

関する分子遺伝学的検討. 三浦清徳

胎児内胎児の発生メカニズムに関する検討. 三浦生子、三浦清徳、山中美智子、平原史樹、新川詔夫、増崎英明

耳垢タイプは母乳分泌量に相関する
のか? 嶋田貴子、三浦清徳、三浦生子、
吉田敦、谷川輝美、北島百合子、中山
大介、増崎英明

妊娠高血圧症候群の重症化を予測する
因子に関する検討. 吉田敦、北島百
合子、谷川輝美、三浦清徳、中山大介、
増崎英明

第 80 回日本超音波医学会 学術集 会、2007/5/18-20、鹿児島

前置胎盤における超音波検査と母体
血漿中 mRNA 定量化の有用性. 三浦
清徳、三浦生子、山崎健太郎、嶋田貴
子、吉田敦、中山大介、宮本正史、吉
村秀一郎、増崎雅子、増崎英明

表現型の異なる双胎例の超音波所見
とその発生機序に関する考察. 山崎健
太郎、三浦清徳、三浦生子、嶋田貴子、
吉田敦、宮本正史、増崎雅子、吉村秀
一郎、中山大介、増崎英明

出生前に認められた胎児卵巣嚢胞の
転帰に関する検討. 嶋田貴子、三浦清
徳、後藤英夫、大畠雅之、中山大介、
増崎英明

子宮筋腫合併妊娠の超音波所見と臨

床所見との関連について. 北島百合子、
三浦清徳、吉田敦、三浦生子、宮本正
史、増崎雅子、吉村秀一郎、中山大介、
増崎英明

癒着胎盤における子宮温存手術. 中山
大介、三浦清徳、藤本洋子、嶋田貴子、
梅崎靖、増崎英明

プロテイン S 欠乏症が疑われた妊娠
中の深部静脈血栓症の 2 症例. 谷川輝
美、中山大介、三浦清徳、吉田敦、増
崎雅子、宮本正史、北島道夫、嶋田貴
子、増崎英明

無心体双胎の出生前超音波所見につ
いて. 松本加奈子、吉田敦、三浦清徳、
中山大介、増崎英明

パネルディスカッション: 癒着胎盤の
術前診断は可能か? 吉田敦、谷川輝美、
三浦生子、宮本正史、増崎雅子、福田
久信、吉村秀一郎、三浦清徳、中山大
介、増崎英明

第 43 回日本周産期・新生児医学会、 平成 19 年 7 月 8 日(日)～10 日(火)、 東京

Duchenne 型筋ジストロフィーの出生
前診断における当科のストラテジー.
三浦清徳、三浦生子、山崎健太郎、嶋
田貴子、吉田敦、中山大介、増崎英明

母体血漿中に流入する胎盤由来
mRNA の同定とその臨床的意義. 三浦

生子、三浦清徳、山崎健太郎、嶋田貴子、平木宏一、中山大介、増崎英明

症例報告：前置胎盤および癒着胎盤合併の妊娠中期中絶。中山大介、吉村秀一郎、三浦清徳、吉田敦、増崎英明

癒着胎盤の術前診断に関する検討。吉田敦、三浦生子、三浦清徳、平木宏一、中山大介、増崎英明

当院における常位胎盤早期剥離についての検討。谷川輝美、中山大介、吉田敦、三浦清徳、三浦生子、嶋田貴子、増崎英明

TTTS を発症しなかった discordant twins の検討。山崎健太郎、三浦清徳、吉田敦、平木宏一、中山大介、増崎英明

第 52 回日本人類遺伝学会総会、2007/9/12-15、東京

シンポジウム：周産期遺伝学の現状と展望

周産期医療における胎児・胎盤由来 cell-free DNA/mRNA の臨床的意義とその応用。三浦清徳

母体血漿中で定量可能な胎盤由来 cell-free mRNA の同定に関する検討
長崎大学医学部産婦人科。三浦生子、三浦清徳、吉浦孝一郎、山崎健太郎、嶋田貴子、平木宏一、吉田敦、谷川輝美、北島百合子、増崎雅子、中山大介、新川詔夫、増崎英明

双胎間輸血症候群の発症予知に関する検討-cell-free placental mRNA の分子マーカーとしての可能性-。山崎健太郎、三浦清徳、三浦生子、吉浦孝一郎、嶋田貴子、中山大介、増崎雅子、新川詔夫、増崎英明

第 14 回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会、2007/10/21、久留米・久留米大学 筑水会館

出生前に胎児洞性徐脈と診断された一例。黒田葵、三浦清徳、山崎健太郎、藤本洋子、中山大介、増崎英明

Nuchal translucency の臨床的意義 -当科における検討から-。吉田至剛、三浦清徳、山崎健太郎、三浦生子、嶋田貴子、中山大介、増崎英明

Duchenne 型筋ジストロフィー保因者の出生前診断における工夫。山崎健太郎、三浦清徳、三浦生子、藤本洋子、池田光、中山大介、増崎英明

第 52 回日本生殖医学会総会、2007/10/25-26、秋田

Kallmann syndrome と Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR-1) の遺伝子構造に関する検討。三浦清徳、三浦生子、山崎健太郎、増崎英明

第 228 回日本産科婦人科学会長崎地方会・日本産婦人科医会長崎県支部会、2007/12/9

母体血漿中へ流入する胎盤特異的

mRNA の同定とその臨床的意義. 三浦清徳、山崎健太郎、三浦生子、増崎英明

H. 指摘財産権の出願・登録状況

三浦清徳

出願番号：特願2007-106595

出願日：平成19年4月13日

名称：「胎盤機能の網羅的かつ非侵襲的評価方法および検査用試薬」

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
平成19年度分担研究報告書

ヒトパピローマウイルス持続感染制御に関する
ゲノム医学からのアプローチ
研究項目：患者試料の遺伝子型タイピング

分担研究者：吉浦 孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授）
木住野 達也（長崎大学先端生命科学研究支援センター・遺
伝子実験施設・准教授）
近藤 新二（長崎大学先端生命科学研究支援センター・遺伝
子実験施設・助教）

研究要旨

本研究は、ヒト子宮頸癌の原因であるヒトパピローマウイルスの持続感染に関わる、宿主（ヒト）側の遺伝的要因を明らかにすることを目的としている。本研究分担グループは、収集された DNA 試料の遺伝子型タイピング技術を確立することが主たる任務である。SNP およびコピー数多型（CNV: copy number variation）とヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染の関連を明らかにするために、本年度は、タイピング技術の確立と改善、使用するシステムの決定、PCR による CNV の検出システムの確立を行った。本年度は、子宮頸癌患者試料およびコントロール試料の収集が充分でないために来年度以降の遺伝子型タイピングへ向けての基礎的データ収集となった。

A. 研究目的

研究の目標は、ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染リスクすなわち子宮頸癌の発症リスクを高めている宿主であるヒトの SNP または CNV を明らかにすることである。

本研究グループは、産科婦人科グループが収集してくる DNA 試料をタイピングすることが任務である。本研究グループ

では、本年度、Affymetrix 社の GeneChip システムを使用しての予備実験的なコントロール試料での遺伝子型タイピングおよび GeneChip によって同定された欠失・重複部位（CNV 部位と考えられる）を定量 PCR 法によって安価に高速に再確認する方法の開発に取り組んだ。

B. 研究方法

1. GeneChip システムの比較検討

本研究は、Affymetrix 社のシステムを使用して遺伝子タイピングを行うことが前提となっていたが、どの Chip を使用するかの決定を行う必要があり、Mapping 500K Array Set、Genome-Wide SNP Array 5.0、Genome-Wide SNP Array 6.0 の3種類の比較検討となった。

2. 定量 PCR によるコピー数確認法の検討

CNV 領域の関連解析は、Affymetrix 社のシステムだけの検証では確実なデータが得られないため、定量 PCR 法による確認作業が必要である。TaqMan 法による定量 PCR は、高価であり関連解析法に応用できないので、今回、安価に CNV を確認できる方法を考案した。また、Roche 社の定量 PCR システム LightCycler480 を用いて HRM (high resolution melting) 解析による SNP のジェノタイピングを行い大量の試料処理が可能か検討した。

C. 研究結果

1. GeneChip システムの比較検討

Affymetrix 社のシステムは、NspI または StyI によってゲノム DNA を消化した後に、末端にリンカー連結し、ユニバーサルプライマーを使用して増幅した産物をハイブリダイゼーションさせる方法をとっている。500K のシステムは、約 50 万個の SNP が搭載されているのみで SNP に特化している。Genome-Wide SNP Array 5.0 は SNP とともに約 40 万個のコピー数検討のプローブを搭載している。5.0 の

システムが遺伝子型タイピング用のプロトコールが、洗練されており本研究のタイピングには 5.0 のシステムが適している。Genome-Wide SNP Array 6.0 のシステムは、90 万の SNP と 90 万のコピー数検討のプローブを搭載しているが、SNP を使用した関連解析には、検出効率をほとんど向上させないことが知られている。

500K のシステムは、プローブ設定にゲノム上の偏りが存在し、CNV 領域の多型解析は、行えない。500K のシステムの利点は、DNA の分解に対して頑強であり、爪から抽出シタ DNA からでも遺伝子型決定・および LOH 解析が可能であった。癌研究などの大きな領域の LOH 解析、いわゆる単一遺伝子病の遺伝子部分の欠失・重複の同定については行えるのであろう。

2. 定量 PCR 法

CNV 領域の関連解析のためには、CNV を簡単に安価に確認できる方法が必要であり、定量 PCR 法を候補として検討した。TaqMan 法は高価であるが、multiplex PCR が可能となりうる。しかし、高価であるために関連解析には適さない。

サイバーグリーンによる定量が安価な方法と考えられたが、サイバーグリーンによる定量は、不安定で条件設定に時間を要する。我々は、サイバーグリーンと似た色素で、かつ通常使用の ExTaq による定量が可能なものを探索した。SYT09green とよばれる色素と ExTaq による定量が、LightCycler480 使用によって感度良く可能であった。本定量法によ

て、CNV 領域の関連解析の再検討が可能に設定できた。

LightCycler480 による HRM 解析によって、安価なジェノタイピングの可能性を検討した。PCR によって増幅するサイズを 100~150bp に設定すれば、3 種類の遺伝子型の区別がある程度可能であった。全ゲノムスキャンの後には候補領域を詳細にジェノタイピングする必要があるので、LightCycler480 による HRM 解析はその場合の、有効な手段となりうる。

D. 考察

本研究の大目標はヒトパピローマウイルス (HPV) の持続感染リスクすなわち子宮頸癌の発症リスクを高めている宿主であるヒトの SNP または CNV を明らかにすることであり、最終的には SNP のタイピングを行う必要がある。全ゲノムを対象とした第一段階のスクリーニングには、Affymetrix 社のシステムの中でも 5.0 または 6.0 の使用がやはり今回の関連解析に必要である。

定量 PCR 法は、今回 SYTO9 Green が安定して定量できることがわかり、CNV の関連解析または通常の発現定量に使用できた。Taq ポリメラーゼも ExTaq の使用が可能であった。本成果は、いわゆる単一遺伝子病の欠失・重複の検出にも利用できる。

LightCycler480 による HRM 解析によって、安価にジェノタイピングが可能であるので、第一段階のスクリーニング後の解析の手段は整えられた。

E. 結論

次年度にヒトパピローマウイルスの持続感染制御に関する SNP、CNV 検索の準備ができた。産科婦人科グループの試料収集の進行とともに遺伝子型タイピングを行っていく。次年度は、本分担研究グループが全ゲノムスキャンを完成させることに全力を尽くす。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki-Ishizaki Y, Kayashima T, Mapendano CK, 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.
2. 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(6): 546-552, 2007.
3. Miura K, Yoshiura K, Miura S, Shimada T, Yamasaki K, Yoshida A, Nakayama D, Shibata Y, Niikawa N, Masuzaki H.

- A strong association between human earwax-type and apocrine colostrum secretion from the mammary gland. *Hum Genet.* 121 (5): 631-633, 2007.
4. 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(4): 334-341, 2007.
 5. Miura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshiura K, Shimada T, Nakayama D, Niikawa N, Masuzaki H. Circulating cell-free placental mRNA in the maternal plasma as a predictive marker for twin-twin transfusion syndrome. *Clin Chem.* 53(6): 1167-1168, 2007.
 6. Sato D, Liang D, Wu L, Pan Q, Xia K, Dai H, Wang H, Nishimura G, Yoshiura K, Xia J, Niikawa N. A syndactyly type IV locus maps to 7q36. *J Hum Genet.* 52(6): 561-564, 2007.
 7. Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obanayama K, Kim G, Liew EL, Sakaeda T, Yoshiura K, Niikawa N, Sakurai M, Ishikawa T. Quantitative structure--activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). *Biochemistry.* 46(26): 7678-7693, 2007.
 8. Dateki S, Kondoh T, Nishimura G, Motomura K, Yoshiura K, Kinoshita A, Kuniba H, Koga Y, Moriuchi H. A Japanese patient with a mild Lenz-Majewski syndrome. *J Hum Genet.* 52(8): 686-689, 2007.
 9. Shiels A, Bennett TM, Knopf HL, Yamada K, Yoshiura K, Niikawa N, Shim S, Hanson PI. CHMP4B, a novel gene for autosomal dominant cataracts linked to chromosome 20q. *Am J Hum Genet.* 81(3): 596-606, 2007.
 10. Kaname T, Yanagi K, Chinen Y, Makita Y, Okamoto N, Maehara H, Owan I, Kanaya F, Kubota Y, Oike Y, Yamamoto T, Kurosawa K, Fukushima Y, Bohring A, Opitz JM, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K. Mutations in CD96, a member of the immunoglobulin superfamily, cause a form of the C (Opitz trigonocephaly) syndrome. *Am J Hum Genet.* 81(4): 835-841, 2007.
 11. Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K. Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. *J Periodontal Res.* 42(6): 541-545, 2007.

2. 学会発表

第 52 回日本人類遺伝学会 2007 年 9 月
12 日 (水) ~ 15 日 (土)、東京

教育講演 4 耳垢遺伝子を通して考える
人類遺伝学研究. 吉浦孝一郎

O-090: 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.
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

O-098: 双胎間輸血症候群の発症予知に
関する検討—cell-free placental
mRNA の分子マーカーとしての可能
性. 山崎健太郎、三浦清徳、三浦生子、
吉浦孝一郎、嶋田貴子、中山大介、増
崎雅子、新川詔夫、増崎英明

O-099: 母胎血漿中で定量可能な胎盤由
来 cell-free mRNA の同定に関する検
討. 三浦生子、三浦清徳、吉浦孝一郎、
山崎健太郎、嶋田貴子、平木宏一、吉
田敦、谷川輝美、北島百合子、増崎雅
子、中山大介、新川詔夫、増崎英明

O-129: 爪から抽出した genomic DNA を
用いた多型解析:血液サンプルとの比
較. 中島光子、新川詔夫、吉浦孝一郎

O-145: 古人骨における耳垢遺伝子解析
の試み. 佐伯和信、吉浦孝一郎、新川
詔夫、岡本圭史、分部哲秋

O-146: 全国スーパーサイエンスハイ
スクール (SSH) の共同による耳垢型対
立遺伝子の全国地図作製の研究. 山田
賢輔、北島玲那、田中清、長嶋哲也、
古賀巖、吉浦孝一郎、新川詔夫

O-166: 合指症 IV 型の遺伝子座マッピ
ング. 佐藤大介、Liang Desheng、Wu
Lingqian、Pan Qian、Xia Kun、Dai

Heping、Wang Hua、西村玄、吉浦孝
一郎、Xia Jiahui、新川詔夫

O-171: 歌舞伎メ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. 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、福島義光、成富研二、新川詔夫

O-179: 未培養羊水の全ゲノム増幅によ
る出生前診断の試み. 佐々木健作、霜
川修、川良洋城、国場英雄、近藤達郎、
夫律子、本多啓輔、松本直通、吉浦孝
一郎、新川詔夫、原田直樹

O-184: 母由来重複に起因する 11p15 部
分トリソミーの 1 例. 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

P-006: C 症候群を呈し、均衡型転座
t(3;18)(q13.13;q12.1)をもつ患児の染
色体切断点解析. 要匡、柳久美子、知
念安紹、前原博樹、吉浦孝一郎、新川
詔夫、成富研二

P-007: C 症候群の原因遺伝子. 柳久美子、
要匡、知念安紹、蒔田芳男、岡本伸彦、
前原博樹、久保田義頭、尾池雄一、山
本俊至、黒澤健司、福島義光、Axel
Bohring、John Opitz M、吉浦孝一郎、
新川詔夫、成富研二

P-040: VWS および PPS モデルとしての
interferon regulatory factor 6 (IRF6)遺
伝子改変マウス. 木下晃、Matine
Dunnwald、Kurt Trout、近藤新二、吉
浦孝一郎、新川詔夫、Baoli Yang、Brian
Schutte

P-115: ABCC11の耳垢型決定多型による機能解析. 三輪晋智、吉浦孝一郎、足立康久、石川智久、新川詔夫

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会

2007年12月11日(火)～15日(土)、パシフィコ横浜、ヨコハマグランドインターコンチネンタルホテル

1P-0123: 新規ヒトABCトランスポーターABCC11の発現系の構築. 豊田優、櫻井亜季、吉浦孝一郎、三輪晋智、新川詔夫、石川智久

3P-1071: 染色体転座切断点解析によるOpitz三角頭蓋症候群の原因同定と病態解析. 要 匡、柳 久美子、知念安紹、蒔田芳男、前原博樹、岡本伸彦、山本俊至、黒澤健司、福嶋義光、J.M. Opitz、吉浦孝一郎、新川詔夫、成富研二

3W20-1: 耳垢型決定因子としてのABCトランスポーター遺伝子(ABCC11). 新川詔夫、吉浦孝一郎

The international symposium in the 7th Annual Meeting of the East Asian union of Human Genetic Society, Dec 7-8, Changsha, China, 2007

Identification of the earwax gene, *ABCC11*, and its function. Yoshiura K.

The American Society of Human Genetics, 57th Annual Meeting San Diego, California, October 23-27, 2007

536/T: Origin and mechanisms of formation of Fwtus-infetu: Two cases with genotype and methylation analysis. Miura S, Miura K, Yoshiura K, Hirahara F, Yamanaka M, Niikawa N, Masuzaki H.

540/T: Deficiency of a member of the immunoglobulin superfamily causes a form of C (Opitz trigonocephaly) syndrome. Kaname T, Yanagi K, Chinen Y, Makita Y, Okamoto N, Maehara H, Owan I, Kanaya F, Oike Y, Yamamoto T, Kurosawa K, Fukushima Y, Opitz JM, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K.

1272/F: Novel CHMP4B mutations underlie autosomal dominant cataracts linked to chromosome 20q. Shiels A, Bennett TM, Knopf HLS, Yamada K, Yoshiura K, Niikawa N, Shim S, Hanson PI.

2419/T: Circulation cell-free placental mRNA in the maternal plasma as a predictive marker for twin-twin transfusion syndrome. Miura K, Yoshiura K, Miura S, Nakayama D, Niikawa N, Masuzaki H.

2524/W: Search for genomic alterations in monozygotic twins discordant for cleft lip and palate. Kimani JW, Yoshiura K, Murray JC.

H. 指摘財産権の出願・登録状況

特許出願

整理番号：P07-0229

提出日：平成19年12月14日

国際出願番号：PCT/JP2006/312673

名称：耳垢型又は腋下臭症の評価方法

発明者

住所：長崎県長崎市文教町1番14

号 国立大学法人長崎大学内

氏名：新川 詔夫

発明者

住所：長崎県長崎市文教町1番14

号 国立大学法人長崎大学内

氏名：吉浦 孝一郎

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

本年の書籍刊行物はありません

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
Yamasaki-Ishizaki Y, Kayashima T, Mapendano CK, 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
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(6)	546-552	2007

Miura K, Yoshiura K, Miura S, Shimada T, Yamasaki K, Yoshida A, Nakayama D, Shibata Y, Niikawa N, Masuzaki H.	A strong association between human earwax-type and apocrine colostrum secretion from the mammary gland.	Hum Genet	121(5)	631-633	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(4):	334-341	2007
Miura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshiura K, Shimada T, Nakayama D, Niikawa N, Masuzaki H.	Circulating cell-free placental mRNA in the maternal plasma as a predictive marker for twin-twin transfusion syndrome.	Clin Chem	53(6)	1167-1168	2007
Sato D, Liang D, Wu L, Pan Q, Xia K, Dai H, Wang H, Nishimura G, Yoshiura K, Xia J, Niikawa N.	A syndactyly type IV locus maps to 7q36.	J Hum Genet	52(6)	561-564	2007

Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obanayama K, Kim G, Liew EL, Sakaeda T, Yoshiura K, Niikawa N, Sakurai M, Ishikawa T.	Quantitative structure--activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1).	Biochemistry	46(26):	7678-7693	2007
Dateki S, Kondoh T, Nishimura G, Motomura K, Yoshiura K, Kinoshita A, Kuniba H, Koga Y, Moriuchi H.	A Japanese patient with a mild Lenz-Majewski syndrome.	J Hum Genet	52(8):	686-689	2007
Shiels A, Bennett TM, Knopf HL, Yamada K, Yoshiura K, Niikawa N, Shim S, Hanson PI.	CHMP4B, a novel gene for autosomal dominant cataracts linked to chromosome 20q.	Am J Hum	81(3):	596-606	2007
Kaname T, Yanagi K, Chinen Y, Makita Y, Okamoto N, Maehara H, Owan I, Kanaya F, Kubota Y, Oike Y, Yamamoto T, Kurosawa K, Fukushima Y, Bohring A, Opitz JM, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K.	Mutations in CD96, a member of the immunoglobulin superfamily, cause a form of the C (Opitz trigonocephaly) syndrome.	Am J Hum Genet	81(4)	835-841	2007

Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K.	Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population.	J Periodontal Res.	42(6)	541-545	2007
Nakayama D, Masuzaki H, Miura K, Hiraki K, Yoshimura S, Ishimaru T.	Effect of placenta previa on blood loss in second-trimester abortion by labor induction using gemeprost.	Contraception	75	238-240	2007
Shimada T, Miyashita M, Miura S, Nakayama D, Miura K, Fukuda M, Masuzaki H.	Genital human papilloma virus infection in mentally-institutionalized virgins.	Gynecologic Oncology	106	488-489	2007
Tanigawa T, Nakayama D, Miura K, Miura S, Shimada T, Masuzaki H.	Prenatal ultrasonographic findings may be useful in predicting the prognosis of trisomy 18.	Prenat Diagn	27	1039-1044	2007
吉田至剛、三浦清徳、中山大介、増崎英明	Nuchal translucency の臨床的意義および問題点とその対応	産婦人科の実際	56 巻第 5 号	781-785	2007
三浦清徳、増崎英明	画像で見る産科学/多胎妊娠における膜性診断の役割	ペリネイタルケア	26 巻第 9 号	862-865	2007
三浦清徳	双胎形成のメカニズムとその異常に関する分子遺伝学的検討	日本産科婦人科学会雑誌	59 巻第 10 号	1814-1825	2007
三浦清徳、増崎英明、石丸忠之	母体血中に流入する胎盤由来 cell-free DNA/mRNA の臨床応用	臨床検査	51 巻 13 号	1691-1697	2007

研究成果の刊行物・別冊

Congenital Arhinia: Molecular-Genetic Analysis of Five Patients

**Daisuke Sato,^{1,2,3} Osamu Shimokawa,^{1,3,4} Naoki Harada,^{3,4} Oystein E. Olsen,⁵ Jia-Woei Hou,⁶
Wolfgang Muhlbauer,⁷ Ellen Blinkenberg,⁸ Nobuhiko Okamoto,⁹ Akira Kinoshita,¹
Naomichi Matsumoto,^{3,10} Shinji Kondo,^{3,11} Tatsuya Kishino,^{3,11} Nobutomo Miwa,^{1,3}
Tadashi Ariga,² Norio Niikawa,^{1,3} and Koh-ichiro Yoshiura^{1,3*}**

¹Department of Human Genetics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

²Department of Pediatrics, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan

³Solution Oriented Research of Science and Technology (SORST), Japan Science and Technology Agency (JST), Kawaguchi, Japan

⁴Kyushu Medical Science, Nagasaki, Japan

⁵Department of Radiology, Great Ormond Street Hospital for Children, London, UK

⁶Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Chang Gung Children's Hospital, Taoyuan, Taiwan

⁷Plastic Surgery Arabella, Munich, Germany

⁸Center for Medical Genetics and Molecular Medicine, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

⁹Department of Planning and Research, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Izumi, Japan

¹⁰Department of Human Genetics, Yokohama City Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan

¹¹Division of Functional Genomics, Center for Frontier Life Sciences, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Received 30 May 2006; Accepted 30 October 2006

Congenital arhinia, complete absence of the nose, is an extremely rare anomaly with unknown cause. To our knowledge, a total of 36 cases have been reported, but there has been no molecular-genetic study on this anomaly. We encountered a sporadic case of congenital arhinia associated with a de novo chromosomal translocation, t(3;12)(q13.2;p11.2). This led us to analyze the patient by BAC-based FISH for translocation breakpoints and whole-genome array CGH for other possible deletions/duplications in the genome. We found in this patient an approximately 19 Mb deletion spanning from 3q11.2 to 3q13.31 but no disruption of any gene(s) at the other breakpoint, 12p11.2. As the deleted segment at 3q was a strong candidate region containing the putative arhinia gene, we also performed the

array CGH in four other arhinia patients with normal karyotypes, as well as mutation analysis of two genes, *COL3A1* and *CPOX*, selected among hundreds of genes located to the deleted region, because they are expressed during early stages of human craniofacial development. However, in the four patients, there were no copy number aberrations in the region examined or no mutations in the two genes. Although our study failed to identify the putative arhinia gene, the data may become a clue to unravel the underlying mechanism of arhinia. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: arhinia; translocation breakpoint; deletion; 3q; 12p; FISH; array CGH

How to cite this article: 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-i. 2007. Congenital arhinia: Molecular-genetic analysis of five patients. *Am J Med Genet Part A* 143A:546–552.

INTRODUCTION

Congenital arhinia, complete absence of the nose, is an extremely rare abnormality with unknown cause. Congenital arhinia is often associated with microphthalmia, choanal atresia, and/or cleft palate [Graham and Lee, 2006]. To the best of our knowledge, only 36 cases of arhinia have been reported [Ruprecht and Majewski, 1978; Kaminker et al., 1985; Cohen and Goitein, 1986; Sakai et al., 1989; Galetti et al., 1994; Onizuka et al., 1995; Thiele et al., 1996;

Grant sponsor: Grants-in-Aid for Scientific Research; Grant number: 13854024; Grant sponsor: Applied Genomics; Grant numbers: 17019055, 17590288; Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan; Grant sponsor: SORST (Japan Science and Technology Agency, JST).

*Correspondence to: Koh-ichiro Yoshiura, MD, PhD, Department of Human Genetics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Sakamoto 1-12-4, Nagasaki 852-8523, Japan.

E-mail: kyoshi@net.nagasaki-u.ac.jp

Published online 15 February 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)

DOI 10.1002/ajmg.a.31613

Choi et al., 1998; Cusick et al., 2000; Olsen et al., 2001; McGlone, 2003; Hou, 2004; Jules et al., 2004; Mathur et al., 2005; Shino et al., 2005; Graham and Lee, 2006]. Most cases were sporadic, but two familial cases were also reported [Ruprecht and Majewski, 1978; Thiele et al., 1996]. As two sisters with arhinia and microphthalmia were born to non-consanguineous parents, an autosomal recessive mode of inheritance has been suggested in this family [Ruprecht and Majewski, 1978]. In the other family, an aunt and a niece were affected with arhinia, suggesting a dominant mode of inheritance with reduced penetrance [Thiele et al., 1996]. Of the 17 patients who were karyotyped, 14 had a normal karyotype, whereas three cases had 46,XX/47,XX,+9 [Kaminker et al., 1985], inv(9) [Cohen and Goitein, 1986], or t(3;12)(q13.2;p11.2) [Hou, 2004]. These findings may indicate that genetic factors play a role in the occurrence of arhinia. Several genes have been proposed as candidates for arhinia, such as *PAX6* and its downstream targets, those of the FGF signaling, *MSX1*, *NRP2*, *GSC*, *ALX3*, and *ALX4* [Hou, 2004; Graham and Lee, 2006]. However, no genetic analysis has yet been undertaken. A de novo balanced reciprocal chromosomal translocation with a congenital disorder provides a good opportunity to discover the gene causing the disease [Mizuguchi et al., 2004].

We previously encountered a patient with congenital arhinia, small eyes and other abnormalities who was cytogenetically diagnosed to have a

translocation, t(3;12)(q13.2;p11.2) [Hou, 2004]. Under a hypothesis that a gene responsible for arhinia is disrupted at either of the breakpoints of the translocation, we performed breakpoint analysis of the patient as well as genome analyses of four other patients with arhinia.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

This study was approved by the Committee for Ethical Issues on Human Genome and Gene Analysis, Nagasaki University. Five patients with arhinia were collected and analyzed as a collaboration study among six medical institutions (Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan; Great Ormond Street Hospital for Children, London, UK; Chang Gung Children's Hospital, Taoyuan, Taiwan; Plastic Surgery Arabella, Munich, Germany; Center for Medical Genetics and Molecular Medicine, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway; and Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Osaka, Japan). Clinical findings of these five patients are shown in Table I. One patient (Patient A) had a de novo translocation, t(3;12)(q13.2;p11.2) and the other four patients (Patients B–E) were karyotypically normal.

We first focused our interest on Patient A and carried out a breakpoint analysis to try to isolate the

TABLE I. Clinical Findings of Five Patients With Arhinia

Clinical findings	Patients [References]				
	A [Hou, 2004]	B [Okamoto, unpublished]	C [Muhlbauer et al., 1993]	D [Olsen et al., 2001]	E [Sakai et al., 1989]
Sex	F	M	F	F	M
Karyotype	46,XX,t(3;12) (q13.2;p11.2)	46,XY	46,XX	46,XX	46,XY
High arched palate	+	+	+	+	+
Hypertelorism	+	+	+	+	+ (pseudo)
Microphthalmia	Bilateral	Left	NA	NA	–
Coloboma iris	+	Left	NA	Bilateral	–
Published					
Development	NA	N	N	N	N
Brain imaging	N	N	N	N	N
Olfactory bulbs	–	–	NA	–	NA
Family history	–	–	–	–	–
Pregnancy	UN	UN	UN	PH	NA
Birth weight (g)	2,800	2,368	2,640	3,070	3,346
Paranasal sinuses	UD	+	–	–	NA
Nasolacrimal ducts	NA	–	–	–	–
Complications	Scoliosis, epilepsy	Hypogonadism, autism	–	–	–
Current status	Living DD GR	Living	Living ND GR NNB	Unknown	Living

F, female; M, male; +, observed; –, not observed; NA, not assessed; N, normal; UN, uneventful; PH, polyhydramnios; UD, underdeveloped; DD, delayed development; ND, normal development; GR, growth retardation; NNB, no nasal breathing.



FIG. 1. Patient B at age 6 days, showing the absence of the nose.

putative arhinia gene. Detailed clinical features of Patients A, C, D, and E were reported previously [Sakai et al., 1989; Muhlbauer et al., 1993; Olsen et al., 2001; Hou, 2004, respectively]. Patient B was a Japanese boy whose clinical manifestations have been unpublished. He was born to healthy and non-consanguineous parents by cesarean at 39 weeks of gestation with a birth weight of 2,368 g, length 48 cm, and OFC of 33.7 cm (Fig. 1). Because of his congenital arhinia, a nasal airway was created by a surgical operation at age 17 days to facilitate oral feeding. Other clinical manifestations included bilateral microphthalmia, coloboma of the iris, mid-face hypoplasia, high arched palate, hypertelorism,

and absent nasolacrimal ducts. He had neither cleft palate nor low set ears. At age 4 years, his weight was 12.7 kg, height 94.7 cm, and OFC 50 cm, and had paranasal sinuses, normal hearing acuity, autistic behavior, and hypogonadotropic hypogonadism. He is currently able to eat foods through his mouth by himself. His psychomotor developmental quotient was estimated at 65.

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Analysis

Metaphase chromosomes were prepared from an immortalized lymphoblastoid cell line according to the standard protocol [Shimokawa et al., 2005]. The RPCI-11 human BAC clones mapped around the breakpoints, 3q13.2 and 12p11.2, were selected and used for FISH analyses. Mapping information was retrieved from the UCSC genome browser, 2003 July version (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). BAC-clone DNA was extracted using an automatic DNA extraction system (Kurabo, Osaka, Japan) and labeled with SpectrumGreen-11-dUTP or SpectrumOrange-11-dUTP (Vysis, Downers Grove, IL) by nick translation. Fluorescent probes were hybridized to metaphase chromosomes for 16–72 hr, and then chromosome slides were washed and counterstained with DAPI using standard protocols [Shimokawa et al., 2005]. Fluorescence signals were observed under Zeiss Axioskop microscope equipped with a quad filter set with single-band excitation filters (84000, Chroma Technology Corporation, Brattleboro, VT). Images were captured by cooled CCD camera (TEA/CCD-1317-G1, Princeton Instruments, Trenton, NJ) and merged with IPLab/MA.

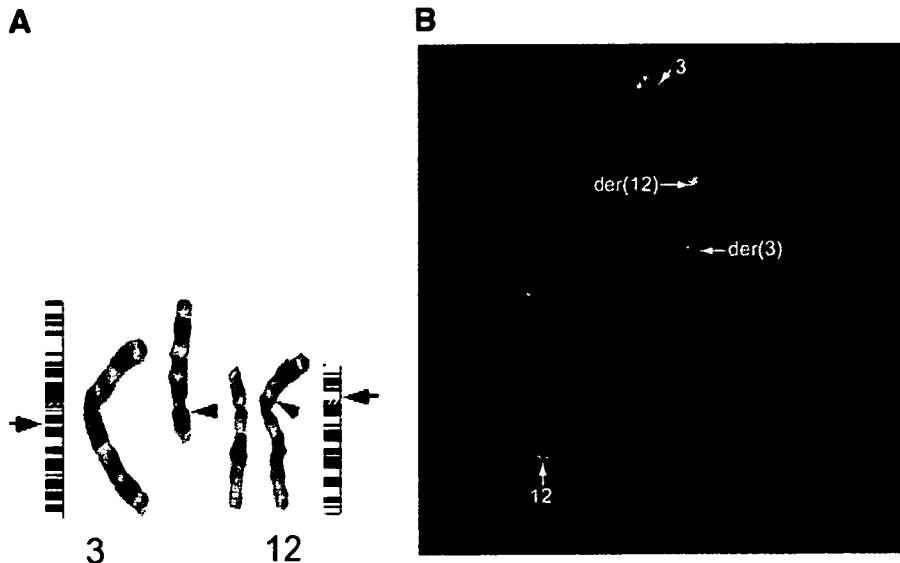


FIG. 2. A: Partial karyotype of Patient A. Arrows and arrowheads show the breakpoints. B: FISH analysis in Patient A. Green signals for a BAC clone, RP11-55L17, that spans the 12p breakpoint appear on der(3), der(12) and normal chromosome 12, while red signals for a chromosome 3-derived clone, RP11-803P6, are seen only on normal chromosome 3. The findings indicate a deletion only in der(3).

Array Comparative Genomic Hybridization (CGH)

DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes by conventional method [Sambrook and Russell, 2001]. To detect chromosomal aberrations, we performed homemade whole-genome BAC-based array CGH (array CGH) using genomic DNA of all five patients according to the method described previously [Miyake et al., 2006]. The microarray contains 2,173 BAC and PAC clones which span the whole genome at each of 1.5 Mb average.

Mutation Analysis

A screening for mutations of *COL8A1* and *CPOX* was performed in the four arhinia patients with normal karyotypes. All exon sequences and their flanking intron sequences of the two genes were

amplified by PCR for direct sequencing. PCR conditions were set at 40 cycles of 94°C for 30 sec, 62°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec in a 15 µl mixture containing 1× PCR buffer with 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each of dNTP, 1 µM each primer and 0.4 Units Taq polymerase (TaKaRa, Otsu, Japan). PCR products were treated with ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and both strands were sequenced with BigDye Terminator Sequencing kit version 3.1 according to the supplied protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reaction mixture was purified using Sephadex G-50 superfine (Amersham Biosciences) and analyzed on the ABI Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems) with the Sequence Analysis software (Applied Biosystems) and aligned with the Auto Assembler version 2.1.1 software (Applied Biosystems) to find DNA alterations.

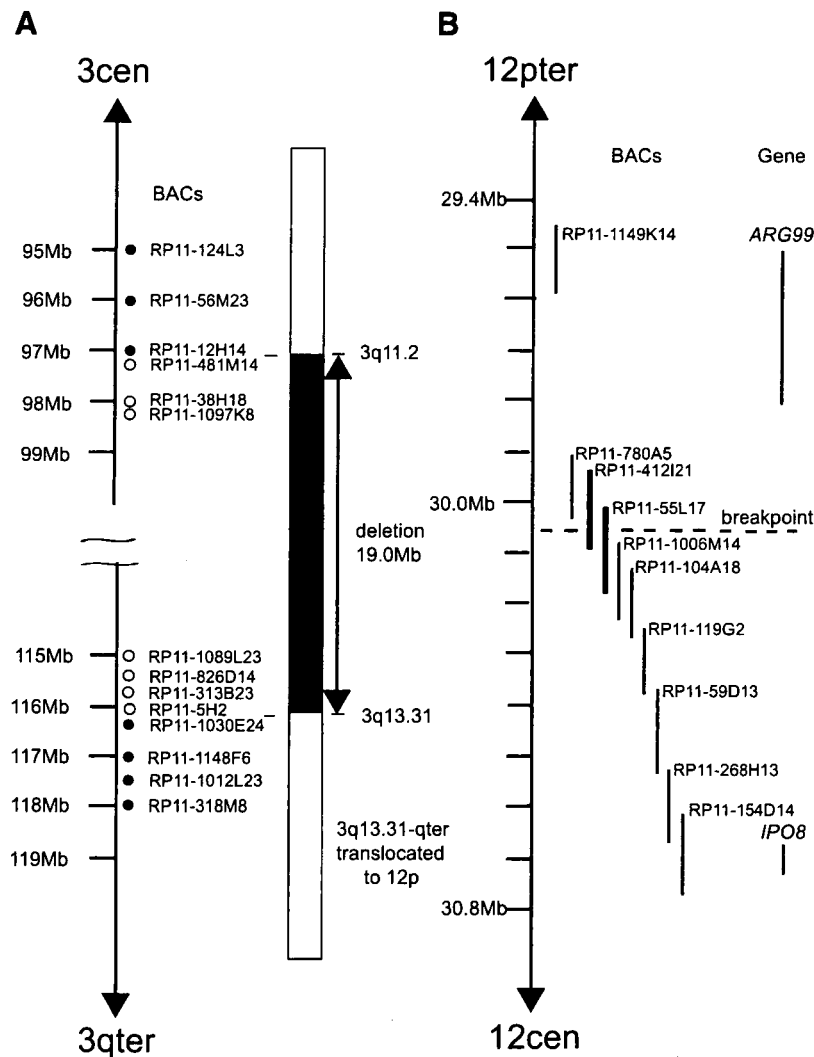


FIG. 3. **A:** Physical map covering the 3q11.2–3q13.31 deleted region of Patient A. Solid and open circles indicate the presence and absence of clones in Patient A, respectively. **B:** Physical map of the 12p11 breakpoint region. Thick lines indicate BAC clones covering the breakpoint. Genes *ARG99* and *IPO8* are located close to the breakpoint.