

201324094A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

診断未定多発奇形・発達遅滞の実態把握と
病因・病態の解明に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 黒澤 健司

平成 26 年（2014）年 3 月

目次

I. 総括研究報告

診断未定多発奇形・発達遅滞の実態把握と病因・病態の解明に関する研究	1
黒澤健司	

II. 分担研究報告

診断未定多発奇形・発達遅滞の診断解析のアルゴリズムの確立	15
黒澤健司	

正常日本人における染色体欠失・重複のとりまとめ	20
小崎健次郎	

診断未定多発奇形・発達遅滞の実態把握と病因・病態の解明に関する研究	23
小崎里華	

多発奇形・発達遅滞症候群の診断と患児家族支援に関する研究	25
大橋博文	

Pitt-Hopkins 症候群およびその類縁疾患に関する研究	29
岡本伸彦	

重度精神遅滞と小脳低形成、肝線維腫の同胞例の臨床像に関する研究	33
水野誠司	

診断未定多発奇形・発達遅滞を示す患者の病因解明	37
山本俊至	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
---------------------	----

IV. 研究成果に関する刊行物・別刷	49
--------------------	----

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
総合研究報告書

診断未定多発奇形・発達遅滞の実態把握と病因病態の解明に関する研究

研究代表者 黒澤健司

地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター 遺伝科部長

研究要旨

診断未定多発奇形・発達遅滞（MCA/MR（multiple congenital anomalies/mental retardation）、あるいは、MCA/DD・ID（developmental delay・intellectual disability））の診断法の確立と原因を解明し、病態を把握し、発生頻度の推定を行うことを目的として研究を進めた。マイクロアレイ染色体検査を実際に診断として用いた場合の陽性検出率も、施設やプラットフォームが異なるにもかかわらず、海外報告とほぼ一致（10–15%）したことは、臨床検査としての普遍性を証明した。その臨床検査としての導入の際に考慮すべき事項をまとめた。マイクロアレイ染色体検査により検出された疾患特異的 CNV が、従来原因不明とされてきたメンデル遺伝形質の原因解明の手掛かりとなることが明らかになった。診断のみならず病因解明でもマイクロアレイ染色体検査は極めて有用であることが判明した。データの集約により日本人の CNV 多型データベースの構築が可能であることが確認された。マイクロアレイ染色体検査は我が国においても早急に臨床検査として導入すべき遺伝学的検査であると考えられた。原因が依然として明らかとなっていない約 9 割におよぶ症例集団への対応、生体試料を用いた分子レベルでの病態解明、次世代シーケンスの導入などが今後の課題となる。

研究組織

研究分担者

小崎健次郎（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授）
小崎里華（国立成育医療研究センター遺伝診療科 医長）
大橋博文（埼玉県立小児医療センター遺伝科 科長）
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）
水野誠司（愛知県心身障害者コロニー中央病院臨床 第1部長）
山本俊至（東京女子医科大学統合医科学研究所 准教授）

研究協力者

黒田友紀子（神奈川県立こども医療センター遺伝科 医師）
成戸卓也（同 研究員）
井田一美（同 研究員）
大橋育子（同 医師）
榎本啓典（JA とりで総合医療センター小児科 医師）
富永牧子（昭和大学横浜市北部病院小児科 医師）
清水健司（埼玉県立小児医療センター遺伝科 医長）

A. 研究目的

生産児の2-3%は、先天性の奇形を有している。死産児ではさらに頻度は上がり、15-20%で先天性の奇形が認められる。多くは原因不明に分類される。特に原因が不明で診断がつかない多発奇形・発達遅滞症例は、MCA/MR（multiple congenital anomalies/mental retardation）、あるいは、MCA/DD・ID（developmental delay・intellectual disability）と記述され、一つの疾患群としてまとめられる。しかし、診断がつかないこの一群は、診断名がないために疾病統計に表れることがなく、具体的な発生頻度の評価や病態把握もなされない。なおかつ多くの合併症を有し、また発達遅滞に対しては養育・教育環境の整備が必要であり、患者および患者家族の負担は病名のある希少難病の場合と差はない。本研究

は、この診断未定多発奇形・発達遅滞（MCA/DD・ID）の診断法の確立と原因を解明し、病態を把握し、発生頻度の推定を行うことを目的としている。2年目には、確立された診断アルゴリズムの有用性を検証し、具体的な診断指針と医療管理指針をまとめた。

B. 研究方法

①MCA/DD・ID 症例に対するマイクロアレイ染色体検査導入のアルゴリズムの確立 a) 神奈川県立こども医療センター（黒澤分担研究者）

遺伝外来初診症例を対象とし、2011年4月から2013年2月までの1年11カ月間に提出されたMCA/DD・ID症例557例に対してマイクロアレイ染色体検査をおこなった。変異検出率や診断の状況、その後の

医療管理状況をまとめた。臨床診断および評価は、MCA/DD・IDの診断医療管理に経験が豊富な小児科専門医・臨床遺伝専門医によった。評価は臨床診断の他に、診断に基づく種々の遺伝学的検査（染色体標準G分染法、遺伝子シーケンス解析、サブテロメアFISHスクリーニング、High resolution melting 解析スクリーニングなど）を組み合わせ、診断解析を進めた。診断確定に至らない症例については、次世代シーケンス解析を考慮した（症例選択による）。

b) 埼玉県立小児医療センター

埼玉県立小児医療センターでは遺伝検査室を設置して当センターに受診する患者の遺伝学的診断を一元的に行っている。平成23年度の遺伝学的検査の実態を検討した。マイクロアレイ染色体検査は76例を対象とした。

c) 愛知県心身障害者コロニー中央病院

汎用データベースソフトにて先天異常症候群診断用の施設内データベースを作成。2010年～2012年12月の間に受診歴のある患児から、先天多発奇形/精神遅滞（MCA/MR）症例を抽出し、42例の同意を得られた症例に対してマイクロアレイ染色体検査を行った。平成25年度には引き続き解析症例を31例追加し検討を加えた。

d) 国立成育医療研究センター（小崎里華分担研究者）

診断未確定の多発奇形・精神運動発達遅滞児が集積された診療症例を対象に、アレイCGH,MLPA法などの新規診断技術を用いて、確定診断のために遺伝学的解析を行った。解析法は、昨年同様である。分子遺伝学的に診断が確定された症例については、国内外のデータベースの検索を通じて近縁症例を収集し、臨床症状と遺伝学的異

常の関係について検討した。

② 診断未定多発奇形・発達遅滞の発生頻度・診断ならびに患児家族支援に関する研究（大橋研究分担者）

埼玉県という比較的人口の多い県（人口約700万人；年間出生数約6万人）の第三次小児医療施設である埼玉県立小児医療センターで開催された診断後の患児家族支援としての先天異常症候群の集団外来をまとめた。埼玉県立小児医療センターでは、同じ疾患をもつ患児・家族が一緒に集まって、情報の提供と共有、そして患者家族間の交流を通じた心理支援（ピアカウンセリング）を目指した“先天異常症候群集団外来”に取り組んでいる。この集団外来が患者・家族の支援にどのように貢献しているかについて、本年度の集団外来参加家族へアンケート調査を行った。アンケートの内容は、今の気持ちとして、外来に参加してよかったか？、目的を果たすことができたか？、役に立つ情報が得られたか？、次回の集団外来に参加したいか？という観点から、とてもそう思う、そう思う、どちらでもない、そう思わない、全くそう思わない、の5段階の中から選択し、さらに具体的な気持ちを自由に記載してもらった。また、現在子育てに困っていること、または工夫していることなどについても記載してもらったこととした。

③ マイクロアレイ染色体における日本人正常集団のコピー数バリエーション（Copy Number Variant, CNV）データベースの基盤整備（小崎健次郎分担研究者）

コピー数バリエーション（Copy Number Variant, CNV）はレファレンス配列に対して重複や欠失が少なくとも1 kb以上ある

DNA 断片のことである (ACMG, Hutton, 2011)。CNV の解釈には含まれている遺伝子や不均衡のサイズを考慮する必要がある。加えて、両親に存在するか、あるいは新生突然変異であるか、臨床的に意義があると知られている領域と完全にもしくは部分的にオーバーラップしているかどうか、健常コントロールのデータベースで報告されているかどうかを評価する。諸外国においては、病的意義のない CNV を集積したデータベース (例: DCIPHER) が作成されている。一方で、CNV には民族間で差があるとも考えられているため、日本人特有の CNV もあると考えられる。未診断の多発奇形症候群の診断のために行われた患者の検査の健常な両親の CNV データを集積し、病的意義のない CNV 領域を特定した。

対象は、MCA/MR によりアレイ CGH 法を実施された患児の両親とした。専用ソフトウェアを作成し、症例ごとに粗データファイル (エクセル形式) から個人情報削除し、CNV 領域の情報のみを取り出し、bed ファイルとしてアSEMBルし、出力させた。出力されたファイルからは、個人別の CNV 情報を再現することは不能であるようにプログラミングを行った。bed ファイルは染色体番号、欠失もしくは重複の開始位置・終了位置、トラック名、DNA strand の向き、重複もしくは欠失の記載からなる。インターバルが 50 kb 未満のものを破棄した。CNV 領域の bed ファイルをヒト参照配列 (hg19) に統一した後、データベース UCSC genome browser 上で可視化した。

④ マイクロアレイ染色体検査で検出したゲノム再構成を手掛かりとした病態の解明 (岡本分担研究者・山本分担研究者)

小児科領域では多発奇形・発達遅滞は、多く存在する。G 分染法では 3% の症例で異常が同定される。マイクロアレイ染色体検査では 20% 程度で異常が同定される。さらには近年では次世代シーケンサーによる解析で責任遺伝子同定に至る例も増加した。大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科受診中の多発奇形・発達遅滞症例で、マイクロアレイ染色体検査により、新規に診断が判明する症例は年々増加している。さらには次世代シーケンサーを用いた解析で原因が判明する症例も増加した。

⑤ MCA/DD・ID を対象とした診療データベースの構築とマイクロアレイ染色体検査 (水野研究分担者)

汎用データベースソフトにて先天異常症候群診断用の施設内データベースを作成。2010 年～2012 年 12 月の間に受診歴のある患児から、本データベースを用いて特定の検索語句を用いて先天多発奇形/精神遅滞 (MCA/MR) 症例を抽出する。いずれも染色体 G バンド分染法で異常が検出されていない症例を抽出対象とした。

C. 研究結果

① MCA/DD・ID 症例に対するマイクロアレイ染色体検査導入のアルゴリズムの確立

a) 神奈川県立こども医療センター (黒澤)

MCA/DD・ID 557 例に対して診断目的にマイクロアレイ染色体検査を行い、14% に臨床的意義ある CNV を検出した。これらの経験から、解析を進める上でのポイント、結果を患者家族に説明する場合の注意事項をまとめ、検査前後の説明や臨床的意義不明の CNV の取り扱いについてまとめた。

b) 埼玉県立小児医療センター

マイクロアレイ解析は 76 例に行い異常率は 11%であった。

c) 愛知県心身障害者コロニー中央病院

平成25年度には、診断未定多発奇形症例の集積を行い対象患者約50名中既知の症候群に該当しない患児31名に対してマイクロアレイ解析を実施した。結果31名中5名に従来の染色体G分染法で診断し得ない微細欠失／重複症候群を診断した。さらに陽性検出例16p13.11重複では、臨床像と遺伝カウンセリングについて検討した。重複は、16p12.3p13.11の2.6Mbで、過去の報告例で16q13.11領域の微細重複は先天性心疾患や多指などの多発奇形や軽度精神遅滞を呈することがある一方、表現形の特徴を伴わない例もある。多発奇形を伴う染色体構造異常症例の遺伝カウンセリングにおいて、微細欠失症例においては通常de novoである確率が極めて高いが、微細重複症例については親や同胞が同一のコピー数異常を有する場合がある。遺伝カウンセリングにおいてはその情報提供が必要である。今後の症例の集積によりさらなる表現形スペクトラムの解析が望まれる。

d) 国立成育医療研究センター

2013年度(2012年4-2013年12月)にアレイCGH解析を行った症例は35例、そのうち31例解析終了し、陽性2症例であった。8q24.3欠失(1.8Mb)、15q11.2欠失(4.9Mb)であり、1症例は既知症候群であった。病的意義不明のCNVも認め、両親解析も含め検討を行った。

臨床現場への研究成果の活用として、確定診断された児・家族に対し合併症の予測、予後など今後の医療管理の方向性を示すことが可能となった。また、次子再発率の予測など、遺伝カウンセリング上、家族に

は有意義な情報提供をすることができた。本研究で整備された基盤を用いることにより、診断不明例に対する段階的な診断アプローチを実施可能となった。今後は、アレイCGH陰性例については、次世代シーケンサーによる解析を検討したい。

② 診断未定多発奇形・発達遅滞の発生頻度・診断ならびに患児家族支援に関する研究(大橋研究分担者)

2013年度は、4月から12月まで、月2回を基本に、計15回開催した。参加家族数は4~27家族(平均12家族)、他県からの参加も平均3家族であった。すべての外来を合計すると、参加家族数は延べ181家族、参加人数は407名となった。本年度新たな集団外来の試みとして、個別の疾患の枠を超えた疾患横断的な集団外来を開催した。

1)ピット・ホプキンス症候群とモワット・ウィルソン症候群の合同集団外来。互いに稀少疾患であり、それぞれ3家族と2家族をフォロー中であった。2疾患ともに重度の発達遅滞などの共通する症状をもつ。共通点と差異とを意識しつつ、疾患の自然歴と健康管理の情報提供と家族間の交流を行ったが、アンケート結果では大変有意義との回答を得た。2)就学をテーマとして疾患横断的な集団外来。疾患の種類を問わず、共通して多くの患児・家族が遭遇する課題がある。その代表の1つが就学問題である。本年、この就学をテーマとして疾患横断的な集団外来を開催した。具体的には、個別の集団外来を開催している23疾患(発達遅滞を伴う)の患児の中で、2015年度就学予定(5才児)と2016年就学予定(4才児)のもの62名を選び、外来の案内を行った。その結果16人(総人数31人)が参加した。臨床心理士が講義を担当した。疾患は異な

っても、共通した心配点をもつことは稀ではない。症状が類似する疾患同士、あるいは共通したテーマを設定しての集団外来は、きわめて稀な疾患の集団外来開催の実現、また効率のよい情報提供と家族間での意見交換に役立つ一つの方法と考えられた。

③マイクロアレイ染色体における日本人正常集団のコピー数バリエーション (Copy Number Variant, CNV) データベースの基盤整備 (小崎健次郎分担研究者)

こども医療センター症例の CNV データから CNV データベース構築の可能性を検討し、UCSC Genome Browser 上での可視化を確認した。複数施設の複数検体からなるデータベース確立の可能性を確認した。

④マイクロアレイ染色体検査で検出したゲノム再構成を手掛かりとした病態の解明 (岡本分担研究者・山本分担研究者)

Rett 症候群は MECP2 遺伝変異による X 連鎖優性遺伝性疾患である。Rett 症候群同様の知的障害、常同運動を認め、MECP2 に異常がない「Rett 症候群類縁疾患」が多数存在する。Pitt-Hopkins 症候群は Rett 症候群との鑑別が重要である。重度精神運動発達遅滞、特徴的顔貌、無呼吸を伴う間欠的過呼吸、小頭症、近視・斜視・乱視などの眼科異常、てんかん、協調運動障害、手の常同運動などを主要症状とする。TCF4 が責任遺伝子である。現在、国内症例 12 例で変異を同定した。変異のない例について次世代シーケンサを用いて、さらに検討中である。GPI アンカー欠損症が、診断未定の神経疾患症例中に存在することが判明しつつある。150 種以上の蛋白質が GPI アンカーを介して細胞表面に発現する。GPI アンカー生合成とその後の修飾には

25 以上の遺伝子が関わっているが、遺伝子変異があると多くの GPI アンカー型蛋白質が細胞表面に発現できず、多彩な症状が出現する。症状としては高アルカリフォスファターゼ血症、精神運動発達遅滞、てんかん発作などが見られる。分担研究者の施設で 10 症例異常の GPI アンカー欠損症を診断することができた。

東京女子医科大学統合医科学研究所では、新規 193 検体を解析し、ほぼ 15%程度で病的な変化を同定できた。診断率は他施設とほぼ同等であり、マイクロアレイ染色体検査を行うための対象の選定に問題がないことを示している。得られた所見の中には、これまでに知られていない微細染色体異常を示すものが複数例あり、これらについては現在論文作成中である。

D. 考察

マイクロアレイ染色体検査を実際に診断として用いた場合の検出率は、神奈川こども医療センター (14%)、埼玉県立小児医療センター (11%)、愛知県心身障害者コロニー (9.5%)、国立成育医療研究センター (16.2%)、と従来報告されている検出率 10-15%とほぼ一致した値であることを確認できた。施設やプラットフォームが異なりながらも、海外報告および国内施設での実施結果がほぼ一致していることは、臨床検査としての普遍性を証明した。我が国ではまだ保険収載となっていないマイクロアレイ染色体検査の臨床検査としての早期の導入の根拠となる。また、その解析プロセスのアルゴリズム、臨床検査報告の在り方などを提示することができた。病態の把握では、実施施設から報告された各症例はゲノムベースで疾患の成り立ちが検討可能となっている。つまり、診断のみ

ならず病態の把握の点でもマイクロアレイ染色体検査は極めて有用であることが判明した。メンデル遺伝形質の病因解明としても有用であることが分かった。

今後の課題としては、さらに原因が依然として明らかとなっていない約 9 割におよぶ症例集団への対応、生体試料を用いた分子レベルでの病態把握、などが大きな課題となる。こうした 8-9 割の残された症例に対する更なる解析として次世代シーケンサーの位置づけを明らかにすることができた。今後の MCA/DD・ID 解析の極めて有用な手段と新しい解析法を提示したことになる。

マイクロアレイ染色体検査は既に海外では、通常の診療に組み込まれつつある。我が国においては、なおも普及していない。普及のためのデータの蓄積は今後の課題ある。また、パネル解析から臨床エクソーム解析への拡大も海外では、議論が始まりつつあり、我が国でも早急に、こうした遺伝的異質性の高い多発奇形・発達遅滞集団に対して適応を広げるべきであると思われる。

E. 結論

診断や原因が明らかにされていない、しかも遺伝的異質性が極めて高く、その医療負担が決して少なくない診断未定の多発奇形・発達遅滞の臨床検査としてマイクロアレイ染色体検査は早期に導入すべきである。また、次世代シーケンス技術との組み合わせが今後期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

【黒澤健司】

Ishikawa A, Enomoto K, Tominaga M, Saito T, Nagai JI, Furuya N, Ueno K, Ueda H, Masuno M, Kurosawa K. Pure duplication of 19p13.3. *Am J Med Genet A*. 2013 Sep;161(9):2300-4

Yasuda S, Imoto K, Uchida K, Machida D, Yanagi H, Sugiura T, Kurosawa K, Masuda M. Successful Endovascular Treatment of a Ruptured Superior Mesenteric Artery in a Patient with Ehlers-Danlos Syndrome. *Ann Vasc Surg*. 2013;27(7):975.e1-5.

Nagase H, Ishikawa H, Kurosawa K, Furuya N, Itani Y, Yamanaka M. Familial severe congenital diaphragmatic hernia: left herniation in one sibling and bilateral herniation in another. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2013;53(1):54-7.

【小崎里華】

Sasaki A, Sumie M, Wada S, Kosaki R, Kuroswa K, Fukami M, Sago H, Ogata T, Kagami M. Prenatal genetic testing for a microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to UPD(14)pat-like phenotype. *Am J Med Genet A*. 2013 Nov 20. doi: 10.1002/ajmg.a.36185. [Epub ahead of print]

Takenouchi T, Hida M, Sakamoto Y, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Severe congenital lipodystrophy and a progeroid appearance: Mutation in the penultimate exon of FBN1 causing a recognizable phenotype. *Am J Med Genet A*. 2013 Dec;161(12):3057-62.

Takenouchi T, Saito H, Oishi N, Fukushima

- H, Kosaki R, Torii C, Takahashi T, Kenjiro K. Daytime somnolence in an adult with Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Jul;161A(7):1803-5.
- 【大橋博文】
- Ochiai D, Ohashi H, Hisazumi-Watanabe H, Sato Y, Yakubo K, Fukuiya T. Simpson-Golabi-Behmel syndrome diagnosed by postmortem magnetic resonance imaging, restricted autopsy, and molecular genetics: a case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 [Epub ahead of print]
- 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.
- Takahashi M, Ohashi H. Craniofacial and dental malformations in Costello syndrome: A detailed evaluation using multi-detector row computed tomography. *Congenit Anom*. 201 53:67-72
- 【岡本伸彦】
- 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]
- 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.
- 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
- 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.
- 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 Oct 3. doi: 10.1038/jhg.2013.104. [Epub ahead of print]
- 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.
- 【水野誠司】
- Hirai M, Muramatsu Y, Mizuno S, Kurahashi N, Kurahashi H, Nakamura M. Developmental changes in mental rotation ability and visual perspective-taking in children and adults with Williams syndrome. *Front Hum Neurosci*. 2013 Dec 11;7:856
- Nishi E, Takamizawa S, Iio K, Yamada Y, Yoshizawa K, Hatata T, Hiroma T, Mizuno S, Kawame H, Fukushima Y, Nakamura T, Kosho T. Surgical intervention for esophageal atresia in patients with trisomy 18. *Am J Med Genet A*. 2013 Dec 5. [Epub ahead of print]

- Suzumori N, Kaname T, Muramatsu Y, Yanagi K, Kumagai K, Mizuno S, Naritomi K, Saitoh S, Sugiura-Ogasawara M. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013 Nov;39(11):1545-7
- Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T. Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS One.* 2013;8(3):e60105.
- 【山本俊至】
- Yamamoto T, Shimojima K: Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder. *Congenit Anom (Kyoto)* 53: 3-8, 2013.
- 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* 35: 411-419, 2013.
- Okumura A, Shimojima K, Kubota T, Abe S, Yamashita S, Imai K, Okanishi T, Enoki H, Fukasawa T, Tanabe T, Dibbens LM, Shimizu T, Yamamoto T: PRRT2 mutation in Japanese children with benign infantile epilepsy. *Brain Dev (Early On-line View).*
- Shimada S, Maegaki Y, Osawa M, Yamamoto T: Mild developmental delay and obesity in two patients with mosaic 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet (in press)*
- Yamamoto T, Togawa M, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Okamoto N: Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including PAX6, WT1, and PRRG4. *Am J Med Genet (in press)*
- Ishii A, Shioda M, Okumura A, Kidokoro H, Sakauchi M, Shimada S, Shimizu T, Osawa M, Hirose S, Yamamoto T: A recurrent KCNT1 mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy. *Gene* 531:467-71, 2013.
- Sangu N, Shimojima K, Shimada S, Ando T, Yamamoto T: Growth patterns of patients with 1p36 deletion syndrome. *Congenit Anom (Kyoto) (in press)*
- Eto K, Sakai N, Shimada S, Shioda M, Ishigaki K, Hamada Y, Shinpo M, Azuma J, Tominaga K, Shimojima K, Ozono K, Osawa M, Yamamoto T: Microdeletions of 3p21.31 characterized by developmental delay, distinctive features, elevated serum creatine kinase levels, and white matter involvement. *Am J Med Genet* 161A: 3049-56, 2013.
- Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T: 109 kb deletion of chromosome 4p16.3 limited to WHSCR2 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 161A: 1465-9, 2013.
- Yamamoto T, Shimada S, Shimojima K: Fiber-FISH analyses as a diagnostic application for orientation of the microduplications. *World J Med Genet* 3; 5-8, 2013.
- Okumura A, Hayashi M, Tsurui H, Yamakawa Y, Abe S, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T,

- Yamamoto T: Lissencephaly with marked ventricular dilation, agenesis of corpus callosum, and cerebellar hypoplasia caused by TUBA1A mutation. *Brain Dev* 35: 274-279, 2013.
- Shichiji M, Ito Y, Shimojima K, Nakamu H, Oguni H, Osawa M, Yamamoto T: A cryptic microdeletion including MBD5 occurring within the breakpoint of a reciprocal translocation between chromosomes 2 and 5 in a patient with developmental delay and obesity. *Am J Med Genet A* 161A: 850-855, 2013.
- Kobayashi S, Inui T, Wakusawa K, Tanaka S, Nakayama T, Uematsu M, Takayanagi M, Yamamoto T, Haginoya K: A case of atypical benign partial epilepsy with action myoclonus. *Seizure* 22: 242-245, 2013.
- Yamamoto T, Matsuo M, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Aso S, Saito K: De novo triplication of 11q12.3 in a patient with developmental delay and distinctive facial features. *Mol Cytogenet* 6: 15, 2013.
- Shimojima K, Shimada S, Sugawara M, Yoshikawa N, Niijima S, Urao M, Yamamoto T: Challenges in genetic counseling because of intra-familial phenotypic variation of oral-facial-digital syndrome type 1. *Congenit Anom (Kyoto)* 53: 155-159, 2013.
- Usui D, Shimada S, Shimojima K, Sugawara M, Kawasaki H, Shigematu H, Takahashi Y, Inoue Y, Imai K, Yamamoto T: Interstitial duplication of 2q32.1-q33.3 in a patient with epilepsy, developmental delay, and autistic behavior. *Am J Med Genet A* 161A: 1078-1084, 2013.
- Sangu N, Shimosato T, Inoda H, Shimada S, Shimojima K, Ando T, Yamamoto T: A novel nucleotide mutation leading to a recurrent amino acid alteration in SH3BP2 in a patient with cherubism. *Congenit Anom (Kyoto)* 53: 166-169, 2013.
- Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi J, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T: Whole-exome sequence for a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria, and midbrain tectal hyperplasia. *Neuropathology* 33: 553-560, 2013.
- Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T: 101 kb deletion of chromosome 4p16.3 limited to WHSCR2 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A* 161A: 1465-1469, 2013.
- 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* 161A: 2078-2083, 2013.
- Shimojima K, Tanaka R, Shimada S, Sangu N, Nakayama J, Iwasaki N, Yamamoto T: A novel homozygous mutation of GJC2 derived from maternal uniparental disomy in a female patient with Pelizaeus–Merzbacher-like disease. *J*

- Neurol Sci 330: 123-126, 2013.
- Uike K, Matsushita Y, Sakai Y, Togao O, Nagao M, Ishizaki Y, Nagata H, Yamamura K, Torisu H, Hara T. Systemic vascular phenotypes of Loeys-Dietz syndrome in a child carrying a de novo R381P mutation in TGFBR2: a case report. BMC Research Notes 6; 456, 2013.
- Torisu H, Watanabe K, Shimojima K, Sugawara K, Sanefuji M, Ishizaki Y, Sakai Y, Yamashita H, Yamamoto T, Hara T. Girl with a PRRT2 mutation and infantile focal epilepsy with bilateral spikes. Brain Dev (in press).
- Abe Y, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, Yamamoto T, Kunishima S, Haginoya K: Bilateral periventricular nodular heterotopia with megalencephaly: a case report. J Child Neurol (in press).
- Shimojima K, Shimada S, Tamasaki A, Akaboshi S, Komoike Y, Saito A, Furukawa T, Yamamoto T: Novel compound heterozygous mutations of POLR3A revealed by whole-exome sequencing in a patient with hypomyelination. Brain Dev (in press)
- Irahara K, Saito Y, Sugai K, Nakagawa E, Saito T, Komaki H, Nakata Y, Sato N, Baba K, Yamamoto T, Chan W, Andrews C, Engle EC, Sasaki M: Pontine malformation, undecussated pyramidal tracts and regional polymicrogyria: a new syndrome. Pediatr Neurol (in press)
2. 学会発表
【黒澤健司】
- Ohashi I, Kuroda Y, Naruto T, Ida K, Kurosawa K. A case report of 0.12Mb microdeletion at 19p13.2 including NFIX gene. European Human Genetic Conference 2013 2013.6.8-11. Paris, France.
- Kuroda K, Ohashi I, Ida K, Naruto N, Kurosawa K. Deletion of UBE3A gene in brothers with Angelman syndrome close to breakpoint of inversion at 15q11.2 and 15q26.1. European Human Genetic Conference 2013 2013.6.8-11. Paris, France.
- Kuroda Y, Ohashi I, Saito T, Nagai J, Ida K, Naruto T, Masuno M, Kurosawa K. Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of mandibulofacial dysostosis. 63rd American Society of Human Genetics, 2013.10.22-26. Boston
- Yoshihara N, Kurosawa K, Ohashi I, Kuroda Y, Osaka H, Yamashita S, Iai M, Takano K, Okuda M, Takagi M, Anzai R, Wada T. A 3.1 Mb deletion at 2q22.1-q22.3 including NXPH2 gene in a boy with intellectual disability. 63rd American Society of Human Genetics, 2013.10.22-26. Boston
- Naruto T, Kuroda Y, Ohashi I, Kurosawa K. Clinical application for gene disorders in children using bench top sequencer. 63rd American Society of Human Genetics, 2013.10.22-26. Boston
- Nishi Y, Tominaga M, Ueda H, Kuroda Y, Ohashi I, Saito T, Nagai J, Kurosawa K. 6q24.3-q25.1 deletion syndrome. 63rd American Society of Human Genetics, 2013.10.22-26. Boston
- Ohashi I, Kuroda Y, Masuno M, Kuroki Y, Kurosawa K. Estimation of live birth

prevalence of Down syndrome in Japan.
63rd American Society of Human
Genetics, 2013.10.22-26. Boston

【小崎里華】

Kosaki R, Takenouchi T, Hida M, Sakamoto
Y, Torii C, Takahashi T, Kosaki K Sever
congenital lypodystrophy and a progeroid
appearance: Mutation in the penultimate
exon of FBN1 causing a recognizable
phenotype. European Society of Human
Genetics, 2013 6.9

【岡本伸彦】

Okamoto N, Yamamoto Y, Kawato K. A
clinical and molecular study of
Pitt-Hopkins syndrome in Japan.
European Human Genetic Conference
2013 2013.6.8-11. Paris, France.

Okamoto N, Miya F, TTsunoda T, Kato M,
Saitoh S, Yamasaki M, Y Kanemura Y,
Kosaki K Application of targeted
next-generation sequencing in the
diagnosis of pediatric neurological
disorders. 63rd American Society of
Human Genetics, 2013.10.22-26. Boston

【水野誠司】

Mizuno S, Muramatsu Y, Miyake N,
Matsumoto N. Distal interphalangeal
joint contracture and absence of flexion
crease in paediatric patients with Kabuki
syndrome with MLL2 mutation. The
European Human Genetics Conference
Paris, June 8, 2013

Muramatsu Y, Kakizawa H, Shimizu K,
Ohashi H, Hayashi S, Inazawa J, Mizuno
S. Atypical interstitial deletion of
7q11.23 containing whole ELN and
partial LIMK1: Phenotype comparison
with typical Williams syndrome. The
European Human Genetics Conference
Paris, June 8, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

診断未定多発奇形・発達遅滞の診断解析のアルゴリズムの確立

研究代表者 黒澤健司

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター 遺伝科部長

研究要旨

マイクロアレイ染色体検査は、発達遅滞あるいは多発奇形症例の第1段階の臨床診断検査に位置づけられるが、日本ではまだ保険収載とならず、臨床検査として定着はしていない。マイクロアレイ染色体検査は疾患特異的ゲノムコピー数多型（Copy number variant:CNV）を解析症例の10-15%に検出できる極めて有用な遺伝学的検査である。しかし、遺伝学的検査である以上、その実践には慎重さが求められる。適応疾患、適応外疾患、検出できる内容とできない内容、検査の基本原則とそれに基づく検出の限界など、十分理解しておくべきことは多い。さらに、報告書の解釈と伝え方、検査前後の遺伝カウンセリングの在り方、予想外の結果の可能性を認識しておくことも重要である。報告書をそのまま患者家族に伝えるべきではないことは、染色体検査と同じである。マイクロアレイ染色体検査は、担当医、解析担当者（検査室・検査センター）、臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラーなど多くの専門職種が関わる遺伝医療のシステムとして導入されるべきである。

研究協力者

黒田友紀子（神奈川県立こども医療センター遺伝科 医師）

成戸卓也（同 研究員）

井田一美（同 研究員）

大橋育子（同 医師）

榎本啓典（JA とりで総合医療センター小児科 医師）

富永牧子（昭和大学横浜市北部病院小児科 医師）

A. 研究目的

マイクロアレイ染色体検査は、発達遅滞あるいは多発奇形症例の第1段階として

の臨床診断検査に位置づけられることは、既に多くの論文で言われていることである。しかし、我が国ではまだ保険収載とならず、臨床検査として定着していないのが実情である。日本では、身体所見や種々の臨床検査で原因がはっきりしない発達遅滞や多発奇形の原因検索としては、依然として染色体検査が第1選択になるが、実際に染色体検査で異常が検出され、診断に至るのは3-5%に過ぎない。それ以外は、症状から特定の疾患を想定し、丁寧に鑑別してゆくほかないわけで、全ゲノムを対象として疾患特異的ゲノムコピー数（Copy number variant:CNV）を10-15%に検出で

きるマイクロアレイ染色体検査が重視されるのは、当然かもしれない。しかし、遺伝学的検査である以上、その実践には慎重さが求められる。この点でも海外ではいち早く実践に関するガイドラインが提唱された。今回、マイクロアレイ染色体検査を臨床導入する際に必須となる遺伝カウンセリングの内容や、解析アルゴリズム、結果解釈の問題を、自験例を中心に検討した。

B. 研究方法

マイクロアレイ染色体検査の適応は、ACMGのガイドライン(Manning et al., 2010)を基本とし、主にMCA/DD・IDを対象(臨床症状の組み合わせから特定既知症候群が想定できず、標準染色体G分染で異常を認めない)とした。2011年4月から2013年2月までに提出された864例のうち、上記適応を満たした院内症例557例であった。マイクロアレイ染色体検査で得られたゲノムコピー数変異(CNV: Copy number variant)は、「臨床的意義不明」「臨床的意義なし」「臨床的意義あり」と、担当小児科医にわかりやすくするために3つに分類し報告した。解析は、マイクロアレイ解析システム(Agilent Technologies)を用いてデータ解析はGenomic Workbench(同)によった。データ解析設定としてderivative log ratio spread > 0.20を基本とした。臨床的意義あるCNVが検出された場合には、FISHあるいは定量PCR法による罹患者および両親解析による診断の確定を基本とした。これらの経験に基づき、我が国でのマイクロアレイ染色体検査の運用について検討を加えた。

(倫理面への配慮)解析にあたっては施設内倫理審査を経たのちに、本人あるいは代諾者(主に親)の文書による同意を得て行

った。

C・D. 研究結果と考察

MCA/ID・DDの診断確定を主訴に来院の親になぜマイクロアレイ染色体検査が必要なのかをきちんと説明する必要がある。そのためには、こうした多発奇形・発達遅滞の診断のアルゴリズムを担当医が理解し、親に説明する必要がある。マイクロアレイ染色体検査はその診断アプローチのなかに位置づけられる遺伝学的検査の一つである。

一般集団における中等度以上の発達遅滞・精神遅滞、あるいは多発奇形、多発奇形・発達遅滞は、1-3%におよぶ。マイクロアレイ染色体検査の適応は、原因不明の多発奇形・発達遅滞、自閉症スペクトラムなどである。また、既知染色体異常症や遺伝性疾患で、臨床症状と診断に矛盾が生じる場合も適応となる。具体的には、性染色体異常症の中には、目立った外表奇形に乏しく、また、発達遅滞も目立たない場合も少なくない。にもかかわらず、染色体検査結果で説明できない症状が目立つ場合には、マイクロアレイ染色体検査の適応となる。

一方で、適応外疾患も十分心得ておく必要がある。臨床的に診断可能なダウン症候群や18トリソミーなどの異数性染色体異常症や、Williams症候群、22q11.2欠失症候群などの既知の微細欠失症候群が適応外とみなされる。理由は、疾患の病因が極めて均一であり、検査(G分染、あるいはFISH)のコストを理由とする。また、マイクロアレイ染色体検査で検出できない異常も適応外となる。均衡型相互転座や、逆位などの均衡型構造異常は検出できない。つまり、児で転座由来が疑われる臨床

的意義ある CNV が検出されたときに、保因者診断としての両親のマイクロアレイ染色体検査は適応とならない。また、XYY などの性染色体数的異常症もコントロールの適切な設定をしないと見落とされる。アレイのカバーする領域にもよるが、微細なマーカー染色体も検出できないことがある。また、低頻度モザイク（例：Pallister-Killian 症候群、9 トリソミーモザイク）も検出が難しい。また、倍数性異常も見落とされることがある。

しかし、全ての均衡型相互転座が適応外ということではない。一般に均衡型相互転座で症状が出現するのは数%程度と言われるが、症状を伴う均衡型相互転座の場合では切断点が本当に均衡型かをマイクロアレイ染色体検査で検討する必要がある。症状の有無にかかわらず、均衡型転座の切断点は微細な欠失・重複が約 20% で認められる。自験例として、親が症状のない均衡型相互転座の保因者で、同じ均衡型相互転座をもつ児に発達遅滞と外表奇形を認めた家系があった。マイクロアレイ染色体検査の結果、転座染色体とは全く異なった番号の染色体に症状の原因となっていた構造異常が検出された。臨床症状と得られた染色体検査結果との整合性を検討し、マイクロアレイ染色体検査の適応を正しく判断する臨床能力は必要である。

正常多型としての CNV なのか、臨床的意義ある CNV なのか、各種のデータベースを参照しても判断できないことは少なくない。また、公開された海外のデータベースをそのまま日本人にあてはめて考えていいのか、議論はまだ一定しない。CNV 領域について両親解析は不可欠となる。しかし、両親いずれかに検出されたからといって、それが病因でないとは言い切れない。

浸透率を考慮に入れる必要があるからである。さらに、特定の CNV においては、もうひとつ別の CNV の組み合わせが、症状の多様性をもたらしている可能性が示唆されており、遺伝カウンセリングにおいては慎重な対応が求められる。アレイの解析解像度(プラットフォーム)にもよるが、普通は複数の CNV が検出される。解析解像度が高くなればなるほど検出される CNV は膨大な数になる。得られた CNV をそのまま患者家族に伝えても、到底理解は得られない。報告書では、得られた CNV を分類して記載すべきであるし、患者家族に伝える担当医も得られた CNV の意義を理解しておく必要がある。一般的な考え方としては、「明らかに無視できる CNV (Segmental duplication など)」「良性、あるいは臨床的意義がないと考えられる CNV」、「臨床的意義不明の CNV」、「臨床的意義が疑われるが、確定的ではない CNV」、「病原性、あるいは臨床的意義ある CNV」、といった 5 段階程度に分類されるかもしれない。報告書を作成する解析施設(検査センター)ごとに定義が異なるので、把握しておく必要がある。

しかし、それでもなお、正常多型としての CNV なのか、臨床的意義ある CNV なのか、各種のデータベースを参照しても判断できないことは少なくない。判断の一つとして CNV の大きさがあり、臨床的意義の有無とはある程度の相関がある。大きさが 400kb 以上では有意に疾患特異的となることが多い。さらにまた、公開された海外のデータベースがそのまま日本人にあてはめて考えていいのか、議論はまだ一定しない。

マイクロアレイ染色体が臨床応用され始めた早い時期から、同じ領域が欠失ある