

201331001B

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)

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  
(H23-実用化(難治)-一般-001)

平成23～25年度 総合研究報告書  
研究代表者 松原 洋一

平成26年(2014)3月

# 目次

---

## I. 総括研究報告

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

松原 洋一 ..... 1

## II. 分担研究報告

1. 次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索

松原 洋一 ..... 7

2. 次世代シーケンサーを用いた遺伝性筋疾患におけるゲノム解析

青木 正志 ..... 11

3. 東北大学関連の臨床検体の遺伝子解析に関する研究

有馬 隆博 ..... 15

4. 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—

1. —特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例—

2. —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—

遠藤 文夫 ..... 21

5. 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

大竹 明 ..... 31

6. 小児内分泌疾患関連の症例収集と解析

緒方 勤 ..... 35

7. 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

小原 収 ..... 43

8. 小児難病の遺伝要因解明へ向けての家系収集とエクソーム解析

呉 繁夫 ..... 49

9. 次世代シーケンサーを用いた新規腓炎関連遺伝子異常の探索

下瀬川 徹 ..... 53

10. 遺伝性疾患症例の収集とマイクロアレイ染色体解析

福嶋 義光 ..... 57

11. 先天代謝異常・遺伝性疾患の症例収集に関する研究

山口 清次 ..... 61

---

12. 希少遺伝性難病の精神発達に関する病態解明のための網羅的分子遺伝学的研究 富田 博秋 .....	69
13. 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 布施 昇男 .....	75
14. 次世代シーケンサーを用いたRas活性化のエピゲノム変化に関する研究 中山 啓子 .....	79
15. 先天奇形症候群の原因遺伝子解析とその病態の解明 青木 洋子 .....	83
16. 次世代シーケンサーを用いた遺伝子情報解析パイプラインの確立 長嶋 剛史 .....	87
17. 次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患新規原因遺伝子探索 新堀 哲也 .....	93
18. 血清中微量RNAの次世代シーケンス解析 舟山 亮 .....	97
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	101
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 .....	107

# I . 総括研究報告

## 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

研究代表者 松原洋一 東北大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

次世代シーケンサーの導入によって、欧米の研究室を中心に希少遺伝性難病の原因遺伝子が次々と解明されつつある。日本国内の研究体制を整備し解析拠点を構築することが急務である。本研究の目的は、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成し、国内の一般研究班と連携して病因遺伝子同定を行うことにある。すでに昨年までの研究によって次世代遺伝子解析のパイプラインが整備され、そのシステムを用いて種々の病因遺伝子探索が進行中である。これまでに神経器疾患、先天奇形、呼吸器疾患、消化器疾患、先天代謝異常症、皮膚疾患、眼疾患、血液疾患などを有する患者より得られた検体について 302 エクソームを解析した。そのうちの数疾患において新規病因遺伝子を同定し論文として報告した。また、既知の病因遺伝子が同定されたものも存在した。

### 研究協力者

青木正志(東北大学大学院医学系研究科)  
新堀哲也(東北大学大学院医学系研究科)  
有馬隆博(東北大学大学院医学系研究科)  
呉 繁夫(東北大学大学院医学系研究科)  
富田博秋(東北大学大学院医学系研究科)  
長嶋剛史(東北大学大学院医学系研究科)  
舟山 亮(東北大学大学院医学系研究科)  
布施昇男(東北大学大学院医学系研究科)  
青木洋子(東北大学大学院医学系研究科)  
中山啓子(東北大学大学院医学系研究科)  
下瀬川徹(東北大学大学院医学系研究科)  
井泉瑠美子(東北大学大学院医学系研究科)  
遠藤文夫(熊本大学大学院生命科学研究部)  
大竹 明(埼玉医科大学)  
山口清次(島根大学)  
福嶋義光(信州大学)  
緒方 勤(浜松医科大学)  
小原 収(かずさDNA研究所)

### A. 研究目的

次世代シーケンサーの導入によって、欧米の研究室を中心に希少遺伝性難病の原因遺伝子が次々と解

明されつつある。日本国内の研究体制を整備し解析拠点を構築することが急務である。

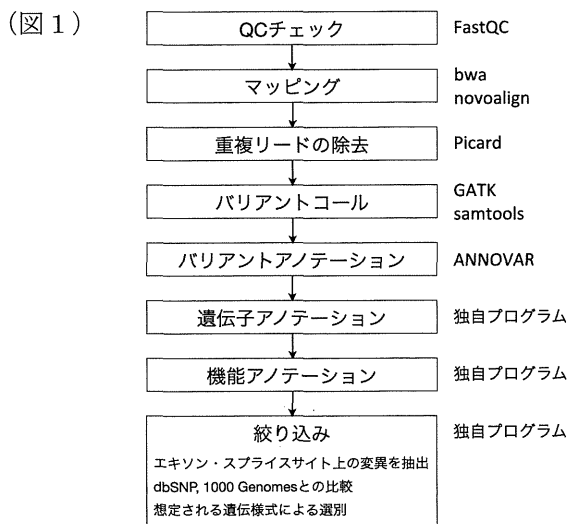
東北大学では、代表研究者の研究室を中心に過去 30 年にわたり一貫して希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発に成果を挙げてきた。また、難治性疾患克服研究事業の支援を得た研究の成果を患者家族に還元してきた。このような背景を元に、東北大学医学部では次世代遺伝子解析コア施設を計画し、専任のバイオインフォマティクス研究者と技術補佐員とともに整備をすすめてきた。

本研究の目的は、これまでに蓄積してきた希少遺伝性疾患の原因遺伝子探索のノウハウをもとに、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成することにある。すでに昨年までの研究によって次世代遺伝子解析のパイプラインが整備され、東北大学関連の検体について解析を実施した。本年度は、分担研究者を増やすとともに全国の研究施設から寄せられた検体について解析を実施した。

### B. 研究方法

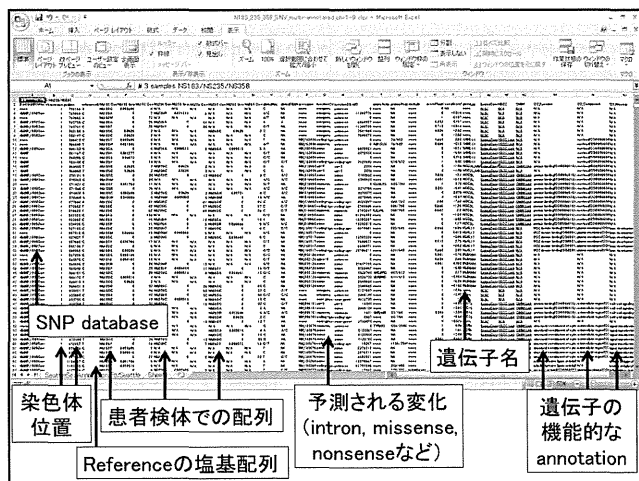
1) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析システム

東北大学に設置された SoLiD4, GAIIX, HiSeq2000, MiSeq の機器を用いて次世代遺伝子解析を実施した。得られたデータの情報解析は図 1 のようなプロトコールに従って実施した。パイプライン開発、性能評価を行った。



最終的な結果は図 2 に示すようなエクセル形式で一覧できるようにし、臨床家にとっても解析がしやすいフォーマットとした。

(図 2)

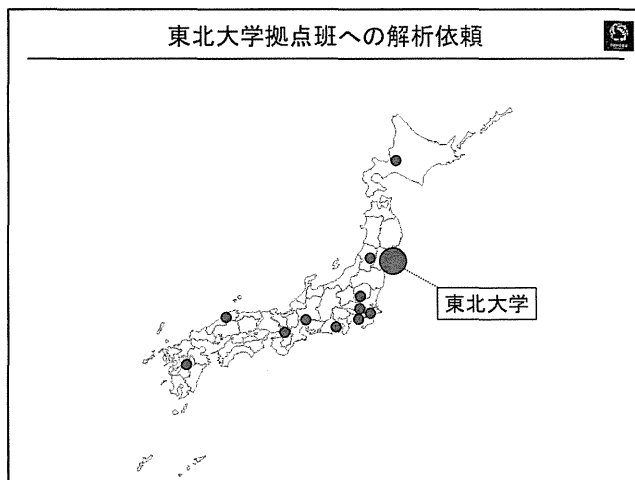


## 2) 全国の難治性疾患克服研究事業研究班からの検体収集と東北大学における遺伝子解析

拠点施設として、全国の研究班からの臨床検体を受託して解析をおこなった。検体依頼があった施設を日本地図上にプロットしたものを図 3 に示す。北海道から九州までの広範囲の地域から臨床検体が寄せられた。これらの症例や家系について、臨床的な評価、これまでの遺伝子解析状況を検討し、必要に応じてマイクロアレイ解析による遺伝子欠失・重複の検索、SNP

を用いた連鎖解析をおこなったうえで、次世代遺伝子解析を実施した。

(図 3)



## 3) デスクトップ型次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断システムの構築

Agilent 社 Haloplex と Illumina 社の次世代シーケンサーMiseq を用いておこなった。

## 4) 各分担研究班独自のプロジェクトの遂行

各分担研究班では、次世代遺伝子解析に適した症例や家系の収集を行うとともに、それぞれ独自の研究を展開した。

### (倫理面への配慮)

本研究は3省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って行った。

## C. 研究結果

### 1) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析 (松原、舟山、長嶋、新堀、中山、青木 (洋))

これまでに 302 サンプル (神経筋疾患 41 例、呼吸器疾患 24 例、消化器疾患 15 例、血液疾患 8 例、先天奇形 55 例、先天代謝異常症 10 例、眼疾患 5 例、皮膚疾患 10 例、腎疾患 8 例、患者の血縁者等健常人 126 例)、38 ランのエキソームデータを解析し、疾患に関連すると考えられる変異を同定した。一部については共同研究者が論文発表を行い、残りのものについては変異リストの検証、疾患との関連についての詳細な解析を進めている。解析結果の中で最も重要となる変異リストについては、共同研究者からのフィードバックに基づき必要な情報の追加、表示形式の変更を随時行った。

平成 25 年度に解析を開始した 12 疾患のうち、有力な新規病因候補遺伝子が同定されたものは 1 疾患、既

知の病因遺伝子が同定されたものが3疾患、塩基読み取りを終了し変異の絞り込み等を行っているのが8疾患となっている。

### 3) 遺伝子診断のためのデスクトップ型次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンシングシステムの構築 (新堀、井泉、青木 (洋)、松原)

対象とした疾患群とそれぞれの遺伝子数は、Ras/MAPK 症候群(24 遺伝子)、成人発症型ミオパチー(44 遺伝子)、遺伝性膵炎(69 遺伝子)、筋萎縮性側索硬化症(35 遺伝子)であった。それぞれのシステム構築と検証を行った。

### 4) 各分担研究班独自のプロジェクトの遂行 (青木、新堀、有馬、呉、富田、長嶋、舟山、布施、下瀬川、遠藤、大竹、山口、福島、緒方、小原)

大竹は、ミトコンドリア呼吸鎖異常症 150 例についてエク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

下瀬川は、既知の遺伝子異常を認めない、遺伝性もしくは家族性膵炎の3家系7症例のエクソーム解析を行い、膵炎との関連が予測された10個の遺伝子(膵消化酵素あるいは膵発現蛋白4個、細胞内Ca関連2個、ユビキチンプロテアソーム2個、小胞体ストレス関連2個)を抽出した。この検討により、国際共同研究として解析中であった、カルボキシペプチダーゼ(CPA1)遺伝子 p.V251M 変異が遺伝性膵炎1家系3人に同定され、国際共同研究グループとともに論文として Nature Genet 誌に報告した。

緒方は、低Ca血症、鼻咽頭閉鎖不全、特徴的顔貌を呈する家系、常染色体優性の腎尿細管水再吸収増加(低Na血症)疾患を呈する家系、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を実施し、低Ca血症、鼻咽頭閉鎖不全、特徴的顔貌を呈する家系にて *TBX1* のフレームシフト変異 (c.1253delA, p.Y418fsX459)を同定した。

呉は、膜性増殖性糸球体腎炎家系、先天性髄鞘化障害家系、点頭てんかん兄弟例、ステロイド依存性ネフ

ローゼ家系に関してエクソーム解析を行い、先天性髄鞘化障害家系とステロイド依存性ネフローゼ家系にて有力な病因候補遺伝子を同定した。

青木は現在まで5世代に渡り約20名の罹患者が出ている常染色体優性遺伝形式をとる MFM の家系のエクソーム解析を行い、TTN の変異 c.90263G>T, p.W30088L が病因変異であることを見出した。

小原は、免疫不全症などの疾患をもつ150検体についてエクソーム配列解析を実施し、疾患原因候補のリストを得た。また、複数の既知遺伝子の遺伝子検査を安価に実現するために、均等化マルチプレックス PCR 法について条件検討をおこなった。

遠藤は、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の臨床症状の検討と鑑別疾患についての検討を行った。エクソーム解析を終了し、現在候補遺伝子を選定中である。

山口は、脊髄小脳変性症、周期性発熱脳症、Leigh 脳症の同胞例とその両親などの症例を収集しエクソーム解析を行った。

布施は、原発開放隅角緑内障3家系についてエクソーム解析を行い、2家系で、SOX ファミリーに属する、神経系の細胞の分化に関連する転写因子とアクチン関連分子の共通変異を見出した。

中山は次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq 解析系を確立した。RAS の活性型変異を発現する細胞にて、HistoneH3K27m の変化を全ゲノム領域で調べたところ、ChIP-qPCR で確認されていた Fas 遺伝子領域を含め、約50個の遺伝子がRASによって転写を抑制され、同時に HistoneH3K27me3 の修飾量を上昇させていることが明らかになった。逆に約30個の遺伝子は、転写が活性化し HistoneH3K27me3 の修飾量が減少した。

長嶋は、次世代シーケンシングによって得られる大量の配列情報から対象とする疾患との関連が想定される変異を抽出するための遺伝子情報解析パイプラインについての詳細な検討・改良をおこなった。

舟山は、原発性胆汁性肝硬変の病態解明と新しい診断方法の開発を目的として、次世代シーケンサーを用いた血清中 microRNA の発現解析を実施し、PBC 罹患者で特異的に発現が低下している4種類の microRNA

を同定するとともにその標的遺伝子を見出した。

新堀は、RAS/MAPK 症候群におけるエクソーム解析と、既知病因遺伝子のスクリーニングを目的としてデスクトップ型次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスを行った。

青木は、エクソーム解析で同定した RIT1 変異の機能解析と、RAS/MAPK 症候群モデルマウスの解析を行った。高アルカリホスファターゼ血症を伴う精神遅滞症家系についても新規原因遺伝子を同定した。

福嶋は、難治性疾患克服研究事業の既存班と協同で、患者支援団体、臨床診断支援グループ、遺伝子医療部門、遺伝学的検査部門、次世代シーケンサー解析部門、等とのネットワークを構築した。

#### D. 考察

昨年度から本年度にかけての研究により、東北大学での次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制が整備・運用された。バイオインフォマティクスを含めた遺伝子解析パイプラインの確立と HiSeq2000 の導入によるスループットの飛躍的な増強により、全国の一般研究班との連携、検体受入を行った。

これまでに 302 検体のエクソーム解析が終了し、新規病因遺伝子が同定されたものが 6 疾患、既知の病因遺伝子が同定されたものが 9 疾患となった。

今後、さらに一般研究班との連携を増やし、より多くの疾患・症例・家系について次世代遺伝子解析を実施する予定である。

#### E. 結論

東北大学における次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の運用を開始し、一般研究班との連携をおこないながらエクソーム解析を実施した。その結果、新規および既知の病因遺伝子を同定することができた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, Chandak GR, Masamune A, et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2013;45:1216-20.
2. 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* 93(1):173-80, 2013.
3. Masamune A, Nakano E, Kume K, Takikawa T, Kakuta Y, Shimosegawa T. PRSS1 c.623G>C (p.G208A) variant is associated with pancreatitis in Japan. *Gut.* 63:366, 2014
4. 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
5. 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
6. 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.)* in press
7. Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsui 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).* in press
8. Sonobe S, Fujimura M, Niizuma K, Nishijima Y, Ito A, Shimizu H, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Kure S, Tominaga T. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-tesla magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213; a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res.* in press
9. Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure



- e. *J Hum Genet.* 58(5):259-66, 2013.
10. Takahashi T, Aoki M, et al., Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 84: 433-40, 2013
  11. Masamune A, Nakano E, Kume K, Kakuta Y, Ariga H, Shimosegawa T. Identification of novel missense CTSC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Gut.*62:653-4, 2013
  12. 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.* 58(5):285-92, 2013
  13. 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.* 17(4):369-73, 2013
  14. 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* 98 (12): E2022–2027, 2013
  15. Fukami M, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Gurger H, Simpson 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* 98 (12): E2013–2021, 2013.
  16. Shi D, Funayama T, Mashima Y, Takano Y, Shimizu A, Yamamoto K, Mengkegale M, Miyazawa A, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Nishida K, Nakazawa T, Richards JE, Fuse N. Association of HK2 and NCK2 with Normal Tension Glaucoma in the Japanese Population. *PLoS ONE.* 8; e54115, 1-11, 2013.
  17. Ninomiya M, Kondo Y, Funayama R, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, Ueno Y, Nakayama K, Shimosegawa T. Distinct MicroRNAs Expression Profile in Primary Biliary Cirrhosis and Evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as Novel Biomarkers. *PLoS One.* 8 (6):e66086, 2013
  18. Hosogane M, Funayama R, Nishida Y, Nagashima T, Nakayama K. Ras-Induced Changes in H3K27me3 Occur after Those in Transcriptional Activity. *PLoS Genet.* Aug;9(8):e1003698, 2013
  19. Patrinos GP, Smith TD, Howard H, Al-Mulla F, Chouchane L, Hadjisavvas A, Hamed SA, Li XT, Marafie M, Ramesar RS, Ramos FJ, de Ravel T, El-Ruby MO, Shrestha TR, Sobrido MJ, Tadmouri G, Witsch-Baumgartner M, Zilfalil BA, Auerbach AD, Carpenter K, Cutting GR, Dung VC, Grody W, Hasler J, Jorde L, Kaput J, Macek M, Matsubara Y, Padilla C, Robinson H, Rojas-Martinez A, Taylor GR, Vihinen M, Weber T, Burn J, Qi M, Cotton RG, Rimo D; (International Confederation of Countries Advisory Council). Human variome project country nodes: Documenting genetic information within a country. *Hum Mutat.* 33(11):1513-9, 2012.
  20. Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Arima T. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. *Human Molecular Genetics* 21: 548-558. 2012.
  21. Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O. Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res.*19(2):143-52, 2013.
  22. Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tomimaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet.* 21:1496-503, 2012.
  23. Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y. Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* Feb;158A(2):412-6, 2012
  24. Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Yamada K, Furui M, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Taketani T, Fukao T, Fukuda S: Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders: Evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. *Mol Genet Met* 107: 87-91, 2012.
  25. Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, Tomita H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features. *J Hum Genet.* 57(3):207-11. 2012
2. 学会発表
- <国外>
1. Aoki Y, Niihori Y, Inoue S and Matsubara Y. Genetic syndromes associated with the Ras/MAK pathway and the identification of mutations in a new gene, RIT1, for Noonan syndrome. Third International Meeting on Genetic Syndromes of the Ras/MAPK Pathway: Towards a Therapeutic Approach (Orlando, USA) 2013年8月2-

- 4日
2. Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, T. Ogata, S. Kure, T. Niihori, Y. Matsubara. Epidemiological features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome: findings from the first nationwide survey. 12th International Congress of Human Genetics (Montreal, Canada) 2011年10月11-15日
  3. Ohara O Post-GWAS animal models 3rd Sardinian Summer School . (Pula, Italy) September, 2013
  4. C. Kamae, N. Nakagawa, H. Sato, K. Honma, N. Mitsuiki, O. Ohara, H. Kanegane, T. Morio, K. Imai and S. Nonoyama. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin  $\kappa$ -deleting recombination excision circles. 15th International Congress of Immunology 2013 Milan Aug, 2013
  5. Fuse N. Molecular Genetic Analysis for Glaucoma using Next-Generation Sequencing Technology. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. Subspecialty Symposium. Hyderabad. India, 2013年1月18日
- <国内>
1. 新堀哲也、青木洋子、番匠俊博、岡本伸彦、水野誠司、黒澤健司、緒方勤、高田史男、長谷川奉延、舟山亮、長嶋剛史、中山啓子、井上晋一、渡邊裕介、小椋利彦、松原洋一 エクソームシーケンシングによるNoonan症候群新規原因遺伝子RIT1の同定 日本人類遺伝学会第58回大会 2013年11月20-23日 仙台
  2. 青木洋子 次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性疾患の原因解明と遺伝子診断の現状 日本人類遺伝学会第58回大会 2013年11月20-23日 仙台
  3. 井泉瑠美子、新堀哲也、青木洋子、鈴木直輝、加藤昌昭、割田仁、高橋俊明、堅山真規、長嶋剛史、舟山亮、阿部康二、中山啓子、青木正志、松原洋一 Mifibrillar myopathy の大家系における次世代シーケンサーを用いた新たな原因遺伝子の同定 日本人類遺伝学会第58回大会 2013年11月20-23日 仙台
  4. 青木洋子、新堀哲也、井上晋一、松原洋一 次世代シーケンサーを用いたヌーナン症候群の遺伝子診断と新規原因遺伝子検索 第116回日本小児科学会学術集会 2013年4月19-21日 広島
  5. 井泉瑠美子、鈴木直輝、加藤昌昭、割田仁、高橋俊明、堅山真規、新堀哲也、青木洋子、松原洋一、舟山亮、西田有一郎、長嶋剛史、中山啓子、青木正志：Myofibrillar myopathyの大家系における次世代型シーケンサーを用いた原因遺伝子の同定. 第54回日本神経学会学術大会、東京、2013年5月29日
  6. 緒方勤、田中紀子、河合昌彦、深見真紀、新堀哲也、青木洋子、松原洋一 エクソーム解析によりTBX1変異が同定された家族性の特徴的顔貌・鼻咽頭閉鎖不全・低Ca血症を呈する5例 日本人類遺伝学会第58回大会 2013年11月20-23日 仙台
  7. 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.
  8. Shirou Matsumoto, Takumi Era, Fumio Endo. 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細胞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
  9. 小原收 次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患解析の現状と課題 第58回日本人類遺伝学会 2013年11月 仙台
  10. 中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez-Roca、Juan I. Arostegui、平家俊男 “Muckle-Wells症候群におけるNLRP3体細胞モザイク変異の検討”第41回日本臨床免疫学会、2013年11月 下関
  11. 中野絵里子、正宗淳、糸潔、下瀬川徹. 次世代シーケンサーを用いた膵炎関連遺伝子異常の同定. 第21回日本消化器関連学会週間2013年10月9-12日 東京
  12. Yamada K, Kobayashi H, Hasegawa Y, Takahashi T, Yamaguchi S: Effect and toxicity of high-dose bezafibrate on mitochondrial fatty acid oxidation in cultured cells. 第55回日本先天代謝異常学会/3rd Asian Congress of Inborn Metabolic Disease. 東京、2013年11月
  13. Yamada K, Kobayashi H, Hasegawa Y, Takahashi T, Yamaguchi S: Effect and toxicity of high-dose bezafibrate on mitochondrial fatty acid oxidation in cultured cells. 第55回日本先天代謝異常学会/3rd Asian Congress of Inborn Metabolic Disease. 東京、2013年11月
  14. 青木正志, ALSの遺伝学Update 第53回日本神経学会総会 2012年5月22-25日 東京
  15. 福嶋 義光. シンポジウム3：稀少難病患者支援と遺伝カウンセリング「難治性疾患克服研究事業と遺伝カウンセリング」. 第36回日本遺伝カウンセリング学会. 2012年6月、松本
  16. 福嶋 義光, 松原 洋一, 野村 文夫, 斎藤 加代子, 高田 史男, 小杉 眞司, 玉置 知子, 櫻井 晃洋, 関島 良樹, 涌井 敬子, 加藤 光広, 小泉 二郎. 疾病中心から患者中心の希少難治性疾患研究を可能とする患者支援団体と専門家集団とのネットワーク構築. 日本人類遺伝学会第57回大会, 2012年10月, 東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他

## II. 分担研究報告

## 次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索

研究代表者 松原 洋一 東北大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

本研究者は、過去 30 年にわたり一貫して希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発に成果を上げてきた。また、難治性疾患克服研究事業の支援を得た研究成果を患者家族に還元してきた。このような背景を基に、新技術としての次世代シーケンサーに注目し、東北大学の全面的な支援を得て遺伝子解析装置を導入し、専任のバイオインフォマティクス研究者と技術補佐員とともに運用体制をすすめてきた。本研究の目的は、これまでに蓄積してきた希少難病の原因遺伝子探索のノウハウをもとに、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成することにある。今年度は昨年度に引き続き臨床検体の収集と次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行った。

### 研究協力者

青木正志(東北大学大学院医学系研究科)  
新堀哲也(東北大学大学院医学系研究科)  
有馬隆弘(東北大学大学院医学系研究科)  
呉 繁夫(東北大学大学院医学系研究科)  
富田博秋(東北大学大学院医学系研究科)  
長嶋剛史(東北大学大学院医学系研究科)  
舟山 亮(東北大学大学院医学系研究科)  
布施昇男(東北大学大学院医学系研究科)  
下瀬川徹(東北大学大学院医学系研究科)  
遠藤文夫(熊本大学生命科学研究部)  
大竹 明(埼玉医科大学医学研究科)  
緒方 勤(浜松医科大学医学系研究科)  
福島義光(信州大学医学系研究科)  
山口清次(島根大学医学部)  
小原 収(かずさDNA 研究所)  
青木洋子(東北大学大学院医学系研究科)  
中山啓子(東北大学大学院医学系研究科)

### A. 研究目的

本研究者は、過去 30 年以上にわたり一貫して希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発に成果を上げてきた。また、難治性疾患克服研究事業の支援を得た研究成果を患者家族に還元してき

た。このような背景を基に、新技術としての次世代シーケンサーに注目し、東北大学の全面的な支援を得て遺伝子解析装置を導入し、専任のバイオインフォマティクス研究者と技術補佐員とともに運用体制をすすめてきた。

本研究の目的は、これまでに蓄積してきた希少難病の原因遺伝子探索のノウハウをもとに、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成し運用することにある。昨年度まで、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の構築、拠点施設としての臨床検体解析プロトコールと倫理的側面に関する指針の検討、東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析を行った。今年度は引き続き臨床検体の収集と次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1) 臨床検体の収集

東北大学関連の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析にふさわしい症例や家系を収集した。

#### 2) 次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析

昨年度整備された次世代遺伝子解析拠点としての体制を活用し次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行った。

### 3) 倫理的側面に関する指針の検討

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を踏まえたうえで、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の倫理的指針を検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析研究は3省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って行った。

## C. 研究結果

### 1) 臨床検体の収集

今年度は解析の対象として新たに14疾患の臨床検体を収集した。その内訳は本研究班員からが11疾患、それ以外からが3疾患であった。また疾患種類別では神経疾患3、腎疾患2、代謝異常疾患5、腫瘍性疾患1、先天異常3であった。それぞれの疾患ごとの検体数は1~66であった。エクソーム解析ではゲノムのコピー数変化の評価は困難であることから、一部のサンプルにおいてはSNPアレイを用いてコピー数変化や Loss of heterozygosity 領域の有無を確認した。

### 2) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

分担研究者との共同研究である低カルシウム血症の家系では病因と考えられる遺伝子変異を同定した (Ogata et al. in press)。また、分担研究者との共同研究で、ステロイド依存性ネフローゼ家系において有力な病因候補遺伝子の一つを同定し、症例を追加し検索をしている。また、ある神経疾患において、既知原因遺伝子に *de novo* 変異を同定した。分担研究者以外との共同研究においても先天異常疾患の解析で病因遺伝子変異の同定に成功している。

### 3) 倫理的側面に関する指針の検討

平成25年2月にヒトゲノム・遺伝子解析研究の三省指針の改正案が公表された。また、今年度は米国では The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) より、エクソーム・ゲノム解析での incidental findings に関する recommendation が発表され、医学的対応可能な疾患については報告すべきとの方向性が示された。海外における現状を鑑みながらも国内の現状に則した倫理的な指針の検討を継続することとした。

## D. 考察

昨年度整備された次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制を運用し、病因遺伝子の同定に成功した。複数のプロジェクトが並行して行われており、今後もこれに引き続き新規病因遺伝子が同定されていくことが期待される。

## E. 結論

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制を運用し、病因遺伝子の同定に成功した。今後も新規病因遺伝子の同定が期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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* 93(1):173-80, 2013.
2. Sekiguchi K, Maeda T, Suenobu S, Kunisaki N, Shimizu M, Kiyota K, Handa Y, Akiyoshi K, Korematsu S, Aoki Y, Matsubara Y, Izumi T. A transient myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome and a germline BRAF mutation. *Am J Med Genet A*. 161(10): 2600-3, 2013
3. Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashima S, Kato K, Fukami F, Aoki Y, Matsubara Y. TBX1 Mutation Identified by Exome Sequencing in a Japanese Family with 22q11.2 Deletion Syndrome-like Craniofacial Features and Hypocalcemia. *PLoS One* in press

### 2. 学会発表

1. Aoki Y, Niihori Y, Inoue S and Matsubara Y. Genetic syndromes associated with the Ras/MAPK pathway and the identification of mutations in a

new gene, RIT1, for Noonan syndrome. Third International Meeting on Genetic Syndromes of the Ras/MAPK Pathway: Towards a Therapeutic Approach (Orland, USA) 2013年8月2-4日

H. 知的財産権の出願・登録状況

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））総合研究分担報告書

次世代シーケンサーを用いた遺伝性筋疾患におけるゲノム解析

分担研究者 青木 正志  
東北大学大学院医学系研究科 神経内科 教授

**研究要旨**

主に成人期に発症する遺伝性筋疾患の中には、種々の筋変性疾患、代謝性疾患、ミトコンドリア関連疾患などが含まれるが、筋疾患関連遺伝子は、複数の巨大遺伝子を含め少なくとも 40 以上存在するため、変異の有無を網羅的に解析することは従来困難であった。このような問題に対して、次世代シーケンサーを利用し、既知の筋疾患関連遺伝子を網羅的に解析することで診断率の向上を得ることが可能である。Dysferlinopathy が疑われるものの診断が未確定の症例で 20 例においてターゲットリシーケンス解析を行った。従来の解析方法で検出できていなかった *DYSF* 遺伝子の変異の検出や、遠位型ミオパチーと類似の臨床・病理像をとる他の筋関連遺伝子での変異が検出されてきている。さらには Myofibrillar myopathy (MFM) の家系においてエクソーム解析と連鎖解析を併用することで、*TTN* 遺伝子に新規の原因変異 (c.90263G>T, p.W30088L) を同定することに成功した。

**研究協力者**

井泉瑠美子

（東北大学神経内科、遺伝病学分野）

加藤昌昭（東北大学神経内科）

割田 仁（東北大学神経内科）

鈴木直輝（東北大学神経内科）

豎山真規（東北大学神経内科）

高橋俊明（国立仙台西多賀病院神経内科）

舟山亮（東北大学細胞増殖制御分野）

長嶋剛史（東北大学細胞増殖制御分野）

中山啓子（東北大学細胞増殖制御分野）

新堀哲也（東北大学遺伝病学分野）

青木洋子（東北大学遺伝病学分野）

松原洋一（東北大学遺伝病学分野）

**A. 研究目的**

主に成人期に発症する遺伝性筋疾患の中には、種々の筋変性疾患、代謝性疾患、ミトコンドリア関連疾患、一部の炎症性疾患が含ま

れるが、筋疾患関連遺伝子は、複数の巨大遺伝子を含め少なくとも 40 以上存在するため、変異の有無を網羅的に解析することは従来困難であった。このような問題に対して、次世代シーケンサーは網羅的な遺伝子配列決定を可能とすることから、既知の筋疾患関連遺伝子を網羅的に解析することで診断率の向上を得ることが第一の目的である。また、既知の筋疾患関連遺伝子に変異を認めない場合や、非典型的で原因不明の遺伝性筋疾患に対し、全エクソン解析（エクソーム解析）を行うことで新たな疾患原因遺伝子を特定することが第二の目的である。遺伝性筋疾患の多くは、原因不明で有効な治療法がないため新たな遺伝子変異を明らかにすることは病態解明につながり、将来的な治療法開発への端緒ともなりうる。

**B. 研究方法**

1. 既知の筋疾患関連遺伝子の解析

次世代シーケンサーを用いてターゲットリシーケンス解析を行う(図1)。解析対象としては、既知の筋疾患関連遺伝子である以下の42遺伝子の検索を行う(H25年2月時点)。新規遺伝子の報告があった場合には随時追加を行う。

## 2. エクソーム解析

既知の筋疾患関連遺伝子に変異を認めない場合に行う。罹患者についてエクソンキャプチャー法を用いて抽出した全エクソン領域を、次世代シーケンサーにて配列解析する。家系内の非罹患者を解析する場合、罹患者と比較することで疾患に関連した変異のみを抽出する。必要に応じて以下のアレイCGHや連鎖解析を行い、照合することで候補遺伝子を絞り込む。

次世代シーケンサーは HiSeq 2000 (Illumina)を用いて 101塩基のペアエンド解析を行った。得られたデータは、BWAでマッピングを行い、GATK v1.5で変異の一塩基置換や欠失挿入の抽出を行った。変異のアノテーションには、ANNOVARを使用した。

(倫理面への配慮)

患者からの臨床情報の取得およびDNAの採

取に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、最初に東北大学医学部のヒトゲノム委員会および倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得ている。

## C. 研究結果

### (1) 既知の筋疾患関連遺伝子の解析 (Dysferlinopathy を中心として)

当科では、1995年より臨床的にDysferlinopathy(三好型遠位型筋ジストロフィーもしくは肢帯型筋ジストロフィー2B型)の疑われる患者に対するDYSF遺伝子の変異スクリーニングをSSCP法により行ってきたが(Takahashi T, et al. 2003, 2013)、発端者169例の約40%で診断が未確定である。これらの症例を対象に、ターゲットリシーケンス解析による既知の筋疾患関連遺伝子の解析を行った。

現在までに、20例のターゲットリシーケンス解析を行った。12サンプル毎のターゲットリシーケンス解析を行った結果、解析対象とした全標的領域の約90%以上が、目標としている最低Depth 30以上でカバーされた。SSCP法で片アレルにのみDYSFの病的変異を検出していた9例中、6例に病因となりうるホモ接合もしくは複合ヘテロ接合のDYSF遺伝

## 筋疾患関連遺伝子を対象としたターゲットリシーケンス

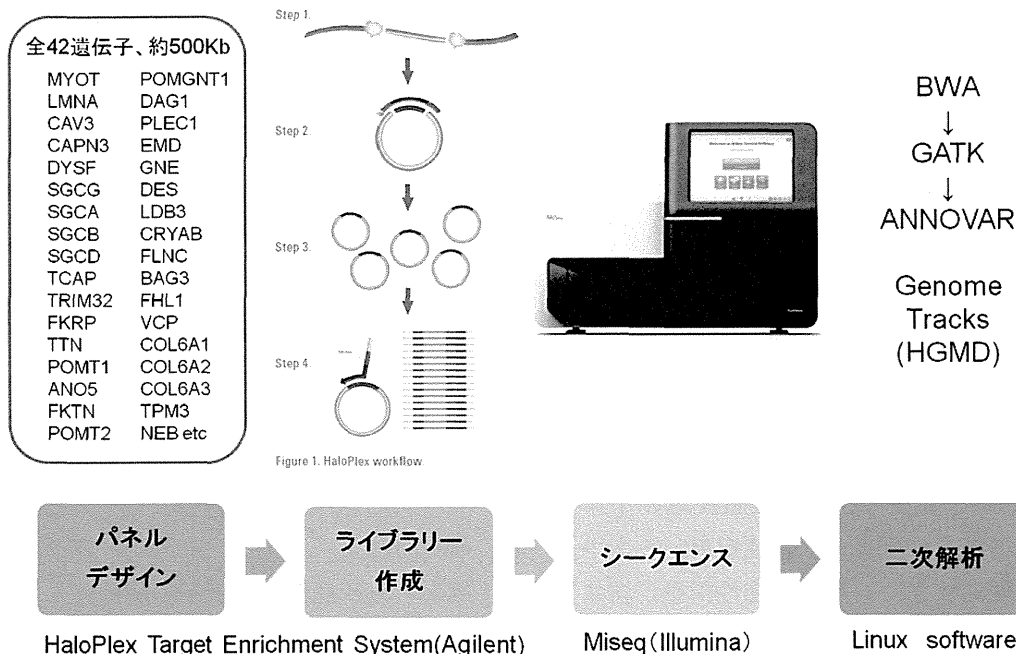


図1 筋疾患関連遺伝子を対象としたターゲットリシーケンス



子変異を検出した。全く *DYSF* に変異を検出していなかった 11 例では、*DYSF* には病的変異を認めなかったものの、3 例でその他の筋疾患遺伝子に原因の可能性のある変異を検出した。

## (2) Myofibrillar myopathy の大家系におけるエクソーム解析

当科で診療を続ける常染色体優性遺伝形式をとる MFM の家系が存在し、現在まで 5 世代に渡り約 20 名の罹患者が出ている (Abe K et al 1993)。本家系の原因遺伝子は未だ不明であることから、新たな原因遺伝子およびその機能を解明することを目標にエクソーム解析を行った。罹患者 4 名、非罹患者 3 名の計 7 名を解析し、罹患者のみに共通するエクソン・スプライシング領域の変異を 64 個検出したが、その内新規の機能的変化を起し得る遺伝子変異は 2 個にまで絞り込まれた。その内 *TTN* の変異 c.90263G>T, p.W30088L (図 2) のみが連鎖解析での連鎖領域内に存在した。この変異を、解析可能な 10 名全てについてサンガーシーケンスした結果、segregation に矛

盾なく、本変異が原因変異であると結論づけた。

## D. 考察

既知の筋疾患関連遺伝子の解析では、既に解析した症例で、従来の解析方法で検出できていなかった *DYSF* 遺伝子の変異の検出や、遠位型ミオパチーと類似の臨床・病理像をとる、他の筋関連遺伝子での変異が検出されてきている。今後、サンガー法に相当する結果を得るためにサンプル当たりどの程度のデータを得る必要があるかについては検討が必要である。また、変異の病的意義を考える上では、継続的な解析症例の蓄積やデータベース化も重要である。

また、エクソーム解析で同定した *TTN* 遺伝子は 363 exons で構成される 294 kb の巨大な遺伝子であり、このような巨大な遺伝子については、次世代シーケンサーを変異の検出に果たす役割は大きい。現在まで前脛骨筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2J) の原因遺伝子として知られてき

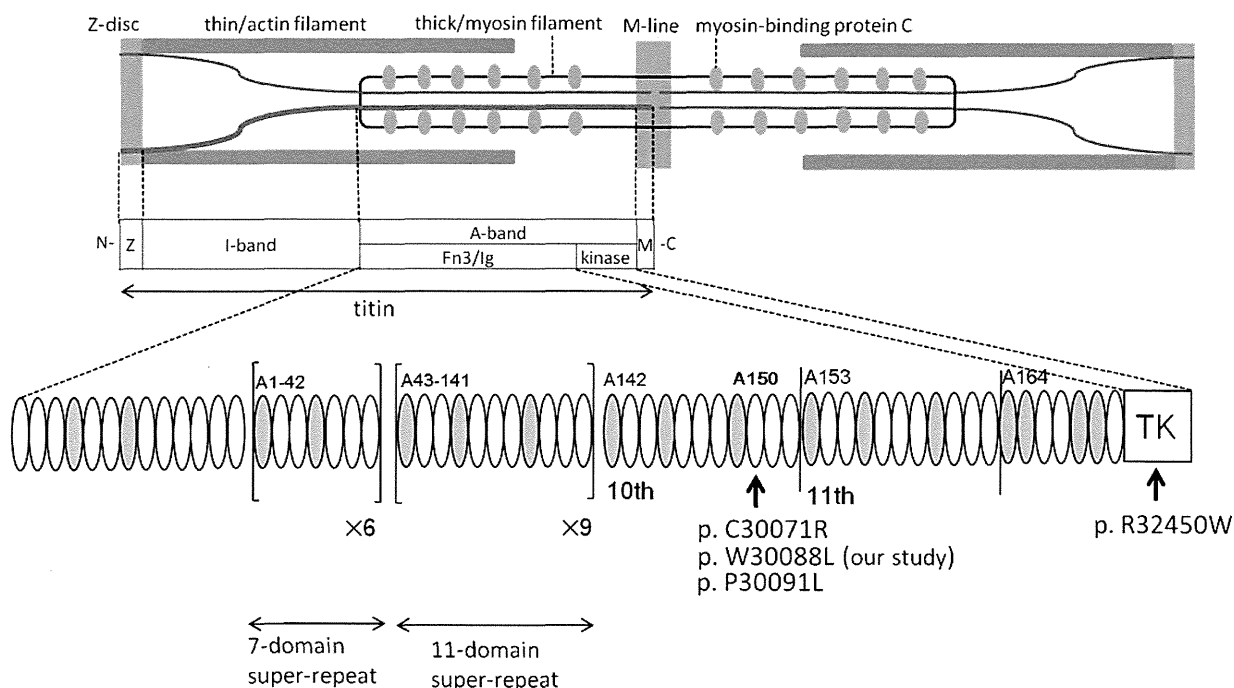


図 2 titin のドメイン構造と病因変異の分布

たが、次世代シーケンサーの普及に伴い、MFМ の病理像を呈する Hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF #603689) の原因遺伝子として近日国外から数例の報告が続いている。

本エクソーム解析の結果は、TTN を MFМ の新たな原因遺伝子として認識する上で、また HMERF の疾患概念を確立する上で重要な報告と考えられる。

#### E. 結論

今後、更なる遺伝性筋疾患の診断率の向上をめざし、ターゲットリシーケンス解析を実用的で有用な診断システムとなるよう検討を行う。病因変異が同定されなかった症例では新規原因遺伝子同定を目指しエクソーム解析を行う。これらの解析症例の蓄積やデータベース化についても重要であり課題とする。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y.: Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet.* 2013; 58(5):259-66

Takahashi T, Aoki M, et al., Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013; 84: 433-40

Hara M, Minami M, Kamei S, Suzuki N, Kato M, Aoki M, Lower motor neuron disease caused by a novel FUS/TLS gene frameshift mutation, *J Neurol.* 2012; 259: 2237-9

Suzuki N, Kato S, Kato M, Warita H, Mizuno H, Kato M, Shimakura N, Akiyama H, Kobayashi Z, Konno H, Aoki M. FUS/TLS-immunoreactive neuronal and glial cell inclusions increase with disease duration in familial amyotrophic lateral sclerosis with an R521C FUS/TLS mutation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012; 71(9): 779-88

##### 2. 学会発表

Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y: A mutation in A-band titin is associated with hereditary myopathy with early respiratory failure in a Japanese family. the 63rd Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Boston, MA, Oct 24, 2013

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1.特許取得

なし

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他

なし

## 東北大学関連の臨床検体の遺伝子解析に関する研究

研究分担者 東北大学大学院医学系研究科 教授 有馬 隆博

## 研究要旨

生殖補助医療（ART）の普及により、これまで非常に稀であった先天性ゲノムインプリンティング異常疾患の発生頻度の増加が世界中で注目されている。ARTが、ゲノムインプリンティングが確立する時期の配偶子を操作する事（排卵誘発、胚操作、受精卵培養、凍結胚操作など）が原因であると推察されている。わが国では Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）と Silver-Russell 症候群（SRS）が ART（IVF or ICSI）との関連性が高く、また DNA メチル化の異常を原因とする（エピゲノム変異）の症例が多い傾向にある事を明らかにした。これら疾患のエピゲノム変異に着目し、まず網羅的にヒトインプリント領域のメチル化インプリントの分子機構について解析し、ART 群と非 ART 群で比較した。その結果、ART 出生による患児では、(A) 複数のインプリント領域の異常 (B) 精子型と卵子型 DMR の両方に異常 (C) 高メチル化と低メチル化を同時に示す (D) メチル化異常の程度は、モザイク型であるという特徴を示した。さらに、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムに特有な傾向がみられた。症例数が少ないため、正確な評価はできないが、これらの結果より、ART により発症したインプリント異常症（SRS と BWS）の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因が多いと推測された。つまり、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）で、異常が起こり、疾患発症を導くリスクが考えられた。

## 研究協力者

樋浦 仁（東北大学大学院医学系研究科）  
岡江 寛明（東北大学大学院医学系研究科）  
宮内 尚子（東北大学大学院医学系研究科）  
佐藤 芙美（東北大学大学院医学系研究科）

## A. 研究目的

生殖補助医療（ART）の普及により、本来稀であるゲノムインプリンティング異常疾患の発生頻度の増加が世界中で注目されている。ART が、ゲノムインプリンティングが確立する時期の配偶子を操作する事が原因であると推察されている。生殖補助医療（ART）の普及により、本来非常に稀であるゲノムインプリンティング（GI）異常疾患の発生頻度の増加が世界中で報告されている。ART が、GI が確立する時期の配偶子、受精卵を

人為的に操作する事が原因であると推察されているためである。先天性 GI 異常症は精神遅滞や発達障害を示し、根本的な治療法はないため対症療法により長期介護が必要となるケースが多い。疾患の発症機序、つまり影響を受ける遺伝子効果により、その病態や重症度は異なる。未だ原因不明例も多くみられる。これまでの先天性ゲノムインプリンティング病における DNA メチル化の解析により、ART との関連が示されたインプリント異常症は、SRS と BWS で、いずれも DNA メチル化の異常を原因とする（エピゲノム変異）の症例が多く、ART 出生児においてもエピゲノム変異の症例が多い傾向にあった。このメチル化異常が ART 出生児の場合、どのような分子機構を原因として起こっているのか、つまり発症時期を特定し、そのリスク要因を同定する事を目的としている。

## B. 研究方法

### (1) ヒトインプリント領域の網羅的解析：

全てのインプリント領域情報をもとに、ヒトインプリント領域の検索を行い、22領域を同定し、PCRプライマーを設計した。この際、DNA多型を含むようにし、条件検討を行った。(1)でメチル化異常(エピゲノム変異)を示した症例のうち、ARTと非ARTの症例について、その発症機序をメチル化異常のパターンを比較する事を目的に、網羅的にメチル化インプリント状態について解析した。

(2) 系統的、網羅的全ゲノムのメチル化解析: Reduced Representation Bisulphite Sequencing (RRBS) : ARTおよび非ARTの先天性ゲノムインプリント病 Silver-Russell 症候群 (SRS) 患者および健常児の末梢血から DNA を抽出した。10ng の DNA を制限酵素 MspI で消化し、末端を修復した後、5メチルシトシンを含むメチル化アダプターとライゲーションした。次に、電気泳動で 150-350bp の DNA 断片を回収、精製した後、Bisulphite 処理を行った。Bisulphite 処理 DNA を鋳型として、インデックス付きプライマーを用いて、PCRにより増幅し、RRBS ライブラリーを作製した。作製したライブラリーのサイズ分布の確認および濃度を定量した後、次世代シーケンサー HiSeq2000 (Illumina) にて配列を決定した。次世代シーケンサーにより得られた塩基配列データは、Bismark で hg19 ヒトゲノムにマッピングし、解析した。Bisulphite 置換効率は nonCpG の置換効率によって算出した。CpG のメチル化は 100bp のタイル毎のメチル化率に変換し、その後の解析を行った。

### (3) エキソーム解析：

ART および非 ART の先天性ゲノムインプリント病 Silver-Russell 症候群 (SRS) および Beckwith-Wiedann 症候群 (BWS) 患者の末梢血 DNA および健常児の臍帯血 DNA を SureSelect Human All Exon V5+UTRs キット (Agilent) を用いてヒト全エクソンを濃縮したライブラリーを作製後、次世代シーケンサー HiSeq2000 (Illumina) にて配列を決定した。次世代シーケンサーにより得られた塩基配列データは BWA を用いて hg19 ヒトゲノムにマッピングした。マッピング結果は Picard を用いて重複リードを除去した後、GATK を用いてリアライメントおよびキャリブレーションを行い、

ANNOVAR を用いてアノテーションおよび公開データとの比較を行った。

### (倫理面への配慮)

**患者検体を用いる研究：**ヘルシンキ宣言 (エジンバラ改訂)、臨床研究に関する倫理指針 (厚生労働省) に従い、本研究を実施。東北大学医学部倫理委員会より、研究プロトコルの承諾を得た。研究対象者の登録にあたっては、機密保護に十分に配慮した。すなわち研究対象者の同定や照会は研究登録番号、症例インシダル、生年月日を用いて行うこととし、直接患者を識別できる情報は事務局のデータベースには登録していない。また、本研究に係わる臨床記録、検査データ、同意に関する記録など医療機関において作成されたものについては保管責任者が鍵のかかるキャビネットに保管。その保管期間は本研究終了時までとし、その後廃棄予定。

**組換え DNA 実験：**全ての実験について、遺伝子組み換え実験および動物実験の承認を得ている。参加者は遺伝子組換え実験の教育訓練を受け「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、実験拡散防止措置確認を行っている。

## C. 研究結果

ART を受けた疾患患者 (SRS:5 名、BWS:1 名)、自然発症の患者 (SRS:10 名、BWS:6 名) について解析した。

### (1) 疾患患者のインプリント遺伝子の DNA メチル化の解析と ART との関連：

DNA 多型を含む Bisulphite PCR Sequence 法を用いて、ヒトメチル化インプリント領域の DNA メチル化の解析を正確に行い、メチル化異常のパターンについて分析し、発症機序を推測した。また、インプリントを受けない領域に関して、2領域についても同様の解析を行った。SRS の場合、ART 治療を受けた患者では、6 例中 5 例において、複数のインプリント領域で異常を認めた。これらの症例は全例、精子型と卵子型 DMR の両方に異常を認めた。また、同一症例で、高メチル化と低メチル化を示し、またその程度は、完全型ではなく、モザイク型を示す事が特徴にみられた。BWS は 1 例しか ART 後の症例は解析出来なかったが、SRS の場合と同様の傾向が見られた (表 1)。