

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年度分担研究報告書

研究課題：地域集積・収集した稀少疾患の系統的原因究明

分担研究項目：次世代シーケンスによるゲノム解析，原因遺伝子同定

分担研究者：

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)
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)

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医学・教授)
新川詔夫 (北海道医療大学・学長)
太田 亨 (北海道医療大学個体差健康科学研究所・准教授)
近藤達郎 (医療型児童入所施設みさかえの園むつみの家)

研究要旨

本研究分担班の研究目的は (1) 患者試料を用いて exome 解析, (2) 原因遺伝子の同定 である。これらの実験を通して、本来の意味での“稀少”疾患に関して、現状の genome 解析手法でどこまで同定可能で、稀少疾患解析にどのような問題点があるのかを把握する。

A. 研究目的

本年度は、次世代シーケンサーを用いて種々の稀少疾患の exome 解析を行い、原因遺伝子同定を目的とした。

DNA 修復異常症, 家族性筋線維腫症 (familial myofibrotomatosis), 心臓伝導障害 (Burgada 症候群をふくむ心電図異常), 筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS), LMC 症候群 (Leukodystrophy,

Microcephaly, Cerebral malformation syndrome), 歌舞伎症候群 (Kabuki syndrome: MLL2, KDM6A 変異陰性群), 間葉性異形成胎盤 (Placental Mesenchymal dysplasia), 家族性白内障, 家族性肺がん, 腎骨化症, 習慣性不育症, 汎下垂体低形成, WHIM-Like 症候群等の data 取得を行い、原因遺伝子同定を試みた。

B. 研究方法

1) Exome 解析

エクソン部 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 5500xISOLiD 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 5500xISOLiD 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。

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。

C. 結果

1) 稀少疾患の exome 解析状況一覧

長崎で 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, Hypogammaglobulinemia, Myelokathexis	AD?	LIG4	論文作成中
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	
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
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 fibromatosis, absent nail	de novo?	De novo mutation 確認中	確認のために症例待ち
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)	Leukodystrophy 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	胞状奇胎様胎 盤	??	Not found	原因遺伝子 不明 (HiSeq2500 にてデータ再 取得中)

WHIM-様症候群は、和歌山県立医科大学皮膚科の金澤伸雄講師から依頼があつて解析を引き受けたものである。患者と母親との解析のみで当初は、*de novo* 想定であり、(母親に無く子にある変異)をリストアップしたが、最終的には、既知の遺伝子LIG4の複合ヘテロ接合変異が認められた。現在は患者線維芽細胞を取得して、X線照射に対するDNA修復機能の低下、およびLIG4を細胞に導入することでDNA修復機能が元に戻ることを確認した。機能的解析の結果からも本患者が、重症免疫不全を呈するLIG4症候群であると確認された。本結果は、現在論文作成中である。また、患者は $\alpha\beta$ T細胞・CD19陽性B細胞選択除去した血縁者間半合致移植(実母から)を受けた。

家族性筋線維腫症は、家系での連鎖解析とexome解析にて、platelet derived growth factor receptor beta (PDGFRB)が原因と推測された。我々がデータで候補変異を見出したと時と同時期に、2013年6月にAmerican Journal of Human GeneticsにPDGFRBが家族性筋線維腫症の原因であるとの報告がなされた。結果的に世界初の報告とはならなかったが、日本での家族性筋線維腫症においてもPDGFRBが原因となるとの追試となった。

LMC症候群は、論文発表では明らかな常染色体劣性遺伝として報告さ

れ、我々も日本人3例の試料収集を行った。Exome解析後のhomozygous 変異、compound heterozygous 変異の重ね合わせでも共通の遺伝子は特定出来なかった。1例は兄弟発症例であり、またDNAマイクロアレイ解析によるSNP遺伝子型決定によって血族婚も考えづらい状況から常染色体優性 (*de novo*) & germline mosaicism が有力であり、1トリオの解析を基準に候補遺伝子をリストアップ中であるが、原因と思われる変異は、不明のままである。

ALSについては、長崎県内のある地域に多発した6例を収集できたので、常染色体劣性遺伝-創始者効果の仮定の下で原因遺伝子特定が可能と思われた。しかし、既知の常染色体優性遺伝形式をとるALSの原因遺伝子にミスセンス変異を認めることもあるが、病気の原因か否かは確定できず原因は不明のままである。

その他、SOLiD5500によるexome解析(Agilent SureSelect v4+UTR使用)によっては、原因を明らかに出来なかった例について、SureSelect v5とIllumina HiSeq2500にて再度exome解析を再開したところである。

D. 考察

紫外線感受性遺伝子群解析に関して UVSSA原因遺伝子単離

Kps3 cell lineとXP24KOをexome解析に用いて、両方のcell lineに共通にUVSSA遺伝子(KIAA1530)の

p.Lys123nonsense 変異が認められた。その後、別のcomplementation group Aのcell lineであるKps2, UV^SS24TAにも同遺伝子にtruncation typeの変異を見だし、原因遺伝子であることを確定した。

稀少疾患のexome解析について

昨年度末から5500xl SOLiDシステムによるexome解析を順調に進行させている。5500xlによるデータ取得は困難であったが、emulsion PCRのステップを改変することで改善され、mean depth > 60 のデータ量で、depth > 10 が95%以上の濃縮ターゲット領域で塩基配列を決定出来る。このデータ量データの質は、Illumina系の次世代シーケンサー使用時と遜色ない。

収集されている稀少疾患は、本来の意味で“稀少”である。1例～数例の疾患群も多く解析している。同じ疾患に分類されていても、exomeから得られた変異情報を重ね合わせから1個の原因遺伝子同定までに至らない例が多い。おそらくは、同一の症状を示す臨床診断疾患は、locus heterogeneityが多くと考えられる。稀少疾患は、遺伝子も特定の一遺伝子が原因であると考えていたが、そうでは稀少とはいっても多くの症例の解析->重ね合わせを行う必要がある。原因を特定出来る疾患はできて、出来ない疾患は出来ないといった、当たり前の状況になっている。

Kabuki症候群, UV感受性疾患, Burugada症候群などは、キャピラリーシーケンサーにてこれまで報告された遺伝子には変異を認めない例を解析しているが、ときおりexome解析から既知の遺伝子変異が認められることがある。キャピラリーシーケンサースクリーニング時に増幅効率の異なるprimer設定が原因で見落とされたも

のと考えられる(データは示していない)。この意味でも、キャピラリーシーケンサーによる塩基情報取得よりも、次世代型(大規模, パーソナルタイプ含め)シーケンサーによる網羅的なゲノム解析情報が、これからますます重要となる。キャピラリーシーケンサーは、一点だけの最終的な確認の為の手段となっていくであろう。

E. 結論

本年度明確に、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
Cockayne Syndrome	----	ERCC1/XPF
Seckel Syndrome	-----	ATRIP
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)

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。HiSeq2500 data 再解析中
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 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。HiSeq2500 data
再解析中

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、かつ変異遺伝子と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、治療に確実には結びつけられない。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。

——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。

——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 海外

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 ABC11 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 ABC11: 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, Saito 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. Kashiyama 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).

国内

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. 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.
4. 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

(招待講演のみ記載, その他は総括研究報告所に記載)

国際学会

なし

国内学会等

1. 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
2. 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
3. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許得取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
難病・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年度分担研究報告書

研究課題：地域集積・収集した稀少疾患の系統的原因究明

分担研究項目：難治性DNA修復欠損性疾患の責任因子同定に関する研究

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）

研究協力者：佐々木健作（長崎大学原爆後障害医療研究所・研究員）

研究要旨

国内外のゲノム不安定性を示す先天性難治性疾患である、色素性乾皮症(XP)、コケイン症候群(CS)、ゼッケル症候群(SS)を中心に、約300症例を収集した。ヌクレオチド除去修復活性を指標にウイルス相補性試験を実施することで、疾患責任遺伝子/相補性群を決定した。責任遺伝子が未知のケースでは、次世代ゲノム解析等により原因遺伝子の探索を実施した。これらの結果、XP/CSと併せてファンコーニ貧血症(FA)を発症する稀な症例の疾患責任変異をXPF遺伝子に同定した。

A. 研究目的

DNA修復機構はゲノムの安定的な維持伝達に必須であり、DNA修復システムの破綻は発がんをはじめとする様々な疾患の原因となっている。本研究では、DNA修復機構に欠損をもつため、高発がん性、発達異常、精神遅滞等の全身性の重篤な症状を発症する、難治性遺伝性疾患の責任遺伝子責任変異を同定し、その分子機能解析をおこなうことで、分子病態を解明することを目的とした。

本研究ではDNA修復機構の中でも、特にヌクレオチド除去修復機構(nucleotide excision repair: NER)とDNA損傷チェックポイントシステム(DNA damage checkpoint: DDC)に主眼を置いて研究を実施した。NERシステムの先天的な欠損により、がんを好発する色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum:

XP)、早老症を示すコケイン症候群(Cockayne syndrome: CS)、日光過敏症と軽微な皮膚症状のみを示す紫外線高感受性症候群(UV-sensitive syndrome: UVSS)と、多岐に渡る難治性疾患が発症する。また、DDCシステムの異常では、小脳症/低身長/発達異常を示すゼッケル症候群(Seckel syndrome: SS)などを発症する。このため、NER機構やDDCシステムの分子メカニズムの解明は、各疾患の原因究明だけでなく、発がんや、細胞老化メカニズムなどの根本的な理解につながると考えられる。

B. 研究方法

NERやDDCの欠損により発症するXP, CS, UVSS, SSとその類縁疾患の検体を国内外より約300症例収集した。その後、DNA修復活性やDNA損傷チェ

ックポイント活性を指標とした細胞レベルでの分類をおこなった。この後、既知の疾患責任遺伝子発現ウイルスによる相補性試験を実施し、相補性群の確定と責任変異の同定をおこなった。これら相補性試験で相補しない症例は、新規疾患責任遺伝子に変異を有する可能性が高い症例であり、これらについて次世代ゲノム解析を実施した。その結果、4つの新規責任遺伝子に疾患責任変異を同定し、さらに分子機能解析を実施することで、対象とする難治性疾患の発症メカニズムの解明を行うとともに、DNA修復とチェックポイントの作用機序の解析をおこなった。

C. 研究結果

1) XP/CS と併せてファンコーニ貧血症(FA) を発症する稀な症例の疾患責任変異を XPF 遺伝子同定

本邦及び欧州の CS 症例約 300 例を解析し、既知の相補性群に属さない症例 3 例を見いだした。これらの症例では、コケイン症としてははじめてとなる、NER の DNA 損傷 5'側の切出し反応を行う、ERCC1/XPF エンドヌクレアーゼに欠損を有することが確認された。さらにこのうちの 1 症例は XP, CS とあわせてファンコーニ貧血 (Fanconi anemia: FA) を発症し、XPF 遺伝子の変異で XP/CS/FA を発症することを確認した。XPF 遺伝子に生じた責任変異により、DNA 損傷の切出し反応に必要なエンドヌクレアーゼ活性が激減していることを生化学的に確認した (*Am J Hum Genet*, **92**: 807-819, 2013)。

D. 考察

次世代ゲノム解析法と細胞 DNA 損傷修復/チェックポイント活性測定システムを組み合わせることで、高精度に新規の疾患責任遺伝子責任変異の同定が可能となった。このシステムの運用により、3 年間の研究期間で 6 種類の新規責任遺伝子の同定に成功しており、高いパフォーマンスであると考えられる。

E. 結論

DNA修復/損傷チェックポイントに異常のある遺伝性難治性疾患において、新規の疾患責任遺伝子として、UVSSA(UVSS), ATRIP(SS), ERCC1(CS), XPF(CS)に疾患責任変異を同定し、これらの遺伝子の分子機能解析を実施した。

F. 研究発表

1. 論文発表

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).

Kashiyama 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).

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).

2. 学会発表 (招待講演のみ)

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

第31回日本美容皮膚科学会, 荻朋男, 紫外線感受性症候群責任遺伝子の分子機能解析, 2013年8月

G. 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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難病・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年度分担研究報告書

研究課題：地域集積・収集した稀少疾患の系統的原因究明

分担研究項目：Exome 解析，迅速診断法の開発，臨床診断

分担研究者

要 匡（琉球大学大学院医学研究科遺伝医学講座・准教授）

成富研二（琉球大学大学院医学研究科遺伝医学講座・教授）

研究要旨

本研究の目的は，(1) 次世代シーケンサを利用し，難病・稀少疾患の原因遺伝子と発症メカニズムを明らかにすること，(2) 原因遺伝子が明確または明確となった疾患の診断法を確立すること，である。本年度は，先端異骨症患児試料，C 症候群関連疾患患児試料の収集と exome 解析，病態解析に加え，現在までに原因が判明した症候群，頭蓋骨早期癒合を来す奇形症候群，結合織病変を来す疾患，難聴をきたす疾患の NGS を利用した迅速遺伝子診断法の開発，NGS 活用による診断の有用性の検討を行った。

A. 研究目的

地域蓄積・収集した稀少疾患の原因解明と診断を目的として，本年度も引き続き，遺伝的異質性が知られている先端異骨症のエクソーム解析と診断法の開発，C 症候群関連疾患の原因遺伝子変異同定と診断法の開発，加えて頭蓋骨早期癒合をきたす疾患や結合織に異常をきたす疾患，難聴をきたす疾患の網羅的診断システムの確立を目指した。

これら疾患については，次世代シーケンサ（NGS）を活用した，whole exome 解析，ターゲットリシーケンス解析による，原因遺伝子の同定，奇形症候群の症状や特徴を対象とした網

羅的迅速遺伝子診断を目的とした。

また，実際の遺伝子診断において，NGS を用いた原因遺伝子解析の有用性を示すことも目的とした。

B. 研究方法

琉球大学を含む沖縄県内および県外大学・医療機関等の研究協力チームで収集された，臨床的に先端異骨症と診断されている患児および家族の計 26 名の検体試料，臨床的に C 症候群あるいは C 様症候群と診断された患児および家族の計 40 名の検体試料について，whole exome 解析，ターゲットリシーケンス解析，Sanger 法によるダイレクトシーケンサ解析を行い，原因遺

伝子，原因遺伝子変異の同定を行った。

先端異骨症においては，患児細胞を用いた病態解析も行った。

また，網羅的遺伝子診断法として，NGS を用いた C (様) 症候群などの頭蓋骨早期癒合を呈する疾患群，および結合織関連遺伝子群の全原因遺伝子を対象としたターゲットリシーケンス解析システム (遺伝子診断パネル) を完成させ，その検証を行った。

加えて，難聴を呈する疾患を対象とした網羅的遺伝子診断パネルを構築した。

さらに，今後の臨床での実用化を目指し，NGS を活用した稀少疾患の遺伝子診断を確立する目的で，プロモーター領域を含めた包括的遺伝子解析とターゲット領域の高深度シーケンス解析を試みた。プロモーター領域を含めた包括的原因遺伝子解析については，集積が認められる Aarskog-Scott 症候群，C (様) 症候群，指節癒合症候群の各原因遺伝子をターゲットとし，システム構築と解析を行った。

ターゲット領域の高深度シーケンス解析については，点状軟骨異形成の原因遺伝子を対象とし，NGS によるターゲットリシーケンス (アンプリコンシーケンス) を行った。

(1) Exome 解析および Sanger シーケンス解析による先端異骨症の原因遺伝子変異検索と病態解析

前年度に引き続き臨床的に先端異骨症 (一部疑いを含む) と診断された患児について，whole exome 解析を行った。Exome 解析は，Agilent 社 SureSelect または Roche 社 SeqCap EZ による濃縮，HiSeq2500 または SOLiD によるペアエンド解析により行い，また，リファレンスマッピング，annotation 付けも同様に行った。

先端異骨症は，孤発例が多いため，

それぞれ，両親および非罹患同胞についても同様に exome 解析を行い，*de novo* 変異の検出を行った。

また，原因遺伝子が推定された患児については，ダイレクトシーケンス (Sanger シーケンス) による遺伝子変異解析・検証も行った。

各患児について，*de novo* 変異データを集積し，有意な変異，即ち，SNP database 未登録でエクソン上あるいはスプライス接合部位にあり，かつ，アミノ酸置換，フレームシフトまたは終止コドンによるタンパク質短縮化，あるいはスプライス異常を来すと思われる変異を抽出した。有意な変異の推定には，PolyPhen や SIFT による結果も加味した。

抽出できた遺伝子について，他の臨床的先端異骨症患児およびそれら両親での変異の有無をダイレクトシーケンス解析により検索し，日本人コントロールでの変異の有無の確認を行った。

加えて，遺伝子変異をもつ患児の株化リンパ芽球様細胞を樹立し，遺伝子産物活性を測定した。

(2) C(様)症候群の NGS 解析

三角頭蓋を認め，臨床的に C 症候群または C 様症候群と診断された患児 32 名のゲノム DNA 試料について引き続き解析した。Whole exome 解析，およびダイレクトシーケンスによる *CD96* 遺伝子，*ASXL1* 遺伝子解析を行った。

Whole exome 解析については，Agilent 社 SureSelect，または Roche 社 SeqCap EZ を使用し，HiSeq2500 または SOLiD を用いて，ペアエンド解析により行った。SNP，indel call，遺伝子情報を含む annotation 付け等も同様に行い，検討した。

(3) NGS を用いた頭蓋骨早期癒合症候群 (C (様) 症候群を含む) と結合織疾患の網羅的迅速診断法の開発

NGS を活用し、C (様) 症候群を含む頭蓋骨癒合症候群を網羅的に診断できるよう、加えて、同時に、結合織に異常を来す疾患群も診断できるよう、原因遺伝子領域の濃縮系をセットアップした。

まず、対象疾患をリストアップし、現在までに同定された原因遺伝子および本研究にて判明した原因遺伝子全てについて、遺伝子の全エクソン領域をカバーする濃縮用プローブを製作し、ターゲットリシーケンス解析を行える系を構築し、実際に遺伝子診断による検証を行った。

(4) NGS を用いた難聴をきたす疾患の網羅的迅速診断法の開発

沖縄は、本州その他の地域と比較してゲノム構造、遺伝子変異/多型およびその頻度の違いが報告されており、稀少疾患において、国内で頻度の高い変異のみを解析することは、遺伝子変異の検出精度の観点からも不十分である。よって、原因遺伝子を網羅的に解析する必要がある。ここで、難聴をきたす疾患は、沖縄においても集積していることが判明している。そこで、研究方法 (3) と同様に、難聴をきたす疾患についても原因遺伝子全てについて、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。

(5) NGS を用いた稀少疾患の診断法の確立

研究者らは、Aarskog-Scott 症候群、C 症候群等の稀少疾患の遺伝子変異スクリーニングについて qPCR-HRM 法を用いた遺伝子コピー数および変異/多型のスキニングシステムを構築

している。しかしながら、本システムでは、変異/多型のスキニングシステムが簡便に行えるものの、新規変異については、変異配列情報までは得られない、また検出率が 100%ではない、といった問題があった。また、我々を含め、現在行われている遺伝子解析は、エクソンのコード領域が主で、非翻訳領域やプロモーターの解析は行われないことがほとんどであった。そこで、次世代シーケンサを用いて、プロモーター、非翻訳領域、イントロン部分も含めた LA-PCR アンプリコンのリシーケンスにより遺伝子診断を包括的かつ迅速に行えるシステムの構築を行った。

対象疾患は、前年度より行っている Aarskog-Scott 症候群、C (様) 症候群に加え、指節癒合症候群とした。それぞれの原因遺伝子 (*FGDI*, *CD96*, *ASXLI*, *NOG*) について、プロモーター領域を含め、全エクソンを含む様、複数の LA-PCR をセットし、PCR 後のアンプリコンを LabChip GX (Perkin Elmer 社) を用いて、大きな重複・欠失の有無の確認とアンプリコン濃度の定量を行い、検体ごとに等量にアンプリコンプールを作成し、断片化後、フラグメントライブラリーを製作、GS Junior (Roche 社) を用いてリシーケンス解析を行った。

稀少疾患の遺伝子診断において、孤発例を経験することは多く、両親の Sanger シーケンス解析により de novo 変異と判定している。しかしながら、同じ変異をもつ患児がまた生まれることもあり、本当に de novo であるかの判定は、Sanger シーケンス解析では困難なことも生じている。現在の遺伝子解析における Sanger シーケンス解析の精度を検証するため、ターゲット領域の高深度シーケンス解析を行った。点状軟骨異形成の原因遺伝子

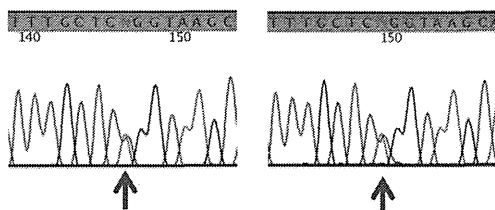
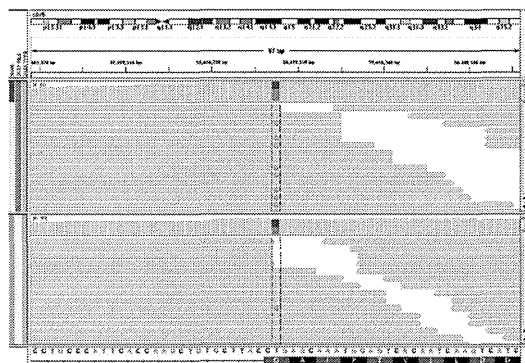
(ARSE) を対象とし、*de novo* と推定された患児とその母親について、NGSによるターゲットリシーケンス (アンプリコンシーケンス) を行った。

C. 研究結果

(1) Exome 解析および Sanger シーケンス解析による先端異骨症の原因遺伝子変異検索と病態解析

臨床的に典型的な先端異骨症患児家族における exome 解析、*de novo* 変異検出の結果、ホルモン感受性典型的先端異骨症の多くは、*PDE4D* 遺伝子に変異が認められた。

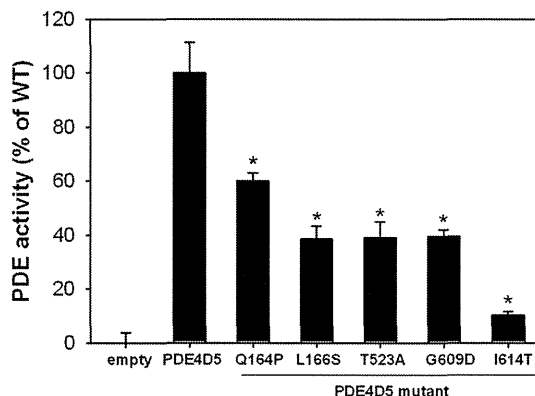
Whole exome 解析と Sanger シーケンス解析により、5 種類の *de novo* 変異に加え、新規遺伝子変異を同定した。



Whole exome 解析と Sanger シーケンス解析による先端異骨症の変異同定

遺伝子変異を認めた患児より、株化リンパ芽球様細胞を樹立し、その酵素活性について検討したところ、全ての患児細胞において、活性異常が認められ、遺伝子産物の異常が発症に関連し

ていると推定された。



先端異骨症患児細胞における酵素活性

ホルモン抵抗性先端異骨症においては、*PRKARIA* 遺伝子変異 (下表) を認めており、他の非典型的で偽性副甲状腺機能低下症と思われる患児一人に *GNAS* 遺伝子変異を認めた。

Sample	Gene	Position	Variant	Effect	Reference	Database	Database	Database	Database
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000
chr17:842738042-842738042	PRKARIA	842738042	A	missense	rs11219872	dbSNP	gn000000000	gn000000000	gn000000000

PRKARIA 遺伝子変異と多型

また、*PDE4D*、*PRKARIA*、*GNAS* に変異を認めない患児での whole exome 解析により、新規遺伝子 (遺伝子 X) の *de novo* 変異を確認したが、本遺伝子変異は、コントロール 1000 検体において認められず、遺伝子産物は *PDE4D* との相互作用があり、*GNAS* シグナル伝達経路上と推定されることから、本遺伝子も新しい原因遺伝子として、その変異が発症に関わっていると考えられた。

遺伝子 X

(2) C(様)症候群の NGS 解析

Whole exome 解析, Sanger シーケンス解析の結果, C 様症候群患児 5 人に計 5 種類の *ASXL1* 遺伝子変異が認められたが, 両親の解析結果, 全て *de novo* 変異であった。ASXL1 遺伝子変異は, exon 12, 13 に集中していた。

一方, *ASXL1* 遺伝子変異を認めなかった C あるいは C 様症候群の, whole exome 解析の結果, 1 人に本症候群に関連すると思われる新規遺伝子 (遺伝子 Z) の変異を *de novo* で認めていたが, 新たに同遺伝子の変異をもつ患児が 2 人見つかった。

これら変異は, コントロール 400 人に認められず, また遺伝子機能。および染色体構造異常の報告から原因である可能性が高いと推定された。

(3) NGS を用いた頭蓋骨早期癒合症候群 (C (様) 症候群を含む) と結合織疾患の網羅的迅速診断法の開発

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

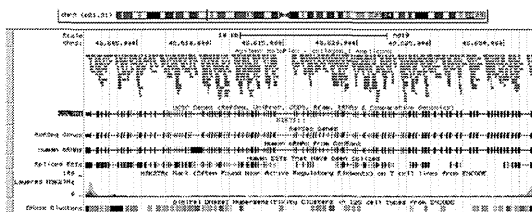
析長 1.07Mb の濃縮系 (頭蓋骨早期癒合疾患および結合織関連疾患の遺伝子診断パネル) をセットアップした。

Phenotype	Gene	Gene	Phenotype	Gene	Gene
181890	Dissecta	COL1A1	181890	Marfan syndrome	FBN1
181890	Dissecta	COL1A2	181890	Contractural arachnoidopathy (familial Shale syndrome)	FBN1
181890	Dissecta	COL1A3	181890	Marfan syndrome, type 1	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A4	181890	Marfan syndrome, type 2	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A5	181890	Marfan syndrome, type 3	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A6	181890	Marfan syndrome, type 4	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A7	181890	Marfan syndrome, type 5	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A8	181890	Marfan syndrome, type 6	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A9	181890	Marfan syndrome, type 7	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A10	181890	Marfan syndrome, type 8	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A11	181890	Marfan syndrome, type 9	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A12	181890	Marfan syndrome, type 10	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A13	181890	Marfan syndrome, type 11	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A14	181890	Marfan syndrome, type 12	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A15	181890	Marfan syndrome, type 13	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A16	181890	Marfan syndrome, type 14	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A17	181890	Marfan syndrome, type 15	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A18	181890	Marfan syndrome, type 16	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A19	181890	Marfan syndrome, type 17	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A20	181890	Marfan syndrome, type 18	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A21	181890	Marfan syndrome, type 19	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A22	181890	Marfan syndrome, type 20	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A23	181890	Marfan syndrome, type 21	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A24	181890	Marfan syndrome, type 22	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A25	181890	Marfan syndrome, type 23	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A26	181890	Marfan syndrome, type 24	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A27	181890	Marfan syndrome, type 25	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A28	181890	Marfan syndrome, type 26	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A29	181890	Marfan syndrome, type 27	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A30	181890	Marfan syndrome, type 28	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A31	181890	Marfan syndrome, type 29	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A32	181890	Marfan syndrome, type 30	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A33	181890	Marfan syndrome, type 31	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A34	181890	Marfan syndrome, type 32	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A35	181890	Marfan syndrome, type 33	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A36	181890	Marfan syndrome, type 34	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A37	181890	Marfan syndrome, type 35	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A38	181890	Marfan syndrome, type 36	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A39	181890	Marfan syndrome, type 37	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A40	181890	Marfan syndrome, type 38	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A41	181890	Marfan syndrome, type 39	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A42	181890	Marfan syndrome, type 40	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A43	181890	Marfan syndrome, type 41	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A44	181890	Marfan syndrome, type 42	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A45	181890	Marfan syndrome, type 43	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A46	181890	Marfan syndrome, type 44	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A47	181890	Marfan syndrome, type 45	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A48	181890	Marfan syndrome, type 46	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A49	181890	Marfan syndrome, type 47	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A50	181890	Marfan syndrome, type 48	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A51	181890	Marfan syndrome, type 49	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A52	181890	Marfan syndrome, type 50	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A53	181890	Marfan syndrome, type 51	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A54	181890	Marfan syndrome, type 52	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A55	181890	Marfan syndrome, type 53	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A56	181890	Marfan syndrome, type 54	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A57	181890	Marfan syndrome, type 55	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A58	181890	Marfan syndrome, type 56	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A59	181890	Marfan syndrome, type 57	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A60	181890	Marfan syndrome, type 58	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A61	181890	Marfan syndrome, type 59	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A62	181890	Marfan syndrome, type 60	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A63	181890	Marfan syndrome, type 61	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A64	181890	Marfan syndrome, type 62	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A65	181890	Marfan syndrome, type 63	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A66	181890	Marfan syndrome, type 64	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A67	181890	Marfan syndrome, type 65	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A68	181890	Marfan syndrome, type 66	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A69	181890	Marfan syndrome, type 67	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A70	181890	Marfan syndrome, type 68	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A71	181890	Marfan syndrome, type 69	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A72	181890	Marfan syndrome, type 70	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A73	181890	Marfan syndrome, type 71	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A74	181890	Marfan syndrome, type 72	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A75	181890	Marfan syndrome, type 73	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A76	181890	Marfan syndrome, type 74	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A77	181890	Marfan syndrome, type 75	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A78	181890	Marfan syndrome, type 76	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A79	181890	Marfan syndrome, type 77	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A80	181890	Marfan syndrome, type 78	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A81	181890	Marfan syndrome, type 79	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A82	181890	Marfan syndrome, type 80	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A83	181890	Marfan syndrome, type 81	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A84	181890	Marfan syndrome, type 82	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A85	181890	Marfan syndrome, type 83	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A86	181890	Marfan syndrome, type 84	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A87	181890	Marfan syndrome, type 85	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A88	181890	Marfan syndrome, type 86	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A89	181890	Marfan syndrome, type 87	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A90	181890	Marfan syndrome, type 88	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A91	181890	Marfan syndrome, type 89	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A92	181890	Marfan syndrome, type 90	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A93	181890	Marfan syndrome, type 91	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A94	181890	Marfan syndrome, type 92	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A95	181890	Marfan syndrome, type 93	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A96	181890	Marfan syndrome, type 94	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A97	181890	Marfan syndrome, type 95	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A98	181890	Marfan syndrome, type 96	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A99	181890	Marfan syndrome, type 97	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A100	181890	Marfan syndrome, type 98	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A101	181890	Marfan syndrome, type 99	COL1A1
181890	Dissecta	COL1A102	181890	Marfan syndrome, type 100	COL1A1

網羅的遺伝子診断対象疾患 (抜粋)

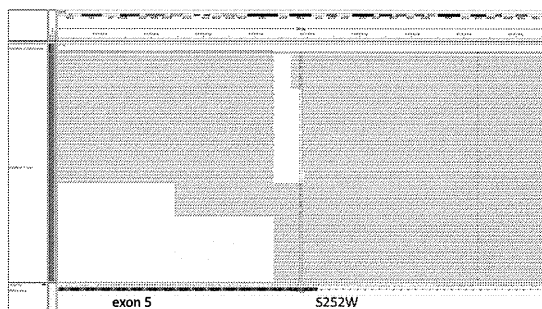
項目	今回の作成データ
対象遺伝子数	96
対象エクソン	coding エクソンのみ
総エクソン数	2321
エクソン外解析長	5' -25bp, 3' +25bp
総ターゲット長	424.79kb
総アンプリコン数	19997
総解析長	1.07Mb
平均リード長	150bp

網羅的遺伝子診断パネルの概要

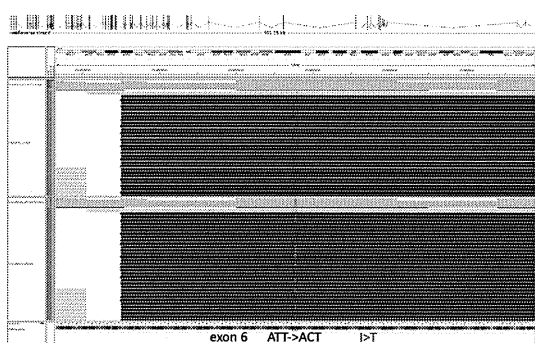


濃縮用プローブのカバー例

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。



同定された *FGF2* 遺伝子変異



同定された *FBN2* 遺伝子変異

(4) NGS を用いた難聴をきたす疾患の網羅的迅速診断法の開発

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。

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。

難聴関連原因遺伝子パネルの概要

項目	作成データ
対象遺伝子数	74
対象エクソン	coding エクソンのみ
総エクソン数	1531
エクソン外解析長	5' -50bp, 3' +50bp
総ターゲット長	397.68kb
総アンプリコン数	16769
総解析長	887.68kb
平均リード長	250bp

(5) NGS を用いた稀少疾患の診断法の確立

Aarskog-Scott 症候群 (*FGD1* 遺伝子)

FGD1 遺伝子の promoter 領域も含めた全 18 エクソンをカバーするゲノム領域の増幅・濃縮が可能な LA-PCR をセットアップした。遺伝子全長が長く、1つの LA-PCR ではカバーできないため4つの領域に分割し、増幅できるようにした。

前年度、*FGD1* 遺伝子変異が判明した Aarskog -Scott 症候群患児 11 症例の変異検出を行えたが、今回、非典型的あるいは症状の一部が認められる患児についてそれぞれ index による区分けを行い、GS Junior (Roche) 1 回のランで解析した。

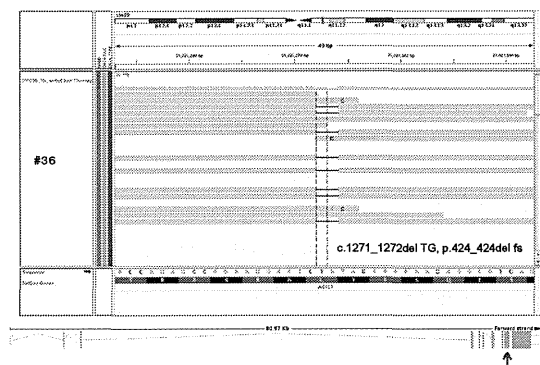
結果、カバー率は x100 以上で十分な解析精度が得られたが、病的でないと思われる SNP は検出されたが、プロモーター領域を含め、病的と思われる変異は確認されなかった。

C (様) 症候群 (*CD96*, *ASXL1* 遺伝子)

同様に、*CD96*, *ASXL1* 遺伝子についても、promoter 領域も含めた全 15, 13 エクソンをカバーするゲノム領域の増幅・濃縮が可能な LA-PCR をセットアップした。

臨床的に C 様症候群と診断された患児において、exon 12 に 2bp の欠失を確認できた。Sanger シーケンス解析で

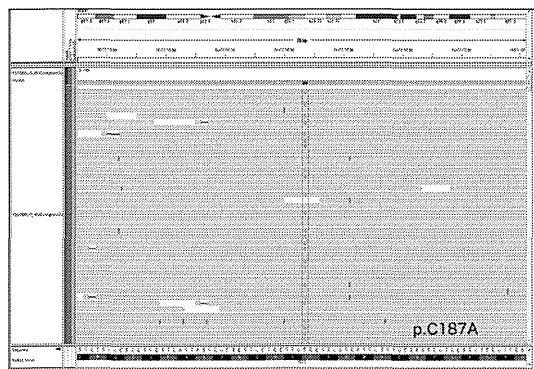
も同様の欠失を確認し、NGS での検出は問題なく診断できた。



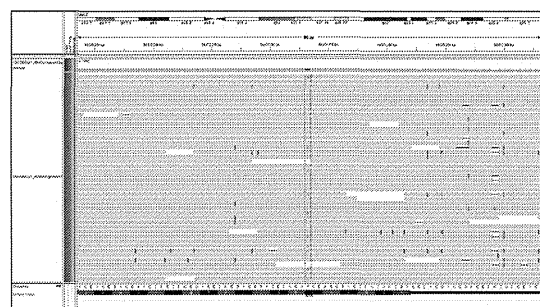
ASXL1 2bp del (exon12)の検出
指節癒合症候群 (NOG 遺伝子)

NOG 遺伝子は全長が~3kb 程度と大きくないため、1つの LA-PCR primer でプロモーター領域約 4kb を含め増幅し、NGS 解析を行った。

臨床的に典型的な本症候群の患児 3 人について解析したところ、2 人にそれぞれ異なるミスセンス変異を認めた。Sanger シーケンス解析においても同様の変異が確認された。それらは、健常コントロール 200 人に認められず、PolyPhen-2, SIFT 等の推定でも病的と判断された。よって、本変異が原因であると考えられた。



NGS 解析により検出された NOG 変異 1

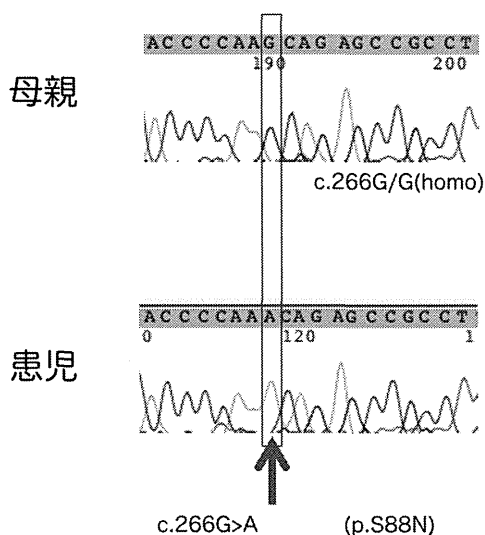


NGS 解析により検出された NOG 変異 2

残り 1 人については、プロモーター領域を含め、点変異、欠失等確認されなかった。

点状軟骨異形成 (ARSE 遺伝子)

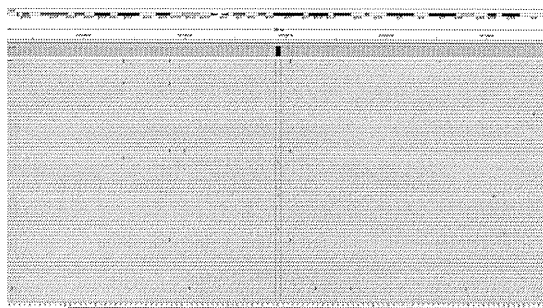
臨床的に点状軟骨異形成と診断された患児の ARSE 遺伝子解析 (Sanger シーケンス解析) により、*de novo* 変異 (c.266G>A, p.S88N) と推定された患児および母親の NGS による高深度シーケンス解析を行った。



De novo と判定された ARSE 遺伝子変異

血液、口腔粘膜より細胞を採取し DNA を抽出後、PCR amplicon を GS Junior を用いて高深度 (x1000) のシーケン

ス解析を行った。すると、母親の血液細胞において、アレル頻度約3%、口腔粘膜細胞においてアレル頻度約5%の体細胞モザイクが検出された。



高深度シーケンス解析(c.266)

c.266	total	%
G	882	96.82
A	29	3.18

母親血球細胞における c.266 アレル頻度

D. 考察

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思われる。

現在までに, C様症候群において, exome解析にて1人に*ASXLI*遺伝子変異を確認し, また, 15人中4人に*ASXLI*遺伝子変異を同定していたが, 今回, whole exome解析の結果, *ASXLI*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。

加えて, 臨床的に診断が確定しない症例も依然存在し, 臨床症状の詳細な比較, 網羅的遺伝子変異解析により, ひきつづき疾患の整理の必要性があると思われる。

NGSを用いた包括的迅速遺伝子解析において, 今回のAarskog-Scott症候群の原因である*FGDI*遺伝子, C(様)症候群の原因である*CD96*, *ASXLI*遺伝子, 指節癒合症症候群の原因遺伝子である*NOG*遺伝子の解析を例として, 比

較的精度が高く、効率のよい解析法であることが示された。

前年度、*FGDI*遺伝子解析の欠失検出において、マッピングデータがSangerシーケンスデータとわずかにずれるなどの問題も明らかとなり、この相違は、実際のNGS解析そのものではなく、おそらくマッピングアルゴリズムによると考えられるため、現在、より精度の高いアルゴリズムの改良を検討しているが完成していない。

しかしながら、変異が検出されるか否かという点においては問題なく、今回の、Aarskog-Scott症候群非典型例、指節癒合症症候群典型例での遺伝子変異非検出例は、本遺伝子が原因であることを否定できると考えられた。よって、他の原因遺伝子の存在を強く示唆できると思われ、今後、新規遺伝子の同定が重要と考えられる。

昨年と同様、ベンチトップ型のNGSを使用した解析は、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型を凌駕しており、今後はNGS解析を中心とした遺伝子診断法の開発が、実用化に向け重要な項目となると思われた。

また、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考えられた。

E. 結論

Whole exome 解析によって先端異骨症の原因遺伝子として*PDE4D*遺伝子および*PRKARIA*遺伝子変異に加え、新規原因遺伝子を明らかにした。次世代シーケンサ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。

さらに、(*CD96* 遺伝子変異, *ASXLI* 遺伝子変異を認めない) C (様) 症候群関連疾患において、複数の患児での新規遺伝子変異の発見や原因遺伝子を中心とした網羅的遺伝子診断法の開発により、臨床的C症候群ならびに類似疾患患児の遺伝子診断に基づく疾患の新たな分類と確定診断が可能となった。

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。

Aarskog-Scott 症候群, C (様) 症候群, 指節癒合症症候群において、NGSを用いたターゲットリシーケンス解析が、今までほとんど行われていなかったプロモーター領域を含めた包括的遺伝子解析において有用であることが示された。

また、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