

201324130A

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)

染色体微細構造異常による発達障害の実態把握と  
疾患特異的 iPS 細胞による病態解析・治療法開発

(H25-難治等(難)-一般-014)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 俊至  
東京女子医科大学 統合医科学研究所

平成 26 (2014)年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
染色体微細構造異常による発達障害の実態把握と疾患特異的iPS細胞 による病態解析・治療法開発 山本俊至	..... 1
II. 分担研究報告	
1. 新規染色体微細欠失症候群の確立 山本俊至	..... 14
2. アレイCGHを用いた小児中枢神経疾患におけるCNV解析 奥村彰久	..... 20
3. 錐体路および脳幹構造の形成異常を呈する症例の遺伝学的検討 斎藤義朗	..... 25
4. 染色体微細構造異常における脳形成異常と発達障害の関連性に 関する研究 鳥巢浩幸	..... 27
5. 染色体微細構造異常に基づくDravet症候群発症についての実態把握 中山東城	..... 31
6. 19番染色体における微細欠失症候群 岡本伸彦	..... 34
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 41

# I . 総括研究報告

染色体微細構造異常による発達障害の実態把握と  
疾患特異的 iPS 細胞による病態解析・治療法開発

研究代表者 山本 俊至 東京女子医科大学統合医科学研究所・准教授

研究要旨

**研究目的:**

マイクロアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析の手法が普及することで、染色体微細構造異常が非特異的な発達障害の原因となっていることが次第に明らかになってきた。このことは中枢神経系において重要な働きを担っている遺伝子は、ゲノムコピーの変化によって重大な影響を来すということを示唆している。本研究では、ここ数年の間に明らかになってきた発達障害の原因となり得る新規染色体微細構造異常 30 疾患を対象として実態把握を行うとともに、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析・治療法開発を目指して取り組んできた。単一の遺伝子変異による遺伝子病の場合には、当該遺伝子を実験動物においてノックダウンするなどにより病態解析を行うことができるのに対して、染色体微細構造異常の場合は、隣り合う複数の遺伝子を同時にノックダウンする必要があり、ゲノム重複の場合には実験動物で再現することがほぼ不可能であるということが疾患特異的 iPS 細胞を利用した病態解析を行う理由である。

**研究方法:**

- A. 実態把握; 30 疾患の患者数を調査した。
- B. 診断支援; 原因不明の新規発達障害患者を対象としてゲノムコピー数解析を行った。
- C. マイクロアレイ染色体検査の対象選定基準策定; 疾患対象の基準を考察した。
- D. 各症候群のガイドライン作成; 各疾患のガイドラインについて検討した。
- E. 患者家族会設立支援; 各疾患の患者家族会の設立を支援した。
- F. 疾患特異的 iPS 細胞による病態解析と治療法研究; 各疾患患者からの生細胞の収集に努めた。

**結果と考察:**

新規患者 193 例の診断支援を行い、30 疾患に該当する全 95 例の症例の存在を確認した。リスト化された 30 疾患に該当しない新規染色体微細欠失を示す症例に関しては、データベースを参照して情報収集を行い、これらが新規染色体微細欠失症候群であることを報告した。これらの患者から、次年度以降の疾患特異的 iPS 細胞による病態解析研究のために皮膚線維芽細胞を収集した。さらに今後のガイドラインの作成に必要な臨床情報の収集を行った。30 疾患のうち、1p36 欠失症候群患者の会の支援を行い、交流会を開催した。

**結論:**

発達障害を来す染色体微細構造異常症候群のうち、既知の 30 疾患に該当する症例の蓄積を行いつつ、新たな染色体微細欠失症候群を確立させた。次年度以降のガイドライン作成や疾患特異的 iPS 細胞による病態解析への道筋を確立させた。

**研究組織****研究代表者:**

東京女子医科大学統合医科学研究所

山本俊至

**研究分担者:**

地方独立行政法人大阪府立病院機構

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

順天堂大学医学部小児科・思春期科学教室

奥村彰久

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

斎藤義朗

東京女子医科大学医学部小児科

平澤恭子

九州大学医学部小児科

鳥巢浩幸

東北大学医学部小児科

中山東城

東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

松尾真理

**1. 研究目的**

2005年頃よりマイクロアレイ染色体検査が臨床的に応用されるようになると、それまでの染色体検査法では同定することができないためよく知られていなかった新しい染色体微細構造異常による疾患が次々と明らかになってきた。染色体微細構造異常により生じる臨床症状は、多くの場合、非特異的な発達障害や精神発達遅滞、てんかんなどの中枢神経症状で占められる。それはヒトの中枢神経の発達や正常な働きにおいては非常に多くの遺伝子が関わっており、それらの重要な遺伝子においては、対立遺

伝子の一方の欠失や重複だけで症状が出やすいという特徴があるためと考えられる。染色体微細構造異常は単に欠失だけではなく、その領域が重複する場合にも、中枢神経症状を発現することが多いが、症状だけで診断することは極めて困難であり、マイクロアレイ染色体検査によってはじめて診断することが可能となる場合が多い。

我々は、マイクロアレイ染色体検査により、これまでに多くの染色体微細構造異常を明らかにし、そのうち原因不明の発達障害患者において最も頻度が高い 1p36 欠失症候群に関して、平成 24 年度までの 3 年間、難治性疾患克服研究事業のテーマとして取り組み、その成果として「1p36 欠失症候群ガイドブック」を刊行した。これらの経緯を踏まえ、我々が過去に診断に関わった全 30 疾患(別添表参照)を対象を広げ、本邦における実態把握調査を行い、診断と治療のガイドラインを作成するとともに、患者の同意を得て疾患 iPS 細胞による病態解析・治療法開発を行う。

染色体微細構造異常症候群は、当該染色体領域に含まれた遺伝子のコピー数の増減によって症状が引き起こされる。多くの場合、当該染色体領域に含まれる複数の遺伝子によって症状の発現が複雑に規定される。従ってマウスを使ったノックアウトの手法では、多くの場合単一遺伝子の欠損による phenotype しか解析できないために、染色体微細構造異常の病態解析を行うのは困難であり、ほとんど研究されていないのが現状である。それに対して、疾患患者由来 iPS 細胞を利用すれば、患者の染色体構造異常をリアルに反映した phenotype を in vitro で解析することが可能となる。申請者らはすでに iPS 細胞を使った病態解析研

究を進めているが、本研究課題に関しては「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」の拠点機関と連携し、対象となる 30 疾患の患者さんから細胞の提供を受けて疾患 iPS 細胞を樹立し、将来の病態解析研究に資することを目標とする。

対象30疾患リスト
1p36欠失症候群
Proximal 1p36欠失症候群
1q44欠失症候群
2p15-p16.1欠失症候群
Feingold症候群(2p24.3欠失)
2q23.1欠失症候群( <i>MBD5</i> )
2q24.2-q24.3欠失/重複症候群( <i>SCN1A</i> )
2q32.1-q33.3欠失/重複症候群( <i>SATB2</i> )
2q37欠失症候群
3p21.31欠失症候群
Cri-du-chat症候群(5pサブテロメア欠失)
5q14.3欠失症候群( <i>MEF2C</i> )
5q31欠失症候群
Williams症候群(7q11.23欠失)
8pサブテロメア欠失
Langer-Giedion症候群(8q24.11欠失)
11p12-p14欠失症候群
Jacobsen症候群(11qサブテロメア欠失)
16p11.2欠失/重複症候群
Miller-Dieker症候群(17pサブテロメア欠失)
17p13.1欠失症候群( <i>GABARAP</i> )
Smith-Magenis症候群(17p11.2欠失)
Potocki-Lupski症候群(17p11.2重複)
21qサブテロメア欠失症候群
DiGeorge症候群(22q11.2欠失)
22q11.2重複症候群
Phelan-McDermid症候群(22q13欠失)
Xp11.3-p11.4欠失( <i>MAOA, MAOB, CASK</i> )
Xq11.1欠失症候群( <i>ARHGEF9</i> )
<i>MECP2</i> 重複症候群(Xq28重複)

## 2. 研究方法

### A. 実態把握

本邦における染色体微細構造異常症候群の実態を把握するための疫学調査を実施する。実施にあたっては、日本小児神経学会などの協力を得て、専門医施設などに対して全 30 疾患を含めた染色体微細構造

異常患者の有無に関する 1 次調査を行う。回答のあった施設に対しては 2 次調査を行い、患者登録を行うとともに臨床症状などに関する詳細な実態を把握し、疫学的評価を行う。自験例も含め、回収された情報を分析し、診断・治療ガイドラインを症候群毎に作成する。(総括;山本、分担;岡本、奥村、斎藤)

### B. 診断支援

諸外国においては、マイクロアレイ染色体検査が原因不明の精神発達遅滞患者における遺伝学的検査の第一段階の検査として行われるようになってきているのに対して、本邦では保険システムの違いもあり、まだほとんど普及していないのが現状である。そのため、本研究においては、臨床的に微細染色体異常症候群が疑われるも診断が確定していない患者サンプルと臨床情報を収集し、次に述べる要検査対象患者の選定基準に則りマイクロアレイ染色体検査を施行し、診断結果を提供する。診断が確定した場合、臨床情報を先の全国調査の結果に加え、各症候群のガイドライン作成の参考とする。(総括;山本、分担;松尾)

### C. マイクロアレイ染色体検査の対象選定基準策定

本邦においては、マイクロアレイ染色体検査そのものの普及が進んでおらず、要検査対象患者の選定基準や診断後の患者の疾患毎の細分化も遅々として進んでいない。このような現状に鑑み、本研究においては、要検査対象患者の選定基準について検討し、その基準に則って未診断患者の診断を進める。実施後の診断率などの結果から、

選定基準の妥当性について検証し、最終的にはマイクロアレイ染色体検査の対象選定基準として提言する。(分担;松尾)

#### D.各症候群のガイドライン作成

本研究においては、全 30 疾患を対象として神経心理学的評価結果の収集(平澤)、神経放射線学的評価結果の収集(鳥巢)、電気生理学的評価結果の収集(中山)を行い、各症候群毎の診断ガイドライン(岡本)と治療ガイドライン(奥村)を作成し、さらに医療的管理・療育基準とリハビリ指針(平澤)を作成する。これらのガイドラインや指針は、日本小児神経学会で承認を得ることを目標とし、承認後はホームページなどを通じて公開するとともに、患者会なども対象とした公開シンポジウムを行って発表する。

#### E.患者家族会設立支援

本研究が対象とする疾患群はいずれも希少で、患者同士の情報交換もままならない。申請者らは、1p36 欠失症候群の家族会設立を支援した経験を生かし、ウェブなどを利用した家族相互の連携体制を構築し、将来的には疾患毎に自立した患者会設立を目指す。(山本、岡本、斎藤)

#### F.疾患特異的 iPS 細胞による病態解析と治療法研究

確実に診断された患者のうち、インフォームド・コンセントが得られた患者を対象に、疾患 iPS 細胞を樹立する(山本)。研究代表者はすでに多くの疾患 iPS 細胞を樹立し、神経系細胞に分化誘導して病態解析を行ってきた経験を有しているが、本研究においては、「疾患特異的 iPS 細胞を活用した

難病研究」の樹立拠点機関と連携し、バンク化を前提とした iPS 細胞樹立を行う。インフォームド・コンセント取得においては、樹立拠点と協同し、共通した書式を使用することにより、よりスムーズな研究の推進に資する。樹立拠点によって樹立された iPS 細胞を使って各疾患の病態解析を行うとともに、将来の治療法開発研究に備える。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針(厚生労働省告示第 255 号)に従って取り扱う。本研究においては患者情報に基づく疫学調査を行うことから、個人情報に配慮する必要があるため、倫理委員会の承認を得て、個人を特定できる情報を除いた調査を行う。マイクロアレイ染色体検査と疾患 iPS 細胞による研究についてはすでに東京女子医科大学の倫理委員会の承認済であるが、書面に基づく説明と書面によるインフォームド・コンセントが必要である。細胞をバンクに寄託する場合には、あらためて承諾を得る必要があるが、基本的には収集される検体には、二重連結可能匿名化番号を付与し、二重連結可能匿名化番号、同意書のコピー1部、および患者情報票のコピー1部については、個人情報管理者が管理する。個人情報と匿名化後の ID を連結する対応表はコンピューターの外部記憶装置に保存し、鍵のかかるキャビネット内で個人情報管理者が保管する。試料等に関するデータベースをコンピューターを用いて取り扱う場合は、インターネットや他のコンピューターから切り離れた状態で取り扱う。

### 3. 研究結果

## A. 実態把握

当初計画では全国調査を行う予定であったが、班員間での意見交換により、そもそも非常に発症頻度の低い疾患であり、マイクロアレイ染色体検査を行わなければ診断がつかないため、全国調査を行うことは非効率ではないかとの意見が大勢を占めたため、マイクロアレイ染色体検査を行っている施設への聞き取り調査を行うことに変更した。また、当初対象としていた DiGeorge 症候群と Williams 症候群は、発症頻度が高く、そもそも希少疾患として馴染まないとの指摘があり、今回の調査対象から外すこととなった。マイクロアレイ染色体検査を実施している施設に聞き取り調査を行った結果、表に挙げる患者の存在を把握することができた。

対象30疾患リスト	症例数
1p36欠失症候群	90
Proximal 1p36欠失症候群	5
1q44欠失症候群	1
2p15-p16.1欠失症候群	1
Feingold症候群(2p24.3欠失)	5
2q23.1欠失症候群(MBD5)	1
2q24.2-q24.3欠失/重複症候群(SCN1A)	5
2q32.1-q33.3欠失/重複症候群(SATB2)	1
2q37欠失症候群	2
3p21.31欠失症候群	2
Cri-du-chat症候群(5pサブテロメア欠失)	0
5q14.3欠失症候群(MEF2C)	1
5q31欠失症候群	2
Williams症候群(7q11.23欠失)	
8pサブテロメア欠失	1
Langer-Giedion症候群(8q24.11欠失)	1
11p12-p14欠失症候群	2
Jacobsen症候群(11qサブテロメア欠失)	1
16p11.2欠失/重複症候群	5
Miller-Dieker症候群(17pサブテロメア欠失)	3
17p13.1欠失症候群(GABARAP)	1
Smith-Magenis症候群(17p11.2欠失)	2
Potocki-Lupski症候群(17p11.2重複)	0
21qサブテロメア欠失症候群	3
DiGeorge症候群(22q11.2欠失)	
22q11.2重複症候群	5
Phelan-McDermid症候群(22q13欠失)	3
Xp11.3-p11.4欠失(MAOA, MAOB, CASK)	1
Xq11.1欠失症候群(ARHGEF9)	1
MECP2重複症候群(Xq28重複)	5

## B. 診断支援

マイクロアレイ染色体検査は本邦においては遅々として普及していないため、自施設で解析できない機関がほとんどである。そこで、臨床症状から本研究において対象としている微細染色体異常が疑われる疾患患者の検体を受け入れ、研究代表者施設において解析する支援体制を構築した。本年においては計 193 検体の解析を受け入れた。

## C. マイクロアレイ染色体検査の対象選定基準策定

解析対象の選定方法については、検討の結果、日本小児遺伝学会ホームページに公開されている「マイクロアレイ染色体検査(cytogenetic microarray)の臨床応用について」を全面的に支持することとした。

## D. 各症候群のガイドライン作成

ガイドライン作成のためには該当疾患患者の情報収集が何よりも重要である。今年度は今後のガイドライン作成のための資料とするため、本邦における各疾患患者の情報収集を行ってきた。

## E. 患者家族会設立支援



(家族会交流会の様子)



本研究班の研究対象の1つである 1p36 欠失症候群の患者会に対して継続的な支援を行い、平成 25 年 9 月 1 日に東京女子医科大学において、患者家族交流会を開催した。現在患者家族間の情報交換のためのメーリングリストの支援を行っている。今後他の疾患患者にも支援を広げていく予定である。

#### F. 疾患特異的 iPS 細胞による病態解析と治療法研究

疾患 iPS 細胞の樹立に関して、今年度 2 名の患者から皮膚線維芽細胞の提供を受けた。現在 iPS 細胞の樹立に取り組んでいるところである。

#### 4. 考察

マイクロアレイ染色体検査によって明らかになる微細染色体異常について新たな症例の蓄積を行うことができた。発達障害を来す患者のうち、マイクロアレイ染色体検査によって染色体微細欠失が明らかになる例は 17% であり、他施設からの報告とほぼ同等であることが示された。微細欠失の種類は様々であり、反復して認められる例は非常に稀である。各微細染色体異常症候群の診断基準や診療ガイドラインを作成していくには可能な限り多くの症例の蓄積が必要となるため、本邦における解析施設からのデータの収集が必要であると考えられ、今後日本版のデータベース構築が望まれる。

#### 5. 評価

##### 1) 達成度について

今年度は各微細染色体異常症候群の症例における臨床情報の収集を行った。各疾

患の発症頻度が低だけでなく、マイクロアレイによるゲノムコピー数解析の手法が広まっていないため、5 例以上把握できた疾患は 7 疾患に限られていた。さらに多くの患者情報を掘り起こすためには、マイクロアレイによるゲノムコピー数解析の手法そのものをさらに普及させる必要があると考えられる。

iPS 細胞樹立のために皮膚線維芽細胞の収集を行うことができたのはわずかに 2 例であった。皮膚線維芽細胞の採取にはバイオプシーという侵襲性の高い手法が用いられることがインフォームド・コンセントを取るにあたって難しいハードルとなったと考えられる。今後は末梢血など、簡単に採取できる生体由来細胞から iPS 細胞を樹立できるようにすべきと考える。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究において新たに認められた微細染色体異常について、現在複数の国際学術論文としてまとめているところであり、研究成果の公開という面で社会的意義があったと考える。本邦においてはマイクロアレイ染色体検査そのものの普及が遅れているため、微細染色体異常に関する一般小児科医レベルにおける理解が深まっていない。本研究の促進のためには、マイクロアレイ染色体検査によって初めて明らかにされる微細染色体異常による発達障害についての理解を広めるための啓発活動が何よりも重要であると考えられる。

##### 3) 今後の展望について

診断基準や診療ガイドラインの作成は、

来年度以降の研究班に引き継がれる予定である。

#### 4) 研究内容の効率性について

マイクロアレイ染色体検査では、ほぼ常に 17%程度の確率で診断が得られる。このことから得られた成果を確実に国際学術論文の形にまとめることができていると考える。一方、疾患 iPS 細胞による病態解析では、iPS 細胞の樹立から病変組織への分化誘導などに非常に時間がかかるため、効率的とは言えない。しかし、病態解析のためには疾患 iPS 細胞を利用する以外に方法がない場合があるため、非効率であっても推進していかなければならないものであると考える。

#### 6. 結論

本研究において、非常に稀な微細染色体異常によって発達障害を来した症例の情報収集を行った。対象疾患とした 30 疾患のうち、診断基準や診療ガイドラインの作成が進んだ疾患もあれば、症例の情報収集が進んでいない疾患もあり、次年度以降の研究班に引き継がれるべきと考える。

#### 7. 健康危険情報

特になし

#### 8. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表	10 件
原著論文による発表	0 件
それ以外(レビュー等)の発表	0 件
そのうち主なもの	

#### 論文発表

なし。

#### 学会発表

1. 山本俊至、島田姿野、下島圭子、松尾真理、平澤恭子、前垣義弘、今井克美、岡本伸彦：非典型的な欠失範囲を示す 1p36 欠失症候群患者の臨床症状の検討 -Genotype-phenotype 関連解析-。第 55 回日本小児神経学会学術集会，2013.5.30-6.1，大分。
2. 下島圭子、山本俊至：小児神経疾患領域における疾患特異的 iPS 細胞の病態解析への応用。第 55 回日本小児神経学会学術集会，2013.5.30-6.1，大分。
3. 小倉加恵子、荒川千賀子、下島圭子、竹下研三、山本俊至：2q37 欠失症候群 2 例における神経心理学的症候の検討。第 55 回日本小児神経学会学術集会，2013.5.30-6.1，大分。
4. 山本俊至：発達障害に関わるゲノム構造異常と疾患感受性遺伝子。第 55 回日本小児神経学会学術集会，2013.5.30-6.1，大分。
5. 山本俊至：[合同シンポジウム;個別化医療の新展開にむけて]染色体分析の今後。第 20 回日本遺伝子診療学会，2013.7.18-20，浜松。
6. 山本俊至：次世代シーケンスによる小児神経疾患の解明。第 53 回日本先天異常学会学術集会，2013.7. 21-23，大阪。
7. 下島圭子、田中竜太、島田姿野、三宮範子、中山純子、岩崎信明、山本俊

- 至: Pelizaeus-Merzbacher-like disease 患者に認められた GJC2 ホモ変異は母親性ダイソミーによる LOH によって生じた. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013.11.20-23, 仙台.
8. 島田姿野、前垣義弘、坂本晴子、下島圭子、大澤真木子、永田智、山本俊至: モザイクによる 1p36 欠失症候群の 3 症例とその臨床的な特徴. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013.11.20-23, 仙台.
  9. 三宮範子、島田姿野、下島圭子、山本俊至: 1p36 欠失症候群の成長パターンに関する検討. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013.11.20-23, 仙台.
  10. 山本俊至、下島圭子、島田姿野、三宮範子、松尾真理、斎藤加代子: 染色体微細 3 重複には 2 つのパターンが存在する. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013.11.20-23, 仙台.
- 2) 海外
- |                |      |
|----------------|------|
| 口頭発表           | 2 件  |
| 原著論文による発表      | 43 件 |
| それ以外(レビュー等)の発表 | 0 件  |
- そのうち主なもの
- 論文発表
1. Yamamoto T, Shimojima K: Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder. *Congenit Anom (Kyoto)* 53: 3-8, 2013.
  2. 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.
  3. 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).
  4. 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)
  5. 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)
  6. 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.
  7. Sangu N, Shimojima K, Shimada S, Ando T, Yamamoto T: Growth patterns of patients with 1p36 deletion syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)* (in press)
  8. 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.
9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. Shimojima K, Shimada S, Sugawara M, Yoshikawa N, Nijjima 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.
  16. 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.
  17. 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.
18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 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.
  22. 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* 34:108–10, 2013.
  23. 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* 161A: 1221–1237, 2013.
  24. 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* 93: 173–180, 2013.
  25. 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* 161A: 2291–2293, 2013.
26. 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, Saito H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N: MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 161A: 2234–2243, 2013.
27. Koder 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, Saito H: De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP–galactose transporter cause early–onset epileptic encephalopathy. *Hum Mutat* 34: 1708–1714, 2013.
28. Koshimizu E, Miyatake S, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito 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* 8: e74167, 2013.
29. Nakajima J, Okamoto N, Shiraishi J, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Kawashima H, Matsumoto N, Miyake N: Novel FIG4 mutations in Yunis–Varon syndrome. *J Hum Genet* (in press).
30. Ichikawa K, Kadoya M, Wada Y, Okamoto N: Congenital disorder of glycosylation type Ic: report of a Japanese case. *Brain Dev* 35: 586–589, 2013.
31. Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Sakamoto M, Miyake N, Saito H, Matsumoto N: A de novo deletion at 16q24.3 involving ANKRD11 in a Japanese patient with KBG syndrome. *Am J Med Genet A* 161A: 1073–1077, 2013.
32. Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito 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: 391–394, 2013.
33. Sakai Y, Ohkubo K, Matsushita Y, Akamine S, Ishizaki Y, Torisu H, Ihara K, Sanefuji M, Kim MS, Lee KU, Shaw CA, Lim J, Nakabeppu Y, Hara

- T. Neuroendocrine phenotypes in a boy with 5q14 deletion syndrome implicate the regulatory roles of myocyte-specific enhancer factor 2C in the postnatal hypothalamus. *Eur J Med Genet* 56: 475-483, 2013.
34. Torisu H, Yoshikawa Y, Yamaguchi-Takada Y, Yano T, Sanefuji M, Ishizaki Y, Sawaishi Y, Hara T. Alexander disease with mild dorsal brainstem atrophy and infantile spasms. *Brain Dev* 35: 441-444, 2013.
  35. 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.
  36. 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).
  37. 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).
  38. 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)
  39. 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)
  40. 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* (in press).
  41. 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* (in press).
  42. 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* (in press).
  43. 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 (in press).

#### 学会発表

1. Okamoto N, Yamamoto Y, Kawato K: A clinical and molecular study of Pitt-Hopkins syndrome in Japan. European Human Genetics Conference 2013, Paris, June 8-11, 2013.
2. Yamamoto T: Practical application of chromosomal microarray testing. The 13th Annual Meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies in conjunction with the 9th National Congress of Genetics Society of China, Harbin, China, Sep, 2013.

#### 8. 知的所有権の出願・取得状況(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. 分担研究報告

## 新規染色体微細欠失症候群の確立

研究代表者 山本 俊至 東京女子医科大学統合医科学研究所・准教授

### 研究要旨

#### 研究目的:

マイクロアレイによる全ゲノムの網羅的なコピー数解析の手法が確立し、全世界的に普及することにより、これまで知られていなかった新規の染色体微細欠失症候群が次々と報告され、疾患概念が確立してきた。しかし、まだ知られていない染色体微細欠失症候群も存在しており、稀なケースの場合には、患者情報が得られにくいという問題がある。そこで全世界で使用されているデータベースを利用して患者情報を収集することにより新しい染色体微細欠失症候群の概念を確立させることを目的とした。

#### 研究方法:

本研究で明らかになった染色体微細欠失患者のうち、過去に報告の無い稀な欠失について DECIPHER データベースを検索し、欠失領域が重なる症例の臨床情報を収集し、共通する症状について解析した。さらに genotype-phenotype 相関を解析し、症状に関連する責任遺伝子について考察した。

#### 結果と考察:

本研究で日本人において明らかになった微細欠失のうち、15q22.2 欠失と Xq22 欠失に関しては論文としての報告がないため DECIPHER データベースを検索し、それぞれ 4 例ずつ海外の症例の存在を明らかにし、電子メールを介して情報収集を行った。その結果、15q22.2 欠失は *NARG2* と *RORA* の領域が精神発達遅滞を示す患者に共通して欠失しており、Xq22 欠失においては共通した欠失領域にある BEX 遺伝子クラスターの領域が重度発達遅滞と行動異常に関連していると考えられた。Xq22 欠失の日本人患者から iPS 細胞研究のための皮膚線維芽細胞の提供を受けた。

#### 結論:

マイクロアレイ染色体検査で明らかになった2人の患者情報から発展させ、2つの新規染色体微細欠失症候群を確立することができた。希少疾患においては、世界的なデータベースを活用することが重要である。今後、患者から提供された皮膚線維芽細胞から疾患 iPS 細胞を樹立させ、神経系細胞における病態をさらに解析する予定である。

#### A. 研究目的

本研究班においては、マイクロアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析が普及することによって初めて明らかになってきた染色体微細構造異常によって発達障害を来す疾患を研究対象としている。調査対象とし

てマイクロアレイが普及する前には知られていなかった 30 の染色体微細構造異常を選定した。しかし、発達障害を来す染色体微細構造異常はこれだけではなく、まだ確立していない症候群も存在する。本研究においては、過去に論文としてもまったく報告の

ない、15q22.2 欠失と Xq22 微細欠失を示す 2 人の日本人患者を同定した。患者の臨床症状がこの染色体微細構造異常によるものとして矛盾がないかどうかは、他の同様の患者と比較するしか方法がない。そこで世界的なデータベースである DECIPHER を検索して同じ領域の微細欠失を示す患者情報を収集した。

## B. 研究方法

### (1) 診断支援

原因不明の発達障害患者を対象にアレイ CGH による網羅的なゲノムコピー数解析を行った。

### (2) アレイ CGH 法による解析

Agilent 社製 60K Human Genome Array を用いて解析した。ゲノムコピー数の異常が認められた場合には、それが真の疾患関連変異であることを確認するために両親も合わせてトリオ解析とした。必要に応じて FISH 解析による確認を行った。

### (3) 倫理面への配慮

本研究においては患者情報に基づく疫学調査を行うことから、個人情報に配慮する必要があるため、東京女子医科大学の倫理委員会に申請し、承認を得た。アレイ CGH 解析については、書面に基づく説明と書面によるインフォームド・コンセントを得て実施する。収集される検体には、二重連結可能匿名化番号を付与し、匿名化番号、同意書のコピー 1 部、および患者情報票のコピー 1 部について個人情報管理者が管理する。個人情報と匿名化後の ID を連結する対応表はコンピューターの外部記憶装置に

保存し、鍵のかかるキャビネット内で個人情報管理者が保管する。試料等に関するデータベースをコンピューターを用いて取り扱う場合は、インターネットや他のコンピューターから切り離れた状態で取り扱う。

## C. 研究結果

### (1) 新規染色体微細欠失の同定

発達障害を示す 2 例の患者において、15q22.2 欠失と Xq22 という過去に報告の無い染色体微細欠失を同定した。いずれも両親には欠失がなく、de novo 変異であった。

### (2) データベースの検索と情報収集

過去に報告の無い 15q22.2 欠失と Xq22 について、DECIPHER データベースを検索したところ、複数の症例の登録があった。登録施設から患者の臨床情報の提供を受け、検討したところ、発達障害やてんかん、行動異常など、共通する症状が認められ、症候群としての疾患概念を満たすものと考えられた。Genotype と phenotype を比較検討し、それぞれの共通した欠失範囲内にある *NARG2* と *RORA*、*BEX* 遺伝子クラスターの欠失がこれらの症状の原因となっている可能性が考えられ、国際医学雑誌に投稿し、受理された。

## D. 考察

本研究により、これまでに知られていない 2 つの新規染色体微細構造異常症候群を確立させた。いずれも精神発達遅滞、あるいは発達障害などの神経症状を共通して示していた。

## E. 結論

リスト化した 30 疾患に該当しない新規染色体微細構造異常症候群の存在を明らかにした。今後もこのような新規症候群が明らかになってくる可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamamoto T, Shimojima K: Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder. *Congenit Anom (Kyoto)* 53: 3-8, 2013.
2. 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.
3. 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* 35: 641-6, 2013.
4. 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* 161A: 1779-85, 2013.
5. 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.
6. 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: 3049-3056, 2013.
7. 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* 164A: 415-420, 2014.
8. 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* 164A: 634-638, 2013.
9. Sangu N, Shimojima K, Shimada S, Ando T, Yamamoto T: Growth patterns of patients with 1p36 deletion syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)* (in press)
10. Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K: Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol*. [Epub ahead of print]
11. Yamamoto T, Mencarelli MA, Di Marco C, Mafalda M, Vascotto M, Balestri P, Gérard M, Mathieu-Dramard M,