

201331005A

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）

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

平成25年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 直通

(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成26（2014）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告		
遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築-----	1	
松本直通		
II. 分担研究報告		
1. 遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築	11	
池川志郎		
2. 次世代シーケンスデータ解析	15	
高橋篤		
3. ゲノム研究倫理と網羅的エクソーム解析の対象症例の集積	17	
福島義光		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	27



平成25年度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））  
総括研究報告書

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

本研究は、特に遺伝性難治疾患を対象に、網羅的全エクソーム解析により原因遺伝子を解明することを目的とする。遺伝性難治疾患の原因遺伝子解明は、低頻度で孤発例が多く従来型の連鎖解析が適応できない、責任遺伝子の点変異が原因の場合も多くマイクロアレー解析が有用でないなど技術的な壁が存在した。次世代シーケンス解析は点変異から染色体微細欠失まであらゆるゲノム上の変化の検出が可能で、遺伝性難治疾患の解明が一気に進むと考えられる。平成 23 年度に、高出力次世代シーケンサー1台と多サンプル処理用エクソームロボットを、平成 24 年度は高出力次世代シーケンサー一台を追加導入し、次世代シーケンス拠点としての環境を整備・強化した。平成 25 年度にはこの環境を生かし SENDA (Nat Genet, 2013)、SEMD-JL1 (Am J Hum Genet, 2013)、ネマリンミオパチー (Am J Hum Genet, 2013)、難治性てんかん (Am J Hum Genet, 2013) などの新規責任遺伝子同定を行った。さらに情報解析は、変異検出感度の高いインフォーマティクスフローを確立、エクソームデータ解析からバリエーション候補の検出を効率よくすすめることが可能であった。

分担研究者

池川志郎・理化学研究所統合生命医科学研究センター・チームリーダー

高橋篤・理化学研究所統合生命医科学研究センター・チームリーダー

福嶋義光・信州大学医学部遺伝医学予防医学講座・教授

A. 研究目的

本研究は、特に遺伝性難治疾患を対象に、網羅的全エクソーム解析により原因遺伝子を解明することを目的とする。

遺伝性難治疾患の原因遺伝子解明は、低頻度で孤発例が多く従来型の連鎖解析が適応できない、責任遺伝子の点変異が原因の場合も多くマイクロアレー解析が有用でない

など技術的な壁が存在した。次世代シーケンス解析は点変異から染色体微細欠失まであらゆるゲノム上の変化の検出が可能で、遺伝性難治疾患の解明が一気に進むと考えられる。

平成23~25年度にかけて、拠点整備と効率化したインフォーマティクス解析の策定を行い大量のサンプル処理を可能とし、集積した症例のエクソーム解析で疾患原因を解明することを目標に研究を進めた。

B. 研究方法

① 症例集積と他の研究班との連携

骨系統疾患コンソーシアム（池川）・胎児骨系統疾患ネットワーク（池川）、臨床遺伝ネ

ネットワーク（松本・福嶋）などを通じ症例を集積した。既に実績と定評のある専門家ネットワークを通じて正確な診断が成され、かつ詳細な臨床情報を得られる症例群を多数集積する。このプロセスを得た質の高い症例を全エクソーム解析することで遺伝子異常を同定する確率が飛躍的に向上する。さらに本事業の一般研究班や難治性疾患克服研究事業奨励研究分野の既存班並びにその流れを汲む研究者と連携し症例を集積・解析を進めた。

## ② 全エクソーム解析

Agilent 社の SureSelect 等を用いてヒトゲノム全遺伝子のエクソン領域のみを分画し、Illumina 社 HiSeq2000 および HiSeq2500 を用いてペアエンドシーケンスを行う。現行試薬における HiSeq2000/2500 のシーケンス産出キャパシティーは、101 bp ペアエンドシーケンス法で1台1ラン600 Gbで64-96サンプルのエクソーム解析が可能であり月に200サンプルのエクソーム処理が可能な状況であった。

## ③ 次世代シーケンスデータ解析

次世代シーケンス算出データから遺伝子変異同定するための効率的な解析フローを策定、これを用いて解析データから疾患に関連する変異を特定する。

## ④ 次世代シーケンスデータの検証

対象とする遺伝性疾患の想定発症モデルに沿って次世代シーケンスで検出した遺伝子異常、稀な SNP 候補群を症例および家族構成員のゲノム DNA を用いて、PCR・キャピラリーシーケンス等で検証していく。検出

した塩基変化を臨床遺伝学的見地に基づき様々な角度から評価する。

⑤ 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討  
本研究で変異が明らかになった症例についての詳細な臨床情報を分析し、遺伝子変異が惹起する臨床病型を明らかにし変異が及ぼす機能的影響を種々の実験系にて検証する。

## ⑥ 次世代データ解析プロトコール

オープンリソースあるいは有料リソースの解析ソフト（マッピングツール、アノテーションツール）を比較検討し効率的かつ効果的な解析系を確立する。

## C. 研究結果

### ① 症例の集積

症例集積は順調に進行し精神遅滞関連症候群150例やてんかん関連症候群720例が蓄積した。一般班である長谷川班、岩本班、西野班やAicardi症候群・孔脳症・Coffin-Siris症候群・ATR-X症候群・Sotos症候群・運動過剰症候群・血管型Ehlers-Danlos症候群・Kabuki症候群・ゲノムコピー数異常などの難治性疾患奨励研究あるいはその流れをくむ研究グループから多数症例提供を受けた。

### ② 全エクソーム解析

HiSeq2000・HiSeq2500 並びに 96 サンプルを処理するエクソームロボットを導入し、最大で月に 200 サンプル超のエクソーム解析が可能となりこれまでに 3500 例を超えるエクソーム解析が行われた。

### ③・④・⑤次世代シーケンスデータ解析・ 検証・臨床病型との検討

エクソーム解析によって SENDA、ネマリンミオパチー、SEMD-JL1、難治性てんかん等の原因が明らかになった。以下、概略を述べる。

#### I. SENDA

SENDA は、脳内鉄沈着神経変性症の一つであり、小児期早期からの非進行性の知的障害と、成人期に急速に進行する錐体外路症状（ジストニアやパーキンソン様症状）、認知症を呈する神経変性疾患である。SENDA を呈する 2 家系（患者 1 名ずつ）に全エクソーム解析を行い、両患者に共通して *WDR45* 遺伝子のデノボ変異を認めました。さらに追加の 3 名の患者について変異解析を行い、すべての患者で *WDR45* 遺伝子変異を認めました。*WDR45* 遺伝子は、オートファジー（自食作用）に必須の分子である酵母 *Atg18* のヒト相同遺伝子である *WIPI4* タンパク質をコードしている。患者由来のリンパ芽球を用いた解析により、*WIPI4* タンパク質の発現が著しく減少しており、オートファジー活性の低下とオートファゴソームの形成異常が認められた（*Nat Genet* 2013）。本研究はオートファジーの異常が神経変性疾患を引き起こすヒトにおける初めて知見である。

#### II. ネマリンミオパチー

常染色体劣性遺伝形式をとり、胎児期より寡動・羊水過多など来たり、出生後も呼吸不全・嚥下困難などの最重症の経過をとる重症型ネマリンミオパチーを呈した 1 家系

の全エクソーム解析を行い、*KLHL40* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を同定した。一般班の西野班と連携し、フィンランド、オーストラリア、アメリカとの国際共同研究に発展、重症ネマリンミオパチーの 143 家系の解析で 28 家系（19.6%）に本遺伝子変異が同定された。よって *KLHL40* 変異が多民族にわたり重症ネマリンミオパチーの高頻度な原因とであることを明らかにした（*Am J Hum Genet*, 2013）。

#### III. SEMD-JL1

脊柱の変形や関節の脱臼など、重度の骨格異常を起こす原因不明の遺伝性難治疾患である関節弛緩を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症 I 型（SEMD-JL1）の患者 6 家系の全エクソーム解析により、*B3GALT6* 遺伝子の変異を発見、その酵素機能が喪失していることを見いだした。細胞と細胞の間を埋める基質の主要な構成成分であるプロテオグリカン（PG）はタンパク質（コアタンパク質）と数本～百本程度のグリコサミノグリカン（GAG）という糖鎖が結合領域を介して連結している。結合領域の合成に必要な酵素が *B3GALT6* タンパク質である。*B3GALT6* 遺伝子の機能障害で GAG 結合領域が正常に合成できないと、骨、軟骨、靭帯、皮膚など多様な組織で異常を引き起こすことが明らかとなり GAG 結合領域病という新たな疾患概念を提起するものである（*Am J Hum Genet*, 2013）。

#### IV. 難治性てんかん

難治性てんかん 379 例を対象に、全エクソーム解析を利用して 4 名に *GNAO1* の変異を認めた。4 名の患者は、難治性のてんか

んに加えて、知的障害、運動発達障害を呈し、うち2名には、意図しない異常運動が起こる不随意運動を認めた。GNAOI 遺伝子からは、神経細胞における細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たすことが知られている3量体Gタンパク質3)の $\alpha$ サブユニット( $G\alpha_o$ )が作られる。3量体Gタンパク質の立体構造モデルにおいて、4つの変異はタンパク質構造を不安定にする、あるいはシグナル伝達の障害を引き起こすことが示唆され、変異 $G\alpha_o$ 発現細胞では、細胞内での発現部位の変化とカルシウム電流の抑制障害が示唆された。本研究は、難治性てんかんの減遺伝子発見にとどまらず、細胞内シグナル伝達の障害という新しいてんかんの発症メカニズムを強く示唆するものである(Am J Hum Genet, 2013)。

#### ⑦ 次世代データ解析プロトコール

Novoalign/GATKをマッピングツールとしてアノテーションにはANNOVARを組み合わせた効率的なエクソーム解析フローを確立、これまでに3500例を超えるエクソーム解析を終了し多数の疾患遺伝子異常同定に効果を上げている。

#### D. 考察

全エクソーム解析を用いて遺伝性疾患の原因解明を少なくとも複数の疾患で行うことが出来た。一方で、明らかな原因特定に至らない症例も多数残されており、全エクソーム解析が万能ではないことは明らかである。未解決の症例については、全エクソーム以外のアプローチを考慮する必要がある

と考える。

#### E. 結論

メンデル遺伝性疾患を解析対象にした次世代シーケンス拠点として解析環境を整備し、エクソーム解析において複数の原因未解明の疾患において責任遺伝子を単離した。情報解析系でも大量解析系への対応も可能と成りエクソーム解析拠点としての研究が順調に進行している。

#### F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Yamashita S, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Iai M, Aida N, Tanaka Y. Neuropathology of Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement and High Lactate caused by a homozygous mutation of DARS2. Brain Dev 35(4):312-316, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.007.
- Tsurusaki Y, \*Kosho T (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitu H, 1 Miyake N, \*Matsumoto N (\*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFDI* mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. Clin Genet 83 (2): 1235-144, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori F, Yamazaki A, Subo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, \*Saitu H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly.

- Ann Neurol 73(1): 48-57, 2013. doi: 10.1002/ana.23736.
- Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Miyake N, Saitsu H, \*Matsumoto N. A de novo deletion at 16q24.3 involving *ANKRD11* in a Japanese patient with KBG syndrome. Am J Med Genet Part A 161A(5): 1073-1077, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35661.
- \*Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, Sasaki M, Iwasaki T, Matsumoto N, Ishii M, Saitsu H. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to SPTAN1 gene mutation. Brain Dev 35(3): 280-283, 2013. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.002.
- Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi H, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, \*Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. J Hum Genet 58(2): 113-115, 2013. doi: 10.1038/jhg.2012.117.
- Higashiyama Y, \*Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ohba C, Fukai R, Miyatake S, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. A novel homozygous *SCARB2* mutation causes late-onset progressive myoclonus epilepsy without renal failure. Mov disord 28(4): 552-553, 2013. doi: 10.1002/mds.25296.
- \*Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, \*Matsumoto N (\*: co-corresponding). *KDM6A* point mutations cause Kabuki syndrome. Hum Mut 34(19): 108-110, 2013. doi: 10.1002/humu.22229.
- Kondo Y, Koshimizu E, Megarbane A, Hamanoue H, Okada I, Nishiyama K, Kodera H, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Doi H, Miyake N, Saitsu H, \*Matsumoto N. Whole-exome sequencing identified a homozygous FNBPA mutation in a family with a condition Microphthalmia with Limb Anomalies-like. Am J Med Genet Part A 161A: 1543-1546, 2013.
- Kimura-Ohba S, Kagitani-Shimono K, Hashimoto N, Nabatame S, Okinaga T, Murakami A, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Hojo K, Tomita R, Taniike M, \*Ozono K. A case of cerebral hypomyelination with spondylo-epi-metaphyseal dysplasia. Am J Med Genet Part A 161A(1): 203-207, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35686.
- \*Miyake N<sup>#</sup>, Yano S<sup>#</sup> (# denotes equal contribution), Sakai C, Hatakeyama H, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, \*Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. Hum Mut 34(3): 446-452, 2013. doi: 10.1002/humu.22257.
- \*Saitsu H<sup>#</sup>, Nishimura T<sup>#</sup>, Muramatsu K<sup>#</sup> (# denotes equal contribution), Kodera H, Kumada S, Sugai K, Kasai-Yoshida E, Sawaura N, Nishida H, Hoshino A, Ryujin F, Yoshioka S, Nishiyama K, Kondo Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Arakawa H, Kato M, \*Mizushima, \*Matsumoto N (\*: co-corresponding). *De novo* mutations in the autophagy gene *WDR45* cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. Nat Genet 45(4): 445-449, 2013. doi: 10.1038/ng.2562.
- Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Sato H, Nakabayashi J, Ban T, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, \*Tamura T. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in the monocyte differentiation program. Blood 121(10): 1839-1849, 2013. doi: 10.1182/blood-2012-06-437863.
- Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Lee BJ, Nishiyama K, Mitsuko Nakashima<sup>1</sup>, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kim JH, Yu YS, \*Matsumoto N. Pathogenic mutations in two families with congenital cataract identified by whole-exome sequencing. Mol Vis 19: 384-389, 2013
- Vergano SS, Santen G, Wieczorek D, Wollnik B, Matsumoto N, Deardorff MA: Coffin-Siris Syndrome (April 2013) in: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, Seattle, 1997-2013. Available at <http://www.genetests.org>. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK131811/>)
- Yokoo N, Marumo C, Nishida Y, Iio J, Maeda S, Nonaka M, Maihara T, Chujoh S, Katayama T, Sakazaki H, Matsumoto N, Okamoto N. A case of Toriello-Carey syndrome with severe congenital tracheal stenosis. Am J Med Genet Part A 161(9):2291-2293, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.35861.
- Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragán DE, Villarroel CE, Ohfu M, Writzl K, Stražišar BG, Hirabayashi S, Chitayat D, Reid DM, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K,

- \*Matsumoto N, \*Saitu H (\* denotes co-corresponding). Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 81(11):992-998, 2013
- Koshimizu E#, Miyatake S# (# denotes equal contribution), Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Matsumoto N. Performance Comparison of Bench-top Next Generation Sequencers Using Microdroplet PCR-Based Enrichment for Effective Targeted Sequencing in Patients with Autism Spectrum Disorder. *Plos One* 8(9): e74167. doi: 10.1371/journal.pone.0074167
- Fukai R, Ochi N, Murakamia A, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, \*Matsumoto N, \*Miyake N. Co-occurrence of 22q11 deletion syndrome and HDR Syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(10):2576-2581, 2013.
- \*Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitu H, Miyake N, \*Matsumoto N (\*: co-corresponding). Clinical consequences of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 161(6):1221-1237, 2013.
- Iida A, Nobuhiko Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, \* Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel *INPPL1* mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet* 58(6):391-394, 2013.
- Nakajima M,# Mizumoto S,# Miyake N,# (# denotes equal contribution) Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis R, Chitayat D, Howard A, Ferraz-Leal G, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Superti-Furga A, Ohashi H, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S\*. Mutations in *B3GALT6*, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* 92(6):927-934, 2013.
- Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu Y, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskiniemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma T, Beckmann JS, Ikegawa I, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and *NEK2* as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(40): 16139-16144, 2013.
- Kodera H, Kato M, Nord AS, Walsh T, Lee M, Yamanaka G, Tohyama J, Nakamura K, Nakagawa E, Ikeda T, Ben-Zeev B, Lev D, Lerman-Sagie T, Straussberg R, Tanabe S, Ueda K, Amamoto M, Ohta S, Nododa Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, King M-C, Matsumoto N, \*Saitu H. Target capture sequencing for detection of mutations and copy number changes causing early-onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 54(7):1262-1269, 2013. doi: 10.1111/epi.12203
- Ravenscroft G#, Miyatake S# (# denotes the first authors with equal contribution), Lehtokari V-L, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJN, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, \*Matsumoto N§, \*Laing NG§ (§ denotes equal contribution as the last author). Mutations in *KLHL40* are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 93(1):6-18, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.004.
- \*Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Yoko Hiraki, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Yoshiura K, \*Matsumoto N, Niikawa N. *MLL2* and *KDM6A* mutations and their clinical consequences in Kabuki syndrome.



- Am J Med Genet Part A 161(9):2234-2243, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.36072.
- Sun S-L, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Ryo Funayama R, Kondo M, Saitsu H, Matsumoto N, Nakayama K, Ishii N\*. Y-Chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. J Immunol 190 (12): 6209-6220, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300303.
- \*Doi H, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Miyatake S, Kawamoto Y, Yoshida T, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Matsumoto N. Diagnostic utility of exome sequencing for autosomal recessive cerebellar ataxia and spastic paraplegia: identification of a novel homozygous *SPG7* mutation. Intern Med 52(14): 1629-1633, 2013
- Fujita A, Suzumura H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Harada N, \*Matsumoto N, \*Miyake N. A Unique Case of de novo 5q33.3q34 Triplication with Uniparental Isodisomy of 5q34qter. Am J Med Genet Part A 161(8):1904-1909, 2013. doi: 10.1002/ajmg.a.36026.
- #Nakamura K, #Kodera H, #Akita T (# denotes equal contribution), Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama T, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, \*Matsumoto N, \*Saitsu H (\* denotes co-correspondence) De novo mutations in *GNAO1* encoding a Gao subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. Am J Hum Genet 93(3):496-505, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.014.
- Kodera H#, Nakamura K# (# denotes equal contribution), Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Mitsuko Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, \*Matsumoto N, \*Saitsu H (\*: co-corresponding). De novo mutations in *SLC35A2* encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. Hum Mut 34(12): 1708-1714, 2013. doi: 10.1002/humu.22446.
- Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki S, Aida N, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, \*Matsumoto N, \*Saitsu H (\*: co-correspondence). Diagnostic utility of whole exome sequencing in cerebellar atrophy in childhood. Neurogenet 14 (3-4): 225-232, 2013. doi: 10.1007/s10048-013-0375-8.
- Gupta VA, Ravenscroft G, Shaheen R, Todd EJ, Swanson LC, Shiina M, Ogata K, Hsu C, Clarke NF, Darras BT, Farrar M, Hashem A, Manton N, Muntoni F, North KN, Sandaradura S, Nishino I, Hayashi YK, Sewry CA, Thompson EM, Brownstein CA, Yu TW, Allcock RJN, Davis MR, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Alkuraya FS, Laing NG, Beggs AH. Identification of *KLHL41* mutations implicates BTB-Kelch-mediated ubiquitination as an alternate pathway to myofibrillar disruption in nemaline myopathy. Am J Hum Genet 93(6):1108-1017, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.020.
- Nakajima J, Eminoglu TF, Vatansever G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Kawashima H, \*Matsumoto N, \*Miyake N (\*: co-correspondence). A novel homozygous *YARS2* mutation causes severe myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia syndrome. J Hum Genet 58(12):822-824, 2013. doi: 10.1038/jhg.2013.104.

## 2. 学会発表

- 順天堂大学医学部セミナー・松本直通「変革期を迎えた疾患ゲノム解析」平成 25 年 6 月 26 日@順天堂大学医学部・東京
- 第 17 回小児分子内分泌研究会特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いてわかってきたこと」平成 25 年 7 月 7 日札幌北広島クラッセホテル
- 次世代解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発研究プロジェクトの成果発表会・松本直通「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築」平成 25 年 7 月 13 日都市センターホテル・東京
- 第 20 回日本遺伝子診療学会大会・シンポジウム 1・松本直通「疾患ゲノム解析における次世代シーケンサーの有用性」平成 25 年 7 月 19 日アクティビティ・浜松コンgresセンター・浜松
- CiRA genomics epigenomics and bioinformatics seminar series VIII. 松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析」平成 25 年 8 月 23 日@CiRA 京都大学
- 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業「次世代遺伝子解析装置を用いた難病研究」平成 25 年度第 1 回ワークショップ 松本直通「コントロールデータベースに関する話題」平成 25 年 8 月 24 日@京都大学 (芝蘭会館)
- 神奈川県立循環器呼吸器病センター職員研修会 松本直通「新たな時代を迎えた遺

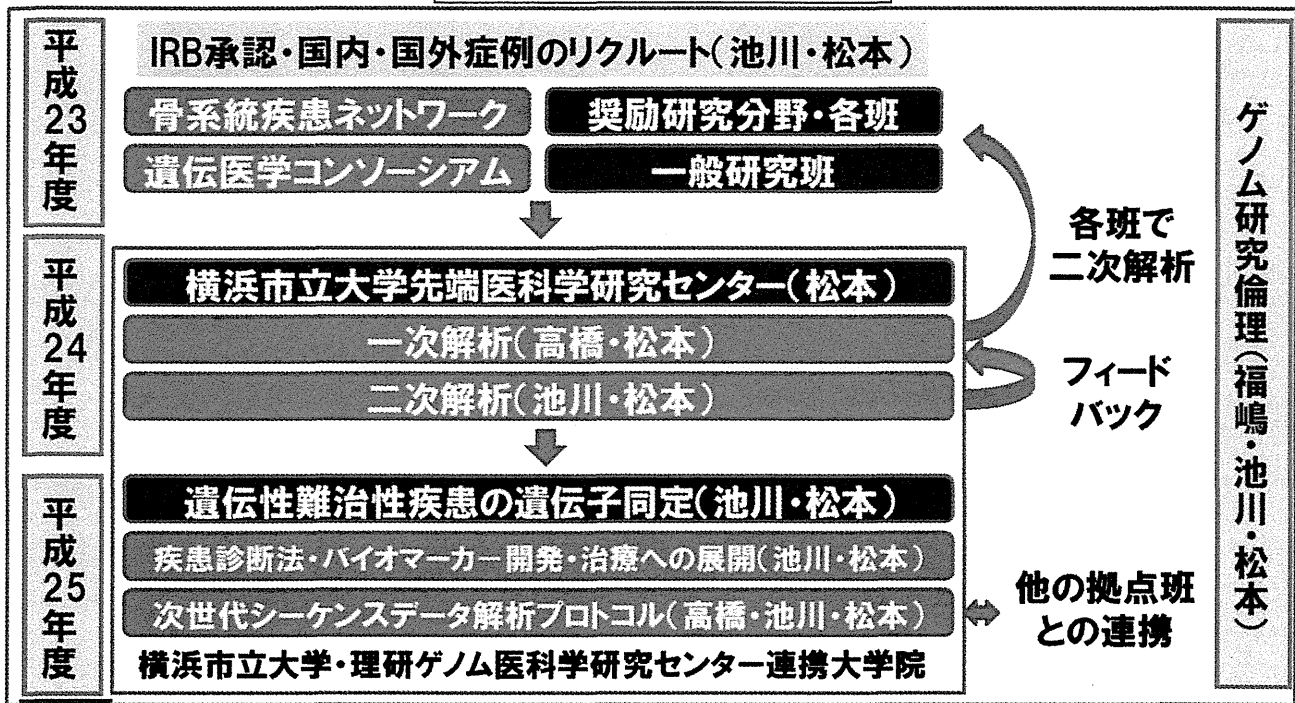
たす疾患の検出方法・平成 25 年 6 月 12 日

- 伝性疾患解析」平成 25 年 8 月 19 日@神奈川県立循環器呼吸器病センター・横浜  
現場の会第三回研究会基調講演・松本直通  
「NGS がもたらしたヒト疾患ゲノム解析のパラダイムシフト」平成 25 年 9 月 4 日神戸国際会議場@神戸
- 第 23 回遺伝医学セミナー講義・松本直通「  
遺伝性疾患の責任遺伝子単離法」平成 25 年 9 月 7 日三井ガーデンホテル千葉@千葉市
- 第 22 回発達腎研究会・特別講演・松本直通  
「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析：現状と限界」平成 25 年 9 月 13 日高槻市生涯学習センター@高槻市
- 第 18 回山形小児神経研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンス解析で分かってきたこと」平成 25 年 9 月 27 日パレスグランデール@山形市
- 第 58 回日本人類遺伝学会大会・シンポジスト・松本直通「ヒト疾患エクソーム解析の現状と課題」平成 25 年 11 月 23 日@江陽グランドホテル仙台
- 希少疾患・難病の全エクソーム解析 -現状と課題- 松本直通「希少疾患・難病の全エクソーム解析-現状と課題-」平成 25 年 12 月 3 日日経バイオテック「希少疾患・難病の治療薬開発におけるゲノム活用」@秋葉原コンベンションホール
- 東京大学大学院人類遺伝学特論 II・Naomichi Matsumoto「Rare Variants in Human Diseases」平成 25 年 12 月 4 日@東京大学
- European Conference of Human Genetic 2013.  
Naomichi Matsumoto, T. Nishimura, K. Muramatsu, H. Kodera, S. Kumada, K. Sugai, E. Kasai-Yoshida, N. Sawaura, H. Nishida, A. Hoshino, F. Ryujin, S. Yoshioka, H. Arakawa, M. Kato, N. Mizushima, H. Saitsu. June 9, 2013 @Palais des Congrès, Paris, France
- NSFC-JST Workshop on Genomics for Clinical Studies. Naomichi Matsumoto, “Mendelian Exome”, Le Meridien She Shan Shanghai, Shenshan, Shanghai, China, Feb 4, 2013

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特願 2013-252720・鶴崎美徳/松本直通・「Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子診断法」  
・平成 25 年 12 月 6 日
- PCT/JP2013/71620・松本直通/三宅紀子・  
ミトコンドリア複合体 III 欠乏症患者又は保因者の検出方法・平成 25 年 8 月 9 日
- 特願 2013-157339 号 松本直通/三宅紀子  
・ケトン血症を伴うリー脳症患者または保因者の検出法。平成 25 年 7 月 31 日
- 特願 2013-123660 才津浩智/松本直通・小児期のてんかんおよび不随意運動をき

研究全体の流れと進行状況



現時点

平成25年度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))  
分担研究報告書

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

分担研究課題：遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

池川志郎 (理化学研究所統合生命医科学研究センター 骨関節疾患研究チーム)

様々な分野の専門医の協力下に、遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析研究の基盤である疾患のサンプルの集積体制を構築した。収集した症例を用いて、いくつかの疾患で、未知の疾患遺伝子の同定に成功した。

## 1. 研究目的

遺伝性難治疾患を対象に、網羅的全エクソーム解析により原因遺伝子を解明するための研究基盤を構築する。それを基に全エクソーム解析を行い、疾患遺伝子を同定する。

## 2. 研究方法

### 1. 症例集積と一般研究班との連携体制の構築

専門医との各種ネットワーク等を通じて遺伝性難治疾患の集積を行う。

### 2. 次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析

松本研究室のシステムによる全エクソーム解析により検出された塩基異常を情報解析、分子遺伝学的解析により検証する。この検証過程を松本研究室でのプロトコール作成へフィードバックする。

### 3. 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討

変異を発見した症例の詳細な臨床情報を分析し、臨床病型を明らかにする。更に、変異が惹起する機能的影響を実験系で検証する。

## 3. 研究結果

### 1. 症例集積と一般研究班との連携体制の構築

骨系統疾患コンソーシウム、胎児骨系統疾患ネットワーク等の遺伝性難治疾患の専門医集団、厚生省難病研究班(澤井班、渡邊班、戸山班他)、エクソーム解析の一般研究班(岩本班等)とのネットワーク

を構築し、遺伝性疾患、難治疾患の患者サンプルを集積する体制を確立した。45疾患、180例について、exome解析を行った。

### 2. 次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析

以下のプロジェクトで、新規の遺伝子の変異の発見に成した。

1) Opsismodysplasia の原因遺伝子が、*INPPL1* (inositol polyphosphate phosphatase-like 1) 遺伝子であることを発見した(J Hum Genet 2013)。

2) Beighton 型脊椎骨端骨幹端異形成症 (spondyloepimetaphyseal dysplasia)、Ehlers-Danlos 症候群 progeroid form の原因遺伝子 *B3GALT6* を発見した(Am J Hum Genet 2013)。

### 3. 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討

1) *PAPSS2* の遺伝子変異を発見した症例の詳細な臨床情報を分析し、臨床病型との関係を検討した。*PAPSS2* 変異の表現型は、従来の分類の常染色体劣性型の短体幹症である事を発見し、その表現型を確立した(J Med Genet 2013)。

2) V型骨形成不全症の臨床像と遺伝子型の関連を明らかにした(J Med Genet 2013)。

## 4. 考察

専門医の協力下に、研究の基盤である難治疾患のサンプルの集積体制を、研究の出口である患者さんへの情報の還元の体制と共に確立することができた。



1,000例近くの in house の日本人の多型データなど、拠点班に集積された情報、ノウハウにより、遺伝子同定の過程が洗練、効率化され、これまでに3つの未知の疾患遺伝子の同定に成功することができた。また、多くの原因遺伝子が既知の疾患で、新たな変異を発見することができた。

## 5. 結論

次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析により遺伝性難治性疾患の原因遺伝子を同定する体制を確立し、これを用いて、未知の疾患遺伝子の同定に成功した。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakajima M, Mizumoto S, Miyake N, Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis L, Chitayat D, Howard A, Leal GF, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitsu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafe L, Ohashi H, Superti-Furga A, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S. Mutations in B3GALT6, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* 92(6):927-34. 2013.
- 2) Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu YP, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskiniemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma TR, Beckmann JS, Ikegawa S, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(40):16139-44, 2013.
- 3) Iida A, Simsek-Kiper PO, Mizumoto S, Hoshino T, Elcioglu N, Horemuzova E, Geiberger S,

Yesil G, Kayserili H, Unite GE, Boduroglu K, Watanabe S, Ohashi H, Alanay Y, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S. Clinical and radiographic features of the autosomal recessive form of brachyolmia caused by PAPSS2 mutations. *Hum Mutat* 34(10):1381-6, 2013.

- 4) Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet* 58(6):391-4, 2013.
  - 5) Kim OH, Jin DK, Kosaki K, Kim JW, Cho SY, Yoo WJ, Choi IH, Nishimura G, Ikegawa S, Cho TJ. Osteogenesis imperfecta type V: Clinical and radiographic manifestations in mutation confirmed patients. *Am J Med Genet A* 161(8):1972-9, 2013.
  - 6) Lachman RS, Burton BK, Clarke LA, Hoffinger S, Ikegawa S, Jin DK, Kano H, Kim OH, Lampe C, Mendelsohn NJ, Shediach R, Tanpaiboon P, White KK. Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A syndrome) and VI (Maroteaux-Lamy syndrome): under-recognized and challenging to diagnose. *Skeletal Radiol* 43:359-369, 2014.
- ### 2. 学会発表
- 1) Ikegawa S. Genetics of Bone and Joint Disease: From Genome to Personalized Medicine. ASBMR annual meeting. Baltimore. Oct 4, 2013.
  - 2) Ikegawa S. Genetic Risk Factors for Common Skeletal Disorders. Croucher Foundation Advanced Study Institute symposium. Hong Kong. Dec 19, 2013
  - 3) Ikegawa S. Translational genomics in bone diseases. The Master Program for Clinical Pharmacogenomics and Pharmacoproteomics. School of Pharmacy, Taipei Medical University. Taipei. Jan 16, 2014
  - 4) Ikegawa S. Genomic study of skeletal disease. The Master Program for Clinical Pharmacogenomics and

- Pharmacoproteomics. School of Pharmacy, Taipei Medical University, ShuangHo Hospital. Taipei. Jan 16, 2014
- 5) Ikegawa S. Genomic study of common diseases: Road from genome to personalized medicine The Master Program for Clinical Pharmacogenomics and Pharmacoproteomics. School of Pharmacy, Taipei Medical University, WanFang Hospital. Taipei. Jan 17, 2014
  - 6) 池川志郎. ゲノム解析による疾患の原因と病態の解明: パーソナルゲノム時代の疾患研究、東京医科歯科大学 大学院特別講義、東京、2013. 10. 29
  - 7) 池川志郎. ゲノム解析による疾患の遺伝的要因の解明: 目の前の患者さんを出発点とした病気の原因の研究、医の原点 (東京大学医学部)、東京、2013. 10. 31
  - 8) 池川志郎. 変形性関節症の遺伝子解析、第 41 回日本関節病学会、名古屋、2013. 11. 2
  - 9) 池川志郎. ゲノム解析研究の整形外科疾患への応用、第 4 回 Orthopaedic Research Club、木更津、2013. 11. 10
  - 10) 中島康晴. 坂本悠磨. 池川志郎. 西村玄. 岩本幸英. 新規の遺伝子変異が同定された II 型コラーゲン異常症の 1 家系、第 25 回日本整形外科学会骨系統疾患研究会、横浜、2013. 11. 09
  - 11) 山本卓明. 坂本悠磨. 本村悟朗. 中村吉秀. 池川志郎. 岩本幸英. 成人時に股関節痛で発症した *COL2A1* 遺伝子変に伴う骨化障害例の検討、第 25 回日本整形外科学会骨系統疾患研究会、横浜、2013. 11. 09

## 7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

分担研究課題：次世代シーケンスデータ解析

分担研究者：高橋篤(理化学研究所統合生命医科学研究センター統計解析研究チーム)

### 研究要旨：

遺伝子難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点として、次世代シーケンスのデータ解析を実施する、大規模なエクソーム解析を実施するための、並列・高速で解析可能なシステムを構築する。次世代シーケンスのデータ解析に必要な、新規アルゴリズム・プログラムの開発を行う。

### A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いた網羅的全エクソーム解析により、遺伝性難治疾患の原因遺伝子を同定するとともに、大規模エクソームデータの情報解析の研究基盤を構築する。

般集団に変異が存在するかが必要になる。その情報を In-house なデータとして、算出可能にした。

### B. 研究方法

#### 1. 次世代シーケンスデータの統計・情報解析

次世代シーケンサーで得られた配列データに対し、情報・統計解析を実施し、遺伝性難治疾患の原因遺伝子の同定を行う。

#### 2. 網羅的エクソームデータ解析の情報基盤の構築

次世代シーケンサーから算出される大規模な配列データの解析を効率的に行うための情報解析基盤の構築を行う。

#### 3. 次世代シーケンサー解析アルゴリズムの開発

次世代シーケンサーの配列データを解析する新規アルゴリズム・プログラムの研究・開発を行う。

#### 2. 網羅的エクソームデータ解析の情報基盤の構築

次世代シーケンサーのデータを効率に解析できるシステムの構築を行った。次世代シーケンスデータのヒトゲノムへのリファレンス配列へのマッピングも含め、独自に開発・作成したプログラムを基に解析システムの構築を行った。構築されたシステムは、複数の既存プログラムを使用したシステムではなく、拡張性が高い独自システムとなっている。

#### 3. 次世代シーケンサー解析アルゴリズムの開発

次世代シーケンサーの解析において、挿入・欠失などの多型の検出は、現時点ではまだ不完全な状況である。そこで、高精度にこれらの多型を検出可能なアルゴリズムの開発・研究を実施した。

### C. 研究結果

#### 1. 次世代シーケンスデータの統計・情報解析

今年度は、横浜市立大学で行われた次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスの実験結果に対し、情報解析を実施し、一塩基多型などの検出を行った。遺伝性難治性疾患に関連する遺伝子・変異を同定するためには、一

### D. 考察

次世代シーケンサーをもちいた解析により、次々と疾患の原因遺伝子が明らかになっている。これらの解析は、大規模データが基本となる。大規模エクソームデータを並列・高速かつ効率的に解析可能なシステムの開発・構築により、遺伝性難治疾患研究の進展が加速することが期待される。

原因遺伝子・変異の同定に至っていない，難治性疾患が存在する．これらの疾患に対しても，新規アルゴリズムなどで，より詳細な統計・情報解析を実施し，原因遺伝子・変異が同定されることが望まれる．

#### E. 結論

遺伝性難治疾患の網羅的全エクソーム解析拠点の次世代シーケンスデータ解析の情報・統計解析を実施した．横浜市立大学より提供された次世代シーケンスデータにおいて，一般集団における変異の情報検出を可能にした．次世代シーケンスによる大規模エクソームデータを並列・高速に解析可能とする独自システムを構築した．

#### F. 健康危険情報

なし．

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## 遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

分担研究課題：ゲノム研究倫理と網羅的エクソーム解析の対象症例の集積

研究分担者 福嶋義光 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座 教授

### 研究要旨

パーソナルゲノム時代における網羅的エクソーム解析の倫理的課題を明らかにし、個人ゲノム情報を適切に医療の場に反映させる医療提供体制のあり方、網羅的エクソーム解析を行う際のインフォームドコンセントのあり方等を検討するための情報収集と共に、対象となる症例の集積に努めた。

### 研究協力者

涌井敬子(信州大学医学部遺伝医学・予防医学)

古庄知己(信州大学医学部附属病院遺伝子診療部)

### A. 研究目的

パーソナルゲノム時代における網羅的エクソーム解析の倫理的課題を明らかにし、個人ゲノム情報を適切に医療の場に反映させる医療提供体制のあり方を提言するとともに、対象となる症例の集積を行う。

### B. 研究方法

#### 1) ゲノム研究倫理の検討のための情報収集

全ゲノムシーケンスによりもたらされる情報の倫理的課題について、文献および学会参加等により情報を収集し、問題点および検討すべき課題を整理した。

#### 2) 症例集積

原因不明の既知の先天奇形症候群あるいは診断未確定の原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群(MCA/MR)症例を収集し、次世代シーケンス法で検出が困難な数十 kb~数 Mb のゲノムコピー数変化(copy number variations; CNVs)を検出するマイクロアレイ染色体解析によるスクリーニングを実施した。マイクロアレイ染色体解析は、CGH法を原理とするCGXアレイ(Roche, 135K/Agilent, 180K Oligo

probe)を用いて実施、専用ソフトであるGenoglyphix®(Signature Genomic Laboratories, LLC)を用いて解析した。

疾患や症状と関連するゲノムコピー数異常を認めなかった症例を網羅的エクソーム解析の候補と症例として、臨床情報を再検討した。

また、試料提供の協力の得られた無症状の親のマイクロアレイ染色体解析を実施し、これまでに得ていた無症状の親のCNVs結果とともに日本人一般成人に認めた先天異常と関連しないコピー数変化(benign CNVs; bCNVs)として検討した。

### C. 研究結果

#### 1) ゲノム研究倫理の検討のための情報収集

##### 1-1. ACMGガイドライン(2013)

米国臨床遺伝・ゲノム学会(American College of Medical Genetics and Genomics; ACMG)のワーキンググループは、2013年3月に臨床の場で実施されるエクソーム解析において、それが目的外のもの(偶発的所見: incidental findings)であっても、被験者にその結果を開示すべき24疾患、56遺伝子を公表した[Green RC et al.: ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. *Genet Med.* 2013;15(7):565-574]. 主な疾患としては、遺伝性乳がん卵巣癌症候群(HBOC)などの遺伝性腫瘍(16疾

患), Marfan 症候群や遺伝性不整脈などの循環器疾患 (7 疾患) および悪性高熱症が含まれている。

これらの疾患・遺伝子は、変異が明らかになった場合には、浸透率が高くほぼ間違いなくその疾患に罹患すること、および診断された場合には、治療法・予防法があり、被験者にとって健康上のメリットがあることから、診療の一環として行われたエクソーム解析においては、これらの情報を被験者に報告すべきであるとしている。

## 1-2. ACMG ガイドライン (2013) への批判

ACMGガイドライン (2013) が公表されて以降、いくつかのグループから、このガイドラインに対して懸念と批判の声が上げられている [Burke W, et al.: Recommendations for returning genomic incidental findings? We need to talk! *Genet Med.* 2013; 15(11):854-9.] [Megan Allyse and Marsha Michie: Not-so-incidental findings: the ACMG recommendations on the reporting of incidental findings in clinical whole genome and whole exome sequencing. *Trends Biotechnol.* 2013;31(8): 439-41].

おもな指摘事項を下記に列挙する。

- ・ 臨床的に問題となった疾患・状態とは無関係な遺伝子の病的変異のスクリーニングを促している。
- ・ 当初の目的以外の 56 遺伝子の分析を要求している。56 遺伝子を調べるための費用、検査室での時間、評価の困難さについての検討が必要。
- ・ 56 遺伝子を報告するという事は、他の遺伝子については報告しないということになるがそれでよいのか。
- ・ 遺伝子変異の情報は自動化により容易に手に入るようになるが、どのように評価するかは難しい。熟練と時間を要する作業が必要となる。
- ・ 無症状の人に行った場合の発症率、疾患の重症度、介入の効果などについては、根拠に乏しい。
- ・ 集団を対象とした検査としての有用性は示されていない。
- ・ 一般人を対象としたスクリーニング検査として

行った場合には、無用な健診、医原性の害、間違った安心などの負の側面が生じる可能性がある。

- ・ 偽陽性および不明瞭な結果は少なくしなければならないが、無症状の人を対象とする場合には、陽性的中率は低くなると予想される。
- ・ 患者の拒否権が確保されていない。
- ・ 成人期発症の疾患の検査を小児期に行う場合の配慮が十分ではない。従来の ACMG と American Academy of Pediatrics の方針とは異なっている。親や血縁者のリスク軽減より、子どもの将来の自己決定権が尊重されるべきである。
- ・ 個人への害とともにヘルスケアシステムへの悪影響 (健常者を病人ときめつけること、不要な医療費、医原性合併症) も考慮する必要がある。
- ・ ACMG ガイドラインは未熟であり、根拠に基づくガイドラインの制定が望まれる。
- ・ 遺伝学的検査法のさまざまな利用法、当事者の支援の方法、倫理的枠組みを議論する必要がある。
- ・ 今後、リストに追加される疾患が増えると予想され、スクリーニングとして広まる可能性がある。
- ・ 遺伝学専門家、検査担当者、臨床医、患者、などのディスカッションが必要である。

## 1-3. Clinical Whole Exome Sequencing の実際

Baylor医科大学遺伝医学検査室は、米国における CLIA認証の臨床検査ラボであり、遺伝学的検査の一項目に、Clinical Exome 解析 (全Exomeシーケンス) を加え、下記の対応により検査を開始している。

- ・ 主治医からの依頼により、受け付ける
- ・ 結果報告は2段階に分けて行われる。最初の報告は、臨床症状と関係のある遺伝子に関する報告 (focused report) であり、4週間以内になされる。
- ・ 最初の報告がなされて6ヶ月以内に被験者が要望すれば、拡大報告 (expanded report) が4週間以内になされる。拡大報告は、ACMGガイドラインに示された24疾患、56遺伝子など、臨床症状と直接関係のない遺伝子の解析結果の報告である。
- ・ 有意な変異が見つかった場合には Sanger 法で確認する。

- ・ 患者が子どもであった場合、両親のエクソーム解析は行わない (Sanger 法で確認する)。

## 2) 症例集積

H25 年度は、37 例の原因不明の既知の先天奇形症候群あるいは診断未確定の MCA/MR 症例と患者家族 20 名を収集し、マイクロアレイ染色体解析を実施した。8 例 (21.6%) に各症例の疾患と関連している可能性の高いゲノムコピー数異常 (pathogenic CNVs: pCNVs) を認めた。pCNVs が検出された症例以外は網羅的エクソーム解析の候補と考え、主治医にさらに詳細な臨床所見の情報提供を依頼している。

過去に実施したものを含め 100 名分ほどの無症状の親に検出された我々の解析プラットフォームにおける bCNVs データを下記に示す。

検出された bCNVs 領域数： 185 (81)

5 名以上に検出された領域数： 21 (1)

2~4 名に検出された領域数： 26 (3)

1 名のみを検出された領域数： 138 (77)

\* ( ) 内は Genoglyphix® で直接比較可能な 2010 年 11 月 4 日時点の DGV に登録のなかった領域数

上記 185 領域のうち、136 領域 (73.5%) は既知の遺伝子とオーバーラップしており、そのうち 23 領域 (全体の 12.4%) は疾患との関連について報告のある遺伝子を含む領域であった。

## D. 考察

ACMG ガイドラインが公表されて以降、偶発的所見の開示方法について、活発な議論が行われている。ここで注意しなければならないのは、米国での議論は、臨床の場で診療目的に行われたエクソーム解析において、予期しない変異が見つかったときにどうするかについて議論がなされているということである。

わが国では、エクソーム解析のほとんどが研究目的で行われており、ACMG ガイドラインをそのまま運用することはできない。しかし、研究目的ではあっても、エクソーム解析を行う場合には、常に偶発的所見が得られる可能性があり、ACMG ガイドラインを初めとする国際的な議論を注視しておかなければな

らない。

ACMG ガイドラインでは、当初の目的以外の 56 遺伝子の分析を要求しているが、研究目的で行う場合、研究対象以外の遺伝子解析にかかる費用、解析に費やす時間、検査精度の確保などについて十分検討しておく必要がある。

さらに、目的外の遺伝子変異が明らかにされた場合、その時点では発症していない人を罹患者と診断することの問題点、すなわち無用なサーベイランス検査やそのことによる医原性の障害、あるいはその逆の間違った安心を与えてしまうなど、ネガティブな側面が生じる可能性があることについても留意しておかなければならない。

わが国において、研究目的でおこなわれる Whole Exome Sequence のあり方について、議論を進めておく必要があるが、その前提となるのは、被験者に対する十分なインフォームドコンセントを可能とする体制整備と必要な際にはしっかりと対応できる遺伝カウンセリング体制の整備であることは論を待たない。

原因不明の先天異常症例に対してマイクロアレイ染色体解析を実施すると、約 20% に pCNV が検出されることが報告されているが、本研究でもほぼ同率の pCNV が検出された。健常者について 50bp 以上の DNA 断片のゲノム変異を登録・公開しているデータベースである Database of Genomic Variants (DGV) によると、現時点で 22300 を超えるゲノムから 250 万以上登録されたゲノム変異の断片の大きさは 50bp から 3Mb におよび、44% は数十 kb 以上の CNVs 検出を目的とするマイクロアレイ解析による結果であることが示されている。これらの結果は、原因不明の遺伝性難治疾患の原因遺伝子探索に際しては、網羅的エクソーム解析の前にマイクロアレイ染色体解析によりゲノムコピー数異常を除外しておくことが有用であることを示している。

また今回、無症状の親に検出された 185 領域の bCNVs を検討したところ、評価時点で DGV に登録のない CNVs が 4 割以上あることが判明した。2013 年 11 月に The Human Genetic Variation Database (HGVD) に追加・公表された 1,208 の健常な日本人の

エクソームシーケンス結果により、日本人特有な SNPs が多数あることが示されたように、CNVs でも同様のことを考慮する必要があり、日本人健常人 CNVs のデータベース構築が求められる。

また、我々が検出した 185 領域の bCNVs の 70%以上が既知の遺伝子とオーバーラップしており、さらにそのうち 23 領域（全体の 12.4%）は疾患との関連について報告のある遺伝子を含む領域であった。

個々の患者の解析では、疾患や症状との関連が明らかにできない CNVs や SNPs (Variants of Unknown Clinical Significance; VUS) も多く検出されるため、各患者の臨床データと CNVs/SNPs データを融合させたデータベースがますます重要となると考えた。

さらに、マイクロアレイ染色体解析により得られる CNVs 情報は、遠くない将来の次世代シーケンサーのさらなる技術革新により検出できるようになることが期待されている。そうなった際には、網羅的エクソーム解析の結果解釈に CNVs 情報も必須となる。欧米の全 Exome シーケンスを臨床検査として実施した検査室においては、従来からの Sanger 法による特定の遺伝子を対象とした分子遺伝学的検査のみならず、マイクロアレイ染色体解析を含む細胞遺伝学的検査や分子生化学的検査などを含む様々な遺伝学的検査の一項目として実施する体制を構築している。わが国においても網羅的エクソーム解析拠点の構築に際して、マイクロアレイ染色体解析も組み合わせた実施体制の整備と、CNVs/SNPs データを融合させたデータベースの構築が必要である。

## E. 結論

パーソナルゲノム時代における網羅的エクソーム解析の倫理的課題について検討した。個人ゲノム情報を適切に医療の場に反映させる医療提供体制のあり方についての提言をめざしてさらに情報収集を継続する。網羅的エクソーム解析の対象となる症例のさらなる集積に努める。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shimizu K, Wakui K, Kosho T, Okamoto N, Mizuno S, Itomi K, Hattori S, Nishio K, Samura O, Kobayashi Y, Kako Y, Arai T, Oh-Ishi T, Kawame H, Narumi Y, Ohashi H, Fukushima Y. Microarray and FISH-based genotype-phenotype analysis of 22 Japanese patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Dec 19. doi: 10.1002/ajmg.a.36308. [Epub ahead of print]

Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2013 Jun;161A(6):1221-37

Tsurusaki Y, Kosho T, Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing in a family with an X-linked lethal malformation syndrome: clinical consequences of hemizygous truncating OFD1 mutations in male patients. *Clin Genet*. 2013 Feb;83(2):135-44

### 2. 学会発表

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 福嶋義光. CGH アレイ解析のピットフォール – 稀な benign CNV の影響で正確な欠失/重複範囲の特定ができない場合がある –. 日本小児遺伝学会学術集会, 2013 年 4 月 17-18 日, 川崎

古庄知己, 三宅紀子, 福嶋義光, 松本直通. D4S T1 欠損に基づく Ehlers-Danlos 症候群の遺伝子解析状況. 日本小児遺伝学会学術集会, 2013 年 4 月 17-18 日, 川崎

清水健司, 古庄知己, 涌井敬子, 鳴海洋子, 糸見和也, 佐村修, 服部重人, 西尾公男, 加古結子, 川目裕, 水野誠司, 岡本伸彦, 大橋博文, 福嶋義光. Wolf-Hirschhorn 症候群 21 例におけるけいれんと遺伝型との関連検討. 日本小児遺伝学会学術集会, 2013 年 4 月 17-18 日, 川崎

涌井敬子, 山口智美, 古庄知己, 福嶋義光. マイクロアレイ染色体解析により検出された日本人成