

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

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

研究分担者 宮 冬樹

独立行政法人理化学研究所横浜研究所 統合生命医科学研究センター
医科学数理研究グループ・リサーチアソシエイト

研究要旨

昨年度までに構築した解析パイプラインにて先天性疾患家系の約300検体について全exonあるいは関連候補遺伝子に絞ったカスタムexome解析を実施し、多数の原因遺伝子変異の同定に至った。新規の原因遺伝子変異候補が複数発見され、基礎科学的な側面の有用性が確認されたと同時に、確定診断に至っていない患者において既知の原因遺伝子変異が認められたことにより確定診断に至った例もあり、臨床的な側面での有用性も確認され、治療法の選択・遺伝カウンセリングへの応用に非常に有用と考えられた。また、全exonの変異抽出解析パイプラインの精度の確認、および全exon解析ではカバーし切れていない遺伝子領域についての新規の解析法の立ち上げも実施した。

A. 研究目的

次世代シーケンスデータというビッグデータから真の疾患原因変異候補を抽出するためには、できる限り見逃し（偽陰性）をなくし、かつエラー（偽陽性）も少なくする必要がある。そのために我々は昨年度までに基本的な解析プログラムを構築した。今年度はさらにこのシステムを一部改良するとともに、全exomeの精度の検証をまず行なうこととした。次に実際の先天性疾患患者および家族検体約300例のexome解析を実施し、原因変異探索を実施すると共にその有用性を確認することを目的に研究を実施した。さらに、全exomeではカバーしきれていない領域を調査し、その領域について追加カスタムexomeシステムの作製も実施することとした。

B. 研究方法

昨年度までに疾患特異的なカスタムexomeを開発し実験および探索を実施し、今年度も一部継続したが、今年度は全exomeをメインに実施したことからここでは全exomeについて記載する。DNAからの全exonの遺伝子領域の収集にはAgilent社のSureSelectXT Human All Exon V4/V5を用いた。全exomeの検体は、疾患家系検体が少なくとも両親および発症患者の計3名以上が用意できる検体

を優先して実施した。実験の手法としては、Agilent社のSureSelect Target Enrichment Systemのプロトコルに準拠したが、端的に記載すると、患者由来の血液からDNAを抽出し、3ug分のDNAをCovaris社のDNA Shearing system M220にて150-200bpに断片化後、特定遺伝子のカスタムプローブまたは全遺伝子のプローブにて特定領域のゲノムDNAをキャプチャーし、次世代シーケンス用アダプターを付加させたのちDNAを増幅し、Illumina社の次世代シーケンサーHiSeq2000にてペアエンドシーケンスを行った。データ量は7Gb程度になるようにシーケンスを実施し、その平均読み深度（depth、同じ場所が何度シーケンスされたか）は最低50以上となるようにした。

次世代シーケンスデータの解析パイプラインを通し実際にcallされてきたvariant（SNV; single nucleotide variant（一塩基多様性））の精度検証は、一部の同一検体をOmniExpressExome SNP chipにてgenotypingし、一致率を検証した。

全exomeにてカバーされていない領域の確認は、NCBI RefSeqデータに登録されているヒト遺伝子のCDS領域を参照し、カバーされていない領域をHaloPlexカスタムexomeシステムにて再設計し、全exomeと同様に次世代シーケンスを実施した。

C. 研究結果

全 exome のプローブ設計領域の全検体での平均 depth は 98.8、うち variant の call 対象となる depth 10 以上の領域の割合は 98.0% となり十分なデータ量が得られていた。まず全 exome の精度を検証するため、全 exome 次世代シーケンスと

OmniExpressExome SNP chip にて、NA18943 という HapMap 検体を用いて双方で genotyping をして検証を行なったところ、両方で genotype が得られている箇所は 245,488 カ所、両方で genotype が不一致な箇所は 162 カ所であった（一致率 99.93% = 162 / 245488）。

先天性疾患家族検体について、構築した解析パイプラインで variant call を行なった結果、1 検体当たりの平均で call される SNV 数は約 7 万、indel 数は約 5 千であった（図 1）。これはこれまで報告されている全 exome 解析の数とほぼ同様であった。その後、データベースに登録されている既知の一般集団で保有する SNV (SNP) を除外し、DNA から作られるタンパク質のアミノ酸翻訳が止まってしまう nonsense 変異、アミノ酸変異を引き起こす missense 変異、アミノ酸翻訳にズレが生じ変異部分以降異なるアミノ酸が翻訳されてしまう frameshift 変異に絞ると、平均で 173 SNVs と 94 indels になった。その後、同一家系で複数検体がある場合には家系内の疾患の有無と変異の出現パターンの遺伝形式が合致する変異のみに絞り込んだ。さらに 2013 年末に京都大学が中心に公開した日本人 1,208 人分の exome データ (HGVD) も新たにフィルターに加え、多人数で同一変異が検出されているものは除外した。この結果、候補に残る variant は平均で 97 SNVs と 8 indels となった。ここから

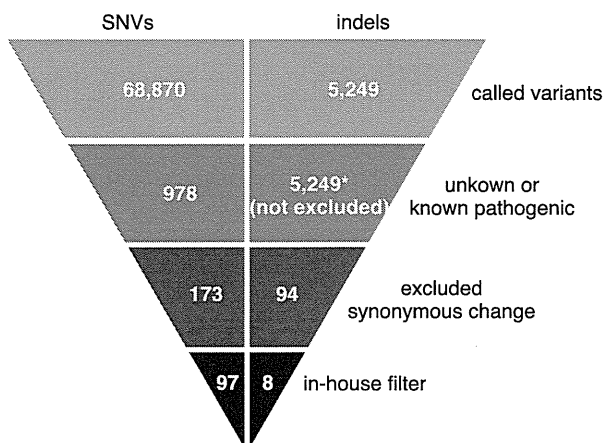


図 1. CallされたSNVおよびindelの数と絞り込み段階で残った数の 1 検体当たり平均数

さらに家系ごとに遺伝形式（表現型）に合致する

variant に絞ると、家系ごとに多少の差はあるが最終的に 1~4 個以下まで絞れる場合がほとんどであった（疾病ごとの詳細な進捗状況については研究分担者の各報告を参照）。見つかったほぼ確定的な疾患原因候補遺伝子変異の主な遺伝形式パターンを図 2 に示した。特徴的であっ

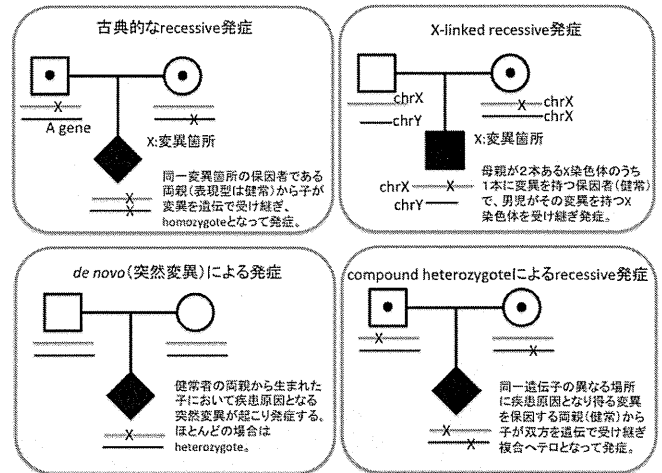


図 2. 観察された主な遺伝形式パターン

たのは、いわゆる古典的な両親から同一箇所の変異を受け継いで homozygote として発症する図 2 左上の例はごく僅かしか存在せず、突然変異 (de novo) による heterozygote によると見られる発症と、同一遺伝子の別の箇所に変異を持つ両親から子が 1 つずつ変異を受け継ぎ発症していると見られる compound heterozygote が非常に多く見受けられた点である (de novo と compound heterozygote がそれぞれ全体の 36.8% ずつを占めた)。de novo mutation は当初から多いことが予想されたが、compound heterozygote は想定よりも多く存在した。さらに興味深いことに、compound heterozygote と考えられる患者例のうち 2 例においては、SNV だけではなく indel が関与する compound heterozygote が観察された。

以上のように、多数の検体で原因と考えられる変異候補を同定したが、一方で候補が一つも見つからない（絞り込み段階で候補 mutation が全て消えてしまう）家系も約 15% 存在した。様々な要因が考えられるが、次世代シーケンスの全 exome で配列が解析可能であった領域を確認したところ、タンパク質をコードしている exon 領域 (CDS 領域) 中、カバーできている領域は 93.6% であった。このことから、カバーされていない残りの領域に見つけられていない原因変異があることが考えられたため、我々は今回用いた SureSelect での全 exome の他に、HaloPlex というゲノムを制限酵素で切断後に特定領域の PCR amplicon を作製し次世代シーケンスするという手法でのカスタムシ

一ケンスを、未カバー領域について追加実施した。CDSの未カバー領域6.4%のうちHaloPlexによるカスタムプローブを設計できた領域は67.7%であり、それを用いて実際にシーケンスしたところ variant call に十分な読み深度 (depth 10 以上) が得られた領域は設計領域中80.8%であった(図3)。

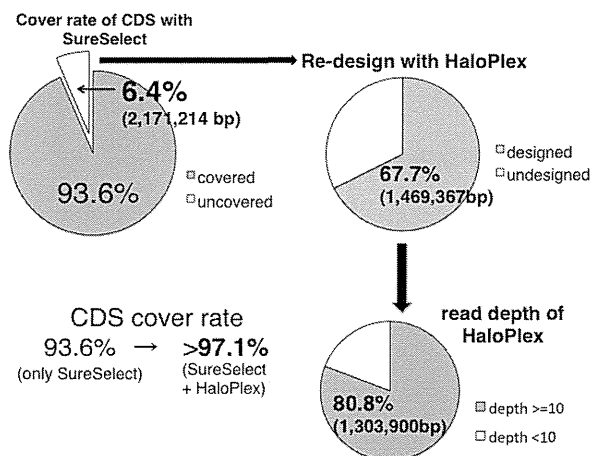


図3.追加カスタムHaloPlex exomeによるCDS領域のカバー率

このカスタムexomeにより、CDS領域中のカバー率は合計97.1%以上になった。現在実際の先天性疾患検体にて追加exomeを実施中であるが、これまで候補が見つからなかった検体においても新規の原因候補が見つかってきており、解析を継続している。

D. 考察

我々は先天性疾患のexome解析のための高精度な variant call 解析システムを開発した。全 exome の場合において精度を検証した 245,488 カ所について少なくとも99.93%以上は正しいcallが得られていることが推測された。以前カスタム exome で同様の精度検証を行なった際に、HapMap SNP chip データと比較し3,129 カ所中16カ所の不一致を認めましたが、サンガーシーケンスでの validation の結果、16カ所全て我々の call の方が正しかったことが実証されたことから、これは SNP chip データと不一致だった0.07%についてサンガーシーケンスによる validation を行なうことによって、おそらくより100%近く正しいcallが得られていることが証明されると考えられる。

実際の先天性疾患家系の exome 解析により多数の家系での原因遺伝子変異と考えられる変異を同定することができたが、当初想定したよりも compound heterozygote による発症と考えられる例が多数見つかったことが興味深かった。特に compound heterozygote と考えられる患者例のうち2例においては、SNV だけではなく indel が関与

する compound heterozygote が観察されたことは、今後の exome 解析において見逃さないように着目すべき点を示唆された例であると考えられる。一般的に SNV に比べると indel は call が難しく高精度な call システムが必要不可欠であるが、我々の例ではサンガーシーケンスにより疾患関連候補 indel は今現在までのところ全て確認されているので、その点でも高精度なシステムができていると考えられる。

また、候補遺伝子変異が一つも残らない家系が我々の系でも15%存在したことは今後の課題である。これは様々な要因が考えられ、例えば遺伝子配列だけでは解明できないメチル化等のエピジェネティックな要因による要因、妊娠中の特定の環境要因の曝露による要因、等が挙げられるが、exome 解析で見逃している領域に原因変異が存在することがまずは有力と考えられる。その穴を埋めるために、我々は exome での見逃し領域にフォーカスしたカスタム HaloPlex システムを構築し、全 exome と統合して exon の CDS 領域の97.1%以上をカバーできるようになった。現在解析中であるが、この追加カスタム exome で新規の疾患原因候補がいくつか見つかってきており、全 exome でもカバーできていなかったさらなる追加の疾患原因変異が同定できることが期待できる。少なくとも遺伝配列要因による発症原因はこれによりさらに補完できるものと考えている。最終的には、継続して見つけれられる疾患原因変異を全て統合させ、臨床にフィードバックさせて臨床現場にて用いる exome スクリーニング系の開発に繋げることを想定しており、現段階の設計でも非常に有用なシステムが完成したのと考えられる。

E. 結論

我々は次世代シーケンサーを用いた先天性疾患原因候補変異の同定解析システムの構築を完成させた。実際の精度は99.93%以上と推測された。実際に先天性疾患患者およびその家族検体を exome シーケンスし、数十家系にて原因と考えられる変異を同定した。その遺伝形式は de novo 変異によるものと、compound heterozygote によるものが大部分を占めており、exome 解析において着目すべき変異パターンを見出した。全 exome でカバーしきれていない領域についてもカスタム exome 解析システムを構築し、遺伝子のCDS領域のカバー率は総合すると97.1%以上となり、これまで全 exome で見つけられなかった変異も同定できる可能性が高く現在解析を継続している。今回同定された変異を元にし、今後、疾患原因メカニズムの解明への基礎研究のみならず、臨床現場へのフィードバックが期待できる成果となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirokawa M, Tajima T, Takahashi A, Ashikawa K, Miya F, Shigemizu D, Ozaki K, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Imai Y, Tanaka T, Tsunoda T, Matsuda K, Kadowaki T, Nakamura Y, Nagai R, Komuro I, Kubo M; A genome-wide association study identifies PLCL2 and AP3D1-DOT1L-SF3A2 as new susceptibility loci for myocardial infarction in Japanese. *Eur. J. Hum. Genet.* (Submitted 2014)
- 2) Okada Y, Miya F, Koike M, Tomisato S, Tokura T, Ishihara Y, Shimojo D, Kanematsu D, Kanemura Y, Kohda K, Sobue G, Yamanaka S, Yuzaki M, Uchiyama Y, Ikeda E, Tsunoda T, Okano H; Incompletely reprogrammed human induced pluripotent stem cells form glioma-like tumors through genomic instability during neural differentiation. *Cell Stem Cell* (Submitted 2013)

2. 学会発表

- 1) Miya F, Morizono T, Abe T, Kubo M, Tsunoda T; Massive Genome-wide cis- and trans-eQTL analysis using next generation sequencing in Japanese population. The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe (2013).
- 2) 宮 冬樹, 森園 隆、阿部 哲雄、久保 充明、角田 達彦; 日本人における全ゲノム間の関連についての網羅的eQTL解析 (Massive Genome-wide cis- and trans-eQTL analysis in Japanese population), 日本人類遺伝学会 第58回大会, 仙台 (2013).
- 3) 岡本 奈那, 岡本 伸彦, 川戸 和美, 松田 圭子, 三島 祐子, 山本 悠斗, 宮 冬樹, 角田 達彦, 加藤 光広, 齋藤 伸治, 山崎 麻美, 金村 米博, 小崎 健次郎; 神経疾患を標的にした次世代シーケンサー解析で診断したBaraitser-Winter症候群の1例, 日本人類遺伝学会 第58回大会, 仙台 (2013).
- 4) Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K; Application of targeted next-generation sequencing in the diagnosis of pediatric neurological disorders. American Society of Human Genetics, Boston (2013).
- 5) Okada Y, Miya F, Koike M, Tomisato S, Tokura T, Ishihara Y, Shimojo D, Hattori C, Kanematsu D, Kanemura Y, Kohda K, Sobue G, Yamanaka S, Yuzaki M, Uchiyama Y, Ikeda E, Tsunoda T, Okano H; Incompletely reprogrammed human iPSCs form glioma-like tumors through genomic instability during neural differentiation. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto (2013).

- 6) 服部 文子, 根岸 豊, 宮 冬樹, 安藤 直樹, 伊藤 哲哉, 角田 達彦, 金村 米博, 小崎 健次郎, 齋藤 伸治; AKT3遺伝子変異による巨脳症の一例 (A case with megalencephaly caused by an AKT3 mutation), 第55回日本小児神経学会学術集会, 大分 (2013).

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

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

研究分担者 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

研究要旨

次世代シーケンス技術は、一般に点変異を検出することは得意であるが、エクソン単位あるいは遺伝子全体を含む領域の欠失・重複を検出することには限界がある。基本的には、こうしたゲノムのコピー数変化 (copy number variant : CNV) は、マイクロアレイや MLPA が得意とする領域である。しかし、臨床診断としてはシーケンスで変異が検出されない場合に CNV を考慮することは必須の課題である。今回我々は、独自の方法で NGS データの CNV 解析を行い、cranioectodermal dysplasia 同胞例に、IFT122 遺伝子の 3 塩基欠失と exon 17-21 の重複を検出した。次世代シーケンスデータの処理によってデータを臨床診断に活用可能であることを確認した。今後 exome 解析への拡大応用が期待される。

研究協力者

成戸卓也

神奈川県立こども医療センター遺伝科

黒田友紀子 同遺伝科

大橋育子 同遺伝科

A. 研究目的

次世代シーケンス技術は、遺伝学研究を加速させたが、その臨床応用も急速に進みつつある。特に、解析対象遺伝子が多い先天異常・希少疾患では、次世代シーケンス技術の診断への応用は期待されている。コスト、労力など多くの点で飛躍的な発展が見込まれている。現在、国内での次世代シーケンサーを用いた研究は、Exome 解析など網羅的ゲノムの解析が中心で、臨床応用に関する研究は少ない。解析に必要なパイプラインや解析キットは開発されたものの、実際の臨床診断での活用例が少ないことが理由の一つかもしれない。上述の次世代シーケンス技術は、一般に点変異を検出することは得意であるが、エクソン単位あるいは遺伝子全体を含む領域の欠失・重複を検出することには限界がある。基本的には、こうしたゲノムのコピー数変化 (copy number variant : CNV) は、マイクロアレイや MLPA が得意とする領域である。しかし、臨床診断としてはシーケンスで変異が検出されない場合に CNV を検討することは避けられない。一方で、NGS、アレイ、MLPA などの技術を複数組み合わせることは結局のところコストや労力の負荷を招き、大きなジレンマとなっている。このアラインメントされたデー

タを CNV 解析するデータ解析技術は期待される領域であり、すでに CoNIFER、CONTRA などのプログラムが普及しつつある。今回我々は、独自の方法で NGS データの CNV 解析を行い、臨床診断に応用したので、臨床症例を例にまとめた。

B. 研究方法

HaloPlex (Agilent) は、制限酵素による断片化、ライブラリー化されたターゲット領域のプロブのハイブリダイズ、ターゲット領域の精製、PCR によるターゲット断片の増幅、といった一連の処理により複数のターゲット領域 DNA 断片のライブラリーを作成するキットである。この方法のメリットは、全てがキット化されワークフローが明瞭であり、Array capture で必要とされるゲノム DNA の断片化が不要なことにある。限られた解析機器でライブラリーを作成する臨床検査では、極めて有用と考えられる。また、対象遺伝子選択とオリゴプロブ設計も全てメーカー開設のインターネット上で自動化されているため、自由度が高く、遺伝的異質性が高い小児の先天異常疾患の遺伝子診断では有用である。今回我々は、この HaloPlex (Agilent) を用いて、サンプル DNA のライブ

ラリー作成を行った。

Ciliopathy は繊毛疾患の総称で、具体的には Bardet-Biedl 症候群、Joubert 症候群、Nephronophthisis、Alstrom 症候群、Meckel 症候群、OFD (oral facial digital) 症候群、Jeune 症候群、頭蓋外胚葉異形成症 (Sensenbrenner 症候群) などが含まれる。それぞれの疾患がさらに遺伝的異質性が高く、Bardet-Biedl 症候群だけでも少なくとも BBS1 から BBS16 までの遺伝子を原因とすると考えられている。今回はこの中の頭蓋外胚葉異形成症 (同胞 1 家系) を対象とした。この Ciliopathy パネル設計は、ターゲット領域数 1454 (398,456bp)、設計上のカバー率 99.4%、ターゲット遺伝子数は 75 で、実際の Mean coverage は 336 reads、Coverage は 97.5% (CDS >5 read)であった。

データ解析ならびに変異検出後の Sanger シーケンス、CNV 解析

得られたデータの解析は機器付属の Miseq Reporter を用いた。さらに当研究室でのオリジナルなパイプラインとして、Genome Analysis Toolkit (GATK)、Picard、BWA を組み合わせ、既知変異との比較は、dbSNP、1000G、Exome Sequence Project (ESP) 6500、を用いた。疾患の性質から MAF<0.01 とした。フィルターとして京都大学で開設された Human Genetic Variation Database も参照した。さらに、Variant call としてスコアの高い変異は、Sanger シーケンスにより確認した。また、得られた bam file を Integrative Genomics Viewer (IGV) で hg19 上に可視化し、確認した。Variant の病原性については、Human Gene Mutation Database (HGMD) professional で既知変異と比較参照を行った。

データの CNV 解析は、得られたリード数を対数変換し、Log 値の相対値を Z-スコアとして評価する方法をとった。パネル解析は 1 回のランで比較的多い複数検体を処理することが可能で、結果として Z-スコア表示でのばらつきが少なくなる。極めて簡便でありながら、比較的鋭敏に CNV を検出できるものと考えた。得られた CNV は、定量 PCR により再評価・検証をおこなった。

(倫理面への配慮)

解析はこども医療センター倫理委員会での承認を得た。全ての解析において文書による同意を親権者から得て行った。

C. 研究結果

【症例】対象は臨床所見から、cranioectodermal

dysplasia と診断を受け、現在定期加療中の同胞例である。同胞らは近親婚のない健康な両親より出生した。

姉:在胎週数 40 週 6 日。出生体重 3086g(-0.2SD)、身長 48cm(-0.8SD)、頭囲 32.5cm(-0.5SD)。発達歴:定頸 4 カ月、独歩 1 歳 3 カ月、K 式発達検査 90 (2 歳 6 カ月)

1 歳時検診で舟状頭蓋、両側鼠径ヘルニアを指摘され当院脳外科初診。1 歳 6 ヶ月時に頭蓋拡大術、6 歳時に反復性滲出性中耳炎、7 歳時に弱視、外斜視の診断。9 歳時に慢性腎不全の診断を受け、11 歳時に体重 34.7kg(-0.4SD) 身長 127cm(-2.5SD)。

妹:在胎週数 39 週 0 日、出生体重 3010g(-0.1SD)、身長 49.5cm(+0.4SD)、頭囲 34cm(+0.1SD)。発達歴は、定頸 4 カ月、独歩 1 歳 10 カ月、発達検査 51 (2 歳 6 カ月)、生下時より右中等度難聴あり。2 歳から補聴器装着。2 歳時に舟状頭蓋に対して頭蓋形成術施行。5 歳時に反復性滲出性中耳炎あり、6 歳で体重 13.3kg(-2.2SD)、身 98.3cm(-2.2SD)、小学校支援級に通学中である。

【解析結果】

当初、父由来のアレルに

IFT122:NM_052990:exon13:c.1629_1631delAGA (p.L543_E544delinsL) のみを検出し、母由来アレルの変異を検出することができなかった。CNV の可能性を考慮して、データの CNV 解析を行ったところ、同胞に共通する IFT122 の exon 17-21 の重複を検出し、同様の重複は母親にも検出することができた。以上から、この同胞例は父由来の 3 塩基欠失、母由来の exon 17-21 の重複による複合ヘテロ変異により発症したと結論した。

D. 考察

次世代シーケンサーの臨床応用を目的に、実際の臨床検体を用いて遺伝的異質性の高い奇形症候群の遺伝子診断を試みた。診断的検査として導入するためには、ワークフローがプロトコル化し、得られた結果の再現性が高く、多検体処理 (High-throughput) が可能であることなどが求められる。次世代シーケンサーはその解析能力から多検体処理は得意であるものの、診断的検査の流れに乗せるには、DNA 処理とデータ解析の工夫は不可欠である。

Custom amplicon による疾患パネルを用いた奇形症候群遺伝子診断として、HaloPlex (Agilent) を用いた独自の疾患パネルによる解析を、Ciliopathy 疾患群で試みた。今回の解析から、本来小さな variant の検出を目的とした custom amplicon でも、データ解析法の工夫により CNV 評価が可能であり、variant が検出さ

れない場合の再評価の方法が明らかにされた。Custom amplicon の CNV 変換による cranioectodermal dysplasia は、これまで報告がない最初の例である。

E. 結論

次世代シーケンサーの臨床応用を目指し、遺伝性疾患の解析を target-enrichment 法を試みた。Custom amplicon による疾患別パネルでは、膨大な variant を整理するために、正確な臨床情報、両親の遺伝情報が不可欠であった。変異が検出され場合には、CNV 解析による再検討を加えることが重要であることを確認した。今後、解析コストがさらに低下するなら exome 解析データを CNV 化し、再検討を追加してゆくことも視野に入れて行く必要がある。

F. 研究発表

論文発表

1. 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(1):173-80.
2. 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
3. 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.

学会発表

1. 黒田友紀子、大橋育子、井田一美、成戸卓也、升野光雄、黒澤健司 Marfan 類縁疾患に対する次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンス解析 第 36 回日本小児遺伝学会学術集会 2013.4.18. 広島

2. 黒田友紀子、大橋育子、高野享子、和田敬仁、小坂仁、松井潔、黒澤健司 先天奇形症候群での次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析. 第 116 回日本小児科学会学術集会 2013.4.19-21. 広島

3. 黒田友紀子、大橋育子、高野享子、和田敬二、松井潔、小坂仁、黒澤健司 次世代シーケンサーを用いた小児神経疾患のターゲットシーケンス解析のワークフロー. 第 55 回日本小児神経学会学術集会 2013.5.30-6.1 大分

4. 黒田友紀子、大橋育子、松浦久美、西川智子、黒澤健司 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析における遺伝カウンセリング. 第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 2013.6.20-23.

5. Kuroda Y, Ohashi I, Saito T, Nagai J, Ida K, Naruto T, Masuno M, Kurosawa K. Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of mandibulofacial dysostosis. 63rd American Society of Human Genetics, 2013.10.22-26. Boston

6. 成戸卓也、黒田友紀子、大橋育子、黒澤健司 ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた小児疾患ターゲットシーケンスの臨床応用 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013.11.20-23. 仙台

7. 大橋育子、黒田友紀子、成戸卓也、真鍋理一郎、吉武和敏、池尾一穂、黒澤健司 エクソーム解析により新規疾患関連遺伝子変異を同定した多発奇形・発達遅滞同胞例 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013.11.20-23. 仙台

8. 黒田友紀子、大橋育子、成戸卓也、高野享子、和田敬仁、黒澤健司 Ciliopathy (Joubert 類縁疾患) パネルを用いた網羅的遺伝子解析 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013.11.20-23. 仙台

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

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

研究分担者 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

研究要旨

脳形成障害およびシナプス形成障害の遺伝学的成因を明らかにすることを目的として、患者集積および、解析を行った。種々の脳形成障害患者の患者および両親の計6家系のエクソーム解析を行い、3例で既に報告のある原因遺伝子の変異（de novo 2例、複合ヘテロ1例）を同定し、2例で可能性の高い候補遺伝子（de novo 1例、複合ヘテロ1例）を同定した。エクソーム解析は原因不明の脳形成障害患者の診断に極めて有用であり、早期の臨床応用が望まれる。

A. 研究目的

脳形成に関わる遺伝子は多岐にわたる。また、異なった遺伝子の変異により、共通した病態をとるために、脳形成障害の遺伝子診断は困難であった。ところが、ハイスループットの新しい遺伝子解析技術の発展により、複数の遺伝子を網羅的に解析することが可能になった。網羅的遺伝子解析は脳形成障害の原因の同定に強力なツールとなっている。マクロな形成障害のほかにシナプス形成障害はミクロな形成障害といえる。シナプス形成障害は知的障害や自閉性障害の共通した病因として注目されている。本研究では、原因不明の脳形成障害を対象として、エクソーム解析の有用性を検討した。

B. 研究方法

エクソーム解析は本研究班脳形成障害チームにおける解析を担当した理化学研究所にて行われた。

対象は原因不明の脳形成障害6例（水無脳症、多小脳回、小頭症、半球間裂嚢胞、透明中隔欠損、脳梁欠損各1例）を対象とした。すべてで両親の検体を一緒に解析した。2例では罹患同胞も同時に解析を行った。

エクソーム解析にて候補遺伝子が同定されたときは、サンガー法にて確認実験を行った。

C. 研究結果

各患者での結果を順に記す。

1) 水無脳症例

TUBA1A 遺伝子にミスセンス変異を de novo

で同定した。TUBA1A 遺伝子は重症脳形成障害の原因として知られており、患者の表現型は本遺伝子変異の臨床スペクトラムに含まれる。従って、同定された変異が原因と判断した。

2) 多小脳回例

GNAI2 遺伝子にミスセンス変異を de novo に同定した。GANI2 遺伝子変異は疾患の原因としては報告されていない。しかし、遺伝子は中枢神経に豊富に発現する G 蛋白関連遺伝子であり、原因である可能性は否定できない。

3) 小頭症例

PLK4 遺伝子に複合ヘテロ変異を同定した。PLK4 遺伝子は疾患の原因としては報告されていない。しかし、本遺伝子は染色体分裂に関連する蛋白であり、原因である可能性は否定できない。

4) 半球間裂嚢胞例

NFIA 遺伝子に de novo の一塩基欠失によるフレームシフト変異を同定した。NFIA 遺伝子の欠失により半球間裂嚢胞を特徴とする脳形成障害の報告があり、本変異が原因であると判断した。

5) 透明中隔欠損例

本例は罹患同胞も解析した。同胞間で共通する病原性が明らかな de novo もしくは複合ヘテロもしくはホモ変異は同定されなかった。

6) 脳梁欠損例

本例も罹患同胞を解析した。罹患同胞 2 例に共通して EPG5 遺伝子に複合ヘテロ変異を同定した。EPG5 の劣性変異は Vici 症候群の原

困であることが2013年に報告されており、本同胞の表現型は良く一致していた。そのため、本同胞はEPG5変異によるVici症候群と診断した。

D. 考察

本研究において原因不明と考えられていた種々の脳形成障害6例にエクソーム解析を実施した。その結果、半数の3例で診断の確定ができた。これら3例は既に報告されていた遺伝子変異に基づく疾患と同じ表現型であった。これらは、しかし、いずれも稀な疾患であり、臨床的に絞り込むこと困難な疾患であった。これら3例ではエクソーム解析が診断に直結し、臨床的には極めて有用であった。

さらに、2例では有力な候補遺伝子を同定した。同定された遺伝子はいずれも中枢神経で重要な役割が予想され、同定された変異が原因である可能性がある。しかし、過去に報告がなく、一例のみであるために、断定することはできない。このような場合には、多数例の解析を待って、同じ遺伝子に変異が同定されれば、より確からしさは増す。しかし、もし、他の患者がみつからなければ、変異遺伝子の機能障害を実験的に示すことが必要になる。中枢神経で主として発現している遺伝子の機能解析は簡単ではなく、実際には解析できない場合が多い。今後、エクソーム解析が普及すると、このような変異がみつかる可能性が高い。これらに対応するためには、同定された変異を系統的に解析するシステムの構築が求められる。

1例では罹患同胞に共通した変異は同定されなかった。エクソーム解析ではすべての遺伝子を網羅してはならず、また、解析に一定のエラーが存在する。従って、変異が同定されないからといって、遺伝性疾患を否定することはできない。このような例では、解析の精度があがったときに、再度解析をするためのシステムが望まれる。

今回の解析では少なくとも3例(50%)に病因変異が同定され、診断を得ることができた。遺伝学的診断を得ることは、自然歴を知ることや、適切な治療介入、また、遺伝カウンセリングの観点から極めて重要である。その意味で、50%は非常に高い。非特異的な知的障害や自閉症では原因不明例にエクソーム解析を行ったときの陽性率は20%程度と報告されている。それから考えると、今回の結果は非常に高い同定率であった。もちろん、例数が少ないために、結論を得ることはできない。しかし、本研究の対象が脳形成異常であったことが率を上げた可能性は指摘できるのと考えられる。即ち、脳形成障害は遺伝子の機能障害が原因である可能性が高く、その意味で、非特異的な知的障害と比較すると高率になる可能性が理解

できる。その意味で、脳形成障害は網羅的遺伝子解析の良い対象と考えられる。

今回の結果はエクソーム解析の威力をまざまざと示している。臨床的な観点からは、エクソーム解析は強力な手法であることは明らかである。臨床診断のためのエクソーム解析はクリニカルエクソームとして注目されている。脳形成障害はクリニカルエクソームの良い適応となる可能性が示唆される。

E. 結論

原因不明の脳形成障害6例を対象としてエクソーム解析を実施し、3例で確定診断を得、2例で候補遺伝子を同定した。脳形成障害の診断においてエクソーム解析は極めて有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueda H, et al. Combination of Miller-Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation. *Eur J Pediatr* (in press)
2. Suzumori N, et al. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39:1545-7.
3. Hamajima N, et al. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One* 2013;8:e75137.
4. Yoneda Y, et al. Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 2013;73:48-57.

2. 学会発表

- 1) Togawa T, et al. Comprehensive mutation analysis by next generation sequencing in patients with neonatal intrahepatic cholestasis. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- 2) Hosoki K, Saitoh S. Molecular and clinical study of 30 Angelman syndrome patients with UBE3A mutations. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- 3) Negishi Y, et al. Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- 4) 青山幸平ら. Greig cephalopolysyndactyly 症候群と MODY2 を伴う隣接遺伝子症候群の1例. 第36回日本小児遺伝学会学術集会 平成25年4月18日
- 5) 根岸豊ら. ミトコンドリア DNA 3697G>A ホモ

プラスミー変異は Leigh 脳症の原因となる.
第 58 回日本人類遺伝学会 平成 25 年 11 月
20-23 日 (仙台)

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

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-

研究分担者 水野誠司
愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部長

研究要旨

稀少な先天異常症候群の臨床情報をデータベース化する意義は、一つは臨床情報を今後の遺伝学研究に資するための研究者間で共有することであり、もう一つは、その情報を臨床遺伝診療に日常的に使用一つはその情報を日常の臨床遺伝診療に役立てることである。

研究領域では、表現形を共通のプラットフォームで記載して遺伝情報と対比させることが重要となっている。マイクロアレイや次世代シーケンサーなどの新しい遺伝学的診断法の進歩で臨床的な診断名が無い先天異常/先天多発奇形/精神遅滞などの原因となる遺伝学的な異常の検出が可能となり、そのGenotype-Phenotypeの関連が検討される時に共通した用語で利用可能な表現形の記載が重要である。

一方遺伝臨床の現場においては、臨床医が全ての診療対象の患者の複数の奇形所見や合併症、成長発達歴などの患者情報を把握することは難しく、患者数が増加するに従い臨床診療用の為のデータベースが必要となる。

今回トロント大学コンピューターサイエンス学部で開発され、米国を中心に臨床診療で使用されているウェブベースのオープンソースデータベースPhenoTipsと、分担研究者が個人で市販のデータベースソフトを用いて作成した患者情報データベースを試用し比較した。

PhenoTipsはコンピュータのCPUの負荷が大きいため市販の個人のPCでの使用には多少の困難を示したが、性能の高いサーバーで電子カルテと同時に使用する環境であれば十分に使用に耐えるソフトであると考えられた。

A. 研究目的

マイクロアレイや次世代シーケンサーなどの新しい遺伝学的診断法の進歩で従来原因不明であった先天異常症候群の原因が解明されるようになった。また従来臨床的な診断名が無い先天異常/先天多発奇形/精神遅滞などの原因となる遺伝学的な異常の検出が可能となり、その遺伝学的異常と臨床情報の比較が今まで以上に重要になっている。そのためには科学的に利用可能な統一した用語で記載された表現形の記載が重要である。

一方先天異常/臨床情報/表現形の用語は1000以上あるといわれ、その遺伝臨床の現場においては、臨床医が全ての診療対象の患者の複数の奇形所見や合併症、成長発達歴などの患者情報を把握することは難しく、患者数が増加するに従い臨床診療用の為のデータベースが必要となる。

そのGenotype-Phenotypeの関連が検討される

トロント大学コンピューターサイエンス学部で開発され、米国を中心に臨床診療で使用されているウェブベースのオープンソースデータベースPhenoTipsは、身体的特徴を含む医学情報、家系図、検査所見、奇形所見等を定められた用語を用いて設計されている。

今後の臨床遺伝診療及び研究に資するデータベースの選択に資する目的で、PhenoTipsと自家製の臨床診療用のデータベースを試用し比較検討した。

B. 研究方法

1. Phenotipsデータベースの試用
 - a) <http://phenotips.org/> からJAVAベースのソフトウェアをダウンロードして、富士通社製ノートパソコンFMV/SH76に組み込み試用。

b) <http://playground.phenotips.org/bin/> のオンラインの試用目的のPhenoTipsの画面から試用。

それぞれ同一の5例の先天異常症例を同一のパーソナルコンピュータにて入力して試用し、その入力に要する時間や臨床現場での実際に運用に耐えうるか否かを検討した。

上記a)b)の条件で、起動させたPhenotipsのデータベースにログインして症例の登録を試し、CFC症候群やOpitz症候群、Cornelia de Lange 症候群、Coffin-Siris症候群、脆弱X症候群の患者の入力をした。

2. 自家製データベースの作成

FileMaker社のデータベース作成ソフトウェアFileMakerPro (ファイルメーカー社)を用いて、診療と診断に必要な下記の項目でフィールドを作成し、一画面で患者の主要な情報が一覧できるように作成し、小児の臨床遺伝の外来診療において利用した。

C. 研究結果

1. Phenotipsデータベースの試用

詳細な Phenotype の所見が、整然と分類されており大項目から中項目、小項目へと順に展開して目的の所見に至る。

使用環境

a) 最新の JAVA を入れて、ダウンロードしたソフトを組み込んで動かしたところ、CPU 使用率は常時 40% を越え、家系図作成時のポインター追従が不良となり、同時使用する他のコンピュータソフトの動きが明らかに重くなった。

b) Phenotips のホームページの試用画面 Playground で同一の作業を行ったところ、特にストレスを感じることなく全ての画面において利用可能であった。

入力は大項目から順に展開して開いて目的の所見に至る方法と、単語を入れて複数の候補から選ぶ方法がある。例えば Curly lash を入れるのに、項目を展開する方法から選ぶとすると、大項目を選ばなければならない。一方直接単語入力する方法では、Curly を入れれば、Curly を含む用語が自動的に複数提示され容易に入力が可能であった。疾患名も同様であり、Opitz と入力すると Opitz を含む全ての疾患名が MIM 番号とともに表示され、それを選択するだけで入力が可能である。

家系図を記入する画面は、マウス操作のみで正確に家系図の描画が可能である。(図 1)

多少の慣れを要するが、画面の左側で選択し

たデータを、画面の右側で簡条書きの文として自動的に記載される。(図 2)

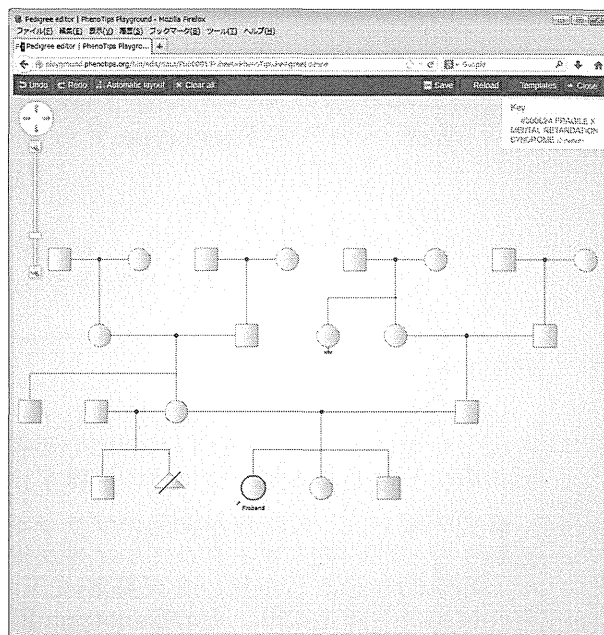


図 1

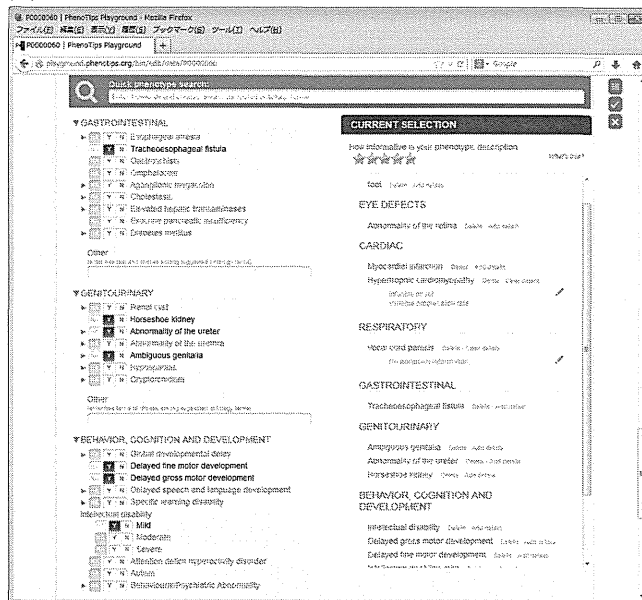


図 2

- 入力項目は
- Patient information
- Family history
- Prenatal and perinatal history
- Measurements
- Growth charts
- Clinical symptoms and physical findings
- に大別され、成長曲線は画面上で自動的に描画される。
- Clinical symptoms and physical findings は更に下位に、以下の項目を有する。
- Growth parameters
- Craniofacial

Eye Defects
 Ear Defects
 Cutaneous
 Cardiac
 Respiratory
 Musculoskeletal
 Gastrointestinal
 Genitourinary
 Behavior, Cognition and Development
 Neurological
 Other

それぞれは更に下位に約 10 個の項目があり Yes か No をポインターで選ぶ。Others の欄は自由記載であり、先頭の単語を入力すると自動的に候補用語が提示される。(図 3)

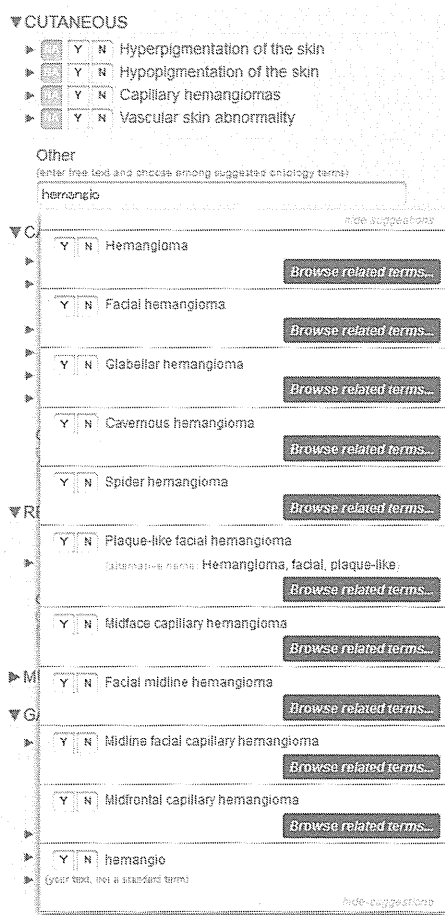


図 3

使用者における項目の追加は想定されておらず、電子カルテの代用にはならない。

日本語の記載は可能であるが、入力項目の先行検索は動作しない。

2. 自家製データベースの作成

FileMaker社のデータベース作成ソフトウェア FileMakerProVer12 (ファイルメーカー社)を

用いて、診療と診断に必要な下記の項目でフィールドを作成し、一画面で患者の主要な情報が一覧できるように作成し、臨床遺外来診療において利用した。(図4)

【基本診療情報】

氏名、生年月日、性別、同胞の数、家族構成、出生時の父母の年齢、紹介元医療機関、紹介元医師名。

基本診療情報は初診時に入力する。

同胞の数は、例として △■○□と家系図を想起できる記号で表示した。家族構成も両親の婚姻状態と保因の有無が一瞥できるよう記号で表示した(例 □/ー●)

【遺伝歴、周産期情報】

家系内の主な保因者情報、周産期の仮死の有無など最小限の情報を記述入力。

【主要所見】

複数の奇形所見の中で診断的価値があると思われる特記すべき所見を記入。8 つの所見が入力できる。

【患者画像】

データベースとは別の領域に患者別フォルダーに身体所見の画像を保存し、データベース画面からボタン一つでそのフォルダーを開くことができるようにスクリプトを作成した。

【診断名】

既知の疾患名を有する場合は、診断名、染色体異常名を記載。未診断の場合は、MCA/MR 他、特記すべき合併症を英語で記載。

【身体計測値】

出生時の在胎週数、身長、体重、頭囲を全例記載。現在の身長、体重、頭囲を SD 値で記載。これらにより Postnatal もしくは Prenatal の Overgrowth, Growth retardation、相対的大頭の有無による疾患の鑑別に有用である。

【特徴的身体所見】

自由記載で 160 字の入力が可能。部位別のフィールド設定は行っていない。

【遺伝学的検査】

染色体 G 分染核型、マイクロアレイ検査(染色体番号と開始点と終点の塩基番号)、遺伝子検査その他の遺伝学的検査

【画像及び各種検査結果】

中枢神経系の画像所見、主な画像診断所見、骨年齢、主な検査所見。

【合併症及び過去及び現在の医療】

循環器合併症、眼科合併症、耳鼻科合併症、整形外科的合併症、歯科合併症、外科泌尿器合併症、内分泌的合併症、神経科および精神科合併症の項目を作成して、合併症や必須検査受検の有無、現在の通院状況を記載。

【発達発育歴】

発達のマイルストーンとなる寝返り、坐位、始歩、始語の月齢を記載。DQ 及び IQ の数値も記載。

【療育歴】

現在の通学通園場所、受けている療育、取得している障害者手帳、所属する患者会の項目を設けた。

【その他】

現在の投薬内容、生活上の問題点、必要な医療的ケアの内容(胃瘻、気管切開など)の項目を設けた。

【フォローアップメモ】

自由記載のフォローアップメモ欄を作成。受診時の所見や伝えた内容、次回受診時の備忘的メモなどに用いている。単語での検索が可能である。

【インターネット情報とのリンク】

この他に、診療中にインターネット上の最新情報にアクセスできるように、診断名最上位の項目をボタン一つで、PubMed, OMIM, GeneReviews から同時に検索が可能になるようにスクリプトを作成したほか、琉球大学成富教授作成の奇形検索ソフト UR-DBMS も FileMaker からボタン一つで立ち上げることを可能とした。

The screenshot shows a FileMaker Pro Advanced window titled "患者データベース" (Patient Database). The main window displays a form for a patient with Williams syndrome. The form is organized into several sections:

- 検索 (Search):** Shows the search criteria: 2014/03/17, 2725, 合計 (未ソート).
- テスト入力 (Test Input):** Includes fields for age (0歳), date (2月15日), sex (男), and birth date (2014.1.1).
- Core Features:** A list of features with checkboxes.
- DIAGNOSIS:** A field for the diagnosis, with a dropdown menu showing "Dysmorphic".
- Genetic Examination:** Includes fields for "核型" (Karyotype) and "遺伝検査" (Genetic testing).
- Measurement:** Includes fields for "身長" (Height), "体重" (Weight), and "頭圍" (Head circumference), along with their respective SD values.
- Radiologic & Laboratory Findings:** Includes fields for "脳画像" (Brain imaging), "脳波" (EEG), "画像診断" (Imaging diagnosis), and "検査所見" (Examination findings).
- Management:** Includes fields for "循環" (Circulation), "眼科" (Ophthalmology), "耳科" (Otorhinolaryngology), "整形" (Plastic surgery), "歯科" (Dentistry), "内分泌" (Endocrinology), and "神経" (Neurology).
- Development:** Includes fields for "発達" (Development), "始歩" (Start of walking), "始語" (Start of language), and "人見知り" (Shyness).
- Follow-up memo:** A large text area for notes.

図 4

D. 考察

小児科領域だけで 1000 以上あると言われる先天異常症候群を対象とする臨床医が全ての患者の合併症の種類や成長発達歴などの患者情報を把握することは難しい。

通常の診療記録としてのカルテは、このような先天異常症候群の診療を想定して設計されていないために、先天異常症候群に特化した施設内の小データベースが必要であった。

当初我々は 一面の画面に必要な臨床情報が全て表示され、画像ファイルへのアクセスも瞬時に行え、インターネットでの文献や遺伝情報の検索もその画面から直接可能であるデータベースを市販のソフトウェアで作成していた。

2012年に、トロント大学コンピューターサイエンス学部で開発され、米国を中心に臨床診療で使用されているウェブベースのオープンソースデータベースPhenoTipsは、身体的特徴を含む医学情報、家系図、検査所見、奇形所見等を定められた用語を用いて設計されており無償で利用が可能である。

使用した範囲では、コンピュータの性能が必要であるが統一した操作方法と入力支援技術により十分に日常診療で使用可能なソフトであると考えられる。一方で日本語化及びカスタマイズの困難さが今後の課題であろう。

E. 結論

Phenotips : Phenotypeデータベースは十分な能力のサーバーにソフトウェアを置き、電子カルテと同時に使用する条件において、日常の遺伝診療と臨床研究に有用なツールであると考えられる。

個人用にカスタマイズが可能であれば、一層日常診療での有用性が高まる。

自家製のデータベースは既に2000件を越える患者情報を入力し日常臨床に資する物になっている一方、入力用語の不統一、家系情報の入力の困難さが課題である。

今後Phenotipsの国際標準化の動向を見定めて、わが国の臨床遺伝臨床への応用の検討に値する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hirai M, Muramatsu Y, Mizuno S, Kurahashi N, Kurahashi H, Nakamura M. Developmental changes in mental rotation ability and visual perspective-taking in children and adults with Williams syndrome. Front Hum Neurosci. 2013 Dec 11;7:856

2) 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.[Epub ahead of print]

3) Nishi E, Takamizawa S, Iio K, Yamada Y, Yoshizawa K, Hatata T, Hiroma T, Mizuno S, Kawame H, Fukushima Y, Nakamura T, Kosho T.

Surgical intervention for esophageal atresia in patients with trisomy 18.

Am J Med Genet A. 2013 Dec 5. [Epub ahead of print]

4) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N.

MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome.

Am J Med Genet A. 2013 Sep;161(9):2234-43

5) Suzumori N, Kaname T, Muramatsu Y, Yanagi K, Kumagai K, Mizuno S, Naritomi K, Saitoh S, Sugiura-Ogasawara M.

Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome.

J Obstet Gynaecol Res. 2013 Nov;39(11):1545-7

6) 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 Jul 11;93(1):173-80.

7) 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 Jun;161A(6):1221-37.

8) Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T.

Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome.

PLoS One. 2013;8(3):e60105.

2. 学会発表

1) 水野誠司、橋本真帆、菱川容子、木村礼子、山田憲一郎、山田裕一、若松延昭

COACH 症候群(JS-H:Joubert syndrome with hepatic disease)の双生児例

第 58 回日本人類遺伝学会 平成 25 年 11 月 23 日 仙台

2) 水野誠司、村松友佳子、谷合弘子、伊藤弘紀、三宅紀子、松本直通

カブキ症候群患児にみられた DIP 関節拘縮と屈曲線消失

第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013 年 7 月 21 日 大阪

3) 村松友佳子、岡本伸彦、鈴森伸宏、要匡、柳久美子、谷合弘子、熊谷恭子、大林伸太郎、成富研二、齋藤伸治、杉浦真弓、水野誠司

BCOR 遺伝子変異を認めた Lenz microphthalmia syndrome における表現型の検討

第 53 回日本先天異常学会学術集会 2013 年 7 月 21 日 大阪

4) S. Mizuno, Y. Muramatsu, N. Miyake, N. Matsumoto

Distal interphalangeal joint contracture and absence of flexion crease in paediatric patients with Kabuki syndrome with MLL2 mutation

The European Human Genetics Conference Paris, June 8, 2013

5) Y. Muramatsu, H. Kakizawa, K. Shimizu, H. Ohashi, S. Hayashi, J. Inazawa, S. Mizuno
Atypical interstitial deletion of 7q11.23 containing whole ELN and partial LIMK1: Phenotype comparison with typical Williams syndrome

The European Human Genetics Conference
Paris, June 8, 2013

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

ダンディウォーカー症候群における遺伝子検索

分担研究者 山崎 麻美
社会医療法人愛仁会高槻病院 副院長

研究要旨

Dandy Walker 症候群 (Dandy Walker malformation; DWM) の責任遺伝子座位は、染色体異常症の検索から、3q24、と6p25.3が知られている。前者は*ZIC1*および*ZIC4*遺伝子の部位を含む領域の欠損が16家系で、後者は*FOXCI*遺伝子を含む領域の欠損でDWMを呈した数家系が報告されている。しかしながらこれまでの報告では*FOXCI*遺伝子のみでDWMを呈したものはなかった。

今回我々は、典型的なDandy Walker 症候群 3家系 3名およびDandy Walker variant 1家系 1名について遺伝子解析を行い、1家系 1症例に*FOXCI*の遺伝子異常を同定し、別の1家系 1症例に*PLG*遺伝子にコンパウンドヘテロ遺伝子異常を同定した。

我々は胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成及び治療法の開発をめざして、それぞれの群における解析遺伝子のパネル化を目指しているが、今回の結果から後頭蓋窩フリーエコー病変の群における解析遺伝子のパネル化に飛躍的な前進になる可能性がある。

研究協力者

研究協力者：社会医療法人愛仁会高槻病院 小児脳神経外科 原田敦子、山中巧、国際福祉大学 放射線科 宇都宮英綱、国立病院機構大阪医療センター 金村米博、理化学研究所 統合生命医科学研究センター 宮冬樹

A. 研究目的

超音波診断などの画像診断の進歩により、先天性水頭症を始めとした難治性脳形成障害症は、現在その多くが、胎生期に診断されるようになった。その中でDandy Walker 症候群は、古くからよく知られた小脳の発生異常の代表的疾患であるが、正しい診断がなされない疾患であることでも有名である。また、予後も正常発達から重篤な後遺症を残すものまではっきりとした評価基準もない。染色体異常を合併することも多く、分子遺伝学的には責任遺伝子座位は、3q24と6p25.3が知られている。前者は*ZIC1*および*ZIC4*遺伝子を含む領域の欠損で、後者は*FOXCI*遺伝子を含む領域の欠損でDWMが生じるので、これらの遺伝子がDWMの責任遺伝子として考えられている。DWMの遺伝子検索の出生前診断における意義を検討するために、次世代シーケンサーを使用して検討を行った。

B. 対象と方法

患者の臨床データおよび画像データを収集した独自のデータサーバーの中から、小児放射線科のエキスパートによる小児放射線読影レビューをうけた典型的な Dandy Walker 症候群 3家系 3名および Dandy Walker variant 1家系 1名を対象とした。胎内診断された児は出生時に臍帯血から、その他の児および両親は末梢血か

ら genomic DNA を抽出した

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析 (whole exome sequencing ; WES) を施行した。タンパク質コーディング全領域の exonic DNAs を抽出するために、SureSelectXT Custom capture library を使用した。Illumina HiSeq 2000 sequencer を用いて シークエンスし、塩基配列データを創出した。dbSNP, 1000 Genomes Project, ESP6500 およびコントロールサンプルを用いて既知の SNP を除外し、候補遺伝子のミスセンス、ノンセンス SNVs とフレームシフト変異を抽出した。

(倫理面への配慮)

情報管理においては、個人情報管理とその漏洩防止に細心で厳重な注意を払う。遺伝子解析がかかわる部分に関しては文部科学省・厚生労働省・経済産業省より施行された【ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針】および遺伝医学関連 10 学会より提案された【遺伝学的検査に関するガイドライン】を遵守する。本研究の全体の計画に関しては、平成 21 年 9 月に国立病院機構大阪医療センター倫理委員会で『難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発』研究の実施について承認を受けた。平成 24 年 10 月に社会医療法人愛仁会高槻病院倫理委員会にて『難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開

発』研究の実施について承認を受けた。

C. 研究結果

症例 1 妊娠 30 週で脳室拡大と後頭蓋窩のエコーフリースペースが確認され、当院へ紹介となった。胎児エコー検査および MRI 検査にて Dandy Walker 症候群と診断された。35 週 3 日に選択的帝王切開で出生した。2 生日の脳室腹腔シャント術を施行した。また先天性緑内障を合併していたため手術を要した。現在 8 か月であるが著明な発達遅滞を認める。父も先天性緑内障があり、心室中隔欠損があり幼少時に手術を受けている。また難聴があった。臍帯血および末梢血より抽出した DNA を用いて WES を行った。患児と父に *FOXC1* 遺伝子の exon1 に G380A(R127H) のミスセンス変異を認めた。

症例 2 妊娠 26 週に先天性水頭症の診断で、A 病院受診し、B 大学病院で Dandy Walker 症候群と診断された。37 週 3 日に帝王切開にて A 病院にて出産した。1 生日に嚢胞腹腔シャント術を施行した。その後シャントトラブルのため何度も手術を受けている。生後 5 か月ごろより偽膜性結膜炎を繰り返し、偽膜除去や羊膜移植を受けている。3 歳 8 か月に DWM の治療目的に紹介にて当院を受診した。末梢血より抽出した DNA を用いて WES を行った。*PLG* 遺伝子の変異を同定した。変異箇所は 2 か所あり、exon17 に C2024A (A675D) のミスセンス変異とイントロン 11 に 1256+1 g>a のスプライシング変異である。前者は母が同じ変異を持ち、後者は父が同じ変異を有するコンパウンドヘテロであった。

D. 考察

Dandy Walker 症候群は、小脳テントの挙上を伴った後頭蓋窩の拡大、脳室拡大、第 4 脳室に続く嚢胞、小脳虫部の無形成や低形成を呈する症候群である。後頭蓋窩の拡大をとまなわなない場合は、Dandy Walker variant と呼ばれている。

Dandy, や Blackfan らは、マジャンディ孔、ルシュカ孔の閉塞が原因である (atresia 説) としたが、Benda らは、この病態を Dandy Walker 症候群と命名した上で、atresia 説ではなく小脳虫部の形成不全が原因であるとした。現在では、正中線上における小脳の癒着障害を伴った Rhombencephalon の停止説が有力である。病因として、母体の糖尿病、ワーファリンの服用、風疹の感染、サイトメガロウイルス感染などの催奇因子の報告もある。種々の染色体異常などの合併もあり、分子遺伝子学的に原因遺伝子を検索する研究が進んでいるが、2004 年にはじめて原因遺伝子の可能性として *ZIC1* および *ZIC4* の両方の遺伝子欠失例が報告された。責任

遺伝子座位は、3q24 と 6p25.3 が知られている。前者は *ZIC1* および *ZIC4* 遺伝子を含む領域の欠損で、後者は *FOXC1* 遺伝子を含む領域の欠損で DWM が生じるので、これらの遺伝子が DWM の責任遺伝子として考えられている。*FOXC1* 遺伝子の遺伝子変異は Axenfeld-Rieger malformation (ARM) の責任遺伝子として有名である。*FOXC1* 遺伝子を含む領域の欠損が DWM の phenotype を呈することは報告されているが、*FOXC1* 遺伝子の遺伝子異常だけでは小脳低形成は示すものの、典型的な DWM を示す報告はこれまでにない。今回の症例は典型的な DWM の phenotype を示す初めての *FOXC1* 遺伝子変異である。また生化学的データでは、R127H は *FOXC1* の分子構造の維持に重大な影響を与えるというデータがある。これまで実際の患者で R127H のミスセンス変異を呈した報告は ARM の 1 例のみで、その患者は中枢神経系や全身の重篤な症状は呈していない。本児例に関しては父の頭蓋内病変の検索を今後行っていく必要がある。

また症例 2 に認めた遺伝子変異は、1 型プラスミノゲン欠乏症の責任遺伝子でありこれまで血液学の分野では多く報告されている。Severe type 1 Plasminogen (PLG) deficiency は、慢性の炎症性疾患であり、線溶系の異常のみではなく、損傷治癒機転、細胞移動、血管新生や発生過程の障害をきたすことが知られている。そのため *PLG* 変異を示す症例の 80% にこの症例のようなルグニアス結膜炎を合併し、8% に先天性閉塞性水頭症を、2% に DWM を合併することが報告されている。

Dandy Walker 症候群のなかでも、その予後は正常のものから重度発達遅滞を呈するものまで幅広くより正確な予後評価が求められる疾患である。機能予後についても様々である。IQ>80 と良好な予後を示すものが、全体の生存者の 12%~65% と幅がある。

今回の遺伝子異常の同定は DWM における分子メカニズムに大きな前進をもたらすものとなる可能性があり、後頭蓋窩フリーエコー病変の群における解析遺伝子のパネル化に飛躍的な前進になる可能性がある。

E. 結論

今回我々は、典型的な Dandy Walker 症候群 3 家系 3 名および Dandy Walker variant 1 家系 1 名について遺伝子解析を行い、1 家系 1 症例に *FOXC1* の遺伝子異常を同定し、別の 1 家系 1 症例に *PLG* 遺伝子にコンパウンドヘテロ遺伝子異常を同定した。

この同定は DWM における分子メカニズムに大きな前進をもたらすものであり、後頭蓋窩フ

リーエコー病変の群における解析遺伝子のパネル化に飛躍的な前進になる可能性がある。

F. 研究発表

論文発表

1. 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
2. Ishihara M, Yamasaki M (6人中6番目) No-no”type bobble-head doll syndrome in an infant with an arachnoidcyst of the posterior fossa: a case report. *Pediatr Neurol*49(6) 474-6 2013
3. 松原 尚子、山崎麻美 (8人中7番目)、異啓司 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) 980-9842013
4. Itoh K, Yamasaki M (5人中4番目), Fushiki SHypoplasia of the spinalcord in a case of fetal akinesia/arthrogryposis sequences. *Neuropathol ApplNeurobiol* 39(4): 441-444,2013
5. 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
6. Fukusumi H, Yamasaki M (10人中7番目), Kanemura YFeeder-free generation and long-termculture of human induced pluripotent stem cells using pericellular matrix ofdecidua derived mesenchymal cells. *PLoS One*8(1) doi: 10.1371, 2013
7. Shofuda T, Yamasaki M (7人中5番目), Kanemura YA method for efficiently generating neurospheres from human-induced pluripotent stem cells using microsphere arrays. *Neuroreport*23;24(2) 84-90, 2013

学会発表

1. Yamasaki M, Shofuda T, Bamba Y, Harada A, Yamanaka T, Nonaka M, Kanemura Y Molecular basis of CSF space anomaly 台湾神経外科医学会 第11回第一次会員大会・学術検討会 2013.11.29~12.1 台中市 台湾
2. Yamasaki M, Yoshida M, Yamanaka T, Harada A, Nonaka M, Momose S Pregnancy of patients with myelomeningocele 41st Annual Meeting of the International Society for Pediatric Neurosurgery, Mainz, Germany, Sept 30 2013 (Sept 29~Oct 3) Mainz Germany
3. Yamasaki M Antenatal hydrocephalus (Joint Session of ISPN and ISHCSF) 41st Annual Meeting of the International Society for Pediatric Neurosurgery, Mainz, Germany, Oct 1 2013 (Sept 29~Oct 3) Mainz Germany
4. 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 9.12(September 8-13 2013) Seoul, Korea
5. Yamasaki M For the Establishing of Criteria in Prenatal Diagnosis of Intractable Fetal Brain Malformation The 25th Annual Meeting of KSPN 2013 JSPN-KSPN Joint Meeting 2013.5.24 Jinju, Republic of Korea
6. Yamasaki M, Shofuda T, Bamba Y, Kanemura Y Research using NSCs and iPS cells derived from patients with intractable brain malformation2013 East Asia Symposium: Rare Diseases of Childhood Nervous System 2013.5.22 Seoul National University Korea

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

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

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

研究分担者 大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科岡本伸彦

研究要旨

次世代シーケンサーを用いて小児神経疾患と関連する284 遺伝子のエクソン塩基配列を標的として解析するシステムを構築し、原因不明の小児神経疾患の原因遺伝子同定を目的とする研究を行った。標的解析40例全例で解析が終了した。標的遺伝子解析では現時点で13例で病的意義が確認できた。全ゲノム解析では14家系中5家系で病因と考えられる変異が同定できた。診断困難な小児神経疾患では次世代シーケンサー解析は有効な解析手段と考えられた。

共同研究者

川戸和美、山本悠斗、松田圭子、三島祐子
(大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科)

宮冬樹 (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)

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)

加藤光広 (山形大学医学部小児科)

山崎麻美 (高槻病院小児脳神経外科)

金村米博 (大阪医療センター臨床研究センター再生医療研究室)

小崎健次郎 (慶応義塾大学医学部臨床遺伝学センター)

A. 研究目的

臨床症状や一般的な検査データのみでは原因不明の小児神経疾患の変異遺伝子同定を試みた。まず、次世代シーケンサーを用いて小児神経疾患と関連する284 遺伝子配列を網羅的に解析するシステムを構築した。このシステムで結論が得られなかった症例の一部はさらに全エクソーム解析も行った。

遺伝子の面から原因を同定し、詳細な病態解析、治療方法の検討をすすめることが目的である。

B. 研究方法

遺伝子解析は中枢神経の発生関連遺伝子やイオンチャンネル遺伝子など神経疾患との関連が高いと考えた284 遺伝子を選択し、そのエクソン部分領域(1.6Mb) DNAをAgilent社のカスタム SureSelect capture oligoにて濃縮回収後し、

Genome Analyzer IIx (Illumina)次世代シーケンサーを用いて解析した。次世代シーケンサーで明確な結論が得られない場合は全エクソームの解析を行った。

その中のnonsynonymous変異について*in silico*解析、種を通じての保存性の確認、両親の変異の有無の解析などにより病的意義の検討を行った。

次世代シーケンサーで得られた結果は、サンガー法による直接シーケンスを用いて確認した。なお、全例で事前にG分染法による一般的な染色体およびマイクロアレイによる染色体の微細異常の有無の検討を行った。

症例は研究分担者の所属する医療機関において診療を受けている症例で、診断が確定していないものを対象とした。合計40症例において標的遺伝子に関する解析を行い、14家系において全エクソーム解析を行った。

(倫理面) 解析にあたっては遺伝カウンセリングを実施し、書面で意思確認を得た。

C. 研究結果

標的遺伝子解析

全40例で標的遺伝子解析が終了した。全例で複数の nonsynonymous 変異が同定された。nonsynonymous 変異でアミノ酸置換が生じていても、親の一方に同じ変異が生じている場合や、*in silico* 解析で病的意義の低いものは疾患との関連がないものと判断した。標的遺伝子解析に加えて個別の解析も行った結果、13例で病的意義が確認できた。

具体的な解析結果について述べる。

1) 脳梁欠損症

脳梁欠損症の男児では、*PTPN11* 遺伝子変異を同定した。これは Noonan 症候群の遺伝子である