

- stenosis. *Am J Med Genet A*. 2013;161:2291-3.
- 91) 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, Matsuiishi 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, Saitsu 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.
- 92) 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, Saitsu H. De Novo Mutations in SLC35A2 Encoding a UDP-Galactose Transporter Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Hum Mutat*. 2013 ;34:1708-14.
- 93) Koshimizu E, Miyatake S, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu 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 Sep 16;8(9):e74167.
- 94) Nakajima J, Okamoto N, Shiraishi J, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Kawashima H, Matsumoto N, Miyake N. Novel FIG4 mutations in Yunis-Varon syndrome. *J Hum Genet*. 2013 Dec;58(12):822-4.
- 95) 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.
- 96) Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takanashi JI, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. Novel intragenic duplications and mutations of CASK in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH). *Hum Genet*. 2012 ;131:99-110
- 97) Yukiko Kawazu, Noboru Inamura, Futoshi Kayatani, Nobuhiko Okamoto, Hiroko Morisaki Prenatal complex congenital heart disease with Loey's–Dietz syndrome *Cardiology in the Young* 2012;22:116-119
- 98) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology* 2012; 78:803-10.
- 99) Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet*. 2012;44:376-8.
- 100) Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J. The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. *Am J Med Genet A*. 2012 ;158A:1292-303.
- 101) Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y. Costello and CFC syndrome study group in Japan. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A*. 2012;158A:1083-94.
- 102) Shimojima K, Okamoto N, Suzuki Y, Saito M, Mori M, Yamagata T, Momoi MY, Hattori H, Okano Y, Hisata K, Okumura A, Yamamoto T. Subtelomeric deletions of 1q43q44 and severe brain impairment associated with delayed myelination. *J Hum Genet*. 2012;57:593-600.

- 103) Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev.* 35 (2013) 411–419
- 104) Shimojima K, Mano T, Kashiwagi M, Tanabe T, Sugawara M, Okamoto N, Arai H, Yamamoto T. Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a duplication-inverted triplication-duplication in chromosomal segments including the PLP1 region. *Eur J Med Genet.* 2012 ;55:400-3.
- 105) Wada Y, Kadoya M, Okamoto N. Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiology.* 2012 ;22:1140-4.
- 106) Takanashi J, Okamoto N, Yamamoto Y, Hayashi S, Arai H, Takahashi Y, Maruyama K, Mizuno S, Shimakawa S, Ono H, Oyanagi R, Kubo S, Barkovich AJ, Inazawa J. Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:3112-8.
- 107) Kim SJ, Bieganski T, Sohn YB, Kozlowski K, Semenov M, Okamoto N, Kim CH, Ko AR, Ahn GH, Choi YL, Park SW, Ki CS, Kim OH, Nishimura G, Unger S, Superti-Furga A, Jin DK. Identification of signal peptide domain SOST mutations in autosomal dominant craniodiaphyseal dysplasia. *Hum Genet.* 2011;129:497-502.
- 108) 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.
- 109) Waga C, Okamoto N, Ondo Y, Fukumura-Kato R, Goto YI, Kohsaka S, Uchino S. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr Genet.* 2011;21:208-11.
- 110) Filges I, Shimojima K, Okamoto N, Röthlisberger B, Weber P, Huber AR, Nishizawa T, Datta AN, Miny P, Yamamoto T. Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome. *J Med Genet.* 2011;48:117-22
- 111) Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet A.* 2011;155:409-14.
- 112) Okamoto N, Hatsukawa Y, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PHPV. *Am J Med Genet A.* 2011;155:1568-73.
- 113) Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Kosho T. Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet A.* 2011;155A:1949-58
- 114) Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy. *Clin Genet.* 2011;80:161-6
- 115) Okamoto N, Tamura D, Nishimura G, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay. *Am J Med Genet A.* 2011;155:2997-3001.
- 116) Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Niihori S, Okano E, Numabe H, Matsubara Y. HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the

- pathogenesis of Costello syndrome. *J Hum Genet.* 2011 ;56:707-15.
- 117) Shimojima K, Okamoto N, Inazu T, Yamamoto T. Tandem configurations of variably duplicated segments of 22q11.2 confirmed by fiber-FISH analysis. *J Hum Genet.* 2011;56:810-2.
- 118) Saitsu H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N: CASK aberrations in male patients with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. *Epilepsia* 53:1441-1449, 2012
- 119) Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Yamaoka S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Yokochi K, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, Saitsu H: De Novo and Inherited Mutations in COL4A2, Encoding the Type IV Collagen alpha2 Chain Cause Porencephaly. *Am J Hum Genet* 90:86-90, 2012
- 120) Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep* (2013);3:1224
- 121) Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori A, Yamasaki M, Kumakura A, Sugo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H. Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* (2013);73:48-57
- 122) Nakayama Y, Yokoi T, Nishina S, Okuyama M, Azuma N. Electroretinography and spectral-domain optical coherence tomography detection of retinal damage in shaken baby syndrome. *J AAPOS.* 2013, 17(4): 411-413.
- 123) Morimoto N, Ogiwara H, Miyazaki O, Kitamura M, Nishina S, Nakazawa A, Maekawa T, Morota N. Gorham-Stout syndrome affecting the temporal bone with cerebrospinal fluid leakage. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013, 77(9): 1596-1600.
- 124) Azuma N, Ito M, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S. Visual outcomes after early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol.* 2013, 131(10): 1309-1313
- 125) Nishina S, Suzuki Y, Yokoi T, Kobayashi Y, Noda E, Azuma N. Clinical features of congenital retinal folds. *Am J Ophthalmol,* 2012, 153(1): 81-87.
- 126) Nishina S, Kurosaka D, Nishida Y, Kondo H, Kobayashi Y, Azuma N. Survey of microphthalmia in Japan. *Jpn J Ophthalmol,* 2012, 56(3): 198-202.
- 127) Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshim S, Hotta Y. Two novel mutations in the EYS Gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. *PLoS ONE,* 2012, 7(2). e31036.
- 128) Shige Yasu C, Yamada M, Mizuno Y, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Clinical features of anterior segment dysgenesis associated with congenital corneal opacities. *Cornea,* 2012, 31 (3): 293-298.
- 129) Nishina S, Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Azuma N. Stereopsis after early surgery for bilateral congenital cataracts. Update on Strabismology, Proceeding of the XIth meeting of the International Strabismological Association in Istanbul, Turkey Sept. 22-25, 2010, 282-286, 2012.
- 130) Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, Shimizu K, Shimizu S, Reiner O, Okano H, Nishina S, Azuma N, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci,* 2011, 31(46): 16872-16883.
- 131) Suzuki S, Kim O-H, Makita Y, Saito T, Lim G-Y, Cho T-J, Al-Swaid A, Alrashees S, Sadoon E, Miyazaki O, Nishina S, Superti-Furga A, Unger S, Fujieda K, Ikegawa S, Nishimura G. Axial Spondylometaphyseal Dysplasia: Additional Reports. *Am J Med Genet A,* 2011,

- 155A(10): 2521-2528.
- 132)Tanaka M, Nishina S, Ogonuki S, Akaike S, Azuma N. Nishida's procedure combined with medial rectus recession for large-angle esotropia in Duane syndrome. *Jpn J Ophthalmol*, 2011, 55(3): 264-267.
- 133)Kobayashi Y, Yokoi T, Yokoi T, Hiraoka H, Nishina S, Azuma N. Fluorescein staining of the vitreous during vitrectomy for retinopathy of prematurity. *Retina*, 2011, 31(8): 1717-1719.
- 134)Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1;20(23):4530-9.
- 135)Lee EK, Kim W, Tominaga K, Martindale JL, Yang X, Subaran SS, Carlson OD, Mercken EM, Kulkarni RN, Akamatsu W, Okano H, Perrone-Bizzozero NI, de Cabo R, Egan JM, Gorospe M. RNA-binding protein HuD controls insulin translation. *Mol Cell*. 2012 Mar 30;45(6):826-35.
- 136)Matsui T, Takano M, Yoshida K, Ono S, Fujisaki C, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H, Akamatsu W. Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. *Stem Cells*. 2012 Jun;30(6):1109-19. (W.A. is Corresponding author)
- 137)Yagi T, Kosakai A, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Nabetani A, Ishikawa F, Arai Y, Hirose N, Okano H, Suzuki N. Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. *PLoS One*. 2012;7(7):e41572.
- 138)Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain*. 2012 Oct 6;5(1):35.
- 139)Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, Akamatsu W, Sasaki T, Yamanaka S, Amagai M, Okano H and Ohyama M: Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo. *J Invest Dermatol*. doi: 10.1038/jid, 2013.
- 140)Nihei Y, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Yagi T, Yoshizaki T, Okano H, Suzuki N. Enhanced Aggregation of Androgen Receptor in Induced Pluripotent Stem Cell-derived Neurons from Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *J Biol Chem*. 2013 Mar 22;288(12):8043-52.
- 141)Higurashi N, Uchida T, Christoph L, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori M, Katsurabayashi S, Shirasaka S, Okano H and Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain* 2013 May 2;6(1):19
- 142)Kim C, Kim W, Lee H, Ji E, Choe YJ, Martindale JL, Akamatsu W, Okano H, Kim HS, Nam SW, Gorospe M, Lee EK. The RNA binding protein, HuD regulates autophagosome formation in pancreatic  $\beta$  cells by promoting autophagy-related gene 5 expression. *J Biol Chem*. 2013 Nov 25. [Epub ahead of print]
- 143)Bundo M, Toyoshima M, Ueda J, Nemoto-Miyake T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Okada Y, Akamatsu W, Kato M, Okano H, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K. Increased L1 Retrotransposition in the Neuronal Genome in Schizophrenia. *Neuron*. 2013 Dec 31. pii: S0896-6273(13)01005-2. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.053. [Epub ahead of print]
- 144)Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett*. 587:1316-1325, 2013.
- 145)Morita A, Nakahira K, Hasegawa T, Uchida K, Taniguchi Y, Takeda S, Toyoda A, Sakaki Y, Shimada A, Takeda H, Yanagihara I.

Establishment and characterization of Roberts syndrome and SC phocomelia model medaka (*Oryzias latipes*). *Dev Growth Differ.* 54:588-604, 2012.

## 2. 学会発表

- 1) 松永達雄、鈴木直大、務台英樹、難波一徳、加我君孝 次世代シークエンサーを用いた難聴の遺伝子診断に関する検討 *Otol Jpn* 2013;23(5):903-907
- 2) 小崎里華 :CHARGE 症候群 p184 今日の小児の治療指針 医学書院 2011
- 3) 小崎里華 :染色体異常症の子どもを経過観察する際のポイント 小児思春期診療最新マニュアル 2011
- 4) 野崎誠 佐々木りか子 土井亜紀子 重松由紀子 久保田雅也 関敦仁 東範行 小崎里華 新関寛徳: 小児期のレックリングハウゼン病患者は初診時に何割が確定診断できるか 日本レックリングハウゼン病学会誌 第2巻 第1号 2012
- 5) 小崎里華 : 先天異常の分類 小児科臨床 66巻増刊号 2013
- 6) 境信哉、真木誠、境直子、須藤章、加藤光広、齋藤伸治 (2012) 脊髄性筋萎縮症 I 型児 (者) におけるスイッチ使用状況・言語発達・上肢機能・QOL—親に対するアンケート調査より—。脳と発達 44:465-471.
- 7) 中嶋枝里子、服部文子、伊藤哲哉、小林悟、中島葉子、安藤直樹、杉田克生、齋藤伸治 (2013) Cockayne 症候群 I 型における合併症出現時期と全身管理。日本小児科学会雑誌 117:760-765.
- 8) 松原尚子、山田成利、伊東裕子、伴建二、紺谷佳代、岡垣篤彦、山崎麻美、巽啓司 当院における胎児期水頭症の診断と予後の検討 日本周産期・新生児医学会雑誌 49 (3) : 980-984 2013.9
- 9) 山崎麻美 胎児の人権 妊娠分娩と脳卒中 The 31st Meeting of The Mt. Fuji Workshop on CVD 株式会社ニューロン社 71-75,2013.7
- 10) 山崎麻美 先天性水頭症 小児脳神経外科 診療ガイドブック メジカルビュー社 68-81,2013.4.1
- 11) 山崎麻美 小児脳神経外科領域における遺伝子診断 専門医に求められる最新の知識 (小児) 脳神経外科速報 23 (2) : 196~206,2013.2
- 12) 山崎麻美、吉岡絵麻、正札智子、高田愛、寺元千佳、埜中正博、金村米博 先天性水頭症の遺伝子診断 日本遺伝カウンセリング学会誌 33(1): 29-36,2012.3
- 13) 山崎麻美、遺伝性水頭症 周産期医学 41 : 1505-1508, 2011
- 14) 山崎麻美 (6人中1番目)、夫 律子 胎児期水頭症の診断と治療および長期予後 脳神経外科ジャーナル 20:322-329, 2011
- 15) 山崎麻美 先天性水頭症と二分脊椎 小児神経学の進歩 40 : 57-71, 2011
- 16) 山崎麻美 小児水頭症の病態と治療 ビジュアル脳神経外科 Anatomy& Surgical Approach4 脳室・松果体 154-161 , 2011
- 17) 岡本伸彦 ノリエ病 日本臨床 別冊先天代謝異常症候群(下) 2012 p861-864
- 18) 岡本伸彦「臨床医が知っておきたい先天異常」Coffin-Siris 症候群 小児科臨床 第66巻増刊号
- 19) 岡本伸彦「Coffin-Siris 症候群と SWI/SNF クロマチン・リモデリング複合体」小児科診療 第76巻7号
- 20) 加藤光広: 脳・脊髄形成異常、皮質形成異常、Dandy-Walker 奇形、Chiari 奇形、二分脊椎 遠藤文夫総編集 小児科診断・治療指針 中山書店 p.744-748, 2012年9月
- 21) 加藤光広: 小脳奇形 小児疾患の診断治療基準 第4版 小児内科増刊号 東京医学社 44;678-679, 2012
- 22) 加藤光広: 【小児脳神経外科の課題】 脳形成異常と遺伝子 脳神経外科ジャーナル 22(4);252-255, 2013
- 23) 仁科幸子: 小児眼科の最近の話題。日本眼科学会雑誌 2013 ; 117(5) : 415-417.
- 24) 仁科幸子, 中山百合, 横井 匡, 東 範行, 近藤寛之, 西田保裕: 小眼球症に伴う眼窩発育異常の画像評価。眼科臨床紀要 2012 ; 5(4) : 387-391.
- 25) 松井 健, 赤松 和土, 岡野 栄之: 神経を創る— Direct conversion による神経系細胞の誘導と医薬応用, in vivo 実験医学によるヒト疾患解明の最前線 実験医学増刊号 30(2) 43-50, 2012
- 26) 赤松 和土: 疾患特異的 iPSC 細胞研究の基礎と実際: バイオクリニカ 28(3) 22-26 2013
- 27) 谷口善仁、吉岡範幸、「分子標的薬—がんから他疾患までの治療をめざして—メダカ活用による創薬」日本臨床 70巻増

刊号 8、413-417、2012

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  
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（難病関連分野）  
総合研究報告書

次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析と診断への応用に関する研究

研究分担者 松永達雄 国立病院機構東京医療センター感覚器センター 聴覚障害研究室 室長  
研究協力者 務台英樹 国立病院機構東京医療センター感覚器センター 聴覚障害研究室 研究員  
研究協力者 難波一徳 国立病院機構東京医療センター感覚器センター 聴覚障害研究室 研究員

研究要旨

小児難聴の多くは遺伝子変異を原因とし、遺伝子診断が難聴の病態予測や療育法の決定に大きな影響を与える。本研究では次世代シーケンサー(NGS)を利用し、原因未確定の難聴患者の原因遺伝子の同定、新規難聴遺伝子の発見と病態メカニズムの解明、難聴遺伝子検査法の開発を目的とした。難聴原因遺伝子の同定率はNGSを用いると60-70%に高まることが明らかとなり、新規の難聴原因遺伝子のほか世界で2例目となる難聴遺伝子の同定に成功し、新たな難聴発症の病態メカニズムを捉えることに成功した。さらに、日本人に最適化した高検出感度かつ費用対効果の高い難聴遺伝子検査法の開発を、臨床検査会社と共同で実施した。

A. 研究目的

難聴はおよそ出生 500 人に 1 人で認められる頻度の高い障害である。小児の難聴は言語発達障害を生じるため健聴者の社会への参加の大きな障壁となる。難聴原因の多くは遺伝性であり、個別の患者で遺伝子診断ができると難聴の病態や特徴、難聴の進行および合併症、悪化の予防、治療法の選択、遺伝相談を的確に行える。難聴の原因遺伝子はこれまでに 70 種類以上報告されており、いまなお増え続けている。一方、保険診療として実施している 10 遺伝子 47 変異の検査では原因同定率が 20-30%に留まる。

本研究では次世代シーケンサー(NGS)による網羅的遺伝子解析を実施し、①原因未確定の難聴患者に対し原因遺伝子を同定すること、②新規の難聴原因遺伝子を探索し、その病態メカニズムを解明すること、③高効率・高検出感度な遺伝子診断法の開発をおこなうこと、を目的とした。

B. 研究方法

解析検体には、当院および関連施設で現在までに収集してきた、遺伝性難聴を疑われる約 1,600 家系から厳選し、平成 23-24 年度：①難聴原因として頻度が高く検出される *GJB2*, ミトコンドリア A1555G, A3243G など、既存の保険診療の対象となる変異を持たない 29 家系、104 検体を選択し、非症候群性・症候群性難聴原因を含めた 84 遺伝子を標的として SureSelect システムにより精製濃縮し、NGS によるデータ創出および解析プログラム AvadisNGS による

信頼性の高い変異検出を行い、サンガー法で確定した。

平成 24-25 年度：②稀少な症候群性難聴および特徴的な難聴 (Auditory Neuropathy) を呈する家系 11 家系 23 名に対して全遺伝子(エキソーム)解析を行った。

平成25年度：③非症候群性・症候群性難聴遺伝子119種類を標的とし、難聴家系22家系22名を用い、日本人に最適化した高効率・高検出感度かつ迅速なNGS遺伝子診断法の開発を臨床検査会社エスアールエル社と共同で行い、遺伝子濃縮の高効率化、解析プログラムの最適化、簡便化を行った。

C. 研究結果

①について：29 家系中 11 家系(38%)で原因遺伝子候補 *ACTG1*, *DFNA5*, *POU4F3*, *SLC26A5*, *SIX1*, *MYO7A*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH2A*, *MYO15A*, *SLC26A4*, *LOXHD1* を同定した。原因遺伝子は家系毎に異なっていた。またこのうち *ACTG1*, *DFNA5*, *POU4F3*, *SLC26A5*, *PCDH15*, *MYO15A*, *LOXHD1* は国内初の原因同定報告である。既存の保険診療での原因同定率が 20-30% (当研究室での、他の難聴遺伝子解析も含めた実績は約 35%) であることに比較し、NGS を用いた本手法による難聴原因遺伝子の同定率は 60-70% に達すると考えられた。

②について：11 家系中 5 家系で原因遺伝子候補 *USH2A*, ●遺伝子, *OPA1*, *SOX10* を同定した。●遺伝子変異は症候群性難聴の原

因遺伝子として、過去1家系のみで報告があり、その病的意義は未確立であったが、今回我々が●遺伝子変異例を同定したことにより、●遺伝子が難聴の原因となりうることを確立した。

さらに、内耳奇形（内耳道狭小）ならびに Duane 症候群様の眼球運動異常を示す1家系については新規の難聴遺伝子候補○遺伝子が同定された。我々は蝸牛神経細胞で本遺伝子が発現していることを見出しており、○遺伝子が未知のメカニズムを介して内耳の正常発生に重要な役割を持つと考えられた。遺伝子の分子機能について研究が進行中である。

③について:解析諸条件の最適化の結果、NGS データ創出後、ミトコンドリア遺伝子の数%のヘテロプラスミー変異、約50塩基の挿入・欠失を含めた病的遺伝子119種中の変異候補を、簡便な操作により1検体あたり2時間以内で検出する手法を確立した。以降の日本人1,208名の遺伝子変異データベースと研究室での知見などを統合し、迅速な原因候補の選択法も確立した。また、カスタムライブラリーの調節により、標的難聴遺伝子領域のNGSでの読み深度を一様に高め、変異検出の信頼性を高めた。

#### D. 考察

NGS を用いた網羅的な難聴遺伝子解析により、難聴原因遺伝子の同定率が 60-70%に達することが明らかとなり、本手法が検査費用対効果が高く、かつ解析時間と労働力の短縮・軽減を達成した難聴遺伝子検査法として非常に有用であると考えられた。

難聴原因として○遺伝子の発見、また一例のみ報告されていた●遺伝子の変異の同定は、難聴発症機序に対する新たな知見を得るだけでなく、難聴遺伝子検査のさらなる感度向上につながる。先天性難聴に対しては早期から補聴器および人工内耳による治療、リハビリテーションすることで高い聴覚活用と言語発達が得られる。難聴遺伝子検査の感度が向上して、早期診断が促進することは患者の治療方針の策定上、きわめて有用である。このため新規遺伝子が発見された際には、これを「難聴遺伝子検査」の対象とするための速やかな制度整備が必要と考えられる。

#### E. 結論

小児難聴の遺伝子診断法の確立を目指し、症候群性難聴の新規原因遺伝子○遺伝子、過去1例のみ報告のある●遺伝子の変異を見出した。また、既知の難聴遺伝子を対象とした

NGSを用いた遺伝子解析により、現状の保険診療として実施される検査に比較しはるかに高感度な解析手法を構築・最適化し、臨床検査会社への技術移転を実施した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表 (\*責任著者)

1. Matsunaga T. Etiology and Genes. In : Microtia and Atresia - Combined Approach by Plastic and Otologic Surgery. Adv Otorhinolaryngol. Kaga K, Asato H (Eds). Karger, Basel .2014;75:2-8
2. Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T\*. Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: A cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. Orphanet J. Rare Dis. 2013;8(1):172
3. Minami SB, Mutai H, Nakano A, Arimoto, Y, Taiji H, Morimoto N, Sakata H, Adachi N, Masuda S, Sakamoto H, Yoshida H, Tanaka F, Sugiuchi T, Kaga K, Matsunaga T\*. GJB2-associated hearing loss undetected by hearing screening of newborns. Gene 2013; 532(1):41-45
4. Okamoto Y, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y, Sugiuchi T, Masuda S, Morimoto N, Sakamoto H, Ogahara N, Takagi A, Taiji H, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T\*. Subgroups of enlarged vestibular aqueduct in relation with SLC26A4 mutations and hearing loss. Laryngoscope 2013[Epub ahead of print]
5. Matsunaga T\*, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S. Genetic analysis of PAX3 for diagnosis of Waardenburg syndrome type I. Acta Otolaryngol 2013 Apr; 133(4): 345-51
6. Watabe T, Matsunaga T\*, Namba K, Mutai H, Inoue Y, Ogawa K. Moderate hearing loss associated with a novel KCNQ4 non-truncating mutation located near the N-terminus of the pore helix. Biochem Biophys Res Commun 2013; 432(3): 475-479



7. Masuda S\*, Usui S, Matsunaga T. High prevalence of inner-ear and/or internal auditory canal malformations in children with unilateral sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013; 77: 228-232
8. Arimoto Y, Namba K, Nakano A, Matsunaga T\*. Chronic constipation recognized as a sign of a SOX10 mutation in a patient with Waardenburg syndrome. *Gene*(in press)
9. Matsunaga T\*, Mutai H, Kunishima S, Namba K, Morimoto N, Shinjo Y, Arimoto Y, Kataoka Y, Shintani T, Morita N, Sugiuchi T, Masuda S, Nakano A, Taiji H, Kaga K. A prevalent founder mutation and genotype–phenotype correlations of *OTOF* in Japanese patients with auditory neuropathy. *Clin Genet* 2012; 82: 425-432
10. Minami SB, Masuda S, Usui S, Mutai H, Matsunaga T\*. Comorbidity of GJB2 and WFS1 mutations in one family. *Gene* 2012; 501(2): 193-197 Erratum in: *Gene* 2012; 504(2): 313
11. Namba K, Mutai H, Kaneko H, Hashimoto S, Matsunaga T\*. In silico modeling of the pore region of a KCNQ4 missense mutant from a patient with hearing loss *BMC Research Notes* 2012 Mar 15; 5: 145
12. Mutai H, Kouike H, Teruya E, Takahashi-Kodomoari I, Kakishima H, Taiji H, Usami SI, Okuyama T, Matsunaga T\*. Systematic analysis of mitochondrial genes associated with hearing loss in the Japanese population: dHPLC reveals a new candidate mutation. *BMC Med Genet*. 2011 Oct 12; 12(1): 135.
13. 松永達雄. Auditory Neuropathy Spectrum Disorders In : 加我君孝・編集. 新生児・幼小児の難聴—遺伝子診断から人工内耳手術、療育・教育まで— 診断と治療社 : 東京 2014:26-29
14. 松永達雄. 難聴遺伝子変異 In : 加我君孝・編集. 新生児・幼小児の難聴—遺伝子診断から人工内耳手術、療育・教育まで— 診断と治療社 : 東京 2014:19-25
15. 松永達雄\*. Pendred 症候群の診断と治療 *日耳鼻会報* 2014; 117: 144-145
16. 松永達雄\*, 藤岡正人, 細谷誠. Pendred 症候群研究の現況と展望 *日本臨牀* 2013; 71(12): 2215-2222
17. 松永達雄, 鈴木直大, 務台英樹, 難波一徳, 加我君孝. 次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断に関する検討 *Otol Jpn* 2013;23(5):903-907
18. 松永達雄. Auditory Neuropathy の遺伝子 *Clinical Neuroscience* 2011; 29 (12): 1409-1411
19. 大原卓哉, 泰地秀信\*, 守本倫子, 本村朋子, 松永達雄. OTOF 遺伝子変異を認める Auditory neuropathy spectrum disorder の乳幼児例における人工内耳装用効果 *Audiology Japan* 2011; 54 (4): 289-297
2. 学会発表
1. Minami S, Namba K, Mutai H, Matsunaga T. Genotype and phenotype correlation in GJB2 mutations (DFNB1) and structural analysis of non-inactivating mutations 35 th annual midwinter research meeting of ARO San Diego, California, USA 2012 年 2月 25-29 日
2. Matsunaga T, Mutai H, Suzuki N, Morita N, Masuda S. Genetic diagnosis of Waardenburg syndrome type I by molecular analysis of PAX3 in Japanese patients The annual meeting of the Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum Rome, Italy 2012 年 8月 26-29 日
3. Shimizu A, Torii C, Suzuki N, Mutai H, Kudoh J, Kosaki R, Matsunaga T, Kosaki K. Rapid and efficient mutation detection in the hundreds of target genes by bench-top next generation sequencer with custom target capture method. 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG) San Francisco, California, USA 2012 年 11月 6-10 日

4. Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Kudoh J, Kosaki K, Matsunaga T. Target-captured next generation sequencing of reported deafness genes reveals variability of genetic background of hereditary hearing loss in Japan. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA 2013年6月22-25日
5. Namba K, Kaneko H, Masuda S, Mutai H, Usui S, Matsunaga T. Novel pathological model of Proximal symphalangism and conductive hearing loss revealed by docking simulation of Noggin and heparin. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA 2013年6月22-25日
6. Fujioka M, Morimoto N, Sakamoto K, Ohtsu M, Nakano A, Arimoto Y, Masuda S, Sugiuchi T, Masuda S, Kaga K, Matsunaga T. Spectrum of hearing level discrepancy in siblings with the same GJB2 mutation in Japanese. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA 2013年6月22-25日
7. 有本友季子、仲野敦子、松永達雄、工藤典代. SOX10 遺伝子の変異を認めた Waardenburg 症候群の2症例 第112回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 京都市 2011年5月19-21日
8. 南修司郎、松永達雄、増田佐和子、臼井智子、藤井正人、加我君孝. WFS1 遺伝子変異と GJB2 遺伝子変異を併せもった遺伝性管音難聴の1家系 第112回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 京都市 2011年5月19-21日
9. 松永達雄. シンポジウム「難聴治療に対する遺伝学的検査の impact」補聴器に関して
10. 第3回難聴遺伝子の研究会 東京 2011年7月2日
11. 難波一徳、金子寛生、松永達雄. 聴神経障害の原因となる新規変異型 OPA1 の予測構造を用いた病的メカニズム 第84回日本生化学会大会 国立京都国際会館 京都 2011年9月21-24日
12. 臼井智子、増田佐和子、石川和代、鶴岡弘美、松永達雄. 早期に発見された低音障害型難聴乳児をきっかけに判明した、まれな遺伝性難聴の一家系 第56回日本聴覚医学会総会・学術講演会 福岡市 2011年10月27-28日
13. 渡部高久、松永達雄、井上泰宏、小川郁. KCNQ4 遺伝子変異を認めた両側性高音障害型感音難聴の一症例 第56回日本聴覚医学会総会・学術講演会 福岡市 2011年10月27-28日
14. 森貞直哉、橋本総子、大坪裕美、付学軍、石森真吾、忍頂寺毅史、橋村裕也、貝藤裕史、鈴木直大、松永達雄、飯島一誠. MLPA 法で診断しえた EYAI 変異による branchio-oto-renal (BOR) 症候群の3家系 第56回日本人類遺伝学会大会 千葉市 2011年11月10-12日
15. 松永達雄、新正由紀子、山本聡、難波一徳、務台英樹、加我君孝. 温度感受性 Auditory Neuropathy における OTOF 遺伝子の新規特異的変異の同定 第21回日本耳科学会 沖縄県宜野湾市 2011年11月24-26日
16. 難波一徳、新谷朋子、藤井正人、加我君孝、松永達雄. Auditory Neuropathy の原因として同定された新規変異型 OPA1 蛋白質の予測構造を用いた病的メカニズムの解明 第21回日本耳科学会 沖縄県宜野湾市 2011年11月24-26日
17. 務台英樹、泰地秀信、宇佐美 真一、松永達雄. dHPLC 法を用いた日本人難聴者におけるミトコンドリア遺伝子多型解析 第21回日本耳科学会 沖縄県宜野湾市 2011年11月24-26日
18. 松永達雄. Auditory Neuropathy の遺伝子診断の治療法選択へのインパクト 第116回日本眼科学会総会、シンポジウム1(眼科・耳鼻咽喉科領域における研究プロジェクト) 東京 2012年4月5日
19. 南修司郎、松永達雄、藤井正人、加我君孝.

- GJB2 遺伝子変異の遺伝子型と表現型の相関についての検討 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 新潟市 2012 年 5 月 10-12 日
20. 松永達雄、守本倫子、新正由紀子、有本由紀子、片岡裕子、岡本康秀、新田清一、新谷朋子、森田訓子、杉内智子、増田佐和子、仲野敦子、泰地秀信、加我君孝. 小児 Auditory Neuropathy (AN) における OTOF 遺伝子の遺伝子型と表現型の相関 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 新潟市 2012 年 5 月 10-12 日
  21. 渡部高久、松永達雄、佐藤美奈子、小川郁. ミトコンドリア tRNA 遺伝子 T7511C 変異による非症候性難聴を示す 1 家系 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 新潟市 2012 年 5 月 10-12 日
  22. 松永達雄、鈴木直大、務台英樹、難波一徳、加我君孝. 次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断に関する検討 第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会 名古屋 2012 年 10 月 4-6 日
  23. 鈴木直大、務台英樹、松永達雄. 次世代シーケンズデータにおける難聴遺伝子変異の探索 第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会 名古屋 2012 年 10 月 4-6 日
  24. 難波一徳、務台英樹、増田佐和子、臼井智子、藤井正人、松永達雄. Noggin タンパク質の *in silico* 解析から推測された SYM-1 におけるアブミ骨を含む骨固着の病態 第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会 名古屋 2012 年 10 月 4-6 日
  25. 松永達雄、加我君孝. 劣性遺伝の先天性難聴に対する次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断の検討 第 57 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 京都 2012 年 10 月 11-12 日
  26. 南修司郎、松永達雄、仲野敦子、有本友季子、泰地秀信、守本倫子、坂田英明、安達のどか、浅沼聡、増田佐和子、阪本浩一、加我君孝. 新生児聴覚スクリーニングで“pass”と評価された GJB2 遺伝性難聴児 13 症例の検討 第 57 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 京都 2012 年 10 月 11-12 日
  27. 鈴木直大、務台英樹、鳥居千春、清水厚志、宮冬樹、難波一徳、工藤純、小崎健次郎、松永達雄. カスタムターゲットリシーケンスによる難聴関連遺伝子の変異探索 第 57 回日本人類遺伝学会大会 東京 2012 年 10 月 24-27 日
  28. 森貞直哉、貝藤裕史、伊藤秀一、奥山虎之、松永達雄、関根孝司、飯島一誠. 本邦における鰓弓耳腎 (BOR) 症候群の全国診療実態調査と遺伝子解析 第 57 回日本人類遺伝学会大会 東京 2012 年 10 月 24-27 日
  29. 難波一徳、金子寛生、増田佐和子、務台英樹、臼井智子、藤井正人、松永達雄. Noggin 蛋白質とヘパリン糖鎖のドッキングシミュレーションから推測された骨形成異常における BMP シグナルの分子病態モデル 第 85 回日本生化学会大会 福岡 2012 年 12 月 11-14 日
  30. 松永達雄、渡部高久、南修司郎、守本倫子、阪本浩一、杉内智子、小川郁、加我君孝. 次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子解析と原因診断への活用 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 札幌市 2013 年 5 月 15-18 日
  31. 水足邦雄、仲野敦子、有本友季子、増田佐和子、阪本浩一、守本倫子、瀧口哲也、小河原昇、加我君孝、松永達雄. CDH23 遺伝子変異による遺伝性難聴の臨床像 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 札幌市 2013 年 5 月 15-18 日
  32. 松永達雄、加我君孝、仲野敦子、有本友季子、杉内智子、泰地秀信、守本倫子、阪本浩一、大津雅秀、増田佐和子、小河原昇. 前庭水管拡大症で認められた SLC26A4 遺伝子変異と臨床的特徴 第 8 回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 前橋市 2013 年 6 月 20-21 日
  33. 藤岡正人、守本倫子、阪本浩一、大津雅秀、仲野敦子、有本友季子、増田佐和子、杉内智子、益田慎、加我君孝、松永達雄. 同一の GJB2 遺伝子変異を有する同胞 (兄弟姉妹) の聴覚 第 8 回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 前橋市 2013 年 6 月 20-21 日

34. 松永達雄、藤岡正人、加我君孝. 次世代シーケンシングで MYO15A 遺伝子変異が認められた先天性難聴の孤発例の 1 例 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013 年 10 月 24-25 日
- 原因候補の同定 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013 年 11 月 24-26 日
35. 高橋優宏, 荒井康裕, 植草智子, 中川辰雄, 松永達雄, 宇佐美真一. 遺伝子診断と術中 EABR が人工内耳に有効であった Auditory neuropathy spectrum disorder 症例 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013 年 10 月 24-25 日
39. 難波一徳、加我君孝、新谷朋子、藤井正人、松永達雄. Auditory Neuropathy 患者で新たに同定された 2 種類の変異型 OPA1 蛋白質の構造予測と分子病態 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013 年 11 月 24-26 日
36. 有本友季子、仲野敦子、工藤典代、松永達雄. 難聴遺伝子解析を行った当科難聴症例の検討
40. 福本一郎、仲野敦子、有本友季子、松永達雄、工藤典代. CDH23 遺伝子変異が検出された難聴 5 症例の検討 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013 年 11 月 24-26 日
37. 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013 年 10 月 24-25 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）  
無し
38. 務台英樹、難波一徳、加我君孝、松永達雄. 孤発例の先天性難聴患者における稀少難聴

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（難病関連分野）  
総合研究報告書

次世代シーケンス法を応用した先天性中枢神経奇形症候群患者の原因遺伝子探索

研究分担者 金村 米博

<sup>1</sup> 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室 室長

<sup>2</sup> 国立病院機構大阪医療センター 脳神経外科

研究要旨

中枢神経奇形領域チーム全体で、標的遺伝子解析パネルを116家系120サンプル、全エクソーム解析を58家系163サンプル、合計で174家系283サンプルを対象として、次世代シーケンス法を活用した先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子探索を実施した。また、XLH患者由来iPS細胞の樹立に成功した。これら成果は、先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明および新規診断・治療法開発につながるものであると考えられ、今後は標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析法を上手く使い分けて研究と臨床に活用していくことが重要であることが示唆された。

研究協力者

正礼智子<sup>3</sup>、吉岡絵麻<sup>4</sup>、高田 愛<sup>1</sup>、埜中正博<sup>2</sup>、  
山崎麻美<sup>5</sup>、原田敦子<sup>5</sup>、山中 巧<sup>5</sup>、寺元千佳<sup>5</sup>、  
宮 冬樹<sup>6</sup>

<sup>3</sup> 国立病院機構大阪医療センター  
臨床研究センター 幹細胞医療研究室

<sup>4</sup> 国立病院機構大阪医療センター  
臨床研究センター 分子医療研究室

<sup>5</sup> 社会医療法人愛仁会高槻病院  
小児脳神経外科

<sup>6</sup> 理化学研究所統合生命医科学研究センター 医  
科学数理研究グループ

A. 研究目的

難治性神経疾患の中でも、X連鎖性遺伝性水頭症（X-linked hydrocephalus；以下XLH）を代表とする遺伝性水頭症や大脳皮質形成異常などの先天性中枢神経奇形症候群は希少疾患であり、研究者人口も少なく、その対策・研究は他の神経疾患に比べて大幅に遅れている。これら先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明と根治的治療法の開発は、臨床神経科学領域における大きな研究テーマの一つと考えられる。近年の次世代シーケンス法の進歩によって、従来の解析手法では原因不明であった様々な難病の遺伝子異常が同定されつつあり、先天性中枢神経奇形症候群の病因検索にその解析手法を応用することが期待される。

そこで我々は、次世代シーケンス法を応用した先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子探索として、先天性中枢神経奇形症候群との関連性が示唆される284個の標的遺伝子を選定して

その解析を実施し（標的遺伝子解析パネル）、さらに、全エクソーム解析法を応用した先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子探索を実施した。また、XLH患者由来細胞からiPS細胞を樹立し、それを用いたin vitro分子病態解析を実施し、その特性解析を実施し、先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明および新規診断・治療法開発につながる標的分子を探索した。

B. 研究方法

1. 解析対象

本研究班に属する、先天性中枢神経奇形症候群を研究対象とする山崎（社会医療法人愛仁会高槻病院）、斉藤（名古屋市立大学大学院医学研究科・新生児・小児医学分野）、加藤（山形大学医学部附属病院・小児科）、岡本（大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター・遺伝診療科）らと共同で研究チーム（以下、中枢神経奇形領域チーム）を形成して症例を集積した。各症例のゲノムDNAは末梢血単核球、分娩時に提供を受けた臍帯血あるいは臍帯から各々抽出し、解析に使用した。

2. 研究の方法

2. 1. 標的遺伝子解析パネル

先天性水頭症、小脳形成障害症、皮質形成異常症、神経管閉鎖不全症、てんかん、頭蓋縫合早期癒合症、小頭症、その他の先天性神経疾患に対する遺伝子解析の標的遺伝子として、284遺伝子を選定した（表1）。これらの遺伝子を選定としたカスタムcapture probeを作製しSureSelectターゲットエンリッチメントシステム（Agilent Technologies社）を用いて解析した。シーケンス

は次世代シーケンサーGAIIまたはHiSeq2000（いずれもIllumina社）にて実施した。原因遺伝子変異の探索には理化学研究所の宮が開発した解析プログラムを用いて、既知の多型を除外し家系条件に合致する変異を選出する等の探索を実施した。

表 1：選定した解析標的遺伝子

疾患群	遺伝子数	代表的な遺伝子
先天性水頭症	33	L1CAM, ZIC2, SHH
小脳形成障害症	32	CASK, PMM2, ALG6
皮質形成異常症	47	DCX, ARX, TUBA1A
神経管閉鎖不全症	98	MTHFR, VANGL1
てんかん	29	CDKL5, SCN1A, TCF4
頭蓋縫合早期癒合症	8	FGFR2, FGFR3, TWIST1
小頭症	13	MCPH1, WDR62, CDK5RAP2
その他	24	UBE3A, HESX1
合計	284	

## 2. 2. 全エクソーム解析

家系検体（患者およびその両親や同胞等）が収集できた検体、および標的遺伝子解析で原因責任遺伝子候補が見つからなかった検体に関して、全遺伝子の exon 領域をターゲットとした SureSelect Human All Exon Kit (V.4 または V.5、Agilent Technologies 社) を用いて全遺伝子の変異を探索した。シーケンスは HiSeq2000 (Illumina 社) にて実施し、シーケンスデータからの責任遺伝子変異探索は上記の標的遺伝子の場合と同様のプログラムを用いて実施した。

## 2. 3. XLH患者由来iPS細胞の樹立

iPS細胞の樹立は、L1CAM遺伝子を有するXLH患者より樹立した線維芽細胞に、京都大学・沖田らが開発した3つのエピソーマルベクター（pCXLE-hOCT3/4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL）を、エレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入し、5つの初期化因子（OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28）とp53-shRNAを発現させ方法を用いて実施した（Okita et al., Nat Methods 8:409-12, 2011, Niwa et al., Gene 108:193-200, 1991）。樹立したiPS細胞は、2種類のSMADシグナル阻害剤を添加した誘導培地で、2週間の浮遊培養を行い、神経幹細胞へ分化誘導し、その後、neurosphere法を用いて継代培養を行った。神経細胞への分化誘導はMatrigel (BD Biosciences) コートチャンバースライドにneurosphereを播種し、無血清培地で2週間接着培養して分化誘導を行い、免疫細胞染色法を用いて分化能評価を実施した。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省・厚生労働省・経済産業省）を遵守し、国立病院機構大阪医療センター医学倫理委員会の

承認（平成21年8月26日：第1版承認、平成25年10月15日：第8版修正承認）および研究チームの各施設内倫理委員会の承認に基づいて実施された。DNA試料の提供およびゲノム・遺伝子解析研究への使用に関しては、書面を用いたインフォームドコンセントを実施して同意取得を行い、提供されたDNA試料は連結可能匿名化状態で研究に使用した。試料提供者の個人情報および遺伝情報は、個人情報管理者および個人情報担当管理者によって細心で厳重な注意の下、管理された。

## C. 研究結果

### 1. 遺伝子解析症例数

中枢神経奇形領域チーム全体で、健常コントロールを含む13カテゴリーの神経疾患を対象として、標的遺伝子解析パネルを116家系120サンプル、全エクソーム解析を10カテゴリーの神経疾患を対象に58家系163サンプル、合計で174家系283サンプルの遺伝子解析を実施した（表2）。

### 2. 代表的な研究成果

#### 2. 1. 標的遺伝子解析パネル

胎生期から脳室拡大を認め、生後両母指内転を確認された先天性水頭症の男児症例において、L1CAM遺伝子変異を同定した。L1CAMはXLHの原因遺伝子であり、本症例の臨床症状はXLHと矛盾せず、L1CAM遺伝子異常を有するXLH症例と確定診断に至った。

#### 2. 2. 全エクソーム解析

脳梁無形成症に臍ヘルニアを合併した兄弟症例を有し、家族性脳梁無形成症が疑われた1家系を対象として、2名の患児とその母親の全エクソーム解析を実施した。その結果、X染色体上に、家族性脳梁無形成症の発症との関連性の報告が無い新規の遺伝子Xのミスセンス異常を同定し、X連鎖性が強く疑われる家族性脳梁無形成症家系の原因遺伝子である可能性が高いと推察された。

#### 2. 3. XLH患者由来iPS細胞の樹立

L1CAM遺伝子異常を有する2症例のXLH患者由来線維芽細胞を用いて、iPS細胞の樹立を試み、その神経分化能を評価した。2症例いずれの線維芽細胞からもiPS細胞の樹立に成功し、neurosphere形成能をもつ神経幹細胞への分化を確認することができた。さらに、neurosphereからβIII-tubulin陽性の神経細胞が分化することを確認することができた。これらXLH患者由来iPS細胞から作成した神経細胞のaxonにおけるL1CAMの発現様式は正常とは異なり、XLH患者の神経細胞におけるL1CAM発現異常の存在を示唆する結果と考える。

表 2 : 解析症例数

疾患名	標的遺伝子解析		全エクソーム解析		累計	
	サンプル数	家系数	サンプル数	家系数	サンプル数	家系数
先天性水頭症	11	10	11	4	22	14
脳梁欠損症	9	9	12	4	21	13
全前脳症	3	3	0	0	3	3
皮質形成異常症	22	22	46	16	68	38
小脳形成異常症	11	10	12	4	23	14
小頭症	28	27	41	13	69	40
大頭症	4	4	3	1	7	5
脳瘤	3	2	0	0	3	2
脊髄腫瘍	6	6	4	2	10	8
アンジェルマン症候群	11	11	0	0	11	11
てんかん	3	3	2	1	5	4
その他	8	8	28	9	36	17
健常コントロール	1	1	4	4	5	5
(小計)	120	116	163	58	283	174

#### D. 考察

次世代シーケンス法を活用して、最終的に中枢神経奇形領域チーム全体で、標的遺伝子解析パネルを 116 家系 120 サンプル、全エクソーム解析を 58 家系 163 サンプル、合計で 174 家系 283 サンプルの遺伝子解析を実施するに至り、次世代シーケンス法を活用した先天性中枢神経奇形症候群の遺伝子解析研究としては、国内研究では有数規模の解析を実施することができたと判断する。

23-24 年度に実施した 284 遺伝子の標的遺伝子解析パネルは、解析対象家系の原因遺伝子とそのパネル中に存在する場合は、一度のシーケンス解析で多数の候補遺伝子の中から原因遺伝子を同定することが可能であり、効率的に原因遺伝子の同定に成功する解析手法であることが示唆され、複数の家系で原因遺伝子の同定に成功した。臨床的には、1 つの病気に複数の原因遺伝子が存在する場合などに、その遺伝子型を決定する際に使用することに適した解析アプローチであると考えられた。一方で、原因が全く未知の疾患・家系の場合、その原因遺伝子がパネル中に存在しない場合が十分想定され、そのような場合は限定された数の遺伝子の検索では、新たに原因遺伝子を同定することは不可能であり、全エクソーム解析を用いたアプローチが非常に有用な手法であることが予測された。全エクソーム解析の結果、X 連鎖性家族性脳梁無形成症の原因遺伝子と推察される遺伝子 X を同定するに至り、原因不明の先天性中枢神経奇形症候群家系の原因遺伝子検索における全エクソーム解析の有用性を確認することができたと考える。また、XLH 患者由来 iPS 細胞の樹立と特性解析に成功したことは、疾患 iPS 細胞を用いた先天性中枢神経奇形症候群研究の実現可能性を示す成果と考えられ、今後の研究の展開が期待される。

現在、標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析にコスト面では大きな差は無くなりつつあり、今後はこの両解析手法を目的に合わせて上手く使い分けて研究と臨床に活用していくこと

が、次世代シーケンス法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の遺伝子研究の方向性であると考えられ、3年間の研究を通じてそれを明らかにすることに貢献できたと結論づける。

#### E. 結論

174家系283サンプルを対象として、次世代シーケンス法を活用した標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子検索を実施した。また、XLH患者由来iPS細胞の樹立に成功した。これら成果は、先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明および新規診断・治療法開発につながるものであると考えられ、今後は標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析法を上手く使い分けて研究と臨床に活用していくこと重要であることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamane J, Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Kanemura Y, Nakamura M, Miyoshi H, Sawamoto K, Toyama Y, Mizusawa H, Okano H: Transplantation of human neural stem/progenitor cells overexpressing Galectin-1 improves functional recovery from focal brain ischemia in the Mongolian gerbil. *Mol Brain* 4(1):35, 2011
- 2) Yamasaki M, Nonaka M, Suzumori N, Nakamura H, Fujita H, Namba A, Kamei Y, Yamada T, Pooh RK, Tanemura M, Sudo N, Nagasaka M, Yoshioka E, Shofuda T, Kanemura Y: Prenatal molecular diagnosis of a severe type of L1 syndrome (X-linked hydrocephalus). *J Neurosurg Pediatr.* 8(4):411-416, 2011
- 3) Kanematsu D, Shofuda T, Yamamoto A, Ban C, Ueda T, Yamasaki M, Kanemura Y: Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta. *Differentiation* 82(2):77-88, 2011
- 4) Irie Y, Saeki M, Tanaka H, Kanemura Y, Otake S, Ozono Y, Nagai T, Kondo Y, Kudo K, Kamisaki Y, Miki N, Taira E: Methamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic cells. *Cell Tissue Res* 345(2):231-241, 2011
- 5) Takenouchi T, Nakazawa M, Kanemura Y, Shimozato S, Yamasaki M, Takahashi T, Kosaki K: Hydrocephalus with Hirschsprung Disease: Severe End of X-linked Hydrocephalus Spectrum. *Am J Med Genet A* 158A(4):812-815, 2012
- 6) Kanematsu D, Kanemura Y: Cellular properties of mesenchymal cells derived from

the decidua of human term placenta and their applications for regenerative medicine. Biomaterials for stem cell therapy: State of Art and Vision for the Future (Edited by Loredana De Bartolo, Augustinus Bader) P.228-248, CRC Press, FL, USA, 2013

- 7) Shofuda T, Kanematsu D, Fukusumi H, Yamamoto A, Bamba Y, Yoshitatsu S, Suemizu H, Nakamura M, Sugimoto Y, Furue MK, Kohara A, Akamatsu W, Okada Y, Okano H, Yamasaki M, Kanemura Y: Human Decidua-Derived Mesenchymal Cells are a Promising Source for the Generation and Cell Banking of Human Induced Pluripotent Stem Cells. Cell Med 4(3):125-147, 2013
- 8) Shofuda T, Fukusumi H, Kanematsu D, Yamamoto A, Yamasaki M, Arita N, Kanemura Y: A method for efficiently generating neurospheres from human-induced pluripotent stem cells using microsphere arrays. Neuroreport 24(2):84-90, 2013
- 9) Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, Yamasaki M, Ohgushi M, Sasai Y, Kanemura Y: Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using Pericellular Matrix of Decidua derived Mesenchymal cells. PLoS ONE 8(1):e55226, 2013
- 10) Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S: Hypoplasia of the spinal cord in a case of fetal akinesia/arthrogryposis sequences. Neuropathol Appl Neurobiol 39(4):441-444, 2013
- 11) Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S: Brain malformation with loss of normal FGFR3 expression in thanatophoric dysplasia type I. Neuropathology 33(6):663-666, 2013

## 2. 学会発表

- 1) Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, Yamasaki M, Sasai Y, Kanemura Y: Generation of human induced pluripotent stem cells using the extracellular matrix of human decidua-derived mesenchymal cells. ISSCR 9th Annual Meeting. 2011.6.16; Toronto, Ontario, Canada
- 2) Hirata M, Hayashida M, Tateyama D, Ozawa Y, Matsumura H, Iemura M, Shofuda T, Kanemura Y, Kohara A, Kawabata K, Mizuguchi H, Furue MK: Comparative analysis of characteristics among human iPS, ES and neuroblastoma cell lines. ISSCR 9th Annual Meeting. 2011.6.16; Toronto, Ontario, Canada

- 3) 金村米博, 山崎麻美: 難治性脳形成障害症の分子病態の解析と新規分子診断法および治療技術の開発. 社団法人日本脳神経外科学会第70回学術総会, 2011.10.14; 横浜市
- 4) 金村米博: iPS細胞研究を応用した難治性脳形成障害症の分子病態解析と新規治療技術開発の可能性. 第54回日本小児神経学会総会, 2012.5.17; 札幌市
- 5) 根岸豊, 服部文子, 安藤直樹, 宮冬樹, 角田達彦, 北井征宏, 荒井洋, 岡本伸彦, 加藤光広, 山崎麻美, 金村米博, 小崎健次郎, 齋藤伸治: 網羅的遺伝子解析により難治性てんかん患児に同定された複合ヘテロSCN2A遺伝子変異. 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012.10.27; 東京都新宿区
- 6) 金村米博: iPS細胞を応用した小児神経難病の研究. 第5回南大阪遺伝診療研究会, 2012.9.28; 堺市
- 7) 服部文子, 根岸豊, 戸川貴夫, 宮冬樹, 安藤直樹, 伊藤哲哉, 角田達彦, 金村米博, 山崎麻美, 小崎健次郎, 齋藤伸治: AKT3遺伝子変異による巨脳症の一例. 第55回日本小児神経学会, 2013.6.1; 大分市
- 8) 芹川武大, 遠山潤, 田澤立之, 西山健一, 後藤清恵, 栗山洋子, 生野寿史, 金村米博, 山崎麻美, 中田光, 高桑好一, 榎本隆之: X連鎖性遺伝性水頭症の出生前診断. 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2013.6.21; 川崎市
- 9) Yamasaki M, Shofuda T, Harada A, Yamanaka T, Bamba Y, Nonaka M, Kanemura Y: Molecular Basis of Csf Space Anomaly. 15th World Congress of Neurosurgery, 2013.9.12; Seoul, Korea

## G. 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  
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（難病関連分野）  
総合研究報告書

次世代シーケンサー技術の臨床応用へむけての基盤整備

研究分担者 小崎里華  
国立成育医療研究センター 器官病態系内科部 遺伝診療科 医長

**研究要旨**

次世代シーケンサー技術を用いて先天異常症の遺伝要因の解明を目的とし、臨床データ・検体の解析を実施した。解析の結果、治療を含めた診療全般の向上に繋がった。また、日本の現在の遺伝子診断システムについて、英国と比較検討し、次世代シーケンサーの臨床応用へむけて考察した。本研究の実施を通じて、本研究班に参画している当施設を含め、中核施設として全国に遺伝子診断を提供可能なネットワークを確立にむけて基盤整備の充実をはかった。

**A. 研究目的**

当研究班全体では、臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指した。先天異常症の原因診断を促進し、治療を含めた診療全般の向上につながることを目的としている。さらには研究の実施を通じて、本研究班に参画しているナショナルセンター等が中核施設として全国に遺伝子診断を提供可能なネットワークを確立することを目的とした。

また、必ずしも次世代シーケンサーの解析では診断が困難な遺伝学的疾患もあり、臨床診断において、疾患ごとに、遺伝学的検査実施のアルゴリズムが異なることが、臨床診断・応用にむけて重要な課題である。

現在、日本で保険収載されている遺伝性疾患は37疾患であり、費用は保険点数で上限4000点、実施施設も大学・研究室・検査会社など様々な条件で遺伝子検査が行われている。

保険収載させていない数百の遺伝性疾患においても同様に様々な施設で実施され、費用は、受益者負担、研究費、医療施設負担などであり、一定した価格設定はされていない現状である。

そこで、すでに遺伝子検査が保険収載され、一般臨床へ実用化されている、英国の遺伝子検査承認までの過程について検証し、我が国における次世代シーケンサー技術の臨床応用へむけての基盤整備を行うことを目的とした。

**B. 研究方法**

①標的遺伝子・標的領域のゲノムDNAを次世代シーケンサーにより解析した。解析対象となる遺伝子について、蛋白質コーディング全領域のゲノム遺伝子配列をデータベースより抽出し、アジレント社製SureSelectターゲットエンリッチメントシステムのカスタムライブラリーを設計した。解析検体は、各過程で厳密に品質を管理しながら、超音波破砕機によるゲノムDNAの断片化、磁性ビーズによる精製、SureSelectターゲットエンリッチメントライブラリーによる各検体の解析対象となる遺伝子領域の濃縮、インデックスタグの付加と増幅を行い、イルミナ社製次世代シーケンサーMiseq, Hiseq2000などを用いて塩基配列データを創出した。

解析プログラムを用いて、検体毎に信頼性の高い遺伝子変異を検出した。粗配列データを生成したのち、粗配列のデータの質の確認を経て参照ゲノムDNA配列上へのマッピングを行った。既知の多型を除外後、同一疾患患者間のデータ等により最終的な候補遺伝子を同定するというアプローチを取った。この各種のステップにおいて、解析法の最適化を進めた。

次世代シーケンサーから得られる大量のデータを効率的に解釈するため、既知の疾患の原因遺伝子と、既知疾患原因遺伝子が属する分子パスウェイの上流・下流の遺伝子の網羅的な列挙を遂行した。これらの遺伝子を標準的な登録番号（カリフォルニア大学サンタクルツ校ゲノムデータベース UCSC ID）に変換した。

②日本と同じく英国では国民皆保険制度 (NHS:National Health Service) が運用されている。遺伝子検査においてもサポートシステム (UKGTN :UK Genetic Testing Network)が提供されていることに注目した。同システムでは740遺伝子検査が実施されており、運用にあたり、下記のフォーマットが用いられている。

Testing criteria : 疾患ごとの専門診察医と受検のための疾患基準を設定。対象は302疾患。

Gene Dossier : 疾患ごとの対象となる遺伝子、感度・特異度・検査技術・精度・検査アルゴリズム・費用対効果などを設定。対象は298疾患。

家庭医・referral centerの専門医から検査施設を通して、これらを申請し、コミッショナーらによる諮問・評価後に、承認を得るシステムである。当研究班の対象疾患である先天異常症候群7疾患を選択し、同システムで用いられているTesting criteria、Gene Dossierの翻訳版を作成した(原文: <http://ukgt.nhs.uk/>)。

### C. 研究結果

①発達遅滞に悪性腫瘍を合併する症候群である Simpson-Golabi 症候群の末梢血と腫瘍組織(神経芽細胞腫)のエクソーム解析を行い、 $\beta$ カテニンの変異を同定した。Simpson-Golabi 症候群の悪性腫瘍におけるセカンドヒットが同定された、世界初例であり、先天異常症候群の重要な合併症である小児がんの発がん機序についての重要な新知見となった。

②当研究班の対象疾患である先天異常症候群8疾患について、UKGTNで用いられているフォーマットの翻訳版を作成した(添付資料)。それらを用いて、検査の対象・感度・特異度・検査アルゴリズム・費用などについて、検討した。

### D. 考察

#### ①遺伝子診断中核施設の確立

次世代シーケンサーによる基盤整備を行い、症例を解析し、新しい知見を得ることができた。

今後、遺伝子診断の医療現場での利用促進するための中核施設として統合環境を整備した。

②UKGTNにおける遺伝子検査の承認にいたる基準を検討した。

Testing criteriaでは、疾患ごとに、原疾患に関連する専門医と遺伝専門医の診察が必要であり、これら専門医らにより、受検にあたり、一定の「疾患」基準を設けられている。このことにより、よりの確な臨床診断がなされることを意味し、ひいては、無用な検査を避けることができ、限りある医療資源を有効に活用することができ、対費用効果もあると考えられる。

Gene Dossierでは、原因遺伝子、感度、特異度・技術・検査の質的保証のための検査室(施設)の実

績、人的・物的資源の定量的評価、検査報告書などについて、疾患ごとに詳細に一定基準に項目を設けられていることは、医療関係者・当事者だけではなく、国としての医療経済を含めた社会政策であることを表しているとともに、日本における、検査室(施設)実績、人的・物的資源の問題がより明らかとなった。遺伝子検査においても、ある一定の基準をもうける標準化が必要であることが考察される。

また、英国では、次世代シーケンサーを用いての遺伝子検査が13件承認され、実施可能となったことを踏まえると、実施可能な遺伝子数は今後、更に増加することが予測される。ここでは、標的遺伝子のみを対象とした疾患パネルを用いている。

費用面でも、現在は、エクソン数により、費用が算定されているが、次世代シーケンサーによって、費用面でも改定がおこなわれるであろう。日本においても、次世代シーケンサーが技術的に安定した技術として提供可能となれば、英国式ネットワークシステム(UKGTN)と同様に日本版を稼働させることは可能であろう。また費用の面でも4000点上限の問題解決に役立つであろう。今後、遺伝子検査を普及させるにあたり、上記システムも大事ではあるが、最重要な点は、結果の解釈に携わる専門医の育成であろう。また、実施にあたり、倫理的配慮、偶発的所見を含め、遺伝カウンセリングなどのガイドライン整備も必要であることはいうまでも無い。

### E. 結論

次世代シーケンサー技術を用いて先天異常症の原因診断を促進し、治療を含めた診療全般の向上につなげた。さらには研究の実施を通じて、本研究班に参画しているナショナルセンター等が中核施設として全国に遺伝子診断を提供可能なネットワークを確立にむけて基盤整備を行った。

### F. 研究発表

論文発表

1. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi k, Hata K, Kosaki K. Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. Am J Med Genet A. (Epub ahead of print )Jan.2014
2. Takeuchi T, Hayashida N, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H ,Kosaki K. 1p34.3 deletion involving GRIK3:Further clinical implication of GRIK family glutamate receptors in the pathogenesis of developmental delay. Am J Med Genet A.

- 164(2)456-60. Feb.,2014
3. Takeuchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H, Kosaki K. Multiple café au lait spots in familial patients with MAP2K2 mutation. *Am J Med Genet A*. 164(2):392-6. Feb.2014
  4. Sasaki A, Sumie M, Wada S, Kosaki R, Kuroswa K, Fukami M, Sago H, Ogata T, Kagami M. Prenatal genetic testing for a microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to UPD(14)pat-like phenotype. *Am J Med Genet A*. 164A(1):264-6. Jan.2014
  5. Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Tanizaki H, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J, Heike T, Okuyama T, Kosaki R, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsuhashi Y, Amagai M. Mutations in SERPINB7, Encoding a Member of the Serine Protease Inhibitor Superfamily, Cause Nagashima-type Palmoplantar Keratosis. *Am J Hum Genet*. 7;93(5):945-56 Nov.2013
  6. Takenouchi T, Hida M, Sakamoto Y, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Severe congenital lipodystrophy and a progeroid appearance: Mutation in the penultimate exon of FBN1 causing a recognizable phenotype. *Am J Med Genet A*. 161(12):3057-62. Dec.2013
  7. Takenouchi T, Saito H, Oishi N, Fukushima H, Kosaki R, Torii C, Takahashi T, Kosaki K. Daytime somnolence in an adult with Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A*. 161A(7):1803-5. Jul.2013
  8. Nakajima M, Mizumoto S, Miyake N, Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis L, Chitayat D, Howard A, Leal GF, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saito H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Ohashi H, Superti-Furga A, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S. Mutations in B3GALT6, which Encodes a Glycosaminoglycan Linker Region Enzyme, Cause a Spectrum of Skeletal and Connective Tissue Disorders. *Am J Hum Genet*. 6;92(6):927-34. Jul.2013
  9. Takenouchi T, Nishina S, Kosaki R, Torii C, Furukawa R, Takahashi T, Kosaki K. Concurrent deletion of BMP4 and OTX2 genes, two master genes in ophthalmogenesis. *Eur J Med Genet*. 56(1):50-3.2013
  10. Takenouchi T, Yagihashi T, Tsuchiya H, Torii C, Hayashi K, Kosaki R, Saitoh S, Takahashi T, Kosaki K. Tissue-limited ring chromosome 18 mosaicism as a cause of Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet A*. 158(A)(10):2621-3.2012
  11. Takenouchi T, Okuno H, Kosaki R, Ariyasu D, Torii C, Momoshima S, Harada N, Yoshihashi H, Takahashi T, Awazu M, Kosaki K. Microduplication of Xq24 and Hartsfield syndrome with holoprosencephaly, ectrodactyly, and clefting. *Am J Med Genet A*. 158(A)(10):2537-41.2012
  12. Kosaki R, Nagao K, Kameyama K, Suzuki M, Fujii K, Miyashita T. Heterozygous tandem duplication within the PTCH1 gene results in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet A*. 158(7):1724-28.2012
  13. Yagihashi T, Kosaki K, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Takahashi T, Sato Y, Kosaki R, Age-dependent change in behavioral feature in Rubinstein-Taybi syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)*. 52(2):82-6.2012
  14. Miyazaki O, Nishimura G, Sago H, Horiuchi T, Hayashi S, Kosaki R. Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasia with 3D CT. *Pediatr Radiol*. 42(7):842-52.2012
  15. Kosaki R, Kaneko T, Torii C, Kosaki K. EEC syndrome-like phenotype in a patient with an IRF6 mutation. *Am J Med Genet A*. 158A(5) :1219-20,2012
  16. Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *Am J Med Genet A*. 158A(3):514-8.2012
  17. Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J. Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes with marked midface retrusion. *J Hum Genet*. 57(3):191-6.2012
  18. Kasahara M, Sakamoto S, Kanazawa H, Karaki C, Kakiuchi T, Shigeta T, Fukuda A, Kosaki R, Nakazawa A, Ishige M, Nagao M, Shigematsu Y, Yorifuji T, Naiki Y, Horikawa R. Living-donor liver transplantation for propionic acidemia. *Pediatr Transplant*. 16(3):230-4.2012
  19. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M, Shimizu H. A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing.

- Exp Dermatol. 20(1):74-6 2011
20. Shimizu H, Migita O, Kosaki R, Kasahara M, Fukuda A, Sakamoto S, Shigeta T, Uemoto S, Nakazawa A, Kakiuchi T, Arai K. Living-related liver transplantation for siblings with progressive familial intrahepatic cholestasis 2, with novel genetic findings. Am J Transplant. 11(2):394-8. 2011
  21. Kosaki R, Fujita H, Ueoka K, Torii C, Kosaki K. Overgrowth of prenatal onset associated with submicroscopic 9q22.3 deletion. Am J Med Genet A. 155(4):903-5. 2011
  22. Kosaki R, Fujita H, Takada H, Okada M, Torii C, Kosaki K Monozygotic twins of Rubinstein-Taybi syndrome discordant for glaucoma. Am J Med Genet A. 155A(5) : 1189-91.2011
  23. Kondoh T, Kanno A, Itoh H, Nakashima M, Honda R, Kojima M, Noguchi M, Nakane H, Nozaki H, Sasaki H, Nagai T, Kosaki R, Kakee N, Okuyama T, Fukuda M, Ikeda M, Shibata Y, Moriuchi H. Donepezil significantly improves abilities in daily lives of female Down syndrome patients with severe cognitive impairment: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Int J Psychiatry Med. 41(1):71-89. 2011
  24. Kosaki K, Saito H, Kosaki R, Torii C, Kishi K, Takahashi T. Branchial arch defects and 19p13.12 microdeletion: defining the critical region into a 0.8 M base interval. Am J Med Genet A. 155A(9):2212-4. 2011
  25. Numabe H, Sawai H, Yamagata Z, Muto K, Kosaki R, Yuki K, Kosaki K. Reproductive success in patients with Hallermann-Streiff syndrome. Am J Med Genet A. 155A(9):2311-3. 2011
  26. Tsutsumi Y, Kosaki R, Itoh Y, Tsukamoto K, Matsuoka R, Shintani M, Nosaka S, Masaki H, Iizuka Y. Vein of Galen Aneurysmal Malformation Associated With an Endoglin Gene Mutation. Pediatrics. 128(5):1307-10.2011
  27. Tonoki H, Harada N, Shimokawa O, Yosozumi A, Monzaki K, Satoh K, Kosaki R, Sato A, Matsumoto N, Iizuka S. Axenfeld-Rieger anomaly and Axenfeld-Rieger syndrome: Clinical, molecular-cytogenetic, and DNA array analyses of three patients with chromosomal defects at 6p25. Am J Med Genet A. 155A(12):2925-32. 2011
  28. Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and Galloway-Mowat multiple congenital anomalies. J Hum Genet. 56(2):110-24 2011
  29. 小崎里華: 遺伝の基礎知識・考え方 月刊母子保健12月号 2013
  30. 小崎里華 : 遺伝性内分泌疾患に関する遺伝カウンセリング 内分泌・糖尿病・代謝内科 vol.37 No.4 2013
  31. 小崎里華 : 先天異常の分類 小児科臨床66巻増刊号 2013
  32. 小崎里華 CHARGE症候群 今日の小児の治療指針 医学書院:184. 2011.
  33. 小崎里華 VATER症候群 今日の小児の治療指針 医学書院:190. 2011
  34. 小崎里華 染色体異常症の子どもを経過観察する際のポイント。・小児思春期診療 最新マニュアル 2011
- 学会発表
1. Narumi Y, Nishina S, Tokimoto M, Aoki Y, Kosaki R, Kosho T, Murata T, Takada F, Fukushima Y. Missense mutation of *MAF* in a Japanese pedigree with congenital cataract. American Society of Human Genetics, 2013
  2. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K. Somatic *CTNNB1* mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline *GPC3* mutation. American Society of Human Genetics, 2013
  3. Kosaki R, Takenouchi T, Hida M, Sakamoto Y, Torii C, Takahashi T, Kosaki K. Sever congenital lypodystrophy and a progeroid appearance: Mutation in the penultimate exon of *FBNI* causing a recognizable phenotype. European Society of Human Genetics, 2013 6.9
  4. Shimizu A, Torii C, Suzuki N, Mutai, J kudoh H, Kosaki R, Mmatsunaga T, Kosaki K. Rapid and efficient mutation in the hundreds of target genes by bench-top next generation sequencer with custom target capture method. American Society of Human Genetics, 2012
  5. Kosaki R, Takeuchi T, Torii C, Nishina S, Kosaki K. Concurrent deletion of BMP4 and OXT2 genes: Clinical evidence of synergistic effect of the two master genes in ophthalmogenesis. American Society of