

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591225

研究課題名（和文）先天異常の発症における大規模ゲノムコピー数多型の関連について

研究課題名（英文）Contribution of large scale genomic copy number variation in the pathogenesis of congenital disorders

研究代表者

山本 俊至 (YAMAMOTO TOSHIYUKI)

東京女子医科大学・国際統合医科学インスティテュート・准教授

研究者番号：20252851

研究成果の概要：ヒトゲノムには一塩基多型のような多様性があることは以前から明らかになってきたが、大規模なゲノムの断片が複数並んで繰り返し構造となっているような領域が多数存在していることが明らかになってきている。本研究では、高密度オリゴアレイによりそのような大規模なゲノムコピー数の増減を網羅的に解析し、明らかとなったゲノム領域をさらに特殊な fiber-FISH 法で可視化して確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝子、ゲノム、人類学、発生・分化、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

2003 年にヒトゲノムプロジェクトが終了し、ヒトゲノムの全ての配列が明らかになった。しかしその一方で、ヒトゲノムプロジェクトが終了するまではわからなかったこととして、ヒトのゲノム配列には、同じ配列が繰り返し挿入されている場所があり、その繰り返し部分が個々人で異なっている領域があることが明らかになってきた。

同じゲノム配列が繰り返し挿入されているような領域は染色体構造が不安定で、親から子へとゲノム上の遺伝情報が次世代に受け継がれる時に欠失や重複を起こして染

色体異常による先天異常症候群を引き起こすことが次第に明らかになってきている。Williams 症候群や 22q11.2 欠失症候群といった先天性心疾患や発達の遅れをきたす染色体微細欠失症候群の患者では、どの患者でもまったく同じ数 Mb 程度の領域のゲノム断片が欠失していることが明らかになっており、欠失断端にゲノムの繰り返し構造が存在し、この領域の染色体構造が不安定であることがすでにわかっている。

2. 研究の目的

本研究では、大規模なゲノムコピー数の増

減が疾患発症に関わるメカニズムを明らかにすることにある。

3. 研究の方法

ヒトゲノムプロジェクトが終了したことで、全てのゲノム上の異常を網羅的に解析するアレイCGHというデジタル染色体解析法が普及してきた。本研究では高密度オリゴアレイCGHを使って先天性疾患のゲノムコピー数の異常を網羅的に解析し、微細なゲノム断片の欠失や挿入を明らかにし、さらにその構造を蛍光色素を使ったFISH法やさらに高解像度のfiber-FISH法を応用してゲノム構造を可視化することにより、実際にどのような構造異常が起こっているのかを明らかにしようとしてきた。

4. 研究成果

(1) アレイCGH解析によるゲノムコピー数の網羅的解析

これまでにまったく原因不明とされた先天性疾患患者のうち、精神発達の遅れやてんかんなど、中枢神経の症状の重い患者について高密度オリゴアレイを用いて全ゲノムのコピー数を網羅的に解析した。約200例中、10%以上で何らかのゲノム異常を認め、これまでに報告のない新規のゲノム異常も複数見出した。これらの成果のうちの一部はすでに論文として公開されている。新規に見出されるゲノムコピー数異常も、これまでにすでに疾患概念が確立しているWilliams症候群や22q11.2欠失症候群と同様に、欠失ゲノム断端に繰り返し構造が存在していることが多く、染色体の不安定な領域において異常が起こりやすいということが明らかとなった。

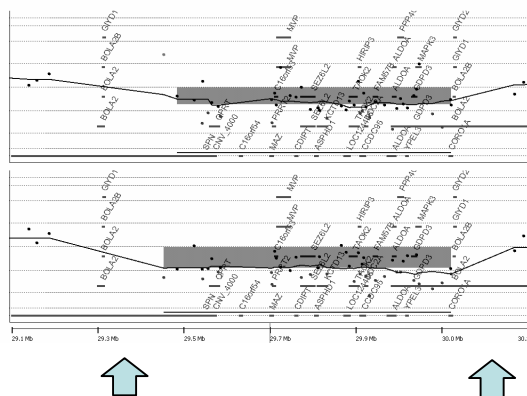


図1 高密度オリゴアレイによるゲノムコピー数の解析例 上下とも同じ異常を示し、異常領域の両断端にはゲノム繰り返し構造が存在している。

(2) Pelizaeus-Merzbacher病におけるPLP1遺伝子領域のゲノム重複構造と臨床症状との関わり

高密度オリゴアレイを用いた解析によりPLP1遺伝子領域が重複していることが明らかとなった患者由来サンプル4例を用い、fiber-FISH法にてゲノム挿入方向を確認した。解析したサンプルにおける重複は、X染色体長腕テロメア側はほぼ同じ領域から始まっていたが、セントロメア側の切断領域はさまざまであり、そのため重複のサイズにはばらつきが認められた。しかし、重複した断片は一樣にタンデムに挿入されており、同じメカニズムで重複が起こっていることが示唆された。

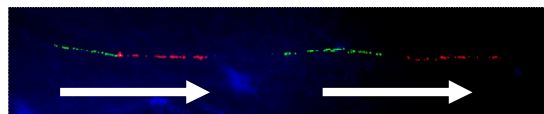


図2 fiber-FISH法によるPLP1遺伝子領域のゲノム断片の挿入方向の解析 2回の繰り返し配列が順列に並んでいることが示された。

(3) ゲノムコピー数多型領域における構造異常解析

これまでの解析で、疾患とは直接関係のない新規のゲノムコピー数の増多を複数確認してきた。これらの領域においてゲノム構造をfiber-FISH法で確認したところ、逆向きに挿入されている領域があり、ゲノムの構造異常はゲノムの領域によってさまざまであることが明らかとなった。これらの事実はゲノム構造異常が発症するメカニズムを追求する上で重要な知見と考えられる。

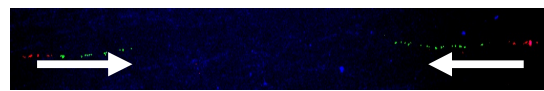


図3 fiber-FISH法によるコピー数多型領域のゲノム断片の挿入方向の解析 2回の繰り返し配列が逆向きに並んでいることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計10件)

Shimajima K, Inoue T, Hoshino A, Kakiuchi S, Watanabe Y, Sasaki M,

Nishimura A, Takeshita-Yanagisawa A, Tajima G, Ozawa H, Kubota M, Tohyama J, Sasaki M, Oka A, Saito K, Osawa M, and Yamamoto T, Comprehensive genetic analyses of PLP1 in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease applied by array-CGH and fiber-FISH analyses identified new mutations and variable sizes of duplications、Brain and Development (in press)、査読有
Toyoshima M, Yonee C, Maegaki Y, Yamamoto T, Shimojima K, Maruyama S and Kawano Y, Vertebral Fusion in a Patient with Supernumerary-der(22)t(11;22) Syndrome、American Journal of Medical Genetics (in press)、査読有
Shimojima K, Yamamoto T, Investigation of the candidate region for trigonocephaly in a patient with monosomy 9p syndrome using array-CGH、American Journal of Medical Genetics (in press)、査読有
Shimojima K, Adachi M, Tanaka M, Tanaka Y, Kurosawa K, Yamamoto T, Clinical features of microdeletion 9q22.3 (pat). Clinical Genetics (in press)、査読有
Liang J-S, Shimojima K, Ohno K, Sugiura C, Une Y, Ohno K, Yamamoto T, A newly recognized microdeletion syndrome of 2p15-16.1 manifesting moderate developmental delay, autistic behavior, short stature, microcephaly, and dysmorphic features: a new patient with 3.2-Mb deletion、Journal of Medical Genetics (in press)、査読有
Liang J-S, Shimojima K, Yamamoto T, Application of Array-Based Comparative Genome Hybridization in Children with Developmental Delay/Mental Retardation. Pediatric Neonatology, 49 巻、2008、213-217、査読有
Yamamoto T, Dowa Y, Ueda H, Kawataki M, Asou T, Sasaki Y, Harada N, Matsumoto N, Matsuoka R, Kurosawa K, Tetralogy of Fallot Associated With Pulmonary Atresia and Major Aortopulmonary Collateral Arteries in a Patient With Interstitial Deletion of 16q21-q22.1、American Journal of Medical Genetics、146A 巻、2008、1575-1580、査読有
Páez MT, Yamamoto T, Hayashi K, Yasuda T, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K, Furutani Y, Asakawa S, Shimizu N, Matsuoka R, Two Patients With Atypical Interstitial Deletions of 8p23.1: Mapping of Phenotypical Traits、

American Journal of Medical Genetics 146A 巻、2008、1158-1165、査読有
下島圭子, 山本俊至、先天性心疾患、ゲノム医学、2 巻、2008、67-71、査読なし
Kaname T, Yanagi K, Chinen Y, Makita Y, Okamoto N, Maehara H, Owan I, Kanaya F, Kubota Y, Oike Y, Yamamoto T, Kurosawa K, Fukushima Y, Bohring A, Opitz JM, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K, Mutations in CD96, a Member of the Immunoglobulin Superfamily, Cause a Form of the C (Opitz Trigonoccephaly) Syndrome、American Journal of Human Genetics、81 巻、835-841、2007.

[学会発表](計 28 件)

山本俊至、重症 RS ウイルス性肺炎により呼吸不全に至った染色体異常 46,XX,del(2)(q23q24.2)を伴う乳児の治療経験[指定発言]、第 562 回日本小児科学会東京都地方会講話会、2009.1.10、本郷

下島圭子, 山本俊至、アナログとデジタルによるゲノム構造解析:アレイ CGH と fiber-FISH 法の融合、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008.12.9、神戸

山本俊至, 下島圭子、ヒト 15 番染色体セントロメア領域における CNV 分布、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008.12.9、神戸

矢野珠巨, 沢石由記夫, 山本俊至, 渡部泰弘, 高橋 勉、特異顔貌・発達遅滞・てんかんを呈し 46,Y,dup(X)(p21.1p22.1)を呈する一卵性双生児の男児、第 42 回日本てんかん学会、2008.10.18-19、東京

山本俊至、高密度オリゴアレイ; 先天異常への臨床応用(シンポジウム)、日本人類遺伝学会第 53 回大会、2008.9、横浜

山本俊至, 下島圭子, 井上岳彦, 藤井裕士, 大野耕策、多彩な症状を示した 16p11.2 微細欠失の母子例、日本人類遺伝学会第 53 回大会、2008.9、横浜

下島圭子, 井上岳彦, 齋藤加代子, 山本俊至、アレイ CGH と fiber-FISH 法を用いたゲノム重複メカニズムの解明、日本人類遺伝学会第 53 回大会、2008.9、横浜

下島圭子, 田中恭子, 山本俊至、アレイ CGH により 22q13.1-q13.31 の中間部重複を同定した 1 男児例、日本人類遺伝学会第 53 回大会、2008.9、横浜

Jao-Shwann Liang, 下島圭子, 大野光洋, 杉浦千登勢, 大野耕策, 山本俊至: A

- newly recognized microdeletion syndrome of 2p15-16.1: a new patient with 3.2-Mb deletion、日本人類遺伝学会第 53 回大会、2008.9、横浜
Iwasaki N, Yamamoto T, Watanabe J, Ogata M, Takizawa M, Iwamoto Y、Whole gene deletion mutation of the HNF-1 gene in Japanese patients with MODY、44th Annual Meeting of the EASD European Association for the Study of Diabetes、2008.9、Rome, Italy
垣内五月, 木村有希, 森田清子, 近藤雅楽子, 大森意索, 清水光政, 渡辺とよ子, 下島圭子, 山本俊至、声帯麻痺を合併し、新生児仮死で出生した Pelizaeus-Merzbacher 病の一症例、第 44 回日本周産期・新生児医学会、2008.7.14、横浜
Liang J-S, Shimojima K, Ohno K, Sugiura C, Une Y, Ohno K, Yamamoto T、New microdeletion syndrome involving 2p15-16.1 in a patient with developmental delay identified by CGH-array、第 50 回日本小児神経学会総会、2008.5.28-31、東京
山本俊至, 下島圭子, 遠山 潤, 奥村 彰久, 前垣義弘, 小国弘量、小児神経疾患の診断における高密度オリゴアレイの意義、第 50 回日本小児神経学会総会、2008.5.28-31、東京
下島圭子, 井上岳彦, 齋藤加代子, 山本俊至、高密度オリゴアレイと FISH 法を用いた Pelizaeus-Merzbacher 病における PLP1 遺伝子の重複メカニズムの解明、第 50 回日本小児神経学会総会、2008.5.28-31、東京
岩崎直子, 尾形真規子, 藤巻理沙, 滝澤美保, 富岡光枝, 山本俊至, 岩本安彦、Hepatocyte nuclear factor-1 遺伝子領域を含む巨大欠失を認めた MODY5、第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、2008.5.22-24、東京
下島圭子, 星野 愛, 小沢 浩, 久保田雅也, 齋藤加代子, 山本俊至、高密度オリゴアレイを利用した Pelizaeus-Merzbacher 病の効率的な診断システム、第 111 回日本小児科学会学術集会、2008.4.25-27、東京
山本俊至, 下島圭子, 遠山 潤, 奥村 彰久, 前垣義弘, 小国弘量、高密度オリゴアレイによる小児神経疾患の診断、第 111 回日本小児科学会学術集会、2008.4.25-27、東京
下島圭子, Marco T Páez, 黒澤健司, 山本俊至、CGH アレイにより 1p36 の中間部微細欠失を認めた 3 番染色体逆位の 1 例、第 31 回日本小児遺伝学会学術集会、2008.4.24-25、東京
山本俊至, 下島圭子、CGH アレイによる小児神経疾患患者におけるゲノムコピー数異常の解析、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007.12、横浜
下島圭子, 山本俊至、CGH アレイ法による 9p 欠失症候群男児例における欠失範囲の同定と三角頭蓋の原因遺伝子座の究明、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007.12、横浜
21 下島圭子, 安達昌功, 黒澤健司, 山本俊至、CGH アレイにて PTCH 遺伝子を含む 9q22 領域の微細欠失を認め Gorlin 症候群と診断された 1 例、第 551 回日本小児科学会東京都地方会講和会、2007.10.13、東京
22 Shimojima K, Yamamoto T、Critical region for trigonocephaly in a patient with monosomy 9p syndrome analyzed by CGH-array、3rd Congress of Asian Society for Pediatric Research、2007.10、Tokyo
23 山本俊至, 下島圭子, Marco T Paez, Yen-ha Tran, 新井正一、CGH アレイによる小児神経疾患の診断、日本人類遺伝学会第 52 回大会、2007.9、東京
24 下島圭子, 安達昌功, 黒澤健司, 山本俊至、CGH アレイにて PTCH 遺伝子を含む 9q22 領域の微細欠失を認め Gorlin 症候群と診断された 1 例、日本人類遺伝学会第 52 回大会、2007.9、東京
25 新井正一, Yen-ha Tran, 下島圭子, Marco T Paez, 山本俊至, 遠山 潤、CGH アレイにより診断された 22 番染色体長腕サブテロメア欠失によるてんかん・精神発達障害の 1 例、日本人類遺伝学会第 52 回大会、2007.9、東京
26 山本俊至, 奥村彰久、アレイ CGH で確定した 7 番染色体部分欠失(q21 q22)の 1 例、第 49 回日本小児神経学会総会、2007.7、大阪
27 下島圭子, Yen Ha Tran, Marco T Paez, 新井正一, 山本俊至、CGH アレイによる Pelizaeus-Merzbacher 病の遺伝子診断、第 31 回遺伝カウンセリング学会、2007.5、東京
28 下島圭子, 山本俊至, 遠山 潤、CGH アレイにより診断された 14 番染色体長腕微細欠失による症候性全般てんかんの 1 例、第 1 回てんかん学会関東甲信越地方会、2007.5、東京
- 〔図書〕(計 7 件)
山本俊至・大橋博文、医薬ジャーナル社、

Allagile 症候群、アレイ C G H 診断ガイドブック(稲澤謙治, 蒔田芳男, 羽田 明 編) 2008、pp124-126

山本俊至・前垣義弘、医薬ジャーナル社、Wolf-Hirschhorn 症候群、アレイ C G H 診断ガイドブック(稲澤謙治, 蒔田芳男, 羽田 明 編) 2008、pp138-140

山本俊至、診断と治療社、E. 先天異常・染色体異常、実践小児神経科(大野耕策・前垣義弘編) 2008、pp154-163

山本俊至、中山書店、てんかんの原因 - 2 イオンチャネル異常、小児科臨床ピクシス(五十嵐隆, 岡 明 編) 2008、pp32-35

山本俊至、中山書店、遺伝に関する相談にどう答えるか、小児科臨床ピクシス(五十嵐隆, 岡 明 編) 2008、pp226-229

前垣義弘・山本俊至、診断と治療社、知的障害の原因、知的障害者の健康管理マニュアル(大野耕策 編) 2007、pp. 8-13

山本俊至、前垣義弘、診断と治療社、その他の知的障害の原因、知的障害者の健康管理マニュアル(大野耕策 編) 2007、pp. 58-62

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 俊至 (YAMAMOTO TOSHIYUKI)
東京女子医科大学・国際統合医科学インスティテュート・准教授
研究者番号：20252851

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし