

201442045A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業
革新的な医薬品等の開発を促進させる研究

(委託業務題目) エピジェネティック稀少疾患の治療に向けた
研究および原因未解明な稀少疾患に対する
解析技術展開研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者：吉浦孝一郎
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

平成27年（2015年）3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、吉浦孝一郎が実施した平成26年度「エピジェネティック希少疾患の治療に向けた研究および原因未解明な希少疾患に対する解析技術展開研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

エピジェネティック希少疾患の治療に向けた研究および原因未解明な希少疾患に対する解析技術展開研究-----1

業務主任者：吉浦孝一郎（長崎大学原爆後障害医療研究所・教授）

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 原因不明遺伝子疾患の原因変異同定

1-1. Exome 解析, 全ゲノム解析による疾患原因変異同定-----23

担当責任者：吉浦孝一郎（長崎大学原爆後障害医療研究所・教授）

1-2. Target resequence に関わる技術開発-----41

担当責任者：要 匡（琉球大学大学院医学研究科・遺伝医学・准教授）

2. 遺伝子疾患病態解析と治療へ向けた基盤研究

2-1. エピジェネティック関連疾患診断-----51

担当責任者：副島英伸（佐賀大学大学院医学系研究科・分子生命科学講座・教授）

2-2. 病態解析のための細胞内遺伝子改変に関わる技術開発とヒト細胞を使った病態解析

2-3. エピジェネティック関連疾患モデル動物作出と治療法の検討-----59

担当責任者：吉浦孝一郎（長崎大学原爆後障害医療研究所・教授）

3. プロジェクトの総合推進-----65

担当責任者：吉浦孝一郎（長崎大学原爆後障害医療研究所・教授）

III. 学会等発表実績 -----73

IV. 主な研究成果の刊行物・別冊 -----89

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費

(難治性疾患実用化研究事業 (革新的医薬品等の開発の促進研究))

平成26年度委託業務成果報告書 (総括)

委託業務課題: エピジェネティック希少疾患の治療に向けた研究および原因未解明な希少疾患に対する解析技術展開研究

業務主任者

吉浦孝一郎 (長崎大学原爆後障害医療研究所・人類遺伝学・教授)

業務担当者

木下 晃 (長崎大学原爆後障害医療研究所・人類遺伝学・講師)

三嶋 博之 (長崎大学原爆後障害医療研究所・人類遺伝学・助教)

荻 朋男 (長崎大学原爆後障害医療研究所・分子医学・准教授)

要 匡 (琉球大学大学院医学研究科・遺伝医学・准教授)

副島 英伸 (佐賀大学大学院医学系研究科・分子生命科学講座・教授)

園田 徹 (九州保健福祉大学保健学部・臨床遺伝学・教授)

渡邊 順子 (久留米大学医学部・GC/MS 医学応用研究施設・講師)

業務協力者

新川 詔夫 (北海道医療大学・学長)

太田 亨 (北海道医療大学個体差健康科学研究所・教授)

近藤 達郎 (医療型児童入所施設みさかえの園むつみの家・医師)

成富 研二 (沖縄南部療育医療センター・医師)

松本 直通 (横浜市立大学大学院医学研究科・遺伝医学・教授)

研究要旨

本研究の目的は (1) 稀少難病患者試料を用いて exome 解析等を実施し, 難病稀少疾患関連の研究事業で蓄積してきた原因不明疾患の原因遺伝子を同定し, 新たな病因・病態の解明を推進する (2) エピジェネティック疾患と考えられる歌舞伎症候群, Sotos 症候群, Beckwith-Wiedeman 症候群の遺伝子解析診断をすすめながら, モデルマウスを作成し, エピジェネティック改変薬剤の効果を検討する。

A. 研究目的

本年度は、未知の原因稀少難病患者試料を用いて exome 解析により新規症候群の新規遺伝子同定を進めつつ、既知原因遺伝子の遺伝子解析も並行して行った。エピジェネティック異常解析対象疾患として、歌舞伎症候群, Sotos 症候群, Beckwith-Wiedeman 症候群の 3 症候群を対象として症状緩和薬剤スクリーニングのためのモデルマウス作成, 機能解析用モデル細胞の作成を試みた。

B. 方法

(1) Whole Exome 解析

エクソン部 DNA の濃縮は, Agilent 社の SureSelect All exon v5 (50M) キットを使用した。取得した塩基配列データは, NovoalignMPI もしくは BWA (Burrows-Wheeler Aligner) を使用してゲノム塩基配列に整列させた。生成された VCF file を Genome Data Toolkit (GATK) を用いて, 細部を再配列, 微調整させ Base-quality score を計算させた。検出された塩基置換および Insertion/Deletion, は ANNOVAR によって注釈付けした。dbSNP (Build 135) に登録されている rs 番号は, annotation file に含めた。バリエーションのアレル頻度を annotation file に含めて記述し, その頻度情報は, 1000Genome project に登録されているゲノム解析によって得

られるアレル頻度, NHLBI exome プロジェクトに登録されている 6500 名の exome データによって得られるアレル頻度, 京都大学ゲノムセンターから公開されている日本人 1,208 名の exome データから算出された頻度である。Annotation file には Segmental duplication 情報も記述した。以上の全ての情報をもとに疾患の候補変異の選択時には, rs 番号, アレル頻度, 個人での zygoty の状況を組み合わせて deleterious (有害) な変異を候補遺伝子, 候補変異として残す作業 (filtering step, prioritizing step) を行った。

(2) 先端異骨症の原因遺伝子変異解析と分子病態解析

先端異骨症は, 孤発例が多いため, それぞれ, 両親および非罹患同胞についても同様に exome 解析を行い, *de novo* 変異の検出を行った。

各患児について, *de novo* 変異データを集積し, 有意な変異, 即ち, SNP database 未登録でエクソン上あるいはスプライス接合部位にあり, かつ, アミノ酸置換, フレームシフトまたは終止コドンによるタンパク質短縮化, あるいはスプライス異常を来すと思われる変異を抽出した。有意な変異の推定には, PolyPhen-2 や SIFT による結果も加味した。

先端異骨症の分子病態解析では, 遺

伝子変異をもつ患児の株化リンパ芽球様細胞を樹立し、タンパク質活性測定や cAMP 測定を行い評価した。また、変異を持つ発現ベクターを作製し、HEK293 細胞に発現させ、影響される他のタンパク質発現について検討した。加えて、抗体を用いて PDE4D ならびに PKA 複合体の一部である PRKAR1A の細胞内局在を両遺伝子が発現している骨肉腫細胞株 (SaOS2) で解析した。

(3) 先端異骨症モデル動物の解析

SleepingBeauty の挿入変異により *Pde4d* 遺伝子を破壊したラット (F344 系統) を Transposagen 社 (米国) より入手し、交配によりホモ接合、ヘテロ接合での成長および骨変化を観察した。

成長に関しては、体重増加等を指標として F344 ラットと比較し行った。骨所見に関しては、全身および前肢の X-ray により、手骨、橈骨、尺骨等の長さを測定し、比較を行った。

(4) NGS を用いた難聴をきたす疾患の網羅的迅速診断法の開発

日本人は米国などに比べ、ゲノムは比較的均一とされているが、地域によって、ゲノム構造、遺伝子変異/多型およびその頻度の違いが報告されている。特に沖縄においては、違いが明確であり、稀少疾患において、国内で頻度の高い変異のみを解析することは、

遺伝子変異の検出精度の観点からも不十分である。よって、まず原因遺伝子を網羅的に解析する必要がある。そこで、難聴をきたす疾患の原因が判明している遺伝子全てについて、全エクソン領域をカバーするターゲットリシーケンス解析系を構築、遺伝子診断を施行し、原因遺伝子および変異型の傾向について検討を加えた。

(5) 臨床への実用化にむけた簡易遺伝子診断法の検討 -Pendred 症候群/前庭水管拡大を例として-

稀少疾患の診断へ向け、沖縄で比較的頻度の高い、難聴に甲状腺腫を伴う Pendred 症候群 (または前庭水管拡大症) を例として、原因遺伝子である *SLA26A4* 遺伝子の解析を行った。

Pendred 症候群 (または前庭水管拡大症) について、我々は、沖縄での患児では、本土と異なる *SLC26A4* 遺伝子変異がある例があることを既に報告している (Ganaha *et al.*, BMC Med Genet 14:56 (2013))。

対象は、Pendred 症候群 (または前庭水管拡大症) と診断された沖縄出身者 27 名とし、ターゲットリシーケンス解析、Sanger 法による全エクソンダイレクトリシーケンス解析により遺伝子変異の同定・検証を行った。

これら結果をもとに、Pendred 症候群/前庭水管拡大症患児における

SLC26A4 遺伝子変異が確認される頻度、その遺伝子型の種類および頻度について集計した。

(6) Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の遺伝子解析

(6-1) 既知の異常を認めない症例の次世代シーケンサーを用いたゲノム解析

既知のゲノム異常、エピゲノム異常を認めない BWS 患者 38 例 (KvDMR1-LOM、H19DMR-GOM、patUPD、*CDKN1C* 変異、11p15 の染色体構造異常のすべてが否定された症例) を whole exome sequencing 解析した。ゲノム DNA を用いて、SureSelect Human All Exon Kit v5 (Agilent 社) でコーディングエクソンをキャプチャーし、HiSeq2000 (Illumina 社) でシーケンスを行った。

(6-2) multilocus methylation defects (MMDs) の解析

11p15 のメチル化異常を認める BWS 患者 54 例 (KvDMR1-LOM 44 例、H19DMR-GOM 10 例) の末梢血からゲノム DNA を抽出し、Busulfite 処理した。MALDI-TOF MS (MassARRAY) (Sequenom 社) で 29 カ所のインプリント DMR のメチル化をスクリーニングした後、メチル化異常を示した DMR について pyrosequencing (Qiagen 社) を用いて確認した。コントロール

として、年齢が一致する正常小児 24 例の末梢血 DNA を用いた。メチル化異常は、解析対象の全 CpG 部位の 6 割以上がコントロールと比べて 15% 以上の差を示した場合とした。メチル化異常を認めた DMR については、RT-PCR による遺伝子発現解析、サンガー法によるシーケンス解析を行った。

(7) Sotos 症候群 (SoS) および Kakubi 症候群 (KS) のエピゲノム解析

BWS 症例における MMDs 解析と同様に MassARRAY と pyrosequencing で解析した。SoS 患者 31 例 (NSD1 点変異 20 例、NSD1 欠失 11 例) の末梢血ゲノム DNA、KS 患者 20 例 (KMT2D 変異 16 例、KDM6A 変異 1 例、変異情報なし 3 例) の末梢血ゲノム DNA を用いた。

(8) モデルマウス作成

8-1) CRISPR/Cas9 マイクロインジェクション法

ゲノム編集技術として確立されてきた CRISPR/Cas9 システムを使って、受精卵に RNA をマイクロインジェクションすることによる遺伝子欠損マウス作成を試みた。ターゲット部位を挟んで guide RNA を 2 種類用意し、Cas9 タンパク発現用 mRNA を用意し、受精卵細胞質へのマイクロインジェクショ

ンを行った。

歌舞伎症候群と Sotos 症候群については、120 受精卵 x 3 回のマイクロインジェクション実験を行った。(gRNA1, gRNA2, Cas9mRNA)の濃度を第一実験 (10ng/uL, 10ng/uL, 20ng/uL), 第二実験 (20ng/uL, 20ng/uL, 35ng/uL), 第三実験 (25ng/uL, 25ng/uL, 50ng/uL) と濃度を変えて、一回の実験につき 120 個の受精卵を使用した。遺伝子破壊のターゲット部位は、それぞれの遺伝子の大きなエクソンとし、Kmt2d 遺伝子については exon35, Nsd1 遺伝子については exon5 とした。

BWS 遺伝子座の特定の領域を欠失している一症例とヒト細胞の ChIP-seq データベースから、同症例の欠失領域内に遺伝子発現調節領域 (region1 と region2) が存在することを見出した。同領域はマウスでも保存されていることから、インプリンティングにおける機能解明のために CRISPR/Cas9 システムを用いて同領域を欠失させたマウスと培養細胞の作製を試みた。今年度は region1 に着目して欠失させた。region 1 (約 1.5 kb) の両端にガイド RNA (gRNA-r1-1 と gRNA-r1-2) をデザインし、この 2 本のガイド RNA と Cas9 mRNA(22.5 ng/ul)を受精卵 69 個に injection したのち、2 cell に発生が進んだ 63 個を 3 匹の偽妊娠マウスに移植した。

8-2) ES 細胞を使った conventional ノックアウト法

通常の ES 細胞を使って、conditional ノックアウトコンストラクトをデザインした。Stos 症候群モデル用の Nsd1 遺伝子は最も大きい exon5, 歌舞伎症候群モデル用の Kmt2d 遺伝子は exon 16-19 をターゲットとした。Exon の欠失は、loxP 配列で挟みコンディショナルに欠失可能となっている。

(9) モデル細胞の作成

BWS について、B6 x PWK の F1 マウス線維芽細胞にガイド RNA 配列と Cas9 を組み込んだ発現ベクター 2 種 (gRNA-r1-1 + Cas9 と gRNA-r1-2 + Cas9) をトランスフェクションし、puromycin で選択した。

SoS について、ヒトテラトカルチノーマ由来幹細胞 NCCIT 細胞を使用した。CRISPR/Cas9 システムを用いて *NSD1* の一方のアレルに truncation mutation を導入し、他方のアレルの exon6 を loxP 配列で挟んだ (floxed-Ex6) コンディショナル KO 細胞の作製を試みた。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて *NSD1* の C 末端に 3xFLAG tag および HA-FLAG tag を挿入した Tagged *NSD1* 細胞の作製を試みた。

C. 結果

(1) Whole Exome 解析一覧

長崎、沖縄で exome 解析進行中の疾患群を以下の表に記載する。

表 2 : exome 解析中の疾患群

Disease	MIM number	Symptoms	Inherit pattern	Genes	Status
Burugada 症候群	heterogenous	心臓伝導障害	AD	Known gene & New gene	論文作成中
WHIM-like 症候群	606593	Wart, Hypogammaglobulinemia, Myelokathexis	AD?	LIG4	論文投稿中
家族性筋線維腫症	228550	筋線維腫	AD	PDGFRB	論文作成中
中條-西村症候群様疾患群			AD AR?	1 de novo 変異同定	確認実験中
家族性肺がん	SFTP(-)	肺がん	AD	70 候補遺伝子	論文投稿中
Zimmerman-Laband 症候群	135500	Gingival fibriomatosis, absent nail	de novo?	2 De novo mutation	確認のため症例待ち
家族性腎症		Motor neuron deficiency	AR? AD?	LMX1B	既報あり (nail-patella 症候群と allelic)
LMC 症候群	(chandler et al., 2006)	Leukodystrophy Microcephaly Cerebral malformation	AR? De novo	1 de novo mutation	確認実験中
家族性脳動静脈奇形			AD	2 linked deleterious mutations	確認実験中
家族性白内障			AD	unidentified	原因遺伝子不明
Kabuki 症候群	KMT2D (-) KDM6A(-)	Eversion of the lower eyelids	AD	左記遺伝子以外 unidentified	原因遺伝子不明
Arrhinia	No entry	無鼻症	de novo	unidentified	原因遺伝子不明
習慣性不育症	No entry	習慣性不育	AD?	unidentified	原因遺伝子

			AR?		不明
Beckwith-Wiedemann 症候群	130650		AD AR	unidentified	原因遺伝子 不明 (担当：副島)

(2) 先端異骨症の原因遺伝子変異解析と分子病態解析

典型的な臨床的先端異骨症患者 7 人の whole exome 解析, direct sequence 解析 (Sanger 法) の結果, 5 種類の *PDE4D* 遺伝子変異を同定した。遺伝子変異は, *PDE4D* タンパク質の立体構造解析において, 活性ドメイン構造に影響を与え, cAMP 結合活性を変化させると推定された。遺伝子変異を認めた患者より, 株化リンパ芽球様細胞を樹立し, その酵素活性について検討したところ, 患者細胞において, PDE 活性の低下が認められた。また, 患者で認められた変異 *PDE4D* 遺伝子発現ベクターを HEK293 細胞へ導入し, forskolin 存在下で cAMP 量を測定したところ, 変異 *PDE4D* 遺伝子導入細胞において, cAMP 量がコントロールと比べ減少しないことが判明した。加えて, 患者株化リンパ芽球様細胞において, 非刺激状態でのリン酸化 CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) タンパク量を測定したところ, 細胞内 pCREB/CREB 比率の有意な低下が認められた。以上より, *PDE4D* は $G\alpha$ -cAMP-PKA シグナル伝達経路に

関与するタンパク質と考えられた。そこで, シグナル伝達経路上の PKA 複合体の一つである PRKAR1A (Protein Kinase, cAMP- -dependent, Regulatory, type I alpha) との細胞内局在を, 骨肉腫細胞株 SaOS2 を用いて検討したところ, 両タンパク質が一致していることが確認された。

(3) 先端異骨症モデル動物の解析

SleepingBeauty により *Pde4d* 遺伝子に挿入変異を起こしたラットを用い, その成長, および骨病変について検討した。

すると, 出生後早期には, 体重増加不良がみとめられた。また, 前肢の手骨部分と前腕骨相当部分の長さの比を測定したところ, 変異ラットでは, 有意に手骨部分の短縮が確認された。以上より, 本変異ラットは, ヒト先端異骨症の症状と類似しており, 詳細な分子病態を解析する上で有用なモデルと考えられた。

(4) NGS を用いた難聴をきたす疾患の網羅的迅速診断法の開発

症候性, 非症候性難聴に関連した原

図 74 遺伝子について、エクソン及び flanking 50bp をターゲットとしたキャプチャーパネルを作製した。症候性、非症候性難聴の患児に対し、本遺伝子診断パネルを使用して解析した結果、*TCOF1* 遺伝子、*SLC26A4* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子等に変異を同定し、診断することができた。

(5) 臨床への実用化にむけた簡易遺伝子診断法の検討 -Pendred 症候群／前庭水管拡大を例として-

難聴を呈し Pendred 症候群または頭部 X-ray にて前庭水管拡大症を認める患児について、(4)の難聴遺伝子診断パネル解析とダイレクトシーケンス (Sanger 法) 解析により遺伝子変異の有無を検討した。

結果、26 人中 25 人に *SLC26A4* 遺伝子変異を認めた。よって、Pendred 症候群／前庭水管拡大症患者における *SLC26A4* 遺伝子変異同定率は、96.2% と算出された。*SLC26A4* 遺伝子に変異を認めた患児の変異型は、アレル頻度の高い順に g. IVS15+5G>A, p. H723R, p. T527P であった。本土ではほとんど認められない変異型、g. IVS15+5G>A が最もアレル頻度が高く、50%であった。

(6) Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) のゲノム解析

(6-1) 既知の異常を認めない症例の次世代シーケンサーを用いたゲノム解析

8 例に BWS とは違う疾患の原因遺伝子の変異が見つかった。内訳は *CDKN1C* 変異 (BWS 原因遺伝子) 1 例、*NSD1* 変異 (Sotos 症候群原因遺伝子) 2 例、*GPC3* 変異 (Simpson-Golabi-Behmel 症候群原因遺伝子) 5 例であった。*CDKN1C* 変異は、サンガー法で見逃していた症例をエクソーム解析で同定したものである。Sotos 症候群と Simpson-Golabi-Behmel 症候群の原因遺伝子変異が見いだされた。これらの疾患は BWS の鑑別診断であり、症状が BWS とオーバーラップしている。類似する他疾患が、臨床的に BWS と診断されていたためと考えられる。また、BWS の新たな原因遺伝子はこれまでに見いだせていない。

(6-2) multilocus methylation defects (MMDs) の解析

KvDMR1-LOM 44 例中 15 例 (34%)、H19DMR-GOM 10 例中 3 例 (30%) に MMDs を認めた。メチル化異常を示したすべての DMR について、両アレルがそろっているか否かを Short tandem repeat により解析し、メチル化異常が染色体異常に起因するものではないことを確認した。これら DMR のメチル化異常が、DMR 自身の塩基配列の

変化に起因している可能性があるため、メチル化異常を示したすべての DMR の塩基配列をサンガー法で解析したが、明らかな変異は認めなかった。一方、KvDMR1-LO 症例では、母性アレルがメチル化されている DMR (matDMR) がメチル化異常の標的となっていた。*ZDBF2*, *FAM50B*, *GNAS1A* の遺伝子発現はそれぞれの DMR のメチル化異常に伴い片アレル発現から両アレル発現に変化しており、DMR のメチル化異常が実際に遺伝子発現パターンに影響していることが明らかとなった。

(7) Sotos 症候群 (BWS) および歌舞伎症候群のエピゲノム解析

BWS 症例と同様に MassARRAY と pyrosequencing で 29 カ所のインプリント DMR のメチル化を解析した。SoS 患者 31 例中 17 例 (55%) で少なくとも一カ所以上の DMR でメチル化異常を認めた。また、特定の 2 カ所の DMR では 8 例 (26%) でメチル化異常を示していた。これらの DMR のメチル化異常は、BWS との臨床的オーバーラップの原因である可能性がある。

KS 患者 20 例の MassARRAY スクリーニングが終了した。8 例 (40%) で少なくとも一カ所以上の DMR でメチル化異常を認めたが、SoS と異なりメチル化異常が高頻度に生じている特

定の DMR はなかった。今後、pyrosequencing で確認する。

(8) モデルマウス作成

8-1) CRISPR/Cas9 マイクロインジェクション法

歌舞伎症候群と Sotos 症候群それぞれの系について、120 受精卵インジェクションを 3 回実施した。歌舞伎症候群モデルマウス作成の為のインジェクションでは 14 匹が誕生し、Sotos 症候群モデルマウス作成の為のインジェクションでは 13 匹が誕生した。尾部から DNA を抽出してターゲット部位の増幅後遺伝子の欠失を確認したところ、歌舞伎症候群モデルマウスでは少なくとも 7 匹、Sotos 症候群モデルマウスでは少なくとも 4 匹が、フレームシフト変異を起こす欠失を持つことが確認出来た。生殖細胞にも変異が導入されていることが期待され、モデルマウスが作成出来たと考えらるが、今後交配して系統を確立する。

BWS については、3 匹の偽妊娠マウスから計 20 匹が出生した。今後、成長を待って尾部よりゲノム DNA を抽出し、PCR にて欠失の有無を確認する。

8-2) ES 細胞を使った conventional ノックアウト法

歌舞伎症候群モデルマウス作成の為の ES 細胞は、PCR によるスクリーニングが終了し 7 個のクローンが組換え

体ES細胞との結果であった。今後、サザンブロット解析を行って確認する。Sotos 症候群モデルマウス作成の為のES細胞でも、12個のPCRスクリーニング陽性クローンが得られており、同様にサザンブロット解析を行っている。

(9) モデル細胞の作成

BWS について、培養細胞については、B6 x PWK の F1 マウス線維芽細胞を使用した。F1 マウス線維芽細胞については、region 1 の欠失をヘテロに保持しているクローンを2クローン得ることができた。SNP を用いて父性アレルの欠失であることを確認した。

Sotos 症候群に関してヒトテラトカルチノーマ由来幹細胞 NCCIT 細胞を使用した。NSDI の一方のアレルが truncation mutation, 他方のアレルが flox-Ex6 のコンディショナル KO 細胞を2クローン得た。3xFLAG tag 細胞については、ヘテロ6クローン、ホモ1クローン、HA-FLAG tag 細胞については、ヘテロ9クローン、ホモ1クローンを得た。

D. 考察

(1) 稀少疾患の exome 解析および遺伝子診断について

原因不明稀少疾患の遺伝子探索については、情報処理技術が向上してきたこともあり、de novo 変異探し、家

系例ともに40-50%は原因が分かるようである。しかし、稀少であるが故に確認作業自体が生物学的な in vitro 実験を行わなければならない、そのステップが論文作成の律速段階となっている。

一方、既知の変異陽性を除外した歌舞伎症候群、Beckwith-Wiedemann症候群の変異解析でも新規遺伝子は見つからない。特に歌舞伎症候群は、KMT2Dのイントロンを含めた全ゲノム領域を探索したが、原因となるような変異は認められなかった。これは、歌舞伎症候群の様な比較的均一な症候群でも遺伝子変異が見つからない例が、15~20%は存在するということであり、すなわち遺伝子だけで疾患の診断は80~90%が限界であろう。

難聴は、全国的に1000出生に1~2人と一定の頻度で認められる疾患であり、その半数以上は遺伝子が関与している。しかしながらその原因となる遺伝子は多様である。難聴には他症状を伴う症候性と伴わない非症候性に大別され、非症候性の原因遺伝子は70以上知られており遺伝子診断を行うのは容易ではない。本網羅的遺伝子診断パネルは、この困難を解消し、迅速な確定診断へ至ることを期待したが、結果(一部)に示すように実際に本パネルを用いて迅速に患児それぞれの

原因となっている遺伝子変異を特定することが出来た。よって、難聴においてはこのパネルを用いてスクリーニング的に遺伝子診断を行い確定させることができると思われた。しかしながら、コストの面からは、日本人集団または沖縄集団で本パネルを用いた解析結果を蓄積し、頻度の高い遺伝子に特化した、より効果的な遺伝子パネルまたは解析系の構築も必要と考えられた。その一例として、沖縄集団に比較的多い症候性難聴の一つ、Pendred 症候群／前庭水管拡大症について、原因遺伝子 *SLC26A4* を中心に変異解析を行った。結果、患児において *SLC26A4* 遺伝子変異は、96.2%に認められ、本疾患が疑われる時は、まず *SLC26A4* をターゲットとして解析することが有用と考えられた。

今回、認められた遺伝子変異は、g. IVS15+5G>A, p. H723R, p. T527P の3つであった。変異型、g. IVS15+5G>A は、東アジアの一部で認められるものの本土ではほとんど認められず、沖縄または沖縄出身者においては、本遺伝子変異も解析対象として加えられるべきと考えられた。また、患児における変異アレルの頻度は、g. IVS15+5G>A, p. H723R の2つで 93.5%を占め、本変異型をターゲットとして検出できる簡易遺伝子診断系の確立は、Pendred 症候群／前庭水管拡大症の診断に時

間的・コスト的にも重要と考えられた。今後は、Pendred 症候群／前庭水管拡大症については、上記簡易遺伝子診断キットを完成させることが臨床への応用・実用化において重要であると思われた。

このような網羅的遺伝子解析パネルから高頻度原因疾患パネルや高頻度遺伝子変異型解析キットと段階を踏んだ診断システムの構築は、診断コストの面から考えても全ての稀少疾患の診断に有用と考えられる。

(2) 先端異骨症モデルラット解析について

臨床的に典型的な先端異骨症患児の解析より、典型的ホルモン感受性先端異骨症の多くは、*PDE4D* 遺伝子が原因と推定された。また、分子生物学・分子遺伝学的解析により、患児由来細胞では cAMP 値や CREB タンパク質リン酸化が変動し、また遺伝子変異の導入により変化することが判明した。加えて、PKA 複合体の一部である *PRKAR1A* と *PDE4D* は細胞内局在が一致することが判明した。よって、典型的先端異骨症は、*PDE4D* の変異により、Gs α -cAMP-PKA シグナル伝達経路の異常をきたし、発症すると考えられた。

このことは、先端異骨症に類似する疾患（非典型例）であるホルモン抵抗性先端異骨症において、*PRKARIA* 遺伝

子変異を認める例があり（下表）、他の非典型的で *GNAS* 遺伝子変異を認める例があることから本シグナル伝達経路が病態に強く係っていることが支持される。挿入変異による *Pde4d* 遺伝子変異ラットについてホモ接合ラットにおける成長曲線、前肢の X-ray 所見および骨長測定値は、生後早期の成長遅延、手骨の短縮を示した。これらは、先端異骨症の所見と一致し、病態モデルとして妥当と思われた。先端異骨症では、成長に従ってやや肥満傾向になることが知られているが、予備的結果で週齢が進むにつれて体重が増加傾向となることを確認しており、妥当性を支持する結果となっている。このラットの解析により詳細な分子病態の解明や治療へ向けた研究が可能となったと考えられた。

（３）歌舞伎症候群および *Sotos* 症候群の DNA メチル化異常について

インプリント DMR のメチル化解析により、55% の症例で DMR のメチル化異常を認め、特定の DMR が高頻度にメチル化異常を示した。これらの DMR のメチル化異常は、*NSD1* のハプロ不全により *DNMT3A* によるメチル化が不完全であったためと推測され、*BWS* との臨床的オーバーラップの原因である可能性がある。作製した *NSD1* 遺伝子改変細胞は、レチノイン

酸で神経系細胞に分化誘導が可能である。今後は、分化誘導前後の細胞を用いて、全ゲノムメチル化解析、ChIP-seq をおこない、*NSD1* の標的遺伝子を同定し、病態解明と治療法開発の基盤を確立する。

歌舞伎症候群患者では、*SoS* と異なりメチル化異常を示す症例が少なく、また、メチル化異常を示す特定の DMR もなかった。今後、pyrosequencing で確認するが、*KMT2D* による *H3K4me3* とインプリント DMR のメチル化との関連は強くないと推測され、むしろヒストンのアセチル化の影響を受けているのかも知れない。

（４）モデルマウス作成について

CRISPR/Cas9 マイクロインジェクション法によって、最短でモデルマウスが作成出来たと考えられる。来年度以降、当初の目的の一つである歌舞伎症候群、*Sotos* 症候群、*Beckwith-Wiedemann* 症候群に効果が期待できる薬剤のスクリーニングを開始出来る。また、ES 細胞はコンディショナルノックアウトのデザインとなっており、歌舞伎症候群・*Sotos* 症候群モデルマウスとしての解析と体細胞突然変異を発生させたときの腫瘍発生のメカニズムも解析出来ると考えられる。

E. 結論

Whole exome 解析によっていくつかの原因不明遺伝子疾患の新規原因遺伝子を明らかにした。特に whole exome 解析法は、孤発例の新生突然変異が原因である疾患には絶大な有効性を持っている。一方、原因変異が同定できると考えられていた単一遺伝子病家系の解析は、最終的に一つの原因変異を特定出来るまでに至らないことが多々ある。一般集団内にある個人が持つ変異が余りにも多いこと、浸透率が必ずしも1でない遺伝子病ということが原因であろう。今後のゲノム解析技術が進歩しても今の状況が大きく改善して90%以上で未知の稀少疾患の原因変異が判明するとは思われない。

ただし、研究分担者である要が示しているように、一旦原因遺伝子が判明した場合の、病態解析や効果が期待できる薬の推測、病態から推測される薬剤の新規適用拡大など変異遺伝子から得られる情報は絶大であるから、今後も exome 等による疾患原因変異探しは重要な位置を占めると思われる。

また、一方で、同一遺伝子の変異部位の違いで全く異なる症候群となることが多く散見されるようになってきた。この事実から、既存薬の適応拡

大として安易に患者へ投与するのは危険であると考えられる。既存薬がいかなるシグナルを抑制しているのか、活性化しているのかを見分けて、適応を考えて行かなくてはならない。In vitro の実験、動物実験はやはり欠かせない。

-----達成度について-----

遺伝子病の exome 解析は既に、臨床応用・臨床検査の段階にあり、塩基配列データ取得・解析までは買う区実に実施可能となっている。最終的に変異がその疾患の原因であるのか否かの決定が、新規疾患である場合は、難しい。

遺伝子診断、未知の疾患の原因変異探し、モデル動物の作成と本年度計画した目標は達成できている。

-----今後の展望について-----

今後は、未だ原因同定に至っていない疾患（患児）について、ゲノムシーケンスを含めて解析を進める。動物モデルが出来上がった分に関しては、既存薬の有用性の検討に入る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

1. Jia N, Nakazawa Y, Guo C, Shimada M, Sethi M, Takahashi Y, Ueda H, Nagayama Y & Ogi T.* A rapid comprehensive assay system for DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA damaging reagents by measuring unscheduled DNA synthesis and recovery of RNA synthesis after DNA damage. *Nature Protocols* 10(1): 12-24. (2015)
2. Kaname T, Ki CS, Niikawa N, Baillie GS, Day JP, Yamamura KI, Ohta T, Nishimura G, Mastuura N, Kim OH, Sohn YB, Kim HW, Cho SY, Ko AR, Lee JY, Kim HW, Ryu SH, Rhee H, Yang KS, Joo K, Lee J, Kim CH, Cho KH, Kim D, Yanagi K, Naritomi K, Yoshiura KI, Kondoh T, Nii E, Tonoki H, Houslay MD, Jin DK. Heterozygous mutations in cyclic AMP phosphodiesterase-4D (PDE4D) and protein kinase A (PKA) provide new insights into the molecular pathology of acrodysostosis. *Cell Signal*. 2014 Nov; 26(11): 2446-2459. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.07.025.
3. Baple E.L., Chambers H., Cross H.E., Fawcett H., Nakazawa Y., Chioza B.A., Harlalka G.V., Mansour S., Sreekantan-Nair A., Patton M.A., Muggenthaler M., Rich P., Wagner K., Coblenz R., Stein C.K., Last J.I., Taylor A.M., Jackson A.P., Ogi T., Lehmann A.R., Green C.M. & Crosby A.H. Hypomorphic PCNA mutation underlies a human DNA repair disorder. *Journal of Clinical Investigation* 124(7): 3137-3146. (2014)
4. Nagata E, Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura KI, Kosho T, Hasegawa T, Kimizuka M, Suzuki A, Shimizu K, Ohashi H, Haga N, Numabe H, Horii E, Nagai T, Yoshihashi H, Nishimura G, Toda T, Takada S, Yokoyama S, Asahara H, Sano S, Fukami M, Ikegawa S, Ogata T. Japanese founder duplications/triplications involving BHLHA9 are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gollop-Wolfgang complex. *Orphanet J Rare Dis*. 2014 Oct 21; 9(1):125.
5. Miura K, Morisaki S, Abe S, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Tateishi S, Mishima H, Yoshiura K, Masuzaki H. Circulating levels of maternal plasma cell-free pregnancy-associated placenta-specific microRNAs are associated with placental weight. *Placenta*. 2014 Oct; 35(10):848-851. doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.002.
6. Miura K, Hasegawa Y, Abe S, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Kinoshita A, Kaneuchi M, Yoshiura K, Masuzaki H. Clinical applications of analysis of plasma circulating complete hydatidiform mole pregnancy-associated miRNAs in gestational trophoblastic neoplasia: A preliminary investigation. *Placenta*. 2014 Sep; 35(9):787-789. doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.004.
7. Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Hayashida C, Abe S, Tokunaga K, Masuzaki H, Yoshiura KI. Genome-wide association study of HPV-associated cervical cancer in Japanese women. *J Med Virol*. 2014 Jul;86(7):1153-1158. doi: 10.1002/jmv.23943.
8. Matsumoto H, Tsuchiya T, Yoshiura K, Hayashi T, Hidaka S, Nanashima A,

- Nagayasu T. ABCC11/MRP8 Expression in the Gastrointestinal Tract and a Novel Role for Pepsinogen Secretion. *Acta Histochem Cytochem.* 2014 Jun 28; 47(3):85-94. doi: 10.1267/ahc.13040.
9. Tsurusaki Y, Koshimizu E, Ohashi H, Phadke S, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K, Koderia H, Miyatake S, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, Matsumoto N. De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Commun.* 2014 Jun 2;5:4011. doi: 10.1038/ncomms5011.
 10. Miura K, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Yamasaki K, Abe S, Hasegawa Y, Kaneuchi M, Yoshida A, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin-twin transfusion syndrome. *Prenat Diagn.* 2014 Apr; 34(4):345-349. doi: 10.1002/pd.4307.
 11. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura K, Masuzaki H. Single human papillomavirus 16 or 52 infection and later cytological findings in Japanese women with NILM or ASC-US. *J Hum Genet.* 2014 May; 59(5):251-255. doi: 10.1038/jhg.2014.9.
 12. Amani D, Khalilnezhad A, Ghaderi A, Niikawa N, Yoshiura KI. Transforming growth factor beta1 (TGFβ1) polymorphisms and breast cancer risk. *Tumour Biol.* 2014 May; 35(5):4757-4764.
 13. Tsukamoto O, Miura K, Mishima H, Abe S, Kaneuchi M, Higashijima A, Miura S, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of endometrioid endometrial carcinoma-associated microRNA in tissue and plasma. *Gynecol. Oncol.* 2014 Mar; 132(2): 715-721.
 14. Ganaha A, Kaname T, Akazawa Y, Higa T, Shinnjou A, Naritomi K, Suzuki M. Identification of two novel mutations in the NOG gene associated with congenital stapes ankylosis and symphalangism. *J Hum Genet.* (2015) 60:27-34.
 15. Horai S, Yanagi K, Kaname T, Yamamoto M, Watanabe I, Ogura G, Abe S, Tanabe S, Furukawa T., Establishment of a Primary Hepatocyte Culture from the Small Indian Mongoose (*Herpestes auropunctatus*) and Distribution of Mercury in Liver Tissue. *Ecotoxicology* (2014) 23:1681-1689.
 16. Kaname T, Yanagi K, Naritomi K., A commentary on the promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet.* (2014) 59:117-118.
 17. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y. Premature termination of reprogramming *in vivo* leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell.* 156(4):663-677, 2014
 18. Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Sanchez-Mut JV, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation

- independent establishment of imprinting. *Genome Res*, 24(4):554-69, 2014
19. Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the IGF2/H19-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet*, 86(6):539-544, 2014
 20. Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Yatsuki H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, Ogata T, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions (DMRs) to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med*, 16(12):903-912, 2014
 21. Takama Y, Kubota A, Nakayama M, Higashimoto K, Jozaki K, Soejima H. Fibroadenoma in Beckwith-Wiedemann syndrome with paternal uniparental disomy of chromosome 11p15.5. *Pediatr Int*, 56(6):931-934, 2014
 22. Ohtsuka Y, Higashimoto K, Sasaki K, Jozaki K, Yoshinaga H, Okamoto N, Takama Y, Kubota A, Nakayama M, Yatsuki H, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Yoshiura KI, Soejima H. Autosomal recessive cystinuria caused by genome-wide paternal uniparental isodisomy in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet*, Published online: 8 November 2014
 23. Nakajima Y, Meijer J, Dobritzsch D, Ito T, Meinsma R, Abeling NG, Roelofsen J, Zoetekouw L, Watanabe Y, Tashiro K, Lee T, Takeshima Y, Mitsubuchi H, Yoneyama A, Ohta K, Eto K, Saito K, Kuhara T, van Kuilenburg AB. Clinical, biochemical and molecular analysis of 13 Japanese patients with β -ureidopropionase deficiency demonstrates high prevalence of the c.977G > A (p.R326Q) mutation. *J Inherit Metab Dis*. 2014 Sep;37(5):801-812.
 24. Ikewaki N, Sonoda T, Migita H: Modulation of CD93 molecule in a human monocyte-like cell line (U937) treated with nickel. *J. of Kushu Univ. of Health and Welfare*, 2014, 15: 129-137.
- 邦文
1. 三嶋博之：UCSC ゲノムブラウザ，羊土社，2014 年，実験医学増刊・今日から使えるデータベース・ウェブツール達人になるための実践ガイド 100，実験医学 32(20)：3223-3225.
 2. 三嶋博之：さまざまなヒトバリエーションデータベース，羊土社，2014 年，実験医学増刊・今日から使えるデータベース・ウェブツール達人になるための実践ガイド 100，実験医学 32(20)：3341-33433.
 3. 要匡，Aarskog-Scott 症候群. 日本臨床別冊 神経症候群 IV (2014) 日本臨床社，東京 434-436. (要 匡)
 4. 要匡，鎖骨頭蓋形成不全症. 日本臨床別冊 神経症候群 IV (2014) 日本臨床社，東京 725-726.
 5. 大場隆，片渕秀隆，副島英伸. 間葉性異形成胎盤 Placental mesenchymal dysplasia (PMD) の診断と原因遺伝子. 病理と臨床、32(5):535-540, 2014
 6. 副島英伸. インプリンティング疾患のエピジェネティクス. 監修：畑田出穂・