

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 直通

(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成26(2014)年 4月

## 目 次

### I . 総括研究報告

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| 統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究 ----- | 1 |
| (資料) 研究全体の流れと進行状況              |   |
| 松本直通                           |   |

### II . 分担研究報告

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 1 . 稀少な遺伝子変異を認めたてんかんおよび発達障害症例   | 11 |
| 岡本伸彦                            |    |
| 2 . 年齢依存性てんかん性脳症の遺伝型と臨床型の関連性の解明 | 19 |
| 加藤光広                            |    |
| 3 . 本邦におけるクレアチン欠損症の解析           | 23 |
| 小坂仁                             |    |
| 4 . 広汎性発達障害関連遺伝子解析による病態解明研究     | 29 |
| 橋本亮太                            |    |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 37 |
|----------------------------|----|

|                        |    |
|------------------------|----|
| IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- | 43 |
|------------------------|----|

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究開発事業）  
総括研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

次世代シーケンサー（NGS）による高出力解析研究により、遺伝子異常の多面性（pleiotropy）が認識され始め、疾患群をより正確に診断する（診断率を向上させる）ためには、より多くの責任/関連遺伝子・候補遺伝子を解析する必要がある。この解決策に大容量型 NGS を用いた全 exome 解析が選択肢となるが、やや高コスト（1 サンプル当たり 2013 年度で 11 万円）である。我々は、数十個の遺伝子を集約する新技術と卓上型 NGS を組み合わせ、効率的かつ安価（1 サンプル当たり 3 万 5 千円）に遺伝子異常を同定する技術（統合的遺伝子解析システム）を確立し、さらに点変異のみならずコピー数異常の検出も可能とした。本技術を導入し効率的にヒト発達障害の遺伝子異常を同定しその分子病理を明らかにし、かつ効率的な診断システムの確立を目指すことを目的とした。平成 25 年度は、難治性てんかんパネル 2 種、Coffin-Siris 症候群関連パネル 1 種を作成し、検出頻度やコストの検討を行い、全エクソーム解析との優劣について検討を加えた。さらにパネルや全エクソームデータを用いた CNV 解析を行い、マイクロアレー解析との比較検討を行った。

分担研究者

岡本伸彦・大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科・主任部長

加藤光広・山形大学医学部小児科学講座・講師

小坂仁・自治医科大学小児科学講座・教授

橋本亮太・大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学・千葉大学・福井大学連合小児発達学研究科附属子どものこころの分子統御機構研究センター/大阪大学大学院医学系研究科・情報統合医学講座精神医学教室・准教授

A．研究目的

本申請研究は、申請者が研究代表を務めた「超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究（H22-神経・筋-一般-012）」の成果を受けた発展研究である。H22-24年度

研究費では、高密度マイクロアレーを用いた疾患ゲノム解析を基軸に、West症候群（Am J Hum Genet, 2010）、Kabuki症候群（Nat Genet, 2010）、Microphthalmia with limb anomaly (MLA)症候群（Am J Hum Genet, 2011）、Coffin-Siris症候群（Nat Genet, 2012）、大田原症候群（Ann Neurol, 2012）、Epilepsia, 2012)等で責任遺伝子を同定した。このうち3疾患の遺伝子異常が染色体微細構造異常に絡んでおり、染色体構造異常解析の有用性は明白であった。これらの研究過程で、年齢依存性てんかんの一群の解析は格段に進歩した。最重症系である大田原症候群では、我々が明らかにした責任遺伝子ARX・STXBP1・KCNQ2・CASKと新たにSCN2A（Neurology, 2013）・GNAO1（Am J Hum Genet, 2013）・SLC35A2（Hum

Mut, 2013) を加えておよそ57%で遺伝子異常が明らかになった。また次世代シーケンサー (NGS) による高出力解析研究により、遺伝子異常の多面性 (pleiotropy) が認識され始め、疾患群をより正確に診断する (診断率を向上させる) ためには、より多くの責任/関連遺伝子・候補遺伝子を解析する必要がある。この解決策に大容量型NGSを用いた全exome解析が選択肢となるが、やや高コスト (1サンプル当たり2013年度で11万円) である。我々は、数十個の遺伝子を集約する新技術と卓上型NGSを組み合わせ、効率的かつ安価 (1サンプル当たり3万5千円) に遺伝子異常を同定する技術 (統合的遺伝子解析システム) を確立し、さらに点変異のみならずコピー数異常の検出も可能とした。本技術を導入し効率的にヒト発達障害の遺伝子異常を同定しその分子病理を明らかにし、かつ効率的な診断システムの確立を目指すことを目的とする。

## B. 研究方法

### I. 症例集積

小児神経臨床研究ネットワーク等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんかんとその類縁疾患を、臨床遺伝ネットワーク等を通じて集積した知的障害関連疾患を集積する。

### II. 統合的遺伝子解析システム開発

大田原症候群を含む年齢依存性てんかん群では、*ARX*・*STXBPI* を含むてんかん関連遺伝子 35 個とさらに 15 個を加えた 50 個の 2 種のパネルを、Coffin-Siris 症候群で変異を

認められた SWI/SNF 複合体の関連遺伝子 22 個を含む候補遺伝子パネルをデザインし、ゲノム DNA を分画、卓上型次世代シーケンス (NGS) で解析を行う。

### III. インフォーマティクス解析

NGS 解析で既に全エクソン解析において研究室内で確立した解析フローを統合遺伝子解析システムにも応用する。NGS データは、研究室独自のインフォーマティクスフローにより効率的な点変異の検出が可能で、かつ CNV に関しては Alex\_NORD プログラムを用いる。

### IV. バックアップシステム

従来型の超細密マイクロアレーと全エクソーム解析・全ゲノム解析による網羅的なゲノム解析手法を遺伝子統合解析システムでの陰性例に適宜用いて新規遺伝子異常とコピー数異常を同定する。特に H25 年度は XHMM プログラムによる全エクソームデータで CNV 検出システムの確立を進めた。

### V. 効果的遺伝子診断システムの確立

本研究の知見に基づく迅速、効果的かつ安価な疾患遺伝子診断システムを考案する。本研究は、所属施設 IRB の承認を受け適切な倫理的配慮と手続きを得て行われた。

## C. 研究結果

### I. 症例集積

小児神経臨床研究ネットワーク (蔵王セミナー等で交流) 等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんかんとその類縁疾患を含めた計 720 例の世界的にも突出し

た症例が集積した。さらに臨床遺伝ネットワーク等により遺伝医学専門医や小児神経科医の協力のもと知的障害関連疾患を呈する症例が 1500 例集積した。今後も種々のチャンネルを通して継続的にこれらの疾患群の集積に努める。

## II. 統合的遺伝子解析システム開発

平成 25 年度研究で大田原症候群を含む年齢依存性てんかん群では、責任遺伝子 *ARX*・*STXBPI*・*CASK*・*KCNQ2* と新規に同定した遺伝子 *SCN2A*・*GNAO1*・*SLC35A2*、他のてんかん関連疾患で同定されている既知遺伝子を加えて 35 個および拡大版 50 個の遺伝子解析パネルを作成し、それぞれで遺伝子変異検出率を明らかにした (28.3%と 18.9%)。さらに Coffin-Siris 症候群で変異を見出した SWI/SNF 複合体遺伝子 22 個の解析パネルも作成、同疾患での変異検出率を明らかにした (25%)。陰性例では、バックアップ解析として全エクソーム解析を追加することになるが、この時点で、遺伝子パネル+全エクソーム解析とパネルを用いず全エクソーム解析のみを行うこととの価格の比較検討を行った。この結果遺伝子パネル/全エクソーム解析の価格比 (3.5 万円/11 万円 = 31.8%) を超える変異検出率をパネルで超えない限り、全エクソーム解析を第一選択とする方が安価で迅速であるとの結論に至った。よって明らかに検出率が 32%を大きく超えることが期待できる疾患はパネルを作成するがそれ以外は全エクソーム解析を選択することとした。

## III. インフォーマティクス解析

NGS 解析で既に全エクソーム解析において研究室内で確立した解析フローを統合遺伝子解析システムにも応用する。Miseq データは、Novoalign/Picard/GATK/Annova を組み合わせた研究室独自の Ecome により効率的な解析が可能である。さらに NGS データから特に欠失を効率的に検出する Alex\_NORD プログラムで非常に小さな (100 bp 程度) 欠失検出が可能である。全エクソーム解析データを用いて XHMM 法で CNV 解析もマイクロアレーで検出される 60%の CNV が検出可能となっている。マイクロアレーで検出できない 10 Kb 以下の CNV 検出が XHMM では検出されているためその正確性を検討中である。

## IV. バックアップシステム

従来型の超細密マイクロアレーも CNV 異常の検出から責任遺伝子の特定する手法として依然重要で統合遺伝子解析システムと並行して適宜行っている。

## V. 効果的遺伝子診断システムの確立

本研究の知見に基づいて効果的かつ安価な疾患遺伝子診断システムの検討を続けている。特に遺伝子パネルを用いた安価なシステムの問題点として、遺伝子解析領域が小さいため検体数を一定数集めて一気に解析できる反面、検体数がそろそろまで解析がはじめられないという矛盾が生じる。また II で述べたように遺伝子パネルでの遺伝子変異同定率が遺伝子パネル/全エクソーム解析のコスト比を超えることで、コスト的に生合成が取れてくるという事が明らかになった。よってパネル解析を優先して行う疾患についてはかなり限定した

適応で行う方が効率が良い。一方で全エクソーム解析で難治性てんかんに関しての新しい遺伝子 *SCN2A* (Neurology, 2013), *GNAOI* (Am J Hum Genet, 2013), *SLC35A2* (Hum Mut, 2013)の単離にも成功しこれを遺伝子パネルに新たに組み込んで遺伝子変異同定率の向上を目指した。

#### D . 考察

遺伝子パネルと全エクソーム解析のパフォーマンスとコストの検討及び上記 2 手法のデータを利用した CNV 解析システムをセットアップし、マイクロアレーデータとの比較を行った。遺伝子パネルはコストメリットは明らかだが、検出率が低い場合全エクソーム解析に移行せざる負えないことも多く、コスト・スピードの観点で全エクソーム解析を第一選択とするメリットも明らかになった。次世代シーケンスデータを用いた CNV 解析では、マイクロアレーデータの 60%程度は検出可能であること、マイクロアレーの検出限界である 10 Kb 以下の欠失等が検出される可能性があること等などが判明し、その特徴を生かしたデータ利用が求められる。

#### E . 結論

H25 年度は、てんかん 35 遺伝子パネルと拡大版 50 遺伝子パネルをそれぞれ難治性てんかん症例 67 例と 37 例に対して施行し、変異陽性例はそれぞれ 19 例 (28.3%) 及び 7 例 (18.9%) であった。SWI/SNF 関連パネル (22 遺伝子搭載) の Coffin-Siris 症候群 8 例解析では 2 例 (25%) で変異を検出

した。変異陰性例は全て全エクソーム解析を用いて再解析を行うこととなったが、この時点で、選択的遺伝子パネル (3.5 万円) とバックアップ検査としての全エクソーム解析 (11 万円) の組み合わせと、最初から全エクソーム検査を行うことの 1 検体当たりのコスト比較を行い、選択的パネルでの変異陽性検出率が 3.5/11 の価格比を超えない限り (31.8%) 遺伝子選択パネルを行う価格のメリットがないことが判明した。てんかん、Coffin-Siris 症候群での変異検出率は遺伝子選択パネルで 18-28%程度で、全エクソーム解析を第一選択とする価格・時間的なメリットが明らかであった。遺伝子選択パネルも全エクソーム解析でもそのデータから CNV をある程度の感度で (およそ 60%) で検出することが可能であった。全エクソーム解析を用いて大田原症候群の新規遺伝子として *SCN2A* (Neurology, 2013)・*GNAOI* (Am J Hum Genet, 2013)・*SLC35A2* (Hum Mut, 2013) を発表した。また幼少期には発達障害、青年期に急速に神経変性が進行して寝たきりになる SENDA の責任遺伝子 *WDR45* を明らかにした (Nat Genet, 2013)。以上のよう初年度として、遺伝子選択パネルの有用性の検討とシステム構築、網羅的解析を用いた発達障害の責任遺伝子の解析が計画通り順調に進んでいる。

#### F . 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていない。

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

- Yamashita S, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Iai M, Aida N, Tanaka Y. Neuropathology of Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement and High Lactate caused by a homozygous mutation of DARS2. *Brain Dev* 35(4):312-316, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.007.
- Tsurusaki Y, \*Kosho T (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitu H, Miyake N, \*Matsumoto N (\*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFDI* mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. *Clin Genet* 83 (2): 1235-144, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori F, Yamazaki A, Subo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, \*Saitu H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 73(1): 48-57, 2013. doi: 10.1002/ana.23736.
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Miyake N, Saitu H, \*Matsumoto N. A de novo deletion at 16q24.3 involving *ANKRD11* in a Japanese patient with KBG syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161A(5): 1073-1077, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35661.
- \*Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, Matsumoto N, Ishii M, Saitu H. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to *SPTAN1* gene mutation. *Brain Dev* 35(3): 280-283, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.002.
- Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi H, Nakashima M, Saitu H, Matsumoto N, \*Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. *J Hum Genet* 58(2): 113-115, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Higashiyama Y, \*Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Ohba C, Fukai R, Miyatake S, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. A novel homozygous *SCARB2* mutation causes late-onset progressive myoclonus epilepsy without renal failure. *Mov disord* 28(4): 552-553, 2013. doi: 10.1002/mds.25296.
- Yamashita S, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Iai M, Aida N, Tanaka Y. Neuropathology of Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement and High Lactate caused by a homozygous mutation of DARS2. *Brain Dev* 35(4):312-316, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.007.
- Tsurusaki Y, \*Kosho T (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitu H, Miyake N, \*Matsumoto N (\*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFDI* mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. *Clin Genet* 83 (2): 135-144, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Yoneda Y, **Haginoya K**, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori F, Yamazaki A, Subo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, \*Saitu H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 73(1): 48-57, 2013. doi: 10.1002/ana.23736.
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Miyake N, Saitu H, \*Matsumoto N. A de novo deletion at 16q24.3 involving *ANKRD11* in a Japanese patient with KBG syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161A(5): 1073-1077, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35661.
- \*Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, Matsumoto N, Ishii M, Saitu H. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to *SPTAN1* gene mutation. *Brain Dev* 35(3): 280-283, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.002.
- Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi H, Nakashima M, Saitu H, Matsumoto N, \*Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. *J Hum Genet* 58(2): 113-115, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Higashiyama Y, \*Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Ohba C, Fukai R, Miyatake S, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. A novel homozygous *SCARB2* mutation causes late-onset progressive myoclonus epilepsy without renal failure. *Mov disord* 28(4): 552-553, 2013. doi: 10.1002/mds.25296.
- \*Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitu H, \*Matsumoto N (\*: co-corresponding). *KDM6A* point mutations cause Kabuki syndrome. *Hum Mut* 34(19): 108-110, 2013. doi: 10.1002/humu.22229.
- Kondo Y, Koshimizu E, Megarbane A, Hamanoue H, Okada I, Nishiyama K, Kodera H, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Doi H, Miyake N, Saitu H, \*Matsumoto N. Whole-exome sequencing identified a homozygous *FNBP4* mutation in a family with a condition microphthalmia with limb anomalies-like. *Am J Med Genet Part A* 161A: 1543-1546, 2013.
- Kimura-Ohba S, Kagitani-Shimono K, Hashimoto N, Nabatame S, Okinaga T, Murakami A, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Hojo K, Tomita R, Taniike M, \*Ozono K. A case of cerebral

- hypomyelination with spondylo-epi-metaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet Part A* 161A(1): 203-207, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35686.
- \*Miyake N<sup>#</sup>, Yano S<sup>#</sup> (# denotes equal contribution), Sakai C, Hatakeyama H, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, \*Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mut* 34(3): 446-452, 2013. doi: 10.1002/humu.22257.
- \*Saitsu H<sup>#</sup>, Nishimura T<sup>#</sup>, Muramatsu K<sup>#</sup> (# denotes equal contribution), Kodera H, Kumada S, Sugai K, Kasai-Yoshida E, Sawaura N, Nishida H, Hoshino A, Ryujin F, Yoshioka S, Nishiyama K, Kondo Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Arakawa H, Kato M, \*Mizushima, \*Matsumoto N (\*: co-corresponding). *De novo* mutations in the autophagy gene *WDR45* cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet* 45(4): 445-449, 2013. doi: 10.1038/ng.2562.
- Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Sato H, Nakabayashi J, Ban T, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, \*Tamura T. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in the monocyte differentiation program. *Blood* 121 (10): 1839-1849, 2013. doi: 10.1182/blood-2012-06-437863.
- oKondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Lee BJ, Nishiyama K, Mitsuko Nakashima I, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kim JH, Yu YS, \*Matsumoto N. Pathogenic mutations in two families with congenital cataract identified by whole-exome sequencing. *Mol Vis* 19: 384-389, 2013
- Vergano SS, Santen G, Wiczorek D, Wollnik B, Matsumoto N, Deardorff MA: Coffin-Siris Syndrome (April 2013) in: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, Seattle, 1997-2013. Available at <http://www.genetests.org>. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131811/>)
- Yokoo N, Marumo C, Nishida Y, Iio J, Maeda S, Nonaka M, Maihara T, Chujoh S, Katayama T, Sakazaki H, Matsumoto N, Okamoto N. A case of Toriello-Carey syndrome with severe congenital tracheal stenosis. *Am J Med Genet Part A* 161(9):2291-2293, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35861.
- Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, **Imai K**, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragán DE, Villarroel CE, Ohfu M, Writzl K, Strazišar BG, Hirabayashi S, Chitayat D, Reid DM, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, **Hayasaka K**, \*Matsumoto N, \*Saitsu H (\* denotes co-corresponding). Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 81(11):992-998, 2013
- Koshimizu E<sup>#</sup>, Miyatake S<sup>#</sup> (# denotes equal contribution), Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Performance comparison of bench-top next generation sequencers using microdroplet PCR-based enrichment for effective targeted sequencing in patients with autism spectrum disorder. *Plos One* 8(9): e74167, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0074167
- Fukai R, Ochi N, Murakamia A, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, \*Matsumoto N, \*Miyake N. Co-occurrence of 22q11 deletion syndrome and HDR Syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(10):2576-2581, 2013.
- \*Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, \*Matsumoto N (\*: co-corresponding). Clinical consequences of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 161(6):1221-1237, 2013.
- Iida A, Nobuhiko Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, \*Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel *INPPL1* mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet* 58(6):391-394, 2013.
- Nakajima M,<sup>#</sup> Mizumoto S,<sup>#</sup> Miyake N,<sup>#</sup> (# denotes equal contribution) Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis R, Chitayat D, Howard A, Ferraz-Leal G, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitsu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Superti-Furga A, Ohashi H, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S\*. Mutations in *B3GALT6*, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* 92(6):927-934, 2013.
- Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu Y, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskiniemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma T, Beckmann JS, Ikegawa I, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and *NEK2* as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(40): 16139-16144, 2013.



- Kodera H, Kato M, Nord AS, Walsh T, Lee M, Yamanaka G, Tohyama J, Nakamura K, Nakagawa E, Ikeda T, Ben-Zeev B, Lev D, Lerman-Sagie T, Straussberg R, Tanabe S, Ueda K, Amamoto M, Ohta S, Nododa Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, King M-C, Matsumoto N, \*Saitu H. Target capture sequencing for detection of mutations and copy number changes causing early-onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 54(7):1262-1269, 2013. doi: 10.1111/epi.12203
- Ravenscroft G#, Miyatake S# (# denotes the first authors with equal contribution), Lehtokari V-L, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJN, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N§, \*Laing NG§ (§ denotes equal contribution as the last author). Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 93(1):6-18, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.004.
- \*Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Yoko Hiraki, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations and their clinical consequences in Kabuki syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(9):2234-2243, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.36072.
- Sun S-L, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Ryo Funayama R, Kondo M, Saitu H, Matsumoto N, Nakayama K, Ishii N\*. Y-Chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. *J Immunol* 190 (12): 6209-6220, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300303.
- \*Doi H, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Miyatake S, Kawamoto Y, Yoshida T, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. Diagnostic utility of exome sequencing for autosomal recessive cerebellar ataxia and spastic paraplegia: identification of a novel homozygous *SPG7* mutation. *Intern Med* 52(14): 1629-1633, 2013
- Fujita A, Suzumura H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Harada N, Matsumoto N, \*Miyake N. A Unique Case of de novo 5q33.3q34 Triplication with Uniparental Isodisomy of 5q34qter. *Am J Med Genet Part A* 161(8):1904-1909, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.36026.
- #Nakamura K, #Kodera H, #Akita T (# denotes equal contribution), Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama T, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, \*Saitu H (\* denotes co-correspondence) De novo mutations in GNAO1 encoding a Gao subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93(3):496-505, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.014.
- Kodera H#, Nakamura K# (# denotes equal contribution), Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Mitsuko Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, \*Matsumoto N, \*Saitu H (\*: co-corresponding). De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mut* 34(12): 1708-1714, 2013. doi: 10.1002/humu.22446.
- Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki S, Aida N, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Matsumoto N, \*Saitu H (\*: co-correspondence). Diagnostic utility of whole exome sequencing in cerebellar atrophy in childhood. *Neurogenet* 14 (3-4): 225-232, 2013. doi: 10.1007/s10048-013-0375-8.
- Gupta VA, Ravenscroft G, Shaheen R, Todd EJ, Swanson LC, Shiina M, Ogata K, Hsu C, Clarke NF, Darras BT, Farrar M, Hashem A, Manton N, Muntoni F, North KN, Sandaradura S, Nishino I, Hayashi YK, Sewry CA, Thompson EM, Brownstein CA, Yu TW, Allcock RJN, Davis MR, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Alkuraya FS, Laing NG, Beggs AH. Identification of KLHL41 mutations implicates BTB-Kelch-mediated ubiquitination as an alternate pathway to myofibrillar disruption in nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 93(6):1108-1117, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.020.
- Nakajima J, Eminoglu TF, Vatansever G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Kawashima H, \*Matsumoto N, \*Miyake N (\*: co-correspondence). A novel homozygous YARS2 mutation causes severe myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia syndrome. *J Hum Genet* 58(12):822-824, 2013. doi: 10.1038/jhg.2013.104.

順天堂大学医学部セミナー・松本直通「変革期を迎えた疾患ゲノム解析」平成 25 年 6 月 26 日@順天堂大学医学部・東京

第 17 回小児分子内分泌研究会特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いてわかってきたこと」平成 25 年 7 月 7 日札幌北広島クラッセホテル

次世代解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発研究プロジェクトの成果発表会・松本直通「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築」平成 25 年 7 月 13 日都市センターホテル・東京

第 20 回日本遺伝子診療学会大会・シンポジウム 1・松本直通「疾患ゲノム解析における次世代シーケンサーの有用性」平成 25 年 7 月 19 日アクトシティ・浜松コンgresセンター・浜松

CiRA genomics epigenomics and bioinformatics seminar series VIII. 松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析」平成 25 年 8 月 23 日@CiRA 京都大学

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業「次世代遺伝子解析装置を用いた難病研究」平成 25 年度第 1 回ワークショップ 松本直通「コントロールデータベースに関する話題」平成 25 年 8 月 24 日@京都大学(芝蘭会館)

神奈川県立循環器呼吸器病センター職員研修会 松本直通「新たな時代を迎えた遺伝性疾患解析」平成 25 年 8 月 19 日@神奈川県立循環器呼吸器病センター・横浜

現場の会第三回研究会基調講演・松本直通「NGS がもたらしたヒト疾患ゲノム解析のパラダイムシフト」平成 25 年 9 月 4 日神戸国際会議場@神戸

第 23 回遺伝医学セミナー講義・松本直通「遺伝性疾患の責任遺伝子単離法」平成 25 年 9 月 7 日三井ガーデンホテル千葉@千葉市

第 22 回発達腎研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析:現状と限界」平成 25 年 9 月 13 日高槻市生涯学習センター@高槻市

第 18 回山形小児神経研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンス解析で分かってきたこと」平成 25 年 9 月 27 日パレスグランデール@山形市

第 58 回日本人類遺伝学会大会・シンポジスト・松本直通「ヒト疾患エクソーム解析の現状と課題」平成 25 年 11 月 23 日@江陽グランドホテル仙台

希少疾患・難病の全エクソーム解析 -現状と課題 - 松本直通「希少疾患・難病の全エクソーム解析-現状と課題-」平成 25 年 12 月 3 日日経バイオテク「希少疾患・難病の治療薬開発におけるゲノム活用」@秋葉原コンベンションホール

Naomichi Matsumoto, T. Nishimura, K. Muramatsu, H. Koderu, S. Kumada, K. Sugai, E. Kasai-Yoshida, N. Sawaura, H. Nishida, A. Hoshino, F. Ryujin, S. Yoshioka, H. Arakawa, M. Kato, N. Mizushima, H. Saitsu. European Conference of Human Genetic 2013. June 9, 2013 @Palais des Congrès, Paris, France

## H. 知的財産権の出願・登録状況

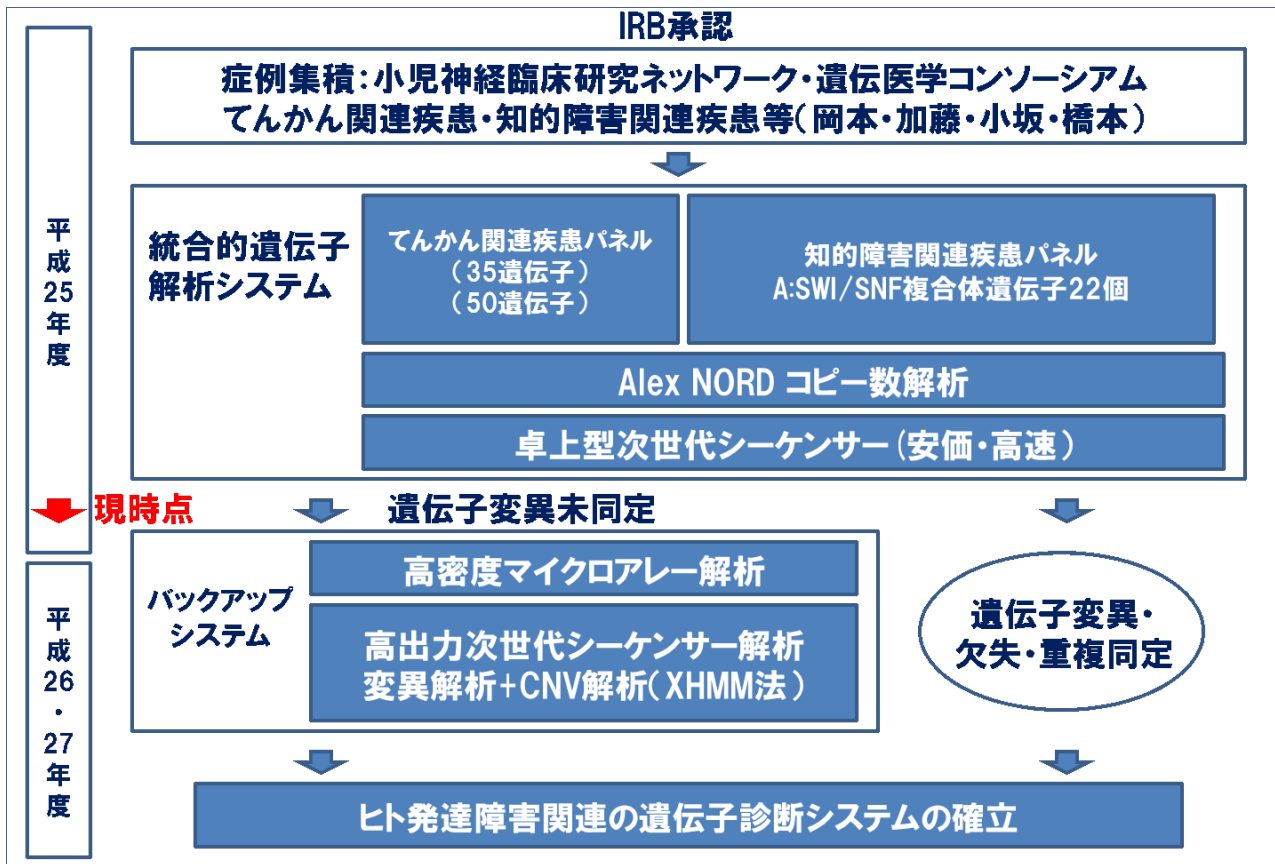
特願 2013-252720・鶴崎美德/松本直通・「Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子診断法」・平成 25 年 12 月 6 日

PCT/JP2013/71620・松本直通/三宅紀子・ミトコンドリア複合体 III 欠乏症患者又は保因者の検出方法・平成 25 年 8 月 9 日

特願 2013-157339 号 松本直通/三宅紀子・ケトン血症を伴うリー脳症患者または保因者の検出法。平成 25 年 7 月 31 日

特願 2013-123660 才津浩智/松本直通・小児期のおてんかんおよび不随意運動をきたす疾患の検出方法・平成 25 年 6 月 12 日

研究全体の流れと進行状況



厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

「統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究」  
(主任研究者 横浜市立大学大学院環境分子医科学 松本直通)

稀少な遺伝子変異を認められたてんかんおよび発達障害症例

研究分担者 大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科岡本伸彦

### 研究要旨

小児の発達障害では原因不明の症例が多数存在する。従来の染色体検査(G分染法)や特定の遺伝子領域をサングァー法で解析する方法では診断に至ることが困難である。マイクロアレイ染色体検査や次世代シーケンサーを用いた解析により、多くの疾患で病態解明につながった。今年度解析を行った症例の中で、重要な知見を得られた症例について考察を行った。

- (1) 自閉症において稀少な変異を複数例で同定した。
- (2) GPIアンカー欠損症は、最近注目されている疾患群であるが、PIGN異常症を診断した。
- (3) てんかん症例においてイオンチャンネル異常症を診断した。
- (4) 小頭症において稀少な責任遺伝子を同定した。

今後も症例を蓄積し、新規疾患単の発見や治療法、療育方法の開発など発展的研究を進める方針である。

### 共同研究者

川戸和美、山本悠斗、松田圭子、三島祐子  
(大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科)

### A. 研究目的

小児の発達障害では原因不明の症例が多数存在する。マイクロアレイ染色体検査や次世代シーケンサー(NGS)を用いた解析により、多くの疾患の病態解明がすすんでいる。原因不明の小児神経疾患を分子遺伝学的に解析し、病態の解明から治療方法の開発を行うことが目的である。

### B. 研究方法

大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療

科でフォロー中の症例で、てんかんや発達障害、知的障害を有する症例。

次世代シーケンサー解析は横浜市大遺伝学の松本直通教授(本研究班主任研究者)のもとで実施した。

(倫理面への配慮)

解析にあたり、保護者の代諾により書面で同意を得た。実施前後に認定遺伝カウンセラーによるカウンセリングを実施した。

### C. 研究結果

疾患群毎にまとめた。

(1) 自閉症

症例1 4歳男児

満期産正出生体重で出生した。生後より哺乳障害あり、チューブ栄養をうけた。重度精神運動

発達遅滞あり、現在も独歩不可で、有意語なし。  
1歳で全身けいれんあり。てんかん治療開始となった。脳波で棘波頻発するが、頭部MRIでは明らかな異常なし。

頭部を床に打ちつける、自分の頭をたたく、機嫌不良で入眠が困難など、自閉症症状を認めた。

遺伝子解析で、神経伝達物質の受容体の遺伝子変異を *de novo* でみいだした。過去に疾病との関連が報告されていない新規遺伝子変異であり、継続的な臨床的検討と類似例の蓄積を計画している。

## 症例 2

自閉症の男児で、運動機能巧緻性の問題もある。てんかんは認めず、全身状態は良好である。転倒しやすく、頭部MRIや脳波検査など神経学的評価では特記事項なし。

マイクロアレイ染色体検査で、発達障害と関連することがすでに報告されている遺伝子領域の微細欠失を認めた。

この欠失は家族性でみられたが、症状は家族内で微妙に差があった。さらに臨床的検討を行っている。

### (2) GPIアンカー欠損症

「高アルカリフォスファターゼ血症と知的障害やてんかんを認める小児神経疾患

(Hyperphosphatasia with mental retardation)」が近年注目されている。GPIアンカーを合成する過程の各種酵素異常による先天性グリコシル化異常 (Congenital disorders of Glycosylation) である。酵素ALPが細胞膜に固定されないために血清での活性値が異常高

値となることが特徴である。ただし、ALPが高値ではない群も存在する。MaydenらはMultiple congenital anomalies- hypotonia-seizures syndromeの家系で *PIGM* 遺伝子異常を同定した。この場合はALPは高値にならない。原因不明のてんかん症例についてNGS解析で *PIGA* 新規遺伝子変異を認めた。

症例は9歳女兒と1歳男児の姉弟。姉は生後1か月より眼球の垂直方向の眼振を認めた。乳児期より重度の精神運動発達とてんかん発作を認めた。現在も頸定なく、有意語もない。摂食機能障害あり、胃瘻を必要とする。MRIで小脳萎縮を認めた。弟も同様経過である。この姉弟は身長と頭囲は大きめであった。

末梢血からDNAを抽出し、SureSelect Human All Exon v4 Kit でキャプチャー後、101bpのペアエンドシーケンス (Illumina HiSeq2000) を施行した。Novoalignでリードをマッピングさせ、Picardでduplicationの除去を行った。GATKで変異のコール、ANNOVARで変異のアノテーションを施行した。dbSNP135においてアレル頻度が1%以上の変異、日本人406名のノーマルコントロールエクソームデータで3人以上がもつ変異は除外し、候補変異の絞り込みを行った。候補変異はサンガー法で確認した。

好中球表面のGPIアンカー型蛋白の発現について、大阪大学微生物病研究所の村上良子博士、木下タロウ博士の研究協力を得た。

*PIGA* 遺伝子の複合型ヘテロ接合を認めた。両親はそれぞれ保因者であった。FACS解析において、複数のGPIアンカー型蛋白の発現低下を認めた。下記に報告された。

Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y,

Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H.

PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy.

Neurogenetics. 2013 Nov 20. [Epub ahead of print]

### (3) イオンチャンネル異常症

#### 症例 1 中学生女児

診断：乳児早期発症てんかん性脳症

満期産正出生体重児。周産期に特記事項なし。

生後5日より眼球偏移、全身強直発作あり。

脳波でsuppression-burst patternを認めた。現在も顎定なく、痙性四肢麻痺を認める。有意語なく、日常生活は全面介助を要する。重度成長障害と、小頭を認めた。マイクロアレイ染色体検査では異常なし。

てんかん遺伝子などに標的を絞ったNGS解析でKCNQ2変異を同定した。両親に変異はなく、*de novo*であった。

#### 症例 2 7歳男児

診断：乳児早期発症てんかん性脳症

満期産正出生体重児。生後5日より眼球偏移、全身強直発作あり。脳波で棘波多発する。7歳でも顎定なく、下肢に痙性を認める。有意語なく、日常生活は全面介助を要する。体格は-2SD程度であるが、頭囲は正常範囲である。マイクロアレイ染色体検査では異常なし。

てんかん遺伝子などに標的を絞ったNGS解析でKCNQ2変異を同定した。両親に変異はなく、*de novo*であった。

#### 症例 3 6歳女児

診断：suppression-burstを伴う早期乳児てんかん性脳症(大田原症候群)。早産正出生体重児。生後1日目から全身けいれんあり、脳波はsuppression-burstであった。その後も難治に経過している。重度の精神遅滞であり寝たきり状態である。頭部MRIで大脳萎縮を認めた。SPECTで脳血流低下あり。

てんかん遺伝子解析でSCN2A変異を同定した。両親に変異はなく、*de novo*であった。

#### 症例 4 乳児女児

在胎41週2300gで出生。哺乳障害あり。前頭縫合隆起、側頭部狭小、眼間開離、眼瞼裂狭小、顔面正中中部低形成、短鼻、平坦な人中、小下顎を認めた。乳児期の体重増加は不良であった。

G分染法では46,XXで異常はなかった。一般血液検査に異常を認めず。

頭部CTで前頭縫合早期癒合あり。生後3ヶ月でてんかん発を発症した。てんかんは難治性に経過した。

顔貌異常より染色体異常考え、SNPマイクロアレイを実施した(三菱化学メディエンス社)。2番染色体長腕に微細欠失を同定した。欠失範囲にはSCN1A遺伝子が含まれた。

#### 参考文献

Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Koder H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation.

#### (4) 稀少な小頭症例

##### 症例1 8歳女児

出生時、両親は健康で家族歴に特記事項なし。満期産正出生体重児。周産期に特記事項なし。乳児期より発達遅滞を認めた。筋緊張低下が強かった。座位保持は3歳で可能となった。現在も未歩行2歳で有意語はない。

手を振る、指をすう、歯ぎしりなど常同行動あり。自分の頭部をたたく自傷行為を認めた。睡眠障害で投薬治療を必要とした。

8歳で体格は - 2 SD前後、頭囲 -2.5SDであった。胸部腹部異常なし。深い眼窩など特徴的顔貌を認めた。

G分染法、マイクロアレイ染色体検査やレット症候群関連遺伝子解析などに異常を認めず、両親とトリオでNGS解析を行ったところ、最近海外で報告のあった新規てんかん関連遺伝子変異を同定した。現在投稿準備中である。

##### 症例2 5歳男児

診断：知的障害、小頭症、てんかん

満期産、子宮内発育遅延で出生。出生時の頭囲は-4SDの高度先天性小頭症であった。特異顔貌、頭部MRIで脳回形成異常を認めた。4歳で歩行可能となるが、有意語は数個程度認めるのみ、重度精神運動発達遅滞である。

4歳で全身けいれんを認めた。てんかんの可能性あり、経過観察中である。G分染法、マイクロアレイ染色体検査では異常なし。

NGS解析で、稀少な小頭症関連遺伝子変異を同定した。過去の報告例と臨床像も合致した。突然変異であることが証明され、遺伝カウンセリ

ングでも有用な情報となった。

#### D. 考察

##### (1) 自閉症に関して

自閉症は新規の原因遺伝子が続々報告されており、今回の経験例でも新規原因遺伝子が疑われた。今回同定された変異は神経伝達物質やシナプスに関与するものであった。新規疾患単位としての確立をめざして研究を継続する方針である。

##### (2) GPIアンカー欠損症に関して

*PIGN*遺伝子変異によるGPIアンカー欠損症は過去には1家系のみでの報告であり、臨床像は明らかでない面が大きい。高ALP血症は認めず、臨床所見からの診断は困難である。今回、世界で2家系目を診断し、論文として報告できた。

GPIアンカー欠損症は原因不明の神経疾患の中に多数潜在している可能性がある。スクリーニングはFACS解析が有用であるが、責任遺伝子は多数存在するので遺伝子解析にはNGSが有用と考えられた。

GPIアンカー欠損症では、てんかんの合併が多い。治療において、ビタミンB6投与が有効な場合がある。正確な診断は治療方法の選択において非常に重要である。

##### (3) イオンチャンネル異常症

最近になって、*KCNQ2*遺伝子変異と乳児のてんかん性脳症の関連が注目されている。Katoらは、9例の*KCNQ2*異常例を報告した。発作は新生児期から発症する強直発作のことが多く、脳波ではsuppression-burst patternを多くの例で認める。Hypsarrhythmiaの例もあった。臨床的には

大田原症候群からWest症候群に移行する傾向があった。発作は投薬で抑制されても、中度から重度の精神運動発達遅滞を認めた。

症例1と2も新生児期発症のてんかん性脳症の形態をとり、重度の精神運動発達遅滞を残した。

大田原症候群はsuppression-burstを伴う早期乳児てんかん性脳症で、重篤な知的障害を伴う難治てんかんである。電位依存性ナトリウムチャンネルサブユニット2型をコードする遺伝子SCN2Aの異常が証明される例が増加している。今回のNGS解析で正確に診断できた。

SCN1Aは電位依存性ナトリウムチャンネルサブユニット1型蛋白をコードする遺伝子であり、乳児重症ミオクロニーてんかん(SME)あるいはDravet症候群[OMIM#607208]の責任遺伝子である。本症は新規抗てんかん薬のスチリペントールの有用性が報告されており、てんかんの遺伝子診断は治療方法の選択においても重要である。

#### (4) 小頭症に関して

小児神経領域で、小頭症は頻度の高い疾患である。精神運動発達遅滞、てんかんや発達障害とも関連する。その原因遺伝子は非常に多岐にわたる。

今回、特有の臨床像を持つ複数症例において、稀少な責任遺伝子を同定できた。病態の理解は疾患の受容過程に良好な効果をもたらす、療育にも有用な情報を与えることが期待される。遺伝子診断の結果は遺伝カウンセリングにおいても有意義であった。

新規疾患が考えられるものはさらに多角的に

病態を解析し、臨床像を明確にしていく方針である。

## F. 研究発表

2013年

Aoki H, Shiomi M, Ikeda T, Ishii T, Shimizu N, Togawa M, Okamoto N, Kadoya M, Wada Y. Decreased sialylation of IgA1 O-glycans associated with pneumococcal hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Int.* 2013 Dec;55(6):e143-5.

Shimizu K, Wakui K, Kosho T, Okamoto N, Mizuno S, Itomi K, Hattori S, Nishio K, Samura O, Kobayashi Y, Kako Y, Arai T, Oh-Ishi T, Kawame H, Narumi Y, Ohashi H, Fukushima Y. Microarray and FISH-based genotype-phenotype analysis of 22 Japanese patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013 Dec 19. doi: 10.1002/ajmg.a.36308. [Epub ahead of print]

Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T. 109 kb deletion of chromosome 4p16.3 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A.* 2013;161:1465-9.

Okamoto N, Fujii T, Tanaka J, Saito K, Matsui T, Harada N. A clinical study of patients with pericentromeric deletion and duplication within 16p12.2-p11.2. *Am J Med Genet A.* 2013 Nov 20. doi: 10.1002/ajmg.a.36217. [Epub ahead of print]

Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. *Neurogenetics.* 2013 Nov 20. [Epub ahead of print]

Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor



- B, Perrier J, Aggarwal S, Dalal A, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. *Clin Genet*. 2013 Jul 1. doi: 10.1111/cge.12225. [Epub ahead of print]
- Wada T, Ban H, Matsufuji M, Okamoto N, Enomoto K, Kurosawa K, Aida N. Neuroradiologic Features in X-linked  $\alpha$ -Thalassemia/Mental Retardation Syndrome. *Am J Neuroradiol*. 2013 ;34 :2034-8.
- Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. *Hum Mutat*. 2013;34:108-10
- Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: Detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2013;161:1221-37.
- Hitomi Yatsuki, Ken Higashimoto, Kosuke Jozaki, Kayoko Koide, Junichiro Okada, Yoriko Watanabe, Nobuhiko Okamoto, Yoshinobu Tsuno, Yoko Yoshida, Kazutoshi Ueda, Kenji Shimizu, Hirofumi Ohashi, Tsunehiro Mukai, Hidenobu Soejima. Novel mutations of CDKN1C in Japanese patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Genes and Genetics*
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Sakamoto M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. A de novo deletion at 16q24.3 involving ANKRD11 in a Japanese patient with KBG syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:1073-7.
- Shimada S, Okamoto N, Hirasawa K, Yoshii K, Tani Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Clinical manifestations of Xq28 functional disomy involving MECP2 in one female and two male patients. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:1779-85.
- Shimada S, Okamoto N, Nomura S, Fukui M, Shimakawa S, Sangu N, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Microdeletions of 5.5 Mb (4q13.2-q13.3) and 4.1 Mb (7p15.3-p21.1) associated with a saethre-chotzen-like phenotype, severe intellectual disability, and autism. *Am J Med Genet A*. 2013;161:2078-83.
- Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev*. 2013;35:411-9.
- Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet*. 2013;58:391-4.
- Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *Am J Hum Genet*. 2013;93:173-80.
- Yokoo N, Marumo C, Nishida Y, Iio J, Maeda S, Nonaka M, Maihara T, Chujoh S, Katayama T, Sakazaki H, Matsumoto N, Okamoto N. A case of Toriello-Carey syndrome with severe congenital tracheal stenosis. *Am J Med Genet A*. 2013;161:2291-3.
- Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi JI, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing of a unique brain

malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria and midbrain tectal hyperplasia. *Neuropathology*. 2012 Dec 13.

Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;161:2234-43.

Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H. De Novo Mutations in SLC35A2 Encoding a UDP-Galactose Transporter Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Hum Mutat*. 2013 ;34:1708-14.

Koshimizu E, Miyatake S, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Performance Comparison of Bench-Top Next Generation Sequencers Using Microdroplet PCR-Based Enrichment for Targeted Sequencing in Patients with Autism Spectrum Disorder. *PLoS One*. 2013 Sep 16;8(9):e74167.

Nakajima J, Okamoto N, Shiraishi J, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Kawashima H, Matsumoto N, Miyake N. Novel FIG4 mutations in Yunis-Varon syndrome. *J Hum Genet*. 2013 ;58:822-4.

Ichikawa K, Kadoya M, Wada Y, Okamoto N. Congenital disorder of glycosylation type Ic: report of a Japanese case. *Brain Dev*. 2013;35:586-9.

## **G . 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

平成 25 年度厚生科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
分担研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

分担研究課題：年齢依存性てんかん性脳症の遺伝型と臨床型の関連性の解明

分担研究者 加藤光広 山形大学医学部小児科学講座

研究要旨：

昨年度、年齢依存性てんかん性脳症である大田原症候群 12 症例の全エクソーム解析を行い、3 症例で *KCNQ2* の新生変異をみいだした。*KCNQ2* は良性家族性新生児痙攣の原因遺伝子として知られていたが、早期発症の年齢依存性てんかん性脳症における *KCNQ2* 変異の寄与は不明な点が多く、変異率と臨床像を調査した。大田原症候群 51 例、早期ミオクロニー脳症 4 例、ウエスト症候群 104 例、その他の乳児期発症てんかん性脳症 80 例の計 239 例に対して *KCNQ2* の変異解析を行い、病的変異を示した 12 例（大田原症候群 10 例、分類不能の乳児期発症てんかん性脳症 2 例）の臨床型を解析した。全例で発作は新生児期に発症し、発作型は強直発作が多かった。脳波は 11 例がサブレッション・バーストを示した。8 例はカルバマゼピンやフェニトイン、トピラメート、バルプロ酸 Na で発作が消失したが、3 か月の死亡例を除き全例精神遅滞を併発した。*KCNQ2* 変異は大田原症候群の約 20%を占める主要な原因であり、発作予後は比較的良好だが、知能障害の改善が今後の課題である。

A．研究目的

年齢依存性てんかん性脳症は、発達期に応じた特徴的なてんかん発作と脳波所見を呈し、認知機能や運動障害などの発達障害を併発する。新生児期に発症する大田原症候群と乳児期に発症するウエスト症候群はその代表的疾患であり、私たちはこれまでに *ARX*, *STXBP1*, *SPTAN1* など複数の原因遺伝子を明らかにしてきた。Weckhuysenらは新生児もしくは乳児期発症の原因不明てんかん性脳症 80 例に対して、*KCNQ2* と *KCNQ3* の変異スクリーニング解析を行い、8 例に *KCNQ2* 変異を同定した(Weckhuysen et al. Ann Neurol 2013)。私たちも昨年度大田原症候群 12 症例の全エクソーム解析を行い、3 症例で *KCNQ2* の新生変異をみいだした(Saitsu et al. Ann Neurol 2012)。*KCNQ2* は良性家族性新生児痙攣の原因遺伝子として知られていたが、早期発症の年齢依存性てんかん性脳症における *KCNQ2* 変異例については不明な点が多い。

本研究では、*KCNQ2* 遺伝子変異による臨床型を明らかにする事を目的とした。

B．研究方法

保護者の承諾を得て、脳形成異常や代謝異常、周産期障害による明らかな原因を除外された年齢依存性てんかん性脳症の患者 239 例（大田原症

候群 51 例、早期ミオクロニー脳症 4 例、ウエスト症候群 104 例、分類不能の乳児期発症てんかん性脳症 80 例）および変異陽性例については両親の血液から DNA を抽出し、さらに臨床情報（発作型・脳波・頭部 MRI・使用薬剤と効果・併発症など）を収集した。

*KCNQ2* 遺伝子の全コード領域を high resolution melting (HRM)法を用いて変異スクリーニングを行い、陽性例に対して直接塩基配列の解析を行った。大田原症候群 51 例中 30 例については全エクソーム解析を行ない、*KCNQ2* 変異とともに *KCNQ3* 変異の有無を確認した。なお、*STXBP1* 変異例と男性では *ARX* 変異例を除外した。

C．研究結果

12 例において 10 種類の *KCNQ2* 変異を同定した。すべてミスセンス変異であった。11 例は新生変異で、1 例は新生児期発症のてんかんを認める母がモザイク変異を有していた。

変異症例は、大田原症候群 10 例、分類不能の乳児期発症てんかん性脳症 2 例であった。9 例は生後 3 日以内に、発作や哺乳不良などの初期症状を示し、全例 2 週間以内にてんかん発作を発症した。時間単位もしくは日単位の強直発作が 11 例に認められた。初回脳波は 10 例でサブレッション・バーストを示し、うち 4 例は非対称性パター

ンを、さらに4例は平坦部分が短かった。てんかん性スパズム発作は4例に認められ、ヒプスアリスミアは3例に認められた。もっとも使用されていた薬剤はフェノバルビタールで、8例は単剤もしくは多剤併用療法、ACTH筋注療法で発作は抑制されていた。最終記録脳波は、8例で焦点性もしくは多焦点性突発波を示し、広汎性の突発波は2例のみであった。1例は生後3か月で亡くなっていた。全例中等度から最重度の知的障害を示した。2例は介助なしに歩行が可能であったが、7例は常時臥床状態であった。頭部MRIを入手した9例中6例に、淡蒼球の異常な高信号を認めた。3例で前頭葉の軽度萎縮と菲薄化した脳梁が経過後期に認められた。

#### D．考察

KCNQ2変異を認めた年齢依存性てんかん性脳症12例中10例は大田原症候群の臨床像を呈し、KCNQ2変異が大田原症候群の主要な原因の一つであることが明らかにされた。その一方、KCNQ3変異は全エクソーム解析を行った大田原症候群30例には認められず、Weckhuysenらの既報告同様、年齢依存性てんかん性脳症のなかの少なくとも大田原症候群におけるKCNQ3変異の寄与率は低いと考えられた。今回年齢依存性てんかん性脳症に認められたKCNQ2変異は全てミスセンス変異であり、良性家族性新生児痙攣で認められるフレームシフト変異やナンセンス変異とは異なっていた。良性家族性新生児痙攣ではKCNQ2でコードされるカリウムイオンチャネルのハプロ不全が疾患原因と推測されているが、良性家族性新生児痙攣の母と分類不能のてんかん性脳症の子に認められたp.Ser247Trp変異はドミナントネガティブ効果が報告されており、年齢依存性てんかん性脳症におけるKCNQ2変異の分子病態についてはさらに検討が必要である。

KCNQ2変異による年齢依存性てんかん性脳症と良性家族性新生児痙攣の臨床像を比較すると、胎生期と出産には異常を認めず、生後1週以内に強直発作で発症する点は共通であった。また良性家族性新生児痙攣でも報告があるように、発作が明白になる以前に顔面紅潮もしくは蒼白、無呼吸、哺乳不良などの自律神経症状と考えられる症状が出現していた。初期の発作頻度は、両者で明らかかな差を認めず、一部の良性家族性新生児痙攣では逆に年齢依存性てんかん性脳症よりも頻回の場合がある。

既報告と合わせKCNQ2変異による年齢依存性て

んかん性脳症23例中18例(78%)において、脳波はサブプレッション・バーストを示した。しかし非対称性や短い平坦部分など非典型的なサブプレッション・バーストが多く、KCNQ2変異の脳波特徴と考えられた。脳形成異常やARX変異、STXBP1変異による大田原症候群と比較し、KCNQ2変異による年齢依存性てんかん性脳症の特徴として、初期の発作消失率が高いこと、West症候群への移行例が少ないこと、カルバマゼピン、フェニトイン、バルプロ酸、トピラマートの有効例が多いことが挙げられる。有効だった4剤はいずれも電位依存性Naチャンネルブロック作用を有する。レチガビンはKCNQ2でコードされるカリウムイオンチャンネルKv7を選択的に開放することが知られており、KCNQ2変異例に対して、より有効な可能性がある。

#### E．結論

KCNQ2の新生変異は早期乳児に発症する年齢依存性てんかん性脳症の原因となり、臨床像として多くは大田原症候群を示す。抗てんかん薬に反応し発作予後は比較的良いが、運動・認知の予後は非常に不良であり、より効果的な治療法の開発が必要である。

#### F．健康危険情報

特になし。

#### G．研究発表

##### 1．論文発表

- 1) Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama J, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H: De Novo mutations in *GNAO1*, encoding a Galphao subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93:496-505,2013.
- 2) Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragan DE, Villarroel CE, Ohfu M, Writzl K, Gnidovec Strazisar B, Hirabayashi S, Chitayat D, Myles Reid D, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K,

- Matsumoto N, Saitsu H: Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 81:992-8,2013.
3. Koder H, Kato M, Nord AS, Walsh T, Lee M, Yamanaka G, Tohyama J, Nakamura K, Nakagawa E, Ikeda T, Ben-Zeev B, Lev D, Lerman-Sagie T, Strausberg R, Tanabe S, Ueda K, Amamoto M, Ohta S, Nonoda Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, King MC, Matsumoto N, Saitsu H: Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 54:1262-9,2013.
  4. Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Koder H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H: Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by *KCNQ2* mutation. *Epilepsia* 54:1282-7,2013.
  - 3) Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Matsuura R, Takayama R, Hamano S, Kinoshita T, Hayasaka K, Matsumoto N: Early-onset epileptic encephalopathies caused by *PIGA* gene mutation. American Epilepsy Society Annual Meeting 2013, December 6-10, 2013, Washington, D.C., USA
  - 4) Murakami Y, Kato M, Saitsu H, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Matsumoto N, Kinoshita T: Inherited GPI-anchor deficiencies caused by the hypomorphic mutations in *PIGA* gene: comparison to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, December 7-10, 2013, New Orleans, USA

H . 知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### 学会発表

- 1) Nakamura K, Saitsu H, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragán DE, Villarreal CE, Ohfu M, Writzl K, Stražišar BG, Hirabayashi S, Chitayat C, Reid DM, Nishiyama K, Koder H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N: Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome: Involvement of chromosomal aberrations in patients with early epileptic encephalopathy. 30th International Epilepsy Congress, June 23 – 27, 2013 Montreal, Canada
- 2) Tohyama J, Akasaka N, Writzl K, Nonoda Y, Hamdan FF, Michaud JL, Osaka H, Shimono M, Kato M, Matsumoto N, Saitsu H. Phenotypic spectrum of *SPTAN1* encephalopathy. 30th International Epilepsy Congress, June 23 – 27, 2013 Montreal, Canada

平成 25 年度厚生科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
分担研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

分担研究課題：本邦におけるクレアチン欠損症の解析

分担研究者 小坂仁 自治医科大学小児科  
研究協力者 秋山倫之 岡山大学病院小児神経科  
和田敬仁、新保裕子 神奈川県立こども医療センター神経内科

研究要旨：

治療可能発達遅滞および自閉症の原因として、治療が可能なクレアチン欠損症に着目し HPLC を用いた簡便なスクリーニング法を開発し、解析を行っている。クレアチン欠損症は L-arginine: glycine amidinotransferase 欠損症, guanidinoacetate methyltransferase 欠損症, creatine transporter 欠損症よりなる。我々は, guanidinoacetate methyltransferase 欠損症の本邦初症例を見出し、治療により著しい改善を認めた。

A．研究目的

種々の発達障害疾患のなかでも、治療可能発達遅滞および自閉症の原因として近年、先天的なクレアチン (CR) 代謝異常症 (CCDS) が注目されている。CR は、脳および筋肉において ATP の速やかな産生に重要な役割を持ち、言語機能を中心とした、知的機能での重要性が近年明らかになりつつある。CR は、血液脳関門を通過しないために、脳において独自の合成、輸送経路を持っている。これらの異常により、脳性クレアチン欠損症；Cerebral creatine deficiency syndromes, CCDS と総称される疾患を呈する。今までに (L-arginine: glycine amidinotransferase (AGAT) 欠損症, guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) 欠損症, creatine transporter (SLC6A8) がみだされている。これら 3 疾患の共通の症状は精神遅滞、自閉症、てんかんであり、欧米では精神遅滞の 2% 前後を占めるといわれるが、本邦では報告例がなく、その頻度は不明であった。昨年までに私共は、これらの疾患のスクリーニング方法として、HPLC を用いた簡便な方法を開発し SLC6A8 欠損症の本邦初症例を報告した。今年度は GAMT 欠損例（本邦初）を診断したので報告する。

B．症例

30 歳台女性。周期異常なし。定額獲得するもたが、以降の運動発達は遅れた。有意語は未獲得

で言語理解も乏しく、30 歳頃より長距離が歩けなくなった。1 歳半ばよりてんかん発作が出現し、Lennox-Gastaut 症候群を呈した。兄が難治性てんかんで死亡している。

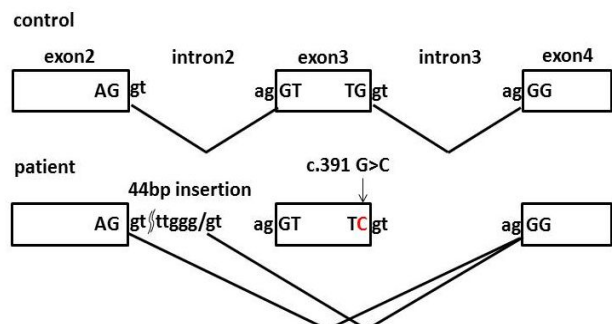
血清クレアチニン (<0.1 mg/dL) とクレアチン (0 mg/dL) が著明低値であり、頭部 MRS でクレアチンピークが欠損しており、頭部 MRI で両側淡蒼球の異常信号をみとめており、CCDS が疑われた。

C．研究結果

前処理した尿 25  $\mu$ l を用い、CR：クレアチン、GAA：グアニジノ酢酸、GN：クレアチニンを測定した。尿中グアニジノ酢酸 (GAA) が著しく上昇しており (548.64 mmol/mol cr; 基準値 3-78)、GAMT 欠損症を強く疑った。GAMT 遺伝子解析をおこなったところ、c.391G>C p.Gly131Arg in exon3 (p.Val110Glyfs\*30 and .Ile111Profs\*73)

c.578 A>G p.Gln193Arg in exon6 の複合ヘテロ変異 (2 つとも新規変異) を確認した。RT-PCR を行ったところ c.391G>C では、スプライシングの異常を来しエクソン 3 がスプライスアウトされ

図 1 . c.391G>C による 2 つのスプライシング産物



た2つの異常スプライシング産物ができていることが判明した。クレアチン・オルニチン補充療法を開始し、てんかん発作は完全抑制され歩行機能の改善もみられた。

#### D . 考察

血漿 GAA 値は、治療前の 28.43  $\mu\text{mol/L}$  (基準値 1.0-3.5) から、治療開始 1、3、6 ヶ月後は 7.53、6.14、5.45  $\mu\text{mol/L}$  と低下した。また髄液 GAA 値は、治療前の 7.09  $\mu\text{mol/L}$  (基準値 0.02-0.50) から、治療開始 6 ヶ月後は 3.01  $\mu\text{mol/L}$  と低下しており、臨床症状の改善と平行していた。

#### E . 結論

統合的遺伝子解析システムから見出される、種々の発達障害関連分子の中には、治療可能な疾患群が含まれる。それらの早期発見システムの構築も平行して進め、得られた成果を還元したい。

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

1. Takanashi JI, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Inoue K, Matsumoto N, James Barkovich A. Different patterns of cerebellar abnormality and hypomyelination between POLR3A and POLR3B mutations. *Brain Dev.* 2013 May 3. doi:pil: S0387-7604(13)00132-0.10.1016/j.braindev.2013.03.006. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23643445
2. Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Anthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG. Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 6-18.
3. Anselm I, Azzouz H, Bratkovic D, de Brouwer A, Hamel B, Kleefstra T, Yntema H, Campistol J, Vilaseca MA, Cheillan D, D'Hooghe M, Diogo L, Garcia P, Valongo C, Fonseca M, Frints S, Wilcken B, von der Haar S, Meijers-Heijboer HE, Hofstede F, Johnson D, Kant SG, Lion-Francois L, Pitelet G, Longo N, Maat-Kievit JA, Monteiro JP, Munnich A, Muntau AC, Nassogne MC, Osaka H, Ounap K, Pinard JM, Quijano-Roy S, Poggenburg I, Poplawski N, Abdul-Rahman O, Ribes A, Arias A, Yap Lito-Lee J, Schulze A, Schwartz CE, Schwenger S, Soares G, Sznajer Y, Valayannopoulos V, Van Esch H, Waltz S, Wamelink MM, Pouwels PJ, Errami A, van der Knaap MS, Jakobs C, Mancini GM, Salomons GS. Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J Med Genet* 2013; 50:463-472.
4. Mitani T, Aida N, Tomiyasu M, Wada T, Osaka H. Transient ischemic attack-like episodes without stroke-like lesions in MELAS. *Pediatr Radiol* 2013; 43: 1400-1403.
5. Kato H, Miyake F, Shimbo H, Ohya M, Sugawara H, Aida N, Anzai R, Takagi M, Okuda M, Takano K, Wada T, Iai M, Yamashita S, Osaka H (2013) Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8. *Brain Dev.* doi:S0387-7604(13)00256-8 [pii]10.1016/j.braindev.2013.08.004
6. Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragan DE, Villarroya CE, Ohfu M, Writzl K, Gnidovec Strazisar B, Hirabayashi S, Chitayat D, Myles Reid D, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H (2013) Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 2013; 81:

992-998.

7. Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama J, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H (2013b) De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a Galphao Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93: 496-505.
8. Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? *Hum Genet*, accepted
9. Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, Shimozawa N, Takamura A, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Eto Y, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. *Neurogenetics* 2013; 14: 225-232.
10. Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H. De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mutat*. 2013;34: 1708-1714.
11. Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. *Pediatr Neurol*. 2013 Nov 4. doi:p11: S0887-8994(13)00559-6.
12. Matsufuji M, Osaka H, Gotoh L, Shimbo H, Takashima S, Inoue K. Partial PLP1 Deletion Causing X-Linked Dominant Spastic Paraplegia Type 2. *Pediatr Neurol*. 2013; 49: 477-481.
13. Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. *JIMD Rep*. 2013 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID:
14. Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology* (Oxford). 2013 Dec 3. [Rheumatology (Oxford). 2013 Dec 3. [Epub ahead of print]
15. Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H. Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. *Pediatr Radiol*. 2014 Jan 14. [Epub ahead of print]

## 2. 学会発表

全脊髄炎を呈し、重度の後遺症を残した急性散在性脳脊髄炎の一例

大城亜希子 1)、高木真理子 1)、安西理恵 1)、奥田美津子 1)、高野亨子 1)、和田敬仁 1)、井合瑞江 1)、山下純正 1)、小坂仁 1)、相田典子 2) 1) 神奈川県立こども医療センター神経内科 2) 放射線科 日本小児神経学会関東地方会 (第 58 回) 平成 25 年 3 月 9 日、東京医科大学病院(東京)

第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome

Kazuyuki Nakamura, 1, 2 Mitsuhiro Kato, 1 Hitoshi Osaka, 3 Sumimasa Yamashita, 3 Eiji Nakagawa, 4 Kazuhiro Haginoya, 5 Jun Tohyama, 6 Mitsuko Okuda, 3 Takahito Wada, 3 Shuichi Shimakawa, 7 Katsumi Imai, 8 Saoko Takeshita, 9 Masaharu Ohfu, 10 Kiyoshi Hayasaka, 1 Hiroto



Saitsu2 English Session 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

COL4A1 変異の臨床病型の広がり: 孔脳症から裂脳症まで

萩野谷和裕、加藤光広、小坂仁、横地健治、荒井洋、和田敬仁、小山典久、近藤典子、高橋悟、平林伸一、平井聡里、才津浩智

拓桃医療療育センター小児科、山形大学小児科、神奈川県立こども医療センター神経内科、聖隷三方原病院小児神経科、森ノ宮病院小児神経科、豊橋市民病院小児科、鳥取大学脳神経小児科、旭川医科大学小児科、長野県立こども病院神経科、横浜市立大学大学院遺伝学

第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

A rapid screening for the genetic diagnosis of Leigh syndrome.

Hitoshi Osaka<sup>1</sup>, Mariko Takagi<sup>1</sup>, Mitsuko Okuda<sup>1</sup>, Rie Anzai<sup>1</sup>, Takahito Wada<sup>1</sup>, Kyoko Takano<sup>1</sup>, Mizue Iai<sup>1</sup>, Sumimasa Yamashita<sup>1</sup>, Kei Murayama<sup>2</sup>, Akira Ohtake<sup>3</sup>

Division of Neurology<sup>1</sup>, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, 232-8555, Japan, Department of Metabolism<sup>2</sup>, Chiba Children's Hospital, Chiba 266-0007, Japan, Department of Pediatrics<sup>3</sup>, Faculty of Medicine, Saitama Medical University, Saitama 350-0495, Japan. English Session 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

生後 4 カ月に発症し急速な退行を示した vanishing white matter disease の 1 例

神奈川県立こども医療センター神経内科 高野亨子、高木真理子、奥田美津子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁

横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

m.3697G>A/ND1 変異を認めた Leigh 症候群の 2 症例

高木真理子、高野亨子、奥田美津子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁

神奈川県立こども医療センター神経内科第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

次世代シーケンサーを用いた小児神経疾患の

ターゲットシーケンス解析のワークフロー

黒田 友紀子<sup>1</sup>、大橋 育子<sup>1</sup>、高野 亨子<sup>2</sup>、和田 敬仁<sup>2</sup>、松井 潔<sup>3</sup>、小坂 仁<sup>2</sup>、黒澤 健司<sup>1</sup>

1. 神奈川県立こども医療センター遺伝科 2. 神奈川県立こども医療センター神経内科 3. 神奈川県立こども医療センター総合診療科第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

ATG > AGG (開始コドン)の変異で軽症の表現型を示した Pelizaeus-Merzbacher 病の一男児例

山本亜矢子、大城亜希子、安西里恵、高木真理子、奥田美津子、新保裕子、高野亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂 仁 神奈川県立こども医療センター 神経内科 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

小児期発症の脊髄小脳変性症: レビューと鑑別診断 シンポジウム 2DNA 修復障害と神経変性

小坂 仁 神奈川県立こども医療センター神経内科 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

ポーランドメービウス症候群の神経病理 血管障害との関連においてー

山下純正、和田敬仁、小坂仁 神奈川県立こども医療センター神経内科 柴崎淳 新生児科 松井潔 総合診療科第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

日内変動のあるジストニアを認め、遺伝子解析で瀨川病と診断した 9 歳女児例

奥田美津子、安西、高木真理子、高野亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂 仁、新宅治夫 神奈川県立こども医療センター 神経内科 大阪市立大学小児科第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

EPI-743 を使用した Leigh 症候群 (ND3; m10158T>C) の 1 例

小坂 仁<sup>1</sup>、高木真理子<sup>1</sup>、村山圭<sup>2</sup>、大竹明<sup>3</sup> 神奈川県立こども医療センター神経内科 1、千葉県こども病院代謝科 2 埼玉医科大学小児科 3 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究 平成 24 年度第 2 回班会議東京国際フォーラム 2013.2.10

ネマリンミオパチーの新規原因遺伝子 KLHL40 の同定

宮武 聡子(みやたけ さとこ)1、奥水 江里子1、林 由起子2、Gianina Ravenscroft3、三宅 紀子1、土井 宏1、鶴崎 美德1、才津 浩智1、小坂 仁4、山下 純正4、大宅 喬5、増澤 祐子6、今村 伸太郎7、山下 倫明7、椎名 政昭8、緒方 一博8、西野 一三2、Nigel Laing3、松本 直通1

1 横浜市立大学 大学院医学研究科 遺伝学、2 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部、3 ウェスタンオーストラリア大学、4 神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター神経内科、5 横浜市立みなと赤十字病院小児科、6 横浜市立大学附属市民総合医療センター、7 水産総合研究センター中央水産研究所、8 横浜市立大学大学院医学研究科生化学

日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

小児期に小脳萎縮を呈する疾患における全エクソーム解析による遺伝子診断

大場 ちひろ1,2、小坂 仁3、井合 瑞江3、山下 純正3、鈴木 ゆめ2、相田 典子4、土井 宏2、富田 敦子2、西山 精視1、鶴崎 美德1、中島 光子1、三宅 紀子1、田中 章景2、松本 直通1、才津 浩智11 横浜市立大学 大学院医学研究科 遺伝学、2 横浜市立大学 大学院医学研究科 神経内科・脳卒中科、3 神奈川県立こども医療センター 神経内科、4 神奈川県立こども医療センター 放射線科日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

3 量体G タンパク質G o サブユニットをコードするGNAO1 のde novo 変異はてんかん性脳症を引き起こす 小寺 啓文1、中村 和幸1,2、秋田 天平3、椎名 政昭4、加藤 光広2、星野 英紀5、寺嶋 宙5、小坂 仁6、中村 真一7、遠山 潤8、熊田 竜郎3、古川 智範3、岩田 暁美3、椎原 隆2,9、久保田 雅也5、早坂 清2、緒方 一博4、福田 敦夫3、松本 直通1、才津 浩智1

1 横浜市立大学 医学部 遺伝学、2 山形大学 医学部 小児科、3 浜松医科大学 医学部 神経生理学講座、4 横浜市立大学大学院 医学研究科生化学教室、5 国立成育医療研究センター 神経内科、6 神奈川県立こども医療センター 神経内科、7 長野赤十字病院 小児科、8 国立病院機構

西新潟中央病院 てんかんセンター小児科、9 群馬県立小児医療センター 神経内科

日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

ケトン血症を伴うLeigh 脳症兄弟例のエクソーム解析

今川 英里1、小坂 仁2、山下 暁朗3、椎名 政昭4、高橋 英彦5、杉江 秀夫6、中島 光子1、鶴崎 美德1、才津 浩智1、緒方 一博4、松本 直通1、三宅 紀子1

1 横浜市立大学 大学院医学研究科 遺伝学教室、2 神奈川県立こども医療センター 神経内科、3 横浜市立大学 大学院医学研究科 分子細胞生物学教室、4 横浜市立大学 大学院医学研究科生化学教室、5 神奈川県立こども医療センター 感染免疫科、6 自治医科大学 小児科

日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

クレアチントランスポーター欠損症5家系の分子遺伝学的検討

和田 敬仁1、立川 正憲2、伊藤 慎悟3、大槻 純男3、新保 裕子4、小坂 仁4

1 京都大学大学院医学研究科 医療倫理学・遺伝医療学分野、2 東北大学大学院薬学研究科 薬学微生物学分野、3 熊本大学大学院生命科学研究部 薬学微生物学分野、4 神奈川県立こども医療センター 神経内科 日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

14q12 欠失症候群の1例 高野 亨子1、小坂 仁1、大橋 育子2、黒田 友紀子2、黒澤 健司2、相田 典子3、村山 圭4 1 神奈川県立こども医療センター 神経内科、2 神奈川県立こども医療センター 遺伝科、3 神奈川県立こども医療センター 放射線科、4 千葉県こども病院 代謝科 日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

小坂 仁 特別講演；小児期神経疾患の治療を目指して 第216回日本小児科学会宮城地方会 2013(平成25)年11月9日(土) 12時 仙台

H. 知的所有権の取得状況；なし

平成25年度厚生科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）  
分担研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究  
分担研究課題：広汎性発達障害の遺伝子解析による病態解明研究

研究分担者 橋本 亮太

大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学・千葉大学・福井大学連合小児発達学研究所  
附属子どものこころの分子統御機構研究センター 准教授

### 研究要旨

広汎性発達障害は、自閉性障害やアスペルガー障害などの自閉症スペクトラム障害を指し、環境因子と遺伝因子による多因子疾患と考えられている。広汎性発達障害の一卵性双生児の一致率は60～90%、遺伝率が90%とされており、統合失調症などの他の精神疾患と比較して、遺伝因子の関与が非常に大きい。今までに、いくつかの遺伝子が広汎性発達障害の原因遺伝子として報告されている。最近、広汎性発達障害において、De novo(新規)のCNV (copy number variation: コピー数変異) やSNV(single nucleotide variant)が、その原因となっていることが報告されている。そこで、本研究においては、孤発例の広汎性発達障害患者30例について、De novoのSNVの検討を行う。広汎性発達障害患者30例について、エクソーム解析を行い、次に両親のゲノムサンプルも用いてde novoの検証を行ったところ、de novoのSNVが見出された。今後、これらのde novoのSNVについて、サンガーシーケンスにより、確認を行う必要があるが、日本人広汎性発達障害患者においてde novoのSNVの報告はなく、このSNVの病的意義については、今後の検討を必要とするが、広汎性発達障害の病態の解明に役立つ知見であると考えられる。

### A. 研究目的

広汎性発達障害は、自閉性障害やアスペルガー障害などの自閉症スペクトラム障害を指し、環境因子と遺伝因子による多因子疾患と考えられている。広汎性発達障害の一卵性双生児の一致率は60～90%、遺伝率が90%とされており、統合失調症などの他の精神疾患と比較して、遺伝因子の関与が非常に大きい。

広汎性発達障害の家系研究より、いくつかの候補遺伝子が見出されている。neuroligin3/4(NLGN3/4)遺伝子もその一つである。このうちNLGN3(Arg451Cys)遺伝子の変異はNLGN3タンパク質のプロセッシングを障害することが知られている。また、NLGN4遺伝子の1186insT変異はアミノ酸が欠損した未熟なNLGN4遺伝子を作る。Neuroliginは、興奮性シナプスであるグルタミン酸や、抑制性のGABA系シナプスを編成する上で必須の、後シナプスに存在する細胞接着分子とシナプス前-neurexin(NRXN)と結合し、軸索と連絡する際の機能的前シナプス構造を形成する契機となる。neurexin1(NRXN1)遺伝子の変異も広汎性発達障害患者から発見された。さらに、新規のコピー数多型解析により広汎性発達障害患者のNRXN1-containing遺伝子の領域に欠失が認められた。NRXN1とNLGNの結合体はシナプスを発達させる。また、NLGN3遺伝子の変異はNRXN

との結合を阻害する。NLGNは、同じく広汎性発達障害と関連するSHANK3と結合する。SHANKタンパク質は、シナプス形成と樹状突起の成熟に關与する。SHANK3遺伝子を含む遺伝子部位の欠失・転座やSHANK3遺伝子の新規の変異が広汎性発達障害で見出されている。

家族研究ではMorrowらが広汎性発達障害とsodium/hydrogen exchanger 9(NHE9)遺伝子の変異との関連を報告している。NHE9遺伝子は、膜のイオン流入を制御する分子の一つである。一方、広汎性発達障害の一つであるRett症候群は、女性患者の80%において、methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) 遺伝子のde novo変異が認められる。MeCP2はメチル化CpGジヌクレオチドと結合する翻訳抑制体であり、通常はヒストンジアセチラーゼ1やクロマチンの抑制に關与するタンパク質を誘導する。

今まではこのような家系研究がおこなわれてきたが、近年、広汎性発達障害の孤発例においてde novoのSNVがその発症の原因となっていることが示唆されている。海外の研究グループは、200例の孤発例広汎性発達障害とその両親のエクソーム解析を行い、その結果、多数のde novoのSNVを見出した。その上、少数ではあるがPOGZなどの遺伝子においては、複数の家族においてde novoのmutationが見出され、新

た原因遺伝子として注目を浴びている。

本年度は、孤発性の広汎性発達障害とその両親のサンプルを用いて de novo の SNV の探索を行った。

## B. 研究方法

広汎性発達障害患者 30 例とその両親 60 例において、主任研究者の松本研究室にてエクソームシーケンスを行った。具体的には、SureSelect Human All Exon Kit Ver.4 (51 Mb) (Agilent 社) でエクソームキャプチャーし、HiSeq2000 (Illumina 社) 101 bp ペアエンドリード解析を行った。得られたシーケンスデータは、Novoalign、GATK プログラムを用いて解析し、Annovar プログラムで機能情報 (dbSNP、遺伝子名、SNP functions (missense、nonsense 変異等)、ポジション、アミノ酸置換等) を付与した。コールされてきた全バリエーションは (スプライスサイト ± 2)、以下のように絞り込んだ。Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP) に登録が無いもの、Exome Sequencing Project (ESP、欧米のエキソームシーケンスデータベース) に登録が無いもの <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>、松本研究室で既に蓄積されている In-house データベースに登録が無いもの。そして、最後に、両親のデータを用いて、de novo であることを検証した。本研究は、大阪大学倫理審査委員会と横浜市立大学倫理審査委員会の承認に基づいて行われた。

### (倫理面への配慮)

本研究は、精神疾患患者を対象とした遺伝子解析研究である。試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、研究施設での倫理委員会において承認を受けた上で研究を行った。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報の厳重な管理 (匿名化) などを徹底させた。また、遺伝子解析研究においては、大阪大学倫理審査委員会において承認を受けている。

本研究の説明を行う過程や試料等提供の過程で、強制的な態度や同意の強要をしないことはいままでのない。試料提供の依頼を拒否したからといって、診療行為等に不合理または不公平なことが行われることは全

くない。また、同意はいつでも文書によって撤回することができ、その場合、試料等は廃棄される。治療中の患者様に関しては、試料提供を依頼することが主治医によって不適切であると判断された場合は、試料提供の依頼は行わない。措置入院している患者様は対象から除外する。

## C. 研究結果

広汎性発達障害 30 例中、25 例において、de novo の SNV が見出された。25 例における de novo の SNV の合計は、55 であり、一例あたりの平均値は、2.2 であった。55 個の SNV のうち、segmental duplication にある SNV が 3 つあり、これらの信頼性は低いと考えられた。この 3 つを除いた 52 個の SNV のうち、9 個が synonymous であり、機能的な変異である可能性が低いと考えられたが、残りの 43 個については、ナンセンス変異を 3 つ含んでおり、機能的な変異であることが期待された。

## D. 考察

広汎性発達障害患者の De novo の SNV の検索を行い、30 例中、25 例において SNV が認められ、一例あたりの数は 2.2 個であった。日本人における広汎性発達障害の de novo の SNV についての検討は未だなされておらず、評価できる結果である。但し、これらの SNV はサンガーシーケンス等によって、確認を行わなければ、真の SNV とは言えず、今後、確認作業を行うことが必須である。さらに、今回見出された SNV 候補の中で、重複したものは認められなかった。単独の家族において認められる場合には、疾患との関連におけるエビデンスが弱く、注意すべき点であると考えられる。その一方で、今回見出された遺伝子のうち、一つが海外の研究において見出された遺伝子と一致するものであった。複数の de novo 変異が見つかることは、偶然とは考えにくく、広汎性発達障害の遺伝子と考えられる。今後、さらなる検討により広汎性発達障害の病態解明につながることを期待される。

## E. 結論

我々は、ヒト発達障害研究に不可欠な発達障害患者を精神医療現場で診療しつつ、研究への同意を取得し、研究参加していただくシステムの構築に成功している。そして、孤発性の広汎性発達障害において、de novo の SNV の検討を行った。これらの結果は、新たな

診断・治療法のシーズと考えられる。このように本研究は、医療行政上、大変有意義であり、国民の保健・精神医療において多大なる貢献ができると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujino H, Sumiyoshi C, Sumiyoshi T, Yasuda Y, Yamamori H, Ohi K, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Higuchi A, Hibi Y, Matsuura Y, Hashimoto R, Takeda M, Imura O. Performance on the Wechsler Adult Intelligence Scale-Third Edition in Japanese patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* (in press)
- 2) Haba R, Shintani N, Onaka Y, Kanoh T, Wang H, Takenaga R, Hayata A, Hirai H, Nagata K, Nakamura M, Kasai A, Hashimoto R, Nagayasu K, Nakazawa T, Hashimoto H, Baba A. Central CRTH2, a second prostaglandin D2 receptor, mediates emotional impairment in the lipopolysaccharide and tumor-induced sickness behavior model. *The Journal of Neuroscience* (in press)
- 3) Horiguchi M, Ohi K, Hashimoto R, Hao Q, Yasuda Y, Yamamori H, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Takeda M, Ichinose H. A functional polymorphism (C-824T) of the tyrosine hydroxylase gene affects intelligence quotient in schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* (in press)
- 4) Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Silvermama M, Kimura N, Satoa M, Saito Y, Suzuki T, Yanagida K, Kodama T, Tanaka T, Okochi M, Tagami , Kazui H, Kudo T, Hashimoto R, Itoh N, Nishitomi K, Kabata-Yamagichi Y, Tsunoda T, Takamura H, Katayama T, Kimura R, Kamino K, Hashizume Y, Takeda M. Transcriptome analysis of distinct mouse strains reveals kinesin light chain-1 splicing as an amyloid beta accumulation modifier. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (in press)
- 5) Nishi A, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Kikuchi K, Shimodera S, Tomotake M, Ohi K, Hashimoto R, Imoto I, Takeda M, Ohmori T. Meta-analyses of blood homocysteine levels for gender and genetic association studies of the MTHFR C677T polymorphism in schizophrenia, *Schizophrenia Bulletin* (in press)
- 6) Fukumoto M, Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Yamamori H, Umeda-Yano S, Iwase M, Kazui H, Takeda M. Relationship between remission status and attention in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* (in press)
- 7) Nakai K, Nakae A, Hashimoto R, Mashimo T, Hosokawa K. Antinociceptive effects of mirtazapine, pregabalin, and gabapentin after chronic constriction injury of the infraorbital nerve in rats. *Journal of Orofacial Pain* (in press)
- 8) Miyashita M, Arai M, Yuzawa H, Ichikawa T, Nohara I, Arai M, Obata N, Toriumi K, Kobori A, Niizato K, Ooshima K, Kushima I, Hashimoto R, Fukumoto M, Koike S, Toyota T, Ujike H, Arinami T, Kasai K, Takeda M, Ozaki N, Okazaki Y, Yoshikawa T, Amano N, Miyata T, Itokawa M. Replication of enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* (in press)
- 9) Kitaichi Y, Hashimoto R, Inoue T, Abekawa T, Kakuta A, Hattori S, Koyama T. Abnormalities in extracellular glycine and glutamate levels in the striatum of sandy mice. *Acta Neuropsychiatrica* (in press)
- 10) Toriumi K, Kondo M, Nagai T, Hashimoto R, Ohi K, Song Z, Tanaka J, Mouri A, Koseki T, Yamamori H, Furukawa-Hibi Y, Mamiya T, Fukushima T, Takeda M, Nitta A, Yamada K, Nabeshima T. Deletion of SHATI/NAT8L increases dopamine D1 receptor on the cell surface in the nucleus accumbens, accelerating methamphetamine dependence. *Int J Neuropsychopharmacol, Neuropsychopharmacol.* 17:443-453, 2014.1
- 11) Watanabe Y, Iijima Y, Egawa J, Nunokawa A, Kaneko N, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N, Kunugi H, Itokawa M, Sasaki T, Ozaki N, Hashimoto R, Shibuya M, Igeta H, Someya T. Replication in a Japanese population that a MIR30E gene variation is associated with schizophrenia. *Schizophr Res*, 150(2-3):596-7, 2013.11
- 12) Yamamori H, Hashimoto R, Ishima T, Kishi F, Yasuda Y, Ohi K, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Ito A, Hashimoto K, Takeda M. Plasma levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in

- treatment-resistant schizophrenia treated with clozapine. *Neurosci Lett*, 556(2013):37-41, 2013.11
- 13) Ohi K, **Hashimoto R**, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Umeda-Yano S, Fujimoto M, Iwase M, Kazui H, Takeda M. Influence of the NRG1 gene on intellectual ability in schizophrenia. *Journal of Human Genetics*, 58(10):700-5, 2013.10
  - 14) Kanazawa T, Ikeda M, Glatt S.J, Tsutsumi A, Kikuyama H, Kawamura Y, Nishida N, Miyagawa T, **Hashimoto R**, Takeda M, Sasaki T, Tokunaga K, Koh J, Iwata N, Yoneda H. Genome-Wide Association Study of Atypical Psychosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatry Genet*, 162(7):679-86, 2013.10
  - 15) Ohi K, **Hashimoto R**, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Fukunaga M, Watanabe Y, Iwase M, Kazui H, Takeda M. The impact of the genome-wide supported variant in the cyclin M2 gene on gray matter morphology in schizophrenia. *Behavioral and Brain Functions*, 9(1):40, 2013.10
  - 16) Seo S, Takayama K, Uno K, Ohi K, **Hashimoto R**, Nishizawa D, Ikeda K, Miyamoto Y, Ozaki N, Nabeshima T, Nitta A. Functional analysis of deep intronic SNP rs13438494 in intron 24 of PCL0 gene. *PLoS One*, 8(10): e76960, 2013.10
  - 17) Ohi K, **Hashimoto R**, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Nakatani N, Kamino K, Takeda M. How to diagnose the 22q11.2 deletion syndrome in patients with schizophrenia: a case report. *Annals of General Psychiatry*, 12(1):29, 2013.9
  - 18) Ikeda M, Okahisa Y, Aleksic B, Won M, Kondo N, Naruse N, Aoyama-Uehara K, Sora I, Iyo M, **Hashimoto R**, Kawamura Y, Nishida N, Miyagawa T, Takeda M, Sasaki T, Tokunaga K, Ozaki N, Ujike H, Iwata N. Evidence for shared genetic risk between methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 38(10):1864-70, 2013.9
  - 19) Furukawa M, Tochigi M, Otowa T, Arinami T, Inada T, Ujike H, Watanabe Y, Iwata N, Itokawa M, Kunugi H, **Hashimoto R**, Ozaki N, Kakiuchi C, Kasai K, Sasaki T, An association analysis of the cardiomyopathy-associated 5(CMYA5) gene with schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatr Genet*, 23(4):179-180, 2013.8
  - 20) **Hashimoto R**, Ikeda M, Ohi K, Yasuda Y, Yamamori H, Fukumoto M, Umeda-Yano S, Dickinson D, Aleksic B, Iwase M, Kazui H, Ozaki N, Weinberger DR, Iwata N, Takeda M. Genome-wide association study of cognitive decline in schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 170(6):683-684, 2013.6
  - 21) Manchia M, Adli M, Akula N, Arda R, Aubry J.M., Backlund L, Banzato C, Baune B, Bellivier F, Bengeser S, Biernacka J, Brichant-Petitjean C, Bui E, Calkin C, Cheng A, Chillotti C, Cichon S, Clark S, Czerski P, Dantas C, Zompo M, DePaulo J, Detera-Wadleigh S, Etain B, Falkai P, Frisen L, Frye M, Fullerton J, Gard S, Garnham J, Goes F, Grof P, Gruber O, **Hashimoto R**, Hauser J, Heilbronner U, Hobann R, Hou L, Jamain S, Kahn J, Kassem L, Kato T, Kelsoe J, Kittel-Schneider S, Kliwicky S, Kuo P, Kusumi I, Laje G, Lavebratt C, Leboyer M, Leckband S, Jaaramillo C, Maj M, Malafosse A, Martinsson L, Masui T, Mitchell P, Mondimore F, Monteleone P, Nallet A, Neuner M, Novak T, O'Donovan C, Osby U, Ozaki N, Perlis R, Pfennig A, Potash J, Reich-Erkelenz D, Reif A, Reininghaus E, Richardson S, Rouleau G, Rybakowski J, Schalling M, Schofield P, Schubert O, Schweizer B, Seemuller F, Grigoriou-Serbanescu M, Severino G, Seymour L, Slaney C, Smoller J, Squassina A, Stamm T, Steele J, Stopkova P, Tighe S, Tortorella A, Turecki G, Wray N, Wright A, Zandi P, Zilles D, Bauer M, Rietschel M, McMahon F, Schulze T, Alda M. Assessment of Response to Lithium maintenance Treatment in Bipolar Disorder: A Consortium on Lithium Genetics (ConLiGen) Report, *PLoS One*, 8(6): e65636, 2013.6
  - 22) Aleksic B., Kushima I, **Hashimoto R**, Ohi K, Ikeda M, Yoshimi A, Nakamura Y, Ito Y, Okochi T, Fukuo Y, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Ujike H, Suzuki M, Inada T, Takeda M, Kaibuchi K, Iwata N, Ozaki N. Analysis of the VAV3 as candidate gene for schizophrenia: evidences from voxel based morphometry and mutation screening. *Schizophrenia Bulletin*. 39(3):720-8, 2013.5
  - 23) Umeda-Yano S, **Hashimoto R**, Yamamori H, Okada T, Yasuda Y, Ohi K, Fukumoto M, Ito A, Takeda M. The regulation of gene expression involved in TGF-

signaling by ZNF804A, a risk gene for schizophrenia. *Schizophr Res*, 146(1-3):273-8, 2013.5

## 2. 学会発表

- 1) **Hashimoto R**, Ikeda M, Yamashita F, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Fukunaga M, Nemoto K, Kasai K, Ozaki N, Iwata N, Takeda M. Genome-wide association study of superior frontal volumes in schizophrenia. 2013 American College of Neuropharmacology(ACNP), Florida,U.S.A., 12.8-12(11),2013. Poster
- 2) Iwata R, Ohi K, Matsukawa H, Kobayashi Y, Masuda A, Mizuno H, Iwama M, Goto D, Yasuda Y, Yamamori H, Tanaka M, **Hashimoto R**, Itohara S, Iwasato T. RacGAP 2-chimaerin regulates spine morphogenesis during development to establish normal hippocampus-dependent learning in adulthood, *Neuroscience2013*, San Diego, 11.9-13(9), 2013. Poster
- 3) Miki K, **Hashimoto R**, Shi K, Yukioka M. Treatment of Fibromyalgia and Chronic pain syndrome Using Neurotrophin (a preparation containing a non-protein extract isolated from the inflamed cutaneous tissue of rabbits inoculated with vaccinia virus). ACR/ARHP Annual Meeting 2013, San Diego, U.S.A. 10.25-30(28),2013. Poster
- 4) **Hashimoto R**, Ikeda M, Ohi K, Yasuda Y, Yamamori H, Umeda-Yano S, Dickinson D, Ozaki N, Weinberger DR, Iwata N, Takeda M. Genome-wide association study of cognitive decline in schizophrenia, 21st World Congress of Psychiatric Geneticsposter, Boston, USA, 10.17-21(18), 2013. Poster
- 5) Ohi K, **Hashimoto R**, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Fukunaga M, Iwase M, Kazui H, Takeda M. The impact of the genome-wide supported variant in the CNM2 gene on gray matter morphology in schizophrenia. 21st World Congress of Psychiatric Geneticsposter, Boston, USA, 10.17-21(18), 2013. Poster
- 6) Saito T, Ikeda M, Kondo K, Okahisa Y, Hishimoto A, Ohnuma T, Hirose Y, **Hashimoto R**, Ozaki N, Iwata N, Pharmacogenomic study for Lamotrigine-induced cutaneous adverse drug reactions. 21st World Congress of Psychiatric Geneticsposter, Boston, USA, 10.17-21(18), 2013. poster
- 7) **Hashimoto R**, Ohi K, Yasuda Y, Yamamori H, Fukumoto M, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Ikeda M, Iwata N, Takeda M. The Japanese Human Brain Phenotype Consortium: Intermediate phenotype studies in neuropsychiatric diseases. Japanese-German Neuroscience Research Network Focusing on Psychosis Session, The 3rd Japanese ? German University Presidents ' Conference 2013(HeKKSaGOn Presidents ' Conference), Gottingen, Germany, 9.12-13(13),2012. Oral
- 8) Fukunaga M, **Hashimoto R**, Watanabe Y, Ohi K, Yamamori H, Fujimoto M, Yasuda Y, Takeda M. Altered frontal brain resting state networks in schizophrenia -A resting state fMRI study. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(24), 2013 . poster
- 9) Yamamori H, **Hashimoto R**, Umeda-Yano S, Weickert CS, Yasuda Y, Ohi K, Fujimoto M, Ito A, Takeda M. Expression analysis of the genes identified by GWAS in postmortem brain tissues from schizophrenia. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(24), 2013. poster
- 10) Kanazawa T, Ikeda M, Glatt S, Tsutsumi A, Kikuyama H, Moritani M, **Hashimoto R**, Sasaki T, Takeda M, Koh J, Iwata N, Yoneda H. Genome-wide association study of atypical psychosis. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(25), 2013. oral
- 11) Kitazawa M, Ohnuma T, takebayashi Y, Aleksic B, Ikeda M, **Hashimoto R**, Iwata N, Ozaki N, Takeda M, Arai H. No association found between the genes situated at 6p22.1 HIST1H2BJ, PRSS16, and PGBD1 in Japanese patients diagnosed with schizophrenia. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(25), 2013. poster
- 12) Ohi K, **Hashimoto R**, Yasuda Y, Nemoto K, Ohnishi T, Fujimoto M, Yamamori H, Umeda-Yano S, Iwase M, Kazui H, Takeda M. Impacts of the genome-wide association mega-analysis supported variants on brain morphology in schizophrenia; a comprehensive VBM analysis. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(26),

2013. oral
- 13) Saito T, Ikeda M, Kondo K, Okahisa Y, Hiishimoto A, Ohnuma T, Hirose Y, Hashimoto R, Ozaki N, Iwata N. Pharmacogenomic study(PGx) for Lamotrigine-induced cutaneous adverse drug reactions. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(26), 2013. poster
  - 14) Yasuda Y, Hashimoto R, Ohi K, Yamamori H, Fukumoto M, Fujimoto M, Takeda M. Impaired cognitive flexibility in Japanese patients with Autism Spectrum Disorders in the Wisconsin Card Sorting Test. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(26), 2013. poster
  - 15) Iwase M, Azechi M, Takahashi H, Aoki Y, Ikeda S, Hata M, Ishii R, Kazui H, Ohi K, Yasuda Y, Hashimoto R, Takeda M, Yamamori H. Tissue oxygen index of NIRS forehead signals during performing frontal lobe tasks in schizophrenia. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(26), 2013. poster
  - 16) Iwase M, Azechi M, Takahashi H, Aoki Y, Ikeda S, Hata M, Ishii R, Kazui H, Yamamori H, Ohi K, Fujimoto M, Yasuda Y, Hashimoto R. Forehead NIRS signals during Sternberg's task in schizophrenia. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(26), 2013. poster
  - 17) Nemoto K, Yamashita F, Ohnishi T, Yamasue H, Yahata N, Takahashi T, Fukunaga M, Ohi K, Hashimoto R, Suzuki M, Kasai K, Asada T. Developing a computer aided diagnosis tool of schizophrenia using voxel-based morphometry. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(27), 2013. poster
  - 18) Fujimoto M, Hashimoto R, Miura K, Yamamori H, Yasuda Y, Ohi K, Umeda-Yano S, Takeda M. Eye movement abnormalities in patients with schizophrenia. 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(27), 2013. poster
  - 19) Hashimoto R. Ohi K, Yasuda Y, Yamamori H, Fukumoto M, Fujimoto M, Umeda-Yano S, Ikeda M, Iwata N, Takeda M. The Japanese Human Brain Phenotype Consortium: Intermediate phenotype studies in schizophrenia. Symposium 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto, 6.23-27(27), 2013. invited speaker
  - 20) Nakai K, Nakae A, Hashimoto R, Mashimo T, Hosokawa K. Effects of intrathecal administration of atypical antipsychotics in a rat model of trigeminal neuropathic pain. Euroanaesthesia 2013, Barcelona, Spain. 6.1-4(2), 2013. Poster
  - 21) Watanabe Y, Tanaka H, Tsukabe A, Kunitomi Y, Nishizawa M, Hashimoto R, Fukunaga M, Tomiyama N. Neuromelanin magnetic resonance imaging of substantia nigra and locus ceruleus in patients with schizophrenia and healthy subjects. 2013 American society of neuroradiology ASNR 51st Annual Meeting & The Foundation of the ASNR, Symposium, San Diego, U.S.A., 5.18-23(22), 2013. Poster
  - 22) **橋本亮太**, 統合失調症患者専門外来と治療抵抗性統合失調症への果てなき挑戦、統合失調症 Web Evening Seminar、大阪、1.23, 2014 講演
  - 23) **橋本亮太**, 治療抵抗性統合失調症への果てなき挑戦：治療のゴールはどこにあるのか？、大日本住友製薬 Q's 研究所講演会「統合失調症を再考する」、徳島、1.17, 2014 講演
  - 24) 三木健司、史賢林、**橋本亮太**、行岡正雄、リウマチ類縁疾患と線維筋痛症、第 28 回日本臨床リウマチ学会、千葉、11.30-12.1, 2013 教育講演
  - 25) **橋本亮太**, 座長、ワークショップ4「クロザピンの臨床」、第 26 回日本総合病院精神医学会総会、11.29-30(30), 2013
  - 26) **橋本亮太**, 治療抵抗性統合失調症への果てなき挑戦：臨床現場から最先端研究まで大分県 Clozapine 講演会、大分、11.22, 2013 講演
  - 27) **橋本亮太**, 司会、第四回脳表現型の分子メカニズム研究会、博多、11.16-17, 2013
  - 28) **橋本亮太**, 慢性疼痛の診断と治療：精神医学的見地から、第 3 回 宮城運動器の痛みを考える会、仙台、2013.11.14 招待講演
  - 29) **橋本亮太**, 山森英長、藤本美智子、安田由華、大井一高、梅田知美、武田雅俊、治療抵抗性統合失調症への果てなき挑戦：治療のゴールはどこにあるのか？、第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会 <CNP+NP> 合同シンポジウム 2「難治性病態の打開に向けて～統合失調症～」、第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会合同年会、沖縄、



- 10.24-26(25),2013. 招待講演
- 30) 沼田周助、木下誠、田嶋敦、下寺信次、**橋本亮太**、井本逸勢、武田雅俊、大森哲郎、治療抵抗性統合失調症のバイオマーカー、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会 合同年会 < CNP+NP > 合同シンポジウム2「難治性病態の打開に向けて～統合失調症～」、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会、沖縄、10.24-26(25),2013. 招待講演
- 31) 山森英長、**橋本亮太**、石間環、岸フク子、安田由華、大井一高、藤本美智子、伊藤彰、橋本謙二、武田雅俊、クロザピン治療を受けた治療抵抗性統合失調症患者血漿中の mature BDNF と MMP-9 の濃度の検討 合同薬理 第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会、沖縄、10.24-26(25),2013. ポスター
- 32) 大井一高、**橋本亮太**、山森英長、安田由華、藤本美智子、梅田知美、福永雅喜、岩瀬真生、数井裕光、武田雅俊、統合失調症における全ゲノム関連メカニズム解析による遺伝子多型の脳構造への影響：包括的 VBM 解析、第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会、沖縄、10.24-26(25),2013. ポスター
- 33) 宇野恭介、徐承姫、松村祥平、大井一高、**橋本亮太**、西澤大輔、池田和隆、酒井規雄、鍋島俊隆、宮本嘉明、新田淳美、精神疾患に関連する PCL0 SNP rs13438494 の分子生物学的検討 第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同年会、沖縄、10.24-26(25),2013. ポスター
- 34) **橋本亮太**、統合失調症専門外来・入院プログラムによる地域医療機関と連携した臨床・教育・研究システム、国立病院機構琉球病院「琉球セミナー」、沖縄、10.23,2013 招待講演
- 35) **橋本亮太**、司会、ポスターセッション P5、第54回日本児童青年精神医学会総会、札幌、10.10-12(10),2013.
- 36) **橋本亮太**、慢性疼痛患者における精神疾患のインパクト -診断から治療まで-、保存的治療を考える会 滋賀、10.5,2013. 招待講演
- 37) **橋本亮太**、線維筋痛症は精神疾患か？シンポジウム1「線維筋痛症の中核群をさぐる」日本線維筋痛症学会第5回学術集会、横浜、10.5-6(5),2013. 招待講演
- 38) **橋本亮太**、座長、「痛みの認知行動療法の基本-うつ病治療の痛みへの展開-」日本線維筋痛症学会第5回学術集会教育セミナー2(ランチョンセミナー)横浜、10.5-6(5),2013.
- 39) 安田由華、**橋本亮太**、大井一高、山森英長、梅田知美、藤本美智子、武田雅俊、自閉症スペクトラム障害を合併した統合失調症のパーソナルゲノム解析、新学術領域研究「脳疾患のゲノム情報」第一回研究班会議、東京、8.3,2013. 口頭
- 40) **橋本亮太**、座長、総合討議-クロザリル治療の5つのポイント、クロザリルワークショップ、大阪、6.28,2013
- 41) **橋本亮太**、大井一高、安田由華、山森英長、梅田知美、藤本美智子、武田雅俊、統合失調症の病態解明研究に必要な疾患概念と定義、理事会企画シンポジウム「統合失調症の分子病態と治療：原因解明と治療法開発の戦略とは」、Neuro 2013、京都 6.20-23(20),2013. 招待講演
- 42) **橋本亮太**、オーガナイザー 理事会企画シンポジウム 統合失調症の分子病態と治療：原因解明と治療法開発の戦略とは Neuro 2013、京都 6.20-23(20),2013.
- 43) 安田由華、**橋本亮太**、大井一高、山森英長、福本素由己、藤本美智子、武田雅俊、日本人の成人自閉症スペクトラム障害患者における WCST を用いた認知の柔軟性の障害の検討、Neuro 2013、京都 6.20-23(20),2013. ポスター
- 44) 梅田知美、**橋本亮太**、山森英長、安田由華、大井一高、藤本美智子、伊藤彰、武田雅俊、神経細胞の分化における統合失調症リスク因子 miR-137 の役割、Neuro 2013、京都 6.20-23(21),2013. ポスター
- 45) 福永雅喜、**橋本亮太**、渡邊嘉之、大井一高、山森英長、藤本美智子、安田由華、武田雅俊、統合失調症における安静時前頭ネットワークの変化 -resting state fMRI 研究、Neuro 2013、京都 6.20-23(21),2013. ポスター
- 46) 宇野恭介、高山佳奈子、徐承姫、大井一高、**橋本亮太**、西澤大輔、池田和隆、酒井規雄、鍋島俊隆、宮本嘉明、新田淳美、セロトニンおよびドパミントランスポーターを過剰発現させた PC12 および HEK293 細胞において、PCL0 の SNP はモノアミン取り込みを制御する、Neuro 2013、京都 6.20-23(21),2013. ポスター
- 47) Yamamori H, **Hashimoto R**, Umeda-Yano S, Weiker CS, Yasuda Y, Ohi K, Fujimoto M, Ito A, Takeda M. Expression analysis of the genes identified by GWAS in postmortem brain tissues from

- schizophrenia. Neuro 2013、京都  
6.20-23(21),2013. ポスター
- 48) Nemoto K, Yamashita F, Ohnishi T, Yamasue H, Yahata N, Takahashi T, Fukunaga M, Ohi K, **Hashimoto R**, Suzuki M, Kasai K, Asada T. Developing a computer aided diagnosis tool of schizophrenia using voxel-based morphometry. Neuro 2013、京都 6.20-23(21),2013. ポスター
- 49) 大井一高、**橋本亮太**、安田由華、根本清貴、大西隆、藤本美智子、山森英長、梅田知美、岩瀬真生、数井裕光、武田雅俊、統合失調症における全ゲノム関連メガ解析による遺伝子多型の脳構造への影響：包括的VBM解析、Neuro 2013、京都 6.20-23(21),2013. ポスター
- 50) 西晃、沼田周助、田嶋敦、木下誠、下寺信次、大井一高、**橋本亮太**、井本逸勢、武田雅俊、大森哲郎、MTHFR 機能多型と統合失調症の遺伝子関連研究、Neuro 2013、京都 6.20-23(22),2013. 口頭
- 51) Prosselkov Pavel、**橋本亮太**、大井一高、武田雅俊、系原重美、NTNG パラログによる認知機能サブドメインの分離、Neuro 2013、京都 6.20-23(22),2013. ポスター
- 52) 岩田亮平、大井一高、松川浩、小林祐樹、増田明、水野秀信、岩間瑞穂、後藤大道、安田由華、山森英長、田中三佳、**橋本亮太**、系原重美、岩里琢治、RacGAP 2-chimaerin regulates developmental spine retraction process to establish normal hippocampus-dependent learning, 第六回 MCCS-Asia シンポジウム、京都、6.19(19), 2013. ポスター
- 53) **橋本亮太**、安田由華、山森英長、大井一高、藤本美智子、福本素由己、梅田知美、武田雅俊、バイオマーカーはどこまで進歩したか、シンポジウム 第109回日本精神神経学会学術総会、福岡、5.23-25(23), 2013. 招待講演
- 54) 須田万理、**橋本亮太**、山森英長、藤野裕士、全静脈麻酔薬を用いて Electroconvulsive Therapy (ECT) 療法を行った場合の成功因子の後方視的検討、日本麻酔科学会第60回学術集会、札幌、5.23~5.25(24),2013. ポスター
- 55) **橋本亮太**、「統合失調症専門外来・入院プログラムによる臨床・教育・研究システムの構築」-大阪大学におけるクロザリル使用経験-、第3回治療抵抗性統合失調症治療研究会、名古屋、5.9, 2013. 特別講演
- 56) 沼田周助、木下誠、田嶋敦、下寺信次、**橋本亮太**、武田雅俊、井本逸勢、大森哲郎、統合失調症における末梢血 DNA メチル化修飾解析研究、第8回日本統合失調症学会、浦河町(北海道)、4.19-20(19),2013. ポスター
- 57) 久島周、アレクシッチ・ブランコ、中村由嘉子、池田匡志、伊東佳人、椎野智子、大河内智、福生泰久、氏家寛、鈴木道雄、稲田俊也、**橋本亮太**、武田雅俊、貝淵弘三、岩田仲生、尾崎紀夫、KALRN, EPHB1 遺伝子のリシーケンス・関連解析と統合失調症の脆弱性への寄与、第8回日本統合失調症学会、浦河町(北海道)、4.19-20(19),2013. ポスター
- 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  
該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
|      |         |           |     |      |     |     |     |

雑誌

| 発表者氏名                             | 論文タイトル名   | 発表誌名                  | 巻号     | ページ       | 出版年  |
|-----------------------------------|---|-----------------------|--------|-----------|------|
| Tsurusaki Y, et al., Matsumoto N. | Exome sequencing identifies an <i>OFDI</i> mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. | Clin Genet            | 83 (2) | 135-144   | 2013 |
| Tsurusaki Y, et al., Matsumoto N. | The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders.   | J Hum Genet           | 58(2)  | 113-115   | 2013 |
| Kondo Y, et al., Matsumoto N.     | Whole-exome sequencing identified a homozygous <i>FBNP4</i> mutation in a family with a condition microphthalmia with limb anomalies-like                                     | Am J Med Genet Part A | 161A   | 1543-1546 | 2013 |
| Miyake N, et al., Matsumoto N.    | Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous <i>UQCRC2</i> mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation.                         | Hum Mut               | 34(3)  | 446-452   | 2013 |
| Saitu H, et al., Matsumoto N.     | <i>De novo</i> mutations in the autophagy gene <i>WDR45</i> cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood.                                     | Nat Genet             | 45(4)  | 445-449   | 2013 |

|  |   |                        |         |             |      |
|--|---|------------------------|---------|-------------|------|
| Kondo Y, et al.,<br>Matsumoto N.               | Pathogenic mutations in two families with congenital cataract identified by whole-exome sequencing.   | Mol Vis                | 19      | 384-389     | 2013 |
| Nakamura K, et al.,<br>Matsumoto N, Saitsu H.  | Clinical spectrum of <i>SCN2A</i> mutations expanding to Ohtahara syndrome.   | Neurology              | 81(11)  | 992-998     | 2013 |
| Koshimizu E, et al.,<br>Matsumoto N.           | Exome sequencing identifies an <i>OFD1</i> mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. | Plos One               | 8(9)    | e74167      | 2013 |
| Nakajima M, et al.,<br>Matsumoto N, et al..    | Mutations in <i>B3GALT6</i> , which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders.                           | Am J Hum Genet         | 92(6)   | 927-934     | 2013 |
| Iida A, et al.,<br>Matsumoto N,<br>Ikegawa S.  | Exome sequencing identifies a novel <i>INPPL1</i> mutation in opsismodysplasia.   | J Hum Genet            | 58(6)   | 391-394     | 2013 |
| Nishiguchi KM,<br>et al., Matsumoto N, et al.  | Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and <i>NEK2</i> as a new disease gene.                                | Proc Natl Acad Sci USA | 110(40) | 16139-16144 | 2013 |
| Kodera H, et al.,<br>Matsumoto N,<br>Saitsu H. | Target capture sequencing for detection of mutations and copy number changes causing early-onset epileptic encephalopathy.  | Epilepsia              | 54(7)   | 1262-1269   | 2013 |

|  |  |                       |          |           |      |
|--|--|-----------------------|----------|-----------|------|
| Ravenscroft G, et al., Matsumoto N*, Laing N (*: co-correspondence and last authros) | Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy.  | Am J Hum Genet        | 93(1)    | 6-18      | 2013 |
| Miyake N, et al., Matsumoto N, Niikawa N.  | MLL2 and KDM6A mutations and their clinical consequences in Kabuki syndrome.   | Am J Med Genet Part A | 161(9)   | 2234-2243 | 2013 |
| Nakamura K, et al., Matsumoto N, Saitu H.  | De novo mutations in GNAO1 encoding a Gα subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy.   | Am J Hum Genet        | 93(3)    | 496-505   | 2013 |
| Kodera H, et al., Matsumoto N, Saitu H.  | De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy.  | Hum Mut               | 34(12)   | 1708-1714 | 2013 |
| Ohba C, et al., Matsumoto N, Saitu H.  | Diagnostic utility of whole exome sequencing in cerebellar atrophy in childhood.   | Neurogenet            | 14 (3-4) | 225-232   | 2013 |
| Gupta VA, et al., Matsumoto N, et al.  | Identification of KLHL41 mutations implicates BTB-Kelch-mediated ubiquitination as an alternate pathway to myofibrillar disruption in nemaline myopathy. | Am J Hum Genet        | 93(6)    | 1108-1117 | 2013 |
| Nakajima J, et al., Matsumoto N, Miyake N.   | A novel homozygous YARS2 mutation causes severe myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia syndrome.  | J Hum Genet           | 58(12)   | 822-824   | 2013 |
| Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T.                            | 109 kb deletion of chromosome 4p16.3 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome  | Am J Med Genet A.     | 161      | 1465-9    | 2013 |

|   |   |                     |     |          |      |
|---|---|---------------------|-----|----------|------|
| Okamoto N, Fujii T, Tanaka J, Saito K, Matsui T, Harada N.  | A clinical study of patients with pericentromeric deletion and duplication within 16p12.2-p11.2   | Am J Med Genet A.   | 164 | 213-9    | 2014 |
| Wada T, Ban H, Matsufuji M, Okamoto N, Enomoto K, Kurosawa K, Aida N.   | Neuroradiologic Features in X-linked $\alpha$ -Thalassemia/Mental Retardation Syndrome.   | Am J Neuroradiology | 34  | 2034-8.  | 2013 |
| Shimada S, Okamoto N, Hirasawa K, Yoshii K, Tani Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T.   | Clinical manifestations of Xq28 functional disorder involving MECP2 in one female and two male patients.  | Am J Med Genet A.   | 161 | 1779-85. | 2013 |
| Shimada S, Okamoto N, Nomura S, Fukui M, Shimakawa S, Sangun N, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T.   | Microdeletions of 5.5 Mb (4q13.2-q13.3) and 4.1 Mb (7p15.3-p21.1) associated with a saethre-chotzen-like phenotype, severe intellectual disability, and autism. | Am J Med Genet A.   | 161 | 2078-83. | 2013 |
| Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T.   | MECP2 duplication syndrome in both genders.   | Brain Dev.          | 35  | 411-9    | 2013 |
| Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. | Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome.  | Am J Hum Genet.     | 93  | 173-80.  | 2013 |

|  |  |                |    |            |       |
|--|--|----------------|----|------------|-------|
| Ichikawa K, Kadoya M, Wada Y, Okamoto N.   | Congenital disorder of glycosylation type Ic: report of a Japanese case.   | Brain Dev.     | 35 | 586-9      | 2013  |
| Mitani T, Aida N, Tomiyasu M, Wada T, Osaka H.   | Transient ischemic attack-like episodes without stroke-like lesions in MELAS.  | Pediatr Radiol | 43 | 1400-1403  | 2013; |
| Anselm I, Azzouz H,(28名) Osaka H, (22名) Mancini GM, Salomons GS.   | Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency.   | J Med Genet    | 50 | 463-472    | 2013  |
| Kato H, Miyake F, Shimbo H, Ohya M, Sugawara H, Aida N, Anzai R, Takagi M, Okuda M, Takano K, Wada T, Iai M, Yamashita S, Osaka H. | Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8. | Brain Dev      | 13 | S0387-7604 | 2013  |
| Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H.   | A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia.  | Pediatr Neurol | 13 | S0887-8994 | 2013  |
| Matsufuji M, Osaka H, Gotoh L, Shimbo H, Takashima S, Inoue K.   | Partial PLP1 Deletion Causing X-Linked Dominant Spastic Paraplegia Type 2.   | Pediatr Neurol | 49 | 477-481    | 2013  |
| Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H.  | A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency.  | JIMD Rep       |    |            | 印刷中   |

|  |  |                              |  |  |            |
|--|--|------------------------------|--|--|------------|
| <p>Abe J, Nakamura K, (14名) Osaka H, (9名) Ichinose H, Heike T.</p> | <p>A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study.</p> | <p>Rheumatology (Oxford)</p> |  |  | <p>印刷中</p> |
| <p>Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H.</p>    | <p>Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction.</p>                              | <p>Pediatr Radiol</p>        |  |  | <p>印刷中</p> |
|  |  |                              |  |  |            |