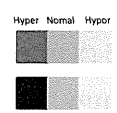


A.SRS			Abnormal methylation			
Case	ART					
1	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated	PEG10 Hypermethylated (mosaic)	GRB10 Hypermethylated	ZNF597 Hypomethylated
2	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)				
3	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated (mosaic)			
4	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	GRB10 Hypermethylated			
5	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	INPP5F Hypermethylated			
6	-	H19 Hypomethylated				
7	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	ZNF597 Hypermethylated (mosaic)	ZNF331 Hypomethylated (mosaic)		
8	-	H19 Hypomethylated				
9	-	H19 Hypomethylated (mosaic)				
10	-	H19 Hypomethylated				
11	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated			
12	-	H19 Hypomethylated				
13	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	FAM50B Hypomethylated			
14	-	H19 Hypomethylated				
15	-	H19 Hypomethylated				

B.BWS			Abnormal methylation		
Case	ART				
1	IVF-ET	LIT1 Hypomethylated	ZDBF2 Hypermethylated	PEG1 Hypermethylated	NESPAS Hypomethylated (mosaic)
2	-	LIT1 Hypomethylated			
3	-	LIT1 Hypomethylated			
4	-	LIT1 Hypomethylated			
5	-	LIT1 Hypomethylated			
6	-	LIT1 Hypomethylated	ZDBF2 Hypomethylated	ZNF331 Hypomethylated (mosaic)	
7	-	LIT1 Hypomethylated			



一方、非 ART 群においては、SRS では 10 例中 3 例、BWS では 6 例中わずか 1 例に複数領域にメチル化異常を示すことが判明した。

(2) 系統的、網羅的全ゲノムのメチル化解析：

メチル化解析には、1塩基のメチル解析結果を 100bp のタイル毎に算出し、転写開始点 (TSS) ($\pm 1\text{kb}$)、CpG アイランド、SINE、LINE、LTR、Repeat DNA および Simple repeat について解析し、健常児と比較してヒートマップにて示した (図 1)。特に、ART 治療を受けた S9 では健常児と比較して全体的に低メチル化状態であった。メチル化異常領域 (20%以上メチル化されたタイルまたは脱メチル化されたタイル) は、TSS では 1831、CpG アイランドでは 1632、SINE では 4047、LINE では 726、LTR では 850、Repeat DNA では 205、Simple repeat では 143 タイルであった。また、メチル化異常領域数について、ART 群および非 ART 群で比較したところ、ART 群でメチル化異常数が多く、特に脱メチル化領域が多かった (図 2)。メチル化異常領域の内訳として、CpG アイランドでは転写開始点、SINE では Alu、LINE では L1、LTR では ERV1 が最も多かった。

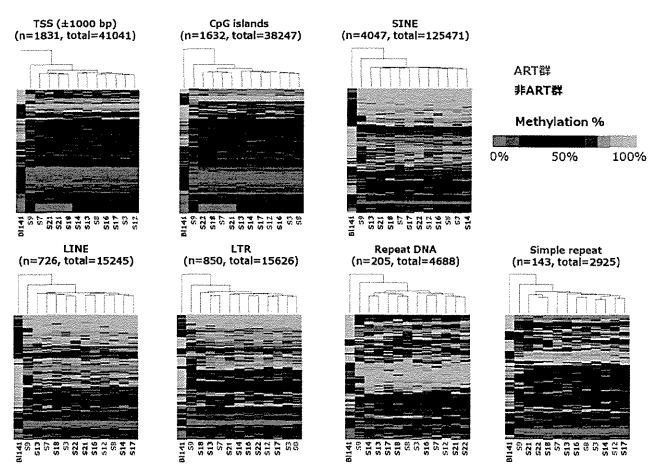
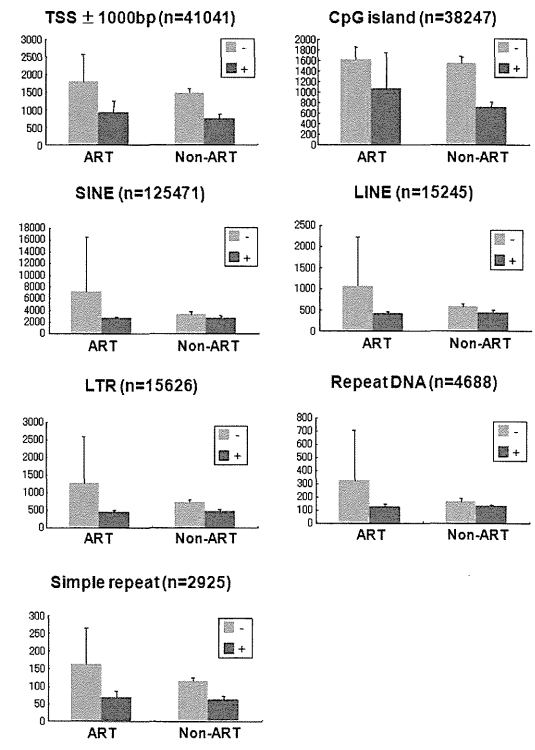


図 1 RRBS 法によるゲノムワイドなメチル化解析
20%以上のメチル化または脱メチル化領域のメチル化異常領域のみを示す。



(3) エキソーム解析：

健常児および先天性インプリント疾患者を比較して、患者のみに見られる変異 SNV/Indel を抽出し、非同義置換 SNV については機能予測プログラム SIFT および PolyPhen-2 で解析を行った。さらに、DNA 多型を含めた Bisphite PCR Sequence 法によりインプリント遺伝子領域の複数領域にメチル化異常を示す患者に見られた変異かつ DNA メチル化に関与する遺伝子の変異について絞り込みを行った。SIFT または PolyPhen-2 により damaging と判定された変異は、TDRD5、KHDC3L、UHRF1BP1、H1FNT、MBD3L2、TET1、XRCC1 および PHC2 の 8 遺伝子であった。その中でも、UHRF1BP1、MBD3L2、TET1 および XRCC1 の 4 遺伝子が新規の変異であった。UHRF1BP1 および MBD3L2 はメチル化の維持に関与しており、TET1 および XRCC1 は脱メチル化に関与している事が知られている。

D. 考察

インプリント異常症は、IVF や ICSI 症例に多い傾向にあるが、リスク要因となりうる ART 操作は排卵誘発法や量、胚培養液の種類など様々であり、特定するに至っていない。ART 操作と DNA メチル化異常に関する動物実験や細胞培養での報告は多数あるものの、ヒト研究においてこれらの検証を行うには限界もある。我々の ART 出生児の疾患患者解析より、非 ART 児に比し、複雑なメチル化異常を呈すること、臨床症状に特異性が見られることから、ART によるリスクは、配偶子形成よりむしろ受精以降の過程で発症するものと考えられた。この結果は、受精卵培養や培養液（法）が影響を与えているように思える。動物胚（ウシ、ヒツジ等）の体外培養によって、胚移植後に子宮内での過剰胎児発育が起り、出生した産仔の死亡率や疾患罹患率が高くなる事が報告されている（Large offspring syndrome : LOS）。これは GI 遺伝子 IGF2R のメチル化の低下と発現の低下によって、IGF2 が過剰に産生されることが原因と推測されている。また、このメチル化の異常は、排卵誘発あるいは体外培養によって生じる事が判明している。マウスにおいても、培養液の組成や体外操作によるメチル化異常についての報告がある。ヒトでは、BWS は胎児、胎盤の肥大

が特徴で LOS と関連する。逆の現象として、SRS では GI 異常が子宮内発育不全（IUGR）の原因となる。インプリント異常疾患である新生児一過性糖尿病病（TNDM）でも IUGR がみられ、ART と関連するかもしれない。しかし、不妊症自身の遺伝的背景も考慮しなければならない。つまり、相乗効果が働くのかもしれない（図 3）。インプリント遺伝子以外の影響に加え、原因遺伝子の探索は重要で、安全な ART 治療を行う上で、予防、診断に十分生かせられると考えている。

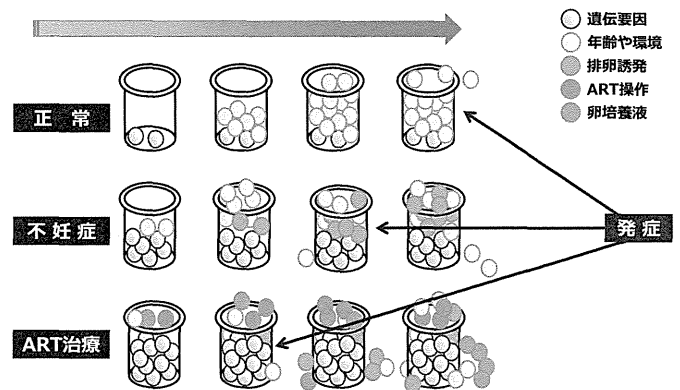


図3 インプリント異常症における閾値に関するモデル

不妊症自身の遺伝的背景に ART 操作が加わり、インプリント異常症を発症しやすくしているのではないかと推測されている。

E. 結論

メチル化異常を呈するインプリント異常症の場合、ART 出生児はその異常のパターンが複雑である。この異常は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。つまり、受精以降の胚操作（受精卵培養、凍結胚操作など）に注意を払わなければならないと考えられる。今後エピゲノム異常を示す症例の発症機序の解明とリスク要因の同定は急務である。

F. 健康危険情報

症例数が少ないため、未だ正確には評価できないが、ART により発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）、つまりメチル化の獲得より、むしろメチル化の維持に影響を与える可能性があり、注意を払わなければならない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy P.J, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, **Arima T**, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyangi K, Soloway P.D. & Sasaki H. Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus. **Science**. 332: 848-852. 2011.
2. Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, **Arima T**. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis. **Fertility and Sterility**. 95: 129-134. 2011.
3. Maeda T, Oyama J, Higuchi Y, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori Y, Nakazono T, **Arima T**, Mimori K, Makino N. The physical ability of Japanese female elderly with cerebrovascular disease correlates to the telomere length and subtelomeric methylation status in their peripheral blood leukocytes. **Gerontology**. 57: 137-143. 2011.
4. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, **Arima T**, Makino N. The correlation between the clinical laboratory data and the telomere length in peripheral blood leukocytes of Japanese female patients with hypertension. **The Journal of Nutrition, Health and Aging (JNHA)**. 15: 240-244. 2011.
5. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori T, Nakazono T, **Arima T**, Makino N. The physical ability of elderly female Japanese patients with cerebrovascular disease correlates with the telomere length in their peripheral blood leukocytes. **Aging Clinical and Experimental Research**. 57: 137-143. 2011.
6. Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, **Arima T**. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. **Human Molecular Genetics** 21: 548-558. 2012.
7. Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Junichi Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, **Arima T**. High-throughput detection of imprint methylation errors in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. **BMC Medical Genomics**.5: 8-17. 2012.
8. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, **Arima T**. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies. **Human Reproduction**. 27 (8), 2541-2548, 2012.
9. **Arima T**, Okae H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Hayashi C. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples. **INTECH**. 29: 183-192. 2012.
10. Sakurai M, Ohtake J, Ishikawa T, Tanemura K, Hoshino Y, **Arima T**, Sato E. Distribution and Y397 phosphorylation of focal adhesion kinase on follicular development in the mouse ovary. **Cell and Tissue Research**. 347: 457-465. 2012.
11. Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, **Arima T**. Stability of the abnormal imprinting of human induced pluripotent stem cells. **BMC Genetics**. 14: 32. 2013.
12. Chiba H, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, **Arima T**. DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technologies. **Pediatrics international**. 55: 542-549. 2013.
13. Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Ogura A, **Arima T**. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. **Hum Mol Genet**. in press.
14. Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, **Arima T**. ART and imprinting errors. **Reproductive Medicine and Biology**. in press.
15. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子, 阿部千鶴, 林千賀. 「ARTにおけるエピジェティクス異常」産婦人科の実際. 金原出版株式会社, 741-750, 2011
16. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子. 「ヒト卵子・精子・胚のエピジェティクス」卵子学. 京都大学学術出版会, 122-131, 2011.
17. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子. 「母子の健康と環境影響」助産雑誌. 医学書院, 62, 11, 2011.

18. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 宮内尚子, 佐藤芙美. 「ゲノムインプリンティングと発がん」 癌と化学療法. 癌と化学療法社, 1745-1749, 2011.
19. 有馬隆博 「生殖補助医療由来の先天性ゲノムインプリンティング異常症」 日本生殖内分泌学会雑誌 Japanese Journal of Reproductive Endocrinology NO.17 54-58, 2012
20. 千葉初音, 岡江寛明, 有馬隆博, ヒト生殖補助医療 (ART) とエピジェネティクスの異常、遺伝子医学MOOK25号 178-183, 株式会社メディカルドゥ 2013.
21. 井原基公, 有馬隆博, 生殖細胞と酸化ストレス、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 247(9), 851-855, 2013.
22. 濱田裕貴, 岡江寛明, 有馬隆博, ARTとエピジェネティックな異常、臨床婦人科産科 医学書院 68(1), 98-105, 2014.
23. 千葉初音, 有馬隆博, 生殖医療と児の奇形, エピジェネティクス異常、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 印刷中.
24. 樋浦仁, 有馬隆博, 生殖補助医療とエピジェネティクス, エピジェネティクス-基礎研究から産業応用への展望-, 株式会社シーエムシー出版 印刷中.
9. 2012 セント・ルカセミナー「胎盤形成とゲノムインプリンティング」大分 (6/3/2012)
10. 第 11 回学術集会日本不妊カウンセリング学会 「生殖医療とエピジェネティクス」 東京 (6/8/2012)
11. 第 5 回生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク公開シンポジウム Non-random loss of imprinting in cloned mice 京都 (11/20-21/2012)
12. 日本生殖再生医学会・第 8 回学術集会「乏精子症とゲノムインプリンティング」 東京 (3/10/2013)
13. 第 116 回日本小児科学会学術集会「生殖補助医療と小児科医療の接点」 広島 (4/20/2013)
14. 第 54 回日本卵子学会「生殖領域におけるエピジェネティクス研究の最前線」 東京 (5/25/2013)
15. 第 31 回日本受精着床学会総会・学術講演会「基礎から臨床へ、ART とエピゲノム」 別府 (8/9/2013)
16. 第 58 回日本生殖医学会 学術講演会・総会「ART とゲノムインプリンティング」 神戸 (11/16/2013)
17. 日本人類遺伝学会 第 58 回大会「ART と先天異常」 仙台 (11/22/2013)

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 第 9 回統合産婦人科研究合同セミナー「エコチルについて」 仙台 (2/19/2011)
2. 第 6 回日本生殖再生医学会「ART におけるエピジェネティック機構」 東京 (3/13/2011)
3. 第 28 回日本医学会総会 「生殖補助医療とインプリンティング異常」 東京 (4/8/2011)
4. 第 96 回東北医学会総会 「ゲノムインプリンティングとヒト疾患」 仙台 (5/20/2011)
5. 第 4 回生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク会 「胎盤特異的インプリント遺伝子の役割」 大阪 (11/18/2011)
6. 熊本大学発生発生医学研究所セミナー「胎盤形成とゲノムインプリンティング」 熊本 (2/10/2012)
7. 日本生殖再生医学会・第 7 回学術集会「ART におけるエピジェネティック機構」 東京 (3/25/2012)
8. Planet xMAP Japan 2012 「男性不妊症精子のイ

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1. インプリント異常症の発症リスク評価方法 (PCT 出願 : PCT/JP2012/003196)
出願日 2012,5,16 発明者 有馬隆博
(出願人 東北大学)

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
（難病関係研究分野））研究分担報告書

次世代シーケンサーによる希少遺伝性疾患の遺伝子解析研究
—劣性遺伝形式を示す新規疾患家系の解析—

1. —特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例—
2. —TORCH 症候群類似症状を呈する家族性頭蓋内石灰化の兄妹症例—

研究分担者 熊本大学大学院生命科学研究部 教授 遠藤文夫

研究要旨

本研究は、希少遺伝性疾患の新規候補遺伝子を同定することを目的とした研究である。すなわち、次世代シーケンサーを用いて希少遺伝性疾患の新規候補遺伝子を同定し、疾患の発症機構を解明し適切な診療指針の確立を目的とする。そのためには希少遺伝性疾患の家系の抽出が必要であり、解析の候補として適切かどうかを検討する必要がある。まず、初年度は候補として、特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例を報告した。同様の病状を呈する疾患として、これまでに *Microphthalmia syndromic 1* (Lenz 症候群)、*Microphthalmia syndromic 2* (*Oculofaciocardiodental syndrome*)があるが、前者は女性の発症は原則的にはなく、後者は男性致死でいずれも該当しない。両者の候補遺伝子として *BCOR* (*BCR-6 corepressor gene*) 遺伝子があるが、本例において遺伝子変異は検出されず、CGH アレイにては異常を検出できなかったため、次世代シーケンサーにて検索を行った。

また、次年度は広範囲の脳内石灰化をきたし、感音性難聴、網膜異常を呈し、著名な退行をきたして TORCH 類似の症状を示す兄と妹の症例を見出した。鑑別疾患として TORCH 症候群、*Aicardi-Goutieres syndrome*、コケイン症候群、内分泌疾患（甲状腺機能低下症、副甲状腺機能亢進症）、炎症性疾患、中毒、ミトコンドリア異常症、リソソーム病が挙げられたがいずれも酵素診断・遺伝子診断で否定され、CGH アレイでも異常を認めず、家族歴から常染色体劣性遺伝が強く疑われたため、次世代シーケンスによる解析を実施するにいたった。

研究協力者

- 仲里仁史（熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野）
三淵 浩（熊本大学医学部附属病院新生児医学寄附講座）
中村公俊（熊本大学医学部附属病院小児科）
松本志郎（熊本大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター）

劣性遺伝の場合、その解析は比較的容易であることがわかってきた。よって、希少遺伝性疾患の家系の抽出が重要であり、解析の候補として適切かどうかを検討する必要がある。本研究では、我々の施設がフォローしている原因不明の家族性疾患 150 例のうち厳密に除外診断ができている症例を抽出し、さらに劣性遺伝性疾患を抽出して、この新規原因遺伝子を同定することを目的とした。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いて希少遺伝性疾患の新規候補遺伝子を同定し、疾患の発症機構を解明し適切な診療指針の確立を目的とする。現在までに多数の解析が実施されてきているが、原因遺伝子の解明までいたる例は限られている。過去の報告より、常染色体

B. 研究方法

今回、我々は上記目的のために、家族歴（兄弟例）のある希少疾患の家系（約 150 家系）を検討した。熊本大学小児科において、通院中の原因不明の希少疾患と思われ、兄弟例を含む家族例を検索し、特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例をピッ

クアップした。既存の疾患との異同、候補遺伝子の検討を行い、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析、同定が可能か検討した。

(倫理面への配慮)

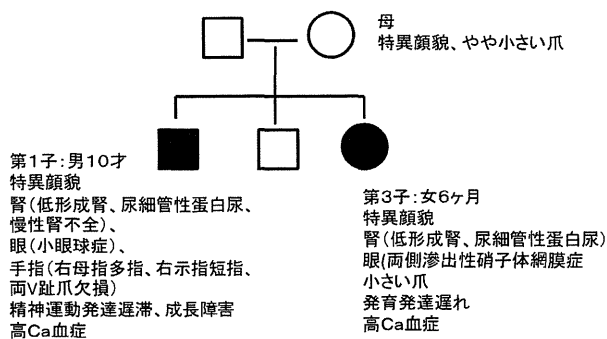
遺伝性疾患の遺伝子解析については熊本大学倫理委員会の承認を得た。また、担当医師は日本人類遺伝学会の臨床遺伝専門医であり、熊本大学における遺伝カウンセリングチームとして研究対象者に人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)、カウンセリング行いながら本研究をすすめた。

C. 研究結果

1. 第1家系

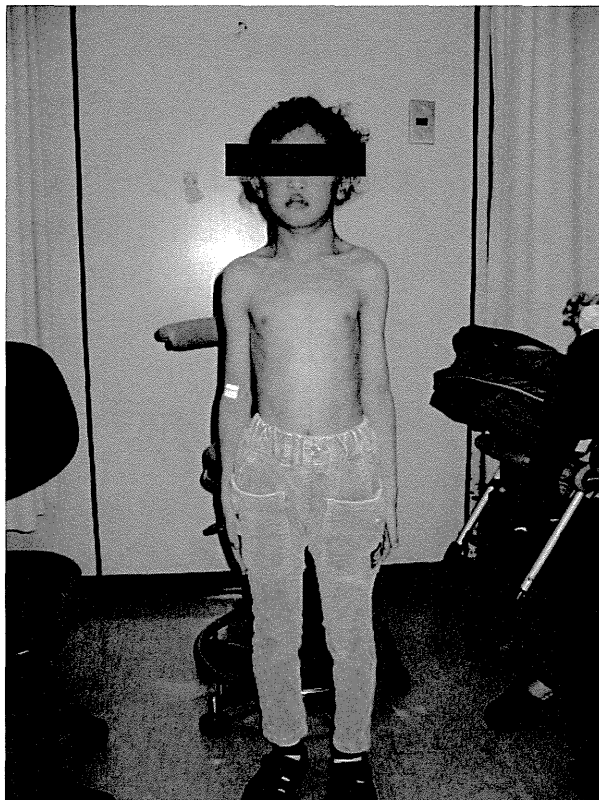
症例

家系図を示した。



血族結婚は認めず、父方母方調べた範囲では、同様の疾患は見当たらなかった。

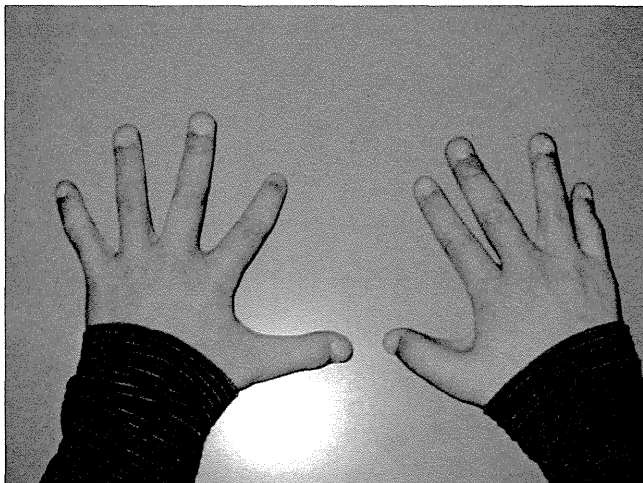
発端者である第1子兄は2002年8月生まれ、胎児期羊水減少、IUGR、胎児徐脈で39w6d、2608g帝王切開で出生した。奇異な顔貌、多指のため基幹的病院に入院した。小頭症、奇異な顔貌(左眼瞼下垂、小眼球、白内障、眼振、細く尖った鼻、大きい立った耳介、薄い頭髪、薄い眉、小顎症)、左示指爪欠損、右軸前性多指、なで肩、細い胸郭、低形成腎、高Ca血症を認めた。心奇形は認めなかった。眼底所見は両側第一次硝子体過形成遺残と診断され、左眼の視力はない状態であった。染色体Gバンドは正常。9歳時の写真を示す。



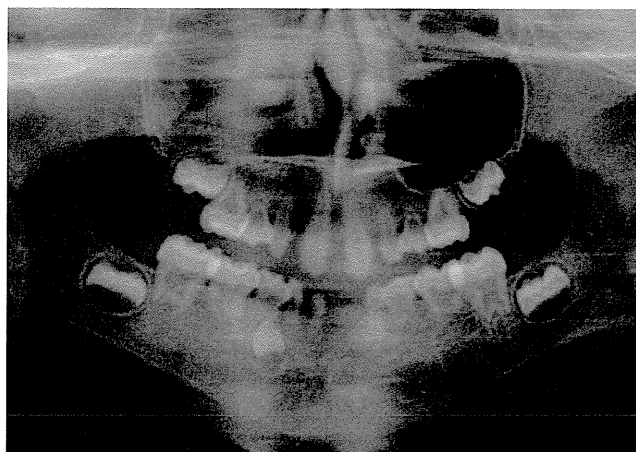
なで肩、細い胸郭が顕著である。



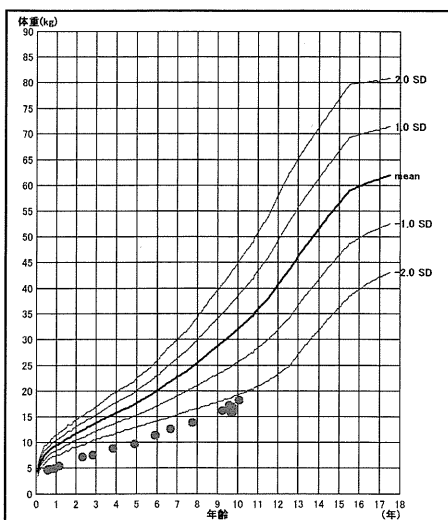
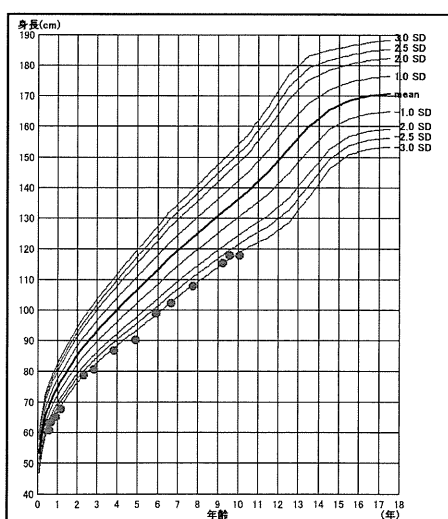
小頭症、奇異な顔貌(左眼瞼下垂、小眼球、白内障、眼振、細く尖った鼻、大きい立った耳介、薄い頭髪、薄い眉、小顎症)を認める。



爪が小さく、左示指爪欠損を認める。右軸前性多指に関しては切除形成されている。

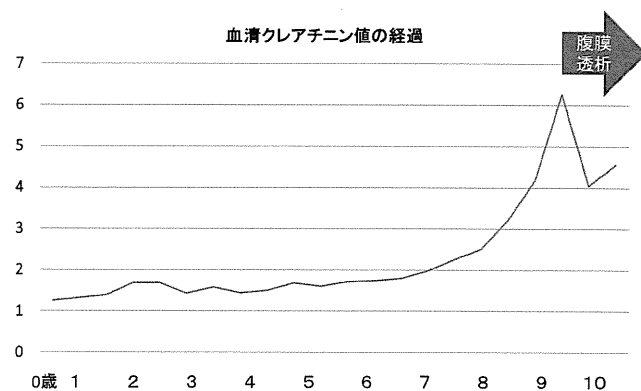


9歳時の歯列のパノラマ撮影を示す。歯牙の欠損、形成異常を認める。癒合、歯髓の拡大ははっきりしない。下に発育曲線を示す。体重は-3SD領域、身長は-2SD領域である。



発達はDQ40-50ぐらいで推移、普通学校の特別支援、弱視学級に通学中である。腎機能は徐々に低下

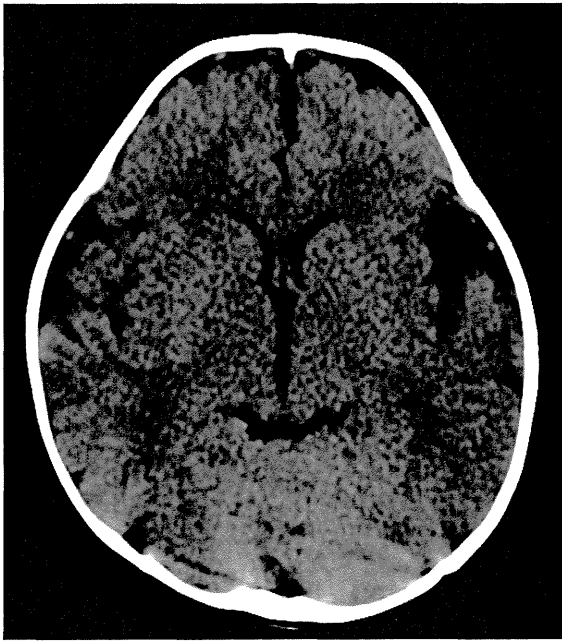
し、現在透析中である。クレアチニンの経過を下图に示した。



低形成腎であり、組織学的検討はなされていない。本例については琉球大学医学部要先生に依頼し、BCOR (BCL-6 corepressor gene) の遺伝子解析を行ったが、異常は検出されなかった。

上記兄の弟は特に異常を認めず。

妹は2012年1月生まれ、胎児期腎低形成を疑われていた。女兒ということも判明していた。出生後、腎低形成、爪の低形成、特異顔貌（小眼球、細く尖った鼻、大きい立った耳介、薄い頭髪、薄い眉）を認め精査、兄と同様の疾患が考えられた。眼科的には両側家族性滲出性硝子体網膜症と診断された。高Ca血症（一過性、低Caフォーミュラ使用）も認める。心奇形は認めない。血清クレアチニン値は生後すぐに1以上あったが、現在0.7-0.8程度で推移している。成長発達は遅れている。



頭部CTでは三角頭蓋とまではいかないが、前頭葉の形成が不良の可能性もある。

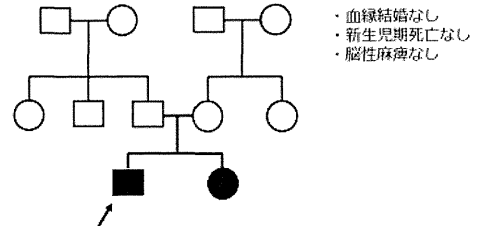
一ケドより耳側周辺部に硝子体中に伸びる白い膜を認める。左眼は耳側の無血管野との境界に増殖膜？を認める。左眼は同部より一部出血、滲出あり。

2. 第2家系

症例

家系図を示した。

【家系図】



血縁結婚は認めず。父方母方調べた範囲では、同様の疾患は見当たらなかった。

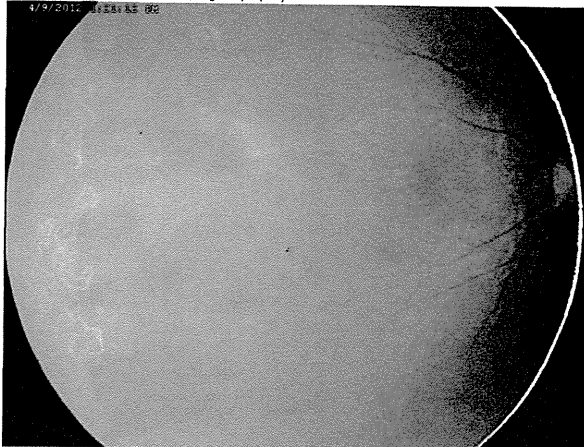
発症者は、平成20年4月17日出生、39週1日2440gであった。新生児期は異常なく、生後2ヶ月時に発熱、側胸部皮下膿瘍形成し、総合病院受診され、WBC 19200, Hb 10.2, Plt 9.1, IgG 200台であり、血小板減少と低ガンマグロブリン血症認めた。免疫不全疑いで精査を受けたが、免疫機能精査ではリンパ球サブセット正常、Wiskott-Aldrich syndrome protein 抗原解析正常で、そのほかの疾患分類にも当てはまるものはなく経過された。次第に体重増加不良、音への反応の鈍さ、発達遅延を認め、筋緊張亢進、ミオクローヌスが激しくなった。ロタウイルス腸炎罹患直前まで、追視あり笑顔見られ、寝返りできており、乳食摂取していた。現在は寝たきりで経管栄養施行中。追視(-)、開眼(+)、筋緊張亢進(+)、DTR亢進(+)、ミオクローヌス(+)。わずかな刺激で全身に強直出現する状態となった。

発症当時のCTを示す。



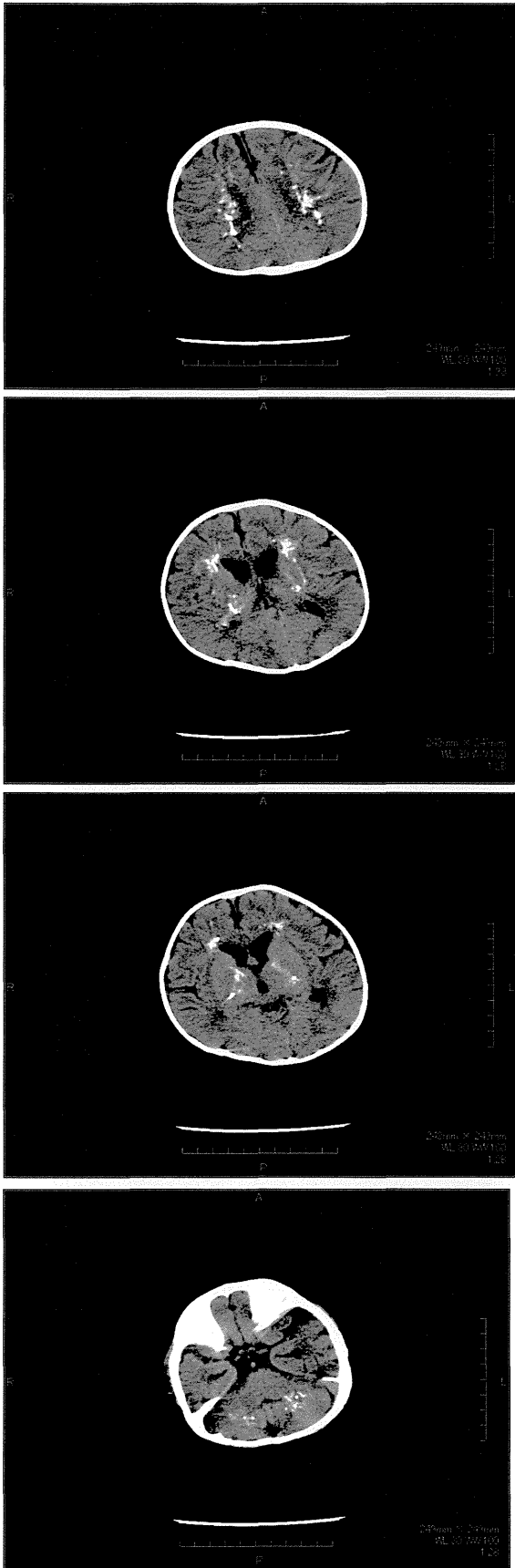
左眼底写真

mei yosioka (ID:12019154)-
4/9/2012 1:16 PM, Retina, Lens 1300, Right Eye (OD)

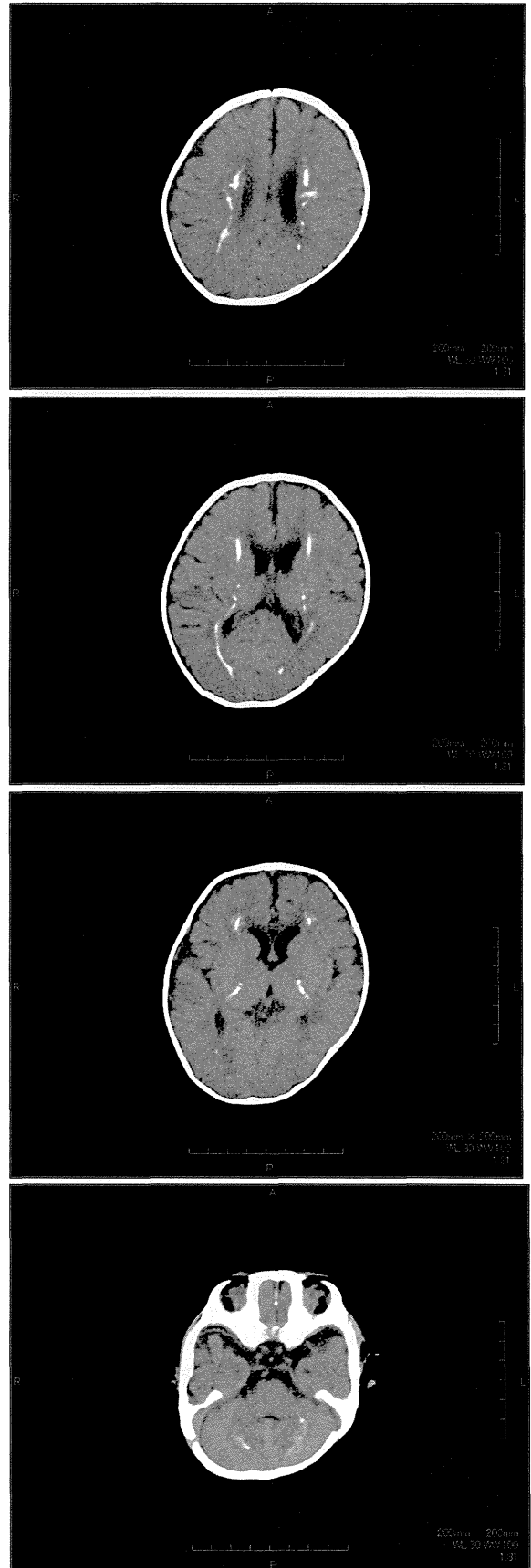


右眼底写真

両眼耳側に1DD程度の無血管野を認める。右眼はア



深部白質、一部基底核、小脳にも石灰化を認めた。
頭部 MRI を示す。



鑑別のための検査データを示す。

- ・脳波（平成 20 年 10 月、12 月）：2 回とも異常なし
- ・頭部 MRI（平成 20 年 10 月施行）：T2 画像で深部白質の low intensity(+)

- ・聴性脳幹反応：両側無反応
- ・血液生化学：軽度肝障害（+）、高アンモニア血症（-）、その他異常なし
- ・血液ガス：異常なし
- ・乳酸、ピルビン酸：異常なし
- ・血液アミノ酸分析：異常なし
- ・腹部エコー：異常なし
- ・TORCH 症候群検査：

① サイトメガロウイルス

臍帯血中 CMV（-）、血中 CMV IgG(+)、IgM(±)、C7-HRP(-) 髄液 CMV IgG(-)、IgM(-)。髄液 CMV の PCR 陰性。

② トキソプラズマ IgG(-)、IgM(-)

③ 濾紙血液の風疹、単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、EB ウイルス：PCR 陰性

<採血検査>ヘモグラム正常、補体価正常、血沈異常なし、血液ガスでアシドーシスなし。軽度肝障害（+）。乳酸・ピルビン酸も異常なし。補体価正常、抗核抗体は陰性。低 IgG、低 IgA 血症（+）。

<タンデムマスクリーニング：6/25>異常なし

<尿中有機酸スクリーニング検査：6/26>異常なし
<感染>

サイトメガロウイルス C7-HRP(6/25)：陰性、

トキソプラズマ IgG 抗体 (8/3)：3 以下 (6 IU/ml 未満)、

トキソプラズマ IgM 抗体 (8/3)：0.1 (0.8 IU/ml 未満)

麻疹/HI(8/3)：8 培未満 (8 倍希釈より実施)

風疹/HI(8/3)：8 培 (8 倍希釈より実施)

水痘・帯状疱疹ウイルス IgG 2.3(2 未満)

水痘・帯状疱疹ウイルス IgM 0.63(0.8 未満)

コクサッキーウイルス B 群 1 型~6 型：すべて 4 倍未満 (4 未満)

はすべて陰性

<髄液検査(8/3)>

細胞数 10/3 個、蛋白 82.5mg/dl, 糖 65mg/dl, LDH 8U/l

ミエリン塩基性蛋白：388pg/ml (102 以下)、

乳酸：16.8mg/dl、ピルビン酸：0.9mg/dl、L/P：18.6、

オリゴクローナルバンド：陰性

インターフェロン α：陰性

ネオプテリン：3pmol/ml

<神経伝導速度検査(7/31)>異常なし

<染色体検査(8/25)>正常核型 46,XY

<眼科コンサルト(6/25)、(7/31)>網膜色素変性 (+)、TORCH 症候群を疑う所見なし。

<皮膚科コンサルト (7/9) >日光過敏症なし

<2 回目頭部 MRI+MRS(8/25)>

頭部 MR:2009/06/25 MR と比較。

・側脳室拡大が進行し、脳溝も前回よりやや拡大しており脳萎縮が疑われる。また、大脳白質にはびまん性に T2 強調像で高信号域を認める。皮質は両側頭頂葉-側頭葉の一部でやや低信号だが、前頭葉-頭頂葉を中心に高信号を呈する。小脳半球も高信号。白質、皮質の高信号ともに前回より目立つ。基底核も高信号となり、これも前回より進行している。脳幹部にも高信号域が広がっている。

また、T1 強調像では大脳皮質や皮質下白質、内包後脚、視床、基底核、脳幹、小脳に高信号域がみられる。FLAIR では大脳半球皮質・皮質下の線状の高信号を認める。DWI ではやはり両側錐体路が高信号。

・右大脳深部白質に関心領域を設定し、short TE MRS 施行。同部では、NAA の低下と著明な Cho の上昇、lac の上昇がみられ、脳の破壊性変化の進行を疑わせる。疾患特異的な異常ピークは認めず。

・左右対称性の病変であり代謝性疾患を疑い。

Cockayne 症候群のほかに、Aicardi-Goutieres syndrome が鑑別に挙がる。

【セカンドオピニオン】

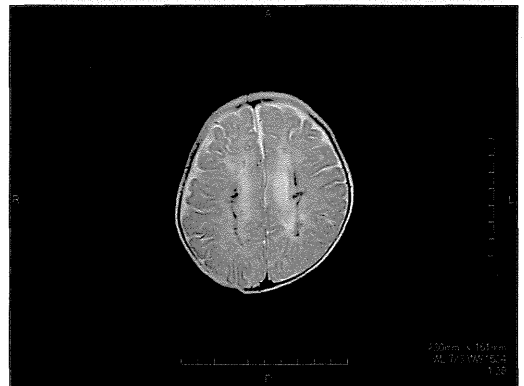
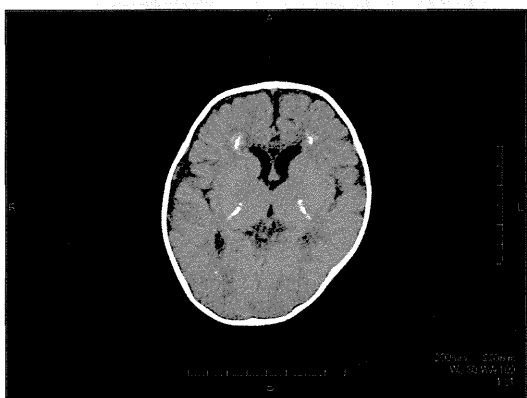
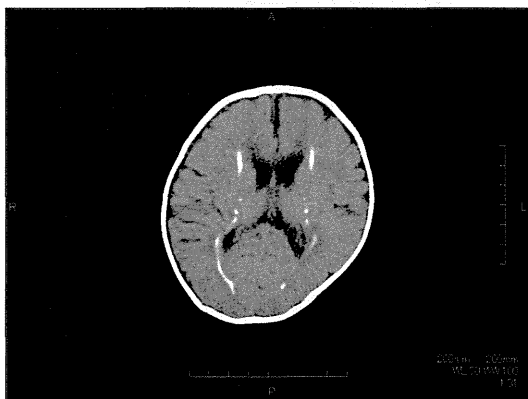
亀田メディカルセンター 小児科 高梨先生、
国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科 佐々木先生

2008 年 10 月の MRI だけみると先天性 CMV 感染症が疑わしく、2009 年 1 月のロタ腸炎罹患時には視床など新たな病変が生じていることから、先天性 CMV 感染症に続いてロタウイルス脳症を発症したと考えられるが、8 月に施行した頭部 MRI 所見では 6 月と比べて病変が進行しており MRS でも脳の破壊性病変の進行が疑われたため、先天性 CMV 感染症→ロタウイルス脳症の説は否定的。髄液中のミエリン塩基性蛋白も増加していることから代謝性でありかつ進

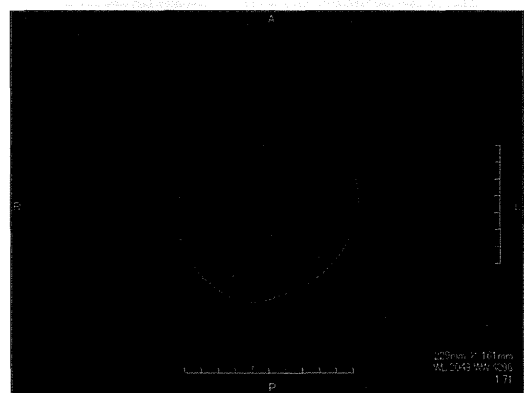
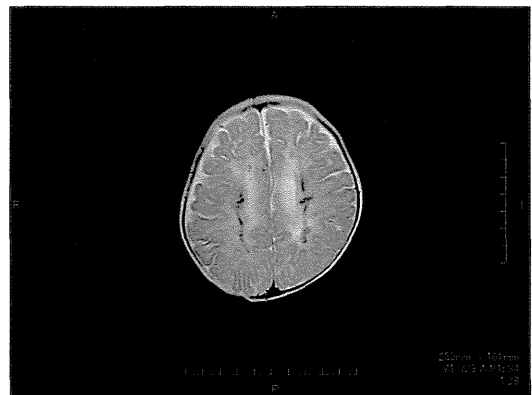
行性の疾患であることが示唆されるが、当てはまる疾患が見当たらない、とのコメントを得ている。

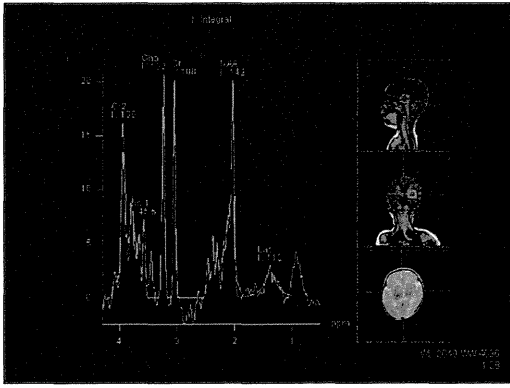
第2子は、在胎41週3日、2670g、Apgar 8/9、正常分娩で出生した。生後、2ヶ月28日目から発熱あり、総合病院へ入院。CTX+ABPC（1日目～10日目）投与し軽快。入院3日目より酸素低下あり、軽微酸素開始（0.25L）。CTなどでは肺野に異常なし。血小板減少もあり継続しており、低 γ グロブリン血症をみとめた。鑑別のために頭部CT撮影したところ脳内に石灰化を認め兄と同じ症状のため、当院へ搬送された。

頭部CT画像検査



第2子の頭部MRI像を示す。





内分泌疾患(甲状腺機能低下症、副甲状腺機能亢進症)、先天性疾患や感染症、炎症性疾患、中毒、は否定された。頭部 MRI から左右対称性の病変であり代謝性疾患が疑われた。当初はコケイン症候群を疑ったが、日光過敏症認めず否定的、遺伝子検査でも異常認めなかった。最終鑑別疾患として Aicardi-Goutieres 症候群が残ったが、全 Exon のシーケンス、cDNA のシーケンスでも変異は認めず、兄、妹ともに既存の疾患はすべて否定された。

鑑別した疾患を以下に示す。

鑑別疾患	鑑別方法	診断
副甲状腺機能異常	内分泌検査	否定
Fahr病	家族歴	否定
Cockayne症候群	光線刺激試験等	否定
21trisomy	染色体検査	否定
MELAS, MERRF	遺伝子検査、MRI所見など	否定
炭酸水素脱水素酵素 I 欠損症	スクリーニング正常	否定
HallervordenSpats 病	MRI所見など	否定
Oculodento-digital dysplasia	CT、骨所見等	否定
Lipoid-proteinosis	皮膚粘膜所見	否定
DHPR欠損症	アミノ酸分析	否定
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症	尿中有機酸分析	否定
Aicardi-Goutieres症候群	髄液中Ifa、遺伝子検査	否定
DNTC	年齢、臨床症状	否定
TORCH症候群	抗体検査、PCR など	否定

更に、CGH アレイを実施したが異常はみとめなかった。

以上の結果より、既存の疾患に分類されない劣性遺伝性の難病と判断されたため、在、父母と妹の genome を抽出し、すべての遺伝子について解析中である。

D. 考察

1. 第1家系

特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例を報告した。これまでの我々の経験からは非常に特徴的であるが非常にまれな疾患と考えられた。同様の病状を呈する疾患として、UR-DBMS (琉球大学遺伝性疾患データベース) により検索を行った。可

能性の高い疾患として、Microphthalmia syndromic 1 (Lenz 症候群)、Microphthalmia syndromic 2 (Oculofaciocardiodental syndrome: OPCD 症候群) が検索された。Lenz 症候群は Hermann & Opitz らが 1969 年に X連鎖性劣性遺伝形式をとり、小眼球ないし臨床的無眼球(片側性または両側性)、耳介聳立; 短い円柱状の胸郭と内方に回転した膝; 柱状の胸郭、なで肩、鎖骨異常(下) 両側性虹彩コロボーマを特徴とする症候群として報告した。OPCD 症候群は Hedera P らが 2003 年、X連鎖性優性遺伝形式をとり、長く鋭い鼻、陥凹した鼻尖、先天性白内障、緑内障、VSD、槌趾; 著明に長い全犬歯 (> 45 mm) (正常 = 26 mm) 小眼球、緑内障、長く狭い顔、幅広い鼻尖: 右手 XP (6M 時) 第 1 中手骨と母指低形成、著明な第 5 指弯指を特徴とする女性例を報告した。しかし、前者は女性の発症は原則的にはなく、後者は男性致死でいずれも該当しない。その後両者の候補遺伝子として *BCOR* (BCR-6 corepressor gene) 遺伝子同定され、病因が明らかになされつつあるが、このような家族例の報告はない。本例においても *BCOR* 遺伝子の解析を行ったが、エクソンおよびエクソン周辺のイントロン領域において遺伝子変異は検出されなかった。歯の所見、心奇形がないなどの特徴からも Lenz 症候群、OPCD 症候群と切り離して考えた方が妥当である。それでは他にどのような疾患が考えられるのだろうか。眼球異常をきたす疾患としては *Microphthalmia syndromic* としていくつかの亜系が知られている。また、*Bresheck syndrome*, *Nance-Horan syndrome*, *Norrie disease*, *Fraser syndrome*, 腎コロボーマ症候群、*Meckel-Gruber syndrome* など知られているが、臨床特徴からは該当しない。上記症候群および眼球形成にかかわる遺伝子としては、*HCCS*, *NHS*, *NDP*, *PQBPI*, *SOX2*, *OTX2*, *PAX6*, *RAX*, *BMP4*, *SMOC1*, *GDP6* などあげられているが、これらを一一つ解析することは困難である。以上より、本兄妹例は希少で新規の遺伝性疾患の可能性が高く、候補遺伝子の同定に関しては、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析がもっとも有用であると考えられた。また、眼球異常遺伝子解析セットなど似たような症候群の遺伝子解析の進捗に大いに寄与する可能性がある。遺伝子の同定および機能分析が

すすめば、治療に対する応用や発生過程における眼球、腎形成の共通メカニズムなど新しい知見が得られるものと期待される。

2. 第2家系

兄と妹が全く同じ症状（脳内石灰化、退行、聴力障害、網膜異常）を呈しており、3親等以内に同様の患者が存在しないため、常染色体劣性遺伝形式がもっとも疑われた。鑑別疾患としては、common disease から rare disease まで幅広く鑑別を行った。特に特徴的である症状として脳内の広範囲の石灰化が指摘できたため、画像診断学的にもアプローチ（国立神経精神センターの神経カンファ、セントメアリー病院神経カンファなど）を行って鑑別しうるすべての疾患について遺伝子検査を実施したが、異常は認められなかった。TORCH 症候群とされる疾患のなかに TORCH が明確に証明できないことがあることはしばしば臨床的に経験されることであり、本疾患はそのような患者の背景にある新規疾患の氷山の一角の可能性もある。また、もっとも臨床症状が近いと考えられた AGS との類縁疾患の可能性も考えられる。髄脳内の IF α はみとめないものの、MRS では脳内で炎症が起きていることが示唆されており、何らかの炎症性サイトカインの関連した疾患である可能性も残り、脳変性疾患、原因不明とされている家族性良性脳内石灰化などの原因解明にもつながる可能性がある。

E. 結論

希少遺伝性疾患の候補として、第1家系として、特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例を抽出した。更に、第2家系として、頭蓋内石灰化、網膜異常、感音性聴力障害をきたした兄、妹例を抽出した。厳密な鑑別に時間を要したが、希少遺伝性疾患候補と考えられ、次世代シーケンサーによる候補遺伝子を同定し、疾患の発症機構を解明する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamamoto A, Nakamura K, Matsumoto S,

Iwai M, Shigematsu Y, Tajima G, Tsumura, Okada S, Mitsubuchi H, Endo F. VLCAD deficiency in a patient who recovered from ventricular fibrillation, but died suddenly of a respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Int.* 2013 Dec;55(6):775-8.

2) Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M, Kume S. VMAT2 identified as a regulator of late-stage β -cell differentiation. *Nat Chem Biol.* 2013 Dec 15

3) Tanaka T, Mochida T, Maki Y, Shiraki Y, Mori H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Endo F, Okamoto M. Interactive network analysis of the plasma amino acids profile in a mouse model of hyperglycemia. *Springerplus.* 2013 Jun 28;2(1):287. Print 2013

4) Ohya Y, Okajima H, Honda M, Hayashida S, Suda H, Matsumoto S, Lee KJ, Yamamoto H, Takeichi T, Mitsubuchi H, Asonuma K, Endo F, Inomata Y. Re-evaluation of the indications for liver transplantation in Wilson's disease based on the outcomes of patients referred to a transplant center. *Pediatr Transplant.* 2013 Jun;17(4):369-73.

5) Kido J, Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R, Endo F. Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J Hum Genet.* 2013 May;58(5):285-92.

2. 学会発表

1) Shirou Matsumoto, Kiyoko Hattori, Kim itoshi Nakamura, Hiroshi Mitsubuchi1, Fumio Endo. A patient of Gaucher's disease type 2 with recurrent ARDS. The

4th International Forum for Lysosomal Storage Disease & 17th Japanese Society for Lysosomal Disease;

- 2) Shirou Matsumoto, Takumi Era, Fumio Endo. 講演 メチルマロン酸血症の神経症状に及ぼす感染症の影響ならびにiPS歳簿を用いた病態解明の試み
(病態生理の詳細な解明とiPS細胞の利用)
2013年10月12日 宮崎シーガイア

H. 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

次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア呼吸鎖異常症の解析 についての研究

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学小児科 教授

研究要旨

呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者 314 家系 318 例をミトコンドリア呼吸鎖異常症（MRCD）と診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く 72 例、次いで Leigh 脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が 28 例、その他が 15 例と極めて多岐にわたっていた。ミトコンドリア遺伝子解析では 160 例について解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を 50 例（31%）に同定した。150 例についてエキソーム解析が終了し、まず 33 例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、BOLA3, ACAD9, EFTu 異常患者等が含まれる。次いで 13 例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に 62 例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。

研究協力者

神田将和（埼玉医科大学ゲノム医学研究センター
トランスレーショナルリサーチ部門）

A. 研究目的

ミトコンドリア呼吸鎖異常症(MRCD)は最も高頻度（1/5,000）なエネルギー産生系の先天代謝異常症であり、症状・罹患臓器・遺伝形式は極めて多岐にわたる。今回の研究は、私達の開発した、酵素診断に始まり次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア遺伝子解析全エキソーム解析に至る系統的病因探索システムがうまく稼働するかどうかを検討することと、その結果を応用して MRCD の病態解明、さらに最終的には新薬の開発を目指すことである。

【考察】私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的探索システム」は充分機能した。今後 iPS 細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し、最終的にはこのシステムを応用して創薬に向けた検討を行いたい。（遺伝子解析部分は、主に文部科学省「革新的細胞解析研究プログラム（セルイノベーション）補助金を用いて行われた。）

B. 研究方法

【対象】941 家系 965 症例から得た 1605 検体（皮膚線維芽細胞 785 検体、肝臓 343 検体、筋肉 323 検体、心臓 108 検体、腎臓 30 検体、脳 7 検体など）。【方法】1) Blue Native 電気泳動を用いた Western Blot と in gel enzyme stain、および in vitro 酵素アッセイを用いた呼吸鎖酵素複合体蛋白レベルの解析。2) サンガーシーケンス法や次世代シーケンス法によるミトコンドリア DNA 全周塩基配列の解析。3) ミトコンドリア DNA 枯渇症候群（mitochondrial DNA depletion syndrome: MTDPS）疑い例については、定量的 PCR（qPCR）による診断確定後、サンガーシーケンス法による頻度の高い 11 種類の原因遺伝子解析。4) 以上で病因が判明しない症例に対する次世代シーケンス法を用いた全エキソーム解析。

（倫理面への配慮）

本研究は申請番号 482（現在更新されて 482-VI）で埼玉医科大学倫理委員会における審査を受け承認を得て行った。遺伝子解析研究についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）および、医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン

(日本医学会 2011 年 2 月)に基づいて行い、さらにこれとは別に各研究機関の倫理審査委員会において承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 酵素診断の結果：現在までのところ、314 家系 318 例を MRCD と診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く 72 例、次いで Leigh 脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が 28 例、その他が 15 例と極めて多岐にわたっていた。2) ミトコンドリア遺伝子解析：160 例について解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を 50 例 (31%) に同定した。つまり 7 割の MRCD は核遺伝子異常と考えられた。3) 150 例についてエキソーム解析が終了し、まず 33 例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、*BOLA3*, *ACAD9*, *EFTu* 異常患者等が含まれる。次いで 13 例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に 62 例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。4) 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は一部の患者細胞の ATP 合成能を回復し、その機序は主に呼吸鎖 III と IV の活性回復であった。

D. 考察

私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的病因探索システム」はしっかりと機能した。今後 iPS 細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し病態を詳しく解明すると共に、このシステムを応用して 5-ALA を発端とする創薬に向けた検討も発展させたい。

E. 結論

私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的病因探索システム」はしっかりと機能した。今後 iPS 細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し病態を詳しく解明すると共に、このシステムを応用して 5-ALA を発端とする創薬に向けた検討も発展させたい。(遺伝子解析部分は、主に文部科学省「革新的細胞解析研究プログラム(セルイノベーション) 補助金を用いて行われた。)

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表著書

1) 大竹 明 : XIII ミトコンドリア病 1. ミトコンドリア病 : 概論. in 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No. 20 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下一病因・病態研究、診断・治療の進歩 - 日本臨床社 大阪 pp623-30, 2012

2) 大竹 明 : XIII ミトコンドリア病 2. ミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 I 欠損症. in 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No. 20 先天代謝異常症候群 (第 2 版) 下一病因・病態研究、診断・治療の進歩 - 日本臨床社 大阪 pp631-7, 2012

原著

1) Arakawa C, Endo A, Kohira R, Fujita Y, Fuchigami T, Mugishima H, **Ohtake A**, Murayama K, Mori M, Miyata R, Hatai Y: Liver-specific mitochondrial respiratory chain complex I deficiency in fatal influenza encephalopathy. *Brain Dev* 34(2): 115-7, 2012.

2) Akamizu T, Sakura N, Shigematsu Y, Tajima G, **Ohtake A**, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K: Analysis of plasma ghrelin in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II. *Eur J Endocrinol* 166(2): 235-240, 2012.

3) 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* 34(10): 861-5, 2012.

4) Yamamoto T, Emoto Y, Murayama K, Tanaka H, Kuriu Y, **Ohtake A**, Matoba R: Metabolic autopsy with postmortem cultured fibroblasts in sudden unexpected death in infancy: Diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Mol Genet Metab* 106(4): 474-7, 2012.

5) 荒尾正人、武者育麻、日笠山絢香、赤塚淳弥、山

- 崎太郎、雨宮 伸、阪本靖介、笠原群生、大竹 明：門脈欠損症 II 型（門脈低形成症）に対してシャント血管離断術が奏功した VACTERL 連合の 1 例. 日本マス・スクリーニング学会誌 22(1): 45-8, 2012.
- 6) Muto A, Takei H, Unno A, Murai T, Kurosawa T, Ogawa S, Iida T, Ikegawa S, Mori J, **Ohtake A**, Hoshina T, Mizuochi T, Kimura A, Hofmann AF, Hagey LR, Nittono H: Detection of $\Delta(4)$ -3-oxo-steroid 5 β -reductase deficiency by LC-ESI-MS/MS measurement of urinary bile acids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 900(1): 24-31, 2012.
- 7) Nagasaka H, Yorifuji T, Bandsma RH, Takatani T, Asano H, Mochizuki H, Takuwa M, Tsukahara H, Inui A, Tsunoda T, Komatsu H, Hiejima E, Fujisawa T, Hirano KI, Miida T, **Ohtake A**, Taguchi T, Miwa I: Sustained high plasma mannose less sensitive to fluctuating blood glucose in glycogen storage disease type Ia children. *J Inherit Metab Dis* 36(1): 75-81, 2013
- 8) Seki Y, Mizuochi T, Kimura A, Takahashi T, **Ohtake A**, Hayashi S, Morimura T, Ohno Y, Hoshina T, Ihara K, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Homma K, Hasegawa T, Matsuishi T: Two neonatal cholestasis patients with mutations in the SRD5B1(AKR1D1) gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment. *J Inherit Metab Dis*. 2012 Nov 16. [Epub ahead of print]
- 9) Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Sanayama Y, Takatani T, Nakagawa S, Hasegawa E, Hirano K, Mochizuki H, Ohura T, Ishige-Wada M, Usui H, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, **Ohtake A**, Yamato S, Miida T: Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. *Clin Chim Acta* 416 (1): 54-9, 2013
- 10) 加藤いづみ、村山 圭、鈴木康浩、岩松利至、今井郁子、大塚晴美、大竹 明：新生児期発症ミトコンドリア呼吸鎖異常症の兄妹例. 日本小児科学会雑誌 116(11): 1717-1723, 2012
- 11) 荒尾正人、武者育麻、日笠山絢香、赤塚淳弥、山崎太郎、雨宮 伸、阪本靖介、笠原群生、大竹 明：門脈欠損症 II 型（門脈低形成症）に対してシャント血管離断術が奏功した VACTERL 連合の 1 例. 埼玉県医学会雑誌 47(1): 224-227, 2012
- 12) Enkai S, Koinuma S, Ito R, Igaki J, Hasegawa Y, Murayama K, **Ohtake A**: Case of an infant with hepatic cirrhosis caused by mitochondrial respiratory chain disorder. *Pediatr Int* 55 (4): e103-6, 2013.
- 13) Kondo H, Tanda K, Tabata C, Hayashi K, Kihara M, Kizaki Z, Taniguchi-Ikeda M, Mori M, Murayama K, **Ohtake A**: Leigh syndrome with Fukuyama congenital muscular dystrophy: A case report. *Brain Dev*, 2013 Oct 7. doi:p11: S0387-7604 (13) 00286-6. 10.1016/j.braindev.2013.09.005. [Epub ahead of print]
- 14) Yamazaki T, Murayama K, Compton AG, Sugiana C, Harashima H, Amemiya S, Ajima M, Tsuruoka T, Fujinami A, Kawachi E, Kurashige Y, Matsushita K, Wakiguchi H, Mori M, Iwasa H, Okazaki Y, Thorburn DR, **Ohtake A**: Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome. *Pediatr Int* 56 (2): in press, 2014
- 15) **Ohtake A**, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria.)* 1840(4): 1355-1359, 2014.

2. 学会発表

（患者会講演、全国レベルの招待・教育講演と国際学会のみ）

- 1) 大竹 明：ミトコンドリア呼吸鎖ってなあに？：包括的診断と治療へ向けての取り組み. ミトコンドリア病患者・家族の会（MCM 家族の会）講演 6月3日

日本医科大学武蔵小杉キャンパス (川崎市), 2012

2) Murayama K, Kawachi E, Tsuruoka T, Mori M, Yamazaki T, Okazaki Y, Takayanagi M, **Ohtake A**: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: the experiment of systematic analysis for causative gene. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. April 1 - 4, Lotte Hotel Seoul (Seoul, Korea), 2012.

3) Takahashi T, Hattori M, Furui M, Yamada K, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S, **Ohtake A**, Wanders RJA, Yamaguchi S: Chemical Diagnosis of Methylmalonate Semialdehyde Dehydrogenase (MMSDH) Deficiency: A First Case Report in East Asia. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. April 1 - 4, Lotte Hotel Seoul (Seoul, Korea), 2012.

4) Fukuoka S, Murayama K, Fushimi T, Muta K, Kawachi E, Ajima M, Mori M, Okazaki Y, Takayanagi M, **Ohtake A**: Clinical manifestation and molecular, biochemical, and histological findings of mitochondrial cardiomyopathies. SSIEM (Society for the Study Group of Inborn Errors of Metabolism) Annual Symposium 2012, September 4-7, ICC (Birmingham, UK), 2012

5) 大竹 明: S3-4 迷った時にはミトコンドリア病. 第 54 回日本先天代謝異常学会総会 シンポジウム 3: 日常診療と先天代謝異常症 11月 15-17日 じゅろくプラザ (岐阜市), 2012

6) **Ohtake A**, Yamazaki T, Murayama K, Mori M, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: exome sequencing for the disease gene

identification. AussieMit2012. 10-12 December, Monash University Caylfield Campus (Melbourne, Australia), 2012

7) Arao M, Sakai T, Musha I, Yamazaki T, Abe Y, Amemiya S, Uehara N, Tokuzawa Y, Okazaki Y, Murayama K, Mori M, **Ohtake A**: Pyruvate therapy for two infantile mitochondrial diseases due to mitochondrial DNA mutations. AussieMit2012. 10-12 December, Monash University Caylfield Campus (Melbourne, Australia), 2012

8) Yamazaki T, Murayama K, Mori M, Iwasa H, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Mimaki M, Okazaki Y, Thorburn DR, **Ohtake A**: Mitochondrial respiratory chain disorders in Japan and the West, focusing principally on the mitochondrial DNA depletion syndrom. AussieMit2012. 10-12 December, Monash University Caylfield Campus (Melbourne, Australia), 2012

9) **Ohtake A**, Murayama K, Mori M, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: exome sequencing for the disease gene identification. International Symposium on Mitochondria 2013/The 13th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit). Symposium 3: Next Generation Technologies for Mitochondrial Disorders. November 6-7. Roppongi Academyhills 49 (Roppongi Hills Mori Tower 49F, Tokyo, Japan), 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

小児内分泌疾患関連の症例収集と解析

研究分担者 緒方勤
浜松医科大学 小児科 教授

研究要旨

近年の次世代シーケンサーを代表とする分子生物学的解析技法の進展により、ヒト遺伝学は新しいパラダイムの時代を迎えている。研究分担者は、この次世代シーケンサープロジェクトにおいて、「小児内分泌疾患」症例を集積し、エクソーム解析による新規責任遺伝子の同定と、ターゲットエンリッチメントによる既知・候補遺伝子の包括的解析を行った。その結果、常染色体優性の低Ca血症、鼻咽頭閉鎖不全、特徴的顔貌を呈する家系において原因遺伝子TBX1を同定した。また、常染色体優性の低Na血症（腎尿細管水再吸収増加）を呈する家系においてこの疾患と連鎖する塩基置換が44個の遺伝子を同定し、さらに、常染色体優性の若年発症糖尿病(MODY)を呈する家系においてMODYと連鎖する塩基置換を70個同定した。現在、真の責任遺伝子同定を進めているデータマイニングの段階に入っている。また、ターゲットエンリッチメントによる尿道下裂患者の解析を行い、多数の患者において原因遺伝子を同定した。これらの成果は、次世代シーケンサーを用いた解析法が、希少疾患の原因解明に有用であることを支持する。さらに、様々な内分泌疾患患者の検体集積と症例登録を開始し、将来の研究を推進する基盤作成に貢献した。

研究協力者

深見真紀(国立成育医療研究センター)

A. 研究目的

近年の次世代シーケンサーを代表とする分子生物学的解析技法の進展により、ヒト遺伝学は新しいパラダイムの時代を迎えている。第1に、エクソーム解析などにより、遺伝性疾患の新規責任遺伝子が次々と同定されるようになってきている。この次世代シーケンサー解析で責任遺伝子を同定するためには、この解析法に適した患者・家系を見いだすことが重要となる。ここで、ある特定の疾患を有する家系において、罹患者と非罹患者の検体を解析することが有用である。この方法は特に常染色体劣性疾患において特に有用とされるが、比較的大きな家系であれば、常染色体優勢疾患においても極めて有用性の高い方法である。特に、当該疾患の既知遺伝子が存在しないときや、既知責任

遺伝子変異が除外されているときには、新規責任遺伝子の同定と、それによる疾患発症機序の解明や新規治療法開発の契機が得られると期待される。第2に、ターゲットエンリッチメントによる既知・候補遺伝子の包括的解析により、遺伝的異質性に富むために、膨大な数の遺伝子解析が必要で得ある疾患の網羅的遺伝子解析が可能となっている。

研究分担者は、「次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究」において、小児内分泌疾患の情報価値の高い家系からの臨床情報やDNA検体集積ならびに解析を担うことで、新規責任遺伝子単離と遺伝的異質性に富む疾患の原因解明を目指し、本研究を行った。さらに、検体集積とその登録を推進した。

B. 研究方法

1. エクソーム解析による新規遺伝子同定：比較的大

きな家系を対象として、表現型の詳細な解析、ならびに既知責任遺伝子が存在するときには、当該責任遺伝子の通常の方法による変異解析を行った。その後、既知責任遺伝子変異が否定された家系においてエクソーム解析を行った。

2. ターゲットエンリッチメントによる既知・候補遺伝子の包括的解析：遺伝的異質性に富む尿道下裂患者68例を対象として、既知・候補遺伝子計122個を対象とする解析を行った。

3. (倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、書面を用いた詳細な同意取得の説明に続き、文書に寄る同意が得られた患者・家系を対象として検体収集を実施している。なお、浜松医科大学において、次世代シーケンサー解析を含む内容として、「性分化疾患・性成熟疾患における遺伝的原因の探索(浜松医科大学第 23-110 号)、ならびに、「先天性奇形症候群における遺伝的原因の探索」(浜松医科大学第 23-112 号)が承認されていることを付記する。

C. 研究結果

常染色体優性の低 Ca 血症、鼻咽頭閉鎖不全、特徴的顔貌を呈する家系におけるエクソーム解析：

われわれは、図 1 に示す家系において、まず既知の常染色体優性の HDR syndrome 責任遺伝子 *GATA3* のコード領域内変異と欠失を除外した。

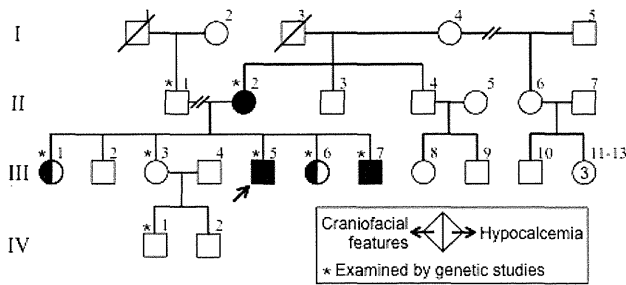


図 1. 低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を呈する家系。黒塗りは、低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を呈する患者、灰色は構音異常、特徴的顔貌を呈する患者を、白塗りは健常者を示す。

その後、東北大学においてエクソーム解析がなされ、疾患と連鎖するヘテロの *TBX1* のフレームシフト変異

(c.1253delA, p.Y418fsX459)が同定された(図 2)。この変異は、mRNA decay を生じることはないが、核移行シグナルと転写活性化シグナルを喪失しており、無機能型変異と推測される。特記すべき点として、本解析結果と過去のデータから、*TBX1* 変異が心疾患、免疫異常、特異的顔貌、低 Ca 血症を生じる 22q11 欠失症候群 22q11 欠失症候群表現型のほぼ全てを、様々な浸透率で生じることが明らかとなった。

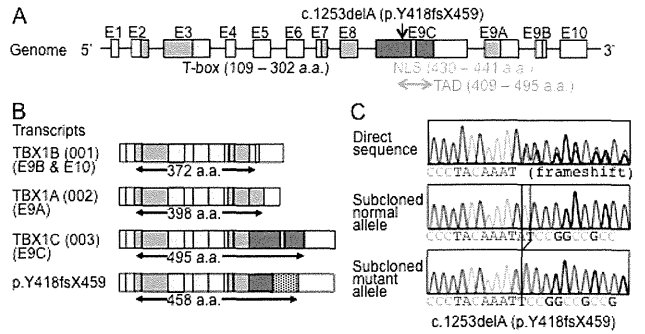


図 2. エクソーム解析で同定された *TBX1* のフレームシフト変異 (c.1253delA, p.Y418fsX459)。A: 遺伝子構造と変異部位。B: cDNA 構造。C: サンガー法による変異の確認。

常染色体優性の低 Na 血症 (腎尿細管水再吸収増加) を呈する家系におけるエクソーム解析：

われわれは、図 3 に示す低 Na 血症を示す家系において、まず既知の VP receptor や aquaporin 関連遺伝子のコード領域内変異を通常のシーケンス解析で除外した。その後、エクソーム解析を実施したところ、この疾患と連鎖する塩基置換が 44 個の遺伝子において見いだされた。現在、ピックアップされた遺伝子の発現パターンや機能解析データに基づいて、真の責任遺伝子を追求しているところである。

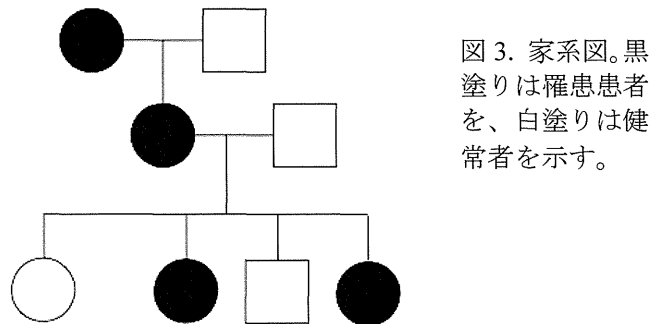


図 3. 家系図。黒塗りは罹患患者を、白塗りは健常者を示す。

常染色体優性の若年発症糖尿病 (MODY) を呈する家系におけるエクソーム解析：