



第4回
X連鎖αサラセミア・精神遅滞症候群
(ATR-X症候群)
患者さんに関わる皆さんのための勉強会
in Kyoto with R-7000@LIVE&MARKET

今日の予定

- ATR-X症候群ネットワークジャパンをふり返る
- 京都大学 和田敬仁
- 「ATR-X 症候群モデルマウスの評価と症状改善薬の探索」
- 東北大学 塩田倫史先生
- 情報交換会

今日のテーマ

お久しぶりでした！
ネットワークを広げよう！
発信していこう！

ATR-X症候群の発症頻度の推定

神奈川県立子ども医療センターのダウン症候群症例との比較から

ダウン症候群 ATR-X症候群

1年あたり約1599名 25年あたり9家系11名

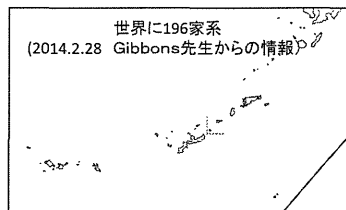
ATR-X症候群はダウン症候群の1/145の頻度

ダウン症候群 ATR-X症候群

10,000出生に10-12例 男児58,000-73,000出生に1例

ATR-X症候群は診断率が低い(診断未定が多い)ことを考慮すると

日本の出生数約100万人=>年間10名前後の患者が発症



診断されていない症例が多いことが推測される

中国 ●

- 分子遺伝学的確定診断例(75例)
- 臨床的診断例(7例)

日本国内のATR-Xと
診断された患者さん(81名)

世界では約200症例が診断されている

RYOVS CAFE

りょうず かみん にようこそ！
ここでは、とっちゃん夫妻の愛犬RYOくんのおページです。
ちよっとゆくり・のんびり居るRYOくん。
お時間があればぜひ一緒にcafeをいかがですか？
日記をブログに変更しました。



<http://www.msanwa.com/ryoukun/>

http://ayukunn-love.blog.so-net.ne.jp/

毎日新聞 佐賀支局 蒔田備彦さん

ATR-X症候群の診断基準の作成(1)

【診断基準】
 必発症状・所見(>90%)(5つ揃えば、ATR-X症候群を強く疑う所見)

1. 男性患者
2. 重度精神運動発達
3. 特徴的顔貌
 顔面中部部の低形成(鼻孔が上向き、厚い下口唇、鼻根部が平低、三角口、すき間の空いた門歯)、小頭、耳介低位
4. 消化器系の異常
 空気嚥下症、嘔吐、胃食道逆流、便秘、イレウス、流涎過多
5. 特異的症候・行動
 手を口に突っ込み嘔吐を誘発
 突然の笑い発作、感情の高ぶり
 自閉症様：視線を合わそうとしない、常同運動(指をこする、など)
 姿勢：斜め上を見上げる、手のひらを上に向けて、顎を突き上げる、あるいは首をしめる仕草
 自傷行為

高頻度に認める症状・所見(50%以上)

新生児期
 哺乳障害(経管栄養を必要とする)、筋緊張低下
 外性器の異常
 小精巣、停留精巣、小陰茎、女性外性器様

消化器系の異常
 空気嚥下症、嘔吐、胃食道逆流、便秘、イレウス、流涎過多

骨格の異常
 先細りの指、第5指短指症、指関節の屈曲拘縮

発育 低身長
 姿勢・運動の異常
 自閉症様：視線を合わそうとしない
 常同運動：指をこする(pill-rolling)、
 姿勢：斜め上を見上げる、顎を手のひらを返して突き上げる、あるいは首をしめるような仕草
 自傷行為

検査
 Brilliant Cresyl Blue染色によるHbHの封入体をもつ赤血球の存在

しばしば認める症状・所見(50%以下)

中枢神経 てんかん

心臓 心奇形

腎臓 奇形

眼科 白内障、斜視

その他

原因不明の脳症、

全く食事を受け付けなくなる発作を周期的に繰り返す

無呼吸、チアノーゼ発作

その他の参考所見

家族歴 X連鎖性遺伝を疑わせる家族歴

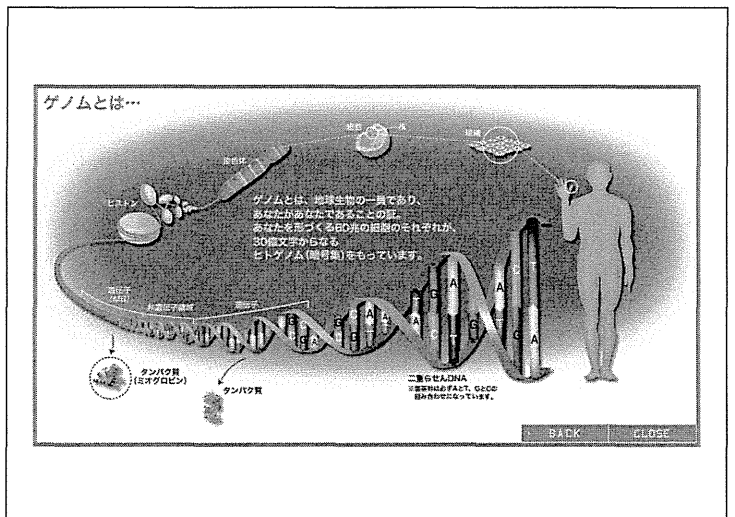
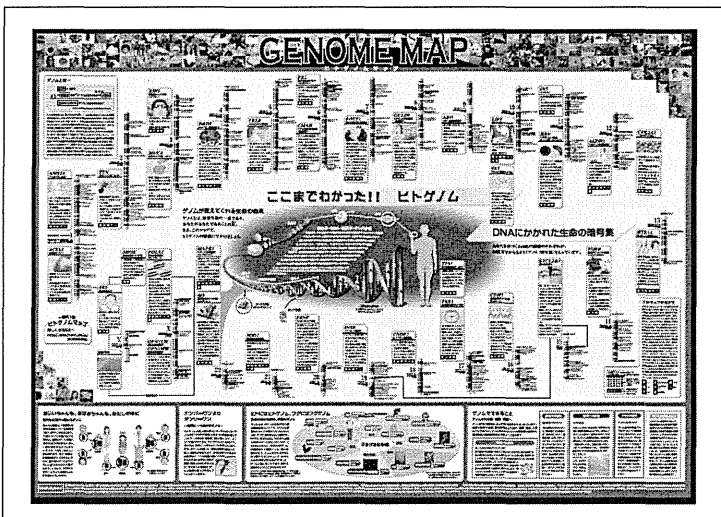
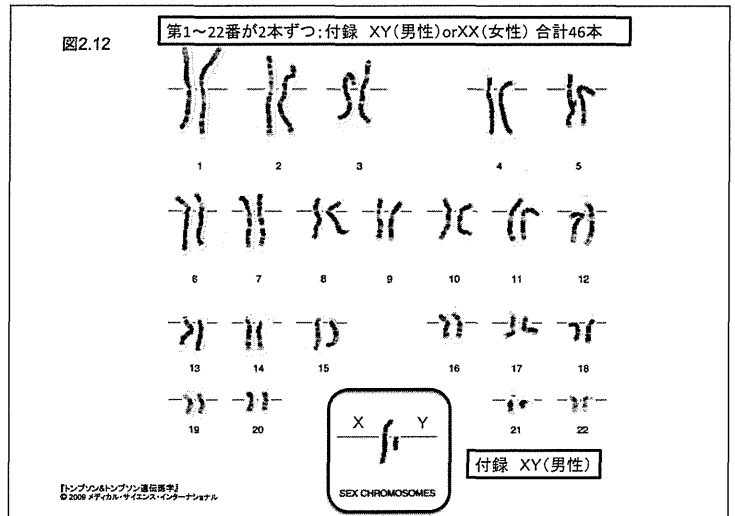
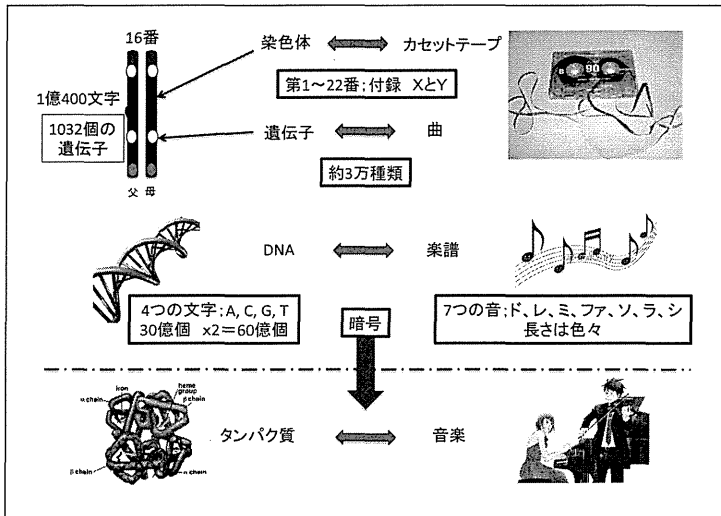
(男性同胞、あるいは母方を介した家系に罹患した患者が存在)

検査

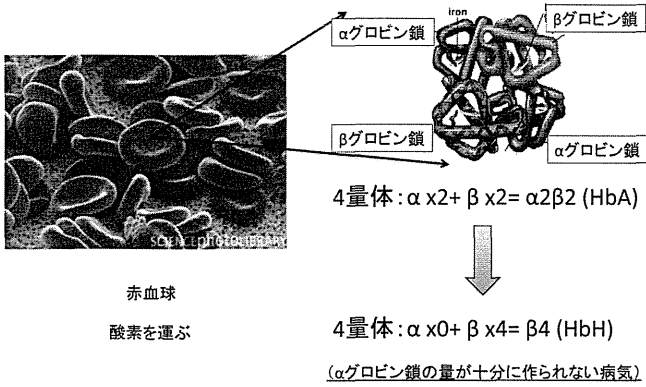
頭部MRI: 脳の構造異常(脳萎縮、脳梁欠損症)、白質の信号異常

ATRX遺伝子変異の存在

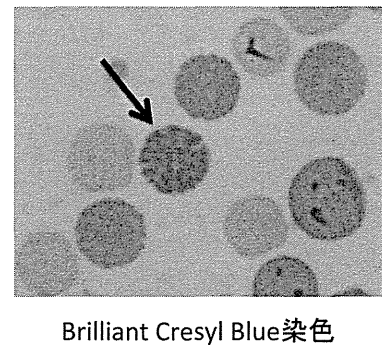
ATR-X症候群を知るために



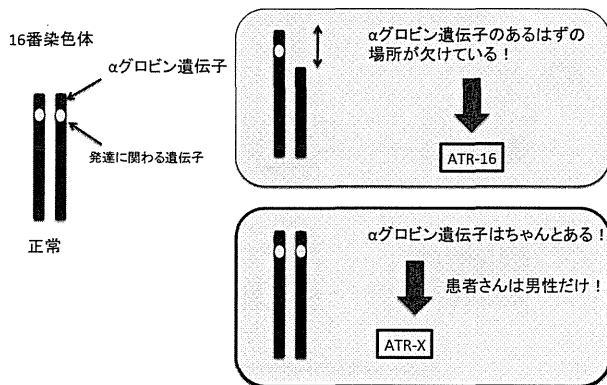
αサラセミアとは？



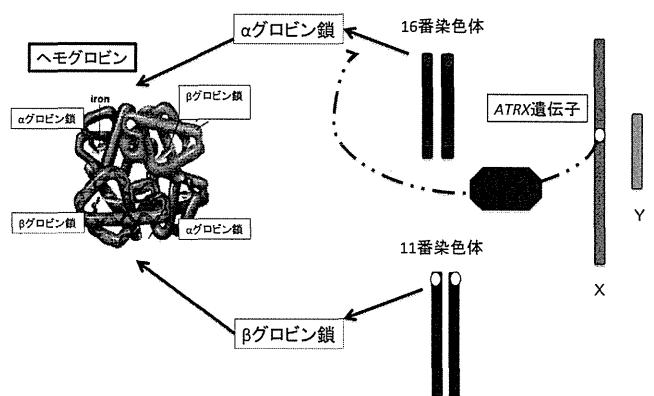
αサラセミア (HbH: β4)



ATR: αサラセミア + MR



原因はX染色体にあるのでは？



ATR(XNP)遺伝子の発見

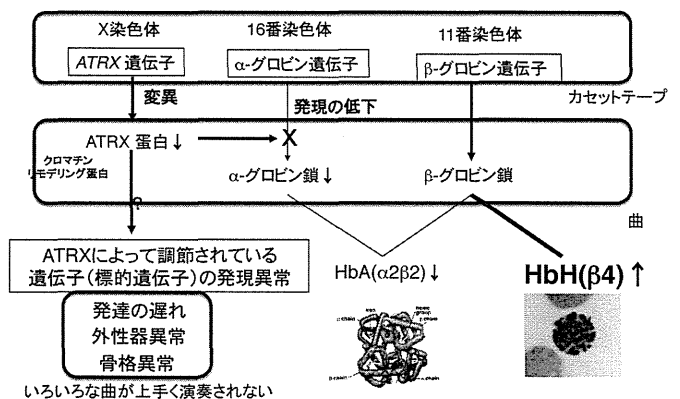
Cell, Vol. 80, 837-845, March 24, 1995. Copyright © 1995 by Cell Press

Mutations in a Putative Global Transcriptional Regulator Cause X-Linked Mental Retardation with α-Thalassemia (ATR-X Syndrome)

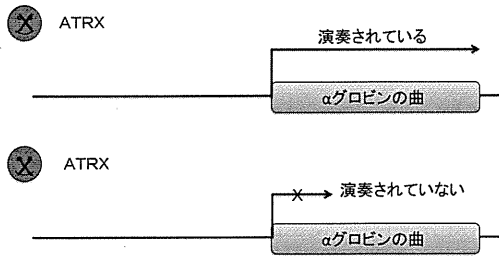
Richard J. Gibbons,* David J. Picketts,* Laurent Villard,* and Douglas R. Higgs*
 *Medical Research Council Molecular Haematology Unit
 Institute of Molecular Medicine
 John Radcliffe Hospital
 Headington, Oxford OX3 9DU
 England
 †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
 Unité 406
 Équipe 3
 Génome et Développement
 13351 Marseille Cedex 5
 France

(DXS72) (Gibbons et al., 1992); a single all XLMR maps to this region (Neri et al., 1992). We have previously suggested that a consistent core of clinical findings in this syndrome indicates that the molecule involves a single gene rather than a cluster of genes (Gibbons et al., 1995). The wide and systems affected, however, suggest that mutations within such a gene exert pleiotropic effects on development. In this respect, it is interesting that carriers have a remarkably skewed pattern of X inactivation in tissues representing blood, endoderm (buccal mucosa) and gut, consistent with a strong selective

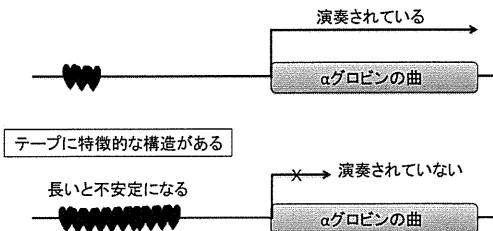
ATR-X症候群における病態



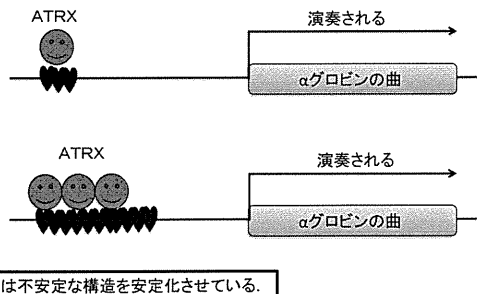
患者さんみんなが αサラセミアになるわけではない！ 2割の患者さんにはサラセミアがない！



患者さんみんなが αサラセミアになるわけではない！ 2割の患者さんにはサラセミアがない！

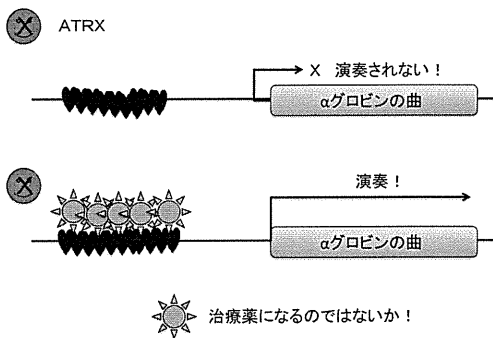


患者さんみんなが αサラセミアになるわけではない！ 2割の患者さんにはサラセミアがない！



ATR-Xは不安定な構造を安定化させている。

患者さんみんなが αサラセミアになるわけではない！ 2割の患者さんにはサラセミアがない！



☀️ 治療薬になるのではないか！

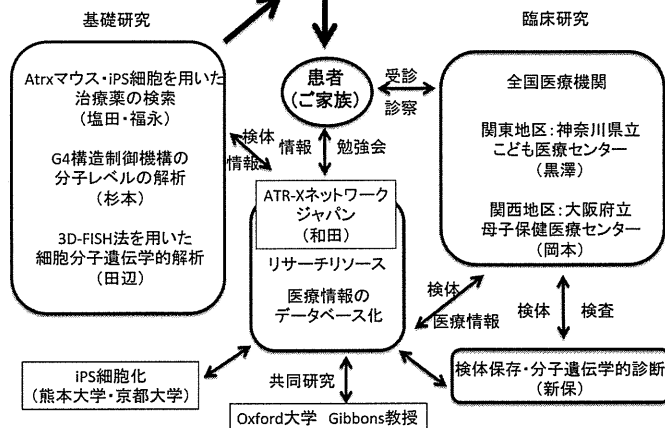
塩田倫史先生(東北大学) 福永浩治(東北大学) 北島勲先生(富山大学)



田辺秀之先生
(総合研究大学院大学)

(Gibbons教授歓迎夕食会 2011.9.14 横浜)

ATR-X症候群
治療薬の開発 平成26年度



ATR-X 症候群モデルマウスの評価と 症状改善薬の探索

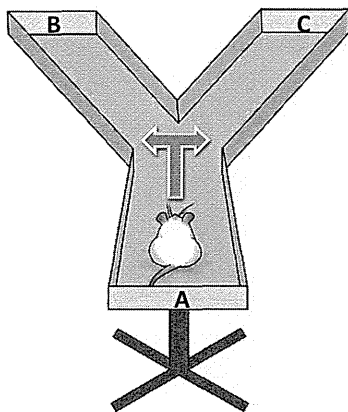
塩田 倫史、澤井 優広、
小野里 美咲、山口 航矢、福永 浩司

東北大学大学院 薬学研究科 薬理学分野

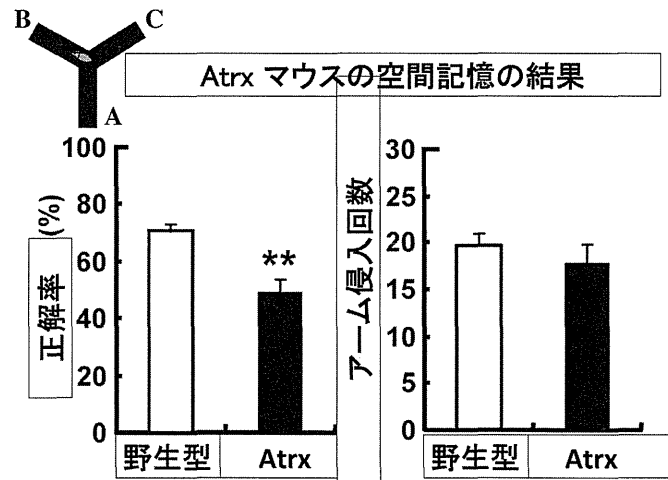
動物で精神運動を評価する方法

- ① Y-字迷路試験 (注意力と空間記憶)
- ② 新奇物体認識試験 (認知機能)
- ③ 受動的回避行動試験(長期記憶)

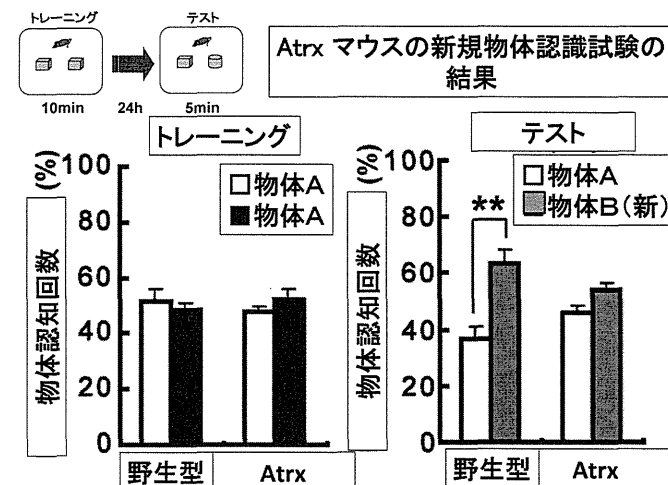
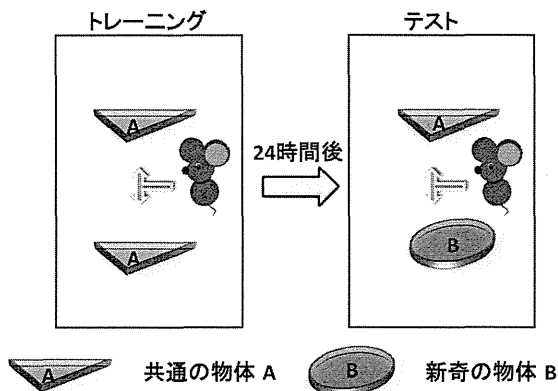
Y字迷路試験 (注意力と空間記憶)



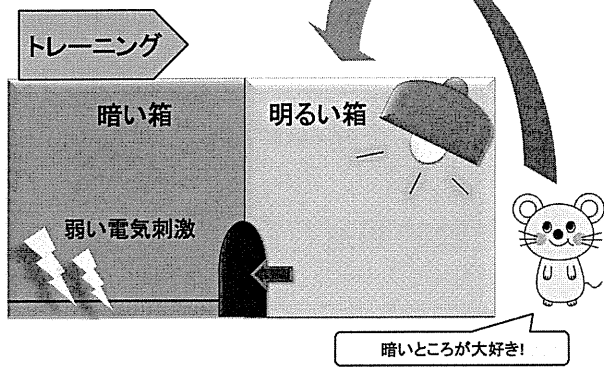
参照: 脳科学辞典 <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E8%BF%B7%E8%B7%AF>



新奇物体認識試験 (認知機能)



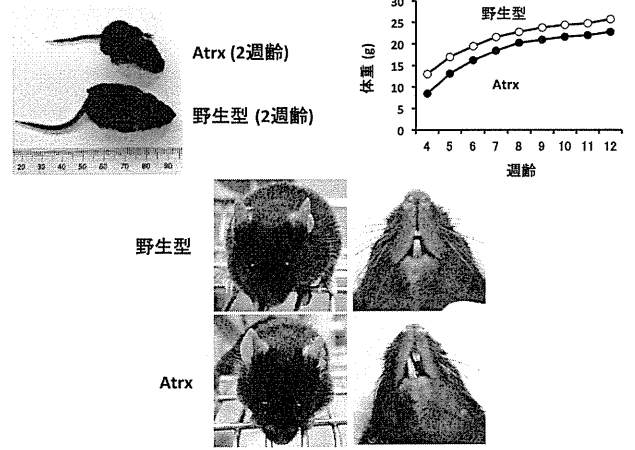
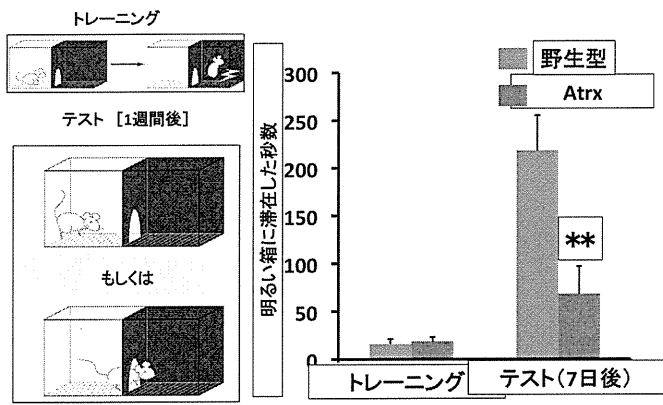
受動的回避行動試験(長期記憶)



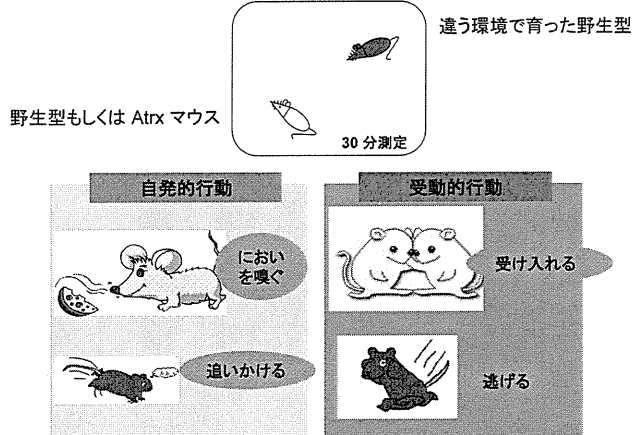
テスト



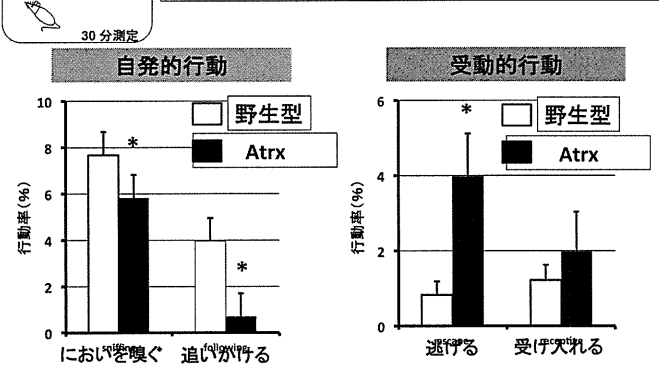
Atrx マウスの受動回避試験(長期記憶)の結果

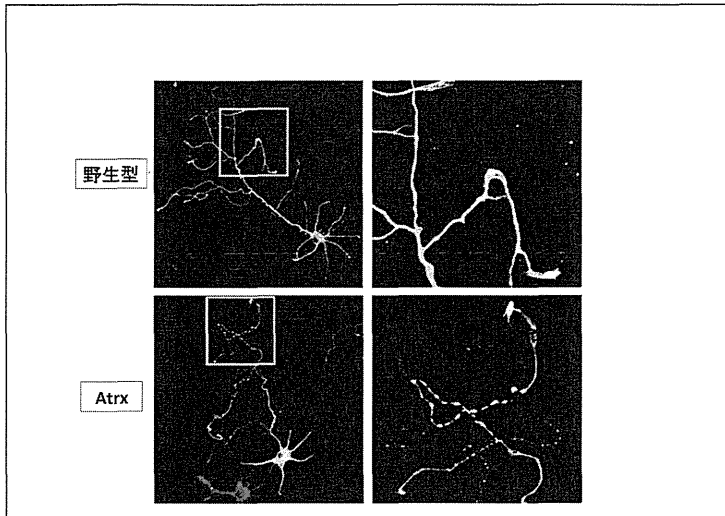
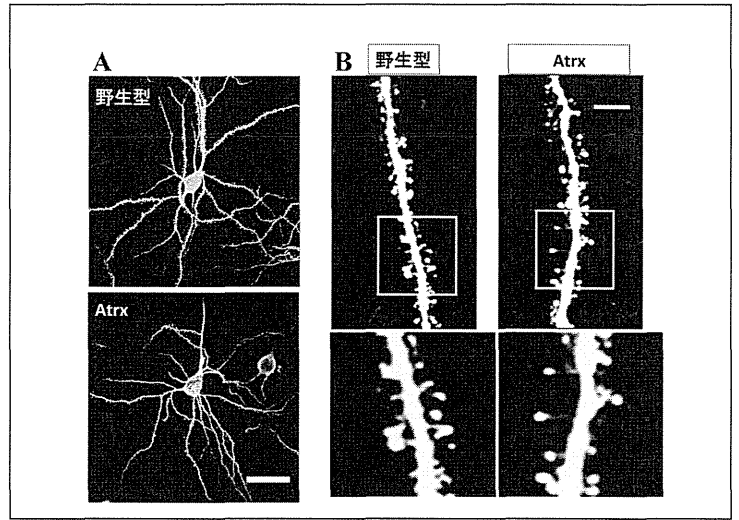
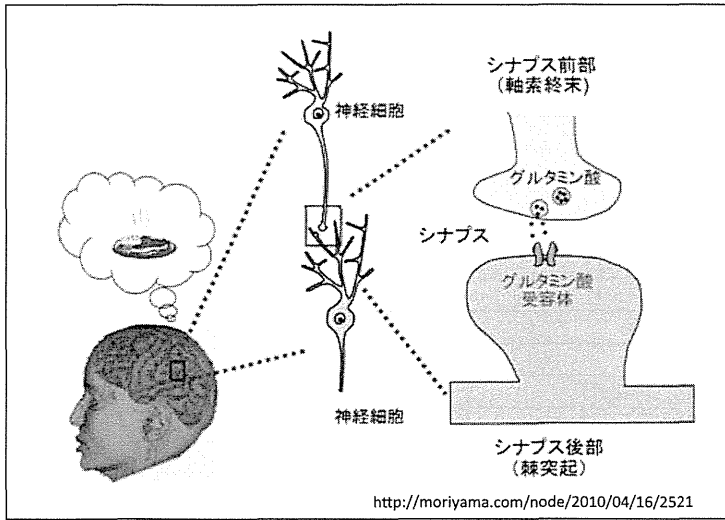


社会性行動観察試験



Atrx マウスの社会性行動試験の結果





まとめ①

Atrx モデルマウスはヒトの症状の一部を示した。

↓

Atrx モデルマウスで症状改善薬の探索をすることができる。

神経可塑性をターゲットにした創薬科学研究
東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野

Department of Pharmacology, Tohoku Univ. Grad. Sch. Pharm. Scis

謝辞

東北大学大学院 薬学研究科

福永 浩司 先生
澤井 優広 (M2)
小野里 美咲 (B4)
山口 航矢 (B4)

京都大学 医学研究科 和田 敬仁 先生

京都大学 iPS細胞研究所 井上 治久 先生

Patient #	Family #	Exon/intron	Nucleotide change	Amino acid change	HbH
1	1	Ex1del	MAGT exon1-ATRX exon 1 large deletion		+
2	2	5' -UTR			+
3	3	2	Ex2_5		+
4			Ex2_5		+
5	4	INT2	(+)23A>G	?	
6	5	5	c. 370G>T; r[243_484del]	p. R81fs	-
7		5	c. 370G>T; r[243_484del]	p. R81fs	-
8	6	6	c. 390_391 ins A	p. E131fs	
9	7			p. Pro170Leu	-
10	8	8	c. 536A>G; r [532_594del]	p. V178_K198del	+
11	9	8	c. 536A>G; r [532_594del]	p. V178_K198del	+
12	10	8	c. 536A>G; r [532_594del]	p. V178_K198del	
13	11	8	c. 536A>G; r [532_594del]	p. V178_K198del	+
14	12	8		p. P190L	+
15	13	8	c. 569C>T	p. P190L	+
16	14	8	c. 580G>A	p. V194I	+
17	15	8	c. 581T>C	p. V194A	-
18	16	10	c. 667T>C	p. C223R	-
19	17	10	c. 668G>T	p. C223F	+
20	18	10	c. 687G>C	p. L229F	+
21	19	10	c. 695G>A	p. C232Y	
22	20	10	c. 727T>C	p. C243R	
23	21	10	c. 734T>C	p. L245P	-
24		10	c. 734T>C	p. L245P	+
25	22	10	c. 736C>T	p. R246C	-
26	23	10	c. 736C>T	p. R246C	+
27	24	10	c. 736C>T	p. R246C	+
28	25	10	c. 736C>T	p. R246C	+
29		10	c. 736C>T	p. R246C	+
30		10	c. 736C>T	p. R246C	-
31	26	10	c. 736C>T	p. R246C	+
32	27	10	c. 736C>T	p. R246C	+
33	28	10	c. 736C>T	p. R246C	+
34	29	10	c. 736C>T	p. R246C	
35	30	10	c. 736C>T	p. R246C	+
36	31	10	c. 736C>T	p. R246C	-
37	32	10	c. 736C>T	p. R246C	+
38	33	10	c. 736C>T	p. R246C	+
39	34	10	c. 736C>T	p. R246C (未確認)	
40	35		c. 736C>T	p. R246C	
41	36	10	c. 794G>A	p. C265Y	+
42	37	10	c. 797A>G	p. Y266C	
43	38	10	c. 832A>C	p. The278Pro	
44	39	10	c. 1727C>A	p. S576X	+
45	40	INT16	(-) 145A>C	?	
46	41	17	c. 4654G>T	p. V1552F	+
47		17	c. 4654G>T	p. V1552F	+
48	42	18	c. 4744_4746 del.	p. T1582del	
49	43	19	c. 4865C>T	p. A1622V	-
50		19	c. 4865C>T	p. A1622V	-
51		19	c. 4865C>T	p. A1622V	-
52	44	19	c. 4870G>A	p. V1624M	+
53		19	c. 4870G>A	p. V1624M	not available
54		19	c. 4870G>A	p. V1624M	+
55	45	19	c. 4934T>C	p. L1645S	+
56	46	int21	c. 5273-5C>G; r [5273-5448del]	p. Y1758X	+

ATR-X症候群 日本人患者さんの
遺伝子変異のまとめ

57	47	23	C. 5498A>G	p. Y1833C	-
58		23	C. 5498A>G	p. Y1833C	-
59	48		C. 5498A>G	p. Y1833C	
60	49	23	c. 5540A>G	p. Y1847C	+
61	50	23	c. 5540A>G	p. Y1847C	+
62		23	c. 5540A>G	p. Y1847C	+
63	51	27	c. 6052G>A	p. G2018R	
64	52	29	c. 6253C>T	p. R2085C	
65	53	30	c. 6392G>A	p. R2131Q	+
66	54	30	c. 6392G>A	p. R2131Q	+
67	55	30	c. 6406G>A	p. D2136N	-
68	56	31	c. 6511A>G	p. Met2171Val	-
69		31	c. 6511A>G	p. Met2171Val	-
70	57	31	c. 6511A>G	p. Met2171Val	-
71	58	int31	insertion of 2kb from chr.2: splicing abnormality		-
72	59	35	c. 7156C>T	p. Arg (CGA) 2386X (TGA)	+
73	60	int35	c. 7200+4A>G, p. L2401fs (?)		-
74	61	36	c. 7423 G>A	p. Ala2475Thr	+
75	62	3'-UTR			

II. 分担研究報告

分担研究報告書

ATR-X 症候群の神経学所見に関する研究

研究分担者 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科 岡本伸彦

研究要旨

ATR-X症候群は特徴的顔貌、軽度HbH病、重度運動精神遅滞、外性器低形成などを特徴とするX連鎖性の先天異常症候群である。Weatherallら(1981)が α サラセミアをともなう精神遅滞3家系を報告した後、Wilkieら(1990)がX連鎖の遺伝形式をとる1つの症候群として確立した。Gibbonsら(1995)が包括的発現調節因子であるXH2/XNP（現在はATR-Xと呼ばれている）遺伝子の変異が原因であることを明らかにした。遺伝子座位はXq13で、責任遺伝子はZinc finger型DNA結合ドメイン、DNAヘリカーゼドメインを持つ転写調節因子である。わが国でも小児病院を中心として症例報告が行われているが、報告例は地域偏在傾向があり、未診断例も多い。大阪府立母子保健総合医療センターでの経験例について脳波や頭部MRI所見など神経学的所見をまとめた。神経学的な特徴を把握することが診断の契機になると考えられる。

A. 研究目的

α サラセミア X連鎖性精神遅滞症候群（略称ATR-X）は、生後まもなくからの筋緊張低下、特徴的顔貌、軽度の α サラセミア（ヘモグロビンH）による貧血、精神運動発達遅滞、外性器異常、消化管機能異常などを特徴とする。本研究は、大阪府立母子保健総合医療センター受診患者におけるATR-X症候群患者の神経学的所見の検討が目的である。ATR-X症候群の責任遺伝子は多くの遺伝子の転写調節に関与している。エピジェネティクスのメカニズムの破綻が基本的な病態と考えられているが、詳細は不明である。ATR-X症候群の病態の研究は、本疾患だけに留まらず、脳神経機能、発達障害や悪性腫瘍の研究に普遍的な意義を持つと考えられる。一部の症例では特徴的な神経学的所見、行動異常を認めることが知られている。

自験例について脳波や頭部MRI所見、行動面の特徴など神経学的所見をまとめた。

B. 研究方法

臨床経過については、カルテの記載を整理した。

倫理面への配慮について、遺伝子解析にあたり、遺伝カウンセリングを行い、インフォームド・コンセントを得た。

C. 研究結果

症例の概要は表にしめした。年齢は2歳から18歳に分布している。当センターでは臨床症状からATR-X症候群を少しでも疑った患者にHbH検出のために赤血球ブリリアントクレシルブルー（BCB）染色をスクリーニング検査として実施している。Dysmorphology的検討で臨床的にATR-Xと診断している。

(1) 発達状況

全例が重度精神運動発達遅滞を認めたが、重度の中でも差を認めた。3例は歩行機能を獲得しており、摂食機能にも大きな問題はなかった。年長者でも結い後の得られない例が多かったが、一部で、簡単な言語を理解し、有意語を表出している例もあった。

一方、2例は胃瘻が必要で寝たきりの状態であり、全面介助必要な状況であった。

(2) てんかん

難治性てんかんの例が存在した。脳波では棘波、棘波徐波結合など異常を認めた。発達遅滞が重度な例ほどてんかんが難治の傾向があった。

てんかんは全例で合併するわけでないが、14歳で初発のてんかんを認めた例があった。ATR-X症候群では脳波検査を含めた長期的なフォローが必要と考えられた。

(3) 行動異常

一部の症例で不機嫌状態が持続し、睡眠障害を認めることがあった。2日以上、まったく睡眠ができないという経過の例もあった。投薬による強制的な睡眠が必要であった。

一部の症例は低気圧接近などの気象の変化に敏感に反応した。低気圧が発生すると不機嫌が増悪し、大声でなく、寝ないなど異常行動がみられた。遠方で発生した台風や地震に敏感に反応する例があった。

ある例では周期的な四肢異常運動がみられた。長時間にわたって全身を揺すり続け、一点を凝視して周囲のよびかけにも反応しなくなった。このような状態は不定期に月1回ほど出現し、3日間ほど持続した。これはてんかん発作ではなく、ATR-Xに伴う行動異常と考えられた。

歩行可能な症例の一部では多動を認めた。走ることもできて、危険回避が困難な状況であった。よくわらい、多幸的であった。

(4) 頭部MRI画像

1症例で広範に散在する白質病変を認めた。しかし、この例は歩行可能で有意語もみられ、神経学的所見は比較的軽度であった。

他の症例でも非特異的な脳萎縮、三角部の白質異常信号を認め、ATR-X症候群の特徴的な画像所見であった。

D. 考察

ATR-X症候群では重度の精神運動発達遅滞を伴う例が多いが、多動症例から寝たきりの例まで、重症度に幅が大きかった。この差はATR-X遺伝子変異の内容により、遺伝子産物の機能がどの程度保たれるかによる可能性がある。言語機能獲得例では、徐々に発達の進歩がみられた。

てんかんはATR-X症候群の重要な合併症のひとつである。今回の検討でも例でてんかんの合併がみられた。14歳で新規に発症した例があった。てんかんの初発年齢には幅があり、脳波検査を含めた定期的なフォローが必要と考えられた。抗てんかん薬の選択に関しては、ATR-X症候群に特に有効なもの、薬剤はなく、発作型にあわせた個別の対応を行う必要がある。

一部の症例で特徴的な頭部MRI所見を認めた。Wadaらは、日本人例27例のATR-X症候群における頭部CTないしMRI画像を分析した。5種類の画像的な分類を行った。

- 1) 17例は非特異的な脳萎縮を認めた。
- 2) 11例はtrigone部の白質異常信号を認めた。
- 3) 1例では広範に散在する白質異常を認めた。

4) 4例では髄鞘化遅延を認めた。

5) 1例では重度で急速進行性の脳皮質萎縮を認めた。このことから、ATR-X蛋白は正常な髄鞘化に必要と考えられた。

睡眠障害、食思不振、自傷行為などATR-X症候群では様々な行動異常があり、個々の症例にあわせた対応が必要である。

低気圧など気象状況に敏感に反応する例が複数例存在した。この原因は不明であるが、ATR-X症候群の特徴のひとつと考えられた。

E. 結論

遺伝子変異を確定したATR-X症候群について神経学的所見をまとめた。

重症度、症状の状況には個人差が大きかった。さらに症例を蓄積し、長期経過を観察予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

論文発表

AJNR Am J Neuroradiol. 2013 Oct;34(10):2034-8.
Neuroradiologic features in X-linked α -thalassaemia/mental retardation syndrome.
Wada T, Ban H, Matsufuji M, Okamoto N, Enomoto K, Kurosawa K, Aida N.

別紙参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表3 ATR-X 症候群の神経学的所見まとめ

年齢	発達状況	脳波 頭部 CT MRI	他合併症	行動異常
16 歳男児	重度知的障害 座位・移動 不可 言語なし てんかん	棘波多発 高振幅徐波 脳萎縮	喉頭軟化症 停留精巣 胃瘻 便秘 噴門形成術後	低気圧時機嫌不良 経口摂取を受けつ けなくなる 不眠で大声をだす 遠方の地震で機嫌 不良になる 自傷行為
15 歳男性	重度知的障害 座位不可 移動不可 言語なし てんかん	脳波異常 MRI 脳萎縮 三角部白質の 高信号	心房中隔欠損 停留精巣 GER 噴門形成術後 胃瘻 便秘	低気圧時機嫌不良 遠方で発生した台 風も感知する 空気嚥下症
4 歳男児	重度知的障害 歩行不可 言語なし てんかん	脳梁低形成	小陰茎 停留精巣	機嫌不良 自傷行為（手をか む）
11 歳男児	重度知的障害 歩行可能 「イヤ」 など発語 GERD 熱性けいれん	MRI で三角部 T2 延長領域あり 脳波異常なし		多動頭著
7 歳男児	重度知的障害歩行 可能 熱性けいれん	脳波 棘波徐波 MRI 白質 T1T2 延長領域あり	性腺機能低下 停留精巣 鼠径ヘルニア	多動 睡眠障害 機嫌不良 興奮
5 歳男児	重度知的障害 座位不可 寝返りまで	脳波 MRI 異常なし	停留精巣 心房中隔欠損 GERD 噴門形成術後	周期的な常同運動 機嫌不良 睡眠障害
15 歳男児	重度知的障害 歩行可能 てんかん	脳波異常	視神経萎縮 GERD 噴門形成術後	台風など低気圧で 機嫌不良

分担研究報告書

ATR-X 症候群の分子遺伝学的診断に関する研究

研究分担者 小坂 仁 自治医科大学

研究要旨：X連鎖性 α サラセミア精神遅滞（ATR-X）症候群が臨床的に疑われる症例の確定診断や、その女性同胞の保因者診断、あるいは男性精神遅滞患者の鑑別診断として、ATR-X 症候群の責任遺伝子 *ATR-X* の分子遺伝学的検討を行った。本研究では、患者末梢血液から直接 RNA を抽出し、cDNA を合成し、PCR+ダイレクトシーケンス法により、あるいはゲノム DNA を用いた PCR+ダイレクトシーケンス法により、*ATR-X* 遺伝子を解析した。また、*ATR-X* 遺伝子内のエクソン欠失を検出する方法を開発し、ATR-X 症候群の兄弟例の母親の詳細な検討により、従来法では解析できなかった母親の体細胞モザイクを検出し、その頻度を推定した。

研究協力者
新保裕子 神奈川県立こども医療センター
臨床研究所 研究員

例の母親の保因者診断を詳細に検討し、従来方法では検出できなかった体細胞モザイク検出方法を確立した。

A. 研究目的

X連鎖性・サラセミア精神遅滞（ATR-X）症候群は男性のみに発症し、重度の精神遅滞、 α サラセミア(HbH病)、特徴的顔貌、外性器異常、骨格異常、独特の姿勢・行動異常を臨床的特徴とする。その責任遺伝子は Xq13 に局在するクロマチンリモデリング蛋白をコードする *ATR-X* 遺伝子であり、Gibbons et al. 1995)、X連鎖精神遅滞症候群の一つである。

ATR-X 遺伝子は 36 エクソン、300kb の genomic DNA からなり、10.5kb の mRNA の転写産物をコードする。機能的に重要な ADD(*ATR-X*-DNMT3a/b-DNMT3L)ドメインとクロマチンリモデリングドメインの2つの領域を持ち、患者のほとんどがこの2つの領域に変異を持っている。

我々は、患者末梢血液から直接 RNA を抽出し、cDNA を合成し、PCR+ダイレクトシーケンス法により *ATR-X* 遺伝子を解析する方法を確立し、臨床応用している。

本研究においては、ATR-X 症候群が疑われ当センターに紹介された 10 例に対して *ATR-X* 遺伝子解析を行った。また、エクソン欠失をもつ兄弟

B. 研究方法

1. *ATR-X* 遺伝子解析

a. 検体として患者末梢血液 5ml (EDTA 採血管) を採取し、3ml をゲノム DNA の抽出、2ml を total RNA 抽出に用いる。ゲノム DNA の抽出は従来法による。全血 2ml から 2~10 μ g の total RNA を抽出。

b. PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara 社) を用いて、抽出した total RNA 2 μ g を用いて、cDNA を合成。

c. *ATR-X* 遺伝子の全コーディング領域をカバーするプライマーペア 12 組を独自に設計し、PCR 産物 (600~1009 塩基対) を得る。

d. RT-PCR 産物を電気泳動により確認後、カラム精製し、シーケンス反応に使用。

e. cDNA 解析で見つかった異常をゲノム DNA で確認する。

2. 女性保因者のヘテロ接合におけるエクソン欠失の解析 (詳細は Shimbo H, et al. J Hum Genet. 2014 (in press) を参照)

患児 (exon 2-5 の欠失) の解析(概要)

- a. 患児末梢血液からゲノム DNA を抽出し、exon2-5 の PCR により PCR 産物を確認
- b. 末梢血 RNA より cDNA を合成し、exon 2-5 欠失の確認
- c. ゲノム DNA を用いて、ブレイクポイントを同定
- d. エクソン 5 (欠失領域) および 6 (非欠失領域) に対するプライマーを設計し、quantitative PCR (qPCR) により定量し、欠失が定量出来るか解析.
- e. ブレイクポイントを挟んだ領域にプライマーを設計しを PCR により解析.

C. 研究結果

1. *ATRX* 遺伝子解析

臨床的に *ATR-X* 症候群が疑われた 10 症例を対象に *ATRX* 遺伝子解析を行い、うち 4 症例において変異を同定し、一例において女性保因者診断を行った。

- ① c.536A>G; r[532_594del], p.V178_K198d
 - ② c.5498 A>G, p.Tyr1833Cys,
 - ③ c.736 C>T, p.Arg246Cys,
 - ④ exon2-5 (350bp)deletion (保因者診断を含む)
- ### 2. 女性保因者のヘテロ接合におけるエクソン欠失の解析 (詳細は Shimbo H, et al. J Hum Genet. 2014 (in press)を参照)

患者で検出された exon 2-5 の欠失は 78.6kb におよぶ遺伝子内の微小欠失であることがゲノム DNA の解析で明らかにされた。エクソン 5 および 6 に対する qPCR を行ったが、欠失をヘミで持つ患児のゲノム DNA では欠失を同定できたが、欠失をヘテロで持つと推測される母親においては、エクソン 5 および 6 の PCR 産物増幅の優位な差異は認めなかった。

ブレイクポイントを同定し、患児および母親のゲノム DNA を用いて、ブレイクポイントを挟

む領域の PCR を行ったところ、患児では 30 回の PCR 増幅で、母親は 40 回で PCR 産物を確認することができ、検量線を用いて解析したところ母親の体細胞モザイク率が 1%未満と推定された。

D. 考察

本研究期間に *ATRX* 遺伝子解析を依頼された 10 例中 4 例で遺伝子変異を同定した。変異を同定されなかった症例の臨床診断は、*ATR-X* 症候群としては非典型的であり、他の臨床診断が疑われ、*ATRX* 遺伝子解析の検出方法は妥当であると推測された。

エクソン欠失に対する保因者診断は、女性のため変異をヘテロに持ったため、従来のゲノム PCR 法では欠失の有無を検出することが出来ない。今回の解析は同胞例の母親の解析であり、すでに、母親が保因者であることは明らかであったが、分子遺伝学的メカニズムを明らかにするために解析を行った。母親の体細胞モザイク率が 1%以下であったため、エクソン 5 (欠失領域) および 6 (非欠失領域) に対する quantitative PCR による定量では検出できず、ブレイクポイントを同定して、初めて解析が可能となった。

X 連鎖性疾患の孤発例において、患児で遺伝子変異が見つかり、母親の末梢血液のゲノム DNA の解析で変異を認めない場合も、母親の germline mosaicism の可能性は否定できず、次子の再発危険率は 0~50%と幅がある。逆に、通常の方法で変異を検出できたとしても、通常、野生型と変異型のアレルの頻度は解析しないため、母親の体細胞の体細胞モザイクの可能性は否定できない。

後者の場合、次子の再発危険率の推定は前者と同じであるが、母親の同胞女性の保因者診断について検討した場合、母親の mosaicism が明らかとなれば、母親の変異は受精卵の体細胞分裂以降の変異獲得であり、母親の女性同胞が保因者の可能性は無視できることになる。これは、不要な情報提供や負担を避けることが出来るため、遺伝カウンセリング上、非常に重要である。

E. 結論

我々の開発した、患者の末梢血から抽出した RNA、および、ゲノム DNA を用いた *ATRX* 遺伝子解析は患者の診断に有効であり、検出率も

高いと推測される。

X連鎖性疾患における末梢血液由来ゲノムDNAを用いた女性保因者診断において、同胞例であり、母親が明らかに保因者 (obligate carrier) であっても、常に、体細胞あるいは生殖細胞モザイクの可能性を考慮することは遺伝カウンセリング上、重要であることが再認識された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Shimbo H, Ninomiya S, Kurosawa K, Wada T. A case report of two brothers with ATR-X syndrome due to low maternal frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the *ATRX*. J Hum Genet. 2014 (in press)

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
ATR-X 症候群の臨床研究および基礎研究のための基盤整備に関する研究

分担研究報告書

バイオアナライザーを用いた X 染色体不活化解析

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

バイオアナライザーを用いた X 染色体不活化アッセイの方法を確立した。X;常染色体均衡型転座例、代表的 X 連鎖劣性遺伝病である Opitz-BBB 症候群などの対象症例や保因女性を用いてアッセイを行い、極めて正確な評価が可能であることを確認した。これまでの大がかりなシーケンサーを用いた解析と異なり、バイオアナライザーによるアッセイは正確で迅速な解析が可能であった。次世代シーケンスによる非症候群性精神遅滞では、ATR-X を初めとした症候群性精神遅滞原因遺伝子と考えられきた遺伝子に変異が検出される可能性もあり、このアッセイは診断さらには遺伝カウンセリングの上でも極めて有用なものと思われる。今後臨床解析手技として整備すべき解析技術である。

A. 研究目的

ヒトを初めとした哺乳動物では、X 染色体の不活化により量的補正がなされている。この不活化は発生初期に起こり、正常な女性では不活化される X 染色体の選択はランダムであるが、いったん決定されるとその細胞系列では不活化される X 染色体は維持される。つまり、基本的に女性は X 連鎖遺伝子の発現についてはモザイクといえる。過剰な X 染色体を有する患者においても同様の現象は観察される。しかし、X 染色体の構造異常や重症の X 連鎖劣性遺伝病における保因者女性では、非ランダムな X 染色体不活化が起こることがあり、病態の把握や保因者診断の際に X 染色体の不活化解析は臨床的にも重要となる。また、遺伝カウンセリングにおいてリスク評

価の有力な手掛かりとなることもある。しかし、一般診療の中で、X の不活化を観察するためにはシーケンサーなどの大型機器が必要で、必ずしも診療の中で用いることは容易ではない。今回我々は、バイオアナライザーを用いて比較的簡便に、しかしながら非常に正確に X 不活化解析が行えることを X 染色体均衡型転座症例、あるいは X 連鎖劣性遺伝病保因者家系で確認したので、その方法をまとめた。

B. 研究方法

対象は以下の 3 家系における保因女性で解析を行った。

1) 症例 1

発達遅滞、大頭症、過成長を主訴に精査希望で来院した児（男児）の母親。児は、

マイクロアレイ染色体検査 (Agilent Technologies, SurePrint G3 8x60k) で 15q24 欠失症候群 (15q24.1-q24.2 に 2.5Mb の欠失) と診断された。児では 15q24 領域の他に大田原症候群原因遺伝子 ARX を含む Xp22.11-p21.3 に 0.7Mb の重複を有し、母親でも同様に Xp22.11-p21.3 の 0.7Mb の重複が確認された。本家系において ARX 重複が臨床症状に影響を及ぼすかを評価するために X 不活化解析を行った。

2) 症例 2

発達遅滞を主訴に来院の 3 歳男児で、マイクロアレイ染色体検査 (Agilent Technologies, SurePrint G3 8x60k) で、MID1 遺伝子 exon 1-4 を含む領域の微細欠失を確認し、臨床症状から Opitz-BBB 症候群と診断した。保因者診断目的に母親の切断点シーケンス解析および X 染色体不活化解析を行った。

3) 症例 3

先天性心疾患、成長障害を主訴に来院した女児で、染色体検査の結果 chrX と chr22 の均衡型転座を示し、核型は 46,X,t(X;22)(p11.21;q11.2)であったため、臨床症状を検討するために、X 不活化解析を行った。

Androgen receptor 領域 CAG リピート多型を用いたアッセイ

高い多型性を呈する CAG リピートを持ち、その近傍に X 不活化と相関する HpaII および HhaI 制限酵素サイトをもつ Androgen receptor 遺伝子を解析対象とした。方法は Allen ら (Am J Hum Genet 51;1229, 1992) に従った。最初に、一定量の gDNA を HpaII 処理、HhaI 処理、未処理の 3 種類準備し、それぞれ酵素処理を行い、そのあとにビーズ精製 (Agencourt

AMPure XP, Beckman Coulter A63881) により DNA を回収。Touch down PCR により Xq12 領域の Androgen receptor の (CAG)_n の多型領域を増幅した (n=11-31)。増幅産物を Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) で解析した (DNA1000, Agilent Technologies)。増幅産物は平均 300bp であった。

(倫理面への配慮)

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、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。解析にあたっては、全ての個人情報情報を潜在化した。

C. 研究結果

1) 症例 1

未処理 49:51、HpaII50:50、HbaI43:57 で X はランダムな不活化だった。

2) 症例 2

HpaII24:76、HbaI6:94

Skewed パターンとなっていた。疾患の特性から矛盾ない。

3) 症例 3

HpaII98:2、HbaI96:4

Skewed パターンとなっていた。均衡型転座であることから、現象として矛盾ない。

D. 考察

Allen ら (Am J Hum Genet 51;1229, 1992) の方法は、X 染色体不活化アッセイとして現在まで広く使われている。歴史的には、最初の報告ではアイソトープを用いた方法が主で、後にシーケンサーを用いた fragment 解析が主流になっている。しかし、このシーケンサーを用いる方法は、シーケンサーの準備や fragment 解析のための操

作が必要で、必ずしも簡便とは言えない。そこで我々は、こうした短い fragment の定量解析を得意とし、高分解能で正確な定量性を再現できる Bioanalyzer を用いて、X 染色体不活化アッセイを行った。対象は今後の汎用性を考慮して、X 染色体均衡型相互転座、代表的 X 連鎖劣性遺伝病を選んだ。結果は、期待通りで 2 つの制限酵素 HpaII および HhaI を用いることで、より正確に X 染色体不活化状態を定量化することが可能であった。実際の遺伝形式や症状と矛盾ないことが確認できた。

この方法が簡便に利用できることにより臨床応用が可能となる。一つは、原因不明の X 染色体微細構造異常がマイクロアレイ染色体検査で検出された場合に、保因者である母親の X 染色体不活化状態を確認することにより、その X 染色体微細構造異常が病原性 (Pathogenic) か否かの判定の参考となるからである。同胞や血縁者内に変異 X を受けついた罹患者がいない場合に、それが病原性変異であるかの判定は遺伝カウンセリングにおいて極めて重要である。同様に、X 連鎖性疾患においても参考となる。X 連鎖劣性遺伝を呈する ATR-X 症候群の保因女性における X 染色体不活化は、skewed パターンを示す。既知報告変異例では、X 染色体不活化アッセイは必ずしも診断上必須ではない。しかし、今後、次世代シーケンスによる網羅的な変異スクリーニングがなされた際に、X 染色体上の不活化を受ける遺伝子の未報告変異が検出されることもあり、上述の変異 X による罹患者が家系内にいない場合には、X の不活化アッセイが有力な参考資料となる可能性がある。ATR-X は、身体所見が診断上極めて有用であるが、非症候群性精神遅滞症例でも報告があり、必ずしも臨床

所見が診断確定の手掛かりになるとは限らない (Guerriniet al., A nonsense mutation of the ATRX gene causing mild mental retardation and epilepsy. *Ann Neurol* 2000;47;117-121.; Moncini et al., *Meta Gene* 2013;1:102-108.)。現在まで、複数の非症候群性精神遅滞例で ATRX の変異が検出されている。次世代シーケンスの時代になっても基本的診断技術としてのサンガーシーケンスと並んで、こうした X 染色体不活化アッセイは重要であり、臨床研究室として装備しておくべきシステムと考えられた。

E. 結論

バイオアナライザーを用いた X 染色体不活化アッセイの方法を確立した。X;常染色体均衡型転座例、代表的 X 連鎖劣性遺伝病である Opitz-BBB 症候群などの対象症例や保因女性を用いてアッセイを行い、極めて正確な評価が可能であることを確認した。これまでの大がかりなシーケンサーを用いた解析と異なり、バイオアナライザーによるアッセイは正確で迅速な解析が可能であった。次世代シーケンスによる非症候群性精神遅滞では、ATR-X を初めとした症候群性精神遅滞原因遺伝子と考えられてきた遺伝子に変異が検出される可能性もあり、このアッセイは診断さらには遺伝カウンセリングの上でも極めて有用なものと思われる。今後臨床解析手技として整備すべき解析技術である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C,