

は GI 異常が子宮内発育不全 (IUGR) の原因となる。インプリント異常疾患である新生児一過性糖尿病 (TNDM) でも IUGR がみられ、ART と関連するかもしれない。しかし、不妊症自身の遺伝的背景も考慮しなければならない。つまり、相乗効果が働くのかもしれない (図3)。インプリント遺伝子以外の影響に加え、原因遺伝子の探索は重要で、安全な ART 治療を行う上で、予防、診断に十分生かせられると考えている。

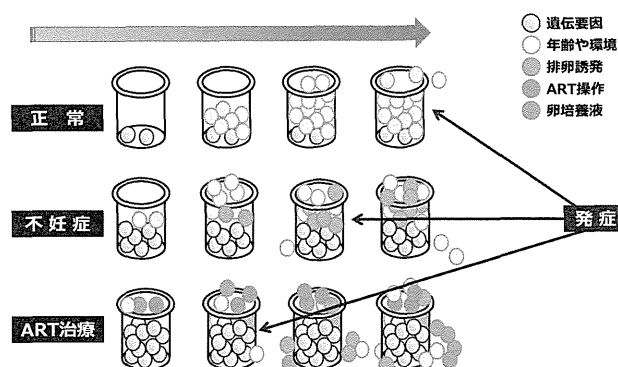


図3 インプリント異常症における閾値に関するモデル
不妊症自身の遺伝的背景に ART 操作が加わり、インプリント異常症を発症しやすくしているのではないか。

E. 結論

メチル化異常を呈するインプリント異常症の場合、ART 出生児はその異常のパターンが複雑である。この異常は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。つまり、受精以降の胚操作(受精卵培養、凍結胚操作など)に注意を払わなければならないと考えられる。今後エピゲノム異常を示す症例の発症機序の解明とリスク要因の同定は急務である。

F. 健康危険情報

症例数が少ないため、未だ正確には評価できないが、ART により発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のプロセス(受精卵培養、凍結胚操作など)、つまりメチル化の獲得より、むしろメチル化の維持に影響を与える可能性があり、注意を払わなければならない。

1. 論文発表

- Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of the abnormal imprinting of human

induced pluripotent stem cells. **BMC Genetics**. 14, 32, 2013.

- Chiba H, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technologies. **Pediatrics international**. 55, 542-549, 2013.
- Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Ogura A, Arima T. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. **Hum Mol Genet**. in press.
- Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. ART and imprinting errors. **Reproductive Medicine and Biology**. in press.
- 千葉初音、岡江寛明、有馬隆博、ヒト生殖補助医療 (ART) とエピジェネティクスの異常、遺伝子医学MOOK25号 178-183, 株式会社メディカルドゥ 2013.
- 井原基公、有馬隆博、生殖細胞と酸化ストレス、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 247(9), 851-855, 2013.
- 濱田裕貴、岡江寛明、有馬隆博、ARTとエピジェネティックな異常、臨床婦人科産科 医学書院 68(1), 98-105, 2014.
- 千葉初音、有馬隆博、生殖医療と児の奇形、エピジェネティクス異常、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 印刷中。
- 樋浦仁、有馬隆博、生殖補助医療とエピジェネティクス、エピジェネティクス-基礎研究から産業応用への展望-、株式会社シーエムシー出版 印刷中。

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 日本生殖再生医学会・第8回学術集会「乏精子症とゲノムインプリンティング」 千葉初音、有馬隆博、シェーンバッハ・サポー、東京 (3/10/2013)
- 第116回日本小児科学会学術集会「生殖補助医療と小児科医療の接点」有馬隆博、広島市文化交流会館、広島 (4/20/2013)

3. 第 54 回日本卵子学会「生殖領域におけるエピジェネティクス研究の最前線」有馬隆博、学術総合センター2 階 一橋記念講堂、東京 (5/25/2013)
4. 第 31 回日本受精着床学会総会・学術講演会「基礎から臨床へ、ART とエピゲノム」有馬隆博、別府 (8/9/2013)
5. 第 58 回日本生殖医学会 学術講演会・総会「ART とゲノムインプリンティング」有馬隆博、神戸ポートピアホテル、神戸 (11/16/2013)
6. 日本人類遺伝学会 第 58 回大会「ART と先天異常」有馬隆博、仙台 (11/22/2013)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

次世代シーケンサーによる希少遺伝性疾患の遺伝子解析研究
－劣性遺伝形式を示す新規疾患家系の解析－
－TORCH 症候群類似症状を呈する家族性頭蓋内石灰化の兄妹症例－

研究分担者 熊本大学大学院生命科学研究部 教授 遠藤文夫

研究要旨

本研究は、希少遺伝性疾患の新規候補遺伝子を同定することを目的とした研究である。すなわち、次世代シーケンサーを用いて希少遺伝性疾患の新規候補遺伝子を同定し、疾患の発症機構を解明し適切な診療指針の確立を目的とする。そのためには希少遺伝性疾患の家系の抽出が必要であり、解析の候補として適切かどうかを検討する必要がある。本年度は広範囲の脳内石灰化をきたし、感音性難聴、網膜異常を呈し、著名な退行をきたして TORCH 類似の症状を示す兄と妹の症例を見出した。鑑別疾患として TORCH 症候群、Aicardi-Goutieres syndrome、コケイン症候群、内分泌疾患（甲状腺機能低下症、副甲状腺機能亢進症）、炎症性疾患、中毒、ミトコンドリア異常症、リソソーム病が挙げられたがいずれも酵素診断・遺伝子診断で否定され、CGH アレイでも異常を認めず、家族歴から常染色体劣性遺伝が強く疑われたため、次世代シーケンスによる解析を実施するにいたった。

研究協力者

仲里仁史（熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野）
 三淵 浩（熊本大学医学部附属病院新生児医学寄附講座）
 中村公俊（熊本大学医学部附属病院小児科）
 松本志郎（熊本大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター）

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いて希少遺伝性疾患の新規候補遺伝子を同定し、疾患の発症機構を解明し適切な診療指針の確立を目的とする。現在までに多数の解析が実施されてきているが、原因遺伝子の解明までいたる例は限られている。過去の報告より、常染色体劣性遺伝の場合、その解析は比較的容易であることがわかってきた。よって、希少遺伝性疾患の家系の抽出が重要であり、解析の候補として適切かどうかを検討する必要がある。本研究では、我々の施設がフォローしている原因不明の家族性疾患 150 例のうち厳密に除外診断ができていない症例を抽出し、さらに劣性遺伝

性疾患を抽出して、この新規原因遺伝子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

今回、我々は上記目的のために、家族歴（兄弟例）のある希少疾患の家系（約 150 家系）を検討した。熊本大学小児科において、通院中の原因不明の希少疾患と思われ、兄弟例を含む家族例を検索し、既存の疾患との異同、候補遺伝子の検討を行い、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析、同定が可能か検討した。

（倫理面への配慮）

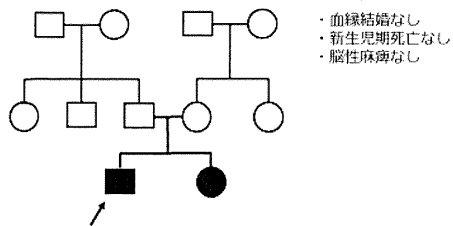
遺伝性疾患の遺伝子解析については熊本大学倫理委員会の承認を得た。また、担当医師は日本人類遺伝学会の臨床遺伝専門医であり、熊本大学における遺伝カウンセリングチームとして研究対象者に人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）、カウンセリング行いながら本研究をすすめた。

C. 研究結果

症例

家系図を示した。

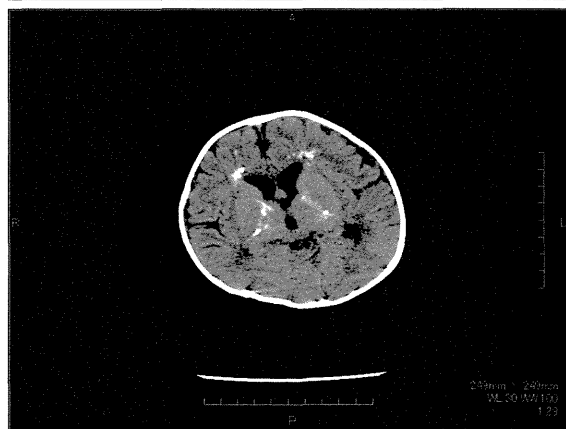
【家系図】



血族結婚はみとめず、父方母方調べた範囲では、同様の疾患は見当たらなかった。

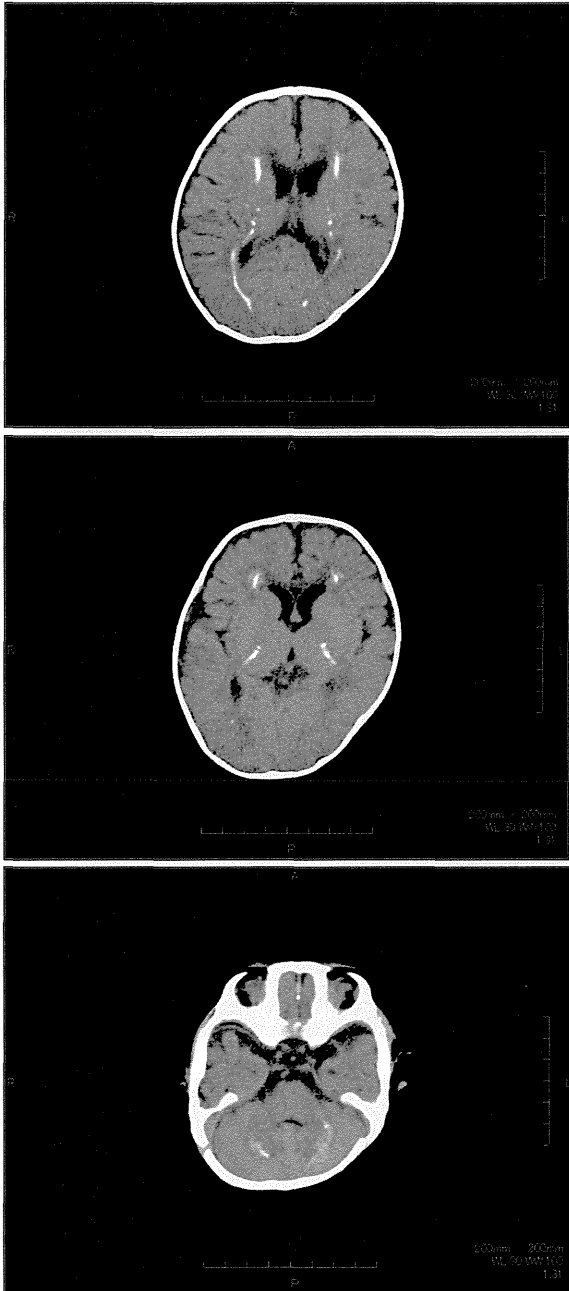
発端者は、平成20年4月17日出生、39週1日2440gであった。新生児期は異常なく、生後2ヶ月時に発熱、側胸部皮下膿瘍形成し、総合病院受診され、WBC 19200, Hb 10.2, Plt 9.1, IgG 200 台であり、血小板減少と低ガンマグロブリン血症認められた。免疫不全疑いで精査を受けたが、免疫機能精査ではリンパ球サブセット正常、Wiskott-Aldrich syndrome protein 抗原解析正常で、そのほかの疾患分類にも当てはまるものではなく経過された。次第に体重増加不良、音への反応の鈍さ、発達遅延を認め、筋緊張亢進、ミオクローヌスが激しくなった。ロタウイルス腸炎罹患直前まで、追視あり笑顔見られ、寝返りできており、乳食摂取していた。現在は寝たきりで経管栄養施行中。追視(-)、開眼(+)、筋緊張亢進(+)、DTR亢進(+)、ミオクローヌス(+)。わずかな刺激で全身に強直出現する状態となった。

発症当時のCTを示す。



深部白質、一部基底核、小脳にも石灰化を認めた。頭部MRIを示す。





鑑別のための検査データを示す。

- ・脳波（平成 20 年 10 月、12 月）：2 回とも異常なし。
 - ・頭部 MRI（平成 20 年 10 月施行）：T2 画像で深部白質の low intensity(+)
 - ・聴性脳幹反応：両側無反応
 - ・血液生化学：軽度肝障害（+）、高アンモニア血症（-）、その他異常なし
 - ・血液ガス：異常なし
 - ・乳酸、ピルビン酸：異常なし
 - ・血液アミノ酸分析：異常なし
 - ・腹部エコー：異常なし
 - ・TORCH 症候群検査：
- ①サイトメガロウイルス

臍帯血中 CMV（-）、血中 CMV IgG(+)、IgM(±)、C7-HRP(-) 髄液 CMV IgG(-)、IgM(-)。髄液 CMV の PCR 陰性。

②トキソプラズマ IgG(-)、IgM(-)

③濾紙血液の風疹、単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、EB ウイルス：PCR 陰性

<採血検査>ヘモグラム正常、補体価正常、血沈異常なし、血液ガスでアシドーシスなし。軽度肝障害（+）。乳酸・ピルビン酸も異常なし。補体価正常、抗核抗体は陰性。低 IgG、低 IgA 血症（+）。

<タンデムマスキング：6/25>異常なし

<尿中有機酸スクリーニング検査：6/26>異常なし
<感染>

サイトメガロウイルス C7-HRP(6/25)：陰性、

トキソプラズマ IgG 抗体 (8/3)：3 以下 (6 IU/ml 未満)、

トキソプラズマ IgM 抗体 (8/3)：0.1 (0.8 IU/ml 未満)

麻疹/HI(8/3)：8 培未満 (8 倍希釈より実施)

風疹/HI(8/3)：8 培 (8 倍希釈より実施)

水痘・帯状疱疹ウイルス IgG 2.3(2 未満)

水痘・帯状疱疹ウイルス IgM 0.63(0.8 未満)

コクサッキーウイルス B 群 1 型～6 型：すべて 4 倍未満 (4 未満)

はすべて陰性

<髄液検査(8/3)>

細胞数 10/3 個、蛋白 82.5mg/dl、糖 65mg/dl、LDH 8U/l

ミエリン塩基性蛋白：388pg/ml (102 以下)、

乳酸：16.8mg/dl、ピルビン酸：0.9mg/dl、L/P：18.6、

オリゴクローナルバンド：陰性

インターフェロン α：陰性

ネオプテリン：3pmol/ml

<神経伝導速度検査(7/31)>異常なし

<染色体検査(8/25)>正常核型 46,XY

<眼科コンサルト(6/25)、(7/31)>網膜色素変性 (+)、TORCH 症候群を疑う所見なし。

<皮膚科コンサルト (7/9) >日光過敏症なし

<2 回目頭部 MRI+MRS(8/25)>

頭部 MR:2009/06/25 MR と比較。

・側脳室拡大が進行し、脳溝も前回よりやや拡大しており脳萎縮が疑われる。また、大脳白質にはびまん性に T2 強調像で高信号域を認める。皮質は両側頭頂葉-側頭葉の一部でやや低信号だが、前頭葉-頭頂葉を中心に高信号を呈する。小脳半球も高信号。白質、皮質の高信号ともに前回より目立つ。基底核も高信号となり、これも前回より進行している。脳幹部にも高信号域が広がっている。

また、T1 強調像では大脳皮質や皮質下白質、内包後脚、視床、基底核、脳幹、小脳に高信号域がみられる。FLAIR では大脳半球皮質-皮質下の線状の高信号を認める。DWI ではやはり両側錐体路が高信号。

・右大脳深部白質に関心領域を設定し、short TE MRS 施行。同部では、NAA の低下と著明な Cho の上昇、lac の上昇がみられ、脳の破壊性変化の進行を疑わせる。疾患特異的な異常ピークは認めず。

・左右対称性の病変であり代謝性疾患を疑い。

Cockayne 症候群のほかに、Aicardi-Goutieres syndrome が鑑別に挙がる。

【セカンドオピニオン】

亀田メディカルセンター 小児科 高梨先生、

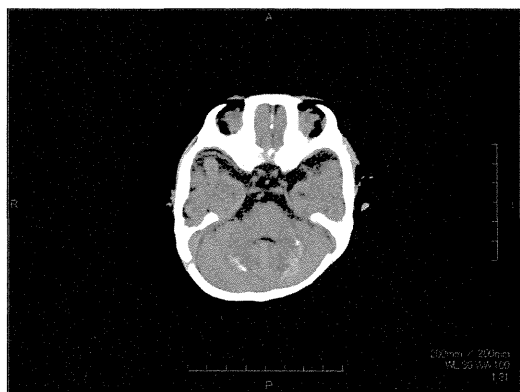
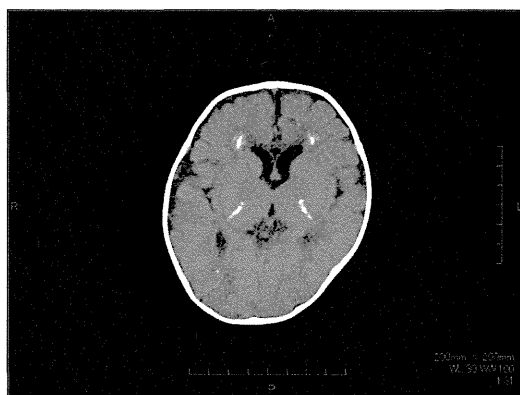
国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科 佐々木先生

2008 年 10 月の MRI だけみると先天性 CMV 感染症が疑わしく、2009 年 1 月のロタ腸炎罹患時には視床など新たな病変が生じていることから、先天性 CMV 感染症に続いてロタウイルス脳症を発症したと考えられるが、8 月に施行した頭部 MRI 所見では 6 月と比べて病変が進行しており MRS でも脳の破壊性病変の進行が疑われたため、先天性 CMV 感染症→ロタウイルス脳症の説は否定的。髄液中のミエリン塩基性蛋白も増加していることから代謝性でありかつ進行性の疾患であることが示唆されるが、当てはまる疾患が見当たらない、とのコメントを得ている。

第 2 子は、在胎 41 週 3 日、2670 g、Apgar 8/9、正常分娩で出生した。生後、2 ヶ月 28 日目から発熱あり、総合病院へ入院。CTX+ABPC（1 日目～10 日目）投与し軽快。入院 3 日目より酸素低下あり、軽微酸素開始（0.25L）。CT などでは肺野に異常なし。血小板減少もあり継続しており、低 γ グロブリン血症

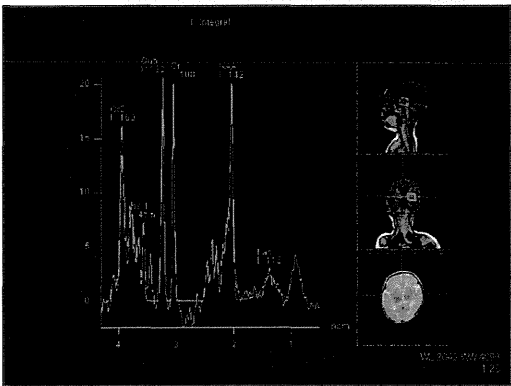
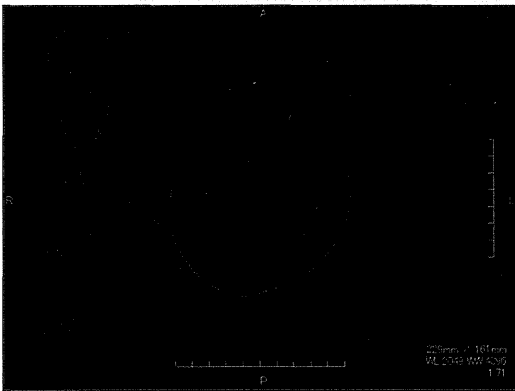
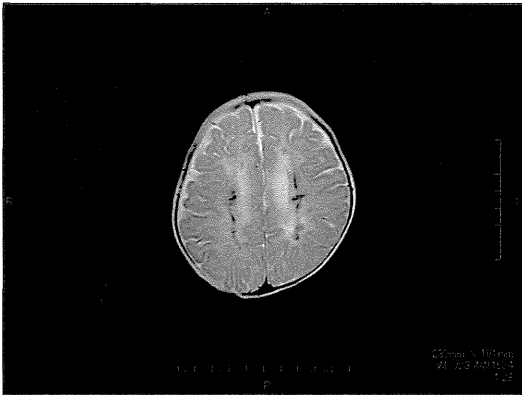
をみとめた。鑑別のために頭部 CT 撮影したところ脳内に石灰化を認め兄と同じ症状のため、当院へ搬送された。

頭部 CT 画像検査





第2子の頭部MRI像を示す。



内分泌疾患(甲状腺機能低下症、副甲状腺機能亢進症)、先天性疾患や感染症、炎症性疾患、中毒、は否定された。頭部MRIから左右対称性の病変であり代謝性疾患が疑われた。当初はコケイン症候群を疑ったが、日

光過敏症認めず否定的、遺伝子検査でも異常認めなかった。最終鑑別疾患として Aicardi-Goutieres 症候群が残ったが、全 Exon のシーケンス、cDNA のシーケンスでも変異は認めず、兄、妹ともに既存の疾患はすべて否定された。

鑑別した疾患を以下に示す。

鑑別疾患	鑑別方法	診断
副甲状腺機能異常	内分泌検査	否定
Fahr病	家族歴	否定
Cockayne症候群	光線刺激試験等	否定
21trisomy	染色体検査	否定
MELAS, MERRF	遺伝子検査、MRI所見など	否定
炭酸水素脱水素酵素 I 欠損症	スクリーニング正常	否定
HallervordenSpats 病	MRI所見など	否定
Oculodento-digital dysplasia	C T、骨所見等	否定
Lipoid-proteinosis	皮膚粘膜所見	否定
DHPR欠損症	アミノ酸分析	否定
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症	尿中有機酸分析	否定
Aicardi-Goutieres症候群	髄液中Ifa、遺伝子検査	否定
DNTC	年齢、臨床症状	否定
TORCH症候群	抗体検査、PCR など	否定

更に、CGH アレイを実施したが異常はみとめなかった。

以上の結果より、既存の疾患に分類されない劣性遺伝性の難病と判断されたため、在、父母と妹の genome を抽出し、すべての遺伝子について解析中である。

D. 考察

1. 第1家系

特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例を報告した。これまでの我々の経験からは非常に特徴的であるが非常にまれな疾患と考えられた。同様の病状を呈する疾患として、UR-DBMS (琉球大学遺伝性疾患データベース) により検索を行った。可能性の高い疾患として、Microphthalmia syndromic 1 (Lenz 症候群)、Microphthalmia syndromic 2 (Oculofaciocardiodental syndrome: OPCD 症候群) が検索された。Lenz 症候群は Hermann & Opitz らが 1969 年に X連鎖性劣性遺伝形式をとり、小眼球ないし臨床的無眼球 (片側性または両側性)、耳介聳立; 短い円柱状の胸郭と内方に回転した膝; 柱状の胸郭、なで肩、鎖骨異常 (下) 両側性虹彩コロボーマを特徴とする症候群として報告した。OPCD 症候群は Hedera P らが 2003 年、X連鎖性優性遺伝形式をとり、長く鋭い鼻、陥凹した鼻尖、先天性白内障、緑内障、VSD、槌趾; 著明に長い全犬歯 (> 45 mm) (正常 = 26 mm) 小眼球、緑内障、長く狭い顔、幅広い鼻

尖：右手 XP (6M 時)第 1 中手骨と母指低形成，著明な第 5 指彎指を特徴とする女性例を報告した。しかし、前者は女性の発症は原則的にはなく、後者は男性致死でいずれも該当しない。その後両者の候補遺伝子として *BCOR* (BCR-6 corepressor gene) 遺伝子同定され、病因が明らかにされつつがあるが、このような家族例の報告はない。本例においても *BCOR* 遺伝子の解析を行ったが、エクソンおよびエクソン周辺のイントロン領域において遺伝子変異は検出されなかった。歯の所見、心奇形がないなどの特徴からも Lenz 症候群、OPCD 症候群と切り離して考えた方が妥当である。それでは他にどのような疾患が考えられるのであろうか。眼球異常をきたす疾患としては *Microphthalmia syndromic* としていくつかの亜系が知られている。また、Breschek syndrome, Nance-Horan syndrome, Norrie disease, Fraser syndrome, 腎コロボーマ症候群、Meckel-Gruber syndrome など知られているが、臨床特徴からは該当しない。上記症候群および眼球形成にかかわる遺伝子としては、*HCCS*, *NHS*, *NDP*, *PQBPI*, *SOX2*, *OTX2*, *PAX6*, *RAX*, *BMP4*, *SMOC1*, *GDP6* などあげられているが、これらを一つ一つ解析することは困難である。以上より、本兄妹例は希少で新規の遺伝性疾患の可能性が高く、候補遺伝子の同定に関しては、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析がもっとも有用であると考えられた。また、眼球異常遺伝子解析セットなど似たような症候群の遺伝子解析の進捗に大いに寄与する可能性がある。遺伝子の同定および機能分析がすすめば、治療に対する応用や発生過程における眼球、腎形成の共通メカニズムなど新しい知見が得られるものと期待される。

2. 第 2 家系

兄と妹が全く同じ症状（脳内石灰化、退行、聴力障害、網膜異常）を呈しており、3 親等以内に同様の患者が存在しないため、常染色体劣性遺伝形式がもっとも疑われた。鑑別疾患としては、common disease から rare disease まで幅広く鑑別を行った。特に特徴的である症状として脳内の広範囲の石灰化が指摘できたため、画像診断学的にもアプローチ（国立神経精神センターの神経カンファ、セントメアリー病院神経カンファなど）を行って鑑別しうるすべての疾患について遺伝子検査を実施したが、異常は認められなかった。

TORCH 症候群とされる疾患のなかに TORCH が明確に証明できないことがあることはしばしば臨床的に経験されることであり、本疾患はそのような患者の背景にある新規疾患の氷山の一角の可能性もある。また、もっとも臨床症状が近いと考えられた AGS との類縁疾患の可能性も考えられる。髄脊内の IF α はみとめないものの、MRS では脳内で炎症が起きていることが示唆されており、何らかの炎症性サイトカインの関連した疾患である可能性も残り、脳変性疾患、原因不明とされている家族性良性脳内石灰化などの原因解明にもつながる可能性がある。

E. 結論

希少遺伝性疾患の候補として、第 1 家系として、特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例を抽出した。更に、第 2 家系として、頭蓋内石灰化、網膜異常、感音性聴力障害をきたした兄、妹例を抽出した。厳密な鑑別に時間を要したが、希少遺伝性疾患候補と考えられ、次世代シーケンサーによる候補遺伝子を同定し、疾患の発症機構を解明する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto A, Nakamura K, Matsumoto S, Iwai M, Shigematsu Y, Tajima G, Tsumura, Okada S, Mitsubuchi H, Endo F. VLCAD deficiency in a patient who recovered from ventricular fibrillation, but died suddenly of a respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Int.* 2013 Dec;55(6):775-8.
- 2) Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M, Kume S. VMAT2 identified as a regulator of late-stage β -cell differentiation. *Nat Chem Biol.* 2013 Dec 15
- 3) Tanaka T, Mochida T, Maki Y, Shiraki Y, Mori

H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Endo F, Okamoto M. Interactive network analysis of the plasma amino acids profile in a mouse model of hyperglycemia. Springerplus. 2013 Jun 28;2(1):287. Print 2013

- 4) Ohya Y, Okajima H, Honda M, Hayashida S, Suda H, Matsumoto S, Lee KJ, Yamamoto H, Takeichi T, Mitsubuchi H, Asonuma K, Endo F, Inomata Y. Re-evaluation of the indications for liver transplantation in Wilson's disease based on the outcomes of patients referred to a transplant center. *Pediatr Transplant*. 2013 Jun;17(4):369-73.
- 5) Kido J, Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R, Endo F. Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J Hum Genet*. 2013 May;58(5):285-92.

2. 学会発表

- 1) Shirou Matsumoto, Kiyoko Hattori, Kimitoshi Nakamura, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo. A patient of Gaucher's disease type 2 with recurrent ARDS. The 4th International Forum for Lysosomal Storage Disease & 17th Japanese Society for Lysosomal Disease;
- 2) Shirou Matsumoto, Takumi Era, Fumio En

do. 講演 メチルマロン酸血症の神経症状に及ぼす感染症の影響ならびにiPS歳簿を用いた病態解明の試み（病態生理の詳細な解明とiPS細胞の利用） 2013年10月12日 宮崎シーガイア

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

次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア呼吸鎖異常症の解析 についての研究

研究分担者 大竹 明 埼玉医科大学小児科 教授

研究要旨

呼吸鎖酵素診断により全国からの依頼患者 314 家系 318 例をミトコンドリア呼吸鎖異常症（MRCD）と診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く 72 例、次いで Leigh 脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が 28 例、その他が 15 例と極めて多岐にわたっていた。ミトコンドリア遺伝子解析では 160 例について解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を 50 例（31%）に同定した。150 例についてエキソーム解析が終了し、まず 33 例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、BOLA3, ACAD9, EFTu 異常患者等が含まれる。次いで 13 例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に 62 例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。

研究協力者

神田将和（埼玉医科大学ゲノム医学研究センター
トランスレーショナルリサーチ部門）

A. 研究目的

ミトコンドリア呼吸鎖異常症(MRCD)は最も高頻度（1/5,000）なエネルギー産生系の先天代謝異常症であり、症状・罹患臓器・遺伝形式は極めて多岐にわたる。今回の研究は、私達の開発した、酵素診断に始まり次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア遺伝子解析全エキソーム解析に至る系統的病因探索システムがうまく稼働するかどうかを検討することと、その結果を応用して MRCD の病態解明、さらに最終的には新薬の開発を目指すことである。

【考察】私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的探索システム」は充分機能した。今後 iPS 細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し、最終的にはこのシステムを応用して創薬に向けた検討を行いたい。（遺伝子解析部分は、主に文部科学省「革新的細胞解析研究プログラム（セルイノベーション）補助金を用いて行われた。）

B. 研究方法

【対象】941 家系 965 症例から得た 1605 検体（皮膚線維芽細胞 785 検体、肝臓 343 検体、筋肉 323 検体、心臓 108 検体、腎臓 30 検体、脳 7 検体など）。【方法】1) Blue Native 電気泳動を用いた Western Blot と in gel enzyme stain、および in vitro 酵素アッセイを用いた呼吸鎖酵素複合体蛋白レベルの解析。2) サンガーシーケンス法や次世代シーケンス法によるミトコンドリア DNA 全周塩基配列の解析。3) ミトコンドリア DNA 枯渇症候群（mitochondrial DNA depletion syndrome: MTDPS）疑い例については、定量的 PCR（qPCR）による診断確定後、サンガーシーケンス法による頻度の高い 11 種類の原因遺伝子解析。4) 以上で病因が判明しない症例に対する次世代シーケンス法を用いた全エキソーム解析。

（倫理面への配慮）

本研究は申請番号 482（現在更新されて 482-VI）で埼玉医科大学倫理委員会における審査を受け承認を得て行った。遺伝子解析研究についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）および、医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン

(日本医学会 2011 年 2 月)に基づいて行い、さらにこれとは別に各研究機関の倫理審査委員会において承認を得て行った。

C. 研究結果

1) 酵素診断の結果：現在までのところ、314 家系 318 例を MRCD と診断した。臨床診断では乳児ミトコンドリア病が最も多く 72 例、次いで Leigh 脳症、脳筋症、肝症、心筋症、神経変性疾患と続き、突然死が 28 例、その他が 15 例と極めて多岐にわたっていた。2) ミトコンドリア遺伝子解析：160 例について解析を行い、既知・未知を合わせて病因と考えられる遺伝子変異を 50 例 (31%) に同定した。つまり 7 割の MRCD は核遺伝子異常と考えられた。3) 150 例についてエキソーム解析が終了し、まず 33 例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。これらの中には、いずれも日本人初例となる、*BOLA3*, *ACAD9*, *EFTu* 異常患者等が含まれる。次いで 13 例でミトコンドリア局在の未報告遺伝子における変異を同定した。最後に 62 例で上記に当てはまらない新規原因遺伝子候補を同定した。4) 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は一部の患者細胞の ATP 合成能を回復し、その機序は主に呼吸鎖 III と IV の活性回復であった。

D. 考察

私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的病因探索システム」はしっかりと機能した。今後 iPS 細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し病態を詳しく解明すると共に、このシステムを応用して 5-ALA を発端とする創薬に向けた検討も発展させたい。

E. 結論

私達の開発した「酵素診断から遺伝子解析に至る系統的病因探索システム」はしっかりと機能した。今後 iPS 細胞樹立を含めた機能解析方法を完成し病態を詳しく解明すると共に、このシステムを応用して 5-ALA を発端とする創薬に向けた検討も発展させたい。(遺伝子解析部分は、主に文部科学省「革新的細胞解析研究プログラム (セルイノベーション) 補助金を用いて行われた。)

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

原著

1) Yamazaki T, Murayama K, Compton AG, Sugiana C, Harashima H, Amemiya S, Ajima M, Tsuruoka T, Fujinami A, Kawachi E, Kurashige Y, Matsushita K, Wakiguchi H, Mori M, Iwasa H, Okazaki Y, Thorburn DR, Ohtake A: Molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: Focusing on mitochondrial DNA depletion syndrome. *Pediatr Int* 56 (2): in press, 2014

2) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta (General Subjects on Special Issue: Frontiers of Mitochondria.)* 1840(4): 1355-1359, 2014.

3) Enkai S, Koinuma S, Ito R, Igaki J, Hasegawa Y, Murayama K, Ohtake A: Case of an infant with hepatic cirrhosis caused by mitochondrial respiratory chain disorder. *Pediatr Int* 55 (4): e103-6, 2013.

4) Kondo H, Tanda K, Tabata C, Hayashi K, Kihara M, Kizaki Z, Taniguchi-Ikeda M, Mori M, Murayama K, Ohtake A: Leigh syndrome with Fukuyama congenital muscular dystrophy: A case report. *Brain Dev*, 2013 Oct 7. doi:p11: S0387-7604 (13) 00286-6. 10.1016/j.braindev.2013.09.005. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

(国際学会のみ)

1) Ohtake A: Diagnosis and treatment for mitochondrial disorders: an update. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases

(ACIMD)/the 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Educational lecture-7. November 27-29. Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort (Chiba, Japan), 2013

2) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: exome sequencing for the disease gene identification. International Symposium on Mitochondria 2013/The 13th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit). Symposium 3: Next Generation Technologies for Mitochondrial Disorders. November 6-7. Roppongi Academyhills 49 (Roppongi Hills Mori Tower 49F, Tokyo, Japan), 2013

3) Ohtake A: Diagnosis and treatment for mitochondrial disorders: an update. The 1st

International ALA and Porphyrin Symposium (IAPS1). Invited lecture-2. October 28. King Hamad University Hospital (Kingdom of Bahrain), 2013

4) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita I, Kishita Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y: Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders in Japan: exome sequencing for disease gene identification. The 12th Annual Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Scientific Meeting. Invited lecture. June 6 - 8, Sofitel Xi' an on Renmin Square (Xi' an, China), 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

小児内分泌疾患関連の症例収集と解析

研究分担者 緒方勤
浜松医科大学 小児科 教授

研究要旨

近年の次世代シーケンサーを代表とする分子生物学的解析技法の進展により、ヒト遺伝学は新しいパラダイムの時代を迎えている。研究分担者は、この次世代シーケンサープロジェクトにおいて、「小児内分泌疾患」症例を集積し、エクソーム解析による新規責任遺伝子の同定と、ターゲットエンリッチメントによる既知・候補遺伝子の包括的解析を行った。その結果、常染色体優性の低 Na 血症（腎尿細管水再吸収増加）を呈する家系において、この疾患と連鎖する塩基置換を 44 個の遺伝子を同定した。また、常染色体優性の若年発症糖尿病(MODY)を呈する家系において、MODY と連鎖する塩基置換を 70 個同定した。現在、真の責任遺伝子同定を進めているデータマイニングの段階に入っている。また、ターゲットエンリッチメントによる尿道下裂患者の解析を行い、多数の患者において原因遺伝子を同定した。これらの成果は、次世代シーケンサーを用いた解析法が、希少疾患の原因解明に有用であることを支持する。さらに、様々な内分泌疾患患者の検体集積と症例登録を開始し、将来の研究を推進する基盤作成に貢献した。

研究協力者

深見真紀(国立成育医療研究センター)

A. 研究目的

近年の次世代シーケンサーを代表とする分子生物学的解析技法の進展により、ヒト遺伝学は新しいパラダイムの時代を迎えている。第 1 に、エクソーム解析などにより、遺伝性疾患の新規責任遺伝子が次々と同定されるようになってきている。この次世代シーケンサー解析で責任遺伝子を同定するためには、この解析法に適した患者・家系を見いだすことが重要となる。ここで、ある特定の疾患を有する家系において、罹患者と非罹患者の検体を解析することが有用である。この方法は特に常染色体劣性疾患において特に有用とされるが、比較的大きな家系であれば、常染色体優勢疾患においても極めて有用性の高い方法である。特に、当該疾患の既知遺伝子が存在しないときや、既知責任遺伝子変異が除外されているときには、新規責任遺伝子の同定と、それによる疾患発症機序の解明や新規治療法開発の契機が得られると期待される。第 2 に、タ

ーゲットエンリッチメントによる既知・候補遺伝子の包括的解析により、遺伝的異質性に富むために、膨大な数の遺伝子解析が必要で得ある疾患の網羅的遺伝子解析が可能となっている。

研究分担者は、「次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究」において、小児内分泌疾患の情報価値の高い家系からの臨床情報や DNA 検体集積ならびに解析を担うことで、新規責任遺伝子単離と遺伝的異質性に富む疾患の原因解明を目指し、本研究を行った。さらに、検体集積とその登録を推進した。

B. 研究方法

1. エクソーム解析による新規遺伝子同定：比較的大きな家系を対象として、表現型の詳細な解析、ならびに既知責任遺伝子が存在するときには、当該責任遺伝子の通常の方法による変異解析を行った。その後、既知責任遺伝子変異が否定された家系においてエクソーム解析を行った。
2. ターゲットエンリッチメントによる既知・候補遺

伝子の包括的解析：遺伝的異質性に富む尿道下裂患者68例を対象として、既知・候補遺伝子計122個を対象とする解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、書面を用いた詳細な同意取得の説明に続き、文書に寄る同意が得られた患者・家系を対象として検体収集を実施している。なお、浜松医科大学において、次世代シーケンサー解析を含む内容として、「性分化疾患・性成熟疾患における遺伝的原因の探索(浜松医科大学第 23-110 号)、ならびに、「先天性奇形症候群における遺伝的原因の探索」(浜松医科大学第 23-112 号)が承認されていることを付記する。

C. 研究結果

常染色体優性の低 Na 血症（腎尿細管水再吸収増加）を呈する家系におけるエクソーム解析：われわれは、図 1 に示す低 Na 血症を示す家系において、まず既知の VP receptor や aquaporin 関連遺伝子のコード領域内変異を通常のシーケンス解析で除外した。その後、エクソーム解析を実施したところ、この疾患と連鎖する塩基置換が 44 個の遺伝子において見いだされた。現在、ピックアップされた遺伝子の発現パターンや機能解析データに基づいて、真の責任遺伝子を追求しているところである。

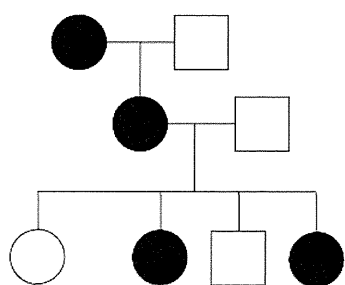


図 1. 家系図。黒塗りは罹患者を、白塗りは健常者を示す。

常染色体優性の若年発症糖尿病 (MODY) を呈する家系におけるエクソーム解析：われわれは、図 2 に示す家系において、既知の常染色体優性形式の MODY 発症責任遺伝子 7 個のコード領域内の変異を除外した。また、詳細な臨床情報収集で症状が既知の MODY とは異なることを明らかとした。本家系では新規 MODY 発症責任遺伝子変異の可能性が推測されることから、

エクソーム解析を行った。MODY と連鎖する塩基置換が 70 個同定され、現在、真の責任遺伝子同定を進めているデータマイニングの段階に入っている。

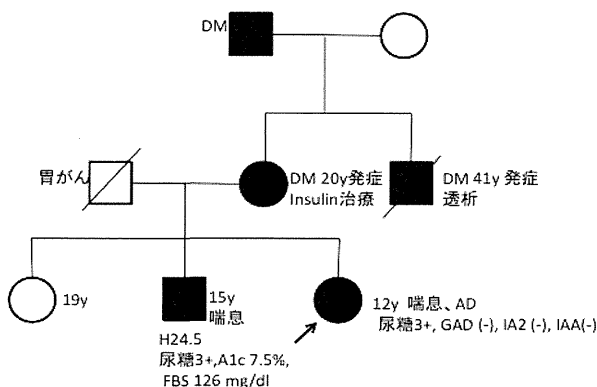


図 4. 原因不明の MODY 家系。黒塗りは罹患者を、白塗りは健常者を示す。

ターゲットエンリッチメントによる性分化・性成熟疾患関連既知・候補遺伝子の包括的解析：尿道下裂患者 68 例中 6 例において疾患に關与する可能性が高い塩基置換が複数の遺伝子 (*AR*, *SFI*, *HSD3B2*) で同定された。さらに、3 例において候補遺伝子の変異が同定された。現在、これらの遺伝子の機能解析を開始している。尿道下裂患者 68 例中 6 例において疾患に關与する可能性が高い塩基置換が複数の遺伝子 (*AR*, *SFI*, *HSD3B2*) で同定された。さらに、3 例において候補遺伝子の変異が同定された。現在、これらの遺伝子の機能解析を開始している。

検体集積と症例登録

われわれは、現在までに、様々な内分泌疾患患者の検体を約 5,000 例集積している。これは、全国の臨床医および関連学会と連携して行ったものである。このうち、本研究期間において、約 1,000 例の検体を集積した。この検体は、現在、国立成育医療研究センター内のデータベースに登録中である。これにより、貴重なサンプル・臨床情報を将来の研究に活用する基盤が樹立された。

D. 考察

本研究の成果は、次世代シーケンサーを用いた解析法が、希少疾患の原因解明に有用であることを支持する。第 1 に、常染色体優性疾患家系におけるエクソーム解析で原因遺伝子あるいは候補遺伝子が同定さ

れた。第2に、特定疾患のターゲットエンリッチメント解析により、多数の患者で原因遺伝子変異が同定された。このような方法は、どちらも従来の個別遺伝子を対象とするサンガー法では不可能であり、今後、このような最新解析法が遺伝子診断・遺伝子解析研究の中核を担うことになると考えられる。

また、検体集積は、わが国の将来の性分化疾患研究の基盤となると期待される。

E. 結論

小児内分泌疾患を対象として、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を、常染色体優性の低Na血症（腎尿細管水再吸収増加）を呈する家系におけるエクソーム解析を行い、この疾患と連鎖する塩基置換が44個の遺伝子を同定した。また、常染色体優性の若年発症糖尿病(MODY)を呈する家系におけるエクソーム解析も実施し、MODYと連鎖する塩基置換を70個同定した。現在、真の責任遺伝子同定を進めているデータマイニングの段階に入っている。また、ターゲットエンリッチメントによる尿道下裂患者の解析を行い、多数の患者において原因遺伝子を同定した。これらの成果は、次世代シーケンサーを用いた解析法が、希少疾患の原因解明に有用であることを支持する。さらに、様々な内分泌疾患患者の検体集積と症例登録を開始し、将来の研究を推進する基盤作成に貢献した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

招待講演 5回（学会発表のデータなし）
原著論文 54件

- Suzuki-Suwanai A, Ishii T, Haruna H, Yamataka A, Narumi S, Fukuzawa R, Ogata T, Hasegawa T*: A report of two novel NR5A1 mutation families: possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and/or depression. *Clin Endocrinol* 78 (6): 957–965, 2013.
- Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S*: Possible contribution of fetal size and gestational age to myocardial tissue Doppler velocities in preterm fetuses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 167 (1):121, 2013.
- Nagasaki K*, Tsuchuya S, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: Neuromuscular symptoms in a patient with familial pseudohypoparathyroidism type Ib diagnosed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Endocr J* 60 (2): 231–236, 2013.
- Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T*: Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS One* 8 (3): e60405, 2013.
- Ayabe T, Matsubara K, Ogata T, Ayabe A, Murakami N, Nagai T, Fukami M*: Birth seasonality in Prader-Willi syndrome resulting from chromosome 15 microdeletion. *Am J Med Genet A* 161 (6):1495–1497, 2013.
- Yamaguchi R, Kato F, Hasegawa T, Katsumata N, Fukami M, Matsui T, Nagasaki K, Ogata T: A novel homozygous mutation of the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene in a Japanese patient with familial glucocorticoid deficiency. *Endocr J* 60 (7): 855–859, 2013.
- Fukami M*, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, Kinoshita E, Dateki S, Ogata T: Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J* 60 (8): 1013–1020, 2013.
- Matsumura T, Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Ayabe T, Katsumata N, Fukami M, Inatani M, Akagi Y, Umezawa A, Ogata T, Miyamoto K: Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *FASEB J* 27 (8): 3198–3208, 2013.
- 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, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N: MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 161 (9): 2234–2243, 2013.
- Ohishi A*, Ueno D, Ogata T: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and adrenal hemorrhage in a Filipino neonate with hyperbilirubinemia. *AJP Rep* 3 (1): 5–8, 2013.
- Aoki Y*, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y: Gain-of-function mutations in *RIT1* cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *Am J Hum Genet* 2013; 93 (1): 173–180.
- Igarashi M, Dung VC, Suzuki E, Ida S, Nakacho M, Nakabayashi K, Mizuno K, Hayashi Y, Kohri K, Kojima Y, Ogata T, Fukami M*: Cryptic genomic rearrangements in three patients with 46,XY

- disorders of sex development. *PLoS One* 8 (7): e68194, 2013.
13. Hayashi M*, Kataoka Y, Sugimura Y, Kato F, Fukami M, Ogata T, Homma K, Hasegawa T, Oiso Y, Sasano H, Tanaka H: A 68-year-old phenotypically male patient with 21-hydroxylase deficiency and concomitant adrenocortical neoplasm producing testosterone and cortisol. *Tohoku J Exp Med* 231 (2): 75–84, 2013.
 14. Fujisawa Y*, Yamaguchi R, Nagata E, Satake E, Sano S, Matsushita R, Kitsuta K, Nakashima S, Nakanishi T, Nakagawa Y, Ogata T: The lipid fraction of human milk initiates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Early Hum Dev*. 2013 Jun 8. doi:pii: S0378-3782(13)00114-X. 10.1016/j.earlhumdev.2013.05.002. [Epub ahead of print]
 15. Fukami M*, Suzuki J, Nakabayashi K, Tsunashima R, Ogata T, Shozu M, Noguchi S: Lack of genomic rearrangements involving the aromatase gene *CYP19A1* in breast cancer. *Breast Cancer* 2013 Apr 30. [Epub ahead of print].
 16. Fujisawa Y*, Yamaguchi R, Satake E, Ohtaka K, Nakanishi T, Ozono K, Ogata T: Identification of *AP2S1* Mutation and Effects of Low Calcium Formula in an Infant with Hypercalcemia and Hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 Sep 30. [Epub ahead of print]
 17. Sasaki A, Sumie M, Eada S, Kosaki R, Kurosawa K, Fukami M, Sago H, Ogata T, Kagami M*: Prenatal Genetic testing for a microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to upd(14)pat-like phenotype. *Am J Med Genet A* (accepted).
 18. Nagasaki K*, Asami T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: Long term follow up study for a patient with Floating-Harbor syndrome due to a hotspot *SRCAP* mutation. *Am J Med Genet A* (accepted).
 19. Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Nagasaki K, Ogata T, Fukami M*: Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol* 2013 Sep 18. doi: 10.1111/cen.12329. [Epub ahead of print].
 20. Nakashima S, Watanabe Y, Okada J, Ono H, Nagata E, Fukami M, Ogata T*: Critical role of Yp inversion in *PRKX/PRKY*-mediated Xp;Yp translocation in a patient with 45,X testicular disorder of sex development. *Endocr J* 2013 Oct 3. [Epub ahead of print].
 21. Tsuchiya T, Shibata M, Numabe H, Jinnno T, Nakabayashi K, Nishimura G, Nagai T, Ogata T, Fukami M*: Compound heterozygous deletions in pseudoautosomal region 1 in an infant with mild manifestations of Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet A* (in press).
 22. Yagasaki H*, Nakane T, Saito T, Koizumi K, Kobayashi K, Ogata T: Disorder of sex development in an infant with molecularly confirmed 46,XY,der(10)t(10;21)(q21.1;q21.3). *Am J Med Genet A* (in press).
 23. Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Sato T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H*: A novel *de novo* point mutation of OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet* (in press).
 24. Kitsuda K*, Yamaguchi R, Nagata E, Nakagawa Y, Ohzeki T, Ogata T, Nakanishi T: Hypertrophic cells in hypophagic intrauterine growth retarded rats without catch-up growth. *Kitasato Med J* (in press).
 25. Fukami M*, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Gurger H, Sompson ER, Emezawa A, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M, Ogata T: Genomic basis of aromatase excess syndrome: recombination- and replication-mediated rearrangements leading to *CYP19A1* overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 Sep 24. [Epub ahead of print].
 26. Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, Ogata T*: IMAGE syndrome: clinical and genetic implications based on investigations in three Japanese patients. *Clin Endocrinol* (in press)
 27. Kawamoto T, Design of the Japan Environment and Children's Study (JECS), a nation-wide birth cohort study in Japan. *EPH* (in press)
 28. Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simon C, Moore H, Harness J, Keirstead H, Vicente Sanchez-Mut J, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D*: Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent establishment of imprinting. *Genome Res* (in press).
 29. Fukami M*, Shozu M, Ogata T: Molecular bases and phenotypic determinants of aromatase excess syndrome. *Int J Endocrinol* 2012: 584807, 2012.
 30. Ogata T*, Sano S, Nagata E, kato F, Fumaki M: *MAMLD1* and 46,XY disorders of sex development. *Semi Reprod Med* 30 (5): 410–416, 2012.
 31. Fukami M, Homma K, Hasegawa T, Ogata T*: Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Dev Dyn* 242(4): 320–329, 2013.
 32. Matsubara K, Ogata T*: Advanced maternal age at childbirth and the development of uniparental disomy. A commentary on the proportion of uniparental disomy is increased in Prader-Willi syndrome due to an advanced maternal childbearing age in Korea. *J Hum Genet* 58 (3): 118–119, 2013.
 33. Fukami M*, Miyado M, Nagasaki K, Shozu M, Ogata T: Aromatase excess syndrome: a rare autosomal dominant disorder leading to pre- or peri-pubertal onset gynecomastia. *Pediatr Endocr Rev* (in press).
1. 深見真紀, 緒方勤: 新規男性ホルモン産生経路: 正常性分化および性分化疾患発症における役割. *細胞工学* 32 (2) (特集: 性決定分化の制御システム): 193–198, 2013.
 2. 緒方勤: 子宮内発育不全の分子遺伝学的解析による早期診断とその意義. *小児科臨床* 66 (ミニ特集:

- 知っておきたい新生児疾患の早期診断): 21-225, 2013.
3. 緒方勤: シルバーラッセル症候群. 周産期医学 43 (3) (染色体異常と先天異常症候群の診療ガイド): 383-387, 2013.
 4. 緒方勤: 性分化疾患の検査の進め方. 小児内科 (特集: 負荷試験の実際): 815-820, 2013.
 5. 緒方勤: 性分化疾患. 愛媛県小児科医会会報第 63 号: 4-15.
 6. 緒方勤, 松原圭子: ART における先天異常と遺伝的問題点. 臨床婦人科産科 68 (1) (生殖医療の進歩と課題): 90-96, 2014.
 7. 緒方勤: SHOX 遺伝子半量不全に起因する低身長: 診断・治療アップデート. Pediatric Endocrinology Reviews 抄訳シリーズ. ジャパンメディアアートパブリッシング. No. 30: 1-2, 2012.
 8. 緒方勤: 原発性性腺機能低下症. 大関武彦, 古川漸, 横田俊一郎, 水口雅. 今日の小児治療指針 15 版. 医学書院 pp 244-245, 2012.
 9. 緒方勤: 心血管病変発症の性差と Y 染色体. MMJ 8 (4): 190-191, 2012.
 10. 緒方勤: Turner 症候群. 吉川史隆, 倉智博久, 平松祐司 (編) 産婦人科疾患最新の治療 2013-2015. 南江堂 pp 297-298, 2013.
 11. 緒方勤: 性分化の分子生物学. 吉田修 (監), 小川修, 岡田裕作, 荒井陽一, 寺地敏郎, 松田公志, 笈義行, 羽瀧友則 (編) ベッドサイド泌尿器科学改定第 4 版. 南江堂 pp 946-951, 2013.
 12. 緒方勤: 性発育の異常 (性分化疾患)
 13. 緒方勤: ヌーナン症候群. 横谷進 (編) 成長障害のマネジメント 改定第 3 版. 医薬ジャーナル社 pp 118-126, 2013.
 3. 緒方勤: 性とインプリンティング. 新学術領域研究「配偶子幹細胞制御機構」第 7 回領域会議特別講演. 2013 年 1 月 23-24 日, 東京.
 4. 緒方勤: 生殖補助医療と小児医療の接点: オーバービュー. 第 116 回日本小児科学会学術集会: 生殖補助医療と小児医療の接点. 2013 年 4 月 19-21 日, 広島.
 5. 緒方勤: 先天性副腎ステロイド合成異常症. シンポジウム: ステロイドホルモン研究 Update. 第 86 回日本内分泌学会学術集会. 2013 年 4 月 25-27 日, 仙台.
 6. 緒方勤: インプリンティング疾患の遺伝子診断: 第 14 染色体父性ダイソミー表現型をモデルとして. シンポジウム: 単因子疾患の遺伝子診療. 第 20 回日本遺伝子診療学会. 2013 年 7 月 18-20 日, 浜松.
 7. 緒方勤: 生殖補助医療とインプリンティング疾患発症. シンポジウム: 疾患から見た ART とエピゲノム. 第 31 回日本受精着床学会学術集会. 2013 年 8 月 8-9 日, 別府.
 8. 緒方勤: インプリンティング疾患の基礎と臨床. 両毛地区小児科講演会. 2013 年 1 月 18 日, 足利.
 9. 緒方勤: 性染色体異常症における精神運動発達遅滞の発症機序. 第 14 回ターナー症候群西日本ネットワーク学術講演会. 2013 年 2 月 23 日, 大阪.
 10. 緒方勤: Prader-Willi 症候群: 厚生労働科学研究の成果から. 竹の子の会総会講演会. 2013 年 4 月 28 日, 静岡.
 11. 緒方勤: ヒトインプリンティング疾患発症機序について. 秋田県小児内分泌診療講演会 2013. 2013 年 5 月 31 日, 秋田.
 12. 緒方勤: 小児科における臨床遺伝学. 第 24 回広島成長障害研究会. 2013 年 6 月 22 日, 広島.
 13. 緒方勤: インプリンティング疾患の基礎と臨床: プラダーウィリ症候群を主として. 第 2 回 KOBE 内分泌・代謝スキルアップセミナー. 2013 年 8 月 24 日, 神戸.
 14. 緒方勤: シルバーラッセル症候群. シルバー・ラッセル症候群ネットワーク医療講演会. 2013 年 12 月 1 日, 東京.

招待講演

1. **Ogata T:** Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency. In: Symposium, Neuroendocrinology, Novel Players in Pituitary Disorders. 2013 Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism; In conjunction with the 32nd Annual Meeting of the Korean Endocrine Society. May 2-5, 2013. Seoul, South Korea.
2. **Ogata T:** Genetic advances in DSD. The Joint Summer School for Pediatric Endocrinology. September 22-25, 2013, Lake Maggiore, Italy.

1. 緒方勤: 脳の性分化に関する最近の知見. 第 22 回日本小児泌尿器科学会教育講演. 2013 年 7 月 10-12 日, 東京.
2. 緒方勤: 性分化疾患の発症機序: 最新の知見. 日本アンドロロジー学会第 32 回学術大会・第 19 回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会特別講演. 2013 年 7 月 26-27 日, 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他

厚生労働科学研究 難治疾患克服研究事業
分担研究報告書

「次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究」

研究分担者 小原 収（公財）かずさ DNA 研究所副所長

研究要旨：従来の遺伝学的なアプローチでは解明が困難であった希少遺伝性難病に対して、次世代シーケンサーを用いた先端ゲノミクスの活用により、従来よりもより迅速かつ正確に確定診断を行えるようにする事と、未知の遺伝的原因を明らかにすることで新しい治療法を開発することを最終的な目標とする。そのために、本分担研究では、均等化マルチプレックス PCR 法の条件の設定などを経て、次世代シーケンサーを用いたアンプリコン遺伝子パネル解析を実現した。更に、今まで原因が不明であった疾患の遺伝的原因を明らかにするために、免疫・アレルギー疾患の研究者と連携し、次世代シーケンサーにより全エクソン配列解析結果と RNA シーケンシングデータを蓄積した。得られた候補変異リストから実際の疾患原因変異に至るためのパイプラインを構築し、その結果をローカルで閲覧可能とするデータ配布用のシステムを実働させた。

研究協力者
兼松 宗太郎 （公財）かずさ DNA 研究所

A. 研究目的

本分担研究は、厚生労働科学研究費補助金での原発性免疫不全症候群に関する調査研究班、血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究班、自己炎症疾患とその類縁疾患に対する新規診療基盤の確立研究班、先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究班と連携して、次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の遺伝子診断法の開発と未解明の遺伝的原因を探索することを目的とする。特に今年度の本分担研究では、上述の目的実現のために、次世代シーケンサーを確定診断目的に実用できる系を実働させることと、一般化しつつある次世代シーケンシングによる網羅的な疾患原因遺伝子変異探索によって新しい変異を同定することを目標とした。

B. 研究方法

- ・ 症状からでは容易に原因遺伝子が絞り込めず、そのために従来の数少ない遺伝子解析によるアプローチでは遺伝的な確定診断がつきにくい血液・免疫系の難病を対象に、既知遺伝子パネルと次世代シーケンサーを駆使することで、低コストかつ迅速に可能性のある既知遺伝子を一括で検査するための遺伝子パネル解析のパイプラインを構築する。均等化マルチプレックス法も活用しながら、卓上型次世代シーケンサー（ロシュ、GS Junior）での解析を実運用し、配列情報解析パイプラインを経て得られる配列解析データの従来法（サ

ンガー法）との精度比較を行った。

- ・ 既知遺伝子の探索のみでは遺伝的な原因が決まらなかった検体について、次世代シーケンサーを用いたより網羅性の高い解析を実施し、新規な遺伝子変異を同定するためのパイプラインを実稼働し、データを蓄積する。
- ・ 従来の全エクソン配列解析を補完するために、血球細胞からのRNAシーケンシングを実施し、データ蓄積を進める。

（倫理面への配慮）

当分担研究のために、かずさDNA研究所の倫理審査委員会において、既知遺伝子の遺伝子検査だけでなく、全エクソンシーケンシングとRNAシーケンシングによる免疫不全症遺伝的原因探索についても審査を受け、承認を得た。こうした網羅的解析は、依頼施設での倫理審査での承認を受けていることが前提条件として、その承認を確認後に各研究班からの検体を受け入れた。

かずさDNA研究所では検体採取を行わないため、匿名化情報のみを取り扱う。しかし、全エクソン配列などの網羅性の高い個人ゲノムの情報を取り扱うことから、得られた全エクソン塩基配列データなどの網羅的なゲノム解析データへのアクセスは限定した関係者にのみ留め、情報シスはセキュリティー管理システムの下に運用した。

C. 研究結果

連携研究班から提出された希望遺伝子パネルに基づき、以下の表に挙げた遺伝子群の次世代シーケンサーでのアンプリコンシーケンシング解析パイプラインを構築した。当初、パネ

ル全体をマルチプレックスシークエンシングするセットアップを試みていたが、新しい遺伝子が見出されるたびにパネル遺伝子リストの更新が行われるのが避けがたいという事実から、敢えて均一化マルチプレックス PCR 法にこだわらずに、全体の解析パイプラインの確立と実運用を優先した。

パネル名	アンプリコン数	遺伝子数
アイカルディ・ゴーティエ症候群 (AGS)	71	7
家族性血球貪食リンパ組織球増多症候群 (FHL)	81	7
メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (MSMD)	95	9
自己炎症疾患	103	8
分類不能型免疫不全症 (CVID)	163	9
重篤複合型免疫不全症 (SCID)	330	25

上表に示すアンプリコン数が 100 前後のパネルはロシュ GS Junior により解析を実施したが、SCID パネルのようにアンプリコン数が 300 を超える場合には、より処理量の大きな卓上シークエンサーであるイルミナ社の MiSeq で対応する方向で検討した。今年度は GS Junior でのパネル遺伝子検査を重点的に行い、開発したデータ解析パイプラインとの組み合わせにより、従来のキャピラリーシークエンシング法と同等もしくはそれ以上の配列決定精度が得られることを確認した。

このように症状から推測される既知遺伝子に変異が見られない症例は、全エクソン解析と RNA シークエンシング解析による解析を行った。現時点では 140 検体程度であるが、年度末までに合計で 180 件近い検体の解析を終える予定である。これらのデータ解析を連携研究者がローカルに実施できるように、アップル社の小型コンピューター MacMini をベースとしたエクソーム解析データの閲覧・フィルタリングのためのツールを開発し、それぞれの共同研究者の手元で大量データを取り扱える体制を整えた。その結果、これまで疾患関連性の報告のない遺伝子に見られた疾患原因候補や疾患関連性が既知の遺伝子に見られた新規変異による非典型症例とみなされる症例を複数見出した。後者については学会発表・論文発表準備を進めたが、前者については、疾患関連性の実証が求められるため、ノックインマウスの作製作業などを理化学研究所統合生命医科学研究センターと連携して進めている。

D. 考察

1) 単独既知遺伝子の従来法での遺伝子検査では、免疫不全症ではおよそ 30% でしか確定診断に至っていなかった。遺伝子パネルによる遺伝子検査の実施により、この確定診断率の向上が期待できる。本プロジェクトでは処理能力の小さなロシュ GS Junior での解析を進めたが、その 2 年後の試薬供給の停止に伴い、今後はイルミナの MiSeq での解析に移行する必要がある。それにより、今後はより大きな遺伝子パネル解析が可能となるので、アンプリコンシークエンシングだけでなく、ハイブリダイゼーションキャプチャーによるターゲットシークエンスでのアプローチも取り込んでいく必要がある。

2) 家族検体の解析と、日本人の稀な 1 塩基多型データの蓄積のおかげで、患者様にのみ見られるパーソナル変異の同定まではほぼ確実に進めるようになった。しかし、すべての原因がエクソン領域にある保証はなく、それらの見出された変異の疾患関連性の実証のためには、依然として他の機能的なアプローチが必須である。RNA シークエンシングは、プロモーター異常、スプライシング異常、発現のアリルバイアスなど、全エクソン配列解析結果を補完する重要なデータであり、そのデータ蓄積が得られたことは意味深いと考える。

3) 全エクソンシークエンシングの劇的なコスト低下に伴い、今後の大きな律速は情報解析プロセスとなると予想される。この問題の解決のためには、大きなハブではなく、分散型の情報処理システムの臨床現場での実働が必要と考えられ、本分担研究で開発したようなローカルでの安価な情報解析ツールは今後もっと重要性を増すものと考えられる。

E. 結論

1) 効率的な遺伝子検査のために、疾患毎の遺伝子解析パネルを設定し、実検体の解析を通じて、このアプローチでの配列解析精度の高さの実証が行えた。

2) 他の厚労省研究班と連携して、次世代シークエンサーによる網羅的な遺伝子構造、発現プロファイル解析を実施し、その結果を共有することにより新しい疾患原因遺伝子変異候補を複数見出した。これらのいくつかについては、ノックインマウスでの検討などのステップでの解析も開始した。このように、希少疾患の臨床グループに対して、網羅的な遺伝子解析の技術基盤提供と具体的なツール提供を実施できた。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM,

- Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, Ohara O, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yagüe J, Nishikomori R, Aróstegui JJ. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis*. 2013 [Epub ahead of print]
2. Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 [Epub ahead of print]
3. Rawat A, Singh S, Suri D, Gupta A, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Vaiphei K, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Chan KW, Lau YL. Chronic Granulomatous Disease: Two Decades of Experience From a Tertiary Care Centre in North West India. *J Clin Immunol*. 2013 [Epub ahead of print]
4. Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T. The identification of a novel splicing mutation in ClqB in a Japanese family with Clq deficiency: a case report. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2013 Oct 28;11(1):41.
5. Wada T, Sakakibara Y, Nishimura R, Toma T, Ueno Y, Horita S, Tanaka T, Nishi M, Kato K, Yasumi T, Ohara O, Yachie A. Down-regulation of CD5 expression on activated CD8(+) T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with perforin gene mutations. *Hum Immunol*. 2013 Dec;74(12):1579-85.
6. Lee YW, Yang EA, Kang HJ, Yang X, Mitsuiki N, Ohara O, Miyawaki T, Kanegane H, Lee JH. Novel mutation of IL2RG gene in a Korean boy with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2013;23(1):65-7.
7. Suzuki J, Kuwahara M, Tofukuji S, Imamura M, Kato F, Nakayama T, Ohara O, Yamashita M. A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the I15 gene locus. *PLoS One*. 2013 Apr 16;8(4):e61785.
8. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A. Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*. 2013 May;33(4):857-64.
9. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 May;131(5):1437-40. e5.
- 2) 学会発表
1. 第七回日本免疫不全症研究会 「食道潰瘍を反復した1型高IgE症候群の1例」 山本崇裕、大西秀典、寺本貴秀、桑原秀次、久保田一生、大塚博樹、川本典生、加藤善一郎、深尾敏幸、谷内江昭宏、小原收 福岡 2014年1月25日
2. 第七回日本免疫不全症研究会 「複合型免疫不全を呈したsLC46A1新規変異による先天性葉酸吸収不全症」 千田奈津子、山田雅文、有賀正、岸本健治、小林良二、小林邦彦、小原收 福岡 2014年1月25日
3. かずさDNA研究所/産総研生命情報工学研究センター共催ワークショップ バイオインフォマティクスとゲノム医療 —その課題と将来展望— 「クリニカルゲノミクスの現状と課題」 小原收 東京 2013年11月
4. The 5th LJI & IMS-RCAI Workshop “Post-GWAS genomic analyses: Mind and bridge the gaps” Ohara O Yokohama, October, 2013