

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461536

研究課題名(和文) トリオ検体におけるアレイCGH法を用いた、ウエスト症候群の原因遺伝子検索

研究課題名(英文) Genomic analysis identifies candidate pathogenic variants in trios with West syndrome by using array CGH

研究代表者

福與 なおみ (Hino-Fukuyo, Naomi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90400366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明の潜因性ウエスト症候群は小奇形を伴う症例が多く、全例孤発例であることに着目した。患者に存在し、罹患していない両親には存在しないde novoのコピー数異常(CNV)領域の有無を、CGHマイクロアレイ法で解析した結果、18例中2例に、ウエスト症候群の原因として考えられるde novoのCNV(Del19p13.2, Dup Xq27.2 q28)を認めた。CNVを認めないトリオ検体14例における次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析では、てんかん性脳症の既知の原因遺伝子(SLC35A2, ALG13)異常の他、新規の候補遺伝子(NR2F1, BRWD3, CACNA2D1)を検出した。

研究成果の概要(英文)：West syndrome, which is narrowly defined as infantile spasms that occur in clusters and hypsarrhythmia on EEG, is the most common early-onset epileptic encephalopathy (E0EE). The genetic etiology of most cases of West syndrome remains unexplained. DNA from 18 patients with unexplained West syndrome was subjected to microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH), followed by trio-based whole-exome sequencing in 14 unsolved families. The array CGH revealed candidate pathogenic copy number variations in two cases, including an Xq28 duplication and a 19p13.2 deletion. Whole-exome sequencing identified candidate mutations in known epilepsy genes in five cases. There candidate de novo mutations were identified in three cases, with two mutations occurring in two new candidate genes (NR2F1 and CACNA2D1). Hemizygous candidate mutations in ALG13 and BRWD3 were identified in the other two cases.

研究分野：小児神経

キーワード：ウエスト症候群 infantile spasms アレイCGH トリオ検体 次世代シーケンサー エクソーム解析  
de novo

## 1. 研究開始当初の背景

ウエスト症候群は乳児期に発症し epileptic spasm、脳波上 hypsarrhythmia、重度の精神発達遅滞を特徴とする難治てんかんである。

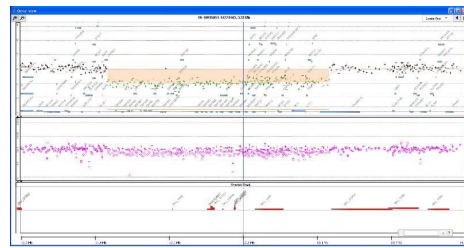
最近精神遅滞の原因遺伝子がウエスト症候群患者にも発見された (ARX 遺伝子 (Nurology 2003;61:267-276, Kato et al. )、STK9 遺伝子 (Am. J. Hum. Genet. 2003;72:1401-1411, Kalscheuer et al. )、CDKL5 遺伝子異常 (J. Med. Genet. 2005;42:103-107, Scala et al. ))。よって、ウエスト症候群と精神遅滞は共通の遺伝学基盤を有する可能性がある。しかし、いまだ本疾患の遺伝学的背景の大部分は不明である。

申請者は、Gバンド法により染色体異常症 (Smith-Magenis 症候群) が明らかになった小奇形を伴うウエスト症候群の症例を初めて報告し (Journal of Child Neurology: 24:868-873, 2009)、原因不明の潜因性ウエスト症候群に小奇形を伴う症例が多いことに着目してきた。小奇形と精神遅滞を伴うことは、染色体異常の存在を示唆する現象であるが、通常の Gバンド法で染色体異常が検出されることは稀である。そこで、微細ゲノコピー数異常の検出に有効であるマイクロアレイ CGH 法による解析を行うことを考えた。

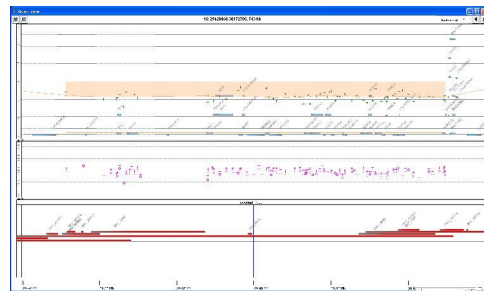
申請者がこれまでに収集したウエスト症候群の症例のうち、小奇形と精神発達遅滞を伴った潜因性ウエスト症候群症例を対象にマイクロアレイ CGH 法によるゲノムコピー数の異常の検出を行ったところ、解析した 31 例のうち、3 例にゲノムコピー数の異常を認めた。

興味深いことに、一部のゲノムコピー数の異常領域に存在する遺伝子の一つは、てんかんと精神遅滞を呈する症例において、遺伝子変異の報告がなされていた。

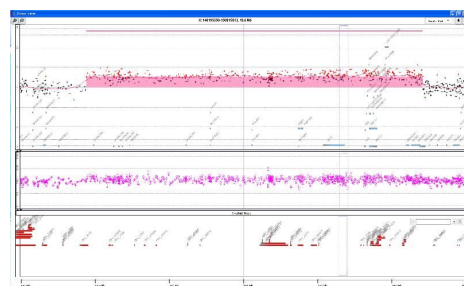
### 16p における 610kb の欠失



### 19p における 1.7 Mb の欠失



### Xq における 800 kb の重複



近年、トリオ検体を対象に、CGH マイクロアレイ法を利用した全ゲノムにわたる遺伝子コピー数変異 (CNV) 解析が行われるようになった。その結果、患児に存在し、疾病に罹患していない両親には存在しない、de novo の CNV が存在する事が明らかになっており、その CNV 領域内に存在する疾患感受性遺伝子が同定も始まっている。

事実、申請者が初めて明らかにした、宮城県におけるウエスト症候群の発生率 (出生 1 万対 3-4) (Epilepsy Research: 87: 299-301, 2009) の調査において、全例が孤発例であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ウエスト症候群の量的形質の遺伝子 (疾患感受性遺伝子) を新たに同

定し、その機能解析を行うことによって病態発症のメカニズムを解明することにある。

ウエスト症候群患児とその両親のトリオ検体を対象に CGH マイクロアレイを用い、de novo の CNV を検出する。さらに、その CNV 領域内に存在する遺伝子群において、CNV のなかった症例に対して高精度融解温度解析 (high resolution melting ; HRM) を用い、全エクソンの遺伝子変異スクリーニングを行う。スクリーニングで検出されたエクソンにおける変異の有無を解析し、そのエクソンをシーケンスすることで、ウエスト症候群の候補遺伝子を特定できる可能性が高い。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

対象は、年齢や性別を問わず、ウエスト症候群と診断された児と、ウエスト症候群の罹患歴のないその児の両親とする。

ウエスト症候群の定義は、Ohtuskaらの文献(Epilepsia 1998:39:30-7)を参考にし、infantile spasms、精神運動発達の停止、hyparrhythmia の3主徴をもつ場合の他、非典型的 hyparrhythmia を呈する乳児期初期の難治性てんかん、2歳以降に hyparrhythmia を呈しシリーズ形成する spasms 症例(late onset West syndrome)もウエスト症候群とする。明らかに基礎疾患が特定できる症例、Gバンド染色体検査にて染色体異常が明らかになった症例(症候性ウエスト症候群)は除外する。

#### (2) 症例の収集

すでに倫理委員会で本研究の承諾を得ている当院および県内外の関連病院の小児神経科の協力を得て症例を収集する。

上記以外の医療機関で該当症例がある場合、その研究協力病院の倫

理委員会において本研究に関する申請を行い許可を得る。次に、東北大学医学系研究科の遺伝子検査に関する指針などにしたがって作成した同意書を用いて、主治医が患者および両親によりインフォームドコンセントを得る。

その後、患児およびその両親の末梢血約5~7ml または唾液を専用の試験管に採取してもらい、当院当科で末梢血または唾液より DNA を抽出して保存し、以後の検査にあてる。

#### (3) 該当症例の遺伝学的解析

アレイ CGH法を用いたスクリーニング検査アレイ CGH法により、全染色体を対象にしてゲノム DNA の過剰、欠失、増幅などのコピー数異常を検出する。

検出した de novo のコピー数異常の領域の遺伝子群を検索し、候補となりえる遺伝子のリストの作成を行う。

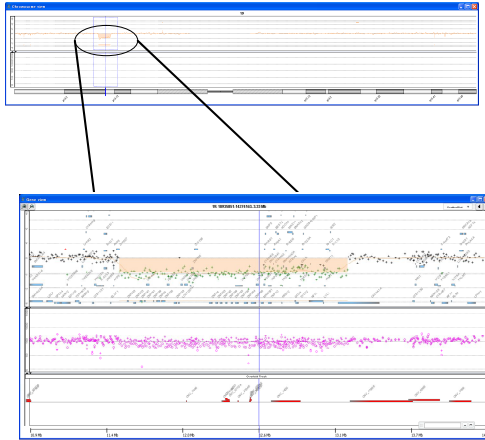
収集した他のウエスト症候群の症例において、候補となりえる遺伝子の HRM 法によるスクリーニングを行う。

### 4. 研究成果

患者に存在し、罹患していない両親には存在しない de novo のコピー数異常(CNV)領域の有無を、CGH マイクロアレイ法で解析した結果、18例中2例に de novo の CNV(Del19p13.2, Dup Xq27.2q28)を認めた。

Xq28 における 8Mb の欠失部位には、FMR1 遺伝子、19p13.2 における欠失部位には、CACNA1A 遺伝子が含まれていた。これらは、てんかんと発達遅滞に関連する既知の遺伝子で、ウエスト症候群の原因として考えられた。

## 19p13.2における欠失部位



コピー数という量的変化のみならず、その中の配列変異や構造多型などの質的変異を効率よく解明する方法として、次世代シーケンサーを用いた「エクソーム解析」がある。

そこで申請者は、CNV を認めなかったトリオ1検体14例において、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行った。その結果、てんかん性脳症の既知の原因遺伝子(SLC35A2, ALG13)異常が検出された。

たとえば、ALG13は、ウエスト症候群を含む小児の難治てんかんの患者で、これまで6人にALG13遺伝子の変異がみついているほか、精神遅滞を呈する患者の1家系でも、ALG13遺伝子の変異がみついている。

申請者は、これら既知の原因遺伝子の他、さらに新規の候補遺伝子(NR2F1, BRWD3, CACNA2D1)を検出した。

NR2F1は、5番染色体に位置する遺伝子である。2014年にBoschらは、発達遅滞、中等度知的障害、および視神経萎縮が特徴である6例に、NR2F1遺伝子異常がみつかったことを報告した(Boschら、94:301-309:2014、Am. J. Hum. Genet.)。6例中4例はNR2F1遺伝子の4月の異なる新生ヘテロ接合ミスセンス変異を証明し、残る2例はNR2F1遺伝子を含む5qのヘテロ接合欠失をもっていた。HEK293細胞でのluciferase reporterによるin vitro機能発現アッセイでは、すべてのミスセンス変異が野生型に比べて転写活性を

有意に減少させていたことから、Boschらは、これらの6症例の症状の発生機序として、ハプロ不全を示唆した。本研究におけるNR2F1遺伝子異常がみつかった症例でも、ウエスト症候群の他に知的障害と視神経萎縮を伴っていた。

## 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1件)

Naomi Hino-Fukuyo, et al., Genomic analysis identifies candidate pathogenic variants in 9 of 18 patients with unexplained West syndrome. 査読有、Hum Genet. 2015 Jun;134(6):649-58. doi: 10.1007/s00439-015-1553-6.

〔学会発表〕(計3件)

福與 なおみ、他

網羅的ゲノム解析によって候補遺伝子が明らかになった潜因性ウエスト症候群

日本てんかん学会、2015年10月31日、長崎ブリックホール(長崎)

菊池 敦生、福與 なおみ、他

潜因性West症候群の網羅的ゲノム解析  
日本臨床遺伝学会、2015年10月16日、京王プラザホテル(東京)

菊池 敦生、福與 なおみ、他

潜因性West症候群に対する網羅的ゲノム解析による遺伝学的診断法の有用性  
日本小児神経学会、2015年5月29日、帝国ホテル大阪(大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福與 なおみ

(HINO-FUKUYO, Naomi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90400366