

201024222A

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の歌舞伎症候群原因遺伝子同定と
遺伝子情報に基づく成長障害治療可能性の研究開発

平成22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23年（2011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の歌舞伎症候群原因遺伝子同定と
遺伝子情報に基づく成長障害治療可能性の研究開発

平成22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23年（2011年）4月

目 次

I. 総括研究報告書

ゲノム異常症としての歌舞伎症候群原因遺伝子同定と遺伝子情報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. 患者試料収集とゲノム解析およびエピジェネティック解析 -----11
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. マッピング, 候補遺伝子解析および変異解析 -----17
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）

研究協力者

要 匡（琉球大学大学院医学研究科・遺伝医学・准教授）

松本直通（横浜市立大学大学院医学研究科・遺伝学・教授）

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22年度総括研究報告書

研究課題：ゲノム異常症としての歌舞伎症候群原因遺伝子同定と遺伝子情報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）

分担研究者

新川詔夫（北海道医療大学・学長）

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）

研究協力者

要 匡（琉球大学大学院医学研究科・遺伝医学・准教授）

松本直通（横浜市立大学大学院医学研究科・遺伝学・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，歌舞伎症候群患者原因遺伝子単離に注力した。

A. 研究目的

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を目指して本年度は，新技術である次世代型シーケンサーを用いた exome

解析により，原因遺伝子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

北海道医療大学の研究分担チーム

から供給された 63 名の歌舞伎症候群患者試料の中から典型的な症例を選んで exome 解析を行い、歌舞伎症候群原因遺伝子を同定する。

(1) Agilent 社製 1M array を用いての exon enrichment

患者試料から抽出された高分子 DNA を使用する。Coding sequence (CDS) とされるエクソン領域についてカスタムアレーデザインを行い 1M array の format にプローブを合成した。歌舞伎症候群患者 DNA から 250 bp 平均長となるように DNA 断片ライブラリーを調整し、ハイブリダイゼーションを

り、それらのアダプターにより GAII のフローセル上でブリッジ PCR 後に、pair-end シーケンスを行った。

(3) Bioinformatics 解析

得られた 75bp paired-end reads (平均 library insert size: 250bp) データから Single nucleotide variant (SNV) および insertion and deletion (in/del) を、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) と Genome Analysis Toolkit (GATK) を使用して解析した。

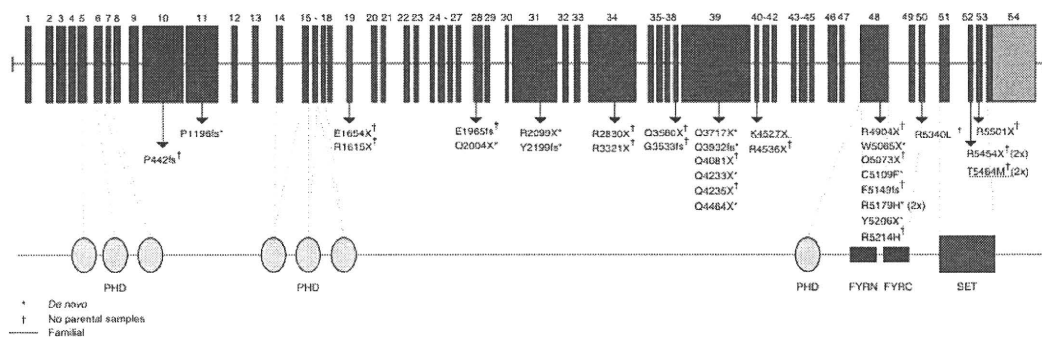


Figure 1 Genomic structure and allelic spectrum of *MLL2* mutations that cause Kabuki syndrome. *MLL2* is composed of 54 exons that encode untranslated regions (orange) and protein coding sequence (blue) including 7 PHD fingers (yellow), FYRN (green), FYRC (green) and a SET domain (red). Arrows indicate the locations of 32 different mutations found in 53 families with Kabuki syndrome including 20 nonsense mutations, 7 indels and 5 amino acid substitutions. Asterisks indicate mutations that were confirmed to be *de novo* and crosses indicate cases for which parental DNA was unavailable. The two underlined mutations were transmitted each within a family, from an affected parent to an affected child.

行い CDS に相当するゲノム領域を濃縮してシーケンス対象 DNA 断片ライブラリーとした。

(2) 次世代型シーケンサーイルミナ社 GAII によるシーケンス

濃縮 DNA 断片ライブラリーの両末端部分にはアダプターが連結されてお

以上の exome 解析は、Washington University との共同研究として行った。

C. 研究結果

Washington University の協力によって 10 名の歌舞伎症候群患者を exome 解析にかけた。患者共通に truncation

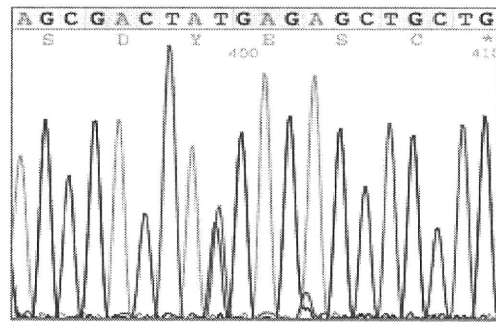
type の変異が存在する遺伝子を選択 異が歌舞伎症候群患者に見られるこ

図 1. Ng et al., Nature Genet. 2010 より引用

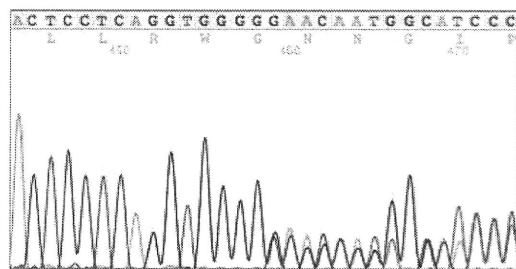
していくことにより, MLL2 遺伝子の変
MLL2 の変異は, 歌舞伎症候群患者の
約 80% に認められ MLL2 の truncation
type 変異すなわち機能喪失をもたら
す変異が歌舞伎症の原因となってい
ることが明らかとなった。

臨床遺伝医により診断確実な歌舞伎
症例でかつ Washington University で
解析していない 8 例を対象として, 長
崎大学で変異解析を行った。1 例で 1
塩基欠失 (frameshift), 2 例で
nonsense mutation, 1 例でエキソンの
最終塩基の G to A transition, 1 例
でアルギニンからグルタミンへの
missense mutation が見つかった。3
例は塩基変異を確認できなかった。

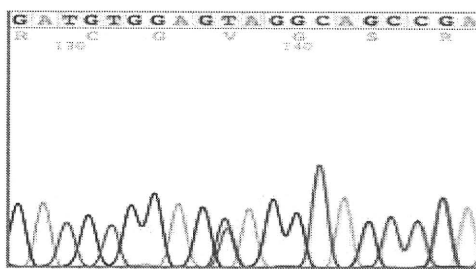
とが同定できた。



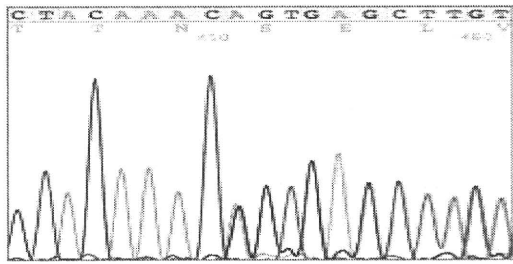
Nonsense 変異 2



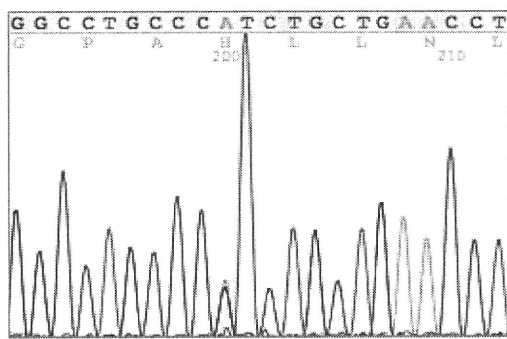
One base deletion



Nonsense 変異 1



Exon の最終塩基 G→A 変異



CAT→CGT missense 変異

D. 考察

今回の研究でMLL2変異が歌舞伎症候群の原因の一つとなっていることは明らかである。70～80%の患者において完全長のタンパク質が合成されないtruncation型の変異が検出される。しかし、残りの20～30%の患者にはMLL2の変異が認められず、他の遺伝子変異によって歌舞伎症候群が発症していることが考えられる。来年度から、MLL2遺伝子変異で説明不可能な症例の原因追及が研究課題として加わる。

MLL2はヒストンH3の4番目のリジン (H3K4) をメチル化して転写活性化を行うと考えられている。MLL2に変異が認められない症例ではMLL2と関連してH3K4のメチル化、転写制御に関わる遺伝子の関与が考えられ、今後の歌舞伎症候群関連遺伝子の単離も期待できる。歌舞伎症候群がメチル化の異常すなわち転写制御の異常によることが示唆され、もともとの目標であった成長障害はメチル化異常による全体的な転写抑制が原因の可能性が出てきた。他のインプリンティング異常と同様にメチル化制御の正常化が根本的な治療であると考えられるが現状では困難であると考えられる。

歌舞伎症候群の多様な症状はMLL2をkey酵素としたメチル化により発現が制御される遺伝子の転写異常によると考えられる。今後MLL2の遺伝子がメチル化を通して転写制御している遺伝子 (target 遺伝子) を明らかとしていくことで、歌舞伎症候群の症状の説明あるいは、対症療法的な治療は見込めるであろう。

現時点で、歌舞伎症候群の原因が判明したが、歌舞伎症候群の多様な臨床症状とMLL2の変異部位・変異の種類との明確な関連、すなわちphenotype-genotype correlationは明らかでない。今後はphenotype-genotype correlationを明らかにし

ながら、歌舞伎症候群患者のDNA診断と臨床的なケアが一体となって患者治療の充実が望まれる。

E. 結論

exome解析によって歌舞伎症候群の原因遺伝子の一つ MLL2 遺伝子を明らかにした。次世代型シーケンサーによる原因不明の遺伝子疾患の解析は非常に有用であることが示された。特に、歌舞伎症候群は、次世代型シーケンサー+exome解析によって原因遺伝子が明らかにされた最初の常染色体優性疾患である。

最初の Cytogenetics Whole - Genome 2.7 M Array により欠失部位を描出してから遺伝子を同定しようとした試みは失敗し、exome解析によって MLL2 遺伝子を単離できた。欠失部位を丹念に解析してからの原因遺伝子単離は有用な方法であるが、歌舞伎症候群はほとんど全てが塩基レベルの変異あるいは insertion/deletion であり、欠失部位探索では全く有効性を見出せなかった。結局、疾患によって遺伝子変異の特徴があり、array解析を行う意味は疾患単位毎に異なることが明らかとなった。

——達成度について——

歌舞伎症候群の原因遺伝子単離を第一の目標として研究を開始し、本年度

実その一つとして MLL2 遺伝子を単離できたことは大きな進展である。

今後（最終年度）は、全国調査によって歌舞伎症候群（様）の頻度を明らかにすると共に、MLL2 を対象として DNA 診断を行う。phenotype-genotype correlation を明らかにしながら、MLL2 遺伝子変異のない患者について、再度 exome 解析を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Tsuda M, Yamada T, Mikoya T, Sogabe I, Nakashima M, Minakami H, Kishino T, Kinoshita A, Niikawa N, Hirano A, Yoshiura K. A type of familial cleft of the soft palate maps to 2p24.2-p24.1 or 2p21-p12. *J. Hum. Genet.* 2010 Feb;55(2): 124-126.
2. Takahata T, Yamada K, Yamada Y, Ono S, Kinoshita A, Matsuzaka T, Yoshiura KI, Kitaoka T. Novel mutations in the SIL1 gene in a Japanese pedigree with the Marinesco-Sjögren syndrome. *J. Hum. Genet.* 2010 Mar;55(3): 142-146.
3. Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense

- mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of fibroblast growth factor receptor 1. *Hum. Reprod.* 2010 Apr;25(4): 1076-1080.
4. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat. Genet.* 2010 Sep;42(9): 790-793.
 5. Matsuzawa N, Kondo S, Shimozato K, Nagao T, Nakano M, Tsuda M, Hirano A, Niikawa N, Yoshiura K. Two missense mutations of the IRF6 gene in two Japanese families with popliteal pterygium syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 2010 Sep;152A(9): 2262-2267.
 6. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Kinoshita A, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. The possibility of microarray-based analysis using cell-free placental mRNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* 2010 Sep; 30(9):849-861.
 7. Oikawa M, Kuniba H, Kondoh T, Kinoshita A, Nagayasu T, Niikawa N, Yoshiura K. Familial brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: linkage analysis with clipped fingernail DNA on high-density SNP array. *Eur. J. Med. Genet.* 2010 Sep-Oct; 53(5): 244-249.
 8. Ono S, Imamura A, Tasaki S, Kurotaki N, Ozawa H, Yoshiura K, Okazaki Y. Failure to Confirm CNVs as of Aetiological Significance in Twin Pairs Discordant for Schizophrenia. *Twin Res. Hum. Genet.* 2010 Oct; 13(5): 455-460.
 9. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Identification of Pregnancy-Associated MicroRNAs in Maternal Plasma. *Clin. Chem.* 2010 Nov; 56(11): 1767-1771.
 10. Ota I, Sakurai A, Toyoda Y, Morita S, Sasaki T, Chishima T, Yamakado M, Kawai Y, Ishidao T, Lezhava A, Yoshiura K-i, Togo S, Hayashizaki Y, Ishikawa T, Ishikawa T, Endo I and Shimada H. Association between breast cancer risk and the wild-type allele of human ABC transporter ABCC11. *Anticancer Research* 2010 Dec; 30 (12): 5189-5194.
- 2) 学会発表

国内学会

第33回日本分子生物学会年会・第83回

日本生化学会大会 合同大会 2010年
12月7日(火)～10日(金), 神戸ポ
ートアイランド, 神戸.

3P-0812: 日本人におけるヒト耳垢遺
伝子ABCC11の Δ 27アリの新たな
見解. 松田律史, 山田愛子, 小野佑
輔, 堀 佑輔, スタレンキ ディミ
トロ, ソンキナ ナディア, 吉浦
孝一郎, 太田 亨, 新川詔夫

3P-0813: Key-value storeを用いた大規
模ゲノムデータ処理の高速化.
Hiroyuki Mishima, 吉浦孝一郎

4P-1117: Clinical feature and
genome/epigenome analyses of
Japanese patients with
Beckwith-Wiedemann syndrome .
Hokuto Yoshinaga, Ken Higashimoto,
Hitomi Yatsukim Toshiyuki Maeda,
Yasushi Ohtsuka, Kosuke Jozaki,
Kazuhiko Nakabayashi, Kenichiro
Hata, Koh-ichiro Yoshiura, Hidenobu
Soejima

4P-1141: ホールエクソンキャプチャー
による歌舞伎メーキャップ症候
群の解析. 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, 吉浦孝一郎, 太田 亨, 新川詔
夫, 成富研二

The 35th Annual Meeting of the
Japanese Society for Investigative
Dermatology, 2010/12/3-5,
Wakayama Prefectural Cultural
Hall (和歌山県民文化会館)

P02-05: A mutation of the
immunoproteasome subunit gene
causes a novel autoinflammatory
disorder Nakajo-Nishimura syndrome
(familial Japanese fever). Kanazawa
Nobuo, Takehiko Sugihara, Hiroyuki
Mishima, Fukumi Furukawa, Hiroaki
Ida, and Koh-ichiro Yoshiura.

C01-02: A mutation of the
immunoproteasome subunit gene
causes a novel autoinflammatory
disorder Nakajo-Nishimura syndrome
(familial Japanese fever). Kanazawa
Nobuo, Kazuhiro Arima, Hiroyuki
Mishima, Fukumi Furukawa, Hiroaki
Ida, and Koh-ichiro Yoshiura.

第55回日本人類遺伝学会2010年10月
27日(水)～30日(土), 大宮ソニ
ックシティ, 大宮

AL-2: Discovery of a gene for Kabuki
syndrome by exome sequencing and
genotype-phenotype relationship in 110
cases. M.J. Bamshad. M.C. Hannibal,
K.J. Buckingham, A.E. Beck, S.B. Ng,
M. McMillin, H. Gildersleeve, A.W.
Bigham, H.K. Tabor, K. Yoshiura, T.
Matsumot, N. Matsumoto, H. Tonoki,

- K. Naritomi, T. Kaname, T. Nagai, H. Ohashi, K. Kurosawa, J. Hou, T. Ohta, C.A. Morris, J.E. Ming, T.H. Shikh, S. Banka, G. Black, J. Clayton-Smith, E.H. Zackai, D. Donnai, N. Niikawa, D.A. Nickerson, J. Shendure
- OP11-051: 日本人におけるヒト耳垢遺伝子ABCC11の Δ 27アレル頻度. 山田愛子, 堀 佑輔, 小野佑輔, 松田律史, ストランキー ディマ, ソンキナ ナディア, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 太田 亨
- OP11-056: 歌舞伎メーキャップ症候群のエクソーム解析. 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, 吉浦孝一郎, 太田亨, 新川詔夫, 成富研二
- OP14-074: HELLP症候群と関連した胎盤特異的microRNAの網羅的解析. 三浦清徳, 東嶋 愛, 三浦生子, 山崎健太郎, 阿部修平, 城 大空, 長谷川ゆり, 中山大介, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- OP15-075: 唇裂口蓋裂のGenome-wide association study. 引田正宣, 津田雅由, 佐々木健作, 三嶋博之, 吉田和加, 夏目長門, 内山健志, 平野明喜, 木下 晃, 吉浦孝一郎
- OP15-075: SFTPC遺伝子変異を認めた家族性肺線維症の一家系. 小野慎治, 田中健之, 木下 晃, 石田正之, 森本浩之輔, 吉浦孝一郎,
- OP18-100: 本邦Beckwith-Wiedemann症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 副島英伸, 吉永北斗, 東元 健, 八木ひとみ, 前田寿幸, 大塚泰史, 中林一彦, 泰 健一郎, 吉浦孝一郎
- OP31-165: 長崎におけるHPV-DNA型の頻度と細胞診判定に関する報告. 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 小寺宏平, 藤下 晃, 鮫島哲郎, 村上 誠, 池本理恵, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- P-020: ウィルス感染防御遺伝子のコピー数多型とHPV持続感染に関する検討. 阿部修平, 三浦清徳, 木下晃, 山崎健太郎, 三浦生子, 嶋田貴子, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- P-024: ABCC11 expression and 538G/A polymorphism in human breast cancer. Sosonkina Nadiya, Starenki Dmytro, 太田 亨, 吉浦孝一郎, 新川詔夫
- P-025: 乳癌FFPE標本を用いたAgilent SurePrint G3 microarrayによるアレイCGHの最適化. 及川将弘, 蔵重智美, 三浦史郎, 中島正洋, 永安 武, 吉浦孝一郎
- P-028: Genetic polymorphism of human ABCC11 as a determinant of earwax type, axillary osmidrosis, and the risk of breast cancer. 豊田 優, 櫻井亜季, 太田郁子, 坂井靖夫, 五味常明,

中川 大, アレキサンダーレジャバ,
中島正洋, 吉浦孝一郎, 林崎良英,
新川詔夫, 石川智久

P-123: 母体血中における胎盤特異的
microRNA群の網羅的スクリーニン
グ. 東島 愛, 三浦清徳, 三浦生子,
山崎健太郎, 阿部修平, 城 大空,
長谷川ゆり, 中山大介, 木下 晃,
吉浦孝一郎, 増崎英明

第6回広島大学・長崎大学連携研究事
業カンファランス -放射線災害医
療の国際教育拠点確立に向けた機
関連携事業- 2010年6月5日 (土) ,
長崎大学医学部ボードインホール,
長崎

2-1: アレイCGHを用いたヒパクシャ
ン乳癌のゲノム不安定性の検討. 及
川将弘, 吉浦孝一郎, 蔵重智美, 三
浦史郎, 中島正洋

第48回日本婦人科腫瘍学会 (つくば国
際会議場、茨城) 2010年7月8-10日
妊娠中の子宮頸部細胞診における日
母分類、ベセスダシステムおよび
HPVスクリーニングの比較. 三浦清
徳、山崎健太郎、池本理恵、三浦生
子、嶋田貴子、濱口大輔、小寺宏平、
藤下晃、鮫島哲郎、村上誠、中山大
介、吉浦孝一郎、増崎英明

第34回日本口蓋裂学会総会・学術集会

2010年5月27日 (木) ~28日 (金) ,
北とぴあ, 東京

シンポジウムI テーマ: 口唇裂・口蓋
裂の分子遺伝学研究-これまでの研
究成果とこれからの原因追求 -S I -
基調講演: 比較的ありふれた病気
(sub-common disease) としての口
唇裂・口蓋裂. 吉浦孝一郎

第106回 日本精神神経学会学術総会
2010年5月20日 (木) ~22日 (土)
広島国際会議場, 広島

2-F-18: 統合失調症および自閉症一卵
性双生児不一致例におけるゲノム
構造変化の検証. 小野慎治, 今村 明,
橋田あおい, 黒滝直弘, 田崎真也,
小澤 寛樹, 吉浦孝一郎

第110回日本外科学会総会 2010年4月
8日 (木) ~10日 (土) , 名古屋国
際会議場, 名古屋

PD-9-1: 乳腺乳頭状腫瘍の臨床病理学
的特徴と細胞遺伝学的プロファイ
ル. 及川将弘, 吉浦孝一郎, 矢野 洋,
安倍邦子, 林徳真吉, 永安 武

第13回北海道出生前診断研究会 2010
年12月4日, 札幌医大記念ホール

Array CGHで診断された1q部分trisomy
症候群の1例. 辻岡孝郎, 工藤京平,
鈴木 雅彦, 大橋 宏史, 小篠菜穂,
宮 卓也, 奥原宏治, 高橋伸浩, 外
木秀文, 飯塚 進, 細木華奈, 斉藤

伸治, 太田 亨, 新川詔夫

国際学会

2010/10/10-14 20th ISUOG World Congress: (Prague, Czech Republic)

A case of mesenchymal diaplusia. Miura K, Yamasaki K, Miura S, Nakayama D, Yoshiura K, Nakayama M, Masuzaki H

The American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting

Washigton D.C., Baltimore, November 2-6, 2010

1147/T: Frequency of 27-bp deletion mutation, another earwax determinant, in ABCC11 among the Japanese population.(1447) (5:00PM-6:00PM on Thu)

Author(s): A. Yamada, Y. Hori, Y. Ono, N. Matsuda, D. Starenki, N. Sosonkina, K. Yoshiura, T. Ohta, N. Niikawa

2219/F: Re-sequencing analysis of candidate region for a neurodegenerative disorder by massively parallel sequencing. T. Kaname, A. Tsujino, K. Yanagi, K. Hayashi, M. Tsukahara, K. Fujimori, I. Kikuzato, M. Teruya, Y. Imada, M. Nezu, S. Yano, Y. Sato, Y. Miwa, T. Niikawa, K. Yoshiura, K. Naritomi

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22年度分担研究報告書

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

分担研究項目：患者試料収集とゲノム解析およびエピジェネティック解析

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）の原因遺伝子の同定と病態生理の解明を目指して本年度は，新技術である次世代型シーケンサーを用いた exome 解析により，原因遺伝子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

北海道医療大学の研究分担チームから供給された 63 名の歌舞伎症候群

患者試料の中から典型的な症例を選んで exome 解析を行い，歌舞伎症候群原因遺伝子を同定する。

(1) Agilent 社製 1M array を用いての exon enrichment

患者試料から抽出された高分子 DNA を使用する。Coding sequence (CDS) とされるエクソン領域についてカスタムアレーデザインを行い 1M array の format にプローブを合成した。歌

舞伎症候群患者 DNA から 250 bp 平均長となるように DNA 断片ライブラリーを調整し、ハイブリダイゼーションを行い CDS に相当するゲノム領域を濃縮してシーケンス対象 DNA 断片ライブラリーとした。

(2) 次世代型シーケンサーイルミナ社 GAI1 によるシーケンス

濃縮 DNA 断片ライブラリーの両末端部分にはアダプターが連結されており、それらのアダプターにより GAI1 のフローセル上でブリッジ PCR 後に、pair-end シーケンスを行った。

(3) Bioinformatics 解析

得られた 75bp paired-end reads (平均 library insert size: 250bp) データから Single nucleotide variant (SNV) および insertion and deletion (in/del) を、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) と

Genome Analysis Toolkit (GATK) を使用して解析した。

以上の exome 解析は、Washington University との共同研究として行った。

C. 研究結果

Washington University の協力によって 10 名の歌舞伎症候群患者を exome 解析にかけた。患者共通に truncation type の変異が存在する遺伝子を選択していくことにより、MLL2 遺伝子の変異が歌舞伎症候群患者に見られることが同定できた。

MLL2 の変異は、歌舞伎症候群患者の約 80 % に認められ MLL2 の truncation type 変異すなわち機能喪失をもたらす変異が歌舞伎症の原因となっていることが明らかとなった。

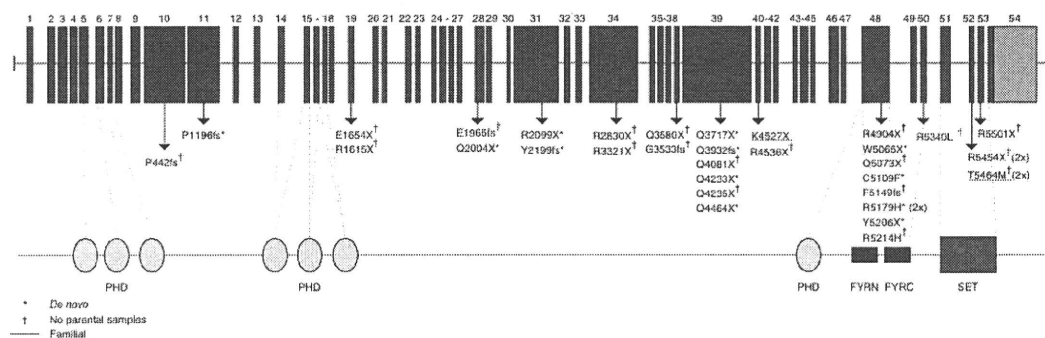


Figure 1 Genomic structure and allelic spectrum of *MLL2* mutations that cause Kabuki syndrome. *MLL2* is composed of 54 exons that encode untranslated regions (orange) and protein coding sequence (blue) including 7 PHD fingers (yellow), FYRN (green), FYRC (green) and a SET domain (red). Arrows indicate the locations of 32 different mutations found in 53 families with Kabuki syndrome including 20 nonsense mutations, 7 indels and 5 amino acid substitutions. Asterisks indicate mutations that were confirmed to be *de novo* and crosses indicate cases for which parental DNA was unavailable. The two underlined mutations were transmitted each within a family, from an affected parent to an affected child.

D. 考察

今回のカスタムアレーによるexome解析により、MLL2変異が歌舞伎症候群の原因の一つとなっていることが明らかとなった。70～80%の患者において完全長のタンパク質が合成されないtruncation型の変異が検出される。しかし、残りの20～30%の患者にはMLL2の変異が認められず、他の遺伝子変異によって歌舞伎症候群が発症していることが考えられる。

MLL2はヒストンH3の4番目のリジン(H3K4)をメチル化して転写活性化を行うと考えられている。歌舞伎症候群がメチル化の異常すなわち転写制御の異常によることが示唆され、もともとの目標であった成長障害はメチル化異常による全体的な転写抑制が原因の可能性が高い。他のインプリンティング異常と同様にメチル化制御の正常化が根本的な治療であると考えられる。

歌舞伎症候群の多様な症状はMLL2をkey酵素としたメチル化により発現が制御される遺伝子の転写異常によると考えられる。今後患者への対処治療を考えたときに、MLL2の遺伝子がメチル化を通して転写制御している遺伝子(target 遺伝子)を明らかとしていくこと重要になってくる。

E. 結論

exome解析によって歌舞伎症候群の原因遺伝子の一つ MLL2 遺伝子を明らかにした。次世代型シーケンサーによる原因不明の遺伝子疾患の解析は非常に有用であることが示された。特に、歌舞伎症候群は、次世代型シーケンサー+exome解析によって原因遺伝子が明らかにされた最初の常染色体優性疾患である。

——達成度について——

歌舞伎症候群の原因遺伝子単離を第一の目標として研究を開始し、本年度実その一つとして MLL2 遺伝子を単離できたことは大きな進展である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Tsuda M, Yamada T, Mikoya T, Sogabe I, Nakashima M, Minakami H, Kishino T, Kinoshita A, Niikawa N, Hirano A, Yoshiura K. A type of familial cleft of the soft palate maps to 2p24.2-p24.1 or 2p21-p12. *J. Hum. Genet.* 2010 Feb;55(2): 124-126.
2. Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense

- mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of fibroblast growth factor receptor 1. *Hum. Reprod.* 2010 Apr;25(4): 1076-1080.
3. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat. Genet.* 2010 Sep;42(9): 790-793.
4. Matsuzawa N, Kondo S, Shimozato K, Nagao T, Nakano M, Tsuda M, Hirano A, Niikawa N, Yoshiura K. Two missense mutations of the IRF6 gene in two Japanese families with popliteal pterygium syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 2010 Sep;152A(9): 2262-2267.
5. Oikawa M, Kuniba H, Kondoh T, Kinoshita A, Nagayasu T, Niikawa N, Yoshiura K. Familial brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: linkage analysis with clipped fingernail DNA on high-density SNP array. *Eur. J. Med. Genet.* 2010 Sep-Oct; 53(5): 244-249.
- 2) 学会発表
- 国内学会
- 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月7日(火)～10日(金), 神戸ポートアイランド, 神戸.
- 3P-0812: 日本人におけるヒト耳垢遺伝子ABCC11のΔ27アリの新たな見解. 松田律史, 山田愛子, 小野佑輔, 堀 佑輔, スタレンキ ディミトロ, ソソンキナ ナディア, 吉浦孝一郎, 太田 亨, 新川詔夫
- 4P-1141: ホールエクソンキャプチャーによる歌舞伎メーキャップ症候群の解析. 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, 吉浦孝一郎, 太田 亨, 新川詔夫, 成富研二
- 第55回日本人類遺伝学会2010年10月27日(水)～30日(土), 大宮ソニックシティ, 大宮
- AL-2: Discovery of a gene for Kabuki syndrome by exome sequencing and genotype-phenotype relationship in 110 cases. M.J. Bamshad, M.C. Hannibal, K.J. Buckingham, A.E. Beck, S.B. Ng, M. McMillin, H. Gildersleeve, A.W. Bigham, H.K. Tabor, K. Yoshiura, T. Matsumoto, N. Matsumoto, H. Tonoki,

- K. Naritomi, T. Kaname, T. Nagai, H. Ohashi, K. Kurosawa, J. Hou, T. Ohta, C.A. Morris, J.E. Ming, T.H. Shikh, S. Banka, G. Black, J. Clayton-Smith, E.H. Zackai, D. Donnai, N. Niikawa, D.A. Nickerson, J. Shendure
- OP11-051: 日本人におけるヒト耳垢遺伝子ABCC11の Δ 27アレル頻度. 山田愛子, 堀 佑輔, 小野佑輔, 松田律史, ストランキー ディマ, ソンキナ ナディア, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 太田 亨
- OP11-056: 歌舞伎メーキャップ症候群のエクソーム解析. 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, 吉浦孝一郎, 太田亨, 新川詔夫, 成富研二
- P-024: ABCC11 expression and 538G/A polymorphism in human breast cancer. Sosonkina Nadiya, Starenki Dmytro, 太田 亨, 吉浦孝一郎, 新川詔夫
- P-028: Genetic polymorphism of human ABCC11 as a determinant of earwax type, axillary osmidrosis, and the risk of breast cancer. 豊田 優, 櫻井亜季, 太田郁子, 坂井靖夫, 五味常明, 中川 大, アレキサンダーレジャバ, 中島正洋, 吉浦孝一郎, 林崎良英, 新川詔夫, 石川智久
- 第13回北海道出生前診断研究会 2010年12月4日, 札幌医大記念ホール
Array CGHで診断された1q部分trisomy症候群の1例. 辻岡孝郎, 工藤京平, 鈴木 雅彦, 大橋 宏史, 小籟菜穂, 宮 卓也, 奥原宏治, 高橋伸浩, 外木秀文, 飯塚 進, 細木華奈, 斉藤伸治, 太田 亨, 新川詔夫
- 国際学会
The American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting
Washington D.C., Baltimore, November 2-6, 2010
- 1147/T: Frequency of 27-bp deletion mutation, another earwax determinant, in ABCC11 among the Japanese population.(1447) (5:00PM-6:00PM on Thu)
Author(s): A. Yamada, Y. Hori, Y. Ono, N. Matsuda, D. Starenki, N. Sosonkina, K. Yoshiura, T. Ohta, N. Niikawa
- 2219/F: Re-sequencing analysis of candidate region for a neurodegenerative disorder by massively parallel sequencing. T. Kaname, A. Tsujino, K. Yanagi, K. Hayashi, M. Tsukahara, K. Fujimori, I. Kikuzato, M. Teruya, Y. Imada, M. Nezu, S. Yano, Y. Sato, Y. Miwa, T. Niikawa, K. Yoshiura, K. Naritomi