

201324099B

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）

メビウス症候群の自然歴に基づく  
健康管理指針作成と病態解明

平成24年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 升野 光雄

平成 26 (2014) 年 3 月

## 目 次

I. 総合研究報告		
メビウス症候群の自然歴に基づく健康管理指針作成と病態解明	-----	1
升野 光雄		
II. 資料		
メビウス症候群の発生頻度の推定と病因解析	-----	13
黒澤 健司		
(資料 1)      メビウス症候群の診断基準 (平成 25 年度 改訂版)	-----	21
(資料 2-5)   メビウス症候群の自然歴	-----	22
(資料 6-10)  メビウス症候群の小児期診療ガイドライン	-----	26
(資料 11)    メビウス症候群の在宅医療管理支援ツール	-----	31
(資料 12-13) メビウス症候群の中枢神経系画像所見の特徴	-----	32
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	35

# I . 総合研究報告

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

メビウス症候群の自然歴に基づく健康管理指針作成と病態解明

研究代表者 升野 光雄  
川崎医療福祉大学 医療福祉学部 医療福祉学科 教授

**研究要旨**

メビウス症候群の類縁疾患も含めた全国二次調査（過去 5 年間）症例と小児専門病院（過去 24 年間）の典型症例における中枢画像所見も含めた臨床像と医療管理の調査をもとに作成したメビウス症候群の診断基準について、日本小児遺伝学会の承認を得た。さらに用語の修正と説明を補足し一部改訂した。

診断基準に基づき、典型例と先天性外転神経麻痺を伴わない不全例の周産期歴・発達歴も含めた自然歴を明らかにした。さらに自然歴を踏まえた小児期診療ガイドラインを作成した。

メビウス症候群の重症例で必要とされる医療管理の中でも最も高度な在宅医療ケアである気管切開とその管理方法、電動吸引器の比較と使用法の動画を家族が理解できるように作成し、本研究班のホームページから閲覧可能とした。

全国二次調査で対象とした新生児科・小児科受診例における中枢神経系 MRI 画像評価では、16 例（典型例 13 例、不全例 3 例）中、典型例 9 例に脳幹形態異常を認めた。第 6・第 7 脳神経を thin slice で評価できた 14 例（典型例 11 例、不全例 3 例）全例に異常を認めた。第 7 脳神経の片側または両側の欠損/低形成は全例で、第 6 脳神経の異常は典型例 10 例で認め、このうち不全例 3 例では第 6 脳神経の異常は明らかではなかった。

責任遺伝子同定を目指し、1 次スクリーニングとして本研究班の診断基準を満たす 19 例に染色体検査およびマイクロアレイ CGH 解析を施行し、染色体微細構造異常は否定された。2 次スクリーニングとしてメビウス症候群類縁疾患で変異が確認されている *TUBB3* や *HOXB1* 遺伝子などを含めた 52 候補遺伝子を次世代シーケンサーにより 17 例に解析したが、病因となる変異は認めなかった。さらに全エクソーム解析を 3 例に行い、共通する遺伝子変異は認められなかったが、今後の解析対象例の蓄積により新規のメビウス症候群責任遺伝子同定が期待される。

**研究分担者**

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  
松井 潔 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 総合診療科 部長  
大山牧子 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 新生児科 医長  
相田典子 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 放射線科 部長  
二宮伸介 公益財団法人大原記念倉敷中央医療機構 倉敷中央病院 遺伝診療部 主任部長

## A. 研究目的

### 1. 背景

メビウス症候群は、先天性顔面神経麻痺と先天性外転神経麻痺を特徴とするが、他の脳神経麻痺や四肢形態異常を伴うこともある。多くは孤発例であるが、30家系ほどの家族例の報告がある。原因は不明で、脳幹（菱脳）の発生障害と考えられている。類縁疾患も含めた日本の実態は明らかではない。根本的治療法はなく、呼吸・嚥下障害をはじめとし合併症は多岐にわたるため、日常生活や医療管理への患者・家族の負担は計り知れない。

これまでに本研究班では、日本での発生頻度は少なくとも生産児 8 万人に 1 人と推定した。日本では、ほとんどが 1 例報告であり、早期診断・医療管理による包括的な対応への組織的な取り組みの報告は本研究班以外にはない。正確な診断基準と自然歴に基づく健康管理指針を作成、公表することで、医療者への啓発を図り、患者・家族が適切な医療を享受することが可能となる。原因として胎生期の虚血（流域梗塞）や遺伝要因が推定されているが、効果的な予防法や根本的な治療法の開発には病因解明が不可欠である。

### 2. 目的

- 1) メビウス症候群の診断基準を作成する。
- 2) メビウス症候群の正確な自然歴を把握する。
- 3) 正確な自然歴に基づいた診療ガイドラインを作成する。
- 4) 原因解明のためゲノム解析による責任遺伝子同定を目指す。
- 5) 患者の生体試料 15 件を目標に収集（ゲノム DNA・細胞株の樹立）・保存し、将来の治療開発への基盤を整備する。
- 6) 研究成果について医療関係者・当事者に情報公開する。

## B. 研究方法

### 1. メビウス症候群の診断基準作成と学会承認

メビウス症候群の類縁疾患も含めた全国二次調査（過去5年間）症例と小児専門病院（過去24年間）の典型症例における中枢画像所見も含めた臨床像と医療管理の調査（平成23・24年度）をもとに本研究班で作成したメビウス症候群の診断基準について、さらに文献的考察を加え、診断のポイントと鑑別診断項目に追記改訂し、平成24年12月3日に日本小児遺伝学会理事会へ承認申請した。

### 2. メビウス症候群の正確な自然歴の把握

平成23年度の全国二次調査による患者の医療情報（合併症の実態および管理状況を含む）と平成24年度のNICU入院・治療歴の調査結果をまとめて、匿名化されたデータベースの作成を行った。

メビウス症候群の自然歴把握のために、診断基準をもとに平成23年度全国二次調査症例を詳細に見直し、典型例と先天性外転神経麻痺を伴わない不全例に分類した。

### 3. 自然歴に基づいた診療ガイドライン作成

小児期の自然歴に基づき、鑑別診断、ライフステージに応じた医療的ケアと療育のポイントをまとめて診療ガイドラインとした。

### 4. 在宅医療管理支援のためのツール作成

メビウス症候群の重症例で必要とされる医療管理の中でも最も高度な在宅医療ケアである気管切開とその管理方法、電動吸引器の比較と使用法について、家族が理解できるよう動画を作成した。

### 5. 中枢神経系 MRI 画像所見の検討

本研究班の全国二次調査症例のうち、MRIによる中枢画像解析の協力が得られ画像が提供された 16 例（典型例 13 例、不全例 3 例）には脳幹の形態と信号異常を、2mm 以下の 3D 画像が撮像された 14 例（典型例 11 例、不全例 3

例)では第6・第7脳神経の形態について検討した。

## 6. 責任遺伝子同定に向けた戦略

責任遺伝子同定を目指し、マイクロアレイCGH解析によるスクリーニングを本研究班のメビウス症候群診断基準を満たす典型例19例に行った。メビウス症候群類縁疾患を含むcongenital cranial dysinnervation disordersで確認されている8個の責任遺伝子およびその遺伝子と機能的にクラスターあるいはネットワークを構成する代表的な44遺伝子(GenomeNetで検索)の計52候補遺伝子をHaloPlex・次世代シーケンサーで典型例17例解析した。更に全エクソーム解析に着手した。

## 7. 患者の生体試料の保存

研究分担者の所属機関で常法により樹立したリンパ芽球様細胞株、培養皮膚線維芽細胞株とゲノムDNAを保存した。

## 8. 研究成果について医療関係者・当事者への情報公開

調査研究によって得られた情報の患者家族への還元と医療・保健・教育・療育・福祉関係者への啓発のため、本研究班のホームページを更新した。

(倫理面への配慮)

・各研究項目の倫理審査委員会承認状況

### 1. 全国疫学調査

「メビウス症候群の全国調査に基づく診断基準と健康管理指針作成に関する研究」(申請者: 升野光雄) 川崎医療福祉大学倫理委員会承認(平成23年10月4日付け)

### 2. ゲノム解析

「原因不明多発奇形精神遅滞症候群のゲノムワイドな病因解析」(申請者: 黒澤健司) 神奈川県立こども医療センター倫理委員会承認(平成22年7月22日付け)

「次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患の

解析研究」(申請者: 黒澤健司) 神奈川県立こども医療センター倫理委員会承認(平成24年8月29日付け)

### 3. 生体試料の難病研究資源バンク(独立行政法人医薬基盤研究所)への寄託

「先天異常症候群患者の保存細胞の公的難病研究資源バンクへの寄託」(申請者: 黒澤健司) 神奈川県立こども医療センター倫理委員会承認(平成22年8月11日付け)

## C. 研究結果

### 1. メビウス症候群の診断基準作成と学会承認

本研究班で作成したメビウス症候群の診断基準について、平成25年4月17日に日本小児遺伝学会理事会で承認を得た。さらに補助項目の中樞神経系画像診断の用語をより明確な表現にし、鑑別診断の周産期脳障害の説明を追加した(資料1)。

### 2. メビウス症候群の自然歴

診断基準に基づき全国調査症例を詳細に見直し、再集計を行うことにより、典型例の自然歴をまとめるとともに、先天性外転神経麻痺を伴わず、四肢形態異常の頻度が低いメビウス症候群の不全例の特徴をより明確にした。今回対象とした新生児科・小児科受診例では、先天性顔面神経麻痺と外転神経麻痺以外に呼吸障害、哺乳障害、嚥下障害、精神運動発達遅滞などの頻度が高く、濃厚な医療管理を要していた。

先天性外転神経麻痺を伴わず、四肢形態異常の頻度が低い不全例7例では、典型例20例と比べて、患者出生時の父平均年齢が高く、四肢形態異常として片側の内反尖足を1例に認めるのみで、遺伝的要因を含めて病的に異質な疾患の可能性が示唆された。典型例ではCT施行例の6割に脳幹石灰化を認め、これらの症例では病因として胎生期の血流障害が示唆された(資料2-5)。

### 3. 自然歴に基づいた診療ガイドライン作成

本症の症状は、先天性顔面神経麻痺・外転神経麻痺に限局した例から、新生児期より濃厚な医療を必要とする例まで幅が広い。重症例の症状は類似しており積極的な医療的ケアを行うことでQOLの改善、発達・発育の促進が得られる。重症例も徐々に医療的ケアから離脱でき、発達も緩徐ではあるが確実に伸びていく。そのためには早期診断が必要で、神経学的所見と画像検査が重要である。本症に類似した「メビウス様症候群」を呈する疾患も同様に幅が広く医療的ケアは類似している。本症は多くの専門科による集学的医療が必要であり、児と家族を支援するため地域連携も欠かせない。

鑑別診断、小児期ライフステージに応じた医療的ケアと療育のポイントを示した（資料6-10）。

### 4. 在宅医療管理支援のためのツール作成

メビウス症候群の重症例の在宅医療ケアで必要となる気管切開とその管理方法、電動吸引器の比較と使用法の動画を作成し、本研究班のホームページから閲覧可能とした（資料11）。

### 5. 中枢神経系MRI画像所見の特徴

#### 1) 脳幹奇形群

16例（典型例13例、不全例3例）中、典型例9例が脳幹奇形と診断された。このうち2例は中脳蓋の肥厚、中脳水道狭窄による水頭症、橋から延髄の低形成を示す共通の所見で、1例に小脳異常を合併した。7例は橋延髄移行部から延髄の低形成を呈し、第6・第7脳神経を評価できた全例で異常が見られた。

#### 2) 非奇形群

脳幹奇形を認めない7例（典型例4例、不全例3例）は全例信号異常や小脳異常を認めず、全体または部分的に小さい脳幹を呈した例が2例（典型例）あり、1mm以下の脳神経撮像を行った1例で第6・第7脳神経異常を認めた。

5例（典型例2例、不全例3例）では脳幹形態は正常と判断され、1mm以下の脳神経撮像を行った全例で第7脳神経異常を、2例（典型例）で第6脳神経異常を認めた（資料12-13）。

### 6. 責任遺伝子同定に向けた戦略

マイクロアレイCGH解析によるスクリーニングでは、メビウス症候群典型例19例に病因となるゲノムコピー数異常は認めなかった。典型例17例に関してメビウス症候群類縁疾患で既知の8遺伝子およびクラスターを形成する44遺伝子、計52遺伝子を解析した。17例のいずれにも有意な変異は認めず、遺伝的異質性の高い疾患の場合、amplicon-based疾患関連遺伝子パネル解析では限界があると考えられた。

これらの結果を踏まえ、原因遺伝子検索目的に全エクソーム解析を3例に行ったが、共通する遺伝子変異は認められなかった。

### 7. 患者の生体試料の保存

将来の治療開発への基盤整備として、メビウス症候群患者のリンパ芽球様細胞株7件、培養皮膚線維芽細胞1件を樹立・保存し、ゲノムDNA19件を保存した。

### 8. 研究成果について医療関係者・当事者への情報公開

本研究班のホームページに研究成果を更新し、平成26年3月に公開した。

## D. 考察

今回調査対象とした新生児科・小児科受診例では、先天性顔面神経麻痺と外転神経麻痺以外に呼吸障害、哺乳障害、嚥下障害、精神運動発達遅滞などの頻度が高く、脳幹の低形成との関連が一因と示唆された。

今回の調査対象では、第7脳神経の欠損/低形成がほぼ例外なく認められ、第6脳神経の異常も典型例ではほぼ全例に認めることが示唆され、典型例では両神経の異常とともに奇形など

の脳幹異常が高い頻度で認められると考えられる。今後、臨床像との関連を詳細に検討することで、メビウス症候群の重症度分類に MRI による脳幹と第 6・第 7 脳神経評価が反映できる可能性が示唆される。

診断基準に基づき明らかにした、典型例と不全例の周産期歴・発達歴も含めた自然歴を踏まえた小児期診療ガイドラインを作成した。これは、メビウス症候群以外の脳幹機能障害を呈する児にも広く活用できる。

責任遺伝子同定に向けて、次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を継続し、確定診断法および治療法開発への基盤とする。

このように疾患ごとに丁寧に先天奇形症候群の研究を継続することは、短期的にも長期的にも先天異常や遺伝性疾患をもつ患者・家族の QOL 向上に寄与すると考えられる。

## E. 結論

本研究班によるメビウス症候群の診断基準について日本小児遺伝学会の承認を得た。さらに用語の表現を一部改訂した。

診断基準に基づき明らかとなった典型例と不全例の周産期歴・発達歴も含めた自然歴を踏まえた小児期診療ガイドラインを作成した。

メビウス症候群の重症例の在宅医療ケアで必要となる気管切開とその管理方法、電動吸引器の比較と使用法の動画を作成し、本研究班のホームページから閲覧可能とした。

新生児科・小児科受診例では、第 6・第 7 脳神経の欠損/低形成とともに形態異常などの脳幹異常が高い頻度で認められた。

責任遺伝子同定のためのゲノム解析システムを整備し、全エクソーム解析を継続中である。

インターネットホームページにより研究成果を公表した（平成 26 年 3 月更新公開）。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Masuno M, Watanabe A, Naing BT, Shimada T, Fujimoto W, Ninomiya S, Ueda Y, Kadota K, Kotaka T, Kondo E, Yamanouchi Y, Inoue M, Ouchi K, Kuroki Y. Ehlers-Danlos syndrome, vascular type: A novel missense mutation in the *COL3A1* gene. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2012; 52(4):207-210.

Enomoto K, Kishitani Y, Tominaga M, Ishikawa A, Furuya N, Aida N, Masuno M, Yamada K, Kurosawa K. Expression analysis of a 17p terminal deletion, including YWHAE, but not PFAFH1B1, associated with normal brain structure on MRI in a young girl. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(9):2347-2352.

Kurosawa K, Tanoshima-Takei M, Yamamoto T, Ishikawa H, Masuno M, Tanaka Y, Yamanaka M. Sirenomelia with a de novo balanced translocation 46,X,t(X;16)(p11.23;p12.3). *Congenit Anom (Kyoto)*. 2012;52(2):106-110.

Kurosawa K, Enomoto K, Tominaga M, Furuya N, Sameshima K, Iai M, Take H, Shinkai M, Ishikawa H, Yamanaka M, Matsui K, Masuno M. Spastic quadriplegia in Down syndrome with congenital duodenal stenosis/atresia. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2012;52(2):78-81.

Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto YI, 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;158:1292-1303.
- 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 epidemiology. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:1083-1094.
- Tachibana Y, Aida N, Enomoto K, Iai M, Kurosawa K. A case of Sjögren-Larsson syndrome with minimal MR imaging findings facilitated by proton spectroscopy. *Pediatr Radiol.* 2012;42:380-382.
- 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.
- Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T. Paternal uniparental disomy 14 and related disorders. Placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics.* 2012;7:1142-1150.
- Saito H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama K, Nishimura A, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N. Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Split-Robo Rho GTPase activating protein 2 (SRGAP2). *Am J Med Genet A.* 2012;158A:199-205.
- 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;158A:1982-1986.
- 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;52:82-86.
- Tanoue K, Matsui K, Nozawa K, Aida N. Predictive value of early radiological findings in inflicted traumatic brain injury. *Acta Paediatr.* 2012;101(6):614-617.
- Murakami A, Gomi K, Tanaka M, Ohyama M, Itani Y, Ishikawa H, Aida N, Furuya M, Tanaka Y. Unilateral glomerulocystic kidney disease associated with tuberous sclerosis complex in a neonate. *Pathol Int.* 2012;62(3):209-215.
- Niwa T, Aida N, Tanaka Y, Tanaka M, Shiomi M, Machida J. Scurvy in a child with autism: magnetic resonance imaging and pathological findings. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2012;34(6):484-487.
- Tanigawa J, Kaneko K, Honda M, Harashima H, Murayama K, Wada T, Takano K, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Aida N, Ohtake A, Osaka H. Two Japanese patients with Leigh syndrome caused by novel SURF1 mutations. *Brain Dev.* 2012;34(10):861-865.
- Odagiri K, Omura M, Hata M, Aida N, Niwa T, Ogino I, Kigasawa H, Ito S, Adachi M, Inoue T. Treatment outcomes, growth

- height, and neuroendocrine functions in patients with intracranial germ cell tumors treated with chemoradiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;84(3):632-638.
- Tachibana Y, Niwa T, Kwee TC, Takahara T, Kusagiri K, Nagaoka T, Watanabe R, Aida N. Effective performance of T(1)-weighted FLAIR Imaging with BLADE in pediatric brains. *Magn Reson Med Sci.* 2012; 11(1):17-26.
- Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Saitsu H, Salomons GS, Jakobs C, Aida N, Toshihiro S, Kuhara T, Matsumoto N. Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol Genet Metab.* 2012;106(1):43-47.
- 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.* 2012 Jun 5. [Epub ahead of print]
- Gomi K, Tanaka M, Yoshida M, Ito S, Sonoda M, Iwasaki F, Niwa T, Aida N, Kigasawa H, Tanaka Y. Primary cerebellar histiocytic sarcoma in a 17-month-old girl. *J Neurosurg Pediatr.* 2012;10(2):126-129.
- Tomiyasu M, Aida N, Watanabe Y, Mori K, Endo K, Kusakiri K, Kershaw J, Obata T, Osaka H. Monitoring the brain metabolites of children with acute encephalopathy caused by the H1N1 virus responsible for the 2009 influenza pandemic: a quantitative in vivo 1H MR spectroscopy study. *Magn Reson Imaging.* 2012;30(10):1527-1533.
- Hino-Shishikura A, Niwa T, Aida N, Okabe T, Nagaoka T, Shibasaki J. Periventricular nodular heterotopia is related to severity of the hindbrain deformity in Chiari II malformation. *Pediatr Radiol.* 2012; 42(10):1212-1217.
- 石川亜貴、榎本啓典、古谷憲孝、室谷浩二、朝倉由美、安達昌功、黒澤健司. CHARGE 症候群 26 例の臨床的検討. *日小児会誌.* 116:1357-1364, 2012.
- 升野光雄. 多科連携における不育症への小児科の役割—出生前対応を含む—. *周産期医学* 42(8):1021-1025, 2012.
- 升野光雄. ダウン症候群 (21-トリソミー症候群). 今日の治療指針 2013 年版, 山口 徹, 北原光夫, 福井次矢編, 医学書院, 東京, 1238-1239, 2013.
- Kuroda Y, Ohashi I, Tominaga M, Saito T, Nagai JI, Ida K, Naruto T, Masuno M, Kurosawa K. De novo duplication of 17p13.1-p13.2 in a patient with intellectual disability and obesity. *Am J Med Genet A.* 2014 Mar 25. [Epub ahead of print]
- Ishikawa A, Enomoto K, Tominaga M, Saito T, Nagai J, Furuya N, Ueno K, Ueda H, Masuno M, Kurosawa K. Pure duplication of 19p13.3. *Am J Med Genet A.* 2013;161:2300-4.
- 升野光雄. Möbius 症候群. 別冊 日本臨床 神経症候群 (第 2 版) IV—その他の神経疾患を含めて— 印刷中
- Sasaki A, Sumie M, Wada S, Kosaki R, Kurosawa 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*. 2014;164(1):264-6.
- Mori T, Mori K, Ito H, Goji A, Miyazaki M, Harada M, Kurosawa K, Kagami S. Age-Related Changes in a Patient With Pelizaeus-Merzbacher Disease Determined by Repeated 1H-Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Child Neurol*. 2013 Sep 20. [Epub ahead of print]
- Ueda H, Sugiura T, Takeshita S, Ito K, Kakita H, Nagasaki R, Kurosawa K, Saitoh S. Combination of Miller-Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation. *Eur J Pediatr*. 2013 Aug 11. [Epub ahead of print]
- 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.
- 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(1):173-80.
- Komatsu T, Duckyoung Y, Ito A, Kurosawa K, Maehata Y, Kubodera T, Ikeda M, Lee MC. Increased oxidative stress biomarkers in the saliva of Down syndrome patients. *Arch Oral Biol*. 2013;58(9):1246-50.
- Kato K, Tanaka M, Toyoda Y, Kigasawa H, Ohama Y, Nishi T, Okuzumi S, Kurosawa K, Aida N, Nagahara N, Tanaka Y. A novel fluorescence in situ hybridization assay for synovial sarcoma. *Pathol Res Pract*. 2013;209(5):309-13.
- 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.
- Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H. Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. *Pediatr Radiol In press*
- Tomiyasu M, Aida N, Endo M, Shibasaki J, Nozawa K, Shimizu E, Tsuji H, Obata T. Neonatal Brain Metabolite Concentrations: An In Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy Study with a Clinical MR System at 3 Tesla. *PLoS One*. 2013;8(11):e82746.
- Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, Shimosawa N, Takamura A, Doi H, Tomita-Katsumoto

- A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Eto Y, Tanaka F, Matsumoto N, Saito H. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. *Neurogenetics*. 2013;14(3-4):225-32.
- Kato H, Miyake F, Shimbo H, Ohya M, Sugawara H, Aida N, Anzai R, Takagi M, Okuda M, Takano K, Wada T, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8. *Brain Dev*. 2013 Sep 14. [Epub ahead of print]
- Tachibana Y, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Kusagiri K, Mori K, Endo K, Obata T, Inoue T. Analysis of multiple B-value diffusion-weighted imaging in pediatric acute encephalopathy. *PLoS One*. 2013;8(6):e63869.
- Wada T, Ban H, Matsufuji M, Okamoto N, Enomoto K, Kurosawa K, Aida N. Neuroradiologic features in X-linked  $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34(10):2034-8.
- Mitani T, Aida N, Tomiyasu M, Wada T, Osaka H. Transient ischemic attack-like episodes without stroke-like lesions in MELAS. *Pediatr Radiol*. 2013;43(10):1400-3.
- Kato K, Tanaka M, Toyoda Y, Kigasawa H, Ohama Y, Nishi T, Okuzumi S, Kurosawa K, Aida N, Nagahara N, Tanaka Y. A novel fluorescence in situ hybridization assay for synovial sarcoma. *Pathol Res Pract*. 2013;209(5):309-13.
- Nozaki T, Nosaka S, Miyazaki O, Makidono A, Yamamoto A, Niwa T, Tsutsumi Y, Aida N, Masaki H, Saida Y. Syndromes associated with vascular tumors and malformations: a pictorial review. *Radiographics*. 2013;33(1):175-95.
- Kouga T, Iai M, Yamashita S, Aida N, Takanashi J, Osaka H. A child with three episodes of reversible splenic lesion. *Neuropediatrics*. 2013;44(4):199-202.
- 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*. 2013;35(4):312-6.
- Tanoue K, Aida N, Matsui K. Apparent diffusion coefficient values predict outcomes of abusive head trauma. *Acta Paediatr*. 2013;102(8):805-8.
- 松井 潔, 田上幸治, 片岡 愛, 荻原 俊. 身長, 体重, 頭囲, 胸囲, 腹囲, 上・下肢長. *小児内科* 2013;45:613-615.
- 松井 潔, 田上幸治, 片岡 愛, 荻原 俊, 矢島秀起, 奥野理奈. 小児病院における二次性カルニチン欠乏の検討. 小児科臨床印刷中
- 松井 潔. 二分脊椎・キアリ奇形. 小児科診療印刷中
- Toyoshima K, Kawataki M, Ohyama M, Shibasaki J, Yamaguchi N, Hoshino R,

Itani Y, Nakazawa M. Tailor-made circulatory management based on the stress-velocity relationship in preterm infants. *J Formos Med Assoc.* 2013; 112(9):510-7.

二宮伸介. 臨床における遺伝学的検査について. 倉敷中央病院年報 2013; 75:1-8.

## 2. 学会発表

升野光雄、黒澤健司、松井 潔、片岡 愛、田上幸治、大山牧子、柴崎 淳、相田典子、小河原昇、山本敦子、二宮伸介、山内泰子、黒木良和. メビウス症候群の小児期の臨床像と医療管理. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 (2012 年 10 月 27 日、東京)

升野光雄、黒澤健司、松井 潔、片岡 愛、田上幸治、大山牧子、柴崎 淳、相田典子、小河原昇、山本敦子、二宮伸介、山内泰子、黒木良和. メビウス症候群の診断基準と小児期健康管理指針の作成. 日本人類遺伝学会第 58 回大会 (2013 年 11 月 21 日、仙台)

大橋育子、片岡 愛、柴崎 淳、大山牧子、松井 潔. 次世代シーケンサーを用いたメビウス症候群原因遺伝子探索. 第 58 回日本未熟児新生児学会 (2013 年 12 月 1 日、金沢)

藤井裕太、相田典子、野澤久美子、野村幸一郎、松井 潔、升野光雄、井上登美夫. メビウス症候群における中枢画像の特徴. 第 43 回日本神経放射線学会 (2014 年 3 月 22 日、米子)

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学術集会 (2012 年 4 月 19 日、久留米)

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 回日本小児科学会学術集会 (2012 年 4 月 22 日、福岡)

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総会 (2012 年 5 月 18 日、札幌)

牧 優子、山内泰子、升野光雄、黒木良和. 岡山県の保健所設置市における保健師の遺伝に関する相談の実態—遺伝医療と地域保健との連携についての検討—. 第 36 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 (2012 年 6 月 8 日、松本)

山内泰子、升野光雄、峠 和美、大西敬子、黒木良和. 地域における臨床医の遺伝医療に関する意識調査. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 (2012 年 10 月 26 日、東京)

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 重複の女児例. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 (2012 年 10 月 26 日、東京)

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. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 (2012 年 10 月 26 日、東京)

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. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 (2012 年 10 月 26 日、東京)

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. 日本人類遺伝学会第57回大会 (2012年10月26日、東京)
- 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. 日本人類遺伝学会第57回大会 (2012年10月26日、東京)
- 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、Sengstag Thierry、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. 日本人類遺伝学会第57回大会 (2012年10月27日、東京)
- 升野光雄、山内泰子、赤池洋人、荻田聡子、尾内一信. 川崎医科大学附属病院小児科遺伝外来～8年間の概要～. 第85回日本小児科学会岡山地方会 (2012年12月2日、岡山)
- 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 Annual Meeting, The American Society of Human Genetics, San Francisco, 2012.11.6-10.
- 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 Annual Meeting, The American Society of Human Genetics, San Francisco, 2012.11.6-10.
- 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 Annual Meeting, The American Society of Human Genetics, San Francisco, 2012.11.6-10.
- 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 Annual Meeting, The American Society of Human Genetics, San Francisco, 2012.11.6-10.
- 相田典子. よくわかる小児脳MRI. 第27回宮崎MRI研究会 (2013年3月16日、宮崎)
- 黒田友紀子、大橋育子、井田一美、成戸卓也、升野光雄、黒澤健司. Marfan 類縁疾患に対する次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンス解析. 第36回日本小児遺伝学会学術集会 (2013年4月18日、広島)
- 大橋育子、黒田友紀子、古谷憲孝、升野光雄、黒木良和、黒澤健司. 遺伝外来受診集団を手掛かりとしたダウン症候群発生頻度の動向. 第116回日本小児科学会学術集会 (2013年4月19日、広島)
- 富永牧子、黒田友紀子、松井 潔、古谷憲孝、升野光雄、黒澤健司. 新しいゲノム病 13q12 欠失症候群の1例. 第116回日本小児科学会学術集会 (2013年4月21日、広島)
- 黒田友紀子、大橋育子、高野享子、和田敬仁、小坂 仁、松井 潔、黒澤健司. 先天奇形症候群での次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析. 第116回日本小児科学会学術集会 (2013年4月19日、広島)

黒田友紀子、大橋育子、高野亨子、和田敬二、松井 潔、小坂 仁、黒澤健司。次世代シーケンサーを用いた小児神経疾患のターゲットシーケンス解析のワークフロー。第 55 回日本小児神経学会学術集会（2013 年 5 月 30 日、大分）

峠 和美、山内泰子、大西敬子、升野光雄、黒木良和。出生後のダウン症候群の診断告知の時に、医療者が親へ伝える情報。第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（2013 年 6 月 21 日、川崎）

大西敬子、山内泰子、峠 和美、黒木良和、升野光雄。FileMaker Pro 11 を用いた遺伝カウンセリング記録作成ツールの作成。第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（2013 年 6 月 22 日、川崎）

黒田友紀子、大橋育子、松浦久美、西川智子、黒澤健司。次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析における遺伝カウンセリング。第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（2013 年 6 月 22 日、川崎）

大橋育子、黒田友紀子、井田一美、成戸卓也、永井淳一、水野誠司、升野光雄、黒澤健司。マイクロアレイ染色体検査における「臨床的意義不明」の結果報告と問題点。第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（2013 年 6 月 22 日、川崎）

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 Annual Meeting, The American Society of Human

Genetics, 2013.10.23, Boston

成戸卓也、黒田友紀子、大橋育子、黒澤健司。ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた小児疾患ターゲットシーケンスの臨床応用。日本人類遺伝学会第 58 回大会（2013 年 11 月 22 日、仙台）

大橋育子、黒田友紀子、成戸卓也、真鍋理一郎、吉武和敏、池尾一穂、黒澤健司。エクソーム解析により新規疾患関連遺伝子変異を同定した多発奇形・発達遅滞同胞例。日本人類遺伝学会第 58 回大会（2013 年 11 月 21 日、仙台）

黒田友紀子、大橋育子、成戸卓也、高野亨子、和田敬二、黒澤健司。Ciliopathy (Joubert 類縁疾患) パネルを用いた網羅的遺伝子解析。日本人類遺伝学会第 58 回大会（2013 年 11 月 23 日、仙台）

河内佳子、高原里枝、清水雅代、二宮伸介。当院における ART 妊娠後と自然妊娠後の初期流産絨毛の染色体分析。日本人類遺伝学会第 58 回大会（2013 年 11 月 21 日、仙台）

松井 潔。こどもの虐待：地域の一員としての役割を考える。第 28 回保団連医療研究集会（2013 年 10 月 12 日、横浜）

#### 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。

## II. 資料

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

メビウス症候群の発生頻度の推定と病因解析

研究分担者 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**

現在まで病因が明らかにされていないメビウス症候群の発生頻度の推定および責任遺伝子の同定を試みた。最初に、神奈川県における小児病院遺伝外来の先天異常・奇形症候群症例の受診状況から、メビウス症候群の発生頻度を推定した。観察期間 1991–2008 年の 18 年間に出生した 11 例のメビウス症候群症例を経験し、この間に 1098 例の Down 症候群新患症例の受診があった。Down 症候群受診例とメビウス症例の発生頻度の比が一定と仮定すると、確定診断例の発生頻度は少なくとも 80,000 出生に 1 例と推定した。

さらに、原因遺伝子同定を目的として、マイクロアレイ CGH 解析と次世代シーケンサーによる候補遺伝子パネル（メビウス症候群類縁疾患で既知報告の 8 遺伝子およびクラスターを形成する 44 遺伝子）解析を本研究班作成のメビウス症候群診断基準を満たす 17 例に対して行った。17 例のいずれにも有意な変異は認めないことから、原因遺伝子検索目的に全エクソーム解析を開始し、3 例に施行した。3 例に共通する遺伝子変異は認められなかったものの、今後、解析対象例の蓄積により、新規のメビウス症候群責任遺伝子同定を目指す予定である。

**共同研究者**

大橋育子（神奈川県立こども医療センター  
遺伝科）

黒田友紀子（同 遺伝科）

成戸卓也（同 遺伝科）

松井 潔（同 総合診療科）

片岡 愛（同 総合診療科）

田上幸治（同 総合診療科）

二宮伸介（倉敷中央病院 遺伝診療部）

94, 1888)。孤発例がほとんどであるが、家族例もまれに報告されている。原因については現在まで明確にされていないが、遺伝的要因の可能性（Legum et al., Clin Genet 20:254-259, 1981; Stabile et al., Clin Genet 25:459-463, 1984）と血流の障害による虚血を原因とする可能性（Bavinck et al., Am J Med Genet 23:903-918, 1986; St. Charles et al., Am J Med Genet 47:289-293, 1993）の 2 つが主に提唱されている。

発生頻度は、50,000 出生に 1 例と報告されている（Verzijl et al., Neurology 61: 327-333, 2003）。

根本的治療はなく、対象療法が中心となっている。医療管理は出生直後から始まり、呼吸・

**A. 研究目的**

メビウス症候群は先天性顔面神経麻痺、外転神経麻痺、四肢欠損を特徴する多発奇形症候群で、1888 年にメビウスによって提唱された Möbius PJ., Munch Med Wochenschr 35:91-

摂食・コミュニケーションなど心理社会的対応・教育など生涯にわたっての全身管理が必要であり、疾患の理解が不可欠である。現在まで、我が国においてはこうしたメビウス症候群に関する包括的かつ総合的研究はなく、実態は不明な状況にある。

ごく最近になり、これまでほとんど進展が見られなかったメビウス症候群病因解析研究において、2つの大きな進展があった。一つは、6つの $\beta$ -tubulinの一つである $\beta$ -tubulin isotype IIIの異常が、神経軸索の伸長の方向性や維持に障害をきたし、脳幹部眼球運動ニューロンの障害を介して、先天性外眼筋線維化症3型（congenital fibrosis of the extraocular muscle type 3; CFEOM3）を引き起こすことが報告された（Tischfield et al., Cell 140:74-87, 2010）。この症候群は、上記CFEOM3とよばれるものの、臨床的にメビウス症候群と極めて類似した臨床像を呈する。もう一つは、メビウス症候群群類似の仮面様顔貌、難聴、顔面神経麻痺を呈した近親婚家系を手掛かりに、*HOXB1*のホモ接合変異を同定した報告である（Webb et al., Am J Hum Genet 91:171-179, 2012）。

これらのことから、脳幹形成および中枢神経系形成に関わる細胞骨格形成因子や転写因子が病因として深く関わるものが推測される。近年の分子細胞遺伝学的解析の進歩により多くの奇形症候群の病因が明らかにされつつある。特にマイクロアレイCGHの普及は奇形症候群責任遺伝子同定に大きく貢献している。

以上の背景から、最初に我が国におけるメビウス症候群の発生頻度の推定を行い、さらに病因解明を目的に、マイクロアレイCGH解析および次世代シーケンサーによる候補遺伝子の網羅的解析（パネル解析ならびにエクソーム解析）を行った。

## B. 研究方法

### 1. メビウス症候群発生頻度の推定

対象は、1991–2008年の18年間に神奈川県立こども医療センター遺伝科へ受診歴のある11例のメビウス症候群症例である。

診断は臨床症状の組み合わせから、臨床遺伝専門医でもある経験豊かなDysmorphologyの専門家あるいは小児神経専門医によってなされた。ほぼ全例で染色体検査など遺伝学的検査がなされて染色体異常症を含めた既知の奇形症候群は臨床的に否定されている。これら11例の出生を年次ごとにまとめ、出生状況に揺らぎがあるか検討した。比較対象として、これら対象症例の出生年次に遺伝科を初診となったダウン症候群症例を取り上げた。ダウン症候群は最も頻度の高い常染色体異常症であり、一般集団における発生頻度は約800出生に1例で、人種差はない。発生頻度が比較的一定で、診断が容易であるダウン症候群との比を観察することにより、発生頻度を推定した。また、ダウン症候群の発生頻度が県内において一定であることを確認するために、神奈川県における先天異常モニタリング調査のデータも参考とした。

### 2. マイクロアレイCGHおよび次世代シーケンサーによる病因解析

対象はメビウス症候群の全国調査に基づく診断基準と健康管理指針作成研究班の二次調査に登録し、かつ原因遺伝子解析に同意が得られた17例である。

全例に染色体検査およびマイクロアレイCGH解析を1次スクリーニングとして施行し、染色体微細構造異常は否定されている。マイクロアレイCGH解析は、Agilent社製SurePrint G3 8x60kのプラットフォームでデータ解析はMicroarray Work Benchによった。ゲノムDNAは、QIAamp DNA Blood Mini kitを用い

て自動抽出機で末梢血液から抽出した。2 次スクリーニングとしてメビウス症候群類縁疾患で既知報告の 8 遺伝子およびクラスターを形成する 44 遺伝子、計 52 遺伝子を対象とした解析を行った。解析対象候補遺伝子の絞り込みは文献情報・先行研究を参考とし、それらを手掛かりに国立遺伝学研究所が開設している Genome Network Platform に属する PPI Network から、関連する遺伝子をさらに絞り込んだ。具体的には、*CHN1* (Duane retraction syndrome 責任遺伝子)、*HOXA1*、*HOXB1*、*KIF21A*、*PHOX2A*、*ROBO3* (controls neurite outgrowth, growth cone guidance 責任遺伝子)、*ROBO1*、*ROBO2*、*SALL4* (Duane-radial ray syndrome 責任遺伝子)、*TUBB3* (congenital fibrosis of the extraocular muscles type 3 責任遺伝子)、*CAD*、*TUBA1A*、*TUBA1B*、*TUBA1C*、*TUBA4A*、*TUBB2A*、*TUBB4B*、*TUBB3*、*TUBB*、*TUBB6* などを含む、52 遺伝子に絞り込んだ。解析方法として、我々は、アレイによる候補領域のキャプチャーではなく、PCR ベースでのカスタムアンプリコン (HaloPlex Agilent 社製) によるターゲットエンリッチメントを行った。解析領域は 112.195 kb で、設計時のカバー率は 98.99%であった。解析は Miseq (Illumina) で行い、得られたデータは、MiSeq 付属の MiSeq Reporter により解析 (annotation、alignment)、また BWA+GATK、Picard、MiSeqReporter、SureCall、ANNOVAR を用いた独自の pipeline を用いた解析も行った。得られた情報の可視化として、Broad Institute の IGV を用いて (bam ファイル) 確認した。

また、全エクソーム解析は対象 3 例 (パネル解析例 1 例、新規登録例 2 例) に対して HaloPlex Exome (Agilent Technologies) を用いてエンリッチメントを行った。解析領域は 37 Mb で 21,522 遺伝子を対象とした。

(倫理面への配慮)

発生頻度に関する研究ではすべての個人情報 は潜在化させた。次世代シーケンサーによる解析は、神奈川県立こども医療センター倫理審査において、研究課題「次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患の解析研究」として平成 24 年 8 月 29 日に承認を得たものである。検査前に十分な説明を行い、文書により同意のもとで解析を行った。

### C. 研究結果

#### 1. メビウス症候群発生頻度の推定

神奈川県における小児病院遺伝外来の先天異常・奇形症候群症例の受診状況から、メビウス症候群の発生頻度を推定した。観察期間 1991-2008 年の 18 年間に出生した 11 症例のメビウス症候群を経験し、この間に 1098 例の Down 症候群新患症例の受診があった。Down 症候群の遺伝外来受診群は神奈川県一般集団における発生動向を反映していた。メビウス症例 11 例の出生は 18 年間で極端な偏りはなく、Down 症候群受診例とメビウス症例の発生頻度の比が一定と仮定すると、その比は 1:100 となり、この期間の神奈川県における推定の Down 症候群発生頻度 (10-12/10,000 出生) を考慮すると、確定診断例の発生頻度は少なくとも 80,000 出生に 1 例と推定された。生命的予後、さらには診断の難易度による診断未確定例が潜在している可能性を考慮すると 40,000-80,000 出生に 1 例と推測されるかもしれない。

#### 2. マイクロアレイ CGH および次世代シーケンサーによる病因解析

マイクロアレイ CGH 解析では、疾患特異的とみなされるゲノムコピー数変化は認められなかった。amplicon-based パネル解析 52 遺伝子の平均カバレッジは 344 reads で、20 reads 以上の CCDS は 95%と良好な結果を得た。3

つの病原性を疑う variant (*GTF3C1*, *NCOR1*, *CREBBP* いずれもヘテロ接合変異) を検出したが、家系解析により両親のいずれかに由来しており疾患との関連はないと判断した。17 例の解析では既知の遺伝子変異を認めず、クラスターを形成する遺伝子解析においても有意な結果は得られなかった。

全エクソーム解析の平均 coverage は 34 reads で、CCDS>5 reads は 79% であり、標準的な解析は可能であった。各症例平均 380 の variant が認められた。3 例に共通した疾患関連遺伝子変異は認められなかった。

#### D. 考察

メビウス症候群の発生頻度についての報告は、Verzijl らの報告 (Verzijl et al., *Neurology* 61: 327-333, 2003) が唯一である。これは、オランダにおける 37 例のメビウス症候群の臨床像をまとめたもので、約 50,000 出生に 1 例としている。必ずしも Verzijl らは全国疫学調査を行ったわけではなく、主に自験例を中心に集計している。しかし、オランダという国の規模 (人口 1600 万人、集計年の総出生数 189,000 人) を考慮すると、比較的妥当な推定値と考えられる。今回の我々の推定も直接のメビウス症候群疫学調査に基づいたものではないが、神奈川県における人口ベースの先天異常疫学調査のデータとの比較を基本とした。神奈川県の人口規模がオランダのほぼ 1/2 であることから比較は妥当と考えられる。非常に興味深いことは、我々の推定値がオランダでの推定値とほぼ一致したことである。今後の課題としては、我が国全体レベルでの発生頻度の推定と実態把握があげられる。

これまで、メビウス症候群様多発奇形症例において、*TUBB3* のヘテロ接合変異、*HOXB1* のホモ接合変異、*FGF8* のヘテロ接合変異の報

告がある。これらのことから、脳幹形成および中枢神経系形成に関わる細胞骨格形成因子や転写因子が病因として深く関与することが推測される。今回、メビウス症候群責任候補遺伝子に関する研究の進展に基づき、次世代シーケンサーによる網羅的なスクリーニングを展開した。対象 17 例では、疾患特異的と考えられる変異は検出できなかった。既知の疾患関連遺伝子に関する解析では、amplicon-based パネル解析は複数の遺伝子を多数対象例に対して同時に解析することが可能で、極めて有用な解析手法である。しかし、選択した遺伝子のみの解析となるため、遺伝的異質性が高い疾患の場合には対象遺伝子を全て網羅しているとは言い難く、今回のパネル解析の限界と考えた。さらに、原因遺伝子同定のためにはより詳細な解析が必要と考え、卓上型次世代シーケンサーで解析可能なプラットフォーム HaloPlex exome を用いての全エクソーム解析を行った。現時点で、既知のメビウス症候群様多発奇形症候群の責任遺伝子に変異を検出していない。メビウス症候群疾患関連遺伝子の同定は重要な課題でありさらに解析数を増やすことによって、新規原因遺伝子の同定が期待される。

#### E. 結論

メビウス症候群の我が国における発生頻度を少なくとも 80,000 出生に 1 例と推定した。

次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析をメビウス症候群典型例 17 例で行った。現在まで、原因と考えられる遺伝子変異を検出していないが、今後全エクソーム解析による責任遺伝子同定を目指す予定である。