出生。出生時体重2515g、身長48.5cm、頭囲33.5cmの標準計測値。新生児期に動脈管開存症、右小眼球症、脈絡膜剥離、両側難聴を認める。当初は経口哺乳していたが誤嚥性肺炎を反復するため経管栄養となる。以下項目別に記載。

【眼】右小眼球症 眼底コロボーマ

【耳科】左高度難聴 耳小骨奇形無し  
耳介奇形無し

【循環器】動脈管開存症

【顔貌】顔面非対象、長円形の輪郭

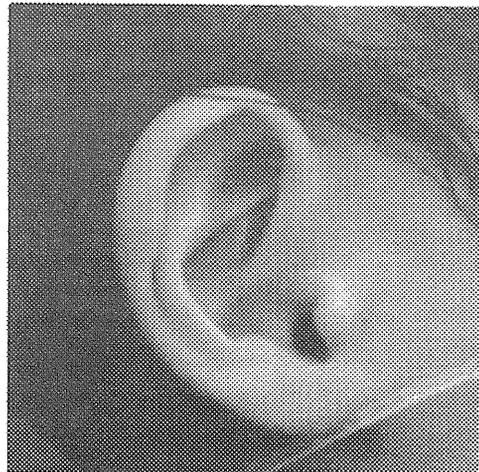
【摂食】誤嚥性肺炎反復し経管栄養

【成長】現在身長-6.5SD

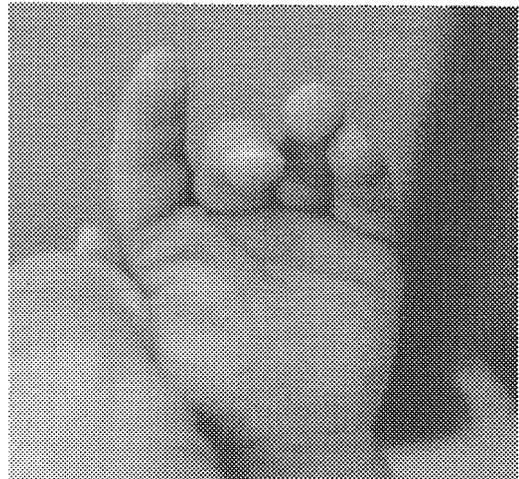
【運動発達】7歳で坐位が可能

【精神発達】IQ<10

【その他】手掌 Hockey Stick Sign あり



症例2の耳介 耳介奇形なしと評価した



症例2の Hockey Stick サイン

Blakeの基準では、

#### Major Characteristics

- Ocular coloboma
- Choanal atresia or stenosis
- Cranial nerve dysfunction or anomaly
- Characteristic CHARGE syndrome ear

#### Minor Characteristics

- Genital hypoplasia
- Developmental delay
- Cardiovascular malformation
- Growth deficiency
- Orofacial cleft
- Tracheoesophageal (TE) fistula

## Distinctive facial features

となり耳介奇形が無いために Major の 3 要素を構成せず診断基準を満たさない。

研究班の診断基準では、

必発症状

耳介奇形を伴う両側性難聴

○低身長

○発達遅滞

大症状

○眼コロボーマ (種類を問わない)

「後鼻孔閉鎖または口蓋裂」

○顔面神経麻痺または非対称な顔

小症状

○心奇形

食道気管支奇形

矮小陰茎または停留精巣 (男児)

にて診断基準の必発症状を満たさない。

## D. 考察

CHARGE 症候群は罹患頻度約 3 万人に 1 名の先天異常症候群であり患者家族にとって医学的情報、生活に関する情報を得るのが困難である。患者支援の一つの形態として同じ疾患を持つ患者家族が特定の日と同じ場所で診察を受け、最新情報に関する話や療育についての指導を受け、患者家族同士で交流するグループ外来は有効な支援の方法であると考えられる。対象患者の募集を他の医療機関宛に送ったところ必ずしも確定診断されていない患者が参加する場合もある。

今回のグループ外来に他院で CHARGE 症候群と診断されていた当院で受診歴のない患児の 1 家族があった。当初初めて受診して参加したが他の患児との違いに親が戸惑い途中退席された。その患児をあらためて診療し CHARGE 症候群との異同について検討した。

同胞例は同一疾患と考えられ、いずれも発達遅滞の程度、成長障害の程度が他の CHD7 変異例の CHARGE 症候群患児に比べて重度である。兄は、本研究班の診断基準を満たすが、Blake の診断基準では境界域であり、耳介形態を CHARGE 耳と認めれば基準に合致する。弟は難聴はあるが耳介奇形を認めないためにいずれの診断基準も満たさないことになる。

症例兄は耳小骨奇形がある一方、耳介の特徴は、耳輪の折れ曲がりがないことや対耳輪の形成の弱さにおいて CHD7 陽性の CHARGE 症候群との差異がある。Blake の基準において CHARGE 耳を大項目にするのであれば CHARGE 耳の定義が必要であろう。

本症例は第一子出産後に主治医から CHARGE 症候群は常染色体優性遺伝形式の疾患で通常孤発例であるため次子再罹患の可能性はほとんどないと説明されて妊娠に臨んだ経緯がある。今後の遺伝子解析の結果が本ケースの臨床像の理解に有用であると考えられる。

## E. 結論

稀少先天異常疾患のグループ外来に参加した非典

型例の CHARGE 症候群同胞例について報告した。同一疾患であると考えられるが、耳介形態の評価で第一子兄は診断基準を満たし第二子は従来の診断基準を満たさない。今後の解析が本症の理解に有用であろう。

## F. 研究発表

1. 論文発表

1) Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N.

MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome

Am J Med Genet A. 2011 Nov 21. [Epub ahead of print]

2) Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Nijima S, Okano E, Numabe H, Matsubara Y.

HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome

J Hum Genet. 2011 Oct;56(10):707-15

3) Seiji Mizuno, Daisuke Fukushi, Reiko Kimura, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Toshiyuki Kumagai, Nobuaki Wakamatsu

Clinical and genomic characterization of siblings with a distal duplication of chromosome 9q (9q34.1-qter)

Am J Med Genet A, 2011 September; 155 (9):224-2280.

4) Liang JS, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, Imai K, Okanishi T, Mizuno S, Okumura A, Sugawara M, Ito T, Ikeda H, Takahashi Y, Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T.

CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders.

Epilepsia. 2011 Oct;52(10):1835-42

5) Miyajima Y, Kitase Y, Mizuno S, Sakai H, Matsumoto N, Ogawa A.

Acute lymphoblastic leukemia in a pediatric patient with Marfan's syndrome

Rinsho Ketsueki. 2011 Jan;52(1):28-31.

6) Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J.

Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies.

J Hum Genet. 2011 Feb;56(2):110-24.

2. 学会発表

1)水野誠司、村松友佳子、西恵理子、加藤久幸、松島正氣、三浦清邦

先天性心疾患、右頬部神経線維腫、中等度精神遅

滞を呈した NF1 欠失型のレックリングハウゼン病の男児例 第 3 回日本レックリングハウゼン病学会学術集会 東京 2011.11.13

2)水野誠司、濱島 崇、西恵理子、村松友佳子、谷合弘子、鬼頭浩史

FBN1 の TGF $\beta$  binding protein-like domain 5 の変異を認めた Geleophysic Dysplasia の 1 例 第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会共同大会 千葉 2011.11.10

3)Eriko Nishi, Seiji Mizuno, Toshiyuki Yamamoto

A novel mutation in GPC3 in a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome (SGBS)

6 1 st annual meeting of American Society of Human Genetics Montreal 2011.10.11

4)水野誠司、村松友佳子、谷合弘子、鈴木基正、丸山幸一、早川知恵実、熊谷俊幸、宮崎修次  
染色体構造異常児の両親染色体検査 - 保有者を特定しない結果告知はまだ必要か -

第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 11 日東京

5)水野誠司 西恵理子 林直子 山田桂太郎 梅村紋子 倉橋宏和 丸山幸一 村松友佳子 中村みほ 熊谷俊幸

SOS1 変異による Noonan 症候群の 2 例

第 35 回小児神経学会東海地方会 2011 年 7 月 23 日名古屋

6)水野誠司 西 恵理子 谷合弘子 村松友佳子  
先天異常症候群の患者家族支援 - 症候群単位のグループ外来の実践 第 51 回日本先天異常学会学術集会 東京 2011.7.22

7)水野誠司 西 恵理子 谷合弘子 村松友佳子  
Mowat-Wilson 症候群の耳介形態

第 51 回日本先天異常学会学術集会 東京 2011.7.22

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

CHARGE症候群の次世代シーケンサーによる遺伝子解析

分担研究者 工藤 純

慶應義塾大学医学部共同利用研究室・遺伝子医学研究室 教授

## 研究要旨

CHARGE症候群は多発奇形症候群である。2/3程度の症例がCHD7遺伝子の変異により発症することが知られている。次世代シーケンサーを用いた迅速かつ安価なCHD7遺伝子診断法の開発のため、CHD7遺伝子の全コーディングエキソンのPCRによる増幅と、ランニングコストが安価な非蛍光型パーソナル次世代シーケンサーを組み合わせた手法による遺伝子変異探索法の実用性を検討した。CHD7遺伝子の全38個のエキソンのうち、ノンコーディングエキソンであるエキソン1を除く37エキソンを26本の約2 kbのPCR断片として増幅し、断片化してからライブラリーを作製し、パーソナル次世代シーケンサーとして半導体シーケンサーイオントレントPGM (Personal Genome Machine) を用いて、シーケンシングを行った。得られた配列データをCHD7参照配列にマッピングしたところ多くの配列がPCRで増幅した領域にマッピングされ高い特異性が確認された。しかし、PGMのデータは同一塩基が繰り返す領域ではリードのエラーが多く、その結果その周辺では偽陽性の変異が多く生ずるため、未知の新規遺伝子変異のスクリーニングも含む遺伝子診断には、適さないことが明らかとなった。

## 研究協力者

清水厚志 (慶應義塾大学医学部分子生物学教室)

鳥居千春 (慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター)

小崎健次郎 (慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター)

## A. 研究目的

CHARGE症候群は2/3程度の症例がCHD7遺伝子の変異により発症することが知られているが、1/3程度の症例については原因が不明である。そのため、第一次の遺伝子診断では38個のエキソンからなるCHD7遺伝子の変異の有無を迅速かつ安価に診断することが望まれる。本研究では、次世代シーケンサーを用いた、迅速かつ安価なCHD7遺伝子診断法の開発のため、CHD7遺伝子の全コーディングエキソンのPCRによる増幅と、ランニングコストが安価な非蛍光型パーソナル次世代シーケンサーを組み合わせた手法による遺伝子変異探索法の実用性を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 標的領域遺伝子配列の増幅

NA18987 (1000人ゲノム日本人試料)のDNAを用いてCHD7遺伝子の全38個のエキソンのうち、ノンコーディングエキソンであるエキソン1を除く37エキソンを26本の約2 kbのPCR断片として増幅した(図1A)。PCR断片の長さは、その後の小断片化の効率をそろえるためにそろえた。PCR断片の濃度をそろえて混合した後、アコースティックソルビライザー (Covaris) によって断片化し、ライブラリーを作製した。

### 2) 次世代シーケンサーによる遺伝子配列の決定

非蛍光型パーソナル次世代シーケンサーとして半導体シーケンサーイオントレント PGM (Personal Genome Machine) (ライフテクノロジー ジャパン社アプライドバイオシステムズ) を用いて、約100塩基長のシーケンシングを行った。その後、自動化コンピュータプログラム群(いわゆるパイプライン)を用いて、粗DNA配列データをヒトゲノム参照配列にマッピングし、塩基置換、欠失、挿入の同定を行った。アライナーとしては bwa を用いた。一方、アライナーとして TorrentSuite (ライフテクノロジー ジャパン社) を用いた解析も行なった。

解析にあたっては個人情報の保護に関する法律を踏まえ、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労働省「疫学研究指針」を遵守し、倫理委員会の承認の下に研究を実施した。

## C. 研究結果

得られた配列データを CHD7 参照配列にマッピングしたところ多くの配列が CHD7 のエキソン領域近傍にマッピングされ高い特異性が確認された(図1B中段)。カバー頻度のバラツキに関しては、平成22年度に実施したエキソンキャプチャー (SureSelect : アジレント社) によって特異的

に濃縮した結果(図 1B 上段)と比べてもムラが少なく優れていた。

半導体シーケンサーPGM による変異の検出に関しては、同一塩基が繰り返すホモポリマー部位でのシーケンスエラーが非常に多いために、間違っ読んだ配列を別の配列にアラインする結果、その周辺で偽陽性の変異が多く生ずることが明らかとなった。その一例として CHD7 遺伝子のエクソン 2 の偽陽性変異を示した(図 2)。PGM のデータはエクソン 2 に変異があることを示したが(図 2 A)、キャピラリーシーケンサーで確認したところ、変異は認められなかった(図 2 B)。この偽陽性変異部位の PGM データのアラインを検討したところ、アライナーについては TorrentSuite の方が多少優れていたが、何れにせよ、GGGGCCCC のリードは 100%間違っていた(図 2 C)。他にも GGG を GG と 100%間違える箇所も見つかった。

#### D. 考察

PCRにより、対象とするエクソン領域を増幅した後で小断片化し、パーソナル次世代シーケンサーでシーケンスする手法は、対象とする遺伝子数が少ない場合は、カバー率の点では問題がなかった。しかし、ランニングコストが低い非蛍光型パーソナル次世代シーケンサーである半導体シーケンサーイオントレントPGMを用いたシーケンシングではホモポリマー部位の解読エラーが多発するため、未知の新規遺伝子変異のスクリーニングも含む遺伝子診断には、適さないことが明らかとなった。

#### E. 結論

次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断法の最適化のため、昨年度はゲノムの標的領域に相補的な配列を持つオリゴシーケンスを作成し、エクソン領域の DNA が選択的に濃縮されることを示した。今年度は、PCR による増幅と非蛍光型パーソナル次世代シーケンサーを用いた手法を検討した。これらの結果から、現時点ではエクソンキャプチャーによる標的遺伝子の濃縮あるいは PCR による増幅と、蛍光型次世代シーケンサーによるシーケンシングを組み合わせるのが、信頼性の高い手法であると結論した。特に安価な遺伝子診断を目指す場合は、GAIIx と同じ原理のパーソナル次世代シーケンサーである MiSeq を用いるのが経済的観点から考えて有力であると判断した。

#### F. 研究発表

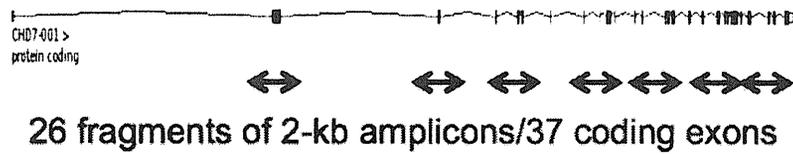
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

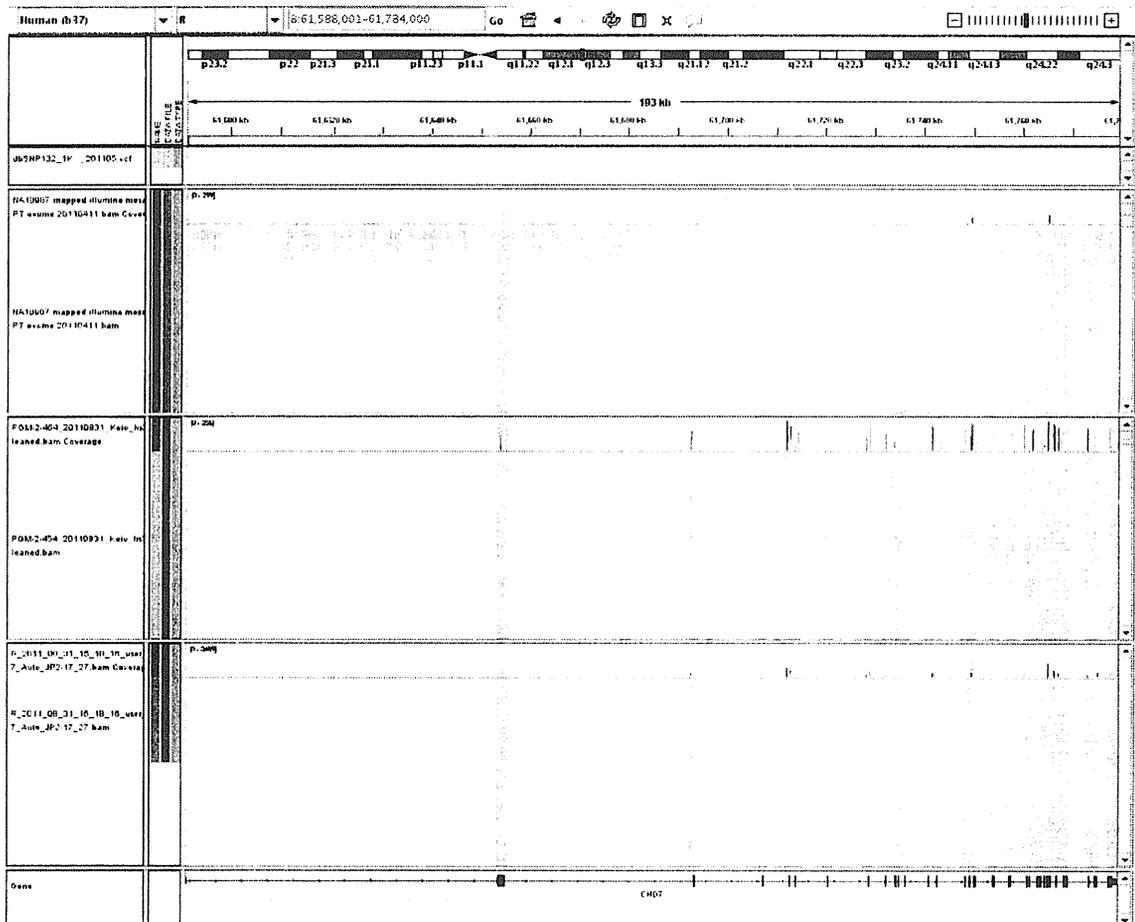
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

図1. CHD7 遺伝子のアンプリコンシーケンスによる解析

(A) CHD7 遺伝子の全コーディングエクソン (エクソン 1 を除く 37 エクソン) を計 26 本の約 2 kb の PCR 断片として増幅した。



(B) Integrative Genomics Viewer によるシーケンス分布の表示



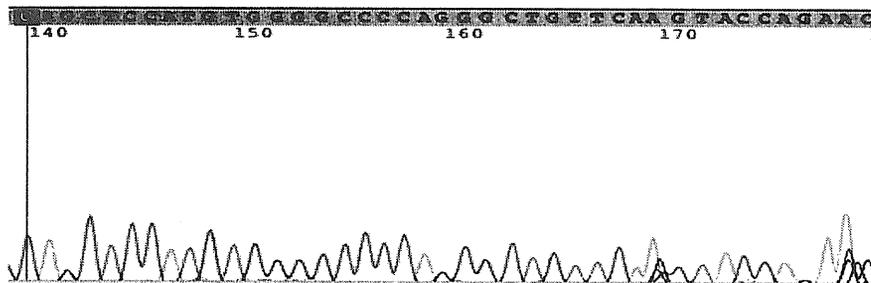
上段 エクソンキャプチャー後に GA で得たシーケンスを自作解析パイプラインでアラインした結果  
 中段 PCR 後に PGM で得たシーケンスを自作解析パイプラインでアラインした結果  
 下段 PCR 後に PGM で得たシーケンスを TorrentSuite (ライフテクノロジー社) でアラインした結果

図 2. PGM で得た CHD7 遺伝子のシーケンスのエラー

(A) CHD7 遺伝子のエキソン 2 で生じた偽陽性変異

					JPT_Exome	PGM_Kaio	PGM_LifeTech	Region	Verification
CHD7	chr8	61654428	GCCCC	GCC,GCCC,GC	none	none	Homo	CDS	FALSE
		61654433	JPT_exome A	C	none	Hetero	none	CDS	FALSE

(B) キャピラリーシーケンサーによる確認

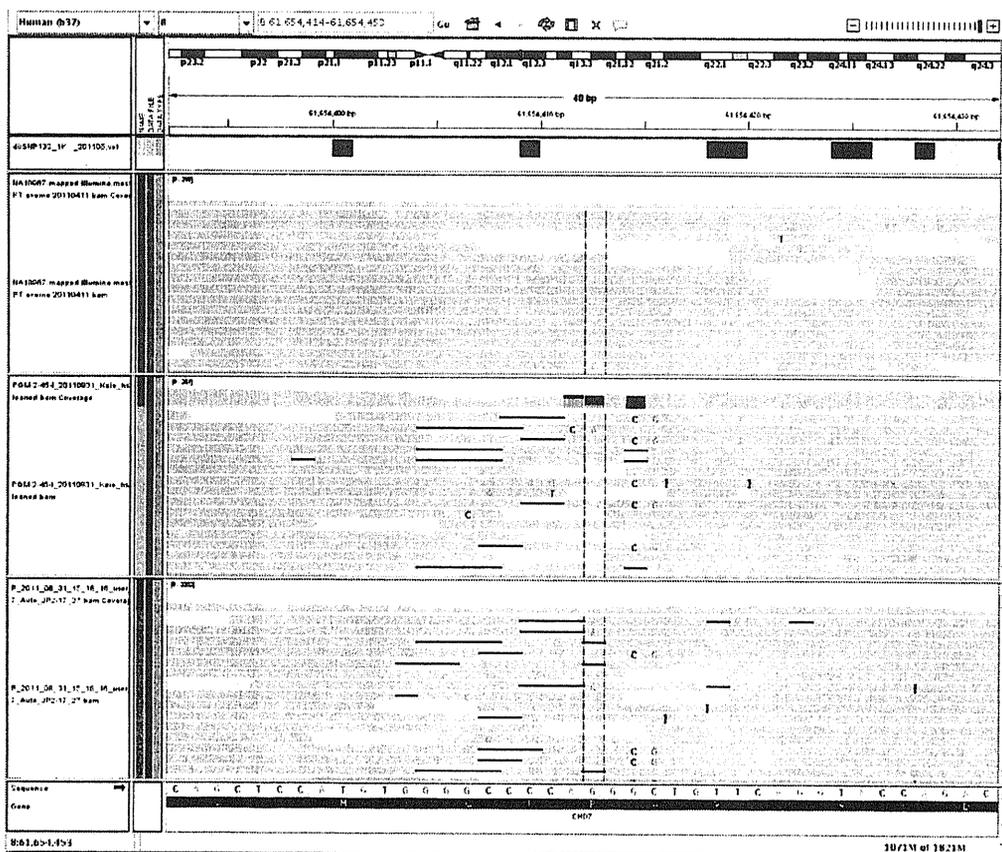


(C) Integrative Genomics Viewerによるエキソン 2 のアライメントの表示

上段 エキソンキャプチャー後に GA で得たシーケンスを自作解析パイプラインでアラインした結果

中段 PCR 後に PGM で得たシーケンスを自作解析パイプラインでアラインした結果

下段 PCR 後に PGM で得たシーケンスを TorrentSuite (ライフテクノロジー社) でアラインした結果



## 研究要旨

CHARGE症候群における眼科的合併症と視覚障害に対する管理・治療法を開発するため、CHD7遺伝子変異陽性例に対する二次調査の一環として、眼異常の合併率と臨床像について詳細に調査・検討した。さらに眼合併症の病態究明のため、CHD7遺伝子変異の位置と眼異常の重症度について検討を加えた。

4施設の総計19例38眼においてCHD7遺伝子変異によって視神経・網脈絡膜コロボーマが約95%と高率に起こっていた。広汎なコロボーマによって黄斑欠損・部分欠損をきたしたものは68%に上った。黄斑欠損の有無によって視力予後は異なり、0.3未満の視力障害例は約65%であった。乳幼児期に保有視機能を評価し、適切な弱視治療・ロービジョンケアを導入することが重要である。また保有視機能を維持するために生涯にわたり併発症に対する眼科的管理が必要である。

CHD7遺伝子変異の領域・位置と重症度について、眼異常の重症度を解剖学的所見によってGrade 1:正常、2:コロボーマ、3:コロボーマ+黄斑欠損、4:コロボーマ+黄斑欠損+小眼球に等級化して検討すると、DNA結合ドメイン欠損例は重症であった。ナンセンス・フレームシフト変異14例において、変異の位置と眼異常の重症度(Grade)に相関がみられた。翻訳停止位置がカルボキシル末端に近い場合には黄斑が形成され、早期に弱視治療を行うと視力が向上する可能性がある。

今後さらにCHD7遺伝子の眼形成に関与する機序について研究し、病態を解明することが視覚障害を軽減するための課題である。

## A. 研究目的

CHARGE症候群の眼科的合併症と視覚障害に対する管理・治療法を開発するために、CHD7遺伝子変異陽性例を対象として、眼異常の合併率と臨床像、重症度を詳細に検討し、その病態を究明することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) CHD7遺伝子変異陽性例の眼合併症・視力

CHD7遺伝子変異陽性例に対する二次調査の一環として、班員の在籍施設(国立成育医療研究センター、大阪府立母子保健総合医療センター、神奈川県立こども医療センター、愛知県心身障害者コロニー中央病院)における変異陽性例の眼合併症の調査を実施した。眼異常の合併率のほか、コロボーマの合併と範囲、黄斑部欠損、他の眼合併所見、併発症の有無、屈折異常、視力などを詳細に検索し臨床像を検討した。

### 2) CHD7遺伝子変異と眼異常の重症度

眼異常の重症度を解剖学的所見によってGrade 1:正常、Grade 2:コロボーマ(黄斑形成)、Grade 3:コロボーマ+黄斑欠損、Grade 4:コロボーマ+黄斑欠損+小眼球(小角膜)に等級化し、CHD7遺伝子変異の領域・位置と重症度について検討を加えた。

### (倫理面への配慮)

慶應大学倫理委員会の承認を得て、研究代表者によって二次調査が実施され、取りまとめられた。患者家族に十分な説明を行い書面にて検査結果の二次利用について同意を得た。診療録の調査や選択された症例の解析にあたっては、匿名化し、個

人が特定できないように配慮した。

## C. 研究結果および考察

### 1) CHD7 遺伝子変異陽性例の眼合併症・視力

4施設の総計19例38眼の遺伝子変異の領域について調べ、眼合併症に関する調査結果を解析した。性別は男性10例(53%)、女性9例(47%)、調査年齢は1~21歳(平均7.9±5.0歳)である。

眼異常(コロボーマ)の合併率は18例(94.7%)と高率で、両眼性17例(89.4%)、片眼性1例(5.3%)であった。眼合併症の内訳として、CHARGE症候群の代表的な眼所見とされている眼底の網脈絡膜コロボーマは18例(94.7%)と高率にみられ、視神経乳頭コロボーマの合併も18例(94.7%)と同等に高率であった。広汎なコロボーマによって黄斑欠損・部分欠損をきたしたものは13例(68.4%)に上った。黄斑欠損を認めた13例のうち、両眼性が8例(42.1%)と多く、片眼性は5例(26.3%)であった。CHD7遺伝子変異陽性例の眼合併症の臨床像として、視神経・黄斑を含む広汎な網脈絡膜コロボーマが高率に起こることが示唆された。視神経及び黄斑欠損が、多くの例に重篤な視覚障害をきたす原因である。しかし、全く異常のない1例、眼底にコロボーマを合併していても黄斑欠損のない5例の存在に注目すると、CHD7遺伝子の変異の位置によっては黄斑が形成され良好な視力が得られる可能性があると考えられる。

他の眼合併症として、小眼球5例(26.3%)、小角膜4例(21.1%)の頻度が比較的高い。よってCHD7遺伝子変異は全眼球に及ぶ先天異常をきたし得ることが示唆された。しかし、後眼部・眼底に比較して前眼部に及ぶ合併所見は少ない(表1)。虹彩-網脈絡膜コロボーマは胎齢6週頃の胎生裂閉鎖不全が

主因とされているが、視神経乳頭や黄斑の欠損に加えて小角膜・小眼球を合併する広汎なコロボーマを形成した例では、CHD7 遺伝子変異によって胎齢 5~6 週の初期に高度の発生異常をきたしたと推定される。

併発症は白内障 1 眼のみで、緑内障や網膜剥離など重篤な併発症は認めなかった。これは、低年齢の患者が多数を占めるためと考えられる。学童期~成人になるとコロボーマには裂孔原性網膜剥離を合併しやすく、小角膜・小眼球例には解剖学的に閉塞隅角緑内障を生じるリスクが高い。保有視機能を生涯にわたり維持するためには、継続した眼科受診、眼球打撲の防御など併発症に対する管理を徹底することが非常に重要である。

表1 眼合併症の内訳

Findings	Number of patients (%)			Number of eyes (%)
	Bilateral	Unilateral	Total	
Colobomata	17 [89.5]	1 [5.3]	18 [94.7]	35 [92.1]
Retinochoroidal	15 [78.9]	3 [15.8]	18 [94.7]	33 [86.8]
Optic disk	15 [78.9]	3 [15.8]	18 [94.7]	33 [86.8]
Macula	8 [42.1]	5 [26.3]	13 [68.4]	21 [55.3]
Iris	1 [5.3]	0 [0.0]	1 [5.3]	2 [5.3]
Lens	0 [0.0]	1 [5.3]	1 [5.3]	1 [2.6]
Microphthalmos	3 [15.8]	2 [10.5]	5 [26.3]	8 [21.1]
Microcornea	3 [15.8]	1 [5.3]	4 [21.1]	7 [18.4]
Ptosis	1 [5.3]	1 [5.3]	2 [10.5]	3 [7.9]
PFV	0 [0.0]	1 [5.3]	1 [5.3]	1 [2.6]
Cataract	0 [0.0]	1 [5.3]	1 [5.3]	1 [2.6]
High myopia (>6.0 D)	2 [10.5]	1 [5.3]	3 [15.8]	5 [13.2]

PFV, persistent fetal vasculature.

屈折検査は 12 例 (63.2%) で施行可能であった。6.0D 以上の強度近視を 3 例 (15.8%) に認めた。

視力測定が可能であった例は 3 歳以上の 17 例 (89.5%) で、両眼開放下または優位眼の矯正視力の分布は 0.05 未満 4 例 (21.1%)、0.05 以上 0.3 未満 7 例 (36.8%)、0.3 以上 1.0 まで 6 例 (31.6%) であった。測定可能であった 17 例中、0.3 未満の視力障害 (WHO 基準, 1992 年) を約 65% に認めたことになる。乳幼児期に、全身的なケアと同時に、保有視機能を評価して適切な弱視治療 (眼鏡・訓練)・ロービジョンケアを導入することが重要である。

2) CHD7 遺伝子変異と眼異常の重症度  
眼異常の重症度を解剖学的所見によって Grade 1~4 に等級化して検討すると、DNA 結合ドメイン (SANT domain) 欠損例は重症であった。左右眼の重症度に一致はみられなかった (Cohen's kappa coefficient, カップ係数  $0.408 \pm 0.144$ )。

ナンセンス・フレームシフト変異 14 例の重症眼において、変異の位置と眼異常の重症度 (Grade) に相関がみられた ( $p=0.02$ , chi-square test, 図1)。すなわち CHD7 蛋白のアミノ酸残基数が 2000a.a. より長いと Grade 1, 2 (黄斑形成)、2000a.a. より短いと Grade 3, 4 (黄斑形成) となりやすい。本検討結果より、翻訳停止位置がカルボキシ末端に近い場合には黄斑が形成され、早期に弱視治療を行うと視力が向上する可能性があると考えられる。

遺伝子診断、および新しい機器である OCT (光干渉断層計) を用いた網膜・黄斑の形態検査、ERG (網膜電図)、黄斑局所 ERG を用いた機能検査を乳幼児期に実施し、保有視機能を早期に評価

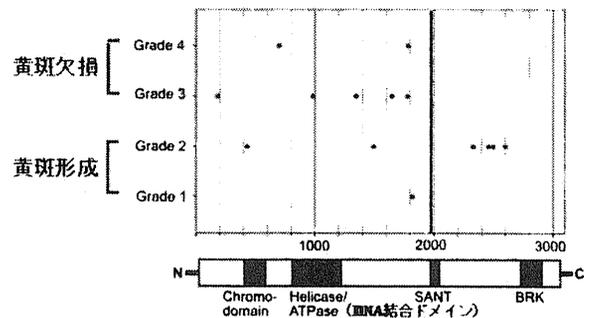
することによって、より効果的な弱視訓練やロービジョンケアを導入することが可能と考えられる。

今後さらに CHD7 遺伝子の眼形成に関与する機序について研究し、病態を解明することが、視覚障害を軽減するための課題である。

#### D. 考察・今後の展望

本研究では、CHD7 遺伝子診断に基づく眼合併症の詳細な調査を進め、CHD7 遺伝子変異陽性例の眼合併症・視覚障害の臨床像が明らかとなった。また CHD 遺伝子変異の位置と眼異常の重症度に相関があることを見出した。本研究結果を国内外に発信し、難治性の希少疾患である CHARGE 症候群の眼科的治療・管理の重要性について提言した (第 56 回日本人類遺伝学会, 2011; Am J Med Genet Part A, 2012)。

今後、遺伝子診断および OCT、ERG を利用した保有視機能の早期評価法を確立することによって、効果的な弱視治療・ロービジョンケア法を開発する



ことが可能と考えられる。さらに CHD7 遺伝子の眼形成に関与する機序について研究し病態を解明することが、視覚障害を軽減するための課題である。

図1 CHD7 変異の位置と眼異常の重症度

#### E. 結論

CHD7 遺伝子診断に基づく眼合併症の詳細な調査を進め、CHD7 遺伝子変異陽性例の眼合併症・視覚障害の臨床像が明らかとなった。加えて、遺伝子変異と眼異常の重症度について検討した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. Am J Med Genet Part A, 2012, Feb 2. [Epub ahead of print].

Nishina S, Kurosaka D, Nishida Y, Kondo H, Kobayashi Y, Azuma N. Survey of microphthalmia in Japan. Jpn J Ophthalmol, 2012, Feb 23. [Epub ahead of print].

Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshim S, Hotta Y. Two novel mutations in the EYS Gene are possible major causes of autosomal

recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. PLoS ONE, 7(2). e31036, 2012

Shigeyasu C, Yamada M, Mizuno Y, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Clinical features of anterior segment dysgenesis associated with congenital corneal opacities. Cornea, 31 (3): 293-8, 2012

Nishina S, Suzuki Y, Yokoi T, Kobayashi Y, Noda E, Azuma N. Clinical features of congenital retinal folds. Am J Ophthalmol, 153 (1): 81-87, 2012

Nishina S, Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Azuma N. Stereopsis after early surgery for bilateral congenital cataracts. Transaction book of XIth ISA meeting, in press

Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, Shimizu K, Shimizu S, Reiner O, Okano H, Nishina S, Azuma N, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. J. Neurosci, 31(46): 16872-16883, 2011

Suzuki S, Kim O-H, Makita Y, Saito T, Lim G-Y, Cho T-J, Al-Swaïd A, Alrashees S, Sadoon E, Miyazaki O, Nishina S, Superti-Furga A, Unger S, Fujieda K, Ikegawa S, Nishimura G. Axial Spondylometaphyseal Dysplasia: Additional Reports. Am J Med Genet A, 155A(10): 2521-2528, 2011

Tanaka M, Nishina S, Ogonuki S, Akaike S, Azuma N. Nishida's procedure combined with medial rectus recession for large-angle esotropia in Duane syndrome. Jpn J Ophthalmol, 55(3): 264-267, 2011

Kobayashi Y, Yokoi T, Yokoi T, Hiraoka H, Nishina S, Azuma N. Fluorescein staining of the vitreous during vitrectomy for retinopathy of prematurity. Retina, 31(8): 1717-1719, 2011

Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saito 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

仁科幸子、中山百合、横井匡、東範行、近藤寛之、西田保裕. 小眼球症に伴う眼窩發育異常の画像評価. 眼科臨床紀要 印刷中

仁科幸子、東 範行. 小児の緑内障治療. あたらしい眼科 29: 7-12, 2012

伊藤牧子、仁科幸子. 視力障害、斜視、弱視. 小児科診療 75: 189-194, 2012

仁科幸子. 乳児の眼鏡. あたらしい眼科 28: 38-40, 2011

仁科幸子. 視力障害のフォローアップ. 周産期医学 41: 1396-1398, 2011

初川嘉一、仁科幸子、菅澤淳、木村亜紀子、矢ヶ崎倂司、不二門尚、平野慎也. 小児の間欠性外斜視に対する後転短縮術の治療成績：多施設共同研究. 日本眼科学会雑誌 115: 440-446, 2011

## 2. 学会発表

仁科幸子、小崎里華、柳橋達彦、東範行、岡本伸彦、初川嘉一、黒澤健司、山根敬浩、水野誠司、都築欣一、小崎健次郎. CHD7 遺伝子変異

による CHARGE 症候群の眼合併症. 第 56 回日本人類遺伝学会, 幕張, 2011.11

仁科幸子、小林百合、横井匡、東範行、近藤寛之、西田保裕. 小眼球症に伴う眼窩發育異常の画像評価. 第 36 回日本小児眼科学会総会, 京都, 2011.7

伊藤牧子、横井匡、小林百合、仁科幸子、東範行、小川学、杉田直. 乳児にみられたカンジダ眼内炎の 1 例. 第 36 回日本小児眼科学会総会, 京都, 2011.7

小林百合、伊藤牧子、横井匡、仁科幸子、東範行、田中三知子. 強膜内陥術の網膜牽引軽減によって視力が向上した網膜ひだの 1 症例. 第 36 回日本小児眼科学会総会, 京都, 2011.7

仁科幸子. 小児の屈折・視力検査の実際. 第 27 回日本弱視斜視学会講習会, 京都, 2011.7

仁科幸子. 小眼球症の診断と管理. 第 34 回獨協医科大学眼科・栃木県眼科医会合同講演会, 宇都宮, 2011.7

仁科幸子、小林百合、伊藤牧子、横井匡、東範行. 小眼球症における黄斑の形態と機能. 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10

仁科幸子. 小児の屈折矯正-遠視の屈折矯正. 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10

仁科幸子. 小児の斜視. 第 21 回東邦大学第二眼科と世田谷区・渋谷区・目黒区眼科医会合同勉強会, 渋谷, 2011.10

仁科幸子. 小児眼疾患ケーススタディ. 第 13 回西東京眼科フォーラム, 吉祥寺, 2011.11

仁科幸子. 斜視と弱視. 東京都眼科医会卒後研修会, 東京, 2011.11

仁科幸子. もう一度学ぼう！小児眼科の ABC. 第 15 回千駄木フォーラム, 上野, 2011.12

宇井理人、東範行、仁科幸子、小林百合、横井匡、伊藤牧子. 家族性滲出性硝子体網膜症に対するバックリング手術. 第 50 回日本網膜硝子体学会, 東京, 2011.12

Yokoi T, Ui R, Ito M, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. Analysis of retinal structure and function in eyes with foveal hypoplasia. 第 50 回日本網膜硝子体学会, 東京, 2011.12

仁科幸子. 小児白内障手術の術後管理. 第 35 回日本眼科手術学会, 京都, 2012.1

仁科幸子. 小眼球症の診断と管理. 第 146 回宮崎県眼科医会講演会, 宮崎, 2012.2

仁科幸子. 乳幼児の眼科疾患と検査. 宮崎県眼科医会眼科職員上級者講演会, 宮崎, 2012.2

仁科幸子. 小眼球症の診断と管理. 第 14 回静岡県小児眼科学研究会, 浜松, 2012.3

仁科幸子. 小眼眼疾患・ケーススタディ. 第 17 回北陸眼疾患シンポジウム, 金沢, 2012.3

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

### 研究要旨

CHARGE 症候群は C=網膜部分欠損、H=心奇形、A=後鼻孔閉鎖、R=成長発達障害、G=性腺機能低下、E=耳奇形・難聴を主徴とする先天奇形症候群であり、CHD7 遺伝子の変異により発症する。循環器・呼吸器という生命維持に必須の臓器の障害に感覚器の二重障害（聴覚障害・視覚障害）を伴い、精神遅滞と多臓器にわたる合併症を有する。外科手術や症状に応じた療育上の対応が行われるが、現在、根治療法は開発されていない。本研究では、CHARGE 症候群患者由来の iPS 細胞および iPS 細胞より神経堤細胞を作成した。今後、薬物スクリーニング等の研究に有用と期待される。

### A. 研究目的

CHARGE 症候群は C=網膜部分欠損、H=心奇形、A=後鼻孔閉鎖、R=成長発達障害、G=性腺機能低下、E=耳奇形・難聴を主徴とする先天奇形症候群で、70%程度の患者に CHD7 遺伝子の変異が同定されている。

高頻度に循環器・呼吸器という生命維持に必須の臓器の障害に感覚器の二重障害（聴覚障害・視覚障害）を伴い、精神遅滞と多臓器にわたる合併症を有する。外科手術や症状に応じた療育上の対応が行われるが、現在、根治療法は開発されていない。

本研究では、CHARGE 症候群患者由来の iPS 細胞(induced pluripotent stem cell)作成を試みた。iPS 細胞は、山中らにより開発された多分化能、自己複製能を持った ES 細胞(embryonal stem cell)様の細胞である。iPS 細胞は成体の皮膚線維芽細胞から樹立されるため、ES 細胞で生じる受精卵を使用することに関する倫理的問題や拒絶反応の問題を回避できるようになり、患者由来の細胞を用いた病気の研究や治療の実現可能性が高まると期待されている。

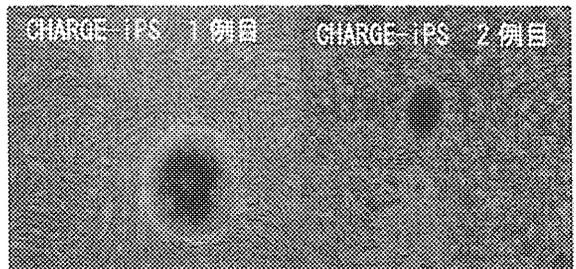
遺伝性疾患に罹患する患者の皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、さらに種々の組織・臓器に分化させる事により、今までは剖検時以外には入手する事が困難であった、組織や臓器を研究の対象とすることが可能となった。病態が明らかになる事により、治療効果のある低分子化合物のスクリーニングや、培養細胞を用いた

治療法の研究が可能となると期待されている。

CHARGE 症候群の原因遺伝子である CHD7 遺伝子は胚発生において神経堤細胞の転写因子の活性化と神経堤細胞の移動促進にクロマチン remodeling 複合体である PBAF (Polybrom, Brg1-Associated Factors) と協調的に働くことが知られている(Ruchi Bajpai, et al. Nature 2010)。CHARGE 症候群患者由来 iPS 細胞を作成し、iPS 細胞より神経堤細胞へ誘導することで、病態解明や新たな治療方法の糸口になると考える。

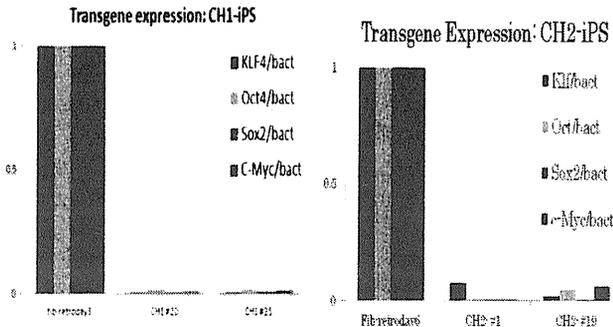
### B. 研究方法 / C. 研究結果

#### ①樹立した iPS 細胞の line 選定



昨年度までに樹立した CHARGE 症候群患者由来 iPS 細胞 2 例において、レトロウィルス感染後の導入遺伝子が高発現している線維芽細胞と樹立した iPS 細胞で導入遺伝子の発現を定量 PCR により比較し、発現が抑えられているものを患者ごとに 2line ずつ選定した(図 1)。

図 1

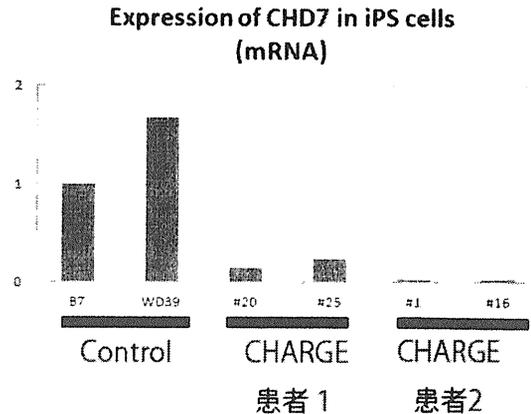


また導入遺伝子が低下しているラインについて CHD7 の発現を定量 PCR で調べ、正常と比較して低値であることを確認した (図 2)。

③神経堤細胞の誘導

2010 年 Studer らはヒ ES 細胞を Noggin、TGF-β 阻害剤添加下の無血清培地で培養を行うことで神経堤細胞を遊離形成した (図 3)。申請者が共同研究する大多茂樹講師は本法を応用し、iPS 細胞から神経堤細胞を効率的に誘導することにより成功した (図 4)。この方法を用い、樹立した CHARGE 患者由来 iPS 細胞、及び正常コントロール iPS を神経堤細胞へ分化誘導した (図 5)。また誘導した CHARGE 患者 iPS 細胞由来神経堤細胞が control-iPS 細胞由来神経堤細胞と同様に SOX10 を発現する神経堤前駆細胞であることを確認した (図 6)。誘導した神経堤細胞を分化誘導し、β III-tubulin(+)細胞、peripherin(+)細胞、GFAP(+)細胞、S100(+)細胞、SMC(+)細胞、Alkaline phosphatase(+)細胞、Alizarinn red(+)細胞、Oil red(+)細胞、Toluidine blue(+)細胞、Safranin-O(+)細胞、

図 2



SILV(+)細胞に分化し、多能性があることを確認した(図 7)

図 6

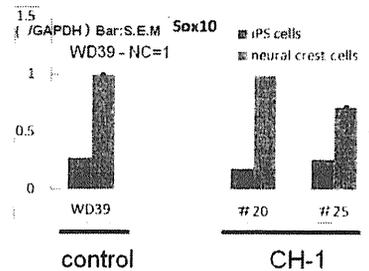
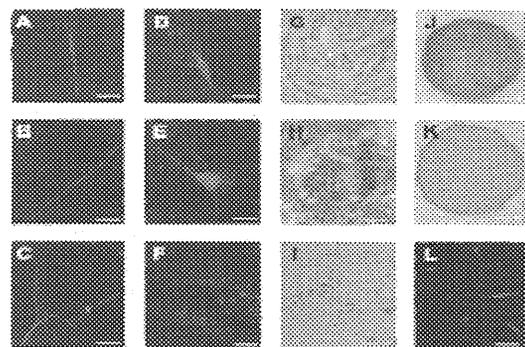
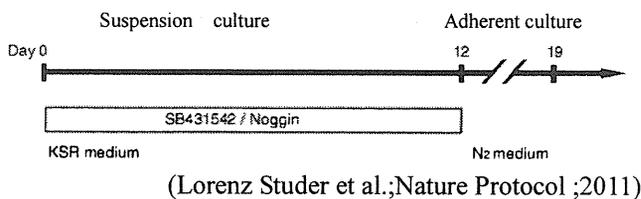


図 7 :



Characterization of differentiated cells from hiPSC-derived NCLCs. (A, B) β-III-tubulin (10 DIV). (C) Penhemin (5DIV). (D) GFAP (5DIV). (E) S100 (5DIV). (F) SMC (5DIV). (G) Alkaline phosphatase (3 Wks). (H) Alizarin red (3 Wks). (I) Oil red. (J) Toluidine blue (5 Wks). (K) Safranin-O (5 Wks). (L) SILV (6 Wks). hiPSC-derived NCLCs generated neural and mesenchymal cell derivatives cells. Scale bar: 20 μm (A-F, L), 100 μm (G-K).

図 3



(Lorenz Studer et al.; Nature Protocol ;2011)

図 4

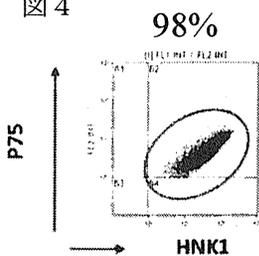


図 5

