

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（難病関連分野）
分担研究報告書

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

研究分担者 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 室長
研究協力者 務台英樹 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 研究員
研究協力者 難波一徳 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 研究員

研究要旨

小児難聴の多くは遺伝子変異を原因とし、遺伝子診断が難聴の病態予測や療育法の決定に大きな影響を与える。本年度は次世代シーケンサー(NGS)を利用し、新規難聴遺伝子の発見と病態メカニズムの解明、および難聴遺伝子診断法の開発を目的とした。エキソーム解析の結果、新規難聴原因遺伝子の候補を1種類、世界で2例目となる難聴遺伝子変異1家系の同定に成功し、新たな難聴発症の病態メカニズムを捉えることに成功した。さらに症候群性難聴原因遺伝子 *USH2A*, *OPA1*, *SOX10* の同定に成功した。また臨床検査会社と共同で、日本人に最適化した高検出感度かつ費用対効果の高い難聴遺伝子検査法の実施した。

A. 研究目的

小児の難聴は言語発達障害を生じるため健聴者の社会への参加の大きな障壁となる。成人の難聴では周囲とのコミュニケーション障害によりそれまで担っていた職場、学校、地域、家族などにおける社会生活を維持できなくなる。治療困難な高度難聴の原因の多くは遺伝性であり、個別の患者で遺伝子診断ができると難聴の病態や特徴、難聴の進行および合併症、悪化の予防、治療法の選択、遺伝相談を的確に行える。その結果、難聴児あるいは成人難聴者の言語コミュニケーションが促進され、社会参加の機会が増し、社会生産性の向上につながるとともに聴覚障害者援助に必要な社会的経費を減らすことができる。

現在までに難聴遺伝子は非症候群性難聴だけでも70種類以上発見されており、今なお増え続けている。新規難聴原因遺伝子の同定は難聴発症メカニズムの理解を深め、将来の治療法開発にもつながる。

本研究では次世代シーケンサー(NGS)による遺伝子解析を実施し、①新規の難聴原因遺伝子を探索し、その病態メカニズムを解明すること、また、②前年度の成果に基づき、高効率・高検出感度な遺伝子検査法の実施をおこなうこと、を目的とした。

B. 研究方法

①：平成24年度より引き続き、解析検体には稀少な症候群性難聴家系、および特徴的な症状を呈する非症候群性難聴（Auditory Neuropathy）を呈する11家系23名に対して全

遺伝子（エキソーム）解析を行った。

②：非症候群性・症候群性難聴遺伝子（核遺伝子・ミトコンドリア遺伝子を含む）119種類を標的としたSureSelectカスタムライブラリーを設計し、難聴家系22家系22名を用い、日本人に最適化した高効率・高検出感度かつ費用対効果の高いNGS遺伝子診断法の開発を臨床検査会社と共同で行い、解析プログラムの諸条件の最適化、簡便化を行った。

なお、本遺伝子解析研究は、研究開始に先立ち当院および共同研究施設での倫理審査で承認をうけた。また本研究は、各検体をご提供下さった患者、ご家族の同意下のもと実施されている。

C. 研究結果

①について：11家系中5家系で原因遺伝子候補 *USH2A*, ●遺伝子, *OPA1*, *SOX10* を同定した。●遺伝子変異は症候群性難聴の原因遺伝子として、過去1家系のみで報告があり、その病的意義は未確立であったが、今回我々が●遺伝子変異例を同定したことにより、●遺伝子が難聴の原因となりうることを確立した。過去報告と、今回解析した患者の症状には相違点もあり、●遺伝子の変異箇所による分子機能変異の程度と症状スペクトラムとの関連が示唆された。

さらに、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家系については新規の難聴遺伝子候補○遺伝子が同定された。我々は蝸牛神経細胞で本遺伝子が発現していることを見出しており、○遺伝子が未知のメカニズムを介して内耳の正常発

生に重要な役割を持つと考えられた。遺伝子の分子機能について研究が進行中である。

②について:解析諸条件の最適化の結果、NGSデータ創出後、ミトコンドリア遺伝子の数%のヘテロプラスミー変異、約50塩基の挿入・欠失を含めた難聴遺伝子119種中の変異候補を、簡便な操作により1検体あたり2時間以内で検出する手法を確立した。これに加え、日本人1,208名の遺伝子多型データ、また当研究室内でこれまで収集してきた日本人難聴者1,600人の難聴遺伝子解析結果、日本人健聴者200名の難聴遺伝子多型情報、米国人6,500人の遺伝子多型情報(ESP6500)、人種別の遺伝子多型情報(dbSNP)、さらに本研究において検出され、非病的変異と同定された遺伝子多型情報をくみあわせた難聴遺伝子の非病的多型データベースを構築した。このデータベースにより、NGSにより検出された数百種類の遺伝子変異から、原因候補を1検体あたり10種程度まで簡便に絞り込むことが可能となり、遺伝子検査の効率化・迅速化に成功した。また、臨床検査会社と共同で、カスタムライブラリーを、標的難聴遺伝子領域のNGSでの読み深度を一様に高めるよう最適化し、変異検出の信頼性を高めた。

D. 考察

エキソーム解析において、新規難聴原因遺伝子○遺伝子の同定に成功し、難聴発症機序に新たな知見を得ることができた。内耳奇形の大部分は原因不明であり、今回の発見は学術的にも臨床的にも極めて意義深い。一方、眼球運動異常を示すDuane症候群の原因にも不明点が多く、眼科領域との今後の連携・共同研究への発展の可能性が開かれた。さらに、症候群性難聴原因として●遺伝子を同定し、今まで1例のみの報告であった●遺伝子の難聴原因としての意義を確立したことは、学術的に意義深く、また遺伝子検査の対象遺伝子を広げ、感度を向上させるものである。

臨床検査会社と共同で、非症候群性・症候群性難聴遺伝子119種類を効率よく濃縮しNGSにより解析する手法を開発した。本手法の特徴は①難聴遺伝子であるミトコンドリアDNAの5領域を、他の核遺伝子と同時に解析できるようにした②通常の濃縮法ではNGSでの読み深度(read depth)に領域ごとに大きく差ができる問題点を修正し、対象全遺伝子の全領域が高精度・高深度で解析できるよう最適化した、の二点である。この最適化技術は他の遺伝性疾患の遺伝子検査にも応用可能で

あり、検査会社による遺伝子検査普及のために貢献するものである。

E. 結論

本年度は、エキソーム解析により新規の難聴原因遺伝子○遺伝子の同定と、過去1例のみ報告のある●遺伝子の同定に成功した。また、難聴遺伝子診断法の確立を目指し、既知の119難聴遺伝子を対象としたNGSを用いた遺伝子解析により、現状の保険診療として実施される検査に比較しはるかに原因同定率の高い解析手法を構築・最適化し、臨床検査会社への技術移転を実施した。

F. 研究発表

1. 論文発表 (*責任著者)

Matsunaga T. Etiology and Genes. In : Microtia and Atresia - Combined Approach by Plastic and Otologic Surgery. Adv Otorhinolaryngol. Kaga K, Asato H (Eds). Karger, Basel .2014;75:2-8

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

Minami SB, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y, Taiji H, Morimoto N, Sakata H, Adachi N, Masuda S, Sakamoto H, Yoshida H, Tanaka F, Sugiuchi T, Kaga K, Matsunaga T*. GJB2-associated hearing loss undetected by hearing screening of newborns. Gene 2013; 532(1):41-45

Okamoto Y, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y, Sugiuchi T, Masuda S, Morimoto N, Sakamoto H, Ogahara N, Takagi A, Taiji H, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T*. Subgroups of enlarged vestibular aqueduct in relation with SLC26A4 mutations and hearing loss. Laryngoscope 2013[Epub ahead of print]

Matsunaga T*, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S. Genetic analysis of PAX3 for diagnosis of Waardenburg syndrome type I. Acta Otolaryngol 2013 Apr; 133(4): 345-51

Watabe T, Matsunaga T*, Namba K, Mutai H,

Inoue Y, Ogawa K. Moderate hearing loss associated with a novel KCNQ4 non-truncating mutation located near the N-terminus of the pore helix. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432(3): 475-479

Masuda S*, Usui S, Matsunaga T. High prevalence of inner-ear and/or internal auditory canal malformations in children with unilateral sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013; 77: 228-232

Arimoto Y, Namba K, Nakano A, Matsunaga T*. Chronic constipation recognized as a sign of a SOX10 mutation in a patient with Waardenburg syndrome. *Gene*(in press)

松永達雄 Auditory Neuropathy Spectrum Disorders In: 加我君孝・編集. 新生児・幼小児の難聴－遺伝子診断から人工内耳手術、療育・教育まで－ 診断と治療社: 東京 2014;26-29

松永達雄 難聴遺伝子変異 In: 加我君孝・編集. 新生児・幼小児の難聴－遺伝子診断から人工内耳手術、療育・教育まで－ 診断と治療社: 東京 2014;19-25

松永達雄*, 藤岡正人, 細谷誠 Pendred 症候群研究の現況と展望 *日本臨牀* 2013; 71(12): 2215-2222

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

松永達雄* Pendred 症候群の診断と治療 *日耳鼻会報* 2014; 117: 144-145

2. 学会発表

Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Kudoh J, Kosaki K, Matsunaga T. Target-captured next generation sequencing of reported deafness genes reveals variability of genetic background of hereditary hearing loss in Japan. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA 2013 年 6 月 22-25 日

Namba K, Kaneko H, Masuda S, Mutai H, Usui S, Matsunaga T. Novel pathological model of Proximal symphalangism and

conductive hearing loss revealed by docking simulation of Noggin and heparin. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA 2013 年 6 月 22-25 日

Fujioka M, Morimoto N, Sakamoto K, Ohtsu M, Nakano A, Arimoto Y, Masuda S, Sugiuchi T, Masuda S, Kaga K, Matsunaga T. Spectrum of hearing level discrepancy in siblings with the same GJB2 mutation in Japanese. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA 2013 年 6 月 22-25 日

松永達雄、渡部高久、南修司郎、守本倫子、阪本浩一、杉内智子、小川郁、加我君孝 次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子解析と原因診断への活用 第 114 回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 札幌市 2013 年 5 月 15-18 日

水足邦雄、仲野敦子、有本友季子、増田佐和子、阪本浩一、守本倫子、瀧口哲也、小河原昇、加我君孝、松永達雄 CDH23 遺伝子変異による遺伝性難聴の臨床像 第 114 回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 札幌市 2013 年 5 月 15-18 日

松永達雄、加我君孝、仲野敦子、有本友季子、杉内智子、泰地秀信、守本倫子、阪本浩一、大津雅秀、増田佐和子、小河原昇 前庭水管拡大症で認められた SLC26A4 遺伝子変異と臨床的特徴 第 8 回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 前橋市 2013 年 6 月 20-21 日

藤岡正人、守本倫子、阪本浩一、大津雅秀、仲野敦子、有本友季子、増田佐和子、杉内智子、益田慎、加我君孝、松永達雄 同一の GJB2 遺伝子変異を有する同胞（兄弟姉妹）の聴覚 第 8 回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 前橋市 2013 年 6 月 20-21 日

松永達雄、藤岡正人、加我君孝 次世代シーケンシングで MYO15A 遺伝子変異が認められた先天性難聴の孤発例の 1 例 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013 年 10 月 24-25 日

高橋優宏, 荒井康裕, 植草智子, 中川辰雄, 松永達雄, 宇佐美真一 遺伝子診断と術中 EABR が人工内耳に有効であった Auditory neuropathy spectrum disorder 症例 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013 年 10 月 24-25 日

有本友季子, 仲野敦子, 工藤典代, 松永達雄 難聴遺伝子解析を行った当科難聴症例の検討 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013 年 10 月 24-25 日

務台英樹, 難波一徳, 加我君孝, 松永達雄 孤発例の先天性難聴患者における稀少難聴原因候補の同定 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013 年 11 月 24-26 日

難波一徳, 加我君孝, 新谷朋子, 藤井正人, 松永達雄 Auditory Neuropathy 患者で新たに同定された 2 種類の変異型 OPA1 蛋白質の構造予測と分子病態 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013 年 11 月 24-26 日

福本一郎, 仲野敦子, 有本友季子, 松永達雄, 工藤典代 CDH23 遺伝子変異が検出された難聴 5 症例の検討 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013 年 11 月 24-26 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
無し

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（難病関連分野）
分担研究報告書

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

研究分担者 金村 米博

¹ 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 室長

² 国立病院機構大阪医療センター 脳神経外科

研究要旨

全エクソーム解析法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子検索を本格的に実施し、中枢神経奇形領域チーム全体で、健常コントロールを含む10カテゴリーの神経疾患を対象として、58家系163サンプルの全エクソーム解析を実施した。家族性脳梁無形成症の1家系からX染色体上の新規原因遺伝子の遺伝子Xの同定に至った。全エクソーム解析法は、標的遺伝子解析パネルでは同定困難な新規原因遺伝子同定に有用であることが明らかになり、今後は標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析法を上手く使い分けて研究と臨床に活用していくことが重要であることが示唆された。

研究協力者

正札智子³、吉岡絵麻⁴、高田 愛¹、埜中正博²、山崎麻美⁵、原田敦子⁵、山中 巧⁵、寺元千佳⁵、宮 冬樹⁶

³ 国立病院機構大阪医療センター

臨床研究センター 幹細胞医療研究室

⁴ 国立病院機構大阪医療センター

臨床研究センター 分子医療研究室

⁵ 社会医療法人愛仁会高槻病院

小児脳神経外科

⁶ 理化学研究所統合生命医科学研究センター 医科学数理研究グループ

A. 研究目的

難治性神経疾患の中でも、X連鎖性遺伝性水頭症を代表とする遺伝性水頭症や大脳皮質形成異常などの先天性中枢神経奇形症候群は希少疾患であり、研究者人口も少なく、その対策・研究は他の神経疾患に比べて大幅に遅れている。これら先天性中枢神経奇形症候群の分子病態解明と根治的治療法の開発は、臨床神経科学領域における大きな研究テーマの一つと考えられる。近年の次世代シーケンス法の進歩によって、従来の解析手法では原因不明であった様々な難病の遺伝子異常が同定されつつあり、先天性中枢神経奇形症候群の病因検索にその解析手法を応用することが期待される。

そこで我々は、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の原因遺伝子検

索として、先天性中枢神経奇形症候群との関連性が示唆される284個の標的遺伝子を選定して、その解析を実施した（標的遺伝子解析パネル）。さらに24年度からは全エクソーム解析法を導入し、25年度も引き続き次世代シーケンス法による全エクソーム解析を応用した先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子検索を実施し、その分子病態解明および新規診断・治療法開発につながる標的分子を探索した。

B. 研究方法

1. 解析対象

本研究班に属する、先天性中枢神経奇形症候群を研究対象とする山崎（社会医療法人愛仁会高槻病院）、齊藤（名古屋市立大学大学院医学研究科・新生児・小児医学分野）、加藤（山形大学医学部附属病院・小児科）、岡本（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）らと共同で研究チーム（以下、中枢神経奇形領域チーム）を形成して症例を集積した。各症例のゲノムDNAは末梢血単核球、分娩時に提供を受けた臍帯血あるいは臍帯から各々抽出し、解析に使用した。

1. 2. 全エクソーム解析

全エクソーム解析は宮（理化学研究所統合生命医科学研究センター・医科学数理研究グループ）が中心と成り、研究代表者の小崎（慶應義塾大学医学部・臨床遺伝学センター）並びに工藤（慶應義塾大学医学部・共同利用研究室・遺

伝子医学研究室)、清水(岩手医科大学)らの研究チームと共同で実施した。

全遺伝子の exon 領域をターゲットとした SureSelect Human All Exon Kit (V.4 または V.5、Agilent Technologies 社)を用いて全遺伝子の変異を探索した。シーケンスは HiSeq2000 (Illumina 社)にて実施し、シーケンスデータからの原因遺伝子変異の探索には理化学研究所の宮が開発した解析プログラムを用いて、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。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)を遵守し、国立病院機構大阪医療センター医学倫理委員会の承認(平成21年8月26日:第1版承認、平成25年10月15日:第8版修正承認)および研究チームの各施設内倫理委員会の承認に基づいて実施された。DNA試料の提供およびゲノム・遺伝子解析研究への使用に関しては、書面を用いたインフォームドコンセントを実施して同意取得を行い、提供されたDNA試料は連結可能匿名化状態で研究に使用した。試料提供者の個人情報および遺伝情報は、個人情報管理者および個人情報分担管理者によって細心で厳重な注意の下、管理された。

C. 研究結果

(1) 遺伝子解析症例数

中枢神経奇形領域チーム全体で、健常コントロールを含む10カテゴリーの神経疾患を対象として、最終的に58家系163サンプル解析の全エクソーム解析を実施した(表1)。

(2) 新規原因遺伝子同定

脳梁無形成症に膺ヘルニアを合併した兄弟症例を有し、家族性脳梁無形成症が疑われた1家系を対象として、2名の患児とその母親の全エクソーム解析を実施した(図1)。その結果、2人の患者に共通にX染色体上の遺伝子Xにミスセンス異常が認められ、母親は同変異をヘテロ接合体で有することが示唆され、Sanger シークエンス法によってこれら遺伝子X異常を確定させた。

同定された遺伝子Xは、文献上、家族性脳梁無形成症の発症との関連性の報告が無い新規遺伝子であり、今回同定されたミスセンス異常は、翻訳タンパク質の機能喪失に至ることが強く示唆される型の変異であった。以上の結果から、X連鎖性が強く疑われる家族性脳梁無形成症家系で同定された遺伝子Xの変異は、本症例の原因遺伝子である可能性が高いと推察された(投稿準備中)。

表1: 中枢神経奇形領域チームで解析を実施した検体・家系数

疾患名	全エクソーム解析	
	サンプル数	家系数
先天性水頭症	11	4
脳梁欠損症	12	4
全前脳胞症	0	0
皮質形成異常症	46	16
小脳形成異常症	12	4
小頭症	41	13
大頭症	3	1
脳瘤	0	0
脊髄髄膜瘤	4	2
アンジェルマン症候群	0	0
てんかん	2	1
その他	28	9
健常コントロール	4	4
(小計)	163	58

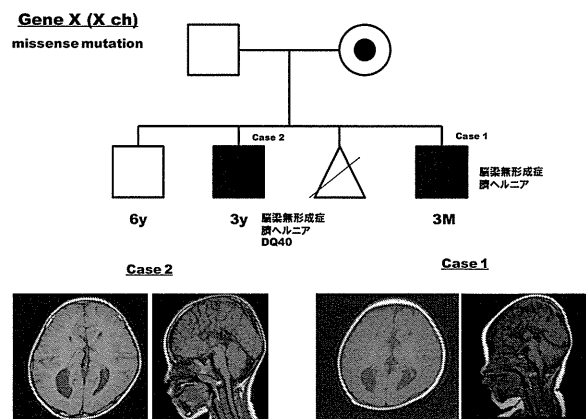


図1: 家族性脳梁無形成症の1家系
上段: 家系図、下段: 頭部MRI画像 (T1強調画像)

D. 考察

最終年度の25年度は全エクソーム解析を本格的に実施した結果、中枢神経奇形領域チーム全体で、最終的に58家系163サンプル解析の全エクソーム解析を実施するに至り、希少神経疾患の全エクソーム解析としては、国内研究では有数規模の解析を実施することができたと判断する。

23-24年度に実施した284遺伝子の標的遺伝子解析パネルは、解析対象家系の原因遺伝子があるパネル中に存在する場合は、一度のシークエンス解析で多数の候補遺伝子の中から原因遺伝子を同定することが可能であり、効率的に原因遺伝子の同定に成功する解析手法であることが示唆され、複数の家系で原因遺伝子の同定に成功した。臨床的には、1つの病気に複数の原因遺伝子が存在する場合などに、その遺伝子型を決

定する際に使用することに適した解析アプローチであると考えられた。一方で、原因が全く未知の疾患・家系の場合、その原因遺伝子がパネル中に存在しない場合が十分想定され、そのような場合は限定された数の遺伝子の検索では、新たに原因遺伝子を同定することは不可能であり、全エクソーム解析を用いたアプローチが非常に有用な手法であることが予測された。今年度の解析の結果、X連鎖性家族性脳梁無形成症の原因遺伝子と推察される遺伝子 X を同定するに至り、原因不明の先天性中枢神経奇形症候群家系の原因遺伝子検索における全エクソーム解析の有用性を確認することができたと考える。

現在、標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析にコスト面では大きな差は無くなりつつあり、今後はこの両解析手法を目的に合わせて上手く使い分けて研究と臨床に活用していくことが、次世代シーケンス法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の遺伝子研究の方向性であると考えられ、3年間の研究を通じてそれを明らかにすることに貢献できたと結論づける。

E. 結論

全エクソーム解析法を用いた先天性中枢神経奇形症候群の原因遺伝子検索を本格的に実施し、標的遺伝子解析パネルでは同定困難な新規原因遺伝子同定に有用であることを明らかにした。今後は標的遺伝子解析パネルと全エクソーム解析法を上手く使い分けて研究と臨床に活用していくこと重要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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* 8(1):e55226, 2013
- 4) 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
- 5) 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

2. 学会発表

- 1) 服部文子, 根岸 豊, 戸川貴夫, 宮 冬樹, 安藤直樹, 伊藤哲哉, 角田達彦, 金村米博, 山崎麻美, 小崎健次郎, 齋藤伸治: AKT3遺伝子変異による巨脳症の一例. 第55回日本小児神経学会, 2013.6.1; 大分市
- 2) 芹川武大, 遠山 潤, 田澤立之, 西山健一, 後藤清恵, 栗山洋子, 生野寿史, 金村米博, 山崎麻美, 中田 光, 高桑好一, 榎本隆之: X連鎖性遺伝性水頭症の出生前診断. 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2013.6.21; 川崎市
- 3) Yamasaki M, Shofuda T, Harada A, Yamanaka T, Bamba Y, Nonaka M, Kanemura Y: Molecular Basis of Csf Space Anomaly. 15th World Congress of Neurosurgery, 2013.9.12; Seoul, Korea

G. 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

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（難病関連分野）
分担研究報告書

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

研究分担者 小崎里華
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

研究要旨

次世代シーケンサー技術を用いて先天異常症の遺伝要因の解明を目的とし、臨床データ・検体の解析を実施した。解析の結果、治療を含めた診療全般の向上に繋がった。また、日本の現在の遺伝子診断システムについて、英国と比較検討し、次世代シーケンサーの臨床応用へむけて考察した。本研究の実施を通じて、本研究班に参画している当施設を含め、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にむけて基盤整備の充実をはかった。

A. 研究目的

当研究班全体では、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ている。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。

また、必ずしも次世代シーケンサーの解析では診断が困難な遺伝学的疾患もあり、臨床診断において、疾患ごとに、遺伝学的検査実施のアルゴリズムが異なることが、臨床診断・応用にむけて重要な課題である。

現在、日本で保険収載されている遺伝性疾患は37疾患であり、費用は保険点数で上限4000点、実施施設も大学・研究室・検査会社など様々な条件で遺伝子検査が行われている。

保険収載させていない数百の遺伝性疾患においても同様に様々な施設で実施され、費用は、受益者負担、研究費、医療施設負担などであり、一定した価格設定はされていない現状である。

そこで、すでに遺伝子検査が保険収載され、一般臨床へ実用化されている、英国の遺伝子検査承認までの過程について検証し、我が国における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を行うことを目的とした。

B. 研究方法

①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。

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。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。

②日本と同じく英国では国民皆保険制度（NHS:National Health Service）が運用されてお

る。遺伝子検査においてもサポートシステム (UKGTN :UK Genetic Testing Network)が提供されていることに注目した。同システムでは740遺伝子検査が実施されており、運用にあたり、下記のフォーマットが用いられている。

Testing criteria : 疾患ごとの専門診察医と受検のための疾患基準を設定。対象は302疾患。

Gene Dossier : 疾患ごとの対象となる遺伝子、感度・特異度・検査技術・精度・検査アルゴリズム・費用対効果などを設定。対象は298疾患。

家庭医・referral centerの専門医から検査施設を通して、これらを申請し、コミッショナーらによる諮問・評価後に、承認を得るシステムである。当研究班の対象疾患である先天異常症候群7疾患を選択し、同システムで用いられているTesting criteria、Gene Dossierの翻訳版を作成した(原文:<http://ukgt.nhs.uk/>)。

C. 研究結果

①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。

②当研究班の対象疾患である先天異常症候群8疾患について、UKGTNで用いられているフォーマットの翻訳版を作成した(添付資料)。それらを用いて、検査の対象・感度・特異度・検査アルゴリズム・費用などについて、検討した。

D. 考察

①遺伝子診断中核施設の確立

次世代シーケンサーによる基盤整備を行い、症例を解析し、新しい知見を得ることができた。

今後、遺伝子診断の医療現場での利用促進するための中核施設として統合環境を整備した。

②UKGTNにおける遺伝子検査の承認にいたる基準を検討した。

Testing criteriaでは、疾患ごとに、原疾患に関連する専門医と遺伝専門医の診察が必要であり、これら専門医らにより、受検にあたり、一定の「疾患」基準を設けられている。このことにより、よりの確な臨床診断がなされることを意味し、ひいては、無用な検査を避けることができ、限りある医療資源を有効に活用することができ、対費用効果もあると考えられる。

Gene Dossierでは、原因遺伝子、感度、特異度・技術・検査の質的保証のための検査室(施設)の実績、人的・物的資源の定量的評価、検査報告書などについて、疾患ごとに詳細に一定基準に項目を

設けられていることは、医療関係者・当事者だけではなく、国としての医療経済を含めた社会政策であることを表しているとともに、日本における、検査室(施設)実績、人的・物的資源の問題がより明らかとなった。遺伝子検査においても、ある一定の基準をもうける標準化が必要であることが考察される。

また、英国では、次世代シーケンサーを用いての遺伝子検査が13件承認され、実施可能となったことを踏まえると、実施可能な遺伝子数は今後、更に増加することが予測される。ここでは、標的遺伝子のみを対象とした疾患パネルを用いている。

費用面でも、現在は、エクソン数により、費用が算定されているが、次世代シーケンサーによって、費用面でも改定がおこなわれるであろう。日本においても、次世代シーケンサーが技術的に安定した技術として提供可能となれば、英国式ネットワークシステム(UKGTN)と同様に日本版を稼働させることは可能であろう。また費用の面でも4000点上限の問題解決に役立つであろう。今後、遺伝子検査を普及させるにあたり、上記システムも大事ではあるが、最重要な点は、結果の解釈に携わる専門医の育成であろう。また、実施にあたり、倫理的配慮、偶発的所見を含め、遺伝カウンセリングなどのガイドライン整備も必要であることはいうまでも無い。

E. 結論

次世代シーケンサー技術を用いて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げた。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にむけて基盤整備を行った。

F. 研究発表

論文発表

1. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi k, Hata K, Kosaki K. Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. Am J Med Genet A. (Epub ahead of print) Jan.2014
2. Takeuchi T, Hayashida N, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H ,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. 164(2)456-60. Feb.,2014
3. Takeuchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki

- R, Takahashi T, Saya H, Kosaki K. Multiple café au lait spots in familial patients with MAP2K2 mutation. *Am J Med Genet A*. 164(2):392-6. Feb.2014
4. 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*. 164A(1):264-6. Jan.2014
 5. 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, Mitsuhashi Y, Amagai M. Mutations in SERPINB7, Encoding a Member of the Serine Protease Inhibitor Superfamily, Cause Nagashima-type Palmoplantar Keratosis. *Am J Hum Genet*. 7;93(5):945-56 Nov.2013
 6. 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*. 161(12):3057-62. Dec.2013
 7. Takenouchi T, Saito H, Oishi N, Fukushima H, Kosaki R, Torii C, Takahashi T, Kosaki K. Daytime somnolence in an adult with Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A*. 161A(7):1803-5. Jul.2013
 8. 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 B3GALT6, which Encodes a Glycosaminoglycan Linker Region Enzyme, Cause a Spectrum of Skeletal and Connective Tissue Disorders. *Am J Hum Genet*. 6;92(6):927-34. Jul.2013
 9. 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*. 56(1):50-3.2013
 10. Takenouchi T, Yagihashi T, Tsuchiya H, Torii C, Hayashi K, Kosaki R, Saitoh S, Takahashi T, Kosaki K. Tissue-limited ring chromosome 18 mosaicism as a cause of Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet A*. 158(A)(10):2621-3.2012
 11. Takenouchi T, Okuno H, Kosaki R, Ariyasu D, Torii C, Momoshima S, Harada N, Yoshihashi H, Takahashi T, Awazu M, Kosaki K. Microduplication of Xq24 and Hartsfield syndrome with holoprosencephaly, ectrodactyly, and clefting. *Am J Med Genet A*. 158(A)(10):2537-41.2012
 12. Kosaki R, Nagao K, Kameyama K, Suzuki M, Fujii K, Miyashita T. Heterozygous tandem duplication within the PTCH1 gene results in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet A*. 158(7):1724-28.2012
 13. Yagihashi T, Kosaki K, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Takahashi T, Sato Y, Kosaki R, Age-dependent change in behavioral feature in Rubinstein-Taybi syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)*. 52(2):82-6.2012
 14. Miyazaki O, Nishimura G, Sago H, Horiuchi T, Hayashi S, Kosaki R. Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasia with 3D CT. *Pediatr Radiol*. 42(7):842-52.2012
 15. Kosaki R, Kaneko T, Torii C, Kosaki K. EEC syndrome-like phenotype in a patient with an IRF6 mutation. *Am J Med Genet A*. 158A(5):1219-20,2012
 16. Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *Am J Med Genet A*. 158A(3):514-8.2012
 17. Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J. Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes with marked midface retrusion. *J Hum Genet*. 57(3):191-6.2012
 18. Kasahara M, Sakamoto S, Kanazawa H, Karaki C, Kakiuchi T, Shigeta T, Fukuda A, Kosaki R, Nakazawa A, Ishige M, Nagao M, Shigematsu Y, Yorifuji T, Naiki Y, Horikawa R. Living-donor liver transplantation for propionic acidemia. *Pediatr Transplant*. 16(3):230-4.2012
 19. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H, Akiyama M, Shimizu H. A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing. *Exp Dermatol*. 20(1):74-6 2011
 20. Shimizu H, Migita O, Kosaki R, Kasahara M,

- Fukuda A, Sakamoto S, Shigeta T, Uemoto S, Nakazawa A, Kakiuchi T, Arai K. Living-related liver transplantation for siblings with progressive familial intrahepatic cholestasis 2, with novel genetic findings. *Am J Transplant*. 11(2):394-8. 2011
21. Kosaki R, Fujita H, Ueoka K, Torii C, Kosaki K. Overgrowth of prenatal onset associated with submicroscopic 9q22.3 deletion. *Am J Med Genet A*. 155(4):903-5. 2011
 22. Kosaki R, Fujita H, Takada H, Okada M, Torii C, Kosaki K. Monozygotic twins of Rubinstein-Taybi syndrome discordant for glaucoma. *Am J Med Genet A*. 155A(5): 1189-91. 2011
 23. Kondoh T, Kanno A, Itoh H, Nakashima M, Honda R, Kojima M, Noguchi M, Nakane H, Nozaki H, Sasaki H, Nagai T, Kosaki R, Kakee N, Okuyama T, Fukuda M, Ikeda M, Shibata Y, Moriuchi H. Donepezil significantly improves abilities in daily lives of female Down syndrome patients with severe cognitive impairment: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Psychiatry Med*. 41(1):71-89. 2011
 24. Kosaki K, Saito H, Kosaki R, Torii C, Kishi K, Takahashi T. Branchial arch defects and 19p13.12 microdeletion: defining the critical region into a 0.8 M base interval. *Am J Med Genet A*. 155A(9):2212-4. 2011
 25. Numabe H, Sawai H, Yamagata Z, Muto K, Kosaki R, Yuki K, Kosaki K. Reproductive success in patients with Hallermann-Streiff syndrome. *Am J Med Genet A*. 155A(9):2311-3. 2011
 26. Tsutsumi Y, Kosaki R, Itoh Y, Tsukamoto K, Matsuoka R, Shintani M, Nosaka S, Masaki H, Iizuka Y. Vein of Galen Aneurysmal Malformation Associated With an Endoglin Gene Mutation. *Pediatrics*. 128(5):1307-10. 2011
 27. Tonoki H, Harada N, Shimokawa O, Yosozumi A, Monzaki K, Satoh K, Kosaki R, Sato A, Matsumoto N, Iizuka S. Axenfeld-Rieger anomaly and Axenfeld-Rieger syndrome: Clinical, molecular-cytogenetic, and DNA array analyses of three patients with chromosomal defects at 6p25. *Am J Med Genet A*. 155A(12):2925-32. 2011
 28. Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and—: Galloway-Mowat multiple congenital anomalies. *J Hum Genet*. 56(2):110-24 2011
 29. 小崎里華: 遺伝の基礎知識・考え方 月刊母子保健12月号 2013
 30. 小崎里華: 遺伝性内分泌疾患に関する遺伝カウンセリング 内分泌・糖尿病・代謝内科 vol.37 No.4 2013
 31. 小崎里華: 先天異常の分類 小児科臨床66巻増刊号 2013
 32. 小崎里華 CHARGE症候群 今日の小児の治療指針 医学書院:184. 2011.
 33. 小崎里華 VATER症候群 今日の小児の治療指針 医学書院:190. 2011
 34. 小崎里華 染色体異常症の子どもを経過観察する際のポイント。・小児思春期診療 最新マニュアル 2011
- 学会発表
1. Narumi Y, Nishina S, Tokimoto M, Aoki Y, Kosaki R, Kosho T, Murata T, Takada F, Fukushima Y. Missense mutation of *MAF* in a Japanese pedigree with congenital cataract. American Society of Human Genetics, 2013
 2. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K. Somatic *CTNNB1* mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline *GPC3* mutation. American Society of Human Genetics, 2013
 3. Kosaki R, Takenouchi T, Hida M, Sakamoto Y, Torii C, Takahashi T, Kosaki K. Sever congenital lipodystrophy and a progeroid appearance: Mutation in the penultimate exon of *FBN1* causing a recognizable phenotype. European Society of Human Genetics, 2013 6.9
 4. Shimizu A, Torii C, Suzuki N, Mutai, J, Kudoh H, Kosaki R, Matsuunaga T, Kosaki K. Rapid and efficient mutation in the hundreds of target genes by bench-top next generation sequencer with custom target capture method. American Society of Human Genetics, 2012
 5. Kosaki R, Takeuchi T, Torii C, Nishina S, Kosaki K. Concurrent deletion of *BMP4* and *OXT2* genes: Clinical evidence of synergistic effect of the two master genes in ophthalmogenesis. American Society of Human Genetics, 2012
 6. Kosaki R, Okuno N, Torii C, Kosaki K:

- Hartsfield syndrome and Xq 24 microduplication European Society of Human Genetics, 2011
7. Kosaki K, Tanaka R, Kosaki R, Uchida C, Torii C, Ishi T, Sato T, Yoshihashi H. Wide phenotypic variability of Kabuki syndrome with MLL2 mutations. American Society of Human Genetics, 2011
 8. 鳴海洋子 仁科幸子 時光元温 青木洋子 小崎里華 涌井敬子 村田敏規 高田史男 古庄知己 福嶋義光 :先天性白内障家系におけるMAF遺伝子変異の同定 第58回 日本人類遺伝学会 2013.11.22
 9. 佐々木 愛子 藤田 秀樹 和田 誠司 小崎里華 堀川 玲子左合 治彦:高齢妊娠を契機に羊水検査を行いX/XY 混合性性腺異形成と診断された3例の臨床経過 第58回 日本人類遺伝学会 2013.11.22
 10. 藤田 秀樹 小崎里華:FGFR2 変異を確認したBeare-Stevenson 症候群の一例 第58回 日本人類遺伝学会 2013.11.22
 11. 小崎健次郎 小崎里華:先天異常症候群診断パネルの臨床応用 第3回 NGS現場の会 2013.9.4
 12. 藤田秀樹 小崎里華:20q端部欠失を認めたVATER連合に類似す多発奇形症例第53回 日本先天異常学会 2013.7.22
 13. 佐々木愛子 藤田秀樹 和田誠司 住江正大 杉林里佳 上出泰山 岡田朋美 太崎友紀子 藤村千鶴子 李紅蓮 小崎里華 左合治彦 :日本における出生前診断の現況 第37回 日本遺伝カウンセリング学会 2013 6.21
 14. 竹澤祐介 余谷暢之 石黒精 紙谷万里子 益田博司 師田信人 小崎里華 宮寄治 西村玄 阪井裕一:当センターで経験した点状軟骨異形成症の環軸亜脱臼に関する臨床的経過の検討 第116回 日本小児学会学術集会 2013.4.20
 15. 高木優樹 藤田秀樹 小崎里華 内木康博 鳴海覚志 三宅紀子 鶴崎美德 才津浩智 中島光子 松本直通 西村玄 長谷川奉延 :SERPINH1遺伝子変異による骨形成不全症の本邦初発例 第36回 日本小児遺伝学会学術集会 2013.4.17
 16. 藤田 秀樹 小崎里華 :染色体G分染法で48,XYYYと49,XYYYYのモザイクを認めた一例 第36回 日本小児遺伝学会学術集会 2013.4.17.
 17. 岡田 朋美 大柴 葉子 佐々木 愛子 谷口 公介 杉林 里佳 住江 正大 和田 誠司 柿島 裕樹 小須賀 基通 小崎里華 小澤 伸晃 左合治彦:羊水検査においてFISH 法 (AneuVysion) とG-band 法で異なった核型結果が得られた2 症例 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.26
 18. 藤田 秀樹 小崎里華: 当院で経験した未診断の発達遅滞・先天性多発奇形症例のアレイCGH 解析(続報) 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.26
 19. 和田 友香 花井 彩江 佐々木 愛子 藤田 秀樹 小崎里華: 近四倍体と18 トリソミーのモザイクの1 女児例 第57回日本人類遺伝学会 2012.10.26
 20. 鳥居千春 丸岡亮 清水厚志 小崎里華 小崎健次郎:次世代シーケンサーを用いた先天奇形症候群の網羅的診断 第52回 日本先天異常学会 2012. 7.6
 21. 藤田秀樹 小崎里華 :アレイCGHで1q24-q25領域に欠失を認めた精神運動発達遅滞児についての検討 第52回 日本先天異常学会 2012.7.6
 22. 三須久美子 桐林和代 佐谷秀行 鳥居千春 小崎里華 小崎健次郎:神経線維腫症1型の遺伝様式に関する患者家族の誤解の類型化 第36回 日本遺伝カウンセリング学会 2012 6.10
 23. 岡田朋美 佐々木愛子 黒田くみ子 上田英梨子 江川真希子 杉林里桂 住江正大 李紅蓮 藤田秀樹 小崎里華 左合治彦: 成育医療研究センターにおける周産期遺伝カウンセリング体制 第36回 日本遺伝カウンセリング学会 2012 6.9
 24. 武内俊樹 下郷幸子 山崎麻美 小崎里華 小崎健次郎 高橋高雄: L1CAM変異により発症した先天性水頭症とHirshsprung 病の合併例 第54回 日本小児神経学会総会 2012.4.19
 25. 柳橋達彦 小崎健次郎 小崎里華 吉橋博史 井原正博 高橋孝雄:Williams症候群における欠失範囲の大きさと発達遅滞の重症度との関係 第115回 日本小児学会学術集会 2012.4.22
 26. 一宮優子 石黒精 中館尚也 前川貴伸 小崎里華 藤田秀樹 阪井裕一 :TPO受容体作動薬が有効であった3p12-13欠失の難治性慢性ITP 第115回 日本小児学会学術集会 2012.4.22
 27. 藤田 秀樹 小崎里華 :アレイCGHで2p部分欠失を認めた自閉症患者についての検討 第35回 日本小児遺伝学会学術集会 2012.4. 19
 28. 李紅蓮 林聡 左合治彦 小崎里華:妊娠中にTrisomy18と診断された妊婦の意思決定 第35回 遺伝カウンセリング学会 2011
 29. 藤田秀樹 小崎里華 :閉症患者検体を用いたアレイCGH 解析による原因遺伝子の検討 第51回日本先天異常学会学術集会 2011.7.22
 30. 柳橋達彦 小崎健次郎 岡本伸彦 水野誠司 黒澤健司 小崎里華 :Rubinstein Taybi 症候群の精神症状の経時的変化と治療可能性 第51回日本先天異常学会学術集会 2011.7.23
 31. 小崎里華 小崎健次郎 黒澤健司 岡本伸彦 水野誠司 高山真一郎:EEC 症候群 (Ectrodactyly, Ectodermal dysplasia Cleft lip_palate syndrome)の本邦実態調査 第51回日本先天異常学会学術集会 2011.7.23

32. 藤田秀樹 小崎里華 :G分染法でde novo均衡型と診断されたてんかん・発達遅滞症例のアレイCGH解析 日本小児遺伝学会学術集会 2011.8. 11
33. 柳橋達彦 小崎健次郎 岡本伸彦 水野誠司 黒澤健司 小崎里華, Rubinstein_Taybi 症候群のbehavioral pattern の経時的变化 日本小児遺伝学会学術集会 2011. 8.11
34. 田中竜馬 小崎健次郎 吉橋博史 小崎里華 高橋孝雄 :MLL2変異の確認されたカブキ症候群10例の臨床像 日本小児学会学術集会 2011.8. 13
35. 藤田秀樹 小須賀基道 奥山虎之 小崎里華 :当センターで経験したX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)の出生前診断の4例 日本小児学会学術集会 2011.8. 13
36. 河合利尚 村山静子 新井勝大 小崎里華 奥山虎之 小野寺雅史 :慢性肉芽腫症における非感染性炎症疾患の検討 日本小児学会学術集会 2011.8. 13
37. 塚口裕康 仲里仁史 森貞直哉 服部元史 伊藤秀一 小崎里華 飯島誠(球体異形成)の全エクソーム解析 第56回日本人類遺伝学会 2011
38. 武内俊樹 柳橋達彦 土屋裕行 鳥居千春 林久美子 小崎里華 高橋孝雄 小崎健次郎:モザイク環状18番染色体によるPitt-Hopkins症候群の1例 第56回日本人類遺伝学会 2011
39. 仁科幸子 小崎里華 東範行 岡本伸彦 初川嘉一 黒澤健司 山根敬浩 水野誠司 都築欣一 小崎健次郎:CHD7遺伝子変異によるCHARGE症候群の眼合併症 第56回日本人類遺伝学会 2011
40. 佐々木愛子 鈴木朋 今野秀洋 住江正大 林 聡 左合治彦 小崎里華 鏡雅代:upd14の出生前診断を行った1例 第56回日本人類遺伝学会 2011
41. 小崎里華 水野誠司 岡本伸彦 黒澤健司 小崎健次郎 高山 真一郎 EEC症候群における有病率の調査と実態調査研究 第56回日本人類遺伝学会 2011
42. 藤田秀樹 鳥居千春 小崎健次郎 小崎里華:当院で経験したAEC(Ankyloblepharon-Ectodermal dysplasia-Cleft lip and/or palate) syndromeの一例 第56回日本人類遺伝学会 2011
43. 小崎健次郎 星野健 小崎里華 高山真一郎 岡本伸彦 水野 誠司 黒澤健司:VATER連合の症状に関する全国調査とデータマイニング 第56回日本人類遺伝学会 2011
44. 岡田朋美 佐々木愛子 林聡 李紅蓮 藤田秀樹 小崎里華 左合 治彦 当センターにおける絨毛生検の検討 第56回日本人類遺伝学会 2011
45. 「先天奇形の疫学、分類と診断、染色体異常、出生前診断」 妊娠と薬情報センター 2011.2.11
46. 「Rubinstein-Taybi症候群 について」 ルビンSTEIN・TEYBI症候群 家族会 「こすもす」交流会 2011. 7. 23
- G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他

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（難病関連分野）
分担研究報告書

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

研究分担者 工藤 純 慶應義塾大学医学部遺伝子医学研究室 教授

研究要旨

次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解読あるいは全翻訳領域解読（いわゆるエキソーム解析）は、未知の疾患原因遺伝子を探索する研究手段として確立されつつあり、われわれの研究班でも遺伝性疾患の新規原因遺伝子の探索や未診断例の原因究明にシーケンシングからデータの解析、検証まで一括して実践している。本研究においては、ゲノムワイドな解析の実験プロトコルとソフトウェアの両面から精度の向上に取り組んできた。次世代シーケンサーによる遺伝子診断の医療現場への普及を目指す際には、正確かつ効率的なシステムの構築が望まれるため、現在利用できる手段を比較し、現時点で最適と思われるパイプライン（組み合わせ）を提示した。研究期間の後期に、欧米で次世代シーケンサーの臨床応用に関するガイドライン等が公表されたが、当研究班で開発したパイプラインはこれらのガイドラインに記載される要件を満たしていると判断できた。

研究協力者

小崎健次郎（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）
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）
鳥居千春（慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター）

A. 研究目的

3年間の研究期間に、次世代シーケンサーはもはや次世代の解析技術ではなくなり、現時点で診療応用が期待される医療技術となりつつある。一方で臨床の現場で次世代シーケンサーを診療に活用するためには、品質保証・医療経済・倫理的な配慮が必要である。これらの潜在的な問題点を念頭に置いて、診療上実用に供することの可能なシステムの構築を試みた。

B. 研究方法

① 標的遺伝子は3レベルに設定した。まず、特定領域の遺伝子群100個程度、全遺伝子、そして、現時点までに疾患との関与が明確になっている約5000個の遺伝子群である。標的遺伝子群について標準的な登録番号（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。具体的にはAgilent社のカスタムマイクロアレイを用いることとし、同社のマイクロアレイ設計ソフトウェアである「eArray」を使用した。

特定の遺伝子群のエクソンを標的としたり、全遺伝子の全エクソンを対象とする場合、すなわち全エキソーム解析では、アジレント社の

SureSelectキットを使用した。一方で、ヒトの既知の疾患原因遺伝子のすべて（約5000遺伝子）を対象とする場合すなわちmedical exomeの解析の際には、イルミナ社のTruSightOneキットを用いた。

② ヒトゲノムDNAの前処理

市販ヒトDNAに対して、インターカレーション法による精密なDNA濃度測定を行い、Covaris社製超音波破碎機を用い、至適条件下で、約300bpへ断片化した。これをベックマン社AMPure磁性ビーズにより精製しSureSelectターゲットエンリッチメントライブラリーとハイブリダイズさせ、解析対象となる稀少遺伝性疾患に関連する遺伝子の近傍を濃縮した。コントロール（市販）のゲノムDNAはインデックスタグを付加し増幅し、イルミナ社製次世代シーケンサーMiSeqないしHiSeqを用いて塩基配列粗配列を得た。品質チェックを経て参照ゲノムDNA配列上へのマッピングを行った。

③ 変異の同定のためのデータの可視化

得られたDNA配列データをヒトの標準的なゲノム配列に整列（アラインメント）した。アラインメントには各種のプログラムを使用した。バリエーションに対して、各種のプログラムによりアノテーションとフィルタリングを行った。バリエーションの検出後のデータ解析にはグラフィ

カルユーザーインターフェースを有するプログラムを使用した。

④ DNA配列データのクオリティの確認
得られたDNA配列データがターゲットとした遺伝子領域を十分にカバーしているかを確認するため、FrommoltによるソフトウェアNGSrich (<http://sourceforge.net/projects/ngsrich/>) を用いて系統的に評価した。

解析にあたっては個人情報保護に関する法律を踏まえ、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労働省「疫学研究指針」を遵守し、倫理委員会の承認の下に研究を実施した。

C. 研究結果

① 解析系の設計

特定の標的領域を網羅的に解析する系を設計した。これら遺伝子の解析体制を整備した。次世代シーケンサーからの粗配列の出力ターゲット濃縮（アジレント社SureSelect）とデスクトップ型シーケンサー（イルミナ社MiSeq）を用いて対象疾患と関連する可能性のある遺伝子を網羅的に解析した。ヒト遺伝性疾患のうち、特に頻度が高い疾患を網羅的に解析する場合には、medical exome解析による方法が有用と思われた。

標的遺伝子解析については、NextGene等のソフトウェア会社の製品で十分に対応が可能と判断されたが、whole exomeやmedical exome解析については、大学等が開発して改良・更新の周期の短いオープンソースのプログラム群を組み合わせ使用する方法を採用した。

② 粗配列のアラインメント

次世代シーケンサーからはDNA配列と塩基毎の精度がfastqフォーマットで出力される。そこで、得られたfastqファイルをヒト参照配列にオープンソフトウェアであるbwa (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) によりアラインメントした。さらに、GATK (IndelRealigner) によって局所的に再度のアラインメントを行い、アラインメントの質を向上させた。変異の検出には、GATK (UnifiedGenotyper) とイルミナ社が公開しているvariant caller、ペーラー医科大学のatlas2 (米国ペーラー大学)、コーネル大学のfreebayesなどを使用し、比較した。いずれもデフォルトの解析条件で分析を行ったところ、freebayesとatlas2は擬陽性率が高く、GATK unified genotyperとイルミナvariant callerを併用している。

③ 変異探索と原因候補遺伝子のリストアップ
アラインメントの結果を種々のソフトウェアにより分析し、アノテーションとフィルタリング

をおこなった。

Variant Effect Predictor (英国ウェルカム財団サンガー研究所とヨーロッパ生命情報研究所)、Snpeff (米国ウエイン大学)、annovar (フィラデルフィア小児病院)、alamut-ht等を用いた。アミノ酸置換の病的意義の解釈について香港大学 Li らが開発した、KggSeq (<http://statgenpro.psychiatry.hku.hk/limx/kggseq/>) を導入した。KggSeqでは10以上の予測プログラムを組み合わせた判定法である。Li MX, Gui HS, Kwan JS, Bao SY, Sham PC. A comprehensive framework for prioritizing variants in exome sequencing studies of Mendelian diseases. *Nucleic Acids Res.* 40:e53, 2012

Variant PredictorとSnpeffはバリエーションの国際標準フォーマットであるVCFファイルを入力ファイルとして、処理後、再びVCFフォーマットとして出力される点で、パイプラインの中間での使用が可能であった。一方で、annovarとalamut-htはVCFファイルの出力は不可能であり、パイプラインの末尾にのみ配置が可能であった。

alamut-htは、変異により潜在的なスプライスサイト（ドナーサイト・アクセプターサイトとも）を検出できる点で有用と考えられた。Alamutは年間ライセンス契約を要するサービスである点で、問題を残していた。代替プログラムとしては香港大学のKggSeqが有用と期待された。アミノ酸の非同義置換の病的意義の解釈については、KggSeqが、10種以上の予測プログラムの予測結果を組み合わせ、判定を行う点で優れていると考えられた。

④ DNA配列データのクオリティの確認

NGSrichによれば、アッセイ全体におけるカバレッジの統計的な情報値とともに、カバレッジが不十分であるエクソンを明確にすることが可能であった。ACMGのガイドラインにはカバレッジの状況についても、最終報告書に記載することが推奨されており、NGSrichの併用が有用であると考えられた。

D. 考察

我々が構築したエクソーム解析のシステムが、未知の疾患原因遺伝子の探索や非典型例の確定診断に有用であることが実証された。次世代シーケンサー解析の遂行には複数の過程が存在する。各過程について多くのプログラム群が国内外の大学等より発表されている。解析上の必要に応じて自由に組み合わせることができる点は、有用である一方、各プログラムの入出力を適切にインターフェースするためには一定のプログラミングのスキルを要するため、次世代シーケンサー解析の臨床現場への普及の妨げとなって

いるのが現状である。

大量の検体を同時並行的に処理しうるパイプラインを構築するとともに、医師が自身でインタラクティブにフィルターを掛けたり、シーケンサーからの生データを確認して、個別のバリエーションの病的意義を効率よく判定可能とする環境を医療の現場の中で構築してゆくかが今後の課題と思われる。

研究期間の最終年度に、アメリカ臨床遺伝専門医会 ACMG から、ACMG clinical laboratory standards for next generation sequencing が発表された。本研究班で最適化を行ってきた要点と概ね一致していた。今後は、系の再現性を担保する方策の確立につとめるとともに、当該ガイドラインに示される報告書のテンプレート等を参考に、依頼医師に対して間違いのない結果の伝達に留意したい。上記ガイドラインによれば、電子カルテへの記載法については、electronic health record 国際基準案 (HL7; <http://www.hl7.org>) に従うことが奨励されている。われわれのパイプラインの末尾には HL7 形式にデータをリフォーマットするスクリプトを加えた。国内標準形式となるよう関係者への普及を図りたい。

E. 結論

正確かつ効率的なシステムの構築を目指して、現在利用できる手段を比較し、現時点で最適と思われるパイプライン（組み合わせ）を提示した。研究期間の後期に、欧米で次世代シーケンサーの臨床応用に関するガイドライン等が公表されたが、当研究班で開発したパイプラインはこれらのガイドラインに記載される要件を満たしていると判断できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sasaki, T., Niizeki, H., Shimizu, A., Shiohama, A., Hirakiyama, A., Okuyama, T., Seki, A., Kabashima, K., Otsuka, A., Ishiko, A., Tanese, K., Miyakawa, S., Sakabe, J., Kuwahara, M., Amagai, M., Okano, H., Suematsu, M., Kudoh, J. Identification of mutations in the prostaglandin transporter gene *SLCO2A1* and its phenotype-genotype correlation in Japanese patients with pachydermoperiostosis. *J. Dermatol. Sci.*, **68**(1):36-44 (2012).

2) Miyamoto K, Suzuki N, Sakai K, Asakawa S, Okazaki T, Kudoh J, Ikeno M, Shimizu N. A novel mouse model for Down syndrome that harbor a single copy of human artificial chromosome (HAC) carrying a limited number of genes from human chromosome 21. *Transgenic*

*Res.*23(2);317-29(2014).

3) 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, Mitsuhashi Y, Amagai M. Mutations in *SERPINB7*, Encoding a Member of the Serine Protease Inhibitor Superfamily, Cause Nagashima-type Palmoplantar Keratosis. *Am J Hum Genet.* **93**(5):945-956(2013).

4) 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.*8(1);172(2013).

5) Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Takeshita M, Hirakiyama A, Okuyama T, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J. The novel *SLCO2A1* heterozygous missense mutation p.E427K and nonsense mutation p.R603* in a female patient with pachydermoperiostosis with an atypical phenotype. *Br J Dermatol.* [Epub ahead of print] (2013).

6) Kanda S, Sasaki T, Shiohama A, Nishifuji K, Amagai M, Iwasaki T, Kudoh J. Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. *Vet Dermatol.*24(1);25-31(2013).

7) Sasaki T, Shiohama A, Kubo A, Kawasaki H, Ishida-Yamamoto A, Yamada T, Hachiya T, Shimizu A, Okano H, Kudoh J, Amagai M. A homozygous nonsense mutation in the gene for Tmem79, a component for the lamellar granule secretory system, produces spontaneous eczema in an experimental model of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.*, **132**(5):1111-1120 (2013).

2. 学会発表

1) 工藤 純、ゲノム解析による遺伝性疾患の原因解明、第16回九州基礎皮膚科研究会 特別講演、福岡、2012年11月17日

2) 佐々木貴史、新関寛徳、清水厚志、塩濱愛子、開山麻美、奥山虎之、関 敦仁、椛島健治、大塚篤司、石河晃、宮川 俊一、天谷雅行、岡野栄之、末松誠、工藤 純、次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析による肥厚性皮膚骨膜症原因遺伝子 *SLC02A1* の同定、日本人類遺伝学会第57回大会、京王プラザホテル、平成24年10月25日～27日

3) Kudoh J, Sasaki T, Shimizu A, Shiohama A, Hirakiyama A, Okuyama T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Ishiko A, Tanese K, Miyakawa S, Sakabe J, Kuwahara M, Amagai M, Okano H, Suematsu M, Niizeki H. Identification of mutations in the prostaglandin transporter gene *SLCO2A1* in Japanese patients with pachydermoperiostosis. American Society of Human Genetics 2012 Annual Meeting, San Francisco, November 6-10, 2012.

G. 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

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）
分担研究報告書

遺伝性疾患の多層オミックス統合解析の基盤構築

研究分担者 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
部門長代理 特命教授

研究要旨

次世代シーケンサーの登場により、疾患原因遺伝子の同定は促進されたが、現在においても同定率は3割程度にとどまる。この原因の一つとして、アミノ酸置換によるタンパク質機能異常の他に、遺伝子制御領域での塩基置換やDNAメチル化の異常による遺伝子発現量の変化が疾患発症に関与すると考えられる。そこで、最終年度である本年は、初年度の多型解析、2年目の遺伝子発現解析に続き、DNAメチル化解析の技術基盤を確立することで、遺伝性疾患を多層オミックスの観点から解明する次世代型遺伝子解析技術の基盤構築を進めた。

研究協力者

八谷剛史^{1,2}、大桃秀樹²、志波 優²、古川亮平²

- 1) 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
- 2) いわて東北メディカル・メガバンク機構 メガバンクデータ管理部門

A. 研究目的

次世代シーケンサーの出力量の増加により、エクソーム解析、ならびに全ゲノム解析を数万円から数十万円程度の低コストで行うことが可能となった。単一遺伝性疾患の原因遺伝子を同定するためのデータ解析も、ソフトウェアの開発による効率化、ならびに1000 Genome Projectを始めとする国際プロジェクトの成果や、本事業拠点班の一つである松田班の日本人多型情報などの公開により、高精度に行うことが可能となった。

しかし、現在においても新規の疾患原因遺伝子の同定率は3割程度に留まり、多数の原因遺伝子が同定されている難聴患者ゲノム解析（松永班との共同研究）においても7割である。単一遺伝性疾患である神経線維腫症1型患者の解析（小崎班との共同研究）では9割の同定率に達したが1割は未同定である。

この原因としては、患者に固有のまれな多型が同定されてもタンパク質機能への影響が必ずしも予測できないこと、または、真の原因がアミノ酸置換を伴わない遺伝子発現（転写産物の構造変化、遺伝子発現量変化）への影響であり、コーディング上に変異が存在しない、などがあげられる。

そこで、平成23年度の多型解析基盤の確立、平成24年度の発現解析基盤の確立に続き、本年

度はDNAメチル化解析の技術基盤を確立することで、遺伝性疾患患者のゲノム、トランスクリプトーム、メチロームの多層オミックスの統合解析による疾患関連遺伝子の解析基盤を構築することを目的とした。

B. 研究方法

複数の健康人ボランティアからBD バキューティナ® CPT™採血管で採取した血液を匿名化後、分離した末梢血単核球細胞（PBMC）からDNAを抽出した。匿名化された1個人のDNA 50ngをDNA Methylation-Gold Kit, EZ (Zymo Research社) によりバイサルファイト処理を行い、EpiGnome Methyl - Seq Kit (epicentre社) によりライブラリーを調整した。調整したライブラリーはバイサルファイト処理によりATリッチに傾いてしまうため、シーケンシングの際の塩基バランスを整えるためにコントロールであるphiX DNAを30%量混合させ、HiSeq2500のRapid mode, single read 全ゲノムバイサルファイトシーケンシング（WGBS）を行った。WGBS後にHiSeq2500から得られたbclファイルを昨年度までに構築した前処理プロセスにより、高品質なfastqファイルに変換した。WGBSは多型解析やトランスクリプトーム解析と異なり、ゴールドスタンダードとなりうるパイプラインが確立されていないため、複数のソフトウェアで検

討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画は文部科学省・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」に準拠した研究計画に基づき実施した。

C. 研究結果

マッピングソフトの最適化のため、DNAメチル化解析で広く使われているbismark、smoothingが可能なパッケージとの連携が可能なBsmooth、市販ソフトであり多型解析で実績のあるnovoalignの3者を比較した。bismarkを用いたところ、マップ率は55%程度であった。Bsmoothでは91%、novoalignでは当初89%のマップ率であったが、novoalignのパラメーターを調整し、最終的に92%のマップ率まで向上させることができた(図1)。

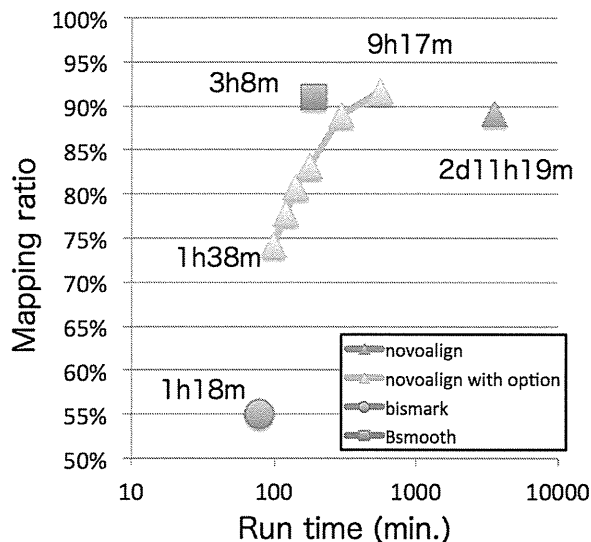


図1：ソフトウェア毎のマップ率の比較

続いて、メチル化解析ソフトについて検討した。methylKitは複数の検体間でのdifferentially methylated region (DMR)やdifferentially methylated cytosine (DMC)の検出、相関解析や階層的クラスタリング解析、主成分分析が可能なRパッケージである。bismarkから出力されるbamファイルをシームレスにDNAメチル化解析できることが特徴の一つであるが、WGBSの様な大きなデータだと、読み込みに非常に時間がかかり、特に複数検体の取り込みでは顕著である。そこで、methylKitに読み込まれたbamファイルのR内部での変換後のフォーマットを確認し、予め、解析サーバ上でbamファイルを整形してメチル化部位のアノテーション情報に変換すること

で、methylKitでの取り込みと解析する時間を劇的に短縮することができた。また、novoalignによるマッピングから得られたbamファイルは、そのままではmethylKitで読み込むことができないが、samtoolsでWatson鎖とCrick鎖に分離し、それぞれmpileupを用いてメチル化部位候補をすべて抽出した後にin-houseプログラムで整形することで、同様にmethylKitで解析することが可能となった(図2, 3)。

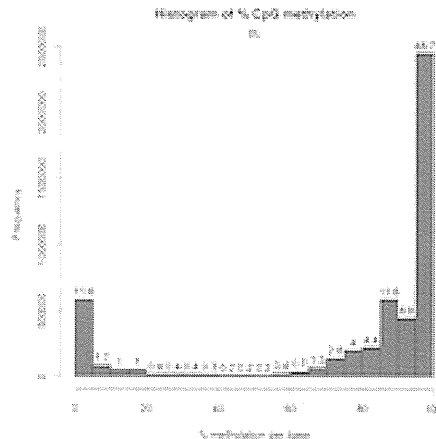


図2：メチル化CpG部位の頻度

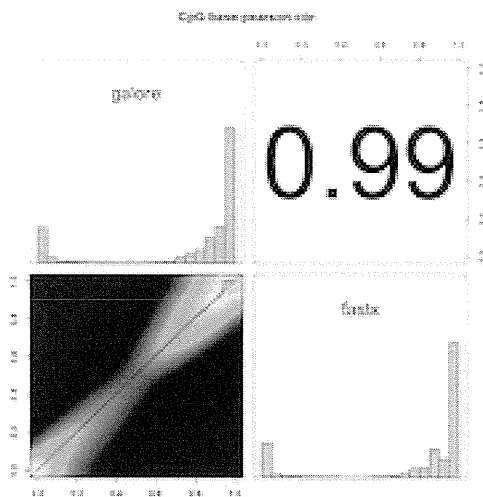


図3：methylKitによるトリミングソフトの比較検証

D. 考察

当初、得られたデータをbismarkでマッピングすることを想定し、実データの取得までの間に小規模に公開データを用いた解析パイプラインを立ち上げていたが、実データを処理する上でごく一部のデータでもmethylkitへのデータの取り込み数時間を要することが判明した。そこで、マッピングデータそのものではなく、methylkitの解析に必要な情報とフォーマットに

bismark_methylation_extractorの出力を解析サーバ上で変換することでデータ取り込みの問題は

解決した。バイサルファイトデータの処理は過渡期であるため、Linux上、あるいはR上で動作するソフトウェアの互換性が少なく、下流のソフトウェアとマッピングソフトの組み合わせに制限が多い。今回は出入力データがバイナリではなかったためフォーマットの変換が容易であったが、すべてのソフトウェアの互換性に対応することは事実上不可能であるため、文献などから情報を収集し、選別した少数のソフトウェアのみ検討した。また、bismarkを用いた時のマップ率が想定よりも低く、実行速度の劣るnovomethylの使用を余儀なくされたが、パラメーターの調整により1/6の実行時間かつマップ率を向上することができた。

E. 結論

DNAメチル化解析技術はゲノム多型解析、遺伝子発現解析と比べ、ゴールドスタンダードとなる解析手法が確立されていない。今回、我々は複数のマッピングソフトの検証と、決定した最適なマッピングソフトのデータをDNAメチル化解析ソフトウェアへ読み込むためデータ変換ツールを作成することで、シーケンシングから解析までシームレスに繋がるシステムを構築することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K and 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 Journal of Rare Diseases*. 2013; 8:172
2. 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; 164A:392-396.
3. 清水 厚志、次世代シーケンサー入門。遺伝子医学 MOOK 別冊「いまさら聞けない『遺伝医学』」 2014 in press.

2. 学会発表

なし

G. 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