

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.

4. Shi D, Takano Y, Nakazawa T, Mengkegale M, Yokokura S, Nishida K, Fuse N. Molecular Genetic Analysis of Primary Open-angle Glaucoma, Normal Tension Glaucoma, and Developmental Glaucoma for the VAV2 and VAV3 Gene Variants in Japanese Subjects. Biochemical and Biophysical Research Communications. 432(3):509-512, 2013

5. Tsuda S, Yokoyama Y, Chiba N, Aizawa N, Shiga Y, Yasuda M, Yokokura S, Otomo T, Fuse N, Nakazawa T. Effect of Topical Tafluprost on Optic Nerve Head Blood Flow in Patients With Myopic Disc Type. J Glaucoma. 22(5):398-403,2013.

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 布施昇男：緑内障の遺伝子診断の潮流  
第120回青森眼科集談会、弘前、2011.4.24
2. 高野良真、石棟、中澤徹、西田幸二、布施昇男：正常眼圧緑内障における *TLR4* 遺伝子の評価  
第115回日本眼科学会総会、東京、2011.5.12
3. 布施昇男：緑内障個別化医療に向けた遺伝子解析  
第3回 KEEP THE VISUAL FIELD、熊本、2011.6.19
4. 高野良真、石棟、清水愛、中澤徹、布施昇男：開放隅角緑内障、偽落屑症候群における *TLR4* 遺伝子の評価  
第22回日本緑内障学会、秋田、2011.9.23  
(Takano Y, Fuse N. Am J Ophthalmol. 154; 825-832, 2012 として雑誌掲載)
5. Shimizu A, Fuse N, Takano Y, Shi D, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nakazawa T. Evaluation for *CNTNAP2* gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese. The 84<sup>th</sup> annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL, 2012.5.10  
(Shimizu A, Fuse N. Mol Vis. 18; 1395-1401,2012 として雑誌掲載)

6. Fuse N. Hot topics. Genetics and Biomarkers in Glaucoma. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. Busan. Korea, 2012.4.13 (Shi D, Fuse N. PLoS ONE. 8; e54115, 1-11, 2013 として雑誌掲載)

7. Fuse N. Molecular Genetic Analysis for Glaucoma using Next-Generation Sequencing Technology. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. Subspecialty Symposium. Hyderabad. India, 2013.1.18

8. 清水愛、布施昇男、高野良真、石棟、鄭曉東、白石敦、大橋裕一、中澤徹 日本人における落屑症候群と *CNTNAP2* 遺伝子多型の関連について 第116回日本眼科学会総会 2012.4.6 (Shimizu A, Fuse N. Mol Vis. 18; 1395-1401,2012.として雑誌掲載)

9. 高野良真、布施昇男、清水愛、石棟、中澤徹 開放隅角緑内障、嚢性緑内障における *CAV1*、*CAV2* 遺伝子の評価 日本眼科学会 2012.4.6

10. 布施昇男 遺伝と診断 第23回緑内障学会シンポジウム 小児緑内障、金沢、2012.9.28

11. Fuse N. Association between optic nerve microcirculation and glaucomatous damage. July 19, 2013 5<sup>th</sup> World Glaucoma Congress. Vancouver.

12. 布施昇男 緑内障のゲノム解析 一次世代医療・個別化医療に向けて—第117回日本眼科学会総会 評議員指名講演 東京 2013.4.6

13. 布施昇男 緑内障のテーラーメイド医療～薬物療法を中心に～ 第11回兵庫県眼科オープンカンファレンス 神戸 2013.9.14

14. 布施昇男 How do the genetic factors relate to NTG? 第24回日本緑内障学会 東京 2013.9.21

15. 布施昇男 個人ゲノム時代の遺伝カウンセリング 第58回日本人類遺伝学会 仙台 2013.11.21

16. 布施昇男 パーソナルゲノム時代の遺伝子診療 15回 Japan Glaucoma Council 「緑内障診療 UPDATE」, 東京, 2013.12.14

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

## 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

研究分担者 中山 啓子 東北大学医学系研究科 教授

## 研究要旨

活性化型 RAS によるエピジェネティックな変化を次世代シーケンサーを用いて調べた。活性化型 RAS 発現によって Histone H3K27me3 を全ゲノム領域で調べたところ、これまで良く知られていた 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ると同時に Histone H3K27me3 の修飾量を上昇することが確認された。逆に約 30 個の遺伝子は、転写が活性化し Histone H3K27me3 の修飾量が減少した。

その変化について時系列を追って調べたところ、転写変化の後に Histone H3K27me3 修飾が変化していた。これまでヒストン修飾の変化が転写の変化を誘導すると考えられてきたが、本研究の結果は、それとは異なり、転写変化の結果、エピジェネティック環境を変化させていることがわかった。

## 研究協力者

細金 正樹（東北大学医学系研究科）

## A. 研究目的

RAS/MAPK syndrome は、RAS シグナル伝達経路に関わるタンパク質が変異することによって、多様な症状を示す症候群である。RAS の活性化そのものが、非常に多様な機能を有し、未だに不明な部分も多い。

本研究では、RAS の活性化がもたらす転写の変化に注目し、その分子機構をあきらかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

マウス NHI3T3 細胞に恒常活性化型 RAS を過剰発現し、それによって引き起こされる変化について、転写の変化とエピジェネティックは変化について調べた。

また、汎用性を調べるために、RAS によって活性化される分子の一つである Raf に ER（エストロゲン受容体）を融合させたタンパク質を恒常的に発現する細胞を作製した。この細胞に ER を活性化する小分子 タモキシフェンを投与すると、リン酸化酵素である Raf が活性化し基質分子をリン酸化する。そのためにタモキシフェンを投与の有無によって、RAS シグナル伝達経路（の一部）を活性化と

シャットオフを行うことができるため、活性化後の時間経過などの研究には有用である。

これらの細胞から、mRNA を抽出し、注目する転写産物については qPCR で定量し、全遺伝子について RNA sequence をおこなった。また、エピゲノム変化については、メチル化 DNA の免疫沈降後の qPCR や、ヒストン修飾特異的免疫沈降後の qPCR を行った。さらに、特に注目した Histone H3K27me3 については、クロマチン免疫沈降後に sequence をすることによって、全ゲノム上の修飾状態を調べた。

RNA sequence および、Histone H3K27me3 の ChIP sequence は、RAS 活性化前、活性化後 2 日目、4 日目、7 日目、12 日目に行い、変化がどのような時間経過によって起こるかを調べた。

Histone H3K27 は、PRC2（Polycomb Repressive Complex 2）によってメチル化修飾を受け Histone H3K27me3 となることが知られている。そこで、PRC2 の構成因子の一つである Suz12 をノックダウンによって発現抑制し、Histone H3K27me3 が低下している環境を作り、RAS による Histone H3K27me3 修飾の促進が、転写にどのように影響を与えるかを検討した。

### C. 研究結果

マウス NHI3T3 細胞に恒常活性化型 RAS を過剰発現すると、アポトーシス誘導因子である Fas の転写が抑制されることが良く知られている。私たちも Fas の転写量を qPCR で調べたところ、RAS 活性化前に比べ、1/10 程度へ低下しており、これまでの研究結果を再現することができた。

Fas が RAS によって転写抑制される際には、Fas プロモーターの DNA がメチル化されていることが報告されていた。しかしながら、私たちがメチル化 DNA の免疫沈降後に qPCR を行い、メチル化 DNA 量を比較したところ、RAS の活性化前後で、Fas 遺伝子プロモーターの DNA メチル化量に変化は認められなかった。また、bi-sulfite sequence によって、実際のメチル化状態を調べたところ、RAS の活性化しなくとも Fas 遺伝子プロモーター領域は、強くメチル化されており、RAS の活性化によってこのメチル化のさらなる増強は認められなかった。また、DNA メチル化に必須であると報告されている G9a 遺伝子を欠失した細胞で RAS を活性化させても、Fas の転写抑制が観察された。以上のことから、Fas の転写抑制にはこれまでの報告と異なり、DNA のメチル化は関与していないと結論づけた。

次に、Fas 遺伝子領域の RAS によるヒストンの修飾変化について調べた。Fas の転写は RAS によって抑制されるので、Fas 遺伝子プロモーター領域では RAS によって転写抑制性のヒストン修飾が誘導される可能性があると考えた。そこで、Histone H3K9 のジメチル化、トリメチル化および、Histone H3K27 のトリメチル化 (Histone H3K27me3) 状態を ChIP qPCR を行うことで調べた。その結果、FAS プロモーター領域では、Histone K9 のメチル化状態は変化しないが、Histone H3K27me3 が有意に増加していることがわかり、RAS によって Histone H3K27me3 誘導が起こることが、転写の抑制を引き起こしている可能性が示唆された。

RAS によって Histone H3K27me3 が誘導されることが判明したので、この誘導が、ゲノム上のどのような位置に起こっているのかを調べるために次世代シーケンサーを用いた ChIP sequence を行った。

まず、RAS を過剰発現していないサンプルで Histone H3K27me3 が遺伝子に対してどのような位置を修飾しているのか、さらに、この修飾と転写量とはどのような関係性

があるのかを調べた。まず、NCBI Reference Sequence Database の transcript を参照配列として、transcript される領域を gene body、transcript の 5' 側 2kb をプロモーター領域と定義した。これらの領域での修飾量を、DNA 長で標準化し、平均修飾量を算出した。また各遺伝子の transcript 量は、RNA sequence の結果を、同様に遺伝子長による標準化を行った。これらの転写量と修飾量の相関関係を調べたところ、gene body の修飾量は、転写と負の相関があり、その相関性はプロモーターの修飾量に比べ強いことが判明した。これまで、プロモーターの修飾量が転写量を制御していると報告されていたが、少なくとも今回のサンプルに関しては、gene body の平均修飾量が、転写量をより強く制御していることが判明した。

そこで、その後の解析は、gene body の修飾量を用いてサンプル間比較を行うことにした。恒常活性化型 RAS の過剰発現によって、Fas 遺伝子領域の Histone H3K27me3 修飾量は増加するものの、細胞あたりの修飾量全体は、変化しないと考えられた。それは、全細胞の各タンパク質抽出液を用いたウェスタンブロット調べたところ全ヒストン量と Histone H3K27me3 修飾量の比は、RAS の発現の有無に関わらず変化が無いことや、蛍光免疫染色で観察される、ゲノムと結合する DAPI 量と抗 Histone H3K27me3 抗体による染色量の比が変化しないこと、などから結論づけた。全修飾量が変化しない仮定したので、Histone H3K27me3 修飾に結合しているゲノム量は不変とし、次世代シーケンサーで得られたデータ数を補正し、各サンプル間での比較を行った。

各遺伝子毎に RAS 発現細胞の転写量を RAS 非発現細胞の転写量で除し、RAS による転写の変化量とした。同様に、各遺伝子毎に RAS 発現細胞の gene body の Histone H3K27me3 修飾量を RAS 非発現細胞の gene body の Histone H3K27me3 修飾量で除した値を RAS による Histone H3K27me3 修飾の変化量とした。転写の変化量と修飾の変化量の相関関係を調べると、転写量が減少すると、修飾量が上昇する関係にあることがわかった。これまでに調べてきた Fas 遺伝子領域も転写が減少し、修飾が増加する遺伝子群に含まれ、次世代シーケンサーによる解析が妥当であることが確認された。この解析によって、Fas 遺伝子以上に大きく転写量を減少させ、修飾量を上昇させる遺伝子を発見することができた。また、RAS は転写を抑制させ、修飾を上昇させるだけでなく、

転写を促進し、修飾を減少させている遺伝子も多く存在することがわかり、RAS は遺伝子によって転写に対して抑制と活性化の作用を持っていることがわかった。

続いて、転写の変化と修飾の変化の時間経過を詳細に調べた。RAS 活性化後に転写量が変化する遺伝子は、933 個あった。また、Histone H3K27me3 修飾が変化する遺伝子は、1027 個見つかった。そのうち転写が変化し、修飾が変化した 115 個について、修飾の変化の経過に注目し、変化のパターンをクラスタリングし、その結果をもとに、さらに転写が減少し修飾が上昇するグループ (49 個の遺伝子)、転写が上昇し修飾が減少するグループ (29 個の遺伝子) に分類した。転写が減少したグループでは、転写の変化はおよそ 2 日間で終了したが、修飾量は、徐々に増加し 12 日を経過しても平衡状態には達していなかった。一方、転写が増加したグループでは、転写の変化は 2 日目には既に始まり、8 日目には平衡状態になっていたが、修飾の変化は、2 日目にはむしろ増加し、8 日目もまだ十分に修飾の解除は認められなかった。このことは、転写の変化は修飾の変化が起こらなくても開始されているということであり、転写の変化に修飾の変化は不要であることが明らかとなった。クラスター分類によって得られたグループでこの結果は得られたが、個別に qPCR および ChIP-qPCR で検証したいいくつかの代表的な遺伝子でも同様の時間経過を確認することができた。

この結果は、転写の変化に Histone H3K27me3 修飾が不要であることを示唆している。これを確認するために Histone H3K27me3 修飾酵素活性を担う Suz12 を siRNA を用いて発現抑制し、RAS を活性化して転写の変化を調べた。その結果、Histone H3K27me3 修飾が抑制されている状態であっても、RAS による転写変化は同様に観察され、Histone H3K27me3 修飾が認められる領域でも転写の変化に修飾は必要無いことが確認された。

また、タモキシフェンによる RAS シグナル経路の活性化系を用いて、RAS による転写抑制後に RAS の活性化を解除し、転写と修飾の変化を調べた。その結果、転写も修飾も RAS を再度不活化することで、基底状態へ戻ることが確認された。Histone H3K27me3 修飾は、転写抑制の維持に働いているとの報告もあるが、少なくとも RAS の活性化 9 日後には、維持機構としての機能はまだ発揮していないことがわかった。

## D. 考察

今回の結果は、RAS はヒストン修飾を介した転写制御を行うのではなく、転写制御がヒストンの修飾の変化を誘導している可能性を示唆した。ヒストン修飾については、多くのデータが蓄積されているが、その多くがある一定の環境での転写と修飾の関係を調べているものであり、時系列を追った相互関係を調べているものは少ない。今後、相互関係や、さらには一細胞での修飾と転写の関係を調べることができるようになると、修飾の生物学的な意義についてより深い理解に繋がると期待される。

次世代シーケンサーは、単一サンプルの全ゲノムを見渡すデータを取得するが、サンプル間の比較を行うためには、解析時に補正することが必要である。同時に大量かつ精度が高い(有効数字が多い)と期待されるデータが取得されるものの、精度を保ったサンプル間比較は、原理的に非常に困難である。ChIP-qPCR の結果を「正解」として、ゲノム上の複数カ所、また RAS 発現から時系列に添ったサンプルを用いて、生物学的に妥当だと考えられるデータを取得することができた。しかし、異なる細胞や異なる刺激では、再度条件設定が必要である。特にヒト患者サンプル患者間の比較検討するためには複数の条件間の比較は困難である。そこで今回の検討とは異なり、ヒト検体に対応するための基礎データ・参照データの蓄積が必要であると考えられた。

## E. 結論

RAS の活性化によってエピゲノム変化を介した転写の変動について次世代シーケンサーを用いて調べた。その結果、RAS は Histone H3K27me3 修飾の変化をもたらすが、その変化は転写の変化に遅れて生じるものであり、RAS はまず転写変化を誘導後に Histone H3K27me3 修飾の変化を誘導していることがわかった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.* 2014 Feb;23(4):992-1001.

Hosogane M, Funayama R, Nishida Y, Nagashima T, Nakayama K. Ras-Induced Changes in H3K27me3 Occur after Those in Transcriptional Activity. *PLoS Genet.* 2013 Aug;9(8):e1003698.

中山啓子, 舟山亮. Illumina 社製シーケンサーの特徴と可能性. *肝胆膵.* 2013;67(1):25-33.

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.* 2013;8(6):e66086.

Sun SL, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Funayama R, Kondo M, Saitsu H, Matsumoto N, Nakayama K, Ishii N. Y chromosome-linked B and NK cell deficiency in mice. *J Immunol.* 2013 Jun 15;190(12):6209-20.

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, 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 Jul 11;93(1):173-80.

## 2. 学会発表

Nakayama, K., Hosogane, M., Funayama, R., Nagashima, T.: Change of Trimethylation of H3K27 Occurs after Ras-mediated Transcriptional

Regulation (口頭発表, NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, Sendai, 2013年5月9日).

Matsushima, W., Funayama, R., Nagashima, T., Nakayama, K. : Comprehensive Analysis of Ras-Mediated Alternative Splicing (口頭発表, NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, Sendai, 2013年5月9日).

Nakayama, K : Functional Analysis of F-box protein in vivo. (口頭発表, The 35th Naito Conference Program(第35回内藤コンファレンス), Sapporo, 2013年7月9日) .

中山 啓子. 転写制御とヒストン修飾 (口頭発表, 順天堂大学 最先端・次世代シンポジウム, 東京, 2013年11月30日) .

舟山亮, 細金正樹, 長嶋剛史, 中山啓子. Ras-MAPK シグナルを介したFas遺伝子の転写抑制機構の解析. (ポスター発表, 第36回日本分子生物学会年会. 神戸. 2013年12月3日)

細金 正樹, 舟山 亮, 西田 有一郎, 長嶋 剛史, 中山 啓子 : がん遺伝子 Ras による転写変化後の H3K27me3 修飾変化 (ポスター発表, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月3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

## 先天奇形症候群の原因遺伝子解析とその病態の解明

分担研究者 青木洋子

東北大学大学院医学系研究科 遺伝病学分野 准教授

### 研究要旨

先天異常は新生児の約3-5%に起こる。先天奇形症候群は先天的に形態異常や機能異常を持つ症候群であり、染色体異常や遺伝子変異がその原因となる。高密度アレイCGH や次世代シーケンサーの台頭により、その原因が次々と明らかになっているが、いまだに原因不明の疾患も数多く存在する。本研究では先天異常症であるRAS/MAPK 症候群と、アルカリホスファターゼ高値を伴う精神遅滞症候群（Marby 症候群）においてエクソーム解析を行い、新規原因遺伝子を同定しRAS/MAPK 症候群についてはその病態を明らかにするためにモデル生物の作製・解析を行った。RAS/MAPK 症候群は sporadic な常染色体優性遺伝性疾患であり原因は heterogenous であるが、エクソーム解析数を増やすことで、新規原因遺伝子を同定できる可能性を示唆した。

### 研究協力者

新堀哲也（東北大学遺伝病学分野）

井上晋一（東北大学遺伝病学分野）

井泉瑠美子（東北大学遺伝病学分野）

守谷充司（東北大学遺伝病学分野）

大場大樹（東北大学遺伝病学分野）

西山亜由美（東北大学遺伝病学分野）

松原洋一（東北大学遺伝病学分野）

Marby 症候群は特異的顔貌・骨格異常・精神運動発達遅滞と持続する高アルカリホスファターゼ血症を伴う症候群である。長らくその原因が不明であったが、199 年にドイツのグループがエクソーム解析を行い、GPI アンカーの生合成に関わる PIGV 遺伝子変異がその原因であることを報告したが、その3割はいまだに原因は不明である。本研究の目的は Marby 症候群と臨床診断されるが、PIGV 遺伝子変異陰性の一家系の原因を明らかにすることである。

### A. 研究目的

RAS/MAPK 症候群は RAS/MAPK シグナル伝達経路の分子異常を伴う先天奇形症候群の総称で、ヌーナン症候群・Costello 症候群、cardio-facio-cutaneous 症候群が含まれる。これらの患者は、低身長・心疾患・精神遅滞・特異的顔貌などの症状をもつが互いに類似しているために分子診断が役立つ。分担者らはこれまでに700例以上のRAS/MAPK症候群に遺伝子診断を提供してきたがその40%はいまだに原因が不明である。本研究の目的は新規原因遺伝子を解明し、その病態を明らかにすることである。

### B. 研究方法

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した。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。

RAS/MAPK 症候群では RAS/MAPK シグナル伝達経路に関連する分子を、Marby 症候群では GPI アンカー生合成に関与する分子を中心に絞り込みを行った。候補となる SNV を抽出したのちに、サンガー法で確認し、必要があれば家族の検体で確認した。遺伝子変異を持つ変異蛋白が病因変異であるかどうかを確認するために、細胞細胞やモデル生物に変異を導入してその機能解析を行った。

#### (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、承認を得た。

### C. 研究結果

#### <RAS/MAPK 症候群>

原因不明の患者計 26 人に対してエクソーム解析を行い、新規の遺伝子 RIT1 を同定し報告した。RIT1 遺伝子変異はこれまでに原因が不明だった 180 人の RAS/MAPK 症候群のうち 17 人(9%)に同定された RIT1 遺伝子変異を導入した細胞では下流の ELK 転写活性が増加することが明らかになった。RIT1 遺伝子変異を導入したゼブラフィッシュを作成したところ、受精後 11 時間の胚では egg sack の形に変化が見られ、受精後 46-52 時間の embryo では、心臓の looping 異常、頭部・顔面の形態異常・卵黄嚢の形の変化が見られ、ヌーナン症候群での異常に類似していた。本研究結果は、これまで機能が不明であった RAS サブファミリーの RIT1 が古典的癌原遺伝子 RAS(HRAS, KRAS, NRAS)と同じ働きを持つ可能性があることを初めて示した。

分担研究者らは RAS/MAPK 症候群研究の国際コンソーシアムに属し、エクソーム解析の情報を交換して研究を進めている。国際コンソーシアムにおいても RAS/MAPK 症候群

の新規原因遺伝子を 2 種同定しており、そのうち一つの遺伝子変異について論文を投稿中である。

RAS/MAPK 症候群 2 疾患に対するモデルマウスに成功し、それらの表現型の改善するような薬剤試験が進行中である。

#### <Marby 症候群>

Marby 症候群特異的顔貌、運動精神遅滞をしめし、血清アルカリホスファターゼ高値を示す。臨床症状からは Marby 症候群が疑われるものの、既知の GPI アンカー生合成に関わる原因遺伝子 PIGV 遺伝子変異陰性の一家系のエクソーム解析を行った。エクソーム解析のデータにおいて、これまでに GPI アンカー生合成異常に関与する遺伝子について絞り込み解析を行ったところ原因遺伝子を同定した。患者の白血球にて GPI アンカー結合蛋白の異常があるかどうか、あるいは変異蛋白の機能解析を施行中である。

### D. 考察

RAS/MAPK 症候群については、その約 40% がいまだに原因不明であったが、エクソーム解析にて同定された RIT1 はヌーナン症候群で 3 番目に頻度が高い遺伝子であることが明らかになりエクソーム解析が強力なツールであることが明らかになった。。さらに遺伝子体制の整備とモデルマウス作製により、その病態の解明が進んでいる。

Marby 症候群はいまだ認知度の低い疾患であるが、小児の精神遅滞の中に存在することが予測されている疾患である。本疾患においても GPI アンカー生合成に関する遺伝子が候補遺伝子となり、エクソーム解析により新規原因遺伝子が次々と報告されている。今後さらなる病因遺伝子の検索や病態メカニズムの解明を目指したい。

### E. 結論

RAS/MAPK 症候群と Marby 症候群で新規原因遺伝子を同定した。RAS/MAPK 症候群は sporadic な常染色体優性遺伝性疾患であり、原因は heterogenous であるが、頻度の高い原因遺伝子をエクソーム解析で同定できる可能性を示唆した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### 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. Sakamoto K, Imamura T, Asai D, Goto-Kawashima S, Yoshida H, Fujiki A, Furutani A, Ishida H, Aoki Y, Hosoi H. Acute

lymphoblastic leukemia developing in a patient with Noonan syndrome harboring a PTPN11 germline mutation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 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
2. 青木洋子「神経-心奇形連鎖：Noonan 症候群類縁疾患における、RAS-MAPK シグナル伝達経路の関与第 55 回日本小児神経学会学術集会 教育講演 平成 25 年 5 月 31 日 大分
3. 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

#### 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



## 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

研究分担者 長嶋 剛史 東北大学大学院医学系研究科 助教

## 研究要旨

本研究の目的は、次世代シーケンサーによって得られる大量の配列情報から生物学・医学的に興味深い遺伝子および変異を抽出するための遺伝子情報解析パイプラインを開発すること、それを用いて本研究事業によって産出されるシーケンスデータから病因の候補となる変異を抽出することである。これは、シーケンスデータ、家系情報等のサンプルに付随する情報、既知の遺伝子変異および遺伝子機能に関する情報を統合的に解析することにより実現する。

## 研究協力者

中山 啓子(東北大学大学院医学系研究科)  
黒田 清隆(東北大学東北メディカル・メガバンク機構)

う。開発したパイプラインを用いて本研究事業によって産出されるデータを解析し病因遺伝子の解明を目指す。

## A. 研究目的

次世代シーケンサー（以下 NGS と略す）の登場により大量の配列情報が容易に得られるようになってきた。例えば、本研究事業で使用する Illumina 社の HiSeq2000 システムの場合、一度の実験で得られる配列情報はヒトゲノムの 20 倍に相当する 600Gb におよぶ。NGS データ解析においてはこのような大量の配列データを効率的に扱うための情報処理技術ならびに塩基配列から生物学・医学的に興味深い知見を抽出するためのバイオインフォマティクス解析手法が極めて重要な役割を果たす。

本分担研究の目的は NGS データから希少遺伝性疾患との関連が示唆される候補遺伝子群の絞り込みを行うために必要な一連の情報解析の流れを遺伝子情報解析パイプラインとして構築することである。パイプライン開発にあたっては本研究事業の解析対象である遺伝性疾患の特性を考慮した上でそれに最適化したパイプライン開発を行う。中でも、家系情報を利用した遺伝様式による絞り込み、既知変異の除外による新規候補変異の抽出、変異がタンパク質へ及ぼす機能の推定が重要となるため、通常の変異解析に加え、これらの点を考慮した解析パイプラインの開発を行

## B. 研究方法

本分担研究で開発した遺伝子情報解析パイプラインにおける解析の流れを図 1 に示す。解析パイプラインは PC クラスタシステム上に実装した。

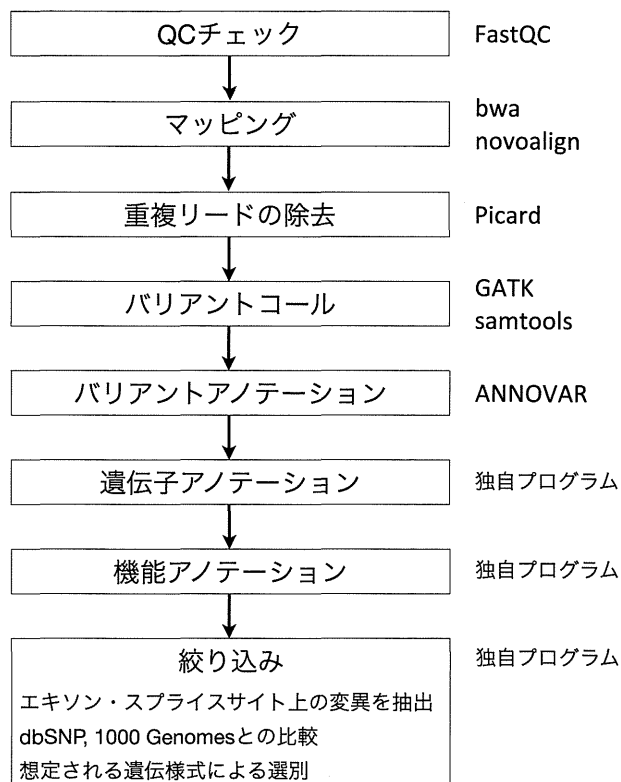


図 1 遺伝子情報解析パイプライン

図1に示した各処理は単一のスクリプトで実行され、それら全体が単一のパイプラインを構成する。実行記録保持のため一連の関連するサンプル群ごとに解析パイプラインを生成しそれを実行する形式を採用した。

本パイプラインの特徴は以下の3点である。

- (1) マッピングおよびバリエントコールについて複数手法の併用により変異の検出感度を向上。
- (2) 複数の遺伝子構造情報データベースを用いることによって偽陰性を削減。
- (3) 遺伝子機能情報が付与された直感的かつ再利用可能な形式での結果の出力。

**(倫理面への配慮)**

本研究における倫理面への配慮については、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」に沿って行う。研究の遂行にあたっては、東北大学における倫理委員会の審査手続きを経て実施する。

**C. 研究結果**

**I. 複数手法併用効果の検証**

本研究で採用した複数手法併用による変異検出の性能を評価するための解析を行った。対象として用いたデータは健常者全血由来のゲノムDNAを断片化し、Agilent社のSureSelectを用いて既知遺伝子のエキソン領域を濃縮したサンプルをIllumina社のGenome Analyzer Iixでpaired-end (片側69塩基)で読み取ったものである。シークエンスの結果得られたリード数は1億リード (5千万リードペア)、標的領域における平均リード深度は67であった。

解析の結果得られたSNVおよびIndelの総数はそれぞれ33432個と5958個であった。各パイプラインで検出された変異の内訳を図2に示す。

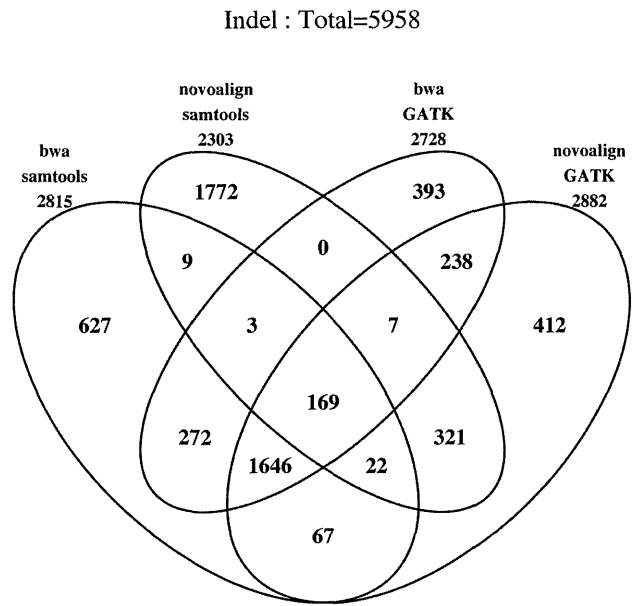
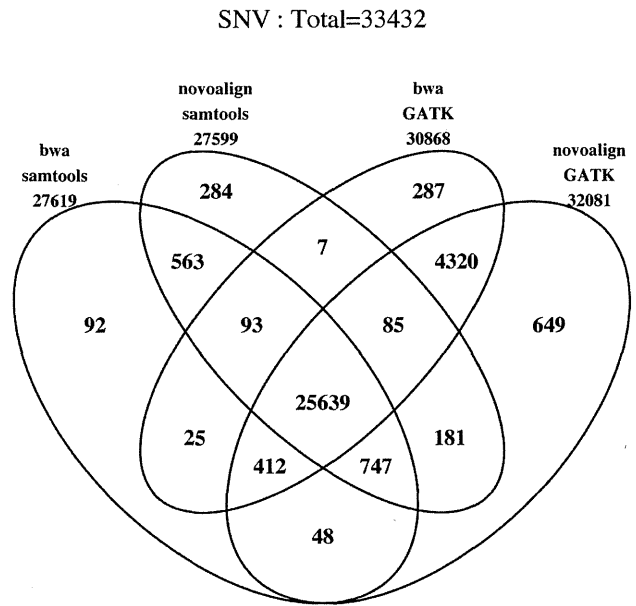


図2 4つのパイプラインで検出された変異の内訳

図2より複数手法の併用によって単一手法のみと比べてより多くの変異が検出されていることが分かる。また今回解析した条件においては、マッピング法による差異よりもバリエントコール法による違いが大きい結果となった。変異の種類別に見た手法間の一致度はSNVに比べてIndelで大きく異なることも明らかとなった。

次に、特定の手法 (bwa + samtools の組み合わせ) でのみ検出された92個の変異と4つの手法全てで共通して検出された25639個の変異のクオリティスコアを比較した。

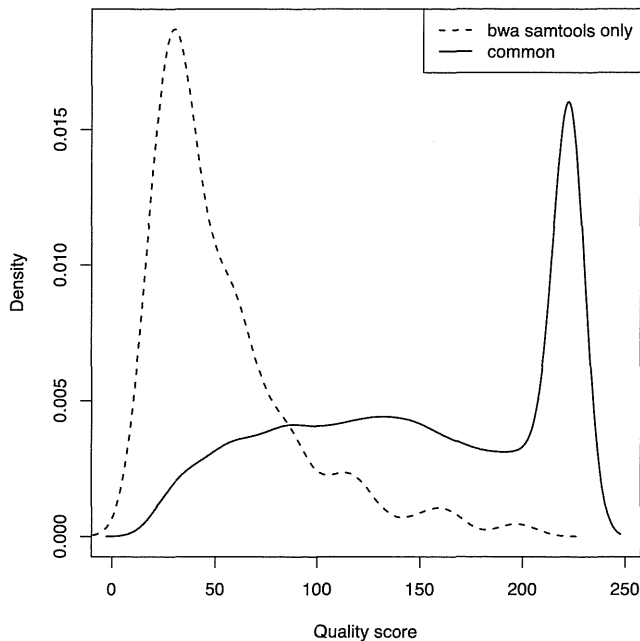


図3 単一手法と複数手法でコールされたSNVのスコアの分布

図3は異なる解析手法で共通して得られる変異のほうがより高いスコアを持つ事を顕著に示している。

以上の結果から、複数の解析手法を併用することでより広範に変異を検出可能であること、それらに基づいて変異リストの優先順位付けが可能であることが明らかとなった。

## II. リード数とSNV検出精度の検討

健康者全血由来のサンプルを用いて行ったエクソーム解析の結果とSNPアレイ (Illumina Human Omni 2.5 Quad) の結果を比較解析によってリード数がSNV検出感度に与える影響を検討した。解析に用いたのはゲノムDNAを断片化しTruSeqを用いて既知遺伝子のエクソン領域を濃縮したサンプルをHiSeq 2000でpaired-end (片側101塩基)で読み取ったものである。

変異検出の精度はシーケンスの結果得られたリード数と密接な関係にあるものと考えられる。そこで、評価のためのデータ取得にあたり、通常よりも多くのリードが得られるように設定の上シーケンスランを実施した。その結果3.63億リードを得た。標的領域における平均リード深度は214である。ここからランダムにダウンサンプリングすることにより、リード数と変異検出精度の関係を実データに基づいて解析した。ダウンサンプリングの結果、標的領域における

平均リード深度46、89、129の3つのサブセットを得た。これに全リード使用時のデータを加え、4つのデータセットについてパイプラインを用いて解析しSNVを同定した。

SNPアレイのデータを正解セットと見なした場合のSNV検出の精度を、リード数との関係で示したのが図4である。

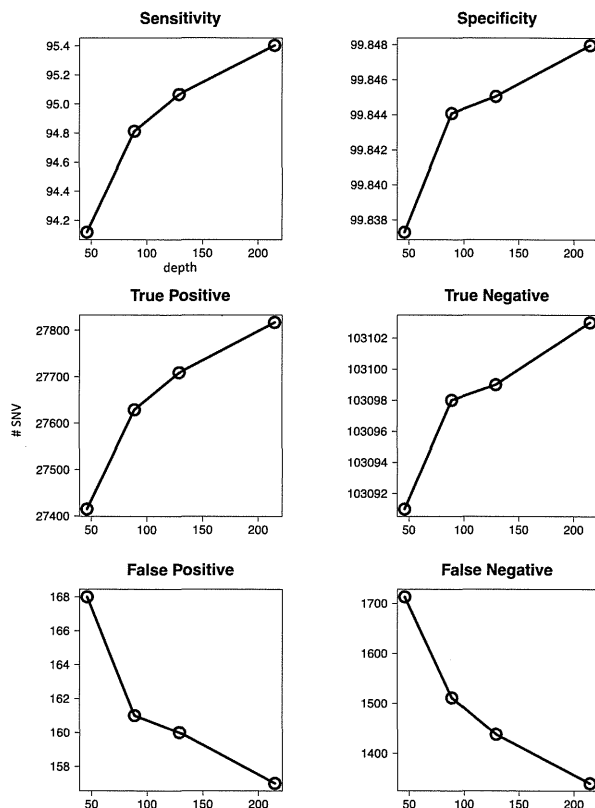


図4 リード数とSNV検出精度

図4よりリード数の増加に伴って感度、特異度ともに増加、偽陽性と偽陰性が減少することが分かる。リード数増加による精度向上は一定ではなく、増加前のリード数に依存する。精度の上昇幅は平均リード深度を46から89へ増加した場合が最大であった。また、リード数の増加による効果が最も顕著にあらわれた指標は偽陰性の低下であった。

## III. 実データ解析

本分担研究で開発した解析パイプラインの性能評価と併行して237サンプル(38ラン)の実データ解析を行い病因の候補と考えられる変異を同定した。その結果に基づいて現在共同研究者が変異リストの検証および疾患との関連についての詳細な解析を行い

論文投稿のための準備を進めている。昨年度までに解析したサンプルに関しては共同研究者が論文発表を行った。

#### IV. 健常者エキソーム解析

これまでに解析を実施したサンプルの内、健常者由来の 38 サンプルを選択し全サンプルを一括してバリアントコールを行った。その結果、RefSeq のエキソン領域内に 65991 個の変異を同定した (SNV 64093 個と Indel 1898 個)。この内 15% (10157 個) が dbSNP と 1000 Genomes の両者で見られない新規の変異であった。新規変異の 25% (全体の 3.8%) に相当する 2528 個が複数のサンプルで同定された変異であり、特に 218 個は 50%以上のサンプルで検出された。これら高頻度に検出されたサンプルは日本人特有に見られる変異の可能性が高いと考えられる。以上の結果は、難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業の成果を基にした原因遺伝子変異データベースの構築研究班へ提供し、他の研究事業において同定された変異とともに Human Genetic Variation Browser で公開されている。

#### D. 考察

本研究では NGS 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を開発した。

性能評価の結果は本パイプラインが高精度に SNV 検出可能であること、複数手法の併用によって変異の検出感度が向上することを示していた。また、リード数と検出精度の間には明確な関係が認められた。必要となるリード数は解析の目的や利用できる検体数、コスト等とのトレードオフによって決定される場合が多い。リード数増加による検出精度の向上の度合いは平均リード深度 100 を超えたあたりから緩やかとなるためここが一つの目安となるものと考えられる。

健常者由来のエキソーム解析の結果から、未だ同定されていない日本人特有の遺伝的多型が多数存在することが示唆された。これらの変異は他の研究事業で得られたデータとの統合解析によってより高精度かつ網羅的に同定されるものと考えられる。

#### E. 結論

本研究では NGS によって得られる配列データから病因の候補となる変異を抽出するために必要な一連のデータ解析を遺伝子情報解析パイプラインとして構築した。本パイプラインを用いた研究成果が報告されており本研究事業における NGS データ解析基盤として一定の役割を果たしたと考えられる。微調整によって解析目的に応じた最適化が可能であること、実際に基づいた利用法を明文化したことから本研究で開発した解析パイプラインは本研究事業終了後も解析目的に応じた利用が可能である。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 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. *Human Molecular Genetics*, 23(4):992-1001, 2014
- 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 SI, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-Function Mutations in RIT1 Cause Noonan Syndrome, a RAS/MAPK Pathway Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 93(1):173-180, 2013.
- 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. *Journal of Human Genetics*, 58(5):159-266, 2013
- 高感度に多型を検出するためのエキソーム・シーケンシング. 舟山亮, 長嶋剛史, 中山啓子. 実験

医学. 30(4):629-634, 2012

2. 学会発表

特に無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

## 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

研究分担者 新堀 哲也 東北大学大学院医学系研究科 助教

## 研究要旨

次世代シーケンサーを駆使し、新規疾患原因遺伝子同定を目指したエクソーム解析を行った。原因不明の皮膚疾患 X、先天性血小板減少症、低 Ca 血症・鼻咽頭閉鎖不全・特徴的顔貌を呈する家系、Noonan 症候群の解析を行い、Noonan 症候群で新規の、先天性血小板減少症、低 Ca 血症・鼻咽頭閉鎖不全・特徴的顔貌を呈する家系では既知の原因遺伝子同定に成功した。

## 研究協力者

井泉 瑠美子（東北大学医学系研究科 大学院生）

矢尾板 全子（東北大学医学系研究科 大学院生）

西山 亜由美（東北大学医学系研究科 大学院生）

## A. 研究目的

本研究に対する科学研究費補助金を元に東北大学に設置された次世代シーケンサーを用いて、遺伝性難病の新規疾患原因遺伝子の同定を目指した。新規原因遺伝子の発見により、難病の病態解明および治療法開発の第一歩となりうる。また、遺伝カウンセリングに役立つ可能性がある。

## 1) 原因不明の皮膚疾患 X

皮膚疾患 X は、若年成人に発症する疾患であり、性差（男<女）が存在することが知られている疾患である。孤発例が存在する一方、常染色体優性遺伝形式が疑われる家系例が存在する。2010 年代に入り、家系例を用いた解析での染色体上の 10cM 以下の領域への連鎖が他の研究グループから報告された。そこで患者検体を用いたエクソーム解析を行い、疾患の原因遺伝子変異の同定を試みた。

## 2) 先天性血小板減少症

先天性血小板減少症は、血小板の大きさや、合併症などから分類される。病因遺伝子変異が同定されていなかった先天性血小板減少症の 2 家系においてエクソーム解析を行った。

## 3) 低 Ca 血症、鼻咽頭閉鎖不全、特徴的顔貌を呈す

る家系

本研究班の浜松医大・緒方勤教授と連携し、上記疾患の原因遺伝子同定を目指しエクソーム解析を行った。

## 4) Noonan 症候群

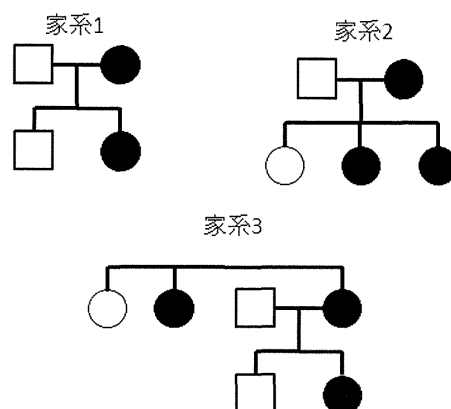
Noonan 症候群は低身長、特異的顔貌、心奇形、精神運動発達遅滞などを伴う症候群である。2001 年以降、類縁疾患を含めた原因遺伝子は 11 遺伝子報告されているが、患者においてこれらを解析しても 3 割では遺伝子変異が同定されず、新規原因の存在が示唆されていた。本研究班の東北大学青木洋子准教授と連携し、既知遺伝子変異陰性患者のエクソーム解析を行い、新規原因遺伝子同定を試みた。

## B. 研究方法

## 1、対象

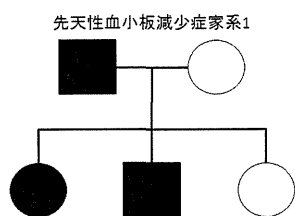
インフォームドコンセントを得た患者および血縁者の末梢血、病変部位から DNA を抽出した。

皮膚疾患 X では 5 家系うち孤発例 2 例（病変部検体から 2 箇所ずつ 4 検体）、家族例 3 家系。合計 17 人、病変部位 4 箇所の 21 検体を解析対象とした。家系図



記載の個人は全員解析した。

先天性血小板減少症では家系1は家系内に3人患者



がおり、健常者2人を含め解析した。家系2は両親健常の孤発例であり、両親と患者の3人を解析対象とした。

低Ca血症、鼻咽頭

閉鎖不全、特徴的顔貌を呈する家系では、患者5人、血縁の健常者3人を解析対象とした。

Noonan症候群では患者14人を対象とした。

## 2、エクソーム濃縮

患者DNAを元に、Agilent社 SureSelect Human All exon kit (Illumina用)を用いてエクソーム濃縮とライブラリ調製を行った。

## 3、次世代シーケンサーでの解析

Illumina社 HiSeq2000を用いて101×2塩基のペアエンド解析も行った。得られたデータはBWA、novoalign、GATK、samtools、VarScan等を用いて解析した。

## 4、遺伝子変異絞り込み

皮膚疾患X、先天性血小板減少症家系1および低Ca血症、鼻咽頭閉鎖不全、特徴的顔貌を呈する家系では家系内患者に共通して存在し、非罹患者には存在しない変異を抽出した。家系2ではde novo変異を抽出した。Noonan症候群では患者で共通して変異を持つ遺伝子を探索した。

## (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。本研究は、すでに東北大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

皮膚疾患Xでは17人に3,187,236のバリエントを同定した。うち、エクソン領域およびエクソンから2塩基以内のイントロンに存在したのは58,635であった。家族例の家系1において患者に存在し、非罹患者に存在する、非同義置換、欠失、挿入、イントロン・エクソン境界から2塩基以内のイントロンの変異は678、1000ゲノムプロジェクトまたは京都大学登録の

日本人エクソームデータベースに未登録またはアレル頻度1%以下のものは92であった。同様の絞り込みにおいて家系2では46、家系3では35に絞られた。

3つの家系に共通して変異が存在する遺伝子は存在しなかったが、2家系に共通して変異の存在する遺伝子は3つであり、これらのうちの2つは多型の多い遺伝子であった。1つの遺伝子が残ったが、孤発例2例には、この遺伝子に変異は認められなかった。また、いずれの家系においても、前述の既報の連鎖領域には病因候補バリエントは認められなかった。次に孤発例の病変部位での体細胞変異を探索し、その変異遺伝子に生殖細胞変異が存在する場合は家族例となるのではないかとの仮説を持ち、絞り込みを行った。2例から採取した4検体において、4検体共に共通して変異の同定された遺伝子はなかった。また、3検体に共通して変異が同定された遺伝子は1つ、2検体に共通して変異が同定された遺伝子は26であった。3検体に共通して変異が同定された遺伝子には、今回解析した患者の血液検体において変異は同定されていなかった。

先天性血小板減少症家系1においては、RUNX1遺伝子にスプライシング異常変異が同定された。家系2においては11のde novo変異候補を同定した。キャピラリーシーケンサーでの確認等解析を続けている。

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は、患者にのみ存在し、健常血縁者、dbSNP、1000ゲノムおよび自験例に存在しない変異であり、非同義置換、欠失、挿入、イントロン・エクソン境界から2塩基以内のイントロンの変異は9つに絞られた。そのうちTBX1遺伝子のフレームシフト変異が文献的にも病因と考えられた。

Noonan症候群においては、エクソーム解析を行った14人中4人において、RIT1遺伝子に共通して変異を有していた。症例を追加し機能解析を加え論文発表を行った。

## D. 考察

皮膚疾患Xにおいては、家系内の患者に存在し、被罹患者には存在しない変異を抽出した。しかし疾患の特徴として性差が大きいことから、血縁男性での不完全浸透も考慮する必要が考えられた。また、原因が単一の遺伝子における低頻度のバリエントで、エクソ

ーム解析で変異が同定できていると仮定すると、該当する遺伝子が存在しなかったことから、

1、単一遺伝子病ではあるが原因遺伝子が単一ではない可能性

2、多因子遺伝の可能性

3、エクソームでは検出できない大きな欠失・挿入・構造異常やターゲット領域外に原因が存在する可能性

などが考えられた。候補遺伝子を病因と決定するためには更なる解析や症例の蓄積が必要である。

先天性血小板減少症および低Ca血症、鼻咽頭閉鎖不全、特徴的顔貌を呈する家系では、新規原因遺伝子の関与を疑い解析を開始したが、既知の原因遺伝子の同定に成功した。診断の目的においてもエクソーム解析は有用であることが示された。

Noonan 症候群においては、これまで既に多数の原因遺伝子が同定されており遺伝的異質性の存在は明らかであったので、それを念頭に置き解析を行うことで新規原因遺伝子同定に成功できた。

## E. 結論

エクソーム解析により、新規疾患原因遺伝子の同定を試みた。Noonan 症候群では新規疾患原因遺伝子の同定に成功した。他2疾患では既知の原因遺伝子の同定に成功した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1: Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashima S, Kato F, Fukami M, 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 (accepted)

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. 2013 Jul 11;93(1):173-80. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.021. Epub 2013 Jun 20.

3: Ninomiya M, Kondo Y, Niihori T, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Sequential analysis of amino acid substitutions with hepatitis B virus in association with nucleoside/nucleotide analog treatment detected by deep sequencing. Hepatol Res. 2013 May 24. doi: 10.1111/hepr.12168.

4: 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 May; 58(5):259-66. doi:10.1038/jhg.2013.9. Epub 2013 Feb 28.

5: Wakusawa K, Kobayashi S, Abe Y, Tanaka S, Endo W, Inui T, Iwaki M, Watanabe S, Togashi N, Nara T, Niihori T, Aoki Y, Haginoya K. A girl with Cardio-facio-cutaneous syndrome complicated with status epilepticus and acute encephalopathy. Brain Dev. 2014 Jan;36(1):61-3. doi: 10.1016/j.braindev.2012.12.007. Epub 2013 Jan 20.

5: 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

### 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 2013年10月22-26日 American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting (米国・ボストン)  
R. Izumi, T. Niihori, Y. Aoki, N. Suzuki, M. Kato, H. Warita, T. Takahashi, M. Tateyama, T. Nagashima,



R. Funayama, K. Abe, K. Nakayama, M. Aoki, Y. Matsubara. A mutation in A-band titin is associated with hereditary myopathy with early respiratory failure in a Japanese family.

2. 2013年10月22-26日 American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting (米国・ボストン)  
T. Niihori, Y. Aoki, T. Banjo, N. Okamoto, S. Mizuno, K. Kurosawa, T. Ogata, F. Takada, M. Yano, T. Ando, T. Hoshika, C. Barnett, H. Ohashi, H. Kawame, T. Hasegawa, T. Okutani, T. Nagashima, S. Hasegawa, R. Funayama, T. Nagashima, K. Nakayama, S. Inoue, Y. Watanabe, T. Ogura, Y. Matsubara. Exome sequencing identifies mutations in a novel gene in patients with Noonan syndrome.

3. 2013年11月20-23日 日本人類遺伝学会 第58回大会(仙台) 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スによる Noonan 症候群新規原因遺伝子 RIT1 の同定

4. 2013年11月20-23日 日本人類遺伝学会 第58回

大会(仙台) 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、豎山 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 Myofibrillar myopathy の大家系における次世代型シーケンサーを用いた新たな原因遺伝子の同定

5. 2013年11月20-23日 日本人類遺伝学会 第58回大会(仙台) 緒方 勤、田中 紀子、河井 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

#### 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

## 血清中微量 RNA の次世代シーケンス解析

研究分担者 舟山 亮 東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センター  
細胞増殖制御分野 助教

## 研究要旨

原発性胆汁性肝硬変 (Primary Biliary Cirrhosis, PBC) は原因不明の難病で、その病態解明と早期の診断法の確立が急務である。次世代シーケンサーを用いたサンプル中の微量核酸の解析技術は、疾患の病態解明と診断方法の開発に有用である。そこで本研究では、まず、C型肝炎罹患者の血清に存在する微量の肝炎ウイルスのRNAを、次世代シーケンサーを用いて同定する解析系を構築した。次にこの解析系を応用して、血清中の microRNA を網羅的に同定する手法を構築した。この手法を用いて、PBC 罹患者と健常者の血清に含まれる microRNA を解析し、PBC 罹患者で特異的に発現が低下している4種類の microRNA を同定した。本研究により、microRNA をバイオマーカーとして用いた PBC の新しい診断方法の開発が進むとともに、microRNA の標的遺伝子の機能解析を通して PBC の病態が解明されることが期待される。

## A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は、肝臓の炎症により肝内胆管が破壊され、胆汁が肝臓内に停滞して肝硬変へと進行する疾患である。自己免疫反応が関与していることが明らかになりつつあるが原因は不明で、特定疾患に指定されており、その病態解明と早期の診断法の確立が急務である。

次世代シーケンサーは、10億個以上という大量のDNA断片の塩基配列を並列に解読できる機器で、遺伝子変異解析や比較ゲノム解析に利用されている。この大量のDNA断片を読み取る技術を利用すると、サンプル中に微量に存在する未知の核酸の塩基配列を高感度に決定できる。これは、既知の塩基配列の核酸の有無を高感度に検出できるPCR法よりも優れた微量核酸の解析技術である。そこで本研究では、1) 次世代シーケンサーを用いて血清中に存在する微量の核酸を解析する技術を確立し、2) この技術を利用してPBCの罹患者で特徴的な発現パターンを示すmicroRNAを同定することを目的とした。

## B. 研究方法

次世代シーケンサーを用いた血清中微量核酸の解析技術を確立するために、C型肝炎罹患者と健常者の血清800 µlから、Trizol LSを用いてtotal RNAを精製した。これを二本鎖DNAに変換後、DNA断片の両端にシーケンス解析のためのアダプター配列を付加して、シーケンスライブラリを作製した。ライブラリの塩基配列は次世代シーケンサーGenome Analyzer IIxを用いて決定した。読み取った配列の情報解析では、まず、宿主(ヒト)由来のリードを除き、残ったリードをC型肝炎ウイルスの配列データにマッピングして、ウイルスゲノムの多様性を解析した。

PBC罹患者のmicroRNAの解析では、PBC罹患者(10名)、B型肝炎罹患者、C型肝炎罹患者、および健常者(各5名)の4種類の血清からtotal RNAを精製し、上記の方法で配列を読み取った。読み取った配列は、microRNAの配列データベース(miRBase)にマッピングし、各microRNAの発現量を算出した。また、検体間で発現量が変動しているmicroRNAを抽出し、その変動パターンをクラスタリング解析により分類して、PBC罹患者で特徴的な発現パターンを示すmicroRNAを探索した。同定したmicroRNAの発現は、Taqmanプ

ローブ (Life Technologies) または miRCURY LNA microRNA PCR system (Exiqon)を用いた RT-qPCR により確認した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号) に沿って実施した。また、東北大学における倫理委員会の審査手続きを経て実施した (受付番号 2010-404)。本研究の対象者からは文書による同意を得た。

### C. 研究結果

次世代シーケンサーを用いた血清中微量核酸の解析技術を確立するために、まず、C型肝炎罹患者2例と健常者1例の血清を解析し、罹患者で特異的に肝炎ウイルス由来のRNAを検出できるか評価した。その結果、C型肝炎ウイルスゲノムの99%以上をカバーする6000~8000の肝炎ウイルス由来のリードを罹患者検体で検出した。このようなリードは健常者由来の検体では検出されず、その特異性が示された。また、罹患者で検出されたウイルス由来RNAの配列を詳細に解析した結果、インターフェロン応答性に影響する2つのアミノ酸 (Arg70 と Met91) に変異をもつ配列が18%存在し、ウイルスゲノムの多様性が示された。

そこで、この解析技術を用いて原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の罹患者の血清を解析した。次世代シーケンサーを用いて読み取った、PBC、B型肝炎、C型肝炎および健常者の血清 microRNA を miRBase にマッピングした結果、1,594種類のmicroRNAが検出された。このうち複数の検体で検出された773種類について発現量を算出し、検体間で発現変動を示した191種類のmicroRNAを抽出した。さらに、これら191種類の発現変動のパターンをクラスター解析により分類し、PBCで特徴的な発現パターンを示すmicroRNAを同定した。

同定したmicroRNAの血清中での発現量をRT-qPCRにより解析した結果、has-miR-505-3p と has-miR-197-3p を含む4種類のmicroRNAの発現量がPBCで特異的に低下していた。また、この4種類のmicroRNAの標的遺伝子を、TargetScan 6.2 と TargetSpy database を用いて探索し、transmembrane

protein 133 と zinc finger protein 462 を含む42種類の遺伝子を見出した。

血清中の核酸は極めて微量のため、構築した解析系では20~25サイクルのPCR増幅が必要であった。この過剰なPCR増幅のために、検出した核酸の定量性がやや低いことが課題となった。そこでこの課題を克服するために、市販されている複数のライブラリ作製試薬の反応効率を検証した。その結果、NuGEN社の試薬を使用すると、初発500pgのDNAから15サイクルのPCR増幅でシーケンス解析可能なライブラリを構築できることが明らかになった。この試薬を用いれば、PCRバイアスを最小限に抑えた定量的な解析が可能になると考えられた。

### D. 考察

血清中の微量核酸の次世代シーケンス解析は、疾患の病態解明や診断マーカーの探索に有用な手法である。本研究で我々はC型肝炎罹患者の血清を用いて、サンプル中の微量核酸を特異的に解析するシステムを構築し、ウイルス由来核酸の検出に成功した。また、この技術を応用して、血清中のmicroRNAの発現量を解析するシステムを構築した。反応効率の高い試薬を用いてライブラリを作製することで、定量性の高い発現解析が可能になるだろう。

PBC、B型肝炎、C型肝炎および健常者の血清を用いてmicroRNAの発現パターンを比較し、PBCで特異的に発現が低下している4種類のmicroRNAを同定した。これらのmicroRNAはPBCの診断マーカーとして利用できる可能性があり、さらに多くの検体を解析することで、マーカーとしての特異性を検証する予定である。また、microRNAの配列から標的遺伝子を予測した結果、これらのmicroRNAは42種類の遺伝子の発現を制御している可能性が考えられた。この中には、transmembrane protein 133 や zinc finger protein 462 など、PBCの病態への寄与が考えられる遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子の機能解析を通して、PBCの病態解明が進むと期待される。

### E. 結論

本研究では、C型肝炎罹患者の血清を使用し、血清中に存在する微量のウイルスRNAを次世代シーケ

ンスにより同定する解析系を構築した。また、この解析系を応用して、血清中の microRNA を網羅的に同定する手法を確立した。この手法を用いて、PBC 罹患者と健常者の血清に含まれる microRNA を解析し、PBC 罹患者で特異的に発現が低下している 4 種類の microRNA を同定した。本研究により、microRNA をバイオマーカーとして用いた PBC の新しい診断方法の開発が進むとともに、microRNA の標的遺伝子の機能解析を通して PBC の病態が解明されることが期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

[舟山亮](#). ChIP-seq 解析をはじめの人のために-ENCODE の ChIP-seq 解析ガイドライン-. *実験医学増刊.* 2013;31(2):201-5.

Hosogane M, [Funayama R](#), Nishida Y, Nagashima T, Nakayama K. Ras-Induced Changes in H3K27me3 Occur after Those in Transcriptional Activity. *PLoS Genet.* 2013 Aug;9(8):e1003698.

中山啓子, [舟山亮](#). Illumina 社製シーケンサーの特徴と可能性. *肝胆膵.* 2013;67(1):25-33.

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.* 2013;8(6):e66086.

Nakanome A, Brydun A, Matsumoto M, Ota K, [Funayama R](#), Nakayama K, Ono M, Shiga K, Kobayashi T, Igarashi K. Bach1 is critical for the transformation of mouse embryonic fibroblasts by Ras(V12) and maintains ERK signaling. *Oncogene.* 2013 Jul 4;32(27):3231-45.

Sun SL, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, [Funayama R](#), Kondo M, Saitsu H, Matsumoto N, Nakayama K, Ishii N. Y chromosome-linked B and NK cell deficiency in mice. *J Immunol.* 2013 Jun 15;190(12):6209-20.

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](#), 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 Jul 11;93(1):173-80.

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 May;58(5):259-66.

Hirotsu Y, Katsuoka F, [Funayama R](#), Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, Engel JD, Yamamoto M. Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res.* 2012 Nov 1;40(20):10228-39.

Ninomiya M, Ueno Y, [Funayama R](#), Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Kimura O, Nakayama K, Shimosegawa T. Use of illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis