

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32707

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19536

研究課題名（和文）原因不明なメンデル遺伝疾患のRNAシーケンス解析による責任遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of Mendelian disease-causing genes by RNA sequencing

研究代表者

鶴崎 美德（Tsurusaki, Yoshinori）

相模女子大学・栄養科学部・准教授

研究者番号：70392040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：スプライスサイトの変異が認められた患者検体3例とエクソーム解析で原因不明な患者検体6例を対象にRNAシーケンス解析を行った。その結果、既知のスプライスサイトの変異を認められた症例はRNAシーケンス解析によりスプライス異常を検出することができた。一方、原因不明な症例に関してはRNAシーケンス解析を行い、スプライス異常や発現変動遺伝子に着目したが、原因を特定することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原因を特定することができない症例もあったが、発現変動遺伝子よりWESでは解析できなかった発現調節領域（プロモータ、UTRなど）の変異、スプライス異常の転写産物よりイントロンの変異を検出することによって、これまでとは異なった視点で疾患責任遺伝子の同定を行う本研究は大変意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：RNA samples derived from three patients with splice site mutation and six patients of unknown causes were examined by RNA sequencing (RNA-seq). RNA-seq detected aberrant splicing in three patients. On the other hand, RNA-seq failed to identification disease-causing genes in six patients.

研究分野：遺伝学

キーワード：RNAシーケンス スプライス異常 発現変動遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサー (NGS) が登場する以前は、メンデル遺伝性疾患 (単一遺伝子疾患) の責任遺伝子を同定するために、大家系を必要とする連鎖解析、血族婚家系を利用したホモ接合性マッピング、あるいは染色体構造異常の構造解析などを利用してきた。しかし孤発例に対しては有効なアプローチはなかった。エクソンキャプチャー法と次世代シーケンス技術を組み合わせた、全エクソームシーケンス解析 (WES) により世界で初めてメンデル遺伝性疾患責任遺伝子の単離がなされ、それ以来、多くのメンデル遺伝性疾患の責任遺伝子が WES にて同定されている。しかし、疾患責任遺伝子と表現型の相関が明らかである孤発例の遺伝疾患を対象に WES を行い、エクソン領域内の変異を隈無く解析しても、既知責任遺伝子内のエクソン領域上には病的な変異が認められない症例や、常染色体劣性遺伝病において 2 つ存在するはずである遺伝子座の変異が、片方の遺伝子座にしか認められないといった症例が少なからず存在している。その場合、WES では解析することが不可能なノンコーディング領域 (エクソンから離れたイントロン領域、転写調節領域など) の変異によるスプライス異常、あるいは遺伝子発現量の異常が疑われる。

2. 研究の目的

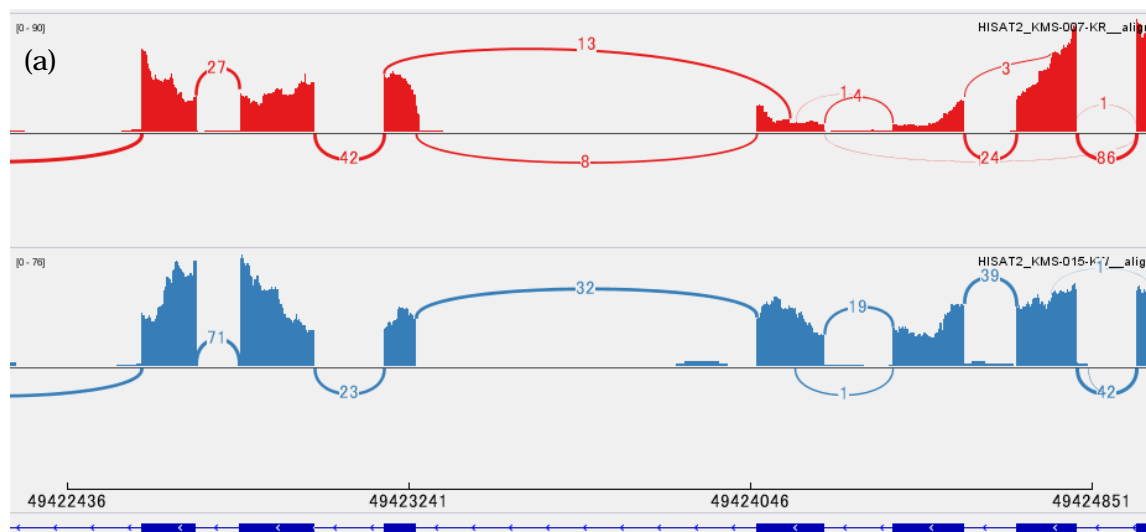
本研究では、RNA を用いて網羅的 RNA シーケンス解析 (RNA-Seq) を行うことにより、イントロンリテンションや、エクソンスキッピングをとまなうスプライス異常の高感度検出、あるいは発現アレイやリアルタイム PCR のような一部分の遺伝子の発現量でなく、遺伝子全体にわたる発現を定量的に測定することを目的とする。最終的には、疾患特異的なスプライス異常の転写産物や発現変動遺伝子から、疾患責任遺伝子の特定を目指した。

3. 研究の方法

スプライスサイトの変異が明らかな 2 症例、エクソン-イントロン境界に変異が認められた 1 症例、および原因不明な 6 症例の全 RNA より strand-specific ライブラリー調製法 (dUTP 法) を用いてライブラリー調整後、Novaseq (150 × 2) シーケンサーによる RNA-seq を行った。得られたデータよりシーケンスリードのトリミング、マッピング、TRM 値、および FPKM 値の算出を行った。

4. 研究成果

(1) KMT2D 遺伝子のスプライスサイトの変異 (c.14000-8C>G、および c.4239+5G>A) を有する歌舞伎症候群 2 例に対して RNA-seq を行い、スプライス異常を確認した。その結果、両症例共にスプライス異常を確認することができた (図 1)



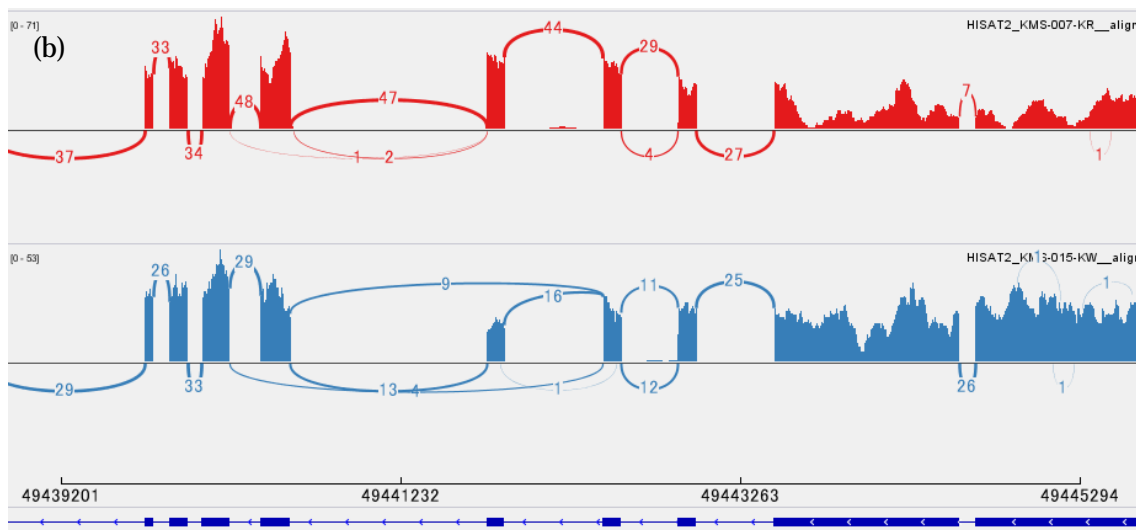


図 1 .RNA-seq により確認されたスプライス異常 (a) KMT2D 遺伝子のスプライスサイトの変異 (c.14000-8C>G) を有する歌舞伎症候群症例。正常なスプライシング (32 リード; 下図) であるのに対し、症例ではスプライス異常 (13 リード) が認められる (上図) (b) KMT2D 遺伝子のスプライスサイトの変異 (c.4239+5G>A) を有する歌舞伎症候群症例。正常なスプライシング (47 リード; 上図) であるのに対し、症例ではスプライス異常 (9 リード) が認められる (下図)

(2) WDR45 遺伝子のエクソン-イントロン境界に認められた *de novo* 変異 [c. 440G>A, p. (Gly147Glu)] を有する発達遅滞 1 例に対して RNA-seq を行い、スプライス異常を確認した。その結果、スプライス異常を確認することができた (図 2)

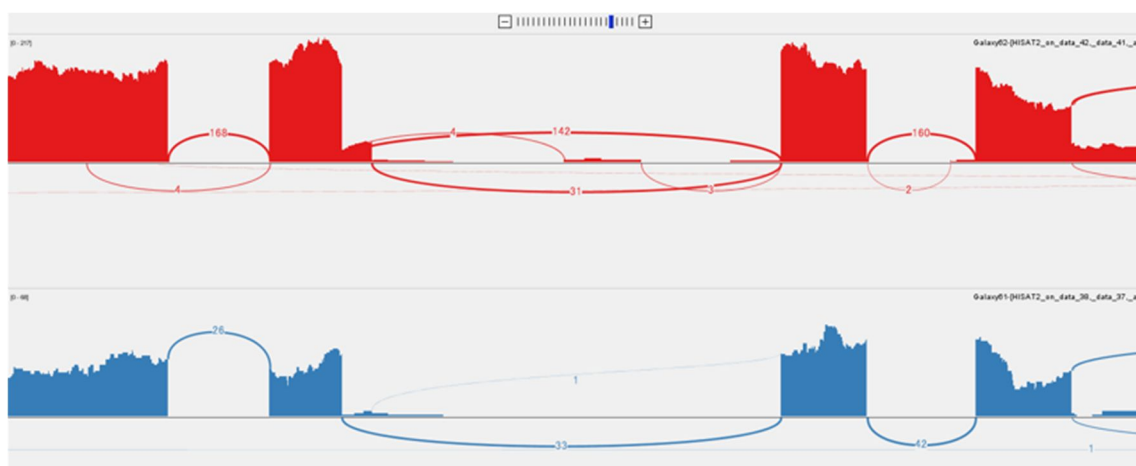


図 2.RNA-seq により確認されたスプライス異常。正常なスプライシング (リード数 33; 下図) であるのに対し、症例ではスプライス異常 (正常: 142 リード (82.1%)、スプライス異常: 31 リード (17.9%)) が認められる (上図)

本症例は WDR45 遺伝子の *de novo* 変異を有するにも関わらず、発達遅滞が軽度であった。RNA-seq の正常なリードが 82.1% に対し、スプライス異常を示すリードが 17.9% と、正常な転写産物と比べ明らかに少ないことと矛盾しない。

(3) 既知遺伝子(*MECP2*) に変異を認めなかったレット症候群 1 例に対し RNA-seq を行い、*MECP2* のスプライシングを確認したが、異常は認められなかった。さらに、本遺伝子の発現変動(FPKM 値) を確認したが、本症例が 6.29721868、コントロールが 5.037161 となり顕著な変化はみられなかった。

(4) 腎に発生している悪性ラブドイド腫瘍 5 症例に対して、まず全エクソームシーケンス解析を行ったところ、2 症例において遺伝子 X にミスセンス変異が認められた。そこで、RNA-seq により本遺伝子の発現変動の確認を行った。その結果、全症例において発現が認められなかった。データベースより正常腎臓の本遺伝子の発現量(RPKM 値) が 32 と低値であることから、今後さらなる精査が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sato Y, Shibasaki J, Aida N, Hiiragi K, Kimura Y, Akahira-Azuma M, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Kurosawa K	4. 巻 5
2. 論文標題 Novel COL4A1 mutation in a fetus with early prenatal onset of schizencephaly.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Genome Var.	6. 最初と最後の頁 4~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-018-0005-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi S, Yokoi T, Hatano C, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Naruto T, Kobayashi M, Ida H, Kurosawa K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Biallelic mutations of EGFR in a compound heterozygous state cause ectodermal dysplasia with severe skin defects and gastrointestinal dysfunction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Genome Var.	6. 最初と最後の頁 11~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-018-0011-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Enomoto Y, Tsurusaki Y, Harada N, Aida N, Kurosawa K.	4. 巻 58
2. 論文標題 A novel AMER1 frameshift mutation in a girl with osteopathia striata with cranial sclerosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Congenit Anom (Kyoto).	6. 最初と最後の頁 145~146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cga.12258.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoi T, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Naruto T, Kurosawa K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Nonsyndromic intellectual disability with novel heterozygous SCN2A mutation and epilepsy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hum Genome Var.	6. 最初と最後の頁 20~20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-018-0019-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Y, Akahira-Azuma M, Harada N, Enomoto Y, Tsurusaki Y, Kurosawa K	4. 巻 58
2. 論文標題 A novel SYNGAP1 variant in a patient with intellectual disability and distinctive dysmorphisms.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Congenit Anom (Kyoto).	6. 最初と最後の頁 188-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12273.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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.	4. 巻 86
2. 論文標題 Homozygous splicing mutation in NUP133 causes Galloway-Mowat syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Neurol.	6. 最初と最後の頁 814 ~ 828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25370.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsurusaki Yoshinori, Ohashi Ikuko, Enomoto Yumi, Naruto Takuya, Mitsui Jun, Aida Noriko, Kurosawa Kenji	4. 巻 4
2. 論文標題 A novel UBE2A mutation causes X-linked intellectual disability type Nascimento	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 17019 ~ 17019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/hgv.2017.19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyatake Satoko, Okamoto Nobuhiko, Stark Zornitza, Nabetani Makoto, Tsurusaki Yoshinori, Nakashima Mitsuko, Miyake Noriko, Mizuguchi Takeshi, Ohtake Akira, Saitsu Hiroto, Matsumoto Naomichi	4. 巻 62
2. 論文標題 ANKRD11 variants cause variable clinical features associated with KBG syndrome and Coffin-Siris-like syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 741 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/jhg.2017.24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okamoto Nobuhiko, Ehara Eiji, Tsurusaki Yoshinori, Miyake Noriko, Matsumoto Naomichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Coffin-Siris syndrome and cardiac anomaly with a novel SOX11 mutation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 105 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takata A, Miyake N, Tsurusaki Y et al.	4. 巻 22
2. 論文標題 Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 734 ~ 747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.12.074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akahira-Azuma Moe, Tsurusaki Yoshinori, Enomoto Yumi, Mitsui Jun, Kurosawa Kenji	4. 巻 5
2. 論文標題 Refining the clinical phenotype of Okur-Chung neurodevelopmental syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 18011 ~ 18011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/hgv.2018.11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Doi H, Koyano S, Miyatake S, Nakajima S, Nakazawa Y, Kunii M, Tomita-Katsumoto A, Oda K, Yamaguchi Y, Fukai R, Ikeda S, Kato R, Ogata K, Kubota S, Hayashi N, Takahashi K, Tada M, Tanaka K, Nakashima M, Tsurusaki Y et al.	4. 巻 63
2. 論文標題 Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 417 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-017-0408-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima Mitsuko, Kato Mitsuhiro, Aoto Kazushi, Shiina Masaaki, Belal Hazrat, Mukaida Souichi, Kumada Satoko, Sato Atsushi, Zerem Ayelet, Lerman-Sagie Tally, Lev Dorit, Leong Huey Yin, Tsurusaki Yoshinori, Mizuguchi Takeshi, Miyatake Satoko, Miyake Noriko, Ogata Kazuhiro, Saitsu Hiroto, Matsumoto Naomichi	4. 巻 83
2. 論文標題 De novo hotspot variants in CYFIP2 cause early-onset epileptic encephalopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 794 ~ 806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Y. Tsurusaki, Y. Sato, J. Shibasaki, N. Aida, K. Hiiragi, Y. Kimura, M. Akahira-Azuma, Y. Enomoto, K. Kurosawa
2. 発表標題 Novel COL4A1 mutation in a fetus with early prenatal onset of schizencephaly
3. 学会等名 European Society of Human Genetics 2018 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Tsurusaki, Y. Kuroda, H. Murakami, Y. Enomoto, Y. Kimura, Y. Yamanouchi, E. Kondoh, K. Ouchi, M. Masuno, K. Kurosawa
2. 発表標題 Causative novel USP9X variants in two Japanese patients with X-linked intellectual disability
3. 学会等名 American Society of Human Genetics 2018 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Tsurusaki, T. Uehara, T. Takenouchi, Y. Enomoto, K. Kosaki, K. Kurosawa
2. 発表標題 De novo DPF2 variant in a Japanese patient with Coffin-Siris syndrome
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 K. Kosaki, M. Minatogawa, T. Takenouchi, Y. Tsurusaki, F. Iwasaki, T. Uehara, C. J. Curry, K. Kurosawa
2 . 発表標題 Phenotype expansion for Kosaki Overgrowth Syndrome
3 . 学会等名 The European Society of Human Genetics 2017 Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Y. Enomoto, Y. Tsurusaki, T. Yokoi, M. Minatogawa, M. Umegae, T. Naruto, T. Shimokaze, K. Kurosawa
2 . 発表標題 Homozygous deletion in RECQL4 caused by the rare identical haplotype
3 . 学会等名 The European Society of Human Genetics 2017 Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 K. Kurosawa, M. Minatogawa, T. Yokoi, Y. Enomoto, K. Ida, N. Harada, J. Nagai, Y. Tsurusaki
2 . 発表標題 Microdeletion of 17q21.31 causes a novel malformation syndrome
3 . 学会等名 American Society of Human Genetics 2017 Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 M. Akahira-Azuma, Y. Tsurusaki, Y. Enomoto, M. Minatogawa, T. Yokoi, K. Kurosawa
2 . 発表標題 De novo missense variant in CSNK2A1 can cause intellectual disability, behavioral problem, and dysmorphic features: The first male child with Okur-Chung neurodevelopmental syndrome
3 . 学会等名 American Society of Human Genetics 2017 Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Tsurusaki, Y. Enomoto, K. Ida, K. Kurosawa
2. 発表標題 Novel AHDC1 mutations cause intellectual disability and developmental delay
3. 学会等名 American Society of Human Genetics 2017 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田 京志、和賀 央子、八谷 靖夫、栗原 栄二、熊田 聡子、竹下 絵里、中川 栄二、井上 健、宮武 聡子、鶴崎 美徳、中島 光子、才津 浩智、後藤 雄一、三宅 紀子、松本 直通
2. 発表標題 男児罹患同胞間で異なるKDM5C変異 (X連鎖性) を認めた1家系
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾 真理、小国 弘量、三宅 紀子、鶴崎 美徳、松本 直通、齋藤 加代子
2. 発表標題 難治性痙攣が終息したNicolaiides-Baraitser症候群の日本人男児例
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴村 宏、鶴崎 美徳、岡本 伸彦、今高 城治、吉原 重美、三宅 紀子、松本 直通
2. 発表標題 NAA10変異を認めたLenz小眼球症の1例
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮武 聡子、三橋 里美、林 由起子、輿水 江里子、鶴崎 美徳、中島 光子、水口 剛、三宅 紀子、才津 浩智、埜中 征哉、西野 一三、松本 直通
2. 発表標題 MYPN遺伝子の劣性変異は小児期発症、緩徐進行性のネマリンミオパチーの原因である
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎本 友美、鶴崎 美徳、赤平 百絵、木村 雄一、成戸 卓也、黒澤 健司
2. 発表標題 CHD8変異をもった自閉症スペクトラム患者
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤平 百絵、黒澤 健司、鶴崎 美徳、榎本 友美、横井 貴之、湊川 真理
2. 発表標題 Spondyloepiphyseal dysplasia congenita (SEDC)の遺伝学的検査による診断例
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横井 貴之、赤平 百絵、湊川 真理、井田 一美、原田 法彰、齋藤 敏幸、永井 淳一、鶴崎 美徳、榎本 友美、成戸 卓也、黒澤 健司
2. 発表標題 未診断多発奇形・知的障害に対する診断アルゴリズムの再検討
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴崎 美德、市川 和志、辻 恵、上原 朋子、武内 俊樹、榎本 友美、井田 一美、後藤 知英、小崎 健次郎、黒澤 健司
2. 発表標題 知的障害に関するGNB1遺伝子のde novo変異
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----