

201238013A

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）

分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の
解明と遺伝子診断ネットワークの形成

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎健次郎

平成25（2013）年3月

目 次

I. 平成24年度構成員名簿	1
II. 総括研究報告書	
平成24年度総括研究報告	3
小崎 健次郎 (慶應義塾大学医学部・臨床遺伝学センター)	
III. 分担研究報告書	
1. 次世代シーケンサーを用いた先天奇形症候群の原因遺伝子群の網羅的解析系のバリデーション	7
小崎 健次郎 (慶應義塾大学医学部・臨床遺伝学センター)	
2. 次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析と診断への応用に関する研究	10
松永達雄 (国立病院機構東京医療センター・感覚器センター・聴覚障害研究室長)	
3. 次世代シーケンサーを応用した先天性中枢神経奇形症候群患者の原因遺伝子探索	14
金村 米博 (独立行政法人国立病院機構大阪医療センター)	
4. 次世代シーケンサーを用いた骨系統疾患の原因遺伝子群の網羅的解析系の設計	18
小崎 里華 (独立行政法人国立成育医療研究センター・内科系専門診療部・遺伝診療科)	
5. 次世代シーケンサーによる解析に関する研究	21
工藤 純 (慶應義塾大学医学部・遺伝子医学研究室)	
6. 次世代シーケンサーによる先天異常症患者ゲノム変異探索システムの改良	23
清水 厚志 (岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・生体情報解析部門)	
7. 次世代シーケンサーを用いたバイオインフォマティクス解析による先天性異常症の遺伝的要因の解明に関する研究	27
宮 冬樹 (独立行政法人理化学研究所・ゲノム医科学研究センター・情報解析研究チーム)	
8. 次世代シーケンサーの臨床診断への応用	32
黒澤 健司 (地方独立行政法人神奈川県立病院機構・神奈川県立こども医療センター遺伝科)	
9. 脳形成障害およびシナプス形成障害の遺伝学的成因に関する研究	40
齋藤 伸治 (名古屋市立大学大学院医学研究科・新生児・小児医学分野)	
10. 遺伝子解析における患者家族向け説明同意文書に関する研究	
- 単一遺伝子解析用説明同意文書とエクソーム解析用同意文書の比較と問題点 -	42
水野 誠司 (愛知県心身障害者コロニー中央病院・臨床第一部)	
11. 難治性脳形成障害症のデータ試料バンクを活用し、次世代シーケンサーを用いた脳梁欠損症の遺伝子解析に関する研究	46
山崎 麻美 (社会医療法人愛仁会・高槻病院)	
12. 小児神経疾患標的遺伝子解析に関する研究	50
岡本伸彦 (地方独立行政法人大阪府立病院機構・大阪府立母子保健総合医療センター)	
13. 東日本圏における患者情報収集 (中枢神経奇形・奇形症候群) と遺伝子解析に関する研究	52
加藤 光広 (山形大学医学部附属病院・小児科)	
14. 眼先天異常の遺伝子診断に関する研究	55
仁科 幸子 (独立行政法人国立成育医療研究センター・感覚器・形態外科部眼科)	
15. iPS細胞を用いた先天異常症の遺伝的要因の解明のためのシステム構築	82
赤松和土 (慶應義塾大学医学部・生理学教室)	
16. 先天性疾患における非同義置換のメダカモデルを用いた解析	85
谷口 善仁 (慶應義塾大学医学部・衛生学公衆衛生学教室)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	89

〔 I 〕

平成24年度構成員名簿

平成24年度 厚生労働省科学研究費補助金
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）
「分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と
遺伝子診断ネットワークの形成」研究班

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	小崎健次郎	慶應義塾大学医学部 臨床遺伝学センター	教授
研究分担者	松永達雄	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 感覚器センター聴覚障害研究室	室長
	金村米博	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 再生医療研究室	室長
	小崎里華	独立行政法人国立成育医療研究センター 内科系専門診療部 遺伝診療科	医長
	工藤 純	慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室	教授
	清水厚志	岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク 機構生体情報解析部門	特命教授
	宮 冬樹	独立行政法人理化学研究所 ゲノム医科学研究センター 情報解析研究チーム	研究員
	黒澤健司	地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター 遺伝科	部長
	齋藤伸治	名古屋市立大学大学院医学研究科	教授
	水野誠司	愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部	部長
	山崎麻美	社会医療法人愛仁会 高槻病院	副院長
	岡本伸彦	地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科	科長
	加藤光広	山形大学医学部附属病院 小児科	講師
	仁科幸子	独立行政法人国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部眼科	医員
	赤松和土	慶應義塾大学医学部 生理学教室	講師
谷口 善仁	慶應義塾大学医学部 衛生学公衆衛生学教室	講師	

〔Ⅱ〕

総括研究報告書

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

「分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と
遺伝子診断ネットワークの形成」

研究代表者 小崎 健次郎
慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授

研究要旨

本研究では中枢神経系・感覚器が発生的に頭部外胚葉という共通の由来を持ち、先天異常の発症に共通の遺伝子経路が関与する可能性が高いことに着目して、コンソーシアムを編成し、臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指した。次世代シーケンサーのデータから真の疾患関連変異候補を抽出するための解析パイプラインの開発・最適化・バリデーションを行った上、先天異常症候群分野・難聴分野・中枢神経奇形分野について約 600 検体を解析した。形態形成遺伝子等を含む 150 遺伝子を網羅するパネル、難聴原因遺伝子・関連遺伝子 140 を網羅するパネル、284 遺伝子の標的遺伝子群パネルとエクソーム解析を並行して適用した。神経皮膚黒色症、Noonan-神経線維腫、新生児期発症の早老症、難聴、小頭症・大頭症等について新規疾患原因遺伝子を同定した。慶應大学に加え、ナショナルセンター・国立病院機構東京医療センター臨床研究センターにおいて全国の先天異常症の遺伝子診断の需要に対して速やかに対応できる体制が整備された。小児医療の均てん化に大きく貢献できる成果である。

研究分担者

松永 達雄	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 感覚器 聴覚障害研究室長
金村 米博	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室長
小崎 里華	独立行政法人国立成育医療研究センター 器官病態系内科部・遺伝診療科 医長
工藤 純	慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室 教授
清水 厚志	慶應義塾大学医学部分子生物学教室 助教
宮 冬樹	独立行政法人理化学研究所ゲノム医科学研究センター 研究員
黒澤 健司	独立地方行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター 遺伝診療科 部長
齋藤 伸治	名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野 教授
水野 誠司	愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部 部長
山崎 麻美	独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 副院長
岡本 伸彦	地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科 主任部長
加藤 光広	山形大学医学部附属病院 小児科 講師
仁科 幸子	独立行政法人国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 眼科 医員
赤松 和土	慶應義塾大学医学部生理学教室 講師
谷口 善仁	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室 講師

研究協力者

緒方 勤	国立大学法人浜松医科大学医学部小児科学講座 教授
沼部 直博	京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻 健康管理学講座医療倫理学 准教授
吉橋 博史	東京都都立小児総合医療センター 臨床遺伝科 医長
武内 俊樹	慶應義塾大学医学部地域小児医療調査研究講座 特任助教
柳橋 達彦	慶應義塾大学医学部小児科学教室 助教
奥野 博庸	慶應義塾大学医学部小児科学教室 医師
山口 有	慶應義塾大学医学部小児科学教室 医師
鳥居 千春	慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 研究員

A. 研究目的

われわれは中枢神経奇形・感覚器奇形・奇形症候群の各領域の先天異常症について各々のコンソーシアムを形成し研究を行っている。研究対象とする全疾患が「希少性・原因不明・治療方法未確立・生活面への長期の支障の4要素」を満たすことから、難治性疾患克服事業に参画し、全体で30余の研究班の活動を遂行してきた。本計画では中枢神経系・感覚器が発生的に頭部外胚葉という共通の由来を持ち、先天異常の発症に共通の遺伝子経路が関与する可能性が高いことに着目して、既存3コンソーシアムの複合体を新たに編成の上、臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指した。先天異常症の原因診断を促進し、治療を含めた診療全般の向上につながることを目的とし、さらには研究の実施を通じて、ナショナルセンターが中核施設として全国に遺伝診断を提供できるネットワークを確立することを目的とした。

B. 研究方法

原因遺伝子の機能や染色体上の位置が不明な疾患については全ゲノム翻訳領域の網羅的解析を行った。同時に原因遺伝子がすでに同定されているが、変異陽性率が数〜数十パーセントに限られる疾患や、これまでの研究により原因遺伝子のゲノム上の位置が判明済みである疾患をも解析対象とした。前者については、同一シグナル伝達経路上の他の全遺伝子のみを標的遺伝子群として解析し、第2・第3の原因遺伝子を同定をめざした。

標的遺伝子・標的領域のゲノムDNAを次世代シーケンサーにより解析し、粗配列データを生成したのち、正常配列上に整理し既知の多型を除外後、同一疾患患者間のデータ等により最終的な候補遺伝子を同定するというアプローチを取った。この各種のステップにおいて、解析法の最適化を進めた。

最適化に際しては、変異探索システムの改良(清水・宮・工藤)、各種解析系の比較(清水)、バリデーション(宮・小崎・黒澤)を行った。さらに、全ゲノム/全エクソーム解析では原因を同定できない疾患への応用に向けて、発現変動遺伝子同定システムの構築(清水)を行った。

次世代シーケンサーから得られる大量のデータを効率的に解釈するため、既知の疾患の原因遺伝子と、既知疾患原因遺伝子が属する分子パスウェイの上流・下流の遺伝子をの遺伝子の網羅的な列挙を進めた(小崎里華・仁科)。これらの遺伝子を標準的な登録番号(カリフォルニア大学サンタクルツ校ゲノムデータベース UCSD ID)に変換した患者ゲノムDNAからこれらの遺伝子に対応する領域を効率的に回収するためのオリゴヌクレオチドアレイを設計した(小崎・松永・金村)。

日本人解析多型のデータは、松田班から早期に供与を受けた(全グループ)。また、全エクソーム解析について拠点班の松本班(金村・山崎・齋藤・加藤)・梅澤班(小崎里華)の協力を得た。

次世代シーケンサーによるゲノム解析により、多数の非同義アミノ酸置換が同定された。これらが先天奇形に与える影響を調べるには、発見された非同義置換の数を考えると、解析を効率的に進めるためのモデルの作成を進めた(谷口)。同時に、従来の単一遺伝子解析用の説明同意文書を用いた時期の家族への説明に比べて、エクソーム解析を前提とした新しい説明同意文書を用いた説明を開始した以降に、患者家族の理解や受け止め方がどのように変化したかについて、診療録と説明者の感想を元に検討した(水野)。変異陽性患者由来の疾患特異的 iPS 細胞の作成とバンキングは再生医療研究や新規薬剤候補化合物の開発に不可欠であることから、厚生労働省・文部科学省「再生医療の実現化プロジェクト「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」の「神経難病研究」班と連携した(赤松)。

(倫理面への配慮)

個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。遺伝子解析に際しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

C. 研究結果

次世代シーケンサーのデータから真の疾患関連変異候補を抽出するため、解析パイプラインの更なる改良を行った(清水・工藤・宮)。その解析パイプラインを用いて、変異箇所が既知の HapMap サンプル(宮)および神経線維腫症1型患者の86検体(小崎)について、我々の実験系で次世代シーケンサーにて変異を探索し精度を検証した結果、偽陽性率(変異が存在しないのに変異を誤って検出してしまう率)・偽陰性率(変異が存在するのに検出できない率)とも極めて0に近い正確な精度を有することが確認できた。

<先天異常症候群分野>

初年度に形態形成遺伝子等を含む150遺伝子を網羅するパネルを完成し、今年度までに260検体の解析を終了した。以下の具体的な成果を得た。

i) 神経皮膚黒色症に NRAS 等 MAPキナーゼ系遺伝子の体細胞変異を同定、ii) CFC 症候群の原因の MEK2 の変異により神経線維腫1型に極めて近い疾患が発症、iii) 新生児期発症の早老症

(Wiedemann-Rautenstrauch 症候群)の原因が、表現型の全く異なるマルファン症候群の原因の FBN1 の特殊な変異により発症、iii) 全エクソーム解析により、青年期発症の早老症患者に幹細胞の維持に必須の Gタンパク受容体の変異を同定した(小崎)。

次世代シーケンサーの臨床応用を目的に、臨床検体を用いて遺伝的異質性の高い奇形症候群の遺伝子診断を試みた。LA-PCR とキット化されている custom amplicon との2つの方法による

target-enrichment で解析の有用性を実証した(黒澤)。SureSelect による標的遺伝子解析の感度・特異度が従来のサンガー法と同程度であることを、神経線維腫症1型患者86名の解析により実証した。86検体中62検体で病的意義のある変異を

同定した。変異検出率72.1%、各エクソンの平均カバレッジは66xであった。次世代シーケンサーによる分析結果と直接シーケンス法による結果は一致した（小崎・清水）。

<難聴分野>

初年度に、難聴原因遺伝子・関連遺伝子140を網羅するパネルを完成した。難聴遺伝子の病的変異が従来のサンガー法で同定されておらず、かつ難聴者および家族のDNA検体が1家系で3人以上から収集されている29家系、104検体について次世代シーケンサーによる塩基配列創出とゲノム上へのマッピング、変異抽出、家系解析を行い、12家系について原因遺伝子変異候補を同定できた（松永）。このうち6種類の原因遺伝子（SLC26A5、ACTG1、POU4F3等）は、本邦で未報告のものであった。

<中枢神経奇形分野>

疾患原因遺伝子・関連遺伝子284を網羅するパネルを完成した（金村）。並行して小児神経放射線の専門家による画像診断検討委員会（山崎）で全ての症例をレビューし、確実な診断のもとに、全国28施設から284家系335症例の登録を行ってきた。

284遺伝子の標的遺伝子群パネル解析を用いて116家系120検体のシーケンスデータの取得を行い、その原因遺伝子同定率は11.6%であった（金村・宮）。小頭症9家系中2家系でPNKP遺伝子に新規のホモ接合変異を同定し、Sanger法で変異を確認した（加藤）。全エクソーム解析に関しては11家系28検体からシーケンスデータの取得を行い、解析を行った全家系における候補遺伝子同定率は36.4%であった。大脳皮質形成障害と大頭症のエクソーム解析ではAKT3のde novo変異を同定できた（齋藤）。

次世代シーケンサーの解析用説明同意書を用いた説明では、染色体、遺伝子、DNAなどの基本的な遺伝学の知識を患者家族が理解することが必要であるために説明に多くの時間を要した。一方、患者家族の遺伝学的事項の理解の程度が向上し、十分に理解した家族においては研究事業への参加意識が高く解析にも協力的な例が多かった。

D. 考察

新規疾患原因遺伝子の発見は、病態の解明とiPS細胞等の再生医療技術を用いた治療法の開発に不可欠である。同時に各患者に対しても合併症の回避・次子再罹患率の予測・分子病態に応じた治療法選択という福利をもたらすと期待される。

神経皮膚黒色症にNRAS等MAPキナーゼ系遺伝子の体細胞変異を同定、ii)CFC症候群の原因のMEK2の変異により神経線維腫1型に極めて近い疾患が発症、iii)新生児期発症の早老症でFBN1変異を同定、小頭症でPNKP遺伝子、大頭症のエクソーム解析ではAKT3の変異を同定することができた。

遺伝性難聴を疑われる家系のうち、原因不明で

あった29家系のうち12家系について新規原因遺伝子変異候補を同定することに成功した。新規疾患原因遺伝子の同定により、生検等、侵襲的な手段によらず疾患の早期の確定診断が可能となり、疾患に特異的な合併症の早期発見と治療が可能になると期待される。

複数施設のバイオインフォマティクスの専門家の調整を通じて、解析パイプラインを最適化することができた。慶應大学に加え、ナショナルセンター・国立病院機構東京医療センター臨床研究センターにおいて全国の先天異常症の遺伝子診断の需要に対して速やかに対応できる体制が整備された。小児医療の均てん化に大きく貢献できる成果である。大型次世代シーケンサーと高スループット小型次世代シーケンサーの利用により、遺伝子診断の実施コストを現行の数分の一にまで低減しており、医療経済に過重な負担を強いることなく遺伝子診断の医療応用を促進できると期待される。

今後の課題として、検査フローの確立、正確な臨床情報と両親の遺伝情報が不可欠であること、次世代シーケンサーの解析能力の向上やライブラリー作成キットの性能の向上など、があげられた。

NGSを用いた遺伝子解析を行う際の患者家族への説明は、ゲノム俯瞰的検査としての遺伝学的事項の理解を必要とするため、結果的に患者家族がより正確で深い理解を得るに至り、研究事業全体の参加意識の向上にも繋がると考えられた。これらの説明と同意取得には遺伝カウンセラーなどの関連専門職の関与も有用であった。次世代シーケンサーによるゲノム解析により、多数の非同義アミノ酸置換が発見されたが先天奇形に与える影響の評価が困難な場合が少なくない。本研究で開発したメダカを用いた解析系は、体外発生するため先天異常の検証に極めて有効であることが示された。

先天異常症の多くはメンデル遺伝病である。遺伝子変異陽性患者由来のiPS細胞は再生医療技術を用いた治療法の開発に大きく貢献できると期待される。

E. 結論

次世代シーケンサーのデータから真の疾患関連変異候補を抽出するための解析パイプラインの開発・最適化・バリデーションを行った神経皮膚黒色症、Noonan-神経線維腫、新生児期発症の早老症、難聴、小頭症・大頭症等について新規疾患原因遺伝子を同定した。慶應大学に加え、ナショナルセンター・国立病院機構東京医療センター臨床研究センターにおいて全国の先天異常症の遺伝子診断の需要に対して速やかに対応できる体制が整備された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *Am J Med Genet A*. 2012;158(3):514-518.
- 2) Kosaki R, Kaneko T, Torii C, Kosaki K. EEC syndrome-like phenotype in a patient with an IRF6 mutation. *Am J Med Genet A*. 2012;158(5):1219-1220.
- 3) Takenouchi T, Nakazawa M, Kanemura Y, Shimozato S, Yamasaki M, Takahashi T, Kosaki K. Hydrocephalus with Hirschsprung disease: severe end of X-linked hydrocephalus spectrum. *Am J Med Genet A*. 2012;158(4):812-5.
- 4) Tanaka R, Takenouchi T, Uchida K, Sato T, Fukushima H, Yoshihashi H, Takahashi T, Tsubota K, Kosaki K. Congenital corneal staphyloma as a complication of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012;158(8):2000-2002.
- 5) Yagihashi T, Kosaki K, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Takahashi T, Sato Y, Kosaki R. Age-dependent change in behavioral feature in Rubinstein-Taybi syndrome. *Congenit Anom*. 2012;52(2):82-86.
- 6) Nomura T, Takenouchi T, Fukushima H, Shimozato S, Kosaki K, Takahashi T. Catastrophic Autonomic Crisis With Cardiovascular Collapse in Spinal Muscular Atrophy With Respiratory Distress Type 1. *J Child Neurol*. 2012 Aug 16.
- 7) Takenouchi T, Enomoto K, Nishida T, Torii C, Okazaki T, Takahashi T, Kosaki K. 12q14 microdeletion syndrome and short stature with or without relative macrocephaly. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(10):2542-4.
- 8) Takenouchi T, Okuno H, Kosaki R, Ariyasu D, Torii C, Momoshima S, Harada N, Yoshihashi H, Takahashi T, Awazu M, Kosaki K. Microduplication of Xq24 and Hartsfield syndrome with holoprosencephaly, ectrodactyly, and clefting. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(10):2537-41.
- 9) Takenouchi T, Yagihashi T, Tsuchiya H, Torii C, Hayashi K, Kosaki R, Saitoh S, Takahashi T, Kosaki K. Tissue-limited ring chromosome 18 mosaicism as a cause of Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(10):2621-3.
- 10) Osumi T, Miharuru M, Fuchimoto Y, Morioka H, Kosaki K, Shimada H. The germline TP53 mutation c.722 C>T promotes bone and liver tumorigenesis at a young age. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;15;59(7):1332-3.

2. 学会発表

- 1) Shimizu A, Torii C, Suzuki N, Mutai J, Kudoh H, Kosaki R, Mmatsunaga T, Kosaki K. Rapid and efficient mutation in the hundreds of target genes by bench-top next generation sequencer with custom target capture method. *American Society of Human Genetics*, 2012
- 2) 三須久美子 桐林和代 佐谷秀行 鳥居千春 小崎里華 小崎健次郎: 神経線維腫症1型の遺伝様式に関する患者家族の誤解の類型化 第36回 日本遺伝カウンセリング学会 2012.6.10
- 3) 武内俊樹 下郷幸子 山崎麻美 小崎里華 小崎健次郎 高橋高雄: LICAM 変異により発症した先天性水頭症と Hirshsprung 病の合併例 第54回 日本小児神経学会総会 2012.4.19
- 4) 柳橋達彦 小崎健次郎 小崎里華 吉橋博史 井原正博 高橋孝雄: Williams 症候群における欠失範囲の大きさと発達遅滞の重症度との関係 第115回 日本小児学会学術集会 2012.4.22

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
3. その他
なし

〔Ⅲ〕

分担研究報告書

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

次世代シーケンサーを用いた先天奇形症候群の原因遺伝子群の網羅的解析系のバリデーション

研究代表者 小崎 健次郎
慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授

研究要旨

本研究は次世代シーケンサーを用いることにより、臨床診断が困難である先天奇形症候群を遺伝子診断により原因を特定し、合併症を回避することによって質の高い診療を提供することを目的としている。初年度は、遺伝子診断を行う臨床的意義が高いと思われる疾患を選定し、ターゲット・エンリッチメントのためのシステムを設計した。約200個の先天奇形症候群原因遺伝子および関連する遺伝子の蛋白質コーディング全領域を網羅的に解析する系を設計した。今年度は3一つの疾患（神経線維腫症1型）に着目し、解析系の感度と特異度を評価した。既存の方法であるサンガー法の結果と完全に一致したことから、次世代シーケンサーを臨床検査として利用する事が可能である。

A. 研究目的

本研究は次世代シーケンサーを用いることにより、臨床診断が困難である先天奇形症候群を遺伝子診断により原因を特定し、合併症を回避することによって質の高い診療を提供することを目的としている。初年度は、遺伝子診断を行う臨床的意義が高いと思われる疾患を選定し、ターゲット・エンリッチメントのためのシステムを設計した。本研究では、当該パネルの感度・特異度を評価するため、パネルに含まれる遺伝子の1つであるNF1遺伝子に注目してバリデーションを行った。NF1遺伝子は皮膚のカフェオレ斑・腋下や鼠径部の雀卵斑様色素斑・虹彩Lisch結節・神経繊維腫を主症状とする常染色体優性遺伝病で神経線維腫症型の原因遺伝子である。NF1遺伝子は58エクソンから構成される巨大遺伝子である上に、変異好発部位が存在せず全領域の分析を要することから、臨床検査としての遺伝子解析はわが国では殆ど行われていない。

B. 研究方法

① NIHの臨床診断基準を満たしたNF1成人患者86名を対象とした。レックリングハウゼン病診療ネットワークを通じて解析希望者をリクルートし、各施設にてインフォームドコンセント、遺伝カウンセリングを行った後末梢血を採取、分析した。

② Agilent社のカスタムマイクロアレイを用いた。同社のマイクロアレイ設計ソフトウェアである「eArray」を使用した。eArrayで自動設計したカスタムキットにはGC含量が高い領域や反復配列の混入を避けるために、複数のエクソン領域でプローブが未設計であった。そこで、プローブの配列とUCSCのエクソン位置情報を比較し、可能な限り未設計領域へ新たにプローブ

を追加設計し、Agilent社に合成を依頼した。

③ 解析検体は、インターカレーション法による精密なDNA濃度測定を行い、Covaris社製超音波破碎機を用い、至適条件下で、約150bpへ断片化する。これをベックマン社AMPure磁性ビーズを用いて精製しSureSelectターゲットエンリッチメントライブラリーとハイブリダイズさせ、各検体の解析対象となる難聴遺伝子領域を濃縮した。各検体はインデックスタグを付加し増幅し、イルミナ社製次世代シーケンサーMiSeqを用いて塩基配列データを創出した。品質チェックを経て参照ゲノムDNA配列上へのマッピングを行い、検体毎に遺伝子変異を同定した。

④ デスクトップ型次世代シーケンサーであるMiSeqを併用した。

⑤ 患者検体から得られたDNA配列データをヒトの標準的なゲノム配列に整列（アラインメント）し、アラインメントのあとのデータ解析にはグラフィカルユーザーインターフェースを有するプログラムを使用した。検出された変異は、直接シーケンス法（サンガー法）を用い確認を行った。

（倫理面への配慮）

個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。遺伝子解析に際しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

C. 研究結果

①解析系の設計

約200個の先天奇形症候群原因遺伝子および関連する遺伝子の蛋白質コーディング全領域を網羅的に解析する系を設計した。

②次世代シーケンサーからの粗配列の出力ターゲット濃縮（アジレント社SureSelect）とデスクトップ型シーケンサー（イルミナ社MiSeq）

を用いて他の先天異常症候群の原因遺伝子とともにNF1遺伝子を網羅的に解析した。

③粗配列のアラインメント

次世代シーケンサーからはDNA配列と塩基毎の精度がfastqフォーマットで出力される。そこで、得られたfastqファイルをヒト参照配列によりアラインメントした。

④ 神経線維腫症1型86検体中62検体で病的意義のある変異を同定した。変異検出率72.1%、各エクソンの平均カバレッジは66xであった。次世代シーケンサーによる分析結果と直接シーケンシング法による結果は一致した。

D. 考察

直接シーケンシング法による結果をゴールドスタンダードとするなら、今回検討した解析プロトコルの感度・特異度は100%と考えられる。以上の成績から次世代シーケンサーを用いたNF1の解析系の感度・特異度が、現行のサンガー法と同等であることが確認された。24例については変異が同定されなかったが、複数エクソンないし遺伝子全体に及ぶ欠失が検出されず、偽陰性となっている可能性がある。複数エクソンないし遺伝子全体に及ぶ欠失は現行の第2世代次世代シーケンサーとサンガー法のともに検出する事が出来ない変異である。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いたNF1遺伝子の解析系の感度・特異度が、現行のサンガー法と同等であることが確認された。NF1遺伝子の解析と他の遺伝子の解析は同じ原理に基づいているため、他の遺伝子の解析についてもNF1と同等の感度・特異度が期待できる。カスタムキットとMiSeqにより、多数の遺伝子を網羅的に解析する事が可能であると証明できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. Am J Med Genet A. 2012;158(3):514-518.
- 2) Kosaki R, Kaneko T, Torii C, Kosaki K. EEC syndrome-like phenotype in a patient with an IRF6 mutation. Am J Med Genet A. 2012;158(5):1219-1220.
- 3) Takenouchi T, Nakazawa M, Kanemura Y, Shimozato S, Yamasaki M, Takahashi T, Kosaki K. Hydrocephalus with Hirschsprung disease: severe end of X-linked hydrocephalus spectrum. Am J Med Genet A. 2012;158(4):812-5.
- 4) Tanaka R, Takenouchi T, Uchida K, Sato T, Fukushima H, Yoshihashi H, Takahashi T, Tsubota K, Kosaki K. Congenital corneal staphyloma as a complication of Kabuki

syndrome. Am J Med Genet A. 2012;158(8):2000-2002.

- 5) Yagihashi T, Kosaki K, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Takahashi T, Sato Y, Kosaki R. Age-dependent change in behavioral feature in Rubinstein-Taybi syndrome. Congenit Anom. 2012;52(2):82-86.
- 6) Nomura T, Takenouchi T, Fukushima H, Shimozato S, Kosaki K, Takahashi T. Catastrophic Autonomic Crisis With Cardiovascular Collapse in Spinal Muscular Atrophy With Respiratory Distress Type 1.J Child Neurol. 2012 Aug 16.
- 7) Takenouchi T, Enomoto K, Nishida T, Torii C, Okazaki T, Takahashi T, Kosaki K. 12q14 microdeletion syndrome and short stature with or without relative macrocephaly. Am J Med Genet A. 2012;158A(10):2542-4
- 8) Takenouchi T, Okuno H, Kosaki R, Ariyasu D, Torii C, Momoshima S, Harada N, Yoshihashi H, Takahashi T, Awazu M, Kosaki K. Microduplication of Xq24 and Hartsfield syndrome with holoprosencephaly, ectrodactyly, and clefting. Am J Med Genet A. 2012;158A(10):2537-41.
- 9) Takenouchi T, Yagihashi T, Tsuchiya H, Torii C, Hayashi K, Kosaki R, Saitoh S, Takahashi T, Kosaki K. Tissue-limited ring chromosome 18 mosaicism as a cause of Pitt-Hopkins syndrome. Am J Med Genet A. 2012;158A(10):2621-3.
- 10) Osumi T, Miharuru M, Fuchimoto Y, Morioka H, Kosaki K, Shimada H. The germline TP53 mutation c.722 C>T promotes bone and liver tumorigenesis at a young age. Pediatr Blood Cancer. 2012;15;59(7):1332-3.

2. 学会発表

- 1) Shimizu A, Torii C, Suzuki N, Mutai J, Kudoh H, Kosaki R, Mmatsunaga T, Kosaki K. Rapid and efficient mutation in the hundreds of target genes by bench-top next generation sequencer with custom target capture method. American Society of Human Genetics, 2012
- 2) 三須久美子 桐林和代 佐谷秀行 鳥居千春 小崎里華 小崎健次郎：神経線維腫症1型の遺伝様式に関する患者家族の誤解の類型化 第36回 日本遺伝カウンセリング学会 2012.6.10
- 3) 武内俊樹 下郷幸子 山崎麻美 小崎里華 小崎健次郎 高橋高雄：L1CAM変異により発症した先天性水頭症とHirschsprung病の合併例 第54回 日本小児神経学会総会 2012.4.19
- 4) 柳橋達彦 小崎健次郎 小崎里華 吉橋博史 井原正博 高橋孝雄：Williams症候群における欠失範囲の大きさと発達遅滞の重症度との関係 第115回 日本小児学会学術集会 2012.4.22

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析と診断への応用に関する研究

分担研究者 松永 達雄
国立病院機構東京医療センター感覚器センター 聴覚障害研究室長

研究要旨

本研究は次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析により難聴の原因診断を促進し、治療を含めた診療全般の向上につながることを目的とする。本年度は難聴に関わる 138 遺伝子のタンパク質コーディング全領域のゲノム遺伝子配列をデータベースより抽出し、アジレント社製 SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムのカスタムライブラリーを用い、遺伝性難聴を疑われる約 1,300 家系のうち、難聴遺伝子の病的変異が従来のサンガー法で同定されておらず、かつ難聴者および家族の DNA 検体が 1 家系で 3 人以上から収集されている 29 家系、104 検体について次世代シーケンサーによる塩基配列創出とゲノム上へのマッピング、変異抽出、家系解析を行い、12 家系について原因遺伝子変異候補を同定することに成功した。このうち 6 種類の原因遺伝子候補は、本邦で未報告のものであった。さらに、日本人における難聴遺伝子の非病的変異のリストアップをすすめ、今後の病的変異候補をより効率的に選択する独自の手法を開発中である。

研究協力者

務台 英樹
国立病院機構東京医療センター感覚器センター
鈴木 直大
国立病院機構東京医療センター感覚器センター

A. 研究目的

小児の難聴は言語発達障害を生じるため健聴者の社会への参加の大きな障壁となる。成人の難聴では周囲とのコミュニケーション障害によりそれまで担っていた職場、学校、地域、家族などにおける社会生活を維持できなくなる。治療困難な高度難聴の原因の多くは遺伝性であり、個別の患者で遺伝子診断ができると難聴の病態や特徴、難聴の進行および合併症、悪化の予防、治療法の選択、遺伝相談を的確に行える。その結果、難聴児あるいは成人難聴者の言語コミュニケーションが促進され、社会参加の機会が増し、社会生産性の向上につながるるとともに聴覚障害者援助に必要な社会的経費を減らすことができる。

現在までに難聴遺伝子は非症候群性難聴だけでも 60 種類以上発見されており、これら多数の難聴遺伝子は類似した特徴を呈するため原因診断が困難である。国内外で臨床的特徴に基づいた難聴遺伝子解析が行われているが原因診断できない例も多い。また、これら全ての遺伝子を調べることはこれまでの方法では多大な労力と費用が生じるため不可能であり、新しい遺伝子検査法が必要とされている。

近年、高速に高精度な遺伝子配列決定を可能にする次世代シーケンサーが開発され、これを用いた網羅的遺伝子検査による難聴を含めた種々の遺伝病の診断率が高いことが証明された。本検査法を日本で行うためには日本人の難聴遺

伝子の特徴を検討して日本人に適した方法を定める必要がある。

本研究では次世代シーケンサーによる難聴遺伝子検査法を確立し、原因不明の難聴原因解明と診断への応用を目的とする。

B. 研究方法

慶應大学医学部臨床遺伝学センター、慶應義塾大学共同利用研究室、国立病院機構東京医療センターを中心としたチームで、次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析が行われた。

解析検体には、国立病院機構東京医療センターおよび関連施設で現在までに収集してきた、遺伝性難聴を疑われる約 1,200 家系のうち、難聴遺伝子の変異が同定されておらず、かつ難聴者および家族の血液検体が 1 家系で 4 人以上から収集されている 15 家系、56 検体を厳密に選択した。なお、全ての検体は、すでに血液からの DNA 抽出が終了している。

解析対象となる遺伝子は、常染色体性優性または劣性の非症候群性難聴遺伝子として同定されている遺伝子 61 種、症候群性難聴の原因遺伝子 23 種、染色体上ミトコンドリア遺伝子 16 種、さらに実験動物モデルにおいて同定されている難聴遺伝子も含め、合計 138 遺伝子の蛋白質コーディング全領域のゲノム遺伝子配列をデータベースより抽出し、アジレント社製 SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムのカスタムライブラリーを設計した。

解析検体は、インターカレーション法による精密なDNA濃度測定を行い、Covaris社製超音波破砕機を用い、至適条件下で、約150bpへ断片化する。これをベックマン社AMPure磁性ビーズを用いて精製し、SureSelectターゲットエンリッチメントライブラリーとハイブリダイズさせ、各検体の解析対象となる難聴遺伝子領域を濃縮した。各検体はインデックスタグを付加し増幅し、イルミナ社製次世代シーケンサー Genome Analyzer IIxを用いて塩基配列データを創出する。品質チェックを経て参照ゲノムDNA配列上へのマッピングを行い、検体毎に遺伝子変異を同定する。

検体毎に同定される遺伝子変異は数百箇所と推定される。このうち、健常者にも頻度が高く存在する非病的遺伝子多型であるかどうか、アミノ酸配列変異を与えるか、タンパク質立体構造に変化をもたらす可能性があるか、家系図と比較し遺伝形式に矛盾がないか、などの項目により、候補遺伝子変異を絞り込む。さらに、従来用いられてきたサンガー法により、原因遺伝子変異を確認する。

次世代シーケンサー解析の効率を促進するために頻度の高い難聴遺伝子については、難聴者および健聴者の検体を用いて従来のシーケンサーによる系統的遺伝子解析を行い、日本人における変異と非病的配列多様体をリストアップした。

本遺伝子解析研究計画は、研究開始に先立ち当院および共同研究施設での倫理審査で承認をうけた。また本研究は、各検体をご提供下さった患者、ご家族の同意下のもと実施されている。

(倫理面への配慮)

個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。遺伝子解析に際しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

C. 研究結果

各検体において、信頼性の高い遺伝子変異数は各検体間でほぼ一定(数百か所)検出され、遺伝子濃縮およびシーケンスまでの手法の再現性が認められた。(表1)

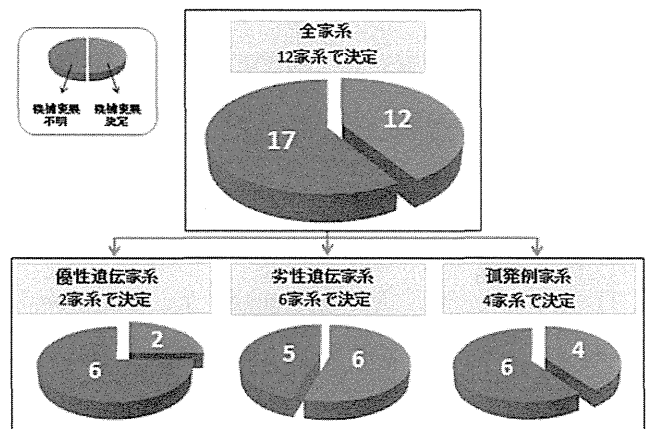
また、上記の各解析手法による絞り込みの結果、29家系中12家系(41%)で、候補遺伝子病的変異を絞り込むことに成功し、それらはすべてサンガー法により確認された。(表2) 同定された原因遺伝子変異候補は、*SLC26A5*、*ACTG1*、*POU4F3*、*SIX1*、*MYO7A*、*CDH23*、*USH2A*、*SLC26A4*、*KCNJ10*、*TMIE*、*MYO15A*、*LOXHD1*の12種類であった。このうち、*ACTG1*タンパク質G268S変異および*MYO7A*タンパク質のW2160G変異については、タンパク質立体構造が変異し、それぞれの機能低下をもたらすことを予測することに成功した。

6家系で病的変異候補としてそれぞれ同定した*SLC26A5*、*ACTG1*、*POU4F3*、*TMIE*、*LOXHD1*、*MYO15A*は、日本で難聴原因として報告のない遺伝子であった。

表1. 検出された遺伝子変異数

検体	解析遺伝子数	検出変異数	非同義変異数
A	11	233	21
B	11	214	21
C	11	221	23
D	11	211	21
E	11	217	23
F	11	220	21
G	11	220	21
H	11	217	21
I	11	214	21
J	11	217	21
K	11	220	21
L	11	217	21
M	11	220	21
N	11	217	21

表2. 原因候補変異を抽出できた家系数



D. 考察

従来のサンガー法などの検査手法では、遺伝性難聴を疑われる患者の20-30%で原因が同定されている。今回我々が開発した次世代シーケンサーによる解析により、原因遺伝子が同定できなかった遺伝性難聴の41%で原因遺伝子候補を絞りこむことができ、合計で60-70%まで診断率が高まることが予想された。本手法は、臨床診断応用に非常に有効であると考えられる。

今回絞り込むことに成功した難聴原因遺伝子候補には特定の偏りがなく、従来知られている*GJB2*、*SLC26A4*、ミトコンドリア遺伝子変異のほかには、日本において特に頻度の高い原因遺

伝子は存在しないことが示唆された。臨床情報から原因遺伝子を推測し逐一解析する従来の手法では、労力・費用から考えてこれらの原因遺伝子候補は到底同定しえず、今回確立した次世代シーケンサーによる網羅解析の有効性が示された。

本結果は、医療介入の選択にも有用であると考えられた。たとえば *MYO7A* 変異が原因候補と絞り込まれた1家系については、先天性難聴に加え遅発性視覚障害の発症が予想され、視覚に依存しない療育手法の選択が重要である。また、頻度の低い原因遺伝子については、世界的にも報告例の少ないものがほとんどであり、各患者の症例の経過観察が、各遺伝子を原因とする難聴の特徴を知るために重要であると考えられた。

2家系については、二遺伝子性難聴と考えられた (*CDH23/PCDH15*、*SLC26A4/KCNJ10*)。従来のほとんどの遺伝病の病因解析は単一遺伝子変異を想定した手法を用いているため、複数遺伝子の原因を想定した新たな解析プログラム開発の必要性が示された。

人種ごとに遺伝子変異の多様性は大きく異なっていることが従来から知られているが、日本人における非病的遺伝子変異データの大規模収集が病的遺伝子変異候補の絞り込み効率を高めるために必須であることが判明し、現在収集を続けている。

次年度はパネルによっても既知遺伝子に原因を認めない30~50家系について全エクソーム解析を実施し、新規の難聴原因遺伝子を同定する。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子の網羅的解析手法を確立し、29家系104検体について、実際に解析を行い、12家系(41%)について原因遺伝子変異候補が同定され、臨床診断に非常に有効であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sun G, Fujii M, Matsunaga T. Functional Interaction between Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Spiral Ligament Fibrocytes (SLFs) *J Neurosci Res* 2012; 90(9):1713-22
- 2) Minami SB, Masuda S, Usui S, Mutai H, Matsunaga T. Comorbidity of GJB2 and WFS1 mutations in one family. *Gene* 2012; 501(2):193-197 Erratum in: *Gene* 2012; 504(2):313
- 3) Matsunaga T, Mutai H, Kunishima S, Namba K, Morimoto N, Shinjo Y, Arimoto Y, Kataoka Y, Shintani T, Morita N, Sugiuchi T, Masuda S, Nakano A, Taiji H, Kaga K. A prevalent founder mutation and genotype-phenotype correlations of *OTOF* in Japanese patients with auditory neuropathy. *Clin Genet* 2012; 82:425-432
- 4) Taiji H, Morimoto N, Matsunaga T. Unilateral cochlear nerve hypoplasia in children with mild to moderate hearing loss. *Acta Otolaryngol* 2012; 132(11):1160-7

- 5) Masuda S, Usui S, Matsunaga T. High prevalence of inner-ear and/or internal auditory canal malformations in children with unilateral sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013; 77:228-232
- 6) Matsunaga T, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S. Genetic analysis of PAX3 for diagnosis of Waardenburg syndrome type I. *Acta Otolaryngol* [2012 Nov 20, Epub ahead of print]
- 7) Nakano A, Arimoto Y, Matsunaga T. Cochlear nerve deficiency and associated clinical features in patients with bilateral and unilateral hearing loss. *Otol Neurotol* [2013 Feb 27, Epub ahead of print]
- 8) Watabe T, Matsunaga T, Namba K, Mutai H, Inoue Y, Ogawa K. Moderate hearing loss associated with a novel KCNQ4 non-truncating mutation located near the N-terminus of the pore helix. *Biochem Biophys Res Commun* [2013 Feb 9, Epub ahead of print]
- 9) 仲野敦子、有本有季子、松永達雄、工藤典代 側頭骨CTで両側蝸牛神経管狭窄を認めた小児難聴症例の検討 日耳鼻会報 2012; 115(9):849-854

2. 学会発表

- 1) Matsunaga T, Mutai H, Suzuki N, Morita N, Masuda S. Genetic diagnosis of Waardenburg syndrome type I by molecular analysis of PAX3 in Japanese patients. The annual meeting of the Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum 2012年8月26-29日 Rome, Italy
- 2) Shimizu A, Torii C, Suzuki N, Mutai H, Kudoh J, Kosaki R, Matsunaga T, Kosaki K. Rapid and efficient mutation detection in the hundreds of target genes by bench-top next generation sequencer with custom target capture method. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG) 2012年11月6-10日 San Francisco, California, USA
- 3) 松永達雄 Auditory Neuropathyの遺伝子診断の治療法選択へのインパクト 116回日本眼科学会総会、シンポジウム1(眼科・耳鼻咽喉科領域における研究プロジェクト) 2012年4月5日 東京
- 4) 南修司郎、松永達雄、藤井正人、加我君孝 GJB2遺伝子変異の遺伝子型と表現型の相関についての検討. 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2012年5月10-12日 新潟市
- 5) 松永達雄、守本倫子、新正由紀子、有本由紀子、片岡裕子、岡本康秀、新田清一、新谷朋子、森田訓子、杉内智子、増田佐和子、仲野敦子、泰地秀信、加我君孝 小児Auditory Neuropathy (AN)における*OTOF*遺伝子の遺伝子型と表現型の相関. 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会2012年5月10-12日 新潟市
- 6) 渡部高久、松永達雄、佐藤美奈子、小川郁 ミトコンドリアtRNA遺伝子T7511C変異による非症候性難聴を示す1家系. 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2012年5月

- 10-12日 新潟市
- 7) 泰地秀信、守本倫子、松永達雄 蝸牛神経低形成例における聴覚所見. 日本聴覚医学会第7回 ERA・OAE 研究会 2012年7月8日 東京
 - 8) 松永達雄、鈴木直大、務台英樹、難波一徳、加我君孝 次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断に関する検討. 第22回日本耳科学会総会・学術講演会 2012年10月4-6日 名古屋
 - 9) 鈴木直大、務台英樹、松永達雄 次世代シーケンスデータにおける難聴遺伝子変異の探索. 第22回日本耳科学会総会・学術講演会 2012年10月4-6日 名古屋
 - 10) 務台英樹、藤井正人、松永達雄 難聴モデルDBA/2Jマウスに対するエピジェネティクス調節と聴力変化の検討. 第22回日本耳科学会総会・学術講演会 2012年10月4-6日 名古屋
 - 11) 難波一徳、務台英樹、増田佐和子、臼井智子、藤井正人、松永達雄 Nogginタンパク質のin silico解析から推測されたSYM-1におけるアブリ骨を含む骨固着の病態. 第22回日本耳科学会総会・学術講演会 2012年10月4-6日 名古屋
 - 12) 岡本康秀、松永達雄、加我君孝 「Pendred症候群治療実態把握のための全国調査」アンケートの検討. 第22回日本耳科学会総会・学術講演会2012年10月4-6日 名古屋
 - 13) 新正由紀子、増田毅、松永達雄、加我君孝、山本聡 温度依存性Auditory Nerve Diseaseの一症例. 第22回日本耳科学会総会・学術講演会 2012年10月4-6日 名古屋
 - 14) 松永達雄、加我君孝 劣性遺伝の先天性難聴に対する次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断の検討. 第57回日本聴覚医学会総会・学術講演会 2012年10月11-12日 京都
 - 15) 南修司郎、松永達雄、仲野敦子、有本友季子、泰地秀信、守本倫子、坂田英明、安達のどか、浅沼聡、増田佐和子、阪本浩一、加我君孝 新生児聴覚スクリーニングで“pass”と評価されたGJB2遺伝性難聴児13症例の検討. 第57回日本聴覚医学会総会・学術講演会 2012年10月11-12日 京都
 - 16) 鈴木直大、務台英樹、鳥居千春、清水厚志、宮冬樹、難波一徳、工藤純、小崎健次郎、松永達雄 カスタムターゲットリシーケンスによる難聴関連遺伝子の変異探索. 第57回日本人類遺伝学会大会 2012年10月24-27日 東京
 - 17) 森貞直哉、貝藤裕史、伊藤秀一、奥山虎之、松永達雄、関根孝司、飯島一誠 本邦における鰓弓耳腎 (BOR) 症候群の全国診療実態調査と遺伝子解析. 第57回日本人類遺伝学会大会 2012年10月24-27日 東京
 - 18) 難波一徳、金子寛生、増田佐和子、務台英樹、臼井智子、藤井正人、松永達雄 Noggin蛋白質とヘパリン糖鎖のドッキングシミュレーションから推測された骨形成異常におけるBMPシグナルの分子病態モデル. 第85回日本生化学会大会 2012年12月11-14日 福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

次世代シーケンス法を応用した先天性中枢神経奇形症候群患者の原因遺伝子探索

分担研究者 金村 米博

¹国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室 室長

²国立病院機構大阪医療センター 脳神経外科

研究要旨

次世代シーケンス法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子探索を本格的に開始した。284 遺伝子の標的遺伝子群パネル解析を用いて 116 家系 120 検体のシーケンスデータの取得を行い、その原因遺伝子同定率は 11.6%であった。全エクソーム解析に関しては 11 家系 28 検体からシーケンスデータの取得を行い、解析を行った全家系における候補遺伝子同定率は 36.4%であった。いずれの手法を用いても原因遺伝子同定に成功した家系が存在するが、その効率は全エクソーム解析のほうが高く、原因不明の先天性中枢神経奇形症候群家系の原因遺伝子探索においては、全エクソーム解析がより効率的な解析手法であることが示唆された。

研究協力者

正札幌子³、吉岡絵麻⁴、高田 愛¹、埜中正博²、山崎麻美⁵、原田敦子⁵、山中 巧⁵、寺元千佳⁵

³国立病院機構大阪医療センター

臨床研究センター 幹細胞医療研究室

⁴国立病院機構大阪医療センター

臨床研究センター 分子医療研究室

⁵社会医療法人愛仁会高槻病院

小児脳神経外科正札幌子 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター

幹細胞医療研究室 室長

A. 研究目的

難治性神経疾患の中でも、X 連鎖性遺伝性水頭症 (X-linked hydrocephalus ; 以下 XLH) を代表とする遺伝性水頭症や脊髄髄膜瘤などの先天性中枢神経奇形症候群は希少疾患であり、研究者人口も少なくその対策・研究は他の神経疾患に比べて大幅に遅れているのが実情である。これら先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明と根治的治療法の開発は、臨床神経科学領域における大きな研究テーマの一つと考えられる。近年の次世代シーケンス法の進歩によって、従来は原因不明であった様々な難病の遺伝子異常が同定されつつあり、先天性中枢神経奇形症候群の病因検索にその解析手法を応用することが期待される。

我々は平成 23 年度、先天性中枢神経奇形症候群の発症との関連性が示唆される 284 個の標的遺伝子を選定して解析を行う体制を構築し、研究に着手した (標的遺伝子群パネル解析)。今年度は、23 年度に開始した標的遺伝子群パネル解析を継続すると同時に、全エクソーム解析を導入し、次世代シーケンス法を応用した先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子探索を多元的に実施し、その分子病態解明および新規診断・治療法開発につながる標的分子を探索した。

B. 研究方法

1. 解析対象

本研究班に属する、先天性中枢神経奇形症候群を研究対象とする山崎 (社会医療法人愛仁会高槻病院)、齊藤 (名古屋市立大学大学院医学研究科・新生児・小児医学分野)、加藤 (山形大学医学部附属病院・小児科)、岡本 (大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター・遺伝診療科) らと共同で研究チーム (以下、神経チーム) を形成して症例を集積し、表 1 に記載された数の家系および検体を解析対象とした。各症例のゲノム DNA は末梢血単核球、分娩時に提供を受けた臍帯血あるいは臍帯から各々抽出し、解析に使用した。

2. 遺伝子解析方法

遺伝子解析は宮 (理化学研究所ゲノム医科学研究センター・情報解析研究チーム) が中心となり、研究代表者の小崎 (慶應義塾大学医学部・臨床遺伝学センター) 並びに工藤 (慶應義塾大学医学部・共同利用研究室・遺伝子医学研究室)、清水 (慶應義塾大学医学部・分子生物学教室) らの研究チームと共同で実施した。23 年度に選定した先天性中枢神経奇形症候群との関連性が示唆されている 284 個の解析候補遺伝子 (表 2) の標的遺伝子群パネル解析、および全エクソーム解析は SureSelect ターゲットエンリッチメン

トシステム (Agilent Technologies社) を用いて実施した。DNA精製後、Covaris社のDNA Shearing systemを使用して150~200bpにDNAを断片化し、target領域のDNAキャプチャーを行った後、シーケンス用index tagを付けたシーケンスライブラリ作製した。シーケンスはIllumina社の次世代シーケンサーを用いて実施した。

疾病名	標的遺伝子群パネル解析		全エクソーム解析	
	検体数	家系数	検体数	家系数
先天性水頭症	11	10	8	3
脳梁欠損症	9	9	5	2
全前脳胞症	3	3	0	0
皮質形成異常症	22	22	9	3
小脳形成異常症	11	10	3	1
小頭症	28	27	3	1
大頭症	4	4	3	1
脳瘤	3	2	0	0
脊髄髄膜瘤	6	6	4	2
アンジェルマン症候群	11	11	0	0
難治性てんかん	3	3	0	0
その他	8	8	5	2
健常コントロール	1	1	3	1

表1：神経チームで解析を実施した検体・家系数

疾患群	遺伝子数	代表的な遺伝子
先天性水頭症	33	L1CAM, ZIC2, SHH
小脳形成障害症	32	CASK, PMM2, ALG6
皮質形成異常症	47	DCX, ARX, TUBA1A
神経管閉鎖不全症	98	MTHFR, VANGL1,
てんかん	29	CDKL5, SCN1A, TCF4
頭蓋縫合早期癒合症	8	FGFR2, FGFR3, TWIST1
小頭症	13	MCPH1, WDR62, CDK5RAP2
その他	24	UBE3A, HESX1,
合計	284	13,595 regions 1,633,485 bases (1.6Mb)

表2：標的遺伝子群パネル解析の対象とした疾患関連遺伝子数

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)を遵守し、国立病院機構大阪医療センター医学倫理委員会の承認(平成21年8月26日：第1版承認、平成25年1月25日：第6版修正承認)および研究チームの各施設内倫理委員会の承認に基づいて実施された。DNA試料の提供およびゲノム・遺伝子解析研究への使用に関しては書面を用いたインフォームドコンセントを実施して同意取得を行い、提供されたDNA試料は連結可能匿名化状態で研究に使用した。試料提供者の個人情報および遺伝情報は、個人情報管理者および個人情報分担管理者によって細心で厳重な注意の下、管理された。

C. 研究結果

1. 標的遺伝子群パネル解析

表2に示す284遺伝子は、全体で13,595領域、約1.6Mbをカバーするように設計されており、24年度末までに神経チーム全体では、116家系120検体のシーケンスデータの取得を行った(表1)。その中で、データ解析が先行して進められた69家系71検体において、報告書作成の段階で疾病の責任遺伝子の同定に至ったのは8家系であり、解析を行った全家系における原因遺伝子同定率は11.6%であった。

(代表的症例1)

症例は生後1か月・男児で、胎生期から脳室拡大を認め、妊娠31週に1564gで出生した。頭囲32.9cm、生後両母指内転を認め、頭部MRIで著