

201317086A

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)

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

平成25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26(2014)年 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究 -----	1
（資料）研究全体の流れと進行状況	
松本直通	

### II. 分担研究報告

1. 希少な遺伝子変異を認めたてんかんおよび発達障害症例 岡本伸彦	11
2. 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 加藤光広	19
3. 本邦におけるクレアチン欠損症の解析 小坂仁	23
4. 広汎性発達障害関連遺伝子解析による病態解明研究 橋本亮太	29

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	37
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	43
-----------------------	----



平成25年度厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究開発事業）  
総括研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

次世代シーケンサー（NGS）による高出力解析研究により、遺伝子異常の多面性（pleiotropy）が認識され始め、疾患群をより正確に診断する（診断率を向上させる）ためには、より多くの責任/関連遺伝子・候補遺伝子を解析する必要がある。この解決策に大容量型 NGS を用いた全 exome 解析が選択肢となるが、やや高コスト（1 サンプル当たり 2013 年度で 11 万円）である。我々は、数十個の遺伝子を集約する新技術と卓上型 NGS を組み合わせ、効率的かつ安価（1 サンプル当たり 3 万 5 千円）に遺伝子異常を同定する技術（統合的遺伝子解析システム）を確立し、さらに点変異のみならずコピー数異常の検出も可能とした。本技術を導入し効率的にヒト発達障害の遺伝子異常を同定しその分子病理を明らかにし、かつ効率的な診断システムの確立を目指すことを目的とした。平成 25 年度は、難治性てんかんパネル 2 種、Coffin-Siris 症候群関連パネル 1 種を作成し、検出頻度やコストの検討を行い、全エクソーム解析との優劣について検討を加えた。さらにパネルや全エクソームデータを用いた CNV 解析を行い、マイクロアレー解析との比較検討を行った。

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・主任部長

加藤光広・山形大学医学部小児科学講座・講師

小坂仁・自治医科大学小児科学講座・教授

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・千葉大学・福井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・情報統合医学講座精神医学教室・准教授

研究費では、高密度マイクロアレーを用いた疾患ゲノム解析を基軸に、West症候群（Am J Hum Genet, 2010）、Kabuki症候群（Nat Genet, 2010）、Microphthalmia with limb anomaly (MLA)症候群（Am J Hum Genet, 2011）、Coffin-Siris症候群（Nat Genet, 2012）、大田原症候群（Ann Neurol, 2012）（Epilepsia, 2012）等で責任遺伝子を同定した。このうち3疾患の遺伝子異常が染色体微細構造異常に絡んでおり、染色体構造異常解析の有用性は明白であった。これらの研究過程で、年齢依存性てんかんの一群の解析は格段に進歩した。最重症系である大田原症候群では、我々が明らかにした責任遺伝子ARX・STXBP1・KCNQ2・CASKと新たにSCN2A（Neurology, 2013）・GNAO1（Am J Hum Genet, 2013）・SLC35A2（Hum

A. 研究目的

本申請研究は、申請者が研究代表を務めた「超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究（H22-神経・筋-一般-012）」の成果を受けた発展研究である。H22-24年度

Mut, 2013) を加えておよそ57%で遺伝子異常が明らかになった。また次世代シーケンサー (NGS) による高出力解析研究により、遺伝子異常の多面性 (pleiotropy) が認識され始め、疾患群をより正確に診断する (診断率を向上させる) ためには、より多くの責任/関連遺伝子・候補遺伝子を解析する必要がある。この解決策に大容量型NGSを用いた全exome解析が選択肢となるが、やや高コスト (1サンプル当たり2013年度で11万円) である。我々は、数十個の遺伝子を集約する新技術と卓上型NGSを組み合わせ、効率的かつ安価 (1サンプル当たり3万5千円) に遺伝子異常を同定する技術 (統合的遺伝子解析システム) を確立し、さらに点変異のみならずコピー数異常の検出も可能とした。本技術を導入し効率的にヒト発達障害の遺伝子異常を同定しその分子病理を明らかにし、かつ効率的な診断システムの確立を目指すことを目的とする。

## B. 研究方法

### I. 症例集積

小児神経臨床研究ネットワーク等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんかんとその類縁疾患を、臨床遺伝ネットワーク等を通じて集積した知的障害関連疾患を集積する。

### II. 統合的遺伝子解析システム開発

大田原症候群を含む年齢依存性てんかん群では、*ARX*・*STXBPI* を含むてんかん関連遺伝子 35 個とさらに 15 個を加えた 50 個の 2 種のパネルを、Coffin-Siris 症候群で変異を

認めた SWI/SNF 複合体の関連遺伝子 22 個を含む候補遺伝子パネルをデザインし、ゲノム DNA を分画、卓上型次世代シーケンス (NGS) で解析を行う。

### III. インフォーマティクス解析

NGS 解析で既に全エクソン解析において研究室内で確立した解析フローを統合遺伝子解析システムにも応用する。NGS データは、研究室独自のインフォーマティクスフローにより効率的な点変異の検出が可能で、かつ CNV に関しては Alex NORD プログラムを用いる。

### IV. バックアップシステム

従来型の超細密マイクロアレーと全エクソーム解析・全ゲノム解析による網羅的なゲノム解析手法を遺伝子統合解析システムでの陰性例に適宜用いて新規遺伝子異常とコピー数異常を同定する。特に H25 年度は XHMM プログラムによる全エクソームデータで CNV 検出システムの確立を進めた。

### V. 効果的遺伝子診断システムの確立

本研究の知見に基づく迅速、効果的かつ安価な疾患遺伝子診断システムを考案する。本研究は、所属施設 IRB の承認を受け適切な倫理的配慮と手続きを得て行われた。

## C. 研究結果

### I. 症例集積

小児神経臨床研究ネットワーク (蔵王セミナー等で交流) 等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんかんとその類縁疾患を含めた計 720 例の世界的にも突出し

た症例が集積した。さらに臨床遺伝ネットワーク等により遺伝医学専門医や小児神経科医の協力のもと知的障害関連疾患を呈する症例が1500例集積した。今後も種々のチャンネルを通して継続的にこれらの疾患群の集積に努める。

## II. 統合的遺伝子解析システム開発

平成25年度研究で大田原症候群を含む年齢依存性てんかん群では、責任遺伝子 *ARX*・*STXBPI*・*CASK*・*KCNQ2* と新規に同定した遺伝子 *SCN2A*・*GNAO1*・*SLC35A2*、他のてんかん関連疾患で同定されている既知遺伝子を加えて35個および拡大版50個の遺伝子解析パネルを作成し、それぞれで遺伝子変異検出率を明らかにした(28.3%と18.9%)。さらに Coffin-Siris 症候群で変異を見出した *SWI/SNF* 複合体遺伝子22個の解析パネルも作成、同疾患での変異検出率を明らかにした(25%)。陰性例では、バックアップ解析として全エクソーム解析を追加することになるが、この時点で、遺伝子パネル+全エクソーム解析とパネルを用いず全エクソーム解析のみを行うこととの価格の比較検討を行った。この結果遺伝子パネル/全エクソーム解析の価格比(3.5万円/11万円=31.8%)を超える変異検出率をパネルで超えない限り、全エクソーム解析を第一選択とする方が安価で迅速であるとの結論に至った。よって明らかに検出率が32%を大きく超えることが期待できる疾患はパネルを作成するがそれ以外は全エクソーム解析を選択することとした。

## III. インフォーマティクス解析

NGS解析で既に全エクソン解析において研究室内で確立した解析フローを統合遺伝子解析システムにも応用する。Miseq データは、Novoalign/Picard/GATK/Annova を組み合わせた研究室独自の Ecome により効率的な解析が可能である。さらに NGS データから特に欠失を効率的に検出する Alex\_NORD プログラムで非常に小さな(100 bp 程度)欠失検出が可能である。全エクソーム解析データを用いて XHMM 法で CNV 解析もマイクロアレーで検出される60%の CNV が検出可能となっている。マイクロアレーで検出できない10 Kb以下の CNV 検出が XHMM では検出されているためその正確性を検討中である。

## IV. バックアップシステム

従来型の超細密マイクロアレーも CNV 異常の検出から責任遺伝子の特定する手法として依然重要で統合遺伝子解析システムと並行して適宜行っている。

## V. 効果的遺伝子診断システムの確立

本研究の知見に基づいて効果的かつ安価な疾患遺伝子診断システムの検討を続けている。特に遺伝子パネルを用いた安価なシステムの問題点として、遺伝子解析領域が小さいため検体数を一定数集めて一気に解析できる反面、検体数がそろそろまで解析がはじめられないという矛盾が生じる。またIIで述べたように遺伝子パネルでの遺伝子変異同定率が遺伝子パネル/全エクソーム解析のコスト比を超えることで、コスト的に生合成が取れてくるという事が明らかになった。よってパネル解析を優先して行う疾患についてはかなり限定した

適応で行う方が効率が良い。一方で全エクソーム解析で難治性てんかんに関する新しい遺伝子 *SCN2A* (Neurology, 2013), *GNAO1* (Am J Hum Genet, 2013), *SLC35A2* (Hum Mut, 2013)の単離にも成功しこれを遺伝子パネルに新たに組み込んで遺伝子変異同定率の向上を目指した。

#### D. 考察

遺伝子パネルと全エクソーム解析のパフォーマンスとコストの検討及び上記2手法のデータを利用したCNV解析システムをセットアップし、マイクロアレーデータとの比較を行った。遺伝子パネルはコストメリットは明らかだが、検出率が低い場合全エクソーム解析に移行せざる負えないことも多く、コスト・スピードの観点で全エクソーム解析を第一選択とするメリットも明らかになった。次世代シーケンスデータを用いたCNV解析では、マイクロアレーデータの60%程度は検出可能であること、マイクロアレーの検出限界である10 Kb以下の欠失等が検出される可能性があること等などが判明し、その特徴を生かしたデータ利用が求められる。

#### E. 結論

H25年度は、てんかん35遺伝子パネルと拡大版50遺伝子パネルをそれぞれ難治性てんかん症例67例と37例に対して施行し、変異陽性例はそれぞれ19例(28.3%)及び7例(18.9%)であった。SWI/SNF関連パネル(22遺伝子搭載)のCoffin-Siris症候群8例解析では2例(25%)で変異を検出

した。変異陰性例は全て全エクソーム解析を用いて再解析を行うこととなったが、この時点で、選択的遺伝子パネル(3.5万円)とバックアップ検査としての全エクソーム解析(11万円)の組み合わせと、最初から全エクソーム検査を行うことの1検体当たりのコスト比較を行い、選択的パネルでの変異陽性検出率が3.5/11の価格比を超えない限り(31.8%)、遺伝子選択パネルを行う価格上のメリットがないことが判明した。てんかん、Coffin-Siris症候群での変異検出率は遺伝子選択パネルで18-28%程度で、全エクソーム解析を第一選択とする価格上の・時間的なメリットが明らかであった。遺伝子選択パネルも全エクソーム解析でもそのデータからCNVをある程度の感度で(およそ60%)で検出することが可能であった。全エクソーム解析を用いて大田原症候群の新規遺伝子として *SCN2A* (Neurology, 2013)・*GNAO1* (Am J Hum Genet, 2013)・*SLC35A2* (Hum Mut, 2013)を発表した。また幼少期には発達障害、青年期に急速に神経変性が進行して寝たきりになるSENDAの責任遺伝子 *WDR45* を明らかにした(Nat Genet, 2013)。以上のように初年度として、遺伝子選択パネルの有用性の検討とシステム構築、網羅的解析を用いた発達障害の責任遺伝子の解析が計画通り順調に進んでいる。

#### 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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 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* 35(4):312-316, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.007.
- 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* 83 (2): 1235-144, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- 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* 73(1): 48-57, 2013. doi: 10.1002/ana.23736.
- 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* 161A(5): 1073-1077, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35661.
- \*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* 35(3): 280-283, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.002.
- 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* 58(2): 113-115, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Higashiyama Y, \*Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, Miyake N, 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* 28(4): 552-553, 2013. doi: 10.1002/mds.25296.
- 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* 35(4):312-316, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.007.
- 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* 83 (2): 135-144, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- 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* 73(1): 48-57, 2013. doi: 10.1002/ana.23736.
- 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* 161A(5): 1073-1077, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35661.
- \*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* 35(3): 280-283, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.002.
- 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* 58(2): 113-115, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Higashiyama Y, \*Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, Miyake N, 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* 28(4): 552-553, 2013. doi: 10.1002/mds.25296.
- \*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(19): 108-110, 2013. doi: 10.1002/humu.22229.
- Kondo Y, Koshimizu E, Megarbane A, Hamanoue H, Okada I, Nishiyama K, Kodera H, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Doi H, Miyake N, Saitsu H, \*Matsumoto N. Whole-exome sequencing identified a homozygous FNBPA mutation in a family with a condition microphthalmia with limb anomalies-like. *Am J Med Genet Part A* 161A: 1543-1546, 2013.
- 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* 161A(1): 203-207, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35686.
- \*Miyake N<sup>#</sup>, Yano S<sup>#</sup> (# 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* 34(3): 446-452, 2013. doi: 10.1002/humu.22257.
- \*Saitsu H<sup>#</sup>, Nishimura T<sup>#</sup>, Muramatsu K<sup>#</sup> (# denotes equal contribution), Kodera H, Kumada S, Sugai K, Kasai-Yoshida E, Sawaura N, Nishida H, Hoshino A, Ryujin F, Yoshioka S, Nishiyama K, Kondo Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Arakawa H, Kato M, \*Mizushima, \*Matsumoto N (\*: co-corresponding). *De novo* mutations in the autophagy gene *WDR45* cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet* 45(4): 445-449, 2013. doi: 10.1038/ng.2562.
- Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Sato H, Nakabayashi J, Ban T, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, \*Tamura T. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in the monocyte differentiation program. *Blood* 121 (10): 1839-1849, 2013. doi: 10.1182/blood-2012-06-437863.
- Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Lee BJ, Nishiyama K, Mitsuko Nakashima, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kim JH, Yu YS, \*Matsumoto N. Pathogenic mutations in two families with congenital cataract identified by whole-exome sequencing. *Mol Vis* 19: 384-389, 2013
- Vergano SS, Santen G, Wiczorek D, Wollnik B, Matsumoto N, Deardorff MA: Coffin-Siris Syndrome (April 2013) in: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, Seattle, 1997-2013. Available at <http://www.genetests.org>. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131811/>)
- Yokoo N, Marumo C, Nishida Y, Iio J, Maeda S, Nonaka M, Maihara T, Chujoh S, Katayama T, Sakazaki H, Matsumoto N, Okamoto N. A case of Toriello-Carey syndrome with severe congenital tracheal stenosis. *Am J Med Genet Part A* 161(9):2291-2293, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35861.
- Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, **Imai K**, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragán DE, Villarroel CE, Ohfu M, Writzl K, Stražišar BG, Hirabayashi S, Chitayat D, Reid DM, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, **Hayasaka K**, \*Matsumoto N, \*Saitsu H (\* denotes co-corresponding). Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 81(11):992-998, 2013
- Koshimizu E<sup>#</sup>, Miyatake S<sup>#</sup> (# denotes equal contribution), Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Performance comparison of bench-top next generation sequencers using microdroplet PCR-based enrichment for effective targeted sequencing in patients with autism spectrum disorder. *Plos One* 8(9): e74167, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0074167
- Fukai R, Ochi N, Murakamia A, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, \*Matsumoto N, \*Miyake N. Co-occurrence of 22q11 deletion syndrome and HDR Syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(10):2576-2581, 2013.
- \*Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, \*Matsumoto N (\*: co-corresponding). Clinical consequences of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 161(6):1221-1237, 2013.
- Iida A, Nobuhiko Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, \*Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel *INPPL1* mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet* 58(6):391-394, 2013.
- Nakajima M,<sup>#</sup> Mizumoto S,<sup>#</sup> Miyake N,<sup>#</sup> (# denotes equal contribution) Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis R, Chitayat D, Howard A, Ferraz-Leal G, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitsu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Superti-Furga A, Ohashi H, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S\*. Mutations in *B3GALT6*, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* 92(6):927-934, 2013.
- Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu Y, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskiniemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma T, Beckmann JS, Ikegawa I, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and *NEK2* as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(40): 16139-16144, 2013.



- Kodera H, Kato M, Nord AS, Walsh T, Lee M, Yamanaka G, Tohyama J, Nakamura K, Nakagawa E, Ikeda T, Ben-Zeev B, Lev D, Lerman-Sagie T, Straussberg R, Tanabe S, Ueda K, Amamoto M, Ohta S, Nododa Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, King M-C, Matsumoto N, \*Saitu H. Target capture sequencing for detection of mutations and copy number changes causing early-onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 54(7):1262-1269, 2013. doi: 10.1111/epi.12203
- Ravenscroft G#, Miyatake S# (# denotes the first authors with equal contribution), Lehtokari V-L, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJN, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, \*Matsumoto N§, \*Laing NG§ (§ denotes equal contribution as the last author). Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 93(1):6-18, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.004.
- \*Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Yoko Hiraki, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Yoshiura K, \*Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations and their clinical consequences in Kabuki syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(9):2234-2243, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.36072.
- Sun S-L, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Ryo Funayama R, Kondo M, Saitu H, Matsumoto N, Nakayama K, Ishii N\*. Y-Chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. *J Immunol* 190 (12): 6209-6220, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300303.
- \*Doi H, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Miyatake S, Kawamoto Y, Yoshida T, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. Diagnostic utility of exome sequencing for autosomal recessive cerebellar ataxia and spastic paraplegia: identification of a novel homozygous *SPG7* mutation. *Intern Med* 52(14): 1629-1633, 2013
- Fujita A, Suzumura H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Harada N, \*Matsumoto N, \*Miyake N. A Unique Case of de novo 5q33.3q34 Triplication with Uniparental Isodisomy of 5q34qter. *Am J Med Genet Part A* 161(8):1904-1909, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.36026.
- #Nakamura K, #Kodera H, #Akita T (# denotes equal contribution), Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama T, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, \*Matsumoto N, \*Saitu H (\* denotes co-correspondence) De novo mutations in GNAO1 encoding a Gao subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93(3):496-505, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.014.
- Kodera H#, Nakamura K# (# denotes equal contribution), Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Mitsuko Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, \*Matsumoto N, \*Saitu H (\*: co-corresponding). De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mut* 34(12): 1708-1714, 2013. doi: 10.1002/humu.22446.
- Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki S, Aida N, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, \*Matsumoto N, \*Saitu H (\*: co-correspondence). Diagnostic utility of whole exome sequencing in cerebellar atrophy in childhood. *Neurogenet* 14 (3-4): 225-232, 2013. doi: 10.1007/s10048-013-0375-8.
- Gupta VA, Ravenscroft G, Shaheen R, Todd EJ, Swanson LC, Shiina M, Ogata K, Hsu C, Clarke NF, Darras BT, Farrar M, Hashem A, Manton N, Muntoni F, North KN, Sandaradura S, Nishino I, Hayashi YK, Sewry CA, Thompson EM, Brownstein CA, Yu TW, Allcock RJN, Davis MR, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Alkuraya FS, Laing NG, Beggs AH. Identification of KLHL41 mutations implicates BTB-Kelch-mediated ubiquitination as an alternate pathway to myofibrillar disruption in nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 93(6):1108-1117, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.020.
- Nakajima J, Eminoglu TF, Vatanever G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Kawashima H, \*Matsumoto N, \*Miyake N (\*: co-correspondence). A novel homozygous YARS2 mutation causes severe myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia syndrome. *J Hum Genet* 58(12):822-824, 2013. doi: 10.1038/jhg.2013.104.

## 2. 学会発表

順天堂大学医学部セミナー・松本直通「変革期を迎えた疾患ゲノム解析」平成25年6月26日@順天堂大学医学部・東京

第17回小児分子内分泌研究会特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いてわかってきたこと」平成25年7月7日札幌北広島クラッセホテル

次世代解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発研究プロジェクトの成果発表会・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」平成25年7月13日都市センターホテル・東京

第20回日本遺伝子診療学会大会・シンポジウム1・松本直通「疾患ゲノム解析における次世代シーケンサーの有用性」平成25年7月19日アクトシティー浜松コンgresセンター・浜松

CiRA genomics epigenomics and bioinformatics seminar series VIII. 松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析」平成25年8月23日@CiRA 京都大学

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25年度第1回ワークショップ 松本直通「コントロールデータベースに関する話題」平成25年8月24日@京都大学（芝蘭会館）

神奈川県立循環器呼吸器病センター職員研修会 松本直通「新たな時代を迎えた遺伝性疾患解析」平成25年8月19日@神奈川県立循環器呼吸器病センター・横浜

現場の会第三回研究会基調講演・松本直通「NGSがもたらしたヒト疾患ゲノム解析のパラダイムシフト」平成25年9月4日神戸国際会議場@神戸

第23回遺伝医学セミナー講義・松本直通「遺伝性疾患の責任遺伝子単離法」平成25年9月7日三井ガーデンホテル千葉@千葉市

第22回発達腎研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析：現状と限界」平成25年9月13日高槻市生涯学習センター@高槻市

第18回山形小児神経研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンス解析で分かってきたこと」平成25年9月27日パレスグランデール@山形市

第58回日本人類遺伝学会大会・シンポジスト・松本直通「ヒト疾患エクソーム解析の現状と課題」平成25年11月23日@江陽グランドホテル仙台

希少疾患・難病の全エクソーム解析 -現状と課題- 松本直通「希少疾患・難病の全エクソーム解析-現状と課題-」平成25年12月3日日経バイオテク「希少疾患・難病の治療薬開発におけるゲノム活用」@秋葉原コンベンションホール

Naomichi Matsumoto, T. Nishimura, K. Muramatsu, H. Kodera, S. Kumada, K. Sugai, E. Kasai-Yoshida, N. Sawaura, H. Nishida, A. Hoshino, F. Ryujin, S. Yoshioka, H. Arakawa, M. Kato, N. Mizushima, H. Saitsu. European Conference of Human Genetic 2013. June 9, 2013 @Palais des Congrès, Paris, France

## H. 知的財産権の出願・登録状況

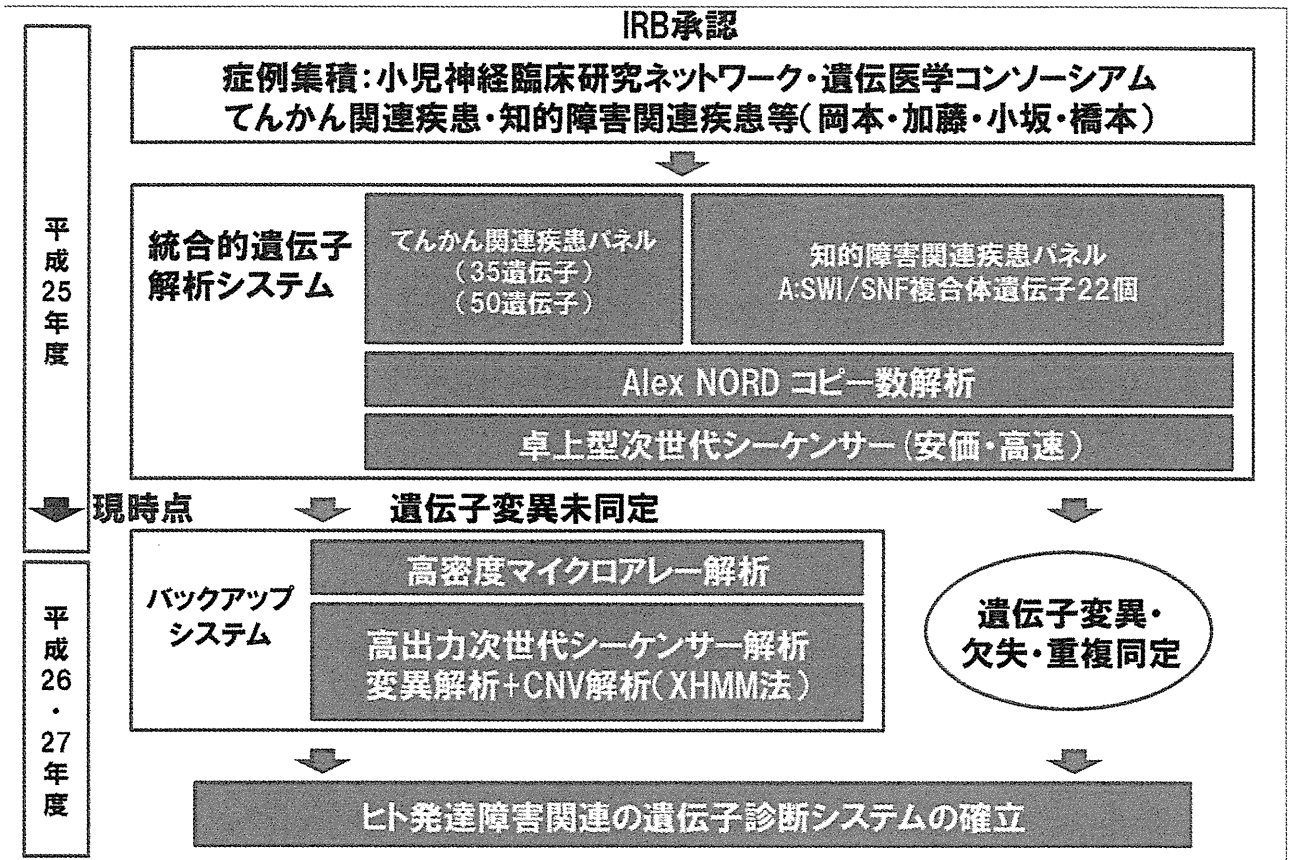
特願 2013-252720・鶴崎美徳/松本直通・「Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子診断法」平成25年12月6日

PCT/JP2013/71620・松本直通/三宅紀子・ミトコンドリア複合体 III 欠乏症患者又は保因者の検出方法・平成25年8月9日

特願 2013-157339号 松本直通/三宅紀子・ケトン血症を伴うリー脳症患者または保因者の検出法。平成25年7月31日

特願 2013-123660 才津浩智/松本直通・小児期のてんかんおよび不随意運動をきたす疾患の検出方法・平成25年6月12日

研究全体の流れと進行状況



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)

「統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究」  
(主任研究者 横浜市立大学大学院環境分子医科学 松本直通)

稀少な遺伝子変異を認めたてんかんおよび発達障害症例

研究分担者 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

小児の発達障害では原因不明の症例が多数存在する。従来の染色体検査(G分染法)や特定の遺伝子領域をサンガー法で解析する方法では診断に至ることが困難である。マイクロアレイ染色体検査や次世代シーケンサーを用いた解析により、多くの疾患で病態解明につながった。今年度解析を行った症例の中で、重要な知見を得られた症例について考察を行った。

- (1) 自閉症において稀少な変異を複数例で同定した。
- (2) GPIアンカー欠損症は、最近注目されている疾患群であるが、PIGN異常症を診断した。
- (3) てんかん症例においてイオンチャンネル異常症を診断した。
- (4) 小頭症において稀少な責任遺伝子を同定した。

今後も症例を蓄積し、新規疾患単の発見や治療法、療育方法の開発など発展的研究を進める方針である。

共同研究者

川戸和美、山本悠斗、松田圭子、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)

A. 研究目的

小児の発達障害では原因不明の症例が多数存在する。マイクロアレイ染色体検査や次世代シーケンサー(NGS)を用いた解析により、多くの疾患の病態解明がすすんでいる。原因不明の小児神経疾患を分子遺伝学的に解析し、病態の解明から治療方法の開発を行うことが目的である。

B. 研究方法

大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療

科でフォロー中の症例で、てんかんや発達障害、知的障害を有する症例。

次世代シーケンサー解析は横浜市大遺伝学の松本直通教授(本研究班主任研究者)のもとで実施した。

(倫理面への配慮)

解析にあたり、保護者の代諾により書面で同意を得た。実施前後に認定遺伝カウンセラーによるカウンセリングを実施した。

C. 研究結果

疾患群毎にまとめた。

(1) 自閉症

症例1 4歳男児

満期産正出生体重で出生した。生後より哺乳障害あり、チューブ栄養をうけた。重度精神運動



発達遅滞あり、現在も独歩不可で、有意語なし。  
1歳で全身けいれんあり。てんかん治療開始となった。脳波で棘波頻発するが、頭部MRIでは明らかな異常なし。

頭部を床に打ちつける、自分の頭をたたく、機嫌不良で入眠が困難など、自閉症症状を認めた。

遺伝子解析で、神経伝達物質の受容体の遺伝子変異を *de novo* でみいだした。過去に疾病との関連が報告されていない新規遺伝子変異であり、継続的な臨床的検討と類似例の蓄積を計画している。

## 症例2

自閉症の男児で、運動機能巧緻性の問題もある。てんかんは認めず、全身状態は良好である。転倒しやすく、頭部MRIや脳波検査など神経学的評価では特記事項なし。

マイクロアレイ染色体検査で、発達障害と関連することがすでに報告されている遺伝子領域の微細欠失を認めた。

この欠失は家族性でみられたが、症状は家族内で微妙に差があった。さらに臨床的検討を行っている。

### (2) GPIアンカー欠損症

「高アルカリフォスファターゼ血症と知的障害やてんかんを認める小児神経疾患

(Hyperphosphatasia with mental retardation)」が近年注目されている。GPIアンカーを合成する過程の各種酵素異常による先天性グリコシル化異常 (Congenital disorders of Glycosylation) である。酵素ALPが細胞膜に固定されないために血清での活性値が異常高

値となることが特徴である。ただし、ALPが高値ではない群も存在する。MaydenらはMultiple congenital anomalies- hypotonia-seizures syndromeの家系で *PIGA* 遺伝子異常を同定した。この場合はALPは高値にならない。原因不明のてんかん症例についてNGS解析で *PIGA* 新規遺伝子変異を認めた。

症例は9歳女兒と1歳男児の姉弟。姉は生後1か月より眼球の垂直方向の眼振を認めた。乳児期より重度の精神運動発達とてんかん発作を認めた。現在も頸定なく、有意語もない。摂食機能障害あり、胃瘻を必要とする。MRIで小脳萎縮を認めた。弟も同様経過である。この姉弟は身長と頭囲は大きめであった。

末梢血からDNAを抽出し、SureSelect Human All Exon v4 Kit でキャプチャー後、101bpのペアエンドシークエンス (Illumina HiSeq2000) を施行した。Novoalignでリードをマッピングさせ、Picardでduplicationの除去を行った。GATKで変異のコール、ANNOVARで変異のアノテーションを施行した。dbSNP135においてアレル頻度が1%以上の変異、日本人406名のノーマルコントロールエクソームデータで3人以上がもつ変異は除外し、候補変異の絞り込みを行った。候補変異はサンガー法で確認した。

好中球表面のGPIアンカー型蛋白の発現について、大阪大学微生物病研究所の村上良子博士、木下タロウ博士の研究協力を得た。

*PIGA* 遺伝子の複合型ヘテロ接合を認めた。両親はそれぞれ保因者であった。FACS解析において、複数のGPIアンカー型蛋白の発現低下を認めた。下記に報告された。

Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y,

Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. *Neurogenetics*. 2013 Nov 20. [Epub ahead of print]

### (3) イオンチャンネル異常症

#### 症例1 中学生女児

診断：乳児早期発症てんかん性脳症

満期産正出生体重児。周産期に特記事項なし。

生後5日より眼球偏移、全身強直発作あり。

脳波でsuppression-burst patternを認めた。現在も頸定なく、痙性四肢麻痺を認める。有意語なく、日常生活は全面介助を要する。重度成長障害と、小頭を認めた。マイクロアレイ染色体検査では異常なし。

てんかん遺伝子などに標的を絞ったNGS解析でKCNQ2変異を同定した。両親に変異はなく、*de novo*であった。

#### 症例2 7歳男児

診断：乳児早期発症てんかん性脳症

満期産正出生体重児。生後5日より眼球偏移、全身強直発作あり。脳波で棘波多発する。7歳でも頸定なく、下肢に痙性を認める。有意語なく、日常生活は全面介助を要する。体格は-2SD程度であるが、頭囲は正常範囲である。マイクロアレイ染色体検査では異常なし。

てんかん遺伝子などに標的を絞ったNGS解析でKCNQ2変異を同定した。両親に変異はなく、*de novo*であった。

#### 症例3 6歳女児

診断：suppression-burstを伴う早期乳児てんかん性脳症（大田原症候群）。早産正出生体重児。生後1日目から全身けいれんあり、脳波はsuppression-burstであった。その後も難治に経過している。重度の精神遅滞であり寝たきり状態である。頭部MRIで大脳萎縮を認めた。SPECTで脳血流低下あり。

てんかん遺伝子解析でSCN2A変異を同定した。両親に変異はなく、*de novo*であった。

#### 症例4 乳児女児

在胎41週2300gで出生。哺乳障害あり。前頭縫合隆起、側頭部狭小、眼間開離、眼瞼裂狭小、顔面正中部低形成、短鼻、平坦な人中、小下顎を認めた。乳児期の体重増加は不良であった。

G分染法では46,XXで異常はなかった。一般血液検査に異常を認めず。

頭部CTで前頭縫合早期癒合あり。生後3ヶ月でてんかん発作を発症した。てんかんは難治性に経過した。

顔貌異常より染色体異常考え、SNPマイクロアレイを実施した（三菱化学メディエンス社）。2番染色体長腕に微細欠失を同定した。欠失範囲にはSCN1A遺伝子が含まれた。

#### 参考文献

Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Koder H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation.

#### (4) 稀少な小頭症例

##### 症例1 8歳女児

出生時、両親は健康で家族歴に特記事項なし。満期産正出生体重児。周産期に特記事項なし。乳児期より発達遅滞を認めた。筋緊張低下が強かった。座位保持は3歳で可能となった。現在も未歩行2歳で有意語はない。

手を振る、指をすう、歯ぎしりなど常同行動あり。自分の頭部をたたく自傷行為を認めた。睡眠障害で投薬治療を必要とした。

8歳で体格は-2SD前後、頭囲 -2.5SDであった。胸部腹部異常なし。深い眼窩など特徴的顔貌を認めた。

G分染法、マイクロアレイ染色体検査やレット症候群関連遺伝子解析などに異常を認めず、両親とトリオでNGS解析を行ったところ、最近海外で報告のあった新規てんかん関連遺伝子変異を同定した。現在投稿準備中である。

##### 症例2 5歳男児

診断：知的障害、小頭症、てんかん

満期産、子宮内発育遅延で出生。出生時の頭囲は-4SDの高度先天性小頭症であった。特異顔貌、頭部MRIで脳回形成異常を認めた。4歳で歩行可能となるが、有意語は数個程度認めるのみ、重度精神運動発達遅滞である。

4歳で全身けいれんを認めた。てんかんの可能性あり、経過観察中である。G分染法、マイクロアレイ染色体検査では異常なし。

NGS解析で、稀少な小頭症関連遺伝子変異を同定した。過去の報告例と臨床像も合致した。突然変異であることが証明され、遺伝カウンセリ

ングでも有用な情報となった。

#### D. 考察

##### (1) 自閉症に関して

自閉症は新規の原因遺伝子が続々報告されており、今回の経験例でも新規原因遺伝子が疑われた。今回同定された変異は神経伝達物質やシナプスに関与するものであった。新規疾患単位としての確立をめざして研究を継続する方針である。

##### (2) GPIアンカー欠損症に関して

*PIGA*遺伝子変異によるGPIアンカー欠損症は過去には1家系のみ報告であり、臨床像は明らかでない面が大きい。高ALP血症は認めず、臨床所見からの診断は困難である。今回、世界で2家系目を診断し、論文として報告できた。

GPIアンカー欠損症は原因不明の神経疾患の中に多数潜在している可能性がある。スクリーニングはFACS解析が有用であるが、責任遺伝子は多数存在するので遺伝子解析にはNGSが有用と考えられた。

GPIアンカー欠損症では、てんかんの合併が多い。治療において、ビタミンB6投与が有効な場合がある。正確な診断は治療方法の選択において非常に重要である。

##### (3) イオンチャンネル異常症

最近になって、*KCNQ2*遺伝子変異と乳児のてんかん性脳症の関連が注目されている。Katoらは、9例の*KCNQ2*異常例を報告した。発作は新生児期から発症する強直発作のことが多く、脳波では suppression-burst pattern を多くの例で認める。Hypsarrhythmiaの例もあった。臨床的には

大田原症候群からWest症候群に移行する傾向があった。発作は投薬で抑制されても、中度から重度の精神運動発達遅滞を認めた。

症例1と2も新生児期発症のてんかん性脳症の形態をとり、重度の精神運動発達遅滞を残した。

大田原症候群はsuppression-burstを伴う早期乳児てんかん性脳症で、重篤な知的障害を伴う難治てんかんである。電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha$ サブユニット2型をコードする遺伝子*SCN2A*の異常が証明される例が増加している。今回のNGS解析で正確に診断できた。

*SCN1A*は電位依存性ナトリウムチャンネル $\alpha$ サブユニット1型蛋白をコードする遺伝子であり、乳児重症ミオクロニーてんかん(SME)あるいはDravet症候群 [OMIM#607208]の責任遺伝子である。本症は新規抗てんかん薬のスチリペンターの有用性が報告されており、てんかんの遺伝子診断は治療方法の選択においても重要である。

#### (4) 小頭症に関して

小児神経領域で、小頭症は頻度の高い疾患である。精神運動発達遅滞、てんかんや発達障害とも関連する。その原因遺伝子は非常に多岐にわたる。

今回、特有の臨床像を持つ複数症例において、稀少な責任遺伝子を同定できた。病態の理解は疾患の受容過程に良好な効果をもたらし、療育にも有用な情報を与えることが期待される。遺伝子診断の結果は遺伝カウンセリングにおいても有意義であった。

新規疾患が考えられるものはさらに多角的に

病態を解析し、臨床像を明確にしていく方針である。

## F. 研究発表

### 2013年

Aoki H, Shiomi M, Ikeda T, Ishii T, Shimizu N, Togawa M, Okamoto N, Kadoya M, Wada Y. Decreased sialylation of IgA1 O-glycans associated with pneumococcal hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Int*. 2013 Dec;55(6):e143-5.

Shimizu K, Wakui K, Kosho T, Okamoto N, Mizuno S, Itomi K, Hattori S, Nishio K, Samura O, Kobayashi Y, Kako Y, Arai T, Oh-Ishi T, Kawame H, Narumi Y, Ohashi H, Fukushima Y. Microarray and FISH-based genotype-phenotype analysis of 22 Japanese patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Dec 19. doi: 10.1002/ajmg.a.36308. [Epub ahead of print]

Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T. 109 kb deletion of chromosome 4p16.3 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;161:1465-9.

Okamoto N, Fujii T, Tanaka J, Saito K, Matsui T, Harada N. A clinical study of patients with pericentromeric deletion and duplication within 16p12.2-p11.2. *Am J Med Genet A*. 2013 Nov 20. doi: 10.1002/ajmg.a.36217. [Epub ahead of print]

Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saito H. PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. *Neurogenetics*. 2013 Nov 20. [Epub ahead of print]

Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor



- B, Perrier J, Aggarwal S, Dalal A, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. *Clin Genet*. 2013 Jul 1. doi: 10.1111/cge.12225. [Epub ahead of print]
- Wada T, Ban H, Matsufuji M, Okamoto N, Enomoto K, Kurosawa K, Aida N. Neuroradiologic Features in X-linked  $\alpha$ -Thalassemia/Mental Retardation Syndrome. *Am J Neuroradiol*. 2013 ;34 :2034-8.
- 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*. 2013;34:108-10
- Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: Detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2013;161:1221-37.
- Hitomi Yatsuki, Ken Higashimoto, Kosuke Jozaki, Kayoko Koide, Junichiro Okada, Yoriko Watanabe, Nobuhiko Okamoto, Yoshinobu Tsuno, Yoko Yoshida, Kazutoshi Ueda, Kenji Shimizu, Hirofumi Ohashi, Tsunehiro Mukai, Hidenobu Soejima. Novel mutations of CDKN1C in Japanese patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Genes and Genetics*
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Sakamoto M, 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 A*. 2013;161A:1073-7.
- Shimada S, Okamoto N, Hirasawa K, Yoshii K, Tani Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Clinical manifestations of Xq28 functional disomy involving MECP2 in one female and two male patients. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:1779-85.
- Shimada S, Okamoto N, Nomura S, Fukui M, Shimakawa S, Sangu N, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Microdeletions of 5.5 Mb (4q13.2-q13.3) and 4.1 Mb (7p15.3-p21.1) associated with a saethre-chotzen-like phenotype, severe intellectual disability, and autism. *Am J Med Genet A*. 2013;161:2078-83.
- Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev*. 2013;35:411-9.
- Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet*. 2013;58:391-4.
- Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *Am J Hum Genet*. 2013;93:173-80.
- Yokoo N, Marumo C, Nishida Y, Iio J, Maeda S, Nonaka M, Maihara T, Chujoh S, Katayama T, Sakazaki H, Matsumoto N, Okamoto N. A case of Toriello-Carey syndrome with severe congenital tracheal stenosis. *Am J Med Genet A*. 2013;161:2291-3.
- Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi JI, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing of a unique brain

malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria and midbrain tectal hyperplasia. *Neuropathology*. 2012 Dec 13.

Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;161:2234-43.

Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H. De Novo Mutations in SLC35A2 Encoding a UDP-Galactose Transporter Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Hum Mutat*. 2013 ;34:1708-14.

Koshimizu E, Miyatake S, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Performance Comparison of Bench-Top Next Generation Sequencers Using Microdroplet PCR-Based Enrichment for Targeted Sequencing in Patients with Autism Spectrum Disorder. *PLoS One*. 2013 Sep 16;8(9):e74167.

Nakajima J, Okamoto N, Shiraishi J, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Kawashima H, Matsumoto N, Miyake N. Novel FIG4 mutations in Yunis-Varon syndrome. *J Hum Genet*. 2013 ;58:822-4.

Ichikawa K, Kadoya M, Wada Y, Okamoto N. Congenital disorder of glycosylation type Ic: report of a Japanese case. *Brain Dev*. 2013;35:586-9.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

分担研究課題：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

分担研究者 加藤光広 山形大学医学部小児科学講座

研究要旨：

昨年度、年齢依存性てんかん性脳症である大田原症候群 12 症例の全エクソーム解析を行い、3 症例で *KCNQ2* の新生変異をみいだした。*KCNQ2* は良性家族性新生児痙攣の原因遺伝子として知られていたが、早期発症の年齢依存性てんかん性脳症における *KCNQ2* 変異の寄与は不明な点が多く、変異率と臨床像を調査した。大田原症候群 51 例、早期ミオクロニー脳症 4 例、ウエスト症候群 104 例、その他の乳児期発症てんかん性脳症 80 例の計 239 例に対して *KCNQ2* の変異解析を行い、病的変異を示した 12 例（大田原症候群 10 例、分類不能の乳児期発症てんかん性脳症 2 例）の臨床型を解析した。全例で発作は新生児期に発症し、発作型は強直発作が多かった。脳波は 11 例がサプレッション・バーストを示した。8 例はカルバマゼピンやフェニトイン、トピラメート、バルプロ酸 Na で発作が消失したが、3 か月の死亡例を除き全例精神遅滞を併発した。*KCNQ2* 変異は大田原症候群の約 20%を占める主要な原因であり、発作予後は比較的良好だが、知能障害の改善が今後の課題である。

A. 研究目的

年齢依存性てんかん性脳症は、発達期に応じた特徴的なてんかん発作と脳波所見を呈し、認知機能や運動障害などの発達障害を併発する。新生児期に発症する大田原症候群と乳児期に発症するウエスト症候群はその代表的疾患であり、私たちはこれまでに *ARX*, *STXBPI*, *SPTANI* など複数の原因遺伝子を明らかにしてきた。Weckhuyzen らは新生児もしくは乳児期発症の原因不明てんかん性脳症 80 例に対して、*KCNQ2* と *KCNQ3* の変異スクリーニング解析を行い、8 例に *KCNQ2* 変異を同定した (Weckhuysen et al. Ann Neurol 2013)。私たちが昨年度大田原症候群 12 症例の全エクソーム解析を行い、3 症例で *KCNQ2* の新生変異をみいだした (Saito et al. Ann Neurol 2012)。*KCNQ2* は良性家族性新生児痙攣の原因遺伝子として知られていたが、早期発症の年齢依存性てんかん性脳症における *KCNQ2* 変異例については不明な点が多い。

本研究では、*KCNQ2* 遺伝子変異による臨床型を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

保護者の承諾を得て、脳形成異常や代謝異常、周産期障害による明らかな原因を除外された年齢依存性てんかん性脳症の患者 239 例（大田原症

候群 51 例、早期ミオクロニー脳症 4 例、ウエスト症候群 104 例、分類不能の乳児期発症てんかん性脳症 80 例）および変異陽性例については両親の血液から DNA を抽出し、さらに臨床情報（発作型・脳波・頭部 MRI・使用薬剤と効果・併発症など）を収集した。

*KCNQ2* 遺伝子の全コード領域を high resolution melting (HRM) 法を用いて変異スクリーニングを行い、陽性例に対して直接塩基配列の解析を行った。大田原症候群 51 例中 30 例については全エクソーム解析を行ない、*KCNQ2* 変異とともに *KCNQ3* 変異の有無を確認した。なお、*STXBPI* 変異例と男性では *ARX* 変異例を除外した。

C. 研究結果

12 例において 10 種類の *KCNQ2* 変異を同定した。すべてミスセンス変異であった。11 例は新生変異で、1 例は新生児期発症のてんかんを認める母がモザイク変異を有していた。

変異症例は、大田原症候群 10 例、分類不能の乳児期発症てんかん性脳症 2 例であった。9 例は生後 3 日以内に、発作や哺乳不良などの初期症状を示し、全例 2 週間以内にてんかん発作を発症した。時間単位もしくは日単位の強直発作が 11 例に認められた。初回脳波は 10 例でサプレッション・バーストを示し、うち 4 例は非対称性パター

ンを、さらに4例は平坦部分が短かった。てんかん性スパズム発作は4例に認められ、ヒプスアリスミアは3例に認められた。もっとも使用されていた薬剤はフェノバルビタールで、8例は単剤もしくは多剤併用療法、ACTH筋注療法で発作は抑制されていた。最終記録脳波は、8例で焦点性もしくは多焦点性突発波を示し、広汎性の突発波は2例のみであった。1例は生後3か月で亡くなっていた。全例中等度から最重度の知的障害を示した。2例は介助なしに歩行が可能であったが、7例は常時臥床状態であった。頭部MRIを入手した9例中6例に、淡蒼球の異常な高信号を認めた。3例で前頭葉の軽度萎縮と菲薄化した脳梁が経過後期に認められた。

#### D. 考察

*KCNQ2* 変異を認めた年齢依存性てんかん性脳症12例中10例は大田原症候群の臨床像を呈し、*KCNQ2* 変異が大田原症候群の主要な原因の一つであることが明らかにされた。その一方、*KCNQ3* 変異は全エクソーム解析を行った大田原症候群30例には認められず、Weckhuysen らの既報告同様、年齢依存性てんかん性脳症のなかの少なくとも大田原症候群における *KCNQ3* 変異の寄与率は低いと考えられた。今回年齢依存性てんかん性脳症に認められた *KCNQ2* 変異は全てミスセンス変異であり、良性家族性新生児痙攣で認められるフレームシフト変異やナンセンス変異とは異なっていた。良性家族性新生児痙攣では *KCNQ2* でコードされるカリウムイオンチャンネルのハプロ不全が疾患原因と推測されているが、良性家族性新生児痙攣の母と分類不能のてんかん性脳症の子に認められた p.Ser247Trp 変異はドミナントネガティブ効果が報告されており、年齢依存性てんかん性脳症における *KCNQ2* 変異の分子病態についてはさらに検討が必要である。

*KCNQ2* 変異による年齢依存性てんかん性脳症と良性家族性新生児痙攣の臨床像を比較すると、胎生期と出産には異常を認めず、生後1週以内に強直発作で発症する点は共通であった。また良性家族性新生児痙攣でも報告があるように、発作が明白になる以前に顔面紅潮もしくは蒼白、無呼吸、哺乳不良などの自律神経症状と考えられる症状が出現していた。初期の発作頻度は、両者で明らかかな差を認めず、一部の良性家族性新生児痙攣では逆に年齢依存性てんかん性脳症よりも頻回の場合がある。

既報告と合わせ *KCNQ2* 変異による年齢依存性

てんかん性脳症23例中18例(78%)において、脳波はサプレッション・バーストを示した。しかし非対称性や短い平坦部分など非典型的なサプレッション・バーストが多く、*KCNQ2* 変異の脳波特徴と考えられた。脳形成異常や *ARX* 変異、*STXBPI* 変異による大田原症候群と比較し、*KCNQ2* 変異による年齢依存性てんかん性脳症の特徴として、初期の発作消失率が高いこと、West 症候群への移行例が少ないこと、カルバマゼピン、フェニトイン、バルプロ酸、トピラマートの有効例が多いことが挙げられる。有効だった4剤はいずれも電位依存性 Na チャネルブロック作用を有する。レチガビンは *KCNQ2* でコードされるカリウムイオンチャンネル Kv7 を選択的に開放することが知られており、*KCNQ2* 変異例に対して、より有効な可能性がある。

#### E. 結論

*KCNQ2* の新生変異は早期乳児に発症する年齢依存性てんかん性脳症の原因となり、臨床像として多くは大田原症候群を示す。抗てんかん薬に反応し発作予後は比較的良いが、運動・認知の予後は非常に不良であり、より効果的な治療法の開発が必要である。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama J, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saito H: De Novo mutations in *GNAO1*, encoding a Galphao subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93:496-505,2013.
- 2) Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragan DE, Villarreal CE, Ohfu M, Writzl K, Gnidovec Strazisar B, Hirabayashi S, Chitayat D, Myles Reid D, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K,