

201331013A

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）

分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の
遺伝要因の解明と遺伝子診断ネットワークの形成

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎健次郎

平成26（2014）年3月

目 次

I. 平成25年度構成員名簿	1
II. 総括研究報告書	
平成25年度総括研究報告	3
小崎 健次郎 (慶應義塾大学医学部・臨床遺伝学センター)	
III. 分担研究報告書	
1. 次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析と診断への応用に関する研究	17
松永達雄 (国立病院機構東京医療センター・感覚器センター・聴覚障害研究室長)	
2. 次世代シーケンス法を応用した	
先天性中枢神経奇形症候群患者の原因遺伝子探索	21
金村 米博 (独立行政法人国立病院機構大阪医療センター)	
3. 次世代シーケンサー技術の臨床応用へむけての基盤整備	24
小崎 里華 (独立行政法人国立成育医療研究センター・内科系専門診療部・遺伝診療科)	
4. 次世代シーケンサーによる解析法の最適化と標準化に関する研究	30
工藤 純 (慶應義塾大学医学部・遺伝子医学研究室)	
5. 遺伝性疾患の多層オミックス統合解析の基盤構築	34
清水 厚志 (岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・生体情報解析部門)	
6. 次世代シーケンサーを用いたバイオインフォマティクス解析による	
先天性異常症の遺伝要因の解明に関する研究	37
宮 冬樹 (独立行政法人理化学研究所・ゲノム医科学研究センター・情報解析研究チーム)	
7. 次世代シーケンサーの臨床診断への応用—CNV解析への応用	41
黒澤 健司 (地方独立行政法人神奈川県立病院機構・神奈川県立こども医療センター遺伝科)	
8. 脳形成障害およびシナプス形成障害の遺伝学的成因に関する研究	44
齋藤 伸治 (名古屋市立大学大学院医学研究科・新生児・小児医学分野)	
9. 先天異常症候群患者の臨床情報データベースの運用に関する研究 - Webベースの PhenotypeデータベースPhenoTipsと診療用自家製データベースの試用比較--	47
水野 誠司 (愛知県心身障害者コロニー中央病院・臨床第一部)	
10. ダンディウォーカー症候群における遺伝子検索	53
山崎 麻美 (社会医療法人愛仁会・高槻病院)	
11. 小児神経疾患標的遺伝子解析と全エクソーム解析に関する研究	56
岡本伸彦 (地方独立行政法人大阪府立病院機構・大阪府立母子保健総合医療センター)	
12. 東日本圏における患者情報収集 (中枢神経奇形・奇形症候群) と 遺伝子解析に関する研究	61
加藤 光広 (山形大学医学部附属病院・小児科)	
13. 眼先天異常の遺伝子診断に関する研究	63
仁科 幸子 (独立行政法人国立成育医療研究センター・感覚器・形態外科部眼科)	
14. iPS細胞を用いた先天異常症の遺伝要因の解明のためのシステム構築	66
赤松和土 (慶應義塾大学医学部・生理学教室)	
15. 先天性疾患における非同義置換のメダカモデルを用いた解析	69
谷口 善仁 (慶應義塾大学医学部・衛生学公衆衛生学教室)	
IV. 資料	71
資料1 : 英国における遺伝子検査サポートシステム(UKGTN:UK Genetic Testing Network) 翻訳	

V. 研究成果の刊行に関する一覧表	133
VI. 研究成果の刊行物・別冊	147

〔 I 〕

平成25年度構成員名簿

平成25年度 厚生労働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（難病関係研究分野）
「分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と
遺伝子診断ネットワークの形成」研究班

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	小崎健次郎	慶應義塾大学医学部 臨床遺伝学センター	教授
研究分担者	松永達雄	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 感覚器センター聴覚障害研究室	室長
	金村米博	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 再生医療研究室	室長
	小崎里華	独立行政法人国立成育医療研究センター 内科系専門診療部 遺伝診療科	医長
	工藤 純	慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室	教授
	清水厚志	岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク 機構生体情報解析部門	特命教授
	宮 冬樹	独立行政法人理化学研究所 総合生命医科学研究センター 医科学数理研究グループ	リサーチ アソシエ イト
	黒澤健司	地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター 遺伝科	部長
	齋藤伸治	名古屋市立大学大学院医学研究科	教授
	水野誠司	愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部	部長
	山崎麻美	社会医療法人愛仁会 高槻病院	副院長
	岡本伸彦	地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科	科長
	加藤光広	山形大学医学部附属病院 小児科	講師
	仁科幸子	独立行政法人国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部眼科	医員
	赤松和土	慶應義塾大学医学部 生理学教室	講師
谷口 善仁	慶應義塾大学医学部 衛生学公衆衛生学教室	講師	

〔Ⅱ〕

總括研究報告

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

「分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と
遺伝子診断ネットワークの形成」

研究代表者 小崎 健次郎
慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授

研究要旨

本研究では中枢神経系・感覚器が発生的に頭部外胚葉という共通の由来を持ち、先天異常の発症に共通の遺伝子経路が関与する可能性が高いことに着目して、コンソーシアムを編成し、臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指した。次世代シーケンサーのデータから真の疾患関連変異候補を抽出するための解析パイプラインの開発・最適化・バリデーションを行った上、先天異常症候群分野・難聴分野・中枢神経奇形分野について約 600 検体を解析した。形態形成遺伝子等を含む 150 遺伝子を網羅するパネル、難聴原因遺伝子・関連遺伝子 140 を網羅するパネル、284 遺伝子の標的遺伝子群パネルとエクソーム解析を並行して適用した。神経皮膚黒色症、Noonan-神経線維腫、新生児期発症の早老症、難聴、小頭症・大頭症等について新規疾患原因遺伝子を同定した。慶應大学に加え、ナショナルセンター・国立病院機構東京医療センター臨床研究センターにおいて全国の先天異常症の遺伝子診断の需要に対して速やかに対応できる体制が整備された。小児医療の均てん化に大きく貢献できる成果である。

研究分担者

松永 達雄	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 感覚器 聴覚障害研究室長
金村 米博	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室長
小崎 里華	独立行政法人国立成育医療研究センター 器官病態系内科部・遺伝診療科 医長
工藤 純	慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室 教授
清水 厚志	慶應義塾大学医学部分子生物学教室 助教
宮 冬樹	独立行政法人理化学研究所総合生命医科学研究センターリサーチアソシエイト
黒澤 健司	独立地方行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター 遺伝診療科 部長
齋藤 伸治	名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野 教授
水野 誠司	愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部 部長
山崎 麻美	独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター 副院長
岡本 伸彦	地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科 主任部長
加藤 光広	山形大学医学部附属病院 小児科 講師
仁科 幸子	独立行政法人国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 眼科 医員
赤松 和土	慶應義塾大学医学部生理学教室 講師
谷口 善仁	慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室 講師

A. 研究目的

われわれは中枢神経奇形・感覚器奇形・奇形症候群の各領域の先天異常症について各々のコンソーシアムを形成し研究を行ってきた。研究対象とする全疾患が「希少性・原因不明・治療方法未確立・生活面への長期の支障の4要素」を満たすことから、難治性疾患克服事業に参画し、全体で30余の研究班の活動を遂行してきた。本プロジェクトでは**中枢神経系・感覚器が発生学的に頭部外胚葉という共通の由来を持ち、先天異常の発症に共通の遺伝子経路が関与する可能性が高いことに着目して、既存3コンソーシアムの複合体**を新たに編成の上、臨床データ・検体・次世代シーケンサー技術という研究リソースを全国規模で共有して遺伝要因の解明を目指した。先天異常症の原因診断を促進し、治療を含めた診療全般の向上につながることを目的とし、さらには研究の実施を通じて、本研究班に参画しているナショナルセンター等が**中核施設として全国に遺伝子診断を提供可能なネットワーク**を確立することを目的とした。

B. 研究方法

中枢神経奇形・感覚器奇形・奇形症候群の各領域の先天異常症について各々のコンソーシアムが、次世代シーケンサー解析をオンサイトで実施できる環境を構築した。コンソーシアム間の協働的な研究事業の展開をめざして、協議のもとに解析プロトコルを策定し、各種のリソース（機器類・国内外のソフトウェアの開発状況、正常多型等）を共有した。

研究の実施に当たっては、**拠点班と緊密に連携**した。特に松田班「網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立」、梅澤班「小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による病因解明とゲノム解析拠点整備」、松本班「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築」、松原班「次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究」と緊密に連携した。松田班から研究実施期間の早期に日本人解析多型のデータ供与を受けた。また、全エクソーム解析について拠点班の梅澤班・松本班・松原班の協力を得た。

原因遺伝子の機能や染色体上の位置が不明な疾患については**全ゲノム翻訳領域の網羅的解析（エクソーム解析）**を行った。同時に原因遺伝子がすでに同定されているが、変異陽性率が数～数十パーセントに限られる疾患も解析対象とした**既知の疾患原因遺伝子と同一のシグナル伝達経路上の他の全遺伝子を標的遺伝子群**として解析し、第2・第3の原因遺伝子の同定をめざした。

標的遺伝子・標的領域のゲノムDNAを次世代シーケンサーにより解析した。解析対象となる遺伝子について、蛋白質コーディング全領域

のゲノム遺伝子配列をデータベースより抽出し、アジレント社製SureSelectターゲットエンリッチメントシステムのカスタムライブラリーを設計した。解析検体は、各過程で厳密に品質を管理しながら、超音波破碎機によるゲノムDNAの断片化、磁性ビーズによる精製、SureSelectターゲットエンリッチメントライブラリーによる各検体の解析対象となる遺伝子領域の濃縮、インデックスタグの付加と増幅を行い、イルミナ社製次世代シーケンサーMiseq, HiSeq2000などを用いて塩基配列データを創出した。

解析プログラムを用いて、検体毎に信頼性の高い遺伝子変異を検出した。粗配列データを生成したのち、粗配列のデータの質の確認を経て参照ゲノムDNA配列上へのマッピングを行った。既知の多型を除外後、同一疾患患者間のデータ等により最終的な候補遺伝子を同定するというアプローチを取った。この各種のステップにおいて、解析法の最適化を進めた。最適化に際しては、変異探索システムの改良（清水・宮・工藤・黒澤）、各種解析系の比較（清水）、バリデーション（宮・小崎・黒澤）を行った。さらに、全ゲノム/全エクソーム解析では原因を同定できない疾患への応用に向けて、発現変動遺伝子同定システムの構築（清水）を行った。効率の良い分析のためにバイオインフォマティクスソフトウェアの開発を進めたが、成果物については結果欄に記載した。

次世代シーケンサーから得られる大量のデータを効率的に解釈するため、既知の疾患の原因遺伝子と、既知疾患原因遺伝子が属する分子パスウェイの上流・下流の遺伝子の網羅的な列挙を遂行した（小崎里華・仁科）。これらの遺伝子を標準的な登録番号（カリフォルニア大学サンタクルツ校ゲノムデータベース UCSC ID）に変換した。患者ゲノムDNAからこれらの遺伝子に対応する領域を効率的に回収するためのオリゴヌクレオチドアレイを設計した（小崎・松永・金村・黒澤）。検体の収集に際しては、研究班の臨床医全員が連携した。

次世代シーケンサーによるゲノム解析により、多数の非同義アミノ酸置換が同定された。これらが先天奇形に与える影響を調べるためのモデル動物を用いた解析系を作成した（谷口）。変異陽性患者由来の疾患特異的iPS細胞の作成とバンクは再生医療研究や新規薬剤候補化合物の開発に不可欠であることから厚生労働省・文部科学省「再生医療の実現化プロジェクト「疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究」の「神経難病研究」班と連携した（赤松）。

倫理的な観点からは、従来の単一遺伝子解析用の説明同意文書を用いた時期の家族への説明に比べて、エクソーム解析を前提とした新しい説明同意文書を用いた説明を開始した以降に、患者家族の理解や受け止め方がどのように変化したかについて、検討した（水野）。偶発的所見

として問題になる遺伝子群についても国際的な動向の把握に努めた。

(倫理面への配慮)

個人情報保護に関する法律を踏まえて研究を実施した。遺伝子解析に際しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、倫理委員会の承認下に研究を実施した。

C. 研究結果

解析システムの最適化

中枢神経奇形・感覚器奇形・奇形症候群の各領域の先天異常症について各々のコンソーシアムが、次世代シーケンサー解析をオンサイトで実施できる環境を構築した。コンソーシアム間の協議のもとに解析プロトコルを策定し、各種のリソース(機器類・国内外のソフトウェアの開発状況、正常多型の情報等)を共有した。アラインメントには BWA・NovoAlign・GATK を用いて変異箇所が既知である HapMap サンプルについて解析を行い、我々が開発した解析パイプラインの精度・感度が国際的なベストプラクティス・ガイドラインを満たす仕様であることを確認した。得られた変異リストの病的意義の付与(アノテーション)をコンピュータで自動的に行うために、複数の異なるプログラム群、SnPEff(米国ウェイン大学)、Variant Effect Predictor(欧州 Ensembl project)、香港大学 KggSeq、Annovar(米国フィラデルフィア小児病院)等を有機的に組み合わせて活用した。既知の多型を除外し家系条件に合致する変異を選出する等の探索を実施した。解析対象遺伝子を含む領域が適切にカバーされたかどうかを、網羅的に検証するためにドイツケルン大学よりソフトウェア NGSrich の供与を受けたが、当研究班により改良を加えた。

次世代シーケンサーパイプラインの結果の臨床医による判定に際しては、VarSifter、NextGENe、AvadisNGS、VariantStudio 等を用いた。VarSifter は NIH で開発されたソフトウェアであるが、NIH のソフトウェア開発者との共同研究により、ヒト遺伝病データベースの最新情報・パスウェイ情報と患者の変異・多型データの同時表示を可能とした。各プログラムにはそれぞれの特質があるため、相補的な使用が望ましいと考えられた。プログラム間のデータの受け渡しのためのデータ変換スクリプト類を作成した(公開準備中)。

解析精度のバリデーションと解析実績

本研究班の課題名は「分野横断型全国コンソーシアムによる先天異常症の遺伝要因の解明と遺伝子診断ネットワークの形成」であり、臨床応用に耐えうる精度を有する遺伝子診断ネットワークの構築も重要な目標と位置づけていた。

そこで、典型的な遺伝性疾患である神経線維腫症 1 型の患者コホート 200 名を対象にバリデーション研究を行い、精度を検証した。

同定された変異について、従来法であり、感度・特異度の観点からは gold standard と考えられているサンガー法と比較・検証したところ偽陽性率・偽陰性率ともゼロであり、臨床検査として十分な精度を有することが実証できた。

上記のように、最適化された解析条件の設定に従い、全ゲノム翻訳領域の網羅的解析(エクソーム解析)を進めた。本研究班の目的には「同一シグナル伝達系路上の全遺伝子の網羅的解析」が含まれており、特定のシグナル伝達系に特化した診断・解析系の開発も並行して行った。先天異常症候群領域では形態形成遺伝子等を含む 459 遺伝子、難聴領域では 119 遺伝子を、中枢神経奇形では、284 遺伝子を網羅する標的遺伝子解析パネルを完成し、エクソーム解析を組み合わせて使用した。全体では、エクソーム解析を約 260 検体、疾患パネル解析を 1050 検体行った。

先天異常症候群領域・中枢神経奇形領域

次世代シーケンサーを用いた患者ゲノム DNA の分析により得られた、代表的な新知見を示す。新規の疾患原因遺伝子の同定、新規の疾患概念を確立した研究を■で示し、その結果、新規治療法の示唆につながった研究に★を加えた。

■★新生児期発症の早老症を主徴とする、新しい疾患概念、Marfanoid-progeroid 症候群を発見し、国際的に認知されるに至った(Am J Med Genet Editorial)。原因遺伝子が同定されたことから、進行性の腎障害の阻止に TGF ベータシグナルの遮断薬である、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬が有効であることが示された。

■★ PDGFRB 遺伝子の変異により新規の過成長症候群が発症することを発見した。過成長と菲薄化した皮膚を有する 2 例の患者で血小板由来成長因子受容体 PDGFRB 遺伝子の新生突然変異を同定し、疾患の原因であることを世界で初めて示した。この疾患は進行性の経過を辿るが、慢性骨髄性白血病治療の分子標的薬として既承認薬であるイマチニブ(グリベック)が有効と想定される。治療可能な新規疾患を同定できたことは大きな成果である。

■全く新規の疾患として YY1 異常症を発見した。発達遅滞に悪性腫瘍を合併する新規症候群の原因として細胞周期調節遺伝子 YY1 (Yin Yang 1) の変異を同定した。オランダのグループが YY1 の変異がありかつ日本人症例と表現型が酷似する症例を有していることが personal communication により判明し、YY1 が新規疾患の原因遺伝子であることを共同で報告した。梅澤拠点班の協力を得て実施した。

■歌舞伎症候群の原因遺伝子として、MLL2 が同定されているが、X 染色体上にある KDM6A 遺伝子が第 2 の歌舞伎症候群の原因候補遺伝子として同定された。しかし、当初の報告は KDM6A を含む X 染色体の微細欠失例のみであった。本研究により、KDM6A 遺伝子の点変異が歌舞伎症候群を生じ、KDM6A が原因遺伝子であることを世界で初めて示した。岡本・水野らの臨床医と拠点班である松本班との共同研究による成果であった。

以下に特定のシグナル伝達系の異常と先天異常症候群発症の関係について着目して得られた成果を例示する。

<コラーゲン異常症>

● 30 歳台以降に発症する微少血管疾患である Hereditary angiopathy with nephropathy, aneurysms, and muscle cramps : **HANAC syndrome** と胎児期に発症する微少血管疾患である **孔脳症**が、**親子で発症した家系を世界では初めて同定**した。親子ともに 4 型コラーゲンの遺伝子変異を有しており、両者が同一疾患であることを世界で初めて示した。

● 4 型コラーゲンの異常により孔脳症を含む血管型 Ehlers-Danlos 症候群がおきることは示され、5 型コラーゲンの変異により、血管病変を伴わない古典型 Ehlers-Danlos 症候群を呈することが知られていた。本研究により、上腸管膜動脈・腹部大動脈解離をきたし、血管型 Ehlers-Danlos 症候群の表現型を呈し、5 型コラーゲンの変異を有する患者を同定した。4 型コラーゲン異常のみならず 5 型コラーゲンの異常によっても血管病変が起きることを初めて確立した。

● 2 型コラーゲンの異常によりスティックラー症候群をきたすが、その転写調節にかかわる SOX9 遺伝子の変異により **Campomelic dysplasia** を来す。スティックラー症候群の症状を呈しながら、SOX9 遺伝子の変異を有する症例を同定した。

<細胞周期制御因子>

● 研究代表者は既に血小板減少症と発達遅滞を伴う新規症候群として、21 番染色体長腕部分欠失を報告した。エクソーム解析により、**血小板減少症と発達遅滞を伴うさらなる新規疾患**の原因として、細胞周期調節遺伝子 **CDC42** の変異を同定した。

● 発達遅滞に悪性腫瘍を合併する症候群である **Simpson-Golabi** 症候群の末梢血と腫瘍組織（神経芽細胞腫）のエクソーム解析を行い、 β カテニンの変異を同定した。Simpson-Golabi 症候群の悪性腫瘍におけるセカンドヒットが同定された、世界初例であり、**先天異常症候群の重要な合併症である小児がんの発がん機序についての重要な新知見**となった。

● 細胞周期制御因子の遺伝子群の網羅的な診断により、ASPM、ACTB、TUBA1A の変異で小頭症、大脳皮質形成異常症、小脳脳幹低形

成症を来すことを示した。胎児期発症の脳形成障害における細胞周期制御因子の遺伝子変異の重要性が示された。

<RAS シグナル伝達経路>

■RAS シグナル伝達経路の異常により Noonan 症候群を発症するが、RAS シグナル経路の遺伝子でありながらこれまで Noonan 症候群との関連が示されていなかった RIT1 遺伝子の変異を世界で初めて同定した。岡本・水野らの臨床医と **拠点班である松原班との共同研究**による成果であった。

■★RAS シグナル伝達経路の MAP2K2 遺伝子の変異により神経線維腫 1 型の症状に臨床的に区別が不可能な病態を発症することを世界で初めて示した。易発がん性を有するが、MEK 阻害剤が有効と考えられる。

●RAS シグナル伝達経路の異常により発症する Noonan 症候群の症状と FGFR シグナル伝達経路の異常により発症する頭蓋縫合早期癒合症の両方の症状を有する患者についてエクソーム解析を行い、SHOC2 遺伝子に変異を同定した。**SHOC2 が RAS シグナル伝達経路と FGFR シグナル伝達経路の両方の経路の連携に重要な役割を果たす分子であることを確立した。**

<PI3K/Akt 経路>

■★**fibroadipose hyperplasia の第 2 の原因遺伝子を同定**した。fibroadipose hyperplasia は AKT1 の変異で発症するが、AKT1 の上流にある PIK3CA によっても発症することを世界で初めて示した。fibroadipose hyperplasia が、PI3K-Akt 経路の異常として包括的に理解できることが示された。**fibroadipose hyperplasia の治療に、既承認薬である mTOR 阻害薬が有効である可能性**が示唆された。

● 水頭症は外科的治療を要するのに対し、多くの巨頭症は経過観察が望ましい。巨頭症の患者 3 名において PIK3CA ないし AKT3 の変異を同定し、遺伝子診断が治療方針の策定に有用であることを示した。

難聴領域

難聴領域は、症状のみから原因遺伝子を特定することが困難である。そこで先天異常症候群・中枢神経奇形とは別にここに難聴領域の研究結果を記載する。

これまでの研究で遺伝性難聴を疑われる約 1,600 家系を集積しているが、従来法であるサングー法で数個の候補遺伝子の解析を行うもこれまでに原因遺伝子が判明していない患者 104 検体について次世代シーケンサーによる解析を行った。29 家系、104 検体を選択し、既知の全非症候群性難聴遺伝子を含む 84 の難聴関連遺伝子の解析を行った。この結果、ACTG1, DFNA5, POU4F3, SLC26A5, SIX1, MYO7A, CDH23, PCDH15, USH2A, MYO15A, SLC26A4, LOXHD1 である遺伝子に変異を認めたが、この中の 7 遺伝子 (ACTG1, DFNA5,

POU4F3, SLC26A5, PCDH15, MYO15A、LOXHD1) については、これまで遺伝子変異を有する日本人患者の報告はない。本検討で変異が同定された遺伝子のいずれも、現在、健康保険により実施されている難聴遺伝子検査の対象に含まれておらず、特異的な臨床的特徴もないため候補遺伝子として予測して解析することもできない。つまり、遺伝子検査の感度の抜本的な向上のためには、上記パネルのような網羅的な診断体制を確立する必要性が明らかとなった。

今回の解析結果から、本網羅的解析を難聴遺伝子検査として用いることで、患者の約 70% で原因遺伝子を特定することができた。この成績はきわめて良好でヨーロッパ連合 EU の難病ネットワーク学会誌 Orphanet Journal of Rare Diseases に報告した。耳鼻科診療の新しいツールとして国内外から注目を受け、既に引用されている。

標的遺伝子に変異がない家族例難聴 14 家系を対象にエクソーム解析を行い、現時点までに 5 家系で原因と思われる遺伝子変異の特定に成功した。

■ 1 家系では新規の難聴原因候補遺伝子 ZBTB10 であり、他の 4 家系では既知の難聴遺伝子である USH2A, OPA1, DLX5, SOX10 であった。新規の難聴原因候補遺伝子 ZBTB10 は、内耳奇形(内耳道狭小) ならびに Duane 症候群様の眼球運動異常を示す 1 家系において同定された。ZBTB10 は Zinc フィンガードメインを有する転写因子であり、下流の転写因子 Sp1, 2, 3 制御を通じ、血管新生および乳癌細胞増殖に重要な VEGF シグナル伝達に抑制的に関わるとされている。一方で、蝸牛神経細胞でも発現しており、未知のメカニズムを介し、内耳の正常発生に重要な役割をもつと考えられた。新規原因遺伝子の変異が同定され、難聴の生物学的な発症機序を考える上で、重要な発見であった。

■ DLX5 変異は症候群性難聴 (SPLIT-HAND/FOOT MALFORMATION 1 WITH SENSORINEURAL HEARING LOSS, AUTOSOMAL RECESSIVE; SHFM1D, OMIM#220600) の原因遺伝子として 1 家系のみで報告があった。1 家系のみであり、その病的意義は未確立であったが、今回、われわれが DLX5 変異陽性例を同定したことにより、DLX5 遺伝子が難聴の原因となりうることを確立した。

産業界との連携

本研究を通じて、標的遺伝子パネル解析では十分な読み深度が得られる反面、カバーできる遺伝子数は限られている。一方、エクソーム解析では、全遺伝子をカバーする一方、標的遺伝子パネルに含まれるような臨床的に重要な遺伝子であっても、読み深度が不十分となることが解決すべき課題として明確にされた。臨床応用を念頭におき、問題解決を図るために、アジレント社の開発担当者との協力し、既知の先天異常の原

因遺伝子約 2000 遺伝子の近傍については、その他の部位に比較して読み深度を 5 倍程度増強したカスタムライブラリーを開発・設計・作成した。開発時の企図通り、エクソーム全域にわたり一様に幅広く読み深度を確保しながら同時に既知疾患原因遺伝子の領域での読み深度を選択的に高めることができた。今後、次世代シーケンサーの臨床応用を考えた際に、きわめて有効な戦略と考えられた。

上述の解析実績を受けて、当該技術の産業化を目指して、臨床検査会社である三菱メディエンス社・エスアールエル社との共同研究が開始され、さらなる研究展開のための定期的な人事交流が実現した。本研究班から臨床検査会社への標的遺伝子解析パネルの技術移転により遺伝子診断の迅速化・標準化が実現された。

D. 考察

先天異常には 1000 以上の疾患が含まれる。疾患群としての頻度は比較的高いが、個々の疾患は稀少疾患であることから、研究推進のためには、全国の医療機関・研究施設との連携が求められる。本プロジェクトでは遺伝子診断ネットワークを構築し、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析により、新規の疾患原因遺伝子の同定や新規疾患概念を確立することができた。いくつかの疾患については、新規治療法が示唆された。

本プロジェクトでは、FBN1 が過成長を伴う新規早老症、Marfanoid-Progeroid 症候群の原因であること、PDGFRB が進行性の精神神経症状を伴う新規過成長症候群の原因であること、YY1 が腹部腫瘍を伴う新規過成長症候群の原因であることを解明した。新たな疾患原因遺伝子の発見は、確定診断や遺伝相談において有用であるとともに、たとえば、FBN1 変異には既承認薬であるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬が、PDGFRB 変異には、チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブが有効と期待される。病態の解明が治療法開発への道筋を開いた。

プロジェクトの開始にあたって、本研究班は、既知疾患原因遺伝子が属するシグナル伝達経路の他の遺伝子の解析を積極的に進めることとした。この戦略によって、コラーゲン異常症・細胞周期制御因子・RAS シグナル伝達経路・PI3K/Akt 経路を含むシグナル伝達経路の遺伝子群の変異と先天異常症候群の関係について、従来の疾患概念を大きく拡張することができた。

また難聴の原因遺伝子として ZBTB10 や DLX5 の役割を初めて明らかにすることができた。新規遺伝子の発見は、難聴遺伝子検査の感度向上につながる。先天性難聴に対しては早期から補聴器および人工内耳による治療、リハビリテーションすることで高い聴覚活用と言語発達を得られる。難聴遺伝子検査の感度が向上して、

早期診断が促進することは患者の治療方針の策定上、きわめて有用である。このため新規遺伝子が発見された際には、これを「難聴遺伝子検査」の対象とするための速やかな制度整備が必要と考えられる。

研究開始時に掲げた目標である**新規疾患原因遺伝子の同定、遺伝子診断中核施設の確立、遺伝子診断の医療現場での利用促進**を概ね達成できたと考えられる。

新規疾患原因遺伝子の同定としては、次世代シーケンサーの応用により先天異常症の発症機序について新知見を得ることができた。過成長症候群等の原因を世界で初めて明らかにすることができた。

i) Marfanoid-Progeroid 症候群を新規疾患として報告し、その原因が FBN1 遺伝子の変異であることを確立した。これまでに認識されていない、過成長を伴う新しいタイプの早老症として国際的に認知された。

ii) 血縁関係にない複数患者に増殖因子 PDGFRB の新生突然変異を認めた。過成長と進行性の神経症状を主徴とする新規疾患である。先行する白血病領域の研究で PDGFRB の拮抗薬としてイマチニブという既承認薬が発売されており、治療が可能な新規疾患と考えられる。

iii) 発達遅滞に悪性腫瘍を合併する新規症候群の原因として細胞周期調節遺伝子 YY1 の変異を同定した。オランダのグループも YY1 の変異があり表現型も日本人と酷似する症例を有していたが、他の症例による確認ができず、未発表となっていることが personal communication により判明した。当研究班が見出した症例と併せて、新規疾患の原因遺伝子であることが確立した。

遺伝子診断中核施設の確立という観点から以下の成果が得られた。次世代シーケンサーによる遺伝子診断の感度・特異度を神経線維腫症 200 例を対象としたバリデーション研究により検証し、**臨床検査としての次世代シーケンサーの分析的妥当性を実証**することができた。今後、新しい解析技術が出現した際には、この検体とデータのセットを標準試料として使用することで、検査の質保証が担保される。この 200 例については、**主たる先天異常症の原因遺伝子座位について読み深度 200 倍という信頼度の高いデータ**が得られており、これらの遺伝子座位について**精度の高い日本人多型情報**を得ることができた。今後、中核施設として遺伝子診断を実施する場合には患者の検体で検出される**多型の病的意義の判定**が重要な役割となるが、上記の多型データベースは正確な判定のために必要不可欠な重要なリソースとなる。

機器開発の観点からは、次世代シーケンサー解析において中核的な位置を占める分析機器会社（アジレント社）と、検査過程の省力化・合

理化について協働し、**自動分注器を用いた新たなコントロールプログラム**を開発した。多数検体の迅速な処理が可能となった。

これらの成果を受けて、慶應義塾大学臨床遺伝学センター・国立成育医療研究センター遺伝診療科・国立東京医療センター感覚器センターに**臨床検査として次世代シーケンサー分析を行うための統合環境を整備**した。慶應義塾大学とナショナルセンターが技術情報、多型情報などを共有することで、効率的な遺伝子診断の実施基盤が確保された。

遺伝子診断の医療現場での利用促進

先天異常症候群と難聴の領域について、次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断について**臨床検査会社に対して技術供与**を進めた。供与した技術は、先天異常症候群以外の遺伝性疾患の遺伝子診断にも応用可能であり、検査会社による遺伝子診断の普及に直接貢献している。本研究で得られた**疾患原因遺伝子変異に関する情報は松田班のデータベースに提供**するとともにウェブサイトで公開した。本研究班で開発した解析プログラムについては日本小児遺伝学会のウェブサイト等を通じて、技術情報を公開している。

ゲノム情報を医療現場で利用する場合には、倫理面からの検討も重要である。偶発的所見の問題等も含めて議論を進めた結果、**小児の診断不明症例について、診療の一環としてエクソーム解析**を実施することについて慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得ることができた。**真の意味でのパーソナルゲノミクスの実現**に向けて、重要な一歩となった。次世代シーケンサーを使った**神経線維腫 1 型の遺伝子診断を先進医療**として実施することについても、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得た。現在、厚生労働省への申請書類を作成している。

学術的な成果としては、いわゆる過成長症候群を中心に新規疾患原因遺伝子を同定することができた。**本プロジェクトで新規疾患として同定した PDGFRB 異常症**については、がん分野の研究から既承認薬（イマチニブ）が存在しており、治療に直結する発見であった。**同様に本プロジェクトで新たな疾患概念として確立した Marfanoid-progeroid 症候群**についても、既承認薬であるアンギオテンシン受容体拮抗薬が有効と考えられる。いずれの成果も、本「次世代遺伝子解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発プロジェクト」事業の「次世代遺伝子解析装置を用いて、難病患者の**全遺伝子を極めて短期間に解析し、早期に原因解明及び新たな治療法・開発を推進**する」という理念にかなうものであった。

国際的な観点からは、YY1 異常症の存在をオランダのグループとともに証明することができた。原因遺伝子の YY1 は細胞周期調節因子であるが、

過去2年間で、Cell誌やNature誌に取り上げられるなど、高い注目を集めていたが、ヒト疾患との直接の関連は不明のままであった。今回の発見によりヒト疾患との関係が確立した。この遺伝子の変異については、研究開始の早期に同定していたが、2例目に遭遇せず、病的意義を証明することができなかった。昨年秋の日本人類遺伝学会において、世界のエクソーム解析研究を先導するオランダナイミヘン大学の研究者情報交換をする機会があり、オランダ・ギリシアにもYY1変異を有する患者が1名ずつ存在することが明らかになり、**日欧連携により新規の疾患を確立**することができた。超稀少疾患の病因研究には、国際連携が有用であると考えられた。

現在、欧米各国で、**UDPプログラム (undiagnosed disease program)**を国家プロジェクトとして推進されている。UDPとは、臨床的に何らかの遺伝性疾患が強く疑われるが、**確定診断に至らない小児・成人に対してエクソーム解析を実施**し、確定診断と治療・合併症の回避を目指すというプロジェクトである。米国 (NIH: Undiagnosed disease program、カナダ (FORGE: Finding of Rare Disease Genes)、英国 (SWAN-UK: Syndromes Without a Name)等)で**国家プロジェクト**として遂行されている。本研究班の成功事例により、わが国においても、UDPを実施しうる体制が整備されたことが実証された。

社会的な観点からは以下の成果が得られた。

慶應義塾大学病院で、欧米に準じた**UDPプログラム**を開始した後に、変異が同定された第1例は、 β ガラクトシダーゼ欠損症であった。**わが国で独自のシャペロン治療法**が開発されつつある疾患であり、診断が確定する事により、**治療への道筋**が示された。変異が同定された第2例は金属キレートタンパクであるセルロプラスミンの欠損症、無セルロプラスミン血症であった。進行すれば全身への鉄沈着により、進行性の退行を来す疾患である。診断が確定する事により、**既承認薬である鉄キレート剤**が有効な病態であることが示された。 β ガラクトシダーゼ欠損症・無セルロプラスミン血症ともに**臨床症状が非特異的**で、症状のみからは臨床診断が困難な稀少疾患である。エクソーム解析によって、診断・治療への道筋が明示できた事例であり、今後、小児医療の格段の向上を目指す際に取りべき道筋を差し示す好例といえる。

胎児期発症の中枢神経奇形の診断不能例に対してもUDPプログラムのアプローチが有用であった。過去3回の妊娠で水頭症を認め、胎児超音波では全く診断が不明であった家系例では、死亡罹患児の保存臍帯由来のゲノムDNAのエクソーム解析によってPOMT2変異を同定することができた。従来は極めて診断が困難であった胎児期の中枢神経異常症の原因検索について、エクソーム解析という新しいアプローチの臨床

的有用性が実証された。胎児死亡の原因の特定は、夫婦の次子挙児への動機づけにつながり、少子化問題の解決にも貢献しうる。

次世代シーケンサー技術を用いた遺伝子診断のバリデーション研究にあたっては、**神経線維腫症の患者会「あせび会」**から**全面的な支援**をいただいた。本プロジェクトの進捗について、患者会の総会で3回の講演活動を行ったところ、多くの患者家族から支持的なコメントを受けた。患者に対しては個別に外来で結果の説明を行ったが、遺伝子診断により確定診断がなされた患者からは、確定診断がついたことにより**治療研究への期待が高まる**という、ポジティブなコメントを受けた。「難治性疾患の患者が遺伝子診断を忌避する傾向にある」という旧来の医療者サイドの懸念が妥当とはいえないことが示された。

患者会のアドバイザーを務め、研究代表者の共同研究者である慶應義塾大学医学部佐秀行教授が、**既承認薬のスクリーニングにより神経線維腫症1型に対して薬効の期待できる候補薬**を見いだしており、近い将来の臨床試験の実施が预期されている。次世代シーケンサーによる遺伝子診断プロジェクトの実施を通じて、**多数の患者とface-to-face communication**を通じて**信頼関係**を築くことができたことは、今後計画される臨床試験の実施を考える上できわめて意義が深い。

研究により得られた成果の今後の活用・提供を考慮する際、全国の小児科臨床の現場では、多くの患者が「未診断」として取り残されている。本研究を通じて、画期的な診断技術である次世代シーケンサーを用いることによって個別患者の発症メカニズムを明らかにすることが可能であることが示され、小児科領域における未診断患者の問題解決に対する明快な解決策が提示できた。

一連の研究を通じて、i) **シグナル伝達経路上で近傍に位置する遺伝子群の変異は類似する症状を呈すること**、ii) **逆に同じ遺伝子の変異であっても表現型(症状)が大きく異なる場合がある**という2点が繰り返し観察された。この2点を考慮すると、既知疾患原因遺伝子およびシグナル伝達経路上の関連する遺伝子群に力点を置いた解析は臨床的有用性が高いと考えられた。シグナル伝達経路に基づくアプローチによれば、一旦候補遺伝子が示されれば、臨床症状との関連づけと遺伝子変異の病的意義の解釈が比較的直裁的であり、患者本人のみの解析によっても十分に診断が可能であった。

一方で、エクソーム解析によれば、これまで疾患との関係が未知であった遺伝子を同定することが期待できる。患者本人のみの解析によった場合、病的意義が不明である遺伝子変化が100か所以上列挙されることになる。この後の絞込みにもっとも有用であったのは、両親の検体を同時に解析し、患者と比較するアプローチ

であった。両親の解析を加えるとコストとして3倍の費用が発生するため、現時点では症例を絞った解析が必要となる。次世代シーケンサー技術のさらなる発展と低価格化が進めば、小児科領域におけるもっとも有力なアプローチとなるであろう。

既知疾患原因遺伝子+シグナル伝達から関連する遺伝子群を中心に解析するアプローチとエクソームのいずれのアプローチに従う場合にも、**遺伝子型と表現型の相関について、日本人のデータを蓄積**してゆく必要がある。表現型をシステム医学的な立場から蓄積する方策として、海外のOntologyのデータベースを適用することが推奨される。Johns-Hopkins大学のPhenoDBやトロント小児病院のPhenoTipsなどの取り組みが参考になる。当研究グループではPhenoTipsを導入し、**患者の網羅的な表現型(いわゆるPhenome)と次世代シーケンサー由来のデータセットを同時に蓄積**し、比較するシステムの開発を始めている。表現型の蓄積は多くの研究者の協力を要する地道な作業であり、**本研究班により形成された臨床医も含めた全国ネットワーク**を生かしてゆきたい。

今年度中に**次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断を先進医療としての申請**する計画であるが、承認をうけることができれば、さらに保険診療として遺伝子診断を実施することを目標にしている。**持続可能な遺伝子診断システムの確立**のためには、商用遺伝子検査会社の参画が有効と思われるが、我々の研究班では上述の通り、**神経線維腫症1型の遺伝子診断および難聴の遺伝子診断について企業への技術移転**を進めることができた。本研究班では、主に小児期に発症する「先天異常症」についてのエクソーム解析を推進したが、同じ手法は他の小児期発症の遺伝性疾患の確定診断を行う上で、きわめて有用な検査法であると期待される。神経線維腫症1型の遺伝子診断および難聴の遺伝子診断の先進医療としての医療経済学的な効果を評価しつつ、エクソーム解析の先進医療への導入を進めたい。

本計画では中枢神経系・感覚器が発生的に頭部外胚葉という共通の由来を持ち、先天異常の発症に共通の遺伝子経路が関与する可能性が高いことに着目して、既存3コンソーシアムの複合体を新たに編成した。次世代シーケンサー技術という研究リソースを3コンソーシアム間で共有したことにより効率よく解析パイプラインを構築することができた。エクソーム解析の実施にあたっては、本研究班内のみならず、**国立成育医療研究センター梅澤班、東北大学松原班、横浜市立大学松本班を含む拠点班と連携**し、研究効率の向上を図った。

松田班の日本人正常人1208人のデータを活用した。同時に、本研究班内でも、正常日本人で、比較的頻度の高い多型を集積し、データベース化を続けている。特定のパスウェイの遺伝子群

に注目した場合には、**松田班データベースに収載されていないが、低頻度で正常対照に含まれる多型が相当数存在**することも明らかになり、インハウスの多型情報として蓄積した。たとえば459遺伝子を標的として孤発例の遺伝子診断を行った場合、10程度の病的意義が不明なアミノ酸置換が候補遺伝子リストに残った。松田班の正常多型データベースで、フィルターを掛けるとその半数程度が候補から除外され、インハウスのデータベースで残りの候補遺伝子の半数程度が除外される。結果として2~3の遺伝子が候補に残り、臨床症状との比較により、病的意義を決定することが可能になった。

インハウスの多型データや変異データを研究班内で効率的に蓄積・活用するために米国ペイラー医科大学のvariant toolsソフトウェア群を導入した。Variant toolsは、本研究班の実施期間中に国際的に急速に普及したデータベース構築用のソフトウェアであるが、当研究班もいち早くこれを導入することにより、主要な先天異常症候群の原因遺伝子の日本人特有の変異・多型についてデータベース化することができた。

解析技術そのものについても、効率的な方法を検討し、成果を得た。

i) パイプラインの出力データの臨床的な意義を解釈するためにNIHが開発したソフトウェア、VarSifterについて慶應大学チームが中心に改良を重ね、本研究班内および国立成育医療研究センターのグループと共有した。必ずしもバイオインフォマティクスの詳細な知識を有さない**臨床医・研究者が研究に直接に参画可能**となり、研究を効率的に遂行可能となった。現在、**改良版VarSifter**を慶應義塾大学病院、国立成育医療研究センター病院において**診療支援ツールとしても活用**している。

ii) ゲノムDNAを一旦制限酵素で切断したあと、次世代シーケンサー処理に必要なDNA断片付加して環状化させるHaloplex法を適用した。TGFβシグナル関連(Marfan症候群類縁の結合織疾患)や、Hedgehogシグナル関連(Joubert症候群等繊維毛異常症)を対象に網羅的な解析を行い、50%程度の患者で変異を同定できた。既報に比較して2倍程度の検出率を示すことができた。

「同一シグナル伝達系路上の全遺伝子の網羅的解析」に用いたHaloplex法における1検体あたりのランニングコストは、現在、保険承認されている遺伝子診断の上限である4000点を下回ると試算された。本研究班の当初の目標として、診療への応用を掲げたが、医療経済学的な観点から、実施可能性を高めた点で、有意義な成果であったと思われる。

iii) 通常、遺伝性疾患の解析では、1番染色体から22番染色体までの核遺伝子の遺伝子配列の解析を行い、ミトコンドリアゲノムの遺伝子配列の解析を加えることは行われていない。難聴患者の相当数にミトコンドリア遺伝子の変異を

認めることから、難聴患者の遺伝子解析に際しては核遺伝子の変異とミトコンドリア遺伝子の変異を同時にアッセイできる分析プロトコルの開発に取り組み、実装に成功した。

E. 結論

先天異常には 1000 以上の疾患が含まれる。疾患群としての頻度は比較的高いが、個々の疾患は稀少疾患であることから、研究推進のためには、全国の医療機関・研究施設との連携が求められる。本プロジェクトでは遺伝子診断ネットワークを構築し、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析により、新規の疾患原因遺伝子の同定や新規疾患概念を確立することができた。いくつかの疾患については、新規治療法の示唆につながった。

研究の遂行に際してバイオインフォマティクスの解析環境を構築・最適化した。診断技術としての次世代シーケンサーの感度・特異度についてのバリデーションをおこなった。この成績に基づき、慶應義塾大学に加え、国立成育医療研究センター・国立病院機構東京医療センター・国立病院機構大阪医療センターにおいて全国の先天異常症の遺伝子診断の需要に対して速やかに対応できる体制が整備された。倫理委員会の承認の下、先進医療としての申請準備を進めるとともに、臨床検査会社への技術移転を完了した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takenouchi T, Sato W, Torii C, Kosaki K. Progressive Cognitive Decline in an Adult Patient with Cleidocranial Dysplasia. *Eur J Med Genet* 2014 (*In press*).
- 2) Takenouchi T, Matsuzaki Y, Yamamoto K, Kosaki K, Torii C, Takahashi T, Kosaki K. SOX9 dimerization domain mutation mimicking type 2 collagen disorder phenotype. *Eur J Med Genet* 2014 (*In press*).
- 3) Nomura T, Takenouchi T, Fukushima H, Shimozato S, Kosaki K, Takahashi T. Catastrophic Autonomic Crisis With Cardiovascular Collapse in Spinal Muscular Atrophy With Respiratory Distress Type 1. *J Child Neurol*. 2013 ;28(7):949-951.
- 4) Takenouchi T, Nishina S, Kosaki R, Torii C, Furukawa R, Takahashi T, Kosaki K. Concurrent deletion of BMP4 and OTX2 genes, two master genes in ophthalmogenesis. *Eur J Med Genet*. 2013 ;56(1):50-53.

- 5) Ueda K, Awazu M, Konishi Y, Takenouchi T, Shimozato S, Kosaki K, Takahashi T. Persistent hypertension despite successful dilation of a stenotic renal artery in a boy with neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet A*. 2013 ;161(5):1154-1157.
- 6) Takenouchi T, Kosaki R, Torii C, Kosaki K. Daytime somnolence in an adult with Smith-Magenis syndrome. *American Journal of Medical Genetics* . 2013;161(7):1803-1805.
- 7) Takenouchi T, Saito H, Maruoka R, Oishi N, Torii C, Maeda J, Takahashi T, Kosaki K. Severe obstructive sleep apnea in Loeys-Dietz syndrome successfully treated using continuous positive airway pressure. *Am J Med Genet A*. 2013 ;161(7):1733-1736.
- 8) Hirasawa A, Zama T, Akahane T, Nomura H, Kataoka F, Saito K, Okubo K, Tominaga E, Makita K, Susumu N, Kosaki K, Tanigawara Y, Aoki D. Polymorphisms in the UGT1A1 gene predict adverse effects of irinotecan in the treatment of gynecologic cancer in Japanese patients. *J Hum Genet*. 2013;58(12):794-798.
- 9) Takenouchi T, Hida M, Sakamoto Y, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Severe congenital lipodystrophy and a progeroid appearance: Mutation in the penultimate exon of FBN1 causing a recognizable phenotype. *Am J Med Genet A*. 2013;161(12):3057-3062.
- 10) Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K. Somatic CTNNA1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. (*in press*)
- 11) Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Tanizaki H, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J, Heike T, Okuyama T, Kosaki R, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsushashi Y, Amagai M. Mutations in SERPINB7, Encoding a Member of the Serine Protease Inhibitor Superfamily, Cause Nagashima-type Palmoplantar Keratosis. *Am J Hum Genet*. 2013 ;93(5):945-956.
- 12) Takagi M, Ishii T, Torii C, Kosaki K, Hasegawa T. A novel mutation in SOX3 polyalanine tract: a case of kabuki syndrome

- with combined pituitary hormone deficiency harboring double mutations in MLL2 and SOX3. *Pituitary*. 2013(in press)
- 13) Takenouchi T, Hashida N, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. 1p34.3 deletion involving GRIK3: Further clinical implication of GRIK family glutamate receptors in the pathogenesis of developmental delay. *Am J Med Genet A*. 2014 Feb;164(2):456-60
 - 14) Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T. Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: A cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. *Orphanet J. Rare Dis*. 2013;8(1):172
 - 15) Shofuda T, Kanematsu D, Fukusumi H, Yamamoto A, Bamba Y, Yoshitatsu S, Suemizu H, Nakamura M, Sugimoto Y, Furue MK, Kohara A, Akamatsu W, Okada Y, Okano H, Yamasaki M, Kanemura Y: Human Decidua-Derived Mesenchymal Cells are a Promising Source for the Generation and Cell Banking of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Med* 4(3):125-147, 2013
 - 16) Shofuda T, Fukusumi H, Kanematsu D, Yamamoto A, Yamasaki M, Arita N, Kanemura Y: A method for efficiently generating neurospheres from human-induced pluripotent stem cells using microsphere arrays. *Neuroreport* 24(2):84-90, 2013
 - 17) Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S: Hypoplasia of the spinal cord in a case of fetal akinesia/arthrogryposis sequences. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39(4):441-444, 2013
 - 18) Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S: Brain malformation with loss of normal FGFR3 expression in thanatophoric dysplasia type I. *Neuropathology* 33(6):663-666, 2013
 - 19) 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, Saito H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Ohashi H, Superti-Furga A, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S. Mutations in B3 GALT6, which Encodes a Glycosaminoglycan Linker Region Enzyme, Cause a Spectrum of Skeletal and Connective Tissue Disorders. *Am J Hum Genet*. 2013 Jun 6;92(6):927-34.
 - 20) Takenouchi T, Saito H, Oishi N, Fukushima H, Kosaki R, Torii C, Takahashi T, Kenjiro K. Daytime somnolence in an adult with Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Jul;161A(7):1803-5.
 - 21) Sasaki A, Sumie M, Wada S, Kosaki R, Kuroswa K, Fukami M, Sago H, Ogata T, Kagami M. Prenatal genetic testing for a microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to UPD(14)pat-like phenotype. *Am J Med Genet A*. 2013 Nov 20. doi: 10.1002/ajmg.a.36185. [Epub ahead of print].
 - 22) Takenouchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H and Kosaki K. Multiple Café au Lait Spots in Familial Patients With MAP2K2 Mutation. *American Journal of Medical Genetics*. (2013) in press.
 - 23) Ishikawa A, Enomoto K, Tominaga M, Saito T, Nagai JI, Furuya N, Ueno K, Ueda H, Masuno M, Kurosawa K. Pure duplication of 19p13.3. *Am J Med Genet A*. 2013 Sep;161(9):2300-4
 - 24) Yasuda S, Imoto K, Uchida K, Machida D, Yanagi H, Sugiura T, Kurosawa K, Masuda M. Successful Endovascular Treatment of a Ruptured Superior Mesenteric Artery in a Patient with Ehlers-Danlos Syndrome. *Ann Vasc Surg*. 2013;27(7):975.e1-5.
 - 25) Hamajima N, Johmura Y, Suzuki S, Nakanishi M, Saitoh S (2013) Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One* 8:e75137.
 - 26) Ishihara M, Nonaka M, Oshida N, Hamada Y, Nakajima S, Yamasaki M “No-no” type bobble-head doll syndrome in an infant with an arachnoid cyst of the posterior fossa: a case report. *Pediatr Neurol* . 49(6) : 474-6, 2013 Dec doi : 10.1016 / j.pediatrneurol. 2013.7.13. Epub 2013 Sep 26
 - 27) Itoh K, Pooh R, Kanemura Y, Yamasaki M, Fushiki S. Hypoplasia of the spinal cord in a case of fetal akinesia/arthrogryposis sequences. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013 Feb 20. doi: 10.1111/nan.12035. PMID: 23421748.
 - 28) Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, Yamasaki M, Ohgushi M, Sasai Y, Kanemura

- Y. Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using pericellular matrix of decidua derived mesenchymal cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e55226. doi: 10.1371/journal.pone.0055226. Epub 2013 Jan 31. PubMed PMID: 23383118; PubMed Central PMCID: PMC3561375.
- 29) 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]
 - 30) Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T. 109 kb deletion of chromosome 4p16.3 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome *Am J Med Genet A*. 2013;161:1465-9.
 - 31) Okamoto N, Fujii T, Tanaka J, Saito K, Matsui T, Harada N. A clinical study of patients with pericentromeric deletion and duplication within 16p12.2-p11.2. *Am J Med Genet A*. 2013 Nov 20. doi: 10.1002/ajmg.a.36217. [Epub ahead of print]
 - 32) Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. *Neurogenetics*. 2013 Nov 20. [Epub ahead of print]
 - 33) Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor B, Perrier J, Aggarwal S, Dalal A, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. *Clin Genet*. 2013 Jul 1. doi: 10.1111/cge.12225. [Epub ahead of print]
 - 34) Wada T, Ban H, Matsufuji M, Okamoto N, Enomoto K, Kurosawa K, Aida N. Neuroradiologic Features in X-linked α -Thalassemia/Mental Retardation Syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013 May 16. [Epub ahead of print]
 - 35) 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;161:1221-37.
 - 36) Yatsuki H, Higashimoto K, Jozaki K, Koide K, Okada J, Watanabe Y, Okamoto N, Tsuo O, Yoshida Y, Ueda K, Shimizu K, Ohashi H, Mukai T, Soejima H, Novel mutations of CDKN1C in Japanese patients with Beckwith-Wiedemann syndrome *Genes and Genetics*
 - 37) Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Sakamoto M, 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 A*. 2013;161A:1073-7.
 - 38) Shimada S, Okamoto N, Hirasawa K, Yoshii K, Tani Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Clinical manifestations of Xq28 functional disomy involving MECP2 in one female and two male patients. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:1779-85.
 - 39) Shimada S, Okamoto N, Nomura S, Fukui M, Shimakawa S, Sangu N, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Microdeletions of 5.5 Mb (4q13.2-q13.3) and 4.1 Mb (7p15.3-p21.1) associated with a saethre-chotzen-like phenotype, severe intellectual disability, and autism. *Am J Med Genet A*. 2013;161:2078-83.
 - 40) 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*. 2013;58:391-4.
 - 41) Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. *Hum Mutat*. 2013;34:108-10
 - 42) Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S,

- Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *Am J Hum Genet.* 2013;93:173-80.
- 43) 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 A.* 2013;161:2291-3.
- 44) 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;161:2234-43.
- 45) Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H. De Novo Mutations in SLC35A2 Encoding a UDP-Galactose Transporter Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Hum Mutat.* 2013 ;34:1708-14.
- 46) Koshimizu E, Miyatake S, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Performance Comparison of Bench-Top Next Generation Sequencers Using Microdroplet PCR-Based Enrichment for Targeted Sequencing in Patients with Autism Spectrum Disorder. *PLoS One.* 2013 Sep 16;8(9):e74167.
- 47) Nakajima J, Okamoto N, Shiraishi J, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Kawashima H, Matsumoto N, Miyake N. Novel FIG4 mutations in Yunis-Varon syndrome. *J Hum Genet.* 2013 Dec;58(12):822-4.
- 48) Ichikawa K, Kadoya M, Wada Y, Okamoto N. Congenital disorder of glycosylation type Ic: report of a Japanese case. *Brain Dev.* 2013;35:586-9.
- 49) Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev.* 35 (2013) 411–419
- 50) Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi JI, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing of a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria and midbrain tectal hyperplasia. *Neuropathology.* 2013;33:553-60.
- 51) Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, Hirotsune S. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep* (2013);3:1224
- 52) 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 A, Yamasaki M, Kumakura A, Sugo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H. Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* (2013);73:48-57
- 53) Nakayama Y, Yokoi T, Nishina S, Okuyama M, Azuma N. Electroretinography and spectral-domain optical coherence tomography detection of retinal damage in shaken baby syndrome. *J AAPOS.* 2013, 17(4): 411-413.
- 54) Morimoto N, Ogiwara H, Miyazaki O, Kitamura M, Nishina S, Nakazawa A, Maekawa T, Morota N. Gorham-Stout syndrome affecting the temporal bone with cerebrospinal fluid leakage. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013, 77(9): 1596-1600.
- 55) Azuma N, Ito M, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S. Visual outcomes after early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol.* 2013, 131(10): 1309-1313
- 56) Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y,

- Akamatsu W, Sasaki T, Yamanaka S, Amagai M, Okano H and Ohyama M: Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo. *J Invest Dermatol*. doi: 10.1038/jid, 2013.
- 57) Nihei Y, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Yagi T, Yoshizaki T, Okano H, Suzuki N. Enhanced Aggregation of Androgen Receptor in Induced Pluripotent Stem Cell-derived Neurons from Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *J Biol Chem*. 2013 Mar 22;288(12):8043-52.
- 58) Higurashi N, Uchida T, Christoph L, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori M, Katsurabayashi S, Shirasaka S, Okano H and Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain* 2013 May 2;6(1):19
- 59) Kim C, Kim W, Lee H, Ji E, Choe YJ, Martindale JL, Akamatsu W, Okano H, Kim HS, Nam SW, Gorospe M, Lee EK. The RNA binding protein, HuD regulates autophagosome formation in pancreatic β cells by promoting autophagy-related gene 5 expression. *J Biol Chem*. 2013 Nov 25. [Epub ahead of print]
- 60) Bundo M, Toyoshima M, Ueda J, Nemoto-Miyake T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Okada Y, Akamatsu W, Kato M, Okano H, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K. Increased L1 Retrotransposition in the Neuronal Genome in Schizophrenia. *Neuron*. 2013 Dec 31. pii: S0896-6273(13)01005-2. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.053. [Epub ahead of print]
- 61) Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett*. 587:1316-1325, 2013.
2. 学会発表
- 1) 松永達雄、鈴木直大、務台英樹、難波一徳、加我君孝 次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断に関する検討 *Otol Jpn* 2013;23(5):903-907
- 2) 野崎誠 佐々木りか子 土井亜紀子 重
- 松由紀子 久保田雅也 関敦仁 東範行 小崎里華 新関寛徳: 小児期のレックリングハウゼン病患者は初診時に何割が確定診断できるか *日本レックリングハウゼン病学会誌* 第2巻 第1号 2012
- 3) 小崎里華 : 先天異常の分類 *小児科臨床* 66巻増刊号 2013
- 4) 中嶋枝里子、服部文子、伊藤哲哉、小林悟、中島葉子、安藤直樹、杉田克生、齋藤伸治 (2013) Cockayne 症候群 I 型における合併症出現時期と全身管理. *日本小児科学会雑誌* 117:760-765.
- 5) 松原尚子、山田成利、伊東裕子、伴建二、紺谷佳代、岡垣篤彦、山崎麻美、巽啓司 当院における胎児期水頭症の診断と予後の検討 *日本周産期・新生児医学会雑誌* 49 (3) : 980-984 2013.9
- 6) 山崎麻美 胎児の人権 妊娠分娩と脳卒中 The 31st Meeting of The Mt. Fuji Workshop on CVD 株式会社ニューロン社 71-75,2013.7
- 7) 山崎麻美 先天性水頭症 小児脳神経外科 診療ガイドブック メジカルビュー社 68-81,2013.4.1
- 8) 山崎麻美 小児脳神経外科領域における遺伝子診断 専門医に求められる最新の知識 (小児) *脳神経外科速報* 23 (2) : 196~206,2013.2
- 9) 山崎麻美、吉岡絵麻、正札智子、高田愛、寺元千佳、埜中正博、金村米博 先天性水頭症の遺伝子診断 *日本遺伝カウンセリング学会誌* 33(1): 29-36, 2012.3
- 10) 岡本伸彦 「Coffin-Siris 症候群と SWI/SNF クロマチン・リモデリング複合体」 *小児科診療* 第76巻7号, 2013
- 11) 加藤光広: 脳・脊髄形成異常、皮質形成異
- 12) 加藤光広: 【小児脳神経外科の課題】 脳形成異常と遺伝子 *脳神経外科ジャーナル* 22(4);252-255, 2013
- 13) 仁科幸子: 小児眼科の最近の話題. *日本眼科学会雑誌* 2013 ; 117(5) : 415-417.
- 14) 赤松 和土: 疾患特異的 iPS 細胞研究の基礎と実際: バイオクリニカ 28(3) 22-26 2013
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

〔Ⅲ〕

分担研究報告