

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

インプリンティング異常を主徴とする先天異常症候群の遺伝学的臨床的検討

研究分担者 齋藤 伸治  
公立大学法人名古屋市立大学大学院 医学研究科 新生児・小児医学分野 教授

**研究要旨**

15q11-q13のインプリンティングに関連する疾患としてPrader-Willi症候群（PWS）、Angelman症候群（AS）、およびSchaaf-Yang症候群（SYS）の体系的遺伝学的解析を実施した。累計として、PWS疑い173例を解析し、片親性ダイソミー25例、刷り込み変異3例を集積した。AS疑いは190例を解析し、片親性ダイソミー12例、刷り込み変異4例、UBE3A変異31例を集積した。2020年からUBE3Aの解析はかずさDNA研究所に技術移転を行い、解析結果の支援を行った。SYSは全国疫学調査で25名の確定診断例を集積した。その後、全国から8名の解析依頼を受けたが、すべて陰性であった。これらの患者のデータベースを構築し、患者データの蓄積と自然歴の把握を行っている。ASについては私たちの施設で遺伝学的解析を行った110例について遺伝型表現型連関を検討した。その結果、知的障害は全例で認められたが、運動障害や行動学的特徴の存在しない例も存在した。これらの結果から、臨床症状のみでASの診断はできないことが明らかになり、遺伝学的解析の意義が示された。

**A. 研究目的**

インプリンティング異常を主徴とする先天異常症候群の診断及び自然歴・合併症の治験の構築を目的として遺伝学的臨床的解析を行った。私たちは全国からPrader-Willi症候群（PWS）及びAngelman症候群（AS）疑い例の遺伝学的解析を依頼され、長年にわたり提供している。PWSとASとは臨床症状の重なる類縁疾患（Temple症候群、Rett症候群、Pitt-Hopkins症候群、Christianson症候群など）が存在する。特に、新しいインプリンティング疾患であるSchaaf-Yang症候群（SYS）の遺伝学的解析も提供するシステムを構築した。このように、インプリンティング異常を主徴とする先天異常症候群プロトタイプである15q11-q13関連インプリンティング疾患に関して総合的な解析ができるシステムを構築した。本研究では、15q11-q13関連インプリンティング疾患について体系的な遺伝学的診断法を確立し、疾患データベースを構築するとともに、臨床症状の解析を行い、15q11-q13関連インプリンティング疾患および類縁疾患の統括的な理解を推進する。

**B. 研究方法**

PWS及びASの遺伝学的診断はまず、SNURF-SNRPN領域のDNAメチル化テストを実施した。メチル化テストが異常の場合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。PWSではメチル化テスト正常の場合は、MEG3のメチル化解析を行い、Temple症候群を診断した。次にMAGEL2の変異解析を実施した。さらに、染色体マイクロアレイ解析を行った。ASではメチル化テスト正常の場合はUBE3Aの翻訳領域をSanger法で解析した。UBE3Aに変異が同定されなかった場合は、7遺伝子（UBE3A, SLC9A6, TCF4, MBD5, CDKL5, MECP2, FOXG1）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。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

15q11-q13のインプリンティングに関連する疾患としてPWS及びASの体系的遺伝学的解析を実施した。累計として、PWS疑い172例を解析し、片親性ダイソミー24例、刷り込み変異3例を集積した。AS疑いは185例を解析し、片親性ダイソミー10例、刷り込み変異4例、UBE3A変異30例を集積した。PWS疑いの172例中116例（67%）は遺伝学的にはPWSが否定された。その中には、Temple症候群、Schaaf-Yang症候群及び染色体微細欠失症候群が含まれていた。AS疑いの185例中126例（68%）は遺伝学的にASが否定され、その中に、Rett症候群、Pitt-Hopkins症候群、Christianson症候群が含まれていた。これらの患者のデータベースを構築した。

さらに、遺伝学的に診断されたAS患者110名を集積し、遺伝学的診断と臨床症状を検討した。UPDとIDとの区別には両親の検体を用いた多型解析が必要である。しかし、両親の検体が入手できない例も存在したため、本解析ではUPDとIDとを合わせて欠失、UBE3A変異と比較検討を行った。対象患者の年齢は1~45歳（中央値7歳）であった。遺伝学的解析の結果は、欠失28例、UPDもしくはID35例、UBE3A変異47例であった。

知的障害はすべての群で100%にみられた。しかし、失調性運動障害は欠失では90%であったが、UPD/IDでは77%、UBE3A変異では91%であった。歩行の未獲得は欠失で63%、UPD/IDで20%、UBE3Aで31%出会った。てんかんの合併は欠失では100%であったが、UPD/IDでは66%、UBE3A変異では72%であった。また、低色素症は欠失で82%、UPD/IDでは36%、UBE3A変異では52%と欠失が多かった。

### D. 考察

15q11-q13 関連インプリンティング疾患である PWS と AS に加えて SYS の診断支援を確立したことで、15q11-q13 関連インプリンティング疾患全ての診断支援を確立することができた。既に、DNA メチル化テストおよび FISH 法により PWS の 98%程の診断が商業的に可能になっている。AS では DNA メチル化テストと FISH 法では診断率が 80%に止まり、UBE3A 変異解析が必要であった。私たちが開発した AS の次世代シーケンシング解析は 2021 年からかずさ DNA 研究所に技術移転を行うことができた。これにより、AS の 90%以

上が商業的に診断可能になった。しかし、UPD と刷り込み変異を区別するための両親検体を用いた多型解析は保険収載されていないため、一部の症例では研究対応の必要性が残っている点が課題である。

これまで、私たちの研究室で解析した症例はデータベースとして蓄積してきた。しかし、技術移転により商業検査センターで解析がされると、症例データベースの蓄積を行うことができない。稀な遺伝性疾患は症例の蓄積が極めて重要であることを考えると、商業検査センターでの解析は気軽に検査はできるものの、問題点を有しているとも言える。また、私たちのデータベースも維持管理の上では脆弱であり、十分に利用できているとは言えない。安定した希少疾患のレジストリーを構築し、自然歴研究を実施するための支援が急務であると考えます。

AS の遺伝学的群ごとの臨床症状について 110 例のまとめを行った。これまでの報告では欠失例の方が非欠失例よりも臨床症状は重症であることが報告されている。また、UPD および ID は AS としては非典型的であり、肥満の合併が多いことも報告されている。今回の解析では、欠失例の方が UPD/ID もしくは UBE3A 変異例よりも運動障害の合併率が高く、歩行獲得率が低かった。この結果は、欠失例が非欠失例より重症であるとのこれまでの報告と一致する。このように遺伝学的群により臨床症状に違いがあるため、管理を行う上では、遺伝学的群に応じたフォローアップが必要と考えられる。また、少数ではあるが、知的障害以外に AS に特徴的な症状を示さない患者が存在することが示された。古典的には Williams らの報告において知的障害、運動障害、行動学的特徴は全例で存在するとされている。しかし、特に非欠失例では症状の非典型的な例も存在する。したがって、臨床症状だけで AS を否定することはできず、原因不明の知的障害の診断においては、網羅的遺伝学的解析の果たす役割は大きいと考えられる。

AS に対するアンチセンス核酸を用いた治験が米国では既に開始されており、我が国でも実施が計画されている。治療法が開発されれば、適切な診断を早期に実施する意義は格段に高まる。我が国においても AS の診断基準や遺伝学的解析の指針を今回の解析を踏まえて作成していきたいと考えている。

### E. 結論

インプリンティング異常を主徴とする先天異常症候群の遺伝学的臨床的解析のプロトタイプとして 15q11q13 関連インプリンティング疾患（PWS、AS、SYS）の体系的遺伝学的解析を

実施し、患者集積とデータベースの構築を行った。また、AS の遺伝学的臨床的解析を行い、日本人患者における遺伝型臨床型連関を報告した。非典型的な患者が存在することから、遺伝学的診断の必要性が明らかになった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Abe J, Takeda A, Saitoh S. A case of tricuspid atresia with Prader-Willi syndrome. *Pediatr Int*. 2020;62(9):1105-6.
- 2) Hara-Isono K, Matsubara K, Fuke T, Yamazawa K, Satou K, Murakami N, Saitoh S, Nakabayashi K, Hata K, Ogata T, Fukami M, Kagami M. Genome-wide methylation analysis in Silver-Russell syndrome, Temple syndrome, and Prader-Willi syndrome. *Clin Epigenetics*. 2020;12(1):159.
- 3) Ieda D, Negishi Y, Miyamoto T, Johmura Y, Kumamoto N, Kato K, Miyoshi I, Nakanishi M, Ugawa S, Oishi H, Saitoh S. Two mouse models carrying truncating mutations in *Magel2* show distinct phenotypes. *PLoS One*. 2020;15(8):e0237814.
- 4) Kondo Y, Aoyama K, Suzuki H, Hattori A, Hori I, Ito K, Yoshida A, Koroki M, Ueda K, Kosaki K, Saitoh S. De novo 2q36.3q37.1 deletion encompassing *TRIP12* and *NPPC* yields distinct phenotypes. *Hum Genome Var*. 2020;7:19.
- 5) Egawa K, Saitoh S, Asahina N, Shiraiishi H. Short-latency somatosensory-evoked potentials demonstrate cortical dysfunction in patients with Angelman syndrome. *eNeurologicalSci*. 2021;22:100298.
- 6) Egawa K, Saitoh S, Asahina N, Shiraiishi H. Variance in the pathophysiological impact of the hemizyosity of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit genes between Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Brain Dev*. 2021;43(4):521-7.
- 7) Ohashi K, Fukuhara S, Miyachi T, Asai T, Imaeda M, Goto M, Kurokawa Y, Anzai T, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Yamagata T, Saitoh S. Comprehensive Genetic Analysis of Non-syndromic Autism Spectrum Disorder in Clinical Settings. *J Autism Dev Disord*. 2021;51(12):4655-62.
- 8) Ohashi K, Fukuhara S, Miyachi T, Asai T, Imaeda M, Goto M, Kurokawa Y, Anzai T, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Yamagata T, Saitoh S. Comprehensive Genetic Analysis of Non-syndromic Autism Spectrum Disorder in Clinical Settings. *J Autism Dev Disord*. 2021;51(12):4655-62.
- 9) 齋藤伸治. 【小児遺伝子疾患事典】II. 神経・筋疾患 *UBE3A*(関連疾患:Angelman 症候群). *小児科診療*. 2021;84(11):1505-6.
- 10) Mizumoto K, Kato K, Fujinami K, Sugita T, Sugita I, Hattori A, Saitoh S, Ueno S, Tsunoda K, Iwata T, Kondo M. A Japanese boy with Bardet-Biedl syndrome caused by a novel homozygous variant in the *ARL6* gene who was initially diagnosed with retinitis punctata albescens: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2022;101(50):e32161.
- 11) Negishi Y, Kurosawa K, Takano K, Matsubara K, Nishiyama T, Saitoh S. A nationwide survey of Schaaf-Yang syndrome in Japan. *J Hum Genet*. 2022;67(12):735-8.
- 12) Saitoh S. Endosomal Recycling Defects and Neurodevelopmental Disorders. *Cells*. 2022;11(1).
- 13) Takahashi Y, Date H, Oi H, Adachi T, Imanishi N, Kimura E, Takizawa H, Kosugi S, Matsumoto N, Kosaki K, Matsubara Y, IRUD Consortium, Mizusawa H. Six years' accomplishment of the Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases: nationwide project in Japan to discover causes, mechanisms, and cures. *J Hum Genet*. 2022;67(9):505-13.
- 14) Fujimoto M, Nakamura Y, Iwaki T, Sato E, Ieda D, Hattori A, Shiraki A, Mizuno S, Saitoh S. Angelman syndrome with mosaic paternal uniparental disomy suggestive of mitotic nondisjunction. *J Hum Genet*. 2023;68(2):87-90.

### 2. 学会発表

- 1) Nakamura Y, Hosoki K, Ieda, Hori I, Negishi Y, Hattori A, Saitoh S, Mild Phenotypic features associated with non-truncating *UBE3A* mutations in Angelman syndrome., 第 62 回日本小児神経学会学術集会, オンライン, 2020.8, 国内
- 2) 堀いくみ, 宮冬樹, 中島光子, 中村勇治, 家田大輔, 大橋圭, 根岸豊, 服部文子, 安藤直樹, 角田達彦, 才津浩智, 金村米博, 小崎健次郎, 齋藤伸治, 当院でエキソーム解析を実施した小児神経疾患症例の臨床的検討, 第 62 回日本小児神経学会学術集会, オンライン, 2020.8, 国内
- 3) 大橋圭, 川岡奈緒実, 谷合弘子, 三宅紀子, 松本直通, 齋藤伸治, *NAA15* 遺伝子の変異に伴う重度知的発達症ならびに自閉スペクトラム症の男児の一例, 第 63 回日本小児神経学会学術集会, オンライン, 2021.5.27, 国内
- 4) Otsuji S, Kato K, Lequesne CH, Mizuno S, Rio M, Miyatake S, Nishio Y, Matsumoto N, Cormier-Daire V, Saitoh S., Biallelic *VPS35L* pathogenic variants cause 3C/Ritscher-Scintel-like syndrome: Description of two novel cases confirming the pathogenicity and clinical diversity., American Society of Human Genetics Virtual Meeting 2021., USA(web), 2021.10.18-22., 国際

- 5) Fujimoto M, Nakamura Y, Iwaki T, Sato E, Ieda D, Hattori A, Shiraki A, Mizuho S, Saitoh S. , Angelman syndrome with mosaic paternal uniparental disomy caused by mitotic nondisjunction., American Society of Human Genetics Annual Meeting 2022., Los Angels, USA, 2022.10.27, 国際
- 6) 藤本真徳、中村勇治、岩城利彦、佐藤恵美、家田大輔、服部文子、白木杏奈、水野誠司、齋藤伸治, 体細胞分裂での不分離による父性片親性ダイソミーの Angelman 症候群の一例, 第 67 回日本人類遺伝学会 学術集会, パシフィコ横浜, 2022.12.14-17, 国内

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