

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：82729

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2022

課題番号：18H06218・19K21320

研究課題名（和文）ロングリードシーケンサーによる先天異常症候群の新規発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Long read sequencing elucidates the mechanism of multiple congenital anomalies.

研究代表者

黒田 友紀子（Kuroda, Yukiko）

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・医長

研究者番号：40823589

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：先天異常症候群に対して、既存のエクソーム解析で変異未検出例の中には、欠失・挿入、均衡型転座、逆位などのゲノム構造異常が一定数存在する。本研究で、コピー数異常を認めない染色体均衡型相互転座を例に、ロングリードシーケンスによりゲノム構造異常を同定した。転座切断点には日本人に多く見られる構造多型があり、従来の参照配列ではなく日本人の参照ゲノム配列を用いて解析を行い同定することができた。本研究を通して、ゲノム構造異常同定のためにロングリードシーケンスが有用な手法であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロングリードシーケンスにより、既存の方法では同定困難であったゲノム構造異常を同定することができた。コピー数異常を伴わないゲノム構造異常は、マイクロアレイ染色体検査、ショートリードシーケンサーによる構造異常解析でも検出が困難である。構造異常によりそこに存在する遺伝子の機能が失われて遺伝性疾患を発症することが予想された。未診断例の中に一定数このようなゲノム構造異常を原因とした例が存在しており、本研究によりゲノム構造異常を診断できたことで、ロングリードシーケンスの有用性を実証することができた。

研究成果の概要（英文）：Some of the undiagnosed multiple congenital anomaly cases would result from genome rearrangements such as insertion/deletion, reciprocal translocation, and inversion. It is hard to find these rearrangements by exome sequencing or the ordinal methods, other than long-read sequencing. In this research, we identified the breakpoints of the balanced reciprocal translocation by a long-read sequencing. Structural variations are highly enriched around the breakpoints of the recombination, so we used the Japanese reference genome distributed by jMorp instead of the GRCh38 genome for mapping the sequences. We found one of two junctions in mapping to jMorp genome, which was not called and found in GRCh38 genome. Long-read sequencing is efficient for the detection of the genome rearrangements. JG2.1.0 would be an alternative reference genome for the detection of the rearrangement encompassing structural variations.

研究分野：臨床遺伝

キーワード：ロングリード ゲノム構造異常 先天異常症候群 均衡型相互転座

1. 研究開始当初の背景

先天異常症候群の遺伝学的診断は、正確な疾患管理・遺伝カウンセリングに必要不可欠である。原因遺伝子が想定できない臨床診断が困難な例ではエクソーム解析などのショートリードシーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析が有用である。ショートリードシーケンサーによる全ゲノム解析での診断率は 40%にのぼり、プロモーターなどの調節領域やスプライシングにかかわるイントロン領域のバリエーションの検出や、ゲノムのコピー数変化やゲノム構造異常を検出することが可能であった。しかし依然として未診断例が半数存在し、その中には欠失・挿入、均衡型転座、逆位などのゲノム構造異常が存在すると考えられた。当初も現在も広く用いられているイルミナ社の HiSeq や MiSeq などの次世代シーケンサーは 100-300 塩基と短いシーケンス長（ショートリード）での解析である。短いリードをつなぎあわせただけではゲノムに関する断片的な情報しか得られずゲノム構造の異常を検出できない場合がある。ショートリードでは、数 kb 単位の塩基挿入・欠失やリピート配列伸長を検出することは困難であるが、1 リードで数 kb におよぶロングリード解析ではゲノム構造の全体像を俯瞰的にみることができる。ロングリードシーケンサーではこれまで検出困難であったゲノム構造異常を解析できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究はロングリードシーケンサーを用いて、これまでに検出できなかったゲノム構造異常を原因とする先天異常症候群を診断することを目的とした。具体的には全ゲノム解析により、複雑なゲノム構造異常の詳細な構造解析と発症メカニズムの推定、変異未検出の臨床診断確定例での疾患発生メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

最初にゲノム構造異常(structural variation, SV)を検出するためのロングリード用の解析パイプラインを構築した。ショートリードシーケンサー用の解析パイプラインはすでに当施設で確立していたが、ロングリード用のものを新たに構築する必要があった。最終的に改良を重ね、マッピングを MiniMap2、SV コールを Sniffles、ビューアーを Ribbon, IGV (integrated genome viewer)を使用して解析を行った。また、Oxford Nanopore Technology 社の PromethION ロングリードシーケンサーを用いてシーケンス解析を行った。

解析パイプラインの有用性を検証するために、コピー数変化を伴わない均衡型相互転座の染色体ゲノム構造異常でロングリード解析を行った。染色体 G-band 検査で転座が認められるものの、コピー数変化を伴わない例では、従来の方法では同定が困難であった。

4. 研究成果

染色体均衡型転座の 2 例に対してロングリードシーケンスを行った。

1 例目は t(X;22)で X 染色体短腕(Xp)と 22 番染色体長腕(22q)の間の相互転座の女児例で

あり、発達遅滞、てんかんを認めていた。マイクロアレイ染色体検査ではコピー数異常を認めず、X 不活化解析では 1:99 と不活化の偏りを認めた。X 染色体と常染色体の間の均衡型相互転座女性の場合には、コピー数異常や遺伝子の切断を伴わなくても X 不活化によって遺伝子発現量的な不均衡が生じて表現型異常を呈する可能性があった。本児の詳細な発症メカニズムを同定するため、ロングリードシーケンスを行った。

Reference genome を GRCh38 にしてマッピングを行い、Sniffles によって派生 X 染色体 der(X) の切断点は塩基単位でコールできた。切断点をはさむダイレクトシーケンスにより切断点を確認した。X 染色体、22 番染色体部分ともにそれぞれ 1 つずつ遺伝子を切断していたが、いずれも疾患との関連は指摘されていない遺伝子だった。一方、派生 22 番染色体 der(22) についてはうまくマッピングが行われず、切断点が検出されなかった。der(X) の切断点に相当する部位を IGV で目視で確認しても、der(22) 切断点に該当するマッピングリードは確認できなかった。der(22) の 22 番染色体部分に構造多型が存在する可能性を考え jMorp より日本人のゲノム配列 (JG2.1.0) を用いてマッピングし直した。JG2.1.0 を用いたマッピングでは切断点と予想される X 染色体、22 番染色体の接合リードを IGV で複数目視で確認することができた。der(22) の接合部付近は AT リピートが連続する領域であり PCR での増幅ができずダイレクトシーケンスでの確認はできなかった。目視で検出した複数リードと JG2.1.0 の参照配列がいずれも一致することを multiple alignment で確認して切断点を決定した。

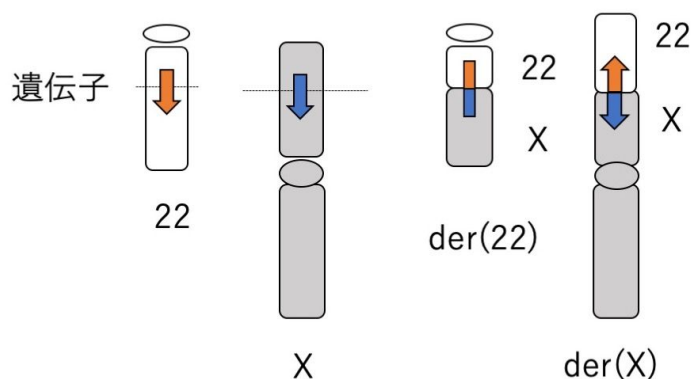


図: 22 番染色体と X 染色体の均衡型相互転座

染色体組み替えは SINE, LINE といった short tandem repeats (STRs) など繰り返し配列を切断点として組み替えがおきる場合があり、組み替え切断点付近は構造多型が存在しやすい領域である。STRs はロングリードで 1 シーケンスリードごとに長く読むことにより、リピートだけではなくユニーク配列の領域を合わせて 1 回で読み取ってマッピングを可能とする。一方、構造多型は人種ごとに異なり数十から数百 kbp とサイズの大きい構造

多型では、ロングリードでも 1 リードで読み取ることが不可能である。ロングリードシーケンスにおいて構造多型をシーケンスする上では、今回のように jMorp などの人種特有のゲノムデータベースを参照配列とすることも選択肢にあがる。最近ではテロメアやセントロメア領域も合わせて参照されている TtoT-CHM13 の利用も検討している。

2 例目は G-band 染色体核型正常例でマイクロアレイ染色体検査で 1 番染色体短腕に約 1Mb、2 番染色体長腕に約 2Mb、19 番染色体長腕に約 4Mb と 3 ヶ所に重複を認めた例である。この結果からは複雑な染色体構造異常が背景にあることが疑われた。構造異常の全体を把握することを目的にロングリードシーケンスを行ったが、それぞれの重複領域でのゲノム構造異常は全くコールされなかった。GRCh38 によって、当該領域それぞれのマッピングリードを IGV で目視することで重複領域をそれぞれ同定した。結果は、いずれも正方向に重複する tandem duplication と判明した。ただ、他の染色体構造異常を同定するには至らなかった。構造異常を特定できなかった原因として、coverage が不十分であること、リード長が想定よりも短いものが多かったことがあげられた。coverage については出力数を増やすことで対応可能であり、リード長ではゲノム抽出時に長いゲノムを抽出できるような手法を用いてライブラリを作成することを検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Takenaka Satoshi, Kuroda Yukiko, Ohta Sayaka, Mizuno Yoko, Hiwatari Mitsuteru, Miyatake Satoko, Matsumoto Naomichi, Oka Akira	4. 巻 179
2. 論文標題 A Japanese patient with RAD51 associated Fanconi anemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 900 ~ 902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajmg.a.61130	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 Kuroda Yukiko, Murakami Hiroaki, Enomoto Yumi, Tsurusaki Yoshinori, Takahashi Kazumi, Mitsuzuka Kanako, Ishimoto Hitoshi, Nishimura Gen, Kurosawa Kenji	4. 巻 95
2. 論文標題 A novel gene (FAM20B encoding glycosaminoglycan xylosylkinase) for neonatal short limb dysplasia resembling Desbuquois dysplasia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Genetics	6. 最初と最後の頁 713 ~ 717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cge.13530	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 Kuroda Yukiko, Kimura Yuichi, Uehara Tomoko, Kosaki Kenjiro, Kurosawa Kenji	4. 巻 60
2. 論文標題 Refinement of 16p13.3 microdeletion syndrome from a case presentation of a girl with epilepsy and intellectual disability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	6. 最初と最後の頁 75 ~ 77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cga.12347	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 Kuroda Yukiko, Murakami Hiroaki, Yokoi Takayuki, Kumaki Tatsuro, Enomoto Yumi, Tsurusaki Yoshinori, Kurosawa Kenji	4. 巻 41
2. 論文標題 Two unrelated girls with intellectual disability associated with a truncating mutation in the PPM1D penultimate exon	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 538 ~ 541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2019.02.007	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 Kuroda Yukiko, Kumaki Tatsuro, Saito Yoko, Enomoto Yumi, Suzuki Hisato, Takenouchi Toshiki, Kosaki Kenjiro, Kurosawa Kenji	4. 巻 191
2. 論文標題 A novel variant of ARPC4 related neurodevelopmental disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 893 ~ 895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.63082	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 Kuroda Yukiko, Matsufuji Mayumi, Enomoto Yumi, Osaka Hitoshi, Takanashi Jun Ichi, Yamamoto Toshiyuki, Numata Uematsu Yurika, Tabata Kenshiro, Kurosawa Kenji, Inoue Ken	4. 巻 epub
2. 論文標題 A de novo U2AF2 heterozygous variant associated with hypomyelinating leukodystrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.63229	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yukiko Kuroda, Hiroaki Murakami, Takayuki Yokoi, Yumi Enomoto, Yoshinori Tsurusaki, Kenji Kurosawa
2. 発表標題 A intellectual disability syndrome with PPM1D truncated mutation in the last and penultimate exons
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukiko Kuroda, Hiroaki Murakami, Yumi Enomoto, Yoshinori Tsurusaki, Tomoko Uehara, Kenjiro Kosaki, Kenji Kurosawa
2. 発表標題 De novo PHF6 mutation in a girl with Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome (BFLS)
3. 学会等名 American Society of Human Genetics Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yukiko Kuroda, Hiroaki Murakami, Yumi Enomoto, Yoshinori Tsurusaki, Tomoko Uehara, Kenjiro Kosaki, Kenji Kurosawa
2 . 発表標題 The refinement of 16p13.3 microdeletion syndrome from a case presentation of a girl with epilepsy, intellectual disability, and distinctive dysmorphic features
3 . 学会等名 American Society of Human Genetics Annual Meeting 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 黒田友紀子、齋藤洋子、榎本友美、成戸卓也、黒澤健司
2 . 発表標題 新規ACTB変異による Baraitser -Winter症候群スペクトラムの一例
3 . 学会等名 第45回日本小児遺伝学会学術集会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 Yukiko Kuroda, Yoko Saito, Tatsuro Kumaki, Yumi Enomoto, Hisato Suzuki, Toshiki Takenouchi, Kenjiro Kosaki, Kenji Kurosawa
2 . 発表標題 Novel ARPC4 variant report in a patient of neurodevelopmental disorders
3 . 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4 . 発表年 2023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
---------	---------