

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

完全ゲノムタイリングアレーを用いたゲノム病解析研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 松本 直通
(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
完全ゲノムタイリングアレーを用いたゲノム病解析研究 -----	1
松本直通	
(資料) 研究全体の流れと進行状況	
II. 分担研究報告	
1. マイクロアレーCGH検証法に関する研究 -----	7
原田直樹	
(資料) MLPA法・MCC法・定量リアルタイムPCR法の原理と結果	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	15

平成18年度厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

完全ゲノムタイリングアレーを用いたゲノム病解析研究

主任研究者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

ヒトゲノムを隙間無く完全にカバーする完全ゲノムタイリングアレーを開発し、これを用いてヒト神経精神発達に重要な影響を及ぼすヒトゲノムの微細構造異常（欠失・重複・転座）を網羅的に解析し、同定されたゲノム異常から神経精神疾患関連遺伝子を単離することを目的として研究を開始した。完全ゲノムタイリングアレーの開発は、米国 CHORI より供与を受けた完全ヒトゲノムタイリング BAC DNA（BAC 32,891 個）を鋳型にを 3 種類のヒトゲノムシーケンスに特異性の高い DOP-PCR プライマーを用いて全クローンの一次 PCR 増幅を終了した。さらに DOP-PCR プライマーの 5' 側に存在するアダプターサイトを標的としたアミノラベル二次プライマーを用いて PCR 増幅が進行中で、現時点で、二次増幅の 38%が終了した。平成 19 年中期（8~10 月）のアレーの完成を目指して計画通りに開発・作製が進行している。さらに近年開発の進んでいるオリゴ DNA アレーとして Affymetrix 社 GeneChip 250K を導入・解析を始め、保有する 4.2K アレーの解析結果と比較検討を行っている。精神遅滞関連疾患・機能性精神疾患の症例集積は順調に進行中である。

分担研究者

原田直樹・九州メディカルサイエンス長崎
ラボラトリー・所長

A. 研究目的

ヒトゲノムを隙間無く完全にカバーする完全ゲノムタイリングアレーを開発し、これを用いてヒト神経精神発達に重要な影響を及ぼすヒトゲノムの微細構造異常（欠失・重複・転座）を網羅的に解析し、同定されたゲノム異常から神経精神疾患関連遺伝子を単離することを目的とする。マイクロアレーCGHは、ゲノムの欠失（1コピー）や重複（3コピー）の正確な同定が可能で、商業レベルで高密度オリゴ DNA アレー等も登場し開発が進んでいる。本研究では、本邦初のゲノム完全タイリングアレーを開発・作製し、市販オリゴ DNA アレーや保有する 4.2K アレーとの比較検討を行う事も目的の一つである。初年度にあたる本年度は、完全ゲノムタイリングアレーの開発を中心的課題と位置づけ、さらにオリゴ DNA

アレーの導入し、並行して疾患の集積と解析を行った。

B. 研究方法

①完全ゲノムタイリングアレーの作製
米国CHORIから供与を受けた完全ヒトゲノムタイリングBAC DNA（BAC 32,891個）を鋳型に3種類のヒトゲノムシーケンスに特異性の高いDOP-PCRプライマーを用いて全クローンの一次PCR増幅を行う。各クローン個別にゲル電気泳動で増幅効率を確認し増幅不良クローンを再度PCRするなど品質の向上に努める。さらにDOP-PCRプライマーの5'側に存在するアダプターサイトを標的としたアミノラベル二次プライマーを用いてPCR増幅を行う。開発の効率と経費節減を図るためPCR増幅のステップの検討を行いプロトコル簡略化も目指す。

②オリゴDNAアレーの導入

Affymetrix社のGeneChip 250Kを導入し、疾患ゲノム解析を開始する。開発済みである4.2Kアレーの解析結果との比較検討を行う。

③症例の集積

遺伝医学コンソーシアムで形成されたネットワークを中心に、精神遅滞関連症候群ならびに機能性精神病（統合失調症並びにパニック障害）の症例を集積する。基本的にリンパ芽球株化を行いゲノムDNAとFISH用細胞ペレットを採取する。

C. 研究結果

①完全ゲノムタイリングアレーの作製

1. アレー作成法の改良

これまで4.2Kアレー（4235個のBACを搭載）の作製に於いては、一次PCRにヒトゲノム特異的な3種類のDOP-PCRプライマーをそれぞれ別の3チューブで増幅後、3チューブの混合液を鋳型にして、DOP-PCRプライマー内に含まれるアダプターサイトを標的としたアミノプライマーを用いて二次PCR増幅を行うという方法でDNAを作製していた。しかしこの方法では32,981個の4倍のチューブを用いてそれぞれPCRを行う必要があり多大な労力・時間・コストがかかる。この問題を解決するため、一次PCRを最初から3種類のDOPプライマーを混合し1つのチューブで増幅する方法をとり、試験的アレー実験にて従来法と比較し遜色ない結果が得られた。この改良法を用いて本研究における32,981個のBACのPCR増幅を2ステップ2チューブのみでの増幅とし多大な時間・労力・そして50%のコストに削減することに成功し、ほぼ開始より1年で完全ゲノムタイリングアレーの完成が可能となる見込みとなった。

2. 順調なアレー作製状況

完全ヒトゲノムタイリングBAC DNA（BAC 32,891個）を鋳型に3種類のヒトゲノムシーケンスに特異性の高いDOP-PCRプライマーを用いて全クローンの一次PCR増幅を終了した。各クローン個別にゲル電気泳動で増幅効率を確認し増幅不良クローンを再度PCRした。アミノラベル二次プライマーを用いて二次PCR増幅も順調に進行中で、既に全クローンの38%が終了した。平成19年中期（8~10月）のアレーの完成を目指しているが概ね計画通りの進行状況である。

②オリゴDNAアレーの導入

Affymetrix社のGeneChip 250Kを導入し、疾

患ゲノム解析を開始した。開発済みである4.2Kアレーの解析結果との比較検討から、高密度のオリゴDNAの利点（多数スポットで総合的に判断出来る等）とアレーデザイン上の欠点（BACアレーに比してS/N比が高く1スポット当たりの信頼性は低いこと、ゲノム上に配置された検出スポット部位の偏りと密度の不均一性が存在し検出不可能な領域も多数ある等）が明らかになった。一方でCopy Number Variation (CNV, コピー数多型) やSegmental duplicationの部位にはスポット配置密度が極めて少なくCNV解析には不適なプラットフォームである事が示唆された。

③症例の集積と解析

歌舞伎メーキャップ症候群 15 例・Coffin-Siris 症候群 12 例・MSD1 異常を認めないSotos 症候群 30 例・Aicardi 症候群 12 例・痙攣と関連するEIEE18 例等既に複数の疾患で 10 例以上の集積を認め、Hemifacial microsomia、Dubowitz 症候群、FG 症候群等も集積中である。統合失調症 60 例、パニック障害 130 例、特発性精神遅滞 150 例も集積済みである。Aicardi 症候群、Coffin-Siris 症候群では保有する 4.2K アレーでの解析が進行中で、複数のゲノム異常領域が同定されており疾患関連遺伝子の有無を検討中である。

D. 考察

本研究課題の中核である完全ゲノムタイリングアレーの開発・作製は、進行状況・品質管理ともに順調に推移している。特にPCR増幅プロトコル改善による効果で、コスト・作製時間の大幅な削減が可能になった。オリゴDNAアレーの導入により、保有する4.2Kアレーとの比較検討が可能となった。両者のプラットフォーム上の解析結果の矛盾点が高率に存在することが明らかになり、4.2KアレーにスポットしたBAC内にオリゴDNAアレースポットが複数以上存在する場合には合致率が上昇するが、それ以外のゲノム部位では合致せず現時点ではいわゆる相補的検査となっている事も判明した。オリゴDNAアレーとBACを基盤とするアレーは、それぞれの長所と欠点を理解して、用途に応じて適切な疾患ゲノム解析を行う必

要がある事が強く示唆される。オリゴ DNA アレー並びに 4.2K アレーによる疾患ゲノム解析を進め、さらに完全ゲノムタイリングアレーを完成させ、疾患ゲノム解析を追加しそれぞれのアレーの比較検討とともに疾患特異的ゲノム異常から疾患関連・感受性遺伝子単離を行う予定である。

E. 結論

本研究はヒトゲノムを隙間無く完全にカバーする完全ゲノムタイリングアレーを開発し、これを用いてヒト神経精神発達に重要な影響を及ぼすヒトゲノムの微細構造異常（欠失・重複・転座）を網羅的に解析し、同定されたゲノム異常から神経精神疾患関連遺伝子を単離することを目的として開始されたが、初年度としてはほぼ予定通りの成果をあげることができたと考えている。特に完全ゲノムタイリングアレーの開発・作製状況は、DNA増幅法の改善によって順調に推移している。

F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていないが、その可能性・危険性等について把握した際には、迅速に対応していきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kurotaki N, Matsumoto N. Sotos syndrome. Genomic disorders: The genomic basis of disease: 237-246, 2006. Edited by Lupski JR and Stankiewicz PT. The Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA

Kanemoto N, Kanemoto K, Nishimura G, Kamoda T, Visser R, Shimokawa O, Matsumoto N. Nevo syndrome : a variant of Sotos syndrome? Am J Med Genet 140A(1): 70-73, 2006

Yamamoto T, Ueda H, Kawataki M, Yamanaka M, Asou T, Kondoh Y, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K. A large interstitial deletion of 17p11.2-13.1 including the Smith-Magenis region in a patient with congenital multiple anomalies. Am J Med Genet 140A(1):88-91, 2006.

Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Ohashi H, Kurosawa K, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Shotelersuk V, Hou J-H, Fukushima Y, Kondoh T, Matsumoto T, Shinoki T, Kato M, Tonoki T, Nomura M, Yoshiura K-I, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N. No causative genomic aberrations by BAC array CGH in Kabuki make-up syndrome. Am J Med Genet 140A(3): 291-293, 2006.

Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Kurosawa K, Kawame H, Iwakoshi M, Kosho T, Fukushima Y, Makita Y, Yokoyama Y, Yamagata T, Kato M, Hiraki Y, Nomura M, Yoshiura K-I, Kishino T, Ohta T, Mizuguchi T, Niikawa N, Matsumoto N. BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation. Am J Med Genet 140A (3): 205-211, 2006.

Kawara H, Yamamoto T, Harada N, Yoshiura K, Niikawa N, Nishimura A, Mizuguchi M, Matsumoto N. Narrowing Candidate Region for Monosomy 9p Syndrome to a 4.7-Mb Segment at 9p22.2-p23. Am J Med Genet 140A (4): 373-377, 2006.

Visser R, Hasegawa T, Niikawa N, Matsumoto N. Analysis of the *NSD1* promoter region in patients with a Sotos syndrome phenotype. J Hum Genet 51(1):15-20, 2006

Ohata T, Yoshida K, Sakai H, Hamanoue H, Mizuguchi T, Shimizu Y, Okano T, Takada F, Fukushima Y, Ikeda S, Matsumoto N. The prevalent -16C>T change at the 5' UTR of the *puratropin-1* gene in autosomal dominant cerebellar ataxia in Nagano. J Hum Genet 51(5): 461-466, 2006

Miura S, Miura K, Masuzaki H, Miyake N, Yoshiura K-i, Sosonkina N, Harada N, Shimokawa O, Nakayama D, Yoshimura S, Matsumoto N, Niikawa N, Ishimaru T. Microarray comparative genomic

- hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. *J Hum Genet* 51(5): 412-417, 2006
- Hamanoue H, Umezu N, Okuda M, Harada H, Sakai H, Mizuguchi T, Ishikawa H, Takahashi T, Miura K, Hirahara F, Matsumoto N Complete Hydatidiform Mole and Normal Live Birth after Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Hum Genet* 51(5): 477-479, 2006
- Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Alain Verloes A, Okamoto N, Hennekam RCM, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline *KRAS* and *BRAF* mutations in cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome. *Nat Genet* 38(3): 294-296, 2006
- Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N, Birk OS, Niikawa N, Sengoku K. Polymorphic alleles of the human *MEII* gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *J Hum Genet* 51(6): 533-540, 2006
- Sakai H, Visser R, Ikegawa S, Ito E, Numabe H, Watanabe Y, Mikami H, Kondoh T, Kitoh H, Sugiyama R, Okamoto N, Ogata T, Fodde R, Mizuno S, Takamura K, Egashira M, Sasaki N, Watanabe S, Nishimaki S, Takada F, Nagai T, Okada Y, Aoka Y, Yasuda K, Iwasa M, Kogaki S, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N. Comprehensive genetic analysis of relevant four genes in 49 patients with Marfan syndrome or Marfan related phenotypes. *Am J Med Genet* 140A: 1719-1725, 2006
- Shimokawa O, Harada N, Miyake N, Satoh K, Mizuguchi M, Niikawa N, Matsumoto N. Array Comparative Genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with 'normal' karyotypes. *Am J Med Genet* 140A(18): 1931-1935, 2006
- Hiraki Y, Fujita H, Yamamori S, Ohashi H, Eguchi M, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N. Mild craniosynostosis with 1p36.3 trisomy and 1p36.3 deletion syndrome caused by familial translocation t(Y;1). *Am J Med Genet* 140A(16): 1773-1777, 2006
- Yamamoto T, Sameshima K, Sekido KI, Aida N, Matsumoto N, Naritomi K, Kurosawa K. Trigonoccephaly in a boy with paternally inherited deletion 22q11.2 syndrome. *Am J Med Genet* 140A(12): 1302-1304, 2006.
- Miura S, Miura K, Yamamoto T, Yamanaka M, Saito K, Hirabuki T, Kurosawa K, Harada N, Ishizaki-Yamasaki Y, Matsumoto M, Hirahara F, Yoshiura K, Masuzaki M, Niikawa N. Origin and mechanisms of formation of fetus-in-fetu: Two cases with genotype and methylation analyses. *Am J Med Genet* 140A(16): 1737-1743, 2006
- Dowa Y, Yamamoto T, Abe Y, Kobayashi M, Hoshino R, Tanaka K, Aida N, Take H, Kato K, Tanaka Y, Ariyama J, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K. Congenital neuroblastoma in a patient with partial trisomy of 2p. *J Pediatr Hematol Oncol* 28(6): 379-382, 2006

2. 学会発表

Naomichi Matsumoto, Noriko Miyake, Osamu Shimokawa, Naoki Harada, Norio Niikawa. BAC array CGH reveals five genomic aberrations in 30 patients with idiopathic mental retardation. (Poster presentation) European Human Genetics Conference 2006 May 6-9, 2006, RAI congress center, Amsterdam, Netherland

松本直通. ヒトゲノム微細構造異常解析の新展開 (教育講演) 第27回臨床細胞分子遺伝研究会 2006年6月17日、兵庫医科大学、西宮

Naomichi Matsumoto, Osamu Shimokawa, Naoki Harada, Norio Niikawa, Remco Visser. Non-hotspot-related breakpoints of common deletions in Sotos syndrome are located within destabilized DNA regions.

(Poster presentation)_11th International Congress of Human Genetics Aug 6-10, 2006, Brisbane, Australia

Naomichi Matsumoto, Haruya Sakai, Akira Nishimura, Takeshi Mizuguchi. Comprehensive genetic analysis of relevant four genes in 49 patients with Marfan syndrome or Marfan related phenotypes. (Poster presentation) 56th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics Oct 9-13, 2006, New Orleans, LA

Naomichi Matsumoto: Basic researches in clinical genetics: array CGH and its clinical application (Symposist, invited speaker) The international symposium in the 6th Annual Meeting of the East Asian Union of Human Genetic Society Nov 16-17, 2006, Swon, Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究全体の流れと進行状況

横浜市立大学倫理審査委員会の承認

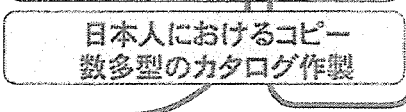
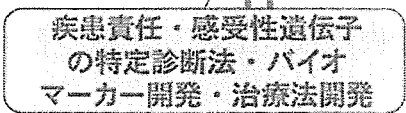
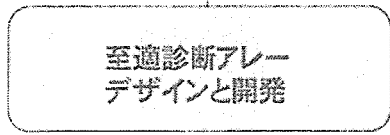
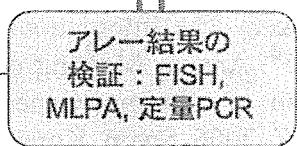
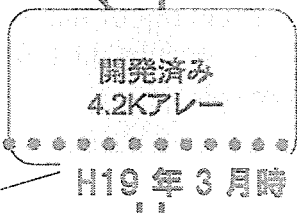
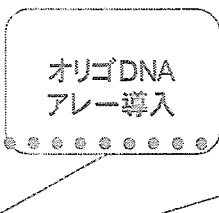
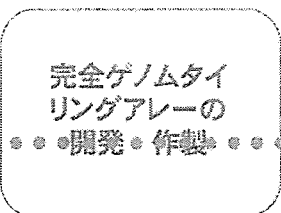
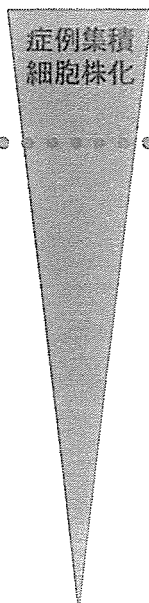
研究代表・松本

研究分担・原田

18
年度

19
年度

20
年度



平成18年度厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

完全ゲノムタイリングアレーを用いたゲノム病解析研究
分担研究課題：マイクロアレーCGH 検証法に関する研究

分担研究者 原田直樹 九州メディカルサイエンス長崎ラボラトリー所長

研究要旨：

マイクロアレーCGH 法は、従来検出不可能な微細な染色体構造異常を感度良く同定する優れた手法である。本研究は、ヒトゲノムを完全に覆う完全ゲノムタイリングアレーを開発し種々の神経精神疾患ゲノムを解析する目的で開始されたが、マイクロアレーCGH 法で検出された異常を効率的・経済的に検証していくシステムが必要不可欠である。検証システムとして従来の FISH 法があるが、細胞ペレットが必要であり、異常を疑う領域が多数である場合、検証する系としては労力が大きいため、それに代替する効率的・経済的な手法を確立すべく MLPA 法・MCC 法・定量リアルタイム PCR 法を導入し検証した。

A. 研究目的

マイクロアレーCGH 法は、従来検出不可能な微細な染色体構造異常を感度良く同定する優れた手法であるが、ハイブリダイゼーションを基本とする実験系であり、他の検証法で擬陽性を除外することでさらに診断精度が向上する。本研究は従来の FISH 法を代替できる手法として MLPA 法・MCC 法・定量リアルタイム PCR 法をそれぞれ比較検討しマイクロアレーCGH の検証法に最適な手法を選択する事を目的とした。

B. 研究方法

マイクロアレーCGH 法で同定された 15q11-q12 領域の染色体微細欠失症例を用いて MLPA 法・MCC 法・定量リアルタイム PCR 法による欠失同定の検出効率・手技の簡便性・費用を比較検討した。

MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) 法は対象領域特異的配列とユニバーサルプライマーで PCR 増幅できる共通配列を結合させたプローブを用い、対象領域上で Forward および Reverse プローブをライゲーションさせそのライゲーションプロダクトを鋳型に蛍光ラベルされたユニバーサルプライマーで増幅する方法である。対象領域のコピー数が PCR 産物量を反映する。PCR 産物は領域ごとにサイズが異なる様設計されているため複数の領域を同時に解析しサイズで分画した後、それぞれの検出シグナル強度の定量的比較しによって対象領域のコピー数を決定する事が可能である。

MCC (Molecular Copy-number Counting) 法は最適な希釈ゲノム DNA を鋳型としてヘミネスティブ PCR により対象領域と正常コピー数領域の 2 箇所を比較する事で相対的コピー数の変化を検出が可能である。

定量リアルタイム PCR 法は専用機器上で、各サイクルにおける対象領域の PCR 産物の蛍光シグナルを検出して定量化手法である。遺伝子発現量の解析では確立された感があるが、モノソミー (ゲノム 1 コピー) やトリソミー (ゲノム 3 コピー) が確実に検出可能であることが本研究では求められる。

C. 研究結果

1. MLPA 法

Prader-Willi/Angelman 症候群領域は既に市販キットが存在し、そのキットを用いると効率よく欠失の同定が可能であったが、自身で設計するプローブを用いると、検出効率が対象領域によって安定しない場合があり、かつ長いオリゴ DNA のコストが難点で、多数の新規領域の解析には適さないと考えられた。

2. MCC 法

原理は単純で、特別な機器も不要であり新規領域の解析にも対応出来るが、鋳型となる至適ゲノム濃度を得るための条件設定及び多数の PCR 反応を行う事での時間・コストがかかる事が判明した。

3. 定量リアルタイム PCR 法

迅速で安定した結果が得られた。また FISH 法に用いるプローブより小さな領域の変化も同定する事が可能であり特に FISH を代替する検証法と成りうる事が示された。1 箇所を検証にかかるコストも FISH と同等であった。

D. 考察

マイクロアレーCGH の結果検証法として FISH 法は既に確立されているが、本研究により定量リアルタイム PCR 法が迅速・安価・効率的であることが判明し FISH の代替法として用いる事が可能である事が判明した。一方で FISH で使用する BAC プローブ等に比較し検査対象領域が数百 bp (BAC は 150 kb) と大きく異なり BAC アレーの検証法として PCR プローブ位置の設定や解釈に注意を要すると考えられる。対象領域を増やすには PCR プローブの数を増やす事も可能であるがコストが問題となる。マイクロアレーCGH の検証は、FISH と定量リアルタイム PCR 法を組み合わせることで効率的に進める事が重要であると考えられた。

E. 結論

マイクロアレーCGH 法の検証系として MLPA 法・MCC 法・定量リアルタイム PCR 法を比較検討した。診断精度・迅速性・経済性において定量リアルタイム PCR 法が最も優れ、FISH と同等の精度を有する事が判明した。今後は FISH と定量リアルタイム PCR 法を組み合わせることで効率的に検証を進めていく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Ohashi H, Kurosawa K, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Shotelersuk V, Hou JW, Fukushima Y, Kondoh T, Matsumoto T, Shinoki T, Kato M, Tonoki H, Nomura M, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N. No detectable genomic aberrations by BAC array CGH in Kabuki make-up syndrome patients. *Am J Med Genet A*. 140:291-3, 2006.

Liang D, Wu L, Pan Q, Harada N, Long Z, Xia K, Yoshiura K, Dai H, Niikawa N, Cai F, Xia J. A father and son with mental retardation, a characteristic face, inv(12), and insertion trisomy

12p12.3-p11.2. *Am J Med Genet A*. 140:238-44, 2006.

Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Kurosawa K, Kawame H, Iwakoshi M, Kosho T, Fukushima Y, Makita Y, Yokoyama Y, Yamagata T, Kato M, Hiraki Y, Nomura M, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Mizuguchi T, Niikawa N, Matsumoto N. BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet A*. 140:205-11, 2006.

Kawara H, Yamamoto T, Harada N, Yoshiura K, Niikawa N, Nishimura A, Mizuguchi T, Matsumoto N. Narrowing candidate region for monosomy 9p syndrome to a 4.7-Mb segment at 9p22.2-p23. *Am J Med Genet A*. 15;140:373-7, 2006.

Hamanoue H, Umezu N, Okuda M, Harada N, Ohata T, Sakai H, Mizuguchi T, Ishikawa H, Takahashi T, Miura K, Hirahara F, Matsumoto N. Complete hydatidiform mole and normal live birth following intracytoplasmic sperm injection. *J Hum Genet*. 51:477-9, 2006.

Miura S, Miura K, Masuzaki H, Miyake N, Yoshiura K, Sosonkina N, Harada N, Shimokawa O, Nakayama D, Yoshimura S, Matsumoto N, Niikawa N, Ishimaru T. Microarray comparative genomic hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. *J Hum Genet*. 51:412-7, 2006.

Dowa Y, Yamamoto T, Abe Y, Kobayashi M, Hoshino R, Tanaka K, Aida N, Take H, Kato K, Tanaka Y, Ariyama J, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K. Congenital Neuroblastoma in a Patient With Partial Trisomy of 2p. *J Pediatr Hematol Oncol*. 28:379-82, 2006.

Miura S, Miura K, Yamamoto T, Yamanaka M, Saito K, Hirabuki T, Kurosawa K, Harada N, Ishizaki-Yamasaki Y, Matsumoto N, Hirahara F, Yoshiura K, Masuzaki H, Niikawa N. Origin and mechanisms of formation of fetus-in-fetus: two cases with genotype and methylation analyses. *Am J Med Genet A*. 140:1737-43, 2006.

Hiraki Y, Fujita H, Yamamori S, Ohashi H, Eguchi M, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N. Mild craniosynostosis with 1p36.3 trisomy and 1p36.3 deletion syndrome caused by familial translocation t(Y;1). *Am J Med Genet A*. 140:1773-7, 2006.

Sakai H, Visser R, Ikegawa S, Ito E, Numabe H, Watanabe Y, Mikami H, Kondoh T, Kitoh H,

Sugiyama R, Okamoto N, Ogata T, Fodde R, Mizuno S, Takamura K, Egashira M, Sasaki N, Watanabe S, Nishimaki S, Takada F, Nagai T, Okada Y, Aoka Y, Yasuda K, Iwasa M, Kogaki S, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N. Comprehensive genetic analysis of relevant four genes in 49 patients with Marfan syndrome or Marfan-related phenotypes. Am J Med Genet A. 140:1719-25.2006.

Miura K, Yoshiura K, Miura S, Kondoh T, Harada N, Yamasaki K, Fujimoto Y, Yamasaki Y, Tanigawa T, Kitajima Y, Shimada T, Yoshida A, Nakayama D, Tagawa M, Yoshimura S, Wagstaff J, Jinno Y, Ishimaru T, Niikawa N, Masuzaki H. Clinical outcome of infants with confined placental mosaicism and intrauterine growth restriction of unknown cause. Am J Med Genet A. 140:1931-5. 2006.

Shimokawa O, Harada N, Miyake N, Satoh K, Mizuguchi T, Niikawa N, Matsumoto N. Array comparative genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with 'normal' karyotypes. Am J Med Genet A. 140:1931-5. 2006.

学会発表

原田直樹, 井田知子, 佐々木由喜, 霜川 修, 矢野一美, 江口真希, 川良洋城, 大村奈緒美, 森内美由紀: 当施設における未培養羊水細胞を用いたFISH法による異数性異常スクリーニング検査の現状. 第13回日本遺伝子診療学会大会

霜川 修, 三宅紀子, 水口 剛, 川良洋城, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 松本直通, 原田直樹: 高精度FISHプローブパネルを用いた染色体構造異常の解析. 第13回日本遺伝子診療学会大会

涌井敬子, 原田直樹, 金井 誠, 関島吉樹, 櫻井晃洋, 和田敬仁, 古庄知己, 山下浩美, 玉井真理子, 松本直通, 福嶋義光: 遺伝医学の発展に伴う世代を越えた遺伝医療のあり方: Pelizaeus-Merzbacher 病家系を経験して. 第13回日本遺伝子診療学会大会

佐藤可奈子, 霜川 修, 三宅紀子, 原田直樹, 太田 亨, 斎藤伸治, 松本直通: プラダーウィリー症候群の責任領域に関する研究. 日本人類遺伝学会第51回大会

浜之上はるか, 梅津信子, 原田直樹, 堺 温哉, 水口 剛, 高橋恒男, 平原史樹, 松本直通: 生殖補助医療後に発生した胎児共存奇胎症例の分子遺伝学的検討. 日本人類遺伝学会第51回大会

涌井敬子, 原田直樹, 金井 誠, 関島吉樹, 櫻井晃洋, 和田敬仁, 古庄知己, 山下浩美, 玉井真理子, 松本直通, 福嶋義光: 遺伝医学の発展に伴う世代を越えた遺伝医療のあり方を考える: Pelizaeus-Merzbacher 病の一家系を経験して. 日本人類遺伝学会第51回大会

川良洋城, 原田直樹, 山本俊至, 新川詔夫, 松本直通: 染色体複雑構造異常を伴う9pモノソミー症候群の1例. 日本人類遺伝学会第51回大会

佐藤大介, 霜川 修, 原田直樹, 岡本伸彦, Jia-Woei Hou, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 松本直通, 有賀 正, 新川詔夫: 先天性無鼻症: 5症例の分子遺伝学的解析. 日本人類遺伝学会第51回大会

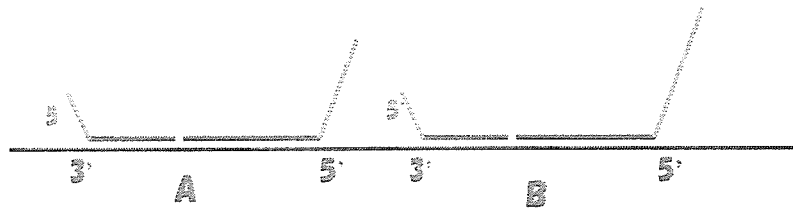
佐々木健作, 霜川 修, 大平寿久, 井田知子, 近藤達郎, 阿部京子, 新川詔夫, 松本直通, 原田直樹: M-FISHとアレイCGH法による過剰 del(13)(q12.1q31.1)染色体を持つ胎児の出生前診断. 日本人類遺伝学会第51回大会

外木秀文, 川良洋城, 原田直樹, 小崎里華, 松本直通: Axenfeld 奇形を持つ女兒の6番染色体短腕部分欠失の解析. 日本人類遺伝学会第51回大会

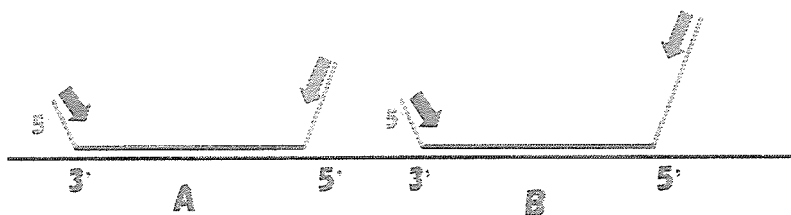
H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

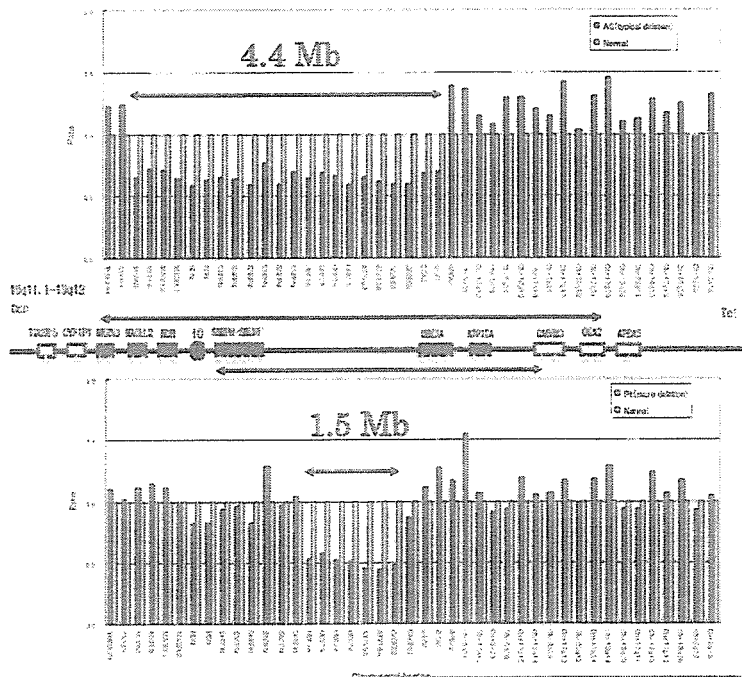
Hybridization and Ligation reaction

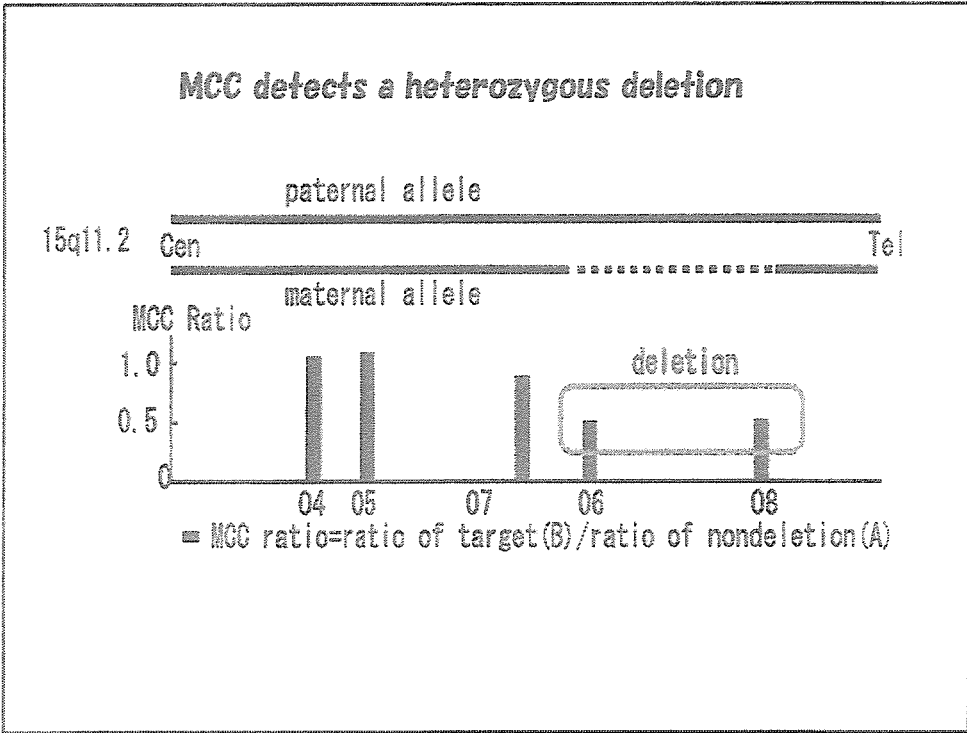
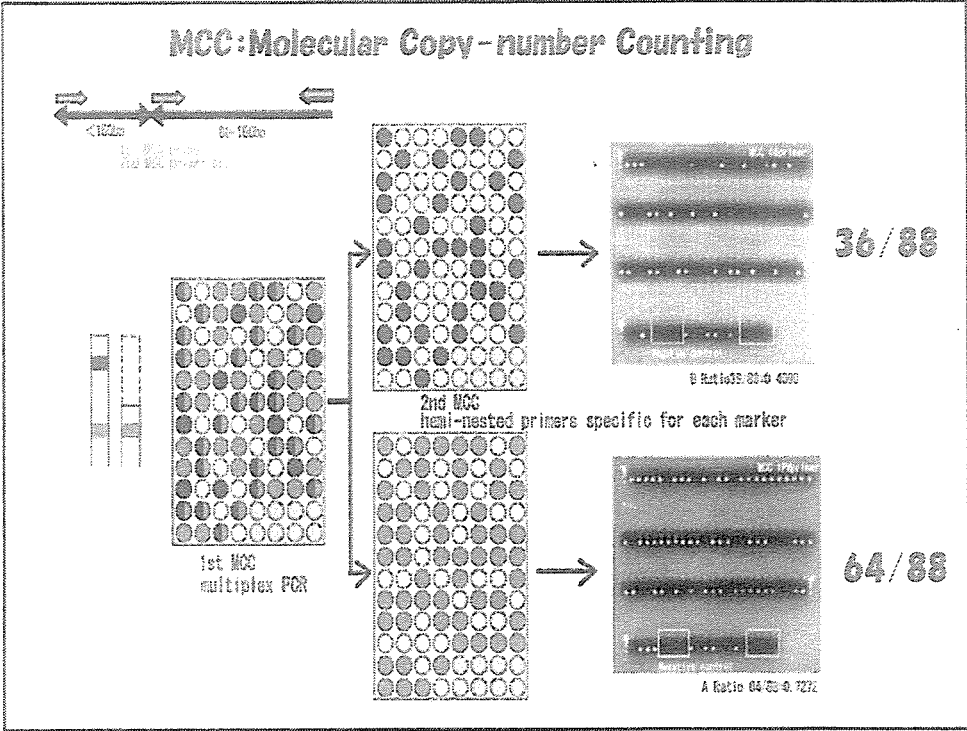


PCR reaction

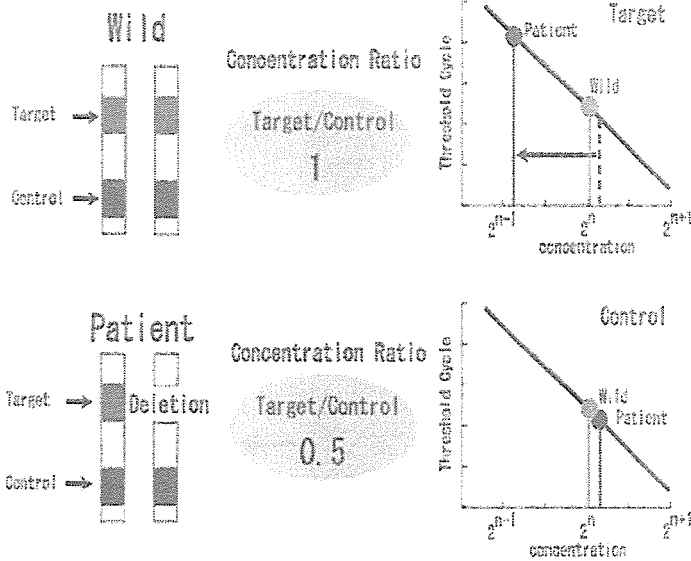


MLPAによる欠失の抽出: 典型15q11-q13欠失(上段)と非典型欠失(下段)

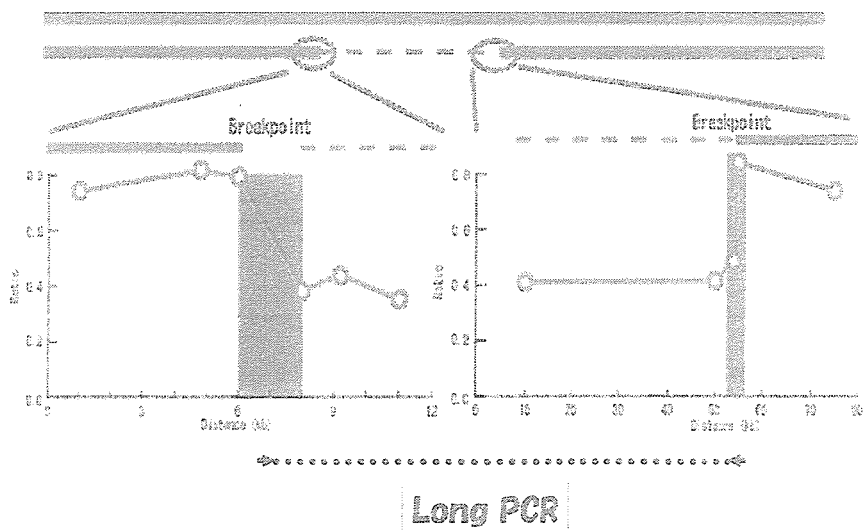




定量リアルタイムPCRの原理



定量リアルタイムPCR:ヘテロ欠失は容易に検出



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kurotaki N, Matsumoto N	Sotos syndrome.	Lupski JR, Stankiewicz PT	Genomic disorders: The genomic basis of disease	The Humana Press Inc	Totowa, NJ	2006	237-246

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kanemoto N, others, Matsumoto N	Nevo syndrome : a variant of Sotos syndrome?	Am J Med Genet	140A(1)	70-73	2006
Yamamoto T, others, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K	A large interstitial deletion of 17p11.2-13.1 including the Smith-Magenis region in a patient with congenital multiple anomalies.	Am J Med Genet	140A(1)	88-91	2006
Miyake N, Shimokawa O, Harada N, others, Matsumoto N	No causative genomic aberrations by BAC array CGH in Kabuki make-up syndrome.	Am J Med Genet	140A(3)	291-293	2006
Miyake N, Shimokawa O, Harada N, others, Matsumoto N	BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation.	Am J Med Genet	140A(3)	205-211	2006
Kawara H, Yamamoto T, Harada N, others, Matsumoto N	Narrowing Candidate Region for Monosomy 9p Syndrome to a 4.7-Mb Segment at 9p22.2-p23.	Am J Med Genet	140A(4)	373-377	2006
Visser R, others, Matsumoto N	Analysis of the <i>NSD1</i> promoter region in patients with a Sotos syndrome phenotype.	J Hum Genet	51(1)	15-20	2006
Ohata T, others, Matsumoto N	The prevalent -16C>T change at the 5' UTR of the <i>puratropin-1</i> gene in autosomal dominant cerebellar ataxia in Nagano.	J Hum Genet	51(5)	461-466	2006
Miura S, others, Harada N, others, Matsumoto N, others.	Microarray comparative genomic hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid.	J Hum Genet	51(5)	412-417	2006
Hamanoue H, others, Harada H, others, Matsumoto N	Complete Hydatidiform Mole and Normal Live Birth after Intracytoplasmic Sperm Injection.	J Hum Genet	51(5)	477-479	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Niihori T, others, Matsumoto N, others.	Germline <i>KRAS</i> and <i>BRAF</i> mutations in cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome.	Nat Genet	38(3)	294-296	2006
Sato H, others, Matsumoto N, others.	Polymorphic alleles of the human <i>MEI1</i> gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest.	J Hum Genet	51(6)	533-540	2006
Sakai H, others, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N	Comprehensive genetic analysis of relevant four genes in 49 patients with Marfan syndrome or Marfan related phenotypes.	Am J Med Genet	140A(16)	1719-1725	2006
Shimokawa O, Harada N, others, Matsumoto N.	Array Comparative Genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with 'normal' karyotypes.	Am J Med Genet	140A	1931-1935	2006
Hiraki Y, others, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N.	Mild craniosynostosis with 1p36.3 trisomy and 1p36.3 deletion syndrome caused by familial translocation t(Y;1).	Am J Med Genet	140A(16)	1773-1777	2006
Yamamoto T, others, Matsumoto N, others.	Trigonocephaly in a boy with paternally inherited deletion 22q11.2 syndrome.	Am J Med Genet	140A(12)	1302-1304	2006
Miura S, others, Harada N, Ishizaki-Yamasaki Y, Matsumoto M, others.	Origin and mechanisms of formation of fetus-in-fetu: Two cases with genotype and methylation analyses.	Am J Med Genet	140A(16)	1737-1743	2006
Dowa Y, others, Harada N, Matsumoto N, Kurisawa K.	Congenital neuroblastoma in a patient with partial trisomy of 2p.	J Pediatr Hematol Oncol	28(6)	379-382	2006
Liang D, others, Harada N, others	A father and son with mental retardation, a characteristic face, inv(12), and insertion trisomy 12p12.3-p11.2.	Am J Med Genet	140A(3)	238-244	2006
Miura K, Yoshiura K, Miura S, Kondoh T, Harada N, Yamasaki K	Clinical outcome of infants with high confined placental mosaicism and intrauterine growth restriction of unknown cause.	Am J Med Genet	140A(17)	1931-1935	2006

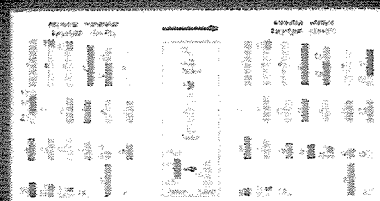
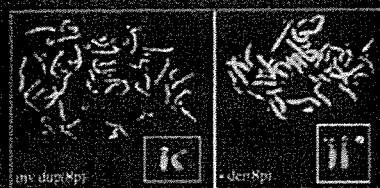
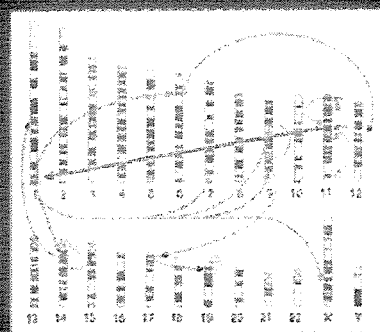
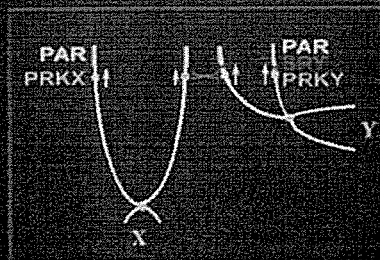
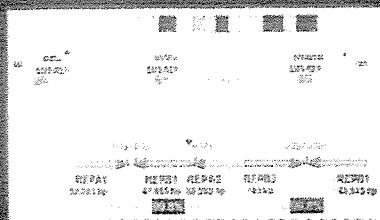
Genomic Disorders

The Genomic Basis of Disease

Edited by

James R. Lupski, MD, PhD

Paweł Stankiewicz, MD, PhD



 HUMANA PRESS

16

Sotos Syndrome

*Naohiro Kurotaki, MD, PhD and
Naomichi Matsumoto, MD, PhD*

CONTENTS

INTRODUCTION
CLINICAL FEATURES
DIAGNOSIS OF SoS
MOLECULAR GENETICS
IS SoS A GENOMIC DISORDER?
IS SoS A CONTIGUOUS GENE SYNDROME?
FUTURE DIRECTION
REFERENCES

INTRODUCTION

Sotos syndrome (SoS) is a well-known overgrowth syndrome with mental retardation, specific craniofacial features, and advanced bone age. Since *NSD1* haploinsufficiency was proven to be the major cause of SoS in 2002, many intragenic mutations and chromosomal microdeletions (MDs) involving the entire *NSD1* gene have been described. The sizes of most SoS MDs are identical and a specific genomic architecture around these MDs was found. Recently, precise analyses of the low-copy repeats (LCRs) flanking the SoS common deletion showed that the deletion arises through nonhomologous recombination (NAHR) utilizing the LCRs, and proved that SoS is a genomic disorder.

SoS (OMIM no. 117550), also known as cerebral gigantism, was originally reported by Sotos et al. (1) in 1964. SoS is characterized by overgrowth, characteristic craniofacial features, developmental delay, and advanced bone age (2). In 2002, *NSD1* disruption was found in a patient with SoS and haploinsufficiency of *NSD1* has been shown to be a major cause of SoS (3). In the Japanese population, about half cases have chromosomal MDs involving the entire *NSD1* gene (3,4). The majority of MDs are identical (4) and the NAHR was shown to be a causative mechanism (5,6). In this chapter, we focus on recent progress in clinical and genetic aspects of SoS. The genomic architecture around the common MD will be presented.

From: *Genomic Disorders: The Genomic Basis of Disease*
Edited by: J. R. Lupski and P. Stankiewicz © Humana Press, Totowa, NJ

CLINICAL FEATURES

SoS typically presents with overgrowth, characteristic craniofacial features, developmental delay, and advanced bone age (2).

Overgrowth: overgrowth usually starts prenatally and can be observed especially in early infancy (2). However, overgrowth seems to normalize during childhood and may not be found in adulthood (7–9).

Craniofacial features: macrocephaly, a high hairline with coarse hair growth, high arched palate, and prominent jaw are common findings. The occipitofrontal circumference is more than 97th percentile in childhood (2).

Developmental delay: developmental delay is a cardinal symptom and can be attributed to central nervous system abnormalities (2). Speech delay and abnormal motor development are commonly observed. Dilatation of cerebral ventricles is sometimes noted. In neuroimaging studies of 40 SoS patients, prominence of the trigone and the occipital horns was found in 90 and 75%, respectively (10).

Advanced bone age: advanced bone age was observed in 31 of 37 (84%) SoS patients (2) and does not appear to be associated with abnormalities of collagen metabolism (11).

Others: cardiac, urogenital, musculoskeletal, and ophthalmologic anomalies have been observed also (2,12–15). Neoplasms in SoS have been found with a frequency of 2.2–3.9% (16).

DIAGNOSIS OF SOS

SoS has been diagnosed based on clinical manifestations, however, the diagnosis is difficult when craniofacial features are less remarkable or are similar to those of other overgrowth syndromes with overlapping phenotypes. Weaver and Beckwith-Wiedemann syndromes associated with *NSDI* abnormalities showed similar facial features to those of SoS (17,18). Overgrowth tends to normalize in adulthood (9), thus, the diagnosis is easier in early life (19). Objective diagnosis of SoS has been substantially improved, since the discovery of *NSDI* mutations in SoS (3). The major diagnostic criteria proposed by Cole and Hughes (2) include pre- and postnatal characteristic overgrowth with advanced bone age, and developmental delay. However, a recent report by Rio et al. (20) indicated that typical facial appearance and macrocephaly were consistently recognized but overgrowth or advanced bone age was not always observed in patients with *NSDI* mutations. Therefore, the diagnostic criteria for SoS likely need to be carefully revised after collecting more data on the phenotypic spectrum in SoS patients with known *NSDI* abnormalities. “Sotos-like syndrome” usually has been referred to a large spectrum of patients that do not fulfill the major criteria for SoS (2,17,20,21).

MOLECULAR GENETICS

NSDI Structure and Functions

Mouse *Nsd1* was originally isolated in 1998 as one of the nuclear proteins interacting with retinoic acid receptors and thyroid hormone receptors (22). The human *NSDI* was identified at the 5q35 breakpoint of a SoS patient with an apparently balanced translocation t(5;8)(q35;q24.1) (23,24). *NSDI* has an 8088-bp open reading frame consisting of 23 exons and is translated into a 2696 amino-acid protein. *NSDI* protein has at least six functional domains, a su[*var*]3-9,enhancer-of-zest,trithorax (SET) domain, two proline-tryptophan-tryptophan-proline (PWWP) domains, and three plant homeodomain protein-finger (PHD)

domains with nuclear localization signals. The SET domain of NSD1 showed methyl transferase activity for Lys36 of histone H3 (H3-K36) and Lys20 of histone H4 (H4-K20), whose methylation may result in transcriptional silencing of developmentally regulated genes (25). PHD finger domains are found in a large number of chromatin regulatory factors like CBP/p300, and chromatin remodeling protein ACF (26). The PWWP domain was initially identified in the protein encoded by the Wolf-Hirschhorn syndrome candidate gene 1 (*WHSC1*) (27). The essential function is still unknown, however, the PWWP domain is often associated with SET domains and is thought to be an essential for development (28). Thus, these six protein domains are suggested to regulate chromatin formations and gene transcriptions (23). Homozygous knockout of *Nsd1* in mice led to embryonic death at 10.5 days and gastrulation failure, suggesting that *Nsd1* may be a protein regulating development especially in an early post-implantation period (25).

The NSD1 is a portion of a fusion protein in a recurrent translocation t(5;11)(q35;p15.5) found in childhood acute myeloid leukemia (29–31). Six non-SoS cases of acute myeloid leukemia had fusion transcripts of *NSD1* and *NUP98* (nucleoporin 98 gene) (29–31). SoS has been suggested to be associated with neoplasms (32). It is also important to address whether *NSD1* abnormality in itself can cause tumorigenesis in the near future.

NSD1 Mutations

NSD1 mutations in SoS have been reported by several groups (3,4,17,20,33–36). To date, among a total of 91 point mutations (PM) have been identified in 241 patients suspected of SoS. Seventy-one protein truncation mutations and 20 missense mutations have been reported with 62 being *de novo* (Fig. 1). Five protein truncation mutations were found in 23 Sotos-like patients (17,20). Protein truncation mutations are spread throughout the entire *NSD1* coding regions; however, missense mutations cluster at the 3' part of *NSD1* where most of the known functional domains are located. In SoS, six missense mutations have been identified in the SET domain, three in the PHD domains and three in the PWWP domains.

Thus, among different world populations, *NSD1* mutations have been consistently shown to be the major cause of SoS. Interestingly, the frequency of MDs involving *NSD1* is quite different. In the Japanese population, about half of the cases (49/95) had MDs, whereas microdeletions are observed in only 11% of cases (13/118) analyzed in European populations (3,4,17,20,33–36). The reason for this observed difference remains to be elucidated.

Genotype/Phenotype Correlation

Interestingly, some clinical differences between SoS patients with PMs and MDs have been reported (14,17,20). Nagai et al. (14) compared clinical phenotypes between 5 PM and 21 MD SoS patients. Both PM and MD cases showed typical craniofacial features. Remarkably, the peak height at younger than 6 years of age and the intelligence quotient/developmental quotient (IQ/DQ) in patients older than 6 years were significantly different between PM and MD patients. The values of the standard deviation (SD) scores were 3.3 (PM) and 2.2 (MD), and IQ/DQ (mean) were 78 ± 12 (PM) and 57 ± 12 (MD), respectively. In addition, MD patients predominantly showed cardiovascular and urogenital abnormalities, and recurrent convulsions.

Rio et al. (20) compared 16 PM and 6 MD patients. Two MD patients showed typical SoS, but the other four patients were diagnosed as Sotos-like syndrome because they did not have overgrowth (height less than +2 SDs), or advanced bone age. Four out of six MD patients had severe mental retardation with no speech at all. Cardiovascular anomalies were found in three