

201324/50A

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）

**ヤング・シンプソン症候群の病因・病態の解明
と治療法開発のための基盤整備に関する研究**

平成 25 年度 総括研究報告書

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

ヤング・シンプソン症候群の病因・病態の解明と治療法開発のための基盤整備に関する研究
..... 1

黒澤健司

II. 分担研究報告

ヤング・シンプソン症候群の迅速診断体制の整備と診断基準の見直し..... 11

黒澤健司

ヒストン修飾異常症としてのヤング・シンプソン症候群と Kabuki 症候群の臨床像の比較検討
..... 15

升野光雄

ヤング・シンプソン症候群の長期的医療管理..... 18

近藤達郎

KAT6B 領域の微細欠失を有する男児例の臨床像に関する研究..... 20

水野誠司

ヤング・シンプソン症候群の内分泌学的特性の検討—4—（成長および成長ホルモン分泌）..... 25

安達昌功

III. 資料..... 27

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 35

V. 研究成果に関する刊行物・別刷..... 39

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）
総括研究報告書

ヤング・シンプソン症候群の病因・病態の解明と治療法開発のための基盤整備に関する研究

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

Exome 解析・マイクロアレイ染色体検査を駆使し、新たな *KAT6B* 変異のほか、ゲノム再構成による *KAT6B* 微細欠失症例を検出した。これで典型例 8 例全てに *KAT6B* の変異を検出し、さらに 2 例のハプロ不全発症例を経験した。変異解析で得られた確定症例を中心として、内分泌学低特性、患者家族への情報の還元の検討と疾患理解の一つの方法としての「症候群カード」の作成、本症候群を含めた先天異常疾患の地域ベースでのサポート体制の在り方、などをまとめた。依然として病態の解明は今後の課題であり、症例をさらに増やして遺伝子型-表現型の相関関係を明らかにし、さらに iPS 細胞やモデル動物による病態の解析が重要と考えられた。

分担研究者

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
近藤達郎 総合発達医療福祉センター みさかえの園むつみの家 診療部長
水野誠司 愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部長
安達昌功 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内 分泌代謝科 部長

研究協力者

黒田友紀子 同 遺伝科 医師
大橋育子 同 遺伝科 医師
成戸卓也 同 研究員
井田一美 同 研究員
西川智子 同 認定遺伝カウンセラー
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

ヤング・シンプソン症候群は、顔貌異常、先天性心疾患、甲状腺機能低下症、重度精神遅滞、骨格異常、外性器異常、尿路奇形を特徴とする先天奇形症候群で、2011年にヒストンアセチル化酵素 KAT6B の異常が原因であることが判明した (Clayton-Smith, 2011; Simpson, 2012; Campeau, 2012)。現在まで 30 例近くの報告が確認されている。当研究班でも exome 解析により同様の結果を得た (2012)。7 家系 7 症例で疾患特異的変異を確認した。この間、全国調査で追加 5 症例を確認、発生頻度を少なくとも 10–20 万出生に 1 例と推定し、患者家族への情報還元を目指ウェブ上にホームページを開設、平成 23 年度には、診断基準を作成、ウェブ上の情報公開、医療管理指針作成、生体試料保存として 5 家系の株化リンパ芽球の保存、を達成した。当研究組織は、臨床遺伝学・臨床奇形学 (Dysmorphology) の専門家集団で、希少疾患の病因遺伝子単離から医療管理までを目指す包括的研究である。KAT6B は、histone acetyltransferase (HAT) 活性を有し、本症の病態を解明することはヒストン修飾因子を原因とする多くのヒトの発生異常の研究に有用な情報を与えてくれる。本研究は、疾患特異的 iPS 細胞技術を用いた神経難病研究拠点の支援を受けてヤング・シンプソン症候群疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、エピゲノム変化も含めた多様な病態を解明することを目標とする。

B. 研究方法

1) 患者臨床情報データベース作成 (水野研究分担者、ほか)

既に遺伝子解析で KAT6B 変異を確認した 7 症例ならびに、遺伝子診断で変異未検出例の臨床症状をまとめ、genotype-phenotype correlation を構築し、データベースを作成する。これにより、KAT6B 遺伝子変異を有しながら非典型症状を有す症例の存在を明らかにすることが可能となり、疾患の広がりを確認できる。海外報告では、同じく KAT6B を

原因とする Genitopattellar 症候群との異同が指摘されている。我々は、さらに非典型例の非典型領域 (exon 18 以外) 変異を検出したことから、異なった病態を呈する一連の疾患群があることを推測している。

2) 診断未定例の再評価

変異 Hot spot である exon 18 以外に KAT6B 全 exon 領域を含む形の変異スクリーニング体制を次世代シーケンサーを用いて構築する。迅速かつ大量検体処理体制を整備し、国内外からの解析依頼に対応できる体制を整える。これは、より多くの症例蓄積とデータ蓄積に連動する。

3) 自然歴に基づいた医療管理プロトコルの作成

平成 24 年度までに作成された合併症に対する医療管理プロトコルを再度見直す。対症療法が基本ではあるものの、自然歴に基づいた早期発見早期治療は、結果として長期予後の改善と医療コストの軽減を期待できる。

4) 患者および患者家族への情報の還元

平成 22–24 年度研究で得られた情報をインターネット上に公開し、医療サイドに対して潜在症例の再評価を呼び掛ける。一方で患者および患者家族に対しては生活管理を含めた適切な情報還元を行う。さらに遺伝子診断確定症例の症状を参考に再検討を経た医療管理指針を公開する。

5) ヤング・シンプソン症候群の内分科学的特性 (安達研究分担者)

ヤング・シンプソン症候群の内分科学的特性に関して、これ迄の検討により下記の知見を得ている。1) 全国調査で集積された 7 症例のうち、1 名が軽症、6 名が顕在性の甲状腺機能低下症と診断された。発症時期が調査可能な 4 症例では、すべて新生児期発症であった。

2) 自験男性例の4名全員が停留精巣を呈し、1名が中枢性性腺機能低下症に移行した。自験女性2名中の1例が続発性無月経を生じた。

同症候群の内分泌特性を引き続き検討する。これまでの甲状腺機能および性腺機能の継続調査に加えて、身長・体重に関する評価、および成長ホルモン分泌能に関する調査も実施する。方法は、主に自施設で経験した症例につき、診療録から情報を抽出する、後方視的検討をおこなった。

【病態解明のための基礎的研究】

6) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

既に平成 22-24 年度研究でリサーチリソースとして生体試料 5 症例の保管がなされている。樹立された株化リンパ芽球は分子遺伝学的手法による病因解明の際の有力な試料として保管されている。これを用いて、疾患特異的 iPS 細胞技術を用いた神経難病研究拠点の支援により、ヤング・シンプソン候群疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、モデル動物では検証し得ないエピゲノム変化も含めた多様な病態を解明することを目標とする。

7) Exome 解析による病因遺伝子の同定

平成 23 年度研究で Exome 解析によりヤング・シンプソン症候群責任遺伝子 KAT6B を明らかにし、平成 24 年度研究では同様手法で従来報告のない exon 16 に変異を検出したことから、本症における exome 解析の有用性を確認した。第 2 の責任遺伝子を想定し、exome 解析を変異未検出例で進める。

(倫理面への配慮)

研究代表者施設では、得られた生体試料の保管、および疾患特異的 iPS 細胞樹立に関しては「診断および難病克服をめざした先天異常症候群の皮膚線維芽細胞の保存 (平成 21 年 9 月 4 日付、施設内倫理審査承認)」、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)」への細胞寄託は「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 (平成 22 年 8 月 11 日付、施設内倫理委員会承認、平成 24 年 8 月 29 日改訂承認、平成 26 年 1 月再改定承認)」として、倫理審査を終えている。Exome 解析に関しては、「ヤング・シンプソン症候群の病因解明 (平成 22 年 7 月 26 日付、施設内倫理委員会承認)」として審査が行われている。

C. 研究結果

1) 患者臨床情報データベース作成

KAT6B 変異陽性性 7 症例について詳細な臨床症状の集積を行った。ほとんどの症例が出生前胎生期からの情報を含め、詳細な情報を集めることができた。つまり、20 歳以上の 3 症例については 20 年以上にわたる長期の医療管理記録、生活記録が集積されたことになる。非常に貴重な情報と思われた。

(水野研究分担者): 臨床症状の評価を行うために、昨年度作成した先天異常症候群の診療に特化し外来診療に活用できる施設内データベースに本年度は米国で近年用いられている先天奇形症候群の表現形データベース PhenoDB を新たに試用し、遺伝性疾患表現形汎用データベースの導入の可能性と問題点について検討した。小奇形を表す用語の最初の数文字を入力すると候補用語を列挙するモジュールが組み込まれ、初心者でも容易に表現形データベースが作成可能であり、今後の Phenome の解析に有用なツールであると考えられた。

2) 診断未定例の再評価

これまで、変異が集中する KAT6B exon 18 を中心に分析を進めてきたが、exome 解析により exon 16 に新規の変異症例を経験したことから、全エクソソンの迅速診断システムの確立が重要と考え、次世代シーケンサーを用いた変異スクリーニング体制を確立した。KAT6B 遺伝子全 exon18 領域を 7 つの PCR 産物でカバーできるようにプライマーを設計し、PCR 産物 (LA-PCR を併用) を Nextera

(Illumina) で処理し (ライブラリー化)、卓上型次世代シーケンサーMiSeq (Illumina) を用いて、極めて効率的に迅速に解析するシステムを確立した。その結果、10-15 サンプルは同時解析が可能であることを確認した。このことにより疑い例の迅速解析が可能となった。また、read depths は極めて高く (数千以上)、その信頼度も高いことが確認できた。また、この手法により、収集新規サンプルに変異陽性を検出した。

(近藤研究分担者) : 診断未定 2 例についてマイクロアレイ染色体 (SurePrint G3 8x60k、Agilent Technologies) で、KAT6B を含むゲノム微細欠失を検出した。微細欠失によるヤング・シンプソン症候群はこれまで報告がなく、新しい発症メカニズムおよび病態の検討に極めて有用な症例と考えられた。

みさかえの園総合発達医療福祉センターむつみの家において「総合発達外来」が開設された平成 19 年 6 月から延べ外来数は、393 (平成 19 年)、1590 (平成 20 年)、2215 (平成 21 年)、2631 (平成 22 年)、3475 (平成 23 年)、4105 (平成 24 年)、4511 (平成 25 年) と確実に増加傾向を示している。封書などの相談も年間 30 例程度あっている。これらを利用しての相談でヤング・シンプソン症候群疑いの症例はこれまで 4 例あった。それぞれは福岡県 2 例 (北九州市立総合療育センター、産業医科大)、佐賀県 1 例 (佐賀大学)、長崎県 1 例 (長崎大学) であった。産業医科大の症例は、現在主治医が遺伝子解析のことを含め、家族と相談中である。他の 3 例については、各主治医を介して、神奈川県立こども医療センターに遺伝子解析を依頼したが、今のところ、KAT6B 遺伝子異常を検出できていない。現在、当センターでフォローしている KAT6B 遺伝子異常のあるヤング・シンプソン症候群者は安定した生活を送っている。iPS 細胞の依頼を現在行っているところである。

3) 自然歴に基づいた医療管理プロトコールの作

成

平成 24 年度研究までに確立された自然歴に基づく医療管理プロトコールに改訂を行った。大きな修正点は、今回 KAT6B を含む領域のゲノム微細欠失症例が 2 例検出されたことである。現在まで報告がなく、新しい疾患概念の可能性もある。これまで、重症度分類を導入するまでもなく全例重症例であったが、ゲノム微細欠失症例は、眼瞼裂狭小や長い指などの骨格特性など中核症状は従来であるが、精神遅滞は中等度で身辺自立も達成可能である範囲と考えられた。これらの事実により、診断基準の見直しと、医療管理プロトコールの見直しを行った。

4) 患者および患者家族への情報の還元

平成 25 年 12 月 21 日 (土曜) に神奈川県立こども医療センターにおいて、研究成果発表ならびに患者家族支援を目的に、「ヤング・シンプソン症候群の会」を開催した。今回で 4 回目となった。参加家系は 7 家系 (19 名) で、いずれも遺伝学的検査により KAT6B の遺伝子変異あるいはゲノム欠失が確認された症例である。研究成果発表の後に懇談会形式で会が進行し、参加者の理解を得ることができた。根本治療は困難なものこうした疾患理解の機会とピアカウンセリングとしての意義を有する時間は極めて有意義と考えられ、開催後に回収されたアンケート調査でも参加者の意志を確認することができた。

(升野研究分担者) : 希少難病の健康管理を目的とした症候群カードの作成と配布の促進。ヤング・シンプソン症候群の本人やその家族を対象として実施された 3 回の患者・家族会「ヤング・シンプソン症候群の会」におけるアンケートを通じて明らかになった問題の解決策として、希少疾患の患者家族や関わる方々の支援を目的に

「YOUNG-SYMPSON SYNDROME CARE CARD」を作成した。現状から希少疾患の患者家族に生じている困難な点を取り上げ、具体的な対策を実施

でき、さらに研究班で得られた最新の情報が不可欠であった。医療ばかりでなく、よりふつうに生活するために必要な支援を実行できたことは、本研究の目的を達成したと考えられる。継続した支援が必要である。このカードは、実際に患者家族が携帯し、医療管理・生活管理の参考になっていることが、「第4回ヤング・シンプソン症候群の会」でも報告された。

5) ヤング・シンプソン症候群の内分泌学的特性 (安達研究分担者)

現在のところ、新規症例の集積は無い。身体発育に関しては、乳幼児期には平均以下(概して-2SD前後)で推移する症例が多く、なかには著しい低身長を呈するものも見られた。性腺機能低下の反映で、思春期年齢以降は身長 SDS スコアが改善し、平均以上に到達する症例も認められた。女性2例は思春期年齢以降に肥満傾向を示し、痩せ傾向の男児例と比して対照的であった。IGF-1 値は、ほぼ年齢性別正常範囲内に分布していた。

IGF-1 値で判断する限り、同症候群における成長ホルモン分泌に、重度の低下は無いものと推察される。乳幼児期の身体発育不良には、摂食状況や合併症に伴う全身状態の寄与が大きいものと思われた。女兒における肥満傾向が同症候群に特有のものかどうか、他施設の例を含めての検討が必要と考えられた。

6) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

まだ、iPS 細胞は樹立されていないが、患者会(平成25年12月21日)を通して、iPS 細胞研究への積極的な参加の呼びかけを行い、理解を得た。5家系でリンパ芽球化が樹立し、保管がなされた。また、3家系では公的な試料バンクへの寄託や iPS 細胞化への賛同をえることができた。また、保管する細胞の研究試料としての継続保存については、医薬基盤研究所難病バンクとの契約ならびに倫理審査を経ることができた。これにより、iPS 細胞も

含め広く研究試料として保管される手続きが達成できた。

7) Exome 解析による病因遺伝子の同定

平成24年度研究では、家系トリオ exome 解析により従来疾患特異的変異が集中する exon18 ではなく、exon16 に新規の変異を確認した。今回、この手法を用いて臨床的に強く疑われる症例に対して trio exome を計画したが、臨床専門医評価により強く疑われる症例では既に従来の方法で変異を確認し、変異を検出しなかったより強い疑い例は存在しなかった。今回の研究では、あらたな Pipeline の基盤整備にとどまった。

D. 考察

今回、次世代シーケンサーを用いた新しい変異スクリーニング体制の確立した。これにより従来のサンガー法によりシーケンス解析からよりコストダウンを図った迅速な解析が可能と考えられる。また、変異モザイクも高い精度で検出できることが他の疾患で確認されていることから(自験症例)、今後正確な診断が、疾患概念の拡大につながるかもしれない。

また、ゲノム微細欠失による新たな2症例を診断し得たことは注目に値する。本疾患はほぼ全例 KAT6B の truncated mutations である。このことは、truncated mutation がそのままハプロ不全としての発症メカニズムを意味するわけではなく、変異アレルの転写産物が発症に対して何らかの影響を及ぼしていることを意味するかもしれない。治療戦略を検討するうえで極めて重要なデータとなることが予想される。しかし、先天異常疾患の多くは、発生初期に重要な機能を果たしている遺伝子であり、出生後の遺伝子の機能解析は病態解明に結びつかない場合が多い。したがって、本疾患も iPS 細胞化によるヒストン修飾の状況の詳細な検討が今後の課題と考えられた。

1) 達成度

当初計画した6項目については、ほぼ計画通りに進んだが、iPS細胞の樹立については現在iPS細胞研究拠点と調整段階にあり、樹立とiPS細胞を用いた具体的な機能解析には至っていない。しかし、樹立後には、こうしたヒストン修飾因子を専門とする基礎研究サイドとも連携をとる予定である。また、exome解析による第2の責任遺伝子の同定については、次世代シーケンスによるより正確な迅速スクリーニング体制を敷いたものの、適切な症例が集積されなかったために、パイプラインの整備にとどまった。ただし、このexome解析のオリジナルなパイプラインの整備は極めて有用なものであることを確認した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

研究成果は、総説として広く基礎研究者にも理解を得られるようにまとめた(黒澤健司 エピジェネティクスと病気. 遺伝子医学 MOOK Vol.25 pp217-222, 2013)。注目されつつある疾患の原因としてのエピジェネティクスを明らかにする極めて重要な疾患であることを強調した。社会的には「ヤング・シンプソンの会」を通して、患者家族の理解を促し、研究における患者家族の参加の意義に広く理解を得ることができた。

3) 今後の展望について

第1に、iPS細胞の樹立は既に複数症例でリンパ芽球株化が樹立し、保管されているので、早急に進めるべき課題である。患者家族の理解を得たことは、研究の加速に極めて有意義と思われた。第2は、多くの診断未確定のヤング・シンプソン症候群疑い例に対する診断の確定である。これまで、特に強く疑う症例についてexomeを施行してきたが、今後は場合によっては診断基準を完全には満たさない不全例などを適応範囲としてもいいかもしれない。第3は、なおも診断がつかずに原因不

明のまま潜在しているヤング・シンプソン症候群症例の診断をどのように進めるべきかということである。研究代表者らは、平成22年からの研究で、発生頻度十萬出生に1例と推定した。つまり、年間5-10例の新たな症例の出生が推定されているのである。しかし、実際はほとんど診断は未定のままである。迅速スクリーニングの活用と広く国内専門施設等に呼び掛ける必要がある。

4) 研究内容の効率性について

短期間ではあるものの、効率的に研究を集約し、生体試料の保管を達成できた。今後は、活用に十艇を置くべきと考えている。疾患の発生頻度の低さから必ずしもこうした研究が効率よく患者の予後改善に供するとはならないものの、学会等を通じて社会に訴え行くことは重要と思われた。

E. 結論

Exome解析・マイクロアレイ染色体検査を駆使し、新たな*KAT6B*変異のほか、ゲノム再構成による*KAT6B*微細欠症例を検出した。これで典型例8例全てに*KAT6B*の変異を検出し、さらに2例のハプロ不全発症例を経験した。変異解析で得られた確定症例を中心として、内分泌学低特性、患者家族への情報の還元の見直しと疾患理解の一つの方法としての「症候群カード」の作成、本症候群を含めた先天異常疾患の地域ベースでのサポート体制の在り方、などをまとめた。依然として病態の解明は今後の課題であり、症例をさらに増やして遺伝子型-表現型の相関関係を明らかにし、さらにiPS細胞やモデル動物による病態の解析が重要と考えられた。

F. 研究発表

論文発表

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
- Soneda A, Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Takagi M, Hasegawa T, Inoue H, Itakura M. Novel compound heterozygous mutations of the growth hormone-releasing hormone receptor gene in a case of isolated growth hormone deficiency. *Growth Hormone and IGF Research* 23 : 89-97, 2013
- Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Asakura Y, Adachi M, Takahashi E, Shiroyanagi Y, Yamazaki Y, Tanaka Y, Hasegawa T. Association between Graves' disease and renal coloboma syndrome: a case report. *Clin Pediatr Endocrinol* 22: 45-51, 2013
- Adachi M. Assessment of user-friendliness of the Norditropin FlexPro for pediatric patients treated with recombinant human growth hormone: results of an open-label user survey. *J Pediatr Endocrinol Metab* 26: 1105-1110, 2013
- Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Asakura Y, Adachi M, Aida N, Tomiyasu M, Tajima G, Hasegawa T. A neonatal patient with classic MSUD: the usefulness of 1HMRS on early diagnosis. *Ped Int* (in press)
- Adachi M, Asakura Y, Muroya K, Goto H, Kigasawa H. Abnormal adipose tissue distribution with unfavorable metabolic profile in five children following hematopoietic stem cell transplantation: A new etiology for acquired partial lipodystrophy. *Clin Pediatr Endocrinol* 22: 53-64, 2013
- Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Tajima T. Classic Bartter syndrome complicated with profound growth hormone deficiency: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2013, 7:283.
- 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*. 2013 Sep;161(9):2234-43
- 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
- 黒澤健司 ヒストン修飾酵素異常症 特集：エピジェネティクスと病気. 遺伝子医学 MOOK Vol.25 pp217-222, 2013
- 黒澤健司 先天異常の疫学 小児科臨床 2013;66:1201-1208.
- 佐藤武志, 室谷浩二, 花川純子, 朝倉由美, 安達昌功, 近藤脩. 訪問看護師による経静脈的ビタミンD補充でくる病の顕著な改善を得た進行性家族性胆汁鬱滞症1型 (Byler病) の1例. *小児科臨床* 66:2263-2267, 2013
- 河野香, 安達昌功, 朝倉由美, 室谷浩二, 鹿間芳明, 赤城邦彦, 田中祐吉, 福田冬季子, 杉江秀夫. 非進行性肝型と考えられる糖原病IV型の1例 *日本小児科学会雑誌* 117:1883-1887, 2013
- 室谷浩二. 症例でみる水電解質異常—中枢性尿崩症と腎性尿崩症 *小児内科* 45: 1583- 1588, 2013
- 土居美智子, 近藤達郎, 森藤香奈子, 本村秀樹, 増崎英明, 松本正, 森内浩幸: 染色体異常児家族への告知に関する家族・医師へのアンケート調査から見えてくるもの—より良い告知の目指して—. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 48(4), 897-904, 2013.
- 近藤達郎: 1-1. ダウン症候群の概略について pp3-5、1-2. 染色体異常と遺伝 pp5-6、1-3. 呼吸器疾患 pp6-7、1-4. 肥満 pp8-9、1-5. 心臓疾患

pp9-10、1-6. 頸椎異常 pp10-11、1-7. 消化器疾患 pp11-12、1-8. 皮膚疾患・アレルギー pp12、1-13. その他の身体的特徴 pp17-19、1-16. 乳幼児健康診断 pp21-22.

ダウン症ハンドブック (改訂版) 菅野敦、玉井邦夫、橋本創一、小島道生 編. 2013.3.25 日本文化社. 東京.

近藤達郎: 先天性疾患の診断を伝える. 小児科診療 76(7): 1061-1066, 2013.

佐治勉、近藤達郎、与田仁志、森尾友宏: ダウン症候群とRS ウィルス感染症の病態を考えるー各領域における現状と問題点ー. Fetal & Neonatal Medicine 5(2), 26-35, 2013.

学会発表

Ohashi I, Kuroda Y, Naruto T, Ida K, Kurosawa K. A case report of 0.12Mb microdeletion at 19p13.2 including *NFLX* 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

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

S. Mizuno, Y. Muramatsu, N. Miyake, N. Matsumoto. 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

Kondoh T, Kanno A, Itoh H, Tonoki H, Kakee N, Okuyama T, Ogata K, Moriuchi H: Deterioration of Abilities in Daily Lives of Unknown Etiology in Adolescent Down Syndrome People - Questionnaire Investigations and Effectiveness of Donepezil Therapy. Annual Meeting of Pediatric Academic Societies. Washington DC, May 4-7, 2013.

Kitamura A, Kondoh T, Noguchi M, Kihara T, Moriuchi H: Voiding dysfunction of Down syndrome - a common but unrecognized complication - . Annual Meeting of Pediatric Academic Societies. Washington DC, May 4-7, 2013.

黒澤健司 ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いたヤング・シンプソン症候群の病態解析 疾患特異的 iPS 細胞技術を用いた神経難病研究 キックオフミーティング 平成 25 年 3 月 14 日 慶應義塾大学

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 2013.11.20-23. 仙台

黒澤健司 マイクロアレイ染色体検査の臨床応用. 第 116 回日本小児科学会学術集会 2013.4.19-21. 広島

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)

水野誠司、橋本真帆、菱川容子、木村礼子、山田憲一郎、山田裕一、若松延昭 COACH 症候群 (JS-H:Joubert syndrome with hepatic disease) の双生児例 第 58 回日本人類遺伝学会 平成 25 年 11 月 23 日 仙台

水野誠司、村松友佳子、谷合弘子、伊藤弘紀、三宅紀子、松本直通 カブキ症候群患児にみられた DIP 関節拘縮と屈曲線消失 第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013 年 7 月 21 日 大阪
村松友佳子、岡本伸彦、鈴木伸宏、要匡、柳久美子、谷合弘子、熊谷恭子、大林伸太郎、成富研二、齋藤伸治、杉浦真弓、水野誠司 BCOR 遺伝子変異を認めた Lenz microphthalmia syndrome における表現型の検討 第 53 回日本先

天異常学会学術集会 2013 年 7 月 21 日 大阪

G. 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

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

ヤング・シンプソン症候群の迅速診断体制の整備と診断基準の見直し

分担研究者 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

これまでまとめてきたヤング・シンプソン症候群の診療指針を見直し、あらたにまとめた。診断基準にゲノム異常（10q22.2 微細欠失）を追加し、遺伝子診断としてマイクロアレイ染色体検査と次世代シーケンサーを組み合わせた解析システムの有用性も確認した。こうした希少難病の多くにおいて病態解明などの基礎研究が進まない理由として生体試料の不足があげられるため、さらなる疾患の拡大と治療を目指した基礎研究の推進が課題と考えられた。

A. 研究目的

神奈川県立こども医療センターは、京浜地区成育医療施設として、先天奇形症候群を含めた希少難病の医療管理を行っている。昨年までにヤング・シンプソン症候群の診療指針をまとめ、さらに治療法開発に不可欠となる検体共有のための難病バンクへの細胞寄託システムを整備した。希少疾患・奇形症候群においては、医療の最初のステップである診断の確定が極めて重要である。今回、昨年までに確立された診断基準・診療指針を見直し、次世代シーケンサーの有用性も確認した。また、同様に難病バンク細胞寄託も見直しを行い、システムに反映した。

B. 研究方法

診断基準見直し：

ヤング・シンプソン症候群は、1987年に顔貌異常、先天性心疾患、甲状腺機能低

下症、重度精神遅滞を呈する原因不明の奇形症候群で、その病因・病態の解明が進みつつある。臨床像は極めて均一であり、症候群としても明確な疾患範疇として確立できることがわかった。2011年に海外のグループにより責任遺伝子が KAT6B と同定されて以降、遺伝子レベルでの正確な診断に基づく診療指針の確立が重要となっている。これまで収集された診断確定症例の各臨床症状を見直し、新たに診療指針をチェックリストとしてまとめた。合併症の羅列でなく、成長・発達ごとの指針となるように配慮した。

KAT6B 変異スクリーニング体制の整備：

これまで、変異が集中する KAT6B exon 18 を中心に分析を進めてきたが、exome 解析により exon 16 に新規の変異症例を経験したことから、全エクソンの迅速診断システムの確立が重要と考え、次世代シーケンサーを用いた変異スクリーニング体制

を確立した。KAT6B 遺伝子全 exon18 領域を 7 つの PCR 産物でカバーできるようにプライマーを設計し、PCR 産物 (LA-PCR を併用) を Nextera (Illumina) で処理し (ライブラリー化)、卓上型次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) を用いて、解析をおこなった。

C. 研究結果

KAT6B 変異スクリーニング体制の整備：

変異スクリーニングを目的とする検体を極めて効率的に迅速に解析するシステムを確立した。その結果、10-15 サンプルは同時解析が可能であることを確認した。このことにより疑い例の迅速解析が可能となった。また、read depths は極めて高く (数千以上)、その信頼度も高いことが確認できた。また、この手法により、収集新規サンプルに変異陽性を検出した。

診断未定 2 例についてマイクロアレイ染色体 (SurePrint G3 8x60k, Agilent Technologies) で、KAT6B を含むゲノム微細欠失を検出した。微細欠失によるヤング・シンプソン症候群はこれまで報告がなく、新しい発症メカニズムおよび病態の検討に極めて有用な症例と考えられた。

診断時基準の見直し：

平成 24 年度研究までに確立された自然歴に基づく医療管理プロトコールに改訂を行った。大きな修正点は、今回 KAT6B を含む領域のゲノム微細欠失症例が 2 例検出されたことである。現在まで報告がなく、新しい疾患概念の可能性がある。これまで、重症度分類を導入するまでもなく全例重症例であったが、ゲノム微細欠失症例は、眼瞼裂狭小や長い指などの骨格特性など中核症状は従来であるが、精神遅滞は中

等度で身辺自立も達成可能である範囲と考えられた。これらの事実により、診断基準の見直しと、医療管理プロトコールの見直しを行った。また、視覚的に医療管理の全体が把握できるように、診療におけるチェックリストを作成した。

診断基準 (平成 25 年度版)

- 1) 特徴的な顔貌
- 2) 精神遅滞：中等度から重度
- 3) 眼症状：眼瞼裂狭小を必須として付随する弱視・鼻涙管閉塞など
- 4) 骨格異常：内反足など
- 5) 内分泌学的異常：甲状腺機能低下症
- 6) 外性器異常：主に男性で停留精巣および矮小陰茎

補助項目：羊水過多、新生児期の哺乳不良、難聴、行動特性、泌尿器系異常。遺伝子診断により KAT6B 遺伝子に疾患特異的変異を検出する。また、マイクロアレイ染色体等で KAT6B を含む 10q22.2 領域の微細欠失を原因とすることもある。

除外診断：

他の奇形症候群あるいは染色体異常症を除外できる。特に眼瞼裂狭小・眼瞼下垂・逆内眼角贅皮症候群 (あるいは眼瞼裂狭小症候群；Blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome BPES) との鑑別は重要。一般に BPES では精神遅滞は目立たないが、微細欠失型の場合は精神遅滞、成長障害、関節症状などを合併することがあり、混同されやすく注意が必要である。また、他の染色体異常症 (上述 BPES 微細欠失型 3q22.3 欠失症候群も含め) を除外する必要がある。

D. 考察

ヤング・シンプソン症候群の診断システムとして、次世代シーケンサーを用いた新しい変異スクリーニング体制を確立した。これにより従来のサンガー法によりシーケンス解析からよりコストダウンを図った迅速な解析が可能となった。また、変異モザイクも高い精度で検出できることが他の疾患で確認されていることから(自験症例)、今後正確な診断が、疾患概念の拡大につながるかもしれない。

ゲノム微細欠失による新たな2症例を診断し得たことは注目に値する。本疾患はほぼ全例 KAT6B の truncated mutations である。このことは、truncated mutation がそのままハプロ不全としての発症メカニズムを意味するわけではなく、変異アレルの転写産物が発症に対して何らかの影響を及ぼしていることを意味するかもしれない。治療戦略を検討するうえで極めて重要なデータとなることが予想される。しかし、先天異常疾患の多くは、発生初期に重要な機能を果たしている遺伝子であり、出生後の遺伝子の機能解析は病態解明に結びつかない場合が多い。したがって、本疾患もiPS細胞化によるヒストン修飾の状況の詳細な検討が今後の課題と考えられた。

今回、昨年までの診療指針に続き、診療におけるチェックリストを作成した。乳幼児期から成人期にいたるまでの診療のポイントや検査項目を視覚的に分かりやすく、診療に携わる一般小児科・内科医でも理解し、さらに、親の理解の補助となる形式とした。長期的なフォローでは、見落とされがちな問題をリスト化することにより見落としがちなような形式になっている。今後は、この形式を多数症例の検討で

さらに詳細にまとめ、個体差も考慮する形式を目指している。

E. 結論

ヤング・シンプソン症候群の診療指針・健康管理チェックリストをまとめた。従来病態が不明とされてきた希少難治性疾患である奇形症候群の診療指針を明らかにすることは極めて重要である。医療サイドの理解が得られ、合併症管理に有用となる。さらに自然歴に関する情報は、将来に対する親の不安を取り除くことを可能とし、結果として長期的予後の改善が期待できる。さらなら疾患の拡大と治療を目指した基礎研究の推進が課題である。

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, 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.
- 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.

2. 学会発表

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 2013.4.18. 広島

黒田友紀子、大橋育子、高野亨子、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 2013.4.19-21. 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 2013.5.30-6.1 大分

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 2013.6.20-23.

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

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 2013.11.20-23. 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 2013.11.20-23. 仙台

黒田友紀子、大橋育子、成戸卓也、高野亨子、和田敬仁、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 2013.11.20-23. 仙台

G. 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

ヒストン修飾異常症としてのヤング・シンプソン症候群と
Kabuki 症候群の臨床像の比較検討

研究分担者 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

ヤング・シンプソン症候群原因遺伝子産物 *KAT6B/MYST4* は、*MOZ/MORF* 複合体の一部をなし、histone acetyltransferase 活性を有する。一方、Kabuki 症候群原因遺伝子産物 *MLL2* も同様にヒストン修飾を担う。今回、我々は上述の知見からヤング・シンプソン症候群と Kabuki 症候群の臨床像を比較し、ヒストン修飾異常症の特徴の抽出を試みた。骨格異常、精神遅滞、特徴的な行動特性を示すこと、特異的顔貌など、まったく異なる奇形症候群でありながら、特徴を示す領域が極めて共通していることがわかった。これらがすべてヒストン修飾異常症の特徴としてあげるべきか現時点では確定できないが、長期にわたる自然歴研究が重要であることは明らかである。Kabuki では腫瘍発生が医学管理上重要であるが、ヤング・シンプソン症候群では今のところ報告がない。さらにまた、他のヒストンアセチル化を担う転写因子を原因とする例の可能性も視野に入れる必要がある。次世代シーケンサーによる網羅的解析や iPS 細胞を用いた機能解析がこうした先天性のヒストン修飾異常症の全貌を明らかにしてくれるかもしれない。

共同研究者

山内 泰子 川崎医療福祉大学医療福祉学部
医療福祉学科准教授

A. 研究目的

ヤング・シンプソン症候群は、1987 年の症例報告に始まり、日本からの追加報告（Masuno, Am J Med Genet, 1999; Kondoh, Am J Med Genet, 2000）により、疾患の全体像が明確にされた。その病因・病態は長く不明であったが、Clayton-Smith ら（2011）らによって Exome 解析により責任遺伝子が *KAT6B/MYST4* と同定され、後に

Genitopatellar 症候群も *KAT6B/MYST4* が原因であることが判明した（Simpson et al., 2012; Campeau et al., 2012）。*KAT6B/MYST4* は、10q22.2 にマップされ、*MOZ/MORF* 複合体の一部をなし、histone acetyltransferase を有する。*KAT6B* は、*RUNX-2* 依存性の転写活性に必要で、脳の発生に重要な働きを示す。

一方、Kabuki 症候群は下眼瞼の外反を伴う切れ長の眼瞼裂などからなる特徴的顔貌、骨格異常、特異な皮膚紋理、精神遅滞、低身長、易感染性など、様々な合併症を特徴とする奇形症候群である。Niikawa

ら（1981）と Kuroki ら（1981）が報告したことから、Niikawa-Kuroki 症候群とも呼ばれる。Exome 解析により責任遺伝子として Histone-lysine N-methyltransferase MLL2（Mixed lineage leukemia 2）が同定されて以降、臨床診断に加えて遺伝子診断が導入されているが、変異検出率は 50–80% で診断の際には注意を要する。また、第 2 の責任遺伝子として *KDM6A* が同定され、臨床的診断例の約 10% に変異が検出される。

今回、我々は上述の知見からヤング・シンプソン症候群と Kabuki 症候群の臨床像を比較し、ヒストン修飾異常症の特徴の抽出を試みた。

B. 研究方法

本研究班での遺伝子解析で診断が確定したヤング・シンプソン症候群症例 5 例の臨床症状と研究分担者が直接解析および医療管理に関わった Kabuki 症候群症例の臨床特徴を比較し、文献的考察を加えた。

（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

Kabuki 症候群において、長くその責任遺伝子は不明であったが、2010 年に海外のグループと日本のグループの共同研究により MLL2（12q13.12）と同定された。MLL2 は、全長 36.3kb で 54 エクソンからなり、5537 個のアミノ酸をコードしている。MLL2 は H3K4 N-methyltransferase として、遺伝子発現とクロマチン構造を初期発生の段階で制御しているとされているが、Kabuki 症候群の上述の個々の症状における影響はほとんどわかっていない。体

細胞変異として、MLL2 は急性骨髄性あるいはリンパ性白血病で、*KDM6A* は腎細胞癌、多発性骨髄腫で、原因遺伝子として知られてきた。遺伝子変異は、MLL2 のハプロ不全をきたす nonsense 変異や frameshift が多いが、missense 変異も散見する。変異は MLL2 の全領域にわたるが、特に exon 39, 40 など 3' 側に偏る傾向がある。変異が検出されるのは臨床診断例の 56-76% とされる。変異が検出されない例では臨床的に非典型例が多い。浸透率は 100% であるが、表現型の差は大きい。*KDM6A* は、Histone 3 trimethyl-lysine 27（H3K27me3）の脱メチル化を担い、しかも MLL2/3 による H3K4 のメチル化と連動している。*KDM6A* は、X 染色体上にあり不活化を受けないが、実際には不活化 X 染色体上の *KDM6A* の発現は低下している。臨床症状の性差の検討が必要である。

一方、ヤング・シンプソン症候群もヒストン修飾を担う *KAT6B* の異常であり、MLL2 の変異同様に機能喪失（殆どが non-sense 変異か frameshift 変異）である。骨格異常、精神遅滞、特徴的な行動特性を示すこと、特異的顔貌など、まったく異なる奇形症候群でありながら、特徴を示す領域が極めて共通している。これらがすべてヒストン修飾異常症の特徴としてあげるべきものか現時点では確定できないが、ヤング・シンプソン症候群の遺伝子レベルで明らかとなる症例の蓄積と長期にわたる自然歴研究はその答えを与えてくれるかもしれない。Kabuki 症候群では腫瘍発生が散見されるが、ヤング・シンプソン症候群では今のところ報告がない。慎重なケアが必要である。また、診断が未定の多発奇形症例に他のヒストンアセチル化を担う転写産物の異常症例が存在するのかも極

めて興味深い。次世代シーケンサーによる網羅的解析や iPS 細胞を用いた機能解析がこうしたヒストンアセチル化異常症の全貌を明らかにしてくれるかもしれない。

E. 結論

先天性のヒストン修飾異常を原因とするヤング・シンプソン症候群と Kabuki 症候群の臨床症状の比較をおこなった。まったく原因遺伝子が異なりながらその臨床特徴に多くの共通点があり、新しい疾患概念の可能性が考えられた。Kabuki 症候群では腫瘍発生もあり、ヤング・シンプソン症候群の医療管理上共通点を考慮に入れることは重要と思われた。今後、iPS 細胞での解析や次世代シーケンサーを用いた解析が課題となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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(9):2300-4.

2. 学会発表

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)

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)

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)

G. 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