

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591506

研究課題名(和文) 奇形症候群診断補助プログラムと遺伝子解析HRM法との融合によるパーソナル診断

研究課題名(英文) Development of personalized diagnosis systems using combination of a supporting program for clinical diagnosis of genetic diseases with HRM analysis for molecular diagnosis

研究代表者

成富 研二 (NARITOMI, Kenji)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20101446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝性疾患データベース (UR-DBMS, Syndrome Finder) を年度ごとに最新のデータに更新し、各疾患について候補遺伝子および変異報告をリストアップしデータベース上で公開した。(http://becomerich.lab.u-ryukyu.ac.jp/)

また、遺伝子群FGD1, MLL2, CD96, ASXL1, 自閉症関連遺伝子群について、変異スクリーニング用プレートを作製し、分子遺伝学的確定診断を個々に行えるシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)： Database for genetic diseases and supporting program for the diagnosis (UR-DBMS, Syndrome Finder) were developed and renewed year-on-year. The database including responsible genes for the diseases was published to the web site (http://becomerich.lab.u-ryuyuu.ac.jp/).

In addition to the published database, we constructed mutation-screening plates for the genes, FGD1, MLL2, CD96, ASXL1, or genes for autism spectrum disorders to substantialize the system for personal molecular diagnosis in combination with the supporting program.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：診断用ソフトウェア 奇形症候群 遺伝子 高精度融解曲線分析法

1. 研究開始当初の背景

奇形症候群などの遺伝性疾患の診断は、経験によるところも多く、また、疾患数も膨大なため、全てを把握することは困難である。コンピューターを利用した診断プログラム、データベースの重要性は世界的に認識されており、英国、ドイツ、オーストラリアなど複数の国において開発されている。

これらデータベースの併用により多くの遺伝性疾患(または奇形症候群)が効率よく臨床的に診断できるようになったが、必ずしも全ての診断ができるとは限らず、複数の候補が残される場合も少なくない。このような場合、確定診断として遺伝子解析が不可欠である。

当時、遺伝子診断の最も確実な方法は、Sanger型シーケンス解析であり、解析は、全エクソンをカバーしてシーケンスを行う方法が確実であった。しかしながら、遺伝子が複数に及ぶ場合や巨大な遺伝子、例えばエクソン数が50以上の遺伝子(ジストロフィン遺伝子など)などについては、コストなどの面から、網羅的に行うには困難なことが多かった。

そこで、変異の有無をスクリーニングする方法として、当時注目されつつあった、高精度融解曲線分析法(High Resolution Melting法(HRM法))に着目し、効率のよい候補遺伝子の変異スクリーニング(遺伝子スキャニング)に、同手法を活用することを計画した。

当時、申請者らも、HRM法による変異解析を開始しており、申請者らの検討では、HRM法の検出精度は、ヘテロ変異でほぼ100%と高く、ホモ変異も90%以上で検出可能という結果を得ていた。

また、定量PCRと組み合わせることで、ダイレクトシーケンス解析のみでは検出が難しいエクソン欠失・重複も検出可能である(欠失・重複の検出の得意な Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification法(MLPA法)の代用も可能である)と考えた。

以上より、申請者が開発している診断用ソフトウェアを改良し、症状から候補疾患、ならびに原因候補遺伝子をピックアップできるようにした後、それら候補遺伝子について定量PCR-HRM法により変異解析の網羅的スキャニングを行うことで、効率の良い確実な確定診断へ至ることができると考えた。

2. 研究の目的

(1) 申請者が開発を行ってきた診断用ソフトウェアをさらに改良し、候補となる診断名に加え、原因候補遺伝子もリストアップされるようにすることを目的とした。(候補疾患の原因遺伝子に加えて、症状-遺伝子対応表を用いて遺伝子名を疾患と切り離してあげられる様にする)

(2) 本邦で認められる遺伝性疾患、遺伝子が大きく解析困難な疾患、原因遺伝子が複数

あり解析が困難な疾患について、定量PCR-HRM法による変異スクリーニングシステムを構築し、また、それらを一般公開することも目標とした。

3. 研究の方法

(1) 診断用ソフトウェアの改良: 遺伝性疾患データベースを年ごとに最新のデータに更新し、各疾患について候補遺伝子および変異報告をリストアップした。

(2) 解析群の分類と定量PCR-HRM(高精度融解曲線分析法)解析条件の設定と変異スクリーニングプレートの作製:

解析群の分類と定量PCR-HRM解析条件の設定: Bohring-Opitz症候群の原因遺伝子ASXL1遺伝子、Aarskog-Scott症候群の原因遺伝子FGD1遺伝子、OpitzC症候群原因遺伝子CD96遺伝子、および自閉症、Kabuki症候群の原因遺伝子(群)において、96wellプレートを用いて定量PCR-HRM解析による変異スクリーニングが可能となるよう、条件設定等を行った。

HRMによる変異スクリーニング解析: 条件設定を終了した各遺伝子について、患児検体でのスクリーニングを行った。

変異スクリーニングプレートの作製: Aarskog-Scott症候群、Opitz三角頭蓋症候群、自閉症等、疾患または症状の各原因および関連遺伝子のエクソン群ごとに96wellプレート1~2枚で定量PCRからHRM解析が行えるスクリーニングプレートを作製した。

4. 研究成果

(1) 診断用ソフトウェアの改良:

遺伝性疾患データベースを年度ごとに最新のデータ(主にOMIM(<http://omim.org/>))のデータを活用)に更新し、各疾患について候補遺伝子および変異報告をリストアップしデータベース上で公開した。

公開は、琉球大学遺伝性疾患データベースの中に、遺伝性疾患の総合データベースとしてUR-DBMSを、症状、所見から診断の推定を行う補助プログラムとしてSyndrome Finderの2種類で行った。Syndrome Finderは、症状等の所見を入力する必要があるため、医師専用とした。



公開したweb siteの画面

(web site:
http://becomerich.lab.u-ryukyu.ac.jp/)

(2) 解析群の分類と定量 PCR-HRM (高精度融解曲線分析法) 解析条件の設定と変異スクリーニングプレートの作製:

条件設定を行う際に、HRM法の精度や感度には使用する蛍光試薬が重要となることが判明したため、HRM法で使用する最適な蛍光試薬の検討を行った。EvaGreen, LCGreen Plus, SYTO9の3蛍光試薬を用い、*FGD1* 遺伝子を指標として、至適濃度、PCRに与える影響、HRMの検出感度、について検討したところ、SYTO9が最もqPCR-HRM法に適していることが分かった。

Bohring-Opitz 症候群の原因遺伝子 *ASXL1* 遺伝子、Aarskog-Scott 症候群の原因遺伝子 *FGD1* 遺伝子、OpitzC 症候群原因遺伝子 *CD96* 遺伝子、および自閉症、Kabuki 症候群の原因遺伝子(群)でのPCR-HRM解析の条件設定を行った後、遺伝子群 *FGD1*, *MLL2*, *CD96*, *ASXL1*, 遺伝子について、患児検体でのスクリーニングを行った。スクリーニング陽性となった領域は、ダイレクトシーケンス解析で変異の有無を確認した。ダイレクトシーケンス解析との比較では、検出できない変異が1種類(1/32)認められた。検出できた変異の再検出率(再現性)は100%であった。

結果、(1)の診断用ソフトウェアにて、上記疾患あるいは候補遺伝子が推定された際に、変異プレートによる解析により、分子遺伝学的確定診断が個々に行えるシステムが構築できた。

加えて、研究期間中、次世代シーケンサが活用されるようになったため、より包括的な変異検出を目指し、*FGD1* 遺伝子について、PCRベースでプロモーターも含めた遺伝子全長を解析できるシステムも構築できた。

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18件)

Kaname T, Yanagi K, Naritomi K. A commentary on the promise of whole-exome sequencing in medical genetics, *Journal of Human Genetics*, (2014), 59, 2014, 117-118. 査読有
DOI:10.1038/jhg.2014.7

Suzumori N, Kaname T, Muramatsu Y, Yanagi K, Kumagai K, Mizuno S, Naritomi K, Saito S, Sugiura M. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome, *Journal of Obstetrics and Gynecology Research*, (2013), 39, 2013, 1545-1547. 査読有

DOI:10.1111/jog.12081

Ganaha A, Kaname T, Yanagi K, Naritomi K, Tono T, Usami S, Suzuki M. Pathogenic substitution of IVS15 + 5G > A in SLC26A4 in patients of Okinawa Islands with enlarged vestibular aqueduct syndrome or Pendred syndrome, *BMC Medical Genetisc*, (2013), 14, 2013, 56. 査読有
DOI:10.1186/1471-2350-14-56

Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet*, (2013) 161A:1221-1237. 査読有
DOI:10.1002/ajmg.a.35933

Naritomi K. In memoriam of Shozo Ohdo MD, PhD: one of the pioneers of clinical geneticist in Japan. *J Hum Genet*, (2013), 58, 117. 査読有
DOI:10.1038/jhg.2012.150

Kaname T, Yanagi K, Naritomi K. A commentary on the diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome and related disorders, *J Hum Genet*, (2013), 58:57. 査読有
DOI:10.1038/jhg.2012.138

Jinam T, Nishida N, Hirai M, Kawamura S, Oota H, Umetsu K, Kimura R, Ohashi J, Tajima A, Yamamoto T, Tanabe H, Mano S, Suto Y, Kaname T, Naritomi K, Yanagi K, Niikawa N, Omoto K, Tokunaga K, Saito N. The history of human populations in the Japanese Archipelago inferred from genomewide SNP data with a special reference to the Ainu and the Ryukyuan populations, *J Hum Genet*, (2012), 57:787-795. 査読有
DOI:10.1038/jhg.2012.114

Yanagi K, Kaname T, Wakui K, Hashimoto O, Fukushima Y, Naritomi K. Identification of four novel synonymous substitutions in the

X-linked genes neuroligin 3 and neuroligin 4X in Japanese patients with autistic spectrum disorder, *Autism Res Treat*, (2012), 2012 id724072. 査読有
DOI:10.1155/2012/724072

Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet*, (2012), 44(4):376-378. 査読有
DOI:10.1038/ng.2219

He Y, Wang WR, Xu S, Jin L; Pan-Asia SNP Consortium (Naritomi K). Paleolithic Contingent in Modern Japanese: Estimation and Inference using Genome-wide Data. *Sci Rep*, (2012), 2:355. 査読有
DOI: 10.1038/srep00355

Yoneda Y, Saito H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, Tomita H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features. *J Hum Genet*, (2012) 57:207-211. 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2012.7

Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura K-i, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou J-W, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, Bamshad MJ. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet.*, (2011). 155A:1511-1516. 査読有
DOI:10.1002/ajmg.a.34074

Hatin WI, Nur-Shafawati AR, Zahri MK, Xu S, Jin L, Tan SG, Rizman-Idid M, Zilfalil BA; HUGO Pan-Asian SNP

Consortium (Naritomi K). Population genetic structure of peninsular Malaysia Malay sub-ethnic groups. *PLoS One*, (2011) 6:e18312. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0018312

[学会発表](計 29 件)

Detection and estimation of variations and their frequencies in a targeted genomic region in a specific population by NGS analysis using pooled DNAs. T. Kaname, K. Yanagi, M. Higa, A. Ganaha, K. Teruya, K. Sato, T. Hirano, Naritomi K. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日(火)~6 日(金), 神戸ポートアイランド, 神戸

Craniosynostosis, collagenopathy 220 疾患を対象とした可変追加型遺伝子診断パネルの作製と実践. 要 匡, 柳久美子, 比嘉真紀, 知念安紹, 當間隆也, 泉川良範, 新川詔夫, 吉浦孝一郎, 成富研二: 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013 年 11 月 21 日(木)~23 日(土), 江陽グランドホテル, 仙台

Detection of variations and their frequencies of the CCR5 gene and its promoter region in Japanese and Okinawan population by NGS analysis using pooled DNAs Authors: T. Kaname, K. Yanagi, M. Higa, S. Song, Naritomi K: The American Society of Human Genetics, 63rd Annual Meeting, Boston, MA, USA, October 22-26, 2013.

Identification of two novel mutations in the NOG gene in patients with Symphalangism syndrome. Authors: A. Ganaha, T. Kaname, K. Yanagi, K. Naritomi, M. Suzuki: EUROPEAN Human Genetics CONFERENCE 2013, Paris, France, June 8-11, 2013.

FGD1 遺伝子変異を認める Aarskog-Scott 症候群の特徴. 要 匡, 岡本伸彦, 黒澤健司, 泉川良範, 福嶋義光, 水野誠司, 成富研二: 第 116 回日本小児科学会学術集会 2013 年 4 月 19 日(金)~21 日(日), 広島国際会議場, 広島市文化交流会館; 広島

Expression and cellular localization of the Trk-fused gene (TFG). K. Yanagi, T. Kaname, Y. Sakiyama, H. Takashima, K. Naritomi: 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日

(火) ~14 日(金), 福岡国際会議場, 福岡

Novel mutations of the FGD1 gene in 16 patients with Aarskog-Scott syndrome. Authors: T. Kaname, K. Yanagi, N. Okamoto, K. Kurosawa, Y. Izumikawa, Y. Fukushima, Y. Makita, M. Tsukahara, A. Altincik, S. Mizuno, K. Naritomi : The American Society of Human Genetics, 62nd Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, November 6-10, 2012.

G-band 染色により核型 46,XY,der(3)der(7), inv ins(3;7)(q21;q32q21.1)とされた裂手裂足患児の転座切断点解析. 柳久美子, 要 匡, 小口良子, 當間隆也, 泉川良範, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二 : 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012 年 10 月 25 日(木) ~27 日(土), 京王プラザホテル, 東京

Aarskog-Scott 症候群における FGD1 遺伝子変異解析. 要 匡, 柳久美子, 岡本伸彦, 黒澤健司, 泉川良範, 福嶋義光, 蒔田芳男, 近藤郁子, 塚原正人, Ayca Altincik, 水野誠司, 伊藤靖典, 成富研二 : 第 19 回日本遺伝子診療学会 2012 年 7 月 27 日(金) ~28 日(土), 三井ガーデンホテル千葉 ; 千葉

Bohring-Opitz 症候群および Opitz C 症候群における遺伝子変異. 要 匡, 柳久美子, 福嶋義光, 蒔田芳男, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二 : 第 52 回日本先天異常学会学術集会 2012 年 7 月 6 日(金) ~8 日(日), 東京女子医科大学弥生記念講堂 ; 東京

Distinct pathogenic substitution of IVS15+5G>A in the SLC26A4 gene in patients with enlarged vestibular aqueduct and Pendred syndrome in Okinawa islands. Authors: A. Ganaha, T. Kaname, K. Yanagi, K. Naritomi, S. Usami, M. Suzuki : EUROPEAN Human Genetics CONFERENCE 2012, Nürnberg, Germany, June 23-26, 2012.

次世代シーケンサによるレンツ小眼球症候群の変異同定と診断システムの確立. 要 匡, 當間隆也, 村松友佳子, 板垣裕輔, 水野誠司, 黒澤健司, 成富研二 : 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 20 日(金) ~22 日(日), 福岡国際会議場 ; 福岡

Screening of mutations in the FGD1 gene in Japanese patients with Aarskog-Scott syndrome. K. Yanagi, T. Kaname, K. Naritomi : 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日(火) ~16 日(金), パシフィコ横浜, 横浜

Opitz C 様症候群 (Bohring-Opitz 症候群)における ASXL1 遺伝子変異. 要 匡, 柳久美子, 福嶋義光, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二 : 日本人類遺伝学会第 56 回大会 2011 年 11 月 10 日(木) ~12 日(土), 幕張メッセ, 千葉

Aarskog-Scott 症候群における FGD1 遺伝子変異. 柳久美子, 要 匡, 岡本伸彦, 塚原正人, 黒澤健司, 泉川良範, 福嶋義光, 蒔田芳男, 近藤郁子, Ayca Altincik, 水野誠司, 伊藤靖典, 成富研二 : 日本人類遺伝学会第 56 回大会 2011 年 11 月 10 日(木) ~12 日(土), 幕張メッセ, 千葉

Detection of a mutation in Lenz microphthalmia family by exome sequencing Author(s): T. Kaname, K. Yanagi, Y. Muramatsu, T. Tohma, H. Hanafusa, K. Morita, S. Ikematsu, Y. Itagaki, K. Kurosawa, S. Mizuno, K. Yoshiura, K. Naritomi : The American Society of Human Genetics, 60th Annual Meeting Montreal, Quebec, Canada, October 11-15, 2011.

Lenz 小眼球症候群を呈する一家系の原因遺伝子解析. 要 匡, 柳久美子, 當間隆也, 村松友佳子, 森田この美, 池松真也, 板垣裕輔, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 成富研二 : 第 18 回出生前診断研究会 2011 年 10 月 1 日(土), 佐賀大医学部臨床大講堂 ; 佐賀

免疫グロブリンスーパーファミリー CD96 の細胞外マトリックスタンパク質との反応性の検討. 要 匡, 柳久美子, 森田この美, 池松真也, 成富研二 : 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21 日(水) ~24 日(土), 京都国際会議館 ; 京都

Opitz 三角頭蓋症候群原因遺伝子 CD96 の PCR-HRM 法による変異スクリーニングシステム. 要 匡, 森田この美, 柳久美子, 花房宏昭, 吉浦孝一郎, 池松真也, 成富研二 : 第 51 回日本先天異常学会学術集会 2011 年 7 月 22 日(金) ~24 日(日), シェーンバッハ・サポー ; 東京

〔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

<http://becomerich.lab.u-ryukyu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成富 研二 (NARITOMI, Kenji)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20101446

(3) 連携研究者

要 匡 (KANAME, Tadashi)
琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40264288

柳 久美子 (YANAGI, Kumiko)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：90294701