

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

研究課題：地域集積・収集した稀少疾患の系統的原因究明

分担研究項目：次世代シーケンスによるゲノム解析，原因遺伝子同定

分担研究者：

吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・人類遺伝学・教授）

木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・人類遺伝学・助教）

研究協力者：

三嶋博之（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・人類遺伝学・助教）

松本直通（横浜市立大学大学院医学研究科・遺伝医学・教授）

新川詔夫（北海道医療大学・学長）

太田 亨（北海道医療大学個体差健康科学研究所・准教授）

近藤達郎（医療型児童入所施設みさかえの園むつみの家）

研究要旨

本研究分担班の研究目的は (1) 患者試料を用いて exome 解析，(2) 原因遺伝子の同定 である。これらの実験を通して，本来の意味での“稀少”疾患に関して，現状の genome 解析手法でどこまで同定可能で，稀少疾患解析にどのような問題点があるのかを把握する。

A. 研究目的

本年度は，次世代シーケンサーを用いて種々の稀少疾患の exome 解析を行い，原因遺伝子同定を目的とした。

昨年度から引き続き，紫外線感受性症候群 A 群（UV sensitive syndrome A

complementation group: UV^SS-A），心臓伝導障害（Burgada 症候群をふくむ心電図異常），筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS），LMC 症候群（Leukodystrophy, Microcephaly, Cerebral malformation

syndrome), 歌舞伎症候群 (Kabuki syndrome: MLL2, KDM6A 変異陰性群), 家族性筋線維腫症 (familial myofibrotomatosis), 間葉性異形成胎盤 (Placental Mesenchymal dysplasia), 家族性肺がん, 腎骨化症, 等の data 取得を行い, 原因遺伝子同定を試みた。

紫外線感受性疾患群には, 色素性乾皮症 (Xeroderma Pigmentosum), Seckel 症候群, Fanconi 貧血, Cockayne 症候群, Nijmegen Breakage syndrome 等が含まれる。これらの疾患について, 遺伝子変異が確定されていない疾患も多いので, 荻グループが中心となって, パーソナルタイプの次世代シーケンサーを用いた迅速診断法の確立を行った。

B. 研究方法

1) Exome 解析

エクソン部 DNA の濃縮は, Agilent 社の SureSelect All exon v2 (38M) キットまたは, All exon v4+UTR を使用して行った。基本は, All exon v4+UTR を使用しているが, UVSSA の exome 解析に限って All exon v2 を使用した。

外部委託時あるいは, 拠点班である松本班でのデータ取得時には, 次世代シーケンサーは GAIIX または HiSeq (illumina 社) を使用し, 長崎ににおいて自らデータ取得する際には 5500xlSOLiD システムを使用した。

得られたデータが 5500xlSOLiD システムによる場合には NovoalignCSMPI (Novocraft 社, Malaysia) を使用し, Illumina 系のデータの場合には, NovoalignMPI を使用してゲノム塩基配列に整列させた。生成された VCF file を Genome Data Toolkit (GATK) を用いて, 細かい部分々々を再配列, 微調整させ Base-quality score を計算させた。小さな欠失(deletion)・挿入(insertion)については, Dindel プログラムを用いて検出を行った。

検出された塩基置換および Insertion/Deletion, は ANNOVAR によって注釈付けした。dbSNP (Build 135) に登録されている rs 番号は, annotation file に含めた。1000Genome project に登録されている 2500 名の 4x(depth)ゲノム塩基配列決定によって得られているアレル頻度, NHLBI exome プロジェクトに登録されている 6500 名の exome データによって得られているアレル頻度は, そのアレル頻度を annotation file に含めて記述した。また, Annotation file には Segmental duplication 情報を記述した。以上の全ての情報をもとに疾患の候補変異の選択時には, rs 番号, アレル頻度, 個人での zygoty の状況を組み合わせて deleterious (有害)な変異を候補遺伝子, 候補変異として残す作業 (filtering step, prioritizing step) を行った。有害と推定

された変異については、HRM 法による変異スクリーニング法を確立し変異確認および380人の一般集団コント

ロール検体での変異のスクリーニングを行った。

ここに、exome解析のパイプライン概要を示す。

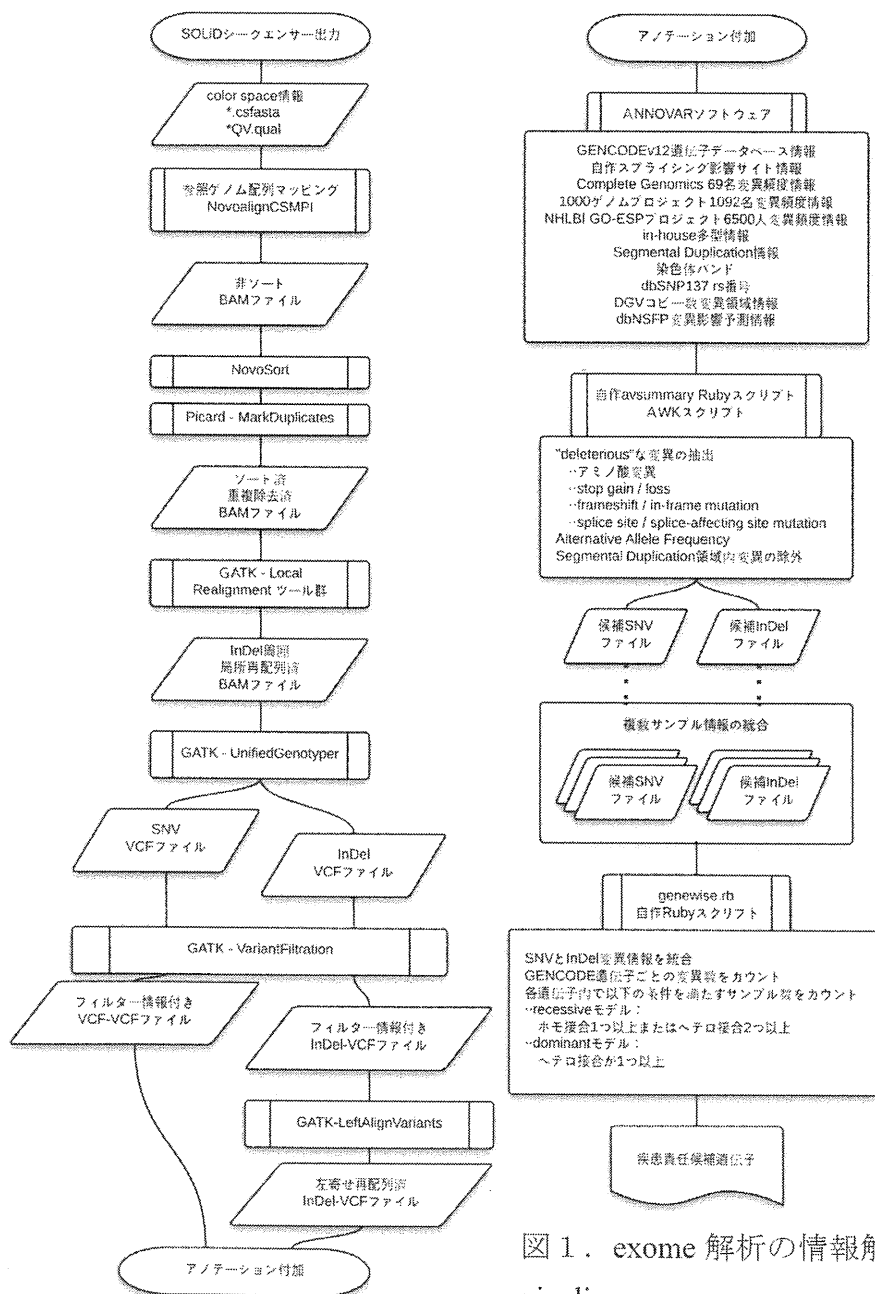


図1. exome解析の情報解析 pipeline

2) 稀少疾患患者の収集

基本的には、これまで収集していた稀少疾患の解析を基盤に据え、他の研究班が扱わない様な疾患に目標を置いて解析する事をめざした。とはいえ、新規の稀少疾患収集のために長崎県内の医療型児童入所施設みさかえの園むつみの家の医師である近藤達郎医師を中心に九州 dysmorphology 研究会を立ち上げ、稀少疾患の収集に努めた。

3) UV^SSA 患者細胞と KIAA1530 遺伝子機能解析

exome 解析によって候補遺伝子として残った KIAA1530 遺伝子について、UV^SS-A 患者細胞, Kps3, XP24KO, Kps2, XP70TO の 4 個の細胞ラインを用いて、遺伝子機能を解析した。全長の KIAA1530 遺伝子をレンチウイルス発現ベクターに組み込み、4 個の細胞ラインにトランスフェクションさせて細胞の欠陥機能が相補されるか否かを行った。

相補試験は、UV 照射した後に起こる RNA 合成に共役した DNA 修復を観察することによって行った。正常細胞では、Alexa 488 labeled 5-ethynyl-2'-deoxyuridine を細胞が DNA 修復の基質として細胞内 DNA に組み込み、Alexa 488 の緑色蛍光を発する。UVSSA 患者細胞ラインは、RNA

合成に共役した DNA 修復欠陥があることが知られており、KIAA1530 遺伝子のトランスフェクションによって本機能が回復するかを検証した。

C.結果

1) UV^SSA 患者細胞の原因遺伝子単離 dbSNP (Build 131) および 1000Genome project phase I data に登録されていない一塩基変異は、以下の様な内訳であった。

表 1 . UVSSA 患者の exome 解析 (filtering) 結果

	Kps3	XP24KO
変異の可能性が高い SNV	217	202
変異の可能性が高い In/Del	46	41
Homozygous mutation	9	17
Compound Heterozygous	9	6
共通	1 (KIAA1530)	

2 名に共通した KIAA1530 stop gain homozygous 変異が UVSSA の原因であると推定された。

次に、KIAA1530 遺伝子をレンチウイルスに組み込み、細胞トランスフェクションして相補試験を試みた。

Kps3, XP24KO, Kps2, XP70TO の全ての細胞で、KIAA1530 遺伝子を発現させることで、Alexa 488 labeled 5-ethynyl-2'-deoxyuridine の細胞 DNA

への取り込みが回復し、KIAA1530 の欠損が、UVSSA の原因であると結論づけられた。

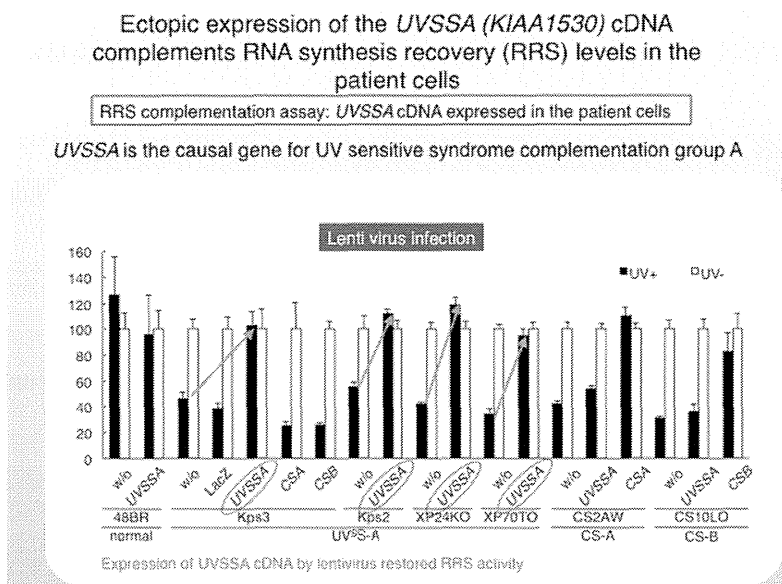


図 2. KIAA1530 遺伝子相補試験による UV 照射後の DNA 修復の回復

2) 稀少疾患の exome 解析状況一覧

長崎で exome 解析進行中の疾患群を以下の表に記載する。

表 2 : exome 解析中の疾患群

Disease	MIM number	Symptoms	Inherit pattern	Genes	Status
UVSSA	614632	紫外線感受性	AR	KIAA1530 (UVSSA)	Nature Genetics 報告
紫外線感受性疾患群 (Seckel, XP 等)	heterogenous	紫外線感受性	AR	finding	Superimposing
Burugada 症候群	heterogenous	心臓伝導障害	AD	Known gene & New gene	Superimposing
ALS	heterogenous	Motor neuron deficiency	AR? AD?	SETX (AD) Other unknow	Superimposing
LMC 症候群	(Chandler et al., 2006)	Leukodystrophy, Microcephaly, Cerebral malformation	AR?	finding	Superimposing
Kabuki 症候群	MLL2 (-) KDM6A(-)	Eversion of the lower eyelids	AD	finding	Superimposing
WHIM-like 症候群	606593	Wart, Hypogammaglobulinemia, Myelokathexis	AD?	Known gene	線維芽細胞にて機能解析予定
Arrhinia	No entry	無鼻症	de novo	finding	Superimposing
習慣性不育症	No entry	習慣性不育	AD? AR?	finding	Waiting for exome
家族性筋線維腫症	228550	筋線維腫	AD		Waiting for exome
Beckwith-Wiedemann 症候群	130650	原因ではなく homozygous 変異 検索	AR 変異 探し	finding	Superimposing
間葉性異形成胎盤	No entry	胞状奇胎様胎盤	??	finding	Superimposing
家族性肺がん	SFTP(-)	肺がん	AD	finding	Superimposing
腎臓骨化症	No entry	腎臓へのカルシウム沈着	AR	candidate 3 genes	Superimposing
下垂体低形成症	262600 (PROP1) 以外	下垂体ホルモン不全	de novo?		Waiting for samples
Zimmerman-Laband 症候群	135500	Gingival fibromatosis, absent nail	de novo?		Waiting for samples

LMC症候群は、論文発表では明らかな常染色体劣性遺伝として報告され、我々も日本人3例の試料収集を行った。Exome解析後のhomozygous 変異、compound heterozygous 変異の重ね合わせでも共通の遺伝子は特定出来なかった。1例は兄弟発症例であり、またDNAマイクロアレイ解析によるSNP遺伝子型決定によって血族婚も考えづらい状況から常染色体優性 (de novo) & germline mosaicism が有力であり、1トリオの解析を基準に候補遺伝子をリストアップ中である。本例は、書状が同じであっても、遺伝形式自体が違っていた例である。LMC症候群は、現在 de novo 解析から原因遺伝子を特定中である。

ALSについては、長崎県内のある地域に多発した6例を収集できたので、常染色体劣性遺伝-創始者効果の仮定の下で原因遺伝子特定が可能と思われた。しかし、実際には6例中2例は、既知の常染色体優性遺伝形式をとるALSの原因遺伝子であるSTEX遺伝子の splice site変異を認め、本例も最初の疾患の均一性の前提から間違っていた例である。現在は、SETX変異 (+) の例を除いた、4例で原因遺伝子同定に向け情報処理、機能解析中である。

WHIM-様症候群は、和歌山県立医科大学皮膚科の金澤伸雄講師から依頼があって解析を引き受けたものであ

る。患者と母親との解析のみで当初は、de novo 想定であり、(母親に無く子にある変異) をリストアップしたが、最終的には、既知の遺伝子 (別の疾患の原因遺伝子) の複合ヘテロ接合変異が認められて、現在は患者線維芽細胞の分離を待つ機能解析の予定である。

D. 考察

紫外線感受性遺伝子群解析に関して UVSSA原因遺伝子単離

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

稀少疾患のexome解析について

昨年度末から5500xl SOLiDシステムによるexome解析を順調に進行させている。5500xlによるデータ取得は困難であったが、emulsion PCRのステップを改変することで改善され、mean depth > 60 のデータ量で、depth > 10 が95%以上の濃縮ターゲット領域で塩基配列を決定出来る。このデータ量データの質は、Illumina系の次世代シーケンサー使用時と遜色ない。

収集されている稀少疾患は、本来の意味で“稀少”である。1例～数例の疾患群も多く解析している。同じ疾患に分類されていても、exomeから得られた変異情報を重ね合わせから1個の原因遺伝子同定までに至らない例が多い。おそらくは、同一の症状を示す臨床診断疾患は、locus heterogeneityが多くと考えられる。稀少疾患は、遺伝子も特定の一遺伝子が原因であると考えていたが、そうでは稀少とはいっても多くの症例の解析→重ね合わせを行う必要がある。原因を特定出来る疾患はできて、出来ない疾患は出来ないといった、当たり前の状況になっている。

Kabuki症候群、UV感受性疾患、Burugada症候群などは、キャピラリーシーケンサーにてこれまで報告された遺伝子には変異を認めない例を解析しているが、ときおりexome解析から既知の遺伝子変異が認められることがある。キャピラリーシーケンサースクリーニング時に増幅効率の異なるprimer設定が原因で見落とされたものと考えられる（データは示していない）。この意味でも、キャピラリーシーケンサーによる塩基情報取得よりも、次世代型（大規模、パーソナルタイプ含め）シーケンサーによる網羅的なゲノム解析情報が、これからますます重要となる。キャピラリーシーケン

サーは、一点だけの最終的な確認の為の手段となっていくであろう。

E. 結論

exome解析によってUV sensitive syndrome complementation group Aの原因遺伝子UVSSA遺伝子（KIAA1530）を単離した。ALSに関しては、既知の遺伝子SETXが見出された。WHIM-様症候群は、既知であるが allelic な疾患が見つけた。その他の稀少疾患解析は、現時阿進行中である

——達成度について——

本年度、exome解析によるデータ取得を進めた。既知の疾患原因遺伝子は確実に捉えられているので、次世代シーケンサーを使った解析は、情報処理も含めて順調に進んでいると考えられる。本事業の最終年度に向けて新規遺伝子の同定に向けて機能解析、疾患収集を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, Ohyama K, Ito K, Mishima H, Nomura M, Kinoshita A, Ono S, Takenaka K, Masuyama R,

- Kudo T, Slor H, Utani A, Tateishi S, Yamashita S, Stefanini M, Lehmann AR, Yoshiura KI, Ogi T. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Genet* 44(5): 586-592, 2012 May.
2. Matsuse M, Sasaki K, Nishihara E, Minami S, Hayashida C, Kondo H, Suzuki K, Saenko V, Yoshiura K, Mitsutake N, Yamashita S. Copy number alteration and uniparental disomy analysis categorizes Japanese papillary thyroid carcinomas into distinct groups. *PLoS One* 7(4): e36063, 2012 April.
 3. Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, Tomita H, Ozawa H, Niikawa N, Kurotaki N. Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. *J Hum Genet* 57(5): 338-341, 2012 May.
 4. Arai J, Tsuchiya T, Oikawa M, Mochinaga K, Hayashi T, Yoshiura KI, Tsukamoto K, Yamasaki N, Matsumoto K, Miyazaki T, Nagayasu T. Clinical and molecular analysis of synchronous double lung cancers. *Lung Cancer* 77(2): 281-287, 2012 Aug.
 5. Mishima H, Aerts J, Katayama T, Bonnal RJ, Yoshiura K. The Ruby UCSC API: accessing the UCSC genome database using Ruby. *BMC Bioinformatics* 13: 240, 2012 Sep.
 6. Hikida M, Tsuda M, Watanabe A, Kinoshita A, Akita S, Hirano A, Uchiyama T, Yoshiura KI. No evidence of association between 8q24 and susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without palate in Japanese population. *Cleft Palate Craniofac J* 49(6): 714-717, 2012 Nov.
 7. Kawakami A, Migita K, Ida H, Yoshiura K, Arima K, Eguchi K. [109th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine: educational lecture: 14. Autoinflammatory syndrome]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi* 101(9): 2733-2739, 2012 Sep.
 8. 井田弘明、有馬和彦、金澤伸雄、吉浦孝一郎. 中條-西村症候群の原因遺伝子とプロテアソーム機能異常リウマチ科, 47(6): 654-660, 2012.
 9. 井田弘明、有馬和彦、金澤伸雄、吉浦孝一郎 プロテアソーム病 炎症と免疫, 20(6): 609-614, 2012.

2) 学会発表

国際学会

ESHG2012 (EUROPEAN Human Genetics CONFERENCE 2012), 6 月 23 日-26 日, Nürnberg, Germany

Tadashi Kaname, Kumiko Yanagi, Yukako Muramatsu, Takaya Tohma, Hiroaki Hanafusa, Konomi Morita, Shinya Ikematsu, Yusuke Itagaki, Hiroko Taniai, Kenji Kurosawa, Seiji Mizuno, Koichiro Yoshiura, Kenji Naritomi. A mutation detected by exome sequencing and phenotypic variability in a family with Lenz microphthalmia syndrome.

The 13th Annual Bioinformatics Open Source Conference, 2012年7月13-14日, Long Beach Convention Center, Long Beach, CA, USA.

Hiroyuki Mishima, Raoul J.P. Bonnal, Naohisa Goto, Francesco Strozzi, Toshiaki Katayama, Pjotr Prins: Biogem, Ruby UCSC API, and Bioruby. (口演)
Hiroyuki Mishima, Raoul J.P. Bonnal, Naohisa Goto, Francesco Strozzi, Toshiaki Katayama, Pjotr Prins: Biogem, Ruby UCSC API, and Bioruby. (ポスター)

20th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 2012年7月15-17日, Long Beach Convention Center, Long Beach, CA, USA.

(06) Hiroyuki Mishima, Jan Aerts, Toshiaki Katayama, Raoul J.P. Bonnal, Koh-ichiro Yoshiura: The Ruby UCSC API: accessing the UCSC Genome Database using Ruby. (ポスター)

6th International Congress on FMF and SAID (Autoinflammation 2010)

2010.9.2-9.6

Amsterdam

Ida H, Arima K, Kinoshita A, Nishima H, Kanazawa N, Furukawa F, Yoshiura K, Eguchi K Functional human protein analysis in the post-genome era learning to new autoinflammatory syndrome (Nakajo-Nishimura syndrome)

Kanazawa N, Nakatani Y, Ida H, Yoshiura K, Furukawa F National surveillance of Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever) in Japan

**10th World Congress on Inflammation
2011.06.25-29 Paris**

Ida H, Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Furukawa F, Murata S, Yoshiura K-I, Eguchi K A novel mutation of proteasome subunit causes decrease of proteasome activity in Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever)

Kanazawa N, Kunimoto K, Mikita N, Furukawa F, Yoshiura K-I, Ida H Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever) and related autoinflammatory disorders accompanied with lipodystrophy

**Annual European Congress of Rheumatology (EULAR 2011)
2011.5.25-28 London**

Arima K, Kanazawa N, Mishima H, Kinoshita A, Ida H, Yoshiura K, Eguchi K Decrease of proteasome activity is associated with a novel mutation of the proteasome catalytic subunit in an autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome.

75th annual meeting of the American College of Rheumatology(ACR 2011)

2011.11.5-9 Chicago

Ida H, Arima K, Kanazawa N, Yoshiura KI Proteasome disability syndrome: an analysis of the pathogenesis of a new autoinflammatory syndrome, Nakajo-Nishimura syndrome

国内学会等

第35回日本小児遺伝学会学術集会
2012年4月18日(水)～19日(木), 久留米大学筑水会館, 久留米.

11:40~12:30: 次世代シーケンスを中心とした最近の話題. 吉浦孝一郎

第8回広島大学-長崎大学連携研究事業カンファランス-放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業- 2012年6月2日(土), 場所: 長崎大学医学部良順会館ボードインホール, 長崎

3-7: 次世代シーケンサーSOLiD5500による塩基配列決定の問題点とプロトコルの改良. 吉浦孝一郎, 林田知佐, 川道麻衣子, 佐々木健作, 木下晃, 三嶋博之

第33回日本炎症再生医学会 H24年7月5日～6日 福岡
プロテアソーム機能不全症(中條-西村症候群)の炎症病態. 井田弘明, 有

馬和彦, 金澤伸雄, 吉浦孝一郎

第52回 日本先天異常学会 2012年7月6日(水)~8日(金), 場所: 東京女子医科大学弥生記念講堂, 東京

Bohring-Opitz 症候群および Opitz C 症候群における遺伝子変異. 要 匡, 柳久美子, 福嶋義光, 蒔田芳男, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二

第63日本皮膚科学会中部支部学術大会 2012年10月13日(土)~14日(日), 場所: 大阪国際会議場, 大阪

シンポジウム1【自己炎症疾患研究の目指すもの】SY1-4: 遺伝子ハンティングの実際.

第57回日本人類遺伝学会 2012年10月24日(水)~27日(土), 京王プラザホテル, 東京

シンポジウム5 (英語セッション)

【次世代シーケンサーと疾患ゲノム解析】S5-2: 次世代シーケンサー解析対象疾患の選択.

O-110: Perlman 症候群における DIS3L2 のエクソン 9 の欠失は LINE-1 間の非相同組み換えによって生じる. 東元 健, 前田寿幸, 八木ひとみ, 岡田純一郎, 佐々木健作, 吉浦孝一郎, 渡邊順子, 副

島英伸

P-5: G-band 染色により核型 46,XY,der(3)der(7),inv

ins(3;7)(q21;q32q21.1) とされた裂手裂足患児の転座点解析. 柳 久美子, 要 匡, 小口良子, 當間隆也, 泉川良範, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二

P-12: 全胎状奇胎特異的 microRNA の同定とその臨床応用に関する検討. 長谷川ゆり, 三浦清徳, 東嶋 愛, 城 大空, 阿部修平, 三浦生子, 三嶋博之, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明

P-130: ホルモン非抵抗性先端異骨症のエクソーム解析. 要 匡, 柳 久美子, 小口良子, 成富研二, 當間隆也, 近藤達郎, 二井英二, 外木秀文, 西村 玄, 吉浦孝一郎, 太田 亨, 新川詔夫, 松浦信夫, Dong-Kyu Jin

第24回日本小児口腔外科学会総会・学術大会, 2012年11月24日(土), 名古屋市愛知学院大学

教育講演6: 次世代シーケンサーを用いたDisease Gene Hunting. 三嶋博之

第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日(火)~14日(金), 福岡市福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡

3W2III-6 (口演) : ヒトゲノム変異解析ワークフローにおける公共データベース活用. 三嶋博之, 吉浦孝一郎

3P-0053 (ポスター) : ヒトゲノム変異解析ワークフローにおける公共データベース活用. 三嶋博之, 吉浦孝一郎

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許得取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究課題：地域集積・収集した稀少疾患の系統的原因究明

分担研究項目：難治性 DNA 修復欠損性疾患の責任因子同定に関する研究

研究分担者：荻朋男（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・分子医学・准教授）

研究協力者：佐々木健作（長崎大学原爆後障害医療研究所・研究員）

研究要旨

DNA修復機構はゲノムの安定的な維持伝達に必須であり、DNA修復システムの破綻は発がんをはじめとする様々な難治性疾患の原因となっている。本研究では、DNA修復機構に欠損をもつ遺伝性疾患の患者から、新規の責任変異を4つの責任遺伝子に同定した。さらに、これら責任因子の分子機能解析をおこなうことで、分子病態を解明することに取り組んだ。

A. 研究目的

DNA修復機構はゲノムの安定的な維持伝達に必須であり、DNA修復システムの破綻は発がんをはじめとする様々な疾患の原因となっている。本研究では、DNA修復機構に欠損をもつため、高発がん性、発達異常、精神遅滞等の全身性の重篤な症状を発症する、難治性遺伝性疾患の責任遺伝子責任変異を同定し、その分子機能解析をおこなうことで、分子病態を解明することを目的とした。

本研究ではDNA修復機構の中でも、特にヌクレオチド除去修復機構 (nucleotide excision repair: NER)とDNA

損傷チェックポイントシステム(DNA damage checkpoint: DDC)に主眼を置いて研究を実施した。NERシステムの先天的な欠損により、がんを好発する色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum: XP)、早老症を示すコケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS)、日光過敏症と軽微な皮膚症状のみを示す紫外線高感受性症候群(UV-sensitive syndrome: UVSS)と、多岐に渡る難治性疾患が発症する。また、DDCシステムの異常では、小脳症/低身長/発達異常を示すゼッケル症候群(Seckel syndrome: SS)などを発症する。このため、NER機構やDDCシステムの分子メカニズムの解明は、各疾患の原因究明

だけでなく、発がんや、細胞老化メカニズムなどの根本的な理解につながると考えられる。

B. 研究方法

NERやDDCの欠損により発症するXP、CS、UVSS、SSとその類縁疾患の検体を国内外より約200症例収集した。その後、DNA修復活性やDNA損傷チェックポイント活性を指標とした細胞レベルでの分類をおこなった。この後、既知の疾患責任遺伝子発現ウイルスによる相補性試験を実施し、相補性群の確定と責任変異の同定をおこなった。これら相補性試験で相補しない症例は、新規疾患責任遺伝子に変異を有する可能性が高い症例であり、これらについて次世代ゲノム解析を実施した。その結果、4つの新規責任遺伝子に疾患責任変異を同定し、さらに分子機能解析を実施することで、対象とする難治性疾患の発症メカニズムの解明を行うとともに、DNA修復とチェックポイントの作用機序の解析をおこなった。

C. 研究結果

(1) NERの修復活性を迅速に評価する新たな手法 EdU Assay/EU Assay を開

発し、研究における修復活性評価のみならず、NER欠損性疾患疑い症例の診断法としてを確立した。さらに、レンチウイルスを用いた既知のNER関連因子 cDNA 発現系と組み合わせる事で、NER欠損性疾患の迅速な確定診断責任遺伝子同定を可能にした。

(2) 既知の相補性群に属さない軽度の日光過敏症を示す日本人2家系のUVSS-2症例について、BGIへの受託により exome 解析を実施し、*KIAA1530* 遺伝子に疾患責任変異を同定した。HUGO 遺伝子命名委員会との協議により *UVSSA* と命名した。セルバンクの調査等により、以前にXPと診断されていたいくつかの軽症日光過敏症についても *UVSSA* に疾患責任変異が同定された。*UVSSA* 遺伝子の機能解析により、*UVSSA* 蛋白質はDNA損傷後に停止したRNAポリメラーゼのユビキチン化修飾に関わっており、この修飾がRNAポリメラーゼのその後の運命(分解・バックトラッキング・滞留)を決定していることを示した。そして、RNAポリメラーゼのDNA損傷個所での挙動が紫外線高感受性症候群とコケイン症候群の病態を決定しているという新しい説を提唱した (*Nature Genetics* 44: 586-592,2012)。

(3) 本邦及び欧州のCS症例約120例を

解析し、

既知の相補性群に属さない症例3例を見いだした。これらの症例では、コケイン症としてははじめてとなる、NERのDNA損傷5'側の切出し反応を行う、ERCC1/XPF エンドヌクレアーゼに欠損を有することが確認された。さらにこのうちの1症例はXP、CSとあわせてファンコーニ貧血(Fanconi anemia: FA)を発症し、XPF 遺伝子の変異でXP/CS/FAを発症することを確認した。XPF 遺伝子に生じた責任変異により、DNA損傷の切出し反応に必要なエンドヌクレアーゼ活性が激減していることを生化学的に確認した

(*American Journal of Human Genetics*, in press)。

(4) 既知の相補性群に属さないSS症例の新規責任遺伝子として *ATRIP* に疾患責任変異を同定した。SSは極めて稀な劣性遺伝性疾患であり、これまでに世界で1家系2症例しか報告が無かった。今回、*ATRIP* の機能欠損によるSSの症例と併せて、既知の責任遺伝子である *ATR* に2種類の新たな責任変異を同定した。これらの変異の分子機能解析から、SS発症と病態に関して新たな知見が得られた (*PLoS Genetics*, 8: e1002945, 2012)。

D. 考察

次世代ゲノム解析法と細胞DNA損傷修復/チェックポイント活性測定システムを組み合わせることで、高精度に新規の疾患責任遺伝子責任変異の同定が可能となった。このシステムの運用により、2年間の研究期間で4種類の新規責任遺伝子の同定に成功しており、高いパフォーマンスであると考えられる。

E. 結論

DNA修復/損傷チェックポイントに異常のある遺伝性難治性疾患において、新規の疾患責任遺伝子として、UVSSA(UVSS)、ATRIP(SS)、ERCC1(CS)、XPF(CS)に疾患責任変異を同定し、これらの遺伝子の分子機能解析を実施した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, Ohyama K, Ito K, Mishima H, Nomura M, Kinoshita A, Ono S, Takenaka K, Masuyama R, Kudo

T, Slor H, Utani A, Tateishi S, Yamashita S, Stefanini M, Lehmann A, Yoshiura K, and *Ogi T. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Genetics*, **44**, : 586-592 (2012).

*Ogi T, Walker S, Stiff T, Hobson E, Limsirichaikul S, Carpenter G, Prescott K, Suri M, Byrd P, Matsuse M, Mitsutake N, Nakazawa Y, Vasudevan P, Barrow M, Stewart G, Taylor M, O'Driscoll M, and Jeggo P. Identification of the first ATRIP-deficient patient and novel mutations in ATR define a clinical spectrum for ATR-ATRIP Seckel syndrome. *PLoS Genetics*, **8**: e1002945 (2012).

Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz D, Guo C, Shimada M, Sasaki K, Fawcett H, Wing J, Lewin S, Carr L, Yoshiura K, Utani A, Hirano A, Yamashita S, Greenblatt D, Nardo T, Stefanini M, McGibbon D, Sarkany R, Fassihi H, Takahashi Y, Nagayama Y, Mitsutake N, Lehmann AR, and *Ogi T. Malfunction of the ERCC1/XPF endonuclease results in diverse clinical manifestations and

causes three nucleotide excision-repair-deficient disorders, Cockayne Syndrome, xeroderma pigmentosum and Fanconi Anemia. *American Journal of Human Genetics*, in press (2013).

2. 学会発表 (招待講演のみ)

Molecular cloning and characterisation of KIAA1530/UVSSA, the responsible gene for UV sensitive syndrome complementation group-A

2011年4月 Responses to DNA damage: from molecular mechanism to human disease, Egmond aan Zee (オランダ)

2012年10月 バイオジャパン (横浜)

2012年7月 東京医科歯科大学難治疾患研究所シンポジウム (東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

日本国特許出願 特願 2011-71082 筆頭発明者:荻朋男 発明の名称:日焼けの原因遺伝子 出願人:長崎大学 出願日:2011年3月28日

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）
平成24年度分担研究報告書

研究課題：地域集積・収集した稀少疾患の系統的原因究明

分担研究項目：Exome 解析，迅速診断法の開発，臨床診断

分担研究者

要 匡（琉球大学大学院医学研究科遺伝医学講座・准教授）

成富研二（琉球大学大学院医学研究科遺伝医学講座・教授）

研究要旨

本研究の目的は、(1) 次世代シーケンサを利用し、難病・稀少疾患の原因遺伝子と発症メカニズムを明らかにすること、(2) 原因遺伝子が明確または明確となった疾患の診断法を確立すること、である。本年度は、先端異骨症患児試料、C 症候群関連疾患患児試料に加え、沖縄型運動感覚ニューロパチー患者試料、Ohdo 症候群患者試料の収集と exome 解析、および奇形症候群の網羅的迅速遺伝子診断法の開発を行った。

A. 研究目的

地域蓄積・収集した希少疾患の原因解明と診断を目的として、本年度は、遺伝的異質性が知られている先端異骨症の原因遺伝子のさらなる同定、C 症候群関連疾患の原因遺伝子変異同定と診断法の開発、加えて沖縄型運動感覚ニューロパチーの原因解析、Ohdo 症候群の原因遺伝子解析・同定を目指した。

これら疾患について次世代シーケンサ(NGS)を用いた whole exome 解析，ターゲットリシーケンス解析により，原因遺伝子を同定すること，NGS を用いた奇形症候群の迅速遺伝子診断法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

琉球大学を含む沖縄県内および県外、北海道医療大学の研究協力チーム

から収集・供給された、臨床的先端異骨症と診断された患児および家族計23名の試料、臨床的C症候群あるいはC様症候群と診断された患児の中でCD96遺伝子変異を認めなかった患児計32名の試料、沖縄型運動感覚ニューロパチー家系試料、Ohdo症候群（オリジナル症例）家系試料について、whole exome解析、およびターゲットリシーケンス解析、Sanger法によるダイレクトリシーケンス解析を行い、原因遺伝子、原因遺伝子変異の同定を行った。

また、迅速遺伝子診断法として、Aardkog-Scott症候群の原因であるFGDI遺伝子の次世代シーケンサを用いた変異スクリーニングシステムの構築、CD96遺伝子の変異スクリーニングを目的として、HRM法によるCD96遺伝子変異スクリーニングシステムに加え、NGSを用いたターゲットリシーケンス（アンプリコンシーケンス）による変異スクリーニングシステムを構築した。

加えて、NGSを用いたC症候群などの頭蓋骨癒合症を含む結合織関連遺伝子群の網羅的変異解析システムの構築を計画した。

(1) Exome解析およびSangerシーケンス解析による先端異骨症の原因遺伝子変異検索

前年度に引き続き臨床的に先端異骨症（一部疑いを含む）と診断された患児について、whole exome解析を行った。Exome解析は、illumina社TruSeqキットまたはAgilent社SureSelectキットによる濃縮、HiSeq2000またはSOLiDによるペアエンド解析により行い、また、リファレンスマッピング、annotation付けも同様に行った。

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

また、原因遺伝子が推定された患児については、ダイレクトリシーケンス（Sangerシーケンス）による遺伝子変異解析・検証も行った。

各患児について、*de novo*変異データを集積し、有意な変異、即ち、SNP database未登録でエクソン上あるいはスプライス接合部位にあり、かつ、アミノ酸置換、フレームシフトまたは終止コドンによるタンパク質短縮化、あるいはスプライス異常を来すと思われる変異を抽出した。有意な変異の推定には、PolyPhenやSIFTによる結果も加味した。

抽出できた遺伝子について、他の臨床的先端異骨症患児およびそれら両親での変異の有無をダイレクトリシーケンス解析により検索し、日本人コン