

先天性大脳白質形成不全症における遺伝要因の包括的検討

著者	市野井 那津子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16214号
URL	http://hdl.handle.net/10097/61113

博士論文

先天性大脳白質形成不全症における遺伝要因の包括的検討

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

発生発達医学講座 小児病態学分野

市野井 那津子

目次

1. 要約	1
2. 研究背景	4
3. 研究目的	8
4. 研究方法	
I 対象	9
II 倫理	9
III 方法	10
5. 研究結果	
I 患者の臨床像	21
II 判明した臨床的異常および遺伝学的異常について	21
6. 考察	27
7. 結論	35
8. 謝辞	36
9. 文献	37
10. 図	42
11. 表	53

1. 要約

先天性大脳白質形成不全症は、大脳白質における髄鞘の先天性形成不全による白質病変を呈する疾患群である。疾患群を構成する個々の病気は、非常に稀であり多様な遺伝的異常を有する。そのため、その疫学や臨床像、遺伝的異常の研究はこれまでほとんど行われていない。そこで今回私は、先天性大脳白質形成不全症の遺伝的要因を明らかにするために、集積した症例について包括的な遺伝学的検査を施行した。

対象は、頭部 magnetic resonance image の T2 強調画像で大脳白質領域に高信号を認め、著明な髄鞘形成障害が示唆された 29 例である。これらの患者に対して、染色体検査、数種の疾患病因遺伝子を標的とした遺伝子解析、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (comparative genomic hybridization; CGH)、さらにエクソーム解析を施行した。

対象患者は、男性 22 名、女性 7 名、発症月齢の中央値は 4 カ月であった。初発症状は、精神運動発達遅滞 (55%) が最多であり、続いて、痙攣、眼振、発育不良がそれぞれ 17% で認められた。このほか、経過中に認めた主な神経学的異常所見は、痙性対麻痺、不随意運動、小頭症などであった。少数例に認めた症状は、性腺機能低下、白内障、頭蓋内石灰化などであった。

解析の結果、対象 29 例中 19 例 (65.5%) で分子遺伝学的異常を指摘しえた。Pelizaeus-Merzbacher 病の病因遺伝子である *PLP1* 異常と、18 番染色体長腕欠失が最多でそれぞれ 11% であった。全体では 19 例に 13 の遺伝学的異常を同定し、*EIF2B2*

遺伝子欠失, 15 番染色体長腕ヘテロ接合性喪失, *SLC16A2* 遺伝子のヘミ接合変異, *TREX1* 遺伝子の複合ヘテロ接合変異, *TUBB4A* 遺伝子の *de novo* 変異, *KCNT1* 遺伝子変異の *de novo* 変異, *MCOLN1* 遺伝子の複合ヘテロ接合変異など非常に多彩であった。

同胞発症家系におけるエクソーム解析で新規の疾患候補遺伝子 *PNPT1* を同定した。*PNPT1* 遺伝子は, 低分子 RNA を細胞質からミトコンドリア内に輸送する機能を有するポリヌクレオチドリン酸化酵素をコードする。これまで, 先天性大脳白質形成不全症において低分子 RNA に関連した病因遺伝子が複数報告されており, 低分子 RNA の合成障害や低分子 RNA へのアミノアシル基付加障害が病態に関与していると考えられている。今回同定した *PNPT1* 遺伝子の機能からは, 先天性大脳白質形成不全症の発症には, 低分子 RNA の減少および機能障害のみならず, 低分子 RNA のミトコンドリアへの輸送障害, すなわちミトコンドリア内の機能的低分子 RNA の減少が要因となることが示唆された。*PNPT1* は, 低分子 RNA と髄鞘化障害における一連の病態解明の一端を担う重要な遺伝子であると考えられた。

各検査別の診断率は, 染色体検査 10% (3/29 例), 標的遺伝子検査 20% (5/25 例), アレイ CGH 10% (2/20 例), エクソーム解析 44% (8/18 例) であった。エクソーム解析導入前後の診断率を比較すると導入前が 38%, 導入後が 65%におよび, 各遺伝子のエクソン領域を網羅的に調べることが可能であるエクソーム解析は, 先天性大脳白質形成不全症のような多様な遺伝子異常を有する疾患群に対する検査として非常

に有用であった。それぞれの遺伝要因から推測される病態に応じて適切な医療を提供するために、エクソーム解析を含めた遺伝学的検査が重要であると考えられた。

2. 研究背景

髄鞘化は脳の成熟に必須の機序である。神経細胞同士における活動電位は神経細胞の軸索を介して伝達されるが、脳の髄鞘化は、軸索を髄鞘（h）で覆うことによって髄鞘が絶縁体として機能し、電気の伝達速度が飛躍的に増加する跳躍伝導に寄与している。特に胎児期から乳幼児期にかけて大脳白質は髄鞘化に伴って急激な変化を遂げる。髄鞘化の成熟によって、正常では頭部 magnetic resonance image（以下 MRI）における大脳白質領域での T1 強調画像の低信号の高信号化、T2 強調画像の高信号の低信号化が観察される¹⁾。先天性大脳白質形成不全症は、この髄鞘化が中枢神経において先天的に障害を受け、ほとんど髄鞘が形成されずに白質変性を呈する疾患群である。頭部 MRI では、髄鞘形成不全を反映し T2 強調画像での高信号が持続して認められることとなる。T1 強調画像の信号は含まれる髄鞘量によって様々な信号を呈する。髄鞘化の障害は広範であり、その症状は中～重度の精神運動発達遅滞や痙性麻痺など重度の神経学的異常を呈する。

髄鞘形成不全（hypomyelination）の診断は頭部 MRI 所見に基づいて行う。少なくとも 6 カ月以上の期間をおいた 2 回の MRI において髄鞘形成不全パターンを示すことで診断する。2 回のうち 1 回は 1 歳以上で評価すべきであり、2 歳以上で著明な髄鞘形成不全を呈した場合は、その後正常な髄鞘形成に至ることはほとんどなく永続的な髄鞘形成不全を示すことがこれまでの経験上判明している²⁾。本邦における「先天性大脳白質形成不全症の診断と治療を目指した研究」班による診断基準³⁾では、MRI

画像による診断に加え痙性四肢麻痺を認めることが必須で、末梢神経障害の有無により分類し、さらに遺伝学的検査による確定を進める。しかし発症初期は痙性四肢麻痺を呈さずに低緊張のことが多い。また大脳白質病変を呈する疾患には、代謝性疾患や全身性障害に伴う二次的な髄鞘化障害あるいは髄鞘化の破壊である脱髄、感染に伴う炎症性疾患なども含まれ、症状または画像所見からこれらを鑑別し先天性大脳白質形成不全症を診断することは困難である場合も少なくない。

先天性大脳白質形成不全症は、上記に述べた臨床症状や頭部 MRI 所見によって診断を行うが、その遺伝形式および遺伝学的異常は多様な疾患群である。常染色体優性遺伝形式、常染色体劣性遺伝形式、X連鎖劣性遺伝形式または孤発性で発症し、染色体異常に起因する疾患、遺伝子欠失に起因する疾患、遺伝子の一部のエクソン領域欠失に起因する疾患、遺伝子点変異あるいは数塩基の挿入または欠失に起因する疾患が判明している。これまで、先天性大脳白質形成不全症の遺伝要因および疫学について包括した研究はほとんど行われていない。数少ない疫学調査の中、日本人における罹患率が10万人あたり1.4人であることが近年報告され本疾患の稀少性が示された⁴⁾。

このように遺伝学的異常の多様性を有し稀少である先天性大脳白質形成不全症について包括的に遺伝要因を検討することは、今後の疾患の診断や遺伝カウンセリング、個々の病因に応じた治療などの進歩に大いに貢献すると考えた。

私は今回、先天性大脳白質形成不全症における遺伝要因を明らかにするために、既知または新規候補の病因遺伝子の変異を網羅的に同定しうるエクソーム解析をも用

いた病因検索を行った。これまで、先天性大脳白質形成不全症における病因検索としては、染色体検査、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (array comparative genomic hybridization; 以下アレイ CGH), 既知遺伝子のサンガー法によるシーケンスなどが広く行われてきた。染色体検査では、目視可能である大きな染色体の構造異常や数的異常を検出できる。アレイ CGH では、ゲノム DNA の微細な重複、欠失などのコピー数の異常を全染色体に対して網羅的に検出しえる。既知遺伝子のサンガー法によるシーケンスでは、各標的遺伝子上の点変異や塩基挿入・欠失を明らかにすることが可能である。しかし、これらの既存の遺伝学的検査では病因を同定しえない患者が先天性大脳白質形成不全症では半数程度に及ぶ⁴⁾。これらの病因不明例に対してエクソーム解析を施行しその有用性について検証することは、今後鑑別診断を行う際の検査計画において遺伝学的検査の位置づけを明らかにすることが可能となり有益であると考えた。

先天性大脳白質形成不全症では、MRI 所見に基づく分類や遺伝学的検査の進歩によって近年新たな疾患が次々と同定されている。本邦の研究班³⁾、Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) , Barkovich⁵⁾ らが hypomyelinating leukodystrophy として挙げている疾患の要覧を表 1 に示す。画像所見上大脳白質病変を呈する疾患が非常に多岐にわたりそれぞれの診断が困難であること、次々と新規病因遺伝子が同定され新たな疾患が追加されていることから、分類によって疾患が合致せず統一した見解がないのが現状である。先に

挙げた 3 つの分類に共通した代表的疾患には、髄鞘の主要な蛋白質のひとつである proteolipid protein 1 の異常が要因とされる Pelizaeus-Merzbacher 病 (病因遺伝子 *PLP1*)⁶⁾ が挙げられる。本疾患は 19 世紀末に初めて報告され、先天性大脳白質形成不全症の半数程度を占める⁴⁾とされている。その後 MRI による診断の進歩とともに、1990 年代前後に報告された疾患には、18 番染色体長腕欠失症候群 (18q 欠失症候群)、Cockayne 症候群, Salla 病, Oculodentodigital dysplasia, fucosidosis などがある。さらに、2000 年代に入って、脱髄型末梢神経炎, 中枢性髄鞘形成不全症, Waardenburg 症候群, Hirschsprung 病⁷⁾, Pelizaeus-Merzbacher 様病⁸⁾, 基底核および小脳萎縮を伴う髄鞘形成不全症⁹⁾, Allan-Herndon-Dudley 症候群¹⁰⁾, ポリメラーゼ III 関連白質ジストロフィー¹¹⁾, 先天性白内障を伴う髄鞘形成不全症¹²⁾などが同定された。次世代シーケンサーの導入によってこれまで分類不能であった髄鞘形成不全を呈する疾患においても、*RARS*¹³⁾, *DARS*¹⁴⁾, *QARS*¹⁵⁾などが病因遺伝子として相次いで報告されている。これらの病因遺伝子から推測される発症機序は多様である。今回、エクソーム解析も含めた包括的な遺伝学的検査を施行することによって新規疾患候補遺伝子を同定することが、髄鞘形成不全の新たな発症機序の解明やより深い病態の理解、適切な疾患の治療や予後予測につながると考えた。

3. 研究目的

本研究の目的は、先天性大脳白質形成不全症について、その遺伝要因を明らかにすることである。

第二の目的として、先天性大脳白質形成不全症の診断ツールとしてのエクソーム解析の有用性を検証することである。

第三に、新規疾患候補遺伝子を同定することである。

4. 研究方法

I 対象

本研究では、何らかの神経学的異常所見を契機に撮影した頭部 MRI 所見上、大脳白質に著明な髄鞘化障害を示唆する T2 強調画像のびまん性高信号領域を有する患者 29 名を対象とした。診断は小児神経科医によって行われた。東北大学病院および宮城県立拓桃医療療育センターに通院している患者らが 18 名、それ以外の患者が通院している病院所在地は、群馬・千葉・滋賀が各 2 名、茨城，愛知，愛媛，広島，福岡が各 1 名であった。頭部 MRI 検査での異常所見が持続していることは 2 回以上の検査で確認されており，子宮内感染は否定された。

II 倫理

本研究においては，東北大学大学院医学系研究科倫理委員会で承認された同意書に基づいて，患者またはその親から書面でのインフォームドコンセントを得たうえで，検体および臨床情報を収集した。

III 方法

1 DNA の抽出

血液： 対象患者およびその両親の末梢血管から PAXgene DNA 採血管に採血した，全血 5ml 白血球中から，PAXgene Blood DNA Kit (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon) を用いて DNA 抽出を行った。または，EDTA 採血管に採血した全血 5ml から，SepaGene® (EIDIA Co., Ltd., Tokyo) を用いて，DNA を抽出した。

唾液： Oragene DNA Sample Collection Kit (Genotek, Ottawa, Ontario) に，患者両親から非侵襲的に唾液を 2ml 採取し，Oragene 精製溶液を用いて，唾液中 DNA 抽出を行った。

以下の実験では，Qubit® dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen Ltd., Paisley) で定量した DNA を使用した。

2 遺伝学的検査

(1) 染色体検査

すべての患者に染色体検査として G 分染法または染色体高精度分染法が施行された。

(2) 標的遺伝子検査

(2)-1 疾患特異的症候を有する症例について

髄鞘形成不全に伴ってある疾患に特異的な症候を有する患者では，疾患病因遺伝

子について異常の有無を検索した。甲状腺機能異常症を合併する 1 症例では Allan-Herndon-Dudley 症候群を疑い *SLC16A2* 遺伝子解析が、頭蓋内石灰化を認める 1 症例では Aicardi-Goutieres 症候群を疑い *TREX1* 遺伝子解析が行われた。また日光過敏症を有する 1 患者では、皮膚線維芽細胞を用いた紫外線感受性試験法を施行した。

(2)-2 疾患特異的症状を有さない症例について既知疾患病因遺伝子 (*PLP1* 遺伝子, *GJC2* 遺伝子, *MBP* 遺伝子) のスクリーニング

本研究において検体収集を開始した 2009 年前後は先天性大脳白質形成不全症の病因遺伝子として, *PLP1* 遺伝子, *GJC2* 遺伝子, *MBP* 遺伝子が主に知られていた。そこで, まずこの 3 遺伝子の異常の有無のスクリーニングを行った。大脳白質病変に随伴する疾患特異的症状を有さず, その時点で原因不明であった患者 23 名に対して, サンガー法による遺伝子変異の有無, および Multiplex Ligation Probe Amplification (以下 MLPA) 法による遺伝子の各エクソンの重複または欠失の有無を確認した。

MLPA 法には, Salsa MLPA Kit (MRC-Holland, Amsterdam)を用いた。

(3) アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション

上述の検査で異常を認めなかった患者 10-29 の 20 名に対してアレイ CGH を施行した。今回 CGH 用マイクロアレイには, CGH 244K または CGH+SNP 180K (Agilent

Technologies, Santa Clara, CA) を使用した。CGH 244K は、236,000 以上のオリゴヌクレオチドがアレイ上に搭載されており、その平均解像度は 6.4 kb である。CGH+SNP 180K は、120,000 CGH プローブ (解像度 25 kb) と 60,000 SNP プローブ (解像度 5-10 Mb) が搭載されておりヘテロ接合性喪失も検出できる。2011 年までは 6 名の患者 (患者 16, 19, 23, 24, 26, 28) に CGH 244K, 以降はヘテロ接合性喪失の検出も目的として 14 名の患者 (患者 10-15, 17, 18, 20-22, 25, 27, 29) に CGH+SNP 180K を使用した。サンプルは、患者から抽出した DNA 1.5 µg および性別を合致させた対照 DNA 1.5 µg を使用した。製造元のプロトコルに従い、制限酵素を用いて切断した DNA に、蛍光色素 Cy3 (対照), Cy5 (患者) による標識反応 (ラベリング) を行った。ラベル化 DNA を精製濃縮したのちに、患者および対照のサンプルを同量混和し、CGH 244K または CGH+SNP 180K 搭載アレイ上で、65°C, 20 rpm で 24-40 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後はアレイスライドを洗浄し、DNA マイクロスキャナでスキャンした。解析は CytoGenomics (v2.5)で行った。

(4) エクソーム解析

(4)-1 エクソーム解析を施行した対象検体

染色体検査, 標的遺伝子検査, アレイ CGH で異常を認めなかった患者 12-29 の 18 名に対して, エクソーム解析を施行した。対象 18 名のうち, 両親 DNA 検体を得ることができず発端者のみの解析を 9 名, 家族の DNA 検体をご提供いただき家系解

析を 9 名に対して行った。家系解析を行った 9 家系のうち、1 家系につき患者および両親の 3 検体を得られたのは 8 家系であった。残る 1 家系は同胞発症家系であり、患者、死亡罹患同胞、健常同胞、両親の 5 検体を得られたが死亡罹患同胞の検体が少量であったためそれを除外した、患者、健常同胞、両親の 4 サンプルをエクソーム解析に使用した。死亡罹患同胞検体はエクソーム解析後の変異確認に用いた。

(4)-2 エクソーム解析におけるサンプル調整法

本研究では Ion Proton (Life Technologies, Carlsbad, CA) を使用しエクソーム解析を行った。ライブラリ作製は以下の手順で行った。まず、DNA 1 μg を AMPure (Agencourt, Boston, MA) で精製したのちに、Ion Shear Plus Reagents Kit (Life Technologies) に付属している試薬を用いて酵素法で断片化し、再度 AMPure で精製し 25 μl に調整した。Library の作製は TargetSeq Exome Kit (標的領域： 50Mb) を用いた。断片化した DNA 25 μl にアダプター (A1, P1) 10 μl , dNTP Mix 2 μl , Nick Polymerase 8 μl , DNA Ligase 4 μl , Nuclease Free water 41 μl を添加し、25°C15 分、72°C20 分、4°C ∞ で加温しアダプターを結合した。AMPure を用いてライブラリの標的ピークが 350 bp となるようサイズセレクションしたのち、Platinum PCR Supermix High Fidelity および Library Amplification Primer Mix を用いて PCR でライブラリを増幅した。PCR は 95°C5 分、[95°C15 秒、58°C15 秒、70°C1 分] \times 7 サイクル、70°C5 分、4°C ∞ で行った。AMPure 精製を行い、BioAnalyzer(Agilent

Technologies)および Qubit® dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen Ltd.)
にてライブラリのサイズおよび定量の評価を行った。次にエクソン領域をキャプチャ
するための手順を行った。500 ng の各サンプルに Human Cot-1 DNA 5 µl, Ion
TargetSeq Blocker P1 5 µl, Ion TargetSeq Blocker A 5 µl を添加し、遠心濃縮機で乾
燥させた。その後、乾燥したチューブに TargetSeq Hybridization Solution A 7.5 µl,
TargetSeq Hybridization Enhancer B 3 µl, Ion TargetSeq Exome Probe Pool 4.5 µl
を加え、47°Cで72時間ハイブリダイゼーションした。Exome Probe がハイブリダイ
ズしたサンプルを Streptavidin beads でキャプチャし、47°Cで加温しながら Wash
solution で洗浄した。再度 Platinum PCR Supermix High Fidelity および Library
Amplification Primer Mix を用いて PCR でライブラリを増幅した。PCR は 95°C5
分, [95°C15秒, 58°C15秒, 70°C1分]×8 サイクル, 70°C5分, 4°C∞で行った。AMPure
で精製したのちに E-Gel SizeSelect Agarose Gel (Applied Biosystems, Foster City,
CA) を用いてライブラリが 250-270 bp となるようサイズセレクションを行った。再
度 AMPure 精製を施行した。以上の工程で作製したライブラリに Ion OneTouch2 を
用いて emulsion PCR を行った。これは形成された emulsion (微細な反応泡) 内に
Ion Sphere Particles (ビーズ) と一種類のライブラリテンプレートを取り込んだの
ちに PCR を行うため、一つの emulsion 内に一種類の配列が増幅した状態となる。
このようにして増幅したサンプルは Ion OneTouch ES でビオチンを用いて回収、濃
縮した。サンプルは1サンプル毎に下準備を行った1枚の Ion PI Chip (v2)にローデ

イングし、Ion Proton シーケンサーで読み取りを行った。

(4)-3 in-silico 解析

A 配列照合，変異検出

Torrent Suit Software (v4.0-4.2)を用いて、ヒトゲノム参照配列 (hg19) へ配列のマッピングを行った。変異の検出は、Torrent Suit Software 付属のツールである Torrent Variant Caller で施行し、変異の意味づけ (アノテーション) には ANNOVAR¹⁶⁾を用いた。

B 変異絞り込み，4種の解析

変異絞り込みの概説について図 1 に示した。変異の絞り込みは、以下の4つの方法でそれぞれ行った； (1) 既知あるいは関連遺伝子解析 (既報の 2 名を除いた解析対象患者 16 名)，(2) 常染色体優性遺伝解析 (家系のサンプルを得られ、常染色体劣性遺伝形式が想定される患者 19 を除いた 8 家系)，(3) 常染色体劣性遺伝解析 [本研究の解析中に他施設で病因遺伝子が判明した既報の 2 名 (患者 14¹¹⁾, 12²⁵⁾] を除いた解析対象患者 16 名)，(4) X 連鎖劣性遺伝解析 (家系のサンプルが得られかつ患者が男性である 4 家系)。(1) 既知あるいは疾患関連遺伝子は、OMIM の Clinical Synopses において、'hypomyelination', 'dysmyelination', 'myelination' と合致する遺伝子およびそれに関連する遺伝子を抽出した。合計 142 遺伝子のリストは表 2 に示した。これらの遺伝子上に位置するバリエーションについて、dbSNP 132 において病的

意義を有さないと考えられているバリエント (Non Flagged single nucleotide variant: Non Flagged SNV) とアミノ酸置換を伴わない synonymous SNV を除外し、エクソン領域またはスプライシング領域以外の変異を除外した。次に非関連疾患および健常両親 36 名の教室内のデータベースで、minor allele frequency < 0.1 を満たさないバリエントを除外した。その後、遺伝形式と合致しないバリエントを除外し、残った変異をサンガー法によるシーケンスで確認した。(2) 常染色体優性遺伝解析、(3) 常染色体劣性遺伝解析、(4) X連鎖劣性遺伝解析においては、dbSNP 132 の Non Flagged SNV と synonymous SNV を除外し、エクソンまたはスプライシング領域以外の変異を除外した。次に 1000 Genome Project, Exome Sequencing Project (ESP) 6500 の 2 つのデータベースを用いて、minor allele frequency < 0.02 を満たさないバリエントを除外し、さらに日本人の SNP データベースである Human Genetic Variation Database (HGVD, Japanese genetic variation consortium, A reference database of genetic variations in Japanese population, URL: <http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB>), 非関連疾患および健常両親 36 名の教室内のデータベースの 2 つを用いて、minor allele frequency < 0.05 を満たさないバリエントを除外した。その後、バリエントの機能予測ツールである SIFT¹⁷⁾, PolyPhen-2¹⁸⁾, MutationTaster¹⁹⁾, GERP++²⁰⁾を用いてバリエントの病的意義を予測した。各機能予測ツールのいずれにおいても病的ではないと予測されたバリエントを除外した。各機能予測ツールの特徴としては、SIFT は種間におけるアミノ酸配列

相同性と置換されたアミノ酸の類似性によって蛋白質機能への影響を予測，**PolyPhen-2** はヒトアミノ酸配列相同性と蛋白質ドメイン，立体構造などに基づき蛋白質機能変化を予測，**MutationTaster** は配列保存性，スプライス部位変化，蛋白変化に伴う mRNA 量への影響を考慮し 1 塩基置換のみならず塩基挿入や欠失も含めた機能を予測，**GERP++**は種間でのヌクレオチド配列の保存性からスコアを計算するツールである。最後に遺伝形式と合致しないバリエントを除外した。(2) 常染色体優性解析では，健常親に認められた変異を除き，*de novo* 変異を探索した。(3) 常染色体劣性遺伝解析では，1 遺伝子に 2 つ以上の変異が検出されたバリエントまたはホモ接合変異が検出されたバリエントを残した。残されたバリエントが 1 人当たり 50 前後と多数であったためさらに **genotype quality** ≤ 20 またはカバーリード数 ≤ 10 のバリエントを除いた。(4) X 連鎖性遺伝解析では，母にヘテロ接合，患者にヘミ接合変異が検出されたバリエントを残した。(1) 既知あるいは関連遺伝子解析と同様に，(2) 常染色体優性遺伝解析で残った変異はすべてサンガー法によるシーケンスで確認した。除外されずに残った遺伝子が 1 つに絞られた患者 19 を除いては，(3) 常染色体劣性遺伝解析および (4) X 連鎖性遺伝解析で残った変異はサンガー法による確認は行っていない。

3 新規疾患候補遺伝子 *PNPT1* の解析

エクソーム解析によって、1家系に新規疾患候補遺伝子 *PNPT1* を同定した。その病原性を確認するため以下の解析を進めた。

(1) 他コホートにおける *PNPT1* 遺伝子スクリーニング

異なる患者に同じ遺伝子異常を同定することによってその病原性を確かなものとするため、他の先天性大脳白質形成不全症患者における *PNPT1* 遺伝子変異の検索を行った。自治医科大学小坂仁教授より、病因不明の先天性白質形成不全症患者20例のDNA検体を供与して頂き、*PNPT1* 遺伝子変異の有無をサンガー法で確認した。各DNAはGenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare) をプロトコル通りに用いて増幅したのちに使用した。Exon 5 および Exon 15 については Nested PCR を施行した。Exon 5 は1回目に Ex 4 F, Ex 17 R プライマーを用いて増幅し、これをテンプレートとして、Ex 5 F および Ex 5 R で再度 PCR を施行した。Exon 15 は Ex 15 F v2 および Ex 15 R v2 を用いて増幅し、これをテンプレートとして Ex15 F, Ex 15 R で2度目の PCR を施行した。各エクソンのプライマーは表3に示した。

(2) ウェスタンブロッティング

PNPT1 がコードする蛋白質 PNPase の発現をウェスタンブロッティングで解析した。患者皮膚線維芽細胞は、ミトコンドリア呼吸鎖酵素解析目的に主治医によって採

取され埼玉医科大学小児科大竹明教授へ送付されたものを、主治医および大竹教授の同意を得て分与していただいた。患者皮膚線維芽細胞および対照として教室内の非関連疾患患者 3 名の皮膚線維芽細胞を用いて以下の手順で行った。

(2)-1 細胞培養

皮膚線維芽細胞は、ペニシリン 20 U/ml, ストレプトマイシン 20 µg/ml, 1M HEPES, 10% fetal bovine serum を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Gran Island, NY) を用いて、37°C, 5%二酸化炭素で培養した。

(2)-2 蛋白抽出

培養皮膚線維芽細胞を 6 ウェルのプレートに撒き、72 時間後に細胞を回収した。10%のプロテアーゼ阻害剤を加えた 10 倍希釈 RIPA Buffer (Cell Signaling Technology, Denvers, MA) 500 µl を用いて細胞を可溶化した。4°C, 8,000 g で 10 分間遠心し、上清を抽出蛋白として使用した。蛋白定量は BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) をプロトコル通りに用いて行った。Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA) 900 µl, 2-Mercaptoethanol 100 µl を抽出した蛋白に同量添加し、100°C, 5 分で加熱変性し SDS-PAGE に使用した。

(2)-3 電気泳動, 転写

SDS-PAGE バッファーおよび 10% BIORAD Mini-PROTEAN TGX Gels (Bio-Rad)

を用い、200V, 20mA, 40W で 50 分泳動した。転写は Trans Blot(Bio-Rad)を用いて行った。

(2)-4 抗体反応および画像解析

一次抗体は、ウサギ PNPase ポリクローナル抗体 (PA5-22397, Thermo), マウス Porin モノクローナル抗体 (Anti-VDAC1 / Porin antibody [20B12AF2], abcam, Cambridge, MA)を用いた。いずれも Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO, Osaka)を用いて 3,000 倍希釈し使用した。二次抗体は、HRP 標識ウサギ抗体および HRP 標識マウス抗体(GE Healthcare)を用いた。それぞれ Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO)を用いて、HRP 標識ウサギ抗体を 50,000 倍希釈、HRP 標識マウス抗体を 10,000 倍希釈した。ECL Prime Western Blotting Detection Reagents Regand (GE Healthcare)による発色後、VersaDoc 5000MP (Bio-Rad) で画像解析を行った。統計学的解析には統計ソフトウェア JMP Pro 11 を用いて Dunnett 検定を行った。ウエスタンブロッティングは 3 回以上繰り返し、同様の傾向であることを確認した。

5. 研究結果

I 患者の臨床像

患者 29 名の臨床的特徴を表 4 に示した。発症月齢の中央値は 4 カ月（0-36 カ月）で、生後 6 カ月以内の発症が 59%，生後 6-12 カ月発症が 21%であった。男女比は男性：女性=22：7であった。血族婚の家系はなかった。最多の初発症状は精神運動発達遅滞で 16 人に認められた。次に痙攣 5 名，眼振 5 名，発育不良 5 名であった。そのほか経過中に認められた主な神経学的異常所見は痙性麻痺 11 名，不随意運動 10 名，小頭症 10 名であった。頻度の低い症状には失調，性腺機能低下，白内障，肝機能障害，オプソクローヌスなどが挙げられた。聴性脳幹反応は結果を確認できた 22 名中 14 名（64%）で異常所見を呈していた。一部の患者は，MRI 所見上脳梁の低形成や大脳あるいは小脳の萎縮を伴っていた。本研究で何らかの遺伝学的異常を指摘され，頭部 MRI のデータを得ることが可能であった 11 名の頭部 MRI T2 強調画像所見を図 2 に示した。髄鞘形成不全の程度および範囲は症例によって様々であった。

II 判明した臨床的異常および遺伝学的異常について

施行した検査および判明した遺伝子異常についての概説を図 3 に示す。全体では 29 人中 19 人（65.5%）が診断に至った。

1 染色体検査

染色体 G 分染法および 18 番染色体高度分染法の染色体検査によって，29 名中 3

名（10％）に異常が判明した。患者 1²¹⁾、患者 2、患者 3 の 3 名全例が 18 番染色体長腕欠失を有しており 18q 欠失症候群と診断した。さらにこの 3 名に対して、先天性大脳白質形成不全症の病因遺伝子と推定されている 18 番染色体長腕に位置する *MBP* 遺伝子の解析を進めた。*MBP* の MLPA あるいは染色体網羅的にアレイ CGH を施行した。その結果、患者 1 および患者 2 においては *MBP* 遺伝子の欠失を認められたが、患者 3 は *MBP* 遺伝子欠失を認めず同遺伝子は正常であることが判明した。この患者 3 で欠失している 18 番染色体長腕領域は *MBP* 遺伝子を含まない範囲であることと X 染色体長腕に Xq28 領域の重複を有することがアレイ CGH により明らかとなった（図 4）。

2 標的遺伝子解析

染色体検査で異常を認めなかった患者 26 名に対して、ある標的遺伝子解析を行った結果、26 名中 5 名（19％）でその異常を指摘しえた。

(1) 疾患特徴的症状を有する患者について

MRI 上のびまん性白質病変に随伴して甲状腺機能異常を呈し Allan-Herndon-Dudley 症候群を疑われた患者 4 では、*SLC16A2* 遺伝子のヘミ接合変異 c.1609_1611 delCCC(a.537delPro) が判明した。頭蓋内石灰化を認め Aicardi-Goutieres 症候群を疑われた患者 5 では、*TREX1* 遺伝子の複合ヘテロ接合変異²²⁾が認められた。また日光過敏症を有する患者 6 では、皮膚線維芽細胞の紫外線

感受性試験が陽性であったことから Cockayne 症候群と診断された。

(2) 疾患特徴的症候を有さない患者について

MLPA, サンガー法による既知遺伝子のスクリーニングによって 23 名中 3 名 (13%) に *PLP1* 遺伝子に異常を認め、Pelizaeus-Merzbacher 病の診断に至った。患者 7 がミスセンス変異, 患者 8 および患者 9²³⁾が *PLP1* 遺伝子欠失を有していた。*GJC2* 遺伝子および *MBP* 遺伝子には, 病的意義を有すると思われる異常は認めなかった。

(3) アレイ CGH

アレイ CGH で異常が判明した患者は 20 名中 2 名であった (10%)。患者 10 に 15 番染色体長腕のヘテロ接合性喪失, 患者 11 に *EIF2B2* 遺伝子の欠失を認めた²⁴⁾。

(4) エクソーム解析

染色体検査, 標的遺伝子解析, アレイ CGH で異常を指摘されなかった患者は 18 名であった。これらに対してエクソーム解析を施行した。うち発端者 2 名の結果は既に報告されており (患者 14¹¹⁾, 12²⁵⁾), 残る 16 名について解析を進めた。既知あるいは関連遺伝子解析で認めた変異をサンガー法で確認し表 5 に示した。既知あるいは関連遺伝子解析では患者 13, 15, 16, 17, 18 の 5 名に変異が判明した。常染色体優性遺伝解析で認めた *de novo* 変異をサンガー法で確認し表 6 に示した。常染色体劣性遺

伝および X 連鎖劣性遺伝解析で残った変異を表 7 に示した。患者 19 の 1 名に常染色体劣性遺伝形式をとる変異が明らかとなった。絞り込みにおけるバリエーション数または遺伝子数の推移を、常染色体優性遺伝解析について表 8 に、常染色体劣性遺伝解析について表 9 に示した。エクソーム解析全体では、既報の患者 14, 12 の 2 名も併せて 18 名中 8 名 (44%) に 6 遺伝子 (*TUBB4A*, *POLR3B*, *KCNT1*, *AHDC1*, *MCOLN1*, *PNPT1*) 上の変異が同定された。エクソーム解析を経てなお遺伝学的異常が不明であった患者は全体の 29 名中 10 名 (34%) であった。

(4)-1 既知あるいは関連遺伝子上の変異

TUBB4A, *POLR3B*, *KCNT1*, *AHDC1*, *MCOLN1* の 5 遺伝子に変異を認めた。患者 12 および患者 13 において *TUBB4A* の変異が判明した。*TUBB4A* (NM_006087.3) はチューブリン β -4a をコードする遺伝子であり、4 型ジストニアあるいは大脳基底核および小脳萎縮を伴う大脳白質形成不全 (hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum) の病因遺伝子である。患者 12 には高頻度変異である c.745G>A(p.Asp249Asn)変異を認めた²⁵⁾。患者 13 にはこれまでに報告のない *de novo* 変異 c.743C>A(p.Ala248Asp)が判明した。患者 14 に常染色体劣性遺伝形式で先天性大脳白質形成不全症を発症する病因遺伝子である *POLR3B* (NM_018082.5) の複合ヘテロ接合変異を認めた¹¹⁾。患者 15 および患者 16 でそれぞれ *KCNT1* 遺伝子のヘテロ接合変異が明らかとなった。*KCNT1* 遺伝子

(NM_020822.2) は、ナトリウム依存性カリウムチャネルをコードする遺伝子である。患者 15 には新規の c.2718G>T(p.Pro906His)の *de novo* 変異, 患者 16 には c.862G>A(p.G288Ser)変異を認めた (両親のサンプルなし)。AHDC1 遺伝子 (NM_001029882.3) の c.2197G>T(p.Ala733Ser)のヘテロ接合変異が患者 17 で判明した。また, 患者 18 では Mucopolipidosis IV 型の責任遺伝子である MCOLN1 (NM_020533.2) に複合ヘテロ接合変異を認めた。c.410T>C (p.Leu137Pro) のミスセンス変異が父由来, c.802_803del (p.Ser268del) のフレームシフト変異が母由来であった。この 2 変異はいずれも新規変異であった。

(4)-2 常染色体劣性遺伝解析で同定した新規候補遺伝子

同胞罹患の 1 家系で, 患者 19 に PNPT1 遺伝子 (NM_033109.4) の複合ヘテロ接合変異を認めた。家系図および同定した変異を図 5 に示す。患者 19 は健常両親の第 4 子である。3 カ月時に体重増加不良, 重度発達遅滞で発症し, 髄鞘化障害, 眼振, てんかんを呈した。第 1 子は妊娠 5 カ月時に腎無形成, 羊水過小, 肺低形成で流産した。第 2 子は健常同胞である。第 3 子は 1 カ月時に哺乳不良・陥没呼吸・重度発達遅滞で発症し, 髄鞘化障害, 眼振, てんかんを呈し 4 歳時に急性脳症のため死亡した。この家系解析で, PNPT1 遺伝子に父由来のミスセンス変異 c.227G>A (p.Gly76Asp) および母由来のナンセンス変異 c.574C>T (p. Arg192del) を, 患者および罹患同胞で認めた。健常同胞には母由来のナンセンス変異のみを認めた。

(5) 新規候補遺伝子 *PNPT1* における解析

病因不明の先天性大脳白質形成不全症の患者 20 名で *PNPT1* 遺伝子のコーディング領域のサンガー法を施行したが、同遺伝子上に病的意義を有すると思われる変異は認めなかった。

次に患者の培養皮膚線維芽細胞を用いて、*PNPT1* 遺伝子にコードされている PNPase 蛋白の発現をウエスタンブロットで確認した。Porin を内在コントロールとして正常コントロール 3 名との比較定量を 5 回繰り返して行ったところ、患者での PNPase 発現量は正常コントロールと比較し有意に低下していた (図 6.A, B)。

6. 考察

本研究では、稀少疾患である先天性大脳白質形成不全症の遺伝学的異常を包括的に検討した。対象患者の臨床像概要は、MRI 所見や甲状腺機能異常、頭蓋内石灰化、性腺機能低下、白内障など一部の所見はある疾患に特徴的であったが、多くは精神発達遅滞、痙性麻痺、痙攣や眼振などのように非特異的で頻度の高い症状であった。このことから臨床所見のみで診断に至るのは困難であると考えられた。また発症時期は生後 6 カ月以内が 59%、生後 6-12 カ月が 21%に及び、発症早期に正確な髄鞘化不全評価を行うことは困難であることが推察された。以上より、先天性大脳白質形成不全症診断においては遺伝学的検査による診断が重要である。

本研究では、対象患者 29 例中 19 例に分子遺伝学的異常を認めた（紫外線感受性試験陽性も含む）。18q 欠失症候群と、*PLP1* 遺伝子異常による Pelizaeus-Merzbacher 病が各 3 名、*TUBB4A* 遺伝子変異、*KCNT1* 遺伝子変異が各 2 名、ほか *SLC16A2* 遺伝子変異、*TREX1* 遺伝子変異、15q ヘテロ接合性喪失、*EIF2B2* 欠失、*POLR3B*、*AHDC1*、*MCOLN1*、*PNPT1* 遺伝子変異、Cockayne 症候群が各 1 名であった。最近日本で行われた疫学調査の報告では、先天性大脳白質形成不全症のおよそ半数が遺伝学的検査で確定診断されており、そのほとんどが Pelizaeus-Merzbacher 病で、他の疾患は散見される程度であった⁴⁾。本研究では 19 例に 13 の遺伝学的異常を同定しえ、その内訳はある特定の疾患が多数を占めることはなく、先天性大脳白質形成不全症の遺伝学的背景が非常に多様であることを示した。先行研究に比べ

Pelizaeus-Merzbacher病の割合が10%と少ないが、これは対象患者登録以前に *PLP1* のスクリーニングが施行され Pelizaeus-Merzbacher 病と診断された患者が今回の検査対象外となっている可能性があるためと考えられた。

今回の研究で明らかとなった遺伝学的異常のうち、18q 欠失は3名であった。2名は *MBP* の1コピー欠失を認めたが、1名（患者3）は *MBP* の2コピー正常を有することが明らかとなった。18q 欠失症候群では、しばしば T2 強調画像で白質の異常高信号が観察される。18q 欠失症候群で高頻度に認める欠失領域 18q23 にはミエリン塩基性蛋白をコードする *MBP* 遺伝子が含まれているため、これまで 18q 欠失症候群にみられる白質病変は *MBP* のハプロ不全による髄鞘化障害の結果であると考えられてきた²⁶⁾。またこれまで私の知りうる限りにおいては 18q 欠失症候群で *MBP* 正常の患者が白質病変を呈した報告はない。しかしながら、18q 欠失症候群で *MBP* 正常の患者が白質病変を呈した本研究の知見からは、*MBP* のハプロ不全が白質病変の原因ではないことが示唆された。患者3で認めた白質病変は、本患者の有する遺伝学的異常から *MBP* を含まない 18q 欠失領域上の遺伝子あるいは Xq28 重複領域上の遺伝子が病因であると考えられた。最近の研究で、白質病変を呈し *MBP* 欠失を伴う 18q 欠失症候群患者の剖検で脳組織の髄鞘化障害の所見を認めないことが示された²⁷⁾。筆者らは、従来の 18q 欠失症候群における白質病変が *MBP* ハプロ不全による髄鞘化障害であるという説は否定的であると述べている。本研究による知見もその先行研究を補強するものである。

TUBB4A 遺伝子に変異を有する患者が 2 名であった。1 名に軽症の臨床経過をたどる²⁸⁾とされる高頻度変異 c.745G>A (p.Asp249Asn), もう 1 名に新規の変異 c.743C>A(p.Ala248Asp)を認めた。*TUBB4A* にコードされる β チュブリンは, α チュブリンとヘテロダイマーを形成し, 細胞骨格に必須である微小管形成に重要な役割を有する。高頻度変異が判明した患者 12 は, 疾患特徴的な MRI 所見および臨床経過を呈していた。患者 13 で明らかになった新規変異 c.743C>A(p.Ala248Asp)は, 高頻度変異によって置換されるアミノ酸 (p.Asp249) の隣で, $\alpha \beta$ チュブリンヘテロダイマー形成の接着部位により近い部位に位置する。患者 12 に比較すると, 表現型は非常に重度の発達遅滞を呈しており, 頭部 MRI 所見上も被殻および尾状核頭の萎縮が重度であった。遺伝子型と表現型との関連性については, さらなる症例の蓄積が必要である。

患者 17 で判明した *AHDC1* 遺伝子のヘテロ接合性ミスセンス変異については, 両親のサンプルを得ることができず *de novo* 変異かどうかは不明である。*AHDC1* 遺伝子の機能についてはまだ十分に解明されていないが, AT リッチな配列部分の DNA に蛋白質を結合させる機能を持つとされている。最近, 髄鞘化遅延を含む類似した表現型をもつ患者 4 名で, ヘテロ接合性の *AHDC1* 遺伝子変異が認められたことが Xia ら²⁹⁾によって報告された。この報告における変異はすべてフレームシフト変異であった。本研究における患者 17 の表現型は既報と矛盾はしていないが, 認めた変異の機能予測解析における病的意義は強くない結果であった。機能予測ツールにおけるスコ

アは、それぞれ SIFT 0.74 (Tolerant ≥ 0.05), PolyPhen2 0.019 (benign ≤ 0.452) であった。今回判明した変異は 1000 Genome, ESP6500, HGVD または in-house データ上、登録されていない稀少変異であるが、この変異の病的意義についてはさらなる症例の蓄積および機能解析が必要である。

難治性てんかんおよび髄鞘形成不全を呈する患者 2 名に異なる *KCNT1* のヘテロ接合性遺伝子変異を認めた。いずれの変異も保存性が高い領域に位置する変異であった。一方は既報にない変異 (p.Gln906His) で家系解析によって *de novo* 変異であることを確認した。もう一方は、既報の 3 カ月時の MRI 所見が正常である悪性焦点移動性乳児てんかんの患者で判明した変異 (p.Gly288Ser) と同一³⁰⁾であり家系解析は行っていない。既報での MRI は生後 3 カ月時点の所見であることから、髄鞘化不全の評価は困難であると思われ、今回髄鞘化不全を有する患者で *KCNT1* 変異 (p.Gly288Ser) を認めたことは矛盾しない。*KCNT1* 遺伝子変異は、これまで 2 種類の難治性てんかんの病因遺伝子として報告されている^{31), 32)}。最近、Vanderver ら³³⁾は *KCNT1* の *de novo* 変異が難治性てんかんのみならず著明な髄鞘化遅延も呈することを 1 症例において報告した。今回髄鞘形成不全 2 名に *KCNT1* 変異を認めたという知見は、*KCNT1* 遺伝子変異が重度の髄鞘化障害と関連するという Vanderver らの既報を補強するものであった。

先天性大脳白質形成不全症には代謝性疾患によるものは含めないが、今回エクソーム解析を通して Mucopolidosis IV 型が 1 例同定された。Mucopolidosis は著明な髄鞘

化障害を呈すること³⁴⁾, 一般的な臨床検査による診断が困難であることおよび疾患特異的な眼科的異常などを発症する前であったことから, そのような早期に頭部 MRI 異常所見を呈する疾患に対してもエクソーム解析は有用であると考えた。

次に, 各遺伝学的検査の有用性について考察する。各遺伝学的検査の診断率は, 染色体検査 10% (10/29), 標的遺伝子解析 20% (5/25), アレイ CGH 10% (2/20), エクソーム解析 44% (8/18) であった。エクソーム解析導入前後を比較すると, 導入前の染色体検査, 標的遺伝子解析およびアレイ CGH の一連の分子遺伝学的検査(紫外線感受性試験も含む)による診断率が 38% (11/29), 導入後の診断率が 65.5% (19/29) であり, 全染色体上の遺伝子のエクソン領域における変異を網羅的に検出できるエクソーム解析は, 稀少で多様な遺伝学的背景を有する先天性大脳白質形成不全症に対して非常に有用であった。

さらに, エクソーム解析によって新規疾患候補遺伝子として挙げられた *PNPT1* 遺伝子について考察する。*PNPT1* はポリヌクレオチドリン酸化酵素 (Polynucleotide phosphohyrase: PNPase) をコードする遺伝子である。本研究の患者 19 の培養皮膚線維芽細胞では, 対照に比較し PNPase 発現量が有意に低下していたことから, 同遺伝子変異を有することで PNPase の機能障害が生じていることが示唆された。PNPase は RNA 加リン酸分解酵素であるが, ミトコンドリアの外膜と内膜の膜間に存在し核遺伝子にコードされている転移 RNA (transfer RNA; 以下 tRNA) を含む低分子 RNA を細胞質からミトコンドリア内に輸送する機能をも有する^{35), 36)}。

PNPase は、脳、心、肺、腎、消化管などを含めた重要な臓器で発現しており、*PNPT1* ノックアウトマウスは胎生致死、また PNPase の発現を欠失した肝細胞およびマウス胚性線維芽細胞は増殖不可であったことから、哺乳動物細胞には PNPase 発現が不可欠であることが示唆されている³⁵⁾。これまで、*PNPT1* 遺伝子異常と先天性大脳白質形成不全症との関連は報告されておらず、非症候性難聴の 1 家系³⁷⁾およびミトコンドリア機能障害と脳症を呈する 1 家系³⁸⁾でそれぞれホモ接合変異が報告されているのみである。これらの報告では、患者の変異を有するマウス胚性線維芽細胞培養細胞および患者皮膚線維芽細胞において、ミトコンドリア内への低分子 RNA の輸送が障害を受けていることが示されている。患者 19 においても、PNPase 発現の低下によってミトコンドリア内への低分子 RNA 輸送障害が生じていることが予想された。

PNPase は種間で保存性の高いドメインによって構成される。 α ヘリカルドメインで分かれた 2 つの RNase PH ドメイン (1st RNase PH, 2nd RNase PH), KH ドメイン, S1 ドメインである³⁹⁾ (図 7)。2nd RNase PH ドメインが RNA 加リン酸分解酵素の活性部位をもち、KH ドメインは PNPase の関与を受ける RNA 結合部位として機能する。PNPase は三量体を形成し機能する³²⁾ が、1st RNase PH ドメインは、立体構造上、KH ドメインと隣接し KH ドメインが形成する孔の安定化を保っていると考えられている³⁶⁾。難聴家系、脳症家系および本研究で同定された変異を図 7 に示した。難聴家系で認めた p.G475E 変異は、三量体形成時に隣接するサブユニットと塩橋を形成する位置にあたり、変異を有するマウス胚性線維芽細胞培養細胞でも三量体

形成が障害されていることが示されている³⁷⁾。既報の変異と今回認めた変異は異なるドメイン上に位置するものの、今回判明した変異の位置する 1st RNase PH ドメインは PNPase の三量体形成に関わると予測されており、PNPase の三量体形成障害、またそれに随伴して tRNA を含む低分子 RNA の輸送障害が生じることが示唆された。

現在、先天性大脳白質形成不全症の病因遺伝子として tRNA を含む低分子 RNA に関連する遺伝子が複数報告されている。ポリメラーゼ III 関連白質ジストロフィーの病因遺伝子である *POLR3A* 遺伝子および *POLR3B* 遺伝子は低分子 RNA の合成に関わるポリメラーゼ III 複合体サブユニットを担い¹¹⁾、その異常が髄鞘形成不全と関連していると考えられている。また *RARS* 遺伝子¹³⁾、*DARS* 遺伝子¹⁴⁾、*QARS* 遺伝子¹⁵⁾などはミトコンドリア内または細胞質に存在する tRNA へのアミノアシル基付加酵素（アミノアシル tRNA 合成酵素）をコードする遺伝子群であり、これらの変異による機能的 tRNA 形成障害が、髄鞘形成不全の発症要因と考えられている。今回候補遺伝子として挙げた、ミトコンドリア内への tRNA を含む低分子 RNA の輸送機能を有する *PNPT1* は、これまでの低分子 RNA 合成障害、機能的 tRNA 形成障害のみならず、低分子 RNA の輸送障害に伴うミトコンドリア内の機能的低分子 RNA の減少が髄鞘形成の障害に関与するという新しい発症機序を示唆していると考えられた。

多様な遺伝要因を有する疾患群に対してそれぞれの遺伝要因を明らかにすることで、各疾患に応じた適切な医療を提供すること、新たな病態を解明することが可能と

なりうる。エクソーム解析を含む遺伝学的検査は、先天性大脳白質形成不全症の診断において重要であると思われた。

7. 結論

先天性大脳白質形成不全症の遺伝学的背景は多様であった。

先天性大脳白質形成不全症の病因遺伝子探索において、エクソーム解析は非常に有用であった。

新規の疾患候補遺伝子 *PNPT1* を同定した。本遺伝子は、先天性大脳白質形成不全症の新たな発症機序を示唆している。

8. 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々から御指導頂きましたことを深く御礼申し上げます。本大学小児病態学分野菊池敦生先生には、総合的な御指導をいただきました。また、同教室実験室の先生方にも、多くの御助言、御指導を賜りました。深謝いたします。

本大学技術補佐員、千葉洋子さん、伊藤久美さんには、多大なる技術的サポートをしていただきました。深謝いたします。

国立精神・神経医療研究センターの沼田有里佳先生には、主にウエスタンブロットにおける技術的御指導を賜り、御礼申し上げます。

本大学医科学五十嵐和彦教授、松本光代先生には、Ion Proton シーケンサーの導入に際し、ライブラリ作製からシーケンスまでの一連の技術的御助言を賜りました。心より感謝いたします。

拓桃医療療育センター萩野谷和裕先生、本大学小児病態学分野福與なおみ先生、自治医科大学小児科学小坂仁教授、埼玉医科大学大竹明教授には、貴重な患者検体をご提供いただきました。この場を借りて御礼申し上げます。また、患者さんおよび御家族、主治医の先生方にも、研究への甚大なる御協力を賜り深謝いたします。

最後に、多くの時間を割いて直接御指導、御鞭撻いただきました植松貢先生、研究の機会を与えてくださり多くのアドバイスをいただきました呉繁夫教授に心より感謝いたします。

9. 文献

- 1) Schiffmann R, van der Knaap MS: Invited article: an MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology*. 2009;72:750–759
- 2) Steenweg ME, Vanderver A, Blaser S, et al. Magnetic resonance imaging pattern recognition in hypomyelinating disorders. *Brain*. 2010;133:2971-2982
- 3) 先天性大脳白質形成不全症：PMD と類縁疾患に関するネットワーク, <http://kcmc.jp/pmd/index.html>
- 4) Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, et al: Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies. *J Neurol*. 2014;261:752-8
- 5) Pouwels PJW, Vanderver A, Bernard G, et al: Hypomyelinating leukodystrophies: Translational research progress and prospects. *Ann Neurol*. 2014;76:1-15
- 6) Inoue K: PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics*. 2005;6:1-16
- 7) Inoue K, Shilo K, Boerkoel CF, et al: Congenital hypomyelinating neuropathy, central dysmyelination, and Waardenburg-Hirschsprung disease: phenotypes linked by SOX10 mutation. *Ann Neurol*. 2002;52:836-42
- 8) Uhlenberg B, Schuelke M, Rüschenhoff F, et al: Mutations in the gene encoding

gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Am J Hum Genet.* 2004;75:251-260

9) van der Knaap MS, Naidu S, Pouwels PJ, et al: New syndrome characterized by hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002;23:1466-1474

10) Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, et al: A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J hum Genet.* 2004;74:168-175

11) Saitsu H, Osaka H, Sasaki M, et al: Mutations in POLR3A and POLR3B encoding RNA Polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2011;89:644–651

12) Zara F, Biancheri R, Bruno C, et al: Deficiency of hyccin, a newly identified membrane protein, causes hypomyelination and congenital cataract. *Nat Genet.* 2006;38:1111-1113

13) Wolf NI, Salomons GS, Rodenburg RJ, et al: Mutations in RARS cause hypomyelination. *Ann Neurol.* 2014;76:134-139

14) Taft RJ, Vanderver A, Leventer RJ, et al: Mutations in DARS cause hypomyelination with brain stem and spinal cord involvement and leg spasticity. *Am J Hum Genet.* 2013;92:774-80

- 15) Zhang X, Ling J, Barcia G, et al: Mutations in QARS, encoding glutaminyl-tRNA synthetase, cause progressive microcephaly, cerebral-cerebellar atrophy, and intractable seizures. *Am J Hum Genet.* 2014;94:547-58.
- 16) Wang K1, Li M, Hakonarson H: ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e164
- 17) SIFT, URL: <http://sift.jcvi.org/>
- 18) PolyPhen2, URL: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- 19) MutationTaster, URL: <http://www.mutationtaster.org/>
- 20) GERP++, URL: <http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/>
- 21) Tada H, Takanashi J-ichi: MR spectroscopy in 18q(-) syndrome suggesting other than hypomyelination. *Brain Dev.* 2014;36:57–60
- 22) Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, et al: A nationwide survey of Aicardi-Goutières syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53:448–458
- 23) Shiihara T, Watanabe M, Moriyama K, et al; A novel PLP1 frameshift mutation causing a milder form of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Dev.* 2014;[Epub ahead of print]
- 24) Shimada S, Miya K, Oda N, et al: An unmasked mutation of EIF2B2 due to

submicroscopic deletion of 14q24.3 in a patient with vanishing white matter disease. *Am J Med Genet. Part A* 2012;158A:1771–1777

25) Miyatake S, Osaka H, Shiina M, et al: Expanding the phenotypic spectrum of *TUBB4A*-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. *Neurology*. 2014;82:2230–2237

26) Loevner L a, Shapiro RM, Grossman RI, et al: White matter changes associated with deletions of the long arm of chromosome 18 (18q- syndrome): a dysmyelinating disorder? *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996;17:1843–1848

27) Tanaka R, Iwasaki N, Hayashi M, et al: Abnormal brain MRI signal in 18q-syndrome not due to dysmyelination. *Brain Dev*. 2012;34:234–237

28) Hamilton EM, Polder E, Vanderver A, et al. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum: further delineation of the phenotype and genotype-phenotype correlation. *Brain*. 2014;137:1921–1930

29) Xia F, Bainbridge MN, Tan TY, et al: *De novo* truncating mutations in *AHDC1* in individuals with syndromic expressive language delay, hypotonia, and sleep apnea. *Am J Hum Genet*. 2014;94:784–789

30) Ishii A, Shioda M, Okumura A, et al: A recurrent *KCNT1* mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy. *Gene*. 2013;531:467–471

- 31) Heron SE, Smith KR, Bahlo M, et al.: Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet.* 2012;44:1188-1190
- 32) Barcia G, Fleming MR, Deligniere A, et al: *De novo* gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet.* 2012;44:1255-9
- 33) Vanderver A, Simons C, Schmidt JL, et al: Identification of a novel *de novo* p.Phe932Ile KCNT1 mutation in a patient with leukoencephalopathy and severe epilepsy. *Pediatr Neurol.* 2014;50:112–114
- 34) Frei KP, Patronas NJ, Crutchfield KE, et al: Mucopolidosis type IV: characteristic MRI findings. *Neurology.* 1998;51:565-9

10. 図の説明

図1： エクソーム解析にて検出された変異の絞り込み法の概説

エクソーム解析において Variant caller で検出されたすべての変異は, ANNOVAR を用いて dbSNP 132 Non Flagged 一塩基置換およびアミノ酸同義置換を除外し, エクソン領域およびスプライシング領域の変異を残した。既知/関連遺伝子上の変異を抽出した解析, 常染色体優性遺伝解析, 常染色体劣性遺伝解析, X連鎖劣性遺伝形式解析を行った。既知/関連遺伝子上の変異は, 遺伝子リスト (表2) を用いてこれらの遺伝子上の変異を抽出した。各解析において, Minor allele frequency, バリアントの機能予測ツールを用いて変異を絞り込み, 遺伝形式とマッチしないバリアントを除外した。常染色体劣性遺伝形式の解析では, さらにエクソームシーケンスの genotype quality およびリード数を用いて変異絞り込みを行った。

図2： 対象患者の頭部 MRI 写真

本研究で何らかの遺伝学的異常が判明した患者の頭部 MRI T2 強調画像軸椎断写真を示した。各患者において髄鞘形成不全を示唆する大脳白質の異常高信号を認めた。

(a) 患者2、14歳。18q 欠失。(b) 患者3、2歳。18q 欠失。(c) 患者4、0歳7カ月。

SLC16A2 遺伝子変異。(d) 患者6、5歳。Cockayne 症候群。(e) 患者10、1歳6カ月。

15q ヘテロ接合性喪失。(f) 患者7、6歳。*PLP1* 遺伝子変異。(g) 患者8、3歳。

PLP1 遺伝子欠失。(h) 患者9、1歳0カ月。*PLP1* 遺伝子欠失。(i) 患者13、11歳。

TUBB4A 遺伝子変異。(j)患者 15、1 歳 10 か月。*KCNT1* 遺伝子変異。(k) 患者 18、3 歳。*MCOLN1* 遺伝子変異。(l) 患者 19、1 歳 5 カ月。*PNPT1* 遺伝子変異。

図 3： 施行した遺伝学的検査およびその結果の概要

先天性大脳白質形成不全症 29 症例に対して施行した遺伝学的検査およびその結果の概要を示した。染色体検査で 3 例に 18 番染色体欠損を認めた。特異的症候として甲状腺機能異常または頭蓋内石灰化を有する症例で、病因遺伝子と考えられた *SLC16A2* 遺伝子、*TREX1* 遺伝子におけるサンガー法を行いそれぞれ変異が同定された。また、紫外線感受性試験によって 1 例がコケイン症候群と診断された。特異的症候を有さない症例に対しては既知遺伝子 (*PLP1*, *GJC2*, *MBP*) のスクリーニングを施行し、*PLP1* 遺伝子異常を各 3 名に認めた。アレイ CGH では、15q ヘテロ接合性喪失および *EIF2B2* 欠失を各 1 名に認めた。さらに、エクソーム解析を施行し 8 名に病的意義を有すると思われる遺伝子異常を認めた。

*男児に対して検討する遺伝子異常。

図 4： 患者 3 のアレイ CGH 結果

A. 18 番染色体の欠失領域を示した。18 番染色体長腕の *MBP* 遺伝子を含まないより末端側において、およそ 1.7 Mb にわたる欠失を認めた。

B. X 染色体の重複領域を示した。Xq28 におよそ 6.5 Mb にわたる重複を認めた。

図 5： *PNPT1* 変異を認めた家系例

- A. *PNPT1* に複合ヘテロ接合変異を認めた 1 家系の家系図を示した。患者 19 は健常両親の第 4 子である。第 1 子は妊娠 5 カ月時に腎無形成，羊水過小，肺低形成で死産した。第 2 子は健常同胞である。第 3 子は 1 カ月時，哺乳不良・陥没呼吸，重度発達遅滞で発症し，髄鞘化障害，眼振を呈した。4 歳時に急性脳症のため死亡した。
- B. 家系内の変異のサンガー法の結果を示した。患者および罹患同胞が複合ヘテロ接合変異を有しており，c.227G>A のミスセンス変異が父由来，c.574C>T のナンセンス変異が母由来であった。

図 6： 患者および対照皮膚線維芽細胞における PNPase 発現

- A. 培養皮膚線維芽細胞から抽出した蛋白を用いて，ウエスタンブロットを行った。

PNPase を 80 kD 付近に，内在コントロールの Porin を 30 kD 付近に認めた。

Pt が患者，C1, C2, C3 が非関連疾患患者

- B. C1 の Porin を Reference として，比較定量を行った結果を示した。C1, C2, C3

と比較して，患者での PNPase の発現は有意に低下していた。

* < 0.01

図 7： PNPase のドメイン構造

A. PNPase は、種間で保存されているドメインから構成される。 α ヘリカルドメイン (図中 H) で分かれた 2 つの RNase PH ドメイン (1st RNase PH, 2nd RNase PH), KH ドメイン, S1 ドメインによる。既報のホモ接合変異 (p.Q387R, p.E475G) は 2nd RNase PH に位置し、今回の新規ヘテロ接合変異 (p.G76D, p.R192*) は、いずれも 1st RNase PH に位置する。

B. PNPase は三量体を形成して、ミトコンドリア膜間に存在する。KH ドメインに認識結合した、細胞質の低分子 RNA が、KH 孔を通過し、ミトコンドリア内へ輸送される。1st RNase PH ドメインは、KH ドメインと隣接し、PNPase の三量体形成の安定化に寄与すると考えられている。

図 1

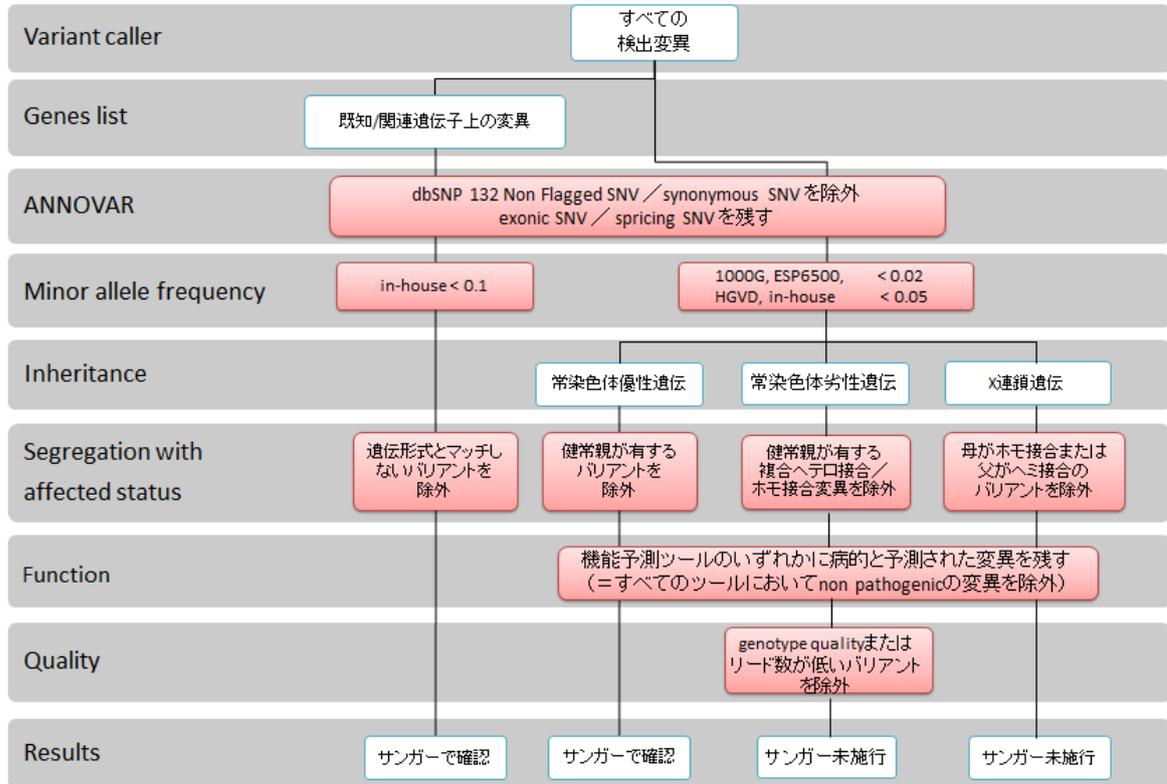


图 2

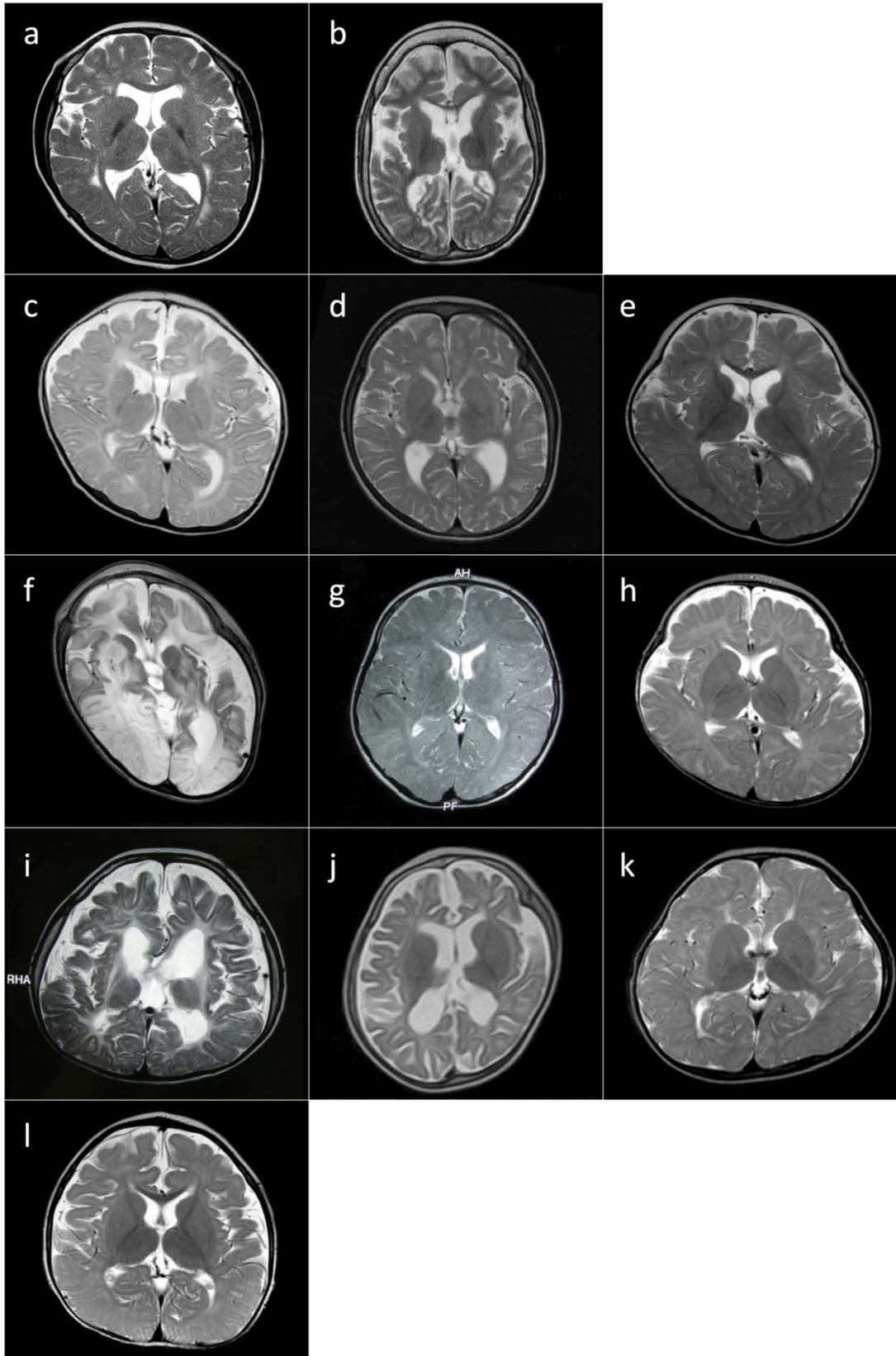


図 3

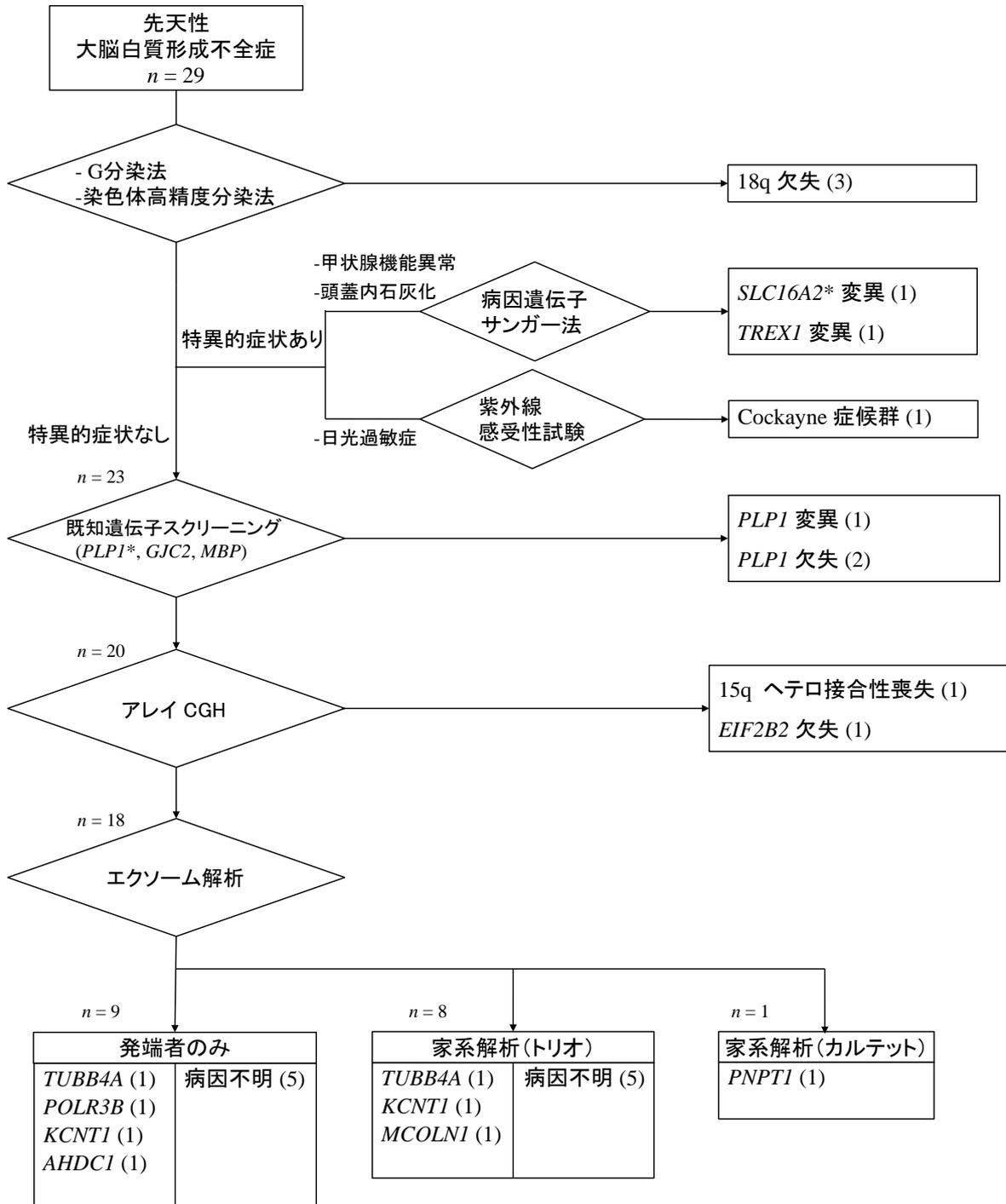
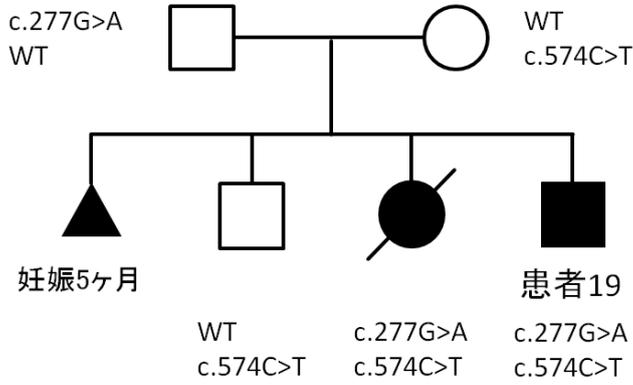


図 5

A



B

	<i>PNPT1</i> Ex3	<i>PNPT1</i> Ex8
父	hetero 	WT
母	WT 	hetero
健常同胞	WT 	hetero
罹患同胞	hetero 	hetero
患者19	hetero 	hetero

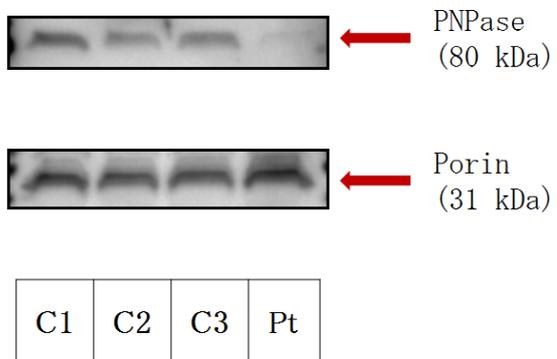
複合ヘテロ接合変異

父由来
 c.227G>A, p.G76D

母由来
 c.574C>T, p. R192*

图 6

A



B

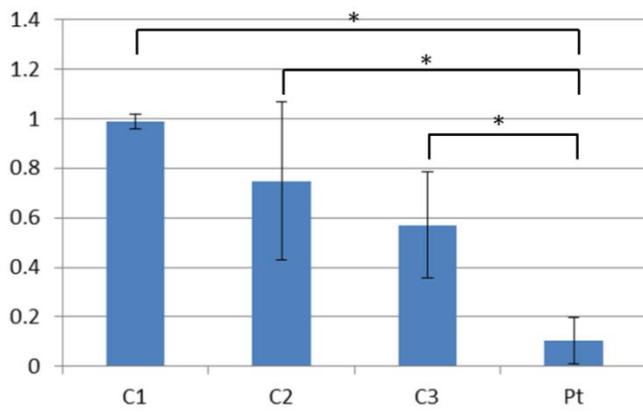
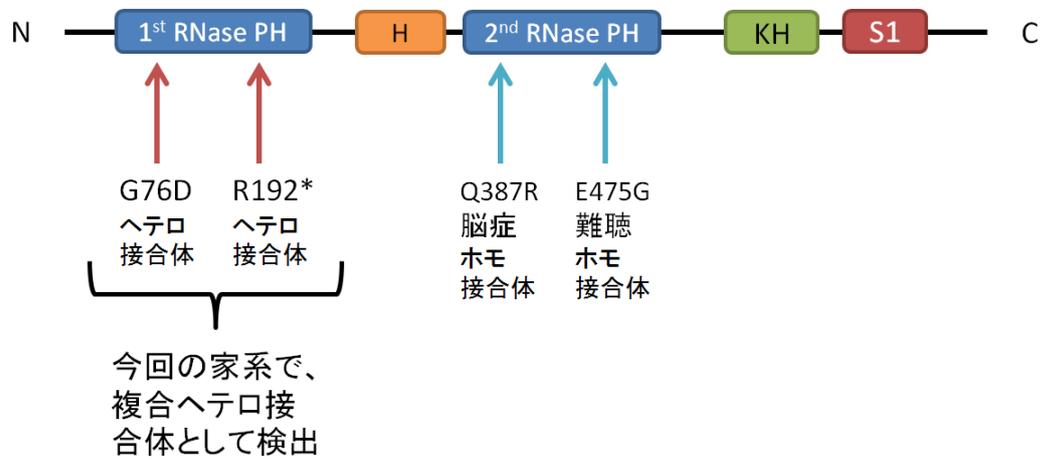
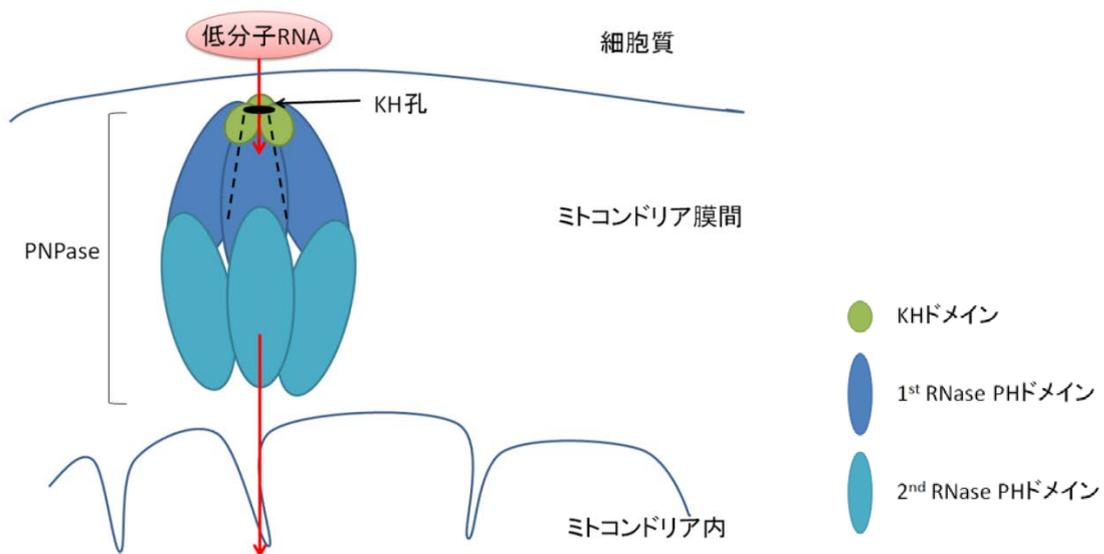


図 7

A



B



PNPaseは三量体を形成して機能する

KH孔にRNAが認識結合

1st RNase PHドメインはKH孔と隣接して三量体の安定化に寄与

11. 表

表 1： 先天性大脳白質形成不全症 疾患リスト

疾患名	遺伝形式	遺伝子名	OMIM (2014)	日本 ³⁾ (2013)	Barkovich ⁵⁾ (2014)
Pelizaeus-Merzbacher 病	X-linked	PLP1	✓	✓	✓
Pelizaeus-Merzbacher 様病1	AR	GJC2	✓	✓	✓
Leukodystrophy, hypomyelinating, 3	AR	AIMP1	✓		
Hsp60 chaperon 病	AR	HSPD1	✓	✓	
先天性白内障を伴う髄鞘形成不全症	AR	FAM126A	✓	✓	✓
基底核および小脳萎縮を伴う髄鞘形成不全症	sporadic	TUBB4A	✓	✓	✓
ポリマーゼⅢ関連白質ジストロフィー	AR	POLR3A POLR3B	✓	✓	✓
18q 欠失症候群	sporadic	MBP		✓	✓
Allan-Herndon-Dudley 症候群	X-linked	SLC16A2		✓	
Salla 病	AR	SLC17A5		✓	✓
脱髄型末梢神経炎、中枢性髄鞘形成不全症、Waardenburg 症候群、Hirschsprung 病	sporadic	SOX10		✓	✓
Cockayne 症候群	AR	ERCC6, ERCC8			✓
Hypomyelination of early myelinated structures	X-linked	<i>unknown</i>			✓
Hypomyelination with brainstem and spinal cord involvement and leg spasticity	AR	DARS			✓
Fucosidosis	AR	FUCA1			✓
Oculodentodigital dysplasia	AD, sporadic	GJA1			✓
RARS-associated hypomyelination	AR	RARS			✓
Trichothiodystrophy with hypersensitivity to sunlight	AR	ERCC2, ERCC3, GTF2H5, MPLKIP			✓
Aicardi-Goutières 症候群	sporadic, AR	TREX1, RNASEH2A-C, SAMHD1			MRIで髄鞘形成不全パターンを示す

AR: autosomal recessive, AD: autosomal dominant

赤字：今回異常が判明した疾患および遺伝子

表 2： 先天性大脳白質形成不全症の既知あるいは関連遺伝子のリスト

<i>AARS</i>	<i>ERCC2</i>	<u><i>MBP</i></u>	<i>SLC17A5</i>
<i>AARS2</i>	<i>ERCC3</i>	<u><i>MCOLN1</i></u>	<i>SLC25A12</i>
<i>ACY1</i>	<i>ERCC6</i>	<i>MED17</i>	<i>SLC25A22</i>
<i>ADSL</i>	<i>ERCC8</i>	<i>MPLKIP</i>	<i>SLC33A1</i>
<u><i>AHDC1</i></u>	<i>FOLR1</i>	<i>MPZ</i>	<i>SLC35A2</i>
<i>AIMP1</i>	<i>FOXG1</i>	<i>MRPS22</i>	<i>SLC6A8</i>
<i>AIMP2</i>	<i>FUCA1</i>	<i>MUT</i>	<i>SNIP1</i>
<i>AMPD2</i>	<i>GAA</i>	<i>NARS</i>	<i>SOX10</i>
<i>ARNT2</i>	<i>GARS</i>	<i>NARS2</i>	<i>SPTAN1</i>
<i>ASNS</i>	<i>GCDH</i>	<i>NGLY1</i>	<i>STAMBP</i>
<i>ASXL1</i>	<i>GDAP1</i>	<i>PARS2</i>	<i>STXBP1</i>
<i>BCAP31</i>	<i>GFM1</i>	<i>PC</i>	<i>TAF2</i>
<i>CARS</i>	<i>GJA1</i>	<i>PEX7</i>	<i>TARS</i>
<i>CARS2</i>	<i>GJC2</i>	<i>PGM3</i>	<i>TARS2</i>
<i>CLP1</i>	<i>GLUL</i>	<i>PHGDH</i>	<i>TBC1D24</i>
<i>COX7B</i>	<i>GLYCTK</i>	<i>PIGA</i>	<i>TSEN2</i>
<i>CTDP1</i>	<i>GNAO1</i>	<u><i>PLEKHG5</i></u>	<i>TSEN34</i>
<i>CYB5R</i>	<i>GPR56</i>	<u><i>PLP1</i></u>	<i>TSEN54</i>
<i>D2HG</i>	<i>GTF2H5</i>	<i>PMP22</i>	<i>TUBA1A</i>
<i>DARS</i>	<i>HARS</i>	<i>POLR3A</i>	<i>TUBA8</i>
<i>DARS2</i>	<i>HARS2</i>	<u><i>POLR3B</i></u>	<i>TUBB</i>
<i>DDOST</i>	<i>HK1</i>	<i>POMK</i>	<i>TUBB2A</i>
<i>DHFR</i>	<i>HSD17B4</i>	<i>PRX</i>	<i>TUBB2B</i>
<i>DNM1L</i>	<i>HSPD1</i>	<i>PSAP</i>	<i>TUBB3</i>
<i>DPM1</i>	<i>IARS</i>	<i>QARS</i>	<u><i>TUBB4A</i></u>
<i>EARS2</i>	<i>IARS2</i>	<i>RARS</i>	<i>UPB1</i>
<i>EGR2</i>	<i>IER3IP1</i>	<i>RARS2</i>	<i>VAR2S2</i>
<i>EIF2B1</i>	<i>KARS</i>	<i>RBM8A</i>	<i>WARS</i>
<u><i>EIF2B2</i></u>	<i>KCNJ10</i>	<i>RMND1</i>	<i>WARS2</i>
<i>EIF2B3</i>	<u><i>KCNT1</i></u>	<i>RNASSET2</i>	<i>YARS</i>
<i>EIF2B4</i>	<i>LARS</i>	<i>SARS</i>	<i>YARS2</i>
<i>EIF2B5</i>	<i>LARS2</i>	<i>SARS2</i>	<i>ZC4H2</i>
<i>ELOVL4</i>	<i>MARS</i>	<i>SEPSECS</i>	<i>ZNF335</i>
<i>EPRS</i>	<i>MARS2</i>	<u><i>SLC16A2</i></u>	

下線： 本研究で病的意義を有すると思われる変異を認めた遺伝子

表 3: *PNPT1* の PCR に用いたプライマー

1	<i>PNPT1</i> Ex1-F	GTA AACGACGGCCAGTGGAAACGAAACTCCATCAGG
2	<i>PNPT1</i> Ex1-R	CGGAAAGGAAATTTGGAAT
3	<i>PNPT1</i> Ex2-F	GTA AACGACGGCCAGTGGATTCTGCCCTTTTTGTT
4	<i>PNPT1</i> Ex2-R	GCAGTGCTCTGGACTCTGGT
5	<i>PNPT1</i> Ex3-F	TCTGATTTCAAAGGAACTTACCA
6	<i>PNPT1</i> Ex3-R	GGAAAAATTCTTTGTTGTGCAAG
7	<i>PNPT1</i> Ex4-F	GTA AACGACGGCCAGTTCAACTTTCCTCTCCCCAAA
8	<i>PNPT1</i> Ex4-R	TGAATAATCTTAGGTGGTGTAAATGC
9	<i>PNPT1</i> Ex5-F	GTA AACGACGGCCAGTTCCAAGGGGATTTTTCTTGA
10	<i>PNPT1</i> Ex5-R	CTGGGCGACAAAGTGAGACT
11	<i>PNPT1</i> Ex6-F	GTA AACGACGGCCAGTCAAAAATTAAGAGGTTTGGCTACAA
12	<i>PNPT1</i> Ex6-R	TAATGAGAGGGCTACGGAAG
13	<i>PNPT1</i> Ex7-F	GTA AACGACGGCCAGTTGAGCCTGATGTCCTAGCAA
14	<i>PNPT1</i> Ex7-R	TCATCTAGTTCAATTCATGAAGAGGT
15	<i>PNPT1</i> Ex8-F	GTTGAAGCCATGACTGGAA
16	<i>PNPT1</i> Ex8-R	CTTGTAAGTAAATCCAGAACAAATGTG
17	<i>PNPT1</i> Ex9-F	GTA AACGACGGCCAGTTTATGTCATGTCATGGTATTTGAA
18	<i>PNPT1</i> Ex9-R	TGCTTCCATGGGAAGTTTCT
19	<i>PNPT1</i> Ex10-F	GTA AACGACGGCCAGTGGAGGGTGGGAGAAAGAAAT
20	<i>PNPT1</i> Ex10-R	CAATTAGGCTTTTGTAGTTTTTCA
21	<i>PNPT1</i> Ex11-F	GTA AACGACGGCCAGTTCAGAGTAATTCACAATGTGTTCA
22	<i>PNPT1</i> Ex11-R	TGCCTTTCCTCTTTGACCTT
23	<i>PNPT1</i> Ex12-F	GTA AACGACGGCCAGTCATCTCCCTTGGTTGATTCC
24	<i>PNPT1</i> Ex12-R	TGATCAAGTTTCCATTTTCAAGG
25	<i>PNPT1</i> Ex13-F	GTA AACGACGGCCAGTGGTTGAGAACTTCTGGGAGA
26	<i>PNPT1</i> Ex13-R	CCATATGACAAAACCTACAGCATC
27	<i>PNPT1</i> Ex14-F	GTA AACGACGGCCAGTTTTTAAGAGTTAGTTGGATTCTTCA
28	<i>PNPT1</i> Ex14-R	GAAAAATGAAGTACAAAACACAGG
29	<i>PNPT1</i> Ex15-F	GTA AACGACGGCCAGTTCCTTAAATCTGTTTTAGTTGTG
30	<i>PNPT1</i> Ex15-R	GAGGGAGAGGTTGCAGTGAG
31	<i>PNPT1</i> Ex15-F v2	GTA AACGACGGCCAGTCTTTGGTTTTTCAGTTTCAGTCTG
32	<i>PNPT1</i> Ex15-R v2	TGTAATCCCAGCTACTTGGGAG
33	<i>PNPT1</i> Ex16-F	GTA AACGACGGCCAGTAAAAACAAAAATGAGATTCTACTGTTC
34	<i>PNPT1</i> Ex16-R	AAAGCTTCTCAGCAAGAGCA
35	<i>PNPT1</i> Ex17-F	GTA AACGACGGCCAGTTGGGCATGGTAAGTACAGGTC

36	<i>PNPT1</i> Ex17-R	TGCAACAAACTTGGGTTCTG
37	<i>PNPT1</i> Ex18-F	GTAAAACGACGGCCAGTAAGACCTTGCCTTAGTTGCTTTT
38	<i>PNPT1</i> Ex18-R	AAGTGAGCCTCCTGCCTTG
39	<i>PNPT1</i> Ex19-F	GTAAAACGACGGCCAGTCAGACCGAGACTCCCTCTCA
40	<i>PNPT1</i> Ex19-R	TCTTCACCATTATTTGTTTTTATCTTT
41	<i>PNPT1</i> Ex20-F	GTAAAACGACGGCCAGTTGCTTTGTGTTTGGACTTAGGA
42	<i>PNPT1</i> Ex20-R	TCAGCCTAATATGGAAAAGTCAA
43	<i>PNPT1</i> Ex21-F	GTAAAACGACGGCCAGTAAACCCATTTTGTTCATTTTTG
44	<i>PNPT1</i> Ex21-R	CCACACCTGGCCAGTACTTC
45	<i>PNPT1</i> Ex22-F	GTAAAACGACGGCCAGTGGGTTTAGATTGTATACCGTGAA
46	<i>PNPT1</i> Ex22-R	GGATGGTCTCGATCTCCTGA
47	<i>PNPT1</i> Ex23-F	GTAAAACGACGGCCAGTAGGGAATATTCTTTAACAGTTTTTCAG
48	<i>PNPT1</i> Ex23-R	CGTCATATCCTTTTCTCCTGGT
49	<i>PNPT1</i> Ex24-F	GTAAAACGACGGCCAGTAAGTGATCCTCCCACCTCAG
50	<i>PNPT1</i> Ex24-R	AAGCCATAAGATTCATAAAGAAAACA
51	<i>PNPT1</i> Ex25-F	GTAAAACGACGGCCAGTTGCTATGCATGAGGCAAGAG
52	<i>PNPT1</i> Ex25-R	GGCACCACTGTATCCCACTG
53	<i>PNPT1</i> Ex26-F	GTAAAACGACGGCCAGTCGTGCTAGAATTGTTTCTTTTCG
54	<i>PNPT1</i> Ex26-R	GGCAAAGTGTATAATTCTTACCAACC
55	<i>PNPT1</i> Ex27-F	GTAAAACGACGGCCAGTCAGAAAACTAATAAAGCTTGAGGAAA
56	<i>PNPT1</i> Ex27-R	TCATAGATGGTGA CTCTTCTTTCAA
57	<i>PNPT1</i> Ex28-F	GTAAAACGACGGCCAGTTCATTGCCTTATTTGGACCAT
58	<i>PNPT1</i> Ex28-R	GGCACATGTAAATGAGCATTTTAGTA

表 4： 対象患者の遺伝学的異常および臨床症状

Pt. ID (sex)	causative chromosome or gene and variant	aff. sib.	birth weight < -1.5 SD	age at onset (m)	initial symptoms	sz	nyst	mus. tone	other features	dysmorphic features	ABR	MRI findings	Ref.
1 (M)	18q deletion 46, XY, del(18)(q21.3)	-		12	ID	-	-	NA	short stature	craniofacial dysmorphisms	n	diffuse T2 HI	Tada et al., 2014
2 (M)	18q deletion 46, XY, r(18)(p11q?23)	-	-1.9	1	failure to thrive	-	+	↓	ID (disable to walk alone), cardiac anomaly	dysmorphisms, tapering fingers, foot deformities, prominent ear	abn	diffuse T2 HI	
3 (M)	18q deletion, Xq28 duplication 46, XY, der(18)t(X;18)(q28;q23)	- S.A.		0	seizures, failure to thrive	+	-	↓	severe ID, IgA deficiency, endocrinosis	craniofacial dysmorphism, tapering fingers, dysmorphic ears	NA	diffuse mild T2 HI, enlargement of lateral ventricle, thin corpus callosum, mild atrophy of frontal lobe	
4 (M)	<i>SLC16A2</i> hemizygote c.1609_1611delCCC, p.Pro537del	-		4	ID (no head control)	-	-	↓	myoclonus, dystonia, abnormal thyroid function	none	NA	diffuse T2 HI, mild atrophy of frontal lobe, enlargement of lateral ventricle, thin corpus callosum	
5 (M)	<i>TREX1</i> compound heterozygote	-		0	fever	-	+	↓	severe ID, mixed quadriplegia, dystonia, abnormal liver function	microcephaly	abn	diffuse T2 HI, cranial calcification (head CT scan)	Abe et al., 2014
6 (F)	not examined (Cockayne syndrome; diagnosed clinically)	-		8	ID	-	-	↑	spastic paraplegia, short stature, cutaneous photosensitivity	craniofacial dysmorphisms	abn	diffuse T2 HI, thin corpus callosum, small brainstem, enlargement of lateral ventricle	
7 (M)	<i>PLP1</i> mutation hemizygote c.538A>C**, p.Thr180Pro	-		0	failure to thrive, stridor	+	+	↑	severe ID, recurrent laryngeal nerve palsy, spasticity	none	abn	diffuse T2 HI, atrophy of brainstem and middle peduncle	
8 (M)	<i>PLP1</i> deletion c.518C>A, p.Pro173Gln c.519_523delTGTGT, p.174_175delValTyr fs*26	-		13	ID (disable to sit alone)	-	+	↑	spastic diplegia	none	abn	diffuse T2 HI	
9 (M)	<i>PLP1</i> deletion	-		7	ID (no head control)	-	-	→	spastic paraplegia	none	abn	diffuse T2 HI, mild atrophy of frontal lobe	Shiuhara et al., 2014
10 (F)	15q Loss of Heterozygosity	-		3	nystagmus abnormal eye movement	+	+	↓	severe ID	none	n	patchy periventricular T2 HI, mild atrophy of cerebrum	
11 (M)	<i>EIF2B2</i> deletion hemizygote	-	-1.8	10	seizures	+	-	↓	deteriorated development, spasticity	craniofacial dysmorphisms, microcephaly	NA	diffuse T2 HI, cerebral hypoplasia, dilation of the lateral ventricles	Shimada et al., 2012
12 (M)	<i>TUBB4A</i> heterozygote	-		18	ID (gait instability)	-	-	↑	spastic paraplegia, ataxia, a few meaningful words at 5 years	none	abn	diffuse T2 HI, atrophy of cerebellum and putamen	Miyatake et al., 2014
13 (M)*	<i>TUBB4A</i> heterozygote c.743C>A**, p.Ala248Asp	-		7	ID (no head control), nystagmus	+	+	↑	severe ID, spastic quadriplegia	none	abn	diffuse T2 HI, unrecognizable putamen and head of caudate nucleus, atrophy of cerebrum and cerebellum, thin corpus callosum	

14 (M)	<i>POLR3B</i> mutation compound heterozygote	+	NA	36	deteriorated motor development (unstable walking)	-	+	↓	mild intellectual disability, severe myopia, ataxia, hypogonadism, cerebellar signs	none	NA	diffuse T2 HI, atrophy of cerebellum, thin corpus callosum	Saito et al., 2011
15 (F)*	<i>KCNT1</i> heterozygote c.2718G>T**, p.Gln906His		NA	3	seizures, nystagmus	+	+	↓	severe ID (no fixation), opsoclonus, spastic quadriplegia	microcephaly	n	severe T2 HI, thin corpus callosum, atrophy of cerebellar vermis, atrophy of cortex	
16 (M)	<i>KCNT1</i> heterozygote c.862G>A, p.Gly288Ser	-		2	seizures	+	-	↓	severe ID, flaccid paraplegia	NA	NA	T2 HI of subcortical white matter, atrophy of cerebrum, thin corpus callosum	
17 (M)	<i>AHDC1</i> heterozygote c.2197G>T**, p.Ala733Ser	-	-1.6	1	nystagmus, tonic posturing of the extremities	-	+	NA	severe ID (no head control)	NA	abn	diffuse T2 HI	
18 (M)*	<i>MCOLN1</i> compound heterozygote c.[410T>C]**:[802_803del]**, p.[Leu137Pro];[p.Ser268del]	-		12	ID (disable to stand)	-	-	NA	spastic paraplegia, no words at 2 years	microcephaly	NA	diffuse T2 HI, atrophy of cerebrum, thin corpus callosum	
19 (M)*	<i>PNPT1</i> compound heterozygote c.[277G>A]**:[574C>T]**, p.[Gly76Asp];[p.Arg192del]	+	-3	3	failure to thrive, ID (no head control)	+	+	↑		craniofacial dysmorphisms, microcephaly	n	diffuse T2 HI, thin corpus callosum, small brainstem	
20 (M)	No candidate variants detected	-		8	ID (disable to sit alone)	-	-	NA	moderate ID, unstable walking, hypodontia, congenital cataract, hypogonadism	hypodontia	n	diffuse T2 HI, mild atrophy of cerebellum	
21 (F)*	No candidate variants detected	-		2	abnormal eye movement, involuntary movement of arms	+	+	↓	severe ID (no head control)	microcephaly	abn	severe T2 HI, atrophy of cerebrum, thin corpus callosum	
22 (F)*	No candidate variants detected	-	-2.7	1	failure to thrive	+	-	↑	severe ID, spastic quadriplegia, stereotypic movements of the hands	craniofacial dysmorphisms, microcephaly	n	T2 HI, atrophy of cerebrum, enlargement of extra cerebral space	
23 (M)*	No candidate variants detected	-		4	ID (no head control)	-	-	↓	severe ID	none	abn	severe T2 HI	
24 (F)*	No candidate variants detected	-		3	ID (no fixation)	+	-	mild ↓	severe ID, involuntary movement	microcephaly	n	T2 HI of frontal lobe, mild enlargement of lateral ventricular, mild atrophy of cerebellar	
25 (M)*	No candidate variants detected	-		18	ID (disable to walk)	-	-	→	failure to thrive, no words at 2 years	none	mild abn	diffuse T2 HI	
26 (M)	No candidate variants detected	+		4	ID (no head control)	+	-	↓	severe ID, involuntary movement, recurrent pancreatitis, hepatic steatosis, intractable diarrhea	none	almos t n	T2 HI of subcortical white matter, atrophy of cerebrum	
27 (M)	No candidate variants detected	-		18	ID (gait instability), nystagmus	-	+	↓	moderate ID, spastic diplegia	none	abn	T2 HI of peripheral lateral ventricular, posterior limb of internal capsule	
28 (F)	No candidate variants detected	-	-2.6	4	ID (no fixation), nystagmus	-	+	↑	failure to thrive, involuntary movement, no words at 6 years	microcephaly	abn	diffuse T2 HI, thin corpus callosum, mild enlargement of lateral ventricle	

29 (M)	No candidate variants detected	-	-2.4	4	seizures	+	-	↑	severe ID, cataract, hypothyroidism, dyskinesia	microcephaly	NA	diffuse T2 HI, atrophy of cortex, enlargement of lateral ventricular, thin corpus callosum
-----------	--------------------------------	---	------	---	----------	---	---	---	---	--------------	----	--

Abbreviations: Pt. ID: patient identifier, M: male, F: female, *trio or quartet samples, **novel mutation, +: present, -: absent, aff. sib.: affected siblings, sz: seizures, nyst: nystagmus, mus. tone: muscle tone, ABR: Auditory brainstem response, Ref.: reference, S.A.: spontaneous abortion, ID: intellectual disability, ↑: high muscle tone (hypertonia), →: normal muscle tone, ↓: low muscle tone (hypotonia), n: normal, abn: abnormal, NA: not available, T2 HI: T2 high intensity

表 5 : 既知あるいは関連遺伝子解析で認めた変異

ID	Chr.	Position	Ref.	Alt.	Gene	Function	Annotation	SIFT	Polyphen2 (HVAR)	MutationTaster Prediction	P-value	GERP++
17	1	27876430	C	A	<i>AHDC1</i>	SNV	NM_001029882:exon6:c.G2197T:p.A733S	0.74	.0019	N	0.914	3.76
16	9	138651532	G	A	<i>KCNT1</i>	SNV	NM_020822:exon11:c.G862A:p.G288S	0.12	0.995	D	1	5.05
15	9	138670657	G	T	<i>KCNT1</i>	SNV	NM_020822:exon23:c.G2718T:p.Q906H	.0	.0967	D	1	3.58
13	19	6495767	G	T	<i>TUBB4A</i>	SNV	NM_006087:exon4:c.C743A:p.A248D	0	0.147	D	1	3.95
18	19	7591651	T	C	<i>MCOLN1</i>	SNV	NM_020533:exon4:c.T410C:p.L137P	0.14	0.206	N	0.993	4.2
18	19	7593068	AG	-	<i>MCOLN1</i>	fs_del	NM_020533:exon7:c.802_803del:p.268_268del	NA	NA	NA	NA	NA

ID, patient identifier; Chr., chromosome; Ref., reference allele; Alt., alternative allele; NA, not applicable; SNV, single nucleotide variant; fs_del, frameshift deletion.

SIFT: <0.05, damaging, >0.05, tolerated.

Polyphen2 (HVAR): >=0.909, probably damaging, >=0.447, possibly damaging, <=0.446, benign.

MutationTaster: Mutations are classified as follows with P-values; "A" ("disease_causing_automatic"); "D" ("disease_causing"); "N" ("polymorphism"); "P" ("polymorphism_automatic"). The P-value is the probability of the prediction, and the closer the probability is to 1 (range: 0–1), the higher the “security” of the prediction.

GERP++: The higher score indicates more conserved.

表 6 : 常染色体優性遺伝解析で認めた候補 *de novo* 変異

ID	Chr.	Position	Ref.	Alt.	Gene	Function	Annotation	SIFT	Polyphen2 (HVAR)	MutationTaster Prediction	P-value	GERP++
13	6	136599544	G	A	<i>BCLAF1</i>	stopgain	NM_014739:exon4:c.C475T:p.R159X	1	.	D	1	4.75
13	19	6495767	G	T	<i>TUBB4A</i>	SNV	NM_006087:exon4:c.C743A:p.A248D	0	0.147	D	1	3.95
15	2	241447109	C	G	<i>ANKMY1</i>	splicing	NM_016552:exon13:c.2128-1G>C	.	.	D	1	2.16
21	5	14364791	A	T	<i>TRIO</i>	SNV	NM_007118:exon15:c.A2620T:p.M874L	1	0.558	D	1	5.27
21	16	2814880	T	C	<i>SRRM2</i>	SNV	NM_016333:exon11:c.T4351C:p.S1451P	0.02	0.979	N	0.615	5.82
22	16	2814880	C	A	<i>AHDC1</i>	SNV	NM_001029882:exon6:c.G2197T:p.A733S	0.74	0.019	N	0.914	3.76
22	18	55269642	G	A	<i>NARS</i>	SNV	NM_004539:exon13:c.C1460T:p.A487V	0.1	0.244	D	0.788	4.03
23	2	210894580	A	G	<i>KANSL1L</i>	SNV	NM_152519:exon10:c.T2218C:p.F740L	0.71	0.979	D	1	3.01
23	3	118943071	G	A	<i>B4GALT4</i>	stopgain	NM_003778:exon5:c.C508T:p.R170X	1	.	A	1	5.01
23	11	64129433	C	A	<i>RPS6KA4</i>	SNV	NM_003942:exon8:c.C865A:p.P289T	0.09	0.079	D	1	4.01
23	X	134856790	A	G	<i>CT45A1</i>	SNV	NM_001017417:exon5:c.A565G;p.I189V	0	0.001	N	1	-3.69

ID, patient identifier; Chr., chromosome; Ref., reference allele; Alt., alternative allele; NA, not applicable.

SIFT: <0.05, damaging, >0.05, tolerated.

Polyphen2 (HVAR): >=0.909, probably damaging, >=0.447, possibly damaging, <=0.446, benign.

MutationTaster: Mutations are classified as follows with P-values; "A" ("disease_causing_automatic"); "D" ("disease_causing"); "N" ("polymorphism"); "P" ("polymorphism_automatic"). The P-value is the probability of the prediction, and the closer the probability is to 1 (range: 0–1), the higher the “security” of the prediction.

GERP++: The higher score indicates more conserved.

	2	122125373	G	T	<i>CLASP1</i>	SNV	NM_015282:exon34:c.C3677A:p.T1226N	0.26	0.075	D	0.651	5.1
	2	122159223	A	G	<i>CLASP1</i>	SNV	NM_015282:exon27:c.T2762C:p.L921P	0	0.998	D	1	5.78
	11	108056024	G	A	<i>NPAT</i>	SNV	NM_002519:exon10:c.C841T:p.P281S	0.53	0.57	D	0.929	4.93
	11	108057246	C	T	<i>NPAT</i>	SNV	NM_002519:exon8:c.G689A:p.R230Q	0.03	0.537	D	0.948	5.76
	14	58896083	T	A	<i>KIAA0586</i>	SNV	NM_001244189:exon3:c.T238A:p.S80T	0.21	0.717	N	0.969	1.14
	14	58941425	C	T	<i>KIAA0586</i>	SNV	NM_001244189:exon21:c.C2894T:p.P965L	0	0.999	D	1	5.29
homozygous												
	7	30693145	CCGGGC	CGGC	<i>CRHR2</i>	fs_sub	NM_001202475:exon13:c.1243_1248GCCG	NA	NA	NA	NA	NA
	13	30091818	AG	-	<i>SLC7A1</i>	fs_del	NM_003045:exon10:c.1401_1402del:p.467_468del	NA	NA	NA	NA	NA

17

compound heterozygous

	3	12857926	G	A	<i>CAND2</i>	SNV	NM_001162499:exon10:c.G1495A:p.A499T	0.56	0.078	D	1	4.12
	3	12857927	C	T	<i>CAND2</i>	SNV	NM_001162499:exon10:c.C1496T:p.A499V	0.45	0.521	D	1	5.12
	3	119128398	G	-	<i>ARHGAP31</i>	fs_del	NM_020754:exon11:c.1701delG:p.P567fs	NA	NA	NA	NA	NA
	3	119133135	C	T	<i>ARHGAP31</i>	SNV	NM_020754:exon12:c.C2359T:p.P787S	0.23	0.996	D	0.929	5
	5	38406987	A	C	<i>EGFLAM</i>	SNV	NM_152403:exon8:c.A886C:p.K296Q	0.59	0.064	D	1	0.689
	5	38407192	G	-	<i>EGFLAM</i>	fs_del	NM_152403:exon8:c.1091delG:p.W364fs	NA	NA	NA	NA	NA
	9	130578203	G	-	<i>ENG</i>	fs_del	NM_000118:exon14:c.1871delT:p.V624fs	NA	NA	NA	NA	NA
	9	130578211	G	-	<i>ENG</i>	fs_del	NM_000118:exon14:c.1863delC:p.A621fs	NA	NA	NA	NA	NA
	10	126681804	C	T	<i>CTBP2</i>	SNV	NM_001329:exon9:c.G1006A:p.A336T	0.13	0.234	D	1	4.72
	10	126681868	C	-	<i>CTBP2</i>	fs_del	NM_001329:exon9:c.942delG:p.P314fs	NA	NA	NA	NA	NA
	12	7469737	G	A	<i>ACSM4</i>	SNV	NM_001080454:exon4:c.G625A:p.A209T	0.02	0.344	N	0.85	2.8
	12	7476145	T	G	<i>ACSM4</i>	SNV	NM_001080454:exon9:c.T1297G:p.S433A	0.56	0.046	D	1	2.4
	12	53170762	C	A	<i>KRT76</i>	SNV	NM_015848:exon1:c.G314T:p.G105V	0.09	0.462	D	1	4.42
	12	53170778	C	A	<i>KRT76</i>	SNV	NM_015848:exon1:c.G298T:p.G100C	0.19	0.754	N	1	3.71
	12	105425605	T	G	<i>ALDH1L2</i>	SNV	NM_001034173:exon20:c.A2352C:p.E784D	0.26	0.029	D	1	0.356
	12	105455494	T	-	<i>ALDH1L2</i>	stopgain	NM_001034173:exon8:c.958delA:p.M320X	NA	NA	NA	NA	NA
	13	114306002	A	G	<i>ATP4B</i>	SNV	NM_000705:exon5:c.T596C:p.V199A	0.02	0.097	D	0.961	3.27
	13	114307200	A	C	<i>ATP4B</i>	SNV	NM_000705:exon4:c.T543G:p.I181M	0	0.9	D	0.962	-2.81
	14	72138332	T	C	<i>SIPA1L1</i>	SNV	NM_015556:exon8:c.T2752C:p.Y918H	0.22	1	D	1	5.86
	14	72138346	A	T	<i>SIPA1L1</i>	SNV	NM_015556:exon8:c.A2766T:p.E922D	0.45	0.331	D	1	-2.32
	16	48231911	G	C	<i>ABCC11</i>	SNV	NM_032583:exon17:c.C2285G:p.S762C	0.04	0.013	N	1	-3.77
	16	48265778	G	A	<i>ABCC11</i>	SNV	NM_032583:exon2:c.C55T:p.R19C	0.05	0.172	N	0.964	3.22
	16	67429024	GCCAG	GCAG	<i>ZDHHC1</i>	fs_sub	NM_013304:exon10:c.1107_1111CTGC:	NA	NA	NA	NA	NA
	16	67440314	G	A	<i>ZDHHC1</i>	SNV	NM_013304:exon3:c.C41T:p.T14M	0	0.962	D	0.998	5.25
	19	5787098	G	A	<i>DUS3L</i>	SNV	NM_020175:exon8:c.C1363T:p.R455W	0.04	0.764	D	0.605	2.1
	19	5788173	G	-	<i>DUS3L</i>	fs_del	NM_020175:exon5:c.957delC:p.P319fs	NA	NA	NA	NA	NA
	20	25456914	G	-	<i>NINL</i>	fs_del	NM_025176:exon17:c.3013delC:p.L1005fs	NA	NA	NA	NA	NA
	20	25485673	G	-	<i>NINL</i>	fs_del	NM_025176:exon6:c.559delC:p.Q187fs	NA	NA	NA	NA	NA
homozygous												
	11	68548140	C	-	<i>CPT1A</i>	fs_del	NM_001876:exon12:c.1426delG:p.A476fs	NA	NA	NA	NA	NA

18

compound heterozygous

5	89949043	G	-	<i>GPR98</i>	fs_del	NM_032119:exon20:c.3652delG;p.G1218fs	NA	NA	NA	NA	NA
5	90015986	T	-	<i>GPR98</i>	fs_del	NM_032119:exon44:c.9569delT;p.V3190fs	NA	NA	NA	NA	NA
5	140773871	G	-	<i>PCDHGA8</i>	fs_del	NM_014004:exon1:c.1491delG;p.Q497fs	NA	NA	NA	NA	NA
5	140774066	C	G	<i>PCDHGA8</i>	SNV	NM_014004:exon1:c.C1686G;p.I562M	0	0.979	N	0.99	2.3
11	76853784	G	C	<i>MYO7A</i>	SNV	NM_000260:exon3:c.G48C;p.L16F	0.01	0.138	N	1	-6.37
11	76890926	G	-	<i>MYO7A</i>	fs_del	NM_000260:exon21:c.2513delG;p.W838fs	NA	NA	NA	NA	NA
13	25376657	A	G	<i>RNF17</i>	SNV	NM_031277:exon14:c.A1897G;p.S633G	0.34	0.985	D	1	4.75
13	25416194	A	G	<i>RNF17</i>	SNV	NM_031277:exon19:c.A2498G;p.N833S	0.5	0.275	D	1	4.07
homozygous											
5	179676012	C	-	<i>MAPK9</i>	fs_del	NM_002752:exon6:c.577delG;p.A193fs	NA	NA	NA	NA	NA
12	53899566	C	T	<i>TARBP2</i>	SNV	NM_134323:exon8:c.C875T;p.P292L	0.26	0.015	D	0.995	4.98
17	8045708	C	-	<i>PER1</i>	fs_del	NM_002616:exon21:c.3328delG;p.A1110fs	NA	NA	NA	NA	NA
hemizygous											
X	18919658	C	G	<i>PHKA2</i>	SNV	NM_000292:exon27:c.G2972C;p.G991A	0.21	0.725	D	1	6.06
X	122799618	C	T	<i>THOC2</i>	SNV	NM_001081550:exon12:c.G1261A;p.A421T	0.54	0.014	D	1	5.7
X	153248292	C	T	<i>TMEM187</i>	SNV	NM_003492:exon2:c.C779T;p.T260M	0.01	0.001	N	1	-6.53
X	153590382	T	C	<i>FLNA</i>	SNV	NM_001456:exon19:c.A2791G;p.N931D	0.86	0.535	D	1	4.72

19

compound heterozygous

2	55906922	G	A	<i>PNPT1</i>	stopgain	NM_033109:exon8:c.C574T;p.R192X	1	.	A	1	3.07
2	55913575	C	T	<i>PNPT1</i>	SNV	NM_033109:exon3:c.G227A;p.G76D	0.03	0.997	D	1	5.05

20

compound heterozygous

2	179449688	G	-	<i>TTN</i>	fs_del	NM_001267550:exon310:c.64680delC;p.P21560fs	NA	NA	NA	NA	NA
2	179485612	C	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon247:c.G45725A;p.R15242K	0	0.005	N	0.569	5.83
2	179547564	C	G	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon135:c.G32954C;p.R10985P	0	0.524	N	0.987	2.95
2	179583569	G	A	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon84:c.C24358T;p.P8120S	0	0.001	N	1	-1.25
9	79229511	T	A	<i>PRUNE2</i>	SNV	NM_015225:exon19:c.A9242T;p.D3081V	0	0.927	D	1	6.17
9	79319847	TT	-	<i>PRUNE2</i>	fs_del	NM_015225:exon8:c.7342_7343del;p.2448_2448del	NA	NA	NA	NA	NA
11	4944714	G	A	<i>OR51G1</i>	SNV	NM_001005237:exon1:c.C856T;p.P286S	0.01	1	D	0.807	4.53
11	4945019	A	C	<i>OR51G1</i>	SNV	NM_001005237:exon1:c.T551G;p.L184R	0.04	0.544	N	1	3.21
14	105408335	A	G	<i>AHNAK2</i>	SNV	NM_138420:exon7:c.T13453C;p.S4485P	0.27	0.992	N	1	-0.711
14	105414881	C	-	<i>AHNAK2</i>	fs_del	NM_138420:exon7:c.6907delG;p.D2303fs	NA	NA	NA	NA	NA
21	37618740	G	A	<i>DOPEY2</i>	SNV	NM_005128:exon19:c.G4462A;p.V1488M	0.11	0.328	D	1	3.88
21	37661405	G	-	<i>DOPEY2</i>	fs_del	NM_005128:exon35:c.6416delG;p.G2139fs	NA	NA	NA	NA	NA

homozygous

1	16344360	A	-	<i>HSPB7</i>	fs_del	NM_014424:exon1:c.99delT;p.A33fs	NA	NA	NA	NA	NA
3	15131939	C	-	<i>ZFYVE20</i>	fs_del	NM_022340:exon5:c.256delG;p.V86fs	NA	NA	NA	NA	NA
5	140735617	G	T	<i>PCDHGA4</i>	stopgain	NM_018917:exon1:c.C943T;p.Q315X	NA	NA	NA	NA	NA
6	139563914	C	-	<i>TXLNB</i>	fs_del	NM_153235:exon10:c.1804delG;p.A602fs	NA	NA	NA	NA	NA
16	57159872	G	-	<i>CPNE2</i>	fs_del	NM_152727:exon11:c.1028delG;p.W343fs	NA	NA	NA	NA	NA
17	26824220	G	-	<i>SLC13A2</i>	fs_del	NM_001145975:exon12:c.1859delG;p.W620fs	NA	NA	NA	NA	NA

21											
compound heterozygous											
1	8419873	T	C	<i>RERE</i>	SNV	NM_012102:exon20:c.A3569G:p.K1190R	0.83	0.114	D	0.963	5.42
1	8419874	T	G	<i>RERE</i>	SNV	NM_012102:exon20:c.A3568C:p.K1190Q	0.1	0.877	D	0.968	5.42
2	179422112	G	A	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon329:c.C87877T:p.R29293C	0	0.999	D	1	5.77
2	179425856	A	C	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon326:c.T85003G:p.S28335A	0	0.171	N	0.995	4.67
2	179456367	A	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon303:c.T60179A:p.L20060H	0	0.739	D	0.595	6.16
2	179456782	C	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon302:c.G59849A:p.R19950Q	0	0.968	D	1	6.03
2	179569261	C	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon105:c.G29938A:p.A9980T	0	0.604	D	1	5.99
16	19020587	C	T	<i>TMC7</i>	SNV	NM_024847:exon2:c.C161T:p.T54M	0.15	0.126	D	1	4.37
16	19027850	G	T	<i>TMC7</i>	SNV	NM_024847:exon3:c.G390T:p.R130S	0.01	0.94	N	0.894	1.97
16	84203818	-	G	<i>DNAAF1</i>	fs_ins	NM_178452:exon8:c.1384_1385insG:p.Q462fs	NA	NA	NA	NA	NA
16	84209590	G	A	<i>DNAAF1</i>	SNV	NM_178452:exon11:c.G1750A:p.D584N	0.01	0.961	D	1	4.86
homozygous											
17	41926219	GGCC	GC	<i>CD300LG</i>	fs_sub	NM_145273:exon2:c.337_340GC:	NA	NA	NA	NA	NA
19	19764799	GGCC	GC	<i>ATP13A1</i>	fs_sub	NM_020410:exon14:c.1965_1968GC:	NA	NA	NA	NA	NA
22											
compound heterozygous											
12	2719761	A	G	<i>CACNA1C</i>	SNV	NM_199460:exon29:c.A3673G:p.K1225E	0.02	0.997	D	1	5.06
12	2797895	G	-	<i>CACNA1C</i>	fs_del	NM_199460:exon49:c.6316delG:p.G2106fs	NA	NA	NA	NA	NA
17	60768003	C	T	<i>MRC2</i>	SNV	NM_006039:exon27:c.C3893T:p.A1298V	.	0.009	D	0.943	-3.25
17	60768363	C	-	<i>MRC2</i>	fs_del	NM_006039:exon28:c.4066delC:p.P1356fs	NA	NA	NA	NA	NA
homozygous											
3	52529442	CG	-	<i>STAB1</i>	fs_del	NM_015136:exon1:c.13_14del:p.5_5del	NA	NA	NA	NA	NA
5	170738586	G	C	<i>TLX3</i>	SNV	NM_021025:exon3:c.G859C:p.V287L	0.01	0.411	D	0.996	4.12
9	140331102	GC	-	<i>ENTPD8</i>	fs_del	NM_198585:exon6:c.656_657del:p.219_219del	NA	NA	NA	NA	NA
19	39521878	AGGGGC	AGGGC	<i>FBXO27</i>	fs_sub	NM_178820:exon3:c.442_447GCCCT	NA	NA	NA	NA	NA
22	26880004	GGCC	GC	<i>SRRD</i>	fs_sub	NM_001013694:exon1:c.148_151GC	NA	NA	NA	NA	NA
23											
compound heterozygous											
2	179425208	G	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon326:c.C85651A:p.P28551T	0	0.999	D	1	5.88
2	179455163	C	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon304:c.G61289A:p.C20430Y	0	0.999	D	1	6.11
2	179590279	A	-	<i>TTN</i>	fs_del	NM_001267550:exon71:c.20652delT:p.F6884fs	NA	NA	NA	NA	NA
2	179638072	C	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon33:c.G7619A:p.R2540H	0	0.002	N	1	-7.02
2	179641717	G	C	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon28:c.C4874G:p.S1625C	0	0.964	N	0.919	5.9
7	100679681	G	A	<i>MUC17</i>	SNV	NM_001040105:exon3:c.G4984A:p.V1662M	0.26	0.756	N	1	0.932
7	100685782	C	T	<i>MUC17</i>	SNV	NM_001040105:exon3:c.C11084T:p.P3695L	0.34	0.988	N	1	1.42
7	149484985	C	A	<i>SSPO</i>	stopgain	NM_198455:exon26:c.C3740A:p.S1247X	NA	NA	NA	NA	NA
7	149504075	A	-	<i>SSPO</i>	fs_del	NM_198455:exon60:c.8899delA:p.N2967fs	NA	NA	NA	NA	NA
14	89171861	T	C	<i>EML5</i>	SNV	NM_183387:exon12:c.A1897G:p.I633V	0.62	0.982	D	1	5.27
14	89181438	C	T	<i>EML5</i>	SNV	NM_183387:exon9:c.G1289A:p.S430N	1	0.002	D	0.879	3.75
15	42149515	C	T	<i>SPTBN5</i>	SNV	NM_016642:exon51:c.G8542A:p.G2848S	0.58	0.67	N	1	3.85
15	42154408	G	A	<i>SPTBN5</i>	SNV	NM_016642:exon44:c.C7468T:p.R2490W	0.01	0.948	N	1	1.32

homozygous											
3	167184878	T	-	<i>SERPINI2</i>	fs_del	NM_001012303:exon4:c.473delA:p.E158fs	NA	NA	NA	NA	NA
11	129742837	G	C	<i>NFRKB</i>	SNV	NM_006165:exon21:c.C2780G:p.P927R	0.12	0.693	N	1	5.26
hemizygous											
X	32613894	C	G	<i>DMD</i>	SNV	NM_000109:exon13:c.G1558A:p.A520T	0.39	0.724	D	1	5.74
X	40482821	G	A	<i>MPC1L</i>	SNV	NM_001195522:exon1:c.G4A:p.A2T	NA	NA	NA	NA	NA
X	69503434	A	C	<i>RAB41</i>	SNV	NM_001032726:exon5:c.A412C:p.II38L	0.03	0.74	N	0.059	0.962
X	77393556	G	A	<i>TAF9B</i>	SNV	NM_015975:exon3:c.C173T:p.S58L	0	0.193	D	1	4.42
X	118242415	G	A	<i>KIAA1210</i>	SNV	NM_020721:exon6:c.C797T:p.T266I	0.14	0.61	N	1	1.02
24											
compound heterozygous											
1	29606109	GC	-	<i>PTPRU</i>	fs_del	NM_005704:exon10:c.1705_1706del:p.569_569del	NA	NA	NA	NA	NA
1	29630375	C	T	<i>PTPRU</i>	SNV	NM_005704:exon17:c.C2515T:p.R839C	.	0.923	D	1	3.2
19	8976753	C	-	<i>MUC16</i>	fs_del	NM_024690:exon73:c.42313delG:p.V14105fs	NA	NA	NA	NA	NA
19	9083162	TCCCCCA	TCCCCCA	<i>MUC16</i>	fs_sub	NM_024690:exon1:c.8647_8653TGGGGA	NA	NA	NA	NA	NA
homozygous											
9	128003136	C	-	<i>HSPA5</i>	fs_del	NM_005347:exon2:c.173delG:p.G58fs	NA	NA	NA	NA	NA
17	60768003	C	T	<i>MRC2</i>	SNV	NM_006039:exon27:c.C3893T:p.A1298V	.	0.009	D	0.943	-3.25
25											
compound heterozygous											
3	38519656	C	-	<i>ACVR2B</i>	fs_del	NM_001106:exon4:c.395delC:p.A132fs	NA	NA	NA	NA	NA
3	38519700	G	-	<i>ACVR2B</i>	fs_del	NM_001106:exon4:c.439delG:p.G147fs	NA	NA	NA	NA	NA
11	1269238	G	A	<i>MUC5B</i>	SNV	NM_002458:exon31:c.G11128A:p.A3710T	0	0.003	N	1	-6.03
11	1272527	C	T	<i>MUC5B</i>	SNV	NM_002458:exon31:c.C14417T:p.T4806M	0	0.01	N	1	-4.13
11	6898235	G	-	<i>OR10A4</i>	fs_del	NM_207186:exon1:c.357delG:p.M119fs	NA	NA	NA	NA	NA
11	6898789	G	A	<i>OR10A4</i>	SNV	NM_207186:exon1:c.G911A:p.R304Q	0.03	0.048	N	1	3.99
19	51842357	C	-	<i>VSIG10L</i>	fs_del	NM_001163922:exon5:c.1514delG:p.G505fs	NA	NA	NA	NA	NA
19	51842385	C	G	<i>VSIG10L</i>	SNV	NM_001163922:exon5:c.G1486C:p.G496R	0.53	0.764	D	1	4.39
19	54376848	C	-	<i>MYADM</i>	fs_del	NM_138373:exon3:c.65delC:p.S22fs	NA	NA	NA	NA	NA
19	54376859	G	A	<i>MYADM</i>	SNV	NM_138373:exon3:c.G76A:p.V26M	0.13	0.01	D	0.659	0.193
homozygous											
1	45270020	-	C	<i>PLK3</i>	fs_ins	NM_004073:exon12:c.1353dupC:p.N451fs	NA	NA	NA	NA	NA
11	6231858	G	-	<i>C11orf42</i>	fs_del	NM_173525:exon2:c.851delG:p.R284fs	NA	NA	NA	NA	NA
11	57070055	C	T	<i>TNKS1BP1</i>	SNV	NM_033396:exon7:c.G4561A:p.V1521M	0.03	0.942	N	1	2.27
14	52782001	CG	-	<i>PTGER2</i>	fs_del	NM_000956:exon1:c.735_736del:p.245_246del	NA	NA	NA	NA	NA
15	64422129	G	-	<i>SNX1</i>	fs_del	NM_003099:exon9:c.822delG:p.V274fs	NA	NA	NA	NA	NA
17	80885780	G	-	<i>TBCD</i>	NA	NM_005993:exon30:c.2610-1G>-	NA	NA	NA	NA	NA
19	55912922	GC	-	<i>UBE2S</i>	fs_del	NM_014501:exon4:c.550_551del:p.184_184del	NA	NA	NA	NA	NA
22	26880004	GGCC	GC	<i>SRRD</i>	fs_sub	NM_001013694:exon1:c.148_151GC	NA	NA	NA	NA	NA
hemizygous											
X	10437606	C	G	<i>MID1</i>	SNV	NM_001193278:exon7:c.G1569C:p.L523F	NA	NA	NA	NA	NA
X	13337363	T	C	<i>ATXN3L</i>	SNV	NM_001135995:exon1:c.A691G:p.R231G	0	0.665	D	0.68	-0.614
X	100871368	TGGGGCCC	TGGGGCCC	<i>ARMCX6</i>	fs_sub	NM_019007:exon3:c.236_243GGGCCCA	NA	NA	NA	NA	NA

X	135572419	G	A	<i>BRS3</i>	SNV	NM_001727:exon2:c.G562A:p.V188I	0.73	0.641	N	0.818	4.22
X	150345221	C	A	<i>GPR50</i>	SNV	NM_004224:exon1:c.C28A:p.P10T	0.03	0.028	N	1	2.23

26

compound heterozygous

2	179402278	A	G	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon355:c.T99656C:p.M33219T	0	0.001	N	0.73	4.73
2	179443382	A	G	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon321:c.T68285C:p.L22762P	0	1	D	1	5.78
4	39201101	A	G	<i>WDR19</i>	SNV	NM_025132:exon6:c.A410G:p.K137R	0.12	0.999	D	1	5.48
4	39226582	ATTTTTC	ATTTTTC	<i>WDR19</i>	fs_sub	NM_025132:exon15:c.1558_1564ATTTTTC:	NA	NA	NA	NA	NA
4	126238905	C	-	<i>FAT4</i>	fs_del	NM_024582:exon1:c.1339delC:p.P447fs	NA	NA	NA	NA	NA
4	126241198	-	TA	<i>FAT4</i>	fs_ins	NM_024582:exon1:c.3632_3633insTA:p.L1211fs	NA	NA	NA	NA	NA
6	158438292	G	A	<i>SYNJ2</i>	SNV	NM_003898:exon2:c.G184A:p.G62S	0	1	D	1	5.13
6	158509750	A	-	<i>SYNJ2</i>	fs_del	NM_003898:exon24:c.3402delA:p.G1134fs	NA	NA	NA	NA	NA
9	6980997	C	G	<i>KDM4C</i>	SNV	NM_001146696:exon9:c.C1060G:p.Q354E	1	0.011	D	0.988	5.54
9	6981036	C	T	<i>KDM4C</i>	SNV	NM_001146696:exon9:c.C1099T:p.H367Y	0.05	0.997	D	1	5.54
17	37864776	G	A	<i>ERBB2</i>	SNV	NM_004448:exon3:c.G428A:p.R143Q	0.08	0.162	D	0.994	5.21
17	37883959	G	C	<i>ERBB2</i>	SNV	NM_004448:exon27:c.G3430C:p.D1144H	0.04	0.212	D	1	4.06
18	21413869	T	-	<i>LAMA3</i>	fs_del	NM_198129:exon24:c.2901delT:p.A967fs	NA	NA	NA	NA	NA
18	21496612	A	G	<i>LAMA3</i>	SNV	NM_198129:exon60:c.A7876G:p.L2626V	0.16	0.203	D	0.981	4.6

homozygous

1	28099862	CGGGGCC	CGGGGCC	<i>STX12</i>	fs_sub	NM_177424:exon1:c.44_50CGGGGCC	NA	NA	NA	NA	NA
4	190946979	G	-	<i>FRG2</i>	fs_del	NM_001005217:exon4:c.574delC:p.Q192fs	NA	NA	NA	NA	NA
9	116132367	GGCC	GC	<i>BSPRY</i>	fs_sub	NM_017688:exon6:c.1154_1157GC	NA	NA	NA	NA	NA
11	120827608	A	-	<i>GRIK4</i>	fs_del	NM_014619:exon16:c.1820delA:p.E607fs	NA	NA	NA	NA	NA
16	108585	T	-	<i>RHBDF1</i>	fs_del	NM_022450:exon18:c.2322delA:p.S774fs	NA	NA	NA	NA	NA
18	13096186	A	G	<i>CEP192</i>	SNV	NM_032142:exon36:c.A6437G:p.D2146G	0.74	0.004	D	1	3.28
19	52034469	C	-	<i>SIGLEC6</i>	fs_del	NM_001245:exon2:c.372delG:p.K124fs	NA	NA	NA	NA	NA

hemizygous

X	152835119	G	A	<i>ATP2B3</i>	SNV	uc004fhu.1:exon3:c.G170A:p.R57Q	0.73	0.072	D	0.796	5.2
---	-----------	---	---	---------------	-----	---------------------------------	------	-------	---	-------	-----

27

compound heterozygous

1	24432539	T	A	<i>MYOM3</i>	SNV	NM_152372:exon5:c.A431T:p.E144V	0.02	0.852	D	0.893	5.34
1	24432540	C	A	<i>MYOM3</i>	stopgain	NM_152372:exon5:c.G430T:p.E144X	0.52	.	A	1	5.34
1	186038870	C	T	<i>HMCN1</i>	SNV	NM_031935:exon51:c.C7955T:p.A2652V	0.39	0.996	D	1	5.51
1	186092164	G	T	<i>HMCN1</i>	SNV	NM_031935:exon81:c.G12311T:p.G4104V	0	1	D	1	5.85
2	152350680	T	C	<i>NEB</i>	SNV	NM_001271208:exon175:c.A24679G:p.S8227G	0.01	0.994	D	1	5.82
2	152543967	A	G	<i>NEB</i>	SNV	NM_001271208:exon27:c.T2603C:p.L868P	0.25	0.936	D	1	5.54
2	179427779	G	A	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon326:c.C83080T:p.R27694C	0	0.999	D	1	5.09
2	179435665	T	C	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon326:c.A75194G:p.H25065R	0	0.01	N	0.734	5.52
2	179481638	G	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon256:c.C47978A:p.T15993N	0	0.081	N	1	0.494
2	179547564	C	G	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon135:c.G32954C:p.R10985P	0	0.524	N	0.987	2.95
2	179606622	C	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon48:c.G11338A:p.E3780K	0	0.001	N	0.996	2.23
3	56627126	A	-	<i>CCDC66</i>	fs_del	NM_001141947:exon8:c.1065delA:p.S355fs	NA	NA	NA	NA	NA
3	56655586	G	T	<i>CCDC66</i>	SNV	NM_001141947:exon18:c.G2787T:p.L929F	0.02	0.998	D	1	5.28

7	100403279	G	-	<i>EPHB4</i>	fs_del	NM_004444:exon15:c.2522delC:p.P841fs	NA	NA	NA	NA	NA
7	100424601	C	T	<i>EPHB4</i>	SNV	NM_004444:exon1:c.G52A:p.E18K	.	0.085	D	1	3.9
9	98270504	C	A	<i>PTCH1</i>	SNV	NM_000264:exon1:c.G140T:p.R47L	0.35	0.001	D	1	0.016
9	98279017	C	A	<i>PTCH1</i>	SNV	NM_001083603:exon1:c.G86T:p.G29V	0	0	D	1	0.458
10	51585223	G	A	<i>NCOA4</i>	SNV	NM_001145260:exon9:c.G1370A:p.G457E	.	0.999	D	1	5.6
10	51585385	C	T	<i>NCOA4</i>	SNV	NM_001145260:exon9:c.C1532T:p.S511L	.	0.9	D	0.906	6.16
11	118451973	G	T	<i>ARCNI</i>	SNV	NM_001655:exon2:c.G16T:p.A6S	0.03	0.974	D	1	5.55
11	118461172	G	A	<i>ARCNI</i>	SNV	NM_001655:exon6:c.G935A:p.R312Q	0.42	0.272	D	1	5.86
15	89398179	C	-	<i>ACAN</i>	fs_del	NM_001135:exon12:c.2363delC:p.S788fs	NA	NA	NA	NA	NA
15	89398406	CC	-	<i>ACAN</i>	fs_del	NM_001135:exon12:c.2590_2591del:p.864_864del	NA	NA	NA	NA	NA
19	9453182	C	T	<i>ZNF559</i>	SNV	NM_001202406:exon6:c.C1247T:p.P416L	0.03	0.983	D	0.968	2.13
19	9453187	G	C	<i>ZNF559</i>	SNV	NM_001202406:exon6:c.G1252C:p.E418Q	0.03	0.196	N	1	-4.26
homozygous											
3	33895390	-	G	<i>PDC6D1P</i>	fs_ins	NM_001162429:exon14:c.1925_1926insG:p.S642fs	NA	NA	NA	NA	NA
9	97083453	GC	-	<i>NUTM2F</i>	fs_del	NM_017561:exon4:c.903_904del:p.301_302del	NA	NA	NA	NA	NA
10	102250549	C	-	<i>SEC31B</i>	fs_del	NM_015490:exon20:c.2564delG:p.G855fs	NA	NA	NA	NA	NA
12	48543772	G	-	<i>ASB8</i>	fs_del	NM_024095:exon4:c.244delC:p.L82fs	NA	NA	NA	NA	NA
16	88786856	G	-	<i>PIEZO1</i>	fs_del	NM_001142864:exon41:c.5886delC:p.A1962fs	NA	NA	NA	NA	NA
19	39521882	GC	-	<i>FBXO27</i>	fs_del	:NM_178820:exon3:c.442_443del:p.148_148del	NA	NA	NA	NA	NA

28

compound heterozygous											
1	68960230	T	A	<i>DEPDC1</i>	SNV	NM_017779:exon2:c.A197T:p.E66V	.	0.943	D	1	5.58
1	68960231	C	A	<i>DEPDC1</i>	stopgain	NM_017779:exon2:c.G196T:p.E66X	.	.	A	1	5.58
1	236157142	C	T	<i>NID1</i>	SNV	NM_002508:exon13:c.G2558A:p.R853Q	0.19	0.73	N	1	5.56
1	236212232	C	T	<i>NID1</i>	SNV	NM_002508:exon2:c.G283A:p.G95R	0.16	0.912	D	0.999	4.81
2	24432835	T	G	<i>ITSN2</i>	SNV	NM_006277:exon35:c.A4325C:p.Y1442S	0.2	0.174	D	0.992	4.26
2	24524088	G	C	<i>ITSN2</i>	SNV	NM_006277:exon11:c.C1016G:p.S339C	0.01	0.974	D	0.981	5.36
2	179422112	G	A	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon329:c.C87877T:p.R29293C	0	0.999	D	1	5.77
2	179456782	C	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon302:c.G59849A:p.R19950Q	0	0.968	D	1	6.03
2	179569261	C	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon105:c.G29938A:p.A9980T	0	0.604	D	1	5.99
2	179599473	C	T	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon51:c.G15178A:p.V5060I	0	0.339	D	1	5.67
2	179638773	C	A	<i>TTN</i>	SNV	NM_001267550:exon31:c.G7122T:p.Q2374H	0	0.999	N	0.99	0.809
3	57431883	T	G	<i>DNAH12</i>	SNV	NM_178504:exon27:c.A3985C:p.II329L	0.02	0.047	D	1	4.62
3	57454515	T	C	<i>DNAH12</i>	SNV	NM_178504:exon17:c.A2297G:p.N766S	0.08	0.005	D	1	-1.24
7	51095724	AGGGGGT	AGGGGGT	<i>COBL</i>	fs_sub	NM_015198:exon10:c.3063_3069ACCCCT	NA	NA	NA	NA	NA
7	51096640	C	G	<i>COBL</i>	SNV	NM_015198:exon10:c.G2153C:p.R718P	0.01	1	N	0.999	-0.034
9	133730221	A	G	<i>ABL1</i>	SNV	NM_007313:exon3:c.A344G:p.N115S	0.58	0.132	D	1	5.67
9	133760303	A	G	<i>ABL1</i>	SNV	NM_007313:exon11:c.A2683G:p.R895G	0.15	0.661	D	1	2.81
15	42982982	C	T	<i>STARD9</i>	SNV	NM_020759:exon23:c.C9206T:p.S3069F	0	0.007	N	1	1.46
15	42982996	G	C	<i>STARD9</i>	SNV	NM_020759:exon23:c.G9220C:p.A3074P	0.03	0.005	N	1	-2.4
15	91811709	G	A	<i>SV2B</i>	SNV	NM_014848:exon10:c.G1247A:p.R416H	0.09	0.869	D	1	5.49
15	91835729	G	A	<i>SV2B</i>	SNV	NM_014848:exon14:c.G1999A:p.G667S	0.5	1	D	1	6.12
16	66967623	G	A	<i>FAM96B</i>	SNV	NM_016062:exon3:c.C242T:p.T81I	0.39	0.008	D	1	3.99
16	66968237	G	-	<i>FAM96B</i>	fs_del	NM_016062:exon1:c.31delC:p.L11fs	NA	NA	NA	NA	NA

homozygous												
16	3533577	C	-	<i>NAA60</i>	fs_del	NM_024845:exon5:c.552delC:p.G184fs	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	70287172	-	G	<i>AARS</i>	fs_ins	NM_001605:exon20:c.2719dupC:p.Q907fs	NA	NA	NA	NA	NA	NA
20	10019093	A	-	<i>ANKEF1</i>	fs_del	NM_022096:exon3:c.144delA:p.G48fs	NA	NA	NA	NA	NA	NA

29

compound heterozygous												
3	12858557	A	G	<i>CAND2</i>	SNV	NM_001162499:exon10:c.A2126G:p.H709R	0.05	0.964	D	1	3.78	
3	12861600	G	A	<i>CAND2</i>	SNV	NM_001162499:exon11:c.G2960A:p.R987Q	0.07	0.801	D	1	5.09	
8	2820911	A	T	<i>CSMD1</i>	SNV	NM_033225:exon60:c.T9287A:p.L3096Q	0.51	0.462	D	1	4.87	
8	3889610	G	C	<i>CSMD1</i>	SNV	NM_033225:exon4:c.C427G:p.H143D	0.19	0.003	D	0.926	5.52	
8	59515840	C	T	<i>NSMAF</i>	SNV	NM_001144772:exon13:c.G1067A:p.R356H	.	1	D	1	5.93	
8	59544086	T	C	<i>NSMAF</i>	SNV	NM_001144772:exon6:c.A446G:p.H149R	.	0.001	D	0.594	5.16	
8	144997654	C	T	<i>PLEC</i>	SNV	NM_201380:exon31:c.G6854A:p.R2285Q	0.05	0.131	N	1	3.88	
8	145007158	G	A	<i>PLEC</i>	SNV	NM_201380:exon14:c.C1951T:p.R651C	0.01	0.8	D	1	5.12	
12	977338	A	T	<i>WNK1</i>	SNV	NM_213655:exon10:c.A2701T:p.I901L	1	0	D	1	-0.196	
12	977995	G	T	<i>WNK1</i>	SNV	NM_213655:exon10:c.G3358T:p.V1120L	0.13	0.013	D	1	2.51	
homozygous												
1	34071525	C	-	<i>CSMD2</i>	fs_del	NM_052896:exon42:c.6287delG:p.R2096fs	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	50946245	C	T	<i>OGDHL</i>	SNV	NM_018245:exon18:c.G2383A:p.A795T	0.14	0.005	D	0.988	3.87	
11	6560038	G	A	<i>DNHD1</i>	SNV	NM_144666:exon16:c.G3323A:p.R1108H	0.1	0.903	N	0.923	3.79	

ID, patient identifier; Chr., chromosome; Ref., reference allele; Alt., alternative allele; fs_del, frameshift deletion; fs_ins, frameshift insertion; fs_sub, frameshift substitution; NA, not applicable.

SIFT: <0.05, damaging, >0.05, tolerated.

Polyphen2 HVAR: >=0.909, probably damaging, >=0.447, possibly damaging, <=0.446, benign.

MutationTaster: Mutations are classified as follows with P-values; "A" ("disease_causing_automatic"); "D" ("disease_causing"); "N" ("polymorphism"); "P" ("polymorphism_automatic"). The P-value is the probability of the prediction, and the closer the probability is to 1 (range: 0–1), the higher the “security” of the prediction.

GERP++: The higher score indicates more conserved.

表 8： 常染色体優性遺伝解析の絞り込みにおけるバリエーション数

患者 ID	13	15	18	21	22	23	24	25
検出されたバリエーション数	34837	33320	34287	33823	34993	33618	29481	35415
<i>de novo</i> 変異	62	41	48	52	260	132	113	256
dbSNP Non Flagged 除外、 synonymous SNV 除外、 exon, splicing 上のバリエーション数	11	5	9	14	39	15	14	38
1000G, ESP6500 < 0.02, HGVD, in-house < 0.05 を 満たすバリエーション数	8	4	7	11	19	13	8	23
家系情報	6	3	6	8	16	7	7	18
機能予測ツール： いずれかが damaging を満た すバリエーション数	4	3	6	7	12	6	6	13
サンガー法によって確認した バリエーション数	2	1	0	2	2	3	0	0

1000G, 1000 genome project; ESP, Exome Sequencing Project; HGVD, Human Genetic Variation Database.

表 9： 常染色体劣性遺伝解析および X 連鎖劣性遺伝解析の絞り込みにおけるバリエントまたは遺伝子数

患者 ID	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
検出されたバリエント数	34837	33320	35230	31718	34287	24050	34875	33823	34993	33618	29481	35415	32081	33779	35299	35596
exon, splicing 領域の バリエント数	10970	10699	11127	10073	10919	8082	11183	10725	10983	10755	19662	11091	10266	10687	11190	11132
1000G < 0.02, ESP6500 < 0.02 を 満たすバリエント数	1653	1576	1810	1816	1648	941	1899	1606	1820	1560	1471	1872	1702	1779	1777	1774
dbSNP Non Flagged を除外した バリエント数	702	692	784	988	781	409	962	776	869	754	657	893	850	867	730	732
常染色体劣性遺伝あるいは X 連鎖遺伝を満たす遺伝子数	76	60	73	156	99	23	126	104	107	107	81	139	119	119	79	80
HGVD < 0.05, in-house < 0.05 を 満たす遺伝子数	35	22	27	77	44	4	33	31	32	43	31	50	43	69	30	20
家系情報	22	14	22	77	29	4	20	17	16	27	12	36	38	50	26	18
機能予測ツール：いずれかが damaging を満たす遺伝子数	13	11	13	59	19	4	22	12	11	20	7	29	29	33	21	9
GQ > 20, DP > 10 を満たす遺伝子数 (うち X 連鎖劣性遺伝形式の遺伝子数)	9(0)	7	6	15	11(4)	1(0)	11	6	7	12(5)	4	18(5)	14(1)	17	13	8

1000G, 1000 genome project; ESP, Exome Sequencing Project; HGVD, Human Genetic Variation Database; GQ, genotype quality; DP, depth.