

第 18 回小児血液セミナー 平成 26 年 4 月 5 日 (土), ANA クラウン プラザホテル福岡. 「小児血液・主要研究における全エクソーム解析の可能性」次世代シーケンサーを用いた疾患解析法～総論

第 57 回日本形成外科学会総会・学術集会 平成 26 年 4 月 9 日 (水) ～11 日 (金), 長崎ブリックホール. 特別企画「予防的乳房切除の今後」 特別企画 1-1 遺伝子診断が医療にもたらすもの

平成 26 年度長崎県高等学校理科教育研究会第 55 回定期大会総会, 2014 年 5 月 23 日 (金) 長崎県佐世保北高校. 医学系研究のための高等学校理科から医学部学生教育について

第 23 回日本組織適合性学会大会, 長崎大学良順会館 ランチョンセミナー 次世代シーケンサーで何が出来るのか 平成 26 年 9 月 14 日 (日)

生命医薬情報学連合大会, 2014 年 10 月 4 日, 仙台市仙台国際センター. 公開セッション第一部・個人ゲノム解析技術の現在と未来／解析結果. 三嶋博之.

北海道大学大学院歯学研究科歯学研究セミナー, 2014 年 8 月 13 日, 札幌市北海道大学. 次世代シーケンサーで挑む口唇口蓋裂と乳歯

歯胚異常の遺伝学.三嶋博之.

第 57 回日本甲状腺学会学術集会 大阪 2014 年 11 月 荻朋男 「ゲノム不安定性疾患群の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析」

学会発表

第10回広島大学-長崎大学連携研究事業カンファランス-放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業- 2014年5月31日 (土), 場所:長崎大学良順会館専斎ホール, 長崎.

digital PCR を利用した rare variant/mutation 検出法の検討. 渡辺聡, 朝重耕一, 吉浦孝一郎, 三嶋博之, 木下晃

新規小頭症/放射線感受性症責任遺伝子の同定と機能解析. 中沢由華, 荻 朋男

日本精神神経学会総会 2014年6月 36～28日 (金) パシフィコ横浜.

1000344: 幻覚・妄想を呈した正常圧水頭症の家族例の遺伝学的考察 森本芳郎, 小野慎治, 黒滝直弘, 吉浦孝一郎, 小澤寛樹

第48回小児内分泌学会学術集会 9月 25～27日, 浜松.

CO-29 中枢神経奇形を合併した複合型下垂体機能低下症の 2 例: trio exome 解析による新規原因遺伝子同定の試み. 渡辺聡, 伊達木澄人,

近河日智, 中富明子, 木下英一, 吉浦孝一郎, 深見真紀, 緒方勤, 森内浩幸.

第59回日本人類遺伝学会 2014年11

月19日(水)~22日(土), 場所: タワーホール船堀(東京都江戸川区), 東京

- 1B0-1: 家族性肺がんにおける新規責任遺伝子の同定. Novel causative gene of familial non-small cell lung cancer. 朝重耕一, 渡辺聡, 三嶋博之, 木下晃, 松本桂太郎, 及川将弘, 宮崎拓郎, 土谷智史, 山崎直哉, 福島喜代康, 永安 武, 吉浦孝一郎
- 1O1-3: 多発性歯牙腫合併症例を含む SATB2 遺伝子変異症候群の新規変異の同定. Identification of Novel Mutations in Patients with SATB2 Gene Mutation Syndrome without Multiple Odontom. 三嶋博之, 菊入崇, 三古谷 忠, 木下晃, 吉浦孝一郎
- 1O14-2: ddPCR を用い他 McCune-Albright 症候群の GNAS モザイク変異検出の試み. GNAS mosaic mutation detection of the McCune-Albright syndrome with ddPCR. 渡辺 聡, 伊達木 澄人, 中富明子, 木下 晃, 朝重耕一, 木下英一, 三嶋博之, 森内浩幸, 吉浦孝一郎

2O3-2: Panic 障害多発家系例に対する Exome 解析. The molecular analysis of familial Panic disorder. 森本芳郎, 小野慎治, 森 貴俊, 黒滝直弘, 吉浦孝一郎, 小澤寛樹

3O4-1: 母体血漿中への妊娠関連胎盤特異的 microRNA の流入量および分娩後の消失速度と陣痛との関連について. Effect of labor on plasma concentrations and postpartum clearance of pregnancy-associated, plasma-specific microRNA. 森崎慎太郎, 三浦清徳, 東島 愛, 阿部修平, 三浦生子, 長谷川ゆり, 吉田 敦, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明

3O4-2: 母体血と比較して胎児血で高発現する microRNA の同定. Identification of highly expressed microRNAs in fetal blood cells compared maternal blood cells. 東島 愛, 三浦清徳, 三嶋博之, 木下晃, 塚本大空, 阿部修平, 長谷川ゆり, 吉田 敦, 吉浦孝一郎, 増崎英明

3O4-3: 母体血漿中 miR-517a および miR518b は前置胎盤に対する帝王切開時の出血量に関連する. miR-517a and miR518b in maternal plasma as a predictive marker for the hemorrhage volume in placenta previa at delivery. 長谷川ゆり, 三浦清徳, 東島 愛, 阿部修平, 三浦生子, 吉

田 敦, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明

3O4-4: 母体血漿中 cell-free microRNA 流入量と母体の body mass index および新生児出生体重との関連.

Circulating levels of maternal plasma cf-miR-21 are associated with maternal body mass index and neonatal birth weight. 瀧 直樹, 三浦清徳, 東島 愛, 長谷川ゆり, 阿部修平, 三浦生子, 村上優子, 三嶋博之, 木下 晃, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明

3O4-5: 双胎間輸血症候群発症予測における母胎血漿中胎盤特異的

cell-free mRNA の有用性に関する検討. Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin-twin transfusion syndrome.

村上優子, 三浦清徳, 東島 愛, 長谷川ゆり, 阿部修平, 三浦生子, 三嶋博之, 木下 晃, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明

3O11-4: NILM/ASC-US 例における HPV-16 単独感染群と HPV-52 単独感染群の細胞診所見の変化. Single human papillomavirus 16 or 52 infection and later cytological findings in Japanese women with NILM or ASC-US. 阿部修平, 三浦清徳, 三浦生子, 山崎健太郎, 長谷川ゆり, 東

島 愛, 吉田 敦, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明

生命医薬情報学連合大会, 2014 年 10 月 2-4 日, 仙台市仙台国際センター. 【国内ポスター】 Hiroyuki Mishima, Koh-ichiro Yoshiura : Handmaid Building of a High-Performance Computing Cluster and a Storage System for Bioinformatics.

第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25~27 日 (横浜)

中沢由華, 郭朝万, 嶋田 繭子, 宮崎仁美, 唐田 清伸, 荻 朋男. 「放射線感受性および各種発達異常を示す遺伝性疾患の新規責任遺伝子の同定と分子機能解析」

郭 朝万, 中沢 由華, 嶋田 繭子, 賈楠, 唐田 清伸, 宮崎 仁美, 荻 朋男. 「Molecular and functional study on the initiation of transcription coupled nucleotide excision repair」

唐田 清伸, 郭 朝万, 荻 朋男. 「転写と共役したヌクレオチド除去修復の in vitro 反応系の構築」

宮崎仁美, 荻 朋男. 「コケイン症候群様の臨床症状を示す遺伝性疾患の責任遺伝子探索」

嶋田繭子, 荻 朋男. 「エキソーム解析を用いた DNA 修復機構欠損性疾患の新規責任遺伝子の探索」

第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム 2014 年 10 月. 京都

荻朋男, 中沢 由華, 勝木 陽子, Alagoz Meryem, Kakaroungkas Andreas, 眞貝 洋一, Jeggo Penny 「ヒストン H3K9 メチル化酵素類の DNA 二重鎖切断修復反応への関与」

日本放射線影響学会第 57 回大会 ワークショップ 2014 年 10 月. 鹿児島

荻朋男 「転写共役ヌクレオチド除去修復の開始反応の分子機構」

第 20 回日本家族性腫瘍学会学術集会 2014 年 6 月. 福島

教育講演 荻朋男 「DNA 修復機構の異常により発症する先天性疾患とゲノム不安定性/発がん」

3R Symposium Program (DNA 修復, 組換え, 修復) に関する国際会議. 御殿場 2014 年 11 月 17~22 日

Tomoo Ogi 「Molecular cloning and characterisation of new human DNA repair genes」

Chaowan Guo, Tomoo Ogi. 「Molecular characterization and functional analysis of XRCC4, a novel pathological gene for radiation sensitivity and developmental abnormalities」

Yuka Nakazawa *et al.* 「ERCC1/XPF deficiency causes three NER- deficient disorders: a patient with various

symptoms of xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and Fanconi anemia」

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特許取得

日本国特許

発明者: 荻 朋男, シリパン リムシリチャイクル, 中沢 由華, 山下 俊一

特許出願人: 長崎大学

名称: 損傷DNA修復物質のスクリーニング法

番号: 特許第5549908号

登録日: 平成26年5月30日

米国特許出願

発明者: 荻 朋男, シリパン リムシリチャイクル, 中沢 由華, 山下 俊一

特許出願人: 長崎大学

名称: 損傷DNA修復物質のスクリーニング法

番号: 12/656, 408

出願日: 平成22年1月28日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費  
(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))  
委託業務成果報告書 (業務項目)

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

業務項目: Target resequence に関わる技術開発

担当責任者:

要 匡 (琉球大学大学院医学研究科先進ゲノム検査医学講座・准教授)

業務協力者

成富 研二 (沖縄南部療育医療センター・医師)

### 研究要旨

本研究の目的は、原因遺伝子が明確または明確となった疾患の迅速診断法を確立すること、である。診断法の確立・実用化として、難聴をきたす疾患の NGS を利用した網羅的解析、および難聴をきたす Pendred 症候群の効果的な遺伝子診断法の開発に関する検討を行った。

#### A. 研究目的

地域蓄積・収集した希少疾患の原因解明と診断を目的として、遺伝的異質性が知られている先端異骨症のゲノム解析と分子病態解析、および診断法の開発、難聴をきたす疾患の網羅的診断システムの確立と簡易迅速診断法の実用化を目指した。

これら疾患について、次世代シーケンサ (NGS) を活用した、whole exome 解析やターゲットリシーケンス解析による原因遺伝子の同定、奇形症候群

の症状や特徴を対象とした網羅的迅速遺伝子診断の確立を目的とした。

また、実際の遺伝子診断において、NGS の有用性を示すことや結果を活用し、実用化の道筋を示すことも目的とした。

#### B. 研究方法

(1) 先端異骨症の原因遺伝子変異解析と分子病態解析

臨床的に先端異骨症 (疑いを含む) と診断された患児について、whole

exome 解析とダイレクトシーケンス (Sanger シーケンス) 解析を行った。Whole exome 解析は, Agilent 社 SureSelect または Roche 社 SeqCap EZ による濃縮, HiSeq2500 によるペアエンド解析により行い, また, リファレンスマッピング, annotation 付けも同様に行った。

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

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。

## (2) 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。

## (3) 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 / 前庭水管拡大症患者における *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。



Patient 1 における *PDE4D* 遺伝子の *de novo* 変異

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
Previous reports	Unpublished	Ref 9	Unpublished	Ref 6	Ref 8	Unpublished	Ref 10
Gene	<i>PDE4D</i>	<i>PDE4D</i>	<i>PDE4D</i>	<i>PDE4D</i>	<i>PDE4D</i>	<i>PDE4D</i>	<i>PDE4D</i>
Location	c.2031 T > C (p.G678T)	c.2518G > A (p.G840S)	c.2031 T > C (p.G678T)	c.2031A > C (p.Q228P)	c.489A > C (p.Q228P)	c.489 T > C (p.L235S)	c.1759A > G (p.T578A)
Clinical findings							
CAI (x/y)	40/2.8	40/3.9	41/2.3	40/2.22	40/2.35	41/2.5	38/2.3
BWT (kg)	14.7 y	14.7 y	14.7 y	14.7 y	14.7 y	14.7 y	14.7 y
Sanctuary (y)	14.7 y	15.5 y	15.5 y	14.7 y	14.7 y	14.7 y	14.7 y
Height (cm)	144.7	155	155	146	146	146	146
Weight (kg)	54	57	57	54	54	54	54
SD	-0.1	-0.7	-0.7	0	0	0	0
Short nose with flat nasal bridge	+	+	+	+	+	+	+
(Nose vertical)	(Nose vertical)	(Nose vertical)	(Nose vertical)	(Nose vertical)	(Nose vertical)	(Nose vertical)	(Nose vertical)
Protruding forehead	+	+	+	+	+	+	+
Large ears	+	+	+	+	+	+	+
Mild mental retardation	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe
Developmental milestones	Delayed	Delayed	Delayed	Delayed	Delayed	Delayed	Delayed
Radiologic findings							
Peripheral skeletal dysplasia	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe
Nonsecondary hypoplasia	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe
Brachydactyly	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe
Adverse of lower age	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Laboratory findings							
Hormonal resistance	No	No	No	No	No	No	No
PTEN/CAI	34/9.8/3	34/1	NA/10.2/4.5	64.6/9.4/7.2	61.7/9.3/3.4	41.9/6.4/4	NA/9.8/5.3
ZS-wt, D	15.29	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FR4/SH	1.54/3.25	1.17/0.91	1.5/1.54	1.25/1.25	1.26/0.41	1.6/1.79	1.15/NA
NGI	0.05	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IGF-1	215.8	272.3	112.6	NA	NA	NA	NA
IGFBP3	3.1/6.3	5.5/3.5	NA	NA	NA	NA	0.1~1.8
ACTH	8.9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Estradiol	79	3.95	NA	NA	NA	0.11	NA
Tetrasomia							

\* Reference cDNA sequence: NM\_001104651.

## C. 研究結果

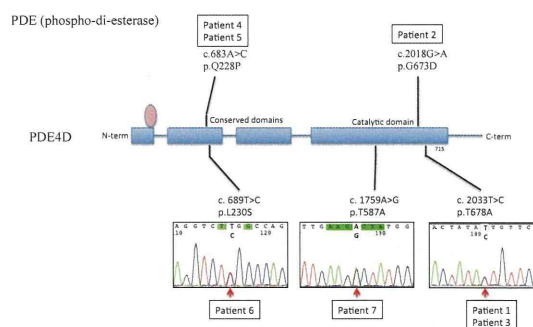
### (1) 先端異骨症の原因解析と分子病態解析

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。



典型的先端異骨症患者における手根骨・足根骨の X-ray (Patient 1)

### 先端異骨症患者の症状のまとめ



### 先端異骨症患者における *PDE4D* 遺伝子変異とアミノ酸配列上の位置

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。

(2) NGS を用いた難聴をきたす疾患の網羅的迅速診断法の開発

症候性、非症候性難聴に関連した原因 74 遺伝子について、エクソン及び flanking 50bp をターゲットとしたキャプチャーパネルを作製した。

Gene	exon	Gene	exon	Gene	exon	Gene	exon	Gene	exon
ACTG1	6	DFNB59	7	HGF	20	MYO7A	50	SLC26A4	21
ATP1A2	23	DIABLO	8	ILDR1	9	NDP	2	SLC26A5	19
CABP2	7	DIAPH1	32	KARS	15	NOG	1	SNAI2	3
CCDC50	12	EDN3	5	KCNE1	1	OTOA	32	SOX10	4
CDH23	71	EDNRB	9	KCNJ10	1	OTOF	48	STRC	33
CEACAM16	7	ESPN	14	KCNQ1	20	OTOG	56	TCOF1	28
CHD7	37	EYA1	19	KCNQ4	15	OTOGL	59	TECTA	23
CIB2	7	EYA4	20	KIAA1199	28	PAX3	11	TMCI	22
CLDN14	1	FGF9	3	LHFPL5	3	PCDH15	44	TMIE	4
CLPP	6	FOX11	2	LOXHD1	47	PDZD7	18	TMPRSS3	13
CLRN1	6	GATA3	5	LRTOMT	12	PNPT1	27	TPRN	3
COCH	13	GDF5	2	MARVELD2	7	POLR1C	10	TRIOBP	24
COL11A2	68	GIPC3	6	MITF	14	POLR1D	4	TSPEAR	13
COL4A3	59	GJB2	1	MSRB3	8	POU3F4	1	TYR	5
COL4A4	48	GJB3	1	MYH14	43	POU4F3	2	USH1C	29
COL4A5	55	GJB6	1	MYH9	42	PTPRQ	53	USH2G	3
COL9A3	33	GPR98	94	MYO15A	63	RDX	17	USH2A	72
CRYM	10	GRHL2	17	MYO1A	27	SEMA3E	18	WFS1	7
DFNA5	11	GRXCR1	4	MYO3A	33	SERPINB6	9		
DFNB31	12	HARS	15	MYO6	35	SIX5	3		

難聴診断対象遺伝子とエクソン数

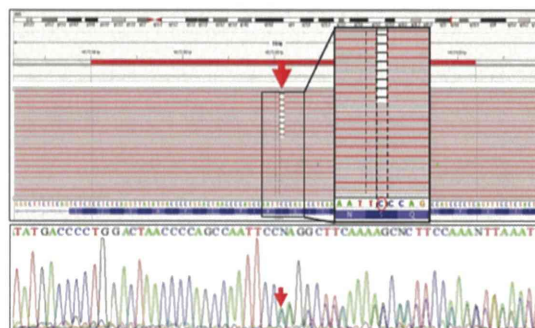
ターゲット領域に対する推定カバー率は 97.67%であった。カバーの薄い領域については、マルチプレックス PCR にて増幅し、補完を行った。

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

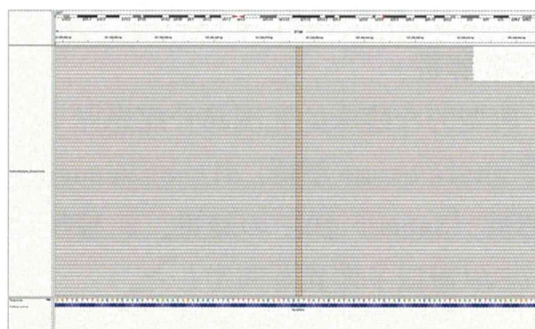
難聴関連原因遺伝子パネルの概要

症候性、非症候性難聴の患児に対し、

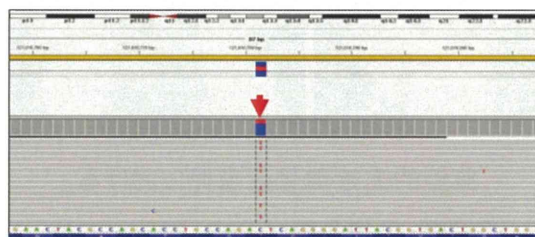
本遺伝子診断パネルを使用して解析した結果、*TCOF1* 遺伝子、*SLC26A4* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子等に変異を同定し、診断することができた。



患児に認められた *TCOF1* 遺伝子変異



検出された *SLC26A4* 遺伝子変異



検出された *TECTA* 遺伝子変異

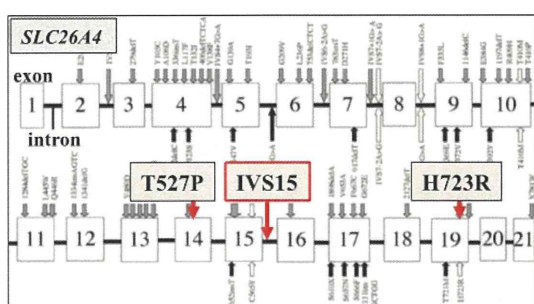


(3) 臨床への実用化にむけた簡易遺伝子診断法の検討 -Pendred 症候群／前庭水管拡大症を例として-

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、(3) の難聴遺伝子診断パネル解析，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／前庭水管拡大症患児における *SLC26A4* 遺伝子変異同定率は，96.2% と算出された。

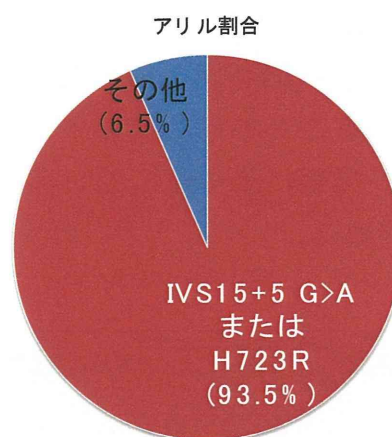
*SLC26A4* 遺伝子に変異を認めた患児の変異型は，アレル頻度の高い順に g. IVS15+5G>A, p. H723R, p. T527P であった。本土ではほとんど認められない変異型, g. IVS15+5G>A が最もアレル頻度が高く，50%であった。



認められた *SLC26A4* 遺伝子変異型

また，残りはほとんどが p. H723R 変異型であり，*SLC26A4* 遺伝子変異を認める患児における g. IVS15+5G>A,

p. H723R 変異型両者を合わせたアレル頻度は，93.5%であった。



*SLC26A4* 遺伝子変異型のアレル頻度

D. 考察

臨床的に典型的な先端異骨症患児の whole exome 解析，Sanger シーケンス解析結果より，典型的ホルモン感受性先端異骨症の多くは，*PDE4D* 遺伝子が原因と推定された。

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，Gsα-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。

chr17	8681985366819853	T	het	1680	86	chr17:131	rs35723852	intronic	PRKARIA			rs35723852	
chr17	8682193865219382	A	het	121	41	35			PRKARIA	synonymous	PRKARIA:1462_2372:missense		
chr17	8683486385249832	A	hom	215	46	chr17:131	rs2302230	intronic	PRKARIA			rs2302230	0.81
chr17	8683902386290231	T	hom	181	42	chr17:131	rs2302231	intronic	PRKARIA			rs2302231	0.79
chr17	868271686527166	T	het	531	5	chr17:131	rs3435818	UTR3	PRKARIA			rs3435818	
chr17	8682743386527433A	G	het	226	3	54			UTR3	PRKARIA		rs3006210	0.006
chr17	8682746865274651	A	het	226	102	chr17:131	rs8082254	UTR3	PRKARIA			rs8082254	0.128
chr17	868276386527634F	G	het	102	5	chr17:131	rs3925	UTR3	PRKARIA			rs3925	0.232
chr17	868283638652836C	T	het	180	5	chr17:131	rs7977	UTR3	PRKARIA			rs7977	0.228

### 非典型例における *PRKARIA* 遺伝子変異

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るが、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。

よって今後、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。

## E. 結論

Whole exome 解析、Sanger シーケンス解析によって先端異骨症の原因遺伝子として *PDE4D* 遺伝子変異を明らかにし、その分子病態の一部を明らかにした。

稀少疾患の臨床では、網羅的で迅速な遺伝子診断の実現が望まれるが、今回の難聴関連遺伝子診断パネルは、一回の解析で遺伝子変異同定が可能であることが示された。特定の症状や関連疾患をターゲットとした網羅的遺伝子診断パネルは、今後臨床での実用化に向けて重要になると思われた。

原因遺伝子がある程度判明した稀少疾患において簡便で迅速な遺伝子診断は有用であると思われる。

Pendred 症候群／前庭水管拡大症を

対象に遺伝子変異頻度および変異型の検討を行った結果、主たる原因遺伝子は *SLC26A4* 遺伝子で変異検出率 96.2%であった。また、沖縄においては変異型が集積し、g. IVS15+5G>A, p. H723R の2つの変異型が 93.5%とほとんどを占めていた。

よって、本疾患に関しては、この2変異型を対象とした検出系（キット）を開発することで、簡便な迅速診断システムの実用化が可能と考えられた。

### ——達成度について——

難病・稀少疾患の原因遺伝子単離と病態解析、原因が同定された稀少疾患の迅速診断法の開発を目標として研究を開始し、当初の予定通り、先端異骨症の原因遺伝子変異の特定と分子病態解析、詳細な病態解析へ向けたモデル動物の検討および解析を行った。

次世代シーケンサを用いた、網羅的で低コストの遺伝子群解析システム（遺伝子診断パネル）を開発に関しては、難聴の網羅的遺伝子診断パネルの作製と診断を行った結果、効率よく診断可能であったことが確認できた。

加えて、難聴をきたす稀少疾患の一つ Pendred 症候群／前庭水管拡大症について、遺伝子変異の傾向を見出したことは、今後の遺伝子診断キットの実用化に向け大きく進展したといえる。

よって、今年度の目的は達成された

と思われる。

今後は、次世代シーケンス解析を中心とした原因特定および病態解析，稀少疾患の網羅的包括的遺伝子診断を継続し，また，Pendred 症候群／前庭水管拡大症を例とした簡易診断キットの実用化を行う予定である

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. 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.
2. Kaname T, Ki C-S, Niikawa N, Baillie GS, Day JP, Yamamura K-i, Ohta T, Nishimura G, Mastuura N, Kim O-H, Sohn YB, Hyun Woo Kim HW, Cho SY, Ko A-R, Lee JY, Kim HW, Ryu SH, Rhee H, Yang K-S, Joo K, Lee J, Kim CH, Cho KH, Kim D, Yanagi K, Naritomi K, Yoshiura K, 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) 26:2446-2459.

3. 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.
4. 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.
5. 要 旨： Aarskog-Scott 症候群 日本臨床別冊 神経症候群 IV (2014) 日本臨牀社，東京 434-436.
6. 要 旨： 鎖骨頭蓋形成不全症 日本臨床別冊 神経症候群 IV (2014) 日本臨牀社，東京 725-726.

##### 2) 学会発表

国内学会等

第37回日本分子生物学会年会 2013年11月25日（火）～27日（木），パシフィコ横浜，横浜

2P-0869: Molecular pathology of acrodysostosis without hormone resistance caused by heterozygous mutations in cAMP phosphodiesterase-4D. Tadashi

Kaname, Chang-Seok Ki, Norio Niikawa, George S. Baillie, Jonathan P. Day, Gen Nishimura, Nobuo Mastuura, Kumiko Yanagi, Kenji Naritomi, Miles D. Houslay, Sung Yoon Cho, Dong-Kyu Jin

第67回日本薬理学会 西南部会 2014年11月23日(日), 産業医科大学 ラマツィーニホール, 北九州

A1-2: 一酸化窒素合成酵素系の遺伝子欠損はマウス中大脳動脈閉塞後梗塞サイズを著明に縮小させる. 筒井正人, 久保田陽秋, 野口克彦, 松崎俊博, 坂梨まゆ子, 喜名美香, 内田太郎, 仲宗根淳子, 要 匡, 須加原一博, 垣花学

日本人類遺伝学会第59回大会 2014年11月20日(木)~22日(土), タワーホール船堀, 東京

1O12-2: Ohdo症候群オリジナル症例はKAT6B, MED12以外の遺伝子が原因である. 要 匡, 柳久美子, 澤田浩武, 比嘉真紀, 園田徹, 成富研二

2O10-1: 次世代シーケンサを活用したHIVゲノム薬剤耐性関連遺伝子マイナーアレルの検出. 島袋末美, 渡嘉敷良乃, 宮城郁乃, 石原美紀, 名護珠美, 建山正男, 比嘉真紀, 仲宗根勇, 要 匡

1P029: CHD7遺伝子の新規変異を認めたCHARGE症候群の一例. 我那覇章, 要 匡

2P030: 脊椎変形・骨端骨化異常に大泉門開大と特徴的顔貌を伴った症例. 知念安紹, 西村玄, 成富研二, 要 匡

第117回日本小児科学会学術集会 2014年4月11日(金)~13日(日), 名古屋国際会議場; 名古屋

1-O-44: 次世代シーケンサにより母親の低頻度体細胞モザイクを確認した点状軟骨異形成症の一例. 要 匡, 黒澤健司, 比嘉真紀, 成富研二

国際学会

EUROPEAN Human Genetics CONFERENCE 2014, Milan, Italy, May 31- June 3, 2014.

P14.76-M: Detection of rare variations in a targeted genomic region in a population by NGS analysis using pooled DNAs. **Authors:** T. Kaname, M. Higa, A. Ganaha, K. Teruya, K. Sato, T. Hirano, K. Naritomi

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- |           |        |
|-----------|--------|
| 1. 特許得取得  | なし     |
| なし        | 3. その他 |
| 2. 実用新案登録 | なし     |

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))  
委託業務成果報告書 (業務項目)

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

業務項目: エピジェネティック関連疾患診断

担当責任者: 副島英伸 (佐賀大学医学部分子生命科学講座分子遺伝学・エピジェネティクス分野・教授)

研究要旨

エピジェネティック疾患として、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)、Sotos 症候群 (SoS)、Kakubi 症候群 (KS) のゲノム解析・エピゲノム解析を行った。既知の異常を認めない BWS のエクソーム解析では、鑑別診断である他疾患の原因遺伝子変異が見いだしたが、新規原因遺伝子は見いだせなかった。全ゲノム解析等の必要性が示唆された。また、multilocus methylation defects (MMDs) 症例の存在と MMDs による遺伝子発現異常を明らかにした。SoS では、BWS との臨床的オーバーラップの原因となる可能性のある DMR のメチル化異常を同定したが、KS では見いだせなかった。

A. 研究目的

本研究では、エピジェネティック疾患として、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)、Sotos 症候群 (SoS)、Kakubi 症候群 (KS) に着目し、患者検体を用いたゲノム解析およびエピゲノム解析を行い、疾患の原因とそれに起因する病態を解明する。さらに、これらの結果を通じて、遺伝診断および治療法開発の基盤形成を目的とする。

BWS は、巨軀、巨舌、臍ヘルニアを三主徴とする過成長症候群の一つで、11p15.5 のインプリント異常により発症するインプリンティング疾患

である。BWS の主要な原因は、KvDMR1 低メチル化 (loss of methylation: LOM, ~50%), H19DMR 高メチル化 (gain of methylation: GOM, ~5%), 父性片親性ダイソミー (paternal uniparental disomy: patUPD, ~20%), *CDKN1C* の機能喪失変異 (~5%), 11p15 の染色体構造異常(重複、転座、逆位等、~2%)が知られているが、およそ 20%の症例ではこれらの異常を認めない。既知の異常を認めない 20%の症例の原因については長らく未解明のままであり、原因同定が課題となっている。そこで、次世代シーク

エンサーを用いたゲノム解析による新規原因遺伝子の同定、およびメチル化解析によるエピゲノム異常の同定を試みる。また、KvDMR1-LOM 症例の約 20%で疾患座位である 11p15.5 以外のインプリント DMR (differentially methylated region) のメチル化異常を示すこと (multilocus methylation defects: MMDs) が報告されているが (Court et al., Hum Mut, 2013; Tee et al., Clin Epigenet, 2013), 本邦症例における MMDs の頻度やその原因については不明である。そこで、これまでに集積した BWS 症例の包括的インプリント DMR のメチル化を解析する。

SoS は、過成長、骨年齢促進、特異顔貌、精神遅滞を特徴とすることから、症状の一部が BWS とオーバーラップする。ヒストン H3 リジン 36 のモノ・ジメチル化 (H3K36me1・H3K36me2) 酵素をコードしている *NSDI* のハプロ不全が原因である。SoS 患者のリンパ芽球では、H3K36me2 が減少し、2 次的に H3K36me3 も減少している (Berdasco M et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2009)。一方、DNA メチル化酵素 DNMT3A は、PWWP ドメインにより H3K36me3 を認識し (Dhayalan A et al., J Biol Chem, 2010), ゲノムの DNA メチル化レベルの制御に関与する可能性が示唆されている。つまり、SoS における H3K36me3 の減少は、

DNMT3A のリクルートに影響を与え、ゲノム DNA メチル化レベルを低下させ、その結果、標的遺伝子の発現に影響を及ぼし症状が出現すると考えられる。

KS は、特徴的顔貌 (外側 1/3 の下眼瞼外反を伴う切れ長の眼瞼裂、弓状で広い眉毛、押しつぶされた鼻尖を伴う短い鼻柱、大きく突出した耳またはカップ耳)、軽微な骨格異常、胎児期遺残である指尖の膨らみ、軽度から中等度の知的障害、そして出生後にはじまる成長障害によって特徴づけられる先天異常症候群である。原因遺伝子の一つはヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) 酵素をコードしている *KMT2D* である。H3K4me3 は遺伝子発現促進と関連しているため、*KMT2D* の変異により遺伝子発現を抑制する DNA メチル化が増加する可能性がある。そこで、患者末梢血 DNA を用いてメチル化解析によるエピゲノム異常を探索し、*KMT2D* の変異と DNA メチル化との関連を解析する。

## B. 研究方法

### 1. Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の解析

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。

## 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。

## 2. Sotos 症候群 (SoS) の解析

### 1) エピゲノム異常の解析

SoS 患者 31 例 (NSD1 点変異 20 例、NSD1 欠失 11 例) の末梢血ゲノム DNA を用いて、BWS 症例における MMDs 解析と同様に MassARRAY と pyrosequencing で解析した。

## 3. Kakubi 症候群 (KS) の解析

### 1) KS の遺伝子 (KMT2D, KDM6A) 解析

既知の原因遺伝子である KMT2D と KDM6A 遺伝子の exon 部には変異の存在しない KS 患者 16 例ゲノム DNA を用いて、再度変異解析を行った。KMT2D に関しては、典型的患者の大部分が変異を有することから、ゲノム DNA capture 法にてイントロンも含めて濃縮後にパーソナルタイプ次世代シーケンサーにて塩基配列を決定した。

### 2) エピゲノム異常の解析

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 を用いて、MMDs 解析と同様の方法で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、佐賀大学医学部倫理委員会、佐賀大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を受けて実施した。人権擁護上の配慮、不利益・

危険性の排除などの詳細な説明を行い、書面により同意を得たうえで検体収集を行った。遺伝子改変実験に当たっては、佐賀大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て実施した。また、動物実験に関しては、佐賀大学動物実験委員会により佐賀大学動物実験安全管理規則等に適合することが認められた。

## C. 研究結果

### 1. BWS の解析

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 例に他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。

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。

### 2. SoS の解析

インプリント DMR のメチル化解析により、55% の症例で DMR で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。

### 3. Kakubi 症候群 (KS) の解析

KS 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る。

既知の変異陽性を除外した歌舞伎症候群の変異解析を、キャピラリーシーケンサーによる見落としを考慮して再スクリーニングした。特に *KMT2D* 遺伝子は、イントロン変異の可能性を含めて capture 法にて塩基配列解析を行ったが、全く変異を認めなかった。欠失/重複等の構造異常は検出中である。

### E. 結論

エピジェネティック疾患として、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)、Sotos 症候群 (SoS)、Kakubi 症候群 (KS)

のゲノム解析・エピゲノム解析を行った。BWS の鑑別診断である他疾患の原因遺伝子変異が見いだしたが、新規原因遺伝子は見いだせていないため、全ゲノム解析等のより網羅的な解析が必要である。また、MMDs 症例の存在と MMDs による遺伝子発現異常を明らかにした。SoS では、BWS との臨床的オーバーラップの原因となりうる DMR のメチル化異常を同定したが、KS では見いだせなかった。

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。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。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 発表論文

- 1) 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
- 2) 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
  - 3) 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
  - 4) 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
  - 5) 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
  - 6) 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
  - 7) 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