

TruSeq Enrichment Kit を用いて精製した結果、重複を除いた塩基配列のうち、60–65%の塩基配列はエクソン領域に由来するものであった。今後、得られた候補遺伝子変異をキャピラリー型シーケンサーで確認した後、他の膜性増殖性糸球体腎炎の孤発症例で同一の遺伝子に変異があるかどうかをスクリーニングすることにより、病因遺伝子の同定を行う予定である。

## E. 結論

3世代からなる膜性増殖性糸球体腎炎の家系を次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行い、候補遺伝子変異を得た。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, 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)

- 2) 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)
- 3) Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Stanier P, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Copp AJ, Greene NDE, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects. *Hum Mol Genet* (in press)
- 4) 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)

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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

研究分担者： 富田 博秋

東北大学 大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野 准教授

研究要旨： 希少遺伝性難病には精神発達の障害を伴う疾患が多く、希少遺伝性難病にみられる精神発達の障害の病態を解明することは、各疾患の病態解明のみならず、精神発達障害全体の病態の理解にも繋がるのが期待される。このような疾患の一つであるソトス症候群は小児期の顕著な過成長、特異的頭顔面、精神発達障害を中心に多様な症状を呈する出生率 1-2万人に1人程度の常染色体優性遺伝性疾患である。本症の責任遺伝子であるNuclear receptor SET Domain containing protein 1 (NSD1)遺伝子はヒストン修飾活性、転写調節に関わることが知られるが機能の詳細は不明である。ソトス症候群罹患者は精神発達遅滞の他、注意欠陥・多動性障害(ADHD)やてんかんなどの中枢神経系障害を呈するが、本年度はこれらの中枢神経障害に関わって、NSD1の下流で引き起こされる遺伝子発現障害を網羅的分子遺伝学的解析により特定することを試みた。まず、組織・細胞特異性によらず普遍的にNSD1の下流で発現調節を受ける遺伝子群を想定し、ソトス症候群罹患者と健常対照者由来のリンパ芽球を用いた包括的遺伝子発現解析により、疾患特異的遺伝子発現変化をスクリーニングし、疾患群に特異的に発現変化をきたす遺伝子群のうち、中枢神経系に発現する遺伝子群を候補遺伝子としてリストアップし、定量PCR法などにより、発現異常を検証した。これらの遺伝子の多くは細胞間信号伝達、発生、細胞分化、神経発達、アポトーシスに関与する生理機能を有することが知られており、ソトス症候群ではNSD1遺伝子の欠失・変異によりエピジェネティックな転写調節機構を介してこれらの遺伝子群の発現の過剰な誘導、抑制が起こり、本症候群の症状を呈することが想定される。今後、次世代シーケンサーによるChIP-seq解析等を用いて更にソトス症候群を始めとする精神発達障害を呈する疾患の病態メカニズムを解明することで、精神発達障害の病態解明と治療法開発に繋がることが期待される。

### 研究協力者：

福與なおみ（東北大学病院 発生発達医学講座 小児病態学分野）

小野 千晶（東北大学 大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野）

兪 志前（東北大学 大学院医学系研究科 精神・神経生物学分野）

### A. 研究目的

次世代シーケンサーによるChIP-seq解析等の網羅的分子遺伝学的解析技術を用いてソトス症

候群を始めとする精神発達障害を呈する疾患の病態メカニズムを解明することで、精神発達障害の病態解明と治療法開発に繋げることを目指す。ソトス症候群の病態において責任遺伝子であるNuclear receptor SET Domain containing protein 1 (NSD1)遺伝子のハプロ不全により、NSD1の下流で引き起こされる遺伝子発現障害を網羅的分子遺伝学的解析により特定し、病態の中でも、ソトス症候群にみられる精神発達遅滞、注意欠陥・多動性障害(ADHD)やてんかんなどの中枢神経系障害の病態のメカニズムを解明し、

ソトス症候群の病態の理解のみならず中枢神経の発達の障害のメカニズムの解明に繋げることを具体的な目的とする。本年度は、組織・細胞特異性によらず普遍的にNSD1の下流で発現調節を受ける遺伝子群を想定し、ソトス症候群罹患者と健常対照者由来のリンパ芽球を用いた包括的遺伝子発現解析により、疾患特異的に遺伝子発現変化をきたす遺伝子群を特定、その中から中枢神経の発達に関わる遺伝子の機能や病態への関与を検証することを目的とした。また、次年度以降に計画している罹患者の血液検体を対象とする次世代シーケンサーによるChIP-seq解析等を用いた転写調節機構の研究を行うために血液検体、臨床情報の集積を行った。

## B. 研究方法

NSD1のハプロ不全の影響で疾患特異的に発現変化する新規分子の探索のためにソトス症候群罹患者5名と健常者6名の株化リンパ芽球を同時に解凍して経代培養を始めたものから総RNAを抽出してイルミナ社Human-6 V2 microarray で包括的な遺伝子発現を行ったデータの解析を行った。細胞培養とマイクロアレイ実験は2回行い、アーティファクト要因と生物学的変化から来る要因との検討も行った。また、そのデータの妥当性、再現性を検証するために、独立した新規のソトス症候群罹患者6名と健常対照者12名を対象とする同様のマイクロアレイ実験のデータの解析も行った。各アレイのプロープの信号強度をBeadStudio 3.1 ソフトウェアで解析した。マイクロアレイ解析を行い、データの再現性の検証や、各種機能カテゴリ解析、パスウェイ解析、上流転写調節機構の予測解析などを行った。また、ヒト中枢神経細胞、グリア細胞由来培養細胞の遺伝子発現プロファイルをイルミナ社Human-6 V2 microarrayで解析したデータと比較して、ソトス症候群の疾患特異的発現異常を呈する遺伝子のうち、中枢神経系に発現すると考えられる

遺伝子群を特定した。

また、上記のマイクロアレイデータ解析の結果から、ソトス症候群の病態メカニズムに係る発現異常を呈する候補遺伝子として注目される遺伝子について特異的なプライマーをデザインし、新たに培養実験を行い、総RNAを抽出して、SybrGreen法を用いた定量PCR法で詳細な発現解析を行った。

また、次年度以降、ソトス症候群罹患者の新鮮血を対象とする遺伝子発現異常を確認し、また、発現調節異常のEpigeneticなメカニズムを解明するための次世代シーケンサーを用いたChIP-seq研究を行うため、ソトス症候群罹患者の臨床データと新鮮血検体の集積を行った。

## C. 研究結果

ソトス症候群の2つのコホートでともに遺伝子発現が20%以上増加している遺伝子が107、20%以上減少している遺伝子が108検出され、このうち、両コホートともに倍以上発現が増加している遺伝子が19、半分以下に発現が減少している遺伝子が11特定された。これらの遺伝子の多くは細胞間信号伝達、発生、細胞分化、神経発達、アポトーシスに関与する生理機能を有することが知られており、ソトス症候群ではNSD1遺伝子の欠失・変異によりエピジェネティックな転写調節機構を介してこれらの遺伝子群の発現の過剰な誘導、抑制が起こり、本症候群の症状を呈することが想定された。

マイクロアレイにより特定されたソトス症候群の疾患特異的に発現が倍以上あるいは半分以下に変化する遺伝子のうち罹患者群で顕著に発現異常を認めた4つの遺伝子について特異的なプライマーをデザインし、新たな培養実験を行って、SybrGreen法による定量PCR実験で検証を行った。うち2つの遺伝子は疾患群で5倍以上と有意に発現が高く、1つの遺伝子は1/5以下と有意に発現が低値を示していた。

## D. 考察

健常対照者には高発現するのに対し、ソトス症候群罹患者では発現しない遺伝子や、逆に健常対照者では発現がみられないのに対し、ソトス症候群罹患者では高発現する遺伝子が特定され、疾患特異的のマーカーとしての利用や病態解明に有用である可能性が示唆された。ソトス症候群罹患者のリンパ芽球で発現変化を受ける遺伝子群はアポトーシス関連遺伝子を多く含んでいた。NSD1 ノックアウトマウスではアポトーシスが観察される (Rayasam ら2003年) ことなどから NSD1変異により、アポトーシス関連遺伝子の転写に顕著な変化が生じ、各組織でアポトーシスの異常を引き起こすことで本症の症状が顕在化することが推察された。ソトス症候群罹患者のリンパ芽球で発現変化を受ける遺伝子群には転写因子OCT1/POU2F1に制御されることが知られる遺伝子が多かったが、先行研究から転写因子OCT1はNSD1により修飾を受けるNFkBのp65の制御を受けることが知られることから、本知見はNSD1の変異、欠失の下流でおこる病態メカニズムを解明する上で有用と考えられた。

また、マイクロアレイにより特定されたソトス症候群の疾患特異的に発現が倍以上あるいは半分以下に変化する遺伝子のうち罹患者群で顕著に発現異常を認めた4つの遺伝子について新たな培養実験を行って定量PCR実験で検証を行ったところ、うち2つの遺伝子は疾患群で5倍以上と有意に発現が高く、1つの遺伝子は1/5以下と有意に発現が低値を示していたことから、ソトス症候群においてNSD1ハプロ不全の影響で顕著に発現異常を呈し、疾患の臨床症状に関係する遺伝子として注目された。

次年度以降、ソトス症候群罹患者の新たなコホートからの新鮮血を対象として本年度同定した遺伝子発現異常を確認し、また、発現調節異常のEpigeneticなメカニズムを解明するための次

世代シーケンサーを用いたChIP-seq研究を行うことで、ソトス症候群の疾患メカニズムと精神発達障害の病態メカニズムの解明、更には治療法に繋がることを期待される。

## E. 結論

ソトス症候群がNSD1の欠失、変異により、アポトーシス制御などに関与する幾つかの分子の発現に顕著な影響を及ぼすことで、精神発達障害を含む本症候群の多彩な症状が惹起されるメカニズムが示唆された。次年度以降、次世代シーケンサーによるChIP-seq解析等を用いて更にソトス症候群を始めとする精神発達障害を呈する疾患の病態メカニズムを解明することで、精神発達障害の病態解明と治療法開発に繋がることを期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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
2. 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
3. 兪志前, 小野千晶, 田邊陽一郎, 小松浩, 松岡洋夫, 曾良一郎, 富田博秋. 双極性障害治療薬のアストロサイトにおける発現プロファイルへの影響. *Bipolar Disorder研究会年会報*, 9: 13-14, 2011.
4. 富田博秋: 遺伝子発現解析研究の実際～ブレインバンク運営に求められている品質管理とは. 脳バンク 精神疾患の謎を解くために. 光文社新書, 東京, pp167-176, 2011.
5. 富田博秋: 求められるブレインバンクの姿 ～ブレインバンクは実際に何をするのか～. 脳バンク 精神疾患の謎を解くために. 光文社新書, 東京, pp237-245, 2011.
6. 富田博秋: 精神神経疾患死後脳のバイオリソース整備. 研究開発戦略センター国際比較調査報告書 2011年版, 独立行政法人科学技術振興機構. pp126-129, 2011.
7. 富田博秋, 小野千晶, 兪志前: 統合失調症の陰性症状の進行に関わる精神神経免疫学的メカニズムに関する研究. こころの健康と病気2010年版, 財団法人 精神・神経科学振興財団. pp119-131, 2011.
8. 富田博秋: 統合失調症の死後脳研究の現状と展望. *精神科治療学* 26 (12), 1581-1587, 2011. (December)

## 2. 学会発表等

1. Tomita H, “Neuroethical perspectives in psychiatric brain banking”, Symposium “Progress in Neuroethics for Human Brain Research” Neuro2011, 2011, Yokohama [2011/9/15]
2. 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. 第33回日本生物学的精神医学会. 東京. [2011/5/20]
3. 岡田武也、橋本亮太、山森英長、梅田知美、安田由華、大井一高、福本素由己、富田博秋、武田雅俊. 統合失調症リスク遺伝子ZNF804Aの新規mRNA variantの検討. 第33回日本生物学的精神医学会. 東京. [2011/5/20]
4. 福與なおみ、富田博秋、岡本信彦、黒澤健司、松本直道、黒滝直弘、萩野谷和裕、植松貢、土屋滋. ソトス症候群のスクリーニング・診断システムの確立に向けた実態調査. 第53回日本小児神経学会総会. 横浜[2011/5/26-8]若手優秀ポスター賞最優秀演題受賞
5. 兪志前、小野千晶、富田博秋. 脳内ミクログリアと末梢単球の遺伝子発現の相関解析 ～統合失調症のミクログリア活性化を介した病態解明に向けた研究手法の開発～. 第6回統合失調症学会. 札幌[2011/7/18]
6. 小野千晶、兪志前、小松浩、曾良一郎、松岡洋夫、石井直人、富田博秋. 統合失調症理患者のTh1およびTh2細胞のマイクロアレイ遺伝子プロファイリング. 第6回統合失調症学会. 札幌[2011/7/18]
7. 福與なおみ、富田博秋、岡本伸彦、黒澤健司、松本直通、黒滝直弘、石川亜貴、萩野谷和裕、植松貢、土屋滋、呉繁夫. ソトス症候群のスクリーニング・診断システム確立にむけた実態調査. 第114回日本小児科学会学術集会. 東京[2011/8/12]
8. Yu Z, Ono C, Tanabe Y, Sora I, Tomita H. Effect of Chronic Lithium Treatment on Gene Expression Profile in Mouse Microglia and Brain Dendritic Cells. Neuroscience 2011 (第34回日本神経科学大会). 横浜[2011/9/15]
9. Ono C, Yu Z, Tanabe Y, Ishii N, Tomita H. FACS-microarray study of immune cell from patients with schizophrenia. Neuroscience 2011 (第34回日本神

経科学大会). 横浜[2011/9/17]

10. 福與なおみ、黒澤健司、岡本伸彦、松本直通、黒滝直弘、石川亜貴、萩野谷和裕、土屋滋、呉繁夫、富田博秋. 本邦におけるソトス症候群の臨床像の検討—ソトス症候群のスクリーニング・診断システム確立にむけて—. 日本人類遺伝学会第56回大会. 横浜[2011/11/11]
11. Itoi K, Uchida K, Fuse T, Iwasaki Y, Yokohashi H, Okazaki A, Sawada K, Das G, Kobayashi K, Tomita H, Tanaka C, Kinoshita K, Ohara S. Identification of novel transcription factors for catecholamine gene expression based upon the comprehensive analyses of transcripts in fetal pontine noradrenergic neurons by FACS-array technology. Society for Neuroscience 38th annual meeting, Washington DC, USA. November 12-16, 2011 (Program #929.12)
12. 富田博秋. ソトス症候群についてもっと分かることよいは何でしょうか? ～基礎研究のめざすところ～. 第2回ソトス症候群の会. 横浜 [2011/11/23]

## G. 知的所有権の取得状況 (予定を含む。)

### 1) 特許取得:

1. Huda A, Bunney WE, Choudary PV, Evans SJ, Jones EG, Li J, Lopez JF, Thompson RC, Myers R, Tomita H, Vawter MP, Watson S. “Genes and pathways differentially expressed in bipolar disorder and/or major depressive disorder” Australian Patent Application 2005258161, Date of Acceptance: May 6, 2011
2. Huda A, Bunney WE, Choudary PV, Evans SJ, Jones EG, Li J, Lopez JF, Thompson RC, Myers R, Tomita H, Vawter MP, Watson S. “Genes and pathways differentially expressed in bipolar disorder and/or major depressive disorder” European Patent Application 11175854.6-2402, Date of Acceptance: Dec 19, 2011

### 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遺伝子情報解析パイプラインの確立

研究分担者 長嶋 剛史 東北大学大学院医学系研究科 助教

### 研究要旨

次世代シーケンサーによって得られる大量の配列情報から生物学・医学的に興味深い遺伝子および変異を抽出しその意味付けを行うためには配列情報解析やアノテーション解析をはじめとするデータ解析手法およびそれらの効果的な組み合わせが重要となる。本研究では、次世代シーケンサーによって得られる大量の配列情報から病因の候補となる変異を得るために必要な一連の処理を遺伝子情報解析パイプラインとして構築し、それをもって病因遺伝子の抽出を目指す。

### 研究協力者

中山 啓子(東北大学大学院医学系研究科)

黒田 清隆(東北大学病院神経内科)

### A. 研究目的

次世代シーケンサー（以下 NGS と略す）の登場により大量の配列情報が容易に得られるようになってきた。例えば、本研究事業で使用する Illumina 社の HiSeq2000 システムの場合、一度の実験で得られる配列情報はヒトゲノムの 20 倍に相当する 600Gb 程度である。したがって NGS データ解析においてはこのような大量の配列情報を効率的に扱うための情報処理技術ならびに ACGT の文字列情報から生物学・医学的に興味深い知見を抽出するためのバイオインフォマティクス解析手法が極めて重要な役割を果たす。

配列データから興味深い結果を得るためには多段階にわたる情報解析が必要となる。データ解析の各段階においては数多くの手法が利用可能である。これまでに確立されている配列情報解析の手法に加え、新規に NGS 用に開発された手法、開発途上のものから広く利用されているものまで質、量ともに多岐にわたる。これらの情報解析手法は現在世界中で活発に開発が進められており、数多の解析手法から目的に応じた適切な手法の組み合わせを選択する事もまたデータ解析における重要な課題である。

そこで本分担研究では NGS によって得られる配列データから希少遺伝性疾患との関連が示唆される候

補遺伝子群の絞り込みを行い、生物学・医学的に意味のある情報を抽出するために必要な一連の情報解析の流れを遺伝子情報解析パイプラインとして確立することを目的とする。開発したパイプラインを用いて本研究事業によって産出されるデータを解析し病因遺伝子を解明することを目指す。

### B. 研究方法

これまでに報告されている NGS を用いた疾患原因候補遺伝子探索の手順を参考にパイプライン中のベースとなる部分の開発を行う。パイプラインは大きく以下の 7 つのステップから構成される。

- (1) QC チェック：得られたリードのクオリティに問題が無いか配列および配列に付随するクオリティスコアの情報に基づいて判断する。
- (2) マッピング：シーケンスされたリードがリファレンスとなるゲノム配列のどの位置由来かを同定する。
- (3) 重複リードの除去：同一のゲノム座標にマップされたリードを除去する。
- (4) バリエントコール：リファレンス配列と異なる箇所を同定する。
- (5) バリエントアノテーション：コールされた変異が遺伝子構造に変化を引き起こしうるか、機能に影響を及ぼし得るかを推測する。
- (6) 遺伝子アノテーション：変異を持つとコールされた遺伝子について、既知の機能情報、関与するシグ

ナル伝達・代謝パスウェイに関する情報を付与する。

(7) 絞り込み：想定される遺伝様式にしたがう変異の選別や既知の変異の除外を行う事で、対象とする疾患との関連が示唆される新規な変異を抽出する。

上記(1)から(6)まではデータや疾患の種別を問わず共通して適用される手順、(7)は各疾患や検体の状況に応じて変更する箇所となる。これらの手順のうち、マッピングの結果がバリエントコールの結果に影響を及ぼす事、異なるバリエントコール法で得られる結果に差異が見られる事がよく知られている。そこで本研究では複数の異なるマッピング手法およびバリエントコール手法を併用する。これにより、より網羅的な変異の検出と同時に得られた変異の優先順位付けを行う。なお、これらの解析はデータ解析専用のPCクラスタシステム上で専用の環境を構築して行う。

#### (倫理面への配慮)

本研究における倫理面への配慮については、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」に沿って行う。研究の遂行にあたっては、東北大学における倫理委員会の審査手続きを経て実施する。

#### C. 研究結果

前節に記した手順にしたがって遺伝子情報解析パイプラインを構築した。解析の各ステップで用いた具体的な手法は以下の通りである。各解析ツールには詳細なパラメータが設定可能である。現在は各ツールの規定値および推奨値、あるいはそれらを緩和したものを採用した。なお括弧内の数字は前節にあるものと対応している。

- (1) FastQC
- (2) bwa, novoalign
- (3) Picard
- (4) samtools, GATK
- (5) ANNOVAR
- (6) 独自プログラム
- (7) 独自プログラム

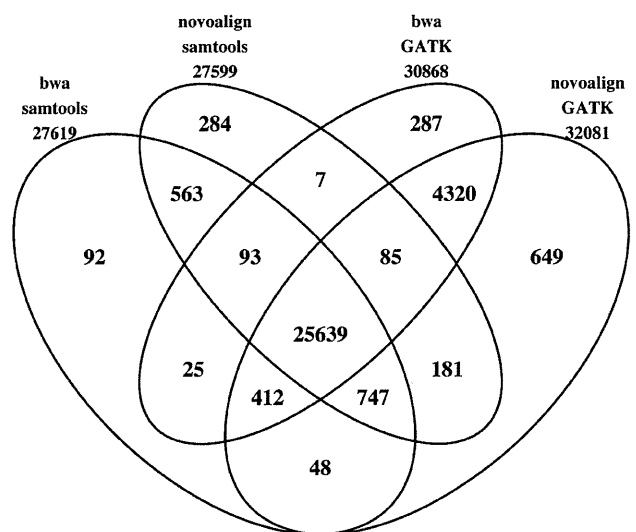
(5) から (7) のステップにおいては Entrez Gene、OMIM、KEGG Pathway、Gene Ontology、dbSNP、1000

Genomes の各データベースを用いてアノテーションを行った。

続いてサンプルデータの解析を通じて本研究で開発したパイプラインの有効性を検証した。対象としたデータは健常者全血由来のゲノム DNA を断片化し、Agilent社のSureSelectを用いて既知遺伝子のエキソン領域を濃縮したサンプルを Illumina 社の Genome Analyzer IIx で paired-end (片側 69 塩基) で読み取ったものである。シーケンスの結果得られたリード数は 1 億リード (5 千万リードペア)、標的領域における平均リード深度は 67 であった。

解析の結果得られた SNV および Indel の数はそれぞれ 33432 個と 5958 個であった。各パイプラインで検出された変異の内訳を図 1 に示す。

SNV : Total=33432



Indel : Total=5958

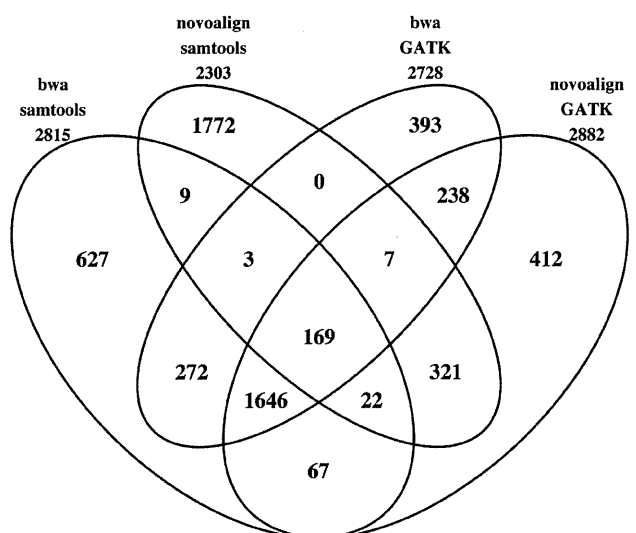


図1 4つのパイプラインで検出された変異の内訳

図1より複数手法の併用によって単一手法のみと比べてより多くの変異が検出されていることが分かる。また今回解析した条件においては、マッピング法による差異よりもバリエーションコール法による違いが大きい結果となった。変異の種類別に見た手法間の一致度はSNVに比べてIndelで大きく異なることも明らかとなった。次に、特定の手法（bwa + samtools の組み合わせ）でのみ検出された92個の変異と4つの手法全てで共通して検出された25639個の変異のクオリティスコアを比較した。

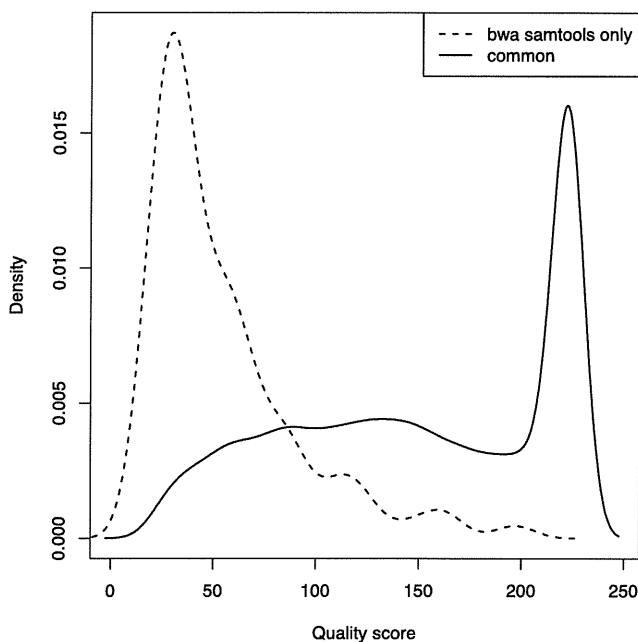


図2 単一手法と複数手法でコールされたSNVのスコアの分布

図2は異なる解析手法で共通して得られる変異のほうがより高いスコアを持つ事を顕著に示している。最後に、本パイプラインによって得られた結果の精度を調べるために同一サンプルを別の計測機器によって得られた結果と比較した。比較対象としてSNP array (Illumina社 HumanOmni2.5)による解析結果を用いた。その結果、96.9-99.1%と非常に高い一致度を示すことを確認した。

以上の結果から、NGSデータを本パイプラインによって解析した結果が異なる計測手法で得られた結果とよく一致すること、複数の解析手法を併用することでより広範に変異を検出可能であること、それらに

基づいて変異リストの優先順位付けが可能であることが明らかとなった。

#### D. 考察

本研究ではNGSによって得られる大量の配列情報から対象とする疾患との関連が想定される変異を抽出するための遺伝子情報解析パイプラインを開発し、データ解析およびSNP arrayとの比較解析からその有効性を検討した。得られた結果は複数パイプラインの併用による精度の向上を示していた。またこれまでに報告のある変異の種類による手法間のばらつきの差異、すなわちSNVで一致が多くIndelで不一致が多いことを確認した。単一塩基の置換に比べて複数塩基の連続した変異の検出には解析手法のさらなる改善が必要であると考えられる。異なる手法で共通して得られる変異が多くかつSNP arrayとの一致度が高いことから本パイプラインが高精度にSNVを検出可能であることが示唆された。一方でSNP array上には存在しない新規SNV候補も相当数検出された。そのうちの9割以上が2つ以上のパイプラインで検出されたものである。今後それらについて検証を行う必要がある。

#### E. 結論

本研究ではNGSによって得られる配列データから病因の候補となる変異を抽出するために必要な一連のデータ解析を遺伝子情報解析パイプラインとして構築した。本研究で開発したパイプラインは本研究事業で得られるシーケンズデータに広く適用可能である。今後、本手法を実データに適用し、各研究者が対象とする疾患に関連する可能性のある変異を同定するとともに、その検証実験から得られる情報を元に解析パイプラインのさらなる精度向上を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

高感度に多型を検出するためのエキソーム・シーケンシング. 舟山亮、長嶋剛史、中山啓子. 実験医



学. Vol. 30、No. 4、pp. 629-634、2012

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

特に無し。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特に無し

## 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

研究分担者 舟山 亮 東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センター  
細胞増殖制御分野 助教

### 研究要旨

次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析は、単一遺伝子病の病因変異の同定に強力な手法で、ゲノムDNAからのエキソン領域の濃縮、次世代シーケンサーによる配列決定、および配列データの情報解析、の3ステップからなる。本研究では、まず、エキソン濃縮ステップの条件検討を行い、1マイクログラムのゲノムDNAから高品質（重複リード率20%以下）で高収量（500ng以上）のライブラリDNAを作製できる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解析パイプラインを構築した。最後に、疾患の病態解明と診断マーカーの探索に応用可能な、次世代シーケンサーを用いた血清中微量RNAの解析システムを構築した。これらの解析システムを用いて、遺伝性難病の病因変異が同定され、その病態が解明されることが期待される。

### 研究協力者

中山 啓子

東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センター 細胞増殖制御分野 教授

きるエキソーム解析のサンプル調製プロトコルを確立し、2)高感度かつ高精度にバリエーションを抽出できる情報解析パイプラインを構築する。また、3)疾患の病態解明と診断マーカーの探索に応用可能な、次世代シーケンサーを用いた血清中微量RNAの解析システムを構築する。

### A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析は、ゲノムDNAからエキソン領域を濃縮し、これを超並列的に配列決定する技術で、もはや遺伝子変異解析になくってはならない手法となっている。しかしながら、その解析技術はいまだ日進月歩であり、情報解析にあっては日々新しい解析プログラムが開発されている。一方、エキソーム解析のサンプル調製は、病因変異の同定に直接的に関わる情報解析の陰に隠れて目立たない存在となっているが、配列データを生み出す根幹となる部分である。病因変異を同定するためには、高品質のDNAサンプルに裏打ちされた高品質の配列データが必要である。

そこで本研究では、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を構築することを目的として、1)高感度に遺伝子変異を検出で

### B. 研究方法

#### 1. エキソーム解析のサンプル調製

次世代シーケンサーを用いて希少遺伝性難病の病因変異を同定するために、ゲノムDNAからエキソン領域を濃縮して配列決定するエキソーム解析を採用した。予備解析の結果、解析に供するゲノムDNAの品質とライブラリDNA作製時の反応条件が、エキソン領域の読み取り深度（カバレッジ）に影響し、結果として遺伝子変異の検出感度に大きく影響しうることが判明した。そこで、ライブラリDNA作製の各ステップを検証し、高感度に遺伝子変異を検出するためのサンプル調製プロトコルを確立した。

#### 2. エキソームの情報解析

次世代シーケンサーにより決定した塩基配列は

以下のように解析した。まず、読み取った 70~100 塩基の配列（リード）をヒトの参照ゲノムにマッピングし、1 分子の DNA 断片に由来すると考えられる重複リードを除いた。次に参照ゲノムと異なる塩基配列をバリエーションとして抽出し、バリエーションに遺伝子情報を付加した。家族歴のある検体については、想定される遺伝様式にもとづいてバリエーションの絞り込みを行い、病因遺伝子変異を探索した。家族歴のある cytoplasmic body myopathy の 4 検体を解析した結果、解析プログラムの種類により、抽出されるバリエーションに違いがあることが明らかとなった。そこで、複数の解析プログラムを併用してできるだけ多くのバリエーションを抽出し、病因遺伝の取りこぼしを少なくする解析パイプラインを構築した。抽出されるバリエーションが多く、絞り込みが困難な場合は、複数の解析プログラムで共通に抽出されるバリエーションを優先的に解析した。

### 3. 血清中微量 RNA の次世代シーケンス解析

C 型肝炎患者由来の血清から RNA を精製し、これを二本鎖 DNA に変換した後、次世代シーケンサーを用いて配列決定した。血清からの微量 RNA の精製はフェノールを用いて行うのが最も効率的であった。情報解析では、読み取ったリードから宿主（ヒト）由来のリードを除き、残ったリードを C 型肝炎ウイルスの配列データベースにマッピングして、ウイルスゲノムの多様性を解析した。

### （倫理面への配慮）

本研究における倫理面への配慮については、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」に沿って行う。研究の遂行にあたっては、東北大学における倫理委員会の審査手続きを経て実施する。

### C. 研究結果

サンプル調製の各ステップを精査した結果、特に注意すべき点として、1)ゲノム DNA の正確な定量、2)ハイブリダイゼーション反応の温度制御、3)PCR 増幅のサイクル数、が挙げられた。一般的に DNA の定量は吸光度測定により行われるが、RNA などの混入により濃度が高く見積もられる傾向にある。そこで、蛍光色

素による DNA 定量法を採用し、高収量（500 ng 以上）のライブラリ DNA が得られるプロトコルを確立した。ハイブリダイゼーションの反応温度はエキソンの濃縮率に直接影響するので、厳密に制御した。また、PCR 増幅のサイクル数を多くするとライブラリ DNA の収量は増加するが、読み取ったリードの重複リード率が上昇することが分かった。そこで、重複リード率が 20%以下となるような PCR サイクル数を決定した。

エキソームの情報解析では、マッピングプログラムとして BWA と Novoalign を、また、バリエーションの抽出プログラムとして SAMtools と GATK を使用した。これらのプログラムを組み合わせることで 4 通りの解析パイプラインを構築し、抽出されたバリエーションの数を比較した。その結果、4 つのパイプラインで共通に抽出されたバリエーションは全バリエーションの 77%で、抽出されるバリエーションの種類が解析プログラムにより異なることが明らかになった。特に GATK は SAMtools より多くのバリエーションを抽出した。

血清中微量 RNA のシーケンス解析では、健常者 1 例と C 型肝炎患者 2 例の計 3 例を解析した。その結果、C 型肝炎ウイルスゲノムの 99%以上をカバーする 6000 ~8000 の肝炎ウイルス由来のリードを患者検体で検出した。その中には、インターフェロン応答性に影響する 2 つのアミノ酸（Arg70 と Met91）に変異をもつ配列が 18%存在し、ウイルスゲノムの多様性が示された。健常者検体では肝炎ウイルス由来のリードは検出されず、解析システムの特異性を確認した。

### D. 考察

エキソーム解析はハイブリダイゼーションや PCR 増幅などの煩雑なサンプル調製を必要とする手法である。ライブラリ DNA の品質は変異の検出に大きく影響するので、高品質のライブラリ DNA を作製できるプロトコルの確立が必須である。今回我々は、サンプル調製の反応条件がライブラリ DNA の収量と変異の検出感度に与える影響を検証し、1 マイクログラムのゲノム DNA から高品質（重複リード率 20%以下）で高収量（500ng 以上）のライブラリ DNA を作製できるサンプル調製プロトコルを確立した。

シーケンスデータの情報解析では、4 通りの解析パイプラインを構築し、抽出されるバリエーションの種類

がパイプラインによって異なることを見出した。エキソームの情報解析で抽出されるバリエーションには、本来変異はないがミスコールされてしまう「偽陽性」のバリエーションと、変異を正しく検出できない「偽陰性」のバリエーションが含まれている。偽陽性のバリエーションを少なくするために解析条件のパラメーターを厳しく設定すると、偽陰性のバリエーションが多くなるので、偽陽性と偽陰性のバリエーションは相反する関係にある。そこで現時点では、4つのパイプラインを併用することによりできるだけ多くのバリエーションを抽出し、病因遺伝子変異の取りこぼしを少なくする手法を採用している。抽出されるバリエーション数が多く、絞り込みが困難な場合は、複数の解析プログラムで共通に検出されるバリエーションを優先的に解析することとした。

血清中微量 RNA の次世代シーケンス解析は、疾患の病態解明や診断マーカーの探索に有用な手法である。今回我々は、C型肝炎ウイルスに感染した患者検体を用いて微量 RNA 解析システムを構築し、ウイルス由来配列の検出に成功した。また、インターフェロン応答性に影響する 2 つのアミノ酸配列の変異を検出した。この解析システムは、ウイルス由来の RNA だけでなく、microRNA などの低分子 RNA の解析にも応用できる。現在、低分子 RNA に着目した診断マーカーの探索を進めている。

## E. 結論

次世代シーケンサーを用いて遺伝性難病の病因変異を同定するには、多くのエキソンを高い読み取り深度で解析することが重要である。本研究では、重複リードの発生率を最小におさえることにより、高感度に遺伝子変異を検出できるサンプル調製プロトコルを確立した。また、4種類の解析プログラムを組み合わせることにより、バリエーションを高感度・高精度に抽出できる 4通りの情報解析パイプラインを構築した。サンプル調製と情報解析との両面の精度を向上させることにより、遺伝性難病の病因変異が同定され、その病態が解明されることが期待される。また、本研究で構築した血清中微量 RNA の解析システムは、遺伝性疾患を含めた様々な疾患の病態解明と診断マーカーの探索に有用な技術である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Okabe H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, and Arima T.

Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression.

Hum. Mol. Genet. 2012, 21(3):548-558

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

舟山亮、長嶋剛史、中山啓子

高感度に多型を検出するためのエキソーム・シーケンシング

実験医学 2012, 30(4):629-634

### 2. 学会発表

細金正樹、舟山亮、西田有一郎、長嶋剛史、中山啓子  
がん遺伝子Rasによる転写制御後にH3K27me3修飾変化が誘起される

第34回日本分子生物学会年会

2011年12月13-16日

横浜市

## 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

研究分担者 布施 昇男 東北大学東北メガバンク機構ゲノム解析分野 教授

### 研究要旨

現在我が国における緑内障有病率（40歳以上）は約5%とされ、その中でも失明になりやすい緑内障は、落屑緑内障及び発達緑内障早発型である。落屑緑内障は、60歳代から発症し手術介入をしても予後は不良である。今回Toll-like receptor 4 (*TLR4*) 遺伝子をスクリーニングし、落屑緑内障と関連することを始めて明らかにした。一方、発達緑内障早発型は希少遺伝性難病であり、生後早期から発症する。*CYP1B1* 遺伝子が唯一発見されている原因遺伝子であるが、我々は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ている。

### 研究協力者

高野 良真（東北大学大学院医学研究科眼科学分野）

清水 愛（東北大学大学院医学研究科眼科学分野）

石 棟（東北大学大学院医学研究科眼科学分野）

### A. 研究目的

現在我が国における緑内障有病率（40歳以上）は約5%とされ、人口から概算して緑内障患者数は約400万人にもものぼる。病型別に見てみると原発開放隅角緑内障の比率が高い。しかし、その中でも失明になりやすい緑内障は、落屑緑内障及び発達緑内障早発型である。本邦において、落屑緑内障及び発達緑内障早発型の病態解明は急務の課題である。近年、ゲノムワイドアソシエーションスタディ (GWAS) を用いてその病態解析もされている。落屑緑内障と *LOXL1* 遺伝子と関連があると我々は報告している (Fuse N, et al. *Mol Vis* 2007) が、いまだ診断に応用できる感度にならない。落屑緑内障の早期発見、発症前診断のために、免疫応答を担う Toll-like receptor 4 (*TLR4*) 遺伝子をスクリーニングし、落屑緑内障と関連することを目的とした。

次に、希少遺伝性難病である発達緑内障早発型に着目した。発達緑内障早発型は、生後早期から発症することが多く、常染色体劣性遺伝と考えられる疾患で、

失明もしくはそれに近い状態になる可能性が高い疾患である。今回唯一の原因遺伝子である *CYP1B1* 遺伝子をスクリーニングし、変異の頻度を探索すること、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、新規遺伝子を同定することを目的とした。

### B. 研究方法

本研究では、東北大学病院眼科緑内障外来において収集した落屑緑内障患者標本、発達緑内障早発型患者標本を用い、各々 Toll-like receptor 4 (*TLR4*) 遺伝子、*CYP1B1* 遺伝子に焦点を絞り、スクリーニングを行った。*TLR4* 遺伝子上の8個の一塩基多型 (SNP) rs10759930、rs1927914、rs1927911、rs12377632、rs2149356、rs11536889、rs7037117、rs7045953を選択し、プライマーを設定し、まずそのPCR条件を設定した。同様に *CYP1B1* 遺伝子に関しては、3つのエクソンの翻訳領域を増幅できるようにプライマーを設定しPCR条件を設定した。PCRがスムーズに試行できていることを確認後、PCRダイレクトシーケンス法にて、一塩基多型 (SNP) やミスセンス変異が無いかどうか確認した。PCRはTakara Ex Taq® を用いて行い、PCR断片はExoSAP-IT® で精製、BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

でシーケンス反応を行った。シーケンサーは、ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzerを使用した。標本は、遺伝子型と表現型（臨床型）を後に解析できるように、臨床データがきちんと整備された貴重な標本である（落屑緑内障75例、発達緑内障早発型18例、正常対照210例）。塩基配列の確認は、DNAシーケンスアセンブルソフトウェアSEQUENCHER™を用いた。

（倫理面への配慮）

なおこの研究課題の計画にあたり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に基づき、倫理委員会に緑内障遺伝子の解明のために東北大学眼科外来にてDNA検体を採取することについて申請しその承認を得てある。対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を十分考慮し、説明と同意（インフォームド・コンセント）を得た。

### C. 研究結果

落屑緑内障と *TLR4* 遺伝子上の SNP に有意差を認めた。rs1927914、rs1927911、rs12377632、rs2149356 のアリル頻度 ( $p=0.019$ ,  $0.021$ ,  $0.038$ ,  $0.015$ ,  $\chi^2$  テスト)。また、ハプロタイプ解析でも、 $p=0.014$  と有意差を認め、落屑緑内障と *TLR4* 遺伝子に相関を認めた。(American Journal Ophthalmology, in revision)

発達緑内障早発型における *CYP11B1* 遺伝子のスクリーニングでは、発端者に V364M のホモ接合体変異と家系内の segregation を認める症例を確認した。しかし、症例群では 20%のみが *CYP11B1* 遺伝子陽性であった。

### D. 考察

*TLR* ファミリーは、自然免疫機構で中心的な役割を果たし、外因性のリガンドを認識し自己、非自己を区別するパターン認識受容体である。今回有意だった SNP は mRNA の安定性に関与し *TLR4* 遺伝子発現に影響を与えている可能性がある。ある種の慢性の感染や炎症が落屑緑内障の発症を誘発しうると推測され

た。

また *CYP11B1* 遺伝子に関しては、20%のみが *CYP11B1* 遺伝子陽性であった。次世代シーケンサーを用いて、残りの 80%の症例をスクリーニングすることによって、新規原因遺伝子の探索の可能性が高いと考えられた。現在、症例・家系の病型の整理と、SureSelect によるライブラリーの作成を行い、現在エクソーム解析を開始できるようにしている。

### E. 結論

*TLR4* 遺伝子と落屑緑内障と相関する。また、日本人発達緑内障早発型では、20%のみが *CYP11B1* 遺伝子陽性である。次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析にて、新規原因遺伝子の探索の可能性はある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

#### 2. 学会発表

布施昇男：緑内障の遺伝子診断の潮流

第120回青森眼科集談会、弘前、2011.4.24

高野良真、石棟、中澤徹、西田幸二、布施昇男：正常眼圧緑内障における *TLR4* 遺伝子の評価

第115回日本眼科学会総会、東京、2011.5.12

布施昇男：緑内障個別化医療に向けた遺伝子解析

第3回 KEEP THE VISUAL FIELD、熊本、2011.6.19

高野良真、石棟、清水愛、中澤徹、布施昇男：開放隅角緑内障、偽落屑症候群における *TLR4* 遺伝子の評価

第22回日本緑内障学会、秋田、2011.9.23

### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

## RAS/MAPK 症候群における新規病因遺伝子の探索

研究分担者 新堀 哲也 東北大学大学院医学系研究科 助教

### 研究要旨

RAS/MAPK 症候群は、細胞内シグナル伝達経路 RAS/MAPK 経路を制御する分子に病因遺伝子を持ち、臨床的にも類似点を持つ Noonan 症候群、Costello 症候群、cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群などの総称である。Noonan 症候群および CFC 症候群では既知の病因遺伝子解析を行っても約 3 割は変異が同定されない。これらの例では新規の病因遺伝子が存在するとの仮説をもち、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を行った。まずは既知の変異が同定されるかを 2 例において検証したところ、SOLiD4 を用いた解析のフィルタリングで 1 例、既知の病因変異が見落とされる可能性があった。そこで病因変異が同定されるようパラメータの見直しを行った。既知の変異が同定されない 1 例での解析では個の病因候補変異が同定された。Hiseq2000 を用いた解析では既知の変異が 2 例とも検出された。今後新規病因遺伝子の同定にはさらなる症例の積み重ねが必要と考えられた。

### 研究協力者

青木洋子(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

Noonan 症候群は低身長、特異的顔貌、心奇形、精神運動発達遅滞などを伴う症候群である。2001 年に原因遺伝子の 1 つである *PTPN11* が同定された。

*PTPN11* がコードする SHP2 はプロテインチロシンホスファターゼであり、細胞外の成長因子・サイトカインなどからのシグナルを細胞内に伝達する

RAS/MAPK 経路を制御する分子である。Noonan 症候群では RAS/MAPK 経路を活性化する変異が同定されることが知られていた。*PTPN11* 遺伝子変異は Noonan 症候群患者の約 4 割のみに同定され、残りの 6 割は原因不明であった。また、相対的大頭、発達の遅れ、心奇形など共通した症状を持ち類縁疾患とされていた

Costello 症候群、cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群は原因不明のままであった。我々はこれらの原因不明の患者では RAS/MAPK 経路を活性化する遺伝子変異が病因なのでは無いかとの仮説をもち、2005 年に Costello 症候群の原因遺伝子が *HRAS* であること、2006 年には CFC 症候群の原因遺伝子が *KRAS*、*BRAF* であ

ることを発表した。これらの発見により類似した臨床症状を持つ症候群が同じシグナル伝達経路の調節異常により起こることが示され、我々は RAS/MAPK 症候群という概念を提唱した（現在では Rasopathy とも呼ばれる。）我々の発表以降、同様の仮説により Noonan (-like) 症候群の原因遺伝子として *KRAS*、*SOS1*、*RAF1*、*SHOC2*、*NRAS*、*CBL* が、CFC 症候群の原因遺伝子として *MEK1/2* が同定された。しかしこれらの遺伝子変異が陰性な患者が Noonan 症候群、CFC 症候群でそれぞれ 3 割程度存在する。これらの患者においては新規病因遺伝子が存在すると考えられている。そこで、我々は既知の原因遺伝子変異陰性の患者において新規病因遺伝子の同定を目的とし、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を行った。Noonan 症候群および CFC 症候群の臨床診断は悩ましい例も多く、遺伝子解析により病因遺伝子変異が同定されなければ「疑い」診断で留まることがあり患者本人および家族にとっても不安を抱え続けることとなりうる。新規病因遺伝子が同定され診断がはっきりすれば、長期的な予後に見通しが立つ可能性や、遺伝カウンセリングに役立つなどのメリットが見込まれるほか、将来的には治療に役立てられる可能性がある。

## B. 研究方法

### 1、対象

インフォームドコンセントを得た Noonan 症候群または CFC 症候群患者 3 名の末梢血から DNA を抽出した。まず既知の原因遺伝子である *PTPN11*、*HRAS*、*KRAS*、*BRAF*、*MEK1/2*、*SOS1*、*RAF1*、*SHOC2*、*NRAS*、*CBL* のコーディング領域とその隣接する領域をキャピラリーシーケンサーで解析した。その結果患者 1 では *BRAF* 変異が、患者 2 には *PTPN11* 変異が同定された。患者 3 にはこれらの原因遺伝子が同定されなかった。患者 1、2 で既知の変異が同定されるかの確認と患者 3 での新規病因遺伝子探索のため、これらの患者 3 名の DNA を用いて次世代シーケンサーでエクソーム解析を行った。

### 2、エクソーム濃縮

患者 DNA を Agilent 社 SureSelect Human All exon kit (SOLiD 用または Illumina 用) を用いてエクソーム濃縮とライブラリ調製を行った。

### 3、次世代シーケンサーでの解析

Life Technology 社 SOLiD4 を用いて 50+35 塩基のペアエンド解析を行った。患者 1、2 についてはそれぞれ 1/4 スライドガラス、患者 3 については 1/2 スライドガラスを用いて解読した。得られたデータは Bioscope を用いて解析された。また、Illumina 社 HiSeq2000 を用いて 90×2 塩基のペアエンド解析も行った。得られたデータは BWA、GATK を用いて解析した。

### (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。本研究は、すでに東北大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1、SOLiD4 での解析

患者 1、2 については約 8.5Gb (約 2 億 reads)、患者 3 においては約 17Gb(約 4 億 reads)の塩基情報を得た。これらの reference genome への map 率は約 60~65%であった。35 塩基 read の map 率が 5 割程度と低値であった。また、検出された SNV・INDEL (single nucleotide

polymorphism/insertion/deletion) 数は患者 1、2 で 6 万前後、うちエクソン領域のものは約 2.3 万であった。患者 3 で検出された SNV・INDEL は約 6.9 万、うちエクソン領域のものは約 2.4 万であった。患者 1、2 において既知の変異が同定されるか確認したところ、患者 2 においては変異が同定されていたが、患者 1 では同定されなかった。そこで、SNV・INDEL 検出のパラメータを患者 1 で変異が同定されるよう調整した。その結果、症例 1、2 では約 10 万 SNV・INDEL が検出され、うちエクソン領域のものは約 2.7 万であった。症例 3 では約 37 万そのうちエクソン領域のものは約 3.8 万であった。この内、同義置換でない物は約 14000、dbSNP129 や 1000 ゲノムプロジェクトで同定されていないものは約 7000、症例 1、2 は病因変異が同定されているためそれ以外の塩基置換は多型の可能性があると考え、症例 1、2 に無く症例 3 のみにあるものは約 5000 同定された。

### 2、HiSeq2000 での解析

患者 1-3 においてそれぞれ約 2.7-3.1Gb (3000 万-3500 万 reads)の塩基情報を得た。これらの reference genome への map 率は 85-95%であった。検出された SNV 数は 18-37 万であった。これらのうちエクソン領域のものはそれぞれ約 2.3 万であった。症例 1、2 において既知の病因変異はいずれも同定された。

## D. 考察

SOLiD4 を用いた解析では当初既知の病因変異が 2 例中 1 例で同定されなかった。この時はその塩基における冗長度やクオリティスコアなどによりフィルタリングを行った結果を見ていたが、フィルタリングを緩めることで変異を同定することができた。単一遺伝子病における病因変異を同定する上では変異の見逃しは致命的であるが、感度を高めるためフィルタリングを緩めたことで偽陽性の変異を検出してしまう可能性が高まったとも言える。

一般に病因変異を同定するためには、変異は機能的な変化が予測される (挿入、欠失、ナンセンス、ミスセンス、スプライシング異常を起こす変異)、SNP データベースには存在しない、同一疾患では複数の患者で同じ遺伝子に変異を有する、といった仮説によって検出された全 SNV・INDEL からさらにフィルタリン



グしていくことになる。ある段階でのフィルタリングを緩めることで他の段階を経て最終的に絞られた SNV・INDEL の数がどの程度影響を受けるか、様々な条件で検討しながら解析を進める必要がある。また、フィルタリングを行う際には遺伝形式の想定に誤りはないか、SNP データベースに変異がある可能性はないか、genetic heterogeneity の可能性はどうか、というように過度の絞り込みにも細心の注意をはらうべきである。病因らしき変異が同定されない場合には、エクソーム解析では同定できないまたは同定しにくい変異（染色体の構造異常、遺伝子コピー数異常、リピート配列やゲノム上に類似配列が複数存在する部位での変異など）に原因がある可能性がないかについても注意を払い、必要があればアレイ CGH や家系例であれば連鎖解析、劣性遺伝形式が疑われれば homozygosity mapping など、他の手法との組み合わせも考慮しなくてはならない。今回の症例 3 においては病因不明の症例としては 1 例のみの検討であったため、十分な病因候補変異の絞り込みがなされていない。複数症例での解析が進めば、共通した遺伝子に変異が存在するといった仮説に基づきさらなる絞り込みが可能となる予定である。

HiSeq2000 を用いた解析においては症例 1、2 において既知の変異いずれも検出することが出来た。しかし、HiSeq2000 においても検出感度・特異度は総 reads 数、mapping ソフトなどの解析パイプラインに依存すると考えられ、それらはある程度確立されつつあるものの日々改良を重ねられているため、病因が同定されていない患者での次世代シーケンサーデータは、常に新しい方法で解析されていくべきである。

Noonan 症候群、CFC 症候群においては臨床的に類似しているが、これまで 10 の既知遺伝子が同定されており、残りの 3 割においても複数の病因遺伝子が存在する可能性が高い。今後、新規病因遺伝子を同定するためにはさらなる症例の蓄積をし、臨床症状がより類似している症例ごとに共通の遺伝子に変異がないか、等の検討方法が必要になると思われる。

## E. 結論

次世代シーケンサーを用い、RAS/MAPK 症候群患者での遺伝子変異同定を試みた。既知変異の同定は

可能であった。新規病因遺伝子同定には病因不明症例のさらなる蓄積を行い、解析をすすめる必要がある。

## 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. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 2011 年 10 月 11-15 日 12th International Congress of Human Genetics (カナダ、モントリオール) 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.

2. 2011 年 11 月 9-12 日 日本人類遺伝学会第 56 回大会 千葉 新堀哲也、青木洋子、岡本伸彦、黒澤健司、大橋博文、水野誠司、川目裕、松原洋一 コステロ症候群の遺伝子解析および HRAS 変異体の機能解析

3. 2011 年 11 月 9-12 日 日本人類遺伝学会第 56 回大会 千葉 阿部裕、青木洋子、栗山進一、川目裕、岡本伸彦、黒澤健司、大橋博文、水野誠司、緒方勤、呉繁夫、新堀哲也、松原洋一

コステロ症候群・CFC 症候群の全国実態調査とその病態に関する研究

## 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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
有馬隆博	ヒト卵子・精子・胚のエピジェティクス	森崇英	卵子学	京都大学学術出版会	京都	2011	122-131
富田博秋	遺伝子発現解析研究の実際～ブレインバンク運営に求められている品質管理とは.	加藤忠史	脳バンク 精神疾患の謎を解くために	光文社新書	東京	2011	167-176
富田博秋	求められるブレインバンクの姿 ～ブレインバンクは実際に何をするのか～.	加藤忠史	脳バンク 精神疾患の謎を解くために	光文社新書	東京	2011	237-245
富田博秋	精神神経疾患死後脳のバイオリソース整備	独立行政法人科学技術振興機構	研究開発戦略センター国際比較調査報告書2011年版	独立行政法人科学技術振興機構	東京	2011	126-129
富田博秋、小野千晶、兪志前	統合失調症の陰性症状の進行に関わる精神神経免疫学的メカニズムに関する研究.	財団法人精神・神経科学振興財団	こころの健康と病気2010年版	財団法人精神・神経科学振興財団	東京	2011	119-131

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, 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 of RNF213 predicts early-onset and severe form of Moyamoya disease.	Neurology			in press
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	Epub ahead of print		2012
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.	Hum. Mol. Genet.	21	548-558	2012

Ninomiya M, Ueno Y, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Kimura O, Nakayama K, Shimosegawa T.	Use of Illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants.	J. Clin. Microbiol.	50	857-866	2012
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	Epub ahead of print		2011
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.	Epub ahead of print		2011
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
Wakabayashi Y, Yamazaki K, Narumi Y, Fuseya S, Horigome M, Wakui K, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T.	Implantable cardioverter defibrillator for progressive hypertrophic cardiomyopathy in a patient with LEOPARD syndrome and a novel PTPN11 mutation Gln510His.	Am J Med Genet A	155A(10)	2529-33	2011
Adachi M, Abe Y, Aoki Y, Matsubara Y.	Epilepsy in RAS/MAPK syndrome: Two cases of cardio-facio-cutaneous syndrome with epileptic encephalopathy and a literature review.	Seizure	Epub ahead of print		2011
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 S, 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.	56(10)	707-15	2011