

201442051A

厚生労働科学研究費委託費
難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)

ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患
特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と治療法開発
(H26-委託(難)-一般-051)

平成26年度 **委託業務成果報告書**

研究代表者 山本 俊至
東京女子医科大学 統合医科学研究所

平成 27 (2015)年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働省科学研究委託事業による委託業務として、東京女子医科大学 統合医科学研究所 准教授 山本俊至が実施した平成26年度「ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明と治療法開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 総括研究報告	
ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明と治療法開発 山本俊至	3
II. 分担研究報告	
1. 自閉症・発達障害患者の診断支援 山本俊至	15
2. ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明 山本俊至	22
3. 自閉症スペクトラム患者の病因遺伝子同定 山形崇倫	29
4. ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明と治療法開発 矢田俊彦	34
5. ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明と治療法開発 岡本伸彦	37
6. 自閉症・発達障害患者の診断支援 小坂 仁	42
7. 疾患特異的iPS細胞の形態・機能評価手法の確立 永田浩一	49
8. ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患特異的iPS細胞樹立 齋藤 潤	56
9. ヒトiPS細胞におけるゲノム編集および神経分化誘導技術の確立による発達障害モデルの作製と創薬スクリーニング系の確立 北島 康司	59
III. 学会等発表実績	67
IV. 研究成果の刊行物・別刷	97

I . 総括研究報告

ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と
治療法開発

研究代表者 山本 俊至 東京女子医科大学統合医科学研究所・准教授

研究要旨

研究目的:

自閉症・発達障害の原因は明らかでない。しかし、一部の患者ではゲノム構造異常によって発症したことが明らかになってきている。自閉症・発達障害の原因を明らかにするため、ゲノム構造異常が明らかな自閉症・発達障害患者から iPS 細胞を樹立して神経細胞に分化誘導させ、シナプスレベルでの病態を電気生理学的手法や免疫組織学的手法を用いて解析し、その病態を明らかにすることが本研究の目的である。病態が明らかになれば、その病態を標的とした治療研究を行うことが可能となる。

研究方法:

原因不明の自閉症・発達障害患者のゲノム構造異常の有無をマイクロアイや次世代シーケンサーを用いて解析する。これによって自閉症・発達障害が発症した原因が明らかになった患者から疾患 iPS 細胞を樹立する。さらに神経細胞に分化誘導させることによりシナプスレベルでの病態を電気生理学的手法や免疫組織学的手法を用いて解析する。

結果と考察:

原因不明の自閉症・発達障害患者 98 名を対象に、マイクロアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析を行った。その結果、新たに 18 名の新規ゲノム異常を明らかにした。また、次世代シーケンサーを用いたパネル解析にも着手した。発達障害の原因として KIF1A や DYRK1A の変異が関わっていることを明らかにした。これらの患者から疾患 iPS 細胞樹立を進めていく。

一方、すでに樹立済のゲノム構造異常が明らかな疾患 iPS 細胞を用いた神経系分化誘導と病態解析を行った。神経系分化誘導法は目的に応じて一般的な SFEBq 法と、迅速分化誘導法の 2 種類の方法を用いた。パッチクランプなどによるシナプスの電荷の測定等の電気生理学解析、神経細胞遊走のタイムラプス観察や免疫組織染色などによる spine の形態や数の観察を行った。

結論:

今後さらに詳細な解析を進め、自閉症・発達障害の治療ターゲットとなる病態を明らかにしていく予定である。

研究組織	
研究代表者:	
東京女子医科大学統合医科学研究所	山本俊至
研究分担者:	
自治医科大学小児科	山形嵩倫
自治医科大学生理学	矢田俊彦
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
自治医科大学小児科	小坂 仁
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所	永田浩一
京都大学 iPS 細胞研究所	齋藤 潤
大阪大学小児科	北畠康司

A. 研究目的

自閉症・発達障害は、原因が明らかでないことが多いため、家庭の養育環境に原因が求められたりするなど、患者家族は周囲の無理解に晒される場合が多い。根本的な治療もなく、社会福祉資源を使った包括的なケアが行われているが十分ではない。近年のゲノム解析手法の著しい発展により、これらの発達障害を示す患者の中に、ゲノム構造異常によって発症した患者が多く存在することが明らかになってきた。我々は、マイクロアレイを用いたゲノムコピー数解析を行うことにより、発達障害の原因となるゲノム構造異常を明らかにしてきた。これまでに明らかにしたゲノム構造異常の領域には、様々なシナプス関連遺伝子が存在しており、

そのためにシナプスの機能障害を引き起こし、発達障害を生じていると考えられるが、高次脳機能障害をマウスなどの実験動物で証明することが困難であるため、神経細胞レベルでの病態解明は進んでいない。そこで我々は、患者由来疾患 iPS を利用した病態解析を着想するに至った。

疾患 iPS 細胞を用いた自閉症・発達障害の研究成果として、自閉症の原因遺伝子のひとつと考えられている SHANK3 が欠失した自閉症患者由来 iPS 細胞のシナプス病態が IGF1 で改善することが海外の研究室から示された(Nature 14; 267-71, 2013)。これは根本的な治療の可能性を示唆する画期的な結果であり、疾患 iPS 細胞を利用することによる神経細胞機能評価の可能性を示したものである。そこで我々は、ゲノム構造異常によって生じた自閉症・発達障害患者のうち年間 10 例から iPS 細胞を樹立して神経細胞に分化誘導させ、シナプスレベルでの病態を電気生理学的手法や免疫組織学的手法を用いて解析し、その病態を標的とした治療研究を行う。また、生細胞を採取することが困難な患者のために、歯髄幹細胞を病態解析に利用する方法や、iPS 細胞にゲノム編集を加えて病態をさらに解析する。

疾患 iPS 細胞を用いた自閉症・発達障害の病態研究は重要であるが、病態を明らかにしようとする場合、発症の原因となるゲノム構造異常が明らかな疾患 iPS 細胞を用いることが何よりも重要である。本研究においては、これまでの研究においてゲノム構造異常がすでに明らかな自閉症・発達障害患者から樹立した疾患 iPS 細胞を用いているところが最も重要である。本研究では、疾患 iPS を用いた病態解析を行い、得られた所見をターゲットとした治療候補薬スクリーニング

に繋げ、将来の治療法開発に発展させることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 診断支援

微細ゲノム構造異常により発症した自閉症・発達障害患者を明らかにするために、マイクロアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析を行い、SHANK3 欠失などによる自閉症・発達障害患者の診断を行った。次世代シーケンサーにより網羅的な遺伝子解析のシステムも構築した。将来的な治療研究を目指し、診断が得られた患者の発達障害の程度を統一したスコアなどで評価し、得られた資料はデータベース化を目指している。

(2) iPS 細胞樹立

自閉症・発達障害の原因となるゲノム構造異常が明らかになった患者から、細胞バンクへの細胞の寄託を前提に書面によるインフォームドコンセントを得て、文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」の樹立拠点である京都大学 iPS 細胞研究所に細胞を送付し、iPS 細胞を樹立する準備を整えている。(京都大学 iPS 細胞研究所とは研究協力に関して合意済。) 京都大学 iPS 細胞研究所において品質管理を行い、神経系細胞への分化誘導を行う予定である。年間 10 人のゲノム構造異常に由来する自閉症・発達障害患者から疾患 iPS 細胞を樹立することを目標とする。

(3) 病態解析

京都大学 iPS 細胞研究所と協力して iPS 細胞の神経系細胞への分化誘導を行った。

神経系に分化誘導した細胞について、パッチクランプなどによるシナプスの電荷の測定等の電気生理学的解析、免疫組織染色などによる spine の形態や数の観察、ゲノム編集の手法による病態再現とレスキューによる病態解析を行った。

(4) iPS 細胞樹立歯髄幹細胞利用

歯髄には神経幹細胞が含まれていることはよく知られている。歯髄細胞を培養するとある程度多能性や分裂能力を維持したままの細胞が得られる。乳歯は自然に脱落するため、採取時にまったく侵襲性がない。そのため自閉症・発達障害患者で採血や皮膚生検に対する恐怖から、なかなか生細胞を採取することができない場合に、代わりに歯髄細胞を利用することが可能である。そこで正常対象と自閉症・発達障害患者由来の歯髄細胞を収集し、成熟したニューロンへの分化誘導、病態解析への応用を試みた。

(5) 情報発信

研究の進捗状況について、ホームページを開設して一般に広く公開している。

(6) 倫理面への配慮

本研究においては患者情報に基づく研究を行うことから、個人情報に配慮する必要があるため、東京女子医科大学の倫理委員会に申請し、承認を得た。ゲノム解析においては書面に基づく説明と書面によるインフォームド・コンセントを得て実施した。収集される検体には、二重連結可能匿名化番号を付与し、匿名化番号、同意書のコピー 1 部、および患者情報票のコピー 1 部

について個人情報管理者が管理する。個人情報と匿名化後の ID を連結する対応表はコンピューターの外部記憶装置に保存し、鍵のかかるキャビネット内で個人情報管理者が保管する。試料等に関するデータベースをコンピューターを用いて取り扱う場合は、インターネットや他のコンピューターから切り離れた状態で取り扱う。

C. 研究結果

(1) 診断支援

原因不明の自閉症・発達障害患者 98 名を対象に、マイクロアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析を行った。その結果、新たに 18 名の新規ゲノム異常を明らかにした。また、次世代シーケンサーを用いたパネル解析にも着手した。発達障害の原因として KIF1A や DYRK1A の変異が関わっていることを明らかにした。

(2) iPS 細胞樹立

本研究では文部科学省「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」の樹立拠点である京都大学 iPS 細胞研究所と提携し、疾患 iPS 細胞を樹立する計画である。そのため、細胞提供元の東京女子医科大学、自治医科大学、大阪母子保健総合医療センターと京都大学との契約締結の手続き中である。契約が成立次第、年間 10 人を目標に細胞提供を開始する。

(3) 病態解析

すでに樹立済のゲノム構造異常が明らかでない疾患 iPS 細胞を用いた神経系分化誘導と病態解析を行った。神経系分化誘導法は目的に応じて一般的な SFEBq 法と、迅速分

化誘導法の 2 種類の方法を用いた。パッチクランプなどによるシナプスの電荷の測定等の電気生理学的解析、神経細胞遊走のタイムラプス観察や免疫組織染色などによる spine の形態や数の観察、ゲノム編集の手法による病態再現とレスキューによる病態解析を行った。他にもオキシトシンが自閉症行動に与える影響についてや、染色体 trisomy が酸化ストレスに与える影響についても解析中である。

(4) iPS 細胞樹立歯髄幹細胞利用

歯髄には神経幹細胞が含まれており、歯髄細胞を培養すると多能性や分裂能力を維持したままの細胞が得られる。乳歯は自然に脱落するため、侵襲性なく採取でき、採血困難な患者からの採取に適しているため、歯髄細胞から成熟したニューロンへの直接分化誘導を試行中である。

(5) 情報発信

平成 26 年 9 月に患者家族会参加の元、研究班班会議を行って情報交換した。またホームページ (<http://square.umin.ac.jp/microindel/>) を開設して研究の進捗状況を公開している。

D. 考察

自閉症・発達障害の原因の多くは未だに明らかでない。しかし、一部の患者においては微細なゲノム構造異常が生じていることが明らかになっており、本研究ではそのような微細なゲノム構造異常の情報を端緒にし、神経細胞のシナプス機能障害などによる高次脳機能への影響を疾患 iPS 細胞を利用することにより明らかにし、さらに明らか

になった病態をターゲットとした治療法開発研究に繋げて行くことを目的としている。本研究の成果によって、まだ明らかになっていないその他多くの自閉症・発達障害患者の発症原因について示唆が得られる可能性がある。そして、本研究の成果により得られた知見が治療研究に応用されれば、これまではケアに留まっていた自閉症・発達障害患者に対する根本的な治療を行うことができる可能性がある。またこの成果は、ゲノム構造異常が認められないその他多くの自閉症・発達障害患者の治療にも繋がる可能性がある。本研究で構築する予定の臨床情報のデータベースは、将来自閉症・発達障害患者の亜分類の試みに利用し、疾患そのものをより深く理解する一助となると考えられる。また、細胞バンクに寄託された疾患 iPS 細胞が多くの研究者に頒布されてさらに研究が進めば、研究の裾野が広がり、さらに多くの成果が得られる可能性がある。

E. 結論

ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害患者を同定し、当該患者から疾患 iPS 細胞を樹立するスキームを構築した。さらに疾患 iPS 細胞を用いた病態解析の手法を確立した。今後、中核となる病態を明らかにし、治療ターゲットを明らかにすることを目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Irahara K, Saito Y, Sugai K, Nakagawa E, Saito T, Komaki H, Nakata Y, Sato N, Baba K, Yamamoto T, Chan WM, Andrews C, Engle EC, Sasaki M.

Pontine malformation, undecussated pyramidal tracts, and regional polymicrogyria: a new syndrome. *Pediatr Neurol* 50: 384-8, 2014.

2. Shimada S, Maegaki Y, Osawa M, Yamamoto T. Mild developmental delay and obesity in two patients with mosaic 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 164A: 415-420, 2014.
3. Yamamoto T, Togawa M, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Okamoto N. Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including PAX6, WT1, and PRRG4. *Am J Med Genet A* 164A: 634-638, 2014.
4. Sangu N, Shimojima K, Shimada S, Ando T, Yamamoto T. Growth patterns of patients with 1p36 deletion syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)* 54: 82-86, 2014.
5. 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* 261: 752-758, 2014.
6. Yamamoto T, Mencarelli MA, Di Marco C, Mafalda M, Vascotto M, Balestri P, Gérard M, Mathieu-Dramard M, Andrieux J, Breuning M, Hoffer MJV, Ruivenkamp CAL, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Umezu R, Kawame H, Matsuo M, Saito K, Renieri A, Mari F. Overlapping microdeletions involving

- 15q22.2 narrow the critical region for intellectual disability to NARG2 and RORA. *Eur J Med Genet* 57: 163-168, 2014.
7. Yamamoto T, Wilsdon A, Joss S, Isidor B, Erlandsson A, Suri M, Sangu N, Shimada S, Shimojima K, Le Caignec C, Samuelsson L, Stefanova M. An emerging phenotype of Xq22 microdeletions in females with severe intellectual disability, hypotonia, and behavioral abnormalities. *J Hum Genet* 59: 300-306, 2014.
 8. Shimojima K, Shimada S, Tamasaki A, Akaboshi S, Komoike Y, Saito A, Furukawa T, Yamamoto T. Novel compound heterozygous mutations of POLR3A revealed by whole-exome sequencing in a patient with hypomyelination. *Brain Dev* 36: 315-321, 2014.
 9. Shimojima K, Narita A, Maegaki Y, Saito A, Furukawa T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing identifies a de novo TUBA1A mutation in a patient with sporadic malformations of cortical development: a case report. *BMC Res Notes* 7: 465, 2014.
 10. Yamamoto T, Shimojima K, Umemura A, Uematsu M, Nakayama T, Inoue K. SLC16A2 mutations in two Japanese patients with Allan–Herndon–Dudley syndrome. *Hum Genome Variation* 1: 14010, 2014.
 11. Shimada S, Shimojima K, Masuda T, Nakayama Y, Kohji T, Tsukamoto H, Matsubasa T, Oka A, Yamamoto T. MLC1 mutations in Japanese patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Genome Variation* 1: 14019, 2014.
 12. Abe Y, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, Yamamoto T, Kunishima S, Haginoya K. Bilateral periventricular nodular heterotopia with megalencephaly: a case report. *J Child Neurol* [Early on-line view]
 13. Shimojima K, Okumura A, Ikeno M, Nishimura A, Saito A, Saito H, Matsumoto N, Yamamoto T. A de novo TUBB4A mutation in a patient with hypomyelination mimicking Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brai Dev*. [Early on-line view]
 14. Shimada S, Shimojima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, Ikeuchi M, Shimakawa S, Shimizu K, Mizuno S, Kubota M, Adachi M, Saito Y, Tomiwa K, Haginoya K, Numabe H, Kako Y, Hayashi A, Sakamoto H, Hiraki Y, Minami K, Takemoto K, Watanabe K, Miura K, Chiyonobu T, Kumada T, Imai K, Maegaki Y, Nagata S, Kosaki K, Izumi T, Nagai T, Yamamoto T. Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications. *Brain Dev* [Early on-line view]
 15. Chong PF, Haraguchi K, Torio M, Kirino M, Ogata R, Matsukura M, Sakai

- Y, Ishizaki Y, Yamamoto T, Kira R. A case of pontine tegmental cap dysplasia with comorbidity of oculoauriculovertebral spectrum. *Brain Dev* [Early on-line view].
16. Kobayashi S, Onuma A, Inui T, Wakusawa K, Tanaka S, Shimojima K, Yamamoto T, Haginoya K. Clinical course and images of four familial cases of Allan-Herndon-Dudley syndrome with a novel monocarboxylate transporter 8 gene mutation. *Pediatr Neurol* [Early on-line view]
 17. Ogura K, Takeshita K, Arakawa C, Shimojima K, Yamamoto T. Neuropsychological profiles of patients with 2q37.3 deletion associated with developmental dyspraxia. *Am J Med Genet B* 165B: 684-90, 2014.
 18. Yamamoto T, Shimojima K, Shimada S, Yokochi K, Yoshitomi S, Yanagihara K, Imai K, Okamoto N. Clinical impacts of genomic copy number gains at Xq28. *Hum Genome Variation* 1: 14001, 2014.
 19. Shimada S, Hirano Y, Ito S, Oguni H, Nagata S, Shimojima K, Yamamoto T. A novel KCNT1 mutation in a Japanese patient with epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Hum Genome Variation* 1: 14027, 2014.
 20. Okumura A, Yamamoto T, Miyajima M, Shimojima K, Kondo S, Abe S, Ikeno M, Shimizu T. 3p interstitial deletion including PRICKLE2 in identical twins with autistic features. *Pediatr Neurol* 51: 730-3, 2014.
 21. Furukawa T, Sakamoto H, Takeuchi S, Ameri M, Kuboki Y, Yamamoto T, Hatori T, Yamamoto M, Sugiyama M, Ohike N, Yamaguchi H, Shimizu M, Shibata N, Shimizu K, Shiratori K. Whole exome sequencing reveals recurrent mutations in BRCA2 and FAT genes in acinar cell carcinomas of the pancreas. *Scientific Reports* [in press]
 22. Okami N, Aihara Y, Akagawa H, Yamaguchi K, Kawashima A, Yamamoto T, Okada Y. Network-based gene expression analysis of vascular wall of juvenile Moyamoya disease. *Childs Nerv Syst* [Epub ahead of print]
 23. Yamamoto T, Shimojima K, Sangu N, Komoike Y, Ishii A, Abe S, Yamashita S, Imai K, Kubota T, Fukasawa T, Okanishi T, Enoki H, Tanabe T, Saito A, Furukawa T, Shimizu T, Milligan CJ, Petrou S, Heron SE, Dibbens LM, Hirose S, Okumura A. Single nucleotide variations in CLCN6 identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures. *Plos One* [in press]
 24. Shimojima K, Okamoto N, Tamasaki A, Sangu N, Shimada S, Yamamoto T. An association of 19p13.2 microdeletions with Malan syndrome and Chiari malformation. *Am J Med Genet A* [in press]
 25. Yamamoto T, Shimada S, Shimojima K, Ikeda H, Oguni K. Epilepsy in 1p36 deletion syndrome is not associated with deletion size. *J Pediatr Epilepsy* [in

- press]
26. Yamamoto T, Shimada S, Shimojima K, Eto K, Yoshitomi S, Yanagihara K, Imai K, Oguni H, Okamoto N. Xq28 duplications and epilepsy: Influence of the combinatory duplication of MECP2 and GDI1. J Pediatr Epilepsy [in press]
 27. Okumura A, Yamamoto T, Kurahashi H, Takasu M. Epilepsies in children with 2q24.3 deletion/duplication. J Pediatr Epilepsy [in press]
 28. Akiyama T, Yamamoto T. Epilepsy and other symptoms associated with chromosome 9q34.11 microdeletion. J Pediatr Epilepsy [in press]
 29. Tsurusawa R, Ihara Y, Ogawa A, Yamamoto T. 16p11.2 microdeletion/microduplication syndrome and benign infantile epilepsy. J Pediatr Epilepsy [in press]
2. 著書
1. 山本俊至, 下島圭子. iPS 細胞(幹細胞)を用いる医療の近未来. 遺伝子医学 MOOK 別冊「今さら聞けない『遺伝医学』」. pp173-181, メディカルドゥ, 大阪, 2014.
 2. 山本俊至. 1p36 欠失症候群. 今日の小児治療指針, 水口雅, ら 編. 医学書院, 東京 [in press]
 3. 山本俊至. Rett 症候群. 今日の小児治療指針, 水口雅, ら 編. 医学書院, 東京 [in press]
 4. 山本俊至. 先天性疾患の疫学および遺伝的基礎. ネルソン小児科学第 19 版(翻訳), エルゼビアジャパン [in press]
 5. 山本俊至. ダウン症候群・染色体異常. こどもの神経の診かた, 新島新一, 山内秀雄, 山本仁 編. 医学書院, 東京 [in press]
 6. 山本俊至. マイクロアレイ染色体検査概論. 小児内科 47 巻増刊号 病態生理 2 [in press]
 7. 山本俊至. アレイ CGH 法によるてんかんの分子診断. 医学のあゆみ [in press]
3. 学会発表
1. 下島圭子, 岡本伸彦, 玉崎章子, 山本俊至. 19 番染色体 p13.2 の微細欠失を示す 3 女児例. 第 37 回日本小児遺伝学会学術集会, 2014.4.10, 名古屋.
 2. 山本俊至. 希少疾患研究においては症例報告の積み重ねが重要である. 研究活性化シンポジウム, 第 117 回日本小児科学会学術集会, 2014.4.11~13, 名古屋.
 3. 山本俊至. 微細なゲノムコピー数異常が中枢神経の発達に及ぼす影響. 知的障害シンポジウム, 第 117 回日本小児科学会学術集会, 2014.4.11~13, 名古屋.
 4. 山本俊至. [シンポジウム]ゲノムコピー数異常が自閉症スペクトラム障害の原因となる. 第 56 回日本小児神経学会学術集会 2014.5.28~31 浜松.
 5. 山本俊至. [教育講演]小児神経科医が知っておくべき遺伝学的検査の現状と倫理社会的諸問題. 第 56 回日本小児神経学会学術集会 2014.5.28~31 浜松.

6. 島田姿野, 久保田雅也, 下島圭子, 山本俊至, 永田 智. HEPACAM を含む 11q23.3-24.2 の微細欠失により発症した Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cyst (MLC). 第 56 回日本小児神経学会学術集会 2014.5.28~31 浜松.
7. 山崎佐和子, 池野観寿, 遠山潤, 下島圭子, 山本俊至. 16q12.2-21 微細欠失により精神運動発達遅滞・焦点性てんかん・特徴的所見を示した 1 男児例. 第 56 回日本小児神経学会学術集会 2014.5.28~31 浜松.
8. 三宮範子, 下島圭子, 奥村彰久, 山本俊至. 乳児良性部分てんかんの遺伝子診断の有用性と課題. 第 38 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2014.6.26~29, 東大阪.
9. 下島圭子, 三宮範子, 島田姿野, 影山優子, 沼部博直, 山本俊至. 非医療系学部学生への遺伝学教育とボランティア体験の重要性~出張講義の感想から見えてきたこと~. 第 38 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2014.6.26~29, 東大阪.
10. 下島圭子, 奥村彰久, 池野充, 才津浩智, 松本直通, 山本俊至. エクソーム解析により TUBB4A に点突然変異を認めた Pelizaeus-Merzbahcer 病類似の先天性白質脳症. 第 54 回日本先天異常学会学術集会, 2014.7.26~27, 相模原.
11. 三宮範子, 下島圭子, 酒井規夫, 岡本伸彦, 安藤智博, 山本俊至. 精神運動発達遅滞、難聴、耳介変形など CHARGE 症候群類似の症状を示した 10q26 微細欠失の 1 例. 第 54 回日本先天異常学会学術集会, 2014.7.26~27, 相模原.
12. 山本俊至. [シンポジウム 7; てんかん症候群原因遺伝子の探求—臨床へのメッセージ: あなたの症例が新たな発見につながる時—] どのようなてんかん症例でアレイ CGH を進めるべきか? 第 48 回日本てんかん学会学術集会 2014.10.1~3, 東京.
13. 山本俊至, 下島圭子. [シンポジウム疾患 iPS 細胞] 小児難病研究における疾患 iPS 細胞利用. 第 87 回日本生化学会大会, 2014.10.15~18, 京都.
14. 山本俊至. [シンポジウム 2: 次世代医療と先天代謝異常] マイクロアレイ染色体検査による先天代謝異常の診断. 第 56 回日本先天代謝異常学会総会/第 12 回アジア先天代謝異常症シンポジウム, 2014.11.13~15, 仙台.
15. 下島圭子, 奈良井哲, 山本俊至. 7p22.1 微細欠失を認め低身長を呈する男児; ACTB ハプロ不全との関わり. 日本人類遺伝学会第 59 回大会/日本遺伝子診療学会第 21 回大会, 2014.11.19~22, 東京.
16. 三宮範子, 下島圭子, 奥村彰久, 山本俊至. PRRT2 変異による乳児良性部分てんかん患者の遺伝学的特徴. 日本人類遺伝学会第 59 回大会/日本遺伝子診療学会第 21 回大会, 2014.11.19~22, 東京.
17. 島田姿野, 山本俊至, 平野嘉子, 小国弘量, 永田智. 新規 KCNT1 変異を確認した Epilepsy of infancy with migrating focal seizures の 1 例. 日本人

類遺伝学会第 59 回大会/日本遺伝子
診療学会第 21 回大会, 2014.11.19～
22, 東京.

18. 山本俊至, 下島圭子, 荒川千賀子.
PLP1 を含む Xq22 の微細欠失は女兒
における重度精神運動発達遅滞と行
動異常の原因となる. 日本人類遺伝学
会第 59 回大会/日本遺伝子診療学会
第 21 回大会, 2014.11.19～22, 東京.
19. 山本俊至. [シンポジウム;乳幼児てんか
ん性脳症の遺伝子診断]マイクロアレイ
染色体検査による乳幼児てんかん性
脳症のゲノム診断. 日本人類遺伝学会
第 59 回大会/日本遺伝子診療学会第
21 回大会, 2014.11.19～22, 東京.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

II. 分担研究報告

自閉症・発達障害患者の診断支援

研究代表者 山本 俊至 東京女子医科大学統合医科学研究所・准教授
研究協力者 恩藤 由美子 東京女子医科大学統合医科学研究所・研究補助員

研究要旨

研究目的:

自閉症・発達障害の原因は明らかでない。しかし、一部の患者ではゲノム構造異常によって発症したことが明らかになってきている。そこで自閉症・発達障害の原因を明らかにするため、マイクロアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析と、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析を行い、原因を明らかにする。

研究方法:

原因不明の自閉症・発達障害患者のうち、本研究の主旨に賛同する患者・家族を対象に遺伝子解析を行った。なお、本研究は学内倫理委員会の承認を得た。

結果と考察:

原因不明の自閉症・発達障害患者 98 名を対象に、マイクロアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析を行った結果、新たに 18 名の新規ゲノム異常を明らかにした。また、次世代シーケンサーを用いたパネル解析にも着手した。発達障害の原因として KIF1A や DYRK1A の変異が関わっていることを明らかにした。

結論:

原因が明らかになった患者のうち、iPS 細胞を樹立して解析する意義のある患者について、iPS 細胞樹立を進める。

A. 研究目的

自閉症・発達障害は、原因が明らかでない場合が多いが、近年の網羅的ゲノムコピー解析により、約 17%の患者において、発症原因となるゲノムコピー数異常が明らかになる。ゲノムコピー数異常が認められない場合は原因を明らかにすることが困難であったが、近年普及してきた次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム解析により、さらに診断される症例が増えてきた。

そこで本研究では、疾患 iPS 細胞研究への参加を前提に、ゲノム診断の支援を行い、新たな患者を掘り起こすことを目的とする。

B. 研究方法

(1) 診断支援

微細ゲノム構造異常により発症した自閉症・発達障害患者を明らかにするために、マイクロアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析を行い、異常が認められない場合はさらに次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析を行った。

(2) 倫理面への配慮

本研究においては患者情報に基づく研究を行うことから、個人情報に配慮する必要があるため、東京女子医科大学の倫理委員会に申請し、承認を得た。ゲノム解析においては書面に基づく説明と書面によるインフォームド・コンセントを得て実施した。

収集される検体には、二重連結可能匿名化番号を付与し、匿名化番号、同意書のコピー1部、および患者情報票のコピー1部について個人情報管理者が管理する。個人情報と匿名化後の ID を連結する対応表はコンピューターの外部記憶装置に保存し、鍵のかかるキャビネット内で個人情報管理者が保管する。試料等に関するデータベースをコンピューターを用いて取り扱う場合は、インターネットや他のコンピューターから切り離れた状態で取り扱う。

C. 研究結果

(1) 診断支援

原因不明の自閉症・発達障害患者 98 名を対象に、マイクロアレイによる網羅的なゲノムコピー数解析を行った。その結果、新たに 18 名の新規ゲノム異常を明らかにした。また、次世代シーケンサーを用いたパネル解析にも着手した。発達障害の原因として KIF1A や DYRK1A の変異が関わっていることを明らかにした。

D. 考察

自閉症・発達障害の原因の多くは未だに明らかでない。しかし、一部の患者においては微細なゲノム構造異常が生じていることが明らかになっており、本研究ではそのような微細なゲノム構造異常の情報を端緒にし、神経細胞のシナプス機能障害などによる高次脳機能への影響を疾患 iPS 細胞を利用することにより明らかにし、さらに明らかになった病態をターゲットとした治療法開発研究に繋げて行くことを目的としている。本研究によって、これまで原因が明らかでなかった患者のうち、18 名において原因があ

きらかになった。今後さらに症例を積み重ね、その中から疾患 iPS 細胞による病態解析のターゲットとなる症例について、iPS 細胞を樹立する。

E. 結論

原因不明の自閉症・発達障害患者の中から新たに原因を明らかにした。今後さらに症例を積み重ねるとともに疾患 iPS 細胞を樹立していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Irahara K, Saito Y, Sugai K, Nakagawa E, Saito T, Komaki H, Nakata Y, Sato N, Baba K, Yamamoto T, Chan WM, Andrews C, Engle EC, Sasaki M. Pontine malformation, undecussated pyramidal tracts, and regional polymicrogyria: a new syndrome. *Pediatr Neurol* 50: 384-8, 2014.
2. Shimada S, Maegaki Y, Osawa M, Yamamoto T. Mild developmental delay and obesity in two patients with mosaic 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 164A: 415-420, 2014.
3. Yamamoto T, Togawa M, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Okamoto N. Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including PAX6, WT1, and PRRG4. *Am J Med Genet A* 164A: 634-638, 2014.
4. Sangu N, Shimojima K, Shimada S, Ando T, Yamamoto T. Growth patterns

- of patients with 1p36 deletion syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)* 54: 82-86, 2014.
5. 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* 261: 752-758, 2014.
 6. Yamamoto T, Mencarelli MA, Di Marco C, Mafalda M, Vascotto M, Balestri P, Gérard M, Mathieu-Dramard M, Andrieux J, Breuning M, Hoffer MJV, Ruivenkamp CAL, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Umezu R, Kawame H, Matsuo M, Saito K, Renieri A, Mari F. Overlapping microdeletions involving 15q22.2 narrow the critical region for intellectual disability to NARG2 and RORA. *Eur J Med Genet* 57: 163-168, 2014.
 7. Yamamoto T, Wilsdon A, Joss S, Isidor B, Erlandsson A, Suri M, Sangu N, Shimada S, Shimojima K, Le Caignec C, Samuelsson L, Stefanova M. An emerging phenotype of Xq22 microdeletions in females with severe intellectual disability, hypotonia, and behavioral abnormalities. *J Hum Genet* 59: 300-306, 2014.
 8. Shimojima K, Shimada S, Tamasaki A, Akaboshi S, Komoike Y, Saito A, Furukawa T, Yamamoto T. Novel compound heterozygous mutations of POLR3A revealed by whole-exome sequencing in a patient with hypomyelination. *Brain Dev* 36: 315-321, 2014.
 9. Shimojima K, Narita A, Maegaki Y, Saito A, Furukawa T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing identifies a de novo TUBA1A mutation in a patient with sporadic malformations of cortical development: a case report. *BMC Res Notes* 7: 465, 2014.
 10. Yamamoto T, Shimojima K, Umemura A, Uematsu M, Nakayama T, Inoue K. SLC16A2 mutations in two Japanese patients with Allan–Herndon–Dudley syndrome. *Hum Genome Variation* 1: 14010, 2014.
 11. Shimada S, Shimojima K, Masuda T, Nakayama Y, Kohji T, Tsukamoto H, Matsubasa T, Oka A, Yamamoto T. MLC1 mutations in Japanese patients with megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Genome Variation* 1: 14019, 2014.
 12. Abe Y, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, Yamamoto T, Kunishima S, Haginoya K. Bilateral periventricular nodular heterotopia with megalencephaly: a case report. *J Child Neurol* [Early on-line view]
 13. Shimojima 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. *Brai Dev.* [Early on-line view]

14. Shimada S, Shimojima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, Ikeuchi M, Shimakawa S, Shimizu K, Mizuno S, Kubota M, Adachi M, Saito Y, Tomiwa K, Haginoya K, Numabe H, Kako Y, Hayashi A, Sakamoto H, Hiraki Y, Minami K, Takemoto K, Watanabe K, Miura K, Chiyonobu T, Kumada T, Imai K, Maegaki Y, Nagata S, Kosaki K, Izumi T, Nagai T, Yamamoto T. Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications. *Brain Dev* [Early on-line view]
15. Chong PF, Haraguchi K, Torio M, Kirino M, Ogata R, Matsukura M, Sakai Y, Ishizaki Y, Yamamoto T, Kira R. A case of pontine tegmental cap dysplasia with comorbidity of oculoauriculovertebral spectrum. *Brain Dev* [Early on-line view].
16. Kobayashi S, Onuma A, Inui T, Wakusawa K, Tanaka S, Shimojima K, Yamamoto T, Haginoya K. Clinical course and images of four familial cases of Allan-Herndon-Dudley syndrome with a novel monocarboxylate transporter 8 gene mutation. *Pediatr. Neurol* [Early on-line view]
17. Ogura K, Takeshita K, Arakawa C, Shimojima K, Yamamoto T. Neuropsychological profiles of patients with 2q37.3 deletion associated with developmental dyspraxia. *Am J Med Genet B* 165B: 684-90, 2014.
18. Yamamoto T, Shimojima K, Shimada S, Yokochi K, Yoshitomi S, Yanagihara K, Imai K, Okamoto N. Clinical impacts of genomic copy number gains at Xq28. *Hum Genome Variation* 1: 14001, 2014.
19. Shimada S, Hirano Y, Ito S, Oguni H, Nagata S, Shimojima K, Yamamoto T. A novel KCNT1 mutation in a Japanese patient with epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Hum Genome Variation* 1: 14027, 2014.
20. Okumura A, Yamamoto T, Miyajima M, Shimojima K, Kondo S, Abe S, Ikeno M, Shimizu T. 3p interstitial deletion including PRICKLE2 in identical twins with autistic features. *Pediatr Neurol* 51: 730-3, 2014.
21. Furukawa T, Sakamoto H, Takeuchi S, Ameri M, Kuboki Y, Yamamoto T, Hatori T, Yamamoto M, Sugiyama M, Ohike N, Yamaguchi H, Shimizu M, Shibata N, Shimizu K, Shiratori K. Whole exome sequencing reveals recurrent mutations in BRCA2 and FAT genes in acinar cell carcinomas of the pancreas. *Scientific Reports* [in press]
22. Okami N, Aihara Y, Akagawa H, Yamaguchi K, Kawashima A, Yamamoto T, Okada Y. Network-based gene expression analysis of vascular wall of juvenile Moyamoya disease. *Childs Nerv Syst* [Epub ahead of print]
23. Yamamoto T, Shimojima K, Sangu N, Komoike Y, Ishii A, Abe S, Yamashita S, Imai K, Kubota T, Fukasawa T, Okanishi T, Enoki H, Tanabe T, Saito A,

- Furukawa T, Shimizu T, Milligan CJ, Petrou S, Heron SE, Dibbens LM, Hirose S, Okumura A. Single nucleotide variations in CLCN6 identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures. Plos One [in press]
24. Shimojima K, Okamoto N, Tamasaki A, Sangu N, Shimada S, Yamamoto T. An association of 19p13.2 microdeletions with Malan syndrome and Chiari malformation. Am J Med Genet A [in press]
25. Yamamoto T, Shimada S, Shimojima K, Ikeda H, Oguni K. Epilepsy in 1p36 deletion syndrome is not associated with deletion size. J Pediatr Epilepsy [in press]
26. Yamamoto T, Shimada S, Shimojima K, Eto K, Yoshitomi S, Yanagihara K, Imai K, Oguni H, Okamoto N. Xq28 duplications and epilepsy: Influence of the combinatory duplication of MECP2 and GDI1. J Pediatr Epilepsy [in press]
27. Okumura A, Yamamoto T, Kurahashi H, Takasu M. Epilepsies in children with 2q24.3 deletion/duplication. J Pediatr Epilepsy [in press]
28. Akiyama T, Yamamoto T. Epilepsy and other symptoms associated with chromosome 9q34.11 microdeletion. J Pediatr Epilepsy [in press]
29. Tsurusawa R, Ihara Y, Ogawa A, Yamamoto T. 16p11.2 microdeletion/microduplication syndrome and benign infantile epilepsy. J Pediatr Epilepsy [in press]
2. 著書
1. 山本俊至, 下島圭子. iPS 細胞(幹細胞)を用いる医療の近未来. 遺伝子医学 MOOK 別冊「今さら聞けない『遺伝医学』」. pp173-181, メディカルドゥ, 大阪, 2014.
2. 山本俊至. 1p36 欠失症候群. 今日の小児治療指針, 水口雅, ら 編. 医学書院, 東京 [in press]
3. 山本俊至. Rett 症候群. 今日の小児治療指針, 水口雅, ら 編. 医学書院, 東京 [in press]
4. 山本俊至. 先天性疾患の疫学および遺伝的基礎. ネルソン小児科学第 19 版(翻訳), エルゼビアジャパン [in press]
5. 山本俊至. ダウン症候群・染色体異常. こどもの神経の診かた, 新島新一, 山内秀雄, 山本仁 編. 医学書院, 東京 [in press]
6. 山本俊至. マイクロアレイ染色体検査概論. 小児内科 47 巻増刊号 病態生理 2 [in press]
7. 山本俊至. アレイ CGH 法によるてんかんの分子診断. 医学のあゆみ [in press]
3. 学会発表
1. 下島圭子, 岡本伸彦, 玉崎章子, 山本俊至. 19 番染色体 p13.2 の微細欠失を示す 3 女児例. 第 37 回日本小児遺伝学会学術集会, 2014.4.10, 名古屋.
2. 山本俊至. 希少疾患研究においては症例報告の積み重ねが重要である.