

| | | | | | | | |
|-------------------------------------|--|---|--|--|---|--------------------|---------------------------|
| Seizure onset | One month | Three months | Seven months | Seven months | Three months | Neonate | Neonate |
| Seizure types | Tonic seizures followed by frequent myoclonus | Myoclonus or epileptic spasm-like movement | Tonic seizures, secondarily generalized seizures | Tonic or clonic seizures | Myoclonic seizures, tonic spasms | Myoclonic seizures | Severe myoclonic seizures |
| EEG findings | Suppression burst at neonatal period | Hypsarrhythmia at 3 months, periodic bursts of multifocal epileptic discharges similar to suppression burst pattern at 10 years | Normal at 7 months, irregular spike-and-slow wave and multifocal spikes at 2 and 5 years | Normal at 7 months | Hypsarrhythmia at 3 months, suppression burst at 5 months | Suppression burst | Suppression burst |
| Seizure prognosis | Intractable | Intractable | Seizure-free at 3 years with TPM | Seizure free at 15 months | Intractable | Intractable | Intractable |
| Development | Hypotonic quadriplegia, profound intellectual disability | Spastic quadriplegia, profound intellectual disability | Profound intellectual disability with autism, but no motor disturbance | Moderate intellectual disability, but no motor disturbance | Hypotonic quadriplegia, profound intellectual disability | Early death | Early death |
| Thin corpus callosum | + | + | - | - | +(at 9 months) | + | + |
| White matter immaturity | + | + | - | - | +(at 9 months) | + | + |
| Restricted diffusion pattern | + | + | - | - | + | N.D. | N.D. |
| Elevated serum alkaline phosphatase | N.D. | + | - | - | + | N.D. | + |

分担研究課題：Cerebral Folate Transport Deficiency の同胞例

分担研究者 小坂仁

自治医科大学小児科

研究協力者 露崎悠、新保裕子 神奈川県立こども医療センター神経内科

研究要旨：

治療可能発達遅滞および自閉症の原因として、Cerebral Folate Transport Deficiency の同胞例を報告する。エクソーム解析にて FOLR1 遺伝子に c. 374G>T p. Arg125Leu および c. 466 T>G p. Trp156Gly のコンパウンドヘテロの遺伝子異常を認めた。髄液中の葉酸値は兄妹ともに測定感度以下であり、フォリン酸投与により、歩行が安定化し、発語も改善を認めた。この疾患の臨床症状は、発達遅滞、小脳失調症、てんかんなど非特異的であり、血清中の葉酸値も正常であるため診断は難しい。治療が有効であるため、早期診断のシステムの構築が望まれる。

A. 研究目的

葉酸の細胞内取り込みに関連する輸送体は reduced folate carrier (RFC, SLC19A1) と folate receptor α (FR α)、*SLC46A1* 遺伝子にコードされる PCFT の 3 種類が主要な分子である。FR α は近位尿細管上皮、脈絡叢などに発現し、FR α に葉酸が結合するとエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれる。FOLR1 遺伝子が Folate Receptor alpha (FR α) をコードしており、FR α 異常は cerebral folate transport deficiency (CFTD) の原因となる (図 1)

この疾患では、フォリン酸内服が有効であるが症状は、発達遅滞、小脳失調、てんかんなど非特異的であり、診断確定例は少ない。今回エクソーム解析により診断された例を経験したので報告する。

B. 症例

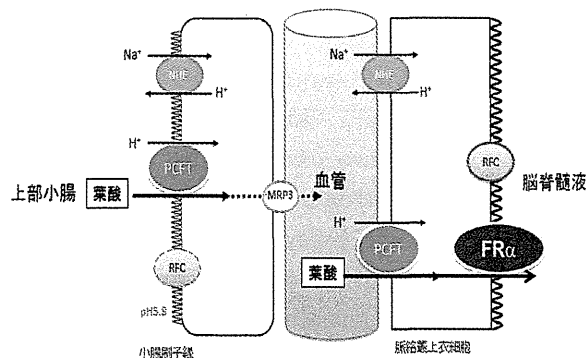
両親は非血縁者の日本人である。兄は 17 歳男児であり、妊娠分娩歴に異常なし。15 ヶ月より歩行開始。2 歳で失調歩行、言語発達遅滞を認め、てんかんを発症した。VPA, CBZ, ZNS, CZP を内服しても 1 日数回の痙攣が続いた。10 歳時小脳失調と痙攣性対麻痺のため歩行できなくなり、MRI では大脳、小脳の萎縮、右前頭葉皮質下石灰化を認めた。妹は、14 歳女児である。妊娠分娩歴に特記事項なし。2 歳までは発達正常であった。徐々に失調歩行となり、企図振戦と不明瞭言語が認められた。10 歳時に無熱性痙攣があり、脳波異常を認め、てんかんと診断した。14 歳時失調歩行は増悪し、MRI にて小脳萎縮を認めた。

C. 研究結果

インフォームドコンセントを得た後、全エクソーム解析を行ったところ FOLR1 遺伝子に c. 374G>T p. Arg125Leu および c. 466 T>G p. Trp156Gly のコンパウンドヘテロの遺伝子異常を認めた。この結果を受けて髄液採取を行ったところ葉酸値；5 MTHF (Methyltetrahydrofolic acid) は兄妹ともに 0.0 (nmol/l ; normal control; 41-117) であり診断が確定した。

治療後の経過

兄；フォリン酸 1mg/kg/日から内服開始し 5mg/kg/日に増量した。内服開始薬 3 週間で、少しの介助で歩行できるようになり、発語も増加した。痙攣発作も減少傾向。
妹；内服して約 1 ヶ月で、走れるようになる。



NHE: Na⁺/H⁺ exchanger
MRP3: Multidrug resistance-associated protein 3
RFC: reduced folate carrier
proton-coupled folate transporter (PCFT): 先天性葉酸吸収不良
folate receptor α (FR α): 大脳葉酸欠乏症

Tsujii&Osaka
日本臨床2013
より改変

図 1、葉酸の吸収に関わる蛋白と対応する疾患

作業療法での細かい作業のスピードも速くなり、2ヵ月後には、質問には“やだ、うん”、などの単調な答えであったのが、“乗らない”、“行かない”など自らの言葉で答えられるようになる、などの改善を認めた。また髄液中5MTHF値は、兄75.2、妹；113.3と正常化した。

D. 考察

FR α 異常による Cerebral folate deficiency では、髄液葉酸値は低下するが、腸管吸収は正常であるため血清葉酸値は維持される。このため診断は難しい。本症例のように、治療薬への反応が良いため早期発見、治療が望まれる。

E. 結論

統合的遺伝子解析システムから見出される疾患群の中には、治療可能なものも含まれる。それらの早期発見システムの構築も平行して進める必要性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? Hum Genet 2014 ; 133 : 225-34
2. Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H. Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. Pediatr Radiol. 2014; 53: 448-58
3. Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. JIMD Rep. 2014 ; 12 : 65-9
4. Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A Novel Two-Nucleotide Deletion in the ATP7A Gene Associated With Delayed Infantile Onset of Menkes Disease. Pediatr Neurol. 2014; 50: 417-20
5. Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. Mol Genet Metab Report, 2014; 1:133-138.
6. Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. Pediatr Neurol. 2014 Jan;50(1):99-100.
7. Nakashima M, 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. 2014 Aug;59(8):471-4.
8. Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. Neurology. 2014 Jun 17;82(24):2230-7.
9. Kouga T, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Yamakawa K, Osaka H. Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome. Brain Dev. 2014 May 9.
10. 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. 2014 May 6;82(18):1587-96.
11. van de Kamp J, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren S, Mancini G, Steinberg S, Salomons G. Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. Clin Genet 2014 Mar 5. doi: 10.1111/cge.12355. [Epub ahead of

- print]
12. Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K. Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol*. 2014 Apr;261(4):752-8.
 13. Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels. *Epilepsia*. 2014 Feb;55(2):e13-7.
 14. Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. *Stem Cell Reports*. 2014 Apr 24;2(5):648-61.
 15. Tamaura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. *Brain Dev*. 2014 Aug 7. pii: S0387-7604(14)00185-5. doi: 10.1016/j.braindev.2014.07.008. [Epub ahead of print]
 16. Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. *J Hum Genet*. 2014 Dec 4. doi:10.1038/jhg.2014.103. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25471517.
 17. 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 an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Creeleukoencephalopathy. *Brain Dev*. 2014 Oct 27. pii: S0387-7604(14)00250-2. doi:10.1016/j.braindev.2014.10.002. [Epub ahead of print]
 18. Niwa T, Aida N, Osaka H, Wada T, Saitsu H, Imai Y. Intracranial Hemorrhage and Tortuosity of Veins Detected on Susceptibility-weighted Imaging of a Child with a Type IV Collagen $\alpha 1$ Mutation and Schizencephaly. *Magn Reson Med Sci*. 2014 Dec 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25500781.
- 雑誌
- 1) 小坂 仁 大脳萎縮症 編集 水澤秀洋、新領域別症候群シリーズ No. 29「神経症候群(第2版) IV、日本臨牀社 p. 319-324. 2014
 - 2) 小坂 仁 小脳萎縮症 編集 水澤秀洋、新領域別症候群シリーズ No. 29「神経症候群(第2版) IV、日本臨牀社 p. 325-328. 2014 (査読無)
2. 学会発表
- Hitoshi Osaka, Hiroko Shimbo, Kei Murayama, Akira Ohtake, Noriko Aida
- A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome.
- Mitochondrial Medicine 2014: Pittsburgh, PA June 4-7, 2014.
- ガバペンチンが有効であった GNAO1 変異をもつヒョレアアテトーシスの一例
- Efficacy of gabapentin for a case with choreoathetosis who has GNAO1 mutation.
- 高木真理子 1, 佐藤睦美 1, 安西里恵 1, 奥田美津子 1, 露崎悠 1, 高野亨子 1, 2, 井合瑞江 1, 中村和幸 3, 4, 才津浩智 3, 小坂仁 1, 5, 山下純正 1
- 1 神奈川県立こども医療センター神経内科, 2 信州大学医学部遺伝医学予防医学講座, 3 横浜市立大学医学部遺伝学講座, 4 山形大学小児科, 5 自治医科大学小児科学講座
- 56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

重度精神遅滞，難治性てんかんの臨床像を示し，
PIGO 遺伝子変異が同定された 1 例

安西里恵¹，佐藤睦美¹，高木真理子¹，奥田美津子¹，
露崎悠¹，高野亨子^{1,4}，井合瑞江¹，中村和幸^{2,3}，
才津浩智²，小坂仁^{1,5}，山下純正¹

1 神奈川県立こども医療センター神経内科，2 横浜市立大学医学部遺伝学，3 山形大学医学部小児科，4 信州大学医学部遺伝医学，5 自治医科大学医学部小児科

56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30.
浜松

Whole exome sequencing reveals molecular basis of
childhood cerebellar atrophy

Hitoshi Osaka^{1,2}，Yu Tsuyusaka¹，Mizue Iai²，
Sumimasa Yamashita²，Nobuyuki Shimozawa³，
Yoshikatsu Eto⁴，Hiroto Saito⁵

1Department of Pediatrics, Jichi Medical School,
2Division of Neurology, Kanagawa Childrens
Medical Center, 3Division of Genomics Research,
Life Science Research Center, Gifu University,
4Advanced Clinical Research Center & Asian LSD
Center, Institute of Neurological disorders,
5Department of Human Genetics, Graduate School of
Medicine, Yokohama City University

56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30.
浜松

Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol
administration in cases of Dravet syndrome

Takeshi Kouga^{1,2}，Mariko Takagi³，Rie Anzai³，
Mutsumi Sato³，Mitsuko Okuda³，Kyoko Takano³，
Mizue Iai³，Sumimasa Yamashita³，Hitoshi
Osaka^{2,3}

1Kanagawa Prefectural Institute of Public
Health, 2Department of Pediatrics, Jichi Medical
University, 3Division of Neurology, Kanagawa
Children's Medical Center

56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30.
浜松

Mutational and functional analysis of Glucose
transporter 1 deficiency syndrome.

Sachie Nakamura¹⁾，Hitoshi Osaka¹⁾，Shinichi
Muramatsu²⁾，Shiho Aoki¹⁾，Eriko F. Jimbo¹⁾，
Takanori Yamagata¹⁾

Department of Pediatrics¹⁾，Department of
Neurology²⁾，Jichi Medical University

2014. 10. 18-22 第 64 回アメリカ人類遺伝学会(サン
ディエゴ)

ミトコンドリア DNA m.3243A>T 変異を認めた
mitochondrial encephalomyopathy, lactic
acidosis and stroke-like episodes の 1 例

池田尚広¹⁾，山崎雅世¹⁾，鈴木峻¹⁾，門田行史¹⁾，
小坂仁¹⁾，杉江秀夫¹⁾，新保裕子²⁾，山形崇倫¹⁾
1)自治医科大学小児科，2)神奈川県立こども医療セ
ンター臨床研究所

56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30.
浜松

Infantile Neuroaxonal Dystrophy 様の脳 MRI 所見
を示した SLC9A6 変異を有する一例

山本亜矢子^{1,2}，和田敬仁^{2,3}，新保裕子²，松本直
通⁴，小坂仁^{2,5}

1 大和市立病院小児科，2 神奈川県立こども医療セン
ター神経内科，3 京都大学大学院医学研究科医療倫
理学/遺伝医療学，4 横浜市立大学大学院医学研究科
遺伝学，5 自治医科大学小児科学講座 56 回日本小児
神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

高野亨子^{1,2}，佐藤睦美¹，高木真理子¹，安西里恵¹，
奥田美津子¹，露崎悠¹，井合瑞江¹，山下純正¹，
小坂仁^{1,3}，佐久間啓⁴，林雅晴⁴

1 神奈川県立こども医療センター神経内科，2 信州大
学医学部遺伝医学・予防医学講座，3 自治医科大学
小児科，4 公益財団法人東京都医学総合研究所脳発
達・神経再生分野

56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30.
浜松

治療可能な小脳失調：Cerebral Folate Transport Deficiency の同胞例

露崎悠 1, 井合瑞江 1, 安西里恵 1, 佐藤睦美 1, 高木真理子 1, 奥田美津子 1, 高野亨子 1, 3, 小坂仁 1, 2, 山下純正 1, 才津浩智 4

1 神奈川県立こども医療センター神経内科, 2 自治医科大学小児科学講座, 3 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座, 4 横浜市立大学医学部遺伝学

56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

当院における副腎白質ジストロフィー6 例の臨床的検討

宮内彰彦 1, 門田行史 1, 池田尚広 1, 川原勇太 1, 長嶋雅子 1, 小坂仁 1, 杉江秀夫 1, 森本哲 1, 渡辺浩史 3, 下泉秀夫 3, 下澤伸行 2, 山形崇倫 1

1 自治医科大学小児科, 2 岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野, 3 国際医療福祉リハビリテーションセンターなす療育園 56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

非造影灌流画像, ASL で最も鋭敏にとらえた MELAS の脳卒中様発作の一例

奥田美津子 1, 佐藤睦美 1, 安西里恵 1, 高木真理子 1, 露崎悠 1, 高野亨子 1, 2, 井合瑞江 1, 小坂仁 1, 3, 山下純正 1

1 神奈川県立こども医療センター神経内科, 2 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座, 3 自治医科大学小児科学講座 56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

頸部動脈解離による脳梗塞

佐藤睦美 1, 高木真理子 1, 安西里恵 1, 奥田美津子 1, 露崎悠 1, 高野亨子 1, 2, 小坂仁 1, 3, 井合瑞江 1, 山下純正 1

1 神奈川県立こども医療センター神経内科, 2 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座, 3 自治医科大学小児科学講座

56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30.

浜松

くも膜下出血を合併した Reversible cerebral vasoconstriction syndrome の女児例

吉原尚子 1, 2, 和田敬仁 1, 3, 高木真理子 1, 佐藤睦美 1, 安西里恵 1, 奥田美津子 1, 露崎悠 1, 小坂仁 1, 4, 高野亨子 1, 5, 井合瑞江 1, 山下純正 1

1 神奈川県立こども医療センター神経内科, 2 日本赤十字社医療センター小児科, 3 京都大学医学部医療倫理学遺伝医療学講座, 4 自治医科大学小児科学講座, 5 信州大学医学部付属病院遺伝医学講座

56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

早期ステロイドパルス療法によるけいれん重積型急性脳症発症予防効果の検討

池田尚広, 山形崇倫, 谷口祐子, 宮内彰彦, 石井朋之, 長嶋雅子, 門田行史, 小坂仁, 杉江秀夫自治医科大学小児科 56 回日本小児神経学会 2014. 5. 28-2014. 5. 30. 浜松

日内変動を伴うジストニアを認める自閉症スペクトラム障害の男児例

宮内彰彦¹⁾、門田行史¹⁾、長嶋雅子¹⁾、杉江秀夫¹⁾、小黒範子²⁾、小坂仁¹⁾、山形崇倫¹⁾

1) 自治医科大学小児科学

2) とちぎリハビリテーションセンター小児科

2014. 9. 20 第 61 回日本小児神経学会関東地方会 (筑波)

H. 知的所有権の取得状況

1. エリスロポエチン発現増強剤。国際出願
国際公開番号：W02014/080640A1

2. 生体試料中のアミンの測定方法およびその方法を用いる患者のスクリーニング方法

特願 2011-019561 特許第 5662182 号

平成26年度厚生科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究
分担研究課題：広汎性発達障害の遺伝子解析による病態解明研究
研究分担者 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 准教授

研究要旨

広汎性発達障害は、自閉性障害やアスペルガー障害などの自閉症スペクトラム障害を指し、環境因子と遺伝因子による多因子疾患と考えられている。広汎性発達障害の一卵性双生児の一致率は60～90%、遺伝率が90%とされており、統合失調症などの他の精神疾患と比較して、遺伝因子の関与が非常に大きい。今までに、いくつかの遺伝子が広汎性発達障害の原因遺伝子として報告されている。最近、広汎性発達障害において、De novo(新規)のCNV (copy number variation:コピー数変異) やSNV (single nucleotide variant) が、その原因となっていることが報告されている。そこで、本研究においては、孤発例の広汎性発達障害患者30例について、De novoのSNVの検討を行う。広汎性発達障害患者30例について、エクソーム解析を行い、次に両親のゲノムサンプルも用いてde novoの検証を行い、最後にサンガーシーケンスによって確認した。その結果、37のde novoのSNVが見出され、そのうちの5つの遺伝子については、既報の遺伝子と一致した。これらのSNVの病的意義については今後の検討を必要とするが、日本人広汎性発達障害患者においてde novoのSNVの報告は初めてであり、広汎性発達障害の病態の解明に役立つ知見であると考えられる。

A. 研究目的

広汎性発達障害は、自閉性障害やアスペルガー障害などの自閉症スペクトラム障害を指し、環境因子と遺伝因子による多因子疾患と考えられている。広汎性発達障害の一卵性双生児の一致率は60～90%、遺伝率が90%とされており、統合失調症などの他の精神疾患と比較して、遺伝因子の関与が非常に大きい。

広汎性発達障害の家系研究より、いくつかの候補遺伝子が見出されている。neuroligin3/4 (NLGN3/4) 遺伝子もその一つである。このうちNLGN3 (Arg451Cys) 遺伝子の変異はNLGN3タンパク質のプロセッシングを障害することが知られている。また、NLGN4遺伝子の1186insT変異はアミノ酸が欠損した未熟なNLGN4遺伝子を作る。Neuroiginは、興奮性シナプスであるグルタミン酸や、抑制性のGABA系シナプスを編成する上で必須の、後シナプスに存在する細胞接着分子とシナプス前 β -neurexin (NRXN) と結合し、軸索と連絡する際の機能的な前シナプス構造を形成する契機となる。neurexin1 (NRXN1) 遺伝子の変異も広汎性発達障害患者から発見された。さらに、新規のコピー数多型解析により広汎性発達障害患者のNRXN1-containing遺伝子の領域に欠失が認められた。NRXN1とNLGNの結合体はシナプスを発達させる。また、NLGN3遺伝子の変異はNRXN

との結合を阻害する。NLGNは、同じく広汎性発達障害と関連するSHANK3と結合する。SHANKタンパク質は、シナプス形成と樹状突起の成熟に関与する。SHANK3遺伝子を含む遺伝子部位の欠失・転座やSHANK3遺伝子の新規の変異が広汎性発達障害で見出されている。

家族研究ではMorrowらが広汎性発達障害とsodium/hydrogen exchanger 9 (NHE9) 遺伝子の変異との関連を報告している。NHE9 遺伝子は、膜のイオン流入を制御する分子の一つである。一方、広汎性発達障害の一つであるRett症候群は、女性患者の80%において、methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) 遺伝子のde novo変異が認められる。MeCP2はメチル化CpGジヌクレオチドと結合する翻訳抑制体であり、通常はヒストンジアセチラーゼ1やクロマチンの抑制に関与するタンパク質を誘導する。

今まではこのような家系研究がおこなわれてきたが、近年、広汎性発達障害の孤発例においてde novoのSNVがその発症の原因となっていることが示唆されている。海外の研究グループは、200例の孤発例広汎性発達障害とその両親のエクソーム解析を行い、その結果、多数のde novoのSNVを見出した。その上、少数ではあるがPOGZなどの遺伝子においては、複数の家族においてde novoのmutationが見出され、新

た原因遺伝子として注目を浴びている。

本年度は、孤発性の広汎性発達障害とその両親のサンプルを用いて de novo の SNV の探索を行った。

B. 研究方法

広汎性発達障害患者 30 例とその両親 60 例において、主任研究者の松本研究室にてエクソームシーケンスを行った。具体的には、SureSelect Human All Exon Kit Ver. 4 (51 Mb) (Agilent 社) でエクソームキャプチャーし、HiSeq2000 (Illumina 社) 101 bp ペアエンドリード解析を行った。得られたシーケンスデータは、Novoalign、GATK プログラムを用いて解析し、Annovar プログラムで機能情報 (dbSNP、遺伝子名、SNP functions (missense、nonsense 変異等)、ポジション、アミノ酸置換等) を付与した。コールされてきた全バリエーションは (スプライスサイト±10)、以下のように絞り込んだ。① Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP) に登録が無いもの、② Exome Sequencing Project (ESP、欧米のエキソームシーケンスデータベース) に登録が無いもの <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>、③ 松本研究室で既に蓄積されている In-house データベースに登録が無いもの。そして、最両親のデータを用いて、de novo であることを検証した。De novo の SNV と考えられるものについては、サンガーシーケンスにて確認した。本研究は、大阪大学倫理審査委員会と横浜市立大学倫理審査委員会の承認に基づいて行われた。

(倫理面への配慮)

本研究は、精神疾患患者を対象とした遺伝子解析研究である。試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、研究施設での倫理委員会において承認を受けた上で研究を行った。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理 (匿名化) などを徹底させた。また、遺伝子解析研究においては、大阪大学倫理審査委員会において承認を受けている。

本研究の説明を行う過程や試料等提供の過程で、強制的な態度や同意の強要をしないことはいうまでもない。試料提供の依頼を拒否したからといって、診療行

為等に不合理または不公平なことが行われることは全くない。また、同意はいつでも文書によって撤回することができ、その場合、試料等は廃棄される。治療中の患者様に関しては、試料提供を依頼することが主治医によって不適切であると判断された場合は、試料提供の依頼は行わない。措置入院している患者様は対象から除外する。

C. 研究結果

広汎性発達障害 30 例とその両親 60 例を用いたトリオのエクソーム解析によって、37 の de novo の SNV と 1 つの小さな欠失が見出された。37 の SNV 中、3SNP はナンセンス変異、1SNV はフレームシフト、27SNV はミスセンス変異、4SNV はアミノ酸置換のないエクソンの変異、3SNV はスプライシングに影響のある可能性のある変異であった。コーディング領域におけるポイントミューテーション変異の割合は、1 トリオあたり 1.2 程度であり、一般に起こる割合より少し多い可能性があった。

D. 考察

広汎性発達障害患者の De novo の SNV の検索を行い、37 の de novo の SNV と 1 つの小さな欠失が見出された。日本人における広汎性発達障害の de novo の SNV についての検討は未だなされておらず、評価できる結果である。今回見出された SNV 候補の中で、重複したものは認められなかった。単独の家族において認められる場合には、疾患との関連におけるエビデンスが弱く、注意すべき点であると考えられる。その一方で、今回見出された遺伝子のうち、5 つ (*POGZ*、*PLEKHA4*、*PCNX*、*PRKD2*、*HERC1*) が海外の研究において見出された遺伝子と一致するものであった。複数の de novo 変異が見つかることは、偶然とは考えにくく、広汎性発達障害の遺伝子と考えられる。今後、さらなる検討により広汎性発達障害の病態解明につながることを期待される。

E. 結論

我々は、ヒト発達障害研究に不可欠な発達障害患者を精神医療現場で診療しつつ、研究への同意を取得し、研究参加していただくシステムの構築に成功している。そして、孤発性の広汎性発達障害において、de novo の SNV の検討を行った。これらの結果は、新たな診断・治療法のシーズと考えられる。このように本研

究は、医療行政上、大変有意義であり、国民の保健・精神医療において多大なる貢献ができると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miura K, Hashimoto R, Fujimoto M, Yamamori H, Yasuda Y, Ohi K, Umeda-Yano S, Fukunaga M, Iwase M, Takeda M. An integrated eye movement score as a neurophysiological marker of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 160(1-3):228-9, 2014. 12 doi: 10.1016/j.schres.2014.10.023.
- 2) Li M, Ohi K, Chen C, He Q, Lu JW, Chen C, Luo XJ, Dong Q, Hashimoto R, Su B. Failure of replicating the association between hippocampal volume and 3 single-nucleotide polymorphisms identified from the European genome-wide association study in Asian populations. *Neurobiology of Aging*, 35(12):2883e.1-2, 2014. 12, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.015.
- 3) Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Ohi K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Takeda M, Ohmori T. Aberrant DNA methylation of blood in schizophrenia by adjusting for estimated cellular proportions. *NeuroMolecular Medicine*, 16:697-703, 2014. 12 doi: 10.1007/s12017-014-8319-5
- 4) Shintani N, Onaka Y, Hashimoto R, Takamura H, Nagata T, Umeda-Yano S, Mouri A, Mamiya T, Haba R, Matsuzaki S, Katayama T, Yamamori H, Nakazawa T, Nagayasu K, Ago Y, Yagasaki Y, Nabeshima T, Takeda M, Hashimoto H. Behavioral characterization of mice overexpressing human dysbindin-1. *Molecular Brain*, 9;7(1):74, 2014. 10
- 5) Hashimoto R, Ikeda M, Yamashita F, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Fukunaga M, Nemoto K, Takahashi T, Ochigi M, Onitsuka T, Yamasue H, Matsuo K, Iidaka T, Iwata N, Suzuki M, Takeda M, Kasai K, Ozaki N. Common variants at 1q36 are associated with superior frontal gyrus volume. *Translational Psychiatry*, 4:e472, 2014. 10 doi:10.1038/tp.2014.110
- 6) Miki K, Hashimoto R, Shi K, Yukioka M, Opioid therapy for knee osteoarthritis and postoperative persistent pain after knee arthroplasty. *Rheumatology*, 53(10):1723-4. 2014. 10 doi:10.1093/rheumatology/keu309
- 7) Iwata R, Ohi K, Kobayashi Y, Masuda A, Masuda A, Iwama M, Yasuda Y, Yamamori H, Tanaka M, Hashimoto R, Itohara S, Iwasato T. RacGAP α 2-chimaerin function in development adjusts cognitive ability in adulthood. *Cell Report*, 8(5):1257-64, 2014. 8 doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.047.
- 8) Yamamori H, Hashimoto R, Fujita Y, Numata S, Yasuda Y, Fujimoto M, Ohi K, Umeda-Yano S, Ito A, Ohmori T, Hashimoto K, Takeda M. Changes in plasma D-serine, L-serine, and glycine levels in treatment-resistant schizophrenia before and after clozapine treatment. *Neurosci Lett*, 582:93-8, 2014. 10 doi: 10.1016/j.neulet.2014.08.052.
- 9) Nishi A, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Kikuchi K, Shimodera S, Tomotake M, Ohi K, Hashimoto R, Imoto I, Takeda M, Ohmori T. Meta-analyses of blood homocysteine levels for gender and genetic association studies of the MTHFR C677T polymorphism in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 40(5):1154-63, 2014. 9 doi: 10.1093/schbul/sbt154
- 10) Yasuda Y, Hashimoto R, Fukai R, Okamoto N, Hirai Y, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Taniike M, Mohri I, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Matsumoto N, Miyake N, Takeda M. Duplication of the NHP1 gene in patients with autism spectrum disorder and normal intellectual ability: a case series. *Annals of General Psychiatry*, 13:22. 2014. 8 doi: 10.1186/s12991-014-0022-2.
- 11) Watanabe Y, Tanaka H, Tsukabe A, Kunitomi Y, Nishizawa M, Hashimoto R, Yamamori H, Fujimoto M, Fukunaga M, Tomiyama N. Neuromelanin magnetic resonance imaging reveals increased dopaminergic neuron activity in the substantia nigra of patients with schizophrenia. *PLoS One*, 11:9(8):e104619, 2014. 8 doi: 10.1371/journal.pone.0104619
- 12) Fujino H, Sumiyoshi C, Sumiyoshi T, Yasuda Y, Yamamori H, Ohi K, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Higuchi A, Hibi Y, Matsuura Y, Hashimoto R, Takeda M, Imura O. Performance on the Wechsler Adult Intelligence Scale-III in Japanese patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 68(7):534-541, 2014. 7 doi: 10.1111/pcn.12165.
- 13) Yasuda Y, Hashimoto R, Ohi K, Yamamori H, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Fujino H, Takeda M. Cognitive inflexibility in Japanese adolescents and adults with autism spectrum disorders. *World J Psychiatry*, 22;4(2):42-48, 2014. 6 doi: 10.5498/wjp.v4.i2.42
- 14) Nishizawa D, Ohi K, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Takeda M, Ikeda K. Association between genetic polymorphism rs2952768, close to the METTL21A and CREB1 genes, and intellectual ability in healthy subjects. *Journal of Addiction Research & Therapy*, 5(2):1000178, 2014. 6 doi: 10.4172/2155-6105.1000178
- 15) Ohi K, Hashimoto R, Ikeda M, Yamashita F, Fukunaga M, Nemoto K, Ohnishi T, Yamamori H, Yasuda Y,

- Fujimoto M, Umeda-Yano S, Watanabe Y, Iwata N, Weinberger DR, Takeda M. Genetic risk variants of schizophrenia associated with left superior temporal gyrus volume. *Cortex*, 58C:23-26, 2014.6 doi: 10.1016/j.cortex.2014.05.011.
- 16) Horiguchi M, Ohi K, Hashimoto R, Hao Q, Yasuda Y, Yamamori H, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Takeda M, Ichinose H. A functional polymorphism (C-824T) of the tyrosine hydroxylase gene affects intelligence quotient in schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 68(6):456-62, 2014.6 doi: 10.1111/pcn.12157.
- 17) Dickinson D, Straub RE, Trampush JW, Gao Y, Feng N, Xie B, Shin JH, Lim HK, Ursini G, Bigos KL, Kolachana B, Hashimoto R, Takeda M, Baum GL, Rujescu D, Callicott JH, Hyde TM, Berman KF, Kleinman JE, Weinberger DR. Differential Effects of Common Variants in SCN2A on General Cognitive Ability, Brain Physiology, and messenger RNA Expression in Schizophrenia Cases and Control Individuals. *JAMA Psychiatry*. 1;71(6):647-56, 2014.6 doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.157.
- 18) Ohgidani M, Kato T.A., Setoyama D, Sagata N, Hashimoto R, Shigenobu K, Yoshida T, Hayakawa K, Shimokawa N, Miura D, Utsumi H, Kanba S. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: Dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease. *Scientific Reports* 14:4:4957, 2014.5 doi: 10.1038/srep04957.
2. 学会発表
- 1) Ohi K, Hashimoto R, Ikeda M, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Fukunaga M, Fujino H, Watanabe Y, Iwase M, Kazui H, Iwata N, Weinberger DR, Takeda M. Glutamate Networks Implicate Cognitive Impairments in Schizophrenia; Genome-Wide Association Studies of 52 Cognitive Phenotypes. 2014 American College of Neuropsychopharmacology (ACNP), Phoenix, U.S.A., 12.7-11(9), 2014. Poster
- 2) Nakazawa T, Hashimoto R, Sakoori K, Sugaya Y, Tanimura A, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Umeda-Yano S, Kiyama Y, Konno K, Iwase M, Kazui H, Numata S, Ohnuma T, Iwata N, Ozaki N, Hashimoto H, Watanabe M, Manabe T, Yamamoto T, Takeda M, Kano M. Brain-enriched sorting nexin family proteins regulate spine morphogenesis and are associated with risk for schizophrenia. 2014 American College of Neuropsychopharmacology (ACNP), Phoenix, U.S.A., 12.7-11(9), 2014. Poster
- 3) Hashimoto R, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Takeda M. Intermediate phenotype studies in schizophrenia (Current research topics in schizophrenia and future perspectives.) 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology. Vancouver, Canada, 6.22-26(23), 2014. invited speaker
- 4) Uno K, Nishizawa D, Seol S, Sakai N, Ohi K, Nabeshima T, Hashimoto R, Ozaki N, Ikeda K, Miyamoto Y, Nitta A. PCLO SNP rs13438494 regulates DA and 5-HT uptake, accompanied with splicing efficiency and dependence-like behaviors in genomic association studies. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology. Vancouver, Canada, 6.22-26(24), 2014. poster
- 5) Nishizawa D, Kasai S, Hasegawa J, Sato N, Tanioka F, Nagashima M, Hiroshi U, Hashimoto R, Tanaka M, Sugimura H, Ikeda K. Associations of an orexin (hypocretin) receptor 2 gene polymorphism with nicotine dependence found in genome-wide and following association studies. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology. Vancouver, Canada, 6.22-26(23), 2014. poster
- 6) 岡右里恵、緒方洋輔、福永雅喜、橋本亮太、花川隆、Resting-state functional connectivity MRI を用いた気分障害患者と健常者の判別精度に対する特徴量抽出手法の影響の検討、平成 26 年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、東京、12.11-13(12), 2014. ポスター
- 7) 永安一樹、松村憲佑、中澤敬信、安田由華、山森英長、梅田知美、大井一高、橋本亮太、武田雅俊、橋本均、自閉症関連候補遺伝子のハイスループット機能評価系による解析、平成 26 年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、東京、12.11-13(12), 2014. ポスター
- 8) 岩田亮平、橋本亮太、糸原重美、岩里琢治、RacGAP $\alpha 2$ キメリンによる認知能力の発達の調節、平成 26 年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、東京、12.11-13(12), 2014. ポスター
- 9) 橋本亮太、多施設共同研究体制の構築、第 5 回脳表現型の分子メカニズム研究会、東京、12.6-7(6), 2014. 口演
- 10) 近藤健治、橋本亮太、池田匡志、高橋秀俊、山森英長、岸太郎、安田由華、島崎愛夕、藤本美智子、大

- 井一高、齊藤竹生、武田雅俊、岩田仲生、統合失調症の GWAS によるプレパルス抑制との共通リスク遺伝子の同定、第 47 回精神神経系薬物治療研究報告会、大阪、12.5, 2014. ポスター
- 11) 吉田正俊、三浦健一郎、橋本亮太、藤本美智子、山森英長、安田由華、大井一高、武田雅俊、伊佐正、統合失調症患者の静止画自由視時の視線データはサリエンシー計算論モデルによって説明できる、第 4 回生理研-名大合同シンポジウム、名古屋、11.22, 2014. ポスター
 - 12) 村松憲佑、永安一樹、中澤敬信、安田由華、山森英長、梅田知美、大井一高、橋本亮太、武田雅俊、橋本均、自閉症の疾患特異的候補遺伝子の機能的スクリーニング系の確立、第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会、名古屋、11.20-22(22), 2014. 口演
 - 13) 橋本亮太、精神疾患の中間表現型研究 (Intermediate phenotype studies in psychiatric disorders)、日本神経精神薬理学会第三回学術奨励賞受賞記念講演、11.21, 2014. 講演
 - 14) 中澤敬信、橋本亮太、永安一樹、安田由華、山森英長、梅田知美、藤本美智子、大井一高、石川充、赤松和土、岡野栄之、武田雅俊、橋本均、iPS 細胞関連技術を用いた統合失調症研究、第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会の合同シンポジウム 1 「iPS 細胞を用いた精神疾患の分子病態研究の現状と展望」名古屋、11.20-22(21), 2014. 口演
 - 15) 橋本亮太、池田匡志、大井一高、安田由華、山森英長、福本素由己、梅田知美、Dickinson D、Aleksic B.、岩瀬真生、数井裕光、尾崎紀夫、Weinberger DR、岩田仲生、武田雅俊、Genome-wide association study of cognitive decline in schizophrenia (統合失調症の認知機能障害の全ゲノム関連解析)、第 59 回日本人類遺伝学会 第 21 回日本遺伝子診療学会合同大会、東京、11.19-22(20), 2014 ポスター
 - 16) 森原剛史、佐藤真広、角田達彦、山口由美、赤津裕康、橋本亮太、紙野晃人、武田雅俊、疾患感受性のマウス系統間差をトランスクリプトーム解析：アルツハイマー病の A β 蓄積量を規定する遺伝子 KLC1E の同定、第 59 回日本人類遺伝学会第 21 回日本遺伝子診療学会合同大会、東京、11.19-22(20), 2014 口頭
 - 17) 橋本亮太、住吉チカ、藤野陽生、山森英長、藤本美智子、安田由華、大井一高、井村修、住吉太幹、武田雅俊、統合失調症患者の認知機能障害の簡易測定法の開発、第 14 回精神疾患と認知機能研究会、東京、11.8, 2014. (講演)
 - 18) 藤野陽生、橋本亮太、住吉チカ、住吉太幹、山森英長、藤本美智子、安田由華、大井一高、武田雅俊、井村修、統合失調症患者の社会機能に影響する要因、第 14 回精神疾患と認知機能研究会、東京、11.8, 2014. (口演)
 - 19) 三木健司、橋本亮太、史賢林、行岡正雄、TKA 術後遷延疼痛の実際 米国でのオピオイドの蔓延 (Opioid therapy for knee osteoarthritis and postoperative persistent pain after knee arthroplasty) 第 42 回日本関節病学会 シンポジウム 11 「関節手術後の疼痛対策」、東京、11.6-7(7), 2014 シンポジスト・座長 招待講演
 - 20) 西澤大輔、笠井慎也、佐藤直美、谷岡書彦、長島誠、氏家寛、橋本亮太、田中雅嗣、梶村春彦、池田和隆、ゲノムワイド関連解析によるオレキシン 2 受容体遺伝子多型 Val308Ile とニコチン依存との関連の同定平成 26 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、横浜、10.3-4(3), 2014 口頭
 - 21) 橋本亮太、山森英長、梅田知美、藤本美智子、安田由華、伊藤彰、武田雅俊、統合失調症患者由来サンプルを用いた統合失調症の病態解明研究、第 11 回 NDDC-JSG 会議、大阪、10.7, 2014 口演
 - 22) 橋本亮太、神経化学が読み解く精神疾患の病態メカニズム、第 7 回 (2014 年) 神経化学の若手研究者育成セミナー、奈良、9.29-10.1(29), 2014. 口演
 - 23) 橋本亮太、安田由華、山森英長、大井一高、藤本美智子、梅田知美、武田雅俊、イントロダクション (Introduction)、生物精神・神経化学合同シンポジウム テーマ：朝から生討論：我が国の発達障害研究はトランスレーショナルとなりうるか？ 臨床精神 vs 神経化学、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、奈良、9.29-10.1(30), 2014. 口演
 - 24) 橋本亮太、大井一高、山森英長、安田由華、藤本美智子、梅田知美、武田雅俊、ビッグサイエンスに対する挑戦：スモールサイエンスと基礎研究の融合 (The challenge to big science: fusion of small science and basic research) シンポジウム 2 「多施設共同研究の意義と日本における現状：欧米に勝つための戦略とは？」第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、奈良、9.29-10.1(29), 2014.

- 25) 齋藤 竹生、池田匡志、近藤健治、岡久祐子、菱本明豊、大沼徹、廣瀬雄一、橋本亮太、尾崎紀夫、岩田仲生、ラモトリギン誘発皮疹に関する薬理遺伝学的研究、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、奈良、9.29-10.1(29-1), 2014. 各賞受賞者ポスター
- 26) 近藤健治、橋本亮太、池田匡志、高橋秀俊、山森英長、岸太郎、安田由華、島崎愛夕、藤本美智子、大井一高、齋藤竹生、武田雅俊、岩田仲生、プレパルス抑制関連遺伝子の探索、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、奈良、9.29-10.1(29), 2014. ポスター
- 27) 安田由華、橋本亮太、中江文、康紅玲、大井一高、山森英長、藤本美智子、萩平哲、武田雅俊、自閉症スペクトラム症における感覚過敏についての研究 (Sensory profile in subjects with autism spectrum disorders) 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、奈良、9.29-10.1(29), 2014. ポスター
- 28) 藤本美智子、橋本亮太、三浦健一郎、山森英長、安田由華、大井一高、梅田知美、岩瀬真生、武田雅俊、統合失調症の生物学的マーカーとしての眼球運動スコアの開発、An integrated eye movement score for biological marker of schizophrenia 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、奈良、9.29-10.1(30), 2014. ポスター
- 29) 山森英長、橋本亮太、石間環、藤本美智子、安田由華、大井一高、梅田知美、伊藤彰、橋本謙二、武田雅俊、複数のバイオマーカーを用いた気分障害と統合失調症の補助診断方法確立の検討 (Assessment of a multi-assay biological diagnostic test for mood disorders and schizophrenia) 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、奈良、9.29-10.1(1), 2014. ポスター
- 30) 布川綾子、渡部雄一郎、飯嶋良味、江川純、金子尚史、澁谷雅子、有波忠雄、氏家寛、稲田俊也、岩田仲生、栃木衛、功刀浩、糸川昌成、尾崎紀夫、橋本亮太、染矢俊幸、TPH2 遺伝子と日本人統合失調症との 2 段階関連解析、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、奈良、9.29-10.1(29), 2014. ポスター
- 31) 江川純、飯嶋良味、渡部雄一郎、布川綾子、金子尚史、有波忠雄、氏家寛、稲田俊也、岩田仲生、功刀浩、糸川昌成、佐々木司、尾崎紀夫、橋本亮太、澁谷雅子、井桁裕文、染矢俊幸、マイクロ RNA30E 遺伝子の稀な変異と統合失調症との関連、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、奈良、9.29-10.1(1), 2014. ポスター
- 32) 橋本亮太、精神疾患とその偏見への挑戦：こころの扉を開き克服するまで、新適塾「脳はおもしろい」第 6 回会合、大阪、9.17, 2014. 講演
- 33) 中澤敬信、橋本亮太、橋本均、細胞内タンパク質輸送と統合失調症、生体機能と創薬シンポジウム 2014、大阪、8.28-29(28), 2014. ポスター
- 34) 橋本亮太、精神疾患分野から-多施設共同研究による倫理的問題点-、ヒトゲノム解析研究倫理審査を考える会、東京、8.3, 2014. 講演
- 35) 安田由華、橋本亮太、大井一高、山森英長、梅田知美、藤本美智子、武田雅俊、孤発性自閉症スペクトラム障害のトリオにおけるエクソーム解析による de novo 変異の同定、新学術領域研究「脳疾患のゲノム情報」第三回研究班会議、東京、7.20, 2014. 口頭
- 36) 三木健司、史賢林、橋本亮太、林淳一朗、行岡正雄、小島崇宏、裁判における CRPS 症例の診断書からみた妥当性、第 12 回整形外科痛みを語る会、福岡、6.28-29, 2014. 招待講演
- 37) 橋本亮太、山森英長、藤本美智子、安田由華、大井一高、梅田知美、武田雅俊、治療抵抗性統合失調症への果てしなき挑戦：治療のゴールはどこにあるのか？第 110 回日本精神神経学会学術総会、横浜、6.26-28(27), 2014. 口演
- 38) 山森英長、橋本亮太、藤本美智子、安田由華、大井一高、福本素由己、武田雅俊、阪大病院でのクロザピンの使用経験と有用性、第 17 回和風会精神医学研究会、大阪 6.8, 2014. 口頭
- 39) 橋本亮太、精神疾患のバイオマーカー研究-DSM-5 への挑戦-、北里大学精神科教室拡大研究会、4.17, 2014. 招待講演
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
該当なし。
 2. 実用新案登録該当なし。
 3. その他
該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|---|--------|------------|------|
| Miyatake S, * <u>Matsumoto N</u> (*: correspondence). | Clinical exome sequencing in neurology practice. | Nat Rev Neurol | 10(12) | 676-678, 2 | 2014 |
| Tsurusaki Y, et al., * <u>Matsumoto N</u> . | De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. Nat Commun | Nat Commun | 5 | 4011 | 2014 |
| Miyatake S, et al., * <u>Matsumoto N</u> , *Saitu H (*: co-correspondence) | Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies, | Neurology | 82(24) | 2230-2237 | 2014 |
| *Kato M, et al., <u>Matsumoto N</u> . | PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. | Neurology | 82(18) | 1587-1596, | 2014 |
| *Nakamura K, et al., <u>Matsumoto N</u> , Saitu H. | AKT3 and PIK3R2 mutations in two patients with megalencephaly-related syndromes. | Clin Genet | 85(4): | 396-398 | 2014 |
| *Miyake N, et al., <u>Matsumoto N</u> . | Ehlers-Danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities. J. Halper (ed.), Progress in heritable soft connective tissue diseases, | Advances in Experimental Medicine and Biology | 802 | 145-159 | 2014 |

| | | | | | |
|---|--|-----------------------|--------|----------|------|
| Ohba C, et al., * <u>Matsumoto N</u> , *Saito H (*: co-correspondence). | PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. | Neurogenet | 59(5) | 292-295 | 2014 |
| Leventer RJ, et al., <u>Matsumoto N</u> , et al. | Is Focal Cortical Dysplasia sporadic? Family evidence for genetic susceptibility. | Epilepsia | 55(3) | e22-26 | 2014 |
| Ohba C, et al., * <u>Matsumoto N</u> , *Saito H (*: co-correspondence). | Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. | Epilepsia | 55(7) | 994-1000 | 2014 |
| #Miyatake S, #Koshimizu E (# denotes equal contribution), et al., * <u>Matsumoto N</u> . | 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, et al., <u>Matsumoto N</u> .* | Novel compound heterozygous PIGT mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. | Neurogenet | 15(3) | 193-200 | 2014 |
| *Miyake N (*: corresponding author), et al., <u>Matsumoto N</u> . | Numerous BAF complex genes are mutated in Coffin-Siris syndrome. | Am J Med Genet Part C | 166(3) | 257-261 | 2014 |
| Katagiri S, et al., <u>Matsumoto N</u> , et al. | Whole exome analysis identifies frequent CNGA1 mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa. | Plos One | 9(9) | e108721 | 2014 |
| Tsurusaki Y, et al., * <u>Matsumoto N</u> | Whole exome sequencing revealed causative biallelic IFT122 mutations in a family with CED1 and recurrent pregnancy loss. | Clin Genet | 85(6) | 592-594 | 2014 |

| | | | | | |
|--|--|------------------------|---------|---------|------|
| Nakamura K, et al., * <u>Matsumoto N</u> , * <u>Saito H</u> (*: co-correspondence). | PIGO mutations in epileptic encephalopathy with mild elevation of alkaline phosphatase levels. | Epilepsia | 55(2) | e13-7 | 2014 |
| Tsurusaki Y, et al., * <u>Matsumoto N</u> . | Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. | Clin Genet | 85(6) | 548-554 | 2014 |
| Ohashi T, et al., <u>Matsumoto N</u> , et al. | Infantile epileptic encephalopathy with a hyperkinetic movement disorder and hand stereotypies arising from a novel SCN1A mutation. | Epileptic Disord | 16(2) | 208-212 | 2014 |
| Imagawa E, et al., * <u>Matsumoto N</u> , * <u>Miyake N</u> | A hemizygous GYG2 mutation causes Leigh syndrome. | Hum Genet | 133 (2) | 225-234 | 2014 |
| Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, <u>Osaka H</u> . | Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. | Pediatr Radiol | 53 | 448-458 | 2014 |
| Akiyama T, <u>Osaka H</u> , Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. | A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. | JIMD Rep | 12 | 65-69 | 2014 |
| Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, <u>Osaka H</u> , Kaler SG. | A Novel Two-Nucleotide Deletion in the ATP7A Gene Associated With Delayed Infantile Onset of Menkes Disease. | Pediatr Neurol | 50 | 417-420 | 2014 |
| Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, <u>Osaka</u> | A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. | Mol Genet Metab Report | 1 | 133-138 | 2014 |

| | | | | | |
|--|---|--------------------|---------|---------|------|
| Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, <u>Osaka H.</u> | A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. | Pediatr Neurol | 50(1) | 99-100 | 2014 |
| Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, <u>Osaka H.</u> , Inoue K. | Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. | J Neurol | 261(4) | 752-758 | 2014 |
| Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishin N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, <u>Osaka H.</u> , Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, | Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. | Stem Cell Reports | 24;2(5) | 648-661 | 2014 |
| Yasuda Y, <u>Hashimoto R.</u> , Ohi K, Yamamori H, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Fujino H, Takeda M. | Cognitive inflexibility in Japanese adolescents and adults with autism spectrum disorders. | World J Psychiatry | 22;4(2) | 42-48 | 2014 |

GENETICS

Clinical exome sequencing in neurology practice

Satoko Miyatake and Naomichi Matsumoto

Clinical exome sequencing (CES) is becoming a standard tool for molecular diagnosis of genetic disorders, with a diagnostic yield of approximately 25%. New studies demonstrate the favourable diagnostic yield of CES for both early-onset and adult-onset neurogenetic disorders. These studies demonstrate the strengths, limitations and potential of CES in neurology practice.

Miyatake, S. & Matsumoto, N. *Nat. Rev. Neurol.* 10, 676–678 (2014); published online 4 November 2014; doi:10.1038/nrneurol.2014.213

Whole-exome sequencing (WES), termed clinical exome sequencing (CES) when used for clinical diagnosis, is currently being integrated into standard medical practice.¹ This new development raises questions regarding the efficiency of CES for the diagnosis of neurogenetic disorders. Two extensive studies on CES, one focusing on cerebellar ataxia² and the other on paediatric neurology,³ have recently addressed this question.

“...WES can realistically be used for diagnosis of patients with suspected genetic disorders...”

In the first study, Fogel *et al.*² described CES in 76 patients (mean age 49 years) with cerebellar ataxia, mainly of the sporadic (56 of 76 patients, 74%) and adult-onset (55 of 76 patients, 72%) type. The authors reported a definitive diagnostic yield of 21%, which compares favourably with other CES studies mainly targeting early-onset diseases. Importantly, common repeat expansion disorders that cause hereditary cerebellar ataxia were excluded in all patients before enrolment. In the second paper, Srivastava *et al.*³ reported a CES study in 78 paediatric patients (mean age 8.6 ± 5.8 years) with various unexplained neurodevelopmental disorders. The presumptive diagnostic yield was 41% (32 of 78), including patients with pathogenic variants previously reported as disease-associated, and patients with novel, probably pathogenic variants in a disease-associated gene.

These studies clearly indicate that the diagnostic yield of CES for neurogenetic disease is high, and CES is beneficial to neurology practice for diagnosis of both early-onset and adult-onset cases. Although approximately 60–80% of patients would not achieve a definitive molecular diagnosis at present, accumulation and later re-evaluation of CES data for similar diseases might lead to identification of previously unknown causative genetic variations.

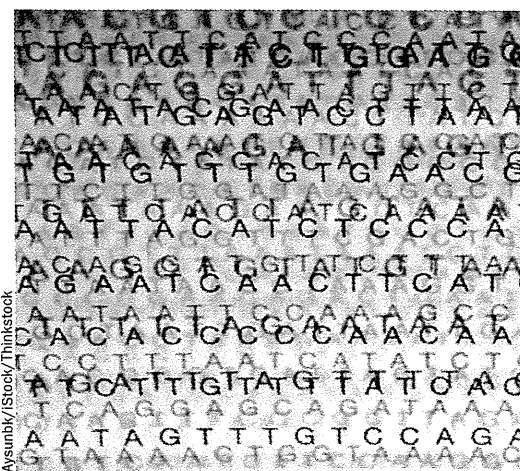
Since the introduction of next-generation sequencing (NGS) technology in 2004, researchers have been able to simultaneously investigate the >20,000 genes that comprise the human genome. WES, as opposed to whole-genome sequencing, is used to sequence (almost) all known coding exonic regions, which comprise only 1–2% of the human genome but harbour around 85% of causative mutations for genetic diseases.⁴ Since 2010, WES has been successfully applied to Mendelian disorders of unknown genetic aetiology, and has identified numerous mutant genes.^{5,6} The power of WES is further demonstrated by the identification of *de novo* and mosaic mutations.⁷ The number of phenotypes with a demonstrated molecular basis in the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database has grown from 2,048 in January 2007 to 4,247 in October 2014, mostly owing to WES.

The current cost of WES per person might only be twofold to fourfold higher than that of some single-gene Sanger sequencing tests.¹ This rapidly decreasing cost combined with superior efficiency, means that

WES can realistically be used for diagnosis of patients with suspected genetic disorders, especially for highly heterogeneous diseases, thereby avoiding the potential ‘diagnostic odyssey’ of the past. In 2012, the first diagnostic CES study of 100 trios with intellectual disability had a diagnostic yield of 16%.⁸ Subsequent CES studies reported a yield of around 25%, depending on the target disease.^{6,8,9}

CES studies of cerebellar ataxia such as that of Fogel *et al.*² are complicated by the highly heterogeneous nature of the disease, comprising >60 primary neurogenetic conditions and nearly 300 additional genetic conditions. Although the technique cannot reliably detect copy number variants, indels of >10 nucleotides, structural variants, repeat expansion, aneuploidy and epigenetic alterations,¹ the authors were able to identify clinically relevant genetic information in 61% of patients (46 of 76). Overall, these data translated to a diagnosis in 21% of patients (16 of 76), all of whom harboured known disease-causing mutations or mutations causing protein truncation in genes with a previously established disease association. However, 40% of patients (30 of 76) harboured highly suspicious potentially pathogenic—but unproven—variants, warranting further investigation.

Patients with conclusively diagnostic mutations in the study by Fogel *et al.*² mostly had sporadic (11 of 16, 69%) and recessive (10 of 11, 91%) mutations, which are typically easier to detect in data from a single



Aasumbly/istock/Thinkstock

clinical exome sequence than are dominant mutations. Although the diagnostic yield for adult patients (onset age >20 years) was lower than in patients with early-onset disease (11% compared with 48%), of those who were diagnosed, most were sporadic cases (4 of 6, 67%), suggesting that CES can be used to diagnose sporadic cases of cerebellar ataxia. By contrast, a 'presumptive' diagnostic yield of 41%, as reported by Srivastava *et al.*,³ seems high compared with similar studies investigating intellectual disability (16–31%).^{8,9} However, this diagnostic yield includes patients with 'likely pathogenic' variants that might require further investigation.

“...CES is beneficial to neurology practice for diagnosis of both early-onset and adult-onset cases”

Notably, the study of Srivastava *et al.*³ provides good examples of how CES can affect clinical practice: potential applications include reproductive planning; earlier diagnosis in other family members; altered prognosis; further disease monitoring or work-up for expected complications; medication changes; and participation in clinical therapeutic trials. These benefits are most relevant to paediatric patients.

The study of Srivastava *et al.*³ also highlights one of the limitations of CES. As no standard criteria are available to judge variants obtained through CES, each laboratory has its own parameters and, potentially, their own definition of a 'pathogenic variant'. Other technical limitations of CES include the fact that some exons are not fully covered, and CES accuracy varies depending on protocols and kits used or data throughput. After sequencing, variant filtering is required to separate the

candidates from the huge numbers of variants obtained through CES. Typically, each laboratory uses its own bioinformatics pipeline to identify candidate variants. Different variants could, therefore, be identified from the same NGS raw data using different pipelines.

As mentioned above, variant filtration and interpretation is a challenging issue. Consensus criteria for evaluating NGS data for clinical use are urgently required. Assessment of the clinical validity of a reported result—that is, whether the variant is clinically compatible, unrelated or atypical (but expanding the phenotypic spectrum)—is also of extreme importance. The ClinVar archive¹⁰ is being developed through international efforts to define clear and definite phenotype–genotype relationships, and might eventually aid interpretation of CES data. Currently, locus-specific databases provide a useful resource for evaluation of variants.

The ethical issues associated with incidental findings, which occur in approximately 1–3% of patients screened with CES, must be considered.¹ The American College of Medical Genetics and Genomics recommends that laboratories screen, and report to the clinician, mutations in a minimum set of 56 genes related to 24 disorders.¹ Genetic counselling before and after screening is particularly important regarding such findings.

The cost of NGS might eventually fall below the costs of clinical diagnosis, leading to 'genotyping first' followed by clinical examination of a patient. If neurology practice does move toward this 'reverse phenotyping framework', as Srivastava *et al.*³ imply, clinical diagnosis to confirm the pathogenicity of the mutation would become more important, but is expected to be rather challenging, as it will require more neurologists with expertise in NGS.

Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3–9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236–0004, Japan (S.M., N.M.).
Correspondence to: N.M.
naomat@yokohama-cu.ac.jp

Acknowledgements

The authors' work is supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Grants-in-Aid for Scientific Research (A and C) from the Japan Society for the Promotion of Science, the Takeda Science Foundation, the fund for Creation of Innovation Centres for Advanced Interdisciplinary Research Areas Program in the Project for Developing Innovation Systems from the Japan Science and Technology Agency, the Strategic Research Program for Brain Sciences, and a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (Transcription Cycle) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

1. Biesecker, L. G. & Green, R. C. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2418–2425 (2014).
2. Fogel, B. L. *et al.* Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia. *JAMA Neurol.* **71**, 1237–1246 (2014).
3. Srivastava, S. *et al.* Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann. Neurol.* **76**, 473–483 (2014).
4. Majewski, J., Schwartzentruber, J., Lalonde, E., Montpetit, A. & Jabado, N. What can exome sequencing do for you? *J. Med. Genet.* **48**, 580–589 (2011).
5. Ng, S. B. *et al.* Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat. Genet.* **42**, 30–35 (2010).
6. Yang, Y. *et al.* Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1502–1511 (2013).
7. Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K. & Mardis, E. R. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell* **155**, 27–38 (2013).
8. de Ligt, J. *et al.* Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1921–1929 (2012).
9. Rauch, A. *et al.* Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* **380**, 1674–1682 (2012).
10. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **42**, D7–D17 (2014).

ARTICLE

Received 8 Oct 2013 | Accepted 30 Apr 2014 | Published 2 Jun 2014

DOI: 10.1038/ncomms5011

De novo SOX11 mutations cause Coffin–Siris syndrome

Yoshinori Tsurusaki^{1,*}, Eriko Koshimizu^{1,*}, Hirofumi Ohashi², Shubha Phadke³, Ikuyo Kou⁴, Masaaki Shiina⁵, Toshifumi Suzuki^{1,6}, Nobuhiko Okamoto⁷, Shintaro Imamura⁸, Michiaki Yamashita⁸, Satoshi Watanabe⁹, Koh-ichiro Yoshiura⁹, Hirofumi Kodera¹, Satoko Miyatake¹, Mitsuko Nakashima¹, Hirotomoto Saito¹, Kazuhiro Ogata⁵, Shiro Ikegawa⁴, Noriko Miyake¹ & Naomichi Matsumoto¹

Coffin–Siris syndrome (CSS) is a congenital disorder characterized by growth deficiency, intellectual disability, microcephaly, characteristic facial features and hypoplastic nails of the fifth fingers and/or toes. We previously identified mutations in five genes encoding subunits of the BAF complex, in 55% of CSS patients. Here we perform whole-exome sequencing in additional CSS patients, identifying *de novo* SOX11 mutations in two patients with a mild CSS phenotype. *sox11a/b* knockdown in zebrafish causes brain abnormalities, potentially explaining the brain phenotype of CSS. SOX11 is the downstream transcriptional factor of the PAX6–BAF complex, highlighting the importance of the BAF complex and SOX11 transcriptional network in brain development.

¹Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan.

²Division of Medical Genetics, Saitama Children's Medical Center, 2100 Magome, Iwatsuki 339-8551, Japan. ³Department of Medical Genetics, Sanjay Gandhi Postgraduate Institute of Medical Sciences, Raebareilly Rd, Lucknow 226014, India. ⁴Laboratory for Bone and Joint Diseases, Center for Integrative Medical Sciences, RIKEN, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. ⁵Department of Biochemistry, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan. ⁶Department of Obstetrics and Gynecology, Juntendo University, Hongo 3-1-3, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan. ⁷Department of Medical Genetics, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, 840 Murodo-cho, Izumi 594-1101, Japan. ⁸National Research Institute of Fisheries Science, 2-12-4 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-8648, Japan.

⁹Department of Human Genetics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.M. (email: naomat@yokohama-cu.ac.jp).

Coffin–Siris syndrome (CSS; MIM#135900) is a congenital disorder characterized by growth deficiency, intellectual disability, microcephaly, characteristic facial features and hypoplastic nails of the fifth fingers and/or toes (Supplementary Fig. 1). Five subunit genes (*SMARCB1*, *SMARCA4*, *SMARCE1*, *ARID1A* and *ARID1B*) of the BAF complex (also known in yeast as the SWI/SNF complex¹) are mutated in 55–70% of CSS patients^{2–6}. Mutations in *SMARCA2*, another BAF complex gene, were reported in the Nicolaïdes–Baraitser syndrome, which is similar to, but distinct from CSS⁷. Furthermore, *de novo* *PHF6* mutations were found in two CSS patients⁶, although no direct interaction has been reported between the BAF complex and *PHF6*, which interacts with the nucleosome remodelling and deacetylation complex⁶. As 30–45% of CSS patients were genetically undiagnosed in three large cohort studies^{2–6}, further genetic investigation is required to fully address the genetic picture of CSS.

Here we apply whole-exome sequencing (WES) to 92 CSS patients, and identify two *de novo* *SOX11* mutations in two unrelated patients. *sox11* knockdown experiments in zebrafish result in a smaller head and significant mortality, which were partially rescued by human wild-type *SOX11* messenger RNA (mRNA), but not by mutant mRNA.

Results

WES of CSS patients. We identified two *de novo* *SOX11* mutations in two unrelated patients, c.347A>G (p.Tyr116Cys) (in patient 1) and c.178T>C (p.Ser60Pro) (in patient 2) (deposited to LOVD, <http://www.LOVD.nl/SOX11>), among 92 CSS patients (including our previous cohorts^{2,3}) analysed by trio-based WES. In the two patients, >10 reads covered 94–92% of coding sequences and only *SOX11* mutations remained as candidate variants in both of them based on the *de novo* model with scores of damaging or disease causing by SIFT, PolyPhen2 and Mutation Taster (Supplementary Table 1). The two heterozygous mutations localize to the high-mobility group (HMG) domain. Neither mutation was registered in the databases examined (1,000 Genomes, Exome Sequencing project (ESP) 6500, and in-house databases containing 575 control exomes) (Supplementary Table 1). We identified a further 22 *SOX11* variants within these three databases, but all of them reside outside the HMG domain and, based on prediction programs, are less likely to be pathogenic (Supplementary Table 1; Supplementary Fig. 2). The amino acids altered in *SOX11* are evolutionarily conserved from zebrafish to human (Fig. 1). The mutations do not alter nuclear localization of *SOX11* protein (Supplementary Fig. 3). *De novo* mutations were confirmed in the two families by Sanger sequencing along with biological parentage. No mutations in any of the other BAF complex genes, *PHF6*, or other potential

candidate genes were found in the two families. Therefore, the two mutations identified are highly likely to be pathogenic. Moreover, *SOX11* was sequenced by WES ($n=23$) or Sanger method ($n=67$) in a further 90 CSS patients, with no mutations found. Fifty-four patients had a mutation in one of the five BAF complex subunit genes (58.7%) (*SMARCA4*, *SMARCB1*, *SMARCE1*, *ARID1A* and *ARID1B* mutations found in 9, 8, 1, 5 and 31 patients, respectively).

Clinical features of patients with *SOX11* mutations. The two patients showed dysmorphic facial features, microcephaly, growth deficiency, hypoplastic fifth toe nails and mild intellectual disability⁸ (Supplementary Fig. 1; Supplementary Table 2). The observed clinical features in both patients are classified to a mild end of CSS as patient 1 spoke early for CSS and patient 2 has relatively high intelligence quotient. Although the two patients do not look similar in facial appearance (patient 1 has midface hypoplasia, while patient 2 does not; in addition there is an ethnic difference, as patients were either Japanese or Indian), they do share features in common, namely, hypertrichosis, arched eyebrows, low-set ears, auricular back-rotation and full cheeks (Supplementary Fig. 1).

Patient 1 (Japanese) was born at 38 weeks of gestation following an uneventful pregnancy. Her birth weight was 2,340 g (−1.9 s.d.), length 45 cm (−2.2 s.d.) and occipitofrontal circumference (OFC) 30.5 cm (−1.8 s.d.). She was hypotonic, had feeding difficulties (especially during the neonatal period) and delayed development. She was able to support her head at 5 months of age, sit at 11 months and walk independently at 1 year 11 months. She started to speak meaningful words at 1 year 7 months. At 3 years, her developmental quotient was estimated using the Kyoto scale of psychological development to be 57. Abdominal echography showed her left kidney was slightly small in size. She has distinctive facial features characterized by midface hypoplasia, short palpebral fissures, hypertelorism, upturned palpebral fissures, long eyelashes, a low nasal root, shortened nose with upturned nostrils, short philtrum, open mouth, full lips and low-set ears. Hypoplastic distal phalanges with nail hypoplasia (especially of the fifth digits) were also noted. Additional findings included hypertrichosis and long eyelashes with abundant hair on the scalp. At 4 years 8 months, she was short with a height of 92.1 cm (−2.9 s.d.) and evaluated for possible growth hormone deficiency with stimulation tests, which showed normal results. At 10 years, she measured 119 cm (−2.8 s.d.), weighed 20.1 kg (−1.8 s.d.) and had an OFC of 47.3 cm (−3.3 s.d.). She attends a special education class for poor performance, but can walk to school by herself (takes approximately half an hour) and is able to communicate verbally, to some extent, with her classmates. Clinical features are summarized in Supplementary Table 2.

Patient 2 (Indian) is a 16-year-old female, and was referred to the genetics outpatient department for evaluation of short stature. She was born at term following a normal pregnancy, but with low birth weight (1.75 kg, −4 s.d.). Developmental milestones were attained normally, but her parents always felt that she lagged behind other children. She was a slow learner with poor scholastic performance and an intelligence quotient of 70–80. She attended a normal class, but struggled to pass class examinations every year. She has a proportionately short stature but not a coarse face. Her chin was small and supraorbital ridges hypoplastic with no ptosis. Her nose was long and alae nasi hypoplastic with overhanging columella. Her hair was thick and rough with some thinning on her scalp. She had increased hair on her back. Her fourth and fifth toes were short and all her finger nails were hypoplastic with thin and tapered fingers. Her fourth and fifth toes on both feet, and also the third toe on her right foot, were

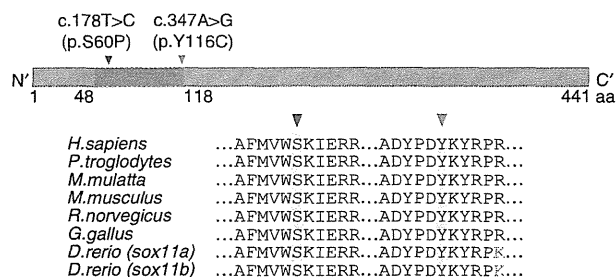


Figure 1 | *SOX11* mutations and functional characterization. *SOX11* mutations in CSS patients. Two missense mutations in the HMG domain (blue box) occur at evolutionarily conserved amino acids.