

が

変異スクリーニングに次世代型シーケンス SOLiD5500 を用いた理由は、新規導入した次世代型シーケンサー SOLiD5500 の塩基配列決定の特徴を見定めるためと、今後 exome 解析を今江の SOLiD5500 によって行っていく際のプロトコルの最適化である。

B. 研究方法

1) UV^SSA 患者細胞の exome 解析

UV sensitive syndrome は七群に分類されていて、うち三群は Cockayne 症候群 (CS) の原因である CSA gene (ERCC8), CSB (ERCC6) の二遺伝子が原因となっていることが知られていたが、他の四群の原因は不明であった。同一の相補グループに分類される (UV sensitive syndrome A complementation group: UV^SS-A) について、exome 解析を行った。使用した細胞は Ksp3 と XP24KO で UV^SS-A として知られている細胞 line である。

エクソン濃縮は、Agilent 社の SureSelect All exon v2 (38M) キットを用い、次世代シーケンスは GAIIx (illumina 社) を使用し、フラグメント解析により行った。

得られたデータは、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) によりヒトゲノム hg19 へマッピングした後、Picard にて、duplicate シーケンスを取り除く等の一次整列データを処理した。生成された VCF file を Genome Data Toolkit (GATK) を用いて、細かい部分々々を再配列、微調整させ Base-quality

score を計算させた。小さな欠失

(deletion)・挿入(insertion)については、Dindel プログラムを用いて検出を試みた。検出された Insertion/Deletion, 塩基置換は ANNOVAR によって注釈付けした。dbSNP (Build 131) および 1000Genome project phase I data に登録されている塩基変化については、とりあえず正常 Variant として処理した。さらに、有意と推定された変異について、HRM 法による変異スクリーニング法を確立し変異確認および 380 人の一般集団コントロール検体での変異のスクリーニングを行った。

2) 歌舞伎症候群患者試料の変異解析

臨床遺伝医の診断により診断確実な歌舞伎症例で Washington University で解析した試料 45 例、および Washington University で解析していない 8 例を網羅的に変異解析した。

変異解析のための PCR 用プライマーの塩基配列は、研究分担者である琉球大学医学部の要匡より情報提供してもらった。MLL2 遺伝子の全 54 エクソンを exon-intron 境界領域も含め増幅し塩基配列決定をおこなった。塩基配列決定は、自ら所有する次世代型シーケンサー SOLiD5500 を使用して多検体の同時シーケンススクリーニング法を行った。PCR にて全エクソンを増幅後、超音波によって断片化し、末端に barcoding して個人個人を区別出来るようなリンカー・プライマーを付加して次世代シーケンサー SOLiD5500 解析用のライブラリーとし

た。塩基配列決定は、SOLiD5500 によって fragment シーケンス法 50 bp によって行い、NovoalignCS (Novocraft 社, Malaysia) を使用して塩基配列の alignment をおこなった。Reference 配列はヒト全ゲノム配列を対象とした。

MLL2 遺伝子 54 エキソンのうち、exon39 と exon48 の大きい二つのエキソンは、変異が多く認められる部位であるので患者 53 例全例について、SOLiD5500 によるスクリーニングと同時に通常のキャピラリーシーケンス法によって塩基配列を決定した。また、exon10 の中央部は繰り返しの塩基配列が出現するために SOLiD5500 によるスクリーニングと同時にキャピラリーシーケンス法によって塩基配列を決定した。

(3) SOLiD5500 プロトコール改良

LifeTechnologies から供給される試薬を用いて exome 解析を行った場合には、目的とするエクソン領域に対し塩基決定出来た領域が、Illumina 社製の次世代シーケンサーを用いた結果（外部委託により UVSSA の解析時に使用）よりも 10%少なかった。これは、SOLiD5500 を基本に exome 解析を行っていかうと考えている我々の研究班には、非常に重大な欠点である。この 10% のカバー率の低さを改善するために、emulsion PCR 法の改良・改善を試みた。

改善ポイントは、emulsion PCR に使用する Taq Polymerase の種類、emulsion の作成方法である。

C. 結果

1) UV^SSA 患者細胞の exome 解析

dbSNP (Build 131) および 1000Genome project phase I data に登録されていない塩基変異は、以下の様な内訳であった。

	Ksp3	XP24K0
変異の可能性が高い SNV	217	202
変異の可能性が高い In/Del	46	41
Homozygous mutation	9	17
Compound Heterozygous	9	6
共通	1	

共通の homozygous 変異が UVSSA の原因であると推定された。

2) 歌舞伎症候群患者試料の変異解析

合計 53 例の歌舞伎症候群患者の変異スクリーニングの結果、33 名が変異有りと認定し、20 名を変異なしとした。変異の内訳は、acceptor site 変異 1 例、donor site 変異 (exon の末端塩基の変化) 2 例、nonsynonymous アミノ酸変異 11 例、stop gain 12 例、frame shift 変異 6 例、inframe deletion (27bp deletion) 1 例であった。歌舞伎症候群内での MLL2 変異陽性率は $33/53 = 62\%$ であった。これらの変異は、Category 1 : SOLiD5500 による screening によって変異候補として列挙されかつキャピラリーシーケンサーによって確認が出来た分 Category 2 : exon39, exon49, exon10

の一部をキャピラリーシーケンサーによって全例塩基配列決定して変異確認が出来た分を含む。

視点を変えて、SOLiD5500 の screening から見た変異解析について結果を記述する。変異候補候補とは、NovoalignCS による配列→GATK による fine alignment→データベースとの照合→SNP としての登録がない塩基置換の選別 といった workflow によって最終的に病的原因として可能性の残る塩基置換である。SOLiD5500 によって候補として上げられた変異は、一塩基置換 (SNV: single nucleotide variation) が 52 個、挿入 (Ins: insertion) が 28 個、欠失 (Del: deletion) が 9 個であった。これらは、全てキャピラリーシーケンサーによって確認作業を行い次の様な正誤の割合となった。

SNV52 個 - (真 23 個, 偽 29 個)

Ins28 個 - (真 1 個, 偽 27 個)

Del19 個 - (真 2 個, 偽 7 個)

次に exon39 と exon48 について、SOLiD5500 とキャピラリーシーケンスとの結果の比較を記述する。全例塩基配列確認をおこなった exon39 と exon48 に存在した変異は 12 例であった。単純塩基置換が 9 例、insertion/deletion が 3 例であった。単純塩基置換が 9 例のうち 2 例は SOLiD5500 の screening workflow によって見落とされていた。insertion/deletion 3 例においては SOLiD5500 を使用した workflow では全て見落されていた。

(3) SOLiD5500 プロトコル改良

LifeTechnologies から供給される emulsion PCR 用の Oil はそのまま使用し、Taq polymerase が含まれるミックスは、使用しないで emulsion PCR mix を作成した。現在、改良プロトコルの最終確認中であるが、最も効率の良い Taq Polymerase と emulsion mixture の作製法が出来たと考えている。

D. 考察

UVSSA原因遺伝子について

Kps3 cell line と XP24KO をexome解析に用いて、両方のcell lineに共通にUVSSA 遺伝子 (KIAA1530) のp.Lys123nonsense 変異が認められた。その後、別の complementation group Aのcell lineである Kps2 , UV^SS24TA にも同遺伝子に truncation typeの変異を見だし、原因遺伝子であることを確定した。

SOLiD5500プロトコル改良

SOLiD5500は、明らかにIllumina社のシーケンスプロトコルに対して劣っている。劣っている理由は、GC-contentが高いDNA断片を塩基配列決定出来ないことは明白であった。その理由は、ligation法による塩基配列決定法にあるのか、emulsion PCR法に頼っている方法にあるのか不明である。ligation法による塩基配列決定法に欠陥がある場合には、個々のユーザーが改良できる範囲を超えているので、我々はとにかく emulsion PCRの改良に取り組んだ。

LifeTechnologies社から提供されたプロトコールを基本に考えつつも、emulsionの作成法、使用するTaq polymeraseの種類、emulsion PCRによって増幅された P1 magnet beads の濃縮法など全て見直して、オリジナルの方法と比較して遜色ない、むしろ勝っているemulsion PCR法を考案した。今後、exome解析に使えることを確認し、来年度以降のexome解析に適用してく予定である。また、我々のemulsion PCRの改良→塩基配列決定による結果からligation法による塩基配列決定法に欠陥があるのかどうか確定される。

次世代型シーケンサーの解析能力について (SOLiD5500オリジナル解析法による変異同定効率)

次世代型シーケンサーSOLiD5500の性能について議論可能なデータを今回の研究で取得したので、これを考察する。SOLiD5500 workflowによって候補として選定された変異は、SNV52個、Ins28個、Del19個であった。

SNV52 個 - (真 23 個, 偽 29 個)

Ins28 個 - (真 1 個, 偽 27 個)

Del19 個 - (真 2 個, 偽 7 個)

このデータによると、感度・特異度ともに非常に悪い。本成績は、設定をdefaultにしたままの変異annotationの結果は信用できないということを示している。

-SNVに関する考察

SNVは、GATKで排出されるデータの中から陽性のSNPを陽性として選別することは可

能である。すなわち感度を上げることは可能である。GATKで計算される Quality Score > 400 で選択することで SOLiD5500 が拾い上げたSNVはほぼ 100%の感度で変異部位を選別できる。ただし、Quality Score ~ 400程度のSNVは、偽SNVも含まれており特異度~95%程度であろう。Quality Score ~ 400付近には偽SNVも含まれる。Quality Score ~ 500を選択基準に設定すれば特異度100%が達成されるであろうと考えられるが感度が落ち、False Negative が増加することになる。このように Quality Score による選択は可能であるが、SOLiD5500 workflowによって候補としてさえ拾われないSNVが存在していた。false negative SNV である。キャピラリーシーケンサーでscreeningしていたexon39とexon48に見だされた9個のSNVのうち2個はworkflow によって見逃されていた。見逃がしの原因は、周囲にSNP部位が多く存在する部位であった。短いリードは目的の部位にマップされており、確かにSNVは確認されていたのだが、“周囲にSNVが多い”ということで、種々のフィルタリングによって候補から外され、変異候補としては最後まで残っていなかった。この2個のSNVのquality scoreは、423.73 と1137.36であり、周辺のSNPの状態に限らず Quality Score は高かった。すなわち、周辺のSNP siteに惑わされず真のSNVとして残すべきであった。SOLiD5500 → NovoalignCS → GATK の workflow によって、大部分のSNVを認識できるようだが、どれくらいのものを見逃がすかは不明である。また、認識で

きたSNVをどのようなフィルターによって感度を上げ、特異度を上げて選別するかは今回の結果を参考に十分に考慮する必要がある。

-InDelに関しての考察

InDelに関して、SOLiD5500 → Novoalign → GATK のworkflowでは見逃しが多いことを知っておくべきである。選び出されたInDelのほとんどすべてが偽であり、false positive である。内容を見ると、SNVとは違って Quality Score は真偽の判断に全く役に立たない。真であっても偽であっても Quality Score は高かった。真偽を区別する方法は、真であった3個の InDel では複数個の独立した InDel を示すリードが存在していて、偽であった34個の InDel には正常を示すリードが30以上あるのに InDel を示す独立のリードが1個または2個しかなかった。このことを手掛かりにして InDel の真偽を判定するのが良いと考えられる。候補として残った InDel の最終的な選択は、InDel を示すリード数が決め手となる。Quality Score は全くあてにならない。

InDel のスクリーニングの問題は、「完全に見落としてしまうことがある」ことにある。exon39とexon48に存在した3個の InDel のうち、1個は正常アレルとしてのリードが30以上あるにもかかわらず、InDel を示すリードが存在せず完全に見落としていた。残り2個は、InDel を示すリード数が少なく、Quality Score も低いために選別の段階で候補から外されていた。したがって、スク

リーニングした53名の試料中にも見落とししている疾患原因 InDel 変異がある可能性が残っている。

InDel の高い見逃し率の原因は、SOLiD5500に依存したことであるのか、Novoalign等の整列ソフトの問題であるのか、繰り返し行うPCR時に発生するエラーに依存するのか不明である。ただし、以下の可能性が考えられる。1) SOLiD5500特有のエラー:二本鎖のDNAが塩基配列決定される場合には両方の鎖が読み取られるはずである。しかし、SOLiD5500で塩基配列決定を行った場合には、片方の鎖しか読めない部位が~30%出現する。極めて不均一で何らかの不具合があるとしか考えられない。このような現象は、塩基配列決定の時なのか、emulsion PCR等の試料準備段階の不具合なのかは不明であるが、SOLiD5500特有の不均一な塩基配列決定が行われる。これに起因して InDel を示すリードが無くなる可能性がある。

2) 高サイクルPCRによるエラーの導入: 今回のtarget領域に塩基配列決定は、MLL2領域のPCRによる増幅~35サイクル。emulsion PCR による増幅~40サイクル。特にemulsion PCRは一分子からPCRを始めるので、その前に導入された人工的なエラー変異が、塩基配列決定される。

E. 結論

exome 解析によって UV sensitive syndrome complementation group Aの原因遺伝子UVSSA遺伝子(KIAA1530)を単離した。

MLL2変異解析において、次世代シーケンサーSOLiD5500の塩基配列決定における感受性、特異度を算出することができた。これによって、どのようなフィルターによって真のSNVを選択できるかを明らかにできた。しかし、InDelに関しては、SOLiD5500を使用して特異度をあげて選択することは可能であるが、感受性を高くするよい方法はいまだ見つけることができない。

SOLiD5500は上記のように明らかに欠点を有しており、プロトコールの見直しを進めた。プロトコールの改善ができ、SOLiD5500による変異解析の感受性と特異度の向上が期待できる。

—達成度について—

本年度は、exome解析によって原因遺伝子同定を報告できるのは一疾患にとどまり、その他の疾患の解析が進まなかった。反省点である。しかし、我々は、ほぼ半年をかけて、次世代シーケンサー解析の基本に据えた SOLiD5500 の使用法を改良したので、来年度の網羅的かつ効率的な exome 解析を可能にした者と考えている。この点では、次年度以降の解析に大いに期待できるものと自負している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Okada I, Hamanoue H., Terada K, Tohma T, Megarbane A, Chouery E, Abou-Ghoch J, Jalkh N, Cogulu O, Ozkinay F, Horie K, Takeda J, Furuichi T, Ikegawa S, Nishiyama K, Miyatake S, Nishimura A, Mizuguchi T, Niikawa N, Hirahara F, Kaname T, Yoshiura K, Tsurusaki Y, Doi H, Noriko Miyake N, Furukawa T, Matsumoto N, and Saito H. SMOC1 Is Essential for Ocular and Limb Development in Humans and Mice. *Am J Hum Genet* Jan;88(1): 1-12, 2011. (IF: 12.303)
2. Amani D, Ravangard F, Niikawa N, Yoshiura KI, Karimzadeh M, Dehaghani AS, Ghaderi A. Coding region polymorphisms in the indoleamine 2,3-dioxygenase (INDO) gene and recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* Jan;88(1): 42-47, 2011. (IF: 2.519)
3. Ono S, Yoshiura K, Kurotaki N, Kikuchi T, Niikawa N, Kinoshita A. Mutation and Copy Number Analysis in Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia Families. *Movement Disorders* Mar; 26(4):762-764. (IF: 4.480)
4. Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders. *J Hum Genet* 2011 Apr;56(4):296-299. (IF: 2.547)

5. Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Miura S, Abe S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women. *J Hum Genet* 2011 Apr;56(4):313-315. (IF: 2.547)
6. Kurotaki N, Tasaki S, Mishima H, Ono S, Imamura A, Kikuchi T, Nishida N, Tokunaga K, Yoshiura K, Hiroki Ozawa H. Identification of Novel Schizophrenia Loci by Homozygosity Mapping Using DNA Microarray Analysis. *PLoS One* May 2011;6(5):e20589 (IF: 4.351)
7. Oikawa M, Nagayasu T, Yano H, Hayashi T, Abe K, Kinoshita A, Yoshiura KI. Intracystic Papillary Carcinoma of Breast Harbors Significant Genomic Alteration Compared with Intracystic Papilloma: Genome-wide Copy Number and LOH Analysis Using High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Microarrays. *Breast J* 2011 Jul-Aug;17(4):427-430. Epub 2011 Jun 9. (IF: 1.425)
8. Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura K, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, Bamshad MJ. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011 Jul;155A(7):1511-1516. Epub 2011 Jun 10. (IF: 2.505)
9. Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, Ichinose K, Nakamura H, Tsujino A, Kawakami A, Matsunaka M, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S, Ohmura K, Mimori T, Hirano M, Ueno S, Tanaka K, Tanaka M, Toyoshima I, Sugino H, Yamakawa A, Tanaka K, Niikawa N, Furukawa F, Shigeo Murata S, Eguchi K, Ida H, Yoshiura K. An assembly defect due to a *PSMB8* mutation reduces proteasome activity and causes autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 2011 Sep;108(36):14914-14919. Epub 2011 Aug 18. (IF:9.771)
10. Mishima H, Sasaki K, Tanaka M, Tatebe O, Yoshiura KI. Agile parallel bioinformatics workflow management using Pwrake. *BMC Res Notes* 2011 Sep 8;4(1):331. [Epub ahead of print] (IF:なし)
11. Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Ikemoto R, Miura S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Pre-vaccination epidemiology of human papillomavirus infections in Japanese women with abnormal cytology. *J Obstet Gynaecol Res* Jul 27. 2011 Nov;37(11): 1666-1670. doi:

- 10.1111/j.1447-0756.2011.01601.x. [Epub ahead of print] (IF:0.869)
12. Ono S, Tanaka T, Ishida M, Kinoshita A, Fukuoka J, Takaki M, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kohno S, Hayashi T, Senba M, Yasunami M, Kubo Y, Yoshida LM, Kubo H, Ariyoshi K, Yoshiura K, Morimoto K. Surfactant protein C G100S mutation causes familial pulmonary fibrosis in Japanese kindred. *Eur Respir J* 38(4): 861-869. 2011. Epub 2011 Aug 4. [Epub ahead of print] (IF:5.922)
13. Sasaki K, Okamoto N, Kosaki K, Yorifuji T, Shimokawa O, Mishima H, Yoshiura K-i, Harada N. Maternal uniparental isodisomy and heterodisomy on chromosome 6 encompassing a *CUL7* gene mutation causing 3M syndrome. *Clin Genet* 80: 478-483. 2011. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01599.x. [Epub ahead of print] (IF: 3.304)
14. Oikawa M, Yoshiura KI, Kondo H, Miura S, Nagayasu T, Nakashima M. Significance of Genomic Instability in Breast Cancer in Atomic Bomb Survivors: Analysis of Microarray-Comparative Genomic Hybridization. *Radiat Oncol* 2011 Dec 7; 6(1):168.
- 15) 井田弘明、吉浦孝一郎、金澤伸雄 特集 II 自己炎症症候群 中條—西村症候群の臨床と病態 炎症と免疫 2011:19(153-157)
- 16) 井田弘明 自己炎症症候群の遺伝子異常 内科 2011:107(645-652)
- 17) 井田弘明 医学用語解説 プロテアソーム 炎症と免疫 2011: 19(297-299)
- 18) 井田弘明 自己炎症症候群と自然免疫 リウマチ科 2011:46(149-154)
- 19) 金澤伸雄、有馬和彦、井田弘明、吉浦孝一郎、古川福実：中條-西村症候群 日本臨床免疫学会誌 2011:34(388-400)
- 2) 学会発表
- 国内学会
- 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日(火)～16日(金), パシフィコ横浜, 横浜.
- 2P-0182: The Ruby UCSC SPI: accessing the UCSC Genoe Database using Ruby. Hiroyuki Mishima, Jan Aerts, Koh-ichiro Yoshiura
- 第56回日本人類遺伝学会 2011年11月9日(水)～12日(土), 幕張メッセ, 千葉
- O-010: 免疫プロテアソームの形成以上と活性低下により自己炎症疾患中條-西村症候群が発症する. 木下 晃, 三嶋博之, 有馬和彦, 金澤伸雄, 村田茂穂, 井田弘明, 吉浦孝一郎
- O-070: SNP マイクロアレイを用いたホモザイゴシティーマッピング. 三嶋博之, 黒滝直弘, 木下 晃, 金澤伸雄, 井田弘明, 吉浦孝一郎
- O-103: 子宮体癌特異的 microRNA の同定とその有用性に関する検討. 城 大空, 三浦清徳, 平木宏一, 東嶋 愛, 阿部修平, 長谷川ゆり, 三浦生子, 嶋田貴子,

山崎健太郎, 三嶋博之, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明

O-104: HPV-DNA 型別による持続感染と子宮頸部細胞診の変化. 山崎健太郎, 三浦清徳, 池本理恵, 三浦生子, 嶋田貴子, 小寺宏平, 藤下 晃, 鮫島哲郎, 村上 誠, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明

O-113: SMOC は眼球・四肢発症に重要である. 浜之上はるか, 岡田一平, 寺田晃士, 當間隆也, Megarbane Andre, Cogulu Ozgur, 堀江恭二, 竹田潤二, 古市達哉, 池川志郎, 新川詔夫, 平原史樹, 要 匡, 吉浦孝一郎, 鶴崎美徳, 土井 宏, 三宅紀子, 古川貴久, 松本直通, 才津浩智

P-008: アレイ染色体検査で同定した Joubert 症候群の一例. 松井 健, 齋藤和正, 近藤達郎, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 原田直樹

P-023: ホモ接合マッピングによる統合失調症の感受性遺伝子の同定. 黒滝直弘, 田崎真也, 三嶋博之, 小野慎治, 今村 明, 菊池妙子, 西田奈央, 徳永勝士, 吉浦孝一郎, 小澤寛樹

P-070: OpitzC 様症候群 (Bohring-Opitz 症候群) における ASXL1 遺伝子変異. 要 匡, 柳 久美子, 福嶋義光, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二

第 18 回出生前診断研究会 2011 年 10 月 1 日 (土), 佐賀大学医学部臨床大講堂, 佐賀

O-6: Lenz小眼球症候群を呈する一家系の原因遺伝子解析. 要 匡, 柳 久美子, 當間隆也, 村松友佳子, 森田この美, 池松真也, 板垣裕輔, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 成富研二

第7回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス -放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業-
2011年6月4日 (土), 場所: 広島大学霞キャンパス, 広島

2-4: microarray CGH 解析によるヒパクシヤ乳癌におけるゲノム不安定性の同定. 及川将弘, 吉浦孝一郎, 近藤久義, 三浦史郎, 永安 武, 中島正洋

国際学会

12th International Congress of Human Genetics and The American Society of Human Genetics, 61st Annual Meeting, Montreal, Canada, October 11-15, 2011

556T: Identification of novel schizophrenia loci by homozygosity mapping using DNA microarray analysis. N. Kurotaki, H. Mishima, S. Ono, A. Imamura, S. Tasaki, T. Kikuchi, N. Nishida, K. Tokunaga, K. Yoshiura, H. Ozawa.

1095T: Detection of a mutation in Lents microphthalmia family by exome sequencing. T. Kaname, K. Yanagi, Y. Muramatsu, T. Tohma, H. Hanafusa, K. Morita, S. Ikematsu, Y. Itagaki, S. Mizuno, K. Yoshiura, K. Naritomi.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）	2. 実用新案登録 なし
1. 特許得取得 なし	3. その他 なし

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))
平成23年度分担研究報告書

研究課題：地域集積・収集した稀少疾患の系統的原因究明

分担研究項目：Exome 解析，迅速診断法の開発，臨床診断

分担研究者

要 匡（琉球大学大学院医学研究科遺伝医学講座・准教授）

成富研二（琉球大学大学院医学研究科遺伝医学講座・教授）

研究要旨

本研究の目的は (1) 大規模高速シーケンサーを利用し，難病・稀少疾患の原因遺伝子を明らかにすること。(2) 原因遺伝子が明確または明確となった疾患の診断法を確立することである。本年度は，Lenz 小眼球症候群家系試料，先端異骨症患者児試料，C 症候群関連疾患患者児試料の収集と exome 解析，および迅速診断法の開発を行った。

A. 研究目的

Lenz 小眼球症候群家系、先端異骨症の原因遺伝子の同定、および C 症候群関連疾患の原因遺伝子変異同定と診断法の開発を目指して、本年度は、次世代型シーケンサーを用いた whole exome 解析により、原因遺伝子を同定すること、および高精度融解曲線分析法 (HRM 法) 等を用いた変異スクリーニング法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

琉球大学を含む沖縄県内および県外、北海道医療大学の研究協力チームから収集・供給された、Lenz 小眼球症候群家系の 15 名の試料、臨床的に先端異骨症と診断された患者および家族計 23 名の試料、C 症候群あるいは C 様症候群と診断された患者の中で CD96 遺伝子変異を認めなかった患者計 17 名の試料について、whole exome 解析、または、Sanger 法によるダイレクトシーケンス解析を行い、原因遺伝子、原因遺伝子変異の同定を行った。

また、迅速遺伝子診断法として、HRM 法を用いた変異スクリーニング系の確立を目指した。

(1) Lenz 小眼球症候群家系の原因遺伝子変異同定

家系内において、患者および保因者（と推定される者）、健常者試料から抽出された高分子 DNA を使用し解析した。共通する遺伝子変異を濃縮し、検出しやすくすることを目的として、患児 4 人のゲノム DNA をプールし、exome 解析を行った。同時に、家系内健常者の DNA についても exome 解析を行った。エクソン濃縮は、Illumina 社の TruSeq キットを用い、次世代シーケンスは、HiSeq2000 (Illumina 社) および SOLiD (現 LifeTechnologies 社) を使用し、フラグメント解析により行った。

得られたデータは、Burrows-Wheeler Aligner (BWA)によりヒトゲノム hg19 へマッピングし、SAMtools を使用し SNP call, indel call を行った。また、SNP131 登録、1000 人ゲノム多型の有無を含む位置情報・変異タイプ情報等の annotation 付け、家系内の健常者との比較解析を行った。

さらに、有意と推定された変異について、PCR-RFLP、HRM 法による変異スクリーニング法を確立し、患児での変異確認および 200 人のコントロール検体での変異のスクリーニングを行った。

(2) Exome 解析による先端異骨症の原因遺伝子同定

臨床的に先端異骨症（一部疑いを含む）と診断された患児 8 人のうち、同胞例を含む 4 人について、whole exome 解析を行った。Exome 解析は、前述同様、Illumina 社 TruSeq キットによる濃縮、HiSeq2000 または SOLiD によるフラグメント解析により行い、また、リファレンスマッピング、annotation 付けも同様に行った。

先端異骨症は、常染色体優性遺伝が推定され、孤発例が多いため、それぞれ、両親および非罹患同胞についても同様に exome 解析を行い、*de novo* 変異の検出を行った。

各患児の *de novo* 変異データを集積し、有意な変異、即ち、SNP database 未登録でエクソン上あるいはスプライス接合部位にあり、かつ、アミノ酸置換、フレームシフトまたは終止コドンによるタンパク質短縮化、あるいはスプライス異常を来すと思われる変異を抽出した。有意な変異の推定には、PolyPhen や SIFT による結果も加味した。その後、全ての患児に有意な変異が認められる遺伝子（4 人ともに変異が確認できた同一の遺伝子）を抽出した。

抽出できた B 遺伝子について、他の 4 人の臨床的先端異骨症患児およびそれら両親での変異の有無をダイレクトシーケンス解析により検索した。本 whole exome 解析は、Sungkyunkwan University (Korea) との共同研究として行った。

(3) C 様症候群の exome 解析と遺伝子変異解析

三角頭蓋を認め、臨床的に C 症候群また

は C 様症候群と診断された患児のうち、*CD96* 遺伝子変異解析において、変異を認めなかった患児 17 名のゲノム DNA 試料について解析した。

2 名について、whole exome 解析を行い、その他については、Sanger 法ダイレクトシーケンスによる遺伝子解析を行った。

Whole exome 解析については、前述と同様に Illumina 社 TruSeq キット、HiSeq2000 および SOLiD を使用し、フラグメント解析により行った。また、SNP、indel call、遺伝子情報を含む annotation 付け等も同様に行い、検討した。

(4) C 症候群の迅速診断法の開発

C 症候群の一部は *CD96* 遺伝子変異によることが判明しているが、本 B 遺伝子変異の有無を効率よくスクリーニングできるように全 15 エクソンに対して、qPCR-HRM 法を用いた遺伝子コピー数および変異/多型のスキニングシステムを構築した。

C. 研究結果

(1) Lenz 小眼球症候群家系の原因遺伝子変異同定

患児プール DNA の whole exome 解析の結果、8124 個の SNP/indel が検出された。

Patient pooled DNA	
Total reads	52,245,612
Mappable reads	46,790,897
% of mappable reads	89.6
On-target reads	33,437,683
% of on-target reads	71.5
% of on-target reads (/total reads)	64.0
Median read depth	39.0x
Mean read depth	45.1x
SNPs	66,361
Indels	14,879
Coding SNPs	19,196
Coding indels	583

プール DNA exome 解析統計データ

この中で、X 染色体上のヘミ接合（データ上ホモと検出される）SNP/indel は 552 個であった。内、SNP131 に登録されていない新規 SNP/indel は 51 個、さらにその中でタンパク質をコードするエクソン上の変異は 4 個であった。

Total SNP, indel	81240
On chromosome X	1393
'Homozygous' variations	552
Novel variations (not SNP131)	51
Exonic variations	4

SNP/indel の内訳

エクソン上の 4 個の変異（多型）

(synonymous SNP 1, small insertion 1, non-synonymous SNP 2) に関する解析結果は以下の通りであった。

1 つは Xq26.1 に存在する遺伝子の

synonymous SNP であり、コントロール検体においても SNP が確認された。

Small insertion は、Xq22.1 に存在する遺伝子内に認められたものの、家系内の健常者 exome データでも認められた。

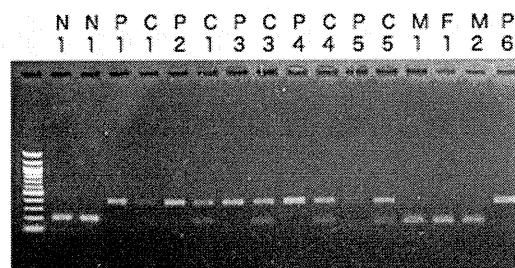
2 つの non-synonymous SNP は、Xp22.33 上の XG 遺伝子内と Xp11.4 上のある A 遺伝子内に存在し、XG 遺伝子上の SNP は、家系内健常者においても認められたため、ある A 遺伝子の変異が原因である可能性が最も高いと考えられた。

Exome 解析により検出されたある遺伝子変異を、患児それぞれに Sanger シーケンス法にて確認したところ、全てに変異を確認できた。加えて、本変異を簡便に検出できるように、目的部位をターゲットとした PCR-RFLP、HRM 検出法を確立し、家系内患児、保因者、健常者および、日本人コントロール 200 人について解析した。

結果、家系内において、患児、保因者、健常者の genotype (PCR-RFLP と HRM の結果は一致していた) は、全て矛盾なく、また、コントロール検体には、本変異を認めなかった。

よって、本変異が今回の Lenz 小眼球症候群家系の原因であると結論づけた。

Exome および Sanger シーケンスによるある A 遺伝子変異の同定



N:normal control, P:patient, C:carrier, M:male, F, female

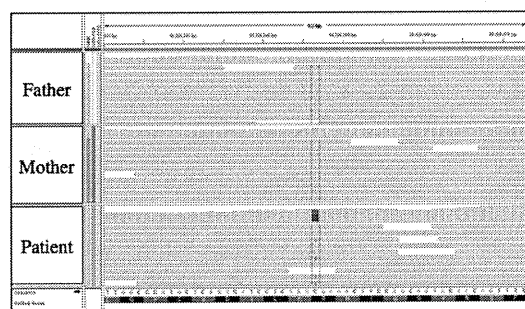
PCR-RFLP による exon 4 genotyping

(2) Exome 解析による先端異骨症の原因遺伝子同定

各患児家族における exome 解析、*de novo* 変異検出、および *de novo* 変異を認める遺伝子の一致性を検討した結果、ある B 遺伝子が原因と推定された。

	family 1				family 2			patient 4,5	
	Father	Mother	Brother	Patient 1	Mother	Sister	Patient 2	patient 4	patient 5
Initial total variant calls	75,958	74,707	75,922	63,884	79,259	82,783	79,834	77,915	71,223
After exclusion of flanking, intronic variants	18,710	18,215	18,845	16,862	19,493	20,034	18,523	18,827	17,614
After exclusion of dUSHIP131	1,061	977	1,070	917	822	965	833	1,526	1,446
After exclusion of shared variants with other family members								120	95
After exclusion of not-shared genes in four patients				23				1	1

Exome データ解析



Heterozygous variation
de novo 変異

本遺伝子は、Sanger シーケンス解析の結果、他の臨床的先端異骨症患児 4 人中 3 人に *de novo* 変異を認め、原因遺伝子の一つであることが判明した。

これら全ての *de novo* 変異は、日本人コントロール 800 検体において、認められなかった。

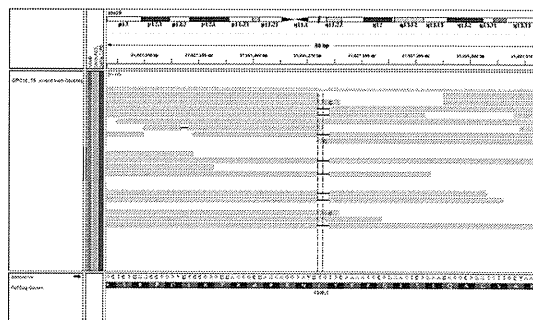
1 人については、本遺伝子の変異を認めず、また、臨床的に鑑別の必要な偽性副甲状腺機能低下症の原因である *GNAS* 遺伝子にも変異を認めなかった。

(3) C 様症候群の exome 解析と C 遺伝子変異解析

2 名の whole exome 解析の結果、1 人に B 遺伝子 exon 11 内の 2 塩基欠失をヘテロで認めた。

OPC#36	
Total reads	46,514,412
Mappable reads	41,746,998
% of mappable reads	89.8
On-target reads	29,853,824
% of on-target reads	71.5
% of on-target reads (/total reads)	64.2
Median read depth	34.0x
Mean read depth	40.2x
SNPs	61,320
Indels	12,872
Coding SNPs	17,856
Coding indels	559

exome 統計データ



2bp del in C (exome data)

もう 1 人には、synonymous SNV および non-synonymous SNV を認めたが、いずれも SNP132 および 1000 人ゲノム多型に登録されている多型であった。その他、intron 領域、3' UTR 領域に SNV を認めたが、少なくとも有意な C 遺伝子変異は認めなかった。

OPC#37 exome data in B

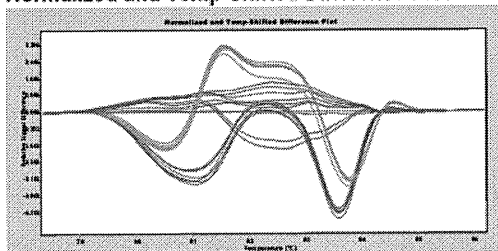
一方、15 人の Sanger シーケンス解析において、4 人に新規変異（ナンセンス変異 2、一塩基欠失変異 1、一塩基挿入変異 1）を認めた。他の患児については、有意な変異を認めなかった。

(4) C 症候群の迅速診断法の開発

CD96 遺伝子の全 15 エクソンに対する qPCR-HRM 法を用いたコピー数・変異/多型スキニングシステムを構築し、日本人コントロール検体について本スキニングを行ったところ、3 つの既知多型 (SNP; rs2276873, rs3832264, rs1513325) と 2 つの新規多型 (SNP; c.1042T>C,

IVS11-111C>T)を検出できた。

Normalized and Temp-Shifted Difference Plot



blue :c.-121C>C/T, IVS1+89 19bp hetero duplication
 red :c.-121C>T/T, IVS1+89 19bp homo duplication
 green :c.-121C>C/C

HRM による CD96 exon 1 多型検出

D. 考察

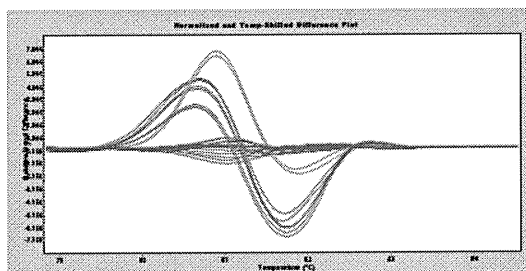
Whole exome解析により、沖縄に集積しているLenz小眼球症候群の家系においてはA遺伝子変異が原因となっていること、先端異骨症においては、B遺伝子変異が原因の一つとなっていることが明らかとなった。

Lenz小眼球症候群については、現在までに、Xp11.4とXq27-q28の2つの遺伝子座が知られている。今回の家系の原因は、Xp11.4に局在するA遺伝子の変異であった。

本遺伝子変異については、PCR-RFLPとHRM法によるスクリーニング結果が一致し、HRM法による迅速診断が可能となった。

A遺伝子は今後、遺伝子変異と表現型、遺伝形式の相違を詳細に検討することが必要であると思われる。

また、Lenz小眼球症候群について、他の家系でA遺伝子変異を確認できない例があり (data not shown)、それらにおいては、Xq27-q28に局在する他の遺伝子が原因であると思われる。Xq27-q28については未だ原



blue :IVS11-111 C>C/C
 red :IVS11-111 C>C/T
 green :IVS11-111 C>T/T

HRM による CD96 exon 11 多型検出

因遺伝子が単離されておらず、今回と同様の次世代シーケンス解析による遺伝子同定が有効であると思われる。

先端異骨症について、whole exome解析、およびそれらのデータ解析が有効に働き、効率よく原因遺伝子同定ができた。本研究により、先端異骨症の原因の多くは、B遺伝子の変異であると結論できた。

しかし、本疾患には他の原因もあると推定される。実際に、臨床遺伝専門医により先端異骨症と診断された4人のSangerシーケンス解析において、1人に遺伝子変異を確認できなかった。

本疾患は、臨床的に疾患概念が確立しているとは言えず、現場では、やや軽症と思われるタイプや内分泌学的反応性の違いのあるタイプなどが混在していると思われる。また、鑑別診断として重要な、偽性副甲状腺機能低下症と一部オーバーラップしている例もあると推定される。これらの混在も

一因と思われるが、前述の結果からも、本疾患の原因は複数あると推定される。

今後、他の原因遺伝子同定も行い、遺伝子型と症状のデータを蓄積し、先端異骨症の疾患概念、疾患分類を確立する必要があると思われる。

C様症候群において、2人のexome解析にて1人にC遺伝子変異を確認できた。また、15人中4人にC遺伝子変異を同定できた。しかしながら、本疾患においても、C遺伝子変異を確認できない患児がいることから他の原因遺伝子の存在も考えられる。

よって、新規原因遺伝子の同定が重要であると思われる。

加えて、臨床的に診断が確定しない症例もあることから、臨床症状の詳細な比較、網羅的遺伝子変異解析により、疾患を整理する必要があると思われる。

C症候群の原因であるCD96遺伝子について、HRM法による変異スクリーニング系を確立したことは、これらC症候群関連疾患を整理する上で、有効と考えられる。

E. 結論

Exome解析によってLenz小眼球症候群家系の原因遺伝子変異(A遺伝子変異)を同定した。また、先端異骨症の原因遺伝子の一つとしてB遺伝子を明らかにした。次世代型シーケンサーを利用した原因不明の遺伝性疾患の解析、とりわけwhole exome解析法は、単一家系例や孤発例の多い遺伝性疾患の原因同定にも非常に有用であること

が示された。さらに、C症候群関連疾患において、(CD96遺伝子変異を認めない)患児での新規B遺伝子変異の発見やCD96遺伝子を中心とした迅速診断法の開発により、臨床的C症候群ならびに類似疾患患児の遺伝子診断に基づく確定診断が確実にできるようになった。

——達成度について——

地域集積された難病・稀少疾患の原因遺伝子単離と迅速診断法の開発を目標として研究を開始し、本年度Lenz小眼球症候群の遺伝子変異、先端異骨症の原因遺伝子を同定し、C様症候群の新規遺伝子変異を同定できたことは大きな進展である。

今後、これら疾患の詳細な病態解析を行うとともに、他の遺伝性疾患についても試料収集を継続し、次世代シーケンス解析を中心とした病因・病態解明、迅速診断法の確立を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Kaname T. A commentary on Implication of gene copy number variation in health and diseases. *J Hum Genet*, (2012) 57:79-80.
2. Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, Tomita H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H,

- Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features. *J Hum Genet*, (2012) 57:207-211.
3. Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura K-i, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou J-W, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, Bamshad MJ. Spectrum of *MLL2* (*ALR*) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet.*, (2011). 155A:1511-1516.
4. Hatin WI, Nur-Shafawati AR, Zahri MK, Xu S, Jin L, Tan SG, Rizman-Idid M, Zilfalil BA; HUGO Pan-Asian SNP Consortium. Population genetic structure of peninsular Malaysia Malay sub-ethnic groups. *PLoS One*, (2011) 6:e18312.

2) 学会発表

国内学会等

ゲノムテクノロジー 第164委員会 沖縄分科会 2012年1月25日(水)～26日(木), 沖縄県市町村自治会館, 那覇.

(シンポジウム) Exome解析を活用したヒト遺伝性疾患の原因解析の実践. 要匡

日本農芸化学会2012年度大会 2012年3月22日(木)～26日(月), 京都女子大学, 京都

3B18a05: 沖縄の自然界からの乳酸菌の単離および乳酸菌代謝産物の機能性の探索. 森田この美、柳久美子、比嘉 瞳、金本昭彦、要 匡、池松真也

第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日(火)～16日(金), パシフィコ横浜, 横浜

2S17-I-2: The practice of whole exome sequencing in two genetic diseases, X-linked recessive and autosomal dominant disorders. T. Kaname

2P-0831: Screening of mutations in the *FGDI* gene in Japanese patients with Aarskog-Scott syndrome. K. Yanagi, T. Kaname, K. Naritomi

日本人類遺伝学会第56回大会 2012年11月10日(木)～12日(土), 幕張メッセ, 千葉

P-070: Opitz C様症候群(Bohring-Opitz症候群)における*ASXL1*遺伝子変異. 要匡、柳久美子、福嶋義光、水野誠司、吉浦孝一郎、新川詔夫、成富研二

P-067: Aarskog-Scott症候群における*FGDI*遺伝子変異. 柳久美子、要匡、岡本伸彦、

- 塚原正人、黒澤健司、泉川良範、福嶋義光、蒔田芳男、近藤郁子、Ayca Altincik、水野誠司、伊藤靖典、成富 研二
- O-131: 沖縄県における前庭水管拡大症の遺伝学的検討. 我那覇章、鈴木幹男、成富研二、要 匡、柳久美子、宇佐美真一
- O-113: SMOC1は眼球・四肢発生に重要である. 浜之上はるか、岡田一平、寺田晃士、竹田潤二、古市達哉、池川志郎、新川詔夫、平原史樹、要 匡、吉浦孝一郎、鶴崎美德、土井宏、三宅紀子、古川貴久、松本直道、才津浩智
- 第18回出生前診断研究会 2011年10月1日(土), 佐賀大医学部 臨床大講堂; 佐賀
- O-6: Lenz小眼球症候群を呈する一家系の原因遺伝子解析. 要 匡、柳久美子、當間隆也、村松友佳子、森田この美、池松真也、板垣裕輔、水野誠司、吉浦孝一郎、成富研二
- 第84回日本生化学会大会 2011年9月21日(水)~24日(土), 京都国際会館; 京都
- 3P-0554: 免疫グロブリンスーパーファミリー CD96の細胞外マトリックスタンパク質との反応性の検討. 要 匡、柳久美子、森田この美、池松真也、成富研二
- 第51回日本先天異常学会学術集会 2011年7月22日(金)~24日(日), シェーンバッハ・サボー; 東京
- P-065: Opitz三角頭蓋症候群原因遺伝子CD96のPCR-HRM法による変異スクリーニングシステム. 要 匡、森田この美、柳久美子、花房宏昭、吉浦孝一郎、池松真也、成富研二
- 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (cosponsor: the Asia-Pacific Developmental Biology Network)
Okinawa Convention Center, Okinawa, May 18-21, 2011
- P-1189: Analysis of interaction between CD96 and extracellular matrix proteins. T. Kaname, K. Yanagi, K. Naritomi
- 国際学会
The American Society of Human Genetics, 60th Annual Meeting
Montreal, Quebec, Canada, October 11-15, 2011
- 1095/T: Detection of a mutation in Lenz microphthalmia family by exome sequencing Author(s): T. Kaname, K. Yanagi, Y. Muramatsu, T. Tohma, H. Hanafusa, K. Morita, S. Ikematsu, Y. Itagaki, K. Kurosawa, S. Mizuno, K. Yoshiura, K. Naritomi
- その他
第136回遺伝子技術講習会 2012年2月

13日(月), 熊本大学; 熊本

次世代シーケンサを活用した、パーソナルゲノムに基づくヒト遺伝性疾患の解析. 要
匡

バイオインフォマティクス・フォーラム

in 沖縄 2011 2011年6月26日(日), 那
覇; 沖縄

医学研究とバイオインフォマティクス. 要
匡

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定
を含む。)

1. 特許得取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし