

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られ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グァ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 *PIGM* 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のペアエンドシーケンス (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。現在も顎定なく、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歳でも顎定なく、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, Kodera 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 - 2 SD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

*PIGN*遺伝子変異によるGPIアンカー欠損症は過去には1家系のみでの報告であり、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トール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す、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, Saitsu 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 α -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