

疾患について患者家族がインターネットで検索することが日常的な現在、診断名が与えられないことで、患者は自身での情報検索や家族間交流の機会も少なくなる。診断名による患者サポートグループやウェブサイトが相次いで公開される一方で、診断名の未確定な先天多発異常患児の親が感じる不安は大きい。そうしたデメリットを解消するためにも、診断未定の多発奇形であっても、例えば脊椎奇形と鎖肛と伴う知的障害の無い小児、多指症と鎖肛と難聴を伴う小児など、多発奇形の部位の組み合わせで医療情報は患者間交流が可能な医学情報提供サイトも今後ニーズがあると思われる。

今回抽出した VATER 症候群類似疾患のうち、脊椎奇形と腎奇形を伴う、BRESEK 症候群は、我々の症例の遺伝子解析をもとに 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を報告した。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。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た。

## E. 結論

VATER 症候群を構成する先天奇形を複数もつ当院通院中の患児を対象にデータベース検索により抽出し、Opitz 症候群、BRESEK 症候群、Cat Eye 症候群において複数要素の合併を認めた他、主たる奇形を一つ欠くために VATER 症候群と診断されなかった 3 症例の検討から、診断名のない先天多発奇形患児への情報提供と包括医療が不十分な現状が認識された。BRESEK 症候群の男児例から *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

- Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu 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]
- 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.
- Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu 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]

- 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.
- 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.
- 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):376-8
- 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
- 水野誠司、西恵理子、谷合弘子、村松友佳子 1、青木洋子、松原洋一 3 歳以降まで原因不明の摂食障害を呈した Noonan 症候群及び CFC 症候群の 3 例. 第 35 小児遺伝学会、久留米 2012.4.19
- 水野誠司、村松友佳子、谷合弘子、齋藤加世子、若松延昭 Mowat-Wilson 症候群の手指及び身体の形態的特徴. 第 52 回日本先天異常学会学術集会 東京 2012.7.6
- 水野誠司、西恵理子、村松友佳子、黒澤健司、岡本伸彦、鶴崎美徳、三宅紀子、松本直通 Coffin Siris 症候群の 2 例 - *ARID1B* 欠失例と変異例 一. 第 57 回日本人類遺伝学会 2102.10.24

## 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  
総合研究報告書

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。その後、研究協力者 清水らが開発した、自動化コンピュータプログラム群（いわゆるパイプライン）を用いて、粗 DNA 配列データをヒトゲノム参照配列にマッピングしたところ、平均 100 倍以上のカバー率でエクソン領域のシーケンスが得られていることが判明し、実験は成功したことが分かった。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、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を行った。

末梢血から得られたゲノム DNA をアコースティックソルビライザー（Covaris）によって断片化した後、アジレント社のエクソンキャプチャーキット（SureSelect Human All Exon kit）を用いてエクソン領域の DNA を選択的に回収し、アダプターを連結し、PCR 法で増幅後、イルミナ社 GAIIX で 75 塩基のペアエンドシーケンシングを行った。

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

エクソーム解析で得られた 7 人の粗 DNA 配列データをヒトゲノム参照配列にマッピングした結果、平均 100 倍以上のカバー率でエクソン領域のシーケンスが得られていることが判明し、実験は成功したことが分かった。

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 人のエキソーム解析で十分なカバー率のエキシ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言う観点からの絞り込みが困難である可能性がある。また、エキ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 人のエキソーム解析からは、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

小崎健次郎、工藤 純：次世代シーケンサーを用いた疾患原因遺伝子の探索—倫理的な配慮も含めて—、細胞工学 30(8):806-807 (2011)

##### 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 細胞の確立総合研究報告書

VATER症候群における内臓奇形の実態

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

VATER 症候群は原因不明な多発奇形症候群である。小児外科的な観点からは、内臓奇形、とりわけ、食道・気管の奇形と直腸肛門奇形が重要である。本研究では、全国調査を行い、VATER 症候群と診断された症例を対象として、小児外科的な内臓奇形の実態について臨床的な観点から調査を行った。一次調査にて VATER 症候群（VATER 連合）の治療経験ありとの回答を得た 111 施設に二次調査を実施し、回答の得られた 120 例を対象として小児外科的な合併奇形を総括した。鎖肛は 120 例中 87 例（72.5%）、食道気管奇形は 120 例中 93 例（77.5%）に認められた。120 例という比較的多数の患者を対象として、日本人 VATER 症候群患者における小児外科的症状の分布を初めて明らかにすることができた。食道気管瘻の頻度が比較的高く、鎖肛と同程度であることが明らかになった。鎖肛は中間位以上が多い傾向がみられた。心奇形の重症度によっては、外科治療の治療戦略を総合的に評価して進めていく必要があると考えられた。VATER 症候群の領域では、国際的には小児外科の研究者により積極的に疾患の発症原因に関する研究が進められている。とくに食道・気管の奇形と直腸肛門奇形という観点から VATER 症候群に似た症状を呈するマウスモデルの研究が進められ、原因遺伝子についても示唆されている。そこで、これらの動物モデルや付随する遺伝学的研究について網羅的な検討を合わせて行ったところ 43 の遺伝子が報告されていることが明らかになった。現在のところ、単一の遺伝子の変異によって発症を説明可能な遺伝子は同定されていない。遺伝学的あるいは発生生物学的な解析からは多様な発症原因が考えられるが、進行性の疾患としては Fanconi 貧血が挙げられ、VATER 症候群が Fanconi 貧血の部分症状であるかどうかの検査を診療プロトコルに含めて行く必要があると考えられた。

研究協力者

小崎里華（国立成育医療研究センター）  
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 症候群は原因不明な多発奇形症候群である。小児外科的な観点からは、消化管奇形（食道・気管の奇形、直腸肛門奇形）、心奇形、腎奇形が重要である。本研究では、全国調査を行い、VATER 症候群と診断される症例を対象として、小児外科的な奇形の実態について調査した。

B. 研究方法

一次調査にて VATER 症候群（VATER 連合）の治療経験ありとの回答を得た 111 施設に二次調査を実施し、回答の得られた 120 例を対象として小児外科的な合併奇形を総括した。一方で、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。個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。有病率に関する調査に際しては、文部科学省・厚生労働省「疫学研究指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

C. 研究結果

消化管奇形について  
二次調査で回収された120例のうち、鎖肛は120例中87例（72.5%）、食道気管奇形は120例中93例（77.5%）に認められた。

アンケートで集積された120例のうち、水頭症合併症例と母体糖尿病合併症例は、病因論的には他のVATER症候群患者と区別すべきであることが先行研究により示されていることから、112例に限った解析もおこなった。それぞれの異常のスペクトラムとその頻度について表1に示す。

鎖肛は112例中80例（71.5%）、食道気管奇形は112例中89例（79.5%）に認められた。

食道閉鎖症の病型であるGross分類では、回答のあった84例中、A型が7例、B型が1例、C型が74例、D型が2例で、食道閉鎖症全般でいわれている頻度と同様で、C型が圧倒的多数を占めた。十二指腸閉鎖を示した症例を10例に認め、注意すべき合併症と考えられた。

直腸肛門奇形について

鎖肛症例のうち、低位鎖肛は29.5%と最も多く、次いで高位鎖肛が25%、残り中間位鎖肛が

17.5%であった。中間位症例は主に直腸尿道瘻であった。食道奇形は一般的な頻度と同様であったが、鎖肛に関しては高位鎖肛の頻度が比較的高いことが明らかとなった。

腎奇形について

VATER症候群の腎奇形で代表的な腎無形成・低形成は全体の38.4%と4割程度であった。機能的問題として膀胱尿管逆流が認められる症例が21.5%にみられた。

心奇形について全体の68.7%に心奇形が認められた。VSDは35.8%、ASDは23.3%、PDAは17.9%と非重症例が多くみられたが、TOFも10.8%に認められた。

これまでにVATER症候群との発症の関連が示唆されている遺伝子群を列挙した。

hedgehog信号伝達系、homeobox遺伝子群、Notch信号伝達系を中心に以下の43遺伝子が列挙された。

NMYC、GLI3、CHD7、SALL1、ZIC3、HLXB9、TBX5、RECQL4、FANCB、NOGGIN、Hoxa3、Hoxb4、Shh、SOX2、Nkx2

PTCH1、GLI1、GLI2、Ptch1、Bmp4、Gli1、Bmp4、Pcsk5、MID1、LPP、HOXD13、JAG1、DLL3、SALL4、ZIC2、FOXF1、MTHFSD、FOXC2、FOXL1、ITGA1、FST、TBX4、TBX2、GLI4、FANCA、FANCB、FANCD1/BRCA2、FANCD2

#### D. 考察

食道気管瘻の頻度が比較的高く、鎖肛と同程度であることが明らかになった。食道閉鎖症症例に対してVATER症候群の有無を検索する頻度が一般に高いが、VATER症候群にC型が多く認められることから、日常臨床において、より密に症候群の有無を検索する必要性があると考えられた。十二指腸閉鎖を示した症例を10例に認め、注意すべき合併症と考えられた。鎖肛も中間位以上の症例が多い傾向が認められた。術後の排便機能傷害を残す症例が多くなることを考え合わせると、本症候群の長期フォローアップの重要性が浮き彫りにされた。腎疾患については、代表的な腎無形成・低形成は全体の38.4%と3割程度であった。機能的問題として膀胱尿管逆流が認められる症例が2割に認められ、解剖学的異常を伴わなくても、腎機能障害の原因として注意すべき状態と考えられた。疾患の発症との関与が疑われる遺伝子は40種類以上であった。なかでもFanconiに貧血に関わる遺伝子は、臨床的な観点から、予後決定因子として注目する必要がある。また、メンデル遺伝形式で説明できないような家系発症例も散見されることから、これらの40遺伝子群および相互作用を有する遺伝子群を中心に変異解析を行い、発症機転を明らかにして行く必要が示された。

#### E. 結論

日本人VATER症候群患者における小児外科的症状の分布を初めて明らかにすることができた。食道気管瘻の頻度が比較的高く、鎖肛と同程度であることが明らかになった。鎖肛と食道

気管奇形がVATER症候群の主要な合併症であることが確認された。食道気管奇形についてはGross C型が多く、VATER症候群の一部ではない食道気管奇形と同様であることが確認された。十二指腸閉鎖を示した症例を10例に認め、注意すべき合併症と考えられた。鎖肛は中間位以上が多い傾向がみられた。心奇形の重症度によっては、外科治療の治療戦略を総合的に評価して進めていく必要があると考えられた。遺伝学的あるいは発生生物学的な解析からは多様な発症原因が考えられるが、進行性の疾患としてはFanconi貧血が挙げられ、VATER症候群がFanconi貧血の部分症状であるかどうかの検査を診療プロトコルに含めて行く必要があると考えられた。

#### 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  
総合研究報告書

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 和土  
慶應義塾大学医学部 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る。

B. 研究方法

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。H23年度はレトロウィルスで皮膚線維芽細胞からiPS細胞樹立を行い、感染6日後の導入遺伝子が高発現している線維芽細胞と樹立したiPS細胞で導入遺伝子の発現を定量PCRにちより比較し、発現が抑えられているlineを選定した。H24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。

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. 皮膚線維芽細胞から、マウスレトロウイルス受容体(Slc7a1)を発現と4遺伝子(Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc)の導入によってiPS細胞を確立した。得られた細胞の正常を細胞遺伝学的方法で確認した。

上記の方法により作成した、iPS細胞について、iPS化の過程で、正常細胞としての性質を維持しているかどうかを確認する目的で、G分染をおこなった。この際、コルセミド処理時のコルセミド濃度を高く設定し、培養時間を延長することが良好な分裂中期増を得ることができた。

2. 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。

3. 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

iPS細胞において、導入した遺伝子(Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc)が高発現しているものは多分化能、自己複製能に乏しいことが先行研究により示されている。樹立したiPS細胞において、今後は導入した遺伝子発現量をRT-PCRにより比較し高発現しているものを除去する必要がある。また未分化マーカー(Nanog, Tra1, Rexなど)の発現、iPS細胞を免疫不全マウスに移植し奇形腫形成能を評価し、多分化能をもつiPS細胞lineを選出する必要がある。

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) Lee EK, Kim W, Tominaga K, Martindale JL, Yang Xl, Subaran SS, Carlson, OD, Mercken EM, Kulkarni RN, **Akamatsu W**, Okano H, Perrone-Bizzozero NI, de Cabo R, Egan JM, Gorospe M. RNA-binding protein HuD controls insulin translation. *Molecular Cell*. 2012 Feb 29.
- 2) Yagi T, Ito D, Okada Y, **Akamatsu W**, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1;20(23):4530-9.
- 3) 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)
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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]

- 9) 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.
- 10) 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, 10<sup>th</sup> ISSCR meeting June15
- 2) Naoko Kuzumaki, Michiko Narita, Yusuke Hamada, Atsumi Nagasawa, Yohei Okada, **Wado Akamatsu**, Hirotaka J Okano, Hideyuki Okano, Minoru Narita :Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the neural differentiation from embryonic stem cells 第34回 日本神経科学大会、2011年9月15日 \*会期9/14-17 (横浜)
- 3) Shigeki Ohta, Aya Misawa, Hironobu Okuno, Kimiko Fukuda, **Wado Akamatsu**, Yutaka Kawakami, Hideyuki Okano :Generation of Neural Crest Progenitor cells from human induced pluripotent stem cells by a simple

method第34回 日本神経科学大会、2011年9月15日 \*会期9/14-17 (横浜)

- 4) Takeshi Matsui, Morito Takano, Kenji Yoshida, Soichiro Ono, Yumi Matsuzaki, Masaya Nakamura, **Wado Akamatsu**, Hideyuki Okano : Direct induction of safe neural stem cells from adult mouse fibroblasts、第34回 日本神経科学大会、2011年9月16日 \*会期9/14-17 (横浜)
- 5) Takeshi Matsui, Morito Takano, Kenji Yoshida, Soichiro Ono, Yumi Matsuzaki, Masaya Nakamura, **Wado Akamatsu**, Hideyuki Okano : "Direct induction of safe neural stem cells from adult mouse fibroblasts.", ISSCR 2011 International Society for Stem Cell Research, Toronto, Canada 2011 6.17

## 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  
総合研究報告書

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 谷口善仁 慶應義塾大学 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。ゼブラフィッシュは体外発生し、胚が透明で遺伝子操作が容易であること、個体の数を多く扱え、発生が早いという利点がある。アドリアマイシンおよびその修飾化合物に曝露させたゼブラフィッシュ胚の一部に上部消化管閉鎖が認められた。観察を容易にするために、Gal4-UASシステムによる腸管特異的に蛍光タンパクを発現するジーントラップラインを確立した。分子メカニズムを明らかにするために、ナノビーズにアドリアマイシンをカプリングし、ニワトリ胚のタンパク抽出液を反応させ、アドリアマイシンに特異的に結合するタンパク質を質量分析により同定した。さらに生化学的分析のためにレコンビナントタンパク質を作成した。

A. 研究目的

VATER連合は椎体異常、肛門奇形、気管食道瘻、橈骨奇形、腎奇形など、複数の臓器において先天異常が発症する奇形症候群の一つである。これら特定の組み合わせで異常が起こる原因には、遺伝的背景に加え環境要因の関与が考えられている。現在までに、アドリアマイシンによるラット・ニワトリの胎生期曝露においてVATER連合様の症状が誘発される事が知られており、動物モデルとして使用されている。アドリアマイシンは造血器腫瘍等に用いられるアントラサイクリン系の抗がん剤で、DNAへのインターカレーションなどによって細胞毒性を発揮するが、なぜラット、ニワトリの動物モデルで特定の臓器のみに異常を生じさせるのかは明らかになっていない。今回、生きたままでの体内臓器の観察や化学物質曝露実験が容易等の利点をもつ脊椎動物である小形魚類を用いてVATER連合様の上部消化管奇形の発現機構を解析する事とした。そのために、パラフィン固定標本の組織学的解析を行うとともに、生きたまま胚を観察するための腸管特異的に蛍光タンパクを発現するトランスジェニックゼブラフィッシュラインを得ることを目的とした。

アドリアマイシンのような複雑な構造の化学物質は、生体内の限られた標的タンパク質に結合し、その機能を修飾することにより効果を発揮するものと考えられる。アドリアマイシンは抗がん剤として用いられ、細胞障害活性をもち、その機序もいくつか提案されているが、どのようにして臓器特異的障害が生じるかに関する知見は今のところない。それを解明する目的で、ナノビーズと質量分析を用いてアドリアマイシンに結合するタンパクを同定することを目的に研究を行った。同定したタンパク質は大腸菌タンパク発現系を用いてレコンビナントタ

ンパク質を作製し、生化学的な機能アッセイに使用することにより、分子メカニズムが明らかになることが期待される。

B. 研究方法

1) ゼブラフィッシュのVATER連合様モデル  
現在までにわれわれは、ニワトリ胚にアドリアマイシンを曝露すると腸管閉鎖などのVATER連合様の症状が出現することを明らかにした。体が透明で、体外発生をするゼブラフィッシュでも同様の現象が起こるかを確かめるために、受精直後のゼブラフィッシュ胚に0~100 ppmのアドリアマイシン（ドキシソルビシン）、およびその誘導体を持続曝露した。その後、孵化率について用量・反応曲線を求めた。腸管閉鎖に関しては、実体顕微鏡による形態学的観察を行った後、胚をパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色により組織学的解析を行った。

2) 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。

3) アドリアマイシン結合タンパク質の同定  
VATER連合様の症状が引き起こされる分子メカニズムを明らかにするために、ナノビーズにアドリアマイシンをカプリングし、ハミルトンステージ12のニワトリ胚のタンパク抽出液を反応させた。カラムを洗浄後、フリーのアドリアマイシンにより結合タンパク質を溶出し、

SDS-PAGE、銀染色により結合タンパク質を確認した。約70kDaの単一バンドを切り出し、質量分析により分子種を同定した。

#### 4) レコンビナントタンパク質の精製

アドリアマイシン結合タンパク質遺伝子として同定されたヒトの遺伝子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) ゼブラフィッシュの VATER 連合様モデル

20~50 ppm の濃度で用量依存的な孵化率の低下が現れた。実体顕微鏡による形態の観察では、アドリアマイシン暴露群で卵黄嚢の拡張、眼球変形、脊柱湾曲、循環不全、心不全が確認された。組織学的な観察からは、暴露群において心臓の低形成、前腸の内腔閉鎖、後腸の腸管壁の細胞配列の菲薄化が認められた。これらの症状は VATER 連合やニワトリモデルにおいてみられるものと類似しており、アドリアマイシンの催奇作用は種を超えて保たれていることがわかった。ただし、前腸閉鎖以外の異常は明らかではなかった。

#### 2) 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、国立遺伝学研究所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。

#### 3) アドリアマイシン結合タンパク質の同定

FG (ferrite-glycidyl methacrylate) ビーズは、東工大の半田宏教授が開発したビーズで、低分子化合物を用いたプルダウンに特化し、低バックグラウンドのタンパク質精製を可能とするさまざまな特徴を兼ね備えている。カルボキシビーズに、アドリアマイシンアミノ基をカップリングし、ハミルトンステージ12の約100個のニワトリ胚から抽出したタンパク質を反応させ、アドリアマイシン結合タンパク質をアフィニティ精製した。SDS-PAGE、銀染色を行ったところ、コントロールであるアドリアマイシンを結合させていないビーズと比べ、約70kDaのところに特徴的なバンドが出現した。質量分析で解析した結果、この単一バンドは、ほぼ同じ分子量からなる遺伝子Aと遺伝子Bであることがわかった。

#### 4) レコンビナントタンパク質の精製

文献上、遺伝子Aと遺伝子Bは互いに結合し、複合体を形成する。そこで、どちらのタンパク質がアドリアマイシンに結合するかを確認するために、両タンパク質をコードするcDNAをpET15bベクターに挿入し、スモールスケールのタンパク質発現を行った。このレコンビナントタンパク質をアドリアマイシンカップリングビーズと個別に反応させたところ、遺伝子A、遺伝子Bの両者ともアドリアマイシンに結合する能力があることが示された。

生化学的な解析を行うために、ラージスケールでのレコンビナントタンパク質精製を試みた。遺伝子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、遺伝子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った。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時間でタンパク質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。約70kDaのタンパク質が遺伝子Bであることがわかったので3Lの大量培養を行ったが、酵素アッセイに十分な量は取れなかった。

### D. 考察

アドリアマイシンによるVATER連合様症状は、ラットを始め、マウス、ニワトリ胎児で観察されている。これらに加えて魚類モデルを作ること、体外発生する胚の透明性に基づく高い観察性、扱いが容易なことに起因する高い操作性の観点から、従来のモデル動物にはない利点があると考えられる。アドリアマイシンに曝露されたゼブラフィッシュ胚は上部腸管で腸管閉鎖が起こり、VATER連合の少なくとも一部は再現できたと考える。

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。胚を固定し、

組織切片を作る方法に比べて、トランスジェニックシステムを用いた方法は、共焦点顕微鏡による組織断面の解析が可能であるし、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、発生のどの時期が腸管閉鎖に感応性かを調べる予定である。

ナノビーズを用いたアドリアマイシン結合タンパク質の同定は、アドリアマイシン自体の構造が複雑であることもあり、バックグラウンドが少ない、ほぼ単一バンドに由来するタンパク質が得られた。

これらのタンパク質の生化学的な意義を理解するためにリコンビナントタンパク質を作製した。遺伝子Aは容易に精製できたものの、遺伝子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ったため、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遺伝子A/遺伝子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る。今後は、モルフォリノや変異体の利用や、次世代シーケンサーによる包括的トランスクリプトーム解析などにより、RNA代謝と管腔形成の関連を調べていく予定である。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

透明で体外発生をするゼブラフィッシュで、アドリアマイシン曝露による上部消化管の閉鎖を誘起できたことは、環境要因におけるVATER連合発症メカニズムの機序の解明に大きく貢献するものと思われる。特に、Gal4-UASシステムで、生きたまま腸管発生を観察できるトランスジェニックゼブラフィッシュシステムができたことは、今後の解析を容易にする。

ナノビーズと質量分析により、互いに結合するRNA関連因子、遺伝子Aと遺伝子Bがともにアドリアマイシンに結合することが明らかとなり、分子標的を含めた議論が加速されるものと思われる。ヒトにおけるVATER連合は、妊婦がアドリアマイシンに曝露される機会が少ないことから直接の原因とは考えられないが、ある種の遺伝子、環境要因が遺伝子A/遺伝子B系の上流・下流、あるいは周辺分子に影響を及ぼす可能性は否定できない。今後のさらなる発展が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakamura S, Watakabe I, Nishimura T, Toyoda A, Taniguchi Y, Tanaka M. Analysis

of medaka sox9 orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance. PLoS One. 7(1):e29982, 2012.

- 2) Ishikawa T, Taniguchi Y, Okada T, Takeda S, Mori K. Vertebrate unfolded protein response: mammalian signaling pathways are conserved in Medaka fish. Cell Struct Funct. 36(2):247-259, 2011.
- 3) Chisada S, Okamoto H, Taniguchi Y, Kimori Y, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Yoshiura Y. Myostatin-deficient medaka exhibit a double-muscling phenotype with hyperplasia and hypertrophy, which occur sequentially during post-hatch development. Dev Biol. 359(1):82-94, 2011.

## 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
- 2) 谷口善仁、加部泰明、小崎健次郎。ナノビーズによるドキシソルビシン標的タンパク質の単離 第34回日本分子生物学会年会 2011年 横浜
- 3) 谷口善仁、加部泰明、小崎健次郎。ニワトリ胚とナノビーズを用いたアドリアマイシンの分子標的の同定 第51回日本先天異常学会学術集会 2011年 東京

## 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  
総合研究報告書

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

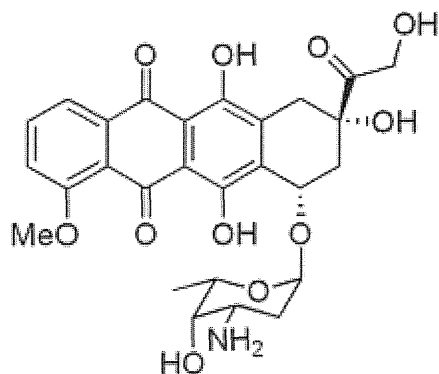
研究分担者 加部泰明 慶應義塾大学医学部 専任講師

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。

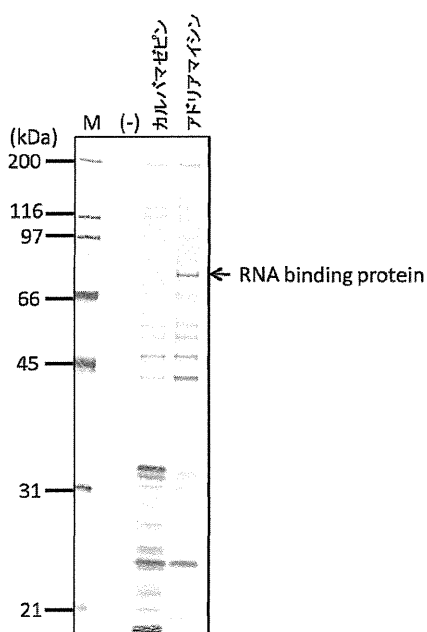


図 アドリアマイシン結合タンパク質のアフィニティ精製

#### D. 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シンの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。

#### E. 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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hotta K, Nashimoto A, Yasumura E, Suzuki M, Azuma M, Iizumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H, Handa H. Vesnarinone Suppresses TNF $\alpha$

mRNA Expression by Inhibiting Valosin-containing Protein. Mol Pharmacol. 2014, in press.

- 2) 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. 83(3):613-20, 2013.
- 3) Noma N, Simizu S, Kambayashi Y, Kabe Y, Suematsu M, Umezawa K. Involvement of NF- $\kappa$ B-mediated expression of galectin-3-binding protein in TNF- $\alpha$ -induced breast cancer cell adhesion. Oncol Rep. 27(6):2080-4, 2012.
- 4) 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.
- 5) 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 $\alpha$  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、梶村眞弓、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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

「一酸化炭素(CO)による脂肪酸、コレステロールの取り込み阻害」末松誠、加部泰明、特願2011-263015, 2011.11.30,

##### 2. 実用新案登録

無し

##### 3. その他

無し

# 〔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
小崎里華	VATER症候群	大関武彦 他	今日の小児の治療指針	医学書院	東京	2011	190
小崎里華	染色体異常症の子どもを経過観察する際のポイント	五十嵐隆 他	小児思春期診療最新マニュアル2011	中山書店	東京	2011	
加部泰明、末松誠、半田宏		杉浦悠季	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	東京	2014	印刷中

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
Takenouchi T, Nishina S, Kosaki R, Torii C, Furukawa R, Takahashi T, Kosaki K	Concurrent deletion of BMP4 and OTX2 genes, two master genes in ophthalmogenesis	Eur J Med Genet.	56(1)	50-53	2013
Takenouchi T, Okuno H, Kosaki R, Ariyasu D, Torii C, Momoshima S, Harada N, Yoshihashi H, Takahashi T, Awazu M, Kosaki K.	Microduplication of Xq24 and Hartsfield syndrome with holoprosencephaly, ectrodactyly, and clefting.	Am J Med Genet A.	158A (10)	2537-2541	2012
Takenouchi T, Enomoto K, Nishida T, Torii C, Okazaki T, Takahashi T, Kosaki K.	12q14 microdeletion syndrome and short stature with or without relative macrocephaly.	Am J Med Genet A	158A (10)	2542-2544	2012
Takenouchi T, Nakazawa M, Kanemura Y, Shimozato S, Yamasaki M, Takahashi T, Kosaki K.	Hydrocephalus with Hirschsprung disease: severe end of X-linked hydrocephalus spectrum.	Am J Med Genet A	158(4)	812-815	2012
Kosaki K, Saito H, Kosaki R, Torii C, Kishi K, Takahashi T.	Branchial arch defects and 19p13.12 microdeletion: defining the critical region into a 0.8 M base interval.	Am J Med Genet A	155A (9)	2212-4	2011

<p>Takeouchi T, Nakazawa M, Kanemura Y, Shimozato S, Yamasaki M, Takahashi T, Kosaki K.</p>	<p>Hydrocephalus with Hirschsprung disease: severe end of X-linked hydrocephalus spectrum.</p>	<p>Am J Med Genet A</p>	<p>158(4)</p>	<p>812-815</p>	<p>2012</p>
<p>Miyazaki O, Nishimura G, Sago H, Horiuchi T, Hayashi S, Kosaki R.</p>	<p>Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasia with 3D CT.</p>	<p>Pediatr Radiol.</p>	<p>42(7)</p>	<p>842-52</p>	<p>2012</p>
<p>Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J.</p>	<p>Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes with marked midface retrusion.</p>	<p>J Hum Genet.</p>	<p>57(3)</p>	<p>191-6</p>	<p>2012</p>
<p>Tsutsumi Y, Kosaki R, Itoh Y, Tsukamoto K, Matsuoka R, Shintani M, Nosaka S, Masaki H, Iizuka Y</p>	<p>Vein of Galen Aneurysmal Malformation Associated With an Endoglin Gene Mutation.</p>	<p>Pediatrics.</p>	<p>128(5)</p>	<p>1307-10</p>	<p>2011</p>
<p>Misako Naiki, Seiji Mizuno, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Reiko Kimura, Makoto Oshiro, Nobuhiko Okamoto, Yoshio Makita, Mariko Seishima, and Nobuaki Wakamatsu</p>	<p>MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome</p>	<p>Am J Med Genet</p>	<p>158A</p>	<p>97-102</p>	<p>2012</p>
<p>Shimojima K, Okamoto N, Suzuki Y, Saito M, Mori M, Yamagata T, Momoi MY, Hattori H, Okano Y, Hisata K, Okumura A, Yamamoto T.</p>	<p>Subtelomeric deletions of 1q43q44 and severe brain impairment associated with delayed myelination.</p>	<p>J Hum Genet.</p>	<p>57</p>	<p>593-600</p>	<p>2012</p>
<p>Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N.</p>	<p>MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome</p>	<p>Am J Med Genet Part A</p>	<p>158</p>	<p>97</p>	<p>2012</p>
<p>Seiji Mizuno, Daisuke Fukushi, Reiko Kimura, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Toshiyuki Kumagai, Nobuaki Wakamatsu</p>	<p>Clinical and genomic characterization of siblings with a distal duplication of chromosome 9q (9q34.1-qter)</p>	<p>Am J Med Genet A,</p>	<p>155 (9)</p>	<p>224-2280</p>	<p>2011</p>



Yamada K, Fukushi D, Ono T, Kondo Y, Kimura R, Nomura N, Kosaki KJ, Yamada Y, Mizuno S, Wakamatsu N.	Characterization of a de novo balanced t(4;20)(q33;q12) translocation in a patient with mental retardation.	Am J Med Genet A.	152A (12)	3057-67	2010
Nakamura S, Watakabe I, Nishimura T, Toyoda A, Taniguchi Y, Tanaka M.	Analysis of medaka sox9 orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance.	PLoS One.	7	e29982	2012

[IV]

研究成果の刊行物・別冊

# Proportion of malformations and genetic disorders among cases encountered at a high-care unit in a children's hospital

Akiko Soneda · Hideki Teruya · Noritaka Furuya · Hiroshi Yoshihashi · Keisuke Enomoto · Aki Ishikawa · Kiyoshi Matsui · Kenji Kurosawa

Received: 5 May 2011 / Accepted: 5 July 2011 / Published online: 16 July 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Genetic disorders and birth defects account for a high percentage of the admissions in children's hospitals. Congenital malformations and chromosomal abnormalities are the most common causes of infant mortality. So their effects pose serious problems for perinatal health care in Japan, where the infant mortality is very low. This paper describes the reasons for admissions and hospitalization at the high-care unit (HCU) of a major tertiary children's referral center in Japan. We retrospectively reviewed 900 admission charts for the period 2007–2008 and found that genetic disorders and malformations accounted for a

significant proportion of the cases requiring admission to the HCU. Further, the rate of recurrent admission was higher for patients with genetic disorders and malformations than for those with acquired, non-genetic conditions. Over the past 30 years, admissions attributed to genetic disorders and malformations has consistently impacted on children's hospital and patients with genetic disorders and malformations form a large part of this facility. These results reflect improvements in medical care for patients with genetic disorders and malformations and further highlight the large proportion of cases with genetic disorders, for which highly specialized management is required. Moreover, this study emphasizes the need for involvement of clinical geneticists in HCUs at children's hospitals.

**Grant sponsor** The Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan

A. Soneda · N. Furuya · H. Yoshihashi · K. Enomoto · A. Ishikawa · K. Kurosawa (✉)  
Division of Medical Genetics,  
Kanagawa Children's Medical Center,  
2-138-4 Mutsukawa, Minami-ward,  
Yokohama 232-8555, Japan  
e-mail: kkurosawa@kcmc.jp

H. Teruya  
Division of Critical Care Medicine,  
Kanagawa Children's Medical Center,  
Yokohama, Japan

K. Matsui  
Division of General Pediatrics,  
Kanagawa Children's Medical Center,  
Yokohama, Japan

H. Teruya  
Department of Pediatrics, Yokohama Rosai Hospital,  
Yokohama, Japan

K. Kurosawa  
Clinical Research Institute, Kanagawa Children's Medical Center,  
Yokohama, Japan

**Keywords** Malformation · Genetic disease · High-care unit · Children's hospital · Mortality

## Introduction

Genetic disorders and birth defects account for a high percentage of the admissions to children's hospitals [4, 13]. In 2008 [5], the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan reported that congenital malformations, chromosomal abnormalities, and genetic diseases are the leading causes of death in children during the first year of life. As per that report, 999 infants under the age of 1 year died of congenital malformations and chromosomal abnormalities; this corresponds to 35.7% of the total number of deaths in this age group. Since 1985, congenital malformations and chromosomal abnormalities have remained the leading causes of infant mortality in Japan [5]. Indeed, in USA it

has been found that patients with genetic disorders had a greater need for hospital admission and were hospitalized for longer durations than were those without genetic disorders [14].

However, recent advances in treatment are likely to improve the survival of individuals with congenital malformations, which, in turn, is likely to increase the rates of readmission to pediatric intensive care units (PICUs) [16]. Several studies have assessed the role of genetic disorders in pediatric mortality and hospitalization [2, 6, 7, 16]. Congenital malformations and chromosomal abnormalities pose serious challenges for perinatal health care in this country, as they are the leading contributors to the infant mortality rate in Japan.

In this study, we assessed the reasons for admissions and hospitalization to the high-care unit (HCU) of a major tertiary children's referral center in Kanagawa Prefecture, Japan, and compared our findings to those of a study of this unit 30 years ago. To elucidate the impact and contribution of birth defects and genetic diseases on pediatric hospitalization, we studied the reason for hospitalization, underlying diagnoses, and duration of hospitalization in this children's hospital in Japan.

## Materials and methods

Permission for the study was obtained from the Ethical Committee of our medical center.

We retrospectively analyzed the cases of children hospitalized at the HCU of Kanagawa Children's Medical Center (KCMC) between June 2007 and December 2008. KCMC is a major tertiary children's referral center for pediatric cardiology, surgery, and cancer cases and serves a large area in Kanagawa Prefecture, Japan. It has an institute for the severely handicapped, a PICU, a neonatal intensive care unit, and an HCU. In contrast to the PICU, which admits patients who have undergone cardiovascular or neurosurgery, the HCU specializes in pediatric patients with other acute conditions. All of the patients were included if they were admitted to the HCU from the emergency room, operating room, or inpatient ward. KCMC, with 419 beds, is the only specialized pediatric hospital in Kanagawa Prefecture, where the total number of births is 80,000 annually [8, 9]. About 8,500 patients (male/female, 1:1) were admitted to KCMC in 2007, and the average of hospital stay was 15.3 days.

We summarized and reviewed the medical charts of all patients admitted to the HCU. The charts and summaries were reviewed for age, sex, duration of hospitalization, underlying disease, and reason for admission. Sub-categories were created for the underlying diseases and reason for admission.

The underlying disease was classified into two main categories: genetic conditions and acquired (non-genetic) conditions. Genetic conditions were considered to include chromosomal abnormalities, recognizable malformation and dysplasia, multiple malformations, isolated malformations (e.g., those related to the heart, central nervous system (CNS), and respiratory and gastrointestinal tracts), other single-gene defect-related conditions, mitochondrial diseases, and metabolic disorders (Table 1). All cases of chromosomal abnormalities and multiple malformations were examined using standard karyotyping. Cases of recognizable malformation/dysplasia were ascertained by clinical dysmorphologists (H.Y., N.F., and K.K.). Acquired conditions were considered to include perinatal complications, trauma, neoplasm, and sequelae of severe infectious conditions.

The reasons for admission were classified as problems of the respiratory system, CNS, heart, gastrointestinal tract, kidneys and urinary tract, infectious diseases, post-operative management, and unknown condition. Those cases that did not fall into these categories were placed into a category called "others."

Statistical analyses were performed to compare the duration of hospitalization and the age distribution, using StatView version 5.0 (SAS Institute, Inc; Cary, NY). Categorical data were reported as counts and percentages, and continuous data as mean (SD) or median values. Statistical differences for categorical variables were determined by using chi-squared analyses. Median differences were compared by Mann–Whitney *U* test.

## Results

A total of 900 admissions, consisting of 687 individual cases with 200 recurrent admissions, were reviewed. Sixteen admissions were excluded from the study because of insufficient information regarding the underlying causes for admission.

The median age at admission was 3.5 years (range, 1 day–32.5 years), and the sex ratio was 1.36 (396 males and 291 females). The median lengths of hospitalization in the HCU were 4 days. Table 2 shows the distribution of the 884 admissions across the different categories of causes for admission. Most patients were admitted for common medical problems, including respiratory problems, post-operative management, and CNS problems. Of the 298 admissions for respiratory problems, most cases involved respiratory infection, including pneumonia and bronchitis. Admissions for post-operative management accounted for 30.7% cases (271 of 884 admissions), while CNS problems such as convulsions, encephalitis, and meningitis accounted for 16.3% (144 of 884 admissions).