

201117005A

厚生労働科学研究費補助金  
成育疾患克服次世代育成基盤研究事業

小児先天性疾患および難治性疾患における  
臨床的遺伝子診断の基盤整備  
(H21-子ども-一般-005)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 緒方 勤

平成 24 年 (2012) 3 月

# 目次

---

## I. 総括研究報告

小児先天性疾患および難治性疾患における臨床的遺伝子診断の基盤整備

緒方 勤 ----- 1

## II. 分担研究報告

1. 先天性疾患の臨床的遺伝子診断と拠点施設の機能拡充に関する研究

緒方 勤 ----- 11

2. 腫瘍性疾患の臨床的遺伝子診断に関する研究

大喜多 肇 ----- 17

3. 小児先天性疾患および難治性疾患における臨床的遺伝子診断の  
基盤整備倫理基盤の確立に関する研究

福嶋 義光 ----- 21

4. 小児先天性疾患および難治性疾患の遺伝カウンセリング体制の実態調査

斎藤 加代子 ----- 25

5. 遺伝子診断の臨床提供のための遺伝子検査ネットワーク構築の研究

松原 洋一 ----- 29

6. 先天性疾患の臨床的遺伝子診断に関する研究

深見 真紀 ----- 35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 45

# I . 総括研究報告

小児先天性疾患および難治性疾患における臨床的遺伝子診断の基盤整備

研究代表者 緒方 勤 浜松医科大学小児科

研究要旨：

本研究の目的は、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断の継続的实施を可能とする基盤を整備することである。当該年度においては、明確な遺伝子診断アプローチが定まっていなかったインプリンティング疾患の解析手法の確立、アレイCGHや次世代シーケンサーなどの全ゲノム解析手法の遺伝子診断への応用、パラフィンブロックを用いた腫瘍性疾患の診断、倫理的基盤の確立（小児遺伝学会や全国遺伝子医療部門連絡会議との連携による「遺伝学的検査の実施」と「試料の保存および研究使用について」の同意書・説明書案の作成ならびに新ガイドライン「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」に記載する内容の提唱）、遺伝カウンセリング体制の実態調査のまとめ、遺伝子診断の臨床提供における経済的基盤整備の研究（NPO法人オーファンネットジャパンとかずさ研究所との協力的体制の確立と遺伝子診断コストの低下）、遺伝医学系統講義の教育ツールの作成とe-learningシステムの構築（遺伝医学講義全18項目のDVD作成と全国遺伝子医療部門連絡会議ホームページからの視聴）を行った。これらの成果は、本邦における臨床的遺伝子診断の推進に大きく貢献すると期待される。

研究分担者

大喜多肇	国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部、機能分化研究室 室長
福嶋義光	信州大学医学部、遺伝医学・予防医学講座、遺伝医学 教授
斎藤加代子	京女子医科大学・遺伝子医療センター、遺伝医学 教授、所長
松原洋一	東北大学医学部、遺伝病学分野、臨床分子遺伝学 教授
深見真紀	国立成育医療研究センター研究所、分子内分泌研究部 部長

A. 研究目的

本研究の目的は、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断の継続的实施を可能とする基盤を整備することである。本邦における遺伝子解析研究は、新規あるいは同定直後の既知遺伝子を対象とし、患者検体は通常研究者の個人的ネットワークを介して集積されている。一方、臨床応用としての遺伝子診断は、その情報が公開され一般医師に広く認知されることで需要が高まるが、この段階では研究メリットに乏しく、遺伝子診断の継続が困難となっている。本研究の必要性は、この乖離を埋めることにある。

B. 研究方法

本研究の遂行にあたっては本研究で実施した遺伝子検査については、10学会が2003年に制定した「遺伝学的検査に関するガイドライン」およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関

する倫理指針（平成17年6月文部科学省厚生労働省経済産業省告示第1号）に従っている。また、解析センターおよび各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得た後、書面によるインフォームド・コンセントを取得している。

C. 研究結果

遺伝子診断体制の拡充

代表的インプリンティング疾患の遺伝子診断のフローチャート作成

**Prader-Willi症候群 (PWS) :** 117例の患者を解析し、全例で異常が同定された。その結果、PWSでは、まず、メチル化解析により、父由来非メチル化DMR（メチル化可変領域）が存在しないことを確認することが必須であるが、その後は、発症頻度から、多くの患者に共通する欠失解析、マイクロサテライト解析によるダイソミー解析、インプリンティングセンターのみの微細欠失解析やエピ変異の有無の検討へと進むことが効率的と考えられた。

**第14染色体父性ダイソミー症候群(upd(14)pat syndrome [UPD14PATS])**：26例の患者を解析し、全例で異常が同定された。UPD14PATSでは、まず、PWS同様、メチル化解析により、母由来非メチル化DMR (IG-DMRおよびMEG3-DMR) が存在しないことを確認することが必須であった。そして、その後は、IG-DMRおよびMEG3-DMRを標的とする欠失解析を行い、異常がない場合に、マイクロサテライト解析によるダイソミー解析やエピ変異の有無の検討へと進むことが効率的と考えられた。アレイCGH解析

**POR 異常症**：サンガー法で遺伝子内変異が同定されなかったPOR 異常症患者3例を対象として、POR 遺伝子を包含する領域のカスタムCGHアレイを作成し、コピー数解析を行った。その結果、全例において微小欠失が同定された。症例1では非翻訳エクソン1を包含する2,487 bpの領域、症例2と3ではエクソン1および翻訳領域であるエクソン2を包含する49,604 bpの領域がヘテロ接合性に欠失していた。症例1の欠失範囲の解析により、エクソン1周辺の異種間相同配列が、高い転写活性化能を有することが見出された。

**SHOX異常症**：翻訳領域塩基配列決定およびMLPAで異常が同定されなかった4家系について、SHOX遺伝子周辺のアレイ解析を行った。その結果、1家系でSHOX遺伝子から300 kb以上離れた領域の微小欠失が同定された。これは、従来知られているエンハンサー領域と重複していなかった。

**アロマターゼ過剰症**：エストロゲン過剰症状を呈するが、エストロゲン産生酵素遺伝子(CYP19A1)に変異を有さない男性患者6家系を対象として、アレイCGHを行った。その結果、全例において翻訳領域外のゲノム微細構造異常が同定された。家系AとBでは、CYP19A1プロモーター領域を包含するタンDEM重複が、家系Cでは隣接遺伝子GLDNとDMXL2の一部を包含する微小欠失が、家系D-FではDMXL2の一部のみを包含する微小欠失が同定された。重複陽性例では機能性プロモーターの数の増加、欠失陽性例では広範囲発現遺伝子DMXL2のプロモーターとCYP19A1との結合がCYP19A1過剰発現を招いたと推測される。

**次世代シーケンサー解析**

性分化疾患を対象として、ターゲットエンリッチメントおよびアンプリコンシーケンシスによるターゲットリシーケンシスについて検討した。その結果、ターゲットリシーケンシスを用いることにより、多数

の検体を対象とした比較的少数の遺伝子解析が迅速かつ低コストで可能になることが明らかとなった。一方、10以上の遺伝子の解析には、ターゲットエンリッチメントが有効であることが見出された。現在、性分化疾患関連114遺伝子、ゴナドトロピン関連49遺伝子、成長障害関連39遺伝子のターゲットエンリッチメントおよびアンプリコンシーケンシスによるターゲットリシーケンシス解析を開始した。

**パラフィン切片を用いた腫瘍性疾患の遺伝子診断**

昨年度に引き続き検討した。腫瘍性疾患では、しばしばパラフィン包埋組織のみしか得られない場合がある、したがって、このような試料からも正確な遺伝子診断を可能とすることは極めて重要である。

Ewing肉腫のホルマリン固定パラフィン包埋切片17例(10μm厚1枚～3枚)よりHigh Pure FFPE RNA micro kitを用いてRNAを抽出したところ、300ng～5μg程度のRNAが抽出可能であった。まず～500ngのRNAとrandom primerを用いTranscriptor First Strand cDNA synthesis kitを用いてcDNAを合成した。コントロールとしてβアクチンに特異的なプライマーを用いてPCRを行ったところ17例全例で35サイクルのPCRで増幅を得た。

さらに、遺伝子解析施設機能拡充の一環として、より稀な腫瘍特異的融合遺伝子解析系を検討した。Ewing肉腫類似の小円形細胞肉腫におけるCIC-DUX4、間葉性軟骨肉腫におけるEWS-NR4A3、TAF15-NR4A3、低悪性度線維粘液性肉腫FUS-CREB3L2、脂肪芽腫のPLAG3関連融合遺伝子、Ewing肉腫のFUS-ERG、FUS-FEV、横紋筋肉腫におけるPAX3-AFX、PAX3-NCOA1、PAX3-NCOA2をRT-PCR法によって解析する系を立ち上げた。

#### 倫理的基盤の確立

臨床的遺伝子診断のための同意文書の作成と臨床的遺伝子診断と遺伝子解析研究との連携についての検討：現在、わが国では、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断のために行われる遺伝学的検査の多くが、研究の一環として行われている。遺伝学的検査が有用であると考えた主治医が、その疾患の遺伝子解析を行っている国内の施設に検査を依頼する際に用いられることを想定し、本研究班において、「遺伝学的検査の実施」と「試料の保存および研究使用」についての同意書・説明書(案)を作成し、全国遺伝子医療

部門連絡会議、日本小児遺伝学会等を通じて、必要な場合には利用できるように広報した。

「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」の作成と普及：2011年2月に公表された「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」には、昨年度、本研究班で提案した以下の内容がすべて記載された。HP上での公表および英文化について協力した。その概要は以下の通りである。

- ・ 遺伝学的検査・診断に関与する医師・医療者は、遺伝医学の系統的知識をもち、遺伝情報の特性に配慮した対応が求められる。
- ・ 遺伝学的検査・診断が行われる場面を 1)すでに発症している患者の診断を目的とする場合と 2)患者ではない者を対象とした保因者診断・発症前診断・出生前診断を目的とする場合とに明確に分類した。1)の場合には、主治医が診療の流れの中で、臨床的有用性がある場合には、積極的に遺伝学的検査・診断の意義を説明し、患者からインフォームドコンセントを得た上で実施すべきである。一方、2)の場合には、事前に適切な遺伝カウンセリングを行い、遺伝的問題の解決のための選択肢の一つとして実施する。
- ・ 薬理遺伝学検査は生殖細胞系列の遺伝情報ではあるが、診療には必須の情報でもあるので、通常の診療情報と同様に扱う。
- ・ 多因子疾患を対象とした易罹患性診断については、分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性などの科学的根拠を明確にした上で実施する。
- ・ 患者の診断を目的として行われた遺伝学的検査の結果は、原則として、他の臨床検査の結果と同様に、患者の診療に関係する医療者が共有する情報として診療録に記載する。
- ・ 遺伝カウンセリングは、情報提供だけでなく、患者・被検者等の自律的選択が可能となるような心理的社会的支援が重要であることから、当該疾患の診療経験が豊富な医師と遺伝カウンセリングに習熟した者が協力し、チーム医療として実施する。

#### 遺伝カウンセリング体制の整備

全国から500名の小児先天性疾患・難治性疾患の診療に当たる医師を抽出して、遺伝カウンセリングに関するアンケートによる実態調査を実施し、40%の回収率で回答を得て分析した。調査結果を詳細に検討し、現状での問題点を抽出した。本アンケート調査は500通投函し、201通を回収、1通は白紙にて200通が有効であり、回収率40%であった。遺伝学的検査は87%で実施されてい

たが、遺伝カウンセリングを実施しているのは49%にとどまり、47%では実施されていなかった。被検者が未成年の場合に、本人にも何らかの説明をすると回答したのは27%、理解度に応じた説明と同意を得ると回答したのは36%(年齢条件あり13%、年齢条件なし23%)であったが、11%は本人には説明をせず両親またはその他の親権者や未成年後見人からのみ同意を得ると回答していた。被検者の年齢については、口頭で同意を得る年齢の下限は5歳から18歳(中央値12歳)、書面で同意を得る年齢の下限は6歳から20歳(中央値15歳)であった。代諾を得る際には、両親または親権者あるいは未成年後見人から同意を得ているのは63%で、片親のみの同意としている場合が18%、親権者ではない親戚から同意を得ている場合も1%あった。同意を取得する方法は、書面で確認するが66%、口頭で確認するが18%であった。遺伝学的検査の結果を説明する相手は、母親のみが8%、両親揃ってまたは親権者あるいは未成年後見人が55%で、本人は3%であった。

#### 経済的基盤の整備

遺伝子検査を希望する医療機関、遺伝子解析実施施設、そして遺伝子解析結果を判定する専門家の3者の間に介在してコーディネートを行うオーファンネットジャパンが中心的機能を担う体制を確立した。特に遺伝子解析施設として、かずさDNA研究所が関わったことが特筆される。

遺伝子検査のフロー：オーファンネットジャパンが医療機関より遺伝子検査の依頼を受けた際には、検査会社であるエスアールエル社に委託して、検体集荷、DNA抽出、検体搬送をおこなう。オーファンネットジャパンが検査を受理した段階でその検体に対してONJ番号が発行され、病院からエスアールエル社に血液検体が渡される時点ではすでに匿名化されている。

抽出されたDNAが大学研究室に送られた場合は、当該研究室内で遺伝子解析と結果判定を行い、遺伝子検査結果報告書を作成する。この報告書はオーファンネット事務局に送付され、さらに本分担研究者である松原によって最終的な校正が行われる。

かずさDNA研究所に移送されて解析される場合には、同研究所のオーファンネット解析チームによって当該遺伝子のシーケンス解析が行われる。解析が終了した段階で、そのデータを当該疾患の専門家がインターネッ

トを通じて閲覧することができる。機密保持のため、ログインIDとパスワードはその都度専門家に通知される。各疾患の専門家は、この結果と既知変異データベース（その多くは未公開で個人的に収集されたもの）を比較することによって、遺伝子検査結果報告書を作成する。この報告書はオーファンネット事務局に送付され、さらに本分担研究者である松原によって最終的な校正が行われる。

国内で検査が提供されていないものについては、ベルギーの遺伝子検査会社であるGENDIAに有料で委託して解析を行うことになっている。

**検査費用：**検査費用については、医療機関から実費をオーファンネットジャパンが徴収し、大学研究室、遺伝子解析コア施設、検査会社に支払う形をとっている。

**オーファンネットジャパンにおける遺伝子検査受入状況（2011年1月～12月）：**2011年3月11日に発生した東日本大震災が、オーファンネットジャパン事務局のある仙台市を直撃したため、数か月間の活動休止を余儀なくされた。総検体数は34件であった。

**新しい検査項目の追加：**本年度は、眼科疾患の遺伝子検査として以下の検査項目について登録を希望する研究室があった。現在、検査提供を開始するための準備中である。

#### e-learningシステム樹立と公開

日本人類遺伝学会および全国遺伝子医療部門連絡会議の協力を得て一遺伝医学系統講義DVDを作成し、HP上で視聴できるe-learningシステムを構築した。その内容は以下の通りである。

1. 遺伝医学の過去・現在・未来、鎌谷直之；
2. 遺伝医学総論、福嶋義光；
3. ヒトゲノム・遺伝子の構造と機能、松本直通；
4. 染色体異常症と細胞遺伝学、玉置知子；
5. 単一遺伝子疾患とメンデル遺伝学、小杉眞司；
6. 多因子疾患の遺伝学、羽田明；
7. 個別化遺伝医療と薬理遺伝学、鎌谷直之；
8. エピジェネティクス、久保田健夫；
9. 生化学遺伝学、松原洋一；
10. 集団遺伝学、徳永勝士；
11. 遺伝性疾患の分子遺伝学的理解、高田史男；
12. 遺伝学的検査、野村文夫；
13. ミトコンドリア遺伝、後藤雄一；
14. 発生遺伝学と先天異常、小崎健次郎；
15. 出生前診断、平原史樹；
16. 腫瘍遺伝学、稲澤譲治；
17. 遺伝性疾患の治療、櫻井晃洋；
18. 遺伝カウンセリング、斎藤加代子。現在までに数百名の受講があった。

#### 研究班ホームページの設置

上記のような様々な情報を研究班から発信するために、ホームページを設置した

(<http://www.nch.go.jp/endocrinology/gene/>)。

#### D. 考察

##### 遺伝子診断体制の拡充

**インプリンティング疾患：**本研究により、代表的なインプリンティング疾患の効率的遺伝子診断アプローチが判明した。これは、今後、インプリンティング疾患の解析に大きく貢献すると期待される。なお、今回のPWSとSRSのデータは、海外のそれと概ね一致する一方、UPD14PATSのデータは、現在まで世界で報告されている患者の約80%をわれわれが同定していることから、本邦のみならず世界的に有用なものと期待される。

**アレイCGH解析：**本研究のデータは、まだ解析途中であるが、欠失解析の重要性、さらに、一般的に解析されているエクソンだけではなく遺伝子発現調節の欠失解析の重要性を示唆する。を解析することの重要性を示唆する。

**次世代シーケンサー解析：**この応用により、多くの新規遺伝子が同定されるようになっていく。この解析方法は、現在、研究に位置づけられ、臨床的遺伝子診断の視野には入らない。しかし、将来的には、普遍的な解析手法となることが予想され、それに備えた拠点施設の整備と共に、倫理的配慮や遺伝カウンセリングの体制整備が必要になると思われる。パラフィン切片を用いた腫瘍性疾患の遺伝子診断：パラフィン包埋組織からのRT-PCRによる遺伝子診断がなされたことは、現実的に入手可能な検体を用いた診断方法の確立に繋がるものである。今後、新鮮検体が入手できなかった症例においても、遺伝子診断が進展することが期待される。

##### 倫理的基盤の確立

小児先天性疾患および難治性疾患の遺伝子解析研究を行っている施設に、確定診断を必要としている患者の主治医が遺伝学的検査を依頼する際に用いることのできる同意文書・説明文書（案）を作成した。現在、わが国では、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断のために行われる遺伝学的検査の多くが、研究の一環として行われていることを考慮し、「遺伝学的検査の実施」についてだけでなく、研究推進のための「試料の保存および研究使用」についての同意書・説明書

の試案も作成した。これらの文書(案)について、昨年度、全国遺伝子医療部門連絡会議に所属する臨床遺伝専門医などの有識者から意見聴取を行ったところ、全く異論はなく、適切なものと判断されたので、今年度は、研究班HPに掲載するなど公表に努め、広く利用を促した。主治医と遺伝子解析担当者との交流が円滑に進み、多くの患者・家族に有用な情報を提供することができるようになるとともに、研究推進に役立つことを期待している。

2003年に公表された遺伝医学関連10学会「遺伝学的検査に関するガイドライン」(10学会指針)の問題点を解決し、広く一般の診療において、遺伝学的検査が有効に利用されるようにするために、2011年2月に、「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」が公表された。このガイドラインには昨年度、本研究班で指摘した記載すべき内容がすべて取り上げられている。遺伝学的検査が行われる疾患(群)、領域、診療科は多様であり、それぞれに固有の留意点が存在するが、さまざまな領域における遺伝学的検査においても遵守すべき基本的事項・原則としてこのガイドラインが広く利用されることを願っている。

#### 遺伝カウンセリング体制の整備

小児先天性疾患・難治性疾患の診療に当たる医師を抽出し、遺伝カウンセリングに関するアンケートによる実態調査を実施し、40%の回収率で回答を得て分析した。被検者が未成年の場合、本人に対する説明と同意が得られていない場合があり、何歳からどのような形で本人の同意を得るかについては、施設毎の判断に委ねられている現状が判明した。また一部の施設では、両親から書面でインフォームドコンセントを取得していない状況であった。遺伝学的検査が日常診療の中で広がっている現状から、未成年者における遺伝学的検査の実施の際には遺伝カウンセリングを実施し、両親からのインフォームドコンセントおよび本人からのインフォームドアセントを合わせて取得する体制を整えることが重要であると考えられた。

#### 経済的基盤の整備

オーファンネットジャパンが中心となって遺伝子検査を行うシステムは、2011年3月11日の東日本大震災による中断があったものの、順調に運営が再開され遺伝子検査を提供することができた。大規模ゲノム解析施設として知られる「かずさDNA研究所」をパートナー

とした、新たな遺伝子診断提供体制も順調に運用することができた。費用的には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー全エクソンのシーケンスを10万5千円という世界で最も安価な価格で提供できていることは、昨今の驚異的な円高を考えると特筆すべきであろう。研究から臨床サービスへの移行が進みつつあるなか、本年度は眼科疾患遺伝子検査10項目について検査登録申し込みがあった。この他にも、黄疸関連の遺伝性疾患や、てんかん関連の遺伝子診断についても登録依頼があり現在協議中である。今後、検査項目を順次追加していくことによって稀少遺伝性疾患の遺伝子検査体制を充実していくことが可能と考えられる。

#### e-learningシステム樹立と公開

遺伝情報を適切に扱うためには、遺伝医学(病気に関係する遺伝継承と多様性の科学)を系統的に学ぶ必要があるが、わが国の医学教育において、遺伝医学を系統的に教育している大学は極めて少ないのが現状である。今回作成した遺伝医学系統講義e-learningシステムは、インターネットを介して、登録した者はだれでもどこでも学習を進めることができるので、遺伝子診断の倫理基盤の確立だけでなく、今後、わが国の遺伝医療の発展の基礎となるものと確信している。

#### E. 結論

当該年度においては、明確な遺伝子診断アプローチが定まっていなかったインプリンティング疾患の解析手法の確立、アレイCGHや次世代シーケンサーなどの全ゲノム解析手法の遺伝子診断への応用、パラフィンブロックを用いた腫瘍性疾患の診断、倫理的基盤の確立(小児遺伝学会や全国遺伝子医療部門連絡会議との連携による「遺伝学的検査の実施」と「試料の保存および研究使用について」の同意書・説明書案の作成ならびに新ガイドライン「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」に記載する内容の提唱)、遺伝カウンセリング体制の実態調査のまとめ、遺伝子診断の臨床提供における経済的基盤整備の研究(NPO法人オーファンネットジャパンとかずさ研究所との協力体制の確立と遺伝子診断コストの低下)、遺伝医学系統講義の教育ツールの作成とe-learningシステムの構築(遺伝医学講義全18項目のDVD作成と全国遺伝子医療部門連絡会議ホームページからの視聴)を行った。これらの成果は、本邦にお



ける臨床的遺伝子診断の推進に大きく貢献すると期待される。

F. 健康危険情報  
該当なし

#### G. 研究発表

1. Inoue H\*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K: Identification and functional analysis of novel human growth hormone-releasing hormone receptor (*GHRHR*) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *Clin Endocrinol* 74 (2): 223–233, 2011 (IF = 3.201)
2. Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Matsubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T\*: Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes. *J Hum Genet* 56 (1): 91–93, 2011. (IF = 2.547)
3. Inoue H\*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K: Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (*GHSR*) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (2): E373–378, 2011. (IF = 6.202)
4. Fukami M, Muroya K, Miyake T, Iso M, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, Ogata T\*: *GATA3* abnormalities in six patients with HDR syndrome. *Endocr J* 58 (2): 117–121, 2011.
5. Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, Ogata T\*: Identification of chromosome 15q terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis. *Endocr J* 58 (3): 155–159, 2011
6. Brandão MP, Costa EM, Fukami M, Gerdulo M, Pereira NP, Domenice S, Ogata T, Mendonca BB. MAMLD1 (Mastermind-Like Domain Containing 1) Homozygous Gain-of-Function Missense Mutation Causing 46,XX Disorder of Sex Development in a Virilized Female. *Adv Exp Med Biol* 707 (10):129–31, 2011.
7. Miyazaki O\*, Nishimura G, Kagami M, Ogata T: Radiological evaluation of dysmorphic thorax in paternal uniparental disomy for chromosome 14. *Ped Radiol* 41 (8): 1013–1019, 2011.
8. Fukami, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T\*: Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of *CYP19A1* and assessment of phenotypic determinants. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (6): E1035–1043, 2011.
9. Ogata T\*, Matsubara K: Steroid 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency and fertility. *Fertil Steril* 95 (7): e46.
10. Nakamura M, Fukami M, Sugawa F, Miyado M, Nonomura K, Ogata T\*: *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS ONE* 6 (4): e19123, 2011.
11. Matsubara K, Murakami N, Nagai T, Ogata T\*: Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis I errors. *J Hum Genet* 56 (8): 566–71, 2011.
12. Nakabayashi K\*, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, David Monk D: Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human specific imprinted genes. *Hum Mol Genet* 20 (16): 3188–97, 2011.
13. Inoue H, Sakamoto Y, Kangawa N, Kimura C, Ogata T, Fujieda K, Qian, ZR, Sano T, Itakura M. Analysis of expression and structure of the rat GH secretagogue/ghrelin receptor (*Ghsr*) gene: roles of epigenetic modifications in transcriptional regulation. *Mol Cell Endocrinol* 345: 1–15, 2011.
14. Soneda S, Yazawa T, Fukami M\*, Adachi M, Mizota M, Fujieda K, Miyamoto K, Ogata T: Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding site. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (11): E1881–1887, 2011.
15. Ishizuka B, Okamoto N, Hamada N, Sugishita Y, Saito J, Takahashi N, Ogata T, Itoh MT. Number of CGG repeats in the *FMR1* gene of Japanese patients with primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril* 96 (5): 1170–1174, 2011.
16. Ayabe T, Ishizuka B, Maruyama T, Uchida H, Yoshimura Y, Yoshida R, Fukami M, Nagai T, Ogata T\*: Association of primary ovarian insufficiency with a specific HLA

- haplotype (A\*24:02-C\*03:03-B\*35:01) in Japanese patients. *Sex Dev* 5 (5): 235–240, 2011.
17. Kalfa N, Cassorla F, Audran F, Abdennabi OI, Philibert P, Bérout C, Guys JM, Reynaud R, Alessandrini P, Wagner K, Bréaud J, Valla JS, Morisson Lacombe G, Daures JP, Baskin L, Fukami M, Ogata T, Sultan C: Polymorphisms of MAMLD1 gene in hypospadias. *J Pediatr Urol* 7 (6): 585–591, 2011.
  18. Ogata T\*, Matsubara K, Nagata E, Sano S, Murakami N, Nagai T: Advanced maternal age and the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through non-disjunction at meiosis I. *J Mamm Ova Res* 28 (3): 96–102, 2011.
  19. Inoue H, Mukai T, Sakamoto Y, Kimura C, Kangawa N, Itakura M, Ogata T, Ito Y, Fujieda K: Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 76 (1): 78–87, 2012.
  20. Sugihara S\*, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahara Y, Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Y, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, Amemiya S, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT): Genetic characteristics on HLA-class II and class I among Japanese type 1A and type 1B diabetic children and their families. *Pediatr Diabetes* (in press).
  21. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T\*: Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* (accepted).
  22. Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsubara K, Matsuoka K, Hasegawa T, Dobashi K, Ogata T\*: Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome: correlation between phenotype and mosaic ratio in the body and the placenta. *Am J Med Genet A* (accepted).
  23. Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, Samuels ME, Ogata T, Deal CL\*: 46, XY gonadal dysgenesis: new SRY point mutation in two siblings with paternal germ line mosaicism. *Clin Genet* (in press).
  24. Abe Y, Aoki Y\*, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y: Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan. *Am J Med Genet A* (accepted).
  25. Kalfa N, Cassorla F, Abdennabi IO, Audran F, Philibert P, Daures JP, Baskin L, Fukami M, Ogata T, Sultan C\*: Exonic polymorphisms of MAMLD1 (CXorf6) are associated with hypospadias. *J Urol* (accepted).
  26. Koyama Y\*, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Hasegawa T, Murata M: Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using Urinary Pregnenetriolone / Tetrahydrocortisone Ratio and 11 $\beta$ -hydroxyandrosterone by Gas chromatography - mass spectrometry. *Clin Chem* (accepted).
  27. Sekii K\*, Ishikawa T, Ogata T, Itoh H, Iwashima S: Association between fetal myocardial tissue Doppler indices before birth and gestational age-specific birth weight in low-risk term pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* (accepted).
  28. Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill G, Pinto C, Manouvrier S, Polak M, Ogata T, C Sultan C\*: Screening of MAMLD1 mutations in 70 children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of 2 new mutations. *PLoS ONE* (accepted).
  29. Fukami M\*, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T: Complex genomic rearrangements in the SOX9 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula. *Am J Med Genet A* (accepted).
  30. Qin X-Y, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H\*: AHR, ARNT2, CYP1A2, CYP17A1 and NR1I2 gene polymorphisms as risk factors for male genital malformations. *J Hum Genet* (accepted).
  31. Ogata T\*, Fukami M, Yoshida R, Nagata E, Fujisawa Y, Yoshida A, Yoshimura Y:

- Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure: Implications for genetic susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors. *Int J Androl* (accepted).
32. Fukami M\*, Shozu M, Ogata T: Molecular bases and phenotypic determinants of aromatase excess syndrome. *Int J Endocrinol* (accepted).
  33. Ogata T\*, Sano S, Nagata E, kato F, Fumaki M: *MAMLD1* and 46,XY disorders of sex development. *Seminars in Reproductive Medicine* (accepted).
  34. Takahashi Y, Hosoki K, Matsushita M, Funatsuka M, Saito K, Kanazawa H, Goto Y, Saitoh S. A Loss-of-Function Mutation in the *SLC9A6* Gene Causes X-Linked Mental Retardation Resembling Angelman Syndrome. *American journal of medical genetics* 2011; Part B 156(7): 799-807.
  35. Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in *SLC25A13*. *Mol Genet Metab*. 2012 Jan 8. [Epub ahead of print]
  36. Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 30. [Epub ahead of print]
  37. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of *RNF213* predicts early-onset and severe form of Moyamoya disease. *Neurology* (in press)
  38. Auerbach AD, Burn J, Cassiman JJ, Claustres M, Cotton RG, Cutting G, den Dunnen JT, El-Ruby M, Vargas AF, Greenblatt MS, Macrae F, Matsubara Y, Rimoin DL, Vihinen M, Van Broeckhoven C. Mutation (variation) databases and registries: a rationale for coordination of efforts. *Nature Rev Genet*. 12(12):881, 2011.
  39. Wakabayashi Y, Yamazaki K, Narumi Y, Fuseya S, Horigome M, Wakui K, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T. Implantable cardioverter defibrillator for progressive hypertrophic cardiomyopathy in a patient with LEOPARD syndrome and a novel *PTPN11* mutation Gln510His. *Am J Med Genet A*. 155A(10):2529-33, 2011
  40. Adachi M, Abe Y, Aoki Y, Matsubara Y. Epilepsy in RAS/MAPK syndrome: Two cases of cardio-facio-cutaneous syndrome with epileptic encephalopathy and a literature review. *Seizure*. 2011 [Epub ahead of print]
  41. Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Niihori S, Okano E, Numabe H, Matsubara Y. *HRAS* mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome. *J Hum Genet*. 56(10):707-15, 2011
  42. Tamaki Y, Arai T, Sugimura H, Sasaki T, Honda M, Muroi Y, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Association between Cancer Risk and Drug-metabolizing Enzyme Gene (*CYP2A6*, *CYP2A13*, *CYP4B1*, *SULT1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1*) Polymorphisms in Cases of Lung Cancer in Japan. *Drug Metab Pharmacokinet*. 26(5):516-22, 2011
  43. Honda M, Muroi Y, Tamaki Y, Saigusa D, Suzuki N, Tomioka Y, Matsubara Y, Oda A, Hirasawa N, Hiratsuka M. Functional characterization of *CYP2B6* allelic variants in demethylation of antimalarial artemether. *Drug Metab Dispos*. 39(10):1860-5, 2011
  44. Tamaki Y, Honda M, Muroi Y, Arai T, Sugimura H, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Novel Single Nucleotide Polymorphism of the *CYP2A13* Gene in Japanese Individuals. *Drug Metab Pharmacokinet*. 26(5):544-7, 2011
  45. Ohashi H, Suzumori K, Chisaka Y, Sonta S, Kobayashi T, Aoki Y, Matsubara Y, Sone M, Shaffer LG. Implications of prenatal diagnosis of the fetus with both interstitial deletion and a small marker ring originating from chromosome 5. *Am J Med Genet A*. 155A(1):192-6, 2011
  46. Watanabe Y, Yano S, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Yoshino M, Matsuishi T. A

familial case of LEOPARD syndrome associated with a high-functioning autism spectrum disorder. *Brain Dev.* 33(7):576-9, 2011

47. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet.* 56(1):34-40, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

## II. 分担研究報告

## 先天性疾患の臨床的遺伝子診断と拠点施設の機能拡充

研究分担者 緒方 勤 浜松医科大学小児科

### 研究要旨

本研究の目的は、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断の継続的实施を可能とする基盤を整備することである。本年度では、国内外でわれわれのグループが最先端の研究を実施している代表的インプリンティング疾患の効率的診断法、および、近年急速に臨床応用が普及してきたアレイCGHおよび次世代シーケンサー解析（研究分担者の深見と共同）について研究を行った。その結果、代表的インプリンティング疾患の遺伝的診断アプローチが確立すると共に、アレイCGHや次世代シーケンサー解析（特にアレイCGH解析）の重要性およびその臨床診断への応用に向けた展開が明らかとなってきた。

### 共同研究者

永田絵子（浜松医科大学小児科）  
加藤美美子（浜松医科大学小児科）  
山口理恵（浜松医科大学小児科）  
鏡雅代（国立成育医療研究センター）  
松原圭子（国立成育医療研究センター）  
佐藤智子（国立成育医療研究センター）

### A. 研究目的

本研究の目的は、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断の継続的实施を可能とする基盤を整備することである。このために、研究分担者として、遺伝子診断法の整備と拠点機能の拡充を目的としている。そして、遺伝子診断法の整備に重点を置き、既に多数の遺伝子診断のための解析ツールを作成した。

本年度は、国内外でわれわれのグループが最先端の研究を実施している代表的インプリンティング疾患の効率的診断法、および、近年急速に臨床応用が普及してきたアレイCGHおよび次世代シーケンサー解析（研究分担者の深見と共同）について研究を行った。

### B. 研究方法

#### インプリンティング疾患

本研究では、下記全ての患者を解析し、効率的診断法の確率を行った。各疾患の概要は以下の通りである。

**Prader-Willi症候群 (PWS)：**日本人PWS患者117例を対象として遺伝子診断を行った。PWSは、特徴的顔貌、高度肥満、精神発達地帯、性腺機能不全などを伴う疾患である。第15染

色体長腕近位部に存在するインプリンティング領域の父性発現遺伝子の発現低下／消失により発症し、その原因は、父由来インプリンティング領域の欠失、母性ダイソミー、その他（エピ変異やインプリンティングセンターのみの微細欠失など）に大別される。

**第14染色体父性ダイソミー症候群(upd(14)pat syndrome [UPD14PATS]：**日本人UPD14PATS患者26例対象として遺伝子診断を行った。UPD14PATSは、特徴的顔貌、胸郭形成不全、腹壁異常、巨大胎盤、羊水過多などを伴う疾患である。第14染色体長腕近位部に存在するインプリンティング領域の父性発現遺伝子の発現過剰により発症し、その原因は、母由来インプリンティング領域の欠失、父性ダイソミー、その他（エピ変異やインプリンティングセンターのみの微細欠失など）に大別される。

**Silver-Russell症候群(SRS)：**日本人SRS患者120例を対象として遺伝子診断を行った。SRSは、胎児期および生後の成長障害、相対的頭圍拡大、骨格非対称などを伴う疾患である。第11染色体上のH19-DMRのエピ変異と第7染色体母性ダイソミーが発症原因として知られている。

#### アレイCGH解析

既に集積済みの様々な性分化疾患患者約100例を対象として、カスタムプローブを用いた全ゲノムアレイCGH解析と、特定部位を集中的に解析する高密度アレイCGH解析を開始した。特定部位としては、研究分担者深見が報告したSHOX, POR, CYP19A1遺伝子周辺の他

に、われわれは、NR5A1, SOX9, GSD3, AKR1C2/4周辺など多数の領域の解析を行っている。

### 次世代シーケンサー解析

性分化疾患を対象として、研究分担者深見と共に、性分化疾患関連114遺伝子、ゴナドトロピン関連49遺伝子、成長障害関連39遺伝子のターゲットエンリッチメントおよびアンプリコンシーケンスによるターゲットリシーケンスを開始した(図1)。

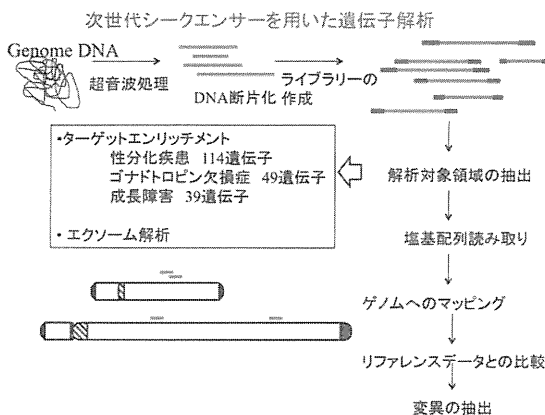


図1. 次世代シーケンサー解析の流れ。

### (倫理面への配慮)

本研究で実施した遺伝子検査については、10学会が制定した「遺伝学的検査に関するガイドライン」およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成17年6月文部科学省厚生労働省経済産業省告示第1号)に従っている。特に、アレイCGや次世代シーケンサー解析では、浜松医科大学および国立成育医療研究センターの倫理委員会の承認を得た後に実施していることを付記する。

## C. 研究結果

### インプリンティング疾患

**PWS**: 117例の患者全例で異常が同定され、その内訳は図2に示す通りである。PWSでは、まず、メチル化解析により、父由来非メチル化DMR(メチル化可変領域)が存在しないことを確認することが必須であるが、その後は、発症頻度から、多くの患者に共通する欠失解析、マイクロサテライト解析によるダイソミー解析、インプリンティングセンターのみの微小欠失解析やエピ変異の有無の検討へと進むことが効率的と考えられた。

**UPD14PATS**: 26患者全例で異常が同定され、その内訳は図3に示す通りである。

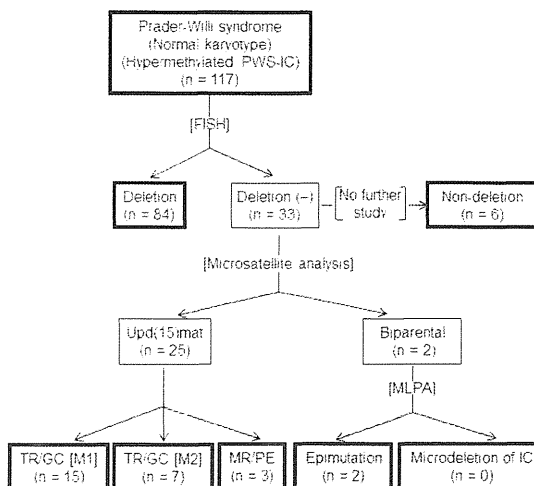


図2. Prader-Willi症候群患者の発症原因。

UPD14PATSでは、まず、PWS同様、メチル化解析により、母由来非メチル化DMR(IG-DMRおよびMEG3-DMR)が存在しないことを確認することが必須であった。そして、その後は、IG-DMRおよびMEG3-DMRを標的とする欠失解析を行い、異常がない場合に、マイクロサテライト解析によるダイソミー解析やエピ変異の有無の検討へと進むことが効率的と考えられた。

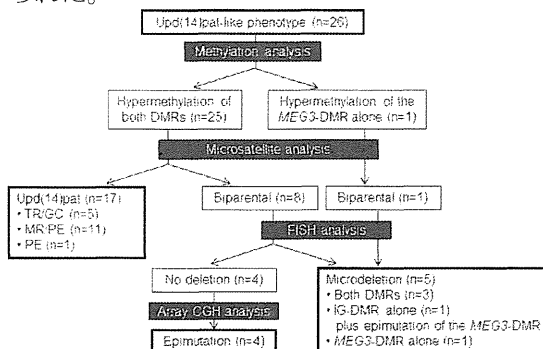


図3. Upd(14)pat症候群患者の発症原因。

**SRS**: 120例のうち、H19-DMRのエピ変異(父由来DMRの低メチル化)が36例で、第7染色体母性ダイソミーが8例で同定された。さらに、世界で2例めとなる全染色体母性ダイソミーモザイク・キメラが1例で同定され、また、因果関係は不明であるが、第17染色体長腕微小欠失が1例で同定された。

### アレイCGH解析

現在までに、46,XY性腺異形成患者において、SOX9上流の約50 kb領域の微小欠失が同定された。これは、世界で初めてのデータであり、





- mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (2): E373–378, 2011. (IF = 6.202)
4. Fukami M, Muroya K, Miyake T, Iso M, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, Ogata T\*: *GATA3* abnormalities in six patients with HDR syndrome. *Endocr J* 58 (2): 117–121, 2011.
  5. Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, Ogata T\*: Identification of chromosome 15q terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis. *Endocr J* 58 (3): 155–159, 2011
  6. Brandão MP, Costa EM, Fukami M, Gerdulo M, Pereira NP, Domenice S, Ogata T, Mendonca BB. MAMLD1 (Mastermind-Like Domain Containing 1) Homozygous Gain-of-Function Missense Mutation Causing 46,XX Disorder of Sex Development in a Virilized Female. *Adv Exp Med Biol* 707 (10):129–31, 2011.
  7. Miyazaki O\*, Nishimura G, Kagami M, Ogata T: Radiological evaluation of dysmorphic thorax in paternal uniparental disomy for chromosome 14. *Ped Radiol* 41 (8): 1013–1019, 2011.
  8. Fukami, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T\*: Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of *CYP19A1* and assessment of phenotypic determinants. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (6): E1035–1043, 2011.
  9. Ogata T\*, Matsubara K: Steroid 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency and fertility. *Fertil Steril* 95 (7): e46.
  10. Nakamura M, Fukami M, Sugawa F, Miyado M, Nonomura K, Ogata T\*: *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS ONE* 6 (4): e19123, 2011.
  11. Matsubara K, Murakami N, Nagai T, Ogata T\*: Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis 1 errors. *J Hum Genet* 56 (8): 566–71, 2011.
  12. Nakabayashi K\*, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, David Monk D: Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human specific imprinted genes. *Hum Mol Genet* 20 (16): 3188–97, 2011.
  13. Inoue H, Sakamoto Y, Kangawa N, Kimura C, Ogata T, Fujieda K, Qian, ZR, Sano T, Itakura M. Analysis of expression and structure of the rat GH secretagogue/ghrelin receptor (*Ghsr*) gene: roles of epigenetic modifications in transcriptional regulation. *Mol Cell Endocrinol* 345: 1–15, 2011.
  14. Soneda S, Yazawa T, Fukami M\*, Adachi M, Mizota M, Fujieda K, Miyamoto K, Ogata T: Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding site. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (11): E1881–1887, 2011.
  15. Ishizuka B, Okamoto N, Hamada N, Sugishita Y, Saito J, Takahashi N, Ogata T, Itoh MT. Number of CGG repeats in the *FMR1* gene of Japanese patients with primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril* 96 (5): 1170–1174, 2011.
  16. Ayabe T, Ishizuka B, Maruyama T, Uchida H, Yoshimura Y, Yoshida R, Fukami M, Nagai T, Ogata T\*: Association of primary ovarian insufficiency with a specific HLA haplotype (A\*24:02-C\*03:03-B\*35:01) in Japanese patients. *Sex Dev* 5 (5): 235–240, 2011.
  17. Kalfa N, Cassorla F, Audran F, Abdennabi OI, Philibert P, Bérout C, Guys JM, Reynaud R, Alessandrini P, Wagner K, Bréaud J, Valla JS, Morisson Lacombe G, Daures JP, Baskin L, Fukami M, Ogata T, Sultan C: Polymorphisms of MAMLD1 gene in hypospadias. *J Pediatr Urol* 7 (6): 585–591, 2011.
  18. Ogata T\*, Matsubara K, Nagata E, Sano S, Murakami N, Nagai T: Advanced maternal age and the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through non-disjunction at meiosis 1. *J Mamm Ova Res* 28 (3): 96–102, 2011.

19. Inoue H, Mukai T, Sakamoto Y, Kimura C, Kangawa N, Itakura M, Ogata T, Ito Y, Fujieda K: Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 76 (1): 78–87, 2012.
20. Sugihara S\*, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahara Y, Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Y, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, Amemiya S, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT): Genetic characteristics on HLA-cass II and class I among Japanese type 1A and type 1B diabetic children and their families. *Pediatr Diabetes* (in press).
21. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T\*: Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* (accepted).
22. Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsubara K, Matsuoka K, Hasegawa T, Dobashi K, Ogata T\*: Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome: correlation between phenotype and mosaic ratio in the body and the placenta. *Am J Med Genet A* (accepted).
23. Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, Samuels ME, Ogata T, Deal CL\*: 46, XY gonadal dysgenesis: new *SRY* point mutation in two siblings with paternal germ line mosaicism. *Clin Genet* (in press).
24. Abe Y, Aoki Y\*, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y: Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan. *Am J Med Genet A* (accepted).
25. Kalfa N, Cassorla F, Abdennabi IO, Audran F, Philibert P, Daures JP, Baskin L, Fukami M, Ogata T, Sultan C\*: Exonic polymorphisms of *MAMLD1* (*CXorf6*) are associated with hypospadias. *J Urol* (accepted).
26. Koyama Y\*, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Hasegawa T, Murata M: Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using uUrinary Pregnanetriolone / Tetrahydrocortisone Ratio and 11 $\beta$ -hydroxyandrosterone by Gas chromatography - mass spectrometry. *Clin Chem* (accepted).
27. Sekii K\*, Ishikawa T, Ogata T, Itoh H, Iwashima S: Association between fetal myocardial tissue Doppler indices before birth and gestational age-specific birth weight in low-risk term pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* (accepted).
28. Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill G, Pinto C, Manouvrier S, Polak M, Ogata T, C Sultan C\*: Screening of MAMLD1 mutations in 70 children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of 2 new mutations. *PLoS ONE* (accepted).
29. Fukami M\*, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T: Complex genomic rearrangements in the *SOX9* 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula. *Am J Med Genet A* (accepted).
30. Qin X-Y, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H\*: AHR, ARNT2, CYP1A2, CYP17A1 and NR1I2 gene polymorphisms as risk factors for male genital malformations. *J Hum Genet* (accepted).
31. Ogata T\*, Fukami M, Yoshida R, Nagata E, Fujisawa Y, Yoshida A, Yoshimura Y: Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure: Implications for genetic susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors. *Int J Androl* (accepted).
32. Fukami M\*, Shozu M, Ogata T: Molecular bases and phenotypic

- determinants of aromatase excess syndrome. Int J Endocrinol (accepted).
33. Ogata T\*, Sano S, Nagata E, kato F, Fumaki M: *MAMLD1* and 46,XY disorders of sex development. Seminars in Reproductive Medicine (accepted).

## 2. 学会発表

省略

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 腫瘍性疾患の臨床的遺伝子診断

研究分担者 国立成育医療研究センター 小児血液・腫瘍研究部 室長 大喜多 肇

### 研究要旨

ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた RT-PCR 法による腫瘍診断について検討した。Ewing 肉腫に特異的な EWS-FLI1 の検出を試みたところ、ホルマリン固定パラフィン包埋組織からも遺伝子診断は可能であったが、十分な感度は得られず、FISH 法等の他の方法も合わせて検討する必要性が考えられた。また、小児領域でも稀な腫瘍において、融合遺伝子を検出する系を立ち上げた。

### 共同研究者

清河 信敬(国立成育医療研究センター小児血液・腫瘍研究部)

### A. 研究目的

本研究は、小児の難治性疾患である腫瘍性疾患の臨床的遺伝子診断の継続的实施を可能とする基盤を整備することを目標とする。腫瘍性疾患は、病理組織学的な診断によって確定診断されるが、しばしば、腫瘍に特異的な遺伝子異常が同定されており、組織学的診断に加えて遺伝子解析を行うことにより、より精度の高い診断が可能となると考えられる。特に特徴的形質の乏しい小円形細胞腫瘍や紡錘形細胞肉腫は、しばしば病理組織学的に鑑別診断が困難で、小児や肉腫を専門とする病理医であっても、確定診断することが困難なこともある。これらの腫瘍は頻度が低いために、検査会社で行われる検査項目はほとんどなく、個人的に研究者に検査を依頼することが一般的と考えられるが、既知の遺伝子診断を研究者の負担で行うことには限界がある。

研究分担者らは、固形腫瘍の遺伝子診断として、Ewing 肉腫ファミリー腫瘍、胞巣型横紋筋肉腫、滑膜肉腫、乳児線維肉腫、先天性間葉芽腎腫、線維形成性小細胞腫瘍、TFE3 転座を伴う腎細胞癌等に対する RT-PCR 法による融合遺伝子発現解析を行ってきた。また、研究分担者は、横紋筋肉腫、Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の多施設共同臨床研究グループの中で、横紋筋肉腫、Ewing 肉腫の遺伝子診断を担当している。これらは、臨床試験参加症例の診断のセントラル・レビューとしての遺伝

子解析であり、臨床試験参加症例に対しては、臨床試験の品質担保の一環として、既に質の高い遺伝子診断が行われている。一方で、治療研究グループに参加している施設であっても、臨床試験参加しない症例や、治療研究グループが存在しない希少な腫瘍症例が存在しており、これらの症例については、検査法自体は確立している場合でも、必ずしも実施体制は整っていない。本研究では、遺伝子診断機能の拡充を図るとともに、非登録症例や、希少な腫瘍症例の遺伝子中央診断を実施するための体制整備を行うことを目的とした。

本年度は遺伝子解析施設の機能拡充の一環としてホルマリン固定パラフィン包埋材料からの RT-PCR 法による腫瘍診断について検討するとともに、今まで解析を行っていなかった稀な融合遺伝子の解析系を立ち上げた。

### B. 研究方法

凍結検体を用いた RT-PCR 法によって融合遺伝子の発現状態が判明している症例 17 例の Ewing 肉腫のパラフィン包埋組織を用いた。パラフィン包埋組織から 10 μm 厚の切片を作製し、1~3 枚の切片から RNA を抽出した。High Pure FFPE RNA micro kit(Roche)を用いて RNA を抽出した。cDNA 合成は random hexamer と Transcriptor Firts Strand cDNA synthesis kit を用いて行った。PCR は、β アクチンあるいは、EWS exon 7 と FLI1 exon 6 に特異的なプライマーと HotStarTaqPlus Mastermix kit を用いて行った。

(倫理面への配慮)