

長崎大学大学院
医歯薬学総合研究科
教授

新川 詔夫

「染色体転座・微細欠失からの
疾病遺伝子の単離と解析」

研究期間：平成１２年１１月～平成１７年１０月

1. 研究実施の概要

(1) 研究の背景と目的

ヒトゲノム計画が終了し、2万数千個の構造遺伝子の存在が明らかになった現在でも、単離・同定された疾患遺伝子は3千～5千種 [最新Online Mendelian in Man (OMIM)では1650種]に過ぎず、疾患座の局在から遺伝子を同定・単離するポジショナルクローニングの重要性は変わらない。

研究代表者、新川詔夫は長く先天異常症、とりわけ先天奇形症候群の臨床・基礎研究に携わってきた。1998年には、約200種の疾患について図示すると共に、その臨床像・原因遺伝子・発症機構などを解説し、臨床診断に有用な先天奇形症候群のアトラスを刊行してきた（2005年に第4刷）[1]。本書の発刊当時は、ほとんどの先天奇形症候群の原因は不明であった。ゲノム医学的手法の発展で、先天異常症の原因遺伝子がしだいに明らかになってきたが依然として不明な疾患は多く、その解明が望まれている。

先天性形態異常の多くは器官形成異常が原因である。形態異常は正常発生の裏返しなので、先天奇形症候群の原因遺伝子とその機能を明らかにする研究は、ヒトの発生機構を明らかにする1つの戦略である。また、形態異常に関わる遺伝子はときに腫瘍発生にも関与する。好例は、Hirschsprung病の原因遺伝子*RET*やCostello症候群の原因遺伝子*HRAS*であり、それらはがん遺伝子でもある。したがって、先天異常症の原因となる新規遺伝子の単離・同定や既知遺伝子の新しい機能の発見は、疾患の確定診断などの医療上の直接貢献だけでなく、遺伝子機能を利用した発生物学的発見にも寄与し、ひいては薬剤などの開発につながる可能性がある。

先天異常症はその重症さから多くは孤発例であり、疾患座のゲノム上の局在は、家系例における連鎖解析など、通常の遺伝学的手法では困難である。しかし、稀に染色体転座を伴う症例が存在し、その切断点が疾患座であることがある。したがって、この切断点を解析し、クローニングすることによって疾患遺伝子を単離する戦略が近道の1つである。本研究の目的は、このような希少な症例を国内外から組織的に集積し、転座切断点から多くの疾病遺伝子の単離・同定を目指したものである。

(2) 研究成果

過去5年の本研究チームの成果は、後述のようにゲノム医学・遺伝医学の一流国際誌上で発表し、5件の特許（国内出願3件、国際出願2件）を申請し、欧米の類似研究拠点に比べて遜色はなく、疾病の性質上、独自性および科学に対する貢献度は高いと考える。日本では本研究チーム以外には本戦略による大規模研究はない。

本研究チームは「臨床細胞遺伝学研究グループ」と「分子遺伝学研究グループ」の2つのチームで構成され（図1）、前者は希少試料の集積と細胞遺伝学解析を、後者は転座切断点クローニングによる遺伝子単離と機能解析を担当した。

本研究期間の1～2年目には、Sotos症候群（脳性巨人症）[2-4]と鏡像多指趾症[14]の原因遺伝子の単離、および肢中部異形成症[15]の原因遺伝子の同定、3～4

年目には、Sotos 症候群の分子病理 [5-13] や 2 型糖尿病 [16]、内蔵逆位 [17]、Marfan 症候群 2 型 [18]などの原因・候補遺伝子を単離・同定・解析し、いくつかの疾患においては、発症機構を明らかにした。最終年度にはヒト耳垢型（乳がん関連）遺伝子の単離と機能解析を行った[19]。また、思春期早発症、無鼻症、無嗅覚症、先天性視力障害症、合指症、裂手・裂足症、Opitz-C 症候群の位置的遺伝子単離は現在進行中である。

一方、ゲノムの微細欠失や重複をもつ先天異常症候群が知られ、ゲノム病と総称される。このような遺伝子コピー数の異常を網羅的に検出するシステムであるゲノム CGH マイクロアレイ（CGH-MA）法の開発を行い、それを用いた臨床応用を開始し、新規の先天異常症を発見した[20]。4300 個の BAC クローンによる全ゲノム CGH アレイは平成 17 年度末までに完成する予定である。

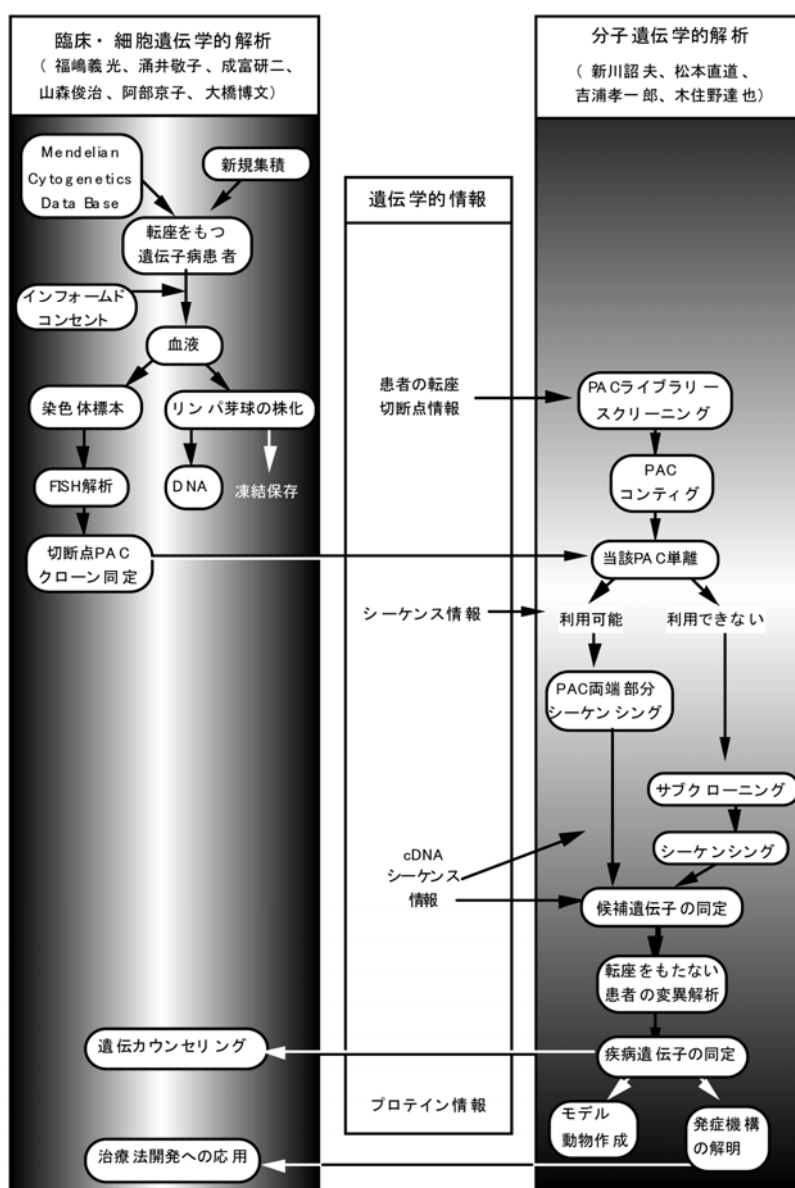


図 1 研究開始当初の本チームの構成図と役割

参考文献

1. 梶井正、黒木良和、新川詔夫、福嶋義光：先天異常症候群アトラス．南江堂，東京，1998，2005.
2. Kurotaki N, Harada N, Yoshiura K, Sugano S, Niikawa N, Matsumoto N: Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. *Gene* 279: 197-204, 2001.
3. Imaizumi K, Kimura J, Matsuo M, Kurosawa K, Masuno M, Niikawa N, Kuroki Y: Sotos syndrome associated with a de novo balanced reciprocal translocation t(5;8)(q35;q24.1). *Am J Med Genet* 107: 58-60, 2002.
4. Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita H-A, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N: Haploinsufficiency of the NSD1 gene causes Sotos syndrome. *Nat Genet* 30 (April): 365-366, 2002.
5. Miyake N, Sugawara H, Kurotaki N, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Tsukahara M, Ishikiriya S, Sonoda T, Miyoshi Y, Sakatsume S, Fukushima Y, Ohashi H, Nagai T, Kawame H, Kurosawa K, Touyama M, Shiihara T, Okamoto N, Nishimoto J, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: Preferential paternal origin of microdeletion as prezygotic chromosome and/or chromatid rearrangements in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* 72 (5): 1331-1337, 2003.
6. Nagai T, Matsumoto N, Kurotaki N, Harada N, Niikawa N, Ogata T, Imaizumi K, Kurosawa K, Kondoh T, Ohashi H, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Yokoyama T, Uetake K, Sakazume S, Fukushima Y, Naritomi K: Sotos syndrome and haploinsufficiency of NSD1: Clinical features of intragenic mutations and submicroscopic deletions. *J Med Genet* 40 (4): 285-289, 2003.
7. Höglund P, Kurotaki N, Kytölä S, Miyake N, Somer M, Matsumoto M: Familial Sotos syndrome is caused by a novel 1 base pair deletion of the NSD1 gene. *J Med Genet* 40 (1): 51-54, 2003.
8. Kurotaki N, Harada N, Shimokawa O, Miyake N, Kawame H, Uetake K, Makita Y, Kondoh T, Ogata T, Hasegawa T, Nagai T, Ozaki T, Touyama M, Shenhav R, Ohashi H, Medne L, Shiihara T, Ohtsu S, Kato Z, Okamoto N, Nishimoto J, Lev D, Miyoshi Y, Ishikiriya S, Sonoda T, Sakazume S, Fukushima Y, Kurosawa K, Cheng J-F, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: Fifty microdeletions among 112 cases of Sotos syndrome: Low copy repeats possibly mediate the common deletion. *Hum Mut* 22(5):378-387, 2003.
9. Visser R, Matsumoto N: The genetics of Sotos syndrome. *Curr Opin Pediatr* 15 (6): 598-606, 2003.
10. Niikawa N: Molecular basis of Sotos syndrome. *Horm Res 62 (Suppl, Proceedings of the 15th Novo Nordisk Symposium on Growth Hormone and Endocrinology: Advances in Dysmorphology, Malta, April 2-3, 2004): 60-65, 2004.*
11. Visser R, Shimokawa O, Harada N, Kinoshita A, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: Identification of a 3.0-kb major recombination hotspot in patients with Sotos syndrome who carry a common 1.9-Mb microdeletion. *Am J Hum Genet* 76 (1): 52-67, 2005.
12. Kurotaki N, Stankiewicz P, Wakui K, Niikawa N, Lupski JR: Sotos syndrome common deletion is mediated by directly oriented subunits within inverted Sos-REP low-copy repeats. *Hum Mol Genet* 14 (4): 535-542, 2005.
13. Visser R, Shimokawa O, Harada N, Niikawa N, Matsumoto N: Non-hotspot-related breakpoints of common deletions in Sotos syndrome are located within destabilized DNA regions. *J Med Genet (in press)*
14. Kondo S, Sugawara H, Harada N, Matsumoto N, Ohashi H, Sato M, Kantaputra PN, Komatsu K, Tomita H, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Yoshiura K: A novel gene is disrupted at a 14q13 breakpoint of t(2;14) in a patient with mirror-image polydactyly of hands and feet. *J Hum Genet* 47: 136-139, 2002
15. Sugawara H, Egashira M, Harada N, Jakobs TC, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: Breakpoint analysis of a familial balanced translocation t(2;8)(q31;p21) associated with mesomelic dysplasia. *J Med Genet* 39(7): e34, 2002
16. Kamimura J, Wakui K, Watanabe Y, Miyake K, Harada N, Kinoshita A, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Ishikawa M, Kasuga M, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N: The IHPK1 gene is disrupted at the 3p21.31 breakpoint of t(3;9) in a family with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Genet* 49(7): 360-365, 2004.
17. Peeters H, Debeer Ph, Wilquet V, Huysmans C, Parthoens E, Fryns JP, Gewillig M, Nakamura Y,

Niikawa N, Van de Ven W, Devriendt K: *PA26* is a candidate gene for heterotaxia in humans: Identification of a novel, *PA26*-related gene family in human and mouse. *Hum Genet* 112 (5-6): 573-580, 2003.

18. Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Abifadel M, Akiyama T, Harada N, Morisaki T, Allard D, Varret M, Claustres M, Morisaki H, Ihara M, Kinoshita A, Yoshiura K, Junien C, Kajii T, Jondeau G, Ohta T, Kishino T, Fukukawa Y, Nakamura Y, Niikawa N, Boileau C, Matsumoto N: Heterozygous *TGFBR2* mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet* 36 (8): 855-860, 2004.
19. Yoshiura K, Kinoshita A, Ishida T, Ninokata A, Ishikawa T, Kaname T, Bannai M, Tokunaga K, Sonoda S, Komak R, Ihara M, Saenko VA, Alipov GK, Sekine I, Komatsu K, Takahashi H, Nakashima M, Sosonkina N, Mapendano CK, Ghadami M, Nomura M, Liang D-S, Miwa N, Kim D-K, Garidkhuu A, Natsume N, Ohta T, Tomita H, Kikuchi M, Russomando G, Hirayama K, Ishibashi M, Takahashi A, Saitou N, Murray JC, Saito S, Nakamura Y, Niikawa N: A single-nucleotide polymorphism in the *ABCC11* gene is the determinant of human earwax type. *Nat Genet* (in press).
20. Harada N, Hatchwell E, Okamoto N, Tsukahara M, Kurosawa K, Kawame H, Kondoh T, Ohashi H, Tsukino R, Kondoh Y, Shimokawa O, Ida T, Nagai T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N. Subtelomere-specific microarray-based comparative genomic hybridization: A rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 41 (2): 130-136, 2004.

2. 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

単因子疾患と染色体異常における疾患発症機構は本質的に異なる。前者は単一遺伝子変異によって起こるが、後者の多くは遺伝子群の包括的な重複・欠失が原因である。しかし非常に稀だが単因子病と均衡型染色体転座を合併する症例がある。もし転座によって疾患の原因となる遺伝子に断裂が起きれば単因子疾患を発症することになり、これらの症例は疾病遺伝子の同定や単離の絶好の出発点となるであろう。一方、ヒトゲノム情報が容易に入手できる現在、ゲノム医学的手法を利用した切断点クローニングによって疾病遺伝子が割合短時間で単離できる。本研究の戦略は、このような症例を「臨床細胞遺伝学研究グループ」が国内外から組織的に集積し、「分子遺伝学研究グループ」は転座切断点から多くの疾病遺伝子の単離・同定を行い、機能解析を通して疾患解明を目指したものである。

均衡型染色体構造異常は、疾患遺伝子単離・同定に関して以下のような利点がある。

- (1) 我が国において患者の集積・発見が多い
- (2) 遺伝子の局在決定が先験的(a priori)であり容易である
- (3) 転座切断点に疾病遺伝子または疾病に関わる調節遺伝子が局在する可能性が高い
- (4) ポジショナルクローニングの出発点とする試料は唯一人の患者でよい

一方、欠点は、(1) 同一切断点をもつ複数の患者が知られているか、あるいは同一領域に疾患座がマップされているという事前情報が必要なこと、(2) このような患者は稀なため網羅的な戦略立案は困難なことである。

研究実施の概要で述べたように、本研究チームは「臨床細胞遺伝学研究グループ」と「分子遺伝学研究グループ」の有機的に結合したコンソーシアムを構成し、前者は均衡型染色体構造異常と先天異常症をあわせもつ希少例の臨床診断の確定、症例からの試料の集積および細胞遺伝学解析を担当し、その情報・試料を後者に転送する。後者は、試料を分子遺伝学的・ゲノム医学的に解析し、転座切断点クローニングによる

遺伝子単離を行い、次いで機能解析を行う。候補遺伝子が疾患遺伝子であることを確定するため、その情報を臨床細胞遺伝学研究グループにフィードバックし、臨床細胞遺伝学研究グループはさらに染色体異常のない通常の当該疾患の症例・試料をさらに集積し、分子遺伝学研究グループが変異解析を行なった。この戦略は功を奏し、上述のまとめのように、5年間に希少例から多くの疾患遺伝子が単離・同定された。本戦略による研究は、本研究期間を通して継続的に行われた。

一方、先天異常症におけるゲノム欠失・重複の重要性を認識し、本研究の2年目からは、ゲノム欠失・重複を効率良く網羅的に同定できるゲノムマイクロアレイCGH法の開発を開始し、3年目以降には一部（サブテロメアマイクロアレイおよび2.2Kアレイ）が完成し、本技術の臨床応用を図り、その結果、新規の先天異常症を発見した。4Kアレイの構築は現在も続行中である。

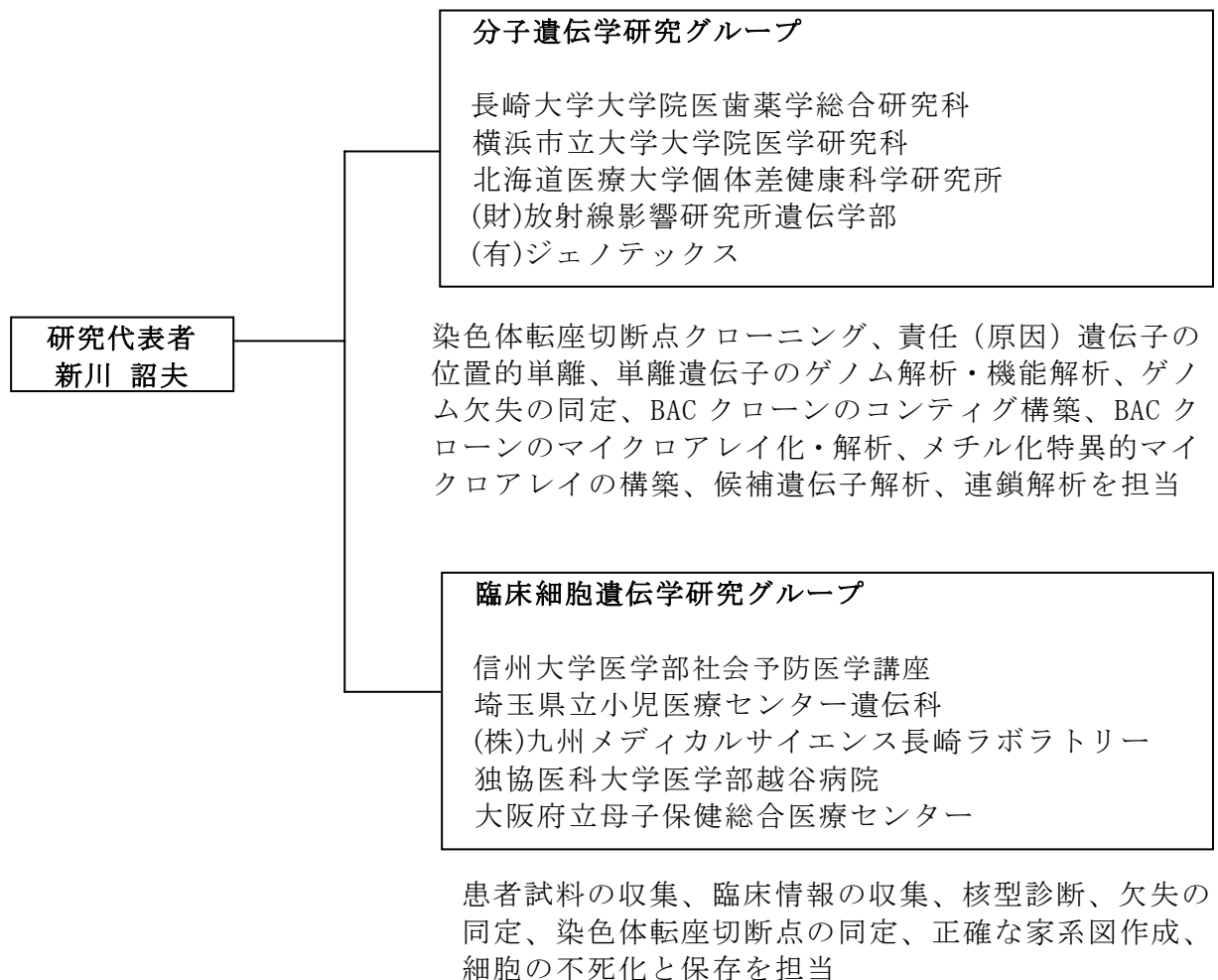
また、4年目からは、疾患座局在の特定が可能な疾患家系が臨床細胞遺伝学研究グループからもたらされたので、伝統的な遺伝学的解析手法である連鎖解析法による家系解析も戦略の1つに加え、遺伝子病や遺伝形質家系を積極的に集積し、いくつかは、原因遺伝子を新規に同定した。

さらに、同定された疾患関連遺伝子の解析を通して、従来未知の機能や他の疾患との関連も明らかになってきた。例えば、「耳垢型」遺伝子は、アポクリン腺における細胞内→外への物質輸送（分泌）に関する*ABCC11*遺伝子の機能的多型によることが判明したが、この遺伝子は乳癌に関連する可能性、加えて多薬剤（主として抗がん剤）耐性遺伝子でもあることから、乾型耳垢型（分泌欠損）多型との関連が示唆され、今後の発展と医療への応用が期待される。

従来、海外では本研究と同様の戦略で単離された疾病遺伝子は多いが、日本ではこの種の業績はほとんどなかった。しかし、国民皆保険制度が確立し、小児科や産婦人科では先天異常症に対する染色体検査が日常的になっている我が国では、諸外国に比較して多くの患者集積がある。したがって、疾病遺伝子の同定・単離競争において、日本がリードできる1つの戦略として、本研究を組織的・大規模に推進しようとしたものである。

本研究で主として扱う疾患である先天性形態異常の原因遺伝子は、ヒトの初期発生に関わるものである。したがって、新規遺伝子や既知遺伝子の新しい機能の発見は、確定診断などの医療上の直接貢献だけでなく、遺伝子機能を利用した細胞生物学的発見にも寄与し、引いては薬剤など新製品の開発につながる可能性がある。得られた成果によって生物学の発展にも寄与すると考える。

(2)実施体制



3. 研究実施内容及び成果

本研究は「臨床細胞遺伝学研究グループ」と「分子遺伝学研究グループ」の2つのグループの共同作業により行われた。前者は試料の集積と細胞遺伝学解析を、後者は転座切断点クローニングによる遺伝子単離と解析を担当した。その結果、8種の未知の先天異常症の原因遺伝子を単離・同定し、いくつかの疾患においては発症機構を明らかにした。以下、各々の疾患について両グループの研究内容と成果をまとめて記す。

3.1 染色体転座からの疾病遺伝子単離と解析

(1) Sotos 症候群（脳性巨人症）の原因遺伝子 *NSD1* の位置的単離と発症分子病理

Sotos 症候群（MIM #117550）は脳性巨人症とも呼ばれる常染色体優性遺伝性の先天性神経疾患である。特異顔貌（大頭、突出した前額、眼瞼裂斜下、尖った頤など）、幼少期から小児期にかけての過成長、骨年齢の促進、行動異常を伴う精神遅滞、中枢神

経系異常（脳奇形、けいれん、脳波異常など）、心奇形、尿路・外性器異常、腫瘍好発などを特徴とするが（図 2）、原因は未知であり、診断は臨床症状からのみ可能であった。過成長症候群の中では最も頻度が高いものの一つで、概略 1 万～2 万人の新生児に 1 人であると推定される。文献上 300 例以上の報告があり、大多数は孤発例であるが 17 例の家族例も知られている。

原因遺伝子単離の糸口は偶然に合併した均衡型転座から得られた。臨床細胞遺伝学グループによって、染色体転座 $t(5;8)(q35;q24.1)$ をもつ Sotos 症候群の孤発例が発見され（図 2）[1]、患者試料が収集された。一方、過去米国から 5q35 切断点をもつ症例が報告されていたので、共通の 5q35 領域にソトス症候群の責任遺伝子が局在し、転座による遺伝子断裂によって発症したとの作業仮説を立て、上記の症例からポジショナルクローニングによる遺伝子単離を開始した。



図 2 Sotos 症候群患者（成富研二博士提供）と報告されていた核型異常

分子遺伝学グループでは、始めに 5q35 切断点近傍の既知遺伝子 *FGFR4* と *JAZ* を候補とした変異解析を行ったが両者には変異は同定されなかった。次いで、末端シーケンシングを繰り返すことで PAC コンティグを構築し、5q35 切断点付近の物理的地図を作成した（図 3）。蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）法により、患者の転座点をカバーする PAC (R1-118m12) およびそのコスミドサブクローン c6B を同定した（図 4）。これは、c6B の FISH シグナルが患者の派生 5 番染色体、派生 8 番染色体双方の切断点、および正常 5 番染色体長腕 q35 領域にみられたためである（図 3）。c6B の塩基配列を決定し、その BLAST サーチで、マウス *Nsd1* 遺伝子のヒトホモログ部分配列 (AC027314) を同定した。全長鎖 cDNA（菅野純夫博士から供与）および cDNA ライブラリーを利用して、ヒト *NSDI* 遺伝子を単離し、その完全長 cDNA の単離、次いでゲノム構造を決定した [2]。*NSDI* は 8,088 塩基の ORF、23 エキソンから成り、ヒト胎児脳や筋肉などで発現する新規遺伝子であった（図 5）。詳細な FISH 解析および *NSDI* の塩基配列決定により、患者の 5q35 切断点は *NSDI* 内に位置することが判明した。

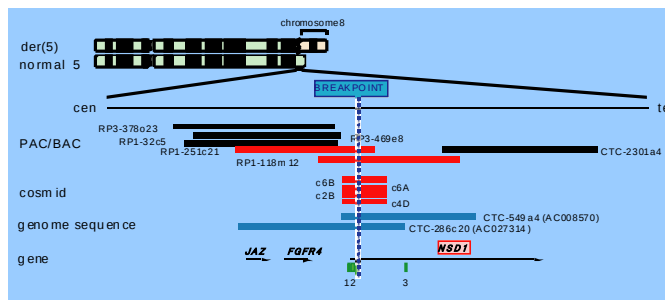


図3 転座切断点 5q35 領域の物理地図と *NSD1*

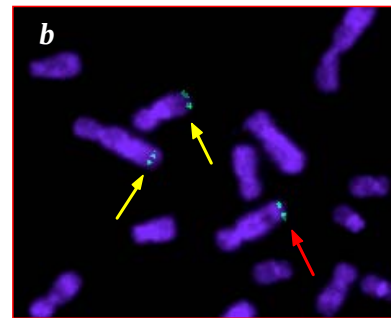


図4 コスミド c6B による FISH 解析。派生 5 番・8 番染色体上の FISH シグナル（黄色矢印）と正常 5 番染色体上のシグナル（赤矢印）

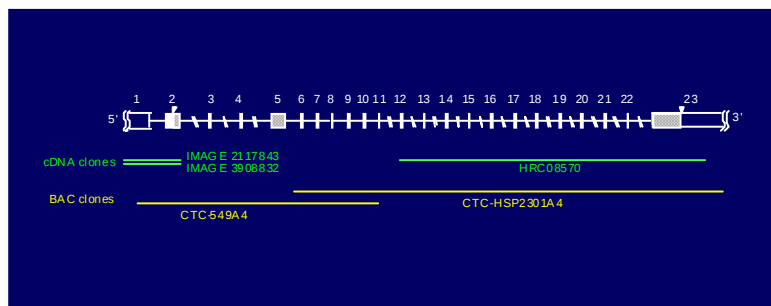


図5 *NSD1* の構造（下段は cDNA クローンと BAC クローン）

次いで、臨床細胞遺伝学研究グループが別途集積した染色体異常を認めない38名のSotos症候群患者中4例（11%）に*NSD1*点変異を同定した。一方、多型解析で多くの患者は、数Mbにおよぶ領域が一見ホモ接合SNPパターンを示し、Hardy-Weinberg平衡との矛盾がみられたので、大きなゲノム欠失を疑いFISH解析を行った。その結果、染色体が利用できた30名中19名に、*NSD1*を含む1.9-Mbにおよぶ欠失、1名にやや小さい欠失を認めた。つまり30名中20名（67%）の患者は2.2Mb欠失をもつことが判明した。欠失の頻度に点変異を合わせると、集積した日本人患者シリーズの77%は*NSD1*を含む欠失か、あるいは*NSD1*の点変異をもつことがわかった。さらに、これらの変異はヘミ接合性欠失、あるいは蛋白翻訳の途中停止をもたらすヘテロ接合性の点変異であったので、*NSD1*のハプロ不全がSotos症候群の原因であると結論した。これらの結果はNature Genetics（2002）[3]に掲載された。

より大規模な患者集団において解析するため、臨床細胞遺伝学研究グループの協力のもと国内外から新たに70例の孤発例を集積し、総計112例について*NSD1*変異検索を行った。その結果、10例に蛋白切断型*NSD1*変異、および5例にアミノ酸置換を伴う

1塩基置換を同定した(図6)。さらに点変異がなく染色体標本の入手できた46例に *NSD1* 全長を含む領域約 1.9-Mb の欠失を、4例にやや小さい欠失を認めた(図7, 9)。変異の内訳は、95例の日本人患者中11例(12%)は点変異、49例(52%)は欠失をもつものに対して、17例の白人患者では4例(24%)が点変異、1名(6%)のみが欠失であった(図8)。全体では58%の患者は *NSD1* 遺伝子のヘミ接合性欠失ないしヘテロ接合性点変異のいずれかを有していたことから、SSの主たる原因が *NSD1* 遺伝子のハプロ不全であることを確認した。

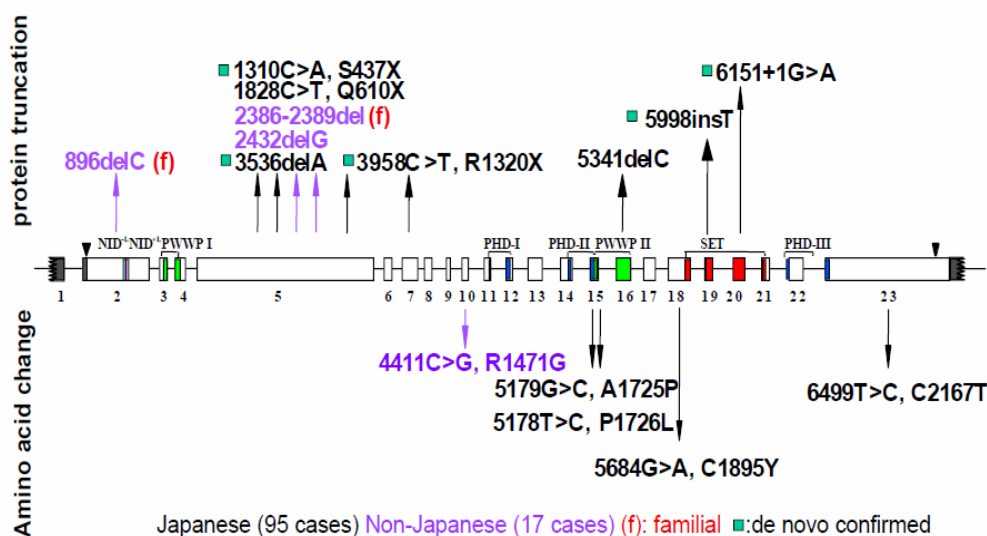


図6 112例のSotos症候群患者にみられた *NSD1* 変異
(上段は欠失および蛋白切断型変異、下段はミスセンス変異)

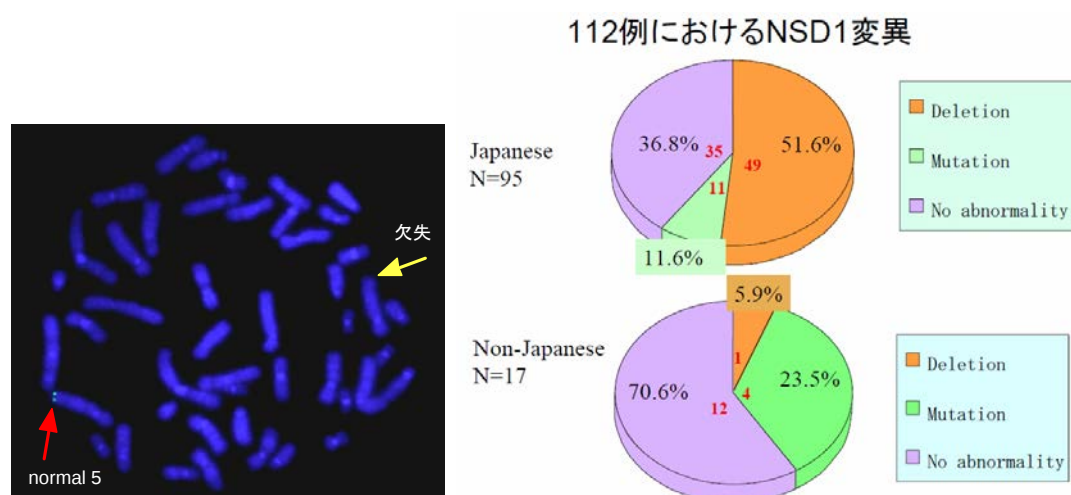


図7 FISHによる欠失の同定

図8 日本人と非日本人患者における *NSD1* 変異の頻度

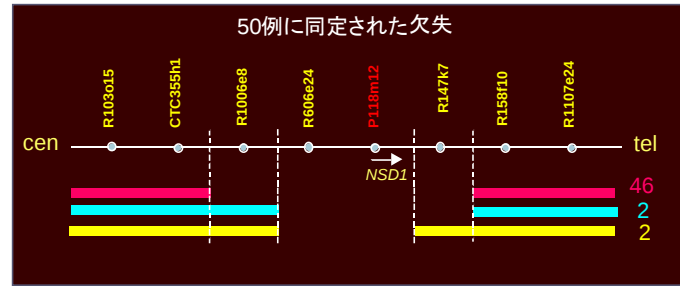


図 9 50 例の Sotos 症候群患者にみられた欠失の範囲

次に、*NSD1* と周辺の SNP ハプロタイプを利用して欠失の起源を調べた。患者と両親の DNA が利用できた 26 家系を解析し、ハプロタイプ情報の得られた 18/20 家系の欠失は父配偶子形成過程で起き、2/20 例が母配偶子形成過程で生じたことが判明した。また、ハプロタイプの構築が可能であった 8 家系中、5 例の父起源例と 1 例の母起源例は染色体内の再構成、2 例の父起源例は染色体間の再構成が欠失の原因であった(図 10)。このことは欠失が同一の機構によって生じたものではないことを示すものであった[4]。

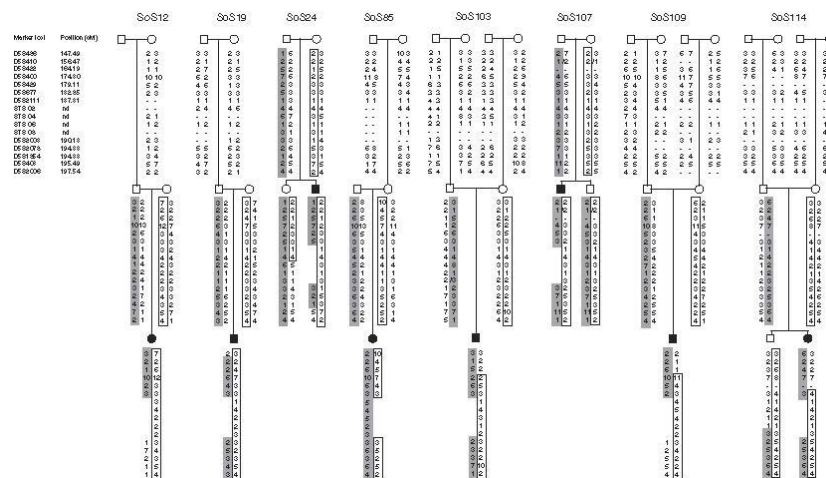


図 10 ハプロタイプ解析による欠失の親起源

日本人 Sotos 症候群患者の約半数で同定される *NSD1* 遺伝子を含んだ 5q35 領域の染色体微細欠失のうち、約 90%以上は 1.9-Mb の共通領域が欠失していた。ゲノムシーケンス情報から得られた共通欠失の近位及び遠位断端付近の領域には、約 400-Kb 大の互いに相溶性の高い領域 (low copy repeat, LCR) が存在していた(図 11)。近位及び遠位 LCR の方向はお互いに逆向きであったが一部の 50-Kb 領域は順方向であり、その順方向領域の相溶性は 98%を超えていた。この順方向の領域は、非アレル間相同組換えにより欠失を惹起する可能性が高い領域と考えられた(図 12)。典型的な微細欠失を有す

る患者のゲノム DNA から BAC ライブラリーを作製した後、順方向 LCR にプローブを作製しライブラリースクリーニングを行い、欠失断端に相当する 1 クローンを同定した。このクローンのシーケンス解析から、1 例における欠失断端の塩基配列が決定された。他の同様の欠失を有する患者 46 名においても同様の部位での欠失を疑い、同部位を患者ゲノムで PCR スクリーニングし、36 例で同様の塩基配列が決定された。この結果、解析した 47 例の欠失例のうち 37 例では欠失断端が順方向 LCR の中でも 3-Kb 領域に集中していた。この一連の結果は Sotos 症候群がゲノム病であることを意味するものである [5-7]。残りの欠失例 10 例においても順方向 LCR 領域に欠失断端を有する可能性が高いため、50-Kb 全領域をカバーする PCR スクリーニング系を開発して解析した結果、4 例でホットスポット以外の欠失断端を同定することができた (図 12)。

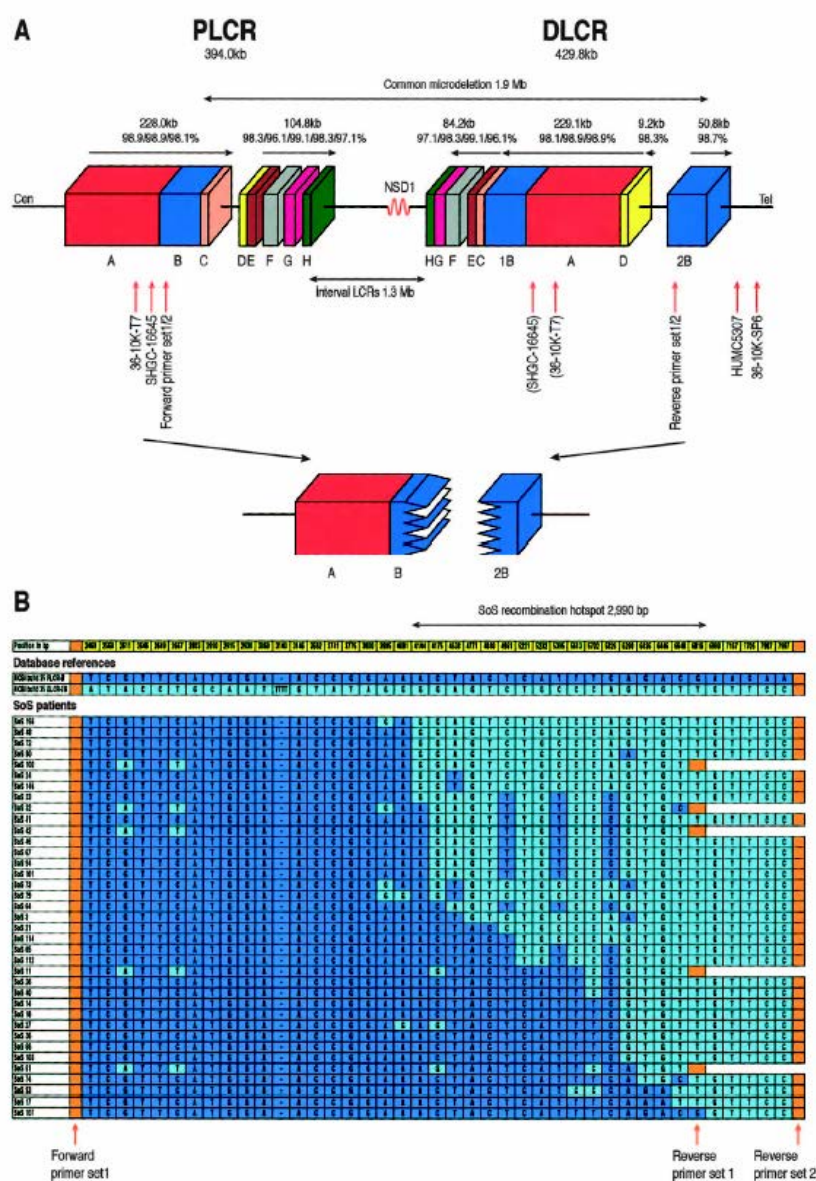


図 11 Sotos 患者にみられた欠失領域両端に存在する LCR (A) と recombination hot spot (B)

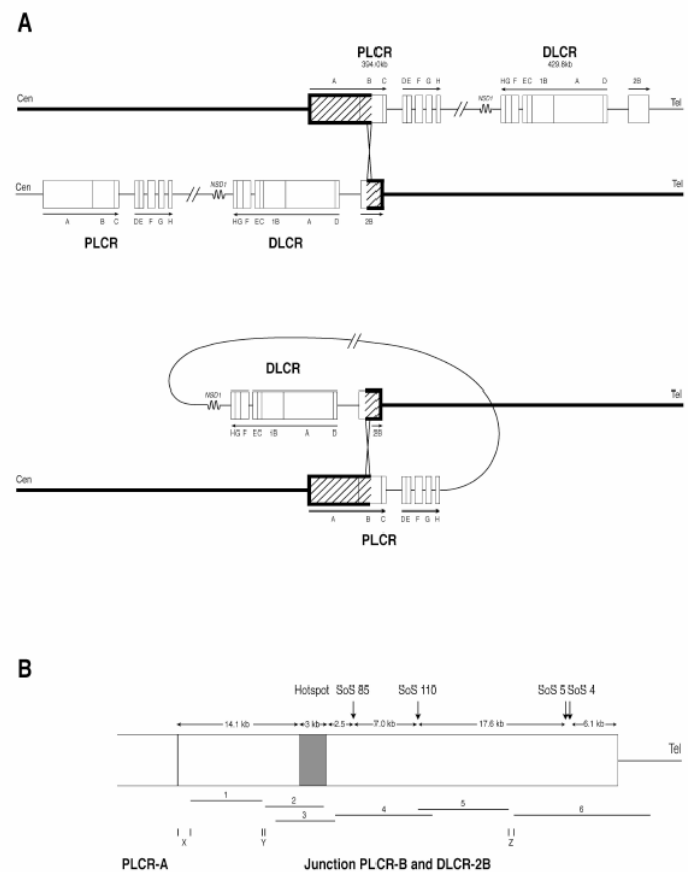


図 12 Sotos 症候群患者にみられる非アレル間相同組換え (A) と、その結果構成される 1.9Mb 欠失 (B) (グレイボックスはホットスポット)。

欠失 21 例と点変異 5 例の詳細な表現型解析から、両群に共通して特異顔貌・過成長・精神遅滞を認めたが、欠失例において過成長の程度は軽く、精神遅滞の程度は重症であった。また、心奇形・泌尿器系異常・反復けいれんは欠失群にのみに認めた (表 1)。つまり Sotos 症候群において遺伝子型・表現型関連が成り立つことを示す[8]。以上の結果から、Sotos 症候群の確定診断法を開発し、国内・国外特許を申請中である。

Table 1 Phenotypic comparison between patients with *NSD1* point mutations and those with deletions involving *NSD1*

	Mutation	Deletion	p value
Total number of patients	5	21	
Sex ratio (male:female)	2:3	15:6	0.21
Age range (years)	9.8 (6.5–17.1)	7.5 (3.0–21.4)	0.35
Growth and maturation			
Birth length (SDS)	1.5 (1.4) (n=3)	0.7 (1.0) (n=19)	0.25
Birth weight (SDS)	1.4 (0.8) (n=5)	0.6 (1.0) (n=21)	0.14
Birth OFC (SDS)	2.1 (0.8) (n=3)	0.9 (1.2) (n=20)	0.10
Gestational age (week)	40 (38–41) (n=5)	40 (36–42) (n=18)	0.36
Overgrowth (<6 years)	5/5	18/21	0.90
Peak height (SDS)	3.3 (0.5) (n=5)	2.2 (1.2) (n=21)	0.007
Overgrowth (>6 years)	2/5	2/11	0.37
Peak height (SDS)	1.9 (1.3) (n=5)	0.9 (1.2) (n=11)	0.14
Advanced bone age (–6 years)	1/1	10/14	0.73
Premature eruption of teeth	2/3	15/17	0.95
Performance			
Mental retardation (–6 years)	3/3	9/9	-
IQ/DQ	60±10 (n=3)	45±20 (n=9)	0.26
Mental retardation (>6 years)	3/4	5/5	0.91
IQ/DQ	78±12 (n=4)	57±12 (n=5)	0.03
Hypotonia	3/5	7/21	0.58
Hyperreflexia	1/3	6/18	0.75
Minor anomaly			
Craniofacial features	5/5	21/21	-
Coarse appearance	(5/5)	(20/20)	(-)
Large head	(5/5)	(18/20)	(0.63)
Prominent forehead	(5/5)	(20/20)	(-)
Receding frontal hair line	(3/4)	(13/17)	(0.77)
Hypertelorism	(4/4)	(18/21)	(0.58)
Downward slanting fissures	(4/4)	(17/21)	(0.47)
Large ears	(4/5)	(16/20)	(0.75)
High arched palate	(3/3)	(17/18)	(0.86)
Other features	5/5	20/21	0.81
Scoliosis	(1/5)	(5/21)	(0.68)
Large hands and feet	(5/5)	(20/21)	(0.81)
Major anomaly			
Brain anomaly	2/5	12/19	0.33
Large ventricle/brain atrophy	(2/5)	(5/19)	(0.46)
Agenesis/hypoplasia of CC	(0/5)	(7/19)	(0.15)
Cardiovascular anomaly	0/5	12/21	0.03
PDA	(0/5)	(4/21)	(0.40)
ASD	(0/5)	(2/21)	(0.65)
PDA and ASD	(0/5)	(6/21)	(0.24)
Urinary anomaly	0/5	7/13	0.05
Hypoplastic kidney	(0/5)	(1/13)	(0.72)
Hydronephrosis	(0/5)	(1/13)	(0.72)
Hydronephrosis and VUR	(0/0)	(4/5)	(0.23)
VUR	(0/0)	(1/5)	(0.72)
Others			
Neonatal asphyxia	1/5	3/21	0.60
Neonatal hypoglycaemia	1/5	4/21	0.69
Neonatal jaundice	0/5	11/21	0.04
Recurrent afebrile convulsions	0/5	13/21	0.02
Malignancy	0/5	1/21	0.81

The denominators indicate the number of patients examined for the presence or absence of each feature, and the numerators represent the number of patients assessed to be positive for that feature. Thus, the differences between the denominators and numerators denote the numbers of patients evaluated to be negative for that feature.

表 1

研究成果の今後期待される効果

マウス Nsd1 蛋白は複数の核受容体のリガンド結合性ドメインと直接結合し、相反する共役因子としてコアクティベーターとコリプレッサー両面の機能をもつ。さらに SET、PWWP および PHD ドメインを有し、クロマチンレベルでの転写調節作用をもつことが示唆される。ヒト NSD1 蛋白もマウスと同様に核内受容体を介して転写過程での遺伝子発現調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

Sotos 症候群が染色体微細欠失症候群であることが実証されたが、本発見により FISH 法により患者の *NSD1* 欠失の確定診断が可能になった。現在、*NSD1* を含む FISH 用プローブの特許出願中であるが、米国アボット（旧 Vysis）社が同特許権を使用し、プローブを製品化する方向で交渉が進行中である。本遺伝子の単離で、臨床診断が曖昧であった小児の巨人症の一部の確定診断と臨床区分が簡便な方法で可能となった意味は大きい。Sotos 症候群遺伝子のマウスモデルは、両アリの KO で胎児致死性であり、Sotos 症候群の良好なモデル動物は未だ作成されていないが、今後は、マウス以外の他種動物でもモデル動物の可能性を検討し、モデルが作成されればさらに病態解明への展開が可能である。

参考文献

1. Imaizumi K, Kimura J, Matsuo M, Kurosawa K, Masuno M, Niikawa N, Kuroki Y: Sotos syndrome associated with a de novo balanced reciprocal translocation t(5;8)(q35;q24.1). *Am J Med Genet* **107: 58-60, 2002**
2. Kurotaki N, Harada N, Yoshiura K, Sugano S, Niikawa N, Matsumoto N: Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. *Gene* **279: 197-204, 2001**.
3. Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita H-A, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N: Haploinsufficiency of the *NSD1* gene causes Sotos syndrome. *Nat Genet* **30 (April): 365-366, 2002**.
4. Miyake N, Sugawara H, Kurotaki N, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Tsukahara M, Ishikiriyama S, Sonoda T, Miyoshi Y, Sakatsume S, Fukushima Y, Ohashi H, Nagai T, Kawame H, Kurosawa K, Touyama M, Shiihara T, Okamoto N, Nishimoto J, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N: Preferential paternal origin of microdeletion as prezygotic chromosome and/or chromatid rearrangements in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* **72 (5): 1331-1337, 2003**.
5. Visser R, Shimokawa O, Harada N, Kinoshita A, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: Identification of a 3.0-kb major recombination hotspot in patients with Sotos syndrome who carry a common 1.9-Mb microdeletion. *Am J Hum Genet* **76 (1): 52-67, 2005**.
6. Kurotaki N, Stankiewicz P, Wakui K, Niikawa N, Lupski JR: Sotos syndrome common deletion is mediated by directly oriented subunits within inverted Sos-REP low-copy repeats. *Hum Mol Genet* **14 (4): 535-542, 2005**.
7. Visser R, Shimokawa O, Harada N, Niikawa N, Matsumoto N: Non-hotspot-related breakpoints of common deletions in Sotos syndrome are located within destabilized DNA regions. *J Med Genet (in press)*
8. Nagai T, Matsumoto N, Kurotaki N, Harada N, Niikawa N, Ogata T, Imaizumi K, Kurosawa K, Kondoh T, Ohashi H, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Yokoyama T, Uetake K, Sakazume S, Fukushima Y, Naritomi K: Sotos syndrome and haploinsufficiency of NSD1: Clinical features of intragenic mutations and submicroscopic deletions. *J Med Genet* **40 (4): 285-289, 2003**.

(2) 染色体転座t(2;14)(p23.3;q13)を伴った鏡像多指趾症の候補遺伝子MIPOL1の単離と解析

本症は軸前性の指趾が軸後性の指趾と鏡像となるような非常に稀な多指趾症である(図13)。臨床細胞遺伝学研究グループによる切断点解析データを利用し、14q13切断点付近に構築した1.2-MbのBAC/PACコンテイング中、7個のBAC/PACクローンから成る500-Kb領域を解析した結果、転座点付近に既知のHNF3 α 遺伝子と新規遺伝子を単離しMIPOL1と命名した(図14)。MIPOL1は約350-Kb長で15個のエクソンから成り、442アミノ酸をコードする。ノザン解析では成人心・肝・骨格筋・腎・膵組織と胎児腎で発現、マウス胎児全組織のin situハイブリダイゼーションでは、E10.5-E13.5胎児全体で発現する。

遺伝子単離に利用した患者の14q13転座はエクソン11と12の間に存在し、MIPOL1を断裂させていた。本コンテイング領域にはMIPOL1以外に遺伝子は存在しない。HNF3 α は糖尿病の原因遺伝子の1つであり、鏡像多指趾の原因遺伝子の候補から除外した。

類似の症状をもつ2名の核型正常の多指症患者におけるMIPOL1の変異解析では変異は同定されなかった。他方の切断点2p23.3に遺伝子は存在しない。したがって、MIPOL1が鏡像多指趾症の強力な候補遺伝子であると結論し、J Hum Genet (2002) [1]で発表した。

その後、マウスのホモログMipol1に変異のあるマウスES細胞が奈良先端科学技術大学院大学(石田靖雅博士)で構築されたので、変異ヘテロマウスを作成し表現型を解析したが、多指趾は見られなかった(図15)。一方、カナダの研究グループから14q13切断点を有する転座をもつ脳梁欠損患者が報告され[2]、切断点クローニングによって、やはりMIPOL1の断裂が証明された。このことから、臨床細胞遺伝学グループが集積した脳梁欠損に多指を伴う先端脳梁症候群患者2例において、MIPOL1変異解析を行ったが、やはり変異は同定されなかった。

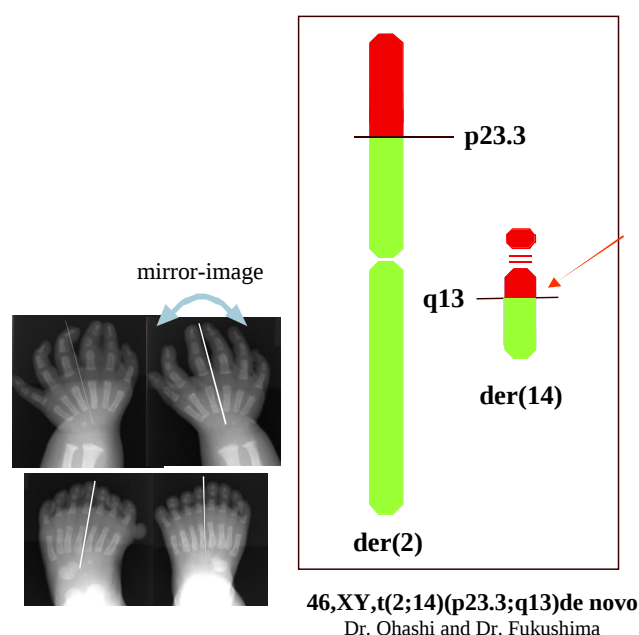


図 13 鏡像多指趾と患者における転座染色体

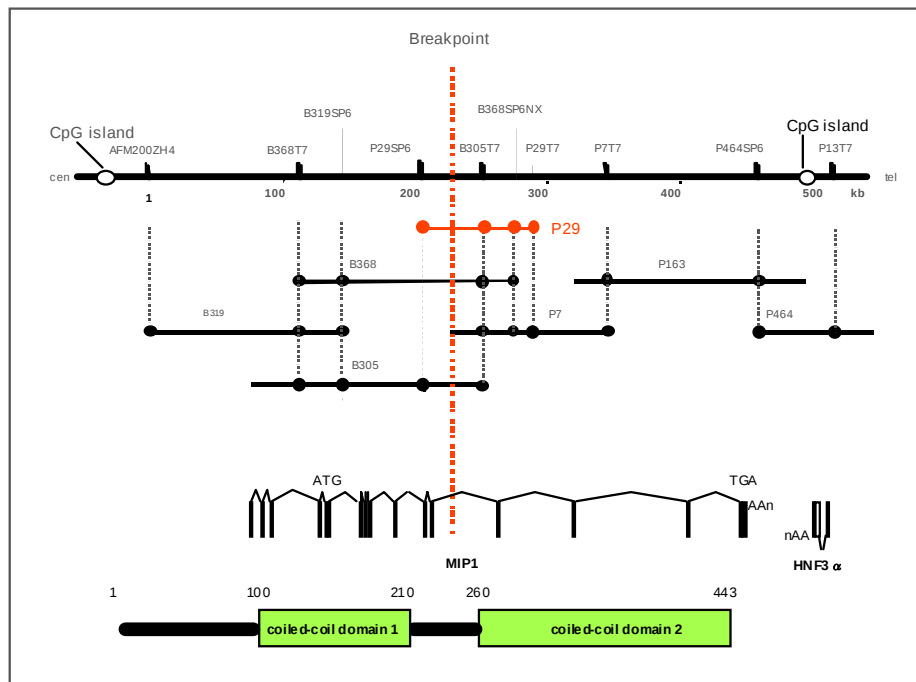


図 14 14q13 切断点領域の物理的地図と *MIPOL1*

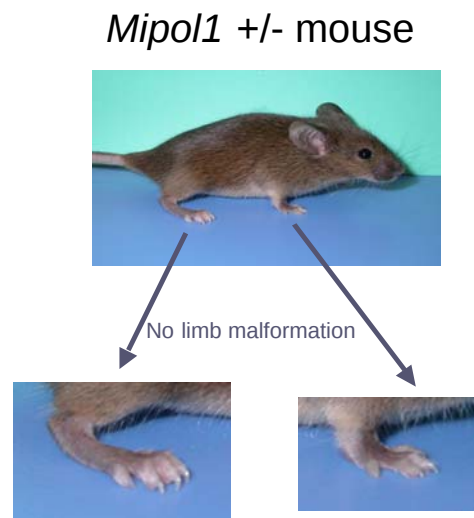


図 15 マウス *Mipol1* 変異のヘテロマウス

参考文献

1. Kondo S, Sugawara H, Harada N, Matsumoto N, Ohashi, H, Sato M, Kantaputra PN, Komatsu K, Tomita H, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Yoshiura K: A novel gene is disrupted at a 14q13 breakpoint of t(2;14) in a patient with mirror-image polydactyly of hands and feet. *J Hum Genet* 47: 136-139, 2002
2. Kamnasaran D, O'Brien PC, Zackai EH, Muenke M, Ferguson-Smith MA, Cox DW.: Rearrangement in the PITX2 and MIOL1 genes in a patient with a t(4;14) chromosome. *Eur J Hum Genet* 11: 315-324, 2003.

研究成果の今後期待される効果

切断点から単離した新規遺伝子 *MIPOL1* の機能は全く不明であるが、指趾や脳形成への役割が示唆され、ヒトを含め実験動物などでの今後の研究発展が待たれる。

(3) t(2;8)(q31;p21)転座をもつ肢中部短縮型骨格異形成症の切断点解析

本症は数種の臨床型から成る四肢中部短縮を伴う小人症の総称である。タイで発見された家系例 [Kantaputra型肢中部短縮型骨異形成症 (MDK) MIM 156232] (図16) において先に行った連鎖解析で、*D2S2188*領域において高いLOD得点を得ていたこと[1]、またこの連鎖領域はイタリアで発見された肢中部短縮型骨異形成症家系の転座 [t(2;8)(q31;p21)]の2q31切断点に一致したことから (図16)、イタリアの1家族4名の患者試料の供与を受け、切断点クローニングを行った。

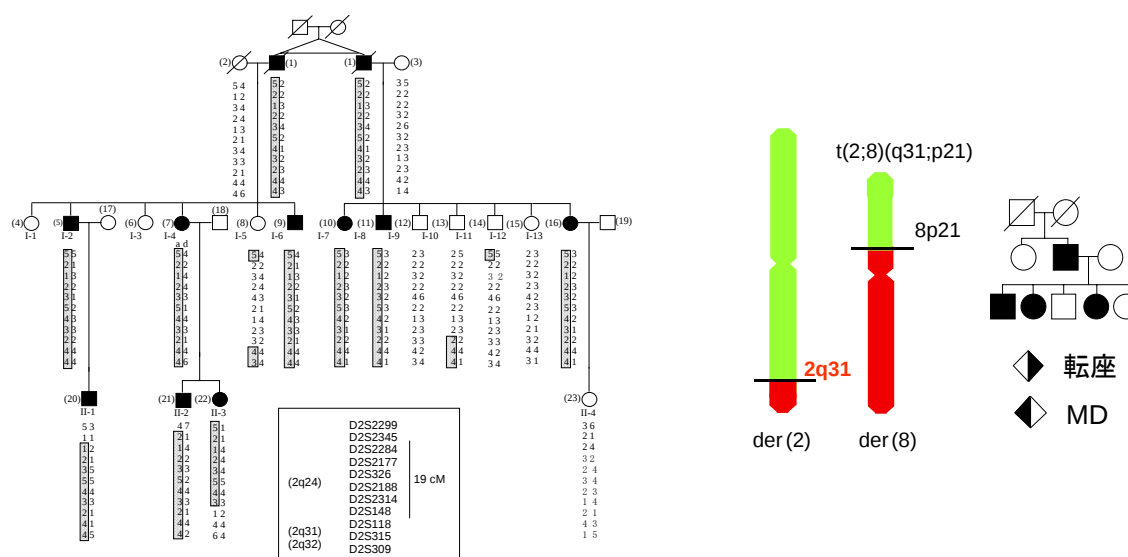


図16 MDKにおける連鎖解析 (A) とイタリア患者家系の染色体転座 (B)

PACライブラリーから *HOXD* 遺伝子を含む9種のクローンを単離した後、そのコスミドサブクローン260個を作成しコンテイングを構築し、FISH法で2q31切断点領域を含むコスミドを同定し解析した (図17)。

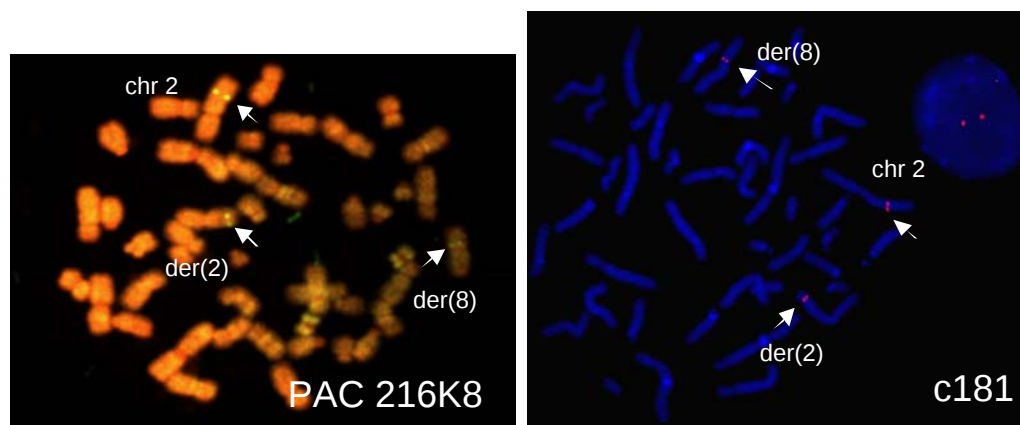


図17 転座切断点2q31におけるPACクローン216K8 (左) とコスミドクローン c181 (右) のFISHシグナル

2q31切断点には遺伝子は存在しなかったが、切断点の55 Kb着糸点側に*HOXD*遺伝子クラスター、23-Kb長腕遠位端側に*MTX2*が存在することが判明した（図18）。一方、8p21切断点にも遺伝子はなく、派生8番染色体由来の2塩基欠失と由来不明の12塩基挿入が確認された。

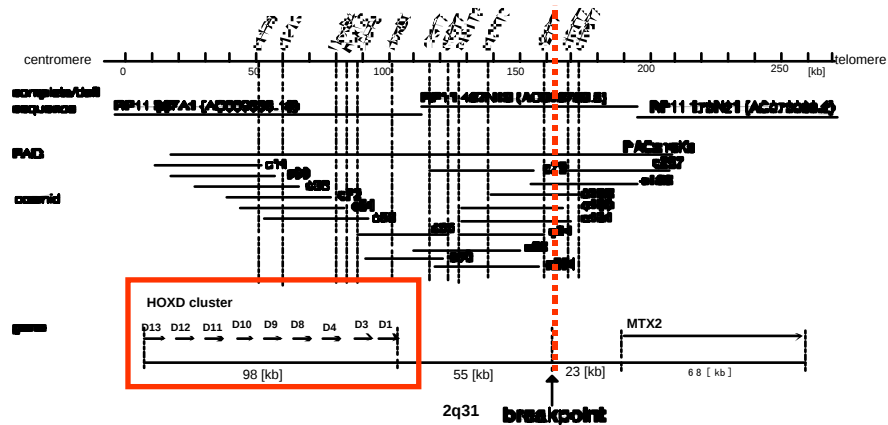


図18 転座切断点2q31領域の物理的地図と近傍遺伝子

*HOXD*は脊椎動物のボディプランに重要な役割を果たしている。とくに*HOXD10-12*は前腕・下腿形成のパターニング（zeugopodium）に重要であることから（図19）、患者の転座の位置効果により*HOXD*発現を変化させた可能性が示唆される。研究結果はJ Med Genet（2002）に掲載された [2]。

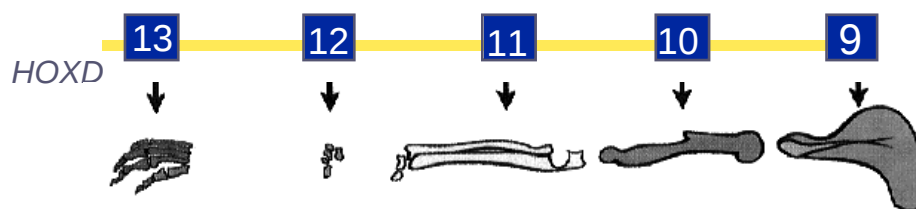


図19 ニワトリ四肢におけるHoxDの発現

参考文献

1. Fujimoto M, Kantaputra PN, Ikegawa S, Fukushima Y, Sonta S, Matsuo M, Ishida T, Matsumoto T, Kondo S, Tomita H, Deng H-X, D'urso M, Rinaldi MM, Ventruto V, Takagi T, Nakamura Y, Niikawa N: The gene for mesomelic dysplasia Kantaputra type is mapped to chromosome 2q24-q32. *J. Hum. Genet.*, 43 (1), 32-36 (1998)
2. Sugawara H, Egashira M, Harada N, Jakobs TC, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: Breakpoint analysis of a familial balanced translocation t(2;8)(q31;p21) associated with mesomelic dysplasia. *J Med Genet* 39: e34, 2002

研究成果の今後期待される効果

同定した切断点には遺伝子は存在しなかったが、脊椎動物のボディプランに重要な役割を果たす *HOXD* 遺伝子クラスター発現を調節するエンハンサーの存在を示唆するものであり、今後の研究発展が期待される。

(4) Marfan症候群2型の原因遺伝子 *TGFBR2* 単離とその機能解析

Marfan 症候群 (MIM #154700) は常染色体優性遺伝性の先天性結合組織疾患である。高身長、細長い体形、くも状指趾、易関節脱臼、脊柱側彎、水晶体脱臼、強度の近視・乱視、大動脈瘤・解離、大動脈弁・僧房弁閉鎖不全などを特徴とし、心不全で突然死することがある。罹病率は3千～5千人に1人だと推定される。リンカーン大統領や音楽家のラフマニノフ、パガニーニなどが本症に罹患していたとされる。元米国のバレーボール選手であったハイマン選手が日本での試合中に突然死したことは有名であり、当時世界的に社会的関心が集まった。患者の多くはフィブリン遺伝子1 (*FBNI*) の変異によるが、*FBNI* 座と連鎖しない家系 (Marfan 症候群 2 型、MIM #154705) が従来から知られていた。

6箇所切断点をもつ複雑転座 $t(1;5;4)(p35;q33.2;q35)$, $ins(3)(q11.2;p11.2p24.2)$ をもつ MS 患者が発見されたのを受けて研究を開始した (図 20)。過去にフランスの研究者によって Marfan 症候群 2 型座が 3p25-p24.2 領域にマップされたことから、その原因遺伝子が我々の患者の 3p24.2 切断点に局在する可能性が高いと考えた。分子遺伝学研究グループは、最初に FISH 解析で切断点を同定する3種の BAC クローンを得た (図 20)。これらのクロンの重複領域の解析では、1つの遺伝子 (*TGFBR2*) しかなく、この遺伝子断裂が RP11-775G14 のコスミドサブクローンによってほぼ決定されたので、*TGFBR2* が最大の候補遺伝子となった (図 20)。

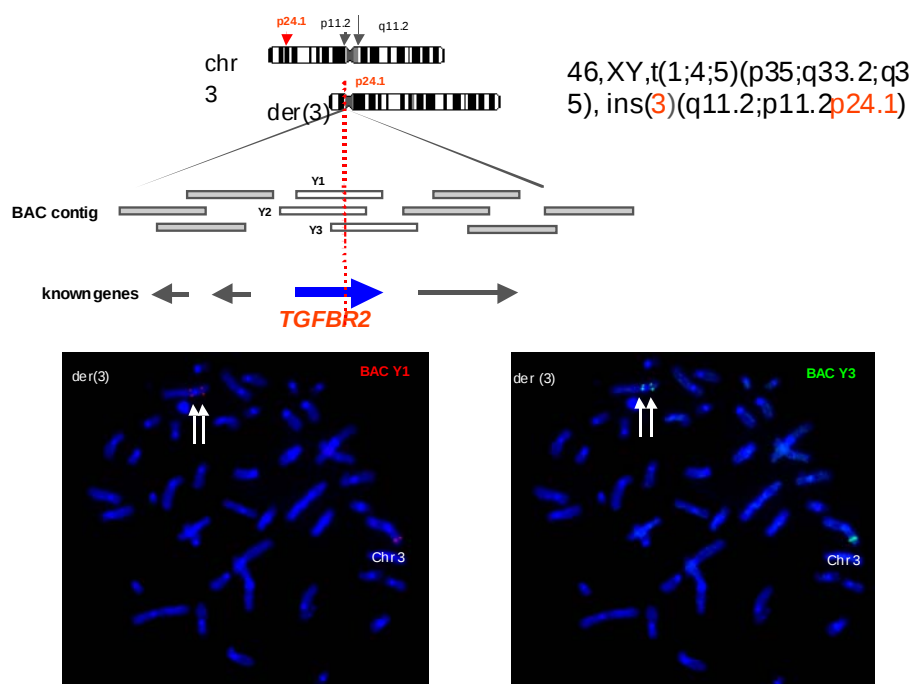


図 20 切断点 3p24.1 付近の BAC コンティグ (上段) と Y1 および Y2 を用いた FISH

次に *FBNI* に変異のないフランス人の 10 家系（先の *FBNI* に連鎖しない家系を含む）および 10 名の日本人 Marfan 症候群 2 型孤発例において *TGFBR2* 変異解析を行った。その結果、5 名の発端者（4 家系と 1 名の孤発例）に 1524G>A、923T>C (L308P)、1346C>T (S449F) および 1609C>T (R537C) を同定した（図 21）。1524G>A はスプライス異常をきたす変異であり、大家系中の Marfan 症候群と共分離した（図 22）。この変異は、正常白人 152 名および正常日本人 267 名にはみられなかった。

同定した *TGFBR2* ミスセンス変異の TGF- β シグナル伝達系における機能的意義を調べた。ヒト *TGFBR2* 全長をクローニングし、Marfan 症候群 2 型家系に同定した 3 種の変異型 *TGFBR2* コンストラクトを作製した。コンストラクトを HEK293 細胞および DR26 細胞（内因性 Tgf β RII 欠損株）にそれぞれ一過性に発現させ、TGF- β 刺激応答性のシスエレメントを上流に導入したルシフェラーゼレポータの活性を指標として影響を野生型と比較した（図 23）。変異型 Tgf β RII を過剰発現させた HEK293 細胞では、TGF- β シグナル伝達の著明な減弱を認めた。DR26 細胞を用いた解析でも、野生型の導入は TGF- β シグナル伝達の回復をもたらしたが、変異型導入では回復しなかった。上記のように 3 種のミスセンス変異はいずれも TGF- β シグナル伝達に関し機能喪失性の変化を引き起こすことがわかった。機能性と非機能性 Tgf β RII が共発現した状態（変異 *TGFBR2* のヘテロ接合体である Marfan 症候群 2 型患者）を調べるため、野生型と変異型を様々な比率で DR26 細胞に遺伝子導入すると、野生型 Tgf β RII 量依存性に TGF- β シグナル系は回復した。しかし、優性阻害効果は認められなかった。

TGFBR2 は TGF- β の II 型受容体である。TGF- β は細胞内ドメインにおいて、1 型・II 型受容体複合体を介して細胞増殖、細胞周期停止、アポトーシス、細胞外マトリクス形成に関わるサイトカインである。*TGFBR2* のミスセンス変異によって、細胞外マトリクスに関わる TGF- β シグナリングのヘテロ接合性の機能喪失をきたすことが Marfan 症候群 2 型の発症機構だと推定される。TGF- β シグナル伝達の異常は腫瘍発生に重要な役割を果たしているが、腫瘍細胞における *TGFBR2* 変異は体細胞変異であり、その大部分はエクソン 3 のポリ A リピート中であって、Marfan 症候群 2 型でみられた germline 変異部位とは異なる。また、Marfan 症候群患者に好腫瘍性は知られていない。一方、後述のように、研究代表者らは過去の研究において Marfan 症候群様の体形を呈する別の単因子疾患である Camurati-Engelmann 病の原因が *TGFB1* 変異であることを明らかにした。これらの結果を総合すると、2 種類（腫瘍形成に関連するものと骨細胞外マトリクスに関連するもの）の TGF- β シグナル伝達経路の存在が強く示唆される。Marfan 症候群は *FBNI* と *TGFBR2* の少なくとも 2 つの遺伝子の変異によって起こると結論した。本研究結果は Nature Genetics (2004) に掲載された [1]。

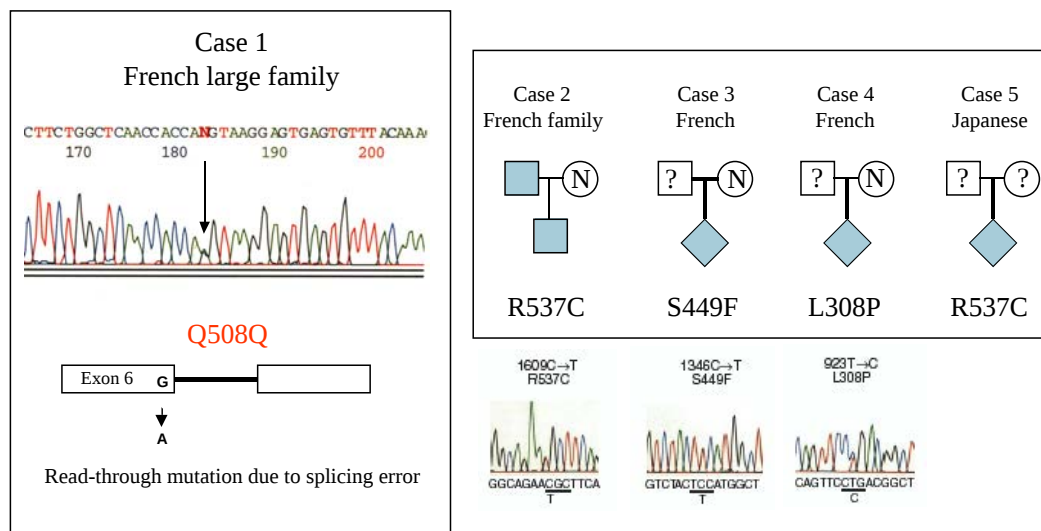


図 21 Marfan 症候群 2 型患者にみられた *TGFBR2* 変異

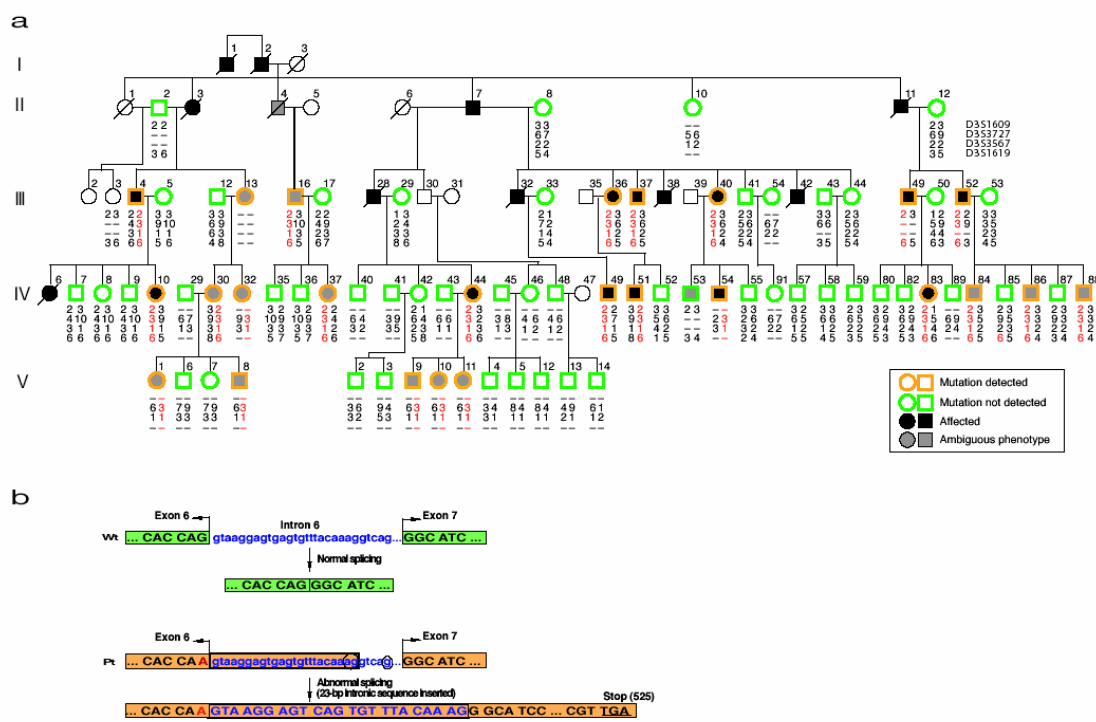


図 22 Marfan 症候群 2 型大家系における *TGFBR2* 変異

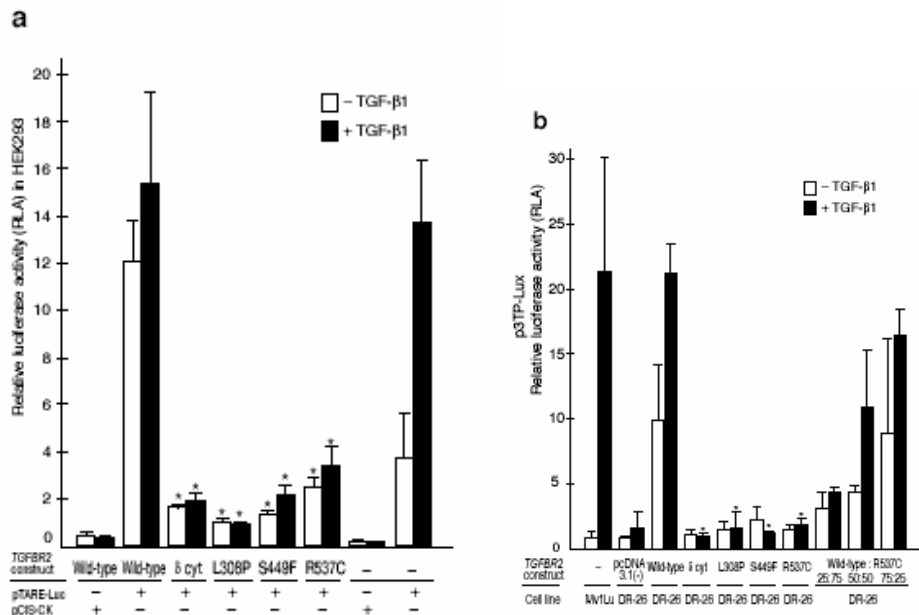


図 23 ルシフェラーゼ活性を指標とした変異 *TGFBR2* の機能解析

参考文献

1. Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Abifadel M, Akiyama T, Harada N, Morisaki T, Allard D, Varret M, Claustres M, Morisaki H, Ihara M, Kinoshita A, Yoshiura K, Junien C, Kajii T, Jondeau G, Ohta T, Kishino T, Fukukawa Y, Nakamura Y, Niikawa N, Boileau C, Matsumoto N: Heterozygous *TGFBR2* mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet* 36 (8): 855-860, 2004.

研究成果の今後期待される効果

Marfan 症候群 2 型の原因遺伝子単離をきっかけとして、複数の遺伝性疾患でも *TGFBR2* や *TGFBR1* の遺伝子異常が同定され、TGF-β受容体病として認識されている。このことは、*TGFBR* の異常で多岐にわたる臨床像が惹起されることを意味し、*TGFBR2* の遺伝子異常の臨床スペクトラムを決定することは臨床的にも極めて重要である。さらに従来構造蛋白 (FBN1) の異常で起こると考えられてきた Marfan 症候群が TGF-βシグナル異常でも惹起されることから、FBN1 を含む結合組織での TGF-βシグナルが病態の中心である可能性が高い。今後は FBN1 を中心とする細胞外マトリックス構造と TGF-βシグナル系の複雑なネットワーク (TGF-β1 リガンドおよび受容体の発現調節、TGF-βファミリーや他のシグナル系とのクロストーク、TGF-βの分泌、細胞外マトリックスへの蓄積と、活性化など) の観点から、Marfan 症候群患者における病態の解明が行われ、治療に向けた展開が期待される。

(5) t(6;18)(q21;q21)をもつ全内蔵逆位の 6q21 切断点からの XPA26 遺伝子の単離

均衡型染色体転座 t(6;18)(q21;q21)をもつ全内蔵逆位 (MIM #606325) の患者の 6q21 切断点から新規遺伝子 *PA26* (MIM #606103) を単離した (図 24、25)。Xenopus のオルソログ *XPA26* は脊索でのみ発現することから、*PA26* 遺伝子のヒト内蔵位置決定におけ

る役割を示唆する結果となった。しかし 40 名の内蔵逆位患者では変異は同定されなかったため、PA26 は主要な位置決定遺伝子ではなさそうである。成果は Hum Genet (2003) に掲載された [1]。

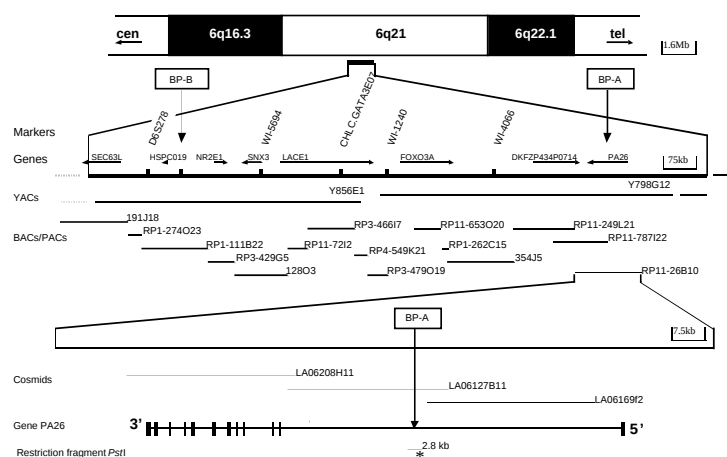


図 24 転座切断点 6q21 で断裂した新規遺伝子 PA26

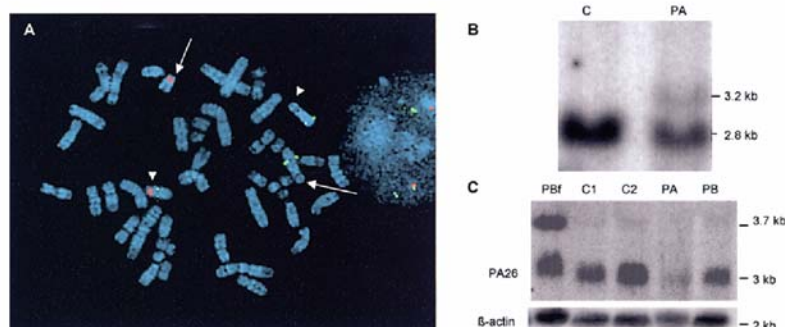


図 25 染色体転座 $t(6;18)(q21;q21)$ をもつ全内蔵逆位患者における FISH(A) と PA26 のサザンブロット(B)およびノザンブロット(C)解析

参考文献

1. Peeters H, Debeer Ph, Wilquet V, Huysmans C, Parthoens E, Fryns JP, Gewillig M, Nakamura Y, Niikawa N, Van de Ven W, Devriendt K: PA26 is a candidate gene for heterotaxia in humans: Identification of a novel, PA26-related gene family in human and mouse. *Hum Genet* 112 (5-6): 573-580, 2003.

研究成果の今後期待される効果

内蔵位置決定遺伝子は PA26 以外にも知られている。これらと PA26 の相互作用の解明が今後の課題であり、その研究発展は初期発生機構の理解に寄与するであろう。

(6) 2 型糖尿病を伴う t(3;9) (p14.2;q31) 転座の 3p14.2 切断点からの *KIAA0263* 同定

臨床細胞遺伝学グループによって、母由来の転座をもち、若年発症で肥満を伴う 2 型糖尿病同胞例が発見された。母も妊娠を契機に 2 型糖尿病を発症し、祖父方の同胞に 1 名糖尿病を認める (図 26)。本家系において、2 型糖尿病関連遺伝子が切断点で断裂しているとの仮説のもとに遺伝子単離を開始した。FISH 解析で両転座点をカバーする BAC クローンを同定した。切断点 3p14.2 では BAC のコスミドサブクロンのコンテイングを構築した。次いで、塩基配列決定とデータベースの利用で、全長約 280-kb 領域中の候補遺伝子検索を行い、4 個の候補遺伝子を単離し、3p14.2 切断点で断裂した *KIAA0263* (inositol hexaphosphate kinase 1, *IHPK1*) 遺伝子を同定した (図 27)。405 名の 2 型糖尿病患者の解析では他の変異はみられなかったが、DM2 の新しい候補遺伝子である。結果は J Hum Genet (2004) で発表した [1]。

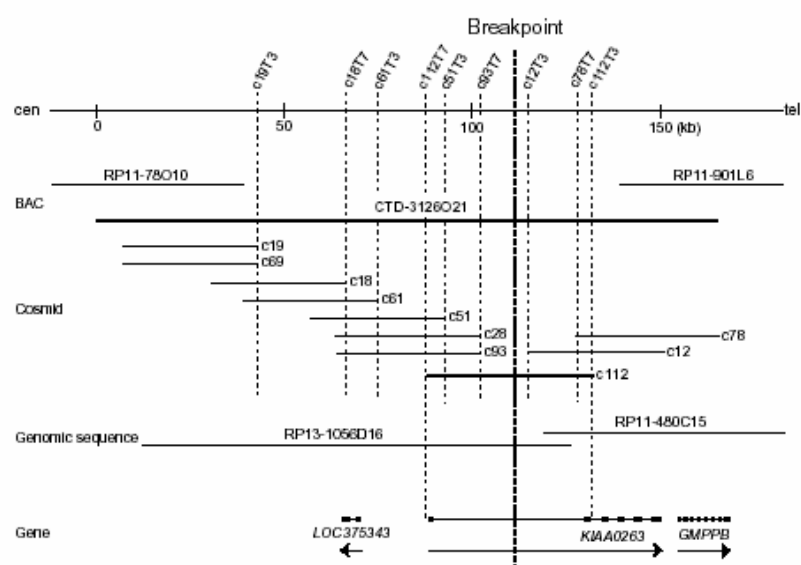
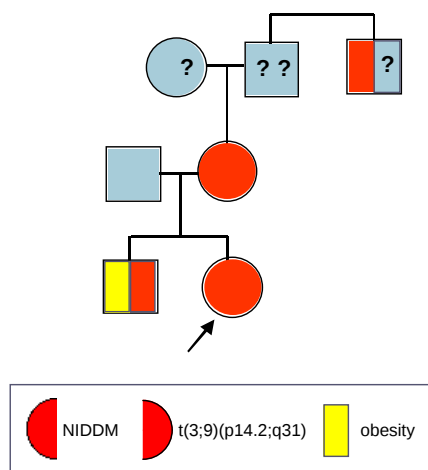


図 26 2 型糖尿病と転座を合わせもつ家系

図 27 3p14.2 切断点付近の物理的地図

参考文献

1. Kamimura J, Wakui K, Watanabe Y, Miyake K, Harada N, Kinoshita A, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Ishikawa M, Kasuga M, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N: The *IHPK1* gene is disrupted at the 3p21.31 breakpoint of t(3;9) in a family with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Genet* 49: 360-365, 2004.

研究成果の今後期待される効果

2 型糖尿病は多因子疾患ではあるが、その感受性遺伝子の多くはまだ不明である。切断点解析から同定した *KIAA0263* はその候補遺伝子の 1 つであり、大規模な 2 型糖尿病患者集団における関連研究が待たれる。

(7) 無鼻症における転座切断点解析

先天性無鼻症を伴う新生転座 [t(3;12) (q11.2;p11.22)] をもつ台湾人症例において、切断点 3q11.2 にマップされる 7 種の BAC クローンによる FISH 解析を行った結果、

3q11.2 転座切断点領域に約 19-Mb の欠失を確認した (図 28)。核型正常の 2 例において、台湾症例の転座切断点および欠失領域を FISH 解析したが、欠失は認めなかった。また、この 2 例では、2.2K 全ゲノムアレイを使用し CGH も行ったが、欠失などの変異は検出しなかった。現在、他の 2 例を解析中である。ゲノムデータベース上で 3q11.2 と 12p11.22 それぞれの切断点領域の候補遺伝子を探索したところ、欠失範囲内には候補となる数種の遺伝子が存在するので、現在それらの変異解析を続行中である。

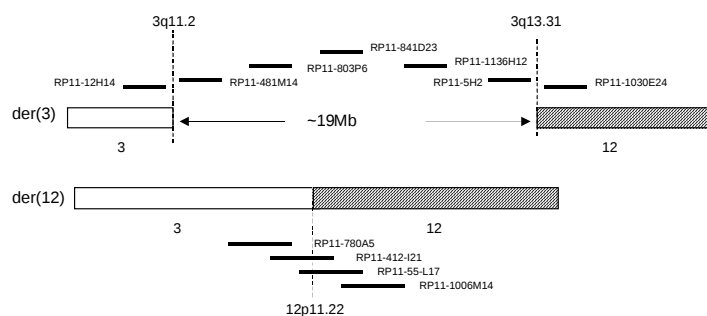


図 28 13q11.2 と 12p11.22 切断点領域の物理地図

(8) Opitz-C 症候群における転座切断点解析と新規遺伝子 Y の単離

特異顔貌、脳梁欠損、唇裂・口蓋裂、三角頭蓋、多合指、関節拘縮、心奇形、外性器異常などを示す Opitz-C 症候群患者に合併した染色体転座 [t(3;18)(q13.2;q12.1)] の 3q13.2 切断点から新規遺伝子 Y を同定した (未発表のため遺伝子名は割愛)。切断点をカバーする BAC コンティグの FISH 解析で切断点を含む BAC を単離し (図 29)、コスミド・プラスミドサブクローンの FISH 解析、サザンブロット解析、インバース PCR 解析、シーケンシング解析により切断点を同定した。現在、切断点に存在する新規遺伝子 Y を解析中である。

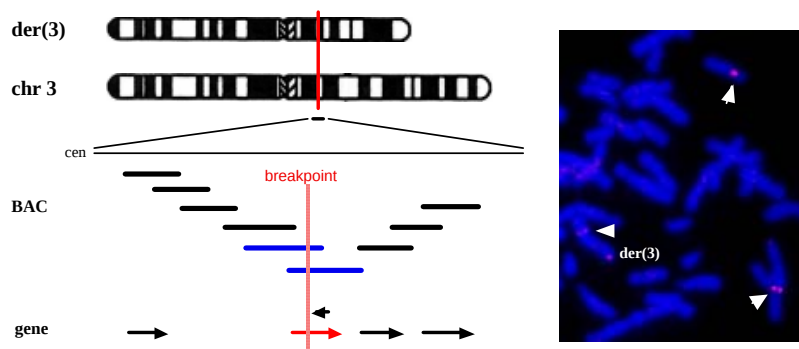


図 29 3q13.2 切断点をカバーする BAC コンティグと遺伝子 Y

(9) 裂手裂足症における転座切断点解析

核型 46, XY, der(3)der(7), inv ins(3;7)(q21;q32q21.1) をもつ先天性裂手裂足患者から 7q21.1 切断点解析を行った。切断点をカバーする BAC コンティグの FISH 解析で、

切断点を含む BAC を単離し、コスミド・プラスミドサブクローンの構造・FISH 解析、サザンブロット解析、インバース PCR 解析、シーケンシング解析により切断点を決定した (図 30)。切断点上にはゲノムデータベース登録遺伝子はなかったが近傍にマップされていた 3 つの EST から RACE 法により新規遺伝子 Z を単離した (未発表につき遺伝子名は割愛)。

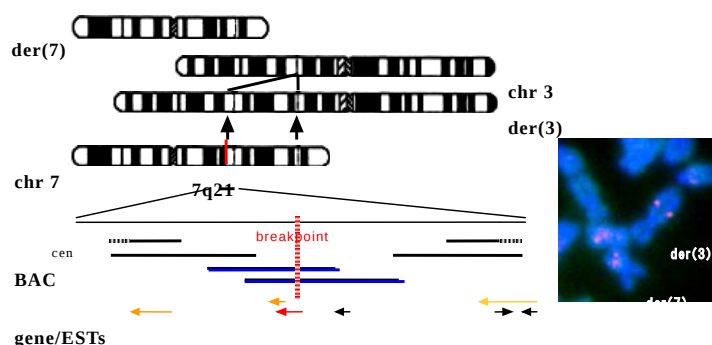


図 30 7q21.1 切断点をカバーする BAC コンティグと新規遺伝子 Z

(10) 特発性中枢性思春期早発症における転座切断点解析

特発性中枢性思春期早発症、言語発達遅滞、特異顔貌を伴い、7q と 10p に切断点のある均衡型相互転座をもつ患者の切断点解析を行った。G 分染法の結果をもとに選択した複数の BAC クローンをを用いた FISH 解析により、両切断点を包含する BAC クローンをそれぞれ同定し、10p については切断点を含む BAC クローンからコスミドライブラリーを作成し、切断点を含むコスミドクローンを同定した。データベース検索により、2ヶ所の転座切断点近傍に 3 つの遺伝子と 3 つの mRNA の存在をみいだしたが、転座により明らかに断裂している既知の遺伝子は存在しなかった。しかし、7q の切断点近傍に存在する 2 個の遺伝子については、既知の機能から、思春期早発や言語発達障害との関連が疑われ、位置効果による影響を考慮した場合には候補遺伝子となる可能性が示唆された (投稿準備中)。

3.2 ポジショナルクローニングによる耳垢型 (乳がん関連) 遺伝子 *ABCC11* の同定と機能的 SNP 解析

ヒト耳垢型は湿型と乾型に二分され、乾型は日本を含めた東アジア人特有 (80%~95%) であり、その他の多くの民族は湿型である。湿型は腋窩腺体臭とリンクし、乳がんの発生に関連するデータがある。我々は過去の研究において、家系を用いた連鎖解析により *D16S3093* と *D16S3080* の間の 5.9-cM に耳垢型遺伝子をマッピングした「1」。

本研究は、上記の連鎖領域からポジショナルクローニング法によって耳垢型決定遺伝子を単離したものである。まず、両マーカー間の BAC クローンの塩基配列データベースにより、137 個のマイクロサテライトマーカーを同定し、132 名の乾型、67 名の湿型試料においてアレル頻度を比較し、約 2Mb の候補領域を特定した。次いで、JSNP お

よび独自に同定した 40 個の SNP のタイピングと関連解析を行った結果、1 つの SNP が乾型個体と 湿型個体の間で $p < 10^{-22}$ の値で有意差を示した。次に、118 名におけるタイピング・関連解析を行った。有意な p 値 ($10^{-6} \sim 9$) を示す 2 種の SNP 間 600-Kb 中に存在する 4 種の遺伝子に絞って 126 名の新たなボランティアにおける SNP タイピング、ハプロタイピング、さらに連鎖不平衡解析を行った結果、1 名を除く全員の耳垢型は、*ABCC11* 遺伝子中の cSNP [c. 538G>A (Gly180Arg)] が決定していることが判明した (図 31)。乾型は AA ホモ接合体、湿型は GG ホモ接合体または GA ヘテロ接合体であった。さらに耳垢型と遺伝子型に矛盾がみられた 1 名の乾型 (GA ヘテロ接合体) では、G アレルの下流に 27bp の欠失 ($\Delta 27$) を同定した。この個体では $\Delta 27$ によって、G アレルは機能を低下したと判断した。すなわち、126 名全員において、*ABCC11* 多型が耳垢型を決定していることが明らかとなった。

ABCC11 は多剤耐性遺伝子であり、乳癌組織で強発現する遺伝子である。ブタ上皮細胞由来の LLC-PK1 細胞を用いた発現・機能解析の結果、乾型蛋白 (MRP8-Arg) は、野生型 (MRP8-Gly) に比べて、細胞内→外への基質排出能が低下していた (図 32)。

次いで世界中の 30 の民族における A アレル (乾型) の遺伝子頻度を調べた結果、東北アジアにピークをもつ南北および東西地理的勾配が明らかとなった (図 33)。遺伝子 X は乳癌や薬剤耐性に関連する遺伝子であり、本研究で得た耳垢型決定多型は、耳垢型のみならず古代モンゴロイドの移動・拡散を示し、さらにアジア人に少ない乳癌や、アジア人の薬剤耐性(副作用)を決定している可能性が高い。本研究結果は Nature Genet に掲載予定である [2]。

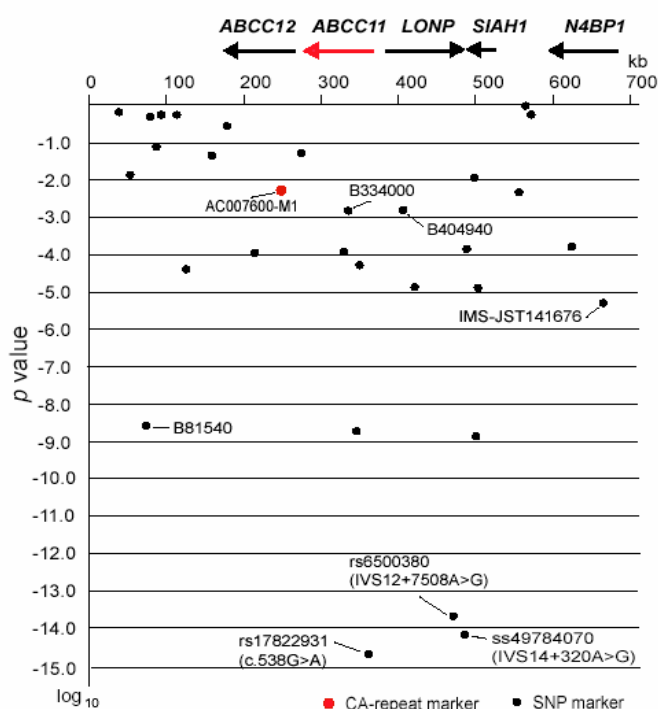


図 31 *D16S3093* と *D16S3080* 間約 600 Kb 領域の SNP、遺伝子および関連解析による p 値

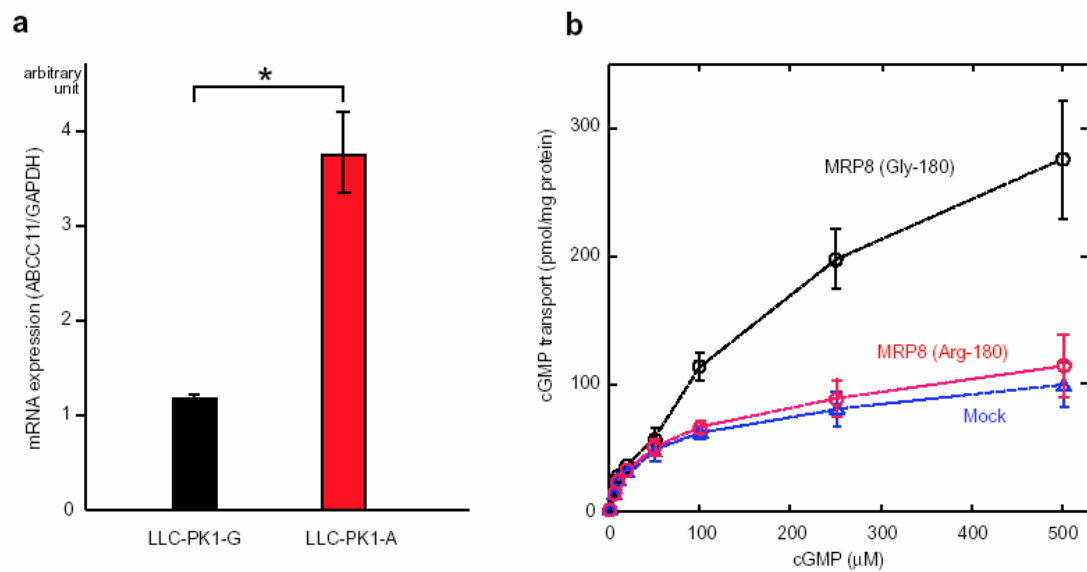


図 32 LLC-PK1 細胞における外来 *ABCC11* 遺伝子の発現 (a) と *ABCC11* 蛋白の細胞内→外への基質排出能

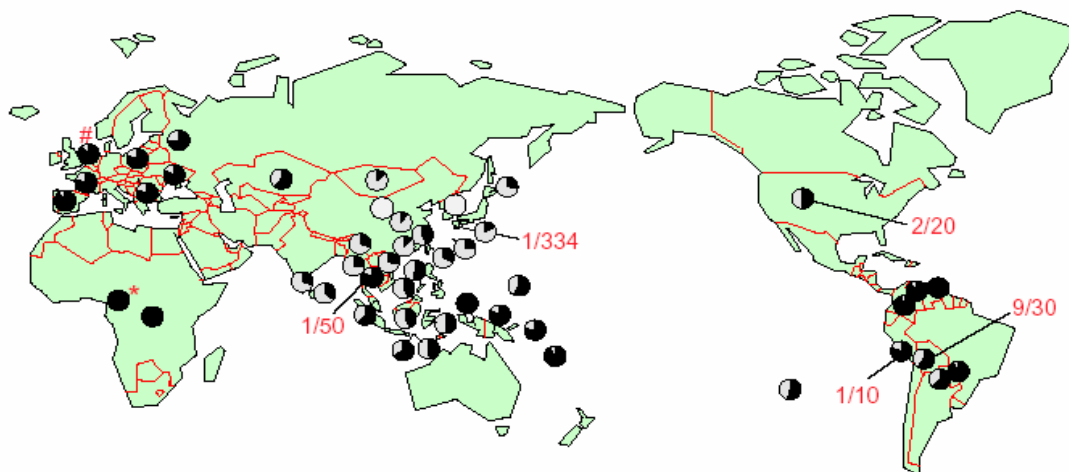


図 33 世界の民族における *ABCC11*-A アレル頻度 (○の白抜き比率) と $\Delta 27$ の頻度 (赤字)

参考文献

1. Tomita H-A, Yamada K, Ghadami M, Ogura T, Yanai Y, Nakatomi K, Sadamatsu M, Masui A, Nanko S, Kato N, Niikawa N: Mapping of the wet/dry earwax locus to the pericentromeric region of chromosome 16. *Lancet* 359 (9322): 2000-2002, 2002
2. Yoshiura1 K, Kinoshita1 A, Ishida T, Ninokata A, Ishikawa T, Kaname T, Bannai M, Tokunaga K, Sonoda S, Komaki R, Ihara M, Saenko VA, Alipov1 GK, Sekine I, Komatsu K, Takahashi H, Nakashima

M, Sosonkina N, Mapendano CK, Ghadami M, Nomura M, Liang DS, Miwa N, Kim DK, Garidkhuu A, Natsume N, Ohta T, Tomita H, Kikuchi M, Russomando G, Hirayama K; Ishibashi M, Takahashi A, Saitou N, Murray JC, Saito S, Nakamura Y, Niikawa N: A functional single-nucleotide polymorphism in the *ABCC11* gene is the determinant of the human earwax type. *Nat Genet (in press)*.

研究成果の今後期待される効果

耳垢型を決定している機能的多型[c. 538G>A (Gly180Arg)]のホスト遺伝子 *ABCC11* は細胞内から細胞外への物質排出に関わる機能をもつことから、多剤耐性遺伝子の 1 つである。その基質はまだ不明であるが、5-FU など抗癌作用をもつ薬剤の可能性が高い。乾型耳垢型は排出機能が障害されていることから、乾型個体は抗がん剤に対して感受性が高いか、または副作用が強い可能性がある。これらが今後証明されれば、抗がん剤使用のときの指標に利用できるであろう。つまりオーダーメイド医療に貢献できるであろう。また *ABCC11* は乳癌組織で強発現しているのも、乳癌発症に関与する可能性も高い。日本人の 80%は乾型耳垢型であり、このことが乳癌が日本人で頻度が低いことを説明するかもしれない。

3.3 アレイ CGH の開発・作製と疾患ゲノム解析

ゲノム上の微細欠失による種々の疾病が知られるようになりゲノム病 (genomic disorder) と総称される。従来原因不明の先天異常症のいくつかはゲノム欠失 (1 コピーの遺伝子) あるいは重複 (3 コピー) による可能性がある。このような背景から、通常の染色体検査では同定できない微細なゲノムのコピー数の異常 (欠失や重複) を高感度・高精度、且つ網羅的に同定するためのシステムの開発を行った。そのうち、テロメア領域に高頻度に起こる染色体再構成を検出するテロメア特異的 CGH マイクロアレイ、および性染色体マイクロアレイの開発に成功した。

(1) アレイ CGH の開発

2003 年春に解読が完了したヒトゲノムシーケンスに基づいて全ゲノムを均等にカバーする BAC クローンを選択し、その全てを FISH 解析で検証し、異所性にまたは複数箇所にシグナルを呈する不適クローンを全て除外し、より高精度・高感度のアレイを作製した。2200 個 (2K) 及び 4300 個 (4K) の BAC より成る 2 種類のアレイを開発した (図 34)。BAC DNA を 3 種類のヒトゲノム特異的 DOP-PCR プライマーで増幅し、さらにその増幅産物をアミノ基ラベルした 2 次プライマーで増幅しアミノ基ラベルされた PCR 増幅 DNA を精製後、特殊加工したスライドガラス上にインクジェット方式でプリントし、スライドガラス上に共有結合させ、安定な DNA スポットを有するアレイを作製した。

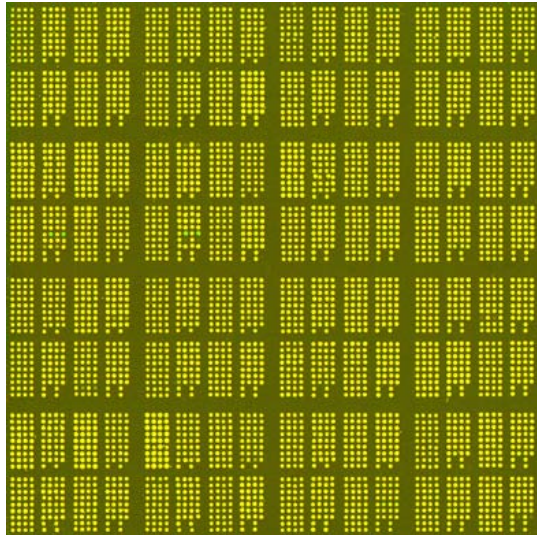


図 34 2K アレイの実際

(1-1) 2K アレイ：ヒト全ゲノムを均等にカバーする 2,505 個の BAC を選択し、不適クローンを全て除外し、2,173 個の BAC より構成されるアレイを作製した。解像度は、2,900 Mb (ヒトゲノム完全配列) / 2173 (BAC 総数) = 1.33 Mb である。さらにヒト全染色体サブテロメア特異的クローンと染色体微細異常症候群領域のクローン 59 クローンを加えた。

(1-2) 4K アレイへの準備：2K アレイで使用したクローンの間のゲノム領域に局在する 2,512 個の BAC クローンを選択し 1-1 と同様に正常対照染色体上で FISH を行い不適クローンを除外し、2,022 個の BAC を選択した。これを 2K アレイで使用したクローンと合わせ計 4,199 個のクローンを選択した (解像度 0.69 Mb)。これにヒト全染色体サブテロメア特異的クローンと染色体微細異常症候群領域のクローン 97 クローンを加えた。

(2) アレイ CGH の臨床応用

(2-1) 2K アレイによる歌舞伎メーキャップ症候群の解析：歌舞伎メーキャップ症候群 (KMS) と診断された 40 症例を 2K アレイを用いて解析した。このうち 2 例に、46,X,der(Y)t(Y;13)(q11.21;q21.31) と 46,XY,inv dup(Y)(q11) の染色体異常を認めた。この染色体異常に相当する部位のクローンは全て異常値を呈し、2K アレイが高感度にゲノムコピー数異常を同定できることが示された。染色体異常が同定されていない 38 例の患者ゲノムにおいて計 120 箇所ゲノムコピー数異常を認め、FISH 解析にてアレイの結果が正しいことが確認された。2p11.2 と 14qter のヘテロ接合性欠失内には、遺伝子が存在せず、Xp22.3 ヘテロ接合性重複は、偽常染色体領域 (PAR1) と重複するため偽常染色体遺伝子を他の患者でスクリーニングしたが、PAR1 には異常なく、同定された異常が KMS の原因である可能性は低い。さらに残りの部位では患者の両親 (正常表現型) や正常対照で同様のゲノム異常を認めたため、ゲノムコピー数の多型である可能性が高い。以上から KMS 特異的なゲノムコピー数の異常が存在する可能性は低いと考えられた。尚、本実験で検出されたコピー数異常多型は、今後のアレイ解析に有用なデータである。

(2-2) 2K アレイによる特発性精神遅滞 30 例の解析：原因不明の特発性精神遅滞患者 30 例の 2K アレイによる解析を行い、8 例において以下に示す微細な病的染色体異常を同定した（5/30=17%）（表 2）。染色体異常の同定率は他の報告と類似し、2K アレイの高感度な検出力を示している。

表 2 2K マイクロアレイによって同定された 5 例の非特異的精神遅滞患者の核型異常

Case	Karyotype
MR88	46, XY, del(15)(q11.2q12)mat
MR96	46, XY, del(1)(q43qter)
MR117	46, XY, del(13)(q13.2q13.2)
MR118	46, XY, der(22)t(19;22)(p13.3q13.31)pat
MR126	46, XY, del(3)(p21p21)de novo
Case 6	46, XX, ish del(1)(p36.3)
Case 7	del(9)(q34)
Case 8	46, XX, del(1)(q24.3q31.2)

(a) 46, XY, del(15)(q11.2q12)mat：母型由来の Angelman 症候群領域の欠失であり世界でも数例しか報告されていない稀な家族性微細欠失症例であった（図 35）。欠失は母方祖父から由来し、母親は症状がないことから、欠失が Prader-Willi 症候群特異的な領域を含んでいないことを示している。現在、欠失断端の塩基レベルでの解析が進行している。

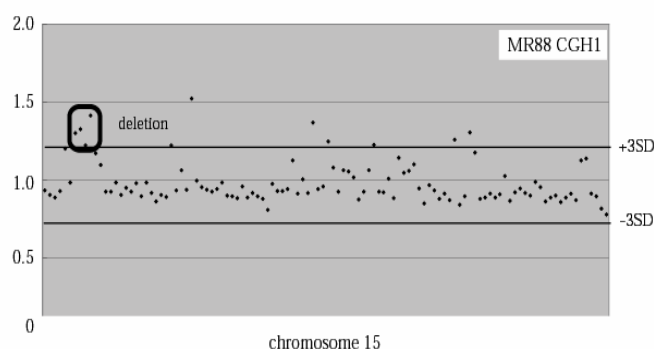


図 35 アレイ解析で同定された 15q11-q12 欠失

(b) 46, XX, del(1)(q43)：両親のゲノム解析は行われていないが、同領域の欠失で本症例と同様の臨床症状（精神遅滞、心疾患、脳梁欠損、口蓋裂）をもつ患者の既報告があるため、本染色体異常がこの症例における症状の原因である可能性が極めて高い。

- (c) 46, XY, der(22)t(19;22)(p13.3;q13.31)pat : 精神遅滞と合併してY染色体を認め、SRYの塩基配列に異常を認めないにもかかわらず女性型を呈する症例であるが、父親の均衡型転座に由来する不均衡型転座症例であることが判明した。ゲノムコピー数異常部位を正確に決定したが、同部位を含む性の異常の報告は認められなかった。精神遅滞はゲノムコピー数の異常によると考えられる。
- (d) 46XY, del(3)(p21)de novo : 3p21領域に約1 Mbにわたる微細な染色体欠失を同定した。この領域に同定された *DOCK3* は、ADHDを呈する inv(3)(p14;q21)の逆位切断点で断裂が報告されており、*DOCK3*の欠落が本症例における精神症状に影響を及ぼしている可能性が示唆される。
- (e) 46XY, dup(22)(q11.2q11.2) : 22q11.2欠失症候群領域と同じ領域が重複していた(図36)。これは、本邦初の22q11.2重複症候群である。

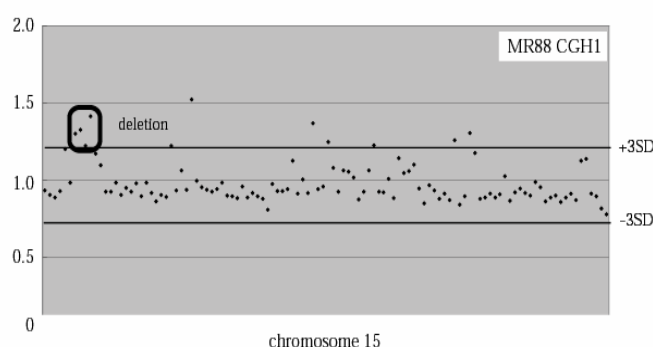


図36 アレイ解析で同定された22q11.2重複

- (f) 1p36欠失症候群の解析：本症候群は、子宮内発育遅延を呈する例が多い。生後も身長、体重増加は不良である。生後早期から筋緊張は低く、フロッピーインファントである。多くは重度精神遅滞である。自閉症の他、自傷行為などの行動異常の例もある。Kチャンネルの欠失例では難治性てんかんになることがある。日本人女児例で先天性筋線維タイプ不均等症を合併した1p36欠失症の1例[46, XX. ish del(1)(p36.3)]は、*SKI proto-oncogene*を含む3Mb以内の欠失であった。先天性筋タイプ不均等症の責任遺伝子は不明であるが、本研究結果は、SKIが重要な候補遺伝子であることを示唆した。
- (g) 9q34欠失：本症候群は通常の染色体検査では核型異常は同定されず、FISH法やマイクロアレイなどで診断される。丸顔、アーチ型の眉毛、眼間開離、鼻根部平低、上向きの鼻孔、口を少しあけて舌を出すことが多い、下口唇が厚い、小顎などの特徴がある。精神遅滞は重い。共同で国内3例の報告を行い新規症候群であることを提唱した[1]。その後、本症候群の認識が高まり、報告例が増加している。
- (h) MYOC遺伝子領域のハプロ不全：MYOCは1qに局在し、若年性開放隅角緑内障の原因遺伝子として多くの変異が報告されている。しかし、MYOC遺伝子変異と緑内障発症機序についてはまだ明らかでない点が多い。従来、MYOCが緑内障を生じる原因としてハプロ不全は否定的と考えられているが、本研究において先天性緑内障の1患

者でハプロ不全を証明した。核型は 46, XX, del(1)(q24.3q31.2)であった [2]。

(2-3) 原爆放射線のゲノム変化におよぼす影響に関する研究 (放射線影響研究所・高橋規郎)：原爆放射線がヒト生殖細胞に及ぼした影響、すなわち被爆者の子供達の集団に観察された突然変異率が、対照集団における突然変異率に比べ、有意に高いかどうかをアレイ CGH 法を用いた解析を試みた。アレイ CGH 法の基礎的実験条件をモデル実験により確立するとともに、80 名の原爆被爆者の子供より得た試料を用いて集団調査を行い、その途中に生じた種々の問題点を解決することにより、大規模調査にも適するように改良した。同時に、このような集団調査より得られたアレイ CGH 法の技術的ノウハウは、本プロジェクトを遂行するにあたり有用なものとなることが期待された。本法の有効性と実験条件の確立を目指して以下の予備実験を行った。(a) λ フェージ DNA を用いた実験、(b) Prader-Willi 症候群関連遺伝子を用いたモデル実験、(c) 約 600 個の BAC クローンをターゲットとして貼りつけたアレイを用いた実験。これらの実験より、マイクロアレイに対する経験を蓄積すると同時に、実験条件を確立すると同時に、この方法により産出される膨大なデータを処理するための、コンピュータソフトウェアを独自に開発した。

上記予備実験の結果は、この方法がゲノムコピー数の増減を確実に検出できる方法であることを示した。そこで以下の試行実験を実施した。(a) 約 2400 個の BAC クローンを 3 枚のガラスに分けて貼りつけものを 1 セットとするアレイを構築した。これらのクローンは約 1.2-Mb の間隔でヒト常染色体上に分布している。(b) 予備実験により確立した至適実験条件を用いて、原爆被爆者の子供 40 名および対照群の子供 40 名より得た DNA を実験した。ヒト Cot-1 DNA、サケ精子 DNA により 1 夜 37°C で前処理して、反復配列を押さえたアレイを用い、ハイブリダイゼーションは 1) Cy5 標識した内部標準 DNA と、Cy3 標識した検査対象 DNA を混合後、プローブして用い、次にこれとは逆に、2) Cy3 標識内部標準 DNA と Cy5 標識検査対象の混合物を用いた。1) 並びに 2) をセットとして各個人に各々行い各スポットの蛍光強度比を計算した。各個人において、上記 1) および 2) の両アレイで、変異が矛盾無く同定できたものの変異型候補とし、それらについては、再現性を確かめた。

この結果、14 種類の稀な変異型(上記集団で 1 例のみ同定されたもの)が同定された。家族調査の結果、子供に同定されたこれらの変異は、両親の少なくとも 1 名から遺伝していることを確認した。これらの遺伝的変異型について、パルスフィールドゲル電気泳動法を用いたサザン法、定量 PCR 法、FISH 法、および塩基配列の決定などを行い、各変異型の特徴付けを行った。この結果は、アレイ CGH 法により、少なくとも 50Kb 以上の変異を同定することが可能であることを示唆している。また、増幅型変異型の一例で、ゲノムコピー数の増加が、トランスクリプトームの上昇をもたらしていることも証明した。一方、250 個の多型変異型(2 名以上の子供に同定された)が 18 種の BAC クローンターゲット上で同定された。すなわち、一人当たり平均 3 個の変異型が存在した。これらの中には、多数の遺伝子を含んでいる領域に存在するものも含んでいるので、表現型(疾患なども含む)とコピー数の増減との関係を検索することも、今後の検討課題として興味あることである。

参考文献

1. Harada N, Takano J, Kondoh T, Ohashi H, Hasegawa T, Sugawara H, Ida T, Yoshiura K-I, Ohta T, Kishino T, Kajii T, Niikawa N, Matsumoto N. Duplication of 8p23.2: a benign cytogenetic variant? *Am J Med Genet* 111 (3): 285-288, 2002
2. Okamoto N, Toribe Y, Nakajima T, Okinaga T, Kurosawa K, Nonaka I, Shimokawa O, Matsumoto N. A girl with 1p36 deletion syndrome and congenital fiber type disproportion myopathy. *J Hum Genet* 47 (10): 556-559, 2002.
3. Sonoda T, Kouno K, Sawada K, Takagi J, Nunoi H, Harada N, Matsumoto N: Duplication (22)(q11.22-q11.23) without coloboma and cleft lip or palate. *Pediatr Int* 45 (1):97-99, 2003.
4. Ida T, Mihar N, Hayashitani M, Shimokawa O, Harada N, Samura O, Kubota T, Niikawa N, Matsumoto N. Functional Disomy for Xq22-q23 in a Girl with Complex Rearrangements of Chromosomes 3 and X. *Am J Med Genet* 120A:557-561, 2003
5. Harada N, Hatchwell E, Okamoto N, Tsukahara M, Kurosawa K, Kawame H, Kondoh T, Ohashi H, Tsukino R, Kondoh Y, Shimokawa O, Ida T, Nagai T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N. Subtelomere-specific Microarray-based Comparative Genomic Hybridization: A Rapid Detection System for Cryptic Rearrangements in Idiopathic Mental Retardation. *J Med Genet* 41(2): 130-136, 2004.
6. Iwakoshi M, Okamoto N, Harada N, Nakamura T, Yamamori S, Fujita H, Niikawa N, Matsumoto N. 9q34.3 deletion syndrome in three unrelated children. *Am J Med Genet* 126A(3): 278-283, 2004
7. Shimokawa O, Kurosawa K, Ida T, Harada N, Kondoh T, Miyake N, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N. Molecular characterization of inv dup del (8p): analysis of five cases. *Am J Med Genet* 128A(2):133-137, 2004
8. Miyake N, Harada N, Shimokawa S, Ohashi H, Kurosawa K, Matsumoto T, Fukushima Y, Nagai T, Shotelersuk V, Yoshiura K-i, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. On the Reported 8p22-p23.1 Duplication in Kabuki Make-up Syndrome (KMS) and its Absence in Patients With Typical KMS. *Am J Med Genet* 128A(2):170-172, 2004
9. Miyake N, Tonoki H, Gallego M, Harada N, Shimokawa S, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. Phenotype-genotype correlation in two patients with 12q proximal deletion. *J Hum Genet* 49(5):282-284, 2004
10. Kurosawa K, Harada N, Saitoh S, Sosonkina N, Niikawa N, Matsumoto N. Unmasking 15q12 Deletion Using Microarray-based Comparative Genomic Hybridization in a Mentally Retarded Boy With r(Y). *Am J Med Genet* 130A(3): 322-324, 2004
11. Harada N, Visser R, Dawson A, Fukamachi M, Iwakoshi M, Okamoto N, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. A 1-Mb critical region in 6 patients with 9q34.3 terminal deletion syndrome. *J Hum Genet* 49(8):440-444, 2004
12. Shimokawa O, Miyake N, Yoshimura T, Sosonkina N, Harada N, Mizuguchi T, Kondoh S, Kishino K, Ohta T, Visser R, Takashima T, Kinoshita A, Yoshiura K, Niikawa N, Matsumoto N. Molecular characterization of del(8)(p23.1p23.1) in a case of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet* 136A(1):49-51, 2005
13. Kosaki R, Kosaki K, Matsushima K, Mitsui N, Matsumoto N, Ohashi H. Refining chromosomal region critical for Down syndrome-related heart defects with a case of cryptic 21q22.2 duplication. *Congenit Anom* 45(2):62-64, 2005.

研究成果の今後期待される効果

2K アレイで明らかになったように、我々の開発したマイクロアレイシステムのゲノムコピー数異常同定の感度・精度は極めて高い。少なくともこれまでの解析から次への展開が可能である。

Angelman 症候群の責任領域を正確に絞り込み、Prader-Willi 責任領域から除外することで Prader-Willi 症候群責任領域への新たな知見を提供できる可能性が高い。精神遅滞において *DOCK3* の塩基配列異常が同定されれば、新たな精神遅滞の責任遺伝子の

一つが明らかとなる。さらに、作製が進行している 4K アレイを用いればより高精度に潜在的なゲノムコピー数異常の同定が可能である。これらのアレイを用いて、多臓器に症状を呈し複数の遺伝子の量的異常が疑われる奇形症候群を解析することで責任遺伝子同定に有用なゲノムコピー数異常を効率的に同定することが可能である。

ヒトゲノムには多くの欠失および重複多型が存在することが明らかになった。調査集団を更に拡大してスクリーニングを行えば、日本人におけるこれらの多型データベースが構築できる。このために必要な父-母-子供を一単位とした家族の細胞株を、約 1000 家族より既に樹立している。この種のデータベースの構築は、これから実施される、例えば「疾患関連遺伝子の単離」や「ガン関連遺伝子の単離」を行う際の重要なバックグラウンドデータとなる。すなわち、これらの遺伝子ハンティングにおいて、「多型変異」を「真の病因遺伝子」と誤解することは往々にしてあることである。しかしこの過誤は「日本人における多型コピー数変異型のデータベース」を参考にすれば防げるものが多々存在するものと考えられる。この意味でも、この研究は将来に繋がる基礎データを広く日本の研究者に提供する下地を作ったものと考えている。

3.4 大腸菌人工染色体 (BAC) によるゲノムライブラリーの作製

(有限会社 ジェノテックス 添田栄一)

細胞遺伝学で観察される染色体転座領域から疾病遺伝子を単離するためには、同領域近傍の物理地図の作成が欠かせない。このために BAC を選び、数百 Kb のスクリーニングとシーケンスによるドラフト解析を可能にした。本 CREST 研究前期では、ヒトゲノム解析計画に使用された RP11-BAC、RP1-6-PAC ライブラリーを染色体変異領域探索のマーカーとして提供した。これらのクローンがヒト染色体上に整列化され、現在ではゲノム CGH マイクロアレイ作製の鋳型として診断検出に役立っている。

疾病遺伝子の構造を解明するためには、変異ゲノム領域の BAC クローンを単離し、シーケンス解析する必要がある。まず、患者ゲノムの BAC ライブラリーを作製した。その行程は、1) 末梢血、あるいは細胞から巨大ゲノムを抽出し、2) 断片化後、BAC ライブラリーを構築し、3) 変異クローンをスクリーニングし、4) ショットガンによるシーケンス解析を行う体系を確立した。

(1)患者の末梢血、あるいは培養細胞からの巨大 DNA 抽出：リンフォブレップで白血球のみを精製する。 5×10^7 /ml の細胞を寒天に溶かし、プラグを作製する。プロテアーゼ K/サルコシン処理で巨大 DNA が抽出できる。

(2)BAC ゲノムライブラリーの作製：BAC のライブラリー作製技術は、当時、試行錯誤でたまたま出来上がるといった状況にあった。本研究で方法論を根本から見直し、平均 125kb のゲノムライブラリー作製をルーチン化した。なお、大きいライブラリーの作製は、空の BAC クローンがふえた。

(3)標的 BAC のスクリーニング：384 ウェロプレートに整列化した BAC ライブラリーから標的クローンを単離するために、PCR による二次スクリーニング法を考案した。ま

ず、384 プレーットのクローンを混ぜ、DNA を抽出。プレート選定の DNA プールとした。プレートの中のクローン座標決定には、縦横溝プレートを考案し、クローン PCR によるプレート座標決定を行った。

(4) シーケンスによるドラフト解析：大量培養と超遠心分離による BAC の精製がボトルネックであった。キアゲンカラムで簡略化し、シーケンス解析に用いた。以上の開発技術は、新川チームの疾患関連 BAC シーケンス解析に用いられた。

研究成果の今後期待される効果

染色体変異のゲノム解析をいかに簡略安定化するかが課題であったが、本研究ではその技術開発を可能にし、同時に、「早く、確実に、かつ、廉価」という目標を達成した。本技術は今後疾患解析研究に広く利用されることが期待される。

4. 研究参加者

① 分子遺伝学研究グループ

氏 名	所 属	役 職	研 究 項 目	参 加 時 期
新川 詔夫	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	教授	研究統括	H12.11.1～H17.10.31
松本 直通	横浜市立大学大学院 医学研究科	教授	位置的単離・機能解析	H12.11.1～H17.10.31
吉浦 孝一郎	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	助教授	切断点・欠失同定	H12.11.1～H17.10.31
木住野 達也	同 先導生命科学 研究支援センター	助教授	メチル化DNA解析	H12.11.1～H17.10.31
近藤 新二	同 先導生命科学 研究支援センター	助手	候補遺伝子解析	H17.4.1～H17.10.31
成富 研二	琉球大学医学部	教授	切断点・欠失同定	H12.11.1～H17.10.31
要 匡	琉球大学医学部	助教授	切断点・欠失同定	*H17.4.1～H17.10.31
太田 亨	北海道医療大学 個体差健康科学研究所	助教授	マイクロアレイ構築	H14.4.1～H17.10.31
塚元 和弘	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	教授	疾患遺伝子機能解析	H15.4.1～H17.10.31
添田 栄一	(有)ジェノテックス	研究員	試料のBACクローン化	H12.11.1～H17.10.31
高橋 規郎	放射線影響研究所	室長	マイクロアレイ解析	H13.4.1～H17.10.31
水口 剛	横浜市立大学大学院 医学研究科	助手	物理地図作成、疾患位置情報決定	H14.4.1～H17.10.31
Christophe Mapendano	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	CREST 研究補助員	候補遺伝子解析・BACライブラリースクリーニング	H14.4.1～H17.10.31
Nadiya Sosonkina	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	CREST 研究補助員	メチル化特異的マイクロアレイ構築	H15.4.1～H17.10.31
渡邊 章	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	CREST 研究補助員	データベース解析	H15.4.1～H17.10.31

氏 名	所 属	役 職	研 究 項 目	参 加 時 期
市川英三郎	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	CREST 研究補助員	連鎖解析	H16. 4. 1～H17. 10. 31
野村 昌代	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生	転座切断点解析	H15. 4. 1～H17. 10. 31
山崎 庸子	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生	メチル化DNA解析	H15. 4. 1～H17. 10. 31
菊池 妙子	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生	候補遺伝子解析	H15. 4. 1～H17. 10. 31
中島 光子	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生	連鎖解析	H16. 4. 1～H17. 10. 31
佐藤 大介	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生	転座切断点解析	H16. 4. 1～H17. 10. 31
三浦 生子	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生	連鎖解析	H16. 4. 1～H17. 10. 31
霜川 修	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生	FISH解析	H16. 4. 1～H17. 10. 31
Remco Visser	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	ポスドク	マイクロアレイ構築	H16. 4. 1～H17. 10. 31
野口 康子	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	CREST 研究補助員	チームの事務担当	H12. 11. 1～H17. 10. 31
楊井 直子	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	CREST 研究補助員	チームの研究補助	H13. 4. 1～H17. 10. 31
宮崎 和美	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	CREST 研究補助員	チームの研究補助	H13. 11. 1～H17. 10. 31
林田 惣一郎	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H12. 11. 1～H13. 3. 31
富田 博秋	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	助手		H12. 11. 1～H14. 3. 31
山崎 健太郎	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H12. 11. 1～H14. 3. 31
高野 潤	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H12. 11. 1～H14. 3. 31
黒滝 直弘	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H12. 11. 1～H15. 3. 31
茅島 智彦	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H12. 11. 1～H15. 3. 31
菅原 裕史	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H12. 11. 1～H15. 3. 31
山田 崇弘	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H13. 4. 1～H15. 3. 31
三輪 晋智	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H14. 4. 1～H15. 3. 31
渡辺 行朗	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H13. 4. 1～H15. 3. 31
小松 万樹	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H12. 11. 1～H14. 3. 31
上村 淳一	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H15. 4. 1～H16. 3. 31
Mohsen Ghadami	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	CREST 研究補助員		H12. 11. 1～H15. 6. 17
高木 直子	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	CREST 研究補助員		H15. 4. 1～H15. 10. 31

氏 名	所 属	役 職	研 究 項 目	参 加 時 期
木下 晃	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	助手		H12. 11. 1～H17. 3. 31
三宅 紀子	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	大学院生		H14. 4. 1～H17. 3. 31

②臨床細胞遺伝学研究グループ

氏 名	所 属	役 職	研 究 項 目	参 加 時 期
福島 義光	信州大学大学院 医学研究科	教授	症例収集、細胞不死化 FISH 解析	H12. 11. 1～H17. 3. 31
大橋 博文	埼玉小児医療センター	科長	症例収集、細胞不死化	H12. 11. 1～H17. 3. 31
阿部 京子	(株)九州 メディカルサイエンス	所長	核型診断、欠失同定	H12. 11. 1～H17. 3. 31
原田 直樹	(株)九州 メディカルサイエンス	課長	FISH 解析、切断点同定	H13. 4. 1～H17. 10. 31
永井 敏郎	獨協医科大学医学部	教授	症例収集、臨床情報収集	H14. 4. 1～H17. 10. 31
岡本 伸彦	大阪府立母子保健総合 医療センター	参事	症例収集、臨床情報収集	H15. 4. 1～H17. 3. 31
坂爪 悟	信州大学大学院 医学研究科	助手		H14. 4. 1～H15. 3. 31
山森 俊治	(株)三菱ビーシーエル	部長		H12. 11. 1～H13. 3. 31

5. 成果発表等

(1) 論文発表 (国内 1 件、海外 77 件)

(国内)

- 梶井正、黒木良和、新川詔夫、福島義光：先天異常症候群アトラス. 南江堂，東京，1998，2005.

(海外)

- Kato R, Kishibayashi J, Shimokawa O, Harada N, Niikawa N, Matsumoto N. Congenital glaucoma and Silver-Russell phenotype associated with partial trisomy 7q and monosomy 15q. *Am J Med Genet* **104 (4): 319-322, 2001**
- Kurotaki N, Harada N, Yoshiura K-I, Kishino T, Sugano S, Niikawa N, Matsumoto N: Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. *Gene* **279 (2): 197-204, 2001**
- Kayashima T, Matsuo H, Satoh A, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Niikawa N, Kishino T. Nonaka myopathy is caused by mutations in the UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene (GNE). *J Hum Genet* **47 (2): 77-79, 2002**
- Kondoh S, Sugawara H, Harada N, Matsumoto N, Ohashi H, Sato M, Kantaputra PN, Ogino T, Tomita H, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Yoshiura K-i. A novel gene is disrupted at a 14q13 breakpoint of t(2;14) in a patient with mirror-image polydactyly of hands and feet. *J Hum Genet* **47 (3): 136-139, 2002**

5. Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita H-A, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura K-I, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N. Haploinsufficiency of the NSD1 gene causes Sotos syndrome. *Nat Genet* 30 (4): 365-366, 2002
6. Harada N, Takano J, Kondoh T, Ohashi H, Hasegawa T, Sugawara H, Ida T, Yoshiura K-I, Ohta T, Kishino T, Kajii T, Niikawa N, Matsumoto N. Duplication of 8p23.2: a benign cytogenetic variant? *Am J Med Genet* 111 (3): 285-288, 2002
7. Sugawara H, Egashira M, Harada N, Jakobs TC, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, D'Urso M, Rinaldi MM, Ventruto V, Niikawa N, Matsumoto N. Breakpoint analysis of a familial balanced translocation t(2;8)(q31;p21) associated with mesomelic dysplasia. *J Med Genet* 39 (7): e34, 2002
8. Nagai T, Shimokawa O, Harada N, Sakazume S, Ohashi H, Matsumoto N, Obata K, Yoshino A, Murakami N, Murai T, Sakuta R, Niikawa N. Postnatal Overgrowth by 15q-trisomy and IUGR by 15q-monosomy due to Familial Translocation t(13;15): Dosage Effect of IGF1R? *Am J Med Genet* 113(2):173-177, 2002
9. Okamoto N, Toribe Y, Nakajima T, Okinaga T, Kurosawa K, Nonaka I, Shimokawa O, Matsumoto N. A girl with 1p36 deletion syndrome and congenital fiber type disproportion myopathy. *J Hum Genet* 47 (10): 556-559, 2002
10. Komatsu K, Nakamura N, Ghadami M, Matsumoto N, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Yoshiura K.-i. Confirmation of genetic homogeneity of nonsyndromic low-frequency sensorineural hearing loss by linkage analysis and a DFNA6/14 mutation in a Japanese family. *J Hum Genet* 47 (8): 395-399, 2002
11. Kayashima T, Katahira M, Harada N, Miwa N, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Nakamura Y, Kajii T, Niikawa N, Kishino T. Maternal isodisomy for 14q21-q24 in a man with diabetes mellitus. *Am J Med Genet* 111(1):38-42, 2002
12. Watanabe Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Ishikawa M, Niikawa N, Yoshiura K-i. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and its signaling pathway. *J Hum Genet* 47 (9): 478-483, 2002
13. Imaizumi K, Kimura J, Matsuo M, Kurosawa K, Masuno M, Niikawa N, Kuroki Y: Sotos syndrome associated with a de novo balanced reciprocal translocation t(5;8)(q35;q24.1). *Am J Med Genet* 107: 58-60, 2002.
14. Tomita H-A, Yamada K, Ghadami M, Ogura T, Yanai Y, Nakatomi K, Sadamatsu M, Masui A, Nanko S, Kato N, Niikawa N: Mapping of the wet/dry earwax locus to the pericentromeric region of chromosome 16. *Lancet* 359 (9322): 2000-2002, 2002
15. Matsumoto N, Niikawa N. Kabuki Make-up Syndrome: A Review. *Am J Med Genet* 117C(1):57-65, 2003
16. Höglund P, Kurotaki N, Kytölä S, Miyake N, Somer M, Matsumoto M. Familial Sotos syndrome is caused by a novel one base pair deletion of the NSD1 gene. *J Med Genet* 40 (1):51-54, 2003
17. Sonoda T, Kouno K, Sawada K, Takagi J, Nunoi H, Harada N, Matsumoto N: Duplication (22)(q11.22-q11.23) without coloboma and cleft lip or palate. *Pediatr Int* 45 (1):97-99, 2003
18. Kayashima T, Yamasaki K, Yamada T, Sakai H, Miwa N, Ohta T, Yoshiura KI, Matsumoto N, Nakane Y, Kanetake H, Ishino F, Niikawa N, Kishino T. The novel imprinted carboxypeptidase A4 gene (CPA4) in the 7q32 imprinting domain. *Hum Genet* 112(3):220-226, 2003
19. Kayashima T, Ohta T, Niikawa N, Kishino T: On the conflicting reports of imprinting status of mouse ATP10a in the adult brain: Strain-background-dependent imprinting? *J Hum Genet* 48(9):492-493; 2003
20. Kayashima T, Yamasaki K, Joh K, Yamada T, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Mukai T, Niikawa N, Kishino T: Atp10a, the mouse ortholog of the human imprinted ATP10C gene, escapes genomic imprinting. *Genomics* 81 (6): 644-647, 2003
21. Miyake N, Kurotaki N, Sugawara H, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Tsukahara T, Ishikiriyama S, Sonoda T, Miyoshi Y, Sakazume S, Fukushima Y, Ohashi H, Nagai T, Kawame H, Kurosawa K, Touyama M, Shiihara T, Okamoto N, Nishimoto J, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. Preferential paternal origin of microdeletion caused by prezygotic chromosome or

- chromatid rearrangements in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* 2(5):1331–1337, 2003
22. Kondoh Y, Toma T, Ohashi H, Harada N, Yoshiura K-i, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. Inv dup del(4)(p14->p16.3::p16.3->qter) With Manifestations of Partial Duplication 4p and Wolf-Hirschhorn Syndrome. *Am J Med Genet* 120A(1): 123–126, 2003
 23. Kayashima T, Yamasaki K, Joh K, Yamada T, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Mukai T, Niikawa N, Kishino T. Atp10a, the mouse ortholog of the human imprinted ATP10A gene, escapes genomic imprinting. *Genomics*. 81(6):644–647, 2003
 24. Ida T, Miharuru N, Hayashitani M, Shimokawa O, Harada N, Samura O, Kubota T, Niikawa N, Matsumoto N. Functional Disomy for Xq22–q23 in a Girl with Complex Rearrangements of Chromosomes 3 and X. *Am J Med Genet* 120A:557–561, 2003
 25. Sugawara H, Harada N, Ida T, Ishida T, Ledbetter DH, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. Complex low copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23. *Genomics* 82(2):238–44, 2003
 26. Kamimura J, Endo Y, Kurotaki N, Kinoshita A, Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Visser R, Ohashi H, Miyakawa K, Gerritsen J, Innes AM, Lagace L, Frydman M, Okamoto N, Puttinger R, Raskin S, Resic B, Culic V, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Ishikawa M, Niikawa N, Matsumoto N. Identification of 8 novel NSD1 mutations in Sotos syndrome. *J Med Genet* 40: e126, 2003
 27. Kurotaki N, Harada N, Shimokawa O, Miyake N, Kawame H, Uetake K, Makita Y, Kondoh T, Ogata T, Hasegawa T, Nagai N, Ozaki T, Touyama T, Shenhav R, Ohashi H, Medne L, Shiihara T, Ohtsu S, Kato Z, Okamoto N, Nishimoto J, Lev D, Miyoshi Y, Ishikiriyama S, Sonoda T, Sakazume S, Fukushima Y, Kurosawa K, Cheng J-F, Yoshiura K-i, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. Fifty microdeletions among 112 cases of Sotos syndrome: Low copy repeats possibly mediate the common deletion. *Hum Mut* 22(5):378–387, 2003
 28. Visser R, Matsumoto N. Genetics of Sotos syndrome (Invited review). *Curr Opin Pediatr* 15(6):598–606, 2003
 29. Nagai T, Matsumoto N, Kurotaki N, Harada N, Niikawa N, Ogata T, Imaizumi K, Kurosawa K, Kondoh T, Ohashi H, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Yokoyama T, Uetake K, Sakazume S, Fukushima Y, Naritomi K: Sotos syndrome and haploinsufficiency of NSD1: Clinical features of intragenic mutations and submicroscopic deletions. *J Med Genet* 40 (4): 285–289, 2003
 30. Shotelersuk V, Srichomthong C, Yoshiura K, Niikawa N: A novel mutation, 1234del(C), of the IRF6 in a Thai family with van der Woude syndrome. *Int J Mol Med* 11 (4): 505–507, 2003
 31. Peeters H, Debeer Ph, Wilquet V, Huysmans C, Parthoens E, Fryns JP, Gewillig M, Nakamura Y, Niikawa N, Van de Ven W, Devriendt K: PA26 is a candidate gene for heterotaxia in humans: Identification of a novel, PA26-related gene family in human and mouse. *Hum Genet* 112 (5–6): 573–580, 2003.
 32. Kamnasaran D, O'Brien PC, Zackai EH, Muenke M, Ferguson-Smith MA, Cox DW.: Rearrangement in the PITX2 and MIOL1 genes in a patient with a t(4;14) chromosome. *Eur J Hum Genet* 11: 315–324, 2003.
 33. Harada N, Hatchwell E, Okamoto N, Tsukahara M, Kurosawa K, Kawame H, Kondoh T, Ohashi H, Tsukino R, Kondoh Y, Shimokawa O, Ida T, Nagai T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N. Subtelomere-specific microarray-based comparative genomic hybridization: A rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. *J Med Genet* 41(2): 130–136, 2004
 34. Yamada T, Mitsuya K, Kayashima T, Yamasaki K, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Yamada H, Minakami H, Oshimura M, Niikawa N, Kishino T. Imprinting analysis of 10 genes and/or transcripts in a 1.5-Mb MEST-flanking region at human chromosome 7q32. *Genomics* 83(3):402–412, 2004
 35. Ghadami M, Majidzadeh-A K, Morovvati S, Damavandi E, Nishimura G, Kinoshita A, Najafi M-T, Niikawa N, Yoshiura K: Familial isolated congenital anosmia with morphologically normal olfactory bulb in two unrelated Iranian families: A new clinical entity? *Am J Med Genet* 127A (3): 307–309, 2004
 36. Mizuguchi T, Furuta I, Watanabe Y, Tsukamoto K, Tomita H, Tsujihata M, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Minakami H, Niikawa N, Yoshiura K: LRP5, low density lipoprotein receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density (BMD). *J Hum Genet* 49 (2): 80–86, 2004

37. Iwakoshi M, Okamoto N, Harada N, Nakamura T, Yamamori S, Fujita H, Niikawa N, Matsumoto N. 9q34.3 deletion syndrome in three unrelated children. *Am J Med Genet* 126A(3): 278-283, 2004
38. Kato R, Kawamura J, Sugawara H, Niikawa N, Matsumoto N. A rapid diagnostic method for a retrotransposal insertional mutation into the FCMD gene in Japanese patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 127A(1):54-57, 2004
39. Shimokawa O, Kurosawa K, Ida T, Harada N, Kondoh T, Miyake N, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N. Molecular characterization of inv dup del (8p): analysis of five cases. *Am J Med Genet* 128A(2):133-137, 2004
40. Miyake N, Harada N, Shimokawa S, Ohashi H, Kurosawa K, Matsumoto T, Fukushima Y, Nagai T, Shotelersuk V, Yoshiura K-i, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. On the Reported 8p22-p23.1 Duplication in Kabuki Make-up Syndrome (KMS) and its Absence in Patients With Typical KMS. *Am J Med Genet* 128A(2):170-172, 2004
41. Miyake N, Tonoki H, Gallego M, Harada N, Shimokawa S, Yoshiura K, Ohta T, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. Phenotype-genotype correlation in two patients with 12q proximal deletion. *J Hum Genet* 49(5):282-284, 2004
42. Okubo A, Miyoshi O, Baba K, Takagi M, Tsukamoto K, Kinoshita A, Yoshiura K, Kishino T, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N. A novel GATA4 mutation completely segregated with atrial septal defect in a large Japanese family. *J Med Genet* 41(7): E97, 2004
43. Kurosawa K, Harada N, Saitoh S, Sosonkina N, Niikawa N, Matsumoto N. Unmasking 15q12 deletion using microarray-based comparative genomic hybridization in a mentally retarded boy with r(Y). *Am J Med Genet* 130A(3): 322-324, 2004
44. Harada N, Visser R, Dawson A, Fukamachi M, Iwakoshi M, Okamoto N, Kishino T, Niikawa N, Matsumoto N. A 1-Mb critical region in 6 patients with 9q34.3 terminal deletion syndrome. *J Hum Genet* 49(8):440-444, 2004
45. Kamimura J, Wakui K, Kadowaki H, Watanabe Y, Miyake K, Harada N, Sakamoto M, Kinoshita K, Yoshiura K.-i, Ohta T, Kishino T, Ishikawa M, Kasuga M, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N. The IHPK1 gene is disrupted at the 3p21.31 breakpoint of t(3;9) in a family with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Genet* 49(7): 360-365, 2004
46. Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, Abifadel M, Harada N, Morisaki T, Allard D, Varret M, Claustres M, Morisaki H, Ihara M, Kinoshita A, Yoshiura K-i, Junien C, Kajii T, Jondeau G, Ohta T, Kishino T, Furukawa Y, Nakamura Y, Niikawa N, Boileau C, Matsumoto N. Heterozygous TGFB2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet* 36(8): 855-860, 2004
47. Ghadami M, Majidzadeh-A K, Morovvati S, Damavandi E, Nishimura G, Kinoshita A, Pasalar P, Komatsu K, Najafi MT, Niikawa N, Yoshiura K: An isolated congenital anosmia locus maps to 18p11.23-q12.2. *J Med Genet* 41: 299-303, 2004
48. Kinoshita A, Shirahama A, Miyahara A, Nishimura G, Haga N, Namba A, Ueda H, Hayashi H, Seidel J, Fukumaki Y, Ikegawa S, Niikawa N, Yoshiura K: TGFB1 mutations in four new families with Camurati-Engelmann disease: Confirmation of independently arising LAP-domain-specific mutations. *Am J Med Genet* 127A: 104-107, 2004
49. Niikawa N: Molecular basis of Sotos syndrome. *Horm Res 62 (Suppl, Proceedings of the 15th Novo Nordisk Symposium on Growth Hormone and Endocrinology: Advances in Dysmorphology, Malta, April 2-3, 2004): 60-65, 2004*
50. Okamoto N, Del Maestro R, Valero R, Monros E, Poo P, Kanemura Y, Yamasaki M. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of L1CAM. *J Hum Genet* 49:334-337, 2004
51. Visser R, Shimokawa O, Harada N, Kinoshita A, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N. Identification of a 3.0-kb major recombination hotspot in Sotos syndrome patients with a common 1.9-Mb microdeletion. *Am J Hum Genet* 76(1):52-67, 2005
52. Miyake N, Harada N, Okamoto N, Sonoda T, Naritomi K, Chinen Y, Kaname T, Tonoki H, Kondoh T, Kurosawa K, Visser R, Kinoshita A, Yoshiura K-I, Niikawa N, Matsumoto N. Four novel NIPBL mutations in Japanese patients with Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet* 135A(1):103-105, 2005
53. Shimokawa O, Miyake N, Yoshimura T, Sosonkina N, Harada N, Mizuguchi T, Kondoh S, Kishino K,

- Ohta T, Visser R, Takashima T, Kinoshita A, Yoshiura K, Niikawa N, Matsumoto N. Molecular characterization of del(8)(p23.1p23.1) in a case of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet* 136A(1):49-51, 2005
54. Boileau C, Jondeau G, Mizuguchi T, Matsumoto N. Molecular genetics of Marfan syndrome. *Curr Opin Cardiol* 20(3): 194-200, 2005
 55. Kosaki R, Kosaki K, Matsushima K, Mitsui N, Matsumoto N, Ohashi H. Refining chromosomal region critical for Down syndrome-related heart defects with a case of cryptic 21q22.2 duplication. *Congenit Anom* 45(2):62-64, 2005
 56. Kurotaki N, Stankiewicz P, Wakui K, Niikawa N, Lupski JR: Sotos syndrome common deletion is mediated by directly oriented subunits within inverted Sos-REP low-copy repeats. *Hum Mol Genet* 14 (4): 535-542, 2005
 57. Miura K, Niikawa N: Do monozygotic dizygotic twins increase after pregnancy by assisted reproductive technology? *J Hum Genet* 50 (1): 1-6, 2005
 58. Yamasaki Y, Kayashima T, Soejima H, Kinoshita A, Yoshiura KI, Matsumoto N, Ohta T, Urano T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Kishino T. Neuron-specific relaxation of Igf2r imprinting is associated with neuron-specific histone modifications and lack of its antisense transcript Air. *Hum Mol Genet (in press)*
 59. Machida H, Tsukamoto K, Wen CY, Shikuwa S, Isomoto H, Mizuta Y, Takeshima F, Murase K, Matsumoto N, Murata I, Kohno S, Wen CY. Crohn's disease in Japanese is associated with a SNP-haplotype of N-acetyltransferase 2 gene. *World J Gastroenterol* 11(31):4833-4837, 2005
 60. Machida H, Tsukamoto K, Wen C-Y, Narumi Y, Shikuwa S, Isomoto H, Takeshima F, Mizuta Y, Niikawa N, Murata I, Kohno S. Association of polymorphic alleles of CTLA4 with inflammatory bowel disease in the Japanese. *World J Gastroenterol* 11 (27): 4188-4193, 2005
 61. Saitoh S, Wada T, Okajima M, Takano K, Sudo A, Niikawa N: Uniparental disomy and imprinting defects in Japanese patients with Angelman syndrome. *Brain Develop* 27: 389-391, 2005
 62. Nagai T, Obata K, Tonoki H, Temma S, Murakami N, Katada Y, Yoshino A, Sakazume S, Takahashi E, Sakuta R, Niikawa N. Cause of sudden, unexpected death of Prader-Willi syndrome patients with or without growth hormone treatment. *Am J Med Genet A* 136 (1): 45-48, 2005
 63. Masuzaki H, Miura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshiura KI, Yoshimura S, Nakayama D, Mapendano CK, Niikawa N, Ishimaru T. Clinical Applications of plasma circulating mRNA analysis in cases of gestational trophoblastic disease. *Clin Chem* 51(7): 1261-1263, 2005
 64. Ohkubo K, Nagashima M, Naito Y, Taguchi T, Suita S, Okamoto N, Fujinaga H, Tsumura K, Kikuchi K, Ono J: Genotypes of the pancreatic beta-cell K-ATP channel and clinical phenotypes of Japanese patients with persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 62:458-65, 2005
 65. Iwanaga H, Tsujino A, Shirabe S, Eguchi H, Fukushima N, Niikawa N, Yoshiura K, Eguchi K: A large deletion involving the 5'-UTR in the spastin gene caused mild phenotype of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Am J Med Genet A* 133: 13-17, 2005
 66. Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yamasaki K, Yoshimura S, Miura S, Nakayama D, Mapendano CK, Niikawa N, Ishimaru T: Placental mRNA in maternal plasma and its clinical application to the evaluation of the placental status in a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clin Chem* 51: 923-925, 2005
 67. Okamoto N, Hatsukawa Y, Shiraishi J, Harada N, Matsumoto N. Chromosome 1q deletion and congenital glaucoma. *Pediatr Int* 47:477-479, 2005
 68. Kurosawa K, Kawame H, Okamoto N, Ochiai Y, Akatsuka A, Kobayashi M, Shimohira M, Mizuno S, Wada K, Fukushima Y, Kawawaki H, Yamamoto T, Masuno M, Imaizumi K, Kuroki Y. Epilepsy and neurological findings in 11 individuals with 1p36 deletion syndrome. *Brain Dev* 27:378-382, 2005
 69. Kurotaki N, Shen JJ, Touyama M, Kondoh T, Visser R, Ozaki T, Nishimoto J, Shiihara T, Uetake K, Makita Y, Harada N, Raskin S, Brown CW, Hoglund P, Okamoto N, Lupski JR. Phenotypic consequences of genetic variation at hemizygous alleles: Sotos syndrome is a contiguous gene syndrome incorporating coagulation factor twelve (FXII) deficiency. *Genet Med* 7:479-483, 2005
 70. Visser R, Shimokawa O, Harada N, Niikawa N, Matsumoto N. Non-hotspot-related breakpoints of common deletions in Sotos syndrome are located within destabilized DNA regions. *J Med Genet (in*

press)

71. Kanemoto N, Kanemoto K, Nishimura G, Kamoda T, Visser R, Shimokawa O, Matsumoto N. Nevo syndrome : a variant of Sotos syndrome? *Am J Med Genet (in press)*
72. Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Hirano A, Akita S, Kinoshita A, Kondo, S, Kishino, T, Uchiyama T, Niikawa N, Yoshiura K: PAX9 and TGFB3 are susceptible to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: Population-based and family-based candidate gene analyses. *J Hum Genet (in press)*
73. Higashimoto I, Yoshiura K, Higashimoto K, Hirakawa N, Soejima H, Totoki T, Mukai T, Niikawa N: The primary palmar hyperhidrosis locus maps to 14q11.2. *Am J Med Genet (in press)*
74. Yoshiura K, Kinoshita A, Ishida T, Ninokata A, Ishikawa T, Kaname T, Bannai M, Tokunaga K, Sonoda S, Komaki R, Ihara M, Saenko VA, Alipov GK, Sekine I, Komatsu K, Takahashi H, Nakashima M, Sosonkina N, Mapendano CK, Ghadami M, Nomura M, Linag D-S, Kim D-K, Ariuntuul G, Natsume N, Ohta T, Tomita H, Kikuchi M, Hirayama K, Ishibashi M, Takahashi A, Saitou N, Saito S, Nakamura Y, Niikawa N: A single nucleotide polymorphism in the ABCC11 gene is the determinant of the human earwax type. *Nat Genet (in press)*
75. Nomura M, Hamasaki Y, Ktayaama I, Niikawa N, Yoshiura K: Eosinophil infiltration and amyloidosis in three patients with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa from a Japanese family *J Hum Genet (in press)*
76. Matsuzawa N, Natsume N, Niikawa N, Shimozaoto K, Yoshiura K: A novel missense mutation (E349V) in a large family with Van der Woude syndrome: Linkage and mutation studies with fingernail DNA *J Dent Res (in press)*
77. Watanabe A, Akita S, Natsume N, Nakano Y, Niikawa N, Uchiyama T, Yoshiura K: A heterozygous missense mutation in RYK may cause nonsyndromic cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J (in press)*

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待、口頭講演 (国内 37 件、海外 8 件)

1. 新川詔夫：特別講演「小児神経疾患のゲノム医学」招待講演、小児神経学会総会、岡山市、平成 13 年 6 月 7 日、2001
2. 新川詔夫：特別講演「骨系統疾患の位置的単離」分子病理学研究会、秋田田沢湖、平成 13 年 6 月 19 日、2001
3. 新川詔夫：特別講演「骨系統疾患の原因遺伝子の単離と解析」日本医学会特別シンポジウム、札幌市プリンスホテル、平成 13 年 9 月 6 日、2001
4. 新川詔夫：特別講演「神経疾患および骨系統疾患遺伝子のポジショナルクローニング：発症機構からゲノム創薬へ発展できるか？」日本薬学会シンポジウム、ゲノム創薬、長崎大学ポンペ会館、2001
5. 菅原裕史、松本直通、江頭昌幸、原田直樹、新川詔夫：ポジショナルクローニングによる肢中部短縮型骨格異形成症の原因遺伝子単離の試み。第 46 回日本人類遺伝学会、大宮市、10 月 2-5 日、2001
6. 霜川 修、原田直樹、松本直通、新川詔夫、大橋博文、永井敏郎：重度発育遅延を呈した del(4)(q21.21q22.2)症例における欠失遺伝子。第 46 回日本人類遺伝学会、大宮市、10 月 2-5 日、2001
7. 黒滝直弘、新川詔夫、吉浦孝一郎、松本直通、新川詔夫、木住野達也：Sotos 症候群患者に合併した染色体転座の 5q35 切断点クローニング。第 46 回日本人類遺伝学会、大宮市、10 月 2-5 日、2001
8. Niikawa N: Invited Speaker [Positional Cloning of Genetic Diseases]、湖南医科大学分子遺伝学研究所 15 周年記念シンポジウム、12 月 23-27 日、2001
9. 黒滝直弘、新川詔夫、吉浦孝一郎、木住野達也、松本直通、今泉清、黒澤健司、大橋博文、近藤達郎、杉本健郎、園田徹、知念安紹、塚原正人、永井敏郎、成富研二、長谷川知子、福岡義光、蒔田芳男、升野光雄：Sotos 症候群患者に合併した染色体転座の 5q35 切断点クロー

ーニング. Medical Genetics 研究会 (平成 14 年 6 月、東京大学医科学研究所講堂)

10. Niikawa: Positional Cloning of Disease Gene. Invited Speaker at the Singapore-Japan Symposium on Biomedical Sciences – From academia to industry in genomic medicine. March 25-26, 2002
11. Kurotak N, Harad N, Niikawa N, Matsumoto N: Sotos syndrome is caused by haploinsufficiency of the *NSD1* gene. The 51st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (October 11-17, 2002, Baltimore)
12. 三宅紀子、菅原祐史、黒滝直弘、松本直通、新川詔夫: Sotos 症候群における *NSD1* 遺伝子を含む新規欠失の親起源. 第 47 回日本人類遺伝学会、名古屋、平成 14 年 11 月 12-15 日
13. 原田直樹、三宅紀子、新川詔夫、松本直通、霜川 修: マイクロアレイ CGH 法を用いたゲノム解析の試み. 第 47 回日本人類遺伝学会、名古屋、平成 14 年 11 月 12-15 日
14. 黒滝直弘、原田直樹、新川詔夫、松本直通、霜川修: *NSD1* 遺伝子のハプロ不全がソトス症候群の原因である. 第 47 回日本人類遺伝学会、名古屋、平成 14 年 11 月 12-15 日
15. Matsumoto N, Kurotaki N, Miyake N, Niikawa N, Höglund P: Familial Sotos syndrome is caused by a novel one base pair deletion of the *NSD1* gene. 第 47 回日本人類遺伝学会、名古屋、平成 14 年 11 月 12-15 日
16. 原田直樹、黒滝直弘、松本直通、新川詔夫: *NSD1* 遺伝子のハプロ不全がソトス症候群の原因である. 第 9 回日本遺伝子診療学会、京都国際会議場 平成 14 年 12 月 18-20 日
17. 新川詔夫、黒滝直弘、原田直樹、松本直通、霜川修: Sotos 症候群の分子診断. 第 9 回九州出生前診断研究会 (平成 14 年 11 月 鹿児島市)
18. 新川詔夫: 先天異常症原因遺伝子の位置的単離. シンポジウム「疾患関連遺伝子同定の基本戦略」、第 25 回日本分子生物学会年会、横浜ホテルパシフィコ、(平成 14 年 12 月 12 日)
19. Matsumoto N: Haploinsufficiency of the *NSD1* gene causes Sotos syndrome. Invited speaker, The 4th Annual GeNeSIS Symposium and Investigators Meeting, May 21-24, Vancouver, Canada, 2003
20. Mohsen Ghadami, Keyvan Majidzadeh-Ardabili, Saeid Morovvati, Gen Nishimura, Norio Niikawa, Koh-ichiro Yoshiura: Familial isolated congenital anosmia with morphologically normal olfactory bulb in two unrelated Iranian families. 53th ASHG 2003 Los Angeles November 4-8, 2003
21. 松本直通: ソトス症候群は *NSD1* のハプロ不全が原因である. 第 48 回日本人類遺伝学会 (平成 15 年 10 月 21-24 日)
22. 吉浦孝一郎: 耳垢形質の決定遺伝子のマッピング・クローニング. 第 48 回日本人類遺伝学会 (平成 15 年 10 月 21-24 日)
23. 三宅紀子、原田直樹、霜川 修、新川詔夫、松本直通: マイクロアレイ CGH による歌舞伎メーキャップ症候群の解析. 第 48 回日本人類遺伝学会 (平成 15 年 10 月 21-24 日)
24. Mohsenn Ghadami、西村 玄、新川詔夫、吉浦孝一郎: A new type of familial isolated congenital anosmia with morphologically normal olfactory bulb in two unrelated Iranian families. 第 48 回日本人類遺伝学会 (平成 15 年 10 月 21-24 日)
25. 霜川修、黒澤健司、近藤達郎、菅原裕史、原田直樹、三宅紀子、新川詔夫、松本直通: Inv dup (8p) 家系の分子細胞遺伝学的解析 (第 3 報): 逆位重複発生機構. 第 48 回日本人類遺伝学会 (平成 15 年 10 月 21-24 日)
26. 原田直樹、新川詔夫、松本直通、岡本伸彦、塚原正人、黒澤健司、川目裕、近藤達郎、大橋博文、近藤油喜、霜川修、井田知子: マイクロアレイ CGH 法による微細染色体再構成の検出. 第 48 回日本人類遺伝学会 (平成 15 年 10 月 21-24 日)
27. 上村淳一、黒滝直弘、三宅紀子、霜川 修、原田直樹、Remco Visser、吉浦孝一郎、太田亨、木住野達也、新川詔夫、松本直通: ソトス症候群 8 症例における *NSD1* 遺伝子変異の同定. 第 48 回日本人類遺伝学会 (平成 15 年 10 月 21-24 日)
28. Remco Visser、黒滝直弘、新川詔夫、松本直通: Characterization of breakpoint regions of the common microdeletion in Sotots Syndrome. 第 48 回日本人類遺伝学会 (平成 15 年 10 月 21-24 日)
29. Nadiya Sosonkina、三宅紀子、松本直通、新川詔夫: Development of *NSD1* exon-specific microarray for detection of intragenic deletions in Sotos patients. 第 48 回日本人類遺伝学会 (平成 15 年 10 月 21-24 日)

30. 松本直通、原田直樹、岩越美恵、岡本伸彦、中村剛史、山森俊治、藤田弘子：マイクロアレイ CGH 法および全サブテロメア FISH 法を用いて同定された新規 MCA/MR 症候群:9q34.3 テロメア欠失。第 13 回日本人類遺伝学会 Medical Genetics 研究会（東京大学医科学研究所、平成 15 年 6 月 19-20 日）
31. Matsumoto N: Genetic causes of Sotos syndrome. Invited speaker, Symposium at the 3rd Biennial Scientific Meeting Asia Pacific Paediatric Endocrine Society, Sept 24-26, Kobe, 2004, Kobe, Japan.
32. Niikawa N: Molecular basis of Sotos syndrome. Invited speaker at the 15th Novo Nordisk Symposium on Growth Hormone and Endocrinology, 2-3 April, 2004, Malta
33. Miyake N, Harada N, Shimokawa O, Sosonkina N, Ookubo A, Matsumoto N, Niikawa N. No complication of 8p22-23.1 duplication in 28 Japanese patient with Kabuki make-u syndrome. 54th ASHG 2004 Toronto, Canada, October 26-30, 2004
34. Visser R, Niikawa N, Matsumoto N. Identification and characterization of the breakpoint region in a Japanese Sotos syndrome patient with a common microdeletion. 54th ASHG 2004 Toronto, Canada, October 26-30, 2004
35. 原田直樹、Remco Visser、Angie Dawson、深町 亮、岩越美恵、岡本伸彦、新川詔夫、松本直通：9q34.3 欠失症候群 6 症例における共通欠失領域の同定。第 49 回日本人類遺伝学会（平成 16 年 10 月 14-15 日）
36. 霜川 修、三宅紀子、Nadiya Sosonkina、原田直樹、近藤達郎、岡本伸彦、園田 徹、太田 亨、福嶋義光、新川詔夫、松本直通：高精度 BAC-FISH パネルを用いた染色体構造異常の解析。第 49 回日本人類遺伝学会（平成 16 年 10 月 14-15 日）
37. Nadiya Sosonkina、三宅紀子、新川詔夫、松本直通：マイクロアレイ CGH 法によるメチル化領域の検出。第 49 回日本人類遺伝学会（平成 16 年 10 月 14-15 日）
38. 三宅紀子、Nadiya Sosonkina、霜川 修、大久保愛子、原田直樹、松本直通、新川詔夫：歌舞伎メーキャップ症候群における 8p22-23.1 領域のゲノム解析。第 49 回日本人類遺伝学会（平成 16 年 10 月 14-15 日）
39. Remco Visser、新川詔夫、松本直通：Identification of the junctional fragment in a Japanese Sotos syndrome patient with a common microdeletion involving NSD1. 第 49 回日本人類遺伝学会（平成 16 年 10 月 14-15 日）
40. 松本直通、大久保愛子、三好 修、馬場是明、吉浦孝一郎、松本直通：新規 GATA4 変異と完全に連鎖した家族性心房中隔欠損症の一例。第 49 回日本人類遺伝学会（平成 16 年 10 月 14-15 日）
41. 新川詔夫 特別講演 先天異常原因遺伝子の単離・同定と遺伝子型・表現型相関。第 47 回日本先天代謝異常学会（平成 16 年 11 月 11-13 日：宇都宮）
42. Sosonkina N, Miyake N, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: Genome-wide screening for novel DMR using methylation-sensitive microarray CGH detection system. 第 50 回日本人類遺伝学会（平成 17 年 9 月 19-22 日）
43. 新川詔夫、駒木亮一、園田俊郎、平山謙二、石田貴文、斉藤成也、吉浦孝一郎：世界民族集団における乾型アリの頻度とモンゴロイドの移住・拡散第 50 回日本人類遺伝学会（平成 17 年 9 月 19-22 日）
44. 吉浦孝一郎、木下 晃、斉藤成也、徳永勝士、中村祐輔、新川詔夫：耳垢型決定遺伝子の同定第 50 回日本人類遺伝学会（平成 17 年 9 月 19-22 日）
45. 中島光子、中野基、平野明喜、吉浦孝一郎、新川詔夫：先天性眼瞼下垂症の原因遺伝子単離を目的としたゲノムワイド連鎖解析 50 回日本人類遺伝学会（平成 17 年 9 月 19-22 日）

(3)特許出願

①国内出願（4件）

1. 「核酸、当該核酸からなるプローブ、及び当該プローブを用いたスクリーニング法」
出願番号：特願 2002-323253
出願年月日：2002 年 11 月 7 日
出願者：国立大学法人長崎大学
発明者：松本直通・新川詔夫
2. 「マルファン症候群診断用プローブ、及び当該プローブを用いたスクリーニング法」
出願番号：特願 2004-158099
出願年月日：2004 年 6 月 2 日
出願者：国立大学法人長崎大学
発明者：新川詔夫・松本直通
3. 「耳垢型又は腋下臭症の評価方法」
出願番号：特願 2005-178563
出願年月日：2005 年 6 月 17 日
出願者：国立大学法人長崎大学
発明者：新川詔夫・吉浦孝一郎
4. 「ソトス症候群診断プローブ」
出願番号：特願 2001-385491
出願年月日：2001 年 12 月 19 日
出願者：国立大学法人長崎大学
発明者：松本直通・新川詔夫

②海外出願（2件）

1. 「Nucleic acid, probe comprising the nucleic acid and screening method using the probe」
国際出願番号：No. 02258404.9-
出願年月日：2003 年 2 月 7 日
出願者：国立大学法人長崎大学
発明者：松本直通・新川詔夫
2. 「マルファン症候群診断用プローブ、及び当該プローブを用いたスクリーニング法」
国際出願番号：PCT/JP2005/010213
出願者：国立大学法人長崎大学、共同出願人 INSRM (France)
発明者：松本直通・新川詔夫・Catherine Boileau・Gwenaielle Beroud
・Guillaume Jondeau

(4) 受賞等

①受賞

松本直通：2003 年度日本人類遺伝学会奨励賞「Sotos 症候群の原因遺伝子のポジショナルクローニングと遺伝子欠失機構の解明」

②新聞報道

1. 平成 14 年 3 月 23 日掲載、毎日新聞（31 面）「乳児に過度な成長「ソトス症候群」特定遺伝子の異常 長崎大原研グループ解明」
2. 平成 14 年 3 月 23 日掲載、読売新聞「ソトス症候群 原因解明 長崎大グループ 異常遺伝子を発見」
3. 平成 14 年 4 月 2 日掲載、朝日新聞（10 面）「ソトス症候群の原因遺伝子特定 長崎大研究グループ」
4. 平成 14 年 3 月 21 日掲載、長崎新聞（3 面）「ソトス症候群 原因遺伝子を発見 長崎大グループ 治療法開発に期待」
5. 平成 14 年 4 月 8 日掲載、河北新報「ソトス症候群遺伝子を発見 長崎大グループ」
6. 平成 14 年 3 月 25 日掲載、日本工業新聞「長崎大 原因遺伝子を特定 脳性巨人症 早期診断が可能に」
7. 平成 14 年 3 月 25 日掲載、Yahoo Japan News（インターネット記事）、「脳性巨人症の原因遺伝子を特定＝早期診断が可能に一長崎大」
8. 平成 14 年 3 月 22 日、NHK ニュース速報「ソトス症候群の原因遺伝子長崎大で発見」
9. 平成 14 年 10 月 31 日掲載、日刊工業新聞「脳性巨人症 DNA 診断法を確立 長崎大ゲノム地図で異常解明」
10. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、朝日新聞（3 面）「マルファン症候群原因遺伝子発見」
11. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、毎日新聞（2 面）「身長伸び心臓病など「マルファン症候群」新たな原因遺伝子」横浜市大などのチームが特定」
12. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、日刊工業新聞（4 面）「マルファン症候群 2 型の原因解明-情報伝達物質の受容体遺伝子の損傷や変異」
13. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、長崎新聞（25 面）「先天性疾患の原因遺伝子 新川長大教授ら特定」
14. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、日本経済新聞（38 面）「先天性疾患の原因遺伝子特定」
15. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、北海道新聞「体が細長く突然死も「マルファン症候群」原因遺伝子を特定」
16. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、化学工業新聞「遺伝病マルファン症候群「2 型」の原因遺伝子発見 JST 研究チーム 確定診断・予防に道」
17. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、日経産業新聞（11 面）「突然死招く「マルファン症候群」新たな原因遺伝子発見 横浜市大と長崎大」
18. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、asahi.com（インターネット記事）「リンカーンも発症？のマルファン症候群、原因遺伝子発見」
19. 平成 16 年 7 月 5 日掲載、Yahoo Japan News（インターネット記事）「先天性疾患の遺伝子特定 マルファン症候群」

(5)その他特記事項

本研究により FISH 法により Sotos 症候群の確定診断が可能になった。現在、*MSDI* を含む FISH 用プローブの特許出願中であるが、米国アボット（旧 Vysis）社が同特許権を使用し、プローブを製品化する方向で交渉が進行中である。

6. 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年 月 日	名 称	場 所	参加人数	概 要
2002 年 3 月 30 日	戦略的基礎研究推進事業（CREST）シンポジウム「メンデル細胞遺伝学」	学士会館、東京	約 50 名	Hans Hilger Ropers・マックスプランク研究所長(Berlin)を招聘し、日欧における染色体転座と疾患遺伝子探索の現状を比較・検討し、本研究の進展に備えた

(2)招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招 聘 の 目 的	滞 在 先	滞 在 期 間
Dr. John Clayton Carey	日米における染色体転座と疾患遺伝子探索の現状比較	長崎大学	H13.11/16-18
Dr. Hans-Hilger ROPERS	日欧における染色体転座と疾患遺伝子探索の現状比較	CREST シンポジウム、東京	H14.3/29-4/2
Dr. Vorasuk Shotelersuk	タイ人患者試料の解析	長崎大学	H14.7/15-21
Dr. Thanh H. Vu	米国における染色体転座と疾患遺伝子探索の現状	長崎大学	H14.12/15-17
Dr. Joseph Wagstaff	日米における染色体転座と疾患遺伝子探索の現状比較	長崎大学	H14.12/14-17
澤 明 先生	日米における染色体転座と疾患遺伝子探索の現状比較	長崎大学	H15.4/13-14
Dr. Jia-Woei Hou	台湾人患者試料の解析	長崎大学	H16.6/22-23
Dr. Ariuntuul Garidkhuu	モンゴル人患者試料の解析	長崎大学	H17.3/7-10
Dr. Kim Dae Kwang	韓国人患者試料の解析	長崎大学	H17.2/20-22
Dr. Kim Dae Kwang	韓国人患者試料の解析	長崎大学	H17.7/24-29

7. 結び

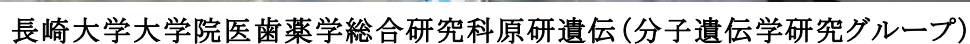
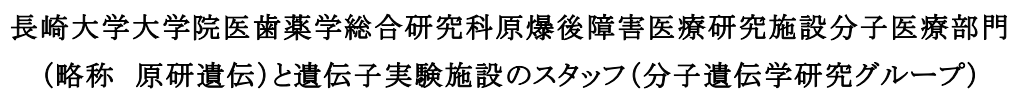
本研究の開始当初に立てた戦略の基本は「希有な事例から普遍化する」というものでした。ある疾患の大集団の解析から原因遺伝子を探索する手法は我が国では不利な面があり、この戦略による遺伝子ハンティング競争では欧米に勝利する可能性は小さいと常々考えていました。本研究チームが勝つ場面の1つは上記の戦略であり、その有利な点は「唯一人の特殊例でも疾患遺伝子を単離・同定できる」ことです。いくつかの疾患においては事実そうになりました。この種の疾患や発端となる患者の発見は、臨床家の力量に一方的に依存しますから、研究開始当初は目標とする疾患は不明瞭でしたが、優秀な臨床細胞遺伝学研究グループの参加者に恵まれて、多くの患者の発掘があり目標は研究の進展とともに明確になってきました。疾患は希少でも、得られた成果の一部の波及効果はかなり大きいと考えます。例えば、Sotos 症候群の原因遺伝子 *NSD1* は、その後、欧米の研究者によって注目され、最近ではメチルトランスフェラーゼ活性のあることが明らかになり、クロマチンの制御に関係することが明らかとなりました。この領域はさらに発展することでしょう。また、Marfan 症候群 2 型の原因遺伝子 *TGFBR2* は別の骨系統疾患でも変異が明らかとなり、腫瘍以外の Tgf- β シグナル伝達系の役割に関する新知見の確立に貢献しました。これらのことから、本研究の目的の大半は達成できたと考えています。

ゲノム科学が巨大化した現在、ある目標をもった継続した研究は、通常の科学研究費ではその達成が困難になってきています。その意味で、ある程度研究代表者が自由裁量可能で継続的な大型研究費である戦略的創造研究推進事業 (CREST) の存在意義は非常に大きいと思います。本チームでも目標達成の他に、若手研究者の育成などの面でも、大きな恩恵を受けました。つまり、かなり不自由なく研究資材を利用できましたし、若手研究者の海外派遣も実現されました。今後も、ぜひ本事業が制度として継続されることを切に願うものです。この意味では、平成 18 年度から、発展研究 (SORST) の制度自体が廃止されことは残念でなりません。我が国の研究活動の停滞が危惧されます。

以下の写真は、複数の施設に分かれていますが、本チームの参加者の皆さんです。彼ら優秀なスタッフに恵まれて目標が達成できたと思います。

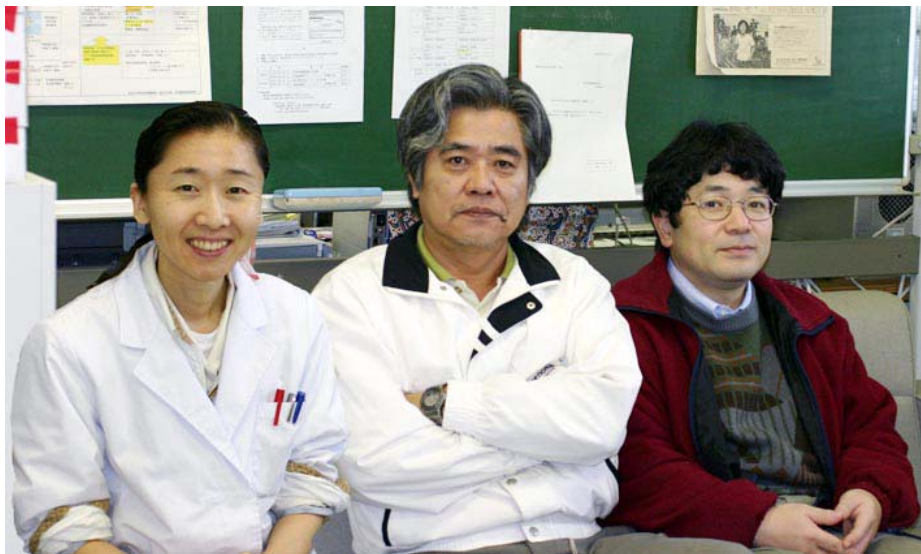
最後に、本チームを陰で支えていただいた「ゲノムの構造と機能」領域代表・大石道夫先生、「かずさ研究事務所」牧口信義技術参事、渡辺昇事務参事、また、本チームの事務スタッフである野口康子さん、研究補助員の宮崎和美さん、楊井直子さんに深く感謝いたします。

August 23, 2005





横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学部門
(松本直通研究室) の皆さん (分子遺伝学研究グループ)



琉球大学医学部医科遺伝学教室(成富研二研究室)の皆さん
(臨床細胞遺伝学グループ、平成 17 年度から分子遺伝学研究グループ)



埼玉小児医療センター遺伝科の皆さん(臨床細胞遺伝学研究グループ)