

平成 22 年 5 月 6 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005～2009  
 課題番号：17019014  
 研究課題名(和文) ヒトゲノム構造解析ツールとしての高密度ゲノムDNAマイクロアレイの開発と応用  
 研究課題名(英文) Development and application of high-density genomic microarray system as a tool for human genome structural variation  
 研究代表者  
 井本 逸勢(橘 逸勢)(IMOTO ISSEI)  
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授  
 研究者番号：30258610

## 研究成果の概要(和文)：

本態不明のヒト疾患の病因・病態に關与する遺伝子同定のため、ヒトゲノム一次構造異常検出ツールとしての高精度・高感度の各種ゲノムアレイの開発と、これらを用いた非特異的多発奇形を伴う精神発達遅滞症例の微細ゲノムコピー数異常解析ならびに検出した異常領域内の遺伝子解析を体系的に行うことにより、ゲノムアレイの臨床応用の基盤技術を確立するとともに疾患関連領域や遺伝子を同定した。

## 研究成果の概要(英文)：

In order to identify genes related to pathogenesis and progression of human diseases, we developed various genomic DNA-array platforms as analytical tools for structural human genome variations, and performed analyses of cryptic copy-number alterations in patients with multiple congenital anomaly/mental retardation (MCA/MR) using these tools. Through systematic array-assisted approach and additional analyses of genes located within regions with copy-number variations, we established technical bases of genomic arrays as diagnostic tools and identified various disease-related regions/genes in patients with MCA/MR.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	13,600,000	0	13,600,000
2006年度	13,600,000	0	13,600,000
2007年度	13,500,000	0	13,500,000
2008年度	11,500,000	0	11,500,000
2009年度	11,500,000	0	11,500,000
総計	63,700,000	0	63,700,000

## 研究分野：ゲノム医科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ヒトゲノム、アレイ CGH、ゲノム構造異常、先天異常、染色体

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムDNAの配列情報が明らかになった現在、微細なレベルでの疾患遺伝子座の発

見は疾患遺伝子の同定に直結する。このため、先天異常や癌など病型は同じであっても複雑な表現型を示す本態不明のヒト疾患における

ゲノム一次構造・機能異常領域を、全ゲノムを対象に高精度かつhigh-throughputに探索できるシステムを構築し効率よくスクリーニングを行っていくことは、これらの疾患の遺伝的要因を解明する重要な手段である。このようなシステムに必要なツールとしての高精度・高感度のゲノムアレイの作製とこれを用いた解析法開発の基盤技術開発、ならびに実際にこのシステムを利用した疾患関連遺伝子探索プログラム構築が、求められている。

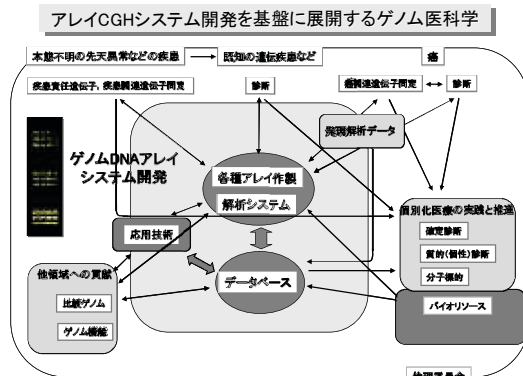
## 2. 研究の目的

1のような背景のもと、①数10Kb—数Mbレベルでゲノムコピー数異常を高感度かつ安定に検出できる高密度・高感度の実用BACアレイを作製する基盤技術を整備し、②これらを用いたアレイCGH法(コピー数異常解析)とならびにその応用法(ゲノム機能異常解析)を、対象疾患ごとに体系的に遂行していくシステムを構築し、効率よく新規疾患関連遺伝子やその調節領域の異常の探索、ならびに新規症候群の同定と分子病態解明を推進するとともに、③実際の臨床診断ツールとなりうるゲノムアレイのデザインとその適応を確立することで個別化医療の推進に寄与し、④ゲノム解析の基盤技術・情報を提供し領域内外の他の研究技術との融合を図ることを、本課題の目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 全ゲノムスクリーニング用アレイ、特定の染色体領域高密度アレイ、あるいは遺伝子・異常領域特異的フォーカスアレイなどの主に bacterial artificial chromosome (BAC) クローンを用いたアレイ各種実用ゲノムアレイを作製するための基盤技術ならびに BAC クローンなどのリソースの充実をはかり、実際にアレイを作製するとともに、これらを用いたアレイ CGH 法の開発・改良ならびに解析ソフトなどのシステム整備を行う。
- (2) 本態不明の多発奇形・精神発達遅滞(MCA/MR)を症状に持つ先天異常症や癌などの臨床検体あるいは細胞株を系統的に収集するシステムを構築し(情報ならびにバイオリソースのバンキングシステム)、これらの材料を対象にアレイ CGH 法を行うことで潜在的な異常領域の探索を行う。さらに、異常領域を指標に疾患関連遺伝子の同定を行う。
- (3) ゲノムアレイと Methylated CpG Island Amplification (MCA) 法と組み合わせたプロモーター領域のメチル化異常解析や chromatin immunoprecipitation (ChIP) 法と組み合わせたプロモーター領域の結合蛋白異常の検出などの応用法を確立し、と同様に詳細に疾患発生に関わるゲノム異常の探索と異常の標的遺伝子の同定を行う。
- (4) 得られた結果を基盤に、疾患あるいは疾

患群ごとにその病態に関わる遺伝子や領域からなる臨床検査レベルで使用可能なアレイを作製し、これを軸にした個別化医療システムを構築する。



本計画研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省共同告示第1号)(平成16年12月28日全部改正)(平成17年6月29日一部改正)」が定めるA群ならびにB群試料等に相当するヒト細胞を用いるため、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」(科学技術会議生命倫理委員会)を十分理解し、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して実施するよう計画された。本研究で用いられるヒト試料は、東京医科歯科大学難治疾患研究所ならびに臨床施設において倫理審査委員会にて承認された手続きに基づき収集され、具体的には、臨床施設でインフォームドコンセントを取得され、匿名化処理が施された後、東京医科歯科大学・難治疾患研究所の細胞ならびにDNAバンクに供与され、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に用いられるため、個人情報情報が漏洩することはないシステムが担保されている。

## 4. 研究成果

- (1) ゲノムアレイ作製と解析システム整備
  - BACクローンを用いた自作アレイ、すなわち、①ゲノムワイドなスクリーニング用高密度アレイ(MCG Whole Genome Array-4500)、X染色体全体をカバーする高密度アレイ(MCG X-tiling Array)、②遺伝疾患診断用アレイ(MCG Genome Disorder Array Ver. 1、Ver. 2、Ver. 3)、③1p36領域の高密度アレイ(MCG 1p36 Contig Array)、④癌関連遺伝子を中心とした遺伝子特異的な高精度アレイ(MCG Cancer Array-800)、⑤Copy number variation (CNV) 領域667座位の検出用のアレイ(MCG Genome Variation Array)の設計、プローブ選択とFISHによる位置確認、アレイの作製と改良、ならびに1コピーの変化の検出が可能であるなどの精度検定の確認を行い、試料解析に用いた。さらに、各アレイに対応した解析ソフトの開発、データ登録、データ更新を行った。

## MCGアレイ

1) Whole Genome Array-4500 - ヒト24種類の染色体を4523 BACでカバー
2) Cancer Array-800 - 800種類の既知がん関連遺伝子を搭載
3) 1p36-Contig Array - 1p36の約20Mbを212 BACで隙間なくカバー
4) X-tiling Array - X染色体を1001個のBACで隙間なくカバー
5) Genome Disorder Array - 各種染色体異常症を検出するための561 BACを搭載
6) Genome Variation Array - 大きなサイズのゲノムコピー数多型の667座位を検出

BACアレイは、染色体解析技術を補完する診断法として臨床応用が期待されることから、これまで蓄積された解析結果ならびに国内外での解析情報を基盤により有用なスクリーニング用アレイ(診断用ターゲットアレイ)の設計とクローン選択を進めた。実際に、遺伝疾患診断用アレイ(MCG Genome Disorder Array Ver.3)は、本課題に期間中に(2009年10月)富士フィルム株式会社より商品化(先天異常症候群解析用DNAアレイ「GD-700」)され、これを用いた受託解析が株式会社ビーエムエルより開始されている(2009年9月28日NEDO、富士フィルム、ビーエムエルよりプレスリリース)。

Genome Disorder (GD)-Array は2009年10月  
実用化供給



東京医科歯科大学・難治研で開発した  
先天異常症診断用BACアレイ  
Genome Disorder (GD)-Array



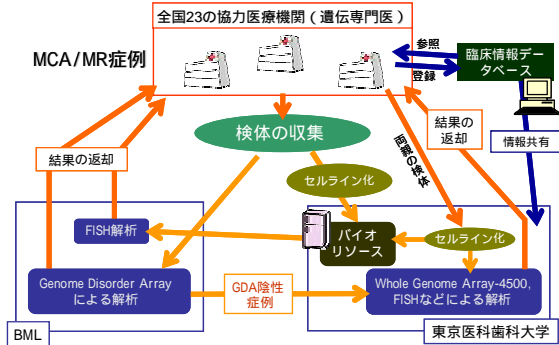
アレイCGHを診断法として活用する  
ための解説書(平成20年3月)

### (2) ゲノムアレイを用いたヒト疾患ゲノムの一次構造異常解析

自作ゲノムアレイを中心に、本課題では特に先天異常症例(通常の染色体検査で異常の検出されないMCA/MR症例)を中心にヒト疾患における潜在的ゲノム一次構造異常・エピゲノム異常解析を行った。羽田支援班との協力のもとに組織した臨床遺伝コンソーシアム内で、MCA/MR症例について100例/年の計画で臨床情報ならびにDNAおよび不死化リンパ球の収集を重点的に展開し、2009年9月現在約550例と計画を上回る症例の登録を達成している。異常の検出された検体を中心に両親検体の登録も進めている。

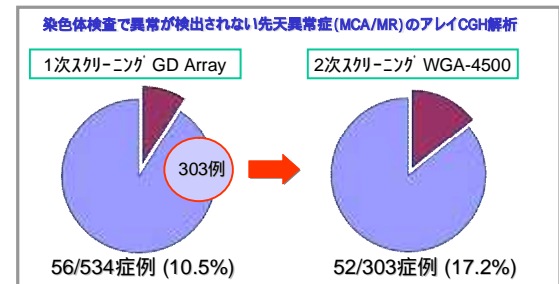
収集されたMCA/MR症例のうち、MCG Genome Disorder Array (GDアレイ)により結果の確

### 実用化を目指した先天異常疾患解析のためのコンソーシアムの構築



定した534症例中56例(10%)に疾患の原因となる異常を検出した。このうち41例はサブテロメア異常であったが、このうち16例は2つの染色体にサブテロメア異常を認め、両親の一方に均衡型転座があることが示唆された。

### コンソーシアム症例解析のまとめ (2005年10月~2009年9月)



### 約1/4にPathogenic CNVを検出

#### 1次スクリーニング陽性: 56例の結果

単一染色体のサブテロメア領域	25例
二染色体のサブテロメア領域	16例
既知の疾患または遺伝子領域	13例
環状染色体うたがい	1例
X染色体モザイク (XX/XXX)	1例
合計	56例

更に、GDアレイ陰性症例のうち303例を対象に、これまでにMCG Whole Genome Array-4500 (WGA-4500)による二次解析

を終了し、52例(17%)に病態と関連すると考えられる微細コピー数変化(Pathogenic CNV, pCNV)を検出した。二次解析の症例数の増加によりpCNV候補の検出率は大きく変わらないことから、GD陰性例全例での解析を行うべく検討を継続しpCNVの検出に務めている。

### 2次スクリーニング: pathogenic CNV 52例

既知の微細欠失症候群	5例	del(1)(q41q42) 1例 del(1)(q43q44) 1例 del(16)(p11.2) 3例
疾患関連遺伝子の指摘	3例	BMP4, CASK, YWHAE
疾患関連遺伝子候補の指摘	7例	MBD2, RELN etc.
新規症候群の可能性	2例	del(10)(q24q25)
男児のX染色体微細欠失	1例	Xp11.3
その他	34例	

各症例の表現型・ゲノム異常情報に関して、羽田支援班、連携研究者の協力により構築し

たCGHアレイ検索症例臨床情報データベースへの情報登録、更新を進めて、また、アレイ解析で得られるコピー数多型情報をデータベース化した。

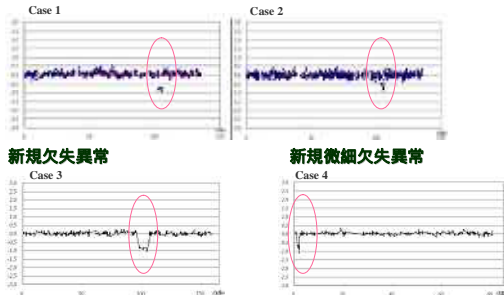
CGHアレイ検索症例臨床情報データベース



ゲノム構造・機能異常を指標に異常領域および領域内遺伝子の詳細な解析を進め、新規の疾患原因/関連遺伝子や調節領域異常の同定を行い、得られた成果は順次報告した(成果公表リスト)。特に、収集した症例中、複数例で重複する箇所に異常が認められる症例や臨床病型が類似する症例については、コンソーシアム内での情報共有により追加症例の収集を行い、新規症候群の確立、genotype-phenotype correlationの検討などを行っている。

Whole Genome Array-4500

血縁のない12例のMCA/MRに検出する同一領域の微細欠失異常



2008年に報告した小脳脳幹形成不全による小頭症を伴うMCA/MR 女児症例の原因遺伝子CASKは、その後臨床所見から全11例で詳細な解析を行い、ヘテロ欠失3例、点突然変異5例、エクソン内2塩基欠失1例、重複2例を検出し、全例にハプロ不全を生じる異常トランスクリプト発現または発現低下をきたすことを見出しており、女児に比較的多い特徴的な表現型を持つMCA/MR症候群であることを確認した。CASK異常症例における表現

CASK異常が疑われる症例の解析

背景: Xp11.4に座位するCASKの異常は、女児における小頭・小脳脳幹部低形成を伴う発達遅滞に關する報告がなされている

対象: 発達遅滞・小頭・小脳脳幹部低形成を伴う女児11例



型は欠失範囲(巻き込まれる他の遺伝子の数)

によるパリエーションがなく、CASK異常が表現型決定に強い影響を持つことが確認された。

解析結果のまとめ

No.	結果	異常の箇所	転写産物への影響
1	ナンセンス変異	exon 2	終止コドンを生じる
2	ナンセンス変異	exon 4	終止コドンを生じる
3	ナンセンス変異	exon 27	終止コドンを生じる
4	2bpの欠失	exon 3	終止コドンを生じる
5	スプライシング領域の変異	intron 4	終止コドンを生じる
6	スプライシング領域の変異	intron 21	終止コドンを生じる
7	ヘテロ欠失		
8	ヘテロ欠失		
9	ヘテロ欠失		
10	中間部重複	exon 3-7	終止コドンを生じる
11	中間部重複		腕内逆位による

pCNVは、病態と無関係なCNV (benign CNV) を区別されることが、診断的にも病態関連遺伝子の同定のためにも重要である。現在、構造異常のデータベース(Database of Genomic Variants)や異常領域の大きさなど等を参考にするとともに、両親解析を行い異常が *de novo* で生じたものであるかどうかの確認を進めている。謙譲な両親から受け継がれ benign CNV と考えられるものは、データベース未登録のものも多く、日本人特異的あるいは比較的稀なCNVが多く存在している可能性を示唆しており、CNVの発見と登録をトリオ解析とともに今後行っていく必要がある。

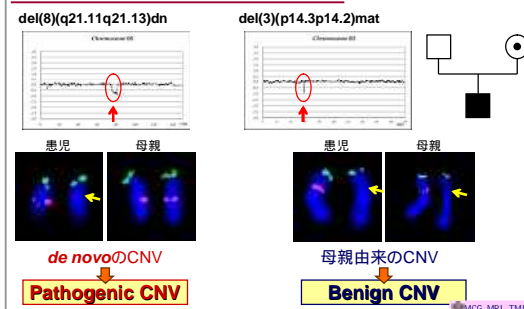
2次スクリーニング: benign CNV 8例

del/dup	locus	サイズ (Mb)	異常クローン	遺伝子	データベースの登録
dup	3p26.3	0.17	RP11-630I1	CNTN4	あり
dup	3p14.3p14.2	0.60	RP11-80H18, RP11-79J19	11 genes	部分的にあり
dup	5p14.3	0.17	RP11-91A5	CDH18	部分的にあり
dup	8p23.2	0.17	RP11-79I19, 45M12, 140K14	CSMD1	あり
dup	9q33.1	0.16	RP11-150L1	TLR4	なし
dup	10q22.3	0.16	RP11-79M9	C10orf11	なし
del	22q11.21	0.42	RP11-155F20, 590C5, 54C2	16 genes	部分的にあり
del	Xp11.23	0.19	RP11-876B24	ZNF630	あり

これまで報告されていなかったCNV

Pathogenic CNVとbenign CNV

MCA/MRの男児に2箇所のCNVを検出した



(3) ゲノムアレイを用いた応用法の確立

BACアレイを基盤にコピー数異常の検出以外に解析を行う方法として、これまでMCA法と組み合わせたプロモーター領域のメチル

化異常の解析法 (BAC-array-based MCA, BAMCA 法) を開発してきた。本方法は、BAC アレイを用いるため分解能は低いものの、全ゲノムにおける俯瞰的なメチル化状態の評価が簡便に行えるなど利点も多く、各種癌の病態や進展に伴う DNA メチル化の変化や悪性度の予測などが行えることも明らかになっている。また、癌におけるメチル化標的となる癌抑制遺伝子候補 (NR112, PTGER2, CRABP1, LAPTM5) の同定とその機能解析にも有用であることが示された。

#### 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 57 件)

1. Honda S, Orii KO, Kobayashi J, Hayashi S, Imamura A, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J. Novel deletion at Xq24 including the UBE2A gene in a patient with X-linked mental retardation. J Hum Genet 2010 Mar 26 [Epub ahead of print] (査読有)
2. Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Sugino Y, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J. Lysosomal-associated protein multispansing transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas. PLoS One 4: e7099, 2009 (査読有)
3. Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 125:2854-62, 2009 (査読有)
4. Hayashi S, Okamoto N, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. Heterozygous deletion at 14q22.1-q22.3 including the BMP4 gene in a patient with psychomotor retardation, congenital corneal opacity and feet polysyndactyly. Am J Med Genet A 146A: 2905-10, 2008 (査読有)
5. Hayashi S, Mizuno S, Migita O, Okuyama T, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. The CASK gene harbored in a deletion detected by array-CGH as a potential candidate for a gene causative of X-linked dominant mental retardation. Am J Med Genet A 146A: 2145-51, 2008 (査読有)
6. Okamoto N, Kubota T, Nakamura Y, Murakami R, Nishikubo T, Tanaka I, Takahashi Y, Hayashi S, Imoto I, Inazawa J, Hosokai N, Kohsaka S, Uchino S. 22q13 microduplication in two patients with common clinical manifestations: A recognizable syndrome? Am J Med Genet A 143A: 2804-9, 2007 (査読有)
7. Tanaka K, Imoto I, Inoue J, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Iwai T, Kawano T, Inazawa J. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma. Oncogene 26: 6456-68, 2007 (査読有)
8. Hayashi S, Honda S, Minaguchi M, Makita Y, Okamoto N, Kosaki R, Okuyama T, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Construction of a high-density and high-resolution human chromosome X array for comparative genomic hybridization analysis. J Hum Genet 52: 397-405, 2007 (査読有)
9. Hayashi S, Ono M, Makita Y, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Fortuitous Detection of a Submicroscopic Deletion at 1q25 in a girl with Cornelia-de Lange syndrome carrying t(5;13)(p13.1;q12.1) by array-based comparative genomic hybridization. Am J Med Genet 143A: 1191-7, 2007 (査読有)
10. Honda S, Hayashi S, Kato M, Niida I, Okuyama T, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Clinical and molecular cytogenetic characterization of two patients with non-mutational aberrations of the FMR2 gene. Am J Med Genet 143A: 687-93, 2007 (査読有)
11. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. Ann Neurol 59: 298-309, 2006 (査読有)
12. Imoto I, Izumi H, Yokoi S, Hosoda H, Shibata T, Hosoda F, Hirohashi S, Inazawa J. Frequent silencing of the candidate tumor-suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small cell lung cancers. Cancer Res 66: 4617-26, 2006 (査読有)
13. Hayashi S, Kurosawa K, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Detection of cryptic chromosome aberrations in a patient with a balanced t(1;9)(p34.2;p24) by array-based comparative genomic hybridization. Am J Med Genet 139A: 32-6, 2005 (査読有)

[学会発表](計 17 件)

1. Imoto I: Integrative genomics and

epigenomics in cancer. The 9th East Asian Union of Human genetics Society. Seoul, Korea. 2009年11月19日

2. 井本逸勢、稲澤譲治：がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析．第68回日本癌学会学術総会．神奈川．2009年10月1日

3. 井本逸勢、林深、本田尚三、稲澤譲治：ゲノムアレイプラットフォームを用いた遺伝疾患研究の進展と臨床応用．日本人類遺伝学会第53回大会．神奈川．2008年9月30日

4. 井本逸勢、小崎健一、稲澤譲治：Cancer genomic and epigenomic analyses on BAC-array platform. 第66回日本癌学会学術総会．神奈川．2007年10月5日

5. 井本逸勢、林深、本田尚三、稲澤譲治：Detecting copy-number variation in the human genome using BAC-array based comparative genomic hybridization. International Symposium on Applied Genomics 2006．神奈川．東京．2006年12月15日

〔図書〕(計4件)

1. 井本逸勢：ゲノムコピー数変化(CNV), BACアレイを用いたアレイCGHと他のマイクロアレイとの比較．アレイCGH診断活用ガイドブック-知っておきたい染色体微細構造異常症-. 62-5, 75-7, 医薬ジャーナル社, 2008

2. 井本逸勢、稲澤譲治：アレイCGH法による腫瘍の微細染色体コピー数異常の検出．造血器腫瘍アトラス-形態, 免疫, 染色体と遺伝子-改訂第4版. 113-7, 日本医事新報社, 2009

3. 井本逸勢：染色体と遺伝子の異常．臨床病態学. 55-76, 医歯薬出版, 2009

〔産業財産権〕

出願状況(計32件)

1. 名称：「先天性異常症の染色体欠失の検出方法」

発明者：稲澤譲治・井本逸勢・林深・会津善紀、国立大学法人東京医科歯科大学・株式会社ビー・エム・エル・富士フィルム株式会社  
権利者：株式会社ビー・エム・エル・富士フィルム株式会社

種類：特許

番号：特願2008-199541(P07-076)

出願年月日：2008年8月1日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.cghtmd.jp/index.html>

(東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子細胞遺伝のCGHデータベース)

マスコミ発表資料

2006年11月16日「微小な染色体異常診断チップの開発」日本経済新聞朝刊

6. 研究組織

(1)研究代表者

井本逸勢(橘逸勢)(IMOTO ISSEI)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：30258610

(2)研究分担者

稲澤譲治(INAZAWA JYOJI)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号：30193550

(3)連携研究者

蒔田芳男(MAKITA YOSHIO)  
旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：20271778