

第54回日本人類遺伝学会 2009年9月23日(水)~26日(土), グランドプリンスホテル高輪, 東京

OA 016: 6番染色体部分片親性ダイソミーを認めた3M症候群の1例. 佐々木健作, 岡本伸彦, 小崎健次郎, 川良洋城, 吉浦孝一郎, 松本直通, 原田直樹

OA 019: アレイ染色体検査のための健常人 CNV データベース構築の試み. 松井健, 霜川修, 齋藤和正, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 松本直通, 原田直樹

OA 056: 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC) の変異解析. 小野慎治, 菊池妙子, 木下晃, 小澤寛樹, 新川詔夫, 吉浦孝一郎

PA 031: 網羅的解析による母胎血中胎盤特異的 microRNA の同定とその局在に関する検討. 三浦清徳, 三浦生子, 東島愛, 阿部修平, 山崎健太郎, 嶋田貴子, 吉田敦, 中山大介, 吉浦孝一郎, 増崎英明

PB 100: 羊水検査で検出した2番染色体長腕逆位重複の1例. 松井健, 堀越嗣博, 川目裕, 霜川修, 佐々木由喜, 松本直通, 吉浦孝一郎, 原田直樹

PB 133: 日本人口唇裂患者における8q24の検証. 津田雅由, 引田正宣, 秋田定伯, 平野明喜, 内山健, 吉浦孝一郎

PB 147: 次世代シーケンサによる日本人ゲノム16q-ADCA原因候補領域の構造解析. 要匡, 塚原正俊, 柳久美子, 藤森一浩, 喜久里育也, 照屋盛実, 今田有美, 鼠尾まい子, 矢野修一, 佐藤友紀, 三輪友希乃, 平野隆, 平野隆城, 高嶋博, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二

PB 148: 嚢胞内乳ガンは嚢胞内乳頭腫に比べ顕著なゲノム変化を有する: 高密度 SNP マイクロアレイによるゲノムワイド copy number/LOH 解析. 及川将弘, 永安武, 矢野洋, 安倍邦子, 林徳真吉, 新川詔夫, 吉浦孝一郎

PB 150: 長崎県におけるHPV-DNA型の分布と子宮頸癌との関連に関する検討. 阿部修平, 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 中山大介, 吉浦孝一郎, 増崎英明

PB 151: 長崎におけるHPV-DNA型の頻度と持続感染に関する研究. 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 藤下晃, 鮫島哲郎, 村上誠, 吉浦孝一郎, 増崎英明

国際学会

The American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting

Honolulu, Hawaii, October 20-27, 2009

1106/W: The difference of HPV (human

papillomavirus) DNA genotypes may influence the speed of carcinogenesis in cervical squamous intraepithelial lesions among Japanese patients. Yakamaski K, Miura K, Miura S, Shimada T, Fujishita A, Samashima T, Murakami M, Yoshiura K, Masuzaki H.

1292/W: Intracystic papillary carcinoma of breast harbors significant genomic alteration compared with intracystic papilloma: Genome-wide copy number and LOH analysis using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. Oikawa M, Nagayasu T, Yano H, Hayashi T, Abe N, Yoshiura K, Niikawa N,

1377/W: DNA array-based copy number analysis in chorionic villus samples (CVS) of spontaneous abortions with normal karyotypes. Yamada T, Ohra T, Hosoki K, Shimada S, Morikawa M, Yamada T, Yoshiura K, Minakami H, Niikawa N

1619/T: Microarray-based analysis using cell-free mRNA in pregnant women has a potential to estimate a placental status. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Higashijima A, Abe S, Yoshiura K, Niikawa N, Masuzaki H.

1985/T: Brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 and 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA on SNP array. Kuniba H, Oikawa M, Kondoh T, Kinoshita A, Moriuchi H, Nagayasu T, Niikawa N, Yoshiura K.

2892/F: Resequencing of the whole candidate region for 16q22-linked spinocerebellar ataxia in Japanese individuals using next-generation sequencing. Kaname T, Tsukahara M, Yanagi K, Fujimori K, Kikuzato I, Teruya M, Imada Y, Nezu M, Yabo S, Sato Y, Miwa Y, Hirano T, Hirano R, Takashima H, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

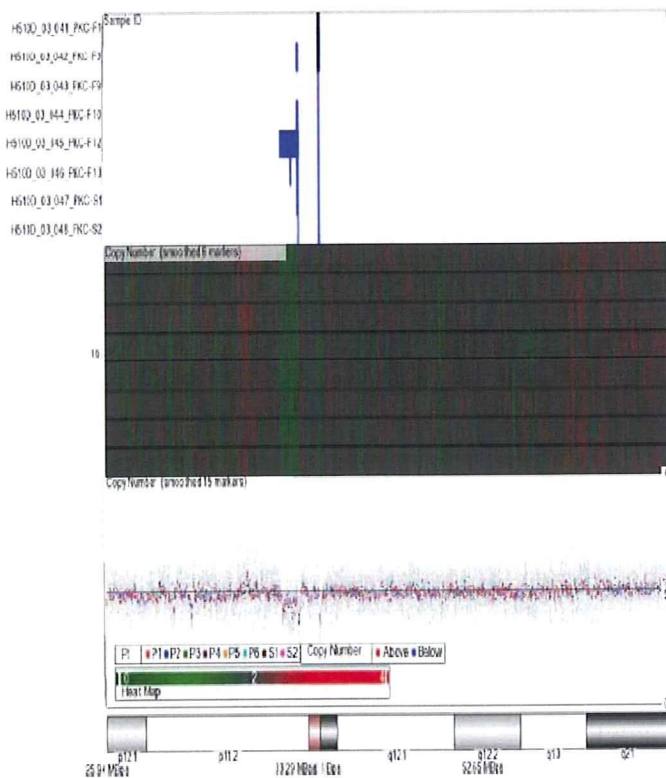
なし

2. 実用新案登録

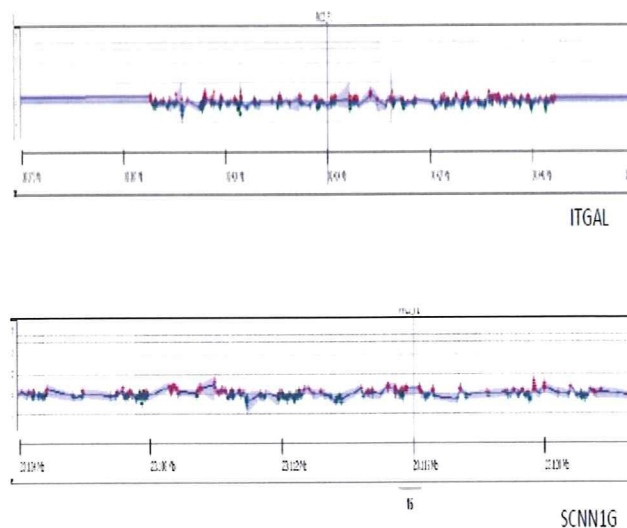
なし

3. その他

なし



(図1) Partek Genomics Suiteで解析したコピー数変化の結果が表示されている。青い線で示されているのが欠失領域であり、上から順にPKC家系1, 3, 9, 10, 12, 13, 孤発例1, 孤発例2と8名分の結果である。その下にはheat mapが示されており、赤が重複領域で、緑が欠失領域である。その下にはプローブの対照と比較した強度が示されている。赤が重複領域で、緑が欠失領域である。その下にはプローブの対照と比較した強度が示されている。



(図2) Agilent社Genomic Workbenchで解析したITGAL, SCNN1G遺伝子のコピー数解析の結果を表示してある。

PKCの原因候補領域の抽出と塩基配列解析、患者iPS細胞の樹立に関する研究

要 旨

研究要旨

家族性の発作性運動誘発性舞踏アテトーゼの原因となっている第16番染色体の構造解析および病態解析を目的として、原因候補領域の抽出と塩基配列解析、iPS細胞の樹立を目指した。原因候補領域の抽出に関して、染色体ソーティングまたはlong-PCR法による抽出を検討し、いずれも可能であった。Long-PCR法による抽出ゲノムの次世代シーケンサーによる全塩基配列決定により、SNP検出も十分行えた。iPS細胞について、EBV株化細胞（浮遊系）からの樹立を試みたが、遺伝子導入効率の低さから困難であった。現段階では、線維芽細胞など接着系の細胞からの樹立が妥当であると思われた。

A. 研究目的

本研究は、家族性の発作性運動誘発性舞踏アテトーゼの原因となっている第16番染色体の候補領域を抽出し、その構造を解析すること、および、病態解析へ向け患児の細胞よりiPS細胞の樹立を試みることを目的とする。

B. 研究方法

第16番染色体の候補領域抽出については、染色体ソーティングによる分離抽出、long-PCR法による増幅抽出を行った。

第16番染色体の分離については、EBV株化細胞を用いて、一色法（クロモマイシンA3染色）にて分離を試みた。まず、増殖期の細胞に、コルセミド添加後、数時間培養し、分裂中期細胞を濃縮し、次に、染色体検査と同様の低張処理を行い、ポリアミン（スペルミン、スペルミジン）を含む緩衝液で置換し、さらに0.1%ジギトニン含有ポリアミン緩衝液中でボルテックス攪拌により染色体を分離させた。その後、クロモマイシンA3で染色し、蛍光強度を指標として高速セルソーターにて染色体ごとの分離を行い、16番染色体を単離した。

Long-PCRについては、約10~20kbごとに増幅できるようにプライマーを設定した。プライマーは、Tm値が70℃~80℃になるように設定し、ヘアピン構造などの構造をさけるように配列を決定した。Long-PCRは、KOD-FX(TOYOBO)またはPrimeSTAR GXL(TAKARA)を使用し、低いバックグラウンドで効率の良い増幅が得られるよう、buffer中のMg⁺⁺濃度、アニーリング温度、プライ

マー濃度の設定を、各領域ごとに行った。

患者由来EBV不死化リンパ球より、iPS細胞の樹立を試みた。患者細胞へ電気穿孔法（マイクロポレーション法）にて、OCT3/4, KLF4, SOX2, c-MYC, NANOG発現ユニットを導入し、フィーダー細胞（マウスEF）上で培養、胚幹細胞様未分化細胞形態を指標としてiPS細胞の有無を確認した。

PKC患児ゲノムBACライブラリーの作製
PKC患児のEBV株化細胞を培養し、1x10⁷細胞/mLの密度でアガロースプラグを作製した。ドデシル硫酸リチウム処理にてそれらプラグよりゲノムを抽出し、BamHI部分消化後、100~300kbのゲノム断片を、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて抽出・精製した。BACベクター（pBACe3.6を使用）については、BamHI完全消化およびpUC領域の除去、アルカリフォスファターゼ処理を行い、クローニング用ベクター断片とした。これらゲノム断片とベクター断片を1:1の割合でligation反応を行い、大腸菌（DH10B）へ電気穿孔法により導入、培養後、ライブラリー原液として、まず、作製効率の検証と品質の確認を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、琉球大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に係る倫理審査委員会の承認を受け、患者よりインフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

染色体ソーティングによる第16番染色体の分離について、EBV株化細胞を用いて、一色法（クロモマイシンA3染色）にて分離を試みたところ、一色法のため、第17番染色体

などの混入は認められるものの、全染色体からの16番染色体の濃縮ができた。しかしながら、次世代シーケンスへの解析に十分な染色体数の収集は時間的を要し、困難であった。

染色体の分離は可能であったが、分離後の実際の解析を考慮した場合、時間または純度と回収効率の向上が必要であり、それによって解決できると考えられた。よって、染色体標本準備条件、分離時の条件を検討により、課題は解決できると考えられる。

広範囲ゲノム領域の全塩基配列決定については、16番染色体全体の塩基配列解析は行っていないものの、第16番染色体の一領域について long-PCR 法により 1 Mb~2 Mb を効率よく増幅・抽出できたため、そのゲノム領域について次世代シーケンサ (SOLiD3) を用いて、全塩基配列解読を行った。結果、その後の SNP 検出等、十分なデータ解析が行えた。具体的には、SOLiD3 を用いたフラグメント解析によるデータの標的領域の冗長度は x2000 以上であり、信頼性の高いデータが得られ、また SOLiD 内 pipeline ソフトウェアによる SNP コールにて、400~500 の SNP が検出できた。この検出された SNP のうち、20 種類の homoSNP について検証したところ、すべて確認され、信頼度は 100% 近いと考えられた。

iPS 細胞について、EBV 株化細胞から OCT3/4 等の遺伝子導入による樹立を試みた。電気穿孔法の導入効率の問題などにより樹立できなかった。電気穿孔法による、EBV 株化細胞へのプラスミドの導入効率は、最高約 10% であったため、この効率を改善させる条件や機器の変更、または導入法の変更が必要と考えられた。

BAC ライブラリーの作製について、患児ゲノム BAC ライブラリーは、インサート陽性クローンの比率は約 70%、インサートの平均長は、150 kb であった。しかしながら、タイターがライブラリーとしては低く (約 4×10^4 cfu/mL)、ライブラリー作製の追加 (ライゲーション比率と導入の条件の再検討も含む) を行う必要がある。よって、追加でライブラリーを作製している。十分なタイターまたはクローン数が得られた後、BAC クローンスクリーニングを予定している。

D. 考察

染色体ソーティングによる第16番染色体の分離について、EBV 株化細胞を用いて、一色法 (クロモマイシン A3 染色) での分離では、第17番染色体などの混入は認められるもの

の、全染色体からの16番染色体の濃縮ができた。精度の高い分離には、やはり二色法がよいと思われるが、設備、調整等の観点からは、一色法の方が簡便で収量確保には有利である。次世代シーケンサの解析精度の確保には、ゲノム (染色体) の収量は重要であり、また、他の染色体の混入が認められたとしても、今後、次世代シーケンサの性能が向上されれば、混入分のゲノムも十分カバーして配列決定ができると考えられる。

広範囲ゲノム領域の全塩基配列決定について、16番染色体全体の塩基配列解析は行っていないものの、long-PCR により 1 Mb~4 Mb を抽出したゲノム領域について次世代シーケンサを用いて、全塩基配列解読を行った結果、SNP 検出等、十分なデータ解析が行えた。これは、目的の領域を抽出できれば、その領域の配列解析は、現在の次世代シーケンサで十分に可能ということである。本研究で行った手法で PKC の全ての候補領域を抽出することで、構造解析が可能となると考えられる。

ゲノムライブラリーは、その後の解析を効率よく行うために、本来のゲノムの10倍以上の冗長度があるとよいとされている。作製した患児ゲノムの BAC ライブラリーは、ゲノムカバー率が十分とは言えなかった。これは、作製時の ligation 等の効率に依存するが、作製を繰り返し行うことで確保できると考えられる。

iPS 細胞について、EBV 株化細胞から OCT3/4 等の遺伝子導入による樹立を試みたが樹立できなかった。これは、主に電気穿孔法の導入効率の問題が大きいと考えられる。現段階において、浮遊系細胞より付着系細胞の方が遺伝子等の導入効率が圧倒的によいので、樹立においては、線維芽細胞等の付着系細胞を使用する方が確実であると思われる。

E. 結論

染色体ソーティングは、今後の次世代シーケンス解析において、最も有効なゲノム抽出手段の一つとなるにもかかわらず、現在ほとんどの施設で行われていない。よって、本手法の確立は、国内外において、また、PKC の他、他の原因不明の難病の解明においても重要なステップとなる。従って、PKC の原因解明も含めて、染色体分離を継続する必要があると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T, Matsumoto N. (2009). Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split foot malformation and hearing loss. *Am J Med Genet.*, 149A:1224-1230.

Pierron S, Richelme C, Triolo V, Mas JC, Griffet J, Karmous-Benailly H, Quere M, Kaname T, Lambert J-C, Giuliano F. (2009). Evolution of a Patient with Bohring-Opitz Syndrome. *Am J Med Genet.*, 149A:1754-1757.

要旨:ゆるやかなゲノムのはなし 「知の津梁 – やわらかい南の学と思想–」 第3巻 pp340-351
沖縄タイムス出版 2010年3月

2. 学会発表

要旨:塚原正俊、柳久美子 他14名:次世代シーケンサを用いた染色体16q22領域の日本人ゲノム構造解析 第49回日本先天異常学会学術集会 鹿児島 2009年6月

要旨:塚原正俊、柳久美子 他14名:次世代シーケンサを用いた原因候補全領域リシーケンス解へのアプローチ;日本人ゲノム16q22領域の構造解析 第16回日本遺伝子診療学会 札幌 2009年7月

要旨:塚原正俊、柳久美子 他14名:次世代シーケンサによる日本人ゲノム16q-ADCA原因候補領域の構造解析 日本人類遺伝学会第54回大会 東京 2009年9月

要旨:ヒト遺伝性疾患の原因同定へ向けた全候補領域リシーケンス解析 第4回 バイオインフォマティクス研究者と医学研究者の交流会 柏(千葉) 2009年11月

要旨:これから目線でゲノムを見に行こう –次世代シーケンサーが我々にもたらしたもの– 市民講座「ゲノム情報をもたらす医療の革新」 東京 2010年2月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wu L,Liang D, Niikawa N, Ma F, Sun M, Pan Q, Long Z, Zhou Z, Yoshiura K, Wang H, Sato D, Nishimura G, Dai H, Zhang X, Xia J.	A ZRS duplication causes syndactyly type IV with tibial hypoplasia.	Am J Med Genet A.	149A(4)	816-818	2009
Kuniba H, Pooh RK, Sasaki K, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Egashira M, Moriuchi H, Yoshiura KI, Niikawa N.	Prenatal diagnosis of Costello syndrome using 3D ultrasonography amniocentesis confirmation of the rare HRAS mutation G12D.	Am J Med Genet A.	149A(4)	785-7	2009
Miyazaki K, Mapendano CK, Fuchigami T, Kondo S, Ohta T, Kinoshita A, Tsukamoto K, Yoshiura KI, Niikawa N, Kishino T.	Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse Snurf/Snrpn gene.	Gene	432(1-2)	97-101	2009
K Hamanoue H, Megarbane A, Tohma T, Nishimura A, Mizuguchi T, Saitsu H, Sakai H, Miura S, Toda T, Miyake N, Niikawa N, Yoshiura K, Hirahara F, Matsumoto N.	A locus for ophthalmo-acromelic syndrome mapped to 10p11.23.	Am J Med Genet A.	149A(3)	336-342	2009
Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N.	Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome.	J Hum Genet.	54(5)	304-309	2009

Toyoda Y, Sakurai A, Mitani Y, Nakashima M, Yoshiura KI, Nakagawa H, Sakai Y, Ota I, Lezhava A, Hayashizaki Y, Niikawa N, Ishikawa T.	Earwax, osmidrosis, and breast cancer: why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter ABCC11 gene determine earwax type?	FASEB J.	23(6)	2001-2013	2009
Nakano M, Miwa N, Hirano A, Yoshiura K, Niikawa N.	A strong association of axillary osmidrosis with the wet earwax type determined by genotyping of the ABCC11 gene.	BMC Genet.	10	42-43	2009
Machida J, Félix TM, Murray JC, Yoshiura K, Tanemura M, Kamamoto M, Shimozato K, Sonta S, Ono T.	Searching for genes for cleft lip and/or palate based on breakpoint analysis of a balanced translocation t(9;17)(q32;q12).	Cleft Palate Craniofac J.	46(5):	532-540	2009
The Super Science High School Consortium.	Japanese map of the earwax gene frequency: a nationwide collaborative study by Super Science High School Consortium.	J Hum Genet.	54(9)	499-503	2009
Kimani JW, Yoshiura K, Shi M, Jugessur A, Moretti-Ferreira D, Christensen K, Murray JC.	Search for Genomic Alterations in Monozygotic Twins Discordant for Cleft Lip and/or Palate.	Twin Res Hum Genet.	12(5)	462-468	2009
Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T, Matumoto N.	Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split Foot malformation and hearing loss	Am J Med Genet.	149A	1224-1230	2009
Pierron,S Richelme C, Triolo V Mas JC, Griffet J, Karmous-Benailly H Quere M, Kaname T, Lambert J-C, Giuliano F.	Evolution of a patient with Bohring-Opitz Syndrome	Am J Med Genet.	149A	1754-1757	2009
要 匡	ゆるやかなゲノムの話 知の津梁—やわらかい南の 学と思想—	沖縄タイムス出版	第3巻	Pp340-351	2010

