

マイクロアレイ染色体検査の臨床運用と2q37欠失症候群の診断基準作成について

研究分担者 大橋博文・埼玉県立小児医療センター遺伝科部長

### 研究要旨

- 1) 本研究班での継続研究として、本年度（平成 29 年度）も診断不明の多発先天異常症例を中心としたマイクロアレイ染色体検査の臨床運用を進めた。平成 29 年 1 月～同年 12 月中旬までの期間でマイクロアレイ染色体検査を施行したのは 125 例（うち両親解析 4 例）であった。このうち G 分染法で既に検出した病原性染色体異常の精密診断は 12 例に施行された。診断不明の先天異常（multiple congenital anomalies; MCA を含む先天異常）の原因診断目的で施行した 109 例中、病原性コピー数異常を 23 例に認め、診断率は 21.1%であった。病原性 CNV 診断例のうち、2 種類の病原性 CNV を認めた 2 例、コピー数不変連続ホモ接合領域（Long Contiguous Stretches of Homozygosity:LCSH）の存在から片親性ダイソミーの診断に至った例、責任遺伝子をシスに調節すると認識されている調節領域の欠失 2 例については詳細に報告し、CGH+SNP を用いたマイクロアレイ染色体検査の有用性を再認識した。
- 2) 本研究班を対象とするマイクロアレイ染色体検査に関わる疾患として 2q37 欠失症候群の診断基準の策定を試みた。本疾患は軽度から中等度の発達遅滞、低身長、肥満、顔貌所見に加え、特徴的な第 3-5 指趾の中手骨/中足骨の短縮や自閉症スペクトラムを主要症状とする微細欠失症候群である。その診断基準の作成にあたり、既知のレビュー文献とともに、海外の希少染色体疾患のサポートグループである Unique (<http://www.rarechromo.org>) における疾患ガイドブック情報も参考とした上で疾患概要につきまとめた。また当センターで過去にマイクロアレイ染色体検査で診断した 3 症例の情報も検討した。これらの情報を加味した上で診断基準の作成を試みた。主要症状として①精神運動発達遅滞、②特徴的顔貌、③第 3-5 指（趾）の中手（足）骨短縮（type E brachydactyly）を挙げ、これらのうち①、②を必須症状とし、診断検査として少なくともマイクロアレイ染色体検査を含むコピー数異常解析検査で HDAC4 遺伝子を含む 2q37.3 領域の欠失を同定できたものを診断確定とした。一方、①、②、③を満たす場合は臨床診断が強く示唆されるため、G 分染法、FISH 法を含む従来検査で 2q37 端部（サブテロメア領域）の欠失と判定されれば診断確定とした。

### 研究協力者

清水 健司（埼玉県立小児医療センター遺伝科）

大場 大樹 (埼玉県立小児医療センター遺伝科)

## A. 研究目的

多発先天異常の診断率を 15%前後底上げできる高解像度とゲノム網羅性を併せ持ったマイクロアレイ染色体検査の我が国における認知が拡大する中、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臨床応用を継続している。これらの成果をもとに本年度は下記 2 点について報告する。1) 平成 29 年のマイクロアレイ解析実績の概要と診断に有用であった特記すべき解析結果の報告、2) マイクロアレイ染色体検査で判明する微細欠失症候群の 1 つである 2q37 欠失症候群について、当センターにおける診断患者、グループ外来開催情報、海外のサポートグループ情報、レビュー文献、等からの情報を基にした診断基準の作成、の 2 点である。

## B. 研究方法

### 1. マイクロアレイ染色体検査の解析実績

平成 29 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のうち、染色体異常症の鑑別を要する先天異常症例や、G 分染法で既に同定された構造異常を有する症例における詳細解析を目的にマイクロアレイ染色体検査 (SurePrint G3 CGH+SNP 4x180K Microarray Kit :Agilent technologies) を施行し、この中で同定されたコピー数変異 (Copy Number Variation: CNV) やコピー数不変連続ホモ接合領域 (Long

Stretches of Contiguous Homozygosity:LSCH) についての病原性解釈と診断解釈につき、追加解析も含めた網羅的検討と分析を行った。(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。

### 2. 2q37 欠失症候群の診断基準作成

マイクロアレイ染色体検査が確定診断に有用な染色体サブテロメア異常症の 1 つである 2q37 欠失症候群について、GeneReviews®を含む文献情報や、海外におけるサポートグループ Unique (<http://www.rarechromo.org>) の情報についてレビューを行い、疾患概要をまとめた(下記参考文献参照)。また当センターで現在までにマイクロアレイ染色体検査で診断した 3 症例の情報も検討した。これらの検討事項を総合して診断基準作成を試みた。

[診断基準作成にあたっての参考文献]

#### 1) “2q37 Microdeletion Syndrome”

GeneReviews[Internet].

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1158/>

#### 2) “2q37 deletion syndrome”

Unique:understanding chromosome disorders[Internet].

<http://www.rarechromo.org/information/Chromosome%20202/2q37%20deletion%20syndrome%20FTNW.pdf>

- 3) “Chromosome 2q37 deletion:clinical and molecular aspects. Am J Med Genet 2007 145C:357-71
- 4) “Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems.” Am J Hum Genet 2010 87:219-28
- 5) “Wilms tumor incidence in children with 2q terminal deletions: a cohort study. Am J Med Genet 2011 155A:2221-3
- 6) “The 2q37-deletion syndrome: and update of the clinical spectrum including overweight, brachydactyly and behavioural features in 14 new patients.” Eur J Hum Genet 2013 21:602-12.
- 7) “Deletion 2q37 syndrome: Cognitive-Behavioral Trajectories and Autistic Features Related to Breakpoint and Deletion Size” Am J Med Genet 2016 170A:2282-91

## C. 研究結果

### 1. マイクロアレイ染色体検査の解析実績

平成29年1月～同年12月24日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125例（うち発端者解析121例、両親解析4例）であり、この間の初診患者382例のうち32%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109例、その他、既に検出した染色体異常の精密診断が12例であった。

本研究班がターゲットとする前者の109例中、23例（20.3%）で診断を得た。このうちマイクロアレイ解析の有用性を認識できる特記すべき診断解釈例をとりあげ、その分類と詳細を述べる（表1参照）。

#### ① 2種類の病原性CNV有する診断例

コピー数異常の組み合わせとしてのsecond hitと呼ばれる2種類の病原性CNVを異なるメカニズムで認めた2例を経験した。1例目は先行するG分染法においてt(1;3)(p13.3;q12)+t(3;8)(p13;q24.1)の2種類の転座の組み合わせをもつ複雑な均衡型構造異常を認めたが、アレイ解析において、転座に関わる複数の切断点のうち2カ所において、切断点より比較的近い領域に、del(1)(p21.1p13.2)の8.8Mb欠失とdel(3)(q13.1q13.13)の3.8Mbの欠失を認めた。ともに認知された既知の症候群領域ではなかったが、欠失サイズやオーバーラップする複数の文献情報から、各々[Pathogenic][Likely Pathogenic]の病原性解釈であり、これらの相加的影響により発端児の表現型を説明しうる診断結果であった。このような複雑な構造異常に伴う欠失はChromothripsis等の機序による1回の独立したイベントに伴い生じるde novo変異の可能性が高いと考えられた。もう1例では、del(1)(p36.32-qter)の2.6Mb端部欠失とdel(17)(q12)の中間部1.6Mb重複の組み合わせが判明した。前者は1p36欠失症候群として病原性が確立しており、浸透率は100%であり発端児の表現型を満たしていた。一方で、17q12微細重複はLow Copy Repeatに惹起される共通領域の重複であり、病原性感受性領域とし

て認知されており、発達遅滞が主たる表現型であるが、浸透率は21%とされている。このことから、前者はde novo、後者は片親由来である可能性が高いと考えられた。

## ② マーカー染色体を有し、コピー数不変連続ホモ接合領域(Long Contiguous Stretches of Homozogosity:LCSH)を契機とした診断例

成長障害を主とする症例において先行するG分染で47,XX,+mar[11]/46,XX[9]が判明し、詳細解析としてマイクロアレイ施行したところ、SNP解析にて7番染色体全域にわたり数十Mbの断続的なLCSHが判明した。表現型と合わせmaternal UPD7 (Russell-Silver症候群) が考えられたため、同領域のメチル化特異的MLPA法による追加解析施行し、母由来パターンと判明し診断確定した。またマーカー染色体は非常に小さく、CEP7プローブFISHでは予想通り7番染色体由来と判明したが、アレイ解析では7番染色体上に有意なコピー数上昇としては認識されず、重複としての病原性は否定的であった。発生メカニズムとしては、LCSHがセントロメア周囲を含んでいたことから、母由来第2減数分裂時の不分離に起因すると考えられた。SNP解析を有することによる診断の有用性を再認識する結果であった。

## ③ 調節領域欠失による診断例

ハプロ不全でおこる疾患の責任遺伝子を含む病原性欠失と関連して、時に原因遺伝子を含まない隣接領域の欠失が同様の表現型を有することを契機に、当該領域が責任遺伝子の調節領域(エンハンサーもしくはサイレンサー領域)と判明することがある。今年度はこのような調節領域のCNV同定を2例で認めた。

1例目は特有の舞踏様運動を伴う神経疾患であるBrain-lung-thyroid syndrome(MIM#610978)の診断が強く疑われる児において、原因遺伝子NKX2-1遺伝子を含まず、その近位のエンハンサー領域と認識されている14q13.2-q13.34領域の約1.6Mbの中間部欠失を認めた。本欠失領域は過去複数の文献において特異的表現型とともに報告されている調節領域のcritical regionを含んでおり、Pathogenicと判断した。もう1例は、重度の筋緊張低下を伴う発達遅滞症例において、Rett症候群バリエント

(MIM#613454)の原因遺伝子FOXG1を含まず、隣接するPRKD1遺伝子を含む14q12-q13.1領域の4.1Mbの欠失を認めた。複数論文の複数例でPRKD1遺伝子を含む欠失がFOXG1遺伝子の発現を変化させること、FOXG1欠失と同様の表現型を呈することが判明しており、本症例においても特異的顔貌所見を含む共通の表現型を有しており、病原性と判断した。

## 2. 2q37欠失症候群の診断基準作成

### ① 疾患のレビュー

[概要]

2q37欠失症候群は、主として2番染色体長腕端部2q37.3領域の微細欠失に起因する染色体サブテロメア異常症であり、軽度から中等度の発達遅滞・知的障害、低身長、肥満、顔貌所見に加え、特徴的な第3-5指趾の中手骨/中足骨の短縮(type E brachydactyly)や自閉症スペクトラムを主要症状とする。

[原因]

2q37.3領域に座位するヒストン脱アセチル化酵素をコードし、骨・軟骨発生、神経細胞維

持に関わる HDAC4 遺伝子が本症候群の主たる骨格・神経症状に寄与する主要な候補遺伝子とされる。単一遺伝子病として HDAC4 ハプロ不全を引き起こす遺伝子内変異による類似表現型の報告を契機に判明した。その他、隣接領域に座位する PRLH, TWIST2, KIF1A, FARP2, PER2, AGAP1 等も主要臨床所見の候補遺伝子として報告されている。

#### [疫学]

発症頻度を明らかにした報告はないが、少なくとも世界で 115 例を超える診断例の報告がある。また 2013 年におけるサポートグループ Unique への登録患者家族は 88 家族であり、新生児～44 歳までの年齢幅であった。欠失範囲は 3Mb 前後から 10Mb 程度の幅である。大部分が新生変異であるが、約 5%が片親の均衡型転座に起因する不均衡型転座である。性差はやや女性に多い。

#### [臨床症状]

- ・発達遅滞 (100%)  
軽度から中等度の発達遅滞をほぼ全例に有する。独歩開始は 15 ヶ月-4 歳。
- ・自閉症スペクトラム (30%前後)  
症状の幅は広いが有意な頻度で認める。特定の者や行動に対するこだわりは過半数に認める。
- ・中手骨・中足骨の短縮 (>50%)  
第 3-5 指趾、時に第 4 指趾のみに認める本症候群の特徴的骨格所見である。Type E brachydactyly と称される。機能的に問題ないことが多く、また小児期早期には臨床的に明らかでないことも多い。
- ・特徴的顔貌 (ほぼ 100%)

目立つ前頭部、狭い眼瞼裂、眼瞼裂斜上、深い眼窩、小さい鼻、上向き鼻孔、目立つ鼻柱、平坦な人中、ふくよかな頬部、薄い上口唇、小さな口などの特徴所見の組み合わせをもつ

- ・低身長 / 肥満 (50%前後)  
肥満の報告は多く、年齢とともに目立つ
- ・Wilms 腫瘍 (過去 3 例)  
2q37.1 領域を含む欠失例において過去 3 例報告があり、いずれも 2 歳以下で発症
- ・その他合併症 (多岐にわたる)  
筋緊張低下 (50%)、摂食障害、けいれん (20-25%)、関節可動域亢進、脱臼、扁平足、脊椎側彎、骨密度低下、胃食道逆流、湿疹、腎嚢胞、口蓋裂、先天性心疾患、先天性難聴、中枢神経奇形 (脳梁形成異常、水頭症)、鼠径ヘルニア、臍ヘルニア

#### [健康管理]

上記身体合併症の評価を行い、判明した合併症に応じた関連科でのフォローを行う (循環器科、整形外科、耳鼻科、腎臓科、神経科等)。発達遅滞においては、発達のマイルストーンにおける適切な評価と程度に応じた療育サポート (理学療法、作業療法、言語療法) を行う。肥満に対しては適切な栄養管理と活動的なライフスタイルを推奨。Wilms 腫瘍のリスクにおいては、2q37.1 領域まで含む欠失がある場合は腹部エコースクリーニングのフォローアップを検討するなどより注意した経過観察を行う。また 2q37.1 に座位し腫瘍抑制の働きを有する DIS3L2 遺伝子欠失の有無にも留意する。

#### [鑑別診断]

Smith-Magenis 症候群は、17p11.2 領域の RAI 1 遺伝子を含む critical region の欠失でおこることが大多数で、一般に染色体検査で鑑別可能である。HDAC4 のハプロ不全が RAI 1 の発現に影響することが報告されており、臨床症状の類似性を遺伝学的にも説明可能であり、留意すべき鑑別診断である。

また、Albright 遺伝性骨異栄養症 (Albright hereditary osteodystrophy:AHO) は、促進型 G 蛋白質共役型受容体をコードする GNAS 遺伝子の機能喪失変異によるおこる。2q37 欠失症候群は、別名 AHO-like 症候群とも呼ばれ、肥満、低身長、短指などの臨床所見が類似するが、Ca、P、副甲状腺、甲状腺ホルモンなどの内分泌学的検査で鑑別する。

その他、type E brachydactyly を共有する Turner 症候群は顔貌所見が異なることや異なる染色体異常症であるため鑑別は比較的容易である。

[予後]

一般に生命予後が短いという報告はないが、先天性の合併症の重症度に依存すると考えられる。

## ② 当センター診断例の検討

当センターで現在までマイクロアレイ染色体検査により本症候群と診断した 3 症例の情報も検討した。

[症例 1] 8 歳女児

arr[hg18]2q37.1q37.3(233,781,112-242,717,069)x1

HDAC4 遺伝子含む 8.9Mb の端部欠失

\* 合併所見

- ・知的障害 (軽度: IQ65) 支援学級在籍

- ・特徴的顔貌
- ・足趾の第 4 中手骨短縮
- ・心室中隔欠損症 (Ope 既往 s)
- ・膀胱尿管逆流 (VUR) IV 度
- ・左内斜視
- ・腰椎側弯、頸椎亜脱臼 (軽度)

明らかな自閉傾向なく、愛嬌がありにこやかであるが他人とのコミュニケーションは困難な面があり。顔貌所見は典型的であり、2q37.1 を含む端部欠失であるが、DIS3L2 遺伝子は欠失内に存在せず、現在まで腎に嚢胞や Wilms 腫瘍の指摘なし。

[症例 2] 7 歳男児

arr[hg18]

2q37.1q37.3(232,657,119-242,654,701)x1  
HDAC4 遺伝子含む 10.0Mb の端部欠失

\* 合併所見

- ・中等度発達遅滞: 支援学校在籍
- ・低身長 (-2.4SD)、肥満なし
- ・特徴的顔貌
- ・短指趾あるも詳細評価未
- ・中耳炎
- ・外反偏平足
- ・心房中隔欠損
- ・粘膜下口蓋裂
- ・臍ヘルニア

自閉傾向やこだわりがあり、知的障害も症例 1 よりは重度である。にこにこ愛嬌があることは症例 1 と共通している。同様に 2q37.1 領域を含む端部欠失であるが、DIS3L2 遺伝子は外れており、Wilms 腫瘍や腎嚢胞などは指摘されていない。

[症例 3] 11 歳男児

arr[hg19]

2q37.2q37.3(235,859,197-243,068,396)x1,

21q22.3(43,592,014-48,090,317)x3

2q 側 7.2Mb の端部欠失 (HDAC4 遺伝子含む)

と 21q 側 4.5Mb の端部重複

\* 合併所見

- ・知的障害 (重度)
- ・低身長 (-3.6SD)、肥満なし
- ・特徴的顔貌
- ・手指の第 4-5 中手骨短縮
- ・ファロー四徴症 (Ope 既往)
- ・胃食道逆流 (Ope 既往)
- ・尿道下裂 (Ope 既往)
- ・周期性嘔吐症

自閉症スペクトラムの詳細な評価は未。顔貌所見は症例 1 や 2 に比べるとやや非典型である。21q 重複の病原性解釈については Down 症候群の責任領域を外れており **uncertain** の評価。不均衡転座の可能性あり。

[検討]

すべての症例で HDAC4 遺伝子を含む 2q37.3 領域の欠失を証明できており、発達遅滞、特徴的顔貌の所見を共有していたため、確定診断となった。文献報告の通り、合併症を含む表現型の幅が症例間で大きかった。不均衡転座の症例では他の重複領域が発達遅滞や顔貌所見に影響を与え、より重度の発達遅滞とやや非典型的な顔貌所見につながっていると考えられた。

症例 1 と症例 2 においては当センターで過去にグループ外来を開催しており (当時症例 1 は 3y0m、症例 2 は 1y11m)、同じ希少疾患をもつ家族同士のピアカウンセリングにつながり、類似した顔貌所見や親しみやすい行動面についても共有した。一方で個々での合併症の幅があることもお互いの感想として述べられた。

### ③ 診断基準の作成

①と②の情報検討から暫定的に下記診断基準を作成した。

#### a. 【主要症状】

必須症状もしくは診断特異性の高い症状

- I. 精神運動発達遅滞
- II. 特徴的顔貌所見 (狭い眼瞼裂、眼瞼裂斜上、深い眼窩、ふくよかな頬、目立つ平坦な人中、目立つ鼻柱、薄い上嘴唇、小口)
- III. 第3-5指 (趾) 中手 (足) 骨の短縮 (第4指趾のみの場合も可)

注) IとIIは感度100%の所見であるが、IIは診断特異性が低く、IIIは評価者により精度が異なる。IIIの感度はI, IIより低い(>50%)が、診断特異性が高い客観所見であるためI-IIIをすべて認めた場合は2q37欠失の臨床診断を強く疑う。年長児での肥満や自閉症スペクトラムなども参考にすべき補助所見である。

#### b. 【検査所見】

- I. マイクロアレイ染色体検査等のコピー数解析で、少なくともHDAC4遺伝子を含む2q37.3領域の欠失の同定

## II. G分染法で2q37領域の欠失と判定

## III. 2qサブテロメアプローブを用いた

FISH法で欠失を同定

注) 最も確実な診断検査はIであるが、日本の遺伝学的検査の現状からIIやIIIのみもカテゴリーに入れた。しかしIIやIIIにおいては、欠失と判定されても、critical regionであるHDAC4遺伝子が欠失範囲から外れている可能性を否定できない。一方でIIやIIIは染色体構造を同定できるため、診断後に家族検査等遺伝カウンセリングにつながる情報となる検査であり、診断後の臨床遺伝学的フォローにおいて必要な検査であることに留意する。一方で、HDAC4遺伝子内変異や、当該遺伝子に近接する切断点を有する転座例において同様の表現型を伴う報告があるが、2q37欠失症候群という名称とは異なる原因となるため、本検査基準からは除外した。

### c. 【診断のカテゴリー】

〈Definite〉

I. AのI,II,IIIすべてを満たしかつBのI,II,IIIのどれかを満たす

II. AのI,IIを満たしかつBのIを満たす

〈Possible〉

I. aのI, IIを満たしかつbのIIもしくはIIIを満たす

注) 主要症状をすべて満たす場合は、臨床診断が強く疑われるため遺伝学的検査の精度が100%でないIIもしくはIIIを満たす場合もdefiniteの診断カテゴリーとした。

### d. 【除外診断】

I. Smith-Magenis症候群

II. Albright 遺伝性骨異栄養症（偽性副甲状腺機能低下症Ia型）

### D. 考察

マイクロアレイ染色体検査（SNP解析含む）の臨床応用において、今年度取り上げたタイプの診断解釈例（CNVのセカンドヒット、LCSHからUPD疾患の同定、調節領域に関連する病原性CNVの同定）は、とりわけ本検査における診断有用性が高いケースと考えられたため抽出して報告した。特に責任遺伝子の外にある調節領域の新たな発見は、遺伝型-表現型の新たな相関に資する情報ともなる。

この有用性を十分生かすためにも、データの解釈を行う際には、当該CNV内に含まれる情報のみならず、染色体バンドから類推できる重要遺伝子や当該CNVに隣接する領域の重要遺伝子の存在に留意するとともに、詳細な臨床情報の把握と合わせて最終的な診断解釈をすることが求められる。

一方、2q37欠失症候群の診断基準作成にあたっては、既知の文献や海外サポートグループ、自施設診断例における臨床情報や遺伝学的検査の情報を参考に、最も感度が高い臨床所見（発達遅滞と特徴的顔貌）と最も本疾患をrule-inしやすい臨床所見（type E brachydactyly）を主要症状として抽出した。一方で、検査所見では、最も確実な遺伝学的診断としてマイクロアレイ染色体検査等によるコピー数解析によりHDAC4遺伝子を含む欠失を同定することとしたが、HDAC4遺伝子



欠失による浸透率は必ずしも完全ではないとの報告もあり、議論の余地があるかもしれない。また必ずしもHDAC4遺伝子を含む欠失を直接的に確定できないG分染法やサブテロメアプローブによるFISH法も選択肢に分類したが、主要症状と検査選択における組み合わせのバランスにより、診断の確からしさのカテゴリー分類を試みた。

## 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) Shiohama T, Ohashi H, Shimizu K, Fujii K, Oba D, Takatani T, Kato M, Shimojo N. l-Thyroxine-responsive drop attacks in childhood benign hereditary chorea: A case report. *Brain Dev.* 2018 40:353-356
- 2) Nakane T, Sawanobori E, Ohashi H, Sugita K. Hyperechoic renal medullary pyramids in a boy with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Clin Dysmorphol.* 2018 27:25-26
- 3) Miyamoto T, Akutsu SN, Fukumitsu A, Morino H, Masatsuna Y, Hosoba K, Kawakami H, Yamamoto T, Shimizu K, Ohashi H, Matsuura S. PLK1-mediated phosphorylation of WDR62/MCPH2 ensures proper mitotic spindle orientation. *Hum Mol Genet.* 2017 26:4429-4440
- 4) Shiohama T, Fujii K, Shimizu K, Ohashi H, Takatani T, Okamoto N, Nishimura G, Kato M, Shimojo N. Progressive subglottic stenosis in a child with Pallister-Killian syndrome. *Congenit Anom (Kyoto).* 2017 doi: 10.1111/cga.12240. [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

- 1) 渡辺 聡、土屋美智子、伊達木澄人、森内浩幸、松本 正、森藤香奈子、清水健司、大橋博文、道和百合、知念安紹、水野誠司、皆川京子、神谷素子、近藤達郎。1q部分重複症候群患者の自然歴についての検討-18例のアンケート調査より-。第40回日本小児遺伝学会 2018.1.12-13, 東京

## 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



## SATB2 異常症の診療ガイドライン

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

先天異常は、一般集団の約 2-3%に及ぶ遺伝的異質性の高い疾患で、医療においてその正確な診断は不可欠である。この集団に対してマイクロアレイ染色体検査で検出できる疾患は 12%程度とされている。今回、重度精神遅滞、特徴的顔貌を特徴とする SATB2 異常症の頻度について検討し、医療管理の内容をまとめた。自験症例である診断未確定 1000 例中に同疾患症例は検出しなかった。治療は対症療法が中心となり、早期のリハビリテーションや療育の対応は極めて重要である。摂食指導や言語指導も重要である。斜視や屈折異常などに対しては眼科精査も適応となる。口蓋奇形に由来する耳鼻咽喉科疾患にも早期からの対応が重要である。てんかん発作に対して、疾患特異的抗てんかん薬は認めない。睡眠障害も目立つことがある。ほかに側彎なども注意する必要がある。診断の手掛かりにもなる歯牙の異常に対しては、定期的歯科受診が重要である。

### A. 研究目的

先天異常は、一般集団の約 2-3%に及ぶ遺伝的異質性の高い疾患で、その発生頻度からも病因解析研究は常に医学の大きな課題である。医療においてその正確な診断は不可欠である。しかし、遺伝的異質性が高いが故に、原因解明は膨大な労力を要する。一般に中等度以上の精神遅滞の病因における遺伝的背景の占める割合は、染色体検査で検出可能な疾患は 3%、マイクロアレイ染色体検査で検出できる疾患は 12%程度とされている。本研究では、次世代シーケンス技術やマイクロアレイ染色体検査を用いて、正確な診断を行い、診療ガイドラインを確立することを目的とする。

SATB2 関連症候群 (SAS) は、言語発達

の遅れ、行動異常および特徴的顔貌を合併し、重度の精神遅滞を特徴とする多臓器にわたる先天異常症候群の一つである。現在まで報告された症例の多くは発達遅滞/知的障害を認めている。幼児期からの筋緊張低下や摂食障害を有することが多い。行動の問題には、自閉症、多動などが含まれる。顔面口腔の異常（口蓋裂、高口蓋、および二分口蓋垂）、歯列異常、上部中央切歯の異常な形状または大きさが含まれる。ほかに骨格異常、成長障害、斜視や屈折異常、先天性心疾患、泌尿生殖器異常、てんかんがある。原因は SATB2 遺伝子異常で、SATB2 遺伝子ヘテロ接合異常 (61%)。SATB2 (22%) を含む 2q33.1 染色体でのヘテロ接合欠失、SATB2 の遺伝子内欠失または重複 (9%)

が原因としてあげられ、さらに SATB2 を破壊する 2q33.1 を切断点とする染色体転座 (8%) などがある。

今回、診断未確定症例約 1000 例に置いてマイクロアレイスクリーニングを行い、症例の有無を検討、さらに文献的考察を行った。

## B. 研究方法

施設内スクリーニングの対象は、神奈川県立こども医療センター受診歴のある診断未確定症例約 1000 例で、染色体検査など一般的な遺伝学的検査がなされて染色体異常症は臨床的に否定されている。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 Genomic Workbench 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、ISCN2009 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。

SATB2 を含む 2q32.1-q33.3 欠失/重複症候群の疾患概要および診療ガイドライン作成を試みた。文献的考察を中心にまとめた。先天異常症候群を含む遺伝病の疾患概要ならびに遺伝カウンセリング、診療ガイ

ドラインをまとめた GeneReviews (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) や OMIM (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) を中心に、さらに個別症例報告も参照して、まとめた。

## (倫理面への配慮)

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、全ての個人情報情報を潜在化した。

## C、D. 研究結果と考察

施設内診断未確定 1000 症例中には、CNV による SATB2 異常症は検出されなかった。一般に発生頻度は、診断未確定精神遅滞症例の 0.25-0.3% と推定されている。実際には、さらに頻度は低い可能性がある。

文献的考察による診療の指針：治療は対症療法が中心となる。発達遅滞に対しては早期のリハビリテーションや療育の対応は極めて重要である。この中には摂食指導や言語指導なども含まれることもある。斜視や屈折異常などに対しては眼科精査も適応となる。口蓋奇形に由来する耳鼻咽喉科疾患にも早期からの対応が重要である。てんかん発作に対して、疾患特異的抗てんかん薬は認めない。睡眠障害も目立つことがある。ほかに側彎なども注意する必要がある。診断の手掛かりにもなる歯牙の異常に対しては、定期的歯科受診が重要である。

## E. 結論

重度精神遅滞、特徴的顔貌を特徴とする SATB2 異常症の頻度について検討し、医療管理の内容をまとめた。自験症例である診断未確定 1000 例中に同疾患症例は検出せず、マイクロアレイ染色体検査では解析の限界があり、次世代シーケンサーなどによる網羅的解析が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Shimbo H, Yokoi T, Aida N, Mizuno S, Suzumura H, Nagai J, Ida K, Enomoto Y, Hatano C, Kurosawa K. Haploinsufficiency of BCL11A associated with cerebellar abnormalities in 2p15p16.1 deletion syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2017;5(4):429-437.

Hori I, Kawamura R, Nakabayashi K, Watanabe H, Higashimoto K, Tomikawa J, Ieda D, Ohashi K, Negishi Y, Hattori A, Sugio Y, Wakui

K, Hata K, Soejima H, Kurosawa K, Saitoh S. CTCF deletion syndrome: clinical features and epigenetic delineation. *J Med Genet.* 2017 Aug 28. pii: jmedgenet-2017-104854. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104854.

[Epub ahead of print]

黒澤健司 マイクロアレイ染色体検査 小児臨床検査のポイント 2017 小児内科 2017;49 (増刊号) :687-690.

### 2. 学会発表

榎本友美、黒澤健司 CNV 検出手法 XHMM と log2ratio 変換法の比較—実際の解析例について— 第 169 回染色体研究会 2017.4.8. 東京慈恵医大

Kurosawa K, Minatogawa M, Yokoi T, Enomoto Y, Ida K, Harada N, Nagai J, Tsurusaki Y. Microdeletion of 17q21.31 causes a novel malformation syndrome. *American Society of Human Genetics* 2017, 2017.10.17-21. Orlando.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 染色体微細欠失・重複症候群の診断システムについて

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・教授

### 研究要旨

#### 研究目的:

染色体の微細欠失や重複は、いわゆるゲノムコピー数変化(copy number variation; CNV)としてよく知られている。微細な染色体欠失や重複などの CNV を効率的に調べる方法として、欧米ではマイクロアレイ染色体検査が普及している。この方法によって、multiple congenital anomalies/ intellectual disability (MCA/ID)患者のうち、およそ 17%程度で何らかの疾患関連 CNV が認められる。ただ、MCA/ID の原因の内訳としては、CNV より、一塩基変化(single nucleotide variant; SNV)が占める割合の方が高く、次世代シーケンサーが普及してきた現在、マイクロアレイ染色体検査による CNV 解析より、次世代シーケンサーによる SNV 解析を優先させる傾向がある。次世代シーケンサーを用いた CNV 解析も一部では行われているため、次世代シーケンサー-first の解析による CNV 同定について検討した。

#### 研究方法:

次世代シーケンサーによる SNV 解析で得られた BAM file を eXome Hidden Markov Model (XHMM)によって解析し、得られたデータをマイクロアレイ染色体検査で確認した。

#### 結果と考察:

発達の遅れと自閉症症状を示す患者において、次世代シーケンサーによる SNV 解析を行ったが有力な病的バリエーションを見出すことができなかった。そこで XHMM 解析を行ったところ、15q14 領域の欠失を示唆する所見が得られた。この所見はマイクロアレイ染色体検査で確認できたが、両親には認められず、de novo 変異であった。欠失範囲には *MEIS* 遺伝子が含まれており、この遺伝子が発達遅滞と自閉症の原因となったことが明らかとなった。

#### 結論:

次世代シーケンサー-first による解析によっても CNV を着実に検出できるようになった。そのため、費用を別に考慮すれば、マイクロアレイ染色体検査による CNV 解析より、次世代シーケンサー-first による解析の方が効率的と考えられる。ただし、XHMM では CNV 範囲の正確な同定や、コピー数の同定を確実に行うことができないため、XHMM で CNV を検出した場合、マイクロアレイ染色体検査による確認が必要である。

#### A. 研究目的

染色体の微細欠失や重複は、いわゆるゲノムコピー数変化(copy number variation; CNV)としてよく知られている。微細な染色体欠失や重複などの CNV を効率的に調べる方法として、欧米ではマイクロアレイ染色体検査が普及している。この方法によって、

multiple congenital anomalies/ intellectual disability (MCA/ID)患者のうち、およそ 17%程度で何らかの疾患関連 CNV が認められる。ただ、MCA/ID の原因の内訳としては、CNV より、一塩基変化(single nucleotide variant; SNV)が占める割合の方が高く、次

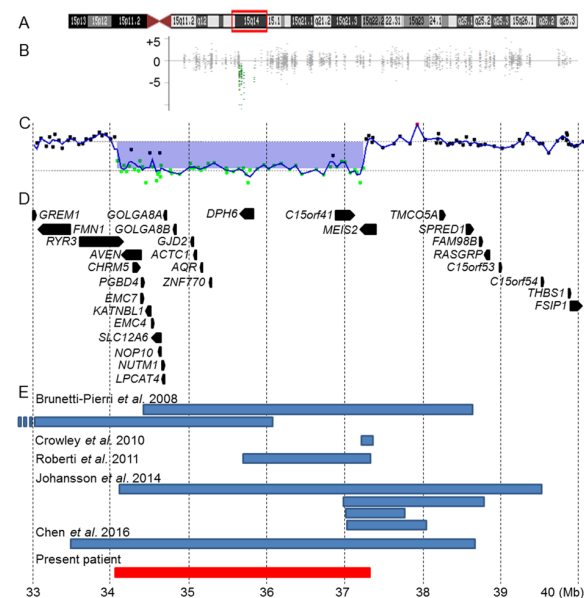
世代シーケンサーが普及してきた現在、マイクロアレイ染色体検査による CNV 解析より、次世代シーケンサーによる SNV 解析を優先させる傾向がある。次世代シーケンサーを用いた CNV 解析も一部では行われているため、次世代シーケンサーfirst の解析による CNV 同定について検討した。

## B. 研究方法

次世代シーケンサーによる SNV 解析で得られた BAM file を eXome Hidden Markov Model (XHMM) によって解析し、得られたデータをマイクロアレイ染色体検査で確認した。

なお、本研究は東京女子医科大学における「遺伝子解析に関する倫理審査委員会」で認められた研究の一部として行い、患者あるいはその家族から書面による同意を得て行った。

## C. 研究結果



症例は9歳男児。心室中隔欠損による心雑音を示したが、自然閉鎖した。浸出性中

耳炎を繰り返している。20 ヶ月で始歩が見られるなど、発達の遅れが認められた。発達指数は 63 と軽度の知的障害を認める。粘膜下口蓋裂のため構音障害を示す。オーム返しが多く、読字困難あり。思い通りにならない場合、しばしば癇癢を起す。コミュニケーションに問題があり、友人関係を構築できない。これらの症状は自閉症を示唆するものであった。

発達の遅れと自閉症症状の原因を明らかにするために、TruSight One (Illumina)を用いた次世代シーケンスによる SNV 解析を行ったが有力な病的バリエーションを見出すことができなかった。そこで得られた BAM ファイルを用いて XHMM 解析を行ったところ、15q14 領域の欠失を示唆する所見が得られた。この所見はマイクロアレイ染色体検査で確認できたが、両親には認められず、de novo 変異であった。欠失範囲には MEIS2 遺伝子が含まれており、この遺伝子が発達遅滞と自閉症の原因となったことが明らかとなった。

## D. 考察

15q14 微細欠失を示す症例は過去に数例報告があり、共通して欠失する領域に MEIS2 が存在している。近年の次世代シーケンスによる解析で、MEIS2 の SNV によって発症した自閉症患者の報告があり、当該遺伝子は原因であることが明らかになっており、本症例は報告と矛盾しない。

## E. 結論

次世代シーケンサーfirst による解析によっても 15q14 微細欠失を同定することができた。このことは、次世代シーケンスデータ



の応用によってCNVを着実に検出できることを示唆している。解析費用を別に考慮すれば、マイクロアレイ染色体検査によるCNV解析より、次世代シーケンサーfirstによる解析の方が効率的と考えられる。ただし、XHMMではCNV範囲の正確な同定や、コピー数の同定を確実に行うことができないため、XHMMでCNVを検出した場合、マイクロアレイ染色体検査による確認が必要であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamamoto T, Lu Y, Nakamura R, Shimojima K, Kira R. Novel A178P mutation in *SLC16A2* in a patient with Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Congenit Anom* (in press)
2. Shimojima K, Okamoto N, Ohmura K, Nagase H, Yamamoto T. Infantile spasms related to a 5q31.2-q31.3 microdeletion including *PURA*. *Hum Genome Var* 5; 18007, 2018
3. 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* 58; 36-38, 2018
4. 福島 茂樹, 瀬戸 俊之, 藤田 賢司, 麻生 和良, 百瀬 有里, 山下 加奈子, 保科 隆男, 佐久間 悟, 新宅 治夫, 東山 滋明, 河邊 讓治, 山本 俊至. 強直間代発作と労作時脱力を繰り返した *PRRT2* 遺伝子異常症の1例. *小児科臨床* 71; 41-46, 2018
5. Seto T, Hamazaki T, Nishigaki S, Kudo S, Shintaku H, Ondo Y, Shimojima K, Yamamoto T. A novel *CASK* mutation identified in siblings exhibiting developmental disorders with/without microcephaly. *Intractable Rare Dis Res* 6; 177-182, 2017
6. Shimojima K, Okamoto N, Goel H, Ondo Y, Yamamoto T. Familial 9q33q34 microduplication in siblings with developmental disorders and acrocephaly. *Eur J Med Genet* 60; 650-654, 2017
7. Hanafusa H, Morisada N, Ishida Y, Sakata R, Morita K, Miura S, Ye M-Y, Yamamoto T, Okamoto N, Nozu K, Iijima K. A girl with the smallest de novo microdeletion of 20q11.2; intellectual disability and dysmorphic features. *Hum Genome Var* 4; 17050, 2017
8. Okamoto K, Tsuchiya Y, Kuki I, Yamamoto T, Saitsu H, Kitagawa D, Matsumoto N. Disturbed chromosome segregation and multipolar spindle formation in a patient with *CHAMPI* mutation. *Mol Genet Genomic Med* 5; 585-591, 2017
9. Matsumaru S, Oguni H, Ogura H, Shimojima k, Nagata S, Kanno H, Yamamoto T. A novel *PGK1* mutation associated with neurological dysfunction and the absence of episodes of hemolytic anemia or myoglobinuria. *Intractable Rare Dis Res* 6: 132-136,

- 2017.
10. Lu YP, Ondo Y, Shimojima K, Osaka H, Yamamoto T. A novel *TUBB4A* mutation G96R identified in a patient with hypomyelinating leukodystrophy onset beyond adolescence. *Hum Genome Var* 4; 17035, 2017.
  11. Shimojima K, Yamamoto T. Characteristics of rare and private deletions identified in phenotypically normal individuals. *Hum Genome Var* 4; 17037, 2017.
  12. Shimojima K, Ondo Y, Okamoto N, Yamamoto T. A 15q14 microdeletion involving *MEIS2* identified in a patient with autism spectrum disorder. *Hum Genome Var* 4; 17029, 2017.
  13. Baba S, Sugawara Y, Moriyama K, Inaji M, Maehara T, Yamamoto T, Morio T. Amelioration of intractable epilepsy by adjunct vagus nerve stimulation therapy in a girl with a *CDKL5* mutation. *Brain Dev* 39: 341-344, 2017.
  14. Yamamoto T, Shimojima K, Ondo Y, Shimakawa S, Okamoto N. *MEDI3L* haploinsufficiency syndrome: A de novo frameshift and recurrent intragenic deletions due to parental mosaicism. *Am J Med Genet A*. 173A; 1264-1269, 2017.
  15. Okamoto N, Shimojima K, Yamamoto T. Neurological Manifestations of 2q31 Microdeletion Syndrome. *Congenit Anom* 57; 197-200, 2017
  16. Shimojima K, Higashiguchi T, Kishimoto K, Miyatake S, Miyake N, Takanashi J, Matsumoto N, Yamamoto T. A novel *DARS2* mutation in a Japanese patient with leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement but no lactate elevation. *Hum Genome Var* 4; 1705, 2017
  17. Iwama K, Mizuguchi T, Takanashi J, Shibayama H, Shichiji M, Ito S, Oguni H, Yamamoto T, Sekine A, Nagamine S, Ikeda Y, Nishida H, Kumada S, Yoshida T, Awaya T, Tanaka R, Chikuchi R, Niwa H, Oka Y, Miyatake S, Nakashima M, Takata A, Miyake N, Ito S, Saitsu H, Matsumoto N. Identification of novel *SNORD118* mutations in seven patients with leukoencephalopathy with brain calcifications and cysts. *Clin Genet* 92; 180-187, 2017
  18. Lu YP, Chong P-F, Kira R, Seto T, Ondo Y, Shimojima K, Yamamoto T. Mutations in *NSDI* and *NFIX* in three patients with clinical features of Sotos syndrome and Malan syndrome. *J Pediatr Genet* 6; 234-237, 2017
  19. 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* 57; 109-113, 2017
  20. 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* 3: e148, 2017
21. 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.
  22. Sangu N, Shimojima K, Takahashi Y, Ohashi T, Tohyama J, Yamamoto T. A 7q31.33q32.1 microdeletion including *LRRC4* and *GRM8* is associated with severe intellectual disability and characteristics of autism. *Hum Genome Var* 4; 17001, 2017.
  23. 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.
  24. 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.
  25. 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.
  26. 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児例. *脳と発達* 49; 28-31, 2017.
2. 著書
    1. 山本俊至. がんゲノム医療. 東京女子医科大学雑誌. 88(1); 1-5, 2018
    2. 山本俊至. 進行性白質脳症の特徴と診断の実際. *新薬と臨床* 67; 271-276, 2018
    3. 山本俊至. 【ニューロジェネティクス新時代 次世代シーケンサーが拓く新しい世界】筋疾患・神経疾患のジェネティクス てんかん. *Clinical Neuroscience* 36; 233-235, 2018.
    4. 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, pp668-672, 2017.
  3. 学会発表
    1. 松尾真理, 山本俊至, 洲鎌倫子, 齋藤加代子. 1q43-44 部分トリソミーの1例. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/13, 東京
    2. 渡辺基子, 金子実基子, 山本俊至. X染色体を含む転座による 3:1 分離で生じた過剰マーカー染色体を示す重度発達遅滞症例. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/13, 東京

3. 瀬戸俊之, 山本俊至, 新宅治夫. Zinc-Finger469 遺伝子異常が認められた複数の脱臼歴と骨密度定価を呈する一例. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/13, 東京
4. 高野梢, 下島圭子, 岡本伸彦, 山本俊至. Proximal 22q13 欠失; SHANK3 のハプロ不全だけでは症状を説明できない症例について. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/12, 東京
5. 下島圭子, 岡本伸彦, 山本俊至. PURA を含む 5q31 微細欠失の新規例. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/12, 東京
6. 柳下友映, 下島圭子, 中野さやか, 今井克美, 山本俊至. WDR26 ハプロ不全によるてんかん症候群; 新規 1q41q42 微細欠失からの考察. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/12, 東京
7. 今泉太一, 渡辺基子, 下島圭子, 熊倉啓, 山本俊至. 1番染色体 UPD による SZT2 ホモ接合変異によって生じたと考えられる重度知的障害症例. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/12, 東京
8. 山内泰輔, 白井謙太郎, 永吉友香子, 神保教広, 南洋輔, 堀哲夫, 今村公俊, 渡辺章充, 山本俊至. 上気道狭窄とてんかん発作の対応に苦慮しクリニカルエクソーム解析で診断が確定した Schinzel-Giedion 症候群の乳児例. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/12, 東京
9. Sekiguchi H, Sato K, Abe T, Yamamoto E, Sakai A, Yamamoto T, Hagiwara N. Insight into Polygenetic Abnormalities in Japanese Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. BCVR The 1st JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018/01/06, Tokyo, Japan
10. 二宮伸介, 久保田真通, 萩野佳代, 山本俊至. 16q11.2q12.2 の微細欠失をきたした1例. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017/11/17, 神戸
11. 下島圭子, 白井謙太郎, 岡本伸彦, 山本俊至. X 染色体上のゲノムコピー数異常を認めた症例の考察. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017/11/17, 神戸
12. 菊池規子, 関口治樹, 佐藤加代子, 菅野仁, 山本俊至, 萩原誠久. ヘテロ家族性高コレステロール血症: 日本人における多遺伝子異常とその特徴. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017/11/17, 神戸
13. 森島靖行, 沼部博直, 若井未央, 森地振一郎, 石田悠, 稲垣夏子, 柏木保代, 山本俊至, 河島尚志. モザイク 13q ヘキサソミーの一例. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017/11/17, 神戸
14. 山本俊至, 下島圭子, 恩藤由美子, 岡本伸彦. 自閉症スペクトラム患者に認められた MEIS2 を含む 15q14 微細欠失. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017/11/17, 神戸
15. 山本俊至. [シンポジウム]染色体微細構造異常による小児神経疾患とその発症メカニズム. 日本人類遺伝学会

- 第 62 回大会, 2017/11/17, 神戸
16. 結城奏、白井謙太朗、高瀬千尋、山内健、神保教広、堀哲夫、榎本啓典、渡辺章充、山本俊至. RAD21 を含む 8 番染色体長腕の微細欠失による Cornelia de Lange syndrome-like phenotype の 1 例. 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 2017/11/16, 神戸
  17. 秋澤叔香、浦野真理、大木岳志、大森鉄平、松尾真理、佐藤裕子、川上和之、山本俊至、富田尚裕、徳重克年、山本雅一、松井英雄、齋藤加代子. 遺伝性腫瘍を疑い小腸がんから診断した Lynch 症候群の 1 家系. 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 2017/11/16, 神戸
  18. 稲垣秀人、完山和生、加藤武馬、大内雄矢、山本俊至、倉橋浩樹. 逆位重複・端部欠失の全ゲノムシーケンスによる切断点解析. 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 2017/11/16, 神戸
  19. 松尾真理、山本俊至、齋藤加代子. [シンポジウム]網羅的ゲノム解析における遺伝カウンセリングと遺伝カウンセラーの役割. 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 2017/11/16, 神戸
  20. Yamamoto T, Shimojima K. [シンポジウム] Neuro-functional analysis using disease-specific iPSC cells. Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry, 2017/09/08, Sendai
  21. 下島圭子、岡本伸彦、山本俊至. 2q23q24 微細欠失症候群の患者に認められる発達遅滞の候補遺伝子絞り込み. 第 57 回日本先天異常学会学術集会, 2017/08/26, 東京
  22. 山本俊至、下島圭子、岡本伸彦、齋藤加代子. CTNNA3 変異の表現型との関係についての考察. 第 24 回日本遺伝子診療学会大会, 2017/07/15, 東京
  23. 山本俊至、下島圭子、岡本伸彦. 網羅的ゲノム解析により発達障害患者に認められた de novo 遺伝子変異. 第 59 回日本小児神経学会学術集会, 2017/06/15, 大阪
  24. 島田姿野、小國弘量、大谷ゆい、西川愛、伊藤進、衛藤薫、中澤友幸、永田智、山本俊至. 発達遅滞を呈し感染を契機に急性脳症を来した HNRNP 遺伝子変異の 1 男児例. 第 59 回日本小児神経学会学術集会, 2017/06/16, 大阪
  25. 小坂仁、井上健、久保田雅也、黒澤健司、才津浩智、佐々木征行、高梨潤一、松井大、三重野牧子、山本俊至、吉田誠克. 遺伝性白質疾患の診断・治療・研究システムの構築. 第 59 回日本小児神経学会学術集会, 2017/06/16, 大阪
  26. 林仁美、鶴澤礼実、小川厚、山本俊至. マイクロアレイ CGH 検査で診断した Rubinstein-Taybi 症候群の 3 歳男児例. 第 59 回日本小児神経学会学術集会, 2017/06/16, 大阪
  27. 松岡剛司、比屋根真彦、大府正治、山本俊至、小坂仁、高梨潤一、才津浩智、井上健. 急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) を発症した PolIII 関連白質ジストロフィーの一例. 第 59 回日本小児神経学会学術集会, 2017/06/15, 大阪
  28. 兵頭勇紀、秋山麻里、小林勝弘、山本

- 俊至. GABRG2 de novo 変異を有し難治てんかんと四肢麻痺を示す 1 女子例. 第 28 回日本小児神経学会中国・四国地方会、2017/7/15, 岡山
29. 高野梢, 浦野真理, 松尾真理, 荒川玲子, 岩崎直子, 山内あけみ, 近藤恵里, 秋澤叔香, 佐藤裕子, 金子実基子, 渡辺基子, 山本俊至, 小川正樹, 斎藤加代子. 東京女子医科大学における無侵襲的出生前遺伝学的検査の遺伝カウンセリングの検討. 第 41 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2017.6.22-25, 東大阪市
30. 山本俊至, 下島圭子, 岡本伸彦, 斎藤加代子. 同胞間で反復して認められた染色体微細構造異常 親世代の低頻度モザイク CNV. 第 41 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2017.6.22-25, 東大阪市

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

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の結果解釈の留意点と活用  
～劣性遺伝性疾患，片親性ヘテロダイソミー診断への応用～

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で検出されるゲノムコピー数バリエーションの臨床的評価は必ずしも容易でないが、解析症例の蓄積により国際的に臨床的評価の検討が進んでいる。また、コピー数バリエーションの検索は、主に優性遺伝形式で発症する疾患を対象としているが、劣性遺伝性疾患の診断に有用だった症例、SNPアレイの genotype 確認により片親性ヘテロダイソミーの診断に到った症例なども経験したので、それらの結果もふまえ、結果解釈のための留意点等について改めて検討した。

### A. 研究目的

マイクロアレイ染色体検査による染色体微細構造異常症候群の診断の現状把握と実施に際しての課題を検討するとともに、検出されるゲノムコピー数バリエーション（CNVs）の結果解釈に有用となる留意点・工夫等について検討する。

### B. 研究方法

1. 諸外国におけるCNVs解析の実態とわが国の課題

次世代シーケンス（NGS）解析技術を用いたターゲットエクソーム解析・全エクソーム解析が原因不明の先天異常症の診断の主流となりつつあり、NGS解析により得たシーケンスデータからCNVsを検出することも可能となってきたが、解析方法に関わらずCNVsの結果解釈の重要性は変わらない。諸外国で進められている臨床的評価の検討についてweb検索した。

2. マイクロアレイ染色体検査による劣性遺伝性疾患，片親性ヘテロダイソミー診断への応用

CNVsの臨床的評価は、主に優性遺伝形式で発症する疾患を対象としている。また、SNPアレイでcallされるのは、ホモとなっている領域すなわち片親性のアイソダイソミーであり、片親性でもヘテロダイソミーはcallされない。

これまでに劣性遺伝性疾患の診断に有用だった症例、片親性ヘテロダイソミーの診断に到った症例など、病的ゲノムバリエーションの確認に通常のドライ解析に工夫が必要だった症例を経験したので、結果解釈での留意点とと

もに紹介する。

解析は、CGX™ SNPアレイ（180K）、解析ソフトはGenoglyphix（共にパーキンエルマー）のプラットフォームで実施した。

（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. 諸外国におけるCNVs解析の実態とわが国の課題

諸外国では、検出されたゲノムバリエーションに対する結果解釈のワーキンググループが組織され、蓄積されたデータからの評価を情報公開している。従来、シーケンスバリエーションとコピー数バリエーションは別々に検討されていたが、遺伝子のゲノムバリエーションとしてDosage Sensitivityの検討がすすんでいる。米国ではClinGen、英国ではDECIPHERにおけるデータの更新が顕著である。さらに、両組織は情報共有も進めている。そしてClinGenでは、既知の染色体微細構造異常を含め、評価したPathogenic CNV regionsも公開を開始した。その情報を、一部改変して別表として示した。

\* ClinGen < <https://www.clinicalgenome.org/> >

\* DECIPHER < <https://decipher.sanger.ac.uk/> >

2. マイクロアレイ染色体検査による劣性遺伝性疾患，片親性ヘテロダイソミー診断への応用

【症例1】2才女児。プラダーウイリー症候群（PWS）が疑われたが、SNRPNメチレー

ションPCR解析は正常パターン、同時に実施されたマイクロアレイ染色体検査にて、2p21に約150kbのCNVs lossを認めたが、その欠失パターンは通常の欠失のパターンでなく、セントロメア寄りの約80kbはlog<sub>2</sub> ratioの平均(AV)は約-0.9であり通常のヘテロ欠失と考えられたが、端部寄りの約70kbの領域はAV:-4以下とホモの欠失となっていることが示唆された。両親の同領域のCNVを確認したところ、父親は児に認めた約150kbがAV:約-0.9のCNVs loss, 母親はその端部寄り約70kbがAV:約-0.9のCNVs lossと、それぞれヘテロの欠失を有しており、児は父と母の欠失の共通領域がホモの欠失となった、常染色体劣性遺伝形式(AR)で発症する, homozygous 2p21 deletion 症候群としても知られる hypotonia-cystinuria 症候群と診断された。

【症例2】2才男児。腎機能障害と自閉スペクトラム症を伴っていた。マイクロアレイ染色体検査にて病的CNVsは検出されなかったが、SNPアレイで2番染色体の約4/5にabsence of heterozygosity(AOH)がcallされた。その後のTruSight One Sequencing Panel解析にて2番染色体に座位する常染色体劣性遺伝性の多臓器障害の関連遺伝子であるX遺伝子のフレームシフトバリエントがホモ接合体で検出され、2番染色体片親性アイソダイソミーにより顕在化したことによるものと評価された。

【症例3】2才男児。発達遅滞、低身長、両側停留精巣、低緊張等を認めた。他院で実施したG分染法、PWS領域および22q11.2欠失症候群領域のFISH法では異常を認めなかった。当院初診時、典型的なPWSの所見に乏しいと評価されたため、まずマイクロアレイ染色体検査を実施し、病的CNVsは検出されなかったが、15q11.2-q12と15q22.31-q23に各約4MbのAOHがcallされた。両親のgenotypeを追加解析し児と比較したところ、15番染色体のAOH callされた2領域は母由来アイソダイソミー、AOH callがなかった領域も母由来のアイソorヘテロダイソミーとして矛盾ないことが確認された。その後追加解析したSNRPNメチレーションPCR解析でもPWSパターンを示し、PWSと診断された。

#### D. 考察

ゲノム解析により検出されるCNVsは多岐にわたり、その臨床的評価は容易でない。解析方法が代わっても、臨床的評価には関係ない。諸外国で構築しているような、ゲノムバリエント解析技術の標準化、検出されたゲノムバリエントに対する結果解釈のワーキン

ググループの組織化、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)等で取り組まれているが、CNVsを含む日本人ゲノムバリエントデータベースの構築、wetおよびdry解析担当者の人材育成等、課題は多い。

また、CNVsの臨床的評価は、主に優性遺伝形式で発症する疾患を対象としているため、一般成人に確認されたCNVsのデータベースであるDGV < [dgv.tcag.ca/](http://dgv.tcag.ca/) >などで確認し、登録が多ければそのCNVsはbenignである可能性が高いと考えるが、劣性遺伝性疾患の場合、同領域の欠失を有している一般成人のデータが含まれていることになるので、CNVsの評価に際しては、AVを確認し、ホモ欠失の可能性がないか、その領域に劣性遺伝形式の疾患関連遺伝子が含まれていないかに留意することにより、劣性遺伝性疾患の診断に繋げることができる可能性がある。

#### E. 結論

マイクロアレイ染色体検査で検出されるCNVsの臨床的評価は必ずしも容易でないが、解析症例の蓄積により国際的に染色体微細構造異常症候群を含む病的ゲノムバリエントの診断に有用な、Dosage Sensitivityの検討がすすんでいる。

また、病的ゲノムバリエントの検索は主に優性遺伝形式で発症する疾患を対象としているが、劣性遺伝性疾患の検出も視野に、CNVs解析に際してはAVの確認が考慮される。さらにSNPアレイでcallされるのは、ホモとなっている領域すなわち片親性のアイソダイソミーであり、片親性でもヘテロダイソミーはcallされないことを認識する必要がある。片親性ヘテロダイソミーを検出するアルゴリズムの開発も期待される。

ゲノム解析技術は改良されても、CNVsを含むゲノムバリエントデータの臨床的評価は変わらない。ゲノム医療の充実のため、日本人のゲノムバリエントデータベース、ゲノムバリエントのwetおよびdry解析担当者の人材育成等を含む体制構築が望まれる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takano K, Goto K, Motobayashi M, Wakui K, Kawamura R, Yamaguchi T, Fukushima Y, Kosho T. Early manifestations of epileptic encephalopathy, brain atrophy, and elevation of serum neuron specific enolase in a boy with beta-propeller protein-associated neurodegeneration. Eur J Med Genet. 60:521-6, 2017



## 2. 学会発表

なし

マイクロアレイ染色体検査データ解釈の応用～劣性遺伝性疾患領域のホモ欠失バリエントと片親性ヘテロダイソミーの同定～. 涌井敬子, 高野亨子, 山口智美, 高橋有希, 河村理恵, 三宅康之, 福山哲広, 古庄知己, 福嶋義光. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017.11.16-18, 神戸

想定より複雑な染色体(ゲノム)再構成が起きている—Metaphase解析により同定できた複雑染色体構造異常例—. 涌井敬子. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017.11.16-18, 神戸

マイクロアレイ染色体検査にて派生染色体に端部欠失が検出されなかった不均衡型転座症例. 河村理恵, 神谷素子, 松田和之, 重藤翔平, 古庄知己, 福嶋義光, 涌井敬子. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017.11.16-18, 神戸

信大病院遺伝子医療研究センター知的障害(ID)外来におけるマイクロアレイおよび次世代シーケンサーを用いた遺伝学的診断. 高野亨子, 古庄知己, 涌井敬子, 西恵理子, 運崎愛, 石川真澄, 黄瀬恵美子, 山口智美, 河村理恵, 本林光雄, 福山哲広, 笛木昇, 平林伸一, 稲葉雄二, 要匡, 秦健一郎, 松原洋一, 福嶋義光. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017.11.16-18, 神戸

マイクロアレイ染色体検査のSNP genotypeデータを用いた構造異常染色体の親由来検討. 涌井敬子, 松本直通, 古庄知己, 福嶋義光. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018.1.12-13, 東京

20番染色体母性片親性ダイソミー5例の臨床像の検討. 川嶋明香, 中村明枝, 井上毅信, 堀川玲子, 涌井敬子, 高野亨子, 水野誠司, 椿淳子, 緒方勤, 深見真紀, 鏡雅代. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018.1.12-13, 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

表. Pathogenic CNV regions

Region name	Location on GRCh37	size (bp)	Haploinsufficiency score	Triplosensitivity score
1p36 terminal region (includes GABRD)	chr1:834083-6289973	5,455,890	3	2
1q21.1 recurrent region (BP3-BP4, distal) (includes GJA5)	chr1:146577486-147394506	817,020	3	3
1q43q44 terminal region (includes AKT3)	chr1:243287730-245318287	2,030,557	3	0
2p15p16.1 region (includes BCL11A)	chr2:59139200-62488871	3,349,671	3	1
2q13 recurrent region (includes NPHP1)	chr2:110879906-110962594	82,688	30. Gene associated with autosomal recessive phenotype	0
2q37.3 terminal region (includes HDAC4)	chr2:239954693-242930600	2,975,907	3	0
3q29 recurrent region (includes DLG1)	chr3:195756054-197344665	1,588,611	3	2
4p16.3 terminal (Wolf-Hirschhorn syndrome) region	chr4:331568-2010962	1,679,394	3	2
5p15 terminal (Cri du chat syndrome) region	chr5:37693-11347262	11,309,569	3	2
5q35 recurrent (Sotos syndrome) region (includes NSD1)	chr5:175728978-177013961	1,284,983	3	3
6q24 region (includes PLAGL1)	chr6:144243292-144416561	173,269	1	3
7q11.23 recurrent (Williams-Beuren syndrome) region (includes ELN)	chr7:72744454-74142513	1,398,059	3	3
7q21.2q21.3 region (includes SHFM1)	chr7:95533860-96779486	1,245,626	Not yet evaluated	Not yet evaluated
7q36.3 ZRS (SHH cis-regulatory) duplication region (within LMBR1 intron 5)	chr7:156583796-156584568	772	0	3
8p23.1 recurrent region (includes GATA4)	chr8:8119295-11765719	3,646,424	3	3
9q34.3 telomere region (includes EHMT1)	chr9:140513444-140730578	217,134	3	0
10q22.3q23.2 recurrent region (LCR-3/4-flanked) (includes BMPR1A)	chr10:81683648-88743240	7,059,592	3	1
11p15 region (includes H19, KCNQ1)	chr11:2016406-2906995	890,589	0	3
11p15.5 region (Imprinting Control Region 1)	chr11:2019075-2024375	5,300	3	0
11p13 (WAGR syndrome) region	chr11:31803509-32510988	707,479	3	1
11p11.2 (Potocki-Shaffer syndrome) region (includes ALX4, EXT2)	chr11:43894800-46152450	2,257,650	3	0
12q14 region (includes GRIP1 and HMG2)	chr12:65071919-68645525	3,573,606	Not yet evaluated	Not yet evaluated
15q11q13 recurrent (PWS/AS) region (BP1-BP3, Class 1)	chr15:22876632-28557186	5,680,554	3	3
15q11q13 recurrent (PWS/AS) region (BP2-BP3, Class 2)	chr15:23758390-28557186	4,798,796	3	3
15q13.3 recurrent region (BP4-BP5) (includes CHRNA7)	chr15:31137104-32445408	1,308,304	3	1
15q24 recurrent region (LCR15q24A to D) (includes STRA6 and CSPG4)	chr15:72963541-75912944	2,949,403	3	1
15q25.2 recurrent region (LCR B-C, proximal)	chr15:83213988-84714734	1,500,746	3	0
16p13.3 region (includes CREBBP)	chr16:3775056-3930121	155,065	3	1
16p13.11 recurrent region (includes MYH11)	chr16:15504454-16292268	787,814	3	2
16p11.2 recurrent region (includes SH2B1) (distal region) (BP2-BP3)	chr16:2882634-29046502	223,868	3	1
16p11.2 recurrent region (includes TBX6) (proximal region) (BP4-BP5)	chr16:29649996-30199855	549,859	3	3
17p13.3 (Miller-Dieker syndrome) region (includes YWHAE and PAFAH1B1)	chr17:1247833-2588909	1,341,076	3	3
17p12 recurrent (HNPP/CMT1A) region (includes PMP22)	chr17:14097915-15470901	1,372,986	3	3
17p11.2 recurrent (SMS/PLS) region (includes RAI1)	chr17:16757111-20219651	3,462,540	3	3
17q11.2 recurrent region (includes NF1)	chr17:29162822-30218667	1,055,845	3	3
17q12 recurrent (RCAD syndrome) region (includes HNF1B)	chr17:34815072-36192492	1,377,420	3	3
17q21.3 recurrent region (includes KANSL1)	chr17:43686245-44164876	478,631	3	2
22q11.21 recurrent (Cat eye syndrome) region (includes CEER2)	chr22:17392953-18591860	1,198,907	0	3
22q11.2 recurrent (DGS/VCFS) region (proximal region, LCR22-A to -B)	chr22:18661725-20311904	1,650,179	3	3
22q11.2 recurrent (DGS/VCFS) region (proximal region, LCR22-A to -D)	chr22:18661725-21561514	2,899,789	3	3
22q11.2 recurrent region (distal region, LCR22-D to LCR22-E or -F)	chr22:21797378-23649113	1,851,735	3	3
22q13 region (includes SHANK3)	chr22:51045516-51178945	133,429	3	0
Xp22.31 recurrent region (includes STS)	chrX:6455811-8133196	1,677,385	3	40: Dosage sensitivity unlikely
Xp11.23 region (includes MAOA and MAOB)	chrX:43514154-43741720	227,566	3	0
Xq28 recurrent region (includes GD11)	chrX:153564626-153889019	324,393	0	3
Xq28 recurrent region (int22h1/int22h2-flanked) (includes RAB39B)	chrX:154124111-154564398	440,287	3	3

\*ClinGen Dosage Sensitivity Curation Page <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/pathogenic\\_region.shtml](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/pathogenic_region.shtml)> より一部改変引用