

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04710

研究課題名(和文) 次世代ゲノム時代の染色体構造異常新規分類へ向けた基盤整備

研究課題名(英文) Establishment of new classification for structural variation based on next generation sequencing

研究代表者

倉橋 浩樹 (Kurahashi, Hiroki)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：30243215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：染色体の複雑構造異常の発生メカニズムはまだよくわかっていない。本研究ではG分染法で見かけ上、三カ所の切断点を持つ染色体構造異常の切断点の解析を行った。を解析した。マイクロアレイ染色体検査を行い、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスをメイトペアで行うことにより、切断点及びジャンクションの配列情報を得た。染色体挿入の切断点近傍のコピー数は複雑に入り組んでおり、クロモスリプシスと呼ばれる染色体破砕現象が生じていることが予想された。遅滞染色体に起因する微小核の中の染色体が、次のDNA複製サイクルの進行度が核ゲノムと遅れが生じることで、DNA鎖が切断されていることが推測された。

研究成果の概要(英文)：It has been unclear how the complex structural variations arise. In this study we analyzed the genomic structure of breakpoints and junctions of complex structural variations. Microarray technique followed by next generation sequencing revealed the genomic information of the breakpoints and junctions. Chromosomal insertions carry complex alternation of the copy number states, suggesting that chromothripsis occurred. Difference of the DNA replication between nuclear genome and chromosome in micronucleus derived from lagging chromosome might lead to the DNA shattering that might induce the chromothripsis.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：染色体 ゲノム 構造異常 挿入 端部欠失・逆位重複 クロモスリプシス

1. 研究開始当初の背景

染色体の複雑構造異常の発生メカニズムはまだよくわかっていない。単純な染色体構造異常は、従来より、DNAの2重鎖切断とその誤った修復によって発生すると考えられてきた。実際に切断点や結合部のゲノム解析により、繰り返して起こる構造異常は、繰り返し配列に起こった切断に対して、染色体上の別の位置の相同配列を介して修復する、修復のエラー、すなわち非アリル間相同組み換え (Non-allelic homologous recombination: NAHR) の経路によって発生する。繰り返して起こらない構造異常は、ランダムな切断に対して、非相同末端結合 (Non-homologous end joining) によって発生する。一方で、近年のマイクロアレイ染色体検査法や次世代シーケンスの普及により、一部の繰り返して起こらない構造異常は、ジャンクション配列は数塩基の微小相同配列 (microhomology) を介して結合しており、なんらかの複製の停止 (Fork Stalling and Template Switching: FoSTeS) の関与が推測された。停止後の複製の再開は、DNA 端の核内距離が近い同時進行中の近傍の複製フォークへの侵入、鋳型乗り換え (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication: MMBIR) による複製の再開が示唆されている。

2. 研究の目的

複雑な構造異常に関しては、まだ切断点やジャンクションのゲノム配列に関する情報が少ない。本研究では、複雑な構造異常の発生メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究ではG分染法で見かけ上は三カ所の切断点を持つ染色体構造異常の切断点の解析を行った。材料としては、染色体挿入、端部欠失・逆位重複を解析した。最初にマイクロアレイ染色体検査を行い、コピー数

の増減を解析した。次に、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスをメイトペアで行うことにより、構造異常の切断点及びジャンクションの配列情報を得た。

4. 研究成果

染色体挿入、3-way 転座などの切断点近傍のコピー数は、G分染で予想したほど単純ではなく、複雑に入り組んでおり、クロモスリプシスと呼ばれる染色体破碎現象が生じていることが予想された。本研究の結果と近年の知見から、遅滞染色体に起因する微小核の中の染色体が、次のDNA複製サイクルの進行度が核ゲノムとずれが生じ、遅れることで、DNA鎖の断端が発生し、上記の経路で修復されることにより複雑構造異常が生じることが推測された。

一方で、染色体端部欠失・逆位重複の発生メカニズムもまだよくわかっていない。頻度の高い8pの端部欠失・逆位重複は相同性の高いinverted repeat配列を介したNAHRとされているが、そうでない散発性のものに関しては未解明である。5例の染色体端部欠失・逆位重複の切断点の解析を行った。マイクロアレイ染色体検査で4p, 8q, 9p, 10q, 11qの端部欠失のすぐ近くに接して重複領域が存在し、逆位重複が同定された。引き続き、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスをメイトペアで行うことにより、端部欠失・逆位重複の切断点及びジャンクションの配列情報を得た。5例のすべての症例において逆位の折り返し点には対称性はなく、長い介在配列が存在した。介在配列のサイズは共通して数kbであった。ジャンクション配列は数塩基のマイクロホモロジーを介して結合しており、FoSTeSの関与が推測された。停止後の複製の再開は、DNA端の核内距離が近い同時進行中の近傍の複製フォークへの侵入、MMBIRによる複製の再開が示唆されているが、本

研究の結果からは、同一フォーク内の leading 鎖から lagging 鎖への鋳型乗り換えが生じたときに、逆位重複が生じることが推測された。

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34件) 全て査読あり

(1) Taniguchi-Ikeda M, Morisada N, Inagaki H, Ouchi Y, Takami Y, Tachikawa M, Satake W, Kobayashi K, Tsuneishi S, Takada S, Yamaguchi H, Nagase H, Nozu K, Okamoto N, Nishio H, Toda T, Morioka I, Wada H, Kurahashi H, Iijima K. Two patients with PNKP mutations presenting with microcephaly, seizure, and oculomotor apraxia. **Clin Genet** 93(4), 931-933, 2018.

(2) Inoue Y, Sakamoto Y, Sugimoto M, Inagaki H, Boda H, Miyata M, Kato H, Kurahashi H, Okumoto T. A family with craniofrontonasal syndrome: the first report of familial cases of craniofrontonasal syndrome with bilateral cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac J**, 15347, 2018.

(3) Ohwaki A, Nishizawa H, Aida N, Kato T, Kambayashi A, Miyazaki J, Ito M, Urano M, Kiriya Y, Kuroda M, Nakayama M, Sonta SI, Suzumori K, Sekiya T, Kurahashi H, Fujii T. Twin pregnancy with chromosomal abnormalities mimicking a gestational trophoblastic disorder and coexistent fetus on ultrasound. **J Obstet Gynaecol**. 2018 Mar 9:1-3.

(4) Rinaldi VD, Bolcun-Filas E, Kogo H, Kurahashi H, Schimenti JC. The DNA damage checkpoint eliminates mouse oocytes with chromosome synapsis failure. **Mol Cell** 67, 1026-1036.e2, 2017.

(5) Nakae S, Kato T, Murayama K, Sasaki H, Abe M, Kumon M, Kumai T, Yamashiro K,

Inamasu J, Hasegawa M, Kurahashi H, Hirose Y. Remote intracranial recurrence of IDH mutant gliomas is associated with TP53 mutations and an 8q gain. **Oncotarget** 8, 84729-84742, 2017.

(6) Azuma Y, Töpf A, Evangelista T, Lorenzoni PJ, Roos A, Viana P, Inagaki H, Kurahashi H, Lochmüller H. Intragenic DOK7 deletion detected by whole-genome sequencing in congenital myasthenic syndromes. **Neurol Genet** 3, e152, 2017.

(7) Nagasaka M, Taniguchi-Ikeda M, Inagaki H, Ouchi Y, Kurokawa D, Yamana K, Harada R, Nozu K, Sakai Y, Mishra SK, Yamaguchi Y, Morikoka I, Toda T, Kurahashi H, Iijima K. Novel missense mutation in DLL4 in a Japanese sporadic case of Adams-Oliver syndrome. **J Hum Genet** 62, 869, 2017.

(8) Kawamura Y, Ohye T, Miura H, Ihira M, Kato Y, Kurahashi H, Yoshikawa T. Analysis of the origin of inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 in the Japanese population. **J Gen Virol** 98, 1823-1830, 2017.

(9) Kato T, Ouchi Y, Inagaki H, Makita Y, Mizuno S, Kajita M, Ikeda T, Takeuchi K, Kurahashi H. Genomic characterization of chromosomal insertions: Implication for mechanism leading to the chromothripsis. **Cytogenet Genome Res** 153, 1-9, 2017.

(10) Kohmoto T, Okamoto N, Naruto T, Murata C, Ouchi Y, Fujita N, Inagaki H, Satomura S, Okamoto N, Saito M, Masuda K, Kurahashi H, Imoto I. A case with concurrent duplication, triplication, and uniparental isodisomy at 1q42.12-qter supporting microhomology-mediated break-induced replication model for replicative rearrangements. **Mol Cytogenet** 10, 15, 2017.

(11) Kato M, Kato T, Hosoba E, Ohashi M, Fujisaki M, Ozaki M, Yamaguchi M,

Sameshima H, Kurahashi H. PCS/MVA syndrome caused by an Alu insertion in the BUB1B gene. **Hum Genome Var** 4, 17021, 2017.

(12) Inagaki H, Kato T, Tsutsumi M, Ouchi Y, Ohye T, Kurahashi H. Palindrome-mediated translocations in humans: a new mechanistic model for gross chromosomal rearrangements. **Front Genet** 7, 125, 2016.

(13) Tsutsumi M, Yokoi S, Miya F, Miyata M, Kato M, Okamoto N, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S, Kurahashi H. Novel compound heterozygous variants in PLK4 identified in a patient with autosomal recessive microcephaly and chorioretinopathy. **Eur J Hum Genet** 24(12), 1702-1706, 2016.

(14) Boda H, Uchida H, Takaiso N, Ouchi Y, Fujita N, Kuno A, Hata T, Nagatani A, Funamoto Y, Miyata M, Yoshikawa T, Kurahashi H, Inagaki H. A PDE3A mutation in familial hypertension and brachydactyly syndrome. **J Hum Genet** 61(8), 701-3, 2016.

(15) Taniguchi-Ikeda M, Takeshima Y, Lee T, Nishiyama M, Awano H, Yagi M, Unzaki A, Nozu K, Nishio H, Matsuo M, Kurahashi H, Toda T, Morioka I, Iijima K. Next-generation sequencing discloses a nonsense mutation in the dystrophin gene from long preserved dried umbilical cord and low-level somatic mosaicism in the proband mother. **J Hum Genet** 61(4), 351-5, 2016.

(16) Markoff A, Kurahashi H, Grandone E, Bogdanova N. Annexin A5 haplotype M2 is not a risk factor for recurrent miscarriages in Northern Europe, is there sufficient evidence? **Reprod Biomed Online** 32(5), 469-73, 2016.

(17) Markoff A, Kurahashi H, Grandone E, Bogdanova N. Authors' response to the letter of Nagirnaja et al., "Response to annexin A5 haplotype M2 is not a risk factor for recurrent

miscarriages in Northern Europe, is there sufficient evidence?" **Reprod Biomed Online** 33(1), 116-7, 2016.

(18) Ohye T, Kawamura Y, Inagaki H, Yoshikawa A, Ihira M, Yoshikawa T, Kurahashi H. A simple cytogenetic method to detect chromosomally integrated human herpesvirus-6. **J Virol Methods** 228, 74-8, 2016.

(19) Suzuki E, Shima H, Toki M, Hanew K, Matsubara K, Kurahashi H, Narumi S, Ogata T, Kamimaki T, Fukami M. Complex X-Chromosomal Rearrangements in Two Women with Ovarian Dysfunction: Implications of Chromothripsis/Chromoanaysynthesis-Dependent and -Independent Origins of Complex Genomic Alterations. **Cytogenet Genome Res** 150(2), 86-92, 2016.

(20) Nakagawa T, Taniguchi-Ikeda M, Murakami Y, Nakamura S, Motooka D, Emoto T, Satake W, Nishiyama M, Toyoshima D, Morisada N, Takada S, Tairaku S, Okamoto N, Morioka I, Kurahashi H, Toda T, Kinoshita T, Iijima K. A novel PIGN mutation and prenatal diagnosis of inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. **Am J Med Genet A** 170(1), 183-188, 2016.

(21) Miyazaki J, Nishizawa H, Kambayashi A, Ito M, Noda Y, Terasawa S, Kato T, Miyamura H, Shiogama K, Sekiya T, Kurahashi H, Fujii T. Increased levels of soluble corin in pre-eclampsia and fetal growth restriction. **Placenta** 48, 20-25, 2016.

(22) Yasui T, Suzuki T, Hara F, Watanabe S, Uga N, Naoe A, Yoshikawa T, Ito T, Nakajima Y, Miura H, Sugioka A, Kato Y, Tokoro T, Tanahashi Y, Kasahara M, Fukuda A, Kurahashi H. Successful living donor liver transplantation for classical maple syrup urine

disease. **Pediatr Transplant** 20(5), 707-710, 2016.

(23) Takaiso N, Nishizawa H, Nishiyama S, Sawada T, Hosoba E, Ohye T, Sato T, Inagaki H, Kurahashi H. Mutation analysis of the JUNO gene in female infertility of unknown etiology. **Fujita Med J** 2(3), 59-61, 2016.

(24) Kurahashi H, Kato T, Miyazaki J, Nishizawa H, Nishio E, Furukawa H, Miyamura H, Ito M, Endo T, Ouchi Y, Inagaki H, Fujii T. Preimplantation genetic diagnosis/screening by comprehensive molecular testing. **Reprod Med Biol** 15(1), 13-19, 2015.

(25) Yokoi S, Ishihara N, Miya F, Tsutsumi M, Yanagihara I, Fujita N, Yamamoto H, Kato M, Okamoto N, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Kojima S, Saitoh S, Kurahashi H, Natsume J. TUBA1A mutation can cause a hydranencephaly-like severe form of cortical dysgenesis. **Sci Rep** 5, 15165, 2015.

(26) Miyazaki J, Ito M, Nishizawa H, Kato T, Minami Y, Inagaki H, Ohye T, Miyata M, Boda H, Kiriya Y, Kuroda M, Sekiya T, Kurahashi H, Fujii T. Intragenic duplication in the PKHD1 gene in autosomal recessive polycystic kidney disease. **BMC Med Genet** 16(1), 98, 2015.

(27) Morine M, Kohmoto T, Masuda K, Inagaki H, Watanabe M, Naruto T, Kurahashi H, Maeda K, Imoto I. A unique TBX5 microdeletion with microinsertion detected in patient with Holt-Oram syndrome. **Am J Med Genet A** 167(12), 3192-3196, 2015.

(28) Yagasaki H, Shichino H, Shimizu N, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S. Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. **Transpl**

Infect Dis 17(1), 160-1, 2015.

(29) Miura H, Kawamura Y, Kudo K, Ihira M, Ohye T, Kurahashi H, Kawashima N, Miyamura K, Yoshida N, Kato K, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T. Virological analysis of inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in three hematopoietic stem cell transplant patients. **Transpl Infect Dis** 17(5), 728-31, 2015.

(30) Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Whole genomic analysis of an unusual human G6P[14] rotavirus strain isolated from a child with diarrhea in Thailand: evidence for bovine-to-human interspecies transmission and reassortment events. **PLoS One** 10(9), e0139381, 2015.

(31) Komoto S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Emergence and characterization of unusual DS-1-like G1P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Thailand. **PLoS One** 10(11), e0141739, 2015.

(32) Nakamura Y, Kikugawa S, Seki S, Takahata M, Iwasaki N, Terai H, Matsubara M, Fujioka F, Inagaki H, Kobayashi T, Kimura T, Kurahashi H, Kato H. PCSK5 mutation in a patient with the VACTERL association. **BMC Res Notes** 8, 228, 2015.

(33) Tsuge I, Morishita M, Kato T, Tsutsumi M, Inagaki H, Mori Y, Yamawaki K, Inuo C, Ieda K, Ohye T, Hayakawa A, Kurahashi H. Novel FATP4 mutations responsible for ichthyosis prematurity syndrome in a Japanese patient. **Hum Genome Var** 2, 15003, 2015.

(34) Tairaku S, Taniguchi-Ikeda M, Okazaki Y, Noguchi Y, Nakamachi Y, Mori T, Kubokawa I,

Hayakawa A, Shibata A, Emoto T, Kurahashi H, Toda T, Kawano S, Yamada H, Morioka I, Iijima K. Prenatal genetic testing for familial severe congenital protein C deficiency. **Hum Genome Var** 2, 15017, 2015.

〔学会発表〕(計 14 件)

(1) Kurahashi H. Screening for Genetic Disease within the Asian context. ASPIRE 3rd Masterclass, Preimplantation Genetic Testing: Screening and Diagnosis, Beijing, China, Oct 12, 2017.

(2) Kurahashi H, Kato T, Kato M, Ouchi Y, Tsutsumi M, Inagaki H. Towards optimization of PGD for recurrent t(11;22) carrier. ESHG2017, Copenhagen, Denmark, May 27-30, 2017.

(3) 倉橋浩樹、造血器腫瘍のクリニカルシークエンスにおける遺伝診療体制の構築、第 59 回日本小児血液がん学会学術集会、松山、Nov 9, 2017.

(4) 倉橋浩樹、次世代型 PGD/PGS の現状と問題点、第 62 回日本生殖医学会学術講演会、下関、Nov 16, 2017.

(5) 倉橋浩樹、Recent advance in our understanding of the molecular nature of chromosomal abnormalities. 日本人類遺伝学会第 62 回大会、神戸、Nov 17, 2017.

(6) Kurahashi H, Mechanism for Structural Variation. APAC RGH Symposium, Singapore, Oct 4, 2016.

(7) Kurahashi H. Palindrome-mediated recurrent translocations in humans. ICHG2016, Kyoto, Japan, Apr 3-7, 2016.

(8) 倉橋浩樹、Palindrome-mediated chromosomal translocations in humans. 日本放射線影響学会第 59 回大会、広島、Oct 28, 2016.

(9) Kurahashi H, Mishra D, Kato T, Inagaki H, Kosho T, Wakui K, Kido Y, Sakazume S, Taniiguchi-Ikeda M, Morisada N, Iijima K,

Fukushima Y, Emanuel BS. Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24.13;q11.21) translocation. European Human Genetics Conference 2015, Glasgow, UK, June 6-9, 2015.

(10) Kurahashi H, Kato T, Inagaki H, Mishra D, Ouchi Y, Tsutsumi M, Ohye T. Palindrome-mediated chromosomal translocations in humans. International Symposium on Genome Science 2015, Tokyo, January 20-21, 2015.

(11) Kurahashi H. Age-related increase of aneuploidy in human oocytes. IFFS/JSRM International Meeting 2015, Yokohama, April 26-29, 2015.

(12) 倉橋浩樹。網羅的手法による着床前診断。第 67 回日本産科婦人科学会学術集会、横浜、April, 10-12, 2015.

(13) 倉橋浩樹。ヒト卵母細胞における染色体分離異常の加齢依存性増加機構、日本人類遺伝学会第 60 回大会、東京、October, 14-17, 2015.

(14) 倉橋浩樹。ヒト卵母細胞における加齢依存性染色体分離異常の発生メカニズム、第 1 回産科婦人科遺伝診療学会、長崎、December, 18-19, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://molgen.icms.fujita-hu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋 浩樹 (KURAHASHI Hiroki)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・分子遺伝学研究部門・教授

研究者番号：30243215