

後、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ズ社) 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

SureSelect で回収した DNA から GAIIX で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 1)。またエキソン 38 に新規の一塩基置換 (c.8403A>T) を発見した (図 2)。

一方、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 (図 3 A)、PGM で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 3 B 中下段)。カバー頻度のバラツキに関しては、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 3 B 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、間違っただけの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 遺伝子のエキソン 2 の偽陽性変異を示した (図 4)。PGM のデータはエキソン 2 に変異があることを示したが (図 4 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 4 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 GGGCCCC のリードは 100%間違っていた (図 4 C)。他にも GGG を GG と 100%間違える箇所も見つかった。

D. 考察

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 を選択的に回収したところ、極めて高い効率で標的領域遺伝子配列が濃縮されることを示した。また PCR により、対象とするエキ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した場合も、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。

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、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。

今後、CHD7 遺伝子に変異が見出せない原因不明の CHARGE 症候群患者から未知の原因遺伝子を探索するために、CHARGE 症候群の発症との関連が強く示唆されて PBAF (polybromo-and BRG1-associated factor-containing complex) を構成する遺伝子群を対象とした遺伝子解析や、全遺伝子を対象としたいいわゆるエキソーム解析の実施を視野に入れた場合、SureSelect で標的配列を濃縮した後、対象とする遺伝子数に応じて、大規模の場合は GAIIX を用い、小規模の場合は 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、有力な手段であると判断した。

E. 結論

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遺伝子診断法の最適化を検討した結果、現時点ではエキ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、蛍光型パーソナル次世代シーケンサーである MiSeq を用いるのが信頼性と経済的観点から考えて、有力であると結論した。また、CHD7 遺伝子変異を持たない症例を対象とした新規原因遺伝子の探索では本研究でとりあげたエキソンキャプチャーによる標的遺伝子の濃縮技術による網羅的な解析が有用であると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

小崎健次郎、工藤 純：次世代シーケンサーを用いた疾患原因遺伝子の探索—倫理的な配慮も含めて—、細胞工学 30(8):806-807 (2011)

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

図 1.

CHD7のゲノム構造とマッピングデータのゲノムブラウザーによる表示



エキソン38に新規の塩基置換 (変異; 拡大図赤) を同定

図 2. CHD7 エキソン 38 に新規の一塩基置換 (c. 8403A>T) を同定した。

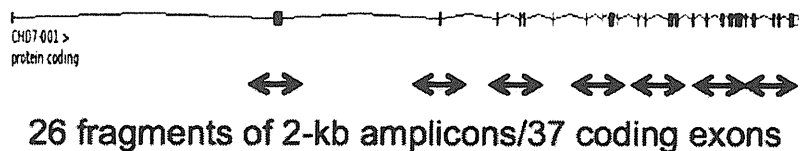
CHD7のコーディング/スプライスサイトの多型と患者で同定したSNV



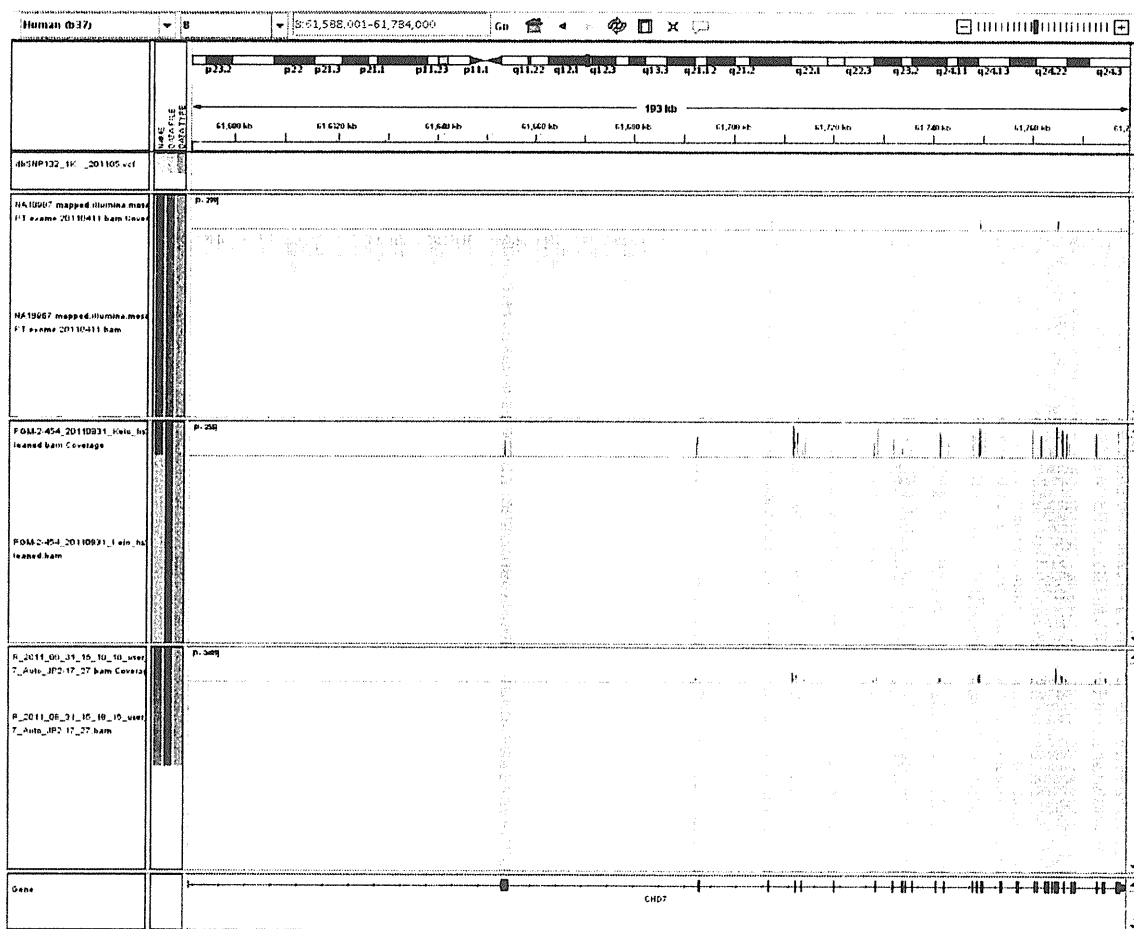
新規の塩基置換を同定

図3. 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



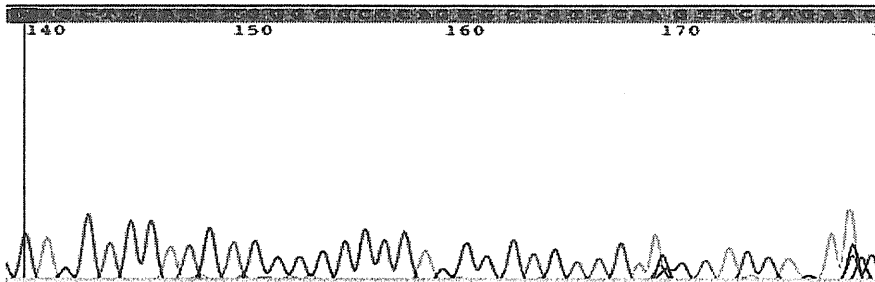
上段 エクソンキャプチャー後に GA で得たシーケンスを自作解析パイプラインでアラインした結果
 中段 PCR 後に PGM で得たシーケンスを自作解析パイプラインでアラインした結果
 下段 PCR 後に PGM で得たシーケンスを TorrentSuite (ライフテクノロジー社) でアラインした結果

図4. CHD7 遺伝子の PGM で得たシーケンスのエラー

(A) CHD7 遺伝子のエクソン2で生じた偽陽性変異

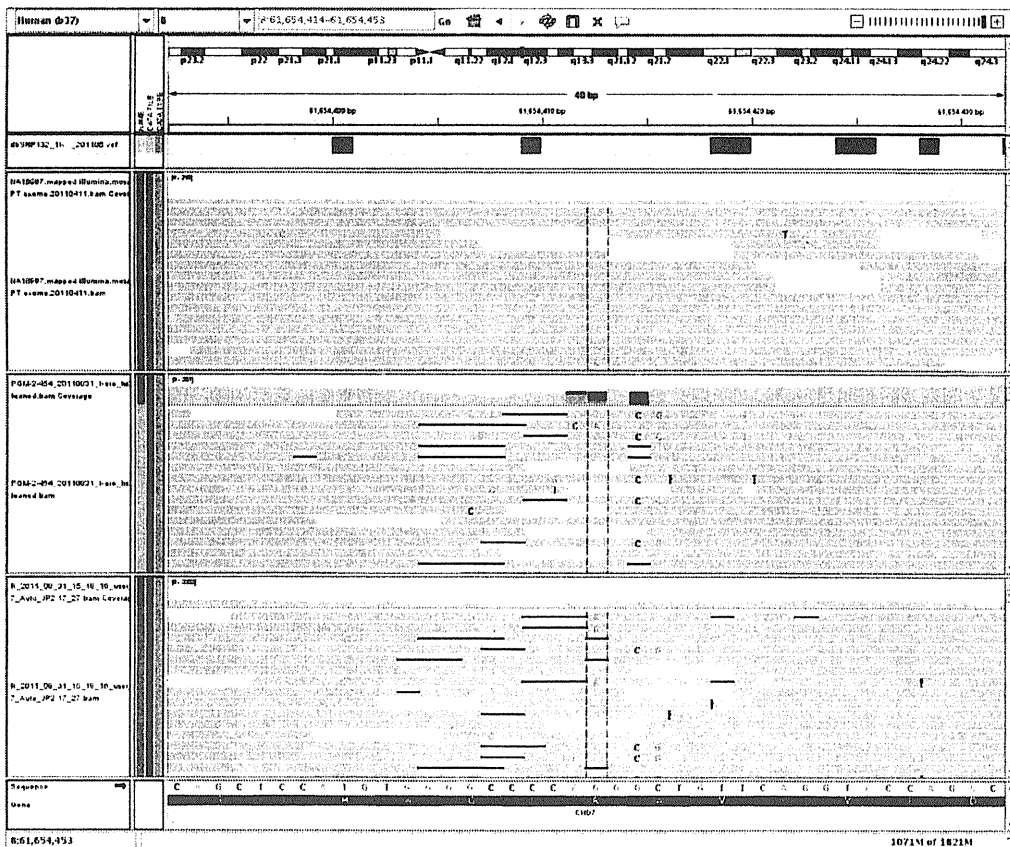
CHD7	chr8	61654428	GCCCC	GCC,GCCC,GC	JPT_Exome	PGM_Kaia	PGM_LifeTech	Region	Verification
		61654433	JPT_exome A	C	none	Hetero	none	CDS	FALSE

(B) キャピラリーシーケンサーによる確認



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

- 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



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症候群の眼合併症と視覚障害に関する研究

研究分担者 仁科 幸子

独立行政法人 国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 眼科医員

研究要旨

CHARGE症候群の患者・家族会を対象としたアンケート調査の一環として、眼合併症と視覚障害に関する実態を書面にて調査した。総計57例の調査結果を患者年齢によって区分し検討した。両眼に眼合併症をもつ視覚障害者の比率は50～70%で、視力障害のほか視野障害、羞明をきたしている例が高率であった。大部分が眼科的管理を受けていたが、乳幼児期（0～3歳）に視覚障害の評価や弱視訓練・ロービジョンケアを行っている例は少数であった。また乳幼児期～学童期に視覚の訓練や特別支援を受けた例の比率が低く、重複障害児に対する医療・療育・教育機関のさらなる連携体制が必要であることが示唆された。

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の評価し、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。保有視機能を早期に評価する方法を検討するために、国立成育医療研究センターに受診した2例4眼に対し、光干渉断層計（OCT）を用いて黄斑を含む網膜の形態検査を施行した。

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関する実態調査を行い、眼科的管理及び療育・教育の現状と問題点について検討した。これを基盤として、眼合併症に対する管理・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) CHARGE症候群の実態調査

CHARGE症候群の患者・家族会を対象としたアンケート調査の一環として、眼合併症の有無、視力・視野障害、羞明、色覚障害の有無、眼鏡・光学的補助具の使用状況、眼科通院状況など、眼合併症と視覚障害の実態を書面にて調査・検討した。また、障害者手帳取得、視覚訓練、視覚特別支援学校との関わりなど福祉や療育・教育に関する側面についても調査した。

2) CHD7遺伝子変異陽性例の眼合併症

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（大阪府立母子保健総合医療センター、愛知県心身障害者コロニー中央病院、神奈川県立こども医療センター、国立成育医療研究センター）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。

3) CHD7遺伝子変異陽性例に対するOCT検査

保有視機能を早期に評価する方法を検討するために、国立成育医療研究センターに受診したCHD7遺伝子変異陽性例2例4眼に対し、全身麻酔下または外来にて、通常的眼科検査と同時に、新たに光干渉断層計 OCT（RS-3000, NIDEK）を用いて黄斑を含む網膜の形態検査を施行した。

4) 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

ポーマ+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) CHARGE 症候群の実態調査

CHARGE 症候群患者総計 57 名の回答を得た。患者年齢によって 0~3 歳 (A 群) 15 名、4~6 歳 (B 群) 14 名、7~12 歳 (C 群) 18 名、13~18 歳 (D 群) 4 名、19 歳~ (E 群) 6 名に区分し検討した。眼疾患のある例は A 群 80%、B 群 100%、C 群 83%、D 群 100%、E 群 100%で、うち両眼に器質的眼合併症をもつ例は A 群 53%、B 群 71%、C 群 50%、D 群 75%、E 群 67%であった。全群とも光覚~0.2 の重篤な視力障害の占める比率が高いが、他に視野障害(44~83%)、羞明(44~75%)を訴える比率も高かった。

全群を通じて眼科疾患のある例は定期的に眼科的検査を受けている例が多い。B 群では屈折矯正眼鏡の使用率が 57%に上り、保有視機能の発達を促す弱視治療が積極的に行われていることが示唆されたが、A 群では 7%と少なく、視覚障害の把握も十分ではなかった。重複障害児であっても、感受性の高い乳幼児期に積極的に視機能の評価、弱視治療を行い、ロービジョンケアを開始することが重要な課題であると考えられた。また全群を通じて、乳幼児期や学童期に視覚訓練や視覚特別支援学校において専門的指導を受けた例の比率が 7~25%と低かった。重複障害児に対する医療、療育・教育の連携体制を作ることが急務である。

2) CHD7 遺伝子変異陽性例の眼合併症

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、女性 9 例、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視神経・網脈絡膜コロボーマが 18 例(94.7%)と高率にみられた。黄斑欠損・部分欠損をきたしたものは 13 例(68.4%)に上った。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。虹彩-網脈絡膜コロボーマは胎齡 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齡 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。

小児が多いため、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。しかし学童期~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。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重要である。

視力測定が可能であった 17 例で、両眼開放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。0.3 未満の視力障害を約 65%に認めたことになる。

3) CHD7 遺伝子変異陽性例に対する OCT 検査

国立成育医療研究センター眼科において OCT による形態検査を施行した CHD7 遺伝子変異陽性例 2 例は 6 歳女兒、7 歳男児である。眼所見として網脈絡膜コロボーマ 2 例 4 眼、視神経乳頭コロボーマ 2 例 3 眼、小角膜・小眼球・水晶体コロボーマ、偏位を 1 例 1 眼に認めた。

OCT による形態評価は 4 眼に実施可能であり、うち 1 例 2 眼では黄斑を含む網膜の異形成を認め、優位眼の視力が 0.04 であった。他の 1 例 2 眼のうち、右眼はコロボーマの範囲が小さく、コロボーマ以外の網膜の形態及び黄斑の中心窩陥凹の形態が正常で視力 1.0 であった。一方、左眼は広汎な網脈絡膜・視神経コロボーマ、近視性不同視を合併し、検眼鏡的に黄斑部の部分欠損と診断された。しかし OCT 検査では黄斑部の中心窩陥凹の形態が不完全ながら保たれていた。屈折矯正と遮閉法による弱視訓練を実施した結果、左眼視力は 0.4 まで向上した。

新たな機器である OCT を用い、黄斑部中心窩陥凹の形態検査を実施することによって、保有視機能を早期に評価し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。

4) CHD7 遺伝子変異と眼異常の重症度

眼異常の重症度を 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。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)。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。

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

CHARGE 症候群の眼科的管理、療育・教育に関する実態調査を実施し、重複障害児(者)に対する視覚訓練やロービジョンケアの遅れが示

された。

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。本研究成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

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 遺伝子の眼形成に關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。

E. 結論

CHARGE 症候群の眼合併症に関する実態調査によって、乳幼児期からの重篤な視覚障害に対する医学的、福祉・教育的なケアの重要性が明らかとなった。

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。

OCT による網膜・黄斑部の形態検査は、保有視機能を早期に評価し、弱視訓練やロービジョンケアを導入するために有用と考えられた。

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-Swaid 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

Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Risk factors for recurrent fibrovascular proliferation in aggressive posterior retinopathy of prematurity after early vitreous surgery. *Am J Ophthalmol*, 150: 10-15, 2010

Ito M, Yokoi T, Sugita S, Shinohara N, Nishina S, Azuma N. Endogenous candida chorioretinitis in a healthy infant. *Jpn J Ophthalmol*, 54: 629-631, 2010

Fujinami K, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Choroidal neovascularization in child following laser pointer-induced macular injury. *Jpn J Ophthalmol*, 54: 631-633, 2010

Shoji K, Ito N, Ito Y, Inoue N, Adachi S, Fujimaru T, Nakamura T, Nishina S, Azuma N, Saitoh A. Is a 6-week course of ganciclovir therapy effective for chorioretinitis in infants with congenital cytomegalovirus infection? *J Pediatr*, 157: 331-333, 2010

Wu J, Kubota J, Hirayama J, Nagai Y, Nishina S, Yokoi T, Asaoka Y, Seo J, Shimizu N, Kajiho H, Watanabe T, Azuma N, Katada T, Nishina H. p38 mitogen-activated protein kinase controls a switch between cardiomyocyte and neuronal commitment of

murine embryonic stem cells by activating MEF2C-dependent BMP2 transcription. *Stem Cells Dev*, 19: 1723-1734

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発育異常の画像評価. *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

伊藤一清水里美、赤池祥子、越後貫滋子、仁科幸子、東 範行. 液晶視力表システムチャートSC-2000 によるロービジョン児のコントラスト視力測定と遮光レンズの効果. *眼科臨床紀要* 3: 70-73, 2010

仁科幸子、横井匡、横井多恵、小林百合、野田英一郎、東範行. 乳幼児眼疾患の発見・受診経路と初診時期. *眼科臨床紀要* 3: 172-177, 2010

仁科幸子. 視神経無形成. *眼科* 52: 205-209, 2010

伊藤・清水里美、赤池祥子、越後貫滋子、仁科幸子、東範行. 国立成育医療センターにおける小児ロービジョンケアの特徴. *眼科臨床紀要* 3: 346-352, 2010

田中三知子、仁科幸子. 小児の眼筋麻痺. *あたらしい眼科* 27: 909-915, 2010

福島梨沙、重安千花、水野嘉信、横井 匡、中川温子、仁科幸子、東範行、山田昌和. セントラルデルモイドの1例. *臨眼* 64: 1337-1340, 2010

2. 学会発表

Nishina S. Invited speaker of the Symposium "Challenging pediatric ophthalmology management problems" Assessment and management of microphthalmos. 25th APAO Congress - A Joint Meeting of APAO/AAO. Beijing, China, 2010.9

Nishina S, Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Azuma N. Stereopsis after early surgery for bilateral congenital cataracts. XI meeting of the International Strabismological Association. Istanbul, Turkey, 2010.9

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発育異常の画像評価. 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. 強膜内陷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

仁科幸子. 小児ロービジョン患者の視機能評価. 第 114 回日本眼科学会総会、名古屋、2010.4

仁科幸子. 先天性水晶体偏位の管理. 第 114 回日本眼科学会総会、名古屋、2010.4

仁科幸子. 未熟児網膜症の診断と治療. 聖マリアンナ医科大学周産期カンファレンス、2010.4

仁科幸子. 発達緑内障の早期発見と診断. 第 66 回日本弱視斜視学会総会・第 35 回日本小児眼科学会総会合同学会、東京、2010.7

伊藤牧子、田中三知子、横井匡、小林百合、野田英一郎、仁科幸子、東範行. 小児眼底の広範囲な構造と機能の検査. 第 66 回日本弱視斜視学会総会・第 35 回日本小児眼科学会総会合同学会、東京、2010.7

田中三知子、伊藤牧子、横井匡、野田英一郎、小林百合、仁科幸子、東範行. 検眼鏡的に異常がな

い視力不良例に対する網膜電図検査. 第 66 回日本弱視斜視学会総会・第 35 回日本小児眼科学会総会合同学会, 東京, 2010.7

初川嘉一、仁科幸子、菅澤淳、木村亜紀子、矢ヶ崎悌司、不二門尚、平野慎也. 外斜視の多施設共同研究 2. 術前眼位と手術効果. 第 66 回日本弱視斜視学会総会・第 35 回日本小児眼科学会総会合同学会, 東京, 2010.7

仁科幸子. 小児の眼疾患の診方. 茨城県眼科医会講演会, つくば, 2010.8

仁科幸子. 小眼球の診断と管理. 杏林大学オープンカンファレンス, 2010.10

伊藤牧子、田中三知子、横井匡、小林百合、仁科幸子、東範行. 小児における全身麻酔下での局所網膜電図検査. 第 58 回日本臨床視覚電気生理学会, 盛岡, 2010.10

田中三知子、伊藤牧子、横井匡、小林百合、仁科幸子、東範行. 小児の網膜疾患に対する全身麻酔下での局所と全視野の網膜電図所見. 第 58 回日本臨床視覚電気生理学会, 盛岡, 2010.10

仁科幸子、黒坂大次郎、西田保裕、近藤寛之、小林百合、東範行. 小眼球症の実態に関する全国調査. 第 64 回日本臨床眼科学会, 神戸, 2010.11

田中三知子、横井匡、小林百合、仁科幸子、東範行. 乳頭周囲ぶどう腫/ 朝顔症候群の黄斑の構造と機能. 第 49 回日本網膜硝子体学会, 大阪, 2010.11

仁科幸子. 斜視と弱視. 東京都眼科医会卒後研修会, 東京, 2010.11

仁科幸子. 小児白内障手術の術後管理. 第 34 回日本眼科手術学会, 京都, 2011.1

仁科幸子. 小児の続発緑内障の治療戦略. 第 34 回日本眼科手術学会, 京都, 2011.1

小林百合、田中三知子、横井匡、仁科幸子、東範行. 水晶体後方完全脱臼を呈した小児同胞 2 例に対する手術治療. 第 34 回日本眼科手術学会, 京都, 2011.1

仁科幸子. 小児の眼疾患の診かた. 第 92 回香川県眼科集談会, 高松, 2011.3

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

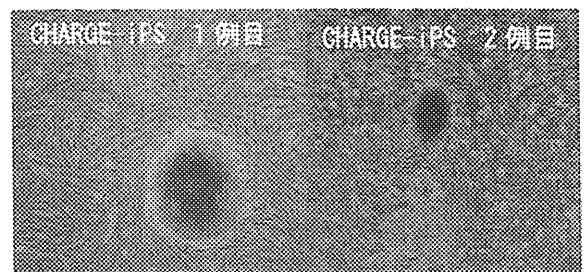
成し、iPS 細胞より神経堤細胞へ誘導することで、病態解明や新たな治療方法の糸口になると考える。

B. 研究方法 / C. 研究結果

①CHARGE 症候群患者由来iPS細胞の樹立

インフォームド・コンセントを得た後 CHARGE 症候群 2 症例(男児 1 例、女児 1 例)より線維芽細胞を樹立した。作成した線維芽細胞にレンチウイルスベクターを用いてマウスレトロウイルス受容体(Slc7a1)を発現させることで、レトロウイルスの感染効率を上げる。その後レトロウイルスベクターにより 4 遺伝子(Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc)を導入した。遺伝子導入されたことを見るため 4 因子に加えて ds-red 遺伝子を同時に遺伝子導入した。

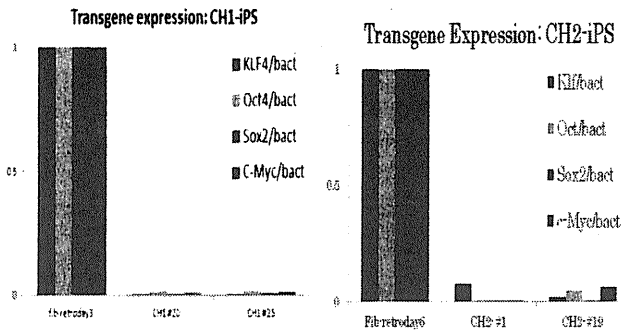
患者由来皮膚線維芽細胞より 1 患者につき 25line の iPS 細胞を 2 名の患者より樹立した。



②樹立した iPS 細胞の line 選定

iPS 細胞において、iPS 細胞樹立と共に導入した 4 遺伝子が発現低下し、内因性の転写因子が発現することが ES 細胞様の多分化能をもった細胞になるために必要である(Laurie. A et al. : Cell 2005) レトロウイ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

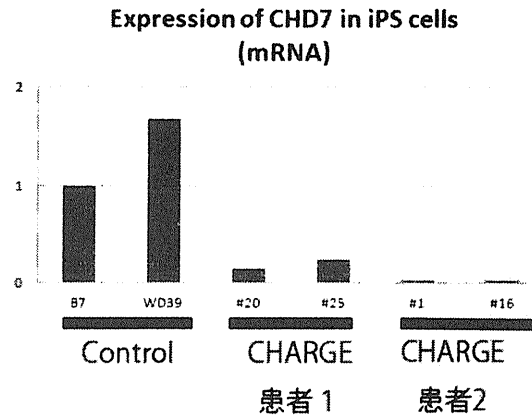


また導入遺伝子が低下しているラインについて CHD7 の発現を定量 PCR で調べ、正常と比較して低値であることを確認した (図 2)。

③神経堤細胞の誘導

2010 年 Studer らはト 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と成功した (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、Alizarin red(+)細胞、Oil red(+)細胞、Toluidine blue(+)細胞、

図 2



Safranin-O(+)細胞、SILV(+)細胞に分化し、多能性があることを確認した(図 7)

図 6

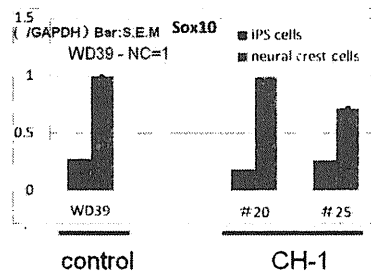


図 3

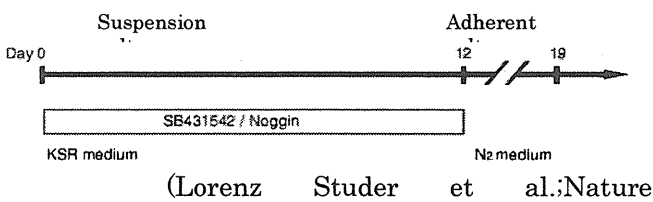


図 5

図 4

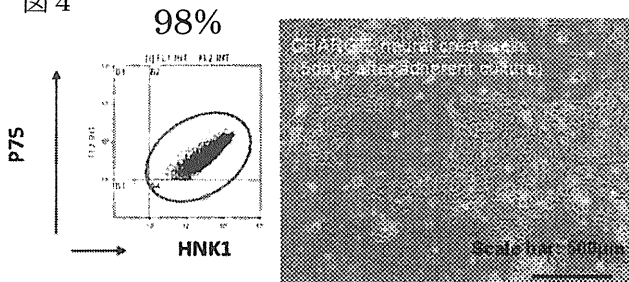
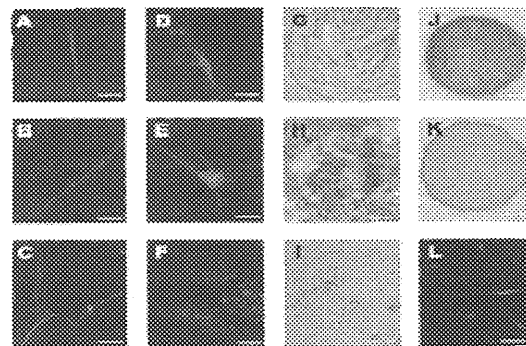


図 7 :



Characterization of differentiated cells from hiPSC-derived NCLCs. (A, B) p-III-tubulin (10 DIV) (C) Peripherin (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).

D. 考察

iPS細胞において、導入した遺伝子 (Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc) が高発現しているものは多分化能、自己複製能に乏しいことが先行研究により示されている。樹立したiPS細胞において、今後は導入した遺伝子発現量をRT-PCRにより比較し高発現しているものを除去する必要がある。また未分化マーカー (Nanog, Tra1, Rexなど) の発現、iPS細胞を免疫不全マウスに移植し奇形腫形成能を評価し、多分化能をもつiPS細胞lineを選出する必要がある。iPS細胞をBMPシグナル、TGF- β シグナルを阻害する環境で培養することで神経堤細胞となることが知られている (Lee G, et al. Nature Protocol 2010)。この方法を用いてiPS細胞を神経堤細胞へ分化誘導した。誘導したCHARGE症候群-iPS細胞由来神経堤細胞でCHD7遺伝子変異に伴い神経堤細胞の移動能が阻害されているかどうかを評価中である。

E. 結論

本研究の期間内にCHARGE症候群患者由来のiPS細胞2例を作成した。これらの細胞はCHARGE症候群の原因遺伝子であるCHD7の発現が減少しており、CHARGE症候群の病態を細胞レベルで再現できると期待できる。現在、Lorenz Studerらの方法をもとに、これらのiPS細胞より神経堤細胞 (CD57/CD271 (+/+)) を得た。これらの神経堤細胞について、コントロール-iPS細胞由来と同等にSOX10を発現すること、多分化能をもつことを確認した。これらのCHARGE症候群iPS細胞はすでに理研BRC細胞バンクに寄託されており、今後、これらの細胞は広くCHARGE症候群の発症機転の検討や候補薬剤のスクリーニングに用いることが期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui T, Takano M, Yoshida K, Soichiro Ono, Fujisaki C, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H, **Akamatsu W.**: Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. *Stem Cells*. 2012 In press
- 2) Lee EK, Kim W, Tominaga K, Martindale JL, Yang Xl, Subaran SS, Carlson, OD, Mercken EM, Kulkarni RN, **Akamatsu W**, Okano H, Perrone-Bizzozero NI, de Cabo R, Egan JM, Gorospe M. RNA-binding protein HuD controls insulin translation. *Molecular Cell*. 2012 Feb 29. [Epub ahead of print]
- 3) Yagi T, Ito D, Okada Y, **Akamatsu W**, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N.

Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1;20(23):4530-9.

4) Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, **Akamatsu W**, Kuwahara R, Ohya M, Amagai M, Matsuzaki Y, Yamanaka S, Okano H, Kawakami Y. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2011 Jan 13;6(1):e16182.

2. 学会発表

(国内)

1) Naoko Kuzumaki, Michiko Narita, Yusuke Hamada, Atsumi Nagasawa, Yohei Okada, **Wado Akamatsu**, Hiroataka J Okano, Hideyuki Okano, Minoru Narita :Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the neural differentiation from embryonic stem cells 第34回 日本神経科学大会、2011年9月15日 *会期9/14-17 (横浜)

2) Shigeki Ohta, Aya Misawa, Hironobu Okuno, Kimiko Fukuda, **Wado Akamatsu**, Yutaka Kawakami, Hideyuki Okano :Generation of Neural Crest Progenitor cells from human induced pluripotent stem cells by a simple method第34回 日本神経科学大会、2011年9月15日 *会期9/14-17 (横浜)

3) Takeshi Matsui, Morito Takano, Kenji Yoshida, Soichiro Ono, Yumi Matsuzaki, Masaya Nakamura, **Wado Akamatsu**, Hideyuki Okano : Direct induction of safe neural stem cells from adult mouse fibroblasts、第34回 日本神経科学大会、2011年9月16日 *会期9/14-17 (横浜)

(国際)

Takeshi Matsui, Morito Takano, Kenji Yoshida, Soichiro Ono, Yumi Matsuzaki, Masaya Nakamura, **Wado Akamatsu**, Hideyuki Okano : "Direct induction of safe neural stem cells from adult mouse fibroblasts.", ISSCR 2011 International Society for Stem Cell Research, Toronto, Canada 2011 6.17

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【海外】

(1) 発明の名称 神経幹細胞製造方法
出願番号 アメリカ 13/127, 566

出願日 2011年5月4日

出願人 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、赤松和土

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究要旨

甲状腺機能亢進症の治療薬であるメチマゾールへの胎児期の曝露により、後鼻腔閉鎖および乳頭低形成を発症する症例が報告されている。また研究代表者の小崎らはメチマゾール曝露後の虹彩・網膜欠損を見出した。このように、メチマゾール曝露後の先天異常は、CHARGE症候群に極めて類似する。本研究では、ゼブラフィッシュの受精卵をメチマゾールに曝露後、表現型を詳細に観察し、メチマゾールへの曝露が胚発生に与える影響を検討することにより、CHARGE症候群の発症機序の解明を試みた。

A. 研究目的

メチマゾールが催奇性を有する可能性は長らく示唆されてきており、曝露後に発症する先天異常はCHARGE症候群に極めて類似しているが、メチマゾールの曝露が胎児発生に与える影響とその発症機序は明らかでない。その一因として、至適なモデル動物による実験系の不備が挙げられる。そこで、本研究ではゼブラフィッシュをモデル動物として用い、受精卵に対するメチマゾール曝露が発生に与える影響についての検討を行い、CHARGE症候群の発症機序解明のためのモデル系を作成することを目的とした。

B. 研究方法

ゼブラフィッシュの成魚は、産卵盛期の日照サイクルである14時間明/10時間暗の長日条件、28.5℃の最適水温下で飼育し、繁殖ストレスのかわからないよう各個体一週間に一回以下の頻度で自然交配を行い、受精直後の卵を採取した。採取した卵は、顕微鏡観察下で正常な受精卵を選別後、六穴プレートに移し、さまざまな濃度のメチマゾールを含む飼育水を直ちにに加え、28.5℃に設定した湿潤気相インキュベーター内で飼育し曝露した。曝露した受精卵は生存数を随時計数しながら、正常胚が自然孵化し始める受精後48時間まで飼育した。実体顕微鏡による外表的な表現型の観察を行い、特徴的な異常を抽出し、各異常の発現頻度を算出した。同様の実験を独立に3回繰返して行った。さらに詳細な表現型観察のため、パラフィン包埋試料の横断切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン染色を施した。また、細胞死の種類を判定するためTUNEL試験を行った。なお本研究は、東京女子医科大学設置の「動物実験委員会」および「動物実験倫理委員会」の定める規定を遵守して行った。

C. 研究結果

まず、メチマゾールの至適曝露濃度の範囲を特定するため、1 M から 1 nM の広範囲にわたって曝露を行った。その結果、1 mM 以下の濃度では外表的な表現型は観察されず、100 mM を超える

濃度では胚発生早期に死滅した。さらに詳細に曝露濃度の範囲を検討した結果、曝露した胚が孵化まで生育し、かつ表現型が顕著に観察されるのは 2 mM から 10 mM の範囲であることが明らかになった。

次に、受精卵を上記のメチマゾール曝露条件下において、受精後 48 時間まで飼育し、外表的な表現型を実体顕微鏡にて観察した。その結果、体表面および網膜のメラニン色素の減少、前脳の細胞死と後脳の低形成、脊索の、特に末端部の形態異常、体節形成異常を伴う体幹の変形が確認された。その出現頻度は濃度依存的であり、高い再現性が確認された。

さらに、外表的な表現型の原因となる内部構造の異常を確認するため、メチマゾール曝露胚の横断切片にヘマトキシリン-エオシン染色を施し、組織形態学的に観察を行った。その結果、神経管背側の消失と神経管不閉鎖を伴う極端な脳の低形成、脊索の形態異常とそれに起因すると考えられる体節形成異常が顕現した。また、この観察により初めて咽頭閉塞が示唆された。さらに、TUNEL試験により、前脳背側部に限定的にアポトーシスによる細胞死が観察された。

D. 考察

ゼブラフィッシュの受精卵をメチマゾールに曝露することにより、さまざまな異常が生じた。それらのうち、咽頭閉鎖を示唆する表現型は、胎児期のメチマゾール曝露後に生じる代表的な先天異常である後鼻腔閉鎖と直接関連付けられることから、ゼブラフィッシュをモデル動物として用いて、メチマゾール曝露が発生に与える影響について検討する、という本研究の方法は妥当であると考えられる。

メチマゾール曝露により異常を呈する器官がゼブラフィッシュ胚、ヒト胎児ともに多岐に及ぶことから、影響を受ける発生イベントがそれぞれに複数ずつ存在する可能性が示唆される。その一方で、一見無関係に見える種々の表現型が、発生初期のある共通のイベントに生じた異常に起因し、その結果が多様な器官で表出した可能性も同様に示唆される。異常を呈している各器官の正常

発生に必須なイベントと遺伝子群の詳細な検討を行うことにより、これら二つの可能性の峻別とともに、メチマゾール曝露後に生じる先天異常の発症機序の解明が可能になると考えられる。**CHARGE**症候群とメチマゾール母体曝露で生じる先天異常が強い類似性を示していることから、両者では同じ発生イベントが影響を受けている可能性が高いと考えられる。従って、本研究でモデル系を作成したことは、**CHARGE**症候群の発症機序解明に向けて一定の成果を挙げたと考えられる。

また、従来のげっ歯類に代表される有胎盤類を用いた研究では困難であった母体曝露を再現する実験系において、ゼブラフィッシュが有用なモデル動物となり得ることを示した、という点も本研究の重要な成果であると考えられる。

E. 結論

ゼブラフィッシュの受精卵をモデル系として用い、メチマゾールへの曝露が胚発生に与える影響を検討することにより、**CHARGE**症候群の発症機序の解明を試みた。メチマゾールに曝露したゼブラフィッシュ胚では、さまざまな異常が出現したが、**CHARGE**症候群とメチマゾール曝露後の先天異常とに共通の表現型と直接関連付けしうる異常も観察され、ゼブラフィッシュモデルの有用性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Characterization of a novel KRAS mutation identified in Noonan Syndrome. Razzaque, Md.A., **Komoike Y.**, Nishizawa T., Inai, K., Furutani, M., Higashinakagawa, T., Matsuoka, R. (†: Contribute equally) *Am. J. Med. Genet. A.* 2012, 158A: 524-532

Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. **Komoike Y.**, Inamura, H., Matsuoka, M. *Arch. Toxicol.* 2012, 86: 37-44

2. 学会発表

蔣池勇太、小崎健次郎。メチマゾール曝露によるゼブラフィッシュの発生異常 第51回日本先天異常学会学術集会 2011 東京

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

〔Ⅱ〕

刊行に関する一覧表

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
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 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	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	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
水野誠司	1p36 欠失症候群	大関武彦	今日の小児治療指針第 15 版	医学書院	東京	2012 年	P180
水野誠司	レックリングハウゼン病	大関武彦	今日の小児治療指針第 15 版	医学書院	東京	2012 年	P190
仁科幸子	角膜の先天・周産期異常、網膜の先天・周産期異常	大鹿哲郎	眼科学 第 2 版	文光堂	東京	2011	98-99,388-400
仁科幸子	風疹	村田敏規	眼科診療クオリファイ 5 全身疾患と眼	中山書店	東京	2011	140-141
仁科幸子	視覚障害	本田 真美 ほか	小児リハビリテーションポケットマニュアル	診断と治療社	東京	2011	165-172
仁科幸子	家族性滲出性硝子体網膜症	白神史雄	眼科診療クオリファイ 8 網膜血管障害	中山書店	東京	2011	226-233
仁科幸子	先天白内障による形態覚遮断弱視、小眼球・ぶどう膜欠損、母斑症	仁科幸子	眼科診療クオリファイ 9 子ども眼と疾患	中山書店	東京	2011	114-115,155-157,220-226
仁科幸子	乳児の眼鏡処方	所 敬、 梶田雅義	眼鏡処方の実際	金原出版	東京	2010	2-9
仁科幸子	Coats 病、乳児内斜視、人形の眼現象、Bergmeister 乳頭、Bell 現象	山本 節	視能矯正学用語解説辞典	メデイカル葵出版	東京	2010	73-74,177-178,213-214
小林百合、仁科幸子	眼科領域の特徴	奥山真紀子 ほか	医療従事者のための子ども虐待防止サポートブック	クインテッセンス出版	東京	2010	148-149

松井 健 / 赤松和土 / 岡野栄之	神経を創る - Direct conversion による神 経系細胞の誘導と医 薬応用	御子柴克彦	in vivo 実験医 学によるヒト疾 患解明の最前線	羊土社	東京	2011	増 刊 Vol.30 No.2
--------------------------	---	-------	-----------------------------------	-----	----	------	-----------------------

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
Honda H, Takubo K, Oda H, Kosaki K, Tazaki T, Yamasaki N, Miyazaki K, Moore KA, Honda Z, Suda T, Lemischka IR.	Hemp, an mbt domain-containing protein, plays essential roles in hematopoietic stem cell function and skeletal formation.	Proc Natl Acad Sci U S A	108	2468-2473	2011
Kosaki K.	Role of rare cases in deciphering the mechanisms of congenital anomalies: CHARGE syndrome research.	Congenit Anom	51	12-15	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	155	903-905	2011
Kaga K, Fukushima K, Kanda Y, Yamashita H, Ito J, Ichikawa G	Nationwide survey of pediatric cochlear implant in Japan	7 th Asia pacific symposium on cochlear implants and related sciences. International Proceedings		69-71	2010
加我君孝	聴覚障害	チャイルドヘルス	13(5)	25-28	2010
加我君孝	重度難聴に対する人工内耳手 術と聴覚脳幹インプラント	学術の動向	15(7)	60-64	2010
加我君孝、新正由紀子、 竹腰英樹、内山勉	聞く・話す力の発達	チャイルドヘルス	13(12)	9-24、	2010
Soneda A, Teruya H, Furuya N, Yoshihashi H, Enomoto K, Ishikawa A, Matsui K, Kurosawa K.	Proportion of malformations and genetic disorders among cases encountered at a high-care unit in a children's hospital.	Eur J Pediatr.	171	301-305	2012
Kurosawa K, Masuno M, Kuroki Y	Trends of occurrence of twin births in Japan.	Am J Med Genet Part A	158A	75-77	2012
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 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, <u>Kosaki R</u> , 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
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.	155A	409-14	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	161-6	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
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 A			2012