

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）  
総合研究報告書

次世代シーケンサーの臨床診断への応用

研究分担者 黒澤 健司

地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター遺伝科 部長

### 研究要旨

次世代シーケンサーの臨床応用を目的に、臨床検体を用いて遺伝的異質性の高い奇形症候群の遺伝子診断を試みた。LA-PCR とキット化されている custom amplicon との 2 つの方法による target-enrichment で解析を進めた。LA-PCR では Kabuki 症候群 32 例中に、MLL2 変異を 22 例に検出し、KDM6A 変異を 1 例に検出した。このうち 1 例は、変異モザイクで、現在まで MLL2 変異モザイクは報告がない。Custom amplicon では、HaloPlex (Agilent) を使い、Marfan 症候群類縁疾患・Ehlers-Danlos 症候群パネル (MES パネル: 15 症例解析) と Ciliopathy 疾患群・Treacher Collins 症候群混合パネル (Cil パネル: 13 症例解析) を作成し、MES パネルは増幅解析が得られたターゲット領域数は 615 (416,587bp) で、20 reads 以上の領域が 83.12%、100 reads 以上が 52.73% を達成した。病原性変異検出は、Marfan 症候群 6 例中で FBN1 が 2 例、TGFB2 が 1 例、Ehlers-Danlos 症候群 6 例中で COL5A1 が 3 例、COL3A1 が 1 例に検出した。病原性 variant を検出しなかった症例の臨床像から CNV の関与を想定し、アレイ CGH でのスクリーニングを行ったところ、1 例で COL5A1 を含む 9q34.3 に 3.2Mb 重複と微細な欠失を伴う複雑なゲノム再構成、頭蓋・外胚葉異形成症で IFT122 の exon17-21 に重複を検出した。Cil パネルでは、Joubert 症候群 6 例中 1 例に TMEM67 の複合ヘテロ変異、1 例に CEP290 の nonsense 変異、1 例に CC2D2A の nonsense 変異をそれぞれヘテロのみで検出した。Bardet-Biedl 症候群 1 例に BBS12 の複合ヘテロ変異を、頭蓋外胚葉異形成症 1 例に IFT122 の複合ヘテロ変異を検出した。Treacher Collins 症候群 (TCS) 類縁疾患 (3 例) では、1 例で TCOF1 の missense 変異を検出 (Nager 症候群) し、variant を検出しない 2 症例に対して GATK で CNV 変換による再評価を行ったところ、1 例に EFTUD2 の一部を含む 17q21.31 の欠失を、1 例に POLR1D の欠失を認めた。今後の課題として、検査フローの確立、正確な臨床情報と両親の遺伝情報が不可欠であること、次世代シーケンサーの解析能力の向上やライブラリー作成キットの性能の向上などがあげられた。

### 研究協力者

成戸卓也

神奈川県立こども医療センター遺伝科

井田一美 同遺伝科

黒田友紀子 同遺伝科

大橋育子 同遺伝科

### A. 研究目的

難病・がんの多くはゲノム・遺伝子の変異を原因とするため、その診断解析に DNA シーケンス技術を用いることは必須である。従来、Sanger 法がその中心をなしてきたし、今後も最終的には Sanger 法での確認の必要性は変わらない。しかし、解析対象遺伝子の数が増せばその労力は膨大な作業になり、特に難病の中心をなす遺伝性疾患では、解析遺伝子を構成する exon 数は多く、同一遺伝子であっても患者ごとに変異の位置が異なる。さらに遺伝的異質性の高い疾患解析では複数の遺伝子について解析が必要となり、これらを総合すると

膨大な作業量となる。次世代シーケンサーは、研究としての活用は勿論であるが、臨床応用としての遺伝子診断にも極めて有用である。現在、国内での次世代シーケンサーを用いた研究は、Exome 解析など網羅的ゲノムの解析が中心で、臨床応用に関する研究は乏しい。解析に必要なパイプラインや解析キットは開発されたものの、実際の臨床診断での活用例が少ないことが理由の一つに挙げられる。Exome 解析を臨床診断に持ち込むことは、現時点では労力やコストの面などから有用とは思われない。しかし、上述の臨床診断技術としては極めて有用な技術と思われる。今回我々は、遺伝性疾患が受診患者の半数以上を占める小児病院において次世代シーケンサーをどのような形で活用していくかその臨床応用の実践についてまとめた。

### B. 研究方法

臨床診断で次世代シーケンサーを用いる場合、診断に基づいた対象領域 (遺伝子) は既に絞られている。いわゆる Target-enrichment によるゲノ

ム DNA 処理が基本である。この Target-enrichment の方法は、PCR、custom amplicon、hybrid-capture の 3 つの方法に分類できる。我々の施設では、Long and accurate PCR (LA-PCR) 産物、およびキットを用いた custom amplicon での疾患パネルによるライブラリー作成で解析を進めた。

#### 1) 対象遺伝子 LA-PCR 産物を用いたライブラリー作成による Kabuki 症候群の遺伝子診断

Kabuki 症候群は、特異顔貌、骨格異常、精神遅滞を伴う先天奇形症候群で、12q13.12 にマップされる MLL2 の機能不全が原因である。MLL2 遺伝子は全長約 36kb、54exon からなり、これまでの報告変異は特定の exon に集中する傾向はあるものの、診断には全 exon のシーケンス解析が必要であった。したがって従来のキャピラリーシーケンスでは相当の労力を要していた。intron も含めた MLL2 遺伝子変異を高精度かつハイスループットで解析することを目的として解析を進めた。対象は臨床症状の組み合わせから Kabuki 症候群と診断された 32 例で、このうち、3 例は既に Sanger 法で変異を確認していた。方法は、MLL2 遺伝子領域を 5 つに分割し (MLL2\_1a : 7,813bp、MLL2\_2 : 6,156bp、MLL2\_3 : 7,287bp、MLL2\_4a : 7,197bp、MLL2\_5 : 8,268bp) LA PCR を行った。LA-PCR の産物 38,192bp を Nextera DNA Sample Prep Kit にてサンプルを処理した。研究途中に Kabuki 症候群第 2 の責任遺伝子 KDM6A が明らかとなり、KDM6A についても同様のシステムを構築し、MLL2 と同時解析を可能にした。32 例は 3 回に分けて Illumina MiSeq でシーケンスを行った。3 回目の解析では、KDM6A を同時解析とし、前 2 回で変異を検出できなかった 7 例も含んだ。各解析はサンプル調整 3 日間、シーケンス 30 時間、解析 5 時間の 5 日間で完了することができた。Nextera Index Kit でインデックスを付加し、10 サンプル (1 回目)、16 サンプル (2 回目)、13 サンプル (3 回目) と多検体同時解析を行った。ソフトウェアは MiSeq に内蔵されている MiSeq Reporter を用いた。

#### 2) Custom amplicon による疾患パネルを用いた奇形症候群遺伝子診断

HaloPlex (Agilent) は、制限酵素による断片化、ライブラリー化されたターゲット領域のプロープのハイブリダイズ、ターゲット領域の精製、PCR によるターゲット断片の増幅、といった一連の処理により複数のターゲット領域 DNA 断片のライ

ブラリーを作成するキットである。この方法のメリットは、全てがキット化されワークフローが明瞭であり、Array capture で必要とされるゲノム DNA の断片化が不要なことにある。限られた解析機器でライブラリーを作成する臨床検査では、極めて有用と考えられる。また、対象遺伝子選択とオリゴプローブ設計も全てメーカー開設のインターネット上で自動化されているため、自由度が高く、遺伝的異質性が高い小児の先天異常疾患の遺伝子診断では有用である。今回我々は、この HaloPlex (Agilent) を用いて、サンプル DNA のライブラリー作成を行った。

#### a. Marfan 症候群、および Marfan 症候群類縁疾患・Ehlers-Danlos 症候群の疾患パネルによる遺伝子解析

Marfan 症候群は、大動脈基部拡張、特徴的骨格、水晶体亜脱臼などを特徴とする遺伝病で、FBN1 遺伝子の変異を原因とする。診断基準を満たす症例では患者の 7-9 割で FBN1 の変異を検出するが、1-3 割では変異を検出できない。この理由として、共通した臨床像を呈する類縁疾患が複数あり、臨床鑑別が困難なことがあげられる。したがって、類縁疾患も合わせて網羅的に解析を進めることが理想であるが、FBN1 だけでも exon が 65 個存在し、類似の血管病変を呈する一連の Ehlers-Danlos 症候群責任遺伝子も合わせると数十遺伝子数百エクソンの解析が必要となり、従来の Sanger 法では現実的ではない。そこで我々は、上述の HaloPlex で独自の疾患パネルを作成し、解析を進めた。対象は、文書によるインフォームドコンセントを得た 15 症例で、Marfan 症候群 6 例 (全例 High resolution melting (HRM) 法で FBN1 全 exon スクリーニングを行い病原性が疑われる融解曲線を認めなかった)、Ehlers-Danlos 症候群 6 例 (3 例は HRM 法で COL3A1 スクリーニングを行い病原性を疑われる融解曲線を認めなかった)、Stickler 症候群 1 例、Loeyz-Dietz 症候群 1 例、Cutis laxa 症候群 1 例であった。疾患特異的パネル作成は、Agilent 社開設の専用ウェブサイト SureDesign を経由して作成した。ターゲット領域数は 927 (141,840bp) で、設計によるカバー率は 99.0%、対象疾患とターゲット 29 遺伝子を【表 1】にまとめた。

#### b. Ciliopathy 疾患群および Treacher Collins 症候群混合パネル解析

Ciliopathy は繊毛疾患の総称で、具体的には Bardet-Biedl 症候群、Joubert 症候群、

Nephronophthisis、Alstrom 症候群、Meckel 症候群、OFD (oral facial digital) 症候群、Jeune 症候群、頭蓋外胚葉異形成症 (Sensenbrenner 症候群) などが含まれる。それぞれの疾患がさらに遺伝的異質性が高く、Bardet-Biedl 症候群だけでも少なくとも BBS1 から BBS16 までの遺伝子を原因とすると考えられている。しかも、時に上記の Ciliopathy 疾患群の間で臨床症状が重なるために、解析は網羅的である必要があるが、従来の Sanger 法でのスクリーニングは現実的ではない。HRM スクリーニングは安価であるが、サンプル処理の労力は少なくなく、また PCR 条件を設定することも困難を伴う。こうした背景から、この疾患群は海外ではいち早く次世代シーケンサーでのパネル式の解析が取り入れられた (殆どは hybrid capture による)。今回、我々は、上記 Marfan 症候群類縁疾患・Ehlers-Danlos 症候群での経験をもとに、HaloPlex を用いて Ciliopathy パネルを設計し、解析を試みた。しかし、発生頻度が極めて低く、結果として需要が少ない遺伝子検査を臨床検査のフローに乗せることは難しい。解析規格サンプル数 (15) を満たすために、より有効にパネルを設計することが求められる。その結果、Ciliopathy 疾患群とは関連がないものの、遺伝的異質性が最近注目されつつある Treacher Collins 症候群を対象疾患として両疾患群混合パネルを作成した。対象は、臨床症状の組み合わせから診断がなされた 13 例で、Joubert 症候群 (6 例)、Bardet-Biedl 症候群 (2 例)、頭蓋外胚葉異形成症 (2 例)、および Treacher Collins 症候群 (TCS) 類縁疾患 (3 例、うち 1 例は Nager 症候群) であった。Ciliopathy+TCS 混合パネル設計は、Marfan 症候群類縁疾患パネル作成と同様で、ターゲット領域数 1454 (398,456bp)、設計上のカバー率 99.4%、ターゲット遺伝子数は 75 であった。

### 3) データ解析ならびに変異検出後の Sanger シーケンス、アレイ CGH 解析

得られたデータの解析は機器付属の Miseq Reporter を用いた。Ciliopathy+TCS パネル (Cil パネル) 解析では、Genome Analysis Toolkit (GATK) によるデータ解析も行った。Variant call としてスコアの高い変異は、Sanger シーケンスにより確認した。また、得られた bam file を Integrative Genomics Viewer (IGV) で hg19 上に可視化し、確認した。Variant の病原性については、Human Gene Mutation Database (HGMD) で既知変異と比較参照を行った。Marfan 症候群類縁疾患・Ehlers-Danlos 症候群パネル解析で、

variant コールが得られない Ehlers-Danlos 症候群典型 2 症例については、アレイ CGH で CNV 検索を試みた。Treacher Collins 症候群類縁疾患症例で、GATK での解析で CNV が想定される症例についても同様にアレイ CGH での確認をおこなった。

### 4) アラインメントデータの CNV 解析

データの CNV 解析は、得られたリード数を対数変換し、Log 値の相対値を Z-スコアとして評価する方法をとった。パネル解析は 1 回のランで比較的多い複数検体を処理することが可能で、結果として Z-スコア表示でのばらつきが少なくなる。極めて簡便でありながら、比較的鋭敏に CNV を検出できるものと考えた。得られた CNV は、定量 PCR により再評価・検証をおこなった。今回はこの中の頭蓋外胚葉異形成症 (同胞 1 家系) を対象とした。

(倫理面への配慮)

解析はこども医療センター倫理委員会での承認を得た。全ての解析において文書による同意を親権者から得て行った。

## C. 研究結果

### 1) 対象遺伝子 LA-PCR 産物を用いたライブラリ作成による Kabuki 症候群の遺伝子診断

1 回目および 2 回目の解析で、既知の SNP を 27 個、未報告の SNP を 19 個見出した。平均カバレッジは 2385 回 (1 回目)、1,652 回 (2 回目) であった。exon 中で SNP データベース中に報告のない変異を Sanger シーケンスと比較して一致することを確認した。全 32 例中 23 例 (MLL2 変異 22 例、KDM6A 変異 1 例) に変異を検出し、9 例は変異がなかった。MLL2 変異の種類としては Frame shift 6 例、Nonsense 12 例、Missense 4 例であった。既知 3 症例のうち 1 例には Sanger シーケンスで見落とされた真の病因変異を確認した。次世代シーケンサーで variant の割合が 30% であったが、サンガーシーケンスでは 25% 未満であるモザイク例が 1 例あった。

### 2) Custom amplicon による疾患パネルでの奇形症候群遺伝子診断

a. Marfan 症候群、および Marfan 症候群類縁疾患・Ehlers-Danlos 症候群の疾患パネルによる遺伝子解析

実際に増幅解析が得られたターゲット領域数は 615 (416,587bp) で、20 reads 以上の領域が

83.12%であった。少なくとも 100 reads 以上が 52.73%であった。

Marfan 症候群 6 例中 2 例に FBN1 病原性変異を、1 例に TGFBR2 病原性変異を検出した。この FBN1 変異 2 症例は HRM スクリーニングで見落とされており、特に 1 例 (MS-018; MES-12) は同 exon にコントロール DNA でも正常 SNP が存在したために、融解曲線で明瞭に区別されなかったことが原因であった。Ehlers-Danlos 症候群 6 例中 3 例に COL5A1 の病原性変異を、1 例に COL3A1 病原性変異を検出した。また、病原性 variant を検出しなかった 2 症例は、発達遅滞 (軽度) も合併したことから CNV の関与を想定し、アレイ CGH (Agilent 60k) でのスクリーニングを行ったところ、1 例 (MES-02) で、COL5A1 を含む 9q34.3 に 3.2Mb 重複と微細な欠失を伴う複雑なゲノム再構成を検出した。Stickler 症候群、Loeys-Dietz 症候群、Cutis laxa 症候群では病原性 variant を検出しなかった。

#### b. Ciliopathy 疾患群および Treacher Collins 症候群混合パネル解析

Joubert 症候群 6 例中 1 例に TMEM67 の複合ヘテロ変異 (Cil-13)、1 例 (Cil-11) に CEP290 の nonsense 変異を (もう一方の変異は未確認)、1 例 (Cil-10) に CC2D2A の nonsense 変異を (もう一方の変異は不明)、Bardet-Biedl 症候群 2 例のうち 1 例 (Cil-03) に BBS12 の複合ヘテロ変異を確認、頭蓋外胚葉異形成症 2 例のうち 1 例 (Cil-07;同胞例) に IFT122 の複合ヘテロ変異を検出した。Treacher Collins 症候群 (TCS) 類縁疾患 (3 例) では、例で TCOF1 の missense 変異を検出 (Nager 症候群 (Cil-09)) したが、他 2 症例で変異を認めないため、GATK で CNV 変換による再評価を行ったところ、1 例に EFTUD2 の一部を含む 17q21.31 の 37kb の欠失を、1 例に POLR1D を含む 13q12.2 の 470kb の欠失をそれぞれ認めた。いずれも、文献的に認められる臨床症状と矛盾しなかった。

#### 4) アラインメントデータの CNV 解析

当初、父由来のアレルに

IFT122:NM\_052990:exon13:c.1629\_1631delAG A (p.L543\_E544delinsL) のみを検出し、母由来アレルの変異を検出することができなかった。CNV の可能性を考慮して、データの CNV 解析を行ったところ、同胞に共通する IFT122 の exon 17-21 の重複を検出し、同様の重複は母親にも検出することができた。以上から、この同胞例は父由来の 3 塩基欠失、母由来の exon 17-21 の重複に

よる複合ヘテロ変異により発症したと結論した。

## D. 考察

次世代シーケンサーの臨床応用を目的に、実際の臨床検体を用いて遺伝的異質性の高い奇形症候群の遺伝子診断を試みた。診断的検査として導入するためには、ワークフローがプロトコル化し、得られた結果の再現性が高く、多検体処理 (High-throughput) が可能であることなどが求められる。次世代シーケンサーはその解析能力から多検体処理は得意であるものの、診断的検査の流れに乗せるには、DNA 処理とデータ解析の工夫は不可欠である。今回、2 つの Target-enrichment の方法によるライブラリー作成から、次世代シーケンサーでの遺伝子診断を試みた。

### 1) 対象遺伝子 LA-PCR 産物を用いたライブラリー作成による Kabuki 症候群の遺伝子診断

Nextera を用いた LA-PCR と組み合わせた PCR 産物のシーケンス解析は、多検体処理、再現性、フローのプロトコル化、いずれの側面も満たすことが可能であった。さらにこれまで報告のない MLL2 変異モザイクも明瞭に検出できた。このモザイク検出は Sanger シーケンスでは見落とされる可能性があり、次世代シーケンスの特性 (高いリード数) を明確に示したものであった。また、研究途中で明らかになった Kabuki 症候群第 2 の責任遺伝子 KDM6A の解析も迅速に対応可能であり、LA-PCR による DNA 処理・ライブラリー作成の柔軟性も示すことができた。今後の課題は、サンプルインデックスの工夫によっては、1 サンプル解析のコストをさらに下げることがあげられる。

### 2) Custom amplicon による疾患パネルを用いた奇形症候群遺伝子診断

HaloPlex (Agilent) を用いた独自の疾患パネルによる解析を、Marfan 症候群類縁疾患・Ehler-Danlos 症候群 (MES パネル)、および Ciliopathy 疾患群・Treacher Collins 症候群 (Cil パネル) で試みた。MES パネルでの variant 検出率は高く、極めて有用であった。FBN1 では、HRM で多型にマスクされ、見落とされた病原性変異の検出が可能であった。HRM も high-throughput で高い精度が特徴であるが、非病原性 SNP が対象サンプルあるいはコントロールサンプルに含まれると、その鑑別には Sanger シーケンスを用いる

他なく、SNPが多くなると作業量も増えてくる。さらに、HRMでは適切なPCRプライマーの設計や一定したPCR条件の設定も不可欠であり、これらを対象疾患に合わせて設計すると膨大な作業量になる(FBN1(全65 exon)やCOL3A1(全51 exon)、COL5A1(全66 exon)、COL5A2(全54 exon))。したがって検出精度に加え、コストと労力でもパネルを用いた解析がHRMを凌ぐ可能性も出てくる。また、今回の解析から、本来小さなvariantの検出を目的としたcustom ampliconでも、データ解析法(GATK)の工夫によりCNV評価が可能であり、variantが検出されない場合の再評価の方法が明らかにされた。Custom ampliconのCNV変換によるEFTUD2とPOLR1Dの欠失の検出は、これまで報告がない最初の例である。

今回、診断検査として次世代シーケンサーを用いる場合の課題もいくつか提示された。一つは、こうしたパネルを用いた網羅的解析では、検出されたvariantと臨床診断との整合性の検討が不可欠なために、解析サイドと臨床サイドで密接な情報共有が重要なことである。複数の疾患を一つのパネルで行う場合には、明らかに臨床症状(診断)と乖離するvariantも多数検出される。データ解析以前に、こうしたvariantを症状から絞り込むことは重要である。解析を進める上で、データの共有に関するシステムも課題と思われる。第2は、遺伝性疾患の遺伝子診断では、遺伝様式と症状から、変異の意義検証として両親解析は必須であるが、今回の解析でもそのことは明らかとなった。特にdigenic変異も含まれるCiliopathyのような極めて遺伝的異質性が高い疾患では、複数の遺伝子に複数のvariantが検出されるため、病原性変異の確定には慎重な検討が必要である。High-throughputを目指すものの、この大きなジレンマを克服するには、データ解析などを整備する必要はあるかもしれない。第3は、こうしたcustom ampliconのTarget-enrichmentは、常に100%ではなく、限界を有していることである。今回のMESパネルでも、臨床的に信頼がおけるreads数100以上の領域は52.73%で、read数20でようやく80%を超えるにとどまった。高いread数で均一にターゲット領域をカバーするキットの工夫は必要である。今後、次世代シーケンサーの性能の向上(総read数の増加)により、どれだけ厚みが期待できるか検討する必要もある。遺伝性疾患の変異の多様性に合わせたワークフローを検討するべきである。

## E. 結論

次世代シーケンサーの臨床応用を目指し、遺伝性疾患の解析をtarget-enrichmentの方法別に試みた。特定遺伝子に絞り込まれる場合には、LA-PCRが極めて有用で、低頻度モザイクの検出も可能で、柔軟な対応が達成できた。Custom ampliconによる疾患別パネルでは、膨大なvariantを整理するために、正確な臨床情報、両親の遺伝情報が不可欠であった。同様変異スクリーニングで優れるHRM以上の効果を期待できることが分かった。次世代シーケンサーの解析能力の向上や、ライブラリー作成キットの性能の向上なども今後の課題としてあげられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

石川亜貴、榎本啓典、古谷憲孝、室谷浩二、朝倉由美、安達昌功、黒澤健司 CHARGE症候群26例の臨床的検討 日児誌 2012;116:1357-1364.

Tachibana Y, Aida N, Enomoto K, Iai M, Kurosawa K. A case of Sjögren-Larsson syndrome with minimal MR imaging findings facilitated by proton spectroscopy. *Pediatr Radiol*. 2012;42:380-382.

Kurosawa K, Tanoshima-Takei M, Yamamoto T, Ishikawa H, Masuno M, Tanaka Y, Yamanaka M. Sirenomelia with a de novo balanced translocation 46,X,t(X;16)(p11.2;p12.3). *Cong Anom* 2012;52:106-110.

Enomoto K, Kishitani Y, Tominaga M, Ishikawa A, Furuya N, Aida N, Masun M, Yamada K, Kurosawa K. Expression Analysis of a 17p Terminal Deletion, including YWHAЕ, but not PAFAH1B1, associated with normal brain structure on MRI in a young girl. *Am J Med Genet Part A* 2012;158A:2347-2352.

Soneda A, Teruya H, Furuya N, Yoshihashi H, Enomoto K, Ishikawa A, Matsui K, Kurosawa K. Proportion of malformations and genetic disorders among cases encountered at a high-care unit in a children's hospital. *Eur J Pediatr* 2012;171:301-305.

Asakura Y, Muroya K, Sato T, Kurosawa K, Nishimura G, Adachi M. First case of a Japanese girl with Myre syndrome due to

- a heterozygous SMAD4 mutation. *Am J Med Genet A*. 2012;158:1982-6.
- 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
- 黒澤健司、富永牧子、榎本啓典、石川亜貴、齋藤敏幸、永井淳一、和田敬仁、小坂仁、古谷憲孝、升野光雄 マイクロアレイ染色体検査の需要の推定 第35回日本小児遺伝学会 2012.4.19. 久留米
- 富永牧子、榎本啓典、石川亜貴、古谷憲孝、安達昌功、小坂仁、升野光雄、黒澤健司 小児病院におけるマイクロアレイ CGH の臨床導入 第115回日本小児科学会 2012.4.20-22. 福岡
- 黒澤健司、富永牧子、和田敬仁、鮫島希代子、石川亜貴、高野亨子、井合瑞江、小坂仁、山下純正 小児病院におけるマイクロアレイ CGH 染色体検査の問題点 第54回日本小児神経学会 2012.5.17-19. 札幌
- 榎本啓典、近藤達郎、水野誠司、安達昌功、室谷浩二、眞鍋理一郎、SengstagThierry、富永牧子、石川亜貴、黒田友紀子、古谷憲孝、西川智子、山内泰子、井田一美、成戸卓也、升野光雄、黒澤健司 Trio+1 エクソーム解析による Young-Simpson 症候群の責任遺伝子同定 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 黒田友紀子、榎本啓典、富永牧子、古谷憲孝、齋藤敏幸、永井淳一、升野光雄、黒澤健司 知的障害、肥満を認めた 17p13.1-p13.2 重複の女兒例 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 大城亜希子、富永牧子、古谷憲孝、黒田友紀子、井合瑞江、升野光雄、黒澤健司 Down 症候群責任領域を含む 2.6Mb の 21q22 部分欠失の一男児例 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 成戸卓也、井田一美、黒田友紀子、富永牧子、榎本啓典、古谷憲孝、黒澤健司 デスクトップ型次世代シーケンサーを用いた歌舞伎症候群の MLL2 遺伝子変異解析 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 井田一美、成戸卓也、富永牧子、黒田友紀子、古谷憲孝、中川栄二、後藤雄一、升野光雄、黒澤健司 MID1 遺伝子の一部を含む Xp22.2 に 310kb の微細欠失を認めた Opitz/BBB 症候群の1家系 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- 榎本啓典、菅原祐之、保立麻美子、元吉八重子、畠井芳穂、水谷修紀、黒澤健司 まれな合併症を伴う TSC2-PKD1 隣接遺伝子症候群の一例 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.24-27. 東京
- Yamanouchi Y, Nishikawa T, Enomoto K, Furuya N, Mizuno S, Kondo T, Adachi M, Muroya K, Masuno M, Kurosawa K. Support for patients with Young-Simpson syndrome, their families and other peoples concerned: Study of patients and family group meetings. 62<sup>nd</sup> America Society of Human Genetics, San Francisco 2012.11.6-10.
- Kurosawa K, Enomoto K, Kondoh T, Mizuno S, Adachi M, Muroya K, Yamanouchi Y, Nishikawa T, Furuya N, Tominaga M, Kuroda Y, Naruto T, Ida K, Sengstag T, Manabe R, Masuno M. Trio-exome sequencing identifies mutations of the gene encoding the histone acetyltransferase KAT6B/MYST4 in individuals with the Young-Simpson syndrome. 62<sup>nd</sup> America Society of Human Genetics, San Francisco 2012.11.6-10.
- Kuroda Y, Saito T, Nagai J, Ida K, Naruto T, Masuno M, Kurosawa K. Microdeletion of

19p13.3 in a girl with Peutz-Jeghers syndrome, intellectual disability, hypotonia, and dysmorphic features. 62nd American Society of Human Genetics, San Francisco 2012.11.6-10.

Enomoto K, Sugawara Y, Hotate H, Motoyoshi Y, Hatai Y, Mizutani S, Kurosawa K. TSC2-PKD1 contiguous deletion syndrome with aortic stenosis and severe myopia. 62nd American Society of Human Genetics, San Francisco 2012.11.6-10.

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 (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

脳形成障害およびシナプス形成障害の遺伝学的成因に関する研究

研究分担者 齋藤伸治  
名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野・教授

研究要旨

脳形成障害およびシナプス形成障害の遺伝学的成因を明らかにすることを目的として、患者集積および解析を行った。シナプス形成障害としてはアンジェルマン症候群をターゲットとして、11例に対して候補遺伝子の網羅的解析を実施した。その結果、UBE3A変異を2例に、SCN2A複合ヘテロ変異を1例に同定した。種々の脳形成障害患者の患者および両親の計7家系のエクソーム解析を行い、4例で既に報告のある原因遺伝子の変異（de novo 3例、複合ヘテロ1例）を同定し、2例で可能性の高い候補遺伝子（de novo 1例、複合ヘテロ1例）を同定した。ターゲット遺伝子解析およびエクソーム解析は原因不明の脳形成障害およびシナプス形成障害患者の診断に極めて有用であり、早期の臨床応用が望まれる。

A. 研究目的

脳形成に関わる遺伝子は多岐にわたる。また、異なった遺伝子の変異により、共通した病態をとるために、脳形成障害の遺伝子診断は困難であった。ところが、ハイスループットの新しい遺伝子解析技術の発展により、複数の遺伝子を網羅的に解析することが可能になった。網羅的遺伝子解析は脳形成障害の原因の同定に強力なツールとなっている。マクロな形成障害のほかにシナプス形成障害はミクロな形成障害といえる。シナプス形成障害は知的障害や自閉性障害の共通した病因として注目されている。本研究では、原因不明の脳形成障害に加えて、シナプス形成障害のモデルのひとつであるアンジェルマン症候群（AS）を対象として網羅的遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

脳形成障害チームにおいて開発された、脳形成に関与する284遺伝子の網羅的解析とエクソーム解析を実施した。エクソーム解析の対象は脳形成障害7例（大頭症、水無脳症、多小脳回、小頭症、半球間裂嚢胞、透明中隔欠損、脳梁欠損各1例）を対象とした。すべてで両親の検体を一緒に解析した。2例では罹患同胞も同時に解析を行った。シナプス形成障害モデルであるアンジェルマン症候群患者11例については284遺伝子パネルを用いた解析を実施した。ターゲット遺伝子解析では、病因である可能性が高い変異が同定された場合に可能であれば両親解析を実施した。

候補遺伝子が同定されたときは、サンガー法

にて確認実験を行った。

C. 研究結果

エクソーム解析の結果を下記に示す。

- 1) 大頭症例  
AKT3 に de novo のミスセンス変異を同定した。同定された変異は、同様の表現型を示す大頭症患者に Riviere らにより報告された変異(Nat Genet 44:934-45, 2012)と同一であり、病因変異と判断した。
- 2) 水無脳症例  
TUBA1A 遺伝子にミスセンス変異を de novo で同定した。TUBA1A 遺伝子は重症脳形成障害の原因として知られており、患者の表現型は本遺伝子変異の臨床スペクトラムに含まれる。従って、同定された変異が原因と判断した。
- 3) 多小脳回例  
GNAI2 遺伝子にミスセンス変異を de novo に同定した。GANI2 遺伝子変異は疾患の原因としては報告されていない。しかし、遺伝子は中枢神経に豊富に発現する G 蛋白関連遺伝子であり、原因である可能性は否定できない。
- 4) 小頭症例  
PLK4 遺伝子に複合ヘテロ変異を同定した。PLK4 遺伝子は疾患の原因としては報告されていない。しかし、本遺伝子は染色体分裂に関連する蛋白であり、原因である可能性は否定できない。
- 5) 半球間裂嚢胞例  
NFIA 遺伝子に de novo の一塩基欠失による



フレームシフト変異を同定した。NFIA 遺伝子の欠失により半球間裂嚢胞を特徴とする脳形成障害の報告があり、本変異が原因であると判断した。

#### 6) 透明中隔欠損例

本例は罹患同胞も解析した。同胞間で共通する病原性が明らかな *de novo* もしくは複合ヘテロもしくはホモ変異は同定されなかった。

#### 7) 脳梁欠損例

本例も罹患同胞を解析した。罹患同胞 2 例に共通して EPG5 遺伝子に複合ヘテロ変異を同定した。EPG5 の劣性変異は Vici 症候群の原因であることが 2013 年に報告されており、本同胞の表現型は良く一致していた。そのため、本同胞は EPG5 変異による Vici 症候群と診断した。

AS を対象とした 284 遺伝子解析は 3 例に原因と判断した変異を同定した。2 例は AS 原因遺伝子 UBE3A 遺伝子のミスセンス変異であった。もう 1 例において SCN2A 遺伝子の複合ヘテロ変異を同定した。SCN2A は種々のてんかん性脳症の原因として同定されており、原因である可能性が高いと考えた。

### D. 考察

本研究において原因不明と考えられていた種々の脳形成障害 7 例にエクソーム解析を実施した。その結果、4 例 (57%) で診断の確定ができた。これら 3 例は既に報告されていた遺伝子変異に基づく疾患と同じ表現型であった。これらは、しかし、いずれも稀な疾患であり、臨床的に絞り込むこと困難な疾患であった。この 4 例ではエクソーム解析が診断に直結し、臨床的には極めて有用であった。

さらに、2 例では有力な候補遺伝子を同定した。同定された遺伝子はいずれも中枢神経で重要な役割が予想され、同定された変異が原因である可能性がある。しかし、過去に報告がなく、一例のみであるために、断定することはできない。このような場合には、多数例の解析を待つて、同じ遺伝子に変異が同定されれば、より確からしきは増す。しかし、もし、他の患者がみつからなければ、変異遺伝子の機能障害を実験的に示すことが必要になる。中枢神経で主として発現している遺伝子の機能解析は簡単ではなく、実際には解析できない場合が多い。今後、エクソーム解析が普及すると、このような変異がみつかる可能性が高い。これらに対応するためには、同定された変異を系統的に解析するシ

ステムの構築が求められる。例えば、本研究班で試みられている疾患特異的 iPS 細胞の作成は具体的な可能性と考える。iPS 細胞が樹立できれば神経細胞へ分化させることが可能になり、機能解析の基盤ができる。このように、エクソーム解析を実用するためには、平行して機能解析できるシステムの構築が必要であると考ええる。

本研究において、1 例では罹患同胞に共通した変異は同定されなかった。エクソーム解析ではすべての遺伝子を網羅してはならず、また、解析に一定のエラーが存在する。従って、変異が同定されないからといって、遺伝性疾患を否定することはできない。このような例では、解析の精度があがったときに、再度解析をするためのシステムが望まれる。

今回の解析では少なくとも 4 例 (57%) に病因変異が同定され、診断を得ることができた。遺伝学的診断を得ることは、自然歴を知ることや、適切な治療介入、また、遺伝カウンセリングの観点から極めて重要である。その意味で、50%は非常に高い。非特異的な知的障害や自閉症では原因不明例にエクソーム解析を行ったときの陽性率は 20%程度と報告されている。それから考えると、今回の結果は非常に高い同定率であった。もちろん、例数が少ないために、結論を得ることはできない。しかし、本研究の対象が脳形成異常であったことが率を上げた可能性は指摘できるのと考ええる。即ち、脳形成障害は遺伝子の機能障害が原因である可能性が高く、その意味で、非特異的な知的障害と比較すると高率になる可能性が理解できる。その意味で、脳形成障害は網羅的遺伝子解析の良い対象と考えられる。

一方、脳で発現する 284 候補遺伝子を搭載したターゲット解析を AS 患者 11 例に実施したところ、3 例で病因と考えられる変異が同定された。そのうち 2 例は AS 原因遺伝子 UBE3A の変異であった。UBE3A は既にサンガー法で解析していたが、見逃されていた。エクソンが多い遺伝子のサンガー法による解析は一定の見逃しがあることが知られているが、今回の結果はその事実を支持する結果であった。網羅的解析は解析速度のみでなく、精度的にも有用であることが示された。UBE3A 以外では 1 例にしか変異が同定されなかった。脳形成障害のエクソームと比較すると同定率の低さがめだつ。AS では明らかな脳形成障害が存在しないため、単純に比較はできない。しかし、中枢神経で重要な役割を果たす遺伝子の数は全遺伝子の半数近いと考えられ、ターゲット遺伝子解析の限界を示唆する結果かもしれない。

臨床的な観点からは、エクソーム解析およびターゲット遺伝子解析などの網羅的遺伝子解析は強力な手法であることは明らかである。臨床診断のためのエクソーム解析はクリニカルエクソームとして注目されている。本邦においても、クリニカルエクソームが利用できる仕組みづくりが求められている。

## E. 結論

原因不明の脳形成障害7例を対象としてエクソーム解析を実施し、4例(57%)で確定診断を得ることができた。また、2例で候補遺伝子を同定した。AS 11例を対象としたターゲット遺伝子解析では3例に原因と考えられる遺伝子変異を同定した。原因不明の中樞神経疾患に対する網羅的遺伝子解析は極めて有用であり、本邦においても臨床で利用できるための仕組みづくりが求められる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hayashi S, et al. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* 56:110-124, 2011.
2. Sato K, et al. Genetic analysis of two Japanese families with progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism. *J Neurol* 258:1327-1332, 2011.
3. Takahashi Y, et al. A loss-of-function mutation in the SLC9A6 gene causes X-linked mental retardation resembling Angelman syndrome. *Am J Med Genet Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156:799-807, 2011.
4. Tohyama J, et al. West Syndrome Associated with Mosaic Duplication of FOXP1 in a Patient with Maternal Uniparental Disomy of Chromosome 14. *Am J Med Genet Part A* 155A:2584-2588, 2011.
5. Sudo A, et al. Successful cochlear implantation in a patient with mitochondrial hearing loss and m.625G > A transition. *J Laryngol Otol* 125:1282-1285, 2011.
6. Hosoki K et al. Hand-foot-genital syndrome with a 7p15 deletion demonstrates a clinically recognizable syndrome. *Pediatr Int* 54:e22-25, 2012.
7. Hosoki K et al. Clinical Phenotype and Candidate Genes for the 5q31.3 Microdeletion Syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:1891-1896, 2012.
8. Kawamura R et al. Visualization of the spatial positioning of the SNRPN, UBE3A, and

GABRB3 genes in the normal human nucleus by three-color 3D-fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 20:659-672, 2012.

9. Tsurusaki Y et al. A DYNC1H1 mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenetics* 13:327-332, 2012.
  10. Takenouchi T et al. Tissue-limited ring chromosome 18 mosaicism as a cause of Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:2621-3, 2012.
  11. Egawa K et al. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci Transl Med* 4:163ra157, 2012.
  12. Ueda H, et al. Combination of Miller-Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation. *Eur J Pediatr* (in press)
  13. Suzumori N, et al. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 39:1545-7, 2013.
  14. Hamajima N, et al. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One* 8:e75137, 2013.
  15. Yoneda Y, et al. Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 73:48-57, 2013.
2. 学会発表
- 1) 齋藤伸治ら. 5q31 微細欠失は乳児期の筋緊張低下と重度精神遅滞を示す新しい症候群である、第 53 回日本小児神経学会総会 平成 23 年 5 月 26-28 日 (東京)
  - 2) 高野亨子ら. Prader-Willi 症候群の摂食の改善について 第 53 回日本小児神経学会総会、平成 23 年 5 月 26-28 日 (東京)
  - 3) 細木華奈ら. PWS 様表現型を示す微細染色体異常、第 56 回日本人類遺伝学会 平成 23 年 11 月 10-12 日 (幕張)
  - 4) Hosoki K, et al. 5q31.3 microdeletion syndrome is a clinically discernible new syndrome characterized by severe neonatal hypotonia, feeding difficulties, respiratory distress, and severe developmental delay. 61th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Montreal, Canada, 10/12-15/2011
  - 5) 根岸豊ら. Three siblings of Leigh syndrome associated with a mitochondrial m.3697G>A mutation. 第 54 回日本小児神経学会 平成 24 年 5 月 17-19 日 (札幌)
  - 6) 齋藤伸治ら. DYNC1H1 変異は特異な大腿四

頭筋優位神経原性筋萎縮症の原因となる、  
第 57 回日本人類遺伝学会 平成 24 年 10 月  
25-27 日 (東京)

- 7) Hosoki K et al. Submicroscopic chromosomal rearrangements in patients with an Angelman syndrome-like phenotype. 62th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11/7-10/2012
- 8) Saitoh S et al. A *DYNC1H1* mutation causes a quadriceps-dominant neurogenic muscular atrophy. 62th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11/7-10/2012
- 9) Saitoh S et al. Molecular genetic investigation on patients with Angelman syndrome in Japan: experience on 168 deletion-negative cases. 2012 Meeting of Angelman syndrome Foundation. Washington DC, USA, 6/26-17, 2012.
- 10) Togawa T, et al. Comprehensive mutation analysis by next generation sequencing in patients with neonatal intrahepatic cholestasis. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- 11) Hosoki K, Saitoh S. Molecular and clinical study of 30 Angelman syndrome patients with *UBE3A* mutations. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013

- 12) Negishi Y, et al. Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- 13) 青山幸平ら. Greig cephalopolysyndactyly 症候群と *MODY2* を伴う隣接遺伝子症候群の 1 例. 第 36 回日本小児遺伝学会学術集会 平成 25 年 4 月 18 日
- 14) 根岸豊ら. ミトコンドリア DNA 3697G>A ホモプラスミー変異は Leigh 脳症の原因となる. 第 58 回日本人類遺伝学会 平成 25 年 11 月 20-23 日 (仙台)

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

先天異常の臨床遺伝診療における患者家族への情報提供とインターネット情報の利用に関する研究

研究分担者 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

**研究要旨**

次世代シーケンサーによる網羅的解析が先天異常の分野に導入される時代になり、新たに研究や診療の対象となっている小児科領域の先天異常症候群を扱う臨床医が研究成果を患者家族に還元する方法について、3つの段階に分けて検討した。1. 臨床医がどのようなインターネット情報にアクセスして疾患情報を入手するか。2. 患者家族に対して新しい技術である次世代シーケンサーによる網羅的解析をどのように患者家族に伝えるか。3. 患者の臨床情報をどのようにデータベース化して活用するか。

1. 臨床医が情報を入手する方法は、既製の海外の充実した遺伝医学情報サイトの活用が有用であった一方、臨床遺伝診療に資する国内の情報が不足している。2. 網羅的解析の説明においては以前の単一遺伝子解析の説明に比べて時間がかかるが、ヒトの遺伝についての全体像の理解がなされた。遺伝学的検査の厚生労働省指針は有用であった。3. 北米で用いられている Web ベースのデータベース PhenoTips の試用でその有用性示された。

全体として、患者家族に遺伝医学研究の成果を還元するためには、上記1のインターネットによる国内情報を提供と、3の患者個人の遺伝学的情報を記録するためのデータベース構築について、さらに長期的な指針が必要であると考えられた。

**A. 研究目的**

次世代シーケンサーによる網羅的解析が先天異常の分野に導入される時代になり、小児科領域の1000近い数の先天異常症候群が新たに研究や診療の対象となっている。これらの疾患を扱う臨床医が診療や研究を患者家族の利益になるように還元するためには、研究者が最新の情報を収集し、それを患者家族が理解できる形で伝え、患者情報を記録に残し共有するというステップを踏む必要がある。

この流れを3つの段階に分けて検討した。1. 臨床医がどのようなインターネット情報にアクセスして疾患情報を入手するか。2. 患者家族に対して新しい技術である次世代シーケンサーによる網羅的解析をどのように患者家族に家族に伝えるか。3. 患者の臨床情報をどのようにデータベース化して活用するか。それぞれについて下記の方法で検討した。

**B. 研究方法**

1. インターネットで公開されている世界中のウェブサイトの中で、遺伝性疾患の臨床像について記載されているサイトを調査した。

2. 患者家族に次世代シーケンス法による網羅的解析について説明する文書について検討した。具体的には、対象と方法:対象は主に多発奇形/精神遅滞をもつ小児症例の親権者である両親

平成23年以前の単一遺伝子解析用説明同意文書を用いた時期と平成24年以後のエクソーム解析用の説明同意文書を用いた時期に行った遺伝子検査を受ける前提の事前説明もしくは遺伝カウンセリングにおいて、患者家族の対応や質問の内容を診療記録を参考に抽出し、その差異を後方視的に検討した。

3. トロント大学コンピューターサイエンス学部で開発され、米国を中心に臨床診療で使用されているウェブベースのオープンソースデータベース PhenoTips は、身体的特徴を含む医学情報、家系図、検査所見、奇形所見等を定められた用語を用いて設計されている。今後の臨床遺伝診療及び研究に資するデータベースの選択に資する目的で、PhenoTips と自家製の臨床診療用のデータベースを試用し比較検討した。

**C. 研究結果**

1. 遺伝性疾患の疾患別情報が掲載されているインターネットサイトを検出し、それぞれの特徴と診療への有用性について検討した。その抜粋を示す。Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

ヒトの遺伝子とその表現形に関する最も権威ある最新情報サイト。Clinical Synopsis の項目に身

体的特徴や合併奇形に関する情報の記載がある。臨床情報も報告された年次順に出典とともに記載されている。治療や療育、マネージメントに関する情報は少ないのはそれらについての論文がないためでもある。

#### Gene Reviews

NCBI のサイトの一つであり、650 を越える疾患についてその専門医が執筆し査読も経ている総説である。疾患の診断、症状、鑑別診断、遺伝カウンセリング、マネージメントまで系統的に記述されており更新も適宜行われている。疾患の認知特性や行動特性の記述も徐々に増えている。染色体異常症は一部しか取り上げられていない。

#### Gene Reviews 日本語

上記 Gene Reviews の日本語訳のサイトである。信州大学医学部附属病院遺伝子診療部が GeneReviews Japan 運営事務局を運営してボランティアで日本語訳を作成している。

#### DYSCERNE

ヨーロッパの Dysmorphology の専門家のネットワークである。その設立目的にウェブを活用した診断と、特定の疾患に特化したマネージメントガイドラインの策定を謳っている。臨床に特化したサイトであり、ガイドラインも各々の症候群の特性を理解した記述である。まだ公開疾患名が少ない。

#### Orphanet

稀少疾患と稀少医薬品に関するデータベースの構築をもとにして、稀少疾患の治療、ケア、マネージメントを目的としている。プロフェッショナルに対する質の高い情報を提供する一方、患者向けにも専門医の所在や医療機関情報も掲載している。30 を越える国が参加して 6 カ国語で提供されている。米国の NCBI のサイトよりも患者向けの視点が強く、疾患情報の一元化を目指している。今後の発展が期待される。

#### URDBMS 琉球大学遺伝性疾患データベース

琉球大学大学院医学研究科遺伝学分野の成富研二教授によって開発し公開された先天異常症候群診断補助データベースである。10000 以上の先天異常症候群や染色体異常症の身体合併症や Dysmorphology の情報を有する利用価値の高いデータベースである。元来診断の為のデータベースであるため、疾患情報は主に形態異常と合併症であり診断後のマネージメントに関する内容は記載されていない。

#### DECIPHER

マイクロアレイ技術の進歩で同定される染色体微細異常症に関する情報共有サイト。欠失領域と表現形に関するデータベースを構築している。疾患情報は形態的特徴と合併症などの簡易情報にとどまるが、登録者同士で患者の詳細についての情報交換が可能。臨床医に有用性が高い。

#### ECARUCA

ヨーロッパ細胞遺伝学協会が設立した細胞遺伝学と臨床情報の統合を目指したデータベース事業。微細欠失に限らず全ての染色体異常症を対象とする。身体写真を含めた詳細な情報の登録が可能であるが、まだ登録症例数が少ない。

2. 平成23年以前の単一遺伝子解析用説明同意文書と平成24年以後のエクソーム解析用の説明同意文書についてその患者説明における際について検討した。以下要旨を記載する。

#### ・説明に要する時間

エクソーム解析説明同意文書を使用する後期において、患者家族への説明に要する時間が長くなった。前期の単一遺伝子検査に比べて、染色体、DNA、遺伝子、エクソン、塩基、など基本的な遺伝学事項の理解に時間を要した。診療時間内で理解できない両親に対しては別時間もしくは遺伝カウンセラーが対応した。

#### ・説明内容の変化

従来の単一遺伝子解析の説明同意文書を用いた場合に比べて、染色体、DNA、遺伝子、エクソン、塩基、などの遺伝学用語についての基本的な事項を患者家族が十分に理解するための説明が増加した。

#### ・患者家族の反応

エクソーム解析説明同意文書導入後の患者家族からの多い質問の一つは、解析によって目的の遺伝子以外の情報も調べられる/知ることができるか否かというものであった。この質問の背景には一つには疾患に関係しない遺伝情報についても同時に知ることができないかという積極的な期待を持つ場合と、知りたくない遺伝情報を伝えられてしまうのではないかという危惧の場合と両者がある。これについては、説明同意文書に記載してあるように、原則として疾患の原因遺伝子、ないしは疾患の関連遺伝子以外は解析しないことを伝えた。

#### ・両親解析の理解

エクソーム解析を前提とするために、検体がトリオで必要であることを説明した。両親の検体提出が両親の解析の為では無く患児の診断の為に必要であることを理解する必要がある。次子再罹患率などの遺伝カウンセリングの目的の採血とは異なることの理解は比較的容易であり、両親採血を拒否されたケースは無かった。両親採血の必要性の説明の中で、一塩基多形や塩基レベルの突然変異の説明を行うために、むしろ疾患の遺伝学的な理解が深まった。

患児の解析と同様に、解析によって目的の遺

伝子以外の情報も調べられる/知ることができるかどうかについての質問もあった。両親の検体採取は、基本的には患児の診断のためであり、原則として疾患の原因遺伝子、ないしは疾患の関連遺伝子以外は解析しないことを伝えた。

3. Phenotipsデータベースと自家製のデータベースを比較試用した概略を示す。

PhenoTips は下記の異なる2つの環境で使用した。

使用環境

a) 最新の JAVA を入れて、ダウンロードしたソフトを組み込んで動かしたところ、CPU 使用率は常時 40% を越え、家系図作成時のポインター追従が不良となり、同時使用する他のコンピュータソフトの動きが明らかに重くなった。

b) Phenotips のホームページの試用画面 Playground で同一の作業を行ったところ、特にストレスを感じることなく全ての画面において利用可能であった。

入力は大項目から順に展開して開いて目的の所見に至る方法と、単語を入れて複数の候補から選ぶ方法がある。例えば Curly lash を入れるのに、項目を展開する方法から選ぶとすると、大項目を選ばなければならない。一方直接単語入力する方法では、Curly を入れれば、Curly を含む用語が自動的に複数提示され容易に入力が可能であった。疾患名も同様であり、Opitz と入力すると Opitz を含む全ての疾患名が MIM 番号とともに表示され、それを選択するだけで入力が可能である。

家系図を記入する画面は、マウス操作のみで正確に家系図の描画が可能である。

多少の慣れを要するが、画面の左側で選択したデータを、画面の右側で箇条書きの文として自動的に記載される

入力項目は

Patient information

Family history

Prenatal and perinatal history

Measurements

Growth charts

Clinical symptoms and physical findings

に大別され、成長曲線は画面上で自動的に描画される。

Clinical symptoms and physical findings は更に下位に、以下の項目を有する。

Growth parameters

Craniofacial

Eye Defects

Ear Defects

Cutaneous

Cardiac

Respiratory

Musculoskeletal

Gastrointestinal

Genitourinary

Behavior, Cognition and Development

Neurological

Other

それぞれは更に下位に約 10 個の項目があり Yes か No をポインターで選ぶ。Others の欄は自由記載であり、先頭の単語を入力すると自動的に候補用語が提示される。

使用者における項目の追加は想定されておらず、電子カルテの代用にはならない。

日本語の記載は可能であるが、入力項目の先行検索は動作しない。

自家製データベース

FileMaker社のデータベース作成ソフトウェア FileMakerProVer12 (ファイルメーカー社)を用いて、診療と診断に必要な下記の項目でフィールドを作成し、一画面で患者の主要な情報が一覧できるように作成し、臨床遺外来診療において利用した。

【基本診療情報】

氏名、生年月日、性別、同胞の数、家族構成、出生時の父母の年齢、紹介元医療機関、紹介元医師名。

基本診療情報は初診時に入力する。

【遺伝歴、周産期情報】

家系内の主な保因者情報、周産期の仮死の有無など最小限の情報を記述入力。

【主要所見】

複数の奇形所見の中で診断的価値があると思われる特記すべき所見を記入。8 つの所見が入力できる。

【患者画像】

データベースとは別の領域に患者別フォルダーに身体所見の画像を保存し、データベース画面からボタン一つでそのフォルダーを開くことができるようにスクリプトを作成した。

【診断名】

既知の疾患名を有する場合は、診断名、染色体異常名を記載。未診断の場合は、MCAMR 他、

特記すべき合併症を英語で記載。

#### 【身体計測値】

出生時の在胎週数、身長、体重、頭囲を全例記載。現在の身長、体重、頭囲を SD 値で記載。

#### 【特徴的身体所見】

自由記載で 160 字の入力が可能。部位別のフィールド設定は行っていない。

#### 【遺伝学的検査】

染色体 G 分染核型、マイクロアレイ検査(染色体番号と開始点と終点の塩基番号)、遺伝子検査その他の遺伝学的検査

#### 【画像及び各種検査結果】

中枢神経系の画像所見、主な画像診断所見、骨年齢、主な検査所見。

#### 【合併症及び過去及び現在の医療】

循環器合併症、眼科合併症、耳鼻科合併症、整形外科的合併症、歯科合併症、外科泌尿器合併症、内分泌的合併症、神経科および精神科合併症の項目を作成して、合併症や必須検査受検の有無、現在の通院状況を記載。

#### 【発達発育歴】

発達のマイルストーンとなる寝返り、坐位、始歩、始語の月齢を記載。DQ 及び IQ の数値も記載。

#### 【療育歴】

現在の通学通園場所、受けている療育、取得している障害者手帳、所属する患者会の項目を設けた。

#### 【その他】

現在の投薬内容、生活上の問題点、必要な医療的ケアの内容(胃瘻、気管切開など)の項目を設けた。

#### 【フォローアップメモ】

自由記載のフォローアップメモ欄を作成。受診時の所見や伝えた内容、次回受診時の備忘のメモなどに用いている。単語での検索が可能である。

#### 【インターネット情報とのリンク】

この他に、診療中にインターネット上の最新情報にアクセスできるように、診断名最上位の項目をボタン一つで、PubMed, OMIM, GeneReviews から同時に検索が可能になるようにスクリプトを作成したほか、琉球大学成富教授作成の奇形検索ソフト UR-DBMS も FileMaker からボタン一つで立ち上げることを可能とした。

### D. 考察

疾患を扱う臨床医が診療や研究を患者家族の利益になるように還元するためのステップとして、この流れを 3 つの段階に分けて検討した。1. 臨床医がどの

ようなインターネット情報にアクセスして疾患情報を入手するか。2. 患者家族に対して新しい技術である次世代シーケンサーによる網羅的解析をどのように患者家族に伝えるか。3. 患者の臨床情報をどのようにデータベース化して活用するか。

1のインターネット情報の入手においては、欧米のサイトへの依存度が高い現実があり、一方で不足しているのは直接患者家族がアクセスできるサイトもしくは患者家族へ医療機関が提供するための情報を掲載しているサイトである。

2つめの患者家族へ新しい技術である次世代シーケンサーによる網羅的解析をどのように患者家族に伝えるかについては、比較的問題なく運用されてると考えられた。

3つめの患者情報のデータベース構築については、北米のウェブベースの PhenoTips は有用であるが、国内の遺伝診療に用いる為には、ハード及び運用面での整備が必要であると考えられた。

### E. 結論

全体として、患者家族に遺伝医学研究の成果を還元するためには、上記1のインターネットによる国内情報を提供、及び患者個人の遺伝学的情報を記録するためのデータベース構築について、長期的な指針が必要であると考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Hirai M, Muramatsu Y, Mizuno S, Kurahashi N, Kurahashi H, Nakamura M. Developmental changes in mental rotation ability and visual perspective-taking in children and adults with Williams syndrome. *Front Hum Neurosci*. 2013 Dec 11;7:856

2) Shimizu K, Wakui K, Kosho T, Okamoto N, Mizuno S, Itomi K, Hattori S, Nishio K, Samura O, Kobayashi Y, Kako Y, Arai T, Oh-Ishi T, Kawame H, Narumi Y, Ohashi H, Fukushima Y.

Microarray and FISH-based genotype-phenotype analysis of 22 Japanese patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Dec 19. [Epub ahead of print]

3) Nishi E, Takamizawa S, Iio K, Yamada Y, Yoshizawa K, Hatata T, Hiroma T, Mizuno S, Kawame H, Fukushima Y, Nakamura T, Kosho T.

Surgical intervention for esophageal atresia in patients with trisomy 18.

*Am J Med Genet A*. 2013 Dec 5. [Epub ahead of print]

- 4) 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, Saitsu 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
- 5) 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
- 6) 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 Jul 11;93(1):173-80.
- 7) Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2013 Jun;161A(6):1221-37.
- 8) Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T. Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS One*. 2013;8(3):e60105.
- 9) Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. *Hum Mutat*. 2013 Jan;34(1):108-10
- 10) 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 Dec;158A(12):3112-8.
- 11) 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)*. 2012 Jun;52(2):82-6.
- 12) 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 Jun;158A(6):1292-303.
- 13) 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 Mar 18;44(4):376-8
- 14) Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N. MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2012.158A:97-102.
- 15) 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, Niijima 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 Oct;56(10):707-15

16) Seiji Mizuno, Daisuke Fukushi, Reiko Kimura, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Toshiyuki Kumagai, Nobuaki Wakamatsu

Clinical and genomic characterization of siblings with a distal duplication of chromosome 9q (9q34.1-qter)

Am J Med Genet A, 2011 September; 155 (9):224-2280.

17) Liang JS, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, Imai K, Okanishi T, Mizuno S, Okumura A, Sugawara M, Ito T, Ikeda H, Takahashi Y, Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T.

CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders.

Epilepsia. 2011 Oct;52(10):1835-42

18) Miyajima Y, Kitase Y, Mizuno S, Sakai H, Matsumoto N, Ogawa A.

Acute lymphoblastic leukemia in a pediatric patient with Marfan's syndrome

Rinsho Ketsueki. 2011 Jan;52(1):28-31.

19) 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 multiple congenital anomalies.

J Hum Genet. 2011 Feb;56(2):110-24.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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）  
総合研究報告書

胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成における解析遺伝子のパネル化の構築

分担研究者 山崎 麻美  
社会医療法人愛仁会高槻病院 副院長

### 研究要旨

我々はこれまでに胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成を目指して、患者由来生体試料（組織・細胞・DNA）などのデータバンクを構築してきた。現在までに333例が登録されている。その中で家族性水頭症5例、脳梁欠損症10例、家族性小頭症2家系、裂脳症、孔脳症、水無脳症、胎児期頭蓋内出血など10例、ダンディウォーカー症候群など後頭蓋窩エコーフリー病変を有する症例5例、二分頭蓋（脳瘤）3家系、大頭症8例について、標的遺伝子検索システム（target sequencing system）と次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析（whole exome sequencing；WES）を施行した。その結果、家族性水頭症1家系に*LI*遺伝子変異を、家族性脳梁欠損症1家系2症例に新規遺伝子変異、孔脳症および水無脳症のそれぞれ1家系に*COL4A1*遺伝子変異を、ダンディウォーカー症候群など後頭蓋窩エコーフリー病変を有する2症例に*FOXCI*および*PLG*遺伝子変異を、大頭症1例に*AKT3*遺伝子変異を2例に*PIK3CA*遺伝子変異を同定した。今回、⑤後頭蓋窩フリーエコー病変⑥大頭症群⑧胎内頭蓋内出血あるいは水無脳症・裂脳症・孔脳症群。⑨脳梁欠損群において、解析遺伝子のパネル化作成に大きな前進があった。

### 研究協力者

社会医療法人愛仁会高槻病院 小児脳神経外科 原田敦子、山中巧、寺元千佳 クリフムマタニティクリニック 夫律子、京都府立医科大学 伊東恭子、北海道大学 山田崇弘、佐賀大学 下川尚子、宮城県立こども病院 白根礼造、室月淳、国立成育医療センター師田信人、新潟大学脳研究所 西山健一、大阪市立総合医療センター坂本博昭、大阪府立母子保健総合医療センター岡本伸彦、京都府立医科大学 伊東恭子、国際福祉大学 宇都宮英綱、神奈川子ども医療センター 相田典子、帝京大学 大場洋、東京大学 森毅、横浜市立大学才津浩智、理化学研究所 山形大学加藤光広、統合生命医科学研究センター 宮冬樹、国立病院機構大阪医療センター 金村米博

#### A. 研究目的

超音波診断などの画像診断の進歩により、難治性脳形成障害症の多くは、胎生期に同定されるようになった。我々は胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成及び治療法の開発をめざして、臨床病態、画像情報、遺伝子情報、患者由来生体試料（組織・細胞・DNA）などのデータバンクを構築してきた。その登録症例は現在までに333例に及ぶ。それらを胎児期超音波検査にて形態的診断上、わかりやすい分類として次の9群に分類した。①脳室拡大が主な所見の水頭症群②全前脳胞症の群③胎児期初期には軽度脳室拡大を呈するもその後小頭症を呈する群④細胞移動障害を呈する群④頭蓋骨縫合早期癒合症を含めた骨系統疾患の群など⑤後頭蓋窩フリーエコー病変⑥大頭症群⑦二分脊椎症群⑧胎内頭蓋内出血あるいは水無脳症・裂脳症・孔脳症群。⑨脳梁欠損群である。その中で、小崎研究班の中で継続して、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を実施し、それぞれの群における解析遺伝子のパネル化を目指し、新しい出生前遺伝子診断方法を確立する

ことが目的である。

#### B. 対象と方法

患者の臨床データおよび画像データを収集した独自のデータサーバーの中から、小児放射線科のエキスパートによる小児放射線読影レビューを受けた家族性水頭症5例、脳梁欠損症10例、家族性小頭症2家系、裂脳症、孔脳症、水無脳症、胎児期頭蓋内出血など10例、ダンディウォーカー症候群など後頭蓋窩エコーフリー病変を有する症例5例、二分頭蓋（脳瘤）3家系、大頭症8例、そして家族性脊髄髄膜瘤5家系を対象とした。胎内診断された児は出生時に臍帯血から、その他の児および両親は末梢血から genomic DNA を抽出した

標的遺伝子検索システム（target sequencing system）と次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析（whole exome sequencing；WES）を施行した。標的遺伝子は難治性脳形成障害症にかかわる284遺伝子を抽出した。WESはタンパク質コーディング全領域の exonic DNAs を抽出するために、SureSelectXT Custom capture library

を使用した。Illumina HiSeq 2000 sequencerを用いてシーケンスし、塩基配列データを創出した。dbSNP, 1000 Genomes Project, ESP6500およびコントロールサンプルを用いて既知のSNPを除外し、候補遺伝子のミスセンス、ノンセンスSNVsとフレームシフト変異を抽出した。

(倫理面への配慮)

情報管理においては、個人情報管理とその漏洩防止に細心で厳重な注意を払う。遺伝子解析がかかわる部分に関しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省より施行された【ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針】および遺伝医学関連10学会より提案された【遺伝学的検査に関するガイドライン】を遵守する。本研究の全体の計画に関しては、平成21年9月に国立病院機構大阪医療センター倫理委員会で『難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発』研究の実施について承認を受けた。平成24年10月に社会医療法人愛仁会高槻病院倫理委員会にて『難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発』研究の実施について承認を受けた。

### C. 研究結果

- ① 小崎班に移行してからも、症例登録協力施設がさらに増えトータルで333件が登録された。
- ② 画像解析診断は、国際福祉大学 宇都宮英綱先生を中心に、神奈川県子ども医療センター 相田典子先生、帝京大学 大場洋先生、東京大学 森毅先生の小児神経放射線科のエキスパートで構成した。サーバを利用した遠隔診断システムを用い、ディスカッションしてレポートを完成させる画像診断のcentral reviewを実施している。
- ③ そのうえで実施した遺伝子解析の結果、家族性水頭症1家系に*LI*遺伝子変異を、家族性脳梁欠損症1家系2症例に新規遺伝子変異、孔脳症および水無脳症のそれぞれ1家系に*COL4A1*遺伝子変異を、ダンディウォーカー症候群など後頭蓋窩エコーフリー病変を有する2症例に*FOXC1*および*PLG*遺伝子変異を、大頭症1例に*AKT3*遺伝子変異を2例に*PIK3CA*遺伝子変異を認めた。

### D. 考察

胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成における解析遺伝子のパネル化の構築については、難治性脳形成障害症を①脳室拡大が主な所見の水頭症群②全前脳胞症の群③胎児期初期には軽度脳室拡大を呈するもその後小頭症を呈する群④細胞移動障害を呈する群④頭蓋骨縫合早期癒合症を含めた骨

系統疾患の群など⑤後頭蓋窩フリーエコー病変⑥大頭症群⑦二分脊椎症群⑧胎内頭蓋内出血あるいは水無脳症・裂脳症・孔脳症群。⑧脳梁無形成と、胎児期の超音波エコー検査で形状的にとらえやすい群に分類してきた。今回の小崎班の研究の中で実施した遺伝子解析で、特に⑤後頭蓋窩フリーエコー病変⑥大頭症群⑧胎内頭蓋内出血あるいは水無脳症・裂脳症・孔脳症群。⑧脳梁無形成群において、高い確率で遺伝子変異が同定され、解析遺伝子のパネル化の構築におおきな全氏をもたらした。

このような網羅的遺伝子解析を実施するにあたって、難治性脳形成障害症のような稀少疾患においては、臨床診断が極めて重要である。小児神経放射線医、小児神経病理、神経小児科医、小児脳神経外科医、など各分野でのエキスパートによるcentral reviewは極めて重要である。

### E. 結論

今回、小崎班で実施した、遺伝子解析によって胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成における解析遺伝子のパネル化の構築は飛躍的に前進した。

### F. 研究発表

#### 論文発表

1. Ishihara M, Yamasaki M (6人中6番目) No-no”type bobble-head doll syndrome in an infant with an arachnoidcyst of the posterior fossa: a case report. *Pediatr Neurol*49(6) 474-6 2013
2. Itoh K, Yamasaki M (5人中4番目) Hypoplasia of the spinalcord in a case of fetal akinesia/arthrogryposis sequences. *Neuropathol ApplNeurobiol*. 2013 Feb 20.
3. Fukusumi H, Yamasaki M, (10人中7番目) Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using pericellular matrix ofdecidua derived mesenchymal cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e55226.
4. Yoneda Y, Yamasaki M, (34人中24番目). Phenotypic Spectrum of COL4A1 Mutations: Porencephaly to Schizencephaly. *Ann Neurol*. 2013 Jan;73:48-57.
5. Yamasaki M, (6人中1番目) Diagnosis, treatment, and long-term outcomes of fetal hydrocephalus. *Semin Fetal NeonatalMed*. 2012;17(6):330-5.
6. Takenouchi T, Yamasaki M, (7人中5番目) Hydrocephalus with Hirschsprung disease:

severe end of X-linked hydrocephalus spectrum. Am J Med Genet A. 2012 158A(4):812-5.

7. Itoh K, Yamasaki M (7人中6番目), Fushiki S Semilobar holoprosencephaly with a unique traversed Sylvian sulcus. Neuropathol Appl Neurobiol 37:685-688, 2011
8. Yamasaki M (15人中1番目), Kanemura, Y. Prenatal molecular diagnosis of a severe type of L1CAM syndrome (X-linked hydrocephalus) J Neurosurg Pediatrics 8: 411-416, 2011

#### 学会発表

##### 国際学会

1. Yamasaki M, Nonaka M, Bamba Y, Teramoto C, Ban C, Pooh R. Diagnosis, Treatment, and Long-Term Outcomes of Fetal Hydrocephalus.

Hydrocephalus 2012 Kyoto 2012.10.21

##### 2. Yamasaki M

Recent research of L1CAM and hydrocephalus. 56th annual meeting of the Society for research into hydrocephalus and spina bifida, York UK 2012 25<sup>th</sup>-28<sup>th</sup> July など 36件

##### 国内学会

山崎麻美、金村米博、埜中正博、夫 律子 遺伝的要因による胎児期水頭症 遺伝医学合同学術集会2011 2011年6月17日 京都 など 78件

#### 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