

- 3) Kurihara Y, Hayashi R, Watanabe E, Miyakawa S, Kajiwara K, Matsuda M, Yoshida K, Shimomura Y, Niizeki H: Novel *EDA* hemizygous frame-shift mutation c. 731delG (p.R244Qfs\*36) underlies hypohidrotic ectodermal dysplasia in a Japanese family. *J Dermatol*. 2014;41(12):1110-2.
- 4) Kubo A. Nagashima-type palmoplantar keratosis: a common Asian type caused by *SERPINB7* protease inhibitor deficiency. *J Invest Dermatol*. 2014;134(8) 2076-2079.
- 5) Nakazawa S, Niizeki H, Matsuda M, Nakabayashi K, Seki A, Mori T, Tokura Y: Involvement of prostaglandin E2 in the first Japanese case of pachydermoperiostosis with *HPGD* mutation and recalcitrant leg ulcer. *J Dermatol Sci*, in press
- 6) Masunaga T, Niizeki H, Yasuda F, Yoshida K, Amagai M, Ishiko A: Splicing abnormality of integrin  $\beta 4$  gene (*ITGB4*) due to nucleotide substitutions far from splice site underlies pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa syndrome, in press
2. 学会発表
- 1) Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsuhashi Y, Amagai M. Mutations in *SERPINB7*, encoding a serine protease inhibitor, cause Nagashima-type palmoplantar keratosis. 74th Annual Meeting Society for Investigative Dermatology, New Mexico, 2014.5.10
- 2) 久保亮治, 塩濱愛子, 佐々木貴史, 中林一彦, 奥山虎之, 小崎健次郎, 工藤純, 秦健一郎, 梅澤明弘, 戸倉新樹, 石河晃, 新関寛徳, 梶島健治, 三橋善比古, 天谷雅行. 長島型掌蹠角化症の原因遺伝子 *SERPINB7* の同定と患者 30 例の変異解析. 第 113 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2014.5.31
- 3) 熊谷宜子, 中村善雄, 佐々木貴史, 高橋勇人, 天谷雅行, 久保亮治. *KRT5* に新規遺伝子変異を認めた色素異常型単純型表皮水疱症の親子例. 第 854 回日本皮膚科学会東京支部地方会, 東京, 2014.6.21
- 4) 吉田和恵, 藤田秀樹, 久保田雅也, 下村裕, 新関寛徳: *PVRL1* 遺伝子変異を認めた cleft lip/palate-ectodermal dysplasia の一例, 第 38 回小児皮膚科学会, 東京, 2014.07.05.
- 5) 本多皓, 佐々木貴史, 中林一彦, 秦健一郎, 谷川瑛子, 久保亮治. 片側性に列序性表皮母斑と掌蹠角化を認めた Costello 症候群の体細胞モザイクの一例. 第 38 回日本小児皮膚科学会学術大会, 東京, 2014.7.5
- 6) **栗原佑一、渡邊絵美子、宮川俊一、梶原久美子、新関寛徳: 無汗性外胚葉形成不全症の一例、第 38 回小児皮膚科学会、東京、2014.07.05**
- 7) 崎山とも, 種本紗枝, 布袋祐子, 松本健一, 久保亮治. 消化管穿孔を繰り返したテネイシンX欠損によるエーラス・ダンロス症候群の 1 例. 2014 年度日本皮膚科学会合同臨床東京地方会, 東京, 2014.7.12
- 8) 仁木真理子, 広瀬憲志, 森谷眞紀, 塩濱愛子, 久保亮治. 長島型掌蹠角化症の 1 例～遺伝子解析を含めて～. 第 29 回角化症研究会, 東京, 2014.8.2
- 9) 田中博子, 吉田憲司, 根岸垂津佐, 石井健, 江藤宏夫, 佐々木貴史, 久保亮治, 石河晃. Dowling-Meara 型単純型表皮水疱症の 1 例. 第 856 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2014.9.20
- 10) 中澤慎介, 森 達吉, 新関寛徳, 戸倉新樹: 難治性下腿潰瘍を合併した肥厚性皮膚骨膜炎の 1 例、第 110 回日本皮膚科学会静岡地方会、三島市、2014.10.18
- 11) Kumagai Y, Nakamura Y, Sasaki T, Takahashi H, Amagai M, Kubo A. A novel frameshift mutation of c.1638\_1641delCAGT in *KRT5* in a Japanese family with epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. Eastern Asia Dermatology Congress (EADC2014), Korea, 2014.10.25

- 12) 中野敏明, 善家由香理, 西川沙織, 中村仁美, 新井達, 衛藤光, 三橋善比古, 久保亮治. 長島型掌蹠角化症の 1 例. 第 857 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2014.11.15
- 13) 向井美穂, 安田文世, 伏間江貴之, 谷川瑛子, 天谷雅行, 久保亮治. 9 番染色体上の *LMX1B* 遺伝子領域に染色体微小欠失を認めた Nail-Patella 症候群の母娘例. 第 857 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2014.11.15
- 14) 小野紀子, 久保亮治, 天谷雅行, 松井順子, 小崎健次郎, 田中勝. Pallister-Killian 症候群の 1 例~伊藤白斑との関連について~. 第 857 回日本皮膚科学会東京地方会, 東京, 2014.11.15
- 15) 皆川智子, 金子高英, 中野 創, 澤村大輔, 水上浩哉, 斎藤陽子, 二川原 健, 新関寛徳: 肥厚性皮膚骨膜炎の 1 例、第 368 回日本皮膚科学会青森地方会、弘前市、2014. 11. 16
- 16) 中澤慎介, 森 達吉, 新関寛徳, 戸倉新樹: 難治性下腿潰瘍を合併した肥厚性皮膚骨膜炎の 1 例、第 38 回皮膚脈管膠原病研究会、東京、2015. 01. 30

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

厚生労働科学研究委託費  
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)研究事業  
委託業務成果報告 (業務項目)

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

担当責任者 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

### 研究要旨

小児科領域には多数の単一遺伝性疾患が含まれている。これらの疾患の多くの確定診断には、遺伝子診断が有効であるが、わが国の小児医療の現場では、遺伝子診断の臨床応用が困難な状況が続いている。一方、欧米では、積極的に遺伝子診断が診療に取り入れられている。近年の次世代シーケンサーの登場により、わが国の“Testing lag”の問題の解決が期待されている。疾患エクソーム解析の手法を活用することにより、小児慢性特定疾患の原因遺伝子を効率的にスクリーニングすることが可能である。各患者について、解析から得られる大量のバリエーションの臨床的意義を吟味する必要があり、吟味をするスキルのある臨床遺伝専門医・小児科医を育成する必要がある。

### A. 研究目的

小児科領域には多数の単一遺伝性疾患が含まれている。これらの疾患の多くの確定診断には、遺伝子診断が有効であるが、わが国の小児医療の現場では、遺伝子診断の臨床応用が困難な状況が続いている。一方、欧米では、積極的に遺伝子診断が診療に取り入れられている。特に英国においては、公的医療サービスの一環として遺伝子診断が活用されている。近年の次世代シーケンサーの登場により、わが国の“Testing lag”の問題の解決が期待されている。わが国における問題点を明らかにし、解決策を提案した。

### B. 研究方法

- 1) 各種疾患原因遺伝子の解析を遺伝子診断に取り入れる際の、各遺伝子の特性について評価した。
  - ① 小児慢性特定疾患のうち、単一遺伝子疾患であり、遺伝子診断の実施が確定診断に有用である疾患をリストアップした。
  - ② 海外の疾患エクソームキット製品 TruSightOne に含まれる遺伝子群と病名の関係についてアップロードを行った。
  - ③ 米国 NIH がとりまとめている、臨床遺伝のデータベース (Clin Genome database) で

単一遺伝子疾患のうち原因遺伝子が同定されている疾患をリストアップした。

- 2) 網羅的な疾患エクソームのキットである、イルミナ社の TruSightOne を用いて、臨床的有用性を検討した。

標準的なパイプラインを用いた後、ヒト既知疾患原因遺伝子、既知疾患原因バリエーション、日本人におけるアレル頻度、モデル動物における表現型、臓器別発現部位などの情報をアノテーションとして付加した。

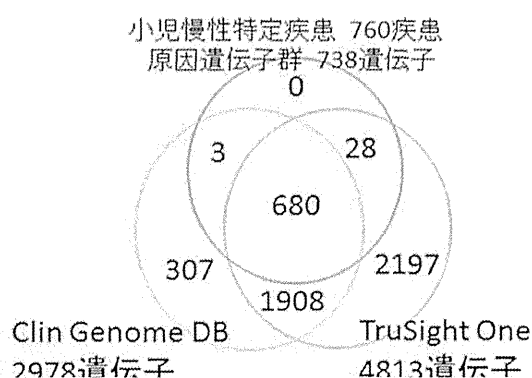
- 3) 米国における未診断プログラムの現状について調査した。  
エクソームトリオ解析により、PDGFRB 変異により発症する、新規の過成長症候群を同定し、報告した。この新規疾患について米国 NIH との共同研究を開始した。

(倫理面への配慮)

慶應義塾大学医学部倫理委員会で承認されたプロトコルに従い、ヒトゲノム指針に配慮し、患者・両親の同意を得て研究を実施した。

### C. 研究結果

小児慢性特定疾患のうち、単一遺伝子疾患であり、遺伝子診断の実施が確定診断に有用である疾患原因遺伝子、海外の疾患エクソームキット製品 TruSightOne に含まれる遺伝子群、米国 NIH がとりまとめている、臨床遺伝のデータベース (Clin Genome database) で単一遺伝子疾患のうち原因遺伝子の包含関係を分析した。結果は下記の通りである。



悪性高熱症の原因遺伝子の変異を有するミオパチー患者の同定、腹部腫瘍の発症リスクのある、稀少な多発奇形症候群cranial sclerosis with osteopathia striataの確定診断 (AMER1変異)、クロバザムが有効と考えられる超稀少疾患であるmyoclonic dystoniaの診断例、SMAD3変異により、早期に大動脈解離を来した家族の診断例などは、遺伝子診断が、合併症を回避する上で、極めて重要な情報を得ることができた。

### D. 考察

疾患エクソームの形式を活用することにより、小児慢性特定疾患の原因遺伝子を効率的にスクリーニング可能であると期待される。小児慢性特定疾患760疾患の738原因遺伝子の9割である680遺伝子が、疾患エクソームキットに含まれていることが明らかとなった。小児慢性特定疾患に含まれる疾患群の遺伝子診断のニーズに十分に答えられる事が明らかとなった。一般に遺伝性疾患は診断がついても、治療可能な事項が少ないと考えられているが、疾患エクソームキットの利用により、一割程度の

症例で、治療的な介入が可能な情報が得られたことは特記すべきである。

一方で、全く新しい疾患概念に対応できる体制の準備も急務である。わが国においても、未診断症例に対して、遺伝子診断を進めるプロジェクトが進行しているが、臨床検体を送付する施設と、検体から得られたゲノムデータを分析している施設が分離している場合が多く、医療としての系統的な取り組みは行われていない。米国NIHのUDPプログラムは臨床医とゲノムセンターが一体となり系統的な取り組みを進めているが、エクソーム解析による診断率は30%程度、新規疾患の同定率は5%程度とのことである。

研究的な観点から、全例の原因をできるだけ詳細に検出するという方法であれば、疾患エクソームを先に行い、診断が得られれば確定、診断が得られなければ全例について全エクソーム解析を行う2段階の手順をとることになる。疾患エクソーム解析 (8万円程度) では30%程度の診断しかできないことを考えると、70%の症例では全エクソーム解析 (15万円程度) を行うことになり、先行した疾患エクソーム解析は無駄になってしまうことになる。一方で、二段目の全エクソーム解析に際しては、既知疾患の原因遺伝子が同定される可能性が極めて低いことから、一例のみで診断が確定することは考えにくく、また、多数のバリエーションが同定されることから、両親の解析も必須となり、さらに15万円 x 2の追加コストが見込まれる。1症例あたりの平均コストは、15万円 x 1.0 + 15万円 x 2 x 0.7 = 36万円となる。この21万の追加コストを投資しないかぎり、疾患エクソームからえられる情報をこえることはできない。

全エクソームと疾患エクソームのどちらが優れているかという議論ではなく、新規疾患を指向した研究的解析なのか、診療応用に主眼を置く診断的解析なのかによって最適な戦略が異なると考えられる。もちろん全エクソームの実施コストが低下し、疾患エクソームの実施コストが低減した場合は全エクソームの実施が第一選択となるであろう。いずれの方法を用いる場合にも、大量のバリエーションの一つ一つを吟味する必要がある。この過程をコンピュータに実施させることは不可能であり、小児科医や臨床遺伝専門医が評価を行うことが必須である。

## E. 結論

疾患エクソーム解析の手法を活用することにより、小児慢性特定疾患の原因遺伝子を効率的にスクリーニングすることが可能であると期待される。各患者について、解析から得られる大量のバリエーションの臨床的意義を吟味する必要がある、吟味をするスキルのある臨床遺伝専門医・小児科医を育成する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takenouchi T, Sakamoto Y, Miwa T, Torii C, Kosaki R, Kishi K, Takahashi T, Kosaki K. Severe craniosynostosis with Noonan syndrome phenotype associated with SHOC2 mutation: Clinical evidence of crosslink between FGFR and RAS signaling pathways. *Am J Med Genet A*. 2014 ;164(11):2869-2872.
- 2) Takenouchi T, Ohyagi M, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Porencephaly in a fetus and HANAC in her father: Variable expression of COL4A1 mutation. *Am J Med Genet*. 2015. 167 (1) :156 - 158
- 3) Takenouchi T, Kosaki R, Nakabayashi K, Hata K, Takahashi T, Kosaki K. Paramagnetic signals in the globus pallidus are a late radiographic sign of juvenile-onset GM1 gangliosidosis. *Pediatr Neurol*. *Pediatr Neurol*. 2015, 166(2):483-486.
- 4) Takenouchi T, Yamaguchi Y, Tanikawa A, Kosaki R, Okano H, Kosaki K. Novel overgrowth syndrome phenotype due to recurrent de novo PDGFRB mutation. *J Pediatr*. *J Pediatr*. 2015. 166(2):483-486.

### 2. 学会発表

1. 小崎健次郎 網羅的遺伝子診断の臨床応用:難病診断のために 日本人類遺伝学会 第59回 診療における次世代シーケンサーの活用と課題 2014年11月 東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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

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）  
希少難病遺伝子診断法の開発

研究分担者 小原 収 （公財）かずさ DNA 研究所 副所長

次世代シーケンシング技術は、網羅的に遺伝子構造を解析する事を可能とただけでなく、遺伝性疾患の確定診断のための遺伝子解析を低コスト化・迅速化することにも寄与する。しかし、その実現のためには、個々にある技術モジュールのその目的への最適化と複数の工程を連結してパイプライン化する作業が求められる。本分担研究では、実際の臨床ニーズに基づいた遺伝子解析パネルをデザインし、それに適した解析パイプラインを構築した。さらに、その実運用の経験を基礎として、より安価で正確な遺伝子解析の実現のために必要な技術開発を加えた。今年度は自己炎症性疾患の診断のための遺伝子解析パネルを重点的に運用し、安定に結果を得られるパイプラインの構築に成功した。

A. 研究目的

希少小児遺伝性疾患において、症状からだけの絞り込みでは未だ原因遺伝子変異の同定が困難な疾患が数多く存在する。従来のキャピラリーシーケンシングで複数の候補遺伝子に変異があるかどうかを確認していくのは時間的・コスト的に臨床現場には不向きであった。しかし、次世代シーケンシング技術の出現により、大量の配列情報が合理的なコストで取得できるようになり、臨床現場に DNA シーケンシングが有用なツールとして迎えられる日が近いと考えられている。しかし、そのためにはいくつかの解決しなければならない問題が残されている。第一は、必要にして十分な遺伝子解析データを精度を落とさずに安価に提供できる体制作りであり、第二は得られたデータを臨床医が有効に臨床に活かしていくためのツールの開発である。これらの問題の解決のためには、実際に臨床医に臨床研究として遺伝子解析結果を提供する実経験を踏まえた上で、現実的な方策を講じていく必要がある。本分担研究では、今後の次世代シーケンシング技術の臨床応用への広がりを目指して、探索目的ではなく、臨床的な確定診断を目的とした次世代シーケンシングを用いた解析パイプラインの構築とその

実運用を通じての高度化を目的とする。

B. 研究方法

本分担研究は、厚生労働科学研究委託費、難治性疾患等克服研究事業の「原発性免疫不全症候群の病態解明と新規治療法開発への応用に関する」研究班、「自己炎症性疾患の治療標的分子の同定および薬剤開発基盤の整備」班、「新生児タンデムマススクリーニング対象疾患の診療ガイドライン改訂、診療の質を高めるための研究」班、本研究班の成育医療研究センターの分担研究者、千葉県こども病院、千葉大学病院、との連携の下に進めた。

各疾患領域の臨床医との議論に基づき、それぞれの疾患において確定診断に至れる可能性を高くできるであろう遺伝子パネルの設計を行った。その遺伝子数に応じて、ターゲット領域を濃縮するためのツール

(Multiplex PCR もしくはハイブリダイゼーションキャプチャー) をデザイン・調製した。次世代シーケンシングのランモードとして、イルミナ社の MiSeq における 300 ヌクレオチドのペアエンドの読み取りを標準とした。検体取り間違えなどの人為的エラーを排除するために、次世代シーケンサーで得られた疾患原因変異候補あるいは一塩基多型の情報は、キャピラリーシーケン

シングにより確認することを原則として運用した。

得られた次世代シーケンサーとキャピラリーシーケンサーからの異なるフォーマットの塩基配列情報を相互に変換可能なツールを開発し、それらの統合化によって臨床医がより確実・正確に確定診断に至れるシステムとして、インターネットへの接続がなくても使える本分担研究者らが開発した小型コンピューター上の情報解析プラットフォーム (Varkeeper) を改良した。

#### 倫理面への配慮

本研究でのヒト解析検体は、それぞれの連携研究機関において適切に倫理的な対応がなされた後に、本研究分担者には匿名化された検体 ID のみが通知される枠組みで研究を実施した。その流れに基づき、本研究での遺伝子解析に関しては、すべての関係する機関でヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則った研究であることを倫理審査委員会で承認を受けた上で、かずさ DNA 研究所の倫理審査委員会の承認を受けた後に実施した。

#### C. 研究結果

各連携研究グループの臨床研究者からの依頼を受け、種々の症候群の確定診断のための遺伝子パネルのデザインを行った。今年度に遺伝子解析パイプラインのデザインと解析準備に至れた遺伝子パネルのリストを表 1 に示す。こうした遺伝子パネル解析のためのターゲット領域濃縮には Multiplex PCR に依拠したアンプリコン解析とハイブリダイゼーションに依拠したハイブリキャプチャー解析のいずれかを用いた。今回のデザインに先立ち、現在の次世代シーケンサーの 1 塩基シーケンシングコストの見積もりとターゲット領域濃縮に必要なコスト・労力の両者のバランスを定量的に検討し、いずれの方法を用いるべきかを判断した。コスト的には圧倒的にアンプリコン解析が有利であるが、解析領域が 100kb を越えた辺りから均等にすべてのエクソンを解析する事が困難になって来るのが欠点であった。一方、ハイブリキャプチャー法は領域が拡大しても同じ実験プロト

コールで臨める点は圧倒的に有利である一方、そのコストの高さと確定診断目的であるにもかかわらずターゲット領域を 100% カバーする事が必ずしも容易でない点が大きな欠点である。ハイブリキャプチャー解析 (アンプリコン解析との折衷法であるアジレント社の HaloPlex 解析法も含む) は既に複数メーカーにより技術的に多様な方法が開発されているため、本分担研究では特にアンプリコン解析のパイプライン化に注力した。今回、以前のロシュ社の Junior からイルミナ社の MiSeq に解析シーケンサープラットフォームに変更して実現された取得塩基数の劇的な増加により、アンプリコン解析の更なる低コスト化とデータ取得の安定化が実現された。この点については、自己炎症性疾患の研究班と連携して進めた自己炎症性疾患の遺伝子パネル解析の 200 症例での解析によってパイプラインの安定稼働を実証する事ができた。

アンプリコン解析の律速の一つは、大量の PCR プライマーのデザイン過程である。特に、従来から知られているアンプリコン解析の問題点であったプライマー配列中の高頻度一塩基多型配列を避けるなどの注意を払う必要があり、本分担研究ではアンプリコン配列がゲノム中に複数コピーないか、プライマー配列中に高頻度の一塩基多型を含まないかをチェックするプライマーデザインパイプラインを構築して対応した。

遺伝子解析パネルがターゲット領域として 100kb を越える場合、ハイブリキャプチャー解析とアンプリコン解析のどちらが現実的に確実な解析結果を提供できるかは予測が困難であった。そこで、表 1 の下部に示されているターゲット領域の大きな遺伝子パネルについてはアンプリコン解析とハイブリキャプチャー解析の両者を試みて、その解析安定性を評価することとした。これらについて、ケトン体代謝異常症とマススクリーニングパネルについては既にアンプリコン解析を開始し、残りのパネルについてはアンプリコン解析系とハイブリキャプチャー解析系に必要なオリゴマーのデザインを今年度終えて、これから解析に取り掛かる段階である。

データ解析については、次世代シーケンサーのデータとして生成される gVCF ファ

イルと従来のキャピラリーシーケンサーから生成される multi-fasta ファイルの相互変換ツールを作製し、統合的な情報プラットフォームで次世代シーケンシング結果とキャピラリーシーケンシング結果の両者を比較・閲覧できるようにできた。これによって、これまで実務上人為的エラーを生じ易かったキャピラリーシーケンスでの次世代シーケンシング結果の確認作業を確実に遂行できるようになった。これらの結果を統合的に臨床医がセキュリティを高く保ちながら閲覧することを可能とするため、ローカルに安価なコンピュータで結果閲覧するシステム(Varkeeper)の改良を進めた。

#### D. 考察

探索型の次世代シーケンサーの応用は既にルーチンとも言える段階に突入し、臨床研究では網羅性の高い遺伝子解析パネルで診断を進める事も一般的になってきている。しかし、それを更に一步進めて、実際の診療に資する情報とするためには、遺伝子解析パネル実施のためのコストの問題、解析精度の問題、臨床医に情報を受け渡すヒト遺伝専門医・カウンセラーと解析実施者との連携関係など、未だ多くの問題が残されている。特に、我が国においては、これらの技術がすべて外来のプラットフォームで占められており、我が国の実際の診療現場のニーズに応えるための遺伝子解析体制の確立、低コスト・高精度遺伝子パネル解析技術の開発、遺伝情報解析プラットフォームの開発など、我が国で解決しなければならない独自の課題も多い。本分担研究では、特に遺伝子解析のパイプライン化に取り組み、連携する各疾患の専門臨床医の方々からのインプットを取り込みながら、診療ニーズに応えられる方向での技術開発を続けることが重要であることが再認識された。そのためには、構築した遺伝子解析ラインを実稼働させ、その中でフィードバックを活用する体制が将来のためにも非常に大きな役割を果たすと考えられる。

#### E. 結論

小型次世代シーケンサーの利用により、

アンプリコン解析による遺伝子パネル解析の安定稼働を実現した。現状ではターゲット領域が 50kb を下回る遺伝子パネルに留まっているが、この解析対象パネルを今後拡大し、それぞれの症候群で求められるニーズに応える遺伝子解析パネルを実現する。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1: Hoshino A, Okuno Y, Migita M, Ban H, Yang X, Kiyokawa N, Adachi Y, Kojima S, **Ohara O**, Kanegane H. X-Linked Agammaglobulinemia Associated with B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Immunol*. 2015 Jan 16. [Epub ahead of print]

2: Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, **Ohara O**, Fujita T, Heike T. Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am J Hum Genet*. 2014 Jul 3;95(1):121-5.

3: Funato M, Uemura O, Ushijima K, Ohnishi H, Orii K, Kato Z, Yamakawa S, Nagai T, **Ohara O**, Kaneko H, Kondo N. A complement factor B mutation in a large kindred with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Clin Immunol*. 2014 Aug;34(6):691-5.

4: Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Kawamoto N, Kasahara K, **Ohara O**, Kondo N. Clinical and genetic characterization of Japanese sporadic cases of periodic Fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis syndrome from a single medical center in Japan. *J Clin Immunol*. 2014 Jul;34(5):584-93.

5: Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM,

Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I,



Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, **Ohara O**, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yagüe J, Nishikomori R, Aróstegui JI. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis*. 2015 Mar;74(3):603-10.

6: Mizuno Y, Kato G, Shu E, Ohnishi H, Fukao T, **Ohara O**, Fukumoto H, Katano H, Seishima M. Merkel Cell Polyomavirus-positive Merkel Cell Carcinoma in a Patient with Epidermodysplasia Verruciformis. *Acta Derm Venereol*. 2015 Jan 15;95(1):98-99.

## 2. 学会発表

1. Implementation of High-Volume Genomic Analyses by Microfluidics/microchip Technologies: Towards Integrative Medical Sciences for Preventive Medicine, **Ohara O**, ICEP2014 Toyama 2014 年 4 月 24 日
2. What is "Next-Generation DNA Sequencing"for?, 小原收、熊本大学「最先端研究セミナー (リエゾンラボ研究会)」 2014 年 5 月 7 日
3. ヒト遺伝性疾患の構造バイオインフォマティクス、土方敦司、小原收、第 86 回日本遺伝学学会、2014 年 9 月 19 日
4. Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations, Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, Ohara O. Fujita T, Heike T, The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2014 年 10 月 19 日
5. 臨床研究のための疾患遺伝子解析パイプラインの構築、小原收 第 56 回日本人類遺伝学学会、2014 年 11 月 20 日
6. IFIH1 遺伝子変異は Aicardi-Goutières 症候群の原因とな

る、小田紘嗣 中川権史 阿部純也 粟屋智就 船曳正英 土方敦 八角高裕 白井剛 小原收 加藤博己 藤田尚志 西小森隆太 平家俊男、第 59 回日本人類遺伝学学会、2014 年 11 月 22 日

7. 次世代シーケンサー (MiSeq) を用いた原発性免疫不全症の遺伝子解析、中山学、小田紘嗣、八角高裕、西小森隆太、平家俊男、小原收、第 8 回日本免疫不全症研究会学術集会、2015 年 1 月 24 日
8. 次世代シーケンサーを用いた原発性免疫不全症の迅速遺伝子診断法の確立、加藤環、釜江智佳子、野々山恵章、今井耕輔、小原收、第 8 回日本免疫不全症研究会学術集会、2015 年 1 月 24 日

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
3. その他

パネル名	領域 (kb)*	遺伝子数	解析方法
FHL (家族性血球貪食リンパ組織球増多症候群)	13	7	アンプリコン
AGS (アイカルディ・グチエール症候群)	15	10	アンプリコン
MSMD (メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染 症)	16	9	アンプリコン
自己炎症疾患	27	12	アンプリコン
CVID (分類不能型免疫不全症)	42	20	アンプリコン
SCID (重篤複合型免疫不全症)	72	30	アンプリコン・ ハイブリキャプチャー
ケトン体代謝異常	95	56	アンプリコン・ ハイブリキャプチャー
先天性代謝異常症マススクリーニング	100	54	アンプリコン・

			ハイブリキャプチャー
			アンプリコン・
糖原病	150	68	ハイブリキャプチャー
			アンプリコン・
神経伝達物質異常	360	144	ハイブリキャプチャー

---

\* 領域はタンパク質コードエクソン領域の長さを示す。実際に決定する領域はこれよりも長い。

表 1. 今年度の本分担研究で運用もしくはデザインした遺伝子パネル群

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 緒方勤 浜松医科大学 小児科 教授

研究要旨

本研究班の目的は、次世代シーケンサーを用いた小児科と産科領域疾患のゲノム・エピゲノム解析手法を軸とした実用化に向けた研究を展開することであり、研究分担者の役割は、解析すべき患者検体および臨床情報の収集、ならびに次世代シーケンサーを用いた解析の一端を担うことである。

本年度、研究分担者は、(1) 既知遺伝子変異が否定された眼白子症の姉妹例を対象とするエクソーム解析、(2) FGN1 変異が否定された Marfan/Shprinzen-Goldberg 症候群患者を対象とするエクソーム解析、(3) t(5;8)(q35.1;p21.1)と連鎖する常染色体優性の Klippel-Feil 症候群家系を対象とするエクソーム解析、(4) 先天性横隔膜ヘルニアを対象とする解析、(5) われわれが同定した裂手裂足症関連疾患と BHLHA9 重複を有する 27 家系における修飾因子同定を目指したエクソーム解析、を行った。その成果は、疾患発症責任遺伝子同定におけるエクソーム解析の有用性を示すとともに、エクソーム解析が様々な目的に応用しうる可能性を示唆する。さらに、エクソーム解析をはじめとする次世代シーケンサー解析技術が臨床現場で応用される基盤を形成するものである。

A. 研究目的

本研究班の目的は、次世代シーケンサーを用いた小児科と産科領域疾患のゲノム・エピゲノム解析手法を軸とした実用化に向けた研究を展開することである。具体的な研究目的は以下の4つである。①これまでの難治性疾患克服研究事業で選定されている様々な研究班と連携し、新規・未知病因遺伝子を同定する。②エピゲノム解析手法の開発と診断への応用。③メタゲノム・マイクロビーム解析手法の開発と診断への応用。④特に本申請では、これまでの研究成果を生かし、難病研究拠点と連携したネットワークを構築し、遺伝子検査支援体制を運用・検証する。

研究分担者の役割は、この計画の中で、解析すべき患者検体および臨床情報の収集、ならびに次世代シーケンサーを用いた解析の一端を担うことである。

B. 研究方法

患者・家族の臨床情報と検体集積：家族発症疾患や複数の患者が見いだされた希少疾患を主に行った。

エクソーム解析：比較的大きな家系を対象として、表現型の詳細な解析、ならびに既知責任遺伝子が存在するときには、当該責任遺伝子の通常の方法による変異解析を行った。その後、既知責任遺伝子変異が否定された家系においてエクソーム解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、検体の収集を含めた研究計画については、国立成育医療センター、および検体収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集した。

C. 研究結果

既知遺伝子変異が否定された眼白子症の姉妹例を対象とするエクソーム解析：

図1に示す家系で行った。この家系では、既知の合併症を伴わない眼白子・眼皮膚白子発症遺伝子である GPR143, TYR, OCA2, TYPR1, SLC45A2 に変異は見られなかった。

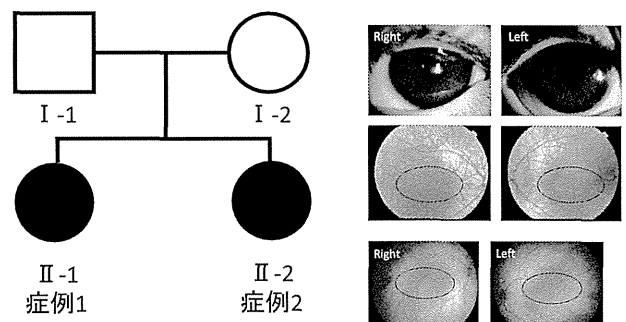


図1.家系図と眼の症状

その結果、Hermansky-Pudlak syndrome type 6 の責任遺伝子 HPS6 に父由来 c.2038C>T (p.Q680X) と母由来 c.1897delC (p.P633fs) が同定された。本症候群のもっとも軽症型と考えられるが、合併症と

して血小板凝集能低下による出血傾向が知られている(他のタイプに見られる間質性肺炎や心筋症のj報告はない)。そこで電子顕微鏡による血小板濃染顆粒の異常を確認したところ、濃染顆粒の欠如が見いだされた(図2)。そのため、この姉妹においては今後月経を含む出血時の対応を考慮する必要があることを伝えた(止血剤の使用など)。

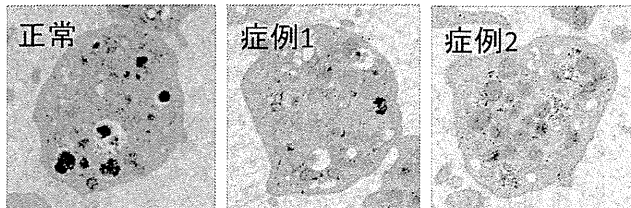


図2。血小板電顕像。濃染顆粒の欠如が見られる。

### FGN1 変異が否定された Marfan または Shprintzen-Goldberg 症候群患者を対象とするエクソーム解析

図3に示す患者で行った。この患者では FBN1 変異は否定されていた。



図3。解析対象患者

その結果、SKI 遺伝子に de novo の c.347G>A (p.G116E)変異が同定された。この変異は、2012年に Shprintzen-Goldberg syndrome (MFS のような骨格系や心臓の特徴と頭蓋骨癒合や神経発達上の異常が認められる)を伴う症例において報告され、SKI 遺伝子変異では心血管系病変が生じやすいことから詳細な心血管系評価を行ったところ、33 mm の大動脈弁輪拡張症が同定された。40 mm 以上では破裂の危険があることから、慎重に経過観察中である。

### t(5;8)(q35.1;p21.1)と連鎖する常染色体優性の Klippel-Feil 症候群家系を対象とするエクソーム解析

われわれは、図4に示す t(5;8)(q35.1;p21.1)と連鎖する Klippel-Feil 症候群家系において切断点を同定していた。そして、転座で破壊された遺伝子が存在しないこと、転座周辺にコピー数変動が存在しないことから、切断点が遺伝子発現調節領域の機能を障害している可能性と、転座と責任遺伝子が無関係である可能性が想定されていた。そこで、エクソーム解析を行ったが、明確な患者特異的変異は見いだされなかった。これは切断点が遺伝子

発現調節領域の機能を障害している可能性を支持するものである。事実、FGF18 と EBN2 という2つの近傍の遺伝子が骨で発現していることが知られており、これらが候補と見なされる。

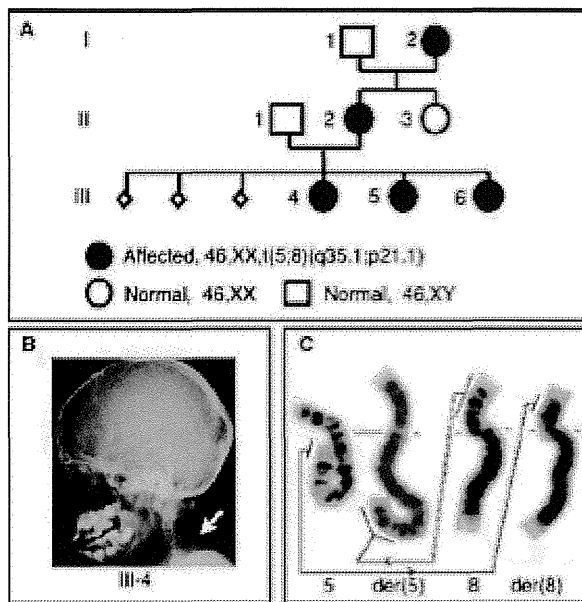


図4。解析対象家系。黒塗りは相互転座と Klippel-Feil 症候群を有する患者を、白塗りは正常核型と正常表現型を呈する健常者を示す。

### 先天性横隔膜ヘルニアを対象とする解析

家族性(同胞発症)の先天性横隔膜ヘルニアを有する3家系と孤発型の先天性横隔膜ヘルニアを有する7症例の検体集積を終了し、現在、エクソーム解析中である。

### 裂手裂足症関連疾患と BHLHA9 重複を有する 27 家系における修飾因子同定のエクソーム解析

われわれは、大腿骨・脛骨・裂手裂足症を伴う患者、脛骨・裂手裂足症を伴う患者、裂手裂足症のみを伴う患者を有する 51 家系を解析し、27 家系において、全く同一の日本人創始者効果による BHLHA9 を伴う 210,050 bp の duplication/triplication を見いだした(図5)。

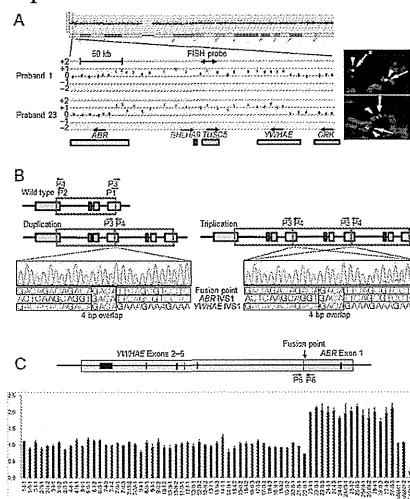


図5。同定された重複・3重複領域。全ての患者で融合点構造は同一である。

そして、この duplication/triplication を有する同一家系内に、大腿骨・脛骨・裂手裂足症を伴う患者、脛骨・裂手裂足症を伴う患者、裂手裂足症のみを伴う患者、正常保因者が存在することから (図 6)、表現度・浸透度を決定する修飾因子の同定を試みた (図 7)。しかし、修飾因子は現在同定されていない。おそらく、修飾因子複数存在すると思われる。



図 6. BHLHA9 を伴う 210,050 bp の duplication/ triplication を伴う 27 家系。大腿骨・脛骨・裂手裂足症を伴う患者 (GWC)、脛骨・裂手裂足症を伴う患者 (SFLBD)、裂手裂足症のみを伴う患者 (SHFM)、正常保因者 (Carrier) が存在する。

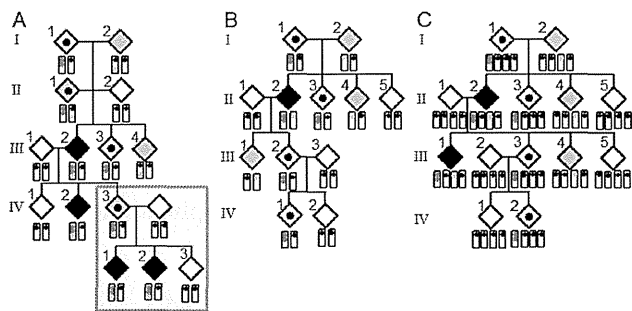


図 7. 修飾因子を重複近傍(A)、重複染色体の相同染色体上 (B)、別の染色体上 (C)に仮定した概念図。

#### D. 考察

本研究の成果は、次世代シーケンサーを用いた解析法が、希少疾患の原因解明に有用であることを支持する。事実、常染色体優性疾患家系におけるエクソーム解析で原因遺伝子あるいは候補遺伝子が同定された。また、エクソーム解析が様々な目的に応用しうる可能性を示唆する。さらに、エクソーム解析をはじめとする次世代シークエ

ンサー解析技術が臨床現場で応用される基盤を形成するものである。

#### E. 結論

(1) 全ての既知遺伝子変異が否定された眼白子症の姉妹例を対象とするエクソーム解析、(2) FGN1 変異が否定された Marfan/Shprinzen-Goldberg 症候群患者を対象とするエクソーム解析、(3) t(5;8)(q35.1;p21.1)と連鎖する常染色体優性の Klippel-Feil 症候群家系を対象とするエクソーム解析、(4) 先天性横隔膜ヘルニアを対象とする解析、(5) われわれが同定した裂手裂足症関連疾患と BHLHA9 重複を有する 27 家系におけるエクソーム解析、を行った。その成果は、疾患発症責任遺伝子同定におけるエクソーム解析の有用性を示すとともに、エクソーム解析が様々な目的に応用しうる可能性を示唆する。さらに、エクソーム解析をはじめとする次世代シーケンサー解析技術が臨床現場で応用される基盤を形成するものである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

- Fukami M\*, Suzuki J, Nakabayashi K, Tsunashima R, **Ogata T**, Shozu M, Noguchi S: Lack of genomic rearrangements involving the aromatase gene *CYP19A1* in breast cancer. *Breast Cancer* 21 (3): 382–385, 2014.
- Nagasaki K\*, Asami T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, **Ogata T**, Fukami M: Long term follow up study for a patient with Floating-Harbor syndrome due to a hotspot *SRCAP* mutation. *Am J Med Genet A* 164 (3): 731–735, 2014.
- Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Nagasaki K, **Ogata T**, Fukami M\*: Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol* 81(2): 314–316, 2014.
- Tsuchiya T, Shibata M, Numabe H, Jinnno T, Nakabayashi K, Nishimura G, Nagai T, **Ogata T**, Fukami M\*: Compound heterozygous deletions in pseudoautosomal region 1 in an infant with mild manifestations of Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet A* 164A (2): 505–510, 2014.
- Yagasaki H\*, Nakane T, Saito T, Koizumi K, Kobayashi K, **Ogata T**: Disorder of sex development in an infant with molecularly confirmed 46,XY,+der(10)t(10;21)(q21.1;q21.3),-21. *Am J Med Genet A* 164 (3): 841–843, 2014.
- Sasaki A, Sumie M, Eada S, Kosaki R, Kurosawa K, Fukami M, Sago H, **Ogata T**, Kagami M\*: Prenatal Genetic testing for a

- microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to upd(14)pat-like phenotype. *Am J Med Genet A* 164A (1): 264–266, 2014.
7. Kitsuda K\*, Yamaguchi R, Nagata E, Nakagawa Y, Ohzeki T, **Ogata T**, Ishii M, Nakanishi T: Hypertrophic cells in hypophagic intrauterine growth retarded rats without catch-up growth. *Kitasato Med J* 44 (1): 38–46, 2014.
  8. Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, **Ogata T**\*: IMAGE syndrome: clinical and genetic implications based on investigations in three Japanese patients. *Clin Endocrinol* 80 (5): 706–713, 2014.
  9. Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simon C, Moore H, Harness J, 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* 24 (4): 554–569, 2014.
  10. Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, **Ogata T**, Hasegawa T\*: Identification and functional characterization of two novel *NPR2* mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 99 (4): E13–18, 2014.
  11. **Ogata T**\*, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashim 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* 9 (3): e91598, 2014.
  12. Yamamoto M, Iguchi G, Bando H, Fukuoka H, Suda K, Takahashi M, Nishizawa H, Matsumoto R, Tojo K, Mokubo A, **Ogata T**, Takahashi Y\*: A missense single-nucleotide polymorphism in the sialic acid acetyl esterase gene is associated with anti-PIT-1 antibody syndrome. *Endocr J* 61 (6): 641–644, 2014.
  13. 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): 353–356, 2014.
  14. Matsubara K, Kataoka N, Ogata 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): 629–633, 2014.
  15. Ohishi A, Nakashima S, **Ogata T**, Iijima S: Early vitamin K deficiency bleeding in a neonate associated with maternal Crohn's disease. *J Perinatol* 34 (8): 636–639, 2014
  16. 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* 81 (2): 139–44, 2014
  17. Kawamoto T, Nitta H, Murata K, Toda E, Tsukamoto N, Hasegawa M, Yamagata Z, Kayama F, Kishi R, Ohya Y, Saito H, Sago H, Okuyama M, **Ogata T**, Yokoya S, Koresawa Y, Shibata Y, Nakayama S, Michikawa T, Takeuchi A, Saitoh H: Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). *BMC Public Health* 2014 Jan 10;14:25. doi: 10.1186/1471-2458-14-25.
  18. Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Sato 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 OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet* 86 (6): 539–544, 2014.
  19. Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Hitomi 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.
  20. 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): 1130–1136, 2014.
  21. Ishikawa T\*, Takehara Y, Yamashita S, Iwashima S, Sugiyama M, Wakayama T, Johnson K, Wieben O, Sakahara H, **Ogata T**: Hemodynamic assessment in a child with renovascular hypertension using time-resolved three-dimensional cine phase-contrast MRI. *J*

- Magn Reson Imaging* 41 (1): 165–168, 2015.
22. Nakashima S, Oishi 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.
  23. Nagata E, Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura K, 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 Gallop-Wolfgang complex. *Orphanet J Rare Dis* 9 (1): 125, 2014.
  24. 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* (in press).
  25. 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* (in press).
  26. 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* (in press).
  27. Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Fukai R, Imagawa E, Ohba C, Kuki I, Makita Y, **Ogata T**, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, **Matsumoto N**\*: Detecting copy number variations in whole exome sequencing data using exome hidden markov model - an expectation of “exome-first” approach. *J Hum Genet* (in press).
  28. 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* (in press).
  29. Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, **Ogata T**\*: Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet* (in press)
  30. Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Jofri K, **Ogata T**, Fukami M\*: Novel splice site mutation in *MAMLD1* in a patient with hypospadias. *Sex Dev* (in press).
  31. 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* (in press).
  32. **Fujisawa Y**, Napoli E, Wong S, Song G, Yamaguchi R, Matsui T, Nagasaki K, **Ogata T**, Giulivi C Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial glucocorticoid deficiency. *BBA Clinical* (in press).
  33. Igarashi M, Mikami H, Katsumi M, Miyado M, Izumi Y, **Ogata T**, Fukami M\*: *SOX3* overdosage permits normal sex development in females with random X inactivation. *Sex Dev* (in press).
  34. Momori Katsumi<sup>a</sup>, Hiromichi Ishikawa<sup>b</sup>, Yoko Tanaka<sup>c</sup>, Kazuki Saito<sup>a,d</sup>, Yoshitomo Kobori<sup>e</sup>, Hiroshi Okada<sup>c</sup>, Hidekazu Saito<sup>d</sup>, Kazuhiko Nakabayashi<sup>f</sup>, Yoichi Matsubara<sup>g</sup>, Tsutomu Ogata<sup>a,h</sup>, Maki Fukami<sup>a</sup>, Mami Miyado<sup>a</sup> Microhomology-Mediated Microduplication in the Y Chromosomal Azoospermia Factor a (AZFa) Region in a Male with Mild Asthenozoospermia. *Cytogenetic and Genome Research* (in press).
  35. Fukami M\*, Miyado M, Nagasaki K, Shozu M, **Ogata T**: Aromatase excess syndrome: a rare autosomal dominant disorder leading to pre- or peri-pubertal onset gynecomastia. *Pediatr Endocr Rev* 11 (3): 298–305, 2014.
  36. Shozu M\*, Fukami M, **Ogata T**: Understanding the pathological manifestations of aromatase excess syndrome: lessons for the clinic. *Expert Rev Endocrinol Metab* 9 (4): 397–409, 2014.
  37. Fukami M\*, **Ogata T**: Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: Rare congenital disorder leading to skeletal malformations and steroidogenic defects. *Pediatr Int* 2014 Oct 8. doi: 10.1111/ped.12518. [Epub ahead of print]
2. 学会発表  
省略
  3. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし



## 分担研究課題

### 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

研究分担者 正宗 淳（東北大学大学院消化器病態学分野、准教授）

#### 研究要旨

全国より遺伝子解析用検体を収集し、約80遺伝子を網羅したHaloPlexプラットフォームを用いた解析とあわせて、特発性膵炎1家系ならびに家族性膵炎1家系につき全エクソーム解析を行った。HaloPlex を用いた*CFTR*遺伝子の網羅的解析では、193例の慢性膵炎症例を解析し、c. A1231G (p. K411E)、c. 1753G>T (p. E585X)、c. 2869delC (p. L957fs)の3個の新規変異を同定した。また、c. 4056G>C (p. Q1352H)および c. 3468G>T (p. L1156F) 変異の頻度は健常者に比べて、慢性膵炎患者において有意に高頻度であることを見出した。2家系の全エクソーム解析を終了し、現在データ解析中である。

#### A. 研究目的

急性膵炎は重症化すると致命率が 10%となる難治性の疾患である。一方、慢性膵炎は腹痛発作を繰り返したのち、進行すると膵外内分泌障害により消化吸収障害や糖尿病を発症する。急性膵炎、慢性膵炎のいずれもアルコール性が最多の成因であるが、原因不明の特発性膵炎の症例も少なくない。若年発症の特発性症例や家族集積性のある症例など、膵炎発症に至る遺伝的背景の存在が示唆される症例もみられる。

膵炎発症に関連する遺伝子異常としては、1996年に遺伝性膵炎の原因遺伝子としてカチオニックトリプシノーゲン(*PRSSI*) 遺伝子異常が報告されて以来、トリプシンの活性化と不活性化に関わる遺伝子異常が報告されてきた。例えば、膵腺房細胞で生成され、トリプシン活性を阻害する膵分泌性トリプシンインヒビター(*SPINK1*) 遺伝子の p. N34S 変異や c. 194+2T>C 変異は、遺伝性膵炎、家族性膵炎や特発性膵炎、特に若年発症の症例に少なからず認められる。一方、2013年に我々を含む国際共同研究によりカルボキシペプチダーゼ A1(*CPA1*) 遺伝子が膵炎と関連することが明らかとなった。*CPA1* 遺伝子異常はトリプシンの活性化

や不活性化には影響を与えず、変性タンパク質が膵腺房細胞内に蓄積した結果、小胞体ストレスを引き起こし膵炎発症に至ると考えられている。しかし濃厚な家族歴を有するにもかかわらず、原因遺伝子の明らかではない家系も少なからずみられる。本研究では、次世代シーケンサーを用いて新たな膵炎関連遺伝子異常を同定することを目的とした。

#### B. 研究方法

研究 1: HaloPlex ターゲットエンリッチメントシステムを用いた網羅的解析

膵消化酵素や膵発現蛋白、細胞内 Ca 関連、小胞体ストレス関連など、膵炎との関連が想定される約 80 遺伝子をカバーする HaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステム (Agilent Technologies 社) を作成した。汎用型のデスクトップシーケンサー (MiSeq) を用いて、日常的に網羅的解析を行う実験系を立ち上げた。慢性膵炎 193 例 (特発性 121 例、アルコール性 46 例、遺伝性 17 例、家族性 9 例) を解析した。日本人健常者のデータとして、Human Genetic Variation Browser

([www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/](http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/)) のデー

タを用いた。

## 研究 2: 次世代シーケンサーを用いた腓炎家系の全エクソーム解析

既知の腓炎関連遺伝子異常を認めない、特発性腓炎 1 家系（患者ならびに両親の 3 検体）および家族性腓炎 1 家系（若年で腓炎を発症した兄弟 3 人と、腓炎の既往を有さない両親の計 5 検体）につき、Illumina 社製 HiSeq2000 を用いて全エクソーム解析を行った。

なお本研究は東北大学遺伝病学分野青木洋子准教授、新堀哲也助教、細胞増殖制御分野 中山啓子教授、舟山 亮助教、西田有一郎助教、長嶋剛史助教との共同研究として遂行された。

（倫理面への配慮）

検体採取、遺伝子解析にあたっては、書面を用いた十分な説明のもと書面による同意を得て行った。本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認（承認番号 2009-403、2011-260、2014-1-221）に基づいて行われた。

## C. 研究結果

研究 1: 約 70 遺伝子に非同義変異・同義変異含め 713 個の遺伝子異常・多型を同定した。以下に *CFTR* (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 遺伝子解析の結果について報告する。*CFTR* 遺伝子は嚢胞性線維症 (cystic fibrosis: CF) の原因遺伝子である。しかしながら 27 エクソンと多数のエクソンを有するため、Sanger 法を用いた従来の方法では解析が困難であった。今回の次世代シーケンサーを用いた解析では、*CFTR* 遺伝子の coding region の 91.6% を 20 リード以上でシーケンス可能であった (図 1)。*CFTR* 遺伝子に非同義多型を 12 個、同義多型を 7 個同定した (表 1)。非同義多型に c.1231A>G (p.K411E)、c.1753G>T (p.E585X) と c.2869delC (p.957fs) の新規 3 多型を認め、また、同義多型にも c.372C>T (p.G124=)、c.3975A>G (p.R132=)、c.4254G>A (p.E1418=) の新規 3 多型

を認めた。非同義多型において、c.4056G>C (p.Q1352H) 多型の頻度は慢性腓炎患者 193 人中 20 人 (10.4%) に認められ、HGVB のデータ (4.9%) と比較し有意に高頻度であった ( $P=0.009$ )。c.3468G>T (p.L1156F) 多型は慢性腓炎患者 193 人中 15 人 (7.8%) に認められ、HGVB (4.0%) と比較し有意に高頻度であった ( $P=0.04$ )。他の非同義多型に関しては、HGVB と比較して頻度に有意差を認めなかった。

研究 2: 遺伝形式に基づきエクソン、スプライスサイトに含まれる多型を抽出し、現在解析中である。

## D. 考察

本研究は次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、新たな腓炎関連遺伝子異常を同定しようとするものである。HaloPlex は新規遺伝子異常の同定のみならず、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) 遺伝子のような 20 以上のエクソンを有する遺伝子の解析にも大きな威力を発揮すると考えられる。実際に、新規 3 多型を含む非同義多型を 12 個同定可能であり、*CFTR* 遺伝子の網羅的解析が効率的に可能であることが示された。さらに本解析系は、一度に多数の遺伝子解析が可能であるため、*SPINK1* 遺伝子と *CFTR* 遺伝子のように、複数の腓炎関連遺伝子異常を trans-heterozygous に有する症例においても威力を発揮すると考えられる。

現在、研究 2 で抽出された遺伝子異常について、腓炎患者における頻度や機能解析の結果をもとに、腓炎との関連を検討中である。

## E. 結論

HaloPlex ターゲットエンリッチメントシステムにより、*CFTR* 遺伝子の新規腓炎遺伝子異常を同定した。次世代シーケンサーを用いたアプローチは腓炎関連遺伝子異常の同定に有用な可能性が示された。

## F. 健康危険情報

該当なし

該当なし

## 2. 実用新案登録

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

### 3. その他

該当なし

1. 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]
2. Nakano E, Masamune A, Kume K, Kakuta Y, Shimosegawa T. Variants in the interferon regulatory factor-2 gene are not associated with pancreatitis in Japan. Pancreas. 2014;43:1125-1126.
3. 正宗 淳、中野絵里子、糸 潔、新堀哲也、青木洋子、下瀬川徹. 膵炎の原因遺伝子探索. 膵臓 2014;29:51-58.
4. 正宗 淳、中野絵里子、糸 潔、新堀哲也、青木洋子、下瀬川徹. 膵炎の原因遺伝子はどこまで解ったか. 肝胆膵 2014;69:1115-1121.
5. 正宗 淳、下瀬川徹. 遺伝性膵炎・家族性膵炎. 胆と膵 2014;25:1137-1141.

### 2. 学会発表

1. 中野絵里子、正宗 淳、糸 潔、下瀬川徹. 次世代シーケンサーを用いた膵炎関連遺伝子の解析. 第 100 回日本消化器病学会総会. 東京. 2014 年 4 月 26 日.
2. 中野絵里子、正宗 淳、糸 潔、下瀬川徹. 次世代シーケンサーを用いた膵炎患者におけるカルシウム感知受容体遺伝子変異の解析. 第 45 回日本膵臓学会大会. 小倉. 2014 年 7 月 12 日.

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

図1: *CFTR*遺伝子エクソンごとのリード数

