

令和元年6月3日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05357

研究課題名(和文) 大量並行シーケンスを用いた多角的アプローチによる希少難治性疾患の解明

研究課題名(英文) Multidirectional approach for human rare diseases using massive parallel sequencing

研究代表者

三宅 紀子 (Miyake, Noriko)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40523494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ヒト単一遺伝子疾患における新規疾患遺伝子を7個同定した(TBCD, AIFM1, NUP133, NOP104, KAT6A, FBOX11, PMPCB)。そのうち、小児早期発症の多系統神経萎縮を起こすTBCD遺伝子に関しては、特許を取得した。Aicardi症候群、関節弛緩型エーラス・ダンロス症候群、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群に関しては、症例を蓄積し、エクソーム解析と一部の典型症例に対して全ゲノム解析を行ったが、新規の遺伝子同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児早期発症の多系統神経萎縮の疾患遺伝子TBCDを同定したことにより、本疾患が常染色体劣性遺伝をとること、また詳細な臨床症状の集積により自然歴が明らかとなった。これらの成果は、本疾患における疾患概念の確立と遺伝カウンセリングや医療的介入時に必要な情報を提供できるものである。ほかの疾患に関しても、疾患責任遺伝子、遺伝形式、自然歴を明らかにできたことは、医療を行う上で非常に有用な情報を提供できるものである。

研究成果の概要(英文)：We identified seven novel disease genes (TBCD, AIFM1, NUP133, NOP104, KAT6A, FBOX11, and PMPCB) including the collaborative work. Among them, we received a patent for the TBCD gene which we identified as the responsible gene for early-onset neurodegenerative encephalopathy. We also analyzed the patients with Aicardi syndrome, hypermobility type of Ehlers-Danlos syndrome, steroid-resistant nephrotic syndrome by whole exome, in addition we analyzed some of typical cases by whole genome sequencing. However, we have not identified the novel disease gene for these diseases by the current methods so far.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：次世代シーケンサー 全エクソーム解析 全ゲノムシーケンス 新規疾患遺伝子 ロングリードシーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、メンデル遺伝性疾患を対象に様々な疾患遺伝子の単離・同定を継続して行ってきた。次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer: NGS) を用いた全エクソームシーケンシング (WES) は技術的に既に確立され、従来の位置的クローニング法によるアプローチでは同定不可能と考えられていた先天性疾患の責任遺伝子が次々に同定されるようになってきた。更に、NGS 試薬の低コスト化、関連技術の選択肢の幅も増え、WES 以外に、全ゲノムシーケンシング (WGS)、特定領域に絞ったターゲットリシーケンシングなども利用可能な状況となった。

2. 研究の目的

本研究で対象とする希少な遺伝性疾患は、発生頻度が比較的低いため認知度が低く、診断基準が明確でないなどの理由から解明があまり進んでいない場合が多かった。しかし、遺伝子の de novo 変異は、配偶子形成時に一定の確率で生じるため、遺伝性疾患はあらゆる地域で確実に発生する。ヒト疾患の責任遺伝子を同定することは、その分子病態・発症メカニズムを明らかにするための最初の重要なステップであり、ひいては治療・予防法の開発に繋がる。本研究では遺伝的要因が想定される希少な難治性疾患を対象に、次世代解析システムを駆使した多角的なアプローチにより疾患責任遺伝子を同定し、疾患発症メカニズムの解明と診断法・予防法・治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 症例集積・臨床所見の評価

遺伝的要因が想定される難治性疾患のうち、既に複数症例が収集済みであった Aicardi 症候群、Galloway-Mowat 症候群、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群、関節弛緩型エーラス・ダンロス症候群等を解析対象とした。その他、遺伝子が未同定の難治性疾患症例を研究協力者とともに検索し、日本国内外の臨床医から詳細な臨床症状および生体試料の提供協力を得た。本研究は横浜市立大学倫理委員会の承認を受け、適切な倫理的配慮と手続きを経て行われた。

(2) WES を用いた候補遺伝子の同定

エクソン領域を効率的にゲノム分画するため、Agilent 社の Sure Select All Human Exon kit を使用し、Illumina 社の HiSeq2000、HiSeq2500 を持っていて塩基配列解読を行った。二次解析には Novoalign, GATK, ANNOVAR を用いた。必要に応じて、患者に加えて両親や罹患同胞を追加で解析した。

(3) 全ゲノムシーケンシングによる網羅的変異解析

WES が功を奏さない疾患に限り、厳選された典型症例に対して全ゲノムシーケンシングを行った。候補となったバリエーションに関してはすべてサンガー法による検証を行った。

(4) 疾患責任遺伝子の機能解析

新規疾患遺伝子が同定された場合には、その分子の特性に応じた機能解析を行い、発症メカニズムの解明を行った。

4. 研究成果

Aicardi 症候群に関しては、現在までに 55 症例を集積した。全症例に対して WES 解析を終了し、うち 2 症例に関しては、別の中樞神経疾患であることを分子遺伝学的に説明し、以降の解析対象から除外した。典型的な 22 症例に関して、全ゲノム解析を行い、SNV 解析が完了しているが、疾患遺伝子同定には至っていない。

現在までに、Galloway-Mowat 症候群は現在までに 29 家系を集積した。本年度は、そのうちの一家系において新規疾患遺伝子 NUP133 を同定し、機能解析により病的変異であることを明らかにした (Fujita A et al., *Annals of Neurology*, 2018)。2015 年に発表したステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の疾患遺伝子である NUP107 遺伝子に引き続き、核膜孔複合体構成タンパク質の両アレル性バリエーションによるヒト疾患の新規疾患遺伝子を世界に先駆けて同定した。

関節弛緩型エーラス・ダンロス症候群においては、発端者を対象に全エクソームを施行したが、病因と考えられるバリエーションの同定にはいたらなかった。

また、習慣性流産の原因と考えられる、NOP104 の変異を同定し、発表した (Suzuki et al., *J Hum Genet.* 2018 Apr; 63(4):425-430)。その他、他施設との多国間共同研究により、新規疾患遺伝子として KAT6A (*Genet Med.* 2019 Apr; 21(4):850-860.), FBOX11 (*Am J Hum Genet.* 2018 Aug 2; 103(2):305-316), PMPCB (*Am J Hum Genet.* 2018 Apr 5; 102(4):557-573)などを同定し、論文発表を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 23 件) すべて査読あり

1. Fujita A, Tsukaguchi H, Koshimizu E, Nakazato H, Itoh K, Kuraoka S, Komohara Y, Shiina M, Nakamura S, Kitajima M, Tsurusaki Y, Miyatake S, Ogata K, Iijima K, Matsumoto N, Miyake N.

- Homozygous splicing mutation in NUP133 causes Galloway-Mowat syndrome. *Ann Neurol.* 2018 Dec;84(6):814-828.
- Kennedy J, Goudie D, Blair E, Chandler K, Joss S, McKay V, Green A, Armstrong R, Lees M, Kamien B, Hopper B, Tan TY, Yap P, Stark Z, Okamoto N, Miyake N, Matsumoto N, Macnamara E, Murphy JL, McCormick E, Hakonarson H, Falk MJ, Li D, Blackburn P, Klee E, Babovic-Vuksanovic D, Schelley S, Hudgins L, Kant S, Isidor B, Cogne B, Bradbury K, Williams M, Patel C, Heussler H, Duff-Farrier C, Lakeman P, Scurr I, Kini U, Elting M, Reijnders M, Schuurs-Hoeijmakers J, Wafik M, Blomhoff A, Ruivenkamp CAL, Nibbeling E, Dingemans AJM, Douine ED, Nelson SF; DDD Study, Arboleda VA, Newbury-Ecob R. KAT6A Syndrome: genotype-phenotype correlation in 76 patients with pathogenic KAT6A variants. *Genet Med.* 2019 Apr;21(4):850-860..
 - Abdel-Salam GMH, Miyake N, Abdel-Hamid MS, Sayed ISM, Gadelhak MI, Ismail SI, Aglan MS, Afifi HH, Temtamy SA, Matsumoto N. Phenotypic and molecular insights into PQBP1-related intellectual disability. *Am J Med Genet A.* 2018 Nov;176(11):2446-2450.
 - Gregor A, Sadleir LG, Asadollahi R, Azzarello-Burri S, Battaglia A, Ousager LB, Boonsawat P, Bruel AL, Buchert R, Calpena E, Cogné B, Dallapiccola B, Distelmaier F, Elmslie F, Faivre L, Haack TB, Harrison V, Henderson A, Hunt D, Isidor B, Joset P, Kumada S, Lachmeijer AMA, Lees M, Lynch SA, Martinez F, Matsumoto N, McDougall C, Mefford HC, Miyake N, Myers CT, Moutton S, Nesbitt A, Novelli A, Orellana C, Rauch A, Rosello M, Saida K, Santani AB, Sarkar A, Scheffer IE, Shinawi M, Steindl K, Symonds JD, Zackai EH; University of Washington Center for Mendelian Genomics; DDD Study, Reis A, Sticht H, Zweier C. De Novo Variants in the F-Box Protein FBXO11 in 20 Individuals with a Variable Neurodevelopmental Disorder. *Am J Hum Genet.* 2018 Aug 2;103(2):305-316.
 - Hyun HS, Kim SH, Park E, Cho MH, Kang HG, Lee HS, Miyake N, Matsumoto N, Tsukaguchi H, Cheong HI. A familial case of Galloway-Mowat syndrome due to a novel TP53RK mutation: a case report. *BMC Med Genet.* 2018 Jul 27;19(1):131.
 - Salehi Chaleshtori AR, Miyake N, Ahmadvand M, Bashti O, Matsumoto N, Noruzinia M. A novel 8-bp duplication in ADAT3 causes mild intellectual disability. *Hum Genome Var.* 2018 May 21;5:7.
 - Vögtle FN, Brändl B, Larson A, Pendziwiat M, Friederich MW, White SM, Basinger A, Kücükköse C, Muhle H, Jähn JA, Keminer O, Helbig KL, Delto CF, Myketin L, Mossmann D, Burger N, Miyake N, Burnett A, van Baalen A, Lovell MA, Matsumoto N, Walsh M, Yu HC, Shinde DN, Stephani U, Van Hove JLK, Müller FJ, Helbig I. Mutations in PMPCB Encoding the Catalytic Subunit of the Mitochondrial Presequence Protease Cause Neurodegeneration in Early Childhood. *Am J Hum Genet.* 2018 Apr 5;102(4):557-573.
 - Guo L, Elcioglu NH, Karalar OK, Topkar MO, Wang Z, Sakamoto Y, Matsumoto N, Miyake N, Nishimura G, Ikegawa S. Dysosteosclerosis is also caused by TNFRSF11A mutation. *J Hum Genet.* 2018 Jun;63(6):769-774.
 - Sakaguchi T, Žigman T, Petković Ramadža D, Omerza L, Pušeljić S, Ereš Hrvacánin Z, Miyake N, Matsumoto N, Barić I. A novel PGAP3 mutation in a Croatian boy with brachytelephalangy and a thin corpus callosum. *Hum Genome Var.* 2018 Mar 8;5:18005.

10. Silva S, Miyake N, Tapia C, Matsumoto N. The second point mutation in PREPL: a case report and literature review. *J Hum Genet.* 2018 May;63(5):677-681.
11. Suzuki T, Behnam M, Ronasian F, Salehi M, Shiina M, Koshimizu E, Fujita A, Sekiguchi F, Miyatake S, Mizuguchi T, Nakashima M, Ogata K, Takeda S, Matsumoto N, Miyake N. A homozygous NOP14 variant is likely to cause recurrent pregnancy loss. *J Hum Genet.* 2018 Apr;63(4):425-430.
12. Sekiguchi F, Nasiri J, Sedghi M, Salehi M, Hosseinzadeh M, Okamoto N, Mizuguchi T, Nakashima M, Miyatake S, Takata A, Miyake N, Matsumoto N. A novel homozygous DPH1 mutation causes intellectual disability and unique craniofacial features. *J Hum Genet.* 2018 Apr;63(4):487-491.
13. Nakajima J, Oana S, Sakaguchi T, Nakashima M, Numabe H, Kawashima H, Matsumoto N, Miyake N. Novel compound heterozygous DPH1 mutations in a patient with the unique clinical features of airway obstruction and external genital abnormalities. *J Hum Genet.* 2018 Apr;63(4):529-532.
14. Miyake N, Ozasa S, Mabe H, Kimura S, Shiina M, Imagawa E, Miyatake S, Nakashima M, Mizuguchi T, Takata A, Ogata K, Matsumoto N. A novel missense mutation affecting the same amino acid as the recurrent PACS1 mutation in Schuurs-Hoeijmakers syndrome. *Clin Genet.* 2018 Apr;93(4):929-930.
15. Miyake N, Wolf NI, Cayami FK, Crawford J, Bley A, Bulas D, Conant A, Bent SJ, Gripp KW, Hahn A, Humphray S, Kimura-Ohba S, Kingsbury Z, Lajoie BR, Lal D, Micha D, Pizzino A, Sinke RJ, Sival D, Stolte-Dijkstra I, Superti-Furga A, Ulrick N, Taft RJ, Ogata T, Ozono K, Matsumoto N, Neubauer BA, Simons C, Vanderver A. X-linked hypomyelination with spondylometaphyseal dysplasia (H-SMD) associated with mutations in AIFM1. *Neurogenetics.* 2017 Dec;18(4):185-194.
16. Miyake N, Inaba M, Mizuno S, Shiina M, Imagawa E, Miyatake S, Nakashima M, Mizuguchi T, Takata A, Ogata K, Matsumoto N. A case of atypical Kabuki syndrome arising from a novel missense variant in HNRNPK. *Clin Genet.* 2017 Nov;92(5):554-555.
17. Latypova X, Matsumoto N, Vineslas-Muller C, Bézieau S, Isidor B, Miyake N. Novel KCNB1 mutation associated with non-syndromic intellectual disability. *J Hum Genet.* 2017 Apr;62(5):569-573.
18. Čulić V, Miyake N, Janković S, Petrović D, Šimunović M, Đapić T, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N. Distal arthrogryposis with variable clinical expression caused by *TNNI2* mutation. *Hum Genome Var.* 2016 Oct 13;3:16035.
19. Miyake N, Fukai R, Ohba C, Chihara T, Miura M, Shimizu H, Kakita A, Imagawa E, Shiina M, Ogata K, Okuno-Yuguchi J, Fueki N, Ogiso Y, Suzumura H, Watabe Y, Imataka G, Leong HY, Fattal-Valevski A, Kramer U, Miyatake S, Kato M, Okamoto N, Sato Y, Mitsuhashi S, Nishino I, Kaneko N, Nishiyama A, Tamura T, Mizuguchi T, Nakashima M, Tanaka F, Saito H, Matsumoto N. Biallelic TBCD Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2016 Oct 6;99(4):950-961.
20. Suzuki T, Miyake N, Tsurusaki Y, Okamoto N, Alkindy A, Inaba A, Sato M, Ito S, Muramatsu K, Kimura S, Ieda D, Saitoh S, Hiyane M, Suzumura H, Yagyu K, Shiraishi H, Nakajima M, Fueki N, Habata Y, Ueda Y, Komatsu Y, Yan K, Shimoda K, Shitara Y, Mizuno S, Ichinomiya K, Sameshima K, Tsuyusaki Y, Kurosawa K, Sakai Y, Haginoya K, Kobayashi Y, Yoshizawa C, Hisano M,

- Nakashima M, Saitsu H, Takeda S, Matsumoto N. Molecular genetic analysis of 30 families with Joubert syndrome. *Clin Genet*. 2016 Dec;90(6):526-535.
21. Miyake N, Abdel-Salam G, Yamagata T, Eid MM, Osaka H, Okamoto N, Mohamed AM, Ikeda T, Afifi HH, Piard J, van Maldergem L, Mizuguchi T, Miyatake S, Tsurusaki Y, Matsumoto N. Clinical features of SMARCA2 duplication overlap with Coffin-Siris syndrome. *Am J Med Genet A*. 2016 Oct;170(10):2662-70.
 22. Fujita A, Isidor B, Piloquet H, Corre P, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. De novo MEIS2 mutation causes syndromic developmental delay with persistent gastro-esophageal reflux. *J Hum Genet*. 2016 Sep;61(9):835-8.
 23. Fujita A, Waga C, Hachiya Y, Kurihara E, Kumada S, Takeshita E, Nakagawa E, Inoue K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Goto YI, Miyake N, Matsumoto N. Different X-linked KDM5C mutations in affected male siblings: is maternal reversion error involved? *Clin Genet*. 2016 Sep;90(3):276-81.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Noriko Miyake, Hiroyasu Tsukaguchi, Eriko Koshimizu, Akemi Shono, Satoko Matsunaga, Masaaki Shiina, Yasuhiro Mimura, Shintaro Imamura, Tomonori Hirose, Koji Okudela, Hae Il Cheong, Kenichi Ohashi, Naoko Imamoto, Akihide Ryo, Kazuhiro Ogata, Kazumoto Iijima, Naomichi Matsumoto. Biallelic NUP107 mutations cause early childhood-onset steroid resistant Nephrotic syndrome. 第 13 回国際人類遺伝学会 (ICHG2016) 2016 年 4 月 3 -7 日 国立京都国際会館、京都
2. 三宅紀子, 塚口裕康, 輿水江里子, 庄野朱美, 野津 寛大, 秋岡祐子, 服部元史, 飯島一誠, 松本直通 NUP107 の両アレル性変異は早期小児期発症のステロイド抵抗性ネフローゼ症候群を引き起こす. 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016 年 5 月 13 -15 日 ロイトン札幌、ホテルさっぽろ芸文館、札幌
3. Noriko Miyake, Hiroyasu Tsukaguchi, Eriko Koshimizu, Akemi Shono, Naomichi Matsumoto. NUP107 mutations cause autosomal recessive inherited early childhood-onset steroid resistant Nephrotic syndrome. European Human Genetics Conference 2016. 2016 年 5 月 21 -24 日 Barcelona, Spain
4. 三宅紀子 小児循環器疾患における遺伝子解析の現状と問題点. 第 52 回日本小児循環器学術総会・学術集会 2016 年 7 月 6 -8 日 東京ドームホテル、東京
5. Noriko Miyake, Hiroyasu Tsukaguchi, Eriko Koshimizu, Akemi Shono, Naomichi Matsumoto. Biallelic NUP107 mutations in early childhood-onset steroid resistant nephrotic syndrome. American Society of Human Genetics 2016 Annual Meeting. 2016 年 10 月 18 -22 日 Vancouver, Canada
6. Noriko Miyake, Takahiro Chihara, Masayuki Miura, Hiroshi Shimizu, Akiyoshi Kakita, Naomichi Matsumoto. TBCD mutations cause autosomal recessive inherited early childhood-onset neurodegenerative encephalopathy. European Human Genetics Conference 2017. 2017 年 5 月 27-30 日 Copenhagen, Denmark
7. Noriko Miyake, Takahiro Chihara, Masayuki Miura, Hiroshi Shimizu, Akiyoshi Kakita, Naomichi Matsumoto. Biallelic TBCD mutations cause early childhood-onset neurodegenerative encephalopathy. The 12th International Workshop on Advances Genomics. 2017 年 6 月 27_-28 日

一橋講堂、東京

8. Noriko Miyake, Takahiro Chihara, Masayuki Miura, Hiroshi Shimizu, Akiyoshi Kakita, Naomichi Matsumoto. Clinical features and the pathomechanism of early childhood-onset neurodegenerative encephalopathy arising from biallelic *TBCD* mutations. American Society of Human Genetics 2017 Annual Meeting. 2017年10月17-21日 Ohlando, USA
9. Noriko Miyake, Takahiro Chihara, Masayuki Miura, Hiroshi Shimizu, Akiyoshi Kakita, Naomichi Matsumoto Early childhood-onset neurodegenerative encephalopathy caused by biallelic *TBCD* mutations. 日本人類遺伝学会 第62回大会 2017年11月15-18日 神戸国際会議場、神戸
10. Noriko Miyake, Shiro Ozasa, Hiroyo Mabe, Shigemi Kimura, Naomichi Matsumoto. A Japanese patient with a novel missense mutation affecting the same amino acid as the recurrent PACS1 mutation. American Society of Human Genetics 2018 Annual meeting. 2018年10月16-20日 San Diego, USA
11. Noriko Miyake, Tomoki Kosho, Naomichi Matsumoto. Genetic analysis of 18 Japanese families clinically diagnosed with Musculocontractural type Ehlers-Danlos syndrome. International symposium on the Ehlers-Danlos syndromes 2018年9月26-29日 Ghent, Belgium
12. 三宅紀子. 遺伝性疾患におけるゲノム解析の展望. 日本人類遺伝学会 第63回大会 2018年11月11-13日 パシフィコ横浜、横浜
13. 三宅紀子. 稀少難治性疾患における遺伝子解析の現状と展望. 日本小児遺伝学会(招待講演) 2019年1月11-12日 ウィンク愛知、名古屋

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：藤田 京志

ローマ字氏名：(FUJITA, atushi)

研究協力者氏名：才田 謙

ローマ字氏名：(SAIDA, ken)

研究協力者氏名：鈴木 敏史

ローマ字氏名：(SUZUKI, toshifumi)

研究協力者氏名：輿水 江里子

ローマ字氏名：(KOSHIMIZU, eriko)

研究協力者氏名：松本 直通

ローマ字氏名：(MATSUMOTO, Naomichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。