

with CHD7 mutations. Am J Med Genet A. 158A(3):514-8.2012

- 9) Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J. Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes with marked midface retrusion. J Hum Genet. 57(3):191-6.2012
- 10) Kasahara M, Sakamoto S, Kanazawa H, Karaki C, Kakiuchi T, Shigeta T, Fukuda A, Kosaki R, Nakazawa A, Ishige M, Nagao M, Shigematsu Y, Yorifuji T, Naiki Y, Horikawa R. Living-donor liver transplantation for propionic acidemia. Pediatr Transplant. 16(3):230-4.2012

2. 学会発表

- 1) Shimizu A, Torii C, Suzuki N, Mutai J, Kudoh H, Kosaki R, Mmatsunaga T, Kosaki K. Rapid and efficient mutation in the hundreds of target genes by bench-top next generation sequencer with custom target capture method. American Society of Human Genetics, 2012
- 2) Kosaki R, Takeuchi T, Torii C, Nishina S, Kosaki K. Concurrent deletion of BMP4 and OXT2 genes: Clinical evidence of synergistic effect of the two master genes in ophthalmogenesis. American Society of Human Genetics, 2012
- 3) 鳥居千春 丸岡亮 清水厚志 小崎里華 小崎健次郎: 次世代シーケンサーを用いた先天奇形症候群の網羅的診断 第52回 日本先天異常学会 2012. 7.6
- 4) 三須久美子 桐林和代 佐谷秀行 鳥居千春 小崎里華 小崎健次郎: 神経線維腫症1型の遺伝様式に関する患者家族の誤解の類型化 第36回 日本遺伝カウンセリング学会 2012 6.10
- 5) 岡田朋美 佐々木愛子 黒田くみ子 上田英梨子 江川真希子 杉林里桂 住江正大 李紅蓮 藤田秀樹 小崎里華 左合治彦: 成育医療研究センターにおける周産期遺伝カウンセリング体制 第36回 日本遺伝カウンセリング学会 2012 6.9
- 6) 武内俊樹 下郷幸子 山崎麻美 小崎里華 小崎健次郎 高橋高雄: LICAM 変異により発症した先天性水頭症と Hirshprung 病の合併例 第54回 日本小児神経学会総会 2012.4.19

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく
有病率調査および DNA バンク・iPS 細胞の確立
分担研究報告書

大阪府立母子保健総合医療センターでの VATER 症候群の臨床的検討

研究分担者 岡本伸彦
大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科

研究要旨

当科で診療を行った VATER 症候群 15 症例について検討を行った。昨年度作成したフォローアップガイドラインを利用して合併症のチェックを行った。今後も長期的に継続してガイドラインに従った医学的評価や長期フォローを行う予定である。ガイドラインについては今後追加修正を行う方針である。

共同研究者

大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科
大町和美、山本悠斗、井上佳世、三島祐子

A. 研究目的

大阪府立母子保健総合医療センター（以下当センター）ののような小児の総合医療機関では VATER 症候群をはじめとする多発先天異常症例を多数例診療している。VATER 症候群は、V: Vertebral defects 椎体異常、A: Anal atresia 肛門奇形（鎖肛など）、TE: Tracheoesophageal fistula with Esophageal atresia 気管食道瘻、R: Renal or Radial defects 腎奇形あるいは橈骨奇形という 5 徴候の頭文字の組み合わせに由来する。C: Cardiac anomalies を含めて VACTER 症候群と称する場合もある。

VATER 症候群は、新生児期より、呼吸・循環、消化器、腎泌尿器、運動器など多系統の症状・所見を呈する。多くの例で数回以上にわたって外科手術を必要とし、栄養管理、感染対策、リハビリテーションなどの慢性的かつ持続的な医学管理を要する。合併症の内容によっては排便機能障害や上肢機能障害など生活面での長期にわたる課題が生じる。長期間にわたり、多くの診療科の関与が必要である。VATER 症候群は新生児期、乳児期、幼児期、学童期、成人期と問題点も変遷する。長期的な面ではまだ不明な点も少なくない。VATER 連合症候群の患児を育てる親にとって、日常生活での注意点、合併症の予後予測は重要な点である。

VATER 症候群が、新生児期より、呼吸・循環、消化器、腎泌尿器、運動器など多系統障害を呈する疾患であるため、早期総合的診断、専門的な診療体制を構築することが目標である。本研究班においては平成 22 年度には VATER 症候群の有病率を推測し、VATER 症候群は出生 2 万から 3 万人に 1 人の有病率との推測値をだした。平成 23 年度には VATER 連合症候群の患児の健康管理に役立てるためにフォローアップガイド

ラインを作成した。今後の研究の進展や内外の文献資料、他の専門医師、他職種や患者家族の意見を取り入れて内容を適宜更新し、有用性を高めることを今後課題とした。平成 24 年度は VATER 症候群の当センターにおける実際の診療状況をまとめた。フォローアップガイドラインに従った医学的評価、フォローを実施した。

B. 研究方法

検討対象は、遺伝診療科で成長発達の評価や合併症の評価を実施した、VATER 症候群 15 例である。現時点では VATER 症候群については明確な診断基準が存在しないが、主要な症状を 3 個以上呈し、染色体異常症や他の疾患を除外したものを VATER 症候群と診断した。

合併症のチェックについては昨年度作成したフォローアップガイドラインを用いた。

C. 研究結果

1) 臨床像

臨床像の性別・年齢・出生時体重を検討した。その内訳は、男 10 人と女 5 人で男女比はほぼ 2 対 1 であった。年齢は、0 歳から 22 歳までであり、年齢別には、1 歳までが 5 人、1 歳以上 6 歳までが 5 人、6 歳以上が 7 人であった。出生時体重においては、出生体重が 1000 g 未満の超低出生体重児が 2 人、低体重児が 7 人、2500g 以上の児が 8 人であった。生後すぐから NICU にて集中治療をうける例が多かった。人工呼吸管理を要する例も多かった。

(V) 椎体異常は、15 人全員に認められた。脊柱側彎は、女性 80%、男性 40%に、椎体癒合は、女性 60%、男性 10%と男女差が認められた。診断の契機は循環器や消化器系の問題があった場合に実施した新生児期の胸腹部の XP で早期に診断された例が多かった。一部の症例は経過観察上での精査目的での評価で診断した。椎体異常を認めた場合、整形外科を受診し、コルセット装着などの治療を受ける例もあった。

(A) 鎖肛は、男女ともに 80%以上でみられ、15 人中 13 名で合併がみられた。女性は高位鎖肛と低位鎖肛が 40%ずつであるが、男性では中間位 50%、高位 30%、低位 10%の順となった。当センターは大阪府下の新生児外科症例が多数集積することから、鎖肛症例が多く紹介される傾向にある。手術および術後の管理は小児外科でうけた。人工肛門についてはストマ外来で専門的な管理をうけた。

(C) 心疾患は、15 人中 14 名にみられた。VSD、ASD、ファロー 4 徴症など各種の心奇形がみられた。肺高血圧症もあった。当センターは大阪府下の新生児外科症例が多数集積することから、先天性心疾患症例が多く集積する傾向にある。心臓血管外科において手術治療をうけた。VACTER 症候群に該当する例が多かった。

(TE) 気管食道瘻など消化管奇形においては C 型食道閉鎖が男性の 50%に、女性の 20%で認められた。一部に十二指腸閉鎖や腸回転異常の例もみられた。鎖肛と同様、小児外科で新生児期早期に手術をうけ、術後のフォローもうけていた。

(R) 橈骨奇形は、男女ともに 60%を占めていた。上肢奇形に左右差はなかった。四肢異常では、爪の形成異常や左右脚長差がみられた例があった。整形外科において専門的な外科治療を受け、術後のリハビリテーションをうけた。

腎臓に関して、膀胱尿管逆流が 60%の男性にみられた。男性 10 人中 3 人で尿道下裂が認められた。

その他の合併症：先天性、出血性のケースも含め、水頭症を認めたのは女性 2 例であった。妊娠中、羊水過多も過小も共に認められた。

2) 身体発育と心理発達面

男子例の身長 SD 値の平均は $-1.8SD(-4.3 \sim -0.5)$ 、同体重 $-1.8SD(-3.9 \sim -0.2)$ 、同頭囲 $-1.2SD(-2 \sim -0.4)$ で、女子例の身長 SD 値の平均は $-1.6SD(-3.3 \sim -0.2)$ 、同体重 $-1.5SD(-2.3 \sim -0.6)$ 、同頭囲 $0.1SD(-1.3 \sim 1.7)$ であった。身長体重の増加不良に比べて、頭囲は保たれる傾向があった。心理発達テスト実施例 9 例中、DQ70 以下の精神発達遅滞が 9 名中 2 名認められた。1 例は自閉症と重度の知的障害を合併した。この原因は不明である。

3) 分子遺伝学的検査

全症例で染色体検査を行ったが、G 分染法では異常は認めなかった。マイクロアレイ検査を行った例もあったが異常は認めなかった。

Fanconi 貧血の合併例はなかった。

D. 考察

VATER 症候群の多くは気管食道瘻や食道閉鎖、鎖肛や先天性心疾患を合併するため、新生児集中治療室に加えて、小児外科や心臓血管外科の専門的診療体制を持つ医療機関での入院治療が必要となる。脊椎奇形や四肢異常を伴うため、整形外科の治療が行われる。橈骨列に異常に対しては、小児の手指の外科を実施できる専

門的な治療体制が求められる。小児科における成長発達面のフォローも重要である。VATER 症候群は小児専門病院など広域的に対応できる医療機関において、専門診療科の連携のもとに包括的な診療体制が必要な代表的な疾患である。

VATER 症候群においては、先天異常の専門医の診療も必須である。新生児期早期に鑑別診断のために Dymorphology (異常形態学) 的な考察を行うことが診断過程に求められる。染色体異常症や CHARGE 症候群など鑑別診断を行う。VATER 連合症候群の確定にいたらず、原因不明の先天異常症候群として診断が確定してない例もある。

主要症状への対応だけでなく、可能性のある多様な病態に対応するためには早期診断と必要な検査の実施が求められる。平成 23 年度には VATER 症候群の患児の健康管理に役立てるためにフォローアップガイドラインを作成した。各症例において予想される問題点について、ガイドラインに従った医学的評価や長期フォローを行う必要がある。ガイドラインについては今後追加修正を行う方針である。

染色体検査など、分子遺伝学的検査では一定の異常は認められなかった。四肢異常の全くない例や知的障害の強い例など、非典型的な症例もみられ、VATER 症候群の中でも、多様性が示唆された。通常実施される G 分染法による染色体検査では異常の検出率は 3%程度である。病因についてはマイクロアレイや次世代シーケンサーによる解析が必要と考えられる。今後も解析を継続する方針である。

E. 結論

大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科で診療を行った、VATER 症候群 15 例の臨床的検討を行った。ガイドラインの有用性、妥当性について今後時間をかけて検討を行う方針である。

参考文献

- 1) Solomon BD, Bear KA, Kimonis V, de Klein A, Scott DA, Shaw-Smith C, Tibboel D, Reutter H, Giampietro PF. Clinical geneticists' views of VACTERL/VATER association. *Am J Med Genet A*. 2012;158A:3087-100.
- 2) B.D.Hall :VATER/VACTERL association: Management of Genetic Syndrome,3rd ed, Willey-Liss, New Jersey,pp871-879,2010
- 3) B.D.Solomon VATER/VACTERL association *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2011;6;56

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 2012. 131: 99-110
- 2) Misako Naiki, Seiji Mizuno, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Reiko Kimura, Makoto Oshiro, **Nobuhiko Okamoto**, Yoshio Makita, Mariko Seishima, and Nobuaki Wakamatsu MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome. *Am J Med Genet.* 2012. 158A: 97-102
- 3) Yukiko Kawazu, Noboru Inamura, Futoshi Kayatani, **Nobuhiko Okamoto**, Hiroko Morisaki Prenatal complex congenital heart disease with Loeys–Dietz syndrome. *Cardiology in the Young.* 2012. 22: 116-119
- 4) 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, Kawachi 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.* 2012. 78: 803-810
- 5) Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, **Okamoto N**, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *Am J Med Genet A.* 2012. 158A: 514-518
- 6) 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. 44: 376-378
- 7) Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, **Okamoto N**, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J. The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. *Am J Med Genet A.* 2012. 158A: 1292-1303
- 8) Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, **Okamoto N**, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y. Costello and CFC syndrome study group in Japan. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A.* 2012. 158A: 1083-1094
- 9) Shimojima K, **Okamoto N**, Suzuki Y, Saito M, Mori M, Yamagata T, Momoi MY, Hattori H, Okano Y, Hisata K, Okumura A, Yamamoto T. Subtelomeric deletions of 1q43q44 and severe brain impairment associated with delayed myelination. *J Hum Genet.* 2012. 57: 593-600
- 10) Shimojima K, Mano T, Kashiwagi M, Tanabe T, Sugawara M, **Okamoto N**, Arai H, Yamamoto T. Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a duplication-inverted triplication-duplication in chromosomal segments including the PLP1 region. *Eur J Med Genet.* 2012. 55: 400-403
- 11) Wada Y, Kadoya M, **Okamoto N**. Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. *Glycobiology.* 2012. 22: 1140-1144
- 12) Takanashi J, **Okamoto N**, Yamamoto Y, Hayashi S, Arai H, Takahashi Y, Maruyama K, Mizuno S, Shimakawa S, Ono H, Oyanagi R, Kubo S, Barkovich AJ, Inazawa J. Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:3112-8

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく
有病率調査および DNA バンク・iPS 細胞の確立
分担研究報告書

VATER症候群と表現形が重複するBRESEK症候群に関する研究

研究分担者 水野誠司
愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部長

研究要旨

重度脊椎奇形を有する先天奇形症候群で原因遺伝子が同定されているものは少ない。VATER 症候群(VATER 連合)は椎骨異常(Vertebrae anomalies)の他、肛門奇形(Anal atresia)、気管食道瘻(Tracheoesophageal fistula)、橈骨奇形および腎奇形(Radial and Renal dysplasia)の5徴候を主徴とし、心奇形(Cardiac anomaly)と橈骨以外の四肢異常(Limb anomalies)を合わせ持つ場合に VACTERL 症候群と称する。複数の臓器において先天異常が発症する機序は不明であり、その発生病態の解明が待たれている。

BRESEK 症候群は重度脊椎奇形を伴う数少ない先天奇形症候群の一つであり、VATER/VACTERL 症候群の主徴と重複する大奇形を有する症候群である。我々は重度の脊椎奇形と内臓奇形を有する BRESEK 症候群の原因が *MBTPS2* 遺伝子のミスセンス変異であることを報告した。小胞体ストレスの関与する先天異常症候群は知見が少なく今後脊椎奇形を伴う奇形症候群の発生病態の解明に寄与する可能性もある。その男児症例の臨床像を提示した。

研究協力者

小崎健次郎（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）

A. 研究目的

VATER 症候群は、V=椎体異常、A=肛門奇形、TE=気管食道瘻、R=橈骨奇形および腎奇形という5徴候の頭文字の組み合わせで命名された症候群である。本症候群において複数の臓器において先天異常が発症する機序は不明であるが、異常を持つ臓器の発症時期の多くが胎生期の初期（原腸形成期）であることから、この時期に胎児の広い範囲に障害が起きていると推測されているが、その発症機序は不明であり、その発生病態の解明が待たれている。

従来重度脊椎奇形を有する先天奇形症候群に染色体異常がある率は少ないと言われるように、脊椎奇形に内部奇形を合わせ持つ先天異常症候群は少ない。例えば脊椎奇形と腎奇形を検索語句として OMIM で疾患検索をすると僅かに VATER 症候群を含む14疾患だけである。

今回、この14疾患の一つで脊椎奇形と腎泌尿器奇形を合併する BRESEK 症候群の男児例を経験した。

BRESEK 症候群は、1996年に Reish らが報告した、全身の無毛と落屑、脊椎奇形、精神遅滞、発達障害、耳介奇形、眼奇形、脳奇形、Hirschsprung 病、小精巣、腎奇形を呈する多発奇形/精神遅滞症候群であり、合併奇形の頭文字から BRESEK または BRESHECK Syndrome と提唱した。その後現在まで4つの症例報告があり、その原因は未解明であった。

私どもは BRESEK 症候群の1男児例を経験し、

その原因が *MBTPS2* 遺伝子のミスセンス変異であることを報告した。

本症の臨床像について報告し脊椎奇形をもつ先天異常症の鑑別診断の一つとして検討する。

B. 研究方法

愛知県心身障害者コロニー中央病院小児内科を受診中の患児を対象として、過去の病歴録および患者家族からの聞き取り調査から患児の新生児期から現在に至るまでの身体所見、成長発達記録と合併症について記載した。

（倫理面への配慮）

今回の調査は、後方視的な観察調査であり患児の個人名が特定されることはない。患者らは未成年であるため、情報の収集に際しては代理人である両親に対して説明を行い同意を得た上で、個人情報の保護の観点から患者氏名が特定されることのないように留意した。

C. 研究結果

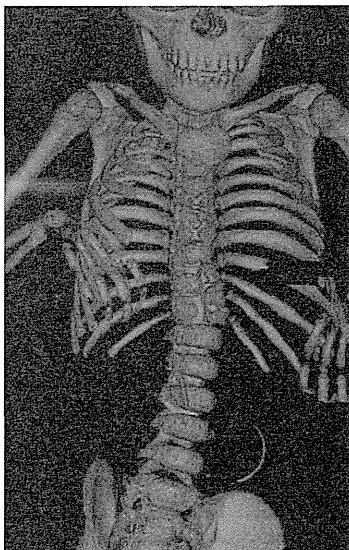
【臨床経過】

近親婚のない健康な父母（ともに31歳）から出生した第1子。妊娠中に子宮内胎児発育遅延と羊水過小を指摘されていた。在胎38週0日骨盤位のために予定帝王切開で出生。出生体重1996g(-2.5SD)、身長44cm(-2.4SD)、頭囲32.5(-0.7SD)。Apgar 4(1') 8(5')。全身無毛で皮膚

は発赤していた。外性器では性別が確定できなかった。多発奇形と喘鳴のため NICU へ転送された。出生時から皮膚は発赤し落屑が著しく、頭髮、眉毛、睫毛含む全身の体毛が無い。新生児期から側弯があり、X 線診断で脊椎奇形が疑われた。外性器は停留精巣と尿道下裂がある。生後 2 週間頃から腹部膨満、嘔吐がつづき直腸生検でヒルシュスプルング病と診断され、生後 2 ヶ月時に人工肛門造設術を行う。先天性喘鳴が続いていたが、生後 5 ヶ月時に気管内挿管にて声門下腔狭窄と気管分岐異常の診断を受け、8 ヶ月時に気管切開術。生後 10 ヶ月頃からてんかん発作。症候性局在関連てんかんの診断で複数の薬剤を用いるが極めて難治。重度の精神運動発達遅滞があり、3 歳時につかまり立ちが可能であったが、3 歳をピークに以後原因不明の退行が進行している。

【脊椎奇形】

新生児期から側弯があり、3D-CT スキャンで(株)胸椎に半椎を認めた(図1)



(図1)

【腎泌尿器奇形】

右腎臓の低形成と尿道下裂、停留精巣を認める(図2)



(図2)

【中枢神経合併症】

脳奇形：大脳形成異常、軽度脳室拡大、四丘体のクモ膜嚢胞。難治性てんかん：無呼吸を伴う症候性局在関連てんかん(6 ヶ月～3 歳に peak)

脳波では後頭葉から常時発作波を認めた
難聴：乳児期から難聴を指摘されて1 歳時 ABR 右 50dB 左 80dB

【皮膚所見】

全身の無毛 皮膚の落屑を認めた。皮膚生検(1 歳時)では毛嚢の数の減少と形態異常。汗腺は存在するが皮脂腺は少ない。角化の亢進が著しい。



【遺伝学的検査】

染色体 G バンド分染法 46,XY

マイクロアレイ (Whole Human Genome Oligo Microarray Kits 244K(Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA)) にて病的なコピー数異常を認めなかった。

皮膚の特徴 (ichthyosiform erythroderma.) が IFAP (ichthyosis follicularis with atrichia and photophobia) 症候群 (MIM #308205) に類似、ヒルシュスプルング病と重度精神遅滞が Mowat-Wilson 症候群に類似することから、患者末梢血から得られたゲノム DNA を PCR 増幅した試料で *MBTPS2* および *ZEB2* の塩基配列の解析を行ったところ、*MBTPS2* にミスセンス変異を同定した。(c.1286G>A, [p.Arg429His])。また遺伝カウンセリングを経ておこなった両親検索で、患児の母に同一の変異を認めた。

D. 考察

重度脊椎奇形と内部奇形、精神遅滞、皮膚症状、ヒルシュスプルング病を特徴とする症候群である BRESEK 症候群は、1996 年に Reish らによって始めて報告された。脊椎奇形と外胚葉形成不全と

IFAP 症候群の現任遺伝子として報告されていた、*MBTPS2* のミスセンス変異によることが認められた。同一の変異は過去に IFAP 症候群の重症例として報告されている変異と同一であった。

しかし今回の我々の報告(文献6)を受けて、米国 NCBI (National Center for Biotechnology Information) は、BRESEK 症候群 (MIM300404) を、OMIM データベースから削除した。IFAP 症候群は BRESEK 症候群とアレリックな疾患であるが、IFAP の 3 主徴の 1 つである Photophobia (羞明) は精神遅滞が重度な小児では診断が困難である。またもう一つの ichthyosis follicularis の診断も乳児期には困難であり、BRESEK 症候群を乳児期に IFAP (ichthyosis follicularis with atrichia

and photophobia) 症候群と臨床的に診断するのは困難であると思われる。合併症の重度さから新生児期に未診断のまま死亡する例もあると推定され、臨床遺伝診断の立場からは、IFAP 症候群とは別の疾患単位として残しておくことを提唱したい。

Xp22.12 に位置する本症候群の原因遺伝子 MBTPS2 は S2P タンパクをコードしその異常は小胞体ストレスに関与するとされる。小胞体ストレスのメカニズムは糖尿病・肥満・骨代謝・癌・神経変性との関わりが示唆されているが、先天異常症候群についてはまだ十分な知見が得られていない。

VATER 症候群とは全体の臨床像が異なるが、脊椎奇形を生ずる数少ない先天性疾患の一つであり、鑑別診断及び病態解明の研究に資する症例であると考えられる。

E. 結論

脊椎奇形を生ずる数少ない先天奇形症候群の一つである BRESEK 症候群の男児例の臨床像を示し、MBTPS2 が原因遺伝子であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. Hum Mutat. 2012 Oct 17. doi: 10.1002/humu.22229. [Epub ahead of print]
- 2) Takanashi J, Okamoto N, Yamamoto Y, Hayashi S, Arai H, Takahashi Y, Maruyama K, Mizuno S, Shimakawa S, Ono H, Oyanagi R, Kubo S, Barkovich AJ, Inazawa J. Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations. Am J Med Genet A. 2012 Dec;158A(12):3112-8.
- 3) Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. Hum Mutat. 2012 Oct 17. doi: 10.1002/humu.22229. [Epub ahead of print]
- 4) Yagihashi T, Kosaki K, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Takahashi T, Sato Y, Kosaki R. Age-dependent change in behavioral feature in Rubinstein-Taybi syndrome. Congenit Anom (Kyoto). 2012 Jun;52(2):82-6.
- 5) Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J. The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. Am J Med Genet A. 2012 Jun;158A(6):1292-303.
- 6) 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, Saitu H, Miyake N, Matsumoto N. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. Nat Genet. 2012 Mar 18;44(4):376-8

- 7) 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 Part A. 2012.158A:97-102.

2. 学会発表

S. Mizuno, M. Oshiro, M. Seishima, N. Okamoto, Y. Makita, N. Wakamatsu BRESHECK syndrome and IFAP syndrome are allelic disorders caused by mutation in MBTPS2 European Human Genetics Conference 2012, Nuremberg, Germany 2012.6

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当無し

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく
有病率調査および DNA バンク・iPS 細胞の確立
分担研究報告書

VATER症候群の次世代シーケンサーによる遺伝子解析に関する研究

研究分担者 工藤 純
慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室 教授

研究要旨

VATER 症候群（VATER 連合）は多発奇形症候群である。一部の症例が SALL1 遺伝子の変異により発症することが知られているが、大部分の症例で遺伝的原因は未解明である。VATER 症候群の原因となる未知の新規原因遺伝子の解明を目指し、次世代 DNA シーケンサーで全エクソン領域を解読する「エクソーム解析」を行なった。当班で収集した VATER 症候群患者 5 人を対象として、ゲノム上のエクソン領域のみを選択的に濃縮した後、次世代シーケンサーを用いてシーケンシングを行なった。しかし、得られたデータの解析から VATER 症候群の発症原因となる新規原因遺伝子の解明には至らなかった。

研究協力者

清水厚志（慶應義塾大学医学部分子生物学教室）
鳥居千春（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）
小崎健次郎（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）

A. 研究目的

VATER 症候群（VATER 連合）は多発奇形症候群である。一部の症例が SALL1 遺伝子の変異により発症することが知られているが、変異の同定されない症例が大部分である。本研究では、次世代 DNA シーケンサーで全エクソン領域を解読する「エクソーム解析」による VATER 症候群の原因となる未知の新規原因遺伝子の解明を目指した。

B. 研究方法

当班で収集した VATER 症候群患者 5 人とそのうち 1 人の患者については両親を含めた親子トリオの計 7 人を対象として、前年度実施した、アジレント社シュアセレクトとイルミナ社次世代シーケンサー GAIIX を用いたエクソーム解析から得られたシーケンスデータの解析を行った。

得られたシーケンスデータのヒトゲノム標準配列へのマッピングと標準配列との比較による変異候補の検出、変異の遺伝子上での位置付けと変異の種類の分類、多型情報の付加、変異候補リスト（約 4 万個/人）の作成は、清水らの作成した解析パイプラインを用いて行なった。遺伝子機能に重大な影響を及ぼす可能性の高い変異を約 1 万個/人抽出し、その中から dbSNP build 135、1000 人ゲノムプロジェクト、日本人 SNP データセットに含まれる既知の多型を除いて 150 個/人程度の候補変異を抽出した。

解析にあたっては個人情報保護に関する法律を踏まえ、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労働省「疫学研究指

針」を遵守し、倫理委員会の承認の下に研究を実施した。

C. 研究結果

ヒトゲノム標準配列との比較から患者一人当たり約 4 万個の候補変異が検出され、そのうち約 1 万個の変異は splice-site (SS) 変異および non synonymous variant (NSV) であった。さらに公表されている既知の SNP データベースに含まれる既知の SNP を除いたところ、最終的に、約 150 個/人程度の候補変異を抽出した。候補変異には SS 変異、nonsense (NS) 変異、start codon loss (SL) 変異、start codon gain (SG) 変異、frameshift (FS) 変異、missense (MS) 変異等が含まれる。

候補変異については、鳥居らによってバリデーションのため、キャピラリーシーケンサーを用いた PCR-シーケンシングを施行したが、3 名以上の患者に共通する候補遺伝子の絞り込みは、出来なかった。

D. 考察

VATER 症候群患者 5 人のエクソーム解析で十分なカバー率のエクソンの配列データを得ることができたが、3 名以上の患者に共通する候補遺伝子の絞り込みは、出来なかった。原因は定かではないが、VATER 症候群の遺伝学的背景が均一ではなく、患者毎に異なる遺伝子が原因となるため、複数の患者に共通する変異遺伝子という観点からの絞り込みが困難である可能性がある。また、エクソーム解析において、解読データが十分な厚みで得られない難読領域が約 10% 存在することから、VATER 症候群の原因と

なり得る変異のホットスポットがこれらの領域に存在するために発見が困難な可能性もある。

E. 結論

VATER症候群（VATER連合）の大部分の症例で遺伝的原因は未解明である。次世代シーケンサーを用いたVATER症候群患者5人のエクソーム解析からは、新規原因遺伝子の発見には至らなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
 VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく
 有病率調査および DNA バンク・iPS 細胞の確立
 分担研究報告書

VATER連合症候群の主要症状である食道閉鎖・鎖肛と関連する遺伝子群の網羅的検討

研究分担者 星野 健
 慶應義塾大学医学部小児外科 講師

研究要旨

大部分の VATER 連合症候群症例の原因は明らかでは無い。遺伝学あるいは発生生物学的なアプローチを用いて、間接的な情報から原因遺伝子が推定されている遺伝子群に関連する遺伝子群やパスウェイを網羅的に把握することは、今後 VATER 連合症候群の発症機転の解明を進めてゆく際に必須の手がかりとなる。文献の網羅的な検討を通じて、43 個の遺伝子を列挙した。関連する遺伝子群に属する variant は病的意義が高い可能性があり、解析を進める際の優先度が高い。

研究協力者

小崎健次郎（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）

A. 研究目的

VATER 連合症候群の原因は多様であると推測されている。例外的な症例では遺伝子変異が報告されているものの、大部分の VATER 連合症候群症例の原因は明らかでは無い。本研究班でも次世代シーケンサーを用いた原因の検索が行われているが、複数の患者に共通に認められる変異は同定されていない。近年、遺伝学あるいは発生生物学的なアプローチを用いて、候補遺伝子の探索が行われ、間接的な情報から原因遺伝子が推定されている。これらの遺伝子の変異は、ごく一部の患者に認められるのみであり、VATER 連合症候群の大部分を説明する遺伝子変異はない。これまでに報告されている遺伝子群に関連する遺伝子群やパスウェイを網羅的に把握することは、VATER 連合症候群の主要な原因遺伝子の同定につながると期待される。そこで、これまでに発症との関与が示唆されている遺伝子のリストを作成した。特に、小児外科的

に問題となる、食道閉鎖ないし鎖肛の表現型と関連している遺伝子群を中心に検討を進めた。ヒト疾患との関連の他に、マウスモデルで食道閉鎖ないし鎖肛の表現型と関連している遺伝子も列挙した。

B. 研究方法

文献の網羅的な検討を通じて、VATER 連合症候群と表現型が類似する疾患の原因遺伝子群、VATER 連合症候群患者のアレイ CGH 解析で検出されている遺伝子群、動物モデルから示唆されている遺伝子群、アドリアマイシンモデルにより遺伝子発現が変動している遺伝子群、Fanconi 貧血の原因遺伝子群を網羅した。

C. 研究結果

網羅的検討の結果を表に示す。hedgehog信号伝達系、homeobox遺伝子群、Notch信号伝達系を中心に43遺伝子が列挙された。

NMYC	Feingold syndrome		Celli, 2003
GLI3	Pallister-Hall syndrome		
CHD7	CHARGE syndorme		
SALL1	Townes-Brocks syndorme		
ZIC3			Ware
HLXB9	Currarino syndrome		
TBX5	Holt-Oram syndrome		
RECQL4	Baller-Gerold syndrome		
FANCB	VATCTERL-hydrocephalus syndrome	X-linked	Holden, 2006
NOGGIN	TEF		Puusepo, 2009
Hoxa3			
Hoxb4			

Shh			Kim, 2001
SOX2	AEG syndrome		
Nkx2			Williamson, 2006
PTCH1			
GLI1			
GLI2			
Ptch1			
Bmp4			
Gli1		hedgehog signalling	
Bmp4		hedgehog signalling	
Pesck5	caudal regression	hedgehog signalling	Szumaska, 2008
MID1	Opitz syndrome (TEF)		
LPP	TEF, 3q28		Arrington, 2010
HOXD13			Garcia-Barcelo, 2008
JAG1	Vertebral defects	Notch signalling	
DLL3		Notch signalling	
SALL4	Okihiro syndrome		
ZIC2		hedgehog signalling	Walsh, 2001
FOXF1	16q24 deletion	target of SHH	Stankiewicz, 2009
MTHFSD	16q24 deletion		Stankiewicz, 2009
FOXC2	16q24 deletion		Stankiewicz, 2009
FOXL1	16q24 deletion		Stankiewicz, 2009
ITGA1			
FST	5q12 deletion, activin-binding protein		
TBX4	17q23		
TBX2	17q23		
GLI4			
FANCA	Fanconi anemia		
FANCB	Fanconi anemia		
FANCD1/BRCA2	Fanconi anemia		
FANCD2	Fanconi anemia		

D. 考察

VATER 連合症候群の遺伝子は不明であるが、文献の網羅的な分析から VATER 連合症候群の主要症状である食道閉鎖・鎖肛と関連する 43 個の遺伝子がリストされた。VATER 連合症候群については、一卵性双胎で一方のみが罹患している症例が知られており、単一の遺伝子のみで発症しない可能性がある。すなわち、浸透率の低い疾患である可能性がある。この場合、VATER 連合症候群の患者の次世代シーケンサー解析の解析結果を解釈する場合、単純な家系解析を適用すると原因遺伝子を見逃す可能性がある。正常多型としては知られていない variant が同定された場合、本研究を通じて作成した遺伝子リス

ト・パスウェイリストと関連する遺伝子群に属する variant は病的意義が高い可能性があり、解析を進める際の優先度が高いと考え得る。

E. 結論

VATER連合症候群に関係する遺伝子群が43個を列挙した。本研究で同定したアドリアマイシン結合蛋白遺伝子および関連遺伝子とともに、今後VATER連合症候群の発症機転の解明を進めてゆく際に必須の手がかりとなる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく
有病率調査および DNA バンク・iPS 細胞の確立
分担研究報告書

VATER 連合患者に関する iPS 細胞に関する研究

研究分担者 赤松 和士
慶應義塾大学医学部生理学教室 講師

研究要旨

VATER連合はV=脊椎、A=肛門、T=気管、E=食道、R=腎臓 を主徴とする先天奇形症候群である。C=先天性心疾患、L=四肢奇形の合併も高頻度に認め、これらを伴うものをVACTERL連合という。循環器・呼吸器という生命維持に必須の臓器の障害に運動器の障害（橈骨奇形・側彎）を伴う、慢性的かつ持続的な疾患であり、生活面での長期にわたる支障を来す。本分担研究班では、VATER連合患者由来のiPS細胞を用いて、VATER連合の病態解明、治療方法の開発を目指す。本年度は、iPS細胞の作成条件について最適化をおこなった。また、作成されたiPS細胞を迅速に分化誘導する方法について検討を行った。

A. 研究目的

VATER 症候群は V=脊椎、A=肛門、T=気管、E=食道、R=腎臓 を主徴とする先天奇形症候群である。C=先天性心疾患、L=四肢奇形の合併も高頻度に認め、これらを伴うものを VACTERL 連合という。循環器・呼吸器という生命維持に必須の臓器の障害に運動器の障害（橈骨奇形・側彎）を伴う、慢性的かつ持続的な疾患であり、生活面での長期にわたる支障を来す。VATER 症候群が多系統に渡る先天異常を発症する機序は不明である。しかし異常を持つ臓器の発生時期の多くが、原腸形成期であることから、この時期に胚の広い範囲に障害が起きていると推測されている。母体糖尿病やトリソミー 18 の部分症状として VATER 連合の症状を呈する場合があることから、催奇形因子や遺伝子異常など、複数の異なる原因により類似する病態を呈すると考えられている。このため、「症候群」という用語の代わりに「連合」という用語で呼ばれる場合がある。ここで連合とは、高頻度に併存する奇形の組み合わせを指す。現時点では、外科手術や症状に応じた療育上の対応が行われるが、現在、根治療法は開発されていない。iPS 細胞は、山中らにより開発された多分化能、自己複製能を持った ES 細胞(embryonal stem cell) 様の細胞である。iPS 細胞は成体の皮膚線維芽細胞から樹立されるため、ES 細胞で生じる受精卵を使用することに関する倫理的問題や拒絶反応の問題を回避できるようになり、患者由来の細胞を用いた病気の研究や治療の実現可能性が高まると期待されている。

遺伝性疾患に罹患する患者の皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、さらに種々の組織・臓器に分化させる事により、今までは剖検時以外には入手する事が困難であった、組織や臓器を研究の対象とすることが可能となった。病態が

明らかになる事により、治療効果のある低分子化合物のスクリーニングや、培養細胞を用いた治療法の研究が可能となると期待されており、病態解明や新たな治療法の糸口になると考えた。

B. 研究方法

H 2 4 年度はVATER症候群iPS細胞作成のための患者選定および協力が得られず、疾患解析に最適な患者iPS細胞樹立に向けた条件検討を行った。本年度は特に協力患者の拡大を図るために、侵襲の少ない末梢血を用いた方法の最適化を行った。血液で皮膚と遜色ない品質のiPS細胞が作成できることを患者にも周知し、今後は引き続き患者のリクルートを積極的に行っていく。

①末梢血からの iPS 細胞の樹立と神経分化

健康成人から末梢血を採取し、CD3陽性のT細胞を純化し、センダイウイルスを用いて遺伝子導入を行いiPS細胞を樹立した。樹立したT細胞由来のiPS細胞を神経分化誘導を行い、疾患解析に用いることが可能かを検討した。

②不死化リンパ芽球株からの iPS 細胞の樹立と神経分化

健康成人から作成した不死化リンパ芽球株に遺伝子導入を行いiPS細胞を樹立した。樹立したT細胞由来のiPS細胞の神経分化誘導を行い、疾患解析に用いることが可能かを検討した。

C. 研究結果

1. T細胞から誘導したiPS細胞は良好に神経分化誘導が可能であり、従来の線維芽細胞由来の細胞と同様に神経疾患の病態解析に使用可能と考えられる。

2. 不死化リンパ芽球から誘導したiPS細胞も良好に神経分化誘導が可能であり、従来の線維芽細胞由来の細胞と同様に神経疾患の病態解析に使用可能と考えられる。

D. 考察

末梢血から作製した iPS 細胞は、T 細胞由来だけでなく、不死化リンパ芽球由来線維芽細胞由来の iPS 細胞も、従来の線維芽細胞由来 iPS 細胞とほぼ同様の分化誘導能力を示し、十分に疾患解析に用いることが出来るのではないかと考えられる。

今後は、より侵襲の低い採血で iPS 細胞が樹立できるという点を患者に周知し、協力を募っていく。受診のタイミングが合わない場合、樹立施設との連携が困難な受診施設では、不死化リンパ芽球化 (SRL に依頼可能) を行い。ストックしておくことを検討すべきであろう。

E. 結論

今後、VATER症候群のiPS細胞の樹立を目指すにあたり、末梢血由来の細胞からのiPS細胞樹立を用いることにより、研究協力を得やすいのではないかと考えられた。また、患者血液の不死化リンパ芽球化を予め行っておくことにより、樹立施設へ即時検体が運搬することが難しい施設でも研究参加が可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui T, Takano M, Yoshida K, Ono S, Fujisaki C, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H, **Akamatsu W**. Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. **Stem Cells**. 2012 Jun;30(6):1109-19. (W.A. is Corresponding author)
- 2) Yagi T, Kosakai A, Ito D, Okada Y, **Akamatsu W**, Nihei Y, Nabetani A, Ishikawa F, Arai Y, Hirose N, Okano H, Suzuki N. Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. **PLoS One**. 2012;7(7):e41572.
- 3) Imamura M, Okuno H, Tomioka I, Kawamura Y, Lin ZY, Nakajima R, **Akamatsu W**, Okano HJ, Matsuzaki Y, Sasaki E, Okano H. Derivation of induced pluripotent stem cells by retroviral gene transduction in Mammalian species. **Methods Mol Biol**. 2012;925:21-48.
- 4) Matsui T, **Akamatsu W**, Nakamura M, Okano H. Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: Basic concepts and potential application for cell replacement therapy. **Exp Neurol**. 2012 Oct 1. pii: S0014-4886(12)00378-0.
- 5) Imaizumi Y, Okada Y, **Akamatsu W**, Koike M,

Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. **Mol Brain**. 2012 Oct 6;5(1):35.

- 6) Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, **Akamatsu W**, Sasaki T, Yamanaka S, Amagai M, Okano H, Ohyama M. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Ectodermal Precursor Cells Contribute to Hair Follicle Morphogenesis In Vivo. **J Invest Dermatol**. 2013 Jan 15. doi: 10.1038/jid.2013.7. [Epub ahead of print]
- 7) Nihei Y, Ito D, Okada Y, **Akamatsu W**, Yagi T, Yoshizaki T, Okano H, Suzuki N. Enhanced aggregation of androgen receptor in induced pluripotent stem cell-derived neurons from spinal and bulbar muscular atrophy. **J Biol Chem**. 2013 Jan 30.
- 8) Ohta S, Imaizumi Y, **Akamatsu W**, Okano H, Kawakami Y. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. **Methods Mol Biol**. 2013;989:193-215. doi: 10.1007/978-1-62703-330-5_16.

2. 学会発表

口頭発表

(招待講演)

- 1) **赤松和土**: 多能性幹細胞由来神経幹細胞を用いた神経系の再生医療の展望 第116回日本眼科学会総会・シンポジウム13 基礎研究セミナー、2012年4月6日(東京・東京国際フォーラム)
- 2) **赤松和土**: 日本分子生物学会第12回春期シンポジウム 多能性幹細胞から神経幹細胞を生み出す分子機構とその応用 2012年4月26日
- 3) **赤松和土**: 幹細胞生物学を応用した神経疾患病態研究 第53回日本神経学会大会・シンポジウムS (1) 4: ALS に対する再生医療の開発、2012年5月23日(東京・東京国際フォーラム)

(ポスター発表)

- 1) **Wado Akamatsu**, Takeshi Matsui, Morito Takano, Kenji Yoshida, Ono Soichiro, Yumi Matsuzaki, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano. NEURAL STEM CELLS DIRECTLY DIFFERENTIATED FROM PARTIALLY REPROGRAMMED FIBROBLASTS RAPIDLY ACQUIRE GLIOGENIC COMPETENCY, 10th ISSCR meeting June15

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【海外】

(1) 発明の名称 神経幹細胞製造方法

出願番号 アメリカ 13/127,566

出願日 2011年5月4日

出願人 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、赤松和土

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく
有病率調査および DNA バンク・iPS 細胞の確立
分担研究報告書
アドリアマイシンによる VATER 連合モデルの作製

研究分担者 氏名 谷口善仁
慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室 講師

研究要旨

われわれは以前、アドリアマイシン曝露ニワトリ胚によるVATER連合モデルを報告した。本研究ではより詳細な解析を行うために、魚類モデルを作製することを試みた。生きた胚を解像度よく観察するために、受精24時間後から腸管に蛍光を発するジーントラップゼブラフィッシュ系統を樹立した。また、昨年度ナノビーズと質量分析より同定したアドリアマイシン結合タンパク2種類について生化学的分析を行うために、大腸菌発現系を用いたりコンビナントタンパク質の作製を行った。

A. 研究目的

前年度、アドリアマイシン曝露ゼブラフィッシュ胚に腸管閉鎖が起こることを示したが、亜致死量を投与してもすべての胚で腸管閉鎖が起こるわけではない。ゼブラフィッシュ胚は比較的透明で、実体顕微鏡により組織内部の観察が可能であるが、管腔形成の詳細な観察を行うには曝露胚をパラフィン固定し、連続切片を作製後、ヘマトキシリン&エオジン染色により組織学的に調べるという一連の操作が必要であった。ゼブラフィッシュの利点を最大限活用し、ライブのまま経時的に腸管形成の観察を行うこと可能とするために、腸管特異的に蛍光を発するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を樹立することを目的に研究を行った。

また、ナノビーズと質量分析を用いた先行研究により、ニワトリ抽出タンパク質からアドリアマイシンに結合するタンパク質の遺伝子Aと、タンパク質の遺伝子Bを単離した。生化学的な分析を行うために、これらのレコンビナントタンパク質精製を試みた。

B. 研究方法

1) 腸管特異的に蛍光を発現する系統の樹立

zTrap(<http://kawakami.lab.nig.ac.jp/ztrap/faces/image/ImageBrowse.jsp>)並びに国立遺伝学研究所内の非公開データベースにおいて、上部消化管の蛍光タンパク発現が受精5日後に起こることが記載されている16系統を抽出した。これらのGal4ジーントラップの候補系統を、レポーターであるUAS-EGFP系統と交配させた。受精12時間後から6~12時間ごとに受精72時間後まで蛍光実体顕微鏡 (FLUO3 Leica社) で観察を続け、発生初期より腸管に蛍光タンパクを発現する系統を単離した。

2) レコンビナントタンパク質の精製

ヒトの遺伝子Aおよび遺伝子BのcDNAを、N末端に6xHisタグが付くようにpET15bベクターにクローニングし、BL21(DE3)を形質転換した。IPTG

でタンパク発現を誘導した後、0.5%NP40などの可溶化バッファーで大腸菌を溶菌し、遠心分離により可溶性画分を得た。これをHis60 Ni Superflow Resin充填カラム、あるいはHisTALON Coカラム (Clontech社) にアプライし、目的タンパク質をアフィニティ精製した。精製タンパク質は、7.5% SDS-PAGEにより分離後、クマシーブリリアントブルー染色、または抗DDX3抗体 (Sigma社) を用いたウェスタンブロットにより解析した。

C. 研究結果

1) 腸管特異的に蛍光を発現する系統の樹立

ゼブラフィッシュは生きたまま個体内部の臓器の観察を行うことが可能である。特に、臓器特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統は、ある臓器の生理的、病的発生プロセスを追うのに適している。そこで、国立遺伝学研究室の川上浩一研究室と共同で、発生初期より腸管にEGFPを発現するジーントラップラインをスクリーニングした。この系は、メダカ由来のトランスポゾンTol2により、遺伝子内に、スプライスアクセプターサイトを持つGal4をランダムに挿入することにより、空間・時間特異的にEGFPを発現するものである。

ゼブラフィッシュの腸管は受精24時間後までに充実性の棒状の組織が形成され、受精48時間後にかけて徐々に管腔が形成されるという発生様式を取る。従って、少なくとも発生24時間後から腸管に蛍光が観察できる系統の単離を目指した。

データベースから候補となるGal4ジーントラップ系統を抽出し、UAS-EGFP系統と交配した。経時的に蛍光を観察して、蛍光が早期に上部消化管特異的に発現する2ライン (gM115A, gM339A) を得た。これらをアドリアマイシンに曝露し、管腔形成を共焦点実体顕微鏡により観察した。

2) レコンビナントタンパク質の精製

タンパクAは、1mM IPTG 37°Cの誘導で可溶性

画分に大量のタンパク質を得ることができた。一方、タンパクBは同条件下でほとんどが不溶性の封入体となり、酵素アッセイを行うために十分な量の可溶性タンパク質を得ることができなかつた。そこでIPTG濃度、培養温度、培養時間、大腸菌株、可溶化バッファーなどの条件検討を行い、0.1 mM IPTG、18°C、16時間でタンパク発現誘導すると可溶性画分が増えることがわかった。ただし、大半はやはり封入体へ移行すること、また複数の夾雑タンパク質が見られるなど問題もあった。

D. 考察

発生初期から腸管特異的に蛍光タンパク質を発現するゼブラフィッシュ系統を樹立できたことは、今後の解析を容易にする。従来は、胚を固定し、組織切片を作るまで管腔形成の詳細が分からなかったが、トランスジェニック系統を用いることで、共焦点顕微鏡による組織断面の解析が可能となる。さらに、生きたままの観察が可能なので、経時的な変化を追跡することもできる。今後は、アドリアマイシン曝露のタイミングを変化させ、発生の中の時期が腸管閉鎖に感応性かを調べる予定である。同様の実験はラットなどの胎盤を持つ哺乳動物では行うことが難しい。ニワトリ胚でも曝露時期の調整は可能であるが、魚類は多数のトランスジェニック胚の使用により、より詳細な解析が可能である。感応性のタイムウィンドウが決定した後は、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析や、*in situ*ハイブリダイゼーションによる発現解析が可能である。

生化学的な分析に関しては、タンパクAはリコンビナントタンパク質が容易に精製できたものの、タンパクBはほとんどが不溶化してしまい、精製が難しかった。条件検討してスケールアップしたが、量、質ともに満足の行くものではなかつたので、今後はpETシステムによる誘導をやめて、弱いプロモーターを利用した発現系や、シャペロンを発現している大腸菌株の利用を考える。アドリアマイシンが妊婦に投与される例は稀であるので、ヒトのVATER連合がアドリアマイシンとタンパクA・タンパクBの相互作用により直接引き起こされるとは考えていないが、遺伝子A/遺伝子Bが関与するシグナル経路のどこかに働きかける可能性はあり、本研究はVATER連合発症メカニズムを解き明かす重要な糸口になることが期待される。

E. 結論

生きたまま腸管管腔形成の観察が可能でゼブラフィッシュトランスジェニック系統を2種類得た。今後はこれらの系統を用いて、アドリアマイシンによる腸管閉鎖の詳細な解析が可能になる。また、アドリアマイシン結合タンパクとして既に同定済みのタンパクAとタンパクBのリコンビナントタンパク質を、大腸菌発現系を用いて精製し、一部可溶化することができた。VATER連合の発症には遺伝要因、環境要因の関与が想定されており、本研究はその一端を解明するものとして将来の

発展が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
1) 谷口善仁、加部泰明、小崎健次郎（口頭）
アドリアマイシン曝露ゼブラフィッシュ胚を用いた催奇性（上部消化管閉鎖）の機構解析 第82回日本衛生学会学術総会、京都、2012年3月

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく
有病率調査および DNA バンク・iPS 細胞の確立
分担研究報告書

VATER 症候群様の副作用を示すアドリアマイシンの新規標的候補タンパク質
スクリーニングに関する研究

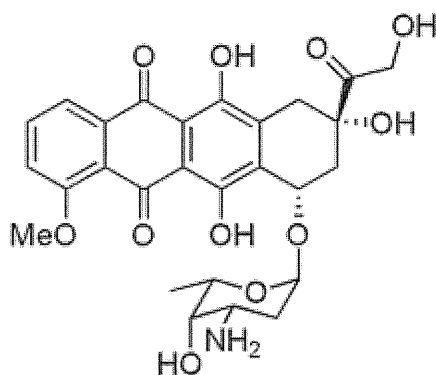
研究分担者 加部泰明
慶應義塾大学医学部医化学教室 専任講師

研究要旨

抗ガン剤として用いられるアドリアマイシンは心肥大などの心機能異常や催奇形成などの副作用を示す事が知られるが、その作用メカニズムについては全く不明である。本研究では低分子化合物に対する受容体をスクリーニング出来る独自のアフィニティ精製システムを駆使して、アドリアマイシンに特異的に結合するタンパク質Xの同定に成功した。この標的候補タンパク質の機能情報を基盤として、VATER症候群の作用発現の分子機構の解明を目指す。

A. 研究目的

アドリアマイシン（図）は、放線菌株から得られたアントラサイクリン系抗生物質の1種で、2本鎖DNAのintercalatorとして働いてガン細胞種の増殖阻害効果を示し、臨床において現在でも、悪性リンパ腫などに対する化学療法に用いられている。しかし、その一方でアドリアマイシンは、心肥大などの心機能異常や催奇形成誘導などの重篤な副作用を示すことが知られるが、その副作用発現の分子メカニズムについては全く不明である。我々は、ナノスケールの担体を用いた独自のアフィニティ精製技術の開発を行い、薬剤やホルモンなどの低分子化合物に選択的に結合するタンパク質の精製システムを確立してきた([Chemical Biology/Chemical Genetics] CMC press, 2009)。このアフィニティスクリーニング技術を駆使してアドリアマイシンの未知の結合タンパク質を同定し、その副作用発現の分子機構の解明に繋げることを目的としている。



B. 研究方法

薬剤をナノアフィニティビーズに固定化するために、薬剤の官能基を利用してビーズ表面上に共有結合によりカップリングを行う必要がある。そこで、カルボン酸修飾型ビーズと、アドリアマイシン中に存在するアミノ基をアミドカップリングにより反応を行い、共有結合させた薬剤固定化ビーズを作製した。

また、アドリアマイシンは、実験レベルにおいてニワトリの胚発生時に添加すると奇形誘導することから、ニワトリ受精卵の初期胚状態のものを集め、タンパク質成分を抽出してアフィニティスクリーニングに用いた。

C. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト臨床検体などやマウスなどの実験動物は用いておらず、試験管内での実験のみ実施している。

D. 研究結果

上記のように調整したニワトリ由来のタンパク抽出液を用いて、アドリアマイシン固定化ビーズと混合してこれに結合するタンパク質のスクリーニングを行った。なお、今回の実験では、アドリアマイシンとは異なる作用で催奇形成誘導を引き起こすと考えられる抗てんかん薬カルバマゼピンを固定化したもので同時に検証し、これらの薬剤にタンパク質結合特異性について検討した。

このスクリーニングの結果、図に示したように、薬剤を固定化したものにおいていくつかの結合してくるバンドが見られた。この中で特に矢印で示した 75kDa 付近の位置に、カルバマゼピンでは結合せず、アドリアマイシン特異的に結合するバンドが見られた。

この SDS ポリアクリルアミドゲル上のバンドを切り出して、trypsin による in gel digestion 法でペプチド分解し、MS スペクトル (Hitachi Nano-Frontier) でペプチド同定を行った結果、これが選択的な塩基配列を認識する RNA 結合性のタンパク質の一つである事が分かった。

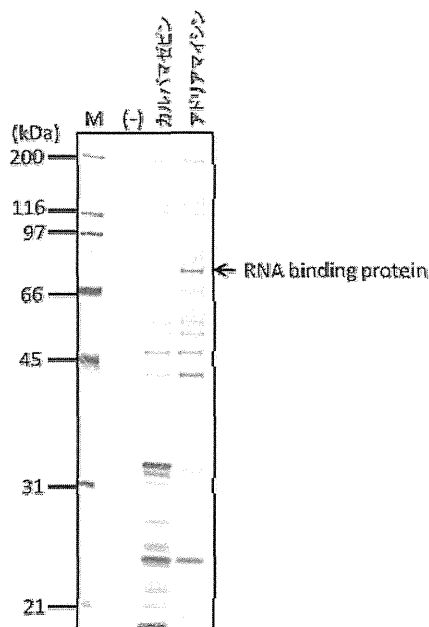


図 アドリアマイシン結合タンパク質のアフィニティ精製

E. 考察

これまでに、アドリアマイシンの分子標的としては、2本鎖DNAにintercalateしたアドリアマイシンがDNA topoisomerase IIなどの酵素を阻害して、染色体DNA複製阻害によるガン細胞増殖抑制効果が知られていたが、このような作用は細胞・組織特異性が無いため、アドリアマイシンによる心機能障害や催奇形成誘導などの局所特異的な副作用発現の作用メカニズムとは異なると考えられている。

本研究の解析で同定されたアドリアマイシン特異的に結合する因子は、特定の塩基配列を認識するRNA結合性のタンパク質であり、特異的遺伝子のRNAのプロセッシングやタンパク質翻訳修飾に関わっていると考えられている。今後、薬剤によるこの標的候補タンパク質の機能制御について解析するとともに、心臓や奇形形成部位での遺伝子発現の影響などについて解析することにより、これまで未知であったVATER症候群様の作用メカニズムの解明に繋がる可能性がある。

F. 結論

本研究の解析で、VATER症候群様の副作用を引き起こすアドリアマイシンの新たな結合タンパク質の同定に成功した。この機能情報を基盤として、未知の病態形成の作用機構の解明に繋げて行きたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Karasawa S, Azuma M, Kasama T, Sakamoto S, Kabe Y, Imai T, Yamaguchi Y, Miyazawa K, Handa H. Vitamin K2 Covalently Binds to Bak and Induces Bak-Mediated Apoptosis. Mol Pharmacol. 2012 in press.
- 2) Noma N, Simizu S, Kambayashi Y, Kabe Y, Suematsu M, Umezawa K. Involvement of NF- κ B-mediated expression of galectin-3-binding protein in TNF- α -induced breast cancer cell adhesion. Oncol Rep. 27(6):2080-4, 2012.
- 3) Morikawa T, Kajimura M, Nakamura T, Hishiki T, Nakanishi T, Yukutake Y, Nagahata Y, Ishikawa M, Hattori K, Takenouchi T, Takahashi T, Ishii I, Matsubara K, Kabe Y, Uchiyama S, Nagata E, Gadalla MM, Snyder SH, Suematsu M. Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(4):1293-8, 2012.
- 4) Nishiyama Y, Goda N, Kanai M, Niwa D, Osanai K, Yamamoto Y, Senoo-Matsuda N, Johnson RS, Miura S, Kabe Y, Suematsu M. HIF-1 α induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice. J Hepatol. 56(2):441-7, 2012.

著書・総説

- 1) 末松誠、久保亜紀子、大村光代、菱木貴子、梶村真弓、加部泰明、杉浦悠季 実験医学「がんと代謝」羊土社、pp193-202, 2012
- 2) 加部泰明、末松誠、半田宏 実験医学別冊「医学生物学における最新プロトコールと実験例」羊土社、2012, in press.

2. 学会発表

無し

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

〔IV〕

研究成果の刊行に関する一覧表