

201419084A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 直通

(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成27(2015)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究 （資料）研究全体の流れと進行状況 松本直通	-----	1
--	-------	---

II. 分担研究報告

1. 希少な遺伝子変異を認めたてんかんおよび発達障害症例 岡本伸彦		11
2. 年齢依存性てんかん性脳症の遺伝型と臨床型の関連性の解明 加藤光広		15
3. Cerebral Folate Transport Deficiencyの同胞例 小坂仁		21
4. 広汎性発達障害関連遺伝子解析による病態解明研究 橋本亮太		27

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	33
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	37
-----------------	-------	----

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究開発事業）
総括研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

次世代シーケンサー（NGS）による高出力解析研究により、遺伝子異常の多面性が認識され、疾患群をより正確に診断する（診断率を向上させる）ためには、より多くの責任/関連遺伝子・候補遺伝子を解析することが不可欠である。この解決策に大容量型 NGS を用いた全エクソーム解析が選択肢となるが、やや高コスト（1 サンプル当たり 2014 年度で 13 万円）である。我々は、数十個の遺伝子を集約する新技術と卓上型 NGS を組み合わせ、効率的かつ安価（1 サンプル当たり 3 万 5 千円）に遺伝子異常を同定する技術（統合的遺伝子解析システム）を確立、さらに点変異のみならずコピー数異常の検出も可能とした。平成 25 年度は、この一定の遺伝子に限定した遺伝子パネル統合解析システムと全エクソーム解析との変異検出率やコストを検討し、遺伝子パネルの変異検出率が、パネル/全エクソームコスト比を上回らない限り遺伝子パネル解析を優先するメリットがないことが判明した。よって平成 26 年度は、全エクソーム解析を基本プラットフォームとして研究を進めた。特に全エクソーム解析データを用いた Nord プログラムによる遺伝子選択的 CNV 解析と XHMM プログラムにおける全ゲノム俯瞰的解析について検討した。

分担研究者

岡本伸彦・大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科・主任部長

加藤光広・山形大学医学部小児科学講座・講師

小坂仁・自治医科大学小児科学講座・教授

橋本亮太・大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学・千葉大学・福井大学連合小児発達学研究所附属子どものこころの分子統御機構研究センター/大阪大学大学院医学系研究科・情報統合医学講座精神医学教室・准教授

A. 研究目的

本申請研究は、申請者が研究代表を務めた「超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究（H22-神経・筋-一般-012）」の成果を受けた発展研究である。H22-24年度

研究費では、高密度マイクロアレーを用いた疾患ゲノム解析を基軸に、West症候群（Am J Hum Genet, 2010）、Kabuki症候群（Nat Genet, 2010）、Microphthalmia with limb anomaly (MLA)症候群（Am J Hum Genet, 2011）、Coffin-Siris症候群（Nat Genet, 2012）、大田原症候群（Ann Neurol, 2012）（Epilepsia, 2012）等で責任遺伝子を同定した。このうち3疾患の遺伝子異常が染色体微細構造異常に絡んでおり、染色体構造異常解析の有用性は明白であった。これらの研究過程で、年齢依存性てんかんの一群の解析は格段に進歩した。最重症系である大田原症候群では、我々が明らかにした責任遺伝子ARX・STXBP1・KCNQ2・CASKと新たにSCN2A（Neurology, 2013）・GNAO1（Am J Hum Genet, 2013）・SLC35A2（Hum

Mut, 2013) を加えておよそ57%で遺伝子異常が明らかになった。また次世代シーケンサー (NGS) による高出力解析研究により、遺伝子異常の多面性 (pleiotropy) が認識され始め、疾患群をより正確に診断する (診断率を向上させる) ためには、より多くの責任/関連遺伝子・候補遺伝子を解析する必要がある。この解決策に大容量型NGSを用いた全exome解析が選択肢となるが、やや高コスト (1サンプル当たり2014年度で13万円) である。我々は、数十個の遺伝子を集約する新技術と卓上型NGSを組み合わせ、効率的かつ安価 (1サンプル当たり3万5千円) に遺伝子異常を同定する技術 (統合的遺伝子解析システム) を確立し、さらに点変異のみならずコピー数異常の検出も可能とした。平成25年度は、この一定の遺伝子に限定した遺伝子パネル統合解析システムと全エクソーム解析との変異検出率やコストを検討し、遺伝子パネルの変異検出率が、パネル/全エクソームコスト比を上回らない限り遺伝子パネル解析を優先するメリットがないことが明らかとなった。よって平成26年度は、全エクソーム解析を基本プラットフォームとして研究を進めた。SNVとCNVを統合的に解析するシステムを確立し、効率的にヒト発達障害の遺伝子異常・分子病理を明らかにし、有効な診断システムの確立を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

I. 症例集積

小児神経臨床研究ネットワーク等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんか

んとその類縁疾患を、臨床遺伝ネットワーク等を通じて集積した知的障害関連疾患を集積する。

II. 統合的遺伝子解析システム開発

平成25年度に遺伝子を限定して統合的に解析する統合的遺伝子解析システムそのものに全エクソーム解析を上回るメリットが少ないことが明らかとなった。よって平成26年度は、本システムでCNV解析に有効であったNordプログラムを全エクソーム解析で可能かどうかの検討に変更することにした。

III. インフォーマティクス解析

NGS解析で既に全エクソン解析において研究室で確立した解析フローを統合遺伝子解析システムにも応用する。NGSデータは、研究室独自のインフォーマティクスフローにより効率的な点変異の検出が可能で、かつCNVに関してはAlexNORDプログラムと全ゲノムを俯瞰するXHMM解析法の確立を目指す。

IV. バックアップシステム

従来型の超細密マイクロアレーと全エクソーム解析・全ゲノム解析による網羅的なゲノム解析手法を遺伝子統合解析システムでの陰性例に適宜用いて新規遺伝子異常とコピー数異常を同定する。

V. 効果的遺伝子診断システムの確立

本研究の知見に基づく迅速、効果的かつ安価な疾患遺伝子診断システムを考案する。本研究は、所属施設IRBの承認を受け適切な倫理的配慮と手続きを得て行われた。

C. 研究結果

I. 症例集積

小児神経臨床研究ネットワーク（蔵王セミナー等で交流）等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんかんとその類縁疾患を含めた計 1040 例の世界的にも突出した症例が集積した。さらに臨床遺伝ネットワーク等により遺伝医学専門医や小児神経科医の協力のもと知的障害関連疾患を呈する症例が 2170 例集積した。今後も種々のチャンネルを通して継続的にこれらの疾患群の集積に努める。

II. 統合的遺伝子解析システム開発

平成 25 年度研究で遺伝子パネル/全エクソーム解析の価格比（3.5 万円/11 万円(2013 年時)=31.8%）を超える変異検出率をパネルで超えない限り、全エクソーム解析を第一選択とする方が安価で迅速であるとの結論に至った。よって明らかに検出率が 32%を大きく超えることが期待できる疾患はパネルを作成するがそれ以外は全エクソーム解析を選択することとし、平成 26 年度は主として全エクソーム解析をメインプラットフォームとしてシステム構築を進めた。

III. インフォーマティクス解析

NGS 解析で既に全エクソン解析において研究室内で確立した解析フローを統合遺伝子解析システムにも応用する。Miseq データは、Novoalign/Picard/GATK/Annova を組み合わせた研究室独自の Ecome により効率的な解析が可能である。さらに遺伝子パネルを用いた NGS データから特に欠失を

効率的に検出する Alex NORD プログラムで非常に小さな（100 bp 程度）欠失検出が可能であったため、平成 26 年度は全エクソーム解析データを用いて Nord プログラムが正確に CNV 検出可能化の検討を加えた。遺伝子パネル解析は解析する遺伝子数が限定的であるため比較的深いシーケンスリードを得ることが可能である（通常数百リード）。一方全エクソーム解析では、通常百リード程度の解析にとどまるため、遺伝子パネルに比して浅いシーケンスリード数の全エクソームデータでも正確に CNV 検出が可能かどうかを検討し、遺伝子パネルと同様な検出感度を有することが判明した。全エクソーム解析データを用いてXHMM法でCNV解析もマイクロアレーで検出される 200 kb サイズを超える CNV の 90%以上が検出可能であることを確認している。さらにマイクロアレーで検出できない 10 Kb 以下の CNV 検出が XHMM では検出され、一定の正確性を有することから特に重要な遺伝子を巻き込む小さな CNV は注意して解析をすることで病的な以上を検出できる可能性が示された。

IV. バックアップシステム

従来型の超細密マイクロアレーも CNV 異常の検出から責任遺伝子の特定する手法として依然重要で統合遺伝子解析システムと並行して適宜行っている。

V. 効果的遺伝子診断システムの確立

平成 25・26 年度研究の知見に基づいて効果的かつ安価な疾患遺伝子診断システムの検討を続けている。遺伝子パネルでの遺伝子変異同定率が遺伝子パネル/全エク

ソーム解析のコスト比を超え無い限りパネルを利用するメリットがないことが明らかになり全エクソーム解析の解析レベルを向上させるかを主軸に研究を進めている。全エクソーム解析で難治性てんかんに関しての新しい遺伝子として平成 25 年は *SCN2A* (Neurology, 2013), *GNAOI* (Am J Hum Genet, 2013), *SLC35A2* (Hum Mut, 2013),平成 26 年は *PIGA* (Neurology 2014, 雑誌の表紙を飾る)等の単離にも成功し遺伝子変異同定率の向上に寄与している。

D. 考察

遺伝子パネルと全エクソーム解析のパフォーマンスとコストの検討及び上記 2 手法のデータを利用した CNV 解析システムをセットアップし、マイクロアレーデータとの比較を行った。遺伝子パネルはコストメリットは明らかだが、検出率が低い場合全エクソーム解析に移行せざる負えないことも多く、コスト・スピードの観点で全エクソーム解析を第一選択とするメリットも明らかになった (平成 25 年度)。全エクソームシーケンスデータを用いた CNV 解析では、Nord プログラムも遺伝子パネル解析と同等の検出感度で CNV を検出し、XHMM ではマイクロアレーで明らかとなった 200 kb サイズ以上の CNV の 90%以上が感度よく検出可能であり、マイクロアレーの検出限界である 10 Kb 以下の欠失等が検出される可能性があること等などが判明し、その特徴を生かしたデータ利用が重要である。

E. 結論

H26 年度は、全エクソーム解析データでも Alex Nord プログラムは問題なく稼働し、XHMM では 200 kb 以上の CNV のおよそ 90%は検出可能であった。全エクソーム解析を用いて大田原症候群の新規遺伝子として *SCN2A* (Neurology, 2013)・*GNAOI* (Am J Hum Genet, 2013)・*SLC35A2* (Hum Mut, 2013)に加えて *PIGA*(Neurology, 2014)、雑誌の表紙を飾る)を発表した。また幼少期には発達障害、青年期に急速に神経変性が進行して寝たきりになる SENDA の責任遺伝子 *WDR45* (Nat Genet, 2013)や Coffin-Siris 症候群の新たな遺伝子 *SOX11* を見いだした (Nat Commun, 2014)。以上の統合的な遺伝子解析システム構築と本システムを利用した発達障害の責任遺伝子の解析が計画通り順調に進んでいる。

F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyatake S, *Matsumoto N (*: correspondence). Clinical exome sequencing in neurology practice. **Nat Rev Neurol** 10(12):676-678, 2014.

Tsurusaki Y, Ohashi H, Phadke S, Koshimizu E, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K-i, Kodera H, Miyatake S, Nakashima N, Saito H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, and *Matsumoto N. *De novo SOX11* mutations cause Coffin-Siris syndrome. **Nat Commun** 5:4011.

Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, *Matsumoto N, *Saito H (*: co-correspondence). Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies, **Neurology** 82(24):2230-2237, 2014.

*Kato M#, *Saito H#, *Murakami Y (*: co-first authors, #: co-correspondence), Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R,

- Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. **Neurology** 82(18):1587-1596, 2014.
- *Nakamura K, Kato M, Tohyama J, Shiohama T, Hayasaka K, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H. *AKT3* and *PIK3R2* mutations in two patients with megalencephaly-related syndromes. **Clin Genet** 85(4): 396-398, 2014
- *Miyake N, Kosho T, Matsumoto N. Ehlers-Danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities. J. Halper (ed.), Progress in heritable soft connective Tissue diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology 802. Pp145-159, 2014 Springer Netherland, Houten, Netherland
- Ichinose Y, Miwa M, Onohara A, Obi K, Shindo K, Saitsu H, Matsumoto N, *Takiyama Y. Characteristic MRI findings in beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN). **Neurol Clin Pract** 4(2):175-177, 2014
- Fukai R, Hiraki Y, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, *Matsumoto N, *Miyake N (*: co-corresponding). A de novo 1.4-Mb deletion at 21q22.11 in a boy with developmental delay. **Am J Med Genet Part A** 164(4):1021-1028, 2014.
- Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, *Matsumoto N, *Miyake N (*: co-correspondence). A Novel WTX Mutation in a Female Patient who has Osteopathia Striata with Cranial Sclerosis and Hepatoblastoma. **Am J Med Genet Part A** 164A(4):998-1002, 2014.
- Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Kawato K, Suzuki Y, Ikeda T, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, *Matsumoto N, *Saitsu H (*: co-correspondence). *PIGN* mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. **Neurogenet** 59(5):292-295, 2014.
- Leventer RJ, Jansen FE, Mandelstam SA, Ho A, Mohamed I, Sarnat HB, Kato M, Fukasawa T, Saitsu H, Matsumoto N, Itoh M, Kalnins RM, Chow CW, Harvey AS, Jackson GD, Crino PB, Berkovic SF, Scheffer IE. Is Focal Cortical Dysplasia sporadic? Family evidence for genetic susceptibility. **Epilepsia**; 55(3):e22-26, 2014.
- Ohba C, MD, Kato M, Takahashi S, Lerman-Sagie T, Lev D, Terashima H, Kubota M, Kawawaki H, Matsufuji M, Kojima Y, Tateno A, Goldberg-Stern H, Straussberg R, MD, Marom D, Leshinsky-Silver E, Nakashima M, Nishiyama K, Tsurusaki T, Miyake N, Tanaka F, *Matsumoto N, *Saitsu H (*: co-correspondence). Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. **Epilepsia** ;55(7):994-1000, 2014.
- Imagawa E, Kayserili H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Nishimura G, Ikegawa S, *Matsumoto N*, *Miyake N (*: co-correspondence). Severe manifestations of Hand-Foot-Genital syndrome associated with a novel *HOXA13* mutation. **Am J Med Genet Part A** 164A(9):2398-2402, 2014.
- #Ohba C, #Nabatame S, (# denotes equal contribution) Iijima Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Ozono K, Saitsu H*, Matsumoto N* (*: co-corresponding). De novo WDR45 mutation in a patient showing clinically Rett syndrome with childhood iron deposition in brain. **J Hum Genet** 59(5):292-295, 2014.
- #Miyatake S, #Koshimizu E (# denotes equal contribution), Hayashi YK, Miya K, Shiina M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Nishino I, *Matsumoto N. Deep sequencing detects very low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy. **Neuromuscul Disord** 24(7):642-647, 2014.
- Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita T, Saitsu H, Matsumoto N*. Novel compound heterozygous *PIGT* mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. **Neurogenet** 15(3):193-200, 2014
- Ozawa T, *Koide R, Nakata Y, Saitsu H, Matsumoto N, Takahashi K, Nakano I, Orimo S. A novel WDR45 mutation in a patient with static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA). **Am J Med Genet Part A** 164(9):2388-2390, 2014.
- *Matsumoto N. A message from the new Editor-in-Chief. **J Hum Genet**. 2014 59(1):1.
- Yasuda Y, *Hashimoto R (* denotes a corresponding author), Fukai R, Okamoto N, Hiraki Y, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Taniike M, Mohri I, Nakashima M, Tsurusaki T, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N, Takeda M. The *NPHP1* duplication in autism spectrum disorder with normal intellectual ability: a case series. **Ann Gen Psychiatry**. 13:22, 2014.
- *Miyake N (*: corresponding author), Tsurusaki Y, Matsumoto N. Numerous BAF complex genes are mutated in Coffin-Siris syndrome. **Am J Med Genet Part C** 166(3):257-261, 2014.
- *Nakashima M (*: corresponding author), Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. **J Hum Genet** 59(8):471-474, 2014.
- Ben-Omran T, Lakhani S, Almureikhi M, Ali R, Takahashi A, Miyake N, Matsumoto N, Ikegawa S, Superti-Furga A, *Unger S. Cono-spondylar dysplasia: Clinical, radiographic, and molecular findings of a previously unreported disorder. **Am J Med Genet Part A** 164(9):2147-2152, 2014.
- *Yoshida K (*: correspondence), Miyatake S, Kinoshita T, Doi H, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. 'Cortical cerebellar atrophy' dwindles away in the era of next-generation sequencing (correspondence). **J Hum Genet** 59(10):589-590, 2014.
- Katagiri S, Akahori M, Sergeev Y, Yoshitake K, Ieko K, Furuno M, Hayashi T, Kondo M, Ueno S, Tsunoda K, Shinoda K, Kuniyoshi K, Tsurusaki Y, Matsumoto N, Tsuneoka H, Iwata T. Whole exome analysis identifies frequent CNGA1 mutations in Japanese population with autosomal recessive

- retinitis pigmentosa. **Plos One** 9(9):e108721, 2014.
- Tsurusaki Y, Yonezawa R, Furuya M, Nishimura G, Pooh RK, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Saito S, *Matsumoto N. Whole exome sequencing revealed causative biallelic IFT122 mutations in a family with CED1 and recurrent pregnancy loss. **Clin Genet** (in press)
- Nakamura K, Osaka H, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, *Matsumoto N, *Saitsu H (*: co-correspondence). *PIGO* mutations in epileptic encephalopathy with mild elevation of alkaline phosphatase levels. **Epilepsia** (in press).
- *Nakayama T, Saitsu H, Endo W, Kikuchi A, Uematsu M, Haginoya K, Hino-Fukuyo N, Kobayashi T, Iwasaki M, Tominaga T, Kure S, Matsumoto N. *RBPJ* is disrupted in a case of proximal 4p deletion syndrome with epilepsy. **Brain Dev** (in press).
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor B, Perrier J, Aggarwal S, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N. Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. **Clin Genet** (in press).
- *Okamoto N, Yamagata T, Yada Y, Ichihashi K, Matsumoto N, Momoi MY, Mizuguchi T. Williams-Beuren syndrome with brain malformation and hypertrophic cardiomyopathy. **Brain Dev** (in press)
- Hara M, Ohba C, Yamashita Y, Saitsu H, Matsumoto N, *Matsuishi T. *De novo SHANK3* mutation causes a female patient with Rett syndrome like phenotype. **Am J Med Genet Part A** (in press).
- Ohashi T, Akasaka N, Kobayashi Y, Magara S, Kawashima H, Matsumoto N, Saitsu H, *Tohyama J. Infantile epileptic encephalopathy with a hyperkinetic movement disorder and hand stereotypies arising from a novel SCN1A mutation. **Epileptic Disord** (in press)
- Kodera H, Ando N, Yuasa I, Wada Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitoh S, *Matsumoto N, *Saitsu H (*:co-corresponding). Compound heterozygous mutations in COG2 encoding a subunit of the conserved oligomeric Golgi complex cause congenital disorder of glycosylation. **Clin Genet** (in press)
- Nakajima J, Okamoto N, Tohyama J, Kato M, Arai H, Funahashi O, Tsurusaki Y, Nakashima M, Kawashima H, Saitsu H, Matsumoto N[#], Miyake N[#] (*: co-corresponding). *De novo EEF1A2* mutations in patients with characteristic facial features, intellectual disability and, autistic behaviors and epilepsy. **Clin Genet** (in press)
- Endo Y, *Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I. Dominant mutations in ORAI1 cause tubular-aggregate- myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channel. **Hum Mol Genet** (in press).
- Okubo M[#], Fujita A[#] (# denotes equal contribution), Saito Y, Komaki H, Ishiyama A, Kojima E, Koichihara R, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Yamazaki H, Kusaka K, Tanaka H, Matsumoto N, Sasaki M. A family of distal arthrogyposis type 5 due to a novel *PIEZO2* mutation. **Am J Med Genet Part A** (in press)
- Suzuki T, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Takeda S, *Matsumoto N. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole genome sequencing. **J Hum Genet** (in press).
- Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Fukuda-Yuzawa Y, Tsuji S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ikeda S, Tanaka F, Matsumoto N, *Yoshida K. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous *DDHD2* mutation. **Sci Rep** (in press)
- *Miyatake S, *Koshimizu E, (*: corresponding author), Tada H, Satoshi Moriya S, Takanashi J, Hirano Y, Hayashi M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H. Atypical giant axonal neuropathy arising from a homozygous mutation by uniparental isodisomy. **Clin Genet** (in press)
- *Saitsu H, Yamashita S, Tanaka Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, *Matsumoto N. Compound heterozygous BRAT1 mutations cause familial Ohtahara syndrome with hypertonia and microcephaly. **J Hum Genet** (in press)
- Zerem A, Lev D, Blumkin L, Goldberg-Stern H, Michaeli-Yossef Y, Halevy A, Kivity S, Nakamura K, Matsumoto N, Leshinsky-Silver E, Saitsu H, *Lerman-Sagie T. Paternal germline mosaicism of a SCN2A mutation results in Ohtahara syndrome in half siblings. **Eur J Paediatr Neurol** (in press)
- *Wada T, Takano K, Tsurusaki Y, Miyake N, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese familial case of myoclonus-dystonia syndrome with a splicing mutation in the SGCE gene. **Pediatr Int** (in press)
- Kubota K, Saito Y, Ohba C, Saitsu H, Fukuyama T, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Matsumoto N. Brain magnetic resonance imaging findings and auditory brainstem response in a child with spastic paraplegia 2 due to a PLP1 splice site mutation. **Brain Dev** (in press)
- *Saitsu H, Tohyama J, Walsh T, Kato M, Kobayashi Y, Lee M, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Goto Y, Nishino I, Ohtake A, King M-C, *Matsumoto N (*: co-correspondence). A girl with West syndrome and autistic features harboring a *de novo* TBL1XR1 mutation. **J Hum Genet** (in press)
- Cho SY, Asharani PV, Kim OH, Iida A, Miyake N, Matsumoto N, Nishimura G, Ki CS, Hong G, Kim SJ, Sohn YB, Park SW, Lee J, Kwun Y, Carney TJ, Huh R, Ikegawa S[#], Jin DK[#]. (*: co-correspondence) (# denotes equal contribution). Identification and in vivo functional characterization of novel compound heterozygous BMP1 variants in osteogenesis imperfecta. **Hum Mut** (in press)
- Shimajima K, Okumura A, Ikeno M, Nishimura A, Saito A, Saitsu H, Matsumoto N, *Yamamoto T. A *de novo* TUBB4A mutation in a patient with hypomyelination mimicking Pelizaeus-Merzbacher disease. **Brain Dev** (in press)
- Nakashima M, Miyajima M, Sugano H, Iimura Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Arai H, *Matsumoto N. The somatic *GNAQ* mutation c.548G>A (p.R183Q) is consistently found in

- Sturge-Weber syndrome. **J Hum Genet** (in press)
- Inui T, Kobayashi T, Kobayashi S, Sato R, Endo W, Kikuchi A, Nakayama T, Uematsu M, Takayanagi M, Kato M, Saitsu H, Matsumoto N, Kure S, Haginoya K. Efficacy of long term weekly ACTH therapy for intractable epilepsy. **Brain Dev** (in press)
- Uchino S, Saitsu H, Kumada S, Nakata Y, Matsumoto N. Stereotypic hand movements in β -propeller protein-associated neurodegeneration: first video report. **Mov Disord** (in press)
- *Takahashi S, Yamamoto S, Okayama A, Araki A, Saitsu H, Matsumoto N, Azuma H. Electroclinical features of epileptic encephalopathy caused by SCN8A mutation. **Pediatr Int** (in press).
- Yoshimura-Furuhata M, Nishimura-Tadaki A, Amano Y, Ehara T, Hamasaki Y, Muramatsu M, Shishido S, Aikawa A, Hamada R, Ishikura K, Hataya H, Hidaka Y, Noda S, Koike K, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Awadu M, Miyake N, Kosho T*. Renal complications in 6p duplication syndrome: microarray-based investigation of the candidate gene(s) for the development of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) and focal segmental glomerular sclerosis (FSGS). **Am J Med Genet Part A** (in press)
- Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H*, Matsumoto N* (*: co-corresponding). Mutations in the glutaminyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. **J Hum Genet** (in press)
- *Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with a severe form of vanishing white matter disease resembling Cree leukoencephalopathy. **Brain Dev** (in press).
- Hiraki Y, Miyatake S, Hayashidani M, Nishimura Y, Matsuura H, Kamada M, Kawagoe T, Yunoki K, Okamoto N, Yofune H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Murakami A, Miyake N, Nishimura G, Matsumoto N. Aortic aneurysm and craniosynostosis in a family with Cantu syndrome. **Am J Med Genet Part A** 164(1):231-236, 2014.
- *Takanashi JI, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Inoue K, Matsumoto N, Barkovich JA. Different patterns of cerebellar abnormality and hypomyelination between POLR3A and POLR3B mutations. **Brain Dev** 36(3):259-263, 2014.
- Nakamura K, Jinnou H, Yokochi K, Okanishi T, Enoki H, Ohki S, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake M, Matsumoto N, Saitsu H*. A de novo *CASK* mutation in pontocerebellar hypoplasia type 3 with early myoclonic epilepsy and tetralogy of Fallot. **Brain Dev** 36(3): 272-273, 2014.
- Kutuk MS, Balta B, Kodera H, Matsumoto N, *Saitsu H, Doganay S, Canpolat M, Dolanbay M, Unal E, Dundar M. Is there relation between COL4A1/A2 mutations and antenatally detected fetal intraventricular hemorrhage? **Childs Nerv Syst** 30(3):419-424, 2014.
- Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Hideo Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, *Miyake N. A hemizygous *GYG2* mutation causes Leigh syndrome. **Hum Genet** 133 (2):225-234, 2014

2. 学会発表

- 第 37 回日本小児遺伝学会学術集会・シンポジウム・松本直通「次世代シーケンサー解析のポテンシャルと小児医療」平成 26 年 4 月 10 日名古屋市立大学桜山キャンパス・名古屋
- The 9th Cherry Blossom Symposium. Symposium 4 “Clinical testing and automation utilizing new technology” Naomichi Matsumoto “Next generation sequencing dissecting human genetic diseases” Yokohama Red Brick Warehouse No. 1, April 19, 2014
- 第 382 回医学研究の基礎を語り合う集い・松本直通「遺伝性疾患におけるエクソーム解析の有用性」平成 26 年 4 月 21 日東京慈恵医科大学九州大学産婦人科セミナー・松本直通「ゲノム解析と医療：1000 ドルゲノム時代を迎えて」平成 26 年 5 月 21 日第二博多借成ビルアイクレオ信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所設立記念講演会・記念講演会・松本直通「ゲノム解析と医療：1000 ドルゲノムシーケンス時代を迎えて」平成 26 年 5 月 25 日・信州大学医学部・松本
- 第 55 回日本神経病理学会総会学術集会・松本直通（シンポジスト）「WDR45 mutations cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood」@シンポジウム 1 (English) 「Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA)：急速に広がる疾患概念」平成 26 年 6 月 7 日学術総合センター藤田保健衛生大学遺伝子網羅的解析センター開所記念セミナー・特別講演「ゲノム解析と医療：1000 ドルゲノム時代を迎えて」平成 26 年 6 月 21 日@藤田保健衛生大学・豊橋

第110回日本精神神経学会学術総会・松本直通（シンポジスト）「発達障害のゲノム解析」シンポジウム 50「精神疾患における分子と臨床の架け橋～病因と治療」2014年6月27日パシフィコ横浜、横浜

がん研臨床試験・研究センター 第12回臨床研究セミナー松本直通「遺伝性疾患のゲノム解析---1000ドルゲノム時代を迎えて---」2014年7月3日がん研究会・東京

横浜市立大学先端医科学研究センター市民講座・松本直通「難病を解き明かすヒト全遺伝子・全ゲノム解析」2014年8月7日ウィリング横浜・横浜
文部科学省イノベーションシステム整備事業先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム「翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」第5回公開シンポジウム・松本直通「ヒト発生・発達異常の分子探索と診断法の開発」2014年8月19日・県民共済みなとみらいホール・横浜

KOBE 内分泌・代謝スキルアップセミナー特別講演・松本直通・「ゲノム解析と医療---1000ドルゲノム時代を迎えて---」平成26年8月23日@ホテルクラウンパレス神戸

第17回胎児遺伝子診断研究会・セミナー1・松本直通「次世代シーケンサーの活用法」平成26年11月7日@ハウステンボス・佐世保

第56回日本先天代謝異常学会総会・松本直通・シンポジスト・「次世代シーケンサーによる遺伝子解析」平成26年11月14日@江陽グランドホテル・仙台

日本人類遺伝学会第59回大会・松本直通・シンポジスト「次世代シーケンサーを用いた染色体・ゲノム構造異常解析」平成26年11月21日@タワーホール船堀・東京

日本人類遺伝学会第59回大会・松本直通・NPG ランチセミナー「人類遺伝学研究におけるデータ

ベースの重要性」平成26年11月22日@タワーホール船堀・東京

The 37th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Matsumoto N (as a symposist). “Congenital intellectual disability syndromes arising from mutations of epigenetic regulators” in the symposium for epigenetic dysregulation and disease. Pacifico Yokohama, Yokohama, Nov 27, 2014.

平成26年度報告会・松本直通「TUBB4A 変異による先天性白質形成不全症」・精神・神経疾患研究開発費（佐々木班）・平成26年11月30日・NCNP

平成26年度報告会・松本直通「Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子探索」精神・神経疾患研究開発費（後藤班）・平成26年12月9日・NCNP

日本遺伝子診療学会：遺伝子診断・検査技術推進フォーラム公開シンポジウム 2014「個別化医療を進めるために」ランチセミナー・松本直通「臨床に役立つ次世代シーケンサーの活用法」・平成26年12月12日・コクヨホール（品川）

H. 知的財産権の出願・登録状況

PCT/JP2014/065217 (2014年6月9日)「重度の知的障害及び運動発達遅滞を伴う難治性てんかんの検出方法」松本直通・才津浩智

指定国移行日本のみ特願 2013-552406 (2014年7月14日)「コフィン・シリリス症候群の検出方法」松本直通・三宅紀子・鶴崎美徳

指定国移行 (JST 採択) 日本・特願 2013-542930 (移行日 2014年4月24日)・米国・14/357,373 (2014年5月9日)「孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法」松本直通・才津浩智

特許第 5608863 号「新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法」松本直通・才津浩智 (2014年9月12日登録・日本)

特願 2013-252720・鶴崎美徳 / 松本直通・

「Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子診断法」・平成
25 年 12 月 6 日

PCT/JP2013/71620・松本直通／三宅紀子・ミトコ
ンドリア複合体 III 欠乏症患者又は保因者の検出
方法・平成 25 年 8 月 9 日・平成 26 年 2 月 7 日

特願 2013-157339 号 松本直通／三宅紀子・ケトン
血症を伴うリー脳症患者または保因者の検出法。
平成 25 年 7 月 31 日

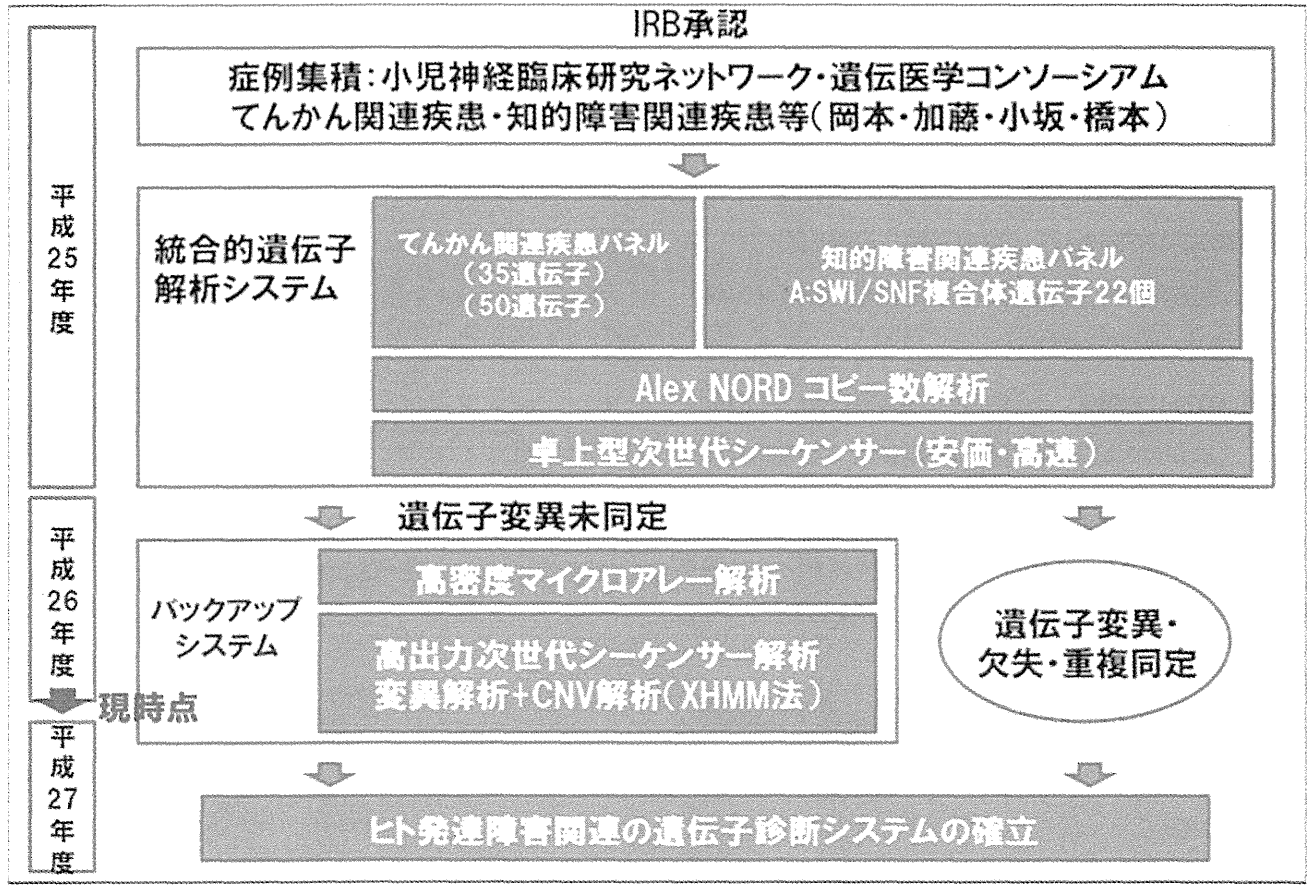
特願 2013-123660 才津浩智／松本直通・小児期の
てんかんおよび不随意運動をきたす疾患の検出
方法・平成 25 年 6 月 12 日

PCT/JP2012/83113 松本直通／鶴崎美徳／三宅紀
子・コフィン-シリス症候群の検出方法・平成
24 年 12 月 20 日

PCT/JP2012/77903 才津浩智／松本直通・孔脳症又
は脳出血のリスクを予測する方法・平成 24 年 10
月 29 日

特願 2012-180356・松本直通／三宅紀子・ミトコン
ドリア複合体 III 欠乏症の確定診断法・平成 24
年 8 月 16 日

研究全体の流れと進行状況



厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

「統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究」
(主任研究者 横浜市立大学大学院環境分子医科学 松本直通)

K B G 症候群の臨床的研究

研究分担者 大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科岡本伸彦

研究要旨

K B G 症候群は、常染色体優性遺伝の先天異常症候群である。巨歯、特異顔貌、低身長、骨格異常、様々な程度の知的障害や発達障害を伴う。16q24 に座位する *ANKRD11* (Ankyrin repeat domain-containing protein 11) が疾患責任遺伝子である。

近年、マイクロアレイ染色体検査や次世代シーケンサーによる解析で *ANKRD11* 遺伝子欠失や変異が同定される場合もあり、本症候群の報告が増加している。自験例 3 症例を通じて、K B G 症候群の臨床像を把握し、的確な診断を行い、医学的管理をすすめる指針を検討した。

共同研究者

大阪府立母子保健総合医療センター遺伝
診療科

松田圭子、山本悠斗、吉井啓示、三島祐
子

A. 研究目的

K B G 症候群 (#148050 KBG syndrome
Macrodonia, mental retardation,
characteristic facies, short stature,
and skeletal anomalies) は、常染色体優
性遺伝の先天異常症候群である。KBG は最
初の報告の患者のイニシャルである。巨
歯、特異顔貌、低身長、骨格異常、様々
な程度の知的障害や発達障害を伴う。
16q24 に座位する *ANKRD11* (Ankyrin
repeat domain-containing protein 11)

が疾患責任遺伝子である (Sirmaci et
al.)。塩基置換、遺伝子内微小欠失、
16q24.3 微小欠失例などが報告されてい
る。

従来、KBG 症候群の報告例は少なく、遺
伝子レベルで変異の証明に至った例はさ
らに稀である。

近年、マイクロアレイ染色体検査次世
代シーケンサーによる解析で *ANKRD11* 遺
伝子変異や欠失が同定される場合もある。

自験例 3 症例を通じて、K B G 症候群
の臨床像を把握し、的確な診断を行い、
医学的管理をすすめる指針を作成するこ
とが本研究の目的である。

B. 研究方法

検討対象は、大阪府立母子保健総合医
療センター遺伝診療科受診中の症例で、

主任研究者の横浜市立大学で遺伝学的検査を行い、K B G症候群の診断にいたった3症例である。成長発達の評価や合併症の評価を実施した。

解析にあたっては遺伝カウンセリングを行い、書面で同意を得た。

C. 研究結果

【症例1】7歳男児

低出生体重児で、新生児一過性多呼吸を認めた。精神運動発達遅滞は遅れ、3歳で歩行開始となった。4歳時、体重 13.3 kg (-1.4 SD), 身長 100.6 cm (-0.3 SD), 頭囲 51.5 cm (0.6 SD) であった。特異顔貌、巨歯を認めた。短指、骨年齢遅延、側彎症を認めた。一般血液検査、G分染法では異常を認めなかった。頭部MRIで小脳低形成を認めた。脳波で多焦点性棘波を認めたが、あきらかなてんかん発作は現時点で認めていない。

知的障害の精査目的で大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科を紹介された。特異顔貌と巨歯からK B G症候群を疑い、マイクロアレイ染色体検査を行った。

ANKRD11 遺伝子を含む微細欠失を認めた (Miyatake et al. Am J Med Genet A. 2013)。

【症例2】10歳男児

満期産正出生体重児で、周産期に特記事項なし。運動発達は問題なかったが、言語遅滞を認めた。体格は標準的であった。特異顔貌、巨歯を認めた。短指、骨年齢遅延を認めた。頭部MRI、脳波に異常なく、てんかん発作は現時点で認め

ていない。乱視であった。

言語遅滞にくわえ、こだわりの強さ、社会性の遅れを認め、自閉症スペクトラムの基準を満たした。

当初、歌舞伎症候群の疑いをもたれ、精査目的で紹介となった。歌舞伎症候群としては非典型的であった。次世代シーケンサー解析の結果、*ANKRD11* 遺伝子変異が同定された。

【症例3】2歳女児

精神運動発達遅滞の精査目的で受診。早産低出生体重児で、周産期に特記事項なし。乳児期に點頭てんかんを発症した。脳波は全般性高振幅棘波徐波を認めた。精神運動発達遅滞を認め、2歳で未歩行、有意語なしである。体格は標準的であった。特異顔貌、巨歯を認めた。頭部MRIで脳梁脂肪腫を認めた。

點頭てんかんの責任遺伝子同定目的で次世代シーケンサー解析の結果、*ANKRD11* 遺伝子変異が同定された。

D. 考察

K B G症候群の3症例を経験した。国内での報告例は稀であるが、1施設で3症例を経験したということは、潜在的な症例の存在を示唆するものである。症例1はK B G症候群を当初から疑ったが、症例2と3は次世代シーケンサー解析で変異が同定され、臨床的な再評価後にK B G症候群で矛盾がないと判断した。しかし、表現型の多様性が顕著であった。

(1) 特異顔貌

3症例とも顔貌所見はK B G症候群と矛

盾しなかった。

乳幼児期は円形顔貌であるが、成長すると三角顔になる。眼間開離、内眼角外方偏位、幅広い眉毛、長い眼瞼裂、平坦な鼻梁、鼻翼低形成上向きの鼻孔、長い人中、小顎、薄い上口唇、弓型の上口唇を認める。

歯異常（巨歯、特に門歯および側切歯がめだつ、幅広い上顎門歯、切歯癒合、乏歯症）はK B G症候群の大きな特徴である。乳歯の段階で特徴を認めていた。

K B G症候群では小頭症を伴うとされるが、3症例では顕著な小頭は認めなかった。

（2）精神運動発達について

K B G症候群ではほとんどの例で軽度ないし中等度の精神遅滞を伴うとされる。重度の例も存在する。*ANKRD11*を含む微細欠失単一遺伝子異常の場合と比較して合併症の状況や障害の重要度に明確な差がないといわれているが、症例1は微細欠失例で重度精神運動発達遅滞であった。症例2は軽度精神運動発達遅滞と自閉症を合併した。K B G症候群では自閉症スペクトラム障害の合併が多いとされる。自閉症の基礎疾患で注意が必要と考えられる。症例3も重度であった。點頭てんかんを併発したことが要因と考えられた。

（3）神経系合併症

K B G症候群では、全般性強直間代けいれんなど、てんかんの合併例も見られる。症例3は點頭てんかんを認めた。K B G症候群での點頭てんかん合併は非常に稀と考えられるが、點頭てんかんの基

礎疾患として考慮に入れる必要があると思われる。

K B G症候群の頭部MRIでは脳室拡大、脳梁形成異常などの報告がある。症例1は小脳虫部低形成であった。症例3は脳梁脂肪腫という稀な所見を認めた。脳梁脂肪腫はPai症候群において有名な所見である。Pai症候群は責任遺伝子は不明である。Pai症候群とK B G症候群との関連について今後の検討が必要と思われる。

（4）身体発育について

低身長は必発ではないが、多くの例で認め、受診のきっかけとなることがある症状である。一部の例は子宮内発育遅延である。今回の3症例では低身長は顕著でなかったが、一部の例で骨年齢遅延を認めた。

（5）骨格系所見

短指、第5指彎曲、側彎や後彎など肋骨脊椎異常を認める。X線所見 骨年齢遅延、脊椎異常（前方切痕、椎間板低形成、ブロック脊椎、椎体骨癒合、椎弓異常）などを認める。股関節異常やペルテス病の例もある。症例1は側彎を認めた。

（6）その他の合併症

K B G症候群では時に難聴の合併も見られる。今回の3症例で難聴はなかったが、K B G症候群では聴力検査が必要である。

K B G症候群では一部の例で先天性心疾患を合併する。従って、K B G症候群を疑った場合、先天性心疾患の精査をおこなうべきである。

男児では停留精巣も時にみられる合併症である。

(7) 鑑別診断

K B G 症候群では高口蓋、粘膜下口蓋裂、二分口蓋垂、鼻咽腔閉鎖不全などの口蓋異常を認めることがある。従って 22q11.2 欠失症候群と鑑別が必要である。

K B G 症候群でも逆三角形頭部や第 5 指彎曲を認める。低身長の場合、シルバー・ラッセル症候群の特徴を満たす可能性があり、注意する。

コルネリア・デランゲ症候群、歌舞伎症候群やコフィン・サイリス症候群との類似点もある。

E. 結論

K B G 症候群の報告例は少ないが、未診断例が存在する可能性が高い。精神運動発達遅滞、自閉症状に加え、特異顔貌、骨格所見、歯の所見が参考になる。

先天性心疾患やてんかんの合併例があるので、K B G 症候群を疑った場合は的確な合併症の精査が必要である。

参考文献

Sirmaci A, Spiliopoulos M, Brancati F, et al.
Mutations in ANKRD11 cause KBG syndrome, characterized by intellectual

disability, skeletal malformations, and macrodontia.

Am J Hum Genet. 2011 Aug
12;89(2):289-94.

Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Sakamoto M, Miyake N, Saito H, Matsumoto N. A de novo deletion at 16q24.3 involving ANKRD11 in a Japanese patient with KBG syndrome. Am J Med Genet A. 2013; 161A:1073-7.

Ockeloen CW, Willemsen MH, de Munnik S, et al. Further delineation of the KBG syndrome phenotype caused by ANKRD11 aberrations.

Eur J Hum Genet. [Epub ahead of print]

F. 研究発表

1. 論文発表

別途参照

2. 学会発表

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

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

分担研究課題：年齢依存性てんかん性脳症の遺伝型と臨床型の関連性の解明

分担研究者 加藤光広 山形大学医学部小児科学講座

研究要旨：

PIGA は GPI(glycosyl-phosphatidyl-inositol)アンカーの最初の生合成ステップに関わり、モザイク変異により発作性夜間血色素尿症を引き起こす。最近、先天性 *PIGA* 変異の1家系男児3例が報告された。年齢依存性てんかん性脳症の患者172例について全エクソーム解析を行い、孤発男性3例と兄弟2例において4種類のヘミ接合性 *PIGA* 変異を同定した。孤発例3例は兄弟例2例と比較してより重症であった。重症例ではミオクロヌスとサプレッションバースト、高アルカリフォスファターゼ血症が認められ、Schinzel-Giedion 症候群と類似する特異顔貌や外表・内臓奇形を呈し、MRI では髄鞘化遅延と脳幹・基底核・視床・深部大脳白質の拡散制限パターンが特徴的であった。末梢血を用いた CD16 発現の FACS 解析が診断に有用である。年齢依存性てんかん性脳症においても *PIGA* 変異など先天性 GPI アンカー欠損症に留意する必要がある。

A. 研究目的

年齢依存性てんかん性脳症は、発達期に応じた特徴的なてんかん発作と脳波所見を呈し、認知機能や運動障害などの発達障害を併発する。新生児期に発症する大田原症候群と乳児期に発症するウエスト症候群はその代表的疾患であり、私たちはこれまでに *ARX*, *STXBPI*, *SPTAN1*, *KCNQ2* など複数の原因遺伝子を明らかにしてきた。

近年、年齢依存性てんかん性脳症において、GPI(glycosyl-phosphatidyl-inositol)アンカー欠損症の報告が散見される。GPI アンカーは、細胞表面タンパク質を細胞膜につなぎとめる糖脂質である。GPI アンカーの生合成とリモデリングには複数の遺伝子が関与し、最初の生合成ステップに関わる *PIGA* の造血幹細胞系列の後天的体細胞モザイク変異では発作性夜間血色素尿症をきたす。その一方、その他の先天性の GPI アンカー欠損症(*PIGM*, *PIGV*, *PIGN*, *PIGL*, *PIGO*, *PIGT*, *PGAP2*)では、てんかん性脳症の主症状であるてんかん発作と知的障害、運動障害の他に、顔貌異常などの外表奇形や骨格異常、心臓や腎尿路、消化管などの内臓奇形など多彩な症状が報告されている。最近、過成長と特異顔貌、ミオクロヌバーストを認める先天性 *PIGA* 変異の1家系男児3例が報告された(Johnston JJ, et al. *Am J Hum Genet* 2012)。

本研究では、てんかん性脳症の患者群における

PIGA 遺伝子変異の寄与とその臨床型を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

保護者の承諾を得て、脳形成異常や代謝異常、周産期障害による明らかな原因を除外された年齢依存性てんかん性脳症の患者172例(大田原症候群50例、早期ミオクロニー脳症2例、ウエスト症候群50例、乳児移動性部分発作7例、分類不能の乳児期発症てんかん性脳症63例;男90例、女82例)の末梢血リンパ球からDNAを抽出し、SureSelectXT Human All Exon Kitを用いて全エクソン領域をキャプチャー後、Illumina HiSeq2000を用いてシーケンスを行ない、*PIGA* 変異の有無を確認した。次世代シーケンサーで認められた *PIGA* 変異は Sanger 法で変異を再確認し、同意が得られた母親の血液からDNAを抽出し保因者の判定を行った。また GPI アンカー型タンパク質の細胞表面への発現を調べるため、*PIGA* 変異陽性患者と正常対照の末梢血を FLAER と CD59, DAF, CD16, CD24, CD48 に対する各抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーによる FACS 解析を行った。さらに、*PIGA* 変異の機能解析として、プロモーターの強さが異なるベクターを用いて *PIGA* 欠損 JY5 細胞に野生型と変異型の *PIGA* cDNA を移入し、GPI アンカー型タンパク質の発現および *PIGA* タンパク質レベルを調べた。また、変異陽性例の臨床情

報（発作型・脳波・頭部MRI・使用薬剤と効果・併発症など）を収集し、遺伝型、機能解析結果と比較した。

C. 研究結果

孤発例3例と兄弟の2例において4つのヘミ接合性 *PIGA* 変異を同定した。1例の c.1234C>T [p.R412X] 変異は既報告と同一であった。他の3つのミスセンス変異 (c.230G.T [p.R77L], c.616A.T [p.I206F], c.355C.T [p.R119W]) は過去に報告のない新しい変異で、母も同じ変異を有していた。

変異症例の臨床情報のまとめを表に示す。症例1は特異顔貌、水腎水尿管症、肝芽腫の併発から Schinzel-Giedion 症候群として以前報告された (Watanabe S, et al. Brain Dev 34:151-155, 2012)。頭部MRIでは、症例1, 2, 5の孤発例3例において脳幹、基底核、視床、深部白質に拡散強調画像で高信号域、ADCマップで低信号域が認められた。症例3, 4の兄弟例では頭部MRIは正常であった。症例1, 2, 5の脳波でサブプレッションバーストもしくは類似所見が認められたのに対し、症例3, 4ではサブプレッションバーストは認められなかった。

5例ともCD16の細胞表面への発現が、正常の5-15%と著しく低下していた。プロモーターの強さの異なるベクターを用いた強制発現では、野生型 cDNA および強いプロモーターを用いた変異型 cDNA ではCD59, DAF, CD48の細胞表面への発現が回復したが、短縮された *PIGA* ではそれらの発現が回復されなかった。弱いプロモーターが組み込まれたベクターでは野生型のみCD59, DAF, CD48の発現が回復し、変異型および短縮された *PIGA* では回復されなかった。強いプロモーターのR412X変異型 cDNA を導入した細胞では、*PIGA* の弱い発現が認められた。

D. 考察

てんかん性脳症の発端者172家系中4家系5例に、*PIGA*変異を同定した。*PIGA*の座位はXp22.2に位置し、予想通り患者は全例男性であり、男性における変異頻度は4.4%(4/90)であった。症例1, 2, 5の孤発例3例は特異顔貌、難治性てんかん、頭部MRI異常、重度の知的障害と運動障害を呈し、兄弟例2例と比較してより重症であった。重症例では、既報告と同じくミオクロノスとサブプレッションバースト、高アルカリフォスファターゼ血症が認められ、*PIGA*変異例に特徴的な所見と考えられた。既報告と同じナンセンス変異p.R412Xが同定

された症例1は、出生時頭囲の増大、より早期発症の難治性てんかん、呼吸管理を必要とし早期死亡につながる重度呼吸障害など、既報告例3例と同様に、ミスセンス変異例に比べてより重症であった。*PIGA*の完全欠損は雄マウスでは胎生9日に致死となるが、今回の発現実験ではR412Xの顆粒球でGPIアンカー型タンパク質は減少しているが発現が認められた。強いプロモーターでは発現が正常レベルに回復していることから、ストップコドンの読み過ぎしリードスルーによって少量の完全長*PIGA*タンパク質が産生され部分的に機能していると考えられる。

兄弟例p.R77Lは、特異顔貌はなく運動障害も軽度で、発作の開始時期も遅く、脳波も発症時は正常で、頭部MRIにも異常を認めず、高アルカリフォスファターゼ血症はなく、比較的軽症であった。FACS解析では、R412X変異の症例1、R119Wの症例5と異なり、CD16の発現のみが低下し、弱いプロモーターを用いた解析でもR412X変異と比べて、DAFとCD48の発現が多く、機能解析の結果と一致していた。臨床的な重症度は*PIGA*タンパク質の残存活性に比例すると推測される。

大脳白質の髄鞘化遅延と白質、脳梁の低形成、軽度の脳萎縮、軽度の小脳低形成は*PIGN*, *PGAP2*, *DPM1*, *DPM2*など他の先天性GPIアンカー欠損症でも報告されているが、重症例3例で認められた頭部MRIの拡散強調画像とADCマップの異常信号はこれまで報告がない。類似所見は非ケトン性高グリシン血症、フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、リー脳症、乳児神経軸索ジストロフィー、ウイルソン病、異染性白質ジストロフィー、カナバン病など特異的な先天性代謝異常症でも認められる。特に、非ケトン性高グリシン血症は早期ミオクロノス脳症の併発が多く、ミオクロノスと脳波でサブプレッションバーストを示す点が*PIGA*変異例と臨床的にも類似しており、共通の病態が推測される。

症例1はSchinzel-Giedion症候群と共通の臨床所見を示していた。*SETBP1*変異を有さないSchinzel-Giedion症候群の症例においては、*PIGA*変異もしくは他の先天性GPIアンカー欠損症が隠れている可能性がある。

E. 結論

PIGA 変異は様々なタイプの乳児期発症てんかん性脳症をきたし、特にミオクロノスと脳波でサブプレッションバーストを示すSchinzel-Giedion 症候群と類似する特異顔貌や

外表・内臓奇形を呈し、MRI では髄鞘化遅延と脳幹・基底核・視床・深部大脳白質の拡散制限パターンが特徴的である。末梢血を用いた CD16 発現の FACS 解析が診断に有用である。年齢依存性てんかん性脳症においても *PIGA* 変異など先天性 GPI アンカー欠損症に留意が必要である。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saitsu H, Tohyama J, Walsh T, Kato M, Kobayashi Y, Lee M, Tsurusaki Y, Miyake N, Goto YI, Nishino I, Ohtake A, King MC, Matsumoto N: A girl with West syndrome and autistic features harboring a *de novo* *TBL1XR1* mutation. *J Hum Genet* 59:581-583,2014.
- 2) Ohba C, Kato M, Takahashi S, Lerman-Sagie T, Lev D, Terashima H, Kubota M, Kawawaki H, Matsufuji M, Kojima Y, Tateno A, Goldberg-Stern H, Straussberg R, Marom D, Leshinsky-Silver E, Nakashima M, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H: Early onset epileptic encephalopathy caused by *de novo* *SCN8A* mutations. *Epilepsia* 55:994-1000,2014.
- 3) Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita T, Saitsu H, Matsumoto N: Novel compound heterozygous *PIGT* mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. *Neurogenetics* 15:193-200,2014.
- 4) Nakamura K, Kato M, Tohyama J, Shiohama T, Hayasaka K, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H: *AKT3* and *PIK3R2* mutations in two patients with megalencephaly-related syndromes: MCAP and MPPH. *Clin Genet* 85:396-8,2014.
- 5) Leventer RJ, Jansen FE, Mandelstam SA, Ho A, Mohamed I, Sarnat HB, Kato M, Fukasawa T, Saitsu H, Matsumoto N, Itoh M, Kalnins RM, Chow CW, Harvey AS, Jackson GD, Crino PB, Berkovic SF, Scheffer IE: Is focal cortical dysplasia sporadic? Family evidence for genetic susceptibility. *Epilepsia* 55:e22-6,2014.
- 6) Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N: *PIGA* mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology* 82:1587-96,2014.

学会発表

- 1) Mitsuhiro Kato: Interneuronopathies and genetics of the epileptic encephalopathies. 10th Asian & Oceanian Epilepsy Congress: Singapore, August 7-10, 2014 (invited lecture)
- 2) Jun Tohyama, Noriyuki Akasaka, Yu Kobayashi, Shinichi Magara, Hideshi Kawashima, Mitsuhiro Kato, Naomichi Matsumoto, Hiroto Saitsu: Genetic analysis in infantile epileptic encephalopathies with movement disorder: a single center study. 11th European Congress on Epileptology: Stockholm, Sweden June 29 - July 3, 2014
- 3) M. Kato, H. Saitsu, H. Osaka, K. Nakamura, T. Watanabe, H. Terashima, T. Ikeda, T. Kumada, H. Matsumoto, T. Yamaguchi, J. Azuma, Y. Tominaga, M. Shinpoo, H. Arai, S. Hirai, S. Takeshita, E. Nakagawa, H. Uchio, Y. Nonoda, T. Iwasaki, T. Chiyonobu, A. Sudo, S. Kimura, Y. Takami, Y. Inaba, T. Wada, S. Kumada, M. Shimono, S. Miyama, K. Orii, N. Akasaka, J. Tohyama, M. Kubota, M. Nakashima, N. Matsumoto: Epilepsy in *STXBP1* encephalopathy: Clinical delineation of 32 Japanese patients including 14 novel patients. 68th American Epilepsy Society Annual Meeting, December 5-9, 2014, Seattle, USA
- 4) J. Tohyama, M. Nakashima, Z. Rener, Primec, C. Gaik-Siew, S. Nabatame, M. Kato, N. Matsumoto, H. Saitsu: Distinct Phenotypes And Genotypes Of *SPTAN1* Encephalopathy. 68th American Epilepsy Society Annual Meeting, December 5-9, 2014, Seattle, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 *PIGA* 変異例の臨床所見

症例	1	2	3	4	5	IV-2	IV-4
Familial or sporadic	Sporadic	Sporadic	Familial (Proband)	Familial (Brother)	Sporadic	Familial (Proband)	Familial (Brother)
Mutation	c.1234C>T (p.R412X)	c.616A>T (p.I206F)	c. 230G>T (p.R77L)	c. 230G>T (p.R77L)	c.355C>T (p.R119W)	c.1234C>T (p.R412X)	c.1234C>T (p.R412X)
Current age	Six years	10 years	Eight years	18 months	15 months	Died at 11 weeks	Died at 10 weeks
Sex	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male
Clinical diagnosis	Ohtahara syndrome, early myoclonic encephalopathy, Schinzel–Giedion syndrome	West syndrome with hypomyelination	Early-onset epileptic encephalopathy	Early-onset epileptic encephalopathy	West syndrome		
Polyhydramnios	+	-	-	-	+	-	+
Gestation	33 weeks	40 weeks	38 weeks	36 weeks	39 weeks	full term	35 weeks
Birth weight	2,857 g	3,566 g	2,715 g	1,896 g	3,468 g	3,540 g	3,500 g
Birth length	42.0 cm	50 cm	50 cm	N.D.	47 cm	53.5 cm	48 cm
Birth head circumference	33.2 cm	N.D.	32.5 cm	N.D.	33.5 cm	37 cm	35.5 cm
Facial dysmorphism	+	+	-	-	+	+	+
Vesicoureteral reflux	+	N.D.	-	-	N.D.	+	N.D.
Joint contractures	+	+	-	-	-	+	+
Hypotonia	+	-	-	-	+	+	+
Hyperreflexia	N.D.	-	-	-	+	+	+