

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⁾ ◆木下 晃²⁾

1) 北海道医療大学個性差健康科学研究所 2) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科人類遺伝学

<研究の目的と進め方>

家族性の単・寡少・多因子疾患を対象に連鎖・罹患同胞対・関連解析などの遺伝学的解析を行い疾患座局在を明らかにし、候補遺伝子解析により疾患関連遺伝子を単離・同定、次いで発症機構を明らかにすることを目的とする。

<2008年度の研究の当初計画>

- (1) 染色体構造異常の解析：ゲノム医科学的解析で切断点領域を同定する。同時に CGH マイクロアレイによって微細欠失の有無を同定する（新川、太田、木下）。対象疾患は昨年度達成途中の t(8;18) (q22;q21) をもつ歌舞伎症候群、および新規の染色体構造異常である 6p25 欠失をもつ Axenfeld-Rieger 症候群、10p12 欠失を合併する Schinzel-Giedion 症候群などである。
- (2) 遺伝学的連鎖解析：マイクロサテライトマーカーを用いるアレライティングを行う（新川、太田）。次いでマーカー座を含む PAC/BAC クローンを単離し、候補遺伝子解析を行い（新川、太田、木下）、原因遺伝子を確定する。対象疾患は難聴を伴う指趾奇形家系や、常染色体劣性の未知リポジストロフィー様疾患家系である。後者疾患ではホモ接合性マッピングを行う。
- (3) 関連解析：Dupuytren 拘縮症を集中的に解析する。また、ABCC11 遺伝子型 (GG) を有する強い腋窩臭と弱い腋窩臭個体の全ゲノム SNP 解析を行い、両者の差を決定する腋窩臭修飾遺伝子を特定する（新川、太田、木下）。
- (4) 家系試料の収集：臨床医共同体を通して未知の遺伝性疾患の罹患同胞対家系、多発家系および染色体構造異常罹患者の集積に当たる。

<2008年度の成果>

- (1) Kabuki 症候群 (KS)：正常核型の KS 患者 18 名において、高密度オリゴマイクロアレイによるゲノムワイドのコピー数変化の検索を行った。述べ 10 名で 9 箇所 (3p26.3, 3p26.2, 4q13.2, 5q21.2-q21.3, 9q21.11-q21.12, 14q11.2, 15q11.2, 18p11.32, 20p12.1) に 35kb ~ 1.27Mb の微細欠失を検出した。このうち 4 領域には遺伝子がなく、遺伝子が存在する 6 領域の欠失はデータベースに既登録の多型であった。遺伝子の存在する 9q21.11-q21.12 の欠失が 1 患者の責任部位と考えられるため、ここに存在する遺伝子 *MAMDC2*, *SMC5*, *KLF9*, *TRPM3* を候補遺伝子とし、43 名の KS 患者において変異解析を行ったが共通の病的変異は同定されなかった。現在、14 名および 38 名の正常核型 KS 患者において Illumina HumanHap370 BeadChip および Exon 510S を用いた解析を施行中である。

近年、RAS-MAPK シグナル伝達系遺伝子の germline 変異が多発奇形・精神遅滞症候群の原因として注目されているので、KS における同遺伝子群との関連を調べた。KS 患者 30 名において

16 遺伝子 (*PTPN11*, *SOS1*, *GRB2*, *HRAS*, *KRAS*, *ERAS*, *NRAS*, *ARAF*, *BRAF*, *RAF1* (*CRAF*), *MEK1*, *MEK2*, *RASA1*, *RASA2*, *RASA3*, *RASA4*) の変異解析を行ったが患者に特異な変異はみられなかった。

20p12.1 の *C20orf133* における 250kb 欠失が KS の責任領域であると報告されたため、追試を行ったが、欠失や点変異は検出されなかった。

転座由来の 8q24 欠失を伴った中国人 KS 例において SNP アレイ解析を行った。8q23.2-q24.12 にかけて計 6.9Mb にわたる 6 箇所の欠失が同定され、欠失内にある既知の 16 遺伝子および周辺遺伝子の計 26 遺伝子について核型正常の 30 名の KS 患者における変異解析を行った。アミノ酸変化を伴う 10 種と伴わない 8 種の未登録の塩基置換、および 39 種の登録 SNP が同定されたが、うち 8 種は母や正常人にみられたので稀なバリエーションであった。6 種の非同義変異と 4 種の同義変異はバリエーションか否か未同定であり、コピー数解析を行ったが変化はなかった。

(2) 発作性運動誘発性コレオアテトーシス (PKC)：過去、連鎖解析で確認された PKC 領域 (D16S3131 ~ D16S408) 中の 157 の遺伝子についての変異解析、およびその後新規に集積した 5 家系が従来の候補領域外側の D16S3131 ~ D16S503 だと判明したので、同領域の 66 遺伝子を候補として変異解析を行ったが、原因遺伝子は特定できなかった。現在マップ領域の外側をさらに解析中である。

(3) 軟口蓋裂：常染色体優性遺伝を示す軟口蓋裂の 1 家系 (5 名の患者を含む 15 名の構成員) の協力を得て、Affymetrix 社の 10K 2.0 Array を用いて連鎖解析を行った。パラメトリック連鎖解析の結果、LOD 値は 1p36.32 で 2.107、2p24.1 - p22.2 で 2.107、5p15.33 で 1.837 を示し、この 3 領域が候補領域として示唆された。今後同領域の変異解析を行う。

(2) Dupuytren 拘縮症：ベラルーシ人試料を用いて、過去の連鎖解析でマップされた 16q の 6 cM 領域にある 524 SNP を選択し、患者 65 試料と正常対照者 55 試料のタイピング後、関連解析を行った。P < 0.01 を示す 5 つの SNP を含む遺伝子のエクソン部分の変異解析を行ったが、変異は発見されなかった。次いで、Affymetrix 社の 50K Array を用いた患者 49 試料と対照者 50 試料の全ゲノム関連解析を行った。p < 0.0006 の SNP について、試料を追加して (患者 77 試料と対照者 66 試料) 解析した結果、3 SNP で p < 0.001 以下となった (最小は p = 0.0000722)。

(5) 彎指・指異形成を伴う難聴：新規の常染色体優性遺伝性疾患と思われる本症の 1 家系 (5 名の罹患者を含む構成員) の連鎖解析を開始した。

(6) 裂手裂足症：逆位挿入 inv ins(3;7)(q21;q32q21.3) をもつ裂手裂足患者から 7q21.3 切断点の解析を行い、新規遺伝子 X を単離した。遺伝子 X は全長約 40kb、9 個のエクソンより構成され、患者で

はイントロン3内に切断点が存在した。裂手裂足症の日本人患児61人中、2人にエクソン6内の点変異(C->T)とエクソン7内の点変異(A->G)を認めた。健常人120人には、これら変異は認められなかった。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究と類似領域の研究は国内外に多いが、同一疾患についての研究は知りえない。とくにKabuki症候群の原因遺伝子の研究は国内外ともない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

Kabuki症候群(KS)は原因不明のままになっている代表的な奇形症候群である。研究代表者らは過去数年、精力的に原因解明に取り組んできたが、決定的な糸口がなく、未だ成功していない。本症は臨床的な症状によって診断されるために、収集した患者試料が均一か否かが第1の問題点である。研究代表者が最近診断した新規患者の臨床所見から、KSは少なくとも2群に分かれる可能性があるとの結論に至った。(1)大きな群を形成するのは下口唇窩あるいは下口唇中央溝をもつもので、(2)一方8q24欠失はサブタイプだと思われる。今後(1)群中の下口唇窩を有する患者のみを集積し、解析を進めたい。

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。マップ領域より長腕末端側に範囲を広げて解析中である。候補遺伝子はみつかったが、一部の変異は一般集団にも発見され、さらに検討が必要である。

<今後の課題>

PKC、Dupuytren拘縮症、Kabuki症候群、彎指・指異形成を伴う難聴など原因・感受性遺伝子未特定の疾患研究を継続する。とりわけKabuki症候群では、下口唇窩・口蓋裂との合併例を重視し、Van der Woude症候群の原因遺伝子であるIRF6の下流の遺伝子(Small prerin rich-like family, Loricrin, Filaggrin, Small prerin-rich 2a, Keratin 2-6b, Irf6, Stratifin, Desmocollin 2, S100a8, S100a9, p63, Keratin 1-14, Desmocollin 3遺伝子)に焦点を当てて解析する予定である。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0806131114

Wu LQ, Long Z, Liang DS, Harada N, Pan Q, Yoshiura K, Xia K, Dai HP, Niikawa N, Xia JH: Pre- and postnatal overgrowth in a patient with proximal 4p deletion. *Am J Med Genet* 146A: 791-794, 2008.

2. 0806121256

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* 146A (1): 124-127, 2008.

3. 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.

4. 0811050847

Nakashima M, Tsuda M, Kishino T, Kondoh S, Kinoshita A, Shimokawa O, Niikawa N, Yoshiura K: Precision of high-throughput single-nucleotide polymorphism genotyping with fingernail DNA: comparison with blood DNA. *Clin Chem* 54 (10): 1746-1748, 2008.

5. 0811050852

Kuniba H, Tsuda M, Nakashima M, Miura S, Miyake N, Kondoh T, Matsumoto T, Moriuchi H, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Naritomi K, Matsumoto N, Kinoshita A, Yoshiura K, Niikawa N. Lack of *C20orf133* and *FLRT3* mutations in 43 patients with Kabuki syndrome in Japan. *J Med Genet* 45 (7): 479-480, 2008.

6. 0811050857

Higuchi N, Tahara N, Yanagihara K, Fukushima K, Suyama N, Inoue Y, Miyazaki Y, Kobayashi T, Yoshiura K, Niikawa N, Isomoto H, Shikuwa S, Mizuta Y, Kohno S, Tsukamoto K: A haplotype, *NAT2*6A*, of the *N*-acetyltransferase 2 gene is an important biomarker for a risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Japanese patients with tuberculosis. *World J Gastroenterol* 13 (45): 6003-6008, 2008.

7. 0811050910

Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N: Sotos syndrome. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley & Sons, Chichester, pp 1-8, 2008 (in press).

8. 0901130933

Kuniba H, Sato D, Yoshiura K, Ohashi H, Kurosawa K, Miyake N, Kondoh T, Matsumoto T, Nagai T, Okamoto N, Fukushima Y, Matsumoto N, Niikawa N: No mutation in RAS-MAPK pathway genes in 30 patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 146A: 1893-1896, 2008.

2) データベース/ソフトウェア

なし