

201/35001A

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(難病関係研究分野)

次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性
難病の原因解明と治療法開発の研究
(H23-実用化(難治)-一般-001)

平成23年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 松原洋一

平成24年(2012)3月

目次

I. 総括研究報告

- 次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究
松原 洋一 1

II. 分担研究報告

1. 次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索
松原 洋一 7
2. 次世代シーケンサーを用いたcytoplasmic body myopathyにおける
新たな原因遺伝子の探索に関する研究
青木 正志 11
3. 東北大学関連の臨床検体の遺伝子解析に関する研究
有馬 隆博 15
4. 次世代シーケンサーを用いた遺伝性腎症の解析
呉 繁夫 19
5. 希少遺伝性難病の精神発達に関する病態解明のための網羅的分子遺伝学的研究
富田 博秋 21
6. 次世代シーケンサーを用いた遺伝子情報解析パイプラインの確立
長嶋 剛史 25
7. 希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発のための遺伝子解析パイプラインの構築
舟山 亮 29
8. 次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究
布施 昇男 33
9. RAS/MAPK症候群における新規病因遺伝子の探索
新堀 哲也 35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷 43

I . 総括研究報告

次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究

研究代表者 松原洋一 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

次世代シーケンサーの導入によって、欧米の研究室を中心に希少遺伝性難病の原因遺伝子が次々と解明されつつある。日本国内の研究体制を整備し解析拠点を構築することが急務である。本研究の目的は、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成し、国内の一般研究班と連携して病因遺伝子同定を行うことにある。本年度は希少遺伝性難病解析のための次世代遺伝子解析システムを構築し、その運用体制を整備した。また、拠点施設としての臨床検体解析プロトコルの作成と倫理的側面に関する指針の検討、東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析を開始するとともに、Human Variome Project との国際連携を行った。

研究分担者

青木正志(東北大学大学院医学系研究科)

新堀哲也(東北大学大学院医学系研究科)

有馬隆博(東北大学大学院医学系研究科)

呉 繁夫(東北大学大学院医学系研究科)

富田博秋(東北大学大学院医学系研究科)

長嶋剛史(東北大学大学院医学系研究科)

舟山 亮(東北大学大学院医学系研究科)

布施昇男(東北大学大学院医学系研究科)

研究協力者

青木洋子(東北大学大学院医学系研究科)

中山啓子(東北大学大学院医学系研究科)

井泉瑠美子(東北大学大学院医学系研究科)

A. 研究目的

次世代シーケンサーの導入によって、欧米の研究室を中心に希少遺伝性難病の原因遺伝子が次々と解明されつつある。日本国内の研究体制を整備し解析拠点を構築することが急務である。

東北大学では、研究代表者の研究室を中心に過去30年にわたり一貫して希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発に成果を挙げてきた。また、難治性疾患克服研究事業の支援を得た研究の成果を患者家族に還元してきた。このような背景を元に、東北大学医学部では次世代遺伝子解析コア施設を計

画し、専任のバイオインフォマティクス研究者と技術補佐員とともに整備をすすめてきた。

本研究の目的は、これまでに蓄積してきた希少遺伝性疾患の原因遺伝子探索のノウハウをもとに、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成することにある。本年度は、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の構築、拠点施設としての臨床検体解析プロトコルと倫理的側面に関する指針の検討、東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析、国際的な Human Variome Project との連携を行った。

B. 研究方法

1) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の整備

東北大学における次世代遺伝子解析拠点としての体制を整備した。

2) 臨床検体解析プロトコルの作成と倫理的側面に関する指針の整備

拠点施設として、今後、一般研究班などの他の連携施設からの臨床検体を受託するにあたり、疾患の選定、家系情報、検体数などの受託基準を定めたプロトコルをと倫理的な指針を検討した。

3) 東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析

東北大学関連の次世代遺伝子解析にふさわしい症

例や家系を収集して解析を開始した。

4) Human Variome Project との連携

国際的な遺伝子変異データベース構築のために設立された Human Variome Project との連携を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析研究は3省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って行った。

C. 研究結果

1) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の整備 (松原、舟山、長嶋、新堀、中山、青木 (洋))

次世代遺伝子解析装置として、東北大学医学部に設置されている SOLiD4 および Genome Analyzer IIx を用いて解析体制を整備した。専任の技術補佐員によってオペレーションを行い、得られたデータは分担研究者のバイオインフォマティクスによって解析する運用体制を整備した。また、本研究によって新たに HiSeq2000 を購入・設置し、スループットを増加させた。

本年度は、エキソーム解析のサンプル調製プロトコルを確立した。また、配列データの情報解析では、複数の解析プログラムを併用することにより、高感度に遺伝子変異を検出できる遺伝子情報解析パイプラインを構築した。

2) 臨床検体解析プロトコルの作成と倫理的側面に関する指針の整備 (松原、青木 (洋))

次年度より、拠点施設として一般研究班などの他の連携施設からの臨床検体を受託するにあたり、疾患の選定、家系情報、検体数などの受託基準を定めたプロトコルを検討した。また、倫理的な指針を検討した。改訂中の三省指針が公表され次第、倫理指針の最終的な策定を行う予定である。

3) 東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析 (新堀、青木 (正)、呉、有馬、富田、布施、青木 (洋)、井泉)

次世代遺伝子解析に適した症例や家系を収集して解析を開始した。

新堀は、これまでに遺伝子変異が同定されていない RAS/MAPK 症候群症例を対象に、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を開始した。

青木 (正) は、東北大学神経内科にて 20 年以上前より診療を続けている常染色体優性遺伝形式をとるミオパチーの大家系 (5 世代、約 20 名の罹患者) について、解析を行った。これまでに複数の候補遺伝子変異が同定され、詳細な解析を実施中である。

呉は、3 世代にわたる膜性増殖性糸球体腎炎家系についてエクソーム解析をおこない、複数の疾患候補遺伝子変異を同定した。現在確認を行なっている。

有馬は、生殖補助医療によって出生したインプリント異常症の患者では、受精以降のメチル化の維持に原因が多いことを見出し、次世代シーケンサーをもちいた原因遺伝子の検索を開始した。

富田は、次世代シーケンサーによる ChIP-seq 解析等を用いて、Sotos 症候群の病態メカニズム解析を開始した。

布施は、生後早期から発症する希少遺伝性難病である発達緑内障早発型の家系を収集し、スクリーニングを行った結果、20%のみが陽性であった。新規遺伝子解析のために、次世代シーケンサーで解析するに適する症例・家系の掘り起しを行い、現在エクソーム解析を開始した。

4) Human Variome Project との連携 (松原)

遺伝子解析結果の解析には、これまでに判明している遺伝子変異データとの照合が必須である。また、本研究推進中に得られる変異/多型を随時収集し、ヒトゲノムのバリエーションとして随時データベースに取り込んでいくことも重要である。このような目的のための包括的かつ統合的な国際的な遺伝子変異データベース構築のために設立された組織が Human Variome Project である。中国がこの国際的プロジェクトに約 200 億円を拠出することになり、2011 年 12 月に北京で Human Variome Project 会議が開催された。松原はこの会議に出席し、世界各国の代表者らと連日データベースの構築について討議を重ねた。現在ワーキンググループによる詳細な検討が進行中である。

D. 考察

本年度の研究によって東北大学における次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制が整備された。バイオインフォマティクスを含めた遺伝子解析パイ

プラインの確立と HiSeq2000 の導入によるスループットの飛躍的な増強を行った結果、次年度からの一般研究班との連携、検体受入準備が整った。

すでに東北大学関連で収集した検体については順次遺伝子解析が進行中であり、候補病因遺伝子変異が同定されている。今後、各変異の検証を進めることによって新規病因遺伝子の同定が期待される。次年度からは、一般研究班との連携を開始し、さらに多くの疾患・症例・家系について次世代遺伝子解析を実施する予定である。

倫理的側面についても検討を開始した。現在改定が進んでいる三省指針が確定し公表された段階で、他の拠点研究班と連携して、研究推進にあたってのガイドラインを策定する予定である。

国際的なデータベース構築も重要な課題である。このプロジェクトへの参加に当たり、北京での会議では日本国内における遺伝子変異データを集積する Japan node の設立が求められた。今後、わが国における体制づくりについて検討が必要と考えられる。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた解析体制を整備し、その運用を開始した。現在、データ解析が進行中であり、新規病因遺伝子の同定が期待される。次年度から一般研究班との連携を開始し、さらに多くの疾患・症例・家系について次世代遺伝子解析を実施する体制を準備した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 30. [Epub ahead of print]
- 2) Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N,

Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet* 2011;56:34-40.

3) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, M.D., Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant in RNF213 is the strong predictor for early-onset and severe form of Moyamoya disease. *Neurology* (in press)

4) Auerbach AD, Burn J, Cassiman JJ, Claustres M, Cotton RG, Cutting G, den Dunnen JT, El-Ruby M, Vargas AF, Greenblatt MS, Macrae F, Matsubara Y, Rimoin DL, Vihinen M, Van Broeckhoven C. Mutation (variation) databases and registries: a rationale for coordination of efforts. *Nature Rev Genet.* 12(12):881, 2011.

5) Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Niihori T, Okano E, Numabe H, Matsubara Y. HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome. *J Hum Genet.* 2011 Oct;56(10):707-15

6) Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy P.J, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyangi K, Soloway P.D. & Sasaki H. Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science.* 332: 848-852. 2011.

7) Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, Arima T. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men

using novel methylation PCR-Luminex analysis. *Fertility and Sterility*. 95: 129-34 2011.

8) Maeda T, Oyama J, Higuchi Y, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori Y, Nakazono T, Arima T, Mimori K, Makino N. The physical ability of Japanese female elderly with cerebrovascular disease correlates to the telomere length and subtelomeric methylation status in their peripheral blood leukocytes. *Gerontology*. 57:137-43. 2011.

9) Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Arima T, Makino N. The correlation between the clinical laboratory data and the telomere length in peripheral blood leukocytes of Japanese female patients with hypertension. *The Journal of Nutrition, Health and Aging (JNHA)*. 15:240-4. 2011.

10) Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori T, Nakazono T, Arima T, Makino N. The physical ability of elderly female Japanese patients with cerebrovascular disease correlates with the telomere length in their peripheral blood leukocytes. *Aging Clinical and Experimental Research*. 57: 137-43 2011.

11) Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Arima T. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. *Human Molecular Genetics* 21:548-52. 2011

12) Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Junichi Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, Arima T. High-throughput detection of imprint methylation errors in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. *BMC Medical Genomics* (in press).

13) Arima T, Okae H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Hayashi C. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples. *INTECH* (in press).

14) Sakurai M, Ohtake J, Ishikawa T, Tanemura K, Hoshino Y, Arima T, Sato E. Distribution and Y397 phosphorylation of focal adhesion kinase on follicular development in the mouse ovary. *Cell and*

Tissue Research (in press).

15) Uematsu M, Haginoya K, Kikuchi A, Nakayama T, Kakisaka Y, Numata Y, Kobayashi T, Hino-Fukuyo N, Fujiwara I, Kure S. Hypoperfusion in caudate nuclei in patients with brain-lung-thyroid syndrome. *J Neurol Sci* (in press)

16) Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metab* (in press)

17) Ninomiya M, Ueno Y, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Kimura O, Nakayama K, and Shimosegawa T. Use of Illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50(3):857-866

18) Yu Z, Ono C, Kim HB, Komatsu H, Tanabe Y, Sakae N, Nakayama KI, Matsuoka H, Sora I, Bunney WE, Tomita H. Four mood stabilizers commonly induce FEZ1 expression in human astrocytes. *Bipolar Disorders*, 13(5-6): 486-499, 2011

19) Yu Z, Ono C, Sora I, Tomita H. Effect of chronic lithium treatment on gene expression profile in mouse microglia and brain dendritic cells. *Japanese Journal of Neuropsychopharmacology*, 31(2): 101-102, 2011

2. 学会発表

1) Y. Abe, Y. Aoki, S. Kuriyama, H. Kawame, N. Okamoto, K. Kurosawa, H. Ohashi, S. Mizuno, T. Ogata, S. Kure, T. Niihori, Y. Matsubara. Epidemiological features of Costello Syndrome and Cardio-facio-cutaneous Syndrome: findings from the first nationwide survey. 2011年10月11-15日 12th International Congress of Human Genetics (カナダ、モントリオール)

2) Saito Y, Aoki T, Niihori T, Abe Y, Kure S, Ohashi K, Kurosawa N, Okamoto N, Kawame H, Mizuno S, Ogata T, Kuriyama S, Matsubara Y. Genetic testing of Ras/MAPK pathway syndromes at Tohoku University.

2011年10月11-15日 12th International Congress
of Huma Genetics (カナダ、モントリオール)

なし

2. 実用新案登録

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

1. 特許取得

なし

Ⅱ. 分担研究報告

次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索

研究分担者 松原洋一 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

次世代シーケンサーの導入によって、欧米の研究室を中心に希少遺伝性難病の原因遺伝子が次々と解明されつつある。しかしながら、国内の研究体制は未整備であり解析拠点の構築が急務である。本研究者は、過去 30 年にわたり一貫して希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発に成果を挙げてきた。このような背景を元に、東北大学に次世代遺伝子解析システムを構築し、専任のバイオインフォマティクス研究者と専任の技術補佐員とともに運用体制を整備し運用を開始した。また、拠点施設としての臨床検体解析プロトコールの作成と倫理的側面に関する指針の検討、東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析、Human Variome Project との国際連携を行った。

研究協力者

青木正志(東北大学大学院医学系研究科)
新堀哲也(東北大学大学院医学系研究科)
有馬隆博(東北大学大学院医学系研究科)
呉 繁夫(東北大学大学院医学系研究科)
富田博秋(東北大学大学院医学系研究科)
長嶋剛史(東北大学大学院医学系研究科)
舟山 亮(東北大学大学院医学系研究科)
布施昇男(東北大学大学院医学系研究科)
青木洋子(東北大学大学院医学系研究科)
中山啓子(東北大学大学院医学系研究科)

クス研究者と技術補佐員とともに運用体制をすすめてきた。

本研究の目的は、これまでに蓄積してきた希少遺伝性疾患の原因遺伝子探索のノウハウをもとに、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成することにある。本年度は、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の構築、拠点施設としての臨床検体解析プロトコールと倫理的側面に関する指針の検討、東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析、国際的な Human Variome Project との連携を行った。

A. 研究目的

次世代シーケンサーの導入によって、希少遺伝性難病の原因遺伝子が次々と解明されつつある。しかしながら国外での研究に比較して国内の研究体制は未整備である。拠点を設けた効率的な解析体制の構築が急務である。

本研究者らは、過去 30 年にわたり一貫して希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発に成果を挙げてきた。また、難治性疾患克服研究事業の支援を得た研究の成果を患者家族に還元してきた。このような背景を元に、新技術としての次世代シーケンサーに注目し、東北大学の全面的な支援を得て遺伝子解析装置を導入し、専任のバイオインフォマティ

B. 研究方法

1) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の整備

東北大学における次世代遺伝子解析拠点としての体制を整備した。

2) 臨床検体解析プロトコールの作成と倫理的側面に関する指針の整備

拠点施設として、今後、一般研究班などの他の連携施設からの臨床検体を受託するにあたり、疾患の選定、家系情報、検体数などの受託基準を定めたプロトコールをと倫理的な指針を検討した。

3) 東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析

本年度は、東北大学関連の次世代遺伝子解析にふさ

わしい症例や家系を収集して解析を開始した。

4) Human Variome Project との連携

国際的な遺伝子変異データベース構築のために設立された Human Variome Project との連携を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析研究は3省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って行った。

C. 研究結果

1) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の整備

次世代遺伝子解析装置として、東北大学医学部に設置されている SOLiD4 および Genome Analyzer IIx を用いて解析体制を整備した。専任の技術補佐員によってオペレーションを行い、得られたデータは分担研究者のバイオインフォマティクスによって解析する運用体制を整備した。また、本研究によって新たに HiSeq2000 を購入・設置し、スループットを増加させた。

バイオインフォマティクスで絞り込まれた候補遺伝子変異についてはキャピラリーシーケンサーによる確認を行うシステムとした。

2) 臨床検体解析プロトコルの作成と倫理的側面に関する指針の整備

次年度より、拠点施設として一般研究班などの他の連携施設からの臨床検体を受託するにあたり、疾患の選定、家系情報、検体数などの受託基準を定めたプロトコルを検討した。また、本研究では個々人の全ゲノム(エクソーム)を検索するため、当該疾患に関係がない遺伝子変異が偶然発見される可能性がある。その中には本人に告知することによって重大な健康被害を未然に防ぐことが可能な情報が含まれている場合(例:薬理学的遺伝子多型)と、逆に告知が不利益をもたらす可能性が高い場合(例:治療法や予防法がない重篤な遅発性遺伝性疾患)が想定される。それらに対する倫理的な指針を検討した。本年度、ちょうど同時期に遺伝子解析に対する三省指針の改定が開始され、本研究報告書作成時点ではまだ確定していない。そこで、三省指針との整合性を保つために倫理指針の最終的な策定は次年度に実施することとした。

3) 東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析

次世代遺伝子解析にふさわしい症例や家系を収集して解析を開始した。具体的には、分担研究者との共同によって、RAS/MAPK 症候群、cytoplasmic body myopathy 家系、モヤモヤ病家系、膜性増殖性糸球体腎炎の3世代家系、先天性ゲノムインプリンティング異常症、Sotos 症候群、早発型発達緑内障家系について検体収集を行い、遺伝子解析を開始した。

4) Human Variome Project との連携

遺伝子解析結果の解析には、これまでに判明している遺伝子変異データとの照合が必須である。また、本研究推進中に得られる変異/多型を随時収集し、ヒトゲノムのバリエーションとして随時データベースに取り込んでいくことも重要である。このような目的のための包括的かつ統合的な国際的な遺伝子変異データベース構築のために設立された組織が Human Variome Project である。中国がこの国際的プロジェクトに約 200 億円を拠出することになり、2011 年 12 月に北京で Human Variome Project 会議が開催された。松原はこの会議に出席し、世界各国の代表者らと連日データベースの構築について討議を重ねた。現在ワーキンググループによる詳細な検討が進行中である。

D. 考察

本年度の研究によって東北大学における次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制が整備された。すでに東北大学関連で収集した検体については順次遺伝子解析が進行中であり、新規病因遺伝子の同定が期待される。

倫理的側面についても検討を開始した。現在改定が進んでいる三省指針が確定し公表された段階で、他の拠点研究班と連携して、研究推進にあたってのガイドラインを策定する予定である。

国際的なデータベース構築も重要な課題である。このプロジェクトへの参加に当たり、北京での会議では日本国内における遺伝子変異データを集積する Japan node の設立が求められた。今後、わが国における体制づくりについて検討が必要と考えられる。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた解析体制を整備し、その運用を開始した。現在、データ解析が進行中であり、新規病変遺伝子の同定が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 30. [Epub ahead of print]
- 2) Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet* 2011;56:34-40.
- 3) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, M.D., Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant in RNF213 is the strong predictor for early-onset and severe form of Moyamoya disease. *Neurology* (in press)
- 4) Auerbach AD, Burn J, Cassiman JJ, Claustres M, Cotton RG, Cutting G, den Dunnen JT, El-Ruby M, Vargas AF, Greenblatt MS, Macrae F, Matsubara Y, Rimoin DL, Vihinen M, Van Broeckhoven C. Mutation (variation) databases and registries: a rationale

for coordination of efforts. *Nature Rev Genet.* 12(12):881, 2011.

- 6) Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Niihori T, Okamoto N, Numabe H, Matsubara Y. HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome. *J Hum Genet.* 2011 Oct;56(10):707-15

2. 学会発表

- 1) Y. Abe, Y. Aoki, S. Kuriyama, H. Kawame, N. Okamoto, K. Kurosawa, H. Ohashi, S. Mizuno, T. Ogata, S. Kure, T. Niihori, Y. Matsubara. Epidemiological features of Costello Syndrome and Cardio-facio-cutaneous Syndrome: findings from the first nationwide survey. 2011年10月11-15日 12th International Congress of Human Genetics (カナダ、モントリオール)
- 2) Saito Y, Aoki T, Niihori T, Abe Y, Kure S, Ohashi K, Kurosawa N, Okamoto N, Kawame H, Mizuno S, Ogata T, Kuriyama S, Matsubara Y. Genetic testing of Ras/MAPK pathway syndromes at Tohoku University. 2011年10月11-15日 12th International Congress of Human Genetics (カナダ、モントリオール)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

次世代シーケンサーを用いた cytoplasmic body myopathy における 新たな原因遺伝子の探索に関する研究

分担研究者 青木 正志
東北大学 大学院医学系研究科 神経内科 教授

研究要旨

東北大学神経内科にて20年以上前より診療を続けている常染色体優性遺伝形式をとるミオパチーの大家系があり、5世代に渡り約20名の罹患者がいる。

このミオパチーは、病理形態学的に骨格筋線維内に無構造、円形の cytoplasmic body と呼ばれる封入体を多数、びまん性に認める点に特徴があり、筋原線維性ミオパチー (Myofibrillar Myopathy) の範疇に含まれる。進行性の筋萎縮と筋力低下のために5-10年の経過の中で呼吸不全となってしまうが、呼吸管理を適切に行うことでADLを維持することができ臨床的に重要な疾患である。

Myofibrillar Myopathy の原因遺伝子およびその表現型は現在まで国外を中心として幾つかが報告されている。しかしながら本家系はいずれの表現型とも一致しない。そこで、我々は本家系において、新たな原因遺伝子およびその機能を解明することを目標に本研究に着手した。

研究協力者

井泉瑠美子（東北大学神経内科）
鈴木直輝（東北大学神経内科）
加藤昌昭（東北大学神経内科）
割田 仁（東北大学神経内科）
豎山真規（東北大学神経内科）
高橋俊明（国立西多賀病院神経内科）
舟山亮（東北大学細胞増殖制御分野）
西田有一郎（東北大学細胞増殖制御分野）
長嶋剛史（東北大学細胞増殖制御分野）
中山啓子（東北大学細胞増殖制御分野）
新堀哲也（東北大学遺伝病学分野）
青木洋子（東北大学遺伝病学分野）
松原洋一（東北大学遺伝病学分野）

る。このミオパチーは、病理形態学的に骨格筋線維内に無構造、円形の cytoplasmic body と呼ばれる封入体（図）を多数、びまん性に認める点に特徴があり、筋原線維性ミオパチー (Myofibrillar Myopathy) の範疇に含まれる。進行性の筋萎縮と筋力低下のために5-10年の経過の中で呼吸不全となってしまうが、呼吸管理を適切に行うことでADLを維持することができ臨床的に重要な疾患である。

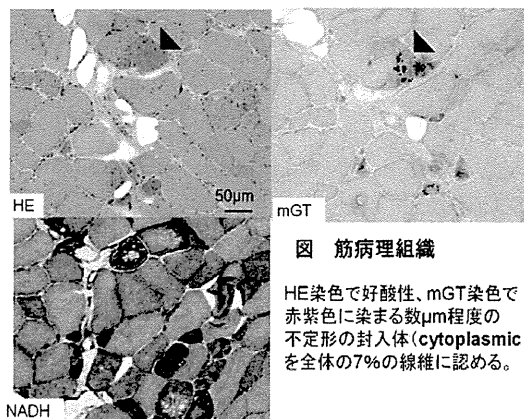


図 筋病理組織

HE染色で好酸性、mGT染色で赤紫色に染まる数µm程度の不定形の封入体 (cytoplasmic body) を全体の7%の線維に認める。

A. 研究目的

東北大学神経内科にて20年以上前より診療を続けている常染色体優性遺伝形

式をとる世界有数のミオパチーの大家系があり、5世代に渡り約20名の罹患者が出てい

表 Myofibrillar Myopathyの既知の原因遺伝子と表現型

Gene Symbol	Protein Name	Position	Inheritance	Frequency	Onset	Muscle Weakness	Heart	Respiratory Failure	GK level	Extramuscular
DES	Desmin	2q35	AD or AR(rare)	8%	10-60	Distal-Proximal	DCM, CB	+	n-5x	
LDLMZASP	LIM domain-binding protein3	16q22.2-q23.3	AD	14%	50	Distal-Proximal	DCM, CB		n-5x	Neuropathy
CRYAB	Alpha-crystallin B chain	11q22.3-q23.1	AD	3%	30-50	Distal-Proximal	DCM, CB		n-7x	Cataract
FLNC	Filamin-C	7q32	AD	4%	30-60	Distal-Proximal	DCM, CB	+	n-5x	Neuropathy
MYOT	Myotilin	5q31	AD	13%	40-70	Distal-Proximal	DCM	+	n-5x	Neuropathy, Contracture
BAG3	BAG family molecular chaperone regulator 3	10q25.7-q26.2	AD	4%	childhood	Proximal	DCM	+	n-15x	Neuropathy, Contracture, Scoliosis, RSS
FAH1	Fah1 four and a half LIM domains 1	Xq25	X-linked	?	infant-adult	Distal-Proximal	CB	+	n-10x	Contracture, Scoliosis, RSS
PLEC	Plectin		AR	?		Distal-Proximal			n-5x	EBS, nail dystrophy
This family			AD		30-40	Distal-Proximal	-	+	n-2x	-

DCM: dilated cardiomyopathy, n-5x: normal to 5 fold, CB: conduction block, RSS: rigid spine syndrome, EBS: epidermolysis bullosa simplex

Myofibrillar Myopathy の原因遺伝子およびその表現型は現在まで国外を中心として幾つかが報告されている（表）。しかしながら本家系はいずれの表現型とも一致しない。そこで、我々は本家系において、新たな原因遺伝子およびその機能を解明することを目標に本研究に着手した。

B. 研究方法

本家系の中の罹患者 5 名、非罹患者 6 名の計 11 名について遺伝子解析の同意を得た。次世代シーケンサーを用いて全エクソンの遺伝子配列を解析し (exome sequence) 罹患者に共通した遺伝子変化の抽出を行った。また、全ゲノム SNP chip を用いた連鎖解析によって変異遺伝子座位を絞込み、次世代シーケンサーの結果と照らし合わせて原因遺伝子の同定を試みている。

なお、患者からの臨床情報の取得および DNA の採取に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、最初に東北大学医学部のヒトゲノム委員会および倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得ている。

C. 研究結果

次世代シーケンサー (Applied Biosystems 社 SOLiD 及び Illumina 社 Genome Analyzer IIx) により、exome sequence を行った結果、約 300 の変異候補部位が得られた。これらについて順次、ダイレクトシーケンスにて確認作業を行っている。

D. 考察

本邦における MFM の遺伝子スクリーニングで既知の遺伝子に変異を見出すことができるのは 30%程度であるとされる。MFM の臨床像は不均一であり、臨床的には肢体型筋ジストロフィーや遠位型ミオパチーと類似するため、あくまでも診断は病理診断である。しかしながら原因遺伝子の違いによる特徴的な筋病理組織変化や蓄積蛋白質の違いは明らかとなっていない。本家系は、既知の遺伝子の表現型として共通して記載のある、拡張型心筋症や伝導ブロックといった心筋障害を合併しない点や、下肢遠位筋の筋力低下から発症するものの、自力歩行可能である内に呼吸不全となる点に特徴があり、既知の原因遺伝子の表現型とは明らかに異なる。本家系において MFM の新たな原因遺伝子を明らかにすることができれば、既知の分子との関連を含め、骨格筋の Z 線の変性機序や細胞内蛋白質の蓄積過程の解明に繋がると考えられ重要である。また、二次性に cytoplasmic body を生じる炎症性筋疾患や筋ジストロフィーの病態解明にも寄与し得ると考えている。

E. 結論

近年、次世代シーケンサーの実用化にともない配列長が短いデータを標準配列にマッピングすることで高速に膨大な配列を決定することが可能となり新規病因遺伝子の報告が相次いでいる。本家系は常染色体優性遺伝形式が明らかな大家系であり、親子関係にある症例も含めて 11 症例での解析が可能であるこ

とから、新規病因遺伝子が特定される可能性が高いと期待される。また当院神経内科や国立精神・神経医療研究センターとの共同研究により、過去に蓄積された多数の骨格筋組織・血液検体の利用が可能であることから、新規遺伝子が明らかとなった場合には、孤発例を含め封入体を生じる疾患における変異の有無について検索を広げることも可能である。

今後も継続して次世代シーケンサーによる変異候補遺伝子の絞込みを行っていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

東北大学関連の臨床検体の遺伝子解析に関する研究

研究分担者 有馬 隆博 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

生殖補助医療（ART）の普及により、先天性ゲノムインプリンティング異常疾患の発生頻度の増加が世界中で注目されている。ART が、ゲノムインプリンティングが確立する時期の配偶子を操作する事（排卵誘発、胚操作、受精卵培養、凍結胚操作など）が原因であると推察されている。分担者は平成 21 年度厚生労働省科学研究費「ゲノムインプリンティング異常症 5 疾患の実態把握に関する全国多施設共同研究」で先天性ゲノムインプリンティング異常症：Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Angelman 症候群（AS）、Prader-Willi 症候群（PWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）、新生児一過性糖尿病（TNDM）のうち、SRS と BWS が ART との関連が強いことを報告した。また、これらの疾患のうち、ART 出生児において DNA メチル化の異常を原因とする（エピゲノム変異）の症例が多い傾向にあった。本年度これら疾患のエピゲノム変異に着目し、まず網羅的にヒトインプリント領域を同定した。次に、ART により発症したインプリント異常症の患者を対象に、全てのインプリント領域のメチル化インプリントの分子機構について解析し、その異常のパターン分析を行った。その結果、ART 出生による患児では、(A) 複数のインプリント領域の異常 (B) 精子型と卵子型 DMR の両方に異常 (C) 高メチル化と低メチル化を同時に示す (D) メチル化異常の程度は、モザイク型であるという特徴を示した。症例数が少ないため、正確な評価はできないが、これらの結果から、ART により発症したインプリント異常症（SRS と BWS）の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因が多いと推測される。つまり、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）で、異常が起り、疾患発症を導いた可能性が推察された。この結果を基に次世代シーケンサーを用い、原因遺伝子の検索を試みる。

研究協力者

樋浦 仁（東北大学大学院医学系研究科）
岡江 寛明（東北大学大学院医学系研究科）
宮内 尚子（東北大学大学院医学系研究科）
佐藤 芙美（東北大学大学院医学系研究科）

A. 研究目的

生殖補助医療（ART）の普及により、特定のゲノムインプリンティング異常疾患の発生頻度の増加が世界中で注目されている。ART が、ゲノムインプリンティングが確立する時期の配偶子を操作する事が原因であると推察されているためである。先天性ゲノムインプリンティング (GI) 異常症には、以下の疾患が含まる。Beckwith-

Wiedemann 症候群（BWS）、Angelman 症候群（AS）、Prader-Willi 症候群（PWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）。本年度は、1) 患者情報と患者検体を用い、遺伝子型と臨床型の関連を明らかにする。特に、DNA メチル化に着目し、異常の頻度、程度、影響を受けやすい遺伝子領域を同定する。2) ART 治療法やメチル化異常との関連について実態を把握し、リスク要因について評価する事を目的とする。

B. 研究方法

(1) 疾患の責任メチル化インプリントの解析：

先天性ゲノムインプリンティング病患者の頬粘膜細胞あるいは血液から DNA を抽出し、責任インプリント遺

伝子領域のメチル化解析を行った。これには、DNA 多型を含めた Bisulphite PCR Sequence 法を用い、正確に評価した。また、結果については、各医療機関の主治医に郵送で報告した。

(2) ヒトインプリント領域の網羅的解析：

マウスで報告されている全てのインプリント領域情報をもとに、ヒトインプリント領域の検索を行い、22 領域を同定し、PCR プライマーを設計した。この際、DNA 多型を含むようにし、条件検討を行った。(1) でメチル化異常 (エピゲノム変異) を示した症例のうち、ART と非 ART の症例について、その発症機序をメチル化異常のパターンを比較する事を目的に、網羅的にメチル化インプリント状態について解析した。また、それぞれの症例毎に、リスク要因についても検討した。

(倫理面への配慮)

患者検体を用いる研究：ヘルシンキ宣言 (エジンバラ改訂)、臨床研究に関する倫理指針 (厚生労働省) に従い、本研究を実施。東北大学医学部倫理委員会より、研究プロトコルの承諾を得た。研究対象者の登録にあたっては、機密保護に十分に配慮した。すなわち研究対象者の同定や照会には研究登録番号、症例イニシャル、生年月日を用いて行うこととし、直接患者を識別できる情報は事務局のデータベースには登録していない。また、本研究に係わる臨床記録、検査データ、同意に関する記録など医療機関において作成されたものについては保管責任者が鍵のかかるキャビネットに保管。その保管期間は本研究終了時までとし、その後廃棄予定。

組換え DNA 実験：全ての実験について、遺伝子組み換え実験および動物実験の承認を得ている。参加者は遺伝子組換え実験の教育訓練をうけ「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、実験拡散防止措置確認を行っている。

C. 研究結果

メチル化インプリントの異常 (エピゲノム変異) 症例に着目した。これまでの報告では、ART と関連するインプリント異常症の発症原因が圧倒的にエピ変異の頻度が高いからである。また、これまでに収集したサンプルも合わせ、ART を受けた疾患患者 (SRS:5 名、BWS:1 名)、自然発症の患者 (SRS:10 名、BWS:6 名) について解析した。

(1) ヒトメチル化インプリント領域の同定：

ヒト精子、血液 DNA を用いて、全てのメチル化インプリント領域を同定した。また、DNA 多型を含む Bisulphite PCR Sequence 法の条件検討を行った。

(2) 疾患患者のインプリント遺伝子の DNA メチル化の解析と ART との関連：

DNA 多型を含む Bisulphite PCR Sequence 法を用いて、ヒトメチル化インプリント領域の DNA メチル化の解析を正確に行い、メチル化異常のパターンについて分析し、発症機序を推測した。また、インプリントを受けない領域に関して、2 領域についても同様の解析を行った。SRS の場合、ART 治療を受けた患者では、6 例中 5 例において、複数のインプリント領域で異常を認めた。これらの症例は全例、精子型と卵子型 DMR の両方に異常を認めた。また、同一症例で、高メチル化と低メチル化を示し、またその程度は、完全型ではなく、モザイク型を示す事が特徴にみられた。BWS は 1 例しか ART 後の症例は解析出来なかったが、SRS の場合と同様の傾向が見られた (表 1)。

一方、非 ART 群においては、SRS では 10 例中 3 例、BWS では 6 例中わずか 1 例に複数領域にメチル化異常を示すことが判明した。

D. 考察

これまでの先天性ゲノムインプリンティング異常症における DNA メチル化の解析により、ART との関連が示されたインプリント異常症は、SRS と BWS で、いずれも DNA メチル化の異常を原因とする (エピゲノム変異) の症例が多く、ART 出生児においてもエピゲノム変異の症例が多い傾向にあった。このメチル化異常が ART 出生児の場合、どのような分子機構を原因として起こっているのか、つまり発症時期を特定し、そのリスク要因を同定する事を試みた。その結果、ART 出生児の特徴としては、(1) 責任領域以外の複数のインプリント領域で異常を認めた (2) 同一症例で、精子型と卵子型 DMR の両方に異常を認めた (3) 同一症例で、高メチル化と低メチル化を示す症例が多い (4) メチル化異常の程度は、完全型ではなく、モザイク型を示す症例が多く見られた。症例数が少ないため、正確な評価はできないが、これらの結果から、ART により発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。また、非インプリント遺伝子では、全く影響を

A.SRS

症例	不妊治療	メチル化異常			
1	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated	PEG10 Hypermethylated (mosaic)	GRB10 Hypermethylated ZNF597 Hypomethylated
2	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)			
3	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated (mosaic)		
4	IVF-ET	H19 Hypomethylated	GRB10 Hypermethylated		
5	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	INPP5F Hypermethylated		
6	-	H19 Hypomethylated			
7	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	ZNF597 Hypermethylated (mosaic)	ZNF331 Hypomethylated (mosaic)	
8	-	H19 Hypomethylated			
9	-	H19 Hypomethylated (mosaic)			
10	-	H19 Hypomethylated			
11	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated		
12	-	H19 Hypomethylated			
13	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	FAM50B Hypomethylated		
14	-	H19 Hypomethylated			
15	-	H19 Hypomethylated			

B.BWS

症例	不妊治療	メチル化異常			
1	ICSI	LIT1 Hypomethylated	ZDBF2 Hypermethylated	PEG1 Hypermethylated	NESPAS Hypomethylated (mosaic)
2	-	LIT1 Hypomethylated			
3	-	LIT1 Hypomethylated			
4	-	LIT1 Hypomethylated			
5	-	LIT1 Hypomethylated			
6	-	LIT1 Hypomethylated	ZDBF2 Hypomethylated	ZNF331 Hypomethylated (mosaic)	
7	-	LIT1 Hypomethylated			

表1 ARTと非ART出生患者のメチル化インプリントの比較

受けていない。このことから、ゲノム全体では影響を受けず、インプリント遺伝子特有の現象で、インプリント遺伝子領域は影響を受けやすい事が示唆された。

に原因があると推測される。つまり、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）に注意を払わなければならないと考えられる。

E. 結論

ARTにより発症したインプリント異常症の分子機構について異常のパターン分析に、共通の特徴的なパターンが見られ、ARTにより発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。つまり、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）に注意を払わなければならないと考えられる。しかし、症例数が少ないため、正確な評価はできないため、今後も症例の収集が必要である。また、今後は、エピゲノム異常を示す症例の発症機序の解明、原因不明例の遺伝子検索、特に non-coding RNA の機能に着目して行く予定である。そのため、網羅的メチル化解析と次世代シーケンサーによる遺伝子配列を決定する計画である。

F. 健康危険情報

未だ正確には評価できないが、ARTにより発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のメチル化の維持

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy P.J, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, **Arima T**, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyanagi K, Soloway P.D. & Sasaki H. Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrfl locus. **Science**. 332: 848-852.2011.
2. Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, **Arima T**. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis. **Fertility and Sterility**. 95: 129-34 2011.
3. Maeda T, Oyama J, Higuchi Y, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori Y, Nakazono T, **Arima T**, Mimori K, Makino N. The physical ability of Japanese female elderly with cerebrovascular disease correlates to the telomere length and subtelomeric methylation status in their peripheral blood leukocytes. **Gerontology**.

- 57:137-43. 2011.
4. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Arima T, Makino N. The correlation between the clinical laboratory data and the telomere length in peripheral blood leukocytes of Japanese female patients with hypertension. **The Journal of Nutrition, Health and Aging (JNHA)**. 15:240-4. 2011.
 5. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori T, Nakazono T, Arima T, Makino N. The physical ability of elderly female Japanese patients with cerebrovascular disease correlates with the telomere length in their peripheral blood leukocytes. **Aging Clinical and Experimental Research**. 57: 137-43 2011.
 6. Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Arima T. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. **Human Molecular Genetics** 21:548-52.2011
 7. Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Junichi Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, Arima T. High-throughput detection of imprint methylation errors in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. **BMC Medical Genomics** (in press).
 8. Arima T, Okae H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Hayashi C. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples. **INTECH** (in press).
 9. Sakurai M, Ohtake J, Ishikawa T, Tanemura K, Hoshino Y, Arima T, Sato E. Distribution and Y397 phosphorylation of focal adhesion kinase on follicular development in the mouse ovary. **Cell and Tissue Research** (in press).
 10. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子, 阿部千鶴, 林千賀. 「ART におけるエピジェティクス異常」産婦人科の実際. 金原出版株式会社, 741-750, 2011
 11. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子. 「ヒト卵子・精子・胚のエピジェティクス」卵子学. 京都大学学術出版会, 122-131, 2011
 12. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子. 「母子の健康と環境影響」助産雑誌. 医学書院, 62, 11, 2011
 13. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 宮内尚子, 佐藤美美. 「ゲノムインプリンティングと発がん」癌と化学療法. 癌と化学療法社, 1745-1749, 2011
 14. 有馬隆博. 「トピックス」日本生殖内分泌学会雑誌 **Japanese Journal of Reproductive Endocrinology** NO.17 2012 印刷中

2. 学会発表

1. 第9回統合産婦人科研究合同セミナー「エコチルについて」有馬隆博 2011.2.19 仙台
2. 第6回日本生殖再生医学会「ARTにおけるエピジェネティック機構」有馬隆博 2011.3.13 東京
3. 第28回日本医学会総会「生殖補助医療とインプリンティング異常」有馬隆博 2011.4.8 東京
4. 第96回東北医学会総会「ゲノムインプリンティングとヒト疾患」有馬隆博 2011.5.20 仙台
5. 第4回生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク会「胎盤特異的インプリント遺伝子の役割」有馬隆博 2011.11.18 大阪
6. 熊本大学発生発生医学研究所セミナー「胎盤形成とゲノムインプリンティング」有馬隆博 2012.2.10 熊本

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

次世代シーケンサーを用いた遺伝性腎症の解析

研究分担者 呉 繁夫 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野 教授

研究要旨

膜性増殖性糸球体腎炎は、腎生検により病理学的解析で診断される腎疾患で、腎機能不全が進行し、多くは腎透析が必要になる難病である。遺伝的要因も関与していると考えられるが、責任遺伝子の同定は進んでいない。症例の多くは孤発例であるが、稀に家系例が存在する。今回、膜性増殖性糸球体腎炎の3世代家系を見出し、その責任遺伝子の同定を次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析した結果、罹患者のみに存在し、非罹患者には存在しない変異でアミノ酸配列の変化を伴うものを15種類見出し、現在確認を行なっている。

研究協力者

熊谷直憲(東北大学大学院小児病態学分野)

菊池敦夫(東北大学大学院小児病態学分野)

A. 研究目的

膜性増殖性糸球体腎炎は、腎生検により病理学的解析で診断される腎疾患で、腎機能不全が進行し、多くは腎透析が必要になる難病である。遺伝的要因も関与していると考えられるが、責任遺伝子の同定は進んでいない。症例の多くは孤発例であるが、稀に家系例が存在する。今回、膜性増殖性糸球体腎炎の3世代家系を見出した。本研究は、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析にて、その病因遺伝子の同定することを目的とする。

B. 研究方法

図1の家系図中「*」で示す罹患者3名及び非罹患者3名より、インフォームド・コンセントを書面で得た上で、ゲノムDNAを調整した。次に、TruSeq Exome Enrichment Kit, (イルミナ社)を用いエクソン部の濃縮を行なった。得られたDNAをイルミナ社シーケンス試薬を用い反応を行い、GAII (イルミナ社)を用いて塩基配列を解析した。多型データベースに登録のないものでエクソン部に存在する遺伝子変異/多型を表としてまとめた。

(倫理面への配慮)

本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認を得た。

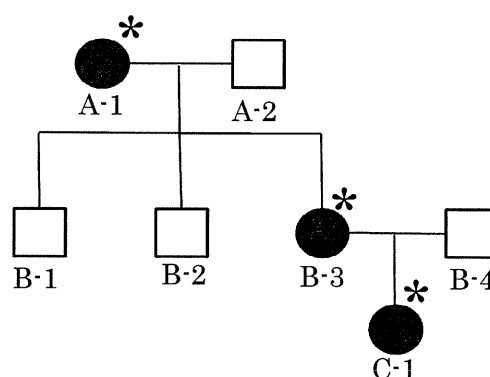


図 膜性増殖性糸球体腎炎の日本人家系

C. 研究結果

エクソン領域に存在し、しかも多型データベースに登録のない遺伝子多型/変異は、A-1に644個、B-3に626個、C-1に652個、認めた。そのうち、A-1、B-3、C-1にヘテロ接合体で認め、非罹患者3名には認められないものは、40個存在した。X染色体上にあり罹患者のみに存在する遺伝子変異は、存在しなかった。更に、そのなかでアミノ酸配列の変化を伴うものは、15個(内13個はミスセンス変異、2個は挿入変異であった。現在のこれらの候補遺伝子変異の確認を行なっている。

D. 考察

エクソーム解析のために行なったエクソン領域を