

平成27年度厚生科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）  
分担研究報告書

次世代シーケンスの有用性と遺伝子診断スキーム

研究分担者 才津 浩智 浜松医科大学医化学

**研究要旨**

遺伝性白質疾患は、乳児期に発症する進行性の疾患であり、いずれも根本的な治療法が未確立である。そのため、患者における疾患原因遺伝子変異の同定（すなわち遺伝子診断）によって、疾患の分子基盤を明らかにすることは、遺伝子変異に基づいた疾患の病態解明と将来的な個別化医療において極めて重要と考えられる。近年、全エクソーム解析の登場により、遺伝子解析のパラダイムシフトがおこっている。本研究では、（１）遺伝性白質疾患における全エクソーム解析の有用性と、（２）今後の遺伝性白質疾患の早期遺伝子診断に必要なスキームについて検討を行った。今後、個々の症例において、全エクソーム解析とターゲット遺伝子を絞ったターゲットリシーケンス解析のどちらを選択するかを仕分けシステムを構築することが、コストを抑えた効率的な遺伝子診断に繋がると考えられる。

**A．研究目的**

本研究は、（１）遺伝性白質疾患における全エクソーム解析の有用性、（２）今後の遺伝性白質疾患の早期遺伝子診断に必要なスキーム、の２点について検討を行った。

**B．研究方法**

遺伝性白質疾患症例に関してこれまでに横浜市立大学で全エクソーム解析を行った症例に関して検討を行った。

**C、D．結果および考察**

**(1) 遺伝性白質疾患診断における次世代シーケンス解析の有用性**

近年の次世代シーケンサーの登場と全エクソーム解析の開発により遺伝子解析技術は飛躍的な進歩を遂げている。エクソーム解析は、ゲノム上のエクソン領域（タンパク質をコードする領域）を選択的にキャプチャし、高効率に濃縮してから次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行うことで、遺伝子をコードする領域の変異を網羅的かつ効率的に解析する手法である<sup>1)</sup>。全エクソーム解析を行うことで、全遺伝子の約9割において疾患候補遺伝子変異がリストアップできるようになり、既知の疾患責任遺伝子の変異について一度に検査することが可能となっただけでなく、様々な条件を課して新規の責任遺伝子変異を特定することが可能になった。以下、実際の例を挙げて、遺伝性白質疾患の遺伝子診断における全エクソーム

解析の有用性について述べる。

小脳萎縮と脳梁低形成を伴うび慢性大脳白質形成不全症（diffuse cerebral hypomyelination with cerebellar atrophy and hypoplasia of the corpus callosum: HCAHC）は、2009年に本研究班の班員らが提唱した新しい疾患概念である<sup>2)</sup>。3歳頃から徐々に進行する歩行失調、振戦、緩徐言語、軽度から中等度の精神運動発達遅滞を呈し、頭部MRI画像上、髄鞘化の遅延、小脳萎縮と脳梁の低形成を認める大脳白質形成不全症であり、その原因遺伝子は不明であった。我々は先天性白質形成不全症研究班を通してHCAHCの5家系6名の患者をリクルートし、各家系から1名ずつ5名の全エクソーム解析を行い、原因遺伝子変異の同定を試みた（図1A）。変異の検出はMAQ<sup>3)</sup>およびSoftGenetics社のNextGENeを用いて行い、これら2つの解析方法で共通して検出した1塩基置換を解析対象とした。また、挿入/欠失変異についてはNextGENeのみで検出した。1家系において姉弟例を認めため常染色体劣性遺伝形式を想定した解析を行い、得られた変異を段階的に絞り込んだ結果、1症例あたり3-8遺伝子が劣性遺伝形式の候補遺伝子として挙げられた（図1B）。

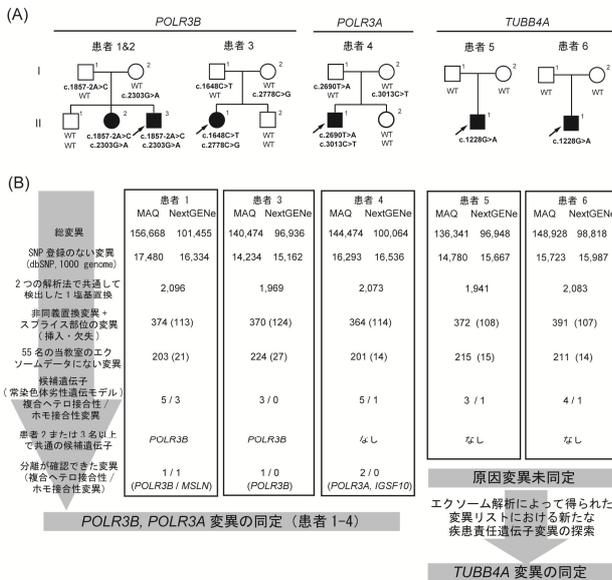


図1. HCAHC 家系の全エクソーム解析<sup>4)</sup>

(A)患者 1-6 の家系図。黒塗りは HCAHC 患者で、全エクソーム解析を行った患者を矢印で示している。塩基変異は、複合ヘテロ接合性変異および *de novo* 変異の家族内での分離を表している。(B) 全エクソーム解析で得られた変異の段階的絞り込みの過程を示す。結果的に、患者 1-4 では *POLR3A* / *POLR3B* の変異が同定され、患者 5、6 においては *TUBB4A* 変異が同定された。

5名で共通の候補遺伝子は認めなかったが、2名共通で *POLR3B* 遺伝子が、1名に *POLR3A* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異(2つある遺伝子座のそれぞれに変異がある状態)を同定し(図1B)患者2(患者1の罹患同胞)についても *POLR3B* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を確認した(図1A)。患者5および患者6については、原因遺伝子変異が特定できなかった。*POLR3A* および *POLR3B* 遺伝子は RNA polymerase III (Pol III) 複合体のコアになるサブユニット(RPC1およびRPC2)をコードしている。複合体の3次元モデルの解析から、同定された変異は、サブユニットの構造あるいはサブユニット間の相互作用に影響を及ぼし、Pol III 活性を低下させると予測できた。Pol は tRNA と 5S rRNA を含む大多数の低分子 RNA をコードする遺伝子を転写しており、これらの低分子 RNA 量が不足することにより髄鞘化不全が起きると考えられた<sup>4)</sup>。

基底核および小脳萎縮を伴う髄鞘形成不全症(Hypomyelination with atrophy of basal ganglia

and cerebellum: H-ABC) は、2002年に van der Knaap らが提唱した疾患概念で、髄鞘化の遅延と小脳および基底核の萎縮をともなう白質形成不全症である<sup>5)</sup>。2013年に チュープリンをコードする *TUBB4A* 遺伝子の *de novo* 変異(ご両親で認められず、患者で起こった新生突然変異)が原因であることが報告された<sup>6)</sup>。H-ABC は HCAHC と臨床所見がオーバーラップする疾患である。そこで、*POLR3A* および *POLR3B* 遺伝子変異が見つからなかった HCAHC の2例において、エクソーム解析で得られた変異リストで *TUBB4A* 変異の有無を検索したところ、2症例で共通して c.1228G>A (p.Glu410Lys)変異が見つかった。この変異は、サンガーシーケンシング法で、ご両親に認められない *de novo* 変異であることが確認できた。p.Glu410Lys 変異の2症例は、H-ABC に認められる基底核の萎縮は明らかでなかった。チュープリンタンパク質の3D構造モデルの解析では、H-ABC 患者で見つかる変異の多くはヘテロダイマーの接合面にあり、縦方向の相互作用に関係しているのに対して、p.Glu410Lys 変異は、プロトフィラメントの外面に位置し、微小管関連蛋白質との相互作用に影響を与える可能性が示唆された(図2)<sup>7)</sup>。

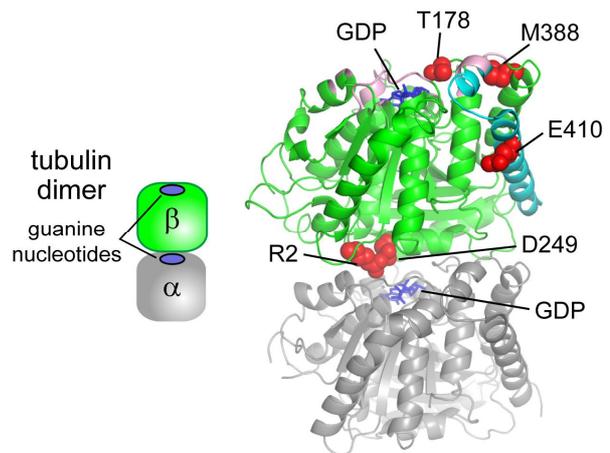


図2. *TUBB4A* 変異のチュープリン重合に与える影響<sup>7)</sup>

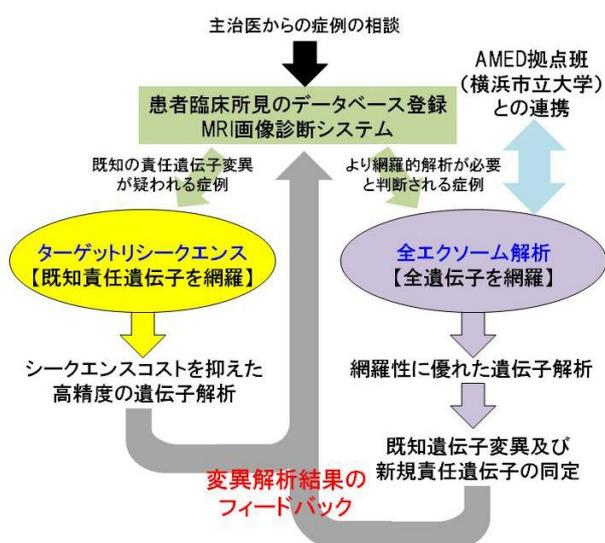
H-ABC 患者で見つかった変異アミノ酸(R2, T178, D249, M388)はヘテロダイマーの接合面にあり、縦方向の相互作用に関係しているのに対して、HCAHC 患者で見つかった変異アミノ酸(E410)はプロトフィラメントの外面に位置している。

このように、1つの遺伝性白質疾患(HCAHC)において全エクソーム解析を行うことにより、

新規原因遺伝子 (*POLR3A*, *POLR3B*) が同定され、さらにオーバーラップする白質疾患の責任遺伝子変異 (*TUBB4A*) も同定された。このことは、画像診断等の臨床所見の詳細な評価と次世代シーケンス解析の網羅性を組み合わせることで、遺伝性白質疾患の遺伝子診断が効率的に行われることを示唆している。

## (2) 遺伝性白質疾患の早期遺伝子診断

遺伝性白質疾患は遺伝的多様性が大きい疾患であり、従来の疾患責任遺伝子毎の PCR-シーケンス法による点変異の検出を複数の疾患責任遺伝子に対して行うことは、大変な時間と労力を要する。更に、例えば Pelizaeus-Merzbacher 病の場合、原因遺伝子 *PLP1* のコピー数異常も検討する必要がある。全エクソーム解析をはじめとする次世代シーケンス解析は、網羅的遺伝子解析が可能のみならず、DNA 断片をキャプチャする場合、コピー数解析も可能である<sup>8,9)</sup>。また、白質疾患の 30~40% 程度は詳細な MRI 画像解析によっても臨床診断が困難であると推定されており<sup>10)</sup>、遺伝的多様性を考慮した場合、遺伝性白質疾患の早期遺伝子診断に次世代シーケンス解析は極めて有用と考えられる。最もコストを抑えて、かつ早期の遺伝子診断が可能と考えられる遺伝子診断のスキームを図 3 に示す。



**図 3 . 遺伝性白質疾患の早期遺伝子診断スキーム案**

ターゲットリシーケンス解析は解析対象の遺伝子を既知の責任遺伝子に絞った解析方法であり、全エクソーム解析と比較してシーケンスコストを抑えて高精度の遺伝子解析が可

能である。しかし一方では新規遺伝子の変異は解析できないため、既知の責任遺伝子に異常を認めない症例に関しては、更なる遺伝子診断のために全エクソーム解析が必要となる。今回提案する遺伝子診断のスキームでは、主治医より研究班に症例の相談があった場合、患者情報のデータベース登録と MRI 画像診断システムの運用を行い、ターゲットリシーケンス解析とより網羅的な全エクソーム解析の 2 つの解析方法への症例の振り分けを行う。変異解析結果はデータベースに登録され、変異情報のフィードバックによって更に画像診断システムの診断精度が上がるのが期待される。また、全エクソーム解析によって新規責任遺伝子を同定することは、遺伝子診断率を上げるだけでなく、責任遺伝子変異がもたらす病態を解析することによって、画期的な治療法に繋がる可能性がある。

難治性疾患については、中枢神経白質形成異常症の遺伝学的検査としては 3,880 点のみが保険診療として算定可能である。今後、次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断のコストダウンを図ることで、診療の質が向上することが期待される。

## 引用文献

1. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12(11): p. 745-55.
2. Sasaki M, Takanashi J, Tada H, et al. Diffuse cerebral hypomyelination with cerebellar atrophy and hypoplasia of the corpus callosum. *Brain Dev* 2009; 31(8): p. 582-7.
3. Li H, Ruan J and Durbin R. Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res* 2008; 18(11): p. 1851-8.
4. Saitsu H, Osaka H, Sasaki M, et al., Mutations in *POLR3A* and *POLR3B* Encoding RNA Polymerase III Subunits Cause an Autosomal-Recessive Hypomyelinating Leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet* 2011; 89(5): p. 644-51.
5. van der Knaap MS, Naidu S, Pouwels PJ, et al. New syndrome characterized by hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002; 23(9): p. 1466-74.
6. Simons C, Wolf NI, McNeil N, et al. A de novo mutation in the beta-tubulin gene *TUBB4A* results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal

- ganglia and cerebellum. *Am J Hum Genet* 2013; 92(5): p. 767-73.
7. Miyatake S, Osaka H, Shiina M, et al. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. *Neurology* 2014; 82(24): p. 2230-7.
  8. Kodera H, Kato M, Nord AS, et al. Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 2013; 54(7): p. 1262-9.
  9. Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, et al. Detecting copy-number variations in whole-exome sequencing data using the eXome Hidden Markov Model: an 'exome-first' approach. *J Hum Genet* 2015; 60(4): p. 175-82.
  10. Schiffmann R and van der Knaap MS. Invited article: an MRI-based approach to the diagnosis of white matter disorders. *Neurology* 2009; 72(8): p. 750-9.

## D . 健康危険情報

特になし。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

1. Kim Y, Asano Y, Koide R, Kimura H, Saitu H, Matsumoto N, Bando M. Callosal disconnection syndrome in symptomatic female carrier of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Neurol Sci.* 2015 Nov 15;358(1-2):461-2. doi: 10.1016/j.jns.2015.08.008.
2. Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saitu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Cree leukoencephalopathy. *Brain Dev.* 2015 Jun;37(6):638-42. doi: 10.1016/j.braindev.2014.10.002.
3. Tsurusaki Y, Tanaka R, Shimada S, Shimojima K, Shiina M, Nakashima M, Saitu H, Miyake N, Ogata K, Yamamoto T, Matsumoto N. Novel compound heterozygous *LIAS* mutations cause glycine encephalopathy. *J Hum Genet.* 2015 Oct;60(10):631-5. doi: 10.1038/jhg.2015.72.

### 2. 学会発表

1. H. Saitu, M. Nakashima, N. Takei, J. Tohyama, M. Kato, H. Kitaura, M. Shiina, H. Shirozu, H. Masuda, K. Watanabe, C. Ohba, Y. Tsurusaki, N. Miyake, Y. Zheng, T. Sato, H.

Takebayashi, K. Ogata, S. Kameyama, A. Kakita, N. Matsumoto. Somatic mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. 69<sup>th</sup> Annual Meeting of American Epilepsy Society, Dec 5 2015, USA

2. 才津浩智、深井綾子、酒井康成、三牧正和、岡本伸彦、鈴木保宏、門田行史、齊藤洋、鳥尾倫子、赤峰哲、高橋長久、小坂仁、山形崇倫、中村和幸、中島光子、鶴崎美徳、三宅紀子、椎名政昭、緒方 一博、松本直通. GNAO1 変異が引き起こす表現型の広がり：てんかん性脳症から不随意運動を伴う発達遅滞まで 日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015 年 10 月 16 日、京王プラザホテル、東京都
3. H.Saitu, R. Fukai, B. Ben-Zeev, Y. Sakai, M. Mimaki, N. Okamoto, Y. Suzuki, Y. Monden, H. Saito, B. Tziperman, M. Torio, S. Akamine, N. Takahashi, H. Osaka, T. Yamagata, K. Nakamura, Y. Tsurusaki, M. Nakashima, N. Miyake, M. Shiina, K. Ogata, N. Matsumoto. Phenotypic spectrum of *GNAO1* variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. 65<sup>th</sup> Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Oct 9 2015, Baltimore, USA
4. Saitu H, Ohba C, Shiina M, Tohyama J, Haginoya K, Lerman-Sagie T, Okamoto N, Blumkin L, Dorit Lev D, Mukaida S, Nozaki F, Uematsu M, Onuma A, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Kato M, Ogata K, Matsumoto N. GRIN1 mutations cause encephalopathy with epilepsy, hyperkinetic and stereotyped movement disorders. 第 52 回日本先天異常学会学術集会、2015 年 7 月 25 日、パシフィコ横浜、横浜
5. 才津浩智 . 招待講演 「次世代シーケンサーを用いた乳幼児てんかん性脳症の遺伝要因の解明」第 4 回次世代シーケンス技術応用研究会、2016 年 2 月 29 日、豊橋技術科学大学、豊橋
6. 才津浩智 . 特別講演 「発達期脳神経疾患の遺伝要因の解明」第 173 回東北小児神経学研究会(四季会)、2016 年 2 月 7 日、アゼリアヒルズ、仙台
7. 才津浩智 . 特別講演 「次世代シーケンサーが切り開く発達期脳神経疾患の原因解明」第 44 回日本小児神経学会東海地方会、

2016年1月23日、名古屋大学医学部基礎  
研究棟 第4講義室、名古屋

8. 才津浩智 . 特別講演 「次世代シーケンサーを用いた包括的遺伝子解析」 第22回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会、2016年10月3日、九州大学医学部同窓会館 小講堂、福岡
9. 才津浩智 . 「網羅的遺伝子異常検出系を駆使した乳幼児てんかん性脳症の遺伝要因の解明」 第5回都医学研シンポジウム、2015年11月12日、一橋講堂、東京都
10. 才津浩智 . 招待講演 「次世代シーケンスが切り開く 疾患の原因解明」 日本人類遺伝学会第60回大会, 2015年10月16日、京王プラザホテル、東京都

## **H . 知的財産権の出願・登録状況**

特になし