

201442082A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子解析
ネットワークとエピゲノム解析拠点整備
に関する研究

26-委託(難)-一般-082

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 松原 洋一

平成 27(2015)年 3 月

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子解析
ネットワークとエピゲノム解析拠点整備
に関する研究

26-委託（難）-一般-082

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 松原 洋一

平成 27（2015）年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告(総括)

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析ネットワークと エピゲノム解析拠点整備に関する研究 松原 洋一 (資料)ChIP-seq解析プロトコールの整備 など	----- 1
--	---------

II. 委託業務成果報告(業務項目)

1. 小児難病の遺伝的背景解明へ向けての家系収集とエクソーム解 析に関する研究 呉 繁夫	----- 9
2. 次世代シーケンサーを駆使した先天性疾患の遺伝子解析と 病態解明に関する研究 青木 洋子	----- 12
3. 次世代シーケンサー解析基盤の整備に関する研究 中山 啓子	----- 16
4. 神経変性疾患・遺伝性筋疾患の遺伝子解析に関する研究 青木 正志	----- 19
5. 遺伝子解析ネットワーク体制とデータベースの構築に関する研究 梅澤 明弘	----- 21
6. 異常妊娠の解析と日本人正常妊娠リファレンスデータの整備・ エピゲノム解析手法の開発に関する研究 秦 健一郎	----- 23
7. 性分化異常、小児内分泌疾患、先天奇形症候群に関する情報 収集と解析 深見 真紀	----- 30
8. 新生児消化管アレルギー児の腸内細菌のメタゲノム解析 に関する研究 松本 健治	----- 40
9. 遺伝性眼疾患の遺伝子変異の検索に関する研究 東 範行	----- 43
10. 先天性免疫不全症の情報収集と解析に関する研究 藤原 成悦、小野寺 雅史	----- 45
11. 胆道閉鎖症、細胞医療に用いる細胞の安全性評価 に関する研究 田上 昭人	----- 49
12. 難治性・先天性皮膚疾患に関する全エクソーム解析研究 新関 寛徳	----- 53

13.	本邦における適正かつ持続可能な遺伝子診断体制構築に関する研究 小崎 健次郎	57
14.	希少難病遺伝子診断法の開発に関する研究 小原 収	60
15.	小児内分泌疾患、先天奇形症候群に関する情報収集と解析 緒方 勤	66
16.	次世代シーケンサーを用いた新規膵炎関連遺伝子異常の探索に関する研究 正宗 淳 (資料)慢性膵炎患者におけるCFTR遺伝子多型 など	72
17.	次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明に関する研究 新堀 哲也	77
18.	染色体異常の発生メカニズムに関する研究 倉橋 浩樹	80
19.	早産の予防、治療を目的とした次世代シーケンサーの活用に関する研究 齋藤 滋	83
III.	学会等発表実績	87
IV.	研究成果の刊行物・別刷	108

I. 委託業務成果報告(総括)

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）
総括研究報告書

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析ネットワークとエピゲノム解析拠点整備
(H26-委託(難)-一般-082)

研究代表者 松原洋一 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所・所長

研究要旨：

成育疾患、特に、小児科・産科領域の難治性疾患や稀少疾患に対し、次世代シーケンサー等の大量配列解析装置を用いた網羅的な遺伝子解析とエピゲノム解析を行い、関連遺伝因子を解明する事を目的とする。これまでの研究代表者および分担研究者らの研究実績に引き続き、本研究事業の遂行に不可欠な次世代シーケンサーによるデータの取得とバイオインフォマティクなデータ解析系を構築・改良と、臨床的診断を目的とした遺伝子解析支援を中心に進めた。本年度は、717症例に対し、全エクソン配列解析を中心とした解析を行った。

研究分担者 氏名

呉 繁夫 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野・教授

青木洋子 東北大学大学院医学系研究科遺伝病学分野・准教授

中山啓子 東北大学大学院医学系研究科細胞増殖制御分野・教授

青木正志 東北大学大学院医学系研究科神経内科学・青木正志

梅澤明弘 独立行政法人国立成育医療研究センター・副所長

秦健一郎 独立行政法人国立成育医療研究センター周産期病態研究部・部長

深見真紀 独立行政法人国立成育医療研究センター分子内分泌研究部・部長

松本健治 独立行政法人国立成育医療研究センター免疫アレルギー研究部・部長

小野寺雅史 独立行政法人国立成育医療研究センター成育医遺伝研究部・部長

東範行 国立成育医療研究センター 眼科／細胞医療研究室・医長／室長

藤原成悦 独立行政法人国立成育医療研究センター母児感染研究部・部長

田上昭人 独立行政法人国立成育医療研究センター薬剤治療研究部・部長

新関寛徳 国立成育医療研究センター 皮膚科・医長

小崎健次郎 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター・教授

小原収 かずさDNA研究所 技術開発研究部・教授

緒方勤 浜松医科大学小児科・教授

正宗淳 東北大学大学院医学系研究科消化器病態学分野・准教授

新堀哲也 東北大学大学院医学系研究科遺伝病学分野・助教

倉橋浩樹 藤田保健衛生大学総合医科学研究部 分子遺伝学研究部門・教授

齋藤滋 富山大学大学院医学薬学研究部産科婦人科・教授

A. 研究目的

次世代シーケンサー等の大規模配列解析装置を駆使し、小児科・産科領域の難治性疾患や稀少疾患の関連遺伝因子を解明する事を目的とする。多くの小児先天性疾患、異常妊娠は、稀少性に加え、点変異や微細欠失、多因子、de novo 変異、エピゲノム変異の背景があると推測され、次世代シーケンサーやマイクロアレイ技術による網羅的配列解析が必須かつ極めて有効と期待される。

B. 研究方法

1. シーケンサーならびに周辺機器

次世代シーケンシング (NGS) にはイルミナ社 HiSeq2500 一台、HiSeq1500 一台、MiSeq 一台を使用した。周辺機器として、ゲノム DNA 断片化にはアコースティックソルビライザー Covaris S220、BRAVO ライブラリ作製自動化システム、DNA/RNA 分析装置バイオアナライザー、自動 DNA 断片ゲル抽出装置ピピンプレップなどを使用した。検証のためのサンガーシーケンシングには ABI3130xl, ABI3500 を使用した。

2. NGS ライブラリー作製実験系

①全エクソン対象エクソーム解析

使用するゲノム DNA 濃度は picogreen 定量キット (Invitrogen) により定量し、1-2 ug をゲノムライブラリー作製に供した。エクソン領域の濃縮には SureSelect Human All Exon V5 キットを用いた。大部分の工程において自動化システムを使用した。DNA ライブラリーの評価 (サイズ確認・濃度推定) には Bioanalyzer (Agilent) もしくは TapeStation(Agilent) を用いた。

②カスタムリシーケンシングには、Haloplex 法あるいは IonAmpliseq 法を用いた。後者については、イルミナ社シーケンサーでのデータ取得が可能となるような改変プロトコルを開発した。

③RNA-seq ライブラリー

イルミナ社 TruSeq RNA Sample Prep Kit v2, TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit, 微量化対応キットを依頼者の目的に応じて使い分けた。

3. エピゲノム解析系の構築

ゲノムワイドな DNA メチル化解析法として、PBAT (post-bisulfite adaptor tagging)法ならびに RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)法を実施できる体制を整備した。また転写因子結合部位ならびにヒストン修飾状態をゲノムワイドに解析する方法である ChIP-seq を実施できる体制を構築した。各手法の詳細は、研究分担者・秦の報告書に記載した。

4. データ解析系

エクソームデータ、RNA-seq データ、RRBS などの bisulfite-seq データ、ChIP-seq データをマッピング・定量化 (発現レベル・メチル化レベル)・可視化するための解析パイプラインを構築した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて計画され、本センターおよび連携研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得て行っている。すべての検体は、書面で患者本人もしくは代諾者からインフォームドコンセントを得た後に採取され、各医療機関で匿名化された。網羅的遺伝子解析については、説明書・同意書を用いて同意を取得した。

C. 研究結果

1. 疾患検体群を対象とした次世代シーケンサー解析・アレイ解析

本事業に参加している分担研究者から提供された検体と、全国 45 か所の研究協力機関から寄せられたヒト疾患検体を中心に、本年度は 717 症例の解析を行った。本年度のシーケンズ実績内訳を表 1 に示した。

2. エピゲノム解析系の構築

ChIPseq 解析ならびに DNA メチル化解析法である RRBS 法についてサンプル調整ならびにライブラリー作製工程のプロトコルを整備し、技術習得を希望する研究グループにプロトコルを配布し、技術指導を実施した。

ChIPseq 解析を例にその概要を記す。ChIPseq 解析は①クロマチン免疫沈降 (ChIP) ②定量 PCR による ChIP 効率と特異性の評価 (ChIP-qPCR)、③ライブラリ作製、④シーケン

シング、⑤データ解析の工程を含む。①②③の工程についてプロトコールを作成し、技術習得を希望するグループ担当者のトレーニングに活用した。図 1A に例として ChIP 実験プロトコール冒頭を示した。6 種類の代表的なヒストン修飾について ChIP-qPCR の positive control となるゲノム領域を選び PCR プライマーを設定した。それらのプライマーを用いた定量 PCR 実験法とデータ解析方法をまとめたプロトコール冒頭と、解析結果例を図 1B に示した。また③④⑤の工程を経て Integrated Genome Viewer (IGV) で可視化したヒストン修飾 ChIPseq データの例を図 1C に示した。

3. 次世代シーケンサーデータ解析系

①リーシケンシング解析

本研究班独自に、次世代シーケンサーデータ解析のためのパイプラインを構築した (図 2)。本パイプラインは Linux 等、UNIX ライクな環境の CUI で動作する。コマンド入力に馴染みのないユーザでも利用し易いように、特に設定変更の必要がなければコマンド 1 つで動作するように設計した。また Linux 初心者にも使いやすいよう施設内ウェブサイトには使用法解説を掲示した (図 3)。すでに当研究所内で得られた 500 検体以上の全エクソンエクソーム解析データに対しての解析実績がある。

②トランスクリプトームデータ解析

i) 二次解析 (マッピング)

RNA-seq ライブラリーのシーケンスデータ (fastq ファイル) のマッピング工程をパイプライン化した。このパイプラインは、Cutadapt によるアダプター配列除去、低クオリティー塩基除去 (独自スクリプト)、tophat2 によるリフレンスゲノム配列へのマッピング、picard による PCR 重複配列除去、samtools による bam ファイル作出の工程から成る。

ii) Avadis NGS を用いた三次解析

分担研究者らの利便性のために、コマmercialに入手できる Avadis NGS ソフトウェアによる解析環境を整備した。複数サンプル間での遺伝子発現量比較、スプライスアイソフォーム毎の発現量比較、新規アイソフォームの検出、SNP 情報を用いたアレル別発現解析、gene ontology 解析、パスウェイ解析などに利用した。

③ エピゲノムデータ解析系の構築
研究分担者・秦の報告書を参照されたい。

D. 考察

本研究事業の支援により、エクソーム解析、リシケンシング、RNA-seq 等の独自の解析系 (パイプライン) を構築運用し、希少疾患症例に対して詳細な解析を短期間で実行することが可能となった。希少疾患の新規因子同定やエピゲノム解析においては、まだ確立されていない手技を駆使した詳細な解析が必要であり、独自にライブラリー作製からインフォマティクスまでを完結させることが必須である。特に、高精度に変異・多型候補の検出が可能になると共に、既存のデータベースから得られる標準配列にうまくマッピングできない変異・多型候補等が多数存在することが表面化してきた。日本人集団の標準配列情報が必須であるがを基に得られたものでないことが原因と考えられる。昨年度までに、研究代表者らを含む 5 つの厚労研究班が公開した日本人約 1,200 人分の多型情報は (Human Genetic Variation Browser: <http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>)、多型の判定に非常に有用であった。今後は、次世代シーケンサーの急速な普及と共に、臨床医から、あるいは一般の方々からの遺伝子検査の要望が高まると予想される。その一方で、本邦における持続可能な遺伝子検査の体制構築に向けて、問題点の整理と解決は喫緊の課題であると考えられる。本研究事業を通して明らかのように、効率的かつ正確な遺伝子検査を提供するにはある程度の拠点集約化が必要であり、また、費用の面からは厳密な適応基準の作成が、さらには、結果返却に伴う学術的・倫理的・法的対応に関する支援体制、等の整備が挙げられる。

6. 結論

小児科・産科領域の希少疾患や難治性疾患の遺伝因子の解明と、遺伝子診断支援を目的とし、次世代シーケンサーを用いたゲノム・エピゲノム解析体制を整備した。本年度は全エクソン配列解析を中心に、717 症例の解析を行った。本研究事業により、高度の遺伝子診断技術が提供可能となり、今後は遺伝子診断支援体制の実装化に向けた、より具体的な運用体制の検証が急務であると考えられる。

7. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Fujiwara I, Murakami Y, Niihori T, Kanno J, Hakoda A, Sakamoto O, Okamoto N, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Kinoshita T, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y.: Mutations in PIGL in a patient with Mabry syndrome. *Am J Med Genet A*. 2015 Feb 23.
- 2). Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T.: Targeted Next-Generation Sequencing Effectively Analyzed the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene in Pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2014 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 3). Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T.: A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines. *Am J Med Genet A*. 2015 Feb;167(2):407-11.
- 4). Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Sasahara Y, Rikiishi T, Nishiyama A, Nishiyama S, Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y, Aoki M.: GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord*. 2014 Dec;24(12):1068-72.
- 5). Inoue S, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y.: New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet*. 2014 Dec 15;23(24):6553-66.
- 6). Dragneva S, Szyszka-Niagolov M, Ivanova A, Mateva L, Izumi R, Aoki Y, Matsubara Y.: Seven Novel Mutations in Bulgarian Patients with Acute Hepatic Porphyrias (AHP). *JIMD Rep*. 2014;16:57-64.
- 7). Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashima S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, Matsubara Y.: TBX1 mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with

22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. *PLoS One*. 2014 Mar 17;9(3):e91598.

- 8). Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M.: Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod*. 2015 Mar;30(3):499-506.

2. 学会発表

(招待講演)

- 1). 松原 洋一 : 「RAS-MAPK 症候群 (RASopathies) をめぐって～希少疾患研究の展望」 第 18 回小児内分泌研究会特別講演, 2014/7/5
- 2). 松原 洋一 : 「小児疾患の遺伝子解析～最近の進歩～」 第 15 回熊本内分泌代謝フォーラム, 2014/9/12
- 3). 松原 洋一 : 「小児慢性特定疾患と遺伝子診断」 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会シンポジウム, 2014/9/27

(一般演題)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-assay Protocol

使用

- PBS(-)
- 16% Formaldehyde Solution (EMS; #15710-S)
- ChIP Reagent (ニッポンジーン; #518-07131)
 - 2M Glycine
 - NP-40 buffer
 - SDS lysis buffer
 - ChIP dilution buffer
 - 1× RIPA buffer (150 mM)
 - ChIP direct elution buffer
- プロテアーゼインヒビターカクテル
- Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG (Cytis; #DB1201)
- Dynabeads Protein A (Cytis; DB10001)
- 各種抗体 (ChIP-grade)
- 5M NaCl
- TE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA)
- 20 mg/ml Proteinase K
- AMPure XP beads (Beckman; A63881)
- 80% EtOH
- Protein DNA LoBind tube, 1.5 ml
- Covaris S220
- Micro tube (6×16 mm), AFA Fiber with Snp-Cap (Covaris; #520045)

固定サンプル(培養細胞)の調製

1. トリプシン処理し回収した細胞を 750 μl の PBS(-) で再懸濁 (懸濁液の一部を細胞数計測)
2. 16% Formaldehyde を 50 μl 添加し (最終濃度: 1%)、チューブをゆすりとりローテーションさせながら室温で 5-10 分間固定する
3. 2M Glycine を 100 μl 追加、同様にローテーションしながら室温で 5 分おく

※ ※ ※ 以降の操作 (免染後の DNA 抽出まで) はすべて氷上で行う ※ ※ ※

4. 遠心し (600×g, 4°C, 5 分) 上清を取り除く。細胞数が多い場合には、冷 PBS(-) で再懸濁し、3×10⁶ 細胞 / 1.5 ml チューブになるよう分注する。
5. 遠心後 (600×g, 4°C, 5 分) 上清をできるだけ取り除き液体窒素で凍結させる。使用するまで -80°C に保存する。

ソニケーションによるクロマチンの断片化

1. Covaris を起動しておく (使用できる温度まで冷却されるのに 50 分程度かかる)
2. 凍結していた固定細胞に Proteinase inhibitor mix (P.I.) を加えた冷 NP-40 buffer 400 μl を加え vortex により十分に懸濁する
3. スピンダウンし、氷上で 10 分間静置する
4. 遠心後 (1,000×g, 4°C, 5 分)、上清を可能な限り取り除く
5. SDS lysis buffer (+PI) 150 μl を加え vortex により十分に懸濁する
6. スピンダウンし、氷上で 10 分間静置する
7. 細胞懸濁液を全量 Micro tube に移し、ソニケーションする

< Covaris S220 の設定 >

Duty Cycle: 5 %
Intensity: 3
Cycles per Burst: 200
Peak incident power: 105
Time: 5-20 min

8. ソニケーション済サンプルを 1.5 ml チューブに回収後、10,000×g、4°C で 10 分間遠心し、

上清を新しい 1.5 ml チューブに回収する。

9. サンプルの一部 (1-10 μl) を取り、ChIP direct elution buffer 100 μl および 20 mg/ml Proteinase K を加えて 65°C で 4 時間一晩インキュベートする (履クロソリンク)。残りのサンプルは (100 μl ずつ分注して)、80°C に保存しておく。
10. AMPure XP beads を用いて DNA を精製し、バイオアナライザーで断片化状況を確認する。100-700 bp の間にスミア状の流動性が確認できると理想的 (例) ヒト皮膚繊維芽細胞を 5、10、15、20 分ソニケーションした時の断片化状況

CAUTION!
ソニケーション条件は、細胞種や使用するソニケーターによっても変わるので、事前に予備検討を行い適切な条件は決定しておく。

ビーズの調製 (抗体の吸着)

1. サンプル数分の Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG (あるいは Dynabeads Protein A) 20 μl を 1.5 ml チューブに分注する。
2. チューブをマグネットスタンドに置き、1 分程度静置する。
3. 上清を捨てる。
4. 同様に、チューブに冷 1×RIPA (150 mM) buffer 200 μl を加え、ピペティングによりビーズを洗浄する (2 回行う)。
5. ビーズに冷 1×RIPA (150 mM) buffer (+PI) 400 μl および抗体 (2 μg) を加え、4°C で 4 時間一晩ゆすりローテーションさせて反応させる。ネガティブコントロールとしては、同濃度の Mouse あるいは Rabbit IgG を加えたサンプルを用意する。
6. スピンダウンしたチューブをマグネットスタンドに置き、静置後、上清を捨てる。
7. チューブに冷 1×RIPA (150 mM) buffer 300 μl を加え、4°C で 5 分間ローテーションさせる。
8. チューブをマグネットスタンドに置き、静置後、上清を捨てる。
- 7-8 の操作を繰り返す。

免染沈降および ChIP DNA の精製

1. 抗体を吸着させたビーズレットに、冷 ChIP dilution buffer (+PI) 400 μl およびソニケーション済サンプルを適量追加、4°C で 2 時間一晩ゆすりローテーションさせて反応させる。また、各サンプルの 1/20-1/100 量を input として 4°C に保存しておく。

なお、CREST 抗体を用いる場合には、それぞれ以下の条件に従って行うこと。

Modification	Beads	Antibody	IP condition
H3K27ac	20 μl	2 μg	150 mM NaCl, 6 hr
H3K4me3	20 μl	2 μg	150 mM NaCl, 6 hr
H3K9me3	20 μl	2 μg	400 mM NaCl, 6 hr
H3K9me3	20 μl	2 μg	400 mM NaCl, 6 hr
H3K27me3	20 μl	2 μg	400 mM NaCl, 6 hr
H3K36me3	20 μl	2 μg	400 mM NaCl, 6 hr
normal IgG	20 μl	2 μg	150 mM NaCl, 6 hr

2. スピンダウンしたチューブを冷やしておいたマグネットスタンドに置き、4°C で静置後、上清

B

ChIP-qPCR (SYBR-green 法・ABI7500 使用) → ↓

***** ↓

準備

- ↓ 準備 0: 定量 PCR の測定原理・標準的データ解析原理を理解する。
- ↓ 準備 1: standard curve (検量線) 用断片化 gDNA の準備
- ↓ 準備 2: プライマーのデザイン・条件検討
- ↓ 準備 3: ChIP DNA・Input DNA 調製
- ↓ 準備 4: サンプル (Std, NC, unknown) 配置の決定
- ↓ 準備 5: ABI7500 software 上で Experiment 作成・保存

***** ↓

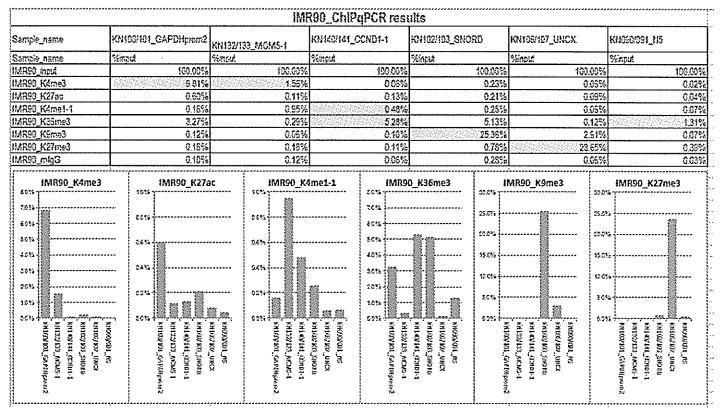
PCR 反応セットアップ ⇒ 7500 RUN ↓

測定終了後のデータ評価 (7500 software) ⇒ Data Export ⇒ シャットダウン ↓

***** ↓

Excel でのデータ解析 ↓

***** ↓



C

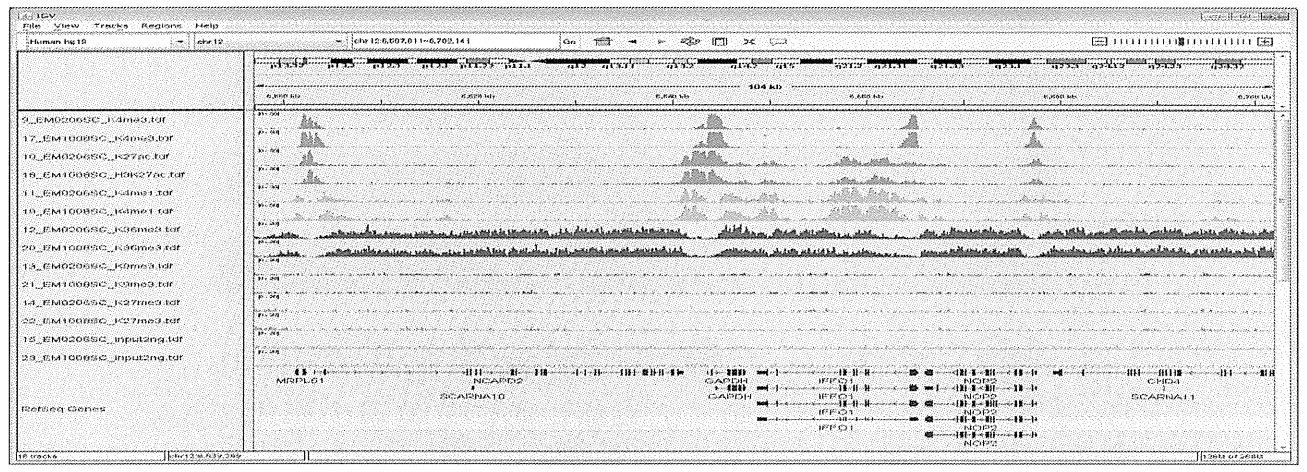


図1: ChIP-seq解析プロトコールの整備

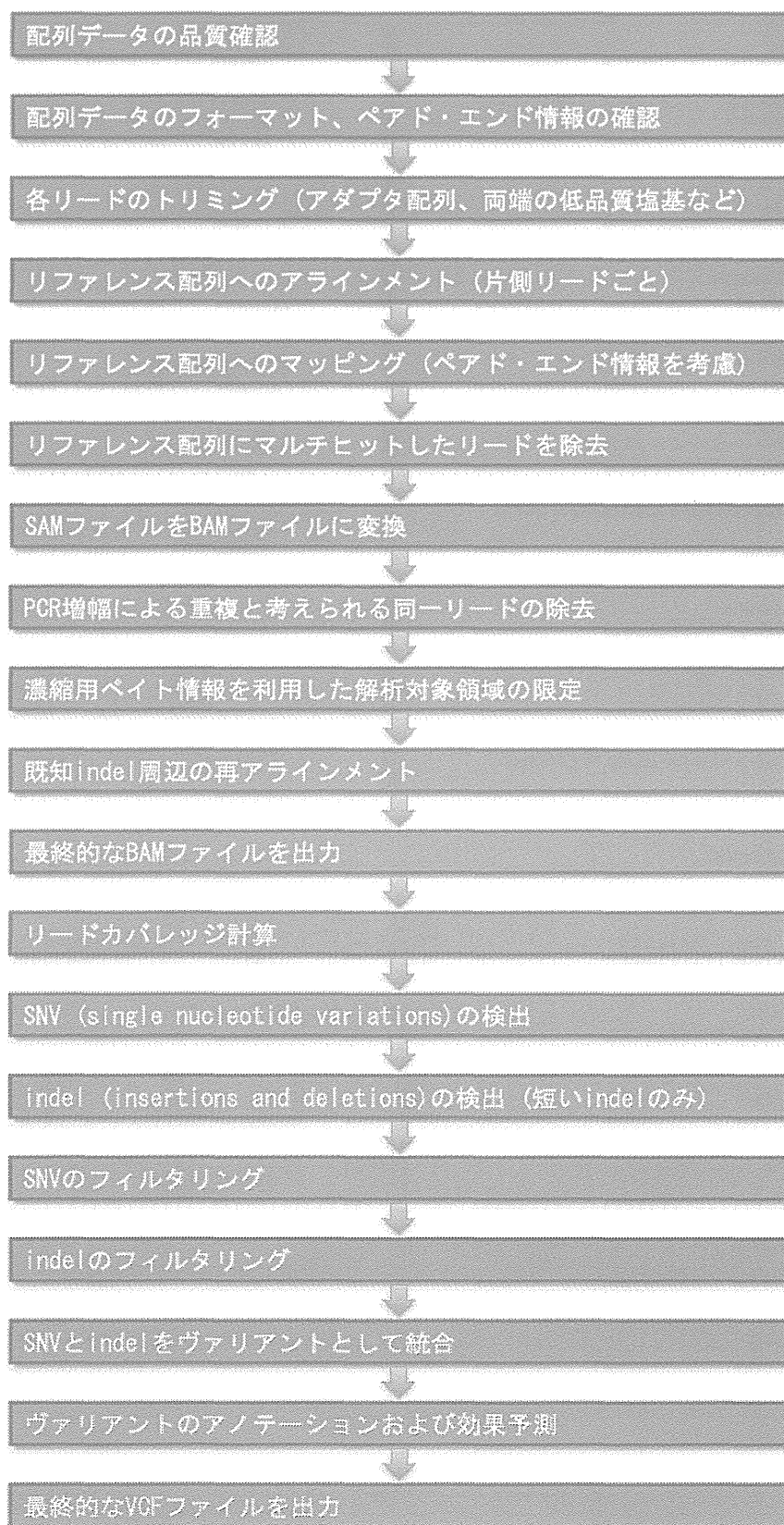


図2: エクソーム解析における処理の流れ

リードのトリミングまでは全ての解析において共通の処理であり、ターゲット・リシーケンシングまたは全ゲノム・リシーケンシングにおいてはエクソーム解析とほぼ同じ処理で解析を行うことができる。



図3: 本拠点事業で開発したデータ解析パイプラインの使用説明ウェブサイト例。機関内でのみ閲覧可能。

表1: シーケンス実績 (2014年4月～2015年2月 (10か月))

解析タイプ	検体数	リード量 / サンプル	合計リード量
Exome (all exon)	348	8-16 Gb	3,260 Gb
Exome (targeted)	100	0.5-2 Gb	100 Gb
全ゲノムシーケンス	4	120 Gb	480 Gb
RNA-seq	62	8 Gb	490 Gb
ChIP-seq	131	2-5 Gb	388 Gb
RRBS	19	5 Gb	95 Gb
SureSelect Methyl-seq	4	20 Gb	80 Gb
PBAT	2	40 Gb	80 Gb
病原体同定	43	1-5 Gb	129 Gb
その他	4		8 Gb
	717		5,110 Gb

II. 委託業務成果報告(業務項目)

小児難病の遺伝的背景解明へ向けての家系収集とエクソーム解析

研究分担者 呉 繁夫

東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野・教授

研究要旨

小児難病の遺伝的背景の解明を目的として、1) ネフローゼ症候群、2) West症候群の家系収集および遺伝子解析を行った。1) ネフローゼ症候群は、常染色体劣性遺伝形式が想定される7家系のエクソーム解析を行い、2家系に罹患者が複合ヘテロ接合体、両親が保因者となる候補遺伝子を同定した。一方の候補遺伝子は腎足細胞に発現を認め、そのノックアウト・マウス作成による機能解析を実施した結果、炎症惹起時におけるノックアウト・マウスで野生型マウスより有意に高濃度にたんぱく尿を認めた。2) West症候群18家系の遺伝子検査による診断効率をみるために、CGHアレイによるゲノムコピー数解析、トリオ検体によるエクソーム解析を実施した。その結果、9例(50%)に既にてんかんの遺伝子として報告のある候補遺伝子に変異を同定し、トリオ検体によるCGHアレイ解析とエクソーム解析によるWest症候群の遺伝子診断は臨床上有用と考えられた。

A. 研究目的

小児難病の遺伝的要因を解明するために、家系収集と次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行なった。家系を収集した疾患としては、1) ステロイド依存性ネフローゼ症候群、2) West症候群、の2疾患である。

B. 研究方法

① ステロイド依存性ネフローゼ症候群

各家族から末梢血を収集し、DNAを抽出してエクソーム解析を行なった。エクソン領域の精製はSureSelectキット(Agilent社)を用い、シーケンシング解析はHiSeq2500(Illumina社)を用いて実施した。フィルタリングは遺伝子変異の頻度、変異効果予測スコア、常染色体劣性遺伝モデルに合致、などの条件で行なった(図1)。

② West症候群

孤発症例18例のトリオ検体を収集し、まずCGHアレイにて欠失・重複を検索した。その後、上記と同様の方法でエクソーム解析を実施し、常染色体劣性遺

伝ないしは新生突然変異を想定したフィルタリングを実施した(図3)。

(倫理面への配慮)

本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認を受け、書面でインフォームドコンセントを得た上で実施した。

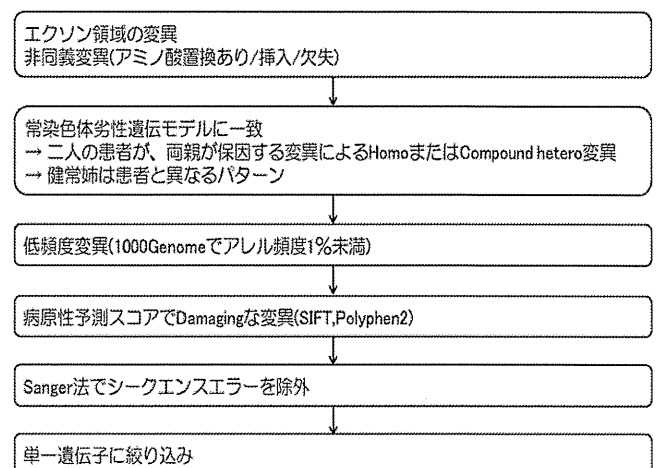


図1 次世代シーケンシング結果のフィルタリング

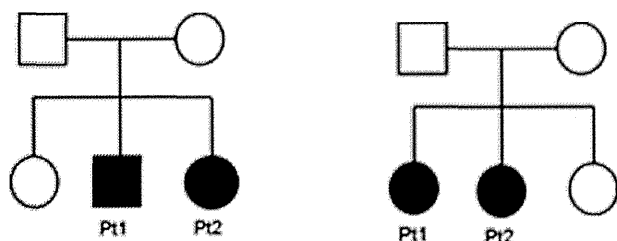


図2 ネフローゼ依存性ネフローゼ症候群の家系

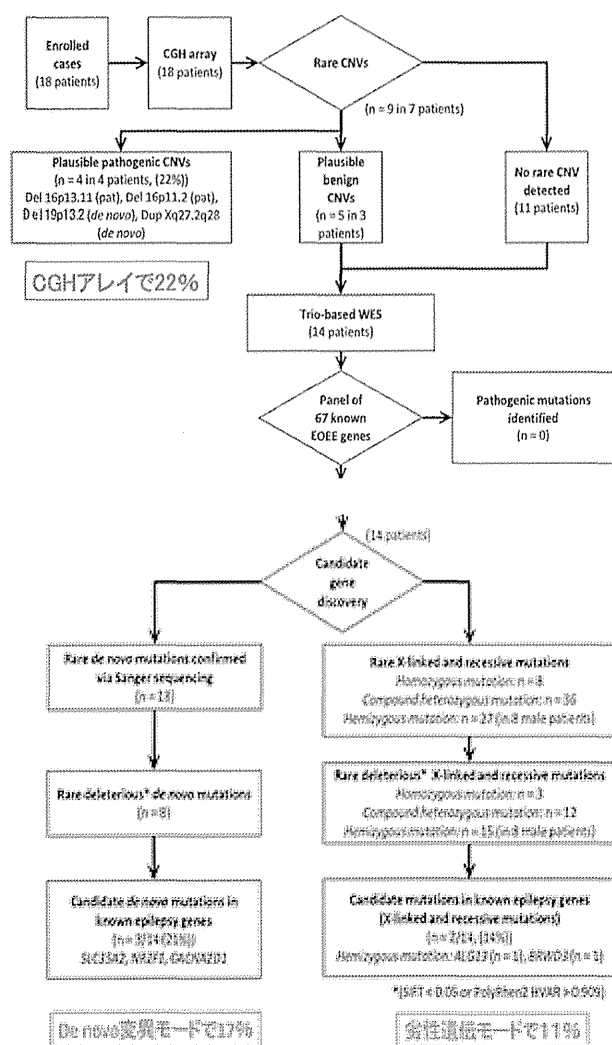


図3 West 症候群の遺伝子診断手順

C. 研究結果

① ステロイド依存性ネフローゼ症候群

常染色体劣性遺伝形式が想定される7家系を解析した。そのうち、図2に示す2家系において有力な病因候補遺伝子をそれぞれ同定した。ネフローゼ症候群孤発例130例を用いて同遺伝子について変異スクリ

ーニングを実施したが、同じ遺伝子に効果の大きな遺伝子変異は同定できなかった。

同定された2遺伝子のうち、一方の遺伝子について更に解析を実施した。まず、遺伝子発現部位を特異抗体を用いた免疫染色法で検索した結果、腎足細胞にその発現が認められた。次に、この遺伝子のノックアウト・マウスを作成し、解析を行なった。その結果、ノックアウト・マウスのホモ接合体は同系統の野生型マウスと変わらない妊孕力を認めた。ノックアウト・マウスのホモ接合体マウスは、体表奇形、体重増加、などの表現型において野生型マウスとの違いを認めなかった。ホモ接合体マウスにLPS投与しその36時間後の尿蛋白濃度を測定し、Cr濃度で補正すると、野生型に比べホモ接合体マウスは尿中蛋白濃度有意に高かった。

② West 症候群

CGHアレイ解析にて、18例中4例(22%)で病因と考えられるCNVを見いだした。残りの14例はエクソーム解析を実施し、新生突然変異遺伝を想定して18例中3例(17%)、常染色体劣性遺伝を想定すると18例中2例(11%)において、既報のてんかん病因遺伝子が見いだされた。最終的に、18例中9例(50%)で病因となる遺伝子の要因を明らかにすることができた。

D. 考察

ネフローゼ症候群の遺伝子解析では、2家系で病因と考えられる遺伝子変異を同定した。その一方の候補遺伝子は腎足細胞に発現を認め、そのノックアウト・マウス作成した結果、炎症惹起時におけるノックアウト・マウスで野生型マウスより有意に高濃度にたんぱく尿を認め、機能的にもネフローゼ症候群の病因遺伝子と考え矛盾は無かった。West症候群18家系の遺伝子検査による診断効率をみるために、トリオ検体によるCGHアレイとエクソーム解析を実施し、18例中9例(50%)に既にてんかんの遺伝子として報告のある候補遺伝子に変異を同定した。この診断法は、West症候群の病因遺伝子を明らかにする上で、有用と考えられた。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

E. 結論

小児ネフローゼ症候群と West 症候群の遺伝子解析
を行ない、幾つかの病因候補遺伝子を同定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

次世代シーケンサーを駆使した先天性疾患の遺伝子解析と病態解明

分担研究者 青木洋子

東北大学大学院医学系研究科 遺伝病学分野 准教授

研究要旨

先天異常は新生児の約 3-5%に起こる。先天奇形症候群は先天的に形態異常や機能異常を持つ症候群であり、染色体異常や遺伝子変異がその原因となる。高密度アレイ CGH や次世代シーケンサーの台頭により、その原因が次々と明らかになっているが、いまだに原因不明の疾患も数多く存在する。本研究では先天異常症である RAS/MAPK 症候群と、アルカリホスファターゼ高値を伴う精神遅滞症候群（Mabry 症候群）において、新規原因遺伝子変異を同定した。RAS/MAPK 症候群については遺伝子診断体制を確立し、その病態を明らかにするためにモデル生物の作製・解析を行った。RAS/MAPK 症候群は sporadic な常染色体優性遺伝性疾患であり、原因は heterogenous であるが、これまでに候補遺伝子として挙げられていなかった遺伝子がエクソーム解析にて続々と同定されてきている。さらにモザイク RASopathies なども報告されているので、疾患概念はさらに広がると考えられた。

研究協力者

新堀哲也（東北大学遺伝病学分野）
井上晋一（東北大学遺伝病学分野）
井泉瑠美子（東北大学遺伝病学分野）
守谷充司（東北大学遺伝病学分野）
大場大樹（東北大学遺伝病学分野）
矢尾板全子（東北大学遺伝病学分野）
西山亜由美（東北大学遺伝病学分野）

A. 研究目的

RAS/MAPK 症候群は RAS/MAPK シグナル伝達経路の分子異常を伴う先天奇形症候群の総称で、ヌーナン症候群・Costello 症候群、cardio-facio-cutaneous 症候群が含まれる。これらの患者は、低身長・心疾患・精神遅滞・特異的顔貌などの症状をもつが互いに類似しているために分子診断が役立つ。分担者らはこれまでに 700 例以上の RAS/MAPK 症候群に遺伝子診断を提供してきたがその 40%はいまだに原因が不明である。本研究の目的は新規原

因遺伝子を解明し、その病態を明らかにすることである。

Mabry 症候群は特異的顔貌・骨格異常・精神運動発達遅滞と持続する高アルカリホスファターゼ血症を伴う症候群である。長らくその原因が不明であったが、2010 年にドイツのグループがエクソーム解析を行い、GPI アンカーの生合成に関わる PIGV 遺伝子変異がその原因であることを報告したが、その 3 割はいまだに原因は不明ある。本研究の目的は Mabry 症候群と臨床診断されるが、PIGV 遺伝子変異陰性の一家系の原因を明らかにすることである。

B. 研究方法

罹患者についてエクソンキャプチャー法を用いて抽出した全エクソン領域を、次世代シーケンサーにて配列解析した。次世代シーケンサーは HiSeq 2000 (Illumina)を用いて 101 塩基のペアエンド解析を行った。得られたデータは、BWA でマッピングを行い、GATK v1.5

で変異の一塩基置換や欠失挿入の抽出を行った。変異のアノテーションには、ANNOVARを使用した。

RAS/MAPK 症候群では RAS/MAPK シグナル伝達経路に関連する分子を、Mabry 症候群では GPI アンカー生合成に関与する分子を中心に絞り込みを行った。候補となる SNV を抽出したのちに、サンガー法で確認し、必要があれば家族の検体で確認した。遺伝子変異を持つ変異蛋白が病因変異であるかどうかを確認するために、培養細胞やモデル生物に変異を導入してその機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者からの臨床情報の取得および DNA の採取に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、東北大学医学部のヒトゲノム委員会および倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得た。動物実験については、遺伝子組み換え実験指針と動物実験指針に則り、東北大学の承認を得て施行した。

C. 研究結果

<RAS/MAPK 症候群>

原因不明の患者計 26 人に対してエクソーム解析を行い、2013 年に新規の遺伝子 RIT1 を同定し報告した。今年度は、RAS/MAPK 症候群研究の国際共同研究にて RAS/MAPK 症候群の新規原因遺伝子 RRAS を同定し、論文として報告した。RRAS 変異は頻度は低いものの、ヌーナン症候群 1 名、AML, JMML を合併したヌーナン症候群 1 名と JMML の 2 名に同定された。RRAS 以外の新規原因遺伝子についてはも解析が継続中である。また、Mosaic RASopathies の一疾患である Shimmelpenning 症候群の新規原因遺伝子も同定した。

分担者らはこれまでに約 700 サンプルの RAS/MAPK 症候群患者の遺伝子診断を提供してきた。2013 年度に同定された RIT1 遺伝子変異は 2013 年以降にも 14 名に同定され、現

在臨床症状の取得と機能解析を行っている。また本年度は Noonan 症候群で成人の心臓に巨大冠動脈瘤を合併した成人に KRAS 変異を同定して報告したほか、多発性黒子を合併する Noonan 症候群に MAP2K1 遺伝子変異を同定したほか、急性リンパ性白血病を合併したヌーナン症候群に PTPN11 変異を同定し報告した。

新たな網羅的診断システムとしてデスクトップ型シーケンサーを用いた遺伝子診断法を確立し、陽性コントロールと、これまでのサンガー法でのスクリーニング陽性例について解析を行っている。

RAS/MAPK 症候群の病態を明らかにするために CFC 症候群モデルマウスを作製し、3 つの薬剤がその表現型改善に有用であることを示した。

<Mabry 症候群>

Mabry 症候群特異的顔貌、運動精神遅滞をしめし、血清アルカリホスファターゼ高値を示す。臨床症状からは Mabry 症候群が疑われるものの、既知の GPI アンカー生合成に関わる原因遺伝子 PIGV 遺伝子変異陰性の一家系のエクソーム解析を行った。エクソーム解析のデータにおいて、これまでに GPI アンカー生合成異常に関与する遺伝子について絞り込み解析を行ったところ PIGL の premature termination のコンパウンドヘテロの変異が原因であることが明らかになった。患者の白血球にて GPI アンカー結合蛋白の異常も示された。PIGL はこれまで CHIME 症候群 (colobomas, heart defects, ichthyosiform dermatosis, mental retardation (intellectual disability), and ear anomalies) の原因であることが報告されていたが、PIGL が新たに Mabry 症候群の原因になることを明らかにした。

D. 考察

RAS/MAPK 症候群については、その約 40%

がいまだに原因不明であったが、エクソーム解析にて同定された RIT1 はヌーナン症候群で3番目に頻度が高い遺伝子であることが示され、エクソーム解析が強力なツールであることが明らかになった。今年度は RIT1 よりはかなり頻度が低いものの国際共同研究にて RRAS 遺伝子変異を同定し報告した。RIT1 は当研究室において 2013 年以降さらに 14 人に同定され、その臨床症状の詳細を検討している。さらに遺伝子体制の整備とモデルマウス作製により、RAS/MAPK 症候群の病態の解明を進める予定である。

Mabry 症候群はいまだ認知度の低い疾患であるが、小児の精神遅滞の中に存在することが予測されている疾患である。本疾患においても GPI アンカー生合成に関する遺伝子が候補遺伝子となり、エクソーム解析により新規原因遺伝子が次々と報告されている。今後さらなる病因遺伝子の検索や病態メカニズムの解明を目指したい。

E. 結論

RAS/MAPK 症候群と Mabry 症候群で新規原因遺伝子を同定した。RAS/MAPK 症候群は sporadic な常染色体優性遺伝性疾患であり、原因は heterogenous であるが、これまでに候補遺伝子として挙げられていない遺伝子がエクソーム解析にて続々と同定されてきている。さらにモザイク RASopathies など報告されてきており、疾患概念はさらに広がると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimoto N, Nakajima H, Sugiura E, Dohi K, Kanemitsu S, Yamada N, Aoki Y, Nakatani K, Shimpo H, Nobori T, Ito M. Bilateral giant

coronary aneurysms in a 40-year-old male with Noonan syndrome caused by a KRAS germline mutation. *Int J Cardiol.* 173:e63-6, 2014

2. Narumi Y, Nishina S, Tokimitsu M, Aoki Y, Kosaki R, Wakui K, Azuma N, Murata T, Takada F, Fukushima Y, Kosho T. Identification of a novel missense mutation of MAF in a Japanese family with congenital cataract by whole exome sequencing: A clinical report and review of literature. *Am J Med Genet A.* 164A:1272-1276, 2014
3. Flex E, Jaiswal M, Pantaleoni F, Martinelli S, Strullu M, Fansa EK, Caye A, De Luca A, Lepri F, Dvorsky R, Pannone L, Paolacci S, Zhang SC, Fodale V, Bocchinfuso G, Rossi C, Burkitt-Wright EM, Farrotti A, Stellacci E, Cecchetti S, Ferese R, Bottero L, Castro S, Fenneteau O, Brethon B, Sanchez M, Roberts AE, Yntema HG, van der Burgt I, Cianci P, Bondeson ML, Digilio MC, Zampino G, Kerr B, Aoki Y, Loh ML, Palleschi A, Di Schiavi E, Carè A, Selicorni A, Dallapiccola B, Cirstea IC, Stella L, Zenker M, Gelb BD, Cavé H, Ahmadian MR, Tartaglia M. Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis. *Hum Mol Genet.* 23:4315-27, 2014
4. Dragneva S, Szyszka-Niagolov M, Ivanova A, Mateva L, Izumi R, Aoki Y, Matsubara Y. Seven Novel Mutations in Bulgarian Patients with Acute Hepatic Porphyrias (AHP). *JIMD Rep.* 16:57-64, 2014
5. Inoue SI, Moriya M, Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, *Aoki Y. New BRAF knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in