

cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet.* 23:6553-66, 2014

6. 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.* 167:407-11, 2015
7. 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 hyperphosphatasia mental retardation syndrome. *Am J Med Genet A*, in press

2. 学会発表

1. 青木洋子、新堀哲也、岡本伸彦、水野誠司、黒澤健司、緒方勤、井上晋一、松原洋一「ヌーナン症候群の新規原因遺伝子 RIT1 の同定」第 117 回日本小児科学会学術集会 2014 年 4 月 11-13 日
2. Aoki Y, Niihori T, Inoue SI and Matsubara Y 「Molecular analysis of RASopathies using next generation sequencer」The 14 th East Asian Union of Human Genetics (EAUHGS) Annual Meeting. 2014 年 11 月 20 日
3. 青木洋子「次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性疾患の遺伝子解析研究の現

状」 日本人類遺伝学会第 59 回大会「診療における次世代シーケンサーの活用と課題」シンポジウム 2014 年 11 月 19-22 日

4. 井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一富田幸子、新堀哲也、大場大樹、小野栄夫、呉繁夫、小椋利彦、松原洋一、青木洋子 新規 BRAF ノックインマウスの作製による cardio-facio-cutaneous 症候群の病態解明と治療法研究 第 59 回日本人類遺伝学会 2014 年 11 月 19-22 日 東京
5. 井上晋一、守谷充司、渡邊裕介、宮川一富田幸子、新堀哲也、大場大樹、小野栄夫、呉繁夫、小椋利彦、松原洋一、青木洋子 BRAF knock-in mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in RASopathies. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 日 横浜

H. 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

分担研究課題

次世代シーケンサー解析基盤の整備

研究分担者 中山 啓子（東北大学大学院医学系研究科 教授）

研究要旨

クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) のサンプル間比較を可能とするために、酵母由来のゲノムDNAにペプチドを融合させた内部標準DNAを作製し、その有用性の検討を行った。作製した内部標準をサンプルに混入させても、免疫沈降およびシーケンス反応には影響を与えないことが確認された。ペプチドを融合した酵母由来ゲノムDNA は、ChIP-seqにおけるサンプル間比較に有用な方法であると考えられた。

A. 研究目的

ChIP-seq は、ゲノム DNA 結合タンパク質やクロマチンタンパク質のゲノム上の位置を全ゲノム上で網羅的に知ることができる有用な方法である。しかし、次世代シーケンサーは超並列的に塩基配列を決定するために、配列決定に供される DNA の絶対量を知ることはできない。その結果、同一ゲノム上の異なる位置でタンパク質の結合量を相互比較することは可能であるが、異なるサンプル間で比較を行うことは原理的に不可能である。

現状では、RNA sequence に用いられている考え方 - すべてのサンプルで全 RNA の絶対量は同一である - を適応しているが、このような考え方が適応できないサンプルが存在することは容易に考えられる。例えば、転写因子の発現量は組織間で異なるので、組織間で転写因子の結合部位と結合量を比較することはできない。そこで、サンプル間比較を行う方法として、酵母由来のゲノム DNA にペプチドを融合させた内部標準 DNA の有用性を比較した。

B. 研究方法

【酵母 DNA 配列の選択】 内部標準用の核酸として出芽酵母のゲノム DNA 配列から、哺乳類ゲノム DNA と相同性が無く、これまで知られている遺伝

子制御配列ではないものを 4 種類選択した。

【内部標準用 DNA とタンパク質の融合】 酵母ゲノム DNA をテンプレートとし、上記で選択した酵母 DNA を PCR で増幅する。その際に、プライマーとして、5' 末端がビオチン化された DNA を用いることで、ビオチン化修飾された DNA 断片を得た。一方ヒストン H3 の N 末端側 40 アミノ酸をコードする DNA 配列をアビジン融合タンパク質発現ベクターにクローニングし、アビジン融合ヒストン H3 ペプチドを得た。これを基質として試験管内でメチル化し、アビジン融合メチル化ヒストン H3 を作製、ビオチン化修飾された DNA 断片と混和し、メチル化ヒストン H3 融合内部標準 DNA (以後 内部標準 DNA) を得た。

【クロマチン免疫沈降と定量的 PCR】 クロマチン免疫沈降 (ChIP) および定量的 PCR (qPCR) は、定法に従って行った。

C. 研究結果

【酵母 DNA 配列の選択】 4 種類の塩基配列について、PCR 増幅とタンパク質との融合反応を行ったが、そのうち最も効率よく融合タンパク質が取得されたものをその後の研究に用いた。

【酵母 DNA 定量測定法】 酵母 DNA をクローニングしているプラスミドを標準品として、定量的 PCR で検量線を作製した。qPCR によって $1\text{ng}/\mu\text{l}$

から 10×10^{-8} ng/ μ l の範囲で、濃度を決定できることが判明した。この範囲では、非特異的なゲノム DNA (ヒトゲノム DNA) が混在していても定量性に影響を与えないことも確認された。そこで、内部標準 DNA をヒトゲノム存在中で濃度決定を行い、検量線内で、再現性を持って濃度を測定できることを確認した。

【酵母 DNA 添加が ChIP に与える影響】 ヒトゲノム DNA に一定量の内部標準 DNA を添加し、ChIP を行った。免疫沈降物中の DNA 量は、Qubit (ライフテクノロジー社製) で測定した。すでに報告されている情報を根拠にメチル化ヒストン H3 が存在しているゲノム、非存在ゲノム部位を ChIP-qPCR で決定した。%input をメチル化ヒストン H3 がゲノム上に存在する量と考えた。内部標準 DNA 添加の有無によって、%input に変化は見られず、内部標準 DNA を ChIP に添加しても ChIP-qPCR への影響は与えないことが判明した。ついで、添加する内部標準 DNA 量を希釈し、ChIP される DNA 量を検討したところ、ChIP される DNA 量は、添加した内部標準 DNA に正に相関していた。

D. 考察

ChIP seq の開発によって、DNA 結合タンパク質の核内での結合領域を網羅的に描出することができることから、転写因子の結合領域やヒストンの修飾状態を全ゲノムレベルで知ることが可能となった。しかしながら次世代シーケンサーによる配列決定が超並列シーケンスに依っていることから、同一ゲノム上で結合部位の有無や結合量の多寡を調べるのには適している一方で、異なるサンプル間での比較は困難である。

これまでこの問題については、情報処理によって解決しようという試みが多数なされていたが、今回のわれわれの試みはサンプル処理段階でそれを行うことを目指しており、大きな期待がかかっている。昨年末に、ショウジョウバエのゲノムを添加し、これを内部標準として用いる方法が発表された。この方法は、全く我々と同じコンセプトを用いており、我々の試みが機能することを強

く示唆するものである。このショウジョウバエのゲノムを用いた研究では、注目するタンパク質がショウジョウバエでも保存されていることが条件となる。今回我々が試みているメチル化ヒストンは、ショウジョウバエにも存在するので、ショウジョウバエゲノムを内部標準として用いることは妥当だと考えられるが、ショウジョウバエに存在しない転写因子やクロマチンリモデリング因子などについては、適応はできない。そのような意味で本研究は非常に汎用性がある方法であると考えられる。

E. 結論

ChIP seq におけるサンプル間比較を行うために、タンパク質融合 DNA を内部標準として用いる可能性について検討した。この内部標準は ChIP-qPCR などに影響を与えないので、ChIP-seq でのサンプル間比較に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia. *Ann Hematol* 93, 1515-1522 (2014).

2) Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai M. M, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PLoS One* 9, e98521 (2014).

3) 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* 24, 1068-1072 (2014).

4) Nakagawa T, Lv L, Nakagawa M, Yu Y, Yu C, D'Alessio A. C, Nakayama K, Fan H. Y, Chen X, Xiong Y. CRL4(VprBP) E3 Ligase Promotes Monoubiquitylation and Chromatin Binding of TET Dioxygenases. *Mol Cell* 57, 247-260 (2015).

2. 学会発表

1) 中山啓子. H3K27 メチル化に先立って転写は抑制される. 新学術領域研究 細胞運命制御 第 5 回領域会議 (東京, 2014)

2) 中山啓子. がん遺伝子による転写変化とエピゲノム変化. 第 23 回長崎障害者支援再生医療研究会 (長崎, 2014)

3) 福本恵美子, Kundu, Lena Rani, 佐藤聡一郎, 細金正樹, 中山啓子. マウス ES 細胞における geminin の細胞周期と分化に対する制御. 第 37 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2014)

4) 細金正樹, 舟山亮, 城田松之, 中山啓子. H3K27me3 修飾パターン形成過程の時系列解析. 第 37 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2014)

5) 久志瞭, 中川直, 中野星児, 遠藤尚博, 中山啓子. 精子形成における E3 ユビキチンリガーゼ β -TrCP の新規基質の同定と解析. 第 37 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2014)

6) Nakagawa T, Nakayama K. TFIID complex changes accompany epithelial-mesenchymal transition (EMT). 第 37 回日本分子生物学会年会 (横浜, 2014)

H. 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

分担研究課題

神経変性疾患・遺伝性筋疾患の遺伝子解析

研究分担者 青木 正志

（東北大学 大学院医学系研究科 神経内科 教授）

研究要旨

当科では、1995年より三好型遠位型ミオパチーもしくは肢帯型筋ジストロフィー（LGMD2B）の疑われる患者に対する *dysferlin* 遺伝子の変異スクリーニングをSSCP法により行ってきたが、発端者169例の約40%で診断が未確定である。今年度の目的は、ターゲットリシーケンス解析により、これら未診断例における診断率の改善を得ることである。従来の解析方法で検出できていなかった *dysferlin* 遺伝子の変異の検出や、遠位型ミオパチーと類似の臨床・病理像をとる、他の筋関連遺伝子での変異が検出されてきている。

研究協力者

高橋 俊明 2)、鈴木 直輝 1)、井泉 瑠美子 1)、加藤 昌昭 1)、豎山 真規 1)、割田 仁 1)、島倉 奈緒子 1)、安藤 里紗 1)、舟山 亮 3)、長嶋 剛史 3)、中山 啓子 3)、新堀 哲也 4)、青木 洋子 4)

- 1) 東北大学医学系研究科 神経内科学分野
- 2) 仙台西多賀病院 神経内科
- 3) 東北大学医学系研究科 細胞増殖制御分野
- 4) 東北大学医学系研究科 遺伝病学分野

A. 研究目的

三好型遠位型ミオパチーもしくは肢帯型筋ジストロフィー（LGMD2B）の原因遺伝子として *dysferlin* の異常が知られている。今回は *dysferlin* 遺伝子異常を伴う筋疾患（Dysferlinopathy）および関連疾患の診断能力向上をめざして次世代シーケンサーを用いてターゲットリシーケンス解析を行う。解析対象としては、*dysferlin* を含む既知の筋疾患関連遺伝子である 44 遺伝子の検索を行う。また、診断例での臨床的特徴について考察する。

B. 研究方法

次世代シーケンサーを用いてターゲットリシーケンス解析を行う。解析対象としては、既知の筋疾患関連遺伝子である 44 遺伝子の検索を行う（H25年2月時点）。

（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、最初に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、承認を得ている。

C. 研究結果

現在までに、20例のターゲットリシーケンス解析を行った。12サンプル毎のターゲットリシーケンス解析を行った結果、解析対象とした全標的領域の約90%以上が、目標としている最低Depth 30以上でカバーされた。

SSCP法で片アレルにのみ *dysferlin* の病的変異を検出していた9例中、6例に病因となりうるホモ接合もしくは複合ヘテロ接合の *dysferlin* 遺伝子変異を検出した。全く *dysferlin* に変異を検出していなかった11例では、*dysferlin* には病的変異を認めなかったものの、3例でその他の筋疾

患遺伝子に原因の可能性のある変異を検出した。

c. 2997G>T (p. W999C)変異が日本人で最も高頻度に見出された (24.2%)。この変異は肢体型に多く、発症が比較的遅く、つま先立ちが保たれることも見出した。

D. 考察

既に解析した症例で、従来の解析方法で検出できていなかった *dysferlin* 遺伝子の変異の検出や、遠位型ミオパチーと類似の臨床・病理像をとる、他の筋関連遺伝子での変異が検出されてきている。今後、サンガー法に相当する結果を得るためにサンプル当たりどの程度のデータを得る必要があるかについては検討が必要である。また、変異の病的意義を考える上では、解析症例の蓄積やデータベース化も重要である。

なお別コホートの症例のエクソーム解析で *titin* 変異を検出し報告しており (文献 3)、今後変異未同定例に対して検討していきたい。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンス解析が筋疾患網羅的スクリーニングとして有用である。今後診断率の向上をめざし、実用的で有用な診断システムとなるよう検討を行う。また、病因変異が同定されなかった症例では新規原因遺伝子同定を目指しエクソーム解析を行う。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 参考論文

1) Takahashi T, et al. Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype. *Neurology* 2003, 60:1799-804.

2) Takahashi T, et al. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:433-40, 2013.

3) Izumi R, et al. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet* 58:259-66, 2013.

2. 発表論文

4) 高橋俊明ら. 舞踏運動を呈した *dysferlin* 異常症の1例. *JMDD* 24: 51-54, 2014

5) Izumi R, et al. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord.* 24:1068-72, 2014

H. 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

分担研究課題

遺伝子解析ネットワーク体制とデータベースの構築

研究分担者 梅澤明弘（副所長）

研究要旨

様々な疾患の解析に利用可能な高精度のリファレンスデータ（標準ゲノム情報）の提供を実現化に必要な要素技術、モデルケースの提示を行った。

A. 研究目的

小児科領域に於ける疾患に関する情報共有に努め、大量の配列解析、バイオインフォマティクス、臨床情報を統合したデータベースを活用し、新たな病因・病態を同定する。これらの成果は、ナショナルセンターバイオバンクプロジェクトと連携し、日本人患者の遺伝子診断精度を高めるための疾患変異データベースを構築のためのモデルを提示する。

B. 研究方法

現在我が国で行われているリファレンスデータの提示に関して行われている様々な研究方法、解析手法を精査し、モデルとなりうるデータ、解析手法、データベース構造等のシステム構築に必要なパラメータを抽出する。

（倫理面への配慮）

本分担課題は実際にヒト試料や動物を取り扱うものではないため、倫理的な取り組みは必要ないと判断した。

C. 研究結果

ゲノム配列データベースに関してのモデルとして、必要な要素について精査した。例えば、これまでに確立したミトコンドリア DNA を指標とする一分子シーケンス解析法を応用して、各種培養条件の与える遺伝的安定性への影響を評価に関するデータベースの構築では、造腫瘍性につながる変化として、各種がん細胞株での遺伝子コピ

ー数変化の情報の比較検討を行うとともに、データの信頼性に関する評価基準の作成を要素としたデータベース構造を有していた。

D. 考察

次世代シーケンス解析の生データから、既存のリファレンス配列（白人由来）へのゲノムアラインメントで漏れた情報の解析手法の開発し、同時に、遺伝学的に日本人由来と推定されるゲノムについて、次世代シーケンサーを用いて全配列決定を行い、日本人のためのリファレンス配列の確立に関してのパイロットデータベースについても考慮した。

E. 結論

本研究において、遺伝子解析情報と臨床情報を有機的に関連付け、バイオリソースとしてより一層の付加価値を生み出す大規模高機能データベースの構築は大変重要であり、すでに先行しているナショナルセンターバイオバンクプロジェクトとも連携し、効率的にデータを蓄積する体制、公開する体制のモデルを提示することで、エンドユーザーの視点からは、わかりやすい遺伝子解析結果レポートシステムや遺伝カウンセリング等の倫理面を含めた支援体制を構築する基盤を確立することが可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費(難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))分担研究報告書

分担研究課題 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
研究分担者 秦健一郎(国立成育医療研究センター 周産期病態研究部部长)

研究要旨

染色体異常等をはじめとするヒトゲノムの量的異常が、不妊・不育・先天異常等の生殖発生の問題にかかわることは広く知られている。すでにヒトゲノムには、従来の細胞生物学的な手法で検出が困難な小さなサイズの欠失、重複といったコピー数多型(CNV: Copy Number Variations)が多数見つかった。疾患群で検出される CNV の病的意義を確定するには、適切なコントロール集団と比較検証することが極めて重要である。しかし、女性の妊娠分娩歴を考慮したゲノムリソースはこれまで報告されていない。本研究では、妊娠分娩経過に特に異常を認めなかった日本人女性の CNV を明らかにし、生殖発生に重篤な影響を与えないと推測される遺伝的多様性標準データの構築をめざした。また、生殖・発生異常や先天奇形症候群など、成育疾患との様々な関連が知られているエピゲノム解析の技術開発と解析体制の整備を行った。

A. 研究目的

疾患のゲノム解析には、適切なコントロール集団のリファレンス配列が必須である。成育疾患の一翼を占める異常妊娠の解析には、「妊娠分娩歴に特段の異常を認めなかった日本人経産婦」のリファレンス情報が必須であるが、妊娠分娩歴までを網羅したリファレンスゲノム情報やバイオリソースは存在しない。そこで本研究では、異常妊娠の解析に加え、日本人正常妊婦のリファレンスデータの整備を目的とした。また、次世代シーケンサーを駆使したエピゲノム解析手法を開発し、本研究班での解析に供する準備を進めた。

B. 研究方法

1. 臨床検体の収集

妊娠分娩歴に特段の異常を有しない正期産妊婦から、分娩後に臍帯血と母体血を、全国の研究協力機関 20 箇所から収集した。これらの検体と臨床情報は、独自のネットワークデータベースで管理した。検体の管理は、ナショナルセンターバイオバンク事業の一環として行った。

2. 網羅的一塩基多型情報を利用したコピー数解析

妊娠・分娩経過と出生児に特段の異常を認めなかった経産婦 411 人から DNA を収集し、2,378,855 の SNP の遺伝子型を解析できる Illumina HumanOmni 2.5-8 アレイを用いてデータを集積した。

より確からしい CNV を検出するために、各プローブのシグナル強度から、2つのアルゴリズムを用いて、CNV 検出を行い、一致して確認された CNV を収集した

3. エピゲノム解析系の構築

①PBAT (post-bisulfite adaptor tagging) ライブラリー

全ゲノムを対象とした DNA メチル化解析法の一つである。バイサルファイト変換反応後にアダプターを付加するため、DNA の損失が少なく、少量のゲノム DNA で解析可能なのが PBAT 法の特徴である。100 ng(2 万個程度の細胞に相当)のゲノム DNA を用いれば、PCR 増幅無しで十分量のライブラリーを得ることが可能であった。

②RRBS ライブラリー

Reduced Representation Bisulfite Sequencing は DNA メチル化解析手法の一つであり、制限酵素

MspI (認識配列 CCGG) 処理により CpG-rich 領域を濃縮した断片化 DNA にアダプター付加、bisulfite 処理、PCR 増幅を施しシーケンスすることで、全ゲノム bisulfite sequencing に比べてより少量のデータでのゲノムワイド DNA メチル化解析が可能である。プロトコールは Boyle et al (Genome Biology 2012) の gel-free 法を採用した。

③ChIP-seq ライブラリー

代表的なヒストン修飾 6 種類 (H3K4me3, H3K27ac, H3K4me1, H3K36me3, H3K27me3, H3K9me3) についてクロマチン免疫沈降を行い Chromatin immuno-precipitation (ChIP) DNA を得た。各ヒストン修飾について免疫沈降の効率と特異性を定量 PCR により評価するための PCR プライマーを設定した。この定量 PCR の結果が良好なサンプルについて、NEBNext ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina を用いてライブラリーを作製した。ChIP-seq ライブラリーに >1kb 以上のインサートが高率に含まれると HiSeq/MiSeq でのシーケンス成功率が極端に低下するため、そのようなライブラリーについては、DNA 断片ゲル抽出装置ピピンプレップによるサイズセレクションを行った上で、シーケンシングを行った。NEBNext ChIP-Seq Library Prep kit (NEB) のプロトコールでは、10 ng の免疫沈降 DNA を出発材料として、x18 サイクルの PCR 増幅を経てライブラリーを作成するよう推奨されているが、10 ng の免疫沈降 DNA を使用した場合は x6 PCR サイクルで十分であること、0.1 ng の免疫沈降 DNA を使用した場合でも x13 PCR サイクルで十分量のライブラリーが得られた。

C. 研究結果

網羅的一塩基多型情報を用いた多型解析

411 人の検体に 6871 か所の CNV (平均 16.7CNV/人) が検出された。この 6871CNV は、588 領域のコピー数減少と 455 領域のコピー数増加を構成しており、図 1 に示す 1043 領域にまとめることができる。

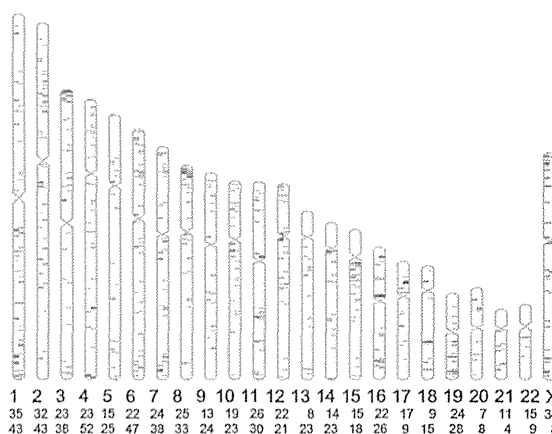


図 1: 観察された 1,043 CNV 領域の分布
青はコピー数増大、赤はコピー数減少を示す

この総領域は、およそ 164Mb (ヒトゲノムの 0.5%) をカバーした。

コピー数減少、とくに検体中にホモ欠失の存在を確認した 15 領域には表 1 に示す遺伝子が存在する。

Coordination	Frequency	Suffered gene		
chr1:161570803-161644281	2/411	<i>FCGR3B</i>	<i>FCGR2B</i>	
chr2:111884593-111886246	3/411	<i>BCL2L11</i>		
chr4:69367146-69489473	302/411	<i>UGT2B17</i>		
chr5:180377470-180424820	32/411	<i>BTNL3</i>		
chr6:32551892-32555728	2/411	<i>HLA-DRA1</i>		
chr7:115584568-115593688	1/411	<i>TVEC</i>		
chr7:141761027-141795404	6/411	<i>MGAM</i>		
chr11:18949220-18961743	1/411	<i>MGRPRX1</i>		
chr19:41350895-41379321	10/411	<i>CYP2A6</i>		
chr19:43590229-43772302	86/411	<i>PSG5</i>	<i>PSG4</i>	<i>PSG9</i>
chr19:46622776-46636139	3/411	<i>JGFL3</i>		
chr19:52132392-52150801	114/411	<i>SICLEC5</i>		

表 1: ホモ欠失が観察された 15 領域に存在する遺伝子

第 1 番染色体の *FCGR3B*, *FCGR2B*, 4 番染色体の *UGT2B17*, 19 番染色体の *CYP2A6* 遺伝子は、疾患感受性について議論のある遺伝子であるが、すでにアジア人で高頻度に欠失が存在することが報告されている遺伝子である (※)。本研究で観察された欠失が実際に存在する傍証と考えられた。

エピゲノム解析系の構築

①DNA メチル化解析

Bisulfite 配列のマッピング (二次解析) には bismark (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/>) を採用した。Cutadapt と bismark の package である "trim galore!" を改変し、bedgraph 形式でデータを可視化する工程 (図 1) までをパイプライン化した。データ評価、サンプル間比較な

どの三次解析には MethylKit (<https://code.google.com/p/methylkit/>) を採用した。

②ChIP-Seq データ解析

特定の DNA 結合タンパクのゲノム標的部位の同定や、ヒストン修飾のゲノムワイド解析を目的に、ChIP-Seq データ解析系を構築した。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)、BWA によるリフェ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、igvtools による tdf ファイル作出までをパイプライン化し、データ可視化(図 2)と PCR duplicate 率の評価を簡便に行える体制を整えた。

D. 考察

検出された CNV のシグナル・データを詳細に検討した。

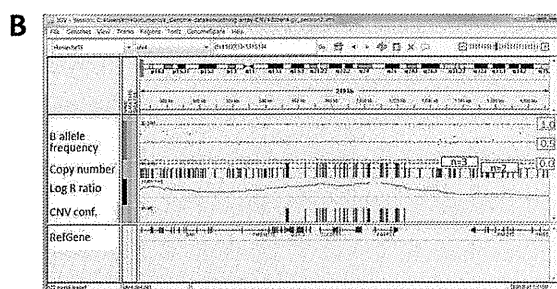
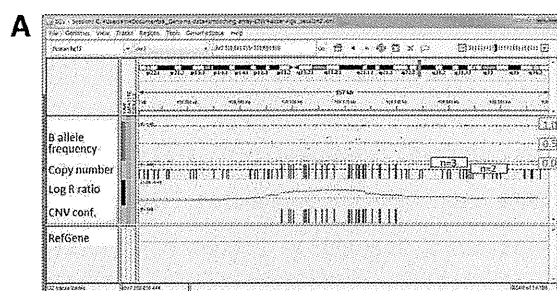


図2: 検出されるコピー数増幅の例

図では、プローブ部位の遺伝子型を A もしくは B と規定し、AA ホモを 0.0、AB ヘテロを 0.5、BB ホモを 1.0 と B アレル頻度として表し、さらに SNP プローブの部位のコピー数を反映するシグナル強度を Log R ratio として示している。典型的なコピー数の増大領域は、図2A に示すように、B アレルの頻度は4グループ

に分散し、Log R ratio が増加することが多い。しかし、コピー数増幅を推定される領域には、図2B に示す B アレル頻度が AAA、BBB の2グループとしか表現されず、Log R ratio の変動のみで検出された CNV 候補領域が含まれている。

図2B のような CNV を収集し検討すると、この例にも示されるようにテロメア近傍に存在することが比較的多く、CNV 領域の GC 含量が高めであることが多い。現在、このような CNV の真偽についてデータを収集中である。

しかしながら、本発表に示す CNV 領域は、同様の SNP アレイを用い同じアルゴリズムで検討すれば、正常コントロールであっても検出される領域であり疾患感受性とかかわらないと推定され、その有用性はかわらない

E. 結論

成育疾患、特に産科異常を伴う症例の解析にも利用可能な、「日本人正常妊婦標準ゲノム情報」を確立した。新規に見出したCNV、あるいは欠失領域に含まれる複数の遺伝子は、すくなくとも日本人集団において、生殖・発生・先天奇形症候群等に強い関連のない領域や遺伝子と考えられた。

また、生殖や発生と深くかかわるエピジェネティックな修飾状態を網羅的に検索する手法を確立した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Takimoto T, Takada H, Ishimura M, Kirino M, Hata K, Ohara O, Morio T, Hara T :
Wiskott-Aldrich Syndrome in a Girl Caused by Heterozygous WASP Mutation and Extremely Skewed X-Chromosome Inactivation: A Novel Association with Maternal Uniparental Isodisomy 6. Neonatology. 2015;107:185-190

- 2). Miyata K, Miyata T, Nakabayashi K, Okamura K, Naito M, Kawai T, Takada S, Kato K, Miyamoto S, Hata K, Asahara H : DNA methylation analysis of human myoblasts during in vitro myogenic differentiation: de novo methylation of promoters of muscle-related genes and its involvement in transcriptional down-regulation. *Hum Mol Genet.* 2015;24:410-423
- 3). Takenouchi T, Kosaki R, Nakabayashi K, Hata K, Takahashi T, Kosaki K : Paramagnetic Signals in the Globus Pallidus as Late Radiographic Sign of Juvenile-Onset GM1 Gangliosidosis. *Pediatr Neurol.* 2014;14:613-614
- 4). Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A : The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun.* 2014;5:5464
- 5). Hayashi K, Kawai YL, Yura K, Yoshida MA, Ogura A, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K : Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the sparkling enope squid, *Watasenia scintillans*. *Mitochondrial DNA.* 2014 (in press)
- 6). Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Ogata T, Yoshimura Y, Fukami M : Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 2014;102:1130-1136
- 7). Sakashita A, Kobayashi H, Wakai T, Sotomaru Y, Hata K, Kono T : Dynamics of genomic 5-hydroxymethylcytosine during mouse oocyte growth. *Genes Cells.* 2014;19:629-636
- 8). Kao TH, Liao HF, Wolf D, Tai KY, Chuang CY, Lee HS, Kuo HC, Hata K, Zhang X, Cheng X, Goff SP, Ooi SK, Bestor TH, Lin SP : Ectopic DNMT3L Triggers Assembly of a Repressive Complex for Retroviral Silencing in Somatic Cells. *J Virol.* 2014;88:10680-10695
- 9). Liao HF, Chen WS, Chen YH, Kao TH, Tseng YT, Lee CY, Chiu YC, Lee PL, Lin QJ, Ching YH, Hata K, Cheng WT, Tsai MH, Sasaki H, Ho HN, Wu SC, Huang YH, Yen P, Lin SP : DNMT3L promotes quiescence in postnatal spermatogonial progenitor cells. *Development.* 2014;141:2402-2413
- 10). Lee SM, Lee YG, Bae JB, Choi JK, Tayama C, Hata K, Yun Y, Seong JK, Kim YJ : HBx induces hypomethylation of distal intragenic CpG islands required for active expression of developmental regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:9555-9560
- 11). Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T : Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun.* 2014;5:4320
- 12). Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A : Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep.* 2014;4:5421
- 13). 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 to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med.* 2014;16:903-912

- 14). Migita O, Maehara K, Kamura H, Miyakoshi K, Tanaka M, Morokuma S, Fukushima K, Shimamoto T, Saito S, Sago H, Nishihama K, Abe K, Nakabayashi K, Umezawa A, Okamura K, Hata K : Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women. *J. Hum. Genet.* 2014;59:326-331
- 15). Kobayashi K, Mitsui K, Ichikawa H, Nakabayashi K, Matsuoka M, Kojima Y, Takahashi H, Iijima K, Ootsubo K, Oboki K, Okita H, Yasuda K, Sakamoto H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Ohara A : ATF7IP as a novel PDGFRB fusion partner in acute lymphoblastic leukaemia in children. *Br J Haematol.* 2014;165:836-841
- 16). Romanelli V, Nakabayashi K, Vizoso M, Moran S, Iglesias-Platas I, Sugahara N, Simón C, Hata K, Esteller M, Court F, Monk D : Variable maternal methylation overlapping the nc886/vtRNA2-1 locus is locked between hypermethylated repeats and is frequently altered in cancer. *Epigenetics.* 2014;9:783-790
- 17). Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K : Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. *Am J Med Genet A.* 2014;164:993-7
- 18). Kawai YL, Yura K, Shindo M, Kusakabe R, Hayashi K, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K : Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the river lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Mitochondrial DNA.* 2014 (in press)
- 19). Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Vicente Sanchez-Mut J, 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.* 2014;24:554-569
- 20). Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Umezawa A, Yamada G, Ogata T, Fukami M : De novo Frameshift Mutation in Fibroblast Growth Factor 8 in a Male Patient with Gonadotropin Deficiency. *Horm Res Paediatr.* 2014;81:139-144
- 21). Masuzawa A, Kiyotani C, Osumi T, Shioda Y, Iijima K, Tomita O, Nakabayashi K, Oboki K, Yasuda K, Sakamoto H, Ichikawa H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Mori T : Poor responses to tyrosine kinase inhibitors in a child with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with SNX2-ABL1 chimeric transcript. *Eur J Haematol,* 2014;92:263-267
- 22). 谷垣伸治, 田中啓, 片山素子, 宮崎典子, 松島実穂, 秦健一郎, 岩下光利 : 助産師の行う超音波検査. *日本周産期・新生児医学会雑誌*
2. 学会発表
(招待講演)
- 1). 秦健一郎: 「生殖と発生のジェネティクス・エピジェネティクス」 北里大学理学部特別講義, 相模原, 2014.12.5
- 2). 秦健一郎: 胎児・胎盤発生異常のジェネティクスとエピジェネティクス, 第10回北関東遺伝診療フォーラム, おおみや, 2014.11.27
- 3). 秦健一郎: 2S3 Prenatal and preimplantation genetic approaches — near future technologies and application. 日本人類遺伝学会第59回大会 日本遺伝子診療学会第21回大会, 東京, 2014.11.21
- 4). 秦健一郎: 胎児と胎盤発生異常のエピジェネティクス, 第37回日本母体胎児医学会学術集会/第17回胎児遺伝子診断研究会/第4回日台韓母体胎児シンポジウム, 佐世保, 2014.11.7

- 5). 秦健一郎: 次世代シーケンサーを用いた臨床研究への応用, イルミナセミナー2014 クリニカルシーケンスの最前線, 東京, 2014.10.15
 - 6). 秦健一郎: 「子宮内胎児発育不全とエピジェネティクス」第21回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会, 宮崎, 2014.9.13
 - 7). 秦健一郎: 胎盤における環境エピゲノム変化とその医療活用. 第3回日本 DOHaD 研究会学術集会, 東京, 2014.7.26
 - 8). 秦健一郎: 「次世代シーケンサーの日常診療への応用～環境は遺伝するか? 新型出生前診断の次は?」第13回別府遺伝医学セミナー, 別府, 2014.6.4
 - 9). 秦健一郎: 生殖・周産期のエピジェネティクス. 第87回日本内分泌学会学術総会, 福岡, 2014.4.27
 - 10). 秦健一郎: 胎児発育異常のゲノム・エピゲノムの解析. 群馬大学生体調節研究所, 前橋, 2014.3.7
 - 11). 秦健一郎: 「環境は遺伝する? ～周産期医療にかかわるジェネティクスとエピジェネティクス～」, 第7回福岡胎児医療フォーラム, 福岡, 2014.1.31
- (一般演題)
- 1). 榎みずほ, 海老原 侑子, 岡村 浩司, 中林一彦, 秦 健一郎, 小林 芳郎, 前原 佳代子: ヒト老化細胞を利用したエピゲノム解析. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.27
 - 2). 中村和昭, 中林一彦, Kyaw Htet Aung, 秦健一郎, 田上昭人: DNA メチル化阻害剤ゼブラリンのヒト胆管癌細胞に対する抗腫瘍活性. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.27
 - 3). 森田純代, 中林一彦, 河合智子, 林恵子, 堀居拓郎, 木村美香, 荒井勇二, 亀井康富, 小川佳宏, 秦健一郎, 畑田出穂: 父性遺伝する食事誘導性肥満の解析. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.27
 - 4). 田山 千春, 高梨(矢延) 理絵子, 富川 順子, 大喜多 肇, 秦 健一郎, 岡村 匡史, 中林 一彦: 転写因子KLF14の白色脂肪組織における炎症制御への関与. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.25
 - 5). 林 恵子, 秦 健一郎, 中林 一彦, 岡村 浩司: 塩基配列伸長アセンブラの開発およびマウス3系統のミトコンドリアゲノム配列の完全決定. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.25
 - 6). 岡村 浩司, 河合 利尚, 林 恵子, 秦 健一郎, 小野寺 雅史, 中林 一彦: 遺伝子治療のための迅速で網羅的な染色体挿入部位同定法の開発. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.25
 - 7). 鈴木 江莉奈, 泉 陽子, 神崎 晋, ハツ賀 秀一, 金城 さおり, 五十嵐 麻希, 中林 一彦, 梅澤明弘, 秦 健一郎, 緒方 勤, 深見 真紀: 疾患遺伝子パネルを用いた低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の遺伝子診断. 日本人類遺伝学会 第59回大会・日本遺伝子診療学会 第21回大会, 東京, 2014.11.22
 - 8). 佐々木 かりん, 安部 晃生, 橋本 和法, 松井英雄, 中林 一彦, 秦 健一郎: 混在した網羅的一塩基多型シグナルから目的とする個体のゲノム情報を抽出して染色体構造を推定する手法の確立. 日本人類遺伝学会 第59回大会・日本遺伝子診療学会 第21回大会, 東京, 2014.11.22
 - 9). 副島 英伸, 畑田 出穂, 中林 一彦, 秦 健一郎, 青木 茂久, 関 博之, 竹田 省, 城 圭一郎: Small for gestational age (SGA)胎盤のゲノムワイド DNA メチル化解析. 日本人類遺伝学会 第59回大会・日本遺伝子診療学会 第21回大会, 東京, 2014.11.21
 - 10). 中林 一彦, 河合 智子, 安部 晃生, 嘉村 浩美, 山田 崇弘, 赤石 理奈, 水上 尚典, 秦 健一郎: 妊娠中の体重増加量と胎盤エピゲノム変化. 日本人類遺伝学会 第59回大会・日本

- 遺伝子診療学会 第 21 回大会, 東京, 2014.11.21
- 11). 松原 圭子, 伊藤 順庸, 榎本 啓典, 中林 一彦, 佐野 伸一郎, 中村 明枝, 秦 健一郎, 緒方 勤, 深見 真紀, 斎藤 伸治, 鏡 雅代: PWS/AS 責任領域の非典型的な欠失を有する症例に対する網羅的メチル解析. 日本人類遺伝学会 第 59 回大会・日本遺伝子診療学会 第 21 回大会, 東京, 2014.11.20
 - 12). 鏡 雅代, 松原 圭子, 中林 一彦, 秦 健一郎, 嘉村 浩美, 中村 明枝, 緒方 勤, 深見 真紀: 14 番染色体インプリンティング異常症 20 例に対する網羅的な DMR メチル化状態の検討. 日本人類遺伝学会 第 59 回大会・日本遺伝子診療学会 第 21 回大会, 東京, 2014.11.20
 - 13). 谷垣 伸治, 右田 王介, 岡村 浩司, 秦 ひろか, 漆山 大知, 佐々木 かりん, 中林 一彦, 左合 治彦, 秦 健一郎: 原因不明胎児異常例におけるエクソーム解析の可能性. 日本人類遺伝学会 第 59 回大会・日本遺伝子診療学会 第 21 回大会, 東京, 2014.11.20
 - 14). Migita O, Maehara K, Nakabayashi K, Okamura K, Hata K: Copy number variants identified in Japanese women. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, U. S. 2014.10.20
 - 15). 碓井宏和, 瞿佳, 中林一彦, 前原佳代子, 秦健一郎, 生水真紀夫: 雄核発生奇胎の SNP アレイによる診断について. 絨毛性疾患研究会, 京都, 2014.10.3
 - 16). 谷垣伸治, 右田王介, 秦ひろか, 漆山大知, 佐々木かりん, 岩下光利, 秦健一郎: 先天異常例の網羅的遺伝子解析の課題—日本人正常集団の標準遺伝配列情報の必要性. 第 50 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 東京, 2013.7.14
 - 17). 河合智子, 安部晃生, 嘉村浩美, 山田崇弘, 赤石理奈, 水上尚典, 中林一彦, 秦健一郎: 妊婦の妊娠期体重増加量と胎盤エピゲノム変化. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2014.5.27
 - 18). 森田純代, 中林一彦, 河合智子, 林恵子, 堀居拓郎, 木村美香, 荒井勇二, 亀井康富, 小川佳宏, 秦健一郎, 畑田出穂: インプリンティングと肥満遺伝子の関係について. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2014.5.27
 - 19). 富川順子, 前原一満, 岡村浩司, 林恵子, 阿久津英憲, 田中智, 大川恭行, 秦健一郎, 中林一彦: Hi-C 法による細胞種特異的なクロマチン高次構造解析. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2014.5.27
 - 20). 松原圭子, 伊藤順庸, 中林一彦, 佐野伸一郎, 中村明枝, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀, 斎藤伸治, 鏡雅代: 15 番染色体インプリンティング調節領域欠失症例の網羅的メチル化解析. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2014.5.26
 - 21). 前田寿幸, Rumbajan Janette Mareska, 東元健, 中林一彦, 八木ひとみ, 秦健一郎, 城圭一郎, 副島英伸: Beckwith-Wiedemann 症候群と肝芽腫における multiple methylation defect の解析. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2014.5.26
 - 22). 中林一彦, Court Franck, 田山千春, Romanelli Valeria, 副島英伸, 和氣徳夫, Esteller Manel, 緒方勤, 秦健一郎, Monk David: Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent control of imprinting in the placenta. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2014.5.26
 - 23). 増田彩子, 加藤聖子, 稲垣徹訓, 楠木絵司, 宮田知子, 竹田省, 秦健一郎: がん幹細胞形質獲得に関連するエピゲノム変化と遺伝子発現変化の統合解析. 日本産婦人科学会 第 66 回学術講演会, 東京, 2014.4.20
 - 24). 秦ひろか, 右田王介, 吉岡伸人, 森崇英, 鈴木直, 田中守, 秦健一郎: 網羅的一塩基多型情

報を利用した原因不明流産絨毛の染色体微細構造異常解析. 日本産婦人科学会 第 66 回学術講演会, 東京, 2014.4.19

- 25). 碓井宏和, 翟佳, 前原佳代子, 埜真輔, 山本憲子, 錦見恭子, 植原貴史, 楯真一, 三橋暁, 秦健一郎, 生水真紀夫: SNP アレイ解析による雄核発生ヘテロ奇胎発生機序の推定. 日本産婦人科学会 第 66 回学術講演会, 東京, 2014.4.20
- 26). 佐々木かりん, 高田史男, 右田王介, 橋本和法, 松井英雄, 秦健一郎: 複数ゲノム領域に DNA メチル化異常を認める胎児発育異常症例の遺伝学的病態背景の探索. 日本産婦人科学会 第 66 回学術講演会, 東京, 2014.4.18
- 27). 右田王介, 前原佳代子, 嶋本富博, 諸隈誠一, 福嶋恒太郎, 和氣徳夫, 宮越敬, 田中守, 齋藤滋, 左合治彦, 秦健一郎: 日本人正常分娩妊婦集団の遺伝的特徴～標準データとしての有用性と注意点～ 日本産婦人科学会 第 66 回学術講演会, 東京, 2014.4.18
- 28). 伊藤由紀, 前原佳代子, 兼城英輔, 宮田知子, 増田彩子, 右田王介, 岡本愛光, 中村仁美, 木村正, 和氣徳夫, 谷口武, 秦健一郎: 正常二倍体だが反復する胞状奇胎に観察される母由来アレルの DNA メチル化異常と NLRP7 遺伝子変異. 日本産婦人科学会 第 66 回学術講演会, 東京, 2014.4.18

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費(難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)))分担研究報告書

分担研究課題 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
研究分担者 深見真紀(国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部部長)

研究要旨

本研究期間内には、性分化疾患、小児内分泌疾患、先天奇形症候群を有する患者の臨床検体 632 を集積し、先行研究と合わせて 6,000 以上の検体を集積した。このうち 872 の遺伝子解析を行った。解析には、次世代シーケンサー、Multiplex ligation dependent probe amplification、Array-comparative genomic hybridization などを使用した。代表的成果として、ゴナドトロピン欠損症と非症候性尿道下裂における既知責任遺伝子変異およびゲノムコピー数異常の寄与の程度を明確とし、個々の遺伝子異常症の臨床的多様性を見出した。また、11β 水酸化酵素欠損症の新規発症機序の解明、分子遺伝学的情報に基づく女性化乳房症の治療法の提唱を行った。さらに、代表的疾患についての公的遺伝子検査支援体制モデル構築、日本人 POR 欠損症データの公開を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、性分化疾患、小児内分泌疾患、先天奇形症候群を有する患者の遺伝子解析を通じて、これらの疾患の発症機序解明と表現型決定因子同定を行い、新規遺伝子診断法の開発と新規治療法の開発につなげることである。本研究の臨床検体集積は厚生労働省難治性疾患克服研究事業研究班および関連学会と連携して行い、検体管理は成育バイオバンク事業と連携して行う。本研究では、疾患遺伝因子データベースを構築し、広く提供する。また、公的遺伝子検査支援体制モデルケースの運用を目指す。

B. 研究方法

1. 臨床検体の集積

厚生労働省難治性疾患克服研究事業研究班(「性分化・性成熟領域 38 疾患の診療ガイドライン作成に向けた遺伝子診断法の確立」研究代表者 深見真紀)および日本小児内分泌学会等と連携し、国内外の医療機関から検体および臨床情報を集積した。これらの検体と臨床情報は、独自のネットワークデータベースで管理した。検体の管理は、ナショナルセンターバイオバンク事業の一環として行った。

2. 遺伝子変異解析とコピー数解析

(1) 既知疾患責任遺伝子解析: 単一遺伝子疾患および oligogenic disorder について、全既知疾患責任遺伝子の変異スクリーニングを行った。多数の既知遺伝子が存在する疾患では、次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンス (Haloplex, Agilent Technologies) もしくはターゲットエンリッチメント (Sureselect, Agilent Technologies) による疾患遺伝子パネルを作成し、解析に使用した。さらに、遺伝子変異が同定された患者の臨床情報を解析し、表現型スペクトラム、遺伝子型-表現型関連の有無、表現型修飾因子を検討した。

(3) Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA): 性分化疾患患者、先天奇形症候群患者のうち、特定染色体座位のコピー数異常が疑われる症例に対し、MLPA 解析 (MRC Holland) を行った。

(4) Array-comparative genomic hybridization (aCGH) 原因不明の症例および上記 MLPA でこれまで報告のないコピー数異常が同定された患者を対象に、aCGH による全ゲノムコピー数解析 (Agilent Technologies) を行った。

3. 公的遺伝子検査支援体制モデル構築

遺伝子診断が診療に有用である疾患を対象として、効率的遺伝子診断システムの構築を行った。また、疾患遺伝子パネルや aCGH など個々の遺伝子検査のコストおよび解析結果報告書のフォーマットの検討

を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析:本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年)を遵守して施行した。国立成育医療研究センター倫理委員会において下記研究課題が承認されている。

1. 性分化疾患・性成熟疾患・生殖機能障害における遺伝的原因の探索(国立成育医療研究センター課題番号512)
2. 卵巣機能不全の分子基盤の探索(国立成育医療研究センター課題番号646)

患者情報登録:国立成育医療研究センター倫理委員会において承認されている。

小児内分泌疾患患者登録システムの確立と推進に関する研究(国立成育医療研究センター課題番号637)

組換えDNA実験:国立成育医療研究センター遺伝子組換え実験安全委員会の講習を受け、実験計画番号(06-7および07-7)で組換えDNA実験が承認されている。

C. 研究結果

1. 臨床検体の集積

本研究期間において、632 の検体および臨床情報を集積した。検体には、ゲノム DNA、mRNA、リンパ芽球様不死化細胞株、皮膚繊維芽細胞などが含まれる。先行研究「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業」で集積した検体と合わせて、6,000 以上の検体が集積された。これらの検体と臨床情報は、クローズドネットワークから成るシステムに登録した。

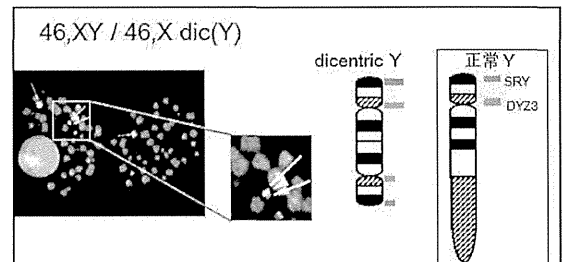
2. 遺伝子解析

本研究期間において、872 の遺伝子解析を行った。代表的な成果は下記のとおりである。

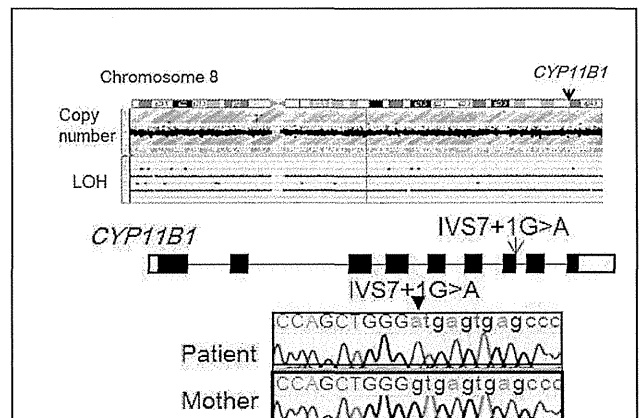
(i) ゴナドトロピン欠損症の遺伝子解析:ゴナドトロピン欠損症 58 例を対象として、全既知発症責任遺伝子 30 の網羅的シーケンスを行った。その結果、14 例において明らかな病的変異を同定した。まれな遺伝子変異として、単独ゴナドトロピン欠損を招く SOX3 ポリアラニン欠失、複合型下垂体機能低下症を招く

WDR11 スプライス変異が同定された。

(ii) 非症候性尿道下裂の遺伝子解析;62例を対象として、既知原因遺伝子変異解析およびコピー数解析を行った。その結果、9例に既知単一遺伝子変異もしくはモザイク染色体構造異常が存在することを見出した(下図)。陰茎部開口尿道下裂を呈する比較的軽度な症例においても、病的単一遺伝子変異が存在することが明らかとなった。また、既報の疾患関連多型は、日本人患者における尿道下裂発症リスクには関与しないことが見出された。

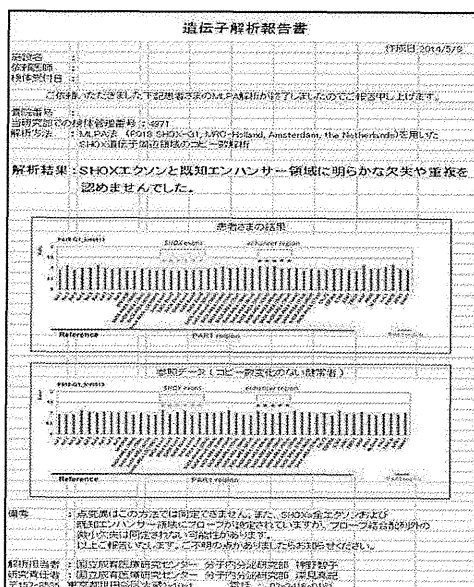


(iii) 11β 水酸化酵素欠損症の新規発症機序の解明:8 番染色体父性片親性アインダイソミーにより CYP11B1 遺伝子劣性変異が顕在化し、非保因者母の存在下において 11β 水酸化酵素欠損症が発症した症例を同定した。常染色体劣性疾患の発症機序のひとつとして、片親性アインダイソミーの可能性を考慮する必要性を明確とした(下図)。



(iv) 女性化乳房症の治療法の提唱:難治性希少疾患である女性化乳房症の原因にアロマターゼ過剰症とアンドロゲン受容体機能残存変異があることを明確とした。さらにこの分子基盤に基づいて、前者にはアロマターゼ阻害剤(アナストロゾール)、後者には選択的エストロゲン受容体モジュレーター(タモキシフェン)が有用であることを提唱した。

3. 公的遺伝子検査支援体制モデル構築:POR 欠損症、SHOX 異常症などの遺伝子診断を行った。また、SHOX 遺伝子解析結果フォーマットの作成を行った(下図)。



4. 成果の公開

日本人 POR 欠損症の変異パターン、表現型スペクトラム、遺伝子型表現型関連のデータをまとめ、ホームページ上で公開した。

D. 考察

(1) 既知発症責任遺伝子の網羅的変異解析とゲノムコピー数解析

本研究によって、ゴナドトロピン欠損症症例の中で既知遺伝子変異陽性例は 30%程度であり、未知の遺伝的要因もしくは環境要因の関与が大きいことが明確となった。今後、変異陰性患者のエクソーム解析などによって、新規発症機序が同定されると期待される。一方、変異陽性患者の臨床解析からは、SOX3 異常症や WDR11 異常症が従来想定されていたよりも幅広い臨床スペクトラムを有することが明確となった。また、非症候性尿道下裂患者の解析では、典型的多因子遺伝病である本症の 10%以上に単一遺伝子変異が存在することが見出された。このような原因遺伝子変異の同定は、個々の患者の予後予測、治療方針の決定、遺伝カウンセリングに役立つ。

(2) 公的遺伝子検査支援体制モデル構築と成果の公表

公的遺伝子検査のパイロットスタディとして、代表的疾患の遺伝子診断を開始した。遺伝子診断技術の提供は、医療レベルの向上につながる。本研究の成果は、先天性疾患の確実かつ継続的遺伝子検査に向けての基盤となる。さらに、日本人患者データベースの構築と情報公開は、日本人に適した診断法、治療法の開発に結びつくのみならず、国際研究に役立つと期待される。

E. 結論

性分化疾患、小児内分泌疾患、先天奇形症候群および非症候性尿道下裂発症における既知責任遺伝子変異の寄与の程度が明確となった。さらに個々の遺伝子異常症の臨床的多様性が見出された。今後、さらに多数の検体の遺伝子解析を行い、公的遺伝子検査支援体制モデル構築と成果の公表を推進する計画である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Abe Y, Nagasaki K, Watababe T, Abe T, Fukami M. Association between compound heterozygous mutations of SLC34A3 and hypercalciuria. *Horm Res Pediatr.* 82(1):65-71, 2014
- 2). Matsubara K, Kataoka N, Ogita S, Sano S, Ogata T, Fukami M, Katsumata N. Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a *CYP11B1* mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia: Implication for a rare etiology of an autosomal recessive disorder. *Endocr J.* 61(6):629-33, 2014
- 3). Suzuki J, Azuma N, Dateki S, Soneda S, Muroya K, Yamamoto Y, Saito R, Sano S, Nagai T, Wada H, Endo A, Urakami T, Ogata T, Fukami M. Mutation spectrum and phenotypic variation in nine patients with SOX2 abnormalities. *J Hum Genet.* 59(6):353-6, 2014

- 4). Inui M, Miyado M, Igarashi M, Tamano M, Kubo A, Yamashita S, Asahara H, Fukami M, Takada S. Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 4:5396, 2014
- 5). Seki A, Jinno T, Suzuki E, Takayama S, Ogata T, Fukami M. Skeletal deformity associated with *SHOX* deficiency. *Clin Pediatr Endocrinol.* 23(3):65-72, 2014
- 6). Shozu M, Fukami M, Ogata T. Understanding the pathological manifestations of aromatase excess syndrome: lessons for the clinic. *Exp Rev Endocrinol Metab.* 9(4):397-409, 2014
- 7). Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Ogata T, Nagasaki K, Fukami M. Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol.* 81(2):314-6, 2014
- 8). Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Ogata T, Yoshimura Y, Fukami M. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 102(4):1130-36, 2014
- 9). Nakashima S, Ohishi A, Takada F, Kawamura H, Igarashi M, Fukami M, Ogata T. Clinical and molecular studies in four patients with SRY-positive 46,XX testicular disorders of sex development: implications for variable sex development and genomic rearrangements. *J Hum Genet.* 59(10):549-53, 2014
- 10). Izumi Y, Musha I, Suzuki E, Iso M, Jinno T, Horikawa R, Amemiya S, Ogata T, Fukami M, Ohtake A. Hypogonadotropic hypogonadism in a female patient previously diagnosed as having Waardenburg syndrome due to a *SOX10* mutation. *Endocrine*, 2014
- 11). Nagata E, Hiroki Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura K-I, 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.* 9:125, 2014
- 12). Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, Nakabayashi K, Sano S, Fuke T, Fukami M, Ogata T. Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet*, 2014[Epub ahead of print]
- 13). Nakashima S, Kato F, Kosho T, Nagasaki K, Kikuchi T, Kagami M, Fukami M, Ogata T. Silver-Russell syndrome without body asymmetry in three patients with duplications of maternally derived chromosome 11p15 involving CDKN1C. *J Hum Genet*, 2014 in press
- 14). Yagi H, Takagi M, Kon M, Igarashi M, Fukami M, Hasegawa Y. Fertility preservation in a family with a novel NR5A1 mutation. *Endocr J*, 2014[Epub ahead of print]
- 15). Fukami M, Ogata T. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Pediatr Int.* 56(6):805-8, 2014
- 16). Saito K, Miyado M, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Katsumi M, Saito H, Kubota T, Okada H, Ogata T, Fukami M. Copy-Number Variations in Y Chromosomal Azoospermia Factor Regions Identified by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *J Hum Genet* 2015 in press