

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20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21(2009)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) 図1. 大田原症候群で同定されたSTXBP1変異、図2. 同定されたミスセンス変異はタンパク質構造を不安定化する、研究計画と進行状況

### II. 分担研究報告

高密度マイクロアレーによるCNVデータベースの作成 ----- 9

原田直樹

(資料) 図1. 250K Nspアレーで検出したCNV、図2. SNP6.0アレーで検出したCNV

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 15

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 19

平成20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最終年度である。昨年度完成した完全ゲノムタイリングアレーの解析条件の至適条件も設定を終え、症例ゲノム解析を開始した。新たに現在入手可能な最高密度のオリゴDNAアレーとしてAffymetrix社GeneChip 6.0も導入した。BACタイリングアレーと高密度オリゴDNAアレーの比較では、ほぼ同等のゲノムコピー数異常検出が可能であることを確認した。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している。このうちアレー解析を契機に遺伝子単離に成功した大田原症候群(新生児期に発症し難治性てんかんと精神遅滞を主徴とする)の成果を発表した(Nature Genet, 2008)。さらに髄鞘化遅延を伴うWest症候群に於いて新規責任遺伝子の単離に成功し、現在遺伝子変異の機能的影響について解析を行っている。また日本人におけるCNVカタログも作成した。

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。本研究の最終年度にあたり、完成したゲノム完全タイリングアレーと商業ベースのオリゴDNAアレーを組み合わせて集積している種々の疾患ゲノム解析を進めた。

B. 研究方法

①完全ゲノムタイリングアレーを用いた解析条件の検討

33,169個全てのBAC DNAをインクジェット法を用いて1枚のアレースライド上に配置した完全ゲノムタイリングアレーが完成し

これを用いて感度の良いコピー数検出のための設定条件の検討を行い至適条件を決定する。

②高密度オリゴDNAアレーの導入

Affymetrix社のGeneChip 6.0を新たに導入し疾患ゲノムを解析し、BACアレー解析結果との比較検討を行う。

③症例の集積とゲノム解析

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自閉症・統合失調症・パニック障害の症例を集積を継続する。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。さらにゲノムDNAはタイリングアレーあるいは高密度オリゴDNAアレーを用いて解析を行う。コピー数異常部位は定量PCRあるいはFISH解析にて検証する。

④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を用いた解析条件の検討

CHORIから供与された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クローンを搭載した完全ゲノムタイリングアレーを用いたゲノムコピー数異常解析に至適な設定条件を各種検討し最も異常検出の成績が良く安定したプロトコールを作成した。

#### ②高密度オリゴDNAアレーの導入

導入したAffymetrix GeneChip 6.0は、全ゲノムに対して185万プローブが配置され、GeneChip 250Kで回避されていたCNV領域も解析対象領域となり種々の点で改善が期待された。実際、比較的偏り無くプローブ配置がなされ高密度の利点は明らかであった。しかし異常部位の検出数が解析プログラムのアルゴリズムで大きく変化し、ゲノムコピー数異常部位のサイズを50 Kbや100 Kbのウィンドウで検出することが最も実的であった。即ちBACタイリングアレーの検出限界である50 Kbと基本的に差はなく、両プラットフォームは解析能力に大きな遜色がないことが明らかになった。

#### ③症例の集積と解析

大田原症候群を含む年齢依存性てんかんの症例が140例程度新たに集積し、この疾患群の研究リソースとしては特筆すべき数となった。歌舞伎メーキャップ症候群・Coffin-Siris症候群・Aicardi症候群、もやもや病、若年性関節性リュウマチ等では、既に複数の疾患で20~40例程度の集積を認め順次解析が進行している。自閉症40例、統合失調症60例、パニック障害130例、特発性精神遅滞150例も集積した。これらの症例群をBACアレーあるいはオリゴDNAアレー、もしくは両プラットフォームを用いて順次解析した。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9q33.3-q34.11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に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Nature Geneticsに発表した(2008)。同定された変異は全てミスセンス変異で、コードするタンパク質の3次元構造上疎水性中心に位置したアミノ酸が置換されることから、タンパク構造の不安定性が示唆された(図1)。生化学的な検討から変異アミノ酸を有するタンパク質は野生型より低い温度でタンパク構造が壊れることが示唆された(図2)。また新規診断法は、本年度に外国特許出願(PTC出願)を行った。さらに髄鞘化遅延を伴うWest症候群に於いて新規責任遺伝子の単離に成功し、現在遺伝子変異の機能的意義について解析を行っている(未発表のため詳述は控える)。これらの疾患ゲノム解析中に病的でない判断した種々のコピー数多型(CNV)を同定し、これをカタログ化した(分担研究者・原田の報告書を参照)。

### D. 考察

昨年度に完成した完全タイリングアレーに最適な実験解析プロトコールを設定し、症例ゲノム解析の検討に用いた。さらに新たに高密度オリゴDNAアレーも併用して、両プラットフォームを比較検討し、両者とも遜色ないデータを算出できることを確認した。アレー解析法で同定した疾患特異的ゲノム異常から、既に2疾患で責任遺伝子単離に成功し本手法を用いた疾患遺伝子単離法の有用性を実証している。今後さらに症例ゲノム解析を進めて新規の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、次年度に完全ゲノムタイリングアレーを完成させ、最終年度までに2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一定の成果を得たと考えている。

## 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 D, Kawara H, Shimokawa O, Harada N, Tonoki H, Takahashi N, Imai Y, Kimura H, Matsumoto N, Ariga T, Niikawa N, Yoshiura K. A girl with Down syndrome and partial trisomy for 21pter-q22.13: A clue to narrow the Down syndrome critical region. *Am J Med Genet*: 146A (1): 124-127, 2008.

Yamada-Okabe T, Matsumoto N. Decreased serum dependence in the growth of NIH3T3 cells from the overexpression of human nuclear receptor-binding SET-domain-containing protein (NSD1) or fission yeast *su(var)3-9*, enhancer-of-zeste, trithorax 2 (SET2). *Cell Biochemistry and Function* 26:146-150, 2008.

Hiraki Y, Okamoto N, Ida T, Nakata Y, Kamada M, Kanemura Y, Yamasaki M, Fujita H, Nishimura G, Kato M, Harada N, Matsumoto N. Two New Cases of Pure 1q Terminal Deletion Presenting With Brain

Malformations. *Am J Med Genet A* 146A: 1241-1247, 2008

Páez M, Yamamoto T, Hayashi K-i, Yasuda T, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K, Furutani Y, Asakawa S, Shimizu N, Matsuoka R. Two patients with atypical interstitial deletions of 8p23.1: Mapping of phenotypical traits. *Am J Med Genet A* 146A: 1158-1165, 2008

Kosho T, Sakazume S, Kawame H, Wakui K, Wada T, Okoshi Y, Mikawa M, Hasegawa T, Matsuura N, Niikawa N, Matsumoto N, Fukushima Y. De novo balanced translocation between 7q31 and 10p14 in a girl with central precocious puberty, moderate mental retardation, and severe speech impairment. *Clin Dysmorphol* 17(1):31-34, 2008.

Hiraki Y, Moriuchi M, Okamoto N, Ishikawa N, Sugimoto Y, Eguchi K, Sakai H, Saito H, Mizuguchi T, Harada N, Matsumoto N. Craniosynostosis in a patient with a *de novo* 15q15-q22 deletion. *Am J Med Genet* 146A(11): 1462-1465, 2008

Mochizuki J, Saito H, Mizuguchi M, Visser R, Miyake N, Unno N, Matsumoto N. Alu-related 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. *Clin Genet* 74:384-391, 2008.

Saito H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Urano K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A, Okada I, Yoshimura Y, Hirai S-i, Kumada T, Hayasaka K, Fukuda A, Ogata K, Matsumoto N. *De novo* mutations in the gene encoding STXBPI (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 40(6): 782-788, 2008

Ozeki Y, Mizuguchi T, Hirabayashi N, Ogawa M, Ohmura N, Moriuchi M, Harada N, Matsumoto N, Kunugi H. A Case of Schizophrenia with Chromosomal Microdeletion of 17p11.2 Containing a

- Myelin-Related Gene PMP22. The Open Psychiatry Journal 2:1-4, 2008
- Kuniba H, Tsuda M, Nakashima M, Miura S, Miyake N, Kondoh T, Matsumoto T, Moriuchi H, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Naritomi K, Matsumoto N, Kinoshita A, Yoshiura K-i, Niikawa N. Lack of C20orf133 and FLRT3 mutations in 43 patients with Kabuki syndrome in Japan. *J Med Genet* 45(7):479-80, 2008
- Nishimura A, Takano T, Mizuguchi T, Saitsu H, Takeuchi Y, Matsumoto N. *CDKL5* disruption by t(X;18) in a girl with West syndrome. *Clin Genet* 74:288-290, 2008
- Yamamoto T, Dowa Y, Ueda H, Kawataki M, Asou T, Sasaki Y, Harada N, Matsumoto N, Matsuoka R, Kurosawa K. Tetralogy of Fallot associated with pulmonary atresia and major aortopulmonary collateral arteries in a patient with interstitial deletion of 16q21-q22.1. *Am J Med Genet A* 160A: 1575-1580, 2008
- Kuniba H, Sato D, Yoshiura KI, Ohashi H, Kurosawa K, Miyake N, Kondoh T, Matsumoto T, Nagai T, Okamoto N, Fukushima Y, Naritomi K, Matsumoto N, Niikawa N. No mutation in RAS-MAPK pathway genes in 30 patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 146A(11):1893-1896, 2008.
- Mizuguchi T, Hashimoto R, Itokawa M, Sano A, Shimokawan O, Yoshimura Y, Harada N, Miyake N, Nishimura A, Saitsu H, Sosonkina N, Niikawa N, Kunugi H, Matsumoto N. Microarray comparative genomic hybridization analysis of 59 patients with schizophrenia. *J Hum Genet* 53:914-919, 2008.
- Watanabe Y, Sakai H, Nishimura A, Miyake N, Saitsu H, Mizuguchi T, Matsumoto N. Paternal somatic mosaicism of a *TGFBR2* mutation transmitting to an affected son with Loey's-Dietz syndrome. *Am J Med Genet* 146A: 3070-3074, 2008.
- Saito S, Kawamura R, Kosho T, Shimizu T, Aoyama K, Koike K-I, Wada T, Matsumoto N, Kato M, Wakui K, Fukushima Y. Bilateral perisylvian polymicrogyria, periventricular nodular heterotopia, and left ventricular noncompaction in a girl with 10.5-11.1 Mb terminal deletion of 1p36. *Am J Med Genet A* 146A: 2891-2897, 2008
2. 学会発表
- Naomichi Matsumoto, Junko Mochizuki: Alu-related 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. (poster presentation). European Human Genetics Conference 2008 (May 31-June 3, 2008, Barcelona, Spain)
- Naomichi Matsumoto, Mitsuhiro Kato, Takeshi Mizuguchi, Keisuke Hamada, Hitoshi Osaka, Jun Tohyama, Katsuhisa Urano, Satoko Kumada, Kiyomi Nishiyama, Akira Nishimura, Ipppei Okada, Yukiko Yoshimura, Syu-ichi Hirai, Tatsuro Kumada, Kiyoshi Hayasaka, Atsuo Fukuda, Kazuhiro Ogata & Hirotomo Saitsu: *De novo* mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. (Poster presentation) The international symposium in the 8<sup>th</sup> Annual Meeting of the East Asian Union of Human Genetic Society (Jul 18-19, 2008, Sapporo, Japan)
- 松本直通 アレーを用いて疾患遺伝子を単離する (シンポジスト) 日本人類遺伝学会第 53 回大会 (9 月 30 日、横浜)
- Naomichi Matsumoto, Junko Mochizuki: Alu-related 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. (poster presentation). 58th Annual Meeting of American Society of Human Genetics (November 11-15, 2008, Philadelphia, Pennsylvania)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

国際出願 PCT/JP2008/73164・松本直通／才  
津浩智・新生児期～乳児期発症の検出  
方法・平成 20 年 12 月 19 日

図1. 大田原症候群で同定された *STXBP1* 変異

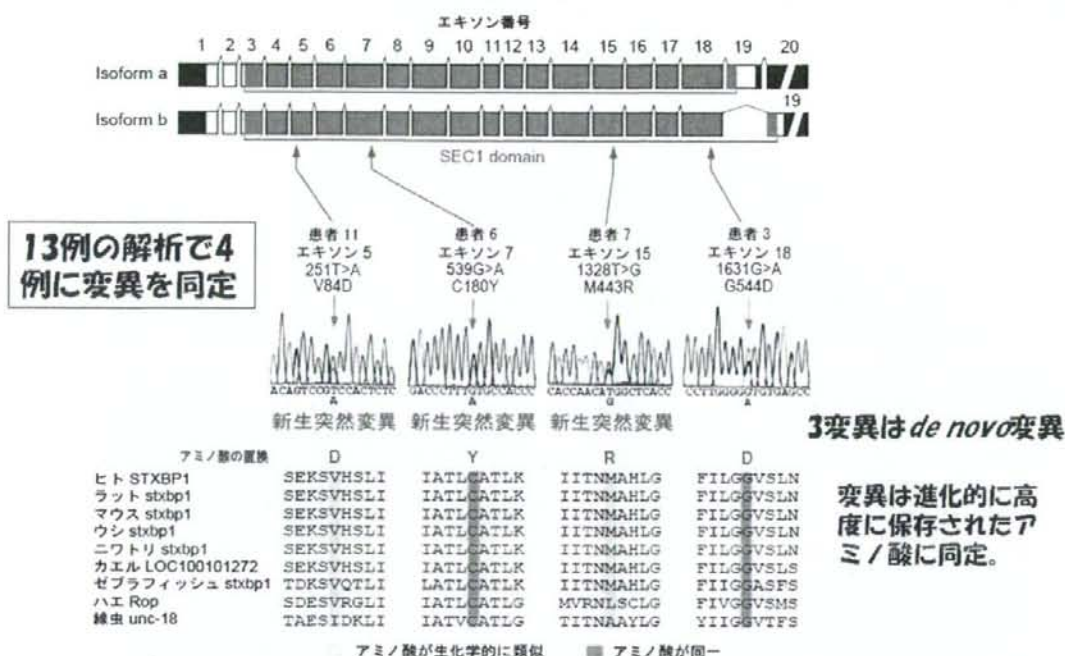
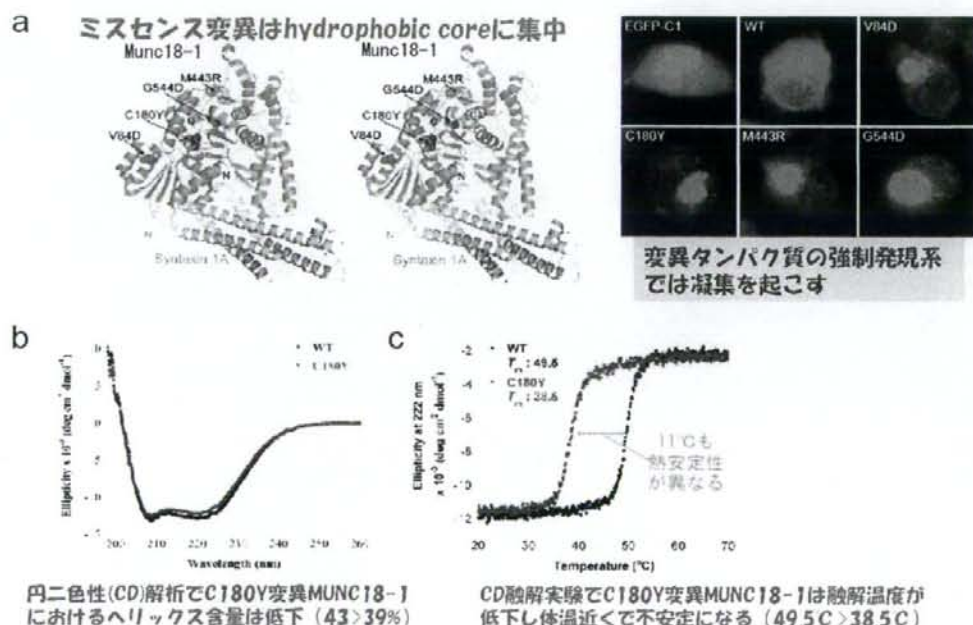


図2. 同定されたミスセンス変異はタンパク質構造を不安定化する



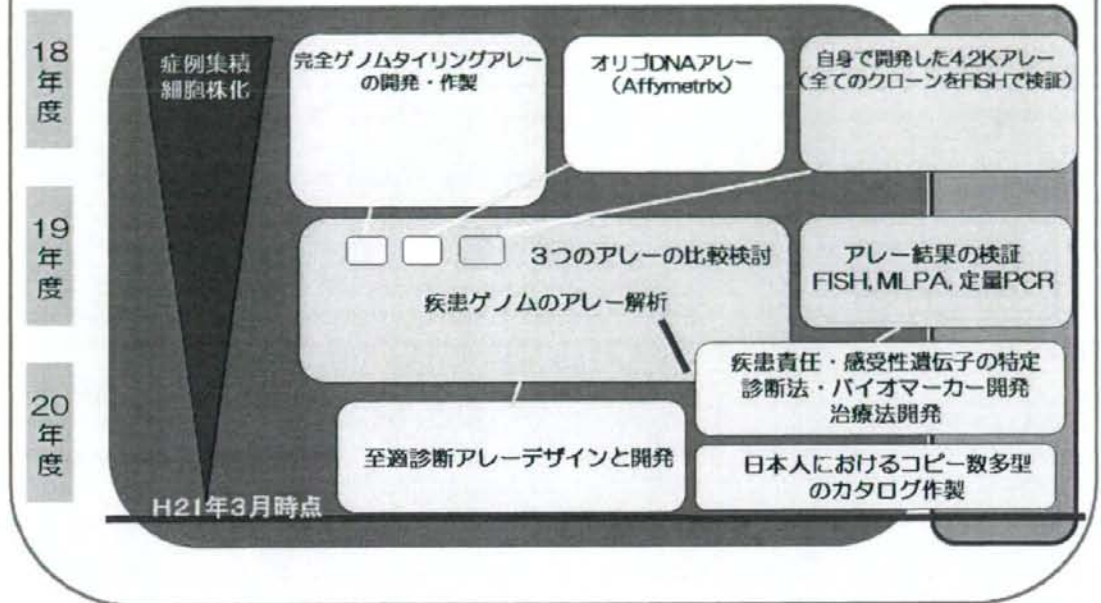


## 研究計画と進行状況

横浜市立大学倫理審査委員会の承認・各検体供与機関での適切な倫理手続きと配慮

研究代表・松本

研究分担・原田



## 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：高密度マイクロアレーによる CNV データベースの作成

分担研究者 原田直樹 九州メディカルサイエンス 所長

高密度マイクロアレーを用いたヒトゲノム解析法は、従来の方法では検出不可能な微細なゲノムコピー数変化を感度良く検出する優れた手法である。本研究によって原因不明である種々な遺伝性疾患症例ゲノムを解析し原因解明の端緒となることが期待されている。我々は多数の日本人ゲノム DNA 試料を対象として高密度オリゴマイクロアレー解析を行い、日本人ゲノム中に観察される CNV を多数同定しカタログ化した。このカタログは今後の疾患ゲノム解析研究において極めて有用な CNV データベースとなる。

### A. 研究目的

ヒトのゲノム上には、個人間でコピー数が異なる領域が存在する。これはコピー数多型 (Copy number Variation: CNV) と呼ばれ、一般的に 1 kb 以上の長さの領域を対象としている。CNV はいわばコピー数の個人差であり、一塩基多型 (SNP) とは異なり、含まれる遺伝子のコピー数がダイナミックに増減することからメンデル遺伝病のみならず、種々の疾患・形質との相関解析が急速に進行している。近年、病的 CNV のみならず、疾患との関連がないと考えられる、いわゆる“良性”の CNV も多数観察され、現在閲覧可能なデータベースで約 20,000 個報告されている。しかし CNV について臨床的な位置付けが明確でないものも

多数存在する。そのため個々の症例に於いて CNV を同定しても、正常多型か、病的かを判断することが時に困難で、個人間で共通にみられる正常多型としての CNV のデータベースの必要性は極めて高い。現在閲覧可能なデータベースでは、人種差を考慮していない、CNV 検出のプラットフォームが統一されていないなど、実際の使用に於いてあくまでも参考程度という位置づけである。よって実際に使用に耐えうる日本人 CNV カタログ/データベースの作成は急務である。高密度マイクロアレー法は、従来検出が困難である微細な CNV を感度良く検出する極めて優れた方法である。最終年度は、高密度オリゴ DNA マイクロアレー法を用い、日本人集団に対しゲノムコピ

一数解析を実施し、網羅的な CNV の同定と、臨床的に病的意義の低い、いわゆる良性多型と考えられる CNV のカタログ/データベース作成を行うことを目的として研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. 高密度マイクロアレー解析による CNV の網羅的抽出

110 例の正常日本人（遺伝性疾患の疾病や保因者でない）を対象に、ヒト末梢血あるいは培養羊水細胞から直接抽出したゲノム DNA 試料を用いて Affymetrix 社 Genome-Wide Human SNP Array 6.0、GeneChip Human Mapping 250K アレーによるゲノムコピー数解析を実施した。SNP 6.0 アレーでは 60 名（両親と子のトリオ 10 家系、30 名を含む）、250K アレーでは 50 名を対象とし、それぞれ 50 kb、100 kb 以上のコピー数変化を解析対象とした。

### 2. コピー数変異の検証

検出したコピー数変異を現在公開中のヒトゲノムデータベースの一つ Database of Genomic Variants (DGV : <http://projects.tcag.ca/variation/>) で照合し、70%以上のオーバーラップするものを既知報告と合致する CNV と判断した。

## C. 研究結果

### 1. 高密度マイクロアレーを用いた CNV の解析

SNP 6.0 アレーと GeneChip 250K アレーによるゲノムコピー数解析の結

果、それぞれ 1,992 個と 2,186 個のコピー数変異部位を検出した（同じ部位で異なる症例で観察される場合、複数回カウントした）。また 1 例あたりではそれぞれ平均で約 36 個と 40 個のコピー数変化を検出した（図 1 と 2）。10 組のトリオ解析においては、遺伝性 CNV に加えてさらに新生（de novo）CNV を 33 個同定した。

### 2. アレーで検出した CNV の検討

DGV との照合の結果、SNP6.0 アレーで検出したコピー数変化部位全 448 箇所の中の 383 箇所(85.5%) が既報告の CNV とオーバーラップしており、未登録の CNV は 65 箇所であった。250K アレーでは、全 755 箇所のコピー数変化を検出し、そのうち 331 箇所(43.8%) が既報告の CNV とオーバーラップし、未登録の CNV を 424 個検出した。

これらの結果をもとに日本人ゲノムを対象とした高密度アレー解析における CNV を集約したカタログ/データベースを作成した。

## D. 考察

日本人末梢血白血球あるいは羊水細胞のゲノム DNA を対象として高密度マイクロアレーによるコピー数解析を実施し、日本人における CNV のカタログ/データベース作成を試みた。この結果、既報 CNV とともに多数の新規 CNV を検出することが可能であった。SNP6.0 アレーと 250K アレーはそれぞれ全ゲノムを 185 万個と 26 万

個のプロープでカバーしており、単純計算すれば SNP6.0 アレーの方が約 7 倍高解像度である。しかし、実際に CNV の検出数でみると、250K アレーの方が約 1.7 倍検出率が高かったことから、250K アレーに特有のアーティファクトの存在が示唆された。現在、CNV 領域にマップされる BAC クロソンをプロープとして FISH 法による検証作業を進めているが、250K アレーに特有のアーティファクト (FISH でコピー数変異を確認できないもの) が複数存在し、特にプロープ数・密度が低い領域においてアーティファクトが生じやすい傾向を確認している。今後解析プロトコルや解析ソフトの検出感度の設定を十分に検討し、アレー毎に設定値を変えて CNV の検出精度を高める必要があると考えられ、データベースの信頼性をさらに高める予定である。

#### E. 結論

CNV 解析において、新たに検出された CNV と疾患との関連性についての判断は極めて難しい。しかし本研究で行った CNV データベース作成等によってその判断を容易にすることが可能となり、臨床検査や疾患遺伝子単離研究等に大いに役立つことが期待される。

#### 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

A girl with Down syndrome and partial trisomy for 21pter-q22.13: a clue to narrow the Down syndrome critical region. Sato D, Kawara H, Shimokawa O, Harada N, Tonoki H, Takahashi N, Imai Y, Kimura H, Matsumoto N, Ariga T, Niikawa N, Yoshiura K. Am J Med Genet A. 146A(1):124-127, 2008.

Pre- and postnatal overgrowth in a patient with proximal 4p deletion. Wu L, Long Z, Liang D, Harada N, Pan Q, Yoshiura K, Xia K, Dai H, Niikawa N, Xia J. Am J Med Genet A. 146A(6):791-794, 2008.

Two patients with atypical interstitial deletions of 8p23.1: mapping of phenotypical traits. Páez MT, Yamamoto T, Hayashi K, Yasuda T, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K, Furutani Y, Asakawa S, Shimizu N, Matsuoka R. Am J Med Genet A. 146A(9):1158-1165, 2008.

Craniosynostosis in a patient with a de novo 15q15-q22 deletion. Hiraki Y, Moriuchi M, Okamoto N, Ishikawa N, Sugimoto Y, Eguchi K, Sakai H, Saito H, Mizuguchi T, Harada N, Matsumoto N. Am J Med Genet A. 146A(11):1462-1465, 2008.

Tetralogy of Fallot associated with pulmonary atresia and major

aortopulmonary collateral arteries in a patient with interstitial deletion of 16q21-q22.1. Yamamoto T, Dowa Y, Ueda H, Kawataki M, Asou T, Sasaki Y, Harada N, Matsumoto N, Matsuoka R, Kurosawa K. Am J Med Genet A. 146A(12):1575-1580, 2008.

Microarray comparative genomic hybridization analysis of 59 patients with schizophrenia. Mizuguchi T, Hashimoto R, Itokawa M, Sano A, Shimokawa O, Yoshimura Y, Harada N, Miyake N, Nishimura A, Saitsu H, Sosonkina N, Niikawa N, Kunugi H, Matsumoto N. J Hum Genet. 53(10):914-919, 2008.

Mirror duplication of chromosome 21 with complete phenotype of Down syndrome. Egashira M, Kondoh T, Kawara H, Motomura H, Tagawa M, Harada N, Moriuchi H. Pediatr Int. 50(4):597-599, 2008.

Prenatal diagnosis of Costello syndrome using 3D ultrasonography amniocentesis confirmation of the rare HRAS mutation G12D. Kuniba H, Pooh RK, Sasaki K, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Egashira M, Moriuchi H, Yoshiura KI, Niikawa N. Am J Med Genet A (in press)

## 2. 学会発表

原田直樹, 佐々木健作, 霜川 修, 川良洋城, 富士山龍伊, 近藤達郎, 夫律子, 松本直通, 吉浦孝一郎, 新川詔夫: マイクロアレイを使用した全ゲノム

コピー数解析による出生前診断の試み. 第 32 回日本遺伝カウンセリング学会

原田直樹, 佐々木由喜, 江口真, 近藤達郎: 当施設における過去 5 年間の羊水検査適応の推移. 第 32 回日本遺伝カウンセリング学会

霜川 修, 佐々木健作, 富士山龍伊, 近藤達郎, 松本直通, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 原田直樹: Challenges of developing of array testing for clinical cytogenetics in Japan. 第 15 回日本遺伝子診療学会大会

霜川 修, 佐々木健作, 坂井和裕, 長田久夫, 佐久本薫, 近藤達郎, 松本直通, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 原田直樹: 羊水検査で検出した稀な 9q 近位部重複異形を有する 3 家系. 日本人類遺伝学会第 53 回大会

原田直樹: マイクロアレイを使用した全ゲノムコピー数解析による染色体検査の有用性と問題点. 日本人類遺伝学会第 53 回大会

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記事項無し

図1. 250K Nspアレーで検出したCNV

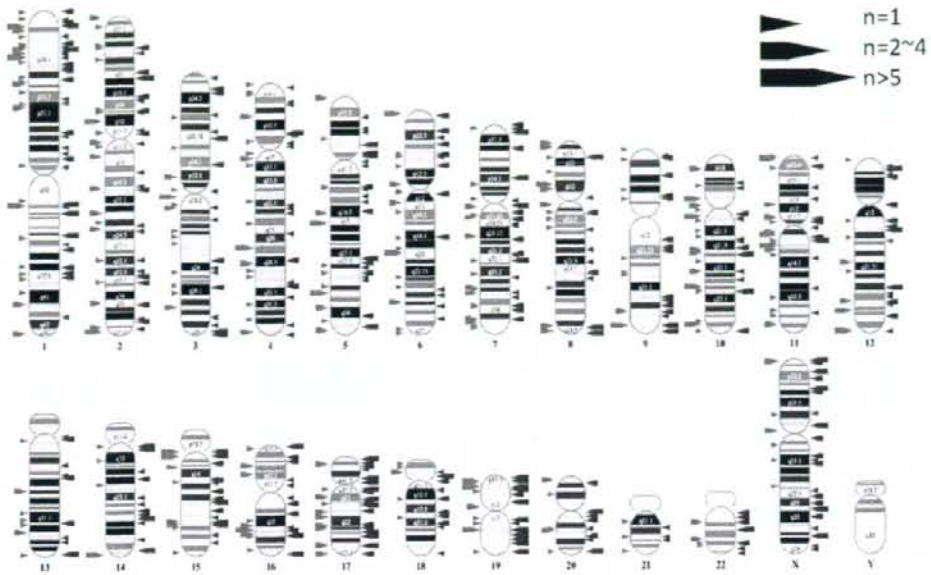


図2. SNP6.0アレーで検出したCNV

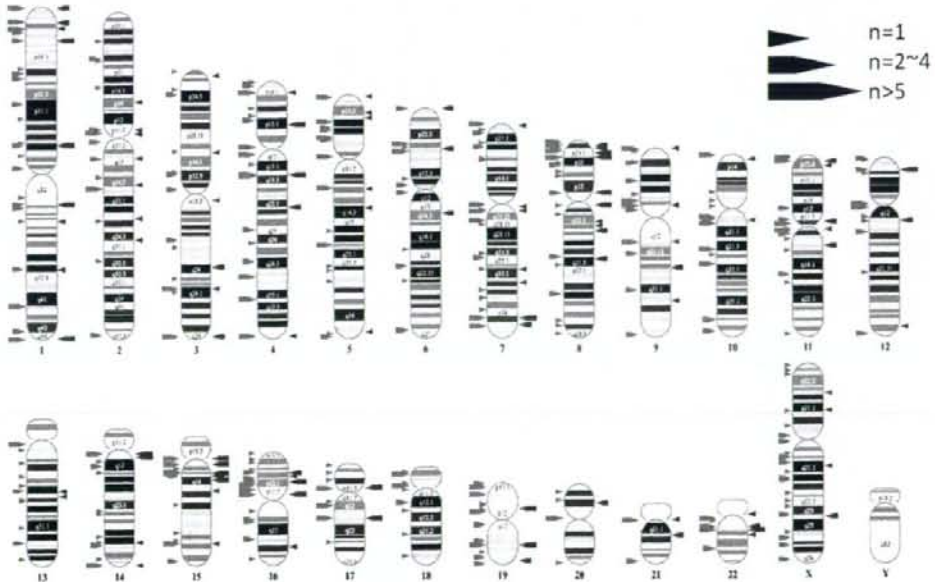


図1・2とも青は重複・赤は欠失、nは症例数を示す。

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
Visser R, Matsumoto N	<i>NSD1</i> and Sotos syndrome	Epstein C, Erickson R, and Wynshaw-Boris A	Inborn Errors of Development 2 <sup>nd</sup> Edition.	Oxford University Press, Inc.	New York	2008	1032-1037

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 D, et al., Harada N, et al., Matsumoto N, et al.	A girl with Down syndrome and partial trisomy for 21pter-q22.13: A clue to narrow the Down syndrome critical region.	Am J Med Genet	146A (1)	124-127	2008
Yamada-Okabe T, Matsumoto N	Decreased serum dependence in the growth of NIH3T3 cells from the overexpression of human nuclear receptor-binding SET-domain-containing protein ( <i>NSD1</i> ) or fission yeast <i>su(var)3-9</i> , enhancer-of-zeste, trithorax 2 ( <i>SET2</i> ).	Cell Biochemistry and Function	26	146-150	2008
Hiraki Y, et al., Harada N, Matsumoto N	Two New Cases of Pure 1q Terminal Deletion Presenting With Brain Malformations.	Am J Med Genet	146A	1241-1247	2008
Páez M, et al., Harada N, Matsumoto N, et al.	Two patients with atypical interstitial deletions of 8p23.1: Mapping of phenotypical traits.	Am J Med Genet	146A	1158-1165	2008
Kosho T, et al., Matsumoto N, et al.	De novo balanced translocation between 7q31 and 10p14 in a girl with central precocious puberty, moderate mental retardation, and severe speech impairment.	Clin Dysmorphol	17(1)	31-34	2008
Hiraki Y, et al., Matsumoto N	Craniosynostosis in a patient with a <i>de novo</i> 15q15-q22 deletion.	Am J Med Genet	146A(11)	1462-1465	2008
Mochizuki J, et al., Matsumoto N.	Alu-related 5q35 microdeletions in Sotos syndrome.	Clin Genet	74	384-391	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saito H, et al., Matsumoto N.	<i>De novo</i> mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy.	Nat Genet	40(6)	782-788	2008
Ozeki Y, et al., Matsumoto N, et al.	A Case of Schizophrenia with Chromosomal Microdeletion of 17p11.2 Containing a Myelin-Related Gene PMP22.	The Open Psychiatry Journal	2	1-4	2008
Kuniba H, et al., Harada N, Matsumoto N, et al.	Lack of C20orf133 and FLRT3 mutations in 43 patients with Kabuki syndrome in Japan.	J Med Genet	45(7)	479-480	2008
Nishimura A, et al., Matsumoto N	<i>CDKL5</i> disruption by t(X;18) in a girl with West syndrome.	Clin Genet	74	288-290	2008
Yamamoto T, et al., Harada N, Matsumoto N, et al.	Tetralogy of Fallot associated with pulmonary atresia and major aortopulmonary collateral arteries in a patient with interstitial deletion of 16q21-q22.1.	Am J Med Genet	160A	1575-1580	2008
Kuniba H, et al., Matsumoto N, et al.	No mutation in RAS-MAPK pathway genes in 30 patients with Kabuki syndrome.	Am J Med Genet	146A(11)	1893-1896	2008
Mizuguchi T, et al., Harada N, et al., Matsumoto N.	Microarray comparative genomic hybridization analysis of 59 patients with schizophrenia.	J Hum Genet	53	914-919	2008
Watanabe Y, et al., Matsumoto N.	Paternal somatic mosaicism of a <i>TGFBR2</i> mutation transmitting to an affected son with Loeys-Dietz syndrome.	Am J Med Genet	146A	3070-3074	2008
Saito S, et al., Matsumoto N, et al.	Bilateral perisylvian polymicrogyria, periventricular nodular heterotopia, and left ventricular noncompaction in a girl with 10.5-11.1 Mb terminal deletion of 1p36.	Am J Med Genet	146A	2891-2897	2008
Wu et al., Harada N, et al.	Pre- and postnatal overgrowth in a patient with proximal 4p deletion.	Am J Med Genet	146A	124-127	2008



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Egashira M, et al., Harada N, et al.	Mirror duplication of chromosome 21 with complete phenotype of Down syndrome.	Pediatr Int	50(4)	597-599	2008
Kuniba H, et al., Harada N, et al.	Prenatal diagnosis of Costello syndrome using 3D ultrasonography amniocentesis confirmation of the rare HRAS mutation G12D.	Am J Med Genet	In press	In press	2009

# INBORN ERRORS *of* DEVELOPMENT

the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis



EDITED BY

Charles J. Epstein

Robert P. Erickson

Anthony Wynshaw-Boris

SECOND EDITION

Sotos syndrome (OMIM 117550) is a childhood overgrowth syndrome characterized by accelerated growth, typical craniofacial features, and a certain level of learning impairment. Sotos syndrome is caused by haploinsufficiency of the Nuclear receptor binding SET Domain protein 1 (*NSD1*) gene at 5q35.2-q35.3. Genetic analysis has established insight in the spectrum of genomic abnormalities of *NSD1*, in the underlying mechanisms of *NSD1* microdeletions and in the genotype-phenotype correlation in Sotos syndrome. However, the functional roles of *NSD1* are yet largely unknown. A major role of *NSD1* seems to lie in the transcriptional regulation of chromatin through the histone methyltransferase activity of its Su(var) 3-9, Enhancer of zeste, Trithorax (SET) domain. Furthermore, the nuclear receptor interacting domains (NIDs) are thought to be involved in transcriptional regulation by acting as both a coactivator and corepressor of nuclear receptors. Identification of interacting proteins and mapping of *NSD1* into causative signaling pathways are the challenging future tasks in Sotos syndrome in order to clarify the link between genetic abnormalities and the Sotos phenotypic characteristics.

#### DEVELOPMENTAL PATHWAY

The *NSD1* gene is mapped to 5q35.2-q35.3 and consists of 23 exons. The open reading frame starts in the second exon, is 8088 bp long, and encodes 2696 amino acids. There are two known transcripts, a shorter variant 1 (7693 bp; GenBank accession number NM\_172349) and a longer variant 2 (8458 bp; GenBank accession number NM\_022455). The *NSD1* gene encodes a protein that consists of multiple functional domains; one Su(var) 3-9, Enhancer of zeste, Trithorax (SET) domain, a SET-associated cyst-rich (SAC) domain, two proline-tryptophan-tryptophan-proline (PWWP) domains, five zinc-finger plant homeodomains (PHDs), a C5HCH domain and two nuclear receptor interaction domains (i.e., NID<sup>-L</sup> and NID<sup>-H</sup>) (see Fig. 113-1). The *NSD1* gene is expressed in the fetal and adult brain, skeletal muscle, kidney, spleen, thymus, lung, and in adult peripheral blood leukocytes (Kurotaki et al., 2001). *NSD1* belongs to a gene-family that includes *NSD2* and *NSD3* and shows approximately 75% and 70% sequence identity, respectively (Kurotaki et al., 2001). These genes possess similar functional domains, although NID<sup>-L</sup> and NID<sup>-H</sup> from *NSD1* are not present (Stec et al., 1998; Angrand et al., 2001; Kurotaki et al., 2001). Hemizygous deletions of *NSD2*, mapped to 4p16.3, are likely to be involved in the pathogenesis of the Wolf-Hirschhorn syndrome and translocations of *NSD2* have been described in multiple myeloma (Stec et al., 1998). *NSD3*, located at 8p12, has been found to be expressed in several tumor cell lines and in primary breast carcinomas (Angrand et al., 2001). Cryptic translocations resulting in fusions with the nucleoporin 98 kDa (*NUP98*) gene have been described in acute myeloid leukemia for both *NSD1* and *NSD3* (Jaju et al., 2001; Rosati et al., 2002).

The human *NSD1* shows 86% sequence similarity to the mouse *Nsd1* and 83% identity at the amino acid level (Kurotaki et al., 2001). Preceding the discovery of human *NSD1*, mouse *Nsd1* was identified in a two-hybrid screen with retinoic acid receptor  $\alpha$  as bait (Huang et al., 1998). It was found that *Nsd1* interacted with nuclear hormone receptors through its nuclear interaction domains. These interactions occurred either in the absence of the ligand through NID<sup>-L</sup> (retinoic acid receptor and thyroid receptor) or in presence of the ligand through NID<sup>-H</sup> (retinoic receptor, thyroid receptor, retinoid X, and estrogen receptors).

It was postulated that *NSD1* could interact both as a corepressor and coactivator of nuclear receptors and would therefore be a bifunctional transcriptional regulator (Huang et al., 1998).

SET domain-containing proteins are known to function as histone methyltransferases at the chromatin level (Kouzarides, 2002). Cell experiments have shown that the SET domain of *NSD1* exerts catalytic activity and methylates specifically histone H3 at lysine 36 (H3-K36) and histone H4 at lysine 20 (H4-K20) (Rayasam et al., 2003). Histone methylation at these specific positions has been associated with repression of chromatin transcription (Rayasam et al., 2003). Also PHD domains are predominantly found in proteins involved in chromatin regulation (Aasland et al., 1995). The PWWP domain is a protein-protein interaction domain, which exerts its function in cell differentiation (Stec et al., 2000).

Recently, an *NSD1*-interacting zinc-finger protein (Nizp1) was identified and a protein-protein interaction between its own C2HR motif and the *NSD1* C5HCH domain was described (Nielsen et al., 2004). In an *NSD1*-dependent manner, Nizp1 showed transcriptional repressor activity (Nielsen et al., 2004). Abolishment of the Nizp1-*NSD1* interaction significantly reduced this activity level of repression. Hence, either through its own domains or through interactions with Nizp1, *NSD1* is likely to be involved in transcriptional regulation of chromatin.

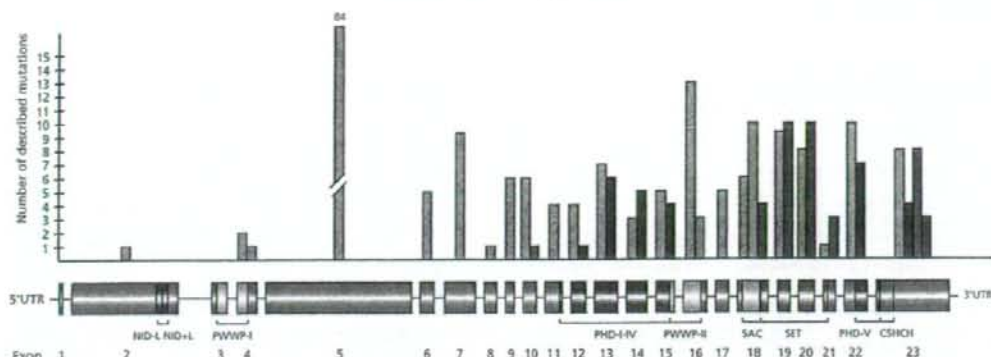
In another study, the involvement of the growth hormone/insulin-like growth factor (GH/IGF) axis in the overgrowth in Sotos patients was investigated (de Boer et al., 2004a). In vitro experiments with skin fibroblasts from Sotos patients showed modestly increased levels of IGFBP-2 and IGFBP-6, as well as reduced levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, and IGFBP-4 (de Boer et al., 2004a). These changes would be more in accordance with a phenotype of short stature rather than tall stature and therefore the interpretation of these in vitro experiments, as well as the involvement of the GH/IGF axis in overgrowth in Sotos syndrome, requires further investigation.

#### CLINICAL DESCRIPTION OF *NSD1*-ASSOCIATED SYNDROMES

##### Sotos Syndrome

Sotos syndrome (OMIM 117550), formerly also known as cerebral gigantism, was first described in 1964 (Sotos et al., 1964). Since then, hundreds of cases have been reported. Until the discovery of *NSD1* as the causative gene, clinical criteria have been the standard for the diagnosis of Sotos syndrome (Cole and Hughes, 1994). Based on recent analyses of a large number of Sotos syndrome patients with a proven *NSD1* abnormality, the diagnostic criteria were redefined (Douglas et al., 2003; Turkmen et al., 2003; de Boer et al., 2004b; Cecconi et al., 2005; Tatton-Brown et al., 2005b; Waggoner et al., 2005). Cardinal features (i.e.,  $\geq 90\%$  of the patients) for the diagnosis of Sotos syndrome are characteristic facial features, overgrowth (height and/or head circumference  $\geq 98$ th percentile), and a certain degree of learning disability (Tatton-Brown et al., 2005b).

The typical Sotos craniofacial phenotype shows a triangular shaped ("inverted pear-like") face with a prominent chin, macrodolichocephaly, frontal bossing with a high hairline, (apparent) hypertelorism, and downslanting of the palpebral fissures (see Fig. 113-2). These features become less apparent in adolescence and adulthood, and therefore,



**Figure 113-1.** Schematic presentation of the *NSD1* structure with its functional domains and distribution of point mutations. The graph above represents the number of point mutations as described in the previous studies (Kurotaki et al., 2003; de Boer et al., 2004b; Melchior et al., 2005; Tatton-Brown et al., 2005b; Tong et al., 2005; van Haelst et al., 2005). The study from Tatton-Brown et al., (2005b) overlaps with those by Cecconi et al. (2005), Douglas et al. (2003), Rio et al. (2003), Turkmen et al. (2003), Waggoner

et al. (2005). The latter ones are, therefore, not included in this graph. Gray bars represent truncating mutations and colored bars indicate missense mutations in the respective functional domains (orange, dark-blue, light-blue, pink, and red) or outside the domains (green). From all studies, familial cases are counted as one single mutation and splice-site mutations are included in the truncating mutation group of the possibly affected exon.

photographs taken at infancy and in childhood are indispensable for diagnosis.

The growth pattern shows an accelerated growth, which starts prenatally or postnatally, and is especially increased in the early years of childhood. The final adult height, however, is found to be within the (high) normal range (Tatton-Brown and Rahman, 2004). Although overgrowth is a cardinal feature, children carrying a pathogenic *NSD1* mutation with normal heights have been described (Tatton-Brown et al., 2005b).

In a large study, 96% (112/117) of the Sotos syndrome patients showed a certain degree of learning disability (Tatton-Brown and Rahman, 2004). The range of mental impairment is usually broad, varying from mild to severe.

Furthermore, Sotos syndrome is associated with a large variety of additional features such as advanced bone age (76%), scoliosis

(43%; 43/101), seizures (41%; 43/105), neonatal feeding problems (83%; 85/105), neonatal hyperbilirubinemia (71%; 61/85), neonatal hypotonia (84%; 76/91), cardiac (24%; 24/102) and genitourinary anomalies (19%; 17/91) (Tatton-Brown and Rahman, 2004; Tatton-Brown et al., 2005b). Tumors are not common in Sotos syndrome, although patients with different types of tumors have been reported (Rahman, 2005).

#### Weaver Syndrome

Clinically overlapping with Sotos syndrome is Weaver syndrome (OMIM 277590), which was initially described in 1974 (Weaver et al., 1974). Less than 100 patients have been reported in the literature so far. Weaver syndrome is characterized by prenatal or postnatal overgrowth, typical facial features (i.e., macrocephaly, flat occiput, hypertelorism, micrognathia, long and prominent philtrum, and large ears), developmental delay, a hoarse low-pitched cry, advanced bone age, and



**Figure 113-2.** Facial features in Sotos syndrome patients with *NSD1* abnormalities. (A) and (B): Japanese girl carrying a whole-gene microdeletion at the age of two months (A) and at three years (B). (C-E): A Japanese boy with a whole gene microdeletion at neonatal age [(C) and (D)] and at the age of six years (E). (F) and (G): Dutch girl with an *NSD1* nonsense mutation (c.1427T > A; p.L476X) at the age of 13 months. (H)-(L): Dutch male with a whole-gene

deletion at neonatal age (H), at one year (I), at two years (J), at five years (K), and at the age of 33 (L). (M) and (N): A ten year old girl from Moroccan ancestry carrying a missense mutation (c.6371G > A; p.C2124Y). [Photograph (E) was reproduced from Visser and Matsumoto, "Genetics of Sotos syndrome," *Curr Opin Pediatr* 2003, 15(6): 598-606. With kind permission from the publisher Lippincott, Williams and Wilkins.]