

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591306
 研究課題名（和文）アンジェルマン及びプラダー・ウィリー症候群の中枢神経機能障害の成因に関する研究
 研究課題名（英文）Pathophysiology of brain dysfunction in Angelman and Prader-Willi syndrome.
 研究代表者
 齋藤 伸治（Saitoh Shinji）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：00281824

研究成果の概要（和文）：アンジェルマン症候群（AS）およびプラダー・ウィリー症候群（PWS）の中枢神経機能障害の成因を明らかにすることを目的に、遺伝学的解析を実施した。AS 168 名、PWS 202 名の遺伝学的解析を行い、AS の 54 名（32.1%）、PWS の 82 名（40.6%）の確定診断を行うことができた。遺伝学的に確定されなかった AS 疑い例の中に、*SLC9A6* 遺伝子変異 1 例および、微細染色体異常 2 例、PWS 疑い例のなかに、微細染色体異常 22 例を同定した。これらの例は AS もしくは PWS と共通した分子経路に変異を持つ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To uncover the pathophysiology underlying brain dysfunction in Angelman syndrome (AS) and Prader-Willi syndrome (PWS), we performed comprehensive genetic analyses on 168 patients with AS and 202 patients with PWS. We identified causative molecular abnormalities in 54 patients (32.1%) for AS and 82 patients (40.6%) for PWS. Furthermore, we identified one patients with a *SLC9A6* mutation 2 patients with submicroscopic chromosomal rearrangements in AS, and 22 patients with submicroscopic chromosomal rearrangements in PWS. These underlying molecular abnormalities should indicate common pathway to cause brain dysfunction in AS and in PWS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

アンジェルマン症候群（AS）およびプラダー・ウィリー症候群（PWS）はともに 15q11-q13 に位置するゲノムインプリンティング遺伝子の機能障害により発症する遺伝性疾患である。どちらも精神遅滞を中心とする中枢神

経機能障害が主たる症状であり、そのため、精神遅滞の疾病モデルを形成している。AS は精神遅滞以外に、てんかん、失調性運動障害を伴っている。それに対して、PWS は新生児期の筋緊張低下、乳児期以降の食欲亢進と肥満を特徴とする。従って、精神遅滞以外に、

てんかんや遺伝性肥満のよいモデルである。

AS と PWS は原因遺伝子の発現調整に領域単位の調整機構であるゲノムインプリンティングが重要な役割を果たしている。ゲノムインプリンティングは遺伝子配列によらない、エピジェネティクスによる遺伝子調整機構の重要なモデルである。したがって、AS と PWS はエピジェネティクスによる遺伝子調整機構と中枢神経機能障害の関連を研究する貴重なモデルである。

私たちはこれまでの研究実績により、体系的な遺伝学的解析方法を構築してきた。新たに来意遺伝学的解析を加えることで、さらに詳細に遺伝学的背景の同定が期待できる。同時に、患者を対象として脳機能検査が実施できることで、モデル動物では得られない、生体情報を得ることができる。これらの遺伝学的解析と脳機能解析を組み合わせることで、中枢神経機能障害のメカニズムを明らかにすることができる点が、AS および PWS 研究の特別な意義を形成している。

私たちが AS 患者を対象として行った先行研究 (Egawa et al., Neuroimage 2008; Asahina et al., J Pediatr 2008) では AS の中枢神経機能障害に GABA 系の発達の機能障害が存在することを示した。しかし、AS の原因遺伝子 *UBE3A* の機能と GABA 系との関連は不明であり、更なる脳機能の情報が必要とされている。

2. 研究の目的

私たちの先行研究において、15q11-q13 に置ける遺伝学的異常を体系的に解析することが可能となった。しかし、集積した患者の半数以上には異常が検出されず、原因不明の状態である。これら患者を対象として、15q11-q13 以外の原因を明らかにすることが本研究の第一の目的である。次に、患者における脳機能障害の評価を詳細に行うために、新しい脳機能解析の開発を目的とする。

3. 研究の方法

臨床的に AS もしくは PWS が疑われ、商業的に FISH 法にて 15q11-q13 の欠失が否定されている AS 疑い 168 名、PWS 疑い 202 名を対象とした。

遺伝学的方法としては、*SNRPV* DNA メチル化テスト、15 番染色体のマイクロサテライト多型解析、刷り込み中心部分の微細欠失解析、AS に対しては *UBE3A* の変異解析を行った。

15q11-q13 以外の解析としては、AS 疑い男児 22 例に対して *SLC9A6* 変異解析を追加した。PWS 疑い例に対して 14 番染色体母性片親性ダイソミーの診断のために、*MEG3* メチル化テスト、14 番染色体のマイクロサテライト多型解析を行った。さらに、これらの解析でも原因が不明であった AS 32 例、PWS 78 例を対象と

して Affimetrics SNP 5.0 アレイを用いて染色体コピー数解析を行った。

脳機能解析としては脳磁図を用いた周波数解析の開発を行った。脳磁図は北海道大学病院において 206 チャンネルの脳磁計を用いて計測を実施した。

AS 患者を対象としての脳機能解析としては、脳磁系による計測に加えて、誘発脳波計による体性感覚電位の測定を実施した。

本研究は北海道大学大学院医学研究科医倫理委員会および名古屋市立大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を受け、書面による説明と同意を行っている。

4. 研究成果

AS が疑われた 168 例で AS と確定診断された例は 54 例であった。内訳は 15 番染色体父性片親性ダイソミー 10 例、刷り込み変異 8 例、不明 (両親の解析できず) 6 名であった。*UBE3A* 変異例を 30 例同定した。これらの変異を認めなかった 22 例の男性患者を対象として *SLC9A6* 変異解析を行い、1 例にフレームシフト変異を同定した。本変異の意義を生化学的に解析し、機能喪失変異により発症すすメカニズムを明らかにした (Takahashi et al., Am J Med Genet B 2011)。DNA アレイを行った 33 例の中に、2 例の異常を同定した。内訳は、10q11.21-q11.23 5.6Mb de novo 欠失 1 例、ring 18 モザイク (18q21.2-q23 29.12Mb, 18p11.32 1.5Mb del) 1 例であった。ring18 例では両親の検索ができず、遺伝性は不明である。

PWS 疑い 202 例のなかで、PWS と遺伝学的に診断された例は、82 名 (40.6%) であり、内訳は 15 番染色体母性片親性ダイソミー 50 例、刷り込み変異 2 例、不明 (両親の解析できず) 30 名であった。PWS が遺伝学的に否定された 120 例中 6 例に *MEG3* メチル化異常を認めた。これらの内訳は 14 番染色体母性片親性ダイソミー 5 例、エピ変異 1 例であった (Hosoki et al., J Pediatr 2009)。DNA アレイ解析は 78 例に実施し、21 例に微細コピー数異常を同定した (Hosoki et al., Ped Int 2012; Hosoki et al., Am J Med Genet A 2012)。内訳は PWS 様表現型を呈すると報告のあるコピー数異常が 3 例 (1p36 欠失 2 例、Xq28 重複)、精神遅滞などの原因であることが既に報告されているコピー数異常が 9 例 (1q44 欠失、2p14 欠失、2q24 欠失、4q21 欠失、6q24 欠失、7p15 欠失、15q13 重複、22q11.2 欠失、Xp22 重複)、精神遅滞や自閉症などの疾患感受性が報告されているコピー数異常が 3 例 (1q21.1 欠失、1q21.1 重複、16q13.11 重複) であった。残り 6 例 (1q22 欠失、1q42 重複、3q13 欠失、5q31 欠失 2 例、Xq22 重複) はこれまでに報告のないコピー数異常であり、データベース登録とも一致しない位置であった。また報告のないコピー数異

常 6 例のうち遺伝性検討が可能であった 5 例は全て *de novo* の異常であった。

脳磁図を用いた脳機能解析としては、周波数解析の有用性についててんかん患者を対象として解析を行った。その結果、脳磁図でも周波数解析が可能であることを示し、てんかん患者の脳機能解析での有用性を示した (Sueda et al, *Epilepsy Res* 2010; Yagyu et al., *Epilepsy Res* 2010)。

AS における体性誘発電位 (SEP) 解析では、大脳感覚野における皮質反応性の異常を確認することができた。しかし、皮質下の神経伝導には異常を認めず、その結果、AS における SEP の異常は大脳皮質の反応性の異常を示すことを明らかにすることができた (図 1) (Egawa et al., in submission)。

この結果は先行研究での脳磁図解析の結果と合わせて、AS における脳機能障害の基盤として GABA 抑制系の機能障害が存在することを示唆する。

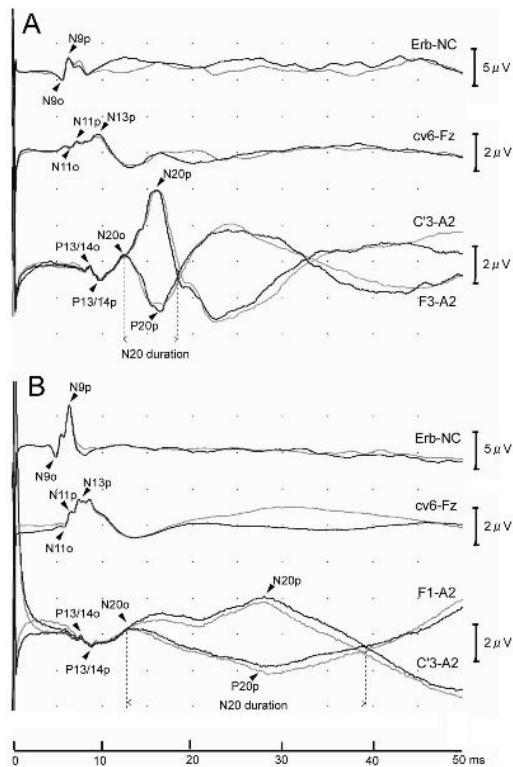


図 1. A: 正常対照における SEP、B: AS (欠失型) 患者における SEP、AS 患者では N20o から先が遅延している。それ以前の皮質下に相当する電位には遅延を認めない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Hosoki K, Ohta T, Fujita K, Nishigaki

S, Shiomi M, Niikawa N, Saitoh S. Hand-foot-genital syndrome with a 7p15 deletion demonstrates a clinically recognizable syndrome. *Pediatr Int* (in press)

2. Hosoki K, Ohta T, Natsume J, Imai S, Okumura A, Matsui T, Harada N, Bacino CA, Scaglia F, Jones JY, Niikawa N, Saitoh S. Clinical Phenotype and Candidate Genes for the 5q31.3 Microdeletion Syndrome. *Am J Med Genet A* (in press)

3. Takahashi Y, Hosoki K, Matsushita M, Funatsuka M, Saito K, Kanazawa H, Goto Y-i, Saitoh S. A loss-of-function mutation in the *SLC9A6* gene causes X-linked mental retardation resembling Angelman syndrome. *Am J Med Genet Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156:799-807, 2011. doi: 10.1002/ajmg.b.31221.

4. Tohyama J, Yamamoto T, Hosoki K, Nagasaki K, Akasaka N, Ohashi T, Kobayashi Y, Saitoh S. West Syndrome Associated with Mosaic Duplication of *FOXP1* in a Patient with Maternal Uniparental Disomy of Chromosome 14. *Am J Med Genet Part A* 155A:2584-2588, 2011. doi: 10.1002/ajmg.a.34224.

5. Yagyu K, Sueda K, Shiraishi H, Asahina N, Sakurai K, Kohsaka S, Sawamura Y, Saitoh S. Direct correlation between the facial nerve nucleus and hemi-facial seizures associated with a gangliocytoma of the floor of the fourth ventricle: a case report. *Epilepsia* 52:e204-6, 2011. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03299.x.

6. Shiraishi H, Ahlfors SP, Stufflebeam SM, Knake S, Larsson PG, Hämäläinen MS, Takano K, Okajima M, Hatanaka K, Saitoh S, Dale AM, Halgren E. Comparison of three methods for localizing interictal epileptiform discharges with magnetoencephalography. *J Clin Neurophysiol* 28:431-40, 2011. doi:10.1097/WNP.0b013e318231c86f

7. Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by

- two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* 56:110-124, 2011.
doi:10.1038/jhg.2010.129
8. Sueda K, Takeuchi F, Shiraishi H, Nakane S, Asahina N, Kohsaka S, Nakama H, Otsuki T, Sawamura Y, Saitoh S. MEG time-frequency analyses for pre and post surgical evaluation of patients with epileptic rhythmic fast activity. *Epilepsy Res* 88:100-107, 2010.
doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.10.002
 9. Yagyu K, Takeuchi F, Shiraishi H, Nakane S, Sueda K, Asahina N, Kohsaka S, Umeoka S, Usui N, Baba K, Saitoh S. The applications of time-frequency analyses to ictal magnetoencephalography in neocortical epilepsy. *Epilepsy Res* 90:199-206, 2010.
doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.05.001
 10. Saitsu H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, Mizuguchi T, Osaka H, Miyata R, Furukawa T, Haginoya K, Hoshino H, Goto T, Hachiya Y, Yamagata T, Saitoh S, Nagai T, Nishiyama K, Nishimura A, Miyake N, Komada M, Hayashi K, Hirai SI, Ogata K, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N. Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am J Hum Genet* 86:881-891, 2010.
doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.013
 11. Yamazawa K, Nakabayashi K, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T. Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell syndrome-like phenotype. *J Med Genet* 47:782-785, 2010. doi:10.1136/jmg.2010.079343
 12. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, Ogata T, Saitoh S. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *J Pediatr* 155:900-903. e1. 2009.
doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.06.045
- [学会発表] (計 12 件)
1. 細木華奈、太田亨、新川詔夫、齋藤伸治 : PWS 様表現型を示す微細染色体異常、第 56 回日本人類遺伝学会 平成 23 年 11 月 10 日 (幕張)
 2. HOSOKI K, OHTA T, NATSUME J, IMAI S, OKUMURA A, MATSUI T, HARADA N, SCAGLIA F, BACINO CA, NIIKAWA N, SAITOH S. 5q31.3 microdeletion syndrome is a clinically discernible new syndrome characterized by severe neonatal hypotonia, feeding difficulties, respiratory distress, and severe developmental delay. 61th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Montreal, Canada, 10/14/2011
 3. 齋藤伸治、細木華奈、夏目淳、今井純好、中島翠、植田佑樹、朝比奈直子、白石秀明 : 5q31 微細欠失は乳児期の筋緊張低下と重度精神遅滞を示す新しい症候群である、第 53 回日本小児神経学会総会 平成 23 年 5 月 26 日 (東京)
 4. 高野亨子、小沢浩、稲田穰、上石晶子、有本潔、木実谷哲史、久保田雅也、齋藤伸治 : Prader-Willi 症候群の摂食の改善について 第 53 回日本小児神経学会総会、平成 23 年 5 月 26 日 (東京)
 5. 細木華奈、太田亨、新川詔夫、齋藤伸治 : ゲノム刷り込み関連疾患 Prader-Willi 症候群の表現型を規定する遺伝学的因子の検討、第 33 回日本分子生物学会年会、平成 22 年 12 月 7 日 (神戸)
 6. 細木華奈、太田亨、新川詔夫、齋藤伸治 : PWS 様表現型を示す微細染色体異常、第 55 回日本人類遺伝学会、平成 22 年 10 月 28 日 (さいたま)
 7. 齋藤伸治、高橋有美、植田佑樹、伊藤智城、白石秀明 : 微細染色体異常はプラダー・ウィリー症候群の重要な鑑別診断である、第 52 回日本小児神経学会総会、平成 22 年 5 月 20 日 (福岡)
 8. 白石秀明、植田佑樹、伊藤智城、高橋有美、香坂忍、齋藤伸治 : 磁図計測を用いた皮質形成異常の早期診断、第 113 回日本小児科学会総会、平成 22 年 4 月 23 日 (盛岡)
 9. Takahashi Y, Funatsuka M, Saitoh K, Hosoki K, Ueda Y, Itoh T, Yagyu K, Shiraishi H, Saitoh S: A novel *SLC9A6* gene mutation in a Japanese patient resembling Angelman syndrome. 59th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, 10/23/2009 (Honolulu, USA)
 10. 細木華奈、太田亨、沼部博直、高田史男、塩見正司、新川詔夫、齋藤伸治 : プラダー・ウィリー症候群様表現型を呈した微細染色体異常、第 54 回日本人類遺伝学会、

平成 21 年 9 月 25 日（東京）

11. 細木華奈、齋藤伸治：日本人 Angelman 症候群の分子遺伝学のおよび臨床的解析、第 16 回遺伝子診療学会、平成 21 年 7 月 31 日（札幌）
12. 高橋有美、齋藤加代子、伊藤智城、柳生一自、朝比奈直子、白石秀明、齋藤伸治：*SLC9A6*変異はアンジェルマン症候群の表現型を示す X 連鎖精神遅滞である、第 51 回日本小児神経学会総会、平成 21 年 5 月 28 日（米子）

〔図書〕（計 2 件）

1. 齋藤伸治：診断手順と技法、Prader-Willi 症候群の基礎と臨床（永井敏郎総編集）p15-18, 2011. 診断と治療社
2. 齋藤伸治：Angelman症候群の運動発達、小児科臨床ピクシス19 ここまでわかった小児の発達（五十嵐隆総編集）p154-155, 2010. 中山書店

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 伸治 (SAITOH SHINJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00281824

(2) 研究分担者

白石 秀明 (SHIRAIISHI HIDEAKI)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：80374411

(3) 連携研究者（該当者なし）