

令和5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

遺伝性白質疾患・知的障害をきたす疾患の診断・治療・研究システム構築班

分担研究課題：遺伝子診断システムの構築

TR 推進

分担研究者 才津 浩智 浜松医科大学 医学部 教授

研究要旨：

白質異常を呈する 2 症例にエクソーム解析を施行し、1 例で原因と考えられる病的バリエーションを同定した。また、もう一例は、令和 3 年度に導入した皮膚線維芽細胞を似た発現プロファイルを持つ尿由来上皮細胞（以下、尿細胞と略）の RNA シークエンス解析、およびターゲットロングリードシークエンスで診断することができた。一方、かずさ DNA 研究所でのパネル検査で病的バリエーションが同定されなかった白質異常を呈する 8 症例に対して、パネル検査データの再解析（2 次解析）を行い、病的と考えられるバリエーションを 5 例において同定した。エクソーム解析症例よりもパネル検査の 2 次解析を行う症例が多くなっており、大脳白質形成不全症のパネル検査が浸透していることが示唆される。本研究を通じた遺伝子診断により、橋渡し研究において重要な希少疾患のレジストリの充実に貢献することができた。

A、B. 研究目的および方法

本研究では、白質異常を呈する 10 症例において、同定した病的バリエーションと網羅的遺伝子解析（パネル検査データの 2 次解析を含む）の有用性について検討した。また、尿細胞の RNA シークエンス解析とターゲットロングリードシークエンスで診断出来た症例に関してはその有用性について検討した。

C. 結果

(1) エクソーム解析で病的バリエーションを同定した症例

症例は 22 歳の女性で、20 歳過ぎから頭痛と眩暈、軽度の視力障害を呈した。頭部 MRI 検査で、内包の両側後肢、大脳脚、上小脳脚および中小脳脚における拡散の減少を伴う T2 延長が認められ、CLCN2 関連白質異常症が疑われた。エクソーム解析をおこなったところ、CLCN2 のホモ接合バリエーション（NM_004366.6:c.61dup, p.(Leu21Profs*27)）が同定された。本バリエーションは、東北メディカルメガバンクが公開している 5 万 4 千人の日本人アレル頻度データ（54K JPN）では 0.002 であるが、80 万人のデータである Genome Aggregation Database（gnomAD）v4.0.0

では、東アジア以外では全く認められない。過去 2 例の日本人症例で報告されており、日本人に特有のバリエーションと考えられた。

(2) 尿細胞の RNA シークエンス解析とターゲットロングリードシークエンスの有用性

単純脳回、白質異常、脳梁の形成不全、小脳虫部形成不全を呈し、染色体検査で染色分体早期解離を呈する症例にエクソーム解析を行い、染色分体早期解離の原因遺伝子の一つである BUB1B 遺伝子に母親由来の既知の c.1452-5A>G ヘテロ接合性バリエーションを同定した。しかし、BUB1B 異常で起こる染色分体早期解離は常染色体潜性遺伝形式であり、父親由来の病的バリエーションはエクソーム解析では同定されなかった。そこで、尿細胞の RNA シークエンス解析と全ゲノム解析（ショートリード）を行ったが、全ゲノム解析でも原因となるバリエーションは同定されなかった。しかし、RNA シークエンス解析では BUB1B 遺伝子のイントロン 2 に異常なリードの集積が認められ、イントロン 2 で異常スプライシングが起こっていることが示唆された（図 1 上段）。そこで数 kb 以上のロングリードシークエンスが可能な Nanopore シークエンサーを用いて、ターゲッ

ト領域を集中的にシーケンスする Adaptive

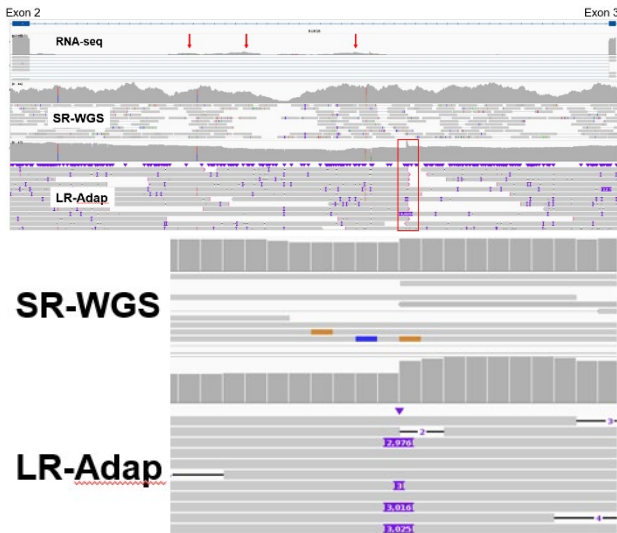


図 1. RNA-seq, ショートリード全ゲノム解析 (SR-WGS), ロングリード Adaptive sampling (LR-Adap) のアライメント結果

異常な RNA-seq リードを赤矢印、Adaptive sampling で同定した挿入を赤枠で示す。下段は赤枠部分の拡大図。約 3-kb の挿入が認められる。

Sampling を行い、イントロン 2 の異常を徹底的に調べたところ、ショートリード全ゲノム解析では同定されなかった約 3kb の挿入がイントロン 2 にあることが分かった (図 1 上段の赤枠、下段)。配列から *Alu* と *SV4* トランスポゾンが挿入されており、日本人 222 名のロングリードシーケンスデータベースである JSV1 によると、1/444 アレルで登録のある挿入であり、稀なゲノム異常と考えられた。

しかし、イントロンへのトランスポゾンの挿入と RNA シーケンス解析での異常リードとの因果関係はこのデータでは分からなかった。そこで、トランスポゾンの挿入配列を加えた新たな参照ゲノム配列を作成し、RNA シーケンスデータを再解析したところ、挿入配列から *BUB1B* のエクソン 3 にスプライスされる異常転写産物が 16 リードで認められた

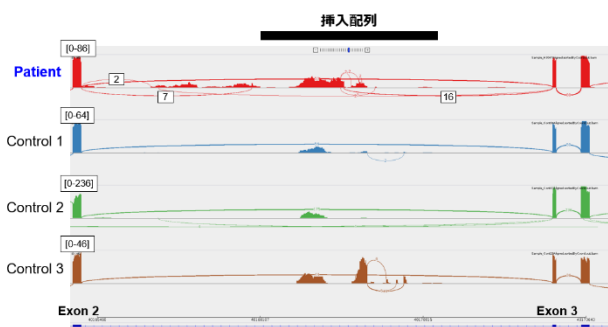


図 2. RNA-seq データの Sashimi plot

(図 2)。このことからトランスポゾンの挿入によって異常なスプライシングが引き起こされたことが強く示唆された。今回、どちらもスプライス異常を引き起こす非コード領域のバリエーションが同定されたが、母親由来の c.1452-5A>G バリエーションと父親由来のトランスポゾンの挿入を持つアレルからどの割合で異常な転写産物ができるかは不明であった。そこで、患者および母親の RNA シーケンスデータを解析して、nonsense mediated mRNA decay によって異常転写産物が壊されることを指標に各アレルから生じる異常転写産物の割合を推定した。図 3 に示すように、母親由来の c. c.1452-5G と c.1045A は同一アレル上にある、父親由来のイントロン 2 へのトランスポゾンの挿入と c.1045G が同一アレル上にある。母親の RNA シーケンスデータでは、c.1045A が 10%、c.1045G が 90%と明らかに c.1045A (つまり c.1452-5G) アレルからの転写産物の割合が低く、ほとんどの転写産物が nonsense mediated mRNA decay で壊されていると考えられた。一方、患者の RNA シーケンスデータでは、c.1045A が 26%、c.1045G が 74%であり、c.1045G (つまり挿入がある) アレルからの転写産物もある程度壊されている

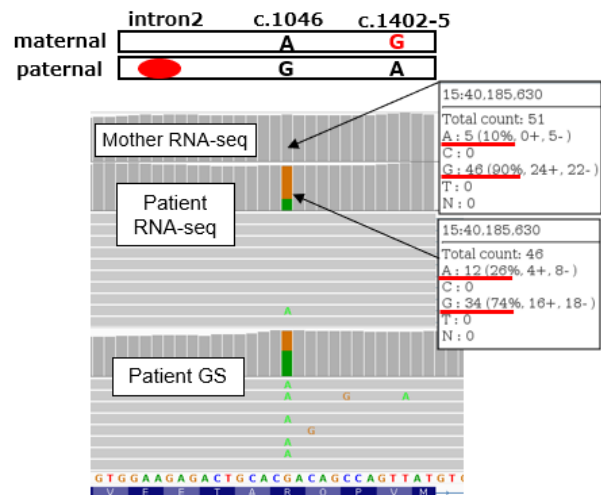


図 3. RNA-seq データによる片アレル性発現解析

ことが明らかになった。さらに、尿細胞を用いた Immunoblot によって、患者では *BUB1B* のタンパク質量が著しく減少していることが分かり、この 2 つのバリエーションが原因となっていることが証明された。

(3) かずさ DNA 研究所でのパネル検査データの再解析

かずさ DNA 研究所でのパネル検査データの再解析を 8 症例に対して行い、病的と考えられるバリエーションを 5 例において同定した。8 症例中、研究班内での臨床所見の検討によって原因候補遺伝子が絞り込まれていた例が 5 例あり、うち 3 例 (60%) において想定された遺伝子に病的バリエーションを同定した。この結果は、本研究班の活動の有用性を示す結果であった。残り 2 例においては、臨床所見から想定される遺伝子がパネル検査では解析対象となっていなかった。一方、臨床所見が比較的非特異的であり、解析対象遺伝子が絞り込まれていなかった 3 症例においても、2 例で病的バリエーションを同定した。1 例は、Leukodystrophy, hypomyelinating, 19, transient infantile (OMIM# 618688) の原因遺伝子として知られている *TMEM63A* 遺伝子のヘテロ接合性ミスセンスバリエーションが同定された

(NM_014698.3:c.1658G>A, p.(Gly553Asp))。本バリエーションは、54K JPN、gnomAD v4.0.0 に登録のない非常に稀なバリエーションであった。本疾患は常染色体顕性遺伝形式を示し、乳児期早期に眼振、発達遅滞、髄鞘形成不全を示す。これらの症状は小児期に徐々に軽快することが報告されているが、同じ Gly553 のアミノ酸置換の日本人症例では、重度の髄鞘形成不全と全般的発達遅滞が報告されていた。眼振、発達の遅れは家系内の複数名で認められており、この *TMEM63A* バリエーションと共分離が確認され、原因と考えられた。もう一例においては、特徴的顔貌・摂食障害・関節拘縮・成長障害などを特徴とする Bohring-Opitz syndrome (MIM # 605039) の原因遺伝子である *ASLX1* 遺伝子にヘテロ接合性のフレームシフトバリエーション (NM_015338.6:c.1934dup, p.(Gly646TrpfsTer12)) を同定した。本バリエーションは、複数の論文で病的と報告されていることから、病的バリエーションと判断された。

D. E. 考察および結論

今回、令和 3 年度に導入した皮膚線維芽細胞を似た発現プロファイルを持つ尿細胞の RNA シークエンス解析と Immunoblot 解析をすることで、非翻訳領域におけるバリエーションを同定し、かつそれらが病的であることを証明することができた。最終的にはターゲットロングリードシークエンスでトランスポゾンの挿入が同定された訳だが、ロングリードシークエンスを行った理由が RNA シークエンスでのイントロン

2 に認められた異常リードであり、片アレル性発現の評価によって各アレルから生じる異常転写産物が評価できたことも合わせると、尿細胞の RNA シークエンス解析は必要不可欠であった。*BUB1B* 遺伝子は血液ではほとんど発現しておらず、非侵襲的に入手できる尿細胞の有用性が確認された。

今回、ショートリードの全ゲノム解析ではイントロン 2 へのトランスポゾンの挿入が同定できなかった。その原因として、挿入がリピート配列上で起こったことが考えられる。リピート配列の異常を含めたゲノム構造異常の検出はロングリードシークエンスが有用であることが知られているが、コスト面で課題があった。今回おこなった Adaptive sampling は、読みたいゲノムの範囲を指定するだけで、その領域を重点的に読む解析であり、ゲノム全体をシークエンスする方法よりもコスト面を低く抑えて解析することが可能である。臨床所見から原因遺伝子が絞り込まれている症例においては、リピート領域の異常を見逃さないために、積極的に Adaptive sampling のようなターゲットロングリードシークエンスを行う必要がある。

今回、8 症例において、かずさ DNA 研究所でのパネル検査の後に、Fastq ファイル形式でデータを頂き再解析した。先天性大脳白質形成異常症の原因となっている 25 遺伝子だけでなく、500 前後の遺伝子がキャプチャされていることが解析で明らかになった。研究班内での臨床所見の検討によって原因候補遺伝子が絞り込まれていた 5 例中 2 例では病的バリエーションが同定されなかったが、この 2 例では臨床所見から想定される遺伝子がキャプチャされておらず、2 次解析の限界も明らかになった。パネル検査は臨床所見から原因となる遺伝子が絞り込める場合には有用であり、実際に 3 検体で病的バリエーションが同定された。うち 1 例は *PLP1* 遺伝子の深部イントロンバリエーションが同定されており (NM_000533.5:c.454-320A>C)、通常のエクソーム解析では同定されないバリエーションであることから、パネル検査がエクソーム解析よりも優れている点があることは明らかである。海外ではエクソーム解析、全ゲノム解析を行って網羅的にデータを取得した後に、バーチャルパネル検査で特定の遺伝子を対象に解析することが行われている。コスト的に合理的であり、今後はバーチャルパネル検査の方向になると予想される。その際においても、バリエーションの解釈ができる人材を育成することが重要である。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuchiya M, Bunai T, Watanabe K, **Saitsu H**, Goshima S. Cerebellar Ataxia With Neuropathy and Vestibular Areflexia Syndrome Due to Replication Factor C Subunit 1 Gene Repeat Expansion. Clin Nucl Med. 2024 Mar 1;49(3):242-243. doi:10.1097/RLU.0000000000005047. Epub 2024 Jan 15. PMID: 38306376.
2. Abe T, Yamashita K, Kikuchi K, Hatai E, Fujii F, Chong PF, Sakai Y, **Saitsu H**, Inoue K, Togao O, Ishigami K. Diagnostic MR imaging features of hypomyelination of early myelinating structures: A case report. Neuroradiol J. 2023 Dec 25;19714009231224419. doi: 10.1177/19714009231224419. Epub ahead of print. PMID:38146229.
3. Kawakami R, Hiraide T, Watanabe K, Miyamoto S, Hira K, Komatsu K, Ishigaki H, Sakaguchi K, Maekawa M, Yamashita K, Fukuda T, Miyairi I, Ogata T, **Saitsu H***. RNA sequencing and target long-read sequencing reveal an intronic transposon insertion causing aberrant splicing. J Hum Genet. 2024 Feb;69(2):91-99. doi:10.1038/s10038-023-01211-8. Epub 2023 Dec 15. PMID: 38102195.
4. Yamoto K, Kato F, Yamoto M, Fukumoto K, Shimizu K, **Saitsu H**, Ogata T. *TBX5* pathogenic variant in a patient with congenital heart defect and tracheal stenosis. Congenit Anom (Kyoto). 2024 Jan;64(1):23-27. doi: 10.1111/cga.12548. Epub 2023 Dec 7. PMID: 38062907.
5. Samejima M, Nakashima M, Shibasaki J, **Saitsu H**, Kato M. Splicing variant of WDR37 in a case of Neurooculocardiogenitourinary syndrome. Brain Dev. 2024 Mar;46(3):154-159. doi: 10.1016/j.braindev.2023.11.007. Epub 2023 Dec 3. PMID:38044197.
6. Watanabe K, Kubota K, Nakashima M*, **Saitsu H***. A case of infantile spasms with three possibly pathogenic de novo missense variants in NF1 and GABBR1. Hum Genome Var. 2023 Nov 22;10(1):30. doi: 10.1038/s41439-023-00256-7. PMID:37993422; PMCID: PMC10665374.
7. Masunaga Y, Ono H, Fujisawa Y, Taniguchi K, **Saitsu H**, Ogata T. Sotos syndrome with marked overgrowth in three Japanese patients with heterozygous likely pathogenic NSD1 variants: case reports with review of literature. Endocr J. 2024 Jan 29;71(1):75-81. doi: 10.1507/endocrj.EJ23-0502. Epub 2023 Nov 22. PMID:37989294.
8. Aoki S, Watanabe K, Kato M, Konishi Y, Kubota K, Kobayashi E, Nakashima M*, **Saitsu H***. Two novel cases of biallelic *SMPD4* variants with brain structural abnormalities. Neurogenetics. 2024 Jan;25(1):3-11. doi: 10.1007/s10048-023-00737-5. Epub 2023 Oct 26.
9. Furukawa S, Kato M, Nomura T, Sumitomo N, Yoneno S, Nakashima M, **Saitsu H***. Novel compound heterozygous ATP1A2 variants in a patient with fetal akinesia/hypokinesia sequence. Am J Med Genet A. 2024 Mar;194(3):e63453. doi:10.1002/ajmg.a.63453. Epub 2023 Oct 23. PMID: 37870493.
10. Torii K, Nishina S, Morikawa H, Mizobuchi K, Takayama M, Tachibana N, Kurata K, Hikoya A, Sato M, Nakano T, Fukami M, Azuma N, Hayashi T, **Saitsu H**, Hotta Y. The Structural Abnormalities Are Deeply Involved in the Cause of RPGRIP1-Related Retinal Dystrophy in Japanese Patients. Int J Mol Sci. 2023 Sep 5;24(18):13678. doi: 10.3390/ijms241813678.
11. Fujisawa Y, Masunaga Y, Tanikawa W, Nakashima S, Ueda D, Sano S, Fukami M, **Saitsu H**, Yazawa T, Ogata T. Serum steroid metabolite profiling by LC-MS/MS in two phenotypic male patients with HSD17B3 deficiency: Implications for hormonal diagnosis. J Steroid Biochem Mol Biol. 2023 Nov;234:106403. doi: 10.1016/j.jsbmb.2023.106403. Epub 2023 Sep 22.
12. Yoh Y, Shiohama T, Uchida T, Ebata R, Kobayashi H, Okunushi K, Kato M, Watanabe K, Nakashima M, **Saitsu H**, Hamada H. Case report: Progressive pulmonary artery hypertension in a case of megalencephaly-capillary malformation syndrome. Front Genet. 2023 Aug 8;14:1221745. doi: 10.3389/fgene.2023.1221745.
13. Kobayashi Y, Tohyama J, Akasaka N, Yamada K, Hojo M, Seki E, Miura M, Soma N, Ono T, Kato M, Nakashima M, **Saitsu H**,

Matsumoto N. The HCN1 p.Ser399Pro variant causes epileptic encephalopathy with super-refractory status epilepticus. Hum Genome Var. 2023 Jun 23;10(1):20. doi: 10.1038/s41439-023-00247-8

14. Akiyama M, Akiyama T, **Saitsu H**, Tokioka Y, Tsukahara R, Tsuchiya H, Shibata T, Kobayashi K. A female patient with adolescent-onset progressive myoclonus epilepsy carrying a truncating MECP2 mutation. Brain Dev. 2023 Nov;45(10):597-602. doi: 10.1016/j.braindev.2023.07.006.
15. Ikeda A, Kumaki T, Tsuyusaki Y, Tsuji M, Enomoto Y, Fujita A, **Saitsu H**, Matsumoto N, Kurosawa K, Goto T. Genetic and clinical features of pediatric-onset hereditary spastic paraplegia: a single-center study in Japan. Front Neurol. 2023 May 12;14:1085228. doi: 10.3389/fneur.2023.1085228. eCollection 2023.

2. 学会発表

1. **才津浩智**. シンポジウム 10 「拡がる遺伝性白質疾患の最前線」 遺伝子解析による大脳白質形成不全症発症メカニズムの解明、第 64 回日本神経学会学術集会、2023 年 5 月 31 日、幕張メッセ
2. **才津浩智**. シンポジウム 2 「ゲノム医療を担う人材育成」 ジェネティックエキスパート認定制度の役割と展望、第 30 回日本遺伝診療学会大会、2023 年 7 月 28 日、三井ガーデンホテル千葉
3. **才津浩智**: 特別講演 1 「網羅的遺伝子解析とマウスモデル解析による遺伝性疾患の病態解明」 第 63 回日本先天異常学会学術集会、2023 年 7 月 29 日、つくば国際会議場
4. **才津浩智**. 招待講演 「網羅的遺伝子解析による希少疾患の遺伝子診断」 Next generation central meeting、2023 年 12 月 2 日、ノボノルディスクファーマ（明治安田生命ビル）

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし