

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ブなどを使用した。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

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。

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。

RNA-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。本年度のシーケンス実績内訳を表 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 クロマチン免疫沈降 (ChIP) 定量 PCR による ChIP 効率と特異性の評価 (ChIP-qPCR)、ライブラリ作製、シーケン

シング、データ解析の工程を含む。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

#### 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。

#### 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、コママーシャルに入手できる 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。

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 lentiginos. *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, Szyska-Niagolov M, Ivanova A, Mateva L, Izumi R, Aoki Y, Matsubara Y.: Seven Novel Mutations in Bulgarian Patients with Acute Hepatic Porphyrins (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