

1. 論文発表

(1) 原著論文

1. Saitsu H, Tohyama J, Kumada T, Hamada K, Okada I, Mizuguchi T, Osaka H, Miyata R, Egawa K, Furukawa T, Haginoya K, Goto T, Yamagata T, Saitoh S, Nagai T, Nishiyama K, Nishimura A, Miyake N, Komada M, Hayashi K, Hirai S, Kato M, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N. *De novo* EIEE2 mutations impairing axon initial segments cause early onset West syndrome. Nat Genet (in revision).
2. Hamanoue H, Rahayuningsih SE, Hirahara Y, Itoh J, Yokoyama U, Mizuguchi T, Saitsu H, Hirahara F, Matsumoto N. Gene screening of 104 patients with congenital heart disease revealed a fresh *GATA4* mutation in atrial septal defect. Cardiol Young 19: 482-485, 2009.
3. Shiihara T, Maruyama K-i, Yamada Y, Nishimura A, Matsumoto N, Kato M, Sakazume S. A case of Baaraitser-Winter syndrome with unusual brain MRI findings of pachygyria, subcortical band heterotopia and periventricular heterotopias. Brain Dev (in press).
4. Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, Ohno T, Miyashita A, Kuwano R, Matsumoto N, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Identification of Independent *APP* Locus Duplication in Japanese Patients with Early-Onset Alzheimer's Disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 80(9): 1050-1052, 2009.
5. Yoshida K, Shimizu Y, Morita H, Okano T, Sakai H, Ohata T, Matsumoto N, Katsuya Nakamura K, Tazawa K-i, Ohara S, Tabata K, Inoue A, Sato S, Shimojima Y, Hattori T, Ushiyama M, Ikeda S-i. Severity and progression rate of cerebellar ataxia in 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA) in the endemic Nagano area of Japan. Cerebellum 8:46-51, 2009.
6. Hamanoue H, Megarbane A, Tohma T, Nishimura A, Mizuguchi T, Saitsu H, Sakai H, Miura S, Toda T, Miyake N, Niikawa N, Yoshiura K, Fumiki H, Matsumoto N. A locus for Ophthalamo-acromelic syndrome mapped to 10p11.23. Am J Med Genet 149A(3): 336-342, 2009.
7. Kuniba H, Yoshiura KI, 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
8. Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T, Matsumoto N. Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split foot malformation and hearing loss. Am J Med Genet 149A(6):1224-1230, 2009.

(2) 総説

1. Matsumoto N. Gene analysis of Marfan syndrome. Proceedings of VIII annual international symposium on advances in understanding aortic diseases. 23-27, 2009

1. 論文発表

(1) 原著論文

1. Kakisaka Y, Haginoya K, Ishitobi M, Togashi N, Kitamura T, Wakusawa K, Sato I, Hino-Fukuyo N, Uematsu M, Munakata M, Yokoyama H, Iinuma K, Kaneta T, Higano S, Tsuchiya S. Utility of subtraction ictal SPECT images in detecting focal leading activity and understanding the pathophysiology of spasms in patients with West syndrome. *Epilepsy Res.* 83:177-183:2009
2. Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Togashi N, Uematsu M, Kitamura T, Kakisaka Y, Ishitobi M, Wakusawa K, Iinuma K, Oguni H, Yamakawa K, Tsuchiya S. Ictal vomiting as an initial symptom of severe myoclonic epilepsy in infancy: a case report. *J Child Neurol.* 24:228-230:2009
3. Haginoya K, Miyabayashi S, Kikuchi M, Kojima A, Yamamoto K, Omura K, Uematsu M, Hino-Fukuyo N, Tanaka S, Tsuchiya S. Efficacy of idebenone for respiratory failure in a patient with Leigh syndrome: a long-term follow-up study. *J Neurol Sci.* 278:112-114:2009
4. Sun G, Haginoya K, Dai H, Chiba Y, Uematsu M, Hino-Fukuyo N, Onuma A, Iinuma K, Tsuchiya S. Intramuscular renin-angiotensin system is activated in human muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 280:40-48:2009
5. Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Uematsu M, Nakayama T, Kikuchi A, Kure S, Kamada F, Abe Y, Arai N, Togashi N, Onuma A, Tsuchiya S. Smith-Magenis syndrome with West syndrome in a 5-year-old girl: a long-term follow-up study. *J Child Neurol.* 24:868-873:2009
6. Haginoya K, Noguchi R, Zhao Y, Munakata M, Yokoyama H, Tanaka S, Hino-Fukuyo N, Uematsu M, Yamamoto K, Takayanagi M, Iinuma K, Tsuchiya S. Reduced levels of interleukin-1 receptor antagonist in the cerebrospinal fluid in patients with West syndrome. *Epilepsy Res.* 85:314-317:2009
7. Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsunashi S, Park YE, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Sugano H, Nishino I. Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest.* 119:2623-2633:2009
8. Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Iinuma K, Uematsu M, Tsuchiya S. Neuroepidemiology of West syndrome and early infantile epileptic encephalopathy in Miyagi Prefecture, Japan. *Epilepsy Res.* 87:299-301:2009

1. 論文発表

(1) 原著論文

1. 稲垣真一郎 小坂仁 辻恵 鮫島希代子 井合瑞江 山田美智子 山下純正 黒澤健司 永井淳一 相田典子 田中祐吉 豊田雅哲 中村充 難波栄二 末梢血泡沫細胞と頭部MRIでの髄鞘化遅延を認めたGM1ガングリオシドーシスの1例 日児誌 2009;113:967-971.
2. 小澤克典、石川浩史、丸山康世、永田智子、長瀬寛美、古谷憲孝、吉橋博史、黒澤健司、柴崎淳、山中美智子 胎児期から14番染色体父性片親ダイソミーを強く疑った1例 日本遺伝カウンセリング学会誌 30:19-22, 2009.
3. Fujita K, Aida N, Asakura Y, Kurosawa K, Niwa T, Muroya K, Adachi M, Nishimura G, Inoue T. Abnormal basiocciput development in CHARGE syndrome. Am J Neuroradiol 30: 629-34, 2009.
4. Kuniba H, Yoshiura KI, 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;54:304-9.
5. Yamanaka M, Ishikawa H, Saito K, Maruyama Y, Ozawa K, Shibasaki J, Nishimura G, Kurosawa K: Prenatal Findings of Paternal Uniparental Disomy 14: Report of Four Patients. Am J Med Genet Part A (in press)
6. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, Ogata T, Saito H S. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. J Pediatr. 2009 Dec;155(6):900-903.e1. Epub 2009 Oct 1.
7. Tsuji M, Aida N, Obata T, Tomiyasu M, Furuya N, Kurosawa K, Errami A, Gibson KM, Salomons GS, Jakobs C, Osaka H. A new case of GABA transaminase deficiency detected with proton MR spectroscopy. J Inherit Metab Dis (in press)
8. Osaka H, Koizume S, Aoyama H, Iwamoto H, Kimura S, Nagai J, Kurosawa K, Yamashita S. Mild phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a PLP1-specific mutation. Brain Dev (in press)
9. Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi N, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. Pediatr Int (in press)

(2) 総説

1. 黒澤健司 奇形症候群の診断 小児神経学の進歩第38集 p1-10、診断と治療社 H21.5.25. 東京
2. 黒澤健司 先天異常の遺伝カウンセリング 小児看護 32:1519-21, 2009.

(1) 原著論文

1. Otomo T, Muramatsu T, Yorifuji T, Okuyama T, Nakabayashi H, Fukao T, Ohura T, Yoshino M, Tanaka A, Okamoto N, Inui K, Ozono K, Sakai N. Mucopolipidosis II and III alpha/beta: mutation analysis of 40 Japanese patients showed genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet.* 2009; 54: 145-51.
2. Hilton E, Johnston J, Whalen S, Okamoto N, Hatsukawa Y, Nishio J, Kohara H, Hirano Y, Mizuno S, Torii C, Kosaki K, Manouvrier S, Boute O, Perveen R, Law C, Moore A, Fitzpatrick D, Lemke J, Fellmann F, Debray FG, Dastot-Le-Moal F, Gerard M, Martin J, Bitoun P, Goossens M, Verloes A, Schinzel A, Bartholdi D, Bardakjian T, Hay B, Jenny K, Johnston K, Lyons M, Belmont JW, Biesecker LG, Giurgea I, Black G. BCOR analysis in patients with OFCD and Lenz microphthalmia syndromes, mental retardation with ocular anomalies, and cardiac laterality defects. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17: 1325-35.
3. Hosokawa S, Takahashi N, Kitajima H, Nakayama, Kosaki K, and Okamoto N. A case of Brachmann-de Lange syndrome with congenital diaphragmatic hernia and NIPBL gene mutation *Congenital Anomaly.* in press
4. Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat.* 2010; 31(3): 284-94

IV. 研究成果の刊行物・別刷

気分障害の網羅的遺伝子発現解析

Comprehensive gene expression analysis into mood disorder



富田 博秋

Hiroaki TOMITA

東北大学大学院医学系研究科精神・神経生物学分野

◎気分障害の成因を解明するうえで、近年急速に発達を遂げたマイクロアレイをはじめとする網羅的遺伝子発現解析技術を用いて双極性障害、大うつ病性障害罹患者や健常対照者の死後脳組織の遺伝子発現を解析することは有効かつ必須のアプローチと考えられ、これまでに複数の研究グループが解析結果の報告を行ってきている。一方、脳機能や精神活動と密接に関連する各種免疫細胞を含み、脳内細胞と発現調節領域を含めて同一の塩基配列のゲノム DNA を有する末梢血は死後脳組織に比べて採取を行いやすく、同一罹患者の病相、病状の違いによる遺伝子発現変化の評価も可能であることから、罹患者や健常人から採取した末梢血全血や血液中のリンパ球などを対象とする網羅的遺伝子発現解析も試みられてきている。本稿では気分障害成因解明に向けての死後脳組織、末梢血などを対象とする網羅的遺伝子発現解析のこれまでの成果と今後の課題・展望について検討を行う。



双極性障害、大うつ病、死後脳、免疫細胞、マイクロアレイ

気分障害とは顕著な気分の変動を中心症状とする疾患を総称し、うつ病相と躁病相の両方を呈する双極性障害と、うつ病相のみを呈する大うつ病性障害はその中核となる疾患である。ゲノムの塩基配列情報は脳組織特異的に mRNA へと転写され、さらに蛋白質に翻訳され、翻訳後修飾を受け、他の分子と相互作用することではじめて脳・精神機能に影響を及ぼすものであり、死後脳組織の網羅的遺伝子発現解析は精神疾患の病態解明には必須のアプローチである。一方、脳機能や精神活動と密接に関連する各種免疫細胞を含み、脳内細胞と発現調節領域を含めて同一の塩基配列のゲノム DNA を有する末梢血由来の細胞を対象とする網羅的遺伝子発現解析も、精神疾患成因解明において有効なアプローチとなりうる(図 1)。

本稿では、気分障害の病態解明に向けた死後脳と末梢血などを対象とする網羅的遺伝子発現解析研究のこれまでの成果と今後の課題・展望につい

て検討したい。

死後脳における遺伝子発現研究

死後脳を対象とする双極性障害と大うつ病性障害の網羅的遺伝子発現研究の、これまでの成果と今後の課題を下記に概説する。

1. 双極性障害

双極性障害の死後脳では MAG, ERBB, TF, PLP1, MOG, MOBP, MOG などの、ミエリンを形成するオリゴデンドロサイトに関連する遺伝子発現が低下しており、この知見は統合失調症や大うつ病性障害罹患者の脳にも共通した現象として観察されている¹⁻³⁾。また、双極性障害ではミトコンドリア機能⁴⁻⁸⁾、受容体・チャネル^{9,10)}、ストレス・免疫反応^{9,10)}、シャペロン機能⁹⁾、ユビキチン系¹⁰⁾、糖代謝^{6,11)}に関連する遺伝子発現変化が報告されている。これまでに報告のある双極性障害の死後脳研究の多くは、スタンレー脳バンクが世界

の研究施設に供給した死後脳を解析したものである。スタンレー脳バンクの双極性障害死後脳に基づく12の研究の生データを統合したメタ解析が行われており、酸化リン酸化、ユビキチン系、RNA スプライシング、細胞内蛋白輸送、熱ショック蛋白質、主要組織適合遺伝子複合体クラスⅡ受容体活性、メタロチオネインという遺伝子カテゴリが双極性障害罹患者の脳で顕著に発現調節を受けていることや、個別の遺伝子としてPENK, GRK3, BDNF, HSPA5, LARS2, APO-L, HINT1, UBE2N, RELNなどの発現が低下していることが報告されている¹²⁾。このほか、双極性障害の自殺既遂者とそれ以外の死因による死亡者との比較でPLSCR4, EMX2の発現量に差があるとする報告¹³⁾や、双極性障害、大うつ病性障害を含めた精神疾患罹患者脳組織では、神経細胞周囲のオリゴデンドロサイト数やカルビンディン陽性介在神経密度の減少と、神経発達やアポトーシスに関連した遺伝子の発現量が相関するという報告がなされている¹⁴⁾。

2. 大うつ病障害

大うつ病性障害を対象とする死後脳マイクロアレイ解析研究は、著者が運営に参加したアメリカのカリフォルニア大学アーバイン校脳バンクのほか、前述のスタンレー財団、エール大学、コロンビア大学、カナダのマギル大学などの脳バンクで集積された死後脳を対象として行われている。著者らのグループは、大うつ病性障害罹患者の前頭前野、前帯状回などのアレイ解析を行い、GABA神経伝達^{15,16)}、グルタミン酸神経伝達¹⁵⁾、線維芽細胞成長因子システム¹⁷⁾、G蛋白結合受容体信号伝達システム(投稿中)に関連する遺伝子発現の顕著な変化を観察した。このほか、これまでにミエリン¹⁸⁾、ポリアミン代謝^{19,20)}、細胞増殖^{14,17,21)}、細胞代謝^{14,16)}、ストレス反応²²⁾、転写^{16,22)}に関する遺伝子群が大うつ病性障害、または大うつ病性障害に伴う自殺の影響により発現変化を受ける遺伝子群として報告されている。大うつ病性障害の病態特異的な発現変化として報告される遺伝子群が双極性障害以上に論文ごとに異なる傾向にあるのは、本質的に大うつ病性障害の成因の異質性が高いと考えられること、準拠する脳バンクの数が多いことなども要因として考えられるが、かならずしもデータそのものの再現性が低いことを意味するものではなく、ただ単にデータ解析や論文化する際の焦点の当て方が異なる面もあると考えられる。

3. 死後脳研究の今後の課題

死後脳研究には、罹患者の病型、病歴、死亡時の病勢、合併症などの多様性に加え、罹患者、健常人ともに共通する問題として喫煙、飲酒、薬剤服用歴、死亡時の年齢、死亡時の状況、死後の脳の摘出・保管状況の多様性などの問題が大きいのにに対し、各脳バンクで集積しうる症例数の数が現在までのところ少ないことから、今後、交絡因子に関する詳細な情報とともに、より多くの死後脳の集積を可能にする脳バンク制度の充実を急ぐ必要がある^{23,24)}。また、これまでの死後脳研究は、おもに欧米の脳バンクで集積された白人からの死後脳提供によるところが多く、アジア人、日本人との遺伝学的バックグラウンドの相違を考えると日本独自の脳バンク制度の整備が望まれる。技術的にも今後、次世代シーケンサーが普及し、より詳細かつ多様な遺伝子転写制御にかかわる現象の評価が可能になることが期待される。また脳は、さまざまな種類の神経細胞やグリア細胞の複合体であるが、これまでの研究の多くは組織ブロックから抽出されたRNAを解析しており、組織ブロックにおける細胞種の混合比率のばらつきに起因する偽陽性や特定の細胞種で起こっている重要な変化が他の細胞種の現象に埋もれて検出されないなどの可能性があり、細胞種特異的現象の評価は今後の課題となる。

末梢血などにおける遺伝子発現研究

死後脳研究に比べて末梢血は採取が行いやすく、また、同一の罹患者から複数の時点で採血を行うことで病相の影響を直接観察することが可能であることから有用な研究の対象となる。血液の遺伝子発現解析が精神疾患の病態解明に有用である可能性として、①脳細胞と血液細胞のゲノム塩基配列は、プロモーターなどの遺伝子発現調節にかかわる領域も含めてほぼ同一であることから、遺伝子発現調節にもある程度相関があると考

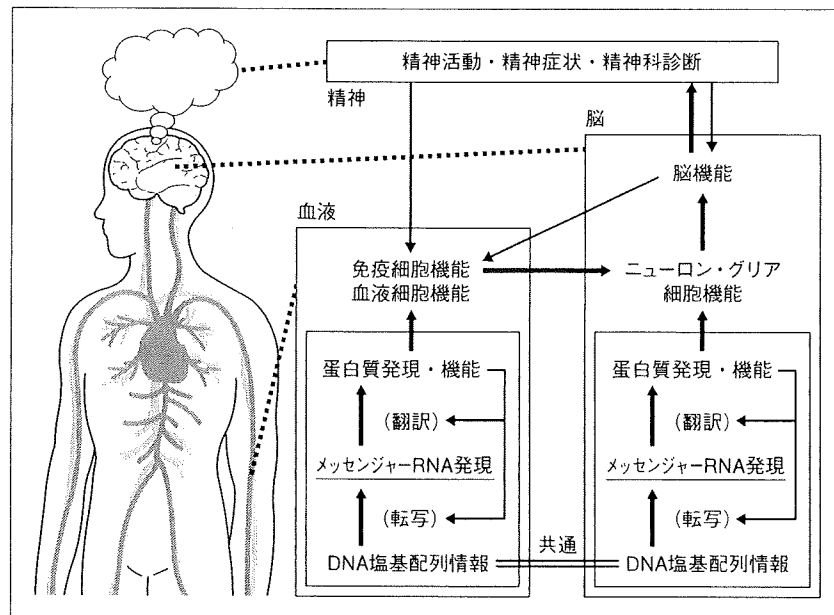


図 1 精神疾患を対象とした死後脳組織および末梢血細胞の網羅的遺伝子発現解析の意義

脳機能や精神活動と各種免疫細胞の機能は密接に関連し、また、脳内細胞と末梢血細胞は発現調節領域を含めてほぼ同一塩基配列のゲノム DNA を有する。精神疾患の成因解明には、死後脳組織を解析することにより生前脳内で精神疾患の病態特異的に起こった分子遺伝学的現象を特定するアプローチと、末梢血細胞を解析することで疾患罹患感受性にかかわる素因や病相・病状に関連して起こる分子遺伝学的現象を特定するアプローチが、ともに有効と考えられる。

えられる。②脳と末梢組織はある程度同様にストレス、ホルモン、神経調節因子などの曝露を受けると考えられる。③モノアミン、サイトカイン等、共通の分子が脳内と末梢細胞で重要な働きをもち、末梢の現象が脳の現象と相関することが報告されている。④神経精神免疫相関、すなわち精神活動から免疫細胞への影響、免疫細胞から脳活動への影響がある、などのことが考えられる(図1)。血液などを対象とする気分障害の網羅的遺伝子発現研究のこれまでの成果と今後の課題を下記に概説する。

1. 双極性障害

双極性障害における末梢血由来細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った研究として統合失調症、双極性障害と健常人の全血をアレイ解析し、APOEC3B, ADSS, ATM, CLC, CTBP1, DATF1, CXCL1, S100A9 の 8 つの遺伝子発現パターンにより統合失調症と双極性障害とを識別できる可能性を示唆する報告や²⁵⁾、躁・うつ病相が短期間のうちに交代する急

速交代型双極性障害罹患者の躁病相時とうつ病相時に複数回採血して単核球層をアレイ解析し、うつ病相時にプロスタグランジン関連遺伝子 PTGDS と AKR1C3 の発現の上昇を認めた報告がある²⁶⁾。また、双極性障害罹患者と健常人由来のリンパ球を 5 日間低糖条件下での培養前後でアレイ解析を行い、低糖培養後のリンパ球中のミトコンドリア電子伝達系遺伝子発現は健常人では上昇するのに対し、罹患者では低下するという報告もある²⁷⁾。

双極性障害罹患に関して不一致(1 人が双極性障害に罹患し、もう 1 人が健常)である一卵性双生児同胞から樹立した B リンパ芽球培養細胞のアレイ解析を行い XBP1 などの発現変化を報告した研究は注目を集め²⁸⁾、その後、XBP1 の機能解析や双極性障害との相関研究など、さまざまな方向からの研究が行われている²⁹⁻³²⁾。一方、別のグループが同様に双極性障害罹患に関して不一致の一卵性双生児の B リンパ芽球のアレイ解析を行った研究では XBP1 の発現変化は追認できず、WNT シ

グナルやアポトーシスに関連する遺伝子発現が上昇していた³³⁾。また、双極性障害群と健常人群由来の B リンパ芽球培養細胞の発現変化を比較した研究としてミトコンドリア関連遺伝子 NDUFV2 の発現変化を認めた報告³⁴⁾や、B リンパ芽球のアレイデータと死後脳のアレイデータとを統合し、双極性障害の病態に関連して死後脳とリンパ芽球で共通に発現調節を受ける遺伝子として LIM と HSPF1 を特定した報告がある⁹⁾。

末梢血に比べ採取が困難であるが、より中枢神経系に近い発現プロファイルをもつと考えられる嗅上皮細胞を双極性障害罹患者と健常人から採取してアレイ解析を行った報告があり、双極性障害罹患者の嗅上皮細胞では細胞死が多くみられ、ホスファチジルイノシトール信号伝達系関連の遺伝子発現の発現変化が認められている³⁵⁾。

2. 大うつ病障害

大うつ病性障害の末梢血を対象とする網羅的遺伝子発現解析研究はこれまでのところ少なく、抑うつ状態の罹患者のリンパ球にセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤である抗うつ剤ベンラファキシンを投与したものと非投与の細胞をアレイ解析し、イオンホメオスタシス、細胞生存、神経可塑性、信号伝達などに関する遺伝子発現を観察した報告³⁶⁾、大うつ病性障害罹患者と健常人の血液を多数のストレス関連遺伝子に特異的なプローブを載せたカスタムアレイで解析し、十数種の遺伝子の発現変化を観察したとする報告³⁷⁾などがある程度である。

3. 末梢血研究の今後の課題

気分障害の成因解明のための末梢血を対象とする網羅的発現解析研究は端緒についたところで、現在のところ再現性の高い知見が得られるに至っていない。これまで末梢血を対象として行われている研究は、新鮮血からの全血、単核球層、またはリンパ球を対象とするものか、B リンパ芽球培養細胞を対象とするものである。B リンパ芽球培養細胞は EB ウイルスがホストのゲノム DNA に挿入されることでリンパ球を株化細胞に形質転換させるが、この工程がランダムに発現調節に影響を及ぼす可能性が考えられる。新鮮血の場合、全血、単核球層はいうに及ばず、リンパ球にしても

B 細胞、T 細胞、NK 細胞、さらにさまざまな性格・機能をもつそれぞれのサブクラスの免疫細胞を含んでおり、死後脳組織ブロックの解析と同様、細胞種の混合の比率のばらつきに起因する偽陽性や、特定の細胞種で起こっている重要な変化が他の細胞種の現象に埋もれて検出されない可能性があり、細胞種特異的な解析が必要と考えられる。これらの課題を解決する方法として著者らは、セルソーターを用いて新鮮血から Th1 や Th2 ヘルパー T 細胞分画や単球などの特定の免疫細胞を単離してアレイ解析を行う技法を確立し、精神疾患の成因解明のため応用している。

おわりに

気分障害の病態解明に向けて死後脳、末梢血を対象にした網羅的遺伝子発現解析研究が複数の研究グループで行われ一定の成果は上がっているが、今後の課題は多い。死後脳研究に関しては、今後より多くの検体を用いて、より有効に交絡因子を考慮に入れた解析を行うことを可能にするような研究体制の拡充が望まれる。欧米の既存の脳バンクは症例数の集積に向けて活発に活動しており、さらにあらたな脳バンクが欧米やアジア諸国で新設されてきている。日本でも死後脳バンク体制構築の必要性についての認識が広まり、日本生物学的精神医学会にブレインバンク設立委員会が設けられるなど、複数の施設で連携して倫理的にも技術的にも信頼に足る死後脳バンクの制度を構築する準備が進んできており、今後のわが国における死後脳研究の発展が期待される。末梢血を対象とする精神疾患の分子遺伝学的研究もまだ端緒についたところで、今後より多くの症例を対象に細胞種や表現型を絞り込んだ研究がなされることで、有益な知見が集積されることが期待される。

文献

- 1) Tkachev, D. et al. : *Lancet*, **362** : 798-805, 2003.
- 2) Sokolov, B. P. : *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **10** : 547-555, 2007.
- 3) MacDonald, M. L. et al. : *Bipolar Disord.*, **8** : 255-264, 2006.
- 4) Iwamoto, K. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **14** : 241-253, 2005.
- 5) Quiroz, J. A. et al. : *Neuropsychopharmacology*, **33** :

- 2551-2565, 2008.
- 6) Sun, X. et al. : *J. Psychiatry Neurosci.*, **31** : 189-196, 2006.
 - 7) Kato, T. et al. : *Can. J. Psychiatry*, **52** : 763-771, 2007.
 - 8) Vawter, M. P. et al. : *Mol. Psychiatry*, **11** : 615, 663-679, 2006.
 - 9) Iwamoto, K. et al. : *Mol. Psychiatry*, **9** : 406-416, 2004.
 - 10) Ryan, M. M. et al. : *Mol. Psychiatry*, **11** : 965-978, 2006.
 - 11) Bezchlibnyk, Y. B. et al. : *Brain Res.*, **1147** : 213-217, 2007.
 - 12) Elashoff, M. et al. : *J. Mol. Neurosci.*, **31** : 221-243, 2007.
 - 13) Kim, S. et al. : *BMC Genomics*, **8** : 413, 2007.
 - 14) Kim, S. and Webster, M. J. : Correlation analysis between genome-wide expression profiles and cytoarchitectural abnormalities in the prefrontal cortex of psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry*, 2008, Sep 2. [Epub ahead of print]
 - 15) Choudary, P. V. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** : 15653-15658, 2005.
 - 16) Sequeira, A. et al. : *Mol. Psychiatry*, **12** : 640-655, 2007.
 - 17) Evans, S. J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 15506-15511, 2004.
 - 18) Aston, C. et al. : *Mol. Psychiatry*, **10** : 309-322, 2005.
 - 19) Klempan, T. A. et al. : Profiling brain expression of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase 1 (SAT1) gene in suicide. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 2009, Jan 16. [Epub ahead of print]
 - 20) Sequeira, A. et al. : *Arch. Gen. Psychiatry*, **63** : 35-48, 2006.
 - 21) Tochigi, M. et al. : *Neurosci. Res.*, **60** : 184-191, 2008.
 - 22) Kang, H. J. et al. : *J. Neurosci.*, **27** : 13329-13340, 2007.
 - 23) Tomita, H. et al. : *Biol. Psychiatry*, **55** : 346-352, 2004.
 - 24) 富田博秋 : 分子精神医学, **6** : 243-250, 2006.
 - 25) Tsuang, M. T. et al. : *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, **133B** : 1-5, 2005.
 - 26) Begemann, M. et al. : *Mol. Med.*, **14** : 546-552, 2008.
 - 27) Naydenov, A. V. et al. : *Arch. Gen. Psychiatry*, **64** : 555-564, 2007.
 - 28) Kakiuchi, C. et al. : *Nat. Genet.*, **35** : 171-175, 2003.
 - 29) Kakiuchi, C. et al. : *J. Neurochem.*, **97** : 545-555, 2006.
 - 30) Hayashi, A. et al. : *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **12** : 33-43, 2009.
 - 31) Cichon, S. et al. : *Nat. Genet.*, **36** : 783-784, author reply 784-785, 2004.
 - 32) Chen, W. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319** : 866-870, 2004.
 - 33) Matigian, N. et al. : *Mol. Psychiatry*, **12** : 815-825, 2007.
 - 34) Washizuka, S. et al. : *Bipolar Disord.*, **7** : 146-152, 2005.
 - 35) McCurdy, R. D. et al. : *Schizophr. Res.*, **82** : 163-173, 2006.
 - 36) Kalman, J. et al. : *Neurochem. Res.*, **30** : 1429-1438, 2005.
 - 37) Ohmori, T. et al. : *J. Med. Invest.*, **52**(Suppl.) : 266-271, 2005.

* * *

III. 肥満症の疫学・病態・診断学の進歩

症候性肥満—病因, 病態, 管理法—
遺伝性肥満

Bardet-Biedl 症候群

Molecular mechanisms of obesity and Bardet-Biedl syndrome

富田博秋

Key words : Bardet-Biedl 症候群, 肥満, 一次繊毛, BBSome, レプチン

はじめに

Bardet-Biedl 症候群 (Bardet-Biedl syndrome: BBS) は肥満・耐糖能障害のほか高血圧, 網膜変性, 認知・学習の障害などの年齢とともに進行する病態と, 多指, 腎奇形, 心奇形, 性腺機能低下などの先天奇形を特徴とする常染色体劣性または二遺伝子性の遺伝性疾患で, これまでに 14 の責任遺伝子が特定されている。有病率は欧米で 15 万人に 1 人前後 (中近東ではより高頻度) と推定され, 比較的まれな疾患である。一般に希少な遺伝性疾患の病因・病態の解明が肥満・糖尿病・高血圧など, 多くの人に関係のある健康要因の成因を解明する有用な足がかりになることがあるが, BBS の分子遺伝学的成因の解明の試みも一般的肥満の成因解明とも関連しながら着実に成果を上げてきている好例の一つといえる。

本稿では BBS にみられる肥満の特徴, 本症候群の責任遺伝子の本症候群および一般的肥満の病因・病態にかかわる分子遺伝学的メカニズムに関してのこれまでに集積されている知見について概説する。

1. Bardet-Biedl 症候群の分子遺伝学的病態

a. Bardet-Biedl 症候群の責任遺伝子の同定と繊毛疾患としての認識の確立

BBS は常染色体劣性遺伝または二遺伝子性の遺伝形式で家族性にみられる先天奇形 (多指, 腎奇形, 心奇形, 性腺機能不全) と, 生後進行する肥満, 網膜変性, 精神発達遅滞を特徴とするが, 奇形, 症状の表出の程度は症例ごとに大きく異なる。連鎖解析などにより少なくとも 14 の責任遺伝子がポジショナルクローニングやその相同遺伝子の解析から同定され¹⁾, *BBS1* 遺伝子から *BBS14* 遺伝子まで命名がなされている。これらの遺伝子は微小管 (microtubule) が形成され細胞内の各領域に向けて伸長する元になっている中心体 (centrosome) や繊毛 (cilium) の土台となる基底小体 (basal body) の構成タンパク質をコードしており, 繊毛の機能や細胞内や繊毛の微小管に沿ったタンパク質や小胞の輸送に重要な役割を有し, BBS は遺伝性繊毛疾患として認識されるに至った。近年, *BBS1*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS8* と *BBS9* の 7 つの遺伝子から翻訳される BBS タンパク質は安定した複合体を形成することがわかり, BBSome

Hiroaki Tomita: Department of Biological Psychiatry, Graduate School of Medicine, Tohoku University 東北大学大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野

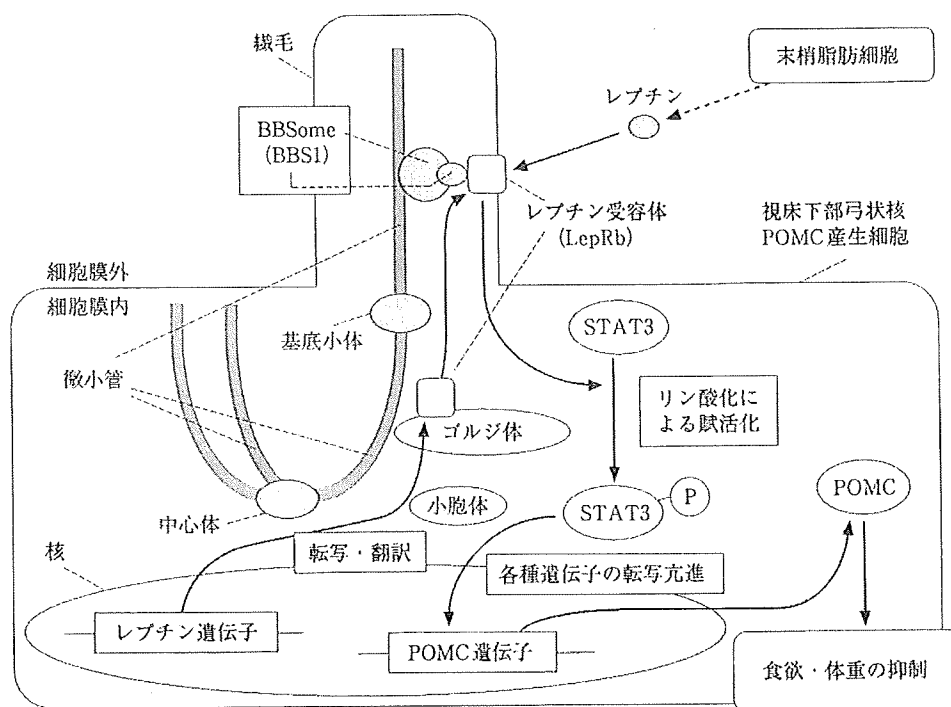


図1 視床下部弓状核 POMC 産生細胞における BBSome 複合体とレプチン信号伝達

視床下部弓状核 POMC (proopiomelanocortin) 産生細胞において Bardet-Biedl 症候群 (BBS) 責任遺伝子から翻訳される BBS タンパク質の複合体である BBSome はその構成タンパクの一つである BBS1 がレプチン受容体 LepRb と結合してゴルジ体から細胞表面、繊毛まで輸送を行う。末梢脂肪細胞から分泌されるレプチンは受容体を刺激することで STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) をリン酸化して賦活化し、POMC の転写、産生を活性化することで食欲を抑制する。BBS 遺伝子の変異はレプチン受容体などのタンパク質の細胞表面への輸送の障害とそれに伴うレプチン信号伝達などの障害を引き起こすことで肥満など BBS の症状を発現させる。

と命名された。BBSome は繊毛へのタンパク質や小胞の輸送を調整すると推定される (図 1)²⁾。

b. 一次繊毛と食欲・体重の調節

繊毛とは細胞体から突き出した尾のような構造物で、一方向に高速の波動運動を行う運動性繊毛 (motile cilium) とアンテナ様の感覚小器官として働く非運動性繊毛 (non-motile cilium)、別名一次繊毛 (primary cilium) とに分けられる。運動性繊毛は外周を囲む 9 本の微小管と中央を通る 2 本の微小管からなりモータータンパク質であるダイニン (dynein) を有するのに対し、一次繊毛は外周 9 本の微小管を有するが中央 2 本の微小管とダイニンを欠いている³⁾。脊椎動物では神経細胞を含むほとんどの細胞が一次繊毛

を有することが知られているがその機能には不明の点が多い^{4,5)}。一次繊毛の基底部から先端部の間の双方向的なタンパク質輸送をつかさどる *Ift88* (intraflagellar transport 88, 別名 *Tg737*) 遺伝子や、*Kif3a* (kinesin family member 3A) 遺伝子を欠失させた遺伝子改変マウスは、胎生期のうちに囊胞腎病変を伴い死亡するが、成獣に達した後でこの 2 つの遺伝子を欠失させると全身の細胞から一次繊毛が消失した状態で生存するため、一次繊毛を欠くことが生体に及ぼす影響を評価できる。一次繊毛を欠いたマウスでは囊胞腎のほかに摂食量の亢進、肥満が認められることから、一次繊毛は全身の細胞の中でも腎臓の尿細管の水流のセンサーとして働いているほ

か、食欲・体重の調節に重要な働きを有することが示唆された。更に食欲・体重の調節を行う視床下部弓状核(arcuate nucleus)のプロオピオメラノコルチン(proopiomelanocortin: POMC)産生神経細胞において、同様の方法で特異的に一次繊毛を消失させたマウスにおいても同様に、摂食亢進、肥満を呈し、POMC産生細胞における一次繊毛が食欲・体重調節に重要な役割を有することが示された⁶⁾。BBSのほかにもAlström症候群などの肥満を呈する疾患の責任遺伝子も繊毛に発現することも繊毛は摂食・体重の調節に関連することを示唆している⁷⁾。

c. Bardet-Biedl 症候群責任遺伝子と食欲・体重の制御機構

前項で取り上げたとおりポジショナルクローニングの成果によりBBSは遺伝性繊毛疾患として認識されるに至り、一次繊毛の障害が肥満を引き起こすことがわかったが、更に近年、BBSタンパク質が視床下部のレプチン(leptin)受容体信号伝達を介して食欲・体重の調節に重要な役割をもつことがわかってきた^{8,9)}。2008年、BBS2遺伝子、BBS4遺伝子、BBS6遺伝子を完全に欠失する遺伝子改変マウスは肥満となり、肥満は摂食量の亢進、活動量の減少、血中レプチン濃度の上昇に伴うことが報告された。レプチンは末梢の脂肪細胞(adipocyte)から分泌されるホルモンで、体内を循環して視床下部の弓状核に発現するレプチン受容体に作用することで、脳に末梢の脂肪貯蔵の状態を知らせる働きをもつ³⁾。レプチンは弓状核のPOMC産生神経細胞のレプチン受容体を賦活化し、細胞内信号伝達下流の転写因子STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)をリン酸化して活性化するなどの機序でPOMC産生を促進するなど、POMC産生細胞の活動を促進することで食欲を抑制に導く。レプチンは神経ペプチドY(neuropeptide Y: NPY)産生神経細胞にも作用するが、NPY産生細胞においてはNPY産生や細胞活動を抑制する方向に働く^{4,10,11)}。POMC産生細胞におけるレプチン受容体を選択的に欠失させたマウスは、摂食が亢進し肥満することが報告されている¹²⁾。また、BBSタンパク質を産生

しない遺伝子改変マウスでは、視床下部のNPY発現には変化がないのに対してPOMC産生が顕著に減少していることから、BBSタンパク質はPOMC産生細胞におけるレプチン信号伝達の方に重要な働きをもっていることが示唆された⁹⁾(図1)。

一般にレプチンは体脂肪量の増加に比例して分泌されて血中濃度が上昇し、摂食量や体重を減少させる負のフィードバック効果をもたらす。肥満の結果として血中レプチン値が持続的に高値となることによりレプチンに反応して食欲の抑制や体重減少が起こらなくなる現象が知られており、レプチン抵抗性(leptin resistance)と呼ばれる。先述のBBSタンパク質を完全に欠失した遺伝子改変マウスにも血中レプチン高値とレプチン抵抗性が認められたが、これらが単に肥満による2次的な現象であるのかどうかを検討するために、BBS遺伝子欠失マウスにカロリー制限を行うことで体重を正常レベルに抑える研究が行われた。カロリー制限により正常体重を示すBBS遺伝子欠失マウスは正常の血中レプチン濃度を示すことから、BBS遺伝子欠失マウスの高レプチン血症は肥満に対して2次的に起こったものと考えられた。一方、興味深い発見として、カロリー制限を行い正常の体重を示すBBS遺伝子欠失マウスにレプチン投与を行っても、BBSタンパク質を発現する野生型マウスに対するレプチン投与でみられる摂食量や体重の減少が起こらず、このことはBBS遺伝子欠失マウスのレプチン耐性は肥満に対する2次的なものではなく、レプチン耐性こそがBBS遺伝子欠失マウスの肥満の原因であることが示された。更に、カロリー制限したBBS遺伝子欠失マウスでは、通常レプチン投与により視床下部のレプチン受容体活性化により細胞内で賦活されるSTAT3の活性も減少していることから、BBS遺伝子欠失マウスのレプチン耐性はレプチン受容体による細胞内へのシグナル伝達が障害されていることに起因することが示された⁶⁾。

更にタンパク質や小胞の輸送にかかわることが想定されるBBSome複合体を構成するBBSタンパク質のうち、BBS1タンパク質のみが6種

のレプチン受容体のうち唯一細胞内へのシグナル伝達ドメインを有する LepRb (leptin receptor, isoform b) タンパク質の細胞内ドメインに結合することが示された。本症の遺伝子変異として最も高頻度にみられる *BBS1* 遺伝子の M390R 変異 (390 番目のアミノ酸残基がメチオニンからアルギニンに置換するミスセンス変異) は *BBS1* タンパク質の LepRb タンパク質への結合を大きく減弱させる。*BBS1* タンパク質は LepRb のほかにも Rabin8 (rab8-specific guanine nucleotide exchange factor) などのタンパク質にも結合することが知られ²⁾、BBSome 複合体により輸送されるタンパク質と結合するサブユニットの役割を果たしていると考えられる。また、BBSome 複合体のうち少なくとも *BBS1* もしくは *BBS2* のタンパク質発現が消失すると、細胞内で構成された LepRb タンパク質のゴルジ体から細胞膜および繊毛への輸送が障害されることも確認された⁸⁾。以上のことから、*BBS* 遺伝子の変異により、レプチン受容体が合成された後ゴルジ体から微小管に沿って細胞表面、繊毛に輸送される機構が障害され、視床下部 POMC 産生細胞においてレプチン受容体による STAT3 などの細胞内シグナル伝達が低下することで POMC 産生や細胞機能が低下することにより、本症の肥満が引き起こされていると考えられる (図 1)。

2. 一般的肥満への関与

一般的肥満 (common obesity) は多くの遺伝子と環境の相互作用によって起こるもので、一般的肥満の成因にかかわる遺伝子の探索が行われてきている。*BBS* 遺伝子は前項のとおり、繊毛機能やレプチン受容体をはじめとするタンパク質輸送への役割から一般的肥満の成因にも何らかの関係をしている可能性が想定されるが、*BBS* 遺伝子が一般的肥満に関与することを示唆する *BBS* 家系を対象とした興味深い研究が行われた。*BBS* 遺伝子変異を両アレルともにホモ接合に有することで *BBS* を発症する罹患者では発

達早期から肥満を認めることは前述のとおりである。*BBS* 遺伝子変異を片アレルにのみヘテロ接合に有する家族構成員は、*BBS* 罹患者に特徴的にみられる先天奇形や多岐にわたる臨床症状を示さずキャリアとなるが、これらの *BBS* 遺伝子変異アレルをヘテロ接合にもつキャリアの家族構成員は、*BBS* 遺伝子変異アレルを全くもたない家族構成員よりも肥満を呈することが報告されている¹³⁾。

BBS 遺伝子の多型が一般的肥満の成因に関与しているかどうかを検討するための相関研究が幾つか行われている^{14,15)}。2006 年の Benzinou らのフランス系白人を対象とした相関研究によれば、*BBS1* 遺伝子の多型は肥満との相関を示さなかったが、*BBS4* 遺伝子と *BBS6* 遺伝子の多型は小児肥満、成人肥満ともに有意な相関を示した。*BBS2* 遺伝子は小児肥満とは相関を示さなかったが成人肥満と有意な相関を示した¹⁴⁾。一方、2005 年の Andersen らのデンマーク系白人を対象とした、*BBS6* 多型と一般的肥満との相関研究では、*BBS6* 多型が一般的肥満の主要な成因となっている根拠は見いだせなかった¹⁶⁾。*BBS* 遺伝子群の一般的肥満への関与に関しては、今後、更に対象を広げた相関研究などにより検討していく必要があると考えられる。

おわりに—Bardet-Biedl 症候群と肥満の病態解明の展望—

今後、各 *BBS* 遺伝子機能の更なる解明が進み、各 *BBS* タンパク質間の相互作用や他の繊毛の構造・機能や微小管輸送機能にかかわるタンパク質との相互作用が解明されることで、*BBS* にみられる肥満などの症状の発現機序の解明が進むものと思われる。また、*BBS* 遺伝子群の分子遺伝学的機序の解明や *BBS* 遺伝子群多型と一般的肥満との相関研究などが進むことで、体重調節における繊毛機能の役割や一般的肥満への *BBS* 遺伝子群の関与の実態や機序の解明が進むことが期待される。

III

■ 文 献

- 1) Leitch CC, et al: Hypomorphic mutations in syndromic encephalocele genes are associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 40: 443-448, 2008.
- 2) Nachury MV, et al: A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129: 1201-1213, 2007.
- 3) Eggenschwiler JT, Anderson KV: Cilia and developmental signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 345-373, 2007.
- 4) Veland IR, et al: Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol* 111: 39-53, 2009.
- 5) Satir P: Cilia biology: stop overeating now! *Curr Biol* 17: R963-965, 2007.
- 6) Davenport JR, et al: Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol* 17: 1586-1594, 2007.
- 7) Hearn T, et al: Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 1581-1587, 2005.
- 8) Seo S, et al: Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet* 18: 1323-1331, 2009.
- 9) Rahmouni K, et al: Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet-Biedl syndrome. *J Clin Invest* 118: 1458-1467, 2008.
- 10) Morton GJ, et al: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443: 289-295, 2006.
- 11) Coll AP, et al: The hormonal control of food intake. *Cell* 129: 251-262, 2007.
- 12) Balthasar N, et al: Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42: 983-991, 2004.
- 13) Croft JB, et al: Obesity in heterozygous carriers of the gene for the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 55: 12-15, 1995.
- 14) Benzinou M, et al: Bardet-Biedl syndrome gene variants are associated with both childhood and adult common obesity in French Caucasians. *Diabetes* 55: 2876-2882, 2006.
- 15) Andersen KL, et al: Variation of the McKusick-Kaufman gene and studies of relationships with common forms of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 225-230, 2005.



Characterization of the Complex 7q21.3 Rearrangement in a Patient With Bilateral Split-Foot Malformation and Hearing Loss

Hiroto Saito,^{1*} Kenji Kurosawa,² Hiroki Kawara,³ Maki Eguchi,³ Takeshi Mizuguchi,¹ Naoki Harada,³ Tadashi Kaname,⁴ Hiroki Kano,⁵ Noriko Miyake,¹ Tatsushi Toda,⁵ and Naomichi Matsumoto¹

¹Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan

²Division of Medical Genetics, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan

³Department of Molecular Cytogenetics, Kyushu Medical Science, Inc., Nagasaki, Japan

⁴Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

⁵Division of Clinical Genetics, Department of Medical Genetics, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan

Received 3 August 2008; Accepted 9 March 2009

We report on complex rearrangements of the 7q21.3 region in a female patient with bilateral split-foot malformation and hearing loss. G-banding karyotype was 46,XX,t(7;15)(q21;q15),t(9;14)(q21;q11.2)dn. By fluorescence, in situ hybridization (FISH), Southern hybridization, and inverse PCR, the 7q21.3 translocation breakpoint was determined at the nucleotide level. The breakpoint did not disrupt any genes, but was mapped to 38-kb telomeric to the *DSS1* gene, and 258- and 272-kb centromeric to the *DLX6* and *DLX5* genes, respectively. It remains possible that the translocation would disrupt the interaction between these genes and their regulatory elements. Interestingly, microarray analysis also revealed an interstitial deletion close to (but not continuous to) the 7q21.3 breakpoint, indicating complex rearrangements within the split-hand/foot malformation 1 (*SHFM1*) locus in this patient. Furthermore, a 4.6-Mb deletion at 15q21.1-q21.2 adjacent to the 15q15 breakpoint was also identified. Cloning of the deletion junction at 7q21.3 revealed that the 0.8-Mb deletion was located 750-kb telomeric to the translocation breakpoint, encompassing *TAC1*, *ASNS*, *OCM*, and a part of *LMTK2*. Because *TAC1*, *ASNS*, and *OCM* genes were located on the reported copy number variation regions, it was less likely that the three genes were related to the split-foot malformation. *LMTK2* appeared to be a potential candidate gene for SHFM1, but no *LMTK2* mutations were found in 29 individuals with SHFM. Further *LMTK2* analysis of SHFM patients together with hearing loss is warranted. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: split-hand/foot malformation; chromosomal translocation; deletion; 7q21.3; microarray

INTRODUCTION

Split-hand/foot malformation (SHFM) is a limb anomaly involving the central rays of the autopods, presenting with syndactyly, median clefts of hands and feet, and aplasia and/or hypoplasia of phalangeal,

How to Cite this Article:

Saito 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 Part A* 149A:1224–1230.

metacarpal and metatarsal bones. Five loci have been considered in relation to syndromic and non-syndromic SHFM: *SHFM1* on 7q21 [Scherer et al., 1994a], *SHFM2* on Xq26 [Ahmad et al., 1987; Faiyaz-Ul-Haque et al., 2005], *SHFM3* on 10q24 [Nunes et al., 1995; Gurrieri et al., 1996; Raas-Rothschild et al., 1996], *SHFM4* on 3q27 [Celli et al., 1999; Ianakiev et al., 2000], and *SHFM5* on 2q31 [Boles et al., 1995; Goodman et al., 2002]. In addition, another locus on 8q21.1-q22.3 has been reported [Gurnett et al., 2006]. *TP63* was successfully isolated as a gene for *SHFM4*, but no other genes were identified from other loci [Celli et al., 1999; Ianakiev et al., 2000; van Bokhoven et al., 2001; Duijff et al., 2003]. Recently, homozygous *WNT10b* mutation at 12q13.12 has been reported in large consanguineous kindred with autosomal recessive SHFM [Ugur and Tolun, 2008].

Grant sponsor: Ministry of Health, Labour and Welfare; Grant sponsor: JST.

*Correspondence to:

Hiroto Saito, Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Fukuura 3-9, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan. E-mail: hsaito@yokohama-cu.ac.jp

Published online 15 May 2009 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com)

DOI 10.1002/ajmg.a.32877

The locus for SHFM1 (OMIM #183600) has been mapped to 7q21.3-q22.1 through the analysis of SHFM-associated chromosomal rearrangements [Scherer et al., 1994a; Crackower et al., 1996]. *DSS1*, *DLX5*, and *DLX6* genes within *SHFM1* have been suggested to be involved in pathogenesis of SHFM1 because of their roles in limb development in mice [Crackower et al., 1996; Robledo et al., 2002]. However, no gene mutations associated with SHFM1 have been reported to date [Crackower et al., 1996]. Hearing loss is commonly associated with SHFM1 (about 35%) [Elliott and Evans, 2006], and SHFM with sensorineural hearing loss, mapped to 7q21.2-q21.3, has been designated as a distinct (or overlapping) clinical entity (SHFM1D, OMIM #220600). Here we report on a patient with bilateral split-foot malformation as well as micrognathia, full lower lip, strabismus and stenosis of bilateral ear canals with a mixed (conductive and sensorineural) type of hearing loss, and possessing a complex chromosomal rearrangement involving 7q21.3. Detailed genomic analysis of the 7q21.3 region implies a new candidate gene for SHFM1 with hearing loss.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Report

The 9-year-old girl is a product of healthy and non-consanguineous parents. She was born at 38 weeks of gestation after uneventful pregnancy. Birth weight was 2,850 g (-0.02 SD), length 48 cm (-0.4 SD), and occipitofrontal circumference (OFC) was 32 cm (-0.5 SD). She was referred to us due to weak sucking at age of 1 month. Right foot showed cutaneous syndactyly of 4th and 5th digits, and absence of 2nd and 3rd digits. Only a reminiscent metatarsal was recognized in the position of 2nd and 3rd digits (Fig. 1A,B). Left foot showed cutaneous syndactyly of 1st and 2nd, and of 4th and 5th digits, and absence of 3rd digit. A defective metatarsal existed in the position of 3rd digit (Fig. 1A,C). Hands were normal by both clinical and radiographic appearance (data not shown). No family history of limb defects was noted. Micrognathia, full lower lip, strabismus, bilateral ear canal stenosis, and a severe mixed type of deafness (70 dB in right and 100 dB in left) were recognized. The strabismus was operated at 17 months, and a hearing aid was started at 14 months. Developmental milestones were delayed. She could walk alone at 21 months. Her development at 25 months was evaluated as an equivalent level at 7–8 months. Bilateral split-foot was surgically repaired at 39 months. Self-injuries, hyperactivity, and sleep disorders were observed since 3 years of age. At age of 8 years, her weight was 29.9 kg ($+0.6$ SD), height 133 cm ($+1.1$ SD), and OFC 52 cm ($+0.2$ SD).

Molecular Cytogenetic Analysis

G-banded chromosomes of peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cell lines were analyzed. Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed using lymphoblastoid cell lines as previously described [Saito et al., 2008]. RPCI-11 BAC clones and approximately 10-kb probes amplified by long PCR using LA Taq polymerase (Takara Bio, Otsu, Japan) were used for FISH. Primer information is available on request.

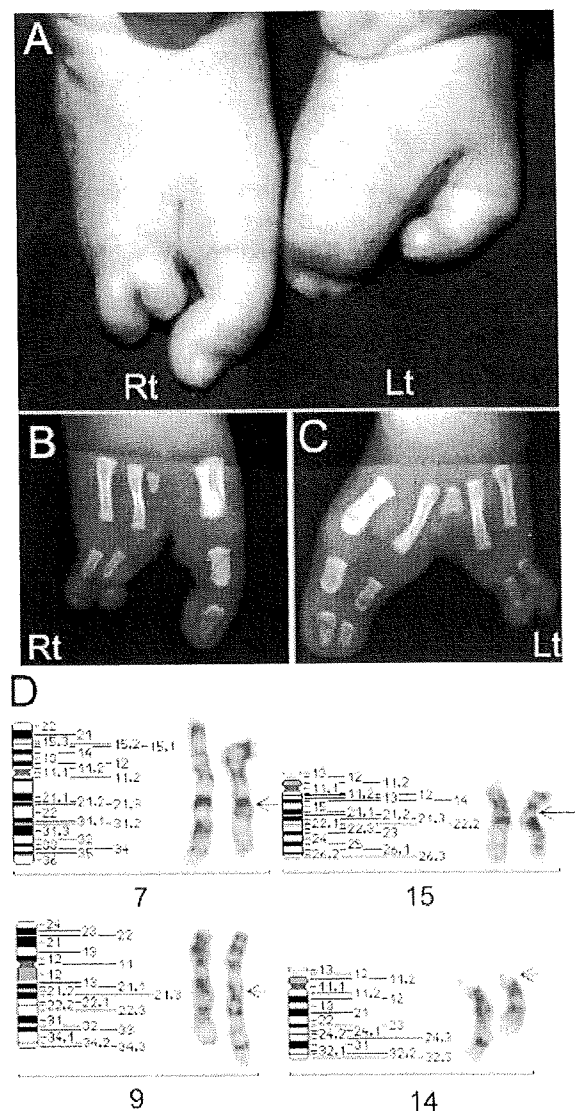


FIG. 1. The patient feet before surgical repair (A) and their X-ray images (B,C). Right foot showed cutaneous syndactyly of 4th and 5th digits, and absence of 2nd and 3rd digits. Only a reminiscent metatarsal was recognized in the position of 2nd and 3rd digits (A,B). Left foot showed cutaneous syndactyly of 1st and 2nd, and of 4th and 5th digits, and absence of 3rd digit. A defective metatarsal existed in the position of 3rd digit (A,C). Partial karyotype of the patient (D). Upper left figure shows chromosomes 7 [left: normal, right: derivative], upper right chromosomes 15 [left: normal, right: derivative], lower left chromosomes 9 [left: normal, right: derivative], and lower right chromosomes 14 [left: normal, right: derivative]. Arrows indicate translocation breakpoints. Rt, right foot; Lt, left foot.

Cloning of Translocation and Deletion Breakpoints

The 7q21.3 translocation breakpoint was analyzed by Southern hybridization using *EcoRI*-, *EcoRV*-, *BglII*-, and *NsiI*-digested patient DNA. Healthy female DNA was also used as a normal

control. Probes were synthesized by PCR DIG probe synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland) using RP11-15f5 DNA as a template. Primer information is available on request. Hybridization, washing, and detection of probes were done according to the manufacturer's protocol. Images were captured on FluorChem (Alpha Innotech, San Leandro, CA). After identification of aberrant DNA fragments by Southern hybridization, size fractioning of electrophoresed *EcoRI*-, *BglII*-, and *NsiI*-digested DNA of the patient was performed using QIAEXII Gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) in order to obtain der(7), der(15), and 7q21.3 deletion junction fragments, respectively. The collected DNA was self-ligated by Ligation high (Toyobo, Osaka, Japan), ethanol precipitated, and dissolved in 20 μ l EB buffer (Qiagen). Inverse PCR was performed in 25 μ l of volume, containing 2 μ l ligated DNA, 1 $\times$ LA PCR bufferII, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM each dNTP, 0.5 μ M each primer, and 1.25 U LA Taq polymerase (Takara Bio). Primers were listed below: *EcoRI*-forward, 5'-TTTCCTCTTTCTCATAGGAAATGC-3'; *EcoRI*-reverse, 5'-ATGTTGGCAATCCGGTAGTC-3'; *BglII*-forward, 5'-CCTGTCTTGGGACTTTGAGG-3'; *BglII*-reverse, 5'-AACCAACCCTCTGGATGACA-3'; *NsiI*-forward, 5'-AGGACCTGGCCCTTGCTTTACACTT-3'; *NsiI*-reverse, 5'-GGGCCCAACA-TAAAGCCCATCTCTA-3'. Negative controls only used either forward or reverse primer. The PCR product was purified with ExoSAP (USB Co., Cleveland, OH) and sequenced for both forward and reverse strands with BigDye Terminator chemistry ver. 3 according to the standard protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA). After breakpoint sequences were disclosed, breakpoint-specific primers for both der(7), der(15), and 7q21.3 deletion junctions were designed: der(7)-forward, 5'-AAGAAGCAAGATTGCCTATGAA-3'; der(7)-reverse, 5'-AGAGACAGAGTCGGCCAGTT-3'; der(15)-forward, 5'-TGGGTCCTTACCTTATGT-TGC-3'; der(15)-reverse, 5'-TCTAGAGGAGCGCTGGCTAC-3'; 7q21del-forward, 5'-TCCACAGCATTTGCAGTAGA-ATCTGA-3'; 7q21del-reverse, 5'-GCTGAAAGATGGGAGAAGTGGCCTA-3'. Junction fragments were attempted to be amplified by PCR using these primer-sets on DNAs of the patient and a normal control.

GeneChip Human Mapping 250K NspI Array

Genomic DNA obtained from peripheral blood leukocytes were used for microarray analysis. Experimental procedures were performed according to the manufacturer's protocol with slight modification (fragmentation time was shortened to 25 min). Call rate was 92.34%. Copy number alterations were analyzed by using CNAG2.0 [Nannya et al., 2005].

Quantitative Real-Time PCR

The interstitial deletion at 7q21.3 was analyzed using the patient's genomic DNA by quantitative real-time PCR (qPCR) on Rotor-Gene 6200 HRM (Corbett Life Science, Sydney, Australia). PCR was performed in a 10 μ l of volume containing 10 ng genomic DNA, 1 $\times$ ExTaq buffer, 0.2 mM each dNTP, 0.5 μ M each primer, 0.25 μ l LCGreen Plus (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT) and 0.25 U Ex TaqHS polymerase (Takara Bio). Five sets of primers, including one normal control set on chromosome 15, were used as qPCR probes. The control set was assigned as a calibrator (a relative

concentration of 1.00). The delta-delta C_t relative quantitative method was employed according to the manufacturer's protocol. Averages of duplicates were calculated by Rotor-Gene 6000 Series Software (Corbett Life Science). Primer information is available on request.

Mutation Analysis

LMTK2 was analyzed on a total of 29 Japanese patients with SHFM. One patient showed esophageal atresia and pulmonary atresia, and another showed tibial hemimelia. Among remaining 27 patients with non-syndromic SHFM (without any other anomalies), 25 patients showed no genomic rearrangement on 10q24 [Kano et al., 2005]. The other four patients have not been analyzed for the 10q24 rearrangement. No patient had hearing loss. Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes according to standard protocols. Genomic DNA was amplified using Genomiphi version 2 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), and then used for mutation analysis. Mutation of 1st to 14th exons covering the *LMTK2* coding region was screened by high-resolution melt analysis. Real-time PCR and subsequent high-resolution melt analysis were performed in 12- μ l mixture on RoterGene-6200HRM (Corbett Life Science) as previously described [Saito et al., 2008]. PCR conditions and primer sequences are available on request.

RESULTS

G-banded chromosomal analysis revealed double balanced translocations. The karyotype was 46,XX,t(7;15)(q21;q15),t(9;14)(q21;q11.2) (Fig. 1D). Her parents showed a normal karyotype (data not shown). To check genomic copy number alterations accompanied by translocations, GeneChip Human Mapping 250K NspI (Affymetrix, Santa Clara, CA) was performed. A $\sim$ 1-Mb interstitial deletion at 7q21.3 and an approximately 4.6-Mb deletion at 15q21.1-q21.2 were found (Fig. 2A, arrow and Fig. 3, bidirectional arrow). No other abnormal copy number alterations were not found around the 9q21 and 14q11.2 regions (data not shown).

Because the patient showed SHFM with hearing loss, we first analyzed chromosomal rearrangement of the 7q21.3 region (Fig. 2A). By FISH analysis using BAC clones around at 7q21, RP11-15f5 [UCSC genome browser coordinate (version Mar. 2006): chr7:96,097,195–96,276,197 bp] was found to span the 7q21 breakpoint as its signals were recognized on der(7), der(15), and normal chromosome 7 (Fig. 2A,B). The breakpoint was further narrowed down by FISH analysis using long PCR products as probes (Fig. 2A,B). While probe I showed only two signals, probe II showed split signals (three signals) in the patient's interphase nuclei, indicating that the breakpoint was located within probe II (Fig. 2A,B). The 7q21.3 deletion junction was narrowed down by qPCR (Fig. 2A).

Southern hybridization analysis using probes P1, P2, and P3 detected aberrant bands (Fig. 2A,C). Inverse PCR on *EcoRI*-, *BglII*-, and *NsiI*-digested DNA was successful for obtaining der(7), der(15), and 7q21.3 deletion junction fragments, respectively. Sequence analysis showed that the 7q21.3 translocation breakpoint was located 38 kb telomeric to *DSS1*, and 258- and 272-kb centro-

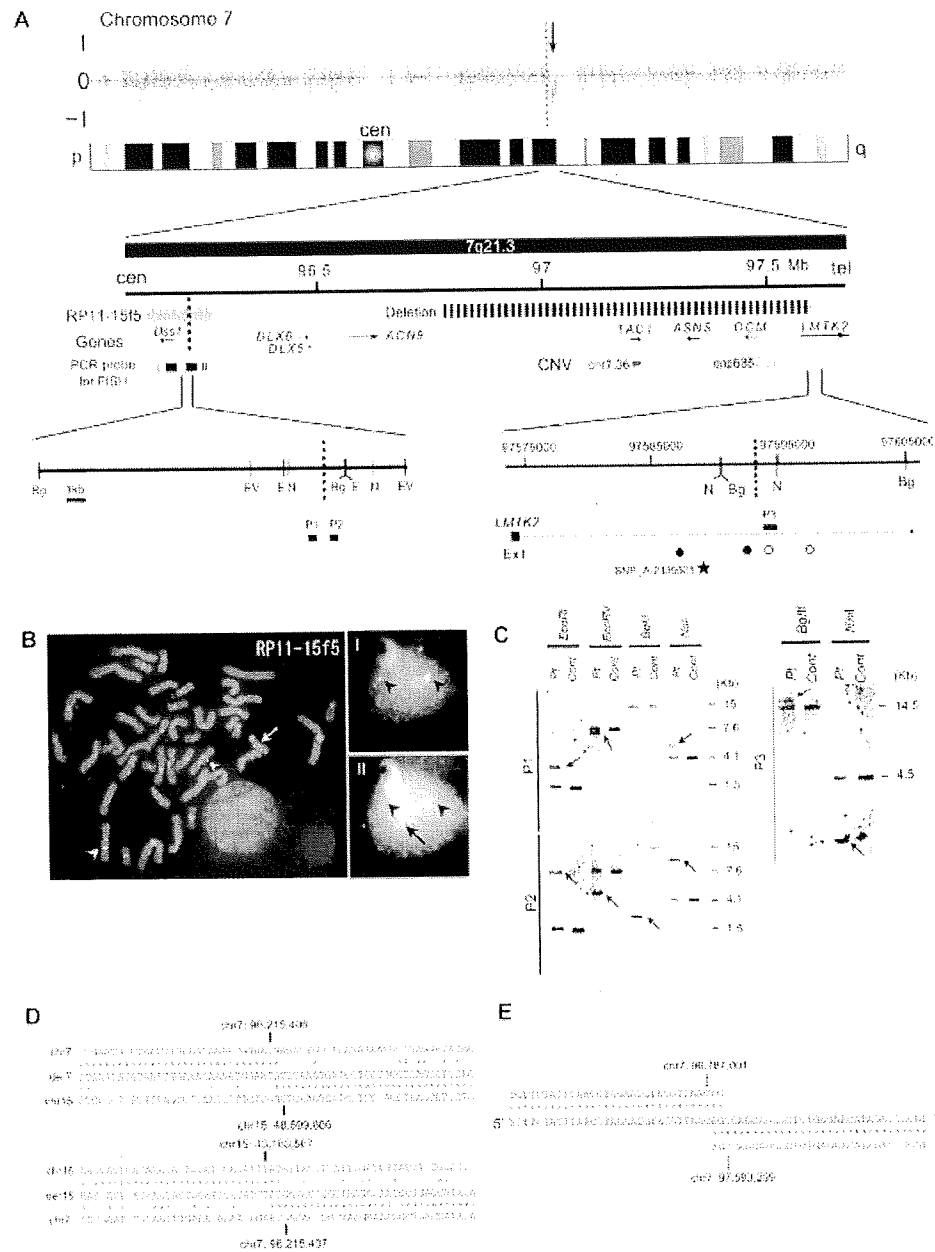


FIG. 2. Characterization of the 7q21.3 rearrangement. **A:** GeneChip analysis of chromosomes 7 in the patient (top). The position (x axis matching the chromosomal 7 ideogram) and $\log_2$ (signal ratio) values (y axis) of each SNP probes are indicated. A thin line indicates copy number inference from Hidden Markov Model. An interstitial deletion at 7q21.3 (arrow) was identified apart from 7q21.3 breakpoint (dashed line). The 7q21.3 genomic rearrangement is schematically presented (middle). RP11-15f5 and PCR probe II span the translocation breakpoint (dashed line). The deletion (dashed thick line) encompasses four genes. *TAC1*, *ASNS*, and *OCM* are overlapped with reported copy number variation (CNV) regions (chr7.36 and cnp635). More detailed maps are shown (bottom). Restriction sites (E, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; Bg, *BglII*; N, *NsiI*) and probes for Southern hybridization (P1-3) are indicated. Translocation breakpoint (dashed line) is located between P1 and P2, and distal deletion breakpoint (dashed line) is flanked by P3. A probe (SNP_A-2139521) in GeneChip (filled star, deleted), positions for qPCR primer-sets (filled circle, deleted; open circle, not deleted) are also depicted. **B:** FISH analysis using a clone [RP11-15f5] and two long PCR probes [I and II in A] on the patient's metaphase chromosomes or interphase nuclei. Arrowhead indicates a signal on chromosomes 7 and arrow shows a signal on a derivative chromosome 15, indicating RP11-15f5 and probe II span the breakpoint. **C:** Southern hybridization using probes P1, P2, and P3 on the patient's genomic DNA. Arrow shows aberrant bands specific to the patient (not observed in control DNA). **D:** Breakpoint junction sequences of der(7) and der(15). In upper part, top, middle, and bottom sequence strands show chromosome 7, derivative chromosome 7, and chromosome 15 sequences, respectively. In lower part, top, middle, and bottom strands show chromosome 15, derivative chromosome 15, and chromosome 7 sequences, respectively. Breakpoint positions are marked according to the UCSC genome browser coordinate (version Mar. 2006). Asterisks indicate nucleotides identical to normal chromosomes. **E:** Deletion junction sequence. Top, middle, and bottom strands show proximal, recombinant, and distal sequences, respectively. Deletion breakpoint location is marked. Two nucleotides were overlapped. Asterisks are matched nucleotides in chromosome 7 sequence.

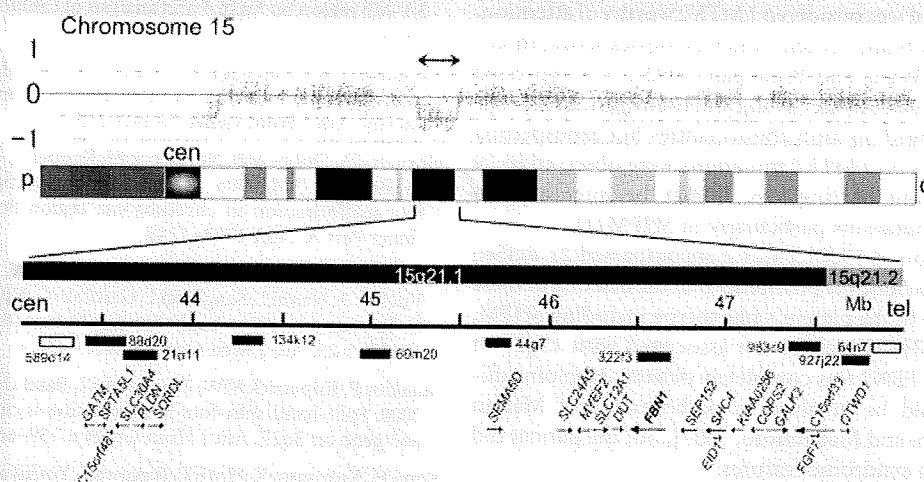


FIG. 3. Characterization of the 15q21 rearrangement. Upper panel: GeneChip analysis of entire chromosome 15 clearly shows the deletion (bidirectional arrow). Deletion at 15q11.2 is reported as a copy number variation. Lower panel: A genomic map of the 15q21.1-q21.2 deletion with 4.6 Mb in size is shown with position of BAC clones used for FISH. Black and white indicates deleted and intact (not deleted), respectively. A total of 21 RefSeq genes, including *FBN1*, are mapped within the deletion [bottom].

meric to *DLX6* and *DLX5*, respectively (Fig. 2A,D). The 7q21.3 deletion was 806 kb in size (from chr7:96, 215, 406–7 to 97, 593, 297–9) and was located 750-kb telomeric to the 7q21.3 translocation breakpoint, encompassing *TAC1*, *ASNS*, *OCM*, and exon 1 of *LMTK2* (Fig. 2A,E).

The rearrangement of the 15q21 region was also complex. The deletion at 15q21.1-q21.2 was approximately 4.6 Mb in size by Affymetrix GeneChip and further BAC FISH analysis, but rather complicated (Fig. 3, bidirectional arrow). The size, 4.6 Mb was somehow different from 5.4 Mb, inferred from breakpoint sequences of der(7) and der(15) (Fig. 2D). The 4.6-Mb deletion contained 21 RefSeq genes including the entire *FBN1* gene (Fig. 3). Approximately a 0.7-Mb segment was retained in the der(15) by FISH using RP11-64n7, RP11-112e7, RP11-964b7, RP11-416k5, RP11-294o11, and partial RP11-637h23 (chr15: 47869993–48550883), but we did not further investigate the retained segment as our main focus was the 7q21.3 region. The rearrangement junctions from both of derivative chromosomes were successfully amplified by PCR only on the patient DNA (data not shown).

We hypothesized that a gene(s) in the 806-kb deletion at 7q21.3 could be responsible for the split-foot phenotype. As *TAC1*, *ASNS*, and *OCM* were overlapped with reported copy number variation regions (chr7.36 and cnp635 in the database; Fig. 2A), it was less likely that a heterozygous deletion of these genes would cause the split-foot phenotype. *LMTK2* gene appeared to be a candidate for SHFM1. We performed *LMTK2* mutation screening in 29 SHFM patients without hearing loss, but no pathological mutations were found.

DISCUSSION

SHFM is a human developmental disorder characterized by missing central rays of the distal extremities, including phalangeal, meta-

carpal, and metatarsal bones [Elliott et al., 2005]. SHFM occur either isolated (non-syndromic) or with other abnormalities (syndromic). Cytogenetic abnormalities, such as deletions, translocations, and inversions in the region of 7q21.3-q22.1 in patients with SHFM, provided evidence that positional effects and/or regulatory elements might play a role in pathogenesis of SHFM [Scherer et al., 1994a,b; Crackower et al., 1996]. This locus has been designated as *SHFM1* (OMIM %183600). Both non-syndromic and syndromic SHFM have been linked to the *SHFM1* locus, including SHFM with sensorineural hearing loss (SHFM1D; OMIM %220600). Three potential candidate genes, *DLX5*, *DLX6*, and *DSS1* (Deleted in the Split-hand/Split-foot 1 region), have been highlighted as they were expressed in the developing limbs in mice [Crackower et al., 1996; Robledo et al., 2002]. Double knockout of *Dlx5* and *Dlx6* in mice resulted in typical SHFM as well as inner ear and severe craniofacial defects [Robledo et al., 2002]. However, the three candidate genes did not seem to be interrupted directly by any of human chromosomal rearrangements, and did not show any point mutations in SHFM patients [Crackower et al., 1996]. One possible hypothesis is that disruption of distant cis-acting regulatory elements or positional effects results in aberrant expression of *DSS1*, *DLX5*, and *DLX6* leading to SHFM1 [Crackower et al., 1996; Scherer et al., 2003]. Alternatively, a gene, not yet identified, exists in different region of SHFM1. *TP63*, encoding P63, is the gene identified in both syndromic and non-syndromic SHFM [Celli et al., 1999; Ianakiev et al., 2000; van Bokhoven et al., 2001; Duijff et al., 2003]. Recently, *p63* has been shown to directly regulate expression of *Dlx5* and *Dlx6* in apical ectodermal ridge in mice [Lo Iacono et al., 2008], suggesting that *p63* and the *Dlx5/Dlx6* locus are involved in the same pathway of SHFM pathogenesis.

Here we report on an unexpected 806 kb interstitial deletion together with a chromosomal translocation in the *SHFM1* locus of the patient with SHFM1D. The deletion involved *TAC1*, *ASNS*,