

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82729

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07864

研究課題名(和文)エクソーム解析で疾患原因不明の患者に対する新手法による原因解明の試み

研究課題名(英文)Diagnostic challenge using new methods in exome-negative patients

研究代表者

榎本 友美 (Enomoto, Yumi)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・研究員

研究者番号：20506290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエクソーム解析で原因不明の患者を対象に全ゲノムシーケンス解析を行い、2名の原因変異を同定する事ができた。1名は患者の表現型に関連する遺伝子のdeepイントロン領域に変異がみつき、機能解析の結果、スプライシング異常が起きている事がわかった。またもう1名の患者(ルビンシュタイン・テイビ症候群)はエクソーム解析では1つとされていた欠失が、実は正常2コピー領域を挟んだ2つの欠失からなる複雑構造変異であり、欠失の1つが原因遺伝子CREBBPの5'UTR領域の一部を含んでいる事がわかった。本研究によりエクソーム解析では解明できなかった患者の変異及び発症メカニズムを明らかにする事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソーム解析では原因不明だった患者を対象に、全ゲノムシーケンスを用いた変異の探索を行った。結果、2名の患者の原因変異および疾患発症メカニズムを明らかにすることができた。本研究にてエクソーム解析の限界、全ゲノムシーケンス解析の可能性および課題が示された。今後の臨床シーケンス、遺伝学的研究の有用なデータになると思われる。

研究成果の概要(英文)：We performed whole genome sequencing (WGS) in exome-negative patients. WGS identified causal variants in two patients. One patient had a de novo variant in deep intronic region of the gene related his clinical features. Our functional study revealed that the variant resulted in aberrant splicing. The other patient (Rubinstein-Taybi syndrome) had scattered deletions including a partial 5'-untranslated region of CREBBP, but all coding exons in CREBBP were intact (two normal copies). Both variants were not identified by exome sequencing. This study using WGS identified the causative variants and elucidated the mechanism of disease in exome-negative patients.

研究分野：遺伝学

キーワード：全ゲノムシーケンス 先天異常 エクソン外変異 複雑構造変異 エクソームシーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンス技術はこれまでの遺伝学的解析に大きな進歩をもたらした。これにより先天異常患者の症状の原因となる遺伝子変異を網羅的に探索することが可能になった。当研究グループではエクソームシーケンスに染色体検査、CGH マイクロアレイを組み合わせた遺伝学的症例解析システムを構築し(図1) 2012年より先天異常の病因解析研究に応用してきた。しかし当解析システムでも、依然として患者の半数以上に原因となる変異が見つからない。一般に臨床エクソームの診断率は25%であり(Yang et al., N Engl J Med, 2013)、現行の解析システムでは限界がある。ゲノム配列におけるエクソンが占める割合はわずか1.5%であり、エクソンのみの解析では残り半数の患者の原因説明は難しいと思われる。新規の責任遺伝子が存在する可能性もあるが、通常のエクソーム解析では検出できない変異および疾患発症のメカニズムについて検討する必要があった。

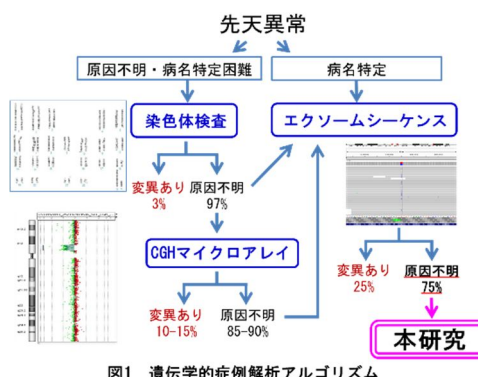


図1 遺伝学的症例解析アルゴリズム

## 2. 研究の目的

本研究の目的は現解析システム(エクソームシーケンス、染色体検査、CGH マイクロアレイ)による解析では原因不明であった患者の疾患原因変異の同定および変異による発症メカニズムの解明である。

## 3. 研究の方法

本研究では現解析システムで原因不明の症例を対象に、主に全ゲノムシーケンス解析を用いて患者の原因変異の探索を行った。全ゲノムシーケンスでは、イントロン等のエクソン外領域変異、トランスポゾン挿入変異、複雑構造異常変異等、通常のエクソーム解析では検出できない変異が見つかる可能性がある。しかしながら全ゲノムシーケンス解析では膨大な数の変異が検出されるため、ターゲット遺伝子がある程度絞られていないと実際の解析は難しい。そこで下記の条件をみたと患者を優先して全ゲノムシーケンス解析を施行した。

解析対象患者群 : 5名

臨床診断がほぼ確定している優性疾患に罹患し、かつ罹患疾患の原因遺伝子が1~数個に絞られる患者。

解析対象患者群 : 2名

臨床診断がほぼ確定している劣性疾患に罹患し、これまでの解析で原因遺伝子の片アレルに原因変異がみついているが、もう片アレルには変異がみつけない患者。

解析対象患者群 : 5名

新規の原因遺伝子の可能性がある患者。

解析対象患者群、はシングルで全ゲノムシーケンス解析を施行した。解析対象患者群の場合は臨床情報によるターゲット遺伝子の絞り込みが困難なため、一部の患者においては患者、父、母のトリオサンプルで全ゲノムシーケンス解析を施行した。

## 4. 研究成果

解析対象患者群の条件を満たす患者1名において、患者の表現型に一致する原因遺伝子のdeepイントロン領域にまれな1塩基置換の変異が見つかった。サンガーシーケンスによる両親解析を行った結果、両親には変異はみつからずde novo変異であることがわかった。病的変異の可能性が高く、機能解析を施行した。患者の末梢血のRNAを用いて変異周辺領域をターゲットとしたRT-PCRを行った結果、正常検体ではみられない異常転写産物が検出された。異常転写産物

のシーケンス解析を行ったところ、変異によるスプライシング異常が起こっていることがわかった。RNAseq 解析でも変異による異常転写産物が確認された。患者の症状とも矛盾なく疾患の原因変異と考えられる。現在論文を準備中である。

また解析対象患者群 のルビンシュタイン・テイビ症候群の患者 1 名は、エクソーム解析にて原因遺伝子の *CREBBP* の上流に *de novo* の欠失が見つかった。しかしながら、エクソーム解析のデータでは exon1 の coding 領域は欠失しておらず、*CREBBP* の他の全 exon にも異常は見つからなかった (図 2(a))。よって *CREBBP* 上流領域の欠失による疾患発症の可能性が強く示唆されたため、欠失範囲を詳細に調べるために全ゲノムシーケンス解析を施行した。結果、エクソーム解析では 1 つの欠失と思われたが、実際は間に正常 2 コピー領域をはさんだ 2 つの欠失からなる複雑構造変異であり、そのうちの 1 つの欠失が *CREBBP* の 5' UTR 領域の一部を含んでいることがわかった (図 2(b), (c), (d))。患者の症状とも矛盾なく疾患の原因変異と考えられる。本研究により、エクソーム解析のみでは解明できなかった患者の変異及び疾患発症メカニズムの詳細が明らかになった。

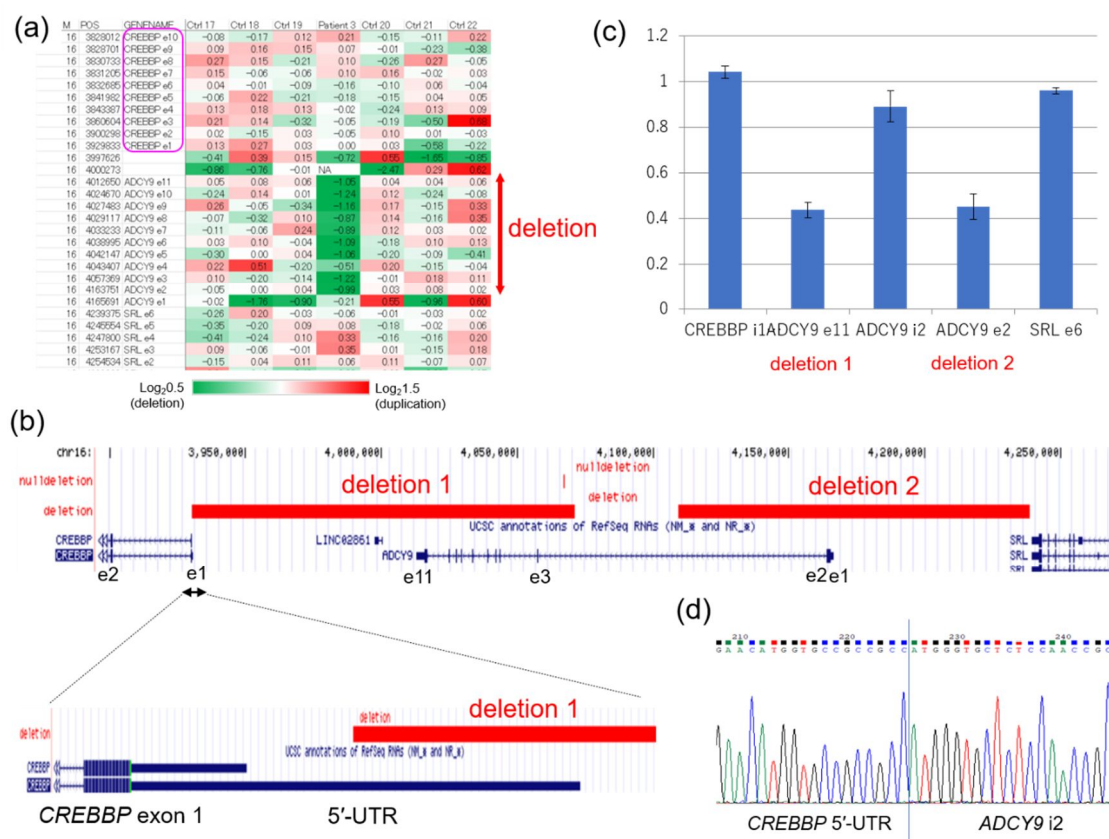


図2 ルビンシュタイン・テイビ症候群の患者に検出された正常 2 コピー領域を挟んだ 2 つの複雑構造欠失

- (a) エクソーム解析の CNV 解析。 *CREBBP* 遺伝子に隣接する *ADCY9* 遺伝子の一部を含む欠失が検出された。しかしながらルビンシュタイン・テイビ症候群の原因遺伝子である *CREBBP* 遺伝子の coding エクソンは欠失していなかった (正常 2 コピー)。
- (b) 全ゲノムシーケンス解析により検出された *CREBBP* 遺伝子周辺の 2 つの欠失。エクソームシーケンスでは 1 つと思われた欠失が実際は正常 2 コピー領域を挟んだ 2 つの欠失であったことがわかった。またそのうちの 1 つの欠失が *CREBBP* の 5' UTR 領域の一部を含んでいることがわかった。
- (c) 正常 2 コピー領域を挟んだ 2 つの欠失の定量 PCR 解析
- (d) *CREBBP* の 5' UTR 領域を含む欠失の切断点解析

しかしながら、解析対象患者群 の残り 3 名、解析対象患者群 の 2 名、解析対象患者群 の 5 名には現時点で原因変異はみつかっていない。解析対象患者群 の患者については、表現型に関連する原因遺伝子の片アレルに病的変異がみついているにも関わらず、もう片アレルの変異をみつけることはできなかった。また解析対象患者群 ではトリオ解析を行った患者においても現時点で原因変異をみつけることはできなかった。本解析では全ゲノムシーケンスを対象とした複雑構造変異の解析ツールやトランスポゾン変異を検出するための解析ツールも導入して解析を行っているが、現行のシステムでは検出できない、より複雑な発症メカニズムがあるのか

もしれない。しかしながら解析アルゴリズムは日々進歩しており、今後も新しい解析ツールを導入することで原因変異および疾患発症メカニズムを解明できる可能性は高いと考えている。また全ゲノムシーケンスとRNAseqを併用し、ゲノム配列情報と転写産物情報を同時に解析することも変異同定のための有用なアプローチの一つと思われる。引き続き解析を続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Enomoto Y, Yokoi T, Tsurusaki Y, Murakami H, Tominaga M, Minatogawa M, Abe-Hatano C, Kuroda Y, Ohashi I, Ida K, Shiiya S, Kumaki T, Naruto T, Mitsui J, Harada N, Kido Y, Kurosawa K | 4. 巻<br>101           |
| 2. 論文標題<br>Divergent variant patterns among 19 patients with Rubinstein-Taybi syndrome uncovered by comprehensive genetic analysis including whole genome sequencing                           | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Clinical Genetics  | 6. 最初と最後の頁<br>335-345 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/cge.14103. Epub 2022 Jan 4  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Enomoto Y, Tsurusaki Y, Kuroda Y, Murakami H, Kimura Y, Shiiya S, Naruto T, Kido Y, Kurosawa K |
| 2. 発表標題<br>Complex rearrangements of CREBBP detected in patients with Rubinstein-Taybi syndrome (RSTS)    |
| 3. 学会等名<br>American Society Of Human Genetics 69th Annual Meeting（国際学会）                                   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>榎本友美, 黒澤健司                          |
| 2. 発表標題<br>エクソーム解析で疾患原因不明の患者に対する 新手法による原因解明の試み |
| 3. 学会等名<br>2019年度「先進ゲノム支援」拡大班会議                |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Enomoto Y, Tsurusaki Y, Kuroda Y, Murakami H, Ida K, Umegae M, Harada N, Kimura Y, Naruto T, Kurosawa K                                  |
| 2. 発表標題<br>Whole exome sequence identified the deletion in 5' UTR or upstream intronic region of CREBBP in a patient with Rubinstein-Taybi syndrome |
| 3. 学会等名<br>American Society Of Human Genetics 68th Annual Meeting（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Enomoto Y, Tsurusaki Y, Kuroda Y, Murakami H, Umegae M, Kimura Y, Naruto T, Shimokaze T, Kurosawa K |
| 2. 発表標題<br>The variety of phenotype in patients with rare Japanese-origin homozygous deletion in RECQL4        |
| 3. 学会等名<br>日本人類遺伝学会第63回大会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                                  | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 連携研究者 | 黒澤 健司<br><br>(Kurosawa Kenji)<br><br>(20277031) | 神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部門長<br><br><br><br>(82729) |    |

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 |
|---------|---------|