

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249019

研究課題名(和文)染色体構造異常の次世代シーケンス解析

研究課題名(英文)Analysis of chromosomal structural abnormalities by next generation sequencing

研究代表者

松本 直通 (Matsumoto, Naomichi)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80325638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,700,000円

研究成果の概要(和文)：染色体構造異常を塩基レベルで明らかにするために、次世代シーケンサーを用いて、読み取り深度の浅い(5x-20x程度)全ゲノムシーケンスを行い効率的な情報解析により構造異常が描出可能かを検討した。あらかじめ染色体構造異常が染色体検査レベルで明らかな検体10例を用いて全ゲノムシーケンスで検討し、解析にはBreakDancerとIGVを用いた。10検体で生じた転座染色体切断点18箇所と逆位切断点4箇所において、それぞれ15箇所(83%)と4箇所(100%)で転座切断点が塩基レベルで決定された。全ゲノムシーケンスが塩基レベルでの構造異常切断点の決定に有用であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Shallow (<20x) whole genome sequencing by next generation sequencing was used to evaluate whether this technique is useful for detecting breakpoints of chromosomal structural abnormalities (CSA). Among 10 patients with known CSA, breakpoints were determined in 15 out of 18 translocations (83%) and 4 out of 4 inversions (100%) using BreakDancer and IGV. Therefore shallow whole genome sequencing is quite useful for determination of chromosomal structural variations at the nucleotide level with the knowledge of results of conventional chromosomal analyses.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：次世代シーケンス 染色体構造異常 全ゲノムシーケンス 塩基配列決定

1. 研究開始当初の背景

2005年に登場した次世代シーケンス(NGS)技術によって、エクソーム解析(遺伝子エクソン領域を集中的に解析)を中心にして急速に発展・展開している。高出力を達成した現在のNGS技術を用いればエクソーム領域に留まらず全ゲノム解析も比較的容易にそして安価に施行可能な環境となった。一方、マイクロアレー解析で明らかとなってきたコピー数異常・多型(CNV)などの染色体(ゲノム)微細構造異常をNGS技術で解明することに、当初大きな期待が寄せられた。しかしNGSを用いた染色体微細構造異常の解析研究は、当初の期待を裏切りあまり進展が見られてない。

2. 研究の目的

NGSを用いて染色体(ゲノム)微細構造異常を網羅的に解析することを目的とする。これまでの高密度マイクロアレー研究で明らかになった微細構造異常例を用いてNGS解析を行い、アレーとNGSのデータの比較検討から構造異常を同定する最適な情報解析プロトコルを確立する。さらにNGS前処理からNGS解析までの実験系での最適条件を見出す。本研究で確立するゲノム微細構造異常解析技術はNGSによる高品質なパーソナル解析時代への重要なステップである。本研究で従来解析の困難であったゲノム微細重複や複雑構造異常を塩基レベルで決定しダイナミックなゲノム動態とその発生メカニズムの解明が可能となる。

3. 研究の方法

NGSを用いて、全ゲノムシーケンス(WGS)を行い、染色体構造異常を明らかにすることを目的として研究を進めた。WGSは1サンプルあたりの解析コストを抑えるため通常のスタンダードな30xカバレッジではなく読み取り深度を5x~20x程度として読み取り深度を浅く解析する。解析には、複数のソフトウェアをトライしBreakDancerを選択して解析を進めた。個々のNGSのリードの詳細な解析にはIntegrated Genome Viewer (IGV)を利用した。解析には、あらかじめ通常の染色体検査で構造異常が明らかでその一部ですでに構造異常切断点の解析が進められた10症例を選択した。均衡型転座を有する8例(うち1例では2種類の転座を有する)と、逆位を有する2例を用いた。

4. 研究成果

転座については、18転座切断点のうち15を(83%)、4逆位切断点では全てを(100%)塩基レベルで決定することが示された。これらのデータはNGSによる読み取り深度の浅い全ゲノム解析で比較的容易に構造異常解析が可能でありことが示された。本解析は、あらかじめ染色体構造異常が明らか

な症例のみを用いており、染色体構造異常が不明な状況下でblindで効率よく染色体構造異常が同定できるのかは今後の課題である。

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20件)

- Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Fukai R, Imagawa E, Ohba C, Kuki I, Nukui M, Araki A, Makita Y, Ogata T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, *Matsumoto N. Detecting copy number variations in whole exome sequencing data using the eXome Hidden Markov Model: an "exome-first" approach. *J Hum Genet* 査読有、2015 ;60(4):175-82. doi: 10.1038/jhg
- Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Hideo Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, *Matsumoto N, *Miyake N. A hemizygous *GYG2* mutation causes Leigh syndrome. *Hum Genet* 査読有、133(2):225-234, 2014 doi: 10.1007/s00439-013-1372-6.
- Suzuki T, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Takeda S, *Matsumoto N. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole genome sequencing. *J Hum Genet* 査読有、59(12):649-654, 2014 Dec. doi: 10.1038/jhg.2014.88.
- *Kato M#, *Saitsu H#, *Murakami Y (*: co-first authors, #: co-correspondence), Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology* 査読有、82(18):1587-1596, 2014. doi: 10.1212/WNL.0000000000000389.
- Tsurusaki Y, Ohashi H, Phadke S, Koshimizu E, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K-i, Kodera H, Miyatake S, Nakashima N, Saitsu H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, and *Matsumoto N. *De novo SOX11* mutations cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Commun* 査読有、5:4011, 2014. doi: 10.1038/ncomms5011.
- Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, *Matsumoto N, *Saitsu H (*:

- co-correspondence). Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies, *Neurology* 査読有、82(24):2230-2237, 2014.doi:10.1212/WNL.0000000000000535.
7. Miyatake S, *Matsumoto N (*: correspondence). Clinical exome sequencing in neurology practice. (News & View) *Nat Rev Neurol* 査読有、10(12):676-678, 2014. doi: 10.1038/nrneurol.2014.213.
 - 8.*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, Saitu 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, 査読有、2013.doi: 10.1002/humu.22257.
 - 9.*Saitu H[#], Nishimura T[#], Muramatsu K[#] (# denotes equal contribution), Kodera H, Kumada S, Sugai K, Kasai-Yoshida E, Sawaura N, Nishida H, Hoshino A, Ryujin F, Yoshioka S, Nishiyama K, Kondo Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Arakawa H, Kato M, *Mizushima, *Matsumoto N (*: co-corresponding). *De novo* mutations in the autophagy gene *WDR45* cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet* 査読有、45(4): 445-449, 2013. doi: 10.1038/ng.2562.
 10. Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Sato H, Nakabayashi J, Ban T, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, *Tamura T. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in the monocyte differentiation program. *Blood* 査読有、121 (10): 1839-1849, 2013. doi: 10.1182/blood-2012-06-437863.
 11. Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragán DE, Villarroya CE, Ohfu M, Writzl K, Stražišar BG, Hirabayashi S, Chitayat D, Reid DM, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, *Matsumoto N, *Saitu H (* denotes co-corresponding). Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 査読有、81(11): 992-998,2013doi:10.1212/WNL.0b013e3182a43e57.
 12. Nakajima M,# Mizumoto S,# Miyake N,# (# denotes equal contribution) Kogawa R, Iida A, Ito H, Kitoh H, Hirayama A, Mitsubuchi H, Miyazaki O, Kosaki R, Horikawa R, Lai A, Mendoza-Londono R, Dupuis R, Chitayat D, Howard A, Ferraz-Leal G, Cavalcanti D, Tsurusaki Y, Saitu H, Watanabe S, Lausch E, Unger S, Bonafé L, Superti-Furga A, Ohashi H, Matsumoto N, Sugahara K, Nishimura G, Ikegawa S*. Mutations in *B3GALT6*, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders. *Am J Hum Genet* 査読有、92(6):927-934, 2013. doi:10.1038/ng.2562
 13. Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu Y, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskiniemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma T, Beckmann JS, Ikegawa I, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 査読有、110(40): 16139-16144, 2013. Doi: 10.1073/pnas.1308243110
 14. Ravenscroft G#, Miyatake S# (# denotes the first authors with equal contribution), Lehtokari V-L, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadurai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJN, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, *Matsumoto N§, *Laing NG§ (§ denotes equal contribution as the last author). Mutations in *KLHL40* are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 査読有、93(1):6-18, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.004.
 15. Sun S-L, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Ryo Funayama R, Kondo M, Saitu H, Matsumoto N, Nakayama K, Ishii N*. Y-Chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. *J Immunol* 査読有、190 (12): 6209-6220, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300303.
 16. #Nakamura K, #Kodera H, #Akita T (#

- denotes equal contribution), Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama T, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima N, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, *Matsumoto N, *Saitu H (* denotes co-correspondence) De novo mutations in GNAO1 encoding a Gαo subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet* 査読有、 ;93(3):496-505, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.014.
17. Kodera H[#], Nakamura K[#] (# denotes equal contribution), Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Mitsuko Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, *Matsumoto N, *Saitu H (*: co-corresponding). De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mut* 査読有、 34(12): 1708-1714, 2013. doi: 10.1002/humu.22446.
18. Gupta VA, Ravenscroft G, Shaheen R, Todd EJ, Swanson LC, Shiina M, Ogata K, Hsu C, Clarke NF, Darras BT, Farrar M, Hashem A, Manton N, Muntoni F, North KN, Sandaradura S, Nishino I, Hayashi YK, Sewry CA, Thompson EM, Brownstein CA, Yu TW, Allcock RJN, Davis MR, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Alkuraya FS, Laing NG, Beggs AH. Identification of KLHL41 mutations implicates BTB-Kelch-mediated ubiquitination as an alternate pathway to myofibrillar disruption in nemaline myopathy. *Am J Hum Genet* 査読有、 93(6):1108-1117, 2013. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.10.020.
19. 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, Saitu 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, 査読有、 2012. doi: 10.1038/ng.2219
20. *Saitu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Whole exome sequenwcing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome.

Ann Neurol 72(2): 298-300, 2012. 査読有、 doi: 10.1002/ana.23620

〔学会発表〕(計 62 件)
以下海外発表のみ抜粋

1. European Conference of Human Genetic 2013. N. Matsumoto, T. Nishimura, K. Muramatsu, H. Kodera, S. Kumada, K. Sugai, E. Kasai-Yoshida, N. Sawaura, H. Nishida, A. Hoshino, F. Ryujin, S. Yoshioka, H. Arakawa, M. Kato, N. Mizushima, H. Saitu. De novo mutations in the autophagy gene encoding WDR45 (WIPI4) cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. June 9, 2013 @Palais des Congrès, Paris, France
2. NSFC-JST Workshop on Genomics for Clinical Studies. Naomichi Matsumoto, “Mendelian Exome”, Le Meridien She Shan Shanghai, Shenshan, Shanghai, China, Feb 4, 2013
3. The 12th annual meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies. Matsumoto Naomichi (oral presentation) “Medelian exome” Nov 29, 2012 at Seoul National University Hospital, Seoul, Korea.
4. American Society of Human Genetics Meeting 2012. Matsumoto N, Tsurusaki Y, Miyake N Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome November 8, 2012 at Moscone Center, San Francisco, CA, USA
5. Translational Genomics Conference 2012 Naomichi Matsumoto (Keynote speaker) Exome sequencing in mendelian disorders. (Hyatt Reagency Jeju, Jeju, Korea, Oct 13, 2012)
6. European Human Genetics Conference 2012 Naomichi Matsumoto “Genetic abnormalities in Coffin-Siris syndrome”(poster) (Nuremberg Conference Center, Nuremberg, Germany, June 24-24, 2012)
7. 2012 Illumina Asica Pacific Scientific Summit [Exome analysis in mendelian disorders] Naomichi Matsumoto (Invited speaker) (Sheraton Mirage Resort & Spa Gold Coast, Gold Coast, Austraria, April 24, 2012)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 11 件)

1. 名称: 「重度の知的障害及び運動発達地帯を伴う難治性てんかんの検出方法」
発明者: 松本直通・才津浩智
権利者: 公立大学法人横浜市立大学
種類: PCT
番号: PCT/JP2014/065217
出願年月日: 平成 26 年 6 月 9 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・三宅紀子・鶴崎美德

権利者：横浜市立大学

種類：特願

番号：2013-552406

出願年月日：平成 27 年 7 月 14 日

国内外の別：国内

3.名称：「孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法」

権利者：松本直通・才津浩智

種類：日本・特願、指定国移行 (JST 採択)

番号：2013-542930、米国 14/357,373

出願年月日：移行日 2014 年 4 月 24 日・

米国 2014 年 5 月 9 日

国内外の別：国外

4.名称：「Coffin-Siris 症候群の新規遺伝子診断法」

発明者：鶴崎美德/松本直通

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：特願

番号：2013-252720

出願年月日：平成 25 年 12 月 6 日

国内外の別：国内

5.名称：ミトコンドリア複合体 III 欠乏症患者又は保因者の検出方法

発明者：松本直通 / 三宅紀子

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：PCT

番号：PCT/JP2013/71620

出願年月日：平成 25 年 8 月 9 日・平成 26

年 2 月 7 日

国内外の別：国内

6.名称：ケトン血症を伴うリー脳症患者または保因者の検出法

発明者：松本直通 / 三宅紀子

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：特願

番号：2013-157339 号

出願年月日：平成 25 年 7 月 31 日

国内外の別：国内

7.名称：小児期のでんかんおよび不随意運動をきたす疾患の検出方法

発明者：才津浩智 / 松本直通

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：特願

番号：2013-123660

出願年月日：平成 25 年 6 月 12 日

国内外の別：国内

8.名称：コフィン - シリス症候群の検出方法

発明者：松本直通 / 鶴崎美德 / 三宅紀子

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：PCT

番号：PCT/JP2012/83113

出願年月日：平成 24 年 12 月 20 日

国内外の別：国内

9.名称：孔脳症又は脳出血のリスクを予測する方法

発明者：才津浩智 / 松本直通

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：PCT

番号：PCT/JP2012/77903

出願年月日：平成 24 年 10 月 29 日

10.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：公立大学法人横浜市立大学

種類：特願

番号：2012-180356

出願年月日：平成 24 年 8 月 16 日

11 名称：コフィン - シリス症候群の検出方法

発明者：松本直通 / 鶴崎美德 / 三宅紀子

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：特願

番号：2012-136

出願年月日：平成 24 年 1 月 4 日

取得状況 (計 1 件)

名称：「新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法」

発明者：松本直通 / 才津浩智

権利者：公立大学法人横浜市立大学

種類：特許

番号：特許第 5608863 号

出願年月日：平成 20 年 12 月 19 日

取得年月日：平成 26 年 9 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 直通 (Matsumoto, Naomichi)

横浜市立大学 医学研究科 教授

研究者番号：80325638

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし