

201442083A

平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業（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）））

遺伝性難治疾患の網羅的遺伝子解析拠点研究

平成 26 年度 **委託業務成果報告書**

主任研究者 松本 直通

（横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学・教授）

平成 27（2015）年 4 月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（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）））による委託業務として、公立大学法人横浜市立大学が実施した平成26年度「遺伝性難治疾患の網羅的遺伝子解析拠点研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 総括研究報告	
遺伝性難治疾患の網羅的遺伝子解析拠点研究----- 松本直通	1
II. 分担研究報告	
1. 遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築 池川志郎	11
2. 次世代シーケンスデータ解析 高橋篤	15
3. ゲノム研究倫理と網羅的エクソーム解析の対象症例の集積 福島義光	17
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	29

平成26年度厚生労働科学研究委託事業（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）））
総括研究報告書

遺伝性難治疾患の網羅的遺伝子解析拠点研究

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

本研究は、希少遺伝性難治性疾患の病態解明と治療法開発に向けた遺伝子解析を強力に推進することを目的とする。申請者らは平成 23-25 年度の「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）」の次世代シーケンス（NGS）拠点班として研究を行ってきた。NGS は 6 台保有し常時稼働する体制である。平成 26 年度にこの後継として、新たに研究を開始、既に新規に複数の疾患で原因となる遺伝子変異を特定し病態発症機序の解明を進めている。ゲノム情報解析は、効率的な解析フローを確立、NGS 解析終了から約 3-5 日以内に候補となる遺伝子異常を特定する流れである。また常時解析フローを改良している。この解析系を用いて他の研究班等と連携し解析を提供（探索研究）、さらに難病診断の提供も進めた。平成 26 年度は、大量の全エクソーム・全ゲノムシーケンスデータを迅速に解析するための解析サーバーを拡充した（並列型サーバー1 台と大容量メモリーサーバー3 台を増設し全体で 500 コアを超える増設を施行）。さらに Coffin-Siris の新規遺伝子 *SOX11* (Nat Commun, 2014), 難治性てんかんの *PIGA* (Neurology, 2014 雑誌の表紙を飾る)、先天性白質形成不全症の原因 *TUBB4A* (Neurology, 2014) 等の遺伝子異常を新たに見いだした。2014 年 12 月末における本拠点における総エクソーム解析サンプル数は 6173 サンプル（うち平成 26 年度拠点として 1625 サンプル）を終了した。

分担研究者

池川志郎・理化学研究所統合生命医科学研究センター・チームリーダー

高橋篤・理化学研究所統合生命医科学研究センター・チームリーダー

福嶋義光・信州大学医学部遺伝医学予防医学講座・教授

医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）」の次世代シーケンス（NGS）拠点班として研究を行ってきた。NGS は 6 台保有し常時稼働する体制である。さまざまなチャネルを通じて希少難治性疾患の症例の集積、全エクソーム解析は 3806 例を終了、少なくとも 16 疾患でその遺伝的原因を明らかにした。Coffin-Siris 症候群 (Nat Genet, 2012) ・ SENDA (Nat Genet, 2013) ・ 難治性てんかん (Ann Neurol, 2012, Am J Hum Genet, 2013) ・ ネマリンミオパチー (Am J Hum Genet, 2013) ・ 遺伝性骨系統疾患 (Am J Hum Genet, 2013) など、国内外でも突

A. 研究目的

本研究は、希少遺伝性難治性疾患の病態解明と治療法開発に向けた遺伝子解析を強力に推進することを目的とする。我々は平成 23-25 年度の「難病・がん等の疾患分野の

出した成果を挙げた。ゲノム情報解析は、効率的な解析フローを確立、NGS解析終了から約3-5日以内に候補となる遺伝子異常を特定する流れである。また常時解析フローを改良している。この解析系を用いて他の研究班等と連携し解析を提供（探索研究）、さらに難病診断サービスを行う。平成23-25年度の拠点研究では一般班の半数である5班と密に連携し、解析過程で生じる正常コントロールは適宜データベースへ（Human Genetic Variation Browser, HGVB）の登録、平成24-25年度の遺伝子ライブラリーデータベース(HGVB)構築（松田班）の1208例の正常対照エクソームデータ中429例（35.5%）は我々の拠点班から供出した。平成26年度にこの後継研究として新たに研究を開始、遺伝性難治疾患で原因となる遺伝子変異を特定し病態発症機序の解明を行うことと難病症例に対する遺伝子診断業務を行うことを目的に研究を進めた。

B. 研究方法

I. 全国規模のネットワークからの症例収集

日本人類遺伝学会、全国遺伝子医療部門連絡会議と連携し、臨床遺伝ネットワーク・骨系統疾患コンソーシアム・胎児骨系統疾患ネットワーク（・蔵王セミナー小児神経ネットワークなどを通じ症例を集積する。既に実績と定評のある専門家ネットワークを通じて正確な診断が成され、かつ詳細な臨床情報を得られる症例群を多数集積する。

II. 次世代シーケンス解析

Agilent 社 SureSelect と Illumina 社 HiSeq2000/HiSeq2500 を用いて全エクソーム解析を行う。現状で 1 ラン 600 Gb、96 サンプルの解析が可能で、20 カバレッジで全遺伝子の 90-95%が解読できる。現状で月に 200 サンプルの処理が可能である。

III. 次世代シーケンスデータ解析

松本は、次世代シーケンス算出データから遺伝子変異同定する Novoalign-Picard-GATK-Annovar 解析フローをさらに効率化した Riker システムを開発し極めて効率よくバリエーションを同定できている。96 サンプルのエクソームデータは保有 IT 資産で 3-5 日で解析が完了する。高橋は、既存解析プログラムの評価・改良と独自の解析プログラムの開発も考慮する。さらに全エクソームデータを用いて遺伝子レベルあるいは全ゲノムレベルにおける CNV 解析も重要であるが、前者には Alex Nord プログラムを、後者には XHMM プログラムを用いる。

IV. 次世代シーケンスデータの検証

対象疾患の発症遺伝モデルに沿って NGS で検出した遺伝子異常、稀な SNP 候補群を症例および家族構成員においてサンガー法で検証する。検出した塩基変化を臨床遺伝学的見地にに基づき様々な角度から評価する。

V. 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討

本研究で変異を有する症例の詳細な臨床情報を分析し、遺伝子変異が惹起する臨床病型を明らかにする。変異が及ぼす機能的

影響を種々の実験系にて検証する。

VI. 次世代データ解析プロトコールの策定

III で松本・高橋が別途開発したプロトコールによる検出データを IV で十分に検証し、最適プロトコールを策定する。既に陽性コントロールとなるデータ（真に原因の変異を含んだエクソームデータ）を多数保有しているためこれを用いて各種インフォーマティクスの比較検討が可能である。拠点班で共通プロトコール策定を進める。

VII. 難病遺伝子診断の支援

各拠点班や臨床遺伝ネットワークと連携を取り難病の遺伝子診断を支援する。

C. 研究結果

I. 全国規模のネットワークからの症例収集

上記の様々なネットワークを通じ症例を集積し、平成 26 年 1 月～12 月に研究室に送付された検体数は 4847 サンプルであった。

II. 次世代シーケンス解析

Agilent 社 SureSelect と Illumina 社 HiSeq2000/HiSeq2500 を用いて全エクソーム解析を行う。現状で 1 ラン 600 Gb、96 サンプルの解析が可能で、20 カバレッジで全遺伝子の 90-95%が解読できる。平成 26 年度は月に 192 サンプルの処理を平均的に行った。

III. 次世代シーケンスデータ解析

松本は、次世代シーケンス算出データから遺伝子変異同定する Novoalign-Picard-GATK-Annovar 解析フローをさらに効率化した Riker システムを開発し極めて効率よくバリエントを同定できている。96 サンプルのエクソームデータは平成 25 年までに保有していた IT 資産で 3-5 日で解析が完了するものであった。平成 26 年度は、並列計算機（300 コア）と大容量メモリーサーバ（60 コア）3 台を新たに導入し、全ゲノム解析においても十分な余力のある解析キャパシティを有するに至っている。さらに全エクソームデータを用いて遺伝子レベルあるいは全ゲノムレベルにおける CNV 解析も重要であるが、前者には Alex Nord プログラムを、後者には XHMM プログラムを用いて、前者では遺伝子の 1 エクソン欠失が、後者では 200 kb 以上の CNV が効率よく同定できるシステムを構築した。

IV. 次世代シーケンスデータの検証

対象疾患の発症遺伝モデルに沿って NGS で検出した遺伝子異常、稀な SNP 候補群を症例および家族構成員においてサンガー法で検証、検出した塩基変化を臨床遺伝学的見地に基づき様々な角度から評価した。CNV については主として定量 PCR による検証を進めた。

V. 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討

本研究で変異を有する症例の詳細な臨床情報を分析し、遺伝子変異が惹起する臨床病型を明らかにする。変異が及ぼす機能的影響を種々の実験系にて検証した。平成 26

年度に新たに結論づけ原因遺伝子は、Coffin-Siris 症候群における *SOX11* (Nat Commun, 2014), 難治性てんかんにおける *PIGA* (Neurology, 2014:論文の成果が雑誌の表紙を飾る), 先天性白質形成不全症における *TUBB4A* (Neurology, 2014) 等であった。また我々の遺伝子解析拠点が世界的にも認知されてきており Nat Rev Neurol にクリニカルエクソームに関する他グループの2つの論文に対するコメントを News & Views 発表した (Nat Rev Neurol, 2014)。

VI. 次世代データ解析プロトコルの策定

平成 23-25 年度に開発した SNV 同定プロトコルは、様々な微調整や追加情報付加により遺伝子変異特定に至るエフォートの軽減がかなり出来つつある。さらに CNV 解析についてもあらかじめ CNV に関する情報が全くない場合は XHMM を、欠失情報や遺伝子異常情報が明らかな場合は Nord プログラムを用いることで、微細な CNV の検出が可能となりつつある。

VII. 難病遺伝子診断の支援

平成 26 年度は各拠点班や臨床遺伝ネットワークと連携を取り難病症例の遺伝子診断支援を積極的に進めた。平成 26 年 4 月～12 月末までに本解析拠点で全エクソーム解析を行った全エクソーム解析数は 1625 症例である。研究と遺伝子診断支援との区別は事前には中々困難であり、我々の位置づけとしては、全エクソームシーケンスを行って既知遺伝子異常が同定されなかった直後に、研究対象にスイッチするという流れで進めている。仮に 25%が研究

対象の症例樽とするとおよそ 400 例超が研究対象で、残りの 1200 例程度が診断支援対象である。

D. 考察

確立し洗練されてきた SNV 解析プロトコルと新たに導入した CNV 解析を用いて様々な遺伝子異常の同定に効果が上がりつつある。複数の疾患において新たな責任遺伝子の同定が進んだ。

E. 結論

H26 年度は、インフォーマティクス解析用のインフラ整備、SNV に加えて CNV 解析のパイプライン整備、そして複数の遺伝性難治性疾患の原因解明、そして 1200 例超の難病遺伝子診断支援を行い、本拠点研究は計画通り順調に進んでいると考えている。

F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyatake S, *Matsumoto N (*: correspondence). Clinical exome sequencing in neurology practice. **Nat Rev Neurol** 10(12):676-678, 2014.

Tsurusaki Y, Ohashi H, Phadke S, Koshimizu E, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K-i, Kodera H, Miyatake S, Nakashima N, Saito H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, and *Matsumoto N. *De novo SOX11* mutations cause Coffin-Siris syndrome. **Nat Commun** 5:4011.

Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K,

- *Matsumoto N, *Saitu H (*: co-correspondence). Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies, **Neurology** 82(24):2230-2237, 2014.
- *Kato M#, *Saitu H#, *Murakami Y (*: co-first authors, #: co-correspondence), Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. **Neurology** 82(18):1587-1596, 2014.
- *Nakamura K, Kato M, Tohyama J, Shiohama T, Hayasaka K, Nishiyama K, Koderia H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saitu H. *AKT3* and *PIK3R2* mutations in two patients with megalencephaly-related syndromes. **Clin Genet** 85(4): 396-398, 2014
- *Miyake N, Kosho T, Matsumoto N. Ehlers-Danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities. J. Halper (ed.), Progress in heritable soft connective Tissue diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology 802. Pp145-159, 2014 Springer Netherland, Houten, Netherland
- Ichinose Y, Miwa M, Onohara A, Obi K, Shindo K, Saitu H, Matsumoto N, *Takiyama Y. Characteristic MRI findings in beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN). **Neurol Clin Pract** 4(2):175-177, 2014
- Fukai R, Hiraki Y, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, *Matsumoto N, *Miyake N (*: co-corresponding). A de novo 1.4-Mb deletion at 21q22.11 in a boy with developmental delay. **Am J Med Genet Part A** 164(4):1021-1028, 2014.
- Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, *Matsumoto N, *Miyake N (*: co-correspondence). A Novel WTX Mutation in a Female Patient who has Osteopathia Striata with Cranial Sclerosis and Hepatoblastoma. **Am J Med Genet Part A** 164A(4):998-1002, 2014.
- Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Kawato K, Suzuki Y, Ikeda T, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, *Matsumoto N, *Saitu H (*: co-correspondence). *PIGN* mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. **Neurogenet** 59(5):292-295, 2014.
- Leventer RJ, Jansen FE, Mandelstam SA, Ho A, Mohamed I, Sarnat HB, Kato M, Fukasawa T, Saitu H, Matsumoto N, Itoh M, Kalnins RM, Chow CW, Harvey AS, Jackson GD, Crino PB, Berkovic SF, Scheffer IE. Is Focal Cortical Dysplasia sporadic? Family evidence for genetic susceptibility. **Epilepsia**; 55(3):e22-26, 2014.
- Ohba C, MD, Kato M, Takahashi S, Lerman-Sagie T, Lev D, Terashima H, Kubota M, Kawawaki H, Matsufuji M, Kojima Y, Tateno A, Goldberg-Stern H, Straussberg R, MD, Marom D, Leshinsky-Silver E, Nakashima M, Nishiyama K, Tsurusaki T, Miyake N, Tanaka F, *Matsumoto N, *Saitu H (*: co-correspondence). Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. **Epilepsia** ;55(7):994-1000, 2014.
- Imagawa E, Kayserili H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitu H, Nishimura G, Ikegawa S, *Matsumoto N*, *Miyake N (*: co-correspondence). Severe manifestations of Hand-Foot-Genital syndrome associated with a novel *HOXA13* mutation. **Am J Med Genet Part A** 164A(9):2398-2402, 2014.
- #Ohba C, #Nabatame S, (# denotes equal contribution) Iijima Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Ozono K, Saitu H*, Matsumoto N* (*: co-corresponding). De novo WDR45 mutation in a patient showing clinically Rett syndrome with childhood iron deposition in brain. **J Hum Genet** 59(5):292-295, 2014.
- #Miyatake S, #Koshimizu E (# denotes equal contribution), Hayashi YK, Miya K, Shiina M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Ogata K, Nishino I, *Matsumoto N. Deep sequencing detects very low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy. **Neuromuscul Disord** 24(7):642-647, 2014.
- Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita T, Saitu H, Matsumoto N*. Novel compound heterozygous *PIGT* mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. **Neurogenet** 15(3):193-200, 2014
- Ozawa T, *Koide R, Nakata Y, Saitu H, Matsumoto N, Takahashi K, Nakano I, Orimo S. A novel WDR45 mutation in a patient with static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA). **Am J Med Genet Part A** 164(9):2388-2390, 2014.
- *Matsumoto N. A message from the new Editor-in-Chief. **J Hum Genet**. 2014 59(1):1.
- Yasuda Y, *Hashimoto R (* denotes a corresponding author), Fukai R, Okamoto N, Hiraki Y, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Taniike M, Mohri I, Nakashima M, Tsurusaki T, Saitu H, Matsumoto N, Miyake N, Takeda M. The *NPH1* duplication in autism spectrum disorder with normal intellectual ability: a case series. **Ann Gen Psychiatry**. 13:22, 2014.
- *Miyake N (*: corresponding author), Tsurusaki Y, Matsumoto N. Numerous BAF complex genes are mutated in Coffin-Siris syndrome. **Am J Med Genet Part C** 166(3):257-261, 2014.
- *Nakashima M (*: corresponding author), Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Matsumoto N. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. **J Hum Genet** 59(8):471-474, 2014.
- Ben-Omran T, Lakhani S, Almureikhi M, Ali R, Takahashi A, Miyake N, Matsumoto N, Ikegawa S, Superti-Furga A, *Unger S. Cono-spondylar dysplasia: Clinical, radiographic, and molecular findings of a previously unreported disorder. **Am J Med Genet Part A** 164(9):2147-2152, 2014.
- *Yoshida K (*: correspondence), Miyatake S, Kinoshita T, Doi H, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitu H, Matsumoto N. 'Cortical cerebellar atrophy' dwindles away in the era of next-generation sequencing

- (correspondence). *J Hum Genet* 59(10):589-590, 2014.
- Katagiri S, Akahori M, Sergeev Y, Yoshitake K, Ikeo K, Furuno M, Hayashi T, Kondo M, Ueno S, Tsunoda K, Shinoda K, Kuniyoshi K, Tsurusaki Y, Matsumoto N, Tsuneoka H, Iwata T. Whole exome analysis identifies frequent CNGA1 mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Plos One* 9(9):e108721, 2014.
- Tsurusaki Y, Yonezawa R, Furuya M, Nishimura G, Pooh RK, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Saito S, *Matsumoto N. Whole exome sequencing revealed causative biallelic IFT122 mutations in a family with CED1 and recurrent pregnancy loss. *Clin Genet* (in press)
- Nakamura K, Osaka H, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, *Matsumoto N, *Saitsu H (*: co-correspondence). *PIGO* mutations in epileptic encephalopathy with mild elevation of alkaline phosphatase levels. *Epilepsia* (in press).
- *Nakayama T, Saitsu H, Endo W, Kikuchi A, Uematsu M, Haginoya K, Hino-Fukuyo N, Kobayashi T, Iwasaki M, Tominaga T, Kure S, Matsumoto N. *RBPJ* is disrupted in a case of proximal 4p deletion syndrome with epilepsy. *Brain Dev* (in press).
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor B, Perrier J, Aggarwal S, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N. Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. *Clin Genet* (in press).
- *Okamoto N, Yamagata T, Yada Y, Ichihashi K, Matsumoto N, Momoi MY, Mizuguchi T. Williams-Beuren syndrome with brain malformation and hypertrophic cardiomyopathy. *Brain Dev* (in press)
- Hara M, Ohba C, Yamashita Y, Saitsu H, Matsumoto N, *Matsuishi T. *De novo SHANK3* mutation causes a female patient with Rett syndrome like phenotype. *Am J Med Genet Part A* (in press).
- Ohashi T, Akasaka N, Kobayashi Y, Magara S, Kawashima H, Matsumoto N, Saitsu H, *Tohyama J. Infantile epileptic encephalopathy with a hyperkinetic movement disorder and hand stereotypies arising from a novel SCN1A mutation. *Epileptic Disord* (in press)
- Kodera H, Ando N, Yuasa I, Wada Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitoh S, *Matsumoto N, *Saitsu H (*:co-corresponding). Compound heterozygous mutations in *COG2* encoding a subunit of the conserved oligomeric Golgi complex cause congenital disorder of glycosylation. *Clin Genet* (in press)
- Nakajima J, Okamoto N, Tohyama J, Kato M, Arai H, Funahashi O, Tsurusaki Y, Nakashima M, Kawashima H, Saitsu H, Matsumoto N[#], Miyake N[#] (*: co-corresponding). *De novo EEF1A2* mutations in patients with characteristic facial features, intellectual disability and, autistic behaviors and epilepsy. *Clin Genet* (in press)
- Endo Y, *Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I. Dominant mutations in *ORAI1* cause tubular-aggregate- myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channel. *Hum Mol Genet* (in press).
- Okubo M[#], Fujita A[#] (# denotes equal contribution), Saito Y, Komaki H, Ishiyama A, Kojima E, Koichihara R, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Yamazaki H, Kusaka K, Tanaka H, Matsumoto N, Sasaki M. A family of distal arthrogryposis type 5 due to a novel *PIEZO2* mutation. *Am J Med Genet Part A* (in press)
- Suzuki T, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Takeda S, *Matsumoto N. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole genome sequencing. *J Hum Genet* (in press).
- Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Fukuda-Yuzawa Y, Tsuji S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ikeda S, Tanaka F, Matsumoto N, *Yoshida K. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous *DDHD2* mutation. *Sci Rep* (in press)
- *Miyatake S, *Koshimizu E, (*: corresponding author), Tada H, Satoshi Moriya S, Takanashi J, Hirano Y, Hayashi M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H. Atypical giant axonal neuropathy arising from a homozygous mutation by uniparental isodisomy. *Clin Genet* (in press)
- *Saitsu H, Yamashita S, Tanaka Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, *Matsumoto N. Compound heterozygous *BRAT1* mutations cause familial Ohtahara syndrome with hypertonia and microcephaly. *J Hum Genet* (in press)
- Zerem A, Lev D, Blumkin L, Goldberg-Stern H, Michaeli-Yossef Y, Halevy A, Kivity S, Nakamura K, Matsumoto N, Leshinsky-Silver E, Saitsu H, *Lerman-Sagie T. Paternal germline mosaicism of a *SCN2A* mutation results in Ohtahara syndrome in half siblings. *Eur J Paediatr Neurol* (in press)
- *Wada T, Takano K, Tsurusaki Y, Miyake N, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese familial case of myoclonus-dystonia syndrome with a splicing mutation in the *SGCE* gene. *Pediatr Int* (in press)
- Kubota K, Saito Y, Ohba C, Saitsu H, Fukuyama T, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Matsumoto N. Brain magnetic resonance imaging findings and auditory brainstem response in a child with spastic paraplegia 2 due to a *PLP1* splice site mutation. *Brain Dev* (in press)
- *Saitsu H, Tohyama J, Walsh T, Kato M, Kobayashi Y, Lee M, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Goto Y, Nishino I, Ohtake A, King M-C, *Matsumoto N (*: co-correspondence). A girl with West syndrome and autistic features harboring a *de novo* *TBL1XR1* mutation. *J Hum Genet* (in press)
- Cho SY, Asharani PV, Kim OH, Iida A, Miyake N, Matsumoto N, Nishimura G, Ki CS, Hong G, Kim SJ, Sohn YB, Park SW, Lee J, Kwun Y, Carney TJ, Huh R, Ikegawa S[#], Jin DK[#]. (*: co-correspondence) (# denotes equal contribution). Identification and in vivo functional characterization of novel compound heterozygous *BMP1* variants in osteogenesis imperfecta. *Hum Mut* (in press)
- Shimojima K, Okumura A, Ikeno M, Nishimura A, Saito

- A, Saitsu H, Matsumoto N, *Yamamoto T. A de novo TUBB4A mutation in a patient with hypomyelination mimicking Pelizaeus-Merzbacher disease. **Brain Dev** (in press)
- Nakashima M, Miyajima M, Sugano H, Iimura Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Arai H, *Matsumoto N. The somatic *GNAQ* mutation c.548G>A (p.R183Q) is consistently found in Sturge-Weber syndrome. **J Hum Genet** (in press)
- Inui T, Kobayashi T, Kobayashi S, Sato R, Endo W, Kikuchi A, Nakayama T, Uematsu M, Takayanagi M, Kato M, Saitsu H, Matsumoto N, Kure S, Haginoya K. Efficacy of long term weekly ACTH therapy for intractable epilepsy. **Brain Dev** (in press)
- Uchino S, Saitsu H, Kumada S, Nakata Y, Matsumoto N. Stereotypic hand movements in β -propeller protein-associated neurodegeneration: first video report. **Mov Disord** (in press)
- *Takahashi S, Yamamoto S, Okayama A, Araki A, Saitsu H, Matsumoto N, Azuma H. Electroclinical features of epileptic encephalopathy caused by SCN8A mutation. **Pediatr Int** (in press).
- Yoshimura-Furuhata M, Nishimura-Tadaki A, Amano Y, Ehara T, Hamasaki Y, Muramatsu M, Shishido S, Aikawa A, Hamada R, Ishikura K, Hataya H, Hidaka Y, Noda S, Koike K, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Awadu M, Miyake N, Kosho T*. Renal complications in 6p duplication syndrome: microarray-based investigation of the candidate gene(s) for the development of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) and focal segmental glomerular sclerosis (FSGS). **Am J Med Genet Part A** (in press)
- Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H*, Matsumoto N* (*: co-corresponding). Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. **J Hum Genet** (in press)
- *Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with a severe form of vanishing white matter disease resembling Cree leukoencephalopathy. **Brain Dev** (in press).
- Hiraki Y, Miyatake S, Hayashidani M, Nishimura Y, Matsuura H, Kamada M, Kawagoe T, Yunoki K, Okamoto N, Yofune H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Murakami A, Miyake N, Nishimura G, *Matsumoto N. Aortic aneurysm and craniosynostosis in a family with Cantu syndrome. **Am J Med Genet Part A** 164(1):231-236, 2014.
- *Takanashi JI, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Inoue K, Matsumoto N, Barkovich JA. Different patterns of cerebellar abnormality and hypomyelination between POLR3A and POLR3B mutations. **Brain Dev** 36(3):259-263, 2014.
- Nakamura K, Jinnou H, Yokochi K, Okanishi T, Enoki H, Ohki S, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake M, Matsumoto N, Saitsu H*. A de novo *CASK* mutation in pontocerebellar hypoplasia type 3 with early myoclonic epilepsy and tetralogy of Fallot. **Brain Dev**36(3): 272-273, 2014.
- Kutuk MS, Balta B, Kodera H, *Matsumoto N, *Saitsu H, Doganay S, Canpolat M, Dolanbay M, Unal E, Dundar M. Is there relation between COL4A1/A2 mutations and antenatally detected fetal intraventricular hemorrhage? **Childs Nerv Syst** 30(3):419-424, 2014.
- Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Hideo Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, *Matsumoto N, *Miyake N. A hemizygous *GYG2* mutation causes Leigh syndrome. **Hum Genet** 133 (2):225-234, 2014

2. 学会発表

- 第 37 回日本小児遺伝学会学術集会・シンポジウム・松本直通「次世代シーケンサー解析のポテンシャルと小児医療」平成 26 年 4 月 10 日名古屋市立大学桜山キャンパス・名古屋
- The 9th Cherry Blossom Symposium. Symposium 4 “Clinical testing and automation utilizing new technology”Naomichi Matsumoto “Next generation sequencing dissecting human genetic diseases”Yokohama Red Brick Warehouse No. 1, April 19, 2014
- 第 382 回医学研究の基礎を語り合う集い・松本直通「遺伝性疾患におけるエクソーム解析の有用性」平成 26 年 4 月 21 日東京慈恵医科大学
- 九州大学産婦人科セミナー・松本直通「ゲノム解析と医療：1000 ドルゲノム時代を迎えて」平成 26 年 5 月 21 日第二博多偕成ビルアイクレオ
- 信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所設立記念講演会・記念講演会・松本直通「ゲノム解析と医療：1000 ドルゲノムシーケンス時代を迎えて」平成 26 年 5 月 25 日・信州大学医学部・松本
- 第 55 回日本神経病理学会総会学術集会・松本直通（シンポジスト）「WDR45 mutations cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood」@シンポジウム 1（English）「Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA): 急速に広がる疾患概念」平成 26 年 6 月 7 日学術総合センター

- 藤田保健衛生大学遺伝子網羅的解析センター開所記念セミナー・特別講演「ゲノム解析と医療：1000ドルゲノム時代を迎えて」平成26年6月21日@藤田保健衛生大学・豊橋
- 第110回日本精神神経学会学術総会・松本直通（シンポジスト）「発達障害のゲノム解析」シンポジウム50「精神疾患における分子と臨床の架け橋～病因と治療」2014年6月27日パシフィコ横浜、横浜
- がん研臨床試験・研究センター 第12回臨床研究セミナー松本直通「遺伝性疾患のゲノム解析---1000ドルゲノム時代を迎えて---」2014年7月3日がん研究会・東京
- 横浜市立大学先端医科学研究センター市民講座・松本直通「難病を解き明かすヒト全遺伝子・全ゲノム解析」2014年8月7日ウィリング横浜・横浜
- 文部科学省イノベーションシステム整備事業先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム「翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」第5回公開シンポジウム・松本直通「ヒト発生・発達異常の分子探索と診断法の開発」2014年8月19日・県民共済みなとみらいホール・横浜
- KOBE 内分泌・代謝スキルアップセミナー特別講演・松本直通・「ゲノム解析と医療--1000ドルゲノム時代を迎えて--」平成26年8月23日@ホテルクラウンパレス神戸
- 第17回胎児遺伝子診断研究会・セミナー1・松本直通「次世代シーケンサーの活用法」平成26年11月7日@ハウステンボス・佐世保
- 第56回日本先天代謝異常学会総会・松本直通・シンポジスト・「次世代シーケンサーによる遺伝子解析」平成26年11月14日@江陽グランドホテル・仙台
- 日本人類遺伝学会第59回大会・松本直通・シンポジスト「次世代シーケンサーを用いた染色体・ゲノム構造異常解析」平成26年11月21日@タワーホール船堀・東京
- 日本人類遺伝学会第59回大会・松本直通・NPG ランチョンセミナー「人類遺伝学研究におけるデータベースの重要性」平成26年11月22日@タワーホール船堀・東京
- The 37th annual meeting of the molecular biology society of Japan. Matsumoto N (as a symposist). "Congenital intellectual disability syndromes arising from mutations of epigenetic regulators" in the symposium for epigenetic dysregulation and disease. Pacifico Yokohama, Yokohama, Nov 27, 2014.
- 平成26年度報告会・松本直通「TUBB4A 変異による先天性白質形成不全症」・精神・神経疾患研究開発費（佐々木班）・平成26年11月30日・NCNP
- 平成26年度報告会・松本直通「Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子探索」精神・神経疾患研究開発費（後藤班）・平成26年12月9日・NCNP
- 日本遺伝子診療学会：遺伝子診断・検査技術推進フォーラム公開シンポジウム2014「個別化医療を進めるために」ランチョンセミナー・松本直通「臨床に役立つ次世代シーケンサーの活用法」・平成26年12月12日・コクヨホール（品川）

H. 知的財産権の出願・登録状況

- PCT/JP2014/065217 (2014年6月9日)「重度の知的障害及び運動発達遅滞を伴う難治性てんかんの検出方法」松本直通・才津浩智
- 指定国移行日本のみ特願 2013-552406 (2014年7月14日)「コフィン・シリリス症候群の検出方法」松本直通・三宅紀子・鶴崎美德
- 指定国移行 (JST 採択) 日本・特願 2013-542930 (移行日 2014年4月24日)・米国・14/357,373 (2014年5月9日)「孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法」松本直通・才津浩智
- 特許第5608863号「新生児期～乳児期発症の難治性

てんかんの検出方法」松本直通・才津浩智（2014
年9月12日登録・日本）

特願 2013-252720 ・鶴崎美徳 / 松本直通 ・
「Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子診断法」・平成
25年12月6日

PCT/JP2013/71620 ・松本直通 / 三宅紀子 ・ミトコ
ンドリア複合体 III 欠乏症患者又は保因者の検出
方法 ・平成 25 年 8 月 9 日 ・平成 26 年 2 月 7 日

特願 2013-157339 号 松本直通 / 三宅紀子 ・ケトン
血症を伴うリー脳症患者または保因者の検出法。
平成 25 年 7 月 31 日

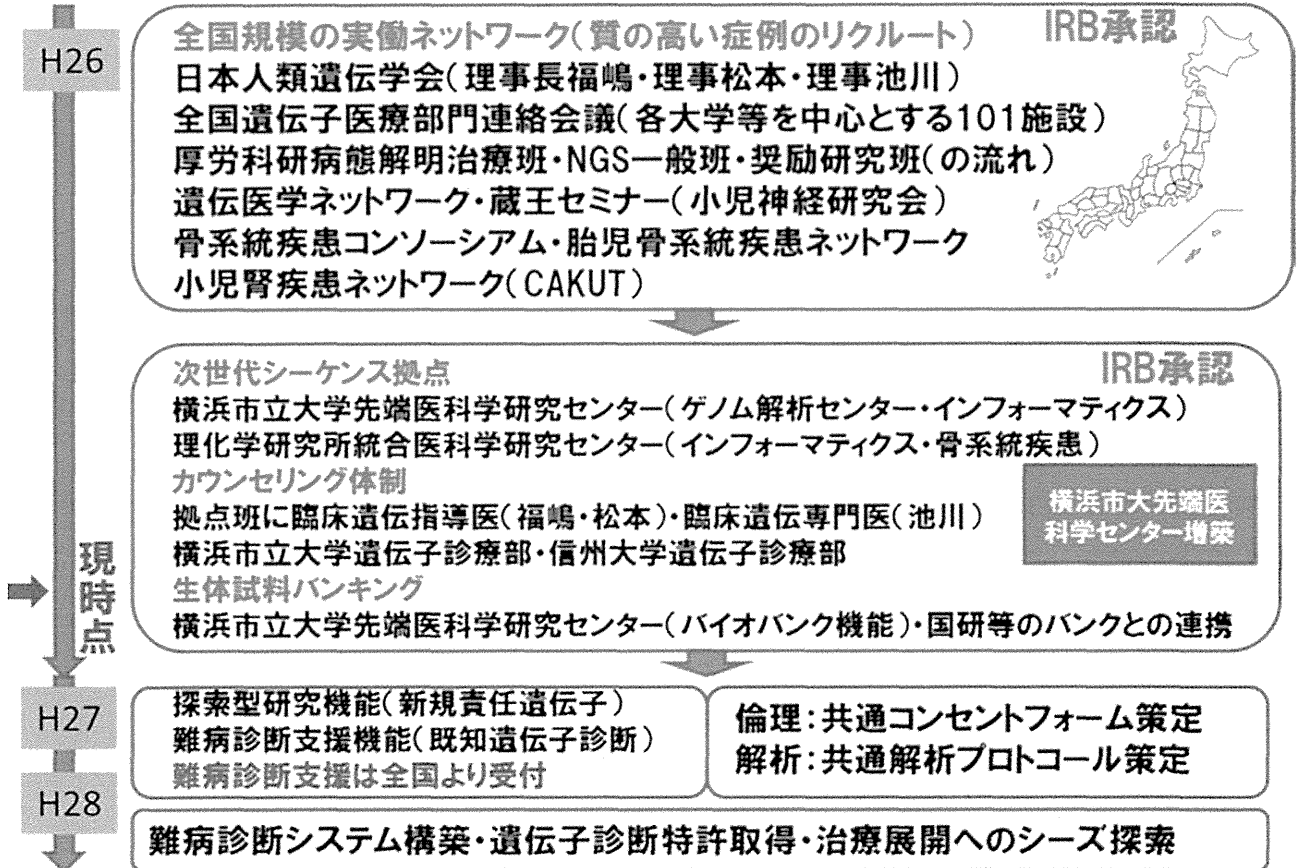
特願 2013-123660 才津浩智 / 松本直通 ・小児期の
てんかんおよび不随意運動をきたす疾患の検出
方法 ・平成 25 年 6 月 12 日

PCT/JP2012/83113 松本直通 / 鶴崎美徳 / 三宅紀
子 ・コフィンーシリス症候群の検出方法 ・平成
24 年 12 月 20 日

PCT/JP2012/77903 才津浩智 / 松本直通 ・孔脳症又
は脳出血のリスクを予測する方法 ・平成 24 年 10
月 29 日

特願 2012-180356 ・松本直通 / 三宅紀子 ・ミトコン
ドリア複合体 III 欠乏症の確定診断法 ・平成 24
年 8 月 16 日

研究全体の流れと進行状況



平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業 (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

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

分担研究課題：遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築

池川志郎 (理化学研究所統合生命医科学研究センター 骨関節疾患研究チーム)

様々な分野の専門医の協力下に、遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析研究の基盤である疾患のサンプルの集積体制を構築した。これを用いて収集した症例を解析して、いくつかの疾患で、未知の疾患遺伝子の同定に成功した。

1. 研究目的

遺伝性難治疾患を対象に、網羅的全エクソーム解析により原因遺伝子を解明するための研究基盤を構築する。それを基に全エクソーム解析を行い、疾患遺伝子を同定する。

2. 研究方法

1. 症例集積と一般研究班との連携体制の構築

専門医との各種ネットワーク等を通じて遺伝性難治疾患の集積を行う。

2. 次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析

松本研究室のシステムによる全エクソーム解析により検出された塩基異常を情報解析、分子遺伝学的解析により検証する。この検証過程を松本研究室でのプロトコール作成へフィードバックする。

3. 遺伝子変異と臨床病型・機能異常の検討

変異を発見した症例の詳細な臨床情報を分析し、臨床病型を明らかにする。更に、変異が惹起する機能的影響を実験系で検証する。

3. 研究結果

1. 症例集積と一般研究班との連携体制の構築

骨系統疾患コンソーシウム、胎児骨系統疾患ネットワーク等の遺伝性難治疾患の専門医集団、厚生省難病研究班(澤井班、渡邊班、戸山班、祖父江班

他)とのネットワークを構築し、遺伝性疾患、難治疾患の患者サンプルを集積する体制を確立した。30 疾患、150 例について、exome 解析を行った。

2. 次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析

以下のプロジェクトで、新規の遺伝子の変異の発見に成した。

1) split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency と Gollop-Wolfgang complex の原因遺伝子が *BHLHA9* 遺伝子であることを発見した。日本人には founder duplications/triplications があることを発見した (Orphanet J Rare Dis 2014)。

2) 劣性遺伝形式を示す骨形成不全症患者で、*BMP1* 遺伝子の複合ヘテロ遺伝子変異を同定し、その機能低下を *in vivo* モデルを用いて証明した (Hum Mutat 2014)。

3) 3つのインド人 Kim 型 Desbuquois dysplasia の家系に共通する新規の *CANT1* 遺伝子変異を発見した (Eur J Med Genet 2014)。

4. 考察

専門医の協力下に、研究の基盤である難治疾患のサンプルの集積体制を、研究の出口である患者さんへの情報の還元のと共に確立することができた。

1,000 例近くの in house の日本人の多型データなど、

横浜市大の拠点班に集積された情報、ノウハウにより、遺伝子同定の過程が洗練、効率化され、多くの疾患遺伝子の同定に成功することができた。また、多くの原因遺伝子が既知の疾患で、新たな変異を発見することができた。

5. 結論

次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析により遺伝性難治性疾患の原因遺伝子を同定する体制を確立し、これを用いて、疾患遺伝子変異の同定に成功した。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lachman RS, Burton BK, Clarke LA, Hoffinger S, Ikegawa S, Jin DK, Kano H, Kim OH, Lampe C, Mendelsohn NJ, Shediak R, Tanpaiboon P, White KK. Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A syndrome) and VI (Maroteaux-Lamy syndrome): under-recognized and challenging to diagnose. *Skeletal Radiol* 43:359-69. 2014.
- 2) Tsurusaki Y, Koshimizu E, Ohashi H, Phadke S, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K, Kodera H, Miyatake S, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, Matsumoto N. De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Commun* 5:4011. 2014.
- 3) Imagawa E, Kayserili H, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ikegawa S, Matsumoto N, Miyake N. Severe manifestations of hand-foot-genital syndrome associated with a novel HOXA13 mutation. *Am J Med Genet A* 164(9):2398-402. 2014.
- 4) Nagata E, Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura KI, 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(1):125. 2014.

- 5) Cho SY, Asharani PV, Kim OH, Iida A, Miyake N, Matsumoto N, Nishimura G, Ki CS, Hong G, Kim SJ, Sohn YB, Park SW, Lee J, Kwun Y, Carney TJ, Huh R, Ikegawa S, Jin DK. Identification and in vivo functional characterization of novel compound heterozygous BMP1 variants in osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2014 [Epub ahead of print].
- 6) Singh A, Kim OH, Iida A, Park WY, Ikegawa S, Kapoor S. A novel CANT1 mutation in three Indian patients with Desbuquois dysplasia Kim type. *Eur J Med Genet* 2014 [Epub ahead of print].

2. 学会発表

- 1) Ikegawa S. Genomic studies of bone and joint diseases: past, present and future. *Skeletal dysplasia workshop*. Stockholm. Mar 13, 2014.
- 2) Ikegawa S. Genomic study of skeletal diseases. 2nd Asia-Pacific Bone & Mineral Research Meeting. Seoul. May 31, 2014.
- 3) Ikegawa S. Genetic study for skeletal dysplasia. The 1st Gachon Skeletal Dysplasia Symposium. Incheon. May 31, 2014.
- 4) Ikegawa S. Genomic study of bone and joint diseases in East Asia. 59th Annual meeting of the Japan society of human genetics. Tokyo. Nov 22, 2014.
- 5) 池川志郎. 整形外科疾患のゲノム解析: パーソナルゲノム時代に取り残されない為に、第3回北大 Orthopaedic Research Seminar、札幌、2014. 3. 24
- 6) 池川志郎. ゲノム解析による疾患の原因と病態の解明: パーソナルゲノム時代の疾患研究の現状と問題点、愛媛大学大学院医学系研究科セミナー、松山、2014. 4. 21
- 7) 池川志郎. 骨・関節疾患のゲノム解析 - パーソナルゲノム時代の疾患研究、第32回日本骨代謝

学会学術集会、大阪、2014. 7. 24

- 8) 池川志郎. 骨系統疾患のゲノム解析 — 日常の臨床の中の遺伝病. 第18回新潟小児整形外科研究会、新潟、2014. 9. 27
- 9) 池川志郎. ゲノム研究の進歩と臨床への応用— 整形外科領域の現状と課題—、第29回日本整形外科学会基礎学術集会、鹿児島、2014. 10. 10
- 10) 池川志郎. 病気と遺伝: 疾患研究のためのひとの遺伝学の基礎知識、愛媛大学医学部特別講義、松山、2014. 10. 20
- 11) 池川志郎. ゲノムからの疾患の解明 — 骨関節疾患を例に一、第4回臨床ゲノム医療学会、東京、2014. 11. 30

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究題目「遺伝性難治疾患の網羅的遺伝子解析拠点研究」
分担研究報告書

分担研究課題：次世代シーケンスデータ解析

高橋篤(理化学研究所統合生命医科学研究センター統計解析研究チーム)

研究要旨：

遺伝性難治性疾患の網羅的遺伝子解析拠点研究として、次世代シーケンスのデータ解析を実施する、次世代シーケンスのデータ解析に必要なプログラムなどの開発を行う。大規模なデータ解析を実施するための解析可能なシステムを構築する。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いた網羅的全エクソーム解析により、遺伝性難治疾患の原因遺伝子を同定するために必要な、大規模データの情報解析の研究基盤を構築するための研究を行う。

B. 研究方法

1. 次世代シーケンスデータの統計・情報解析

次世代シーケンサーで得られた配列データに対し、効率的・迅速に情報・統計解析を実施するための研究開発を行う。

2. 網羅的エクソームデータ解析の情報基盤の構築

次世代シーケンサーから算出される大規模な配列データを解析するために必要な情報解析基盤の構築を行う。

C. 研究結果

1. 次世代シーケンスデータの統計・情報解析

次世代シーケンサーによる解析では、同じ配列データであっても、解析に使用しているツールなど解析手法が異なると、解析に必要な時間や結果が大きく異なる。次世代シーケンサーによって読み取られたゲノム配列情報をリファレンス配列にマッピングするため使われているプログラムの一つに bwa がある。

bwa には、aln と mem の 2 つの手法がある。aln と mem による違いを調べた。mem は aln よりも約 4 倍高速であり、精度はほとんど変わらなかった。

リファレンス配列へのマッピングに関して、リファレンス配列に decoy 配列を加えた場合の影響についても調べた。その結果、decoy 配列を加える事により、偽陽性が減少する事がわかった。

2. 網羅的遺伝子解析拠点の情報基盤の構築

遺伝性難治性疾患に関連する遺伝子・変異を同定するためには、一般集団に変異が存在するかの情報が必要になる。解析手法が異なると得られる変異情報が異なるために、同じ解析手法で解析を行うのが望ましい。横浜市立大学で行われた次世代シーケンサーによる全エクソームシーケンスの実験結果を一般集団として利用した解析をするためのシステムを構築した。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた解析により、次々と疾患の原因遺伝子が明らかになっている。これらの解析は、大規模データが基本であり、解析に時間がかかる。解析手法により、時間や精度が異なる。bwa の場合は、解析に要する時間と精度を考慮すると、decoy 配列を用いた mem が良いと考えられる。次世代シーケンサーの解析で偽陽性を減

らすためには、同一手法、同一条件で解析をすることが重要である。横浜市立大学のデータを一般集団として解析をする場合において、これを行うことが可能になった。

E. 結論

遺伝性難治疾患の網羅的遺伝子解析拠点研究において、情報解析の研究を実施した。横浜市立大学より提供された次世代シーケンスデータを用いて、一般集団における変異の検出を可能にするシステムを構築した。

F. 健康危険情報 なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ben-Omran T., Lakhani S., Almureikhi M., Ali R., Takahashi A., Miyake N., Matsumoto N., Ikegawa S., Superti-Furga A., and Unger S. Cono-Spondylar Dysplasia: Clinical, Radiographic, and Molecular Findings of a Previously Unreported Disorder. *Am J Med Genet A* 164A, 2147-52 (2014).

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築
分担研究課題：ゲノム研究倫理と網羅的エクソーム解析の対象症例の集積
研究分担者 福嶋義光 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座 教授

研究要旨

パーソナルゲノム時代における網羅的エクソーム解析の倫理的課題を明らかにし、個人ゲノム情報を適切に医療の場に反映させる医療提供体制のあり方、網羅的エクソーム解析を行う際のインフォームド・コンセントのあり方等を検討するための情報収集と共に、対象となる症例の集積に努めた。

研究協力者

涌井敬子(信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座)
高野亨子(信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座)
古庄知己(信州大学医学部附属病院遺伝子診療部)

A. 研究目的

パーソナルゲノム時代における網羅的エクソーム解析の倫理的課題を明らかにし、個人ゲノム情報を適切に医療の場に反映させる医療提供体制のあり方を提言するとともに、対象となる症例の集積を行う。

B. 研究方法

1) ゲノム研究倫理の検討のための情報収集

全ゲノムシーケンスによりもたらされる情報の倫理的課題について、文献および学会参加等により情報を収集し、問題点および検討すべき課題を整理した。

2) 症例集積

原因不明の既知の先天奇形症候群あるいは診断未確定の原因不明の多発奇形／知的障害症候群(MCA/ID)症例を収集し、次世代シーケンス法(NGS)で検出が困難な数十 kb～数 Mb のゲノムコピー数変化(copy number variations; CNVs)を検出するマイクロアレイ染色体解析によるスクリーニングを実施した。マイクロアレイ染色体解析は、CGH 法を原

理とする CGX アレイ (Agilent, 60k Oligo probe) を用いて実施、専用ソフトである Genoglyphix® (Signature Genomic Laboratories, LLC)を用いて解析した。

疾患や症状と関連するゲノムコピー数異常を認めなかった症例を網羅的エクソーム解析の候補と症例して、臨床情報を再検討した。

また、試料提供の協力の得られた無症状の親のマイクロアレイ染色体解析を実施し、これまでに得ていた無症状の親の CNVs 結果とともに日本人一般成人に認めた先天異常と関連しないコピー数変化(benign CNVs; bCNVs)として検討した。

C. 研究結果

1) ゲノム研究倫理の検討のための情報収集

1-1. ACMG ステートメント (2013) のその後

米国臨床遺伝・ゲノム学会 (American College of Medical Genetics and Genomics; ACMG) のワーキンググループは、2013 年 3 月に臨床の場で実施されるエクソーム解析において、それが目的外のもの(偶発的所見: incidental findings)であっても、被験者にその結果を開示すべき 24 疾患、56 遺伝子を公表した [Green RC et al.:ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. *Genet Med.* 2013;15(7):565-574]. 主な疾患としては、遺伝性乳

がん卵巣癌症候群 (HBOC) などの遺伝性腫瘍 (16 疾患), Marfan 症候群や遺伝性不整脈などの循環器疾患 (7 疾患) および悪性高熱症が含まれている。

これらの疾患・遺伝子は、変異が明らかになった場合には、浸透率が高くほぼ間違いなくその疾患に罹患すること、および診断された場合には、治療法・予防法があり、被験者にとって健康上のメリットがあることから、診療の一環として行われたエクソーム解析においては、これらの情報を被験者に報告すべきであるとしている。

その後、ACMG 会員へのアンケート調査を含む種々の検討が行われ、2014 年 11 月に "American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Policy Statement: Updated Recommendations Regarding Analysis and Reporting of Secondary Findings in Clinical Genome-Scale Sequencing" を公表した。この文書では、whole exome sequencing (WES) と whole genome sequencing (WGS) とを合わせて、genome-scale sequencing と表現しており、また従来 incidental findings (IF) と呼んでいた目的外の遺伝子情報のことを secondary findings (SF) と表現している。

その骨子は下記の通りである。

- clinical genome-scale sequencing が行われる場合には、認証を受けた遺伝学の専門家により文書でインフォームド・コンセントを得ておかなければならない。その内容には、検査の本質、解釈が困難である場合があること、プライバシー、他の血縁者への影響、得られたデータが直ちに臨床的に有用であるとは言い切れないこと、などが含まれる。検査実施時に患者は、当初の検査目的を理解するだけでなく、検査室では治療・予防が可能と考えられる疾患の遺伝子の病的バリエーションを検出するためにルーチンに解析を行っていることを理解しておかなければならない。
- 患者はインフォームド・コンセントの過程で、これらの解析を拒否 (opt out) することができるが、それによっておこることも理解しておかなければならない。
- 小児においても、成人と同様の遺伝子セットの解

析を行うが、小児の両親はインフォームド・コンセントの過程で、拒否することができる。

- 解析する遺伝子の病気のリストを示し、それぞれの病気について説明を行うことは困難なので、患者には、医学的に有意義であると考えられる遺伝子セットの解析を希望するかどうかの選択肢が与えられる。

最後に、ACMG は、genome-scale testing をめぐる問題は極めて複雑であり、新しい知見、技術に基づき、二次的所見としてルーチンに解析すべき遺伝子リストを恒常的に見直すとともに、ACMG の会員だけでなく、多領域の専門家を含めたワーキンググループで、患者にとってもっともよい方法を検討していくとしている。

1-2. 塩基配列多様体 (sequence variant) の解釈

従来、遺伝学的検査は、ある遺伝性疾患の可能性のある患者を対象に、候補となる責任遺伝子の変異を検出ために行われてきた。しかし、NGS の登場により、genome-scale testing が広く行われるようになり、数多くのバリエーションが検出されるようになった。

変異 (Mutation) と多型 (polymorphism) という用語は広く用いられているが、pathogenic か、benign かについては明確ではなく混乱をまねくので、ACMG では塩基配列多様体 (シークエンス・バリエーション) の解釈に関する標準ガイドライン: Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association of Molecular Pathology の作成準備が行われている。

その概要は下記の通りである。

- 変異 (mutation) と多型 (polymorphism) という用語を廃止し、ゲノム上の全ての変化を次の 5 つの修飾語をつけて、バリエーションと表現する。likely という用語は限定して用いられるべきであり、90%以上の確かさがある場合に用いることを目標とする。