

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461520

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いたヌーナン症候群類縁疾患の網羅的遺伝子診断システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of comprehensive gene analysis of Noonan syndrome and related disorders

研究代表者

新堀 哲也(Niihori, Tetsuya)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40436134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヌーナン症候群、コステロ症候群、CFC症候群の原因遺伝子解析は最近、デスクトップ型次世代シーケンサーにより、網羅的な解析が可能となっているが、価格および対象遺伝子のデザイン変更が困難である。そこで、これまでサンガー法に使用してきたプライマーを用いたMultiplex PCRにより増幅した配列をNGSで解析する系の確立を行った。陽性対照を含むのべ48検体で解析を行ったが、良好な結果を得た。今後さらなる条件検討を行いながら運用していく予定である。

研究成果の概要(英文)：NGS enables comprehensive gene analysis of Noonan syndrome and related disorders. However, there are problems about cost and flexibility of target design. To solve these problems, we established a gene analysis system using multiplex PCR and NGS. We analyzed total 48 samples including positive controls. The results were acceptable, though minor modifications were needed.

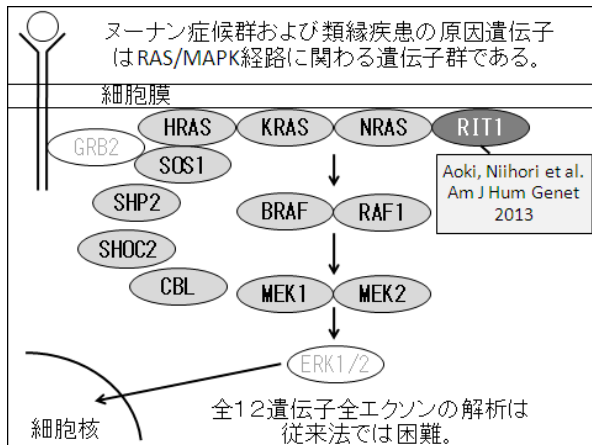
研究分野：分子遺伝学

キーワード：ヌーナン症候群 コステロ症候群 CFC症候群 遺伝子解析 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

ヌーナン症候群は、低身長、眼瞼解離などの特徴的顔貌、心奇形などを伴う先天奇形症候群である。2001年に原因遺伝子の一つとしてPTPN11が同定された。PTPN11のコードするプロテインチロシンホスファターゼ SHP2は、成長因子、サイトカイン、ホルモンなどのシグナルをRAS/MAPK (ERK) 経路の上流で正に制御する分子である。ヌーナン症候群で同定された変異は機能獲得型変異であることが示され (Tartaglia et al. Nat Genet 34:148-50, 2003, Niihori et al. J Hum Genet 50:192-202, 2005)、下流のRAS/MAPK 経路を活性化する変異であるとされている。

研究代表者らは、臨床的に類似した疾患もRAS/MAPK 経路に関わる変異が病因ではないかとの仮説に従い、類縁疾患であるコストロ症候群に HRAS の変異を同定し (Aoki, Niihori et al. Nature Genet 37:1038-40, 2005)、それに引き続き Cardio-facio-cutaneous (CFC) 症候群に BRAF、KRAS の変異を同定し発表した (Niihori et al. Nature Genet 38:294-296, 2006)。その後、同じ細胞内シグナル伝達経路を担う分子である MEK1/2、SOS1、RAF1、SHOC2、NRAS、CBL にも CFC 症候群患者およびヌーナン症候群患者で変異が同定され、我々も報告を行なった (Narumi Y, Aoki Y, Niihori T et al. 2007、Narumi Y, Aoki Y, Niihori T et al. 2008、Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T et al. 2010、Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T et al. 2010)。さらに我々は最近、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析からヌーナン症候群の新規原因遺伝子 RIT1 の同定に成功した (Aoki, Niihori et al. Am J Hum Genet 93(1):173-180, 2013)。



しかしこれら 12 の遺伝子の解析においてもヌーナン症候群および CFC 症候群の約 3 割では変異が同定されず、さらに新たな原因遺伝子の存在が示唆されている。これまでの一連の研究では、既知遺伝子をキャピラリーシーケンサーで解析してきた。臨床症状のみから原因遺伝子を推定するのは困難であり、これまでは頻度の高い遺伝子から解析するなどの工夫を行ってきたが、最終的には既知遺伝子の全エクソンを解析する必要がある。

上記既知遺伝子の解析においては、12 遺伝子のエクソン領域及び隣接するイントロン領域を 4 から 25 のアンプリコンに分割して解析しており、全てのコーディング領域を解析するには大変な労力および時間を必要としている。そのため、一部遺伝子でホットスポットのみの解析に終わっているサンプルが存在する。最近、デスクトップ型次世代シーケンサーと各社から販売されているライブラリ調製キットの導入により、簡便でハイスループットな解析が可能となりつつあり、申請者らも使用しているが、問題点も明らかとなってきた。

(1) 納期、価格

カスタムキットでデザインを行う場合、解析したい遺伝子・領域を決定し発注後納期まで 4-8 週程度かかる。また、48 または 96 反応分などのセットが多く、まとまった予算が必要で、1 反応 (1 サンプル) あたり 2 万円程度かかる物が多い。

(2) デザイン

一度デザインされたキットでは、新たに解析したい遺伝子ができたとしても途中から追加することは不可能で、購入した反応分はそのままのデザインで使用することとなるのがほとんどである。これは疾患の原因遺伝子が新たに次々と発見されている現状では不利である。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、ヌーナン症候群類縁疾患の次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析手法を確立することである。キャピラリーシーケンスに使用した PCR プライマーを用いることで実験系立ち上げのコストを下げ、既存のターゲットリシーケンス用ライブラリ調製キットに存在した、コストパフォーマンスとターゲット設定の制限の問題を解消し、「その時読みたい遺伝子が」「比較的安価に」「正確に」解析できることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) M13 プライマーを用いた NGS 解析の試み
これまでサンガー法での遺伝子診断には、M13Forward または M13Reverse 配列を付加した PCR プライマーを用いていた。それらのプライマーをそのまま用い、Miseq での読み取りができないかを試みた。

ゲノム DNA を鋳型に Multiplex PCR にて目的領域の 12 遺伝子、150 アンプリコンの増幅を行なった。

M13forward および reverse 配列に NGS での読み取りに必要な P5、P7 およびインデックス配列を付加するため 2nd PCR を行い、ライブラリを作成した。

NGS でのシーケンスプライマーとして M13forward および reverse 配列を用い、Illumina Miseq で読み取りを行った。

M13 プライマーの塩基長を調整するなど
の条件検討も行った。

- (2) アダプター付加を含むライブラリー調製
(1) に代わる方法として断片化してアダプター
付加を行うことで読み取りライブラリー
を作成した。

ゲノム DNA を鋳型に Multiplex PCR にて目的
領域の 12 遺伝子、150 アンプリコンの
増幅を行なう。

DNA を超音波にて断片化し、Illumina シー
クエンス配列を持つ Y 字型アダプターを
ligation。

P5、P7 およびインデックス配列を付加す
るため PCR を行い、ライブラリーを作成。

Illumina Miseq で読み取りを行った。

これらの研究は、東北大学大学院医学系研究
科倫理委員会による承認を受けて行った。

4. 研究成果

(1) M13 プライマーを用いた NGS 解析の試み
一部のクラスターでは塩基配列の読み取り
が可能であったものの、全体のリードの質は
低く、十分なリード長も得られなかった。M13
プライマーをシークエンスプライマーとし
て十分な質・量のデータを得ることは困難と
判断した。

(2) アダプター付加を含むライブラリー調製
Miseq で読み取ったリードを fastqc などの
ソフトウェアでクオリティチェックを行っ
た。概ね良好な塩基配列データを得ることが
できていた。

さらに M13 配列やアダプター配列を除去し、
bwa で参照ゲノムにマッピングし GATK でバリ
アントコールした。4 例の陽性対照における
解析でも各変異の検出には成功しているが、
アンプリコンの増幅高率が均等でなく、十分
な量のリードでカバーされない領域が存在
するため、さらに Multiplex PCR に使用する
プライマーの条件検討を行った。のべ 32 例
の陽性対照において解析を行ったが、約 100
塩基の欠失など以外は変異同定が可能であ
った。また、新規検体 16 例の解析を行っ
たところ、サンガー法での結果と 16 例とも
一致していた。しかし 2 アンプリコンは毎回
十分な増幅ができず、更に 4 - 6 アンプリ
コンは十分な増幅が得られない場合があっ
た。すなわち約 95% のアンプリコンは塩基配
列決定が可能と考えられたが、残りの配列を
どうすべきか、さらなる検討が必要と考え
られた。1 ランあたりの検体数はコストと反比例
するため、なるべく多くのサンプルを 1 ラン
で解析できたほうがコスト的には有利であ
る。現状では 1 ランあたり 8 サンプルずつ行
っており、今後さらなる条件検討によって同
時に解析可能な検体数は増やせる見込みで
はあるが、収集される検体数には限りがある
ため、サンプルが蓄積するのを待つ時間が長
くなると逆に不都合となる。今後はコストと
結果を得るまでの時間のバランスを考えて

運用していく必要がある。当初の予想通り、
ヌーナン症候群の新規原因遺伝子 PPP1CB、
MRAS が昨年から本年にかけて同定された。こ
れらの遺伝子のプライマーを Multiplex PCR
に追加すれば本研究で確立した方法で解析
が可能である。

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 6 件)

1. Patient with a novel purine-rich
element binding protein A mutation.
Okamoto N, Nakao H, Niihori T, Aoki Y.
Congenit Anom (Kyoto). 2017 Feb 6. doi:
10.1111/cga.12214. [Epub ahead of
print] 査読有り
2. Human genetic variation database, a
reference database of genetic
variations in the Japanese population.
Higasa K, Miyake N, Yoshimura J,
Okamura K, Niihori T, Saito H, Doi K,
Shimizu M, Nakabayashi K, Aoki Y,
Tsurusaki Y, Morishita S, Kawaguchi T,
Migita O, Nakayama K, Nakashima M,
Mitsui J, Narahara M, Hayashi K,
Funayama R, Yamaguchi D, Ishiura H, Ko
WY, Hata K, Nagashima T, Yamada R,
Matsubara Y, Umezawa A, Tsuji S,
Matsumoto N, Matsuda F. J Hum Genet.
2016 Jun;61(6):547-53. doi:
10.1038/jhg.2016.12. 査読有り
3. Spectrum of mutations and
genotype-phenotype analysis in Noonan
syndrome patients with RIT1 mutations.
Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto
N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M,
Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y,
Hokosaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita
O, Mima A, Lapunzina P, Santos-Simarro
F, Garcia-Minaur S, Ogata T, Kawame H,
Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S,
Matsubara Y, Kure S, Aoki Y. Hum Genet.
2016 Feb;135(2):209-22. doi:
10.1007/s00439-015-1627-5. 査読有り
4. Somatic BRAF c.1799T>A p.V600E
Mosaicism syndrome characterized by a
linear syringocystadenoma
papilliferum, anaplastic astrocytoma,
and ocular abnormalities. Watanabe Y,
Shido K, Niihori T, Niizuma H, Katata
Y, Iizuka C, Oba D, Moriya K,
Saito-Nanjo Y, Onuma M, Rikiishi T,
Sasahara Y, Watanabe M, Aiba S, Saito
R, Sonoda Y, Tominaga T, Aoki Y, Kure
S. Am J Med Genet A. 2016
Jan;170A(1):189-94. doi:
10.1002/ajmg.a.37376. 査読有り
5. A postzygotic NRAS mutation in a

patient with Schimmelpenning syndrome. Kuroda Y, Ohashi I, Enomoto Y, Naruto T, Baba N, Tanaka Y, Aida N, Okamoto N, Niihori T, Aoki Y, Kurosawa K. Am J Med Genet A. 2015 Sep;167A(9):2223-5. doi: 10.1002/ajmg.a.37135. 査読有り

6. A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines. Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T. Am J Med Genet A. 2015 Feb;167A(2):407-11. doi: 10.1002/ajmg.a.36842. 査読有り

〔学会発表〕(計 1件)

新堀哲也、井泉瑠美子、西山亜由美、矢尾板全子、大場大樹、守谷充司、井上晋一、舟山亮、城田松之、中山啓子、松原洋一、青木洋子。次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索。第3回生命医薬情報学連合大会 2014.10.2-4 仙台国際センター(仙台市)

〔図書〕(計 0件)

〔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

新堀 哲也 (Tetsuya Niihori)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40436134

(2) 研究分担者

松原 洋一 (Yoichi Matsubara)
国立行政法人国立成育医療研究センタ

一・所長室・研究所長
研究者番号：00209602

青木 洋子 (Yoko Aoki)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80332500

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

梅木 郁美 (Ikumi Umeki)