

われわれは、図 4 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。

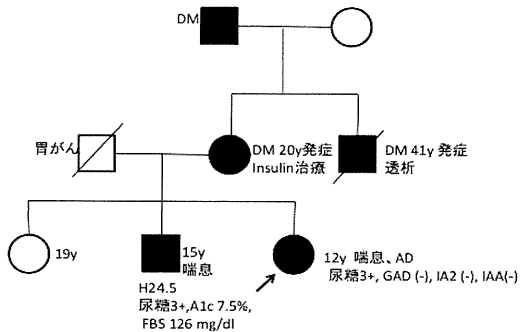


図 4. 原因不明の MODY 家系。黒塗りは罹患患者を、白塗りは健常者を示す。

t(5;8)(q35.1;p21.1)と連鎖する常染色体優性の

Klippel-Feil 症候群家系：

家系図は、図 5 に示す通りである。われわれは、この家系において、まず相互転座の切断点を決定した。また、アレイ CGH により、転座周辺に明確なコピー数変動が存在しないことを確認した。そして、決定された切断点により破壊された遺伝子は存在しないことを見いだした。この結果は、切断点が遺伝子発現調節領域の機能を障害していることを推測させるが、Klippel-Feil 症候群が、相互転座染色体とは無関係である可能性を示唆する。現在、この可能性を考えて、エクソーム解析に着手する予定である。

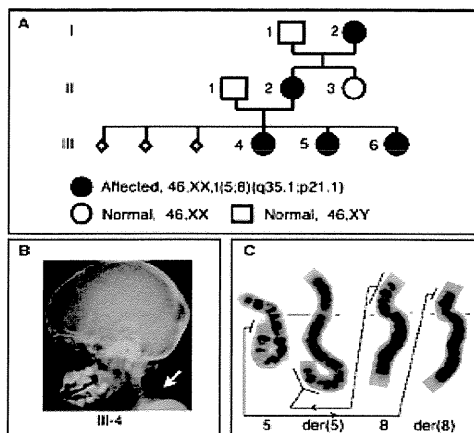


図 5. 黒塗りは相互転座と Klippel-Feil 症候群を有する患者を、白塗りは正常核型と正常表現型を呈する健常者を示す

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 例において疾患に関与する可能性が高い塩基置換が複数の遺伝子(*AR*, *SFI1*, *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行い、常染色体優性の低 Ca 血症、鼻咽頭閉鎖不全、特徴的顔貌を呈する家系において原因遺伝子 *TBX1* を同定した。また、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が 44 個の遺伝子を同定し、さらに、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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

原著論文

- Inoue H, Mukai T, Sakamoto Y, Kimura C, Kangawa N, Itakura M, Ogata T, Ito Y, Fujieda K: Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 76 (1): 78–87, 2012.
- Sugihara S*, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahara Y, Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Y, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, Amemiya S, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT): Genetic characteristics on HLA-class II and class I among Japanese type 1A and type 1B diabetic children and their families. *Pediatr Diabetes* 13 (1): 33–44, 2012.
- Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T*: Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 20 (9): 928–932, 2012.
- Oto Y*, Obata K, Matsubara K, Kozu Y, Tsuchiya T, Sakazume S, Yoshino A, Murakami N, Ogata T, Nagai T: Growth hormone secretion and its effect on height in pediatric patients with different genotypes of Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 158A (6): 1477–1480, 2012.
- Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsubara K, Matsuoka K, Hasegawa T, Dobashi K, Ogata T*: Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome: correlation between phenotype and mosaic ratio in the body and the placenta. *Am J Med Genet A* 158A (2): 465–468, 2012.
- Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, Samuels ME, Ogata T, Deal CL*: 46, XY gonadal dysgenesis: new *SRY* point mutation in two siblings with paternal germ line mosaicism. *Clin Genet* 82 (6): 505–513, 2012.
- Abe Y, Aoki Y*, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y: Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: Findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A* 158A (5): 1083–1094, 2012.
- Koyama Y*, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Hasegawa T, Murata M: Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using urinary pregnanetriolone /tetrahydrocortisone ratio and 11 β -hydroxyandrosterone by gas chromatography - mass spectrometry. *Clin Chem* 58 (4): 741–747, 2012.
- Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S: Deterioration of myocardial tissue Doppler indices in a case of fetal hydrothorax as a promising indication for clinical intervention before the development of nonimmune hydrops fetalis. *Arch Gynecol Obstet* 286 (4): 1079–1080, 2012.
- Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill G, Pinto C, Manouvrier S, Polak M, Ogata T, C Sultan C*: Screening of *MAMLD1* mutations in 70 Children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of two new mutations. *PLoS One* 7 (3): e32505, 2012.
- Qin X-Y, Miyado M, Kojima Y, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, Yonemoto J, Fukami M, Ogata T, Sone H*: Identification of novel low-dose bisphenol A targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS ONE* 7 (5): e36711, 2012.
- Sekii K*, Ishikawa T, Ogata T, Itoh H, Iwashima S: Fetal myocardial tissue Doppler indices before birth physiologically change in proportion to body size adjusted for gestational age in low-risk term pregnancies. *Early Hum Dev* 88 (7): 517–523, 2012.
- Fukami M*, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T: Complex genomic rearrangements in the *SOX9* 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula. *Am J Med Genet A* 158A (7): 1529–1534, 2012.
- Ogata T*, Fukami M, Yoshida R, Nagata E, Fujisawa Y, Yoshida A, Yoshimura Y: Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure. *J Hum Genet* 57 (7): 449–452, 2012.
- Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H*: Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of

- cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet* 57 (7): 434–441, 2012.
16. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T*: Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 27 (8): 2541–2548, 2012.
 17. Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T*, Fukami M: *PRKARIA* mutation affecting cAMP-mediated G-protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (9): E1808–1813, 2012.
 18. Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T*: Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics* 7 (10): 1142–1150, 2012.
 19. Qin XY, Sone H*, Kojima Y, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Zaha H, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Fukami M, Ogata T: Individual variation of the genetic response to low-dose bisphenol A in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One* 7 (12): e52756, 2012.
 20. Moritani M, Yokota I, Tsubouchi K, Takaya R, Takemoto K, Minamitani K, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Itakura M, Ogata T, Sugihara S, Amemiya S: Identification of *INS* and *KCNJ11* gene mutations in type 1B diabetes in Japanese children with onset of diabetes before 5 yr of age. *Pediatr Diabetes* 14 (2): 112–120, 2012.
 21. Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, Ogata T*: *Maml1* deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology* 153 (12): 6033–6040, 2012.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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, Satsuishi 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, Saitu 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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.

35. 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]
36. 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].
37. 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]
38. 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).
39. 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).
40. 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].
41. 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].
42. Tsuchiya T, Shibata M, Numabe H, Jimno 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).
43. 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).
44. 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).
45. 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).
46. 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].
47. 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)
48. Kawamoto T, Design of the Japan Environment and Children's Study (JECS), a nation-wide birth cohort study in Japan. *EPH* (in press)
49. 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).
50. Fukami M*, Shozu M, Ogata T: Molecular bases and phenotypic determinants of aromatase excess syndrome. *Int J Endocrinol* 2012: 584807, 2012.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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. 緒方勤: 性分化疾患. 臨床と研究(特集:小児診療のピットフォール II). 89 (5): 53–58, 2012.
2. 緒方勤: 性分化疾患. 小児科(小児疾患の診断治療基準). 44 (増刊号): 218–219, 2012.
3. 緒方勤: ARTにおけるインプリンティング異常. *Medical Science Digest* 38 (6): 249–252, 2012.
4. 緒方勤: 子どもの健康と環境ホルモン: 男児外陰部異常をモデルとして. *小児科臨床* 65 (増刊号: 小児の中毒): 1565–1572, 2012.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
 8. 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.
 9. 緒方勤: 性分化疾患. 愛媛県小児科医会会報第 63 号: 4-15.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 緒方勤: 心血管病変発症の性差と Y 染色体. *MMJ* 8 (4): 190-191, 2012.
 14. 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.
 15. 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, 寛義行, 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.
 16. 緒方勤: 性発育の異常(性分化疾患)
 17. 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.
- 招待講演
1. Ogata T: Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency: A Unique Disease Leading to Disorders of Sex Development in Both 46,XY and 46,XX Patients. Invited Lecture. In: The 6th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. April 23-27, 2012. Kona Hawaii, USA.
 2. Ogata T: Genetics of DSD (Disorders of sex development). In: Disorders of sex development. The 15th International and 14th European Congress of Endocrinology (ICE/ECE). May 5-9, 2012, Florence, Italy.
 3. Ogata T, Shozu M, Fukami M: Aromatase Excess Syndrome as a Model for Genomic Disorder: Identification of Molecular Bases and Phenotypic Determinants. In: Kaichi Kida Session. The 7th Asia Pacific Paediatric Endocrine Society Meeting. November 14-17, 2012. Bali, Indonesia.
 4. 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.
 5. Ogata T: Genetic advances in DSD. The Joint Summer School for Pediatric Endocrinology. September 22-25, 2013, Lake Maggiore, Italy.
1. 緒方勤: エピジェネティクスと小児成長発達. 第 115 回日本小児科学会学術集会教育講演. 2012 年 4 月 20-22 日, 福岡.
 2. 緒方勤: 性分化疾患の基礎と臨床. 第 58 回愛媛県小児科医会特別講演. 2012 年 9 月 2 日, 松山.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 緒方勤: 胎児期における環境化学物質と先天奇形の発症. 第 115 回日本小児科学会学術集会: 子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)と小児内分泌代謝疾患. 2012 年 4 月 20-22 日, 福岡.
 6. 緒方勤: バックドア経路: テストステロンを經由しないジヒドロテストステロン産生経路: 第 35 回日本分子生物学会学術集会ワークショップ哺乳類の性分化・性成熟の新知見 性腺機能を制御する遺伝子ネットワークとその破綻による疾患. 2012 年 12 月 11-14 日, 福岡.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 緒方勤: 生殖補助医療における遺伝的安全性の検討. 浜松市医師会生涯教育研修会. 2012 年 1 月 26 日, 浜松.
 13. 緒方勤: ゲノムインプリンティングと個体・胎盤成長発達. 第 42 回九州小児内分泌懇話会. 2012 年 2 月 4 日, 福岡.
 14. 緒方勤: 小児内分泌関連疾患におけるインプリンティングにかかわる最近の話題. JCR 研修会. 2012 年 2 月 17 日, 芦屋.
 15. 緒方勤: 日本人 1 型糖尿病の遺伝素因について. 第 11 回静岡県小児糖尿病・脂質代謝研究会. 2012 年 2 月 18 日, 浜松.

16. 緒方勤：性の分化・発達と小児医療. 第 188 回浜松市小児科医会研究会. 2012 年 3 月 7 日, 浜松.
17. 緒方勤：性分化疾患とゲノム異常. 第 15 回宮崎代謝内分泌研究会. 2012 年 4 月 11 日, 宮崎.
18. 緒方勤：インプリンティング疾患研究アップデート. 第 45 回新潟小児内分泌懇話会. 2012 年 6 月 8 日, 新潟.
19. 緒方勤：小児の成長と成長障害. 浜松市健康増進課研修会. 2012 年 7 月 25 日, 浜松.
20. 緒方勤：ゲノム異常としての性分化疾患. 第 11 回熊本内分泌代謝フォーラム. 2012 年 8 月 17 日, 熊本.
21. 緒方勤：ヌーナン症候群とからだの成長. 厚生労働科研費ヌーナン症候群シンポジウム. 2012 年 8 月 18 日, 東京.
22. 緒方勤：成長障害と遺伝子異常. 第 11 回東海小児内分泌セミナー. 2012 年 10 月 27 日, 名古屋.
23. 緒方勤：環境ホルモン物質の子どもへの影響. 松葉のダイオキシン調査実行委員会研修会. 2012 年 10 月 29 日, 東京.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 緒方勤：インプリンティング疾患の基礎と臨床：プラダーウイ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.
30. 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.

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
3. 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パイプラインの実稼働を実現した。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情報解析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解明されていない遺伝的原因を解明することを目的とする。そのために、当分担研究では、次世代シーケンサーを確定診断レベルでつかえる精度で、かつその高いスループットを活かす遺伝子診断方法を開発することと、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（全エクソンシーケンシング及び RNA シーケンシング）によって新しい変異を血液免疫系疾患において同定することを目標とする。

B. 研究方法

・ 症状からでは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ことを目指し、アンプリコンシーケンシングによって、高

精度・高効率で遺伝子診断を実現する系を構築し、その評価を行う。

- ・ 既知遺伝子の探索のみでは遺伝的な原因がわか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構築する。
- ・ 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、それらがどのように全エクソン配列解析を補完しうるかを検討する。

（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。かずさ DNA 研究所では検体採取を行わないため、共同研究先からの匿名化検体のみを取り扱う。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、情報システムはパスワードと ID によるセキュリティー管理の下に運用した。

C. 研究結果

高精度で安価な遺伝子検査の実現に向けて、症状だけからでは特定の原因遺伝子の特定が困難な疾患に対して、10 前後の候補遺伝子からなるパネルを設定し、それをアンプリコンシー

クエンシングにより解析する系を立ち上げた。省力化のために、均一化マルチプレックスPCR法によるアンプリコン調製系を自己炎症疾患パネルで立ち上げ、他の疾患パネル（アイカルディ・ゴートイエ症候群、家族性血球貪食リンパ組織球増多症候群、メンデル遺伝型マイコプラズマ肺炎易感染症、分類不能型免疫不全症）についてもアンプリコン調製条件を確立した。これらのアンプリコンは、卓上型の次世代シーケンサー（ロシュ社、GS Junior）を用いてシーケンシングを行い、そのデータを解析するためのソフトウェア（ソムリエシステムと命名）によって遺伝子変異の検出とアノテーションを行った。のべ塩基長が約500kbpの達する複数のアンプリコンを従来法のキャピラリーシーケンシングと本次世代シーケンシング法の両方で解析し、次世代シーケンサーを用いて得た結果がキャピラリーシーケンシングと同等もしくはそれ以上の精度を有することを見出した。

更に、既に既知遺伝子が疾患原因であることの除外診断が終えられている症例について、2年間で150件体強（家族検体数も含む）の全エクソン配列解析を行った。これらのエクソームデータの情報解析パイプラインを立ち上げ、それぞれの変異データを蓄積した。大量の遺伝子変異データを共同研究先の各厚労省研究班の研究者がローカルに閲覧・解析できるように、小型卓上コンピューターによる解析システム

（Varkeeperと命名）を構築し、それぞれの共同研究者にこのツールの提供を行った。それらの解析からほぼ原因と特定された変異については研究会などで報告すると共に、論文としての投稿もしくは投稿準備を進めている。

このように、全エクソン配列解析は非常に有効な方法ではあるが、我が国のように希少疾患症例の蓄積の難しい状況下では、なかなか見出された遺伝型と表現型の間の関係を結論付けるのが困難である。そこで、患者様から非侵襲に採取可能な血球細胞の全転写産物解析（RNAシーケンシング）を全エクソン配列解析結果の補完情報として用いることを計画し、50例を超す血球成分のRNA Sequencingデータによる遺伝子発現プロファイルを蓄積した。しかし、今回調べた症例の範囲では、疾患症例に特異的に劇的に発現パターンを変える遺伝子は残念ながら見出せなかった。

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れていなかった。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、アンプリコンシーケ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ケ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できるようになった。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シーケンシングは、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。

E. 結論

1) 卓上型次世代シーケンサーの活用により、効果的かつ高精度に疾患遺伝子パネルの解析が実現できた。これにより、これまでよりも安価・迅速に原因遺伝子変異の同定に至れる可能性を著しく高めることができた。

2) 家族検体の解析と、日本人健常者の稀な1塩基多型データの公開のおかげで、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できるようになった。その結果、複数の例において、疾患原因とみられる変異の同定もしくは変異候補の絞り込みを実現した。

3) しかし、十分な家系データが得られず、症例数が少なく遺伝形態も不明の場合には原因遺伝子変異の特定のためには機能解析が不可欠となる。今後、次世代シーケンサーでの解析が臨床レベルに同定されることにより、遺伝的な情報だけでなく、患者様のより機能的な状態を記述する計測方法の進歩が最終診断のためには重要となることが予想されるが、そのための貴重な知見であるRNAシーケンシングデータの蓄積を進めることができた。

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 Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(1):65-7.
 7. 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.
 8. 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.
 9. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2013 Feb;90(2):164-8.
 10. Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O. A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins. *Curr Chem Genomics*. 2012;6:27-37.
 11. Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Autosomal-dominant chronic mucocutaneous candidiasis with STAT1-mutation can be complicated with chronic active hepatitis and hypothyroidism. *J Clin Immunol*. 2012 Dec;32(6):1213-20.
 12. Takezaki S, Yamada M, Kato M, Park MJ, Maruyama K, Yamazaki Y, Chida N, Ohara O, Kobayashi I, Ariga T. Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *J Immunol*. 2012 Aug 1;189(3):1521-6.
 13. Suri D, Singh S, Rawat A, Gupta A, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Bilhou-Nabera C, Proust A, Ahluwalia J, Dogra S, Saikia B, Minz RW, Sehgal S.

- Clinical profile and genetic basis of Wiskott-Aldrich syndrome at Chandigarh, North India. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2012 Mar;30(1):71-8.
14. Mohammadzadeh I, Yeganeh M, Aghamohammadi A, Parvaneh N, Behniafard N, Abolhassani H, Tabassomi F, Hemmat M, Kanegane H, Miyawaki T, Ohara O, Rezaei N. Severe primary antibody deficiency due to a novel mutation of mu heavy chain. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012;22(1):78-9.
 15. Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield MS, Ariga T, Miyawaki T. Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol.* 2012 Jun;95(6):692-6.
 16. 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.* 2012 Apr;19(2):143-52.
 17. Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H. Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Rheumatol Int.* 2012 Dec;32(12):3761-4.
- 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
 5. 第40回日本毒性学会学術年会 シンポジウム 毒性オミクス「生体システムダイナミクス理解のための統合ゲノミクス解析の将来展望」 小原收 千葉 2013年6月
 6. 第116回日本小児科学会学術集会 「ゲノミクスを基礎とした新しい病因探索法」分野別シンポジウム「原発性免疫不全症：新しい疾患、トピックス」小原收 広島 2013年4月
 7. 第58回日本人類遺伝学会「次世代シーケンシング技術とゲノミクス解析」シンポジウム：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 小原收 仙台 2013年11月
 8. 第4回関東甲越免疫不全症研究会 「IgA単独欠損症として紹介され、TREC/KRECの結果からRAG1異常と同日示した1例」 加藤環、釜江智佳子、本間健一、池川健、横須賀とも子、和田泰三、谷内江昭宏、西田直徳、金兼弘和、満生紀子、小原收、今井耕輔、森尾友宏、野々山恵章 2013年9月
 9. 第41回日本臨床免疫学会総会 「本邦におけるICF (Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies) 症候群5例の検討」 藤環、釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、久保田健夫、本間健一、小原收、今井耕輔、野々山恵章 下関 2013年11月
 10. 日本人類遺伝学会第58回大会 「次世代シーケンサーを用いてICF (Immunodeficiency with centromeric instability and facial anomalies) 症候群と診断した2例」 釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、本間健一、小原收、今井耕輔、久保田健夫、野々山恵章 仙台 2013年11月
 11. 第41回日本臨床免疫学会総会 「BTK変異をみとめたIgA単独欠損の解析 (IgA deficiency caused by the missense mutation in the BTK gene)」 満生紀子、今井耕輔、Xi YANG、金兼弘和、小阪嘉之、高田英俊、水谷修紀、小原收、森尾友宏 下関 2013年11月
 12. 15th International Congress of Immunology 2013 “Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles” C. Kamae,

- N. Nakagawa, H. Sato, K. Honma, N. Mitsuiki, O. Ohara, H. Kanegane, T. Morio, K. Imai and S. Nonoyama, Milan, Italy, Aug, 2013
13. 3rd Sardinian Summer School “Post-GWAS animal models” Ohara O. Pula, Italy, September, 2013
 14. 第34回日本炎症・再生医学会 “CINCA 症候群/NOMID 患者単球における、IL-1・分泌能の1細胞解析” 中川権史、志村七子、白崎善隆、山岸舞、井澤和司、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、小原收 京都、2013年7月
 15. 第41回日本臨床免疫学会「Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討」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、平家俊男下関、2013年11月27日
 16. 第23回日本小児リウマチ学会 「一般検査データから見た家族性及び二次性血球貪食性リンパ球組織球症の特徴と病態の考察」八角高裕、堀雅之、井澤和司、西小森隆太、小原收、平家俊男 大宮、2013年10月
 17. 第23回日本小児リウマチ学会 “Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討” 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 大宮、2013年10月
 18. 第58回日本人類遺伝学会 「エクソンスキップに伴い、非典型的な表現型を呈した Filamin A 異常症の兄弟例」 小田紘嗣、西小森隆太、中川権史、日衛嶋栄太郎、井澤和司、河合朋樹、沼部博直、小原收、平家俊男 仙台 2013年11月
 19. Nakagawa K, Shimura N, Shirasaki Y, Yamagishi M, Izawa K, Nishikomori R, Kawai T, Yasumi T, Heike T, Ohara O. Single cell fluorescent immunoassay of CINCA/NOMID. 7th international congress of FMA and AIDs, Lausanne, May 22, 2013.
 20. Y. Shirasaki, M. Yamagishi, K. Izawa, K. Nakagawa, A. Nakahara, N. Suzuki, J. Mizuno, T. Sekiguchi, T. Heike, R. Nishikomori, S. Shoji, O. Ohara, “ Real-time secretion analysis revealed correlation of IL-1beta release and loss of cell membrane integrity”, MicroTAS 2013, pp.1686-1688, 27-31 Oct. 2013, Freiburg, Germany
 21. 第6回日本免疫不全症研究会「新規B因子昨日獲得型変異を有する非典型的溶血性尿毒症候群の1家系」大西秀典、船戸道典、近藤直美、小原收、上村治 東京 2013年1月26日
 22. 第6回日本免疫不全症研究会「単一細胞免疫ノアッセイによる NLRP3 体細胞モザイクの機能的解析の試み」白崎善隆、志村七子、山岸舞、井澤和司、中川権史、西小森隆太、平家俊男、小原收 東京 2013年1月26日
 23. 第3回関東甲越免疫不全症研究会 「次世代シーケンサーにより、原因遺伝子の同定に至った CVID の1例」釜江智佳子、満生紀子、小原明、野口恵美子、久保田健夫、本間健一、小原收、今井耕輔、野々山恵章 東京、2012年9月22日
 24. 第3回関東甲越免疫不全症研究会 「PIDJ ネットワークを介した PID 患者の遺伝子解析 (2007~2012年)」満生紀子、大嶋宏一、今井耕輔、小原收、森尾友宏、水谷修紀 東京、2012年9月22日
 25. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Genetic Analysis for 207 Cases with Primary Immunodeficiency (PID) Consulted to A Single Center through PID Network in Japan (PIDJ) in 5 Years (2007-2011)” . N. Mitsuiki, K. Oshima, K. Imai, O. Ohara, T. Morio, S. Mizutani, Florence, Italy, October 3-6 2012
 26. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in Japan.” K. Honma, K. Imai, C. Kamae, H. Ishida, Y. Ito, S. Kojima, T. Yokosuka, H. Kanegane, T. Morio, Y. Sasahara, T. Fujiwara, H. Harigae, Y. Hashii, O. Ohara, S. Nonoyama Florence, Italy, October 3-6 2012
 27. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “GENETIC ANALYSIS OF AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME IN JAPAN” R. Nishikomori, J. Abe, K. Izawa, T. Kawai, T. Yasumi, N. Mitsuiki, O. Ohara, I. Toyoshima, K. Hasegawa, H. Ichinose, T. Heike. Florence, Italy, October 3-6 2012
 28. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Gain-of-Function Mutation in the STAT1 DNA-Binding Domain” Y.

- Yamazaki, M. Yamada, S. Takezaki, M. Kato, M.-J. Park, K. Maruyama, N. Chida, O. Ohara, I. Kobayashi, T. Ariga. Florence, Italy, October 3-6 2012
29. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry in patients with chronic granulomatous disease” T. Wada, M. Muraoka, T. Toma, T. Shigemura, K. Agematsu, H. Moriuchi, O. Ohara, T. Morio, A. Yachie. Florence, Italy, October 3-6 2012
30. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “*NLRP3* somatic mosaicism can cause Muckle-Wells syndrome” K. Izawa, R. Nishikomori, H. Oda, K. Nakagawa, E. Hiejima, K. Yoshioka, J. Abe, T. Kawai, T. Yasumi, T. Heike, A. Hijikata, O. Ohara, M. Saito, T. Nakahata, T. Kawai, S. Takei. Florence, Italy, October 3-6 2012
31. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Induced Pluripotent Stem Cells derived from patients with Reticular Dysgenesis” K. Oshima, A. Niwa, K. Imai, S. Nakamura, Y. Jindai, T. Tanaka, M. Yanagimachi, O. Ohara, H. Yabe, S. Kojima, T. Nakahata, S. Nonoyama, M.K. Saito. Florence, Italy, October 3-6 2012
32. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology Japan 2012. “Systems immunology: Tackling the complexity of the immune system Kobe” Ohara O. December, 2012
33. 第54回日本小児神経学会総会. “先進ゲノミクスの疾患研究における展開” 小原 収、札幌 May, 2012

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定も含む）
なし

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

研究分担者 呉 繁夫 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野 教授

研究要旨

次世代シーケンサーを用いた小児難病の病因遺伝子の探査を行う目的で、常染色体優性遺伝を示す家系、及び常染色体劣性遺伝を示す家系の掘り起こしと検体の収集を行った。常染色体優性遺伝を呈する家系として、慢性増殖性糸球体腎炎の3世代家系を見出した。また、常染色体劣性遺伝家系としては、先天性髄鞘化障害同胞例、ステロイド依存性ネフローゼ症候群同胞例、點頭てんかん同胞例、3家系例を見出した。以上の家系のなかで、點頭てんかん兄弟例を除く3家系では、インフォームドコンセントを取得した後、血液検体を収集した。慢性増殖性糸球体腎炎の3世代家系では、疾患頻度、遺伝形式などから、15個の疾患感受性遺伝子の候補と選定したが、それ以上の絞り込みは困難であった。先天性髄鞘化障害家系とステロイド依存性ネフローゼ症候群家系では、常染色体劣性遺伝を想定して、有力な候補遺伝子変異を特定することが出来た。

研究協力者

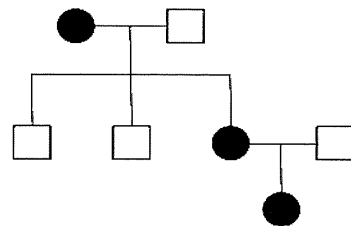
菊池敦生 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野

A. 研究目的

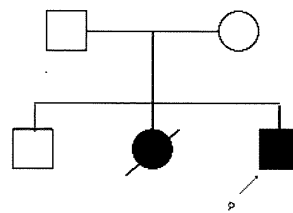
小児難病の遺伝要因を解明するために、家系収集と次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行った。家系を収集した疾患としては、1) 慢性増殖性糸球体腎炎、2) 先天性髄鞘化障害、3) ステロイド依存性ネフローゼ症候群、の3疾患である。

B. 研究方法

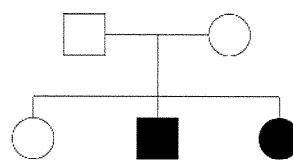
各家族から末梢血を収集し、DNAを抽出してエクソーム解析を行なった。エクソン領域の精製はSureSelectキット(Agilent社)を用い、シーケンス解析はHiSeq2500(Illumina社)を用いて実施した。先天性髄鞘化障害家系とステロイド依存性ネフローゼ症候群家系は常染色体劣性遺伝、膜性増殖性糸球体腎炎は常染色体優性遺伝を想定したフィルタリングを実施した。



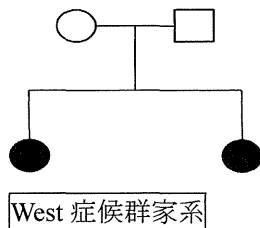
膜性増殖性糸球体腎炎家系



先天性髄鞘化障害家系



ステロイド依存性ネフローゼ家系



(倫理面への配慮)

本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認を受け、書面でのインフォームドコンセントを得た上で実施した。

C. 研究結果

①膜性増殖性糸球体腎炎：常染色体優性遺伝として 15 個以上の病因候補遺伝子を選定したが、それ以上の絞り込みは困難であった。

②先天性髄鞘化障害家系：

有力な責任候補遺伝子の一つを同定した。この結果をキャピラリー・シーケンサーで確認した。この遺伝子の病因として確定する目的で、先天性髄鞘化障害 30 症例を更に収集し、同定された候補遺伝子の変異スクリーニングを実施している。

③點頭てんかん兄弟例

家系の臨床症状の把握は行なったが、血液検体の取得には至っていない。

④ステロイド依存性ネフローゼ家系

有力な病因候補遺伝子の一つを同定し、現在ネフローゼ症候群孤発症例を収集し、同じ遺伝子内の変異スクリーニングを実施している。

D. 考察

平成 23-25 年度の本研究により、慢性増殖性糸球体腎炎(常染色体優性遺伝)、先天性髄鞘化障害同胞例、ステロイド依存性ネフローゼ症候群同胞例、West 症候群同胞例(常染色体劣性遺伝)の 4 つの小児難病家系を見出した。このうち、West 症候群家系以外の家系から血液検体を収集し、次世代シーケンサーによるエクソーム解析を実施した。その結果、先天性髄鞘化障害とステロイド依存性ネフローゼ症候群の家系において、両親が非罹患者であり、かつ罹患者の性別が異なることから、常染色体劣性遺伝が強く示唆され

る。この二つの家系ではエクソーム解析で有力な候補遺伝子変異を同定することができ、罹患者は複合ヘテロ接合体と考えられた。一方、膜性増殖性糸球体腎炎家系では、罹患者が全て女性であることから、常染色体優性遺伝の他、X連鎖優性遺伝の可能性も考えられる。いずれの遺伝形式によるフィルタリングにおいても候補遺伝子変異は多数存在し、遺伝子同定には至らなかった。

先天性髄鞘化障害の責任遺伝子は、既に複数報告されているが、ステロイド依存性ネフローゼ症候群の疾患感受性遺伝子に関しては、未だ同定に至っていないため、学術的意義は大きい。更にネフローゼ症候群の疾患感受性遺伝子が同定されることで、代表的な小児難病の一つの遺伝子診断法や治療の開発に結びつく可能性があり、社会的意義も大きい。

先天性髄鞘化障害に関しては、同症の孤発症例を多数収集し、同遺伝子に変異を持つステロイド依存性ネフローゼ症候群の責任遺伝子に関しては、既にノックアウト・マウス作成に着手しており、その詳しい病態解明と疾患モデル動物を用いた治療法開発に結びつけていく計画である。

E. 結論

小児難病である、先天性髄鞘化障害、慢性増殖性糸球体腎炎、ステロイド依存性ネフローゼ症候群、の 3 疾患の家系例を解析し、先天性髄鞘化障害家系とステロイド依存性ネフローゼ症候群家系では有力な候補遺伝子変異を特定することが出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohtake A, Aoki Y, Saito Y, Niihori T, Shibuya A, Kure S, Matsubara Y. Non-hodgkin lymphoma in a patient with cardiofaciocutaneous syndrome. J Pediatr Hematol Oncol. 2011 Dec;33(8):e342-6.

- Kure S. Two novel laboratory tests facilitating diagnosis of glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinemia). *Brain Dev.* 2011 Oct;33(9):753-7.
- Sakamoto O, Ohura T, Murayama K, Ohtake A, Harashima H, Abukawa D, Takeyama J, Haginoya K, Miyabayashi S, Kure S. Neonatal lactic acidosis with methylmalonic aciduria due to novel mutations in the SUCLG1 gene. *Pediatr Int.* 2011 Dec;53(6):921-5.
- Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology.* 2012 Mar 13;78(11):803-10.
- Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metab.* 2012 Apr;105(4):553-8.
- 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, Tominaga 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.* 2012 Apr 1;21(7):1496-503.
- Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y; Costello and CFC syndrome study group in Japan. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A.* 2012 May;158A(5):1083-94.
- Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, Ishii N. Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. *PLoS One.* 2012;7(6):e37892.
- Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Hirano E, Kure S, Goto YI, Inoue K. Depletion of molecular chaperones from the endoplasmic reticulum and fragmentation of the Golgi apparatus associated with pathogenesis in Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Biol Chem.* 2013 Mar 15;288(11):7451-66.
- Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun SL, Sato M, Asao A, Haji Y, Sasahara Y, Candotti F, Tsuchiya S, Kure S, Sugamura K, Ishii N. Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PLoS One.* 2013 Aug 21;8(8):e71594.
- Watanabe Y, Sasahara Y, Ramesh N, Massaad MJ, Yeng Looi C, Kumaki S, Kure S, Geha RS, Tsuchiya S. T-cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly downregulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep;132(3):648-655.e1.
- Wongkittichote P, Sukasem C, Kikuchi A, Aekplakorn W, Jensen LT, Kure S, Wattanasirichaigoon D. Screening of SLC25A13 mutation in the Thai population. *World J Gastroenterol.* 2013 Nov 21;19(43):7735-42.
- Kakisaka Y, Ohara T, Hino-Fukuyo N, Uematsu M, Kure S. Abdominal and lower back pain in pediatric idiopathic stabbing headache. *Pediatrics.* 2014 Jan;133(1):e245-7.

Horino S, Sasahara Y, Sato M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Sato A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of donor-derived regulatory T cells after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. *Pediatr Transplant*. 2014 Feb;18(1):E25-30.

2. 学会発表

Kure S. Identification of a susceptibility gene for

Moyamoya disease (MMD), RNF213, 3rd International Moyamoya Meeting, July 12-13, 2013, Sapporo.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

次世代シーケンサーを用いた新規膵炎関連遺伝子異常の探索

研究分担者 下瀬川 徹 東北大学消化器病態学分野 教授

研究要旨

新たな膵炎関連遺伝子異常を同定することを目的に、次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行った。既知の膵炎関連遺伝子異常を認めない遺伝性膵炎・家族性膵炎3家系、7症例について全エクソーム解析を行い、膵炎関連候補遺伝子10個を同定した。一方、膵消化酵素や膵発現蛋白、細胞内Ca関連、小胞体ストレス関連など、膵炎との関連が想定される68遺伝子をカバーするHaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステムを作成し、新たな膵炎関連遺伝子異常として、カチオニックトリプシノーゲン(*PRSSI*)遺伝子の p.G208A 変異を同定した。次世代シーケンサーを用いたアプローチは膵炎関連遺伝子異常の同定に有用な可能性が示された。

研究協力者

正宗 淳（東北大学消化器病態学分野 准教授）

糸 潔（同 助教）

濱田 晋（同 助教）

中野 絵里子（同 大学院生）

もかかわらず、原因遺伝子の明らかではない家系も少なからずみられる³⁾。本研究では、次世代シーケンサーを用いて新たな膵炎関連遺伝子異常を同定することを目的とした。

B. 研究方法

研究 1: 次世代シーケンサーを用いた膵炎家系の全エクソーム解析

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(家系1: 親、子2人; 家系2および家系3: 親子)7サンプルにつき、Illumina社HiSeq2000を用いて全エクソーム解析を行った。

研究 2: HaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステムを用いた網羅的解析

膵消化酵素や膵発現蛋白、細胞内Ca関連、小胞体ストレス関連など、膵炎との関連が想定される68遺伝子をカバーするHaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステム(Agilent Technologies社)を作成した。汎用型のデスクトップシーケンサー(MiSeq)を用いて、日常的に網羅的解析を行う実験系を立ち上げた。

なお本研究は東北大学遺伝病学分野松原洋一教授、青木洋子准教授、新堀哲也助教、細胞増殖制御分野中山啓子教授、舟山 亮助教、西田有一郎助教、長嶋

A. 研究目的

急性膵炎は重症化すると致死率が10%となる難治性の疾患である。重症急性膵炎は厚生労働省の特定疾患(難病)に指定されている。一方、慢性膵炎は腹痛発作を繰り返したのち、進行すると膵外内分泌障害により消化吸収障害や糖尿病を発症する。急性膵炎、慢性膵炎のいずれもアルコール性が最大の成因であるが、原因不明の特発性膵炎の症例も少なくない。

膵炎発症に関連する遺伝子異常としては、1996年に遺伝性膵炎の疾患遺伝子としてカチオニックトリプシノーゲンが報告¹⁾されて以来、トリプシンの活性化と不活性化に関わる遺伝子異常が報告されてきた。例えば、膵腺房細胞で生成され、トリプシン活性を阻害する膵分泌性トリプシンインヒビター(*SPINK1*)遺伝子の p.N34S 変異や c.194+2T>C 変異は、遺伝性膵炎、家族性膵炎や特発性膵炎、特に若年発症の症例に少なからず認められる²⁾。しかし濃厚な家族歴を有するに

剛史助教との共同研究として遂行された。

(倫理面への配慮)

検体採取、遺伝子解析にあたっては、書面を用いた十分な説明のもと書面による同意を得て行った。本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認（承認番号 2009-403、2011-260）に基づいて行われた。

C. 研究結果

研究 1: 各サンプル平均 1.76 億リードが得られた。エクソン、スプライスサイトに含まれる多型を抽出し、dbSNP、1000Genomes に含まれるものを除外し、さらに家系内に共通してみられる 1348 個を候補遺伝子多型とした。その機能と発現部位などを確認し、さらに候補を絞り込んだ。その結果、膵炎との関連が予測された 10 個の遺伝子を抽出した。10 個の内訳は、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 個であった。このうち、この検討により、偶然にも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 (CPAI) 遺伝子 p.V251M 変異が遺伝性膵炎 1 家系 3 人に同定された⁴⁾。

研究 2: *PRSSI* 遺伝子異常 (p.R122H 変異, p.N29I 変異), 及び *SPINK1* 遺伝子異常 (p.N34S 変異, c.194+2T>C 変異) 陰性の特発性慢性膵炎患者 6 例を解析した。その結果, 68 遺伝子中 62 遺伝子に, 計 174 個の遺伝子異常や多型が同定された。興味深いことに *PRSSI* 遺伝子の p.G208A 変異を認めた。p.G208A 変異はアルコール性慢性膵炎患者 232 人中 8 人 (3.4%), 特発性慢性膵炎患者 198 人中 9 人 (4.5%) に同定され, 健常者 411 人中 1 人 (0.2%) に比較し有意に高頻度であった (表 1)⁵⁾。この変異は中等度の分泌障害から膵腺房細胞内に小胞体ストレスをおこし, 膵炎発症に関連している可能性が示されている⁶⁾。また, p.G208A 変異がみられた慢性膵炎患者 18 人中 2 人にキモトリプシン C (CTRC) 遺伝子 p.R29Q 変異を, 1 人に *SPINK1* 遺伝子 p.N34S 変異を認めており, 本変異はアルコールや他の遺伝子異常と相乗的に作用し膵炎を発症させると推測された。

D. 考察

本研究は次世代シーケンサーを用いた全エクソームの網羅的解析により、新たな膵炎関連遺伝子異常を同定しようとするものである。日本における遺伝性膵炎家系の検討では、約 30% の家系で *PRSSI* や *SPINK1* といった既知の膵炎関連遺伝子異常が同定されない³⁾。本研究においては、そのような家系を対象とし、遺伝様式や機能、発現部位などに基づき 10 個の膵炎関連候補遺伝子を抽出した。偶然にも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 (CPAI) 遺伝子 p.V251M 変異が遺伝性膵炎家系 3 人に同定された。本遺伝子異常はトリプシンの活性化や不活性化には影響を与えず、変性タンパク質が膵腺房細胞内に蓄積した結果、小胞体ストレスを引き起こし膵炎発症に至ると考えられている⁴⁾。

このように次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析は新規膵炎関連遺伝子異常の検索に有用と考えられる一方、1 サンプルあたり数万の変異が検出されるため、遺伝様式などによる絞り込みができない場合には、変異の絞り込みに大変な困難を伴う。われわれは、全エクソーム解析の結果や膵炎動物モデルでの知見を踏まえて、膵消化酵素や膵発現蛋白、細胞内 Ca 関連、小胞体ストレス関連など、膵炎との関連が想定される 68 遺伝子をカバーする HaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステムを作成し、日常的に網羅的解析を行う実験系を立ち上げた。すでに *PRSSI* 遺伝子 p.G208A 変異をはじめ、多数の変異、多型を同定しており、特発性膵炎を中心に 80 症例以上の解析が終了している。これらについて、膵炎患者における頻度や機能解析の結果をもとに、膵炎との関連を検討中である。なお、HaloPlex™ は新規遺伝子異常の同定のみならず、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 遺伝子のような 20 以上のエクソンを有する遺伝子の解析にも大きな威力を発揮すると考えられる。

E. 結論

全エクソーム解析ならびに HaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステムにより、新規膵炎関連遺伝子異常を同定した。次世代シーケンサーを用いたアプローチは膵炎関連遺伝子異常の同定に有用な可能性が示された。

F. 参考文献

1. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996; 14:141-145.
2. Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2000; 25: 213-216.
3. Masamune A. Genetics of pancreatitis –The 2014 update-. *Tohoku J Exp Med.* 2014, in press.
4. 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.
5. 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.* 2014;63:366.
6. Schnúr A, Beer S, Witt H, Hegyi P, Sahin-Tóth M. Functional effects of 13 rare PRSS1 variants presumed to cause chronic pancreatitis. *Gut.* 2014;63:337-43.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masamune A, Nakano E, Kume K, Kakuta Y, Ariga H, Shimosegawa T. Identification of novel missense CTRC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Gut.* 2013;62:653-4.
2. 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.* 2014;63:366.
3. 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. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Nakano E, Masamune A, Kume K, Kakuta Y, Shimosegawa T. Mutational analysis of the chymotrypsin C (CTRC) and Interferon regulatory factor 2 (IRF2) genes in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Digestive Disease Week 2013.* 2013年5月18–21日 –Orland, FL, USA–
2. Kume K, Masamune A, Shimosegawa T. Whole exome sequencing might become the new strategy to identify unknown mutations for pancreatitis. *Digestive Disease Week 2013.* 2013年5月18–21日 –Orland, FL, USA–
3. 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–

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 1. 日本人慢性膵炎患者における *PRSSI* 遺伝子 c. 623G>C (p. G208A) 変異の頻度

成 因		陽 性	頻 度	オッズ比 (95%信頼区間)	P 値
アルコール性	n=232	8	3.4%	14.6 (1.8 to 117.8)	0.002
特発性	n=198	9	4.5%	19.5 (2.5 to 155.2)	<0.001
遺伝性	n=34	1	2.9%	12.4 (0.7 to 203.2)	0.15
家族性	n=20	0	0%	1.0 (1.0 to 1.0)	>0.99
慢性膵炎全体	n=484	18	3.7%	15.8 (2.1 to 119.2)	<0.001
コントロール	n=411	1	0.2%		