

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19404

研究課題名(和文) 遺伝性心疾患の原因遺伝子同定ツールの開発および臨床応用

研究課題名(英文) Development and clinical application of a novel method for identifying genes related to cardiovascular diseases

研究代表者

岡崎 敦子(今井敦子)(Imai-Okazaki, Atsuko)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：70761691

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)：遺伝性心疾患の原因遺伝子同定には連鎖解析が用いられてきたが、実臨床で遭遇する小家系では候補遺伝子の絞り込みが不十分でありその欠点を克服した手法の開発が課題であった。申請者は疾患家系内の非罹患者の代わりに非血縁の健常者を用いて患者-健常者間の遺伝学的距離をハミング距離比(Hamming Distance Ratio: HDR)として計測し原因遺伝子を同定するHDR法を開発した。さらにHDR法を発展改良させ各遺伝形式および染色体欠失領域への適応拡大および健常者データの整備により、臨床現場で活用可能な原因遺伝子同定ツールの開発・公開を行い、同ツールを用いた遺伝性心疾患家系での新規遺伝子同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：To detect causative genes related to cardiovascular disease, linkage analysis has conventionally been used. However, linkage analysis is underpowered in small families as often seen in clinical settings. We therefore developed a novel method for identifying genes, where DNA differences between a patient and unrelated healthy individuals around candidate genes are measured by the Hamming Distance Ratio (HDR). We further developed the HDR method to detect causative genes with various modes of inheritance and chromosomal deletions and succeeded in releasing software as a novel analysis tool for gene identification. As a clinical application of this tool, novel genes related to cardiovascular diseases have been identified.

研究分野：臨床ゲノム医学

キーワード：遺伝性心疾患 遺伝統計解析 原因遺伝子同定 染色体欠失同定 エクソーム解析 全ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

遺伝性心疾患の原因遺伝子同定には従来連鎖解析が用いられてきたが、連鎖解析は疾患家系内の非罹患者を含む数十人の DNA を必要とし、実臨床でしばしば遭遇する小家系では候補遺伝子の絞り込みが不十分であった。上記欠点を克服した原因遺伝子同定ツールの開発が臨床現場での課題であり、申請者は疾患家系内の非罹患者の代わりに健常日本人コントロールを用いて患者-非血縁者間の遺伝学的距離をハミング距離比 (Hamming Distance Ratio: HDR) として計測し原因遺伝子を同定する新規手法を開発し、同手法を用いた常染色体劣性遺伝性疾患家系での原因遺伝子同定に成功した。遺伝性心疾患の診断率向上を目指し、HDR 法を発展させ各遺伝形式および染色体欠失領域への適応拡大および同手法に搭載する健常者データの整備により、臨床現場で活用可能な遺伝性心疾患の原因遺伝子同定ツールの開発を提案した。

2. 研究の目的

本研究は、臨床現場で活用できる遺伝性心疾患の原因遺伝子同定ツールの確立を目的とする。原因遺伝子同定には、エクソン上の全塩基配列を解読するエクソーム解析が行われるが、検出した約 80000 バリエーションから 1 原因遺伝子に絞り込むには、遺伝統計手法の併用が必要である。従来の連鎖解析の欠点を克服するために、申請者は新規の遺伝統計手法である HDR 法を開発した。HDR 法では、罹患者 1 名と非血縁の健常者数十名のゲノム領域を HDR により比較し、罹患者に特異的に見られるゲノム領域上の変異を疾患変異とする。開発した HDR 法を更に発展させる以下 3 項目の開発が研究目的である。

- (1) 各遺伝形式および染色体欠失領域への HDR 法の適応拡大を目指す
- (2) 非血縁の健常者として一般ユーザーが使える健常者データを搭載した HDR 法の提供を目指す
- (3) 発展改良した HDR 法を用いた新規遺伝性心疾患家系での原因遺伝子同定を目指す

3. 研究の方法

原因遺伝子および染色体欠失領域を同定済みの遺伝性心疾患家系において、各遺伝形式・染色体欠失それぞれで最適な HDR を再定義した上で用いる統計量および評価領域長の最適化による HDR 法の発展改良を行う。さらに発展改良した HDR 法を新規の遺伝性心疾患家系に適応し原因遺伝子・染色体欠失同定を試みる。また公開されている 1000 人ゲノムプロジェクトの健常日本人 DNA を入手後に代表的な日本人のミトコンドリアハプログループを有する 20 サンプルを同定し、同サンプルに対して全ゲノム解析を行い HDR 法で利用可能な健常データとして整備、HDR 法へ

の搭載を行い HDR 法の臨床現場での活用を目指す。

4. 研究成果

(1) HDR 法のアルゴリズムを発展改良させ、疾患染色体欠失領域を同定する HDR-del 法を開発し、染色体欠失構造の同定に成功した (Hum Mutat, 2017, 図 1)。

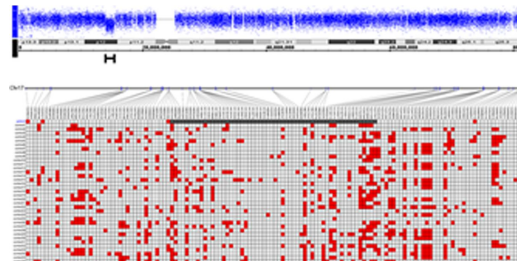


図 1: HDR 法を発展改良し開発した新規染色体同定法 (HDR-del 法) および同手法を用いて同定した染色体欠失領域の一例

さらに常染色体優性遺伝性疾患に対する解析アルゴリズムも開発し、上記全ての解析が 1 つのプログラム内で行える解析ソフトウェアを完成させ、臨床現場でより活用しやすくするため解析の高速化および必要なコンピュータスペックを改良したアルゴリズムも搭載し、新規原因遺伝子同定ツールとして公開した (図 2)。

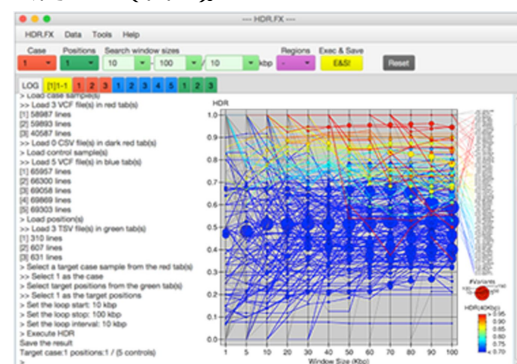


図 2: 開発した遺伝性心疾患の原因遺伝子同定ツール

(<http://www.gi.med.osaka-u.ac.jp/software/hdr2>にて公開中)

(2) 開発した新規の遺伝統計手法である HDR 法に搭載するための非血縁健常者コントロールのデータ解析・整備を行った。まず 1000 人ゲノムプロジェクトの健常日本人 120 検体の公開 DNA サンプルを入手後、同プロジェクトの健常日本人サンプルの公開エクソーム解析データを用いてミトコンドリアのハプログループを解析し、日本人における推定ハプログループ頻度から日本人を代表すると推定される 20 サンプルを選定した後次世代シーケンサーを用いて全ゲノム解析を行った。さらに様々な実験プロトコールで解析される疾患家系のエクソーム解析データに対応可能とするために、バイオインフォマティ

クス解析手法を用いて主要なエクソーム解析実験プロトコールに対応したコントロールデータ 20 人分のデータ生成を完了させた。

(3) 発展改良した HDR 法の適応家系を拡大させ、HDR 法開発時の French-Canadian 家系の疾患遺伝子同定に加えて (Sci Rep, 2015) 日本人の疾患家系においても HDR 法を用いた疾患遺伝子の絞り込みに成功した (J Hum Genet, 2016, Nephrol Dial Transplant, 2017, Hum Mol Genet, 2017)。さらなる HDR 法の適応拡大として、ミトコンドリア DNA 変異および X 染色体上の変異により生じる心筋症に対する解析も行い、それぞれにおいて新規原因遺伝子同定に成功した (Int J Cardiol, 2016, J Pediatr, 2018)。

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) 全て査読有

1: Imai-Okazaki A, Kishita Y, Kohda M, Yatsuka Y, Hirata T, Mizuno Y, Harashima H, Hirono K, Ichida F, Noguchi A, Yoshida M, Tokorodani C, Nishiuchi R, Takeda A, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Barth Syndrome: Different Approaches to Diagnosis. J Pediatr. 2018;193:256-260. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.09.075.

2: Imai-Okazaki A, Ott J. Genetic Linkage Mapping. eLS. 2018;1:1-5. doi: 10.1002/9780470015902.a0005360.pub2

3: Imai-Okazaki A, Kohda M, Kobayashi K, Hirata T, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, Nakaya A, Ott J. HDR-del: A tool based on Hamming distance for prioritizing pathogenic chromosomal deletions in exome sequencing. Hum Mutat. 2017;38:1796-1800. doi: 10.1002/humu.23298.

4: Yamamoto S, Kaimori JY, Yoshimura T, Namba T, Imai A, Kobayashi K, Imamura R, Ichimaru N, Kato K, Nakaya A, Takahara S, Isaka Y. Analysis of an ADTKD family with a novel frameshift mutation in MUC1

reveals characteristic features of mutant MUC1 protein. Nephrol Dial Transplant.

2017;32:2010-2017. doi:

10.1093/ndt/gfx083.

5: Kondo H, Maksimova N, Otomo T, Kato H, Imai A, Asano Y, Kobayashi K, Nojima S, Nakaya A, Hamada Y, Irahara K, Gurinova E, Sukhomyasova A, Nogovicina A, Savvina M, Yoshimori T, Ozono K, Sakai N. Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms. Hum Mol Genet. 2017;26:173-183. doi:10.1093/hmg/ddw377.

6: Imai A, Kishita Y, Nakayama Y, Fujita S, Futatani T, Kohda M, Yatsuka Y, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Dried blood spots for newborn screening allows easy determination of a high heteroplasmy rate in severe infantile cardiomyopathy. Int J Cardiol. 2016;221:446-9. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.06.287.

7: Imai A, Kohda M, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Lathrop M, Okazaki Y, Ott J. HDR: a statistical two-step approach successfully identifies disease genes in autosomal recessive families. J Hum Genet. 2016;61:959-963. doi:10.1038/jhg.2016.85.

[学会発表](計 9 件)

1. Suhyun Hwangbo, Jin-Young Jang, Atsuko Imai, Jurg Ott, Taesung Park, Association Test for Rare Variants using the Hamming Distance, 17th European Conference on Computational Biology (国際学会), 2018

2. Atsuko Imai, Yuko Nakayama, Shuhei Fujita, Yasushi Sakata, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki, Genetic analysis of rapidly progressive mitochondrial

cardiomyopathy with loss of ATP synthesis, 第 81 回日本循環器学会学術集会, 2017

3. 小林 香織, 今井 敦子, 山崎 悟, 菊地 正隆, 足尾 勉, 上條 憲一, 松村 泰志, 中谷 明弘, エクソーム解析基盤を用いた日本人変異解析における解析手法の検証と可視化, 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017

4. Kohda M, Kishita Y, Mizuno Y, Imai A, Nakaya A, Hirata T, Yatsuka Y, Bornha NN, Harashima H, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y, Genetic analysis of mitochondrial disorder, 第 5 回生命医薬情報学連合大会, 2017 年

5. 今井 敦子, 藤田 修平, 中山 祐子, 武田 充人, 坂田 泰史, 大竹 明, 岡崎 康司, Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATP Synthesis, 第52回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2017

6. 今井 敦子, 藤田 修平, 中山 祐子, 武田 充人, 坂田 泰史, 大竹 明, 岡崎 康司, Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATP synthesis, 第52回日本小児循環器学会総会・学術集会, 2016

7. 今井 敦子, 藤田 修平, 木下 善仁, 神田 将和, 八塚 由紀子, 中山 祐子, 二谷 武, 平田 智子, 水野 洋介, 原嶋 宏子, 中谷 明弘, 坂田 泰史, 武田 充人, 森 雅人, 村山 圭, 大竹 明, 岡崎 康司, 進行性の乳児心筋症におけるミトコンドリアDNA変異同定およびATP合成酵素欠損の証明, 第25回日本小児心筋疾患学会, 2016

8. Atsuko Imai, Akihiro Nakaya, Somayyeh Fahiminiya, Martine Tetreault, Jacek Majewski, Yasushi Sakata, Seiji Takashima, Mark Lathrop, Jurg Ott, Family-Control analysis based on Hamming distance for

prioritizing candidate pathogenic variants, The 13th International Congress of Human Genetics (国際学会), 2016

9. Atsuko Imai, Yoshihito Kishita, Yuko Nakayama, Shuhei Fujita, Takeshi Futatani, Masakazu Kohda, Yukiko Yatsuka, Akihiro Nakaya, Yasushi Sakata, Kei Murayama, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki, Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency, 第13回アジアミトコンドリア学会 (国際学会), 2016

〔図書〕(計 2 件)

1. 岡崎敦子(分担執筆), 監訳 大竹 明, 岡崎康司, 村山 圭. 代謝ナビゲーションミトコンドリアを中心とする代謝ネットワーク、メディカルサイエンスインターナショナル, 2017, 256

2. 今井敦子(分担執筆)、ミトコンドリア病診療マニュアル編集委員会、村山 圭、小坂 仁、米田 誠他. ミトコンドリア病診療マニュアル 2017、診断と治療社、2016, 172

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究成果物の公開ホームページ (研究室ホームページ内)
HDR (Hamming Distance Ratio) 2
<http://www.gi.med.osaka-u.ac.jp/software/hdr2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岡崎 (今井) 敦子 (IMAI-OKAZAKI ATSUKO)
大阪大学・医学系研究科・特任助教 (常勤)
研究者番号: 70761691

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし

(4) 研究協力者
該当なし