

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791155

研究課題名（和文）共通のゲノム異常に起因する新規症候群の定義と病態解析

研究課題名（英文）Establishment of a novel syndrome caused by common genomic aberration and investigation of the etiology

研究代表者

林 深 (HAYASHI SHIN)

東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンター・特任講師

研究者番号：50596244

研究成果の概要（和文）：

報告者らはこれまでに臨床的に診断がつかず染色体核型正常である多発奇形を伴う発達遅滞症例を収集し、アレイ CGH をはじめとする種々のゲノム解析技法を用いて原因探索を行ってきた。本研究ではこれらのスクリーニングで見いだされた新規症候群であることが疑われる類似した臨床症状を呈する 5 症例を対象に、疾患原因遺伝子探索を施行した。

研究成果の概要（英文）：

We have recruited undiagnosed cases with multiple congenital anomalies and mental retardation of unknown etiology and screened their genomic aberration by array CGH and other analyzing techniques. In this study we selected five cases of a possibly novel syndrome with resembling phenotypes to investigate a causative gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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・先天異常学 新規症候群

## 1. 研究開始当初の背景

精神発達遅滞は知能指数 (IQ)70 未満で定義され、全人口の 2-3% に存在すると報告されているが、その約 60% は原因不明であり、診断、病態理解、加療・療育方針決定などに大きな支障を来している。疾患単位として確立された先天異常症候群は表現型 (phenotype) からの臨床診断が可能であるが、遺伝形質 (genotype) を診断する技法は、従来染色体核型分析などに限られてきたのが実情であった。

しかし、1998 年に開発されたアレイ CGH は高感度かつ高精度にゲノムコピー数異常 (copy number variant; CNV) の検出が可能であり、染色体分析を補完・代替する技術として先天異常疾患の解析に広く応用されつ

つある。

我々はアレイ CGH を先天異常疾患の診断・原因探索のツールとして確立することを目的とし、全国 23 の医療機関とコンソーシアムを形成して、臨床的に診断がつかず染色体核型正常である多発奇形を伴う発達遅滞症例を収集し、BAC アレイ・SNP アレイなどを用いた多段階スクリーニングを行ってきた。その結果として、全体の約 20% に疾患原因となるゲノム構造変化を見いだすとともに、CASK, BMP4 と呼ぶ疾患原因遺伝子、10p11.23 欠失による新規症候群候補の報告などを行ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、前項に述べたようなこれまで

の経験・成果を基盤として、上記スクリーニングを通じて収集・解析された症例の中から新規症候群の疑われる症例を選択し、疾患原因を探求し、新規症候群を確立することを目標とした。

本研究の具体的な対象となる例を提示する。重度精神遅滞、長く細い顔、歯肉肥大、歯叢生、細長い四肢・指趾といったきわめて類似した phenotype を共有する 5 症例である。このうち 2 症例はアレイ CGH 解析によって 3 番染色体短腕 (3p) の約 1Mb の領域にヘテロ欠失を検出し、3 症例は欠失を認めなかった。欠失を有する症例と有しない症例が共通の機序によって成立しているならば、本領域に含まれた 1 つまたは複数の遺伝子のハプロ不全が 5 症例に共通する phenotype に関与している可能性が高い。

我々

はこの疾患原因遺伝子を特定し、genotype-phenotype の連関と病態成立の機序を明らかにし、診断・治療・療育に寄与する成果を上げることを目的とした。

具体的には、本研究期間内に、以下の点を明らかにすることを目標とした。

#### (1) 疾患原因遺伝子の探索

3p の約 1Mb の領域をターゲットとして、疾患原因となる候補遺伝子の探索を行う。

#### (2) 疾患原因遺伝子候補の機能解析

モデル動物を用いて、発達の部位や時期の解析、ノックアウト動物の表現型などを解析し、特に生体の発生においていかなる機能を有するかを明らかにする。

#### (3) 新規症例の収集と genotype/phenotype 情報の集積

Phenotype の類似、または 3p 領域のゲノム異常を指標としてさらに症例を収集して解析の対象とするとともに、臨床的知見を集積し、本疾患の臨床的側面を明らかにする。

### 3. 研究の方法

前項で述べた目標達成のため、本研究では下記のような研究方法を策定した。

#### (1) 疾患原因遺伝子の探索

対象となる 5 例中 2 例に約 1Mb のヘテロ欠失が見出された 3p 領域をターゲットとし、きわめて類似した phenotype を有しているが 3p 欠失が見られなかった 5 例中 3 症例を対象として、疾患原因となるゲノム構造変化を解析してゆく。

① **原因候補遺伝子の変異解析**: サンガーシーケンシングまたは次世代シーケンサーを用いて、本候補領域に含まれる約 30 個の protein-coding gene の全エクソンに対して変異解析を行い、転写・翻訳

レベルに異常を及ぼす変異を検索する。

② **SNP アレイを用いた解析**: 全ゲノムをカバーする SNP アレイによる解析を行い、ターゲット領域に生じるゲノムの微細な CNV、または片親性ダイソミーの検出を試みる。また、ターゲット領域外に生じた CNV が表現型を修飾する可能性を考え ('double-hit model', Girirajan et al., 2010)、ターゲット領域外に生じたゲノムコピー数変化やダイソミーなどのゲノム構造変化についても表現型への影響を考慮する。

③ **転写産物の解析**: ゲノム DNA に異常が見られない場合、転写レベルで異常が生じている可能性を考え、リンパ球より樹立したセルラインを用いて mRNA の変異解析を行う。リンパ球における発現の低い遺伝子に対しては 5-aza-2-deoxycytidine 添加などによる強制発現を行い、転写産物を得る。

#### (2) 疾患原因遺伝子候補の機能解析

前項において見出された、あるいは絞り込まれた疾患原因遺伝子候補をターゲットとして、その機能と原疾患における多様な表現型との関連を明らかにする。

具体的には、マウス胎児などを用いた発生段階における各臓器や組織の発現解析、モデル細胞株における過剰発現/発現抑制系の作成と機能解析、ゼブラフィッシュ等を用いた遺伝子発現抑制モデルによる当該遺伝子が発生段階の表現型に及ぼす影響評価などを検討する。

#### (3) 新規症例の収集と genotype/phenotype の情報集積

主に臨床的側面から、対象としている疾患群の新規候補症例を収集し、研究リソースの拡充を図る。

① **新規候補症例の収集**: 当疾患群の重度精神遅滞・長く細い顔・歯肉肥大・歯叢生・細長い指趾といった比較的明瞭な臨床的特徴を手がかりとして、共同研究を行ってきた臨床期間に広く類似症例の提供を呼びかける。

② **新規症例の収集**: 潜在的な未診断症例の収集が一定数存在している可能性を考え、原因不明の精神遅滞症例の収集・解析を併せて継続する。

### 4. 研究成果

#### (1) 疾患原因遺伝子の探索

原因遺伝子探索のため、平成 23 年度第 2 回文部科学省科学研究費新学術領域研究 (研究領域提案型)『生命科学系 3 分野支援活動』『ゲノム支援』支援課題に申請して採択された。本支援のもと、3p 欠失

が見られなかった3症例のうち2症例を対象に、3pの約1Mbの領域のみならず全ゲノムを対象とした全ゲノム再シーケンシングの施行を申請した。倫理的な条件の整備に時間を要したが、現在次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンシングを施行中である。本結果を受け、2症例に共通するゲノム変異の中から遺伝子の転写・翻訳レベルに異常を及ぼす変異を抽出し、疾患原因候補とする予定である。

また、付加的なゲノム構造変化の探索を目的として、対象の全5症例に対してSNPアレイによる再解析を行い、臨床症状を負荷する可能性のあるゲノムコピー数変化や片親性ダイソミーを探索した。この結果は次世代シーケンサーによる候補遺伝子検索結果と併せ、病態を評価する基盤とする予定である。

## (2) 疾患原因遺伝子候補の機能解析

本項は、前項の結果を受けて候補遺伝子に対して施行する予定である。

## (3) 新規症例の収集と genotype/phenotype の情報集積

なお、潜在的な未診断症例が一定数存在している可能性を考えて原因不明の精神遅滞症例の収集・解析を継続し、BACアレイ・オリゴアレイ・SNPアレイなどを用いた解析・再解析を行っている。平成24年には76例のゲノムアレイ解析を施行した。

報告書作成時までには累積で646症例を解析し、145例(22.4%)に疾患原因となるゲノム構造変化を見いだした成果を挙げている。

## 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6件)

1. Takanashi J, Okamoto N, Yamamoto Y, Hayashi S, Arai H, Takahashi Y, Maruyama K, Mizuno S, Shimakawa S, Ono H, Oyanagi R, Kubo S, Barkovich AJ, Inazawa J.: Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations. *Am J Med Genet A*. 158A:3112-8, 2012.  
DOI: 10.1002/ajmg.a.35640.
2. Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I,

Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J.: The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup(X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. *Am J Med Genet A*. 158A:1292-303, 2012.

DOI: 02/ajmg.a.35321.

3. Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J.: Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes with marked midfacial hypoplasia. *J Hum Genet*. 57:191-6, 2012.  
DOI: 10.1038/jhg.2011.154.
4. Honda S, Satomura S, Hayashi S, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J, Japanese Mental Retardation Consortium.: Concomitant microduplications of MECP2 and ATRX in male patients with severe mental retardation. *J Hum Genet*. 57:73-7, 2012.  
DOI: 10.1038/jhg.2011.131.
5. Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takanashi J, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J.: Novel intragenic duplications and mutations of CASK in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH). *Hum Genet*. 131:99-110, 2012.  
DOI: 10.1007/s00439-011-1047-0.
6. Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H,

Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J.: Clinical application of Array-based Comparative Genomic Hybridization by Two-stage Screening for 536 Patients with Mental Retardation and Multiple Congenital Anomalies. *J Hum Genet.* 56:110-24, 2011.  
DOI: 10.1038/jhg.2010.129.

[学会発表] (計 5 件)

1. Hayashi S, Naganawa M, Uehara DT, Inazawa J. Investigation of the Parental Origin and Genomic Mechanisms Involved in de novo Pathogenic CNVs in Congenital Disorders. *The American Society of Human Genetics 62<sup>nd</sup> annual meeting*, San Francisco, Nov 7-10, 2012. (poster)
2. 林深, Daniela Tiaki Uehara, 長縄光代, 稲澤譲治. 高解像度アレイを用いた pathogenic CNV を付加的に修飾する微細 CNV の探索. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 (東京), 2012 年 10 月 27 日.
3. 林深, 本田尚三, 里村茂子, 井本逸勢, 中川栄二, 後藤雄一, 稲澤譲治. 重度精神遅滞を呈する男児例に同時に見られた MECP2, ATRX の重複. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 (東京), 2012 年 10 月 26 日.(ポスター)
4. 林深, Daniela Chiaki Uehara, 長縄光代, 井本逸勢, 蒔田芳男, 羽田明, 稲澤譲治. オリゴアレイ・SNP アレイを用いた先天異常疾患症例におけるゲノム異常評価とアレイポテンシャルの比較. 日本人類遺伝学会第 56 回大会 (千葉), 2011 年 11 月 10 日.
5. Hayashi S, Imoto I, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Pathogenic CNVs and causative genes detected by two-stage screening in 647 patients with mental retardation and

multiple congenital anomalies of unknown etiology. *12<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics / The American Society of Human Genetics 61<sup>st</sup> annual meeting*, Montreal, Oct 12-14, 2011. (poster)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等  
日本人健常者の親子のトリオ 100 組をアレイ解析したデータを基に、日本人健常者集団におけるゲノム多様性である CNV や LOH の出現頻度を収載する”MCG CNV Database”を構築して公開した。  
<http://www.cghtmd.jp/CNVDatabase>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
林 深 (Hayashi Shin)

研究者番号 : 5 0 5 9 6 2 4 4

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :

