

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
総合研究報告書

「アンジェルマン症候群とピットホプキンス症候群
および類縁疾患の遺伝学的臨床的解析」

研究分担者 齋藤 伸治

名古屋市立大学・大学院医学研究科 教授

研究要旨

ASが疑われた患者に対して系統的な遺伝学的診断を実施し、ASの確定診断がつかなかった例に対して、7遺伝子（*UBE3A*、*TCF4*、*MECP2*、*SLC9A6*、*CDK5L*、*FOXP1*、*MBD5*）のパネル解析を実施した。その結果遺伝学的に確定診断されたAS 100例を集積した。遺伝学的分類は欠失28例（28%）、UPD 8例（8%）、ID 6例（6%）、*UBE3A*変異47例（47%）、UPD/ID 11例（11%）であった。発達については非欠失群間では大きな違いはなかったが、欠失群は非欠失群に比べると発達の遅れが強いことが示された。パネル解析により、*TCF4*変異3例、*MECP2*変異4例、*SLC9A6*変異1例、*FOXP1*変異1例を同定した。それぞれ、Pitt-Hopkins症候群、Rett症候群、Christianson症候群、Rett類縁疾患と診断した。同定された変異はすべてde novoであり、ACMGガイドラインにより病原性と判断された。ASが疑われる非典型例のなかに、一定の割合で異なる疾患が存在することが明らかになった。ASと確定診断された例でも遺伝型により経過が異なる。また、類縁疾患ではそれぞれ経過が異なるため、正確な診断がQOL改善には必要である。ASが臨床的に疑われた例のQOL改善には系統的な遺伝学的診断が重要である。

A. 研究目的

Angelman症候群（AS：指定難病201）は知的障害、てんかん、失調性運動障害を特徴とする疾患である。比較的頻度が高いが、特に、乳児期の症状は発達の遅れとてんかん発作が主体であり、非特異的である。そのため、異なった遺伝性疾患がASと疑われる可能性がある。Pitt-Hopkins症候群、Rett症候群（指定難病156）、Christianson症候群などがASと似た症状を示すことが知られている。私たちは、ASおよびASと鑑別が問題になる疾患がどの程度存在し、それらの臨床経過の違いがQOLに与える影響を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

ASの最も多い欠失が商業的検査でのFISH法で否定された患者を対象とした。ASの遺伝学的診断は*SNURF-SNRPN*領域のDNAメチル化テストを行い、メチル化テストがASパターンの場合には両親の検体を用いて15q11-q13領域の多型マーカーにて親由来を判定した。両親の検体が得られなかった時は片親性ダイソミー（UPD）/ 刷り込み変異（ID）と分類した。メ

チル化テスト正常の場合 *UBE3A* の翻訳領域をSanger法で解析した。いずれにおいても異常が同定されなかった例をパネル解析の対象とした。

パネル解析には *UBE3A*、*TCF4*、*MECP2*、*SLC9A6*、*CDK5L*、*FOXP1*、*MBD5* のエクソン領域をAmpliSeq™ Custom Panel (Life Technologies)にてライブラリを作成し、次世代シーケンサー（Ion GeneStudio S5）にて塩基解読を行った。解析はCLC Genomics Workbench7.0にて実施した。臨床症状は主治医に記載していただいた臨床症状提供用紙に基づき検討を行った。

（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され、両親から書面による同意を得た。

C. 研究結果

遺伝学的に確定診断されたAS 100名が集積され、解析が実施できた。遺伝学的分類は欠失28例（28%）、UPD 8例（8%）、ID 6例（6%）、

*UBE3A*変異47例 (47%)、*UPD/ID* 11例 (11%)であった。*UPD/ID*の11例は両親の検体が入手できず、区別ができなかった。保険検査でFISH法が可能のために、本解析では欠失例の対象は少なかった。

発達については非欠失群間では大きな違いはなかったが、欠失群は非欠失群に比べると発達の遅れは強かった。具体的には座位獲得月齢(平均)は欠失18.1か月、*UPD* 14か月、*ID* 10か月、*UPD/ID* 8.9か月、*UBE3A*変異12か月であり、歩行開始年齢(平均)は欠失4.6歳に対して、*UPD* 2.4歳、*ID* 2.2歳、*UPD/ID* 3.4歳、*UBE3A*変異2.8歳であった。一方、言語発達では群間での違いは明らかではなかった。てんかんの合併は欠失では100%であったが、*UPD* 25%、*ID* 80%、*UPD/ID* 91%、*UBE3A*変異72%であった。また、初回発作の年齢は欠失では1.9歳であったが、*UPD* 2.6歳、*ID* 3.3歳、*UPD/ID* 3.8歳、*UBE3A*変異2.8歳であり、欠失群が最も低い年齢であった。

*AS*類似疾患では、*TCF4*変異3例、*MECP2*変異4例、*SLC9A6*変異1例、*FOXG1*変異1例を同定した。それぞれ、*Pitt-Hopkins*症候群、*Rett*症候群、*Christianson*症候群、*Rett*類縁疾患と診断した。同定された変異はすべて*de novo*であり、*ACMG*ガイドラインにより病原性と判断された。*SLC9A6*の変異は-8のイントロン領域の変異であったが、末梢白血球由来*RNA*を用いた*RT-PCR*解析にて正常なスプライシングが存在しないことを確認し、病原性と判断した。

*AS*類似疾患の臨床症状は乳児期では互いに鑑別が困難であったが、年齢が上がるに従い、それぞれの特徴が明らかになっていた。

D. 考察

*AS*における遺伝学的群と臨床症状との関係では欠失群が重症であると報告されている。今回の研究においても欠失群では発達の遅れが強く、てんかんの合併が多く、てんかん発症が早いことが示された。欠失群は*AS*の70%の多数を占めるため、欠失群の重症度が一般的な*AS*のイメージを作っていると思われる。非欠失例では全体的な発達が良好であり、3歳前後に歩行を獲得することが多く、欠失群より1~2歳ほど早い傾向を認めた。運動発達には明確な違いを認めたが、有意味語の獲得には明らかな違いはなく、非欠失例においても言語の獲得はわずかであった。このように、*AS*では全体的な発達に関わらず、表出性言語発達の遅れが特徴と考えられる。言語理解は非欠失例で良好かもしれないが、評価方法が難しいため、今回の調査では示すことはできなく、今後の課題と考える。てんかんの合併率も欠失群では非欠失群と

比較して高く、発症年齢も早かった。一方、発作型には大きな違いはなかった。従って、欠失群と非欠失群との違いは程度の違いと考えられる。

臨床的に*AS*が疑われたが、遺伝学的に否定された患者の中で多かったのは*Pitt-Hopkins*症候群と*Rett*症候群であった。*Pitt-Hopkins*症候群はTakanoらの先行研究で*AS*疑いに中で一定頻度存在すると報告されている。このように、臨床的な診断のみではこれらの疾患を区別することはできなかった。これらの疾患は乳児期の発達遅滞、てんかんの合併に加えて、顔貌や行動特性に重なりが見られる。一方、*Rett*症候群は神経学的退行、*Christianson*症候群は進行性の小脳萎縮が*AS*とは異なる症候となるが、乳児期にははっきりしない。このように乳児期には症状が重なっているが、その後の経過は異なるために、正確な診断は*QOL*の向上のために重要である。

E. 結論

日本人においても*AS*は欠失群が重症であることが明らかになった。*AS*の遺伝学的群における臨床症状の違いを踏まえて、患者の自然歴を予想することで、*AS*患者の経過観察および適切な療育の計画に資することが期待でき、ひいては、患者および家族の*QOL*の向上を図ることに活用できる。*AS*類似疾患は乳児期には症状が互いにオーバーラップしているが、その後の経過が異なるため、正確な診断が*QOL*改善には必要である。そのため、*AS*が臨床的に疑われた例の*QOL*改善には系統的な遺伝学的診断が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) N. Hamada, Y. Negishi, M. Mizuno, F. Miya, A. Hattori, N. Okamoto, M. Kato, T. Tsunoda, M. Yamasaki, Y. Kanemura, K. Kosaki, H. Tabata, S.Saitoh, and K. I. Nagata, „Role of a heterotrimeric G-protein. Gi2. in the corticogenesis: possible involvement in periventricular nodular heterotopia and intellectual disability., J Neurochem, vol. 140 no. 1, 82-95,2017
- 2) D. Shigemizu, F. Miya, S. Akiyama, S. Okuda, K. A. Boroovich, A. Fujimoto, H. Nakagawa, K. Ozaki, S. Niida, Y. Kanemura, N. Okamoto, S.Saitoh, M. Kato, M. Yamasaki, T. Matsunaga, H. Mutai, K. Kosaki, and T. Tsunoda, „IMSindel: An accurate intermediate-size indel detection tool incorporating de novo assembly and gapped global-local alignment with split read analysis., Sci Rep, vol. 8 no. 1,5608,2018

- 3) M. Kagami, K. Nagasaki, R. Kosaki, R. Horikawa, Y. Naiki, S. Saitoh, T. Tajima, T. Yorifuji, C. Numakura, S. Mizuno, A. Nakamura, K. Matsubara, M. Fukami, and T. Ogata, „Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients., *Genet Med*, vol. 19 no. 12, 1356-1366, 2017
- 4) T. Okazaki, Y. Saito, R. Hiraiwa, S. Saitoh, M. Kai, K. Adachi, Y. Nishimura, E. Nanba, and Y. Maegaki, „Pharmacoresistant epileptic eyelid twitching in a child with a mutation in SYNGAP1., *Epileptic Disord*, vol. 19 no. 3, 339-344, 2017
- 5) Y. Nakamura, Y. Togawa, Y. Okuno, H. Muramatsu, K. Nakabayashi, Y. Kuroki, D. Ieda, I. Hori, Y. Negishi, T. Togawa, A. Hattori, S. Kojima, and S. Saitoh, „Biallelic mutations in SZT2 cause a discernible clinical entity with epilepsy. developmental delay. macrocephaly and a dysmorphic corpus callosum., *Brain Dev*, vol. 40 no. 2, 134-139, 2018
- 6) I. Hori, R. Kawamura, K. Nakabayashi, H. Watanabe, K. Higashimoto, J. Tomikawa, D. Ieda, K. Ohashi, Y. Negishi, A. Hattori, Y. Sugio, K. Wakui, K. Hata, H. Soejima, K. Kurosawa, and S. Saitoh, „CTCF deletion syndrome: clinical features and epigenetic delineation., *J Med Genet*, vol. 54 no. 12, 836-842, 2017
- 7) N. Okamoto, F. Miya, T. Tsunoda, M. Kato, S. Saitoh, M. Yamasaki, Y. Kanemura, and K. Kosaki, „Novel MCA/ID syndrome with ASH1L mutation., *Am J Med Genet A*, vol. 173 no. 6, 1644-1648, 2017
- 8) N. Okamoto, F. Miya, Y. Hatsukawa, Y. Suzuki, K. Kawato, Y. Yamamoto, T. Tsunoda, M. Kato, S. Saitoh, M. Yamasaki, Y. Kanemura, and K. Kosaki, „Siblings with optic neuropathy and RTN4IP1 mutation., *J Hum Genet*, vol. 62 no. 10, 927-929, 2017
- 9) Y. Negishi, F. Miya, A. Hattori, Y. Johmura, M. Nakagawa, N. Ando, I. Hori, T. Togawa, K. Aoyama, K. Ohashi, S. Fukumura, S. Mizuno, A. Umemura, Y. Kishimoto, N. Okamoto, M. Kato, T. Tsunoda, M. Yamasaki, Y. Kanemura, K. Kosaki, M. Nakanishi, and S. Saitoh, „A combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly., *BMC Med Genet*, vol. 18 no. 1, 4, 2017
- 10) K. Kato, F. Miya, I. Hori, D. Ieda, K. Ohashi, Y. Negishi, A. Hattori, N. Okamoto, M. Kato, T. Tsunoda, M. Yamasaki, Y. Kanemura, K. Kosaki, and S. Saitoh, „A novel missense mutation in the HECT domain of NEDD4L identified in a girl with periventricular nodular heterotopia. polymicrogyria and cleft palate., *J Hum Genet*, vol. 62 no. 9, 861-863, 2017
- 11) I. Hori, T. Otomo, M. Nakashima, F. Miya, Y. Negishi, H. Shiraishi, Y. Nonoda, S. Magara, J. Tohyama, N. Okamoto, T. Kumagai, K. Shimoda, Y. Yukitake, D. Kajikawa, T. Morio, A. Hattori, M. Nakagawa, N. Ando, I. Nishino, M. Kato, T. Tsunoda, H. Saitsu, Y. Kanemura, M. Yamasaki, K. Kosaki, N. Matsumoto, T. Yoshimori, and S. Saitoh, „Defects in autophagosome-lysosome fusion underlie Vici syndrome, a neurodevelopmental disorder with multisystem involvement., *Sci Rep*, vol. 7 no. 1, 3552, 2017
- 12) M. Nakashima, Y. Negishi, I. Hori, A. Hattori, S. Saitoh, and H. Saitsu, „A case of early-onset epileptic encephalopathy with a homozygous TBC1D24 variant caused by uniparental isodisomy,” *Am J Med Genet A*, vol. 179, no. 4, pp. 645-649, Apr, 2019.
- 13) Takata, N. Miyake, Y. Tsurusaki, R. Fukai, S. Miyatake, E. Koshimizu, I. Kushima, T. Okada, M. Morikawa, Y. Uno, K. Ishizuka, K. Nakamura, M. Tsujii, T. Yoshikawa, T. Toyota, N. Okamoto, Y. Hiraki, R. Hashimoto, Y. Yasuda, S. Saitoh, K. Ohashi, Y. Sakai, S. Ohga, T. Hara, M. Kato, K. Nakamura, A. Ito, C. Seiwa, E. Shirahata, H. Osaka, A. Matsumoto, S. Takeshita, J. Tohyama, T. Saikusa, T. Matsuishi, T. Nakamura, T. Tsuboi, T. Kato, T. Suzuki, H. Saitsu, M. Nakashima, T. Mizuguchi, F. Tanaka, N. Mori, N. Ozaki, and N. Matsumoto, „Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder,” *Cell Rep*, vol. 22, no. 3, pp. 734-747, Jan 16, 2018.
- 14) Hori, F. Miya, Y. Negishi, A. Hattori, N. Ando, K. A. Boroevich, N. Okamoto, M. Kato, T. Tsunoda, M. Yamasaki, Y. Kanemura, K. Kosaki, and S. Saitoh, „A novel homozygous missense mutation in the SH3-binding motif of STAMBP causing microcephaly-capillary malformation syndrome,” *J Hum Genet*, vol. 63, no. 9, pp. 957-963, Sep, 2018.
- 15) K. Kato, S. Mizuno, M. Inaba, S. Fukumura, N. Kurahashi, K. Maruyama, D. Ieda, K. Ohashi, I. Hori, Y. Negishi, A. Hattori, and S. Saitoh, „Distinctive facies, macrocephaly, and developmental delay are signs of a PTEN mutation in childhood,” *Brain Dev*, vol. 40, no. 8, pp. 678-684, Sep, 2018.
- 16) T. Mushiroda, Y. Takahashi, T. Onuma, Y. Yamamoto, T. Kamei, T. Hoshida, K. Takeuchi, K. Otsuka, M. Okazaki, M. Watanabe, K. Kanemoto, T. Oshima, A. Watanabe, S. Minami, K. Saito, H. Tanii, Y. Shimo, M. Hara, S. Saitoh, T. Kinoshita, M. Kato, N. Yamada, N. Akamatsu,

T. Fukuchi, S. Ishida, S. Yasumoto, A. Takahashi, T. Ozeki, T. Furuta, Y. Saito, N. Izumida, Y. Kano, T. Shiohara, M. Kubo, and G. S. Group, "Association of HLA-A*31:01 Screening With the Incidence of Carbamazepine-Induced Cutaneous Adverse Reactions in a Japanese Population," JAMA Neurol, vol. 75, no. 7, pp. 842-849, Jul 1, 2018.

- 17) D.Ieda, I. Hori, Y. Nakamura, K. Ohashi, Y. Negishi, A. Hattori, A. Arisaka, S. Hasegawa and S. Saitoh. A novel splicing mutation in SLC9A6 in a boy with Christianson syndrome. Hum Genome Var;6.15.2019
- 18) Y. Negishi, D. Ieda, I. Hori, Y. Nozaki, T. Yamagata, H. Komaki, J. Tohyama, K. Nagasaki, H. Tada and S. Saitoh. Schaaf-Yang syndrome shows a Prader-Willi syndrome-like phenotype during infancy. Orphanet Journal of Rare Diseases;14.277.2019
- 19) 齋藤伸治 Angelman 症候群.小児科.60.961-966.2019

2. 学会発表

- 1) Negishi Y, Ieda D, Miyamoto T, Hori I, Hattori A, Nozaki Y, Komaki H, Tohyama J, Nagasaki K, Tada H, Oishi H, Saitoh S. Truncating *MAGEL2* mutations produce fetal lethality in mice and may recapitulate pathogenesis of Schaaf-Yang syndrome. 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2017/10/18-21(Orland, USA)ポスター発表
- 2) Nakamura Y, Togawa Y, Okuno Y, Muramatsu H, Ieda D, Hori I, Negishi Y, Hattori A, Saitoh S. A patient with compound heterozygous mutations in *SZT2* represents a discernible clinical entity with developmental delay, macrocephaly and dysmorphic corpus callosum. 第 59 回日本小児神経学会学術集会 (大阪) 2017/6/16-18 口頭発表
- 3) 中村勇治、浅田英之、久保田哲夫、奥野友介、村松秀城、河合智子、佐藤万仁、高橋義行、小島勢二、齋藤伸治. UPD(15)pat に伴う *HERC2*、*DUOX2* のヘテロ接合性喪失による blended phenotype の 1 例. 第 41 回日本小児遺伝学会 (名古屋) 2019/1/11-12.口頭発表
- 4) Nakamura Y, Togawa Y, Okuno Y, Muramatsu H, Nakabayashi K, Kuroki Y, Ieda D, Hori I, Negishi Y, Togawa T, Hattori A, Kojima S, Saitoh S. Novel biallelic mutations in *SZT2* cause mild intellectual disability and epilepsy:

expanding the phenotypic spectrum. 2018 Annual Meeting of American Society of Human Genetics. 2018/10/17-20 (SanDiego, USA) ポスター発表.

- 5) 根岸豊、家田大輔、中村勇治、堀いくみ、服部文子、野崎靖之、小牧宏文、遠山潤、長崎啓佑、多田弘子、大石久史、齋藤伸治. Schaaf-Yang 症候群の臨床像検討とトランスジェニックマウスを用いた病態解析. 第 60 回日本小児神経学会 (幕張) 2018/5/31 口頭発表
- 6) Hori I, Miya F, Nakamura Y, Ieda D, Negishi Y, Hattori A, Tsunoda T, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Clinical, genetic, and biochemical analyses for PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly. 第 61 回日本小児神経学会学術集会 (名古屋) 2019/5/31 口頭発表
- 7) Nakamura Y, Kato K, Tsuchida N, Matsumoto N, Takahashi Y, Saitoh S. Constitutive activation of mTORC1 signaling induced by biallelic loss-of-function mutations in *SZT2* underlies a discernible neurodevelopmental disease. 69th American Society of Human Genetics Annual Meeting (Houston, USA) 2019/10/16 ポスター発表
- 8) Kato K, Oka Y, Muramatsu H, Vasilev F, Otomo T, Oishi H, Kawano Y, Nakazawa Y, Ogi T, Takahashi Y, Saitoh S. Biallelic *VPS35L* pathogenic variants cause 3C/Ritscher-Schinzel-like syndrome through dysfunction of retriever complex. 69th American Society of Human Genetics Annual Meeting (Houston, USA) 2019/10/16 ポスター発表

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