

次世代シーケンサーを用いた遺伝子情報解析パイプラインの確立

研究分担者 長嶋 剛史 東北大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

次世代シーケンサーによって得られる大量の配列情報から生物学・医学的に興味深い遺伝子および変異を抽出するための遺伝子情報解析手法を開発し、それを用いて本研究事業によって産出されるシーケンスデータから病因候補遺伝子・変異を抽出することが本研究の目的である。これは、シーケンスデータ、サンプルに付随する情報、既知の遺伝子変異および遺伝子機能に関する情報を統合的に解析する遺伝子情報解析パイプラインを構築することにより実現する。

研究協力者

中山 啓子(東北大学大学院医学系研究科)

黒田 清隆(東北大学東北メディカル・メガバンク機構)

A. 研究目的

次世代シーケンサー（以下 NGS と略す）の登場により大量の配列情報が容易に得られるようになってきた。例えば、本研究事業で使用する Illumina 社の HiSeq2000 システムの場合、一度の実験で得られる配列情報はヒトゲノムの 20 倍に相当する 600Gb におよぶ。NGS データ解析においてはこのような大量の配列データを効率的に扱うための情報処理技術ならびに塩基配列から生物学・医学的に興味深い知見を抽出するためのバイオインフォマティクス解析手法が極めて重要な役割を果たす。

本分担研究では NGS データから希少遺伝性疾患との関連が示唆される候補遺伝子群の絞り込みを行い、生物学・医学的に意味のある情報を抽出するために必要な一連の情報解析の流れを遺伝子情報解析パイプラインとして構築する。

遺伝性疾患の原因遺伝子探索においては、想定される遺伝様式による絞り込み、既知変異の除外による新規候補変異の抽出、変異がタンパク質へ及ぼす機能の推定が重要となる。そこで、通常の変異解析に加え、これらの点を考慮した解析パイプラインの開発を行う。開発したパイプラインを用いて本研究事業によって産出されるデータを解析し病因遺伝子の解明を目

指す。

B. 研究方法

これまでに報告されている変異解析の手法を参考に遺伝子情報解析パイプラインを作成し PC クラスタシステム上に実装した。図 1 に解析の流れを示す。

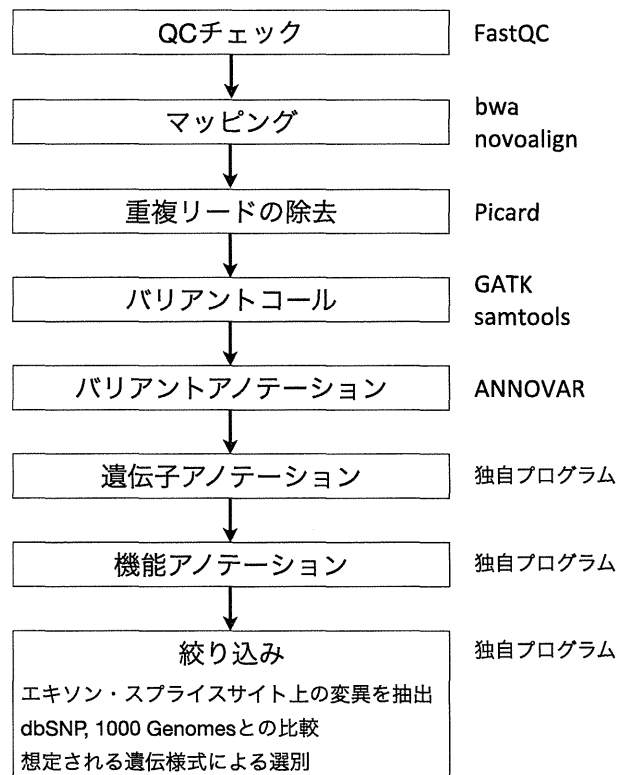


図 1 遺伝子情報解析パイプライン

本パイプラインの特徴は以下の 3 点である。

- (1) マッピングおよびバリアントコールについて

複数手法の併用により変異の検出感度を向上。

- (2) 複数の遺伝子構造情報データベースを用いることによって偽陰性を削減。
- (3) 遺伝子機能情報が付与された直感的かつ再利用可能な形式での結果の出力。

(倫理面への配慮)

本研究における倫理面への配慮については、遺伝子解析研究は3省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って行う。研究の遂行にあたっては、東北大学における倫理委員会の審査手続きを経て実施する。

C. 研究結果

・SNP アレイとの比較による解析パイプラインの評価
健常者全血由来のサンプルを用いて行ったエキソーム解析の結果と SNP アレイ (Illumina Human Omni 2.5 Quad) の結果を比較解析によってパイプラインの評価を行った。エキソーム解析に際しては、ゲノム DNA を断片化し TruSeq を用いて既知遺伝子のエキソン領域を濃縮したサンプルを HiSeq 2000 で paired-end (片側 101 塩基) で読み取ったものである。

変異検出の精度はシークエンスの結果得られたリード数と密接な関係にあるものと考えられる。そこで、評価のためのデータ取得にあたり、通常よりも多くのリードが得られるように設定の上シークエンスを行った。その結果 3.63 億リードを得た。標的領域における平均リード深度は 214 である。ここからランダムにダウンサンプリングすることにより、リード数と変異検出精度の関係を実データに基づいて解析した。ダウンサンプリングの結果、標的領域における平均リード深度 46、89、129 の3つのサブセットを得た。これに全リード使用時のデータを加え、4つのデータセットについてパイプラインを用いて解析し SNV を同定した。

SNP アレイのデータを正解セットと見なした場合の SNV 検出の精度を、リード数との関係で示したのが図 2 である。

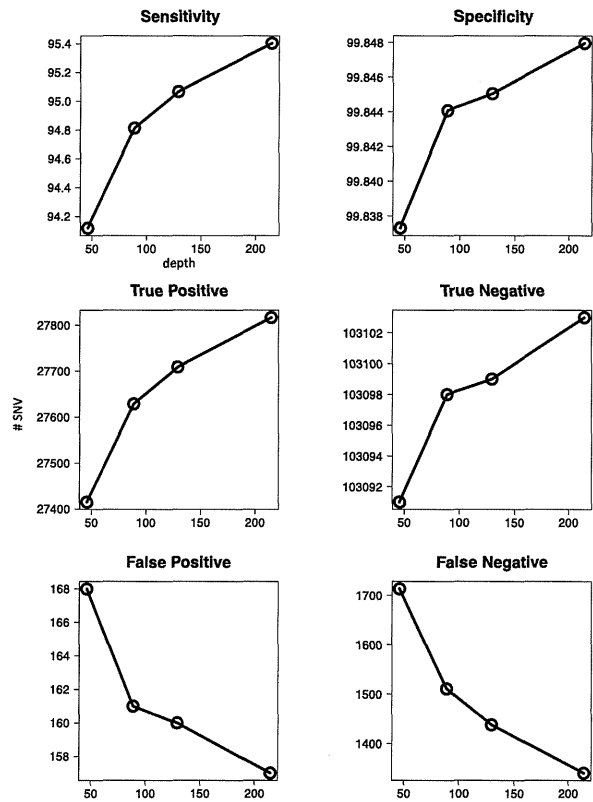


図 2 リード数と SNV 検出精度

図 2 より、リード数の増加に伴って感度、特異度ともに増加、偽陽性と偽陰性が減少することが分かる。リード数増加による精度向上は一定ではなく、増加前のリード数に依存する。精度の上昇幅は平均リード深度を 46 から 89 へ増加した場合が最大であった。また、リード数の増加による効果が最も顕著にあらわれた指標は偽陰性の低下であった。

・実データ解析

開発したパイプラインを用いて 50 サンプルの解析を行い、病因の候補と考えられる変異を同定した。得られた変異リストの検証、疾患との関連について現在共同研究者が詳細な解析を進めている。

D. 考察

本研究では NGS によって得られる大量の配列情報から対象とする疾患との関連が想定される変異を抽出するための遺伝子情報解析パイプラインを開発した。データ解析および SNP アレイとの比較解析からその有効性を検討した。得られた結果は本パイプラインが高精度に SNV 検出可能であることを示していた。

リード数と検出精度の間には明確な関係が認められた。必要となるリード数は解析の目的や利用できる検体数、コスト等とのトレードオフによって決定される場合が多い。リード数増加による検出精度の向上の度合いは平均リード深度 100 を超えたあたりから緩やかとなるためここが一つの目安となるものと考えられる。

E. 結論

本研究では NGS によって得られる配列データから病因の候補となる変異を抽出するために必要な一連のデータ解析を遺伝子情報解析パイプラインとして構築した。本研究で開発したパイプラインは本研究事業で得られるシーケンスデータに広く適用可能であり、今年度 50 サンプルの解析を行った。今後、それらの検証実験から得られる情報を元に解析パイプラインのさらなる精度向上を行う予定である。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara M. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *Journal of Human Genetics*. (in press)

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

特に無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特に無し

次世代シーケンサーを用いた RAS/MAPK 症候群における病因遺伝子の探索

研究分担者 新堀 哲也 東北大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

RAS/MAPK 症候群は、細胞内シグナル伝達経路 RAS/MAPK 経路を制御する分子に病因遺伝子を持ち、臨床的にも類似点を持つ Noonan 症候群、Costello 症候群、cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群などの総称である。Noonan 症候群および CFC 症候群では既知の病因遺伝子解析を行っても約 3 割は変異が同定されない。これらの例では新規の病因遺伝子が存在するとの仮説をもち、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を行った。新生突然変異を想定し、患者および臨床症状を持たない両親での解析を行い、変異を 4 つまで絞り込むことが可能であり、そのうちの 1 つは病因変異であると考えられた。また、既知病因遺伝子のスクリーニングを目的としてデスクトップ型次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスを行った。今後新規病因遺伝子の同定にはさらなる症例の積み重ねが必要と考えられた。

研究協力者

青木洋子（東北大学大学院医学系研究科）
井泉瑠美子（東北大学大学院医学系研究科）
矢尾板全子（東北大学大学院医学系研究科）

A. 研究目的

Noonan 症候群は低身長、特異的顔貌、心奇形、精神運動発達遅滞などを伴う症候群である。2001 年に原因遺伝子の 1 つである *PTPN11* が同定された。

PTPN11 がコードする SHP2 はプロテインチロシンホスファターゼであり、細胞外の成長因子・サイトカインなどからのシグナルを細胞内に伝達する

RAS/MAPK 経路を制御する分子である。Noonan 症候群では RAS/MAPK 経路を活性化する変異が同定されることが知られていた。*PTPN11* 遺伝子変異は Noonan 症候群患者の約 4 割のみに同定され、残りの 6 割は原因不明であった。また、相対的大頭、発達の遅れ、心奇形など共通した症状を持ち類縁疾患とされていた Costello 症候群、cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群は原因不明のままであった。我々はこれらの原因不明の患者では RAS/MAPK 経路を活性化する遺伝子変異が病因なのでは無いかとの仮説をもち、2005 年に Costello 症候群の原因遺伝子が *HRAS* であること、2006

年には CFC 症候群の原因遺伝子が *KRAS*、*BRAF* であることを発表した。これらの発見により類似した臨床症状を持つ症候群が同じシグナル伝達経路の調節異常により起こるということが示され、我々は RAS/MAPK 症候群という概念を提唱した（現在では RASopathy とも呼ばれる。）我々の発表以降、同様の仮説により Noonan (-like) 症候群の原因遺伝子として *KRAS*、*SOS1*、*RAF1*、*SHOC2*、*NRAS*、*CBL* が、CFC 症候群の原因遺伝子として *MEK 1/2* が同定された。しかしこれらの遺伝子変異が陰性な患者が Noonan 症候群、CFC 症候群でそれぞれ 3 割程度存在する。これらの患者においては新規病因遺伝子が存在すると考えられている。また、現在 RAS/MAPK 症候群の既知の病因遺伝子は上述の通り 11 種類あり、それらのすべてを従来のサンガー法で解析するにはかなりの労力を必要とすることから、効率的なスクリーニング法が必要とされている。そこで、我々は①既知の原因遺伝子変異陰性の患者において新規病因遺伝子の同定を目的とし、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を行った。さらに、②デスクトップ型次世代シーケンサーを用いた既知遺伝子変異スクリーニングの手法確立を目指し、Agilent 社 Haloplex を用いた既知病因遺伝子を中心としたターゲットリシーケ

ンスを行った。

Noonan 症候群および CFC 症候群の臨床診断は悩ましい例も多く、遺伝子解析により病因遺伝子変異が同定されなければ「疑い」診断で留まることがあり患者本人および家族にとっても不安を抱え続けることとなりうる。病因遺伝子が同定され診断がはっきりすれば、長期的な予後に見通しが立つ可能性や、遺伝カウンセリングに役立つなどのメリットが見込まれるほか、将来的には治療に役立てられる可能性がある。

B. 研究方法

①エクソーム解析

1、対象

患者の両親に症状がない場合、常染色体劣性遺伝形式や X 連鎖劣性遺伝形式も否定はできないが、Noonan 症候群では経験的に常染色体優性遺伝形式の報告がほとんどであるため、病因変異は新生突然変異であると仮定して変異の絞り込みを行うこととした。インフォームドコンセントを得た、両親健常の Noonan 症候群患者の末梢血から DNA を抽出した。まず既知の原因遺伝子である *PTPN11*、*HRAS*、*KRAS*、*SOS1* の全コーディングエクソン、*BRAF* のエクソン 6、11-16、*MEK1/2* のエクソン 2、3、*RAF1* のエクソン 7、14、17、*SHOC2* のエクソン 1 をキャピラリーシーケンサーで解析した。その結果これらの領域には変異が同定されなかった。新規病因遺伝子探索のため、この患者およびその両親の DNA を用いて次世代シーケンサーでエクソーム解析を行った。

2、エクソーム濃縮

患者 DNA を Agilent 社 SureSelect Human All exon kit v4 を用いてエクソーム濃縮とライブラリ調製を行った。

3、次世代シーケンサーでの解析

Illumina 社 HiSeq2000 を用いて 101×2 塩基のペアエンド解析も行った。得られたデータは bwa、GATK を用いて解析した。

②Haloplex を用いた既知遺伝子スクリーニング

1、対象

まずは既知の病因変異の同定が可能であるかを確認するため、それぞれ *PTPN11*、*HRAS*、*SOS1*、*SHOC2* に遺伝子変異が確認されている患者 4 人および変

異未同定の患者 3 人由来の DNA を用いた。

2、ターゲット領域濃縮

Agilent 社 Haloplex を用いてターゲット領域の濃縮を行った。ターゲット領域として、RASopathy の原因遺伝子である *PTPN11*、*HRAS*、*KRAS*、*BRAF*、*MEK1/2*、*SOS1*、*RAF1*、*SHOC2*、*NRAS*、*CBL*、*NF1*、*SPRED1* の非翻訳領域を含む全エクソン領域を含むようにデザインをした。

3、デスクトップ型次世代シーケンサーでの解析

Illumina 社の Miseq を用いて 150bp×2 ペアエンド解析を行った。患者 7 人およびキット付属のコントロール DNA の 8 サンプル分を 1 回のランで解析した。得られたデータは bwa および GATK を用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析研究は 3 省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って行った。本研究は、すでに東北大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

①エクソーム解析

両親の解析が可能であった例においてはエクソン領域に 28091 個の遺伝子変異が同定された。そのうち dbSNP および 1000 ゲノムプロジェクトといった SNP データベースにない変異は 1802 個であった。これらのうち、非同義置換変異は 834 個であった。さらにこれらのうち、両親に同定されなかった変異（つまり新生突然変異の可能性のある変異）は 73 個であった。これまでの文献によれば、1 世代あたりの非同義置換の新生突然変異は 1 個程度であることから、73 個のうちの多くが偽陽性であると考えられた。そこで変異同定ソフトウェアである GATK において quality score などを用いてフィルタリングを行い、より信頼性の高い変異を抽出した。患者で同定されたエクソン領域の変異 25093 個のうち、5 つが新生突然変異の候補とされた。そのうちの 4 つは SNP データベースになく、非同義置換であった。これらのうちの 1 つは *CBL* 遺伝子のスプライシング異常を起こす既知の変異であり、この変異が病因であると考えられた。新生突然変異を探索する戦略での病因候補絞り込みに成功した。

②Haloplex を用いた既知遺伝子スクリーニング

それぞれのサンプルあたり 92-174Mb の塩基情報を得た。これらの reference genome への map 率は 91-95%、ターゲット領域での Depth の平均は 521-980、中央値は最低で 137 であった。ターゲット領域の 92.9-97.3% は 5×以上でカバーされた。エクソン領域検出された SNV 数は 69-109 個であった。キャピラリーシーケンスですでに同定されている *PTPN11*、*HRAS*、*SOS1*、*SHOC2* の遺伝子変異はいずれも同定された。変異未同定患者においては既知遺伝子変異は同定されなかった。

D. 考察

エクソーム解析における病因遺伝子の絞り込み戦略のうち、孤発例で優性遺伝形式が想定される場合には、(1) 同じ疾患であれば同じ遺伝子に変異を持つとの仮説のもと、同じ疾患を持つ患者のみ複数解析し、それらの患者で共通して変異を持つ遺伝子を探す手法、(2) 両親の解析が可能である場合は病因変異が新生突然変異であることを想定して、患者にあって両親にない変異を探す手法、が考えられる。(1) の手法では解析が患者のみでよいという利点があるものの、患者数ある程度確保する必要があること、同じ疾患であっても異なる遺伝子に変異が存在することもまれではなく、解析した患者の一部は別な病因によることも想定して解析を進めなくてはならないこと、SNP データベースを用いて候補を絞り込むことを前提としており、SNP データベースの内容に結果が左右されることなどが問題となる。その一方で (2) の手法では非罹患者のご両親の解析を必要とするが、その結果による変異の絞り込みは非常にシンプルであり、かつ少数に病因候補を絞り込むことが可能である。我々は (2) の手法での絞り込みを試み、病因変異の同定を行うことができた。今回の例以外でも同様の戦略で先天奇形 1 例において病因変異を同定、別の 1 例では 2 つまで変異の絞り込みに成功している。この手法には適用できる症例に限られるものの有用な方法であるため、今後も (1) の手法のみならず (2) の手法が適用可能な症例のさらなる蓄積により新規病因遺伝子の同定が可能となると考えられる。

新規病因遺伝子を同定するためには、既知の病因変

異の有無を確認しておくことが必要である。エクソーム解析の対象となる前の段階での既知遺伝子変異の確認には、現在は主に 1 エクソン毎にキャピラリーシーケンスを行っている。この手法は、正確性は確保されているものの低スループットであり、新たな効率的なスクリーニング手法を確立したいと考えた。そのための条件としては (1) サンプル調整の手技が煩雑でないこと、(2) 正確性がある程度あること、(3) 高スループットであること、(4) 費用が高額でないこと、などが考えられる。今回用いた Haloplex では、サンプル調整は容易で、2 日で可能であった。データの正確性がどの程度確保できるかを言いかえれば、ターゲット領域がどの程度の割合でどの程度の depth でカバーできるかということになる。今回は既知の変異がすべて検出できていたものの、そのうちの 1 つは 2 本のリードのみでカバーされていた領域で検出されており、さらにその領域はカバーされていなかったサンプルもあった。Haloplex は制限酵素でゲノム DNA の断片化を行うため、制限酵素の認識配列に多型が存在すると、個人によってカバーのされ方が異なることが知られている。デザインの自由度があまりないキットを使用し、このようなある程度の頻度で変異が同定される領域が読めていない場合、データ量を増やす、キャピラリーシーケンスでカバーする、などの方策が必要と考えられる。データ量に関しては今回の解析で得られた結果では、平均の depth としては十分かと思われたが、中央値は低く、特定の領域の depth が高いため、平均値を釣り上げているものと考えられた。キャピラリーシーケンスでカバーする場合、その領域が多くなると簡便性が低下してしまう。今後はそのバランスを検討する必要がある。スループットと価格については、必要なデータ量の再検討などを行い 1 ラン当たり同時に解析できるサンプル数を今後検討する予定である。

E. 結論

次世代シーケンサーを用い、エクソーム解析およびターゲットリシーケンス解析で RAS/MAPK 症候群患者での遺伝子変異同定を試みた。既知変異の同定は可能であった。新規病因遺伝子同定には病因不明症例のさらなる蓄積を行い、解析をすすめる必要がある。

希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発のための遺伝子解析パイプラインの構築

研究分担者 舟山 亮 東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センター
細胞増殖制御分野 助教

研究要旨

次世代シーケンサーはヒトゲノムを 1~2 週間で解読できるので、単一遺伝子病の病因変異の同定に強力な手法である。また、大量の DNA 断片を並列に解読するため、読み取った配列のコピー数をカウントすることにより、遺伝子発現パターンの解析にも有用である。本分担者は東北大学大学院医学系研究科が所有する 3 台の次世代シーケンサーの管理と運用業務に従事しているため、まず、次世代シーケンサーの整備、運用状況を報告する。また、原発性胆汁性肝硬変（Primary Biliary Cirrhosis, PBC）の病態解明と新しい診断方法の開発を目的として、次世代シーケンサーを用いた血清中 microRNA の発現解析を実施したので、その結果も合わせて報告する。microRNA 発現解析の結果、PBC 罹患患者で特異的に発現が低下している 4 種類の microRNA を同定し、その標的遺伝子を見出した。本研究により PBC の病態解明が進むことが期待される。

研究協力者

中山 啓子

東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センター 細胞増殖制御分野 教授

A. 研究目的

次世代シーケンサーは、多数の DNA 断片の塩基配列を並列に解読することにより、従来型シーケンサーに比べて革命的に大量の塩基配列を解読することができる。本研究事業の拠点である東北大学大学院医学系研究科は高出力型の次世代シーケンサーを 3 台（HiSeq2000、Genome Analyzer IIx および SOLiD4）所有している。このうち HiSeq2000 は、本研究事業で整備した機器である。本分担者は 3 台のシーケンサーの管理と運用業務に従事しているため、まず、本学医学系研究科での次世代シーケンサーの整備、運用状況を報告する。

また、本分担者は、次世代シーケンサーを用いて、原発性胆汁性肝硬変（Primary Biliary Cirrhosis, PBC）の病態解明と新しい診断法開発に関する研究を実施した。PBC は、肝臓の炎症により肝内胆管が破壊

され、胆汁が肝臓内に停滞して、肝硬変へと進行する疾患である。自己免疫反応が関与していることが明らかになりつつあるが原因は不明で、特定疾患に指定されている。そこで本研究では PBC の病態解明と新しい診断法を開発することを目的として、1) 血清に含まれる微量の microRNA を解析するための次世代シーケンシング技術を確立する、2) この技術を利用し、PBC の罹患患者で特徴的な発現パターンを示す microRNA を探索する。

B. 研究方法

血清中 microRNA の次世代シーケンシング解析では、PBC 罹患患者（10 名）、B 型肝炎罹患患者、C 型肝炎罹患患者、および健常者（各 5 名）の 4 種類の血清を解析した。採取した血清 800 μ l から、Trizol LS を用いて total RNA を精製した。これを二本鎖 DNA に変換すると同時に、DNA 断片の両端にシーケンシング解析のためのアダプター配列を付加して、シーケンシングライブラリを作製した。その後、microRNA 由来の DNA 断片を多く含む、約 150bp のライブラリ DNA をサイズセレクトした後、次世代シーケンサー

めの有効な手立てはなかったが、患者支援団体、臨床診断支援グループ、遺伝子医療部門、遺伝学的検査部門、次世代シーケンサー解析部門、等とのネットワークを構築することにより、希少遺伝性難病の原因究明が飛躍的に進むことが期待される。

マイクロアレイ染色体解析により、明らかな病的変異のゲノムコピー数異常が検出されなかったMCA/MR syndrome 症例から、次世代シーケンサー解析の候補となる症例がないかについて慎重に検討し、適応と考えられた症例については主治医へ本研究への協力を改めて呼びかけている。次年度以降、さらに新規症例の収集に努めながら、過去にマイクロアレイ染色体検査でbCNVのみであった症例の臨床症状の見直しも繰り返し行うことにより、次世代シーケンサー解析の候補となる症例を増加させることが重要である。

E. 結論

難治性疾患克服研究事業の既存班と協同で、次世代シーケンサー解析の対象となるMCA/MR syndrome 症例の収集を行った。次世代シーケンサー解析に適した候補症例をさらに絞り込むため、収集症例にはゲノムコピー数異常に起因する既知の症候群を除外する目的でマイクロアレイ染色体検査を実施した。

F. 健康危険情報

特になし。(あれば書いてください)

G. 研究発表

1. 論文発表

Yanagi K, Kaname T, Wakui K, Hashimoto O, Fukushima Y, Naritomi K. Identification of Four Novel Synonymous Substitutions in the X-Linked Genes Neurologin 3 and Neurologin 4X in Japanese Patients with Autistic Spectrum Disorder. *Autism Res Treat.* 2012;2012:724072. Epub 2012 Jul 16.

Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y. Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2012 Feb;158A(2):412-6.

Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *Am J Med Genet A.* 2012 Apr;158A(4):861-8.

2. 学会発表

福嶋 義光. シンポジウム3: 希少難病患者支援と遺伝カウンセリング「難治性疾患克服研究事業と遺伝カウンセリング」. 第36回日本遺伝カウンセリング学会. 2012年6月8-10日, 松本

福嶋 義光, 松原 洋一, 野村 文夫, 斎藤 加代子, 高田 史男, 小杉 眞司, 玉置 知子, 櫻井 晃洋, 関島 良樹, 涌井 敬子, 加藤 光広, 小泉 二郎. 疾病中心から患者中心の希少難治性疾患研究を可能とする患者支援団体と専門家集団とのネットワーク構築. 日本人類遺伝学会第57回大会, 10月25-27日, 東京

涌井 敬子, 古庄 知己, 鳴海 洋子, 大橋 博文, 清水 健司, 岡本 伸彦, 水野 誠司, 黒澤 健司, 高田 史男, 川目 裕, 佐村 修, 服部 重人, 福嶋 義光. ゲノムコピー数異常の情報のみでは正確な染色体再構成の確認はできない -核型分析技術を含む細胞遺伝学的視点の必要性-. 日本人類遺伝学会第57回大会, 10月25-27日, 東京

鳴海 洋子, 清水 健司, 鮫島 希代子, 数川 逸郎, 中村 恒一, Yumie Rhee, Yoon-Sok Chung, 古庄 知己, Ok-Hwa Kim, 福嶋 義光, Woong-Yang Park, 西村 玄. NOTCH2 遺伝子エキソン34 変異における臨床像の検討. 日本人類遺伝学会第57回大会, 10月25-27日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし (あれば書いてください)

Genome Analyzer IIx を用いて配列決定した。

読み取った配列は、microRNA の配列データベース (miRBase) にマッピングし、各 microRNA の発現量を算出した。次に、検体間で発現量が変動している microRNA を抽出し、その変動パターンをクラスタリング解析により分類して、PBC 罹患患者で特徴的な発現パターンを示す microRNA を探索した。同定した microRNA の発現は、Taqman プローブ (Life Technologies) または miRCURY LNA microRNA PCR system (Exiqon) を用いた RT-qPCR により決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に沿って実施した。また、東北大学における倫理委員会の審査手続きを経て実施した。

C. 研究結果

1. 次世代シーケンサーの運用状況

本事業のゲノム・遺伝子解析は、主に、東北大学大学院医学系研究科で所有している 3 台の次世代シーケンサーを用いて行った。2012 年度 (4 月～11 月) に本学医学系研究科で解析を実施したのは 180 検体で、119 検体のエキソーム解析をはじめとして、small RNA 解析、RNA-seq 解析、全ゲノム解析、ChIP-seq 解析などを実施した。

本事業で整備した HiSeq2000 は、試薬の送液を制御するバルブにトラブルが多発したが、10 月 30 日に送液ユニットを新しい部品に交換した結果、送液のトラブルは解消した。

2. 血清中 microRNA の次世代シーケンズ解析

次世代シーケンサーを用いて読み取った、PBC、B 型肝炎、C 型肝炎および健常者の血清 microRNA を miRBase にマッピングした結果、1,594 種類の microRNA が検出された。このうち複数の検体で検出された 773 種類について発現量を算出し、検体間で発現変動を示した 191 種類の microRNA を抽出した。さらに、これら 191 種類の発現変動のパターンをクラスター解析により分類し、PBC で特徴的な発現パターンを示す miRNA を同定した。

同定した microRNA の血清中での発現量を、RT-qPCR により解析した。その結果、has-miR-505-3p と has-miR-197-3p を含む 4 種類の microRNA が PBC で特異的に発現量が低下していた。次世代シーケンズ解析の結果、PBC で特異的に発現量が増加している microRNA が抽出されたが、それらは RT-qPCR では確認することができなかった。

PBC で特異的に発現量が低下していた 4 種類の microRNA の標的遺伝子を、TargetScan 6.2 と TargetSpy database を用いて探索し、transmembrane protein 133 と zinc finger protein 462 を含む 42 種類の遺伝子を見出した。

D. 考察

本研究では、PBC の病態解明と新たな診断方法の構築を目的として、次世代シーケンサーを用いて血清 microRNA の発現パターンを解析した。PBC、B 型肝炎、C 型肝炎および健常者の血清で microRNA の発現パターンを比較し、PBC で特異的に発現が低下している 4 種類の microRNA を同定した。

microRNA の配列から標的遺伝子を予測した結果、これらの microRNA は 42 種類の遺伝子の発現を制御している可能性が考えられた。この中には、transmembrane protein 133 と zinc finger protein 462 が含まれていた。PBC 罹患患者の血中には、核膜タンパク質 Gp210 と zinc finger protein に対する自己抗体が存在することが報告されている。本研究の結果明らかになった microRNA の発現低下が、標的遺伝子の発現を上昇させることにより、PBC の病態に寄与している可能性がある。

血清中の核酸は極めて微量のため、次世代シーケンズ解析では 25 サイクルの PCR 増幅を行い、シーケンズライブラリを作製した。この過剰な PCR 増幅のために、次世代シーケンサーを用いた microRNA の発現量解析は定量性が低いことが問題である。この点を克服するためには、微量の核酸から効率的にシーケンズライブラリを構築し、PCR バイアスを最小限に抑える技術が必要である。現在、ピコグラム量の核酸から次世代シーケンズ解析を行うためのライブラリ構築システムを検証している。

E. 結論

疾患の原因を解明し、治療法を開発することを目的として、東北大学大学院医学系研究科では3台の高出力型次世代シーケンサーを駆使して研究を実施している。次世代シーケンサーの稼働率を最大にして、効率的に実験データを出力するために、読み取り結果の品質管理と機器のメンテナンスに細心の注意を払っている。特に、読み取り時のクラスター密度は、出力される塩基数に直接影響するので、最適なクラスター密度で解析を行うように工夫している。また、血清 microRNA の次世代シーケンス解析は、疾患の病態解明や診断マーカーの探索に有用な手法である。今回我々は、PBC 罹患者で特異的に発現が低下している4種類の microRNA を同定し、その標的遺伝子を見出した。本研究により PBC の病態解明が進むことが期待される。なお、本研究の成果は、現在、論文として投稿中である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakanome A, Brydun A, Matsumoto M, Ota K, Funayama R, Nakayama K, et al. Bach1 is critical for the transformation of mouse embryonic fibroblasts by Ras (V12) and maintains ERK signaling. *Oncogene*. in press Jul 30.

Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, et al. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *Journal of Human Genetics*. in press.

舟山亮. ChIP-seq 解析をはじめの人のために-ENCODE の ChIP-seq 解析ガイドライン-. 実験医学増刊号. 2013;31(2):201-5.

Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, et al. Nrf2-MafG

heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov 1;40(20):10228-39.

2. 学会発表

舟山亮, 細金正樹, 長嶋剛史, 中山啓子. shRNA ライブラリによるスクリーニングによる遺伝子サイレンシング機構の解析. 第35回日本分子生物学会年会. 2012年12月13日. 福岡県福岡市.

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

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

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
Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y;	Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey.	Am J Med Genet A.	158A	1083-94	2012
Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y.	Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure.	J Hum Genet			in press
有馬隆博	生殖補助医療由来の先天性ゲノムインプリンティング異常症	Japanese Journal of Reproductive Endocrinology 日本生殖内分泌学会雑誌	17	54-58	2012
Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Arima T.	Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression.	Hum Mol Genet.	21(3)	548-558	2012
Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, Arima T.	High-throughput detection of aberrant imprint methylation in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method.	BMC Medical Genomics.	5	8-17	2012
Arakawa C, Endo A, Kohira R, Fujita Y, Fuchigami T, Mugishima H, Ohtake A, Murayama K, Mori M, Miyata R, Hatai Y	Liver-specific mitochondrial respiratory chain complex I deficiency in fatal influenza encephalopathy.	Brain Dev	34(2)	115-7	2012
Akamizu T, Sakura N, Shigematsu Y, Tajima G, Ohtake A, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K	Analysis of plasma ghrelin in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II.	Eur J Endocrinol	166(2)	235-240	2012
Yamamoto T, Emoto Y, Murayama K, Tanaka H, Kuriu Y, Ohtake A, Matoba R	Metabolic autopsy with postmortem cultured fibroblasts in sudden unexpected death in infancy: Diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders.	Mol Genet Metab	106(4)	474-7	2012

Seki Y, Mizuochi T, Kimura A, Takahashi T, Ohtake A, Hayashi S, Morimura T, Ohno Y, Hoshina T, Ihara K, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Homma K, Hasegawa T, Matsuishi T	Two neonatal cholestasis patients with mutations in the SRD5B1(AKR1D1) gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment.	J Inherit Metab Dis	inpress		2012 Nov 16. [Epub ahead of print]
Inoue H, Mukai T, Sakamoto Y, Ogata T, et al.	Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency.	Clin Endocrinol	76 (1)	78–87	2012
Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T*	Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype.	Eur J Hum Genet	20 (9)	928–932	2012
Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Ogata T* et al.	Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome: correlation between phenotype and mosaic ratio in the body and the placenta.	Am J Med Genet A	158A (2)	465–468	2012
Koyama Y*, Homma K, Fukami M, Ogata T, et al.	Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using uUrinary Pregnanetriolone / Tetrahydrocortisone Ratio and 11 β -hydroxyandosterone by Gas chromatography - mass spectrometry.	Clin Chem	58 (4)	741–747	2012
Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Ogata T, et al.	Screening of MAMLD1 mutations in 70 Children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of two new mutations.	PLoS One	7 (3)	e32505	2012
Qin X-Y, Miyado M, Kojima Y, Ogata T, et al	Identification of novel low-dose bisphenol a targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients.	PLoS ONE	7 (5)	e36711	2012
Fukami M*, Tsuchiya T, Takada S, Ogata T, et al.	Complex genomic rearrangements in the SOX9 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula.	Am J Med Genet A	158A (7)	1529–1534	2012
Ogata T*, Fukami M, Yoshida R, Nagata E, Fujisawa Y, Yoshida A, Yoshimura Y	Haplotype analysis of ESR2 in Japanese patients with spermatogenic failure.	J Hum Genet	57 (7)	449–452	2012
Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Ogata T, et al.	Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies.	Hum Reprod	27 (8)	2541–2548	2012
Nagasaki K, Iida T, Ogata T, et al.	PRKARIA mutation affecting cAMP-mediated G-protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance.	J Clin Endocrinol Metab	97 (9)	E1808–1813	2012

Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Ogata T*, et al.	Mamld1 deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development.	Endocrinology	153(12)	6033-6040	2012
Fukami M*, Shozu M, Ogata T	Molecular bases and phenotypic determinants of aromatase excess syndrome.	Int J Endocrinol	2012	584-807	2012
Moritani M, Yokota I, Tsubouchi K, Ogata T, et al.	Identification of INS and KCNJ11 gene mutations in type 1B diabetes in Japanese children with onset of diabetes before 5 yr of age.	Pediatr Diabetes	2012 Sep 10. doi	10.1111/j.1399-5448.2012.00917.x.	[Epub ahead of print]
Nagasaki K*, Tsuchuya S, Saitoh A, Ogata T, Fukami M.	Neuromuscular symptoms in a patient with familial pseudohypoparathyroidism type Ib diagnosed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification.	Endocr J		(accepted)	
Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Ogata T* et al.	Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome.	PLoS ONE		(accepted)	
Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N.	A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic	Eur J Haematol.	90(2)	164-168	2013
Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N.	Autosomal-Dominant Chronic Mucocutaneous Candidiasis with STAT1-Mutation can be Complicated with Chronic Active Hepatitis and Hypothyroidism.	J Clin Immunol.	32(6)	1213-1220	2012
Takezaki S, Yamada M, Kato M, Park MJ, Maruyama K, Yamazaki Y, Chida N, Ohara O, Kobayashi I, Ariga T.	Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain.	J Immunol.	189(3)	1521-1526	2012
Mohammadzadeh I, Yeganeh M, Aghamohammadi A, Parvaneh N, Behniafard N, Abolhassani H, Tabassomi F, Hemmat M, Kanegane H, Miyawaki T, Ohara O, Rezaei N.	Severe primary antibody deficiency due to a novel mutation of mu heavy chain.	J Investig Allergol Clin Immunol.	22(1)	78-79	2012
Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O.	Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing.	DNA Res.	19(2)	143-152	2012
Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H.	Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome.	Rheumatol Int.	32(12)	3761-3764	2012

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 in mice and humans.	Hum Mol Genet.	21	1496-1503	2012
Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, M.D., 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, and Matsumoto N	Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease.	Neurology	78	803-810	2012
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.	105	553-558	2012
Uchida N, Sakamoto O, Irie M, Abukawa D, Takeyama J, Kure S, Tsuchiya S.	Two novel mutations in the lactase gene in a Japanese infant with congenital lactase deficiency.	Tohoku J Exp Med.	227	69-72	2012
Masamune A, Nakano E, Kume K, Kakuta Y, Ariga H, Shimosegawa T.	Identification of novel missense CTRC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis.	Gut	Epub ahead of print		2012
Kume K, Masamune A, Ariga H, Hayashi S, Takikawa T, Miura S, Suzuki N, Kikuta K, Hamada S, Hirota M, Kanno A, Shimosegawa T.	Do genetic variants in the SPINK1 gene affect the level of serum PSTI?	J Gastroenterol	47(11)	1267-74	2012
Yanagi K, Kaname T, Wakui K, Hashimoto O, Fukushima Y, Naritomi K	Identification of Four Novel Synonymous Substitutions in the X-Linked Genes Neuroligin 3 and Neuroligin 4X in Japanese Patients with Autistic Spectrum Disorder.	Autism Res Treat	2012	724072, 5 pages	2012
Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y	Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome.	Am J Med Genet A	158A	412-416	2012
Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K.	Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: report of a new patient with intractable seizures and review of literature.	Am J Med Genet A	158A	861-868	2012

Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Yamada K, Furui M, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Taketani T, Fukao T, Fukuda S	Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders: Evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay	Molecular Genetics and Metabolism	107	87-91	2012
Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S	Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1	Anal Bioanal Chem	10	Online	2012
Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, Tomita H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N.	Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features.	J Hum Genet	57(3)	207-11	2012
Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, Tomita H, Ozawa H, Niikawa N, Kurotaki N.	Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions.	J Hum Genet	57(6)	399	2012
Okada T, Hashimoto R, Yamamori H, Umeda-Yano S, Yasuda Y, Ohikubo K, Fukumoto M, Ikemoto K, Kunii Y, Tomita H, Ito A, Takeda M.	Expression analysis of a novel mRNA variant of the schizophrenia risk gene ZNF804A.	Schizophr Res	141(2-3)	277-8	2012
Shimizu A, Takano Y, Shi D, Yokokura S, Yokoyama Y, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nakazawa T, Fuse N.	Evaluation of CNTNAP2 gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese.	Molecular Vision	18	1395-1401	2012
Takano Y, Shi D, Shimizu A, Funayama T, Mashima Y, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nishida K, Nakazawa T, Fuse N.	Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in Japanese subjects with primary open angle, normal tension, and exfoliation glaucoma.	Am J Ophthalmol	154	825-832	2012

Shi D, Funayama T, Mashima Y, Takano Y, Shimizu A, Yamamoto K, Mengkegale M, Miyazawa A, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Nishida K, Nakazawa T, Richards JE, Fuse N.	Association of HK2 and NCK2 with Normal Tension Glaucoma in the Japanese Population.	PLoS ONE	8	e54115, 1-11	2013
Wakusawa K, Kobayashi S, Abe Y, Tanaka S, Endo W, Inui T, Iwaki M, Watanabe S, Togashi N, Nara T, Niihori T, Aoki Y, Haginoya K.	A girl with Cardio-facio-cutaneous syndrome complicated with status epilepticus and acute encephalopathy.	Brain Dev.			in press
舟山亮	ChIP-seq 解析をはじめの人のために-ENCODE の ChIP-seq 解析ガイドライン-	実験医学増刊	31	201-5	2013
Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, Engel JD, Yamamoto M	Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks	Nucleic Acids Res.	40	10228-39	2012

(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

Prevalence and Clinical Features of Costello Syndrome and Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome in Japan: Findings From a Nationwide Epidemiological Survey

Yu Abe,¹ Yoko Aoki,^{1*} Shinichi Kuriyama,² Hiroshi Kawame,³ Nobuhiko Okamoto,⁴ Kenji Kurosawa,⁵ Hirofumi Ohashi,⁶ Seiji Mizuno,⁷ Tsutomu Ogata,⁸ Shigeo Kure,⁹ Tetsuya Niihori,¹ Yoichi Matsubara¹ and Costello and CFC syndrome study group in Japan

¹Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

²Department of Molecular Epidemiology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

³Department of Genetic Counseling, Ochanomizu University, Tokyo, Japan

⁴Department of Medical Genetics, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Izumi, Osaka, Japan

⁵Division of Medical Genetics, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan

⁶Division of Medical Genetics, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan

⁷Department of Pediatrics, Central Hospital, Aichi Human Service Center, Kasugai, Aichi, Japan

⁸Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Shizuoka, Japan

⁹Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

Received 13 July 2011; Accepted 26 December 2011

Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome are congenital anomaly syndromes characterized by a distinctive facial appearance, heart defects, and intellectual disability. Germline mutations in *HRAS* cause Costello syndrome, and mutations in *KRAS*, *BRAF*, and *MAP2K1/2* (*MEK1/2*) cause CFC syndrome. Since the discovery of the causative genes, approximately 150 new patients with each syndrome have been reported. However, the clinico-epidemiological features of these disorders remain to be identified. In order to assess the prevalence, natural history, prognosis, and tumor incidence associated with these diseases, we conducted a nationwide prevalence study of patients with Costello and CFC syndromes in Japan. Based on the result of our survey, we estimated a total number of patients with either Costello syndrome or CFC syndrome in Japan of 99 (95% confidence interval, 77–120) and 157 (95% confidence interval, 86–229), respectively. The prevalences of Costello and CFC syndromes are estimated to be 1 in 1,290,000 and 1 in 810,000 individuals, respectively. An evaluation of 15 adult patients 18–32 years of age revealed that 12 had moderate to severe intellectual disability and most live at home without constant medical care. These results suggested that the number of adult patients is likely underestimated and our results represent a minimum prevalence. This is the first epidemiological study of Costello syndrome and CFC syndrome. Identifying patients older than 32 years of age and following up on the patients reported here is important to estimate the precise prevalence and the natural history of these disorders.

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

How to Cite this Article:

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. 2012. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: Findings from a nationwide epidemiological survey.

Am J Med Genet Part A 158A:1083–1094.

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; Grant sponsor: The Japan Society for the Promotion of Science; Grant sponsor: The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Conflict of interest: None.

*Correspondence to:

Yoko Aoki, MD, PhD, Department of Medical Genetics, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Sendai 980-8574, Japan.
E-mail: aokiy@med.tohoku.ac.jp

Published online 11 April 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/ajmg.a.35292

Key words: Costello syndrome; cardio-facio-cutaneous syndrome; prevalence; RAS-MAPK pathway

INTRODUCTION

Costello syndrome (OMIM 218040), a rare, multiple congenital anomaly syndrome, was first described by Costello in 1971 [Costello, 1971]. Costello syndrome is characterized by intellectual disability, a high birth weight, neonatal feeding problems, short stature, congenital heart defects, curly hair, distinctive facial features, nasal papillomata, and loose integuments of the back of the hands [Hennekam, 2003]. Cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome (OMIM 115150) was first described in 1986 [Reynolds et al., 1986]. Affected individuals present with heart defects, short stature, frequent intellectual disability, and ectodermal abnormalities such as sparse, fragile hair, hyperkeratotic skin lesions, and a generalized ichthyosis-like condition. These syndromes overlap phenotypically with Noonan syndrome (OMIM 163950). We discovered that *HRAS* mutations are causative of Costello syndrome [Aoki et al., 2005], and we and other group subsequently identified mutations in *KRAS*, *BRAF*, and *MAP2K1/2* (MEK1/2) in patients with CFC syndrome [Niihori et al., 2006; Rodriguez-Viciana et al., 2006]. Missense mutations in *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS*, *RAF1*, and *NRAS* have been identified in individuals affected by Noonan syndrome or Noonan syndrome with multiple lentigines, previously known as LEOPARD syndrome (OMIM 151100, 611554) [Tartaglia et al., 2001; Schubbert et al., 2006; Pandit et al., 2007; Razzaque et al., 2007; Roberts et al., 2007; Tartaglia et al., 2007; Cirstea et al., 2010]. Mutations in *SHOC2* have been identified in patients with Noonan-like disorder with loose anagen hair (OMIM 613563) [Cordeddu et al., 2009]. Because the clinical manifestations of these diseases are similar, a novel disease entity was proposed that consists of a syndrome characterized by a dysregulation of the RAS/MAPK signaling pathway [Aoki et al., 2008; Tidyman and Rauen, 2009].

Evaluation of the clinical manifestations of Costello and CFC syndromes revealed the similarities and differences between individuals with the diseases. Individuals with either syndrome have distinctive facial features; full cheeks and a large nose and mouth are characteristic of individuals with Costello syndrome, and a high cranial vault, bitemporal narrowing and a hypoplastic supraorbital ridge are characteristic of individuals with CFC syndrome. Wrinkled palms and soles have been thought to be characteristic features of individuals with Costello syndrome. A recent evaluation showed that 30% of individuals with CFC syndrome also have wrinkled palms and soles [Narumi et al., 2007]. Heart defects have been frequently reported in individuals with Costello and CFC syndromes; 61% of patients with Costello syndrome have hypertrophic cardiomyopathy, while 44 and 56% of Costello syndrome patients have congenital heart defects and arrhythmia, respectively. In contrast, hypertrophic cardiomyopathy, congenital heart defects, and arrhythmia have been observed in 36, 45, and 9%, respectively, of patients with CFC syndrome [Lin et al., 2011].

Approximately 10–15% of individuals with Costello syndrome develop malignant tumors, including transitional carcinomas in the bladder, rhabdomyosarcomas, and neuroblastomas

[Aoki et al., 2008; Kratz et al., 2011]. Although association of malignant tumors has been rarely reported in individuals with CFC syndrome, we observed patients with *BRAF* mutations who developed acute lymphoblastic leukemia (ALL) and non-Hodgkin lymphoma [Niihori et al., 2006; Makita et al., 2007; Ohtake et al., 2011].

The number of patients known to have these diseases is growing due to the identification of the causative genes. At least 150 genotyped patients with Costello syndrome have been reported [Lin et al., 2011]. In addition, more than 100 individuals with CFC syndrome have been reported in the literature [Rauen, 2007]. Till date, however, an epidemiological study has not been conducted. In order to identify the precise number of patients with these diseases, the natural history of the diseases, the prognosis and the rate of tumor development, we performed a nationwide investigation of both Costello syndrome and CFC syndrome.

MATERIALS AND METHODS

First-Stage Survey

The protocol we followed was established by the Research Committee on the Epidemiology of Intractable Diseases funded by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan [Kawamura et al., 2006]. The prevalence of intractable diseases, including moyamoya disease, pancreatitis and sudden deafness, were all reported using this protocol [Teranishi et al., 2007; Kuriyama et al., 2008; Satoh et al., 2011]. The protocol consists of a two-stage postal survey. The first-stage survey aimed to estimate the number of individuals with Costello syndrome or CFC syndrome, and the second-stage survey aimed to identify the clinico-epidemiological features of the two syndromes.

The pediatric departments of all hospitals were identified based on a listing of hospitals as of 2008 supplied by the R & D Co.LTD (Nagoya, Japan). These hospitals were classified into seven categories according to the type of institution (i.e., university hospital or general hospital) and the number of hospital beds. Hospitals were then randomly selected from each of these categories for sampling. The sampling rate was approximately 5, 10, 20, 40, 80, and 100% of general hospitals with less than 100 beds, 100–199 beds, 200–299 beds, 300–399 beds, 400–499 beds, and 500 or more beds, respectively, and 100% of university hospitals [Kuriyama et al., 2008]. To increase the efficiency of the study, we sent a survey form to 205 pediatricians and 44 clinical geneticists working in the departments of gynecology, genetics, or ophthalmology in university hospitals (See Supplemental eTable I in supporting information online). We also selected 29 physicians who previously sent patient samples to our facility for molecular analysis. These hospitals were separately classified into a “selected hospitals” category, and all hospitals in this category were surveyed. Another 205 institutions that treat the disabled were included in order to identify adult patients.

The survey was mailed out to the targeted departments of health institutes in October 2009 along with cover letters. A simple questionnaire was used to ask about the number of patients with Costello syndrome known to have an *HRAS* mutation, CFC syndrome patients with mutations in *KRAS*, *BRAF*, or *MAP2K1/2*