

- A, Furuya N, Aida N, Masun M, Yamada K, Kurosawa K. Expression Analysis of a 17p Terminal Deletion, including YWHAE, but not PAFAH1B1, associated with normal brain structure on MRI in a young girl. *Am J Med Genet Part A* 2012;158A:2347-2352.
- 5) 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* 2012;171:301-305.
- 6) Asakura Y, Muroya K, Sato T, Kurosawa K, Nishimura G, Adachi M. First case of a Japanese girl with Myre syndrome due to a heterozygous SMAD4 mutation. *Am J Med Genet A*. 2012;158:1982-6.
2. 学会発表
- 1) 黒澤健司、富永牧子、榎本啓典、石川亜貴、齋藤敏幸、永井淳一、和田敬仁、小坂仁、古谷憲孝、升野光雄 マイクロアレイ染色体検査の需要の推定 第35回日本小児遺伝学会 2012.4.19. 久留米
- 2) 富永牧子、榎本啓典、石川亜貴、古谷憲孝、安達昌功、小坂仁、升野光雄、黒澤健司 小児病院におけるマイクロアレイ CGH の臨床導入 第115回日本小児科学会 2012.4.20-22. 福岡
- 3) 黒澤健司、富永牧子、和田敬仁、鮫島希代子、石川亜貴、高野亨子、井合瑞江、小坂仁、山下純正 小児病院におけるマイクロアレイ CGH 染色体検査の問題点 第54回日本小児神経学会 2012.5.17-19. 札幌
- 4) 榎本啓典、近藤達郎、水野誠司、安達昌功、室谷浩二、眞鍋理一郎、SengstagThierry、富永牧子、石川亜貴、黒田友紀子、古谷憲孝、西川智子、山内泰子、井田一美、成戸卓也、升野光雄、黒澤健司 Trio+1 エクソーム解析による Young-Simpson 症候群の責任遺伝子同定 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 5) 黒田友紀子、榎本啓典、富永牧子、古谷憲孝、齋藤敏幸、永井淳一、升野光雄、黒澤健司 知的障害、肥満を認めた 17p13.1-p13.2 重複の女兒例 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 6) 大城亜希子、富永牧子、古谷憲孝、黒田友紀子、井合瑞江、升野光雄、黒澤健司 Down 症候群責任領域を含む 2.6Mb の 21q22 部分欠失の一男児例 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 7) 成戸卓也、井田一美、黒田友紀子、富永牧子、榎本啓典、古谷憲孝、黒澤健司 デスクトップ型次世代シーケンサーを用いた歌舞伎症候群の MLL2 遺伝子変異解析 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 8) 井田一美、成戸卓也、富永牧子、黒田友紀子、古谷憲孝、中川栄二、後藤雄一、升野光雄、黒澤健司 MID1 遺伝子の一部を含む Xp22.2 に 310kb の微細欠失を認めた Opitz/BBB 症候群の1家系 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 9) 榎本啓典、菅原祐之、保立麻美子、元吉八重子、畠井芳穂、水谷修紀、黒澤健司 まれな合併症を伴う TSC2-PKD1 隣接遺伝子症候群の一例 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 10) Yamanouchi Y, Nishikawa T, Enomoto K, Furuya N, Mizuno S, Kondo T, Adachi M, Muroya K, Masuno M, Kurosawa K. Support for patients with Young-Simpson syndrome, their families and other peoples concerned: Study of patients and family group meetings. 62nd America Society of Human Genetics, San Francisco 2012.11.6-10.
- 11) Kurosawa K, Enomoto K, Kondoh T, Mizuno S, Adachi M, Muroya K, Yamanouchi Y, Nishikawa T, Furuya N, Tominaga M, Kuroda Y, Naruto T, Ida K, Sengstag T, Manabe R, Masuno M. Trio-exome sequencing identifies mutations of the gene encoding the histone acetyltransferase KAT6B/MYST4 in individuals with the Young-Simpson syndrome. 62nd America Society of Human Genetics, San Francisco 2012.11.6-10.
- 12) Kuroda Y, Saito T, Nagai J, Ida K, Naruto T, Masuno M, Kurosawa K. Microdeletion of 19p13.3 in a girl with Peutz-Jeghers syndrome, intellectual disability, hypotonia, and dysmorphic features. 62nd America Society of Human Genetics, San Francisco 2012.11.6-10.
- 13) Enomoto K, Sugawara Y, Hotate H, Motoyoshi Y, Hatai Y, Mizutani S, Kurosawa K. TSC2-PKD1 contiguous deletion syndrome with aortic stenosis and severe myopia. 62nd America Society of Human Genetics, San Francisco 2012.11.6-10.
- 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

表 1. Marfan 症候群類縁疾患・Ehlers-Danlos 症候群解析パネル

診断名	遺伝子
Marfan syndrome	FBN1、
Loeys-Dietz syndrome	TGFBR1、TGFBR2、SMAD3
CCA	FBN2
TAAD	MYH11, ACTA2, MYLK
Ehlers-Danlos syndrome	COL5A1, COL5A2
EDS kyphoscoliosis (VI)	PLOD
EDS vascular (IV)	COL3A1
Homocystinuria	CBS
Arterial tortuosity syndrome	SLC2A10
Tenascin deficiency	TNXB
EDS VIIA, B	COL1A1, COL1A2
EDS musculocontractural type	CHST14
Occipital horn cutis laxa	ATP7A
Cutis laxa	FBLN5, FBNL4(EFEMP2), ATP6VA2, PYCR1
Aortic valve disease	NOTCH1
Stickler syndrome	COL2A1, COL9A1, COL11A1, COL11A2, COL9A2

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

脳形成障害およびシナプス形成障害の遺伝学的成因に関する研究

研究分担者 齋藤伸治
名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野 教授

研究要旨

脳形成障害およびシナプス形成障害の遺伝学的成因を明らかにすることを目的として、患者集積および解析を行った。脳形成障害患者は先天性水頭症、大脳皮質形成障害と大頭症の計3例のエクソーム解析を行い、大頭症の患者においてAKT3のde novo変異を同定した。シナプス形成障害としてはアンジェルマン症候群をターゲットとして、11例に対して候補遺伝子の網羅的解析を実施した。その結果、UBE3A変異を1例に、SCN2A複合ヘテロ変異を1例に同定した。この結果から、本研究スキームの有用性が示された。

A. 研究目的

脳形成に関わる遺伝子は多岐にわたる。また、異なった遺伝子の変異により、共通した病態をとるために、脳形成障害の遺伝子診断は困難であった。ところが、ハイスループットの新しい遺伝子解析技術の発展により、複数の遺伝子を網羅的に解析することが可能になった。網羅的遺伝子解析は脳形成障害の原因の同定に強力なツールとなっている。マクロな形成障害のほかにシナプス形成障害はミクロな形成障害といえる。シナプス形成障害は知的障害や自閉性障害の共通した病因として注目されている。本研究では、原因不明の脳形成障害に加えて、シナプス形成障害のモデルのひとつであるアンジェルマン症候群（AS）を対象として網羅的遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

脳形成障害チームにおいて開発された、脳形成に関与する284遺伝子の網羅的解析とエクソーム解析を実施した。解析の対象は原因不明の脳形成障害3例（先天性水頭症、大脳皮質形成障害、大頭症）についてはエクソーム解析の同意を得て、両親検体と一緒にトリオ解析を実施した。シナプス形成障害モデルであるアンジェルマン症候群患者11例については284遺伝子パネルを用いた解析を実施した。病因である可能性が高い変異が同定された場合に可能であれば両親解析を実施した。

（倫理面への配慮）

個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。遺伝子解析に際しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

C. 研究結果

1) エクソーム解析

エクソーム解析は3家系に実施したが、解析は1例においてのみ終了している。解析が終了した大頭症の1例には、15個の非同義変異が同定されたが、その中のひとつAKT3に同定されたc.688A>G; p.N229S変異はごく最近、同様の表現型を示す大頭症患者にRiviereらにより報告された変異(Nat Genet 44:934-45, 2012)と同一であった。そこで、サンガー法にて両親を含めて解析した結果、de novoの変異であることが確認された。RiviereらはAKT3変異例はmegalencephaly polymicrogyria polydactyly hydrocephalus (MPPH)の表現型をとると報告したが、本例では多指症を伴わず、AKT3変異の表現型の多様性を示すことができた。

284遺伝子解析は現時点で4例において終了している。その中で、1例にはASの原因遺伝子であるUBE3Aのc.1013A>C; p.S143R変異を同定した。サンガー法にて両親を含めて解析した結果、de novoの変異であることが確認された。UBE3Aは次世代解析の前にすでにサンガー法での解析を終了していたが、見逃されていた。さらに別の1例においてSCN2A遺伝子の複合ヘテロ変異(c.514A>G; p.I172V, c.3623A>G; p.N1208S)を同定した。前者は母由来、後者は父由来であり、両親はそれぞれの保因者であった。残りの2例では病因となる変異は同定できなかった。

D. 考察

本解析の約半数は現在解析中であり、今回は中間的な報告にとどまっている。しかし、既に、網羅的解析に意義を強く示す結果である。エクソーム解析は1例のみで解析が終了しており、原因遺伝子の同定が可能であった。エクソーム解析技術の発展により候補遺伝子を少数に絞り込むことができる。本例においても15個の候補遺伝子が同

定され、その中に、既報の遺伝子が存在したことで、原因遺伝子が同定された。この程度の数であれば、bioinformaticsや複数症例の共通解析などを行うことで、高い確率で原因の同定に辿り着くことができる。即ち、必ずしも表現型が共通していない孤発例の解析においても、エクソーム解析の意義が高いことを示している。脳形成障害は表現型が多彩であるために、同一遺伝子の変異においても異なった所見を呈することは良く知られている。そのため、表現型から絞り込むことは難しい場合が多い。従って、形成障害を広く対象とするエクソーム解析は、原因遺伝子同定に欠かせない手法と位置づけることができる。

一方で、284個の遺伝子解析パネルはより診断的な位置づけとしての役割が期待される。エクソームと異なり、遺伝子機能が確立している遺伝子のみを搭載しているため、解釈が容易であり、機能解析へつなげることができる。今回解析が終了した4例中2例（50%）において原因遺伝子を同定したことは、パネルの意義を明瞭に示している。同定された1例では、すでにサンガー法が行われていたUBE3A遺伝子を見逃しを発掘した。サンガー法はスループットが低いために、カバー率が低く、ノイズの存在等から一定の確率で見逃しがあることが指摘されている。次世代シーケンス技術は高いカバー率とコンピュータによる解析により、見逃しが低い。今回の結果は、シーケンス解析における次世代技術の有用性を示しており、今後のシーケンス解析の標準として位置づけられる可能性を示している。また、SCN2A変異はこれまでの報告では主として新生児けいれんの原因遺伝子として捉えられており、難治性てんかんの原因としての報告は少数みられるのみであった。本例においては、複合ヘテロ接合のために、正常の配列を持たないこととなる。このことは、同一遺伝子が複数の表現型を示すことの良い例となると考える。実際、他のイオンチャネル遺伝子においても、表現型の幅は従来考えられていたよりも多く、また、遺伝子型表現型連関は必ずしもはっきりしないことが報告されている。非典型的な症状の例の原因がすでに報告のある異なった疾患の原因遺伝子である可能性は、想像以上に多いと思われる。そのため、知的障害や脳形成障害などにおいては、原因遺伝子の同定には網羅的解析が欠かせない役割を果たすことになる。

今回の解析で使用した284遺伝子が適切かどうかは、多数の解析によりそれぞれの遺伝子の意義に関するデータを蓄積することが必要である。臨床応用においては、エクソーム解析のように評価できない遺伝子を多数含む解析は馴染まない。診断に適切な遺伝子パネルの構築が重要であり、本研究で用いたパネルはそのプロトタイプとしての価値があると考えられる。

E. 結論

網羅的遺伝子解析は脳形成障害などの先天性神経疾患の解析に強力なツールであり、原因遺伝子同定から臨床診断まで幅広い応用が期待できる。

今回のパネル作成はプロトタイプとしての重要な意義を有している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hosoki K et al. Hand-foot-genital syndrome with a 7p15 deletion demonstrates a clinically recognizable syndrome. *Pediatr Int* 54:e22-25, 2012.
- 2) Hosoki K et al. Clinical Phenotype and Candidate Genes for the 5q31.3 Microdeletion Syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:1891-1896, 2012.
- 3) Kawamura R et al. Visualization of the spatial positioning of the *SNRPN*, *UBE3A*, and *GABRB3* genes in the normal human nucleus by three-color 3D-fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 20:659-672, 2012.
- 4) Tsurusaki Y et al. A *DYNC1H1* mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenetics* 13:327-332, 2012.
- 5) Takenouchi T et al. Tissue-limited ring chromosome 18 mosaicism as a cause of Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:2621-3, 2012.
- 6) Egawa K et al. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci Transl Med* 4:163ra157, 2012.

2. 学会発表

- 1) 根岸豊ら. Three siblings of Leigh syndrome associated with a mitochondrial m.3697G>A mutation. 第54回日本小児神経学会 平成24年5月17-19日（札幌）
- 2) 齋藤伸治ら. *DYNC1H1* 変異は特異な大腿四頭筋優位神経原性筋萎縮症の原因となる、第57回日本人類遺伝学会 平成24年10月25-27日（東京）
- 3) Hosoki K et al. Submicroscopic chromosomal rearrangements in patients with an Angelman syndrome-like phenotype. 62th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11/7-10/2012
- 4) Saitoh S et al. A *DYNC1H1* mutation causes a quadriceps-dominant neurogenic muscular atrophy. 62th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11/7-10/2012
- 5) Saitoh S et al. Molecular genetic investigation on patients with Angelman syndrome in Japan: experience on 168 deletion-negative cases. 2012 Meeting of Angelman syndrome Foundation. Washington DC, USA, 6/26-17, 2012.

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

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

遺伝子解析における患者家族向け説明同意文書に関する研究
- 単一遺伝子解析用説明同意文書とエクソーム解析用同意文書の比較と問題点 -

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

次世代シーケンサー（NGS）の開発により遺伝子の塩基配列の解読速度が飛躍的に向上した。先天奇形症候群の遺伝子解析においても、従来のキャピラリーシーケンス法による単一遺伝子の解析から、NGSによるゲノム上の全エクソンの解析に移行しつつあり、これにともない患者家族への説明においても将来のエクソーム解析まで含めた解析を前提にした新たな説明同意文書を用いるようになった。従来の単一遺伝子解析用の説明同意文書を用いた時期の家族への説明に比べて、エクソーム解析を前提とした新しい説明同意文書を用いた説明を開始した以降に、患者家族の理解や受け止め方がどのように変化したかについて、診療録と説明者の感想を元に検討した。

次世代シーケンサーの解析用説明同意書を用いた説明では、染色体、遺伝子、DNAなどの基本的な遺伝学の知識を患者家族が理解することが必要であるために説明に多くの時間を要した。一方、患者家族の遺伝学的事項の理解の程度が向上し、十分に理解した家族においては研究事業への参加意識が高く解析にも協力的な例が多かった。

NGSを用いた遺伝子解析を行う際の患者家族への説明は、ゲノム俯瞰的検査としての遺伝学的事項の理解を必要とするため、結果的に患者家族がより正確で深い理解を得るに至り、研究事業全体の参加意識の向上にも繋がると考えられた。これらの説明と同意取得には遺伝カウンセラーなどの関連専門職の関与も有用であった。

研究協力者

小崎健次郎（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）

A. 研究目的

医療機関における遺伝学的検査は、血液検査や生化学検査などの通常の臨床検査とは性格を異にする。それは3つの特殊性すなわち、その結果は生涯変わらない「普遍性」、将来の疾患発症を示す「予見性」、血縁関係者の情報も同時に示すことになる「共有性」があるからであると言われる。遺伝学的検査を受ける患者や未成年者の場合の親権者はその特殊性と遺伝学的検査の結果がもたらす意義を十分に理解して上で個人の意志として受ける必要がある。

そのための手続きとして、かつて2003年に遺伝関連10学会が「遺伝学的検査に関するガイドライン」を策定し遺伝学的検査を受ける患者への説明と同意についての理念とその方法について記載した。2011年2月には日本医学会が、「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」として、より現実の医療に近い方法での患者への説明と同意について指針を示した。それによると、すでに発症している患者の診断を目的として行われる遺伝学的検査の患者への説明の留意点として、

「検査前の適切な時期にその意義や目的の説

明を行うことに加えて、結果が得られた後の状況、および検査結果が血縁者に影響を与える可能性があること等についても説明し、被検者がそれらを十分に理解した上で検査を受けるか受けないかについて本人が自律的に意思決定できるように支援する必要がある。十分な説明と支援の後には、書面による同意を得ることが推奨される。これら遺伝学的検査の事前の説明と同意・了解（成人におけるインフォームド・コンセント、未成年者等におけるインフォームド・アセント）の確認は、原則として主治医が行う。また、必要に応じて専門家による遺伝カウンセリングや意思決定のための支援を受けられるように配慮する。」と示し、書面での説明と同意の取得を望ましいとした。

これらの指針を受けて、わが国では疾患を有する患者の遺伝子検査を実施する際に説明文書と同意文書を作成することが一般的となった。これが策定された当時のキャピラリー式シーケンサーの時代には1つの遺伝子を解読するのに数日を要するために、研究解析の対象遺伝子は1個から数十個までのあらかじめ特定できる数であり、書面でも対象の遺伝子を特定すること

が可能であった。

次世代シーケンサーの時代に入り飛躍的に塩基解読の速度が向上し2万を超える全遺伝子の解読が数日内に可能になると、解析対象は全遺伝子、全エクソンとなり、患者家族に対する説明もあらかじめ対象遺伝子を特定しない説明文書に変更されるとともに、検査結果の伝達方法や範囲についてもあらためて検討が必要となった。

我々は2012年度に改訂された慶應大学医学部臨床遺伝学センターで行う先天異常症候群に対する遺伝子解析の患者家族への説明同意文書を用いて患者家族に説明を行っている。それ以前の単一遺伝子用の説明文書を用いた時期との比較検討を行い、新たな説明同意文書導入後の患者家族の対応の変化について考察した。

B. 研究方法

対象と方法:対象は主に多発奇形/精神遅滞をもつ小児症例の親権者である両親(もしくは父、母単独)。

平成23年以前の単一遺伝子解析用説明同意文書を用いた時期と平成24年以後のエクソーム解析用の説明同意文書を用いた時期に行った遺伝子検査を受ける前提の事前説明もしくは遺伝カウンセリングにおいて、患者家族の対応や質問の内容を診療記録を参考に抽出し、その差異を後方視的に検討した。

(倫理面への配慮)

個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。遺伝子解析に際しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

C. 研究結果

・説明に要する時間

エクソーム解析説明同意文書を使用する後期において、患者家族への説明に要する時間が長くなった。前期の単一遺伝子検査に比べて、染色体、DNA、遺伝子、エクソン、塩基、など基本的な遺伝学事項の理解に時間を要した。診療時間内で理解できない両親に対しては別時間もしくは遺伝カウンセラーが対応した。

・説明内容の変化

従来の単一遺伝子解析の説明同意文書を用いた場合に比べて、染色体、DNA、遺伝子、エクソン、塩基、などの遺伝学用語についての基本的な事項を患者家族が十分に理解するための説明が増加した。

・患者家族の反応

エクソーム解析説明同意文書導入後の患者家族からの多い質問の一つは、解析によって目的の遺伝子以外の情報も調べられる/知ることができるか否かというものであった。この質問の背景には一つには疾患に関係しない遺伝情報についても同時に知ることができないかという積極的な期待を持つ場合と、知りたくない遺伝情報を伝えられてしまうのではないかという危機

の場合と両者がある。これについては、説明同意文書に記載してあるように、原則として疾患の原因遺伝子、ないしは疾患の関連遺伝子以外は解析しないことを伝えた。

・両親解析の理解

エクソーム解析を前提とするために、検体がトリオで必要であることを説明した。両親の検体提出が両親の解析の為では無く患児の診断の為に必要であることを理解する必要がある。次子再罹患率などの遺伝カウンセリングの目的の採血とは異なることの理解は比較的容易であり、両親採血を拒否されたケースは無かった。両親採血の必要性の説明の中で、一塩基多形や塩基レベルの突然変異の説明を行うために、むしろ疾患の遺伝学的な理解が深まった。

患児の解析と同様に、解析によって目的の遺伝子以外の情報も調べられる/知ることができるかどうかについての質問もあった。両親の検体採取は、基本的には患児の診断のためであり、原則として疾患の原因遺伝子、ないしは疾患の関連遺伝子以外は解析しないことを伝えた。

・その他

患者家族からの質問の多くは、対象となる遺伝子や結果の返し方など、すでに説明文書に記載してあるものであった。患者の基本的知識の程度に応じた説明が必要であり、遺伝カウンセラーの個別の対応が有用であった。

D. 考察

遺伝学的検査にはゲノム全体を対象として遺伝学的変異を探索する「俯瞰的検査」と、特定の部位、特定の遺伝情報のみを対象として行う「標的検査」に大別される。次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析は、仮にそれが特定の遺伝子ないしは遺伝子群を対象としたものであっても、最終的にはエクソーム解析を前提としているために、「俯瞰的検査」を行うことに等しい。

標的検査の場合には、検査を受ける時点で特定の診断名が付与されている場合が多い。医療者や患者が求める結果は、変異陽性か陰性の二者択一であり、その解析手法や遺伝学的現象への関心は薄い。医療者側も十分な説明がなくても検査を行う傾向がある。

一方俯瞰的検査は、可能性の高くない一つの結果を求めるものであり、患者家族が何らかの結果が出ることへの期待感が高い。必然的に解析のメカニズムや遺伝学的現象への関心も高くなる。

今回の新しいエクソーム解析用の遺伝学的検査の説明によって、患者家族が疾患の遺伝学的メカニズムの全体像をより深く理解するようになり、疾患の遺伝子研究事業に対しても協力的に関わる姿勢がみられた。患者によって理解の程度に差があるために、理解を補助するために遺伝カウンセラーの関与が必要な場面も単一遺伝子解析の場合に比べて多かったが、全体としては医療者と患者間のコミュニケーションが増えて信頼関係が深まる印象を持った。

患者家族の検査についての多い質問の一つは次子再罹患率や次世代への遺伝についての不安

であり、これは単一遺伝子解析の場合でもエクソーム解析の場合でも同じである。その説明に必要な基本的な遺伝学的事象についての理解が深まっているために正確な理解は困難ではなかった。

もう一つの多い質問は、遺伝情報の結果をどう伝えるかという結果説明の方法と、どこまでの遺伝情報が開示されるのかというその範囲であった。これについては、全エクソームの解析という事前説明のために、全ての疾患の遺伝子情報が解析されるという期待や誤解を生じることが十分に予測され、説明同意文書においてもそれを記載した。

一般論として、エクソーム解析で予見される倫理的問題の一つは、解析した全ゲノム情報を患者家族に提供できるか否か、もう一つは偶発的に発見した遺伝学的所見について患者に伝えるか否かである。これに関しては行政や学会レベルにおける倫理指針はまだ策定されていないが、今回用いた説明同意書では、予測される解析結果を、a. 先天異常と関係することが既に知られている遺伝子の変化。b. 先天異常と関係することは現時点では知られていないが、科学的にあたな先天異常と関連がある可能性が極めて高いと判断される遺伝子の変化。c. 病気と関係することがわかっているが、先天異常とは直接に関連がない遺伝子の変化。と3種類に分類し、a. の結果だけを知りたいのか、a. および b. の結果を知りたいのか、についてあらかじめ患者家族に選択してもらい、c については、先天異常とは直接に関連がない遺伝子の異常が見つかったとしても、伝える事はないとした。

実際にはこれらの記載があるにもかかわらず、面談では多くの場合に結果の伝え方と伝える範囲についての質問が多く、説明文書における重要なポイントを特に強調する必要性を感じた。

一般的には新しい技術の理解はそれを専門としない人には困難であるが、次世代シーケンサーによるエクソーム解析の理解は遺伝学的な基礎知識の説明を丁寧に行えば決して困難なものではなく、むしろ検査や研究事業への理解も深まる。説明と同意にはある程度のスキルと説明に要する時間が必要であり、遺伝カウンセラーや研究コーディネイターなどの関連専門職も今後必要となろう。

E. 結論

次世代シーケンサーによるエクソーム解析を前提とした説明同意文書を導入した結果、患者家族が疾患の遺伝学的メカニズムの全体像をより深く理解するようになり、疾患の遺伝子研究事業に対しても協力的に関わる姿勢がみられた。

臨床の現場では遺伝カウンセラーや研究コーディネイターなどの関連専門職の関与が有用であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M,

Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. *Hum Mutat.* 2012 Oct 17. doi: 10.1002/humu.22229. [Epub ahead of print]

- 2) Takanashi J, Okamoto N, Yamamoto Y, Hayashi S, Arai H, Takahashi Y, Maruyama K, Mizuno S, Shimakawa S, Ono H, Oyanagi R, Kubo S, Barkovich AJ, Inazawa J. Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations. *Am J Med Genet A.* 2012 Dec;158A(12):3112-8.

- 3) Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. *Hum Mutat.* 2012 Oct 17. doi: 10.1002/humu.22229. [Epub ahead of print]

- 4) Yagihashi T, Kosaki K, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Takahashi T, Sato Y, Kosaki R. Age-dependent change in behavioral feature in Rubinstein-Taybi syndrome. *Congenit Anom (Kyoto).* 2012 Jun;52(2):82-6.

- 5) Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J. The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. *Am J Med Genet A.* 2012 Jun;158A(6):1292-303.

- 6) 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. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet.* 2012 Mar 18;44(4):376-8

- 7) 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 Part A* 2012.158A:97-102.

2. 学会発表

- 1) S. Mizuno, M. Oshiro, M. Seishima, N. Okamoto, Y. Makita, N. Wakamatsu BRESHECK syndrome and IFAP syndrome are allelic disorders caused by mutation in MBTPS2 European Human Genetics Conference 2012, Nuremberg, Germany 2012.6

- 2) 水野誠司、西恵理子、谷合弘子、村松友佳子1、青木洋子、松原洋一 3歳以降まで原因不明の摂食障害を呈したNoonan症候群及びCFC症候群の3例 第35小児遺伝学会、

久留米 2012.4.19

- 3) 水野誠司、村松友佳子、谷合弘子、齋藤加世子、若松延昭 Mowat-Wilson 症候群の手指及び身体の形態的特徴 第 52 回日本先天異常学会学術集会 東京 2012.7.6
- 4) 水野誠司、西恵理子、村松友佳子、黒澤健司、岡本伸彦、鶴崎美徳、三宅紀子、松本直通 Coffin Siris 症候群の 2 例 - ARID1B 欠失例と変異例 - 第 57 回日本人類遺伝学会 2102.10.24

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
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

難治性脳形成障害症のデータ試料バンクを活用し、次世代シーケンサーを用いた脳梁欠損症の
遺伝子解析に関する研究

分担研究者 山崎 麻美
社会医療法人愛仁会高槻病院 副院長

研究要旨

我々はここ数年間、難治性脳形成障害症における臨床病態、画像情報、遺伝子情報、患者由来生体試料（組織・細胞・DNA）などのデータバンクを構築してきた。難治性脳形成障害症は疾患が多岐にわたり、正確な画像診断が要求される。我々は小児神経放射線の専門家による画像診断検討委員会で全ての症例をレビューし、確実な診断のもとに、全国28施設から284家系335症例の登録を行ってきた。その中で今回、脳梁欠損症の10症例において、病態解明のため、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。284の候補標的遺伝子群パネル解析を8例、全エキソーム解析を2例に行った。そのうち6例に脳梁欠損症の責任遺伝子として同定されていない遺伝子に異常があり、候補遺伝子の可能性を示唆するものとしてあがってきた。現在それらが、責任遺伝子であるかどうかについて、検討している。

研究協力者

吉岡絵馬¹、正札智子¹、高田愛¹、寺元千佳³、桢中正博²、金村米博^{1, 2}、原田敦子³、山中巧³
国立病院機構 大阪医療センター 臨床研究センター先進医療開発部¹、脳神経外科²、
社会医療法人愛仁会高槻病院小児脳神経外科³

A. 研究目的

超音波診断などの画像診断の進歩により、先天性水頭症を始めとした難治性脳形成障害症は現在、胎生期に同定されるようになった。2005年に『胎児期水頭症診断と治療ガイドライン』を刊行した。しかしながら胎児期脳室拡大と診断される中には、多くの脳形成障害疾患が含まれている。その一つが脳梁欠損症である。脳梁欠損症の中には、予後のよい単純な脳梁欠損症から複雑な合併症を有し、予後不良のものまでその病態は様々である。形態診断からさらに予後評価を確実にしていくために、遺伝子診断の果たす役割は大きい。脳梁欠損症は、いくつかの責任遺伝子が同定された疾患もあるが、まだまだそれは一部にすぎない。今回、次世代シーケンサーを用いて脳梁欠損症の遺伝子解析を行ない、脳梁欠損症における遺伝子診断、病因探索の可能性を追求していく。

B. 研究方法

我々のところで立ち上げている難治性脳形成障害症（fetal brain malformation）サーバー（<http://fms.fetal-brain-malformation.jp>）には、284家系335症例が登録されている。そのうち画像診断、病理診断などによりなんらかの形態診断がついているものが243家系あった。244家系の症例の内訳は、重症水頭症64家系、全前脳胞症10家系、脳梁欠損症27家系、神経細胞移動異常症34家系、ダンディウォーカー症候群などの小脳異常17家系、水無脳症1家系、二分頭蓋（脳瘤）12家系、脊髄髄膜瘤43家系、骨

系統疾患14家系、骨疾患14家系、小頭症15家系、大頭症13家系その他の上記に分類されない脳形成異常症14家系であった。この中の、脳梁欠損症について次世代シーケンサーを用いて検索した。脳梁欠損症の分類は、脳梁欠損症のみを呈するいわゆる単純型（図1）が7家系、その他の合併奇形を伴う複雑型5家系、大脳半球間裂嚢胞を伴うもの（図2）が15家系であった。

脳梁欠損症単純型5家系6例、複雑型2家系2例、大脳半球間裂を合併するもの2家系2例の9家系10症例を選択し、今回次世代シーケンサー法にて遺伝子解析を行った。標的遺伝子群パネル解析を8例、全エキソーム解析を2例に行った。

（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い、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】を遵守した。本研究の全体の計画に関しては、国立病院機構大阪医療センター倫理委員会（平成21年8月26日：第1版承認、平成25年1月25日：第6版修正承認）、社会医療法人高槻病院で『難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発』研究の実施（平成24年9月承認）にて承認を受けた。

C. 研究結果および考察

- ① 10例の内訳は表に示すとおりで、単純型6例複雑型2例、半球間裂嚢胞合併型2例である。ACC1およびACC1-Bは兄弟で、家族性脳梁欠損症である。
- ② 全エキソーム解析を家族性の2例、標的遺伝子群パネル解析をその他の8例に行った。
- ③ 全エキソーム解析の2例、標的遺伝子群パネル解析の4例に5候補遺伝子異常が同定された。(同定率60%)
- ④ それらについて、現在Sangerシーケンス法を用いて、家系内の疾病罹患者、非罹患者の解析、同一疾病患者の解析をすすめ、さらに検討を行っている。

D. 考察

脳梁欠損は約200の症候群に合併するといわれる。また形態学的には脳梁欠損のみを呈するもののなかでも、その予後は正常から重度発達遅滞まで様々である。Fratelli Nらは、脳梁欠損症117例の予後を評価したところ、70例(80%)は何らかの先天性疾患に合併し、形態異常49例で、染色体異常が33例であった。先天性疾患がない場合の正常発達は、64%であったと述べている。脳梁欠損だけを呈する場合、その予後の評価は難しく、より詳細な病型分類が求められる。遺伝子診断はそのための大きな武器になるが、これまで責任遺伝子が同定されたものはごくわずかであった。今回、候補遺伝子につながる遺伝子異常が60%で同定されたことは画期的である。これらがさらに責任遺伝子として同定されればその意義は極めて大きい。

また脳梁はmassa commissuralisを新皮質からの交連線維が通過することによって形成され、膝部から形成され始め尾側に向かって幹部、膨大部と形成され、最後に頭側の吻部が形成される。脳梁欠損症は、通過する窓がないため交叉しないでProbst側として残るものと、交叉する繊維の形成不全に分けられる。また一旦脳梁が形成された後、あるいは形成の途中で何らかの病変によって形成されなかったものなど、発生学的に様々なものが混在して呼ばれている。脳形成異常の病因を探求していくうえで、非常に重要なものであり、その分子遺伝子学は発生学的にも興味深いものである。

E. 結論

このような様々な病態を内在した脳梁欠損症という重要な構造異常における今後の遺伝子学的診断、さらに分子遺伝子学的病院の探索に次世代シーケンス法特に全エキソーム診断の果たす意義は極めて大きく、画期的な進歩につながる可能性を示唆するものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S. Hypoplasia of the spinalcord in a

case of fetal akinesia/arthrogryposis sequences. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013 Feb 20. doi: 10.1111/nan.12035. PMID: 23421748.

- 2) Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, Yamasaki M, Ohgushi M, Sasai Y, Kanemura Y. Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using pericellular matrix of decidua derived mesenchymal cells. *PLoS One.* 2013;8(1):e55226. doi: 10.1371/journal.pone.0055226. Epub 2013 Jan 31. Central PMCID: PMC3561375.
- 3) Shofuda T, Fukusumi H, Kanematsu D, Yamamoto A, Yamasaki M, Arita N, Kanemura Y. A method for efficiently generating neurospheres from human-induced pluripotent stem cells using microsphere arrays. *Neuroreport.* 2013 Jan 23;24(2):84-90. doi: 10.1097/WNR.0b013e32835cb677. PubMed PMID: 23238165.
- 4) Yamasaki M, Nonaka M, Bamba Y, Teramoto C, Ban C, Pooh R. Diagnosis, treatment, and long-term outcomes of fetal hydrocephalus. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012 Dec;17(6):330-5. doi: 10.1016/j.siny.2012.07.004. Epub 2012 Oct 23. PubMed PMID: 23089488.
- 5) 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.* 2012 Apr;158A(4):812-5. doi: 10.1002/ajmg.a.35245. Epub 2012 Feb 21. PubMed PMID: 22354677.
- 6) 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 A, Yamasaki M, Kumakura A, Sugo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H. Phenotypic Spectrum of COL4A1 Mutations: Porencephaly to Schizencephaly. *Ann Neurol.* 2013 Jan;73:48-57.
- 7) 山崎麻美 小児脳神経外科領域における遺伝子診断 専門医に求められる最新の知識 (小児) 脳神経外科速報 23 :196~206,2013
- 8) 埜中正博、山崎麻美 小児のシャント手術 *Clinical Neuroscience 臨床神経科学* 30:441-442, 2012
- 9) 山崎麻美 胎児期水頭症の診断と治療および長期予後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。厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「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」平成 23 年度総括・分担研究報告書 9-16 , 2012

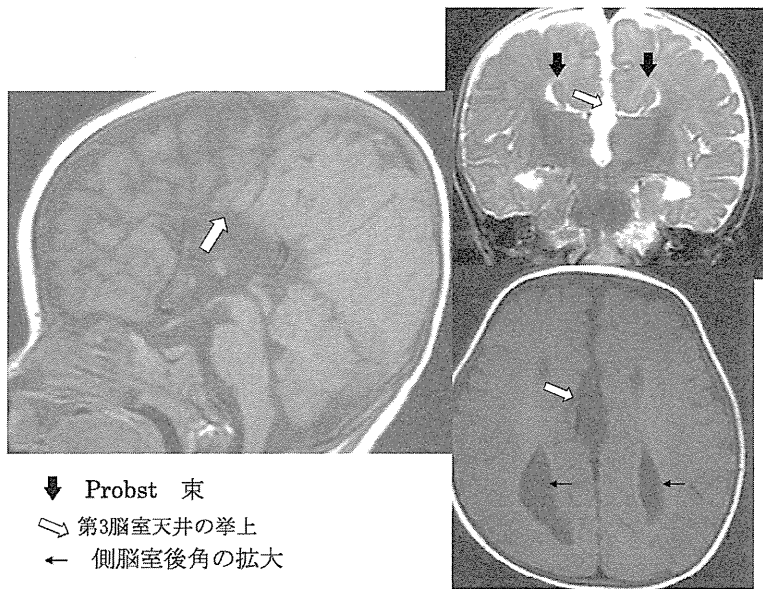
10) 山崎麻美、吉岡絵麻、正札智子、高田愛、寺元千佳、埜中正博、金村米博先天性水頭症の遺伝子診断 日本遺伝カウンセリング学会誌 33: 29-36 ,2012

2. 学会発表 (国際学会)

- 1) Yamasaki M X-linked hydrocephalus 23rd annual meeting of the European society for pediatric neurosurgery, May. 1-5,2012 Amsterdam The Netherlands
- 2) Yamasaki M, Yokota C, Oshida N, Teramoto C, Nonaka M Medical problems in adult spina bifida patients 56th annual meeting of the Society for research into hydrocephalus and spina bifida, York UK 2012 2^{5th}-2^{8th} July
- 3) Yamasaki M Recent research of L1CAM and hydrocephalus 56th annual meeting of the Society for research into hydrocephalus and spina bifida, York UK 2012 2^{5th}-2^{8th} July
- 4) Oshida N,Nonaka M,Yokota C,Nakajima S,Yamasaki M Secession from a shunt dependency in patients with childhood hydrocephalus ISPN 2012 2012.9.10 Sydney Australia
- 5) Yokota C,Nonaka M, Oshida N, Nakajima S,Yamasaki M Endoscopic third ventriculostomy (ETV) for syringomyelia associated with hydrocephalus ISPN 2012 2012.9.10 Sydney Australia
- 6) Nonaka M, Oshida N,Yokota C,Yamasaki M,Nakajima S, Induction of symptomatic Chiari II malformation by rapid reduction of intracranial pressure ISPN 2012 2012.9.10 Sydney Australia
- 7) Yamanaka T, Harada A, Yamasaki M A case of PHACES syndrome prenatally diagnosed as Dandy-Walker malformation Hydrocephalus 2012 Kyoto 2012.10.21
- 8) Nonaka M, Oshida N,Yokota C,Yamasaki M,Nakajima S, Shunt removal for shunt-dependent childhood hydrocephalus Hydrocephalus 2012 Kyoto 2012.10.21
- 9) Yamasaki M, Nonaka M, Bamba Y, Teramoto C, Ban C, Pooh R Diagnosis, Treatment, and Long-Term Outcomes of Fetal Hydrocephalus Hydrocephalus 2012 Kyoto 2012.10.21
- 10) Oshida N,Nonaka M,Nakajima S,Yamasaki M Natural history of the intracranial cysts Hydrocephalus 2012 Kyoto 2012.10.21
- 11) Harada A, Sano M, Yamanaka T, Yoshimura J, Nishiyama K, Nonaka M, Kosaki K, Okamoto N, Yamasaki M, Fujii Y Treatment strategy and genetic diagnosis in pediatric macrocephaly Hydrocephalus 2012 Kyoto 2012.10.20

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



↓ Probst 束
 ↗ 第3脳室天井の挙上
 ← 側脳室後角の拡大

図1 (単純型、複雑型) 脳梁欠損症

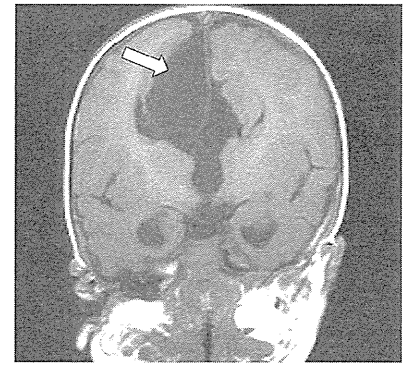


図2 (大脳半球間裂嚢胞を合併した脳梁欠損症)

a | b
 | c
 ↗ 半球間裂嚢胞

表 1

A:全エクソーム解析 B: 標的遺伝子群パネル解析 S: 単純型、C: 複雑型、IHC:大脳半球間裂嚢胞合併

ACC	FBM	性別	合併症	発達	解析方法	遺伝子解析結果	備考
1(S)	I041	男児	なし、	幼若のため判定保留	A	遺伝子 a 異常	
1(S)	I041-B	男児	なし	発達遅滞	A	遺伝子 a 異常	2 の兄
2(C)	I019	男児	異所性灰白質	正常	B		
3(S)	C021	男児	停留精巣	正常	B		
4(S)	C022	男児	臍ヘルニア, dimple	正常	B	遺伝子 b 異常	
5 (IHC)	T006	女児	大脳半球間裂嚢胞, 羊膜索症候群	幼若のため判定保留	B	遺伝子 c 異常	
6(S)	C020	男児	なし	正常	B	遺伝子 d 異常	
7(S)	C005	女児	なし	正常	B		
8 (C)	C013	女児	側彎 (軽度), 顔貌異常 (多毛, 粗野な顔貌, 前向きの鼻孔, 厚い口唇) Coffin-Siris 疑い	発達遅滞	B		
9 (IHC)	C018	男児	大脳半球間裂嚢胞	発達遅滞	B	遺伝子 e 異常	

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

小児神経疾患標的遺伝子解析に関する研究

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

次世代シーケンサーを用いて小児神経疾患と関連する 284 遺伝子のエクソン塩基配列を標的として解析するシステムを構築し、原因不明の小児神経疾患の原因遺伝子同定を目的とする研究を行った。標的解析 40 例中、24 例で解析が終了した。標的遺伝子解析では現時点で 3 例で病的意義が確認できた。一方、全エクソーム解析では 1 家系において両親と児を含めた解析で突然変異であることが確認され、病的意義が確認できた。4 例で最終診断が確定した。今後の検討により、さらに確定例が増加する可能性がある。次世代シーケンサー解析は有効な解析手段と考えられた。

共同研究者

大町和美、山本悠斗、井上佳世、三島祐子
（大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科）
宮冬樹（理化学研究所ゲノム医科学研究センター情報解析研究チーム）
齋藤伸治（名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野）
加藤光広（山形大学医学部小児科）
山崎麻美（高槻病院小児脳神経外科）
金村米博（大阪医療センター臨床研究センター再生医療研究室）
小崎健次郎（慶応義塾大学医学部臨床遺伝学センター）

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いて小児神経疾患と関連する 284 遺伝子配列を網羅的に解析するシステムを構築し、原因不明の小児神経疾患の原因遺伝子同定を試みた。

B. 研究方法

遺伝子解析は中枢神経の発生関連遺伝子やイオンチャンネル遺伝子など神経疾患との関連が高いと考えた 284 遺伝子を選択し、そのエクソン部分領域(1.6Mb) DNAをAgilent社のカスタム SureSelect capture oligoにて濃縮回収後、Genome Analyzer IIx (Illumina)次世代シーケンサーを用いて解析した。あるいは全エクソームの解析を行った。

その中のnonsynonymous変異についてin silico解析、種を通じての保存性の確認、両親の変異の有無の解析などにより病的意義の検討を行った。

必要に応じてサンガー法による直接シーケンスを用いて変異を確認した。全例でG分染法による一般的な染色体およびマイクロアレイによる染色体の微細異常の有無の検討を行った。

症例は研究分担者の所属する医療機関において診療を行っている症例で、診断が確定していないものを対象とした。合計40症例において標的遺伝子に関する解析を行い、3家系4症例において全エクソーム解析を行った。

解析にあたっては遺伝カウンセリングを実施し、書面で意思確認を得た。

（倫理面への配慮）

個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。遺伝子解析に際しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

C. 研究結果

表に今回の解析対象疾患を示す。診断名が複数存在する場合は主要なものに分類した。全例、精神運動発達遅滞を認めた。

本報告書作成時点で標的解析 40 例中、24 例で解析が終了した。全例で複数の nonsynonymous 変異が同定された。nonsynonymous 変異でアミノ酸置換が生じていても、親の一方に同じ変異が生じている場合や、in silico 解析で病的意義の低いものは疾患との関連がないものと判断した。標的遺伝子解析では報告書作成時点で 3 例で病的意義が確認できた。両親との比較が終了しておらず、病的意義の判断が保留になっている症例は他にも存在する。

一方、全エクソーム解析では 1 家系において両親と児を含めた解析で突然変異であることが確認され、病的意義が確認できた。

具体的な疾患について述べる。小脳低形成の 2 例で CASK 遺伝子のエクソン 2 とエクソン 9 にナンセンス変異をそれぞれ認めた。CASK 遺

伝子異常による mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH: MIM ID #300749)と診断できた。この2例はともに小頭症、精神運動発達遅滞を合併した。CASK 遺伝子変異の場合、画像的には小脳橋低形成を伴う小頭症で、脳梁の大きさが保持されているという特徴があるが、この2例の画像の特徴も一致した。

なお、標的遺伝子解析を行って明らかな異常がなかった小脳低形成例において、マイクロアレイ解析を行った結果、1例で CASK 遺伝子全領域の欠失を同定した。

DYRK1A 遺伝子変異はコーディング領域中のナンセンス変異であり、大きく機能が損なわれることが推察された。症例は重度精神運動発達遅滞であるが、DYRK1A 遺伝子変異で通常観察される小頭症はなく、頭囲は大きかった。水頭症や脳室拡大はなかった。

ALDH18A1 変異を皮膚弛緩症の症例で同定した。全身の皮膚弛緩、関節過伸展、重度精神運動発達遅滞、低身長、特徴的顔貌を認めた。皮膚弛緩症の責任遺伝子は複数あるが、他の遺伝子変異は認めず、de novo で存在した ALDH18A1 遺伝子変異が責任遺伝子であることが結論づけられた。

表 解析の対象となった症例の診断分類

	標的解析	全Exome
先天性水頭症	1	0
脳梁欠損症	1	1
全前脳胞症	0	0
皮質形成異常症	6	1
小脳形成異常症	6	0
小頭症	18	0
大頭症	1	0
脳瘤	0	0
脊髄髄膜瘤	0	0
アンジェルマン症候群	0	0
てんかん	3	0
その他	4	2
健常コントロール	0	0
	40	4

D. 考察

病的意義の確認できた疾患について整理する。

(1) CASK 異常症は mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia

(MICPCH: MIM ID #300749)と称されている。

CASK はシナプスに存在し、転写因子 TBR1 と相互作用する足場蛋白であり、RELN など大脳皮質の発生に関与する遺伝子群の発現を調節する。CASK 異常マウスは脳・頭蓋形成異常と口蓋裂をきたす。CASK の変異が小頭症や脳幹小脳低形成の原因である。女兒が患者として認識される X 連鎖性疾患である。

変異を同定した2症例はともに臨床的、画像的にも MICPCH に合致する所見であった。早期ストップコドンであり、病的意義が確認できた。

マイクロアレイ解析で欠失のあった症例も臨床的に CASK 異常による MICPCH と矛盾しない結果であった。CASK 異常はマイクロアレイと変異解析を組み合わせて実施する方がよいと考えられた。

(2) DYRK1A は dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK) family に属するプロテインカイネーゼである。

DYRK1A は神経細胞の増殖や分化を通じて脳の成長に関わる。DYRK1A は 21 番染色体長腕に座位がある。ダウン症候群ではトリソミー効果のために DYRK1A が過剰に発現することが知的障害や小頭症の原因のひとつとされている。マウスにおける Dyrk1a ハプロ不全では脳容量の減少がみられた。ヒトにおいても DYRK1A 遺伝子変異による知的障害、てんかん、小頭症の報告が散見される。今回の症例は小頭症でなく、頭囲は大であった。DYRK1A 遺伝子変異では小頭症が必発の所見でないことが考えられた。今後は類似症例に対して、DYRK1A 遺伝子の解析を行っていくこととなる。

(3) Cutis laxa(皮膚弛緩症)は複数の原因遺伝子が知られている、全身結合組織の異常などを特徴とする先天異常症候群である。本症例は大脳皮質の異常を伴ったことで解析対象とした。

ALDH18A1 異常の場合、アミノ酸の1種である、プロリンの合成過程の酵素異常である。低プロリン血症、低オルニチン血症、低シトルリン血症、低アルギニン血症を認める。プロリンはコラーゲンの主要な成分で、これが不足するためにコラーゲン合成障害が生じる。オルニチン、シトルリン、アルギニンが不足すると、尿素サイクルの回転がうまくいかず、高アンモニア血症を生じることがある。

小児期から皮膚の皺が多く、皮下脂肪が少ない。皮膚関節過伸展(不安定性)、指が長い、扁平足、股関節脱臼など全身の骨格系の異常を認める。手足の筋萎縮、神経伝導速度の低下、骨密度低下、精神運動発達遅滞、てんかんなど多彩な所見を認める。

この症例の ALDH18A1 変異はヘテロであったが、両親に変異はみられなかった。この遺伝子はヘテロ接合の場合、dominant negative 効果で発症することが知られており、病的意義が存在すると考えられた。皮膚弛緩症は鑑別すべき病態が多いが、今回の解析で確定にいたり、今後の治療にむけて有用な結果が得られた。

E. 結論

神経疾患と関連する 284 遺伝子配列を網羅的に解析するシステムを構築した。標的解析 40 例中、24 例で解析が終了した。その中で標的遺伝子解析では 3 例で病的意義が確認できた。全エクソーム解析では 1 家系において病的意義が確認できた。現時点で 4 例で最終診断が確定した。1 例においては標的遺伝子解析で異常を認めなかったが、マイクロアレイ解析で欠失を認めた。マイクロアレイによる染色体レベルの異常の有無は確認する必要があると考えられた。次世代シーケンサーを用いた標的解析は多数の遺伝子解析を効率的に実施できるが、神経疾患の責任遺伝子は年々増加しており、全エクソーム解析の重要性が高まると考えられる。正確な診断のもとに今後の予後予測、注意すべき合併症の早期把握、治療方針決定や遺伝カウンセリングに有用な情報が得られた。次年度は今年度の解析結果のさらなる検討、類似症例の診断、さらに新規症例の検討を行う方針である。

F. 研究発表

- 1) 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.* 2012. 131: 99-110
- 2) Misako Naiki, Seiji Mizuno, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Reiko Kimura, Makoto Oshiro, **Nobuhiko Okamoto**, Yoshio Makita, Mariko Seishima, and Nobuaki Wakamatsu MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome. *Am J Med Genet.* 2012. 158A: 97-102
- 3) Yukiko Kawazu, Noboru Inamura, Futoshi Kayatani, **Nobuhiko Okamoto**, Hiroko Morisaki Prenatal complex congenital heart disease with Loey's-Dietz syndrome. *Cardiology in the Young.* 2012. 22: 116-119
- 4) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, 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.* 2012. 78: 803-810
- 5) 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. 158A: 514-518
- 6) 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. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet.* 2. 2012. 44: 376-378
- 7) Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, **Okamoto N**, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J. The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. *Am J Med Genet A.* 2012. 158A: 1292-1303
- 8) Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, **Okamoto N**, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y. Costello and CFC syndrome study group in Japan. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A.* 2012. 158A: 1083-1094
- 9) Shimojima K, **Okamoto N**, Suzuki Y, Saito M, Mori M, Yamagata T, Momoi MY, Hattori H, Okano Y, Hisata K, Okumura A, Yamamoto T. Subtelomeric deletions of 1q43q44 and severe brain impairment associated with delayed myelination. *J Hum Genet.* 2012. 57: 593-600
- 10) Shimojima K, Mano T, Kashiwagi M, Tanabe T, Sugawara M, **Okamoto N**, Arai H, Yamamoto T. Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a duplication-inverted triplication-duplication in chromosomal segments including the PLP1 region. *Eur J Med Genet.* 2012. 55: 400-403
- 11) Wada Y, Kadoya M, **Okamoto N**. Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiology.* 2012. 22: 1140-1144
- 12) Takanashi J, **Okamoto N**, Yamamoto Y, Hayashi S, Arai H, Takahashi Y, Maruyama K, Mizuno S, Shimakawa S, Ono H, Oyanagi R, Kubo S, Barkovich AJ, Inazawa J. Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:3112-8

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

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

東日本圏における患者情報収集（中枢神経奇形・奇形症候群）と遺伝子解析に関する研究

研究分担者 加藤光広 山形大学医学部附属病院 小児科 講師

研究要旨

脳形成異常の原因遺伝子が数多く報告されるようになり、遺伝子座異質性の顕著な疾患は画像からの原因遺伝子の絞り込みが困難になってきている。脳形成異常 34 家系 34 例に対し、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を行い、小頭症 9 家系中 2 家系で *PNKP* 遺伝子に新規のホモ接合変異を同定し、Sanger 法で変異を確認した。2 家系 3 例の表現型は既報告に一致していた。また、拠点施設と連携し全ゲノムアレイ解析と全エクソーム解析を行い、橋小脳低形成を伴うてんかん性脳症の 2 例に *CASK* 変異を同定した。次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析は原因遺伝子同定に有用であり、臨床的にも応用可能であることが示された。

A. 研究目的

近年の遺伝子解析技術の進歩により、脳形成異常についても数多くの原因遺伝子が同定されている。画像診断、特に頭部 MRI によって原因遺伝子の推定が部分的に可能であるが、複数の原因遺伝子が同じ表現型を示す遺伝子座異質性の報告が増えており、表現型から原因遺伝子を推定することは必ずしも容易ではない。特に、小頭症や全前脳胞症、小脳形成異常症は遺伝子座異質性が顕著であり、DHPLC 法や HRM 法による変異スクリーニングや Sanger 法によるシーケンシングは効率が悪い。また、非特異的な脳形成異常や水頭症、髄膜瘤では、原因不明例がいまだに多い。次世代シーケンサーは、網羅的なシーケンシングが可能であり、上述の問題を解決できると推測される。

本研究では、脳形成異常、特に遺伝子座異質性の著明な小頭症と小脳形成異常の原因遺伝子同定のために、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。なお、小脳形成異常の解析については、拠点班である横浜市立大学と連携して解析を行った。

B. 研究方法

山形大学医学部小児科の脳形成障害データベースから脳形成異常が両側対称性で遺伝子異常が推測される 34 家系 34 例（先天性水頭症 6 例、全前脳胞症 3 例、皮質形成異常症 9 例、小脳形成異常 3 例、小頭症 11 例、脊髄髄膜瘤 1 例、眼底異常 1 例）に対し、標的候補遺伝子解析を行った。小頭症 11 家系の分類は、真正小頭症 6 家系 6 例、橋小脳低形成を伴う同胞例 1 家系 1 例、滑脳症を伴う同胞例 2 家系 2 例、小頭症と多小脳回の併発 2 家系 2 例である。また、小脳低形成を伴う滑脳症の姉妹例 1 家系に対し、全エクソーム解析を行った。小脳低形成を伴うてんかん性脳症 6 家系 6 例については横浜市立大学で全ゲノムアレイ解析と全エクソーム解析を行った。次世代シーケンサーで確認された変異は、患児

と罹患同胞および両親検体を Sanger 法によるシーケンシングで確認し、表現型の詳細を病歴と画像データを用いて比較検討した。

（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

標的候補遺伝子解析で、小頭症 2 家系 2 例に *PNKP* 遺伝子に共通のホモ接合ミスセンス変異 (*PNKP*:NM_007254:exon14:c.C1286G:p.A429G) を認めた。1 家系は同胞発症であり、Sanger 法で検証した結果、患児と罹患同胞は同変異 (c.1286C>G) のホモ接合、両親はヘテロ接合であることを確認した。解析途中の 1 家系を除く、他の小頭症 8 家系でも 2~10 個（平均 5 個）の遺伝子にヘテロ接合変異を認めたが、ホモ接合変異はなかった。

PNKP 遺伝子に変異を認めた 3 例（症例 1 と 2 は兄妹例、症例 3 は孤発例）は、満期出生で出生体重が 2116 g, 1656 g, 2610 g と小さく、出生時頭囲は 28 cm (-3.9 SD), 28.5 cm (-3.5 SD), 26.5 cm (-5 SD) といずれも -3SD を下回っていた。最終診察時の頭囲は 3 歳で 37.5 cm (-7.7 SD), 21 か月で 36.5 cm (-6.5 SD), 9 か月で 36.5 cm (-6.7 SD) と著明な小頭症を呈した。3 例ともてんかん発作を乳児期 (8 か月、3 か月、6 か月) に発症し、眼球偏位と片側性の間代痙攣、二次性全般発作を認めた。症例 3 は 3 種類の抗てんかん薬を併用し発作は消失したが、症例 1 と 2 では難治であった。新版 K 式による発達指数は症例 1 が 18、症例 2 が 30 であった。症例 1 と 2 に軽度の痙性を認めたが、症例 3 では 9 か月時点で運動に異常はみられなかった。頭部 MRI では症例 1 と 2 で前頭葉の皮質が部分的に軽度厚く、後頭は単純脳回の小頭症と小脳虫部の軽度低形成を認め、症例 3 は皮質の肥厚を伴わない単純脳回型小頭症であった。

小脳低形成を伴うてんかん性脳症の男児 2 例に *CASK* 遺伝子の変異、エクソン 2 を含む 111Kb の微細欠失と一塩基置換 (c.1A>G)、を認めた。

D. 考察

PNKP 遺伝子は、2010年に、早期に発症する難治性てんかん発作と発達遅滞を呈する小頭症(MCSZ) 7家系の原因遺伝子として報告された(Shen J, et al. *Nat Genet*, 2010)。常染色体劣性遺伝形式を示し、フレームシフト変異とスプライシング変異の他、ホモ接合のミスセンス変異(p.E326K)も血族婚の3家系で報告されているが、今回同定された変異の報告はなく、新しい変異であった。2家系とも同じ変異であったが、縁戚関係は知られておらず、出身地も遠く離れている。日本人集団での保因者頻度の確認と疾患原因としての確認のために、今後正常対照での変異スクリーニングを行う予定である。

前述の7家系11例の報告では、出生時頭囲は30~34 cm(-3 SD~10%ile)であるが、成長に伴い頭囲は-7~-3 SD と小頭の程度がより強くなり、生後1~6か月の間に全例てんかん発作を発症する。今回*PNKP* 遺伝子変異が同定された3症例も、出生時から小頭症を示し、生後さらに小頭の程度が増し、乳児期にてんかん発作を発症しており、表現型が一致する。既報告では脳回形成は正常もしくは単純脳回であるが、今回の2症例では前頭の皮質が軽度肥厚しており、神経細胞移動障害の併発を示唆する。

PNKP はポリヌクレオチドに対するホスファターゼ活性とキナーゼ活性の両者を有し、一本鎖および二本鎖 DNA の切断を結合修復する。*PNKP* 変異によって細胞レベルでは放射線感受性を有し、アポトーシスが誘発される。*PNKP* 変異による癌化は確認されていないが、*PNKP* 変異による進行性の小脳萎縮と末梢神経障害が最近報告された(Poulton C, et al. *Neurogenet*, 2013)。今回の3症例は9か月から3歳と既報告よりも若く退行は認められないが、神経変性症としても留意する必要がある。

2家系以外の小頭症8家系では標的候補遺伝子解析では疾患原因と考えられる変異は同定されなかった。真正小頭症以外の小頭症の原因は未解明なものが多く、標的候補遺伝子解析では既知遺伝子が主体となり変異検出には限界があり、今後は全エクソーム解析を行う必要がある。

CASK 遺伝子は Xp11.4 に位置し、主に女性の小頭と橋小脳低形成を伴う X 連鎖性精神遅滞の原因遺伝子として知られている。男児の報告は1例のみであり、今回2症例の男児で *CASK* 変異が同定され、推測どおり男児では女児よりも重症であることが確認された。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた標的候補遺伝子解析によって小頭症の2家系で *PNKP* 変異が同定され、既報告の表現型と一致していた。また全エクソーム解析により *CASK* 変異が同定され、次世代シーケンサーの臨床応用の有用性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 male patients with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. *Epilepsia* 53:1441-1449, 2012
- 2) Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Yamaoka S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Yokochi K, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, Saitsu H: De Novo and Inherited Mutations in *COL4A2*, Encoding the Type IV Collagen alpha2 Chain Cause Porencephaly. *Am J Hum Genet* 90:86-90, 2012
- 3) Nakamura K, Kato M, Sasaki A, Kanai M, Hayasaka K: Congenital dysplastic microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum with diffuse intracranial calcification. *J Child Neurol* 27:218-221, 2012
- 4) 加藤光広: ARX 遺伝子と介在ニューロン病. 抑制性シナプスの基礎と臨床 *Clinical Neuroscience* 30(12);1401-1403, 2012
- 5) 加藤光広: 脳・脊髄形成異常、皮質形成異常、Dandy-Walker 奇形、Chiari 奇形、二分脊椎 遠藤文夫総編集 小児科診断・治療指針 中山書店 p.744-748 2012年9月
- 6) 加藤光広: 小脳奇形 小児疾患の診断治療基準 第4版 小児内科増刊号 東京医学社 44;678-679, 2012

2. 学会発表

- 1) Mitsuhiro Kato: Lissencephaly and related disorders. International Child Neurology Congress (ICNC) Pre Congress Symposium Malformations of Cortical Development, May 27, 2012, Brisbane, Australia
- 2) 加藤光広: 脳形成異常と遺伝子. 第32回日本脳神経外科コンgres総会: 横浜 2012年5月11日
- 3) 加藤光広: 新しい疾患概念“介在ニューロン病”について. 第9回小児病理セミナー: 大阪 2012年9月8日
- 4) 加藤光広: 大脳介在ニューロンの分子機構障害による形態異常と機能異常 一介在ニューロン病一. シンポジウム“小児神経の「臨床」における「分子・形態」アプローチ”第44回日本臨床分子形態学会総会・学術集会: 高知 2012年9月28日
- 5) 加藤光広: 中枢神経系疾患の出生前診断の現状と課題. シンポジウム5: 個別化治療 up to date: 遺伝子診断の現状と治療への応用 第46回日本てんかん学会: 東京 2012年10月11日
- 6) 高橋信也、加藤光広、菊池貴洋、才津浩智、松本直通、早坂清: *COL4A1* 遺伝子変異が同定された孔脳症の1例. 第54回日本小児神経学会総会: 札幌 2012年5月17-19日

- 7) 瀬戸俊之、加藤光広、三木幸雄、植松貢、新宅治夫：自傷行為を繰り返す多発性多小脳回と片側性脳梁体部欠損の男児例. 第54回日本小児神経学会総会：札幌 2012年5月17-19日
- 8) 斉藤真希、菊池健二郎、浜野晋一郎、加藤光広、井田博幸：レベチラセタムが著効したと考えられる外性器異常を伴うX連鎖性滑脳症の1例. 第54回日本小児神経学会総会：札幌 2012年5月17-19日
- 9) 萩野谷和裕、荒井洋、小坂仁、加藤光広、横地健治、才津浩智：Type 4 collagen α 2 chain (COL4A2)の変異は孔脳症の原因となる. 第54回日本小児神経学会総会：札幌 2012年5月17-19日
- 10) 才津浩智、加藤光広、小坂仁、森山伸子、堀田秀樹、西山精視、鶴崎美徳、三宅紀子、早坂清、松本直通：CASKのnull変異は小脳低形成を伴う太田原症候群をひきおこす. 第57回日本人類遺伝学会総会：東京 2012年10月25-27日
- 11) 加藤光広：脳形成障害とてんかん. 第31回香川発達神経研究会・学術講演会：高松 2012年3月10日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
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

眼先天異常の遺伝子診断に関する研究

分担研究者 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

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。眼先天異常の内訳は多種多様であるが、全身疾患・奇形症候群に伴う比率が高い。

本研究では中枢神経系・感覚器が発生学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、コンソーシアムを編成し、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している。そこで、すでに難聴と中枢神経奇形に対し成果を挙げている遺伝子変異解析パネルを、眼科領域にも応用するために設計を開始した。

各種の遺伝子・遺伝子疾患のデータベースから眼科疾患関連遺伝子を抽出して、857遺伝子・1130疾患の対照表を作成した。本リストを用い眼科領域でも効率よく遺伝子解析を行うことができる。慶應義塾大学臨床遺伝学センターおよび国立成育医療研究センターに精査加療目的にて受診した小角膜・小眼球・先天白内障などの前眼部の眼先天異常患児に対し、遺伝学的検索を進めている。また、さまざまな眼先天異常に対し、遺伝要因による病態の解明のため、新たな機器・評価法を導入して前眼部～後眼部の形態・機能について精密な解析を加えた。これらの研究の推進によって、眼先天異常に対し効率的な遺伝子診断が可能となり、病態解明と治療法の開発に寄与すると期待される。

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。眼先天異常の内訳は多種多様であるが、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。

本計画では中枢神経系・感覚器が発生学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、コンソーシアムを編成し、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している。

これまでの研究で、難聴と中枢神経奇形の分野で、既知遺伝子群の変異解析を行うため解析パネルの設計と運用を開始している。感度・特異度とも極めて高く、既知遺伝子群の遺伝子診断に極めて有用であることが示されている。この成果を用いて、眼科領域においても臨床応用可能なパネルの設計を開始した。

臨床現場において、さまざまな眼先天異常患児に対し、遺伝学的検索を進め、病態の解明に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1) 眼先天異常の遺伝子変異解析パネルの設計
各種の遺伝子・遺伝性疾患のデータベース GeneCards(<http://www.genecards.org/>)を利用して、眼の異常のある疾患名一原因遺伝子対について

網羅的なリストの作成を行った。GeneCardsは OMIM, SWISS-PROT, GenAtlas, GeneTests, GAD, GDPInfo, bioalma, Leiden, Atlas, BCGD, TGDB, HGMDなどの遺伝子データベースを統合したデータベースである。

2013年3月のGeneCardsデータベースによれば 6237 の遺伝子が、疾患と関与する遺伝子"disease genes"として登録されている、このうちもっとも権威ある遺伝性疾患データベースであるOMIM (<http://www.omim.org/>)に掲載されていて、かつ eyeというキーワード合致する遺伝子名に絞り込みを行うと、857遺伝子が得られた。

さらに米国保健研究所・OMIMが維持している国際表記遺伝子名と疾患名のリストのファイル mim2gene.txtを利用して、眼科疾患関連遺伝子名と疾患名の対照表を作成した。2つのファイル共通keyを遺伝子名とし、Unix/Linuxの標準コマンドjoinを用いて共通keyで結合した。

2) 眼先天異常に対する遺伝子診断と病態解明

慶應義塾大学臨床遺伝学センターおよび国立成育医療研究センター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、全身検索、家族歴を聴取し、遺伝要因につき解析した。また病態解明のため、光干渉断層計 (optical coherence tomography: OCT)、全視野および黄斑局所網膜電図

(electroretinogram: ERG) を新たに導入して精密な形態・機能解析を行った。対象疾患は両眼性の小角膜・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