

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：18001  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591329  
 研究課題名（和文） 次世代シーケンサーを利用した三角頭蓋症候群の原因および病態解明  
 研究課題名（英文） Study on causes and mechanisms of trigonocephaly syndromes using Next-generation sequencers.  
 研究代表者  
 要 匡（KANAME TADASHI）  
 琉球大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号：40264288

研究成果の概要（和文）：

三角頭蓋を呈する疾患は複数あり、その原因や全体像は明確になってはいない。本研究では、それら症候群の原因・病態解明および変異検出法の構築を目的とし、解析を行った。

結果、アレイ CGH により 9q34.11 の部分欠失を、次世代シーケンサーによるホールエクソーム解析により、*ASXL1* 変異（Bohring-Opitz 症候群患児）を、ダイレクトシーケンス解析により *CD96* 変異、*ASXL1* 変異を新たに同定した。両遺伝子については、qPCR-HRM 法を用いた変異スクリーニング法を確立した。また、*CD96* はラミニンと結合することが判明した。

研究成果の概要（英文）：

There are many syndromes with trigonocephaly. However, almost all the syndromes have not been identified their responsible genes and their mechanisms. The aim of this study was to identify abnormalities in the patients with trigonocephaly and to establish the gene-scanning system for responsible genes for trigonocephaly.

We identified a partial deletion of 9q34.11 in a patient by array-CGH, a mutation in the *ASXL1* gene in a patient with Bohring-Opitz syndrome by whole exome analysis using Next-generation sequencer, and mutations in *CD96* or *ASXL1* in six patients by direct sequencing analysis. We also established gene-scanning systems for *CD96* and *ASXL1* by qPCR-HRM method.

For the mechanisms of trigonocephaly, we found that *CD96* interacts with an extra-cellular matrix protein, laminin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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、奇形症候群、ゲノム、次世代シーケンサー、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

三角頭蓋は、前頭縫合の早期癒合により生

じるが、その原因や全体像は明確になってはいない。三角頭蓋を呈する疾患（三角頭蓋症

候群)は、おそらく原因遺伝子の違いにより精神発達にほとんど影響のないタイプと、頭蓋内圧に関係なく精神発達に障害が生じるタイプがあると推定される。しかしながら、原因が不明なため、症状のみからタイプを判定することは困難で、不必要な外科的治療が行われている場合もあると思われる。

よって、原因を特定することは、手術適応や、患児の発達予後、療育を考える上でも重要と思われる。

三角頭蓋を呈する疾患は、その症状のみ認められる非症候性の他、症候性の代表的疾患疾患として、Opitz 三角頭蓋症候群、Bohring-Opitz 症候群、9p-症候群、Jacobsen 症候群 (11q-症候群) などが知られている。

本研究申請当時、三角頭蓋症候群は、非症候性三角頭蓋患児における *FGFR1* 遺伝子点変異の一例報告の他、原因がある程度推定されている領域 (3 番染色体、9 番染色体短腕、11 番染色体長腕) が知られていたが、原因となる遺伝子は特定されていなかった。

我々は、Opitz 三角頭蓋症候群を呈し、均衡型転座 (t(3;18)) をもつ患児の切断点解析より原因遺伝子の一つ (*CD96* 遺伝子: 遺伝子座 3q13.13) を特定した。ところが、他の原因については、領域の絞り込みが困難で、全てを通常的手法で解析することは、不可能に近く、原因遺伝子の特定には、全く新しい手法が必要であると思われた。

当時、我々は、研究協力者である塚原博士 (研究開始時; トロピカルテクノセンター) との共同で、新型機器の次世代シーケンサー 3 台 (ABI 社 SOLiD) を用いて、コントロール検体のゲノム解析を開始しており、次世代シーケンサー解析のノウハウを有していた。

そこで、我々は、当時開発されたばかりの次世代シーケンサーを効果的に活用し、これまで不可能であった全候補領域の解析を短期間で行うことで、疾患の原因を確実に特定するという手法をもとに、研究計画を立案した。

また、三角頭蓋を呈する患児について、国内外の多くの施設より紹介 (英国、米国、フランス、ドイツ、イタリア、デンマーク、ノルウェー、イスラエル、ブラジル、アルゼンチンなど 20 以上の施設より紹介) があり、その原因説明が待たれていた。

加えて、本研究で計画した全候補領域リシーケンスという手法は、平成 19 年から平成 20 年にかけて登場した次世代シーケンサーによって可能となったばかりであり、海外との競争を考慮しても、重要な研究であり、本研究手法は、遺伝性疾患原因解明のブレイクスルーとなりうると思われた。

## 2. 研究の目的

本研究は、未だ解明されていない三角頭蓋症候群について、次世代シーケンサーを用いて患児ゲノムの候補領域を網羅的に解読・解析することで、確実に原因を特定することを目的とした。

特定できた三角頭蓋原因遺伝子に関しては、遺伝子診断システムを構築し、外科的治療適応の判定や発達を含めた予後の推定材料となることを、また、三角頭蓋に重要なシグナル伝達経路の解明を目指した。

具体的には、

- (1) 三角頭蓋を呈する患児ゲノムの原因候補領域について、次世代シーケンサーを用いて全て解読し、原因を特定する。
  - (2) 新たに特定された三角頭蓋の原因遺伝子について、診断システムを構築する。
  - (3) *CD96* を中心として他のタンパク質との関係および遺伝子発現変化を解析し、三角頭蓋が生じる病態の解明をめざす。
- 以上を目標とした。

## 3. 研究の方法

研究は、以下の方法にて行った。

- (1) 三角頭蓋を呈する患児のアレイ CGH 解析および遺伝子変異解析

三角頭蓋を呈する患児について、臨床遺伝学的に診断し、まずアレイ CGH によるゲノムの微小欠失、重複の有無を検索した後、それらを認めない患児について、*CD96* 遺伝子および研究期間中に同定された原因遺伝子の変異解析を行った。

- (2) 次世代シーケンサーによるリシーケンス解析

まず、日本人コントロールのゲノム DNA より long-PCR による候補領域抽出を行い、次世代シーケンサーによる解析による SNP, indel 検出を試みた。

次に、患児ゲノムによる次世代シーケンサー解析を行った。本研究期間中にホールエクソソムキャプチャーを行うシステムが確立されたため、患児ゲノムは、ホールエクソソムキャプチャーによるエクソソム解析を行った。

- (3) 三角頭蓋を呈する症候群の原因遺伝子に基づく変異スクリーニングシステムの構築

本研究期間中に判明した (していた) 三角頭蓋を呈する症候群の原因遺伝子、*CD96*, *ASXL1* 遺伝子について、変異スクリーニングシステムを構築し、検証を行った。

- (4) 三角頭蓋発症に重要な *CD96* を中心としたシグナル伝達経路の解析

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株である K562 を用いて、*CD96* 安定発現細胞株を樹立した後、*CD96* と反応する細胞外マトリックスの検索

を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 三角頭蓋を呈する患児のアレイ CGH 解析  
および遺伝子変異解析 *CD96* 遺伝子変異解析

三角頭蓋を呈する患児について、顔貌その他の症状等、臨床遺伝学的に Opitz 三角頭蓋症候群 (OTCS)、Bohring-Opitz 症候群 (BOPS) と診断された患児の *CD96* 遺伝子解析を行った。OTCS の患児については、1 例、exon6 の欠失が確認されたが、海外症例においては、いずれも変異が確認できなかった。BOPS の患児については、*CD96* 変異を認めなかった (Pierron *et al*)。 (BOPS 患児の原因遺伝子については後述)

三角頭蓋を呈する患児のアレイ CGH では、1 人に 9 番染色体長腕 (9q34.11) に約 1.2Mb の部分欠失を認めた (図 1)。1 例ではあるが、本欠失領域内にも、三角頭蓋の原因が存在する可能性があると思われた。

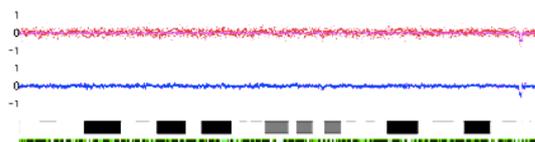


図 1 : del (9) (q34.11q34.11)

(2) 次世代シーケンサーによるリシーケンス解析

日本人コントロールゲノム 1 Mb について long-PCR 法 (平均長約 20kb) による増幅・抽出を検討したところ、厳密な primer 設定、条件設定により 1~3Mb 程度であれば十分に抽出できることを確認した。抽出したゲノムを、次世代シーケンサー (SOLiD3) を用いてフラグメント解析 (1000x 以上の冗長度) を行い、pipeline ソフトウェア、市販のソフトウェアによる SNP コールを行い、ゲノム 100kb 当たり 80~100 の SNP を検出できた。

その後、本研究期間中にホールエクソンキャプチャーを行えるようになったため、*CD96* 遺伝子変異およびアレイ CGH での変異を認めない患児について、ホールエクソーム解析を行った。

キャプチャーには、illumina 社の TruSeq 試薬を用い、次世代解析には SOLiD4 plus, HiSeq2000 を使用した。2 人の患児でホールエクソンキャプチャーを行い、SNP, indel call, 比較解析等により、1 人に *ASXL1* 遺伝子の欠失変異を同定した。(図 2)

さらに、他の BOPS 患児でシーケンス解析を行い、5 つの新規変異を同定した。(投稿準備中)

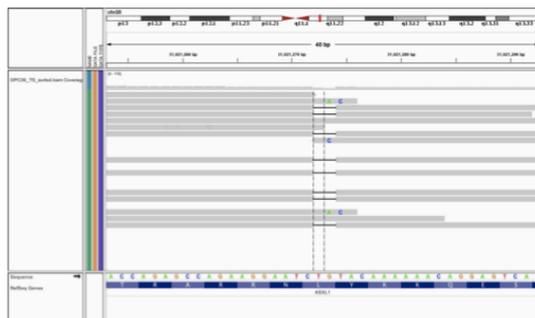


図 2 : 次世代シーケンサー解析により同定した *ASXL1* 欠失変異

(3) 三角頭蓋を呈する症候群の原因遺伝子に基づく変異スクリーニングシステムの構築

*CD96* 遺伝子、*ASXL1* 遺伝子について、定量 PCR-高性能融解曲線分析法による遺伝子変異スクリーニング系、ダイレクトシーケンスによる変異直接検出(検証)系を整備し、遺伝子診断システムを完成させた。

また、本手法を用いて、遺伝子変異およびコントロール検体での新規 SNP を確認した。

(4) 三角頭蓋発症に重要な *CD96* を中心としたシグナル伝達経路の解析

*CD96* 安定発現 K562 細胞株を用いて、コラーゲン I, IV, フィブロネクチン、ラミニン、poly-D-lysine をコートした培養プレートで、マトリックスタンパク質への接着性を経時的に計測した。結果、フィブロネクチンを介したシグナル伝達が行われている可能性が示唆された。(投稿準備中)

#### 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 21 件)

- ① 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*, 査読あり 2012, in press.
- ② He Y, HUGO Pan-Asian SNP Consortium ., Paleolithic Contingent in Modern Japanese: Estimation and Inference using Genome-wide Data. *Sci Rep*, 査読あり 2012, 2 :355. doi:10.1038/srep00355
- ③ Xu S, Pugach I, Stoneking M, Kayser M, Jin L; HUGO Pan-Asian SNP Consortium,

- Genetic dating indicates that the Asian-Papuan admixture through Eastern Indonesia corresponds to the Austronesian expansion Proc Natl Acad Sci U S A, 査読あり 2012, 109:4574-4579.
- ④ Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi -Ko Y, Kaname T, Naritomi K, 他 23 名, Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. Nat Genet, 査読あり 2012, 44:376-378. doi: 10.1038/ng.2219.
- ⑤ Cheung W, Kotzamanis G, Abdulrazzak H, Goussard S, Kaname T, Kotsinas A, Gorgoulis VG, Grillot -Courvalin C, Huxley C. Bacterial delivery of large intact genomic -DNA-containing BACs into mammalian cells, Bioeng Bugs, 査読あり 2012, 3:86 -92. <http://dx.doi.org/10.4161/bbug.18621>
- ⑥ Kaname T, A commentary on implication of gene copy number variation in health and diseases, J Hum Genet, 査読あり 2012, 57:79-80.
- ⑦ Yoneda Y, Naritomi K (15 人中 14 番目), Matsumoto N, Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features, J Hum Genet, 査読あり 2012, 57:207-211.
- ⑧ Yang X, Xu S: HUGO Pan -Asian SNP Consortium; Indian Genome Variation Consortium, Identification of close relatives in the HUGO Pan-Asian SNP database, PLoS One, 査読あり 2011, 6:e29502.
- ⑨ Hannibal MC, Naritomi K, Kaname T (36 人中 17, 18番目), Bamshad MJ Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome, Am J Med Genet, 査読あり 2011, 155A:1511 -1516. doi: 10.1002/ajmg.a.34074.
- ⑩ Hatin WI, Nur-Shafawati AR, Zahri MK, Xu S, Jin L, Tan SG, Rizman-Idid M, Zilfalil BA: HUGO Pan -Asian SNP Consortium, Population genetic structure of peninsular Malaysia Malay sub-ethnic groups, PLoS One, 査読あり 2011, 6:e18312.
- ⑪ Okada I, Kaname T (28 人中 21 番目), Saitsu H, MOC1 is essential for ocular and limb development in humans and mice, Am J Hum Genet, 査読あり 2011, 88:30-41.
- ⑫ 要 匡, DNA・遺伝子・染色体、日本医師会雑誌、査読なし、2010, 139:558-559.
- ⑬ Xu S, Kangwanpong D, Seielstad M, Srikumool M, Kampuansai J, Jin L; HUGO Pan-Asian SNP Consortium, Genetic evidence supports linguistic affinity of Mlabri--a hunter-gatherer group in Thailand, BMC Genet, 査読あり 2010, 11:18.
- ⑭ 當山真弓、當山潤、遠藤尚宏、竹谷徳雄、高良幸伸、要 匡、成富研二、NDS1 欠失の認められた Sotos 症候群 16 例の臨床的検討、日本小児科学会雑誌、査読あり、2010, 114:48-52.
- ⑮ Pierron S, Richelme C, Triolo V, Mas JC, Griffet J, Karmous-Benailly H, Quere M, Kaname T, Lambert JC, Giuliano F, Evolution of a patient with Bohring-Opitz syndrome, Am J Med Genet, 査読あり 2009, 149A:1754-1757.
- ⑯ Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T, Matsumoto N, Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split-foot malformation and hearing loss, Am J Med Genet, 査読あり 2009, 149A:1224-1230.
- ⑰ HUGO Pan-Asian SNP Consortium Mapping human genetic diversity in Asia, Science, 査読あり 2009, 326:1541-1455.
- ⑱ 要 匡、Opitz 症候群 (Opitz G/BBB 症候群)、小児科診療、査読なし、2009, 72suppl:69.
- ⑲ 要 匡、Holt-Oram 症候群、小児科診療、査読なし、2009, 72suppl:53.
- ⑳ 要 匡、holoprosencephaly sequence、小児科診療、査読なし、2009, 72suppl:52.
- 21 Kuniba H, Kaname T, Naritomi K (19 人中 11, 12 番目), Niikawa N, Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome, J Hum Genet, 査読あり 2009, 54:304-309.

[学会発表] (計 4 4 件)

- ① 要 匡、Exome 解析を活用したヒト遺伝性疾患の原因解析の実践 (invited)、ゲノムテクノロジー第 164 委員会 沖縄分科会、2012 年 1 月 25 日、那覇
- ② Kaname T, The practice of whole exome sequencing in two genetic diseases, X-linked recessive and autosomal dominant disorders (invited), 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13-16

- 日、横浜
- ③ 要 匡、他、Opitz C様症候群 (Bohring-Opitz症候群) におけるASXL1遺伝子変異、日本人類遺伝学会第56 回大会、2011年11月10-12日、千葉
- ④ Kaname T, et al., Detection of a mutation in Lenz microphthalmia family by exome sequencing. 61<sup>st</sup> the American Society of Human Genetics Annual meeting, 18-21 October 2011, Montreal, Canada.
- ⑤ 要 匡、他、Lenz小眼球症候群を呈する一家系の原因遺伝子解析、第18回出生前診断研究会、2011年10月1日、佐賀
- ⑥ 要 匡、他、免疫グロブリンスーパーファミリーCD96の細胞外マトリックスタンパク質との反応性の検討、第84回日本生化学会大会、2011年9月21-24日、京都
- ⑦ 要 匡、他、Opitz三角頭蓋症候群原因遺伝子CD96のPCR-HRM法による変異スキニングシステム、第51回日本先天異常学会学術集会、2011年7月22-24日、東京
- ⑧ 要 匡、医学研究とバイオインフォマティクス(invited)、バイオインフォマティクス・フォーラムin 沖縄2011、2011年6月26日、那覇
- ⑨ Kaname T, et al, Analysis of interaction between CD96 and extracellular matrix proteins, 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 18-21 May 2011, Okinawa
- ⑩ 要 匡、次世代シーケンサが拓く医療・医学の新時代(invited)、OKINAWA ライフサイエンスシンポジウムIII、2011年1月20日、那覇
- ⑪ 要 匡、他、Exome analysis in a patient with Kabuki make-up syndrome by whole exon capture and re-sequencing. BMB2010、2010年12月7-10日、神戸
- ⑫ 要 匡、他、微量検体からの迅速・安価な遺伝子変異スキニングシステムの構築、第17回出生前診断研究会、2010年11月20日、那覇
- ⑬ Kaname T, et al., The development of high-throughput gene scanning system for autism spectrum disorders by a PCR coupled high-resolution melting curve analysis. 60<sup>th</sup> the American Society of Human Genetics Annual meeting, 2-6 November 2011, Washington DC, USA.
- ⑭ 要 匡、他、歌舞伎メーキャップ症候群のエクソーム解析、日本人類遺伝学会第55回大会、2010年10月27-30日、大宮
- ⑮ 要 匡、他、PCR-高精度融解曲線分析法による自閉症関連遺伝子群の変異/多型スキニングシステムの構築、第50回に本先天異常学会学術集会、2010年7月8-10日、淡路(兵庫)
- ⑯ Kaname T, et al., Resequencing of the candidate region for 16q-ADCA and detection of an insertion polymorphism by fragment assembly data using massively parallel short-read sequencing. ESHG2010 (EUROPEAN Human Genetics Conference 2010), 12-15 June 2010, Gothenburg, Sweden.
- ⑰ Kaname T, et al., Exploring the responsible gene for a familial ALS by next-generation sequencer (invited), 第51回日本神経学会総会、2010年5月22日、東京
- ⑱ 要 匡、他、自閉症関連遺伝子NLGN3, NLGN4の高速多型スキニングシステムの構築と解析、第113 回日本小児科学会学術集会、2010年4月23-25日、盛岡
- ⑲ 要 匡、これから目線でゲノムを見に行こう-次世代シーケンサーが我々にもたらしたもの- (invited)、市民講座「ゲノム情報がもたらす医療の革新」、2010年2月28日、東京
- ⑳ 要 匡、ヒト遺伝性疾患の原因同定へ向けた全候補領域リシーケンス解析(invited)、第4回バイオインフォマティクス研究者と医学研究者の交流会、2009年11月20日、柏(千葉)
- 21 Kaname T, et al., Resequencing of the whole candidate region for 16q22-linked spinocerebellar ataxia in Japanese individuals using next-generation sequencing, 59<sup>th</sup> the American Society of Human Genetics Annual meeting, 22 October 2009, Hawaii, USA.
- 22 要 匡、他、次世代シーケンサによる日本人ゲノム16q-ADCA 原因候補領域の構造解析、日本人類遺伝学会第54回大会、2009年9月25日、東京
- 23 要 匡、他、次世代シーケンサを用いた原因全候補領域リシーケンス解析へのアプローチ、第16回日本遺伝子診療学会、2009年7月31日、札幌
- 24 要 匡、他、次世代シーケンサを用いた染色体16q22 領域の日本人ゲノム構造解析、第49回日本先天異常学会学術集会、2009年6月26日、鹿児島
- 25 成富研二、要 匡、ヒト疾患と遺伝子：臨床診断と責任遺伝子診断(invited)、第49回日本先天異常学会学術集会、2009年6月25日、鹿児島
- 26 Kaname T, et al., A PCR coupled high-resolution melting analysis for reliable gene scanning of the faciogenital dysplasia gene, FGD1. ESHG2009 (EUROPEAN Human Genetics Conference 2009), 24 May 2009, Vienna,

Austria

- 27 要 匡、他、PCR-高解像度融解曲線分析法による高速遺伝子変異スクリーニングシステムの構築、第 112 回日本小児科学会学術集会、2009 年 4 月 17-19 日、奈良

他 17 件

[図書] (計 6 件)

- ① Kaname T., Yanagi K., Maehara H. Osteosarcoma and midkine, 'Midkine: From embryogenesis to pathogenesis and medication'. Springer, 2012, in press
- ② Kaname T. Female carrier. 'Encyclopedia of Genetics 2<sup>nd</sup> edn'. Elsevier, 2012, in press
- ③ Kaname T. Inversion. 'Encyclopedia of Genetics 2<sup>nd</sup> edn'. Elsevier, 2012, in press
- ④ 成富研二、オピッツ症候群「症候群ハンドブック」 中山書店、2011、p674.
- ⑤ 要 匡、オピッツC症候群「症候群ハンドブック」 中山書店、2011、p666.
- ⑥ 要 匡、ゆるやかなゲノムのはなし「知の津梁 やわらかい南の学徒思想 3」 沖縄タイムス出版、2010、pp340-351.

[その他]

ホームページ等

<http://web.me.com/knaritomi/> 琉球大学遺伝医学/Home.html

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

要 匡 (KANAME TADASHI)

琉球大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40264288

### (2) 研究分担者

成富 研二 (NARITOMI KENJI)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20101446

柳 久美子 (YANAGI KUMIKO)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90294701

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：