

2008.08.00 15

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18年度～20年度 総合研究報告書

主任研究者 松本 直通

平成21(2009)年 4月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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
主任研究者 松本直通	
(資料) 図 1. 大田原症候群で同定された STXBP1 変異	
(資料) 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	
(資料) 研究計画と進行状況	
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	13
分担研究者 原田直樹	
(資料) 図 1. アレー解析結果の各種検証法の検討	
(資料) 図 2. 各種キットを用いた WGA 法とアレー解析結果	
(資料) 図 3. 250K Nsp アレーで検出した CNV	
(資料) 図 4. SNP 6.0 アレーで検出した CNV	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
III. 研究成果の刊行物・別刷	31



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)  
(総合) 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て計画され、平成18年度～20年度の3年間で施行された。完全ゲノムタイリングアレーの開発は、米国CHORIより供与を受けた完全ヒトゲノムタイリングBAC DNA (BAC 32,891個)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DNA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、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二次PCR増幅、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トティングを行い33K BACアレーが平成19年度中期に完成した。さらに商業ベースオリゴDNAアレーとしてAffymetrix社GeneChip 250K・GeneChip 6.0を導入しBACアレーと併用して疾患ゲノム解析を進めた。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、GeneChip 250Kでは、アレーデザイン上CNV多型領域が解析対象でないなど、アレーデザイン上の欠点が明らかになったが、GeneChip 6.0ではBACアレーと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・機能性精神疾患の症例集積は順調に進行し、このうち新生児期に発症し難治性でんかんと精神遅滞を主徴とする大田原症候群での責任遺伝子単離に成功した(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。並行して日本人における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。マイクロアレーCGHは、ゲノムの欠失(1コピー)や重複(3コピー)の正確な同定が可能で、商業レベルでは高密度オリゴDNAアレーの

開発が進行している。本研究では、BACを基盤とするゲノム完全タイリングアレーを開発・作製し、また商業ベース市販オリゴDNAアレーと比較検討を行いプラットフォームの特色を明らかにすることも目的の一つである。そして開発したアレーとオリゴDNAアレーを組み合わせ集積している種々の疾患ゲノム解析を進め、疾患に関連・責任遺伝子の同定をめざす。

B. 研究方法

①完全ゲノムタイリングアレーの作製と解析条件の検討  
米国CHORIから供与を受けた完全ヒトゲノムタイリングBAC DNA (BAC 32,891個)を鋳型に3種類のヒトゲノムシーケンスに特異性の高いDOP-PCRプライマーを用いて全ク



ローンの一次PCR増幅を行う。各クローン個別にゲル電気泳動で増幅効率を確認し増幅不良クローンを再度PCRするなど品質の向上に努める。さらにDOP-PCRプライマーの5'側に存在するアダプターサイトを標的としたアミノラベル二次プライマーを用いてPCR増幅を行う。開発の効率と経費節減を図るためPCR増幅のステップの検討を行いプロトコル簡略化も目指す。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)。作成したタイリングアレーを使用して最も感度の良くコピー数検出のための至適条件を決定する。

## ②オリゴDNAアレーの導入

Affymetrix社のGeneChip 250K (25万プローブ/全ゲノム)およびGeneChip 6.0 (185万プローブ/全ゲノム)を導入し、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系の完成

#### 1. アレー作成法の改良

これまで4.2Kアレー(4235個のBACを搭載)の作製に於いては、一次PCRにヒトゲノム特

異的な3種類のDOP-PCRプライマーをそれぞれ別の3チューブで増幅後、3チューブの混合液を鋳型にして、DOP-PCRプライマー内に含まれるアダプターサイトを標的としたアミノプライマーを用いて二次PCR増幅を行うという方法でDNAを作製していた。しかしこの方法では32,981個の4倍のチューブを用いてそれぞれPCRを行う必要があり多大な労力・時間・コストがかかる。この問題を解決するため、一次PCRを最初から3種類のDOPプライマーを混合し1つのチューブで増幅する方法をとり、試験的アレー実験にて従来法と比較し遜色ない結果が得られた。この改良法を用いて本研究における32,981個のBACのPCR増幅を2ステップ2チューブ(各ステップ1チューブ)のみでの増幅とし多大な時間・労力・そして50%のコスト削減に成功した。

#### 2. 完全ゲノムタイリングアレーの完成

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年度中期に完成した。このアレーを用いて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ルを作成した。

### ②オリゴDNAアレーの導入

Affymetrix社のGeneChip 250Kを導入し、疾患ゲノム解析を開始し開発済みである4.2Kアレーの解析結果との比較検討を行った。30症例の解析で比較検討した。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 V



ariation (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ないことが判明した。最終年度に新たに Affymetrix GeneChip 6.0 を導入した。このプラットフォーム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の改善が期待された。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实际的であった。BAC タイリングアレーにおける検出限界である 50 Kb と基本的に差はなく、両プラットフォームの解析能力には、大きな差が無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を行っている。通常、1 症例に於いて 10~20 箇所ゲノムコピー数異常が同定され、ヒトコピー数多型データベースに登録されている CNV との重なり等を検討して、登録されていないものを優先して検証を行っている。複数の疾患に関連すると想定されるゲノム異常領域が同定されており疾患関連遺伝子の変異の有無を症例に於いて検討中である。遺伝的背景が均一の疾患を如何に集積するかが研究の鍵となると考え症候群を中心に症例を集積した経緯がある。

### 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、タンパク質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質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。今後は、CNVから疾患遺伝子単離を行う戦略は継続し、さらにCNVを有さない遺伝子の点変異が主病理である疾患においては次世代シーケンサーによる直接のゲノムシーケンス解析等を考慮する必要があると考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Kurotaki N, Matsumoto N. Sotos syndrome. Genomic disorders: The genomic basis of disease: 237-246, 2006. Edited by Lupski JR and Stankiewicz PT. The Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA
- Kanemoto N, Kanemoto K, Nishimura G, Kamoda T, Visser R, Shimokawa O, Matsumoto N. Nevo syndrome : a variant of Sotos syndrome? Am J Med Genet 140A(1): 70-73, 2006
- Yamamoto T, Ueda H, Kawataki M, Yamanaka M, Asou T, Kondoh Y, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K. A large interstitial deletion of 17p11.2-13.1 including the Smith-Magenis region in a patient with congenital multiple anomalies. Am J Med Genet 140A(1):88-91, 2006.
- Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Ohashi H, Kurosawa K, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Shotelersuk V, Hou J-H, Fukushima Y, Kondoh T, Matsumoto T, Shinoki T, Kato M, Tonoki T, Nomura M, Yoshiura K-I, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N. No causative genomic aberrations by BAC array CGH in Kabuki make-up syndrome. Am J Med Genet 140A(3): 291-293, 2006.
- Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Sosonkina N, Okubo A, Kawara H, Okamoto N, Kurosawa K, Kawame H, Iwakoshi M, Kosho T, Fukushima Y, Makita Y, Yokoyama Y, Yamagata T, Kato M, Hiraki Y, Nomura M, Yoshiura K-I, Kishino T, Ohta T, Mizuguchi T, Niikawa N, Matsumoto N. BAC array CGH reveals genomic aberrations in idiopathic mental retardation. Am J Med Genet 140A (3): 205-211, 2006.
- Kawara H, Yamamoto T, Harada N, Yoshiura K, Niikawa N, Nishimura A, Mizuguchi M, Matsumoto N. Narrowing Candidate Region for Monosomy 9p Syndrome to a 4.7-Mb Segment at 9p22.2-p23. Am J Med Genet 140A (4): 373-377, 2006.
- Visser R, Hasegawa T, Niikawa N, Matsumoto N. Analysis of the *NSD1* promoter region in patients with a Sotos syndrome phenotype. J Hum Genet 51(1):15-20, 2006
- Ohata T, Yoshida K, Sakai H, Hamanoue H, Mizuguchi T, Shimizu Y, Okano T, Takada F, Fukushima Y, Ikeda S, Matsumoto N. The prevalent -16C>T change at the 5' UTR of the *puratropin-1* gene in autosomal dominant cerebellar ataxia in Nagano. J Hum Genet 51(5): 461-466, 2006
- Miura S, Miura K, Masuzaki H, Miyake N, Yoshiura K-i, Sosonkina N, Harada N, Shimokawa O, Nakayama D, Yoshimura S, Matsumoto N, Niikawa N, Ishimaru T. Microarray comparative genomic hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. J Hum Genet 51(5): 412-417, 2006
- Hamanoue H, Umezu N, Okuda M, Harada H, Sakai H, Mizuguchi T, Ishikawa H, Takahashi T, Miura K, Hirahara F, Matsumoto N. Complete Hydatidiform Mole and Normal Live Birth after Intracytoplasmic Sperm Injection. J Hum Genet 51(5): 477-479, 2006
- Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Alain Verloes A, Okamoto N, Hennekam



- RCM, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline *KRAS* and *BRAF* mutations in cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome. *Nat Genet* 38(3): 294-296, 2006
- Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N, Birk OS, Niikawa N, Sengoku K. Polymorphic alleles of the human *MEII* gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *J Hum Genet* 51(6): 533-540, 2006
- Sakai H, Visser R, Ikegawa S, Ito E, Numabe H, Watanabe Y, Mikami H, Kondoh T, Kitoh H, Sugiyama R, Okamoto N, Ogata T, Fodde R, Mizuno S, Takamura K, Egashira M, Sasaki N, Watanabe S, Nishimaki S, Takada F, Nagai T, Okada Y, Aoka Y, Yasuda K, Iwasa M, Kogaki S, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N. Comprehensive genetic analysis of relevant four genes in 49 patients with Marfan syndrome or Marfan related phenotypes. *Am J Med Genet* 140A: 1719-1725, 2006
- Shimokawa O, Harada N, Miyake N, Satoh K, Mizuguchi M, Niikawa N, Matsumoto N. Array Comparative Genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with 'normal' karyotypes. *Am J Med Genet* 140A(18): 1931-1935, 2006
- Hiraki Y, Fujita H, Yamamori S, Ohashi H, Eguchi M, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N. Mild craniosynostosis with 1p36.3 trisomy and 1p36.3 deletion syndrome caused by familial translocation t(Y;1). *Am J Med Genet* 140A(16): 1773-1777, 2006
- Yamamoto T, Sameshima K, Sekido KI, Aida N, Matsumoto N, Naritomi K, Kurosawa K. Trigonocephaly in a boy with paternally inherited deletion 22q11.2 syndrome. *Am J Med Genet* 140A(12): 1302-1304, 2006.
- Miura S, Miura K, Yamamoto T, Yamanaka M, Saito K, Hirabuki T, Kurosawa K, Harada N, Ishizaki-Yamasaki Y, Matsumoto M, Hirahara F, Yoshiura K, Masuzaki M, Niikawa N. Origin and mechanisms of formation of fetus-in-fetu: Two cases with genotype and methylation analyses. *Am J Med Genet* 140A(16): 1737-1743, 2006
- Dowa Y, Yamamoto T, Abe Y, Kobayashi M, Hoshino R, Tanaka K, Aida N, Take H, Kato K, Tanaka Y, Ariyama J, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K. Congenital neuroblastoma in a patient with partial trisomy of 2p. *J Pediatr Hematol Oncol* 28(6): 379-382, 2006
- Horikoshi H, Kato Z, Masuno M, Asano T, Nagase T, Yamagishi Y, Kozawa R, Arai T, Aoki M, Teramoto T, Omoya K, Matsumoto N, Kurotaki N, Shimokawa O, Kurosawa K, Kondo N. Neuroradiologic findings in sotos syndrome. *J Child Neurol* 21(7):614-618, 2006
- Sato K, Iwakoshi M, Shimokawa O, Sakai H, Ohta T, Saitoh S, Miyake N, Niikawa N, Harada N, Saito 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 *NSD1*-intragenic deletions in Japanese Sotos syndrome: Analysis of 30 patients by *NSD1*-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 Loey's-Dietz syndrome with a *TGFBR2* mutation. *Internal Medicine* 2007;46(24):1995-2000, 2007
- 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, Saitu 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, Saitu H, Mizuguchi M, Visser R, Miyake N, Unno N, Matsumoto N. Alu-related 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. *Clin Genet* 74:384-391, 2008.
- Saitu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Uruno 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 STXBP1 (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 Loeys-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, Noriko Miyake, Osamu Shimokawa, Naoki Harada, Norio Niikawa. BAC array CGH reveals five genomic aberrations in 30 patients with idiopathic mental retardation. (Poster presentation) European Human Genetics Conference 2006 May 6-9, 2006, RAI congress center, Amsterdam, Netherland

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

Naomichi Matsumoto, Osamu Shimokawa, Naoki Harada, Norio Niikawa, Remco Visser. Non-hotspot-related breakpoints of common deletions in Sotos syndrome are located within destabilized DNA regions. (Poster presentation) 11<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics Aug 6-10, 2006, Brisbane, Australia

Naomichi Matsumoto, Haruya Sakai, Akira Nishimura, Takeshi Mizuguchi.

Comprehensive genetic analysis of relevant four genes in 49 patients with Marfan syndrome or Marfan related phenotypes. (Poster presentation) 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics Oct 9-13, 2006, New Orleans, LA

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

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, Semtember 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, TGFB1, and TGFB2 analyses in congenital contractural arachnodactyly. (poster presentation) 57<sup>th</sup> 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)

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, Ippei Okada, Yukiko Yoshimura, Syu-ichi Hirai, Tatsuro Kumada, Kiyoshi Hayasaka, Atsuo Fukuda, Kazuhiro Ogata & Hiroto Saito: *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). 58<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Human Genetics (November 11-15, 2008, Philadelphia, Pennsylvania)

G. 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

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

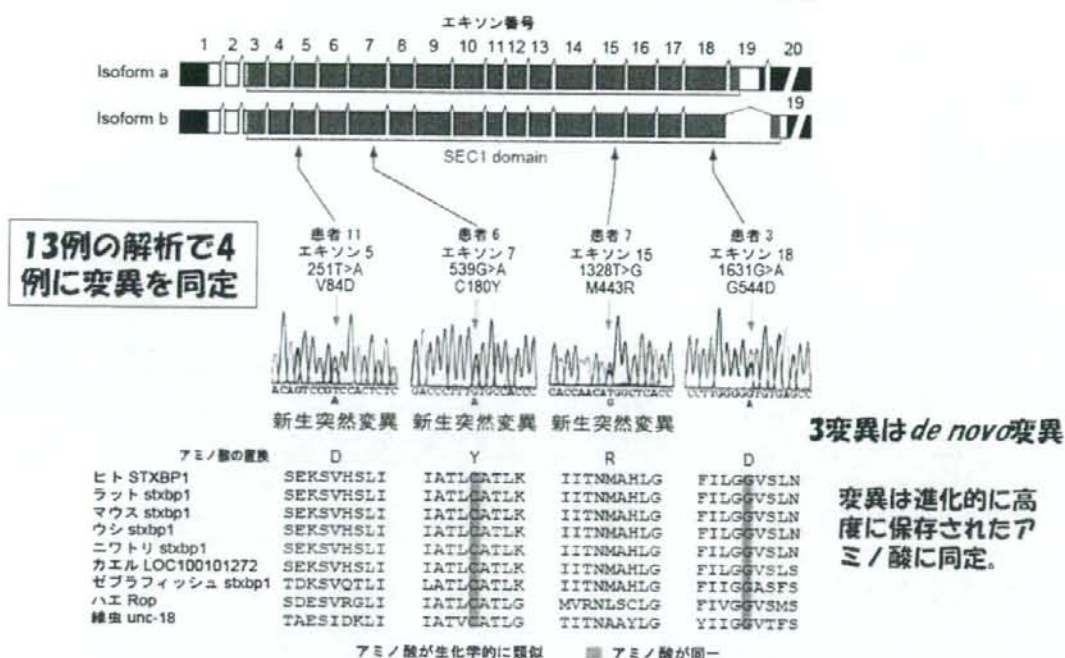
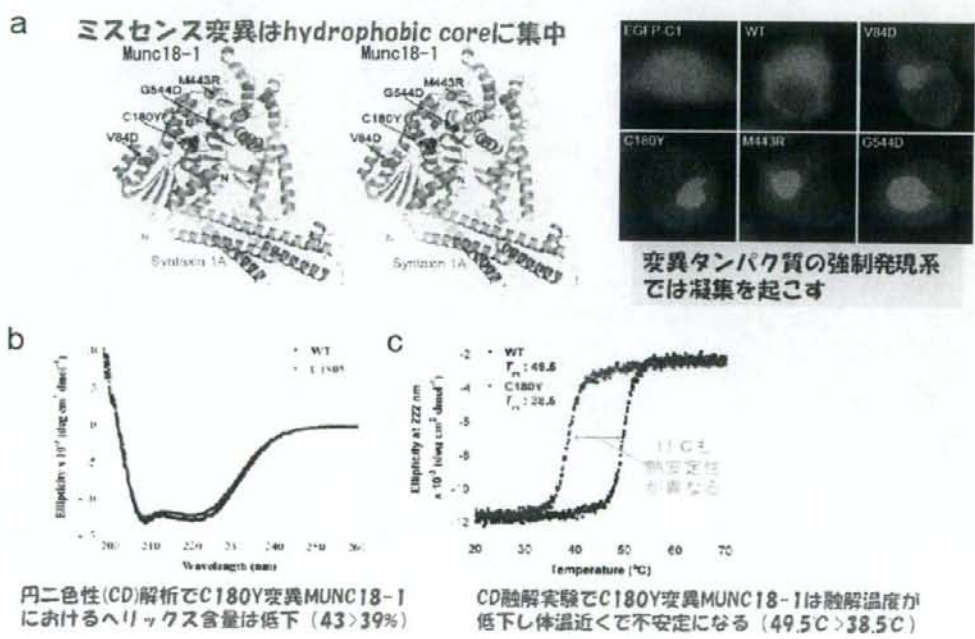


図2. 同定されたミスセンス変異はタンパク質構造を不安定化する



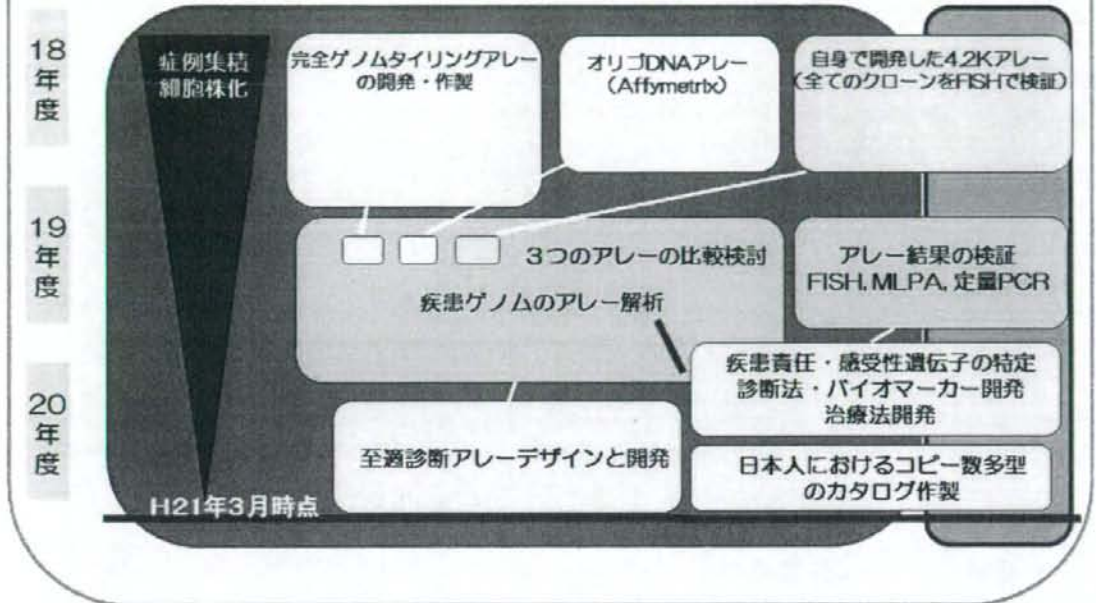


## 研究計画と進行状況

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



厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテラーメード研究)  
(総合) 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

- (平成18年度) マイクロアレーCGH検証法に関する研究  
(平成19年度) 全ゲノム増幅によるアレー解析試料の調整  
(平成20年度) 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

ゲノムのコピー数を対象にしたマイクロアレー解析法は、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し責任遺伝子を単離する目的で行われた。分担研究として、平成18年度はアレー解析で検出されたコピー数異常を効率的に検証するための各種検証法の比較検討を行い、平成19年度はアレー解析法の臨床応用を視野に入れ、微量のゲノムDNAから全ゲノム増幅法(Whole Genome Amplification, WGA)を介したアレー解析の可能性を検討した。最終年度(平成20年度)は、高密度アレーを用いて日本人の50~100 Kb以上のコピー数多型(CNV)のカタログ/データベース作成を行った。いずれ課題も本研究課題を技術的・理論的に補強し研究を順調に遂行するための重要な研究課題であった。アレー結果検証法としては定量リアルタイムPCR法がFISHと共に最も効果的・効率的な手法であり、全ゲノム増幅法も数百KbのCNVは検出可能でありゲノムDNA微量解析も技術的に可能であることを確認した。日本人ゲノムのCNVカタログ/データベース作成も完了し、このカタログは今後の日本人ゲノムのアレー解析に極めて重要な情報を提供する。計画された研究は全て順調に遂行されたと考えている。

A. 研究目的

①マイクロアレーCGH 検証法に関する研究

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

②全ゲノム増幅(WGA)によるアレー解析試料の検討

マイクロアレーCGH法には、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を用いてアレーによるゲノムコピー数解析が可能かを検討した。

③高密度マイクロアレーによるCNVデータベースの作成

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 kbp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) とは異なる。近年、先天性異常などの臨床的に疾患との関連性のある CNV のみならず、疾患との関連がないと考えられる、いわば“良性”の CNV も多数報告されている。しかし多くの CNV についてその臨床的な位置付けが明確ではない状況にある。そのため症例解析における CNV が正常多型か、病的かを判断することが時に極めて困難である。個人間で共通にみられる正常多型としての CNV データベースのニーズは極めて高い。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。高密度マイクロアレーは、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手法である。本年度は、高密度マイクロアレー法を用い、日本人集団に対しゲノムコピー数解析を実施し、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た。

## B. 研究方法

### ①マイクロアレーCGH 検証法に関する研究

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

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

可能である。

MCC (Molecular Copy-number Counting) 法は最適な希釈ゲノム DNA を鋳型としてヘミネスティッドPCRにより対象領域と正常コピー数領域の2箇所を比較する事で相対的コピー数を推定することが可能である。

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

### ②全ゲノム増幅 (WGA) によるアレー解析試料の検討

#### 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 アレーのプラットフォー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-②-1 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・増幅をおこなった行った。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-②-2 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 アレー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。

#### ③症高密度マイクロアレーによるCNVデータベースの作成

##### 1. 高密度マイクロアレー解析による CNV の網羅的抽出

ヒト末梢血から直接抽出したゲノム DNA 試料を対象として 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。検出対象のCNVはSNP 6.0アレーは50 kb以上のゲノムサイズを有するもの、250Kアレーでは100 kb以上を有するものを対象とした。解析対象は110例で、その内SNP 6.0では60例(10組の親子[トリオ]を含む)、250Kでは50例においてアレー解析を施行した。

##### 2. 各ゲノムコピー数解析結果に対する検討

それぞれのゲノムコピー数解析結果をAffymetrix社製ソフトウェア Genotyping Console (GTC)を用いて検討した。コピー数変化の検討に際しては、現在公開されているヒトゲノムデータベースの一つである Database of Genomic Variants (DGV : <http://projects.tcag.ca/variation/>)との照合を行い、さらにバクテリア人工染色体 (BAC) クローンを用いた FISH (fluorescence *in situ* hybridization)法による検証を行った。マイクロアレーのデータ解析には Affymetrix 社の Genotyping console (GTC)の ver 2.1 あるいは ver 3.0.2 を用いた。

#### C. 研究結果

##### ①マイクロアレーCGH 検証法に関する研究 (図1)

##### 1. MLPA 法

Prader-Willi/Angelman 症候群領域は既に市

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

##### 2. MCC 法

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

##### 3. 定量リアルタイムPCR法

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

#### ②全ゲノム増幅 (WGA) によるアレー解析試料の検討

##### 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アレー解析におけるSNPコール率とlog2Ratio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2)。

##### 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10μg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 アレー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 ver. 3 を使用）、平均 SNP コール率は 89.4%、log2Ratio 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。

## ③ 高密度マイクロアレーによる CNV データベースの作成

### 1. 高密度マイクロアレーを用いた CNV の解析

SNP 6.0 によるゲノムコピー数解析の結果、症例ゲノム 1 例あたり平均 36 前後のコピー数変化を検出した。GeneChip 250K では 1 症例ゲノム平均 40 であった。10 組のトリオ解析においては、遺伝性 CNV に加えて新生 (de novo) CNV を 33 領域同定した。

### 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 のカタログ/データベースを作成した。

### D. 考察

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

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 マイクロアレー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 程度のゲノム欠失・重複が正確に検出可能であった。3 種の全ゲノム増幅試薬キットを使用した GeneChip オリゴマイクロアレー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 アレーを使用する際には、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。WGA を利用することにより微量の検体を対象としたアレー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。

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 クロー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。今後解析プロトコー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

マイクロアレーCGH 法の検証系として MLPA 法・MCC 法・定量リアルタイム PCR 法を比較検討した。診断精度・迅速性・経済性において定量リアルタイム PCR 法が最も優れ、FISH と同等の精度を有する事が判明した。以降の研究は FISH と定量リアルタイム PCR 法を組み合わせることで効率的に検証を進めた。微量なゲノム DNA でもアレー解析が可能となる WGA 法は実際に使用可能なレベルである。特にアレー解析では GenomePlex でのデータが最も適していると判断した。

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変有用である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

Liang D, Wu L, Pan Q, Harada N, Long Z, Xia K, Yoshiura K, Dai H, Niikawa N, Cai F, Xia J. A father and son with mental retardation, a characteristic face, inv(12), and insertion trisomy 12p12.3-p11.2. *Am J Med Genet A*. 140:238-44, 2006.

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

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

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

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

Dowa Y, Yamamoto T, Abe Y, Kobayashi M, Hoshino R, Tanaka K, Aida N, Take H,



- Kato K, Tanaka Y, Ariyama J, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K. Congenital Neuroblastoma in a Patient With Partial Trisomy of 2p. *J Pediatr Hematol Oncol*. 28:379-82, 2006.
- Miura S, Miura K, Yamamoto T, Yamanaka M, Saito K, Hirabuki T, Kurosawa K, Harada N, Ishizaki-Yamasaki Y, Matsumoto N, Hirahara F, Yoshiura K, Masuzaki H, Niikawa N. Origin and mechanisms of formation of fetus-in-fetu: two cases with genotype and methylation analyses. *Am J Med Genet A*. 140:1737-43. 2006.
- Hiraki Y, Fujita H, Yamamori S, Ohashi H, Eguchi M, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N. Mild craniosynostosis with 1p36.3 trisomy and 1p36.3 deletion syndrome caused by familial translocation t(Y;1). *Am J Med Genet A*. 140:1773-7. 2006.
- Sakai H, Visser R, Ikegawa S, Ito E, Numabe H, Watanabe Y, Mikami H, Kondoh T, Kitoh H, Sugiyama R, Okamoto N, Ogata T, Fodde R, Mizuno S, Takamura K, Egashira M, Sasaki N, Watanabe S, Nishimaki S, Takada F, Nagai T, Okada Y, Aoka Y, Yasuda K, Iwasa M, Kogaki S, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N. Comprehensive genetic analysis of relevant four genes in 49 patients with Marfan syndrome or Marfan-related phenotypes. *Am J Med Genet A*. 140:1719-25. 2006.
- Miura K, Yoshiura K, Miura S, Kondoh T, Harada N, Yamasaki K, Fujimoto Y, Yamasaki Y, Tanigawa T, Kitajima Y, Shimada T, Yoshida A, Nakayama D, Tagawa M, Yoshimura S, Wagstaff J, Jinno Y, Ishimaru T, Niikawa N, Masuzaki H. Clinical outcome of infants with confined placental mosaicism and intrauterine growth restriction of unknown cause. *Am J Med Genet A*. 140:1931-5. 2006.
- Shimokawa O, Harada N, Miyake N, Satoh K, Mizuguchi T, Niikawa N, Matsumoto N. Array comparative genomic hybridization analysis in first-trimester spontaneous abortions with 'normal' karyotypes. *Am J Med Genet A*. 140:1931-5. 2006.
- 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.
- 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, Dow A, 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, Saito 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, 井田知子, 佐々木由喜, 霜川 修, 矢野一美, 江口真希, 川良洋城, 大村奈緒美, 森内美由紀: 当施設における未培養羊水細胞を用いた FISH 法による異数性異常スクリーニング検査の現状. 第 13 回日本遺伝子診療学会大会

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

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

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

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

涌井敬子, 原田直樹, 金井 誠, 関島吉樹, 櫻

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

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

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

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

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

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: マイクロアレーCGH により検