

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

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

分担研究者 金村 米博

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

研究要旨

先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明を目指し、次世代シーケンス法を応用した原因遺伝子検索と、患者由来細胞からの iPS 細胞樹立とその分化細胞の細胞特性解析に着手した。23 年度は、先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子検索を実施するための解析標的遺伝子の選定を行い、284 遺伝子を選定し、その解析に着手した。また、L1CAM 遺伝子異常を有する 2 症例の XLH 患者線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、その分化細胞（神経細胞）の特性解析を実施した。24 年度以降、これら研究を更に加速させていく予定である。

研究協力者

正札 智子 国立病院機構大阪医療センター
臨床研究センター 幹細胞医療研究室 室長

A. 研究目的

難治性神経疾患の中でも、X 連鎖性遺伝性水頭症 (X-linked hydrocephalus ; 以下XLH) を代表とする遺伝性水頭症や脊髄髄膜瘤などの先天性中枢神経奇形症候群は希少疾患であり、研究者人口も少なくその対策・研究は他の神経疾患に比べて大幅に遅れているのが実情である。これら先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明と根治的治療法の開発は、臨床神経科学領域における大きな研究テーマの一つと考えられる。近年の次世代シーケンス法の進歩によって、従来は原因不明であった様々な難病の遺伝子異常が同定されつつあり、先天性中枢神経奇形症候群の病因検索にその解析手法を応用することが期待されている。また、従来は技術的にも倫理的にも極めて困難であった。しかし、体細胞に遺伝子導入を行うことで多能性幹細胞にリプログラミングする iPS 細胞 (Induced pluripotent stem cells) 作成技術を応用することで、線維芽細胞や血液細胞など、比較的採取が容易な体細胞から iPS 細胞を樹立して、それを神経細胞に分化誘導することで、患者の病因を内在した神経細胞を大量に作成することが可能となった。この大きなブレークスルーにより、従来は極めて困難であった、先天性中枢神経奇形症候群の患者由来ヒト神経細胞の特性解析が実施可能になり、これら細胞を疾患モデル系として応用した病態研究を展開することが可能になった。そこで本研究では、

先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明を目指し、次世代シーケンス法を応用した原因遺伝子検索の実施と、患者由来細胞から iPS 細胞を樹立し、それをを用いた *in vitro* 分子病態解析を実施し、新規診断・治療法開発につながる標的分子を探索する。

B. 研究方法

1. 次世代シーケンス法を用いた先天性中枢神経奇形疾患群の遺伝子解析 本研究班に属する、先天性中枢神経奇形疾患群を研究対象とする山崎 (大阪医療センター・臨床研究センター)、斉藤 (名古屋市立大学大学院医学研究科・新生児・小児医学分野)、加藤 (山形大学医学部附属病院・小児科)、岡本 (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) らの研究チーム、および遺伝子解析を共同で実施する小崎 (慶應義塾大学医学部・臨床遺伝学センター)、工藤 (慶應義塾大学医学部・共同利用研究室・遺伝子医学研究室)、清水 (慶應義塾大学医学部・分子生物学教室)、宮 (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) らの研究チームと共同で、これまでの各施設における研究実績および文献等で先天性中枢神経奇形症候群との関連性が示唆されている解析候補遺伝子を探索し、SureSelect ターゲットエンリッチメントシステム (Agilent Technologies社) を用いて解析するための標的遺伝子の選定を行った。

2. 先天性中枢神経奇形疾患群患者由来 iPS 細胞の樹立

iPS 細胞の樹立は、京都大学・沖田らが開発した方法を用いて実施した (Okita et al., Nat Methods 8:409-12, 2011, Niwa et al., Gene

108:193-200, 1991)。患者より樹立した線維芽細胞に、3つのエピソーマルベクター (pCXLE-hOCT3/4-shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL) を、エレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入し、5つの初期化因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28) とp53-shRNAを発現させた。7日目に線維芽細胞を回収し、MEFフィーダー細胞上に再播種し、翌日よりヒトES細胞用培地で培養を行った。出現したヒトES細胞様コロニーを単離後、継代培養を行い、アルカリホスファターゼ活性の確認と、RNA/ゲノム解析を行った。RNA解析ではヒトES細胞マーカー遺伝子の発現を、ゲノム解析ではL1CAM遺伝子の変異と、エピソーマルベクターのゲノム挿入がない事を確認した。樹立したiPS細胞は、2種類のSMADシグナル阻害剤 (Dorsomorphin, SB431542) を添加した誘導培地で、2週間の浮遊培養を行い、神経幹細胞へ分化誘導した。その後、B-27 Supplement (GIBCO社)、増殖因子 (FGF2, EGF, LIF) を添加した培地で、neurosphere形態での継代培養を行った。神経細胞への分化誘導はMatrigel (BD Biosciences) コートしたチャンバースライドにneurosphereを播種し、B-27 Supplementを添加した分化培地 (無血清、増殖因子フリー) で2週間接着培養し、分化誘導を行った。分化誘導後の細胞は、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、anti- β III-tubulin 抗体 (TuJ1; Babco社)、anti-human L1抗体、TO-PRO-3 (Invitrogen社) で各々免疫細胞染色解析を行い、神経系細胞の出現を観察、分化能評価を実施した。

(倫理面への配慮)

研究計画「難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発」を大阪医療センター医学倫理委員会へ申請し、その承認を受けた (初回承認日:平成21年8月26日、修正後承認日:平成23年12月6日)。試料提供のインフォームド・コンセントは、倫理委員会承認を受けた説明文書、同意書を用いて実施された。

C. 研究結果

1. 次世代シーケンス法を用いた先天性中枢神経奇形疾患群の遺伝子解析

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 遺伝子を選定した (表 1)。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. 先天性中枢神経奇形疾患群患者由来 iPS 細胞の樹立

23年度は L1CAM 遺伝子異常を有する 2 症例 (表 2) の XLH 患者由来線維芽細胞を用いて、iPS 細胞の樹立を試み、その神経分化能を評価した。2 症例いずれの線維芽細胞からも iPS 細胞の樹立に成功し、neurosphere 形成能をもつ神経幹細胞への分化を確認することができた (図 1)。さらに、neurosphere から β III-tubulin 陽性の神経細胞が分化することを確認することができた。これら XLH 患者由来 iPS 細胞から作成した神経細胞の axon における L1CAM の発現様式は正常とは異なり、XLH 患者の神経細胞における L1CAM 発現異常の存在を示唆する結果と考える (図 2)。

表 1 : 選定した解析標的遺伝子

疾患群	遺伝子数	代表的な遺伝子
先天性水頭症	33	L1CAM, ZIC2, SHH
小脳形成障害症	32	CASK, PMM2, ALG6
皮質形成異常症	47	DCX, ARX, TUBA1A
神経管閉鎖不全症	98	MTHFR, VANGL1
てんかん	29	CDKL5, SCN1A, TCF4
頭蓋縫合早期癒合症	8	FGFR2, FGFR3, TWIST1
小頭症	13	MCPH1, WDR62, CDK5RAP2
その他	24	UBE3A, HESX1
合計	284	

表 2 : 先天性中枢神経奇形症候群患者由来 iPS 細胞の樹立

症例	疾患	遺伝子異常					種類
		遺伝子名	部位	塩基異常	たんぱく質異常		
1	X連鎖性遺伝性水頭症	LICAM	Exon 18	c. 2250 C>A	p. 750 Tyr>Stop	ナンセンス変異	
2	X連鎖性遺伝性水頭症	LICAM	Intron 4	c. 400+5 G>A		スプライス異常	

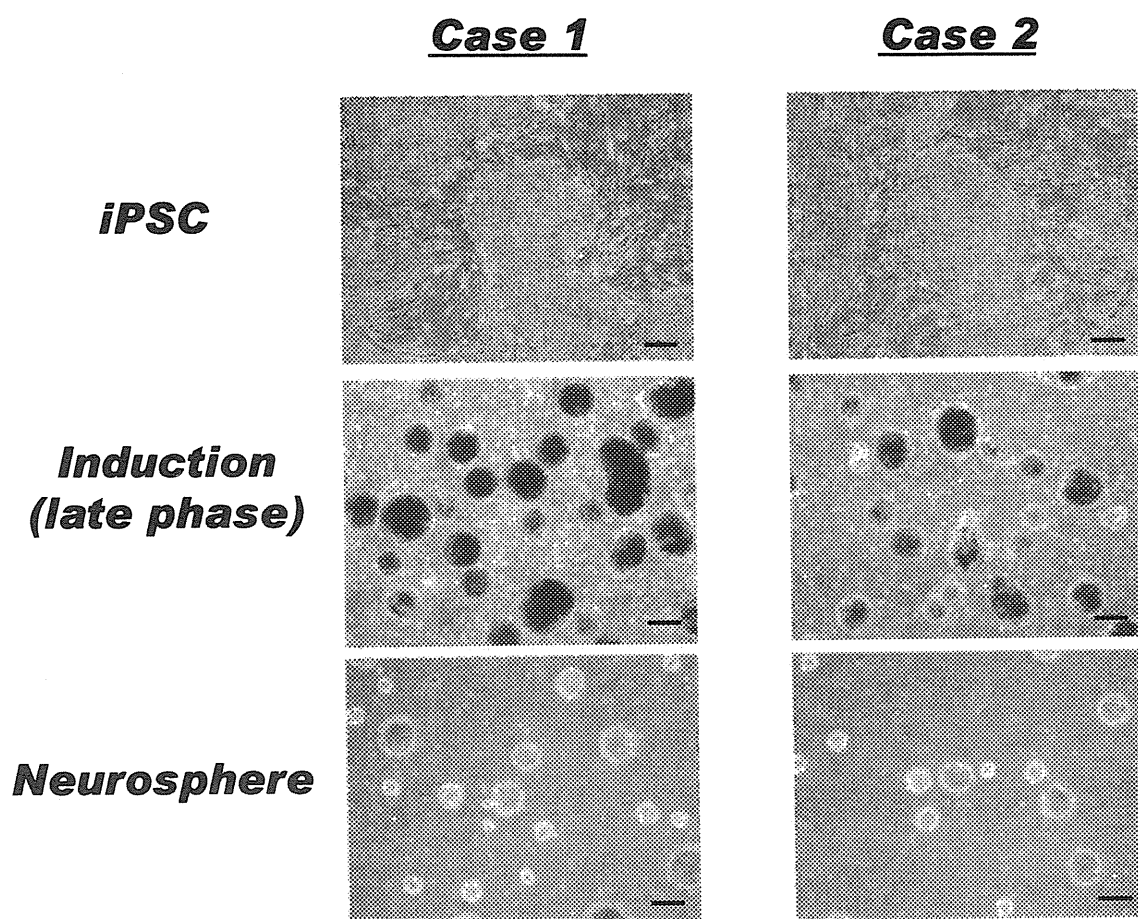
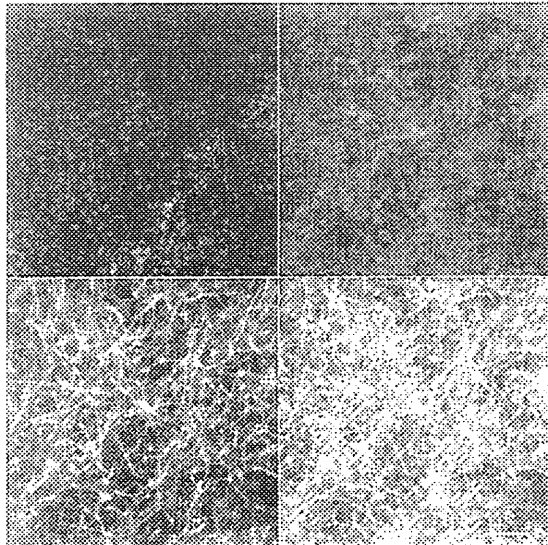
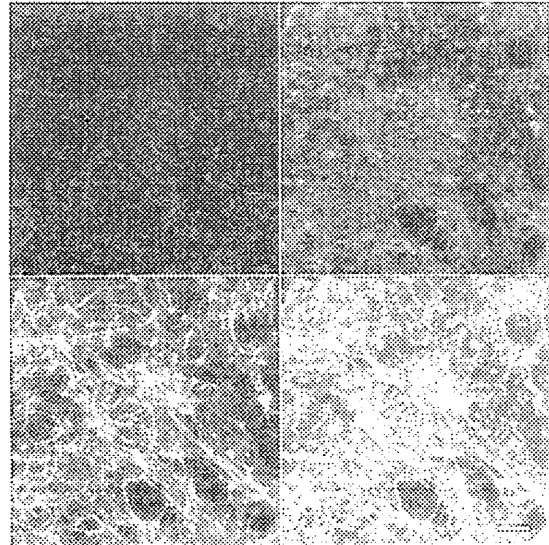


図 1 : XLH 患者由来 iPS 細胞と神経幹細胞への分化誘導
bar = 200 μ m

Case 1



Case 2



β III-Tubulin/L1CAM/ITO-PRO-3

図2 : XLH 患者由来 iPS 細胞から分化誘導して作成した神経細胞の細胞免疫染色

bar = 50 μ m

D. 考察

先天性中枢神経奇形症候群の病態解明において、その原因遺伝子の同定は重要な位置を占める。現在までにその原因遺伝子として、多数の遺伝子異常が報告されており、これら研究によって当該領域の研究は大きく進展した。しかし一方で、依然として多くの症例、とりわけ家族歴が明確でない孤発例の多くはその原因遺伝子が不明なままであり、その病態も十分に解明されていない。このような原因遺伝子が不明な症例の遺伝子解析に関しては、従来法（サンガー法等）を用いて多数の候補遺伝子のシーケンス解析を個別に行うことは、時間的・労力的・コスト的に大きな負担を要する解析であり、このことが新たな遺伝子異常検索を困難にしてきた。しかし、次世代シーケンス法を用いることで、多数の標的遺伝子の検索を一度に短時間で実施できるようになったのみならず、全エクソンレベルでの解析、さらに全ゲノムレベルでの解析も実現可能となった。23年度は、従来の検索では原因遺伝子が不明である症例を対象として、次世代シーケンス法を用いた遺伝子解析を先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子検索に導入する第一段階として、文献等で報告のある284遺伝子の検索を一度の解析で実現する体制を構築した。この解析を進めることで、既知遺伝子異常の有無を概ね評価することが可

能になると考えられる。まずはこの解析結果を詳細に分析して原因遺伝子の同定を試み、さらに、標的遺伝子検索で異常が見つからなかった症例に関しては、24年度以降、全エクソン解析等を実施し、未知領域の検索を検討していきたいと考える。

一方、23年度は、XLH患者の線維芽細胞からiPS細胞を作成し、その神経分化能を確認すると同時に、作成した神経細胞におけるL1CAM発現異常を確認することができた。本成果により、先天性中枢神経奇形疾患群患者由来iPS細胞を用いた疾患研究の実現可能性と有用性を確認できたものとする。24年度は、更に症例を重ね、種々の疾患の分子病態解明につながる知見の探索を実施したいと考える。

E. 結論

次世代シーケンス法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子検索として、284解析標的遺伝子の解析体制を整え、具体的な解析に着手した。また、L1CAM遺伝子異常を有する2症例のXLH患者線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、その分化細胞（神経細胞）の特性解析を実施した。24年度以降、これら研究を更に加速させていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, Yamasaki M, Sasai Y, Kanemura Y: Generation of human induced pluripotent stem cells using the extracellular matrix of human decidua-derived mesenchymal cells. ISSCR 9th Annual Meeting. 2011.06.16; Toronto, Ontario, Canada

Hirata M, Hayashida M, Tateyama D, Ozawa Y, Matsumura H, Iemura M, Shofuda T, Kanemura Y, Kohara A, Kawabata K, Mizuguchi H, Furue MK: Comparative analysis of characteristics among human iPSC, ES and neuroblastoma cell lines. ISSCR 9th Annual Meeting. 2011.06.16; Toronto, Ontario, Canada

金村米博, 山崎麻美: 難治性脳形成障害症の分子病態の解析と新規分子診断法および治療技術の開発. 社団法人日本脳神経外科学会第70回学術総会, 2011.10.14; 神奈川県横浜市

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

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

分担研究者 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

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、臨床診断が困難である先天奇形症候群を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。初年度は、遺伝子診断を行う臨床的意義が高いと思われる疾患を選定し、ターゲット・エンリッチメントのためのシステムを設計した。約200個の先天奇形症候群原因遺伝子および関連す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。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が、患者当たり平均200本のデータを得る事ができた。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。

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、臨床診断が困難である先天奇形症候群を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。初年度は、遺伝子診断を行う臨床的意義が高いと思われる疾患を選定し、ターゲット・エンリッチメントのためのシステムを設計した。

B. 研究方法

①解析系の設計

比較的頻度の高い先天奇形症候群の原因遺伝子と、既知疾患原因遺伝子が属する分子パスウェイの上流・下流の遺伝子を併せて200個程度の遺伝子をリストアップした。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。

②患者由来ゲノムDNAの前処理

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社製超音波破碎機を用い、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した。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

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。

④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)し、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を使用した。

C. 研究結果

①解析系の設計

約200個の先天奇形症候群原因遺伝子および関連す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。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

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

れているが、患者当たり平均200本のデータを得る事ができた。

③粗配列のアラインメント

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/>)によりアラインメントした。

④変異探索と原因候補遺伝子のリストアップ

アラインメントの結果を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。

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M,²¹ Shimizu H. A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing. *Exp Dermatol*. 20(1): 74-76;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): 394-398;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): 903-905;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): 2212-2214;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): 2311-2313;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): 1307-1310;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): 2925-2932;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): 110-124;2011

1. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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解析に関する研究
研究分担者 工藤 純 慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室 教授

研究要旨

次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解読あるいは全翻訳領域解読（いわゆるエキソーム解析）は、未知の疾患原因遺伝子を探索する研究手段としてはほぼ確立されており、我々も既に遺伝性疾患の新規原因遺伝子の探索にシーケンシングからデータの解析、検証まで一括して実践している。本研究においては、以上のゲノムワイドな解析のウェットとソフトの両面における精度のさらなる向上を目指すと共に、そのノウハウを生かして、疾患毎の様々な状況に応じて、次世代シーケンサーを活用した遺伝子解析システムを構築し、実践することを目指す。近い将来日常的な遺伝子診断において次世代シーケンサーを活用するためには、経済的かつ簡便なシステムの構築が望まれるため、現在利用できる手段の中から、最適の手段を比較検討した。標的を絞った候補遺伝子群の解析手段としてベイトRNA とのハイブリダイゼーションによりエクソンのみを濃縮する手法と、エクソンのPCRによる増幅を行なう手法を比較した。また、安価で迅速なパーソナル次世代シーケンサーとして非蛍光型半導体シーケンサーイオントレント PGM (Personal Genome Machine) を用いたシーケンシングのデータを評価した。

研究協力者

清水厚志（慶應義塾大学医学部分子生物学教室）
鳥居千春（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）
小崎健次郎（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）

A. 研究目的

疾患毎の様々な状況に応じて、次世代シーケンサーを活用した遺伝子解析システムを構築し、実践することを目指す。近い将来日常的な遺伝子診断において次世代シーケンサーを活用するためには、経済的かつ簡便なシステムの構築が必要であり、そのことを念頭に置いて、実用的なシステムを構築する。

B. 研究方法

1) 標的領域遺伝子配列の増幅

標的遺伝子からのエクソンの増幅については、増幅効率と、PCR 増幅後の物理的剪断力による小断片化の条件を揃えるために、約 2 kb の PCR 断片として増幅した。PCR 断片の濃度をそろえて混合した後にアコースティックソルビライザー (Covaris) によって断片化し、ライブラリーを作製した。

2) パーソナル次世代シーケンサーによるシーケンシング

非蛍光型パーソナル次世代シーケンサーとして半導体シーケンサーイオントレント PGM (Personal Genome Machine) (ライフテクノロジー ジャパン社 アプライドバイオシステムズ) を用いて、約 100 塩基長のシーケンシング

を行った。その後、自動化コンピュータプログラム群（いわゆる解析パイプライン）を用いて、粗 DNA 配列データをヒトゲノム参照配列にマッピングし、塩基置換、欠失、挿入の同定を行った。

解析にあたっては個人情報保護に関する法律を踏まえ、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労働省「疫学研究指針」を遵守し、倫理委員会の承認の下に研究を実施した。

C. 研究結果

PCR 断片のシーケンシングから得られた配列データをヒトゲノム参照配列にマッピングしたところ多くの配列が標的遺伝子のエクソン領域近傍にマッピングされ高い特異性が確認された。カバー頻度のバラツキに関しては、これまでに実践したエクソンキャプチャー (SureSelect : アジレント社) による特異的に濃縮した結果と比べてもムラが少なく優れていた。

半導体シーケンサーPGM による変異の検出に関しては、同一塩基が繰り返すホモポリマー部位でのシーケンスエラーが多いために、

間違っ読んだ配列を別の配列にアラインする結果、その周辺で偽陽性の変異が多く生ずることが明らかとなった。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析システムのうち、特に候補遺伝子群を絞った解析を実施するための手段として、PCR 増幅による手段をすべてマニュアルで実践したが、実験にかかる手間とコストを考えた場合、少なくとも現状では、5-6個以下の遺伝子を対象とした場合には、選択肢として残るものの、それ以上の数の候補遺伝子群を一括して解析するためには、エキソンキャプチャー (SureSelect) を用いる方が、多数検体の一括処理には優れていると判断した。ただし、エキソンキャプチャーでは、5-10%の難読領域が発生するため、その部分のみに照準を絞った PCR 増幅の併用は、考慮する価値があると思われる。また、ランニングコストが安価でかつシーケンシングが迅速な半導体シーケンサーイオントレント PGM についてはホモポリマー部位の解読エラーが多発するため、未知の新規遺伝子変異のスクリーニングも含む遺伝子診断には、適さないことが明らかとなった。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析システムのうち、特に候補遺伝子群を一括して解析するためには、PCR 増幅による手法ではなくて、エキソンキャプチャー (SureSelect) を用いる方が、多数検体の一括処理には優れていると判断した。また、候補遺伝子群のみを対象としたシーケンシングには、多数検体にタグを付けて、GAIIX 等の次世代シーケンサーを用いて一括シーケンシングを行なうこともできるが、解析規模に応じて、小回りが利き、かつランニングコストが安価なパーソナル次世代シーケンサーを用いるのが、将来の運用を考えた場合、現実的であると判断した。シーケンシングが迅速な半導体シーケンサーイオントレント PGM についてはホモポリマー部位の解読エラーが多発するため、未知の新規遺伝子変異のスクリーニングも含む遺伝子診断には、適さないことが明らかとなり、GAIIX と同じ原理のパーソナル次世代シーケンサーである MiSeq を用いるのが有力であると判断した。以上の組み合わせで、遺伝子解析システムを構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

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変異探索システムの構築

研究分担者 清水厚志

慶應義塾大学医学部分子生物学教室 助教

研究要旨

原因遺伝子が既知の遺伝性疾患においても変異が見つからない患者が見受けられる。そこで、各研究分担グループが対象とする疾患へ関与する可能性が疑われる数百の遺伝子のリストから Sure Select Custom Target Enrichment kit を設計した。MiSeq により一度に 4 名分のサンプルを次世代シーケンシングしたところ、対象領域当たり 200 本のデータを得る事ができた。また、得られた fastq 配列から変異抽出を行うパイプラインを構築した。

A. 研究目的

近年次世代シーケンサーの台頭により多数の遺伝性疾患の原因遺伝子が同定されている。しかし、既知の遺伝性疾患であるにも関わらず、変異が未だ同定できていない患者が少なからず存在する。その理由の 1 つとして同一疾患で原因遺伝子が異なる locus heterogeneity などが考えられる。

そこで、数十人から数百人の特定の遺伝性疾患患者のゲノム DNA から当該疾患に関与すると疑われる数百程度の限定した遺伝子のみについて、次世代シーケンシング法により配列情報を入手し、既知の一塩基多型 (SNPs) との比較により患者特有の変異/多型を抽出することで、各疾患の原因となる特徴的な遺伝子変異をカタログ化することを第一の目的とした。

得られた変異の検証方法としては、タンパク質機能解析、培養細胞や iPS 細胞を用いたオミックス解析や、モデル生物の作製が考えられる。小型魚類であるメダカはヒトと同じ脊椎動物であり、多数の遺伝子が相同の関係にある。また、ノックアウト/ノックダウン法や、遺伝子導入法が確立されている。そこで、メダカを用いた原因候補遺伝子の検証法確立を第二の目的とした。

B. 研究方法

1. Agilent SureSelect Custom Target Enrichment kit の設計

各分担グループから過去の臨床報告や、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 UCSC gene ID に変換し、Agilent 社のカスタムマイクロアレイ設計ツールである「eArray」により目的遺伝子断片を効率よく回収する Custom Target Enrichment kit (以下カスタムキット) を設計した。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。

2. Illumina 社製次世代シーケンサー MiSeq による解析

デスクトップ型次世代シーケンサーである MiSeq は小型ではあるが、出力量は 2Gb にもおよび、数年前のフラッグシップ機と同等の性能を持つ。そこで上記カスタムキットと、既存のキナーゼのみをターゲットとした SureSelect Human Kinome Kit (以下キノームキット) を使用し MiSeq により患者ゲノム配列の解読を行った。

3. 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。

(倫理面への配慮)

次世代シーケンサーを用いたゲノム解析に関しては慶應義塾大学医学部倫理委員会に審査を申請し、既に承認されている。

4. モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) による疾患候補遺伝子のノックダウン

次世代シーケンシング法により得られた疾患原因候補遺伝子の一つをモデルとして、メダカ胚でのノックダウン解析を試みた。Ensembl (<http://www.ensembl.org/>)にて、ヒト遺伝子名からメダカオルソログ遺伝子を検索して配列情

報を入手した。ESTデータベースと比較ゲノム解析により遺伝子構造モデルを推定した。予想cDNA配列の開始コドンに対応するMOを作製した。作製したMOを一細胞期のメダカ受精卵にインジェクションし、経時的に表現型の変化を観察した。

(倫理面への配慮)

本動物実験は慶應義塾大学動物実験委員会のガイドラインに従った。本申請時点で、本研究に関する遺伝子組換え、動物実験はすべて承認を受けている。

C. 研究結果

1. MiSeqによる次世代シーケンシング

市販のキノームキット(約600遺伝子対象)とMiSeqによる患者1名のゲノムシーケンシングでは、対象領域当たり平均600本の配列を得ることができた。一方、カスタムキット(約300遺伝子対象)とMiSeqでは患者4名で対象領域当たり平均200本の配列を得ることができた。

2. メダカ胚を用いたノックダウン

開始コドンに設計したMOとコントロールMOの間での明瞭な表現型の差を観察する事はできなかった。

D. 考察

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、SureSelectとMiSeqで複数の患者の数百の遺伝子を解析するという、我々の研究計画の有効性を十分示す事ができた。

一方開始コドンをターゲットにしたメダカ胚のノックダウン解析では明瞭な結果が得られなかったため、今後はスプライシングを阻害するMOを設計し、RNAレベルでの影響と表現型の相関を確認する必要がある。

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. 研究発表

1. 論文発表

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・マウスの全エクソンリシーケ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

2. 学会発表

Shimizu, A. Minoshima S. and Shimizu, N.; Retrotransposition of core duplicon triggered formation of multiple low copy repeats (LCRs) during primate evolution. 12th International Congress of Human Genetics / 61th The American Society of Human Genetics Annual Meeting, Montreal, Canada (Oct. 2011) 10/11-15

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

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的要因の解明に関する研究

研究分担者 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

研究要旨

次世代シーケンサーの解析に係るバイオインフォマティクスは発展途上段階であることから、解析に必要とされる迅速で偽陽性・偽陰性率の低い解析用パイプラインを作製し解析用サーバーを構築し実装した。解析パイプラインの検証には1000 Genomes Projectのexomeデータを用いて精度を調べ、サンガーシーケンス法でも確認実験を行い、1%の偽陽性率と推測される閾値とパラメーターを設定できた。現在、実際の先天性疾患サンプルについてシーケンスを行っており、実際のデータと比較しつつさらなるパラメーターの検証と最適化を行っていく。

A. 研究目的

近年の次世代シーケンサー技術の発展により、それまで行われてきた単独あるいは少数の疾患関連の候補遺伝子に対しての変異探索から、ゲノムワイドに1塩基レベルで未知の疾患関連変異の探索が短時間で可能になるというブレイクスルーが起こってきている。しかしながら次世代シーケンサー解析で生じる膨大なデータから真の疾患関連変異あるいは責任遺伝子を同定するバイオインフォマティクス手法は確実には確立されておらず発展途上段階にある。

そこで我々は、バイオインフォマティクス手法を用いることで、疑陽性を減らしつつ、プログラムやコンピュータシステムを最適化することにより迅速に各先天性異常症の関連候補変異を同定する手法の開発を行った。また、各種公開データベースから情報を収集し、探索領域の遺伝子およびタンパク質情報、既知の疾患関連情報、遺伝子ネットワーク情報の統合も行い、候補変異同定後の機能解析や機能分類解析・パスウェイ解析に向けたシステムも開発した。

B. 研究方法

次世代シーケンサーを用いた疾患関連候補遺伝子同定までの一連の解析の流れの概略を図1に示した。サンプルのシーケンス配列とヒトゲノムリファレンス配列とで配列の異なる変異候補は数万から数十万塩基以上検出される場合が多く、その中から偽陽性と偽陰性を減らし真の疾患関連候補遺伝子を絞り込む工程が極めて重要になる。そこで我々は既存の解析ツール類と独自で開発したプログラム群を組み合わせた解析パイプラインを作製した。また、その解析パイプラインが正しい変異を検出しているかを確認するため、公開されているシーケンス配列を用いて作製した解析パイプラインを実行し検出された変異をランダムに抽出し、サンガーシー

ケンス法にて検証実験も行い、各種解析パラメーターを調整した。

また、図1中にも記載したが、特に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

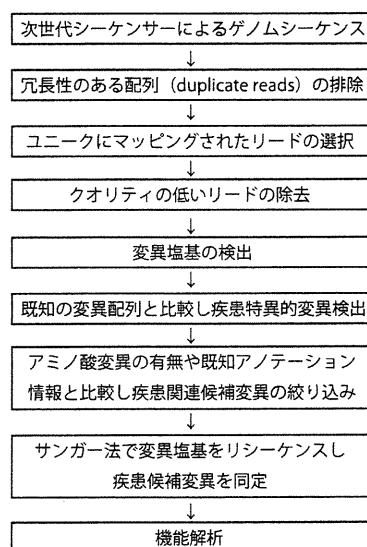


図1. 次世代シーケンサーを用いた解析の流れ

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。1000Gデータの正確性の検証は、信頼精度が高く1000Gと同一サンプルのSNP（一塩基多型）データを有するInternational HapMap project（以下HapMap）のデータと比較することで行い、さらに一部はサンガーシーケンス法でも確認した。

遺伝子、タンパク質、疾患のそれぞれの情報や機能分類・パスウェイ解析についてはこれまで我々が作製してきたプログラムに最新情報を組み込み、次世代シーケンスデータ解析用に最適化を行い本解析への準備を行った。

C. 研究結果

次世代シーケンスデータのための一連の解析パイプラインを作製し、基本部分を完成させた。32コア、144TBストレージの解析サーバーを構築し、1サンプル当たり数時間で変異同定まで行えるプログラムを作製した。

1000Gのデータのうち、日本人サンプルのexomeデータのゲノム上の6,256万塩基について解析し、構築した解析パイプラインで変異を同定した。このうちHapMapデータベースに登録されている545万（サンプル間の重複含む）の変異について、一致率を確認した（図2）。1000Gでの読み深度（depth）によって一致率が異なり予想通り深度が浅いところは不一致率が上昇した。この一致率が99%を超える読み深度を閾値とした場合、433万の変異が1000G exomeデータで検出された。433万のうちHapMap上に存在する変異の割合は51.8%であり、残りの48.2%は1000Gでのみ検出される変異であった。その48.2%の中からランダムに100個（homo変異とhetero変異からそれぞれ50個ずつ）を抽出しサンガーシーケンス法でリシーケンスし確認したところ、99個は1000Gデータと塩基配列が一致し、hetero変異の1個だけが不一致であった（偽陽性率1%）。

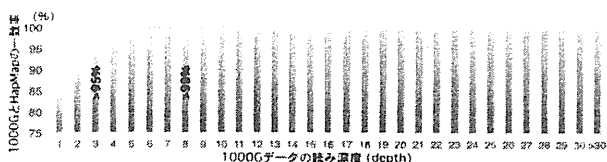


図2. 1000GデータとHapMapデータとの一致率

D. 考察

1000G exomeのデータから今回の閾値で検出された変異とHapMapデータベースおよびdbSNPデータベースのbuild 129 (build 129以降はdepthの浅い全ゲノムのデータを含むため信頼度が低い可能性がある)を組み合わせると、疾患関連変異の絞り込みを行うと、最も偽陰性の少ない変異を検出可能であると考えられる。

方で、最も偽陽性の少なくなる絞り込みの方法としては全人種での1000Gのexomeおよびwhole genomeシーケンスで検出された変異とdbSNPのbuild 135に含まれる変異を疾患候補変異から除外することであるが、この場合、偽陰性が多くなる危険性がある。この絞り込み条件は偽陽性と偽陰性のトレードオフの関係であり、最良の絞り込み条件を今後さらに検討していく必要がある。また、今回は1000Gデータについて、日本人のexomeのみを用いたが、他人種のexomeデータおよびwhole genomeシーケンスデータについても変異検出のパラメーターを厳しくすれば精度の高い変異を得られる可能性があり、その点も今後の検証課題である。

また、変異検出解析パイプラインの各パラメーターについても、実際の我々のシーケンスデータを解析し、さらなる最適値の検証を継続していく必要がある。

E. 結論

次世代シーケンサーの解析用サーバー環境と解析パイプラインのプログラム類の作製を行い、解析のための基本構造を完成させた。絞り込み条件のための参照データの作製と検証を行い、疑陽性率およそ1%と推定される閾値での条件を設定できた。

現在、我々のグループで実際の先天性疾患サンプルをシーケンス中であり、このデータが得られた段階で、今回作製したパイプラインで変異を検出し、閾値やパラメーター等をさらに精度の高いものに改良していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

Hepatitis C virus infection suppresses the interferon response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse. Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, Abe H, Miki D, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, Chayama K. *PLoS One* (6), e23856, 2011.

2. 学会発表

Okada Y, Miya F, Kanemura Y, Koike M, Kohda K, Yuzaki M, Uchiyam Y, Tsunoda T, Yamanaka S, Okano H. Evaluation of human iPS cells by neural differentiation and tumorigenicity. 8th IBRO World congress of Neuroscience, Florence, July 2011.

Ishii S, Okada Y, Miya F, Tsunoda T, Shimazaki T, Okano H. Efficient generation and developmental analysis of basal forebrain cholinergic neurons from mouse embryonic stem cells 8th IBRO World congress of Neuroscience, Florence, July 2011.

Ishii S, Okada Y, Miya F, Tsunoda T, Shimazaki T, Okano H. Efficient generation and developmental analysis of basal forebrain cholinergic neurons from mouse embryonic stem cells, The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Yokohama, September 2011.

Okada Y, Miya F, Kanemura Y, Sunabori T, Koike M, Kohda K, Yuzaki M, Uchiyama Y, Tsunoda T, Yamanaka S, Okano H, Evaluation of human iPS cells by neural differentiation and tumorigenicity, The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Yokohama, September 2011.

Ishii S, Okada Y, Miya F, Tsunoda T, Shimazaki T, Okano H.: Efficient generation and developmental analysis of basal forebrain cholinergic neurons from mouse embryonic stem cells. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, Washington DC, November 2011.

加藤陽一郎、前佛均、高田亮、角田達彦、宮冬樹、小原航、中村祐輔、藤岡知昭 浸潤性膀胱癌に対するカルボプラチン/ジェムシタビン (C a G) の感受性予測システムの構築 第99回日本泌尿器科学会総会 2011. 4. 21-25

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

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

—血管型 Ehlers-Danlos 症候群診断への応用—

分担研究者 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

研究要旨

先天奇形症候群の診断の問題点として、発生頻度が極めて低く臨床診断に専門的知識が必要であることや、病因変異が極めて多様で (遺伝子内点変異、遺伝子欠失・重複など) 解析に膨大な労力を要することがあげられる。すべて網羅する診断検査法はない。超高速 (次世代) シーケンサーは、極めて大きな威力を発揮するが、発生頻度が低く、臨床診断が明らかな疾患での解析では依然として Sanger シーケンスが不可欠となる。高分解能融解曲線分析法 High resolution melting (HRM) は、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。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。今後、病因解析として次世代シーケンサーも含めた変異解析アルゴリズムの検討が課題である。

A. 研究目的

先天異常症、特に先天奇形症候群は遺伝的異質性の高い疾患のひとつであり、その原因の解明は医学的にも発生生物学的にも極めて重要である。しかし、その病因を明らかにすることは極めて困難とされている。その理由には、発生頻度が極めて低く、臨床診断に専門的知識が必要であることや、責任遺伝子の病因となる変異が極めて多様で (遺伝子内点変異、遺伝子欠失・重複など) 解析に膨大な労力を要するがあげられる。しかも、それらをすべて網羅する診断検査法がないのが実際である。Sanger シーケンス法は基本となる遺伝学的解析法であるが、解析領域が限定され、エクソン数の多い疾患では大きな負担となる。また、ゲノムコピー数の変化は検出できない。マイクロアレイ CGH 法はゲノムコピー数解析に適するものの、コストなどの問題も伴う。こうした状況で登場した超高速 (次世代) シーケンサーは、極めて大きな威力を発揮することは明らかであるが、発生頻度が低く、臨床診断が明らかな疾患での解析では依然として Sanger シーケンスが不可欠となる。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。

B. 研究方法

対象は、臨床症状から血管型 Ehlers-Danlos 症候群と診断した 20 代女性で、解析に際しては文書による同意書を得たのちに採血を行い、末梢血より通常法によりゲノム DNA を抽出し、解析を進めた。HRM は、LightCycler480 (Roche) を用いて、解析キットとして LightCycler480 HRM Master (Roche) を用いた。各ウェルでの PCR は、総量 15 μ l とし、gDNA を 20ng、MgCl₂ を 3.0mM とした。PCR 条件はタッチダウン法を採用し、95°C 10min の後に、94°C 20 sec、60°C (-0.5°C/cycle) 30 sec、72°C 90 sec を 14 cycles、95°C 20 sec、53°C 30 sec、72°C 90 sec の 31 cycles を行い、HRM をプログラムに従って行った。HRM 解析により融解曲線が正常コントロールと変化を示した領域エクソンについて、Sanger シーケンスを行い、変異を確定した。血管型 Ehlers-Danlos 症候群責任遺伝子 COL3A1 のプライマーは全 51 エクソンについて、アミノ酸コード領域を中心にエクソン-イントロン境界領域を含むように設計した。プライマー設計に関しては Primer 3 を利用した。検出された各変異については、SNP 登録の有無や変異登録の有無について、各種のデータベース (The Human Gene Mutation Database: HGMD、Ensembl Genome Browser など) を参照した。

(倫理面への配慮)

HRM による解析は、こども医療センター倫理

審査において研究課題「マルファン症候群、およびマルファン症候群類縁疾患の遺伝子診断研究」として平成22年7月2日に承認を得たものである。検査前に十分な説明を行い、文書により同意のもとで解析を行った。解析にあたっては、全ての個人情報情報を潜在化した。

C. 研究結果

51エクソン領域のHRM解析により、5領域において融解曲線の変化を見出し、シーケンスを行った。このうち、4か所はデータベース登録のあるdbSNPであり(rs72425404, rs13306269, rs28413125, rs3215251)であったが、1か所はデータベース登録なく、HGMDにも登録のない新規の変異であった【図】。この変異について両親解析を行ったが、両親に変異は認められなかった。エクソン-イントロン境界領域にあり、転写産物に重大な影響を与える可能性が高いことなどは、これまで明らかにされているCOL3A1変異として矛盾ないことなどから、この変異を疾患特異的変異とみなした。

D. 考察

Sangerシーケンス法は、遺伝学的変異解析法の最も単純で、最も確実な方法であり、今後もその価値は変わらない。多くの疾患が遺伝子レベルで診断が可能となり、その有用性は言うまでもない。しかし、多くの遺伝病責任遺伝子は遺伝子も大きく、かつエクソン数も極めて多い。Sanger法で読み取れる領域は500-1000 bpが標準なので、全領域を解析する場合の労力は小さくない。しかもコストとも相関する。迅速な変異スクリーニング法として、熱変性1本鎖DNAのゲル泳動の変化から変異をスクリーニングするSSCP法の確立以来、こうした変異スクリーニング法は数多く開発されてきた。このHRMもその一つに位置づけられる。今回の結果が示すように、HRMの長所はコストと時間、大量処理能力、解析手順の簡素さ、などがあげられる。変異モザイクも高い精度で検出することが可能である。今後次世代シーケンサーの臨床応用が進むにつれ、コストダウンやアライメントの自動化など多くの改良と進歩が進むことが予想される。しかし、特定の限定された遺伝子における変異スクリーニングは、特に臨床診断においては依然としてこうした小回りのきく解析がSanger法と組み合わせられて有用と考えられる。しかし、解析領域についてはおおよそ200-300 bpが理想であり、それ以上のフラグメント長では検出精度が低下することが確認されている。領域が多い場合には、試薬分注も労力となるため、分注の自動化も考慮すべきであろう。病因解析において、変異スクリーニングのシステムの検討は、今後も重要となる。変異解析アルゴリズムの検討が課題である。

E. 結論

血管型Ehlers-Danlos症候群の変異スクリーニン

グにおいて、HRMを導入し、従来報告のない新規病変変異を検出した。HRMは、簡便で高い検出精度を保ち、コストパフォーマンスに優れるため、その臨床応用は重要とみなされる。今後、超高速(次世代)シーケンサーの普及も含め、変異スクリーニングのアルゴリズムの検討も課題と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

Kurosawa K, Enomoto K, Tominaga M, 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. [Epubahead of print]

Kurosawa K, Tanoshima-Takei M, Yamamoto T, Ishikawa H, Masuno M, Tanaka Y, Yamanaka M. Sirenomelia with a de novo balanced translocation46,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

2. 学会発表

黒澤健司、石川亜貴、和田敬仁、小坂仁 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)の臨床応用 第53回日本小児神経学会 2011.5.26-27. 横浜

Kurosawa K, Enomoto K, Furuya N,

Ishikawa A, Tominaga M, Wada T, Masuno M, Kuroki Y. Estimation of prevalence of malformation syndrome by population-based birth defects monitoring system in Japan. European Human Genetics Conference 2011. 2011.5.28-31. Amsterdam RAI, The Netherlands.

富永牧子、榎本啓典、石川亜貴、古谷憲孝、吉橋博史、黒澤健司 全サブテロメア MLPA 法による多発奇形/精神遅滞 (MCA/MR) の変異スクリーニング 第 114 回日本小児科学会 2011.8.12-14. 東京

黒澤健司、榎本啓典、古谷憲孝、石川亜貴、富永牧子、和田敬仁、升野光雄、黒木良和 先天異常モニタリング調査および遺伝外来受診例による先天奇形症候群発生頻度の推定 第 114 回日本小児科学会 2011.8.12-14. 東京

島貴史、榎本啓典、古谷憲孝、黒澤健司、竹内麻希、関藍 先天代謝異常症を明らかにした、横紋筋融解症を繰り返した染色体複雑構造異常の 1 例 第 114 回日本小児科学会 2011.8.12-14. 東京

石川亜貴、富永牧子、榎本啓典、古谷憲孝、上田秀明、康井制洋、黒澤健司 高分解融解曲線分析法 (HRM) による Marfan 症候群原因遺伝子 FBN1 変異スクリーニング

黒澤健司、塩味正栄、浜之上聡、永井淳一、齋藤敏幸、榎本啓典、富永牧子、古谷憲孝、升野光雄、気賀沢寿人 del(1)(p22.3p22.1)により

Diamond-Blackfan 症候群と好中球減少を呈した 1 女性例. 第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12. 千葉

石川亜貴、田中藤樹、重富浩子、続晶子、黒澤健司 頭蓋骨早期癒合を呈した 7 番染色体短腕中間部欠失の女児例. 第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12. 千葉

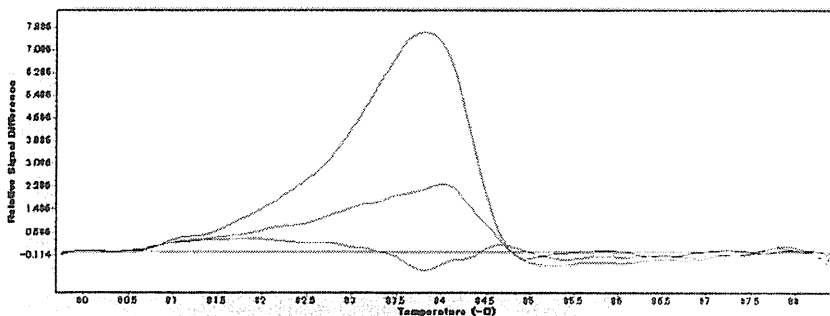
榎本啓典、菅原祐之、富永牧子、古谷憲孝、安達昌功、水野誠司、山内泰子、升野光雄、近藤達郎、土井庄三郎、水谷修紀、黒澤健司 3q22.3 を含む染色体部分欠失に起因する BPES の臨床像. 第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12. 千葉

黒澤健司、富永牧子、古谷憲孝、和田敬仁、小坂仁、室谷浩二 新しい染色体微細構造異常 - 15q24 欠失症候群の 1 男児例. 第 313 回日本小児科学会神奈川県地方会 2011.11.19.横浜

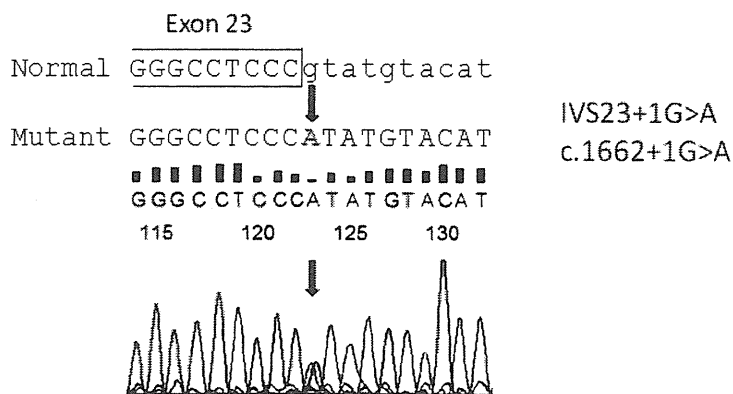
黒澤健司 希少難病と小児病院遺伝科 公開シンポジウム・成果発表会「難治性疾患の克服に向けて」 2011.7.10. 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定をむ。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



COL3A1遺伝子exon 23 HRM解析



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
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
研究分担者 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

研究要旨

中枢神経奇形をきたす小児神経疾患の成因を明らかにするために、網羅的遺伝子解析の対象となる患者を集積するシステムを構築した。その結果、原因不明の巨脳症患者を同定し、解析を進めることができた。さらに、シナプス形成異常のプロトタイプとしてAngelman症候群に注目し、体系的な遺伝学的解析方法を確立した。同様の症状を示すが、原因不明の例を集積し、網羅的遺伝子解析の対象として位置づけることができた。

A. 研究目的

中枢神経奇形は中枢神経発生に関わる遺伝子変異により引き起こされる場合が多い。これまでに、数多くの原因遺伝子が同定されているが、原因不明の中枢神経奇形は未だに沢山存在する。その主たる原因は中枢神経発生に関連する遺伝子の数が極めて多いことによる。発生に関連する遺伝子は互いに深く相互作用を行っているため、複数の遺伝子変異が良く似た表現型を示す。したがって、中枢神経奇形の原因遺伝子を検討するためには、網羅的な遺伝子解析が求められる。近年の遺伝子解析技術の発展により、このような網羅的遺伝子解析が可能となった。私たちは、中枢神経奇形をきたす小児神経疾患の原因遺伝子同定を目的として、適切な患者集積のための、臨床診断システムの構築を行った。さらに、精神遅滞や自閉症の原因としてシナプス形成の異常が注目されている。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。

B. 研究方法

中枢神経奇形の患者の体系的な診断方法として、MRIによる形態診断を行い、患者集積を行った。

対象となる患者の基礎疾患を除外するために、染色体検査Gバンドに加えて、アレイCGH(Agilent 60Kアレイ)を行い、微細染色体コピー数異常を検討した。

ASの診断にはSNRPN遺伝子のDNAメチル化テスト、両親の検体を用いた多型解析を行い、異常のない場合は原因遺伝子であるUBE3Aの変異解析を実施した。

C. 研究結果

原因不明の中枢神経奇形の患者を同定した。患者は生後6か月時に頭囲は+7.6SDと著しい大

頭症を示していた。詳細なMRIの解析では、頭頂部～シルビウス裂優位に広範囲に広がる多小脳回、脳回形成異常を伴う巨脳症であった。さらに、中心被蓋路にT2WI高信号域、深部白質のT2WI/FLAIR高信号域を認めた。この患者の中枢神経奇形はこれまでに報告のないものであった。Gバンドでは正常女性核型であったために、アレイCGHを行った。アレイCGHでは微細染色体コピー数異常は同定されなかった。本患児およびご両親の検体を網羅的遺伝子解析の対象としている。

AS患者に対しては、体系的な遺伝学的解析システムを構築した。これまでに、ASが疑われた患者144名を対象として解析したところ、84名には明確な原因がみつからなかった。これらの患者はASと似た機序による中枢神経機能障害が存在する可能性があり、シナプス形成異常の候補として位置づけることができる。

D. 考察

中枢神経奇形の患者に対して、網羅的遺伝子解析を実施するためには、適切な患者の集積が必要である。特に、臨床的な評価をきちんとすることが重要である。MRIを中心とした画像診断を中核として、適切な神経学的解析を行うことで、適切な中枢神経奇形患者を集積する体制を整えることができたと考えている。実際、そのようななかで、これまでに報告のない中枢神経奇形を伴う巨脳症を見つけることができた。

さらに、網羅的解析に進む前に、染色体解析をあらかじめ行う必要がある。特に、微細染色体コピー数異常については、アレイCGHを実施することが必要である。そのため、本年度はアレイCGHを実施する体制の構築を行うことができた。

これらの臨床的、遺伝学的解析を実施することで、適切な患者を網羅的遺伝子解析に提供することができると思われる。

中枢神経奇形はさまざまであり、微細な異常であっても、臨床的には重篤な症状を示しうる。そのような例として、シナプス形成異常が重要と考

えている。シナプス形成異常が原因であることが示されたASはモデルとして重要である。これまでの研究により、ASの表現型を示すが、原因不明の例の蓄積が進んでいる。これらの例は網羅的遺伝子解析のよいリソースと考えられる。

E. 結論

網羅的遺伝子解析の対象となる中枢神経奇形患者を集積するために、臨床的、遺伝学的解析のシステムを構築した。その結果、原因不明の巨脳症の例を解析に進めることができた。さらに、シナプス形成障害の例としてASの体系的遺伝学的診断方法を確立し、AS様症状を示すが、原因不明の症例の蓄積を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

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)

2. 学会発表

微細欠失は乳児期の筋緊張低下と重度精神遅滞を示す新しい症候群である、第53回日本小児神経学会総会 平成23年5月26-28日(東京)

高野亨子、小沢浩、稲田穰、上石晶子、有本潔、木実谷哲史、久保田雅也、斉藤伸治：Prader-Willi 症候群の摂食の改善について 第53回日本小児神経学会総会、平成23年5

月26-28日(東京)

細木華奈、太田亨、新川詔夫、斉藤伸治：PWS様表現型を示す微細染色体異常、第56回日本人類遺伝学会 平成23年11月10-12日(幕張)

OKI K, OHTA T, NATSUME J, IMAI S, OKUMURA A, MATSUI T, HARADA N, SCAGLIA F, BACINO CA, NIIKAWA N, SAITOH S. 5q31.3 microdeletion syndrome is a clinically discernible new syndrome characterized by severe neonatal hypotonia, feeding difficulties, respiratory distress, and severe developmental delay. 61th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Montreal, Canada, 10/12-15/2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし