

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2011～2012

課題番号：23689052

研究課題名（和文） 次世代解析システムを駆使した疾患責任遺伝子の解明

研究課題名（英文） Identification of novel disease genes utilizing next generation sequencer

研究代表者

三宅 紀子（MIYAKE NORIKO）

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40523494

研究成果の概要（和文）：本研究は、遺伝的要因が想定される希少な先天性疾患を対象に、次世代解析システムを駆使して疾患責任遺伝子を同定し、疾患発症メカニズムの解明と診断法・予防法・治療法を確立することを目的とする。従来の遺伝学的解析（連鎖解析およびコピー数異常解析等）とエクソーム解析を駆使し、Coffin-Siris 症候群、ミトコンドリア複合体 III 欠損症、短体幹症における新規の責任遺伝子 8 個の同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：Our aim is to identify the novel disease genes responsible for the congenital diseases. Based on the genetic evidence, we intend to clarify the whole picture of the etiology and contribute to develop the diagnostic tools, prevention and treatment. In this project, utilizing the emerging technology of next generation sequencer, we successfully identified total number of eight novel responsible genes for Coffin-Siris syndrome, Mitochondrial complex III deficiency and autosomal recessive brachyolmia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2012年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

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、先天異常学

1. 研究開始当初の背景

2010 年以降ゲノム分画と次世代シーケンサーを組み合わせたエクソーム解析を用いた先天性疾患の疾患責任遺伝子同定が徐々に報告されるようになった。この技術はどれも数例の孤発例から疾患責任遺伝子の同定に成功しており、大家系等を必要とした従来のポジショナルクローニングでは不可能であったケースにおいて遺伝子同定が可能

になった。

2. 研究の目的

申請者が今まで研究対象としてきた希少な遺伝性疾患の責任遺伝子は、ドラッグシーズとなった遺伝子群のおよそ 12% を占めることから、1 つでも多くの先天性疾患の責任遺伝子を明らかにすることは、創薬を含めた新規の治療・予防法を確立するためにも極め

て重要である。以上の経緯から本申請では遺伝的要因が想定される希少な先天性疾患を対象に、次世代解析システムを駆使して疾患責任遺伝子を同定し、疾患発症メカニズムの解明と診断法・予防法・治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 症例集積

日本国内外の先天性疾患および先天奇形学に通じた臨床医から詳細な臨床症状および生体試料の提供協力を得た。

(2) SNP mapping を用いた連鎖解析による候補領域の特定

比較的家系サイズの大きい家系例で、近親婚の家族歴の明らかな症例では、連鎖解析により候補領域の特定が可能である。今回我々はAffymetrix社のGeneChip Human Mapping 10Kを使用し、Allegro ver.2による多点連鎖解析を行った。

(3) 高密度アレイによる全ゲノム微細構造異常解析

Affymetrix社の最高解像度のCytoscan HD arrayを用いて、欠失10kb異常、重複100kb以上のコピー数変化を検出し、その病的意義を検証した。*de novo*の変異は、病的意義を示唆するものであり、両親検体が得られた場合に検証を行った。

(4) キャプチャー技術を併用した次世代シーケンサーによるゲノム解析

エクソン領域を効率的にゲノム分画するため、Agilent社のSure Selectを使用した。その後、Illumina社のGenome Analyzer IIxもしくはHiSeq2000を持って塩基配列解読を行った。

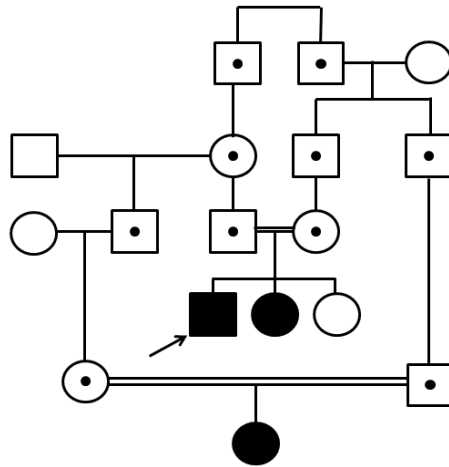
4. 研究成果

(1) Coffin-Siris 症候群 (CSS)

重度の精神発達遅延、成長障害、小頭症、特異な顔貌、まばらな頭髪およびまつ毛、手足の第5指の爪の無～低形成を特徴とする先天性奇形症候群である。全例孤発例であり、家系を用いた連鎖解析は不可能であった。そこで我々は、集積した22症例中、典型例5例を対象に全エクソーム解析を行い、そのうち2症例に共通する*SMARCB1*遺伝子に病的と考えられる*de novo* (新生) 変異を同定した。本遺伝子が、クロマチン再構成因子であるSWI/SNF複合体を形成することから、さらに残りの21症例を対象にSWI/SNF複合体の各構成サブユニットをコードする15遺伝子に対して変異解析を行った。結果、21症例中18症例で*SMARCB1*と一緒に働くタンパク質の遺伝子群、*SMARCA4*、*SMARCE1*、*ARID1A*、*ARID1B*、*SMARCA2*のいずれかに変異を認めた。本研究により、CSSの大部分(87%)がSWI/SNF複合体のいずれかの遺伝子群の異常で説明

可能であった。

(2) ミトコンドリア複合体 III 欠乏症 新生児期発症の低血糖、乳酸アシドーシス、



ケトン血症、高アンモニア血症を呈するメキシコの近親婚家系を対象に解析を行った。

図1 家系図

近親婚の家族歴が明らかであったため(図1)、常染色体劣性遺伝病を疑い、連鎖解析を施行した。その結果、候補領域を36Mbに絞り込んだ。並列して、SeqCap EZ (NimbleGen)によるゲノム分画と、Genome Analyzer IIx (Illumina)によるエクソームシーケンシングを施行した。その結果、候補領域内に存在し、罹患者3名に共通するホモ接合性変異は*UQCRC2*遺伝子のc.547C>T (p.Arg183Trp)のみであった。*UQCRC2*遺伝子は、mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase core protein IIというミトコンドリア呼吸鎖複合体IIIの一構成成分をコードする。本タンパク質は、通常二量体を形成し、複合体I、IVと共にスーパー複合体を形成し、一つの酵素として働くことが知られている。結晶構造のモデル解析により、本変異が*UQCRC2*の二量体形成を障害することが予測された。また、患者由来の繊維芽細胞を用いた解析により、患者細胞では複合体IIIの酵素活性が低下していることが証明され、さらにスーパー複合体の形成も障害されていることが明らかとなった。以上により、*UQCRC2*遺伝子のホモ接合性変異が新生児期発症のミトコンドリア複合体III異常症を引き起こすことを解明した。

(3) 1型短体幹症

近親婚の家族歴があるトルコの1家系において短体幹症を呈する3名の罹患者を対象に、エクソーム解析を行った。常染色体劣性遺伝性疾患が想定されたため、3症例に共通したホモ接合性変異を抽出したところ、

PAPSS2 遺伝子のホモ接合性のフレームシフト変異を同定した。*PAPSS2* 遺伝子のコードする *PAPSS2* は軟骨の代謝に重要な役割を果たす酵素であり、本変異により機能喪失に至ると考えられた。さらに、この家系の患者と類似の病態を示す非家族性の3症例を解析し、いずれの患者にも *PAPSS2* 遺伝子の機能喪失性のホモ接合性もしくは複合ヘテロ接合性変異を同定し、*PAPSS2* が1型短体幹症の責任遺伝子であることを明らかにした。

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 34 件)

1. Miyake N[#], Yano S[#] (# denotes equal contribution), Sakai C, Hatakeyama H, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, *Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mut* 34(3):446-452, 2013, doi: 10.1002/humu.22257. (査読有)
2. Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi H, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome related disorders. *J Hum Genet* 58(2):113-115, 2013, doi: 10.1038/jhg.2012.117. (査読有)
3. Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood*. 121(10):1839-1849, 2013 doi:
4. Tsurusaki Y[#], *Kosho T[#] (# denotes equal contribution), Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N (*: co-correspondence). Exome sequencing identifies an *OFDI* mutation in a family of X-linked lethal congenital malformation syndrome: delineation of male Oral-facial-digital syndrome type 1. *Clin Genet* 83(2):135-144, 2013, doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01885.x. (査読有)
5. Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori F, Yamazaki A, Subo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H. Phenotype spectrum of *COL4A1* mutations : porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 73(1):48-57, 2013, doi: 10.1002/ana.23736. (査読有)
6. 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, Saitsu H, *Miyake N, *Matsumoto N (*: co-corresponding).

- Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44(4):376-378, 2012, doi: 10.1038/ng.2219. (査読有)
7. Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, *Matsumoto N (*: co-corresponding). *KDM6A* point mutations cause Kabuki syndrome. *Hum Mut* 34 (1): 108-110, 2012, doi: 10.1002/humu.22229. (査読有)
 8. Miyake N[#], Elcioglu NH[#] (# denotes equal contribution), Iida A, Isguven P, Dai J, Murakami N, Takamura K, Cho T-J, Kim O-H, Nagai T, Ohashi H, Nishimura G, Matsumoto N, Ikegawa S. *PAPSS2* mutations cause autosomal recessive brachyolmia. *J Med Genet* 49(8): 533-538, 2012, doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101039. (査読有)
 9. Miyatake S, Miyake N, Doi H, Ogata K, Kawai M, Matsumoto N. A novel SACS mutation in a Japanese family with atypical phenotype of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Intern Med* 51: 2221-2226, 2012, https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/51/16/51_51.7374/_article(査読有)
 10. Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki T, Saitsu H, Miyake N, Masuda M, Matsumoto N. Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing. *Hum Genet* 131: 591-599, 2012, doi: 10.1007/s00439-011-1105-7. (査読有)
 11. Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi 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: 803-810, 2012, doi: 10.1212/WNL.0b013e318249f71f. (査読有)
 12. Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, Saitsu H. *De novo* and inherited mutations in the gene encoding a type IV collagen $\alpha 2$ chain (*COL4A2*) cause porencephaly. *Am J Hum Genet* 90 (1):86-90, 2012, doi: 10.1016/j.ajhg.2011.11.016. (査読有)
 13. Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome. *Ann Neurol* 72(2): 298-300, 2012(査読有)
 14. Saitsu H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. *CASK* aberrations in males with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia.

- Epilepsia 53(8): 1441-1449, 2012, doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03548.x (査読有)
15. Saitsu H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. CASK aberrations in male patients with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. *Epilepsia*. 53(8):1441-1449, 2012 doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03548.x. (査読有)
16. Miyake N, Yamashita S, Kurosawa K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Matsumoto N. A novel homozygous mutation of DARS2 may cause a severe LBSL variant. *Clin Genet*. 80(3):293-296, 2011, doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01644.x. (査読有)
17. Miyake N, Demer JL, Shaaban S, Andrews C, Chan WM, Christiansen SP, Hunter DG, Engle EC. Expansion of the CHN1 strabismus phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52(9):6321-6328, 2011, doi: 10.1167/iovs.11-7950. (査読有)
18. Tsurusaki Y, Osaka H, Hamanoue H, Shimbo H, Tsuji M, Doi H, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N*. Rapid detection of a mutation causing X-linked leucoencephalopathy by exome sequencing. *J Med Genet*. 48(9):606-9, 2011, doi: 10.1136/jmg.2010.083535. (査読有)
19. Kosho T, Miyake N, Mizumoto S, Hatamochi A, Fukushima Y, Yamada S, Sugahara K, Matsumoto N. A response to: loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (D4ST1/CHST14) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, "dermatan sulfate-deficient Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome". Which name is appropriate, "Adducted Thumb-Clubfoot Syndrome" or "Ehlers-Danlos syndrome"? *Hum Mutat*. 32(12):1507-9, 2011(査読有)
20. Abdel-Salam GM, Miyake N, Eid MM, Abdel-Hamid MS, Hassan NA, Eid OM, Effat LK, El-Badry TH, El-Kamah GY, El-Darouti M, Matsumoto N. A homozygous mutation in RNU4ATAC as a cause of microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I (MOPD I) with associated pigmentary disorder. *Am J Med Genet A*. 155A(11):2885-2896, 2011, doi: 10.1002/ajmg.a.34299. (査読有)
21. Chan WM#, Miyake N# (# denotes equal contribution), Zhu-Tam L, Andrews C, Engle EC. Two novel CHN1 mutations in 2 families with Duane retraction syndrome. *Arch Ophthalmol*. 129(5):649-52, 2011, doi: 10.1001/archophthalmol.2011.84. (査読有)
22. Dai J, Kim OH, Cho TJ, Miyake N, Song HR, Karasugi T, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Nagai T, Matsumoto N, Ohashi H, Kamatani N, Nishimura G, Furuichi T, Takahashi A, Ikegawa S. A founder mutation of CANT1 common in Korean and Japanese Desbuquois dysplasia. *J Hum Genet* 56(5):398-400, 2011, doi: 10.1038/jhg.2011.28(査読有)
23. Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi

H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Kosho T. Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet A*;155A(8):1949-1958, 2011, Review. (査読有)

24. Saitsu H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shibayama H, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, Matsumoto N. Mutations in POLR3A and POLR3B encoding RNA Polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet* 89(5):644-651, 2011, doi: 10.1016/j.ajhg.2011.10.003(査読有)
25. Doi H, Yoshida K, Yasuda T, Fukuda M, Fukuda Y, Morita H, Ikeda S, Kato R, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Sakai H, Miyatake S, Shiina M, Nukina N, Koyano S, Tsuji S, Kuroiwa Y, Matsumoto N. Exome sequencing reveals a homozygous SYT14 mutation in adult-onset, autosomal-recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. *Am J Hum Genet*. 89(2):320-327, 2011, doi: 10.1016/j.ajhg.2011.07.012. (査読有)

[学会発表] (計4件)

1. 三宅紀子、鶴崎美徳、Desheng Liang、Lingqian Wu、松本直通. 人類遺伝学会第57回大会・一般口演・臨床遺伝学3「X連鎖性を疑われたがミトコンドリア遺伝病

であった一難聴家系の解析」2012年10月27日京王プラザホテル(東京)

2. Noriko Miyake, Tomoki Kosho, Shuji Mizumoto, Tatsuya Furuichi, Atsushi Hatamochi, Shiro Ikegawa, Shuhei Yamada, Kazuyuki Sugahara, Naomichi Matsumoto. *CHST14* mutations in Ehlers-Danlos syndrome. The 11th East Asia Union of Human Genetics Annual meeting (oral presentation) (幕張メッセ(千葉県)、2011年11月10日)
3. 三宅紀子、古庄知己、水本秀二、松本直通 新型 Ehlers-Danlos 症候群 (D4ST1 欠損症) の遺伝学的検索。日本人類遺伝学会第56回大会(一般口演)(幕張メッセ(千葉県)、2011年11月10日)
4. Noriko Miyake, Tomoki Kosho, Shuji Mizumoto, Tatsuya Furuichi, Atsushi Hatamochi, Shiro Ikegawa, Shuhei Yamada, Kazuyuki Sugahara, Naomichi Matsumoto. Loss-of-function mutations of *CHST14* cause a new type of autosomal recessive Ehlers-Danlos syndrome. European Human Genetics Conference 2011 (poster session) (Amsterdam, The Netherlands, 2011 May 30th).

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

1. 名称: ミトコンドリア複合体 III 欠乏症の確定診断法
発明者: 松本直通/三宅紀子
権利者: 横浜市立大学
種類: 特願
番号: 2012-180356
出願年月日: 平成24年8月16日
国内外の別: 国内
2. 名称: コフィン-シリス症候群の検出方法
発明者: 松本直通/鶴崎美徳/三宅紀子
権利者: 横浜市立大学
種類: 特願
番号: 2012-136
出願年月日: 平成24年1月4日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 紀子 (MIYAKE NORIKO)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 40523494

(2) 連携研究者

加藤 光弘 (KATO MITSUHIRO)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：10292434

岡本 信彦 (OKAMOTO NOBUHIKO)

大阪府立母子総合医療センター・企画調査
部・参事

研究者番号：30416242