

201331007A

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)

地域蓄積・収集した稀少疾患の系統的原因究明

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：吉浦孝一郎

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

平成26年(2014年)3月

目 次

I. 総括研究報告書	
地域蓄積・収集した稀少疾患の系統的原因究明-----	3
吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 次世代シーケンス解析, マッピング, 候補遺伝子解析および変異解析-----	19
研究分担者	
木下 晃（長崎大学原爆後障害医療研究所人類遺伝学・講師）	
三嶋博之（長崎大学原爆後障害医療研究所人類遺伝学・助教）	
吉浦孝一郎（長崎大学原爆後障害医療研究所人類遺伝学・教授）	
2. 次世代シーケンス解析, マッピング, 候補遺伝子解析および変異解析-----	27
研究分担者	
荻 朋男（長崎大学原爆後障害医療研究所分子医学・准教授）	
3. Exome 解析, 迅速診断法の開発, 臨床診断-----	31
研究分担者	
要 匡（琉球大学大学院医学研究科遺伝医学・准教授）	
成富 研二（琉球大学大学院医学研究科遺伝医学・教授）	
4. 炎症疾患診断と試料収集, 炎症疾患遺伝子解析-----	43
研究分担者	
井田 弘明（久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科学・准教授）	
5. 臨床症候群診断, 試料収集-----	47
研究分担者	
渡邊 順子（久留米大学医学部・GC/MS 医学応用研究施設・講師）	
6. 臨床診断, 遺伝カウンセリング-----	51
研究分担者	
園田 徹（九州保健福祉大学保健学部臨床遺伝学・教授）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	53
IV. 主な研究成果の刊行物・別冊 -----	59

I. 総括研究報告書

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))
平成25年度総括研究報告書

研究課題：地域集積・収集した稀少疾患の系統的原因究明

研究代表者：吉浦孝一郎 (長崎大学原爆後障害医療研究所人類遺伝学・教授)

分担研究者

木下 晃 (長崎大学原爆後障害医療研究所人類遺伝学・講師)
三嶋 博之 (長崎大学原爆後障害医療研究所人類遺伝学・助教)
荻 朋男 (長崎大学原爆後障害医療研究所分子医学・准教授)
要 匡 (琉球大学大学院医学研究科遺伝医学・准教授)
成富 研二 (琉球大学大学院医学研究科遺伝医学・教授)
園田 徹 (九州保健福祉大学保健学部臨床遺伝学・教授)
井田 弘明 (久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科学・准教授)
渡邊 順子 (久留米大学医学部・GC/MS 医学応用研究施設・講師)

研究協力者

松本直通 (横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学・教授)

研究要旨

本研究の目的は (1) 大規模高速シーケンサーを利用し、難病・稀少疾患の原因遺伝子を明らかにすること、(2) 遺伝子情報に基づき、その疾患の治療法の開発の基盤とし医療への応用をはかることである。本提案で原因遺伝子解明を目指す疾患は、Cockayne 症候群、C 症候群、末端異骨症、筋線維腫症、筋萎縮性側索硬化症、歌舞伎症候群、遺伝性炎症疾患、LCM 症候群等である。本年は、既収集の whole exome 解析データを収集し、原因遺伝子特定に向けて解析を進めた。

A. 研究目的

本年度は、次世代シーケンサーを用いて稀少疾患の原因遺伝子を特定するべく、whole exome 解析を精力的に

行うことを主眼とした。原因特定作業は長崎 (吉浦研究分担班) と沖縄 (要研究分担班) で担当した。荻グループは、同定した DNA 修復酵素変異の生

化学的機能解析を行い、その他のグループは新規稀少難病疾患の発見に努めた。

B. 方法

(1) Whole Exome 解析の pipeline

クソン部 DNA の濃縮は、Agilent 社の SureSelect All exon v2 (38M) キットまたは、All exon v5 を使用して行った。年度当初は、長崎において自らデータ取得の際に 5500xlSOLiD システムを使用した。しかし、年度終盤は Illumina HiSeq2500 が導入され、HiSeq2500 を活用した。

得られたデータが 5500xlSOLiD システムによる場合には NovoalignCSMPI (Novocraft 社, Malaysia) を使用し、Illumina 系のデータの場合には、NovoalignMPI を使用してゲノム塩基配列に整列させた。生成された VCF file を Genome Data Toolkit (GATK) を用いて、細部を再配列、微調整させ Base-quality score を計算させた。

検出された塩基置換および Insertion/Deletion, は ANNOVAR によ

って注釈付けした。dbSNP (Build 135) に登録されている rs 番号は、annotation file に含めた。1000Genome project に登録されている 2500 名の 4x(depth)ゲノム塩基配列決定によって得られているアレル頻度、NHLBI exome プロジェクトに登録されている 6500 名の exome データによって得られているアレル頻度は、そのアレル頻度を annotation file に含めて記述した。また、Annotation file には Segmental duplication 情報を記述した。最近は、「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）」の拠点班による日本人 1,208 人の WES の変異頻度情報も加味した annotation を行っている。以上の全ての情報をもとに疾患の候補変異の選択時には、rs 番号、アレル頻度、個人での zygosity の状況を組み合わせて deleterious (有害)な変異を候補遺伝子、候補変異として残す作業 (filtering step, prioritizing step) を行った。Prioritizing step は次ぎに示すとおりである。

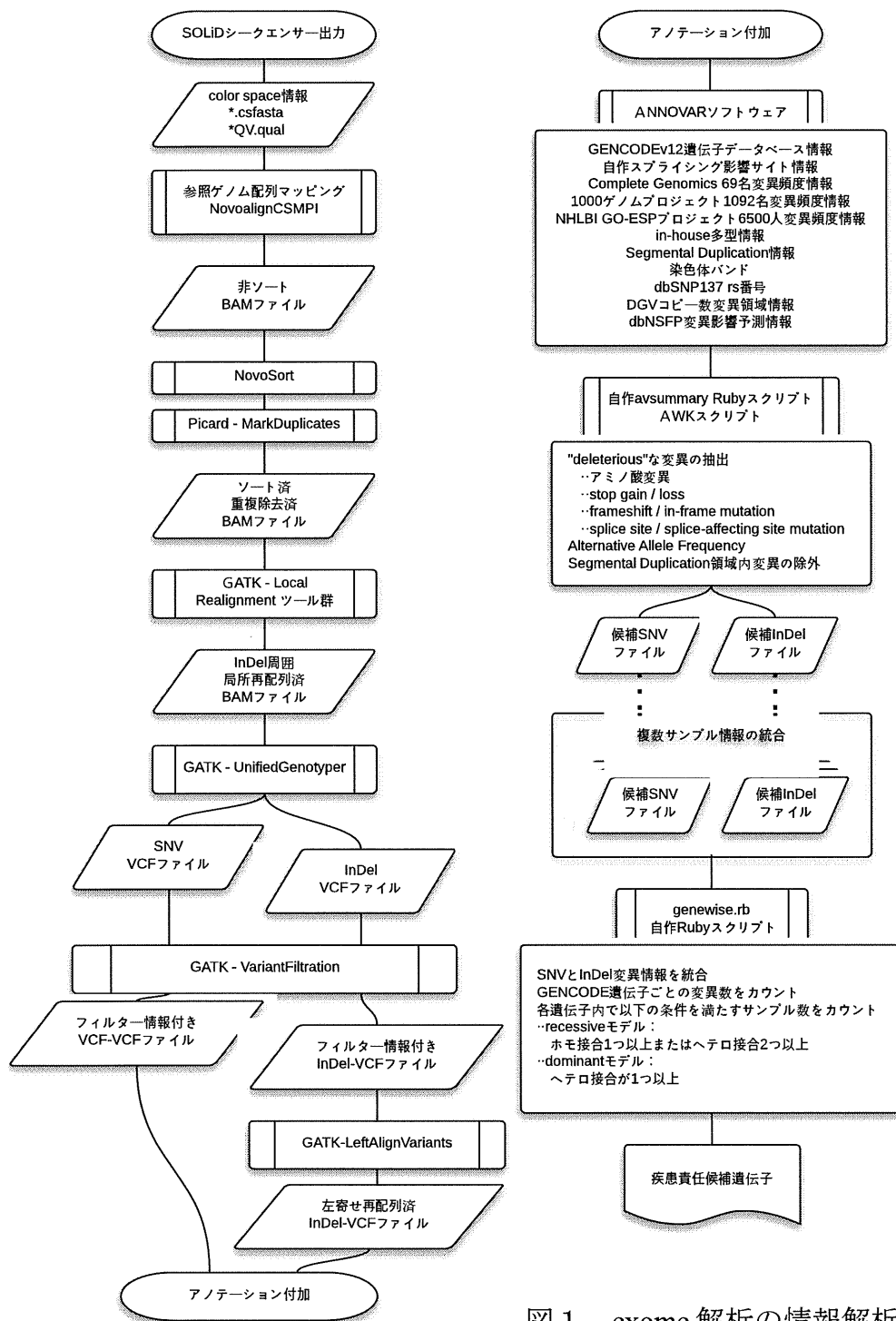


図1. exome解析の情報解析 pipeline

(2) 稀少疾患患者の収集

基本的には、これまで収集していた稀少疾患の解析を基盤に据え、他の研究班が扱わない様な疾患に目標を置いて解析する事をめざした。新規の稀少疾患収集のために長崎県内の医療型児童入所施設みさかえの園むつみの家の医師である近藤達郎医師を中心に九州 dysmorphology 研究会を立ち上げ、稀少疾患の収集に努めた。

(3) 原因遺伝子確定後の NGS を用いた研究的スクリーニング診断および臨床診断業務

三角頭蓋を認め、臨床的な C 症候群または確実な C 様症候群、結合織に異常を来す疾患群、難聴をきたす疾患、Aarskog-Scott 症候群、指節癒合症候群、歌舞伎症候群、DNA 修復異常症候群についても原因遺伝子の全エクソン領域をカバーするターゲットリシーケンス解析系を構築した。ターゲット濃縮は、Agilent 社の SureSelect, あるいは multiplex PCR 法にて調製を行った。

C (様) 症候群は、頭蓋骨早期癒合の一つである前頭縫合の早期癒合により三角頭蓋を特徴とするが、三角頭蓋を呈する症候群は他にも知られており、また、他の頭蓋骨癒合と合併することもある。よって、これらを包括的に診

断可能にするため、頭蓋骨早期癒合を呈する疾患を全てについて網羅的に診断可能とする系を構築した。加えて、C (様) 症候群は、皮膚弛緩も特徴としており、これらを含めた結合織の異常に関連する疾患群もリストアップし、網羅的遺伝子診断の対象とした。対象とした症候群は 212 疾患とし、本研究により判明した疾患遺伝子を含め、総遺伝子数 96, 総エクソン数 2321, 総アンプリコン数 19997, 総解析長 1.07Mb の濃縮系 (頭蓋骨早期癒合疾患および結合織関連疾患の遺伝子診断パネル) をセットアップした。

歌舞伎症候群に関して、MLL2 遺伝子と KDM6A 遺伝子に関しては、AMpliSeq 法 (multiplex PCR 法) にて調整した。アンプコン数は約 200 である。歌舞伎症候群に関しては、変異解析が完全ではなかった症例を再解析した。シーケンスは、IonProton で行い、変異の検出は、IonProton 付属の variant call にて行った。

C. 結果

(1) 稀少疾患の exome 解析状況一覧

長崎、沖縄で exome 解析進行中の疾患群を以下の表に記載する。

表 2 : exome 解析中の疾患群

Disease	MIM number	Symptoms	Inherit pattern	Genes	Status
UVSSA	614632	紫外線感受性	AR	KIAA1530 (UVSSA)	Nature Genetics 報告
Cockayne Syndrome, Xeroderma Pigmentosum, and Fanconi Anemia	heterogenous	紫外線感受性	AR	ERCC1-XPF	American Journal of Human Genetics 報告
Burugada 症候群	heterogenous	心臓伝導障害	AD	Known gene &	論文作成中

				New gene	
WHIM-like 症候群	606593	Wart, Hypogammaglo bulinemia, Myelokathexis	AD?	LIG4	論文作成中
Acrodysostosis	101800 604603		AR	PRKAR1A PDE4D GNAS	論文投稿中
C- like syndrome			AD	geneX (3 de novo 変異)	機能解析中
家族性筋線維腫症	228550	筋線維腫	AD	PDGFRB	論文作成中
中條-西村症候群様疾 患群				1 de novo 変 異同定	機能解析中
家族性肺がん	SFTP(-)	肺がん	AD	70 候補遺伝 子	孤発肺がん 例にて変異 screening 中
下垂体低形成症	262600 (PROP1)以外	下垂体ホルモ ン不全	de novo?	4 candidate de novo mutation, confirmed	確認のため に症例待ち s
腎臓骨化症	No entry	腎臓へのカル シウム沈着 (骨 化)	AR?	candidate 3 genes	確認のため に症例待ち
Zimmerman-Laband 症 候群	135500	Gingival fibriomatosis, absent nail	de novo?	De novo mutation 確 認中	確認のため 症例待ち
ALS	heterogenous	Motor neuron deficiency	AR? AD?	SETX (AD) その他	原因遺伝子 不明
LMC 症候群	(chandler et al., 2006)	Leukodysplasia Microcephaly Cerebral malformation	AR?	Not found	原因遺伝子 不明 (HiSeq2500 にてデータ再 取得中)
Kabuki 症候群	MLL2 (-) KDM6A(-)	Eversion of the lower eyelids	AD	左記遺伝子 以外 Not found	原因遺伝子 不明 (HiSeq2500 にてデータ再 取得中)

Arrhinia	No entry	無鼻症	de novo	Not found	原因遺伝子不明 (HiSeq2500にてデータ再取得中)
習慣性不育症	No entry	習慣性不育	AD? AR?	Not found	原因遺伝子不明 (HiSeq2500にてデータ再取得中)
Beckwith-Wiedemann症候群	130650		AR 変異探し	Not found	原因遺伝子不明 (HiSeq2500にてデータ再取得中)
間葉性異形成胎盤	No entry	胎状奇胎様胎盤	??	Not found	原因遺伝子不明 (HiSeq2500にてデータ再取得中)

3) ターゲット遺伝子の解析

結合組織病関連遺伝子スクリーニング対象とした症候群は212疾患とし、本研究により判明した疾患遺伝子を含め、総遺伝子数 96, 総エクソン数 2321, 総アンプリコン数 19997, 総解析長 1.07Mb の濃縮系 (頭蓋骨早期癒合疾患および結合組織関連疾患の遺伝子診断パネル) をセットアップした。本遺伝子診断パネルを使用して、冠状縫合早期癒合を呈する患児, 細長い指趾, 関節拘縮を呈する患児の遺伝子解析を行った結果, *FGF2* 遺伝子, *FBN2* 遺伝子変異を同定した。

症候性, 非症候性難聴に関連した原因 74 遺伝子について, エクソン及び flanking 50bp をターゲットとしたキャプチャーパネルを作製した。これらについては, 現在スクリーニング進行中である。ターゲット領域に対する推定カバー率は 97.67%であった。カバーの薄い領域については, マルチプレックス PCR にて増幅し, 補完を行った。

歌舞伎症候群に関して, *MLL2* 遺伝子と *KDM6A* 遺伝子に関しては, AMpliSeq 法 (multiplex PCR 法) にて

調整した。アンプコン数は約 200 である。新規症例も含めて 72 例の変異解析を行った。これまでに, 確認されている変異は, ほぼ検出される。検出出来ない部分は, amplicon が設定されていない等の部分であり, multiplex PCR 法にて充分スクリーニング可能である。歌舞伎症候群では, *MLL2* 遺伝子と *KDM6A* 遺伝子に変異を認めない症例が 12 例ある。これらの既知原因遺伝子変異陰性例は, exome 解析を進めているが, 新規の原因変異は見つっていない。

D. 考察

明確に, 原因遺伝子と確定できた疾患と新規原因遺伝子

疾患名 ----- 遺伝子名

UVSSA-----UVSSA

(KIAA1530)

Cockayne Syndrome----ERCC1/XPF

Seckel Syndrome-----ATRIP

Lentz syndrome-----BCOR1

Acrodysostosis-----PDE4D, PRKAR1A,
geneA

C syndrome -----geneB

Neuropathy (Okinawa type)--TFG
Brugada syndrome-----geneC
WHIM-like syndrome---LIG4

確定的でないが、可能性がある疾患と
遺伝子（確認中もふくめて）

Ohdo syndrome
Calcified kidney
Familial lung cancer
汎下垂体低形成

未だ原因不明の疾患と遺伝子

ALS-----一般集団にある既知原
因遺伝子内の rare variant のみ検
出（しかし、原因の可能性も残
る）

LCM syndrome----- 3 名間で共通の変
異遺伝子が見つからない

Arhinia ----- HiSeq2500 data 再解析
中

Familial cataract - HiSeq2500 data 再解
析中（連鎖解析データあり）

習慣性不育症 ----- HiSeq2500 data 再
解析中

Zimmermann-Laband syndrome -----
HiSeq2500 data 再解析中

Familial arterial venous
malformation----- HiSeq2500
data 再解析中（連鎖解析データ
あり）

Nakajo-Nishimura syndrome ----
HiSeq2500 data 再解析中

Combined immunodeficiency --
HiSeq2500 data 再解析中

歌舞伎症候群 ----- MLL2, KDM6A 以外
は、全く不明

臨床的に典型的な先端異骨症患児
の exome 解析, Sanger シーケンス解析
結果より, 典型的ホルモン感受性先端
異骨症の多くは, *PDE4D* 遺伝子が原
因と推定された。本疾患は, 遺伝的異
質性があり, 実際に, 臨床遺伝専門医

により先端異骨症と診断された 4 人
の Sanger シーケンス解析において, 未
だ 1 人に遺伝子変異を確認できてい
ない。

また, 本疾患は, 臨床的に疾患概念
が確立しておらず, 現場では, やや軽
症と思われるタイプや内分泌学的に
ホルモン反応性の違いのあるタイプ
などが混在していると思われる。加え
て, 鑑別診断として重要な偽性副甲
状腺機能低下症と症状がオーバーラ
ップしている例もあり, 遺伝子解析結
果と合わせて, 疾患分類を新たに行う
必要がある。これらの混在も一因と思
われるが, 前述の結果からも, 本疾患
の原因は他にもあると推定される。

今回, 非典型的患者の whole exome
解析から新たに原因遺伝子が見つ
かったことは, 遺伝的異質性を示すと
ともに, これらの蓄積によって疾患を
引きこすのに重要なシグナル伝達経
路や, 遺伝子型—症状関係を明らか
にできると思われた。

今後, さらに他の原因遺伝子同定も
行い, 遺伝子型と症状のデータを蓄
積し, 先端異骨症の疾患概念, 新し
い疾患分類を提唱できるとされる。

現在までに, C様症候群において,
exome解析にて 1 人に *ASXL1* 遺伝子
変異を確認し, また, 15 人中 4 人に
ASXL1 遺伝子変異を同定していた
が, 今回, whole exome解析の結果,
ASXL1 遺伝子, *CD96* 遺伝子に変異を
認めない患児に新規原因遺伝子と
推定される変異を計 3 人確認した。
以上より, CあるいはC様症候群に
遺伝的異質性がある事は明確であ
り, 全貌を明らかにする必要がある
ことを示している。本疾患に対して
は遺伝子解析により確定診断を行
うことが必要であると思われるた
め, 原因遺伝子の同定は今後も重
要であると思われた。また, C (様)
症候群の病態解明に向け, 新規原因
遺伝

子の機能解析も必要であると思われた。

原因不明稀少疾患症例は、臨床現場からの解析要望は、多い。しかし、稀少であるから1例だけの解析になり、基本は原因不明のままである。新生突然変異であり、極めて有害変異と推測可能で、かつ変異遺伝子はその病態を説明出来ると合理的に説明出来る場合に、原因変異であろうと推察できる。それ以外の場合には、1例解析では、新規原因遺伝子の同定は、不可能である。しかしながら、WHIM-like 症候群では、1例症例で片親だけの解析であったが、LIG4 の変異であるとほぼ確定でき、骨髄移植の適応まで進めることが出来た。理由は、遺伝子機能が判明していて、変異が極めて有害であると推察できたことによる。

以上からいえることは、NGS を利用した原因不明稀少疾患解析は、一部の患者には絶大な恩恵をもたらす、予後改善、医療に直結する。遺伝子変異から診断可能で、薬あるいは治療方針が決定出来る。しかし、多くの1例稀少疾患は、既知の遺伝子上の変異でなければ、治療に確実に結びつけられない。やはり、稀少疾患であっても臨床的に均一な症候群集団として試料を整理し、系統的に解析して行かなければならない。

NGS を用いての疾患名がある程度推測される様な場合の迅速遺伝子解析(ほぼ、確定診断を求める場合)は、精度高く、効率のよい解析法であることが示された。ベンチトップ型のNGS を使用した解析でも、従来の Sanger シーケンス解析に比較して、解析コスト、解析時間、解析可能検体数は、いずれも Sanger 型を凌駕するものである。また、ハイブリダイゼーションを基盤にした濃縮法も、Multiplex PCR 法を基盤にした濃縮法もどちらの方法も十

分に正確に診断ツールとして使えることが明らかとなった。今後は、ベンチトップ型の次世代シーケンサーを用いた、臨床でのシーケンス検査が一般に普及していくと考えられる。今回の結果および NGS の性能から考えると、さらに多検体あるいは、多数の疾患遺伝子を対象とした、NGS 解析による迅速な遺伝子解析(診断)が可能と考えられた。

今後、さらに多検体あるいは、多数の疾患遺伝子を対象とした、NGS 解析による包括的で迅速な遺伝子解析(診断)へ向け、整備を行うこと必要であると考えられた。点状軟骨異形成症例における、母親の高深度ターゲットリシーケンス解析による体細胞低頻度モザイクの検出は、NGS の特性を十分に発揮した結果と言える。Sanger 型シーケンス解析において、検出困難な低頻度モザイクの検出は、臨床的に重要な性腺モザイクの推定を可能とし、症例の遺伝カウンセリング、診療方針の決定等において、今後必須の解析となりうると思われた。

E. 結論

Whole exome 解析によっていくつかの原因不明遺伝子疾患の新規原因遺伝子を明らかにした。次世代シーケンサーを利用した原因不明の遺伝性疾患の解析に優性遺伝、劣性遺伝を問わず有効であった。特に whole exome 解析法は、単一家系例や孤発例の多い奇形症候群の原因同定にも非常に有用であることが示された。

これら原因遺伝子がある程度判明した稀少疾患の臨床では、網羅的で迅速な遺伝子診断の実現が望まれるが、今回作製した頭蓋骨早期癒合および結合織関連遺伝子診断パネル、難聴関連遺伝子診断パネルを例として、特定

の症状や関連疾患をターゲットとした網羅的遺伝子診断パネルは、今後臨床での実用化に向けて重要になると思われた。

原因不明稀少疾患症例は、臨床現場からの解析要望は、多い。しかし、稀少であるから1例だけの解析になり、基本は原因不明のままである。新生突然変異であり、極めて有害変異と推測可能で、かつ変異遺伝子はその病態を説明出来ると合理的に説明出来る場合に、原因変異であろうと推察できる。WHIM-like 症候群では、1例症例で片親だけの解析であったが、LIG4 の変異であるとはほぼ確定でき、骨髄移植の適応まで進めることが出来た。理由は、遺伝子機能が判明していて、変異が極めて有害であると推察できたことによる。

以上からいえることは、NGS を利用した原因不明稀少疾患解析は、一部の患者には絶大な恩恵をもたらす、予後改善、医療に直結する。遺伝子変異から診断可能で、薬あるいは治療方針が決定出来る。しかし、多くの1例稀少疾患は、既知の遺伝子上の変異でなければ、治療に確実に結びつけられない。やはり、稀少疾患であっても臨床的に均一な症候群集団として試料を整理し、系統的に解析して行かなければならない。

高深度ターゲットリシーケンス解析による低頻度体細胞モザイクの検出は、これまで不可能であった性腺モザイク（卵巣）の推定を可能とし、臨床において重要な手法となると考えられた。

——達成度について——

研究開始時の解析目標とした症例群は、全て解析し、目標が達成したと判断している。しかし、稀少疾患新規原因遺伝子は単離数が少ない。

長崎 dysmorphology 研究会および、九州内の臨床遺伝学、小児遺伝学の専門医を中心に稀少疾患情報の提供集中がなされるようなシステムを構築した。

次世代シーケンサーを用いて、頭蓋骨早期癒合や難聴など症状を基にした網羅的で低コストの遺伝子群解析システム（遺伝子診断パネル）を開発したこと、プロモーター領域も含めた包括的遺伝子解析が行える例を示せたこと、ターゲット領域の高深度シーケンス解析により性腺モザイクを推定できる低頻度体細胞モザイクを検出できたことは、臨床応用に向けた大きな進展である。今後は、次世代シーケンス解析を中心とした原因特定解析を継続し、また、臨床での応用を目指し、NGS を活用した稀少疾患の遺伝子解析を継続することで、実践的な網羅的包括的遺伝子診断法を確立できると考えられる。

——今後の展望について——

本研究を含めて、NGS を有効に活用した疾患解析は、稀少疾患の原因解明や迅速遺伝子診断への有用性が示された。しかし、一方では、現在のNGS解析技術および現在のゲノム情報・知識では、原因同定に至らない疾患（患児）も多数存在することが明らかになった。

今後は、稀少疾患収集の集約化（本研究班には琉球大学遺伝性疾患データベースと九州 dysmorphology 研究会）をはかって、稀少疾患収集を進める必要があるし、進める。これら稀少疾患の収集・解析拠点・診断拠点としての役割をめざす。

現在も、未だ原因同定に至っていない疾患（患児）について、新規に長崎大学原爆後障害医療研究所に導入された HiSeq2500 を使ってゲノム data

収集を進めており、いくつかの新規疾患原因遺伝子が明らかに出来るものと期待している。

今回の一連の研究では、特に「新規

原因遺伝子発見」ということに重きをおいたが、今後は遺伝子診断拠点としての責務を担うことも可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Sasaki K, Mishima H, Miura K, Yoshiura KI. Uniparental disomy analysis in trios using genome-wide SNP array and whole-genome sequencing data imply segmental uniparental isodisomy in general populations. *Gene* 2013. 512(2):267-274.
2. Yamada A, Ishikawa T, Ota I, Kimura M, Shimizu D, Tanabe M, Chishima T, Sasaki T, Ichikawa Y, Morita S, Yoshiura KI, Takabe K, Endo I. High expression of ATP-binding cassette transporter ABCB11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival. *Breast Cancer Res Treat* 137(3): 773-782, 2013.
3. Ishikawa T, Toyoda Y, Yoshiura K, Niikawa N. Pharmacogenetics of human ABC transporter ABCB11: new insights into apocrine gland growth and metabolite secretion. 2013. *Front Genet* 3: 306.
4. Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenat Diagn* 2013. 33(3): 214-222.
5. Higashimoto K, Maeda T, Okada J, Ohtsuka Y, Sasaki K, Hirose A, Nomiya M, Takayanagi T, Fukuzawa R, Yatsuki H, Koide K, Nishioka K, Joh K, Watanabe Y, Yoshiura KI, Soejima H. Homozygous deletion of DIS3L2 exon 9 due to non-allelic homologous recombination between LINE-1s in a Japanese patient with Perlman syndrome. *Eur J Hum Genet* 2013. 21(11):1316-1319.
6. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasa K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H. Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. *J Hum Genet* 58(5): 250-253. 2013.
7. Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura KI, Masuzaki H. Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. *J Med Virol* 2013 85(12): 2093-2100.
8. Nakao K, Oikawa M, Arai J, Mussazhanova Z, Kondo H, Shichijo K, Nakashima M, Hayashi T, Yoshiura K, Hatachi T, Nagayasu T. A Predictive Factor of the Quality of Microarray Comparative Genomic Hybridization Analysis for Formalin-fixed Paraffin-embedded Archival Tissue. 2013. *Diagn Mol Pathol* 22(3):174-180.
9. Hasegawa Y, Miura K, Furuya K, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of Complete Hydatidiform Mole

- Pregnancy-Associated MicroRNAs in Plasma. *Clin Chem* 2013. 59(9):1410-1412.
10. 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, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Sep;161(9):2234-2243.
 11. Kashiwara K, Nakazawa Y, Pilz D, Guo C, Shimada M, Sasaki K, Fawcett H, Wing J, Lewin S, Carr L, Yoshiura K, Utani A, Hirano A, Yamashita S, Greenblatt D, Nardo T, Stefanini M, McGibbon D, Sarkany R, Fassih H, Takahashi Y, Nagayama Y, Mitsutake N, Lehmann AR, and Ogi T. Malfunction of Nuclease ERCC1-XPF Results in Diverse Clinical Manifestations and Causes Cockayne Syndrome, Xeroderma Pigmentosum, and Fanconi Anemia. *The American Journal of Human Genetics*, **92**: 807-819, 2013.
 12. Woodbine L, Neal JA, Sasi NK, Shimada M, Deem K, Coleman H, Dobyns WB, Ogi T, §Meek K, §Davies EG, §Jeggo PA. PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *The Journal of Clinical Investigation*, **123**: 2969-2980, 2013.
 13. Matsuse M, §Mitsutake N, Tanimura S, Ogi T, Nishihara E, Hirokawa M, Fuziwara CS, Saenko VA, Suzuki K, Miyauchi A, Yamashita S. Functional characterization of the novel BRAF complex mutation, BRAF (V600delinsYM), identified in papillary thyroid carcinoma. *International Journal of Cancer*, **132**: 738-743, 2013.
 14. Kaname T, Yanagi K, Naritomi K. A commentary on the promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*, (2014) in press. (Doi:10.1038/jhg.2014.7).
 15. Suzumori N, Kaname T, Muramatsu Y, Yanagi K, Kumagai K, Mizuno S, Naritomi K, Saitho S, Sugiura M. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstetr Gynaecol Res*, 39:1545-1547, 2013.
 16. Ganaha A, Kaname T, Yanagi K, Naritomi K, Tono T, Usami S, Suzuki M. Pathogenic substitution of IVS15 + 5G > A in SLC26A4 in patients of Okinawa Islands with enlarged vestibular aqueduct syndrome or Pendred syndrome. *BMC Med Genet* 14:56, 2013.
 17. Altıncık A, Kaname T, Demir K, Böber E. A novel mutation in a mother and a son with Aarskog-Scott syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 26:385-388, 2013.
 18. Kaname T. Female carrier, Maloy S, Hughes K. Eds. '*Brenner's Encyclopedia of Genetics 2nd edn.*' Elsevier, Oxford, 30-32, 2013.
 19. Kaname T. Inversion, Maloy S, Hughes K. Eds. '*Brenner's Encyclopedia of Genetics 2nd edn.*' Elsevier, Oxford, 135, 2013.
 20. 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*, 161A:1221-1237, 2013.
21. Migita K, Agematsu K, Masumoto J, Ida H, Honda S, Jiuchi Y, Izumi Y, Maeda Y, Uehara R, Nakamura Y, Koga T, Kawakami A, Nakashima M, Fujieda Y, Nonaka F, Eguchi K, Furukawa H, Nakamura T, Nakamura M, Yasunami M. The contribution of SAA1 polymorphisms to Familial Mediterranean fever susceptibility in the Japanese population. *PLoS One* 8(2):e55227, 2013.
 22. Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T. Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: a previously unrecognized complication. *Pediatrics*, 131(1):e327-330. 2013.
 23. Miyake N, Yano S, Sakai C, Hatakeyama H, Matsushima Y, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, 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 Mutat*. 34(3):446-452, 2013.
 24. Okano Y, Kobayashi K, Ihara K, Ito T, Yoshino M, Watanabe Y, Kaji S, Ohura T, Nagao M, Noguchi A, Mushiake S, Hohashi N, Hashimoto-Tamaoki T. Fatigue and quality of life in citrin deficiency during adaptation and compensation stage. *Mol Genet Metab*. 109(1):9-13, 2013.
 25. Nakashima S, Watanabe Y, Okada J, Ono H, Nagata E, Fukami M, Ogata T. Critical role of Yp inversion in PRKX/PRKY-mediated Xp;Yp translocation in a patient with 45,X testicular disorder of sex development. *Endocr J*. 60(12): 1329-1334, 2013.
 26. Ikewaki N, Sonoda T, Inoko K. Unique properties of cluster of differentiation 93 in the umbilical cord blood of neonates. *Microbiol Immunol* 2013 Dec 57(12): 822-832.
- 邦文
1. 遺伝性疾患におけるエクソーム解析の有用性と近将来. 吉浦孝一郎 医学のあゆみ, 245(5):363-368, 2013.
 2. 全エクソーム解析における情報処理. 三嶋博之 医学のあゆみ, 245(5):345-351, 2013.
 3. 常染色体優性遺伝性疾患のエクソーム解析. 要 匡, 柳久美子: 医学のあゆみ 245:381-385, 2013.
 4. 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼの分子メカニズム. 黒滝直弘, 小野慎二, 小澤寛樹, 吉浦孝一郎 神経内科 79(6):718-725, 2013.
 5. 右田清志、野中文陽、和泉泰衛、江口勝美、中村正、井田弘明、上松一永: 家族性地中海熱の臨床 炎症と免疫 21: 40-46, 2013.
 6. 川上純、右田清志、井田弘明: 自己炎症疾患 medicina 50:458-62, 2013.
 7. 井田弘明 遺伝性発熱性疾患の遺伝子診断ガイドライン リウマチ科 50:507-511, 2013
 8. 井田弘明 自己炎症症候群 最新医学社 68:2561-2569, 2013
 9. Molecular cloning and characterisation of UVSSA, the responsible gene for UV-sensitive syndrome. Ogi T, Nakazawa Y, Sasaki K, Guo C, Yoshiura K, Utani A, Nagayama Y. *Journal of Biochemistry*

(Tokyo). 85: 133-144, 2013.

2) 学会発表
国際学会

**1. American Society of Human Genetics,
63rd Annual Meeting, Boston
Convention Center & Exhibition Center,
October 22-26, 2013, Boston**

An infantile case of hepatomegaly, lactic acidosis, hypoglycemia, ketosis, and hyperlipidemia of unknown etiology. **Authors:** Watanabe Y, Seki Y, Yanagi T, Mizouchi T, Takeuchi T, Iwamoto J, Yoshino M, Watanabe S, Inokuchi T, Yano S, Yoshiura K, Matsuishi T.

579T: Detection of variations and their frequencies of the CCR5 gene and its promoter region in Japanese and Okinawan population by NGS analysis using pooled DNAs **Authors:** T. Kaname, K. Yanagi, M. Higa, S. Song, K. Naritomi

**2. EUROPEAN Human Genetics
CONFERENCE 2013, Paris, France,
June 8-11, 2013.**

P01.047: A novel *ARSE* mutation in a patient with chondrodysplasia punctata 1 and in his mother with low frequent somatic and/or germline mosaicism detected by deep sequencing using NGS. **Authors:** Tadashi Kaname, Kenji Kurosawa, Kumiko Yanagi, Kenji Naritomi

P02.105: Identification of two novel mutations in the NOG gene in patients with Symphalangism syndrome. **Authors:** A. Ganaha, T. Kaname, K. Yanagi, K. Naritomi, M. Suzuki

**3. 12th International Congress of Inborn
Errors of Metabolism 2013.9.3-9.6
(Barcelona)**

Mitochondrial ubiquinol-cytochrome c

reductase core protein II defects may affect multiple metabolic pathways. Yano S, Miyake N, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Goto Y, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N.

Intragenic deletion in ornithine transcarbamylase gene associated with nonhomologous recombination between an AluSx and MER68 repetitive sequences. Yoshino M, Harada N, Watanabe Y, Soejima M, Koda Y, Okano Y, Nakamura H, Yorifuji T.

**4. The 3rd Asian Congress for Inherited
Metabolic Diseases (ACIMD)
2013.11.27-29 (Urayasu, Chiba)**

**The 55th Annual Meeting of Jte Japanese
Society for Inherited Metabolic Disease
(JSIMD),**

Watanabe Y, Seki Y, Yanagi T, Mizouchi T, Takeuchi T, Iwamoto J, Yoshino M, Watanabe S, Inokuchi T, Yano S, Yoshiura K, Matsuishi T. : An infantile case of hepatomegaly, lactic acidosis, hypoglycemia, ketosis, and hyperlipidemia of unknown etiology.

Okano Y, Kobayashi K, Ihara K, Ito T, Yoshino M, Watanabe Y, Kaji S, Ohura T, Nagao M, Noguchi A, Mushiaki S, Hohashi N, Hashimoto-Tamaoki T. : Fatigue and quality of life in citrin deficiency during adaptation and compensation stage.

Yoshino M, Harada N, Watanabe Y, Koda Y, Okano Y, Nakamura H, Yorifuji T. : Application of SNP-based haplotype analysis to prenatal monitoring in a pregnancy at risk for ornithine transcarbamylase deficiency.

Harada N, Yoshida M, Watanabe Y, Soejima M, Koda Y, Okano Y, Nakamura H, Yorifuji T. : Intragenic

deletion in OTC gene associated with nonhomologous recombination between an AluSx and MER68 repetitive sequences.

国内学会等

1. 第9回広島大学-長崎大学連携研究事業カンファランス -放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業- 2013年6月1日(土), 場所: 広島大学霞キャンパス, 広島

地域集積して認められた筋萎縮性側索硬化症6名の exome 解析. 吉浦孝一郎, 木下晃, 三嶋博之, 佐々木健作, 辻野彰, 川上純

2. 公開シンポジウム-次世代遺伝子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- 平成25年7月13日13時~17時, 場所: 都市センターホテル コスモスホール

個別疾患に対するアプローチ及び地域での取り組みについて

地域蓄積・収集した稀少難病の遺伝子原因究明と遺伝性疾患診断システムの構築. 吉浦孝一郎

3. 第58回日本人類遺伝学会 2013年11月20日(水)~23日(土), 江陽グラウンドホテル, 仙台

O19: Ion AmpliSeq™ Custom Panel を用いた Kabuki 症候群の変異解析. 渡辺聡, 三嶋博之, 朝重耕一, 木下晃, 吉浦孝一郎

O32: シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析. 大塚康史, 佐々木健作, 城崎幸介, 東元 健, 岡本伸彦, 高間勇一, 窪田昭男, 松本富美, 中山雅弘, 吉浦孝一郎, 副島英伸

O44: TogoWS REST サービスによる

UCSC ゲノムデータベースの利用. 三嶋博之, 西澤達也, 吉浦孝一郎, 片山俊明

O67: PRRT2 の変異は発作性運動誘発性ジスキネジアだけでなく良性家族性乳児けいれんの原因でもある. 黒滝直弘, 小野慎治, 木下 晃, 新川詔夫, 小澤寛樹, 吉浦孝一郎

O80: Ornithine transcarbamylase 遺伝子の SNP にもとづくハプロタイプ解析の出生前モニタリングへの応用. 芳野信, 原田なをみ, 渡邊順子, 副島美貴子, 神田芳郎, 岡野善行, 中野博昭, 依藤 亨.

P-75: ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた遺伝子領域解析—Aarskog-Scott 症候群原因関連遺伝子解析—. 柳久美子, 要 匡, 比嘉真紀, 知念安紹, 泉川良範, 當間隆也, 岡本伸彦, 黒澤健司, 福嶋義光, 蒔田芳男, 水野誠司, 平木洋子, 田島敏広, 成富研二

P156: Craniosynostosis, collagenopathy 220 疾患を対象とした可変追加型遺伝子診断パネルの作成と実践. 要 匡, 柳 久美子, 比嘉真紀, 知念安紹, 當間隆也, 泉川良範, 新川詔夫, 吉浦孝一郎, 成富研二

4. 生命医薬情報学連合大会, 2013年10月29日, 東京都江戸川区タワーホール 深堀

三嶋博之: Gene Hunting: できること・できないこと (フォーカストセッション・オミックス解析における実務者意見交換会).

5. NGS 現場の会第三回研究会, 2013年9月4-5日, 神戸市神戸国際会議場, 神戸

2-47-B: 三嶋博之, 西澤達也, 片山俊明: TogoWS REST サービスによる UCSC ゲノムデータベースの利用.

6. 第 53 回日本先天異常学会学術集会
2013年7月21日(日)~23日(火),
千里ライフサイエンスセンター;大阪
S1-2: 硬組織先天異常の遺伝学. 要 匡
7. 第 116 回日本小児科学会学術集会
2013年4月19日(金)~21日(日),
広島国際会議場, 広島市文化交流会
館; 広島
O-116: FGD1 遺伝子変異を認める
Aarskog-Scott 症候群の特徴. 要 匡,
岡本伸彦, 黒澤健司, 泉川良範, 福
嶋義光, 水野誠司, 成富研二
DIS3L2 のエクソン 9 の欠失変異を認めた
Perlman 症候群の本邦第一例. 岡田
純一郎, 廣瀬彰子, 神田 洋, 岩田欧
介, 福澤龍二, 高柳 俊光, 渡邊順子,
松石豊次郎.
乳糖除去 MCT ミルク(ML-3)を用いた
シトリン欠損症(NICCD)の1例. 横
地賢興, 柳忠宏, 関祥孝, 渡邊順子,
松石豊次郎, 水落建輝, 猪口隆洋,
早坂清, 呉繁夫.
8. 第 473 回日本小児科学会福岡地方会
2013.2.9 (福岡市)
古賀木綿子, 原田なをみ, 松石豊次
郎, 猪口隆洋, 芳野 信, 松石豊次
郎, 渡邊順子. オルニチントランス
カルバミラーゼ欠損症 (OTCD) の at
risk 新生児における迅速診断の有用
性.
9. 第 36 回日本小児遺伝学会 2013.4.18
(広島市)
古賀木綿子, 原田なをみ, 猪口隆洋, 芳
野 信, 松石豊次郎, 渡邊順子. オ
ルニチントランスカルバミラーゼ欠
損症 (OTCD) の at risk 新生児にお
ける迅速診断の有用性
10. 第 2 回九州新生児スクリーニング研究
会 2013.10.25 (熊本市)
渡邊順子, 田代恭子, 青木久美子,
石毛美夏, 猪口隆洋, 松石豊次郎.
新生児タンデムマススクリーニング
で発見されたグルタル酸血症 I 型
(GAI) 症例.
11. 第 20 回 遺伝性疾患に関する出生前診
断研究会 2013.9.28 (鹿児島市)
原田なをみ, 田中征治, 芳野 信,
齋藤仲道, 田中悦子, 此元隆雄, 中
西浩一, 松石豊次郎, 渡邊順子. フ
ィンランド型先天性ネフローゼ症候
群の出生前診断.
12. 第 37 回日本遺伝カウンセリング学会
2013.6.20-23 (川崎市)
原田なをみ, 大矢崇志, 沼田早苗,
松石豊次郎, 橋本 隆, 渡邊順子. 歯
状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症
(DRPLA) 家系列の遺伝カウンセリ
ングの経験. 2013.6.21
13. 第 477 回日本小児科学会福岡地方会
2013.12.14 (久留米市)
木下正啓, 原 尚子, 田中祥一郎, 海野
光昭, 神田 洋, 岩田欧介, 前野泰樹,
岸本慎太郎, 工藤割嘉公, 家村素史,
須田憲治, 田中征治, 原田なをみ, 渡
邊順子, 松石豊次郎. マイクロアレ
イ解析が有用であった 15q26 部分欠
失の1例
- 招待講演
1. 京都市京都大学 iPS 細胞研究所, 2013
年5月16日,
三嶋博之: ヒト疾患の次世代 Gene
Hunting. CiRA Genomics, Epigenomics
and Bioinformatics Seminar Series
2. 北海道大学大学院歯学研究科歯学研究
セミナー, 2013年3月12日, 札幌市

北海道大学

三嶋博之:次世代シーケンサーを用いた Gene Hunting

3. 第22回DNA複製・組換え・修復ワークショップ,
荻 朋男, 紫外線DNA損傷による RNA polymeraseの修飾分子機構, 2013年11月
4. 第 31 回日本美容皮膚科学会, 2013 年 8 月, 荻 朋男, 紫外線感受性症候群責任遺伝子の分子機能解析,
5. 第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013 年 7 月 21 日 (日) ~23 日 (火), 千里ライフサイエンスセンター; 大阪 S1-2: 硬組織先天異常の遺伝学. 要 匡

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

日本国特許出願 特願 2011-71082 筆頭発明者:荻朋男 発明の名称:日焼けの原因遺伝子 出願人:長崎大学 出願日:2011年3月28日

荻 朋男

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書