

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659513

 研究課題名（和文）次世代高速シークエンサーと高密度マイクロアレイを用いた遺伝性疾患病
 因遺伝子の同定

 研究課題名（英文）Identification of pathogenic genes for genetic diseases using
 next-generation sequencing and high-density microarray

研究代表 松原 洋一（MATSUBARA YOICHI）

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00209602

研究成果の概要（和文）：新しい遺伝子解析機器である次世代高速シークエンサーと高密度マイクロアレイを用いて、これまで原因不明であった遺伝性疾患の病因遺伝子を探索した。その結果、筋萎縮や筋力低下をきたすミオパチーの病因遺伝子を明らかにすることができた。また、先天奇形症候群や内分泌疾患でもこれまでに知られていない新しい病因遺伝子を解明した。以上の成果は、各疾患の病態解明に役立つとともに、将来的には治療法の開発に有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Next-generation sequencing and high-density microarray analysis were used to investigate disease-causing genes for genetic diseases in which molecular pathogenesis had not been clarified. We successfully identified a pathogenic gene for a subtype of myopathies in one family. We also identified novel disease-causing genes in a congenital anomaly syndrome and an endocrine disorder. The results would lead to the understanding of the pathogenesis of these disorders and the development of therapeutic means.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：遺伝性疾患、遺伝子解析、シークエンス

1. 研究開始当初の背景

小児医療では、成人に比較して遺伝性疾患の比率が高く、その確定診断、予後推定、合併症の予防、さらには治療とケアが重要である。遺伝性疾患の原因遺伝子は従来の研究によってまだ明らかにされていないものも数多く、その探索と同定が大きな課題である。ごく最近、新しい遺伝子解析法として次世代高速シークエンサーと高密度マイクロアレイが登場し、個々人のゲノムを短期間のうちに網羅的にすべて解析することが可能とな

った。

2. 研究の目的

本研究では、次世代高速シークエンサーと高密度マイクロアレイを用いて全ゲノムの網羅的解析をおこなう事により、新しい遺伝性疾患の遺伝子探索法を確立することを目的とする。次世代高速シークエンサーを用いた遺伝子解析法のうち、ゲノムの全エクソンをあらかじめ捕捉し、エクソンのみをシークエンスするエクソームシークエンス法（全遺

伝子のエクソンをキャプチャーし解析する)は、その効率性と経済性から遺伝性疾患の原因遺伝子同定法として注目されている。すでに米国ではこの手法をもちいて Kabuki 症候群の原因遺伝子の同定などの成功例が報告されている。このような網羅的遺伝子解析では、その人種・民族に固有の膨大な遺伝子多型 (バックグラウンドノイズ) を情報処理でどう除去して行くかが課題であるが、まだ日本人集団では確立されていない。申請者の所属する東北大学大学院医学系研究科では、平成 22 年度に次世代高速シーケンサーが共通機器室に導入され稼働を開始している。この新しい設備を用いることによって、方法論を確立する。

3. 研究の方法

本研究者がこれまでに収集した遺伝性疾患患者の DNA 検体の中で、病因遺伝子が明らかにされていないものを対象として解析を行う。

(1) エクソン領域の捕捉・濃縮

SureSelect Human All Exon Kit (アジレント社) を用いて、各検体のゲノム DNA から約 38 Mb のエクソン領域 (ヒトゲノム領域の約 1%) を捕捉・濃縮する。

(2) 次世代高速シーケンサーによる解析

次世代高速シーケンサー (SOLiD™ 4 System, GAII, HiSeq2000) を用いた解析をおこない、全エクソンの塩基配列を決定する。

(3) エクソームシーケンズ結果の情報処理による解析

次世代高速シーケンサーで得られたシーケンズ結果から、まず、①アミノ酸置換を伴う塩基置換、②エクソン/イントロン境界のスプライス部位に存在する塩基置換、③翻訳領域に存在する欠失・挿入を抽出する。このなかから、dbSNP などのデータベースに存在する遺伝子多型をフィルターして取り除く。つぎに、家系内で、罹患者に共通して認められる遺伝子変化で、かつ家系内の非罹患者では認められないものを選択する。ストップコドンやフレームシフトなどの機能喪失型の遺伝子変化があるものを最優先の候補遺伝子とするが、ミスセンス変異などの機能障害の実験的裏付けが必要なものについても検討対象とする。該当遺伝子についてこれまでに知られている機能 (ヒト以外の生物を含む) を参考に病因遺伝子としての可能性が高いかどうかを検討する。

(4) キャピラリーシーケンサーによる遺伝子変異の確認

検討の対象として選択した遺伝子変化については、従来型のキャピラリーシーケンサーで再確認を行う。

(5) 各検体におけるマイクロアレイを用いた遺伝子コピー数の解析ゲノム上の重複・

欠失の検出

Human Genome CGH Microarray 244K (アジレント社) および同社の DNA マイクロアレイスキャナを用いて解析を行う。

(6) 病因候補遺伝子の機能解析

エクソームシーケンズとマイクロアレイによって絞り込まれた病因候補遺伝子について、その遺伝子に関して過去に報告されている知見を参考に、遺伝子機能の探索と遺伝子変異による機能変化を解析する。

なお、本研究は 3 省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って行った。

4. 研究成果

エクソン領域の捕捉・濃縮、次世代高速シーケンサーによる解析、エクソームシーケンズ結果の情報処理による解析については、本研究班としての方法を確立した。

次に、種々の遺伝性疾患を有する患者より得られた検体 115 および健常人 40 についてエクソーム解析を実施した。また、必要に応じて高密度マイクロアレイ解析をおこなった。疾患群の分類は以下のとおりである (数字は、エクソーム数を示す) :

神経筋疾患	8
呼吸器疾患	24
消化器疾患	15
血液疾患	4
先天奇形	44
先天代謝異常	5
眼疾患	5
皮膚疾患	10

これまでに報告されていない新規病因遺伝子が同定されたものは 5 疾患、既知の病因遺伝子が同定されたものが 6 疾患、解析を終了したものが 5 疾患、解析中のものが 2 疾患、解析準備中のものが 4 疾患であった。新規病因遺伝子については、機能解析をおこなった。このうち、cytoplasmic body myopathy 家系における TTN 遺伝子の異常については、すでに論文発表をおこなった。また、先天奇形症候群の新規病因遺伝子については現在、論文投稿中、内分泌疾患については機能解析を実施中である。

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 19 件)

1. Izumi R, Nihori T, Suzuki N, Kato M, Warita H, Tateyama M, Aoki M, Takahashi

- T, Nagashima T, Funayama R, Nakayama N, Abe K, Matsubara Y. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with myofibrillar myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet* 58(5):259-66, 2013. doi: 10.1038/jhg.2013.9. (査読有)
2. Komatsuzaki S, Sakamoto O, Fuse N, Uematsu M, Matsubara Y, Ohura T. Clinical Reasoning: A young man with progressive subcortical lesions and optic nerve atrophy. *Neurology*. 79(7):e63-68, 2012. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182648bb6. (査読有)
 3. Saito Y, Aoki Y, Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP, Imaizumi M, Rikiishi T, Sasahara Y, Kure S, Niihori T, Tsuchiya S, Kojima S, Matsubara Y. Casitas B-cell lymphoma mutation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 36(8):1009-1015, 2012. doi: 10.1016/j.leukres.2012.04.018. (査読有)
 4. Metoki H, Ohkubo T, Obara T, Akutsu K, Yamamoto M, Ishikuro M, Sakurai K, Iwama N, Katagiri M, Sugawara J, Hirose T, Sato M, Kikuya M, Yagihashi K, Matsubara Y, Yaegashi N, Mori S, Suzuki M, Imai Y; BOSHI Study Group. Daily serial hemodynamic data during pregnancy and seasonal variation: the BOSHI study. *Clin Exp Hypertens*. 34(4):290-296, 2012. doi: 10.3109/10641963.2012.681086. (査読有)
 5. Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y; Costello and CFC syndrome study group in Japan. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A*. 158A(5):1083-1094, 2012. (査読有)
 6. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawachi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology*. 78(11):803-810, 2012. doi: 10.1212/WNL.0b013e318249f71f. (査読有)
 7. Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metab*. 105(4):553-558, 2012. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.12.024. (査読有)
 8. Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet*. 21(7):1496-1503, 2012. doi: 10.1093/hmg/ddr585. (査読有)
 9. Asano M, Fujimura T, Wakusawa C, Aoki Y, Matsubara Y, Aiba S. A Case of Almost Unilateral Focal Dermal Hypoplasia Resulting From a Novel Mutation in the Gene. *Acta Derm Venereol*. 93(1):120-121, 2012. doi: 10.2340/00015555-1399. (査読有)
 10. Patrinos GP, Smith TD, Howard H, Al-Mulla F, Chouchane L, Hadjisavvas A, Hamed SA, Li XT, Marafie M, Ramesar RS, Ramos FJ, de Ravel T, El-Ruby MO, Shrestha TR, Sobrido MJ, Tadmouri G, Witsch-Baumgartner M, Zilfalil BA, Auerbach AD, Carpenter K, Cutting GR, Dung VC, Grody W, Hasler J, Jorde L, Kaput J, Macek M, Matsubara Y, Padilla C, Robinson H, Rojas-Martinez A, Taylor GR, Vihinen M, Weber T, Burn J, Qi M, Cotton RG, Rimoin D; (International Confederation of Countries Advisory Council). Human variome project country nodes: Documenting genetic information within a country. *Hum Mutat*. 33(11):1513-1519, 2012. doi: 10.1002/humu.22147. (査読有)
 11. Wakabayashi Y, Yamazaki K, Narumi Y, Fuseya S, Horigome M, Wakui K, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T. Implantable cardioverter defibrillator for progressive hypertrophic cardiomyopathy in a patient with LEOPARD syndrome and a novel PTPN11 mutation Gln510His. *Am J Med Genet A*. 155A(10):2529-2533, 2011.

- doi: 10.1002/ajmg.a.34194. (査読有)
12. Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Niihori T, Okano E, Numabe H, Matsubara Y. HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome. *J Hum Genet.* 56(10):707-715, 2011. doi: 10.1038/jhg.2011.85. (査読有)
 13. Tamaki Y, Arai T, Sugimura H, Sasaki T, Honda M, Muroi Y, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Association between cancer risk and drug-metabolizing enzyme gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) polymorphisms in cases of lung cancer in Japan. *Drug Metab Pharmacokinet.* 26(5):516-522, 2011. (査読有)
 14. Honda M, Muroi Y, Tamaki Y, Saigusa D, Suzuki N, Tomioka Y, Matsubara Y, Oda A, Hirasawa N, Hiratsuka M. Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of antimalarial artemether. *Drug Metab Dispos.* 39(10):1860-1865, 2011. (査読有)
 15. Tamaki Y, Honda M, Muroi Y, Arai T, Sugimura H, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Novel single nucleotide polymorphism of the CYP2A13 gene in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet.* 26(5):544-547, 2011. (査読有)
 16. Ohashi H, Suzumori K, Chisaka Y, Sonta S, Kobayashi T, Aoki Y, Matsubara Y, Sone M, Shaffer LG. Implications of prenatal diagnosis of the fetus with both interstitial deletion and a small marker ring originating from chromosome 5. *Am J Med Genet A.* 155A(1):192-196, 2011. doi: 10.1002/ajmg.a.33764. (査読有)
 17. Watanabe Y, Yano S, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Yoshino M, Matsuiishi T. A familial case of LEOPARD syndrome associated with a high-functioning autism spectrum disorder. *Brain Dev.* 33(7):576-579, 2011. doi: 10.1016/j.braindev.2010.10.006. (査読有)
 18. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet.* 56(1):34-40, 2011. doi: 10.1038/jhg.2010.132. (査読有)
 19. Aizaki K, Sugai K, Saito Y, Nakagawa E, Sasaki M, Aoki Y, Matsubara Y. Cardio-facio-cutaneous syndrome with infantile spasms and delayed myelination. *Brain Dev.* 33(2):166-169, 2011. doi: 10.1016/j.braindev.2010.03.008. (査読有)
- [学会発表] (計3件)
- 1) 齋藤由佳、青木洋子、村松秀樹、今泉益栄、力石健、笹原洋二、呉繁夫、新堀哲也、小島勢二、松原洋一 Noonan 症候群類縁疾患と小児血液腫瘍における CBL の分子遺伝学的解析 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012 年 10 月 24-27 日、東京
 - 2) Y. Abe, Y. Aoki, S. Kuriyama, H. Kawame, N. Okamoto, K. Kurosawa, H. Ohashi, S. Mizuno, T. Ogata, S. Kure, T. Niihori, Y. Matsubara. Epidemiological features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome: findings from the first nationwide survey. 12th International Congress of Human Genetics, 2011 年 10 月 11-15 日、モントリオール、カナダ
 - 3) Identification of a susceptibility gene for Moyamoya disease, RNF213 by a genome-wide association study. S. Kure, F. Kamada, Y. Aoki, Y. Abe S, Komatsuzaki, A. Kikuchi, J. Kanno, T. Niihori, M. Fujimura, Y. Mashimo, M. Ono, N. Ishii, Y. Owada, Y. Suzuki, A. Hata, T. Tominaga, Y. Matsubara. 12th International Congress of Human Genetics, 2011 年 10 月 11-15 日、モントリオール、カナダ
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
松原 洋一 (MATSUBARA YOICHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00209602
 - (2) 研究分担者
新堀 哲也 (NIIHORI TETSUYA)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40436134

呉 繁夫 (KURE SHIGEO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10205221

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
青木 洋子 (AOKI YOKO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80332500