

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461522

研究課題名(和文) マイクロアレイおよび次世代シーケンズを用いた知的障害原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Genetic evaluation of patients with intellectual disability using chromosomal microarray and next-generation sequencing

研究代表者

高野 亨子 (TAKANO, Kyoko)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：70392420

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)：知的障害(ID)は知能指数が70未満で小児期に発症する病態である。人口の1～3%が罹患し小児科や遺伝科を受診する機会の高い疾患の一つであるが、その原因は半数以上で不明である。本研究ではID患者専用の「ID外来」を開設し、3年間で109名の患者の研究協力同意を得て、段階的に遺伝学的検査を行った。マイクロアレイ染色体検査と染色体G分染法、次世代シーケンサーを用いたID既知遺伝子パネル解析、臨床または全エクソーム解析を行い、27/109名(24.8%)で原因が判明した。今後の健康管理や遺伝カウンセリングに活かす事が出来、ID患者に対する系統的な遺伝学的検査は有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intellectual disability (ID) is commonly defined by an intelligence quotient below 70 and starts before the age of 18. ID is one of the most frequent developmental disorders in children, and its prevalence is 1-3% in the general population. However, more than half of ID was of unknown etiology due to its clinical and genetic heterogeneities. The “ID clinic” was established at the Center for Medical Genetics, Shinshu University Hospital in April 2014. We provide clinical diagnosis, genetic evaluation, and genetic counseling to patients with ID. Genetic evaluation includes chromosomal microarray analysis, targeted NGS using the panel of ID-related genes, and exome sequencing. To date, 109 patients have visited the “ID clinic” and genetic causes were identified in 27 patients (24.8%). Genetic evaluation in the “ID clinic” is thought to be useful in providing definitive diagnosis, expected clinical course, and recurrence risk to patients and their family.

研究分野：小児神経学、小児科学、臨床遺伝学

キーワード：知的障害 次世代シーケンサー マイクロアレイ染色体検査 疾患パネル解析 エクソーム解析 遺伝カウンセリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 知的障害 (intellectual disability; ID) は知能指数 (IQ) が 70 未満、18 歳未満で発症する病態であり、罹患率は全人口の 1~3% と頻度が高く、小児神経外来や遺伝外来に受診する機会の高い疾患の一つである。ID の原因は大きく遺伝的要因と環境的要因の二つに分けられる (図 1)。軽度 ID (50<IQ<70) の原因は複数の遺伝的要因、環境的要因がかかっていると考えられているが、全人口の 0.3~0.4% を占める IQ<50 の中等度~重度 ID の約半数は遺伝的要因で起こると考えられている。

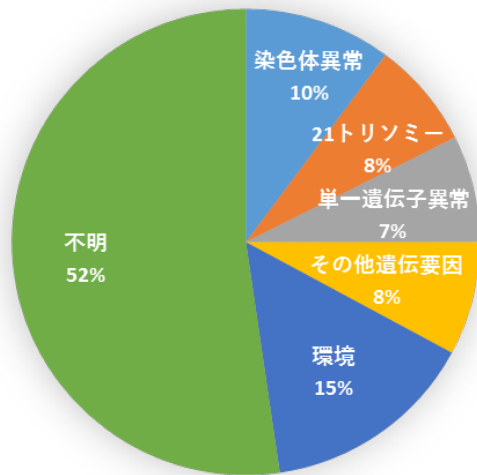


図 1 ID の原因 10,997 名 (男 59%、女 41%、米国 1989~2002) Stevenson RE, et al. 2003

(2) ID の男女比は 1.2~1.3 と男性に多いことから X 連鎖性 ID (X-linked ID; XLID) の研究は進んだ。1983 年の Lesch-Nyhan 病の責任遺伝子 HPRT から始まり研究開始時点で約 100 の XLID 原因遺伝子が同定されており、XLID は男性 ID 患者の 5~10% を占めると考えられている。原因遺伝子が多数あること、原因遺伝子による臨床的特徴の差がわかりにくいことから、遺伝学的検査としての臨床的応用は困難であった。2000 年代半ばのマイクロアレイ染色体検査の登場により ID 患者の ~15 - 20% においてゲノムコピー数異常が同定されるようになった。また 2011 年以降の次世代シーケンシングの実用化により ID 原因遺伝子の網羅的解析が可能になり、稀な X 連鎖性、常染色体優性、常染色体劣性遺伝 ID 原因遺伝子も同定されるようになり、トリオ全エクソーム解析で ~38 - 55%、XLID 家系において X 染色体全エクソーム解析を行い ~70% で原因が判明したと報告された (Willmsen MH and Kleefstra T, 2014)。

2. 研究の目的

欧米では ID の原因検索の第一段階としてマイクロアレイ染色体検査、第二段階として全エクソーム解析を行い成果をあげているが、本邦ではまだ体制が整っていない。本研究は

ID に対する遺伝学的解析を体系化し、長野県における ID 患者の病因および臨床像を明らかにすることを目的とする。病因が明らかになることにより患者の遺伝カウンセリングおよび健康管理に役立てることができ、将来的に治療に結びつく可能性がある。また本研究の成功により本邦における ID 病因検索体制の基盤を作ることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 「ID 外来」の開設

平成 26 年 4 月に信州大学医学部附属病院遺伝子診療部 (現、遺伝子医療研究センター) に「ID 外来」を開設。患者 (代諾者) の同意を書面で得た上で、臨床情報 (知的障害の程度、合併症の有無など) および検体採取 (血液) の上、遺伝学的検査を行った。同外来で結果開示および遺伝カウンセリングを行った。この研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認を受けて行った (遺伝子解析研究承認番号 452)。

(2) 遺伝学的検査

段階的に以下の順番で行った。

第 1 次スクリーニング: マイクロアレイ染色体検査および染色体 G 分染法、自施設または他施設ですでに染色体異常または病的ゲノムコピー数変化がないことが判明している患者は から参加。

第 2 次スクリーニング: 次世代シーケンサーを用いた ID パネル解析、卓上型次世代シーケンサー Ion PGM を用いて、知的障害関連 49 既知遺伝子カスタムパネル (ID パネル) 解析を行った。2015 年の英国 DDD study グループが報告した重度神経発達症患者約 1,000 人の全エクソーム解析結果を踏まえ、平成 28 年 4 月より ID パネル遺伝子を 80 遺伝子に増やした。第 2 次スクリーニングまでは全例に行う。

3 次スクリーニング: 自施設にて卓上型次世代シーケンサー MiSeq を用いた TruSightOne シーケンスパネル (臨床エクソーム解析、疾患関連 4,813 遺伝子) 解析または連携研究施設 (国立成育医療研究センター) にて全エクソーム解析を行った。およびで見つかった変異に関しては、既知データベース検索、多型データベース検索、機能予測プログラムを用いて絞込みを行い、サンガーシーケンシングで確認、原則両親および患者の segregation を確認した。

4. 研究成果

(1) 研究参加患者

患者背景: 研究期間内に計 109 名の患者が登録された。男性 60 名 (55%)、女性 49 名 (45%) 研究参加時平均年齢は 6 歳 11 カ月 (10 カ月~21 歳) 早産児は 14 名 (13%) 低出生体重児 (<2,500g) は 32 名 (29%)

超低出生体重児 (<1,000g) は 2 名 (2%)、新生児仮死を 9 名 (8%) に認めた。また ID および自閉スペクトラム症 (ASD) を含む神経発達症の家族歴は 29 名 (27%) に認めた。

患者臨床症状：参加患者の IQ または発達指数は図 2 に分類された。また合併症は図 3 の通りであった。

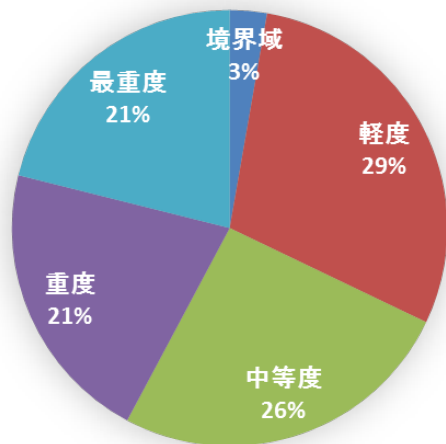


図 2 研究参加患者の知能指数・発達指数

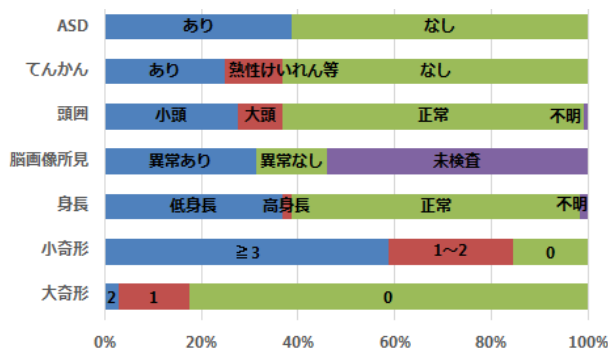


図 3 研究参加患者の合併症

(2) 遺伝学的検査結果

第 1 次スクリーニング：6 名で染色体構造異常や染色体微細欠失が判明した (6/109 = 5.5%)。研究参加前にすでにマイクロアレイ染色体検査を受け、異常を認めなかった患者を除くと、6/53 名で陽性であった (11.3%)。

第 2 次スクリーニング：92 名で解析が終了し、15 名で病的変異が見出された (16.3%)。

3 次スクリーニング：上記陰性例の一部について、TruSightOne シーケンスパネルまたは連携研究施設にてトリオ全エクソーム解析を行い、それぞれ 4/19、2/11 で既知の ID 原因遺伝子の病的変異が見つかった。

遺伝学的検査まとめ

研究参加患者 109 名中 27 名で ID の原因が判明した (24.8%)。

考察

3 年間に 109 名の患者の研究参加同意を得て研究をすすめた。参加患者の特徴として中等度より重い知的障害を有する患者が約 2/3 を占め、知的障害が重い患者ほど原因検索のニーズが高いことが予測された。また合併症では ASD を約 39% に認め比較的多かった。大奇形 (手術を要するような形態・機能異常、先天性心疾患や口蓋裂など) の合併は少なく、小奇形 (手術を要しない形態・機能異常、顔貌の特徴など) を 1 つ以上持つ患者は 84% と多かった。

遺伝学的検査では第 1 次スクリーニングでは本研究では陽性率 11.3% と欧米と比較すると (~15 - 20%) 低かった。新たに解析した症例が 53 名と少なかったためと考えられた。第 2 次スクリーニングは 16% で陽性であり既知遺伝子のスクリーニングとして有用であると考えられた。第 3 次スクリーニングは症例数が少ないため今後症例を蓄積していく必要がある。

「ID 外来」にて遺伝学的検査結果開示を行い、原因が判明した患者には遺伝学的エビデンスに基づいた健康管理の方針の提供および次子再発率など遺伝カウンセリングの提供を行った。原因が現時点で判明していない患者に関しても、可能な限り「ID 外来」で継続診療を行い、今後第 3 次スクリーニングにつなげていく予定である。

< 引用文献 >

- Stevenson RE, Procopio-Allen AM, Schroer RJ, Collins JS. Genetic syndromes among individuals with mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2003;123A:29-32.
- Willemsen MH, Kleefstra T. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet*. 2014;85:101-110.
- Deciphering Developmental Disorders Study. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature*. 2015;519:223-228.

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 4 件)

- Nakashima M, Takano K, Tsuyusaki Y, Yoshitomi S, Shimono M, Aoki Y, Kato M, Aida N, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Osaka H, Saitou H, Matsumoto N. WDR45 mutations in three male patients with West syndrome. *J Hum Genet*. 2016;61:653-61. 査読有 doi: 10.1038/jhg.2016.27.
- Takano K, Shiba N, Wakui K, Yamaguchi T, Aida N, Inaba Y, Fukushima Y, Kosho

T. Elevation of neuron specific enolase and brain iron deposition on susceptibility-weighted imaging as diagnostic clues for beta-propeller protein-associated neurodegeneration in early childhood: Additional case report and review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2016; 170A: 322-8. 査読有 doi: 10.1002/ajmg.a.37432. Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Cree leukoencephalopathy. *Brain Dev*. 2015;37:638-42. 査読有 doi: 10.1016/j.braindev.2014.10.002. Wada T, Takano K, Tsurusaki Y, Miyake N, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. Japanese familial case of myoclonus-dystonia syndrome with a splicing mutation in SGCE. *Pediatr Int*. 2015 ;57:324-6. 査読有 doi: 10.1111/ped.12613.

[学会発表](計 12 件)

高野亨子、本林光雄、山口智美、涌井敬子、稲葉雄二、古庄知己、福嶋義光 . 肝脾腫を呈した Coffin-Siris 症候群の 1 男児例, 第 39 回日本小児遺伝学会学術集会, 2016/12/9, 慶應義塾大学 (東京) Kyoko Takano, Mitsuo Motobayashi, Tomomi Yamaguchi, Keiko Wakui, Yuji Inaba, Yoshimitsu Fukushima, Tomoki Kosho. Hepatosplenomegaly as the initial manifestation of Coffin-Siris syndrome caused by an AR1D1B mutation. , 第 66 回米国人類遺伝学会, 2016/10/20, バンクーバー(カナダ) 高野亨子、古庄知己、福嶋義光 . 知的障害 (Intellectual Disability: ID) 外来 ~2 年間の成果~, 第 8 回日本小児科学会長野地方会, 2016/6/26, 上田市文化センター (長野県・上田市) 高野亨子、古庄知己、涌井敬子、福嶋義光 .SHANK3 遺伝子変異を認めた 1 女児例, 第 58 回日本小児神経学会学術集会, 2016/6/4, 京王プラザホテル新宿 (東京) 高野亨子、神谷素子、稲葉雄二、福山哲広、平林伸一、笛木昇、西恵理子、古庄知己、福嶋義光 . 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部知的障害 (ID) 外来の取り組み ~ 第 2 報 ~, 第 119 回日本小児科学会学術集会, 2016/5/15, ロイトン札幌 (北海道・札幌市) Kyoko Takano, Tomoki Kosho, Keiko Wakui, Motoko Kamiya, Mitsuo Motobayashi, Naoko Shiba, Tetsuhiro Fukuyama, Noboru Fueki, Shinichi

Hirabayashi, Eriko Nishi, Masumi Ishikawa, Emiko Kise, Tomomi Yamaguchi, Rie Kawamura, Yuji Inaba, Yoshimitsu Fukushima. Genetic evaluation of patients with intellectual disability (ID) using chromosomal microarray and targeted next-generation sequencing at the "ID clinic", The 13th International Congress of Human Genetics, 2016/4/5, 国立京都国際会館 (京都府・京都市) 高野亨子、古庄知己、涌井敬子、神谷素子、石川真澄、黄瀬恵美子、山口智美、河村理恵、西恵理子、柴直子、本林光雄、稲葉雄二、福山哲広、平林伸一、笛木昇、福嶋義光 . 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部知的障害 (ID) 外来受診患者の遺伝学的背景・臨床症状の検討、日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015/10/16、京王プラザホテル (東京) Kyoko Takano, Naoko Shiba, Kazuya Goto, Tomomi Yamaguchi, Keiko Wakui, Tomoki Kosho, Yuji Inaba, Yoshimitsu Fukushima. Two patients diagnosed with BPAN in infancy. . 第 65 回米国人類遺伝学会、2015/10/8, ボルチモア (米国) 高野亨子、柴直子、本林光雄、稲葉雄二、福山哲広、平林伸一、笛木昇、西恵理子、石川真澄、黄瀬恵美子、山口智美、河村理恵、涌井敬子、古庄知己、福嶋義光 . 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部知的障害 (ID) 外来開設 1 年間の成果 - 遺伝学的背景・臨床症状の検討 -, 第 38 回日本小児遺伝学会学術集会, 2015/7/25、パシフィコ横浜会議センター (神奈川県・横浜市) 高野亨子、本林光雄、稲葉雄二、福山哲広、平林伸一、笛木昇、西恵理子、古庄知己、福嶋義光 . 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部知的障害 (ID) 外来開設の試み . 第 118 回日本小児科学会学術集会, 2015/4/18, 大阪国際会議場、(大阪府・大阪市) 高野亨子、西村貴文、涌井敬子、山口智美、高橋悟、古庄知己、福嶋義光 . CDKL5 遺伝子重複を認めた低身長と小頭症を伴う発達遅滞の男児例 . 日本人類遺伝学会第 59 回大会、2014/11/21、タワーホール船堀 (東京) Kyoko Takano, Takafumi Nishimura, Keiko Wakui, Satoru Takahashi, Yuji Inaba, Tomoki Kosho, Yoshimitsu Fukushima. A duplication of the CDKL5 gene identified in a boy with developmental delay with autistic behavior, short stature and microcephaly. 第 64 回米国人類遺伝学会、2014/10/21, サンディエゴ (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 亨子 (TAKAN0, Kyoko)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号：70392420

(2) 研究分担者

古庄 知己 (KOSH0, Tomoki)
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属
病院)・准教授
研究者番号：90276311

稲葉 雄二 (INABA, Yuji)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号：30334890

涌井 敬子 (WAKUI, Keiko)
信州大学・学術研究院医学系・講師
研究者番号：50324249

福嶋 義光 (FUKUSHIMA, Yoshimitsu)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：70273084

(3) 連携研究者

松本 直通 (MATSUMOTO, Naomichi)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：80325638

要 匡 (KANAME, Tadashi)
国立研究開発法人国立成育医療研究セ
ンター・ゲノム医療研究部・部長
研究者番号：40264288