

201128127A

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23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24年（2012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 -----15

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 -----21

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 -----31

IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----37

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23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) 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。MLL2 遺伝子変異が歌舞伎症候群の原因の原因であることが判明したので，日本人歌舞伎症候群患者において MLL2 遺伝子の変異検出，phenotype-genotype correlation を明らかとすること，および MLL2 変異陰性患者の病態の特徴付けおよび遺伝子解析を目的とした。

A. 研究目的

昨年度，歌舞伎症候群（新川-黒木症候群）の原因遺伝子の一つが MLL2

であることを報告した。本年度は，病態生理の解明を目指して，phenotype-genotype correlation を

明らかにすることを目的とした。これまでに収集していた患者試料と新規収集した試料あわせて 53 例の歌舞伎症候群の変異解析をおこなった。

変異スクリーニングには、次世代型シーケンス SOLiD5500 を用い、機器自体の塩基配列解読の正確性や特性の把握にも務めた。

遺伝子単離後も、歌舞伎症候群および歌舞伎様症候群の疾患サンプルの収集、臨床的表現型解析を継続した。北海道医療大学の研究分担チームにより北海道内の歌舞伎症候群と歌舞伎症候群様患者の臨床症状の詳細を記述しながら、アレイ解析を行った。

B. 研究方法

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（これは、昨年度の報告書に記載した）、それらに加え Washington University で解析した試料も含めた 45 例を本年度新たに解析した。

変異解析のための PCR 用プライマーの塩基配列は、研究協力者である琉球大学医学部の要匡より情報提供してもらった。MLL2 遺伝子の全 54 エキソンを exon-intron 境界領域も含め増幅し塩基配列決定をおこなった。塩基配列決定は、次世代型シーケンサー

SOLiD5500 を使用して多検体の同時シーケンススクリーニング法を行った。PCR にて全エキソンを増幅後、超音波によって断片化して末端に barcoding して個人個人を区別出来るようなリンカー・プライマーを付加して次世代シーケンサー SOLiD5500 解析用のライブラリーとした。塩基配列決定は、SOLiD5500 によって fragment シーケンス法 50 bp によって行い、NovoalignCS (Novocraft 社, Malaysia) を使用して塩基配列の alignment をおこなった。Reference 配列はヒト全ゲノム配列を対象とした。

54 エキシソンのうち、exon39 と exon48 の大きいエキソンは、変異が多く認められる部位であるので患者 53 例全例について、SOLiD5500 によるスクリーニングと同時に通常のキャピラリーシーケンス法によって塩基配列を決定した。また、exon10 の中央部は繰り返しの塩基配列が出現するために SOLiD5500 によるスクリーニングと同時にキャピラリーシーケンス法によって塩基配列を決定した。

新規症例・フォーアップ症例

症例 1：患児は、女兒で切れ長の眼瞼列と眼瞼外側の外反、大きな耳介を認め、軽度の精神発達遅滞と、低身長を認めた。口唇の pit は認めないが、顔貌が歌舞伎症候群に似るため、歌舞伎

症候群と診断した。

症例 2 : 2 例目は、前回の歌舞伎症候群遺伝子単離に用いた患者サンプルでもある。今回、患児が心奇形のため、心臓手術を受けることになったが、患者両親のインフォームド・コンセント、および本学倫理委員会承認のもと、手術時に破棄される患児組織から線維芽細胞の培養を行い液体窒素に凍結保存した。

症例 3 : 3 例目は、すでに 40 歳を超える歌舞伎症候群で、この患者サンプルも前回の歌舞伎症候群遺伝子単離のサンプルとして用いられた。歌舞伎症候群の年齢的経過にともなう症状や表現型の変化は、まだ報告されていない。この患者は、新川らにより歌舞伎症候群が発見されて間もないころ診断された患者で、歌舞伎症候群と診断されたもっとも高年齢のグループに属する。患者の顔貌は、眉は太く外側 1/3 はやはり疎である。口唇のピットはないが二つの隆起は存在する。日常生活では感染症に弱いなどの問題はなく、農業など保護者と働き自立した生活を送っている。腫瘍などの特記すべき問題点もない。

症例 1 については、顔貌から歌舞伎症候群としたが、MLL2 遺伝子の変異解析の前に染色体異常の有無のスクリーニングのために Affymetrix 社製 Cytogenetics Array を行った。

Cytogenetics Array の解析は、Affymetrix 社の添付プロトコールに従い、GeneChip システムを用いて data を取得した。Data 解析は、Affymetrix 社から配付されている Chromosome Analysis Suite (ChAS) を用いた。

C. 結果

合計 53 例の歌舞伎症候群患者の変異スクリーニングの結果、33 名が変異有りとして認定し、20 名を変異なしとした。変異の内訳は、acceptor site 変異 1 例、donor site 変異 (exon の末端塩基の変化) 2 例、nonsynonymous アミノ酸変異 11 例、stop gain 12 例、frame shift 変異 6 例、inframe deletion (27bp deletion) 1 例であった。歌舞伎症候群内での MLL2 変異陽性率は $33/53 = 62\%$ であった。これらの変異は、Category 1 : SOLiD5500 による screening によって変異候補として列挙されかつキャピラリーシーケンサーによって確認が出来た分 Category 2 : exon39, exon49, exon10 の一部をキャピラリーシーケンサーによって全例塩基配列決定して変異確認が出来た分を含む。

視点を変えて、SOLiD5500 の screening から見た変異解析について結果を記述する。変異候補候補とは、NovoalignCS による配列→GATK による

fine alignment→データベースとの照合→SNPとしての登録がない塩基置換の選別 といった workflow によって最終的に病的原因として可能性の残る塩基置換である。SOLiD5500 によって候補として上げられた変異は、一塩基置換 (SNV: single nucleotide variation) が 52 個, 挿入 (Ins: insertion) が 28 個, 欠失 (Del: deletion) が 9 個であった。これらは、全てキャピラリーシーケンサーによって確認作業を行い次の様な正誤の割合となった。

SNV52 個 - (真 23 個, 偽 29 個)

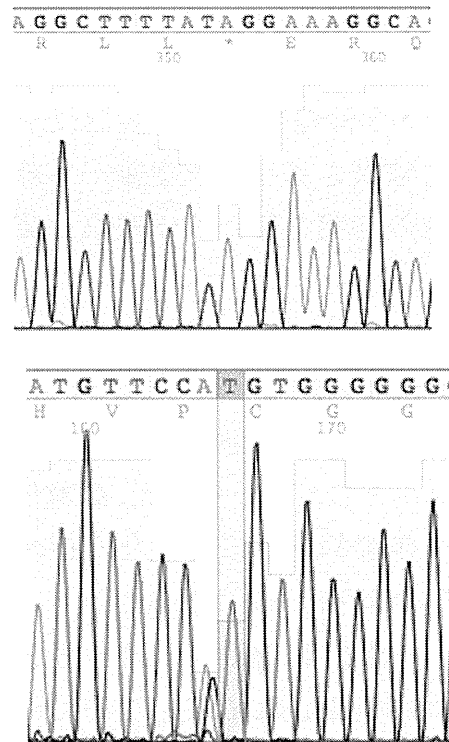
Ins28 個 - (真 1 個, 偽 27 個)

Del9 個 - (真 2 個, 偽 7 個)

次に exon39 と exon48 について、SOLiD5500 とキャピラリーシーケンスとの結果の比較を記述する。全例塩基配列確認をおこなった exon39 と exon48 に存在した変異は 12 例であった。単純塩基置換が 9 例, insertion/deletion が 3 例であった。単純塩基置換が 9 例のうち 2 例は SOLiD5500 の screening workflow によって見落とされていた。insertion/deletion 3 例においては SOLiD5500 を使用した workflow では全て見落されていた。

北海道医療大学から送付された症例 2 は NGKS042, 症例 3 は NGKS039 に対応する。それぞれ mutation が発見

され、NGKS042: MLL2: NM_003482: exon39: c.11149C>T: p.Q3717X, NGKS039: MLL2: NM_003482: exon48: c.G15536A: p.R5179H であった。

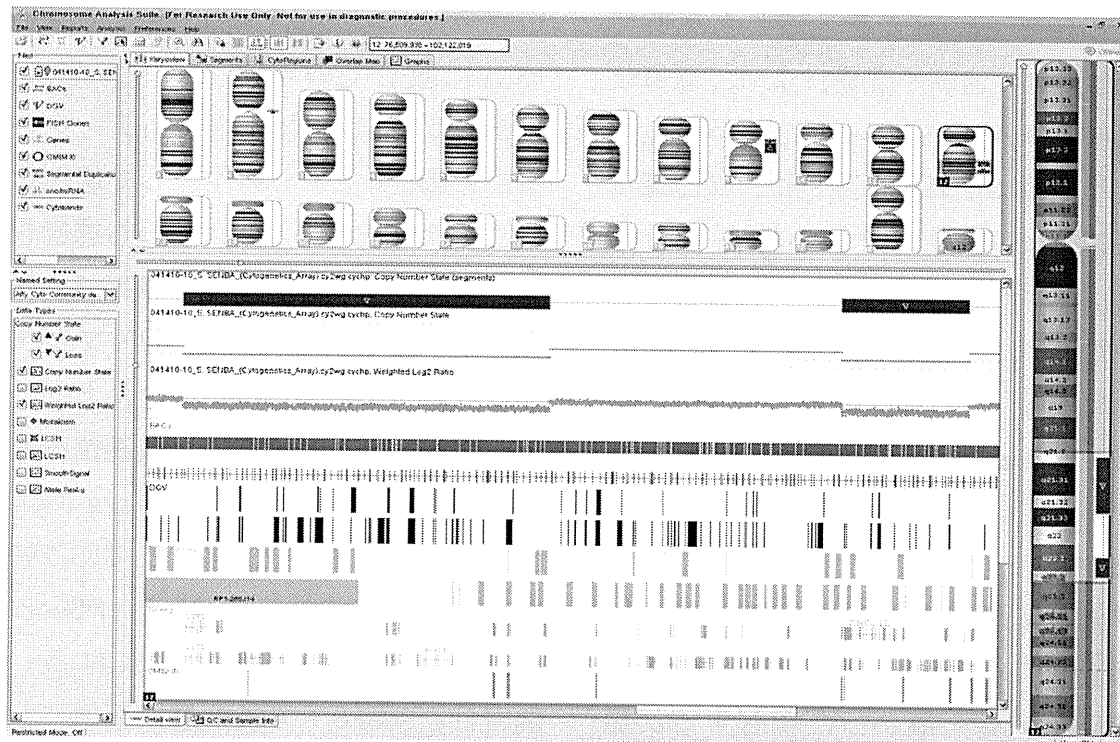


症例 3 患者は、体格は比較的大きく、典型的な眼瞼の表現形は年齢と共に印象がうすくなってきており、年齢が上がってきた歌舞伎症候群は、顔貌からは診断がつけにくいことがうかがえる。今回本症例 2 からインフォームド・コンセントを得て線維芽細胞を樹立出来た。

症例 1 は、顔貌から歌舞伎症候群と診断したが、Cytogenetics Array の結果 12q の欠失が明らかになった。

欠失は karyotype で 12q21.2-21.3 (77, 622, 934-88, 598, 573)x1 および 12q23.1-23.2 (97374540-101, 182, 380)x1 と示される。MLL2 遺伝子は、12q13.12 chr12:49,412,758-49,449,107 に位置しており、本症例で認められた欠失領

域は MLL2 遺伝子の変化とは独立であって、MLL2 に変化がある歌舞伎症候群とは思われなかった。



D. 考察

歌舞伎症候群のMLL2変異について

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。60~70%の患者において変異が認められる。そのうちの約50%が、nonsense mutation, insertion / deletion, またはsplice siteに関連する変異である。すなわち変異の半数

が truncation 型の変異を占める。変異のうち約50%が nonsynonymous missense mutation (非同義的アミノ酸変化) である。これらのデータは、他の研究者からの報告より missense mutation の割合が多くなっている (Hannibal et al., 2011; Paulussen 2011; Li et al., 2011; Banka et al., 2012)。これは、おそらく missense mutation が歌舞伎症候群の原因変異であるか否かの判断を保留して病因

として確実な変異が論文に報告されているのであろうと考えられる。我々の変異スクリーニングで認められた11例のアミノ酸変化も一部は病因ではない多型が含まれている可能性があるので、今後の検証が必要である。

歌舞伎症候群患者の30~40%の患者にはMLL2の変異が認められないのは、他の報告でもおおよそ一致した見解である。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変異陰性症例は、MLL2遺伝子以外の原因遺伝子の存在またはMLL2遺伝子内のPCRによって変異解析が行われていないイントロン部の変異が考えられる。しかし、PCR-screeningによって見逃されたイントロン部の変異で全てのMLL2変異陰性症例を説明できるとは考えられずMLL2遺伝子以外の歌舞伎症候群原因遺伝子の存在が確実視される。MLL2遺伝子変異の無かった現有する20症例は、今後のexome解析対象である。

次世代型シーケンサーの解析能力について

次世代型シーケンサーSOLiD5500の性能について議論可能なデータを今回の研究で取得したので、これを考察する。SOLiD5500 workflowによって候補として選定された変異は、SNV52個、Ins28個、Del19個であった。

SNV52個 - (真23個, 偽29個)

Ins28個 - (真1個, 偽27個)

Del19個 - (真2個, 偽7個)

このデータによると、感度・特異度ともに非常に悪い。本成績は、設定をdefaultにしたままの変異annotationの結果は信用できないということを示している。

-SNVに関する考察

SNVは、GATKで排出されるデータの中から陽性のSNPを陽性として選別することは可能である。すなわち感度を上げることは可能である。GATKで計算される Quality Score > 400 で選択することで SOLiD5500 が拾い上げたSNVはほぼ100%の感度で変異部位を選別できる。ただし、Quality Score ~ 400程度のSNVは、偽SNVも含まれており特異度~95%程度であろう。Quality Score ~ 400付近には偽SNVも含まれる。Quality Score ~ 500を選択基準に設定すれば特異度100%が達成されるであろうと考えられるが感度が落ち、False Negativeが増加することになる。このように Quality Score による選択は可能であるが、SOLiD5500 workflowによって候補としてさえ拾われぬSNVが存在していた。false negative SNVである。キャピラリーシーケンサーでscreeningしていた exon39と exon48に見だされた9個の

SNVのうち2個はworkflowによって見逃されていた。見逃がしの原因は、周囲にSNP部位が多く存在する部位であった。短いリードは目的の部位にマップされており、確かにSNVは確認されていたのだが、“周囲にSNVが多い”ということで、種々のフィルタリングによって候補から外され、変異候補としては最後まで残っていなかった。この2個のSNVのquality scoreは、423.73と1137.36であり、周辺のSNPの状態に限らずQuality Scoreは高かった。すなわち、周辺のSNP siteに惑わされず真のSNVとして残すべきであった。SOLiD5500 → NovoalignCS → GATKのwork flowによって、大部分のSNVを認識できるようだが、どれくらいのもを見逃がすかは不明である。また、認識できたSNVをどのようなフィルターによって感度を上げ、特異度を上げて選別するかは今回の結果を参考に十分に考慮する必要がある。

-InDelに関する考察

InDelに関して、SOLiD5500 → Novoalign → GATKのworkflowでは見逃しが多いことを知っておくべきである。選出されたInDelのほとんどすべてが偽であり、false positiveである。内容を見ると、SNVとは違ってQuality Scoreは真偽の判断に全く役に立たない。真であっても偽であって

もQuality Scoreは高かった。真偽を区別する方法は、真であった3個のInDelでは複数の独立したInDelを示すリードが存在していて、偽であった34個のInDelには正常を示すリードが30以上あるのにInDelを示す独立のリードが1個または2個しかなかった。このことを手掛かりにしてInDelの真偽を判定するのが良いと考えられる。候補として残ったInDelの最終的な選択は、InDelを示すリード数が決め手となる。Quality Scoreは全くあてにならない。

InDelのスクリーニングの問題は、「完全に見落としてしまうことがある」ことにある。exon39とexon48に存在した3個のInDelのうち、1個は正常アレルとしてのリードが30以上あるにもかかわらず、InDelを示すリードが存在せず完全に見落としていた。残り2個は、InDelを示すリード数が少なく、Quality Scoreも低いために選別の段階で候補から外されていた。したがって、スクリーニングした53名の試料中にも見落としていた疾患原因InDel変異がある可能性が残っている。

InDelの高い見逃し率の原因は、SOLiD5500に依存したことであるのか、Novoalign等の整列ソフトの問題であるのか、繰り返し行うPCR時に発生するエラーに依存するのか不明である。ただし、以下の可能性が考えられる。

1) SOLiD5500特有のエラー：二本鎖のDNAが塩基配列決定される場合には両方の鎖が読み取られるはずである。しかし、SOLiD5500で塩基配列決定を行った場合には、片方の鎖しか読めない部位が～30%出現する。極めて不均一で何らかの不具合があるとしか考えられない。このような現象は、塩基配列決定の時なのか、emulsion PCR等の試料準備段階の不具合なのかは不明であるが、SOLiD5500特有の不均一な塩基配列決定が行われる。これに起因してInDelを示すリードが無くなる可能性がある。

2) 高サイクルPCRによるエラーの導入：今回のtarget領域に塩基配列決定は、MLL2領域のPCRによる増幅～35サイクル。emulsion PCRによる増幅～40サイクル。特にemulsion PCRは一分子からPCRを始めるので、その前に導入された人工的なエラー変異が、塩基配列決定される。

北海道医療大学症例2は、年齢を重ねた歌舞伎症候群で、小児の頃の特徴的な表現型が弱くなっているようである。年齢的な変化を見るにはさらなる症例を増やす必要がある。症例2は、MLL2遺伝子内にstop gainを起こすnonsense mutationであり、かつ臨床症状的にも歌舞伎症候群典型例である。今回本症例2からインフォームド・コンセントを得て線維芽細胞を樹

立出来たことにより、本サンプルを用いることにより歌舞伎症候群の外胚葉由来遺伝子発現、HistonH3K4のメチル化の解析が可能となる。今後、MLL2遺伝子機能の生化学的な解析を行うにあたり重要な試料である。

症例1は、顔貌から歌舞伎症候群と診断したが、Cytogenetics Arrayの結果12qの欠失が明らかになった。欠失は karyotype で 12q21.2-21.3(77,622,934-88,598,573)x1 および 12q23.1-23.2(97374540-101,182,380)x1 と示される。MLL2遺伝子は、12q13.12 chr12:49,412,758-49,449,107に位置しており、本症例で認められた欠失領域はMLL2遺伝子の変化とは独立であって、MLL2に変化がある歌舞伎症候群とは思われなかった。

MLL2変異は歌舞伎症候群の70～80%の患者において変異が検出される。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。研究代表者の吉浦の解析でも変異が認められない症例が存在している。我々が今回提示した症例1はまだMLL2遺伝子の変異解析が終了していないが、deletion部位に歌舞伎症候群の第二原遺伝子の存在も示唆される。症例1の欠失領域

は、心臓・顔・皮膚症候群で報告されているが、患児はこの疾患とは眼瞼がことなるように思われた。したがって、MLL2遺伝子領域と染色体inversionをおこしてinversionの切断により歌舞伎症候群表現型を示した可能性、歌舞伎症候群ではない可能性、またMLL2遺伝子以外で歌舞伎様顔貌を示す責任遺伝子が存在する可能性がある。今後のexome解析対象症例である。

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。顔貌から典型的な歌舞伎症候群と思われる患者であっても30~40%はMLL2変異陰性であった。現在までのところ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。

本年度のMLL2変異解析において、次世代シーケンサーSOLiD5500の塩基配列決定における感受性、特異度を算出することができた。これによって、どのようなフィルターによって真のSNVを選択できるかを明らかにできた。しかし、InDelに関しては、SOLiD5500を

使用して特異度をあげて選択することは可能であるが、感受性を高くするよい方法はいまだ見つけることができない。今後はMLL2遺伝子が、HistonH3K4のメチル化等を通して発現制御する遺伝子を明らかにするとともに、MLL2遺伝子の片アレル機能不全による細胞現象を明らかにして歌舞伎症候群の症状改善薬の手掛かりを得ることが重要である。同時に歌舞伎症候群は、MLL2遺伝子のみならず別の遺伝子が発症に関与している可能性が示唆されており、今後も歌舞伎症候群の遺伝子解析は重要課題である。

——達成度について——

歌舞伎症候群の原因遺伝子 MLL2 を明らかにすることができ、60~70%に変異が見つかるというところまでは明らかにすることができた。これにより、ある程度の感度で歌舞伎症候群の分子遺伝学的診断が可能となった。しかし、MLL2 遺伝子の機能から何らかの症状の緩和にいたる治療法の開発にはいたっていない。また、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 を明らかにすることができていない。また、MLL2 以外の歌舞伎症候群原因遺伝子の存在が強く疑われるが、それはまだ明らかに出来てい

ない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Okada I, Hamanoue H., Terada K, Tohma T, Megarbane A, Chouery E, Abou-Ghoch J, Jalkh N, Cogulu O, Ozkinay F, Horie K, Takeda J, Furuichi T, Ikegawa S, Nishiyama K, Miyatake S, Nishimura A, Mizuguchi T, Niikawa N, Hirahara F, Kaname T, Yoshiura K, Tsurusaki Y, Doi H, Noriko Miyake N, Furukawa T, Matsumoto N, and Saitu H. SMOC1 Is Essential for Ocular and Limb Development in Humans and Mice. *Am J Hum Genet* Jan;88(1): 1-12, 2011. (IF: 12.303)
2. Amani D, Ravangard F, Niikawa N, Yoshiura KI, Karimzadeh M, Dehaghani AS, Ghaderi A. Coding region polymorphisms in the indoleamine 2,3-dioxygenase (INDO) gene and recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* Jan;88(1): 42-47, 2011. (IF: 2.519)
3. Ono S, Yoshiura K, Kurotaki N, Kikuchi T, Niikawa N, Kinoshita A. Mutation and Copy Number Analysis in Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia Families. *Movement Disorders* Mar; 26(4):762-764. (IF: 4.480)
4. Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. *J Hum Genet* 2011 Apr;56(4):296-299. (IF: 2.547)
5. Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Miura S, Abe S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women. *J Hum Genet* 2011 Apr;56(4):313-315. (IF: 2.547)
6. Kurotaki N, Tasaki S, Mishima H, Ono S, Imamura A, Kikuchi T, Nishida N, Tokunaga K, Yoshiura K, Hiroki Ozawa H. Identification of Novel Schizophrenia Loci by Homozygosity Mapping Using DNA Microarray Analysis. *PLoS One* May 2011;6(5):e20589 (IF: 4.351)
7. Oikawa M, Nagayasu T, Yano H, Hayashi T, Abe K, Kinoshita A, Yoshiura KI. Intracystic Papillary Carcinoma of Breast Harbors Significant Genomic Alteration

- Compared with Intracystic Papilloma: Genome-wide Copy Number and LOH Analysis Using High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Microarrays. *Breast J* 2011 Jul-Aug;17(4):427-430. Epub 2011 Jun 9. (IF: 1.425)
8. Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura K, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, Bamshad MJ. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011 Jul;155A(7):1511-1516. Epub 2011 Jun 10. (IF: 2.505)
- 9 Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, Ichinose K, Nakamura H, Tsujino A, Kawakami A, Matsunaka M, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S, Ohmura K, Mimori T, Hirano M, Ueno S, Tanaka K, Tanaka M, Toyoshima I, Sugino H, Yamakawa A, Tanaka K, Niikawa N, Furukawa F, Shigeo Murata S, Eguchi K, Ida H, Yoshiura K. An assembly defect due to a *PSMB8* mutation reduces proteasome activity and causes autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 2011 Sep6;108(36):14914-14919. Epub 2011 Aug 18. (IF:9.771)
10. Mishima H, Sasaki K, Tanaka M, Tatebe O, Yoshiura KI. Agile parallel bioinformatics workflow management using Pwrake. *BMC Res Notes* 2011 Sep 8;4(1):331. [Epub ahead of print] (IF:なし)
11. Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Ikemoto R, Miura S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Pre-vaccination epidemiology of human papillomavirus infections in Japanese women with abnormal cytology. *J Obstet Gynaecol Res* 2011 Jul 27. doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01601.x. [Epub ahead of print] (IF:0.869)
12. Ono S, Tanaka T, Ishida M, Kinoshita A, Fukuoka J, Takaki M, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kohno S, Hayashi T, Senba M, Yasunami M, Kubo Y, Yoshida LM, Kubo H, Ariyoshi K, Yoshiura K, Morimoto K. Surfactant protein C G100S mutation causes familial pulmonary fibrosis in Japanese kindred. *Eur Respir J* 38(4):

- 861-869. 2011. Epub 2011 Aug 4. [Epub ahead of print] (IF:5.922)
13. Sasaki K, Okamoto N, Kosaki K, Yorifuji T, Shimokawa O, Mishima H, Yoshiura K-i, Harada N. Maternal uniparental isodisomy and heterodisomy on chromosome 6 encompassing a *CUL7* gene mutation causing 3M syndrome. *Clin Genet* 80: 478-483. 2011. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01599.x. [Epub ahead of print] (IF: 3.304)
14. Oikawa M, Yoshiura KI, Kondo H, Miura S, Nagayasu T, Nakashima M. Significance of Genomic Instability in Breast Cancer in Atomic Bomb Survivors: Analysis of Microarray-Comparative Genomic Hybridization. *Radiat Oncol* 2011 Dec 7; 6(1):168.
15. Hikida M, Tsuda M, Watanabe A, Kinoshita A, Akita S, Hirano A, Uchiyama T, Yoshiura KI. No evidence of association between 8q24 and susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without palate in Japanese population. *Cleft Palate Craniofac J* 2011 Oct 7. [Epub ahead of print] (IF: 0.770)
16. Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet.* 2012 Mar 18; 44(4): 376-378. doi: 10.1038/ng.2219. [Epub ahead of print]
- 2) 学会発表
国内学会
第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日(火)～16日(金), パシフィコ横浜, 横浜.
2P-0182: The Ruby UCSC SPI: accessing the UCSC Gene Database using Ruby. Hiroyuki Mishima, Jan Aerts, Koh-ichiro Yoshiura
- 第56回日本人類遺伝学会 2011年11月9日(水)～12日(土), 幕張メッセ, 千葉
O-010: 免疫プロテアソームの形成以上と活性低下により自己炎症疾患中條-西村症候群が発症する. 木下 晃, 三嶋博之, 有馬和彦, 金澤伸雄, 村田茂穂, 井田弘明, 吉浦孝一郎

O-070: SNP マイクロアレイを用いたホモザイゴシティーマッピング. 三嶋博之, 黒滝直弘, 木下 晃, 金澤伸雄, 井田弘明, 吉浦孝一郎

O-103: 子宮体癌特異的 microRNA の同定とその有用性に関する検討. 城 大空, 三浦清徳, 平木宏一, 東嶋 愛, 阿部修平, 長谷川ゆり, 三浦生子, 嶋田貴子, 山崎健太郎, 三嶋博之, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明

O-104: HPV-DNA 型別による持続感染と子宮頸部細胞診の変化. 山崎健太郎, 三浦清徳, 池本理恵, 三浦生子, 嶋田貴子, 小寺宏平, 藤下 晃, 鮫島哲郎, 村上 誠, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明

O-113: SMOC は眼球・四肢発症に重要である. 浜之上はるか, 岡田一平, 寺田晃士, 當間隆也, Megarbane Andre, Cogulu Ozgur, 堀江恭二, 竹田潤二, 古市達哉, 池川志郎, 新川詔夫, 平原史樹, 要 匡, 吉浦孝一郎, 鶴崎美德, 土井 宏, 三宅紀子, 古川貴久, 松本直通, 才津浩智

P-008: アレイ染色体検査で同定した Joubert 症候群の一例. 松井 健, 齋藤和正, 近藤達郎, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 原田直樹

P-023: ホモ接合マッピングによる統合失調症の感受性遺伝子の同定.

黒滝直弘, 田崎真也, 三嶋博之, 小野慎治, 今村 明, 菊池妙子, 西田奈央, 徳永勝士, 吉浦孝一郎, 小澤寛樹

P-070: OpitzC 様 症 候 群 (Bohring-Opitz 症候群) における ASXL1 遺伝子変異. 要 匡, 柳 久美子, 福嶋義光, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二

第 18 回出生前診断研究会 2011 年 10 月 1 日 (土), 佐賀大学医学部臨床大講堂, 佐賀

O-6: Lenz小眼球症候群を呈する一家系の原因遺伝子解析. 要 匡, 柳 久美子, 當間隆也, 村松友佳子, 森田この美, 池松真也, 板垣裕輔, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 成富研二

第7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- 2011年6月4日 (土), 場所: 広島大学霞キャンパス, 広島

2-4: microarray CGH 解析によるヒバクシャ乳癌におけるゲノム不安定性の同定. 及川将弘, 吉浦孝一郎, 近藤久義, 三浦史郎, 永安 武, 中島正洋

国際学会

12th International Congress of Human Genetics and The American

**Society of Human Genetics, 61st
Annual Meeting, Montreal,
Canada, October 11-15, 2011**

556T: Identification of novel schizophrenia loci by homozygosity mapping using DNA microarray analysis. N. Kurotaki, H. Mishima, S. Ono, A. Imamura, S. Tasaki, T. Kikuchi, N. Nishida, K. Tokunaga, K. Yoshiura, H. Ozawa.

1095T: Detection of a mutation in Lents microphthalmia family by exome sequencing. T. Kaname, K. Yanagi, Y.

Muramatsu, T. Tohma, H. Hanafusa, K. Morita, S. Ikematsu, Y. Itagaki, S. Mizuno, 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23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

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）

研究要旨

本研究分担班の研究目的は（1）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）歌舞伎症候群・歌舞伎様症候群の疾患サンプル収集，（3）臨床的表現型解析である。

A. 研究目的

遺伝子単離後も，歌舞伎症候群および歌舞伎様症候群の疾患サンプルの収集，臨床的表現型解析を継続した。

B. 研究方法

北海道医療大学の研究分担チームにより北海道内の歌舞伎症候群と歌舞伎様症候群患者の臨床症状の詳細を記述しながら，変異解析を行い phenotype-genotype correlation を明らかにする。

(1) 症例

症例 1：

患児は、女児で切れ長の眼瞼列と眼瞼外側の外反、大きな耳介を認め、軽度の精神発達遅滞と、低身長を認めた。口唇の pit は認めないが、顔貌が歌舞伎症候群に似るため、歌舞伎症候群と診断した。

症例 2：

2 例目は、前回の歌舞伎症候群遺伝子単離に用いた患者サンプルでもある。今回、患児が心奇形のため、心臓手術を受けることになったが、患者両親の

インフォームド・コンセント、および本学倫理委員会承認のもと、手術時に破棄される患児組織から線維芽細胞の培養を行い液体窒素に凍結保存した。

症例 3 :

3 例目は、すでに 40 歳を超える歌舞伎症候群で、この患者サンプルも前回の歌舞伎症候群遺伝子単離のサンプルとして用いられた。歌舞伎症候群の年齢的経過にともなう症状や表現型の変化は、まだ報告されていない。この患者は、新川らにより歌舞伎症候群が発見されて間もないころ診断された患者で、歌舞伎症候群と診断されたもっとも高年齢のグループに属する。患者の顔貌は、眉は太く外側 1/3 はやはり疎である。口唇のピットはないが二つの隆起は存在する。日常生活では感染症に弱いなどの問題はなく、農業など保護者と働き自立した生活を送っている。腫瘍などの特記すべき問題点もない。

(2) Affymetrix 社製 Cytogenetics array を用いてのゲノム構造異常解析

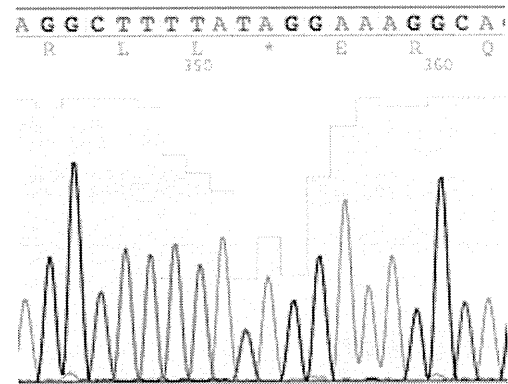
症例 1 については、顔貌から歌舞伎症候群としたが、MLL2 遺伝子の変異解析の前に染色体異常の有無のスクリーニングのために Cytogenetics Array を行った。Cytogenetics Array

の解析は、Affymetrix 社の添付プロトコールに従い、GeneChip システムを用いて data を取得した。Data 解析は、Affymetrix 社から配付されている Chromosome Analysis Suite (ChAS) を用いた。

C. 研究結果

症例 2 は NGKS042, 症例 3 は NGKS039 に対応する。

NGKS042: MLL2: MLL2: NM_003482: exon39: c.11149C>T: p.Q3717X



NGKS039: MLL2: MLL2: NM_003482: exon48: c.15536G>A: p.R5179H

