

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462225

研究課題名(和文)二分脊椎が見られる重度知的障害の病因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of the genes associated with spina bifida harboring intellectual disability

研究代表者

若松 延昭 (Wakamatsu, Nobuaki)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部・部長

研究者番号：60274198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：対象症例は、姉弟例で共に重度知的障害、運動発達遅滞と著しい身体発育不全(低身長)が見られ、姉には二分脊椎とキアリー型奇形が見られた。解析の結果、姉弟共に2番染色体短腕末端のトリソミーと5番染色体短腕末端のモノソミーがあり、その大きさはそれぞれ18.77 Mbと17.89 Mbであった。父親に2番染色体短腕と5番染色体短腕間での均衡型相互転座が見られ、父親の精子が正常核型の母親の卵と受精することで、姉と弟にトリソミー-2pとモノソミー-5pが生じたと考えられた。我々は、染色体転座の断点部位を同定した。海外の症例とともに5例に見られる染色体の構造異常は神経管閉鎖障害の病因と考えられる

研究成果の概要(英文)：The partial trisomy 2p24 has been reported to be associated with NTDs such as anencephaly, encephalocele, and spina bifida. We report the cases of 2 siblings with trisomy 2p24.3pter and monosomy 5p14.3pter caused by paternal translocation t(2;5)(p24.3;p14.3). Of the 2 siblings, the elder sister had spina bifida. We determined the nucleotide sequences of chromosomal breakpoints and found that the sizes of trisomy 2p and monosomy 5p segments were 18.77 and 17.89 Mb, respectively. NTDs were present in 4 of 7 previously reported patients as well as in 1 patient examined of the present study. Comparison of clinical features of the patients with trisomy 2p and monosomy 5p including our cases, we identified characteristic features of trisomy 2p24.3pter. Increased gene dosages of dosage sensitive genes or genes at the trisomy segment (2p24.3) of the presented patients could be associated with NTDs of patients with trisomy 2p.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：二分脊椎 2番染色体短腕 部分トリソミー 5p-症候群

## 1. 研究開始当初の背景

二分脊椎は無脳症、頭蓋脊椎破裂とともに、神経管閉鎖障害 (neural tube defects; NTD) (OMIM #182940) の主要な疾患の1つであり、脊柱管を形成する脊椎骨の先天的な形成不全のために脊髄が脊椎の外に出て、様々な神経障害が見られる。本邦の NTD の発症頻度は、出生した子供の1万人に対して約6人であるが、病因の多くは不明である。一方、NTD の疾患モデルマウスの研究により、200個以上の遺伝子の異常が NTD の発症に関与することが明らかになっている (参考論文1)。従って、ヒトにおいても胎生期の神経管の形成に関与する様々な遺伝子の異常が二分脊椎の病因と考えられるが、最近のコホート研究により病因候補遺伝子あるいは危険因子として遺伝子変異が同定されているのは、VANGL1、glycine cleavage system (GCS) 関連遺伝子、PAX3、SCRIB など、わずかである (参考論文2-5)。従って、本研究において二分脊椎が見られる疾患の病因遺伝子を同定して臨床像と遺伝子変異の関連を明らかにし、その研究成果を誌上で発表することは、二分脊椎の病態を明らかにする上で極めて重要でインパクトがあると考えられる。

(参考論文)

- Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 88:653-669, 2010.
- Bartsch O, Kirmes I, et al. Novel VANGL1 Gene Mutations in 144 Slovakian, Romanian and German Patients with Neural Tube Defects. *Mol Syndromol*, 3:76-81, 2012.
- Narisawa A, Komatsuzaki S, et al. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet*, 21:1496-1503, 2012.
- Agopian AJ, Bhalla AD, et al. Exon sequencing of PAX3 and T (brachyury) in cases with spina bifida. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 97:597-601, 2013.
- Lei Y, Zhu H, et al. Mutations in planar cell polarity gene SCRIB are associated with spina bifida. *PLoS One*, 26:8, 2013.

## 2. 研究の目的

二分脊椎は先天的に脊椎骨が形成不全となつて起きる神経管閉鎖障害の一つであり、脊髄が脊椎の外に出て癒着や損傷するために様々な神経障害が見られる。二分脊椎の発

症には、危険因子としての「葉酸欠乏」や「抗てんかん剤」以外に、神経管の形成に必要な様々な遺伝子が関与していると考えられるが、未だ大部分症例において病因は不明である。申請者らは、重度知的障害、多発奇形と低身長が見られる姉・弟の症例を経験した。

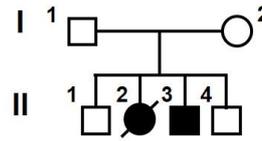


図1

その姉(□-2)には、二分脊椎が見られた。本疾患は胎生期の神経管や脳などの様々な器官の形成に関与する遺伝子(タンパク質)の異常が病因と考えられる。本研究では、アレイ CGH、エキソーム解析などの分子遺伝学的手法を駆使して、本疾患の病因遺伝子の同定を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 弟症例(図1、II-3)のGバンド法による染色体分析では異常が見られなかった。

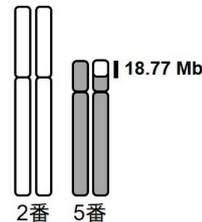


図2

そこで、弟症例のDNAを用いてアレイ CGH 解析を行い、本疾患の病因に染色体の微細な欠失や重複などの構造異常が見られるか否かを明らかにする。

(2) 家系員4名(父、母、症例(II-3)、健康な弟)(図1)のエキソーム解析を行い、病因遺伝子の同定を行う。

(3) 同定した病因候補遺伝子を NTD の疾患モデルマウスの約200個の病因遺伝子と比較し、病因遺伝子の絞り込みを行う。

## 4. 研究成果

対象症例は、姉(図1、□-2)に二分脊椎とキアリー型奇形が見られ、姉と弟(□-3)共に重度知的障害、運動発達遅滞と著しい身体発育不全(低身長)が見られる姉弟例である。平成26年から平成28年までの本研究(基盤C)において以下のことが明らかになった。

(1) □-3のエキソーム解析では、NTDの疾患モデルマウスの約200個の病因遺伝子に相当する遺伝子や既知のヒトNTDの病因遺伝子に変異はなかった。(2)アレイCGHにより、姉弟共に2番染色体短腕末端のトリソミー(トリソミー2p24.3-pter)と5番染色体短腕末端のモノソミー(モノソミー5p14.3-pter)を同定した。(3)塩基配列の決定によりトリソミーとモノソミーの大きさ

はそれぞれ 18.77 Mb と 17.89 Mb であり、過剰な 2p24.3-pter が 5p14.3-pter の欠失箇所に転座していた (図 2)。父親の染色体核型は 46,XY,t(2;5)(p24.3;p14.3)で、2 番染色体短腕と 5 番染色体短腕間での均衡型相互転座が見られ、本相互転座を持つ父親の精子が正常核型の母親の卵子と受精することで、姉と弟にトリソミー-2p とモノソミー-5p が生じたと考えられた。これまでに 2p24 トリソミーと二分脊椎との関連が報告されているが (参考文献 1、2)、二分脊椎が見られる 2p24 トリソミーの症例で、トリソミーの原因となる染色体転座の断点部位、すなわちトリソミー領域の長さを同定したのは申請者が初めてである。また、トリソミー-2p とモノソミー-5p が見られる症例は本症例を含めて 9 例の報告があり、そのうち 5 例 (55.6%) に NTD が見られた。本症例は本邦初のトリソミー-2p を伴った二分脊椎の症例であり、本研究結果は海外の学術雑誌に受理された。(雑誌文献 1)

(参考論文)

1. Therkelsen AJ, Hultén M, et al. Presumptive direct insertion within chromosome 2 in man. *Ann Hum Genet*, 36:367-373, 1973.
2. Lurie IW, Ilyina HG, et al. Trisomy 2p: analysis of unusual phenotypic findings. *Am J Med Genet*, 55:229-236, 1995.

## 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 13 件)

- (1) Fukushi D, Kurosawa K, Suzuki Y, Suzuki K, Yamada K, Watanabe S, Yokochi K, Wakamatsu N. Clinical and molecular genetic characterization of two siblings with trisomy 2p24.3pter and monosomy 5p14.3pter. *Am J Med Genet A* in press.
- (2) Suzuki Y, Enokido Y, Yamada K, Inaba M, Kuwata K, Hanada N, Morishita T, Mizuno S, Wakamatsu N. The effect of rapamycin, NVP-BEZ235, aspirin, and metformin on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway of PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Oncotarget* 2017 May 02. doi: 10.18632/oncotarget.17566. [Epub ahead of print]
- (3) Teraishi M, Takaishi M, Nakajima K, Ikeda M, Higashi Y, Shimoda S, Asada Y, Hijikata A, Ohara O, Hirai Y, Mizuno S, Fukada T, Furukawa T, Wakamatsu N, Sano S. Critical involvement of ZEB2 in collagen fibrillogenesis: the molecular reminiscent of Mowat-Wilson syndrome with Ehlers-Danlos syndrome. *Scientific Report* 7:46565. doi: 10.1038/srep46565, 2017.
- (4) Tanigawa J, Mimatsu H, Mizuno S, Okamoto N, Fukushi D, Tominaga K, Kidokoro H, Muramatsu Y, Nishi E, Nakamura S, Motooka D, Nomura N, Hayasaka K, Niihori T, Aoki Y, Nabatame S, Hayakawa M, Natsume J, Ozono K, Kinoshita T, Wakamatsu N, Murakami Y. Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties. *Hum Mutat* 2017 Mar 23. doi: 10.1002/humu.23219. [Epub ahead of print]
- (5) Ono H, Kurosawa K, Wakamatsu N, Masuda S. Hearing impairment in a female infant with interstitial deletion of 2q24.1q24.3. *Congenit Anom (Kyoto)*. Dec 30. Doi: 10.1111/cga.12207, 2016. [Epub ahead of print]
- (6) Baba S, Saito T, Yamada Y, Takeshita E, Nomura N, Yamada K, Wakamatsu N, Sasaki M: Novel mutation in HPRT1 causing a splicing error with multiple variations. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* Jan 2;36(1):1-6. doi: 10.1080/15257770.2016. 1163381, 2017. Epub 2016 Oct 18.
- (7) Takagi T, Nishizaki Y, Matsui F, Wakamatsu N, Higashi Y: *De novo* inbred heterozygous *Zeb2/Sip1* mutant mice uniquely generated by germ-line conditional knockout exhibit craniofacial, callosal and behavioral defects associated with Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mol Genet* 24(22): 6390-6402, 2015. Doi: 10.1093/hmg/ddv350. Epub 2015 Aug 28.
- (8) Yamada K, Aiba K, Kitaura Y, Kondo Y, Nomura N, Nakamura Y, Fukushi D, Murayama K, Shimomura Y, Pitt J, Yamaguchi S, Yokochi K, Wakamatsu N: Clinical, biochemical and metabolic characterization of a mild form of human short-chain enoyl-CoA hydratase deficiency: significance of increased N-acetyl-S-(2-carboxypropyl)cysteine excretion. *J Med Genet* 52(10): 691-698, 2015. Doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103231. Epub 2015 Aug 6.
- (9) Yamada K, Naiki M, Hoshino S, Kitaura Y,

- Kondo Y, Nomura N, Kimura R, Fukushi D, Yamada Y, Shimozawa N, Yamaguchi S, Shimomura Y, Miura K, Wakamatsu N: Clinical and biochemical characterization of 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase (HIBCH) deficiency that causes Leigh-like disease and ketoacidosis. *Mol Genet Metab Rep* 1: 455-460, 2014.
- (10) Yamada Y, Nomura N, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Wakamatsu N, Matsuda Y, Yamauchi T, Ueda T, Hasegawa H, Nakamura M, Ichida K, Kaneko K, Fujimori S: Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiencies: HPRT1 mutations in new Japanese families and PRPP concentration. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 33(4-6): 218-222, 2014.
- (11) Yamada Y, Nomura N, Yamada K, Matsuo M, Suzuki Y, Sameshima K, Kimura R, Yamamoto Y, Fukushi D, Fukuhara Y, Ishihara N, Nishi E, Imataka G, Suzumura H, Hamano S, Shimizu K, Iwakoshi M, Ohama K, Ohta A, Wakamoto H, Kajita M, Miura K, Yokochi K, Kosaki K, Kuroda T, Kosaki R, Hiraki Y, Saito K, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Wakamatsu N: The spectrum of *ZEB2* mutations causing the Mowat-Wilson syndrome in Japanese populations. *Am J Med Genet A* 164A(8): 1899-1908, 2014.
- (12) Naiki M, Ochi N, Kato YS, Purevsuren J, Yamada K, Kimura R, Fukushi D, Hara S, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi S, Wakamatsu N: Mutations in *HADHB*, which encodes the  $\beta$ -subunit of mitochondrial trifunctional protein, cause infantile onset hypoparathyroidism and peripheral polyneuropathy. *Am J Med Genet A* 164A(5): 1180-1187, 2014.
- (13) Fukushi D, Yamada K, Nomura N, Naiki M, Kimura R, Yamada Y, Kumagai T, Yamaguchi K, Miyake Y, Wakamatsu N: Clinical characterization and identification of duplication breakpoints in a Japanese family with Xq28 duplication syndrome including *MECP2*. *Am J Med Genet A* 164A(4): 924-933, 2014.
- [学会発表](計 24 件)  
<国内学会> (計 20 件)
- (1) 村上智美, 渡邊誠司, 山田憲一郎, 若松延昭, 柳澤敦広, 高梨潤一, 奥村良法, 愛波秀男。乳児期に緩徐に発症した SLC19A3 遺伝子変異を有する 1 例。第 61 回静岡小児神経研究会(浜松) 2014.7.5.
- (2) 山田憲一郎, 内木美紗子, 星野伸, 北浦靖之, 近藤雄介, 野村紀子, 木村礼子, 福士大輔, 山田裕一, 下澤伸行, 山口清次, 下村吉治, 三浦清邦, 若松延昭。HIBCH (3-Hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase) 欠損症の同定と変異タンパク質の生化学的解析。第 87 回日本生化学会大会(京都) 2014.10.18.
- (3) 山田憲一郎, 内木美紗子, 星野伸, 北浦靖之, 近藤雄介, 下澤伸行, 山口清次, 下村吉治, 三浦清邦, 若松延昭。第 56 回日本先天代謝異常大会(仙台)2014.11.14.
- (4) 福士大輔, 山田憲一郎, 野村紀子, 内木美紗子<sup>1</sup>, 木村礼子, 山田裕一, 熊谷俊幸, 山口久美子, 三宅能成, 若松延昭。家族性 Xq28 重複症候群の染色体重複機構の解明。日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会(東京) 2014.11.22.
- (5) 若松延昭: チアミントランスポーター, SLC19A3 欠損症とその病態解明。ビタミン B 研究委員会 第 438 回研究協議会(大阪) 2014.11.22.
- (6) Wakamatsu N, Yamada K, Naiki M, Hoshino S, Kitaura Y, Kondo Y, Nomura N, Kimura R, Fukushi D, Yamada Y, Shimozawa N, Yamaguchi S, Shimomura Y, Miura K. Clinical and biochemical characterization of patients with HIBCH deficiency. 第 56 回日本神経学会学術大会(新潟) 2015.5.20.
- (7) 鈴木康予, 榎戸靖, 山田憲一郎, 若松延昭, 水野誠司, 花田直樹, 森下剛。PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) の 1 症例。第 103 回東海臨床遺伝・代謝懇話会(名古屋) 2015.6.30.
- (8) 水野誠司, 榎戸靖, 森下剛, 花田直樹, 山田憲一郎, 若松延昭。著しい下肢の過成長と部分的皮下脂肪組織の増殖を呈する PROS (PIK3CA-related Overgrowth Spectrum) の 1 例。第 55 回日本先天異常学会(横浜) 2015.7.25.
- (9) 榊原崇文, 高木久美子, 越智聡史, 竹下佳弘, 山田憲一郎, 若松延昭, 嶋緑倫。Biotin-Responsive Basal Ganglia Disease(BBGD)と診断した幼児例。第 58 回日本小児神経学会近畿地方会(大阪) 2015.10.24.
- (10) 福士大輔, 水野誠司, 稲葉美枝, 鈴木

- 香, 野村紀子, 鈴木康予, 山田憲一郎, 若松延昭. *SF3B4* の欠失が見られる Nager 症候群の 1 症例. 日本人類遺伝学会第 60 回大会 (東京) 2015.10.16.
- (11) 若松延昭, 山田憲一郎, 北浦靖之, 近藤雄介, 野村紀子, 村山圭, 山口清次, 下村吉治, 横地健治, James Pitt. 軽症 Short-chain enoyl-CoA hydratase (ECHS1) 欠損症の生化学的解析: 診断に有効な化合物の同定. 第 57 回日本先天代謝異常学会総会 (大阪) 2015.11.12.
- (12) 山田憲一郎, 相場佳織, 北浦靖之, 近藤雄介, 野村紀子, 中村勇治, 福士大輔, 村山圭, 下村吉治, James Pitt, 山口清次, 横地健治, 若松延昭. ヒト ECHS1 の生化学的解析と軽症型 ECHS1 欠損症の病態解明. BMB2015・第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会 (神戸) 2015.12.3~12.4.
- (13) 鈴木康予, 榎戸 靖, 山田憲一郎, 花田直樹, 森下 剛, 水野誠司, 若松延昭. *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS) の病態解明. BMB2015・第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会 (神戸) 2015.12.3.
- (14) 鈴木康予, 水野誠司, 榎戸 靖, 山田憲一郎, 稲葉美枝, 村松友佳子, 花田直樹, 森下 剛, 若松延昭. *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS) の 1 症例. 第 27 回日本整形外科学会骨系統疾患研究会 (岐阜) 2015.12.5.
- (15) 鈴木康予, 若松延昭: Deficiency of lysosomal enzymes leads to an increase in insoluble alpha-synuclein. 第 57 回日本神経学会学術大会 (神戸) 2016.5.21.
- (16) 若松延昭: SLC19A3 欠損症: 遺伝子型と臨床症状の関連について. 第 444 回ビタミン B 研究協議会 (富山) 2016.6.16.
- (17) 鈴木香, 山田憲一郎, 辻愛, 柴田克己, 若松延昭. SLC19A3 異常症モデルマウスにおける視床内側下核での神経変性. 第 39 回日本神経科学大会 (横浜) 2016.7.21.
- (18) 山田憲一郎, 村上智美, 榎原崇文, 鈴木香, 山口清次, 渡邊誠司, 若松延昭. 新規 SLC19A3 欠損症の同定と変異 SLC19A3 のチアミントランスポーター活性. 第 58 回日本先天代謝異常学会総会 (東京) 2016.10.27.
- (19) 鈴木康予, 榎戸 靖, 山田憲一郎, 稲葉美枝, 花田直樹, 森下 剛, 水野誠司, 若松延昭. PI3K/AKT/mTOR シグナル阻害剤による *PIK3CA*-related overgrowth spectrum 患者皮膚線維芽細胞の増殖抑制効果. 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2016.12.1.
- (20) 加藤君子, 福士大輔, 鈴木康予, 山田憲一郎, 若松延昭, 相場佳織. Xq27-q28 に欠失が見られた 1 女児例. 第 106 回東海臨床遺伝・代謝懇話会 (名古屋) 2017.2.18.
- <国際学会> (計 4 件)
- (1) Yamada K, Naiki M, Hoshino S, Kitaura Y, Kondo Y, Nomura N, Kimura R, Fukushi D, Yamada Y, Shimomura Y, Miura K, Wakamatsu N. A case of siblings with Leigh-like disease caused by 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase deficiency. European Human Genetics Conference 2014 (Milano Italy) 2014.6.1.
- (2) Pitt J, Peters H, Yaplito-Lee J, Boneh A, Ferdinandusse S, Ruitter J, Wanders RJA, Kok F, Boy R, Korman SH, Fitzsimons PE, Crushell E, Hughes J, Yamaguchi S, Goto Y, Wakamatsu N, Yamada K, Yokochi K, Chen BC, Ngu LH. Leigh disease and the valine pathway. Annual Symposium 2015, Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (Lyon, France) 2015.9.4.
- (3) Suzuki Y, Enokido Y, Yamada K, Hanada N, Morishita T, Mizuno S, Wakamatsu N. Inhibition of overactivated PIK3/AKT/mTOR signalling pathway as a therapeutic strategy for *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS). The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics (ICHG 2016) (Kyoto, Japan) 2016.4.4.
- (4) Wakamatsu N, Fukushi D, Suzuki K, Nomura N, Suzuki Y, Yamada K, Inaba M, Mizuno S. Clinical and genetic characterization of patient with *SOX5* haploinsufficiency caused by *de novo* balanced chromosomal translocation. The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG 2016)(Kyoto, Japan) 2016.4.5.
- 〔図書〕(計 3 件)
- (1) 山田裕一, 若松延昭: HPRT 欠損症 (Lesch-Nyhan 症候群, Kelley-Seegmiller 症候群). 別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.28 「神経症候群□-その他の神経疾患を含めて-(第 2 版)」, pp 632-636, 2014.
- (2) 若松延昭, 平木洋子: Mowat-Wilson 症候

群．別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.29「神経症候群□-その他の神経疾患を含めて-(第2版)」, pp 613-616, 2014.

- (3) 鈴木康予, 水野誠司, 榎戸 靖, 山田憲一郎, 稲葉美枝, 村松友佳子, 花田直樹, 森下 剛, 若松延昭: *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS)の1症例. 第27回日本整形 外科学会骨系統疾患研究会記録集, 29-31, 2016.

〔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〕

ホームページ等なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若松 延昭 (WAKAMATSU NOBUAKI)

愛知県心身障害者コロニー

発達障害研究所・遺伝学部・部長

研究者番号: 60274198

### (2) 研究協力者

野村紀子 (NOMURA NORIKO)

福士大輔 (FUKUSHI DAISUKE)

黒澤健司 (KUROSAWA KENJI)

横地健治 (YOKOCHI KENJI)