malformation syndrome: clinical consequences of hemizygous truncating OFD1 mutations in male patients. Clin Genet 83(2): 135-144, 2013.

113) Sugiura K, Takeichi T, Tanahashi K, Ito Y, Kosho T, Saida K, Uhara H, Okuyama R, Akiyama M. Lamellar ichthyosis in a collodion baby caused by CYP4F22 mutations in a non-consanguineous family outside the Mediterranean. J Dermatol Sci 72(2): 193-195, 2013.

114) Nitta H, Unoki M, Ichiyanagi K, Kosho T, Shigemura T, Takahashi H, Velasco G, Francastel C, Picard C, Kubota T, Sasaki H. Three novel ZBTB24 mutations identified in Japanese and Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients. J Hum Genet 58(7): 455-460, 2013.

115) Tanaka K, Sekijima Y, Yoshida K, Tamai M, Kosho T, Sakurai A, Wakui K, Ikeda S, Fukushima Y. Follow-up nationwide survey on predictive genetic testing for late-onset hereditary neurological diseases in Japan. J Hum Genet 58(8): 560-563, 2013.

116) Oshima H, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H and Oshima M: TNF-□/TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Noxo1 and Gna14 in tumor cells. Oncogene 2013 (doi: 10.1038/onc.2013.356)

117) Takenouchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H and Kosaki K: Multiple cafe′ au lait spots in familial patients with MAP2K2 mutation. Am J Med Genet (in press)

118) Yoshida GJ, Saya H.Inversed relationship between CD44 variant and c-Myc due to oxidative stress-induced canonical Wnt activation.Biochem Biophys Res Commun. 2013 [Epub ahead of print]

119) Ishimoto T, Sugihara H, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Okabe H, Hidaka K, Yokoyama N, Miyake K, Yoshikawa M, Nagano O, Komohara Y, Takeya M, Saya H, Baba H.Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation. Carcinogenesis. 2013 [Epub ahead of print]

120) Yoshida GJ, Saya H.EpCAM expression in the prostate cancer makes the difference in the response to growth factors.Biochem Biophys Res Commun. 2014 ;443(1):239-245.

121) Matsuo M, Shimodaira T, Kasama T, Hata Y, Echigo A, Okabe M, Arai K, Makino Y, Niwa S, Saya H, Kishimoto T.Katanin p60 Contributes to Microtubule Instability around the Midbody and Facilitates Cytokinesis in Rat Cells.PLoS One. 2013;8(11):e80392.

122) Fierro S, Seishima R, Nagano O, Saya H, Einaga Y.In vivo pH monitoring using boron doped diamond microelectrode and silver needles: application to stomach disorder diagnosis.Sci Rep. 2013;3:3257. .

123) Jin Y, Tachibana I, Takeda Y, He P, Kang S, Suzuki M, Kuhara H, Tetsumoto S, Tsujino K, Minami T, Iwasaki T, Nakanishi K, Kohmo S, Hirata H, Takahashi R, Inoue K, Nagatomo I, Kida H, Kijima T, Ito M, Saya H, Kumanogoh A.Statins decrease lung inflammation in mice by upregulating tetraspanin CD9 in macrophages.PLoS One. 2013;8(9):e73706.

124) Hirano T, Satow R, Kato A, Tamura M, Murayama Y, Saya H, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Fukami K.Identification of novel small compounds that restore E-cadherin expression and inhibit tumor cell motility and invasiveness.Biochem Pharmacol. 2013 ;86(10):1419-1429.

125) Yoshida GJ, Saya H, Zouboulis CC.Three-dimensional culture of sebaceous gland cells revealing the role of prostaglandin E2-induced activation of canonical Wnt signaling.Biochem Biophys Res Commun. 2013 ;438(4):640-646.

126) Wada T, Ishimoto T, Seishima R, Tsuchihashi K, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Masuko T, Wright NA, Furuhashi S, Hirashima K, Baba H, Kitagawa Y, Saya H, Nagano O.Functional role of CD44v-xCT system in the development of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia.Cancer Sci. 2013;104(10):1323-1329.

127) Oikawa T, Nakamura A, Onishi N, Yamada T, Matsuo K, Saya H.Acquired expression of NFATc1 downregulates E-cadherin and promotes cancer cell invasion.Cancer Res. 2013 ;73(16):5100-5109.

128) Kitagawa M, Fung SY, Onishi N, Saya H, Lee SH.Targeting Aurora B to the equatorial cortex by MKlp2 is required for cytokinesis.PLoS One. 2013;8(6):e64826.

129) Bao Y, Mukai K, Hishiki T, Kubo A, Ohmura M, Sugiura Y, Matsuura T, Nagahata Y, Hayakawa N, Yamamoto T, Fukuda R, Saya H, Suematsu M, Minamishima YA.Energy management by enhanced glycolysis in G1-phase in human colon cancer cells in vitro and in vivo.Mol Cancer Res. 2013;11(9):973-985.

130) Nishimura K, Oki T, Kitaura J, Kuninaka S, Saya H, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Kitamura T.APC(CDH1) targets MgcRacGAP for destruction in the late M phase.PLoS One. 2013;8(5):e63001.

131) Kim M, Kim M, Lee S, Kuninaka S,

Saya H, Lee H, Lee S, Lim DS.cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes.EMBO J. 2013;32(11):1543-1555.

132) Sampetrean O, Saya H.Characteristics of glioma stem cells.Brain Tumor Pathol. 2013 ;30(4):209-214

133) Ishikawa T, Shimizu T, Ueki A, Yamaguchi SI, Onishi N, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Yamaguchi R, Miyano S, Saya H.Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells.Cancer Sci. 2013;104(7):880-888.

134) Atsumi Y, Inase A, Osawa T, Sugihara E, Sakasai R, Fujimori H, Teraoka H, Saya H, Kanno M, Tashiro F, Nakagama H, Masutani M, Yoshioka K.The Arf/p53 protein module, which induces apoptosis, down-regulates histone H2AX to allow normal cells to survive in the presence of anti-cancer drugs.J Biol Chem. 2013;288(19):13269-13277.

135) Osawa T, Atsumi Y, Sugihara E, Saya H, Kanno M, Tashiro F, Masutani M, Yoshioka K.Arf and p53 act as guardians of a quiescent cellular state by protecting against immortalization of cells with stable genomes. Biochem Biophys Res Commun. 2013 ;432(1):34-39.

136) Higurashi N, Uchida T, Christoph L, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori M, Katsurabayashi S, Shirasaka S, Okano H and Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. Mol Brain 2013 May 2;6(1):19.

137) Kim C, Kim W, Lee H, Ji E, Choe YJ, Martindale JL, Akamatsu W, Okano H, Kim HS, Nam SW, Gorospe M, Lee EK. The RNA binding protein, HuD regulates autophagosome formation in pancreatic β cells by promoting autophagy-related gene 5 expression. J Biol Chem. 2013 Nov 25. [Epub ahead of print]

138) Bundo M, Toyoshima M, Ueda J, Nemoto-Miyake T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Okada Y, Akamatsu W, Kato M, Okano H, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K. Increased L1 Retrotransposition in the Neuronal Genome in Schizophrenia. Neuron in press.

139) Kohara, N.Hirayama, S.Shioda, M.Ozawa, A.Ohtani, E.Kawaguchi, M.Iemura, N.Matsunaga, A.Momiyama, M.Kobori, T.Masui, Japanese Cultured Cell Lines Collection from Hereditary Disease, ISBER 2013 Annual Meeting & Exhibits, May 6-8, 2013

2. 学会発表

1) 渡辺　聡，三嶋博之，朝重耕一，木下晃，吉浦孝一郎. Ion AmpliSeqTM Custom Panel を用いたKabuki症候群の変異解析. 第58回日本人類遺伝学会2013年11月20日（水）～23日（土），仙台

2) 大塚康史，佐々木健作，城崎幸介，東元　健，岡本伸彦，高間勇一，窪田昭男，松本富美，中山雅弘，吉浦孝一郎，副島英伸. シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析. 第58回日本人類遺伝学会2013年11月20日（水）～23日（土），仙台

3) 三嶋博之，西澤達也，吉浦孝一郎，片山俊明. TogoWS REST サービスによるUCSCゲノムデータベースの利用. 第58回日本人類遺伝学会2013年11月20日（水）～23日（土），仙台

4) 黒滝直弘，小野慎治，木下　晃，新川詔夫，小澤寛樹，吉浦孝一郎.　PRRT2の変異は発作性運動誘発性ジスキネジアだけでなく良性家族性乳児けいれんの原因でもある. 第58回日本人類遺伝学会2013年11月20日（水）～23日（土），仙台

5) 青山幸平、水野晴夫、齋藤伸治. Greig cephalopolysyndactyly 症候群と MODY2 を伴う隣接遺伝子症候群の１例. 第 36 回日本小児遺伝学会学術集会　平成 25 年 4 月 18 日

6) 副島英伸. ゲノム・インプリンティングとヒト疾患−間葉性異形成胎盤の分子遺伝学的解析　群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点セミナー 2013.9.20. 群馬大学

7) 副島英伸. インプリンティング疾患Beckwith-Wiedemann症候群と類縁疾患におけるエピゲノム・ゲノム異常. 第5回金沢大学学際科学実験センターシンポジウム「深遠なる疾患エピジェネティクス」2013.7.5. 金沢大学

8) 宮崎仁美、東元 健、矢田有加里、遠藤高帆、Sharif Jafar、小森敏治，、松田正史、古関庸子、中山学、副島英伸、半田宏、古関明彦、広瀬進、西岡憲一. Ash1l methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract Polycomb silencing. 第36回日本分子生物学会年会 2013.12.3-6. 神戸（1P-0177）

9) 副島英伸. Beckwith-Wiedemann症候群と関連疾患におけるゲノム・エピゲノム異常. 日本人類遺伝学会第58回大会「シンポジウム8　先天異常とゲノム・エピゲノム」203. 11.20-23. 仙台（S8-3プログラム・抄録集p108）

10) 中林一彦、Trujillo Alex Martin、田山千春、兼城英輔、和氣徳夫、副島英伸、緒方勤、Monk David、秦健一郎. ゲノムワイ

ドDNAメチル化解析によるヒトインプリントーム解明．日本人類遺伝学会第58回大会 203.11.20-23．仙台（O27プログラム・抄録集 p126）
11) 大塚泰史、佐々木健作、城崎幸介、東元健、岡本信彦、高間勇一、窪田昭男、松本富美、中山雅弘、吉浦孝一郎、副島英伸．シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析．日本人類遺伝学会第58回大会 203.11.20-23．仙台（O32プログラム・抄録集 p127）
12) 副島英伸、東元健、城崎幸介、八木ひとみ、大塚泰史、前田寿幸、青木早織、岡島翠、坂口勲、大場隆、片渕秀隆．間葉性異形成胎盤における11p15刷り込み領域の分子遺伝学的解析．日本人類遺伝学会第58回大会 203.11.20-23．仙台（O70プログラム・抄録集 p137）
13) 秋山辰穂、勝村啓史、埴原恒彦、太田博樹、中込滋樹、藤本一真、副島英伸、城圭一郎、木村亮介、石田肇、安河内朗、樋口重和．時計遺伝子 PERIOD2 の多型と光刺激応答の生理的多様性の関係及ひ゛その人類学的考察．第67回日本人類学会大会 203.11.1-4．筑波（Y-1抄録集 p43）
14) 小金渕佳江、中込滋樹、間野修平、石崎直也、河村正二、木村亮介、石田肇、城圭一郎、副島英伸、藤本一真、佐藤公俊、湯澤泉、安井美江、隈部俊宏、藤井清孝、秋山辰穂、埴原恒彦、太田博樹．モヤモヤ病原因遺伝子RNF213の琉球諸島・北部九州ヒト集団における遺伝的多型．第67回日本人類学会大会 203.11.1-4．筑波（A-28抄録集 p57）
15) 副島英伸、東元健、城崎幸介、八木ひとみ、大塚泰史、前田寿幸、青木早織、岡島翠、坂口勲、大場隆、片渕秀隆．間葉性異形成胎盤における11p15インプリント領域の分子遺伝学的解析．第21回日本胎盤学会学術集会 2013.10.25-26．名古屋市（一般演題2-1、プログラム・抄録集p55）
16) 青木早織、大場隆、岡島翠、坂口 勲、東元健、副島英伸、福永真治、片渕秀隆．本邦における間葉性異形成胎盤の臨床像．第21回日本胎盤学会学術集会 2013.10.25-26．名古屋市（一般演題2-2、プログラム・抄録集p55）
17) 鮫島梓、米田徳子、森尻昌人、米澤理可、米田哲、塩崎有宏、夫律子、中山雅弘、副島英伸、齋藤滋．母体血中sFlt-1が異常高値を示したPlacental Mesenchymal Dysplasiaの一例．第21回日本胎盤学会学術集会 2013.10.25-26．名古屋市（一般演題2-3、プログラム・抄録集p56）
18) 副島英伸、東元健、八木ひとみ、青木早織、鮫島梓、齋藤滋、夫律子、中山雅弘、坂口勲、大場隆、片渕秀隆．11p15インプリントドメインのメチル化異常を認めた間葉性異形成胎盤の1例．第20回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会 2013.9.28．鹿児島（一般演題3、抄録集p10）
19) Takamatsu Y, Maeda T, Matsuo M, Higashimoto K, Kawashima M, Matsushima T, Soejima H. Practical use of pyrosequencing analysis to detect Moyamoya disease susceptible gene RNF213 variant c.14576G>A. 3rd International Moyamoya Meeting. 2013.7.12-13. Sapporo (Workshop IV, invited oral speaker)
20) 大塚泰史、佐々木健作、城崎幸介、東元健、岡本信彦、高間勇一、窪田昭男、松本富美、中山雅弘、吉浦孝一郎、副島英伸．シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析．第48回日本小児腎臓病学会2013.6.28-29．徳島（抄録集p110，口演O-05，優秀演題奨励賞受賞）
21) 東元　健、城崎幸介、八木ひとみ、古庄知己、松原圭子、山田大輔、前田寿幸、大塚泰史、古関明彦、緒方勤、副島英伸．H19DMRメチル化異常で発症するインプリント疾患におけるH19DMRの変異解析．第7回日本エピジェネティクス研究会年会　2013.5.30-31．奈良（抄録集p60，ポスターP-36）
22) 前田寿幸、東元健、中林一彦、城崎幸介、八木ひとみ、緒方勤、秦健一郎、副島英伸．Beckwith-Wiedemann症候群におけるインプリントDMRのマルチローカスメチル化解析．第7回日本エピジェネティクス研究会年会　2013.5.30-31．奈良（抄録集p61，ポスターP-38）
23) 長嶋一昭、田中大祐、東元　健、八木ひとみ、杉崎　和、田原 裕美子、小倉かさね、佐藤広規、佐藤雄一、山野　言、副島英伸、稲垣暢也．新生児期低血糖合併Beckwith-Wiedemann症候群患者における病態形成機序の検討．第56回日本糖尿病学会年次学術集会　2013.5.16-18．熊本
24) <u>森崎裕子</u>．Marfan症候群と類縁疾患の原因遺伝子による臨床所見の比較検討．in 第49回日本小児循環器学会．(東京) 2013.7.11.
25) 森崎隆幸、<u>森崎裕子</u>．フィラミン異常症による大動脈瘤・解離．in 第59回日本人類遺伝学会（仙台）2013.11.20.
26) <u>森崎裕子</u>．「遺伝性稀少難病に対する国立循環器病研究センターの取り組み」in 第1回難病医療ネットワーク学会（大阪）シンポジウム2013.11.9
27) 宮本達雄　他　分裂期キネシンKIF2Aを介した細胞増殖に共役した繊毛退縮機構　第35回日本分子生物学会年会（神戸）2013年12月
28) 宮本達雄　他　人工ヌクレアーゼを用いたヒト培養細胞での一塩基編集：放射線感受性SNPの評価系構築への試み　第56回日本放射線影響学会（青森）2013年10月
29) 小林純也　他　酸化ストレスによるATM

キナーゼの活性制御　第56回日本放射線影響学会（青森）2013年10月

30) 松浦伸也　他　人工ヌクレアーゼによる一塩基編集法を利用したPCS (MVA)症候群の遺伝子間領域変異の同定　第58回日本人類遺伝学会（仙台）2013年11月
31) 富永牧子、黒田友紀子、松井潔、古谷憲孝、升野光雄、黒澤健司　新しいゲノム病13q12欠失症候群の1例　第116回日本小児科学会学術集会　2013.4.19-21. 広島
32) 黒澤健司、黒田友紀子、大橋育子、田上幸治、高野亨子、和田敬仁、井合瑞江、松井潔、小坂仁　自閉症・発達遅滞病因検索としてのマイクロアレイ染色体検査. 第55回日本小児神経学会学術集会　2013. 5.30-6.1　大分
33) 大橋育子、黒田友紀子、黒澤健司、和田敬二、小坂仁　17P13.3重複症候群の1例. 第55回日本小児神経学会学術集会　2013. 5.30-6.1　大分
34) 大橋育子、黒田友紀子、井田一美、成戸卓也、永井淳一、水野誠司、升野光雄、黒澤健司　マイクロアレイ染色体検査における「臨床的意義不明」の結果報告と問題点. 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会　2013.6.20-23. 川崎
35) 西悠里、黒田友紀子、大橋育子、成戸卓也、西村玄、黒澤健司　IFT122に変異と遺伝子内重複を認めたCranioectodermal dysplasia(CED)の姉妹例　日本人類遺伝学会第58回大会　2013.11.20-23.　仙台
36) 水野誠司、橋本真帆、菱川容子、木村礼子、山田憲一郎、山田裕一、若松延昭　COACH症候群(JS-H:Joubert syndrome with hepatic disease)の双生児例　第58回日本人類遺伝学会　平成25年11月23日　仙台
37) 水野誠司、村松友佳子、谷合弘子、伊藤弘紀、三宅紀子、松本直通　カブキ症候群患児にみられたDIP関節拘縮と屈曲線消失　第53回日本先天異常学会学術集会　2013年7月21日　大阪
38) 村松友佳子、岡本伸彦、鈴森伸宏、要匡、柳久美子、谷合弘子、熊谷恭子、大林伸太郎、成富研二、齋藤伸治、杉浦真弓、水野誠司　BCOR遺伝子変異を認めたLenz microphthalmia syndromeにおける表現型の検討　第53回日本先天異常学会学術集会　2013年7月21日　大阪
39) 岡本伸彦　他　GPI アンカー合成異常症であるPIGN 異常症の同胞例　日本人類遺伝学会
40) 岡本伸彦　他　次世代シークエンサー解析により診断したSENDA 小児例　日本人類遺伝学会シンポジウム8　先天異常とゲノム・エピゲノム
41) 岡本伸彦　他　1q41q42欠失症候群の1例　日本小児遺伝学会
42) 古庄知己（信州大学医学部附属病院　遺伝子診療部）、三宅紀子（横浜市立大学大学院医学研究科　遺伝学）、福嶋義光（信州大学医学部附属病院　遺伝子診療部）、松本直通（横浜市立大学大学院医学研究科　遺伝学）. D4ST1欠損に基づくEhlers-Danlos症候群の遺伝子解析状況. 第36回日本小児遺伝学会（平成25年4月18日　於　エソール広島、広島）
43) 古庄知己（信州大学医学部附属病院　遺伝子診療部）、三宅紀子（横浜市立大学大学院医学研究科　遺伝学）、福嶋義光（信州大学医学部附属病院　遺伝子診療部）. デルマタン4-O-硫酸基転移酵素-1欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群の発見. 第116回日本小児科学会学術集会（平成25年4月19日　於　広島）
44) 古庄知己、石川 真澄、黄瀬 恵美子、鳴海 洋子、関島 良樹、櫻井 晃洋、丸山 孝子、佐藤 瞳、水内 麻子、山下 浩美、玉井 真理子、河村 理恵、涌井 敬子、福嶋義光（信州大学医学部附属病院　遺伝子診療部）. 遺伝性・先天性疾患に関する横断的診療連携体制の構築：信州大学医学部附属病院遺伝子診療部の挑戦. 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（平成25年6月20日～23日　於　信州大学医学部附属病院、松本）
45) 古庄知己、岳鳳鳴、坂翔太、積田奈々、笠原優子、岡田尚巳、水本秀二、小林身哉、中山淳、三宅紀子、野村義宏、江良択実、簱持淳、石川真澄、涌井敬子、福嶋義光、松本直通、菅原一幸、佐々木克典、武田伸一. デルマタン4-O-硫酸基転移酵素（D4ST1）欠損によるEhlers-Danlos症候群（DDEDS）の疾患モデルの構築と検証. 日本人類遺伝学会第58回大会（平成25年11月21-23日　於：江陽グランドホテル）
46) 赤松　和土：招待講演：多能性幹細胞・神経幹細胞を用いた再生医療と病態解析：愛知医科大学　細胞治療研究会　2013年3月5日　愛知
47) 赤松　和土：シンポジウム　疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明および゛治療法確立研究：神経疾患患者由来細胞からの神経系細胞の誘導と病態解析：日本再生医療学会総会　2013年3月22日　横浜
48) 赤松　和土, 岡野　栄之：シンポジウム45 iPS細胞技術を用いた中枢神経系の再生と創薬研究：iPS technology-based cell therapy for damaged CNS and investigation of neural disorders.：第90回日本生理学会大会2013年3月29日東京
49) 赤松　和土：　特別講演：iPS細胞技術の神経疾患研究・治療への応用　第116回日本小児科学会学術集会2013年4月19日　広島
50) 赤松　和土：招待講演：iPS細胞技術を用いた神経系の再生医療と疾患解析　　第11回横浜小児先端医療セミナー　2013年5月24日　横浜
51) 赤松　和土：招待講演：iPS細胞技術を用

いた神経系の再生医療と疾患解析　第2回小児泌尿器科研究会　2013年6月1日　東京

52) 赤松　和土：招待講演：iPS細胞を使った神経疾患の治療法の開発: 第20回東京血管疾患研究所セミナー　2013年6月8日東京

53) 赤松　和土：シンポジウム　疾患iPS細胞と創薬：神経疾患患者由来細胞からの神経系細胞の誘導と病態解析：炎症再生学会　2013年7月2日　京都

54) 赤松　和土：「iPS technology-based regenerative medicine for damaged central nervous system」第11回遺伝子治療学会シンポジウム　2013年7月6日　岡山

55) 赤松　和土：「iPS細胞技術を用いた神経疾患研究と治療」第37回日本血液事業学会総会シンポジウム　2013年10月21日　札幌

56) 増井徹　「人体由来試料の商業利用の課題について 一わたしの体はだれのもの？」 第12 回日本組織移植学会・学術集会　ラフレさいたま　2013年 8 月 3 日

57) 増井徹　「医学研究における包括的同意」、日本医師会「第５回 第 XIII 次生命倫理懇談会」日本医師会館　 2013 年 8 月 22 日

58) 増井徹、坂手龍一、高橋一朗「遺伝子解析研究の基盤的支援ー難病研究資源バンクの取組」講演 日本人類遺伝学会第 58 回大会　　セミナー　江陽グランドホテル 宮城　 2013 年 11 月 23 日

59) 増井徹、坂手龍一、高橋一朗　「希少疾患の克服に向けて～研究基盤の重要性と課題」34回日本臨床薬理学会学術総会ランチョンセミナー　東京国際フォーラム　2013年12月5日

60) Masui, T.　What's mine is my own?　The First International Workshop onRegistration of Rarediseases, Tokyo Forum, July 26, 2013

61) 倉田　真由美, 深川　明子, 坂手　龍一, 堤　正好, 増井　徹「個人情報≠遺伝情報の取扱について一各指針の比較検討から」トーゴーの日シンポジウム 2013　時事通信ホール　東京、2013年 10 月 4

62) 坂手龍一、深川明子、平田誠、山下智也、山田弘、高橋一朗、増井徹「創薬・疾患研究をサポートする医薬基盤研究所のデータベース」トーゴーの日シンポジウム 2013　時事通信ホール　東京、2013年 10 月 5 日

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

（参照）成果物一覧

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総合研究報告書

遺伝子変異陽性患者の全国分布の把握と登録

研究分担者　小崎　健次郎
慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター　教授

研究要旨
先天異常症候群（奇形症候群）の多くは希少疾患である。治療研究を展開する上では、診断が確定している患者を把握することは重要である。本研究では、遺伝子変異陽性例の受療施設をデータベース化することにより、患者個人のプライバシーを保護しつつ、患者・主治医と研究者の継続的な連携を確保することを企図した。15疾患22遺伝子1286名を登録した。これらの症例は診断が確実な症例であり、臨床症状等の情報は今後、臨床研究を進めるうえでエビデンスの高い資料と考え得る。

A．研究目的

先天異常症候群（奇形症候群）の多くは希少疾患である。過去の研究により、全国の患者数の概数については把握がなされているが、診断の妥当性等についての検証は行われていない。従来、遺伝性疾患の治療は困難と考えられてきたが、遺伝性疾患に対して有効な低分子化合物が開発されたり、遺伝子編集技術の急速内進歩により、遺伝性疾患に対する治療可能性が現実のものとなりつつある。今後、治療研究を展開する上では、診断が確定している患者を把握することは重要である。一般に遺伝子診断の感度は100％ではないが、特異度はほぼ100％であるので、遺伝子変異陽性者を把握することは、今後の研究の発展を考える上で重要である。
全国の遺伝子変異陽性患者数の所在の概要に関する把握が求められる。患者の個人情報に抵触しない形で、患者の所在を把握する手法の確立が必要である。
本研究では、遺伝子変異陽性例の受療施設をデータベース化することにより、患者個人のプライバシーを保護しつつ、患者・主治医と研究者の継続的な連携を確保することを企図した。
　今後、遺伝子診断が確定診断の手法として普及することが期待される。遺伝子検査法として網羅的な手法である次世代シーケンサーが標準的な解析法になると予測される。次世代シーケンサーの国際標準データフォーマットとして一般的なVCF（Variant Call Format）であることを鑑み、受療施設情報を取り去り、日本人における先天異常症候群の病的遺伝子変異を統合したVCFファイルを作成し、全国の大学病院や検査会社等で参照・活用できるデータを生成することを目指した。

B．研究方法

各施設から集積されたデータをHGVS（Human Genome Variation Society）が定めるフォーマットに統一した（例１）。HGVSフォーマットに統一後、Leiden university medical centerが提供するMutalyzerを用いて表記ミスがないかどうかチェックした。レファレンス配列との記載が一致しない変異に関しては修正し、再度チェックを行い、最終的にレファレンス配列と整合性の取ることができなかったフォーマットに関しては、データ提供施設に問い合わせを行った。データ修正後、重複を削除した。提出されたデータがアミノ酸表記のみのものは除外した。

本学で集積したデータに関しては、上述の一連のチェックを行った後、IGV（Integrative Genomics View）の画面をAlamuteで確認し、Mutalyzer等を用いた一連の作業がレファレンス配列との整合性をチェックするのに適切であるか、アミノ酸表記が正しいかを確認した。

C．研究結果

15疾患22遺伝子1286名を登録した。これらの症例は診断が確実な症例であり、臨床症状等の情報は今後、臨床研究を進めるうえでエビデンスの高い資料と考え得る。さらに、詳細な情報が

得られた21遺伝子471変異から確実に病的変異と考えられるもの（フレームシフト、ナンセンス、de novoのミスセンス）を抜き出すと、21遺伝子261変異のデータとなった。これを次世代シーケンサー等で一般的なVCF（Variant Call Format）に変換し（例２）、日本人における先天異常症候群の病的遺伝子変異を統合したVCFを作成した。内訳に関しては表１に示す。これは、今後一般的な遺伝子検査法として普及が見込まれる次世代シーケンサーのデータフォーマットとなっており、日本人における先天異常症候群の病的遺伝子変異を統合したデータベースとなった。本研究班の活動範囲を超えて、全国の大学病院や検査会社等で参照・活用できるデータとなった。

BRAF	10
BUB1B	2
CDKN1C	8
CHD7	76
CREBBP	26
FBN1	30
HRAS	7
KMT2D	34
KRAS	1
MEK1	2
MEK2	1
MLL2	3
NSD1	7
PTPN11	15
RAF1	4
RIT1	9
SHOC2	1
SOS1	2
TGFBR1	4
TGFBR2	5
UBE3A	14
合計	261

表 1.

D．考察

遺伝子診断等により診断が確実である患者群について受療施設を含めてデータベース管理することで、各疾患の医療ニーズ・医療経済的ニーズの把握が可能となった。同時に全国の大学病院や検査会社等で参照・活用できる疾患原因変異のデータを編纂することができた。

①遺伝子変異陽性患者の登録

既に遺伝子診断により確定診断されている患者のレジストリー情報を用いて、レジストリーに個人情報は登録せず、主治医名（受療施設名）のみ登録した。レジストリーの登録を進めるとともに遺伝子変異のリストを(独)医薬基盤研究所の増井の協力を得てウェブサイトに公開した。レジストリーを活用して、先天異常症候群に関する全国共同研究を進めた。（基盤研：http://raredis.nibio.go.jp/malformation/management_guidelines、日本小児遺伝学会 http://p-genet.umin.jp/downloads/management_guidelines16.pdf）

②患者の変異の登録

登録された変異を有する細胞の作製（iPSを介するまたはヒト疾患モデル）→既承認薬のライブラリー・スクリーニングという一連の流れの各要素の最適化を行うことができた。一部の疾患については候補薬を得ることができた。今後は、疾患数を増やし、より多くの疾患に対する候補薬の同定に結び付けてゆく計画である。候補薬が得られた場合、登録した主治医・受療施設のデータベースを通じて、臨床治験への参加希望者をリクルートすることになる。

なお、遺伝子診断は各施設の倫理委員会の承認を経て実施した。倫理的な配慮から、遺伝子診断の結果は各施設内で個人情報を削除した上、全データを単一データファイルとした。当該ファイルから個人のゲノム情報を特定することは不可能である。上記の処理作業は各施設で完遂した。

E．結論

遺伝子診断等により診断が確実である患者群について受療施設を含めてデータベース管理することで、各疾患の医療ニーズ・医療経済的ニーズの把握が可能となった。同時に全国の大学病院や検査会社等で参照・活用できる疾患原因変異のデータを形式で編纂することができた。
国際的な病的変異データベースであるLOVDの規定する形式でもデータを整えた。

F．研究発表
1. 論文発表
Nomura T, Takenouchi T, Fukushima H, Shimozato S, Kosaki K, Takahashi T.Catastrophic Autonomic Crisis With Cardiovascular Collapse in Spinal Muscular Atrophy With Respiratory Distress Type 1.J Child Neurol. 2013 ;28(7):949-951.
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. 2013 ;56(1):50-53.
Ueda K, Awazu M, Konishi Y, Takenouchi T, Shimozato S, Kosaki K, Takahashi T.Persistent hypertension despite successful dilation of a stenotic renal artery in a boy with neurofibromatosis type 1.Am J Med Genet A. 2013 ;161(5):1154-1157.
Takenouchi T, Kosaki R, Torii C, Kosaki K.Daytime somnolence in an adult with Smith-Magenis syndrome.American Journal of Medical Genetics . 2013;161(7):1803-1805.
Takenouchi T, Saito H, Maruoka R, Oishi N, Torii C, Maeda J, Takahashi T, Kosaki K.Severe obstructive sleep apnea in Loeys-Dietz syndrome successfully treated using continuous positive airway pressure.Am J Med Genet A. 2013 ;161(7):1733-1736.
Hirasawa A, Zama T, Akahane T, Nomura H, Kataoka F, Saito K, Okubo K, Tominaga E, Makita K, Susumu N, Kosaki K, Tanigawara Y, Aoki D.Polymorphisms in the UGT1A1 gene predict adverse effects of irinotecan in the treatment of gynecologic cancer in Japanese patients. J Hum Genet. 2013;58(12):794-798.
Takenouchi T, Hida M, Sakamoto Y, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K.Severe congenital lipodystrophy and a progeroid appearance: Mutation in the penultimate exon of FBN1 causing a recognizable phenotype. Am J Med Genet A. 2013;161(12):3057-3062.
Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K .Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient withSimpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. Am J Med Genet A. 2014 Apr;164(4):993-7
Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Tanizaki H, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J, Heike T, Okuyama T, Kosaki R, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsuhashi Y, Amagai M.Mutations in SERPINB7, Encoding a Member of the Serine Protease Inhibitor Superfamily, Cause Nagashima-type Palmoplantar Keratosis.Am J Hum Genet. 2013 ;93(5):945-956.
Takagi M, Ishii T, Torii C, Kosaki K, Hasegawa T.A novel mutation in SOX3 polyalanine tract: a case of kabuki syndrome with combined pituitary hormone deficiency harboring double mutations in MLL2 and SOX3.Pituitary. 2013(in press)
Takenouchi T, Hashida N, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K.1p34.3 deletion involving GRIK3: Further clinical implication of GRIK family glutamate receptors in the pathogenesis of developmental delay.Am J Med Genet A. 2014 Feb;164(2):456-60
Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T. Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: A cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. Orphanet J. Rare Dis. 2013;8(1):172

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

例１：

CHD7	NM_017780.3:c.469C>T	p.(Arg157X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.490C>T	p.(Gln164X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.550C>T	p.(Gln184X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.604C>T	p.(Gln202X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.613C>T	p.(Gln205X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.640delT	p.(Ser214ProfsX91)	frameshift
CHD7	NM_017780.3:c.934C>T	p.(Arg312X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.1025delA	p.(Gln342ArgfsX10)	frameshift
CHD7	NM_017780.3:c.1036A>T	p.(Arg346X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.1281T>A	p.(Tyr427X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.1295delA	p.(His432LeufsX31)	frameshift
CHD7	NM_017780.3:c.1414_1417delACTG	p.(Thr472GlyfsX3)	frameshift
CHD7	NM_017780.3:c.1480C>T	p.(Arg494X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.1683delC	p.(Leu563X)	frameshift
CHD7	NM_017780.3:c.1957_1958delCC	p.(Pro653GlufsX22)	frameshift
CHD7	NM_017780.3:c.2096G>A	p.(Ser699Asn)	missense
CHD7	NM_017780.3:c.2101A>T	p.(Lys701X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.2180T>G	p.(Leu727X)	Nonsense
CHD7	NM_017780.3:c.2195delC	p.(Pro732HisfsX23)	frameshift
CHD7	NM_017780.3:c.2504_2508delATCTT	p.(Tyr835SerfsX14)	frameshift

例２：

```
##fileformat=VCFv4.0
#CHROM	POS	ID	REF	ALT	QUAL	FILTER	INFO
17	19559711	NM_000382.2:c.504_505insAG	G	GAG	.	.	.
12	124229474	NM_012463.3:c.1561_1562delATinsTGCAAAGGA	CAT
	CTGCAAAGGA	.	.	.
7	140501336	NM_004333.4:c.736G>C	G	C	.	.	.
7	140501303	NM_004333.4:c.769C>A	C	A	.	.	.
7	140501302	NM_004333.4:c.770A>G	A	G	.	.	.
7	140481402	NM_004333.4:c.1406G>A	G	A	.	.	.
7	140477853	NM_004333.4:c.1455G>C	G	C	.	.	.
7	140477848	NM_004333.4:c.1460T>G	T	G	.	.	.
7	140477813	NM_004333.4:c.1495A>G	A	G	.	.	.
7	140477807	NM_004333.4:c.1501G>A	G	A	.	.	.
7	140477806	NM_004333.4:c.1502A>G	A	G	.	.	.
7	140453987	NM_004333.4:c.1741A>G	A	G	.	.	.
15	40476003	NM_001211.5:c.670C>T	C	T	.	.	.
15	40498482	NM_001211.5:c.1833delT	TT	T	.	.	.
X	41712461	NM_003688.3:c.79C>T	C	T	.	.	.
X	41604817	NM_003688.3:c.316C>T	C	T	.	.	.
X	41379807	NM_003688.3:c.2632C>T	C	T	.	.	.
11	2906581	NM_000076.2:c.139C>T	C	T	.	.	.
11	2906403	NM_000076.2:c.316_317insGCGC	G	GGCGC	.	.	.
11	2906259	NM_000076.2:c.460delC	AC	A	.	.	.
11	2906018	NM_000076.2:c.701delG	GG	G	.	.	.
11	2905999	NM_000076.2:c.721C>T	C	T	.	.	.
```

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総合研究報告書

ヒストンアセチル化・メチル化異常症の検出法に関する研究

研究分担者　氏名　　吉浦　孝一郎
所属機関・職名　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

歌舞伎症候群原因遺伝子としてMLL2とKDM6Aが同定され，同症候群の個々の臨床症状は，ヒストンメチル化異常による遺伝子発現低下による可能性が高い。そこで，歌舞伎症候群患者末梢有核血球を用いて，全ゲノムを対象としてヒストンのメチル化プロファイリングを行い歌舞伎症候群症状発現に重要な役割を果たしている遺伝子領域を明らかにすることを目的とした。また，MLL2遺伝子，KDM6A遺伝子ともに変異のない歌舞伎症候群も存在するので，それら患者に共通する変異をExome解析法によって明らかにすることで，ヒストンのメチル化制御を含めたエピジェネティック制御に関わる遺伝子を明らかにすることを第二目的とした。

A．研究目的

先天性奇形症候群等の単一遺伝子疾患において，遺伝子変異が根本原因でありながら，病態発現には遺伝子変異によって引き起こされるヒストンアセチル化・メチル化異常が関わってくることが広く知られてきた。本研究班内および当教室に全国から収集される種々の疾患群の遺伝子検査，遺伝子変異陽性患者登録と研究資源収集を行いつつ，ヒストンアセチル化・メチル化異常，DNA メチル化異常を検出する手法を開発して病態発症予測を行い患者臨床に役立てることを目的とする。

B．研究方法

1. エピジェネティック解析に向けた患者試料収集

患者末梢血を収集し，ゲノム DNA を分離・抽出して遺伝子検査に保存および使用する。

細胞を分離しそのまま凍結し epigenetics 解析用に保存および使用する。

現有している歌舞伎症候群 DNA 試料は，精製 DNA または EB ウイルスによる株化細胞であり，ヒストンや DNA のエピジェネティック変化の解析は，およそ不可能である。エピジェネティック変化解析には，新鮮細胞あるいはおそらくプライマリー培養細胞（線維芽細胞など）が必要である。

新たに遺伝子診断を依頼される症例，あるいは既収集患者であっても定期的にフォローアップされている症例に関して，再度全ゲノム解析およびメチル化・アセチル化解析のために同意書を取得し直すと同時に，DNA 抽出と末梢有核血球の保存事業を行う。末梢血有核血球単離は，Blood lysis buffer (NH4Cl:155mM, KNCO3:10mM, EDTA:1mM) にて赤血球を溶血させ有核血球を遠心分離すると同時に，HetaSep (STEMCELL Technologies 社)を用いた有核血球分離法により行った。

2. 歌舞伎症候群患者解析

歌舞伎症候群原因遺伝子として，MLL2 遺伝子と KDMA6 遺伝子が同定されている。しかし，MLL2 遺伝子にも KDMA6 遺伝子にも原因変異が見つからない症例がある。今後のエピジェネティック解析のためには，MLL2 遺伝子と KDMA6 の変異探索を行いながら，変異陽性例，変異陰性例を区別しつつ収集保存する。変異陰性例については，新規原因遺伝子による可能性が残されており，本年も引き続き歌舞伎症候群患者の変異解析と exome 解析を継続した。MLL2 遺伝子と KDM6A 遺伝子変異陰性 15 例を対象として exome 解析を実施した。

Exon 濃縮は Agilent 社の SureSelect v5 を用い，シーケンサーは Illumina HiSeq2500 システムを用いた。

3. 収集患者試料解析のための Chromatin-Immunoprecipitation Sequence 法（ChIP-Seq 法）の効率化，標準化

ChIP-Seq 法は，大量のシーケンスが可能となり，また，メチル化ヒストン，アセチル化ヒストン，メチル化シトシン等に対する全ゲノムエピジェネティック解析が可能となってきている。我々は，次世代型シーケンサーとして 5500xl SOLiD システムの利点を活かして ChIP-Seq 法が可能になるように，5500xl SOLiD のシーケンスプロトコールを改良した。また，同時に次世

代シーケンスとして世界標準である Illumina HiSeq2500 も使用してシーケンス解析を進めた。

C．研究結果

歌舞伎症候群新規患者解析

1. エピジェネティック解析に向けた患者試料収集

昨年度，次世代シーケンサーを利用したシステムは構築した。前年度の４例に歌舞伎症候群遺伝子解析に加えて本年度，埼玉小児医療センターから４例（MLL2 変異陽性例２例，不明２例），北海道医療大学から２例（MLL2 変異陽性例２例），愛知学院大学１例（MLL2 変異陽性例１例），長崎大学１例（MLL2 変異陽性例１例），大阪市立大学から１例（MLL2 変異陽性例１例）の９例を新規収集した。愛知学院大学の１例を除いた８例の新鮮血から白血球を分離し，凍結保存した。

2. 歌舞伎症候群患者解析

MLL2 (KMT2D) および KDM6A に変異のない患者試料が 15 例ある。それらに関し exome 解析を行った。データの解析中であるが，共通に抽出される変異は発見されず，MLL2 (KMT2D), KDM2 以外の新規原因遺伝子は，見つかっていない。

3. 収集患者試料解析のための Chromatin-Immunoprecipitation Sequence 法（ChIP-Seq 法）の効率化，標準化

1) シーケンサープロトコールの改良：プロトコール改良は，通常の exome 解析法にて target 領域を広く塩基配列決定が出来ること（カバー率が高いこと）で評価した。平均 depth 70 程で depth > 15 領域が 90% 以上となり，SureSelect v4+UTR を使った exome 解析としては，Illumina 社の HiSeq システムを使用した時と同等以上の性能を示した。
シーケンサーシステムは，HiSeq2500 も使用しており，今後，ChIP-Seq 実験のデータ比較を SOLiD 法と HiSeq2500 法で行う予定である。

2) ホルマリン固定等の実験条件最適化：
ChIp-Seq 法では，ホルマリンによる DNA をヒストンの架橋の強度の最適化が必要であり現在検討中である。また，DNA のメチル化，ハイドロキシメチル化の同定のためにそれらの修飾シトシンの化学修飾が必要で，それらの検討を現在進めている。

D. 考察

エピジェネティック解析について，インフラ整備は整い実施できる体制を構築できた。KAPA DNA polymerase を使用し，emulsion PCRにてシーケンス鋳型を調整することで，これまでよりは偏りのないdataを出すことが可能で，全ゲノムを対象としたエピジェネティック解析が可能となった。また現在，患者の実試料（血球や線維芽細胞）の調製法について最適化の検討を行っており，最適化が終了次第，ChiP-Seq法と修飾シトシン解析法にて歌舞伎症候群患者末梢血試料を使用して，エピジェネティック変化部位の特定を目指す。これにより，歌舞伎症候群の個々の症状発症の原因となっている遺伝子領域が個別に特定されていくと期待できる。現状は，まだ患者末梢血を用いたヒストンアセチル化領域を目標とした ChIP-Seq法 によるヒストンアセチル化異常部位の探索を進められていない。

歌舞伎症候群でのヒストンアセチル化異常領域の特定は，歌舞伎症候群の症状発現の原因となっている個々の遺伝子を明らかに出来るはずである。既に8例のMLL2遺伝子変異陽性の患者末梢白血球，1例のKDM6A遺伝子変異陽性の線維芽細胞，２例の両遺伝子変異陰性の患者末梢白血球が揃っており，ChIP-Seq法 によるヒストンアセチル化部位の解析を進められる状況に至っている。個々の個別症状改善のための，患者症状改善・治療薬開発に有益な情報の取得を進める。

歌舞伎症候群患者のDNA診断は，MLL2 (KMT2D) およびKDM6Aは，すでにパーソナルタイプの次世代シーケンサーで行われている。これらの２遺伝子に変異が無い症例でも，２例以上で“有害”変異が重なることがなかった。しかし，変異陰性の例も熟練した臨床遺伝医が診断しており，診断カテゴリー自体は，過りがない。原因遺伝子探索は，基礎研究としては継続しつつも，臨床研究としては，治療薬（症状改善薬）探索へと足場を移してくことが望ましいと考える。

歌舞伎症候群患者変異解析の結果，MLL2およびKDM6A遺伝子変異陰性15例を確定させた。これらの試料についてexome解析を行ったが，新規の原因遺伝子はまだ同定できていない。これらMLL2遺伝子・KDM6A遺伝子変異陰性例では，新規変異遺伝子の存在を仮定しなくとも，MLL2遺伝子・KDM6A遺伝子のイントロン変異，微少なexon単位での欠失・重複，あるいはMLL2遺伝子・KDM6A遺伝子自身のエピジェネティック変異の可能性が残っており，それらの可能性の検証を行っていく。

歌舞伎症候群は最終的には，個別遺伝子の変異に注目するよりも，大局的に見て歌舞伎症候群＝ヒストンアセチル化異常疾患症と捉えて，治療へ向かう方が，患者へのメリットが大きいようである。アメリカ人類遺伝学会で報告されたように，MLL2遺伝子ノックアウトでは，ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（histone deacetylase inhibitor（HDAC inhibitor））投与がマウスの記憶障害を改善したとの報告がなされ，ますます，歌舞伎症候群＝ヒストンアセチル化異常疾患症

として症状改善薬の開発が可能となっている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は，ガン治療薬として進められており，それらのガン治療薬の中から抗ガン作用（細胞増殖阻害作用）よりも歌舞伎症候群症状改善作用の方が強い薬剤があると想像される。

そのような，治療薬開発および評価のためにも，歌舞伎症候群モデルマウス作成と薬効評価のシステム開発が今後の課題である。

E. 結論

本年度は，ChIP-Seqの解析までに至らなかった。しかし，プロトコールの確定，試料収集が順調に進んでおり，全ゲノムのヒストンメチル化，ヒストンアセチル化解析，修飾シトシン変化を解析し，歌舞伎症候群の分子病理解明への道筋は付けられた。今後，歌舞伎症候群に現れる個別症状を説明出来る遺伝子を探し，治療および症状軽減のための薬物開発の基礎シーズとしたい。また，原遺伝子が判明していない症例に関しては，exome解析による新規遺伝子の発見をめざす。

歌舞伎症候群は，ヒストンアセチル化異常症との認識が正しいと思われる。すなわち，細胞内のヒストン低アセチル化が原因である。原因遺伝子は MLL2, KDM6A を初めとし多くの遺伝子が関わっている可能性がある。これらの遺伝子変異がもととなり，個別症状発現においては，ヒストンアセチル化異常が引き起こされた別の遺伝子群が関与し，ヒストンアセチル化異常がそれら様々な遺伝子であることに由来して，多彩な臨床症状を呈すると考えられる。

個別症状改善の薬剤開発のためには，ChIP-Seq法 による患者末梢血や線維芽細胞を用いたヒストンアセチル化異常領域（おそらくヒストン低アセチル化領域）の探索は不可欠である。と同時に，歌舞伎症候群の治療薬開発のためには，歌舞伎症候群モデルマウス作成，ヒストンアセチル化異常領域の特定，治療効果評価 in vitro システムの開発（ヒストンアセチル化状態の正常化評価システム等）および治療効果評価マウスシステムの開発が重要である。

F．研究発表

1. 論文発表

1) Sasaki K, Mishima H, Miura K, Yoshiura KI. Uniparental disomy analysis in trios using genome-wide SNP array and whole-genome sequencing data imply segmental uniparental isodisomy in general populations. Gene 2013 Jan 10;512(2):267-274. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.035. Epub 2012 Oct 27.
2) Yamada A, Ishikawa T, Ota I, Kimura M, Shimizu D, Tanabe M, Chishima T, Sasaki T, Ichikawa Y, Morita S, Yoshiura KI, Takabe K, Endo I. High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. Breast Cancer Res Treat 137(3): 773-782, 2013 Feb. doi: 10.1007/s10549-012-2398-5. Epub 2013 Jan 4.
3) Ishikawa T, Toyoda Y, Yoshiura K, Niikawa N. Pharmacogenetics of human ABC transporter ABCC11: new insights into apocrine gland growth and metabolite secretion. Front. Genet. 3:306. doi: 10.3389/fgene.2012.00306. 2013, Jan 03.
4) Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. Prenat Diagn. 2013 Mar;33(3):214-222. doi: 10.1002/pd.4045. Epub 2013 Jan 27.
5) Higashimoto K, Maeda T, Okada J, Ohtsuka Y, Sasaki K, Hirose A, Nomiyama M, Takayanagi T, Fukuzawa R, Yatsuki H, Koide K, Nishioka K, Joh K, Watanabe Y, Yoshiura KI, Soejima H. Homozygous deletion of DIS3L2 exon 9 due to non-allelic homologous recombination between LINE-1s in a Japanese patient with Perlman syndrome. Eur J Hum Genet. 2013 Mar 13. doi: 10.1038/ejhg.2013.45. [Epub ahead of print]
6) Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasa K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H. Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. J Hum Genet. 58(5):250-253. 2013 May doi: 10.1038/jhg.2013.7. Epub 2013 Mar 7.Mar 7. doi: 10.1038/jhg.2013.7. [Epub ahead of print]
7) Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz D, Guo C, Shimada M, Sasaki K, Fawcett H, Wing J, Lewin S, Carr L, Yoshiura K, Utani A, Hirano A, Yamashita S, Greenblatt D, Nardo T, Stefanini M, McGibbon D, Sarkany R, Fassihi H, Takahashi Y, Nagayama Y, Mitsutake N, Lehmann AR, and Ogi T. Malfunction of the ERCC1/XPF endonuclease results in diverse clinical manifestations and causes three nucleotide excision-repair-deficient disorders, Cockayne Syndrome, xeroderma pigmentosum and Fanconi Anemia. ***Am J Hum Genet***, 2013 92(5):807-819. May2; doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.007. Epub 2013 Apr 25.
8) Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura KI, Masuzaki H. Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is

associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. J Med Virol. 2013 Aug 19. doi: 10.1002/jmv.23709. [Epub ahead of print]

9) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. AM J Med Gene A. 2013 Sep;161(9):2234-2243. doi: 10.1002/ajmg.a.36072. Epub 2013 Aug 2.

10) Nakao K, Oikawa M, Arai J, Mussazhanova Z, Kondo H, Shichijo K, Nakashima M, Hayashi T, Yoshiura K, Hatachi T, Nagayasu T. A Predictive Factor of the Quality of Microarray Comparative Genomic Hybridization Analysis for Formalin-fixed Paraffin-embedded Archival Tissue. 2013. Diagn Mol Pathol. Sep;22(3):174-180. doi: 10.1097/PDM.0b013e31828191de.

11) Hasegawa Y, Miura K, Furuya K, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of Complete Hydatidiform Mole Pregnancy-Associated MicroRNAs in Plasma. Clin Chem. 2013. Sep;59(9):1410-1412. doi: 10.1373/clinchem.2013.206391. Epub 2013 Jul 1. No abstract available.

12) Ogi T, Nakazawa Y, Sasaki K, Guo C, Yoshiura K, Utani A, Nagayama Y. [Molecular cloning and characterisation of UVSSA, the responsible gene for UV-sensitive syndrome]. Seikagaku. 2013. Mar;85(3):133-144. Review. Japanese. No abstract available.

2. 学会発表

63) **American Society of Human Genetics, 63rd Annual Meeting, Boston Convention Center & Exhibition Center, October 22-26, 2013, Boston**. An infantile case of hepatomegaly, lactic acidosis, hypoglycemia, ketosis, and hyperlipidemia of unknown etiology. Watanabe Y, Seki Y, Yanagi T, Mizouchi T, Takeuchi T, Iwamoto J, YoshinoM, Watanabe S, Inokuchi T, Yano S, Yoshiura K, Matsuishi T.

64) **第9回広島大学–長崎大学連携研究事業カンファランス –放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業– 2013年6月1日（土），場所：広島大学霞キャンパス，広島** 地域集積して認められた筋萎縮性側索硬化症6名の exome 解析．吉浦孝一郎，木下晃，三嶋博之，佐々木健作，辻野彰，川上純

65) **公開シンポジウムー次世代遺伝子解析装置を用いた難病の原因究明，治療法開発研究プロジェクトの成果ー　平成２５年７月１３日１３時～１７時，場所：都市センターホテル　コスモスホール**　３．個別疾患に対するアプローチ及び地域での取り組みについて　地域蓄積・収集した稀少難病の遺伝子原因究明と遺伝性疾患診断システムの構築．吉浦孝一郎

66) **第58回日本人類遺伝学会 2013年11月20日（水）～23日（土），江陽グランドホテル，仙台**

O19: Ion AmpliSeqTM Custom Panel を用いた Kabuki 症候群の変異解析．渡辺　聡，三嶋博之，朝重耕一，木下晃，吉浦孝一郎

O32: シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析．大塚康史，佐々木健作，城崎幸介，東元　健，岡本伸彦，高間勇一，窪田昭男，松本富美，中山雅弘，吉浦孝一郎，副島英伸

O44: TogoWS REST サービスによる UCSC ゲノムデータベースの利用．三嶋博之，西澤達也，吉浦孝一郎，片山俊明

O67: PRRT2 の変異は発作性運動誘発性ジスキネジアだけでなく良性家族性乳児けいれんの原因でもある．黒滝直弘，小野慎治，木下　晃，新川詔夫，小澤寛樹，吉浦孝一郎

P156: Craniosynostosis, collagenopathy 220 疾患を対象とした可変追加型遺伝子診断パネルの作成と実践．要　匡，柳　久美子，比嘉真紀，知念安紹，當間隆也，泉川良範，新川詔夫，吉浦孝一郎，成富研二

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）
総合研究報告書

Ras/MAPKシグナル伝達異常関連症候群に関する研究

研究分担者　松原洋一　国立成育医療研究センター・研究所長

研究要旨

Ras/MAPKシグナル伝達異常関連症候群は、コステロ症候群、CFC (cardio-facio-cutaneous) 症候群、ヌーナン症候群などを総称する疾患概念である。いずれも特異的顔貌・心疾患・骨格異常・精神遅滞・皮膚症状・易発がん性などを示す常染色体優性遺伝性疾患で、細胞内のRas/MAPKシグナル伝達経路に関わる遺伝子の先天的異常によってひきおこされる。これらの疾患群の病因・病態はまだ十分に解明されておらず、また自然歴も不明な点が多い。本分担研究では、まず全国調査によって両疾患の日本における罹患数の算出を行い、その病態や合併症について解析を行った。この調査結果を参考に、コステロ症候群およびCFC症候群の診療の手引を作成した。さらに、ヌーナン症候群における新規病因遺伝子の探索を行い、これまでに報告されていないRIT1遺伝子を同定した。

研究協力者
緒方　勤（国立成育医療研究センター・研究所）
黒澤健司（神奈川県立こども医療センター・遺伝科）
川目　裕（東北大学・東北メディカル・メガバンク機構遺伝子診療支援・遺伝カウンセリング分野）
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）
大橋博文（埼玉県立小児医療センター・遺伝科）
水野誠司（愛知県心身障害者コロニー中央病院）
栗山進一（東北大学・大学院医学系研究科）
呉　繁夫（東北大学・大学院医学系研究科）
青木洋子（東北大学・大学院医学系研究科）
新堀哲也（東北大学・大学院医学系研究科）
井上晋一（東北大学・大学院医学系研究科）
阿部　裕（東北大学・大学院医学系研究科）
斎藤由佳（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）

A．研究目的

Ras/MAPKシグナル伝達異常関連症候群は、コステロ症候群、CFC (cardio-facio-cutaneous) 症候群、ヌーナン症候群などを総称する疾患概念である。いずれも特異的顔貌・心疾患・骨格異常・精神遅滞・皮膚症状・易発がん性などを示す常染色体優性遺伝性疾患で、細胞内のRas/MAPKシグナル伝達経路に関わる遺伝子の先天的異常によってひきおこされる。これらの疾患群の病因・病態はまだ十分に解明されておらず、また自然歴も不明な点が多い。

本分担研究では、まずコステロ症候群およびCFC症候群の全国調査を実施した。その調査結果を踏まえて、両疾患の診療の手引のための疾患特異的成長手帳を作成した。また、ヌーナン症候群の病因解明を目的として新規病因遺伝子の探索をおこなった。

B．研究方法

1）コステロ症候群およびCFC症候群に関する全国調査

本分担研究に先行して実施したコステロ症候群・CFC症候群の全国一次調査をもとに、患者を現在フォローしている医療機関を対象に調査用紙を送付して情報を取得した。

2）疾患特異的成長手帳の作成

成書の「Preventive Management of Children with Congenital Anomalies and Syndromes」(Wilson GN, Cooley WC著、Cambridge University Press, 2000）をベースとして、本分担研究者及び研究協力者による知見を加えて作成した。

3）ヌーナン症候群における新規病因遺伝子の探索

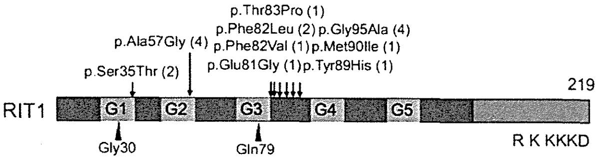
既知の病因遺伝子に変異が認められなかったヌーナン症候群患者14名から得られたゲノムDNAを検体とし、次世代シークエンサーを用いたエクソーム解析によって病因遺伝子の探索を行った。さらに、180人の患者検体にたいして新規病因遺伝子の変異解析を行った。

C．研究結果

１）ヌーナン症候群における新規病因遺伝子の探索

14名の患者検体のエクソーム解析によって、RIT1遺伝子の変異が同定された。次に180名の患者検体においてRIT遺伝子の解析を行ったところ、17名(9%)に遺伝子変異が同定された。 遺伝子変異の種類とその位置を図１に示す。遺伝子変異の多くは、RIT1遺伝子のswitch1と呼ばれる部分に集中していた。

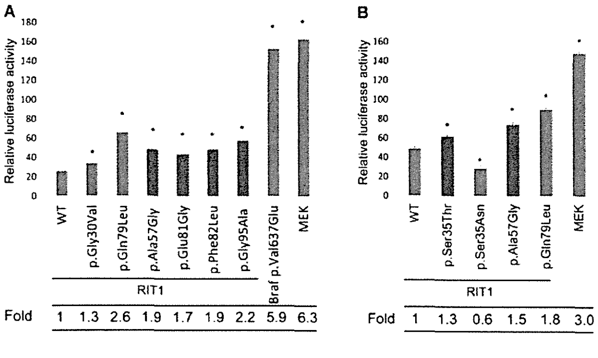
（図１）



臨床病型の検討では、RIT1遺伝子変異をもつ患者はヌーナン症候群の中でも肥大型心筋症の合併率が高いことが判明した。

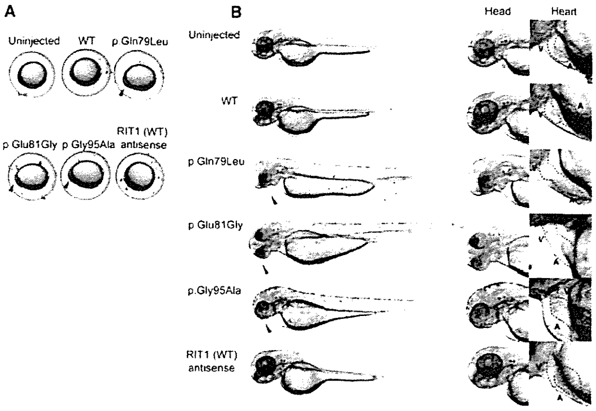
次に、患者で認められた変異RIT1遺伝子をNIH3T3細胞で発現させ、シグナル伝達経路下流にあるELK1による転写活性をルシフェラーゼアッセイで測定したところ、正常対照に比較して亢進していることが明らかとなった（図２の赤で示した部分)。

（図２）



さらに患者で同定された遺伝子変異をゼブラフィッシュに導入したところ、心臓の異常や頭部の変形が確認された（図３)。心拍も正常対照に比較して著明な徐脈を示した。

（図３）



２）疾患特異的成長手帳の作成

コステロ症候群およびCFC症候群の診療の手引のための疾患特異的成長手帳を作成した（表１および表２)。それぞれ年齢に応じて必要なチェック項目と必要に応じて連携すべき診療部門を示した。

D．考察

本分担研究者は、これまでに600例以上のRAS/MAPK症候群に対して遺伝子診断を提供してきた。そのうち約40%はいまだ原因が不明であり、新たな原因遺伝子の検索を行っている。今回、次世代シークエンサーを用いた解析によって新たにRIT1遺伝子に異常を持つ症例の存在が明らかとなった。同定された変異は、これまでにRas/MAPKシグナル伝達異常関連症候群で認められた他の遺伝子変異と同様、Ras/MAPKシグナル伝達経路を活性化するものであった。また、変異を導入したゼブラフィッシュで観察された形態学的異常は、ヌーナン症候群患者で認められる表現型に類似しているものと考えられた。本研究成果は、これまで機能が不明であったRASサブファミリーの*RIT1*が古典的癌原遺伝子*RAS*(*HRAS, KRAS, NRAS*)と同じ働きを持つ可能性があることを初めて示すとともに、同疾患の病態の解明や治療への道を切り開くものとして期待される。

臨床的には、コステロ症候群およびCFC症候群の自然歴や合併症が次第に明らかになりつつある。とくに心筋症や悪性腫瘍の合併は生命予後に大きく関与するため、定期的なモニタリングと早期発見・早期介入が不可欠である。この点に鑑み、診療の手引のための疾患特異的成長手帳を作成した。わが国における今後の診療に活用することで、患者のQOLの向上にもつながることが期待される。

E．結論

コステロ症候群･CFC 症候群のわが国における患者数の推定を行うとともに、臨床症状と合併症を詳細に検討した。この解析結果を踏まえて、両症候群の診療の手引を作成した。また、ヌーナン症候群の新規病因遺伝子を同定することに成功した。

F．研究発表

1. 論文発表

1) Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: A novel source for hepatocytes. Liver Transpl. 2013 Nov 23. doi: 10.1002/lt.23800. [Epub ahead of print]
2) Sekiguchi K, Maeda T, Suenobu S, Kunisaki N, Shimizu M, Kiyota K, Handa YS, Akiyoshi K, Korematsu S, Aoki Y, Matsubara Y, Izumi T. A transient myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome and a germline BRAF mutation. Am J Med Genet A. 161(10):2600-3, 2013.
3) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. Am J Med Genet A. 161(9):2234-43, 2013.
4) Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. Am J Hum Genet 93(1):173-80, 2013.
5) 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. 58(5):259-66, 2013.
6) Aoki Y, Matsubara Y. Ras/MAPK syndromes and childhood hemato-oncological diseases. Int J Hematol. 97(1):30-6, 2013.
7) Asano M, Fujimura T, Wakusawa C, Aoki Y, Matsubara Y, Aiba S. A case of almost unilateral focal dermal hypoplasia resulting from a novel mutation in the PORCN gene. Acta Derm Venereol. 93(1):120-1, 2013.
8) Ninomiya M, Kondo Y, Niihori T, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Sequential analysis of amino acid substitutions with hepatitis B virus in association with nucleos(t)ide analogue treatment detecting by deep sequencing. Hepatol Res. 2013 [Epub ahead of print]
9) Komatsuzaki S, Sakamoto O, Fuse N, Uematsu M, Matsubara Y, Ohura T. Clinical Reasoning: A young man with progressive subcortical lesions and optic nerve atrophy. Neurology. 79(7):e63-8, 2012.
10) Saito Y, Aoki Y, Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP, Imaizumi M, Rikiishi T, Sasahara Y, Kure S, Niihori T, Tsuchiya S, Kojima S, Matsubara Y. Casitas B-cell lymphoma mutation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res. 36(8):1009-15, 2012.
11) Metoki H, Ohkubo T, Obara T, Akutsu K, Yamamoto M, Ishikuro M, Sakurai K, Iwama N, Katagiri M, Sugawara J, Hirose T, Sato M, Kikuya M, Yagihashi K, Matsubara Y, Yaegashi N, Mori S, Suzuki M, Imai Y; BOSHI Study Group. Daily serial hemodynamic data during pregnancy and seasonal variation: the BOSHI study. Clin Exp Hypertens. 34(4):290-6, 2012.
12) 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. 158A(5):1083-94, 2012.
13) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. Neurology. 78(11):803-10, 2012.

14) 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(4):553-8, 2012.
15) Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. Hum Mol Genet. 21(7):1496-503, 2012.
16) Patrinos GP, Smith TD, Howard H, Al-Mulla F, Chouchane L, Hadjisavvas A, Hamed SA, Li XT, Marafie M, Ramesar RS, Ramos FJ, de Ravel T, El-Ruby MO, Shrestha TR, Sobrido MJ, Tadmouri G, Witsch-Baumgartner M, Zilfalil BA, Auerbach AD, Carpenter K, Cutting GR, Dung VC, Grody W, Hasler J, Jorde L, Kaput J, Macek M, Matsubara Y, Padilla C, Robinson H, Rojas-Martinez A, Taylor GR, Vihinen M, Weber T, Burn J, Qi M, Cotton RG, Rimoin D; (International Confederation of Countries Advisory Council). Human variome project country nodes: Documenting genetic information within a country. Hum Mutat. 33(11):1513-9, 2012.

2. 学会発表

1) 松原洋一　次世代シークエンサーによる遺伝性疾患研究・診療のパラダイムシフト　日本人類遺伝学会第 58 回大会、仙台、平成 25 年 11 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）
総合研究報告書

先天性異常の疾患群に関する調査研究に関する研究；インプリンティング異常症

研究分担者　緒方勤　　浜松医科大学小児科　教授

研究要旨

本研究班の目的は、患者の表現型（症状）・遺伝子変異・担当医を登録するシステムの確立、そこから得られる患者自然歴にもとづく治療ガイドライン「疾患別母子手帳」の作成、手術時残余検体・皮膚検体を活用した疾患特異的iPS細胞株の作成、既承認薬を用いた候補薬スクリーニング体制の構築である。われわれは、この目的達成のために、インプリンティング異常症、特に、第14染色体父性・母性ダイソミー症候群、シルバーラッセル症候群、プラダーウイリ症候群を主として研究を実施し、患者集積、遺伝子診断フローチャート、診断基準をまとめることができた。また、第14染色体父性ダイソミー症候群表現型陽性患者の皮膚繊維芽細胞を用いてiPS細胞を作成中である。さらに、IMAGe症候群におけるCDKN1C変異の同定、CDKN1C軽度機能亢進変異やコピー数増加がシルバーラッセル症候群のサブタイプを形成することを見いだした。これらの成果は、本研究班の目的達成に直接的に貢献しうるものである。

A．研究目的

本研究班の目的は、患者の表現型（症状）・遺伝子変異・担当医を登録するシステムの確立、そこから得られる患者自然歴にもとづく治療ガイドライン「疾患別母子手帳」の作成、手術時残余検体・皮膚検体を活用した疾患特異的iPS細胞株の作成、既承認薬を用いた候補薬スクリーニング体制の構築である。このために、現在までに先天性異常疾患群の領域で組織された20余の研究奨励分野研究班からだされた患者概数の把握、原因遺伝子の決定・遺伝子変異解析系の確立などの成果を統合・発展させることが重要である。これには、標準的診療の確立と治療法の研究の発展のため、該当する20余の研究班間で共通の枠組みを適用した、研究活動を展開することが極めて有効と考えられる。具体的には、先天異常を専門としない一般医師および患者家族へのわかりやすい診療ガイドラインを統一的な方法で提供する必要がある。また、先天異常については、内科的治療は困難と考えられてきたがマルファン症候群など一部の疾患について内服薬による予後の改善（disease modifying drug）の先鞭がつけられており、疾患特異的iPS細胞の樹立と病変組織に対応する細胞の樹立と、当該細胞もちいた候補薬のスクリーニングが待たれている。

われわれは、本年度、先天異常疾患のうち、インプリンティング異常症について、患者集積、遺伝子診断フローチャート、診断基準についてまとめた。

B．研究方法

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して行い、検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集した。

なお、下記の研究課題が、浜松医科大学倫理委員会で承認されていることを付記する。

- 成長障害における遺伝的原因の探索
- 先天性奇形症候群における遺伝的原因の探索
- 胎児・胎盤の成長・発達における遺伝および環境因子の検討

分子生物学的解析では、シークエンス解析、メチル化解析、マイクロサテライト解析、アレイCGH解析、MLPA解析など、現在なしうる解析をほぼ全て行った。

C．研究結果

患者検体の集積

既に本研究の対象となるインプリンティング疾患表現型陽性患者約400例から臨床症状と末梢血検体を集積し、その全例において、現在実施しうる発症原因の解析を終了した。また、比較的少数例ではあるが胎盤集積もなされている。さらに、DMR同定に有用である全染色体父性ダイソミーモザイク症例や全染色体母性ダイソミーキメラ症例も見出した（表1）。

第14染色体父性・母性ダイソミー症候群

39例の第14染色体父性ダイソミー症候群表現型陽性患者の遺伝的原因は図1のように診断された。これにより遺伝子診断フローチャートが完成した。また、これらの患者の解析から父性ダイソミー症候群の診断基準案は表2のように、第14染色体母性ダイソミー症候群の診断基準案は表3のようにまとめられた。

さらに、これらの患者の解析から、以下のことが判明した。(1) 配偶子形成時に樹立されるIG-DMRは胎盤におけるインプリンティングセンター (IC) であ

る。(2) 受精後に樹立される*MEG3*-DMR は個体におけるIC である。(3) IG-DMR は個体における*MEG3*-DMR のメチル化パターン制御機能を有する。(4) *MEG3*-DMR には CTCF タンパク結合部位が存在する。(5) Upd(14)pat 症候群の表現型は主に父性発現遺伝子 *RTL1* の過剰発現による。(6) Upd(14)mat 症候群の表現型は主に父性発現遺伝子 *DLK1* および *RTL1* の発現低下に起因する。(7) 母性発現遺伝子 *RTL1as* にコードされる *microRNA* は *RTL1* の発現抑制機能を有する。

次に、インプリンティング遺伝子が胎盤形成に重要な役割を演じていることから、第 14 染色体父性ダイソミー患者の胎盤組織を検討した。その結果、患者胎盤では、末梢絨毛の過形成、血管内皮細胞と pericytes の過形成、RTL1 の過剰発現が認められた（図)。これは、胎盤組織の異常を同定した初めての成果である。

また、われわれは、第 14 染色体父性ダイソミー症候群表現型陽性患者のうち、世界で唯一の IG-DMR 単独欠失症例と*MEG3*-DMR 単独エピ変異症例、ならびに世界で数例しか報告されていない IG-DMR と *MEG3*-DMR の両者のエピ変異症例の皮膚繊維芽細胞を用いて iPS 細胞を作成中である。

シルバーラッセル症候群

138 例のシルバーラッセル症候群表現型陽性患者の遺伝的原因は図 2 のように診断された。また、その診断基準案は表 4 のようにまとめられた。さらに、以下のことが判明した。(1) 日本人シルバーラッセル症候群の 31.2%は H19-DMR の低メチル化を、6.5%は第7染色体母性ダイソミーを有する。H19-DMR の低メチル化患者は、出生時の相対的頭囲拡大、身長・体重の重度の低下、半身低形成などを高頻度に伴い、第7染色体母性ダイソミー患者は、言語発育遅滞を高頻度に伴う。(2) IGF2 が脳では例外的に両親性発現を示すことに一致して、H19-DMR の低メチル化患者では、IGF2 の発現量を反映するメチル化係数が、修正時の身長・体重・胎盤重量と良く相関し、頭囲とは相関しなかった。(3) その母性ダイソミーが SRS を生じる第 7 染色体長腕には、胎盤特異的 DMR が存在する。(4) 第 17 染色体長腕の微小欠失は、SRS 発症原因の一つであり、この領域には候補遺伝子が存在する。(5) エピ変異例の 2.4%において、複数のメチル化異常（低メチル化と高メチル化の両者）が認められ、これは、エピ変異を有する患者の一部においてメチル化の開始・維持に異常が存在する可能性を示唆する。

プラダーウイリ症候群

209 例のシルバーラッセル症候群表現型陽性患者の遺伝的原因は図 4 のように診断された。さらに、以下のことが判明した。(1) PWS と診断された患者の一部は、upd(14)mat 症候群を有する。(2) PWS-IC 周辺の配列は、極微細欠失（約 75 kb）患者における Angelman 症候群（AS）発症に関与する（AS 発症最少領域が母由来第 15 染色体から欠失すると AS を発症するが、AS 発症最少領域と PWS-IC 周辺配列が同時に欠失すると AS を生じない）。(3) PWS-IC には CTCF 結合配列が存在する。

IMAGe症候群

最近IMAGe症候群（子宮内発育遅滞、骨幹端異形成、副腎低形成、男児外性器異常）の原因が、インプリンティング遺伝子（母性発現遺伝子）CDKN1Cの機能亢進変異であることが示された。われわれは、本邦におけるIMAGe症候群3例を解析し、2例においてCDKN1Cの機能亢進変異を同定した（図5）。そして、(1) IMAGe症候群表現型がシルバーラッセル症候群の表現型を含むこと、(2) 相対的頭囲拡大が存在し、これはCDKN1Cが脳においてのみ両親性発現を示すことに一致すること、(3) 副腎低形成が糖質ステロイドのみの欠乏症状を伴いうること、(4) 外性器異常が、胎盤低形成に起因する胎盤ゴナドトロピン分泌低下に起因することを、世界で初めて見出した。さらの、その後の文献データから、CDKN1Cの高度機能亢進変異がIMAGe症候群を、軽度機能亢進変異がシルバーラッセル症候群を生じることを見い出した。

シルバーラッセル症候群サブタイプの提唱

われわれは、IMAGe 症候群患者がシルバーラッセル症候群表現型を呈するものの、左右非対称を欠くこと、また、相対的頭囲拡大の程度が軽度であることを見いだした（表)。さらに、２例において、11p15 遠位部の CDKN1C を含む母由来染色体過剰が、まさしくシルバーラッセル症候群表現型を呈するものの、左右非対称を欠くことや相対的頭囲拡大の程度が軽度であることを見いだした。この母由来染色体過剰は、CDKN1C 発現過剰以外の遺伝子発現増かを伴わないことから、、CDKN1C の軽度機能亢進変異とコピー数増加が、Nechine らにより提唱されたシルバーラッセル症候群診断基準を満足するものの、左右非対称の欠落や相対的頭囲拡大により特徴づけられるシルバーラッセル症候群のサブタイプを構築することを世界で初めて見いだした。

インプリンティング疾患における原因別発症頻度の解析

インプリンティング疾患は、ダイソミー、エピ変異、インプリンティング領域の欠失、インプリンティング遺伝子内変異によって発症する。われわれは、自験例と文献例を解析し、その原因別発症頻度を解析した。その結果は表に示す通りである。プラダーウイリ症候群とアンジェルマン症候群において欠失が多いことは、インプリンティング領域の両側に low-copy repeat が存在することで説明される。また、単一遺伝子疾患としてのインプリンティング疾患も存在し、これらのことは、包括的な解析の必要性を示唆する。

個々のインプリンティング遺伝子変異解析

66個のインプリンティング遺伝子を含む成長関連遺伝子を対象としてTarget Enrichment解析を行い、成長障害患者の2例において父親由来発現遺伝子*RTL1*遺伝子にミスセンス置換を見出し、また、同時に複数の遺伝子変異を同定している。

D．考察

以上の成果は、本研究班の目的である患者の表現型（症状）・遺伝子変異・担当医を登録するシステムの確立、そこから得られる患者自然歴にもとづく治療ガイドライン「疾患別母子手帳」の作成、手術時残余検体・皮膚検体を活用した疾患特異的iPS細胞株の作成、既承認薬を用いた候補薬スクリーニング体制の構築の全てに直接的に貢献しうるものである。さらに、インプリンティング疾患診断の普及に応用できるものである。

E．結論

以上の成果は、本研究班の目的である患者の表現型（症状）・遺伝子変異・担当医を登録するシステムの確立、そこから得られる患者自然歴にもとづく治療ガイドライン「疾患別母子手帳」の作成、手術時残余検体・皮膚検体を活用した疾患特異的iPS細胞株の作成、既承認薬を用いた候補薬スクリーニング体制の構築の全てに直接的に貢献しうるものである。さらに、インプリンティング疾患診断の普及に応用できるものである。

F．研究発表

論文発表

1. Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, Ogata T: IMAGe syndrome: clinical and genetic implications based on Iinvestigations in three Japanese patients. *Clin Endocrinol* (in press)
2. Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Sato T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H: A novel *de novo* point mutation of OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet* (in press).
3. Tsuchiya T, Shibata M, Numabe H, Jinnno T, Nakabayashi K, Nishimura G, Nagai T, Ogata T, Fukami M: Compound heterozygous deletions in pseudoautosomal region 1 in an infant with mild manifestsations of Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet A* (in press).
4. Nakashima S, Watanabe Y, Okada J, Ono H, Nagata E, Fukami M, Ogata T: Critical role of Yp inversion in *PRKX/PRKY*-mediated Xp;Yp translocation in a patient with 45,X testicular disorder of sex development. *Endocr J* 2013 Oct 3. [Epub ahead of print].
5. Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Nagasaki K, Ogata T, Fukami M: Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol* 2013 Sep 18. doi: 10.1111/cen.12329. [Epub ahead of print].
6. Fujisawa Y, Yamaguchi R, Satake E, Ohtaka K, Nakanishi T, Ozono K, Ogata T: Identification of *AP2S1* Mutation and Effects of Low Calcium Formula in an Infant with Hypercalcemia and Hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (12): E2022–2027.
7. Fukami M, Suzuki J, Nakabayashi K, Tsunashima R, Ogata T, Shozu M, Noguchi S: Lack of genomic rearrangements involving the aromatase gene *CYP19A1* in breast cancer. *Breast Cancer* 2013 Apr 30. [Epub ahead of print].
8. Fukami M, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Gurger H, Sompson ER, Emezawa A, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M, Ogata T: Genomic basis of aromatase excess syndrome: recombination- and replication-mediated rearrangements leading to *CYP19A1* overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (12): E2013–2021, 2013.
9. Igarashi M, Dung VC, Suzuki E, Ida S, Nakacho M, Nakabayashi K, Mizuno K, Hayashi Y, Kohri K, Kojima Y, Ogata T, Fukami M: Cryptic genomic rearrangements in three patients with 46,XY disorders of sex development. *PLoS One* 8 (7): e68194, 2013.
10. Fukami M, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, Kinoshita E, Dateki S, Ogata T: Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J* 60 (8): 1013–1020, 2013.
11. Yamaguchi R, Kato F, Hasegawa T, Katsumata N, Fukami M, Matsui T, Nagasaki K, Ogata T: A novel homozygous mutation of the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene in a Japanese patient with familial glucocorticoid deficiency. *Endocr J* 60 (7): 855–859, 2013.
12. Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T: Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS One* 8 (3): e60405, 2013.
13. Ogata T, Sano S, Nagata E, kato F, Fumaki M: *MAMLD1* and 46,XY disorders of sex development. *Semi Reprod Med* 30 (5): 410–416, 2012.
14. Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, Ogata T: *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.
15. 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.

学会発表

1. Ogata T: Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency: A Unique Disease Leading to Disorders of Sex Development in Both 46,XY and 46,XX Patients. Invited Lecture. In: The 6th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. April 23–27, 2012. Kona Hawaii, USA.
2. Ogata T: Genetics of DSD (Disorders of sex development). In: Disorders of sex development. The 15th International and 14th European Congress of Endocrinology (ICE/ECE). May 5–9, 2012, Florence, Italy.
3. 緒方勤：エピジェネティクスと小児成長発達．第 115 回日本小児科学会学術集会教育講演．2012 年 4 月 20–22 日，福岡．

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1．特許取得

該当なし

2．実用新案登録

該当なし

3．その他

該当なし