

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）
遺伝学的検査の実施拠点の在り方に関する研究
分担研究報告書

小児病院におけるマイクロアレイ染色体検査実施状況

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 本伸彦

研究要旨

小児科領域では原因不明の知的障害や自閉症、多発先天異常において、染色体検査が実施される。従来のG分染法では異常の検出率は3%程度である。マイクロアレイ染色体検査はG分染法で同定困難な微細な染色体の欠失や重複（CNV）を件出可能である。15～20%の検出率といわれている。最近大阪府立母子保健総合医療センター受診症例で実施したマイクロアレイ染色体検査の実施状況をまとめた。最近100例で31例の異常が同定された。適切な症例の選択により、従来言われているよりも高率の異常CNVの同定が可能であった。実施にあたっては慎重な臨床的評価と遺伝カウンセリング実施体制が重要と考えられた。

A．研究目的

臨床的に確定診断が困難な小児の知的障害、自閉症や先天異常などにおいては、マイクロアレイ染色体検査が推奨されている。従来のG分染法では異常の検出率は3%程度である。マイクロアレイ染色体検査はG分染法で同定困難な微細な染色体の欠失や重複（CNVs：copy number variations）を件出可能である。15～20%の検出率といわれている。わが国でもマイクロアレイ染色体検査の普及が望まれる。しかし、保険収載がないために、高額検査（10-15万円）である。あるいは研究所レベルの解析となっている。CNVs領域の解析結果の解釈については、臨床遺伝学に精通した専門家の関与が必要である。実施にあたっては遺伝カウンセリングが必須である。大阪府立母子保健総合医療センターでは関西地域の小児医療の中核的医療機関であり、多くの先天異常症例が集積する。他の医療機関で診断がつかなかった症例が多数紹介され

る。

大阪府立母子保健総合医療センターでのマイクロアレイ染色体検査の実施状況をまとめた。

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最近マイクロアレイ染色体検査を実施した知的障害と先天異常を合併する100例について結果をまとめた。

症例は全例、G分染法で異常がない症例か、異常核型があってもそれだけで病状を説明できない症例である。事前に詳細な臨床的評価を行い、単一遺伝子病や環境要因による疾患を極力排除し、マイクロアレイ染色体検査で異常が検出されそうな症例を選択している。

マイクロアレイ染色体検査は、東京医科歯科大学分子細胞遺伝学教室（林深先生、稲澤譲治先生）、東京女子医科大学統合医科学研究所（山本俊至先生）、（株）三菱化学メディエンスで行った。マイクロアレイで異常が見つからなかった症例の一部について、単一遺伝子疾患の解

析を大阪府立母子保健総合医療センター内で実施した。あるいは次世代シーケンサー解析を横浜市立大学遺伝学教室（松本直通先生）に依頼した。

（倫理面への配慮）マイクロアレイ染色体検査および遺伝子解析にあたり、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

最近100例では31例（31%）で病的なコピー数変化を同定した。この検出率は過去のマイクロアレイでの異常検出率（15 - 20%）よりも多かった。異常例では両親の検査を行ってde novoの確認を行うように努めているが、一部の例は今後確認予定である。しかし、欠失範囲の大きなや過去のデータベースとの比較から、これら31例は全例有意な変化と考えている。

事前に既知の症候群は十分鑑別を行っているが、Williams症候群、Smith-Magenis症候群が各1例診断された。この2例は事前にG分染法は行っていたが、FISHは行っておらず、マイクロアレイ染色体後に診断にいたった。症状的にはやや非典型例であった。

SNPアレイ実施例ではLOH領域がひろく、特定の劣性遺伝病がホモ接合になっていることが判明した例があった。

解析結果から、特定の原因遺伝子が同定され、病態の解明に有用なデータが得られた例が存在した。均衡型転座と思われたが、転座領域に微細欠失を認める例が複数あった。一方、均衡型転座であるが、転座に関与する染色体に欠失がなく、別の領域に欠失を認める例があった。このような所見はマイクロアレイ染色体検査を行

わなければ同定困難と考えられた。

D. 考察

マイクロアレイ染色体検査は従来の方法で同定されない染色体異常の検出に非常に有力な検査である。後出の関連論文にあるように、マイクロアレイ染色体検査を用いた研究論文も多数発表している。

マイクロアレイ染色体検査実施にあたっては事前の臨床的な評価が重要である。ダウン症候群や22q11.2欠失症候群のような従来の染色体検査で診断できる疾患、単一遺伝子病を事前に極力排除した。そこではDysmorphology的考察が重要であった。詳細な評価を行えば、30%の症例で有意なCNVを検出することができる可能性がある。

実施にあたっては事前に遺伝カウンセリングを行った。これは主治医とともに非医師の認定遺伝カウンセラーも担当した。結果の解釈に際しても、遺伝カウンセラーが医師の診断後のカウンセリングを行った。遺伝カウンセラーはマイクロアレイ染色体や次世代シーケンサーに関する知識も要求される。マイクロアレイ染色体検査の普及にあたっては、こうした専門職種の養成も重要課題である。

複数のCNVsが出現する例も少なくなかった。両親の検査を行い、比較する必要があった。マイクロアレイ染色体検査実施にあたっては、両親の検査が必要になる可能性について、事前に説明が必要である。

今回の解析で異常を認めなかった症例の一部について、次世代シーケンサー解析を行った結果、現時点において2症例でSWI/SNF系の遺伝子変異とてんかん関連遺伝子変異を同定した。さ

らに解析を継続予定である。次世代シーケンサー解析にあたっては、事前のマイクロアレイ解析で病的CNVsを把握しておくことは重要と考えられる。

マイクロアレイ染色体検査の実施にあたっては結果の専門的解釈を行い、遺伝カウンセリングを行う体制が必須と考えられた。一般の医療機関で行う場合も、適宜コンサルトできる体制が必要であろう。

E . 結論

マイクロアレイ染色体は非常に有用性の高い検査であり、さらなる普及が望まれる。しかし、実施にあたっては臨床遺伝学的な詳細な検討が必要である。遺伝カウンセリング体制の充実が必要と考えられた。

F . 研究発表

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.

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. *AJNR 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, Saitu 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.* 2013;33:553-60.

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, Saitu 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, Saitu 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, Saitu 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;8:e74167.

Nakajima J, Okamoto N, Shiraishi J, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu 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