

強く疑われた。

(2) 系統的、網羅的全ゲノムのメチル化解析：

生殖細胞（精子）と体細胞（血液）のDNAを用いて、網羅的メチル化解析を行った。

Bismark (Bowtie ベース) でマッピングツールを用い、ヒトゲノム配列へマッピング中である。また、得られたデータから全シトシンについてメチル化パーセンテージとリード数を算出している。予備実験が正確に評価できた時点で、症例のメチル化解析を行う。

D. 考察

これまでの先天性ゲノムインプリンティング病におけるDNAメチル化の解析により、ARTとの関連が示されたインプリント異常症は、SRSとBWSで、いずれもDNAメチル化の異常を原因とする（エピゲノム変異）の症例が多く、ART出生児においてもエピゲノム変異の症例が多い傾向にあった。このメチル化異常がART出生児の場合、どのような分子機構を原因として起こっているのか、つまり発症時期を特定し、そのリスク要因を同定する事を目的としている。ART出生児のエピゲノム異常の特徴としては、1) 責任領域以外の複数のインプリント領域で異常、2) 同一症例で、精子型と卵子型DMRの両方に異常、3) 同一症例で、高メチル化と低メチル化を示す、4) メチル化異常の程度は、完全型ではなく、モザイク型を示す症例が多い特徴がみられた。これらの解析結果から、ARTにより発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。これらのエピゲノム異常が、インプリント遺伝子領域に限定されるのか、その他の遺伝子領域にも影響を与えるのか、その場合は、特定の発達に重要な領域であるのか、あるいは疾患原因となる領域であるのかなど、構造上、生物学的機能上の特徴を明らかにするため、全ゲノムを対象に網羅的メチル化解析を行う必要がある。また、これらの結果を総合的に評価することにより、ART操作のリスク要因の同定そして予防、疾患の病態や治療法の選択に多に貢献する事が予想される。現在、基礎検討を行っているが、次年度には解析可能である。

E. 結論

メチル化異常を呈するインプリント異常症の場合、ART出生児はその異常のパターンが複雑である。この異常は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。つまり、受精以降の胚操作（受精卵培養、凍結胚操作など）に注意を払わなければならないと考えられる。また、今後は、エピゲノム異常を示す症例の発症機序の解明に着目して行く予定である。そのため、網羅的メチル化解析と次世代シーケンサーによる遺伝子配列を決定する計画である。

F. 健康危険情報

症例数が少ないため、未だ正確には評価できないが、ARTにより発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）、つまりメチル化の獲得より、むしろメチル化の維持に影響を与える可能性があり、注意を払わなければならない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Okao H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, **Arima T**. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. **Hum Mol Genet.** 21 (3), 548-558, 2012.
- Sakurai M, Ohtake J, Ishikawa T, Tanemura K, Hoshino Y, **Arima T**, Sato E. Distribution and Y397 phosphorylation of focal adhesion kinase on follicular development in the mouse ovary. **Cell and Tissue Research.** 347, 457-465, 2012.
- Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples. **Arima T**, Okao H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Hayashi C. **INTECH.** 29, 183-192, 2012.
- Hiura H, Okao H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, **Arima T**. High-throughput detection of aberrant imprint methylation in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. **BMC Medical Genomics.** 5, 8-17, 2012.
- Hiura H, Okao H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van

De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, **Arima T**. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies. **Human Reproduction**. 27 (8): 2541-2548, 2012.

6. Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, **Arima T**. Stability of the abnormal imprinting of human induced pluripotent stem cells. **BMC Genetics**. (in press)
7. **有馬隆博**、樋浦仁、岡江寛明。「生殖補助医療由来の先天性ゲノムインプリンティング異常症」 *Japanese Journal of Reproductive Endocrinology* 日本生殖内分泌学会雑誌 17, 54-58, 2012.

2. 学会発表

1. 熊本大学発生発生医学研究所セミナー「胎盤形成とゲノムインプリンティング」有馬隆博 2012.2.10 熊本
2. 卵巣に関する国際カンファレンス 2012 "The International Ovarian Cancer 2012" 「ART and Epigenetic Errors - Abnormal DNA methylation in imprinting disorders after ART」有馬隆博 2012.3.17 東京
3. 日本生殖再生医学会・第7回学術集会「ARTにおけるエピジェネティック機構」有馬隆博 2012.3.25 東京
4. Planet xMAP Japan 2012 「男性不妊症精子のインプリント遺伝子を標的とした DNA メチル化解析」有馬隆博 2012.5.16 東京
5. 2012 セント・ルカセミナー「胎盤形成とゲノムインプリンティング」有馬隆博 2012.6.3 大分
6. 第11回学術集会日本不妊カウンセリング学会「生殖医療とエピジェネティクス」有馬隆博 2012.6.8 東京
7. 第5回生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク 「Non-random loss of imprinting in cloned mice」有馬隆博 2012.11.20-21 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

1. ヒト精子の質的機能評価システムに応用する DNA メチル化解析システムの開発 (P20110420)
発明者 有馬隆博 (出願人 東北大学) 出願日 2012.5.16 PCT 出願

次世代シーケンサーによる希少遺伝性疾患の遺伝子解析研究 —特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例—

研究分担者 遠藤 文夫 熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野 教授

研究要旨

次世代シーケンサーを用いて希少遺伝性疾患の新規候補遺伝子を同定し、疾患の発症機構を解明し適切な診療指針の確立を目的とする。希少遺伝性疾患の候補として、特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例を報告する。同様の病状を呈する疾患として、これまでに Microphthalmia syndromic 1(Lenz 症候群)、Microphthalmia syndromic 2 (Oculofaciocardiodental syndrome)があるが、前者は女性の発症は原則的にはなく、後者は男性致死でいずれも該当しない。両者の候補遺伝子として *BCOR* (BCR-6 corepressor gene) 遺伝子があるが、本例において遺伝子変異は検出されなかった。非常に興味深い症例として報告すると同時に、希少遺伝性疾患候補と考えられ、次世代シーケンサーによる候補遺伝子を同定し、疾患の発症機構を解明する予定である。

研究協力者

三淵 浩（熊本大学医学部附属病院新生児寄付講座）
仲里 仁史（熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野）

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いて希少遺伝性疾患の新規候補遺伝子を同定し、疾患の発症機構を解明し適切な診療指針の確立を目的とする。そのためには希少遺伝性疾患の家系の抽出が必要であり、解析の候補として適切かどうかを検討する必要がある。

B. 研究方法

今回、われわれは上記目的のために、家族歴（兄弟例）のある希少疾患の家系を検討する。熊本大学小児科において、通院中の原因不明の希少疾患と思われる、兄弟例を含む家族例を検索し、特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例をピックアップした。既存の疾患との異同、候補遺伝子の検討を行い、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析、同定が可能か検討した。

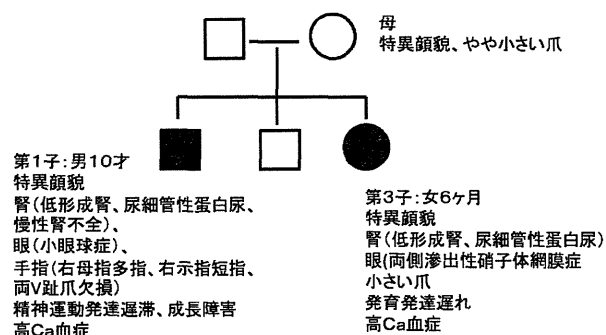
（倫理面への配慮）

遺伝性疾患の遺伝子解析については熊本大学倫理委員会の承認を得ている。また、担当医師は日本人類遺伝学会の臨床遺伝専門医であり、熊本大学における遺伝カウンセリングチームとして研究対象者に人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）、カウンセリング行いながら本研究をすすめる。

C. 研究結果

症例

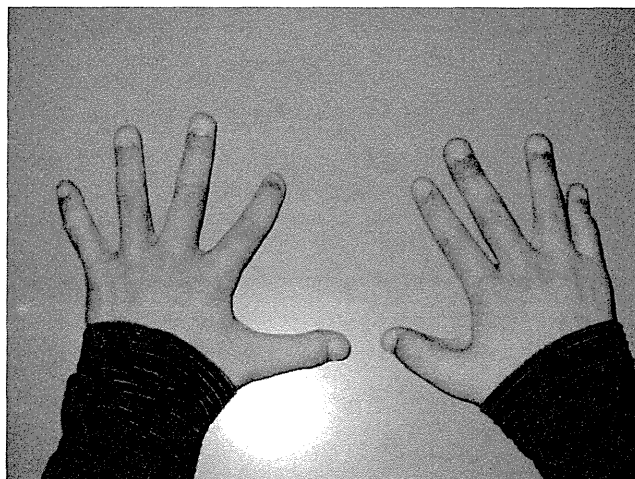
家系図を示した。



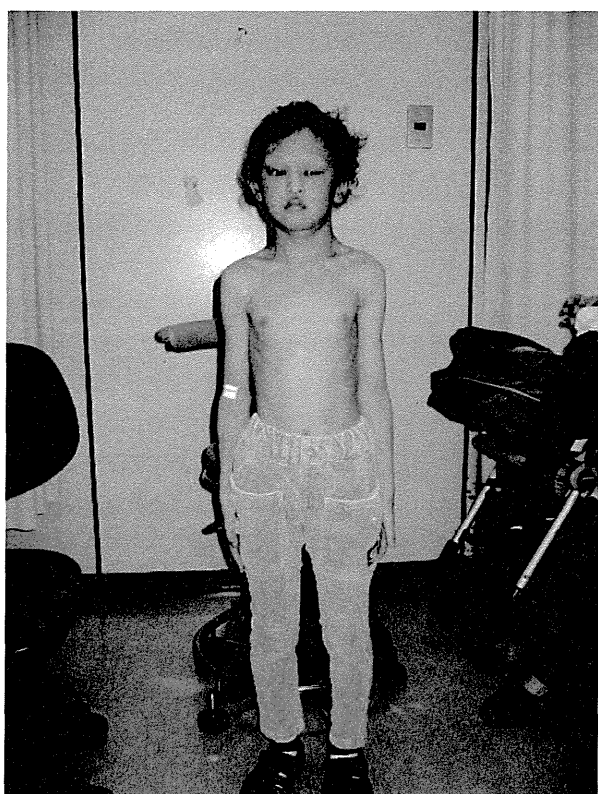
血族結婚はみとめず、父方母方調べた範囲では、同様の疾患は見当たらなかった。

発端者である第1子兄は2002年8月生まれ、胎児期羊水減少、IUGR、胎児徐脈で39w6d、2608g帝王切開で出生した。奇異な顔貌、多指のため基幹的病院に入院した。小頭症、奇異な顔貌（左眼瞼下垂、小眼球、白内障、眼振、細く尖った鼻、大きい立った耳介、薄い頭髪、薄い眉、小顎症）、左示指爪欠損、右軸前性多指、なで肩、細い胸郭、低形成腎、高Ca血症を認めた。心奇形は認めなかった。眼底所見は両側第一次硝子体過形成遺残と診断され、左はほとんど視力はない状態であった。染色体Gバンドは正常。精査目的で当院受診され、フォロー開始された。9歳時の写真を示す。

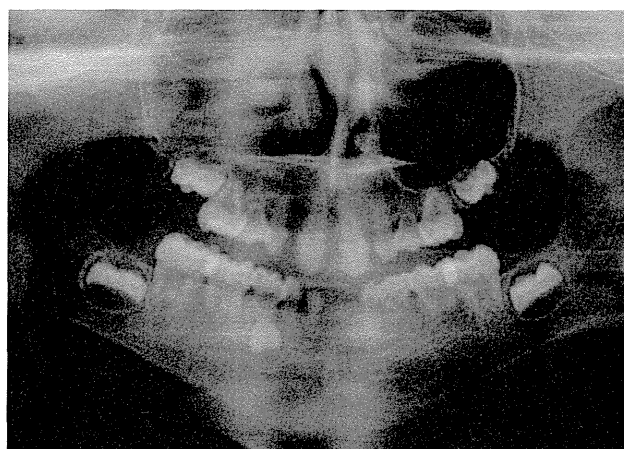
眼振、細く尖った鼻、大きい立った耳介、薄い頭髪、薄い眉、小顎症)を認める。



爪が小さく、左示指爪欠損を認める。右軸前性多指に関しては切除形成されている。



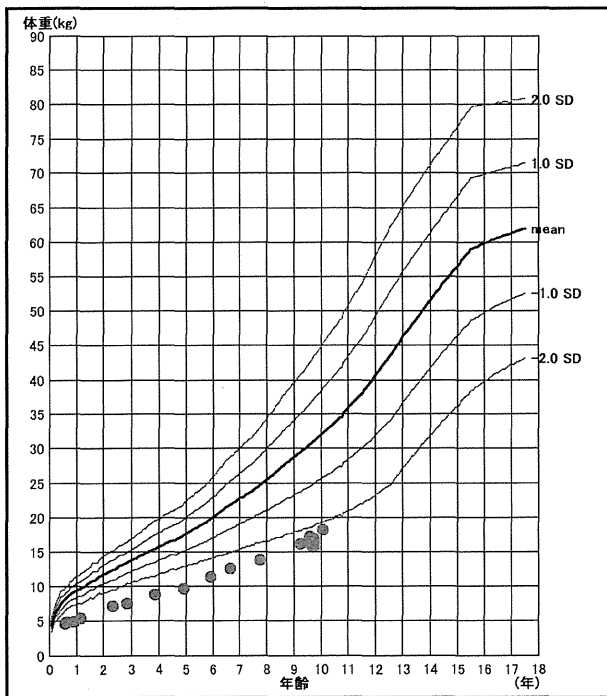
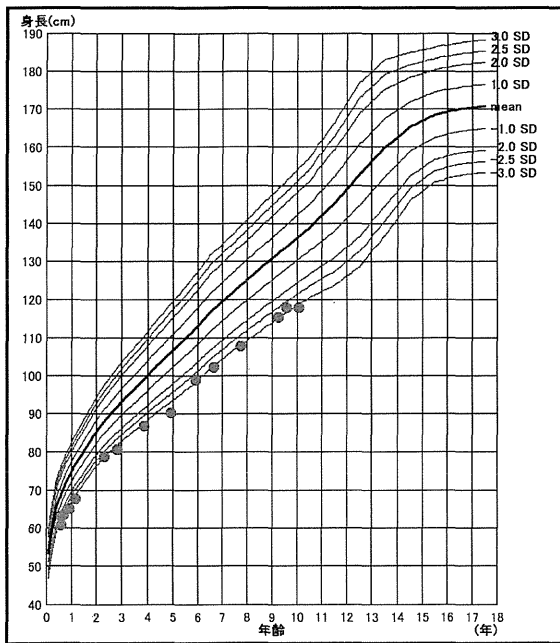
なで肩、細い胸郭が顕著である。



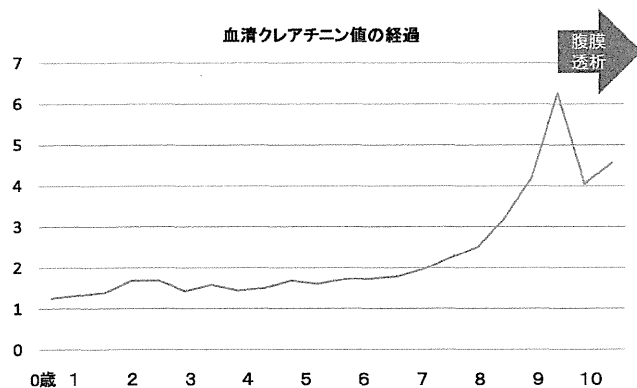
9歳時の歯列のパノラマ撮影を示す。歯牙の欠損、形成異常を認める。癒合、歯髓の拡大ははっきりしない。下に発育曲線を示す。体重は-2SD領域、身長は-3SD領域である。



小頭症、奇異な顔貌（左眼瞼下垂、小眼球、白内障、



発達は DQ40-50 ぐらいで推移、普通学校の特別支援、弱視学級に通学中である。腎機能は徐々に低下し、現在透析中である。クレアチニンの経過を下图にしめした。

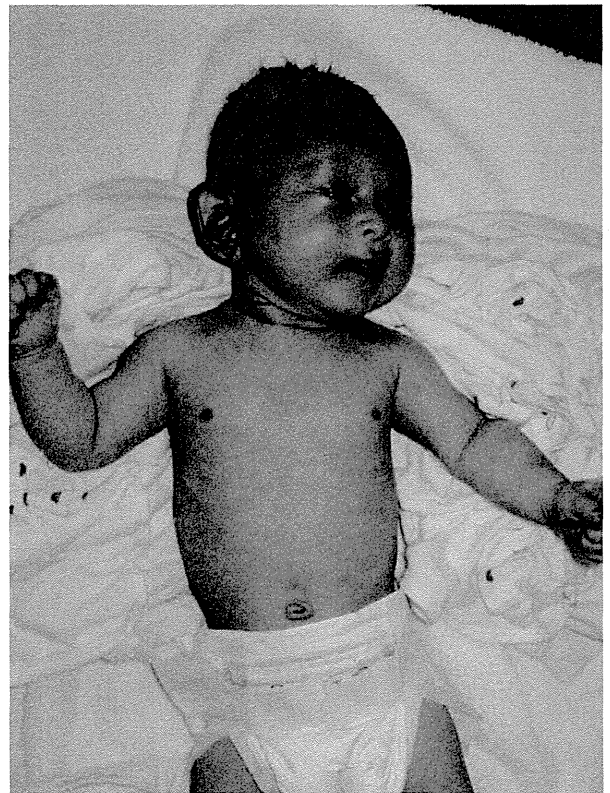


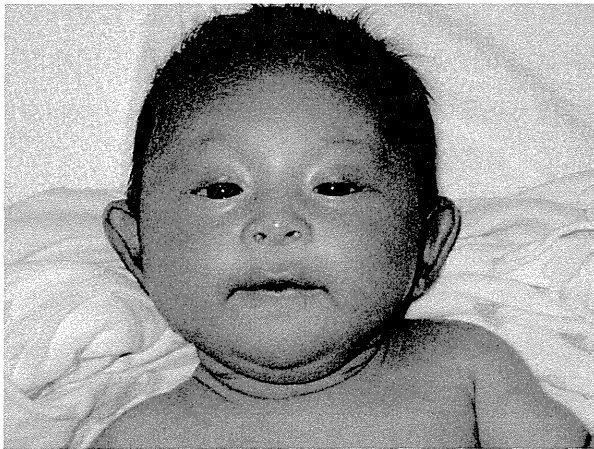
低形成腎であり、組織学的検討はなされていない。本例については琉球大学医学部要先生に依頼し、*BCOR* (*BCL-6 corepressor gen*) の遺伝子解析を行ったが、異常は検出されなかった。

上記兄の弟は特に異常を認めず。

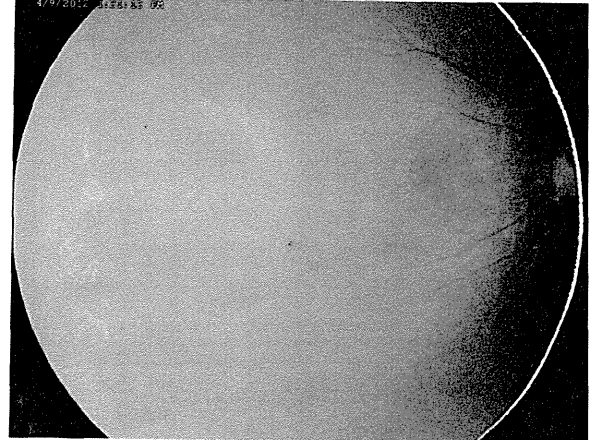
妹は 2012 年 1 月生まれ、胎児期腎低形成疑われていた。女兒ということも判明していた。出生後、腎低形成、爪の低形成、特異顔貌(小眼球、細く尖った鼻、大きい立った耳介、薄い頭髪、薄い眉)を認め精査、兄と同様の疾患が考えられた。眼科的には両側家族性滲出性硝子体網膜症と診断された。高 Ca 血症(一過性、低 Ca フォーミュラ使用)も認める。心奇形は認めない。血清クレアチニン値は生後すぐに 1 以上あったが、現在 0.7-0.8 程度で推移している。成長発達は遅れている。

生後すぐの妹の写真、頭部 CT、眼底所見を示す。





mei yosioka (ID:12019154)-
4/9/2012 1:16 PM, Retina, Lens 1300, Right Eye (OD)



右眼底写真

両眼耳側に 1DD 程度の無血管野を認める。右眼はアーケードより耳側周辺部に硝子体中に伸びる白い膜を認める。左眼は耳側の無血管野との境界に増殖膜？認める。左眼は同部より一部出血、滲出あり。

D. 考察

特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例を報告した。これまでの我々の経験から特徴的であるが、非常にまれな疾患と考えられた。同様の病状を呈する疾患として、UR-DBMS (琉球大学遺伝性疾患データベース) により検索を行った。可能性の高い疾患として、Microphthalmia syndromic 1 (Lenz 症候群)、Microphthalmia syndromic 2 (Oculofaciocardiodental syndrome: OPCD 症候群) が検索された。Lenz 症候群は Hermann & Opitz らが 1969 年に X 連鎖性劣性遺伝形式をとり、小眼球ないし臨床的無眼球 (片側性または両側性) 耳介聳立、短い円柱状の胸郭と内方に回転した膝、柱状の胸郭、なで肩、鎖骨異常 (下) 両側性虹彩コロボーマを特徴とする症候群として報告した。OPCD 症候群は Hedera P らが 2003 年、X 連鎖性優性遺伝形式をとり、長く鋭い鼻、陥凹した鼻尖、先天性白内障、緑内障、VSD、槌趾、著明に長い全犬歯 (> 45 mm) (正常 = 26 mm) 小眼球、緑内障、長く狭い顔、幅広い鼻尖、右手 XP (6M 時) 第 1 中手骨と母指低形成、著明な第 5 指彎指を特徴とする女性例を報告した。しかし、前者は女性の発症は原則的にはなく、後者は男性致死でいずれも該当しない。その後両者の候補遺伝子として *BCOR* (BCR-6 corepressor gene) 遺伝子同定され、病因が明らかにされつつあるが、このような家族例の



頭部 CT では三角頭蓋とまではいかないが、前頭葉の形成が不良の可能性もある。



左眼底写真

次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア呼吸鎖異常症の解析 — 酵素診断から遺伝子解析に至る系統的病因探索システムの構築 —

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学小児科 教授

研究要旨

呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者 798 名中 284 名をミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) と診断した (診断率 284/798=35.6%)。臨床診断としては Leigh 症候群と乳児ミトコンドリア病が最も多かったが、肝症、心筋症などの単一臓器障害もかなりを占め、極めて多様であった。酵素診断では Complex I 欠損症が最も多く 123 例、次いで複数の呼吸鎖複合体欠損症が 96 例、Complex IV 欠損症が 49 例、Complex III 欠損症が 10 例であった。ミトコンドリア遺伝子について従来法と Ion PGM 法を用いた解析で合計 156 例について解析を行い病因と考えられる遺伝子変異を 45 例に同定し、ミトコンドリア遺伝子異常が病因となる率: 29% (45/156) を同定した。104 症例について核遺伝子についてのエキソーム解析が終了し、うち 27 症例について、既知の原因遺伝子として報告がなくミトコンドリア局在タンパク質をコードしている遺伝子に劣性遺伝形式での変異が、別の 18 症例で既知の原因遺伝子における新規変異が同定された。

研究協力者

神田将和 (埼玉医科大学ゲノム医学研究センター
トランスレーショナルリサーチ部門)

いたい。(遺伝子解析部分は、主に文部科学省「革新的細胞解析研究プログラム (セルイノベーション) 補助金を用いて行われた。)

A. 研究目的

ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) は最も高頻度 (1/5,000) なエネルギー産生系の先天代謝異常症であり、症状・罹患臓器・遺伝形式は極めて多岐にわたる。今回私達は日本全国から依頼された症例を対象とし、酵素診断に始まり、次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア遺伝子解析、全エキソーム解析に至る系統的病因探索システムを構築したので、本システムを用いた現在までの解析結果を報告する。【対象】 775 家系 798 症例から得た 1265 検体 (皮膚線維芽細胞 614 検体、肝臓 264 検体、筋肉 250 検体、心臓 93 検体、腎臓 27 検体、脳 7 検体など) を対象とした。

【考察】私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的探索システム」は充分機能した。今後 iPS 細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し、最終的にはこのシステムを応用して創薬に向けた検討を行

B. 研究方法

1) Blue Native 電気泳動を用いた Western Blot と *in gel* enzyme stain、および *in vitro* 酵素アッセイを用いた呼吸鎖酵素複合体蛋白レベルの解析。2) サンガーシーケンス法やライフテクノロジーズ社 Ion PGM シーケンサーによるミトコンドリア DNA 全周塩基配列の解析。3) ミトコンドリア DNA 枯渇症候群 (mitochondrial DNA depletion syndrome: MTDPS) 疑い例については、定量的 PCR (qPCR) による診断確定後、サンガーシーケンス法による頻度の高い 11 種類の原因遺伝子解析。4) 以上で病因が判明しない症例に対する次世代シーケンス法を用いた全エキソーム解析。

(倫理面への配慮)

本研究は申請番号 482 (現在更新されて 482-V) で埼玉医科大学倫理委員会における審査を受け承認を

得て行った。遺伝子解析研究についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）および、医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン（日本医学会 2011 年 2 月）に基づいて行い、さらにこれとは別に各研究機関の倫理審査委員会において承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 酵素診断の結果：現在までのところ、279 家系 284 名を MRCD と診断した（診断率 284/798=35.6%）。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く 71 例（致命的乳児ミトコンドリア病が 49 例、非致命的乳児ミトコンドリア病が 22 例）、次いで Leigh 症候群が 50 例、ミトコンドリア脳筋症が 50 例、ミトコンドリア肝症が 34 名、ミトコンドリア心筋症が 19 例、原因不明の神経変性疾患が 11 例、乳幼児突然死が 25 例、その他が 24 例であった。酵素診断では Complex I 欠損症が最も多く 123 例、次いで複数の呼吸鎖複合体欠損症が 96 例、Complex IV 欠損症が 49 例、Complex III 欠損症が 10 例であった。2) ミトコンドリア遺伝子解析：156 例について解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を 45 例（29%）に同定した。つまり 70%以上の MRCD は核遺伝子異常と考えられた。3) 23 家系 25 症例を MTDPS と確定し、このうち 4 家系 6 症例で既知 11 遺伝子（4 遺伝子、重複あり MPV17, POLG, DGUOK, SUCLG1）における変異を特定した。4) 104 症例についてエキソーム解析が終了した。うち 27 症例について新規の原因遺伝子となる候補を、別の 18 症例で既知の原因遺伝子における新規変異が同定された。

D. 考察

私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的探索システム」は充分機能した。今後 iPS 細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し、最終的にはこのシステムを応用して創薬に向けた検討を行いたい。

E. 結論

ミトコンドリア病はいかなる症状、所見、発症年齢、遺伝形式でも発症しうる疾患群であるが、呼吸鎖異常

症 (MRCD) としてとらえることにより、次世代シーケンス法を用いた解析の良い対象となることが確認された。（遺伝子解析部分は、主に文部科学省「革新的細胞解析研究プログラム（セルイノベーション）補助金を用いて行われた。）

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 著書

1) 大竹 明 : XIII ミトコンドリア病 1. ミトコンドリア病：概論. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.20 先天代謝異常症候群（第 2 版）下—病因・病態研究、診断・治療の進歩— 日本臨床社 大阪 pp623-630, 2012

2) 大竹 明 : XIII ミトコンドリア病 2. ミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 I 欠損症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.20 先天代謝異常症候群（第 2 版）下—病因・病態研究、診断・治療の進歩— 日本臨床社 大阪 pp631-637, 2012

原著

1) Arakawa C, Endo A, Kohira R, Fujita Y, Fuchigami T, Mugishima H, **Ohtake A**, Murayama K, Mori M, Miyata R, Hatai Y: Liver-specific mitochondrial respiratory chain complex I deficiency in fatal influenza encephalopathy. *Brain Dev* 34(2): 115-7, 2012.

2) Akamizu T, Sakura N, Shigematsu Y, Tajima G, **Ohtake A**, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K: Analysis of plasma ghrelin in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II. *Eur J Endocrinol* 166(2): 235-240, 2012.

3) Tanigawa J, Kaneko K, Honda M, Harashima H, Murayama K, Wada T, Takano K, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Aida N, **Ohtake A**, Osaka H: Two Japanese patients with Leigh syndrome caused by novel SURF1 mutations. *Brain Dev* 34(10): 861-5, 2012.

- 4) Yamamoto T, Emoto Y, Murayama K, Tanaka H, Kuriu Y, **Ohtake A**, Matoba R: Metabolic autopsy with postmortem cultured fibroblasts in sudden unexpected death in infancy: Diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Mol Genet Metab* 106(4): 474-7, 2012.
- 5) 荒尾正人、武者育麻、日笠山絢香、赤塚淳弥、山崎太郎、雨宮 伸、阪本靖介、笠原群生、**大竹 明**: 門脈欠損症 II 型 (門脈低形成症) に対してシャント血管離断術が奏功した VACTERL 連合の 1 例. *日本マス・スクリーニング学会誌* 22(1): 45-8, 2012.
- 6) Muto A, Takei H, Unno A, Murai T, Kurosawa T, Ogawa S, Iida T, Ikegawa S, Mori J, **Ohtake A**, Hoshina T, Mizuochi T, Kimura A, Hofmann AF, Hagey LR, Nittono H: Detection of $\Delta(4)-3$ -oxo-steroid 5β -reductase deficiency by LC-ESI-MS/MS measurement of urinary bile acids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 900(1): 24-31, 2012.
- 7) Nagasaka H, Yorifuji T, Bandsma RH, Takatani T, Asano H, Mochizuki H, Takuwa M, Tsukahara H, Inui A, Tsunoda T, Komatsu H, Hiejima E, Fujisawa T, Hirano KI, Miida T, **Ohtake A**, Taguchi T, Miwa I: Sustained high plasma mannose less sensitive to fluctuating blood glucose in glycogen storage disease type Ia children. *J Inherit Metab Dis* 36(1): 75-81, 2013
- 8) Seki Y, Mizuochi T, Kimura A, Takahashi T, **Ohtake A**, Hayashi S, Morimura T, Ohno Y, Hoshina T, Ihara K, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Homma K, Hasegawa T, Matsuishi T: Two neonatal cholestasis patients with mutations in the SRD5B1(AKR1D1) gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment. *J Inherit Metab Dis*. 2012 Nov 16. [Epub ahead of print]
- 9) Nagasaka H, Okano Y, Kimura A, Mizuochi T, Sanayama Y, Takatani T, Nakagawa S, Hasegawa E, Hirano K, Mochizuki H, Ohura T, Ishige-Wada M, Usui H, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, **Ohtake A**, Yamato S, Miida T: Oxysterol changes along with cholesterol and vitamin D changes in adult phenylketonuric patients diagnosed by newborn mass-screening. *Clin Chim Acta* 416 (1): 54-9, 2013
- 10) 加藤いづみ、村山 圭、鈴木康浩、岩松利至、今井郁子、大塚晴美、**大竹 明**: 新生児期発症ミトコンドリア呼吸鎖異常症の兄妹例. *日本小児科学会雑誌* 116(11): 1717-1723, 2012
- 11) 荒尾正人、武者育麻、日笠山絢香、赤塚淳弥、山崎太郎、雨宮 伸、阪本靖介、笠原群生、**大竹 明**: 門脈欠損症 II 型 (門脈低形成症) に対してシャント血管離断術が奏功した VACTERL 連合の 1 例. *埼玉県医学会雑誌* 47(1): 224-227, 2012

2. 学会発表

(患者会講演、全国レベルの招待・教育講演と国際学会のみ)

- 1) **大竹 明**: ミトコンドリア呼吸鎖ってなあに? : 包括的診断と治療へ向けての取り組み. ミトコンドリア病患者・家族の会 (MCM 家族の会) 講演 6月3日 日本医科大学武蔵小杉キャンパス (川崎市), 2012
- 2) Murayama K, Kawachi E, Tsuruoka T, Mori M, Yamazaki T, Okazaki Y, Takayanagi M, **Ohtake A**: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: the experiment of systematic analysis for causative gene. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. April 1 - 4, Lotte Hotel Seoul (Seoul, Korea), 2012.
- 3) Takahashi T, Hattori M, Furui M, Yamada K, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S, **Ohtake A**, Wanders RJA, Yamaguchi S: Chemical Diagnosis of Methylmalonate Semialdehyde Dehydrogenase (MMSDH) Deficiency: A First Case Report in East Asia. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. April 1 - 4, Lotte Hotel Seoul

(Seoul, Korea), 2012.

4) Fukuoka S, Murayama K, Fushimi T, Muta K, Kawachi E, Ajima M, Mori M, Okazaki Y, Takayanagi M, **Ohtake A**: Clinical manifestation and molecular, biochemical, and histological findings of mitochondrial cardiomyopathies. SSIEM (Society for the Study Group of Inborn Errors of Metabolism) Annual Symposium 2012, September 4-7, ICC (Birmingham, UK), 2012

5) 大竹 明:S3-4 迷った時にはミトコンドリア病. 第 54 回日本先天代謝異常学会総会 シンポジウム 3: 日常診療と先天代謝異常症 11月 15-17日 じゅうろくプラザ (岐阜市) , 2012

6) **Ohtake A**, Yamazaki T, Murayama K, Mori M, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: exome sequencing for the disease gene identification. AussieMit2012. 10-12 December, Monash University Caylfield Campus (Melbourne,

Australia), 2012

7) Arao M, Sakai T, Musha I, Yamazaki T, Abe Y, Amemiya S, Uehara N, Tokuzawa Y, Okazaki Y, Murayama K, Mori M, **Ohtake A**: Pyruvate therapy for two infantile mitochondrial diseases due to mitochondrial DNA mutations. AussieMit2012. 10-12 December, Monash University Caylfield Campus (Melbourne, Australia), 2012

8) Yamazaki T, Murayama K, Mori M, Iwasa H, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Mimaki M, Okazaki Y, Thorburn DR, **Ohtake A**: Mitochondrial respiratory chain disorders in Japan and the West, focusing principally on the mitochondrial DNA depletion syndrom. AussieMit2012. 10-12 December, Monash University Caylfield Campus (Melbourne, Australia), 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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

小児内分泌疾患関連の症例収集と解析

研究分担者 緒方 勤 浜松医科大学 小児科 教授

研究要旨

近年の次世代シーケンサーを代表とする分子生物学的解析技法の進展により、遺伝性疾患の新規責任遺伝子が次々と同定されるようになってきている。この次世代シーケンサー解析で責任遺伝子を同定するためには、この解析法に適した患者・家系を見いだすことが重要となる。本年度は、下記の家系の集積と次世代シーケンサー解析を開始した。(1) 常染色体優性の低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を呈する家系：既知責任遺伝子 GATA3 変異と欠失を除外した後エクソーム解析を行い、疾患と連鎖するヘテロの TBX1 のフレームシフト変異を同定した。これにより、TBX1 のフレームシフト変異が低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を招くことが明らかとなった。(2) 常染色体優性の腎尿細管水再吸収増加（低 Na 血症）疾患を呈する家系：既知の VP receptor や aquaporin 関連遺伝子の変異を除外した後エクソーム解析を実施し、この疾患と連鎖する変異を約 20 の遺伝子において見いだした。現在、ピックアップされた遺伝子の発現パターンや機能解析データを用いた解析を行っている。(3) 常染色体優性の若年発症糖尿病(MODY)を呈する家系：既知の常染色体優性形式の MODY 発症責任遺伝子の変異を除外した後、エクソーム化石に着手している。(4) t(5;8)(q35.1;p21.1)と連鎖する常染色体優性の Klippel-Feil 症候群家系：切断点により破壊された遺伝子は存在しないことから、エクソーム解析に着手している。以上、われわれは、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析に値する家系の集積とその解析を実施し、新規責任遺伝子の同定とそれによる疾患発症機序の解明や新規治療法開発の基盤整備を進めている。

A. 研究目的

近年の次世代シーケンサーを代表とする分子生物学的解析技法の進展により、遺伝性疾患の新規責任遺伝子が次々と同定されるようになってきている。そして、この強力な解析ツールを活用した新規遺伝子の同定とその遺伝子型-表現型解析や機能解析により、ヒト遺伝学は新しいパラダイムの時代を迎えている。

この次世代シーケンサー解析で責任遺伝子を同定するためには、この解析法に適した患者・家系を見いだすことが重要となる。第1は、遺伝的異質性が低い疾患において、多数の典型的な患者検体を集積することである。多くの患者で変異が認められる遺伝子を探索することで、その疾患の責任遺伝子を同定することが可能である。第2は、ある特定の疾患を有する家系において、罹患者と非罹患者の検体を集積することである。この方法は特に常染色体劣性疾患において有用とされるが、比較的大きな家系であれば、常染色体優勢疾患においても極めて有用性の高い方法である。特に、当該疾患の既知遺伝子が存在しないときや、既知責任遺伝子変異が除外されているときには、新規責任遺伝子の同定と、それによる疾患発症機序の解明や新規治療法開発の契機が得られると期待される。

研究分担者は、「次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究」において、小児内分泌疾患の情報価値の高い家系からの臨床情報や DNA 検体集積ならびに解析を担うことで、新規責任遺伝子単離を目指している。本年度は、このような家系の集積と次世代シーケンサー解析を開始したので、その成果について報告する。

B. 研究方法

比較的大きな家系例を対象として、表現型の詳細な解析、ならびに既知責任遺伝子が存在するときには、当該責任遺伝子の通常の方法による変異解析を行った。その後、既知責任遺伝子変異が否定された家系において次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行った、

（倫理面への配慮）

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、書面を用いた詳細な同意取得の説明に続き、文書に寄る同意が得られた患者・家系を対象として検体収集を実施している。なお、浜松医科大学において、次世代シーケンサー解析を含む内容として、「性分化疾患・性成熟疾患における遺伝的原因の探索（浜松医科大学第 23-110 号）、ならびに、「先天性奇形症候群における遺伝的原因の探索」（浜松医科大学第 23-112 号）が承認されていることを付記する。

C. 研究結果

以下の家系について、解析を精力的に進めている。
1. 常染色体優性の低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を呈する家系におけるエクソーム解析：
家系図は、図 1 に示す通りである。われわれは、この家系において、まず既知の常染色体優性の HDR syndrome 責任遺伝子 GATA3 のコード領域内変異と欠失を除外した。また、常染色体劣性の HRD syndrome 責任遺伝子 TBCE の変異も除外した。これらの結果

から、本家系はエクソーム解析に値すると考え、東北大学において解析がなされた。その結果、疾患と連鎖するヘテロの *TBX1* のフレームシフト変異が同定された。この *TBX1* は、心疾患、免疫異常、特異的顔貌、低 Ca 血症を生じる 22q11 欠失症候群の責任遺伝子の一つとされるものである。特記すべき点として、本解析により、*TBX1* のフレームシフト変異が低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を招くことが明らかとなった。

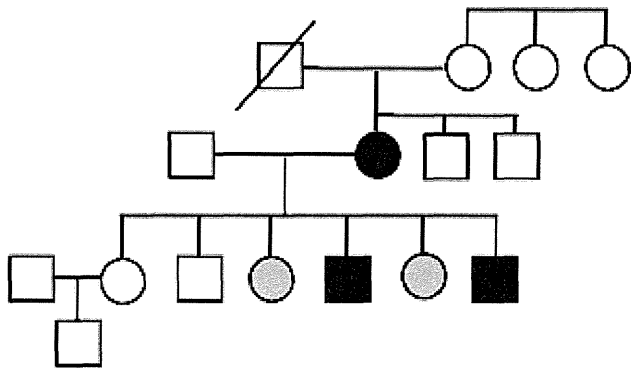


図 1. 低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を呈する家系。黒塗りは、低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を呈する患者、灰色は構音異常、特徴的顔貌を呈する患者を、白塗りは健常者示す。

2. 常染色体優性の腎尿細管水再吸収増加（低 Na 血症）疾患を呈する家系におけるエクソーム解析：家系図は、図 2 に示す通りである。われわれは、この家系において、まず既知の VP receptor や aquaporin 関連遺伝子のコード領域内変異を通常のシーケンス解析で除外した。その後、エクソーム解析を実施したところ、この疾患と連鎖する変異が約 20 の遺伝子において見いだされた。現在、ピックアップされた遺伝子の発現パターンや機能解析データに基づいて、真の責任遺伝子を追求しているところである。

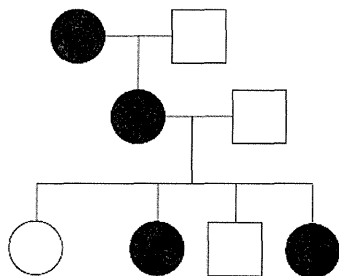
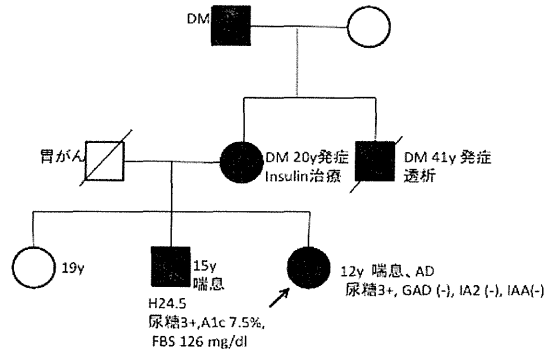


図 2. 黒塗りは罹患患者を、白塗りは健常者を示す。

3. 常染色体優性の若年発症糖尿病(MODY)を呈する家系におけるエクソーム解析：家系図は、図 3 に示す通りである。われわれは、この家系において、既知の常染色体優性形式の MODY 発症責任遺伝子 7 個のコード領域内の変異を除外した。また、詳細な臨床情報収集で症状が既知の MODY とは異なることを明らかとした。これにより、本家系では新規 MODY 発症責任遺伝子変異の可能性が推測されることから、エクソーム解析を行った。現在、解読は終了し、データマイニングの段階に入っている。

図 3. 黒塗りは罹患患者を、白塗りは健常者を示す。

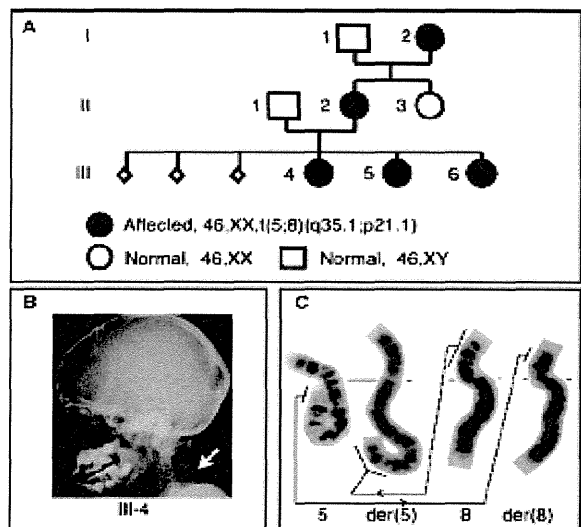
4. t(5;8)(q35.1;p21.1)と連鎖する常染色体優性の



Klippel-Feil 症候群家系：

家系図は、図 4 に示す通りである。われわれは、この家系において、まず相互転座の切断点を決定した。また、アレイ CGH により、転座周辺に明確なコピー数変動が存在しないことを確認した。そして、決定された切断点により破壊された遺伝子は存在しないことを見いだした。この結果は、切断点が遺伝子発現調節領域の機能を障害していることを推測させるが、Klippel-Feil 症候群が、相互転座染色体とは無関係である可能性を示唆する。現在、この可能性を考えて、エクソーム解析に着手する予定である。

図 4. 黒塗りは相互転座と Klippel-Feil 症候群を有する患者を、白塗りは正常核型と正常表現型を呈する健



常者を示す

D. 考察

本研究において、われわれは、多数の内分泌疾患を有する家系を見いだした。最も重要な点として、既知の責任遺伝子変異を除外していることが挙げられる。したがって、エクソーム解析に値する家系を集積され、エクソームにより、新規責任遺伝子が同定されると期待される。また、他にも多くの家系において検体集積を開始している。

さらに、現在までに、エクソーム解析数家系で実施した。そして、常染色体優性の低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を呈する家系では責任遺伝子が同定され、

常染色体優性の腎尿細管水再吸収増加（低 Na 血症）疾患では候補遺伝子が見いだされている。今後、残る家系や新しく同定される家系においてエクソーム解析を行い、新規責任遺伝子の同定とそれによる疾患発症機序の解明や新規治療法開発に繋げたい。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析に値する家系を集積し、その解析を進めている。そして、既に常染色体優性の低 Ca 血症、構音異常、特徴的顔貌を呈する家系では責任遺伝子が同定され、常染色体優性の腎尿細管水再吸収増加（低 Na 血症）疾患では候補遺伝子が見いだされている。次年度において、新規責任遺伝子の同定とそれによる疾患発症機序の解明や新規治療法開発が進展すると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue H, Mukai T, Sakamoto Y, Kimura C, Kangawa N, Itakura M, Ogata T, Ito Y, Fujieda K: Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 76 (1): 78–87, 2012.
2. Sugihara S*, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahara Y, Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Y, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, Amemiya S, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT): Genetic characteristics on HLA-cass II and class I among Japanese type 1A and type 1B diabetic children and their families. *Pediatr Diabetes* 13 (1): 33–44, 2012.
3. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T*: Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 20 (9): 928–932, 2012.
4. Oto Y*, Obata K, Matsubara K, Kozu Y, Tsuchiya T, Sakazume S, Yoshino A, Murakami N, Ogata T, Nagai T: Growth hormone secretion and its effect on height in pediatric patients with different genotypes of Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 158A (6): 1477–1480, 2012.
5. Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsubara K, Matsuoka K, Hasegawa T, Dobashi K, Ogata T*: Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome: correlation between phenotype and mosaic ratio in the body and the placenta. *Am J Med Genet A* 158A (2): 465–468, 2012.

6. Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, Samuels ME, Ogata T, Deal CL*: 46, XY gonadal dysgenesis: new *SRY* point mutation in two siblings with paternal germ line mosaicism. *Clin Genet* 82 (6): 505–513, 2012.
7. Abe Y, Aoki Y*, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y: Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: Findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A* 158A (5): 1083–1094, 2012.
8. Koyama Y*, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Hasegawa T, Murata M: Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using uUrinary Pregnanetriolone / Tetrahydrocortisone Ratio and 11 β -hydroxyandosterone by Gas chromatography - mass spectrometry. *Clin Chem* 58 (4): 741–747, 2012.
9. Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S: Deterioration of myocardial tissue Doppler indices in a case of fetal hydrothorax as a promising indication for clinical intervention before the development of nonimmune hydrops fetalis. *Arch Gynecol Obstet* 286 (4): 1079–1080, 2012.
10. Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill G, Pinto C, Manouvrier S, Polak M, Ogata T, C Sultan C*: Screening of *MAMLD1* mutations in 70 Children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of two new mutations. *PLoS One* 7 (3): e32505, 2012.
11. Qin X-Y, Miyado M, Kojima Y, Zaha H Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, Yonemoto J, Fukami M, Ogata T, Sone H*: Identification of novel low-dose bisphenol A targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS ONE* 7 (5): e36711, 2012.
12. Sekii K*, Ishikawa T, Ogata T, Itoh H, Iwashima S: Fetal myocardial tissue Doppler indices before birth physiologically change in proportion to body size adjusted for gestational age in low-risk term pregnancies. *Early Hum Dev* 88 (7): 517–523, 2012.
13. Fukami M*, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T: Complex genomic rearrangements in the *SOX9* 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula. *Am J Med Genet A* 158A (7): 1529–1534, 2012.
14. Ogata T*, Fukami M, Yoshida R, Nagata E, Fujisawa Y, Yoshida A, Yoshimura Y: Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure. *J Hum Genet* 57 (7): 449–452, 2012.
15. Qin X-Y, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H*: Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet* 57 (7): 434–441, 2012.

16. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T*: Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 27 (8): 2541–2548, 2012.
 17. Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T*, Fukami M: *PRKARIA* mutation affecting cAMP-mediated G-protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (9): E1808–1813, 2012.
 18. Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T*: Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics* 7 (10): 1142–1150, 2012.
 19. Moritani M, Yokota I, Tsubouchi K, Takaya R, Takemoto K, Minamitani K, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Itakura M, Ogata T, Sugihara S, Amemiya S: Identification of *INS* and *KCNJ11* gene mutations in type 1B diabetes in Japanese children with onset of diabetes before 5 yr of age. *Pediatr Diabetes*
 20. Suzuki-Suwanai A, Ishii T, Haruna H, Yamataka A, Narumi S, Fukuzawa R, Ogata T, Hasegawa T*: A report of two novel *NR5A1* mutation families: possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and/or depression. *Clin Endocrinol* (accepted).
 21. Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, , Ogata T*: *Mamld1* deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology* (accepted).
 22. Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S*: Possible contribution of fetal size and gestational age to myocardial tissue Doppler velocities in preterm fetuses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (accepted).
 23. Nagasaki K*, Tsuchuya S, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: Neuromuscular symptoms in a patient with familial pseudohypoparathyroidism type Ib diagnosed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Endocr J* (accepted).
 24. Ohishi A*, Ueno D, Matsuoka, H, Kawamoto, F, Ogata T: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and adrenal hemorrhage in a Filipino neonate with hyperbilirubinemia. *Am J Perinatol Reports* (in press).
 25. Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Tamazawa K, Ogata T*: Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS ONE* (accepted).
 26. Ayabe T, Matsubara K, Ogata T, Ayabe A, Murakami N, Nagai T, Fukami M*: Birth seasonality in Prader-Willi syndrome resulting from chromosome 15 microdeletion. *Am J Med Genet A* (accepted).
 27. Fukami M*, Shozu M, Ogata T: Molecular bases and phenotypic determinants of aromatase excess syndrome. *Int J Endocrinol* 2012: 584807, 2012.
 28. Ogata T*, Sano S, Nagata E, kato F, Fumaki M: *MAMLD1* and 46,XY disorders of sex development. *Semi Reprod Med* 30 (5): 410–416, 2012.
 29. Fukami M, Homma K, Hasegawa T, Ogata T*: Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Dev Dyn* 2012 Oct 16. doi: 10.1002/dvdy.23892. [Epub ahead of print].
2. 学会発表
省略
- H. 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

次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究

研究分担者 小原 収 (公財) かずさ DNA 研究所副所長

研究要旨：従来の遺伝学的なアプローチでは解明が困難であった希少遺伝性難病に対して、次世代シーケンサーを用いた先端ゲノミクスのアプローチにより、従来よりもより迅速かつ正確に確定診断を行えるようにする事と、未知の遺伝的原因を明らかにすることで新しい治療法を開発することを目指す。そのために、本分担研究では、一度に複数の既知遺伝子の遺伝子検査を安価に実現する方法の検討を行い、均等化マルチプレックス PCR 法の条件を絞り込んだ。更に、今まで原因が不明であった疾患の遺伝的原因を明らかにするために97検体の全エクソン配列解析を実施し、疾患原因候補のリストを得た。これらの候補変異リストから実際の疾患原因変異に至るための補完法として、血球細胞の RNA シーケンシングで解明可能な情報を予備検討した。

研究協力者

兼松 宗太郎 (公財) かずさ DNA 研究所

A. 研究目的

本分担研究は、厚生労働科学研究費補助金での原発性免疫不全症候群に関する調査研究班、血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究班、自己炎症疾患とその類縁疾患に対する新規診療基盤の確立研究班、先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究班と連携して、次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の遺伝子診断法の開発と解明されていない遺伝的原因を解明することを目的とする。特に今年度の本分担研究では、上述の目的実現のために、次世代シーケンサーを確定診断レベルでつかえる精度で、かつその高いスループットを活かす方法を開発することと、一般化しつつある次世代シーケンシングによる網羅的な疾患原因遺伝子変異探索によって新しい変異を同定することを目標とした。

B. 研究方法

- ・ 症状からでは原因遺伝子が絞り込めず、そのために従来の数少ない遺伝子解析によるアプローチでは遺伝的な確定診断がつきにくい血液・免疫系の難病を対象に、既知遺伝子パネルと次世代シーケンサーを駆使することで、低コストかつ迅速に可能性のある既知遺伝子を一括で検査するための遺伝子パネル解析のパイプラインを構築することを目指し、均等化マルチプレックスPCR法によるライブラリー構築パイプラインの反応条件を最適化する。
- ・ 既知遺伝子の探索のみでは遺伝的な原因が決まらなかった検体について、次世代シーケン

サーを用いたより網羅性の高い解析を実施し、新規な遺伝子変異を同定するためのパイプラインを構築する。

- ・ 従来の全エクソン配列解析を補完するために、血球細胞からのRNAシーケンシングを実施し、それらがどのように全エクソン配列解析を補完しうるかを検討する。

(倫理面への配慮)

当分担研究のために、かずさDNA研究所の倫理審査委員会において、既知遺伝子の遺伝子検査だけでなく、全エクソンシーケンシングとRNAシーケンシングによる免疫不全症遺伝的原因探索についても審査を受け、既に承認を得ている。こうした網羅的解析は、依頼施設での倫理審査での承認を受けていることが前提条件として、その承認を確認後に各研究班からの検体を受け入れた。

かずさDNA研究所では検体採取を行わないため、匿名化情報のみを取り扱う。しかし、全エクソン配列などの網羅性の高い個人ゲノムの情報を取り扱うことから、得られた全エクソン塩基配列データなどの網羅的なゲノム解析データへのアクセスは限定した関係者にのみ留め、情報システムにセキュリティー管理システムを導入して運用した。

C. 研究結果

連携研究班から提出された希望遺伝子パネルには、エクソンを含むPCR産物(サイズ、およそ500 bases:以下、アンプリコンと略)が100-300まで含まれていた。例として、自己炎症疾患の遺伝子パネルでの予備検討によれば、これらのアンプリコンはそれぞれが異なる増幅され易さを有しており、1チューブで100アン

プリコン近くを通常の方法でPCR増幅しようとすると、個々のアンプリコンの最終的な増幅産物量には1000倍以上の違いが生じる。現在広く行われている次世代シーケンシングを用いるアンプリコンシーケンシングでは、この量的なバイアスを大量の塩基配列アウトプットの産生で解決しようとするものであるが、そのような方向は本分担研究で目指す実用的な遺伝子診断法の確立とは一致しない。そのため、我々は、均一化マルチプレックスPCR法により、多数のアンプリコンをなるべく少数の反応チューブでできる限り均等に増幅する方法の検討を行った。この目的のために、かずさDNA研究所で以前に報告した方法を利用することをまず試みた(Nucleic Acids Res. 2005 Aug 8;33(14):e126)。この方法は既にメーカーによりキットが市場化されているが、今後の次世代シーケンシング用のキット開発を視野に入れ、新たな国内メーカーと秘密保持契約を締結して自社製酵素を分与してもらい、この方法での均等化マルチプレックスPCR法の検討をまず行った。しかし、残念ながら、既に市販されているキットを上回る結果を得る事ができなかった。更に、このマルチプレックスアンプリコン増幅の不均等さの一つの大きさがアンプリコンに固有のGC含量などによる事が明らかとなり、用いるポリメラーゼによって増幅バイアスが大きく異なることが判明した。これらの事から、我々の保有技術の均等化マルチプレックスPCR系と、近年の改良を続けられた酵素によるマルチプレックス系(残念ながら、この酵素系には我々の均等化マルチプレックスPCRのトリックは奏功しなかった)の組み合わせで、実用的な遺伝子パネルによる遺伝子診断系を実現することとした。未だ自己炎症疾患用遺伝子パネルの88アンプリコンの増幅に5チューブ程度の異なる反応が必要であるが、このチューブ数を更に減らすための検討を続けている。この自己炎症疾患診断パネル解析には、卓上次世代シーケンサーであるロシュJuniorを用いる事を想定しており、1回のランで5名程度の検査ができることを直近のゴールとしている。

このように、既に既知遺伝子が疾患原因であることの除外診断が終えられている症例について、今年度は97件(家族検体数も含む)の全エクソン配列解析を行った。これらの情報解析パイプラインを立ち上げ、遺伝子変異データを共同研究先の各厚労省研究班の研究者に報告し、バイオインフォマティクスによる絞り込みと実験的な機能解析による絞り込みが続けられている。その中の2件については、ほぼ疾患原因であろうと思われる変異が見出され、現在最終的な機能解析とともに論文作成準備中である。

このように、全エクソン配列解析は非常に有効な方法ではあるが、我が国のように希少疾患症例の蓄積のない状況下では、なかなか見出されたジェノタイプと表現型の間の関係を結論付けるのが困難である。そこで、患者様から非侵襲に採取可能な血球細胞の全転写産物解析(RNAシーケンシング)を全エクソン配列解析結果の補完情報として用いるアプローチの可能性を検討した。その結果、5000-6000万リードを100ベースのペアエンドでイルミナHiSeqで解析した場合、単核球では約65%のヒト転写産物が検出可能であり、白血球ではその割合が60%程度まで下がることが分かった。また、塩基配列のバリエーションコールの結果を見ると、全エクソン配列解析よりも多くの変異が検出される傾向が見られた。

D. 考察

1) 単独既知遺伝子の従来法での遺伝子検査では、免疫不全症ではおよそ30%でしか確定診断に至れていなかったため、遺伝子パネルによる遺伝子検査の実施はこの問題を解決する可能性をもつ。現時点では、100アンプリコンをモデルケースとして行っているが、よりハイスループットの次世代シーケンサーを用いると、前処理のPCR過程がコスト的には最も大きな部分を占めるようになる。そのため、現在では100チューブで行っている反応を10本以下のチューブで実現することは現実的なコストの問題として重要である。1チューブ反応は未だ達成できていないが、5チューブ以下での反応系として確立することは可能だろうと思われる。

2) 家族検体の解析と、日本人の稀な1塩基多型データの蓄積のおかげで、患者様にのみ見られるパーソナル変異の同定まではほぼ確実に行えるようになった。しかし、すべての原因がエクソン領域にある保証はなく、それらの見出された変異の疾患関連性の実証のためには別のアプローチが必須である。RNAシーケンシングは、プロモーター異常、スプライシング異常、発現のアリルバイアスなど、全エクソン配列解析結果を補完する重要なデータであり、全エクソン配列解析よりもむしろ容易に実施できることを実証できた意味は大きい。ただし、マッピングエラーや逆転写時のエラーなど、配列情報の精度は全エクソン解析よりも劣ると考えられ、全エクソン配列解析とRNAシーケンシングの併用が最も効率的だと考えられる。

F. 健康危険情報 なし

E. 結論

1) 効率的な遺伝子検査のために、疾患毎の遺伝子解析パネルを設定し、その例として自己炎症疾患遺伝子パネル(7遺伝子、88アンプリコ

ン)に対して均等化マルチプレックスPCR法の条件検討を行い、5チューブ以下の反応で次世代シーケンサーの前処理増幅プロセスが実現できる条件を見出した。

2) 他の厚労省研究班と連携して、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子構造、発現プロファイル解析を実施し、その結果を共有することにより新しい疾患原因遺伝子変異候補を見出した。これについては、バイオインフォマティクスによる絞り込みと並行して、候補遺伝子変異の機能解析も開始し始めた。

G. 研究発表

1) 論文発表

1: Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A. Rapid Detection of Intracellular p47phox and p67phox by Flow Cytometry; Useful Screening Tests for Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol*. 2013 [Epub ahead of print]

2: Shirasaki Y, Yamagishi M, Shimura N, Hijikata A, Ohara O. Toward an understanding of immune cell sociology: real-time monitoring of cytokine secretion at the single-cell level. *IUBMB Life*. 2013 65(1):28-34.

3: Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 [Epub ahead of print]

4: Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2012 [Epub ahead of print]

5: Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O. A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins. *Curr Chem Genomics*. 2012 6:27-37.

6: Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Autosomal-Dominant Chronic Mucocutaneous Candidiasis with STAT1-Mutation can be Complicated with Chronic Active Hepatitis and

Hypothyroidism. *J Clin Immunol*. 2012 32(6):1213-20.

7: Takezaki S, Yamada M, Kato M, Park MJ, Maruyama K, Yamazaki Y, Chida N, Ohara O, Kobayashi I, Ariga T. Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *J Immunol*. 2012 189(3):1521-6.

8: Suri D, Singh S, Rawat A, Gupta A, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Bilhou-Nabera C, Proust A, Ahluwalia J, Dogra S, Saikia B, Minz RW, Sehgal S. Clinical profile and genetic basis of Wiskott-Aldrich syndrome at Chandigarh, North India. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2012 30(1):71-8.

9: Mohammadzadeh I, Yeganeh M, Aghamohammadi A, Parvaneh N, Behniafard N, Abolhassani H, Tabassomi F, Hemmat M, Kanegane H, Miyawaki T, Ohara O, Rezaei N. Severe primary antibody deficiency due to a novel mutation of mu heavy chain. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012 22(1):78-9.

10: Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield MS, Ariga T, Miyawaki T. Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol*. 2012 95(6):692-6.

11: Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O. Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res*. 2012 19(2):143-52.

12: Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H. Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Rheumatol Int*. 2012 32(12):3761-4.

2) 学会発表

1. 第3回関東甲越免疫不全症研究会 「次世代シーケンサーにより、原因遺伝子の同定に至ったCVIDの1例」釜江智佳子、満生紀子、小原明、野口恵美子、久保田健夫、本間健一、小原 収、今井耕輔、野々山恵章 東京、2012年9月22日

2. 第3回関東甲越免疫不全症研究会「PIDJ ネットワークを介したPID患者の遺伝子解析(2007~2012年)」満生 紀子、大嶋 宏一、今井 耕輔、小原 収、森尾 友宏、水谷 修紀 東京、2012年9月22日

3. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Genetic Analysis for 207 Cases with Primary Immunodeficiency (PID) Consulted to A Single Center through PID Network in Japan (PIDJ) in 5 Years (2007-2011)”. N. Mitsuiki, K. Oshima, K. Imai, O. Ohara, T. Morio, S. Mizutani, Florence, Italy, October 3-6 2012

4. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in Japan.” K. Honma, K. Imai, C. Kamae, H. Ishida, Y. Ito, S. Kojima, T. Yokosuka, H. Kanegane, T. Morio, Y. Sasahara, T. Fujiwara, H. Harigae, Y. Hashii, O. Ohara, S. Nonoyama Florence, Italy, October 3-6 2012

5. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “GENETIC ANALYSIS OF AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME IN JAPAN” R. Nishikomori, J. Abe, K. Izawa, T. Kawai, T. Yasumi, N. Mitsuiki, O. Ohara, I. Toyoshima, K. Hasegawa, H. Ichinose, T. Heike. Florence, Italy, October 3-6 2012

6. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Gain-of-Function Mutation in the STAT1 DNA-Binding Domain” Y. Yamazaki, M. Yamada, S. Takezaki, M. Kato, M.-J. Park, K. Maruyama, N. Chida, O. Ohara, I. Kobayashi, T. Ariga. Florence, Italy, October 3-6 2012

7. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry in patients with chronic granulomatous disease” T. Wada, M. Muraoka, T. Toma, T. Shigemura, K. Agematsu, H. Moriuchi, O. Ohara, T. Morio, A. Yachie. Florence, Italy, October 3-6 2012

8. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “*NLRP3* somatic mosaicism can cause Muckle-Wells syndrome” K. Izawa, R. Nishikomori, H. Oda, K. Nakagawa, E. Hiejima, K. Yoshioka, J. Abe, T. Kawai, T. Yasumi, T. Heike, A. Hijikata, O. Ohara, M. Saito, T. Nakahata, T. Kawai, S. Takei. Florence, Italy, October 3-6 2012

9. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Induced Pluripotent Stem Cells derived from patients with Reticular Dysgenesis” K. Oshima, A. Niwa, K. Imai, S. Nakamura, Y. Jindai, T. Tanaka, M. Yanagimachi, O. Ohara, H. Yabe, S. Kojima, T. Nakahata, S. Nonoyama, M.K. Saito. Florence,

Italy, October 3-6 2012

10. 第6回日本免疫不全症研究会「新規B因子昨日獲得型変異を有する非典型的溶血性尿毒症症候群の1家系」大西秀典、船戸道典、近藤直美、小原収、上村治 東京 2013年1月26日

11. 第6回日本免疫不全症研究会「単一細胞免疫ノアッセイによる *NLRP3* 体細胞モザイクの機能的解析の試み」白崎善隆、志村七子、山岸舞、井澤和司、中川権史、西小森隆太、平家俊男、小原収 東京 2013年1月26日

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定も含む)
なし

次世代シーケンサーを用いた遺伝性小児疾患家系の解析

研究分担者 呉 繁夫 （東北大学医学系研究科小児病態学分野）

研究要旨

次世代シーケンサーを用いた遺伝性小児疾患の病因遺伝子の探査を行う目的で、常染色体優性遺伝を示す家系、及び常染色体劣性遺伝を示す家系の掘り起こしと検体の収集を行った。その結果、常染色体優性遺伝を呈する家系として、ステロイド反応性ネフローゼ家系、家族性血小板減少症家系、膜性増殖性糸球体腎炎家系、を見いだした。また、常染色体劣性遺伝家系としては、點頭てんかん兄弟例、ネフローゼ症候群兄弟例、等を見いだした。この中で、膜性増殖性糸球体腎炎家系に関しては倫理委員会の承認を得て、検体収集と次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を既に開始している。

研究協力者

熊谷直憲（東北大学大学院小児病態学分野）

菊池敦生（東北大学大学院小児病態学分野）

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いて遺伝性小児疾患の疾患感受性遺伝子を同定する目的で遺伝性疾患家系の発掘と収集を行う。

B. 研究方法

東北大学病院小児科、及びその関連病院で診療している遺伝性疾患の対象家系を対象とする。具体的には、3世代以上追跡可能な常染色体優性遺伝を示す家系、及び兄弟例など常染色体劣性遺伝を示す家系の調査を実施した。

（倫理面への配慮）

既に検体収集を実施している膜性増殖性糸球体腎炎家系の遺伝子解析に関しては、東北大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

常染色体優性遺伝の家系として、ステロイド反応性ネフローゼ家系、家族性血小板減少症家系、膜性増殖性糸球体腎炎家系、の3家系を見いだした。また、X連鎖性の精神発達遅滞を示す4世代家系も同定した。

常染色体劣性遺伝家系としては、點頭てんかん兄弟例、ネフローゼ症候群兄弟例、等を調査を行った。この中で、膜性増殖性糸球体腎炎家系に関しては倫理委員会の承認を得て、家族のうち6名（罹患者3名、非罹患者3名）のDNA検体を終了した。この6名のDNA検体について、次世代シーケンサーによるエクソーム解析を既に実施し、3名の罹患者でヘテロ接合体、3名の非罹患者でホモ接合体を示す42個の候補遺伝子変異を同定した。このなかで、その遺伝子発現や1000人ゲノムの情報から候補遺伝子を更に絞り込み、キャピラリー・シーケンサーによる変異の確定を行っている。

D. 考察

常染色体劣性を示す大家系は見いだすことが出来ず、3世代以上追跡できる家系はいずれも常染色体優性家系であった。膜性増殖性糸球体腎炎家系のエクソーム解析で見いだされた候補遺伝子変異の更なる解析で病因遺伝子の同定をめざす。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた遺伝性小児疾患の病因遺伝子の探査を行う目的で、常染色体優性遺伝を示す家系、及び常染色体劣性遺伝を示す家系の掘り起こしと検体の収集を行った。その結果、常染色体優性

遺伝を呈する3家系、常染色体劣性遺伝家系と考えられる兄弟例を2家系見出し、そのうち1家系でエクソーム解析を開始した。

3. その他

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metabol*, 105:553-8, 2012
2. Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Stanier P, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Copp AJ, Greene NDE, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects. *Hum Mol Genet*, 21:1496-503, 2012
3. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, M.D., Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, and Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant in *RNF213* is the strong predictor for early-onset and severe form of Moyamoya disease. *Neurology*, 78:803-10, 2012

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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。