

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）  
分担研究報告書

## 次世代シーケンスとマイクロアレイ染色体の組み合わせによる染色体微細構造解析

黒澤 健司

神奈川県立こども医療センター遺伝科 部長

**研究要旨**

エクソーム解析は、全遺伝子に対して網羅的ではあるものの、CNV (Copy number variant) 評価としては限界がある。XHMM (eXome Hidden Markov Model) は、一定のアルゴリズムで CNV 評価を行うが、パラメーター設定によっては、ある程度の物理的範囲が必要である。エクソン単位での評価は、今後の臨床応用で極めて需要である。今回このデータ処理により 2 例の症例でエクソン単位での CNV が発症原因であることを明らかにした。診断未確定症例では、マイクロアレイ解析が次世代シーケンス後の CNV 確認として有用となる可能性がある。

**A. 研究目的**

全ゲノムシーケンスの臨床応用が視野に入りつつある現在、得られたシーケンスデータによる構造解析および CNV 解析は極めて重要となる。次世代シーケンスの臨床応用の適応範囲は極めて広く、従来染色体微細構造異常としてマイクロアレイで検出してきた疾患特異的コピー数変化 (Copy number variant) も、次世代シーケンスデータの、データ変換解析により、エクソン単位、あるいは遺伝子単位で、検出することが可能となりつつある。現在まで、我々の研究グループでは、視覚的に理解しやすく、データの解釈が一般臨床医でも可能となるエクソン単位の CNV 評価を取り入れてきた。

今回、さらに症例を追加して次世代シーケンスデータによる CNV 評価とマイクロアレイ染色体検査の併用による臨床診断のプロセスを検討した。

**B. 研究方法**

対象は、知的障害および先天性の多発形態異常を身体特徴とする症例で、臨床症状の組み合わせおよび通常の診療で行われる生化学的検査及び染色体検査からは、特定の診断確定に至らない症例であった。次世代シーケンサーによる疾患原因遺伝子変異スクリーニングは、卓上型次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ社) ないしは HiSeq3000 (イルミナ社) を使い、ゲノム上のターゲット領域のキャプチャーは、MiSeq プラットフォームでは TruSight One Sequencing Panel (イルミナ社)、HiSeq3000 では SureSelect (アジレント・テクノロジー社) を使用した。解析パイプラインは、GATK、BWA、snpEff を主軸として、病原性予測として CADD、PolyPhen-2、SIFT、PROVEAN を使い、参

照データベースとして gnomAD、jMorp、HGVD、ClinVar、HGMD などを用いた。このバリエーション評価は、施設内倫理承認のもと、親権者からの同意書を取得したのちに進めた。マイクロアレイ解析は、Agilent 社製マイクロアレイシステムを用い、アレイは SurePrint G3 Human CGH Microarray kit 8x60K を用いた。解析手順は、Agilent 社による標準プロトコールに準じて進めた。得られたデータの解析は Agilent Genomic Workbench ソフトウェアを用いた。データは DLR spread 値 < 0.30 を採用した。比較対照 DNA は、Promega 社製 Female および Male genomic DNA を用いた。

(倫理面への配慮)

まとめるにあたって、個人情報取り扱い留意し、連結可能匿名化のもとで解析を進めた。

**C. 研究結果**

症例 1 は、聴力低下を主訴に来院の男児で、頭部 MRI などから超神経腫瘍が疑われた。原因検索としてメンデル遺伝病パネル解析を施行、NF2 遺伝子エクソン 9-14 の約 13 から 20Kb の欠失が疑われた。定量 PCR 法によりコントロールと比較し、欠失を確認した。

症例 2 は、軽度の発達遅滞とカフェオーレ斑を主訴に来院した 4 歳男児。身体所見から神経線維腫症 1 型を疑い、メンデル遺伝病パネル解析を施行。NF1 遺伝子を含む欠失を確認。マイクロアレイ染色体検査で、NF1 を含む 17q11.2 の 1.2Mb の欠失を確認した。

**D. 考察**

エクソーム解析で得られたデータから 1 エクソ

ン単位の微細欠失を検出することが可能であることを、実際の臨床症例で確認できた。既存の同様機能を有すプログラムとしてXHMMがあるが、1エクソン単位は事実上困難である。我々の方法では、エクソン単位の評価が可能で、極めて臨床的意義が高い。しかし、限界もあり、候補遺伝子が事前に明確にされている必要がある。また、エクソン内に埋もれる微細欠失は検出できない。全ゲノムシーケンスデータを視野に入れた場合、データ量は各段に増加し、アルゴリズムに従う計算方法の工夫が必要となる。

## E. 結語

次世代シーケンスデータを変換することによりCNV評価を行った。症例によってはエクソン単位で評価が可能であった。特に、ハプロ不全で発症する疾患では、一塩基の変化(SNV)とCNV同時に評価できることを確認した。今後、マイクロアレイ解析は、alternative methodsとしての有用性が期待されるかもしれない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ohashi I, Kuroda Y, Enomoto Y, Murakami H, Masuno M, Kurosawa K. 6p21.33 Deletion encompassing CSNK2B is associated with relative macrocephaly, facial dysmorphism, and mild intellectual disability. Clin Dysmorphol. 2021 Mar 19. doi:

10.1097/MCD.0000000000000372.

Yokoi T, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Harada N, Saito T, Nagai JI, Naruto T, Kurosawa K. An efficient genetic test flow for multiple congenital anomalies and intellectual disability. Pediatr Int. 2020 May;62(5):556-561.

### 2. 学会発表

西村直人(遺伝科), 熊木達郎, 村上博昭, 黒澤健司  
4p16.3 微細欠失の遺伝子型と表現型の相関性  
に関する検討 第123回日本小児科学会  
2020.8.21-23. オンライン

榎本友美、鶴崎美徳、小林 眞司、井上 真規、藤田和俊、相田 典子、熊木 達郎、村上博昭、黒澤健司 POLR1B の recurrent 変異, c.3007C>T (p.Arg1003Cys)はトリーチャーコリンズ症候群4において外耳道閉鎖と小耳症に関与する 第65回日本人類遺伝学会  
2020.11.19-21 名古屋

## 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