

で好発する変異部位であった。また重症肥大型心筋症を合併した2症例で認めた c.1528C>G (p.Q510E)変異は HCM との関連が指摘されている変異であった。

Q510E 変異を認めた2症例の症状を記述する。

【症例1】 0ヶ月男児

母2経産。母体に妊娠高血圧症候群の合併症あり。家族歴は特記事項なく、血族婚もなし。在胎35週1日、体重1828g(-1.2SD)、身長39.5cm(-2.3SD)、頭囲31.5cm(-0.1SD)で出生した。出生直後より著明な心筋肥大を認めた。心電図は正常で伝導障害はなかった。眼間離開、余剰な後頸部皮膚、耳介低位、耳介後方回転より Noonan 症候群が疑われた。聴覚スクリーニングは正常で、眼科的異常はなかった。腹部エコーでは、腎尿路系の構造異常はなかった。

【症例2】 4歳男児

母1経産。母体合併症なし。家族歴に特記事項なく、血族婚もなし。在胎40週5日、体重3386gで出生。出生時より両室の心筋肥大・流出路狭窄、肺動脈弁狭窄、体肺動脈側副血行路(MAPCA)を認めた。4歳6ヶ月時にMAPCAをコイル塞栓術、4歳9ヶ月時に右室心筋切除術を施行した。その後も心筋肥大は改善せず、内科的治療を継続している。心電図では、心筋肥大による変化を認めているが、不整脈は認めていない。両耳難聴で人工内耳を留置しており、斜視、外反偏平足も合併した。-2.5SDから-3.0SDの低身長で、定頸6-7ヶ月、座位8-10ヶ月、立位15ヶ月、独歩27ヶ月と運動発達遅滞を認めた。眼間離開などの身体的所見より Noonan 症候群が疑われた。

D. 考察

Noonan 症候群は眼間離開などの特徴的な顔貌に加えて、先天性心疾患(肺動脈狭窄、肥大型心筋症)、低身長、筋緊張低下、軽度の精神発達遅滞、眼科的異常、難聴、腎奇形、リンパ浮腫、凝固異常などを呈する先天異常症候群である。細胞の増殖・分化・死を制御するRAS/MAPKシグナル伝達経路を構成する分子の遺伝子変異が発見され、Costello症候群、CFC症候群とともにRAS/MAPK症候群(RASopathy)という新しい疾患概念が確立されている。

Noonan 症候群の原因遺伝子としては、PTPN11(40-50%)、SOS1(10-20%)、RAF1(3-17%)が代表的であり、その他にもKRAS、NRAS、BRAF、MEK1の変異も少数認められる。今回の我々の解析でもPTPN11変異陽性はおおよそ半数であった。

PTPN11遺伝子変異と表現型の関連としては、一部の変異(T73I変異など)と若年性骨髄単核性白血病(JMML)の関係などが知られている。一方、先天性心疾患としては Noonan 症候群変異好発部位であるエキソン8変異とPSとの関連、エキソン3変異と心房中隔欠損(ASD)との関連などが指摘されている。今回の解析例の中ではエキソン8変異例の1例にはPSはなかったが、エキソン3変異例の2例ともASDを伴っていた。

Noonan 症候群でのHCMの合併は20-30%程度であるが、PTPN11変異陽性例では5.9-12.5%と頻度は低い傾向がある。しかし、PTPN11遺伝子の中でHCMとの関連が指摘されている変異もあり、その代表としてY279C変異(エキソン7)、T468M変異(エキソン12)、Q510E変異(エキソン13)が知られている。これらの変異はうちY279C変異、T468M変異は臨床的には Noonan 症候群というよりもLEOPARD症候群としての報告がほとんどである。

LEOPARD症候群はL(多発する黒子)、E(心筋伝導障害)、O(眼間離開)、P(肺動脈弁狭窄)、A(外性器異常)、R(成長障害)、D(難聴)を特徴とする Noonan 症候群の類縁疾患である。顔貌所見は Noonan 症候群とかなり類似するが、黒子やカフェオレ斑、難聴の合併が多く、HCMが70-80%と高率であることが特徴である。LEOPARD症候群では90%以上でPTPN11遺伝子変異を認めるが、変異部位がY279C、T468M変異にほぼ限られている。今回の解析で診断したT468M変異を認めた(親子)同胞例でも、黒子、難聴を伴っておりLEOPARD症候群の表現型ももちあわせていた。

Q510E変異の報告例は本症例を含めて今までに7例ある(表1)。この7症例全例でHCMを合併していることは特筆すべきである。これまでの報告例では7例中4例が Noonan 症候群、残る3例が黒子・カフェオレ斑の存在からLEOPARD症候群と診断されていた。

表 1. PTPN11 の Q510E 変異例の臨床症状

性別	男	女	男	男	女	男	男
年齢	1歳3ヶ月	2歳	2.3歳	2ヶ月	37歳	0ヶ月	4歳
黒子	—	+	—	—	+	—	—
カフェオレ斑		+	+	—		—	—
心疾患	—	M弁異常	PS	MR, VSD	—	PS	PS
心筋症	HCM	HCM	HCM	HCM	HCM	HCM	HCM
ECG異常					+	—	+
難聴	+	—	—	—	+	—	+
成長障害	—	+	+	—	+	+	+
精神遅滞	+	+	+				+
表現型	NS	LS	LS	NS	LS	NS	NS
文献	Takahashi (2005)	Digilio (2006)	Digilio (2006)	Faienza (2009)	Lehmann (2009)	症例1	症例2

Q510E 変異変異は細胞レベルで phosphatase 活性低下を認めており機能喪失変異と考えられている。PTPN11 遺伝子がコードする SHP2 は3つのドメインから形成されており PTP domain と N-SH2 domain がループ構造を形成して活性化することがわかっている。Noonan 症候群、LEOPARD 症候群では、ループ構造にかかわる部分の変異が多い。Q510 もループ構造を作る上で重要な catalytic cleft 構造の一部であることがわかっている。Q510E 変異での HCM の発症機序には Akt/mTOR シグナル伝達経路の亢進が細胞レベルの実験で指摘されている。Akt/mTOR シグナル系は RAS/MAPK シグナル伝達経路と並んで腫瘍発生のメカニズムとして重要な経路である。PTPN11 遺伝子がコードする SHP2 蛋白が脱リン酸化によりシグナルを抑制しているが、Q510E 機能喪失変異により心筋の増殖・肥大が発生すると考えられている。

E. 結論

Noonan 症候群を疑った 21 例において PTPN11 遺伝子解析を行った結果 9 例 (43%) で陽性であった。この中で重症肥大型心筋症を合併した 2 症例に c.1528C>G (p.Q510E) 変異を認めた。PTPN11 遺伝子 Q510E 変異は肥大型心筋症に強く関係する変異であ

り注意が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

1. 特許取得

2. なし。

3. 実用新案登録

4. なし。

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

KRAS 変異を有する Noonan 症候群の病像に関する研究

研究分担者 川目 裕

お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科
ライフサイエンス専攻遺伝カウンセリングコース 教授

研究要旨

Noonan 症候群は、1/1,000-2,500 人と比較的頻度が高く、低身長、先天性心疾患、様々な程度の発達の遅れ、翼状頸、外反肘、特徴的な顔貌などを呈する先天異常症候群である。近年になって Noonan 症候群と臨床症状が類似している類縁症候群である Costello 症候群、Cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群において RAS/MAPK シグナルシグナル伝達系に関わる遺伝子異常であることが判明したことから、臨床的に Noonan 症候群と考えられる症候群においても新規の責任遺伝子が見いだされている。

今回、我々は当初 Costello 症候群と診断されていた、重度の摂食障害、心筋症、低身長、発達の遅れと著名な過敏性を有する Noonan 症候群類縁症候群の女兒に、KRAS 遺伝子の生殖細胞系列の変異を認めた。本変異を有する症例と臨床症状は、共通性が多く、特にリンパ浮腫は特徴的であった。

KRAS 変異症例は、Noonan/Costello/CFC の多様な臨床症状を有することが確認された。今後、更なる症例の蓄積によって、詳細な臨床症状のスペクトラムの解明が可能となり、Noonan 症候群類縁症候群の遺伝型の早期診断による、自然歴に応じたより良いフォローアップが可能となると考えられた。

研究協力者

なし

A. 研究目的

Noonan 症候群は、1/1,000-2,500 人と比較的頻度が高く、低身長、先天性心疾患、様々な程度の発達の遅れ、翼状頸、外反肘、特徴的な顔貌などを呈する先天異常症候群である。胎児期から周産期に多彩な症状を有し、それらの症状は、非特異的なものが多く、典型例でないと診断はしばしば困難である。

近年になって Noonan 症候群と臨床症状が類似している類縁症候群である Costello 症候群、Cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群において RAS/MAPK シグナルシグナル伝達系に関わる遺伝子異常であることが判明したことから、臨床的に Noonan 症候群と考えられる症候群においても新規の

責任遺伝子が見いだされてきた。

現在、4 つの責任遺伝子が知られており (PTPN11、SOS1、RAF1、KRAS)、さらに SHOC2 遺伝子も Noonan 様症候群の責任遺伝子として同定されている。Noonan 症候群と臨床診断をうけた約 80%にこれらの遺伝子変異を認めると報告されている。

近年は、さらに症例の蓄積とともにこれらの遺伝子型と表現型の相関の情報も蓄積されつつある。

今回、我々は、当初、Costello 症候群と診断されていた、重度の摂食障害、心筋症、低身長、発達の遅れと著名な過敏性を有する Noonan 症候群類縁症候群の女兒に、KRAS 遺伝子の生殖細胞系列の変異を認めたので、その病像について検討をおこなった。

さらに今回、Noonan 症候群の類縁症候群である Costello 症候群の家族向けの情報提供冊子の作成を試みた。

B. 研究方法

後方視的に診療録を検討。遺伝学的検査は、十分な説明と同意のうえ、研究代表者の東北大学大学院医学系研究科遺伝病学分野の青木洋子先生の研究室にて行われた。文献データ・ベースであるPubMedより、*KRAS* 変異症例を収集した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析にあたっては、遺伝カウンセリングを行い書面にて同意を得た。また患児の写真、発表について書面にて同意を得ている。

C. 研究結果

1. 症例報告

【症例】母25歳。第2子として、在胎37週1日BW 3480g、BL 46cm、OFC 34cm 出生。日齢11で体重減少、哺乳不良あり、近医の病院に紹介入院。Cystic hygroma、摂食哺乳障害を認めることから、Costello 症候群の診断を受ける。以後、経管栄養を開始。1歳6か月時に心拡大を認め、肥大型心筋症の診断を受けフォローアップ開始。4歳時、身長；-6.4SD、体重；-3.3SD、OFC：-1.5SD。brachycephaly、bi-temporal narrowing、mild downslanting palpebral fissures、depressed nasal root、thick lips、tenting upper lip、mild pectus excavatum、hyperextensive fingers、deep palmer/plantar crease。色黒、しかしその他の湿疹などなし。頭髪は、粗でなく curly なし。著名な過敏性を認め、診察室に入ると、啼泣し。自傷行為で自身の頭を叩くことあり。8歳時、*HRAS* 遺伝子検査を行うが変異を認めず。Noonan 症候群類縁症候群の診断名でフォローを継続。9歳時、右頸部の腫脹を認め、リンパ浮腫の診断にて、3回の穿刺術を行う。現在、13歳、特別支援学校に通い、経管栄養。経口摂取は極わずか。

13歳時に Noonan 症候群類縁症候群として、遺伝子検査をおこなう。*KRAS* 遺伝子にミスセンス変異 (c.101C>G、p. P34R) を認めた。

2. Costello 症候群の家族向け冊子の作成

Costello 症候群のサポートグループである“Costello Kids: Costello syndrome Support Group”、GeneReviews、Management of Genetic Syndrome、3rd ed を参考にして

作成をおこなった。

D. 考察

2005年に Noonan 症候群類縁症候群である Costello 症候群の責任遺伝子が発見されたことを契機に、*RAS/MAPK* シグナル伝達系に関わる分子の機能亢進型変異が、一連の Noonan 症候群類縁症候群を引き起こすことが解明された。

そのひとつの分子である *KRAS* についての遺伝子変異は、2006年に CFC 症候群、Noonan 症候群の責任遺伝子として別の2つのグループから報告された。その後、2007年には臨床的には Noonan 症候群から Costello 症候群と診断された20歳女性に *KRAS* 変異を認めた報告があり、さらに Zenker らによると、12例の *KARS* 変異症例をまとめ、臨床症状には幅があり、Noonan 症候群、Costello 症候群、CFC 症候群に加えて、Noonan/CFC という非典型的な臨床症状を有することが報告された。今回の症例も、乳児期には、Noonan 症候群よりも顔貌の特徴が著名で、摂食障害も強く、成長障害も強いことから、Costello 症候群と診断されたことから、*KRAS* 変異の臨床症状の幅広さと、典型的な Noonan 症候群の臨床型をとらないことが確認された。

今回の症例に認められた変異 (P34R) は、Schubbert ら (2007) の報告に1例あり、今回が世界で2例目の症例となる。その症例の当初の臨床診断は、CFC 症候群であった。さらに論文中の臨床所見と本症例の症状を比較検討したところ、相対的巨頭症、心筋症、有意な低身長、また重度の遅れは合致した。さらにリンパ浮腫と乳び胸の合併が報告されており、我々の症例も9歳時に発症しており共通している。

E. 結論

当初、Costello 症候群と診断されていた症例において、既知の *KRAS* 変異を認めた。本変異を有する症例と臨床症状は、共通性が多く、特にリンパ浮腫は特徴的であった。*KRAS* 変異症例は、Noonan/Costello/CFC の多様な臨床症状を有することが確認された。今後、更なる症例の蓄積によって、詳細な臨床症状のスペクトラムの解明が可能となり、Noonan 症候群類縁症候群の遺伝型の早期診断による、自然歴に応じたより良

いフォローアップが可能となると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 迫田麻莉、四元淳子、山本佳世乃、川目裕. 新生児スクリーニング陽性・偽陽性という結果が親の心理社会面に与える影響に関する文献的検討. 日本遺伝カウンセリング学会誌 32 : 157-167, 2011
- 2) 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
- 3) Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, Habel A, Marino B, Oskarsdottir S, Philip N, Sullivan K, Swillen A, Vorstman J, International 22q11.2 Deletion Syndrome Consortium. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr* 159:332-9, 2011

2. 学会発表

- 1) 井上佳世, 玉井真理子, 関由起子, 井上洋士, 北村弥生, 長濱輝世, 丹明彦, 久地井寿哉, 石射いずみ, 柿沼章子, 大平勝美, 山本佳世乃, 川目 裕. 日本における血友病の遺伝カウンセリングの実情と課題. 第 35 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会. 京都, 2011 年 6 月
- 2) 金子実基子, 大橋博文, 篁倫子, 川目 裕. 染色体構造異常の保因者診断が本人と家族へ及ぼす心理的影響; 量的および質的研究. 第 35 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会. 京都, 2011

年 6 月

- 3) 朱肖捷, 川目 裕, 山本佳世乃. 多様な文化における遺伝カウンセリングの現状について. 第 35 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会. 京都, 2011 年 6 月
- 4) 山本佳世乃, 川目 裕. 遺伝性疾患に関わるクライアントへのライフストーリーインタビューの効果. 第 35 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会. 京都, 2011 年 6 月
- 5) 深野智華, 山本佳世乃, 川目 裕. 遺伝性疾患を有するクライアントや家族の遺伝情報に対する理解不足や誤解について. 第 35 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会. 京都, 2011 年 6 月
- 6) 安田有理, 山本佳世乃, 川目 裕. Fabry 病を有する成人患者における心理社会的問題に関する文献検討. 第 35 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会. 京都, 2011 年 6 月
- 7) 飯倉立夏, 山本佳世乃, 川目 裕 : Costello 症候群の摂食障害についての文献検討. 第 34 回日本小児遺伝学会, 横浜, 2011 年 8 月
- 8) 齋藤敦子, 山本佳世乃, 川目 裕 : 精神遅滞を合併する遺伝性疾患における問題行動の文献検討. 第 34 回日本小児遺伝学会, 横浜, 2011 年 8 月
- 9) 荒川経子, 奥原かおり, 鬼沢典朗, 川目 裕. 総合周産期母子医療センターにおける看護師としての認定遺伝カウンセラーの活動. 第 10 回日本遺伝学会学術集会, 東京, 2011 年 9 月
- 10) 岩柳実穂, 山本佳世乃, 川目 裕. DTC (Direct-to-Consumer) 遺伝子検査: 利用対象者の意識と現状についての文献的検討. 第 56 回日本人類遺伝学会大会. 千葉, 2011 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

先天異常症候群のアレイ CGH 解析

研究分担者 吳 繁夫 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野 教授

研究要旨

昨年度に引き続き、先天異常症の CGH マイクロアレイ解析によるゲノム・コピー数異常のスクリーニングを実施した。今年度は、先天性甲状腺機能低下症、舞踏病様不随意運動、反復性呼吸器感染症の症状の組み合わせから、Brain-thyroid-lung 症候群が疑われた症例におけるアレイ CGH法の有用性を報告する。本症例では、NKX2.1 遺伝子のエクソン・シーケンス解析では遺伝子変異を認めず、CGH アレイ解析で14番染色体q12-13領域にNKX2.1遺伝子を含む2.6Mbの欠失を認め、遺伝子診断が確定した。

研究協力者

菊池敦生、植松 貢

（東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野）

A. 研究目的

昨年度から先天異常が疑われる症例に対し、アレイ CGH 解析を実施している。今回、先天性甲状腺機能低下症、運動発達遅滞、舞踏病様不随意運動、反復性呼吸器感染症を呈する6歳女児の解析例を報告する。臨床症状からBrain-thyroid-lung 症候群が疑われたが、責任遺伝子であるNKX2.1遺伝子アレイ CGH 解析にてNKX2.1遺伝子の欠失を見出したので報告する。

B. 研究方法

患児の末梢血からゲノム DNA を抽出した。NKX2.1 遺伝子変異解析は、最初に全蛋白翻訳領域を PCR 法にて増幅し、直接シーケンス法にて行った。アレイ CGH 解析は、アジレント社製 Human Genome CGH マイクロアレイ 244k を用いてゲノム・コピー異常を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は、東北大学医学部倫理委員会の承認を受けており、解析にあたってはインフォームド・コンセントを書面で得た上で実施した。

C. 研究結果

【症例】6歳、女児。周産期、出産時に特に異常を認めなかった。甲状腺機能低下症の新生児スクリーニングの精査にて先天性甲状腺機能低下症との診断を受け、甲状腺ホルモン製剤の補充療法を続けている。知的発達は正常であるが、運動発達は遅れ、お座りは12カ月、独歩は38カ月で初めて可能になった。体幹部の筋緊張低下を認め、刺激時の舞踏病様不随意運動が著明であった。頭部 MRI 検査では異常を認めなかった。1歳6か月頃から、呼吸器感染症を繰り返すようになり、1年間で5回、市中病院へ入院している。両親に血族婚なく、同様な症状を示す家族もない（図1に家系図を示す）。

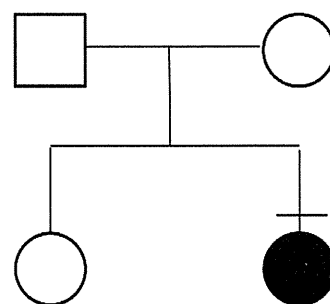


図1 Brain-thyroid-lung 症候群が疑われた女児の家系図

【遺伝子解析】

先天性甲状腺機能低下症、舞踏病様不随意運動、反復性呼吸器感染症の症状の組み合わせから、Brain-thyroid-lung 症候群が疑われ、エクソン・シークエンスによる、NKX2.1 遺伝子変異解析をおこなったが、変異を見出すことは出来なかった。そこで、アジレント社製 Human Genome CGH マイクロアレイ 244k を用いて、遺伝子コピー数異常を検索したところ、14q12-13 領域に 2.6Mb の欠失を認めた (図 1)。

D. 考察

Brain-thyroid-lung 症候群は、先天性甲状腺機能低下症、舞踏病様不随意運動、反復性呼吸器感染症を特徴とする遺伝性疾患で、常染色体優性遺伝を示す。今回の症例では、両親の遺伝子解析は実施出来なかったが、両親ともに無症状であることから、新規突然変異による 2.6Mb の欠失と考えられる。発症機序としては本症のように NKX2.1 遺伝子の全領域欠失する症例で本症を呈することから、ハプロ不全によるものと推察される。本症例では、遺伝子解析として通常行われているエクソン・シークエンスが実施されたが遺伝子変異を見出す事が出来なかった。そこで、遺伝子コピー数異常を疑い、アレイ CGH 解析を行い、遺伝子欠失を証明する事が出来た。

E. 結論

先天異常症の解析にアレイ CGH 解析は、有用な解析手段と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saito H, 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 in *RNF213* is the strong predictor for early-onset and severe form of Moyamoya disease. Neurology (in press)

- 2) Uematsu M, Haginoya K, Kikuchi A, Nakayama T, Kakisaka Y, Numata Y, Kobayashi T, Hino-Fukuyo N, Fujiwara I, Kure S. Hypoperfusion in caudate nuclei in patients with brain-lung-thyroid syndrome. J Neurol Sci (in press)
- 3) Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Stanier P, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Copp AJ, Greene NDE, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects. Hum Mol Genet (in press)
- 4) Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citr in deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. Mol Genet Metab (in press)

2. 学会発表

- 1) 植松貢、菊池敦生、沼田有里佳、福與なおみ、廣瀬 三恵子、萩野谷和裕、呉 繁夫、土屋滋 「尾状核の血流低下を認めた Brain-Thyroid-Lung 症候群の 3 例」 第 62 回北日本小児科学会、2011 年 9 月 11 日 (札幌)
- 2) 菊池敦生、市野井那津子、坂本 修、大浦敏博、佐伯武頼、小林圭子、松原洋一、呉 繁夫 「シトリン欠損症の簡便・迅速な遺伝子診断法の確立 ―感度の更なる改善と 2 年間の運用実績について―」 第 53 回日本先天代謝異常学会総会 2011 年 11 月 24-26 日、東京
- 3) 呉 繁夫、鎌田文顕、青木洋子、阿部裕、新堀哲也、小松崎匠子、菊池敦生、菅野潤子、土屋滋、松原洋一 「モヤモヤ病遺伝的要因の解明 ―疾患感受性遺伝子と創始者変異の同定」 第 114 回日本小児科学会学術集会、2011 年 4 月 15-17 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

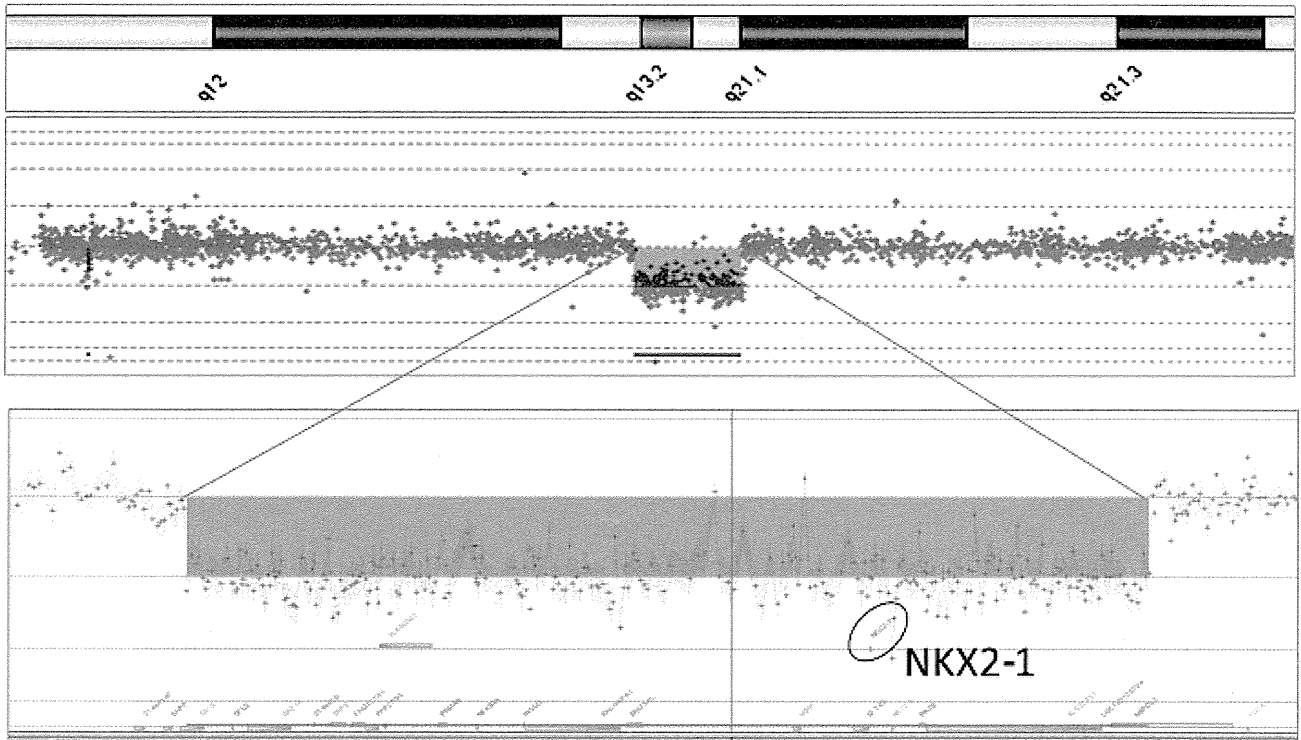


図 症例のアレイ CGH 解析の結果

NKX2.1 遺伝子を含む 14q12-13 領域の蛍光シグナル強度が、約半分に低下している。横軸は染色体上の位置、縦軸は蛍光シグナルの強度を示す。青色は対照検体よりシグナル強度が強い事を、赤色は対照検体よりシグナル強度が弱い事を示す。

難治性疾患克服のための遺伝子解析プラットフォーム設計

研究分担者 栗山進一 東北大学大学院医学系研究科分子疫学分野 教授

研究要旨

The Sanger Institute は、ヒトゲノム解析計画で世界の中で主導的な役割をはたし、現在もゲノム医科学研究において世界の三指にはいる施設として広く知られている。本研究の目的は、難治性疾患克服に資するため、The Sanger Institute を訪問して、その歴史、現状ならびに課題を明らかにすることである。2011年11月17日、イギリス Cambridge の The Sanger Institute を訪問し、施設の視察とともに Professor Michael R Stratton, Director 他と討論した。The Sanger Institute は、UK Biobank と同じく、Wellcome Trust 財団の出資によるゲノムに関する最先端研究施設のひとつである。ヒトゲノムプロジェクトではヒトゲノムのおよそ3分の1を解読し、大きな貢献をした。DNA の解析に関しては、科学的需要にこたえるために分析専門部署を作成し解析にあたっていた。また、解析チームは120人のスタッフが8つのチームに分けられ、DNA Pipelines の長が統括していた。イルミナのプロセッシングに50人、ジェノタイプングやマイクロアレイに13人、454/CEに15人割り当てており、また、パイプライン全体のサービスに23人、サンプル管理に13人をあてがっていた。特筆すべきは、DNA 解析部門専従の Informatics and Infrastructure 要員が25人おり、実働の解析部隊以外に必要な数の情報を扱うスタッフを準備していた点である。Sequencer は、HiSeq2000 27台、454FLX 3台、GAII 2台、ABI3730xL 10台、Ion torrent 2台、MiSeq 4台、PacBio RS 1台（一個の細胞から genome のシーケンスを行う）であった。膨大な数の Sequencer であり、近年は次世代シーケンサーの割合が過半数を占める。また、The Sanger Institute では、他のプロジェクトとの戦略的關係を取っていた。

研究協力者

なし

Professor Michael R Stratton, Director、Mr Stephen Masson, Head of Finance & Procurement、Dr Karen Kennedy, Head of Strategic Relations、Mrs Emma Millican, Head of DNA Pipelines、Dr Simon Kelley, Principal Systems Administrator、Dr David Jackson, Senior Scientific Manager、Dr Adrian Ibrahim, Head of Technology Transfer and Business Development と討論した。

A. 研究目的

The Sanger Institute は、ヒトゲノム解析計画で世界の中で主導的な役割をはたし、現在もゲノム医科学研究において世界の三指にはいる施設として広く知られている。本研究の目的は、難治性疾患克服に資するため、The Sanger Institute を訪問して、その歴史、現状ならびに課題を明らかにすることである。

B. 研究方法

2011年11月17日、イギリス Cambridge の The Sanger Institute を訪問し、施設の視察とともに Dr Don Powell, Media, PR & Communications Manager、

C. 研究結果

The Sanger Institute は、UK Biobank と同じく、Wellcome Trust 財団の出資によるゲノムに関する最先端研究施設のひとつである。ヒトゲノムプロジェクトではヒトゲノムのおよそ3分の1を解読し、大きな貢献をした。

The Sanger Institute の主要な研究は、ヒト遺伝

子の配列変異を識別し、特定の変異体が健康と疾病に与える影響を解析することである。The Sanger Institute は Dr. Fred Sanger にちなんで名づけられた。Dr Sanger は、ノーベル賞を 2 度受賞し、ヒトゲノムプロジェクトで使われている DNA シーケンシングを考案した人物である。

視察の際に対応していただいた所長の Professor Stratton 自身の言によれば、シーケンサの数でみた場合、中国 BGI、米国 Broad に次いで世界 3 番目の規模とのことであった。ただし言外に、研究内容では世界最高であるとの自負を読み取れた。

Sanger Institute における検体は Human Genetics、Mouse and Zebrafish Genetics、Pathogen Genetics のテーマに絞って行われていた。

DNA の解析に関しては、科学的需要にこたえるために分析専門部署を作成し解析にあたっていた。また、解析チームは 120 人のスタッフが 8 つのチームに分けられ、DNA Pipelines の長が統括していた。イルミナのプロセッシングに 50 人、ジェノタイプングやマイクロアレイに 13 人、454/CE に 15 人割り当てており、また、パイプライン全体のサービスに 23 人、サンプル管理に 13 人をあてがっていた。特筆すべきは、DNA 解析部門専従の Informatics and Infrastructure 要員が 25 人おり、実働の解析部隊以外に必要な数の情報を扱うスタッフを準備していた点である。

Sequencer は、HiSeq2000 27 台、454FLX 3 台、GAII 2 台、ABI3730xL 10 台、Ion torrent 2 台、MiSeq 4 台、PacBio RS 1 台（一個の細胞から genome のシーケンシングを行う）であった。膨大な数の Sequencer であり、近年は次世代シーケンサーの割合が過半数を占める。また、The Sanger Institute では、他のプロジェクトとの戦略的關係を取っていた。1000 genomes、Genome reference Consortium、European Bioinformatics Institute (EBI) などであり、iPS、トランスレーショナル・リサーチにも積極的に進出していた。

科学的なアウトプットとして、以下を行っている。

①1,600 以上の library clone、vector を供出、②4,000 以上の ES (Embryonic stem) 細胞を供出、③

700 種の zebrafish (変異あり) を供出、④600 種のマウスを供出。

D. 考察

The Sanger Institute 視察の結果、ゲノム医科学研究施設の設計に当たっては、以下の点に留意すべきであることが明らかとなった。

①人件費に多くの経費を使う。

②IT 部門も多くの経費を必要とする。

③The Sanger Institute の建物はどれも美しく機能的であり建築コンペを行ったと聞いた。もし時間的余裕があるならコンペを行い選考に時間をかけたい。

④The Sanger Institute が 20 年かけて到達したレベルに数年で追いつくにはかなりの困難が伴うと予想されるが、参加者各人の覚悟次第で不可能ではないと考える。

⑤データストレージのバックアップ先について

The Sanger Institute では、バックアップ先を異なる大陸にしているとした。東北大学でもデータについてはどこかと提携し、自然災害リスクなどが異なる地域に設置する必要があると考えられる。特に電源喪失リスクへの対応が必要と考えられる。

⑥データセンターの機材は冷却を行う必要があり、2 階吹き抜け構造が必要とされていた。メンテナンスの容易さ、冷却効率を保つためにも、エアフローに留意し、余裕のある構造が必要であると考えられた。

⑦解析機器は同じ品番のものを複数個並列で導入し、また、折を見て入れ替え・廃棄を行っていた。数年後に新技術を導入した機材が開発されるときに入れ替える可能性を考えながら施設設計並びに予算を立てる必要があると思われた。

⑧検体解析に比較して IT 周りの役割分担に関してはあまり組織立っていないようであった。優秀なスタッフを中心に臨機応変に対応している様相であった。こちらのガバナンスに関しては他の IT センターを参考にしようがよいと思われた。

⑨単なるバンクで終わらせるのか、更なる発展を考えるのかを常に考えなければいけない。サンプルの供与も重要な役割となろうが、常に一歩先行く研究結果、情報を出し続けなければならない。

⑩ゲノム医科学研究施設として発展させるためには、

faculty の厳選とそれを支える statistician, technician, IT person の充実が必要である。The Sanger Institute の人員の内訳 (staff の数が faculty の数の 20 倍以上) はたいへん参考になろうかと思う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	J Hum Genet	(accepted)		
Fukami M*, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T	Heterozygous cryptic deletion in the SOX9 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula.	Am J Med Genet A	(accepted)		
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
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	Epub ahead of print		2012
Soneda A, Teruya H, Furuya N, Yoshihashi H, Enomoto K, Ishikawa A, Matsui K, Kurosawa K.	Proportion of malformations and genetic disorders among cases encountered at a high-care unit in a children's hospital.	Eur J Pediatr.	171	301-305	2012
Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takanashi JI, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J.	Novel intragenic duplications and mutations of CASK in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH).	Hum Genet.	131	99-110	2012

Uematsu M, Haginoya K, Kikuchi A, Nakayama T, Kakisaka Y, Numata Y, Kobayashi T, Hino-Fukuyo N, Fujiwara I, Kure S.	Hypoperfusion in caudate nuclei in patients with brain–lung–thyroid syndrome.	J Neurol Sci	Epub ahead of print		2011
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.	Epub ahead of print		2011
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	Epub ahead of print		2011
Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N.	MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome	Am J Med Genet A	Epub ahead of print		2011
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
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
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, Niijima 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

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
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
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
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
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
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
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
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
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

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
Sasaki K, Okamoto N, Kosaki K, Yorifuji T, Shimokawa O, Mishima H, Yoshiura KI, Harada N.	Maternal uniparental isodisomy and heterodisomy on chromosome 6 encompassing a CUL7 gene mutation causing 3M syndrome.	Clin Genet	80	478-483	2011
Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N.	A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty.	Am J Med Genet A.	155	409-414	2011
Okamoto N, Hatsukawa Y, Shimojima K, Yamamoto T.	Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PHPV.	Am J Med Genet A.	155	1568-1573	2011
Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Kosho T.	Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients.	Am J Med Genet A.	155A	1949-1958	2011
Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N.	Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy.	Clin Genet.	80	161-166	2011
Okamoto N, Tamura D, Nishimura G, Shimojima K, Yamamoto T.	Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay.	Am J Med Genet A.	155	2997-3001	2011
Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J.	Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies	J Hum Genet.	56(2):	110-124	2011

Seiji Mizuno, Daisuke Fukushi, Reiko Kimura, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Toshiyuki Kumagai, Nobuaki Wakamatsu	Clinical and genomic characterization of siblings with a distal duplication of chromosome 9q (9q34.1-qter)	Am J Med Genet A,	155 (9)	224-2280	2011
Liang JS, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, Imai K, Okanishi T, Mizuno S, Okumura A, Sugawara M, Ito T, Ikeda H, Takahashi Y, Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T.	CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders.	Epilepsia	52(10):	1835-42	2011
Hirai N, Matsune K, Ohashi H.	Craniofacial and oral features of Sotos syndrome: differences in patients with submicroscopic deletion and mutation of NSD1 gene	Am J Med Genet A.	155A	2933-9	2011
Matsumoto Y, Miyamoto T, Sakamoto H, Izumi H, Nakazawa Y, Ogi T, Tahara H, Oku S, Hiramoto A, Shiiki T, Fujisawa Y, Ohashi H, Sakemi Y, Matsuura S.	Two unrelated patients with MRE11A mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly.	DNA Repair	10	314-21	2011
Sakazume S, Ohashi H, Sasaki Y, Harada N, Nakanishi K, Sato H, Emi M, Endoh K, Sohma R, Kido Y, Nagai T, Kubota T.	Spread of X-chromosome inactivation into chromosome 15 is associated with Prader-Willi syndrome phenotype in a boy with a t(X;15)(p21.1;q11.2) translocation.	Hum Genet	131	121-30	2011

(作成上の留意事項)

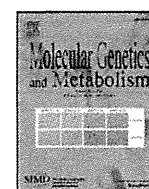
1. 「研究成果の刊行に関する一覧表」に記入した書籍又は雑誌は、その刊行物又は別刷り一部を添付すること。
2. 研究報告書（当該報告書に含まれる文献等を含む。以下本留意事項において同じ。）は、国立国会図書館及び厚生労働省図書館並びに国立保健医療科学院ホームページにおいて公表されるものであること。研究者等は当該報告書を提出した時点で、公表について承諾したものとすること。
3. 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。各項目の記入量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして差し支えない。

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgmeSimple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in *SLC25A13*Atsuo Kikuchi ^{a,*}, Natsuko Arai-Ichinoi ^a, Osamu Sakamoto ^a, Yoichi Matsubara ^b, Takeyori Saheki ^{c,1}, Keiko Kobayashi ^d, Toshihiro Ohura ^e, Shigeo Kure ^a^a Department of Pediatrics, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8574, Japan^b Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8574, Japan^c Institute for Health Sciences, Tokushima Bunri University, 180 Yamashiro-cho, Tokushima 770-8514, Japan^d Department of Molecular Metabolism and Biochemical Genetics, Kagoshima University, Kagoshima 890-8544, Japan^e Division of Pediatrics, Sendai City Hospital, 3-1 Shimizukoji, Wakabayashi-ku, Sendai, Miyagi 984-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2011

Received in revised form 29 December 2011

Accepted 30 December 2011

Available online xxxx

Keywords:

Citrin deficiency

Genetic diagnosis

Rapid diagnosis

Expanded newborn screening

SLC25A13

ABSTRACT

Citrin deficiency is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the *SLC25A13* gene and has two disease outcomes: adult-onset type II citrullinemia and neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency. The clinical appearance of these diseases is variable, ranging from almost no symptoms to coma, brain edema, and severe liver failure. Genetic testing for *SLC25A13* mutations is essential for the diagnosis of citrin deficiency because chemical diagnoses are prohibitively difficult. Eleven *SLC25A13* mutations account for 95% of the mutant alleles in Japanese patients with citrin deficiency. Therefore, a simple test for these mutations is desirable. We established a 1-hour, closed-tube assay for the 11 *SLC25A13* mutations using real-time PCR. Each mutation site was amplified by PCR followed by a melting-curve analysis with adjacent hybridization probes (HybProbe, Roche). The 11 prevalent mutations were detected in seven PCR reactions. Six reactions were used to detect a single mutation each, and one reaction was used to detect five mutations that are clustered in a 21-bp region in exon 17. To test the reliability, we used this method to genotype blind DNA samples from 50 patients with citrin deficiency. Our results were in complete agreement those obtained using previously established methods. Furthermore, the mutations could be detected without difficulty using dried blood samples collected on filter paper. Therefore, this assay could be used for newborn screening and for facilitating the genetic diagnosis of citrin deficiency, especially in East Asian populations.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Citrin deficiency is an autosomal recessive disorder that results from mutations in the *SLC25A13* gene [1] and causes two diseases: adult-onset type II citrullinemia (CTLN2; OMIM #603471) and neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency (NICCD; OMIM#605814) [1–4]. The clinical appearance of these diseases is variable and ranges from almost no symptoms to coma, brain edema, and severe liver failure requiring transplantation [5–8]. In a study of patients with NICCD, only 40% of individuals were identified by newborn screenings to have abnormalities, such as hypergalactosemia, hypermethioninemia, and hyperphenylalaninemia [9]. Other

patients were referred to hospitals with suspected neonatal hepatitis or biliary atresia, due to jaundice or discolored stool [9]. Hypercitrullinemia was not observed in all patients [9]. Mutation analysis of *SLC25A13* is indispensable because of the difficulties associated with the chemical diagnosis of citrin deficiency. The *SLC25A13* mutation spectrum in citrin deficiency is heterogeneous, and more than 31 mutations of *SLC25A13* have been identified to date [1,10–18]. However, there are several predominant mutations in patients from East Asia. As shown in Table 1, 6 prevalent mutations account for 91% of the mutant alleles in the Japanese population [12,19]. Five additional mutations also occur within a 21-bp cluster in exon 17 (Table 1 and Fig. 1D). The six prevalent mutations, together with the five mutations in exon 17, account for 95% of the mutant alleles in Japan [12,19].

Several different methods, such as direct sequencing, PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), are currently used for the detection of mutations in *SLC25A13* [1,10–14,19]. However, these methods are too complex for clinical use. Direct sequencing is a standard but cumbersome method. The PCR-RFLP method is

Abbreviations: CTLN2, adult-onset type II citrullinemia; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HRM, high resolution melting; NICCD, neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency; Tm, melting temperature.

* Corresponding author. Fax: +81 22 717 7290.

E-mail address: akikuchi-thk@umin.ac.jp (A. Kikuchi).¹ Present address: Institute of Resource Development and Analysis, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan.

1096-7192/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ymgme.2011.12.024

Please cite this article as: A. Kikuchi, et al., Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in *SLC25A13*, *Mol. Genet. Metab.* (2012), doi:10.1016/j.ymgme.2011.12.024

Table 1
Seven primer/probe sets and 11 targeted mutations of *SLC25A13*.

Primer/probe set	Mutation	Location	Nucleotide change	Effects of mutations	Allele frequency ^a [19]	References	
A	Mutation [I]	:851del4	exon 9	c.851_854delGTAT	p.R284fs(286X)	33.2%	[1]
B	Mutation [II]	:g.IVS11+1G>A	intron 11	c.1019_1177del	p.340_392del	37.6%	[1]
C	Mutation [III]	:1638ins23	exon 16	c.1638_1660dup	p.A554fs(570X)	3.4%	[1]
D	Mutation [IV]	:S225X	exon 7	c.675C>A	p.S225X	5.3%	[1]
E	Mutation [V]	:g.IVS13+1G>A	intron 13	c.1231_1311del	p.411_437del	8.2%	[1]
F	Mutation [XIX]	:IVS16ins3kb	intron 16	c. aberrant RNA	p.A584fs(585X)	4.6%	[19]
G	Mutation [VI]	:1800ins1	exon 17	c.1799_1800insA	p.Y600X	1.3%	[10]
	Mutation [VII]	:R605X	exon 17	c.1813C>T	p.R605X	0.90%	[10]
	Mutation [VIII]	:E601X	exon 17	c.1801G>T	p.E601X	1.2%	[11]
	Mutation [IX]	:E601K	exon 17	c.1801G>A	p.E601K	0.30%	[11]
	Mutation [XXI]	:L598R	exon 17	c.1793T>G	p.L598R	0%	[15]
					Total 95.1%		

* The frequency of each mutant allele among Japanese patients with citrin deficiency.

complicated and can lead to genotyping errors, due to incomplete digestion by the restriction enzymes. DHPLC is time-consuming and requires expensive equipment. Thus, there is a strong need for the development of a simple test for these mutations.

The goal of this study was to establish a rapid and simple test for the detection of the 11 most common *SLC25A13* mutations. We adopted the HybProbe format (Roche) for the detection of the mutations using real-time PCR followed by a melting-curve analysis with adjacent hybridization probes [20,21]. This assay can be completed in less than 1 h and has the advantage of being a closed-tube assay. The fundamental process for detecting point mutations using the HybProbe assay is presented in Fig. 1A. The 11 prevalent mutations contain not only point mutations but also include a 4-bp deletion and insertions of 1-bp, 23-bp and 3-kb genomic fragments (Table 1 and Fig. 1). Careful design of the PCR primers and HybProbes enabled us to test for these various *SLC25A13* mutations.

2. Methods

2.1. Subjects

CTLN2 and NICCD were diagnosed, as previously described [9,10,19,22–24]. Genomic DNA of the patients was obtained from peripheral blood leukocytes using the DNeasy blood kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Genomic DNA was purified from filter paper blood samples using the ReadyAmp Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Mutations in these DNA samples

were analyzed at Kagoshima University using a combination of PCR with or without restriction enzyme digestion or by direct sequencing, as previously described [1,10–14,19]. Another set of samples was obtained from 420 healthy volunteers (mainly from Miyagi prefecture in the northeastern region of Japan) at Tohoku University. Genomic DNA from leukocytes was extracted, as described above.

2.2. Detection of seven prevalent mutations in *SLC25A13* using the HybProbe assay

HybProbe probes comprise a pair of donor and acceptor oligonucleotide probes designed to hybridize adjacent to their target sites in an amplified DNA fragment [20,21]. The donor probes are labeled at their 3' end with fluorescein isothiocyanate (FITC), whereas the acceptor probes are labeled at their 5' end with LC Red640; these acceptor probes are phosphorylated at their 3' end to prevent extension by the DNA polymerase. When two probes hybridize to the amplicon, the fluorescent dyes are located within 5 bases of each other, which allows fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the excited FITC and the LC Red640; this process emits light that can be quantified by real-time PCR. Following PCR amplification, a melting-peak analysis is performed. The melting peak is produced by the reporter probe, which has a lower melting temperature (T_m) than the other probe, called the anchor probe. As the reporter melts from the target, the fluorophores are separated, and the FRET ceases. The T_m of the reporter probe determines the reaction

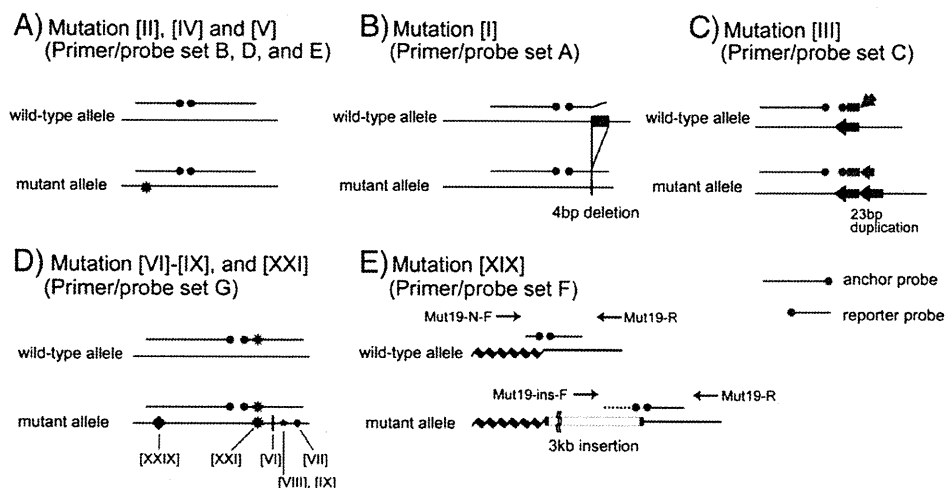


Fig. 1. Principle of *SLC25A13* mutation detection by melting-curve analysis with the HybProbe assay. In primer/probe sets A–E, and G, PCR was performed with a pair of primers, whereas in primer/probe set F, two forward primers and one common reverse primer were used for the amplification of both wild-type and mutant alleles. Note that mutation [XXIX], located on the anchor probe of primer/probe set C, is a non-target mutation.

Please cite this article as: A. Kikuchi, et al., Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in *SLC25A13*, Mol. Genet. Metab. (2012), doi:10.1016/j.ymgme.2011.12.024