

2012JP005A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

平成24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 直通

（横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授）

平成25（2013）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築 -----	1
松本直通 (資料) 研究全体の流れと進行状況	
II. 分担研究報告	
1. 遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築	13
池川志郎	
2. 次世代シーケンスデータ解析	15
高橋篤	
3. ゲノム研究倫理と網羅的エクソーム解析の対象症例の集積	17
福島義光	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	23

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野））
総括研究報告書

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

本研究は、特に遺伝性難治疾患を対象に、網羅的全エクソーム解析により原因遺伝子を解明することを目的とする。遺伝性難治疾患の原因遺伝子解明は、低頻度で孤発例が多く従来型の連鎖解析が適応できない、責任遺伝子の点変異が原因の場合も多くマイクロアレー解析が有用でないなど技術的な壁が存在した。次世代シーケンス解析は点変異から染色体微細欠失まであらゆるゲノム上の変化の検出が可能で、遺伝性難治疾患の解明が一気に進むと考えられる。平成23年度に、高出力次世代シーケンサー1台と多サンプル処理用エクソームロボットを導入、平成24年度は高出力次世代シーケンサー1台を追加導入し、次世代シーケンス拠点としての環境を整備・強化した。さらにエクソーム解析を用いて Coffin-Siris 症候群 (Nat Genet, 2012)、大田原症候群 (Ann Neurol, 2012)、常染色体劣性遺伝性体短幹症 (J Med Genet, 2012) ミトコンドリア異常症 (Hum Mut 印刷中) などの新規責任遺伝子同定を行った。さらに情報解析において既に一定の成果を出していた解析系に加えて、よりシンプルで変異検出感度の高い新たなインフォーマティクスフローを構築し、エクソーム解析データ解析からバリエーション候補の一覧までの自動化と高率化を行い変異同定の理想的なプロトコルを有するに至った。

分担研究者

池川志郎・理化学研究所ゲノム医科学研究センター・チームリーダー

高橋篤・理化学研究所ゲノム医科学研究センター・チームリーダー

福嶋義光・信州大学医学部遺伝医学予防医学講座・教授

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

平成24年度は、拠点化の環境整備の一環として大量サンプル処理対応と遺伝性疾患の症例集積を加速させること、集積済みのエクソーム解析で疾患原因を解明すること、インフォーマティクス解析を効率化することを目標に研究を進めた。

A. 研究目的

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

遺伝性難治疾患の原因遺伝子解明は、低頻度で孤発例が多く従来型の連鎖解析が適応できない、責任遺伝子の点変異が原因の場

B. 研究方法

① 症例集積と他の研究班との連携

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

② 全エクソーム解析

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

③ 次世代シーケンスデータ解析

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

④ 次世代シーケンスデータの検証

対象とする遺伝性疾患の想定発症モデルに沿って次世代シーケンスで検出した遺伝子異常、稀な SNP 候補群を症例および家族構

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

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

⑥ 次世代データ解析プロトコール

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

C. 研究結果

① 症例の集積

症例集積は順調に進行し精神遅滞関連症候群980例やてんかん関連症候群480例がすでに蓄積している。一般班である長谷川班、岩本班、西野班やAicardi症候群・孔脳症・Coffin-Siris症候群・ATR-X症候群・Sotos症候群・運動過剰症候群・血管型Ehlers-Danlos症候群・Kabuki症候群・ゲノムコピー数異常などの難治性疾患奨励研究あるいはその流れをくむの研究グループから多数症例提供を受けた。

② 全エクソーム解析

HiSeq2000 の追加導入で解析容量は 1200 Gb を超えた。エクソームのための DNA 処理を一度に最大 98 サンプル行うことができるロボットを導入し、エクソーム処理は月に 200 サンプル超の処理が可能となった。

③・④・⑤次世代シーケンスデータ解析・検証・臨床病型との検討

エクソーム解析によって Coffin-Siris 症候群、大田原症候群、常染色体劣性遺伝性短体幹症、ミトコンドリア異常症等の原因が明らかになった。以下、概略を述べる。

I. Coffin-Siris 症候群

Coffin-Siris 症候群(以下 CSS と称す)は、軽度～中等度の精神遅滞・中等度以上の低緊張・てんかん・粗な顔貌と手足第 5 指の低形成などの奇形兆候を特徴と多発奇形・精神遅滞症候群の一つである。稀な疾患でその頻度や遺伝要因の解明は進んでいなかった。CSS を対象に高密度マイクロアレーで解析を行ったが非典型例でのみ染色体微細欠失(6q25 領域の 9.2 Mb 欠失)を認めるも、典型例 10 例で CNV 異常は同定されなかった。典型例 5 例を対象に全エクソーム解析を行い責任遺伝子 *SMARCB1* 異常を 2 例に同定した。更なる解析で計 4 例で異常を認めた。*SMARCB1* はクロマチンリモデリング活性を有する SWI/SNF 複合体の 1 つのサブユニットをコードする。*SMARCB1* 異常で説明されない CSS 症例に対して SWI/SNF 複合体のサブユニットをコードする 16 遺伝子をスクリーニングし、*SMARCA4* 異常を 6

例、*SMARCE1* 異常を 1 例、*ARID1A* 異常を 3 例、*ARID1B* 異常を 5 例で認め、解析した CSS22 症例中 19 症例で SWI/SNF 複合体サブユニットの何れかの異常を認めた (Nat Genet 2012)。

II. 大田原症候群

大田原症候群 (early infantile epileptic encephalopathy with suppression burst : EIEE) は、新生児～乳児期早期に頻回の短い単発性あるいはシリーズ形成性の全般性強直発作で発症し、脳波上顕著な suppression burst を示す、精神運動発達遅滞を伴う難治性のてんかん性脳症である。発症は 10 万に 1 例程度とされるが詳細は不明である。約 75% の EIEE 症例が West 症候群(點頭てんかん)に移行し、一連の年齢依存性てんかん性脳症群と考えられる。EIEE の多くは脳形成異常を伴うが、脳形態異常を認めない症例が存在し、遺伝的な素因が示唆されていた。これまでに X 染色体上に位置する *ARX* の変異が男児例で、9 番染色体上の *STXBP1* の異常が男女の両方の症例で報告されている。しかし EIEE 症例の過半数は上記 2 遺伝子異常で説明がつかない。*ARX* 及び *STXBP1* 異常の無い EIEE 12 例において全エクソーム解析を行った。内訳は男児 6 例、女児 4 例であった。12 例で 964 バリエントを検出した。このうち 3 例で *KCNQ2* のミスセンス変異を検出した。両親検索の結果 de novo で生じた変化であった。このことは EIEE の原因として *KCNQ2* が重要な位置を占めていることを強く示唆する (Ann Neurol 2012)。*KCNQ2* は、元々 Benign familial neonatal seizure 1 の責任遺伝子の一つとして報告されていた。今回の我々の発見と他

のグループによる neonatal epileptic encephalopathy の変異報告と合わせ、*KCNQ2* 変異が良性のてんかんに限らず重症型のてんかんの原因であることが強く示唆された

III. 常染色体劣性遺伝性短体幹症

短体幹症は、脊椎の異常により体幹（胴体）の短縮を起こす疾患の総称である。いずれの疾患も 1 種類の遺伝子の変異により発症する単一遺伝病で、側彎など脊椎の変形、早期の椎間板の変性、四肢関節の異常など、多様な骨格異常を引き起こす。3 人の 1 型短体幹症患者を有する 1 つの家系のエクソーム解析を行い 3 人に共通する遺伝子変異として *PAPSS2* 遺伝子の 1 塩基の挿入変異を同定した。さらに類似の病態を示す非家族性の患者 3 人について、*PAPSS2* 遺伝子の変異を調べたところ、いずれの患者にも相同染色体の両方に *PAPSS2* 遺伝子の機能を喪失させる異なる変異を同定し *PAPSS2* 遺伝子異常が 1 型短体幹症の原因であることが明らかになった (J Med Genet, 2012)。

IV. ミトコンドリア異常症

反復性新生児発症代謝不全を呈する血族婚家系（メキシコ人）で臨床的に診断のつかない病型に関して、SNP アレーを用いたホモ接合性マッピングとエクソーム解析を行い責任遺伝子である *UQCRC2* のホモ接合性ミスセンス変異を特定した。*UQCRC2* はミトコンドリア呼吸鎖複合体 III のコアタンパク質をコードしミトコンドリア呼吸鎖の解析では複合体 III の発現・機能低下を認め遺伝子異常が来す病態が明らかになった (Hum Mut in press)。

⑦ 次世代データ解析プロトコール

Novoalign/GATK をマッピングツールとしてアノテーションには ANNOVA を組み合わせた効率的なエクソーム解析フローを確立、これまでに 1500 例を超えるエクソーム解析を終了し多数の疾患遺伝子異常同定に効果を上げている。

D. 考察

メンデル遺伝性疾患を解析対象にした次世代シーケンス拠点として解析環境を強化するとともにエクソーム解析において複数の原因未解明の疾患において責任遺伝子を単離した。さらに情報解析系でも大量解析系にも対応できる効率的・効果的解析系を確立しエクソーム解析の大量解析が進行している。

E. 結論

次世代シーケンサー解析拠点としてアクティブに機能できる環境を整備し、貴重なサンプル集積とエクソーム解析が進行し原因不明の遺伝性疾患の解明が進んでおり、エクソーム解析拠点として十分に機能していると考えている。

F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていない。

G. 研究発表

*Saitsu H, Kato M, Matsumoto N.

- Haploinsufficiency of *STXBPI* and Ohtahara syndrome. Jasper's basic mechanism of the epilepsies, 4th edition, edited by Noebels J, Avoli M, Rogawski M, Olsen RW, and Delgado-Escueta AV. Oxford University Press Page 824-834, 2012.
- Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, *Saitsu H. *De novo* and inherited mutations in the gene encoding a type IV collagen $\alpha 2$ chain (*COL4A2*) cause porencephaly. *Am J Hum Genet* 90 (1):86-90, 2012
- Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki T, Saitsu H, Miyake N, Masuda M, *Matsumoto N. Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing. *Hum Genet* 131: 591-599, 2012
- Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Nishiyama K, Tsurusaki T, Doi H, Miyake N, Ryoo N-K, Kim JH, Yu KS, *Matsumoto N. A family of oculofaciocardiodental syndrome (OFCD) with a novel *BCOR* mutation and genomic rearrangements involving *NHS*. *J Hum Genet* 57(3): 197-201, 2012
- Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, *Matsumoto N. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of *NFLX* cause Sotos-like syndrome. *J Hum Genet* 50(3): 207-211, 2012
- *Saitsu H, Osaka H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N. A girl with early-onset epileptic encephalopathy associated with microdeletion involving *CDKL5*. *Brain Dev* 34(5): 364-367, 2012
- Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, 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, *Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A Variant of *RNF213* Predicts Early-Onset and Severe Form of Moyamoya Disease. *Neurology* 78: 803-810, 2012
- *Hamdan FF[#], Saitsu H[#] (# denotes equal contribution), Masuko K, Gauthier J, Dobrzaniecka S, Spiegelman D, Lacaille JC, Décarie JC, Matsumoto N, Rouleau GA, Michaud JL. Mutations in *SPTAN1* in intellectual disability and pontocerebellar atrophy. *Eur J Hum Genet* 20 (7): 796-800, 2012.
- *Saitsu H[#], Kato M[#] (# denotes equal contribution), Shimono M, Senju A, Tanabe S, Kimura T, Nishiyama K, Yoneda Y,

- Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Association of genomic deletions in the *STXBPI* gene with Ohtahara syndrome. *Clin Genet* 81(4): 399-402, 2012
- Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, *Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: Report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *Am J Med Genet Part A* 158 (4): 861-868, 2012
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, *Miyake N, *Matsumoto N (*: co-corresponding). Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44(4):376-378, 2012
- *Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Saitsu H, Salomons GS, Jakobs C, Aida N, Shinka T, Kuhara T, Matsumoto N. Contiguous deletion of *SLC6A8* and *BAP31* in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol Genet Metab* 106(1): 43-47, 2012
- *Writzl K, Primec ZR, Stražišar BG, Osredkar D, Pečarič-Meglič N, Kranjc BS, Nishiyama K, Matsumoto N, Saitsu H. Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with *SPTANI* mutation. *Epilepsia* 53(6): e106-110, 2012
- *Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Whole exome sequencing identifies *KCNQ2* mutations in Ohtahara syndrome. *Ann Neurol* 72(2): 298-300, 2012
- *Saitsu H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. *CASK* aberrations in males with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. *Epilepsia* 53(8): 1441-1449, 2012
- Miyake N[#], Elcioglu NH[#] (# denotes equal contribution), Iida A, Isguven P, Dai J, Murakami N, Takamura K, Cho T-J, Kim O-H, Nagai T, Ohashi H, Nishimura G, Matsumoto N, Ikegawa S. *PAPSS2* mutations cause autosomal recessive brachyolmia. *J Med Genet* 49(8): 533-538, 2012
- *Terao Y, Saitsu H, Segawa M, Kondo Y, Sakamoto K, Matsumoto N, Tsuji S, Nomura Y. Diffuse central hypomyelination

- presenting as 4H syndrome caused by compound heterozygous mutations in POLR3A encoding the catalytic subunit of polymerase III. *J Neurol Sci* 320(1-2): 102-105, 2012
- Miyatake S, Miyake N, Doi H, Ogata K, Kawai M, *Matsumoto N. A novel SACS mutation in a Japanese family with atypical phenotype of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Intern Med* 51: 2221-2226, 2012
- Tsurusaki Y, *Kosho T (# denotes equal contribution), Hatahaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N (*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFDI* mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. *Clin Genet* (in press)
- Yamashita S, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Iai M, Aida N, Tanaka Y. Neuropathology of Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement and High Lactate caused by a homozygous mutation of *DARS2*. *Brain Dev* (in press)
- *Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, Matsumoto N, Ishii M, Saitsu H. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to *SPTAN1* gene mutation. *Brain Dev* (in press)
- Tsurusaki Y, *Saitoh S, Tomizawa K, Sudo A, Asahina N, Shiraishi H, Ito J, Tanaka H, Doi H, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N (* denotes co-corresponding). A *DYNC1H1* mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenet* (in press)
- Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori F, Yamazaki A, Subo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, *Saitsu H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* (in press)
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Miyake N, Saitsu H, *Matsumoto N. A De Novo Deletion at 16q24.3 Involving *ANKRD11* in a Japanese Patient With KBG Syndrome. *Am J Med Genet Part A* (in press)
- *Miyatake S, Touho H, Miyake N, Ohba C, Doi H, Matsumoto N. Sibling cases of Moyamoya disease with different *RNF213* genotypes and varying clinical course and severity. *J Hum Genet* (in press)
- Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi

H, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, *Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. *J Hum Genet* (in press)

Higashiyama Y, *Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, PhD, Miyake N, MD, PhD, Saitsu H, Ohba C, Fukai R, Miyatake S, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. A novel homozygous *SCARB2* mutation causes late-onset progressive myoclonus epilepsy without renal failure. *Mov disord* (in press)

*Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, *Matsumoto N (*: co-corresponding). *KDM6A* point mutations cause Kabuki syndrome. *Hum Mut* 34 (1): 108-110, 2012.

Ikegawa S, Nakashima M, Matsumoto N. TGF- β and Genetic Skeletal Diseases. "TGF β in Human Disease" edited by Moustakas A and Miyazawa K. Springer (submitted)

Kimura-Ohba S, Kagitani-Shimono K, Hashimoto N, Nabatame S, Okinaga T, Murakami A, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Hojo K, Tomita R, Taniike M, *Ozono K. A case of cerebral hypomyelination with spondylo-epi-metaphyseal dysplasia. *Am J Med Genet Part A* (in press)

*Miyake N[#], Yano S[#] (# denotes equal contribution), Sakai C, Hatakeyama H, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, *Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mut* (in press)

2. 学会発表

2012 Illumina Asica Pacific Scientific Summit [Exome analysis in mendelian disorders] Naomichi Matsumoto (Invited speaker) (Sheraton Mirage Resort & Spa Gold Coast, Gold Coast, Australia, April 24, 2012)

神戸大学大学院医学研究科講義・松本直通
「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24
年5月29日・神戸大学医学部

第5回みやこ小児神経臨床懇話会（特別講演）・松本直通・「小児神経疾患における遺伝子研究の新潮流」H24年6月9日・メルパルク京都

2012 イルミナ次世代シーケンサーユーザーフォーラム・松本直通（招待講演）・「遺伝性疾患のエクソーム解析」・H24年6月20日・東京国際フォーラム

European Human Genetics Conference 2012
Naomichi Matsumoto "Genetic abnormalities in Coffin-Siris

syndrome”(poster) (Nuremberg Conference Center, Nuremberg, Germany, June 24-24, 2012)

次世代シーケンス拠点班（松本班）講演会
松本直通「次世代シーケンスを用いた
遺伝性疾患へのアプローチ」H24 年 7
月 10 日・大宮ソニックシティ・大宮

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター学術
セミナー 松本直通「遺伝性疾患のエ
クソーム解析」・H24 年 7 月 13 日・埼
玉医科大学

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克
服研究事業「次世代遺伝子解析装置を
用いた難病研究」平成 24 年度第 1 回公
開ワークショップ・松本直通「遺伝性
難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点
の構築」H24 年 9 月 6 日京都大学医学
研究科芝蘭会館

第 34 回日本生物学的精神医学会・シンポジ
ウム 1・松本直通（シンポジスト）「自
閉症スペクトラムとてんかんに着目し
たゲノム解析」2012 年 9 月 28 日・神戸
国際会議場

厚生労働科学研究費・難治性疾患克服研究
事業神経変性疾患に関する調査研究
班・「病態に根ざした ALS の新規治療開
発」分科班・平成 24 年度ワークショッ
プ・松本直通「次世代シーケンサーを
活用した遺伝性疾患の網羅的エクソ
ーム解析」平成 24 年 10 月 5 日@東京(シ
ェンバッハサボー)

Translational Genomics Conference 2012
Naomichi Matsumoto (Keynote speaker)
Exome sequencing in mendelian disorders.
(Hyatt Reagency Jeju, Jeju, Korea, Oct 13,
2012)

生命医薬情報学連合大会 2012・松本直通(招
聘講演)「遺伝性疾患のエクソーム解
析」平成 24 年 10 月 17 日@東京(タワ
ーホール船堀)

人類遺伝学会第 57 回大会・ランチョンセミ
ナー 1 「遺伝性疾患の効率的な次世代
シーケンス解析」(アジレント共催) 平
成 24 年 10 月 25 日京王プラザホテル(東
京)

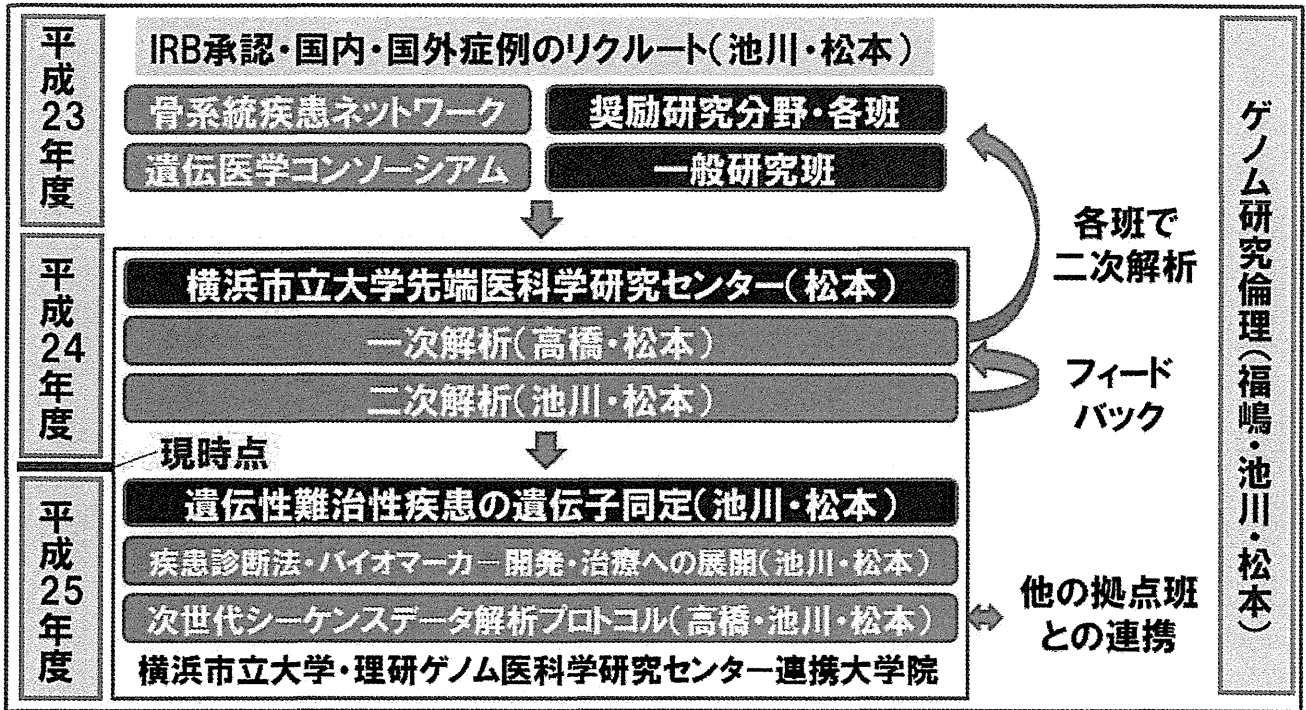
The 57th annual meeting, Japanese Society of
Human Genetics・Naomichi Matsumoto
(Symposist)“Isolation of genes causative
for genetic diseases by next generation
sequencer”in Symposium 5 entitled “Next
Generation Sequencing for
disease-genome analysis”. Oct 25, 2012 at
Keoi Plaza Hotel, Tokyo

ゲノム解析懇話会(トランスジェニック共
催)・松本直通「次世代シーケンスを用
いた疾患ゲノム解析」平成 24 年 10 月
25 日京王プラザホテル(東京)

人類遺伝学会第 57 回大会・基本講座・いま
さら聞けない「遺伝医学」・松本直通(講
師)「次世代シーケンサー入門」平成 24
年 10 月 26 日京王プラザホテル(東京)

- 新学術領域研究「転写サイクル」平成 24 年度第 1 回領域会議・松本直通「SWI/SNF 複合体異常が来す Coffin-Siris 症候群」平成 24 年 10 月 29 日・長崎大学医学部良順会館
- American Society of Human Genetics Meeting 2012. Matsumoto N, Tsurusaki Y, Miyake N Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome November 8, 2012 at Moscone Center, San Francisco, CA, USA
平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム成果報告会・松本直通「発達障害に関わる分子異常探索」平成 24 年 11 月 21 日 京都リサーチパーク・京都
- 平成 24 年度脳科学戦略推進プログラム課題 F 発達障害研究チーム第二回分科会・松本直通「発達障害に関わる分子異常探索」平成 24 年 11 月 22 日 京都リサーチパーク・京都
- The 12th annual meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies. Matsumoto Naomichi (oral presentation) “Medelian exome” Nov 29, 2012 at Seoul National University Hospital, Seoul, Korea.
- 第 152 回染色体研究会・特別講演・松本直通「エクソーム解析」平成 24 年 12 月 1 日・東京医科大学病院・東京
- 精神・神経疾患研究開発費 23-5 「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」平成 24 年度「西野班」班会議特別講演・松本直通「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年 12 月 8 日・JA 共済ビル・東京
- 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ・精神のオミックス(オーガナイザー内匠透・松本直通)松本直通「発達障害におけるゲノム解析：次世代技術を用いて」(シンポジスト)平成 24 年 12 月 13 日福岡国際会議場・福岡
- Advans 研究会 2012・招聘講演・松本直通「遺伝性疾患のエクソーム解析」平成 24 年 12 月 15 日ホテルグランドパレス・東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- PCT/JP2012/83113 松本直通／鶴崎美德／三宅紀子・コフィン-シリス症候群の検出方法・平成 24 年 12 月 20 日
- PCT/JP2012/77903 才津浩智／松本直通・孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法・平成 24 年 10 月 29 日
- 特願 2012-180356・松本直通／三宅紀子・ミトコンドリア複合体 III 欠乏症の確定診断法・平成 24 年 8 月 16 日

研究全体の流れと進行状況



平成24年度厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))
分担研究報告書

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

分担研究課題：遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

池川志郎 (理化学研究所ゲノム医科学研究センター 骨関節疾患研究チーム)

様々な分野の専門医の協力下に、遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析研究の基盤である疾患のサンプルの集積体制を構築した。収集した症例を用いて、いくつかの疾患で、未知の疾患遺伝子の同定に成功した。

1. 研究目的

遺伝性難治疾患を対象に、網羅的全エクソーム解析により原因遺伝子を解明するための研究基盤を構築する。それを基に実際に全エクソーム解析を行い、疾患遺伝子を同定する。

2. 研究方法

1. 症例集積と一般研究班との連携体制の構築

専門医との各種ネットワーク等を通じて遺伝性難治疾患の集積を行う。

2. 次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析

松本研究室のシステムによる全エクソーム解析により検出された塩基異常を情報解析、分子遺伝学的解析により検証する。この検証過程を松本研究室でのプロトコール作成へフィードバックする。

3. 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討

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

3. 研究結果

1. 症例集積と一般研究班との連携体制の構築

骨系統疾患コンソーシウム、胎児骨系統疾患ネットワーク等の遺伝性難治疾患の専門医集団、厚生省難病研究班(澤井班、渡邊班、戸山班他)、エキソーム解析の一般研究班(岩本班等)とのネットワーク

を構築し、遺伝性疾患、難治疾患の患者サンプルを集積する体制を確立した。

2. 次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析

以下のプロジェクトで、変異の発見に成した。

1) 骨頭骨化障害の1家系で、エクソーム解析により、*PAPSS2* 遺伝子の新規の遺伝子変異を発見した。更に、*PAPSS2* 遺伝子変異は、短体幹症 (brachyolmia)を起すことを発見した (Miyake et al. J Med Genet 2012)。

2) Opsismodysplasia の原因遺伝子が、*INPPL1* (inositol polyphosphate phosphatase-like 1) 遺伝子であることを発見した (論文投稿/査読中)。

3) Beighton 型脊椎骨端骨幹端異形成症 (spondyloepimetaphyseal dysplasia)、Ehlers-Danlos 症候群 progeroid form の原因遺伝子を発見した (論文投稿/査読中)。

3. 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討

PAPSS2 の遺伝子変異を発見した症例の詳細な臨床情報を分析し、臨床病型との関係を検討した。*PAPSS2* 変異の表現型は、従来のカテゴリの常染色体劣性型の短体幹症である事を発見し、その表現型を確立した (論文投稿/査読中)。

4. 考察

専門医の協力下に、研究の基盤である難治疾患のサ

ンプルの集積体制を、研究の出口である患者さんへの情報の還元体制と共に確立することができた。

1,000例近くの in house の日本人の多型データなど、拠点班に集積された情報、ノウハウにより、遺伝子同定の過程が洗練、効率化され、未知の疾患遺伝子の同定に成功することができた。プロジェクトの正当性、妥当性は証明できたので、今後、如何にプロジェクトの規模を拡大していくかが課題であろう。

5. 結論

次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析により遺伝性難治性疾患の原因遺伝子を同定する体制を確立した。

6. 研究発表

1. 論文発表

Miyake N, Elcioglu NH, Iida A, Isguven P, Dai J, Murakami N, Takamura K, Cho TJ, Kim OH, Hasegawa T, Nagai T, Ohashi H, Nishimura G, Matsumoto N, Ikegawa S. PAPSS2 mutations cause autosomal recessive rachyolmia. J Med Genet. 2012; 49:533-538

2. 学会発表 (招待講演)

- 1) Ikegawa S. Genomic study of bone and joint diseases - Where we were, and where we are going. Nature Genetics China. Hangzhou. May 19.2012
- 2) Ikegawa S. Rare Diseases and Common Problems: Lessons from One to the other. 6th Annual Introductory Course on Skeletal Dysplasias. Lausanne. Jul.05.2012
- 3) Ikegawa S. Skeletal Dysplasia in Mice and Human. 22nd Annual Scientific Meeting/1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting. Perth. Sep 3.2012
- 4) Ikegawa S. Genetic approaches. 1st International Scoliosis Genetics Interest Group meeting. Dallas. Oct 15.2012
- 5) Ikegawa S. Genomic study of common polygenic diseases - where we are, and where we are going. 21st KOGO Annual Conference. Seoul. Sep 13. 2012.
- 6) Ikegawa S. Association studies of bone and joint diseases by China-Japan collaboration. 7th

International Congress of Chinese Orthopaedic Association. Beijing. Nov 17. 2012.

- 7) Ikegawa S. Genomic study of bone and joint diseases - where we were, and where we are going. 12th Annual meeting of the EAUHG (East Asian Union of Human Genetics Societies). Seoul. Nov 29.2012
- 8) 池川志郎: 遺伝性疾患の原因遺伝子をみつけるには: 骨の病気を例に、遺伝医学研究会協賛セミナー、東京、2012.5.10
- 9) 池川志郎. 股関節疾患と遺伝 - 大腿骨頭壊死症を中心に -, 第4回股関節疾患研究会、福岡、2012.8.01
- 10) 池川志郎: 骨・関節疾患のゲノム解析: パーソナルゲノム時代の疾患研究、日本人類遺伝学会第57回大会、東京、2012.10.26
- 11) 池川志郎: 小児整形外科疾患の遺伝子解析、第27回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋、2012.10.27

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

分担研究課題：次世代シーケンズデータ解析

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

研究要旨：

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点として、次世代シーケンズのデータ解析を実施し、一塩基多型(SNP)、欠損・欠失などを検出した。大規模なエクソーム解析を実施するための、並列・高速で解析可能なシステムの構築を行なっている。次世代シーケンズのデータ解析に必要な、新規アルゴリズム・プログラムの開発を行なっている。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. 次世代シーケンズデータの統計・情報解析

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

2. 網羅的エクソームデータ解析の情報基盤の構築

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

3. 次世代シーケンサー解析アルゴリズムの開発

次世代シーケンサーの配列データを解析する新規アルゴリズム・プログラムの研究・開発を行う。

C. 研究結果

1. 次世代シーケンズデータの統計・情報解析

今年度も引き続き、次世代シーケンサーによる全エクソームデータの情報解析を実施した。解析には、公開されている様々なツールを用いた。各サンプルに存在する一塩基多型(SNP)、

短い塩基の挿入・欠失などの結果が得られた。

2. 網羅的エクソームデータ解析の情報基盤の構築

引き続き、次世代シーケンサーのデータを効率に解析できるシステムの構築を行なっている。独自に開発・作成したプログラムを基に解析システムの構築をしている。網羅的エクソーム解析拠点として、大規模エクソーム解析を並列・高速に解析可能とするシステム構築を引き続き進めている。

3. 次世代シーケンサー解析アルゴリズムの開発

次世代シーケンサーの解析において、挿入・欠失などの多型の検出は、現時点ではまだ不完全な状況である。そこで、高精度にこれらの多型を検出可能なアルゴリズムの開発・研究に取り組んでいる。

D. 考察

次世代シーケンサーをもちいた解析により、次々と疾患の原因遺伝子が明らかになっている。技術の発展により、次世代シーケンサーから算出されるデータ量は増加している。これらの大規模なデータを如何に、正確にかつ高速に解析するかが重要となっている。現在、次世代シーケンサーを使用した大規模な研究では、データ解析がボトルネックになりつつある。この問題を解決するために、大規模エクソームデータを並列・高速かつ効率的に解析可能

なシステムの開発・構築は解決すべき、非常に重要な課題のひとつであると考えられる。

E. 結論

遺伝性難治疾患の網羅的全エクソーム解析拠点の次世代シーケンスデータ解析の情報・統計解析を実施した。並列・高速に大規模エクソームデータ解析を可能とするシステムの構築を行なっている。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築
分担研究課題：ゲノム研究倫理と網羅的エクソーム解析の対象症例の集積
研究分担者 福嶋義光 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座 教授

研究要旨：

パーソナルゲノム時代における網羅的エクソーム解析の倫理的課題を明らかにし、個人ゲノム情報を適切に医療の場に反映させる医療提供体制のあり方、網羅的エクソーム解析を行う際のインフォームドコンセントのあり方等を検討するための情報収集と共に、対象となる症例の集積に努めた。

研究協力者

涌井敬子(信州大学医学部遺伝医学・予防医学)

Genoglyphix® (Signature Genomic Laboratories, LLC)を用いて解析した。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1) ゲノム研究倫理の検討のための情報収集

全ゲノムシーケンスによりもたらされる情報の倫理的課題について、文献および学会参加等により情報を収集するとともに、2013年4月1日から施行される新しい「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」の記載内容について検討した。

2) 症例集積

原因不明の既知の先天奇形症候群あるいは診断未確定の原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群(MCA/MR)のうち、網羅的エクソーム解析の対象となる詳細な臨床情報を得られる症例を抽出する。次世代シーケンス法で検出が困難な、数十kb~数Mbのゲノムコピー数変化が発症の原因となっている症例を除外しておくため、収集した症例について、マイクロアレイ染色体解析をCGH法を原理とするCGXアレイ(Roche, 135K Oligo probe)を用いて実施、

C. 研究結果

1) ゲノム研究倫理の検討のための情報収集

1-1. Incidental findings について

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

の医師に伝え結果の開示について検討して頂く等の対応については準備しているが、患者以外の血縁者の解析に際しても、患者の症状との関連で検討している遺伝子以外の情報をどう扱うかといったことの検討も必要となってくると考えられる。

次世代シーケンサーで産出されるデータの中に予期しない重要な遺伝的情報が包含されていた場合の扱い方については、2013年4月1日から施行予定の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（新3省指針）に次のような記載があることがわかった。

<偶発的所見の開示に関する方針に関する細則>

研究責任者は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究の過程において当初は想定していなかった提供者及び血縁者の生命に重大な影響を与える偶発的所見(incidental finding)が発見された場合における遺伝情報に関する方針についても検討を行い、提供者又は代諾者等からインフォームド・コンセントを受ける際には、その方針を説明し、理解を得るように努めることとする。

<遺伝情報の非開示に関する細則>

研究責任者は、提供者が自らの遺伝情報の開示を希望していない場合であっても、その遺伝情報が提供者及び血縁者の生命に重大な影響を与えることが判明し、かつ、有効な対処方法があるときは、研究を行う機関の長に報告することとする。

研究を行う機関の長は、特に下記の事項についての考慮を含む開示の可否並びにその内容及び方法についての倫理審査委員会の意見を求め、それに基づき、研究責任者、提供者の診療を担当する医師及びその医師が所属する医療機関の長と協議することとする。その結果を踏まえ、研究責任者は提供者に対し、十分な説明を行った上で、当該提供者の意向を確認し、なお開示を希望しない場合には、開示してはならないこととする。

- ・提供者及び血縁者の生命に及ぼす影響
- ・有効な治療の有無と提供者の健康状態
- ・血縁者が同一の疾患等に罹患している可能性

- ・インフォームド・コンセントに際しての研究結果の開示に関する説明内容

1-2. 匿名性の保持について

ゲノム研究において、匿名性の確保は極めて重要であるが、Science の1月号に、Gymrek らによる衝撃的な論文が掲載された（Science 339:321-324, 2013）。“Identifying personal genomes by surname inference”と題するもので、1,000ゲノム、HapMap, CEPH, など公的にアクセス可能なデータベースの情報のみで、個人を同定できる場合があることが示された。

2) 症例集積

収集した 42 例の原因不明の既知の先天奇形症候群あるいは診断未確定の MCA/MR 症例について、マイクロアレイ染色体解析を実施した。

7 例（17%）に各症例の有する先天異常と関連している可能性の高い 2Mb 以上のゲノムコピー数異常（pathogenic CNV: pCNV）を認めた。その他 7 例は、検出されたゲノムコピー数異常と臨床症状との関連が不確定であり、29 例は臨床症状との関連はないと考えられているコピー数異常（benign CNV: bCNV）のみであった。pCNV が検出された 7 症例以外は網羅的エクソーム解析の候補と考えられ、主治医に詳細な臨床所見の情報提供を依頼している。

D. 考察

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

パーソナルゲノム解析研究の進展は、人間一人一人の疾病罹患リスクを明らかにするが、これは生まれながらにして、将来の健康状態には格差が存在す

ることを示すことであり、「人類皆平等」という誰もが信じて疑わない道徳感にどのような影響を与えるか、また新たな差別が生まれぬか、について生命倫理の観点から検討を開始しておく必要がある。

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

パーソナルゲノム解析研究の成果を臨床応用するためには検査の精度管理が前提となるので、各検査機関に要求される設備、検査手順書、人材育成のあり方などを検討しておく必要がある。

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

次世代シーケンサーを用いた研究における課題の一つとして、偶発的所見が得られたときの対応があるが、新3省指針に、明確な記載がなされたので、今後それに従って実施することになる。

ゲノム研究において、匿名性が破られる事態が生じかねないという報告がなされた。ゲノム研究で得られた成果は、匿名性を確保し、プライバシーを守った上で、得られた成果は幅広く公表し、さまざまな研究に役立てることを原則に、今まで行われてきた。しかし、公的データベースに個人のゲノム情報を掲載することには、新たなリスクを伴うことを再認識する必要がある。今後、次世代シーケンサーを用いた研究にサンプルを提供する被検者へのインフォームドコンセントの内容を再検討し、一般社会のゲノム研究への理解を深化させていく必要がある。

原因不明の先天異常症例に対してマイクロアレイ染色体解析を実施すると、約20%にpCNVが検出されることが知られているが、本研究でも収集した42例の原因不明の先天異常症例のうちほぼ同率の

pCNVが検出された。この結果は、原因不明の遺伝性難治疾患の原因遺伝子探索に際しては、網羅的エクソーム解析の前にマイクロアレイ染色体解析によりゲノムコピー数異常を除外しておくことが有用であることを示している。

E. 結論

パーソナルゲノム時代における網羅的エクソーム解析の倫理的課題について検討した。個人ゲノム情報を適切に医療の場に反映させる医療提供体制のあり方についての提言をめざしてさらに情報収集を継続する。網羅的エクソーム解析の対象となる症例のさらなる集積に努める。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y. Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012 Feb;158A(2):412-6.

Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *Am J Med Genet A*. 2012 Apr;158A(4):861-8.

Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu