

平成25年度厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究開発事業）
総括研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

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

次世代シーケンサー（NGS）による高出力解析研究により、遺伝子異常の多面性（pleiotropy）が認識され始め、疾患群をより正確に診断する（診断率を向上させる）ためには、より多くの責任/関連遺伝子・候補遺伝子を解析する必要がある。この解決策に大容量型 NGS を用いた全 exome 解析が選択肢となるが、やや高コスト（1 サンプル当たり 2013 年度で 11 万円）である。我々は、数十個の遺伝子を集約する新技術と卓上型 NGS を組み合わせ、効率的かつ安価（1 サンプル当たり 3 万 5 千円）に遺伝子異常を同定する技術（統合的遺伝子解析システム）を確立し、さらに点変異のみならずコピー数異常の検出も可能とした。本技術を導入し効率的にヒト発達障害の遺伝子異常を同定しその分子病理を明らかにし、かつ効率的な診断システムの確立を目指すことを目的とした。平成 25 年度は、難治性てんかんパネル 2 種、Coffin-Siris 症候群関連パネル 1 種を作成し、検出頻度やコストの検討を行い、全エクソーム解析との優劣について検討を加えた。さらにパネルや全エクソームデータを用いた CNV 解析を行い、マイクロアレー解析との比較検討を行った。

分担研究者

岡本伸彦・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・山形大学医学部小児科学講座・講師

小坂仁・自治医科大学小児科学講座・教授

橋本亮太・大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学・千葉大学・福井大学連合小児発達学研究科附属子どものこころの分子統御機構研究センター/大阪大学大学院医学系研究科・情報統合医学講座精神医学教室・准教授

A．研究目的

本申請研究は、申請者が研究代表を務めた「超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究（H22-神経・筋-一般-012）」の成果を受けた発展研究である。H22-24年度

研究費では、高密度マイクロアレーを用いた疾患ゲノム解析を基軸に、West症候群（Am J Hum Genet, 2010）、Kabuki症候群（Nat Genet, 2010）、Microphthalmia with limb anomaly (MLA)症候群（Am J Hum Genet, 2011）、Coffin-Siris症候群（Nat Genet, 2012）、大田原症候群（Ann Neurol, 2012）、Epilepsia, 2012)等で責任遺伝子を同定した。このうち3疾患の遺伝子異常が染色体微細構造異常に絡んでおり、染色体構造異常解析の有用性は明白であった。これらの研究過程で、年齢依存性てんかんの一群の解析は格段に進歩した。最重症系である大田原症候群では、我々が明らかにした責任遺伝子ARX・STXBP1・KCNQ2・CASKと新たにSCN2A（Neurology, 2013）・GNAO1（Am J Hum Genet, 2013）・SLC35A2（Hum

Mut, 2013) を加えておよそ57%で遺伝子異常が明らかになった。また次世代シーケンサー (NGS) による高出力解析研究により、遺伝子異常の多面性 (pleiotropy) が認識され始め、疾患群をより正確に診断する (診断率を向上させる) ためには、より多くの責任/関連遺伝子・候補遺伝子を解析する必要がある。この解決策に大容量型NGSを用いた全exome解析が選択肢となるが、やや高コスト (1サンプル当たり2013年度で11万円) である。我々は、数十個の遺伝子を集約する新技術と卓上型NGSを組み合わせ、効率的かつ安価 (1サンプル当たり3万5千円) に遺伝子異常を同定する技術 (統合的遺伝子解析システム) を確立し、さらに点変異のみならずコピー数異常の検出も可能とした。本技術を導入し効率的にヒト発達障害の遺伝子異常を同定しその分子病理を明らかにし、かつ効率的な診断システムの確立を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

I. 症例集積

小児神経臨床研究ネットワーク等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんかんとその類縁疾患を、臨床遺伝ネットワーク等を通じて集積した知的障害関連疾患を集積する。

II. 統合的遺伝子解析システム開発

大田原症候群を含む年齢依存性てんかん群では、*ARX*・*STXBPI* を含むてんかん関連遺伝子 35 個とさらに 15 個を加えた 50 個の 2 種のパネルを、Coffin-Siris 症候群で変異を

認めた SWI/SNF 複合体の関連遺伝子 22 個を含む候補遺伝子パネルをデザインし、ゲノム DNA を分画、卓上型次世代シーケンス (NGS) で解析を行う。

III. インフォーマティクス解析

NGS 解析で既に全エクソン解析において研究室内で確立した解析フローを統合遺伝子解析システムにも応用する。NGS データは、研究室独自のインフォーマティクスフローにより効率的な点変異の検出が可能で、かつ CNV に関しては Alex_NORD プログラムを用いる。

IV. バックアップシステム

従来型の超細密マイクロアレーと全エクソーム解析・全ゲノム解析による網羅的なゲノム解析手法を遺伝子統合解析システムでの陰性例に適宜用いて新規遺伝子異常とコピー数異常を同定する。特に H25 年度は XHMM プログラムによる全エクソームデータで CNV 検出システムの確立を進めた。

V. 効果的遺伝子診断システムの確立

本研究の知見に基づく迅速、効果的かつ安価な疾患遺伝子診断システムを考案する。本研究は、所属施設 IRB の承認を受け適切な倫理的配慮と手続きを得て行われた。

C. 研究結果

I. 症例集積

小児神経臨床研究ネットワーク (蔵王セミナー等で交流) 等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんかんとその類縁疾患を含めた計 720 例の世界的にも突出し

た症例が集積した。さらに臨床遺伝ネットワーク等により遺伝医学専門医や小児神経科医の協力のもと知的障害関連疾患を呈する症例が 1500 例集積した。今後も種々のチャンネルを通して継続的にこれらの疾患群の集積に努める。

II. 統合的遺伝子解析システム開発

平成 25 年度研究で大田原症候群を含む年齢依存性てんかん群では、責任遺伝子 *ARX*・*STXBPI*・*CASK*・*KCNQ2* と新規に同定した遺伝子 *SCN2A*・*GNAO1*・*SLC35A2*、他のてんかん関連疾患で同定されている既知遺伝子を加えて 35 個および拡大版 50 個の遺伝子解析パネルを作成し、それぞれで遺伝子変異検出率を明らかにした (28.3%と 18.9%)。さらに Coffin-Siris 症候群で変異を見出した SWI/SNF 複合体遺伝子 22 個の解析パネルも作成、同疾患での変異検出率を明らかにした (25%)。陰性例では、バックアップ解析として全エクソーム解析を追加することになるが、この時点で、遺伝子パネル+全エクソーム解析とパネルを用いず全エクソーム解析のみを行うこととの価格の比較検討を行った。この結果遺伝子パネル/全エクソーム解析の価格比 (3.5 万円/11 万円 = 31.8%) を超える変異検出率をパネルで超えない限り、全エクソーム解析を第一選択とする方が安価で迅速であるとの結論に至った。よって明らかに検出率が 32%を大きく超えることが期待できる疾患はパネルを作成するがそれ以外は全エクソーム解析を選択することとした。

III. インフォーマティクス解析

NGS 解析で既に全エクソーム解析において研究室内で確立した解析フローを統合遺伝子解析システムにも応用する。Miseq データは、Novoalign/Picard/GATK/Annova を組み合わせた研究室独自の Ecome により効率的な解析が可能である。さらに NGS データから特に欠失を効率的に検出する Alex_NORD プログラムで非常に小さな (100 bp 程度) 欠失検出が可能である。全エクソーム解析データを用いて XHMM 法で CNV 解析もマイクロアレーで検出される 60%の CNV が検出可能となっている。マイクロアレーで検出できない 10 Kb 以下の CNV 検出が XHMM では検出されているためその正確性を検討中である。

IV. バックアップシステム

従来型の超細密マイクロアレーも CNV 異常の検出から責任遺伝子の特定する手法として依然重要で統合遺伝子解析システムと並行して適宜行っている。

V. 効果的遺伝子診断システムの確立

本研究の知見に基づいて効果的かつ安価な疾患遺伝子診断システムの検討を続けている。特に遺伝子パネルを用いた安価なシステムの問題点として、遺伝子解析領域が小さいため検体数を一定数集めて一気に解析できる反面、検体数がそろわずまで解析がはじめられないという矛盾が生じる。また II で述べたように遺伝子パネルでの遺伝子変異同定率が遺伝子パネル/全エクソーム解析のコスト比を超えることで、コスト的に生合成が取れてくるという事が明らかになった。よってパネル解析を優先して行う疾患についてはかなり限定した

適応で行う方が効率が良い。一方で全エクソーム解析で難治性てんかんに関する新しい遺伝子 *SCN2A* (Neurology, 2013), *GNAOI* (Am J Hum Genet, 2013), *SLC35A2* (Hum Mut, 2013)の単離にも成功しこれを遺伝子パネルに新たに組み込んで遺伝子変異同定率の向上を目指した。

D . 考察

遺伝子パネルと全エクソーム解析のパフォーマンスとコストの検討及び上記 2 手法のデータを利用した CNV 解析システムをセットアップし、マイクロアレーデータとの比較を行った。遺伝子パネルはコストメリットは明らかだが、検出率が低い場合全エクソーム解析に移行せざる負えないことも多く、コスト・スピードの観点で全エクソーム解析を第一選択とするメリットも明らかになった。次世代シーケンスデータを用いた CNV 解析では、マイクロアレーデータの 60%程度は検出可能であること、マイクロアレーの検出限界である 10 Kb 以下の欠失等が検出される可能性があること等などが判明し、その特徴を生かしたデータ利用が求められる。

E . 結論

H25 年度は、てんかん 35 遺伝子パネルと拡大版 50 遺伝子パネルをそれぞれ難治性てんかん症例 67 例と 37 例に対して施行し、変異陽性例はそれぞれ 19 例 (28.3%) 及び 7 例 (18.9%) であった。SWI/SNF 関連パネル (22 遺伝子搭載) の Coffin-Siris 症候群 8 例解析では 2 例 (25%) で変異を検出

した。変異陰性例は全て全エクソーム解析を用いて再解析を行うこととなったが、この時点で、選択的遺伝子パネル (3.5 万円) とバックアップ検査としての全エクソーム解析 (11 万円) の組み合わせと、最初から全エクソーム検査を行うことの 1 検体当たりのコスト比較を行い、選択的パネルでの変異陽性検出率が 3.5/11 の価格比を超えない限り (31.8%) 遺伝子選択パネルを行う価格のメリットがないことが判明した。てんかん、Coffin-Siris 症候群での変異検出率は遺伝子選択パネルで 18-28%程度で、全エクソーム解析を第一選択とする価格・時間的なメリットが明らかであった。遺伝子選択パネルも全エクソーム解析でもそのデータから CNV をある程度の感度で (およそ 60%) で検出することが可能であった。全エクソーム解析を用いて大田原症候群の新規遺伝子として *SCN2A* (Neurology, 2013)・*GNAOI* (Am J Hum Genet, 2013)・*SLC35A2* (Hum Mut, 2013) を発表した。また幼少期には発達障害、青年期に急速に神経変性が進行して寝たきりになる SENDA の責任遺伝子 *WDR45* を明らかにした (Nat Genet, 2013)。以上のよう初年度として、遺伝子選択パネルの有用性の検討とシステム構築、網羅的解析を用いた発達障害の責任遺伝子の解析が計画通り順調に進んでいる。

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

1 . 論文発表

- 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* 35(4):312-316, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.007.
- Tsurusaki Y, *Kosho T (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitu 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* 83 (2): 1235-144, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- 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, *Saitu H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 73(1): 48-57, 2013. doi: 10.1002/ana.23736.
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Miyake N, Saitu 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* 161A(5): 1073-1077, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35661.
- *Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, Matsumoto N, Ishii M, Saitu H. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to SPTAN1 gene mutation. *Brain Dev* 35(3): 280-283, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.002.
- Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi H, Nakashima M, Saitu H, Matsumoto N, *Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. *J Hum Genet* 58(2): 113-115, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Higashiyama Y, *Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu 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* 28(4): 552-553, 2013. doi: 10.1002/mds.25296.
- 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* 35(4):312-316, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.007.
- Tsurusaki Y, *Kosho T (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitu 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* 83 (2): 135-144, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- 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, *Saitu H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 73(1): 48-57, 2013. doi: 10.1002/ana.23736.
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Miyake N, Saitu 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* 161A(5): 1073-1077, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35661.
- *Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, Matsumoto N, Ishii M, Saitu H. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to SPTAN1 gene mutation. *Brain Dev* 35(3): 280-283, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.002.
- Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi H, Nakashima M, Saitu H, Matsumoto N, *Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. *J Hum Genet* 58(2): 113-115, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Higashiyama Y, *Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu 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* 28(4): 552-553, 2013. doi: 10.1002/mds.25296.
- *Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitu H, *Matsumoto N (*: co-corresponding). *KDM6A* point mutations cause Kabuki syndrome. *Hum Mut* 34(19): 108-110, 2013. doi: 10.1002/humu.22229.
- Kondo Y, Koshimizu E, Megarbane A, Hamanoue H, Okada I, Nishiyama K, Kodera H, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Doi H, Miyake N, Saitu H, *Matsumoto N. Whole-exome sequencing identified a homozygous FNBP4 mutation in a family with a condition microphthalmia with limb anomalies-like. *Am J Med Genet Part A* 161A: 1543-1546, 2013.
- 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* 161A(1): 203-207, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35686.
- *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* 34(3): 446-452, 2013. doi: 10.1002/humu.22257.
- *Saitsu H[#], Nishimura T[#], Muramatsu K[#] (# denotes equal contribution), Kodera H, Kumada S, Sugai K, Kasai-Yoshida E, Sawaura N, Nishida H, Hoshino A, Ryujin F, Yoshioka S, Nishiyama K, Kondo Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Arakawa H, Kato M, *Mizushima, *Matsumoto N (*: co-corresponding). *De novo* mutations in the autophagy gene *WDR45* cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet* 45(4): 445-449, 2013. doi: 10.1038/ng.2562.
- Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Sato H, Nakabayashi J, Ban T, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, *Tamura T. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in the monocyte differentiation program. *Blood* 121 (10): 1839-1849, 2013. doi: 10.1182/blood-2012-06-437863.
- Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Lee BJ, Nishiyama K, Mitsuko Nakashima I, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kim JH, Yu YS, *Matsumoto N. Pathogenic mutations in two families with congenital cataract identified by whole-exome sequencing. *Mol Vis* 19: 384-389, 2013
- Vergano SS, Santen G, Wieczorek D, Wollnik B, Matsumoto N, Deardorff MA: Coffin-Siris Syndrome (April 2013) in: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, Seattle, 1997-2013. Available at <http://www.genetests.org>. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131811/>)
- Yokoo N, Marumo C, Nishida Y, Iio J, Maeda S, Nonaka M, Maihara T, Chujoh S, Katayama T, Sakazaki H, Matsumoto N, Okamoto N. A case of Toriello-Carey syndrome with severe congenital tracheal stenosis. *Am J Med Genet Part A* 161(9):2291-2293, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35861.
- Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, **Imai K**, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragán DE, Villarroel CE, Ohfu M, Writzl K, Stražišar BG, Hirabayashi S, Chitayat D, Reid DM, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, **Hayasaka K**, *Matsumoto N, *Saitsu H (* denotes co-corresponding). Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 81(11):992-998, 2013
- Koshimizu E[#], Miyatake S[#] (# denotes equal contribution), Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Performance comparison of bench-top next generation sequencers using microdroplet PCR-based enrichment for effective targeted sequencing in patients with autism spectrum disorder. *Plos One* 8(9): e74167, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0074167
- Fukai R, Ochi N, Murakamia A, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, *Matsumoto N, *Miyake N. Co-occurrence of 22q11 deletion syndrome and HDR Syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(10):2576-2581, 2013.
- *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 (*: co-corresponding). Clinical consequences 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 Part A* 161(6):1221-1237, 2013.
- Iida A, Nobuhiko Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, *Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel *INPPL1* mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet* 58(6):391-394, 2013.
- Nakajima M,[#] Mizumoto S,[#] Miyake N,[#] (# denotes equal contribution) Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis R, Chitayat D, Howard A, Ferraz-Leal G, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitsu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Superti-Furga A, Ohashi H, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S*. Mutations in *B3GALT6*, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* 92(6):927-934, 2013.
- Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu Y, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskiniemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma T, Beckmann JS, Ikegawa I, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and *NEK2* as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(40): 16139-16144, 2013.

- Kodera H, Kato M, Nord AS, Walsh T, Lee M, Yamanaka G, Tohyama J, Nakamura K, Nakagawa E, Ikeda T, Ben-Zeev B, Lev D, Lerman-Sagie T, Straussberg R, Tanabe S, Ueda K, Amamoto M, Ohta S, Nododa Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, King M-C, Matsumoto N, *Saitu H. Target capture sequencing for detection of mutations and copy number changes causing early-onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 54(7):1262-1269, 2013. doi: 10.1111/epi.12203
- Ravenscroft G#, Miyatake S# (# denotes the first authors with equal contribution), Lehtokari V-L, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJN, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N§, *Laing NG§ (§ denotes equal contribution as the last author). Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 93(1):6-18, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.004.
- *Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Yoko Hiraki, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations and their clinical consequences in Kabuki syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(9):2234-2243, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.36072.
- Sun S-L, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Ryo Funayama R, Kondo M, Saitu H, Matsumoto N, Nakayama K, Ishii N*. Y-Chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. *J Immunol* 190 (12): 6209-6220, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300303.
- *Doi H, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Miyatake S, Kawamoto Y, Yoshida T, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. Diagnostic utility of exome sequencing for autosomal recessive cerebellar ataxia and spastic paraplegia: identification of a novel homozygous *SPG7* mutation. *Intern Med* 52(14): 1629-1633, 2013
- Fujita A, Suzumura H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Harada N, Matsumoto N, *Miyake N. A Unique Case of de novo 5q33.3q34 Triplication with Uniparental Isodisomy of 5q34qter. *Am J Med Genet Part A* 161(8):1904-1909, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.36026.
- #Nakamura K, #Kodera H, #Akita T (# denotes equal contribution), Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama T, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, *Saitu H (* denotes co-correspondence) De novo mutations in GNAO1 encoding a Gao subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93(3):496-505, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.014.
- Kodera H#, Nakamura K# (# denotes equal contribution), Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Mitsuko Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, *Saitu H (*: co-corresponding). De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mut* 34(12): 1708-1714, 2013. doi: 10.1002/humu.22446.
- Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki S, Aida N, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Matsumoto N, *Saitu H (*: co-correspondence). Diagnostic utility of whole exome sequencing in cerebellar atrophy in childhood. *Neurogenet* 14 (3-4): 225-232, 2013. doi: 10.1007/s10048-013-0375-8.
- Gupta VA, Ravenscroft G, Shaheen R, Todd EJ, Swanson LC, Shiina M, Ogata K, Hsu C, Clarke NF, Darras BT, Farrar M, Hashem A, Manton N, Muntoni F, North KN, Sandaradura S, Nishino I, Hayashi YK, Sewry CA, Thompson EM, Brownstein CA, Yu TW, Allcock RJN, Davis MR, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Alkuraya FS, Laing NG, Beggs AH. Identification of KLHL41 mutations implicates BTB-Kelch-mediated ubiquitination as an alternate pathway to myofibrillar disruption in nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 93(6):1108-1117, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.020.
- Nakajima J, Eminoglu TF, Vatansever G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Kawashima H, Matsumoto N, *Miyake N (*: co-correspondence). A novel homozygous YARS2 mutation causes severe myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia syndrome. *J Hum Genet* 58(12):822-824, 2013. doi: 10.1038/jhg.2013.104.

順天堂大学医学部セミナー・松本直通「変革期を迎えた疾患ゲノム解析」平成 25 年 6 月 26 日@順天堂大学医学部・東京

第 17 回小児分子内分泌研究会特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いてわかってきたこと」平成 25 年 7 月 7 日札幌北広島クラッセホテル

次世代解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発研究プロジェクトの成果発表会・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」平成 25 年 7 月 13 日都市センターホテル・東京

第 20 回日本遺伝子診療学会大会・シンポジウム 1・松本直通「疾患ゲノム解析における次世代シーケンサーの有用性」平成 25 年 7 月 19 日アクトシティ・浜松コンgresセンター・浜松

CiRA genomics epigenomics and bioinformatics seminar series VIII. 松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析」平成 25 年 8 月 23 日@CiRA 京都大学

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 25 年度第 1 回ワークショップ 松本直通「コントロールデータベースに関する話題」平成 25 年 8 月 24 日@京都大学(芝蘭会館)

神奈川県立循環器呼吸器病センター職員研修会 松本直通「新たな時代を迎えた遺伝性疾患解析」平成 25 年 8 月 19 日@神奈川県立循環器呼吸器病センター・横浜

現場の会第三回研究会基調講演・松本直通「NGS がもたらしたヒト疾患ゲノム解析のパラダイムシフト」平成 25 年 9 月 4 日神戸国際会議場@神戸

第 23 回遺伝医学セミナー講義・松本直通「遺伝性疾患の責任遺伝子単離法」平成 25 年 9 月 7 日三井ガーデンホテル千葉@千葉市

第 22 回発達腎研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析:現状と限界」平成 25 年 9 月 13 日高槻市生涯学習センター@高槻市

第 18 回山形小児神経研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンス解析で分かってきたこと」平成 25 年 9 月 27 日パレスグランデール@山形市

第 58 回日本人類遺伝学会大会・シンポジスト・松本直通「ヒト疾患エクソーム解析の現状と課題」平成 25 年 11 月 23 日@江陽グランドホテル仙台

希少疾患・難病の全エクソーム解析 -現状と課題- 松本直通「希少疾患・難病の全エクソーム解析-現状と課題-」平成 25 年 12 月 3 日日経バイオテク「希少疾患・難病の治療薬開発におけるゲノム活用」@秋葉原コンベンションホール

Naomichi Matsumoto, T. Nishimura, K. Muramatsu, H. Koderu, S. Kumada, K. Sugai, E. Kasai-Yoshida, N. Sawaura, H. Nishida, A. Hoshino, F. Ryujin, S. Yoshioka, H. Arakawa, M. Kato, N. Mizushima, H. Saitsu. European Conference of Human Genetic 2013. June 9, 2013 @Palais des Congrès, Paris, France

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2013-252720・鶴崎美德/松本直通・「Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子診断法」・平成 25 年 12 月 6 日

PCT/JP2013/71620・松本直通/三宅紀子・ミトコンドリア複合体 III 欠乏症患者又は保因者の検出方法・平成 25 年 8 月 9 日

特願 2013-157339 号 松本直通/三宅紀子・ケトン血症を伴うリー脳症患者または保因者の検出法。平成 25 年 7 月 31 日

特願 2013-123660 才津浩智/松本直通・小児期のおてんかんおよび不随意運動をきたす疾患の検出方法・平成 25 年 6 月 12 日

研究全体の流れと進行状況

