

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

マイクロアレイ染色体検査の臨床運用：常染色体劣性遺伝病の診断経験も含めて

研究分担者 大橋博文・埼玉県立小児医療センター遺伝科科長

研究要旨

1) 本研究班での昨年度からの継続研究として、本年度（平成 28 年度）もマイクロアレイ染色体検査の臨床運用を進めた。平成 28 年 1 月～同年 12 月までの期間の症例でマイクロアレイ染色体検査を施行したのは 128 例だった。当センター遺伝科のこの期間の初診患者の 34%がマイクロアレイ解析の対象となっていた。その内分けは、診断不明の先天異常（multiple congenital anomalies; MCA を含む先天異常）をもつ児が 116 例、その他、既に検出した染色体構造異常等の精密診断等が 12 例だった。本研究班がターゲットとする前者の 116 例中、17 例（14.7%）で診断を得た。2) サラ病（Salla disease: MIM#604369）のマイクロアレイ染色体検査による診断例。サラ病は先天性大脳白質形成不全を特徴とする疾患で、6q13 領域に存在する SLC17A5 が責任遺伝子である。症例は 3 才男児。主訴は発達遅滞と髄鞘化遅延。マイクロアレイ染色体検査で、6q13 領域の約 240Kb のコピー数低下（欠失）を認めた（74,258,424-74,498,173）x1）。この当該 CNV はの原因遺伝子である SLC17A5 遺伝子全長を含んでいた。本遺伝性疾患は劣性遺伝形式であり、この片アレル遺伝子欠失のみでは発症しないが、非欠失アレル遺伝子に変異が存在する可能性を想定した。TruSight One(Illumina)を用いた疾患関連遺伝子（最大 4813）ターゲット領域（hg19）解析の結果、同遺伝子に c.116G>A:p.Arg39His（hemizygote）変異を認め、遺伝学的確定診断に至った。3) 先天異常症候群の診断後の患者家族支援としての疾患集団外来の開催も継続して進めた。2016 年 5 月～2016 年 11 月までの間に、計 10 回の外来を開催した。参加家族数は 3～21 家族（平均 11.5 家族）、合計 115 家族であった。他県からの参加家族も平均 3.8 家族あった。

研究協力者

清水 健司（埼玉県立小児医療センター遺伝科）

A. 研究目的

G 分染による染色体検査の限界を克服するゲノム全体を俯瞰する網羅的検査として、マイクロアレイ染色体検査の運用が期待されて

いる。本研究班における当分担研究者の研究として、地域の小児専門医療施設である当分担研究者の所属する埼玉県立小児医療センターにおけるマイクロアレイ染色体検査の実際

の臨床的な運用に関して、本年度は次の3点について報告する。1) 本年度(平成28年度)のマイクロアレイ染色体検査の実績解析、2) マイクロアレイ解析で診断し得た常染色体劣性遺伝病の診断例、3) 先天異常症候群の診断後の患者家族支援としての疾患集団外来の開催、である。

B. 研究方法

1. マイクロアレイ染色体検査の実績

平成28年4月～同年12月までの間に、埼玉県立小児医療センター遺伝科外来を受診した患児に行ったマイクロアレイ染色体検査実績の検討を行った。

2. マイクロアレイ染色体検査による常染色体劣性遺伝病の診断

マイクロアレイ染色体検査によって検出された欠失領域に存在する臨床症状と合致する常染色体劣性遺伝病の原因遺伝子に着目し、非欠失アレル遺伝子の変異同定による遺伝学的確定診断を行う。

3. 先天異常症候群の診断後の患者家族支援としての疾患集団外来の開催

本年度も、比較的頻度が高く受診患者数が多い、新たに診断を受けた患児がいる、集団外来開催を家族が希望している、共有すべき重要な情報や新たな知見がある、臨床研究の推進と関連がある、などを基準に疾患を選定し、集団外来を開催した。

(倫理面への配慮)

マイクロアレイ染色体検査については、関連ガイドラインを遵守して行う。また、マイクロアレイ染色体検査施行に関しては施設の倫理委員会で承認済みである。

C. 研究結果

1. マイクロアレイ染色体検査の実績

平成28年1月～同年12月までの期間の症例でマイクロアレイ染色体検査を施行した例は128例だった。当センター遺伝科のこの期間の初診患者数は373例であったので、その34%がマイクロアレイ解析の対象となったことになる。その内分けは、診断不明の先天異常

(multiple congenital anomalies; MCAを含む先天異常)をもつ児が116例、その他、既に検出した染色体構造異常等の精密診断等が12例、だった。本研究班がターゲットとする前者の116例中、17例(14.7%)で診断を得た。これら17例のマイクロアレイ解析結果とその解釈を表1に示す。

2. 常染色体劣性遺伝性疾患のマイクロアレイ解析による診断

【症例】

3才男児。主訴は発達遅滞と髄鞘化遅延。経過は、10ヶ月健診で下肢の筋緊張亢進と発達の遅れを指摘され、1才7ヶ月時のMRIで高度の髄鞘化遅延、白質容量減少、脳梁菲薄化、小脳軽度萎縮があった。診察上体幹優位の筋緊張低下があり、深部腱反射は下肢で亢進していた。染色体検査は異常がなかった。

【マイクロアレイ解析】

表1. マイクロアレイ染色体検査診断実績(平成28年1~12月)

<p>①Xp22.33(169,796-595,143)/Yp11.22(119,796-545,143) x3 [Likely pathogenic]</p>	<p>Xp22.33/Yp11.22の偽常染色体領域における約425Kbの重複を認めました。切断点がSHOX遺伝子領域内に存在しており、SHOX partial duplication が考えられ、確認のためMLPA法施行したところ、SHOX遺伝子内Ex1-3領域の部分重複を認め、アレイ結果との整合性を認めました。この場合低身長やLeri-Weill症候群等との関連が報告されています。[J Clin Endocrinol Metab. 2011 Feb;96(2):E404-12][Genet Med. 2010 Oct;12(10):634-40]</p>
<p>①6p25.3p25.2(919,175-3,501,166)x1 [Pathogenic]</p>	<p>①6p25.3-p25.2領域における約2.58Mbの中間部微細欠失を認めました。上記は眼や脳などの早期発生に重要な転写因子であるFOXO1遺伝子を含み、6p25 deletion syndromeとして認識されています。主要所見として、虹彩異常や緑内障、難聴、中枢神経異常(脳室拡大やDandy-Walker variant)、骨格所見、発達遅滞等の報告がありますが、微細欠失で知的障害のない例の報告もあり表現型の幅も認識されています。[Eur J Med Genet 58(2015):310-8]</p>
<p>①22q11.21(18,706,001-21,505,417)x3 [Pathogenic/Clinically associated]</p>	<p>①22q11.21領域の約2.62Mbの重複を認めました。上記重複は22q11.2重複症候群(MIM#608363)として報告がありますが、健康な例から、低身長・学習障害・発達遅滞を呈する例でも表現型の幅が広いことが知られており、児の表現型への寄与については慎重な判断が必要です。また健康な片親に同様の重複を認めることがあります[22q11.2 Duplication. 2009 Feb 17 (Updated 2013 Nov 21). GeneReviews?]</p>
<p>①Xp22.33p11.21(332,683-57,521,192)x1~2. [Pathogenic] ②Xq21.1q28(78,055,922-155,226,944)x1~2 [Pathogenic]</p>	<p>①② Xp22.33(端部)-p11.21領域における約57.2Mbのコピー数低下とXq21.1-q28(端部)領域における約77.2Mbのコピー数低下を同時に認めており、これら以外のセントロメア周囲の正常コピー数領域と合わせてr(X)の存在を示唆します。しかしながら、コピー数低下領域のlog2値はそれぞれ-0.52/-0.51と正常コピー数とのモザイク46,X,r(X)/46,XXを示唆します。G分染法結果との違いは、解析する血液細胞の種類の違いや培養過程の有無に起因する可能性があります。</p>
<p>①17p13.3(751,195-1,732,318)x1 [Pathogenic]</p>	<p>①17p13.3領域の約981Kbの中間部微細欠失を認めました。当該欠失はPAFAH1B1遺伝子より遠位に切断点があり、この場合Miller-Dieker症候群で認める滑脳症の合併はありませんが、欠失範囲にYWHAE遺伝子を含むことにより、出生前後の中等度~重度の成長障害や軽度~中等度の発達遅滞、顔貌所見の原因となります。また時に中枢神経形態異常やその他身体合併症の報告も見られます。成長ホルモンの効果があった報告も認めます。[Am J Med Genet 158A:2347-52,2012/ Eur J Med Genet 53(5):303-8,2010]</p>
<p>①Xp22.31(6,552,712-8,097,511) x0 [Pathogenic]</p>	<p>①Xp22.31領域の約1.55Mbの欠失を認めました(Pathogenic)。上記欠失範囲にはSTS遺伝子を含んでおり、X連鎖性魚鱗病(MIM#308100)の原因となります。また隣接する欠失遺伝子PNPLA4やVCX遺伝子も含んでおり、発達遅滞や注意欠陥多動/自閉傾向に寄与する可能性があります[Gene. 2013 Sep 25;52(7):578-83]。しかしながら本見で認める身体所見すべての原因となつているかどうかは慎重な判断が必要です。</p>
<p>①7p22.2p22.1(2,956,450-5,640,790)x3 [Pathogenic]</p>	<p>①7p22.2-p22.1領域における約2.7Mbのコピー数増加(重複)を認めました。上記は7p22.1微細重複症候群として近年認識されている領域と重なっており、主要候補遺伝子であるACTBを含んでおります。本症候群では、大頭、目立つ前頭部、大泉門開大などの頭蓋顔面所見、発達遅滞(言語遅滞)、骨格所見(脊椎彎曲等)の主徴候に加え、心疾患や泌尿器所見の報告も認め、本症例の表現型と矛盾しませんが、本症例で認める出生前後の重度成長障害は非典型的です。軽度所見を有する親からのinheritanceの報告もあり、表現型の幅には注意が必要です。</p>
<p>①18q22.1q23(62,002,702-78,012,829) x1 [Pathogenic]</p>	<p>①18q22.1-q23領域の約16.0Mbの欠失を認めました。当該領域の欠失は18qモノソミー症候群(MIM#61808)のcritical regionを含んでおり、髄鞘化遅延、外耳道閉鎖(狭窄)、難聴、足部異常(垂直距骨、内反足、扁平足)、先天性心疾患、口唇口蓋裂、腎臓異常、成長ホルモン分泌不全などの合併症の責任領域もしくは量感受性(ハプロ不全)遺伝子(NETO1,CYB5A,TSHZ1,MBP,NFATC1)を含んでおります[Am J Med Genet 169C:265-280,2015][Hum Genet 133:199-209,2014]</p>
<p>①22q11.21q11.23(21,505,358-23,654,222) x1 [Pathogenic]</p>	<p>①22q11.21-q11.23領域における約2.1Mbの欠失を認めました。上記はdistal chromosome 22q11.2 deletion syndrome (MIM#61867)で報告のある欠失であり、LCR22-DとLCR22-Fの間の非アレル間相同組み換えで起こります。この領域の欠失の主要所見として、早産、低出生体重、運動発達遅滞、軽度から中等度の知的障害、行動面の問題、先天性心疾患などの報告があり、本児の表現型に矛盾しません。一方で顔脱肛腫瘍のハイリスクとなるLCR22-FとLCR22-G間のSMARCB1遺伝子を含む欠失領域は含んでおりません。[Genet Med. 2014 Jan;16(1):92-100]</p>
<p>①15q11.2(22,765,628-23,146,132)x3 [Pathogenic-Susceptibility Locus]</p>	<p>①15q11.2領域の約381Kbの微細重複を認めました。本欠失範囲はBP1-BP2間のLow Copy Repeatsに惹起された4遺伝子(TUBGCP5,CYFIP1,NIPA1,NIPA2)を含む共通領域の重複であり、15q11.2 microduplicationとして認識されている領域です。臨床所見においては、発達言語遅滞、行動や感情の問題(自閉症スペクトラムや注意欠陥多動)の報告が中心ですが、表現型の幅は広く、また症状がない方も多く不完全浸透と考えられており、健康な片親から受け継いでいる可能性があります。疾患感受性領域としての評価です[Hum Genet; 130(4):517-28,2011]。</p>
<p>①3q22.3q23(136,002,607-141,953,305)x1 [Pathogenic]</p>	<p>①3q22.3-q23領域における約5.95Mbの中間部欠失を認めました。上記欠失領域内には顔裂狭小症候群の原因遺伝子であるFOXO2全長を含んでおり、児の表現型にも合致します。また隣接遺伝子群の欠失も重なるため、低身長、発達遅滞や小頭所見にも寄与していると考えられます。[M.H.de Ru et al. Am J Med Genet 137A:81-7,2005][S.J. Dean et al.Pediatric Neurology 50:636-9,2014]</p>
<p>①22q13.3q13.33(45,721,068-51,224,252)x1 [Pathogenic]</p>	<p>①22q13.31-q13.33(端部)領域における約5.5Mbの欠失を認めました。本欠失は22q13.3欠失症候群のcritical region(SHANK3遺伝子等)を含む44個のOMIM遺伝子を含んでおり、既知の報告と合わせ、病原性と考えられます。主要徴候として、発達遅滞、重度の言語遅滞、自閉症のスペクトラム、時にけいれん等の身体合併症の報告もあります。またリング不安定性としての共通所見である成長障害(22q13.3欠失とは反対所見)、小頭などの原因にもなります。[Am J Med Genet 164A:1659-65,2013]</p>
<p>①1q21.1q21.2(146,507,518-147,824,207)x3 [Pathogenic-Susceptibility Locus]</p>	<p>①1q21.1-q21.2領域における約1.3Mbの微細重複を認めました。疾患感受性領域として認識されており、非アレル間相同組み換えにより、TAR領域を含まない共通領域の重複サイズに一致します。本重複で起こりうる表現型は大頭、筋緊張低下、発達遅滞、知的障害、自閉症スペクトラム等、本症例の表現型に矛盾しないと考えられます。しかしながら表現型の幅は広く、症状がない方も多く不完全浸透と考えられており、健康な片親から受け継いでいる可能性があるため、遺伝カウンセリング上注意が必要です。[Genetics in Medicine 2016.18.341-9][Unique: rare chromosome disorder support group,2013]</p>
<p>①4q13.2q21.21(70,303,326-79,209,282)x1 [Pathogenic]</p>	<p>①4q13.2-q21.21領域における約8.9Mbの中間部欠失を認めました。全く同一の欠失領域の報告はありませんが、本領域と重なる複数の4q近位部欠失の病原性報告があります。共通の表現型として、発達遅滞・言語遅滞、成長障害、大頭、時にけいれん(20%程度)が報告されており、児の表現型にも合致します。内臓奇形や中枢奇形の報告はほとんどないことも矛盾しません。一方、Pibaldismの原因となる4q12領域のKit遺伝子は欠失範囲に含まれていませんが、典型的な顔脱肛腫瘍はないものの低色素の薄い毛髪を認めます。[Unique 2006/ Am J Med Genet134A:226-8,2005/ Am J Med Genet 167A:231-7,2015]</p>
<p>①7q31.2q32.3(116,753,232-130,519,488)x1 [Pathogenic]</p>	<p>①7q31.2q32.3領域における約13.8Mbの中間部欠失を認めました。全く同一の欠失領域の報告はありませんが、本領域と重なる複数の7q31-32領域欠失の病原性報告があります。共通の表現型として、発達遅滞や言語遅滞、自閉症スペクトラムがあります。心疾患、けいれん、難聴など身体合併症の報告もありますが、欠失サイズの多様性ととも表現型の幅も異なります。また7q32.2のインプリンティング領域(MEST遺伝子)も欠失範囲に含まれており、父由来欠失ではRussell-Silver症候群類似所見の報告があります。本症例はGoldenhar症候群の表現型に合致しており、7q31-q32欠失との関連報告は今までありません。[Unique 2011/ Am J Med Genet 172C:102-108,2016/Am J Med Genet 170A:743-749,2015]</p>
<p>①22q13.33(51,107,409-51,224,202)x1 [Pathogenic]</p>	<p>①22q13.33領域における約116.8Kbのコピー数低下を認めました。Log2値や欠失サイズからは、他方法(qPCRやMLPA)による確認が望まれます。確認された場合、本欠失領域は22q13.3末端のSHANK3、ACR,RABL2B遺伝子を含んでおり、Phelan-Macdermid syndrome (22q13.3 deletion syndrome)の責任領域と合致し、主として発達遅滞、言語遅滞の原因となります[GeneReviews]。一方本症例は上記症候群の欠失の中では最も小さな部類で表現型も軽度な傾向が報告されていますが、GERD、けいれん、心臓、腎臓疾患など注意すべき合併症の評価とフォローは大切です。後述する重複領域が表現型の重症度に寄与する可能性はありますが、明らかではありません。</p>
<p>①Xp22.33(477,652-596,208)x3 [Pathogenic-Susceptibility Locus /annotation]</p>	<p>Xp22.33領域(偽常染色体領域:PAR1)における172kbのコピー数上昇を認め、確認のため施行したMLPA法においても同一領域の重複と判断されました。当該重複はSHOX遺伝子の一部とSHOX遺伝子調節領域の一部を含んでおり、過去の報告においては、低身長、Leri-Weill病、ミユール管形成不全、自閉症スペクトラムの各疾患で有意にSHOX領域の重複を認めています。重複範囲、表現型ともに幅があり、病原性としての議論もあります。本症例の表現型(低身長)からは当該領域の重複が病原性に関与している可能性が考えられます。[Eur J Hum Genet.20:125-7,2011/Genet Med. 12:634-40,2010/ J Med Genet.53:536-47,2016]</p>

Agilent human genome CGH+SNP180K / Agilent CytoGenomics 2.9 / UCSC hg19/GRCh37による解析の結果、6q13領域の約240Kbのコピー数低下（欠失）を認めた（74,258,424-74,498,173)x1）。この当該CNVはサラ病（Salla disease: MIM#604369）の原因遺伝子であるSLC17A5遺伝子全長を含んでいた。本遺伝性疾患は、劣性遺伝形式であり、この片アレル遺伝子欠失のみでは発症しないので、単に本疾患の保因者診断がなされたに過ぎないと判断すべきところである。しかしながら、サラ病は先天性大脳白質形成不全の原因疾患の1つであり、患児の中樞神経所見に合致しているため、この遺伝子欠失のサラ病発症への関与として、非欠失アレルの遺伝子内に変異が存在する可能性を想定した。

TruSight One(Illumina)を用いた疾患関連遺伝子（最大4813）ターゲット領域（hg19）解析の結果、SLC17A5遺伝子にc.116G>A:p.Arg39His（hemizygot）変異を認めた。この変異はデータベース[HGMD,dbSNP138(Common,Flagged)]に報告がないものの、以下の理由から“Likely Pathogenic”と判断した。すなわち、1）一般集団データベースにない（HGVD:0/2,202）か、有意に低い(ExAC:1/121,272) アレル頻度、2）疾患特異的な表現型、3）マイクロアレイ検査にてもう一方のアレルに母由来の遺伝子全長の欠失を認めていること（本変異は父由来）、4）In-Silico解析で病原性との評価（SIFT/Polyphen2/Mutation taster）、5）LOVDデータベースでprobably pathogenicの評価。

3. 先天異常症候群の診断後の患者家族支援としての疾患集団外来の開催

2016年5月～2016年11月までの間に、計10回の外来を開催した。参加家族数は3～21家族(平均11.5家族)、合計115家族であった。他県からの参加家族も平均3.8家族あった(表2)。

D. 考察

マイクロアレイ染色体検査で同定された欠失領域に存在する単一遺伝性疾患の原因遺伝子のうち、通常注目するのはハプロ不全で発症する疾患である。常染色体劣性遺伝性疾患の場合は、一方のアレル（遺伝子）が染色体欠失領域に含まれていても、他方の遺伝子が機能していれば発症しない（保因者）。しかし、非欠失アレル（遺伝子）に変異が存在している場合には、両遺伝子ともに機能を障害され発症する（染色体欠失による劣性遺伝病の顕在化）。このような発症は例外的事象ではあるが、患者の臨床症状から可能性が考えられる場合には劣性遺伝病であっても欠失領域の責任遺伝子に注目して、非欠失アレル遺伝子の変異解析を行うことが重要である。マイクロアレイ染色体検査は優れた網羅的スクリーニング検査であるが、質の高い臨床評価が診断精度に大きく貢献することを示す症例と考えた。

E. 結論

1）マイクロアレイ染色体検査の1年間の検査実施実績検討、2）マイクロアレイ染色体検査による常染色体劣性遺伝病の診断例の

表2. 2016年度開催 先天異常症候群集団外来開催状況

日付	疾患名	テーマ	情報提供 担当者	家族数	参加人数	他県よりの家族数
2016/5/10	頭蓋・前額・鼻症候群	疾患の概要	遺伝科医	3	8	0
2016/6/15	5pモノソミー症候群	疾患の概要	遺伝科医	6	14	1
2016/7/20	4pモノソミー症候群	疾患の概要	遺伝科医	3	8	1
2016/7/27	9pトリソミー・テトラソミー症候群	疾患の概要	遺伝科医	7	23	1
2016/8/25	CHARGE症候群	福祉制度と社会資源	ソーシャル ワーカー	12	31	1
2016/8/31	22q11.2欠失症候群	ことばのはなし	言語聴覚士	11	25	1
2016/9/21	カブキ症候群	疾患概要	遺伝科医	19	39	12
2016/9/28	ソトス症候群	先輩のご家族の話	母親	21	42	8
2016/10/12	ウィリアムズ症候群	発達	作業療法士	19	36	9
2016/11/24	プラダーウィリー症候群	不適応行動とその対応	精神科医	14	22	4
			2016年度 合計	115	248	38
			2016年度 平均	11.5	24.8	3.8

経験、3) 先天異常症候群の疾患集団外来の開催を行った。

F. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

- 1) Nakajima M, Kou I, Ohashi H; Genetic Study Group of the Investigation Committee on the Ossification of Spinal Ligaments., Ikegawa S. Identification and Functional Characterization of RSPO2 as a Susceptibility Gene for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine. Am J Hum Genet. 99:202-7, 2016
- 2) 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 K, Kondoh T.

Detailed analysis of 26 cases of 1q partial duplication/triplication syndrome. Am J Med Genet A. 2016 170:908-17

- 3) 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, García-Miñaur 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 2016 135:209-22
- 4) Shiohama T, Fujii K, Hino M, Shimizu K, Ohashi H, Kambe M, Nakatani Y, Mitsunaga T, Yoshida H, Ochiai H, Shimojo N. Coexistence of neuroblastoma and ganglioneuroma in a girl with a hemizygous deletion of chromosome

11q14.1-23.3. Am J Med Genet A. 2016
170:492-7.

2. 学会発表

なし

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

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））
分担研究報告書

マイクロアレイ染色体検査も含めた診療で用いる包括的遺伝学的検査の説明書・同意書

研究分担者 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 遺伝科部長

研究要旨

保険収載された遺伝学的検査の拡大により、次世代シーケンスの臨床応用が本格化しつつある。網羅的ゲノム解析手法の一つであるエクソーム解析のデータを利用して、CNV 検出を試み、マイクロアレイ染色体検査以上に高い検出感度で疾患特異的 CNV が検出可能であることを確認した。このことから、網羅的ゲノム解析を遺伝学的検査として臨床に導入するためには、マイクロアレイ染色体検査とエクソーム解析を別次元の検査として説明するのではなく、同次元で説明する方が妥当と考えられた。この事実をもとに、説明同意書の作成を試みた。今後、さらに解析手法が高度化するにしたがって再度の見直しも必要と考えられた。

A. 研究目的

平成 28 年度より保険収載された遺伝学的検査は 72 疾患群に増え、遺伝学的検査が本格的に医療に導入されつつある。遺伝学的検査の難しさは、疾患ごとに解析手法や原理が異なり、さらに結果の表記の様式なども大きく異なる点があげられる。解釈に至っては、臨床症状との関連から下すべきであり、検査担当者と検体提出者の間での臨床症状に関する情報の連携がなければ成立しない。次世代シーケンサーの登場により、その技術が臨床に応用され、遺伝医療が大きく進展することが予想されている。上述の 72 疾患群の検査でも、次世代シーケンサーの使用が期待されている疾患が複数含まれている。次世代シーケンサーの利点は、単に網羅的であるだけでなく、deep

sequencing によりモザイクを正確に検出することが可能であることや、read depth からゲノムコピー数の変化 (CNV) も評価可能であることがあげられる。以上を考慮すると、遺伝性疾患の診断において、網羅的なゲノム解析を用いる場合、その方法としてマイクロアレイ染色体検査と次世代シーケンス解析を別次元で説明し、それぞれに対して同意書を得る従来の方法から、網羅的解析として一元的に説明し、同意を得ることが現実的となりつつある。

こども医療センターでは 2010 年からマイクロアレイ染色体を、2012 年から次世代シーケンス解析を臨床診断に導入したが、従来のような 2 つの解析方法に対して別々の説明を行ってきた。しかし実際には、次世代シーケンスによる臨床エクソーム (メン

デル遺伝病パネル) 解析データの CNV 変換で診断に至ったケースを複数経験している。今回、CNV (copy number variant) 評価も SNV (single nucleotide variant) 評価も可能な網羅的ゲノム解析を診療で用いるための説明同意の在り方を具体例を挙げて検討した。

B. 研究方法

末梢血液リンパ球を用いた通常の染色体分析は、標準的方法によった。次世代シーケンスシステムは、Illumina 社 MiSeq、解析プラットフォームは主に TruSight One Sequencing Panel を用いた。ライブラリー調整およびシーケンス解析は規定のプロトコールに従った。データ解析は、BWA、GATK からなる当センター構築のパイプラインを用い、参照データベースは施設内および公開データベースを利用した。マイクロアレイ CGH は、Agilent 社製マイクロアレイシステムを用い、アレイは SurePrint G3 Human CGH Microarray kit 8x60K を用いた。解析手順は、Agilent 社による標準プロトコールに準じて進めた。得られたデータの解析は Agilent Workbench ないしは CytoGenomics3.0 ソフトウェアを用いた。データは DLR spread 値<0.30 を採用した。比較対照 DNA は、Promega 社製 Female および Male genomic DNA を用いた。解析したゲノム DNA は、QIAamp DNA Blood Mini kit を用いて自動抽出機で末梢血液から抽出した。アレイ CGH で検出されたゲノムコピー数異常は、ISCN2016 に準じて記載した。参照ゲノムマップとして UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (hg19) Assembly を用いた。

(倫理面への配慮)

次世代シーケンシングおよびマイクロアレイ CGH による解析は、こども医療センター倫理審査において、研究課題「原因不明多発奇形精神遅滞症候群のゲノムワイドな病因解析」として平成 22 年 7 月 22 日に承認を得たものである。検査前に十分な説明を行い、文書により同意のもとで解析を行った。解析にあたっては、全ての個人情報も潜在化した。

C. 研究結果

Pitt-Hopkins 症候群 8 歳女児
臨床症状の組み合わせから Pitt-Hopkins 症候群と診断した 8 歳女児例を経験した。Pitt-Hopkins 症候群責任遺伝子 TCF4 の全エクソンならびにエクソン-イントロン境界領域のサンガーシーケンスで変異を認めなかったことから、微細欠失型の Pitt-Hopkins 症候群ないしは症状が共通した他の奇形症候群を想定してマイクロアレイ染色体検査を行った。しかし、明らかな欠失はコールされなかった。そこで read depth を CNV 変換して再評価を行ったところ、TCF4 遺伝子 exon 13 から exon 20 までの欠失を検出した。この欠失範囲は、最少で 33.2kb、最大で 1.88Mb に及んだ。当初のマイクロアレイ染色体のプラットフォームは 60k (オリゴプローブ間隔は平均約 50kb) なので、コールされているとの仮定から、再度マイクロアレイ染色体検査結果を Geneview 画面で確認したところ、確かに該当領域で 1 プローブの低下が確認できた。

D. 考察

次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析であるエクソームデータを CNV 変換することにより、マイクロアレイ染色体と同等ないしはそれ以上に高い感度で微細な CNV を検出できることが分かった。この結果から、CNV 検出を視野に入れた網羅的なゲノム解析を臨床検査として導入する際には、エクソーム解析とマイクロアレイ染色体検査を別々に行われる遺伝学的検査として説明されるより、全ゲノムを対象とした遺伝学的検査として説明がなされる方が、妥当であると考えられた。この事実を踏まえ、全ゲノムを対象とする遺伝学的検査の説明文書・同意書を検討した。検討を要した点は、1) 検査の目的とは別の 2 次的な所見 (incidental findings 、あるいは secondary findings) の取り扱い、2) 解析終了後のデータの取り扱い (有用な in-house データとして遺伝学的検査を実行する上で不可欠な要素)、3) segregation 解析として両親を中心とした家系解析が求められること、4) オプトアウトの設定、などが挙げられた。

今後、本格的にエクソーム解析が遺伝学的検査として導入される場合には、再度の見直しも必要かもしれない。

E. 結論

エクソーム解析データを用いた CNV 検出を試み、マイクロアレイ染色体検査以上に高い検出感度で疾患特異的 CNV を検出することが可能であることを確認した。このことから、網羅的ゲノム解析を前提とした遺伝学的検査として臨床に導入するには、マイクロアレイ染色体検査とエクソーム解析を別次元の検査として説明するのではな

く、同次元で説明する方が妥当とみなし、説明同意書の作成を試みた。今後、さらに解析手法が高度化するにしたがって再度の見直しも必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ono H, Kurosawa K, Wakamatsu N, Masuda S. Hearing impairment in a female infant with interstitial deletion of 2q24.1q24.3. *Congenit Anom* (Kyoto). 2016 Dec 30. doi: 10.1111/cga.12207. [Epub ahead of print]
- Hossain MA, Yanagisawa H, Miyajima T, Wu C, Takamura A, Akiyama K, Itagaki R, Eto K, Iwamoto T, Yokoi T, Kurosawa K, Numabe H, Eto Y. The severe clinical phenotype for a heterozygous Fabry female patient correlates to the methylation of non-mutated allele associated with chromosome 10q26 deletion syndrome. *Mol Genet Metab*. 2017 Mar;120(3):173-179. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.01.002.
- Shimbo H, Oyoshi T, Kurosawa K. A contiguous gene deletion neighboring TWIST1 identified in a patient with Saethre-Chotzen syndrome associated with neurodevelopmental delay: possible contribution of HDAC9. *Congenit Anom* (Kyoto). 2017 Feb 21. doi: 10.1111/cga.12216. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

Hatano C, Yokoi T, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Saito T, Nagai J, Kurosawa K. Dosage Changes of *NIPBL* cause various types of neurodevelopmental disability. The 13th International Congress of Human Genetics 2016.4.3-7 Kyoto

Enomoto Y, Yokoi T, Hatano C, Ohashi I, Kuroda Y, Tsurusaki Y, Ida K, Naruto T, Kurosawa K. The comprehensive genetic analysis of Rubinstin-Taybi syndrome(RSTS). The 13th International Congress of Human Genetics 2016.4.3-7 Kyoto

Shimbo H, Yokoi T, Mizuno S, Suzumura H, Aida N, Nagai J, Ida K, Enomoto Y, Hatano C, Kurosawa K. Structural brain abnormalities associated with deletion at chromosome 2p16.1. The 13th International Congress of Human Genetics 2016.4.3-7 Kyoto

湊川真理、羽田野ちひろ、横井貴之、大橋育子、黒田友紀子、黒澤健司 Pitt-Hopkins 症候群 3 例に対する診断アプローチ 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.5.13-15 札幌

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝学的検査についての説明

(2017年4月1日)

ヒトのゲノム・遺伝子解析技術の進歩により、より迅速に、網羅的にゲノム・遺伝子を解析することが可能となりました。このヒトゲノム・遺伝子解析技術を応用して、先天的な病気や健康に関わる体質の原因をゲノムや遺伝子から考えることは医療として重要です。この説明文書では、診療として行われる遺伝学的検査について基本的なことをまとめました。それぞれの疾患に関すること（解析対象遺伝子、得られる結果に基づく治療の可能性など）については、担当医から十分な説明を受け、検査を選択願います。

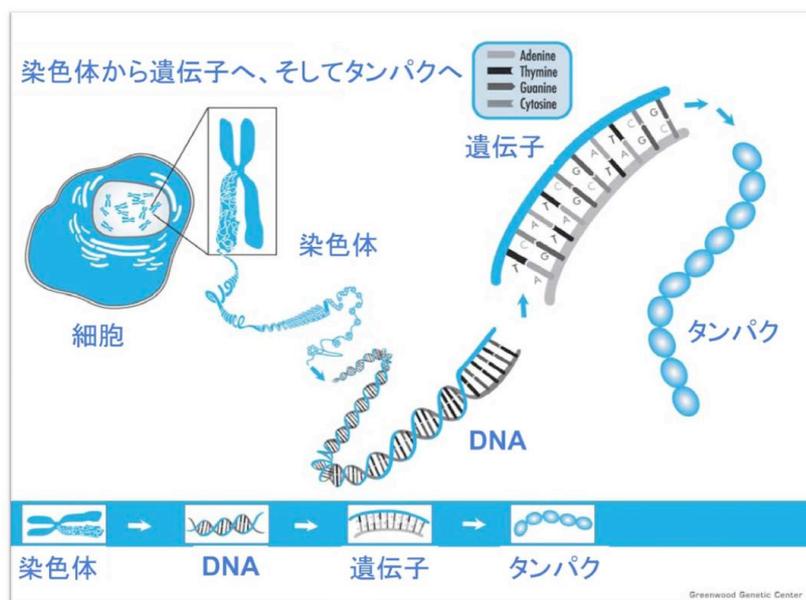
1. 検査の目的・意義：

遺伝子やゲノムの変化が原因として発症する疾患を遺伝病と呼びます。ヒトの遺伝子は20,000種類以上と推測され、そのうち、疾患発症との関連が明らかなものは約5,000種類とされています。現在さらに研究が進み、遺伝病の原因遺伝子は増えつつあります。原因を遺伝子やゲノムの暗号（塩基配列と呼びます）のなかに見出すことは、診断を確実にし、家系内での再発を推定し、医療管理に役立つこともあります。さらに将来何らかの対策や治療法が生みだされるかもしれません。このように遺伝病の原因をゲノム・遺伝子のレベルで明らかにすることは、極めて重要なことです。

遺伝学的検査とは、現在あなた（患者様）が罹患している遺伝性が疑われる疾患について遺伝子やゲノムを詳細に調べる検査を指します。得られた結果と症状との関連を検討し、医療管理に役立て、遺伝カウンセリング等へ応用することを目的としています。

2. 遺伝・遺伝子・ゲノム：

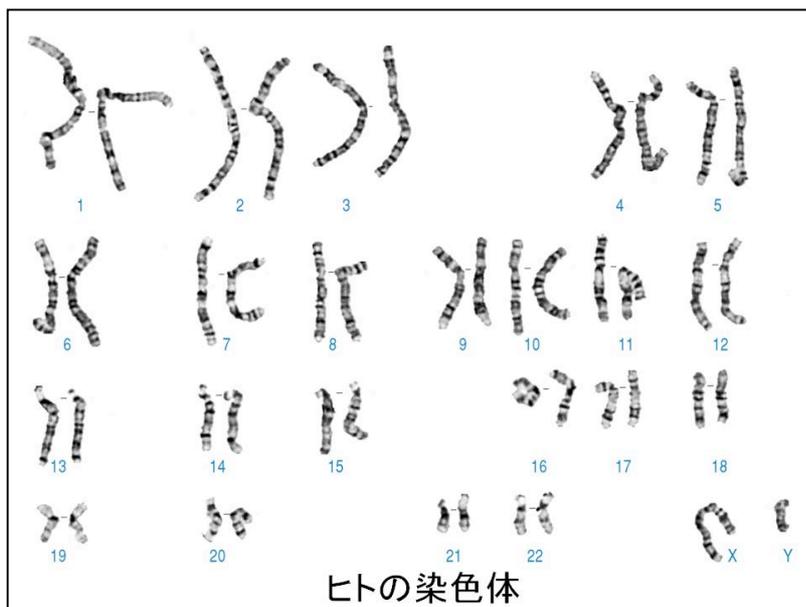
《遺伝子とは》



「遺伝」という言葉は、「親の体質が子に伝わること」を言います。ここでいう「体質」の中には、顔かたち、体つきのほか、性格や病気に罹りやすいことなども含まれます。ある人の体の状態は、遺伝とともに、生まれ育った環境によって決まりますが、遺伝は基本的な部分で人の体や性格の形成に重要な役割を果たしています。「遺伝」という言葉に「子」という字が付き「遺伝子」となりますと、「遺伝を決定する小単位」という科学的な言葉になります。人間の場合、2万種類以上の遺伝子が働いていますが、その本体は「DNA」という物質です。「DN

A」は、A, T, G, Cという四つの文字（塩基）の連続した鎖です。文字（塩基）は、一つの細胞の中で約30億個あり、その文字（塩基）がいくつかつながって遺伝子を構成しています。

このように、一つの細胞の中には 2 万種類以上の遺伝子が散らばって存在しています。この遺伝



情報を総称して「ゲノム」という言葉で表現することもあります。人間の体は、数十兆個の細胞から成り立っていますが、細胞の一つ一つにすべての遺伝子が含まれています。遺伝子には二つの重要な働きがあります。第1の役割は、遺伝子が精密な「人体の設計図」とであるという点です。受精した一つの細胞は、分裂を繰り返してふえ、一個一個の細胞が、「これは目の細胞」、「これは腸の細胞」と決まりながら、最終的には数十兆個まで増えて人体を形作りますが、その設計図はすべて遺伝子に含まれています。第2の重要な役割は「種の保存」です。両親から子供が生まれるのもやはり遺伝

子の働きです。人類の先祖ができてから現在まで「人間」という種が保存されてきたのは、遺伝子の働きによっています。遺伝子は祖先から受け継いできた大切な情報です。

《遺伝子・ゲノム解析の特徴》

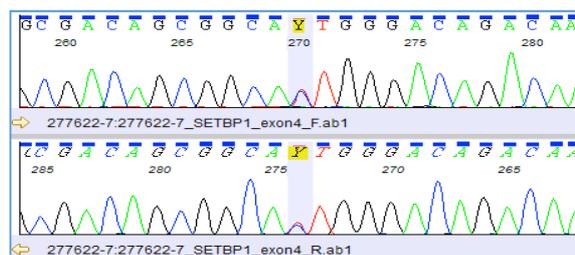
遺伝子には、「人体の設計図」、「種の保存」という二つの重要な役割があることをすでに述べました。ゲノム・遺伝子の変化は、その人の体質を規定する要因にもなりますが、その体質が病的な場合には、遺伝病の原因にもなります。したがって、ゲノム・遺伝子を調べることは、病気の原因を明らかにすることにもなり、さらに、その情報をもとに合併する病気を予防したり、早期発見をすることもできます。また、患者さんの血縁者の中から未発症の患者さんを見つけだし、早期発見、早期治療により病気を治すことも可能かもしれません。もうひとつの有用性としては、得られた結果をもとにした次子再発の可能性に関する遺伝カウンセリングが可能となります。

3. 検査の任意性と撤回の自由：

この検査の同意はあなたの自由意志で決めてください。強制いたしません。一旦同意した場合でも、あなたが不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができ、その場合は採取した血液やゲノム・遺伝子を調べた結果やゲノム情報などは廃棄され、ほかの診療目的に用いられることはありません。

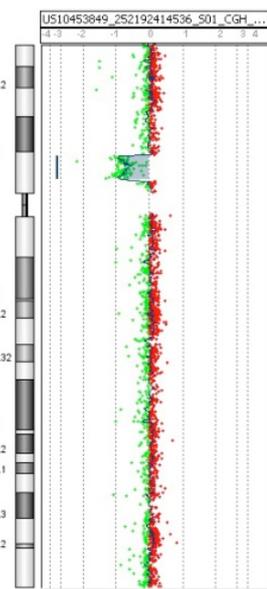
4. 検査の原理・方法・精度について：

血液は決められた量を採血します。採血にともなう身体の高危険性は一般の採血検査と同じです。疾患や状況によっては、血液以外の組織（唾液や皮膚など）を用いることもあります。これらの組織細胞に含まれるゲノム DNA を抽出し、解析を行います。実際にあなたが受ける遺伝学的検査の基本的な原理については、担当医にご確認ください。代表的なゲノム・遺伝子の解析方法を下記にまとめました。



1) サンガーシーケンス法

対象とする特定の遺伝子を構成する文字（塩基）を直接読む方法です。既に特定の原因遺伝子が疑われている、あるいは家系内で遺伝子の変異が特定されている場合に用いる方法です。解析する範囲には限界があり、また、低頻度のモザイクやゲノムの大きな欠失・重複は検出できません。



2) マイクロアレイ染色体検査

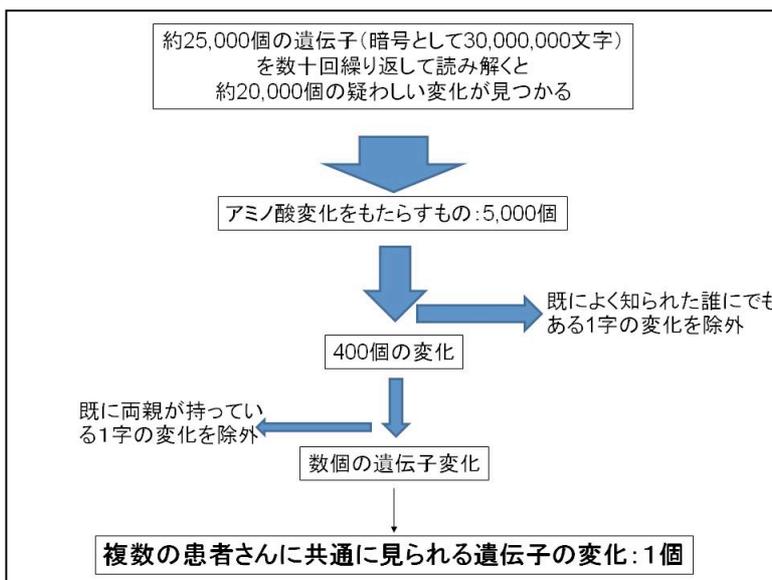
相対的なゲノム（遺伝情報の総体）のコピー数を比較する手法です。ヒトはそれぞれの遺伝子を父親、母親から1つ（1コピー）ずつ受け継いで、常染色体では各遺伝子2つ（2コピー）ずつ持っています。患者DNAと対照となる正常ヒトDNA量とを比較し、過剰あるいは不足（欠失）領域を探します。両親に過剰・欠失がなく、患者DNAのみにゲノムの量的変化が認められ、かつ、それが複数の同様の疾患患者DNAで共通する場合、その領域が疾患発症の原因領域と断定できます。普通、人はだれもみな性格も体質も異なり、1卵性ふたごを除いて同じ人は世の中に存在しません。こうしたそれぞれの違い、つまり個性を規定しているのはゲノム（あるいは遺伝子、DNAの塩基配列、コピー数の変化（copy number variant: CNV））の違いであり、われわれはみな他人と違う膨大なゲノムの変化を有しています。したがって、そのゲノムのコピー数変化（CNV）があなたの病気の原因と考えるためには、患者であるあなた（お子様）にあって、両親にないゲノムの変化を見つけ出すことが重要となります。原因の可能性が推測されるゲノムのコピー変化（CNV）が検出された場合には、両親の解析が必要になります。原因が全く不明の遺伝性疾患の検査にこの技術を用いた場合の、診断率は約10–15%です。マイクロアレイ染色体検査の限界として、この方法では均衡型相互転座を検出することができないこと、染色体再構成の位置的情報が得られないこと、倍数性異常を検出できないこと、低頻度モザイクを検出できないこと、浸透率の低いCNV効果では判断が難しくなること、などがあげられます。

3) エクソーム (Exome) 解析

具体的な原因遺伝子が予想つかない場合には、すべて（約25000種類）の遺伝子が検査の対象になります。その25000種類の遺伝子の中の暗号1文字の違いを見つけ出す方法がエクソーム解析です。この気が遠くなるような作業は、数年前まで、現実的ではありませんでしたが、ごく最近の遺

伝子解読機器（次世代シーケンサーと呼ばれます）の開発により、現実的なものとなりました。しかし、この手法もマイクロアレイ染色体検査と同じく、単なる他人との「違い」と疾患発症原因となった「変異」とを区別するのは容易ではありません。なぜなら、膨大な量（数十万）の「他人との違い」の中からたった一つの「固有の違い」を見つけ出す作業に匹敵するからです。この方法では、両親とのゲノム情報の比較をして初めて見つけ出すことができます。

この解析では次世代シーケンサーのほかに、膨大な量のゲノム情報を処理するバイオインフォマティクスの技術も必要になります。



原因が全く不明の遺伝性疾患の検査にこの技術を用いた場合の、診断率は約20–25%です。

5. 検査後の試料・ゲノムデータ等の保存・使用・廃棄について：

今回の検査に使われるあなたの血液試料（DNA 等）は、再検査等で使用できるように2年間保存します。遺伝子・ゲノムの解析技術の進歩によりさらに詳細な解析でそれまで不明であった原因がわかることもあるからです。ただし、この DNA 等の試料は時間とともに劣化する可能性や量的制限もあり、必ずしも将来の検査を保障するものではありません。希望の申し出によって廃棄も可能です。再解析等による保存試料の使用は、改めて担当医と相談願います。

エクソーム解析など網羅的な解析では、血液・DNA 試料だけでなく、疾患以外の個人のゲノム情報も得られます。あなた（患者様）の網羅的なゲノム・遺伝子解析では、比較対象として公開してある数万人以上の人たちのゲノム情報が役立っています。ゲノム情報はあなた自身の診療に役立つことが第1の目的ですが、他の人たちの診療に役立つ貴重な情報でもあります。当センターでは個人情報保護に配慮して院内で保管・利用させていただきます。

6. 検査結果の今後の診療等への利用可能性について：

検査結果は、診断を確実にし、家系内での再発を推定し、医療管理に役立つこともあります。さらに将来何らかの対策や治療法が生みだされるかもしれません。遺伝カウンセリング等へ応用をすることも可能です。

7. 検査解析期間について：

採血後、結果をお知らせするまでには一定の時間を要します。

複雑な染色体再構成	3-6 か月
マイクロアレイ染色体検査	約 6 か月
特定の遺伝子の塩基配列決定	約 3 か月
次世代シーケンサーによる網羅的解析	約 1 年
その他の遺伝学的検査	担当医に確認

上記は目安であり、詳細は担当にご確認願います。

8. 検査に係る費用について：

検査費用は神奈川県立病院機構が定める規定に従います。また、保険の範囲で行われる遺伝学的検査では、結果説明の際に遺伝カウンセリング加算が算定されます。詳細については担当医にご確認願います。

9. 検査を受けた方にもたらされる利益、不利益及び負担・予測される結果について：

遺伝学的検査では、あなた（患者様）やあなたの血縁者の方に対して、将来の発病に対する不安や社会的差別などの様々な倫理的・法的・社会的問題が生じる可能性も考えられます。

遺伝子異常が見つかった場合は、両親のいずれかが遺伝子異常を有する場合もあり、両親やご家族の方が心理的・社会的に不安を感じる可能性があります。検査前に、この点について十分な遺伝カウンセリングをおこないます。実際に、両親のいずれかが遺伝子の異常を有している可能性のある検査結果が得られた場合には、遺伝カウンセリングとしてご家族の意向を取り入れながら慎重に検索や結果の説明を進めます。

遺伝学的検査で異常が見つからない場合にも、あなた（患者様）が異常を持っていないと結論づけることは出来ません。結果に関してご家族の方が、就職・結婚などへの影響などの不安を感じたり、さらに詳しい情報を知りたいと思う場合には、遺伝カウンセリングを受けることが出来ます。

10. 検査の限界、あいまいな結果、解釈が困難な結果が生じる可能性について：

遺伝学的検査では、異常が検出されない場合でも臨床診断が否定されたわけではありません。特に低頻度のモザイクでは、原因のゲノムや遺伝子の変異を検出することが困難なことがあります。遺伝学的検査には検査技術に由来するさまざまな限界があります。

遺伝学的検査では、さらに、あなた（患者様）の病気・体質の原因か原因でないかはっきりしない、あいまいな結果がでることもあります。結果により一部の症状は説明がつくものの、必ずしもその変異がすべての症状を説明できない、解釈困難な結果が生じる可能性もあります。

11. 検査の目的とは異なる二次的な検査所見が得られる可能性とその取扱いについて：

全ゲノムを解析範囲とするマイクロアレイ染色体検査やエクソーム解析では、あなた（患者様）の病気や症状とは直接関連性のない膨大なゲノム情報が得られます。しかし、それらは暗号としてのゲノム情報であり、意味づけされて解釈を加えられるのは、あなた（患者様）の病気の発症にかかわることが推定される極めてわずかのゲノム・遺伝子情報です。ゲノム・遺伝子の情報は解釈を加えて初めてその意味がわかります。したがって、膨大なゲノム・遺伝子情報が得られても説明できるのは、意味づけされて症状に直接関連のある遺伝情報のみになります。この膨大なゲノム・遺伝子情報とは下記のような内容を含みます。

将来発症するかもしれないほかの病気のこと

薬に対する反応やアレルギーのこと

身長や体重など体質に関すること

性格や気分などこころの働きに関すること

自分の祖先や血縁者との関連性に関すること

これらのあなた（患者様）の病気や症状とは直接関連性のない、意味づけできない、あるいはされていない膨大なゲノム情報をお伝えすることはしません。

ただし、明らかに試料提供者の健康に支障をもたらすことが予測される場合には、あなた（患者様、同意が得られない場合には代諾者）の同意のもとで結果を開示することもあります。

12. 得られた結果の検証として両親・血縁者のゲノム・遺伝子解析が必要となる可能性について：

こどもの遺伝情報は親に由来することから、得られたゲノム・遺伝子解析結果に関して両親の検査が必要になります。罹患者が家系内に複数いる場合には、家系内罹患者（あるいは非罹患者・非発症者）の検査が必要となることもあります。こうした血縁者の遺伝学的検査は、疾患の発症様式、遺伝形式によって変異の検出方法が異なります。また、結果の解釈も発症者（罹患者）とは異なることがあります。あなた（患者様）の疾患での血縁者検査の意義については、担当医に確認願います。両親や血縁者の遺伝学的検査も診療として扱われます。

13. 再検査・再解析の可能性について：

検査結果があいまい、あるいはデータ量が基準を満たさない場合には、再検査を行うこともあります。また、将来遺伝子解析技術がより進歩した場合やデータ解析プログラムがより高い精度でデータを解析することが可能となった場合には、保存 DNA や保管されたゲノムデータの再解析を行うこともあります。さらに解析の際に参照するデータベースの充実などによっても解析精度が向上することがあります。再検査・再解析であなた（患者様）の診療に有用な結果が得られた場合には、あなた（患者様）に開示されます。

14. 個人情報の保護の方法：

ゲノム・遺伝子の結果は様々な問題を引き起こす可能性があるため、他の人に漏れないように、取扱いを慎重に行う必要があります。あなたの血液や試料 DNA には、新しく符号をつけ、鍵のかかる部屋での保管庫に厳重に保管されることとなります。検体試料には、個人の名前など特定できる情報が外されます。このことにより、あなたの個人情報保護されます。解析の結果についてあなたに説明する場合は、報告書としてあなたにお知らせすることが可能となります。

15. 検査結果の開示について :

あなた（患者様）や両親が説明を望まれる場合に、結果についての説明を診療として行います。たとえあなたの家族に対しても、あなたの承諾または依頼なしに結果を告げることはいたしません。あなたの結果について説明を希望される場合は、血液採取後 5 年以内に申し出て下さい。それ以後はその結果を保管できない場合があります。

方法で述べたとおり、膨大なゲノム情報が得られますが、そのほとんどはあなた（患者様）の健康に直接かわるか断定できないものです。したがって、原則として対象疾患の原因と考えられるゲノム情報以外のゲノム情報は開示いたしません。しかし、明らかに試料提供者（患者さん）あるいはその血縁者の方々の生命・健康に大きくかわかる問題が生じると予想される場合には、ご本人の同意のもとで開示をすることがあります。これらは、遺伝カウンセリングとして行われます。

16. 検査に伴う遺伝カウンセリングについて :

あなた（患者様）が、病気のことや染色体・遺伝子解析研究に関して、不安に思うことがあったり、相談したいことがある場合に備えて、遺伝カウンセリング外来を設置しています。ここでは、遺伝カウンセリング担当者があなたの相談を受けることが可能です。担当医師・説明者にその旨申し出て下さい。

17. 将来のより詳細な遺伝学的検査の希望について :

科学の進歩は目覚ましく、全エクソーム解析から全ゲノム解析に向かいつつあります。今回の検査であなた（患者様）の病気の原因がはっきりしない場合でも、将来さらにゲノム・遺伝子を詳しく解析することにより、原因を明らかにすることができるかもしれません。将来のより詳細な遺伝学的検査の希望の有無についてお知らせください。

18. 問い合わせ先 :

遺伝学的検査に関するお問い合わせ等は、下記の解析責任者（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）、認定遺伝カウンセラー宛にお寄せください。

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
解析責任者 黒澤健司（メディカルゲノムセンター・遺伝科）
認定遺伝カウンセラー 西川智子・松浦公美

TEL : 045-711-2351 FAX : 045-742-7821



遺伝学的検査に関する同意書

私は、(疾患名) _____ に対する遺伝学的検査について
医師 _____ より説明を受け、下記事項を十分理解しましたので、検査実施者に依頼することを同意致します。

- 検査の目的や意義
- 遺伝子やゲノム、疾患の遺伝形式などの基本事項について
- 検査を受けることが任意で、同意の撤回は可能なことについて
- 検査の原理・方法・精度などについて
- 検査後の試料・ゲノムデータ等の保存・使用・廃棄について
- 検査結果の今後の診療等への利用可能性について
- 検査解析期間について
- 検査に係る費用について
- 検査を受けた方にもたらされる利益、不利益及び負担・予測される結果について
- 検査の限界、あいまいな結果、解釈が困難な結果が生じる可能性について
- 検査の目的とは異なる2次的な検査所見が得られる可能性とその取扱いについて
- 得られた結果の検証として両親・血縁者のゲノム・遺伝子解析が必要となる可能性について
- 再検査・再解析の可能性
- 個人情報保護の方法
- 検査結果の開示について
- 検査に伴う遺伝カウンセリングについて

* 将来のより詳細な遺伝学的検査を： 希望します 希望しません

患者名 (患者本人が同意に関して判断ができないときは代諾者)

平成 年 月 日

氏 名 _____

代諾者 _____ (続柄)

説明を行った医師

同席者

氏 名 _____

氏 名 _____

病院名 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

住 所 〒232-8555 横浜市南区六ツ川2-138-4

電 話 045-711-2351

CASE REPORT

Hearing impairment in a female infant with interstitial deletion of 2q24.1q24.3

Hiroaki Ono¹, Kenji Kurosawa², Nobuaki Wakamatsu³, and Shin Masuda⁴

The Departments of ¹Pediatrics, ⁴Pediatric rehabilitation, Hiroshima Prefectural Hospital Hiroshima, ²Division of Medical Genetics Kanagawa Children's Medical Center Yokohama, Kanagawa, and ³Department of Genetics, Institute for Developmental Research Aichi Human Service Center Kasugai, Aichi, Japan

ABSTRACT Patients with interstitial deletions in 2q24.1q24.3 are rarely reported. These patients manifest a variety of clinical features in addition to intellectual disability, depending on the size and location of the deletion. We report a female patient with interstitial deletion of 5.5 Mb in 2q24.1q24.3, who showed intrauterine growth retardation, hypotonia, global developmental delay, microcephaly, and characteristic facial appearance. In addition, she had hearing impairment, with no auditory brainstem response. Case of 2q24.1q24.3 deletion with hearing impairment is quite rare. We suspect that hearing impairment is caused by bilateral cochlear nerve deficiency due to cochlear nerve canal stenosis. Further studies are necessary to evaluate hearing impairment as a clinical feature in patients with *de novo* heterozygous 2q24.1q24.3 deletion.

Key Words: 2q24.1q24.3 deletion, cochlear nerve deficiency, hearing impairment

INTRODUCTION

Recently, specific phenotype for 2q24.1q24.3 deletion has been reported, and is characterized by intrauterine growth retardation, hypotonia, severe intellectual disability, microcephaly and autistic spectrum behavior with or without seizures. A total of 17 patients with deletions involving the 2q24.1q24.3 region have been reported in the literature. Although intellectual disability and developmental delay are common in all patients, other symptoms varied, suggesting that some genes are specifically associated with the clinical features of 2q24.1q24.3 deletion. Here we report hearing impairment as a new phenotype of 2q24.1q24.3 deletion and discuss the pathogenesis of this symptom.

CLINICAL REPORT

The patient is the first child from healthy unrelated 29-year-old parents. Her family history was unremarkable. Pregnancy was complicated by poor fetal growth, and she was born at 40 weeks and 5 days of gestation. Her birthweight was 2340 g (below 10th

centile), length was 46.8 cm (below 25th centile) and head circumference was 30.5 cm (below 3rd centile), indicating intrauterine growth retardation. Since neonatal hearing screening with automated auditory brainstem response was “refer”, she was tested with auditory brainstem response test (ABR), which revealed no response. Neonatal serological testing for TORCH infections was negative, and cytomegalovirus DNA was not detected in her umbilical cord. At 7 months of age she was referred to our hospital because of developmental delay. On examination, the patient had microcephaly with a head circumference of 39.7 cm (below 3rd centile). Height and weight were plotted at the 50th centile for age. She had characteristic facial appearance with hypertelorism, telecanthus, almond shaped palpebral fissures, low-set ear, protruding ears, underdeveloped antihelix, exaggerated cupid's bow, tented mouth, small nose and micrognathia (Fig. 1a,b). Her head and neck were unstable, but she showed eye tracking. Neurological examination showed muscle hypotonia and with normal deep tendon reflexes. Electroencephalography and brain magnetic resonance imaging revealed normal findings. The heart and renal ultrasound findings were unremarkable. Examinations for congenital metabolic diseases, including urine analysis of organic acids, showed normal findings.

At the age of 1 year, audiometric evaluations were performed. The threshold of conditioned orientation reflex was 43.8 dB. ABR and auditory steady-state response were negative (Fig. 2a). Axial images of temporal bone computed tomography (CT) depicted bilateral cochlear nerve canals measuring 1.0 mm in diameter (Fig. 2b). Developmentally, she rolled over at 1 year and 3 months, sat unsupported at 2 years, and walked while holding on to something at 2 years and 9 months. A developmental quotient of Enjoji Scale of Infant Analytical development was 17 at 2 years 8 months. At 5 years of age, her body weight was 14.6 kg (below 10th centile), length was 100 cm (below 10th centile) and head circumference was 46 cm (below 3rd centile). She was able to walk unsupported, but no fine motor skills were found. She still could not use meaningful words, sign language and understand any speech.

CYTOGENETIC ANALYSIS

The G-banded karyotyping identified interstitial deletion of chromosome 2q with the karyotype of 46, XX, del(2)(q24.1q24.3) (Fig. 3a). To identify the precise chromosomal deletion region, we performed array comparative genomic hybridization (Array-CGH) analysis using the Agilent SuperPrint G3 Human CGH Microarray Kit 8 × 60 K (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) and genomic DNA extracted from peripheral blood using Qiagen

Correspondence: Hiroaki Ono, Department of Pediatrics, Hiroshima Prefectural Hospital, 1-5-54 Ujina Kanda, Minami-ku, Hiroshima 734-0844, Japan.

Email: h-ono@hph.pref.hiroshima.jp

Received November 18, 2016; revised and accepted December 27, 2016.

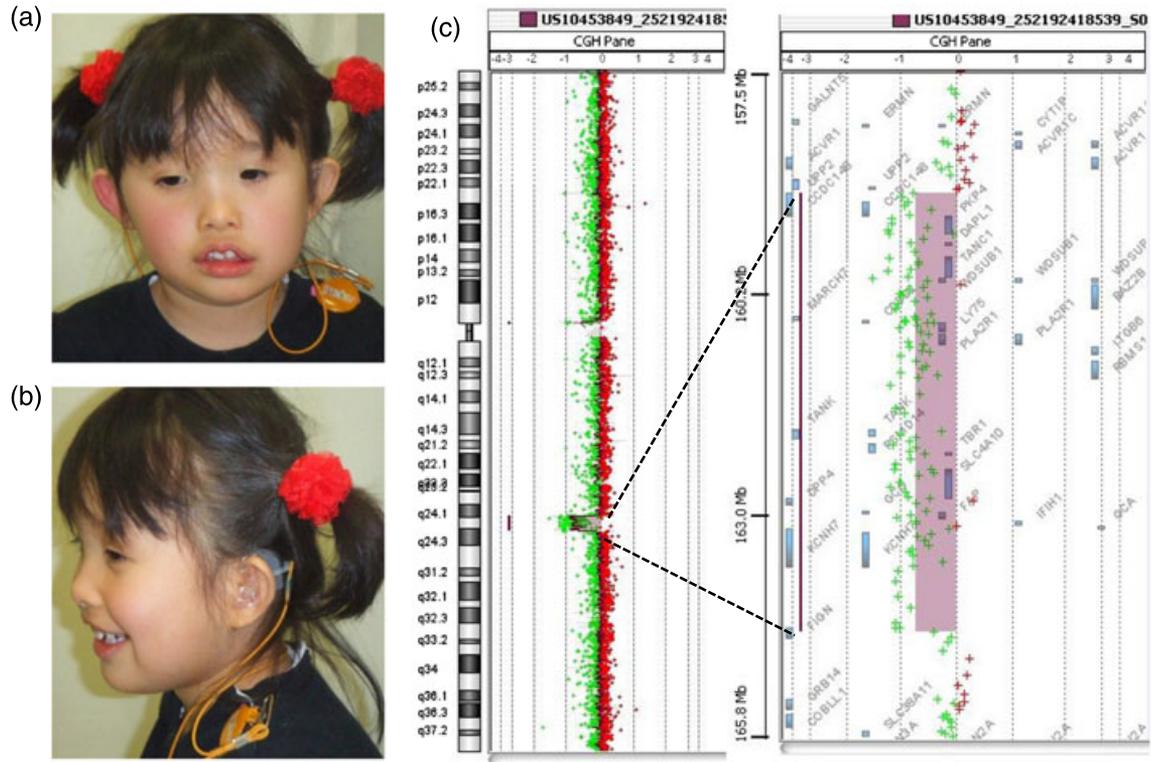


Fig. 1 (a and b): Frontal (a) and lateral (b) view of the proband. Permission was obtained from the parents for presentation. (c) Results of array comparative genomic hybridization analysis. Chromosome view (left) indicates an interstitial deletion in chromosome 2 involving band q24.1 to band q24.3. In the expanded gene view (right) of the deleted 5.5 Mb region (159 028 726–164 512 552), the area shaded in purple contains the genes with imbalance of copy number.

extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instruction. Array-CGH identified a 5.5 Mb microdeletion of 2q24.1-q24.3 with proximal base pair coordinates 159 028 726–164 512 552 (Fig. 1c). Genomic positions refer to the human reference sequence (GRCh 37/hg 19) produced by the Genome Reference Consortium. The deletion was confirmed by FISH experiments using BAC clone (RP11-703 K10, 2q24.2 160.2–160.4 Mb) on metaphase cells (Agilent Genomic Workbench Software) (Fig. 3b). Analysis of parental chromosomes showed normal chromosomes, suggesting *de novo* deletion in chromosome 2q in the presented patient.

DISCUSSION

In the presented patient, the deletion spans 5.5 Mb in 2q24.1q24.3, including 34 genes from *PKP4* to *FIGN*. Several genes in the 2q24.1q24.3 region have been reported to be involved in normal brain development and function. Some of these genes have been considered to be candidates for various clinical features. Belengeanu et al. (2014) compared the clinical features of their patient to six previously published patients with a deletion in 2q24.2q24.3 and suggested that six genes (*PSMD14*, *TBR1*, *SLC4A10*, *DPP4*, *KCNH7*, and *FIGN*) could contribute to intellectual disability and/or autistic spectrum behavior. It is noteworthy that the six genes are located in the deleted region of the presented patient.

Cochlear nerve deficiency (CND) has been known as one of the common causes of congenital hearing loss. Cochlear nerve canal

stenosis with a diameter of 1.5 mm or less as assessed by CT suggests CND or hypoplasia (Masuda et al. 2013). In the presented patient, temporal CT depicted bilateral cochlear nerve canals measuring only 1.0 mm in diameter. Therefore, we speculated that bilateral CND may be a cause of her sensory hearing loss. The exact causes and mechanisms of CND remain unclear. Previous study demonstrated that *TANC1*, which is contained in the deleted region, is a scaffold component protein in post-synaptic density regions and strongly binds PDZ domain of *SCR1B* (Luck et al. 2011). *USH1C* (also known as harmonin) is a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells (Verpy et al. 2000). Since the defect in *USH1C* causes Usher syndrome type 1C associated with profound sensorineural deafness and vestibular dysfunction, we suggest that haplodeficiency of *TANC1* may affect the function of *USH1C* which results in the dysfunction of inner ear sensory hair cell.

Taken together, we report for the first time a patient with 5.5 Mb deletion in 2q24.1q24.3 presenting with hearing impairment possibly due to bilateral CND, in addition to global developmental delay, microcephaly, hypotonia and characteristic facial appearance. Clinical and cytogenetic analyses of more patients with CND and global developmental delay are needed to clarify the relationship between 2q24.1q24.3 deletions and these rare clinical features.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interests.

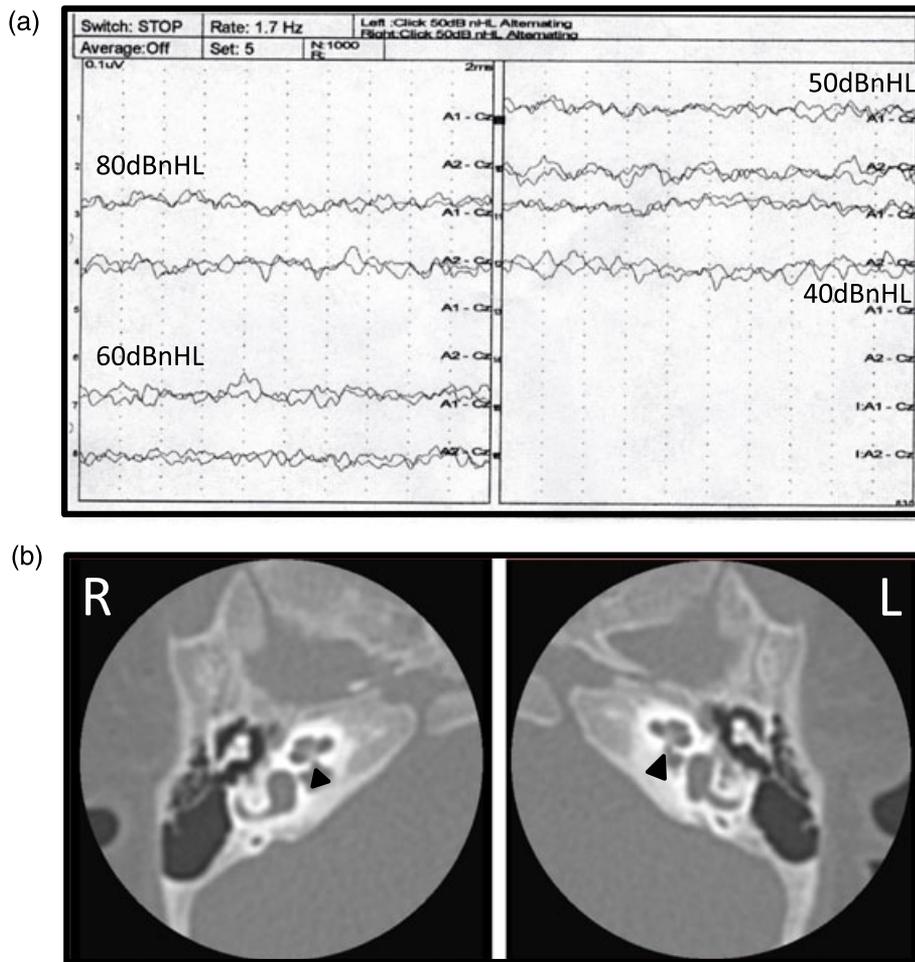


Fig. 2 (a) Auditory brainstem response test shows no response to stimulation ranging from 30 to 80dBnHL. (b) Axial images of temporal bone CT at the level of the cochlear indicate stenoses in bilateral cochlear nerve canals. The left panel shows the right ear (R) and the right panel shows the left ear (L). Arrowhead indicates the stenotic cochlear nerve canal.

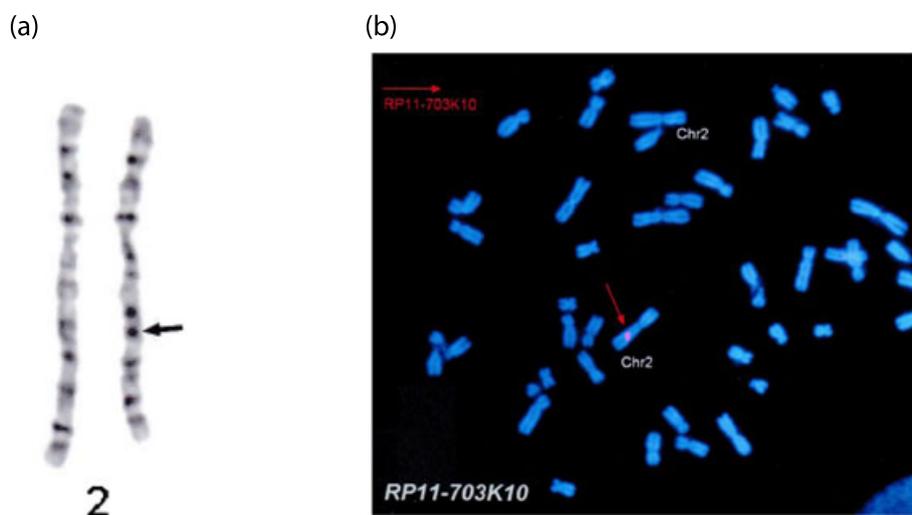


Fig. 3 (a) The G-banded karyotyping showing interstitial deletion of chromosome 2q with the karyotype of 46, XX, del(2)(q24.1q24.3). b: FISH image of the patient using a BAC clone RP11-703 K10.

REFERENCES

- Belengeanu V, Gamage TH, Farcas S et al. 2014. A de novo 2.3 Mb deletion in 2q24.2q24.3 in a 20-month-old developmentally delayed girl. *Gene* 539:168–172.
- Masuda S, Usui S, Matsunaga T. 2013. High prevalence of inner-ear and/or internal auditory canal malformations in children with unilateral sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 77:228–232.
- Luck K, Fournane S, Kieffer B, Masson M, Nominé Y, Travé G. 2011. Putting into practice domain-linear motif interaction predictions for exploration of protein networks. *PLoS One* 6 .e25376
- Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I et al. 2000. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat Genet* 26:51–55.

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患政策研究事業)
分担研究報告書

16p11.2 欠失・重複症候群の実態把握について

研究分担者 山本 俊至 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター・准教授

研究要旨

研究目的:

16p11.2 欠失・重複症候群は1万人当たり数人の頻度で起こる稀な染色体微構造異常による。2008 年、マイクロアレイ染色体検査によって世界中から発見の報告が相次いだ。その大部分は自閉症患者に認められたというものであった。本邦ではまだほとんど報告がない。そこで診断の一助とするため、本疾患と診断された日本人患者の症状をまとめた。

研究方法:

これまでに診断がついた日本人 16p11.2 欠失・重複症候群患者の情報を収集した。

結果と考察:

分担研究者の単独施設において、これまでに 4 家系の存在を明らかにした。このうち 3 家系の発端者はてんかん症状を認め、残り 1 家系の発端者は自閉症症状を示した。2 家系の患者では軽度知的障害が認められた。3 家系の母親は発端者と同じ遺伝子型を示していたが、神経症状は明らかでなかった。このことは、16p11.2 欠失・重複症候群の浸透率は低く、必ずしも自閉症症状を主な症状とせず、てんかんや軽度知的障害などの広範な神経症状と関連していることを示唆している。

結論:

日本人 16p11.2 欠失・重複症候群の実態は未だに明らかではないが、診断がついた発端者では、広範な神経症状が認められるものの、同じ遺伝子型を示す家族が何ら症状を示さないことが多いことが明らかになった。

A. 研究目的

16p11.2 欠失・重複症候群は、16p11.2 領域のわずか 500 kb 程度の領域が欠失、あるいは重複することによって生じるが、2008 年頃に次々と報告のあった自閉症の大規模コホート研究によって自閉症患者の 1%程度に認められることが示された。欠失を示す場合と重複を示す場合で明らかな症状の違いはない。自閉症以外に患者で認められる症状として、発達遅滞、自閉症を含む発達障害、わずかな身体的特徴などが挙げられる。

16p11.2 欠失・重複症候群で欠失・重複

が認められる領域には、両切断端にゲノムの繰り返し構造があり、このため非相同染色体組換による欠失・重複が生じやすく、患者で認められるゲノムコピー数異常の領域は共通している。ゲノム病の1つとして認識される。16p11.2 欠失・重複の領域は遺伝子密度が高く、約 25 個の遺伝子が存在しているが、どの遺伝子がどの症状と関連しているかは明らかになっていない。

本邦における 16p11.2 欠失・重複症候群患者の実態は明らかでない。

B. 研究方法

分担研究者の施設においてこれまでに実施されたマイクロアレイ染色体検査によって明らかになった 16p11.2 欠失・重複症候群患者の臨床情報を収集・調査した。

C. 研究結果

3 家系において 16p11.2 欠失を、1 家系において 16p11.2 重複を認めた。

16p11.2 欠失を示した患者の一人は乳児期早期のてんかん症状で発症したが、それ以外の症状は明らかでない。この患者の両親は検索されておらず、遺伝によるものかどうかは不明である。

16p11.2 欠失を示した残りの 2 家系のうち 1 家系の発端者では自閉症症状が主な症状であった。もう 1 家系の発端者ではてんかん症状と軽度知的障害が認められた。この 2 家系とも母親において同じ 16p11.2 欠失が認められた。

16p11.2 重複を示した 1 家系の発端者はてんかん症状を認めた。同じ重複を持つ母親は無症状であった。

D. 考察

4 家系の 16p11.2 欠失・重複症候群家系の発端者は、必ずしも自閉症症状を主な症状とせず、てんかんや軽度知的障害などの広範な神経症状を示した。このうち 3 家系は無症状の親世代から 16p11.2 欠失あるいは重複を受け継いでいたが、親は無症状であり、16p11.2 欠失あるいは重複の浸透率が低いことが示唆される。

E. 結論

16p11.2 欠失・重複症候群患者の症状は

多彩である一方、同じ遺伝子型を示す家族が無症状である場合が多く、実態把握が容易でない可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimojima K, Okamoto N, Yamamoto T. A 10q21.3q22.2 microdeletion identified in a patient with severe developmental delay and multiple congenital anomalies including congenital heart defects. *Congenit Anom* (in press)
2. Okamoto N, Shimojima K, Yamamoto T. Neurological Manifestations of 2q31 Microdeletion Syndrome. *Congenit Anom* (in press)
3. Shimojima K, Okamoto N, Yamamoto T. Possible genes responsible for developmental delay observed in patients with rare 2q23q24 microdeletion syndrome: literature review and description of an additional patient. *Congenit Anom* (in press)
4. Alber M, Kalscheuer VM, Marco E, Sherr EH, Lesca G, Till M, Gradek G, Wiesener A, Korenke CG, Mecier S, Becker F, Yamamoto T, Scherer SW, Marshall C, Walker S, Dutta U, Dalal A, Suckow V, Jamali P, Kahrizi K, Najmabadi H, Minassian BA. The ARHGEF9 Disease: Phenotype Clarification and Genotype-Phenotype Correlation. *Neurol Genet* (in press)
5. Shirai K, Higashi Y, Shimojima K, Yamamoto T. An Xq22.1q22.2

- nullisomy in a male patient with severe neurological impairment. *Am J Med Genet A* 173A: 1124-1127, 2017.
6. Murakoshi M, Takasawa K, Nishioka M, Asakawa M, Kashimada K, Yoshimoto T, Yamamoto T, Takekoshi K, Ogawa Y, Shimohira M. Abdominal paraganglioma in a young woman with 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 173A: 495-500, 2017.
 7. Matsuo M, Yamauchi A, Ito Y, Sakauchi M, Yamamoto T, Okamoto N, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saito K. Mandibulofacial dysostosis with microcephaly: A case presenting with seizures. *Brain Dev* 39: 177-181, 2017.
 8. Shimojima K, Ondo Y, Matsufuji M, Sano N, Tsuru H, Oyoshi T, Higa N, Tokimura H, Arita K, Yamamoto T. Concurrent occurrence of an inherited 16p13.11 microduplication and a de novo 19p13.3 microdeletion involving *MAP2K2* in a patient with developmental delay, distinctive facial features, and lambdoid synostosis. *Eur J Med Genet* 59: 559-563, 2016.
 9. Yamamoto T, Shimojima K, Matsufuji M, Mashima R, Sakai E, Okuyama T. Aspartylglucosaminuria caused by a novel homozygous mutation in the *AGA* gene was identified by an exome-first approach in a patient from Japan. *Brain Dev* 39: 422-425, 2017.
 10. 四家達彦, 高橋幸利, 木村暢佑, 今井克美, 山下行雄, 山本俊至, 高橋孝雄. 治療戦略の変更により ADL を改善し得た *CDKL5* 異常症による難治性てんかんの女兒例. *脳と発達* 49: 28-31, 2017.
 11. Yamamoto T, Shimojima K, Yamazaki S, Ikeno K, Tohyama J. A 16q12.2q21 deletion identified in a patient with developmental delay, epilepsy, short stature, and distinctive features. *Congenit Anom (Kyoto)* 56: 253-255, 2016.
 12. Hamatani M, Jingami N, Tsurusaki Y, Shimada S, Shimojima K, Asada-Utsugi M, Yoshinaga K, Uemura N, Yamashita H, Uemura K, Takahashi R, Matsumoto N, Yamamoto T. The first Japanese case of leukodystrophy with ovarian failure arising from novel compound heterozygous *AARS2* mutations. *J Hum Genet* 61: 899-902, 2016.
 13. Shimojima K, Narai S, Togawa M, Doumoto T, Sangu N, Vanakkere OM, De Paepee A, Edwards M, Whitehall J, Brescianini S, Petit F, Andrieux J, Yamamoto T. 7p22.1 microdeletions involving *ACTB* associated with developmental delay, short stature, and microcephaly. *Eur J Med Genet* 59: 502-6, 2016.
 14. Shimojima K, Maruyama K, Kikuchi M, Imai A, Inoue K, Yamamoto T. Novel *SLC16A2* mutations in patients with Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Intractable Rare Dis Res* 5: 214-217, 2016.
 15. Shimojima K, Ondo Y, Nishi E, Mizuno S, Ito M, Ioi A, Shimizu M, Sato M,

- Inoue M, Okamoto N, Yamamoto T. Loss-of-function mutations and global rearrangements in *GPC3* in patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Hum Genome Var* 3: 16033, 2016.
16. Morisada N, Ioroi T, Taniguchi-Ikeda M, Ye MJ, Okamoto N, Yamamoto T, Iijima K. A 12p13 *GRIN2B* deletion is associated with developmental delay and macrocephaly. *Hum Genome Var* 3: 16029, 2016.
17. Yamamoto T, Shimojima K, Ondo Y, Imai K, Chong P-F, Kira R, Amemiya M, Saito A, Okamoto N. Challenges in detecting genomic copy number aberrations using next-generation sequencing data and the eXome Hidden Markov Model: a clinical exome-first diagnostic approach. *Hum Genome Var* 3: 16025, 2016.
18. Iwasaki N, Tsurumi M, Asai K, Shimuzu W, Watanabe A, Ogata M, Takizawa M, Ide R, Yamamoto T, Saito K. Pancreatic developmental defect evaluated by celiac artery angiography in a patient with MODY5. *Human Genome Var* 3: 16022, 2016.
19. Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K. Systematic cellular disease models reveal synergistic interaction of trisomy 21 and *GATA1* mutations in hematopoietic abnormalities. *Cell Reports* 15: 1228-41, 2016.
20. Itakura A, Saito Y, Nishimura Y, Okazaki T, Ohno K, Sejima H, Yamamoto T, Maegaki Y. Successful treatment of migrating partial seizures in Wolf-Hirschhorn syndrome with bromide. *Brain Dev* 38; 658-62, 2016.
21. 下島圭子, 三宮範子, 島田姿野, 影山優子, 沼部博直, 山本 俊至. 非医療系大学生のダウン症候群および出生前診断についての理解と意識の分析. *日本遺伝カウンセリング学会誌* 37; 39-43, 2016.
22. Oka M, Shimojima K, Yamamoto T, Hanaoka Y, Sato S, Yasuhara T, Yoshinaga H, Kobayashi K. A novel *HYLS1* homozygous mutation in living siblings with Joubert syndrome. *Clin Genet* 89: 739-43, 2016.
23. Sangu N, Okamoto N, Shimojima K, Ondo Y, Nishikawa M, Yamamoto T. A de novo microdeletion in a patient with inner ear abnormalities suggests the existence of the responsible gene in 10q26.13. *Human Genome Var* 3: 16008, 2016.
24. Shimojima K, Okamoto N, Yamamoto T. A novel *TUBB3* mutation in a sporadic patient with asymmetric cortical dysplasia. *Am J Med Genet A* 170A: 1076-9, 2016.
25. Watanabe S, Shimizu K, Ohashi H, Kosaki R, Okamoto N, Shimojima K, Yamamoto T, Chinen Y, Mizuno S, Dowata 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 K, Kondoh T. Detailed analysis of 26 cases of 1q partial duplication/triplication 1 syndrome. *Am J Med Genet A* 170A: 908-17, 2016.
26. Yamamoto T, Igarashi N, Shimojima K, Sangu N, Sakamoto Y, Shimoji K, Nijima S. Use of targeted next-generation sequencing for molecular diagnosis of craniosynostosis: identification of a novel de novo mutation of *EFNB1*. *Congenit Anom (Kyoto)* 56: 91-3, 2016.
27. Yamamoto T, Shimojima K, Yano T, Ueda Y, Takayama R, Ikeda H, Imai K. Loss-of-function mutations of *STXBPI* in patients with epileptic encephalopathy. *Brain Dev* 38: 280-4, 2016.
2. 著書
1. 山本俊至. マイクロアレイ染色体検査. 水口雅・岡明・尾内一信 [編]. 小児臨床検査ガイド 第2版. 文光堂, 東京, (in press)
2. 下島圭子, 山本俊至. ゲノム解析とiPS細胞を用いた病態. 技術情報協会 [編]. 解析 iPS 細胞の最新技術開発. 技術情報協会, 東京, pp158-164.
3. 奥山虎之・山本俊至 [編]. 小児の遺伝性疾患 症例から学ぶ遺伝学的検査診断遺伝カウンセリングの進めかた. 診断と治療社, 東京, 2016.
4. 山本俊至. 技術講座 エキスパート: 遺伝子・染色体検査「マイクロアレイ染色体検査概論」. 検査と技術 44; 578-84, 2016.
5. 山本俊至. 遺伝カウンセリング. 特集 周産期医学必修知識 第8版. 「周産期医学」46 巻増刊号 (in press)
6. 山本俊至. 先天代謝異常におけるマイクロアレイ染色体検査の応用. 小児科診療 79: 727-732, 2016.
7. 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 pp227-232, 2016.
8. 山本俊至 (訳). 染色体異常と大規模 DNA 変化を調べるための遺伝子検査技術. ゲノム医学, 菅野純夫・福嶋義光 編. ゲノム医学. メディカルサイエンスインターナショナル, 東京 pp452-67, 2016.
3. 学会発表
1. Dowa Y, Sameshima K, Ichinomiya K, Shiihara T, Shimojima K, Yamamoto T. Two cases of monosomy of 3q with cerebral MRI findings. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
2. Moroto M, Chiyonobu T, Tokuda S, Kosaka K, Morioka S, Yamamoto T, Aoki Y, Morimoto M. Similarities of the ectodermal dysplasia, hypohidrotic, with hypothyroidism and agenesis of the corpus callosum (OMIM 225040) and cardio-facio-cutaneous syndrome

- (OMIM 115150). The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
3. Ueda K, Okamoto N, Toribe Y, Shimojima K, Yamamoto T. Tatton-Brown-Rahman syndrome due to 2p23 microdeletion. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
 4. Seto T, Yamamoto T, Shimojima K, Shintaku H. Novel mutation in the *COL1A1* gene causes severe scoliosis and valvular heart disease in a Japanese family with osteogenesis imperfecta. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
 5. Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T, Nagata S. Mutation in the gene encoding eukaryotic translation initiation factor 2B in Japanese patients with vanishing white matter disease. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
 6. Matsuo M, Sakauchi M, Yamauchi A, Ito Y, Yamamoto T, Okamoto N, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saito K. A case of mandibulofacial dysostosis with microcephaly presenting with epilepsy. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
 7. Yamamoto T, Shimojima K, Shibata T, Akiyama M, Oka M, Akiyama T, Yoshinaga H, Kobayashi K. Novel *PLA2G6* mutations associated with an exonic deletion due to non-allelic homologous recombination in a patient with infantile neuroaxonal dystrophy. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
 8. Yamamoto T, Shimojima K, 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 variation in *CLCN6* identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
 9. Shimojima K, Okumura A, Hayashi M, Kondo T, Inoue H, Yamamoto T. *CHCHD2* is down-regulated in neuronal cells differentiated from iPS cells derived from patients with lissencephaly. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.

Japan.

10. 山本俊至. [シンポジウム 11: 小児神経疾患の最新理解]網羅的遺伝子診断. 第 58 回日本小児神経学会学術集会 2016.6.3-5, 東京.
11. 下島圭子, 岡本伸彦, 山本俊至. 非対称性大脳皮質異形成症症例に認められた新規 *TUBB3* 変異. 第 58 回日本小児神経学会学術集会 2016.6.3-5, 東京.
12. 島田姿野, 山本俊至, 下島圭子, 永田 智 . Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts の日本人 8 名における *MLC1* 遺伝子解析. 第 58 回日本小児神経学会学術集会 2016.6.3-5, 東京.
13. 山本俊至. 指定発言「種々の介入を要した Emanuel 症候群の乳児期の発達経過」. 第 628 回日本小児科学会東京都地方会講和会, 2016.6.11, 東京.
14. 山本俊至, 下島圭子, 恩藤由美子, 岡本伸彦. 次世代シーケンスによる SNV スクリーニングだけでは CNV が見逃される. 第 56 回日本先天異常学会学術集会, 2016.7.29-31, 姫路.
15. 下島圭子, 恩藤由美子, 松藤まゆみ, 佐野のぞみ, 水流尚志, 山本俊至. ラムダ縫合早期癒合を示した *MAP2K2* 領域の微細欠失による RASopathies 患者. 第 56 回日本先天異常学会学術集会, 2016.7.29-31, 姫路.

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

H. 知的所有権の取得状況

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

マイクロアレイ染色体検査でみつかる染色体微細構造異常症候群の
診療ガイドラインの確立に関する研究

研究分担者 涌井 敬子 信州大学医学部遺伝医学・予防医学教室 講師

研究要旨：マイクロアレイ染色体検査により診断される、多発奇形・発達遅滞を主症状とする染色体微細構造異常症候群の診療ガイドラインの確立を目的として、代表的な疾患に関して、全国調査による国内患者の把握や、臨床診断基準、重症度判定基準の策定を実施し、これらの疾患の患者や家族に対する支援を通じて、稀少難病の医療や福祉の向上に貢献することをめざす。

A. 研究目的

染色体微細構造異常症候群のほとんどは、確定診断に遺伝学的検査としてのマイクロアレイ染色体検査による特定領域のゲノムコピー数バリエーション（copy number variants: CNVs）の検出が必須である。マイクロアレイ染色体検査の実施に際しての課題などを、公開データベース/ガイドライン、自験データなどから抽出し、世界で実施されている遺伝学的検査の現状についての認識を深める。

B. 研究方法

1. 諸外国で実施されている細胞遺伝学的検査の実態とわが国の課題

‘GeneTests’ < <https://www.genetests.org/> > は、米国で運用されている先天異常患者の診断目的の遺伝学的検査に関する情報サイトのひとつで、2016年12月8日現在、5,810遺伝子、4,745疾患に関する遺伝学的検査についての情報が掲載されている。ここに掲載されている細胞遺伝学的検査の項目を分析した。

2. マイクロアレイ染色体検査実施に関するガイドラインで指摘されている留意事項

マイクロアレイ染色体検査が原因不明の先天異常患者に実施すべき第一選択の遺伝学的検査として普及している諸外国においては、検査実施に際してのガイドライン等の整備も進んでいる。以下の米国および欧州におけるガイドラインおよび自験データより、マイクロアレイ染色体検査実施の際の留意事項について抽出した。

ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics

Laboratory Quality Assurance Committee, Genet Med. 2013 Nov;15(11):901-909, 2013

Genome-wide arrays: quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. Vermeesch JR et al, Hum Mutat. 33(6):906-915, 2012

（倫理面への配慮）

本研究の実施に際しては、倫理指針等を遵守し、関係する多発奇形・発達遅滞を有する患者やその家族が不利益を被ることの無いよう、個人情報保護に留意する。

C. 研究結果

1. 諸外国で実施されている細胞遺伝学的検査の実態とわが国の課題

‘GeneTests’に掲載されている情報は、以前は分子遺伝学的手法を用いた遺伝学的検査の情報が主であったが、現在は検査法の分類として、細胞遺伝学的検査も加わっている。それは、染色体微細構造異常症候群を検出するための細胞遺伝学的検査法であるマイクロアレイ染色体検査法が、諸外国では原因不明の先天異常患者に実施すべき第一選択の遺伝学的検査として普及したこと、検出されたCNVsが原因と考えられる疾患が多く認識されるようになってきたこと、そのうちの一部が患者の蓄積により疾患単位として確立してきた、といった背景によると考えられた。そして、検査の項目は、分染法・FISH法・マイクロアレイ染色体検査法といった解析法の違いだけでなく、出生後・出生前の区別や、検査に用いる試料などによっても分類され、それぞれに費用が決められていた。

一方、神経線維腫症I型やCHARGE症候群といった、シーケンスバリエーション（SVs）の検出を目的とした分子遺伝学的解析法が主たる遺伝学的検査である一部の単一遺伝子疾患の遺伝

学的検査法としても、細胞遺伝学的検査（マイクロアレイ染色体検査法やFISH法）を実施している検査施設も少なからず見受けられた。疾患によっては低頻度ながら当該遺伝子に関連するCNVsが病的バリエーションとなっていることが知られており、病的バリエーションの検索に、SVsのみならずCNVsも対象にする必要性が認識されてきたことを反映していると考えられた。

一方、マイクロアレイ染色体検査で検出しようとする病的バリエーションは、優性遺伝形式の疾患がほとんどであるが、劣性遺伝形式の疾患も視野に入れた場合、シーケンス解析やコピー数異常解析では検出できない、一方のアレルの染色体構造異常がもうひとつの病的バリエーションとなる場合があることにも留意が必要である（Poot M & Haaf T (Mol Syndromol. 6(3):110-134, 2015)

以上の結果を2016年日本小児遺伝学会にて発表した。

2. マイクロアレイ染色体検査実施に関するガイドラインで指摘されている留意事項

マイクロアレイ染色体検査を臨床検査として実施する際に、留意すべき項目を以下に抽出した。

- ・アレイデザイン
- ・検証と妥当性確認
- ・レファレンス DNA
- ・解析ソフト
- ・精度管理
- ・解析および解釈の品質基準
- ・報告書の品質基準
- ・CNVsに伴う染色体再構成の確認のための技術利用

解析および解釈の品質基準に関連して、自験データを分析した。既知の染色体微細構造異常症候群として知られている領域以外に検出されたCNVsについては、臨床症状との関連の評価は容易ではない。その際に参照する公開データベースのひとつに、630万人以上の正常対象のCNVsが登録されている、カナダで運用されているDatabase of Genomic Variants (DGV) < <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> > がある。自験の先天異常患者に検出されたCNVsの臨床的評価のために実施した、患者の症状を認めない親を対象としたマイクロアレイ染色体検査で検出されたbenignとおもわれるCNVsでも、DGVにも登録がなかったCNVsも少なくなかった。人種差の影響が視され、日本人のCNVsデータベース構築が望まれる。また、特定領域においては関連遺伝子の表現度の多様性による影響も除外できないため、データベース

の充実と定期的なデータの見直しが必須と考えられた。症状を認めない親から伝わったCNVsであっても、病的でないことが検証されていない限り、安易にbenignとすべきでないことは、既報告されている諸外国のガイドラインでも指摘されていた。

以上の結果を2016年国際人類遺伝学会にて発表した。

D. 考察

今回、‘GeneTests’や諸外国のマイクロアレイ染色体検査実施に関するガイドラインの分析より、世界で実施されている遺伝学的検査の現状についての認識を深めた。わが国に適した遺伝学的検査としてのマイクロアレイ染色体検査実施施設の実施体制の構築とともに、実施施設間で共有する実施ガイドライン等の整備が必要である。

E. 結論

国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）が立ち上がり、わが国においてもゲノム医療の充実が期待されている。遺伝性疾患の発症原因となる責任遺伝子の病的バリエーションは多様であり、次世代シーケンサーを用いた遺伝学的検査法でも特定できない場合がある。わが国においても遅ればせながら臨床シーケンシングが普及しようとしている今、医療として重要な確定診断に結びつける病的バリエーションの検出率向上のためにも、改めてマイクロアレイ染色体検査を含む細胞遺伝学的検査の実施体制の充実が必要と考えた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Moteki H, Azaiez H, Sloan-Heggen CM, Booth K, Nishio SY, Wakui K, Yamaguchi T, Kolbe DL, Iwasa YI, Shearer AE, Fukushima Y, Smith RJ, Usami SI. Detection and Confirmation of Deafness-Causing Copy Number Variations in the STRC Gene by Massively Parallel Sequencing and Comparative Genomic Hybridization. Ann Otol Rhinol Laryngol. 125(11):918-923,2016

2. 学会発表

Retrospective evaluation of rare benign CNVs detected by chromosomal microarray (ポスター). Wakui K, Kosho T, Takano K, Narumi Y, Shimizu K, Nishi E, Mizuno S, Yamaguchi T, Kawamura R, Ohashi H, Fukushima Y, The 13th International Congress of Human Genetics, 2016.4.4, 京都

遺伝学的検査情報サイト‘GeneTests’に掲載されている細胞遺伝学的検査についての分

析（ポスター）：涌井敬子，福嶋義光，第39
回日本小児遺伝学会学術集会，2016.12.10，東
京

H. 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