

201135005A

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）

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 直通

(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成24（2012）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

| | |
|-------------------------------|---|
| 遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築 ----- | 1 |
| 松本直通 (資料) 研究全体の流れと進行状況 | |

II. 分担研究報告

| | |
|---------------------------------|----|
| 1. 難治性遺伝病の次世代シーケンス解析のための研究基盤の整備 | 9 |
| 池川志郎 | |
| 2. 次世代シーケンスデータ解析 | 11 |
| 高橋篤 | |
| 3. ゲノム研究倫理と網羅的エクソーム解析の対象症例の集積 | 13 |
| 福島義光 | |

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 17 |
|---------------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- | 19 |
|-----------------------|----|

平成23年度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））
総括研究報告書

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

本研究は、特に遺伝性難治疾患を対象に、網羅的全エクソーム解析により原因遺伝子を解明することを目的とする。遺伝性難治疾患の原因遺伝子解明は、低頻度で孤発例が多く従来型の連鎖解析が適応できない、責任遺伝子の点変異が原因の場合も多くマイクロアレー解析が有用でないなど技術的な壁が存在した。次世代シーケンス解析は点変異から染色体微細欠失まであらゆるゲノム上の変化の検出が可能で、遺伝性難治疾患の解明が一気に進むと考えられる。

本年度は、高出力次世代シーケンサーの導入と多サンプル処理用エクソームロボットを導入し、次世代シーケンス拠点としての環境を整備した。さらにエクソーム解析を用いて常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症、びまん性大脳白質変性症の新規責任遺伝子の同定を行った。さらに情報解析において既に一定の成果を出していた解析系に加えて、よりシンプルで変異検出感度の高い新たな解析系を確立した。

分担研究者

池川志郎・理化学研究所ゲノム医科学研究センター・チームリーダー

高橋篤・理化学研究所ゲノム医科学研究センター・チームリーダー

福島義光・信州大学医学部遺伝医学予防医学講座・教授

できない、責任遺伝子の点変異が原因の場合も多くマイクロアレー解析が有用でないなど技術的な壁が存在した。次世代シーケンス解析は点変異から染色体微細欠失まであらゆるゲノム上の変化の検出が可能で、遺伝性難治疾患の解明が一気に進むと考えられる。

A. 研究目的

本研究は、特に遺伝性難治疾患を対象に、網羅的全エクソーム解析により原因遺伝子を解明することを目的とする。

遺伝性難治疾患の原因遺伝子解明は、低頻度で孤発例が多く従来型の連鎖解析が適応

本年度は、拠点化の環境整備を進め大量サンプル処理施設に対応させること、遺伝性疾患の症例集積を加速させること、集積済みのエクソーム解析で疾患原因を解明すること、インフォーマティクス解析を効率化することを目標に研究を進めた。

B. 研究方法

① 症例集積と他の研究班との連携

骨系統疾患コンソーシアム（池川）・胎児骨系統疾患ネットワーク（池川）、臨床遺伝ネットワーク（松本・福島）などを通じ症例を集積した。既に実績と定評のある専門家ネットワークを通じて正確な診断が成され、かつ詳細な臨床情報を得られる症例群を多数集積する。このプロセスを得た質の高い症例を全エクソーム解析することで遺伝子異常を同定する確率が飛躍的に向上する。さらに本事業の一般研究班や難治性疾患克服研究事業奨励研究分野の既存班と連携し症例を集積・解析を進めた。

② 全エクソーム解析

Agilent 社の SureSelect 等を用いてヒトゲノム全遺伝子のエクソン領域のみを分画し、Illumina 社 GAIIX を用いてペアエンドシーケンスを行う。現行試薬における GAIIX のシーケンス産出キャパシティーは、101 bp ペアエンドシーケンス法で1ラン50-60 Gbで、1レーンにつき1サンプルで、ある程度十分な（8 Gb）エクソーム解析が可能である。HiSeq2000 を新たに導入し解析容量は拡大する。

③ 次世代シーケンスデータ解析

次世代シーケンス算出データから遺伝子変異同定する MAQ 基盤の解析フローと NextGENe を併用した解析フローは確実な変異候補群を抽出するのに効果的である。

④ 次世代シーケンスデータの検証

対象とする遺伝性疾患の想定発症モデルに沿って次世代シーケンスで検出した遺伝子

異常、稀な SNP 候補群を症例および家族構成員のゲノム DNA を用いて、PCR・キャピラリーシーケンス等で検証していく。検出した塩基変化を臨床遺伝学的見地に基づき様々な角度から評価する。

⑤ 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討
本研究で変異が明らかになった症例についての詳細な臨床情報を分析し、遺伝子変異が惹起する臨床病型を明らかにし変異が及ぼす機能的影響を種々の実験系にて検証する。

⑥ 次世代データ解析プロトコール

既に確立している解析系は2系統の解析系データの共通項を探すというもので、信頼性は高いが解析に時間がかかるなどボトルネックを有していた。これを克服すべく種々のオープンリソースの解析ソフト（マッピングツール、アノテーションツール）を比較検討し効率的かつ効果的な解析系を確立する。

C. 研究結果

① 症例の集積

症例集積は順調に進行し精神遅滞関連症候群500例やてんかん関連症候群390例がすでに蓄積している。一般班である長谷川班、岩本班やAicardi症候群・孔脳症・Coffin-Siris症候群・ATR-X症候群・Sotos症候群・運動過剰症候群・血管型Ehlers-Danlos症候群・Kabuki症候群・ゲノムコピー数異常などの難治性疾患奨励研究からも多数症例提供を受けた。

②全エクソーム解析

HiSeq2000 を新たに導入し解析容量は 600 Gb を超えおよそ 10 倍に拡大した。エクソームのための DNA 処理を一度に最大 98 サンプル行うことができるロボットを導入し月に 100 サンプルの処理が可能となった。

③・④・⑤次世代シーケンスデータ解析・検証・臨床病型との検討

MAQ/NextGENe 解析によって X 連鎖性白質ディストロフィー、X 連鎖性白質脳症、常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症、びまん性大脳白質形成不全症、解離性大動脈瘤、Coffin-Siris 症候群等の原因が明らかになった。このうち常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症、びまん性大脳白質形成不全症、Coffin-Siris 症候群の遺伝子単離の概略を以下に述べる。

I. 常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症

血族婚を有する 1 家系の homozygosity mapping では 3 領域、計 11.35Mb が候補領域としてクローズアップされた。エクソーム解析の結果では同候補領域内に、SNP 登録のないアミノ酸変異を伴うホモ接合性変異は 2 種類であり、サンガー法でも存在が確認された。このうち家系内表現型と変異が連鎖したのは *SYT14* のミスセンス変異のみであった。この変異は正常日本人 576 アレルで認められず、複数の変異効果予測プログラムにおいて病的であることが示唆された。同遺伝子の mRNA はヒト、マウス脳（特に小脳）において発現し、マウスおよびヒト小脳の免疫染色では同遺伝子産物は Purkinje 細胞に特異的に局在した。野生型、

および変異型のタンパク質を培養細胞（COS-1 細胞）に強制発現すると、野生型では細胞膜近傍への蓄積が認められるのに対し、変異型では細胞膜近傍への局在がみられず、小胞体への局在が観察された。細胞内局在の変化は細胞分画法によっても確認された。（Am J Hum Genet, 2011）。

II. HCAHC

小脳萎縮と脳梁低形成を伴うびまん性大脳白質形成不全症 (Diffuse cerebral hypomyelination with cerebellar atrophy and hypoplasia of the corpus callosum : HCAHC) は、2009 年に国立精神・神経医療研究センター・佐々木征行部長らが初めて報告した新しい白質形成不全症である。全エクソームシーケンスを 3 名の患者で行い、1 名において *POLR3A* 遺伝子の、2 名において *POLR3B* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を同定した。*POLR3A* および *POLR3B* 遺伝子は RNA polymerase III (PolIII) 複合体のコアになるサブユニット (RPC1 および RPC2) をコードし、同定された変異は PolIII 活性を低下させると予想された。PolIII は tRNA と 5SrRNA を含む大多数の低分子 RNA をコードする遺伝子を転写しており、これらの低分子 RNA 量が不足することにより髄鞘化不全が起きると考えられた (Am J Hum Genet, 2011)。

III. Coffin-Siris 症候群

Coffin-Siris 症候群(以下 CSS と称す)は、軽度～中等度の精神遅滞・中等度以上の低緊張・てんかん・粗な顔貌と手足第 5 指の低形成などの奇形兆候を特徴と多発奇形・精神遅滞症候群の一つである。稀な疾患でそ

の頻度や遺伝要因の解明は進んでいない。
CSS を対象に高密度マイクロアレー及びヒト全遺伝子のエクソン領域 (全エクソーム) の解析を行いその遺伝的原因を明らかにした。2例において責任遺伝子である CSS1 に関する CNV が同定された (論文投稿中)。

⑥次世代データ解析プロトコール

種々の検討の結果 Novoalign/GATK をマッピングツールとしてアノテーションには ANNOVA を組み合わせて効率的なエクソーム解析フローを確立した。

D. 考察

メンデル遺伝性疾患を解析対象にした次世代シーケンス拠点として環境整備を進めるとともにエクソーム解析において複数の原因未解明の疾患において責任遺伝子を単離した。さらに情報解析系でも大量解析系にも対応できる効率的・効果的解析系を確立できた。

E. 結論

次世代シーケンサー解析拠点としてアクティブに機能できる環境を整備し、貴重なサンプル集積とエクソーム解析が進行し原因不明の遺伝性疾患の解明が順調に進行している。

F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsurusaki Y, Osaka H, Hamanoue H, Shimbo H, Tsuji M, Doi H, Saitsu H, *Matsumoto N, *Miyake N. Rapid detection of a mutation causing X-linked leukodystrophy by exome sequencing. J Med Genet 48 (9): 606-609, 2011.

*Saitsu H, Matsumoto N. Genetic commentary: *De novo* mutations in epilepsy. Dev Med Child Neurol 53 (9):806-807, 2011.

Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy. Clin Genet 80 (2): 161-166, 2011

Doi H, Yoshida K, T Yasuda, Fukuda M, Fukuda Y, Morita H, Ikeda S-i, Kato R, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Sakai H, Miyatake S, Shiina M, Nukina N, Koyano S, Tsuji S, Kuroiwa Y, *Matsumoto N. Exome sequencing reveals a homozygous *SYT14* mutation in adult-onset autosomal recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. Am J Hum Genet 89(2):320-327, 2011.

Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki T, Saitsu H, Miyake N, Masuda M, *Matsumoto N. Rapid detection of gene mutations

responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing. Hum Genet (in press)

*Saito H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, *Matsumoto N. Mutations in *POLR3A* and *POLR3B* encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. Am J Hum Genet 89(2):320-327, 2011

2. 学会発表

講演会「次世代シーケンサーを用いた最先端研究」・松本直通「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」(徳島・徳島大学医学部臨床第一講堂 8月26日)

第一回サイトジェノミクスセミナー・松本直通(特別講演)「次世代シーケンス法による疾患研究の最前線」(三菱化学メディエンス志村事業所・東京 9月17日)

第46回産婦人科研究会(順天堂大学) 松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(順天堂大学医学部・東京 9月20日)

第18回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会・松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現

状」(佐賀大学医学部・佐賀 10月1日)

日本人類遺伝学会第56回大会・松本直通「ヒト遺伝性疾患の原因解明を目指して」学会賞受賞講演(於・幕張メッセ 11月11日)

日本人類遺伝学会第56回大会「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」松本直通(シンポジスト)シンポジウム11(超高速シーケンサーによる疾患ゲノム解析)(於・幕張メッセ 11月12日)

国立精神・神経医療研究センターTMC棟／クラスター研究棟開棟記念講演会「遺伝性神経疾患のエクソーム解析」松本直通(招待講演)(国立精神・神経医療研究センター 11月22日)

The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan・Next generation sequencing technology enables a large scale medical genomic research (symposium)「Disease genome analysis using next generation sequencer」Naomichi Matsumoto (Invited speaker)(Dec 14, 2011 at Yokohama, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

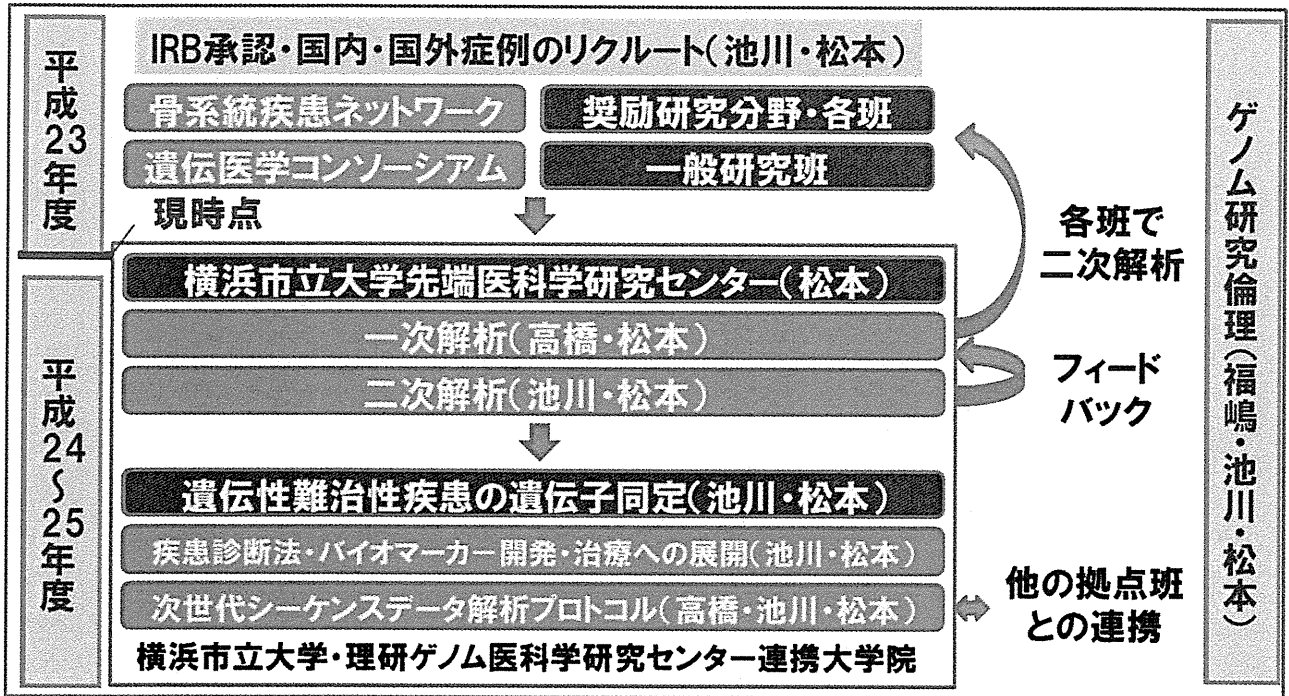
特願 2012-136 松本直通／鶴崎美徳／三宅紀子・コフィンーシリス症候群の検出方法・平成24年1月4日

特願 2011-226488・才津浩智／松本直通・び慢性大脳白質形成不全症の検出方

法・平成 23 年 10 月 14 日

特願 2011-136277・松本直通／土井宏・常
染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症の検
出方法・横浜市立大学・平成 23 年 6 月
20 日

研究全体の流れと進行状況



平成23年度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))
分担研究報告書

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

分担研究課題：難治性遺伝病の次世代シーケンス解析のための研究基盤の整備

池川志郎(理化学研究所ゲノム医科学研究センター 骨関節疾患研究チーム)

専門医の協力下にて、遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析研究の基盤である疾患のサンプルの集積体制を構築した。収集した症例を用いて、いくつかの未知の疾患遺伝子の同定に成功しており、プロジェクトの正当性、妥当性を証明できた。

1. 研究目的

遺伝性難治疾患を対象に、網羅的全エクソーム解析により原因遺伝子を解明するための研究基盤を構築する。

2. 研究方法

1) 症例集積と一般研究班との連携体制の構築

専門医との各種ネットワーク等を通じて遺伝性難治疾患の集積を行う。

2) 次世代シーケンスデータの検証

全エクソーム解析により検出した塩基異常を検証する。この検証過程をプロトコール作成へフィードバックする。

3) 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討

変異を発見した症例の詳細な臨床情報を分析し、臨床病型を明らかにする。更に、変異が惹起する機能的影響を実験系で検証する。

4) 次世代データ解析プロトコールの策定

共同研究者が開発したプロトコールによる検出データの比較検討により、最適なプロトコール作りを行う。

5) ゲノム研究倫理の検討

本研究に関連する倫理的課題を調査・整理する。

3. 研究結果

1) 症例集積と一般研究班との連携体制の構築

骨系統疾患コンソーシウム、胎児骨系統疾患ネットワーク等の専門医集団、厚生省難病研究班(澤井班、渡邊班他)、エキソーム一般研究班(岩本班等)とのネットワークを構築し、遺伝性難治疾患の集積を確立した。

2) 次世代シーケンスデータの検証

全エクソーム解析により検出した塩基異常をPCR、キャピラリーシーケンス等による従来法

にて検証した。数プロジェクトで、変異の発見に成功した。

3) 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討

PAPSS2の変異を発見した骨系統疾患症例の詳細な臨床情報を分析し、臨床病型との関係を検討し、劣性型のbrachyolmiaである事を発見した。

4) 次世代データ解析プロトコールの策定

生データにより、開発したプロトコールによる検出データの比較検討した。

5) ゲノム研究倫理の検討

本研究に関連する倫理的課題を調査・整理し、共通のインフォームドコンセントの様式を整備した。

4. 考察

専門医の協力下にて、研究の基盤である難治疾患のサンプルの集積体制を、研究の出口である患者さんへの情報の還元の体制と共に確立することができた。拠点班として、収集した症例を下に既に、未知の疾患遺伝子の同定に成功しており、プロジェクトの正当性、妥当性は証明できたと考えている。

5. 結論

網羅的エクソームのための遺伝性難治疾患のサンプルの集積体制を確立した。

F. 健康危険情報
特になし。

6. 研究発表

1. 学会発表

Ikegawa S. Rare diseases and common problems: Lessons from one to another. 5th Annual Introductory Course on Skeletal Dysplasias. Freiburg, Germany. Jul 17, 2011.

池川志郎. 疾患遺伝子研究の現状と未来: 骨・関節疾患を例に. 徳島大学「次世代シーケンサーを用いた最先端研究」. 徳島大学医学部. 2011年8月26日.

池川志郎. ゲノム時代の骨系統疾患の臨床と研究. 第23回 日本整形外科学会 骨系統疾患研究会. 京都. 2011年12月9日.

Ikegawa S. Next steps for genetic study of skeletal diseases- problems and solutions from 10 years' experience. Symposium on Developmental Genomics and Genetics Disorders. Hong Kong. Jan 17, 2012.

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

分担研究課題：次世代シーケンスデータ解析

分担研究者 高橋篤(理化学研究所ゲノム医科学研究センター統計解析研究チーム)

研究要旨：

遺伝子難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点として、次世代シーケンスデータ解析を行った。解析は公開されている既存のツールだけではなく、独自に開発したツールで行うことにより、今後の詳細な解析、拡張性を可能にした。独自開発のため、拠点班としての大規模エクソームの解析のためのプロトコル・システム構築にも応用できる。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いた網羅的全エクソーム解析により、遺伝性難治疾患の原因遺伝子を同定するとともに、大規模エクソームデータの情報解析の研究基盤を構築する。

B. 研究方法

1. 次世代シーケンスデータの統計・情報解析

次世代シーケンサーで得られた配列データに対し、情報・統計解析を行い、遺伝性難治疾患の原因遺伝子の同定を行う。

2. 網羅的エクソームデータ解析の情報基盤の構築

次世代シーケンサーから算出される大規模な配列データの解析を効率的に行うための情報解析基盤の構築を行う。

C. 研究結果

1. 次世代シーケンスデータの統計・情報解析

全エクソームデータの情報解析を、公開されているツールを用いて行った。一塩基多型(SNP)、短い塩基の挿入・欠失などの検出を行った。さらに、配列データのreference配列へのマッピングから多型検出を行う解析プログラムを独自に作成し、多型の検出を行った。

2. 網羅的エクソームデータ解析の情報基盤の構築

公開されているプログラムではなく、独自に作成した各種プログラムを用いて、効率に解析できるシステムの構築を行なっている。網羅的エクソーム解析拠点として、大規模エクソーム解析を可能とする情報解析システム構築を進めている。

D. 考察

次世代シーケンサーの解析において、世界中で様々な解析方法・ツールが提案・公開されている。公開されているツールは便利で有用なものも多く存在する。しかしながら、さらなる詳細な解析を行いたい場合、ツールが対応していないならば、解析を進めるのが難しくなる。解析手法がツールにより、制限されてしまう。そのため、独自に様々なツールを開発し、解析を行うことは次世代シーケンサーなどの新技術の解析には必須であると考えている。さらに、大規模エクソームデータの解析の効率化などを行うためにも独自の情報解析技術が重要であると考えている。

E. 結論

遺伝性難治疾患の網羅的全エクソーム解析拠点の構築の次世代シーケンスデータ解析の情報・統計解析を行い、大規模エクソームデータ解析のシステムの構築を行った。

F. 健康危険情報

特になし.

G. 研究発表

1. 論文発表

A founder mutation of CANT1 common in Korean and Japanese Desbuquois dysplasia. Dai J, Kim OH, Cho TJ, Miyake N, Song HR, Karasugi T, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Nagai T, Matsumoto N, Ohashi H, Kamatani N, Nishimura G, Furuichi T, Takahashi A, Ikegawa S. J Hum Genet. 2011,56(5):398-400

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成23年度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))
分担研究報告書

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

分担研究課題：ゲノム研究倫理と網羅的エクソーム解析の対象症例の集積

分担研究者 福嶋義光(信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座)

研究要旨：

網羅的エクソーム解析の対象となる症例の集積に努めると共に、パーソナルゲノム時代における倫理的課題を明らかにし、個人ゲノム情報を適切に医療の場に反映させる医療提供体制のあり方を検討するための情報収集を行った。

A. 研究目的

網羅的エクソーム解析の対象となる症例の集積を行うとともに、パーソナルゲノム時代における倫理的課題を明らかにし、個人ゲノム情報を適切に医療の場に反映させる医療提供体制のあり方を提言する。

B. 研究方法

1) 症例集積

網羅的エクソーム解析の対象となる症例は、詳細な臨床情報を得られる原因不明の既知の先天奇形症候群が中心であるが、福嶋が研究代表者として難治性疾患克服研究事業奨励研究分野の既存班「ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群(ウォルフヒルシュホーン症候群を含む)の診断法の確立と患者数の把握に関する研究」の対象として集積し、ゲノムアレイ解析を実施してきた症例のうち、臨床症状との関連が明らかと評価されたゲノムコピー数異常を伴う症例以外の症例に、本網羅的エクソーム解析の対象となる症例がないか見直しを行っている。臨床症状との関連が明らかかどうかの判断に両親の解析が必要となる症例も少なくなく、そのような症例については両親の試料提供を依頼し、両親試料の追加解析後の再評価で、病的変異と判断されたゲノムコピー数異常を伴っていなかった症例から本

解析対象となる症例を絞り込み、網羅的エクソーム解析の候補と考えられた症例については、主治医へ本研究への協力を改めて呼びかける。

2) ゲノム研究倫理の検討のための情報収集

全ゲノムシーケンスによりもたらされる情報の倫理的課題について、文献および学会参加等により情報を収集した。

C. 研究結果

1) 症例集積

「ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群(ウォルフヒルシュホーン症候群を含む)の診断法の確立と患者数の把握に関する研究」の対象として集積してきた症例は、既知の症候群にあてはまらない原因不明の先天多発奇形/精神遅滞(MCA/MR)症候群が中心である。これらの症例の中から、網羅的エクソーム解析の対象となる症例を抽出することは、以下の理由により、困難であった。まず、通常5個以上検出されてくるゲノムコピー数変化のほとんどが臨床症状と関連していないと考えられるコピー数バリエーション(benign CNV)であるものの、一般成人の解析において公開されているコピー数異常のデータベースにも自施設で蓄積しているデータベースにも benign CNV として登録されていない

いユニークなコピー数変化が多数検出されてくる
ことがあげられる。また、一般的に病的変異である
可能性が高いとされる 200kb 以上の大きさのゲノ
ムコピー数減少あるいは 400kb 以上の大きさのゲ
ノムコピー数増加であっても、一般正常成人の解析
において 1Mb を超えるゲノムコピー数変化も散見
されるため、病的変化であるかどうかの判断は困難
である。さらに、そのゲノムコピー数の変化が、既
知の遺伝子がマップされている領域であっても、一
概に病的なものであると断定することは困難であ
る。したがって、これらの変化が認められた場合で
も、網羅的エクソーム解析の対象外と考えることは
できないと考え、慎重に見直して絞り込んでいる。
網羅的エクソーム解析の候補と考えられた症例に
ついては、主治医に本研究への協力を改めて行っ
ている。

2) ゲノム研究倫理の検討のための情報収集

次世代シーケンサーで産出されるデータは、大量
で予期しない重要な遺伝的情報も包含されている
可能性があることは広く認識されている。本研究は
原因不明の遺伝性難治疾患の原因遺伝子解明を目的
としており、解析対象疾患の罹患者の多くは小児
であり、研究への参加は親の代諾で実施されることが
多いと考えられる。そして、患者に見出された変異
が疾患の原因であるかどうかの検討が必要な場合、
親や非罹患者の血縁者が同じ変異を有しているか
どうかの確認が必要であり、また、解析対象疾患が
劣性遺伝形式で発症する場合、親が保因者かどう
かの確認が必要になる場合も想定される。患者以外
の血縁者の解析が必要となった場合、それらの対象
者に患者の疾患と関係のない予期せぬ遅発性の遺
伝性疾患の発症前診断となるような結果が含まれ
てくる可能性も否定できない。患者に研究対象疾
病とは無関係だが、解析の途中で症例の生命予後
を左右する明らかな遺伝的異常が同定された場合
には、倫理委員会等においてその結果の開示がも
たらす有用性と問題点を十分かつ慎重に検討の上、
症例への開示が明らかに有益であるという判断が
成された場合に診療担当の医師に伝え結果の開示
について検討して頂く等の対応については準備し
ているが、

患者以外の血縁者の解析に際しても、患者で検討
している遺伝子以外の情報をどう扱うかといった
ことの検討も必要となってくると考えられる。

D. 考察

「ゲノムコピー数異常を伴う先天奇形症候群(ウ
ォルフヒルシュホーン症候群を含む)の診断法の確
立と患者数の把握に関する研究」の対象としてゲ
ノムコピー数異常をまず疑って集積してきた症例
のうち、両親試料の追加解析後、明らかな病的変
異のゲノムコピー数異常が検出されないと評価し
た症例から、本網羅的エクソーム解析の候補とな
る症例がないかについて慎重に検討し、適応と考
えられた症例については主治医へ本研究への協
力を改めて呼びかけている。

網羅的エクソーム解析の目的は、原因不明の遺
伝性難治疾患の原因を明らかにし、診断法、治
療法、予防法の開発に結びつけることである。現
在、個人個人のゲノム情報を、各人の健康増進、
疾病予防、および発症した場合には最適な治療・
ケアの提供に役立てるために、パーソナルゲノ
ム解析が進められようとしているが、パーソナル
ゲノム解析を実際に、保健・医療サービスの一つ
として導入するためには、下記の課題について検
討しておく必要がある。

1. パーソナルゲノム解析研究の進展は、人間
一人一人の疾病罹患リスクを明らかにするが、こ
れは生まれながらにして、将来の健康状態には格
差が存在することを示すことであり、「人類皆平等」
という誰もが信じて疑わない道徳感にどのような
影響を与えるか、また新たな差別が生まれな
いか、について生命倫理の観点から検討を開始
しておく必要がある。

2. さまざまな遺伝情報について、臨床的に有
用であるのかについての評価法を確立しておく必
要がある。ある遺伝子多型が、疾病の罹患性に
関係しているという科学的事実と、その遺伝子多
型情報が、健康増進、疾病予防、適切な治療・
ケアの提供に有用であることとは異なっているこ
とを常に考えておかなければならない。

3. パーソナルゲノム解析研究の成果を臨床応
用するためには検査の精度管理が前提となるので、
各

検査機関に要求される設備, 検査手順書, 人材育成のあり方などを検討しておく必要がある。

4. パーソナルゲノム解析研究は社会の理解を得つつ進めていく必要があり, パーソナルゲノム解析について常に社会に情報発信をすることは必須である。その際, 研究の意義とともに研究の進展に付随して起こりうるリスクについても示し, それを防ぐための対応方法についての理解を得ておく必要がある。

E. 結論

難治性疾患克服研究事業の既存班と協同で, 網羅的エクソーム解析の対象となる症例の集積を行うとともに, パーソナルゲノム時代における倫理的課題について検討した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

福嶋義光: 遺伝医療の基盤整備・均てん化. (遺伝医療と社会 Vol.4). 医学のあゆみ. 237 (7): 803-805, 2011

福嶋義光: 遺伝子研究・診断・治療の倫理 (特集: 糖尿病と遺伝子). 月刊糖尿病 3 (4):114-119, 2011

福嶋義光: 臨床遺伝医療. BIO Clinica 26:271-275, 2011

2. 学会発表

涌井敬子, 古庄知己, 高田史男, 福嶋義光. 染色体端部欠失患者の両親のメタフェーズ解析の必要性 - 染色体端部欠失パターンを示す患者の親に認めた均衡型構造異常からの考察 -. 第34回日本小児遺伝学会学術集会, 横浜

鳴海洋子, 古庄知己, 福山哲広, 西村貴文, 松浦宏樹, 涌井敬子, 福嶋義光. 13番長腕中間部欠失症候群の1例. 第34回日本小児遺伝学会学術集会, 横浜

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 清水健司, 大橋博文, 福嶋義光. Cytogenetic Array 解析により検出された一般成人のゲノムコピー数変化. 遺伝医学合同学術集会 2011 (第35回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 第18回日本遺伝子診療学会大会, 第17回日本家族性腫瘍学会学術集会), 京都

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 大橋博文, 清水健司, 岡本伸彦, 水野誠司, 黒澤健司, 高田史男, 川目裕, 福嶋義光. 染色体構造異常およびMCA/MR患者を対象としたマイクロアレイ染色体検査とmetaphase FISH法による臨床細胞遺伝学的解析結果, 日本人類遺伝学会第56回大会, 千葉

清水健司, 黒田友紀子, 糸見和也, 服部重人, 西尾公男, 水野誠司, 岡本伸彦, 川目裕, 鳴海洋子, 古庄知己, 涌井敬子, 大橋博文, 福嶋義光. マイクロアレイ染色体検査によるWolf-Hirschhorn症候群22例の遺伝型-表現型相関解析, 日本人類遺伝学会第56回大会, 千葉

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 |
|------|---------|-----------|-------|------|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |

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 |
|---|--|----------------------|--------|---------|------|
| Tsurusaki Y, et al., Matsumoto N, Miyake N. | Rapid detection of a mutation causing X-linked leukodystrophy by exome sequencing. | J Med Genet | 48 (9) | 606-609 | 2011 |
| Saitsu H, Matsumoto N. | Genetic commentary: <i>De novo</i> mutations in epilepsy. | Dev Med Child Neurol | 53 (9) | 806-807 | 2011 |
| Tsurusaki Y, et al., Matsumoto N. | Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy. | Clin Genet | 80 (2) | 161-166 | 2011 |
| Doi H, et al., Matsumoto N | Exome sequencing reveals a homozygous <i>SYT14</i> mutation in adult-onset autosomal recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. | Am J Hum Genet | 89(2) | 320-327 | 2011 |
| Saitsu H, et al., Matsumoto N. | Mutations in <i>POLR3A</i> and <i>POLR3B</i> encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. | Am J Hum Genet | 89(11) | 644-651 | 2011 |
| Sakai H, et al., Matsumoto N. | Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing. | Hum Genet | 印刷中 | | 2012 |



Rapid detection of a mutation causing X-linked leucoencephalopathy by exome sequencing

Yoshinori Tsurusaki, Hitoshi Osaka, Haruka Hamanoue, et al.

J Med Genet 2011 48: 606-609 originally published online March 17, 2011

doi: 10.1136/jmg.2010.083535

Updated information and services can be found at:
<http://jmg.bmj.com/content/48/9/606.full.html>

These include:

References

This article cites 19 articles, 7 of which can be accessed free at:
<http://jmg.bmj.com/content/48/9/606.full.html#ref-list-1>

Article cited in:
<http://jmg.bmj.com/content/48/9/606.full.html#related-urls>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

Epidemiology (437 articles)
Genetic screening / counselling (581 articles)

Notes

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

SHORT REPORT

Rapid detection of a mutation causing X-linked leucoencephalopathy by exome sequencing

Yoshinori Tsurusaki,¹ Hitoshi Osaka,² Haruka Hamanoue,¹ Hiroko Shimbo,² Megumi Tsuji,² Hiroshi Doi,¹ Hiroto Saito,¹ Naomichi Matsumoto,¹ Noriko Miyake¹

¹Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan
²Division of Neurology, Clinical Research Institute, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan

Correspondence to

Dr Noriko Miyake, Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan; nmiyake@yokohama-cu.ac.jp

Received 20 October 2010
 Revised 14 December 2010
 Accepted 5 February 2011
 Published Online First
 17 March 2011

ABSTRACT

Background Conventional PCR-based direct sequencing of candidate genes for a family with X-linked leucoencephalopathy with unknown aetiology failed to identify any causative mutations.

Objective To carry out exome sequencing of entire transcripts of the whole X chromosome to investigate a family with X linked leucoencephalopathy.

Methods and results Next-generation sequencing of all the transcripts of the X chromosome, after liquid-based genome partitioning, was performed on one of the two affected male subjects (the proband) and an unaffected male subject (his brother). A nonsense mutation in *MCT8* (c.1102A→T (p.R368X)) was identified in the proband. Subsequent PCR-based direct sequencing of other family members confirmed the presence of this mutation, hemizygous in the other affected brother and heterozygous in the proband's mother and maternal grandmother. *MCT8* mutations usually cause abnormal thyroid function in addition to neurological abnormalities, but this proband had normal thyroid function.

Conclusion Single-lane exome next-generation sequencing is sufficient to fully analyse all the transcripts of the X chromosome. This method is particularly suitable for mutation screening of X-linked recessive disorders and can avoid biases in candidate gene choice.

INTRODUCTION

High-throughput, next-generation sequencing (NGS) can have a tremendous impact on human genetic research.¹ Even personal whole-genome analysis is possible,² but the cost of obtaining and analysing an entire genome from many people is still unrealistic for many laboratories. Selection and enrichment of regions of interest (genome partitioning) enable us to use NGS efficiently for reasonable numbers of patients with genetic disorders.^{3–6}

Ready-to-use microarray-based and solution-based hybridisation systems are now commercially available. A combination of genome partitioning using these systems and NGS is one of the most promising ways to identify genes causing Mendelian disorders.^{3–6}

Here, we performed exome sequencing of entire transcripts of the whole X chromosome to investigate a family with X linked leucoencephalopathy with unknown aetiology after intensive candidate gene analysis by conventional exon-by-exon Sanger sequencing. A single-lane run of NGS on only two

family members successfully determined the leucoencephalopathy-causing mutation.

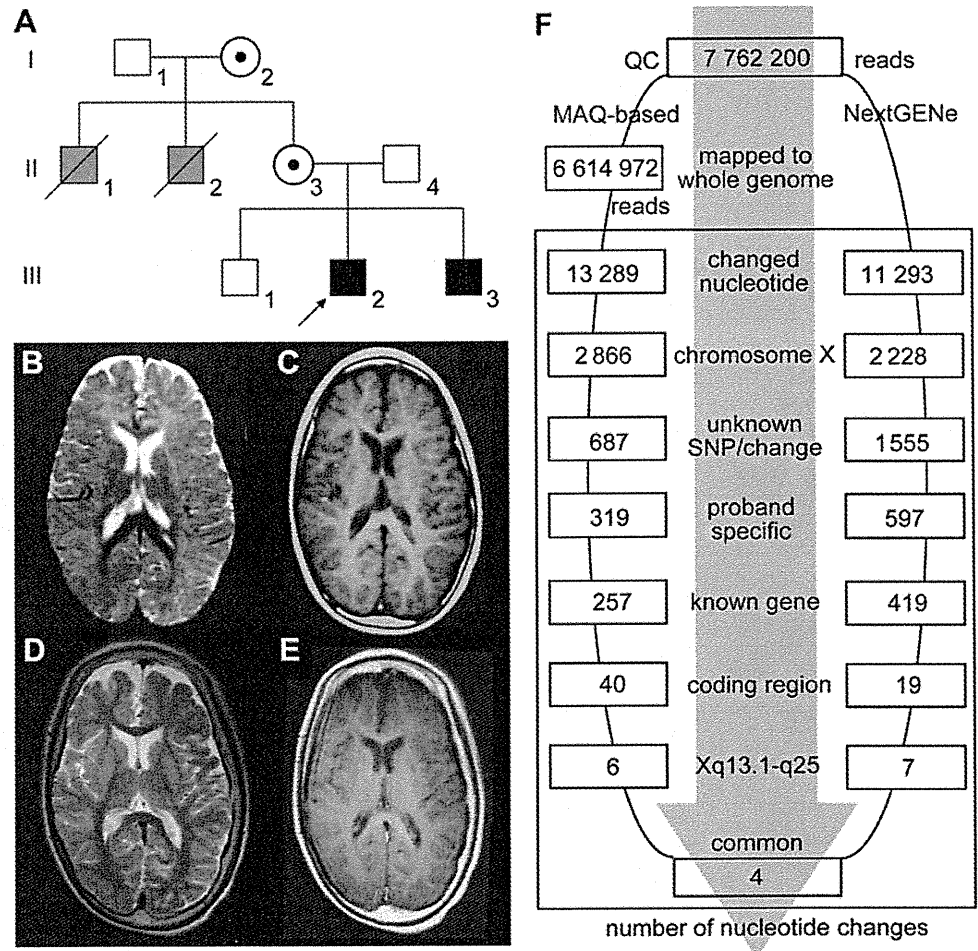
SUBJECTS AND METHODS**A family with X-linked leucoencephalopathy**

The proband (III-2) was a 13-year-old boy. He was born to Japanese consanguineous parents (II-3, 4) after an uneventful pregnancy (figure 1A). His birth weight was 3440 g. Congenital horizontal nystagmus was noted as a neonate. Because of his poor weight gain and developmental delay, he was referred to us at age 5 months. He showed progressive spasticity and dystonia with exaggerated deep tendon reflexes as well as myoclonic and tonic seizures, which responded to valproic acid and clonazepam at age 21 months. Brain MRI at 2 years showed diffuse hyperintensity of the frontal lobe on T2-weighted images, suggesting hypomyelination, and normal T1-weighted images (figure 1B,C). The peak latency intervals in auditory brainstem responses (I–V/III–V) were 4.63/2.37 ms, which were elongated compared with those of age-matched controls (4.24±0.08/1.97±0.08 ms (mean±SD)). He was clinically diagnosed with Pelizaeus–Merzbacher disease (MIM#312080), although neither mutation nor duplication was found in *PLP1* (RefSeq Gene ID, NM_000533) or *GJA12* (NM_020435) (the duplication in *GJA12* was not checked). He was never able to follow objects or control his head.

The dystonia worsened and he is now mechanically ventilated because of tracheomalacia. A thyroid function test at age 13 years indicated all normal levels: free tri-iodothyronine (T₃) 1.2 ng/ml (normal range 0.8–1.6 ng/ml), free thyroxine (T₄) 6.4 µg/dl (normal range 6.1–12.4 µg/dl) and thyroid-stimulating hormone 1.2 µIU/ml (normal range 0.5–5 µIU/ml). Brain MRI at age 13 years demonstrated improvement of myelination in the white matter, but he still presented with severe mental retardation (figure 1D,E). His younger brother was an 8-year-old boy (III-3) with an almost identical clinical course and MRI findings. His grandparents (I-1, I-2) were both healthy. The elder uncle (II-1) died at age 27 years who, initially, could walk with support but who declined towards the end of his life. Another uncle (II-2) was diagnosed with cerebral palsy and died at 7 months of age of unknown causes.

Informed consent was obtained from the patient's family members in accordance with human study protocols approved by the

Figure 1 Pedigree and brain MRI of the proband. (A) Family pedigree. (B) T2-weighted image at age 2 years shows diffuse hyperintensity, especially in the frontal lobe. (C) T1-weighted image at 2 years shows nearly complete myelination. (D and E) At age 13 years, both T2 (D) and T1 (E)-weighted images demonstrate complete myelination; the hypomyelination observed at age 2 years can therefore be regarded as delayed myelination. (F) Flow of informatics analysis. A MAQ-based method and NextGENe analysis were performed (III-2). The selection methods included variation relative to the human genome reference sequence; variants mapped to the X chromosome; unknown variants (excluding registered SNPs); variants identified in the proband only (not in his healthy brother); variants in known genes; coding region variants; variants in genes at Xq13.1–q25; and variants common to the two informatics methods. MAQ, Mapping and Assembly with Qualities; SNP, single nucleotide polymorphism.



institutional review board at Kanagawa Children's Medical Centre and Yokohama City University School of Medicine.

Genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping

Genome-wide SNP genotyping was undertaken for individuals I-1, I-2, II-3, II-4, III-1, III-2 and III-3 using the GeneChip Human Mapping 10K Array *Xba* 142 2.0 (Affymetrix Inc, Santa Clara, California, USA), according to the manufacturer's protocols. Mendelian errors in the pedigree to exclude conflicted SNPs were checked using GeneChip operating software 1.2 (Affymetrix) and batch analysis in GeneChip genotyping analysis software 4.0 (Affymetrix), with the default settings for a mapping algorithm. Copy Number Analyzer for GeneChip 2.0 was used to validate copy number alterations.⁷ The linked region with SNPs shared between individuals III-2 and III-3 (not observed in III-1) was checked manually.

Genome partitioning, short-read sequencing and sequence alignment

Genomic DNAs from the proband (III-2) and his unaffected brother (III-1) were used for this study. Three micrograms of DNA were processed using a SureSelect X chromosome test kit (1582 transcripts covering 3053 kb) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), according to the manufacturer's instructions. Captured DNAs were analysed using an Illumina GAIIX (Illumina Inc, San Diego, California, USA). We used only one of the eight lanes of the flow cell (Illumina), performing single 76 bp reads for each sample. Image analysis and base calling were performed by sequence control software (SCS) real-time analysis (Illumina) and/or offline Basecaller software v1.6

(Illumina) and CASAVA software v1.6 (Illumina). Reads were aligned to the human reference genome sequence (UCSC hg18, NCBI build 36.1) using the ELAND v2 program (Illumina). Coverage was calculated statistically. Identified variants were annotated based on novelty, impact on the encoded protein, the number and frequency of reads and conservation. NextGENe software v1.99 (SoftGenetics, State College, Pennsylvania, USA) was also used to analyse reads, with the default settings.

Mapping strategy and variant annotation

Approximately 9.9 million reads from III-1 (the unaffected sibling) and 7.8 million reads from III-2 (the proband), which passed the quality control (Path Filter), were mapped to the human reference genome by Mapping and Assembly with Qualities (MAQ)⁸ and NextGENe software (SoftGenetics) (figure 1F). The bait region of the X chromosome based on the manufacturer's information was carefully evaluated. MAQ was able to align 7 359 688 and 6 614 972 reads to the whole genome for III-1 and III-2, respectively, which were statistically analysed for coverage using a script created by BITS Co Ltd (Tokyo, Japan). SNPs and indels were extracted from the alignment data using another script created by BITS, along with information on registered SNPs (dbSNP build 130). A consensus quality score of ≥ 40 was used for the SNP analysis in MAQ.

Capillary sequencing

Possible pathological variants were confirmed by Sanger sequencing using an ABI 3500xl or ABI3100 autosequencer (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), following the manufacturer's protocol. Sequencing data were analysed by