

### 研究要旨

CHARGE 症候群の生活面から見た患者・家族のニーズは十分に明らかにされていない。患者・家族を対象として、自由記載として、アンケートを行い、60名の回答結果を集計した。テキストマイニングの手法 KeyGraph 分析を行ったところ「情報」「目標」「参加」と直接リンクのあるキーワードとして「(家族の)会」が示されていることから、難病支援における患者家族会の重要性が示唆された。

現在使われている遺伝子診断法(PCR-シーケンシング法)では検出し得ないタイプの遺伝子異常が存在するなどの可能性が考えられる。③については、特に数十塩基から数百キロ塩基程度の欠失ないし重複や、イントロン等翻訳領域以外の部分の変異が原因と考えられている。本研究によりアレイ CGH 法を用いて、現在、検出が困難な種類の CHD7 遺伝子変異の検出法の開発を進めた。アレイ CGH の技術により、これまでの染色体解析では検出し得なかった微細な欠失が同定可能となった。今後の研究推進において、CHD7 変異陽性患者コホートの確保は不可欠であり、今回、遺伝子診断の精度の向上に成功したことは、今後の本研究の遂行のために、大きな意義を有していると考えられた。

上記のごとく、正確な遺伝子診断法を開発した上、2004年に原因遺伝子が同定されて以来、研究グループとして集積している日本人 CHARGE 症候群原因遺伝子の遺伝子変異のスペクトラムを明らかにした。遺伝子診断方法の精度の向上を図った上、これまでに解析した結果を総括した。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 CHARGE 症候群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。

### 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  
柳橋達彦 慶應義塾大学医学部小児科学教室

### B. 研究目的

- (1) 患者・家族会あてアンケート自由記載欄の半定量的データマイニング

CHARGE症候群は多発奇形症候群であるが、生活面からみた患者・家族のニーズは十分に明らかにされていない。CHARGE症候群の患者・家族を対象として、自由記載として、アンケートを行い結果を集計した。テキストマイニングの手法を用いて、重要語の自動抽出を試みた。

- (2) 遺伝子診断の精度の向上

現在、原因遺伝子としてCHD7が同定されているが、変異が同定される症例は全体の70%程度とされている。全例に変異が同定されない理由として、現在使われている遺伝子診断法(PCR-シーケンシング法)では検出し得ないタイプの遺伝子異常が存在するなどの可能性が考えられる。特に数十塩基から数百キロ塩基程度の欠失ないし重複や、イントロン等翻訳領域以外の部分の変異が原因と考えられている。本研究ではアレイCGH技術を利用して、CHD7遺伝子内の微小な遺

伝子内欠失を網羅的に同定する方法を開発した。

- (3) 日本人CHARGE症候群患者におけるCHD7遺伝子の変異スペクトラムの解明

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。しかし、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。当研究グループ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。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した。

### B. 研究方法

- (1) 患者・家族会あてアンケート自由記載欄の半定量的データマイニング

CHARGE 症候群の患者・家族会のメンバーにアンケートを送付した。昨年度は半定量的な解析を行い、報告した。今年度は、60名の個別の意見

を列挙し、集約した。これらのアンケート結果を「テキストマイニング」の手法を用いて処理し、専門用語自動抽出を行った。「専門用語自動抽出システム」[言選Web]

<http://gensen.dl.itc.u-tokyo.ac.jp/gensenweb.html>を使用した。東京大学の大澤らが提唱したデータマイニング・フレームワークにもとづくソフトウェア Polaris を使用した。KeyGraph マイニング・アルゴリズムによりキーワード抽出を行った。キーワード間の関連の強さについては Jaccard 係数を用いて算出した。

#### (2) 遺伝子診断の精度の向上

患者に由来するゲノム DNA を Cy5、正常対照者由来のゲノム DNA を Cy3 でラベル化し、アレイ上で 65°C、40 時間のハイブリダイゼーションを行い、マイクロアレイスキャナーにて、スキャンし、これを専用ソフトウェアにて数値化した後、各遺伝子のゲノムコピー数を解析した。

#### (3) 日本人 CHARGE 症候群患者における CHD7 遺伝子の変異スペクトラムの解明

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。研究班に関連するウェブサイト <http://www.dhplc.jp> に全プロトコルを公開している。

#### (倫理的配慮)

個人情報の保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。変異陽性例の表現型の詳細な解析に際しては文部科学省・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」を、有病率に関する調査に際しては、文部科学省・厚生労働省「疫学研究指針」を遵守し、倫理委員会の承認下で研究を実施した。

### C. 研究結果

#### (1) 患者・家族会あてアンケート自由記載欄の半定量的データマイニング

アンケートの自由記載欄全体の総語数 9073 語から重要語の自動抽出をおこなったところ、以下の結果を得た。「重要度が高い」単語として、「障害」「子ども」「親」「支援」などの単語が得られた。また、CHARGE 症候群の特徴である「重複障害」というキーワードも高い点数が得られた。KeyGraph 法によりキーワード間のネットワークを分析したところ、親・子など家族を中心とする島、重複障害・負担・学校・支援など生活目に関する島、子ども・成長・将来・不安などの将来像に関する島が求められた。

#### (2) 遺伝子診断の精度の向上

従来のシーケンス法では遺伝子変異が検出されなかった症例を対象にアレイ CGH 解析を行った。異常のない部分のゲノムコピー数は 2 だが、図の中央部分のゲノムコピー数は 1 を呈し、当

該領域内の遺伝子内欠失の存在を判断できた。

#### (3) 日本人 CHARGE 症候群患者における

CHD7 遺伝子の変異スペクトラムの解明  
検査プロトコルの標準化し、公開した。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。  
(別表)

### D. 考察

#### (1) 患者・家族会あてアンケート自由記載欄の半定量的データマイニング

60 例という比較的多数の患者家族を対象として、アンケートを行い、自由記載欄に含まれる重要語の自動抽出を通じて、患者家族のニーズに訴えを明らかにした。医療以外のキーワードとして「教育」「社会」などのキーワードが認められ、支援の必要性が示された。「情報」「目標」「参加」と直接リンクのあるキーワードとして「(家族の)会」が示されていることから、難病支援における患者家族会の重要性が示唆された。

#### (2) 遺伝子診断の精度の向上

アレイ CGH 技術および次世代シーケンサー技術を利用して、CHD7 遺伝子内の微小な遺伝子内欠失やイントロン内の変異を網羅的に同定する方法を開発し、遺伝子診断の感度を向上させることができた。今回、従来法より精度の高い遺伝子診断法の開発に成功したことは、患者・家族にも遺伝カウンセリングとして還元可能な有用な成果である。

#### (3) 日本人 CHARGE 症候群患者における

CHD7 遺伝子の変異スペクトラムの解明  
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。変異陽性例に認められた変異はほぼ全例がナンセンス変異ないしフレームシフト変異であった。なお、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

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。

## E. 結論

CHARGE 症候群の患者・家族会あての自由記載アンケートの重要語の自動抽出を行い、「障害」「子ども」「親」「支援」「重複障害」「教育」「社会」などのキーワードを明らかにした。「情報」「目標」「参加」と直接リンクのあるキーワードとして「(家族の)会」が抽出され、難病支援における患者家族会の重要性が示唆された。

アレイ CGH 技術を利用して、CHD7 遺伝子内の微小な遺伝子内欠失を同定する方法を確立し、遺伝子診断の感度を向上させた。

遺伝子診断方法の精度の向上を図った上、これまでに解析した結果を総括した。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 CHARGE 症候群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 2011.184

小崎里華 VATER 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

小崎里華 藤田秀樹 妊娠前・妊娠初の相談 北川道弘 村島温子 妊婦・授乳婦のための服薬指導 医薬ジャーナル社 東京 2010 41-42,198-201,211-214

小崎里華 子どもの障害(奇形)とケア 北川道弘 村島温子 妊婦・授乳婦のための服薬指導 医薬ジャーナル社 東京 2010.198-201,211-214

小崎里華 藤田秀樹 こどもの障害(奇形)とケア 北川道弘 村島温子 妊婦・授乳婦のための服薬指導 医薬ジャーナル社 東京 2010 211-214

小崎里華 先天異常の疫学・分類・診断 伊藤真也 村島温子 妊婦と授乳 南山堂 東京 2010. 12-19

雑誌

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, Kasa hara 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

Kosaki R, Fujita H, Takada H, Okada M, Torii C, Kosaki K Monozygotic twins of Rubinstein-Taybi syndromediscordant for glaucoma. *Am J Med Genet A.* 155A (5) 1189-91 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* A155A(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

Fujita H, Torii C, Kosaki R, Yamaguchi S, Kudoh J, Hayashi K, Takahashi T, Kosaki K, Yamaguchi S, Kudoh J, Hayashi K, Takahashi T, Kosaki K. Microdeletion of the Down syndrome critical region at 21q22. *Am J Med Genet A.* 152A(4) 950-3 2010

Izumi K, Okuno H, Maeyama K, Sato S, Yamamoto T, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Interstitial microdeletion of 4p16.3: contribution of WHSC1 haploinsufficiency to the pathogenesis of developmental delay in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A.* 152A(4)1028-32.2010

Fujita H, Yanagi T, Kosaki R, Torii C, Bamba M, Takahashi T, Kosaki K. Transverse limb defect in a patient with Jacobsen syndrome: concurrence of malformation and disruption. *Am J Med Genet A.* 152A(4) 1033-5 2010

Kosaki R, Kikuchi S, Koinuma G, Higuchi M, Torii C, Kawasaki K, Kosaki K. Two patients with Rubinstein-Taybi syndrome and severe pulmonary interstitial involvement. *Am J Med Genet A.* 152A(7) 1844-6 2010

Takahashi H, Hayashi S, Miura Y, Tsukamoto K, Kosaki R, Itoh Y, Sago H. Trisomy 9 mosaicism diagnosed in utero. *Obstet Gynecol Int.* 2010

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

Ohnuki Y, Torii C, Kosaki R, Yagihashi T, Sago H, Hayashi K, Yasukawa K, Takahashi T, Kosaki K. Cri-du-Chat Syndrome Cytogenetically Cryptic Recombination Aneusomy of Chromosome 5: Implications in Recurrence Risk Estimation. *Mol Syndromol.* 1(2)95-98 2010

Kasahara M, Sakamoto S, Shigeta T, Fukuda A, Kosaki R, Nakazawa A, Uemoto S, Noda M, Naiki Y, Horikawa R. 2. Living-donor liver transplantation for carbamoyl phosphate synthetase 1 deficiency. *Pediatr Transplant.* 14(8)1036-40 2010

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

小崎里華 発生遺伝学と先天異常 遺伝子診療学 68.33-37.2010

小崎里華 口唇、口、口腔領域 小児内科 42.1339-1355.2010

Yagihashi T, Kato M, Izumi K, Kosaki R, Yago K, Tsubota K, Sato Y, Okubo M, Watanabe G, Takahashi T, Kosaki K. Adult phenotype of Muvihill-Smith syndrome. *Am J Med Genet* 149.496-500.2009

Kosaki R, Migita O, Takahashi T, Kosaki K. Two distinctive classic genetic syndromes, 22q11.2 deletion syndrome and Angelman syndrome, occurring within the same family. *Am J Med Genet* 149.702-5.2009

Kasahara M, Horikawa R, Sakamoto S, Shigeta T, Tanaka H, Fukuda A, Abe K, Yoshii K, Naiki Y, Kosaki R, Nakagawa A. Living donor liver transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Liver Transpl.* 15.1867-71.2009

2. 学会発表  
なし

#### 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

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

変異のタイプ	変 異
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
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

変異のタイプ	変 異
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

## 研究要旨

CHARGE症候群は多発先天性異常症候群であり、正確な診断と専門各科の連携が重要である。患者総数は明らかでなかったが、大阪府立母子保健総合医療センターでの過去の診療患者数から有病率を推定したところ出生2～3万人に1人と考えられた。また継続診療中の20例において、*CHD7* 遺伝子解析をおこなったうち15例に変異を検出した。臨床症候では、難聴・脳神経異常と特徴的な顔貌は全例に、眼のコロボーマ17/20例、先天性心疾患18/20例、後鼻孔閉鎖/狭窄3/20例が認められた。年齢層別に臨床像を検討したところ、乳・幼児期の哺乳・摂食障害、成長障害が顕著であり、学童期、思春期から嗅覚障害・性腺機能不全が明らかになっていた。コミュニケーション可能な幼児・学童は9/13例、保育所・聾学校・特別支援校等へ就学し思春期以降は作業所へ就業していた。臨床診断時や遺伝子検査前後に遺伝カウンセリングが行われ、年齢や臨床像によって異なる課題が明らかになった。

## 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  
三島祐子、池川敦子、大町和美、山本悠斗

## A. 研究目的

CHARGE症候群（以下CS）は*CHD7*遺伝子のハプロ不全による多発先天異常症候群である。*CHD7*は胚発生初期の神経堤遺伝子の発現に関与し、器官形成に広範囲な影響を及ぼす。そのため多器官での形態異常や機能障害が引き起こされる。疾患概念は、すでに30年前Pagonらが確立し、下記の主要症状の頭文字をとって命名されている。診断基準にはBlakeやVerloesの記載がある。2004年に責任遺伝子*CHD7*が発見され、遺伝子診断も可能になった。

C: coloboma of the eye

H: heart defect

A: atresia of the choanae

R: retardation of growth and/or development

G: genital and urinary abnormalities

E: ear malformation and/or hearing loss

上記以外にも多様な臓器に症状があるため、的確な診断によって可能性のある合併症を早期に診断し対応することが重要である。しかしCSは多くの先天異常症候群と同じく患者数は少なく、特定疾患にも指定されていないため、正確な患者数や臨床像の把握が困難な現状にある。そこで、CS患者のQOL向上と必要な医療体制整備のため有病率の推測と臨床像の検討を行い、遺伝カウンセリング課題を考察した。

## B. 研究方法

大阪府立母子保健総合医療センター（以下当センター）は大阪府の小児高度専門医療施設であり、多発先天異常症候群や外科系疾患を持つ小児が多く受診している。比較的頻度の高い先天異常症候群など、有病率に関するデータが存

CHARGE症候群の成人期の病像の解明と遺伝子診断の臨床応用・iPS細胞の確立在する既知の疾患との比較により、およそのCS有病率や患者数を推測した。

また臨床像の横断的検討では、遺伝診療科開設2009年度から2010年度の2年間に当センターを受診したCS患者20例のカルテ記載と遺伝カウンセリング記録を整理した。CSの診断基準に基づいた典型例を対象とした。*CHD7*遺伝子診断を実施している例が多いが、変異が検出できない可能性や第2遺伝子変異の可能性もあるので、典型例であれば遺伝子診断で変異陰性であってもCSの診断を否定しなかった。遺伝子診断は慶応義塾大学小児科学・臨床遺伝学センターで実施した。

## C. 研究結果

当センター過去20年間にCSと診断された患者で、2009年までに出生した20例を5年ごとに区分し、出生年別患者数を他の先天異常症候群とともに一覧にした（表1）。初診時の年齢は様々であるが、年間1例程度のCS患者が診断されていることになる。当センターではダウン症候群初診患者数は年間約30例である。ほぼダウン症候群30例に対して1例であるなら、ダウン症候群の有病率（出生率）700-1,000人に1人を単純に30倍すると、CSの有病率は出生2～3万人に1人程度となる。また、当センターで20例のCSを診断した期間に、22例のRubinstein-Taybi症候群（RTS）、48例のPrader-Willi症候群（PWS）、22例のSotos症候群（STS）、20例のWilliams症候群（WS）、21例のBeckwith-Wiedemann症候群（BWS）の初診があった。PWSは主要な症候群の中では患者数が多く、他の症候群の2倍強であった。他4疾患とCS患者数はほぼ同数であった。これらの症候群の患者数との文献的比較からもCSが出生2～3万人に1人という値は妥当なも

のと思われた。

横断的に臨床像を検討した対象は、2009年度から2010年度の2年間に受診した20例で、年齢が0歳から24歳、性別は男女10例ずつの同数であった。遺伝子検査を実施したのは20例中19例、そのうちCHD7遺伝子に変異のあった15例を一覧にした(表2)。ナンセンス変異が6例、フレームシフト変異が5例、スプライシング変異が3例、エクソン単位の欠失が1例あった。

臨床診断の基準、Pagon /Blake / Verloes の各診断基準別に、臨床像を概観した(表3)。脳神経異常、発達遅滞、外耳奇形・難聴、特徴的顔貌は全例に認められ、眼のコロボーマは85%、先天性心疾患は80%、発育遅滞は70%、外生殖器異常は男児のみで90%、内耳低形成は精査した全例に認められた。

また、横断的臨床像を0-2歳の乳幼児、3-4歳の幼児、5-6歳の幼児、7-12歳の学齢期、思春期以降の5群に分けて、CS主要症状と医療・療育状況を中心に検討した。

0-2歳の乳幼児は4例とも先天性心疾患が見られた(表4)。先天性心疾患は多様で特徴的疾患はないが、PDA, ASD, VSD, DORVなどが多かった。乳児期早期に手術が必要な例があった。4例とも後鼻腔閉鎖や狭窄はなかったが、口唇口蓋裂、喉頭軟化症などあり、全例とも胃食道逆流症(GER)を発症していた。3例で眼のコロボーマを認めた。出生週数・出生時体重では、全員正期産で胎内発育は正常域にある。この傾向は他の年齢層でも、ほぼ同様である。しかし出生直後から哺乳障害、栄養摂取困難によって発育が遅延した。No.8の児も生後6ヶ月時には-3SDまで低下していたが、1歳を過ぎてキャッチアップした。No.17の児は生後1ヶ月で心臓手術を受け、その後の経過が安定せず発育が停滞した。生下時体重を超えたのが生後3ヶ月であった。男児3例に小陰茎・停留精巣が認められた。内耳CTで蝸牛や三半規管の低形成と高度難聴は全例に認められた。医療面では、心疾患・食道気管低形成のため気管切開が必要な例があった。4例とも胃瘻ないし経鼻チューブ栄養を必要とした。難聴に対しては補聴器装着が始められ、人工内耳手術の検討もおこなわれていた。

3-4歳の幼児4例では、眼のコロボーマ・先天性心疾患はそれぞれ4例中3例に認めた(表5)。後鼻腔閉鎖は認めなかったが、気管食道の低形成がみられた。乳児期から哺乳障害を認め、低身長で発育遅延が顕著である。発達面では、3例が3歳までに独歩を獲得し、聴覚支援校において早期療育を受けていた。気管切開や高度難聴もあることから発語はないが、手話を駆使し、iPhoneの操作をこなせる児もいた。乳幼児期からの医療ケアが必要な状況が持続し、地域療育困難な児もいた。No.7の児は、人工内耳手術を実施し現在もリハビリを受けている。

5-6歳の幼児では、眼のコロボーマ・心疾患が全例に見られ、後鼻腔閉鎖・狭窄の例と口唇裂の例があった(表6)。No.2は重症で低身長

が著しいが、他の3例は発育に伸びがあり、3歳までに独歩を獲得していた。発語できる2例は2語文を話せた。療育面では、経口摂取できる例でも摂食訓練が必要であった。療育を受けながら地域の保育所や幼稚園に通うが、家族からは「就学後に給食がたべられるか」「地域の小学校で適切な療育が受けられるか」と不安の声もあった。三半規管の低形成があるため、車酔いをしないことに親が気づいている例がおおかった。

学童期の5例は全例に低身長が著明であった(表7)。4例は就学前後までに独歩獲得していた。精神発達は重度遅滞だが、簡単な手話でのコミュニケーションができた。2例に自傷・他傷行為が見られた。4例が学齢期にもチューブ栄養が必要であった。その中の1例は機能的には可能だが、心理的に経口摂取を拒否をしている状況であった。4例には嗅覚異常が認められた。また誤嚥性肺炎予防の吸引が頻回に必要な児もいるが、支援学校で医療行為を行う体制が不備であり、家族に負担がかかっていた。三半規管の低形成があるため、車酔いをせず、移動中の車中でも本を読むことができる例がいた。

思春期以降の3例は女性で、低ゴナドトロピン性性腺機能低下証と原発性無月経がある(表8)。2例は学童期に成長ホルモン治療を受けたが、骨端線閉鎖遅延のために思春期以降も身長の伸びがあり150cmを超えた。現在は性ホルモン補充療法を受けている。また社会参加の面では、作業所へ就労し、1例は親元を離れてグループホームでの生活を送っている。

遺伝子検査前後に遺伝カウンセリングを行った。その時のクライアントの心情を示す言葉を抽出した(表9)。乳児の母親は、「疾患の原因が妊娠中の影響でないとされたことで救われたように感じた」と語った。遺伝子検査実施の前に臨床診断された疾患について説明を受けたことが、数多くの合併症を知り覚悟ができたが、反面で今後の不安も感じることもつながっていた。NICUでの臨床心理士との面談では、「産後3週間の記憶がない」「面会に来院することが怖くてためらわれた」「しかし児の生命力には親の不安を蹴散らす力がある」と語られている。また、「原因をはっきりさせたい」「確定診断名を得たい」と遺伝子検査による確定診断を望む家族もいる。一方、「研究協力としての遺伝子検査には応じるが、既に臨床診断があるので改めて診断を得るメリットは少ない」と言う家族もあった。療護施設に入所した児は、自傷行為・他傷行為があり、施設職員が今後の療育のために診断や治療方針を求めて受診した。成人例では、性腺機能低下の基礎疾患検索のために受診した。母親は診断名が付き疾患原因が判明したと納得されたが、本人への告知や次世代再発率についての説明に戸惑いを示した。

## D. 考察

### 1.有病率

CSのような稀少難治性疾患は、一般の小児医療機関では正確な診断がついていない場合もあ



り、患者が集積する専門医療機関の患者数からの推測は有病率推定の有用な手段となる。諸外国においてもCS有病率に関する報告は少ない。Issekutzらはカナダで出生8500人に1人の有病率を報告した3)。欧米では1万人に1人程度といわれている。神奈川県でもダウン症候群出生頻度との比較による同様の調査からCSの有病率は28,000-34,000人に1人という結果が出ている4)、今回の検討と比較すると欧米の有病率は若干多めである。CSはほとんどの症例が新生突然変異であり、人種間による有病率の差はほとんどないと予測されるので、未診断例が存在する可能性も否定できない。米国では各州に小児病院が整備され、遺伝部門があるので、確定診断に至る率が高いと思われる。日本においてもCS診療体制の充実が望まれる。

## 2. 遺伝子変異と臨床像

原因遺伝子とされる*CHD7*遺伝子は、8q12に位置するChromodomain Helicase DNA結合遺伝子の一つであり、神経堤遺伝子の転写回路活性化に関与する5)。神経堤細胞は胎芽期に遊走する細胞群で多様な細胞に分化するので、その遺伝子の転写因子となる*CHD7*の変異は神経堤細胞の多能性や遊走を阻害し、多器官の形成不全を引き起こす。

対象20例に認められた難聴、特に内耳（前庭器官／蝸牛）低形成、また下部脳神経麻痺と関連した摂食嚥下障害、特徴的顔貌に関与する顔面神経など脳神経異常、眼のコロボーマ、先天性心疾患などは、遺伝子変異の結果と考えられる。*CHD7*遺伝子に変異のあった15例中のナンセンス変異6例、フレームシフト変異5例、エクソン欠失1例においては、タンパク合成の短縮、またスプライシング変異3例が異常タンパク合成による機能喪失による*CHD7*遺伝子のハプロ不全である。しかし、変異は同定されなかったが臨床診断基準上の典型例もあり、今回の解析方法で変異が同定できなかった可能性および*CHD7*遺伝子以外の原因遺伝子の存在も考えられる。

臨床診断の大基準とされる後鼻孔閉鎖・狭窄の例は少なかった。遺伝子変異例で眼のコロボーマが無い症例もあった。遺伝型-表現型の関連は明確でなく、変異陽性例の更なる検討が必要と考えられる6)。CSは常染色体優性遺伝形式の疾患で罹患率に性差はなく、対象例でも男女同数であった。海外では家族例の報告もある7)。対象に家族例は無く全例新生突然変異と考えられた。

## 3. 乳児期・幼児期の臨床像

出生直後から先天性心疾患や気管食道奇形などへの外科的集中管理が必要となった例が多い。この乳児急性期を乗り切れば生命予後は良いとされる8)。しかし、乳児期の哺乳障害は頻度が高く大きな問題である。これには筋緊張の低下や口唇口蓋裂・食道気管の低形成など形態異常とともに、哺乳嚥下を司る脳神経異常による咽頭筋協調運動不全、胃食道逆流症などが関与し

ている。経口摂取できるようになった幼児でも、経管栄養の併用や摂食訓練が必要な例が多く、哺乳・摂食障害は長期に及ぶ。そのため成長発育は遅延するが、積極的な経管栄養管理によってキャッチアップする例もあり、小柄なりの発育がある。幼児期には多くの児が独歩を獲得しているが、三半規管低形成に伴う前庭機能低下のために転びやすいなど、運動面の問題が多かった。車酔いをしにくいという特徴があった。

知的発達の面では、多くのCS児が視覚・聴覚の重複障害を持つために、従来の発達検査法では正確な評価は困難であり、親への問診や行動観察が発達評価に必要である。また乳児期には消化管や心疾患で集中治療が優先される場合も多く、感覚器の早期評価は難しい。眼コロボーマや内耳のCT所見からCSの診断につながる場合もある。特に高度難聴に対しては、新生児スクリーニングによる早期診断、補聴器装着、聴能訓練が重要である。一部、人工内耳手術を受けた例もあった。手術適応と術後リハビリテーションに課題はあるが、一定の効果が報告されている9)。また、幼児期に聴覚支援校での早期療育を受ける例では、家族とともに手話や多様なサイン語を習得し、視覚言語を発達させている。iPhoneなど先進モバイル端末の操作ができる児がおり、新たなコミュニケーション手段を獲得しているといえる。一方、地域の保育所や幼稚園に通う児もいる。摂食や言語発達面で特別支援を要するが、一般子ども集団からの刺激も発達に有用である。

## 4. 学童期・思春期以降の臨床像

学童期に自傷行為・他傷行為を認める例がある。CS児に特異的な行動パターンとしても報告されるが、精神発達とともに伸びる自意識や欲求に対して、それを表現するスキルが追いつかないことも要因の一つと考えられる。Hartshorneは、ダウン症候群の社交性やPrader-Willi症候群の過食といった疾患特異的行動と並べて、CSのユーモアセンスを特徴にあげている10)。学童期の重症例でも補聴器のハウリングで周囲をからかい楽しんでいる様子が認められた。こだわりや多動傾向もあり自閉症スペクトラムや広汎性発達障害の場合もあるが、CSの知覚障害や特異的な世界観も考慮した適切な療育が必要である。

吸引・注入などのケアが継続的に必要な年長児もいる。学校で付き添いを求められる場合もあり、家族の負担が大きい。また進学に際して、聴覚など専門的支援教育か医療ケア重視の支援教育か、二者択一に悩む例もあった。患者会であるCHARGEの会アンケート調査には、付き添いのために親が離職せざるを得ないという声や、障害者手帳の部位ごとでなく総合的な判定を望む声もある。成長発達する児に対しての支援教育環境の整備は重要である。CSのように重複障害を持つ児と家族へ、臨床像・生活像を理解した上で支援制度の拡充が望まれる。

年長児、成人期のCS臨床像の情報は成書にも少ない。今回の研究の対象例では、思春期以降

の女性は原発性無月経であった。学童期から思春期にかけては性腺機能低下のために第二次性徴の遅延が認められる。性ホルモン補充療法を受けている2例は、現在の身長が150cmを超え、標準女性の身長に近づいている。学童期に成長ホルモン治療を受けたが、思春期以降も身長の伸びがあり、骨端線閉鎖の遅れが影響していると考えられる。またCHD7遺伝子変異は嗅脳形成にも関与すると報告されており11)、学童期より嗅覚異常が判明する例も多い。成人期へ向けたトータルな健康管理には内分泌学的精査が重要である。

## 5. 遺伝カウンセリング

CSは臨床診断が可能であるが、確定診断のために遺伝子検査を行うことがある。典型例の約70%にCHD7遺伝子の変異が同定される。正確な診断は、CSとして適切な関連診療科の関与や合併症の早期発見とともに、治療療育の見通しが得られ、後の健康管理に有用である。しかし遺伝子検査は、生涯変化せず血縁者間で一部共有されるなどの特性を持つ遺伝情報を明らかにする。そのためガイドラインでは、確定診断として用いられる遺伝子検査に対しても、事前のインフォームドコンセントと専門家による遺伝カウンセリングの必要性を示している12)。

遺伝カウンセリングは、遺伝学的情報を提供し自律的な意思決定を支援する行為であり14)、「遺伝」という言葉で想起される狭義の再発率の相談のみではない。遺伝子や染色体の変異によって生じる疾患について、正確な情報をわかりやすく伝え、「遺伝性疾患とは遺伝するもの」という誤解を解きながら、心理支援を行う教育的なプロセスである。遺伝子検査においては、検査結果が被検者自身に与える心理社会的影響が重視され、事前に検査の意義を十分納得した上での同意が必須である。近年遺伝子の研究が進み、疾患の治療予防や臨床研究も行われている。CSも厚生労働省難治性疾患克服事業の対象疾患となり、当センターも研究班に参加しCS研究に関わった14)。検査への同意の中には、こうした研究協力への理解も含まれる。また、検査結果の開示において、遺伝子検査によって変異が同定されない場合があるが、すでに臨床診断がついていれば診断が覆ることはない。その点にも理解が得られることが必要である。

今回の遺伝子検査前後の遺伝カウンセリングでクライアントが語られた内容から、遺伝カウンセリングの課題点を考察した。

まず、臨床診断告知に伴うCS児の家族への対応である。出生後直ちに児の集中治療が開始されることが多いため、家族は誕生を喜んだり親子関係を育むことが困難な状況にある。母親の言葉には、多くの合併症を次々と告げられ、ハイリスクな疾患のマイナスイメージに圧倒されている様子が表れている。出産した母は、先天異常の原因に対して自責の念を持つことがある。遺伝性疾患の正しい理解によって自責が少しでも軽減できることは重要である。しかし出生直後は、提供する情報の内容だけでなく、タイム

ングや情報量の検討も個々に考える必要がある。過剰な情報は疾患理解を妨げ、児の受容さえ危くする可能性がある。児のセルフイメージ形成に親の視線は重要だといわれる15)。遺伝カウンセリングのプロセスで、気持ちと知識が整理され、児についての理解が深まり子育てに向き合う姿勢を持てるよう支援する必要がある。

次に、遺伝子診断による確定診断は適切な医療介入やフォロー方針決定に必要であるが、検査同意には個別性を考慮すべきである。児の病名が不明な場合、家族の不安は大きい。病名が明らかになることや、再発率が明確になる利点は大きいですが、遺伝子変異が同定されない場合もある。また変異があってもそれに対する直接的な治療はない。場合によっては血縁者の検査が必要な場合もある。確定診断を得るための遺伝子検査であっても、各々のケースでメリットデメリットは必ずしも同じではなく、家族によって受け止め方は異なる。遺伝カウンセリングでは意思決定の過程で生じる家族の迷いにも寄り添い、自律的な決定ができるように非指示的に中立的立場で支援すべきである。

最後に、家族は児の検査同意の代諾者だという点にも留意すべきである。遺伝子検査の目的は、児に適切な医療を行い、疾患について理解を深めて健康管理に役立てることである。また年長児や成人であれば、自分自身の疾患理解や次世代再発率についても、理解度に応じた情報を得ておく必要がある。CS年長者自身に対するカウンセリングは今後の課題である。

## E. 結論

CSの有病率が出生2〜3万人に1人という推定結果より、未診断例の多いことが予測され、早期診断と適切な診療対応が望まれる。当センターにおけるCS継続診療中20例の臨床像をまとめ、医療ケアの課題を検討した。CSのような稀少疾患の診断や治療において、遺伝子解析が疾患解明と合併症治療に有用であり、また患者や家族にとっては遺伝カウンセリングによって疾患や児に対する理解を深め健康管理に役立てられるように、今後も他の専門各科との連携で遺伝医療の充実を図る必要がある。

## 参考文献

Blake KD, Davenport SL, Hall BD, et al. CHARGE association: an update and review for the primary pediatrician. Clin Pediatr (Phila), 1998; 37: 159-73.

Verloes A. Updated diagnostic criteria for CHARGE syndrome: a proposal. Am J Med Genet A, 2005; 133A: 306-8.

Issekutz KA, Graham JM, Prasad C, et al. An epidemiological analysis of CHARGE syndrome: preliminary results from a Canadian study. Am J Med Genet A, 2005; 133A: 309-17.

本研究班平成21年度報告書

Ruchi Bajpal, Denise A.Chen, Alvaro Rada-iglesias, et al. CHD7 cooperates with

PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature*, 2010; 463:958-62

Michiko Aramaki, Toru Uda, Rika Kosaki, et al. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *J Pediatr*, 2006;148:410-4

Lalani SR, Safi ullah AM, Fernbach SD, et al. Spectrum of CHD7 mutation in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*, 2006; 78:303-14

Christine A. Oley. CHARGE SYNDROME. Management of genetic syndrome, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc. New York, 2010.

三科潤.難聴-新生児聴覚スクリーニングとその成果.小児内科40 : 2008;1505-08

Timothy S. Hartshorne,PhD. Behavioral phenotype.:Sidebar 28-1 CHARGE Sense of Humor.CHARGE Syndrome, A Volume in the Genetics and Communication Disorders Series, Plural Publishing, San Diego,2010

1佐藤直子.Kallmann症候群,中枢性性腺機能不全.小児内科40;2008 : 682-89

1日本医学会.医療における遺伝学的検査 診断に関するガイドライン, 2011

認定遺伝カウンセラー制度.

<http://plaza.umin.ac.jp/~GC/About.html>

<http://clin-res-chargesyndrome.jp/research>

Ann P. Walker, M. A. C. G. C. The practice of genetic counseling: A guide to genetic counseling, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2009

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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 2011;21:208-11.

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, 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*. 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.

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*. 2011;155A:1949-58

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]

Yukiko Kawazu, Noboru Inamura, Futoshi Kayatani, Nobuhiko Okamoto, Hiroko Morisaki

Prenatal complex congenital heart disease with Loeys-Dietz syndrome

*Cardiology in the Young* 2011 on line 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*. 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.

11)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, Niijima 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;56:707-15.

## 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

表 1) 当センターを受診した主要先天異常症候群出生年別患者数

	CS	RTS	PWS	Sotos	WS	BWS
2005-2009	7	6	8	5	4	5
2000-2004	2	7	16	5	3	7
1995-1999	6	5	10	5	9	4
・1994	5	4	14	7	4	5
合計	20	22	18	22	20	21

表 2) CHARGE 症候群での *CHD7* 遺伝子変異の概要

番号	年齢	性別	変異の型
5	4 y	M	Nonsense
6	3 y	F	Nonsense
8	1 y	M	Nonsense
9	1 y	M	Nonsense
13	11 y	M	Nonsense
17	0 y	M	Nonsense
2	5 y	F	Frame shift
10	21 y	F	Frame shift
12	11 y	F	Frame shift
16	3 y	M	Frame shift
19	5 y	F	Frame shift
1	7 y	M	Splice site
14	10 y	M	Splice site
15	10 y	M	Splice site
11	17 y	F	Deletion

表 3) CHARGE 症候群 臨床診断基準別症候

	Pagon 基準	Blake 基準	Verloes 基準	% (20 例中)
眼のコロボーマ	17	17	17	85 %
脳神経異常		20	20	100 %
先天性心疾患	16	16	16	80 %
食道気管低形成		5	5	25 %
後鼻腔閉鎖・狭窄	3	3	3	15 %
口唇口蓋裂		11		55 %
発育遅滞	14	14	14	70 %
発達遅滞	20	20	20	100 %
外性器異常	男児 9/10	男児 9/10		男児で 90 %
外耳奇形・難聴	20	20	20	100 %
内耳低形成			17/17	精査例で 100%
特徴的顔貌		20		100 %

表4) CHARGE 症候群 乳幼児例 (0-2 歳児) 臨床像

番号	8	9	17	20
(月齢) 性別	(21m) M	(25m) M	(5m) M	(15m) F
出生時	満期産 / AFD	満期産 / AFD	満期産 / AFD	満期産 / AFD
C コロボーマ	—	+	+	+
H 先天性心疾患	PDA, ASD, DORV (手術+)	PDA, PS, CAVC DORV	PDA, ASD (手術+)	PDA, ASD, VSD (手術+)
A 後鼻腔閉鎖 口唇口蓋裂 食道気管 消化器	— — 軟口蓋機能不全 胃食道逆流	— 口蓋裂 喉頭軟化症 胃食道逆流 食道裂孔ヘルニア	— 口唇口蓋裂 気管/喉頭軟化症 胃食道逆流 食道裂孔ヘルニア	— 口蓋裂 喉頭軟化症 胃食道逆流
R 発育遅滞 発達遅滞	身長 -1.5SD 体重 -0.6SD 独歩 1y9m DQ64	身長 -3.3SD 体重 -2.1SD 座位 2y DQ26	身長 -3.6SD 体重 -4.4SD 支持座位	身長 -3.9SD 体重 -4.2SD 支持座位
G 外性器異常	小陰茎 停留精巣	小陰茎 停留精巣	小陰茎 停留精巣	なし
E 外耳奇形 内耳低形成 聴力損失	+ + 左右 105dB 補聴器装用	+ + 右 90dB 左 70dB 補聴器装用	+ + 高度難聴	+ 不明 右 105dB 左 90dB
在宅医療	気管切開 胃瘻	気管切開 胃瘻	気管切開 チューブ栄養	チューブ栄養
遺伝子変異	ストップコドン	ストップコドン	ストップコドン	解析中

表5) CHARGE 症候群 幼児例 (3-4 歳) 臨床像

番号	5	6	7	16
(年齢) 性別	(4y) M	(4y) F	(3y) F	(3y) M
C コロボーマ	+	+	+	—
H 先天性心疾患	—	PDA(手術+)	PDA, ASD, VSD DORV(手術+)	PDA(手術なし)
A 後鼻腔閉鎖 口唇口蓋裂 食道気管低形成	—	— 口唇裂 食道閉鎖	鼻腔低形成 口唇口蓋裂 胃食道逆流	— 喉頭軟化症 食道裂孔
R 発育遅滞 発達遅滞	身長 -3SD 独歩 2y9m 重度 手話	身長 -4.9SD 独歩 2y	身長 -2.4SD 支持立位 DQ38 手話	身長 -1SD 独歩 2y5m DQ42 手話
G 外性器異常	小陰茎 停留精巣	なし	なし	小陰茎 停留精巣
E 内耳低形成 聴力	+ 右 100dB 左 60dB	+ 左右 70dB	不明 高度難聴 人工内耳	不明 左右 105dB 人工内耳予定
療育	聴覚支援校	聴覚支援校	PT 通院	聴覚支援校
在宅医療		気管切開 胃瘻	胃瘻	経管栄養
遺伝子変異	ストップコドン	ストップコドン	検査実施せず	フレームシフト

表6) CHARGE 症候群 幼児例 (5-6歳) 臨床像

番号	2	3	4	19
(年齢) 性別	(6y) F	(5y) F	(5y) M	(5y) F
C コロボーマ	+	+	+	+
H 先天性心疾患	PDA,ASD,VSD, COA(手術+)	PDA,ASD (手術なし)	PDA (手術+)	PDA,ASD (手術+)
A 後鼻腔閉鎖 口唇口蓋裂 食道気管低形成	後鼻孔閉鎖 - 食道閉鎖 喉頭軟化症	- 口唇裂	後鼻孔閉鎖 -	- 口唇裂 胃食道逆流
R 発育遅滞 発達遅滞	身長 -4SD 座位 重度	身長 -0.1SD 独歩 1y9m DQ65	身長 -1.3SD 独歩 1y6m DQ61→42	身長 -1SD 独歩 3y 重度
G 外性器異常	不明	不明	なし	不明
E 内耳低形成 聴力損失	+	+	なし	不明
	右 90 左 105dB	右 20 左 100dB	左右 95dB	左右 75-85dB
療育	療育園	保育所	保育所	幼稚園
在宅医療	気管切開 チューブ栄養			チューブ栄養 経口摂取訓練
遺伝子変異	フレームシフト	変異なし	変異なし	フレームシフト

表7) CHARGE 症候群 学童期例 (7-12歳) の臨床像

番号	1	12	13	14	15
(年齢) 性別	(8y) M	(12y) F	(11y) M	(11y) M	(10y) M
C 眼	+	+	+	+	+
H 心疾患	PDA,ECD (手術+)	PDA (手術+)	-	PDA,VSD TGA(手術+)	-
A 後鼻孔閉鎖 口唇口蓋裂 食道気管形成	- - 食道閉鎖	- 口蓋裂 胃食道逆流	- 口唇口蓋裂 胃食道逆流	- - 胃食道逆流	- 口唇口蓋裂 食道閉鎖
R 身長 発達遅滞	-5.6SD 支持立位 重度	-2.9SD 独歩→徘徊 重度 自傷/他傷	-2.9SD 独歩 5y 重度 手話 自傷/他傷	-3.4SD 独歩 7y DQ29→16 手話	-4.7SD 独歩 5y DQ17 手話
G 外性器	小陰茎 停留精巣	不明	小陰茎 停留精巣	小陰茎 停留精巣	小陰茎 停留精巣
E 内耳低形成 聴力損失 嗅覚異常	+	+	+	+	+
	高度難聴 +	高度難聴 -	左右 105dB +	左右 90dB -	80dB/100dB +
療育	支援校 全介助	療護施設 全介助	支援校 身辺自立	支援校 トイレサイン	支援学級
在宅医療	胃瘻		胃瘻	経鼻チューブ	胃瘻
遺伝子変異	スプライス異常	フレームシフト	ストップコドン	スプライス異常	スプライス異常

表8) 思春期以降の臨床像

番号	10	11	18
(年齢) 性別	(21y) F	(20y) F	(24y) F
C コロボーマ	+	+	-
H 先天性心疾患	PDA,VSD(手術+)	-	ASD,VSD(手術+)
A 後鼻腔閉鎖 口唇口蓋裂 食道気管低形成	後鼻孔閉鎖 口唇口蓋裂	- - 胃食道逆流	食道気管瘻
R 身長 発達遅滞	150.8cm 15y まで-3SD 独歩 4y IQ42	117cm(17y) -7.9SD 支持立位(13y)車いす 重度(點頭てんかん)	152.7cm 14y-3SD GH 治療 IQ42
G 性腺機能低下	低ゴナドトロピン性性 腺機能低下 原発性無月経	低ゴナドトロピン性性 腺機能低下 原発性無月経	低ゴナドトロピン性性 腺機能低下 原発性無月経
E 内耳低形成 聴力損失	+	+	不明
就労 自立 医療	作業所 性ホルモン補充療法	作業所 全介助	グループホーム 性ホルモン補充療法
遺伝子変異	フレームシフト	微細欠失	変異なし

表9) 遺伝カウンセリング

患児の年齢	クライアント	語られた内容から
0y	母	妊娠中の影響ではないと言われ救われた思いだった 産後3週間のことは何も覚えていない この子には今後も多くの病気があるのか(覚悟と不安)
0y	母/祖母	確定診断で原因をはっきりさせたい
5y	父/母	研究協力には応じるが、遺伝子検査で確定診断が得られても、直接のメリットは少ないように思う。
5y	父/母	病名がついて原因が分かったことがうれしい 摂食障害があるので、就学してからの給食などが心配
12y	施設職員	療護施設に入所後。自傷行為/他傷行為がある 診断を療育に活かしたい
24y	母	これまで「心臓手術後」という病名しかなかった 本人に次世代再発率などを伝える必要があるのか

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合分担研究報告書

CHARGE 症候群の診断と患者家族支援に関する研究

分担研究者 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。

研究班の分担研究として、患者家族への支援について検討するために平成 21 年度に家族会の協力を得て患者アンケートを行い患者のニーズについて把握した。22 年度にはその結果を活用して CHARGE 症候群患児家族への最新医療情報の提供と家族間の交流を目的としてグループ外来を開催し遺伝性疾患研究の家族へのフィードバックを実践し、ウェブサイトを構築して患者への情報提供の一手段とした。

### 共同研究者

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は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。

患者会協力を得て行ったアンケートにおいて、遺伝子検査についての質問を集計し、遺伝子診断が患者家族にとって有用であるかを検討した。

次いで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。

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ため、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、CHD7 陽性例とのその臨床像の異同について検討した。

### B. 研究方法

CHARGE 症候群の全国的な患者家族のサポートグループである「CHARGE の会」の会員宛にアンケートを送付し、アンケート中の下記の項目について検討した。

1. 患者会のアンケート全集計結果から Blake の診断基準の各項目に相当する症状を有する人数を集計。
2. 患者会に属する患者のうち変異陽性例の個々の患者が Blake の基準を満たしているかどうかを検討する。
3. 患者家族アンケートにおいて遺伝子診断の意義についての設問（下記）について集計検討する。

愛知県心身障害者コロニー中央病院小児内科を受診中の CHARGE 症候群患児の小児を対象に医学的情報の提供、患者家族の交流を目的とした昨年度グループ外来を行った。参加者を対象に、開催後 6 か月から 1 年の間に面談による聞き取り調査を行った。

グループ外来参加者の中で 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。

(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、アンケート調査、グループ外来への参加と情報の収集に際しては代理人である両親に対して説明を行い、同意を得た個人情報のみがお互いに共有できるように配慮した。

## C. 研究結果

### 1. 家族会アンケートから

質問 1 遺伝子診断を受けて良かったことへの回答

関わってくれる人に症状や先の見通しを説明しやすくなった。

病名が確定していると、いろいろな情報に振り回されなくなるのが良い。

遺伝子変異による CHARGE 連合だと確定したので原因がわかって、とりあえず納得した。

今まで複数の障害があるということで各科を単体で受診し、トータル的に診てくれる病院もなく、また適切な療育も受けられなかったが、確定診断がついたことで医療機関や療育園に対して、適切なサービスを受けていないことを説明できた。

今後どのような問題が出てくるのか情報があれば予測を立てる事が出来る事。

CHARGE と確定できたことで他の病気についても何をすべきか考えてもらえるようになった。

今後何らかの発見があった時に本人に有益なことがあると思う

病名が確定できたことにより、療育や医療面でもより積極的になれたこと。

将来的なビジョンが持てるようになったこと。

兄弟児には遺伝的影響はないとわかったこと。

CHARGE という病名がわかるまでに9年もかかったので遺伝子診断の結果を聞いて今までの症状に納得できた。

CHARGE と診断されはっきりして安心した。

原因が分かってすっきりした。

質問 2 遺伝子診断を受けて戸惑ったことに対する質問への回答

親としては CHARGE だと思っていたので気持ち的には何も変わらなかった。

兄弟には、遺伝しないときちんと説明頂いたが心のどこかにひっかかるのか未だに一人っ子で兄弟ができない。

CHARGE と認めたくなかったのが決定されたこと。

CHARGE 症候群として、トータル的に診てもらえる医療機関が欲しい。各病院各診療科で検査が重複することがある。

## 2. CHARGE 症候群グループ外来 (2011 年 2 月) の構成内容

対象患者

当院通院中の 10 歳未満の CHARGE 症候群の患児 10 名にグループ外来の案内を書面で郵送した。対象患者は当院通院中の CHARGE 症候群と診断しているで、CHARGE 症候群の診断は Blake の診断基準により行った。郵送した書面は案内文および申込書で、申込書にはすべての参加者氏名と関係のほか住所電話番号、メールアドレス、及び当日取り上げて欲しい話題と質問を掲載した。また氏名、生年月日、住所、電話、アドレスについては各々当日配布する参加者名簿への記載の可否の記入を求めた。

患児 9 名の家族から参加の申込みがあった。この他病院のウェブサイトを見て自ら参加を希望された 2 家族があり、グループ外来当日に初診受付し参加した。

参加者：11 家族 (児：11 名、父母等 18 名)

グループ外来の進行

9 時半受付開始

10 時～

「CHARGE 症候群の概容と最近の話題」

小児科医師

10 時 40 分～

「見ることと遊ぶこと」

視覚障害指導員 (視覚訓練士)

11 時 10～

質疑応答、自己紹介

11:50 分

記念撮影

12 時～

自由交流

医師の講演は、CHARGE 症候群の歴史、診断、主な合併症とそれらに対する治療と療育、今後の定期的フォローアップスケジュールについて述べた。

リハビリテーション部門の療法士の講演は、こどものコミュニケーション手段の発達の違いについての話題を提供した。

家族からの主な質問内容

- ・複数診療科の医師により治療方針が異なることに対する不安 (口蓋裂閉鎖術、気管切開閉鎖術の時期について耳鼻科医と口腔外科医と外科医で意見が異なり時期が決定しない)。
- ・CHARGE 症候群の患児はどんなことが得意か知りたい。
- ・将来の進路、進学について
- ・遺伝子の病的変異の発症メカニズムについて知りたい
- ・同じ遺伝子変異で何故症状が異なるのか知りたい
- ・食事のリハビリ、言語の療育について

- ・将来の結婚や出産について
- ・歩行時のふらつきについて、将来的にも持続するの

各々に対して、医師、療法士が回答した。その後の自由交流では近い年齢の子どもの家族が自然に集まり電話番号やアドレスの交換をして有意義な時間を過ごしていた。

### 3. ウェブサイトの作成

インターネット上で本症候群を検索する対象者は、本症候群に関係する医療者および患者関係者の両者が想定される。両者が閲覧することを想定して本研究班のホームページを作成し公開した。

#### 研究班の概容、CHARGE 症候群とは

- ・厚生労働省の難治性疾患克服事業の概説
- ・設立の経緯と研究目的

#### CHARGE 症候群の解説

- ・診断基準
- ・健康管理情報

#### 研究成果

- ・わが国の患者数の推計
- ・患者家族会への支援
- ・感覚器の障害に関する研究
- ・基礎研究、海外との連携
- ・遺伝子診断の案内

#### 班員名簿

患者のご家族の方へ

医師向け情報

関連情報リンク

#### 図 研究班のウェブサイト



### D. 考察

CHARGE 症候群家族アンケートにおいて遺伝子検査への感想を求めた結果では、多くの家族が診断の確定を前向きに評価していることが読み取れる。

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に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。しかし費やす準備期間、関わるスタッフの数は多大なものがあり、一般病院の採算を考慮した診療では行い得ない。稀少疾患のグループ外来が普及するためには制度的な支援も必要であろうと思われる。

上記のようなグループ外来は患者に一番近い立場での支援であるのに対して、インターネットはその対極にある。昨今のインターネットは情報提供だけではなく、コミュニケーションやコミュニティ形成の手段としても有用であり、患者家族同士が知り合い情報を共有する手段としても活用が期待され、今回我々が作成したウェブサイトがその一助となると考える。

### E. 結論

分担研究として CHARGE 症候群患者家族への情報提供と支援の方法について検討した。

遺伝子診断を早期に行うことのメリットを家族が感じられるためには、診断後の情報提供や支援体制を充実させることが重要である。稀少先天異常疾患のグループ外来やウェブサイトの作成は、患者への情報提供、心理的支援、患者間の交流において、有効な患者支援の一形態であると考えられる。

### 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)

61st 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 一保有者を特定しない結果告知はまだ必要かー

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 ー 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

### 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が、1/3程度の症例については原因が不明である。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、(1) SureSelectシステム（アジレント社）を用い、ゲノムの標的領域に相補的な配列を持つベイトRNAを作成し、エキソン領域のDNAをハイブリダイゼーションで選択的に回収した後シーケンシングを行う手法と、(2) CHD7遺伝子の全コーディングエキソンをPCRにより増幅後、シーケンシングを行う手法を試みた。また、次世代シーケンサーについては、(3) SBS (Sequencing by Synthesis) 法による蛍光色素を用いたシーケンサーであるイルミナ社のGenome Analyzer IIx (GAIIx)と(4) ランニングコストが安価な非蛍光型パーソナル半導体次世代シーケンサーイオントレントPGM (Personal Genome Machine) の両者を比較し、遺伝子変異探索法の実用性を検討した。標的DNAの調製については、SureSelectを用いた場合も、PCRを用いた場合も、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遺伝子のコーディング配列を含む標的領域にマッピングされ高い特異性が確認された。また、研究協力者の清水らが開発した、自動化コンピュータプログラム群（いわゆる解析パイプライン）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。マッピングによって得られた塩基置換リストとdbSNPsと1000人ゲノムプロジェクトのデータに含まれる既知の塩基置換のアノテーションを比較することで、新規変異の同定を試みた。次世代シーケンサーについては、GAIIxでは安定してエラーの少ないデータが得られたのに対して、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小児科学教室→臨床遺伝学センター）  
小崎健次郎（慶應義塾大学医学部小児科学教室→臨床遺伝学センター）

## A. 研究目的

CHARGE症候群は遺伝子変異により発症する多発奇形症候群である。一部の症例がCHD7遺伝子の変異により発症することが知られているが、変異の同定されない症例も少なくない。本研究では、次世代シーケンサーを用いた、高効率な遺伝子診断法の確立をめざし、ゲノム上の特定領域を選択的に解析する技術と次世代シーケンサーを比較検討し、分析手法の最適化を行った。

## B. 研究方法

1) CHD7 遺伝子の標的領域 DNA の調製  
アジレント社のエキソンキャプチャキット (SureSelect Human All Exon 50Mb kit) を用いて CHD7 遺伝子の標的領域に相補的な配列を持つ 120base のベイト RNA を作成した。ゲノム DNA はアコースティックソルビライザー (Covaris) によって断片化した後、常法に従い、エキソン領域の DNA を選択的に回収し、アダプターを連結し、PCR 法で増幅した。

一方、ゲノム DNA から直接 PCR によって、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 3 A)。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にそろえた。PCR

断片の濃度をそろえて混合した後に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

SureSelect で回収した DNA は、イルミナ社の Genome Analyzer IIx (GAIIx) で 75 塩基のペアエンドシーケンシングを行った。その後、研究協力者 清水らが開発した、自動化コンピュータプログラム群（いわゆる解析パイプライン）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。

マッピングによって得られた塩基置換リストと dbSNPs と 1000 人ゲノムプロジェクトのデータに含まれる既知の塩基置換のアノテーションを比較することで、新規変異の同定を試みた。

一方、PCR で増幅した DNA については、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ズ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