

- 断と原因遺伝子. 病理と臨床、32(5):535-540, 2014
- 8) 副島英伸. インプリンティング疾患のエピジェネティクス. 監修: 畑田出穂・久保田健夫、エピジェネティクスの産業応用、シーエムシー出版、東京、2014, 266-279
 - 9) 東元健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群、別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群 (第2版) IV-その他の神経疾患を含めて-, 日本臨牀社、大阪、2014, 498-501
 - 10) 前田寿幸、副島英伸. Silver-Russell 症候群別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群 (第2版) IV-その他の神経疾患を含めて-, 日本臨牀社、大阪、2014, 685-688
- ## 2. 学会発表
- 1) 前田寿幸. 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 69 回佐賀小児科地方会 2014.4.5. 佐賀
 - 2) 大塚泰史. Beckwith-Wiedemann 症候群における片親性父性ダイソミーの遺伝学多様性と臨床症状との関連. 第 69 回佐賀小児科地方会 2014.4.5. 佐賀
 - 3) 中林一彦、Court Franck、田山千春、Romanelli Valeria、副島英伸、和氣徳夫、Esteller Manel、緒方勤、秦健一郎、Monk David. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent control of imprinting in the placenta. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 2014.5.25-27. 東京大学 (抄録集 p46, ポスターP-7)
 - 4) 西岡憲一、Hitomi Miyazaki, Ken Higashimoto, Yukari Yada, Takaho A. Endo, Jafar Sharif, Manabu Nakayama, Hidenobu Soejima, Haruhiko Koseki, Susumu Hirose. Ash1l methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract Polycomb silencing. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 2014.5.25-27. 東京大学 (抄録集 p55, ポスターP-26)
 - 5) 前田寿幸、Rumbajan Janette Mareska、東元健、中林一彦、八木ひとみ、秦健一郎、城圭一郎、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群と肝芽腫における multiple methylation defect の解析. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 2014.5.25-27. 東京大学 (抄

録集 p83, ポスターP-81)

- 6) 副島英伸、Rumbajan Janette Mareska、畑田出穂、中林一彦、泰健一郎、青木茂久、関博之、竹田省、城圭一郎． Small for gestational age (SGA) 胎盤のゲノムワイド DNA メチル化解析． 日本人類遺伝学会第 59 回大会 2014.11.19-22. 東京 (2P-016 プログラム・抄録集 p343)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許得取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし
- し

厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患実用化研究事業 (革新的医薬品等の開発の促進研究))
委託業務成果報告書 (業務項目)

委託業務課題: エピジェネティック希少疾患の治療に向けた研究および原因未解明な希少疾患に対する解析技術展開研究

業務項目(1): 病態解析のための細胞内遺伝子改変に関わる技術開発とヒト細胞を使った病態解析

業務項目(2): エピジェネティック関連疾患モデル動物作出と治療法の検討

担当責任者: 吉浦孝一郎 (長崎大学原爆後障害医療研究所・人類遺伝学・教授)

業務分担者: 副島英伸 (佐賀大学医学部分子生命科学講座分子遺伝学・エピジェネティクス分野 教授)

研究要旨

エピジェネティック疾患として、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)、Sotos 症候群 (SoS)、Kakubi 症候群 (KS) のゲノム解析・エピゲノム解析の病態を解析するために、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変マウス作製、培養細胞作製を試み、実験条件の決定および遺伝子改変細胞を得ることができた。これらのマウス、細胞を用いることで、インプリンティングの分子機構の解明、標的遺伝子の同定、病態解明と治療法開発の基盤が確立できると期待される。

A. 研究目的

本研究では、エピジェネティック疾患として、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)、Sotos 症候群 (SoS)、Kakubi 症候群 (KS) に着目し、患者検体を用いたゲノム解析およびエピゲノム解析を行い、疾患の原因とそれに起因する病態を解明する。さらに、これらの結果を通じて、遺伝診断および治療法

開発の基盤形成を目的とする。

BWS は、巨軀、巨舌、臍ヘルニアを三主徴とする過成長症候群の一つで、11p15.5 のインプリント異常により発症するインプリンティング疾患である。BWS の主要な原因は、KvDMR1 低メチル化 (loss of methylation: LOM、~50%)、H19DMR 高メチル化 (gain of methylation: GOM、

～5%)、父性片親性ダイソミー (paternal uniparental disomy : patUPD、～20%)、*CDKN1C* の機能喪失変異 (～5%)、11p15 の染色体構造異常(重複、転座、逆位等、～2%)が知られているが、およそ20%の症例ではこれらの異常を認めない。メチル化インプリント確立の詳細な機構については不明であるため、BWS のモデルマウス、モデル細胞を作製する。

SoS は、過成長、骨年齢促進、特異顔貌、精神遅滞を特徴とすることから、症状の一部が BWS とオーバーラップする。ヒストン H3 リジン 36 のモノ・ジメチル化 (H3K36me1・H3K36me2) 酵素をコードしている *NSD1* のハプロ不全が原因であるが、*NSD1* の標的遺伝子は未解明のままである。標的遺伝子探索および病態解析のために SOS のモデル細胞を構築する。

KS の原因遺伝子の一つはヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) 酵素をコードしている *KMT2D* である。H3K4me3 は遺伝子発現促進と関連しているため、*KMT2D* の変異により遺伝子発現を抑制する DNA メチル化が増加する可能性がある。

以上の3疾患は、DNA メチル化、ヒストンアセチル化等の修飾異常の可能性があるので、患者末梢血の解析では病態把握が困難である可能性が高い。そこで、それぞれの疾患のモデ

ル細胞およびモデルマウスを構築し、病態解明のための材料とする。また、モデルマウスはヒストン修飾薬剤、DNA メチル化修飾薬剤を使用する事で、治療法開発の基盤形成に役立つ。

B. 研究方法

1. BWS のモデルマウス、モデル細胞の作製

BWS 遺伝子座の特定の領域を欠失している一症例とヒト細胞の ChIP-seq データベースから、同症例の欠失領域内に遺伝子発現調節領域 (region1 と region2) が存在することを見出した。同領域はマウスでも保存されていることから、インプリンティングにおける機能解明のために CRISPR/Cas9 システムを用いて同領域を欠失させたマウスと培養細胞の作製を試みた。今年度は region1 に着目して欠失させた。region 1 (約 1.5 kb) の両端にガイド RNA (gRNA-r1-1 と gRNA-r1-2) をデザインし、この2本のガイド RNA と Cas9 mRNA(22.5 ng/ul)を受精卵 69 個に injection したのち、2 cell に発生が進んだ 63 個を3匹の偽妊娠マウスに移植した。

培養細胞については、B6 x PWK の F1 マウス線維芽細胞にガイド RNA 配列と Cas9 を組み込んだ発現ベクター2種 (gRNA-r1-1 + Cas9 と gRNA-r1-2 + Cas9) をトランスフェクションし、

puromycin で選択した。

2. *NSD1* 遺伝子改変細胞の作製

ヒトテラトカルチノーマ由来幹細胞 NCCIT 細胞を使用した。CRISPR/Cas9 システムを用いて *NSD1* の一方のアレルに truncation mutation を導入し、他方のアレルの exon6 を loxP 配列で挟んだ (floxed-Ex6) コンディショナル KO 細胞の作製を試みた。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて *NSD1* の C 末端に 3xFLAG tag および HA-FLAG tag を挿入した Tagged *NSD1* 細胞の作製を試みた。

3. Kakubi 症候群 (KS), Sotos 症候群および Beckwith-Wiedemann 症候群のモデルマウス作成

3-1) CRISPR/Cas9 マイクロインジェクション法

ゲノム編集技術として確立されてきた CRISPR/Cas9 システムを使って、受精卵に RNA をマイクロインジェクションすることによる遺伝子欠損マウス作成を試みた。ターゲット部位を挟んで guide RNA を 2 種類用意し、Cas9 タンパク発現用 mRNA を用意し、受精卵細胞質へのマイクロインジェクションを行った。

歌舞伎症候群と Sotos 症候群については、120 受精卵 x 3 回のマイクロインジェクション実験を行った。

(gRNA1, gRNA2, Cas9mRNA) の濃度を第一実験 (10ng/uL, 10ng/uL, 20ng/uL), 第二実験 (20ng/uL, 20ng/uL, 35ng/uL), 第三実験 (25ng/uL, 25ng/uL, 50ng/uL) と濃度を変えて、一回の実験につき 120 個の受精卵を使用した。遺伝子破壊のターゲット部位は、それぞれの遺伝子の大きなエクソンとし、Kmt2d 遺伝子については exon35, Nsd1 遺伝子については exon5 とした。

BWS 遺伝子座の特定の領域を欠失している一症例とヒト細胞の ChIP-seq データベースから、同症例の欠失領域内に遺伝子発現調節領域 (region1 と region2) が存在することを見出した。同領域はマウスでも保存されていることから、インプリンティングにおける機能解明のために CRISPR/Cas9 システムを用いて同領域を欠失させたマウスと培養細胞の作製を試みた。今年度は region1 に着目して欠失させた。region 1 (約 1.5 kb) の両端にガイド RNA (gRNA-r1-1 と gRNA-r1-2) をデザインし、この 2 本のガイド RNA と Cas9 mRNA (22.5 ng/ul) を受精卵 69 個に injection したのち、2 cell に発生が進んだ 63 個を 3 匹の偽妊娠マウスに移植した。

3-2) ES 細胞を使った conventional ノックアウト法

通常の ES 細胞を使って、conditional ノ

ックアウトコンストラクトをデザインした。Stos 症候群モデル用の Nsd1 遺伝子は最も大きい exon5, 歌舞伎症候群モデル用の Kmt2d 遺伝子は exon 16-19 をターゲットとした。Exon の欠失は, loxP 配列で挟みコンディショナルに欠失可能となっている。。

(倫理面への配慮)

本研究は、佐賀大学医学部倫理委員会、佐賀大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を受けて実施した。人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除などの詳細な説明を行い、書面により同意を得たうえで検体収集を行った。遺伝子改変実験に当たっては、佐賀大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て実施した。また、動物実験に関しては、佐賀大学動物実験委員会により佐賀大学動物実験安全管理規則等に適合することが認められた。

C. 研究結果

1. BWS のモデルマウス、モデル細胞の作製

3 匹の偽妊娠マウスから計 20 匹が出生した。今後、成長を待って尾部よりゲノム DNA を抽出し、PCR にて欠失の有無を確認する。F1 マウス線維芽細胞については、region 1 の欠失をヘテロに保持しているクローンを 2 クロ

ーン得ることができた。SNP を用いて父性アレルの欠失であることを確認した。

2. NSDI 遺伝子改変細胞の作製

NSDI の一方のアレルが truncation mutation、他方のアレルが flox-Ex6 のコンディショナル KO 細胞を 2 クローン得た。3xFLAG tag 細胞については、ヘテロ 6 クローン、ホモ 1 クローン、HA-FLAG tag 細胞については、ヘテロ 9 クローン、ホモ 1 クローンを得た。

3. Kakubi 症候群 (KS), Sotos 症候群および Beckwith-Wiedemann 症候群のモデルマウス作成

3-1) CRISPR/Cas9 マイクロインジェクション法

歌舞伎症候群と Sotos 症候群それぞれの系について、120 受精卵インジェクションを 3 回実施した。歌舞伎症候群モデルマウス作成の為のインジェクションでは 14 匹が誕生し、Sotos 症候群モデルマウス作成の為のインジェクションでは 13 匹が誕生した。尾部から DNA を抽出してターゲット部位の増幅後遺伝子の欠失を確認したところ、歌舞伎症候群モデルマウスでは少なくとも 7 匹、Sotos 症候群モデルマウスでは少なくとも 4 匹が、フレームシフト変異を起こす欠失を持つことが確認出来た。生殖細胞にも変異が導入

されていることが期待され、モデルマウスが作成出来たと考えらるが、今後交配して系統を確立する。

BWSについては、3匹の偽妊娠マウスから計20匹が出生した。今後、成長を待って尾部よりゲノムDNAを抽出し、PCRにて欠失の有無を確認する。

3-2) ES 細胞を使った conventional ノックアウト法

歌舞伎症候群モデルマウス作成の為のES細胞は、PCRによるスクリーニングが終了し7個のクローンが組換え体ES細胞との結果であった。今後、サザンブロット解析を行って確認する。Sotos 症候群モデルマウス作成の為のES細胞でも、12個のPCRスクリーニング陽性クローンが得られており、同様にサザンブロット解析を行っている。

D. 考察

1. BWS の解析

BWS のモデルマウスについては、CRISPR/Cas9 システムを用いて生仔を得ることができた。2本のガイドRNAとCas9 mRNAを受精卵に注入する実験系の条件を決めることができた。今後は、出生したマウスの欠失の有無の確認を進める。また、受精卵注入実験を繰り返し行い、目的のマウスが得る。F1マウス線維芽細胞については、父性アレルの region 1 が欠失した

細胞を得たが、インプリンティング機構の解明には母性アレルの欠失細胞も必要であるため、引き続き細胞を作製する。また、region 2 の欠失マウスおよび欠失細胞も作製し、最終的には region 1 と region 2 の両方を欠失したマウスと細胞の作成を目指す。

2. SoS の解析

作製した *NSDI* 遺伝子改変細胞は、レチノイン酸で神経系細胞に分化誘導が可能である。今後は、分化誘導前後の細胞を用いて、全ゲノムメチル化解析、ChIP-seq をおこない、*NSD1* の標的遺伝子を同定し、病態解明と治療法開発の基盤を確立する。

3. Kabuki 症候群 (KS), Sotos 症候群および Beckwith-Wiedemann 症候群のモデルマウス作成

Kabuki 症候群と Sotos 症候群のノックアウトマウスは作成出来たと考えられる。CRISPR/Cas9 システムを利用した受精卵からのノックアウトマウス作成は、極めて効率的である。CRISPR/Cas9 マイクロインジェクション法によって、最短でモデルマウスが作成出来たと考えられる。来年度以降、当初の目的の一つである歌舞伎症候群、Sotos 症候群、Beckwith-Wiedemann 症候群に効果が期待できる薬剤のスクリーニングを開始出来る。また、ES

細胞はコンディショナルノックアウトのデザインとなっており、歌舞伎症候群・Sotos 症候群モデルマウスとしての解析と体細胞突然変異を発生させたときの腫瘍発生のメカニズムも解析出来ると考えられる。

E. 結論

CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変マウス作製、培養細胞作製を試み、実験条件の決定および遺伝子改変細胞を得ることができた。これらのマウス、細胞を用いることで、インプリンティングの分子機構の解明、標的遺伝子の同定、病態解明と治療法開発の基盤が確立できると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

「業務項目：Exome 解析，全ゲノム解析による疾患原因変異同定 Exome 解析，全ゲノム解析による疾患原因変異同定」の項の記載と重なるため，そちらを参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

「業務項目：Exome 解析，全ゲノム解析による疾患原因変異同定 Exome 解析，全ゲノム解析による疾患原因変異同定」の項の記載と重なるため，そちらを参照。

厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患実用化研究事業 (革新的医薬品等の開発の促進研究))
委託業務成果報告書 (業務項目)

委託業務課題: エピジェネティック希少疾患の治療に向けた研究および原因未解明な希少疾患に対する解析技術展開研究
業務項目: プロジェクトの総合推進
担当責任者: 吉浦孝一郎
業務分担者: 渡邊 順子 (久留米大学医学部・GC/MS 医学応用研究施設・講師)

研究要旨

本研究の目的の一つは難病稀少疾患の診断を行い、試料収集を行うことである。病因・病態の解明を推進することであり、臨床診断に注力した。マイクロアレイ解析及びエキソーム解析を行った。

A. 研究目的

原因不明の多発先天奇形を合併する症例について、マイクロアレイ解析にて染色体微細重複、欠失の有無を確認し、さらにエキソーム解析を行った。

を用いたマイクロアレイ解析、およびエキソーム解析を行った。

(倫理面への配慮)

通常の臨床診察業務の一貫であり、倫理的な問題は特にない。

B. 研究方法

患者からの血液検体から染色体標本を作成すると同時に、DNAを抽出し、Affymetrix社のCytoScan HD array

C. 研究結果

(症例要約および解析結果)

① NAAS 7545-00 36週5日、出生体重2914g (+1.3SD) で出生した児。Apgar8/9。

大脳白質髄鞘化遅延、脳梁欠損、肥大型心筋症、肺動脈弁上狭窄、低位鎖肛と多発奇形および眼間解離、耳介低位、特異顔貌を認めた。羊水検査では染色体核型正常、出生後の染色体 G-band 法では 46, XX, ?del(15)(q11.2q11.2) と 15 番染色体長腕に不明瞭部位あり、15 番染色体長腕 q11.2 及び q11.2 を切断点とする中間部欠損が疑われた。

▶ 46, XX, arr(1-22, X)X2

マイクロアレイ解析の結果、15 番染色体に欠失は認めず、病的コピー数変異および 10Mb を超過する LCSH (コピー数不変 LOH) 領域は検出せず。

②-a) NOKO 9447-00 (双胎第一子)
骨幹端異形成症

②-b) NOKO 9447-03 (双胎第二子)
腹壁破裂 (それ以外は BWS の症状に乏しい)。父 44 歳, 母 43 歳。ICSI-ET (凍結胚移植) で妊娠成立した二絨毛膜二羊膜双胎。胎児期より第 1 子 (②-a) は四肢短縮を、第 2 子 (②-b) は臍帯ヘルニアの指摘あり。②-a は全身骨写により骨幹端異形成症を認め、低身長、四肢町の左右差を認める。二児ともに精神遅滞は認めない。染色体 G-band 核型は、46, XY であり Y 染色体の構造異常が疑われたが、父にも同じ形態を認めており、正常変異と考えられた。骨幹端異形成症は IMAGE 症候群、腹壁破裂は Beckwith-Wiedemann 症候群

(BWS) の一症状であり、両症候群が Allelic な疾患であること、凍結胚移植で妊娠成立した双胎において認められた症状であることから、BWS 領域のインプリンティング異常による発症が疑われた。

▶ BWS 領域の遺伝子異常およびインプリンティング異常について検索を行ったが、いずれの異常も認めなかった。

③ TOAI 7710-00 先天性微絨毛封入体症。40 週 1 日, 3250g で出生。日齢 6 から大量の黄色水様便を認め、現在も 1 日 2500-2000ml の水溶性下痢が持続。十二指腸粘膜の病理所見では、電顕で微絨毛の萎縮と微絨毛封入体を認め、光顕で腸上皮管腔側の PAS 染色と CD10 染色が強陽性であったため、先天性微絨毛封入体症と臨床診断。

▶ エキソーム解析では、常染色体劣性モデル、新生突然変異を想定したモデルで検討したが、いずれのモデルにおいても、疾患の原因となるような候補領域、遺伝子は同定できていない。

先天性微絨毛封入体症の既知の遺伝子異常についても、本症例では異常は認めなかった。

D. 考察

多発奇形症候群、生殖医療により誕生した双胎症例、先天性微絨毛封入体

症を疑われる先天性難治性下痢症症例に対して、それぞれマイクロアレイ解析、インプリンティング異常を含む遺伝子解析、エキソーム解析を行った。いずれの症例においても病因となり得る明らかな遺伝子異常は同定されなかった。今後は遺伝子異常、エピゲノム異常以外の発症メカニズムの可能性を考えることは勿論ではあるが、同様症例の蓄積を行い解析を加える必要がある。

E. 結論

今回、重複した大奇形および精神遅滞の合併症例、先天性下痢症例について、microarray 解析、エキソーム解析を行った。異なる合併奇形をもつ双胎症例についてはBWS領域におけるインプリンティング異常についても解析も加えた。4症例ともに病因となるメカニズムの診断にはいたらなかった。Microarray 解析を行った症例についてコピー数の変化を認めなかった症例についてはexome解析の候補と考え、引き続き検討予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Nakajima Y, Meijer J, Dobritzsch D, Ito T, Meinsma R, Abeling NG, Roelofsen J,

Zoetekouw L, Watanabe Y, Tashiro K, Lee T, Takeshima Y, Mitsubuchi H, Yoneyama A, Ohta K, Eto K, Saito K, Kuhara T, van Kuilenburg AB. Clinical, biochemical and molecular analysis of 13 Japanese patients with β -ureidopropionase deficiency demonstrates high prevalence of the c.977G > A (p.R326Q) mutation. *J Inherit Metab Dis.* 2014 Sep;37(5):801-12.

2) 学会発表

国際学会

1. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism 2014.9.2-5 (Innsbruck).

P223: Watanabe Y, Ozono S, Sugie H, Fukuda T, Yano S, Matsuishi T. Phosphoglycerate kinase-1 (PGK-1) deficiency presenting as neonatal onset hemolytic anemia, rhabdomyolysis, and mild developmental delay.

2. The 64th Annual Symposium of the American Society of Human Genetics 2014.10.18-22 (San Diego).

2258M: Watanabe Y, Ozono S, Sugie H, Fukuda T, Yano S, Matsuishi T. Phosphoglycerate kinase-1 (PGK-1) deficiency presenting as neonatal onset hemolytic anemia, rhabdomyolysis, and mild developmental delay.

国内学会等

1. 第 37 回日本小児遺伝学会 2014.4.18 (名古屋市).
 - IV-16) 中島信一, 渡邊順子, 岡田純一郎, 永田絵子, 加藤芙弥子, 山口理恵, 小野裕之, 深見真紀, 中西俊樹, 緒方 勤. X-Y 転座を伴う *SRY(+)* 45,X male の分子遺伝学的解析.
 - VIII-36) 芳野裕子, 海野光昭, 西村美穂, 中川慎一郎, 大園秀一, 上田耕一郎, 原田なをみ, 渡邊順子, 松石豊次郎. 進行性の貧血を合併した 5 番染色体長腕中間部欠失症例.
2. 第 117 回日本小児科学会 2014.4.19-21 (名古屋市).
 - 3P-395) 渡邊順子, 関祥孝, 柳忠宏, 水落 建樹, 竹内 孝仁, 岩本二郎, 猪口 隆洋, 矢野 正二, 鹿毛 政義, 松石 豊次郎. 原因不明の脂肪肝、低血糖、ケトーシス、高乳酸血症、高脂血症を呈する乳児例.
 - 3P-284) 大園 秀一(久留米大学 小児科学), 渡邊 順子, 西村 美穂, 中川 慎一郎, 上田 耕一郎, 稲田 浩子, 福田 冬季子, 杉江 秀夫, 松石 豊次郎. 横紋筋融解症・溶血性貧血を認めた Phosphoglycerate kinase 欠損症の一例.
3. 第 56 回日本小児神経学会 2014.5.29-31 (浜松市).
 - P-063: 緒方怜奈, 松岡幹, 原口康平, チョン・ピンフィー, 吉良龍太郎, 渡邊順子, 才津浩智. GLUT1 欠損症と考えられていたがエクソーム解析により乳児悪性焦点移動性部分発作と診断された一例. A case of malignant migrating partial seizures in infancy following GLUT1 deficiency syndrome.
4. 第 38 回日本遺伝カウンセリング学会 2014.6.20-23 (川崎市).
 - P-10: 元島成信, 原田なをみ, 田中 征治, 芳野 信, 齋藤伸道, 田中悦子, 此元隆雄, 中西浩一, 松石豊次郎, 渡邊順子. フィンランド型先天性ネフローゼ症候群の出生前診. Prenatal diagnosis of Finnish type congenital nephrotic syndrome.
5. 第 41 回日本マススクリーニング学会 2014.8.22-23 (広島市).
 - O-27: 田代 恭子, 石井 宏美, 木下 幸恵, 鈴谷 由吏, 柳内 千尋, 井上 かおり, 稲場 美佐, 青木 久美子, 但馬 剛, 依藤 亨, 重松 陽介, 猪口 隆洋, 松石 豊次郎, 渡邊 順子. 当施設で診断した軽症型プロピオン酸血症 7 症例の

検討.

6. 第 21 回 遺伝性疾患に関する出生前診断研究会 2014.9.13 (宮崎市).

1: 原田なをみ、田中征治、芳野信、齋藤仲道、田中悦子、此元隆雄、中西浩一、松石豊次郎、渡邊順子. マイクロアレイ解析が有用であった 15 番染色体 q26 端部欠失の 1 例.

7. 第 56 回日本先天代謝異常学会 2014.11.13-15 (仙台市).

P-13: 石毛美夏、小川えりか、碓井ひろみ、米沢龍太、小平隆太郎、渡邊順子、湊上達夫、高橋昌里. 治療中に急性硬膜下出血をきたしたグルタル酸血症 I 型の 1 例.

P-20: 鈴谷由吏、田代恭子、稲場美佐、青木久美子、但馬剛、依藤亨、重松陽介、猪口隆洋、松石豊次郎、渡邊順子. 当施設で診断した軽症型プロピオン酸血症 7 症例の検討.

P-36: 中島葉子、Judith Meijer、Doreen Dobritsch、渡邊順子、久原とみ子、三瀨浩、李知子、衛藤薫、伊藤哲哉、Andre Van Kuilenburg. β ウレイドプロピオナーゼ欠損症の臨床的・生化

学的・分子生物学的検討と p.R326Q 変異頻度.

8. 第 59 回日本人類遺伝学会 2014.11.20-23 (東京都).

1P040: 原田なをみ、田中征治、芳野信、齋藤仲道、田中悦子、此元隆雄、中西浩一、松石豊次郎、渡邊順子. マイクロアレイ解析が有用であった 15 番染色体 q26 端部欠失の 1 例. Identification of terminal deletion of Chr.15q by SNP microarray in a patient with a normal karyotype in amniocytes.

9. 第 482 回日本小児科学会福岡地方会 2014.12.13 (久留米市).

15: 八戸由佳子、田中玄師、田中征治、渡邊順子、松石豊次郎、長井孝二郎、坂本照夫、岡田純一郎. 学童期の急性発作に対し血液浄化療法が有効であったメープルシロップ尿症の 1 例.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許得取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患実用化研究事業 (革新的医薬品等の開発の促進研究))
委託業務成果報告書 (業務項目)

委託業務課題: エピジェネティック希少疾患の治療に向けた研究および原因未解明な希少疾患に対する解析技術展開研究

業務項目: プロジェクトの総合推進

担当責任者: 吉浦孝一郎

業務分担者: 園田 徹 (九州保健福祉大学保健科学部作業療法学科・教授)

研究要旨

本研究の目的の一つは難病稀少疾患の原遺伝子を同定し、新たな病因・病態の解明を推進することであり、そのための各症例の臨床診断、遺伝カウンセリングを担当した。地域蓄積する疾患とそれらの患者の試料収集を目指した。

A. 研究目的

難病稀少疾患の臨床診断、遺伝カウンセリングとそれらの患者の試料収集を目的とした。

についての助言をしたり、月1回の症例検討会に出席したりした。

(倫理面への配慮)

通常の臨床診察業務の一貫であり、倫理的な問題は特にない。

B. 研究方法

宮崎県内の主な新生児施設 (宮崎大学医学部付属病院、県立宮崎病院、県立延岡病院、宮崎県医師会病院など) で先天異常の児が出生した場合、連絡が入り、診察に出かけた。宮崎大学医学部付属病院の遺伝カウンセリング部運営委員会委員として、遺伝相談に

C. 研究結果

Down 症候群、Williams 症候群、Sotos 症候群、kabuki 症候群、Rett 症候群、口顔指症候群 type I、CHARGE 症候群、羊膜破裂シーケンス、De Lange 症候群、Hallermann-Streiff 症候群、多発奇形 / 精神遅滞、46,X,dup(q21.2q26)、46,XY,t(2;3)(p13;q26),del(8)(q12.2q21.1

9), 46,XX,del(10)(p12.3→ter), 口唇口蓋裂, 滑脳症, 脳梁欠損, 孔脳症, 脊髄髄膜瘤, シトルリン血症I型などの症例の臨床診断, 遺伝カウンセリングを行ったが, 新しい奇形症候群の発見や地域蓄積する疾患の発見はなかった。

D. 考察

なかなか, 症例の集積が難しい。

E. 結論

新しい奇形症候群や地域蓄積する疾患の発見に努めたが, その目的を十分果たすことができなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Ikewaki N, Sonoda T, Migita H: Modulation of CD93 molecule in a human monocyte-like cell line (U937) treated with nickel. *J. of Kushu Univ. of Health and Welfare*, 2014, 15: 129-137.

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許得取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 学会等発表実績

学会等発表実績

委託業務題目「エピジェネティック希少疾患の治療に向けた研究および原因未解明な希少疾患に対する解析技術展開研究」

機関名 長崎大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表者氏名	発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
T. Kaname, M. Higa, A. Ganaha, K. Teruya, K. Sato, T. Hirano, K. Naritomi.	Detection of rare variations in a targeted genomic region in a population by NGS analysis using pooled DNAs. (ポスター)	EUROPEAN Human Genetics CONFERENCE 2014	Milan, Italy, May 31- June 3, 2014.	国外
Watanabe Y, Ozono S, Sugie H, Fukuda T, Yano S, Matsuishi T.	Phosphoglycerate kinase-1 (PGK-1) deficiency presenting as neonatal onset hemolytic anemia, rhabdomyolysis, and mild developmental delay. (ポスター)	Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism	Innsbruck, Austria, 2014.9.2-5	国外
Watanabe Y, Ozono S, Sugie H, Fukuda T, Yano S, Matsuishi T.	Phosphoglycerate kinase-1 (PGK-1) deficiency presenting as neonatal onset hemolytic anemia, rhabdomyolysis, and mild developmental delay. (ポスター)	The 64 th Annual Symposium of the American Society of Human Genetics	San Diego, USA. 2014.10.18-22	国外
吉浦孝一郎	「小児血液・主要研究における全エクソーム解析の可能性」次世代シーケンサーを用いた疾患解析法～総論。(口頭)	第18回小児血液セミナー, ANAクラウンプラザホテル福岡.	平成26年4月5日(土)	国内

吉浦孝一郎	「予防的乳房切除の今後」 遺伝子診断が医療にもたらすもの。(口頭)	第57回日本形成外科学会総会・学術集会, 長崎ブリックホール.	平成26年4月9日(水)~11日(金)	国内
吉浦孝一郎	医学系研究のための高等学校理科から医学部学生教育について。(口頭)	平成26年度長崎県高等学校理科教育研究会第55回定期大会総会, 長崎県佐世保北高校.	2014年5月23日(金)	国内
吉浦孝一郎	ランチョンセミナー 次世代シーケンサーで何が出来るのか。(口頭)	第23回日本組織適合性学会大会@長崎大学良順会館	平成26年9月14日(日)	国内
三嶋博之	公開セッション第一部・個人ゲノム解析技術の現在と未来/解析結果。(口頭)	生命医薬情報学連合大会, 仙台市仙台国際センター.	2014年10月4日	国内
三嶋博之	次世代シーケンサーで挑む口唇口蓋裂と乳歯歯胚異常の遺伝学。(口頭)	北海道大学大学院歯学研究科歯学研究セミナー, 札幌市北海道大学.	2014年8月13日	国内
荻朋男	ゲノム不安定性疾患群の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析。(口頭)	第57回日本甲状腺学会学術集会 大阪	2014年11月13日~15日	国内
前田寿幸, 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。(口頭)	第69回佐賀小児科地方会, 佐賀.	2014年4月5日	国内
大塚泰史, 副島英伸	Beckwith-Wiedemann症候群における片親性父性ダイソミーの遺伝学多様性と臨床症状との関連。(口頭)	第69回佐賀小児科地方会, 佐賀.	2014年4月5日	国内

渡辺聡, 朝重耕一, 吉浦孝一郎, 三嶋博之, 木下晃	digital PCR を利用した rare variant/mutation 検出法の検討. (口頭)	第10回広島大学-長崎大学連携研究事業カンファランス, 長崎大学良順会館専斎ホール, 長崎.	2014年5月31日(土)	国内
中沢由華, 荻朋男	新規小頭症/放射線感受性症責任遺伝子の同定と機能解析. (口頭)	第10回広島大学-長崎大学連携研究事業カンファランス, 長崎大学良順会館専斎ホール, 長崎.	2014年5月31日(土)	国内
要匡, 黒澤健司, 比嘉真紀, 成富研二	次世代シーケンサにより母親の低頻度体細胞モザイクを確認した点状軟骨異形成症の一例. (口頭)	第117回日本小児科学会学術集会, 名古屋国際会議場, 名古屋.	2014年4月11日(金)~13日(日)	国内
渡邊順子, 関祥孝, 柳忠宏, 水落建樹, 竹内孝仁, 岩本二郎, 猪口隆洋, 矢野正二, 鹿毛政義, 松石豊次郎.	原因不明の脂肪肝、低血糖、ケトーシス、高乳酸血症、高脂血症を呈する乳児例. (口頭)	第117回日本小児科学会学術集会, 名古屋国際会議場, 名古屋.	2014年4月11日(金)~13日(日)	国内
大園秀一(久留米大学小児科学), 渡邊順子, 西村美穂, 中川慎一郎, 上田耕一郎, 稲田浩子, 福田冬季子, 杉江秀夫, 松石豊次郎.	横紋筋融解症・溶血性貧血を認めた Phosphoglycerate kinase 欠損症の一例. (口頭)	第117回日本小児科学会学術集会, 名古屋国際会議場, 名古屋.	2014年4月11日(金)~13日(日)	国内
中島信一, 渡邊順子, 岡田純一郎, 永田絵子, 加藤芙弥子, 山口理恵, 小野裕之, 深見真紀, 中西俊樹, 緒方勤.	X-Y 転座を伴う SRY(+) 45,X male の分子遺伝学的解析. (ポスター)	第37回日本小児遺伝学会, 名古屋市.	2014年4月10日(木)	国内