

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15702

研究課題名（和文）R言語を用いた次世代シーケンサーの網羅的解析パイプラインの構築

研究課題名（英文）Development of a comprehensive analysis pipeline for next-generation sequencers using the R

研究代表者

安藤 匡宏（Ando, Masahiro）

鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教

研究者番号：60896976

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では遺伝性ニューロパチーや脊髄小脳変性症の包括的遺伝子診断（次世代シーケンサーを用いたターゲットパネル解析や全エクソーム解析）を申請者が開発した解析パイプラインを併用することで効率的に実施した。これまでに解析を行なった2695例のCMT患者については疫学的特徴や臨床的・遺伝的特徴をまとめて学術論文として報告した。また既報告遺伝子も多数同定し、PTRH2遺伝子、SLC12A6遺伝子、NEFH遺伝子、POLR3B遺伝子についてはそれぞれ臨床的・遺伝的特徴を学術論文として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全エクソーム解析データから原因遺伝子を同定するためにはその膨大な数の変異をそれぞれ病原性判定する必要がある。しかし既知の病原性変異であるかの確認やACMGガイドラインにそった解析（複数のコントロールデータベースとの比較や複数のin silico analysisなど）は非常に煩雑である。本研究ではRを用いた解析パイプラインを構築し、病原性判定を自動化するとともに、多数の症例を横断的に解析を可能とした。本研究の成果は、本邦の遺伝性神経疾患患者の遺伝子診断を確定する効率的な解析手法を構築したことであり、遺伝子診断が確定することで病態解明や治療法開発にも寄与する。

研究成果の概要（英文）：This study efficiently performed a comprehensive genetic diagnosis of inherited peripheral neuropathy and spinocerebellar degeneration (target resequencing and whole exome analysis using next-generation sequencers) using our analysis pipeline. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of the 2695 CMT patients analyzed to date have been summarized and reported in scientific papers. In a scientific paper, we also identified many previously reported genes and reported the clinical and genetic characteristics of the PTRH2, SLC12A6, NEFH, and POLR3B genes.

研究分野：シャルコー・マリー・トゥース病

キーワード：次世代シーケンサー Charcot-Marie-Tooth 脊髄小脳変性症 R言語 解析パイプライン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子解析技術の進歩により、多くの疾患で原因遺伝子が同定され、日常診療においても遺伝子検査が広く行われるようになった。またそれらの原因遺伝子が同定された疾患の一部においては酵素補充療法や遺伝子治療といった有効な治療法が実用化されつつあるが、これらの遺伝性神経筋疾患に対する治療は遺伝子診断の確定が絶対条件であり、遺伝子診断技術のさらなる進歩が必要とされている。

実際においては原因遺伝子の同定が困難な症例が多数存在する。未知の原因遺伝子が多数存在すると推定されるほか、多数の原因遺伝子における表現型の重なりがさらに診断を困難にしている。そのため、原因遺伝子の同定には解析症例の表現型を超えて、同定される全ての変異に対して、変異の評価を行う解析パイプラインの構築が必要不可欠である。そのため本邦の遺伝性神経疾患の包括的遺伝子解析データを効率的に解析するパイプラインの開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 既報告変異との照合、(2) ACMG ガイドラインに沿った変異の評価、(3) 横断的解析のシステム構築を目指し、以下の手順で研究を進める。

(1) 既報告変異との照合

既知の遺伝子変異データベースに Human Gene Mutation Database を採用し、R 言語を用いた解析パイプラインを作成。表現型などによらず、すべての変異に対して既知の遺伝子変異かを解析する。

(2) ACMG ガイドラインに沿った新規変異の解析

正常コントロールデータベースにも存在する多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) の判定には約 12 万人の WES データから作成された gnomAD を採用し、日本人特有の SNP 解析では Human Genetic Variation Database (HGVD) と Integrative Japanese Genome Variation Database (iJGVD) を採用した。またその他のコントロールとして、当研究室で以前に行った HTLV-1 関連脊髄症の WES データ (倫理審査済) も使用した。In silico analysis では ACMG ガイドラインで推奨されている解析の中で SIFT, PROVEAN, Polyphen2, Mutation Assessor, FATHMM, Condel を採用した。表現型については前述の HGMD より、登録されている全ての表現型を抽出し、遺伝子毎の表現型データベースを新たに構築し、定期的に更新する。それらのデータベースを前述の R 言語を用いた解析パイプラインに組み込む。

(3) 横断的解析システムの構築

前述の R 解析パイプラインを使用した繰り返し処理を行うことにより全ての症例の全変異に対して情報付けを可能とする。それによりデータが統合されたファイルが作成可能となり、効率的に変異を抽出するシステムや他の症例と比較するシステムを構築する。

3. 研究の方法

本研究では解析パイプラインの構築とともに、その解析パイプラインを使用した包括的遺伝子解析を行なう。包括的遺伝子解析については以下の手順で研究を進める。

(1) 遺伝性神経疾患の包括的遺伝子解析

遺伝性ニューロパチー症例を解析する場合には、CMT 既知の遺伝子以外にも脊髄小脳変性症や遠位型ミオパチー、筋萎縮性側索硬化症、ミトコンドリア異常症といった表現型の重なりが期

待される遺伝性神経疾患の原因遺伝子も併せて解析する．また遺伝子診断された症例については遺伝子毎の頻度や遺伝的・臨床的特徴を明らかにする．

(2)新規原因遺伝子の同定

前項の横断的システムを使用することで，トリオ解析の効率化や複数の症例が共有する変異の抽出を行うことが容易に可能となった．それらの機能を用いて，遺伝性神経疾患における新規原因遺伝子探索を行う．

4．研究成果

本研究では遺伝性ニューロパチーや脊髄小脳変性症の包括的遺伝子診断を申請者が開発した解析パイプラインを併用することで行なった．またその解析にて遺伝子診断がなされた症例・原因遺伝子に関して，臨床的特徴・遺伝学的特徴を論文にて発表した．研究期間全体を通じた研究成果は下記のとおりである．

- ・遺伝性ニューロパチー/CMT患者 2695 症例の臨床的・遺伝学的特徴をまとめて学術論文として報告した．発症年齢毎，CMT 型ごとの診断率や原因遺伝子についても解析し，RFC1 リピート異常伸張を伴う CMT18 家系を同定したことについても併せて報告した．(M Ando et al, Biomedicines, 2022)

- ・本邦発となる PTRH2 新規変異による IMNEPD(infantile-onset multisystem neurologic, endocrine, and pancreatic disease)症例を同定し，その臨床的・遺伝学的特徴を報告した(M Ando et al, Neurological Sciences, 2022).

- ・世界で 3 報目となる POLR3B 変異に伴う脱髄型 CMT 2 家系を同定し，その臨床的特徴と 2 つの新規変異について報告した(M Ando et al, Ann Clin Transl Neurol, 2022).

- ・NEFH 変異による遺伝性ニューロパチーを 4 家系同定し，臨床的・遺伝学的特徴を明らかにした．全ての家系が同じ変異であり，ハプロタイプ解析にて創始者効果を確認した．(M Ando et al, J Hum Genet, 2022)．

- ・SLC12A6 のヘテロ変異に伴う CMT を 9 家系同定した．また中枢神経合併症（精神発達遅滞など）を認めることを初めて報告した(M Ando et al, Ann Clin Transl Neurol, 2022).

- ・RFC1 リピート異常伸張を伴う脊髄小脳変性症を 15 家系同定し，臨床的・遺伝学的特徴を報告した．(M Ando et al, Front Neurol, 2022).

- ・遺伝性ニューロパチーの新規原因遺伝子(Gene X)を同定した．現在は東海大学との共同研究にてゼブラフィッシュでノックアウトモデルを樹立し，運動神経配列の乱れなどを確認した．(学術論文未発表)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Higuchi Y, Ando M, Yoshimura A, Hakotani S, Koba Y, Sakiyama Y, Hiramatsu Y, Tashiro Y, Maki Y, Hashiguchi A, Yuan J, Okamoto Y, Matsuura E, Takashima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Prevalence of Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome in Patients with Cerebellar Ataxia in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebellum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12311-021-01323-x	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 Taniguchi T, Ando M, Okamoto Y, Yoshimura A, Higuchi Y, Hashiguchi A, Matsuda N, Yamamoto M, Dohi E, Takahashi M, Yoshino M, Nomura T, Matsushima M, Yabe I, Sanpei Y, Ishiura H, Mitsui J, Nakagawa M, Tsuji S, Takashima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Elderly patients with suspected Charcot-Marie-Tooth disease should be tested for the TTR gene for effective treatments.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-021-01005-w	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 Ando M, Higuchi Y, Takeuchi M, Hashiguchi A, Takashima H.	4. 巻 3
2. 論文標題 The first case of infantile-onset multisystem neurologic, endocrine, and pancreatic disease caused by novel PTRH2 mutation in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 2133-2136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10072-021-05817-8	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 Ando M, Higuchi Y, Okamoto Y, Yuan J, Yoshimura A, Takei J, Taniguchi T, Hiramatsu Y, Sakiyama Y, Hashiguchi A, Matsuura E, Nakagawa H, Sonoda K, Yamashita T, Tamura A, Terasawa H, Mitsui J, Ishiura H, Tsuji S, Takashima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 An NEFH founder mutation causes broad phenotypic spectrum in multiple Japanese families.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-022-01019-y	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 Hiramatsu Y, Okamoto Y, Yoshimura A, Yuan JH, Ando M, Higuchi Y, Hashiguchi A, Matsuura E, Nozaki F, Kumada T, Murayama K, Suzuki M, Yamamoto Y, Matsui N, Miyazaki Y, Yamaguchi M, Suzuki Y, Mitsui J, Ishiura H, Tanaka M, Morishita S, Nishino I, Tsuji S, Takashima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Complex hereditary peripheral neuropathies caused by novel variants in mitochondrial-related nuclear genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-022-11026-w.	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安藤匡宏
2. 発表標題 Charcot-Marie-Tooth病における次世代シーケンサーを用いたcopy number variation解析
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤匡宏
2. 発表標題 南九州地域を中心とした小脳性運動失調症におけるRFC1遺伝子解析
3. 学会等名 令和3年度運動失調班 班会議
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------