

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関連分野)  
研究分担報告書

先天異常症の臨床遺伝診療に有用なインターネットウェブサイトに関する研究

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

インターネットの普及と発展により、専門的な情報もネット上に蓄積されるようになり、さらに最近の検索技術の向上は誰もが情報をウェブ上で入手可能にした。従来はいわゆるその領域の専門家しか入手が困難な情報を、それを専門としない一般の医療関係者が見ることが可能になった。このような背景の中で先天多発奇形を診療する医師がインターネット情報を十分に活用することの重要性が一段と高まっている。今回一般の臨床医がアクセス可能なインターネット上の医療情報サイトで提供されている各疾患の臨床情報とマネージメントに関する記述について調査し検討した。

遺伝性疾患に関する情報を提供している多くのサイトでは、疾患の分子病態に関する記載が主体で鑑別診断に関する情報や疾患のマネージメントに関する情報は必ずしも多くない。それは疾患の療育やマネージメントに関する情報は必ずしも科学的な評価を経ていないことが一因であると考えられる。

近い将来遺伝性疾患の形態的特徴や疾患情報だけではなく認知行動特性が明らかになるに従い、教育関係者や福祉関係者がその特性を理解した対応のために新たな情報を共有する場が必要になる。頻度の少ない遺伝性疾患はその疾患を持つ患者に関わる人も多くないため、そのような多種の関係者が情報を共有し交換する場としてインターネットウェブサイトのもつ可能性は大きい。

### 研究協力者

小崎里華 (国立成育医療研究センター遺伝診療科)

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

先天異常症はその種類が多くかつ頻度が少ないために一般の臨床医がその疾患に遭遇することがまれでありその都度最新情報を入手する必要がある。その一つの手段がインターネット上の情報収集であり、先天多発奇形を診療する医師がインターネット情報を十分に活用することの重要性が一段と高まっている。今回一般の臨床医がアクセス可能なインターネット上の医療情報サイトについて調査し検討した。

### B. 研究方法

インターネットで公開されている世界中のウェブサイトの中で、遺伝性疾患の臨床像について記載されているサイトを調査した。

(倫理面への配慮)

今回の調査では、患者の個人情報の扱いはないため、倫理的な問題は生じない。

### C. 研究結果

遺伝性疾患の疾患別情報

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

ヒトの遺伝子とその表現形に関する最も権威あ

る最新情報サイト。Clinical Synopsis の項目に身体的特徴や合併奇形に関する情報の記載がある。臨床情報も報告された年次順に出典とともに記載されている。

治療や療育、マネージメントに関する情報は少ないのはそれらについての論文がないためでもある。

Gene Reviews

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/review?db=GeneTests>

NCBI のサイトの一つであり、650 を越える疾患についてその専門医が執筆し査読も経ている総説である。疾患の診断、症状、鑑別診断、遺伝カウンセリング、マネージメントまで系統的に記述されており更新も適宜行われている。疾患の認知特性や行動特性の記述も徐々に増えている。染色体異常症は一部しか取り上げられていない。

Gene Reviews 日本語

<http://grj.umin.jp/>

上記 Gene Reviews の日本語訳のサイトである。

信州大学医学部附属病院遺伝子診療部が

GeneReviews Japan 運営事務局を運営してボ

ランティアで日本語訳を作成している。

疾病資料庫

<http://www.genes-at-taiwan.com.tw/genehelp/d/index.asp?kid=A>

中華民国人類遺伝学会が作成している疾患情報のサイトである。記載されている疾患の数は多いが、概して疾患概要の総論のみであり臨床情報は多くない。

## DYSCERNE

<http://www.dyscerne.org/>

ヨーロッパの *Dysmorphology* の専門家のネットワークである。その設立目的にウェブを活用した診断と、特定の疾患に特化したマネージメントガイドラインの策定を謳っている。臨床に特化したサイトであり、ガイドラインも各々の症候群の特性を理解した記述である。まだ公開疾患名が少ない。

## Orphanet

<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/home.php?Lng=GB>

フランスをベースに構築された稀少疾患ネットワークである。稀少疾患と稀少医薬品に関するデータベースの構築をもとにして、稀少疾患の治療、ケア、マネージメントを目的としている。プロフェッショナルに対する質の高い情報を提供する一方、患者向けにも専門医の所在や医療機関情報も掲載している。30 を越える国が参加して 6 カ国語で提供されている。米国の NCBI のサイトよりも患者向けの視点が強く、疾患情報の一元化を目指している。今後の発展が期待される。

## URDBMS 琉球大学遺伝性疾患データベース

<http://becomerich.lab.u-ryukyu.ac.jp/top.html>

琉球大学大学院医学研究科遺伝学分野の成富研二教授によって開発し公開された先天異常症候群診断補助データベースである。10000 以上の先天異常症候群や染色体異常症の身体合併症や *Dysmorphology* の情報を有する利用価値の高いデータベースである。元来診断の為のデータベースであるため、疾患情報は主に形態異常と合併症であり診断後のマネージメントに関する内容は記載されていない。

## DECIPHER

<http://decipher.sanger.ac.uk/>

マイクロアレイ技術の進歩で同定される染色体微細異常症に関する情報共有サイト。欠失領域と表現形に関するデータベースを構築している。疾患情報は形態的特徴と合併症などの簡易情報にとどまるが、登録者同士で患者の詳細についての情報交換が可能。臨床医に有用性が高い。

## ECARUCA

ヨーロッパ細胞遺伝学協会が設立した細胞遺伝学と臨床情報の統合を目指したデータベース事業。微細欠失に限らず全ての染色体異常症を対象とする。身体写真を含めた詳細な情報の登録が可能であるが、まだ登録症例数が少ない。

## D. 考察

現在は多くの遺伝子疾患に関するデータベースが存在するがその多くは疾患の分子病態に関する記載が主体で鑑別診断に関する情報や疾患の生活特性やマネージメントに関する情報は必ずしも多くない。それは疾患の鑑別診断やマネージメントは必ずしも論文化されたものが多いために、従来の論文化された情報を元に構築さ

れるデータベースには掲載されることが少ないためであろう。

より臨床医に還元させるために構築されたのが、*Decipher* や *Euracula* などの臨床医が情報をアップロードして交換するデータベースである。論文になる以前の情報、論文化には至らない患者情報が得られる点で有用であるが、情報の質にばらつきがあり科学的な客観性に欠ける場合もある。個々の症例報告と科学的客観性は時に相反する可能性があることを留意すべきである。

将来のインターネットウェブサイトの展開として、医師以外の職種への情報提供が考えられる。遺伝性疾患の形態的特徴や疾患情報だけではなく認知行動特性が明らかになるに従い、教育関係者や福祉関係者がその特性を理解した対応のために新たな情報を共有する場が必要になる。頻度の少ない遺伝性疾患はその疾患を持つ患者に関わる人も多くないため、そのような多様な関係者が情報を共有し交換する場としてインターネットウェブサイトのもつ可能性は大きい。

また様々な治療法に関する治験の対象患者の募集も、現在の特設施設の通院患者や患者会に属する人を対象としたものから、インターネットで公募して相応の対価を提供することで研究者と患者を個々で結びつけることが可能となる。

近年その稀少性のために研究が進まない疾患群に対する対策事業や医薬品開発を促進させようとする動きが高まっている。その方法の一つがインターネットを活用した多分野間のネットワーク化である。効率的に運用しそこに臨床医の参加を促すことが、ひいては患者家族に対するフィードバックになると考える。

## E. 結論

遺伝性疾患の臨床に役立つ情報を提供するインターネット上のウェブサイトについて調査検討した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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]

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, Niihori 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

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.

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

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.

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

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

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

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

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

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 一 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

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野)

分担研究報告書

先天性水頭症の遺伝子診断の現況と今後の方向

分担研究者 山崎 麻美

独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 副院長

**研究要旨**

水頭症の遺伝子解析のこれまでの成果と今後の課題について述べた。現在までに68家系に63種類のL1遺伝子異常を同定してきた。I群は2家系、II群14家系 III群は46家系、であった。68家系の中で76例の患者にL1遺伝子異常を同定し、その家系の43例の女性が保因者であることを同定した。10名の保因者の女性の15回の妊娠に際して、出生前遺伝子解析の希望があり、15回のうち、7回に出生前遺伝子解析を行った。その家系のL1遺伝子異常が同定されていて、保因者であることが明らかなる場合のみが対象になり、原因不明の脳室拡大を主な症状とする胎児期水頭症に出生前遺伝子診断を行うことは不可能である。今後、DNAチップ、アレイCGHを用いた網羅的な遺伝子解析も含めた診断方法の検討が必要になってくる。

研究協力者

吉岡絵麻 同センター臨床研究センター先進医療研究開発部  
正札智子 同センター臨床研究センター先進医療研究開発部  
高田愛 同センター臨床研究センター先進医療研究開発部  
寺元千佳 同センター 看護部  
埜中正博 同センター 脳神経外科  
金村米博 同センター 臨床研究センター先進医療研究開発部

**A. 研究目的**

水頭症は何らかの原因により脳室やくも膜下腔に異常に髄液が貯留し、脳室の拡大を呈し、過去あるいは現在において脳圧が亢進した病態(症候群)をいう。先天性水頭症は、脳室拡大を主な症状とするもの(isolated ventriculomegaly:IVM)と、脊髄髄膜瘤、ダンディーウォーカー症候群、全前脳胞症、脳瘤、頭蓋早期癒合症、脳梁欠損など中枢神経系疾患にともなう水頭症がある。IVMのなかに、X染色体連鎖性遺伝性水頭症(XLH)のように遺伝子異常によるものや、6p deletion症候群のように染色体異常に伴うもの、Walker-Warburg症候群などのように症候群の一症状が水頭症であるものがあり、これを各種症候群に合併する水頭症として、単純な脳室拡大すなわち狭義のIVMと区別している。直接水頭症関連疾患とは言えないが、胎児期に軽度脳室拡大と間違われる滑脳症なども鑑別すべき疾患として認識しておく必要がある。

ところでこれら先天性水頭症関連疾患には、遺伝的因子が大きく関与しているものと環境的因子が関与しているものがある。遺伝的因子が大きく関与しているものであっても、遺伝子

診断の意義が臨床的に確立しているものはない。XLHは、そのなかでも分子遺伝子学的にも、神経発生学的見地からでも最も研究の進んだ疾患で、その臨床的意義が確立している。

XLHは、1949年に水頭症、精神発達遅滞(Mental retardation)、下肢の痙性麻痺(Shuffling gate)、拇指の内転屈曲(Adducted thumbs)を臨床的特徴とする疾患としてBickersとAdamsによってはじめて報告された。剖検脳の解析から当初はその原因は中脳水道狭窄にあると考えられていた。その後のより詳細な病態解析の結果、中脳水道狭窄を伴わない症例が存在すること、さらに前述の臨床的特徴に加え、延髄錐体路の低形成、脳梁の低形成、脳室腹腔シャント手術後の脳室壁に見られる波状変化、視床癒合、視床間橋の増大、四丘体板の肥大、小脳虫部前葉の委縮等の中枢神経組織の形態学的異常の合併に加え、ヒルシュスプルング氏病の合併例などが報告され、現在では多彩な神経発生異常を合併する疾患であると認識されている。

1992年、RosenthalらはXLHの1家系に免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着因子(cell adhesion molecules) L1CAM(以下L1)遺伝子異常を同定した。その後、MASA症候群、伴性劣性痙性麻痺(X-linked Spastic Paraplegia Type 1)および伴性劣性脳梁欠損症(X-linked Corpus Callosum Agenesis)にもL1遺伝子異常が同定され、これら4つの症候群は、現在では同一遺伝子(L1)異常による表現型の違いと考えられ、L1症候群(L1 Syndrome)という新しい概念が提唱されている。

**B. 研究方法**

1999年以降、これまで全国レベルでのXLH

家系の集積を行い、遺伝子解析を実施してきた。家族歴、臨床像や神経放射線学的特徴からXLHが疑われる家系についてL1遺伝子解析を行った。解析にあつたては、各施設で遺伝カウンセリングを充分に行い同意が得られた上で、末梢血を採取し、Genomic DNAを抽出した。L1CAM遺伝子全28エクソンは、それぞれのエクソン・イントロン境界を含むように設定されたプライマーを用いて、PCR法にて増幅した。PCR反応はgenomic DNA 100ngをテンプレートにして、Takara Ex Taq (宝酒造)を用いてGeneAmp® PCR System 9700 (PE Biosystems)にてそれぞれ30サイクルの増幅を行った。PCR反応終了後、PCR生成物は2%アガロースゲルで電気泳動確認を行い、その後、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用いてアガロースゲルより回収した。シーケンスは、アガロースゲルから回収されたPCR生成物を直接テンプレートとし、PCRプライマーをシーケンスプライマーにして、ABI Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いた蛍光ダイターミネーター法によるダイレクトシーケンスにて行った。シーケンス反応終了後、生成物の精製をillustra sephadex G50 fine DNA Grade (GE Healthcare)を用いて行い、キャピラリーシーケンスサー (ABI PRISM 3130X, Applied Biosystems)にて解析を行った。シーケンスデータはGENETYX-MAC (ver9.01)にて解析をした。遺伝子型の重症度から3群に分類するYamasaki分類を用いた。すなわち遺伝子異常が細胞内ドメインに限られるものをI群、細胞外ドメインの点変異およびアミノ酸欠失をII群、細胞外ドメインでのナンセンス変異・フレームシフト異常・スプライス部位異常などによりL1が断裂し、膜貫通部分を有しないものを、III群に分類した。

(倫理面への配慮)

情報管理においては、個人情報管理とその漏洩防止に細心で厳重な注意を払う。遺伝子解析がかかわる部分に関しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省より施行された【ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針】および遺伝医学関連10学会より提案された【遺伝学的検査に関するガイドライン】を遵守する。本研究の全体の計画に関しては、平成21年9月に国立病院機構大阪医療センター倫理委員会で『難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発』『L1遺伝子解析』研究の実施について承認を受けた。

### C. 研究結果および考察

① 現在までに68家系に63種類のL1遺伝子異常を同定してきた。68家系の中で血縁関係のない2家系以上に同じ遺伝子異常が認められた

のはたった9家系のみであった。すなわち3種類の遺伝子異常が、血縁関係のない2家系に、1種類の遺伝子異常が血縁関係のない3家系に認められた。その9家系を除いた68家系中59家系(87%)では、それぞれの家系に特有な遺伝子異常であったということである。また68家系中家族歴があつたのは、43%で、孤発例は57%であった。また68家系のうち49家系(71%)がこれまでに報告のない新規のL1遺伝子異常であった。翻訳領域異常は38家系、翻訳領域以外の部位に異常は30家系であった。翻訳領域異常のうち、ミスセンス異常は15家系、ナンセンス異常15家系、フレームシフト異常7家系、アミノ酸欠失1家系あつた。調節部位異常のスプライス部位異常24家系でイントロン異常5家系であった。また一方遺伝型分類ではI群は2家系、II群14家系III群は46家系、分類できないものが6家系あつた。

#### ② 患者診断、保因者診断

68家系の中で76例の患者にL1遺伝子異常を同定し、その家系の43例の女性が保因者であることを同定した。また保因者と診断された女性がXLHの症状を呈することもなかった。

#### ③ 出生前遺伝子解析

10学会ガイドラインの出生前診断および保因者診断の項にしたがって、まず胎児の性別をチェックし、胎児が男児であるときのみL1遺伝子解析を行ない、女児であるときは遺伝子解析を行なわないというプロトコルを2004年に策定し、現在はそれに従って行っている。実際には我々は、本邦でのL1遺伝子異常が明らかになっている68家系中の、10名の保因者の女性の15回の妊娠に際して、出生前遺伝子解析の希望があり、15回のうち、7回に出生前遺伝子解析を行った。7回の内訳は、10学会ガイドライン以前におこなった女児3例と男児4例である。そのうち、遺伝子異常があつたのは3例(男児1例、女児2例)であった。L1遺伝子異常のあつた男児は妊娠中絶され、それ以外の13人は出産にいたり、L1症候群の症状なく正常発達である。14回のうち、12回は9週から12週に絨毛検査によって、2回は15週と16週に羊水穿刺を行って、DNAを抽出した。

#### 4. 考察

XLH症例の臨床症状の詳細な解析を実施した結果、MASA症候群の1例を除いたすべての症例に重症水頭症が見られ、同時に視床間橋の増大、四丘体板の肥大、小脳虫部全体あるいは前葉の局所的萎縮、シャント後の脳室の波状変化が存在することが明らかとなった。これら臨床症状の解析が実施できた家系のL1遺伝子異常のほとんどは、膜結合部が欠損したL1分子発現に至る異常(Class III)か、L1EDにおけるL1分子の立体構造の維持に重要なアミノ酸異常(Class II)、mRNAのスプライス異常の結果、Class III異常と同様に膜結合部が欠損した異常L1分子発現に至るスプライス部位異常

のいずれかのタイプであり、これらは全て L1 分子の機能が大きく障害されるタイプの遺伝子異常であることが明らかとなった。つまり、これらの遺伝型は L1-LF (L1 loss of function) mutation で、その表現型は重症型 L1 症候群であると考えられる。一方、遺伝型として Class I 異常を有する症例には、必ずしも重篤な水頭症の合併が見られず、その臨床症状は比較的軽く、表現型としては軽症型 L1 症候群と考えられる。MASA 症候群などはこの軽症型 L1 症候群に含まれると考えられる。

また出生前診断の意義については、遺伝子診断を行った場合 13 週ごろには診断がつくので、形態的に脳室拡大が診断できる 18 週から 22 週ごろよりは、少なくとも 6 週間早く診断ができる。この 6 週間の違いは、妊娠中の母体の精神的不安を軽減し、もし妊娠継続をあきらめる場合には、肉体的負担の軽減と大きな意義がある。

しかし、対象はあくまでその家系の L1 遺伝子異常が同定されていて、保因者であることが明らかな場合のみが対象になり、原因不明の脳室拡大を主な症状とする胎児期水頭症に出生前遺伝子診断を行うことは不可能である。

#### D. 結論

先天性水頭症関連疾患のように、脳室拡大という形態学的な枠組みで総括される疾患は、さまざまな疾病や病態を含んでいる。それ故、予後のよい単純な脳室拡大から致死的な疾患までその予後は様々である。また脳室拡大は現在では比較的容易に胎生期に胎児超音波検査で診断されている。胎児期早期に軽度脳室拡大を呈するものの中に、多くの難治性脳形成障害症が含まれているが、それぞれが希少疾患であるので、画像診断や病理診断がエキスパートによって充分検討されずに、病名すらはっきりしないまま、脳性麻痺という大雑把な診断に終わっているものも多い。最近の分子遺伝子学的手法の進歩により、これら難治性脳形成障害症の原因遺伝子が明らかになり病態分類も変化してきている。画像診断や遺伝子診断などを駆使した胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成を目標として、2009年より厚生科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業として『胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成』に関する研究を開始している。今後、DNAチップ、アレイCGHを用いた網羅的な遺伝子解析も含めた診断方法の検討が必要になってくる。

#### E. 結論

本研究班の目的を推進するために、眼科領域において小眼球症、先天白内障などの眼先天異常における全身検索・遺伝子診断、CHARGE 症候群、Hallermann-Streiff 症候群などの奇形症候群に伴う眼合併症の詳細な検討を進めた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamasaki M, Nonaka M, Bamba, Y, Teramoto, C, Ban C Pooh R Diagnosis, Treatment, and Long-Term Outcomes of Fetal Hydrocephalus Seminars in fetal & Neonatal Medicine in press

Yamasaki M, Nonaka M, Suzumori N, Nakamura H, Fujita H, Namba A, Kamei Y, Yamada T, Pooh RK, Tanemura M, Sudo N, Nagasaka M, Yoshioka E, Shofuda T, Kanemura Y: Prenatal molecular diagnosis of a severe type of L1 syndrome (X-linked hydrocephalus). J Neurosurg Pediatr. 8(4):411-6, 2011

Takenouchi T, Nakazawa M, Kanemura Y, Shimozato S, Yamasaki M, Takahashi T, Kosaki K: Hydrocephalus with Hirschsprung Disease: Severe End of X-linked Hydrocephalus Spectrum. Am J Med Genet A Bamba Y, Nonaka M, Nakajima S,

Yamasaki M Threedimensional-reconstructed CT-MR fusion image -based preoperative planning for surgical procedures for spinal lipoma or tethered spinal cord after myelomeningocele (MMC) repair. Neurol Med Chir(Tokyo) 51: (5) 397-402, 2011

Itoh K, Ogi H, Yaoi T, Yoshifuji K, Pooh R, Yamasaki M, Fushiki S Semilobar holoprosencephaly with a unique traversed sylvian sulcus. Neuropathol Appl Neurobiol Jan, 5. doi: 10.1111/j.1365-2990, 2011

Yamanaka K, Ishihara M, Nakajima S, Yamasaki M, Yoshimine T Coil embolization of a traumatic intracranial aneurysm of the distal part of the azygos anterior cerebral: Report of a case followed up for 4 years. Neurol Med Chir(Tokyo) 51 (8) : 572-575, 2011

Kanematsu D, Shofuda T, Yamamoto A, Ban C, Ueda T, Yamasaki M, Kanemura Y Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta Differentiation 82(2):77-88, 2011

##### 【和文】

山崎麻美 小児脳神経外科領域における遺伝子診断 NEUROLOGICAL SURGERY 脳神経外科 39 (1) : 65-77, 2011.1.10 医学書院 (東京)  
山崎麻美, 埜中正博, 馬場庸平, 寺元千佳, 伴千秋, 夫律子 胎児期水頭症の診断と治療および長期予後脳神経外科ジャーナル 20(5):322-329, 2011

山崎麻美 先天性水頭症と二分脊椎 小児神経学の進歩 40 : 57-71, 2011 山崎麻美 水頭症リハビリテーションポケットマニュアル pp.14-16 6

月 30 日 診断と治療社（東京）

山崎麻美 小児水頭症の病態と治療ビジュアル  
脳神経外科 Anatomy& Surgical Approach4 脳  
室・松果体 154-161 2011 年 4 月 1 日メジカ  
ル・ビュー社（東京）

山崎麻美 遺伝性水頭症 周産期医学 41  
(11) : 1505-1508 2011 年 11 月 10 日 東京医  
学社（東京）

学会発表

Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D,  
Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M,  
Yamasaki M, Sasai Y, Kanemura Y:

Generation of human induced pluripotent  
stem cells using the extracellular matrix of  
human decidua-derived mesenchymal cells.  
ISSCR 9th Annual Meeting. 2011.06.16;  
Toronto, Ontario, Canada

Yamasaki M, Shofuda T, Bamba Y, Yoshioka E,  
Nonaka M, Kanemura Y Stem cell research in  
severe type of L1CAM syndrome(X-linked  
hydrocephalus) Society for research into  
hydrocephalus and spina bifida 55<sup>th</sup> Annual  
meeting Nottingham 2011 June 23<sup>rd</sup>, 2011  
Nottingham(UK) Scientific program

Yamasaki M, Nonaka M, Kanemura Y, Pooh R  
For the establishing of criteria in prenatal  
diagnosis of intractable fetal brain  
malformation. 39<sup>th</sup> Annual meeting of the  
international society for pediatric neurosurgery  
Oct16-20, 2011 Goa(India)

Tatebayashi M, Teramoto C, Nonaka M,

Yamasaki M Study on support of prenatally  
diagnosed children with congenital  
hydrocephalus by occupational  
therapists Oct.20, 2011 Goa(India)

#### 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



厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関連分野）  
研究分担報告書

分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と  
遺伝子診断ネットワークの形成ピット・ホプキンス症候群の遺伝子解析

分担研究者 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

Pitt-Hopkins 症候群は最近海外で診断例が増加し、注目されている中心神経系異常を主要症状とする先天異常症候群である。日本での確実な報告例はほとんどない。主な臨床症状は、重度精神運動発達遅滞、狭い側頭部・落ちくぼんだ眼・肉付きのよい頬部・太い鼻梁・M字型の上下口唇と厚い下口唇を伴う大きな口・よく発達した下顎など特徴的顔貌、無呼吸を伴う間欠的過呼吸、出生後の小頭症、近視・斜視・乱視などの眼科異常、便秘、てんかん、協調運動障害、手の常同運動などである。子宮内発育は正常である。出生時の身体計測値は標準的であるが、生後の身長体重増加不良を認める。出生時の頭囲も標準的であるが、徐々に小頭となる。MRI では脳梁低形成や脳室拡大を認める。Pitt-Hopkins 症候群は、Angelman 症候群や Rett 症候群の鑑別として重要である。従来、これらの症候群と誤診されてきた可能性が高い。未診断例が多数存在すると思われる。18q21.1 に座位する *TCF4* 遺伝子が責任遺伝子であり、遺伝子診断が可能である。遺伝子全体の欠失例があり *TCF4* 遺伝子解析とマイクロアレイ解析を併せて実施する必要がある。しかし、Pitt-Hopkins 症候群に合致する身体所見、臨床像を有しながら変異を認めない例もあり、次世代シーケンサーを用いた解析が必要である。

#### 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  
大町和美 山本悠斗 池川敦子 三島祐子

#### A. 研究目的

Pitt, Hopkins et al. (1978) は精神遅滞、反復性の過呼吸発作、大きな口を特徴とする2例を報告した。その後、いくつかの症例報告が行われ、Pitt-Hopkins 症候群が確立した。本症候群は重度精神運動発達遅滞、てんかん、乳児期よりはじまる過呼吸発作、生後の成長障害、小頭症、特徴的顔貌が主な所見である。顔貌の特徴は、狭い側頭部・落ちくぼんだ眼・肉付きのよい頬部・太い鼻梁・M字型の上下口唇と厚い下口唇を伴う大きな口・よく発達した下顎などである。近視・斜視・乱視などの眼科異常も多い。指趾先端部の fetal pads も特徴的所見である。協調運動障害、手の常同運動も診断の手がかりとなる。機知の症候群であるレット症候群やアンジェルマン症候群と似た臨床所見もみられる。

男女の罹患率は同様であり、突然変異による常染色体優性遺伝が示唆された。Amiel ら (2007) Zweier ら (2007) はマイクロアレイ解析により、それぞれ 18q21.1 に 1.8Mb ないし 1.2Mb の微細欠失を同定した。そこには *TCF4* 遺伝子が存在し、責任遺伝子であることが判明した。複数例の遺伝子解析でも *TCF4* 遺伝子変異が証明された。

*TCF4* 遺伝子は胎児の神経系、神経堤細胞の発達に重要である。ミスセンス変異、ナンセンス変異などの遺伝子異常の他、遺伝子欠失、染色体

18q21.1 を含む欠失例も同様の所見を呈する。Rett 症候群や Angelman 症候群を疑ったが否定された症例の中に Pitt-Hopkins 症候群が含まれていることが報告されている。

本研究は Pitt-Hopkins 症候群患者の正確な遺伝子診断、病態解析と臨床像の検討が目的である。解析方法としてシーケンサーやマイクロアレイによる解析を用いた。正確な診断により、病態を把握し、予後を予測することができる。遺伝カウンセリングにも重要な情報を提供することができる。

#### B. 研究方法

大阪府立母子保健総合医療センター受診患者において臨床経過や特徴的顔貌から本症候群を疑った 20 症例について検討を行った。臨床経過については、診療録の記載を整理した。遺伝子診断には末梢血リンパ球から抽出した DNA を用いた。*TCF4* 遺伝子のエクソンと近傍のイントロンの含む領域を PCR で増幅し、シーケンサーで塩基配列決定を行った。この遺伝子は 18q21.1 に座位し、20 エクソンからなるが、エクソン 18 付近にホットスポットがある。

症例 1 のマイクロアレイ解析は東京医科歯科大学分子細胞遺伝学、林 深先生、稲澤譲治先生の研究室で開発した WGA4500 (全ゲノム BAC アレイ) によった。遺伝子解析にあたり、遺伝カウンセリングを行い、インフォームド・コンセントを得た。



## C. 研究結果

20 症例中、9 症例において変異を同定した。このうち 7 例について臨床経過を記載する。

### 症例 1

10 歳女児。家族歴に特記事項なし。在胎 39 週。出生体重 2480 g (-1.4SD)、身長 47 cm (-1.3SDD)、頭囲 30.5 cm (-1.9SD) Ap9/10 で周産期に特記すべき異常なし。乳児期より発達の遅れあり。他院で精査を受け、脳梁低形成が判明した。間欠性外斜視、嚥下障害、精神発達遅滞、唾液が多く手もみ動作があり、臨床的にレット症候群が疑われていた。脳波は異常なく、てんかん発作もなかった。発達遅滞の原因精査目的で当科を受診した。染色体 G-band は 46,XX で正常であったが、微細異常を疑ってマイクロアレイ解析を行った。その結果、18q21.2 の微細欠失が検出された。この欠失は両親には認められず、de novo であった。特徴的顔貌を認めた。心肺、腹部所見に異常はない。食欲は良好であるが、便秘と腹部膨満がある。10 歳で、体重 18 kg (-2.1SD)、身長 117 cm (-3.2SD)、頭囲 47 cm (-3.4SD) で、成長障害、小頭症を認める。過呼吸発作が認められたが、チアノーゼを生じるほどの重症度はではなかった。発達状況：頸定 5 か月。3 歳で座位不可。6 歳でつかまり立ち。現在も歩行は獲得できていない。有意語はみられない。重度知的障害である。特別支援学校に在籍している。

### 症例 2

16 歳女児。家族歴に特記事項なし。在胎 41 週。出生体重 3250 g (0.2SD)、身長 48 cm (-1.2SDD)、頭囲 32.4 cm (-0.6SD) で出生。乳児期より発達遅滞あり。常同的な手もみ動作があり、Rett 症候群を疑い *MECP2* 遺伝子検査を行ったが異常なかった。口が大きく、粗野な顔貌。心肺と腹部所見に異常はなし。便秘と睡眠障害があり、投薬を行った。退行所見は認められない。近視性乱視である。指趾に fetal pad を認めた。

16 歳で、体重 41 kg (-1.4SD)、身長 145 cm (-2.3SD)、頭囲 52 cm (-1.4SD)。小頭症はめだたなかった。口を動かす常同行為、口唇をならす、手を絡める、手で叩く、歯軋りをするなどの行動がみられた。

発達状況：頸定 5-6 か月、寝返り 9 か月。独歩不可で、車いすで移動。有意語なし。特別支援学校に通っている。療育手帳 A 判定、身体障害者手帳 1 級。

遺伝子解析結果：*TCF4* 遺伝子の変異が検出され、Pitt-Hopkins 症候群と診断した。

### 症例 3

4 歳女児。家族歴に特記事項なし。在胎 39 週。出生体重 3450 g (1.2SD)、身長 54 cm (2.3SDD)、頭囲 35.5 cm (0SD) で出生。乳児期より精神運動発達遅滞があり、近医より精査目的で紹介となった。手を握る、機嫌がよき、よく笑うなどから、Angelman 症候群を疑い、染色体 G-band、FISH を実施するが、異常は検出されなかった。脳波でも、Angelman 症候群のパターンは認められなかった。てんかん発作なし。15 番 UPD とマイクロ

アレイ検査を実施したが、異常は検出されず、Angelman 症候群は否定的と考えた。大きな口で口唇が厚く、特徴的顔貌を認めた。心肺と腹部所見は異常なし。指趾に fetal pad を認めた。4 歳で、体重 12 kg (-0.6SD)、身長 94 cm (-0.4SDD)、頭囲 46 cm (-1.1SD)。退行も認められない。食欲もあり、便秘もない。

発達状況：頸定 3 か月、寝返り 7 か月、座位 18 か月。3 歳半で手を持つと歩く。有意語なし。リハビリセンターに通園している。手をたたき、おもちゃを持つ、喜怒哀楽の表現ができている。遺伝子解析結果：*TCF4* 遺伝子の変異が検出され、Pitt-Hopkins 症候群と診断した。

### 症例 4

出生体重正常範囲で周産期に特記事項なし。乳児期より発達遅滞あり。学童期より歩行可能となる。支援学校に入学。現在も有意語なし簡単な指示は理解可能。DQ 16 と最重度精神運動発達遅滞。特徴的顔貌あり。眼科で、近視、乱視、斜視を認めた。てんかん発作なし。

遺伝子解析結果：*TCF4* 遺伝子の変異が検出され、Pitt-Hopkins 症候群と診断した。

### 症例 5

9 歳男児。家族歴に特記事項なし。在胎 38 週。出生体重 1660 g (-3.2SD)、身長 41 cm (-3.5SDD)、頭囲 29 cm (-2.5SD)。周産期に特記すべき異常なし。乳児期より発達の遅れあり。生後 11 か月の時に、運動発達遅滞を主訴に近医を受診した。その後原因精査のため、当院に紹介となった。染色体 G-band は 46,XY、FISH、マイクロアレイでも異常はなかった。Angelman 症候群は否定された。小頭症のため、頭部 MRI を施行するが、異常なく、経過観察となった。心肺と腹部所見に異常はない。

9 歳で、体重 16 kg (-2.4SD)、身長 1144 cm (-2.9SD)、頭囲 47 cm (-3.8SD) で、体格は小さ小頭症である。指趾に fetal pad を認めた。発作とてんかんはないが、脳波異常はあり。視聴覚に問題はない。常同運動、歯軋り、手をたたき動作がみられる。発達状況：5 歳で歩行可能となったが、ふらつきがあり、手でバランスをとる状態である。普通校に通い、支援教育を併用している。スプーンにすくうと食べる。物を持つことはない。有意語なし。遺伝子解析結果：*TCF4* 遺伝子の変異が検出され、Pitt-Hopkins 症候群と診断した。

### 症例 6

5 歳男児。在胎 40 週で出生体重 3100 g で出生。周産期に特記すべき異常なし。運動発達遅滞を主訴に精査をうける。染色体 G-band 46,XY で頭部 MRI 異常なし。脳波異常あるが発作なし。5 歳で、身長体重はほぼ標準で小頭症なし。特徴的顔貌あり。手をたたき反復動作あり。Fetal pads を認めた。弱視、斜視を認めた。

発達状況：5 歳で座位不安定。物を持つことはできない。有意語なし。最重度知的障害。

遺伝子解析結果：*TCF4* 遺伝子の変異が検出され、Pitt-Hopkins 症候群と診断した。

### 症例 7

5 歳男児。在胎 39 週 2700g で出生。乳児期より発達遅滞あり、精神運動発達遅滞を主訴に精査目

的で受診。独歩4歳で、現在も有意語なし。重度知的障害である。歯軋り、手をたたく反復動作あり。特徴的顔貌、斜視あり。入眠前に息止めすることある。染色体46,XYで正常核型。頭部MRI異常なし。脳波異常あるがてんかん発作なし。身長105 cm (-0.8SD) 体重15 kg (-1.3SD) 頭囲48 cm (-2SD) とやや小柄。

遺伝子解析結果：TCF4遺伝子の変異が検出され、Pitt-Hopkins症候群と診断した。

図に変異の位置を示す。ここに提示していない2例を含めて9例で遺伝子変異が同定された。TCF4遺伝子は20エクソンあるが、変異はエクソン16-18に多かった。これは海外の報告と一致した。エクソン18には転写因子としての機能に重要なHelix-loop-helix domainがあり、この部分の機能消失が発症に関係する。

#### D. 考察

遺伝子診断で確定できたPitt-Hopkins症候群をまとめた。全例が成長障害、重度精神運動発達遅滞を認めた。歩行機能獲得例は3例のみであった。有意語獲得例はなかったが、簡単な言語指示に従うことは可能であった。全例、日常生活では全般的な介助が必要であった。

手もみ動作など、Rett症候群に類似した手の常同運動を認める例があった。当初、Rett症候群を疑って遺伝子診断を実施した例もあったが、MECP2遺伝子変異は認めなかった。他にも手と口の共同運動が苦手である。手をたたく行動を反復する、くり返して机をたたく、などの常動行動が見られた。手を口に入れる、口を触る、歯ぎしりなどの行動を継続する場合がある。運動失調症もみられる。手もみ動作、歯ぎしり、呼吸異常などはRett症候群でも認める。Rett症候群ではMECP2遺伝子変異を認めるが、30%のRett症候群では遺伝子変異を認めない。従来、Rett症候群と臨床診断された症例の中に、Pitt-Hopkins症候群が含まれている可能性がある。

Pitt-Hopkins症候群ではよく笑う、などAngelman症候群に類似した特徴的な行動もみられる。特徴的顔貌も共通する部分があるので、Angelman症候群と鑑別が重要である。メチル化特異性PCR法を実施した症例もあったが異常は認められなかった。てんかんの例もあるが、Angelman症候群でみられるような特徴的脳波所見は認めない。Angelman症候群を疑って否定された症例の中にも相当数Pitt-Hopkins症候群が含まれている可能性がある。

本症候群の当初の報告では呼吸異常が重要とされた。間歇的過呼吸発作に続く無呼吸発作があり、チアノーゼを認めることがある。診断に際して重要視されている過呼吸やそれに伴う無呼吸は1例で認めただけであり、程度も軽かった。てんかんの合併例も多くなかった。呼吸異常とてんかんは認める例もあるが、診断に必須の所見とはいえないようである。ただし、10歳以上で過呼吸が出現する例もあり、注意して経過をみる必要がある。

全例とも特徴的顔貌を認めた。顔貌の特徴は、狭い側頭部・落ちくぼんだ眼・肉付きのよい頬部・太い鼻梁・M字型の上口唇と厚い下口唇を伴う大きな口・よく発達した下顎などである。本症候群は特徴的顔貌から診断を疑うことが可能である。Dysmorphology的検討が重要である。特に口唇の形状や指趾fetal padsが特徴的である。斜視、乱視、遠視など眼科的異常を伴う例が多いことも特徴である。まぶしそうなめつき、眼を細めてみようとするような特徴的な様子が認められた。

9例でTCF4遺伝子異常を同定した。8例は1-2塩基欠失によるフレームシフトによるヤストップコドン変異であり、1例は染色体18q21の微細欠失であった。遺伝子変異例と欠失例では大きな臨床上的差異は認めなかった。欠失例は外国例でも報告されている。しかし、11例では変異は同定されなかった。TCF4遺伝子診断はシーケンズだけでは診断に限界があり、マイクロアレイやMLPA法による解析を併用する必要がある。こうした解析を組み合わせてもTCF4遺伝子の変異が同定されない場合、他の関連遺伝子の網羅的な解析が必要となる。次年度では次世代シーケンサーを用いた解析を計画している。

#### E. 結論

Pitt-Hopkins症候群の9例でTCF4遺伝子異常を同定した。1例は染色体18q21の微細欠失であった。シーケンズだけでは診断に限界があり、マイクロアレイによる解析が有用である。全例重度発達遅滞や特徴的顔貌などを認めた。本症候群は特徴的顔貌から診断を疑うことが可能である。Dysmorphology的検討が重要である。口唇の形状や指趾のfetal padsが特徴的である。外国で重要視されている過呼吸やそれに伴う無呼吸は必ずしも多くなかった。しかし、遺伝子変異が同定できない例もあった。次年度では次世代シーケンサーを用いた解析を計画している。

#### 参考文献

- Pitt D, Hopkins I. A syndrome of mental retardation, wide mouth and intermittent overbreathing. Aust Paediatr J. 1978;14:182-4.
- Amiel J, Rio M, de Pontual L, Redon R, Malan V, Boddaert N, Plouin P, Carter NP, Lyonnet S, Munnich A, Colleaux L. Mutations in TCF4, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. Am J Hum Genet. 2007;80:88-93.
- Zweier C, Peippo MM, Hoyer J, Sousa S, Bottani A, Clayton-Smith J, Reardon W, Saraiva J, Cabral A, Gohring I, Devriendt K, de Ravel T, Bijlsma EK, Hennekam RC, Orrico A, Cohen M, Dreweke A, Reis A, Nurnberg P, Rauch A. Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with

intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). Am J Hum Genet. 2007;80:994-1001.

#### F.研究発表

##### 発表論文

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.

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.

4) 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.

5) 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

6) 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]

7) 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

8) 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

9) Misako Naiki, Seiji Mizuno, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Reiko Kimura, Makoto Oshiro, Nobuhiko Okamoto, Yoshio Wakamatsu, 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

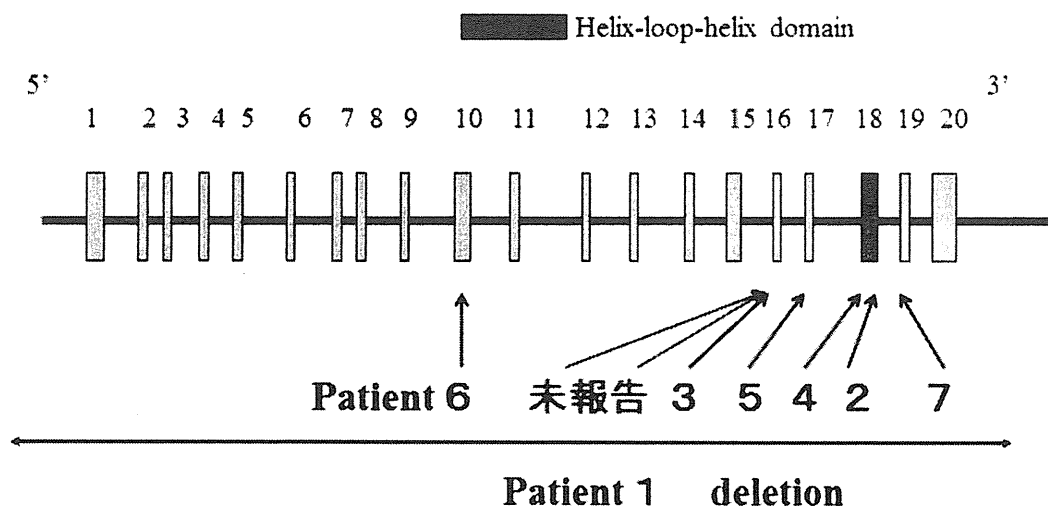
なし

表 Pitt-Hopkins 症候群の身体的特徴

特徴的顔貌	落ちくぼんだ眼 (眼が深い位置にある) 広い鼻根部・太い鼻梁 鼻先が下方を向く (日本人ではわかりにくい) 鼻孔が広い 口が大きい 下ぶくれの顔立ち 歯のすきまが広い 上嘴唇が弓形 下嘴唇が厚い カップ状の耳介 肉付きのよい耳介
成長発達	重度精神発達遅滞・重度言語発達遅滞 出生時の身体計測値は標準的 生後の発育障害 生後の小頭症 (生後の頭囲増加ペースが遅くなる) 頭囲正常例もある てんかん 脳波異常
行動面	呼吸異常 過呼吸発作 無呼吸発作 幸福そうな様子 よく笑う
協調運動障害 常同運動	重度運動失調 手・口運動の共同運動障害 歯ざしり 手をたたく 手でものをたたく 手を口に入れる、口を触る
眼異常	斜視 近視 乱視
手異常	先細りの指 第V指彎曲 胎児性指ふくらみ 母指屈曲線消失
消化器系	便秘
CT/MRI 異常	側脳室拡大 大脳皮質左右差 脳梁低形成 大脳前後経短縮 (短頭)

図

## TCF4遺伝子構造と変異部位



### 研究要旨

小頭症はさまざまな基礎疾患、特に奇形症候群に併発し、小頭症単独例では複数の原因遺伝子が同定されている。脳形成障害データベースから小頭症を示す42家系48例（男28例、女20例）を抽出し、画像による細分類を行い、遺伝性が強く疑われる6家系9例を次世代シーケンサーによる標的候補遺伝子解析の対象とし臨床症状およびARX, TUBA1Aの解析を行った。真正小頭症は少なく、滑脳症や脳梁欠損、橋小脳低形成などほかの中枢神経系奇形の併発例が多かった。症状として重度の知的障害の他、てんかん発作や運動障害を併発する例が多かった。ARX, TUBA1Aには変異を認めなかった。画像からは原因遺伝子の特定が困難な症例が多く、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析が必要である。

### A. 研究目的

奇形症候群に最も多く認められる中枢神経系奇形は小頭症である。他の奇形徴候を伴わず、小頭症が単独で認められることもあり、真正小頭症と呼ばれる。小頭症は脳容積、特に大脳容積の減少であり、ヒトへの進化と密接に関連することが想定され、系統発生と個体発生の両面から研究が進められ、近年分子レベルでの新たな知見が数多く得られている。特に、真正小頭症を示す血族婚のある家系や大家系の連鎖解析から、ヒトの小頭症の原因遺伝子が複数同定され、その多くが細胞分裂に関与し、発生学的に神経細胞の産生障害が一義的な原因であることが示された。その一方、頭部MRIの普及によって、小頭症は大脳皮質形成障害の有無や他に併発する脳形成障害の種類によって細分化されている。現時点では小頭症の原因遺伝子同定は連鎖解析が可能な家族例が多い真正小頭症が主体であるが、次世代シーケンサーの活用によって今後、孤発例が多いそれ以外の小頭症に関しても原因遺伝子（遺伝型）が同定され、画像分類（表現型）との相関関係が明らかにされることが期待される。

本研究では、次世代シーケンサーによる既知および候補遺伝子の網羅的スクリーニングおよびその後のエクソームシーケンス解析対象となる小頭症の症例を、画像を中心として臨床的に分類し、今後明らかになることが予想される遺伝型との相関関係の基礎資料を準備する。

### B. 研究方法

平成24年3月時点での山形大学医学部小児科の脳形成障害データベースから小頭症を呈する42家系48例（男28例、女20例）を抽出し、Barkovichらの分類に基づき画像所見による細分類（1.真正小頭症を含む皮質の厚さが正常か薄い小頭症、2.皮質の厚さが厚い小頭症（小滑脳症）、3.多小脳回もしくは他の皮質形成異常を伴う小頭症）を行った。また、次世代シーケンサーを用いた標的候補遺伝子解析用に、初回の今年度は遺伝性が強く疑われる家族例・真正小頭症例を中心

に6家系を選択した。内訳は真正小頭症2家系2例、橋小脳低形成を伴う1家系2例（同胞発症）、滑脳症を伴う同胞例2家系4例、小頭症と多小脳回の併発1例、計6家系9例（男7例、女2例）である。難治性の下痢を併発する真正小頭症の1家系でARX遺伝子解析を、橋小脳低形成を併発する小頭症2家系4例でTUBA1A遺伝子解析を行った。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析は山形大学医学部倫理審査委員会の承認を受け行われた。

### C. 研究結果

42家系48例中、  
1.皮質の厚さが正常か薄い小頭症は19家系23例で、そのうち橋小脳低形成を伴う症例が4家系5例、白質障害を伴う症例が5家系7例、真正小頭症が5家系5例に認められた。  
2.皮質の厚さが厚い小頭症（小滑脳症）は、12家系14例で、そのうち著明な橋小脳低形成を伴うBarth typeは4家系4例に認められた。  
3.多小脳回もしくは他の皮質形成異常を伴う小頭症は11家系11例で、そのうち脳梁欠損を伴うものが5家系5例であった。

次世代シーケンサーによる標的候補遺伝子解析のために抽出した6家系9例の病歴および症状を示す。年齢は生後1か月から5歳で、在胎週数は35-40週（平均37.4週）、出生時の頭囲は27.2-31.5cm（平均28.6cm）、出生時の体重は2014-2846g（平均2368g）であった。生後1か月の1例と生後5か月で死亡した1例を除く7例の症状は、全例が知的障害（発達指数18-60、平均32）を示し、運動障害は5例に、またてんかん発作は4例に認められた。

今回の解析ではARXおよびTUBA1Aには変異は認められなかった。

## D. 考察

遺伝子解析が進んでいる真正小頭症は5家系5例のみでいずれも孤発例であり、既報告とは異なっていた。逆に白質障害や脳梁欠損、橋小脳低形成などの脳形成障害を併発する例が多かった。抽出元の脳形成障害データベースは、当初、遺伝子解析が進んでいた滑脳症を中心として構築されてきた経緯があるために、細分類の症例頻度に偏りが生じたものと考えられる。

真正小頭症以外の小頭症の原因は未解明なものが多い。脳梁欠損を伴う症例で *AKT3* 変異が、滑脳症を伴う症例で *WDR62* と *TUBA1A* 変異が、脳梁欠損、橋小脳低形成を伴う症例で *TUBA1A* 変異が報告されているのみである。滑脳症か脳梁欠損か橋小脳低形成を伴う症例では *TUBA1A* 変異のスクリーニングを終え、今回の解析では *TUBA1A* 変異を認めなかった。今回解析対象とした6家系9例以外でも画像からは原因遺伝子の特定が困難な症例が多い。これらは次世代シーケンサーによる網羅的な標的候補遺伝子解析の良い対象となり、今後の成果が期待される。

今回の次世代シーケンサーによる標的候補遺伝子解析対象症例には同胞発症の3家系6例が含まれている。2家系は兄と妹、姉と弟であり常染色体劣性遺伝が、もう1家系は兄と弟であり常染色体劣性もしくはX連鎖性遺伝形式が疑われる。本邦では生活水準の高さおよび遺伝知識の普及により連鎖解析に有用な大家系や血族婚は現在ほとんど経験されないが、本例のような稀少疾患の小家系や孤発例の原因遺伝子同定に次世代シーケンサーを用いたエクソームシーケンスの有用性が示されており、標的候補遺伝子解析で変異が見つからない場合でも、新規の原因遺伝子同定につながることを期待される。

小頭症の神経症状は知的障害が主体で、てんかん発作や運動障害の併発率が高いことが改めて示された。他の脳形成障害を伴う症例は、より重症であり、一部でてんかん発作は抑制されているものの、多くの症状は難治である。本研究によって原因遺伝子が同定され、表現型との相関関係が明らかにされることで予後予測や遺伝相談に寄与しなければならない。

## E. 結論

奇形症候群を伴わない小頭症は中枢神経系の併発奇形により細分類され、国内ではいずれも孤発例が多い。知的障害を主として神経症状が強く、次世代シーケンサーによる原因遺伝子同定が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tohyama J, Kato M, Kawasaki S, Harada N, Kawara H, Matsui T, Akasaka N, Ohashi T, Kobayashi Y, Matsumoto N. Dandy-Walker malformation associated with heterozygous *ZIC1* and *ZIC4* deletion: Report of a new patient. *Am J Med Genet A* 155A:130-133, 2011
- 2) Hirose M, Haginoya K, Yokoyama H, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Munakata M, Uematsu M,

Iinuma K, Kato M, Yamamoto T, Tsuchiya S. Progressive atrophy of the cerebrum in 2 Japanese sisters with microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space. *Neuropediatrics* 42:163-166, 2011

### 2. 学会発表

- 1) Mitsuhiro Kato, Yuichi Takami, Kimio Minagawa, Tamiko Negoro, Jun Natsume, Kiyoshi Hayasaka: Mutation analysis of *TUBA1A* in patients with lissencephaly sequence. 2011 Pediatric Academic Societies' & Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, April-May 2011, Denver, Colorado, USA
- 2) 五十嵐愛子、川谷正男、中井昭夫、大嶋勇成、加藤光広: DCX 遺伝子変異を認めた皮質下帯状異所性灰白質の男児例. 第53回日本小児神経学会総会: 横浜 2011年5月
- 3) 塩浜直、富田美佳、大曾根義輝、藤井克則、河野陽一、加藤光広: 遅発進行性の水頭症を合併した MPPH-CM Syndrome の男児乳児例. 第53回日本小児神経学会総会: 横浜 2011年5月
- 4) 井上大嗣、里龍晴、宇野奈菜子、国場英雄、森内浩幸、松尾光弘、松坂哲應、加藤光広: Leucodysplasia, microcephaly, cerebral malformation (LMC) の女児例. 第53回日本小児神経学会総会: 横浜 2011年5月
- 5) 中村和幸、菊池貴洋、加藤光広、早坂清: 好酸球性関節炎・骨髄炎による歩行障害をきたした単純脳回型小頭症の1例. 第53回日本小児神経学会総会: 横浜 2011年5月
- 6) 鈴木基正、大野敦子、糸見和也、大澤弘勝、加藤美穂子、長坂昌登、井澤雅子、濱島 崇、横塚太郎、生田岳人、糸見世子、加藤光広: 硬膜下液貯留を伴った X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG) の1例. 第35回日本小児神経学会東海地方会: 名古屋 2011年7月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究要旨

眼先天異常は小児の視覚障害原因の第1位を占め、多くは病因不明で有効な治療法が確立されていない。眼先天異常にはさまざまな眼疾患が含まれるが、いずれも全身疾患・奇形症候群に伴う比率が高い。眼科領域では、種々の眼先天異常に対し全身異常の合併を検討し遺伝要因の検索を促進すること、奇形症候群に伴う眼合併症を詳細に検討し病態の解明に寄与することを目的とした。

国立成育医療研究センター眼科に精査加療目的にて受診した眼先天異常患児に対し、小児科、遺伝診療科に依頼して全身異常の合併を検討し、遺伝的検索を行った。また本研究班にて遺伝子解析を実施している各種奇形症候群の眼合併症につき詳細に検討した。眼先天異常のうち、小眼球症では全国から症例を集積した結果、全身異常の合併を31%と高率に認め、家族歴のある例は7.2%であった。先天白内障では、全身異常の合併を22%に認め、早期手術による視力予後に影響を与えていた。奇形症候群のうち、本研究班4施設においてCHARGE症候群(CHD7変異陽性)19例38眼の眼合併症を検討したところ、視神経・網脈絡膜コロボーマが約95%と高率に起こり、黄斑欠損・部分欠損68%、0.3未満の視力障害例は約65%であった。Hallermann-Streiff症候群3例6眼の検討では、全例で両眼に高度の小眼球、先天白内障を認め、白内障手術の有無にかかわらず全例に滲出性網膜剥離・網膜ひだを併発した。

今後さらなる疾患および症例を集積し、眼科的分析・遺伝子診断を推進し、遺伝要因と病態の解明に寄与することが課題である。また研究成果を取り入れて医療現場において眼先天異常の患児に対する効果的な治療法を検討していきたい。

## A. 研究目的

眼先天異常は小児の視覚障害原因の第1位、約57%を占め、依然として病因不明で有効な治療法のない疾患が多い。眼先天異常にはさまざまな眼疾患が含まれるが、いずれも全身疾患・奇形症候群に伴う比率が高く、特に中枢神経系異常の検索が、病因診断のため必須となる。

本研究の目的は、中枢神経・感覚器領域の先天異常症に対し新たな分野横断型全国コンソーシアムを結成して遺伝要因を解明し、遺伝子診断の医療現場での利用を促進することである。眼科領域では、さまざまな眼先天異常に対し全身異常の合併を検討し遺伝要因の検索を促進すること、奇形症候群に伴う眼合併症を詳細に検討し病態の解明に寄与することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 眼先天異常に対する全身検索・遺伝子診断

国立成育医療研究センター眼科に精査加療目的で受診した眼先天異常患児に対し、眼科的精査・治療を行うとともに、総合診療科(小児科)・遺伝診療科に依頼して、全身異常につき検索を行った。また遺伝診療科に依頼して遺伝要因につき精査を行った。対象疾患は小眼球症、先天白内障、先天緑内障、先天無虹彩、網脈絡膜コロボーマ、種々の網膜ジストロフィー、視神経乳頭異常などの眼先天異常である。疾患別に全身異常の合併率、内訳に

ついて検討を加えた。家族歴を聴取し、一部の疾患に対しては、遺伝子診断を実施した。

### 2) 奇形症候群に伴う眼合併症の検討

慶應義塾大学臨床遺伝学センター・国立成育医療研究センター遺伝診療科をはじめ本研究コンソーシアムで遺伝子解析を実施している各種奇形症候群の眼合併症につき眼科的精査を行った。眼異常の合併率、異常部位と程度、黄斑部の形成、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。はじめに、CHARGE症候群、Hallermann-Streiff症候群、Stickler症候群など高頻度に眼異常を合併するものを対象とした。

### (倫理面への配慮)

遺伝子変異解析はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して実施された。随時、慶應義塾大学臨床遺伝学センター・国立成育医療研究センター遺伝診療科において遺伝カウンセリングを提供した。眼科所見については、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) 眼先天異常に対する全身検索・遺伝子診断対



象疾患として小眼球症、先天白内障、先天緑内障、先天無虹彩、網脈絡膜コロボーマ、網膜ジストロフィー（レーベル先天盲、若年性網膜色素変性症、先天錐体機能不全、黄斑ジストロフィー、眼白子症など）、視神経乳頭異常（視神経低・無形成、乳頭異常）など多種多様な眼先天異常を取り上げ実施中である。眼および全身検索の進んだ主要な疾患について以下に結果を示す。

#### ①小眼球症

国立成育医療研究センター眼科が主体となって全国 454 施設に受診した小眼球症患者 851 例の調査・分析を行った結果、全身異常の合併を 224 例（31%）と高率に認めた。その内訳は中枢神経系障害・発達遅延 12.7%、多発奇形症候群 9.4%、染色体異常 3.6%、その他の全身異常 5.3%であった。一方、家族歴は 61 例（7.2%）に認め、遺伝形式は常染色体優性 25 例、常染色体劣性 1 例、伴性劣性 3 例、不明 32 例であった。

眼科に受診する小眼球症の多くは原因不明であり、遺伝的要因について十分な検索がなされていない可能性がある。とくに両眼性の場合には、重篤な視覚障害に加えて全身異常の合併頻度が高く、特に中枢神経系障害の比率が高い。本研究コンソーシアムにおいて遺伝子診断ネットワークを形成し、病態解明と治療法の開発を推進することが課題である。

#### ②先天白内障

国立成育医療研究センター眼科にて精査を行い高度の水晶体混濁に対し早期手術の対象となった先天白内障の患児 95 例（手術年齢 6 歳未満、経過観察期間 4 年以上）の全身検索を行ったところ、21 例（22%）に全身異常を合併した。その内訳はダウン症候群 6 例、Lowe 症候群 6 例、その他の奇形症候群 7 例であった。全身異常の合併は、生直後から高度の両眼性の先天白内障をきたした例に多かった。

近年、先天白内障に関しては、早期発見・早期手術・弱視訓練によって良好な視力予後が得られる例が増加した。しかし、全身異常の合併例では、白内障以外の眼合併異常を伴う例も多く、早期に白内障手術を行っても、弱視治療の成功しない例、緑内障・網膜剥離などの重篤な眼合併症を併発する例など、視力予後不良例の比率が高い。

本疾患においても、依然として全身異常や遺伝的要因について十分な検索がなされていない例も散見されるため、本研究コンソーシアムにおいて遺伝子診断ネットワークを形成し、病態を解明することが課題である。

#### 2) 奇形症候群に伴う眼合併症の検討

眼異常を合併する奇形症候群は多数存在するが、希少疾患が多いため十分な眼科的検索がなされていないのが現状である。はじめに CHARGE 症候群、Hallermann-Streiff 症候群など高頻度に眼異常を合併する症候群を対象として検討を進めた。現在、他のさまざまな症候群における眼合併症の精査を実施し集積している。

#### ①CHARGE 症候群

慶應義塾大学にて遺伝子検査を実施した症例のうち、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の 4 施設における CHD7 遺伝子変異陽性例 19 例 38 眼を対象として、眼合併症について調査・解析した。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、視神経及び網脈絡膜コロボーマの合併が 18 例（94.7%）と高率であった。黄斑欠損・部分欠損をきたしたものは 13 例（68.4%）に上った。両眼開放下または優位眼の矯正視力が 0.3 未満の視力障害を約 65%に認めた。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 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。

本研究コンソーシアムにおいて症例を集積し、研究を推進することによって CHD7 遺伝子の眼形成に関わる病態を解明することが課題である。

#### ②Hallermann-Streiff 症候群

国立成育医療研究センター眼科・遺伝診療科で精査・治療を行い経過観察している 3 例 6 眼の眼合併症につき検討した。全例で生後 3 ヶ月までに眼異常が発見され、先天白内障に対する手術目的に眼科へ紹介された。

眼合併症の内訳として小眼球、先天白内障の合併が 6 眼（100%）と高率であった。先天白内障 2 例 4 眼は早期手術を実施し弱視訓練を行っているが、1 例 2 眼は白内障が自然に吸収され、手術を行わず経過をみている。特記すべき合併症として、生後数カ月のうちに 6 眼（100%）に滲出性網膜剥離・網膜ひだを認めたことが挙げられる。2 例 4 眼は術後に発症し、うち 1 眼は自然軽快しないため強膜開窓術を実施した。1 例 2 眼は手術を行わなくとも滲出性網膜剥離を生じたが、自然軽快傾向にある。

本症候群は特徴的な眼先天異常及び併発症を高頻度に合併する疾患であり、視力障害に対する更なる治療法を開発するためにも遺伝的要因の解析と病態の解明が課題となる。

## D. 考察・今後の展望

本研究班の目的を推進するために、眼科領域において、さまざまな眼先天異常に対し全身異常の合併を検討し遺伝的要因の検索を推進すること、奇形症候群に伴う眼合併症を詳細に検討し、病態の解明に寄与することが課題である。

小眼球症、先天白内障、CHARGE 症候群、Hallermann-Streiff 症候群において一定の成果を挙げているが、今後、さらなる疾患および症例の集積、眼科的分析を課題としたい。

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、視覚障害原因の多くを占める眼先天異常に対し、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。さらに眼先天異常に関する遺伝要因・病態を解明することが、新たな治療法の開発に結びつくと考えられる。

## E. 結論

本研究班の目的を推進するために、眼科領域において小眼球症、先天白内障などの眼先天異常における全身検索・遺伝子診断、CHARGE 症候群、Haller-Streiff 症候群などの奇形症候群に伴う眼合併症の詳細な検討を進めた。

## 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, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet A*, 155: 409-414, 2011

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、矢ヶ崎悌司、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

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

厚生労働科学研究費補助金  
 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野)  
 分担研究報告書  
 分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と  
 遺伝子診断ネットワークの形成  
 研究分担者 赤松和土  
 慶應義塾大学 医学部 講師

**研究要旨**

臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指す。研究チーム内での分担研究者の役割は疾患特異的iPS細胞の樹立と蓄積である。これまでに16種類の疾患iPS細胞を作成し、いくつかの疾患ではiPS細胞から誘導した細胞が患者と同じ表現型を持つことを示した。神経系においては疾患iPS派病態解析の有用なツールとなり得る。

**A. 研究目的**

本計画では中枢神経系・感覚器が発生的に頭部外胚葉という共通の由来を持ち、先天異常の発症に共通の遺伝子経路が関与する可能性が高いことに着目して、既存3コンソーシアムの複合体を新たに編成の上、臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指す。研究チーム内での分担研究者の役割は疾患特異的iPS細胞の樹立と蓄積である。

**B. 研究方法**

①健常人由来 iPS細胞の樹立

インフォームド・コンセントを得た後、健康成人女性より皮膚組織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。

②樹立したiPS細胞のline選定

iPS細胞において、iPS細胞樹立とともに導入した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6日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にちより比較し、発

現を抑えられているlineを選定した。

以下の疾患に関してiPS細胞の作成に着手した。

疾患名
自閉症
家族性筋萎縮性側索硬化症
チャージ症候群
球脊髄性筋萎縮症 (SBMA)
歌舞伎症候群
モワット・ウィルソン症候群
メルヴィル・スミス症候群
家族性パーキンソン病 PARK2
家族性パーキンソン病 PARK8
家族性パーキンソン病 PARK6
シェーグレン・ラルソン症候群
乳児重症ミオクロニーてんかん
統合失調症 (22q11.2欠失症候群)
Pelizaeus-Merzbacher 病
Rett 症候群
プラダー・ウィリー症候群

(倫理面への配慮)

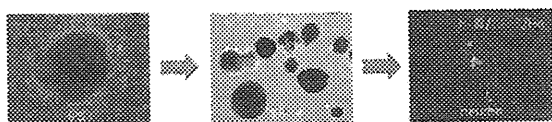
動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。また、当研究室におけるヒトES細胞の使用については、文部科学省の「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成19年10月31日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生

医学の基礎的研究」として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。患者からの iPS 細胞の樹立は「神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」として慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受けており（2008年6月）、十分な説明の上で患者の同意の下で行われる。他施設との共同研究においては当該施設においても倫理委員会の承認を受けている。

## C. 研究結果

### 1. ALS (FUS 変異)

常染色体優性遺伝の遺伝形式をとる FUS 遺伝子変異(H517D;1550c>G in exon 15)を有する30代の患者から線維芽細胞を樹立し、そこからレトロウイルスもしくはエプゾーマルプラスミド法を用いて樹立した iPS 細胞の神経分化を確認した。現在これらのクローンを高効率に運動ニューロンに誘導するプロトコルを用いて分化誘導させ、正常対照細胞との違いを解析している。



Quality Checkを終了し、神経への分化を確認

### 2. パーキンソン病 (PARK2)

常染色体劣性遺伝若年発症型パーキンソン症候群 (ARJP) の一つである PARK2 患者 (67 才、日本人女性; 50 才、日本人男性) から採取された皮膚繊維芽細胞から、レトロウイルスによる遺伝子導入(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を行い、iPS 細胞を樹立した。神経分化が良好な 7 クローン (PA1, 9, 22, PB1, 2, 17, 20) を解析に用いるクローンとして選定し、PARK2 患者由来 iPS 細胞、及び対照群としてヒト ES 細胞、健康人由来 iPS 細胞から神経幹細胞及び TH 陽性のドーパミン作動性ニューロンを高効率に誘導することに成功した。また誘導された神経幹細胞・ニューロンにおいてマイクロアレイ解析を行い、患者群において 2 倍以上増加あるいは減少した遺伝子が確認された。これらにはユビキチン・プロテアソーム系及びミトコンドリア動態に関わる遺伝子が含まれており、PARK2 研究で報告されているミトコンドリア障害や酸化ストレス等の代謝異常につながる事が示唆され、これまで未知であった PARK2 の発症に至る生化学的機序を解明できると期待される。

### 3. 疾患特異的 iPS 細胞のバンクへの寄託

これまで理研 BRC に 6 症例 22 株の寄託を行ったが、H23 年度後半から H24 年度にかけて、さらに多くの細胞株を寄託すべく品質チェックなどの準備を行っている。

1:20(23):4530-9.

## D. 考察

新規の iPS 細胞の樹立とこれまで樹立した iPS 細胞を用いて、病態と関連する表現型を生体外で再現することに成功した。パーキンソン病 (PARK2) においても酸化ストレスに対する反応を中心に検索を行っている。ALS (FUS 変異) に関しては今後は疾患の表現型を中心に解析を行っていく予定である。また、積極的に理研 BRC への細胞の寄託を進めていく。

## E. 結論

16 種類の疾患 iPS 細胞を作成し、いくつかの疾患では iPS 細胞から誘導した細胞が患者と同じ表現型を持つことを示した。神経系においては疾患 iPS 派病態解析の有用なツールとなり得る。

## 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

### 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

(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