

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82729

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461538

研究課題名(和文) ヒトの発生異常としての多発奇形・精神遅滞の病因解析

研究課題名(英文) Genetic and genomic analysis on the patients with multiple congenital anomalies

研究代表者

黒澤 健司 (Kurosawa, Kenji)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部門長

研究者番号：20277031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多発奇形・精神遅滞をヒトにおける発生異常ととらえ、その病因を明らかにすることを目的に、エクソーム解析による網羅的な遺伝子・ゲノム異常スクリーニングを行った。対象としては、現在までにマイクロアレイCGHを終え、臨床的に既知疾患を否定した症例を選択した。文部科学省科学研究費新学術領域研究(研究領域提案型)「ゲノム科学の総合的推進に向けた大規模ゲノム情報生産・高度情報解析支援」(ゲノム支援)のサポートを得て解析を進めた。31症例のうち、9家系で疾患特異的変異を検出することができた。未同定家系では新規の病因遺伝子異常に由来する可能性がある。引き続きの検討が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Uncovering the molecular mechanism for birth defects is critical to understand the biological mechanism of human development. To elucidate the causative gene responsible for multiple congenital anomalies of unknown origin, we performed whole exome sequence on the patients with the disorders. This work was supported by MEXT KAKENHI (No.221S0002). 31 patients were enrolled after first screening with standard karyotyping and cytogenetic microarray. Of 31 patients, the causative genomic variants for the disorders could be identified in 9 families (30%). Further analysis will be required to identify the molecular mechanism for these congenital anomalies.

研究分野：小児科学

キーワード：多発奇形 variant 精神遅滞 次世代シーケンス エクソーム解析 マイクロアレイ ゲノム支援 copy number

### 1. 研究開始当初の背景

先天異常は一般集団の 3 - 5% に認められ、その原因解明と治療法の開発は医療における重要な課題である。平成 21 年から始まった厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業奨励研究分野では、67% が遺伝性疾患でその多くが先天異常に分類される。また、我が国における乳児死亡原因の第 1 位は、先天異常・変形・染色体異常が 35.7% を占める (国民衛生の動向 2010)。小児の難病症例が集中する小児病院において遺伝的要因・先天異常例は全入院の 57% を占める (Soneda, Kurosawa, 2012)。診断技術の向上や医療の発展によっても先天異常の比率は変わらない。特に診断未定の多発奇形・精神遅滞 (MCA/MR) 症例は研究、医療施策いずれにも対象とされることがほとんどなかった。しかし、総体としての頻度は極めて高く、生涯にわたる医療負担は勿論、家族の負担も極めて大きい。さらに、こうした MCA/MR は、その原因がヒトの発生に関わる遺伝子であることが少なくなく、原因不明の MCA/MR の原因を明らかにすることは、ヒトの発生の基本的メカニズムを明らかにすることに結びつく。研究代表者らは MCA/MR の一つとされ、研究開始当時原因遺伝子が全く不明であった Young-Simpson 症候群の原因解明に取り組み、エクソーム解析によりその原因をヒストン修飾酵素 KAT6B と同定するに至った経験を有している。

### 2. 研究の目的

本研究は、こうした研究経験をもとに、さらに発展させ、MCA/MR の孤発あるいは同胞発症例を対象として、マイクロアレイ解析およびエクソーム解析を駆使し、その病因を明らかにすることを目的としている。病因をゲノムレベルで明らかにすることにより、具体的なモデル動物による疾患モデルを構築し、その発生メカニズムと病態解明が可能となる。つまり、ヒトの発生異常としての MCA/MR の原因をゲノム・遺伝子レベルで確定し、その機能障害を受けた遺伝子の機能から結果 (症状) に至るメカニズム (病態) を推測・検討し、検証してゆく (モデル動物) ことにある。これは、同時に診断法の確立をもたらし、さらには、発生頻度の推定評価も可能とするものでもある。これまで、研究代表者は先天異常・MCA/MR 症例の診断・医療管理を専門とし、上述の得られた成果はウェブ上 (<http://kcmc.jp/yss/index.html>) に公表、患者家族への情報還元を行ってきた。発生頻度推定も先天異常モニタリング調査研究の経験から可能である (Kurosawa et al, 2012)。病因を明らかにすることは、結果として、診断法の確立や、医療管理指針作成や、発生頻度の推定評価も可能となる。根本治療が困難なヒトの発生異常 (先天異常) の予後改善を目標に据える。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象症例の選択

研究代表者の所属施設の遺伝外来では、年間 450 例の新患受診例があり、うち約 200 例が診断目的の MCA/MR である。同胞発症例も散見する。臨床評価は極めて重要で、既知症候群等を本研究対象から除外する必要がある。このプロセスは、機械化は不可能であり、経験と知識が基本となる。先天異常を専門とし、これまで国内第 1 例報告を複数行ってきた (Kurosawa et al. Am J Med Genet 1996; Kurosawa et al. Brain Dev 1995) 経験に基づいて進めた。

#### (2) マイクロアレイ CGH によるゲノム微細構造異常を原因とする症例のスクリーニング・除外

マイクロアレイは、Agilent 社製マイクロアレイシステムを使用し、解析プラットフォームは SurePrint G3 シリーズを用いた。FISH 解析で用いる BAC クローンは、CHORI 32K plate から選択し、通常法で抽出・ラベリング後、Leica CW4000 で観察した。臨床症状は診療記録からまとめた。得られた結果は、hg19 に準拠した UCSC Genome Browser に従って検討する。ISCA データ、および DECIPHER データなど種々のデータベースを参照して変異の意義を検討した。

#### (3) 全エクソーム解析

エクソーム解析による網羅的な遺伝子・ゲノム異常スクリーニングの対象としては、上述のマイクロアレイ CGH を終え、臨床的に既知疾患を否定した症例を選択した。文部科学省科学研究費新学術領域研究 (研究領域提案型) 「ゲノム科学の総合的推進に向けた大規模ゲノム情報生産・高度情報解析支援」 (ゲノム支援) のサポートを得て解析を進めた。キャプチャーは Agilent SureSelect V5+UTRs で、HiSeq 2500 を用いて、Paired end でランを行った。参照ゲノムは hg19 assembly に基づき、dbSNP 135, NHLBI Exome Sequencing project, 1000 genomes を用いた。データ解析パイプラインは BWA, Samtools, GATK, ANNOVAR で構成した。log<sub>2</sub> ratio によるデータの CNV 変換も行った。

### 4. 研究成果

30 家系、31 症例に対して全エクソーム解析を行った。多発奇形・精神遅滞 20 家系 (同胞発症 7 家系) 先天性心疾患 5 例 (同胞発症 4 家系) その他の先天異常 6 家系 (同胞発症 3 家系) であった。多発奇形・精神遅滞で 7 例、その他で 2 例、合計 9 家系で疾患特異的変異を検出することができた。現在も家系解析を含め、解析継続中である。先天性心疾患同胞例、並びにその他の先天異常では、同胞例にもかかわらず、疾患特異的変異を検出することができていない。未同定家系では新規の病因遺伝子異常に由来する可能性がある。引き続きの検討が今後の課題である。

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 10 件)

Tsurusaki Y, Ohashi I, Enomoto Y, Naruto T, Mitsui J, Kurosawa K, Aida N. A novel UBE2A mutation causes X-linked intellectual disability type Nascimento. Human Genome Variation. 2017 June 8;4:17019. 査読有、DOI:10.1038/hgv.2017.19.

Shimbo H, Oyoshi T, Kurosawa K. A contiguous gene deletion neighboring TWIST1 identified in a patient with Saethre-Chotzen syndrome associated with neurodevelopmental delay: possible contribution of HDAC9. Congenit Anom (Kyoto). 2017 Feb 21. 査読有、DOI:10.1111/cga.12216.

Tsuji-Hosokawa A, Matsuda N, Kurosawa K, Kashimada K, Morio T. A case of MECP2 duplication syndrome with gonadotropin-dependent precocious puberty. Horm Res Paediatr. 2016 Sep 21. 査読有、DOI:10.1159/000449222

Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hokosaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mima A, Lapunzina P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Ogata T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S, Matsubara Y, Kure S, Aoki Y. Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. Hum Genet. 2016 Feb;135(2):209-22. 査読有、DOI:10.1007/s00439-015-1627-5

Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, Ogata T. Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). Eur J Hum Genet. 2015 Oct;23(11):1488-98. 査読有、DOI:10.1038/ejhg.2015.13.

Kuroda Y, Ohashi I, Naruto T, Ida K, Enomoto Y, Saito T, Nagai JI, Wada T, Kurosawa K. Delineation of the KIAA2022 mutation phenotype: Two

patients with X-linked intellectual disability and distinctive features. Am J Med Genet A. 2015;167(6):1349-53. 査読有、DOI:10.1002/ajmg.a.37002

Kuroda Y, Ohashi I, Enomoto Y, Naruto T, Baba N, Tanaka Y, Aida N, Okamoto N, Niihori T, Aoki Y, Kurosawa K. A postzygotic NRAS mutation in a patient with Schimmelpenning syndrome. Am J Med Genet A. 2015;167A(9):2223-5. 査読有、DOI:10.1002/ajmg.a.37135

Kuroda Y, Ohashi I, Saito T, Nagai JI, Ida K, Naruto T, Wada T, Kurosawa K. Deletion of UBE3A in brothers with Angelman syndrome at the breakpoint with an inversion at 15q11.2. Am J Med Genet A. 2014;164A(11):2873-8. 査読有、DOI:10.1002/ajmg.a.36704

Kuroda Y, Saito T, Nagai J, Ida K, Naruto T, Masuno M, Kurosawa K. Microdeletion of 19p13.3 in a girl with Peutz-Jeghers syndrome, intellectual disability, hypotonia, and distinctive features. Am J Med Genet A. 2015;167A(2):389-93. 査読有、DOI:10.1002/ajmg.a.36813.

Miyake F, Kuroda Y, Naruto T, Ohashi I, Takano K, Kurosawa K. West syndrome in a patient with Schinzel-Giedion syndrome. J Child Neurol. 2015;30(7):932-6. 査読有、DOI: 10.1177/0883073814541468

〔学会発表〕(計 20 件)

横井貴之、湊川真理、羽田野ちひろ、榎本友美、鶴崎美徳、成戸卓也、小崎健次郎、黒澤健司 次世代シーケンサーにより診断された KBG 症候群の臨床像 第 39 回日本小児遺伝学会 2016.12.9-10. 慶應義塾大学(東京都港区)

Tsurusaki Y, Enomoto Y, Yokoi T, Hatano C, Ida K, Kurosawa K. Next-generation sequencing identifies novel *ARID1B* mutations in patients with Coffin-Siris syndrome. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016.4.3-7. 国立京都国際会館(京都府京都市)

Minatogawa M, Iwasaki F, Fukuda K, Hatano C, Yokoi T, Enomoto Y, Ida K, Tsurusaki Y, Harada N, Saitou T, Nagai J, Goto H, Kurosawa K. Early development of rare tumors in

individuals with congenital malformation syndrome. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016.4.3-7. 国立京都国際会館(京都府京都市)

Shimbo H, Yokoi T, Mizuno S, Suzumura H, Aida N, Nagai J, Ida K, Enomoto Y, Hatano C, Kurosawa K. Structural brain abnormalities associated with deletion at chromosome 2p16.1. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016.4.3-7. 国立京都国際会館(京都府京都市)

Hatano C, Yokoi T, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Saito T, Nagai J, Kurosawa K. Dosage Changes of NIPBL cause various types of neurodevelopmental disability. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016.4.3-7. 国立京都国際会館(京都府京都市)

中村航、羽田野ちひろ、横井貴之、黒澤健司、榎本友美、鶴崎美徳、原田法彰、永井淳一次世代シーケンサー(NGS)を用いて診断した KBG 症候群の 2 例 第 339 回日本小児科学会神奈川県地方会 2016.3.12. 神奈川県総合医療会館(神奈川県横浜市)

黒澤健司、羽田野ちひろ、横井貴之 原因不明遺伝子関連疾患におけるゲノム解析の実際 第 337 回日本小児科学会神奈川県地方会 2015.11.28. 神奈川県総合医療会館(神奈川県横浜市)

横井貴之、羽田野ちひろ、鶴崎美徳、榎本友美、成戸卓也、林至恩、小林正久、井田博幸、黒澤健司 EGFR の機能喪失型変異の複合ヘテロ接合を有する一男児例 日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015.10.14-17. 京王プラザホテル(東京都新宿区)

Enomoto Y, Yokoi T, Hatano C, Ida K, Naruto T, Kurosawa K. Genetic analysis of autism spectrum disorder(ASD) based on developed diagnostic flows using next-generation sequencing (NGS). 米国人類遺伝学会 2015, 2015.10.6-9. Baltimore (USA)

Hatano C, Yokoi T, Enomoto Y, Saito T, Nagai J, Kurosawa K. Deletion of KIRREL3 causes intellectual disability in Jacobsen syndrome. 米

人類遺伝学会 2015, 2015.10.6-9. Baltimore (USA)

横井貴之、大橋育子、黒田友紀子、羽田野ちひろ、榎本友美、成戸卓也、升野光雄、黒澤健司 次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患におけるコピー数異常の検出。日本遺伝カウンセリング学会 2015.6.26-28. 三井ガーデンホテル千葉(千葉県千葉市)

羽田野ちひろ、横井貴之、渡邊肇子、露崎悠、新保裕子、榎本友美、成戸卓也、大橋育子、黒田友紀子、後藤知英、黒澤健司 遺伝性小児神経領域疾患診断への臨床エクソームの導入 第 57 回日本小児神経学会 2015.5.28-30. 帝国ホテル大阪(大阪府大阪市)

横井貴之、羽田野ちひろ、伊藤進、相田典子、呉繁夫、升野光雄、黒澤健司 Rubinstein-Taybi 症候群の成人例における脳血管障害 第 118 回日本小児科学会 2015.4.17-19. 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

羽田野ちひろ、横井貴之、黒田友紀子、大橋育子、安西里恵、井合瑞江、黒澤健司 CASK truncating 変異を有する男児はモザイク例のみ生存しうる 第 118 回日本小児科学会 2015.4.17-19. 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

黒澤健司 小児科診療における次世代シーケンス解析。第 59 回日本人類遺伝学会 2014.11.20-22. タワーホール船堀(東京都江戸川区)

榎本友美、大橋育子、黒田友紀子、羽田野ちひろ、横井貴之、井田一美、成戸卓也、黒澤健司 小児病院の診断における次世代シーケンサーの利用。第 59 回日本人類遺伝学会 2014.11.20-22. タワーホール船堀(東京都江戸川区)

横井貴之、大橋育子、黒田友紀子、羽田野ちひろ、榎本友美、成戸卓也、升野光雄、井田博幸、黒澤健司 メンデル遺伝病エクソーム解析による多発奇形・発達遅滞(MCA/ID・DD)の解析。第 59 回日本人類遺伝学会 2014.11.20-22. タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Hatano C, Yokoi T, Wakui K, Enomoto K, Kuroda Y, Ohashi I, Kosaki R, Kurosawa K. Contiguous deletion of CADPS2 and GRM8 associates with severe autism spectrum disorder. American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting, 2014.10.18-22.

San Diego ( USA )

黒澤健司 診療における次世代シーケ  
ンス解析 結果のまとめ方と伝え方  
第 38 回日本遺伝カウンセリング学会  
2014.6.27-29. 近畿大学ノーベンバーホ  
ール ( 大阪府東大阪市 )

Kurosawa K, Ohashi I, Kuroda Y,  
Naruto T, Saito T. J Nagai. 6p21.33  
microdeletion associated with EHMT2  
haploinsufficiency and intellectual  
disability. European Human Genetics  
Conference 2014, 2014.5.31-6.2. Milan  
( Italy )

〔図書〕(計 1 件)

黒澤健司 先天異常概論 別冊日本臨床  
No.29.神経症候群 ( 第 2 版 ) . 2014 年、  
pp.7-13

〔産業財産権〕

出願状況 ( 計 0 件 )  
該当なし

取得状況 ( 計 0 件 )  
該当なし

〔その他〕

ホームページ等 :  
該当なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

黒澤 健司 ( KUROSAWA, Kenji )  
地方独立行政法人神奈川県立病院機構  
神奈川県立こども医療センター・臨床研究  
所・部門長  
研究者番号 : 20277031

### (2)研究分担者

該当なし ( )

### (3)連携研究者

該当なし ( )

### (4)研究協力者

成戸 卓也 ( NARUTO, Takuya )  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部  
人類遺伝学・助教  
研究者番号 : 60438124

鶴崎 美徳 ( TSURUSAKI, Yoshinori )  
地方独立行政法人神奈川県立病院機構  
神奈川県立こども医療センター・臨床研究  
所・主任研究員  
研究者番号 : 70392040

榎本 友美 ( ENOMOTO, Yumi )  
地方独立行政法人神奈川県立病院機構  
神奈川県立こども医療センター・臨床研究  
所・研究員  
研究者番号 : 20506290