

201224100A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 直通

(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成25(2013)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究	1
松本直通	

II. 分担研究報告

1. 16番染色体短腕のゲノムコピー数増加と自閉症	13
岡本伸彦	
2. 広汎性発達障害関連遺伝子による病態解明研究	21
橋本亮太	
3. 年齢依存性てんかん性脳症の遺伝型と臨床型の関連性の解明	29
加藤光広	
4. 本邦におけるクレアチン欠損症の解析	33
小坂仁	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	41
-----------------	----

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
総括研究報告書

超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究

主任研究者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

Copy Number Variation (CNV)の発見によりヒト脳神経疾患ゲノム解析は新たな局面を迎えている。ほぼ同一の CNV が精神遅滞症候群やてんかんあるいは自閉症などの発達障害を含む多様なヒトの疾患を惹起していることが明らかになり、これら多様な疾患群の共通項が CNV（のみ）であるという新たな「genotype-first」の時代を迎えた。本研究は、先端技術を用いてこれらの発達期の様々な障害を対象に網羅的な解析を行い CNV の視点からこれらの疾患群を再定義し、CNV を利用した新たな効率的診断法と責任分子単離を行うことを目的とする。対象疾患は、ヒト発達障害の中でも重要な、自閉症、精神遅滞症候群、てんかん関連疾患とする。症例集積は順調に進行し自閉症は 200 例・精神遅滞関連症候群 980 例・てんかん関連症候群 480 例を集積し高解像度マイクロアレーを用いた CNV 解析は 200 例を超え、数多くの興味深い CNV の知見を得ることに成功している。これらの個々の症例の詳細な解析から疾患に関与する分子群の特定を進めている。本年度は三つの疾患の責任遺伝子の解明に成功した：Coffin-Siris 症候群 (Nat Genet 2012) の新規責任遺伝子 5 つ、大田原症候群 (Ann Neurol 2012) の新規遺伝子 1 つ、Kabuki 症候群 (Hum Mut 2012) の新規遺伝子 1 つである。

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・科長

橋本亮太・大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学連合小児発達学研究科附属子どものこころの分子統御機構研究センター/大阪大学大学院医学系研究科・精神医学・准教授

加藤光広・山形大学医学部発達生体防御学講座・小児医科学分野・講師

小坂仁・神奈川県立こども医療センター神経内科・科長/神奈川県立がんセンター臨床研究所

発達障害を含む多様なヒトの疾患を惹起していることが明らかになり、これら多様な疾患群の共通項が CNV（のみ）であるという新たな「genotype-first」の時代を迎えた。本研究は、先端技術を用いてこれらの発達期の様々な障害を対象に網羅的な解析を行い CNV の視点からこれらの疾患群を再定義し、CNV を利用した新たな効率的診断法と責任分子単離を行うことを目的とする。研究代表・松本は、全ての高解像度プラットフォームに対応したアレー解析機器を完備し（Affymetrix 社・Agilent 社に加えて Illumina 社のアレー解析機器を新たに導入）、世界最高レベルの解析環境を有す。この研究環境・実績を応用し、ヒト発達障害の中でも重要な自閉症、精神遅滞症候群、てんかん関連疾患に対して世界最高解像度の CNV 解析と塩基レベルでの解析を行い発達障害に関与する遺伝的効果の高い遺伝子を同定する。本邦では CNV を解析対象としたまとまった研究は皆無でその実体解明は急務である。平成24年度までに自閉症、精神遅滞症例

A. 研究目的

Copy Number Variation (CNV)の発見によりヒト脳神経疾患ゲノム解析は新たな局面を迎えている。ほぼ同一の CNV が精神遅滞症候群やてんかんあるいは自閉症などの発

、てんかん関連疾患を対象に500例超の解析を既に行い、超細密レベルでの染色体異常カタログと候補遺伝子探索を継続している。一方、明らかに病的なCNVを有さない症例においてCNVを端緒にしたアプローチは無力である。この欠点を克服するため次世代シーケンサーを用いた全エクソン領域（エクソーム）シーケンスの開発を進め、解析系を確立した。平成24年度はCNVを有さない疾患に2疾患においても責任遺伝子の同定に至ることができた。Coffin-Siris症候群と大田原症候群である（エクソームシーケンス）。さらに複数例の微細欠失異常から第二の責任遺伝子として強く疑われていたKDM6A遺伝子の点変異を世界に先駆けてKabuki症候群で見出した。

B. 研究方法

①症例の集積

各研究分担者および遺伝医学に関する独自のネットワーク・蔵王セミナー等で形成された小児神経臨床研究ネットワークを中心に、てんかん関連疾患・精神遅滞関連症候群ならびに自閉症を広く集積する。末梢血の得られた検体は基本的にリンパ芽球株化を行いゲノムDNAと併に染色体が可能なプラットフォームを形成する。

②高密度アレーの比較検討

Affymetrix 社 Cytogenetics Array 2.7M (全ゲノムにわたって270万マーカーを搭載)あるいはCytoscan HD (遺伝子を中心に最適化された260万マーカーを搭載)、Agilent 社 1M/400K (全ゲノムにわたってそれぞれ100万/40万マーカー搭載)、NimbleGen 社 2.1M/700K アレー (それぞれ210万/70万マーカー搭載)を用いてCNV検出の感度や精度等を比較検討しCytoscan HDの感度および正確性を確認することができた。

③疾患責任遺伝子の単離

CNV異常を認めないCoffin-Siris症候群典型例とSTXBP1・ARX異常を認めない大田原症候群典型例に対して次世代シーケンサーを用いた全エクソン領域の解析により新規責任遺伝子を特定する。さらに複数の微細欠失例の存在から責任遺伝子であることを強く疑われていたKDM6A遺伝子の変異解析

をMLL2遺伝子変異陰性例のKabuki症候群に対して行った。

C. 研究結果

①症例の集積

症例集積は順調に進行し既に自閉症は200例・精神遅滞関連症候群980例・てんかん関連症候群480例を超えた。本年度に責任遺伝子が明らかになったKabuki症候群も既に80例を超える集積状況となった。

②高密度アレーの比較検討とCNV検出

Affymetrix社のCytogenetics array 2.7MあるいはCytoscan HDをprimary platformとして、疾患ゲノム解析を進めた。既に200例を超える症例の1次解析は終了した。高解像度であるため通常1例に於いて数十カ所のCNVおよび染色体微細構造異常候補領域を検出するため、それぞれを個別にCNVの真偽を検証していくことは物理的・費用的にも相当困難である。検証系の効率化・簡素化の目的で他のプラットフォームの高密度アレーを用いていわゆるdouble arraysによる解析を進めた。この過程で各種商業プラットフォームの特性と解析上の注意点が明らかになった。Affymetrix社のcytogenetics array 2.7Mでは、プローブ密度は現存アレーで最高レベルであるが、専用ソフトウェア(ChAS)のversion up後に測定値が不安定なプローブがかなり削除されているため実質2.1 M程度に解像度が減じていた。一方、cytogenetics arrayのさらなる改良版であるcytoscan HDアレーはCNV解析に加えて系情報を加味したAllele peakの情報が極めて有用で高い信頼度でCNV検出が可能であった。また他のプラットフォーム特性を考慮しながら適宜double array解析を追加し必要に応じて個別にFISHや定量PCRによる検証も追加し異常CNV、染色体微細構造異常領域のカタログ作成を進め興味深いCNV異常が多数検出された。Double array検証でcytoscan HDアレーの秀逸性を確認することができたので本年度は特にcytoscan HDアレーを軸に解析を進めた。

③疾患責任遺伝子の単離

I. Coffin-Siris 症候群

Coffin-Siris 症候群(以下 CSS と称す)は、軽度～中等度の精神遅滞・中等度以上の低緊張・てんかん・粗な顔貌と手足第5指の低形成などの奇形兆候を特徴と多発奇形・精神遅滞症候群の一つである。稀な疾患でその頻度や遺伝要因の解明は進んでいなかった。CSS を対象に高密度マイクロアレーで解析を行ったが非典型例でのみ染色体微細欠失(6q25 領域の 9.2 Mb 欠失)を認めるも、典型例 10 例で CNV 異常は同定されなかった。典型例 5 例を対象に全エクソーム解析を行い責任遺伝子 *SMARCB1* 異常を 2 例に同定した。更なる解析で計 4 例で異常を認めた。*SMARCB1* はクロマチンリモデリング活性を有する SWI/SNF 複合体の 1 つのサブユニットをコードする。*SMARCB1* 異常で説明されない CSS 症例に対して SWI/SNF 複合体のサブユニットをコードする 16 遺伝子をスクリーニングし、*SMARCA4* 異常を 6 例、*SMARCE1* 異常を 1 例、*ARID1A* 異常を 3 例、*ARID1B* 異常を 5 例で認め、解析した CSS22 症例中 19 症例で SWI/SNF 複合体サブユニットの何れかの異常を認めた (Nat Genet 2012)。尚、非典型例で認めた 6q25 微細欠失の中に *ARID1B* が含まれており *ARID1B* 欠失によって非典型的 CSS が生じたと考えられた (図 1) (Nat Genet 2012)。プロジェクトにおける非典型例の解釈という課題が浮き彫りとなった。

II. 大田原症候群

大田原症候群 (early infantile epileptic encephalopathy with suppression burst : EIEE) は、新生児～乳児期早期に頻回の短い単発性あるいはシリーズ形成性の全般性強直発作で発症し、脳波上顕著な suppression burst を示す、精神運動発達遅滞を伴う難治性のてんかん性脳症である。発症は 10 万に 1 例程度とされるが詳細は不明である。約 75% の EIEE 症例が West 症候群(点頭てんかん)に移行し、一連の年齢依存性てんかん性脳症群と考えられる。EIEE の多くは脳形成異常を伴うが、脳形態異常を認めない症例が存在し、遺伝的な素因が示唆されていた。これまでに X 染色体上に位置する *ARX* の変異が男児例で、9 番染色体上の *STXBP1* の異

常が男女の両方の症例で報告されている。しかし EIEE 症例の過半数は上記 2 遺伝子異常で説明がつかない。*ARX* 及び *STXBP1* 異常の無い EIEE12 例において全エクソーム解析を行った。内訳は男児 6 例、女児 4 例であった。12 例で 964 バリエーションを検出した。このうち 3 例で *KCNQ2* のミスセンス変異を検出した。両親検索の結果 de novo で生じた変化であった。このことは EIEE の原因として *KCNQ2* が重要な位置を占めていることを強く示唆する (Ann Neurol 2012)。*KCNQ2* は、元々 Benign familial neonatal seizure 1 の責任遺伝子の一つとして報告されていた。今回の我々の発見と他のグループによる neonatal epileptic encephalopathy の変異報告と合わせ、*KCNQ2* 変異が良性のてんかんに限らず重症型のてんかんの原因であることが強く示唆された

III. Kabuki 症候群

Kabuki 症候群は、歌舞伎役者のクマドリを思わせる特異顔貌と知的障害を特徴とする先天多発奇形症候群である。長らく原因が不明であったが、2010 年ついに全エクソーム解析を用いて責任遺伝子である *MLL2* の単離に至った(ワシントン大学との共同研究、Nat Genet 2010)。一方、世界中で解析が進行し Kabuki 症候群の *MLL2* 変異率は 56-76%程度で、およそ 1/3 の症例は *MLL2* 変異を認めない。2012 年に *MLL2* 陰性の Kabuki 症候群で *KDM6A* を含む CNV 異常(微細欠失)が他グループより報告され (Am J Hum Genet, 2012)、*KDM6A* が第二の責任遺伝子として浮上した。我々は、*MLL2* 異常を認めない KMS 症例 32 例の *KDM6A* 変異スクリーニングを施行し 3 例で *KDM6A* 変異を認め、*KDM6A* が Kabuki 症候群の第二の責任遺伝子であることを証明した (Hum Mut in press)。

④次世代シーケンスを用いた CNV 同定法
難治性てんかん性脳症を対象にてんかん関連遺伝子 35 遺伝子 (156 kb) を網羅的に解析するターゲットキャプチャー法を開発した。この方法により 24 症例を卓上型シーケンサー Miseq で 1 ランで解析した。全症例において対象遺伝子領域を 250 リード以上でシーケンスが可能であった。ポジティブ

コントロールとして3種の異なるミスセンス変異、6種類の10 bp未満の塩基欠失挿入は全て検出可能であった。またマイクロアレー解析で明らかになった6つの4.6 Kb~2.8 Mbまでの染色体微細欠失が全てAlex Nordプログラムで確実に検出され次世代シーケンスを用いて点変異のみならずCNV解析までが可能であることが判明した（投稿準備中）。

D. 考察

最終年度である平成24年度までに極めて質の高い発達障害関連疾患1500例超を集積した。高解像度のマイクロアレー解析において500例を超える症例の2次解析（アレー解析+他方での検証）を終了し、多数の疾患関連CNVを同定した。一方でCNV異常の無い症例について次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析法の開発を進め、高率に点変異を同定するシステムを確立した（平成22-23年度中期まで）。CNV解析とバックアップシステムとしての次世代解析を組み合わせることで3疾患の遺伝子単離を行った。CSSのSWI/SNFサブユニット遺伝子異常と大田原症候群のKCNQ2は、エクソーム解析の成果、Kabuki症候群のKDM6A異常は、染色体微細異常欠失からの遺伝子異常の同定である。さらに次世代シーケンスデータを用いたCNV解析も十分可能であることを確認した。

E. 結論

CNV解析と次世代解析は補完的で発達障害関連疾患の解析には両プラットフォームが必要である。本研究の当初の目標の多数の発達障害関連疾患を単離することが可能であり達成度は極めて高いと考える。

F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていないが、その可能性・危険性等について把握した際には、迅速に対応していきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

*Saitsu H, Kato M, Matsumoto N.

Haploinsufficiency of *STXBPI* and Ohtahara syndrome. Jasper's basic mechanism of the epilepsies, 4th edition, edited by Noebels J, Avoli M, Rogawski M, Olsen RW, and Delgado-Escueta AV. Oxford University Press Page 824-834, 2012.

Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, *Saitsu H. De novo and inherited mutations in the gene encoding a type IV collagen $\alpha 2$ chain (*COL4A2*) cause porencephaly. Am J Hum Genet 90 (1):86-90, 2012

Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki T, Saitsu H, Miyake N, Masuda M, *Matsumoto N. Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing. Hum Genet 131: 591-599, 2012

Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Nishiyama K, Tsurusaki T, Doi H, Miyake N, Ryoo N-K, Kim JH, Yu KS, *Matsumoto N. A family of oculofaciocardiodental syndrome (OFCD) with a novel *BCOR* mutation and genomic rearrangements involving *NHS*. J Hum Genet 57(3): 197-201, 2012

Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Nishiyama K,

- Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, *Matsumoto N. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of *NFIX* cause Sotos-like syndrome. *J Hum Genet* 50(3): 207-211, 2012
- *Saitsu H, Osaka H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N. A girl with early-onset epileptic encephalopathy associated with microdeletion involving *CDKL5*. *Brain Dev* 34(5): 364-367, 2012
- Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, *Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A Variant of *RNF213* Predicts Early-Onset and Severe Form of Moyamoya Disease. *Neurology* 78: 803-810, 2012
- *Hamdan FF[#], Saitsu H[#] (# denotes equal contribution), Masuko K, Gauthier J, Dobrzaniecka S, Spiegelman D, Lacaille JC, Décarie JC, Matsumoto N, Rouleau GA, Michaud JL. Mutations in *SPTAN1* in intellectual disability and pontocerebellar atrophy. *Eur J Hum Genet* 20 (7): 796-800, 2012.
- *Saitsu H[#], Kato M[#] (# denotes equal contribution), Shimono M, Senju A, Tanabe S, Kimura T, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Association of genomic deletions in the *STXBP1* gene with Ohtahara syndrome. *Clin Genet* 81(4): 399-402, 2012
- Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, *Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *Am J Med Genet Part A* 158 (4): 861-868, 2012
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, *Miyake N, *Matsumoto N (*: co-corresponding). Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44(4):376-378, 2012
- *Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Saitsu H, Salomons GS, Jakobs C, Aida N, Shinka T, Kuhara T, Matsumoto N. Contiguous deletion of *SLC6A8* and *BAP31* in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol Genet Metab* 106(1): 43-47, 2012

- *Witzl K, Primec ZR, Stražišar BG, Osredkar D, Pečarič-Meglič N, Kranjc BS, Nishiyama K, Matsumoto N, Saitsu H. Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with *SPTAN1* mutation. *Epilepsia* 53(6): e106-110, 2012
- *Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Whole exome sequencing identifies *KCNQ2* mutations in Ohtahara syndrome. *Ann Neurol* 72(2): 298-300, 2012
- *Saitsu H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. *CASK* aberrations in males with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. *Epilepsia* 53(8): 1441-1449, 2012
- Miyake N[#], Elcioglu NH[#] (# denotes equal contribution), Iida A, Isguven P, Dai J, Murakami N, Takamura K, Cho T-J, Kim O-H, Nagai T, Ohashi H, Nishimura G, Matsumoto N, Ikegawa S. *PAPSS2* mutations cause autosomal recessive brachyolmia. *J Med Genet* 49(8): 533-538, 2012
- *Terao Y, Saitsu H, Segawa M, Kondo Y, Sakamoto K, Matsumoto N, Tsuji S, Nomura Y. Diffuse central hypomyelination presenting as 4H syndrome caused by compound heterozygous mutations in *POLR3A* encoding the catalytic subunit of polymerase III. *J Neurol Sci* 320(1-2): 102-105, 2012
- Miyatake S, Miyake N, Doi H, Ogata K, Kawai M, *Matsumoto N. A novel SACS mutation in a Japanese family with atypical phenotype of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Intern Med* 51: 2221-2226, 2012
- Tsurusaki Y, *Kosho T (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N (*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFDI* mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. *Clin Genet* (in press)
- Yamashita S, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Iai M, Aida N, Tanaka Y. Neuropathology of Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement and High Lactate caused by a homozygous mutation of *DARS2*. *Brain Dev* (in press)
- *Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, Matsumoto N, Ishii M, Saitsu H. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to *SPTAN1* gene mutation. *Brain Dev*

(in press)

Tsurusaki Y, *Saitoh S, Tomizawa K, Sudo A, Asahina N, Shiraishi H, Ito J, Tanaka H, Doi H, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N (* denotes co-corresponding). A *DYNC1H1* mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenet* (in press)

Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori F, Yamazaki A, Subo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, *Saitsu H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* (in press)

Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Miyake N, Saitsu H, *Matsumoto N. A De Novo Deletion at 16q24.3 Involving ANKRD11 in a Japanese Patient With KBG Syndrome. *Am J Med Genet Part A* (in press)

*Miyatake S, Touho H, Miyake N, Ohba C, Doi H, Matsumoto N. Sibling cases of Moyamoya disease with different *RNF213* genotypes and varying clinical course and severity. *J Hum Genet* (in press)

Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi

H, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, *Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. *J Hum Genet* (in press)

Higashiyama Y, *Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, PhD, Miyake N, MD, PhD, Saitsu H, Ohba C, Fukai R, Miyatake S, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. A novel homozygous *SCARB2* mutation causes late-onset progressive myoclonus epilepsy without renal failure. *Mov disord* (in press)

*Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, *Matsumoto N (*: co-corresponding). *KDM6A* point mutations cause Kabuki syndrome. *Hum Mut* 34 (1): 108-110, 2012.

Ikegawa S, Nakashima M, Matsumoto N. TGF- β and Genetic Skeletal Diseases. "TGF β in Human Disease" edited by Moustakas A and Miyazawa K. Springer (submitted)

Kimura-Ohba S, Kagitani-Shimono K, Hashimoto N, Nabatame S, Okinaga T, Murakami A, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Hojo K, Tomita R, Taniike M, *Ozono K. A case of cerebral hypomyelination with spondylo-epi-metaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet Part A* (in press)

*Miyake N[#], Yano S[#] (# denotes equal contribution), Sakai C, Hatakeyama H, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, *Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. Hum Mut (in press)

2. 学会発表

2012 Illumina Asica Pacific Scientific Summit
[Exome analysis in mendelian disorders]Naomichi Matsumoto (Invited speaker) (Sheraton Mirage Resort & Spa Gold Coast, Gold Coast, Australia, April 24, 2012)

神戸大学大学院医学研究科講義・松本直通
「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24
年 5 月 29 日・神戸大学医学部

第 5 回みやこ小児神経臨床懇話会（特別講演）・松本直通・「小児神経疾患における遺伝子研究の新潮流」H24 年 6 月 9 日・メルパルク京都

2012 イルミナ次世代シーケンサーユーザーフォーラム・松本直通（招待講演）・「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24 年 6 月 20 日・東京国際フォーラム

European Human Genetics Conference 2012
Naomichi Matsumoto“Genetic abnormalities in Coffin-Siris

syndrome”(poster) (Nuremberg Conference Center, Nuremberg, Germany, June 24-24, 2012)

次世代シーケンス拠点班（松本班）講演会
松本直通「次世代シーケンスを用いた遺伝性疾患へのアプローチ」H24 年 7 月 10 日・大宮ソニックシティ・大宮

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター学術セミナー 松本直通「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24 年 7 月 13 日・埼玉医科大学

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業「次世代遺伝子解析装置を用いた難病研究」平成 24 年度第 1 回公開ワークショップ・松本直通「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築」H24 年 9 月 6 日京都大学医学研究科芝蘭会館

第 34 回日本生物学的精神医学会・シンポジウム 1・松本直通（シンポジスト）「自閉症スペクトラムとてんかんに着目したゲノム解析」2012 年 9 月 28 日・神戸国際会議場

厚生労働科学研究費・難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班・「病態に根ざした ALS の新規治療開発」分科班・平成 24 年度ワークショップ・松本直通「次世代シーケンサーを活用した遺伝性疾患の網羅的エクソーム解析」平成 24 年 10 月 5 日@東京(シェーンバッハサボー)

Translational Genomics Conference 2012
Naomichi Matsumoto (Keynote speaker)
Exome sequencing in mendelian disorders.
(Hyatt Reagency Jeju, Jeju, Korea, Oct 13,
2012)

生命医薬情報学連合大会 2012・松本直通(招
聘講演)「遺伝性疾患のエクソーム解
析」平成 24 年 10 月 17 日@東京(タワ
ーホール船堀)

人類遺伝学会第 57 回大会・ランチョンセミ
ナー 1「遺伝性疾患の効率的な次世代
シーケンス解析」(アジレント共催)平
成 24 年 10 月 25 日京王プラザホテル(東
京)

The 57th annual meeting, Japanese Society of
Human Genetics・Naomichi Matsumoto
(Symposist)“Isolation of genes causative
for genetic diseases by next generation
sequencer”in Symposium 5 entitled “Next
Generation Sequencing for
disease-genome analysis”. Oct 25, 2012 at
Keoi Plaza Hotel, Tokyo

ゲノム解析懇話会(トランスジェニック共
催)・松本直通「次世代シーケンスを用
いた疾患ゲノム解析」平成 24 年 10 月
25 日京王プラザホテル(東京)

人類遺伝学会第 57 回大会・基本講座・いま
さら聞けない「遺伝医学」・松本直通(講
師)「次世代シーケンサー入門」平成 24
年 10 月 26 日京王プラザホテル(東京)

新学術領域研究「転写サイクル」平成 24 年
度第 1 回領域会議・松本直通「SWI/SNF
複合体異常が来す Coffin-Siris 症候群」
平成 24 年 10 月 29 日・長崎大学医学部
良順会館

American Society of Human Genetics Meeting
2012. Matsumoto N, Tsurusaki Y, Miyake
N Mutations affecting components of the
SWI/SNF complex cause Coffin-Siris
syndrome November 8, 2012 at Moscone
Center, San Francisco, CA, USA

平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム成
果報告会・松本直通「発達障害に関わ
る分子異常探索」平成 24 年 11 月 21 日
京都リサーチパーク・京都

平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム課
題 F 発達障害研究チーム第二回分科
会・松本直通「発達障害に関わる分子
異常探索」平成 24 年 11 月 22 日京都リ
サーチパーク・京都

The 12th annual meeting of East Asian Union of
Human Genetics Societies. Matsumoto
Naomichi (oral presentation) “Medelian
exome”Nov 29, 2012 at Seoul National
University Hospital, Seoul, Korea.

第 152 回染色体研究会・特別講演・松本直
通「エクソーム解析」平成 24 年 12 月 1
日・東京医科大学病院・東京

精神・神経疾患研究開発費 23-5「筋ジスト
ロフィーおよび関連疾患の診断・治療

開発を目指した基盤研究」平成 24 年度
「西野班」班会議特別講演・松本直通
「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成
24 年 12 月 8 日・JA 共済ビル・東京

第 35 回日本分子生物学会年会ワークショ
ップ・精神のオミックス(オーガナイザ
ー内匠透・松本直通)松本直通「発達障
害におけるゲノム解析：次世代技術を
用いて」(シンポジスト)平成 24 年 12
月 13 日福岡国際会議場・福岡

Advans 研究会 2012・招聘講演・松本直通「遺
伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年
12 月 15 日ホテルグランドパレス・東京

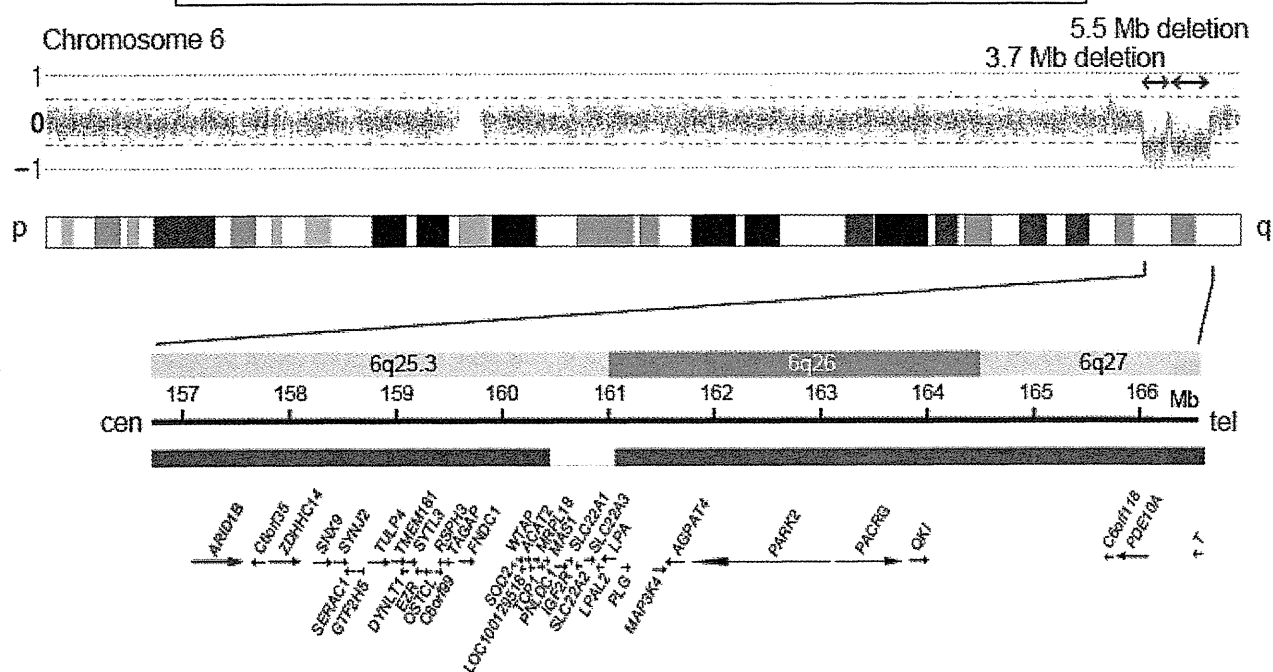
H. 知的財産権の出願・登録状況

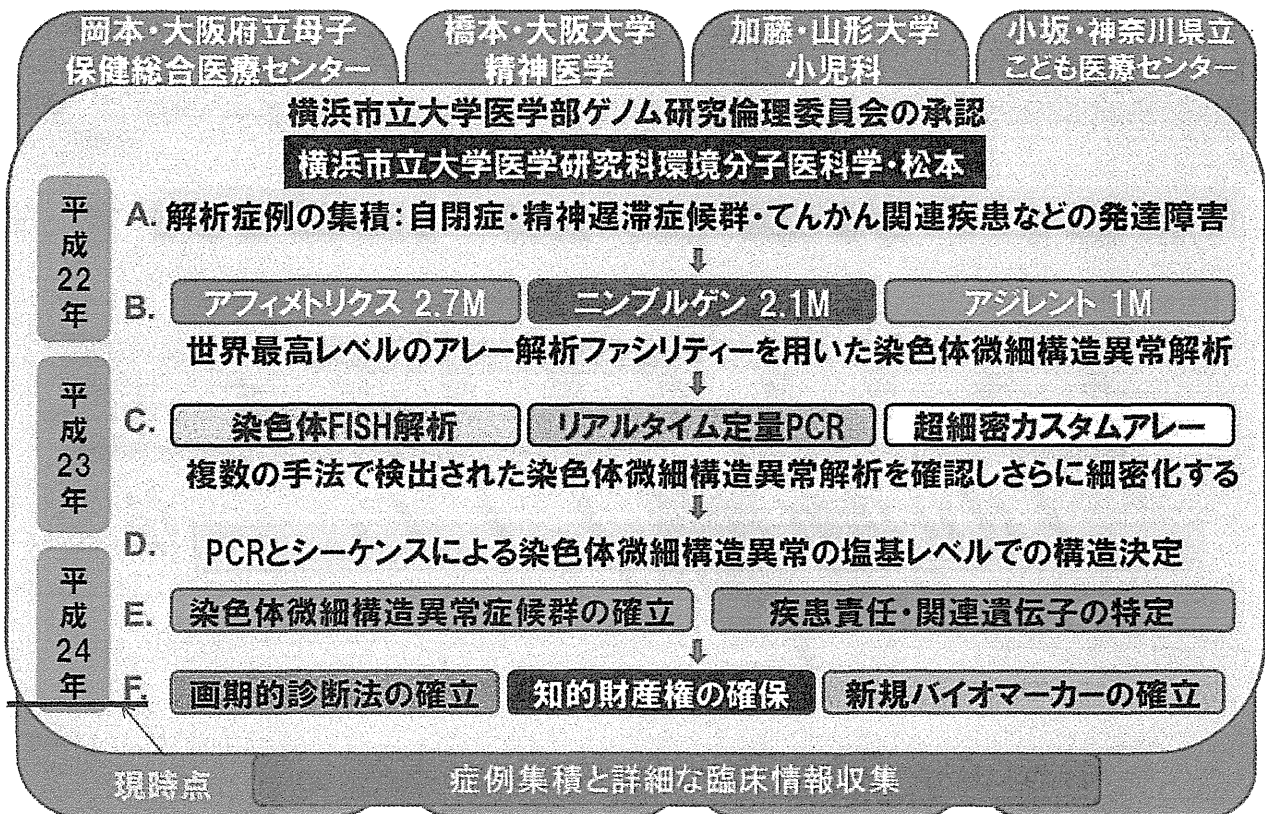
PCT/JP2012/83113 松本直通／鶴崎美徳／三
宅紀子・コフィンーシリス症候群の検出
方法・平成 24 年 12 月 20 日

PCT/JP2012/77903 才津浩智／松本直通・孔
脳症又は脳出血のリスクを予測する方
法・平成 24 年 10 月 29 日

特願 2012-180356・松本直通／三宅紀子・ミ
トコンドリア複合体 III 欠乏症の確定診
断法・平成 24 年 8 月 16 日

図 1. 責任遺伝子 *ARID1B* を含む 6q25.3-q27 微細欠失の同定





厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
平成24年度分担研究報告書

超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究

分担研究課題：16番染色体短腕のゲノムコピー数増加と自閉症

分担研究者：大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科 岡本伸彦

研究要旨

マイクロアレイ解析では従来の染色体検査では同定困難であったゲノムコピー数の変化が的確に把握できる。米国では多発先天奇形や精神遅滞あるいは自閉症に対して、第一段階で実施すべき検査と位置づけられている。16番染色体短腕のコピー数増加を伴う自閉症2例を報告し、症状や検査所見の分析を行い、文献的考察を行った。16p12.2-11.2重複症候群は自閉症を主要症状とする新規の微細構造異常症候群と考えられた。16p13.11重複症候群は臨床所見に幅が広いと考えられた。自閉症では親に患児と同じコピー数変化を認める場合もあるが、それで病的意義が否定されとは限らず、慎重な結果の解釈と遺伝カウンセリングが必要である。

共同研究者	けられている。16番染色体短腕のコピー数
大阪府立母子保健総合医療センター	増加を伴う自閉症2例を報告し、症状や検査
遺伝診療科	所見の分析を行い、文献的考察を行った。
大町和美、山本悠斗、井上佳世、三島祐子	自閉症の原因究明にマイクロアレイ染色体
三菱化学メディエンス	検査は重要な情報を提供するが、マイクロ
齋藤和正、松井健、原田直樹	アレイ染色体検査の実施に際して配慮すべき課題を探ること目的である。

A. 研究目的

マイクロアレイ染色体検査では従来の染色体検査では同定困難であったゲノムコピー数の変化が的確に把握できる。米国では多発先天奇形や精神遅滞あるいは自閉症に対して、第一段階で実施すべき検査と位置づ

B. 研究方法

当センターを受診している自閉症を主とした原因不明の精神運動発達遅滞例を対象とした。両親からインフォームド・コンセントを得て解析を行った。末梢血リンパ球か

らDNAを抽出した。Affimetrix SNP array 6.0を用いた。解析は三菱化学メディエンスにおいて実施した。

C. 研究結果

症例の臨床的事項について述べる

(症例1)

発達遅滞、自閉症の9歳女児。

38週3200gで出生。歩行開始は1歳5ヶ月と遅延。言語発達遅滞、衝動性、多動性あり。社会性、会話能力が低く、4歳で自閉症の診断を受けた。小学校は特別支援学級。発音は不明瞭で不器用さ目立つ。記憶力はよく、記号や道順へのこだわりなど、自閉症の基準を満たす。G-bandは46, XXで正常女性核型であった。一般血液検査異常なし脳波検査で棘波を認めたが、現在までてんかん発作なし。頭部MRIでは異常なし。円形顔貌、豊かな頬、大きな口など特徴的であった。多毛を認めた。8歳時の計測では身長112cm(-2.2SD)、体重21.5kg (-0.7SD) と小柄であった。頭囲53cm (0.9SD) と相対的大頭であった。

9歳になって、会話能力が向上し、ひらが

な、カタカナの読み書きも上達した。指を使う程度の計算も可能になった。こだわり行動は続いており、自閉症スペクトラムの診断基準は満たしている。

マイクロアレイ解析で16p12.2-11.2重複症候群と判明。16番短腕に約6.7Mbの重複を認めた。FISHでの確認も行った。両親には重複を認めなかった。

(症例2)

自閉症、精神運動発達遅滞の4歳女児

在胎36週2050gにて出生、周産期異常なし。額定10ヶ月、手をついて独座14か月、ずりばい移動や立位は不可。有意語なし。1歳10か月時、熱性けいれん重積あり、1歳11か月時、全身強直発作あり、てんかんの診断で抗けいれん剤を投与開始となった。脳波で棘波あり。

頭部MRIでは脳室、脳槽拡大、前頭葉・側頭葉全部の萎縮あり。一般血液検査、尿中有機酸分析、トランスフェリン糖鎖解析等で代謝異常を疑う所見なし。G-bandでは46, XXと正常女性核型。身長109.0cm(+1.9SD) 体重22.0kg(+2.7SD) と体格は大きい。斜視、低緊張の顔貌あり。運動発達遅滞に加えて、

言語や対人面の遅れなど自閉症スペクトラムの基準に合致する所見を認めた。

マイクロアレイ解析で16p13.11重複症候群と判明。約1.2Mbの重複が16番染色体短腕に同定された。この重複は、FISHにおいても確認された。親の一方に同じ重複を認めた。

D. 考察

16番染色体短腕は繰り返し配列が集積し、非アレル性相同組み替え (non-allelic homologous recombination: NAHR) が生じやすい領域である。

最もよく知られている16p11.2欠失症候群は自閉症、注意欠陥多動症、てんかん、肥満などと関連する。特徴的顔貌、頭囲大を示す場合もある。593kbのほぼ共通した領域の欠失が認められる。欧米では多数例の自閉症患者を対象としたマイクロアレイ解析で多数例が報告されている。自閉症の1%程度で出現するとい報告が複数存在する。しかし、軽度遅滞ないし無症状の親も児と同じ欠失を持つことがある。16p11.2重複も発達正常な例が存在する。

16p11.2欠失症候群よりもややテロメア側の16p12.2-11.2欠失症候群が報告されている1)。The chromosome 16p12.2-p11.2 deletion syndrome, 7.1- to 8.7-Mb [#613604]としてOMIMにも登録されている。平坦な顔面、前頭部突出、眼瞼裂斜下、内眼角贅皮、耳介低位、眼の位置が奥まっている、などの特徴的顔貌に加え、哺乳・摂食障害、乳児期の筋緊張低下、低身長、特に言語発達を中心とする精神運動発達遅滞を認める。感染症、特に中耳炎を繰り返すことが多く、滲出性中耳炎になりやすい。一部の症例は先天性心疾患や胃食道逆流症を伴う。現在まで数例が報告されている。

症例1に認められた16p12.2-11.2重複症候群はまだ疾患単位としては確立していないが、16p12.1-11.2欠失症候群の領域の重複による疾患である。徐々に症例は増えている2-4)。軽度から重度の知的障害、自閉症、低身長、特徴的顔貌、指趾異常などを特徴とする。過去に報告された数例の検討では、顔貌においては共通した異常は認められておらず、身体所見から本症候群を疑うことは困難である。16p12.2-11.2欠失症

候群は精神運動発達遅滞を特徴とするが、自閉症状は報告されていない。これに対して16p12.2-11.2重複症候群は自閉症を特徴とする。自閉症を対象にしたマイクロアレイ解析で症例が増加する可能性がある。表1に自験例を含めた、本症候群の過去の報告例のまとめを示す1-4)。

両親に重複を認めなかったことより、このコピー数変化は突然変異と考えられた。

症例2にみられた16p13.11欠失症候群は知的障害、自閉症、統合失調症、てんかん、注意欠陥多動症などの発達障害や精神疾患と関連が知られている5)。多数例のマイクロアレイ解析により、16p13.11重複も知的障害や自閉症、てんかんの症例の中に見いだされている。表2に過去の症例のまとめを示す。しかし、症例2のように無症状の親や同胞にも重複が見いだされることが知られている。家系内で共通のゲノムコピー数の変化を持ちながら、症状が不一致である現象は先述した16p11.2欠失や16p11.2重複なども知られている。16p12.1欠失や16p12.1重複の場合、この単独の欠失や重複だけでは発症せず、他の領域のコピー数変化

が加わることで発達遅滞が顕著になるという、「two hit theory」が提唱されている。児と親にマイクロアレイで同じCNVが存在するが、児にのみ症状を認める場合、児にはマイクロアレイで検出できない別の遺伝子変異が生じている可能性がある。

マイクロアレイ染色体検査で得られた結果については慎重な分析、結果の解釈が必要である。一般的には親に同じ異常がみられた場合は病的意義がないものと考えることが多いが、自閉症など発達障害においては、親子で同じ異常があっても病的でないと断定できない場合がある。第1の理由として、患児において、マイクロアレイで検出されない別の異常が隠れている可能性は否定できないことがあげられる。次世代シーケンサーなどを用いた自閉症関連遺伝子の解析も合わせて実施する必要があると思われる。第2の理由として、親にも発達障害があるが、軽症のために認識されずいたり、成人期に病像が変化している可能性が考えられる。両親の小児期の状況について詳細な問診が必要であるが、現実的には正確な診断は困難な場合が多いと思われる。

る。第3に父親由来と母親由来で遺伝子の発現に差が生じる可能性があり、刷り込みをうける遺伝子では注意が必要である。その他の環境要因の関与の可能性も存在する。

自閉症例のマイクロアレイの結果を患者家族に説明する場合、誤解のないように慎重に遺伝カウンセリングを実施する必要があると考えられる。

E. まとめ

自閉症例においてマイクロアレイ染色体検査で16番染色体短腕のコピー数増加を伴う2例報告した。無症状の親にも同じ変化がみられた例があり、結果の解釈には慎重な考察が必要と考えられた。

【参考文献】

- 1) Ballif BC, Hornor SA, Jenkins E, et al. Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. Nat Genet 2007;39:1071-107.
- 2) Finelli P, Natacci F, Bonati MT, et al. FISH characterisation of an identical (16)(p11.2p12.2) tandem duplication in two unrelat-

ed patients with autistic behavior. J Med Genet 2004;41:e90.

- 3) Tabet AC, Pilorge M, Delorme R, et al. Autism multiplex family with 16p11.2p12.2 microduplication syndrome in monozygotic twins and distal 16p11.2 deletion in their brother. Eur J Hum Genet 2012;20:540-546.
- 4) Barber JC, Hall V, Maloney VK, et al. 16p11.2-p12.2 duplication syndrome; a genomic condition differentiated from euchromatic variation of 16p11.2. Eur J Hum Genet. [2012 Epub ahead of print]
- 5) Nagamani SC, Erez A, Bader P, et al. Phenotypic manifestations of copy number variation in chromosome 16p13.11. Eur J Hum Genet. 2011;19:280-6.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文

別掲

H. 知的財産権の出願・登録

なし

表 1 16p12.2-p11.2 重複症候群の報告例のまとめ

	Finelli et al. [2004] Patient 1	Ballif et al. [2007] Subject 5	Tabet et al. [2012] Patient 2 (MZ tw in)	Tabet et al. [2012] Patient 3 (MZ tw in)	Barber et al. [2012] Patient 1	Barber et al. [2012] Patient 2	症例 1
重複サイズ[Mb]	8Mb Dup	5.7 Tri 1.1 Dup	8.95 Mb Dup	8.95 Mb Dup	7.7-8.1 Mb Dup	7.8-8.4 Mb Dup	6.7 Mb Dup
診断年齢	25years	10years	17years	18years	15years	45years	8years
性別	M	F	M	M	F	M	F
発達遅滞	+	+	+	+	+	+	+
知的障害	重度	重度	重度	重度	中度	+	軽度
てんかん	+				-	-	-
脳波異常	+				-		+
自閉症	+	+	+	+	+	-	+
強迫行為	+				+	+	+
常同行為	+	+	+	+	+		+
社会的問題	+	+	+	+	+		-
身長 (centile)	<3rd %	-3~4SD	normal	normal	<p25	0.4 th %	-2.2SD
体重 (centile)	<3rd %	-2SD	-2SD	-1SD	<p25		-0.7SD
頭囲 (centile)	25th %	-1SD	-1SD	-1SD	<p50	Macro	0.9SD
顔貌							
円形顔貌		+	-	-			+
三角顔貌		-	+	+			-
眉間突出		-	+	+	+		-
鼻根部平低	+	+	+	+	+		+
眼瞼裂斜上		-	+	+	-	-	-
落ち窪んだ眼		-	+	+			-
眼間開離	+	+	+	+			-
眼振 斜視		+	+	+		+	-
前向き鼻孔		+			+		-
上口唇異常	+				-		-
耳介低位	-				+	+	+
大きな口	+	+					+
豊かな頬		+					+
小下顎・後退		-	-	-	-	+	-
手指異常	+	FP	+	+	-	短指	FP
多毛							+

Tri: Triplication Dup: Duplication FP: Fetal pads