

200936189A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ゲノム異常症として歌舞伎症候群原因遺伝子同定と
遺伝子に基づく成長障害治療可能性の研究開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：吉浦孝一郎
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

平成22年（2010年）4月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ゲノム異常症として歌舞伎症候群原因遺伝子同定と

遺伝子に基づく成長障害治療可能性の研究開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：吉浦孝一郎

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

平成22年（2010年）4月

目 次

I. 総括研究報告書

ゲノム異常症として歌舞伎症候群原因遺伝子同定と遺伝子に基づく成長障害
治療可能性の研究開発

吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）-----1

II. 分担研究報告書

1. 患者試料収集体制の整備，情報の整理統括 -----12

研究分担者

新川詔夫（北海道医療大学個体差健康科学研究所・教授）

太田 亨（北海道医療大学個体差健康科学研究所・准教授）

2. 患者試料のゲノムコピー数の解析 -----20

研究分担者

木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----26

IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----29

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成21年度総括研究報告書

研究課題：ゲノム異常症として歌舞伎症候群原因遺伝子同定と遺伝子に基づく成長障害治療可能性の研究開発

研究代表者：吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

研究要旨

本研究の目的は（1）未だ原因不明である歌舞伎症候群（新川-黒木症候群）の原因遺伝子の同定と病態生理の解明，（2）病態生理，分子病態にもとづいた歌舞伎症候群の症状，特に出生後成長障害，女兒の思春期早発の治療方針策定の基礎データを得ることである。本年度は，新規の歌舞伎症候群患者試料収集整理と2.7M arrayによる全ゲノムコピー数異常の検出を行った。

分担研究者

新川 詔夫（北海道医療大学個体差健康科学研究所・教授）

太田 亨（北海道医療大学個体差健康科学研究所・准教授）

木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・人類遺伝学・助教）

A. 研究目的

歌舞伎症候群（新川-黒木症候群）は研究分担者新川らが確立した疾患単位で，世界で400例以上の報告があるが，未だ原因不明である。本研究の目的は（1）その原因遺伝子の同定と病態生理の解明，（2）病態生理，分子病態にもとづいた歌舞伎症候群の症状，特に出生後成長障害，女兒の思春期早発の治療方針策定の基礎データ

を得ることである。

B. 研究方法

研究期間中に，下口唇窩または下口唇中央溝をもつ典型例を収集し不死化細胞株を樹立する。加えて，すでに当教室で凍結保存している典型例・非典型例の本症患者の lymphoblastoid cell line (LCL) 細胞とあわせて解析対象とする。すでに収集している症例

ではLCL細胞はないがDNAのみを保有しているものがあり、これも解析対象とする。

(1) 歌舞伎症候群を優性遺伝と想定し Affymetrix Cytogenetics Whole - Genome 2.7M Array を用いての全ゲノム微小コピー数異常領域の同定

患者試料は新たに収集して抽出した高分子DNAおよびLCLとして保存している細胞から高分子DNAを抽出して使用する。Cytogenetics Whole - Genome 2.7M Array は Affymetrix 社から供給されるプロトコールに則り実験し、データ解析は Partek Genomics Suite および Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software を使用する。

(2) 常染色体劣性遺伝・片親性ダイソミー性疾患と想定し Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 による遺伝子型決定 (ROH: runs of homozygosity 領域の決定)

(1)と同様に高分子DNAを使用して、Affymetrix 社から供給されるプロトコールに則り実験を行う。

(3) メチル化異常症と考えて、クロマチン免疫沈降後の DNA 断片シ

ーケンスプロファイルによる患者と対照者の差異の描出

使用する抗体は、抗 MBD2 抗体・抗 H3K9 メチル (不活性ヒストン) 抗体を使った免疫沈降を行い、得られた沈降物内の DNA 断片を、次世代シーケンサーを用いて読み、どこの領域が多く沈降されてくるかを比較する。すなわち正常コントロール細胞と患者細胞でどこが不活性化されているかのプロファイルを作成し、不活化領域を同定する。

(4) 候補遺伝子の変異解析・定量解析

かねてから下口唇窩 (lip pit) が Van der Woude 症候群 (VWS) に特徴的とされていたが、歌舞伎症候群の一症状として見られることが知られていて、VWS の原因である IRF6 遺伝子の情報伝達系に関する遺伝子が原因であるかもしれないとの仮説に基づいて IRF6 関連遺伝子の変異解析・定量解析を行う。変異解析は従来からの PCR-direct sequence 法を採用し、定量は、SYT013 を用いての増幅効率によってコピー数の定量を行う。PCR の機械は Roche 社の lightCycler480 を使用する。本年度中に、定量 PCR 時の反応液作成や分注作業は特化した分注機 (Qiagen 社の Qiagility) を使用することによって、安定したデータがえ

られることがわかり、Qiagility 購入し実験することとした。

C. 研究結果

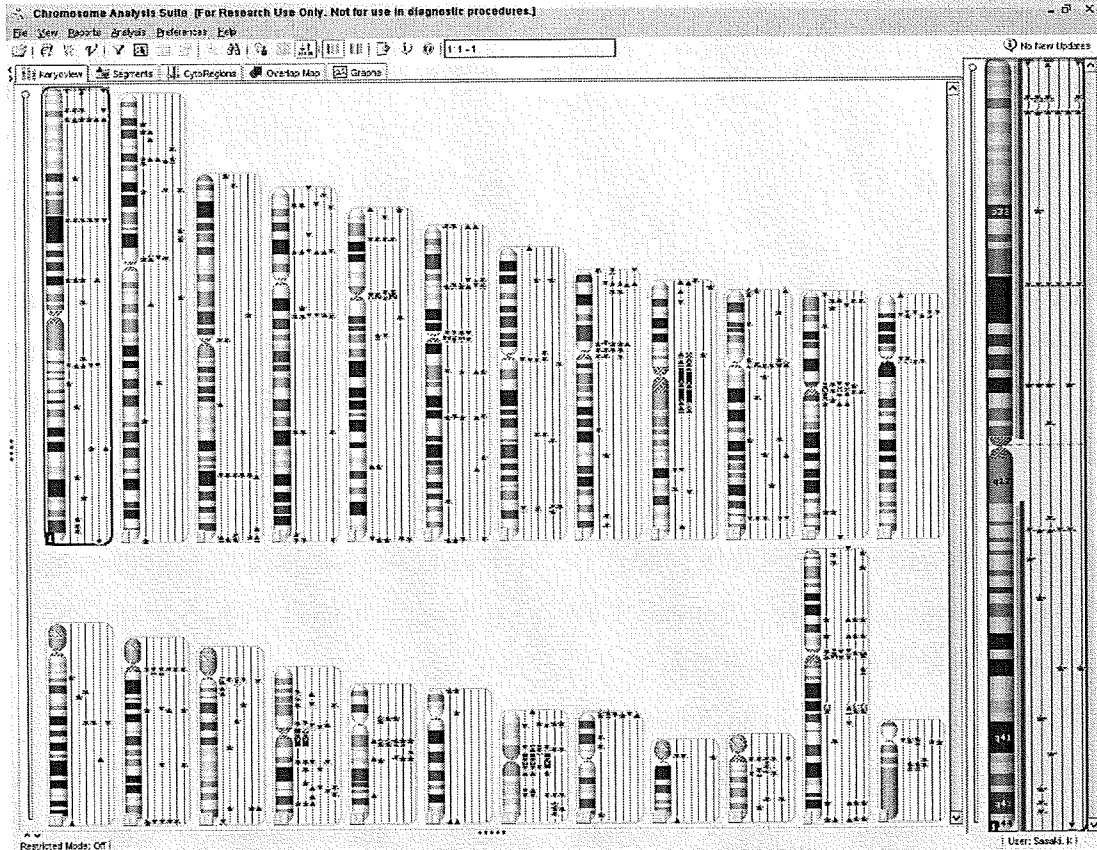
新規典型例試料収集～DNA チップ解析について

北海道医療大学チームで収集された歌舞伎症候群典型例7例を収集し、そのうち4例については両親の試料も収集した。典型例7例のうち6例を解析した。Cytogenetics Whole - Genome 2.7M Array が供給開始される前であり、Affymetrix Genome - Wide Human SNP Array 5.0 (SNP array 5.0) による解析を行った。隠れマルコフモデル解析の結果、欠失・重複は同定されなかった。SNP array 5.0を使った隠れマルコフモデル解析による解像度を約 50 kbと考えると、これ以上の大きさの疾患原因と考えられる欠失・重複は見つからなかった。

以前、我々は9q21.11-q21.12 (～1.27 Mb)の欠失が、遺伝子を含んでかつコピー数多型の報告がない場所として報告した (Kuniba et al., 2009)。その欠失部位なかには、TRPM3, KLF9,

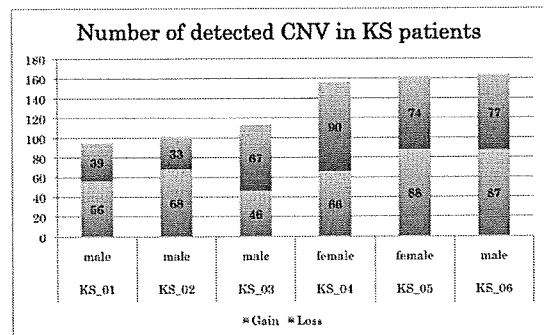
SMC5, MAMDC2の4遺伝子が欠失領域に含まれていた。しかし、これらの遺伝子について、他の患者のDNAを用いて変異解析を行い、原因変異と判断できる変異はなかった。イギリスから、歌舞伎症候群様の患者で9q21.11付近に転座を認めて、転座の切断点がTRPM3遺伝子の中にある症例の相談を受け、その患者のTRPM3遺伝子を解析したが、変異が認められなかった。TRPM3遺伝子の変異が歌舞伎症候群様の症状をもたらす可能性があるが確定できない。

Cytogenetics Whole - Genome 2.7M Array が供給され始めたので、それを用いて、北海道医療大学で解析を行った同一症例5例と長崎大学で保存されていた典型歌舞伎症候群1例の合計6例をパイロットスタディーとしてコピー数変化の同定を行った。



(図 1)

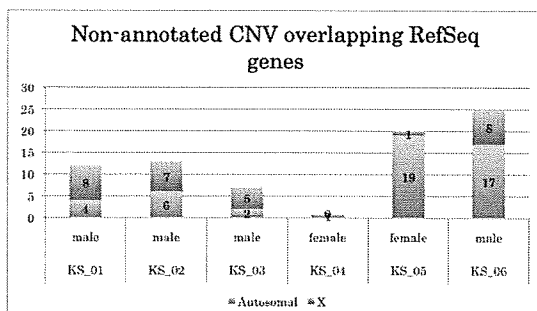
染色体の模式図の右側に6人分の結果が表示されている。赤い下方を向いた▼が欠失箇所、青い上方を向いた▲が重複箇所である。右に第一番染色体を拡大した図が表示されている。6名の患者解析の結果をそれぞれの患者について欠失および重複の数を表示したのが表1である。



(表 1)

1名につきおよそ100カ所のコピー数変化が見られる。このうち、歌舞伎症候群の原因として可能性があるのは、多型としてデータベースに登録されおらず、かつ遺伝子領域を含んでいる部位である。そのような部位を抽出

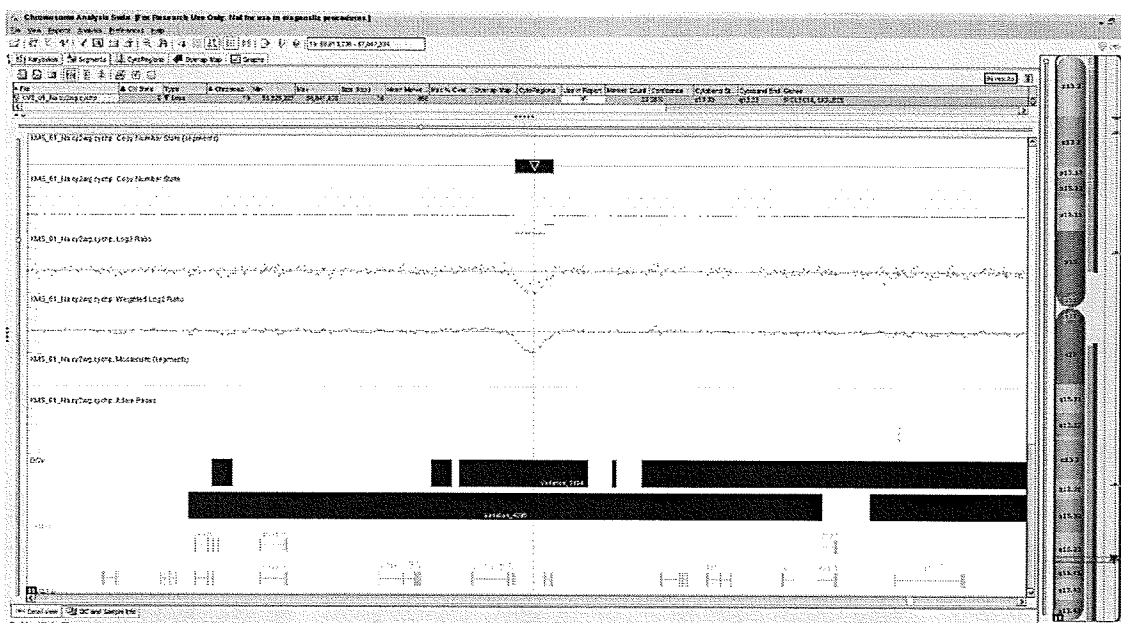
し数を表示したのが次の表 2 である。



(表 2)

候補領域として選択された領域は各個人において、1カ所から25カ所まで様々であった。また、既存の公開デー

タベース以外に自ら解析した対照試料および affymetrix 社から提供されている対照試料にもない領域が3カ所残った。2カ所が重複で3コピー、1カ所が欠失である。3カ所に7遺伝子が含まれている。現在7遺伝子については、SYTO13を使った定量PCR法によってコピー数状態を確認しつつ、他の患者で変異解析を行っているところである。欠失として確認された Chip 解析の結果が次の図 2 である。



(図 2)

図 2 の例では、図の中央に欠失領域が描出されている。欠失範囲は 19 kb であった。しかし、本領域は CNV 登録がなされている部位で病的な意義は無

いと考えられる。

D. 考察

Affymetrix CytoGenetics Whole - Genome 2.7M Array の供給が遅れ、平

成21年12月によりやく使用可能となった。今後は、当初の予定通り、2.7M Arrayを使って新規歌舞伎典型例と既試料所有の合計63例を対象として、Cytogenetics Whole - Genome 2.7 M Array により解析を進める。解像度は10〜20 kbと考えられ、エキソン単位での欠失・重複が検出できると考えられる。同一DNA試料5例を北海道医療大学で SNP 5.0 Array を使用し、長崎大学で 2.7 M Array を使用した結果を比較すると、SNP 5.0 Array 解析によっては明らかにできない欠失・重複が 2.7 M Array によって描出されている。構造異常を見つけ出すには、2.7 M Array が優れていることがわかる。歌舞伎症候群が単純な機能喪失による疾患であれば、2.7 M Array 解析により63例中に欠失が認められるであろうし、原因は見つけられると期待できる。

SNP 6.0 による homozygosity mapping およびクロマチン免疫沈降による解析は実質的に進んでいない。homozygosity mappingは重なる度合いのカットオフ値の設定のとまどっていること、クロマチン免疫沈降は使用する抗体の品質確保がうまくいっていないことに原因しているようである。homozygosity mappingによる候補領域の選定は困難であるように考えられる。クロマチン免疫沈降は、抗

体を各会社の各種抗体を比較検討していく。

今後の計画に関して、主として次の点を強力に推進していく予定である。1) 2.7M arrayによるゲノムコピー数変化をDNA使用可能な63例についてすべてスクリーニングを行い、遺伝子を含んだ欠失・重複を描出する。2) 欠失重複領域を定量PCRによって確認していく。3) 新川グループによって本年度収集された歌舞伎症候群患者典型例1例と両親を用いて全ゲノムのexome解析を行う。3)の計画に関しては、array解析では明らかにできない塩基置換を検出する目的であり1)2)のarray解析とセットで行えば、必ず歌舞伎症候群の原因遺伝子を明らかとできる。

E. 結論

本年度新たに収集した歌舞伎症候群症例を含めDNAとして利用可能な試料が63症例となった。

2.7M array の解析は、消耗品の供給が年度末近くになったために、まだ進んでいないが、確実に解析を進めスクリーニングが完了できるであろう。

Array解析による構造異常同定を補う意味でのexome解析を今後予定している。exome解析は、本年度に研究グループとして次世代型シーケンサーの使用実績を積んでおり来年度に向

けての準備は完了している。

——達成度について——

主たる目標であった Cytogenetics Whole - Genome 2.7 M Array により解析が遅れている。発売が延期される状況であったため、これまで描出していた 9q21.11 欠失, 8q24.11 の欠失の他の患者での確認, およびこれらの欠失領域に見られる遺伝子の変異解析, RASA1 の変異解析に時間を取られた。年度終了間際になり 2.7 M Array が利用可能となって, 解析を進めている最中である。この点では, ほとんど目標は達成されていない。これまでの結果の検証は全て終了し, 研究計画していた実験が始まった段階である。既所有の LCL 細胞についても新たに解凍し培養し高品質の DNA を揃え今後のどのような解析にも耐えうる DNA の確保を行った。Cytogenetics Whole - Genome 2.7 M Array 解析をできる限り進め, 欠失解析の目標達成をはかる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*. 2009 Feb 15;149A(4): 816-818.

2. 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. Feb 15.
3. 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. Mar 1.
4. 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*. 2009 Mar;149A(3): 336-342.

5. 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.* 2009 May; 54(5): 304-309.
 6. 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.* 2009. Jun; 23(6): 2001-2013.
 7. 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.* 2009 Aug 4; 10: 42.
 8. 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.* 2009 Sep; 46(5): 532-540.
 9. 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.* 2009 Sep; 54(9): 499-503.
 10. 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.* 2009 Oct; 12(5): 462-468.
 11. HUGO Pan-Asian SNP Consortium. Indian Genome Variation Consortium: Mapping human genetic diversity in Asia. *Science* 326(5959):1541-1545, 2009 (Dec 11, 2009).
2. 学会発表
国内学会
第 16 回日本遺伝子診療学会 2009 年 7 月 30 日(水)～8 月 1 日(土),

- ホテル札幌ガーデンパレス, 札幌
- W-14: 日本における HPV 感染の特徴と HPV 持続感染に関わる SNP 検索. 吉浦孝一郎, 三浦清徳, 中山大介, 増崎英明
- 0-03: ヒト疾患モデルとしての interferon regulatory factor 6 遺伝子改変マウスの表現型解析
- 0-06: 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, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 松本直通, 原田直樹
- 0-08: Brain AVM maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA using high-density SNP array. 及川将弘, 国場英雄, 近藤達郎, 永安 武, 新川詔夫, 吉浦孝一郎
- 0-11: PCR-高解像度融解曲線分析法による遺伝子スキャンニングシステムの構築. 要 匡, 柳 久美子, 福嶋義光, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二
- 0-12: 次世代型シーケンサを用いた原因候補全領域リシーケンス解析へのアプローチ:日本人ゲノム 16q122 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, 三輪有希乃, 平野 隆, 平野隆城, 高嶋 博, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二
- 0-23: 母体血中への胎盤特異的 miRNA の流入量に関する検討. 三浦清徳, 三浦生子, 東嶋 愛, 阿部修平, 山崎健太郎, 嶋田貴子, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 0-25: 自己免疫疾患におけるマイクロキメリズムノ関与に関する検討. 東嶋 愛, 三浦清徳, 山崎健太郎, 小川文秀, 川上 純, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 0-26: 長崎県における HPV-DNA 型の分布と DNA 型による癌化への影響に関する検討. 阿部修平, 山崎健太郎, 三浦清徳, 中山大介, 嶋田貴子, 三浦生子, 藤下 晃, 鮫島哲郎, 村上誠, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 0-33: 軟口蓋裂および粘膜下口蓋裂のゲノムワイド連鎖解析. 津田雅由, 中島光子, 平野明喜, 三古谷 忠, 山田崇弘, 吉浦孝一郎
- 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
- 0A 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
- 0A 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蹈アテトーゼ (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. 特許得取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成21年度分担研究報告書

研究課題：ゲノム異常症として歌舞伎症候群原因遺伝子同定と遺伝子に基づく成長障害治療可能性の研究開発

分担研究項目：患者試料収集体制の整備，情報の整理統括

分担研究者

新川 詔夫（北海道医療大学個体差健康科学研究所・教授）

太田 亨（北海道医療大学個体差健康科学研究所・准教授）

研究要旨

本研究の目的は（1）未だ原因不明である歌舞伎症候群（新川-黒木症候群）の原因遺伝子の同定と病態生理の解明，（2）病態生理，分子病態にもとづいた歌舞伎症候群の症状，特に出生後成長障害，女兒の思春期早発の治療方針策定の基礎データを得ることである。本年度は，新規の歌舞伎症候群患者試料収集整理と新規患者試料の全ゲノムコピー数異常の検出を行った。

A. 研究目的

歌舞伎症候群（新川-黒木症候群）は研究分担者新川らが確立した疾患単位で，世界で400例以上の報告があるが未だ原因不明である。本研究の目的は（1）その原因遺伝子の同定と病態生理の解明，（2）病態生理，分子病態にもとづいた歌舞伎症候群の症状，特に出生後成長障害，女兒の思春期早

発の治療方針策定の基礎データを得ることである。

本分担研究グループでは，患者臨床データの整理，新規患者DNA試料取得，患者lymphoblastoid cell line (LCL) 樹立を主な研究目的とし，新規患者DNAに対して，Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (SNP array 6.0) による解析を行った。

B. 研究方法

研究期間中に、新川・太田が下口唇窩または下口唇中央溝をもつ典型例を北海道地区で診断し、末梢血を収集し細胞を LCL 化する。加えて、すでに当該研究室内に凍結保存している典型例・非典型例の本症患者の液体窒素凍結 LCL を解凍・再培養し、高分子 DNA を抽出後、分子遺伝学的解析用に準備する。また LCL 化はされていないが DNA のみを保有している既収集例があり、それらの整理も行う。

(1) 歌舞伎症候群患者の収集

平成 21 年度は、新川と太田が北海道各地の数カ所の中核病院へ出向き、同病院遺伝外来に通院中の患者を直接診察し、新規に診断する本症患者を収集する。とくに下口唇窩あるいは下口唇中央溝をもつ典型例の収集を行う。

インフォームドコンセントの基に、新規に診断した患者の血液試料を収集しリンパ球を不死化する。不死化は契約のもとに、臨床検査所である SRL に委託して行い、樹立 LCL を北海道医療大学において液体窒素中で保存する。

収集した血液試料の一部から高分子 DNA を抽出・保存する。また、LCL として以前から保存している細胞を解凍・再培養し高分子 DNA を抽出し、解析用に準備する。

(2) 表現型の解析

歌舞伎症候群は確定診断できる検査はなく、臨床症状から診断される疾患であり、原因論的に不均一な疾患群を含む可能性がある。そのため、分子遺伝学的解析の前に、新規収集患者および既保存患者の表現型を詳細に解析し、可能な限りランキングを行う。とくに下口唇窩・下口唇溝や 5 つの主要症状（特異顔貌・低身長・精神遅滞・骨格異常・皮膚紋理異常）の有無、および親の類似顔貌の有無についての解析を行い、少なくとも典型例と非典型例の 2 群に分類する。

(3) 新規患者における染色体構造変化の解析

新規患者 6 例の高分子 DNA を使用して、Affymetrix SNP5.0 アレイを用いて、不均衡型染色体構造変化の解析を行う。

C. 研究結果

(1) 新規試料収集および試料の整理

平成 21 年度は 9 例の新規患者を収集し患者試料を得た。このうち、6 例は下口唇窩または下口唇溝をもつ典型例であり、1 例は口唇窩・溝はないものの典型例であり、残り 2 例は非典型例であった（表 1）。典型例 7 例の LCL を樹立した。7 例中の 4 例に関し

ては両親の協力が得られ、DNA を抽出して保存し来年度の exome 解析に利用する。9 例中の 2 例は下口唇窩・溝のない歌舞伎症候群であった。ここでは、便宜的に非典型例と記述している。

表 1 新規患者 9 例

患者	表現型	性・年齢	LCL	唇瘻・溝
1	典型	男・30	樹立	溝
2	典型	男・5	樹立	瘻
3	典型	男・14	樹立	溝
4	典型	女・1	樹立	瘻
5	典型	男・2	樹立	なし
6	典型	女・8	樹立	溝
7	典型	男・29	樹立	溝
8	非典型	女・0	なし	なし
9	非典型	女・4	なし	なし

上記新規試料も含めて、これまで収集・保存していた試料を整理した。解凍・再培養可能であった LCL が 43 例、線維芽細胞が 3 例、再培養できず（しかし DNA は保存している）例が 3 例、DNA のみ抽出されている例が 14 例あった。以上の 63 例が分子遺伝学解析に利用できる現有試料であった。加えて 2 例は、埼玉小児医療センター（大橋博文博士が管理）に LCL が保存されていることが確認されており解析可能である。

(2) 新規典型例における SNP アレイ解析

SNP 5.0 アレイを用いた新規患者 6 例における解析では共通した大きな欠失・重複はみられなかった（図1）。

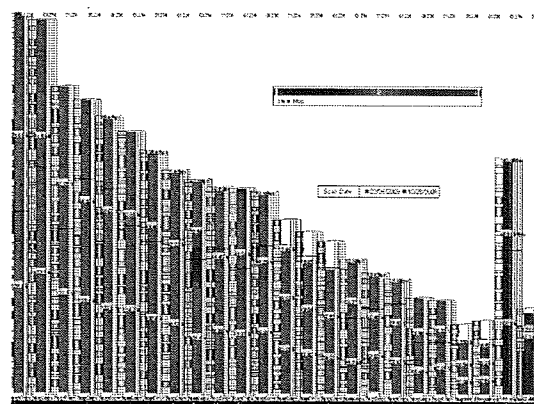


図 1 全ゲノムにおける染色体変化

下口唇窩を 1 症状とする Van der Woude 症候群の責任遺伝子 (*IRF6*) 座およびその関連遺伝子座が第 1 染色体にあることから、とくに同染色体上の構造異常の有無を詳細に調べたが、異

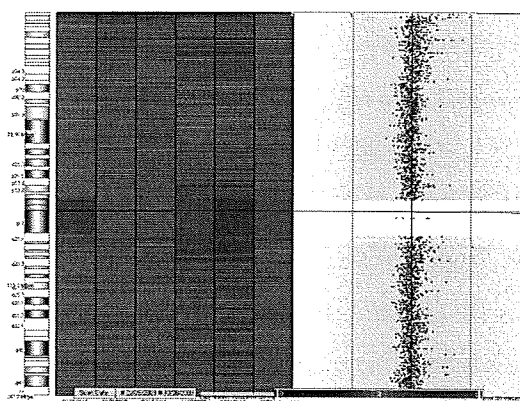


図 2 6 例における第 1 染色体の解析
常は同定されなかった（図2）。

D. 考察

新規収集および既収集試料の整理を行い、63例が現有、2例が埼玉小児

医療センターへの依頼で解析可能である。合計65例が歌舞伎症候群の分子遺伝学的解析に供することが可能である。これほどの規模で歌舞伎症候群患者試料収集を行っている研究グループはなく、今後の分子遺伝学解析にとって、世界中の研究室に比してもアドバンテージを有している。

当北海道医療大学の研究分担グループでは、スクリーニングとホモ接合性マッピングの目的で北海道で試料収集した新規典型例6例について、SNP 5.0によるマイクロアレイ解析を行ったが、構造異常はみられなかった。今後は、長崎大学のグループと連携して2.7M Arrayの解析を精力的に進めていく必要がある。

本年度に歌舞伎症候群典型例を確定診断させ、両親のDNA試料を得た4例は貴重な試料である。技術的な進歩により全ゲノムのエキソン(exon)を抽出して次世代型シーケンサーにより塩基配列を決定する方法(exome解析)が現実的となっているので、4例の両親-患者のトリオ試料は、exome解析の好試料であり親子3名をexome解析解析することによって全エキソンから歌舞伎症候群患者に起きた新生突然変異を見つけ出すことが可能となる。本解析は、来年度以降のプロジェクトとなるであろう。次年度研究に

備えて、より多くのトリオ試料を既存例を含めて収集開始した。

E. 結論

本年度新たに収集した歌舞伎症候群症例を含めDNAとして利用可能な試料が65症例となった。今年度の解析では病的なコピー数変化や塩基置換などは同定できなかったが、次年度以降に予定しているexome解析への試料の一端を収集した、表現型解析によって、さらに多くの典型例におけるトリオ試料の収集を精力的に行う。Exome解析は、本年度に研究グループとして次世代型シーケンサーの使用実績を積んでおり来年度に向けての準備は完了している。

——達成度について——

主たる目標であった試料収集と試料整理の達成度は70%である。残り30%は全例のトリオ試料の収集および全例の表現型の再確認である。トリオ試料に関してはインフォームドコンセントが困難な症例もあり、次年度の努力目標である。また、既存症例に関しては主治医へのアンケート調査を基にした表現型解析を次年度に予定する。

F. 健康危険情報

なし