

200707023A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究

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19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20(2008)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. 全ゲノム増幅によるアレイ解析試料の調整	7
原田直樹	
(資料) 未増幅DNA, GenomePlex増幅、Genomiphi増幅、Repli-G による増幅DNAを用いたGeneChip 250Kの解析結果	

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19年度厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメード研究)
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、これを用いてヒト精神神経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精神神経疾患関連遺伝子を単離することを目的とした研究の次年度である。本邦初となる完全ゲノムタイリングアレーは、計画通り平成19年10月に完成した。米国 CHORI からの DNA を主体とするヒトゲノムの 99%を網羅的に被覆する 33,169 個の BAC DNA を鋳型に DOP-プライマーを用いて一次 PCR 増幅・二次 PCR 増幅を完了した。フィルター法で全増幅産物を精製後、委託外注によるスライドスポッティングを行い 33K BAC アレーが完成した。現在、33K アレーを用いた解析系の至適条件を検討中である。導入した Affymetrix 社 GeneChip 250K と保有する 4.2K アレーの両プラットフォームを用いて症例 30 例における解析結果の比較検討を行った。精神遅滞関連疾患・機能的な精神疾患の症例集積は順調に進行中である。さらに精神発達遅滞とてんかんを併発する 1 症候群 (EIEE、大田原症候群) の責任遺伝子単離に世界に先駆けて成功した。

分担研究者

原田直樹・九州メディカルサイエンス所長

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、これを用いてヒト精神神経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精神神経疾患関連遺伝子を単離することを目的とする。本研究の次年度にあたり、本邦初のゲノム完全タイリングアレーを完成することが、最重要課題であった。さらに商業ベースのオリゴ DNA アレーと保有する 4.2K アレーとの比較検討によって BAC アレーとオリゴ DNA アレーの特性を明らかにし適切なアレー研究展開に必要な情報を集積することも重要な目的の一つであった。

B. 研究方法

①完全ゲノムタイリングアレーの完成

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 33,169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増幅を行い、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。全クローンのPCR増幅産物はフィルター法で精製しインクジェット法を用いて1枚のアレースライド上に全てのクローンDNAを配置する(委託外注)。

②オリゴDNAアレーと4.2K BACアレーの両解析結果の比較検討

導入した Affymetrix 社の GeneChip 250K と開発済みである 4.2K アレーを用いて同一の疾患ゲノムを解析し、両プラットフォームの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。

④精神遅滞関連疾患の責任遺伝子単離
疾患ゲノム解析で同定された病的ゲノムコピー数異常領域から候補遺伝子を選出し同様の疾患群を対象に遺伝子変異の特定を行う。

C. 研究結果

①完全ゲノムタイリングアレーの作製

1. アレーの完成 (平成 19 年 10 月)

CHORIから供与された完全ヒトゲノムタイリングBAC DNA (BAC 32,891個)に当研究室で独自に収集した補強クローン分278個(サブテロメアおよび染色体微細欠失・重複症候群責任領域を含む)を追加した33,169クローンを鋳型に、全クローンの一次PCR増幅・二次PCR増幅・フィルター精製・インクジェットによるアレースポットティング(委託外注)が完了した(平成19年10月)。当初の計画通り平成19年度中期の完成となった。

②オリゴDNAアレーと4.2K BACアレーとの比較検討

約30症例を用いた比較検討を行った。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)が一層明らかになった。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薄い点を考慮しなければならぬことが判明した。

③症例の集積と解析

歌舞伎メーカーシップ症候群 15 例・Coffin-Siris 症候群 13 例・MSD1 異常を認めない Sotos 症候群 30 例・Aicardi 症候群 15 例・痙攣と精神発達遅滞を併発する EIEE (大田原症候群) 14 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 アレーと Affymetrix GeneChip 250K での解析を終了した。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の症例を検討中である。

④疾患遺伝子の単離

EIEE 症例の 1 例で常染色体上に微細欠失を同定した。同部位から脳で発現し機能的に てんかんと関連する可能性の高い候補遺伝子群を選定し、他の同症候群症例で変異解析を行ったところ 4 例に点突然変異を同定した。この変異は両親の検体の得られた 3 例で新規突然変異であることが判明し責任遺伝子であると結論した(世界に先駆けた成果で、未発表のため詳述できないが、現在投稿中。また新規診断法として特許出願)。

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が本年度中期に予定通り完成した。現在完全タイリングアレーに最も最適な実験解析プロトコルを検討中でありプロトコルが完成次第症例ゲノム解析の検討に入る予定である。オリゴ DNA アレーと BAC アレーとの比較検討をさらに進め、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、両プラットフォームがそれぞれ違う領域を対象にしていることが明らかになってきた。よって現時点ではいわゆる相補的検査となっている状態である。完成した 33K BAC アレーを加えさらに症例ごとに詳細に解析していくことで疾患解析に最適なプラットフォームとは何かの貴重な情報が得られることが期待される。既に 1 症候群において疾患特異的ゲノム異常から疾患関連遺伝子単離にも成功し本手法を用いた疾患遺伝子単離法の有用性を示した。完全タイリングアレーを用いた症例ゲノム解析を進めることでさらに新しい精神神経疾患関連遺伝子の同定が可能になることが期待される。

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、次年度として、完全ゲノムタイリングアレーは計画通り完成し、既に精神発達遅滞症候群の1疾患で責任遺伝子単離にも成功しているなど順調に進行していると考えている。

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

Sato K, Iwakoshi M, Shimokawa O, Sakai H, Ohta T, Saitoh S, Miyake N, Niikawa N, Harada N, Saitu H, Mizuguchi M, Matsumoto N. Angelman syndrome caused by an identical familial 1487-kb deletion. *Am J Med Genet* 143A(1): 98-101, 2007.

Mizuguchi T, Matsumoto N. Recent advance in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *J Hum Genet* 52(1): 1-12, 2007

Yamasaki-Ishizaki Y, Kayashima T, Christophe M, Soejima H, Ohta T, Masuzaki H, Kinoshita A, Urano T, Yoshiura K, Matsumoto N, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Kishino T. Role of DNA methylation and histone H3 Lysine 27 methylation in tissue-specific imprinting of mouse *Grb10*. *Mol Cell Biol*

27(2):732-742, 2007.

Nakashima M, Takamura N, Namba H, Saenko V, Meirmanov S, Matsumoto N, Hayashi T, Maeda S, Sekine I. RET oncogene amplification in thyroid cancer: correlations with radiation-associated and high-grade malignancy. *Hum Pathol* 38(4): 621-628, 2007.

Sato D, Shimokawa O, Harada N, Olsen OE, Hou J-W, Muhlbauer W, Blinkenberg E, Okamoto N, Kinoshita A, Matsumoto N, Kondo S, Kishino T, Miwa N, Ariga T, Niikawa N, Yoshiura K. Congenital arhinia: molecular-genetic analysis of five patients. *Am J Med Genet* 143A(6):546-552, 2007

Nishimura A, Sakai H, Ikegawa S, Nagai T, Takada F, Ohata T, Tanaka F, Kamasaki H, Saitu H, Mizuguchi T, Matsumoto N. *FBN2*, *FBN1*, *TGFBR1*, and *TGFBR2* analyses in congenital contractural arachnodactyly. *Am J Med Genet* 143A(7):694-698, 2007.

Sosonkina N, Miyake N, Harada H, Starenki D, Ohta T, Fukushima Y, T Kosho, Niikawa N, Matsumoto N. Less frequent *NSDI*-intra-genic deletions in Japanese Sotos syndrome: Analysis of 30 patients by *NSDI*-exon array CGH, quantitative fluorescent duplex PCR, and fluorescence in situ hybridization. *Acta Medica Nagasakiensia* 52:29-34, 2007.

Togashi Y, Sakoda H, Nishimura A, Matsumoto N, Hiraoka H, Matsuzawa Y. A Japanese family of typical Loeys-Dietz syndrome with a *TGFBR2* mutation. *Internal Medicine* 2007;46(24):1995-2000, 2007

2. 学会発表

Naomichi Matsumoto, Mie Iwakoshi. Angelman syndrome caused by an identical familial 1487-kb deletion. (Poster presentation) European Human Genetics Conference 2006 (June 16-19, 2007, Nice

Acropolis congress center, Nice, France)

Naomichi Matsumoto. Chromosomal submicroscopic changes. (Invited lecture) The 1st National Summer Program of Graduates in Medical Genetics in China (August 7, Changsha, China)

Naomichi Matsumoto. Cerebral gigantism with histone methyltransferase abnormality: Sotos syndrome (Symposist, invited speaker) Neuro2007 (Yokohama, September 10, 2007)

Naomichi Matsumoto. Gene analysis of Marfan syndrome (Invited lecture) VIII Annual International Symposium on Advances in Understanding Aortic Diseases (Tokyo, October 13, 2007)

Naomichi Matsumoto, Akira Nishimura, Haruya Sakai, Hiroto Saito, Takeshi Mizuguchi. FBN2, FBN1, TGFBR1, and TGFBR2 analyses in congenital contractural arachnodactyly. (poster presentation) 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Oct 23-27, 2007, San Diego, CA)

松本直通「BAC array CGH: seven years experience」(招聘講演) 第5回サイトミクス研究会 (11月2日 東京)

Naomichi Matsumoto. Genetic analysis of Marfan syndrome and its related disorders. (invited lecture) The 2007 EAUHGS symposium (Dec 8, Changsha, China)

松本直通「染色体構造異常と疾患遺伝子」(シンポジウム:ゲノムから疾患へ)(シンポジスト) BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同)(12月15日、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2007-340147・松本直通/才津浩智・新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの責任遺伝子を用いた確定診断法・平成19年12月28日

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：全ゲノム増幅によるアレイ解析試料の調整

分担研究者 原田直樹 九州メディカルサイエンス 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ているが、将来的には臨床応用が期待される。我々は全ゲノム増幅（Whole Genome Amplification）法により調整したDNA試料を用いたマイクロアレイによるゲノムコピー数解析の可能性について検討を行った。この結果、WGAで調整したDNAを用いて数100kbの比較的小さなサイズのゲノムコピー数変異が検出可能なこと確認した。

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、解析結果の検証を含めて、数マイクログラムのゲノムDNAを必要とする。そのため微量の検体しか入手できず、細胞培養等ができない場合には解析対象とすることが困難である。WGA法は極少量の検体組織から抽出したゲノムDNAを数百万倍に増幅することが可能であり、種々の遺伝子解析に利用されている。我々はWGA法により調整したDNAを用いてアレイによるゲノムコピー数解析が可能かを検討した。

B. 研究方法

1. 比較検討するWGAキット

5p15.33-p13.31領域の染色体欠失症例について、末梢血から直接抽出した未処理ゲノムDNA、Genomiphi V2キット（GEヘルスケアバイオサイエンス）での増幅ゲノムDNA、REPLI-gキット（QIAGEN）での増幅ゲノムDNA、GenomePlex Complete Whole Genome Amplificationキット（SIGMA）での増幅ゲノムDNAを用いてAffymetrix社GeneChip Human Mapping 250Kアレイのプラットフォーム

ムにおけるゲノムコピー数解析結果の比較検討を行った。

2. 未培養羊水細胞を対象としたWGAによる試料調整

羊水中には生存細胞（living cells）が20～7%しか存在せず（妊娠16週と30週の検体の平均；自社データ）、染色体や遺伝子検査を行う場合には細胞培養が必須となる。もし未培養細胞から微量のDNAを直接抽出し、WGAで試料を調整できれば胎児診断において大変有用なリソースとなると考えられる。そこでB.1で比較検討の結果最もゲノムコピー数解析に適した試料調整可能と判断されたGenomePlexキットを使用して未培養羊水細胞からの試料調整・増幅をおこなった。3mlの羊水（妊娠週数平均16週）21検体からDNAを抽出後にWGAを行い、DNA回収量とスミアサイズを比較検討した。

3. 未培養羊水細胞のWGA試料の品質検定

B.2のWGA試料を用いて複数のSTSマーカーでのPCR増幅効率を検討した。また1症例についてはWGA試料の疾患責任遺伝子を直接シーケンス解析し、また他の1例については、複数のSTR（short tandem repeat）座を対象としたフラグ

メント解析を行った。

4. WGA 試料のゲノムコピー数解析
未培養羊水 3ml の細胞ペレットから調整した 21 例の WGA 試料について GeneChip 250K Nsp アレイによるゲノムコピー数解析を実施し、染色体異常、ゲノムコピー数変異の検出を試みた。

C. 研究結果

1. WGA キット

GeneChip によるコピー数解析の結果、直接抽出、Genomiphi、REPLI-g、GenomePlex で調整した DNA の GeneChip 250K アレイ解析における SNP コール率と \log_2 Ratio の標準偏差 (SD) はそれぞれ、95.97%/0.212 (コール率/SD)、96.54%/0.317、95.52%/0.397、93.82%/0.311 であった。コール率は GenomePlex が最も低く、SD は REPLI-g が最も高いという結果であったが、Genomiphi と REPLI-g では直接抽出 DNA には認められないアーチファクトと思われるコピー数変化が多数見られ、その傾向は特に REPLI-g で顕著であった。これに対し、GenomePlex では他の WGA キットで見られたアーチファクトは殆ど検出しなかったため、ゲノムコピー数解析用の試料調整に最適と思われた (図 1)。

2. 未培養羊水細胞からの WGA 試料調整
未培養羊水細胞からの DNA の直接抽出では 1ml あたり平均 100ng 程度の羊水量に応じた DNA 収量が得られたが、これを鋳型に全ゲノム増幅後は平均 10・g の DNA が回収され、解析した 21 検体毎の収量の差は無かった。またアガロースゲル電気泳動で観察できる、増幅 DNA サイズや質に差異は無かった。

3. WGA 試料の品質検定

前記 WGA 試料を使用した複数の STS の PCR では安定して増幅産物が得られた。1 例については HRAS 遺伝子のタンパクコード領域の PCR ダイレクトシーケン

ス解析を行い、Costello 症候群で既知のヘテロ接合性点変異の同定が可能であった。また他の 1 例では、WGA 試料と培養細胞から抽出した DNA の両方について 14 番染色体上の複数の STR 座を対象としたフラグメント解析を行い、WGA 試料で未増幅 DNA に比して非特異的ハローバンドのピークが高い傾向が見られた。WGA ではユニークな領域では塩基レベルでも増幅精度は高いと思われたが、反復配列領域の増幅精度にはやや問題がある可能性が示唆された。

4. ゲノムコピー数解析

21 例の WGA 試料の GeneChip 250K アレイによるゲノムコピー数解析を実施した結果 (解析ソフトには CNAG ver3 を使用)、平均 SNP コール率は 89.4%、 \log_2 Ratio の SD の平均は 0.27 であった。異数性染色体異常 (トリソミー 21) に加えて、数 100kb 前後までサイズのゲノム欠失、重複が正確に検出可能であり、1 検体あたり平均 3.2 個のゲノムコピー数変異 (コピー数多型を含む) を検出可能することができた。

D. 考察

未培養羊水細胞の WGA により調整した DNA 試料を対象として GeneChip マイクロアレイを使用したゲノムコピー数解析を実施した。穿刺直後の新鮮な羊水では細胞の大半が死細胞であり、SNP コール率や SD 値は培養細胞やリンパ球から抽出した試料よりやや悪い値を示したが、数百 kb 程度の小さなゲノム欠失・重複が正確に検出可能であった。

今回は 3 種の全ゲノム増幅試薬キットを使用し GeneChip オリゴマイクロアレイによるコピー数検出の精度検討を行ったが、少なくとも GeneChip アレイを使用する際には、Phi29 DNA polymerase による同一温度条件下の多発置換増幅 (MDA) 法をベースとする Genomiphi V2 や REPLI-g キットよりも、単純な PCR をベースとする GenomePlex

キットの方がよりコピー数異常の検出に優れた全ゲノム増幅 DNA が調整可能であった。今後は他のゲノムコピー数解析プラットフォーム、即ち BAC アレイ CGH、オリゴアレイ CGH 法についても WGA 法の適用の可能性について検討を行いたいと考えている。

WGA を利用することにより微量の検体を対象としたアレイ解析が実施可能となり、病理標本への利用等、臨床検査への応用への拡がり期待される。

E. 健康危険情報
特になし。

F. 研究発表

論文発表

Sato D, Shimokawa O, Harada N, Olsen OE, Hou JW, Muhlbauer W, Blinkenberg E, Okamoto N, Kinoshita A, Matsumoto N, Kondo S, Kishino T, Miwa N, Ariga T, Niikawa N, Yoshiura K. Congenital arhinia: molecular-genetic analysis of five patients. *Am J Med Genet A*. 143:546-52. 2007.

Kikuchi T, Nomura M, Tomita H, Harada N, Kanai K, Konishi T, Yasuda A, Matsuura M, Kato N, Yoshiura K, Niikawa N. Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC): confirmation of linkage to 16p11-q21, but unsuccessful detection of mutations among 157 genes at the PKC-critical region in seven PKC families. *J Hum Genet*. 52:334-41. 2007.

学会発表

原田直樹, 佐々木由喜, 霜川 修, 井田知子, 近藤達郎, 新川詔夫: 羊水染色体検査における問題点 -検査の立場から-. 第 31 回日本遺伝カウンセリング学会

霜川 修, 佐々木健作, 国場英雄, 近藤達郎, 夫 律子, 松本直通, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 原田直樹: 未培養羊水

の全ゲノム増幅による出生前診断の試み. 第 14 回日本遺伝子診療学会大会

外木秀文, 川良洋城, 原田直樹, 小崎里華, 佐藤孝平, 新保輝味, 工藤夏美, 松本直通: Axenfeld-Rieger 奇形と Axenfeld-Rieger 症候群: 6p25 の構造異常を持つ 2 例の検討. 日本人類遺伝学会第 52 回大会

水口 剛, 平木洋子, 霜川 修, 原田直樹, 三宅紀子: マイクロアレイ CGH により検出された 2q27.3 モノソミーの分子細胞遺伝学的解析. 日本人類遺伝学会第 52 回大会

大村奈緒美, 森内美由紀, 佐々木健作, 国場英雄, 近藤達郎, 松本直通, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 原田直樹: t(1;3)(p13;q25) 相互転座切断点に微細欠失を認めた精神遅滞児の 1 例. 日本人類遺伝学会第 52 回大会

国場英雄, 霜川 修, Liang Desheng, Xia Jiahui, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 原田直樹, 近藤達郎, 大橋博文, 黒澤健司, 福嶋義光, 成富研二, 新川詔夫: 歌舞伎メーカーキャップ症候群の染色体転座・微細欠失内の候補遺伝子解析. 日本人類遺伝学会第 52 回大会

佐々木健作, 霜川 修, 川良洋城, 国場英雄, 近藤達郎, 夫 律子, 本多敬輔, 松本直通, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 原田直樹: 未培養羊水の全ゲノム増幅による出生前診断の試み. 日本人類遺伝学会第 52 回大会

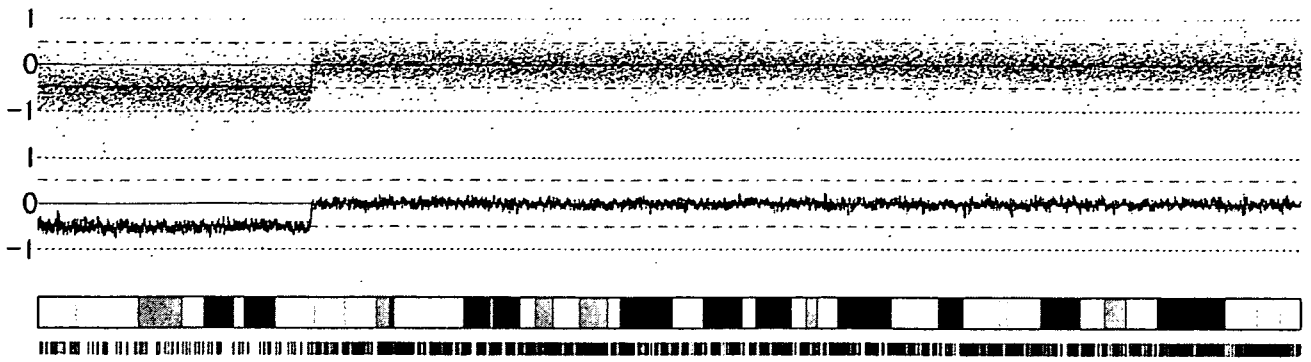
霜川 修, 夫 律子, 副島英伸, 佐々木健作, 近藤達郎, 松本直通, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 原田直樹: 母由来重複に起因する 11p15 部分トリソミーの 1 例. 日本人類遺伝学会第 52 回大会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

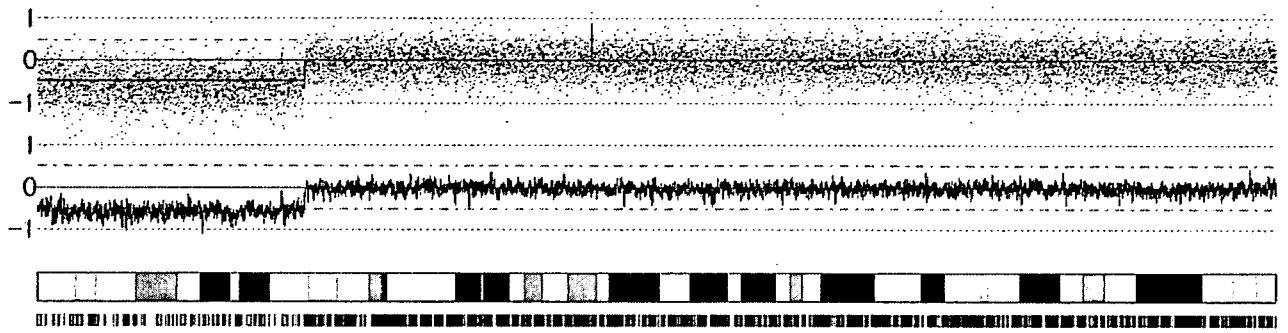
Ch5

未增幅 DNA



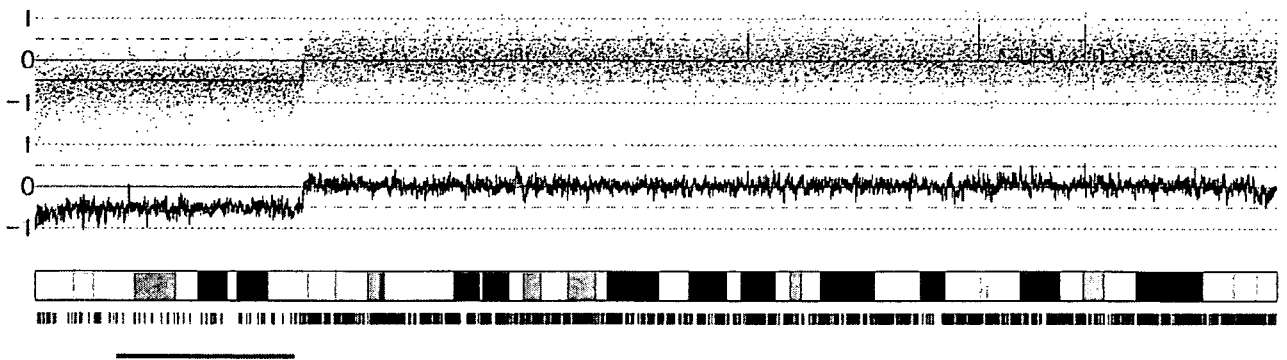
Ch5

GenomePlex 增幅



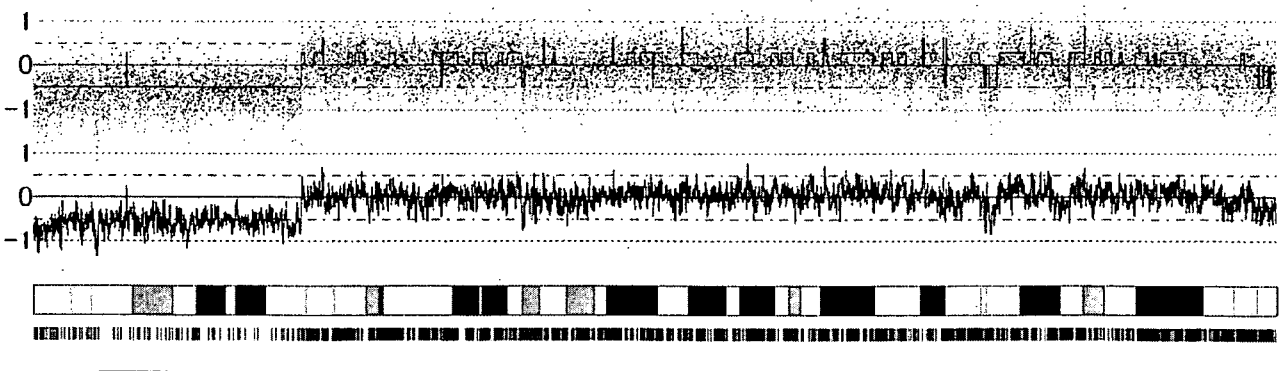
Ch5

Genomiphi 增幅



Ch5

Repli-g 增幅



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
無し							

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
Sato K, et al., Matsumoto N.	Angelman syndrome caused by an identical familial 1487-kb deletion.	Am J Med Genet	143A(1)	98-101	2007
Mizuguchi T, Matsumoto N.	Recent advance in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders.	J Hum Genet	52(1)	1-12	2007
Yamasaki-Ishizaki Y, et al., Matsumoto N, et al.	Role of DNA methylation and histone H3 Lysine 27 methylation in tissue-specific imprinting of mouse <i>Grb10</i> .	Mol Cell Biol	27(2)	732-742	2007
Nakashima M, et al., Matsumoto N, et al.	RET oncogene amplification in thyroid cancer: correlations with radiation-associated and high-grade malignancy.	Hum Pathol	38(4)	621-628	2007
Sato D, et al., Matsumoto N, et al.	Congenital arhinia: molecular-genetic analysis of five patients.	Am J Med Genet	143A(6)	546-552	2007
Nishimura A, et al., Matsumoto N.	<i>FBN2</i> , <i>FBN1</i> , <i>TGFBR1</i> , and <i>TGFBR2</i> analyses in congenital contractural arachnodactyly.	Am J Med Genet	143A(7)	694-698	2007
Sosonkina N, et al., Matsumoto N.	Less frequent <i>NSD1</i> -intra-genic deletions in Japanese Sotos syndrome: Analysis of 30 patients by <i>NSD1</i> -exon array CGH, quantitative fluorescent duplex PCR, and fluorescence in situ hybridization.	Acta Medica Nipponica	52	29-34	2007
Togashi Y, et al., Matsumoto N, et al.	A Japanese family of typical Loey-Dietz syndrome with a <i>TGFBR2</i> mutation.	Internal Medicine	46(24)	1995-2000	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kikuchi T, et al., Harada N, et al.	Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC): confirmation of linkage to 16p11-q21, but unsuccessful detection of mutations among 157 genes at the PKC-critical region in seven PKC families.	J Hum Genet.	52	334-341	2007

Research Letter

Angelman Syndrome Caused by an Identical Familial 1,487-kb Deletion

Kanako Sato,¹ Mie Iwakoshi,² Osamu Shimokawa,^{3,4} Haruya Sakai,¹ Tohru Ohta,⁵ Shinji Saitoh,⁶ Noriko Miyake,⁴ Norio Niikawa,⁴ Naoki Harada,³ Hiroto Saito,¹ Takeshi Mizuguchi,¹ and Naomichi Matsumoto^{1*}

¹Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan

²Nishinomiya Municipal Wakaba-en, Nishinomiya, Japan

³Kyushu Medical Science Nagasaki Laboratory, Nagasaki, Japan

⁴Departments of Human Genetics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

⁵The Research Institute of Personalized Health Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Ishikari-tobetsu, Japan

⁶Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan

Received 25 August 2006; Accepted 29 September 2006

How to cite this article: Sato K, Iwakoshi M, Shimokawa O, Sakai H, Ohta T, Saitoh S, Miyake N, Niikawa N, Harada N, Saito H, Mizuguchi T, Matsumoto N. 2007. Angelman syndrome caused by an identical familial 1,487-kb deletion. *Am J Med Genet Part A* 143A:98–101.

To the Editor:

Angelman syndrome (AS, OMIM #105830) is a neurodevelopmental disorder characterized by mental retardation, ataxia, hypotonia, epilepsy, absence of speech, and specific facial features. At least four major mechanisms causing AS were validated: (i) an interstitial deletion of 15q11-q13 (70–75%), (ii) uniparental disomy (2–3%), (iii) imprinting defects (3–5%), (iv) *UBE3A* mutations (20%) [Clayton-Smith and Laan, 2003]. Most deletions are similar in size (approximate 4 Mb) and occur de novo through maternal unequal crossing over between low copy repeats (LCRs). Paternal occurrence of similar deletions, instead, results in Prader–Willi syndrome (PWS, OMIM #176270). In PWS no coding mutations have been found in contrast with *UBE3A* mutations in AS, suggesting that PWS is caused by loss of function of multiple genes.

Different sized deletions associated with AS are very rare. To our knowledge, at least three familial atypical deletions were reported [Saitoh et al., 1992; Buxton et al., 1994; Burger et al., 2002], but in one family [Buxton et al., 1994] a microdeletion could not be confirmed by another group [Sutcliffe et al., 1997]. In the remaining two families, microdeletions caused AS in maternal inheritance but no PWS features in paternal inheritance, enabling differentiation of the PWS critical region (PWSCR) from the AS critical region (ASCR).

We encountered a similar family with an atypical microdeletion through microarray CGH analysis of 30 individuals with idiopathic mental retardation

[Miyake et al., 2006]. The family consisted of a boy, who was later confirmed with AS, and an asymptomatic mother and maternal grandfather (Fig. 1A). All three had an atypical microdeletion. Methylation PCR analysis [Kubota et al., 1997] of the proband showed a normal pattern (data not shown).

The deletion was intensively analyzed. FISH analysis using RPCI-11 BAC clones (701H24, 171C8, 1081A4, 607F22, 931B1, 2C7, 434O21, 203C13, 638J6, 899B22, 58D7, and 142M24) on the proband's metaphase chromosomes revealed that 1081A4, 607F22, 931B1, 2C7, 434O21, 203C13, 638J6, 899B22, and 58D7 were deleted, 171C8 and 142M24 were partially deleted, and 701H24 was not deleted (data not shown). Cosmid subclones constructed from BAC 171C8 were used for further FISH analysis. Cosmid D-2 was partially deleted (data not shown), indicating that the proximal deletion breakpoint was located in a region between UCSC coordinate chromosome 15 nucleotide 22,928,853 and 22,974,812 (end sequences of cosmid D-2). Subsequently quantitative real-time PCR (qPCR)

Grant sponsor: Ministry of Health, Labour and Welfare; Grant sponsor: Yokohama Foundation for Advancement of Medical Science; Grant sponsor: Mitsubishi Foundation; Grant sponsor: SORST, Japan Science and Technology Agency (JST).

*Correspondence to: Naomichi Matsumoto, Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Fukuura 3-9, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan.

E-mail: naomat@yokohama-cu.ac.jp

DOI 10.1002/ajmg.a.31550

ANGELMAN SYNDROME CAUSED BY ATYPICAL FAMILIAL DELETION

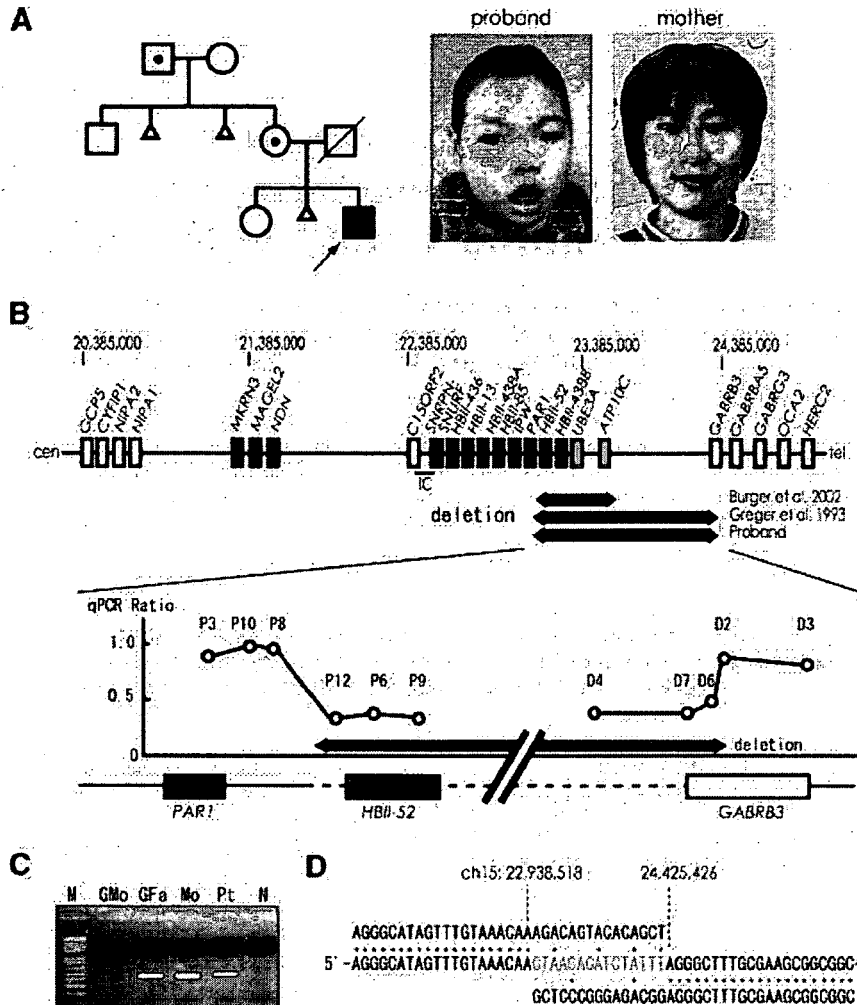


FIG. 1. A: Pedigree of the family and photographs of the proband (arrow) and his mother. Proband, mother, and maternal grandfather (dotted) had a deletion. His father died of biliary atresia at 31 years old. B: Schematic presentation of genes (black boxes: genes expressed from paternal chromosome, gray boxes: genes expressed from maternal chromosome, open boxes: genes expressed from both chromosomes), rare familial deletions, and result of quantitative real-time PCR (qPCR) analysis. Deletion from *HBII-52* cluster to *GABRB3* was confirmed. C: Deletion specific PCR analysis of the family. PCR using primers, DSF and DSR, could successfully amplify a 2.6-kb product from grandfather (GFa), mother (Mo), and patient (Pt), but not from grandmother (GMo). M: size marker, N: negative control. D: Sequence of deletion breakpoints. The sequence in a middle row indicates the patient's sequence spanning the deletion. Upper and lower rows show normal sequences corresponding to centromeric and telomeric to the deletion. Proximal and distal deletion breakpoints are marked with UCSC coordinate chromosome 15 nucleotide positions. Fifteen nucleotides (in gray) were inserted. Asterisks indicate nucleotides identical to normal chromosome 15 sequence.

using DyNAmo HS SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Espoo, Finland) was conducted to determine breakpoint locations according to the methods by Boehm et al. [2004] with some modification. A total of six sets of primers (P3, P10, P8, P12, P6, and P9) as test probes were designed within the cosmid D-2 region along with a control primer set for *FBN1* locus at 15q21.1. Rotor-Gene™ 6200 HRM (Corbett Life Science, Sydney, Australia) could demonstrate a heterozygous deletion for primer-sets P12, P6, and P9 (Fig. 1B). Similarly five sets of primers (D4, D7, D6, D2, and D5) were selected from the region of BAC 142M24 and three sets, D4, D7, and D6, implied a deletion. Thus proximal and distal deletion break-

points seemed to exist between P8 and P12 and between D6 and D2, respectively. Finally deletion breakpoints were successfully amplified as an approximate 2.6-kb product by PCR using LA-Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) and primers (DSF: 5'-TATAACTAGGTATTGGACTCATACTGAGGA-3' and DSR: 5'-ACCTACAGCCTTCTAAGTACTGTATCCAT-3') from the patient's DNA as well as his mother and maternal grandfather, but not from his maternal grandmother (Fig. 1C) or 10 normal controls. The PCR products were sequenced (Fig. 1D). The proband, his mother, and maternal grandfather had exactly the same breakpoint sequences. The deletion was 1,487-kb in size and

contained *HBII-52*, *HBII-438B*, *UBE3A*, *ATP10C*, and a part of *GABRB3* (Fig. 1B). Proximal and distal breakpoints were not related to any of PWS/AS-related LCRs [Christian et al., 1999]. It was surprising that the sequences were completely identical to those found in the family previously described [Greger et al., 1993]. Relationship of the two families could not be confirmed. However, coincidence of proximal and distal deletion breakpoints as well as inserted 15 nucleotides strongly suggests that the two families originated from the same ancestor. Both families indeed live in neighboring prefectures in Japan.

Phenotype of the proband is compatible to AS and was similar to that of the patient with the identical deletion described by Saitoh et al. [1992] (detailed clinical information was described by Sugimoto et al. [1992]) (Table I). As his mother inherited the deletion from his maternal grandfather, she may suffer from some of PWS features if the deletion contains a gene(s) for PWS. She was carefully evaluated with regard to diagnostic criteria for PWS [Holm et al., 1993]. Only one major criterion (genetic microdeletion) and one minor (myopia) were recognized, thus PWS was definitely unlikely. This

is consistent with the previous finding that a clinically healthy mother of three AS sibs, all sharing an identical deletion [Saitoh et al., 1992; Sugimoto et al., 1992].

Recently brain-specific snoRNA *HBII-52* was found to regulate alternative splicing of serotonin receptor 2C, possibly influencing the serotonin response [Kishore and Stamm, 2006]. Clustering 47 copies of *HBII-52* are maternally imprinted and are suggested to play an important role in pathogenesis of PWS [Cavaille et al., 2000]. However in this family as well as the previously described family [Saitoh et al., 1992], two healthy mothers possessed the microdeletion inherited from their fathers and the deletion included the complete *HBII-52* locus. Thus, the normal phenotype of the mother described here again supports that *HBII-52* does not play any roles in PWS. Similarly the paternally inherited 570-kb deletion in a healthy mother also included *HBII-52* [Burger et al., 2002; Runte et al., 2005]. Rare balanced translocations involving paternal 15q11-q13 in PWS and rare atypical microdeletions now delimit the PWSCR to a 121-kb region covering *HBII-438A* and *HBII-85* clusters [Wirth et al., 2001; Gallagher et al., 2002].

TABLE I. Phenotype of the Proband and Cases Previously Reported

Patient	Proband	Patient 1* [Saitoh et al., 1992]	B-5490 [Burger et al., 2002]
Psychomotor development			
Mental retardation	Severe	Yes	Yes
Absence of speech	Yes	Yes	Yes
Able to speak single word	No	No	No
Able to make sound	Yes		
Able to use sign language	Yes (only at urination)		
Age walked alone	2 years 7 months		1 year 6 months
Neurological features			
Epilepsy	Yes	Yes	
EEG	Abnormal	Abnormal	No
Ataxia (When excited/running) (not marked)	Yes	Yes	Yes
Wide-based gait	Yes		
Flapping hands (when excited/running)	Yes (slightly)	Yes	
Behavior			
Happy disposition	Yes		
Characteristic laughter	No	Yes	Yes
Physical features			
Prominent mandible	Yes	Mild	
Small widely spaced teeth	Yes		Yes
Large mouth	Yes		No
Protruding tongue	Yes (slightly)	Yes	Yes
Small head (<25th percentile)	Yes	Yes	
Occiput	Normal	Flat	
Squint	Yes	Yes	
Weight	Within 90 percentile		-0.2 SD
Height	Within 90 percentile		+0.8 SD
Hypopigmentation	No	No	No
Miscellaneous			
Sleep	Disrupted		
Mouthing	No		
Dribbling/drooling	Yes		
Other	Father is dead (Biliary atresia)		

This table is made with reference to a paper by Fung et al. [1998].

*Clinical information of Patient 1 and his affected sibs was described in a paper by Sugimoto et al. [1992].

In conclusion, a very rare identical 1,487-kb deletion was found in two families possibly originating from the same ancestor. It should be stressed that the deletion can be inherited without any symptoms through paternal lines. Finally *HBII-52* may not be important for PWS pathogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

Research grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare for N.M., Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (Research on Pathomechanisms of Brain Disorders) for N.M., Research Promotion Fund from Yokohama Foundation for Advancement of Medical Science for N.M., Natural Science Research Fund from the Mitsubishi Foundation for N.M., and SORST from Japan Science and Technology Agency (JST) for N.N.

REFERENCES

- Boehm D, Herold S, Kuechler A, Liehr T, Laccione F. 2004. Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. *Hum Mutat* 23:368–378.
- Burger J, Horn D, Tonnie H, Neitzel H, Reis A. 2002. Familial interstitial 570 kbp deletion of the *UBE3A* gene region causing Angelman syndrome but not Prader–Willi syndrome. *Am J Med Genet* 111:233–237.
- Buxton JL, Chan CT, Gilbert H, Clayton-Smith J, Burn J, Pembrey M, Malcolm S. 1994. Angelman syndrome associated with a maternal 15q11-13 deletion of less than 200 kb. *Hum Mol Genet* 3:1409–1413.
- Cavaille J, Buiting K, Kieffmann M, Lalonde M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Huttenhofer A. 2000. Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14311–14316.
- Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH. 1999. Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader–Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* 8:1025–1037.
- Clayton-Smith J, Laan L. 2003. Angelman syndrome: A review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet* 40:87–95.
- Fung DC, Yu B, Cheong KF, Smith A, Trent RJ. 1998. *UBE3A* “mutations” in two unrelated and phenotypically different Angelman syndrome patients. *Hum Genet* 102:487–492.
- Gallagher RC, Pils B, Albalwi M, Francke U. 2002. Evidence for the role of *PWCR1/HBII-85* C/D box small nucleolar RNAs in Prader–Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 71:669–678.
- Greger V, Woolf E, Lalonde M. 1993. Cloning of the breakpoints of a submicroscopic deletion in an Angelman syndrome patient. *Hum Mol Genet* 2:921–924.
- Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F. 1993. Prader–Willi syndrome: Consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 91:398–402.
- Kishore S, Stamm S. 2006. The snoRNA *HBII-52* regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* 311:230–232.
- Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH. 1997. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet* 16:16–17.
- 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. 2006. BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet Part A* 140A:205–211.
- Runte M, Varon R, Horn D, Horsthemke B, Buiting K. 2005. Exclusion of the C/D box snoRNA gene cluster *HBII-52* from a major role in Prader–Willi syndrome. *Hum Genet* 116:228–230.
- Saitoh S, Kubota T, Ohta T, Jinno Y, Niikawa N, Sugimoto T, Wagstaff J, Lalonde M. 1992. Familial Angelman syndrome caused by imprinted submicroscopic deletion encompassing *GABAA* receptor beta 3-subunit gene. *Lancet* 339:366–367.
- Sugimoto T, Yasuhara A, Ohta T, Nishida N, Saitoh S, Hamabe J, Niikawa N. 1992. Angelman syndrome in three siblings: Characteristic epileptic seizures and EEG abnormalities. *Epilepsia* 33:1078–1082.
- Sutcliffe JS, Jiang YH, Galijaard RJ, Matsuiura T, Fang P, Kubota T, Christian SL, Bressler J, Cattanach B, Ledbetter DH, Beaudet AL. 1997. The *E6-Ap* ubiquitin-protein ligase (*UBE3A*) gene is localized within a narrowed Angelman syndrome critical region. *Genome Res* 7:368–377.
- Wirth J, Back E, Huttenhofer A, Nothwang HG, Lich C, Gross S, Menzel C, Schinzel A, Kioschis P, Tommerup N, Ropers HH, Horsthemke B, Buiting K. 2001. A translocation breakpoint cluster disrupts the newly defined 3' end of the *SNURF-SNRPN* transcription unit on chromosome 15. *Hum Mol Genet* 10:201–210.



Recent progress in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders

Takeshi Mizuguchi · Naomichi Matsumoto

Received: 31 August 2006 / Accepted: 26 September 2006 / Published online: 24 October 2006
© The Japan Society of Human Genetics and Springer-Verlag 2006

Abstract Marfan syndrome (MFS, OMIM #154700) is a hereditary connective tissue disorder, clinically presenting with cardinal features of skeletal, ocular, and cardiovascular systems. In classical MFS, changes in connective tissue integrity can be explained by defects in fibrillin-1, a major component of extracellular microfibrils. However, some of the clinical manifestations of MFS cannot be explained by mechanical properties alone. Recent studies manipulating mouse *Fbn1* have provided new insights into the molecular pathogenesis of MFS. Dysregulation of transforming growth factor beta ($TGF\beta$) signaling in lung, mitral valve and aortic tissues has been implicated in mouse models of MFS. *TGFBR2* and *TGFBR1* mutations were identified in a subset of patients with MFS (MFS2, OMIM #154705) and other MFS-related disorders, including Loeys–Dietz syndrome (LDS, #OMIM 609192) and familial thoracic aortic aneurysms and dissections (TAAD2, #OMIM 608987). These data indicate that genetic heterogeneity exists in MFS and its related conditions and that regulation of $TGF\beta$ signaling plays a significant role in these disorders.

Keywords Marfan syndrome · *FBN1* · *TGFBR1* · *TGFBR2* · $TGF\beta$ signaling · Genetic heterogeneity · Loeys–Dietz syndrome · Familial thoracic aortic aneurysms and dissections

Introduction

Marfan syndrome (MFS, OMIM #154700) is a connective tissue disorder with autosomal dominant inheritance. MFS is clinically diagnosed according to the Ghent criteria, which describe pleiotropic manifestations affecting multiple organs (De Paepe et al. 1996). Typical MFS can affect the skeletal system (marfanoid habitus including arachnodactyly, dolichostenomelia, pectus deformity and scoliosis), the ocular system (ectopia lentis) and the cardiovascular system (aortic aneurysm/dissection and mitral regurgitation), as well as other systems, including lung, skin, integument, and dura mater. Significant phenotypic variability of MFS is commonly observed between affected members of different families and even among affected members within a single family. Neonatal MFS (nMFS) is the most severe type of MFS and is characterized by severe atrioventricular valve dysfunction, arachnodactyly, joint contracture, crumpled ears and pectus deformity. In addition to classic MFS, incomplete forms of MFS are seen, in which symptoms overlap with those of MFS but the phenotypes do not satisfy the Ghent criteria.

This review focuses on the recent advances in the genetics of MFS and its associated conditions, including Loeys–Dietz syndrome, non-syndromic thoracic aortic aneurysms and dissections, and Shprintzen–Goldberg craniosynostosis syndrome. Abnormal

T. Mizuguchi · N. Matsumoto (✉)
Department of Human Genetics,
Yokohama City University Graduate School of Medicine,
Fukuura 3-9, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan
e-mail: naomat@yokohama-cu.ac.jp

T. Mizuguchi · N. Matsumoto
Solution-Oriented Research for Science
and Technology (SORST), JST, Kawaguchi, Japan

transforming growth factor beta ($TGF\beta$) signaling will be discussed as the core pathogenesis of MFS.

Genetics of Marfan syndrome and its related disorders

FBNI mutation-related disorders

Marfan syndrome

Molecular diagnosis of MFS became possible after mutations had been identified in the *FBNI* gene (Dietz et al. 1991; Lee et al. 1991). *FBNI* is a 230 kb gene, containing 65 exons, which encodes the structural protein fibrillin-1 (Corson et al. 1993). More than 600 *FBNI* mutations are registered in the UMD-*FBNI* database for MFS and its associated disorders (<http://www.umd.be:2030/>) (Collod-Beroud et al. 2003). The mutation detection rate of *FBNI* in MFS varies among studies, ranging from 9% to 91% (Katzke et al. 2002; Loeys et al. 2004; Tynan et al. 1993). This variability could be explained, in part, by the different techniques used, but the most significant influencing factor is likely to be sample bias. The frequencies are quite different between patients fulfilling the Ghent criteria and those not fulfilling them (Biggin et al. 2004; Halliday et al. 2002; Loeys et al. 2001; Rommel et al. 2002, 2005; Tynan et al. 1993).

Extensive mutational analyses failed to show *FBNI* involvement in almost 10% or more of patients with MFS satisfying the Ghent criteria. Although one possible explanation could be due to so-called missing mutations in the promoter region or in other non-coding sequences, the existence of a second locus for MFS (*MFS2*) was hypothesized (Collod et al. 1994; Dietz et al. 1995; Gilchrist 1994). In 2004, patients with *MFS2* were shown to have mutations in the *TGFBR2* gene, which encodes the transmembrane receptor type II of $TGF\beta$ (Mizuguchi et al. 2004). *TGFBR2* mutations were later linked to other clinically overlapping syndromes, described below (Kosaki et al. 2006; Loeys et al. 2005; Pannu et al. 2005a).

Other fibrillinopathies

FBNI mutations were also found in incomplete forms of MFS as well as in several other MFS-related disorders such as nMFS, isolated ectopia lentis, Shprintzen–Goldberg craniosynostosis syndrome (SGS), familial thoracic aortic aneurysms and dissections (TAAD), and autosomal dominant Weill–Marchesani syndrome (Table 1) (Faivre et al. 2003; Francke et al. 1995; Kainulainen et al. 1994; Milewicz et al. 1996; Sood

et al. 1996). This resulted in the recognition of “fibrillinopathies” caused by *FBNI* aberrations (Charbonneau et al. 2004).

TGFBR mutation-related disorders

Marfan syndrome type 2

In 1993 Boileau et al. (1993) reported a large French family (MS1 family) with a Marfan-like phenotype that was not linked to the *FBNI* locus. The syndrome was subsequently designated Marfan syndrome type 2 (*MFS2*, OMIM #154705). In this review we are defining *MFS2* genetically (not clinically) as the classic MFS phenotype (based on the Ghent criteria) caused by mutation in the *TGFBR2* locus.

Marfan-like symptoms observed in this family consisted of severe cardiovascular findings, including sudden death of affected members at young age, probably due to a thoracic aortic dissection, and typical MFS skeletal features, but no significant ocular findings were seen. However, one affected family member (IV-83 from the large French family, MS1) was recently reported to suffer from ectopia lentis, which is clinically compatible with classic MFS according to the Ghent criteria but surprising in light of the absence of the condition in other family members (Mizuguchi et al. 2004). Clinical re-evaluation of this individual as well as other affected members is warranted.

Genetic analysis of the French family enabled a successful mapping of the second locus for MFS (*MFS2*) to 3p24.2-p25 (Collod et al. 1994). A Japanese boy with MFS was later shown to have de novo complex chromosomal rearrangements involving 3p24.1, which is close to the *MFS2* locus (Mizuguchi et al. 2004). Detailed genomic analysis revealed that the 3p24.1 breakpoint disrupted the *TGFBR2* gene. Subsequent *TGFBR2* sequence analysis in the MS1 family identified in all affected members a nucleotide substitution c.1524G > A (p.Q508Q) of *TGFBR2*, which is

Table 1 Marfan syndrome-related disorders and mutated genes

Disorder	Gene
Marfan syndrome	<i>FBNI</i> , <i>TGFBR1</i> , <i>TGFBR2</i>
Neonatal Marfan syndrome	<i>FBNI</i>
Familial thoracic aortic aneurysms and dissections	<i>FBNI</i> , <i>TGFBR1</i> , <i>TGFBR2</i>
Isolated ectopia lentis	<i>FBNI</i>
Shprintzen–Goldberg craniosynostosis syndrome	<i>FBNI</i> , <i>TGFBR2</i>
Autosomal dominant Weill–Marchesani syndrome	<i>FBNI</i>
Loyes–Dietz syndrome	<i>TGFBR1</i> , <i>TGFBR2</i>