

トロールでの変異の有無の確認を行った。

本解析は、Sungkyunkwan University (Korea) との共同研究として行った。

(2) C(様)症候群の NGS 解析

三角頭蓋を認め、臨床的に C 症候群または C 様症候群と診断された患者 32 名のゲノム DNA 試料について解析した。Whole exome 解析、およびダイレクトシーケンスによる *CD96* 遺伝子、*ASXL1* 遺伝子解析を行った。

Whole exome 解析については、illumina 社 TruSeq キット、または Agilent 社 SureSelect キットを使用し、HiSeq2000 および SOLiD を用いて、ペアエンド解析により行った。また、SNP, indel call, 遺伝子情報を含む annotation 付け等も同様に行い、検討した。

(3) 沖縄型遺伝性運動感覚ニューロパチーの NGS 解析

沖縄型運動感覚ニューロパチーは、30-50 歳頃より有痛性筋けいれんで始まる近位筋優位の神経原性筋萎縮症である。疾病後期には人工呼吸器を必要とするようになり、その病態・経過は感覚ニューロパチーを除き、筋萎縮性側索硬化症と同様である。本疾患は、文字通り沖縄に多く認められ（沖縄 20 家系、滋賀 1 家系）、常染色体優性遺伝を示す。

本疾患は、鹿児島大学神経内科・老年病学の高嶋らにより、連鎖解析にて、原因が 3q21 の約 2MB の領域にあると推定されていたので、高嶋らと共同で、患者家系における本領域のターゲットリシーケンス解析を行った。

ターゲットリシーケンス解析は、LA-PCR 増幅により候補領域を抽出・濃縮し、HiSeq2000 および SOLiD を使用し、ペアエンド解析により行った。また、SNP, indel call, に加え、BreakDancer 等を用いて欠失・重複、ポリヌクレオチド伸張を含むゲノム構造変化の検出も行い解析した。

(4) Ohdo 症候群（オリジナル症例）の NGS 解析

1986 年に Ohdo らが発表した Ohdo 症候群は、眼瞼裂狭小、発達遅滞を特徴とする奇形症候群である。発表した家系より常染色体劣性遺伝が推定されているが、その原因は不明である。

現在、Ohdo 様症候群（Ohdo/SBBYS 症候群）の原因遺伝子として *KAT6B* 遺伝子が特定されており、臨床的には異なる疾患と捉えられているものの、Ohdo 症候群との異同は問題になっている。また、遺伝形式が異なる、X連鎖遺伝を示す症候群の原因として *MED12* 遺伝子の変異が報告されている。

今回、発表 (original) 家系について、

これら KAT6B 遺伝子、MED12 遺伝子を含めた NGS による whole exome 解析、ターゲットリシーケンス解析、および、Sanger 法ダイレクトリシーケンスによる遺伝子解析を行った。

Whole exome 解析については、Agilent 社 SureSelect キット、HiSeq2000 および SOLiD を使用し行った。Target re-sequencing については、KAT6B 遺伝子、MED12 遺伝子それぞれの領域について、LA-PCR による領域増幅を行い、フラグメントライブラリーを作製し、解析した。全て SNP, indel call, 遺伝子情報を含む annotation 付け等を行い検討した。Sanger 法ダイレクトリシーケンスについては、KAT6B 遺伝子、MED12 遺伝子について、通常どおり、全エクソンに対し、primer を設定し、ダイレクトリシーケンスを行った。

(5) NGS を用いた Aarskog-Scott 症候群、C 症候群の迅速診断法の開発

奇形症候群の一つである Aarskog-Scott 症候群の一部は *FGDI* 遺伝子変異が原因であることが判明しているが、本遺伝子変異の有無を効率よくスクリーニングできるように全 18 エクソンに対して、研究者らは、既に qPCR-HRM 法を用いた遺伝子コピー数および変異／多型のスキヤニングシステムを構築している。しかしな

がら、本システムでは、変異／多型のスキヤニングシステムが簡便に行えるものの、新規変異については、変異配列情報までは得られない、また検出率が 100% ではない、といった問題があった。そこで、次世代シーケンサを用いて、FGD1 遺伝子のプロモーター、イントロン部分も含めた LA-PCR アンプリコンのリシーケンスにより遺伝子診断を迅速に行えるシステムの構築を行った。具体的には、全エクソンを含む様、4 種の LA-PCR をセットし、PCR 後のアンプリコンを LabChip GX (Perkin Elmer 社) を用いて、大きな重複・欠失の有無の確認とアンプリコン濃度の定量を行い、検体ごとに等量にアンプリコンプールを作成し、断片化後、フラグメントライブラリーを作製、GS Junior (Roche 社) を用いてリシーケンス解析を行った。

C 症候群について、前年度 qPCR-HRM 法による変異スキヤニング法を確立したが、Aarskog-Scott 症候群と同様に LA-PCR による CD96 ゲノム領域増幅と NGS を用いたターゲットリシーケンス解析による迅速診断法を構築した。

(6) NGS を用いた奇形症候群 (C 症候群を含む結合織遺伝子関連疾患群) の網羅的迅速診断法の開発

NGS を活用し、C 症候群を含む頭蓋

骨癒合症候群および結合織関連疾患を網羅的に診断できるよう、解析遺伝子数を拡大した濃縮系をセットアップした。

まず、対象疾患をリストアップし、現在までに同定された原因遺伝子を全てリストアップした後、これら遺伝子の全エクソン領域をカバーする濃縮用プローブを作製した。

C. 研究結果

(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

臨床的に典型的な先端異骨症患者児家族における exome 解析、*de novo* 変異検出、および *de novo* 変異を認める遺伝子の一致性を検討した結果、ホルモン感受性典型的先端異骨症の多くは、*PDE4D* 遺伝子に変異が認められた。

Whole exome 解析と Sanger シーケンス解析により、現在までに、5 種類の *de novo* 変異を同定した。

ホルモン抵抗性先端異骨症においては、*PRKARIA* 遺伝子変異（下表）を認め、他の非典型的先端異骨症には *GNAS* 遺伝子を含め変異を認めなかった。

exon	chr	pos	ref	alt	gene	transcript	protein	amino acid	ref	alt
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	
exon 12	1	111,111,111	A	G	PRKARIA	PRKARIA	Protein kinase A	Val	Val	

PRKARIA 遺伝子変異と多型

これら、非典型的先端異骨症（偽性副甲状腺機能低下症を含む）の whole exome 解析により、新たに新規遺伝子（遺伝子 X）の *de novo* 変異を確認した。

本遺伝子変異は、コントロール 400 検体において、認められず、遺伝子産物が *GNAS* シグナル伝達経路上にあると推定されることから、本遺伝子変異が新たな原因であると考えられた。

(2) C(様)症候群の NGS 解析

Whole exome 解析、Sanger シーケンスの結果、C 様症候群患者 5 人に計 5 種類の *ASXL1* 遺伝子変異を同定できた。それらは、全て exon 12, 13 に集中しており、他の報告からも、これらエクソンに変異は集中していると思われた。

一方、20 人の C あるいは C 様症候群に *ASXL1* 遺伝子変異を認めなかったが、whole exome 解析の結果、1 人に本症候群に関連すると思われる新規遺伝子（遺伝子 Z）の変異を *de novo* で認めた。

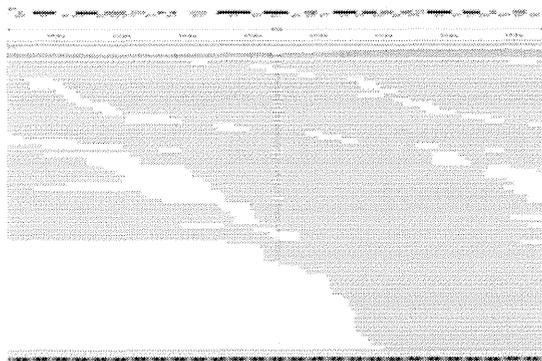
本変異は、コントロール 200 人に認められず、また遺伝子機能から原因である可能性が高いと推定された。

(3) 沖縄型遺伝性運動感覚ニューロパチーの NGS 解析

本疾患の原因候補領域は、3q12.1-q12.2(rs3821358-rs1449308)の約2.2Mbの範囲にあり、これら全領域をカバーするに LA-PCR primer を設定し、増幅・濃縮を行った後、NGS ペアエンド解析を行い、得られた read データを、同領域リファレンス配列へのマッピング、BreakDancer 等による構造変化検出を試みた。

結果、33箇所のリファレンスと異なる構造変化 (indel, tandem duplication, others) が推定され、全て PCR、Sanger シーケンス等により解析、確認を行ったが、病的と思われる構造変化は認められなかった。

Chromosome	Start (kb)	End (kb)	Gene	Variant Type	RefSeq ID	Variant
3	12,100	12,200	TFG	SNV	rs3821358	C>T
3	12,200	12,300	TFG	SNV	rs1449308	G>A
3	12,300	12,400	TFG	SNV	rs1449309	T>C
3	12,400	12,500	TFG	SNV	rs1449310	A>G
3	12,500	12,600	TFG	SNV	rs1449311	G>C
3	12,600	12,700	TFG	SNV	rs1449312	T>A
3	12,700	12,800	TFG	SNV	rs1449313	C>G
3	12,800	12,900	TFG	SNV	rs1449314	A>T
3	12,900	13,000	TFG	SNV	rs1449315	G>T
3	13,000	13,100	TFG	SNV	rs1449316	C>A
3	13,100	13,200	TFG	SNV	rs1449317	T>G
3	13,200	13,300	TFG	SNV	rs1449318	A>C
3	13,300	13,400	TFG	SNV	rs1449319	G>T
3	13,400	13,500	TFG	SNV	rs1449320	C>A
3	13,500	13,600	TFG	SNV	rs1449321	T>G
3	13,600	13,700	TFG	SNV	rs1449322	A>C
3	13,700	13,800	TFG	SNV	rs1449323	G>T
3	13,800	13,900	TFG	SNV	rs1449324	C>A
3	13,900	14,000	TFG	SNV	rs1449325	T>G
3	14,000	14,100	TFG	SNV	rs1449326	A>C
3	14,100	14,200	TFG	SNV	rs1449327	G>T
3	14,200	14,300	TFG	SNV	rs1449328	C>A
3	14,300	14,400	TFG	SNV	rs1449329	T>G
3	14,400	14,500	TFG	SNV	rs1449330	A>C
3	14,500	14,600	TFG	SNV	rs1449331	G>T
3	14,600	14,700	TFG	SNV	rs1449332	C>A
3	14,700	14,800	TFG	SNV	rs1449333	T>G
3	14,800	14,900	TFG	SNV	rs1449334	A>C
3	14,900	15,000	TFG	SNV	rs1449335	G>T
3	15,000	15,100	TFG	SNV	rs1449336	C>A
3	15,100	15,200	TFG	SNV	rs1449337	T>G
3	15,200	15,300	TFG	SNV	rs1449338	A>C
3	15,300	15,400	TFG	SNV	rs1449339	G>T
3	15,400	15,500	TFG	SNV	rs1449340	C>A
3	15,500	15,600	TFG	SNV	rs1449341	T>G
3	15,600	15,700	TFG	SNV	rs1449342	A>C
3	15,700	15,800	TFG	SNV	rs1449343	G>T
3	15,800	15,900	TFG	SNV	rs1449344	C>A
3	15,900	16,000	TFG	SNV	rs1449345	T>G
3	16,000	16,100	TFG	SNV	rs1449346	A>C
3	16,100	16,200	TFG	SNV	rs1449347	G>T
3	16,200	16,300	TFG	SNV	rs1449348	C>A
3	16,300	16,400	TFG	SNV	rs1449349	T>G
3	16,400	16,500	TFG	SNV	rs1449350	A>C
3	16,500	16,600	TFG	SNV	rs1449351	G>T
3	16,600	16,700	TFG	SNV	rs1449352	C>A
3	16,700	16,800	TFG	SNV	rs1449353	T>G
3	16,800	16,900	TFG	SNV	rs1449354	A>C
3	16,900	17,000	TFG	SNV	rs1449355	G>T
3	17,000	17,100	TFG	SNV	rs1449356	C>A
3	17,100	17,200	TFG	SNV	rs1449357	T>G
3	17,200	17,300	TFG	SNV	rs1449358	A>C
3	17,300	17,400	TFG	SNV	rs1449359	G>T
3	17,400	17,500	TFG	SNV	rs1449360	C>A
3	17,500	17,600	TFG	SNV	rs1449361	T>G
3	17,600	17,700	TFG	SNV	rs1449362	A>C
3	17,700	17,800	TFG	SNV	rs1449363	G>T
3	17,800	17,900	TFG	SNV	rs1449364	C>A
3	17,900	18,000	TFG	SNV	rs1449365	T>G
3	18,000	18,100	TFG	SNV	rs1449366	A>C
3	18,100	18,200	TFG	SNV	rs1449367	G>T
3	18,200	18,300	TFG	SNV	rs1449368	C>A
3	18,300	18,400	TFG	SNV	rs1449369	T>G
3	18,400	18,500	TFG	SNV	rs1449370	A>C
3	18,500	18,600	TFG	SNV	rs1449371	G>T
3	18,600	18,700	TFG	SNV	rs1449372	C>A
3	18,700	18,800	TFG	SNV	rs1449373	T>G
3	18,800	18,900	TFG	SNV	rs1449374	A>C
3	18,900	19,000	TFG	SNV	rs1449375	G>T
3	19,000	19,100	TFG	SNV	rs1449376	C>A
3	19,100	19,200	TFG	SNV	rs1449377	T>G
3	19,200	19,300	TFG	SNV	rs1449378	A>C
3	19,300	19,400	TFG	SNV	rs1449379	G>T
3	19,400	19,500	TFG	SNV	rs1449380	C>A
3	19,500	19,600	TFG	SNV	rs1449381	T>G
3	19,600	19,700	TFG	SNV	rs1449382	A>C
3	19,700	19,800	TFG	SNV	rs1449383	G>T
3	19,800	19,900	TFG	SNV	rs1449384	C>A
3	19,900	20,000	TFG	SNV	rs1449385	T>G
3	20,000	20,100	TFG	SNV	rs1449386	A>C
3	20,100	20,200	TFG	SNV	rs1449387	G>T
3	20,200	20,300	TFG	SNV	rs1449388	C>A
3	20,300	20,400	TFG	SNV	rs1449389	T>G
3	20,400	20,500	TFG	SNV	rs1449390	A>C
3	20,500	20,600	TFG	SNV	rs1449391	G>T
3	20,600	20,700	TFG	SNV	rs1449392	C>A
3	20,700	20,800	TFG	SNV	rs1449393	T>G
3	20,800	20,900	TFG	SNV	rs1449394	A>C
3	20,900	21,000	TFG	SNV	rs1449395	G>T
3	21,000	21,100	TFG	SNV	rs1449396	C>A
3	21,100	21,200	TFG	SNV	rs1449397	T>G
3	21,200	21,300	TFG	SNV	rs1449398	A>C
3	21,300	21,400	TFG	SNV	rs1449399	G>T
3	21,400	21,500	TFG	SNV	rs1449400	C>A
3	21,500	21,600	TFG	SNV	rs1449401	T>G
3	21,600	21,700	TFG	SNV	rs1449402	A>C
3	21,700	21,800	TFG	SNV	rs1449403	G>T
3	21,800	21,900	TFG	SNV	rs1449404	C>A
3	21,900	22,000	TFG	SNV	rs1449405	T>G
3	22,000	22,100	TFG	SNV	rs1449406	A>C
3	22,100	22,200	TFG	SNV	rs1449407	G>T
3	22,200	22,300	TFG	SNV	rs1449408	C>A
3	22,300	22,400	TFG	SNV	rs1449409	T>G
3	22,400	22,500	TFG	SNV	rs1449410	A>C
3	22,500	22,600	TFG	SNV	rs1449411	G>T
3	22,600	22,700	TFG	SNV	rs1449412	C>A
3	22,700	22,800	TFG	SNV	rs1449413	T>G
3	22,800	22,900	TFG	SNV	rs1449414	A>C
3	22,900	23,000	TFG	SNV	rs1449415	G>T
3	23,000	23,100	TFG	SNV	rs1449416	C>A
3	23,100	23,200	TFG	SNV	rs1449417	T>G
3	23,200	23,300	TFG	SNV	rs1449418	A>C
3	23,300	23,400	TFG	SNV	rs1449419	G>T
3	23,400	23,500	TFG	SNV	rs1449420	C>A
3	23,500	23,600	TFG	SNV	rs1449421	T>G
3	23,600	23,700	TFG	SNV	rs1449422	A>C
3	23,700	23,800	TFG	SNV	rs1449423	G>T
3	23,800	23,900	TFG	SNV	rs1449424	C>A
3	23,900	24,000	TFG	SNV	rs1449425	T>G
3	24,000	24,100	TFG	SNV	rs1449426	A>C
3	24,100	24,200	TFG	SNV	rs1449427	G>T
3	24,200	24,300	TFG	SNV	rs1449428	C>A
3	24,300	24,400	TFG	SNV	rs1449429	T>G
3	24,400	24,500	TFG	SNV	rs1449430	A>C
3	24,500	24,600	TFG	SNV	rs1449431	G>T
3	24,600	24,700	TFG	SNV	rs1449432	C>A
3	24,700	24,800	TFG	SNV	rs1449433	T>G
3	24,800	24,900	TFG	SNV	rs1449434	A>C
3	24,900	25,000	TFG	SNV	rs1449435	G>T
3	25,000	25,100	TFG	SNV	rs1449436	C>A
3	25,100	25,200	TFG	SNV	rs1449437	T>G
3	25,200	25,300	TFG	SNV	rs1449438	A>C
3	25,300	25,400	TFG	SNV	rs1449439	G>T
3	25,400	25,500	TFG	SNV	rs1449440	C>A
3	25,500	25,600	TFG	SNV	rs1449441	T>G
3	25,600	25,700	TFG	SNV	rs1449442	A>C
3	25,700	25,800	TFG	SNV	rs1449443	G>T
3	25,800	25,900	TFG	SNV	rs1449444	C>A
3	25,900	26,000	TFG	SNV	rs1449445	T>G
3	26,000	26,100	TFG	SNV	rs1449446	A>C
3	26,100	26,200	TFG	SNV	rs1449447	G>T
3	26,200	26,300	TFG	SNV	rs1449448	C>A
3	26,300	26,400	TFG	SNV	rs1449449	T>G
3	26,400	26,500	TFG	SNV	rs1449450	A>C
3	26,500	26,600	TFG	SNV	rs1449451	G>T
3	26,600	26,700	TFG	SNV	rs1449452	C>A
3	26,700	26,800	TFG	SNV	rs1449453	T>G
3	26,800	26,900	TFG	SNV	rs1449454	A>C
3	26,900	27,000	TFG	SNV	rs1449455	G>T
3	27,000	27,100	TFG	SNV	rs1449456	C>A
3	27,100	27,200	TFG	SNV	rs1449457	T>G
3	27,200	27,300	TFG	SNV	rs1449458	A>C
3	27,300	27,400	TFG	SNV	rs1449459	G>T
3	27,400	27,500	TFG	SNV	rs1449460	C>A
3	27,500	27,600	TFG	SNV	rs1449461	T>G
3	27,600	27,700	TFG	SNV	rs1449462	A>C
3	27,700	27				



KAT6B SNP rs71929101

よって、両遺伝子はオリジナル症例の原因ではなく、分子遺伝学的にも異なる疾患と考えられた。

Whole exome 解析の SNP, indel call で得られたデータについて、患児にホモ接合で、両親にヘテロ接合で認められる遺伝子変異の抽出を行ったところ、1つの候補遺伝子変異(遺伝子 Y)が抽出された。本変異は、SNP データベースに登録がなく新規のものであり、沖縄コントロール 100 人に認められず、原因である可能性が高いと考えられた。



遺伝子 Y

(5) Aarskog-Scott 症候群の迅速

診断法の開発

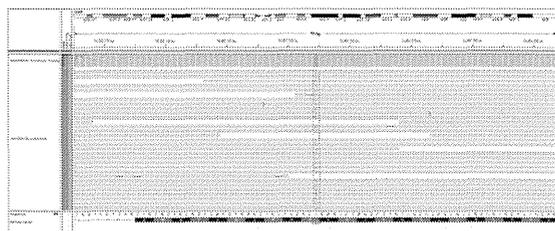
FGD1 遺伝子の promoter 領域も含めた全 18 エクソンをカバーするゲノム領域の増幅・濃縮が可能な LA-PCR をセットアップした。遺伝子全長が長く、

1つの LA-PCR ではカバーできないため 4つの領域に分割し、増幅できるようにした。

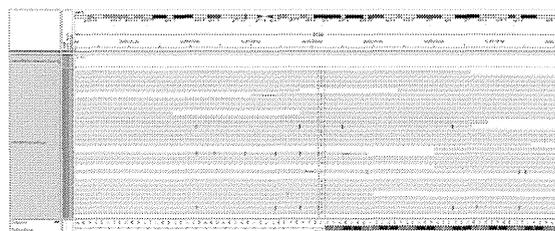
今回、臨床的に典型的な Aarskog-Scott 症候群 13 症例、非典型的あるいは症状の一部が認められる患児 12 例の 25 検体についてそれぞれ index による区分けを行い、GS Junior (Roche) 1 回のランで解析した。

結果、カバー率は x100 以上で十分な解析精度が得られ、また、全ての SNV(11 変異)を検出できた。

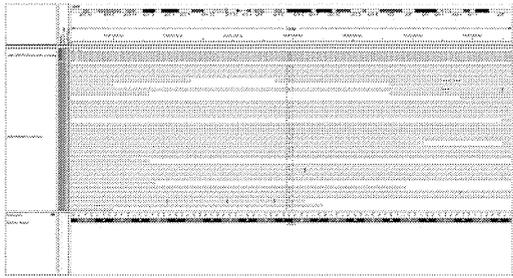
(c.1906C>T (p.R636W), c.2148+1G>A, c.2221G>T (p.E741X), c.1102-2A>G, c.1564C>T (p.R552C), c.1195T>C (p.F399L)についてマッピング結果を示す)



FGD1 c.1906C>T (p.R636W)



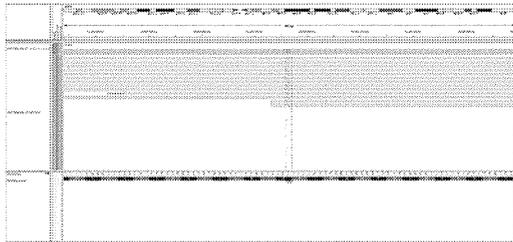
FGD1 c.2148+G>A



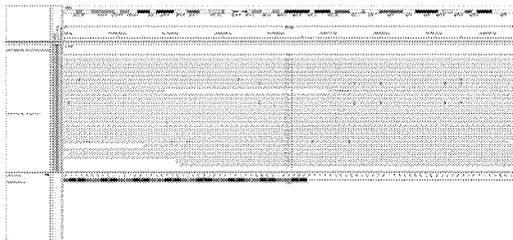
FGD1 c.2221G>T (p.E741X)



FGD1 c.1102-2A>G



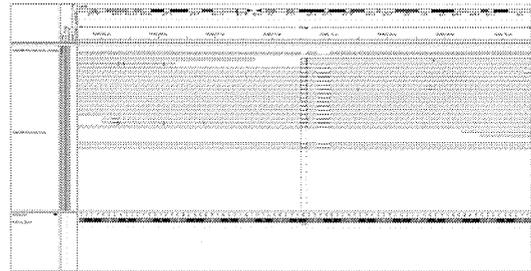
FGD1 c.1564C>T (p.R552C)



FGD1 c.1195T>C (p.F399L)

これら検出された SNV のうち、一塩基置換については、全て Sanger シーケンス解析と同じ結果であったが、欠

失 (c.1780_1782GAA del) については、マッピングデータが Sanger シーケンス配列とずれが生じることがあることが判明した。



FGD1 c.1780_1782GAA del 部位のマッピング

(6) NGS を用いた奇形症候群 (C 症候群を含む結合織遺伝子関連疾患群) の網羅的迅速診断法の開発

C 症候群は、頭蓋骨癒合の一つである三角頭蓋を特徴とするが、三角頭蓋を呈する症候群は他にも知られており、また、他の頭蓋骨癒合と合併することもある。よって、これらを包括的に診断可能にするため、頭蓋骨癒合を呈する疾患を全てリストアップし、加えて、結合織の異常に関連する疾患群をリストアップし、網羅的遺伝子診断の対象とした。

対象とした症候群は 212 疾患とし、総遺伝子数 96、総エクソン数 2321、総アンプリコン数 19997、総解析長 1.07Mb の濃縮系をセットアップした。

項目	今回の作成データ
対象遺伝子数	96
対象エクソン	coding エクソンのみ
総エクソン数	2321
エクソン外解析長	5' -25bp, 3' +25bp
総ターゲット長	424.79kb
総アンプリコン数	19997
総解析長	1.07Mb
平均リード長	150bp

迅速診断対象遺伝子概要

D. 考察

臨床的に典型的な先端異骨症患児家族における exome 解析、*de novo* 変異検出、および *de novo* 変異を認める遺伝子の一致性を検討した結果、ホルモン感受性典型的先端異骨症の多くは、*PDE4D* 遺伝子が原因と推定された。

本疾患は、遺伝的異質性が推定され、他の原因が残されている可能性があり、実際に、臨床遺伝専門医により先端異骨症と診断された4人のSangerシーケンス解析において、1人に遺伝子変異を確認できていない。

本疾患は、臨床的に疾患概念が確立しているとは言えず、現場では、やや軽症と思われるタイプや内分泌学的反応性の違いのあるタイプなどが混在していると思われる。また、鑑別診断として重要な、偽性副甲状腺機能低下症と一部オーバーラップしている例もあると推定される。これらの混在も一因と思われるが、前述の結果から

も、本疾患の原因は複数あると推定される。

今回、非典型的患者のwhole exome解析から新たに原因遺伝子が見つかったことは、遺伝的異質性を示すとともに、これらの蓄積によって遺伝子型—症状関係を明らかにできると思われた。

今後、さらに他の原因遺伝子同定も行い、遺伝子型と症状のデータを蓄積することで、先端異骨症の疾患概念、疾患分類を確立できると思われる。

現在までに、C様症候群において、exome解析にて1人に*ASXLI*遺伝子変異を確認し、また、15人中4人に*ASXLI*遺伝子変異を同定したが、今回、whole exome解析の結果、*ASXLI*遺伝子、*CD96*遺伝子に変異を認めない患児に新規原因遺伝子と推定される変異を確認した。これら結果は、CあるいはC様症候群に遺伝的異質性がある事を明確に示しており、全貌を明らかにする必要のあることを示している。本疾患に対しては遺伝子診断を行うことが重要であると思われるため、新規原因遺伝子の同定は今後も重要であると思われた。

また、臨床的に診断が確定しない症例もあることから、臨床症状の詳細な比較、網羅的遺伝子変異解析により、疾患を整理する必要があると思われた。

Ohdo症候群については、分子遺伝学的にも、本疾患が独立した症候群であることが示され、新規遺伝子の同定と遺伝子解析法の構築が今後の病態解析、遺伝子診断に重要であると思われる。

NGSを用いた迅速遺伝子解析において、今回のAarskog-Scott症候群の原因であるFGD1遺伝子、C症候群の原因であるCD96遺伝子の解析を例として、比較的精度が高く、効率のよい解析法であることが示された。しかしながら、FGD1遺伝子解析の欠失検出において、マッピングデータがSangerシーケンスデータとわずかにずれるなどの問題も明らかとなった。この相違は、実際のNGS解析そのものではなく、おそらくマッピングアルゴリズムによると考えられるため、より精度の高いアルゴリズムの改良も今後必要となると考えられた。

しかしながら、ベンチトップ型のNGSを使用した解析にも関わらず、従来のSangerシーケンス解析に比較して、解析コスト、解析時間、解析可能検体数は、いずれもSanger型を凌駕するものであり、今後はNGS解析を中心とした、遺伝子診断の開発も重要となると思われた。

今回の結果およびNGSの性能から考えると、さらに多検体あるいは、多数の疾患遺伝子を対象とした、NGS解

析による迅速な遺伝子解析（診断）が可能と考えられた。

E. 結論

Exome 解析によって先端異骨症の原因遺伝子として *PDE4D* 遺伝子および *PRKARIA* 遺伝子変異に加え、新規原因遺伝子を明らかにした。次世代型シーケンサを利用した原因不明の遺伝性疾患の解析、とりわけ whole exome 解析法は、単一家系例や孤発例の多い奇形症候群の原因同定にも非常に有用であることが示された。

さらに、C症候群関連疾患において、(*CD96* 遺伝子変異、*ASXL1* 遺伝子変異を認めない) 患児での新規遺伝子変異の発見や *CD96* 遺伝子を中心とした迅速診断法の開発により、臨床的 C 症候群ならびに類似疾患患児の遺伝子診断に基づく疾患の新たな分類と確定診断が期待される。

沖縄型運動感覚ニューロパチーは、東大神経内科グループと同様であったが、TFG 遺伝子の変異により発症すると推定された。

Ohdo 症候群においては、臨床的分類と同様に、Ohdo-like(Ohdo/SBBYS) 症候群および X連鎖 Ohdo-like 症候群と異なることが分子遺伝学的にも示され、新規原因遺伝子の変異によると推定された。

これら原因遺伝子が判明した奇形

症候群の臨床では、迅速で効率のよい遺伝子診断の実現が望まれるが、C症候群、Aarskog-Scott症候群において、NGSを用いたターゲットリシーケンス解析が有用であることが示された。

今後は、本手法をさらに発展させ、多数の奇形症候群（遺伝子群）を対象とした、網羅的迅速遺伝子診断法の確立が有用であると思われる。

——達成度について——

地域集積された難病・稀少疾患の原因遺伝子単離と迅速診断法の開発を目標として研究を開始し、当初の予定通り、先端異骨症の原因遺伝子を同定し新規変異を同定、ホルモン抵抗性先端異骨症の *PRKARIA* 遺伝子変異を同定、非典型的先端異骨症の新規原因遺伝子を同定、C（様）症候群の新たな原因遺伝子を同定できた。

また、東京大神経グループと結果は同じであったが、沖縄型運動感覚ニューロパチーの原因を特定できたこと、Ohdo症候群（オリジナル症例）は、Ohdo-like症候群の原因とは異なり、別の遺伝子が原因となっていることを発見できたことは大きな進展である。

さらに、次世代シーケンサを用い、迅速で低コストのAarskog-Scott症候群遺伝子変異解析システムを開発したこと、および、Aarskog-Scott症候群の新規遺伝子変異を同定できたこと

も大きな進展である。

今後は、最終年度に向け、原因を同定できた疾患について詳細な病態解析を行うとともに、他の集積された遺伝性疾患についても解析を継続し、次世代シーケンサ解析を中心とした原因特定研究を完成させ、次世代シーケンサを併用した病因・病態解明、迅速診断法を確立する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Suzumori N, Kaname T, Muramatsu Y, Yanagi K, Kumagai K, Mizuno S, Naritomi K, Saitho S, Sugiura M. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstetr Gynaecol Res*, (2013) *in press*.
2. Altıncık A, Kaname T, Demir K, Böber E. A novel mutation in a mother and a son with Aarskog-Scott syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab*, (2013) doi: 10.1515/jpem-2012-0233. [Epub ahead of print].
3. Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T,

- Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet*, (2013) *in press*.
4. Kaname T, Yanagi K, Naritomi K. A commentary on the diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome and related disorders. *J Hum Genet*, (2013) 58:57.
 5. Jinam T, Nishida N, Hirai M, Kawamura S, Oota H, Umetsu K, Kimura R, Ohashi J, Tajima A, Yamamoto T, Tanabe H, Mano S, Suto Y, Kaname T, Naritomi K, Yanagi K, Niikawa N, Omoto K, Tokunaga K, Saitou N. The history of human populations in the Japanese Archipelago inferred from genomewide SNP data with a special reference to the Ainu and the Ryukyuan populations. *J Hum Genet*, (2012) 57:787-795.
 6. Yanagi K, Kaname T, Wakui K, Hashimoto O, Fukushima Y, Naritomi K. Identification of four novel synonymous substitutions in the X-linked genes *neurologin 3* and *neurologin 4X* in Japanese patients with autistic spectrum disorder. *Autism Res Treat*, (2012) 2012 id724072. doi:10.1155/2012/724072.
 7. Cheung W, Kotzamanis G, Abdulrazzak H, Goussard S, Kaname T, Kotsinas A, Gorgoulis VG, Grillot-Courvalin C, Huxley C. Bacterial delivery of large intact genomic-DNA-containing BACs into mammalian cells. *Bioeng Bugs*, (2012) 3(2).
 9. Kaname T, Yanagi K, Maehara H. Osteosarcoma and *midkine*. '*Midkine: From embryogenesis to pathogenesis and medication*' Ergüven M, Billir A, Muramatsu T. Eds. Springer, New York, (2012) pp313-319.
 10. 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. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet*, (2012) 44(4):376-378.
 9. He Y, Wang WR, Xu S, Jin L; Pan-Asia SNP Consortium. Paleolithic Contingent in Modern Japanese:

Estimation and Inference using
Genome-wide Data. *Sci Rep*, (2012)
2:355.

2) 学会発表

国内学会等

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
国際会議場, 福岡

4P-0017: Re-sequencing and refinement
of genomic structure of six
susceptibility regions to diabetes
mellitus in a mice strain (*Mus
musculus molossinus*). T Kaname, K.
Yanagi, S. Song, Z. Li, K-i. Yamamura

4P-0513: Expression and cellular
localization of the Trk-fused gene
(TFG). K. Yanagi¹, T. Kaname, Y.
Sakiyama, H. Takashima, K. Naritomi

日本人類遺伝学会第57回大会 2012年
10月25日(木)～27日(土), 京王
プラザホテル, 東京

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

LS-11-2: ターゲトリシーケンス再び

-from bench to clinic-. 要 匡

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
児の転座切断点解析. 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

O-69: BCOR遺伝子変異(c.254C>T)を
認めた胎児Lenz無眼球症の1例. 鈴
森伸宏、要 匡、柳久美子、村松友
佳子、谷合弘子、水谷栄太、大林伸
太郎、齋藤伸治、杉浦真弓

第19回日本遺伝子診療学会 2012年7
月27日(金)～28日(土), 三井ガ
ーデンホテル千葉; 千葉

O-7: Aarskog-Scott症候群における
FGD1遺伝子変異解析. 要 匡、柳久
美子、岡本伸彦、黒澤健司、泉川良
範、福嶋義光、蒔田芳男、近藤郁子、
塚原正人、Ayca Altincik、水野誠
司、伊藤靖典、成富 研二

第52回日本先天異常学会学術集会
2012年7月6日(金)～8日(日),
東京女子医科大学弥生記念講堂; 東
京

PA2-4: 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115回日本小児科学会学術集会 2012
年4月20日（金）～22日（日），福
岡国際会議場；福岡

O-334: 次世代シーケンサによるレン
ツ小眼球症候群の変異同定と診断
システムの確立. 要 匡、當間隆也、
村松友佳子、板垣裕輔、水野誠司、
黒澤健司、成富研二

国際学会

**The American Society of Human
Genetics, 62nd Annual Meeting, San
Francisco, CA, USA, November 6-10,
2012.**

2758W: Novel mutations of the FGD1
gene in 16 patients with Aarskog-Scott
syndrome. **Authors:** T. Kaname, K.
Yanagi, N. Okamoto, K. Kurosawa, Y.
Izumikawa, Y. Fukushima, Y. Makita,
M. Tsukahara, A. Altincik, S. Mizuno,
K. Naritomi

**10th Korean PWS Symposium, Seoul,
Korea, September 18, 2012.**

(invited): A practical approach to genetic
diseases by next-generation
sequencing technologies. : T. Kaname

**EUROPEAN Human Genetics
CONFERENCE 2012, Nürnberg,**

Germany, June 23-26, 2012.

P12.131: A mutation detected by exome
sequencing and phenotypic variability
in a family with Lenz microphthalmia
syndrome. **Authors:** T. Kaname, K.
Yanagi, Y. Muramatsu, T. Tohma, H.
Hanafusa, K. Morita, S. Ikematsu, Y.
Itagaki, H. Taniai, K. Kurosawa, S.
Mizuno, K. Yoshiura, K. Naritomi

P02.150: Distinct pathogenic substitution
of IVS15+5G>A in the SLC26A4
gene in patients with enlarged
vestibular aqueduct and Pendred
syndrome in Okinawa islands.
Authors: A. Ganaha, T. Kaname, K.
Yanagi, K. Naritomi, S. Usami, M.
Suzuki

その他

**H24 年度 熊本大学体験講座「遺伝子
と仲良くなろう」2013年2月9日(土)
～2月10日(日), 熊本大学；熊本
iPS細胞ってな～に. 要 匡**

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



1 家系の患者と健常者の遺伝子を次世代シーケンサー(5500 SOLiD シーケンサー ; Life Technologies 社)でデータ取得後、以下の条件を満たす遺伝子を抽出した。

- 1) 非患者は正常ホモかヘテロをもつ、
- 2) 患者は変異ホモをもつ、
- 3) malignant な変異 (nonsynonymous SNV, stop gain/loss, frameshift, nonframeshift, スプライシング異常) である、
- 4) 1,000 人ゲノムプロジェクト(1,000g project) およびエキソームシーケンシングプロジェクト 6,500 (ESP6,500 project) から多型ではない、
- 5) segmental duplication 領域ではない。

C. 研究結果

研究方法に示した条件を満たす遺伝子は、10 遺伝子 11 か所のみ抽出された。さらに変異の有無を確かめるため、シーケンスを行い確認したところ、患者で変異のあるホモ、健常兄弟でホモあるいはヘテロである 5 か所のミスセンス変異を確認した。変異による蛋白構造変化を PolyPhen2 プログラムで予測したところ、probably damaging を示すものが存在した。

GeneID	uniq_loci	recessive	dominant	affl_HOM	affl_HET	
SMPDL3B		1	1	1	1	0
HISPL2		1	1	1	1	0
OPRN1		1	1	1	1	0
HLA-DQB1		2	1	1	2	0
ANKK1A		1	1	1	1	0
CPH6E		1	1	1	1	0
KIAA1867		1	1	1	1	0
HP55		1	1	1	1	0
BBP2		1	1	1	1	0
MICAL2		1	1	1	1	0

D. 考察

次世代シーケンサーによって、疾患遺伝子が 5 遺伝子まで絞ることができた。現在、疾患遺伝子の可能性のある 5 遺伝子について siRNA を作成、ヒト由来の骨芽細胞、前破骨細胞、軟骨細胞へ導入して、細胞が変化するかスクリーニングを行っている。1 家系では疾患遺伝子と確定できないため、同様の家系を全国的に調査したい。疾患遺伝子が絞られた後、骨融解の激しいムチランス型 RA 患者の遺伝子変異を解析する予定である。

E. 結論

関節破壊が進行する 1 家系の遺伝子解析を次世代シーケンサーで行い、5 か所のミスセンス変異を確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Migita K, Uehara R, Nakamura Y,
Yasunami M, Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki
M, Nakamura A, Masumoto J, Yachie A,
Furukawa H, Ishibashi H, Ida H,
Yamazaki K, Kawakami A, Agematsu K.
Familial Mediterranean Fever in Japan.
Medicine (Baltimore) 91:337-343, 2012

Migita K, Ida H, Moriuchi H, Agematsu K.
Clinical relevance of MEFV gene
mutations in Japanese patients with
unexplained fever. J Rheumatol.
39:875-877, 2012

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

井田弘明、福田孝昭 自己炎症症候群
の定義と分類 九州リウマチ
32(2):75-78, 2012

井田弘明、福田孝昭 自己炎症症候群
日本臨床 70(suppl 8):561-568, 2012

井田弘明 自己炎症症候群 日本医事
新報 4615:78-83, 2012

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

国内学会

第 56 回日本リウマチ学会学術集会
H24 年 4 月 26 日～28 日 東京都
井田弘明、海江田信二郎、本多靖洋、
有馬和彦、金崎克也、福田孝昭
自己炎症症候群であるプロテアソーム機能不全症の解析結果を利用した
関節リウマチの病態解明の試み

第 33 回日本炎症再生医学会 H24 年 7
月 5 日～6 日 福岡
井田弘明、有馬和彦、金澤伸雄、吉浦
孝一郎
プロテアソーム機能不全症(中條-西村
症候群)の炎症病態

国際学会

IEIIS 2012 Homeostatic Inflammation
Symposium 2012.10.23-26 Tokyo
Ida H, Kaieda S, Honda S, Arima K,
Yoshiura K, Kanazawa N, Fukuda T.
Proteasome disability syndrome: a novel
autoinflammatory syndrome

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：臨床症候群診断、試料収集

分担研究者：渡邊順子（久留米大学医学部小児科学講座・講師）

研究要旨

本研究に関し、分担者としての研究目的は(1) 確実な臨床診断を行い遺伝子特定のための試料を均一化すること(2) 稀な遺伝子疾患と思われる症例を実際に、gene hunting を行う研究班(吉浦グループ、要グループ)に提供することである。本年度は、原因不明の代謝疾患を提供した。

A. 研究目的

原因不明の多発先天奇形を合併する症例について、遺伝子変異解析を行う前に、マイクロアレイ解析にて染色体微細重複、欠失の有無を確認する。

B. 研究方法

患者からの血液検体から染色体標本を作成すると同時に、DNAを抽出し、Affymetrix社のCytoScan HD arrayを用いて解析する。

C. 結果

症例要約およびmicro array解析結果)

① SHIR 3386-00 多発性関節可動域制限、側わん症、左股関節脱臼、重度精神遅滞、小奇形(小顎、下顎後退、長くて深い人中)

▶ 46,XX,arr(1-22,X)X2

病的コピー数変異および10Mbを超過するLCSH(コピー数不変LOH)領域は検出せず

② MOAR 2976-00 先天性食道閉鎖症、動脈管開存症、大動脈縮窄症、右片腎、左腎形態異常、メチルマロン酸尿症、精神遅滞

▶

46,XX,arr18p11.21(13,894,280-14,412,624)

X1

病的コピー数変異および 10Mb を超過する LCSH (コピー数不変 LOH) 領域は検出せず

③ HASH 7384-00 子宮内発育遅延、羊水過少、口唇口蓋裂、そけいヘルニア、停留睾丸、右腎欠損、重度精神遅滞

▶ 46,XY,arrYq11.223q11.23(24,640,460-28,339,599)X2,1q31.1(188,889,792-189,386,477)

X1

病的コピー数変異および 10Mb を超過する LCSH (コピー数不変 LOH) 領域は検出せず

④ INMA 4014-00 子宮内発育遅延、低出生体重児、単一臍帯動脈、著明な成長障害、先天性心疾患 (心室中隔欠損症、心房中隔欠損症、不整脈)、両側水腎症

▶ 46,XX,arr

15q26.1q26.3(92,464,369-102,429,112)X1

15番染色体長腕 q26.1 にマップされる約 10Mb のシングルコピーロスを検出。欠失領域には既知疾患関連遺伝子として *IGF1R*, *MEF2A*, *ADAMTS17*, *CHSY1* などが含まれていた。

⑤ NARE 8447-00 子宮内発育遅延、成長障害、先天性心疾患 (心房中隔欠損症、心室中隔欠損症、副三尖弁、僧帽弁はパラシュート弁、肺高血圧症)、右腎欠損・左水腎症(VUR IV)、吸収不全症候群、重度精神遅滞、口唇口蓋裂、小奇形 (頭

大泉門狭小、眼間離開、切れ長の大きな眼、丸い顔、小顎症、翼状頸)

▶ 46,XX,inv(9),arr

7q11.21(64,608,268-65,094,968)X1

病的コピー数変異および 10Mb を超過する LCSH (コピー数不変 LOH) 領域は検出せず

D. 考察

エクソーム解析を行うにあたり、対象症例が、染色体の微細欠失、重複を有しないことを確認することは必須である。染色体レベルの異常がないことが明らかになった後に、遺伝子レベルの変異を検索することになる。今回、当科でフォロー中の精神遅滞を伴う奇形症候群の未診断例について、染色体欠失、重複の有無を検索するために micro array 解析を行った。1例のみで疾患に関連があると考えられる、染色体欠失を確認した。この症例は羊水細胞を用いた初回の G-band 解析では正常核型、次いで行った児の末梢血を用いた G-band 解析では今回の解析で判明した部位とは異なる部位にコピー数の変化を認めた。今回の症例は、micro array 解析により見出される染色体微細欠失症候群として既報のものと同一であったが、他の症例に比較し、臨床的に成長障害、各臓器障害がより重症であることから、欠失領域内の遺伝子の関与の有無について検討が必

要と考える。

E. 結論

今回、重複した大奇形および精神遅滞の合併症例について、microarray 解析を行った。4 症例中 1 例のみにコピー数の減少を認め、欠失領域内の遺伝子と症状との関連性が強く示唆された。microarray 解析によりコピー数の変化を認めなかった症例については、exome 解析の候補と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet A*. 158A(7): 1670-1675, July 2012.
2. Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T. Coagulopathy in Patients With Late-Onset Ornithine Transcarbamylase

Deficiency in Remission State: A Previously Unrecognized Complication. *Pediatrics*. 131(1):e327-330, Jan 2013.

3. Higashimoto K, Maeda T, Okada J, Ohtsuka Y, Sasaki K, Hirose A, Nomiyama M, Takayanagi T, Fukuzawa R, Yatsuki H, Koide K, Nishioka K, Joh K, Watanabe Y, Yoshiura K, Soejima H. Homozygous deletion of *DIS3L2* exon 9 due to non-allelic homologous recombination between LINE-1s in a Japanese patient with Perlman syndrome. *European Journal of Human Genetics*. in press 2013 Mar 13. doi: 10.1038/ejhg.2013.45. [Epub ahead of print]
4. Miyake N, Yano S, Sakai C, Hatakeyama H, Matsushima Y, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, Saito H, Ogata K, Goto YI, Matsumoto N. Source. Mitochondrial Complex III Deficiency Caused by a Homozygous UQCRC2 Mutation Presenting with Neonatal-Onset Recurrent Metabolic Decompensation. *Hum Mutat*. 34(3):446-452. 2013, Mar.