

201135013A

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)

分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の  
解明と遺伝子診断ネットワークの形成

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎健次郎

平成24(2012)年3月

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)

分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の  
解明と遺伝子診断ネットワークの形成

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎健次郎

平成24(2012)年3月

# 目 次

I. 平成23年度構成員名簿	1
II. 総括研究報告	
平成23年度総括研究報告	3
小崎 健次郎(慶應義塾大学・医学部・臨床遺伝学センター)	
III. 分担研究報告	
1. 次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析と診断への応用に関する研究	12
松永達雄(東京医療センター・臨床研究センター聴覚障害研究室 聴覚障害研究室長)	
2. 全国圏における先天性中枢神経奇形症候群患者の遺伝子変異解析体制 および患者由来iPS細胞樹立体制の整備	15
金村 米博(独立行政法人国立病院機構大阪医療センター)	
3. 次世代シーケンサーを用いた先天奇形症候群の原因遺伝子群の網羅的解析系の開発	20
小崎 里華(独立行政法人国立成育医療研究センター・内科系専門診療部・遺伝診療科)	
4. 次世代シーケンサーによる解析に関する研究	23
工藤 純(慶應義塾大学医学部共同利用研究室・遺伝子医学研究室)	
5. 次世代シーケンサーによる変異探索システムの構築	25
清水 厚志(慶應義塾大学医学部分子生物学教室)	
6. 次世代シーケンサーを用いたバイオインフォマティクス解析による 先天性異常症の遺伝要因の解明に関する研究	27
宮 冬樹(独立行政法人理化学研究所 ゲノム医科学研究センター 情報解析研究チーム)	
7. 高分解能融解曲線分析法 High resolution melting (HRM)による 遺伝性疾患変異スクリーニングの確立	30
—血管型 Ehlers-Danlos 症候群診断への応用—	
黒澤 健司(地方独立行政法人神奈川県立病院機構・神奈川県立こども医療センター遺伝科)	
8. 中枢神経奇形をきたす小児神経疾患の成因に関する研究	33
齋藤 伸治(名古屋市立大学大学院医学研究科)	
9. 先天異常症の臨床遺伝診療に有用なインターネットウェブサイトに関する研究	35
水野 誠司(愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部)	
10. 先天性水頭症の遺伝子診断の現況と今後の方向	38
山崎 麻美(独立行政法人国立病院機構大阪医療センター)	
11. 分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と 遺伝子診断ネットワークの形成ピット・ホプキンス症候群の遺伝子解析	42
岡本伸彦(地方独立行政法人大阪府立病院機構・大阪府立母子保健総合医療センター)	
12. 東日本圏における患者情報収集(中枢神経奇形・奇形症候群)と遺伝子解析に関する研究	47
加藤 光広(山形大学医学部附属病院小児科)	
13. 眼先天異常を伴う奇形症候群の遺伝要因に関する研究	49
仁科 幸子(独立行政法人国立成育医療研究センター・臓器・運動器病態系外科部眼科)	

14. 分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と 遺伝子診断ネットワークの形成 赤松和土(慶應義塾大学医学部生理学教室)	53
15. 先天異常症の大規模疾患モデル作成に関する研究 谷口 善仁(慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室)	55
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
V. 研究成果の刊行物・別冊	

〔 I 〕

平成23年度構成員名簿

平成23年度 厚生労働省科学研究費補助金  
 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)  
 「分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と  
 遺伝子診断ネットワークの形成」研究班

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	小崎健次郎	慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター	教授
研究分担者	松永達雄	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室	聴覚障害研究室長
	金村米博	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター	再生医療研究室長
	小崎里華	独立行政法人国立成育医療研究センター 内科系専門診療部遺伝診療科	医長
	工藤 純	慶應義塾大学医学部共同利用研究室・遺伝子医学研究室	教授
	清水厚志	慶應義塾大学医学部分子生物学教室	助教
	宮 冬樹	独立行政法人理化学研究所 ゲノム医科学研究センター 情報解析研究チーム	研究員
	黒澤健司	地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター遺伝科	部長
	齋藤伸治	名古屋市立大学大学院医学研究科	教授
	水野誠司	愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部	部長
	山崎麻美	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター	先進医療研究開発部長
	岡本伸彦	地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科	科長
	加藤光広	山形大学医学部附属病院小児科	講師
	仁科幸子	独立行政法人国立成育医療研究センター 臓器・運動器病態系外科部眼科	医員
	赤松和土	慶應義塾大学医学部生理学教室	講師
谷口 善仁	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室	講師	

〔Ⅱ〕

総括研究報告書

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  
「分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と  
遺伝子診断ネットワークの形成」  
研究代表者 小崎 健次郎  
慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授

**研究要旨**

本研究は次世代シーケンサーを用いることにより先天異常症の遺伝子診断により原因を特定し、合併症を回避することによって質の高い診療を提供することを目的としている。研究班には分子遺伝学の専門家および 先天奇形症候群、聴覚障害および視覚障害等の感覚器障害、中枢神経奇形の各分野の専門医が参加している。初年度は、検体の収集を行うための体制を整備するとともに、解析方法の最適化を行った。臨床医は、高度な分析の対象となるべき症例の選定のための作業を進めた。各分野について～300個の程度の対象疾患と関連する可能性のある遺伝子の蛋白質コーディング全領域を網羅的に解析する系を設計できた。先天異常症候群について、～200個の遺伝子を網羅的に解析系 (“Malforme”) が設計できた。難聴については138遺伝子の解析系を設計できた。先天性水頭症、小脳形成障害症、皮質形成異常症、神経管閉鎖不全症、てんかん、頭蓋縫合早期癒合症、小頭症、その他の先天性神経疾患、に対する遺伝子解析の標的遺伝子として、284遺伝子を含む解析系が設計できた。これら遺伝子の解析体制を整備し、具体的な遺伝子解析に着手した。次世代シーケンサーによる変異探索では変異の検出におよそ平均100本のリードが必要とされている。今回我々は患者当たり平均200本のデータを得る事ができた。次世代シーケンサーからはDNA配列と塩基毎の精度がで出力される (fastqフォーマット)。そこで、得られたfastqファイルをヒト参照配列に整列した上で、変異探索と原因候補遺伝子のリストアップを行った。上記の疾患解析パイプラインを用いてアラインメントを行い、標準的なフォーマット (BAMフォーマット) として出力した。神経線維腫症 (5例)・Stickler症候群(3例)など原因遺伝子のサイズが大きな疾患についても、遺伝子変異を同定することが出来た。また、神経線維腫症の解析では、古典的な原因遺伝子とされるNF1に変異が無く、RAS遺伝子パスウェイに属する他遺伝子のミスセンス変異を有する症例を同定することができた。既知遺伝子の上流・下流の遺伝子を併せて解析するアプローチの有効性が示された。これらの結果から、ターゲット濃縮 (アジレント社SureSelect) とデスクトップ型シーケンサー (イルミナ社MiSeq) を用いて～5名程度の患者について300個の程度の対象疾患と関連する可能性のある遺伝子を網羅的に解析する当初の計画のフィージビリティを十分に示す事ができた。



### 研究分担者

松永 達雄 独立行政法人国立病院機構東京医療センター 感覚器 聴覚障害研究室長  
金村 米博 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室長  
小崎 里華 独立行政法人国立成育医療研究センター 器官病態系内科部・遺伝診療科 医長  
工藤 純 慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室 教授  
清水 厚志 慶應義塾大学医学部分子生物学教室 助教  
宮 冬樹 独立行政法人理化学研究所ゲノム医科学研究センター 研究員  
黒澤 健司 独立地方行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター  
遺伝診療科 部長  
齋藤 伸治 名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野 教授  
水野 誠司 愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部 部長  
山崎 麻美 独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 副院長  
岡本 伸彦 地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター  
遺伝診療科 主任部長  
加藤 光広 山形大学医学部附属病院 小児科 講師  
仁科 幸子 独立行政法人国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 眼科 医員  
赤松 和土 慶應義塾大学医学部生理学教室 講師  
谷口 善仁 慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室 講師

### 研究協力者

緒方 勤 国立大学法人浜松医科大学医学部小児科学講座 教授  
沼部直博 京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻健康管理学講座医療倫理学 准教授  
吉橋 博史 東京都都立小児総合医療センター 臨床遺伝科 医長  
武内 俊樹 慶應義塾大学医学部地域小児医療調査研究講座 特任助教  
柳橋達彦 慶應義塾大学医学部小児科学教室 助教  
奥野 博庸 慶應義塾大学医学部小児科学教室 医師  
山口 有 慶應義塾大学医学部小児科学教室 医師  
鳥居 千春 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 研究員  
高田はづき 独立行政法人国立成育医療研究センター 研究員

## A. 研究目的

本研究は次世代シーケンサーを用いることにより先天異常症の遺伝子診断により原因を特定し、合併症を回避することによって質の高い診療を提供することを目的としている。研究班には分子遺伝学の専門家および先天奇形症候群、聴覚障害および視覚障害等の感覚器障害、中枢神経奇形の各分野の専門医が参加している。初年度は、検体の収集を行うための体制を整備するとともに、解析方法の最適化を行った。臨床医は、高度な分析の対象となるべき症例の選定のための作業を進めた。

## B. 研究方法

### ①解析系の設計

先天奇形症候群（研究者分担小崎健次郎・小崎里華）、聴覚障害（研究者分担松永）および視覚障害等（研究者分担仁科）の感覚器障害、中枢神経奇形の各グループが過去の臨床報告や、分子レベルでの相互作用から推定して提示された150個から300個程度の遺伝子をリストアップした。既知疾患原因遺伝子が属する分子パスウェイの上流・下流の遺伝子も併せて解析することとした。これらの遺伝子を標準的な登録番号（カリフォルニア大学サンタクルツ校ゲノムデータベース UCSD ID）に変換した（研究分担者清水・工藤）。患者ゲノムDNAからこれらの遺伝子に対応する領域を効率的に回収するためのオリゴヌクレオチドアレイを設計した。具体的にはAgilent社のカスタムマイクロアレイを用いることとし、同社のマイクロアレイ設計ソフトウェアである「eArray」を使用した。eArrayで自動設計したカスタムキットにはGC含量が高い領域や反復配列の混入を避けるために、複数のエクソン領域でプローブが未設計であった。そこで、プローブの配列とUCSCのエクソン位置情報を比較し、可能な限り未設計領域へ新たにプローブを追加設計し、Agilent社に合成を依頼した。中枢神経異常として、分担研究者の齋藤は精神遅滞や自閉症の原因としてシナプス形成の異常に注目した。シナプス形成異常は微細な中枢神経奇形と位置づけることも可能である。このような疾患の体系的な遺伝学的解析システムを構築するモデルとして、Angelman症候群（AS）の遺伝学的診断方法の体系化を行った。分担研究者の山崎は中枢神経奇形のプロトタイプとして水頭症の遺伝子診断法の体系化を行った。分担研究者加藤は小頭症の遺伝子診断の体系化を行った。

### ②患者由来ゲノムDNAの前処理

小児病院の臨床遺伝専門医である研究分担者（黒澤・岡本・水野・小崎里華）のネットワークを通じて、患者に対して研究への参加と理解を求めた。解析検体は、インターカレーション法による精密なDNA濃度測定を行い、Covaris社製超音波破砕機を用い、至適条件下で、約150bpへ断片

化する。これをベックマン社AMPure磁性ビーズを用いて精製しSureSelectターゲットエンリッチメントライブラリーとハイブリダイズさせ、各検体の解析対象となる難聴遺伝子領域を濃縮した。各検体はインデックスタグを付加し増幅し、イルミナ社製次世代シーケンサーGenome Analyzer IIxを用いて塩基配列データを創出する。品質チェックを経て参照ゲノムDNA配列上へのマッピングを行い、検体毎に遺伝子変異を同定する。本遺伝子解析研究計画は、研究開始に先立ち各研究施設での倫理審査で承認をうけた。また本研究は、各検体をご提供下さった患者、ご家族の同意下のもと実施した。

### ③次世代シーケンサーによる解析

同一原理に基づく2種の次世代シーケンサー（Illumina社）を用いた解析を実施した。GAII（工藤研究分担者）は高出力であるが、多量の検体を用意する必要がある。そこでGAIIによる解析に加えて、デスクトップ型次世代シーケンサーであるMiSeqを併用した（清水研究分担者）。

### ④疾患解析パイプラインの構築

次世代シーケンサーからはDNA配列と塩基毎の精度がfastqフォーマットで出力される。そこで、得られたfastqファイルをヒト参照配列にbwa (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) によりアライメントし、GATK (<http://www.broad-institute.org/gsa/wiki/>) により変異探索と原因候補遺伝子のリストアップを行った（清水研究分担者・宮研究分担者）。

### ⑤疾患原因遺伝子の効率の良い絞り込み方法の開発

先天性疾患の場合は検出された変異が疾病特異的な変異であり、正常人は有しない変異のみに絞り込むことが有用と考えられるが、公開データベース上の既報変異の中には偽陽性も含まれている場合も少なくないと考えられ、そのまま全てを絞り込みに用いると偽陰性を生じる（真の疾患関連変異を見落とす）可能性がある。特に近年国際プロジェクトで進められている正常人2,000人以上のゲノムを次世代シーケンサーにて解析している1000 Genomes Project（1000G）の情報は有用ではあるが偽陽性を含む危険性もある。そこで我々は1000Gで決定された変異をそのまま用いる絞り込みの他に、元のシーケンスデータから解析パイプラインを通してクオリティの高い変異のみを抽出する方法を試行し、最終的な疾患関連候補変異の絞り込みパターンを数種作製した（宮研究分担者）。

### ⑥変異の同定のためのデータの可視化

患者検体から得られたDNA配列データをヒトの標準的なゲノム配列に整列（アラインメント）する際には、自動化されたプログラムが有効であるが、アラインメントのあとのデータ解

析にはグラフィカルユーザーインターフェースを有するプログラムの使用が有効であると思われた。変異を検出するための種々のパラメータが存在するが、ナンセンス変異およびフレームシフト変異を優先して、疾患原因候補遺伝子として取り上げ、その中で変異が同定で着ないときには、ミスセンス変異の評価を行った。ミスセンス変異の評価の際には、Liuらによって提唱された、dbNSFPスコアを用いた。dbNSFPスコアは、特定の部位にアミノ酸置換が起きたときに病的意義を有するかどうかについて、4種の予測プログラムによりスコアを求め、その結果をデータベース化したものである。

<https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>

#### ⑦次世代シーケンサー以外のスクリーニング法の応用

Target enrichmentのあと次世代シーケンサーを使用する方法は極めて感度の高い解析法であるが、GC含量の高い領域など、解析が困難な場合が残る。これらの問題を解決するために他の遺伝子変異スクリーニング法を並行して活用する必要がある。そこで高分解能融解曲線分析法High resolution melting (HRM)は、qPCRによる高解像度融解曲線分析を行なうことで、増幅フラグメント内の変異をスクリーニングする方法で、手技・コストなどの面で臨床応用の幅が広い。海外でも、病因遺伝子が限定されている場合には、dHPLCと並んで有用性が評価されている。今回我々は、この解析方法を導入し、血管型Ehlers-Danlos症候群の診断に応用し、その有用性を確認したのでまとめた。

#### ⑧臨床診断のためのウェブサイト情報の集積・分析

先天多発奇形を診療する医師がインターネット情報を十分に活用することの重要性が一段と高まっている。今回一般の臨床医がアクセス可能なインターネット上の医療情報サイトで提供されている各疾患の臨床情報とマネジメントに関する記述について調査し検討した。

### C. 研究結果

#### ①解析系の設計

各領域について~300個の程度の対象疾患と関連する可能性のある遺伝子の蛋白質コーディング全領域を網羅的に解析する系を設計できた。先天異常症候群について、~200個の遺伝子を網羅的に解析系("Malfome")が設計できた。難聴については138遺伝子の解析系を設計できた。先天性水頭症、小脳形成障害症、皮質形成異常症、神経管閉鎖不全症、てんかん、頭蓋縫合早期癒合症、小頭症、その他の先天性神経疾患、に対する遺伝子解析の標的遺伝子として、284遺伝子を含む解析系が設計できた。これら遺伝子の解析体制を整備し、具体的な遺伝子解析に着手した。

#### ②次世代シーケンサーからの粗配列の出力

次世代シーケンサーによる変異探索では変異の検出におよそ平均100本のリードが必要とされている。今回我々は患者当たり平均200本のデータを得る事ができた。この結果により、ターゲット濃縮(アジレント社SureSelect)とデスクトップ型シーケンサー(イルミナ社MiSeq)を用いて~5名程度の患者について300個の程度の対象疾患と関連する可能性のある遺伝子を網羅的に解析する当初の計画のフィジビリティを十分に示す事ができた。

#### ③粗配列のアライメント

次世代シーケンサーからはDNA配列と塩基毎の精度がfastqフォーマットで出力される。そこで、得られたfastqファイルをヒト参照配列にbwa(<http://bio-bwa.sourceforge.net/>)によりアライメントした。

#### ④変異探索と原因候補遺伝子のリストアップ

GATK(<http://www.broad-institute.org/gsa/wiki/>)により変異探索と原因候補遺伝子のリストアップを行った。上記の疾患解析パイプラインを用いてアライメントを行い、標準的なフォーマット(BAMフォーマット)として出力した。BAMフォーマットのデータをS社のソフトウェアにより可視化して解析した。神経線維腫症(5例)・Stickler症候群(3例)など原因遺伝子のサイズが大きな疾患についても、遺伝子変異を同定することが出来た。また、神経線維腫症の解析では、古典的な原因遺伝子とされるNF1に変異が無く、RAS遺伝子パスウェイに属する他遺伝子のミスセンス変異を有する症例を同定することができた(投稿準備中)。既知遺伝子の上流・下流の遺伝子を併せて解析するアプローチの有効性が示された。

#### ⑤臨床診断のためのウェブサイト情報の集積・分析

遺伝性疾患の疾患別情報

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

ヒトの遺伝子とその表現形に関する最も権威ある最新情報サイト。

Gene Reviews

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/review?db=GeneTests>

NCBIのサイトの一つであり、650を超える疾患についてその専門医が執筆し査読も経ている総説である。

疾病資料庫

<http://www.genes-at-taiwan.com.tw/genehelp/dbindex.asp?kid=A>

中華国民人類遺伝学会が作成している疾患情報のサイトである。

DYSCERNE

<http://www.dyscerne.org/>

ヨーロッパのDysmorphologyの専門家のネットワークである。

Orphanet

<http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/home.php?Lng=GB>

フランスをベースに構築された稀少疾患ネットワークである。

URDBMS 琉球大学遺伝性疾患データベース

<http://becomerich.lab.u-ryukyu.ac.jp/top.html>

琉球大学大学院医学研究科遺伝学分野の成富研二教授によって開発し公開された先天異常症候群診断補助データベースである。

DECIPHER

<http://decipher.sanger.ac.uk/>

マイクロアレイ技術の進歩で同定される染色体微細異常症に関する情報共有サイト。

ECARUCA

ヨーロッパ細胞遺伝学協会が設立した細胞遺伝学と臨床情報の統合を目指したデータベース事業。

#### D. 考察

初年度は、計画通り、次世代シーケンサーを用いて既知遺伝子群の遺伝子解析を行い、そのパフォーマンスを確認することができた。先天奇形症候群については、全ゲノムではなく、100余の遺伝子のスクリーニングを行った。臨床症状から、特定の疾患が疑われ、当該疾患の原因とされる遺伝子にナンセンス変異やフレームシフト変異など、明らかに病的意義がある変化については、解釈に困難を要することは無い。しかし、鑑別疾患に含まれる複数の疾患の原因遺伝子にミスセンス変異が複数個同定された場合には、病的意義の解釈が容易ではない。dbNSFPスコアが参考になるが、特定は可能だが、決定的ではない。常染色体優性遺伝の孤発例であれば、両親の検体を調べ、デノボ変異であるかどうかを確認することが望まれる。また、常染色体劣性遺伝病の場合、同一遺伝子について異なるアミノ酸置換の複合ヘテロ接合体となっていることが確認されれば、当該遺伝子は、その患者の疾患の原因遺伝子である可能性は示唆されるが、特定することは難しいと考えられた。日本人におけるアミノ酸置換のレパートリーを蓄積し、研究者間で共有してゆく必要があると考えられた。また、臨床診断の重要性が改めて認識された。この観点からも一般臨床医が利用できる臨床診断のためのウェブサイト情報を整理することが有用と考えられた。次世代シーケンサーによる分析は、化学反応系の設計やデータの処理のいずれについても未だ発展途上で有り、さまざまな分析技術が存在している。各難病研究分野の医師が、バイオインフォマティクスの専門家と協働し、各疾患領域の解析にもっとも適して分析手法を選定して行くことの重要性が再認識された。既知の先天異常の原因遺伝子の網羅的解析により原因遺伝子が同定されない患者・家系では、未知の遺伝子が原因で

ある可能性がある。このような家系の解析には、平成24年度に積極的に全遺伝子の網羅的解析（エクソーム解析）を行い、新規疾患原因遺伝子の同定に取り組む。

#### E. 結論

既知の遺伝性疾患でも原因遺伝子に変異が見つからない患者が見受けられる。本年度の成果によりカスタムキットとMiSeqにより、およそ150から300個の対象疾患と関連する可能性のある多数の遺伝子を網羅的に解析する事が可能であると証明できた。次年度以降は検体入手から変異解析までを速やかに行うためのパイプラインの改良を進めると共に、患者群から得られた多数の多型・変異から疾患に関わる遺伝子を抽出するシステムを構築する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Numabe H, Sawai H, Yamagata Z, Muto K, Kosaki R, Yuki K, Kosaki K. Reproductive success in patients with Hallermann-Streiff syndrome. *Am J Med Genet A*. 155: 2311-2313;2011

Honda H, Takubo K, Oda H, Kosaki K, Tazaki T, Yamasaki N, Miyazaki K, Moore KA, Honda Z, Suda T, Lemischka IR. HEMP, an mbt domain-containing protein, plays essential roles in hematopoietic stem cell function and skeletal formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108: 2468-2473;2011

Kosaki R, Fujita H, Ueoka K, Torii C, Kosaki K. Overgrowth of prenatal onset associated with submicroscopic 9q22.3 deletion. *Am J Med Genet*. 155: 903-905;2011

Wat j anabe K, Okada E, Kosaki K, Tsuji K, Ishii T, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M. Surgical treatment for scoliosis in patients with Shprintzen-Goldberg Syndrome. *Journal of Pediatric Orthopedics*. 31: 186-193;2011

Mutai H, Kouike H, Teruya E, Takahashi-Kodomoari I, Kakishima H, Taiji H, Usami SI, Okuyama T, Matsunaga T. Systematic analysis of mitochondrial genes associated with hearing loss in the Japanese population: dHPLC reveals a new candidate mutation. *BMC Med Genet*. 2011, 12:135

Namba K, Mutai H, Kaneko H, Hashimoto S, Matsunaga T. In silico modeling of the pore region of a KCNQ4 missense mutant from a patient with hearing loss. *BMC Research Notes (in press)*

松永達雄

- Auditory Neuropathy の遺伝子 Clinical Neuroscience 29 (12) 1409-1411, 2011  
大原卓哉、泰地秀信、守本倫子、本村朋子、松永達雄
- OTOF 遺伝子変異を認める Auditory neuropathy spectrum disorder の乳幼児例における人工内耳装用効果  
Audiology Japan 54 (4) 289-297, 2011  
仲野敦子、有本友季子、松永達雄、工藤典代
- Otoferlin 遺伝子変異が確認された小児難聴症例の検討 Otol Jpn 22(1):47-52, 2012  
Takenouchi T, Nakazawa M, Kanemura Y, Shimozato S, Yamasaki M, Takahashi T, Kosaki K: Hydrocephalus with Hirschsprung Disease: Severe End of X-linked Hydrocephalus Spectrum. Am J Med Genet A, in press
- Yamane J, Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Kanemura Y, Nakamura M, Miyoshi H, Sawamoto K, Toyama Y, Mizusawa H, Okano H: Transplantation of human neural stem/progenitor cells overexpressing Galectin-1 improves functional recovery from focal brain ischemia in the Mongolian gerbil. Mol Brain 4(1):35, 2011
- Yamasaki M, Nonaka M, Suzumori N, Nakamura H, Fujita H, Namba A, Kamei Y, Yamada T, Pooh RK, Tanemura M, Sudo N, Nagasaka M, Yoshioka E, Shofuda T, Kanemura Y: Prenatal molecular diagnosis of a severe type of L1 syndrome (X-linked hydrocephalus). J Neurosurg Pediatr. 8(4):411-6, 2011
- Kanematsu D, Shofuda T, Yamamoto A, Ban C, Ueda T, Yamasaki M, Kanemura Y: Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta. Differentiation 82(2):77-88, 2011
- Irie Y, Saeki M, Tanaka H, Kanemura Y, Otake S, Ozono Y, Nagai T, Kondo Y, Kudo K, Kamisaki Y, Miki N, Taira E: Methamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic cells. Cell Tissue Res 345(2):231-241, 2011
- Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M, Shimizu H A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing. Exp Dermatol 20(1) 74-6 2011
- Shimizu H, Migita O, Kosaki R, Kasahara M, Fukuda A, Sakamoto S, Shigeta T, Uemoto S, Nakazawa A, Kakiuchi T, Arai K Living-related liver transplantation for siblings with progressive familial intrahepatic cholestasis 2, with novel genetic findings. Am J Transplant. 11(2) 394-8 2011
- Kosaki R, Fujita H, Ueoka K, Torii C, Kosaki K. Overgrowth of prenatal onset associated with submicroscopic 9q22.3 deletion. Am J Med Genet A. 155(4) 903-5 2011
- Kondoh T, Kanno A, Itoh H, Nakashima M, Honda R, Kojima M, Noguchi M, Nakane H, Nozaki H, Sasaki H, Nagai T, Kosaki R, Kakee N, Okuyama T, Fukuda M, Ikeda M, Shibata Y, Moriuchi H. Donepezil significantly improves abilities in daily lives of female Down syndrome patients with severe cognitive impairment: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial Int J Psychiatry Med 41(1) 71-89 2011
- Kosaki K, Saito H, Kosaki R, Torii C, Kishi K, Takahashi T Branchial arch defects and 19p13.12 microdeletion: defining the critical region into a 0.8 M base interval. Am J Med Genet A 155A(9) 2212-4 2011
- Numabe H, Sawai H, Yamagata Z, Muto K, Kosaki R, Yuki K, Kosaki K. Reproductive success in patients with Hallermann-Streiff syndrome Am J Med Genet A 155A(9) 2311-3 2011
- Tsutsumi Y, Kosaki R, Itoh Y, Tsukamoto K, Matsuoka R, Shintani M, Nosaka S, Masaki H, Iizuka Y Vein of Galen Aneurysmal Malformation Associated With an Endoglin Gene Mutation. Pediatrics 128(5) 1307-10 2011
- Tonoki H, Harada N, Shimokawa O, Yosozumi A, Monzaki K, Satoh K, Kosaki R, Sato A, Matsumoto N, Iizuka S Axenfeld-Rieger anomaly and Axenfeld-Rieger syndrome: Clinical, molecular-cytogenetic, and DNA array analyses of three patients with chromosomal defects at 6p25. Am J Med Genet A 155A(12) 2925-32 2011
- Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. J Hum Genet. 56(2) 110-24 2011
- Tsutsumi Y, Kosaki R, Itoh Y, Tsukamoto K, Matsuoka R, Shintani M, Nosaka S, Masaki H, Iizuka Y Vein of Galen Aneurysmal Malformation Associated With an Endoglin

Gene Mutation. Pediatrics 128(5)

1307-10 2011

清水 厚志\*、佐々木貴史；基礎の基礎. 細胞工学. 2011, 30:790-795 \*本特集号「次世代シーケンサーを使いこなす」監修

清水 厚志；ヒト・マウスの全エクソソニクエンシングと疾患原因遺伝子の同定. 細胞工学. 2011, 30:808-814

清水 厚志；次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析. 臨床検査. 2011, 55:841-846

Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth Hormone-dependent Pathogenesis of Human Hepatic Steatosis in a Novel Mouse Model Bearing a Human Hepatocyte-repopulated Liver.

*Endocrinology* 152, 1479-1491, 2011.

Furuya N, Sameshima K, Iai M, Take H, Shinkai M, Ishikawa H, Yamanaka M, Matsui M, Masuno M. Spastic quadriplegia in Down syndrome with congenital duodenal stenosis/atresia. *Cong Anom* 2012 (in press)

Kurosawa K, Masuno M, Kuroki Y. Trends in occurrence of twin births in Japan. *Am J Med Genet Part A* 2012;158A:75-77.

Soneda A, Teruya H, Furuya N, Yoshihashi H, Enomoto K, Ishikawa A, Matsui K, Kurosawa K. Proportion of malformations and genetic disorders among cases encountered at a high-care unit in a children's hospital. *Eur J Pediatr* 2012;171:301-305.

Tachibana Y, Aida N, Enomoto K, Iai M, Kurosawa K. A case of Sjögren-Larsson syndrome with minimal MR imaging findings facilitated by proton spectroscopy. *Pediatr Radiol* 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]

Kurosawa K, Tanoshima-Takei M, Yamamoto T, Ishikawa H, Masuno M, Tanaka Y, Yamanaka M. Sirenomelia with a de novo balanced translocation 46,X,t(X;16)(p11.2;p12.3). *Cong Anom* (in press)

黒澤健司 確定診断とその進め方 遺伝子医学MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 福嶋義光編 メディカルドゥ p58-9, 2011.7 大阪

黒澤健司 先天奇形、先天奇形症候群、Dysmorphology 遺伝子医学MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 福嶋義光編 メディカルドゥ p76-9, 2011.7 大阪

黒澤健司 予想外の結果が得られた場合：次世代シーケンス 遺伝子医学MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 福嶋義光編 メディカルドゥ p345-7, 2011.7 大阪

Hayashi S, et al. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* 56:110-124, 2011.

Sato K, et al. Genetic analysis of two Japanese families with progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism. *J Neurol* 258:1327-1332, 2011.

Takahashi Y, et al. A loss-of-function mutation in the *SLC9A6* gene causes X-linked mental retardation resembling Angelman syndrome. *Am J Med Genet Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156:799-807, 2011.

Tohyama J, et al. West Syndrome Associated with Mosaic Duplication of FOXP1 in a Patient with Maternal Uniparental Disomy of Chromosome 14. *Am J Med Genet Part A* 155A:2584-2588, 2011.

Sudo A, et al. Successful cochlear implantation in a patient with mitochondrial hearing loss and m.625G > A transition. *J Laryngol Otol* 125:1282-1285, 2011.

Hosoki K, et al. Hand-foot-genital syndrome with a 7p15 deletion demonstrates a clinically recognizable syndrome. *Pediatr Int* (in press)

Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N.

MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome *Am J Med Genet A*. 2011 Nov 21. [Epub ahead of print]

*J Hum Genet*. 2011 Oct;56(10):707-15

Seiji Mizuno, Daisuke Fukushi, Reiko Kimura, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Toshiyuki Kumagai, Nobuaki Wakamatsu

Clinical and genomic characterization of siblings with a distal duplication of chromosome 9q (9q34.1-qter)

*Am J Med Genet A*, 2011 September; 155 (9):224-2280.

Liang JS, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, Imai K, Okanishi T, Mizuno S, Okumura A, Sugawara M, Ito T, Ikeda H, Takahashi Y, Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T.

CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders.

*Epilepsia*. 2011 Oct;52(10):1835-42

Miyajima Y, Kitase Y, Mizuno S, Sakai H, Matsumoto N, Ogawa A.

Acute lymphoblastic leukemia in a pediatric patient with Marfan's syndrome

*Rinsho Ketsueki*. 2011 Jan;52(1):28-31.

Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S,

Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet.* 2011 Feb;56(2):110-24.

Yamasaki M, Nonaka M, Bamba, Y, Teramoto, C, Ban C Pooh R Diagnosis, Treatment, and Long-Term Outcomes of Fetal Hydrocephalus Seminars in fetal & Neonatal Medicine in press

Yamasaki M, Nonaka M, Suzumori N, Nakamura H, Fujita H, Namba A, Kamei Y, Yamada T, Pooh RK, Tanemura M, Sudo N, Nagasaka M, Yoshioka E, Shofuda T, Kanemura Y: Prenatal molecular diagnosis of a severe type of L1 syndrome (X-linked hydrocephalus). *J Neurosurg Pediatr.* 8(4):411-6, 2011

Takenouchi T, Nakazawa M, Kanemura Y, Shimozato S, Yamasaki M, Takahashi T, Kosaki K: Hydrocephalus with Hirschsprung Disease: Severe End of X-linked Hydrocephalus Spectrum. *Am J Med Genet A* Bamba Y, Nonaka M, Nakajima S, Yamasaki M Three-dimensional-reconstructed CT-MR fusion image –based preoperative planning for surgical procedures for spinal lipoma or tethered spinal cord after myelomeningocele (MMC) repair. *Neurol Med Chir(Tokyo)* 51: (5) 397-402, 2011

Itoh K, Ogi H, Yaoi T, Yoshifuji K, Pooh R, Yamasaki M, Fushiki S Semilobar holoprosencephaly with a unique traversed sylvian sulcus. *Neuropathol Appl Neurobiol Jan*, 5. doi: 10.1111/j.1365-2990, 2011

Yamanaka K, Ishihara M, Nakajima S, Yamasaki M, Yoshimine T Coil embolization of a traumatic intracranial aneurysm of the distal part of the azygos anterior cerebral: Report of a case followed up for 4 years. *Neurol Med Chir(Tokyo)* 51 (8) : 572-575 , 2011

Kanematsu D, Shofuda T, Yamamoto A, Ban C, Ueda T, Yamasaki M, Kanemura Y Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta *Differentiation* 82(2):77-88, 2011

Waga C, Okamoto N, Ondo Y, Fukumura-Kato R, Goto YI, Kohsaka S, Uchino S. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr Genet.* 2011 2011;21:208-11.

Sasaki K, Okamoto N, Kosaki K, Yorifuji T, Shimokawa O, Mishima H, Yoshiura KI, Harada N. Maternal uniparental isodisomy and heterodisomy on chromosome 6 encompassing a CUL7 gene mutation causing 3M syndrome. *Clin Genet.* 2010 Nov 20. On line

Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet A.* 2011;155:409-14.

Okamoto N, Hatsukawa Y, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PHPV. *Am J Med Genet A.* 2011;155:1568-73.

Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Kosho T. Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet A.* 2011;155A:1949-58

Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takashi JI, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. Novel intragenic duplications and mutations of CASK in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH). *Hum Genet.* 2011 Jul 7. [Epub ahead of print]

Yukiko Kawazu, Noboru Inamura, Futoshi Kayatani, Nobuhiko Okamoto, Hiroko Morisaki

Prenatal complex congenital heart disease with Loeys-Dietz syndrome *Cardiology in the Young* 2011 on line

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.* 2011;80:161-6

Misako Naiki, Seiji Mizuno, Kenichiro Yamada, Yasukazu Yamada, Reiko Kimura, Makoto Oshiro, Nobuhiko Okamoto, Yoshio Makita, Mariko Seishima, and Nobuaki Wakamatsu MBTPS2 mutation causes BRESEK/BRESHECK syndrome *Am J Med Genet* 2011 on line

- Okamoto N, Tamura D, Nishimura G, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay. *Am J Med Genet A*. 2011;155:2997-3001.
- Tohyama J, Kato M, Kawasaki S, Harada N, Kawara H, Matsui T, Akasaka N, Ohashi T, Kobayashi Y, Matsumoto N. Dandy-Walker malformation associated with heterozygous *ZIC1* and *ZIC4* deletion: Report of a new patient. *Am J Med Genet A* 155A:130-133, 2011
- Hirose M, Haginoya K, Yokoyama H, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Munakata M, Uematsu M, Iinuma K, Kato M, Yamamoto T, Tsuchiya S. Progressive atrophy of the cerebrum in 2 Japanese sisters with microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space. *Neuropediatrics* 42:163-166, 2011
- Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *Am J Med Genet Part A*, 2012, Feb 2. [Epub ahead of print].
- Nishina S, Kurosaka D, Nishida Y, Kondo H, Kobayashi Y, Azuma N. Survey of microphthalmia in Japan. *Jpn J Ophthalmol*, 2012, Feb 23. [Epub ahead of print].
- Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshim S, Hotta Y. Two novel mutations in the *EYS* Gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. *PLoS ONE*, 7(2). e31036, 2012
- Shigeyasu C, Yamada M, Mizuno Y, Yokoi T, Nishina S, Azuma N. Clinical features of anterior segment dysgenesis associated with congenital corneal opacities. *Cornea*, 31 (3): 293-8, 2012
- Nishina S, Suzuki Y, Yokoi T, Kobayashi Y, Noda E, Azuma N. Clinical features of congenital retinal folds. *Am J Ophthalmol*, 153 (1): 81-87, 2012
- Nishina S, Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Azuma N. Stereopsis after early surgery for bilateral congenital cataracts. Transaction book of XIth ISA meeting, in press
- Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, Shimizu K, Shimizu S, Reiner O, Okano H, Nishina S, Azuma N, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci*, 31(46): 16872-16883, 2011
- Suzuki S, Kim O-H, Makita Y, Saito T, Lim G-Y, Cho T-J, Al-Swaid A, Alrashees S, Sadoon E, Miyazaki O, Nishina S, Superti-Furga A, Unger S, Fujieda K, Ikegawa S, Nishimura G. Axial Spondylometaphyseal Dysplasia: Additional Reports. *Am J Med Genet A*, 155A(10): 2521-2528, 2011
- Tanaka M, Nishina S, Ogonuki S, Akaike S, Azuma N. Nishida's procedure combined with medial rectus recession for large-angle esotropia in Duane syndrome. *Jpn J Ophthalmol*, 55(3): 264-267, 2011
- Kobayashi Y, Yokoi T, Yokoi T, Hiraoka H, Nishina S, Azuma N. Fluorescein staining of the vitreous during vitrectomy for retinopathy of prematurity. *Retina*, 31(8): 1717-1719, 2011
- Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet A*, 155: 409-414, 2011
- Matsui T, Takano M, Yoshida K, Soichiro Ono, Fujisaki C, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H, Akamatsu W.: Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. *Stem Cells*. 2012 In press
- Lee EK, Kim W, Tominaga K, Martindale JL, Yang XL, Subaran SS, Carlson, OD, Mercken EM, Kulkarni RN, Akamatsu W, Okano H, Perrone-Bizzozero NI, de Cabo R, Egan JM, Gorospe M. RNA-binding protein HuD controls insulin translation. *Molecular Cell*. 2012 Feb 29. [Epub ahead of print]
- Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec
2. 学会発表  
なし
- 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



〔Ⅲ〕

分担研究報告書

## 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

次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析と診断への応用に関する研究

分担研究者 松永 達雄

国立病院機構東京医療センター感覚器センター 聴覚障害研究室長

### 研究要旨

本研究では次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析により難聴の原因診断を促進し、治療を含めた診療全般の向上につなげることを目的とする。本年度は難聴に関わる 138 遺伝子の蛋白質コーディング全領域のゲノム遺伝子配列をデータベースより抽出し、アジレント社製 SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムのカスタムライブラリーを設計した。また、遺伝性難聴を疑われる約 1,200 家系のうち、難聴遺伝子の病的変異が同定されておらず、かつ難聴者および家族の DNA 検体が 1 家系で 4 人以上から収集されている 15 家系、56 検体を選択した。この検体をライブラリーとカスタムハイブリダイズさせ、各検体から解析対象となる難聴遺伝子領域を濃縮し、インデックスタグを付加して増幅し、イルミナ社製次世代シーケンサー Genome Analyzer IIx を用いて塩基配列データの創出を開始した。併行して、頻度が比較的高い 23 難聴遺伝子については日本人難聴者および健聴者の検体を用いて従来のシーケンサーによる系統的遺伝子解析を行い、日本人における変異と非病的配列多様体をリストアップした。本研究で高い成果を出すためには医学的知識と科学技術の融合を効果的に進めることが最重要であることがあらためて認識され、その実現には、実際に診療に当たる医師と遺伝子情報を解析する研究者との間で難聴の医療と医学について意見を交わすことができる体制作りが不可欠であると考えられた。

研究協力者

務台 英樹

国立病院機構東京医療センター感覚器センター

鈴木 直大

国立病院機構東京医療センター感覚器センター

### A. 研究目的

小児の難聴は言語発達障害を生じるため健聴者の社会への参加の大きな障壁となる。成人の難聴では周囲とのコミュニケーション障害によりそれまで担っていた職場、学校、地域、家族などにおける社会生活を維持できなくなる。治療困難な高度難聴の原因の多くは遺伝性であり、個別の患者で遺伝子診断ができると難聴の病態や特徴、難聴の進行および合併症、悪化の予防、治療法の選択、遺伝相談を的確に行える。その結果、難聴児あるいは成人難聴者の言語コミュニケーションが促進され、社会参加の機会が増し、社会生産性の活性化につながるとともに聴覚障害者援助に必要な社会的経費を減らすことができる。

現在までに難聴遺伝子は非症候群性難聴だけでも 60 種類以上発見されており、これら多数の難聴遺伝子は類似した特徴を呈するため原因診断が困難である。国内外で臨床的特徴に基づいた難聴遺伝子解析が行われているが原因診断できない例も多い。また、これら全ての遺伝子を調べることはこれまでの方法では多大な労力と費

用が生じるため不可能であり、新しい遺伝子検査法が必要とされている。

近年、高速に高精度な遺伝子配列決定を可能にする次世代シーケンサーが開発され、これを用いた網羅的遺伝子検査による難聴を含めた種々の遺伝病の診断率が高いことが証明された。本検査法を日本で行うためには日本人の難聴遺伝子の特徴を検討して日本人に適した方法を定める必要がある。

本研究では次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析により、難聴の原因診断を促進し、治療を含めた診療全般の向上につなげることを目的とする

### B. 研究方法

慶應大学医学部臨床遺伝学センター、慶應義塾大学共同利用研究室、国立病院機構東京医療センターを中心としたチームで、次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析が行われた。

解析検体には、国立病院機構東京医療センターおよび関連施設で現在までに収集してきた、遺伝性難聴を疑われる約 1,200 家系のうち、難聴遺伝子の変異が同定されておらず、かつ難聴者および家族の血液検体が 1 家系で 4 人以上から収集されている 15 家系、56 検体を厳密に選択した。なお、全ての検体は、すでに血液からの DNA 抽出が終了している。

解析対象となる遺伝子は、常染色体性優性または劣性の非症候群性難聴遺伝子として同定さ

れている遺伝子61種、症候群性難聴の原因遺伝子23種、染色体上ミトコンドリア遺伝子16種、さらに実験動物モデルにおいて同定されている難聴遺伝子も含め、合計138遺伝子の蛋白質コーディング全領域のゲノム遺伝子配列をデータベースより抽出し、アジレント社製SureSelectターゲットエンリッチメントシステムのカスタムライブラリーを設計した。

解析検体は、インターカレーション法による精密なDNA濃度測定を行い、Covaris社製超音波破砕機を用い、至適条件下で、約150bpへ断片化する。これをベックマン社AMPure磁性ビーズを用いて精製し、SureSelectターゲットエンリッチメントライブラリーとハイブリダイズさせ、各検体の解析対象となる難聴遺伝子領域を濃縮した。各検体はインデックスタグを付加し増幅し、イルミナ社製次世代シーケンサーGenome Analyzer IIxを用いて塩基配列データを創出する。品質チェックを経て参照ゲノムDNA配列上へのマッピングを行い、検体毎に遺伝子変異を同定する。

検体毎に同定される遺伝子変異は数百箇所と推定される。このうち、健常者にも頻度が高く存在する非病的遺伝子多型であるかどうか、アミノ酸配列変異を与えるか、たんぱく質立体構造に変化をもたらす可能性があるか、家系図と比較し遺伝形式に矛盾がないか、などの項目により、候補遺伝子変異を絞り込む。さらに、従来用いられてきたサンガー法により、原因遺伝子変異を確認する。

次世代シーケンサー解析の効率を促進するために頻度の高い難聴遺伝子については、難聴者および健聴者の検体を用いて従来のシーケンサーによる系統的遺伝子解析を行い、日本人における変異と非病的配列多様体をリストアップした。

本遺伝子解析研究計画は、研究開始に先立ち当院および共同研究施設での倫理審査で承認をうけた。また本研究は、各検体をご提供下さった患者、ご家族の同意下のもと実施されている。

### C. 研究結果

平成24年3月までに全56検体について、次世代シーケンサーを稼働する前段階の処理まで滞りなく終了し、次世代シーケンサーによる解析が現在進行中である。今後、各検体についてまず変異候補が同定され、次いで変異が確定される。

また、本研究で次世代シーケンサーによる解析対象となる138難聴遺伝子の中で頻度が比較的高い23難聴遺伝子(GJB2、SLC26A4、OTOF、CDH23、GJB3、GJB4、GJB5、GJB6、GJA1、KCNQ4、TECTA、WFS1、COL11A2、MYO7A、COCH、TEPRSS3、Pejvakin、CLRN1、DFNA5、KCNJ10、POU3F4、FOXI1、MYH9)について、従来のシーケンサーによる系統的

遺伝子解析で日本人における変異と非病的配列多様体のリストアップを終了した。次世代シーケンサーによる解析結果から遺伝子変異候補が同定する際に、このリストを用いることで作業効率が大きく促進される

### D. 考察

本研究における、日本初の難聴遺伝子の次世代シーケンサーによる網羅的解析には、大量のデータの効率的な処理、過去の報告などの豊富な知識の活用、また徹底的な検体の品質管理などが不可欠である。実際に解析を実施して、本研究で高い成果を出すためには医学的知識と科学技術の融合を効果的に進めることが最重要であることをあらためて認識した。また、本研究中の各段階における、報告書に記述しきれない貴重な経験、認められた技術的改良点の数々は、現在の難聴遺伝子診断にとってかわる、より有効な診断法を確立するためのノウハウとなることが確認できた。

本研究により、これまで段階的に進める必要があった難聴遺伝子検査を一度の検査で結果を出せるようになり、早期原因診断を可能とする。また、これまで約50%で原因診断できなかった遺伝性難聴の原因診断が、本診断の実用化によってその大部分で迅速かつ経済的に可能となる。難聴の早期原因診断は、特に小児難聴に対して適正な治療を早期に選択できて良好な言語発達へ導けると共に、不必要あるいは不適正な治療を避けることができる。これにより、社会参加できる難聴者が増大し、社会の活性化と障害者援助に必要な社会的経費の減少につながる。さらに、子どもの難聴の原因やその対応が不明であると、親は不安で多数の医療機関で過剰な診察、検査を受ける場合も多いが、早期診断と治療法の選択が可能となることにより、そのような心理的、身体的、経済的な負担、過剰な医療費を減らすことができる。

現在進めているの既知の難聴遺伝子の網羅的解析で原因が判明しない家系では、未知の難聴遺伝子が原因である可能性がある。このような家系の解析には、次年度以後に全エクソーム解析を行い、新規難聴遺伝子の同定に取り組む。新規難聴遺伝子の同定は、難聴遺伝子診断の感度を向上するとともに、難聴の病態について分子メカニズムの解明が進み、将来の分子標的薬や遺伝子治療の開発につながる。

本研究成果を診療に効果的に活用するためには、原因遺伝子や遺伝子型と臨床的特徴の関係(genotype-phenotype correlation)を明確にしていく必要もある。このため次世代シーケンサーにより急速に充実する遺伝子情報と併行して、臨床情報の充実と、臨床へのフィードバックの体制の構築も併行して進めていく必要がある。その実現には、実際に診療に当たる医師と遺伝子情報を解析する研究者との間で難聴の医療と

医学について意見を交わすことができる体制作りが不可欠である。

## E. 結論

遺伝医学を専門とする研究医、遺伝性難聴を専門とする研究医師、遺伝子研究者、難聴を多く扱う一般診療医、など様々な職種から構成されたチームにより、次世代シーケンサーを用いた原因不明の難聴家系における難聴遺伝子の網羅的解析が開始された。その解析対象とするゲノム領域は従来より飛躍的に広く、しかも臨床診断に直結するため研究、臨床の両面において意義が高いと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 書籍

松永達雄

難聴 In: 泉孝英・編集. 今日の診療のためにガイドライン外来診療 2012 日経メディカル開発: 東京 2012; 505-507

#### 雑誌

Mutai H, Kouike H, Teruya E, Takahashi-Kodomoari I, Kakishima H, Taiji H, Usami SI, Okuyama T, Matsunaga T.

Systematic analysis of mitochondrial genes associated with hearing loss in the Japanese population: dHPLC reveals a new candidate mutation.

BMC Med Genet. 2011, 12:135

Namba K, Mutai H, Kaneko H, Hashimoto S, Matsunaga T In silico modeling of the pore region of a KCNQ4 missense mutant from a patient with hearing loss BMC Research Notes (in press)

松永達雄

Auditory Neuropathy の遺伝子 Clinical Neuroscience 29 (12) 1409-1411, 2011

大原卓哉、泰地秀信、守本倫子、本村朋子、松永達雄

OTOF 遺伝子変異を認める Auditory neuropathy spectrum disorder の乳幼児例における人工内耳装用効果

Audiology Japan 54 (4) 289-297, 2011

仲野敦子、有本友季子、松永達雄、工藤典代

Otoferlin 遺伝子変異が確認された小児難聴症例の検討 Otol Jpn 22(1):47-52, 2012

### 2. 学会発表

松永達雄 シンポジウム「難聴治療に対する遺伝学的検査の impact」補聴器に関して

第3回難聴遺伝子の研究会 2011年7月2日

東京

白井智子、増田佐和子、石川和代、鶴岡弘美、松永達雄 早期に発見された低音障害型難聴乳児をきっかけに判明した、まれな遺伝性難聴の一家系 第56回日本聴覚医学会総会・学術講演会 2011年10月27-28日 福岡市

渡部高久、松永達雄、井上泰宏、小川郁

KCNQ4 遺伝子変異を認めた両側性高音障害型

感音難聴の一症例 第56回日本聴覚医学会総

会・学術講演会 2011年10月27-28日福岡市

森貞直哉、橋本総子、大坪裕美、付学軍、石森

真吾、忍頂寺毅史、橋村裕也、貝藤裕史、鈴木

直大、松永達雄、飯島一誠 MLPA 法で診断

しえた EYA1 変異による branchio-oto-renal

(BOR) 症候群の3家系 第56回日本人類

遺伝学会大会 2011年11月10-12日 千葉市

松永達雄、新正由紀子、山本聡、難波一徳、務

台英樹、加我君孝

温度感受性 Auditory Neuropathy における

OTOF 遺伝子の新規特異的変異の同定 第21回

日本耳科学会 2011年11月24-26日 沖縄県

宜野湾市

難波一徳、新谷朋子、藤井正人、加我君孝、松

永達雄 Auditory Neuropathy の原因として同定

された新規変異型 OPA1 蛋白質の予測構造を用いた

病的メカニズムの解明 第21回日本耳科学会

2011年11月24-26日 沖縄県宜野湾市

務台英樹、泰地秀信、宇佐美 真一、松永達雄

dHPLC 法を用いた日本人難聴者におけるミトコ

ンドリア遺伝子多型解析 第21回日本耳科学会

2011年11月24-26日 沖縄県宜野湾市

## G. 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