

201331006B

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等疾患分野の医療の実用化研究事業

(難病関係研究分野)

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

(H23-実用化(難病) - 一般-006)

平成23～25年度 総合研究報告書

平成26年5月

主任研究者 岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター

臨床研究センター (感覚器センター)

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等疾患分野の医療の実用化研究事業

(難病関係研究分野)

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

(H23-実用化(難病) - 一般-006)

平成23～25年度 総合研究報告書

平成26年5月

主任研究者 岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター

臨床研究センター (感覚器センター)

<http://www.kankakuki.go.jp>

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

班員名簿（平成26年5月現在）

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
主任研究者	岩田 岳	国立病院機構東京医療センター臨床研究センター	部 長
分担研究者	池尾一穂 古野正朗 三宅養三 吉村長久 角田和繁 近藤峰生 篠田 啓 國吉一樹 林 孝彰 上野真治	国立遺伝学研究所生命情報・DBJ 研究センター 理化学研究所オミックス基盤研究領域 愛知医科大学 京都大学医学部眼科学教室 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター 三重大学大学院医学系研究科神経感覚医学講座眼科学 帝京大学医学部眼科学教室 近畿大学医学部眼科学教室 東京慈恵会医科大学眼科学教室 名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学	准教授 上級研究員 理事長 教 授 室 長 教 授 准教授 講 師 講 師 助 教
事務局	照山 遊	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター（感覚器センター） 分子細胞生物学研究部 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL (03)3411-0111 (内 8659) FAX (03) 3411-1026 E-Mail: teruyamayu@kankakuki. go. jp	秘 書
経理事務担当	小林正昭	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 事務部 企画課 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL : 03-3411-0111 (内 2122) FAX : 03-3411-0366 E-Mail : masaakikobayashi@ntmc. hosp. go. jp	業務班長

目 次

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による 黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

I. 総合研究報告	1
岩田 岳 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター(感覚器センター)	2
II. 分担研究報告	11
池尾一穂 国立遺伝学研究所生命情報・DDBJ 研究センター	12
古野正朗 理化学研究所オミックス基盤研究所	15
角田和繁 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター(感覚器センター)	18
近藤峰生 三重大学大学院医学系研究科臨床医学系講座眼科学	23
篠田 啓 帝京大学医学部眼科学教室	30
國吉一樹 近畿大学医学部眼科学教室	35
林 孝彰 東京慈恵会医科大学眼科学教室	37
上野真治 名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学	42
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	72

I. 総合研究報告

平成23～25年度 厚生省科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
総合研究報告書

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

研究代表者 岩田 岳 国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター 部長

研究要旨：ヒトは情報の約8割を視覚に頼っており、これが障害されると通常の生活に著しい影響をおよぼす。視機能に必要な黄斑は網膜のほぼ中央に位置し、視細胞が集中する構造となっている。黄斑ジストロフィーはこの黄斑部が障害される難治性の眼疾患であり、日本には潜在的に約2万人の患者がいると考えられている。黄斑ジストロフィーは両眼性で進行性の機能障害を黄斑部にもたらす疾患の総称であり、臨床診断にあたっては電気生理学的検査を含む視機能検査を包括的に行う必要がある。現在黄斑ジストロフィーの治療法は無いが、将来の有効な治療法としては遺伝子治療や再生医療、そして人工網膜などが検討されている。これまでにスターガルト病、錐体ジストロフィー、BEST病等、その他の黄斑ジストロフィーを含めて米国人を対象とした遺伝子解析によって優性型、劣性型、X染色体型が解明されているが、日本人患者での網羅的な解析は行われていない。近年、次世代シーケンサーの登場によって、患者の全エクソンを対象としたエクソーム解析や全ゲノム解析が可能になり、眼科疾患においてもこの手法を利用した遺伝子解析が多数報告されるようになった。我々はオカルト黄斑ジストロフィーの原因遺伝子 RP1L1 を発見した経験があり (Akahori et al, Am J Hum Genet 2010)、本研究では理化学研究所 (次世代シーケンス) と国立遺伝学研究所 (遺伝子解析) との共同研究によって、黄斑疾患を含む10種類の遺伝性網脈絡膜疾患 (レーバー先天性黒内障、網膜色素変性、黄斑ジストロフィー、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィー) を対象に全エクソーム解析によって日本人患者における原因遺伝子を解明し、その発症機序と治療法を開発することを目的とする。

分担研究者：古野正朗・理化学研究所、池尾一穂・国立遺伝学研究所、三宅養三・愛知医科大学、角田和繁・国立病院機構東京医療センター、近藤峰生・三重大学、篠田啓・帝京大学、國吉一樹・近畿大学、林孝彰・東京慈恵会医科大学、吉村長久・京都大学

A. 研究目的

ヒトは情報の約8割を視覚情報に頼り、これが障害されると通常の生活に著しい影響をおよぼす。網膜のほぼ中央に位置する黄斑は視細胞が集中する視機能にとっては最も重要な部位である。黄斑および黄斑周辺が障害される黄斑ジストロフィーは遺伝性の希少難治性眼疾患であり、日本には潜在的に約2万人の患者がいる。黄斑ジストロフィーは両眼性、進行性の機能障害を黄斑部にきたす疾患の総称であり、臨床診断にあたっては電気生理学的検査を含む機能検査を包括的に行う必

要がある。現在黄斑ジストロフィーの治療法は無いが、将来の有効な治療法として、遺伝子治療が期待されている。また、再生医療や人工網膜などの研究も進行中であるが治療に利用できる段階ではない。

黄斑ジストロフィーは主に視細胞か網膜色素上皮細胞で発現する遺伝子の変異体によって発症するが、遺伝子変異によっては黄斑を含む広範囲に障害がおよぶことがある。これらの遺伝性網脈絡膜疾患にはレーバー先天性黒内障、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィーなどがある。

この20年間、これらの遺伝性網脈絡膜疾患について、日本人患者におけるジェノタイピングをPCRとサンガーシーケンス法を用いて、欧米で報告された遺伝子変異の検証が行われたが、多くの疾患で既知遺伝子変異を発見することは稀であった。すなわち、本研究までは日本人における発症原因遺伝子変異の

情報は限られていた。

本研究はこのような研究状況を打開するために、最新のエクソーム解析の技術を用いて、日本では初めての全遺伝子を対象にした、10種類の遺伝性網膜疾患（黄斑ジストロフィー、レーバー先天性黒内障、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィー）を対象にした、原因遺伝子解明を目的とした研究である。

B. 研究方法

1) 診断と血液検体、唾液検体の収集（三宅、吉村、角田、近藤、篠田、國吉、林、上野）

対象疾患の臨床診断にあたっては、眼底像、網膜断層像、さらに電気生理学的検査を含む視機能検査を包括的に行った。参加施設は倫理委員会の承認済みである。患者から書面による同意を得て全血あるいは唾液からDNAが抽出された。症例情報はすでに運営されている感覚器ネット症例情報収集システム (<https://niso.kankakuki.go.jp/karte/Login.jsp>) を用いて暗号化された状態でオンライン登録され、東京医療センターでデータの保存、管理が行われている。

2) エクソームシーケンシス（古野）

基本的には優性、劣性、X染色体、孤発例について、家系内の代表患者1名のエクソーム解析を行い、既知変異が発見されなかった場合には、劣性家系においては両親を加えた3検体あるいは兄妹を加えた4検体のエクソーム解析を行い、優性家系においては3世代の両親と親戚の患者2名を加えた8名についてエクソーム解析を行った。

斑ジストロフィーおよび関連眼疾患の家系より採取されたDNA検体を超音波破碎装置コバリスを用いて断片化後、アジレント社自動ライブラリー作製システムを用いて、同社 SureSelect v4 キットまたは SureSelect v4+UTR キットのプロトコルに従って、検体毎に異なるインデックス配列を含むアダプターを結合したライブラリーを調製した。ヒト全エクソームコーディング領域を網羅的にカバーするゲノム領域の塩基配列をプローブとして、ハイブリダイゼーションによりエクソーム領域の濃縮を行った。混合したエクソーム濃縮ライブラリーをイルミナ社 HiSeq2000 シーケンサーを用いて解析し、両端から100塩基ずつの配列データを得た。CASAVA v1.8 ソフトウェアによるベースコールおよびインデックス配列に基づき各検体に由来する塩基配列データを分離した。

3) エクソーム配列の解析（池尾、岩田）

データ解析に関して、検体ごとのSNV、挿入欠損変異(INDEL)の検出に関しては、世界的に標準となっているGATKのBest Practices workflowに従った。具体的には、シーケンサーから得られた大量のショートリードをBWA (ver. 0.6.2) を用いて参照配列にマッピングし、Picard (ver. 1.62) を用いて重複リードを除去する。次にGATK (ver. 2.7-4) を用いてINDEL周辺のリードを整理した上で、リードのクオリティ情報を再計算し、最終的なマッピング結果とする。最終的なマッピング結果を入力として、GATKのUnifiedGenotyperモジュールによってSNV、INDELの検出を行う。検出された変異は、HapMapや1000 Genomes、dbSNPといった既知変異の情報を元にクオリティを再計算する。さらに、トリオで読まれた家系が有る場合には、GATKのPhaseByTransmissionモジュールを用い、上染色体のみフェージングを行った。検出された生の変異リストには、その後複数のアノテーションが加えられ、疾患の候補となる変異が絞り込まれていく。まずはsnpEff (ver. 3.3) を用いて、検出された変異がExon内にあるのか、アミノ酸を変え得るnon-synonymous変異であるのかなどの情報を付与した。また、検出された変異が1000 Genomes、日本人1000 Exome (HGVD) といったデータベース中に存在するか、存在するのであればどの程度の頻度かの情報を付与した。また、PolyPhen2、PROVEANといった変異の有害度を推定するツールのスコアも付与した。さらに、EyeSAGE、The Ocular Tissue DatabaseもしくはSRAに登録されたRetinaのRNA-seqのデータから、眼の組織での遺伝子の発現量を得て、アノテーションに用いた。最終的に上記のアノテーションが追加されたファイルを用いて、アミノ酸配列を変え得る変異のみを抽出し、1%以上の頻度で出現する既知変異を除去した。また、377検体中7検体が正常であったため、それら7検体で出現する変異を全て除去した。あとは家系ごとの特徴に合わせて、優性変異、劣性ホモ接合変異、複合ヘテロ接合変異、X連鎖性変異、子で新規に生じた突然変異などを網羅的に抽出し、疾患の候補変異を絞り込んだ。

4) 変異体タンパク質の構造解析（岩田）

変異体のタンパク質構造はNational Eye Institute, National Institute of Health 研究員のYuri Sergeev, Ph.D. によってコンピューターシミュレーションが行われ、正常体との比較が行われた。タンパク質が他のタンパク質と複合体を形成する場合にはそれらを加えた構造解析も可能な範囲で行った。アミノ酸配列はUniProtKBデータベース (<http://www.uniprot.org/uniprot/P51160>) を用い、構造はautomated protein-homology modeling server Swiss-Model

(<http://swissmodel.expasy.org>)によって、Protein Data Bankに保存されているテンプレート構造を使ってシュミレートされた。

5) 視細胞株および患者iPS細胞を用いた変異体タンパク質の機能解析 (岩田)

遺伝子変異によるタンパク質への影響はアミノ酸置換かスプライシング異常によるタンパク質の欠損が見つかっており、これらの変異体タンパク質の細胞内での局在や細胞死との関連を調べるために、マウス視細胞株(661W, RGC5 cell line)および患者iPS細胞(リンパ球由来)から視細胞(Jin, Iwata, Takahashi et al, PLoS One 2011)および網膜色素上皮細胞を作製して観察した。

6) 変異体タンパク質を発現する遺伝子改変動物の作製と病理学的解析 (岩田)

遺伝子変異による発症メカニズムを研究するために、原因遺伝子のノックアウトマウス、ノックアウトカニクイザルを作製し、その病理学および視機能への影響を観察した。

7) 診断キットの作製 (岩田)

本研究事業で発見された新規変異について日本大手診断薬会社と秘密保持契約を結び、その情報を全て伝えた。この変異情報に基づいて、遺伝子変異検出用プローブを作製し、患者でも負担できるような価格帯で検査キットを作製中である。この会社はすでに他の遺伝子変異について、検査キットを検査受託会社に販売しており、平成26年10月の日本臨床眼科学会までに製品の開発をめざす。

8) 新薬の開発 (岩田)

本研究事業によって発見された遺伝子変異について、日本大手製薬企業と秘密保持契約を結び、薬による発症の遅延、発症の予防が可能か検討を行っている。今回の解析によって得られた遺伝子変異は欧米人では検出されておらず、アジアの患者に共通する可能性が高い。発症機序の解明によって得られた分子経路に基づいて、その経路を抑制あるいは促進する生体分子を探索し、モデル動物への投与によって発症の遅延、予防を試みる。

9) 日本人遺伝性網膜疾患の遺伝子データベースへの登録 (岩田、三宅、吉村、角田、近藤、篠田、國吉、林、上野)

本研究によって得られる新規遺伝子変異を将来の診断基準に役立てる目的で、個々の患者の遺伝子変異は京都大学医学研究科付属ゲノム医学センターの松田文彦教授(主任研究者)が作製した遺伝性希少難病疾患データベースプロジェクトに分担研究者として参加し、遺伝子変異を逐次登録している。松田班のデータベースは遺伝子情報のみであるために、眼底像や網膜電図など眼科診断に必要な

症例情報と遺伝子情報を組み合わせた我々独自の公開用情報データベースを作製中である。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析については研究計画書、患者説明書、患者同意書、患者撤回書を作成し、東京医療センター及び関係施設の倫理委員会で審査され、承認された施設からのみDNA検体を収集する。患者が検体の破棄を希望した場合には直ちに検体を焼却処分する。動物実験においては、いずれの実験も動物への苦痛を軽減する処置を取ること、使用動物数を最小限にすること、苦痛を与えないよう十分な麻酔をかけること、手術処置は両眼でなく片眼のみに行う等、in vitro 試験等の代替法を導入するなど動物愛護上の注意を心がけ、所属施設の「動物実験倫理委員会」の承認を得る。

C. 研究結果

1) 患者及び家族の検体収集

この3年間で496家系(808検体)の収集に成功した。遺伝性網膜疾患の検体収集数としては日本で最大であり、これらがデータベース化されたのも初めてである。疾患別の内訳はオカルト黄斑ジストロフィー64家系(75検体)、黄斑ジストロフィー34家系(39検体)、スターガルト病26家系(28検体)、レーバー黒内障23家系(29検体)、網膜色素変性208家系(250検体)、先天性夜盲症17家系(23検体)、錐体杆体ジストロフィー42家系(48検体)、脈絡膜ジストロフィー3家系(5検体)、その他・シンドローム105家系(311検体)である。

2) 公開用症例・遺伝子情報データベース

症例情報データベースに収集した情報は症例数を含めて貴重な情報であり、エクソームの解析結果を加えることによって、今後の日本の眼科診療にとってきわめて貴重な情報源になると期待される。これらの情報を加工して、公開用のウェブサーバーを準備中である。公開用ウェブページには眼底像、網膜断層像、視機能、遺伝子変異情報が網羅される(<http://www.retina.go.jp>)。

3) エクソーム解析

本研究によって収集された6割の432検体についてエクソームシーケンズを行い、解析を行った。国内では初めての全エクソーム解析によって明らかにされたことは、(1)7割の患者は新規遺伝子変異によって発症しており、これまで欧米で報告されたものとは異なる遺伝子変異によって発症することが明らかになった。(2)この中には多数の新規遺

伝子が含まれ、日本人は欧米人とは異なる遺伝子によって発症することが明らかにされた。

(3) 1つの原因遺伝子変異について2家系以上で検出ことは稀であり、日本人の多様性が証明された。日本人は欧米人と同様に多数の原因遺伝子によって発症することが明らかになり、各原因遺伝子について2家系以上での検出が確認されるまで解析を継続する必要がある。

4) 新規遺伝子の発見

本研究では11の新規遺伝子が発見された。眼科分野において単一研究グループからこれほど多くの新規遺伝子が発見されたのは国内では初めてであり、国際的にも珍しい。既知遺伝子は発見されず、未解決の家系も複数存在する。

5) 新規変異(既知遺伝子)の発見

既知遺伝子における新規変異についても多数発見されている。①黄斑ジストロフィー(優性1遺伝子変異)、②網膜色素変性(劣性16遺伝子変異)、③レーベル黒内障(劣性8遺伝子変異)、④オカルト黄斑ジストロフィー(優性1遺伝子変異)、⑤杆体錐体ジストロフィー(劣性1遺伝子変異)など。

6) オカルト黄斑ジストロフィー

オカルト黄斑ジストロフィーの原因遺伝子RP1L1は我々が2010年に発見した(Akahori, Iwata et al., AJHG 2010)遺伝子である。本研究では64家系を収集し、エクソーム解析によって遺伝子変異が遺伝子の2か所に集中していることが明らかになった。①最も多い遺伝子変異はR45Wでこの領域は網膜色素変性の原因遺伝子RP1がコードするタンパク質と相互作用する部位に位置する。②2つめの変異はアミノ酸1200番前後に集中しており、この領域は反復アミノ酸配列の直前に位置しており、タンパク質機能への影響はまだ明らかにされていない。

8) レーベル黒内障

レーベル黒内障は若年性の難病であるが、黄斑部を含む網膜変性や他の臓器の障害が観察される病気である。日本では解析が全く進んでいなかった。本研究では複数の新規遺伝子の発見に加え、2家系以上で発見された遺伝子としてRPE65、RDH12、CRB1が確認され、日本人に多い遺伝子変異として論文を報告した。

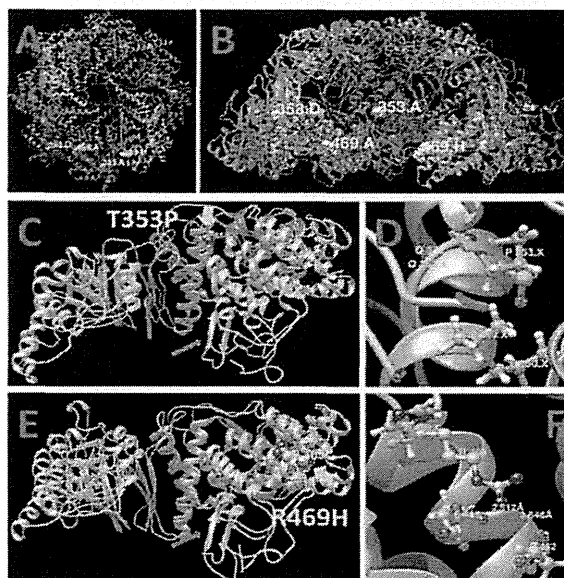
9) 網膜色素変性

網膜色素変性は患者が3万人以上存在すると考えられている網膜疾患である。その他の遺伝性網膜疾患と同様に疾患の予防、治療、遅延の方法は遺伝子治療が1例で成功しているのみである。本研究によって複数の新規遺

伝子および新規変異が発見された。新規変異の中に劣性家系におけるCNGA1遺伝子変異が含まれるが、この変異はタンパク質のN末端よりでトランケーションが起こり、機能不能な短いタンパク質が生成される、事実上機能的ノックアウト状態によって発症している。ノックアウトによって網膜色素変性が発症することは稀であり、実験動物の作製が簡単である。この遺伝子変異の位置を切断するCRISPR/Cas9ベクターを作製し、マウスとカンクイザルについて、ノックアウト動物の作製を開始した。成功すれば世界初の網膜色素変性カンクイザルが期待される。

10) 変異体タンパク質の構造解析(岩田)

変異体のタンパク質構造はNational Eye Institute, National Institute of Health 研究員のYuri Sergeev, Ph.D.によってコンピューターシミュレーションが行われ、正常体との比較が行われた。レーベル黒内障の変異体の構造解析(論文投稿準備中)。



11) 視細胞株および患者iPS細胞を用いた変異体タンパク質の機能解析(岩田)

本研究によって新規遺伝子における遺伝子変異が発見された患者については、通常採血によるリンパ球からiPS細胞を樹立している。遺伝性網膜疾患は何れも視細胞か網膜色素上皮細胞に局在するタンパク質への変異によって発症することから、iPS細胞を両細胞へ分化誘導させている。変異体遺伝子のトランスフェクションとはことなり、患者由来の細胞における変異体の影響を調べることが可能である(Jin, Iwata, Takahashi et al, PLoS One 2011)。

12) 変異体タンパク質を発現する遺伝子改変動物の作製と病理学的解析(岩田)

CNGA1遺伝子変異が機能的ノックアウト

であることから、CRISPR/Cas9システムを用いたノックアウトマウスとノックアウトカニクイザルの作製を開始した。ノックアウトマウスは当研究部で、ノックアウトカニクイザルは医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターの下澤律浩研究員との共同研究によって実施している。ノックアウト動物を作製する過程において、ES細胞を樹立して、計画されたようにCNGA1遺伝子が切断しているか確認する。これが成功すれば世界初の網膜色素変性カニクイザルが期待される。

1 3) 診断キットの作製 (岩田)

本研究事業で発見された新規変異について日本大手診断薬企業と秘密保持契約を結び、その情報を全て伝えた。この変異情報に基づいて、遺伝子変異検出用プローブを作製し、患者でも負担できるような価格帯で検査キットを作製中である。この会社はすでに他の遺伝子変異について、検査キットを検査受託会社に販売しており、平成26年10月の日本臨床眼科学会までに製品の開発をめざす。

1 4) 新薬の開発 (岩田)

本研究事業によって発見された遺伝子変異について、日本大手製薬企業と秘密保持契約を結び、薬による発症の遅延、発症の予防が可能か検討を行っている。今回の解析によって得られた遺伝子変異は欧米人では検出されておらず、アジアの患者に共通する可能性が高い。発症機序の解明によって得られた分子経路に基づいて、その経路を抑制あるいは促進する生体分子を探索し、モデル動物への投与によって発症の遅延、予防を試みる。

D. 考察

本研究は遺伝性眼疾患を対象とした全エクソーム解析としては日本で初めての研究である。8施設から496家系(808検体)の収集に成功し、その6割についてエクソーム解析を行った。我々の予想に反し、黄斑ジストロフィーを含む遺伝性網膜疾患の発症原因の多くは、これまで報告されていない新規遺伝子変異によるものが約7割であることが明らかにされた。先人がPCRとサンガーシーケンスで既知変異を探索しても答えが得られなかった理由が今回の研究によって明らかにされた。原因遺伝子の種類は多岐にわたり、2家系以上で同一遺伝子に変異が検出されるのはオカルト黄斑変性と一部のレーベル黒内障と網膜色素変性稀のみである。さらに残り4割の検体をエクソーム解析することによって新たな遺伝子変異が解明されると思われる。

今回明らかにされた遺伝子変異は日本人特有(あるいは東洋人特有)のものとして今後日本人を含む東洋人で検出されると思われる。このような理由から今回検出された全ての遺伝子変異について、検出プローブを大手

遺伝子検査会社(秘密保持契約締結)と共同で準備中である。10月の臨床日本眼科学会までに製品化をめざしている。

今回明らかにされた新規遺伝子については遺伝子変異によるタンパク質の機能変化や細胞内での働きを解析して、発症機序を明らかにしようとしている。特に新規の黄斑ジストロフィー原因遺伝子とレーベル黒内障原因遺伝子については、変異体のタンパク質相互作用や細胞内での分解作用などに異常が観察されている。動物モデルについてもCNGA1のタンパク質トランケーションをCRISPR/Cas9システムを用いてマウスとカニクイザルのCNGA1遺伝子のゲノム切断を試みている。

今回のエクソーム解析において全ての家系について結果が得られたわけではない。家系によっては候補となる遺伝子変異が少数に絞り込まれたにもかかわらず、エクソン配列から優劣をつけることができず、原因遺伝子が未決定の家系がある。これらの候補遺伝子変異については変異体の機能解析を行う予定である。

E. 結論

日本において全く解析が進んでいなかった遺伝性網膜疾患(黄斑ジストロフィー、レーバー先天性黒内障、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィー)808検体を収集し、その6割について全エクソーム解析を行った。その結果、多数の新規遺伝子変異と新規遺伝子が明らかにされた。日本人は同一眼疾患について、多様な遺伝子を原因として発症しており、臨床像からこれを分類することがきわめて困難であることから、今後遺伝子変異を基準とした診断が主流になると考えられる。

解析結果は京都大学松田教授の厚労省難治性疾患のデータベースに掲載されることになっており、日本の眼疾患としては初めて公開データベースとなる。新規遺伝子については変異体の機能解析が行われており、患者iPS細胞から視細胞や網膜色素上皮細胞に分化誘導させて、変異体の影響を調べている。

遺伝子検査と創薬については、それぞれ大手検査・製薬企業と秘密保持契約を結び、共同開発を行っている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

平成23年度

論文発表

Shen X, Ying H, Qiu Y, Park J-S, Shyam R, Chi Z-L, Iwata T, Yue BYJT. Processing of optineurin in neuronal cells. *J Biol Chem* 2011;286:3618-29

Kabuto T, Takahashi H, Goto-Fukuura Y, Igarashi T, Akahori M, Kameya S, Iwata T, Mizota A, Yamaki K, Miyake Y, Takahashi H. A new mutation in the RP11 gene in a patient with occult macular dystrophy associated with a depolarizing pattern of focal macular electroretinograms. *Mol Vis* 2012;18:1031-9

Hara K, Akahori M, Tanito M, Kaidzu S, Ohira A, Iwata T. Analysis of LOXL1 gene variants in Japanese patients with branch retinal vein occlusion. *Mol Vis* 2011;17:3309-13

Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. Clinical characteristics of occult macular dystrophy in a large family with mutation of RP11 gene. *Retina* 2012; Mar 29 epub

Fujinami K, Akahori M, Fukui M, Tsunoda K, Iwata T, Miyake Y. Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. *Acta Ophthalmol* 2011;89(3):e297-8. doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.01848.x

Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hirami Y, Iwata T, Takahashi M. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2011;6(2):e17084

書籍

岩田岳、「眼科と補体」、『補体への招待』木下タロウ編、189-193、メディカルビュー社 (2011)

岩田 岳、「視力・資格を司る黄斑の生理機能と黄斑変性の分子メカニズム」、『実験医学』、加我君孝編、526-532、羊土社 (2011)

学会発表

第115回日本眼科学会 (東京、2011年5月) 小林宏明、岡本はる、池在龍、村上晶、岩田岳、黄斑変性カニクイザルにおける血漿プロテオーム解析

Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Usui T, Hatase T, Nakamura M, Ohde H, Itabashi T, Okamoto H, Takada Y, and Iwata T. Dominant mutations in RP11 are responsible for occult macular dystrophy. *ARVO* (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Chi Z, Katakai Y, Shimozawa N, Suzuki MT, Iwata T. Microarray analysis of RPE cells isolated from cynomolgus monkey with early-onset drusen formation. *ARVO* (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Kobasyashi H, Okamoto H, Chi Z, Murakami A, Iwata T. Plasma proteome analysis on cynomolgus monkey pedigrees with early onset drusen formation. *ARVO* (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Iwata T, Chi Z, Yoshida T, Fujinami K, Miyake Y, Mizota A, Katakai Y, Suzuki MT, Shimozawa N, Yoshikawa Y, Lambris JD. Inhibition of drusen formation by Compstatin in cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. 5th International Complement Therapeutics Conference, Aegean Conferences (Rhodes, Greece, June 2011)

Iwata T, Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Usui T, Hatase T, Nakamura M, Ohde H. Dominant mutations in RP11 are responsible for occult

macular dystrophy (Miyake's Disease).
ASHG (Montreal, Canada, October 2011)

平成24年度

論文発表

Kabuto T, Takahashi H, Goto-Fukuura Y, Igarashi T, Akahori M, Kameya S, Iwata T, Mizota A, Yamaki K, Miyake Y, Takahashi H. A new mutation in the RP1L1 gene in a patient with occult macular dystrophy associated with a depolarizing pattern of focal macular electroretinograms. *Mol Vis* 2012;18:1031-9

Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. Clinical characteristics of occult macular dystrophy in a large family with mutation of RP1L1 gene. *Retina* 2012; Mar 29 epub

Thakkinstian A, McEvoy M, McKay GJ, Chakravarthy U, Chakrabati S, Kaur I, Silvetri G, Francis P, Iwata T, Akahori M, Farwick A, Euijung R, Edward A, Seddon JM, Attia J. The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 2012;10.1093/aje/kws03

Minegishi Y, Iejima D, Kobayashi H, Chi Z-L, Kawase K, Yamamoto T, Seki T, Yuasa S, Fukuda K, Iwata T. Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein insolubility and initiates familial primary open-angle glaucoma. *Human Molecular Genetics* 2013; Advance online publication

書籍

岩田岳、古野正朗、池尾一穂、全エクソーム解析による遺伝性網脈絡膜疾患の原因遺伝子探索、エクソーム解析 - 成果と将来 - (企画: 松本直道)、医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社 2013;245:401-407

岩田岳、眼疾患をきたす遺伝子変化、第117回日眼評議員会指名講演: 「眼疾患と遺伝子」をより理解するために、日本の眼科、公益社団法人日本眼科医会 2013;84:265-269

岩田岳、Optineurin と正常眼圧緑内障、Digest シリーズ (企画: 本庶佑)、Medical Science Digest、ニューサイエンス社 2013;39:2-4

第115回日本眼科学会 (東京、2011年5月) 小林宏明、岡本はる、池在龍、村上晶、岩田岳、黄斑変性カニクイザルにおける血漿プロテオーム解析

学会発表

岩田岳、次世代シーケンサーを用いた眼疾患の原因遺伝子の探索、116回日本眼科学会、2012年4月、東京

岩田岳、補体抑制による加齢黄斑変性発症抑制の試み、第49回補体シンポジウム、2012年8月、大阪

Takeshi Iwata, Disease and Biology of the Macula, 第1回銀川国際眼科フォーラム、2012年8月、中国銀川市

峯岸ゆり子、小林宏明、家島大輔、岩田岳、オプチニューリン E50K 変異体による正常眼圧緑内障の病態機序の解明、2012年12月、東京

Yuriko Minegishi, Hiroaki Kobayashi, Takeshi Iwata. Comparative functional analysis of optineurin and its glaucoma-related mutant E50K by mammalian cell-based LC-MS/MS proteomics. 2012 Biennial Meeting International Society for Eye Research. August 2012, Berlin, Germany

中山真央、亀井淳三、溝田淳、岩田岳、加齢黄斑変性感受性遺伝子 HtrA1 のトランスジェニックマウスモデルを用いた習慣危険因子 (喫煙) の影響に関する研究、喫煙科学研究財団平成23年度助成研究発表会。2012年7月、東京

田邊和彦、木村至、岡本はる、村上晶、海老原伸行、岩田岳、毛様体における Rab8 および ERM family の発現変化の検討、第23回日本緑内障学会、2012年9月、奈良

平成25年度

論文発表

Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Yoshitake K, Abe K, Ikeo K, Furuno M, Tsunoda K, Kusaka S, Shimomura Y, Iwata T. Longitudinal clinical course of three Japanese patients with Leber congenital amaurosis/severe early childhood onset retinal dystrophy with *RDH12* mutation. *Documenta Ophthalmologica* 2014 in press

Katagiri S, Akahori M, Hayashi T, Yoshitake K, Gekka T, Ideo K, Tsuneoka H, Iwata T. Autosomal recessive cone-rod dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the *EYS* gene. *Documenta Ophthalmologica* 2014 in press

Matsumoto CS, Shinoda K, Matsumoto H, Seki K, Nagasaka E, Iwata T, Mizota A. What monitor can replace cathode ray tube for visual stimulation to elicit multifocal electroretinograms? *Journal of Vision* 2014 in press

Kobayashi H, Okamoto H, Murakami A, Iwata T. Plasma Proteome Analysis On Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Pedigrees With Early Onset Drusen Formation. *Journal of Experimental Animals* 2014 in press

Ohkuma Y, Hayashi T, Sakai T, Watanabe A, Yamada H, Akahori M, Itabashi T, Iwata T, Noda T, Tsuneoka H. Retinal angiomatous proliferation associated with risk alleles of *ARMS2/HTRA1* gene polymorphisms in Japanese patients. *Journal of Clinical Ophthalmology* 2014;8:143-8

Iwata T, Animal Models for Eye Diseases, Handbook of Laboratory Animal Science III, (Editor: Hau J and Schapiro SJ) CRC Press 2014;195-217

Katagiri S, Yoshitake K, Akahori M, Hayashi T, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsuneoka H, Iwata T. Whole-exome sequencing identifies

a novel *ALMS1* mutation (p.Q2051X) in two Japanese brothers with Alstrom Syndrome. *Molecular Vision* 2013;19:2393-406

Sakuramoto H, Kuniyoshi K, Tsunoda K, Akahori M, Iwata T, Shimomura Y. Two siblings with late-onset cone-rod dystrophy and no visible macular degeneration. *Journal of Clinical Ophthalmology*. 2013;7:1703-11

Nakamura N, Tsunoda K, Fujinami K, Shinoda K, Tomita K, Hatase T, Usui T, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. [Long-term observation over ten years of four cases of cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 2013;117:629-40

Fujinami K, Tsunoda K, Nakamura N, Kato Y, Noda T, Shinoda K, Tomita K, Hatase T, Usui T, Akahori M, Itabashi T, Iwata T, Ozawa Y, Tsubota K, Miyake Y. Molecular characteristics of four Japanese cases with *KCNV2* retinopathy: report of novel disease-causing variants. *Molecular Vision* 2013;19:1580-90

Minegishi Y, Iejima D, Kobayashi H, Chi Z-L, Kawase K, Yamamoto T, Seki T, Yuasa S, Fukuda K, Iwata T. Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein insolubility and initiates familial primary open-angle glaucoma. *Human Molecular Genetics* 2013;22:3559-67

書籍

赤堀正和、岩田岳、黄斑ジストロフィー、特集 ゲノムと網膜関連疾患の関与を探る (編集: 山城健児)、*RETINA Medicine*、先端医学社 2014;3:33-37

岩田岳、古野正朗、池尾一穂、全エクソーム解析による遺伝性網脈絡膜疾患の原因遺伝子探索、エクソーム解析 - 成果と将来 - (編集: 松本直道)、*医学のあゆみ*、医歯薬出版株式会社 2013;245:401-407

岩田岳、眼疾患をきたす遺伝子変化、第117回日眼評議員会指名講演：「眼疾患と遺伝子」をより理解するために、日本の眼科、公益社団法人日本眼科医会 2013;84:265-269

岩田岳、Optineurin と正常眼圧緑内障、Digest シリーズ（編集：本庶佑）、Medical Science Digest、ニューサイエンス社 2013;39:2-4

岩田岳、緑内障の遺伝子とその機能解析、緑内障の病態と疫学、高齢者の視覚障害とそのケア（編集：小口芳久）、公益財団法人長寿科学振興財団、2013;107-118

学会発表

Daisuke Iejima; Toru Noda; Atsushi Mizota; Takeshi Iwata. Characterization of HtrA1 Promoter in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration, ARVO 2013 Seattle WA USA

Yuriko Minegishi; Takeshi Iwata Distinct protein complex formation evokes insolubility of OPTN and mislocalization in iPSC-derived neural cells from E50K-POAG patients. ARVO 2013 Seattle WA USA

Yu Kato; Kaoru Fujinami; Natsuko Nakamura; Masakazu Akahori; Takeshi Iwata; Kazushige Tsunoda. Clinical and Molecular Findings in Japanese Cases with *KCNV2*-retinopathy: Report of Novel Variants. 2013 ARVO Seattle WA USA

8 知的所有権の出願・取得状況

- 1 特許取得 無し
- 2 実用新案登録 無し
- 3 その他 無し

II. 分担研究報告

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

研究分担者 池尾 一穂国立遺伝学研究所/生命情報・DDBJ 研究センター

研究要旨

リファレンス配列へのマッピング後、アミノ酸配列の変化を対象に全エクソンを検索し、エクソンの欠損、挿入、反復候補として遺伝子変異を決定する。

A. 研究目的

エクソン配列情報のテンプレート配列へのマッピングと患者-健常者間の比較を行う。基本的にはアミノ酸配列を変化させる変異を対象に全エクソンを検索し、エクソンの欠損、挿入、反復によって報告されていないアミノ酸配列の変化が現れた場合にこれに着目する。候補として挙がってくる遺伝子変異について、東京医療センターにおいて、遺伝子についてのこれまでの報告や、患者や健常者での発生頻度を Taqman アッセイなどによって確認し、疾患遺伝子変異を決定する。

B. 研究方法

1) 健常なカニクイザル5個体と、加齢黄斑変性症に罹患した7個体のカニクイザルの Exome シーケンスを行い、罹患個体でのみ特異的にアミノ酸置換が生じる変異を網羅的に抽出する。

2) 眼科疾患の計390検体を対象に全 Exome シーケンスを行い、標準となっているヒトゲノムとの変異を網羅的に抽出する。抽出

された変異は、劣性遺伝形式、優性遺伝形式の家系ごとに適切なフィルタリングを行い、候補となる変異を網羅的に抽出する。

C. 研究結果

1) 本研究では、アカゲザルのリファレンスゲノムと、Ensembl、Refseq の遺伝子領域の情報を用いた。Exome としてアノテーションづけられている配列は約 50 Mbase である。

1 個体あたり、約 3000 万リード、6 Gbase の配列が得られた。95%以上の配列が読まれた Exon の割合は、86~87%であった。リファレンスとなるアカゲザルのゲノムと比較すると、正常 5、罹患 7 の合計 12 個体併せた場合、9,557,690 個所に変異が見られた。その中で、罹患個体のみが有している変異は 947,875 個所であり、罹患した 7 個体全てで共通に保持している変異は 316 個所であった。さらにその中で、Exon 内の変異で、アミノ酸に置換が生じたもののみを抽出すると、合計 31 個の変異が抽出された。

2) 本研究では Agilent SureSelect

Human All Exon V4+UTRs によって Exome キャプチャを行い、Illumina HiSeq2000 を用いてシーケンスを行った。シーケンスデータから SNV, INDEL 抽出までの一連の解析は Broad Institute の定めた Best Practices Workflow に従い、BWA, Picard, Genome Analysis Toolkit を用いて解析を行った。

今年度は前年度の解析結果を受け、遺伝病の候補変異を絞り込みやすい劣性遺伝形式の家系を中心に解析を行った。劣性遺伝形式が疑われる家系の場合は、基本的には罹患者本人とその両親の 3 人をセットでシーケンスを行い、罹患者の兄弟姉妹の採血が可能な場合には、兄弟姉妹も含めてシーケンスを行った。その結果、今年度は新しく 39 家系 142 検体についてシーケンスを行い、データ解析を行った。優性遺伝形式の原因遺伝子探索は、親子 3 名程度を用いた全 Exome シーケンスでは、候補変異の絞り込みが通常困難になるため、調査した割合的には少なく、7 家系 8 検体のみである。

昨年度までにシーケンスした家系とあわせると、合計 187 家系 390 検体のシーケンスを行ったことになる。

今年度行った解析フローの変更点として、The Human Genetic Variation Database (HGVD) のデータを用いることで、1000 ゲノムデータベースを用いても除去できなかった日本人特有の変異を効率的に除去することが可能となり、候補数を 15% 減少させることができた点が挙げられる。

上記の HGVD も含めた変異解析のフローに関しては、全て国立遺伝学研究所で開発中の次世代シーケンサー解析プラットフォームである Maser というシステムにパイ

ラインとして登録済みである。そのため、他機関の研究者も Maser を用いることで、同様の解析を自動で行うことが可能となっている。

また、今年度は全 Exome シーケンスから解析可能な構造多型についても調査を行った。コピー数変異多型 (CNV) に関しては、XHMM というツールを用いて解析を行った。さらに、大規模な挿入、欠損変異や、逆位、重複に関して Pindel というツールを用いて優性遺伝形式が疑われる家系を中心に解析した。しかし、検出された CNV は抗体の可変領域など、人が本来多コピー持っている遺伝子であり、疾患と結びつくような構造多型は今のところ見つかっていない。

D. 考察

1) 本研究で絞り込まれた 31 個の変異は、15 個が第 7 染色体の 0-30 Mbase 付近に集中しており、本研究からは、この領域に疾患の原因となる変異が存在する確率が高いと考えられる。しかし、この領域は過去に連鎖解析で絞り込まれた領域とは異なっていた。連鎖解析では、診断時のエラーなどを盛り込んだ解析手法が確立しているが、Exome 解析はまだ歴史が浅く、今後サンプル数を増やした際に、変異抽出のエラー、診断時のエラーなどを考慮した、よりロバスト性の高い解析手法の確立が求められる。

2) Exome シーケンスデータから CNV を探索したが、疾患の候補となる CNV は検出されなかった。そもそも、がん細胞では CNV が多数報告されている一方で、遺伝病では CNV の寄与がどの程度あるのか

未だ不明であり、本来 CNV が存在しない可能性も十分にあり得る。さらに Exome シーケンスを行う際には、Exon 領域の濃縮が必要となり、SureSelect による各 Exon 領域のキャプチャ効率のばらつきも問題であった。

以上のキャプチャ効率の問題点は、今後解析手法が全 Exome シーケンスから全ゲノムシーケンスへと移行するにしたがって解決されると期待される。また、CNV 以外の構造多型についても、全ゲノムシーケンスを行うことでイントロン領域の構造多型も検出できるようになるため、検出感度が高まることが期待される。

E. 結論

眼科疾患の検体計 390 検体 (187 家系) について全 Exome シーケンスを実施した。その中の 11 家系については既知遺伝子中の新規変異として論文を作成し、既に 1 報は出版済みである。今後は、病気の原因であるかどうかの検証が難しい新規遺伝子新規変異について、十分な検証を行い、インパクトの高い発見に繋がればと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1 : Mol Vis. 2013 Nov 24;19:2393-406.

Whole-exome sequencing identifies a novel ALMS1 mutation (p.Q2051X) in two Japanese brothers with Alström syndrome.

Katagiri S, Yoshitake K, Akahori M, Hayashi T, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsuneoka H,

Iwata T.

2 : Doc Ophthalmol. 2014 Mar 21.

Autosomal recessive cone-rod dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the EYS gene.

Katagiri S, Akahori M, Hayashi T, Yoshitake K, Gekka T, Ikeo K, Tsuneoka H, Iwata T.

2. 学会発表

2013 年分子生物学会 P1-1044

De novo assembly pipeline development on NGS analysis platform, Maser

Kazutoshi Yoshitake, Nobuyuki Fujii, Norikatsu Monma, Kazuho Ikeo

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

I. 参考文献

なし

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)

平成 23～25 年度 分担研究報告書

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明
「次世代シーケンサーを用いたエクソーム領域の塩基配列解析」

研究分担者 古野正朗 理化学研究所 上級研究員

研究要旨

黄斑ジストロフィーおよび関連する遺伝性網膜関連疾患の原因となる遺伝子を見つけるため、疾患罹患者および健常者より採取された DNA 検体について、全遺伝子を対象としたエクソーム濃縮ライブラリーの作製および次世代シーケンサーによる塩基配列解析を実施した。

A. 研究目的

ハイブリダイゼーション法による DNA 濃縮技術および次世代シーケンサーを用いた高速塩基配列技術を用いて罹患者および健常者の DNA 検体を比較することにより、疾患原因となる遺伝子変異を効率良く発見することが可能となる。本研究では、黄斑ジストロフィーを含む遺伝性網脈略疾患について東京医療センターを中心とする国立大学病院および関連病院が診断・採取した検体より全遺伝子のエクソン領域に対応する DNA を濃縮、次世代シーケンサーによる高速解析を実施することにより、全エクソン領域についての原因遺伝子解析に必要な高品質かつ十分な量の塩基配列データを得ることを目的とする。

B. 研究方法

黄斑ジストロフィーおよび関連する遺伝性網膜関連疾患の家系より採取された DNA 検体を断片化後、ヒトの全遺伝子領域をコ

ードするプローブを用いたハイブリダイゼーションによるエクソーム DNA の濃縮、およびイルミナ社シーケンサー用ライブラリーの調製を行う。ライブラリーを混合後、イルミナ社 HiSeq2000 シーケンサーにより塩基配列解析を実施、目的とするエクソン領域の大きさに対して平均約 100 倍量相当の塩基配列データを得る。得られた配列についてインデックス配列を区別することにより各検体に由来する塩基配列を分離する。得られた塩基配列データについて疾患の原因となる変異解析を行うため、東京医療センターおよび遺伝学研究所に供する。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に当たっては、理化学研究所の倫理委員会に申請し承認を得た。また、臨床診断および検体の採取を行う東京医療センターおよび関連病院についても倫理委員会の承認を得ており、倫理に対して十分

な配慮の元に研究を行っている。

C. 研究結果

東京医療センターおよび関連病院にて遺伝性網膜疾患家系の患者および健常者から採取した血液より抽出された DNA 検体について、エクソームシーケンス解析を行った。

平成 24 年度は 42 検体について解析を実施した。これらの DNA について北海道システム・サイエンス株式会社へ委託し、ヒト全エクソン領域を網羅的にカバーするアジレント社 SureSelect v4 kit を用いた、イルミナ社シーケンス解析に対応したライブラリーを作製した。作製したライブラリーについて、イルミナ社 HiSeq2000 シーケンサーを用いて、7 レーン分の解析を実施し、両端から 100 塩基ずつの配列データを得た。イルミナ社 CASAVA ソフトウェアによるベースコールおよびインデックス配列に基づき各検体由来の塩基配列の分離を実施した結果、42 検体全体で合計約 2450 億塩基 (245 ギガベース)、1 検体あたり平均約 58 億塩基 (5.8 ギガベース) の配列情報データを得た。解析された配列データのうち、約 85% の塩基において Q30 以上の品質を示した。ターゲットとなるエクソン領域の大きさ (約 51 メガベース) に対して、1 検体あたり 100 倍以上に相当する塩基配列データを得ることができた。

当研究プロジェクトでは眼疾患に関する家系について多数の検体を収集しており、エクソーム解析を効率的に進めるためには、エクソーム濃縮およびライブラリー作製のスループットをあげることが重要である。そこで、多検体からのライブラリー作製効

率化に対応するため、エクソーム濃縮およびライブラリー作製の自動化システム (アジレント社 Bravo) を導入、エクソーム解析の高速化および品質安定化を実現した (図 1)。

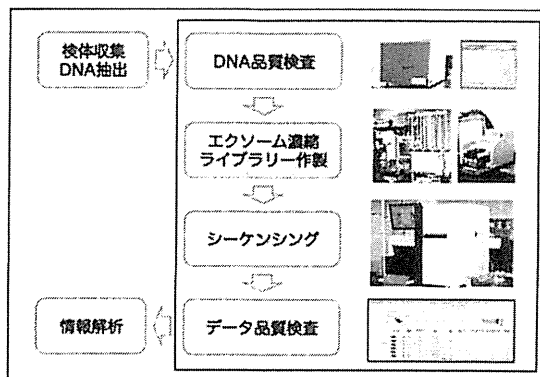


図 1 Exome 解析のフロー

遺伝性網膜疾患家系より収集された検体について、DNA 品質検査、エクソーム濃縮ライブラリー作製、シーケンシング、およびデータ品質検査の各プロセスを実施。得られた塩基配列データは、疾患の原因となる変異を同定するための情報解析に供される。

平成 25 年度は、この自動ライブラリー作製システムを用いて、96 種類の DNA 検体について解析を行った。エクソーム濃縮およびライブラリー作製はアジレント社 SureSelect v4 + UTR kit のプロトコールに従って行った。作製したライブラリーについてイルミナ社 HiSeq2000 シーケンサーを用いて 24 レーン分の解析を実施、両端から 100 塩基ずつの配列データを得た。CASAVA ソフトウェアによるベースコールおよびインデックス配列に基づきそれぞれの検体に由来する塩基配列の分離実施した結果、96 検体全体で合計約 8870 億塩基