

多発家系を基盤にした単・少・多因子疾患関連遺伝子の探索

●新川 詔夫¹⁾ ◆太田 亨¹⁾ ◆三輪 晋智²⁾ ◆木下 晃²⁾

1) 北海道医療大学健康科学研究科 2) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

<研究の目的と進め方>

単因子・寡少因子・多因子疾患多発家系のゲノム解析により疾患座の局在を明らかにし、次いで疾患関連遺伝子を単離・同定し、発症機構を明らかにすることで医療への応用を図る。このため(1) 遺伝子病を合併した染色体構造異常症例からの疾患遺伝子単離、(2) 連鎖解析・候補遺伝子解析による単因子疾患原因遺伝子の単離、(3) 罹患同胞対・関連解析による少・多因子疾患感受性遺伝子の特定を行う。

<2007年度の研究の当初計画>

染色体構造異常の解析：BAC クローンをを用いる FISH 解析で切断点領域を同定、同時にゲノム CGH マイクロアレイによって微細欠失の有無を同定する。対象疾患は inv ins(3;7) (q21;q32q21.1) を合併する裂手裂足症、複雑転座 t(8;18) (q24.1;q21.2) を合併する Kabuki 症候群、逆位 inv(17) (q21.31q23.1) をもつ全爪低形成症である。

遺伝学的連鎖解析：マイクロサテライトマーカーを利用したアレルタイピング・ハプロタイプ解析を行う。対象疾患は家族性眼瞼下垂症、下顎前突症、4 型合指症、1 型合指症、一過性運動誘発性コレオアテトーシス (PKC)、家族性リポジストロフィー様疾患などである。

関連・罹患同胞対解析：男性型禿頭症、Dupuytren 拘縮症などを対象に罹患同胞対あるいは症例・対照を集積し、Affimetrix 社の 50-500K Array を用いて SNP 解析を行い、感受性遺伝子を特定する。

<2007年度の成果>

染色体異常からの疾患遺伝子の単離と同定：

(a) t(3;18) をもつ Opitz C 症候群患者の 3q 切断点から遺伝子 TACTILE を同定した。切断点はエクソン 5 内に存在した。患者細胞における遺伝子発現は正常の 50% に低下していた。核型正常患者 1 人に新生のヘテロ接合性ミスセンス変異 (839C>T, T280M) を認めたが、健常日本人 420 人にみられなかった。機能解析では、遺伝子産物 CD96 は細胞接着・増殖関連蛋白であり、変異をもつ患者に接着・増殖能の低下を認めた。患者 2 名にイントロン 6 の 5 塩基挿入 (c.856-80insTTATG) のホモ接合を同定したが、一般集団中のアレルの頻度は 0.202 であり SNP だと判定した。18 名の白人患者の変異解析では 839C>T 変異はみられなかった。

(b) ins(3;7) をもつ裂手裂足患者から 7q 切断点の同定を行った。切断点上には遺伝子はなかったが、近傍の EST から新規遺伝子 Y を単離した。核型正常の裂手裂足患児 2 人にエクソン 6 内の点変異 (C>T) またはエクソン 7 内の点変異を認めたが、健常人 120 人にはみられなかった。

(c) t(8;18) をもち、多発性外骨種を合併する Kabuki 症候群患者の切断点解析を行った。FISH 解析で 8q 切断点より約 13Mb 遠位に存在する *EXT1* の欠失を検出したが *TRPS1* は存在した。2.2k BAC マイクロアレイ CGH で、8q 切断点遠位に 5.5Mb 欠失、18q 切断点に 1.5Mb 欠失を確認した。さらに隣接 BAC による FISH

解析により、8q 切断点遠位側に 1.1Mb の欠失、0.7Mb の非欠失領域を挟んだ遠位側に 4.3Mb 欠失の存在を確認した。また 18q 切断点欠失は 1.5Mb のサイズであることを確認した。欠失領域内には計 24 個の既知遺伝子が存在するが、核型正常の Kabuki 症候群患者において、そのうち *TRPS1* と *COL14A1* を含む 11 遺伝子の変異解析を行い変異はみられなかった。

(d) 特異顔貌と爪低形成および inv(17)(q21.31q23.1) をもつ患者の逆位切断点を解析した。17q21.2 切断点領域は keratin 遺伝子クラスターを含み、17q23.2 切断点は *BCAS3* と *TBX4* の一部を含むことが判明した。患者の爪形成不全は、逆位により keratin 関連遺伝子の 1 つが断裂されたことが原因だと考えられる。

単因子疾患における連鎖解析：

(a) 4 型合指症：5 世代 8 名の罹患者がいる家族の連鎖解析で、7q36 の D7S3070 と D7S559 間の 17cM 領域において最大 LOD 得点 =1.613 (組換え率 =0.00、浸透率 =1.00) を得た。同領域の候補遺伝子 *LMBR1*、*SHH*、*ZRS* には変異はみられなかった。

(b) 1 型合指症罹患者家族の連鎖解析で 4 ヶ所の候補領域を見出した。

(c) PKC の新規の 5 家族における連鎖解析で、従来の PKCCR に再びマップされた。PKCCR 付近の計 158 遺伝子 (計 1588 エクソン) の変異解析では変異は同定されなかった。

(d) 30 名の Kabuki 症候群患者において、16 種の RAS-MAPK シグナル伝達系遺伝子の候補遺伝子解析を行った。29 種の塩基置換を同定したが、2 種の稀なバリエーションの他全て既知の SNP であった。

(e) 2000 年に筆者らが報告した常染色体優性の後極性白内障座と同じ領域に白人家系の白内障がマップされたのを受け、候補遺伝子探索で両家系に CHMP4B 遺伝子の点変異を同定した。

少・多因子疾患における関連解析：

(a) Dupuytren 拘縮症患者 70 名、対照 70 名を集積し、HapMap データを参照して 16q の候補領域中 524 SNP 部位における関連解析を INVADER 法で行った。5 つの SNP 領域が P <0.01 を示し、このうち候補遺伝子中に局在する 2 つの SNP (rs2111114 と rs8063241) の P 値は各々 0.0055 と 0.0014 であった。一方、患者 81 名と対照者 66 名において、P が低値の 2 種 SNP と 7 種の周辺 SNP を追加してアレル型との関連解析、ハプロタイプ解析、連鎖不平衡解析を行ったが P 値はいずれも有意ではなかった。

(b) 173 名の産婦および 79 名の腋窩アポクリン腺除去手術を受けた臭汗症患者において、腋窩臭症と湿型耳垢型との関連解析を行った。湿型耳垢型は *ABCC11*-SNP の遺伝子型で判定した。上記 2 集団では各々非常に強い相関を示した (p < 5.0 × 10⁻⁹ および p < 3.0 × 10⁻²⁵)。したがって、湿型耳垢型は腋窩臭症の必要条件である。

<国内外での成果の位置づけ>

上記疾患の責任・感受性遺伝子はいずれも未知のものである。

Kabuki 症候群、裂手裂足症、Dupuytren 拘縮症などは国外でもその解析が行われているが、いずれも結論は得られていない。連鎖解析や関連解析は国内外で多数の研究がある。染色体異常からの疾患遺伝子の単離と同定は国内では東京医科歯科大学以外に研究がない。しかし海外では多数の研究拠点が有り、多くの研究成果を挙げている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

裂手裂足症では、切断点からの候補遺伝子の同定には成功したが、現在までに調べた限り、他の患者には遺伝子変異は同定されなかった。このことは、本症候群には異質性があるのか、隠された特殊な変異があるのかが問題である。Kabuki 症候群においては、同定した複雑欠失は予想外であり、欠失内の候補遺伝子には調べた限り変異はみられない。現在 *DCC* と *CSMD3* の変異解析を続行中である。PKC の変異解析は困難を極めている。過去のマップを詳細に調べた結果、データの一部に誤りがあった。男性型禿頭症の 3 大家系を集積したが、その解析は未着手である。Dupuytren 拘縮症では、得られたデータの Bonferoni 法による P 値補正の結果、有意差は消失した。

<今後の課題>

染色体異常の解析：Kabuki 症候群患者では、上記 t(8;18) の 8q 微細欠失部位と 2Mb しか離れていない領域の微細重複の報告があるので、その領域の遺伝子を候補とする解析が課題である。

単因子疾患における連鎖解析：PKC では、過去の連鎖解析データの誤りを正して候補領域を確定し、より 16q 遠位側に焦点を絞り変異解析を行う必要があるか、新しい変異解析の発想が必須だと考える。某県に特異的にみられる常染色体劣性リポジストロフィー様の未知の疾患数家系におけるホモ接合性マッピングを開始した。

少・多因子疾患の解析：Dupuytren 拘縮症では、全ゲノムのマイクロアレイ解析が必要との結論に達した。

罹患多発家系・試料の収集：本研究自体は一種の症例・家系依存型研究であるから、研究期間内さらに多くの試料の集積に努めたい。

<成果公表リスト>

(1) 論文/プロシーディング

- (0801221442) Sato D, Kawara H, Shimokawa O, Harada N, Tonoki H, Takahashi N, Imai Y, Kimura H, Matsumoto N, Ariga T, Niikawa N, Yoshiura K: A Down syndrome girl with partial trisomy for 21pter-q22.13: A clue to narrow the Down syndrome critical region. *Am J Med Genet* (in press)
- (0801221453) Nakashima M, Nakano M, Hirano A, Kishino T, Kondoh S, Miwa N, Niikawa N, Yoshiura K. Genome-wide linkage analysis and mutation analysis of hereditary congenital blepharoptosis in a Japanese family. *J Hum Genet* 53(1): 34-41, 2008.
- (0801221507) Miura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshiura K, Shimada T, Nakayama D, Niikawa N, Masuzaki H. Circulating cell-free placental mRNA in the maternal plasma as a predictive marker for twin-twin transfusion syndrome. *Clin Chem* 53 (6): 1167-1168, 2007.
- (0801221515) Miura K, Yoshiura K, Miura S, Shimada T, Yamasaki K, Yoshida A, Nakayama D, Shibata Y, Niikawa N, Masuzaki H. A strong association between human earwax-type and apocrine colostrum secretion from the mammary gland. *Hum Genet* 121 (5): 631-633, 2007.
- (0701191125) Kikuchi, T., Nomura, M., Tomita, H., Harada, N.,

- Kato, N., Yoshiura, K., Niikawa N.: Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC): Confirmation of linkage of to 16p11-q21 but unsuccessful detection of mutations among 158 genes at the PKC-critical region in seven PKC families. *J Hum Genet* 52: 334-341, 2007.
- (0608051106) Sato D, Shimokawa O, Harada N, Olsen OE, Hou J-W, Muhlbauer W, Blinkenberg E, Okamoto N, Kinoshita A, Matsumoto N, Kondo S, Kishino T, Miwa N, Niikawa N, Yoshiura K: Congenital arhinia: Molecular-genetic analysis of five patients. *Am J Med Genet* 143A: 546-552, 2007.
 - (0701191045) Yamasaki Y, Kayashima T, Mapendano CK, Soejima H, Ohta T, Masuzaki H, Kinoshita A, Urano T, Yoshiura K, Matsumoto N, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Kishino T: Role of DNA methylation and histone H3 lysine 27 methylation in tissue-specific imprinting of mouse *Grb10*. *Mol Cell Biol* 27 (2): 732-742, 2007.
 - (0608051118) Matsuzawa N, Nagao T, Niikawa N, Shimozato K, Yoshiura K: *PTCH1* mutations in four Japanese families with basal cell nevus syndrome. *J Clin Pathol* 59 (10): 1084-1086, 2006.
 - (0710030919) Hu H, Wu LQ, Feng Y, Pan Q, Long Z, Li J, Dai HP, Xia K, Liang DS, Niikawa N, Xia JH: Molecular analysis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct in the mainland Chinese: A unique *SLC26A4* mutation spectrum. *J Hum Genet* 52 (6): 492-497, 2007.
 - (0801221539) Nii E, Urawa M, Nshimura T, Kitou H, Ikegawa S, Shimizu S, Niikawa N, Taneda H, Uchida A: Acrodysostosis with unusual iridal color changing with age. *Am J Med Genet* 144B (6): 824-825, 2007.
 - (0801221546) Kaname T, Yanagi K, Chinen Y, Makita Y, Okamoto N, Maehara H, Ohwan I, Kanaya F, Kubota Y, Oike Y, Yamamoto T, Kurosawa K, Fukushima Y, Bohring A, Opitz JM, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K: Opitz C (trigonocephaly) syndrome caused by deficiency of a member of the immunoglobulin superfamily, *CD96*. *Am J Hum Genet* 81(4): 835-841, 2007.
 - (0710030828) Shiels A, Bennett TM, Knopf HL, Yamada K, Yoshiura K, Niikawa N, Shim S, Hanson PI. *CHMP4B*, a novel gene for autosomal dominant cataracts linked to chromosome 20q. *Am J Hum Genet* 81 (3): 596-606, 2007.
 - (0801230755) Sato D, Liang DS, Wu LQ, Nishimura G, Yoshiura K, Xia JH, Niikawa N: A syndactyly type IV locus maps to 7q36. *J Hum Genet* 52(6): 561-564, 2007.
 - (0801230813) Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obanayama K, Kim GW, Liew EL, Sakaeda T, Yoshiura K, Niikawa N, Sakurai M, Ishikawa T: Quantitative SAR analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter *ABCB1*. *J Biochem* 46 (26): 7678-7693, 2007.
 - (0801230819) Sosonkina N, Miyake N, Harada N, Starenki D, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N: *NSD1* exon array CGH rules out intragenic deletions as a possible cause in 30 Japanese patients with Sotos syndrome. *Acta Med Nagasakiensia* 52 (1): 29-34, 2007

(2) データベース/ソフトウェア
なし