

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09975

研究課題名(和文) 低頻度モザイク変異検出技術を用いた生殖細胞モザイク変異の推定診断法開発

研究課題名(英文) Development of presumptive diagnostic methods for germ line mosaic variants using low frequency mosaic variants detection technologies

研究代表者

加藤 光広 (Kato, Mitsuhiro)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：10292434

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)：生殖細胞のモザイク変異の頻度は疾患毎に異なり、多くは頻度が不明で、正確な遺伝相談の足かせになっている。低頻度体細胞モザイク変異の診断法を開発し、より正確な遺伝相談に寄与することが本研究の目的である。小児神経疾患の原因遺伝子解析を行い、3年間で185例の変異を同定した。当初両親には変異がないと考えられた母親の検体を用いて、デジタルPCRによるモザイクの確認を行った。Sanger法では見逃されるモザイク変異がDigital PCRによって確認され、モザイク率を明らかにした。重篤な疾患における遺伝相談では、正確な情報提供が重要であり、Digital PCRによる解析が推奨される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

からだや細胞の一部に変異が起きて、正常と変異が混じった状態をモザイク変異と言います。血液では変異がなくても、精子や卵子などでモザイク変異を起こしていると次の子どもへの遺伝に影響します。私たちは、頻度が少ないモザイク変異の診断法を開発し、より正確な遺伝相談を行うための研究を行いました。小児神経疾患の原因遺伝子解析を行い、3年間で185例の変異を見つけました。両親には一見変異が認められませんでした。デジタルPCRという新しい解析手法により、ひとりの母親で5%の変異を確認することができました。重篤な病気の遺伝相談では、正確な情報提供がたいせつであり、デジタルPCRが役立つことを示しました。

研究成果の概要(英文)：The frequency of germline mosaic variants varies from disease to disease, and the frequency is often unknown, which is a hindrance to accurate genetic consultation. The purpose of this study is to develop diagnostic methods for low-frequency somatic mosaic variants and contribute to more accurate genetic counseling. We analyzed the causative genes for neurological diseases in children and identified 185 variants in 3 years. Mosaic was confirmed by digital PCR using a sample of a mother whose sample was initially considered to have no variant. A mosaic variant that was overlooked by the Sanger method was confirmed by digital PCR, and the mosaic rate was clarified. Accurate information is critical for genetic counseling in serious diseases, and analysis by Digital PCR would be recommended.

研究分野：小児神経学、臨床遺伝学

キーワード：モザイク変異 デジタルPCR 遺伝相談

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちは、1999年から脳形成障害、2002年からてんかん症候群を主とする小児神経疾患に対して原因遺伝子解析を行い、世界に先駆けて原因遺伝子を数多く同定した(表1)。

同定した変異の多くが健常な両親の血液には変異が認められない常染色体優性もしくはX連鎖性の de novo 変異である。研究開始当初においても、脳形成障害の65例が de novo 変異(28例が常染色体優性、37例がX連鎖性)、てんかん症候群の137例が de novo 変異(127例が常染色体優性、10例がX連鎖性)であり、希少疾患の de novo 変異例を多数有していた。

表1 応募者達が同定した疾患原因遺伝子

| 疾患 | 遺伝子 | 論文 |
|-------------------|--------|---------------------|
| 外性器異常を伴うX連鎖性滑脳症 | ARX | Nat Genet 2002 |
| 潜因性 West 症候群 | ARX | Neurology 2003 |
| 大田原症候群 | ARX | Am J Hum Genet 2007 |
| 大田原症候群 | STXBPI | Nat Genet 2008 |
| 白質低形成を伴う West 症候群 | SPTAN1 | Am J Hum Genet 2010 |
| 大田原症候群 | KCNQ2 | Ann Neurol 2012 |
| 孔脳症 | COL4A2 | Am J Hum Genet 2012 |
| 裂脳症 | COL4A1 | Ann Neurol 2013 |
| 大田原症候群、他 | GNAO1 | Am J Hum Genet 2013 |
| 大田原症候群、他 | SCN2A | Neurology 2013 |
| 脳鉄沈着症(SENDA) | WDR45 | Nat Genet 2013 |
| 限局性皮質異形成 | MTOR | Ann Neurol 2015 |

両親の保因者検査が陰性の de novo 変異では、次子への再発率は低いが、両親のどちらかの生殖細胞モザイク変異によって、罹患児のいる両親における再発率は一般集団より高くなる。生殖細胞モザイク変異の頻度は疾患毎に異なるが、生殖細胞モザイク変異の正確な頻度の測定は難しく、多くの疾患では不明である。また、集団の経験則によって求められた数値を個別の症例にあてはめて行う遺伝相談は正確性が不足し、症例毎に具体的な再発率を伝えることが望ましい。

表2 応募者達が検出したモザイク変異

| 疾患 | 遺伝子 | モザイク変異保有者 | モザイクの種類 | 論文 |
|-----------------------|--------|-----------|----------|---------------------|
| 皮質下帯状異所性灰白質 | DCX | 患者 | 体細胞 | Ann Neurol 2001 |
| 大田原症候群 | STXBPI | 健康父 | 体細胞・生殖細胞 | Clin Genet 2011 |
| 小脳低形成を伴う大田原症候群 | CASK | 健康母 | 体細胞・生殖細胞 | Epilepsia 2012 |
| 大田原症候群 | SCN2A | 患者 | 体細胞 | Neurology 2013 |
| 大田原症候群 | GNAO1 | 患者 | 体細胞 | Am J Hum Genet 2013 |
| Aicardi-Goutieres 症候群 | TREX1 | 患者 | 体細胞 | Rheumatology 2014 |
| 乳児移動性部分発作 | KCNT1 | 健康母 | 体細胞・生殖細胞 | Epilepsia 2015 |
| 不随意運動を伴うてんかん性脳症 | GRIN1 | 患者 | 体細胞 | Epilepsia 2015 |
| 外性器異常を伴うX連鎖性滑脳症 | ARX | 健康母 | 生殖細胞 | unpublished |

近年、次世代シーケンサーによるディープシーケンシング技術の応用によって、体細胞モザイク変異の同定または生殖細胞モザイク変異が推定される機会が増えており(表2)、モザイク変異の頻度は従来考えられていたよりも多いことが予想される。

また、第1子が重篤な外性器異常を伴うX連鎖性滑脳症と診断され、サンガー法によるシーケンス解析では母に変異を認めなかったが、母の希望で出生前診断を行ったところ、胎児に第1子と同じ変異を認め、母が生殖細胞モザイク変異を有する例を経験した。生殖細胞モザイク変異の保因者では、生殖細胞以外にも変異を有する体細胞が混在する例がある。変異細胞の混在率が高ければサンガー法によるシーケンス解析や高感度融解曲線分析(HRM)法、全エクソーム解析(リード数 30x~100x)でもモザイク変異の同定は可能だが、従来の解析法では検出されない5%未満の低頻度体細胞モザイク変異を検出することによって、生殖細胞モザイク変異の可能性をより正確に推測することができる。

2. 研究の目的

近年、次世代シーケンサーによるディープシーケンス解析やデジタルPCRを用いたまれな変異の検出技術が進歩し、がん研究などの分野において応用されている。また、変異アレール特異的PCRと定量PCRを組み合わせることによって、高感度で簡便なモザイク変異のスクリーニングが可能である。本研究では、これまでの症例蓄積の利点を活かし、最新技術を

用いることによって、低頻度体細胞モザイク変異の検出を行い、生殖細胞モザイク変異の推定診断法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによるモザイク変異の検出

de novo 変異が同定された遺伝子のゲノム領域をターゲットとしてプライマーを作成し、リード数が 10,000x 以上になるように複数の領域をパネル化して long PCR により包括的に増幅しライブラリを作成する。次に次世代シーケンサー MiSeq もしくは HiSeq2000 (Illumina) を用いてシーケンスを行い、変異型と野生型のリード数を比較し、モザイク率を求める。

(2) デジタル PCR によるモザイク変異の検出

モザイク変異が疑われる症例の DNA サンプルを用いて droplet デジタル PCR を行い、患児とその両親の血液由来 DNA の解析を行った。Digital PCR Master Mix v2、QuantStudio[®] 3D Digital chip kit v2 を使用し、TaqMan[®] MGB probe として Wild type: ACTCTACACTCTGGATG (VIC) と Mutant: ACTCTACATTCTGGATG (FAM) を用いて PCR 反応を行った。反応済みのチップは QuantStudio[®] 3D Digital PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いてリードを行い、QuantStudio[®] 3D AnalysisSuite[™] により解析を施行した。変異陽性分画と陰性分画の算出によりモザイク変異率を求めた。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによるモザイク変異の検出

脳形成障害とてんかん症候群を中心に小児神経疾患の原因遺伝子解析を行い、患児と両親の Trio 検体で年間 200 家系以上を新たに収集した。その結果、初年度は 47 例、2 年度 53 例、3 年度は 85 例の de novo 変異を同定した。モザイク変異の検出法として、次世代シーケンサーを用いたディープシーケンスのためのカスタムターゲットパネルを作成し、脳形成異常、早期発症てんかん性脳症など 19 例で de novo 変異を同定したが、患児および両親の検体にモザイク変異を疑わせる変異アレールと野生型アレールの比率の偏りはなかった。

(2) デジタル PCR によるモザイク変異の検出

当初 de novo と考えられた DCX 変異をあらためて見直し、母親において変異アレール (c. 639C>T, p. T230I) を疑わせるピークが認められた (図 1)。デジタル PCR の結果、変異型の割合は、患児で 99.2% (2169/2177)、母で 5.1% (204/3999)、父で 0.3% (6/2250) (母と父の比率の差の検定 P 値 < 0.001) であった。

(図 2 変異型は青 (FAM)、野生型は赤 (VIC)、Mutant+Wild type (ウェル内にどちらも存在するものは緑、産物が存在しないウェルは黄で表示した)

Sanger 法では見逃されるモザイク変異が Digital PCR によって、具体的な比率として検出された。重篤な疾患における遺伝相談では、正確な情報提供が重要であり、Digital PCR による解析が推奨される。

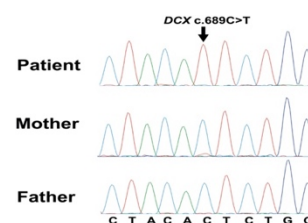


図 1 DCX 変異の患児と両親の Sanger シーケンス

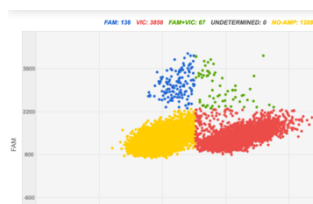


図 2 母親のデジタル PCR 結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Akita Tenpei, Aoto Kazushi, Kato Mitsuhiro, Shiina Masaaki, Mutoh Hiroki, Nakashima Mitsuko, Kuki Ichiro, Okazaki Shin, Magara Shinichi, Shiihara Takashi, Yokochi Kenji, Aiba Kaori, Tohyama Jun, Ohba Chihiro, Miyatake Satoko, Miyake Noriko, Ogata Kazuhiro, Fukuda Atsuo, Matsumoto Naomichi, Saitsu Hiroto | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 De novo variants in CAMK2A and CAMK2B cause neurodevelopmental disorders | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology | 6. 最初と最後の頁 280 ~ 296 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.528 | 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 Araya Nami, Takahashi Yukitoshi, Shimono Masayuki, Fukuda Tomofumi, Kato Mitsuhiro, Nakashima Mitsuko, Matsumoto Naomichi, Saitsu Hiroto | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 A recurrent homozygous NHLRC1 variant in siblings with Lafora disease | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Human Genome Variation | 6. 最初と最後の頁 6-9 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-018-0015-9 | 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 Fassio Anna, Esposito Alessandro, Kato Mitsuhiro, Saitsu Hiroto, et al. | 4. 巻 141 |
| 2. 論文標題 De novo mutations of the ATP6V1A gene cause developmental encephalopathy with epilepsy | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Brain | 6. 最初と最後の頁 1703 ~ 1718 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awy092 | 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 van der Sluijs PJ, Jansen S, Vergano SA, Adachi-Fukuda M, Alanay Y, AlKindy A, Baban A, Bayat A, Beck-Wodl S, Berry K, Bijlsma EK, Bok LA, Brouwer AFJ, van der Burgt I, Kato M, et al. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 The ARID1B spectrum in 143 patients: from nonsyndromic intellectual disability to Coffin?Siris syndrome | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Genetics in Medicine | 6. 最初と最後の頁 1295 ~ 1307 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41436-018-0330-z | 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 Tsuchida N., Nakashima M., Miyuchi A., Yoshitomi S., Kimizu T., Ganesan V., Teik K.W., Ch'ng G.-S., Kato M., Mizuguchi T., Takata A., Miyatake S., Miyake N., Osaka H., Yamagata T., Nakajima H., Saitu H., Matsumoto N. | 4. 巻 93 |
| 2. 論文標題 Novel biallelic SZT2 mutations in 3 cases of early-onset epileptic encephalopathy | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Genetics | 6. 最初と最後の頁 266 ~ 274 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.13061 | 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 Tsuchida N., Nakashima M., Kato M., et al. | 4. 巻 93 |
| 2. 論文標題 Detection of copy number variations in epilepsy using exome data | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Genetics | 6. 最初と最後の頁 577 ~ 587 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.13144 | 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 Hiraide Takuya, Nakashima Mitsuko, Yamoto Kaori, Fukuda Tokiko, Kato Mitsuhiro, Ikeda Hiroko, Sugie Yoko, Aoto Kazushi, Kaname Tadashi, Nakabayashi Kazuhiko, Ogata Tsutomu, Matsumoto Naomichi, Saitu Hiroto | 4. 巻 137 |
| 2. 論文標題 De novo variants in SETD1B are associated with intellectual disability, epilepsy and autism | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Human Genetics | 6. 最初と最後の頁 95 ~ 104 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-017-1863-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 Helbig Ingo, Heinzen Erin L., Mefford Heather C., the International League Against Epilepsy Genetics Commission (including Kato M) | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 Genetic literacy series: Primer part 2-Paradigm shifts in epilepsy genetics | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Epilepsia | 6. 最初と最後の頁 1138 ~ 1147 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/epi.14193 | 査読の有無 無 |
| 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 Hamada Nanako, Ogaya Shunsuke, Nakashima Mitsuko, Nishijo Takuma, Sugawara Yuji, Iwamoto Ikuko, Ito Hidenori, Maki Yuki, Shirai Kentaro, Baba Shimpei, Maruyama Koichi, Saitsu Hiroto, Kato Mitsuhiro, Matsumoto Naomichi, Momiyama Toshihiko, Nagata Koh-ichi | 4. 巻 141 |
| 2. 論文標題 De novo PHACTR1 mutations in West syndrome and their pathophysiological effects | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Brain | 6. 最初と最後の頁 3098 ~ 3114 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awy246 | 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 Akita Tenpei, Aoto Kazushi, Kato Mitsuhiro, Shiina Masaaki, Mutoh Hiroki, Nakashima Mitsuko, Kuki Ichiro, Okazaki Shin, Magara Shinichi, Shiihara Takashi, Yokochi Kenji, Aiba Kaori, Tohyama Jun, Ohba Chihiro, Miyatake Satoko, Miyake Noriko, Ogata Kazuhiro, Fukuda Atsuo, Matsumoto Naomichi, Saitsu Hiroto | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 De novo variants in CAMK2A and CAMK2B cause neurodevelopmental disorders | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology | 6. 最初と最後の頁 280 ~ 296 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.528 | 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 Syrbe S, Harms FL, Parrini E, Montomoli M, Mutze U, Helbig KL, Polster T, Albrecht B, Bernbeck U, van Binsbergen E, Biskup S, Burglen L, Denecke J, Heron B, Heyne H O, Hoffmann GF, Hornemann F, Matsushige T, Matsuura R, Kato M, et al. | 4. 巻 140 |
| 2. 論文標題 Delineating SPTAN1 associated phenotypes: from isolated epilepsy to encephalopathy with progressive brain atrophy | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Brain | 6. 最初と最後の頁 2322 ~ 2336 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awx195 | 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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuyuki Nakamura, Takahiro Abiko, Takashi Kanbayashi, Mitsuko Nakashima, Hiroto Saitsu, Naomichi Matsumoto, Mitsuhiro Kato |
| 2. 発表標題 HECW2 mutation causes periodic attacks of paralysis, intellectual disability and hypotonia |
| 3. 学会等名 15th International Child Neurology Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| | |
|---------|---|
| 1. 発表者名 | Hiroto Saito, Tenpei Akita, Kazushi Aoto, Mitsuhiro Kato, Masaaki Shiina, Hiroki Mutoh, Mitsuko Nakashima, Ichiro Kuki, Shin Okazaki, Shinichi Magara, Takashi Shiihara, Kenji Yokochi, Kaori Aiba, Jun Tohyama, Chihiro Ohba, Satoko Miyatake, Noriko Miyake, Kazuhiro Ogata, Atsuo Fukuda, Naomichi Matsumoto |
| 2. 発表標題 | De novo variants affecting autoinhibition of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, cause neurodevelopmental disorders |
| 3. 学会等名 | American Society of Human Genetics (国際学会) |
| 4. 発表年 | 2018年 |

| | |
|---------|---|
| 1. 発表者名 | Taikan Oboshi, Yukitoshi Takahashi, Asako Horino, Yuiti Kimizu, Shinsaku Yoshitomi, Tokito Ymaguchi, Hiroko Ikeda, Hidenobu Otani, Katumi Imai, Hideo Shigematsu, Yushi Inoue, Mitsuhiro Kato |
| 2. 発表標題 | Epileptic spasms in five children carrying WDR45 mutations |
| 3. 学会等名 | 19th International Symposium on Severe Infantile Epilepsy Treatment (国際学会) |
| 4. 発表年 | 2018年 |

| | |
|---------|--|
| 1. 発表者名 | Mitsuhiro Kato, Hiroki Mutoh, Tenpei Akita, Takuma Shibata, Hiroyuki Wakamoto, Hiroko Ikeda, Hiroki Kitaura, Kazushi Aoto, Mitsuko Nakashima, Tianying Wang, Chihiro Ohba, Satoko Miyatake, Noriko Miyake, Akiyoshi Kakita, Kensuke Miyake, Atsuo Fukuda, Naomichi Matsumoto, Hiroto Saito |
| 2. 発表標題 | Biallelic variants in CNPY3 cause West syndrome with hippocampal malrotation and characteristic fast waves |
| 3. 学会等名 | 13th European Congress on Epileptology (国際学会) |
| 4. 発表年 | 2018年 |

| | |
|---------|--|
| 1. 発表者名 | Kato Mitsuhiro |
| 2. 発表標題 | Why aetiology matters. |
| 3. 学会等名 | The 32nd International Epilepsy Congress (IEC 2017), Barcelona (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 | 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiroshi Shiraku, Mitsuko Nakashima, Saoko Takeshita, Khoo Chai Soon, Muzhirah Haniffa, Ch'ng Gaik Siew, Kazuma Takada, Keisuke Nakajima, Masayasu Ohta, Tohru Okanishi, Sotaro Kanai, Ayataka Fujimoto, Hiroto Saito, Naomichi Matsumoto, Mitsuhiro Kato |
| 2. 発表標題 PROSC mutations feature variable phenotype of early-onset epileptic encephalopathy |
| 3. 学会等名 American Epilepsy Society 2017, 71st Annual Meeting: Washington D.C. (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 加藤光広 |
| 2. 発表標題 てんかん性脳症の成因 遺伝子診断のup to date |
| 3. 学会等名 第11回日本てんかん学会関東甲信越地方会：新宿（招待講演） |
| 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 |
|-------------------|--|------------------------------------|----|
| 研究 分 担 者 | 中村 和幸 (Nakamura Kazuyuki) (20436215) | 山形大学・医学部・助教 (11501) | |