

「ゲノムの構造と機能」

平成12年度採択研究代表者

新川 詔夫

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授)

「染色体転座・微細欠失からの疾病遺伝子の単離と解析」

1. 研究実施の概要

2003年、ヒトゲノムの大規模シーケンシングの終了が宣言された。しかし、大部分の疾病遺伝子は未知であり、位置的単離法による疾患遺伝子同定の重要性は変わらない。単一（メンデル）遺伝子病と染色体転座や微細欠失を合併する患者は絶好の材料であり、患者が唯一でも原因遺伝子の単離の可能なことがある。本研究では、症例を国内外からこのような症例・試料を組織的に集積し、転座切断点・欠失領域からの疾病遺伝子の単離・同定を目指す。過去3年間に多数の患者試料を収集し、Sotos症候群、Engelmann病、鏡像多指趾症、肢中部短縮型骨格異形成症、Marfan症候群2型などの原因・候補遺伝子を単離・同定・解析し、いくつかの疾患においてはその発症機構を明らかにした。ヒト耳垢型（乳がん関連）、無嗅覚症、先天性視力障害症、合指症、Bardet-Biedl症候群3型、新生転座を合併した肥満・糖尿病の位置的遺伝子単離は現在進行中であり、思春期早発症および無鼻症の原因遺伝子単離を開始した。ゲノムの微細欠失や重複を網羅的に検出するシステムであるゲノムCGHマイクロアレイ法の一部は完成し、それを用いる臨床応用を開始、新規の先天異常症を発見した。全ゲノムCGHマイクロアレイは平成16年度までに完成する予定である。

2. 研究実施内容

本研究は臨床細胞遺伝学研究グループと分子遺伝学研究グループの2グループで各々仕事を分担して行った。臨床細胞遺伝学研究グループでは研究参加者が細胞遺伝学的に診断し、かつインフォームドコンセントを得た患者試料を採取後、一部は細胞遺伝学的に解析し、残りはEBVで不死化し後者グループの研究に備える。一方、分子遺伝学研究グループでは、前者が集積した試料と細胞遺伝学所見から、転座切断点をクローニングし、単離した遺伝子を解析し、疾患原因遺伝子を同定する。また、後者グループは全ゲノムCGHマイクロアレイの開発を行い、臨床細胞遺伝学研究グループの協力を得て、その臨床応用を図る。

(A) 分子遺伝学研究グループ

(1) Sotos症候群 (脳性巨人症) の分子病理 : Sotos症候群は成長過多、精神遅滞、特異顔貌、脳内奇形、痙攣をみる神経疾患である。平成14年度の研究で染色体転座から単離した原因遺伝子NSD1の変異解析および表現型解析を、臨床細胞遺伝学研究グループの協力のもと、国内外から集積した総計112例の試料について行った結果、(1) 95例の日本人患者中11例は点変異、49例 (52%) はNSD1を含む約2 Mbの欠失をもつものに対して (図1) 、17例の白人患者では4例が点変異、1名のみが欠失を有すること、(2) 欠失21例と点変異5例の詳細な表現型解析から両群に共通して特異な顔貌・過成長・精神発達遅滞を認めたが、心奇形・泌尿器系異常・反復痙攣は欠失群にのみに認めること、(3) 欠失はその領域に存在するlow copy repeats (LCR) が介在する可能性が高いこと、(4) 2家系の親子例に点変異を認めること、などを明らかにした。これらの研究成果は、Journal of Medical Genetics (2003) およびHuman Mutation (2003) に掲載された。これらから、Sotos症候群の確定診断法を開発し、特許申請中である。

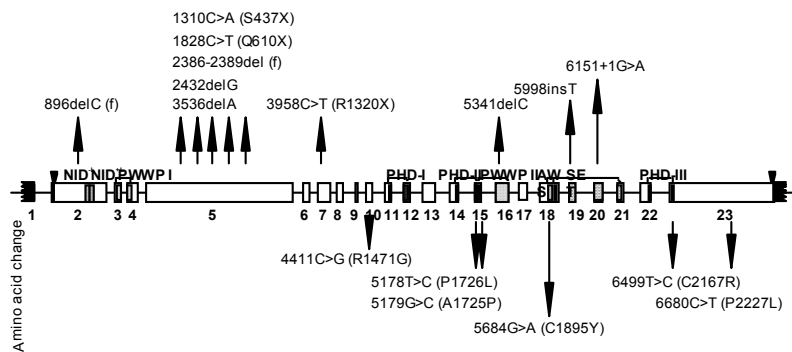
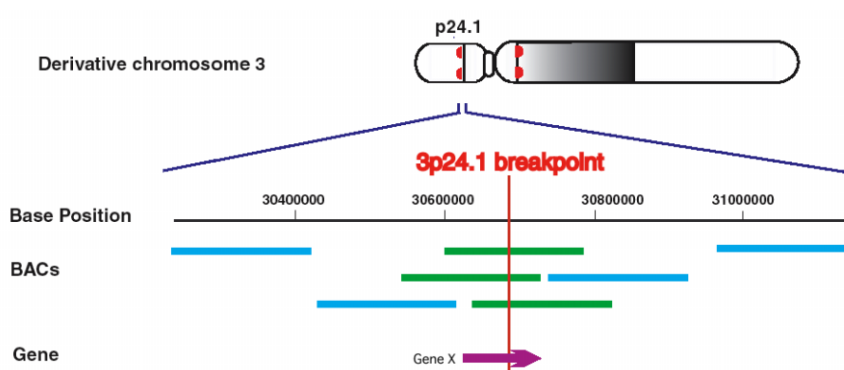


図1 Sotos症候群患者におけるNSD1変異

(2) t(3;9)(p14.2;q31)転座を伴う肥満・糖尿病の解析 : 若年発症で肥満を伴うNIDDM同胞例に母由来の転座を認めた。母も妊娠を契機にNIDDM発症を認め、祖父方の同胞に1名糖尿病を認める。本家系において、NIDDM関連遺伝子が切断点で断裂しているとの仮説のもとに遺伝子単離を開始した。FISH解析で両転座点をカバーするBACクローンを同定した。切断点3p14.2ではBACのコスミドサブクローンのコンティグを構築した。次いで、塩基配列決定とデータベースの利用で、全長約280 kb領域中の候補遺伝子検索を行い、候補遺伝子KIAA0263 (inositol hexaphosphate kinase 1 gene, IHPK1)を単離した。KIAA0263の蛋白翻訳領域に関して、NIDDM患者405名における変異解析を行ったが、いくつかのSNPs以外に病因となる変異は同定できなかった。この結果はJ Hum Genetで発表予定である。

(3) Marfan症候群2型 : 6ヶ所の切断点をもつ複雑染色体異常t(1;5;4)(p35;q33.2;q35), ins(3)(q11.2;p1.2p24.2)を合併し、Marfan症候群様症状を呈する患者を解析した。過去にMarfan症候群2型座が3p25-p24.2領域にマップされたことから、3p24.2切断点に、その原因遺伝子が存在する可能性が高い。本研究で、同切断点をカバーする3個のBACクローンを単離し、切断点に一致する遺伝子X (未発表のため遺伝子名は割愛)を単離し

た（図2）。次いで、74名からなるフランス人のMarfan症候群家系、他の9家系、および10名の日本人孤発例について変異解析を行い、4種の変異を同定した [c.1524G>A (p. Q508Q)、c. 923T>C (p. L308P)、c. 1346C>T (p. S449F)、およびc. 1609C>T (p. R537C)]を同定した。c. 1524G>Aはスプライシング異常を起こす変異であり、またc. 923T>Cはde novo変異であった。これら全てのミスセンス変異は、267名の日本人および92名の白人では見られず、広く生物で保存されている機能ドメイン中に存在した。また全ての変異は遺伝子の機能低下をきたすことが判明した。これらの結果から、遺伝子XはMarfan症候群2型の原因遺伝子であると結論した。結果はNature Geneticsで発表予定である。



(4) 耳垢型（乳がん関連）遺伝子の位置的単離：ヒト耳垢型は湿型と乾型に二分され、日本人の80%は乾型で、白人・黒人はほとんど例外なく湿型である。湿型は腋窩腺体臭とリンクし、乳がんの発生に関連するデータがある。平成14年度の研究で家系を用いた連鎖解析によりマップした領域のBACクローンの塩基配列データベースを用いて、137個のマイクロサテライトマーカーを同定し、64名の乾型、54名の湿型試料においてアレル頻度を比較し、約2 Mbの候補領域を特定した。次いで、JSNPおよび独自に同定した40SNPのタイピング、および連鎖不平衡解析を行った結果、1つのSNPが乾型132人と湿型67人間で $p < 10^{-22}$ の値で有意差を示した。同領域約100kbが耳垢型遺伝子が存在する領域であり、有力な候補遺伝子の解析を進めている。

(5) ゲノム CGHマイクロアレイの構築：ゲノム上の微細欠失による種々の疾病が知られるようになりゲノム病と総称される。従来原因不明の先天異常症のいくつかはゲノム欠失（1コピー遺伝子）による可能性がある。ゲノム欠失の網羅的同定が可能なCHGマイクロアレイシステムを開発中である。そのうち、テロメア領域に高頻度にかかる染色体再構成を検出するテロメア特異的CGHマイクロアレイ、および性染色体マイクロアレイの開発に成功した（図3）。5例のWolf症候群（4p-）全例で欠失を検出したので、その有効性が確認された。また、新規に解析した3症例において、9qサブテロメア欠失をもつら新しい疾患単位（新規の微細欠失症候群）を確立した。さらに71例の特発性精神発達遅滞症例を解析し、4例にサブテロメア領域の異常を検

出した。1 Mb毎の解像度を示す性染色体アレイによってKabuki make-up症候群26例で解析したが欠失や重複を認めなかった。本結果はAmerican Journal of Medical Genetics (in press)で発表した。

1. 5Mb解像度をもつ全ゲノムCGHマイクロアレイの開発を行っている。ヒト全ゲノムを均等にカバーする約2000個のBACクローン全てをDOP-PCRで増幅し、全ゲノムアレイを構築する。現在、2000クローンのFISH解析を終了し、想定される位置に正確にマップされ、多発シグナルを呈さないマイクロアレイに適したクローンの選択が終了した。CGHの予備的研究も成功した。つまり、2.2Mbの欠失を伴うSotos症候群患者DNAと正常対照DNA用い、欠失内外にマップされるクローンをスライドガラス上に固着させ、試料DNAをCy3とCy5で標識[組合わせA：患者Cy3、対照Cy5]あるいはその逆(B)]し、スライド上でハイブリさせ、マイクロアレイスキャナーでシグナル比を比較した。欠失外クローンはCy3/Cy5比が1であったが、欠失内クローンの比はほぼ0.5(組合わせA)および2(組合わせB)と、矛盾のないデータを得た。本全ゲノムマイクロアレイの応用範囲は広く、原因不明の自然流産、非特異的精神遅滞症、ゲノム病、原因不明症候群の解明に役立つと考えられる。

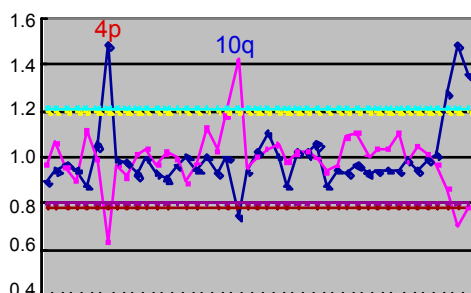


図3 テロメア特異的CGHマイクロアレイによる4p monomyと10q trisomyの同定

(B) 臨床細胞遺伝学研究グループ

(1) 染色体転座をもつ単因子遺伝病およびその患者試料の収集：単因子遺伝病や臨床症状と関連した染色体均衡型構造異常症例を収集し、その切断点解析から疾患原因遺伝子を単離することを目標としている。3省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、且つ所轄の倫理委員会の承認を得た後、患者(代諾者)からインフォームド・コンセントを得て、本グループ全員により、染色体構造異常と表現型異常の双方をもつ疾患の新規患者の試料を収集した。試料の一部はEBウイルスで不死化し、細胞を液体窒素中で保存し、臨床細胞遺伝学グループ自身および分子遺伝学研究グループの研究に供した。分子遺伝学研究グループで単離・同定するSotos症候群候補遺伝子の変異解析のため、32例の新規患者を集積し、試料を調整した。

(2) 転座切断点の分子細胞遺伝学的解析：肥満を伴う糖尿病罹患の1家系(母、兄、妹)における転座の切断点クローニングのため、BACライブラリーからデータベースを利用し、

さらに染色体FISH法によるクローン同定を行った。その結果、3p14.1切断点は2つのSTSの間に、9q31切断点も2種のSTS間に狭めることができた。この結果は分子遺伝学グループに移管され、上記3-(A)-(2)の研究進展に供した。一方、7qと10pのde novo 均衡転座をもつ特発性思春期早発症患者の解析を行った。最初に患者細胞株から作成した染色体標本を用い、上記と同様の解析で転座点BACクローンを単離した。責任部位は約100 Kb範囲にあると推定した。同領域内に存在するcDNAをクローニングし、特発性思春期早発症の候補遺伝子とした。他の特発性思春期早発症患者における変異解析を行っている。

3. 研究実施体制

(1) 分子遺伝学研究グループ

① 研究分担グループ長：新川 詔夫（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科、教授）

② 研究項目：

- (A) 染色体構造異常の切断点からの疾患遺伝子の単離、
- (B) 疾患遺伝子の機能解析、
- (C) 微細欠失同定のためのマイクロアレイシステムの構築

(2) 臨床細胞遺伝学研究グループ

① 研究分担グループ長：福嶋 義光（信州大学大学院医学研究科、教授）

② 研究項目：

- (A) 臨床試料の収集と細胞の不死化
- (B) 症例収集と臨床情報収集
- (C) 核型診断と欠失同定

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Kayashima T, Ohta T, Niikawa N, Kishino T: On the conflicting reports of imprinting status of mouse ATP10a in the adult brain: Strain-background-dependent imprinting? *J Hum Genet* 48 (9):492-493; . 2003.
- Gibbs RA, Niikawa N, 他127名 (The International HapMap Consortium): The International HapMap Project. *Nature* 426: 789-796, 2003.
- Visser R, Matsumoto N: The genetics of Sotos syndrome. *Curr Opin Pediatr* 15 (6): 958-606, 2003.
- Higashimoto K, Urano T, Sugiura K, Yatsuki H, Joh K, Wei Z, Iwakawa M, Ohashi H, Oshimura M, Niikawa N, Mukai T, Soejima H: Loss of CpG methylation is strongly correlated with loss of histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet* 73 (4): 948-956, 2003.
- Kurotaki N, Harada N, Shimokawa O, Miyake N, Kawame H, Uetake K, Makita Y

- Kondoh T, Ogata T, Hasegawa T, Nagai T, Ozaki T, Touyama M, Shenhav R, Ohashi H, Medne L, Shiihara T, Ohtsu S, Kato Z, Okamoto N, Nishimoto J, Lev D, Miyoshi Y, Ishikiriyama S, Sonoda T, Sakazume S, Fukushima Y, Kurosawa K, Cheng J-F, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: Fifty microdeletions among 112 cases of Sotos syndrome: Low copy repeats possibly mediate the common deletion. *Hum Mut* 22 (5):378-387, 2003.
- Yamada K, Andrew C, Chan W-M, McKeown CA, Magli A, de Berardinis T, Lowenstein A, Lazar M, O'Keefe M, Letson R, London A, Ruttum M, Matsumoto N, Saito N, Morris L, Del Monte M, Johnson RH, Uyama E, Houtman WA, de Vries B, Carlow TJ, Hart BL, Krawiecki N, Shoffner J, Vogel MC, Katowitz J, Goldstein SM, Levin AV, Sener EC, Ozturk BT, Akersu AN, Brodsky MC, Hanisch F, Cruse RP, Zubcov A, Robb RM, Roggenkamper P, Gottlob I, Kowal L, Battu R, Traboulsi EI, Franceschini P, Newlin A, Demer JL, Engle EC: Heterozygous mutations of the kinesin KIP21A in congenital fibrosis of the extraocular muscles type 1 (CFEOM1). *Nature Genet* 35 (4): 318-321, 2003.
- Saenko V, Rogounovitch T, Shimizu-Yoshida Y, Abrosimov A, Lushnikov E, Roumiantsev P, Matsumoto N, Nakashima M, Meirmanov S, Ohtsuru A, Namba H, Tsyb A, Yamashita S. Novel tumorigenic rearrangement, Δ rfp/ret, in a papillary thyroid carcinoma from externally irradiated patient. *Mutat Res* 527(1-2):81-91, 2003 (A section of fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis)
- Matsumoto N, Niikawa N: Kabuki make-up syndrome: A Review. *Am J Med Genet* 117C (1): 57-65, 2003.
- Höglund P, Kurotaki N, Kytölä S, Miyake N, Somer M, Matsumoto M: Familial Sotos syndrome is caused by a novel 1 base pair deletion of the *NSDI* gene. *J Med Genet* 40 (1): 51-54, 2003.
- Sonoda T, Kouno K, Sawada K, Takagi J, Nunoi H, Harada N, Matsumoto N: Duplication (22)(q11.22-q11.23) without coloboma and cleft lip or palate. *Pediatr Int* 45 (1):97-99, 2003.
- Kayashima T, Yamasaki K, Joh K, Yamada T, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Mukai T, Niikawa N, Kishino T: *Atp10a*, the mouse ortholog of the human imprinted *ATP10C* gene, escapes genomic imprinting. *Genomics* 81 (6): 644-647, 2003.
- Miyake N, Sugawara H, Kurotaki N, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Tsukahara M, Ishikiriyama S, Sonoda T, Miyoshi Y, Sakatsume S, Fukushima Y, Ohashi H, Nagai T, Kawame H, Kurosawa K, Touyama M, Shiihara T, Okamoto N, Nishimoto J, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: Preferential

paternal origin of microdeletion as prezygotic chromosome and/or chromatid rearrangements in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* 72 (5): 1331-1337, 2003.

- Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T: Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of *Ube3a*. *Hum Mol Genet* 12 (8): 837-847, 2003.
- Asanoma K, Matsuda T, Kondo H, Kato K, Kishino T, Niikawa N, Wake N, Kato H: *NECCI*, a candidate choriocarcinoma suppressor gene that encodes a homeodomain consensus motif. *Genomics* 81: 15-25, 2003.
- Kondoh Y, Toma T, Ohashi H, Harada N, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: Inv dup del(4)(:p14->p16.3::p16.3->qter) with manifestations of partial duplication 4p and Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 120A (1):123-126, 2003.
- Peeters H, Debeer Ph, Wilquet V, Huysmans C, Parthoens E, Fryns JP, Gewillig M, Nakamura Y, Niikawa N, Van de Ven W, Devriendt K: *PA26* is a candidate gene for heterotaxia in humans: Identification of a novel, *PA26*-related gene family in human and mouse. *Hum Genet* 112 (5-6): 573-580, 2003.
- Broman KW, Matsumoto N, Giglio S, Martin CL, Roseberry JA, Zuffardi O, Ledbetter DH, Weber JL. Common long human inversion polymorphism on chromosome 8p. In: Goldstein DR (ed) *Science and Statistics: A Festschrift for Terry Speed*. IMS Lecture Notes-Monograph Series 40: 237-245, 2003.
- Sugawara H, Harada N, Ida T, Ishida T, Ledbetter DH, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: Complex low copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23. *Genomics* 82: 238-244, 2003.
- Ida T, Mihar N, Hayashitani M, Shimokawa O, Harada N, Samura O, Kubota T, Niikawa N, Matsumoto N: Functional disomy for Xq22-q23 in a girl with complex rearrangements of chromosomes 3 and X. *Am J Med Genet* 120A (4): 557-561, 2003.
- Kamimura J, Endo Y, Kurotaki N, Kinoshita A, Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Visser R, Ohashi H, Miyakawa K, Gerritsen J, Innes AM, Lagace L, Frydman M, Okamoto N, Puttinger R, Raskin S, Resic B, Culic V, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Ishikawa M, Niikawa N, Matsumoto N. Identification of eight novel *NSD1* mutations in Sotos syndrome. *J Med Genet* 40 (11) e126, 2003.

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：2件）