

29. Fukami M*, Seki A, Ogata T: *SHOX* Haploinsufficiency as a Cause of Syndromic and Non-Syndromic Short Stature. *Mol Syndromol* (accepted).

2. 学会発表
省略

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. Netchine-Harbison 診断基準症状の陽性頻度

	TOTAL SRs OVERALL	1p16LOM	matUPD7	SRs clin moles neg	non-SR\$ SGA*
Netchine-Harbison Scoring System Factors:					
1. SGA WULh \leq -2SDS *	91.6% (55 of 60)	100% (35 of 35)	72.7% (8 of 11)	85.7% (12 of 14)	
2. Relative Macrocephaly	85.7% (179 of 209)	99.1% (111 of 112)	85.2% (23 of 27)	55.4% (31 of 56)	15.8% (23 of 146)
3. Postnatal Lth/Ht \leq -2SDS mean &/or MPTH	84.2% (267 of 317)	83.8% (145 of 173)	80.9% (38 of 47)	86.8% (72 of 83)	87.7% (128 of 146)
4. Forehead, Protruding/Prominent	88.1% (177 of 201)	93.7% (118 of 126)	100.0% (27 of 27)	77.6% (59 of 76)	17.1% (25 of 146)
5. Feeding Difficulties	70.4% (216 of 307)	71.7% (124 of 173)	87.2% (41 of 47)	54.8% (40 of 73)	25.3% (37 of 146)
6. Asymmetry	57.3% (271 of 473)	77.4% (175 of 226)	29% (18 of 62)	39.5% (62 of 157)	5.8% (18 of 266)
Birth Measurements:					
Birth Weight SDS	-2.96 (n=374)	-3.22 (n=200)	-2.45 (n=53)	-2.79 (n=105)	-2.32 (n=205)
Birth Length SDS	-3.68 (n=294)	-4.30 (n=144)	-2.88 (n=33)	-3.04 (n=101)	-2.99 (n=205)
Birth HC SDS	-1.13 (n=274)	-0.81 (n=137)	-0.95 (n=33)	-1.66 (n=88)	-1.67 (n=115)
Additional Characteristics:					
Triangular face	93.9% (154 of 164)	98.7% (73 of 74)	50.0% (8 of 16)	98.7% (73 of 74)	22% (20 of 90)
Delay closure fontanelle	42.6% (20 of 47)	44.4% (16 of 36)	36% (4 of 11)		
Low-set &/or posteriorly rotated ears	49.3% (131 of 266)	50% (70 of 140)	68.8% (33 of 48)	35.9% (28 of 78)	23.5% (23 of 98)
Downturned mouth	47.7% (84 of 176)	57.0% (65 of 114)	25.7% (10 of 39)	39.1% (9 of 23)	12.3% (12 of 98)
Irregular/crowded teeth	36.9% (72 of 195)	28.6% (30 of 105)	38.9% (14 of 36)	24.1% (13 of 54)	4.0% (4 of 90)
Micrognathia	61.7% (71 of 115)	74.7% (89 of 79)	25.9% (7 of 27)	56.0% (5 of 9)	23.0% (21 of 90)
Low muscle mass	56.3% (58 of 103)	67.2% (41 of 61)	47.4% (9 of 19)	34.8% (8 of 23)	11.2% (11 of 98)
Shoulder dimples	65.6% (40 of 61)	77.1% (27 of 35)	66.7% (8 of 12)	35.7% (5 of 14)	25.0% (2 of 8)
5th finger clinodactyly	74.6% (238 of 319)	80.7% (142 of 176)	56.3% (27 of 48)	77.8% (63 of 81)	19.2% (28 of 146)
Syndactyly of toes	29.9% (79 of 264)	41.8% (59 of 141)	16.7% (8 of 48)	16.0% (12 of 75)	11.2% (11 of 98)
Prominent heels	44.3% (27 of 61)	25.7% (9 of 35)	100% (12 of 12)	42.9% (6 of 14)	37.5% (3 of 8)
Café au Lait spots	12.4% (18 of 145)	11.6% (11 of 95)	11.1% (3 of 27)	22.0% (2 of 9)	10.9% (15 of 138)
Scoliosis &/or Kyphosis	17.6% (40 of 227)	10.0% (15 of 97)	16.3% (7 of 43)	24.4% (19 of 78)	
Male Genital Abnormalities (cryptorchidism, hypospadias, chordee)	40% (34 of 85)	44.4% (28 of 63)	21.4% (3 of 14)	37.5% (3 of 8)	21.2% (11 of 52)
Motor delay	36.6% (93 of 254)	30.5% (43 of 141)	58.3% (21 of 36)	41.3% (26 of 63)	18.8% (26 of 138)
Speech delay	39.7% (75 of 189)	31.7% (32 of 101)	63.9% (23 of 36)	38.5% (20 of 52)	19% (17 of 90)
Autism/PDD	18.03% (11 of 61)	5.7% (2 of 35)	68.3% (7 of 12)	14.3% (2 of 14)	12.5% (1 of 8)
High pitched/squeaky voice	45.2% (19 of 42)	39% (10 of 26)	71% (5 of 7)	44% (4 of 9)	12% (11 of 90)
Excessive sweating	53.8% (57 of 106)	51.4% (36 of 70)	70.4% (19 of 27)	22% (2 of 9)	2% (2 of 90)
Hypoglycemia	22.3% (23 of 103)	21.7% (15 of 69)	29% (6 of 20)		5.2% (3 of 48)

* Most of the studies made SGA mandatory for clinical diagnosis; the only one that did not & used either length or weight was Azzi et al (2015)

[†] Azzi, Fuke & Netchine used a consistent definition of "feeding difficulties" as defined by the N-H scoring system; the others used independent definitions

[‡] A single subject from this group was not SGA from the Azzi et al study but patient specific data was not available so percentages could not be altered

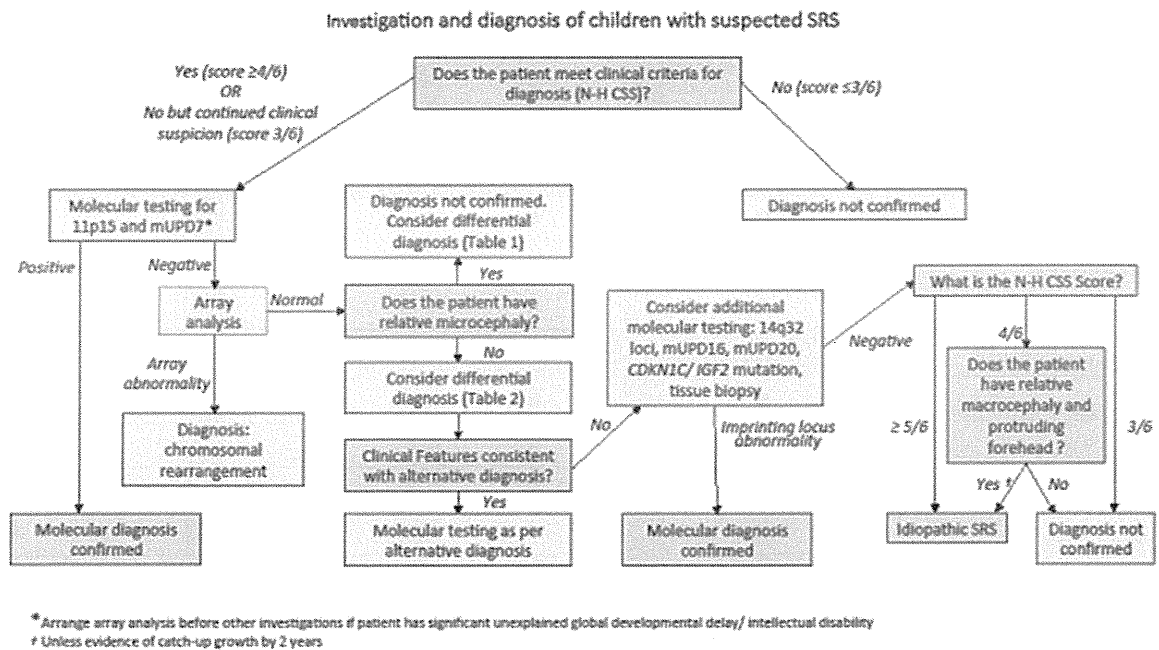


図 1. Silver-Russell 症候群の分子遺伝学的診断ステップ

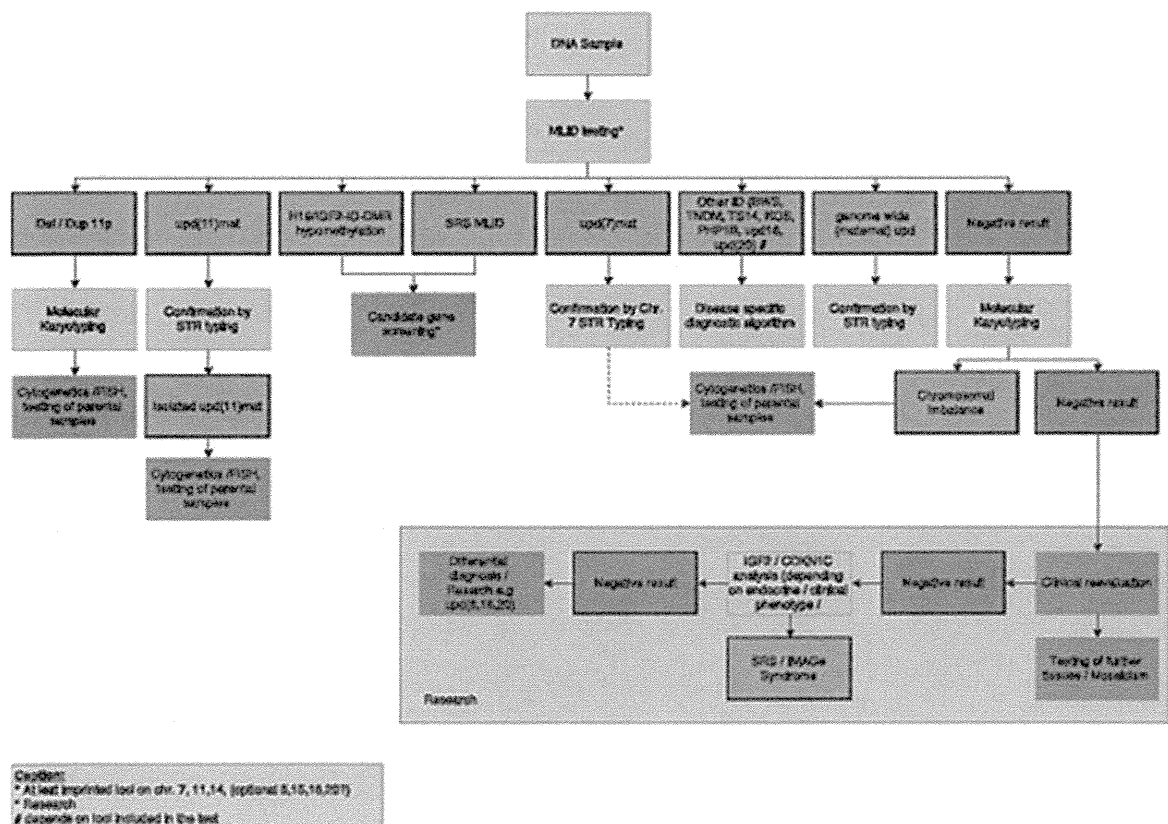


図 2. MLID 同定のアプローチ

表 3. 年齢ごとの管理上の注意点

Action Points	Infancy Newborn - 2 yrs	Early Childhood 2 - 6 years	Late Childhood - Adolescence	Adolescence - Adulthood
Anticipatory Guidance				
Early intervention referral	■	■	N/A	N/A
Family support	■	■	■	■
Genetic counselling	■	■	■	■
Medical Evaluation				
Feeding & caloric intake	■	■	■	■
GERD	■	S	N/A	N/A
Weight gain/BMI	■	■	■	■
Linear growth	■	■	■	■
ENT	■	S	S	S
Sleep	S	O	O	O
Hypoglycaemia	■	S	S	N/A
Speech & language evaluation	■	■	S	N/A
Development/cognition	■	S	S	S
Neurology (myoclonus- dystonia for matUPD7)	■	■	■	■
Scoliosis	O	■	■	S
Limb length discrepancy/asymmetry	■	■	■	■
Psychosocial evaluation	N/A	■	■	■
Orthodontic/dental	N/A	■	■	S
Bone age x-rays	N/A	O (Yearly until BA \geq CA, then every 6m)	O (Yearly until BA \geq CA, then every 6m)	S (until adult BA)
Puberty (androgens/LH/FSH)	N/A	S (if clinical signs)	O (annually)	O (until final height)
IGF-1/IGFBP3 Levels annually		O	O	S
Insulin resistance	N/A	O	O	O
Fertility	N/A	N/A	S	S

■ to be performed

O Objective (by standard testing method)

S Subjective (by history)

N/A Not

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

Angelman症候群とPitt-Hopkins症候群の診断法の確立

研究分担者 齋藤 伸治

公立大学法人名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野・教授

研究要旨

Angelman症候群（AS）およびPrader-Willi症候群（PWS）との診断法確立を目的として、体系的な遺伝学的診断法を構築し多数例に対して検討を行った。AS疑い112例、PWS疑い112例を対象とした。その結果、ASでは42例（37.5%）、PWSでは30例（26.8%）の診断を確定することができた。AS疑い例のなかに、メチル化テストでPWSと診断された例が2例、レット症候群1例が含まれていた。PWS疑い例のなかに、Temple症候群3例、6q16.1-21欠失症候群1例が含まれていた。体系的遺伝学的診断は確定診断に必須である。臨床的疑い例には異なる疾患がまぎれており、その意味でも遺伝学的診断の価値は高い。

A. 研究目的

Angelman症候群（AS）およびPrader-Willi症候群（PWS）は共に発達の遅れを示す疾患であり、原因遺伝子が15q11-q13のゲノム刷り込み領域に存在するために、共通の遺伝学的診断法を用いて初期診断を行うことができる。私たちは両疾患を診断するための体系的遺伝学的診断法を開発し、全国からの解析依頼に応じてきている。これらの解析のなかで、それぞれ100例以上の解析を行ったので、その結果を分析した。

B. 研究方法

ASもしくはPWSが疑われた患者それぞれ112例から末梢血を採取し、ゲノムDNAを抽出した。すでにFISH法にて15q11-q13の欠失が同定された患者は除外した。可能であれば、両親の採血も行った。

体系的遺伝学的診断法はまずSNURF-SNRPN遺伝子のDNAメチル化テストを行い、陽性の場合には両親の検体を用いて多型解析を行い、片親性ダイソミーもしくは刷り込み変異の診断を行った。ASではメチル化テスト陰性例にはUBE3A変異解析をサンガー法にて実施した。これらの解析でも変異が同定されなかった場合は、AS類似n症状を示すことが知られている6個の遺伝子（SLC9A6、TCF4、MBD5、CDKL5、MECP2、FOXG1）のコーディング領域を対象とするシーケンスパネルをAmpliSeq（Lifetechnologies）により作成し、Ion PGMを用いて解析した。PWSではメチル化テスト陰性例に対して、14q32位置する刷り込み遺伝子MEG3遺伝子のDNAメチ

ル化テストを行い、Temple症候群の同定を行った。以上がない場合は、AgilentSurePrint G3 Human CGH60Kを用いて染色体コピー数解析を実施した。アレイCGH解析は5例のみ解析を終了し、途上である。

（倫理面への配慮）

本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査委員会にて承認を受けており、解析にあたっては、両親から書面による同意を得た。

C. 研究結果

AS疑い110例中、DNAメチル化テストは16例（14.5%）で陽性（父由来パターンのみ）であった。内6例で両親解析が実施され、4名が15番染色体父性片親性ダイソミーであり、2例が刷り込み変異であった。メチル化テスト陰性94例のなかで、26例（全体の23.6%）にUBE3Aの変異を同定した。いずれの変異も同定されなかった例に対して6遺伝子を含むシーケンスパネル解析を実施し、1例にMECP2変異を同定し、Rett症候群と診断した。

PWS疑い114例中、DNAメチル化テストは30例（26.3%）に陽性（母性メチル化パターン）であった。内14例で両親解析が実施され、12名が15番染色体母性片親性ダイソミーであり、2例が刷り込み変異であった。DNAメチル化テストの結果が父性メチル化パターンのみが2例あり、ASと診断された。メチル化テスト陰性80例のなかで、MEG4メチル化テスト陽性が3例あり、Temple症候群と診断した。Temple症候群3例のうち、2例は14番染色体母性片親性ダイソミーであり、1例はエピ変

異であった。アレイCGHは5例にしかできなかつたが、その中に6q16.1-21の12Mb欠失例を1例同定した。6q16.1-21にはSIM1遺伝子が存在し、SIM1を含む欠失はPWSと似た症状を示すことが報告されており、原因として矛盾しないと考える。

D. 考察

体系的遺伝学的診断によりASでは38.1%、PWSでは26.3%の診断を確定することができた。診断確定と同時に、遺伝学的群の決定ができることの意義は大きい。特に、ASではUBE3A変異が23.6%に同定されたが、その約1/3の母親は保因者と考えられ、遺伝カウンセリングの観点から重要である。また、PWSでは早期からの栄養指導や成長ホルモンの使用の可能性があり、確定診断の意義は高い。したがって、体系的遺伝学的診断はASとPWSの診断として欠かせないと考えられる。特に、どちらの疾患も小児慢性疾患に認定され、その認定には遺伝学的診断が要求されている。その意味で、体系的遺伝学的診断は保険適応とされるべき検査と考えられる。

いずれの疾患もその疑い例のなかに、異なる疾患が同定された。ASとRett症候群は類似していることが知られているが、経過は大きく異なる。その意味でも適切な診断は重要である。良く知られていることではあるが、実際にPWS疑い例のなかに、ASが2例含まれていた。ASとPWSとの遺伝学的診断の第一選択はDNAメチル化テストであるが、日本では保険適応の関係で、普及していない。実際、医療現場ではFISH法による診断が第一選択として実施されている。FISH法では欠失の親由来がわからないために、誤った診断となっている患者の存在が予想される。DNAメチル化テストの早期の保険適応が望まれる理由と考えられる。

PWS疑い例のなかに3例のTemple症候群が存在したことは、興味深い。この2つの疾患が特に乳児期ににていることは知られているが、経過は大きく異なる。どちらもメチル化テストで診断ができることから、PWS疑い例でSNRPNメチル化テスト陰性例にはMEG3メチル化テストの実施は大きな意義があると考えられる。また、いくつかの染色体微細欠失症候群とPWSとの類似も指摘されている。今回、6q16.1-21欠失例が存在したことは、これまでの報告を支持する結果と考えられ、染色体アレイ解析の重要性を示していると考えられる。

E. 結論

AS と PWS とに対する体系的遺伝学的診断法を構築し、その結果を解析した。遺伝学的診断は臨床診断の確定のみならず、良く似ているが異なった疾患の診断に繋がるために、重要であり、早期の保険適応が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Negishi Y*, Miya F*, Hattori A, Mizuno K, Hori I, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Truncating mutation in *NFLA* causes brain malformation and urinary tract defects. *Hum Genome Var* 2:15007, 2015. * Equal contribution.
- 2) Miya F, Kato M, Shiohama T, Okamoto N, Saitoh S, Yamasaki M, Shigemizu D, Abe T, Morizono T, Boroevich KA, Kosaki K, Kanemura Y, Tsunoda T. A combination of targeted enrichment methodologies for whole-exome sequencing reveals novel pathogenic mutations. *Sci Rep* 5:9331, 2015.
- 3) Yokoi S, Ishihara N, Miya F, Tsutsumi M, Yanagihara I, Fujita N, Yamamoto H, Kato M, Okamoto N, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Kojima S, Saitoh S, Kurahashi H, Natsume J. TUBA1A mutation can cause a hydranencephaly-like severe form of cortical dysgenesis. *Sci Rep* 5:15165, 2015.
- 4) Saitoh S. Clinical, molecular, and neurophysiological features in Angelman syndrome. *J Pediatr Epilepsy* 4:17-22, 2015.

2. 学会発表

- 1) 齋藤伸治. 小児神経科医に必要な遺伝学的検査の解釈. 日本小児神経学会学術集会 (大阪) 2015年5月29日
- 2) Negishi Y, Miya F, Hattori A, Hori I, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Truncating mutation in *NFLA* causes brain malformation and urinary tract defects. 日本小児神経学会学術集会 (大阪) 2015年5月29日

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

原因不明疾患に対する網羅的遺伝子解析研究事業にて原因遺伝子を同定した
先天多発奇形/知的障害症候群例の表現形に関する研究

研究分担者 水野 誠司
愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部長

研究要旨

全エクソーム解析事業で多発先天奇形/知的障害症候群(MCA/MR)症例を解析し、過去に報告の無いもしくは極めて報告の少ない原因遺伝子変異が同定されるケースが増えている。今回診断未特定の多発奇形/知的障害症候群の男児において、DNA結合タンパクをコードする遺伝子にHeterozygousなフレームシフト変異を同定した。本疾患の原因遺伝子と考えられたため、その臨床像を報告する。

特徴的な顔貌、細長い四肢と関節の過伸展と柔らかい皮膚の特徴、出生後の成長障害と相対的大頭、自閉傾向のない精神遅滞と言語発達遅滞を特徴とする、臨床的に認識可能な先天異常症候群の一つと考えられる。

A. 研究目的

本年度から始まった診断的網羅的遺伝子解析研究事業にて解析した診断未特定の多発奇形/知的障害症候群の男児において、DNA結合タンパクをコードする遺伝子（遺伝子X）にHeterozygousなフレームシフト変異を同定した。本疾患の原因遺伝子と考えられ、本患児の臨床像を明かにする。

B. 研究方法

本症例の診療録の後方視的検討、理学的診察及び家族への聞き取りにより、その身体的特徴と成長発達の特徴を記載した。

(倫理面への配慮)

当院通院中の患者は未成年でありかつ知的障害を有するため、該当するガイドラインを遵守し、患者情報の収集に際しては代理人である両親に対して説明を行い同意を得た上で、個人情報の保護の観点から患者氏名が特定されることのないように留意している。

C. 研究結果

【周産期歴、遺伝歴】

両親は近親婚のない、健康な35歳母、30歳父。特記すべき遺伝歴はない。正常な妊娠経過の後、骨盤位及び児頭骨盤不均等のために、在胎40週1日に予定帝王切開にて出生した。

出生体重2560g(-1SD) 身長47.0cm(-1SD) 頭囲35.0cm(+1SD).と相対的大頭を認めた。

【出生後の経過と発達】

乳児期に軽度の哺乳不良を認め、その後の筋緊張低下が持続したため生後5ヶ月時に精査目的で受診した。当初は先天性筋疾患を疑われた。低緊張による運動発達遅滞は著明であり、寝返り22ヶ月。這う30ヶ月、坐位30ヶ月、膝立ち4歳半、伝い歩き8歳。9歳から下肢装具使用にて一人歩き可能となる。知的障害は重度で5歳時の発達指数は23（KIDS発達スケールT）。13歳時において発声はあるが有意な言語の表出はない。他者との情緒的な交流を楽しみ、簡単な指示を理解し、指さして意思を表示し、絵本やPCに関心を示す。

【画像及び生理検査所見】

生後5ヶ月時と8歳時の脳MRIにおいて、特記すべき所見なし。生後1歳3ヶ月時の脳波所見に特記すべき異常なし。

【Dysmorphology】

目立つ額部、相対的大頭、平坦な鼻根部、内眼角贅皮、聳立した耳介、薄い髪、低い鼻、膨らんだ頬、長円形の顔。色白の皮膚等の特徴的顔貌を呈し、乳児期にはLanger-Gideon症候群を疑われた。

【内部奇形】

8歳時に超音波検査で軽度の大動脈弁逆流を認める。

腎泌尿器系の奇形はない。

【骨格】

細く長い四肢、やせ形の体型、相対的大頭が特徴的である。指尖間長/身長=105%。13歳時7ヶ月時身長146cm(-2SD)、体重27.1kg(-2.4SD)、頭囲54kg(+0.5SD)。上顎の低形成と下顎の軽度の突出を認め、反対咬合がある。指節関節、手関節、肘関節の過伸展を認める。

【皮膚】

伸展性のあるすべすべした皮膚が特徴的である。下肢の一部に魚鱗癬様の変化を有する。上記関節所見と合わせて当初結合織疾患を疑わせた。

【感覚器】

水晶体脱臼なし、屈折異常無し、網膜異常なし。難聴を認めず

【その他】

原因の特定できない頻尿が幼児期から現在まで持続している。

D. 考察

本症例の特徴を要約すると、特徴的な顔貌、結合織疾患を疑わせる細長い四肢と関節の過伸展と柔らかい皮膚の特徴、出生後の成長障害と相対的大頭、自閉傾向のない精神遅滞と言語発達遅滞である。結合織疾患を疑って実施した心臓超音波検査で軽度の大動脈弁逆流を認め、現在も定期観察中である。

網羅的エクソーム解析にて同定した本遺伝子は多種に保存され多系統の細胞に発現するDNA結合タンパクをコードする遺伝子であり、その機能喪失変異は先天多発奇形症候群の原因となり得る。

過去の国外の網羅的解析研究報告において1例のみ本遺伝子変異と同一の変異例が症例一覧の中に簡略に記載されている。発達遅滞と大頭について本症と合致する一方で、消化管奇形、心奇形、脳白質異常は本症に認められていない。今後の新たな症例報告との比較検討が本遺伝子の表現形の理解に資すると考えられる。

E. 結論

原因不明疾患の解析研究事業による全エクソン解析により原因遺伝子と考えられる変異を同定した症例の臨床像を明らかにした。

特徴的な顔貌、細長い四肢と関節の過伸展と柔らかい皮膚の特徴、出生後の成長障害と相対的大頭、自閉傾向のない精神遅滞と言語発達遅滞を特

徴とする、臨床的に認識可能な先天異常症候群の一つと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hokosaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mima A, Lapunzina P, Santos-Simarro F, Garcia-Minaur S, Ogata T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S, Matsubara Y, Kure S, Aoki Y. Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. *Hum Genet* 135(2):209-222, 2016

Watanabe S, Shimizu K, Ohashi H, Kosaki R, Okamoto N, Shimojima K, Yamamoto T, Chinen Y, Mizuno S, Dowa Y, Shiomi N, Toda Y, Tashiro K, Shichijo K, Minatozaki K, Aso S, Minagawa K, Hiraki Y, Shimokawa O, Matsumoto T, Fukuda M, Moriuchi H, Yoshiura KI, Kondoh T. Detailed analysis of 26 cases of 1q partial duplication/triplication syndrome. *Am J Med Genet A* 2016 (in press).

Uehara DT, Hayashi S, Okamoto N, Mizuno S, Chinen Y, Kosaki R, Kosho T, Kurosawa K, Matsumoto H, Mitsubuchi H, Numabe H, Saitoh S, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. SNP array screening of cryptic genomic imbalances in 450 Japanese subjects with intellectual disability and multiple congenital anomalies previously negative for large rearrangements. *J Hum Genet* 2016 (in press).

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
37(5):515-526, 2015

2. 学会発表

Seiji Mizuno, Yasushi Enokido, Tsuyoshi
Morishita, Naoki Hanada, Nobuaki
Wakamatsu

Somatic mosaicism for the mutation in PIK3CA
and significant activation of Akt/mTOR
signaling in a girl with segmental overgrowth:
Clinical report of PROS

Annual Meeting of European Society of Human
Genetics, Jan 6 2015, Glasgow, UK

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
研究分担報告書

ピット・ホプキンス症候群の臨床像検討と健康管理ガイドライン策定

分担研究者 岡本 伸彦

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター
遺伝診療科 主任部長

研究要旨

Pitt-Hopkins 症候群は重度精神運動発達遅滞、特異顔貌（狭い側頭部・落ちくぼんだ眼・肉付きのよい頬部・太い鼻梁・M字型の上口唇と厚い下口唇を伴う大きな口・よく発達した下顎など）、無呼吸を伴う間欠的過呼吸、出生後の小頭症、近視・斜視・乱視などの眼科異常、便秘、てんかん、協調運動障害、手の常同運動などを主要症状とする先天異常症候群である。MRI では脳梁低形成や脳室拡大を認める。18q21.1 に座位する TCF4 遺伝子が責任遺伝子である。欧米では多数の症例が報告されているが、日本では現在まで数例の報告しかなく、遺伝子変異による典型例の報告はなかった。しかし、当科で全国から解析依頼をうけた症例などをまとめた結果、17 例の Pitt-Hopkins 症候群で遺伝子変異例を検討したが、このことは潜在的な症例が多数存在することを示唆する。欧米と日本で大きく認知度に差が存在する先天異常症候群の一つである。これらの症例について臨床遺伝学的に検討を行い、体系的に PHS を診断するシステムを構築した。健康管理のためのガイドラインも作成した。

研究協力者

大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科
遺伝カウンセラー
松田圭子 川戸和美 三島祐子 山本悠斗

A. 研究目的

Pitt-Hopkins 症候群（以下 PTHS）は 1978 に、Pitt と Hopkins が最初に報告した。2007 年に責任遺伝子が 18 番染色体に座位する transcription factor 4 (TCF4) のハプロ不全が原因であることが判明した。全例が突然変異による発症であり、常染色体優性遺伝形式をとる。一部に劣性ものもあり、責任遺伝子は contactin associated protein like 2 (CNTNAP2) (7q35-36) neurexin 1 alpha (NRXN1) gene on the short arm of chromosome 2 (2p16.3) がある。

海外では多数の PTHS 報告があるが国内では認知度が低い。国内例の臨床遺伝学的評価を行い、健康管理ガイドラインを策定した。

B. 研究対象と方法

別途、遺伝子解析で確定診断された 17 症例を臨床的に評価した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析にあたってはインフォームド/コンセントに注意し、保護者の代諾での意思確認を行い、書面で同意を得た。全例で遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

17 例の症状の状況は表 1 に記載した。男児 10 例、女児 7 例であった。年齢は 1 歳から 28 歳に分布した。全員で染色体 G 分染法を行ったが、異常はなかった。変異については 17 例中遺伝子欠失 4 例、ナンセンス変異 5 例、フレームシフト変異 4 例、スプライス異常 2 例であり、遺伝子の機能が明らかに損なわれるものであった。2 例はミスセンス変異であったが、これも病原性が高いと判断された。

PTHS の診断では特徴的顔貌が最も重要である。狭い側頭部、深い眼窩、太い鼻梁、M字型の上口唇と厚い下口唇を伴う大きな口、肉付きのよい頬部、よく発達した下顎を認める。全症例で特徴的顔貌を認め、診断の契機となった。また、近視・斜視・乱視などの眼科異常も多く認めた。

多くの例は出生時の身体計測値は標準的であったが、身長は-2~3SD 程度で小柄であった。出生時の頭囲も標準的であったが、小頭の傾向であった。しかし、頭囲が正常の例も存在した。成人例で身長 160cm 以上、頭囲 59cm と比較的体格の大きい症例も見受けられた。レット症候群と比較すると小頭症はめだたなかったが、マイクロアレイで 18q21 の欠失を認めた例では-2.5SD の小頭症であった。

全例が重度知的障害であった。有意語獲得例はなかった。簡単な指示の理解は可能な例が多かった。運動発達も遅れ、歩行可能例は全例 4 歳以降で歩行機能を獲得できた。歩行可能例では失調性歩行を認めた。頭部 MRI では、軽度大脳萎縮、脳室拡大な

どの変化が多く例で認められた。脳波異常を認めても発作はなく、てんかん治療中の例はなかった。手をたたく、机をたたく、手をなめる、口を触る、タオルを常に口に入れる、歯ぎしりなどの行動異常が見られた。手もみ動作からレット症候群と似た症状を認めた例があった。運動失調症もみられた。よく笑う傾向があり、アンジェルマン症候群を疑われた例もあった。

外国の報告では呼吸異常が重視されている。しかし、今回の検討では典型的な過呼吸発作は17例中1例で認めたのみであった。脳波異常を認めても発作はなく、てんかん治療中の例はなかった。過呼吸異常とてんかん発作はPTHSでは以外と少ない可能性がある。加齢とともに発現する可能性もあり、注意が必要である。

PTHSの診断が確定するまでは、レット症候群やアンジェルマン症候群の検査を行った例があったが遺伝学的検査で否定された。

PTHSでは、Walenらの診断基準(表1)とMarangiの診断基準(表1)が存在する。表の左端に示した症状や所見によって、点数が決められ、総合点数でPTHSの疑い程度を決めるものである。Walenらの診断基準(表1)では典型的でない症状があれば減点される。詳細は参考文献に記載されている。Walenらの基準では満点が20点で、15点以上がPTHSの遺伝子解析の対象とされるが、17例中15例が15点以上であった。他の2例も14点であった。Marangiの診断基準では、10点がカットオフとされるが、17例全例が11点以上であった。Marangiの診断基準にもWalenらの診断基準にも取り入られていないが、指趾末節の腹側部の胎児性膨らみ(fetal pads)はPTHSでよくみられるという報告がある。表1の最下段に追加して示したように、今回の研究でも多くの症例で認められた

D. 考察

Pitt-Hopkins症候群はアンジェルマン症候群、レット症候群あるいはモワット・ウィルソン症候群の鑑別として重要である。欧米では多数の報告があるが国内では染色体異常に伴う症例がPTHS症状を呈していたという報告が散見される程度であり、典型例の報告は乏しい。しかし、今回17例が診断されたことより、国内でも多数症例の存在が疑われた。アンジェルマン症候群やレット症候群と診断されている例が多いと予想される。

共通の症状として、重度知的障害と運動発達遅滞、特徴的顔貌、行動異常が多い。こうした所見はPTHSの診断の契機となる。欧米のPTHS症例で

強調されている呼吸異常やてんかんは少なかった。呼吸異常にこだわると診断を看過する可能性がでてくる。ただし、呼吸異常は加齢とともに顕著になる可能性があり、年少例では今後注意して経過をみる必要がある。

PTHSの診断においてはDysmorphology的考察が重要である。今回まとめた全例で特徴的な顔貌を認めた。小頭症はないか、あっても-3SD以下の重度例はなかった。-3SD以下の小頭症や進行性の小頭症があれば、PTHSの診断に疑問を抱くべきである。むしろ頭囲が大きい例も存在した。斜視など眼科異常も多く、PTHSを疑った場合、眼科精査が重要である。口唇口蓋裂のような大奇形や先天性心疾患や消化管閉鎖など内臓疾患の合併は通常みられない。便秘の例が多いが、これは機能的なものと考えられる。

顔貌以外にPTHSで重要な特徴は異常行動である。無目的に手をたたく、机をたたく、手をなめる、口を触る、よだれが多くタオルを常に口に入れる、歯ぎしりなどの行動異常が多く例で見られた。Rett症候群で特徴とされる手もみ動作を認める例があるが、PTHSでは合目的な手の動きが消失することはない点が鑑別点とされる。人見知りがなく、他者に近づいて顔をのぞき込んだり、触れたりする行動がある。よく笑う傾向があり、アンジェルマン症候群と似た行動を示す例もある。Van BalkomらはPTHS10症例について発達行動面の特徴を検討した。全例が重度知的障害を認めた。愛想のよい態度で、不適応行動は少なかった。言語による意思疎通は困難で、常同運動が頻回にみられた。このように行動観察はPTHSの診断に重要である。

確定診断はTCF4遺伝子解析による。コーディング領域のエクソンと近傍のイントロン領域をPCRで増幅して塩基配列を決定する。PTHSの遺伝子解析では、点変異例以外に微細欠失例が存在することに注意がいる。欠失の確認にはマイクロアレイ染色体検査やMLPA法が有用である。微細欠失例ではTCF4の近傍の他の遺伝子も欠失するため、症状が修飾される可能性がある。

表1にはのせていないが、臨床的にPTHSを強く疑ったが、TCF4遺伝子変異や欠失も認めない症例も数例存在した。それらの症例もマイクロアレイ染色体検査では他の領域の欠失はなく、染色体レベルの異常は否定された。このような症例に対しては、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析を行い、別の疾患や新規症候群と判明した例もある。

臨床的に疑いを持ち、遺伝子解析を行う対象を選択する基準として、Marangiの診断基準とWalen

らの診断基準とが存在する。今回の例でも点数の高い例が多かった。この二つの診断基準は PTHS の国内例でも診断の参考になると考えられた。Marangi の診断基準にも Walen らの診断基準にも取り入られていないが、指趾末節の腹側部の胎児性膨らみ (fetal pads) は PTHS で多く認められ、診断基準に取り入れてもよいと考えられた。ただし、この fetal pads は、歌舞伎症候群で多くみられる所見であり、PTHS に特異的なものではない。

PTHS の治療においては特に有効な薬剤は存在しない。てんかんを合併した場合は、一般的な抗てんかん薬の対象となる。療育訓練が重要である。知的障害は重度であるが、簡単な指示は理解でき、徐々に発達は伸びるようである。発達退行はみられていない。

1 施設においても複数例の PTHS を経験したことは、潜在的な症例の存在を示唆するものである。日本での PTHS の報告はまだ少なく、未診断例が多数存在すると思われる。正確な診断により、発症機序の確認、病態の把握、さらには治療方法の開発にむけた研究が可能になると考えられる。長期予後についても今後の研究が必要である。

診断の道筋は次のような内容となる

- ① 特徴的な顔貌があることから、Dysmophology 的に診断を疑うことができる。臨床症状も特徴があるが、欧米の症例で強調されている呼吸異常やてんかんは必ずしも多くなかった。小頭症も顕著ではなく、むしろ大頭の例もあった。こうした点にとらわれると診断を看過する可能性がある。
- ② より頻度の高いアンジェルマン症候群、レット症候群を鑑別する。メチル化解析や MECP2 遺伝子解析を行う。
- ③ 遺伝子全体の欠失例があり、確定診断のためには TCF4 遺伝子解析とマイクロアレイ解析を併せて実施する必要がある。MLPA 法で TCF4 欠失を調べる専用のキットがある。
- ④ TCF4 遺伝子に変異がない場合は、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析の適応がある。

健康管理の案は表 2 に示した。

E. 結論

- 1) Pitt-Hopkins 症候群症候群の 17 症例をまとめた結果から国内例の臨床像の特徴を検討した。てんかんと呼吸障害が少ない傾向があった。
- 2) 診断の道筋を示した。
- 3) 健康管理ガイドラインを作成した。てんかんと呼吸障害は少なかったが、健康管理で注意すべき点に含めた。潜在例を的確に診断し、健康管理を行うことが重要である。今後さらに症例数を増加して検討を進める予定である。

謝辞 症例をご紹介いただきました、全国の先生方に深謝いたします

F. 研究発表

1. 論文発表
別掲
2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1 17 症例のまとめ

Clinical score by Whalen et al. [Human Mutation 2011]		全 17 症例
多く見られる所見	点数	有所見者数
深い眼窩	1	7
顔面正中部あるいは、または顔面下部の膨らみ	1	17
鼻		
目立つ鼻筋	1	16
広く、とがった鼻先	1	15
広がった鼻孔	1	17
口		
大きな口	1	17
テント状の上口唇/めだつ Cupid' bow	1	17
外にめくれた下口唇	1	17
神経系/行動面		
3 歳以降で歩行開始あるいは 3 歳までの顕著な運動発達遅滞	2	17
失調性歩行	1	8
有意語なし	2	17
頭部あるいは上肢の常同運動	2	15
過呼吸	1	1
筋緊張低下	1	17
微笑	1	15
不安/興奮	1	12
斜視	1	15
一般的でない所見		
-3SD 以下の小頭症	-2	
過成長	-1	
内臓奇形	-1	
合目的な上肢機能の喪失	-1	
	Max 20	14~19 点

Clinical score by Marangi et al. [AJMG 2012]		
典型的顔貌	4	17
部分的に PTHS を示唆する顔貌	2	
中度から重度の精神遅滞	2	17
言語表出がない	2	17
重度の表出障害	1	14
出生時の発育正常	1	13
生後の小頭症	1	1
呼吸異常	1	17
協調運動障害	1	17
斜視・近視・不同視	1	9
便秘	1	1
てんかん	1	13
	Max 16	11~14 点

胎児性指腹膨らみ(Fetal pads)		13
----------------------	--	----

表2 Pitt-Hopkins 症候群症候群 健康管理ガイドライン
チェックリスト

	新生児期	乳児期	幼児期
症状・注意点	哺乳状態 嘔吐の有無 筋緊張	成長発達遅滞 嘔吐 哺乳障害 便秘	成長発達遅滞 てんかん発作
評価項目	総合的な診察 診断を疑う 新生児スクリーニング 先天性心疾患の検査 心電図・胸部 X-P 聴力検査・ABR 血液・尿検査 染色体検査 遺伝子検査*	1-3ヶ月毎診察 身長・体重・頭囲 哺乳栄養状況 発達の評価 運動発達確認 視力・聴力 血液・尿検査 脳波・頭部 MRI 遺伝子検査*	3-6ヶ月ごと診察 身長・体重・頭囲 発達評価 視力眼位など眼科精査 聴力 血液・尿検査 脳波・頭部 MRI 遺伝子検査*
専門診療科	新生児科 遺伝診療科 遺伝カウンセリング* 合併症によって 循環器科 眼科 耳鼻咽喉科など	小児科 小児神経科 遺伝科など 眼科・耳鼻咽喉科 予防接種	小児科 小児神経科、 遺伝科など 眼科・耳鼻咽喉科 整形外科 予防接種
療育や教育、福祉		保健師訪問 家族支援	早期療育 PT OT ST 幼児教室など 療育手帳 身障手帳

* 遺伝学的検査は専門医療機関紹介後に実施

* PHTS は新生児期・乳児期早期の診断は困難な場合が多い

表 2 Pitt-Hopkins 症候群症候群 健康管理ガイドライン (学童期以降)

	小学生	中学生	高校生	成人期
症状・注意点	成長発達遅滞 就学状況 てんかん発作 呼吸異常 眼科異常	成長発達遅滞 多動や行動異常 てんかん発作 呼吸異常	知的障害 学校での状況 学校との連携 てんかん発作 呼吸異常	生活習慣病 精神心理面 てんかん発作 呼吸異常
評価項目	半年ごと診察 身体発育 発達評価 採血・検尿 視覚・聴覚 脳波・MRI 関節の状態確認 齲歯予防 予防接種状況	内科診察 半年・年 1 回 身体発育 精神発達 視覚・聴覚 採血・検尿 側彎 脳波・MRI (必要時) 齲歯予防 予防接種状況	内科診察 半年・年 1 回 身体発育 発達評価 視覚・聴覚 採血・検尿 側彎 脳波・MRI (必要時) 齲歯予防 予防接種状況	年 1 回の内科的 診察 (必要に応 じてさらに多 い) 身体計測 採血・検尿 生活習慣病
専門診療科	小児科 小児神経・遺伝 眼科 耳鼻咽喉科 整形外科 歯科	小児科 小児神経・遺伝 眼科 耳鼻咽喉科 整形外科 歯科	小児科から内科 小児神経・遺伝 眼科 耳鼻咽喉科 整形外科 歯科	神経内科 遺伝 眼科 耳鼻咽喉科 整形外科 歯科 必要時 精神科
療育や教育、福祉	家族支援 就学支援 療育の継続 言語聴覚訓練	家族支援 就学支援	家族支援 就学就労支援	就労 障害者福祉制度

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

真性小頭症の発症機序に関する研究

研究分担者 松浦 伸也
広島大学 原爆放射線医科学研究所 教授

研究要旨

日本人真性小頭症家系の全エクソーム解析により WDR62/MCPH2 遺伝子に新規の複合ヘテロ変異を同定した。ゲノム編集法を用いて、WDR62/MCPH2 遺伝子変異を導入したモデル細胞を樹立して、WDR62/MCPH2 が水平方向の紡錘体軸の維持に関わることを明らかにした。

A. 研究目的

真正小頭症は、重度小頭症を特徴とする常染色体劣性の遺伝病である。これまでに 13 原因遺伝子が同定されており、そのほぼすべてが中心体に局在することが知られている。しかし、その分子機能は不明な点が多く、細胞レベルでの小頭症発症メカニズムの理解は十分には進んでいない。そこで平成 27 年度は、真正小頭症の発症機構を解明することを目的とした

B. 研究方法

日本人真性小頭症家系の原因遺伝子を探索し、その疾患モデル細胞を作製することにより、小頭症発症機構を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究では、頻度が稀な疾患の患者とその家系のゲノム DNA を使用するため、個人情報保護が必要がある。研究代表者は「広島大学ヒトゲノム研究倫理審査委員会」に申請して既に承認を得ている（課題名：先天異常症候群の病因遺伝子と病態に関する研究、承認番号：第ヒ-94 号）。家族のインフォームドコンセントを得て、患者とその家系のゲノム DNA を抽出した。

C. 研究結果

全エクソーム解析により日本人真性小頭症 1 家系の同胞 2 例に WDR62/MCPH2 遺伝子の c.731 C>T (p.Ser244Leu) ミスセンス変異と c.2413G>T (p.Glu805X) ナンセンス変異との複合ヘテロ変異を同定した。

WDR62/MCPH2 の生理機能を明らかにするために、人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 を用いて、ヒト WDR62/MCPH2 欠損培養細胞株を樹立した。正常細胞の分裂期中期において、紡錘体は細胞接

着面に対し水平に形成され、均等分裂を保証している。WDR62/MCPH2 欠損細胞株では、微小管重合活性の低下により、細胞分裂軸の不安定化が亢進した。

次に、WDR62/MCPH2 欠損細胞株に野生型 WDR62 を発現させたところ細胞分裂軸の安定化が回復した。一方、WDR62 S244L 変異体、WDR62 D805X 変異体は紡錘体への局在は認められたが、細胞分裂軸の不安定化は改善されなかった。

D. 考察

ヒトの神経発生において、神経幹細胞は均等分裂により十分な幹細胞数を確保した後、不均等分裂によってニューロンを産生することで正常な脳サイズが規定されている。本研究から、WDR62/MCPH2 遺伝子変異による細胞分裂軸制御の破綻が神経幹細胞集団の増大を阻害して、小頭症を引き起こしていることが示唆された。

E. 結論

エクソーム解析により、WDR62/MCPH2 遺伝子に新規の複合ヘテロ変異を同定した。ゲノム編集法を用いて、WDR62/MCPH2 を原因とする小頭症のモデル細胞を樹立して、WDR62/MCPH2 が水平方向の紡錘体軸の維持に関わることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyamoto T, and Matsuura S. Ciliopathy in PCS(MVA) syndrome. *Oncotarget* (2015) Sep 22;6(28):24582-3.

doi: 10.18632/oncotarget.

2. 学会発表

1) Miyamoto T, et al. Inducible Cas9/CRISPR system as a tool to study DNA damage response. The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015) (京都) 2015年5月

2) Yanagihara H, et al. Generation of SNP-knock-in cells using CRISPR/Cas9 system for elucidation of the effect on radiation sensitivity. The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015) (京都) 2015年5月

3) 宮本達雄 他 ヒト培養細胞における1本鎖DNAを用いた簡便な放射線感受性候補SNP導入法の開発 第56回原子爆弾後障害研究会(広島) 2015年6月

4) 宮本達雄 他 ゲノム編集法を用いた放射線感受性の個人差を規定する遺伝的素因の同定 第41回中国地区放射線影響研究会(広島) 2015年7月

5) Royba E, et al. Custom-made system for estimation of individual difference of radiosensitivity 第74回日本癌学会学術総会(名古屋) 2015年10月

6) 宮本達雄 他 真性小頭症で同定されたWDR62/MCPH2 遺伝子変異とゲノム編集技術を利用した疾患モデル細胞の作製 第60回日本人類遺伝学会(東京) 2015年10月

7) Matsuura S, et al. Analysis of individual difference of radiosensitivity using genome-editing technique. The 3rd International Symposium on the System of Radiological Protection (ICRP 2015) (Korea) 2015年10月

8) 政綱宜規 他 真性小頭症で同定されたWDR62/MCPH2 遺伝子変異による細胞分裂軸制御不全 第38回日本分子生物学会年会(神戸) 2015年12月

9) Akutsu SN, et al. Insufficiency of BubR1 gene increases structure-chromosomal instability post ionizing radiation. The 5th International symposium of Phoenix Leader Education

Program for Renaissance from Radiation Disaster (広島) 2016年2月

10) Royba E, et al. Application of genome editing technology into radiation biology for understanding individual difference of radiosensitivity. The 5th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster (広島) 2016年2月

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

過成長を主徴とする奇形症候群に関する研究

研究分担者 副島 英伸
佐賀大学医学部分子生命科学講座 教授

研究要旨

過成長を主徴とする奇形症候群として Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) と Sotos 症候群 (SS) の遺伝子解析を行った。BWS には複数の発症原因があるが、そのうちの1つである 11 番染色体の父性片親性ダイソミー (paternal uniparental disomy : patUPD) モザイクで発症した症例を解析したところ、19% に GWpUPD モザイク (genome wide patUPD mosaic = androgenetic/biparental mosaic) 症例を見いだした。GWpUPD モザイク症例は、部分 pUPD モザイク症例に比べ、高頻度に発達障害、心奇形、腫瘍を合併していた。また、部分 pUPD モザイク症例では、巨舌が有意に多く認められた。GWpUPD モザイク症例のうち 1 例が常染色体劣性遺伝病のシスチン尿症を合併していた。本症例は、SLC7A9 の変異を父から受け継ぎホモ接合となっていたことから、GWpUPD モザイク症例において父由来の劣性遺伝子変異が表現型に影響することが明らかとなった。SS 症例で低メチル化を示すインプリント DMR-X について、培養細胞を用いてメチル化と遺伝子発現の関連性を解析したところ、DMR-X のメチル化の低下に伴い遺伝子 A の発現量が増加していた。遺伝子 A は細胞増殖に関連するインプリント遺伝子であることから、その過剰発現がソトス症候群の過成長の一因になっていると考えられた。

研究協力者

東元 健・佐賀大学医学部・助教
八木ひとみ・佐賀大学医学部・技術専門職員

A. 研究目的

本研究では、過成長を主徴とする奇形症候群として Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) と Sotos 症候群 (SS) を対象とし、患者検体を用いた遺伝子解析(ゲノム解析およびエピゲノム解析)を行い、ゲノム・エピゲノム異常と病態の関連性について解明する。さらに、これらの結果を通して、エビデンスに基づいた診療指針の確立・普及および遺伝子変異データの蓄積に貢献する。BWS は、過成長、巨舌、臍ヘルニアを三主徴とする過成長症候群の一つで、11p15.5 のインプリント異常により発症するインプリンティング疾患である。BWS の主要な発症原因は、KvDMR1 低メチル化 (loss of methylation : LOM)、H19DMR 高メチル化 (gain of methylation : GOM)、11 番染色体の父性片親性ダイソミー (paternal uniparental disomy : patUPD)、CDKN1C の機能喪失変異、11p15 の染色体構造異常(重複、転座、逆位等)が知られている。BWS は Wilms 腫瘍や肝芽腫をはじめとする胎児性腫瘍が発生しやすいことが知られているが、腫瘍の発生頻度は上述の発症原因のタイプ毎に異なる。具体的には、

H19DMR-GOM と patUPD の腫瘍発生頻度は 25% 以上、KvDMR1-LOM と CDKN1C 変異は 5% 程度と大きな違いがある。胎児性腫瘍のリスクを判定し、腫瘍の早期発見を診療に反映させるためには、個々の症例の遺伝子解析を行い発症原因のタイプを確定することが重要である。当研究室では、BWS 症例の遺伝子解析を行っているが、2011 年までは研究費を用いて無償で行ってきた。しかし、研究費での遺伝子解析が困難になってきたことから 2012 年より有償化した (トリオ解析で 5 万円)。

BWS の発症原因の 1 つである patUPD は、正常細胞とのモザイクとして認められる。このモザイクは、発生のきわめて初期に生じる 11 番染色体の体細胞組換えに起因する。このため、大半の症例は、11 番染色体の部分 UPD を示すが、一部にはすべての染色体が父由来である細胞のモザイク症例 (androgenetic/biparental mosaic = genome wide patUPD mosaic: GWpUPD mosaic) が存在すると報告されている (Eggermann T, et al., J. Mol. Med., 2014)。そこで、patUPD モザイク症例中における GWpUPD モザイク症例の頻度および臨床症状の特徴を明らかにすることを目的とした。

SS は、過成長、骨年齢促進、特異顔貌、精神遅滞を特徴とすることから、症状の一部が BWS と

オーバーラップする。ヒストン H3 リジン 36 のモノ・ジメチル化 (H3K36me1・H3K36me2) 酵素をコードしている NSD1 のハプロ不全が原因である。NSD1 のハプロ不全による H3K36me3 の減少は、DNA メチル化酵素 DNMT3A のリクルートに影響を与え、DNA メチル化レベルを低下させ、その結果、標的遺伝子の発現に影響を及ぼし症状が出現すると考えられる。昨年までの研究で、患者末梢血 DNA を用いた包括的なインプリント DMR のメチル化解析を行ったところ、特定の DMR が高率に低メチル化を示すことを見いだした。今年度は、この低メチル化と遺伝子発現の関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の解析

1) BWS 症例における既知異常同定のための遺伝子解析

上述の 3 つの診断基準のうちいずれかに合致する BWS 症例の末梢血由来ゲノム DNA を用いた。KvDMR1-LOM と H19DMR-GOM については、メチル化感受性サザンブロットあるいは bisulfite-pyrosequencing 法で解析した。patUPD については、11p15 の Short tandem repeat (STR) マーカー (*D11S1997*, *HUMTH01*, *D11S1984*) を PCR で増幅したのち、Applied Biosystems 3130 genetic analyzer で電気泳動し、GeneMapper software で各アレル由来 PCR 産物のピーク高を計測してモザイク率を算出した。*CDKN1C* 変異については、全コーディングエクソンをサンガー法にて解析した。

2) patUPD モザイク症例中の GWpUPD モザイク症例の同定と臨床症状の解析

GWpUPD モザイク症例を同定するため、これまでの解析で patUPD モザイクと診断した 36 例を SNP array 6.0 (Affymetrix)あるいは全染色体に局在する STR マーカーで解析した。SNP array のデータは、Nexus copy number software 6.0 を用いて解析し、patUPD の範囲とコピー数を決定した。STR マーカーについては、上述の方法と同様に解析した。さらに、部分 patUPD モザイク症例と GWpUPD モザイク症例の臨床症状について統計学的に比較解析した。

3) GWpUPD モザイク症例における常染色体劣性遺伝病原因遺伝子の変異解析

GWpUPD モザイク症例は、androgenetic 細胞と biparental 細胞のモザイクであることから、父親が常染色体劣性遺伝病原因遺伝子のキャリアで

あれば、その劣性遺伝病を発症する可能性がある。GWpUPD モザイク症例中に常染色体劣性遺伝病であるシスチン尿症を発症した症例を見出したため、シスチン尿症の原因遺伝子 *SLC3A1* と *SLC7A9* の変異解析を行った。

2. Sotos 症候群 (SS) の解析

1) DNA 低メチル化 DMR と遺伝子発現量の解析

SS 症例の約半数で異常低メチル化を示す DMR-X について、培養細胞 HEK293 (ヒト胎児腎由来) と PK4 (膵臓がん由来) を用いて、DMR のメチル化異常との関連するインプリント遺伝子 A の発現量を解析した。細胞を DNA 脱メチル化剤 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR) 0.5 μ M 存在下で 7 日間培養し、DMR のメチル化状態を bisulfite-pyrosequence 法で解析した。また、遺伝子 A の発現量を Droplet Digital PCR 法で定量的に解析した。内部コントロールには β -actin を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は、佐賀大学医学部倫理委員会、佐賀大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を受けて実施した。人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除などの詳細な説明を行い、書面により同意を得たうえで検体収集を行った。

C. 研究結果

1. BWS の解析

1) BWS 症例における既知異常同定のための遺伝子解析

前述の診断基準のいずれかに合致する BWS 症例は計 198 例であった (2016 年 2 月 1 日現在)。遺伝子解析の結果を表 1 に示す。

表 1 発症原因別頻度 (n = 198)

発症原因	症例数	頻度
KvDMR1-LOM	61	31%
H19DMR-GOM	13	7%
patUPD	47	24%
CDKN1C 変異	13	7%
Trisomy 11	8	4%
既知の異常なし	56	28%