

表 ATR-X 症候群の異常行動まとめ

年齢	発達状況	脳波 頭部 CT MRI	行動異常	対応
1 8 歳男児	重度知的障害 座位・移動 不可 言語なし てんかん	棘波多発 高振幅徐波 MRI 脳萎縮	低気圧時機嫌不良 経口摂取を受け つけなくなる 不眠で大声をだ す 遠方の地震で機 嫌不良になる 自傷行為	薬物治療
1 9 歳男性	重度知的障害 座位不可移動不可 言語なし てんかん 胃瘻	脳波異常 MRI 脳萎縮	低気圧時機嫌不良 遠方で発生した 台風も感知する 空気嚥下症	薬物治療
4 歳男児	重度知的障害 歩行不可 言語なし てんかん	脳梁低形成	機嫌不良 自傷行為（手を かむ）	薬物治療
1 4 歳男児	重度知的障害 歩行可能 「イヤ」 など発語あり 熱性けいれん	MRI で三角部 T2 延長領域あり 脳波異常なし	歩行可能 常に興奮する 多動顕著 自傷・他傷行為 危険回避困難	周囲の監視必要
7 歳男児	重度知的障害 歩行可能 熱性けいれん	脳波 棘波徐波 MRI 白質 T1T2 延長領域あり	多動 睡眠障害 機嫌不良 興奮	薬物治療
6 歳男児	重度知的障害 座位不可 寝返りまで	脳波 MRI 異常なし	常同行動 常に体を揺する 手を噛む	薬物治療
4 歳男児	重度知的障害 未歩行 有意語なし	脳波異常	台風など低気圧 で機嫌不良	

ATR-X 症候群の遺伝子診断に関する研究

担当責任者 黒澤 健司

地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター遺伝科

【研究要旨】エクソーム解析により、非症候群性精神遅滞・自閉症と考えられていた集団にしばしば ATR-X 症候群が検出されていることが報告されている。従来の、臨床診断に基づいてのシーケンス解析による診断確定の基本的流れに変化がみられる。この傾向は次世代シーケンサーの普及により加速する可能性がある。今回我々は、次世代シーケンサーによるスクリーニング（メンデル遺伝病パネルスクリーニング）で ATR-X 症候群の疾患特異的変異が検出可能性であるか検討した。平均 depths は十分であったが、実際には領域ごとに極めて差が大きかった。浅い read 領域に疾患原因となる変異が存在する場合には variant call がなされない可能性を考慮する必要があった。一方、既存データベースでは、一般集団でのアレル頻度がある程度反映している仮定し、ESP6500 で検証を試みたところ、1/10544 の頻度で *ATRX* の pathogenic variant が潜在していた。この値は、概算としては当研究グループが推測した一般集団での発生頻度と近かった。variant の意義づけは推測プログラムによるものなので、症例ごとの十分な臨床評価が重要であることが分かった。今後、実際の患者集団解析とゲノムデータベースにより、より正確な疾患疫学調査が可能かもしれない。

1. 研究目的

X 連鎖 α サラセミア・精神遅滞症候群（X-linked α -thalassemia/mental retardation syndrome: ATR-X MIM. #301040）は、粗な特異顔貌、軽度の HbH 病、重度精神遅滞、外性器異常などを特徴とする X 連鎖性症候群である。原因遺伝子は Xq21.1 にマップされる *ATRX* で、*ATRX* は核内タンパクとして、複合体を作って DNA メチル化に関わるクロマチンの再構築に関与している。女性保因者では skewed パターンのために、保因者診

断として BCB 染色法を用いる場合は慎重を要する。性腺モザイク例や、非症候群性精神遅滞の *ATRX* 変異例の報告もある。臨床的には、多くの合併症を有し、疾患を理解した医療管理が重要とされる。現在まで、世界で 100 例以上の報告があり、我が国においても数十例以上の症例の存在が確認されている。上述の極めて特徴的な症状を合併するが長期的な予後との関連は依然と不明なことが多い。

ATR-X は、特徴的な臨床像を契機として、

遺伝解析により診断の確定がなされる。診断の確定のためには、遺伝子解析が必須といえる。しかし、実際に未報告変異が検出された場合、それが pathogenic variant (疾患特異的バリエント) と決定づけることは意外と難しい。一方で、網羅的遺伝子解析手法の一つである次世代シーケンサーによるエクソーム解析により、非症候群性精神遅滞・自閉症と考えられていた集団にしばしば ATR-X 症候群が検出されていることが報告されている。従来の、臨床診断に基づいてのシーケンス解析による診断確定の基本的流れに変化がみられる。この傾向は次世代シーケンサーの普及により加速する可能性がある。以上の背景から、今回我々は、次世代シーケンサーによるスクリーニング(メンデル遺伝病パネルスクリーニング)で ATR-X 症候群の疾患特異的変異が検出可能性であるか検討した。さらに、海外および国内のゲノムデータベースに、変異アレルは潜在しているのか検討した。後者は、当研究グループが最初に検討した一般集団における発生頻度の評価のゲノム疫学の見地からの検証にも相当するかもしれない。各種データベースを参照しつつ検討した。

2. 研究方法

診断が未定の神経疾患を疑われる 2 症例を対象として、次世代シーケンスの解析結果を検討した。解析方法として、臨床エクソームキット (TruSight One Sequence Panel, Illumina) を用いて卓上型次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) で解析を進めた。得られたデータは、当施設でのオリジナルパイプラインを用いた。variant マッピング : BWA 0.7.5a、重複検

証 : Picard 1.98、variant calling と indel realignments : GATK 2.7.2.、機能推定 : ANNOVAR を組み合わせた。データの可視化は、IGV (Integrative Genomics Viewer) を用いた。参照ゲノムデータベースは、Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)、1000 Genomes Project, などを用いた。また、HGMD (Human Gene Mutation Database : <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) の最新版も参考とした。日本人データベースとして Human Genetic Variation Database (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>) を参照した。さらに日本人データの不足を補うため、施設内既存 Exome データ (in-house データ) も参照する系とした。

解析にあたっては施設内倫理審査を経たのちに、対象症例に対して文書による同意のもとで解析を進めた。

3. 研究結果

ESP6500 および HGVD など既存データベースから、疾患特異的 (変異) アレルの有無や頻度を ATRX について検討した。ESP6500 での ATRX では probably damaging とされる variant アレルが 20 種類以上あり、一般集団の発生頻度を考慮に入れても、それが実際に疾患発症に関わる pathogenic variant あるとは考えられなかった (Polyphen-2 や SHIFT などのしる予測プログラムの限界)。一方で、明らかに疾患発症に関わる可能性が高く、文献的報告もある disruptive 変異としての c.3179T>G (L1060*) が 1/10544 アレルの頻度で正常集団に潜在していることがわかった。この頻度は女性 4000 人に一人

が、保因者である可能性にもなるが、あくまでも1アレルのみなので、統計的には大きな幅が出てきて、この値をそのまま保因者の潜在に適用できない。しかし、かつて本研究班でまとめた受診例から推測した一般集団におけるATR-X症候群の発生頻度（男児5～6万出生に1例）と比較して、非現実的ではない値であると考えられた。

次世代シーケンスでは、その解析精度はread depthsとターゲット領域のカバー率で表現されるが、実際にメンデル遺伝病パネルで十分なdepthsが得られているか否かを、IGVで可視化して確認した。いずれの症例ともATR-Xの平均値としてのdepthは50-60と極めて良好であることを確認し、今回用いたプラットフォームがスクリーニングとして有効であることを確認した。

4. 考察

ATR-X症候群の遺伝子診断の解析方法として、次世代シーケンスの導入を前提として、解析のシミュレーションを行った。既存データベースは、一般集団での頻度のある提訴反映していることが推測されたが、variantの意義づけは推測プログラムによるものなので、症例ごとの十分な臨床評価が重要であることが分かった。今後、実際の患者集団解析とゲノムデータベースにより、より正確な疾患疫学調査が可能かもしれない。

次世代シーケンスのプラットフォームに由来する解析のpitfallをread depthsを例に検証した。平均depthsは十分であったが、実際には領域ごとに極めて差が大

きかった。浅いread領域に疾患原因となる変異が存在する場合にはvariant callがなされない可能性が高い。次世代シーケンスの臨床導入で注意すべき点と考えられた。

5. 結論

ATR-X症候群の遺伝子診断の解析方法として、次世代シーケンスの導入を前提として、解析のシミュレーションを行った。データベースの有用性や限界、次世代シーケンスのpitfallを確認した。しかし、それでもなおその有用性は極めて高く、症例ごとの解析後の検証が今後の課題である。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表

大橋育子、西川智子、松浦公美、成戸卓也、黒田友紀子、黒澤健司. 次世代シーケンスの臨床応用に伴うIncidental findingsへの対応—パイロットスタディ報告—遺伝科医の立場から 第38回日本遺伝カウンセリング学会 2014.27-29. 東大阪市

原著論文

- 1) Miyake F, Kuroda Y, Naruto T, Ohashi I, Takano K, Kurosawa K. West Syndrome in a Patient With Schinzel-Giedion Syndrome. J Child Neurol. 2014 Jul 14.. [Epub ahead of print]
- 2) Shimbo H, Ninomiya S, Kurosawa K, Wada T. A case report of two brothers with ATR-X syndrome due to low maternal

frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the ATRX. J Hum Genet. 2014 Jul;59(7):408-10.

その他の発表

黒澤健司 ゲノムデータベースの利用
医学のあゆみ 2014;250:349-352.

2) 海外

Enomoto Y, Ohashi I, Kuroda Y, Hatano C,
Yokoi T, Ida K, Naruto T, Kurosawa K.
Implementing next generation sequencing in
clinical practice of children's hospital.
American Society of Human Genetics 64th
Annual Meeting, 2014. 10.18-22. San Diego.

7. 知的所有権の出願・取得状況
なし。

ATR-X症候群の分子遺伝学的診断と病態解析に関する研究

担当責任者 新保裕子 神奈川県立こども医療センター 臨床研究所

【研究要旨】 X-連鎖性 α サラセミア精神遅滞（ATR-X）症候群が疑われる症例の確定診断として、ATR-X症候群の責任遺伝子 *ATRX* の遺伝子解析を行った。本研究において、末梢血液から RNA またはゲノム DNA を抽出した。RNA に関してはオリゴ dT を用いて cDNA を合成した。PCR で増幅後、その PCR 産物をサンガーシーケンス法で解析した。*ATRX* 遺伝子のエクソン 1 欠失例においては、隣接する *MAGT1*（マグネシウム輸送タンパク質）遺伝子解析を行ったところ、*MAGT1* 遺伝子のエクソン 2～10 も欠失していることが判明した。ゲノム DNA 解析により切断点決定、cDNA 解析により、*MAGT1* エクソン 1+*ATRX* エクソン 2-35 の結合を確認し、融合タンパクができている可能性が示唆された。

A. 研究目的

X-連鎖性 α サラセミア精神遅滞（ATR-X）症候群は男性のみに発症し、重度の精神遅滞、特徴的な顔貌、外性器異常、骨格異常、 α サラセミア、行動異常を特徴とする。海外では 200 人以上、日本では 80 以上の患者が診断されている（R.J. Gibbons et.al. Hum Mutat 29 (2008), T.Wada et.al. Am J Neuroradiol 34 (2013)）。

その責任遺伝子は Xq13 に局在するクロマチンリモデリング蛋白をコードする *ATRX* 遺伝子である（R.J. Gibbons et.al. Am J Med Genet 55 (1995)）。

ATRX 遺伝子は全 35 エクソン、300kb のゲノムからなり、10.5kb の mRNA の転写産物をコードする。機能的に重要な ADD(ATRX-DNMT3-DNMT3L)ドメインとヘリカーゼドメインから構成され、患者のほとんどがこの領域に変異をもつ。

我々は患者末梢血から RNA を抽出し、cDNA を合成し、PCR、サンガーシーケンス法により、*ATRX* 遺伝子を解析する方法を確立し、臨床応用している。

本研究においては、ATR-X 症候群が疑われた 13 例に対し、*ATRX* 遺伝子解析を行った。*ATRX* エクソン 1 欠失例において、隣接する *MAGT1* 遺伝子解析を行ったところ、*MAGT1* 遺伝子のエクソン 2～10 まで欠失していることが判明した。cDNA 解析により、*MAGT1* エクソン 1+*ATRX* エクソン 2-35 の結合を確認し、融合タンパクができている可能性が示唆された。

また、女性同胞者の保因者診断に対応するため、切断点決定も行った。

定量 PCR を用いた低頻度モザイクの検出法は既に確立してある（H. Shimbo et.al. S. Ninomiya, K. Kurosawa, T. Wada. J Hum Genet 59 (2014)）。

B. 研究方法

1. 遺伝子解析

a. ゲノム DNA, RNA

抽出 検体として患者末梢血液 (EDTA2Na) 5ml (3ml をゲノム DNA 抽出、2ml を RNA 抽出) に使用。

b. cDNA 合成

Primescript RT reagent kit (Takara) を用いて抽出した totalRNA から cDNA を合成。

c. PCR、シーケンス

*ATR*X 遺伝子の全コーディング領域をカバーするプライマー12組を独自に設計、PCR 反応、シーケンス施行。

d. cDNA 解析で見つかった変異をゲノム DNA で確認。

2. 欠失領域の決定

*ATR*X エクソン 1 欠失例において、*ATR*X 上流にある *MAGT1* 遺伝子(全 10 エクソン)について、PCR を行い、*MAGT1* エクソン 2-10 が欠失が判明、cDNA 解析により、*MAGT1* エクソン 1 のすぐ後に *ATR*X エクソン 2 が繋がっていることを確認。ゲノム DNA 解析により切断点決定。

C. 研究結果

臨床学的 ATR-X が疑われた 13 症例 (2013 年度未解決 1 例含む)を対象に、*ATR*X 遺伝子解析を行い、6 症例について変異を同定した(表 1)。4 例については変異が見つからず、3 例は現在解析中である。

MAGT1+*ATR*X の部分欠失例においては、mRNA(cDNA)解析により、*MAGT1* エクソン 1+*ATR*X エクソン 2-35 の結合を認めた。ゲノム解析では切断点を同定

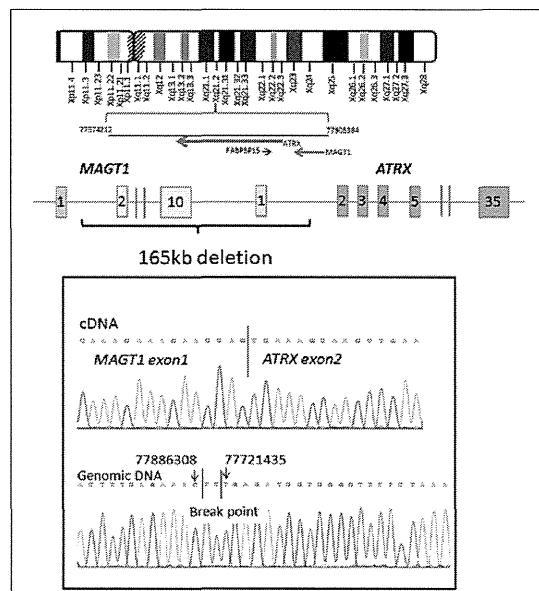
し、約 165kb 欠失と 2 塩基挿入を確認した (図 1)。

IVS1 - 1G>A (intron1), exon2 skipping の症例に関しては、コケイン症候群の原因遺伝子 ERCC6 も変異が見つかった。

表 1 *ATR*X 遺伝子変異

変異	種類
p.Pro190Thr(exon7)	ADD domain
p.Arg246Cys(exon9) (2例)	ADD domain
p.Tyr266Cys(exon9)	ADD domain
IVS1-1G>A (intron1), exon2 skipping	スプライシング
MAGT1exon2-10+ATR exon1 deletion	欠失

図 1. *MAGT1*exon2-10+*ATR*Xexon1 の欠失例



D. 考察

本研究期間に *ATR*X 遺伝子解析を依頼された 13 症例中、6 症例について変異を同定した。変異が同定されなかった症例の臨床診断は、ATR-X 症候群としては非典型的であり、他の疾患が疑われる。

ATRX エクソン 1 欠失例に関しては、隣接遺伝子の *MAGT1* のエクソン 2-10 も欠失していることが判明した。ゲノム DNA 解析により切断点決定、RNA 解析により、*MAGT1* エクソン 1+*ATRX* エクソン 2-35 の結合を確認し、融合タンパクができている可能性が示唆された。

MAGT1 は細胞膜に存在するマグネシウム輸送タンパク質であり、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の取り込みに関与する。*MAGT1* 欠損症においては、CD4 リンパ球減少及び慢性ウイルス感染症を特徴とすることも報告されている(N. Wu et.al. Magnesium in a signalling role. *Nature* 475, 462-463 (2011), J. F. Foley et.al. Magnesium Required? *Sci. Signal.* 4, ec212 (2011), Feng-Yen Li et.al., Second messenger role for Mg^{2+} revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature* 475, 471-476 (2011))。

E. 結論

患者の末梢血から抽出した RNA 及びゲノム DNA を用いたサンガーシーケンス法による *ATRX* 遺伝子解析は *ATR-X* 患者の診断に有効である。今後、次世代シーケンス法も取り入れ、臨床学的に *ATR-X* 症候群が疑わしい症例のみ、1st line で hot spot をサンガーシーケンス法、2nd line に次世代シーケンス法、また非典型例に関しては 1st line に次世代シーケンス法を検討する。

今回経験した *ATRX* エクソン 1 欠失例に関しては、隣接遺伝子の *MAGT1* のエクソン 2-10 も欠失していることが判明した。RNA 解析により、*MAGT1* エク

ソン 1+*ATRX* エクソン 2-35 の結合を確認し、融合タンパクができている可能性が示唆された。RNA 解析の重要性を再認識した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimbo H, Ninomiya S, Kurosawa K, Wada T. A case report of two brothers with *ATR-X* syndrome due to low maternal frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the *ATRX*. *J Hum Genet*, 59 (2014) 408-410.

2) 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 Rep*.1 (2014) 133-138

3) 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) [Epub ahead of print]

4) 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. 37(2015)243-249.

5) 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): 50:417-420

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. (2014): 50:99-100

2. 学会発表

1) Shimbo H, Kurosawa K, Okamoto N, Ninomiya S, Wada T. Molecular genetic study of 75 patients with ATR-X syndrome in Japan. 64th American Society of Human Genetics . 2014.10.18-22 San Diego

2) Osaka H, Shimbo H, Murayama K, Akira Ohtake, Noriko Aida. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. Mitochondrial Medicine. 2014.6. 4-7 Pittsburgh PA

3) Sasaki Y, Shimbo H, Osaka H. Regulation of osteoblast derived from dental pulp cells of cleidocranial dysphasia. 9th Biennial Conference of

PDAA 2014.8.22-24 Singapore

4) 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, 和田敬仁, 新保裕子, 松本直通, 小坂仁 56 回日本小児神経学会 平成 26 年 5 月 28-30 日 浜松

5) 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, 山崎雅世, 鈴木峻, 門田行史, 小坂仁, 杉江秀夫, 新保裕子, 山形崇倫 56 回日本小児神経学会 平成 26 年 5 月 28-30 日 浜松

6) 頭蓋縫合早期癒合症に対する縫合切除と術後ヘルメット装着による治療. 伊藤進、三宅勇平、下吹越航、新保裕子 第 42 回日本小児神経外科学会, 仙台, 2014 年 5 月

7) 頭蓋縫合早期癒合症に対する縫合切除と術後ヘルメット装着による治療 伊藤進、鈴木良介、三宅茂太、新保裕子 第 10 回 craniosynostosis 研究会, 名古屋, 2014 年 7 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許第 5662182 号

発明の名称： 生体試料中のアミン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

特許権者： 地方独立行政法人神奈川県
立病院機構

発明者： 和田敬仁、新保裕子、小坂仁

出願番号： 特願 2011-019561

出願日： 平成 23 年 2 月 1 日

登録日： 平成 26 年 12 月 12 日

Ⅲ. 学会等発表実績

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「クロマチンリモデリング因子ATRXタンパクの異常により発症するX連鎖 α サラセミア/精神遅滞症候群のアミノレブリン酸による治療法の開発」

代表 京都大学 和田敬仁

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Molecular genetic study of 75 patients with X-linked alpha-thalassemia and mental retardation (ATR-X) syndrome in Japan. (ポスター発表)	H. Shimbo, K. Kurosawa, N. Okamoto, S. Ninomiya, T. Wada.	64th Annual Meeting of American Society of Human Genetics	Oct. 18-22, 2014.	国外
ATR-X症候群における染色体テリトリーおよび関連遺伝子領域の核内空間配置解析（ポスター発表）	田辺秀之、和田敬仁	日本人類遺伝学会第59回大会	2014. 11	国内
染色体キッシングが見られたATR-X症候群患者由来細胞核の遺伝子空間配置（ポスター発表）	田辺秀之、塩田倫史、和田敬仁	第32回染色体ワークショップ	2014. 12	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
A case report of two brothers with ATR-X syndrome due to low maternal frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the ATRX.	Shimbo H, Ninomiya S, Kurosawa K, Wada T.	J Hum Genet 59:408-410	2014	国外
ATR-X症候群	和田敬仁	別冊日本臨床 29:441-444	2014	国内

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。
（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

SHORT COMMUNICATION

A case report of two brothers with ATR-X syndrome due to low maternal frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the *ATR-X*

Hiroko Shimbo¹, Shinsuke Ninomiya², Kenji Kurosawa³ and Takahito Wada^{1,4}

In clinical practice, it is important to diagnose the carrier state of female patients with X-linked diseases for genetic counseling to calculate the recurrent risk of offspring. Because some X-linked diseases show high rates of gonadal mosaicism, this diagnosis is sometimes difficult, when there are few offspring in a family and no mutation is detected in the maternal genomic DNA. Here, we report two male siblings with ATR-X syndrome carrying an intragenic deletion of 78.6 kb involving exons 2–5 out of the 35 exons in the *ATR-X*, as revealed by PCR amplification of these exons. The mother was expected to be an obligate carrier, but we could not confirm her as a mutation carrier by quantitative PCR (qPCR) for the exons. However, we identified the breakpoint of *ATR-X*, and qPCR with breakpoint-specific primers revealed gonosomal mosaicism, with a relative frequency of the mutation of <1% in genomic DNA of her peripheral blood. For these obligate carriers of X-linked disease, we should aggressively investigate the maternal genomic status, not only because her genetic condition is important for estimating the recurrent risk of her offspring but also because a diagnosis of her gonosomal mosaicism can render negligible the possibility that her female siblings are carriers. We should reconfirm that a female who has a risk of being a carrier has a gonosomal or somatic mutation, even if she is an obligate carrier or apparently harbors a mutation.

Journal of Human Genetics (2014) 59, 408–410; doi:10.1038/jhg.2014.45; published online 5 June 2014

INTRODUCTION

X-linked α -thalassemia mental retardation syndrome (ATR-X syndrome; MIM# 603040) is characterized by severe intellectual disability, dysmorphic facies, hypotonia, genital and skeletal abnormalities and downregulation of the α -globin genes (α -thalassemia).¹ More than 80 patients have been molecularly diagnosed in Japan and more than 200 patients worldwide.² Most of their mutations are clustered in two functionally important regions: the ADD (*ATR-X*-DNMT2-DNMT3) and helicase domains, resulting in loss of function.²

Generally, in sporadic cases of severe X-linked disease with zero-fitness, the probability that the mother is a mutation carrier is 2/3 and the probability that the patient has a *de novo* mutation is 1/3.³ Thus, it is important to diagnose the mother's mutation carrier state to calculate the probability of the recurrence risk in the offspring. On the other hand, even if no mutations are detected in genomic DNA extracted from their peripheral blood, we should consider the possibility of germline, somatic or gonosomal mosaicism. Germline and gonosomal mosaicism have been recently reported in several other X-linked diseases,⁴ and two cases of mosaicism, including gonosomal and germline, have been documented among 20 families of sporadic cases with ATR-X syndrome.⁵

Here, we report the case of two brothers affected with ATR-X syndrome, having an intragenic deletion involving exons 2–5 of the 35 exons in the *ATR-X*, and their mother exhibiting gonosomal mosaicism, with the mutant allele at <1% incidence in the peripheral blood. This finding renders negligible the probability that his mother's female siblings are carriers of the mutation.

CASE REPORT

Case 1 (Figure 1; III-2) is a 9-year-old boy. He was suspected of having ATR-X syndrome at the age of 2 years on the basis of severe motor and psychiatric developmental delay, characteristic hypotonic facies, spaced teeth and presence of HbH inclusions in his brilliant cresyl blue (BCB)-stained peripheral blood. PCR of all exons and exon–intron boundaries was performed with specific primers, and PCR amplifications were not observed for exons 2–5 out of all 35 exons. His genomic DNA showed a deletion of exons 2–5 in the *ATR-X*, confirming his diagnosis molecularly. His mother's mutation carrier state could not be diagnosed. He had received surgery for undescended testes. He has a 1-week vomiting episode annually. He had gastroesophageal reflux during his infancy but has grown out of it. He was diagnosed as having epilepsy and takes valproic acid. He has recently begun walking with assistance.

¹Department of Neurology, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan; ²Department of Clinical Genetics, Kurashiki Central Hospital, Kurashiki, Japan; ³Medical genetics, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan and ⁴Department of Medical Ethics and Medical Genetics, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

Correspondence: Dr T Wada, Department of Medical Ethics and Medical Genetics, Kyoto Graduate School of Medicine, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8501, Japan.

E-mail: takahito.wada0001@me.com

Received 31 March 2014; revised 21 April 2014; accepted 24 April 2014; published online 5 June 2014

He cannot speak any meaningful words but can understand simple words and situations around him. His weight, height and head circumference are 18.3 kg (−1.9 s.d.), 116.3 cm (−3.1 s.d.) and 47.2 cm (−2.5 s.d.), respectively.

Case 2 (Figure 1; III-3) is a 5-year-old boy, a younger brother of Case 1. At birth, he presented with multiple congenital anomalies, including tetralogy of Fallot, heart anomaly, complete tracheal ring,

bilateral severe deafness, total blindness due to bilateral persistent hyperplastic primary vitreous, hypospadias and bilateral undescended testis. He had operations in infancy for tetralogy of Fallot and gastroesophageal reflux. He had epilepsy at the age of 4 years. He shows very severe psychomotor developmental delay and central hypotonic facies. He can roll over but cannot sit unassisted. He cannot speak any meaningful words. His clinical condition is much

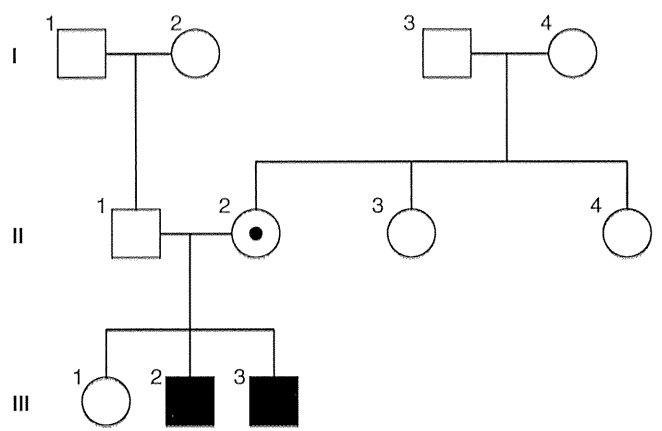


Figure 1 Family tree. III-2 and III-3 are patients. Their mother, II-2, is healthy and a carrier of the mutation in gonosomal mosaicism.

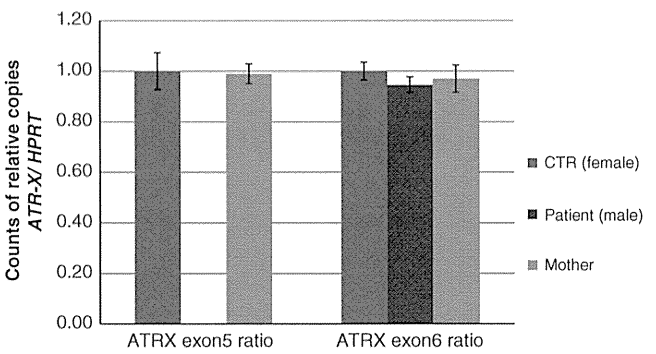


Figure 3 The result of quantitative PCR using primers for exons 5 and 6. It did not detect a copy number difference between mother and a control for exon 5, which was deleted in the patient. *HPRT* (X-linked) is the reference gene. A full color version of this figure is available at the *Journal of Human Genetics* journal online.

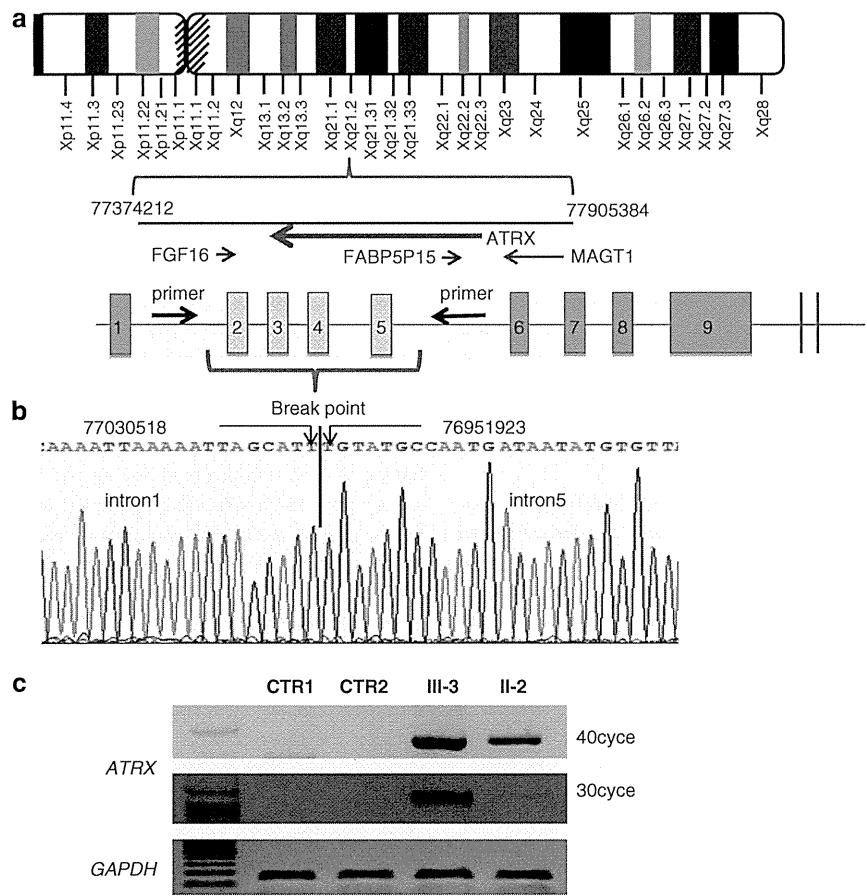


Figure 2 (a) (top) Schematic presentation of the part of X chromosome around *ATR-X* on Xq21; (middle) the direction of the *ATR-X*; and (bottom) a schema of the deleted exons of the *ATR-X* detected in the patient. The deletion spans approximately 78.6 kb (chromosome X, NC_000023.10: 77030517-76951924). (b) Sequence chromatogram showing breakpoint of genomic DNA from patient III-3. (c) PCR using the primers flanking the deletion from intron 1 to intron 5 in the *ATR-X* amplifies 1141-bp products in 40 cycles (top) and 30 cycles (middle). *GAPDH* is the reference gene (bottom). CTR1 and CTR2 are normal control samples. A full color version of this figure is available at the *Journal of Human Genetics* journal online.

severer than that of his brother and initially ATR-X syndrome was not suspected for his diagnosis.

He was referred to our medical center at 5 years. Approximately, 60% of his BCB-stained peripheral blood revealed HbH inclusions, and he was diagnosed to have the same mutation in the *ATRX*. His weight, height and head circumference are 10.185 kg (-3.0 s.d.), 95.5 cm (-3.4 s.d.) and 39.7 cm (-6.4 s.d.), respectively.

RESULTS

Diagnosis of the patient (III-3) by PCR

We could not amplify exons 2–5 of the 35 exons in *ATRX* in the genomic DNA extracted from the peripheral blood of the patient (III-3), indicating an intragenic deletion involving exons 2–5 in *ATRX* as well as in his elder brother (III-2). His cDNA shows that the 3' end of exon 1 abuts the 5' end of exon 6, indicating exon skipping of exons 2–5 resulting in a 350-bp deletion (Supplementary Figure S1). This transcript is expected to be translated into a prematurely truncated protein, p.Ser7Argfs*13.

Identification of the breakpoint

We designed PCR primers to amplify the flanking region of the deleted regions of genomic DNA from the patient (Figure 2a). No amplification of amplicons using the primers was observed in a normal control (Figure 2c).

We sequenced the PCR product and identified the 5' end at the breakpoint in intron 1 and the 3' end of intron 5, with primers flanking the deleted region. The deletion spans approximately 78.6 kb (chromosome X, NC_000023.10: 77030517-76951924) (Figure 2b).

Diagnosis of the mother's carrier state

Quantitative PCR (qPCR) using primers for each exon did not detect a copy number difference between exon 5, which was deleted, and exon 6, which was not deleted (Figure 3).

Primers flanking the deletion amplified an 1144-bp product in both the patients and the mother at 40 cycles but not in the mother at 30 cycles (Figure 2c). These findings suggest that the mother carried the same deleted mutation by gonosomal mosaicism, considering that she has two sons with ATR-X.

Estimation of the relative frequency of the mutant allele

Using qPCR with primers flanking the deletion, we estimated at $<1\%$ the relative frequency of the mutant allele in genomic DNA from peripheral blood of the mother. A dilution series of known template concentrations of the patient's genomic DNA was used to establish a standard curve. The standard curve showed a linear form ($R^2 = 0.9996$) (Supplementary Figure S2).

DISCUSSION

We report two affected brothers of ATR-X syndrome with an intragenic deletion of 78.6 kb involving exons 2–5 in the *ATRX*, resulting from their mother's gonosomal mosaicism. It was technically difficult to confirm her mosaicism by qPCR for each exon of the *ATRX*, because the relative frequency of the mutant allele was low, at $<1\%$. After we had identified the breakpoint in the patients' genomic DNA and designed primers straddling the breakpoint, we could easily detect the mutant allele in her genomic DNA.

When we diagnosed the first patient by the usual PCR, we did not know the mother's carrier state. The second patient was diagnosed as having ATR-X syndrome with the same mutation, and their mother was expected to be an obligate mutation carrier. There were two problems in diagnosing her carrier state, which are as follows: first, the mutation was a deletion that was not detected by conventional PCR and sequencing, and second, the relative frequency of the mutant allele in the peripheral blood was too low for the copy number to be determined by qPCR.

In fact, the information about the mother's mosaicism does not aid in genetic counseling to calculate the recurrent risk of subsequent offspring, because she is an obligate mutation carrier. But this information is important for genetic counseling of her two sisters (Figure 1, II-3 and II-4), because her mutation must have occurred *de novo* after fertilization, and the probability that her sisters carry the same mutation is expected to be negligible. Therefore, their genetic counseling was not required.

In clinical practice, somatic, gonadal or gonosomal mosaicism presents several problems, particularly if a patient's mother does not have the mutant allele in her blood; isolated gonadal mosaicism can be suspected, if the same mutant allele is transmitted to a second offspring and he is found to be affected. The relative frequency of the mutant allele in the mosaicism of her peripheral blood is not helpful for estimating the frequency in her ova. In our case, the relative frequency of the mutant allele in the ova could be $<1\%$ as in the peripheral blood or could be much higher, approximately 50%.

It is often difficult to contact the families of maternal female siblings and provide them with clinical information. The present study highlights the importance of thoroughly diagnosing the mother's mutation carrier status, even if only one offspring is affected or she does not exhibit the mutation. These findings allow us to decide whether to inform her female siblings and their families.

In the next-generation sequencing era, we will encounter more patients or carriers with mosaicism of mutant alleles.⁶ We should reconsider mosaicism from the standpoint of genetic counseling.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patients and their families for their clinical information. This study was supported by research grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare (H25-nanchi-ippan-114; to TW).

- Gibbons, R. J., Brueton, L., Buckle, V. J., Burn, J., Clayton-Smith, J., Davison, B. C. *et al.* Clinical and hematologic aspects of the X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X). *Am. J. Med. Genet.* **55**, 288–299 (1995).
- Gibbons, R. J., Wada, T., Fisher, C. A., Malik, N., Mitson, M. J., Steensma, D. P. *et al.* Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Hum. Mutat.* **29**, 796–802 (2008).
- Young, I. D. *Introduction to Risk Calculation in Genetic Counseling*. 2nd edn. (Oxford, New York, NY, USA, 1999).
- Wang, Y., Busin, R., Reeves, C., Bezman, L., Raymond, G., Toomer, C. J. *et al.* X-linked adrenoleukodystrophy: ABCD1 de novo mutations and mosaicism. *Mol. Genet. Metab.* **104**, 160–166 (2011).
- Bachoo, S. & Gibbons, R. J. Germline and gonosomal mosaicism in the ATR-X syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **7**, 933–936 (1999).
- Pagnamenta, A. T., Lise, S., Harrison, V., Stewart, H., Jayawant, S., Quaghebeur, G. *et al.* Exome sequencing can detect pathogenic mosaic mutations present at low allele frequencies. *J. Hum. Genet.* **57**, 70–72 (2012).

Supplementary Information accompanies the paper on Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/jhg>)

VIII 先天異常/先天奇形

染色体異常・先天奇形症候群

X連鎖精神遅滞症候群 症候群性X連鎖精神遅滞

ATR-X 症候群

ATR-X syndrome

Key words : ATR-X 症候群, α サラセミア, 精神遅滞, エピジェネティクス,
クロマチンリモデリング

和田 敬 仁

1. 概念・定義

1981年に α サラセミア(ヒトヘモグロビンにおける, β グロビンに対する α グロビンの低下による量的不均衡)と精神遅滞の合併例(ATR: α -thalassemia/mental retardation)が初めて報告されて以来, α グロビン遺伝子が局在する16p13.3を含む領域の欠失を認める隣接遺伝子症候群(ATR-16)と、欠失を認めない症例に区別された。後者は、重度の精神遅滞を伴い、特徴的顔貌を呈し、臨床的に一様であり、患者が男性のみであることから、責任遺伝子がX染色体上にあることが予想され、ATR-Xと名付けられ、1995年に英国のGibbonsにより責任遺伝子 $ATRX$ が同定された¹⁾。

ATR-X症候群(X-linked α -thalassemia/mental retardation syndrome, MIM #301040)は、その責任遺伝子 $ATRX$ がX染色体上に局在するX連鎖精神遅滞(XLID)症候群の一つである。典型的なATR-Xの臨床像は、男性の患者、重度の精神遅滞、 α サラセミア(HbH病)の存在、特徴的顔貌、外性器異常、骨格異常、行動異常といった多彩な症状を特徴とする。 $ATRX$ 遺伝子は非特異的XLIDの責任遺伝子でもある²⁾。

ATR-X症候群は、クロマチンリモデリングタンパクをコードする $ATRX$ 遺伝子変異による $ATRX$ タンパクの機能低下が、クロマチン構造の破綻を引き起こし、複数の遺伝子発現が異常をきたし発症すると考えられ、エピジェネティ

クスのメカニズム破綻により発症するクロマチン病と位置付けられる³⁾。

2. 疫 学

世界では200症例以上、日本国内では約80症例が診断されている⁴⁻⁶⁾。発症頻度は、ダウン症候群の1/145程度であり、男児58,000-73,000人出生に1人、日本では毎年10人前後が発症していると推定され(神奈川県立こども医療センター 黒澤健司先生のデータ)、未診断例が多数存在すると考えられる。まれではあるが、X染色体の不活化の偏り(skewed X-inactivation)を免れることによる女性例の発症も報告されている⁷⁾。

3. 病 因

責任遺伝子 $ATRX$ 遺伝子(Xq13.3)がコードしている $ATRX$ タンパクはクロマチンリモデリングタンパクと考えられ、N端のplant homeodomain(PHD)様 zinc finger とすぐ上流のC₂C₂モチーフからなるADD($ATRX$ -DNMT3b-DNMT3L)ドメインと呼ばれる領域、および中央部の7つのhelicase motifからなるクロマチンリモデリングドメインの機能上重要な2つの領域をもつ⁸⁾。患者の60%および40%の変異がそれぞれの領域で検出される(図1)。後者の構造により $ATRX$ タンパクはクロマチンリモデリングタンパクのSNF2サブファミリーに分類される。

Takahito Wada: Department of Medical Ethics and Medical Genetics, Kyoto University Graduate School of Medicine 京都大学大学院医学研究科 医療倫理学・遺伝医療学分野

0047-1852/14/¥60/頁/JCOPY

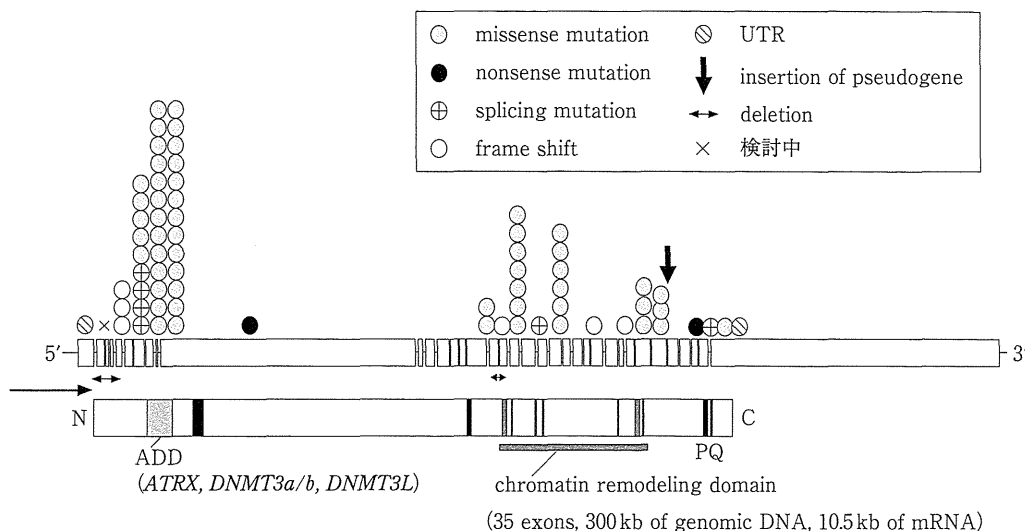


図1 日本人のATR-X症例75人で検出されたATR-X遺伝子変異
機能的に重要な2つのドメインに変異が集中している。

ATR-XはATR-Xタンパクの機能喪失により発症し、その多彩な症状から、クロマチンリモデリングを介した複数の遺伝子の発現調節異常が想定されているが、遺伝子発現調節のメカニズムは不明な点が多い。

最近、ATR-Xタンパクのターゲットは、テロメアやユークロマチンのG/C-richなVNTR (variable number tandem repeat)を含むシーケンスをもち、*in vivo*でG-quadruplexを含むnon-B DNA structureと呼ばれる特別な構造(G4 structure)をとることが示された。ATR-XタンパクはこのG4 structureを認識し、その構造を変換することにより、下流の遺伝子発現を調節しているが、異常ATR-Xタンパクはこれを認識できず、VNTRが伸張するほど下流の遺伝子発現が強く影響を受けると考えられる(図2)。ATR-Xタンパクは核内における細胞周期、DNA転写、DNA修復、DNA組み替え、DNA複製など様々な現象に関わっている可能性がある⁹⁾。

4. 病 態

Kitajimaらが³⁾ Atrxマウスを作成し、contextual fear memory(文脈恐怖条件付き記憶)が損なわれ、海馬のCA1領域で高頻度刺激による誘発される長期増強(long term potentiation:

LTP)の減少が、ATR-Xタンパクの機能低下による、海馬におけるカルシウム-カルモジュリン依存性リン酸化酵素(α CaMKII)の自己リン酸化とイオンチャネル型グルタミン酸受容体の一つであるAMPA1(GluR1)のリン酸化の減少であることを示した¹⁰⁾。また、内側前頭前皮質の樹状突起棘(dendritic spine)の形態異常と、同部位におけるCaMKII活性の異常上昇を示し、ヒトの精神遅滞におけるRac1-GEF/PAK情報伝達系の異常と樹状突起棘の形態異常の関与を示した¹¹⁾。

5. 診断と鑑別診断¹²⁾

XLIDを中心とした男性の重度精神遅滞を呈する疾患は、すべて鑑別すべき疾患である。特に、外性器異常、特異顔貌(顔面中心部の低形成;上向きの鼻、三角口、隙間ある門歯や歯列不正)、嘔吐・便秘・流涎過多などの消化器症状を呈する患者では、本症候群を強く疑い、末梢血液のbrilliant cresyl blue染色によりHbHを検索することが重要だが、確定診断にはATR-X遺伝子解析が必要であり、国内では研究レベルで解析可能である。

現在のところ、遺伝子変異型と表現型の明らかな相関は認めていないが³⁾、唯一、C末端の欠

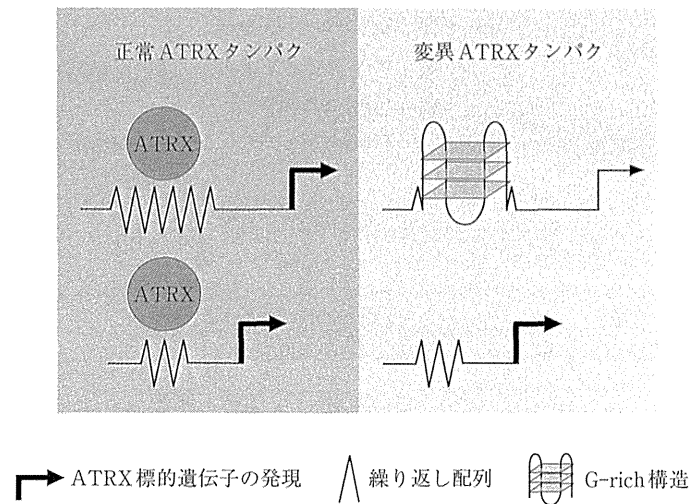


図2 ATRX タンパクの tandem repeat への結合による
遺伝子発現の制御(文献⁹⁾より改変)

正常では, ATRX タンパクは繰り返し配列に結合し, 遺伝子発現を on にしているが(図左), 変異 ATRX タンパクでは, 繰り返し配列に結合できないため, G-quadruplex という構造をとり, 繰り返し配列の長さ依存性に遺伝子発現が抑制される(図右).

失をもつ症例で重症の外性器異常を呈し, また, クロマチンリモデリング領域よりも ADD ドメインに変異をもつ症例の方が重症である傾向がある。

歩行可能例は少なく, 歩行可能例も 10 代後半で歩行を獲得することが多い。精神遅滞は重度であり, 日常生活は全介助を要することがほとんどであり, 有意語の言語獲得は難しいが, 有意語を獲得した軽症例も報告されている。同程度の精神遅滞を呈する症候群の患者と比べると, ATR-X 症候群の患者の多くは, 視線を合わそうとしない, 常同行為を繰り返すといった一見自閉症様の行動を伴う頻度が高い。外性器異常は, 小精巣や停留精巣の軽症例から, 女性様外性器異常を呈する症例まで幅広い。

ATR-X の名前が示すとおり, α サラセミアの存在は特徴的であるが HbH 封入体をもつ赤血球の割合は, 患者により 1% 未満から数十%と幅広く, また, 患者の 20% では検出されないため, HbH 陰性は ATR-X 症候群を否定するものではないことに注意が必要である。

脳 MRI では特異的所見に乏しいが, 白質に T2 高信号の異常所見から白質異常症が疑われる症例もあり, 注意が必要である¹³⁾。

6. 治療と予後

対症療法が中心となる。大きな合併奇形がなければ, 生命予後は悪くない。摂食や栄養の管理が重要であり, その原因検索と外科的治療を含めた適切な処置が必要である¹⁴⁾。

文献

- 1) Gibbons RJ, et al: Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 80: 837-845, 1995.
- 2) Wada T, Gibbons RJ: ATR-X syndrome. In: *Genetics and Genomics of Neurobehavioral Disorders* (ed by Fisch GS), p 309-334, Humana Press, Totowa, 2003.
- 3) Huidobro C, et al: The role of genetics in the establishment and maintenance of the epigenome. *Cell Mol Life Sci* 70: 1543-1573, 2012.

- 4) Gibbons RJ, et al: Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Hum Mutat* **29**: 796–802, 2008.
- 5) 和田敬仁ほか: X-linked α -thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X) の3症例. *脳と発達* **30**: 283–289, 1998.
- 6) Wada T, et al: Molecular genetic study of Japanese patients with X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X). *Am J Med Genet* **94**: 242–248, 2000.
- 7) Wada T, et al: Non-skewed X-inactivation may cause mental retardation in a female carrier of X-linked alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X): X-inactivation study of nine female carriers of ATR-X. *Am J Med Genet* **138A**: 18–20, 2005.
- 8) Gibbons RJ, et al: Mutations in transcriptional regulator ATRX establish the functional significance of a PHD-like domain. *Nat Genet* **17**: 146–148, 1997.
- 9) Law MJ, et al: ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. *Cell* **143**: 367–378, 2010.
- 10) Nagami T, et al: Reduced expression of the ATRX gene, a chromatin-remodeling factor, causes hippocampal dysfunction in mice. *Hippocampus* **21**: 678–687, 2011.
- 11) Shioda N, et al: Aberrant calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity is associated with abnormal dendritic spine morphology in the ATRX mutant mouse brain. *J Neuroscience* **31**: 346–358, 2011.
- 12) Gibbons RJ, Wada T: ATRX and X-linked α -Thalassemia Mental Retardation syndrome. In: *Inborn Errors of Development* (ed by Epstein CJ, et al), p 943–954, Oxford University Press, New York, 2008.
- 13) Wada T, et al: Neuroradiologic features in X-linked α -thalassemia/mental retardation syndrome. *Am J Neuroradiol* **34**: 2034–2038, 2013.
- 14) Martucciello G, et al: Gastrointestinal phenotype of ATR-X syndrome. *Am J Med Genet* **140A**: 1172–1176, 2006.