

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19068

研究課題名(和文)エクソーム解析によるQT延長症候群の疾患原因変異の網羅的探索

研究課題名(英文) Investigation of disease-causing variants of Long QT syndrome using whole exome sequencing

研究代表者

重水 大智 (SHIGEMIZU, Daichi)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・メディカルゲノムセンター・ユニット長

研究者番号：70617464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト参照配列にマップされなかったリード(部分)配列のリアライメントとde novoアセンブリの技術を組み合わせることで正確な中間サイズインデル同定手法IMSindel (intermediate-size indel detection tool)を開発した。この開発手法は、QT延長症候群だけでなく他の疾患の新たな疾患原因変異の同定に貢献できることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：I developed a new method that detects InterMediate-Size indels using a combination of soft-clipped fragments realignment and de novo assembly of unmapped reads (IMSindel). I suggest that this methodology will contribute to the discovery of intermediate-size indels associated with long QT syndrome as well as the other diseases.

研究分野：遺伝統計学

キーワード：中間サイズインデル 次世代シーケンサー エクソーム解析 QT延長症候群

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソームシーケンスの家系解析で最終的に疾患原因遺伝子の同定に至った、いわゆる成功確率は20%から50%程度と低く、家系においては変異候補が全く検出されないケースもある。その要因として、次世代シーケンサーは一回の読み取り長が短い(150bp程度)ため、①長い挿入・欠失(long InDel)の検出が困難である、②市販のエクソームキットでは全てのエクソンをカバーされていない(約1割の遺伝子コード領域は未解析)等があげられる。実際、申請者のLQTSの家系解析においても、35家系中12家系(12/35=34.3%)において全く変異候補が検出されなかった。

2. 研究の目的

本研究は、家系解析の結果、全く変異候補が検出されなかった12家系に対して、①既存のWESキットでは未解析の領域(約1割の遺伝子コード領域)に対する追加シーケンス解析と②新規 long InDel 検出法の開発を行うことで網羅的な変異探索を行い、新規疾患原因遺伝子の同定、解明を目指す。

3. 研究の方法

通常のWES家系解析で変異候補が全く検出されなかった12の家系例に対して、網羅的な疾患原因変異の探索、同定を行う。その研究計画の進め方は、

- (1) 使用したエクソンキャプチャーキットのターゲットから外されている領域の特定
- (2) その領域を追加シーケンスするためのプローブの設計と追加シーケンス解析
- (3) 通常のWES解析では検出することができない long InDel の検出システムの開発
- (4) long InDel 検出システムの検出能評価

の、主に4つからなる。

4. 研究成果

(1-2)使用したエクソンキャプチャーキットのターゲットから外されている領域の特定をし、追加シーケンス解析を行ったが、新規変異候補の同定には至らなかった。

(3-4) ヒト参照配列にマップされなかったリード(部分)配列のリアライメントと *de novo* アセンブリの技術を組み合わせることで正確な中間サイズインデル同定手法 IMSindel(intermediate-size indel detection tool)を開発しました(図1)。

78 サンプルの全エクソームシーケンスデータに IMSindel を適応したところ、新たに

18,192のインデル(14,216欠失と3,976挿入)が同定されました(図2a)。

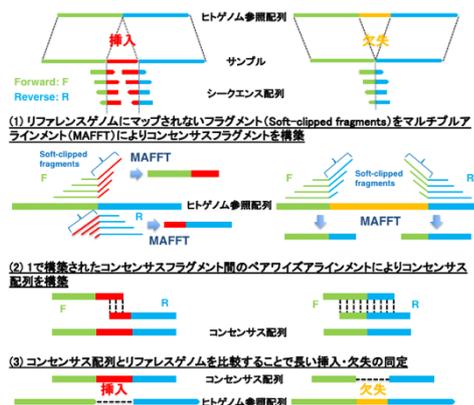


図1 IMSindelの概要

さらに12種類の機能分類(intronic, intergenic, UTR3, UTR5, ncRNA, nonframeshift deletion, nonframeshift insertion, splicing, frameshift deletion, frameshift insertion, stop gain and stop loss)を行い、その中で最も遺伝子機能に影響を与える可能性が高い5種類(ncRNA, splicing, frameshift insertion, frameshift deletion, stop gain and stop loss)について詳しく調べた結果、1サンプルあたり6個程度の疾患原因変異候補が存在することを明らかにしました(図2b, c)。これまでの次世代シーケンス解析では疾患原因変異が同定されないサンプルは多々ありますが、それらのサンプルから新たな疾患原因変異を同定する新たな解析手法として、今回の開発手法は高く期待されます。

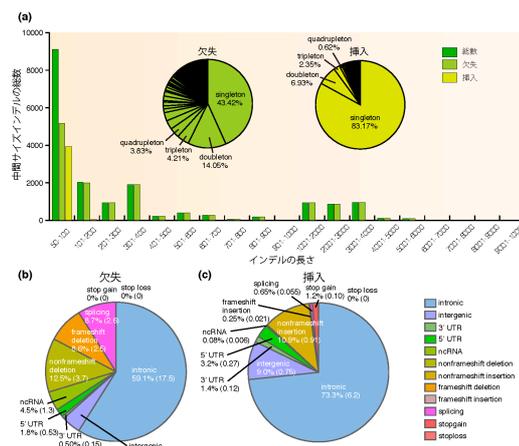


図2 IMSindelの適応結果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. López, Y., Kamola, P.J., Sharma, R., **Shigemizu, D.**, Tsunoda, T., and Sharma, A (2018) Computational pipelines and workflows in Bioinformatics. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* Sep 1.
 2. Nishino, J., Kochi, Y., **Shigemizu, D.**, Kato, M., Ikari, K., Ochi, H., Noma, H., Matsui, K., Morizono, T., Boroevich, K., Tsunoda, T., and Matsui, S. (2018) Empirical Bayes estimation of semi-parametric hierarchical mixture models for unbiased characterization of polygenic disease architectures. *Frontiers in Genetics* Apr 24.
 3. **Shigemizu, D.**, Miya, F., Akiyama, S., Okuda, S., Boroevich, K., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Ozaki, K., Niida, S., Kanemura, Y., Okamoto, N., Saitoh, S., Kato, M., Yamasaki, M., Matsunaga, T., Mutai, H., Kosaki, K., and Tsunoda, T. (2018) IMSindel: An accurate intermediate-size indel detection tool incorporating de novo assembly and gapped global-local alignment with split read analysis. *Sci Rep* Apr 4;8(1):5608.
 4. **Shigemizu, D.**, Iwase, T., Yoshimoto, M., Suzuki, Y., Miya, F., Boroevich, K., Katagiri, T., Zembutsu, H., and Tsunoda, T. (2017) The prediction models for postoperative overall survival and disease-free survival in patients with breast cancer. *Cancer Med* Jul;6(7):1627-1638.
 5. Ichikawa, M., Aiba, T., Ohno, S., **Shigemizu, D.**, Ozawa, J., Sonoda, K., Fukuyama, M., Itoh, H., Miyamoto, Y., Kubo, M., Tsunoda, T., Makiyama, T., Tanaka, T., Shimizu, W., and Horie, M. (2016) Phenotypic Variability of ANK2 Mutations in Patients with Inherited Primary Arrhythmia Syndromes. *Circ J* Oct. 25.
 6. Sharma, A., **Shigemizu, D.**, Boroevich, K., Lopez, Y., Kamatani, Y., Kubo, M., and Tsunoda, T. (2016) Stepwise Iterative Maximum Likelihood Clustering Approach. *BMC Bioinformatics* Aug 24;17(1):319.
 7. Yagihara, N., Watanabe, H., Barnett, P., Duboscq-Bidot, L., Thomas, A.C., Yang, P., Ohno, S., Hasegawa, K., Kuwano, R., Chate, S., Redon, R., Schott, J.J., Probst, V., Koopmann, T.T., Bezzina, C.R., Wilde, A.A.M., Nakano, Y., Aiba, T., Miyamoto, Y., Kamakura, S., Darbar, D., Donahue, B.S., **Shigemizu, D.**, Tanaka, T., Tsunoda, T., Suda, M., Sato, A., Minamino, T., Endo, N., Shimizu, W., Horie, M., Roden, D.M., and Makita, N. (2016) Variants in the SCN5A promoter associated with various arrhythmia phenotypes. *J Am Heart Assoc* Sep 13;5(9).
- [学会発表](計 16 件)
1. **Shigemizu, D.**: Clinical study using Next generation sequencing. *Japanese Society of Bioinformatics*, Kagoshima, 2018, May 25. (口頭)
 2. Okamoto, K., **Shigemizu, D.**, Okano, T., Yeh, T.W., Takashima, T., Yamashita, M., Tanita, K., Ono, S., Mitsui, N., Naruto, T., Okada, S., Takagi, M., Mori, M., Kanegane, H., Tsunoda, T., Imai, K., and Morio, T.: Whole exome sequence analysis using the known and candidate genes for primary immunodeficiency diseases. *The 2nd Scientific Congress of Asia-Pacific Society for Immunodeficiency*, 2018, May 7, Chongqing, China. (ポスター)
 3. Yagihara, N., Watanabe, Y., Makita, N., Horie, M., Shimizu, W., Ono, S., Hasegawa, K., Aiba, T., Tanaka, T., Tsunoda, T., **Shigemizu, D.**, and Minamino, T.: Identification of Mutations in Causative Genes for Cardiomyopathies in Patients with Arrhythmia Syndromes and Structurally Normal Heart. *The 82th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society*, 2018, Mar. 24, Osaka, Japan. (ポスター)
 4. Watanabe, R., Ohno, S., Aiba, T., Ishikawa, Nakano, Y., Aizawa, Y., Hayashi, K., Murakoshi, N., Nakajima, T., Yagihara, N., **Shigemizu, D.**, Mishima, H., Sudo, T., Higuchi, C., Takahashi, A., Sekine, A., Minamino, N., Makiyama, T., Tanaka, Y., Murata, H., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Watanabe, A., Tachibana, M., Morita, H., Miyamoto, Y., Yoshiura, K., Tsunoda, T., Watanabe, H., Kurabayashi, M., Nogami, A., Kihara, Y., Makita, N., Shimizu, W., Horie, M., and Tanaka, T.: Targeted deep sequencing reveals novel mutations in Japanese long QT syndrome patients. *The Japan Society of Human Genetics*, 2017, P-162, Kobe, Hyogo, Japan. (ポスター)
 5. Miya, F., **Shigemizu, D.**, Kanemura, Y., Saitoh, S., Okamoto, N., Kato, M., Yamasaki, M., Matsunaga, T., Mutai, H., and Kosaki, K.: Development and assessment of a pathogenic mutations search method for subjects where exome has previously failed. *The Japan Society of Human Genetics*, 2017, O-98, Kobe, Hyogo, Japan. (口頭)
 6. **Shigemizu, D.**, Miya, F., Akiyama, S., Okuda, S., Boroevich, K.A., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Ozaki, K., Niida, S., Kanemura, Y., Okamoto, N., Saitoh, S., Kato, M., Yamasaki, M., Matsunaga, T.,

- Mutai, H., Kosaki, K., and Tsunoda, T.: An accurate intermediate-size indel detection tool for discovery of mutations associated with human disease. *The Japan Society of Human Genetics*, 2017, O-97, Kobe, Hyogo, Japan. (口頭)
7. Asanomi, Y., **Shigemizu, D.**, Nagata, Y., Mitsumori, R., Mori, T., Niida, S., and Ozaki, K.: Exome sequencing analyses for late-onset Alzheimer's disease in Japanese. *The Japan Society of Human Genetics*, 2017, O-91, Kobe, Hyogo, Japan. (口頭)
 8. Mitsumori, R., Asanomi, Y., **Shigemizu, D.**, Nagata, Y., Mori, T., Akiyama, S., Niida, S., and Ozaki, K.: Genome wide association study for late-onset Alzheimer's Disease in a Japanese population. *The Japan Society of Human Genetics*, 2017, O-90, Kobe, Hyogo, Japan. (口頭)
 9. **Shigemizu, D.**, Miya, F., Akiyama, S., Okuda, S., Boroevich, K.A., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Ozaki, K., Niida, S., Kanemura, Y., Okamoto, N., Saitoh, S., Kato, M., Yamasaki, M., Matsunaga, T., Mutai, H., Kosaki, K., and Tsunoda, T.: Development of an accurate intermediate-size indel detection tool for discovery of mutations associated with human disease. *Informatics In Biology, Medicine and Pharmacology (IIBMP2017)*, 2017, O1-1, Sapporo. (口頭, ポスター, 研究奨励賞)
 10. **Shigemizu, D.**, Miya, F., Akiyama, S., Okuda, S., Boroevich, K.A., Fujimoto, A., Nakagawa, H., and Tsunoda, T.: IMSindel: An accurate intermediate-size indel detection tool incorporating de novo assembly and gapped global-local alignment into split reads. *The American Society of Human Genetics*, 2017, P1374F, Orland, FL, USA. (ポスター)
 11. Watanabe, R., Ohno, S., Aiba, T., Ishikawa, Nakano, Y., Aizawa, Y., Hayashi, K., Murakoshi, N., Nakajima, T., Yagihara, N., **Shigemizu, D.**, Mishima, H., Sudo, T., Higuchi, C., Takahashi, A., Sekine, A., Minamino, N., Makiyama, T., Tanaka, Y., Murata, H., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Watanabe, A., Tachibana, M., Morita, H., Miyamoto, Y., Yoshiura, K., Tsunoda, T., Watanabe, H., Kurabayashi, M., Nogami, A., Kihara, Y., Makita, N., Shimizu, W., Horie, M., and Tanaka, T.: Identification of novel long QT syndrome-associated mutations by targeted sequencing analyses. *European Human Genetics Conference*, 2017, Copenhagen, Denmark. (ポスター)
 12. 宮 冬樹, **重水 大智**, 齋藤 伸治, 須藤 章, 中川 英刀, 奥田 修二郎, 岡本 伸彦, 加藤 光広, 山崎 麻美, Keith A. Boroevich, 金村 米博, 小崎 健次郎, 角田達彦: 既存の exome 解析では疾患原因変異同定が困難な検体の原因変異探索手法の開発. *NGS 現場の会第5回研究会*, 2017, 仙台. (ポスター)
 13. Matsukura, M., Sindo, S., Kimura, S., Yamamoto, K., Hoshina, K., Mitsui, J., Tsuji, S., **Shigemizu, D.**, Tsunoda, T., Ozaki, K., Tanaka, T., and Watanabe, T.: Investigation of Disease Associated Genetic Factors of Peripheral Arterial Disease in a Japanese Population. *The 57th Annual Meeting of Japanese College of Angiology*, 2016, Nara. (口頭)
 14. **Shigemizu, D.**, Miya, F., Fujimoto, A., Boroevich, K.A., Okuda, S., and Tsunoda, T.: Development of a long indel detection method using the realignment of the misaligned reads. *The American Society of Human Genetics*, 2016, P1867W, Vancouver, Canada. (ポスター)
 15. Satake, W., Suzuki, Y., **Shigemizu, D.**, Takahashi, A., Yamamoto, K., Murata, M., Hattori, N., Tsunoda, T., Tsuji, S., Kubo, M., Sugano, S., Matsumoto, N., and Toda, T.: Exome Association study and 2nd SNP-GWAS of Parkinson's disease in Japan. *The 13th International Congress of Human Genetics*, 2016, Kyoto, Japan. (口頭)
 16. **Shigemizu, D.**, Momozawa, Y., Abe, T., Morizono, T., Boroevich, K.A., Takata, S., Ashikawa, K., Kubo, M., and Tsunoda, T.: Performance comparison of four commercial human whole-exome capture platforms. *The 13th International Congress of Human Genetics*, 2016, P111, Kyoto, Japan. (ポスター)
- [図書](計 4 件)
1. **重水 大智**: エクソーム解析による疾患ゲノム研究 (2018). *細胞*, 5 月号.
 2. **重水 大智**: エクソームシーケンズとプレジジョン・メディシン (2017). *アンチ・エイジング医学*, 10 月号 Vol. 13 No. 5 36-40.
 3. **重水 大智**: エクソーム解析によるこれからの疾患ゲノム研究 (2017). *細胞*, 7 月号 Vol. 49 No. 8 416-419.
 4. **重水 大智**: エクソーム解析によるこれからの疾患ゲノム研究 (2017). *Bio Clinica*, 6 月号 Vol. 32 No. 6 591-594.
- [産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重水 大智 (SHIGEMIZU Daichi)
国立長寿医療研究センター・メディカルゲ
ノムセンター・遺伝統計解析ユニット長
研究者番号: 70617464

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()