

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430194

研究課題名(和文) 頭蓋骨早期癒合疾患の次世代遺伝子一括診断システムの確立と治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Establishment of next-generation comprehensive diagnostic system for patients with craniosynostosis and search for therapeutic targets

研究代表者

要 匡 (Kaname, Tadashi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・部長

研究者番号：40264288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋骨に変化を来す疾患は多数あり、その診断や予後の判断に苦慮することも多い。そこで、現在までに知られている37疾患(種類)、遺伝子28種類について、ベンチトップ型次世代シーケンサを用いた、プロモーター領域を含む遺伝子解析が行える系を構築した。また、原因不明の疾患について全エクソーム解析を行った。結果、76例中、40例(52.6%)に病的バリエーションを確認した。病的バリエーションは、FGFR2、FGFR3、ASXL1、TWIST1の他、ASXL3遺伝子に認められた。加えて、全エクソーム解析によりASXL2遺伝子、FOXP1遺伝子の病的バリエーションを認める例を確認できた。

研究成果の概要(英文)：There are many types of craniosynostosis. Clinical diagnosis and prediction of development and prognosis are difficult in some patients. Thus, we constructed a panel analysis system for craniosynostosis covering 37 disorders (28 genes) by target resequencing using a next-generation sequencer. The system targeted not only exons but also promoter region of the genes. We also performed whole exome analysis in undiagnosed patients. Out of 76 patients, 40 patients were genetically diagnosed by targeted resequencing analysis using the panel (diagnostic yield was 52.6%). Pathogenic variants in FGFR2, FGFR3, ASXL1, TWIST1 or ASXL3 were found in the patients with craniosynostosis. Whole exome sequencing analysis revealed pathogenic variant in the ASXL2 or FOXP1 gene in undiagnosed patients.

研究分野：遺伝医学

キーワード：頭蓋骨早期癒合 ターゲトリシーケンス解析 全エクソーム解析 遺伝子パネル 次世代シーケンサ

1. 研究開始当初の背景

頭蓋骨早期癒合を呈する疾患は多数あり、その診断や予後の判断に苦慮することも多い。例えば三角頭蓋を呈する疾患(三角頭蓋症候群)は、精神発達にほとんど影響のないタイプと、頭蓋内圧に関係なく精神発達に障害が生じるタイプ(オピッツ三角頭蓋症候群など)があると推定され、多くの症候群が知られているが、顔貌等のみから正確に診断を行うことは困難なことも多い。三角頭蓋に限らず、頭蓋骨早期癒合を呈する疾患は総合すると多くの症候群が知られており、原因遺伝子が判明しているものでも30疾患以上知られている(表1)。

これらに対しては、鑑別を慎重に行い、該当する原因遺伝子解析を行うことで確定診断に至ることが出来るが、遺伝子が多岐にわたる事が多く、それらを全て従来のシーケンサを用いて解析するには、コスト的にも、時間的にもかかりすぎる点が問題である。また、今までの遺伝子解析の最大の問題点として、従来遺伝子解析は、エクソンを中心に行われ、プロモーター領域に関する変異解析はほとんど行われていないという問題もある。

そこで、ベンチトップ型の次世代シーケンサを利用して、プロモーターを含むこれら遺伝子群を全て解析するシステムを構築することを計画した。これによって、効率よく遺伝子解析情報を臨床に提供でき、確定診断やその後の治療研究に有用となると思われる。

一方、頭蓋骨早期癒合を呈する疾患は、原因不明なものも未だ多く存在し、原因遺伝子を特定していく必要もある。

申請者らは、オピッツ三角頭蓋症候群に、均衡型転座(t(3;18))を合わせもつ患児の切断点解析から原因遺伝子の一つ(CD96 遺伝子)を世界で初めて特定した。(引用文献1)しかし、本手法は均衡型転座が見つからないと原因に迫れないという難点があった。

近年、患児ゲノムのほぼ全エクソン領域を

対象とした、全エクソーム解析(但し100%ではない)が普及し、申請者らも、本手法を用いて、最近原因遺伝子が同定されたボーリング・オピッツ症候群において、同様にASXL1 遺伝子変異を特定し、また、別の新規遺伝子の同定を行った。

この全エクソーム解析は、遺伝性疾患の原因遺伝子特定法として非常に効果的な手法と考えられ、実際に、申請者らは、本手法により、小眼球症候群、先端異骨症についても原因を特定している。

申請者らは、現在原因不明の頭蓋骨早期癒合を呈する疾患についても、全エクソーム解析、必要に応じて全ゲノム解析により新たに原因を特定できると考えた。

そして、これら解析を行い、原因遺伝子、変異をつぎつぎに特定していくことで、結果は、臨床へ還元できるとともに、患児由来細胞解析等と合わせて頭蓋骨早期癒合に関するシグナル伝達の未だ不明な部分が明らかになり、骨早期癒合全体像と重要部分(コントロール可能な治療標的分子)が見えてくると考えた。

表1: 頭蓋骨早期癒合を呈する症候群

癒合部位	疾患	OMIM	遺伝子	座位	exon数	遺伝子長[kb]
1coonal, lambdoid	Antley-Bixler synd.	207410	FGFR2	10q26.13	18	120
2coonal, lambdoid	Antley-Bixler synd. with genital anomalies and disordered steroidogenesis	201750	POR	7q21.11	16	72
3coronal	Apert synd.	101200	FGFR2	10q26.13	18	120
4	Alagille synd.	118450	JAG1	20p12.1	26	37
5	Alagille synd. 2	610205	NOTCH2	1p12-p13	34	160
6multiple	Baller-Gerold synd.	218600	RECQL4	8q24.3	20	6.7
7multiple	Beare-Stevenson cutis gyrata synd.	123790	FGFR2	10q26.13	18	120
8metopic	Bohring-Opitz synd.	605039	ASXL1	20q11.21	13	81
9multiple	Boston type (Craniosynostosis, type 2)	604757	MSX2	5q35.2	2	6.7
10multiple	Carpenter synd.	201000	RAB23		7	33.5
11sagittal	Cranioectodermal dysplasia 1	218330	IFT122	3q21.3-q22.1	28	65
12sagittal	Cranioectodermal dysplasia 2	613610	WDR35	2p24.1	28	80
13sagittal	Cranioectodermal dysplasia 3	614099	IFT43	14q22.3	10	100
14sagittal	Cranioectodermal dysplasia 4	614378	WDR19	4p14	36	110
15sagittal	Craniosynostosis, type 1	123100	TWIST1	7p21.1	2	2.5
16coronal	Craniosynostosis, type 3	615314	TCF12	15q21.3	21	370
17coronal	Craniosynostosis, type 4	600775	ERF	Xq13.1	4	7.6
18coronal	Cranio-fronto-nasal dysplasia	304110	EFNB1	Xq13.1	5	13.2

## (つづき) 頭蓋骨早期癒合を呈する症候群

癒合部位	疾患	OMIM	遺伝子	座位	exon数	遺伝子長[kb]
19 multiple	Cruson synd.	123500	<i>FGFR2</i>	10q26.13	18	120
20 multiple	Cruson with acanthosis nigricans	612247	<i>FGFR3</i>	4p16.3	19	16.5
21 metopic	Frydman trigonocephaly	190440	<i>FGFR1</i>	8p11.22	18	60
22	trigonocephaly 2	614485	<i>FREM1</i>	9p22	38	180
23 multiple	Jackson-Weiss dyns.	123150	<i>FGFR1</i>	8p11.22	18	60
24 coronal	3MC synd. (Michels synd.)	257920	<i>MASP1</i>	3q27.3	16	75
25	3MC synd. 2	265050	<i>COLEC11</i>	2p25.3	8	50
26 coronal	Muenke synd.	602849	<i>FGFR3</i>	4p16.3	19	16.5
27 metopic	Opitz C synd.	211750	<i>CD96</i>	3q13.13	15	111
28 multiple	Osteoglophonic dysplasia	166250	<i>FGFR1</i>	8p11.22	18	60
29 coronal, sagittal	Pfeiffer synd.	101600	<i>FGFR1, FGFR2</i>	8p11.22, 10q26.13	18, 18	60, 120
30 coronal, lambdoid/metopic	Saether-Chatzen synd.	101400	<i>TWIST1, FGFR2</i>		18	120
31 multiple	Seckel synd 1	210600	<i>ATR</i>	3q23	47	130
32 sagittal	Shprintzen-Goldberg synd.	182212	<i>SKI</i>	1p36.33	7	102
33 multiple	Thanatophoric dysplasia	187600	<i>FGFR3</i>	4p16.3	19	16.5
34 sagittal	Tricho-dento-osseous type I	190320	<i>DLX3</i>	17q21.33	3	5.5
35 coronal	Ventruto synd.	113100	<i>GDF5</i>	20q11.22	4	22
36 metopic	Baraitser-Winter syndrome 1	243310	<i>ACTB</i>	7p22.1	64 (36)	
37 metopic	Baraitser-Winter syndrome 2	614583	<i>ACTG1</i>	17q25.3	63 (12.5)	

## 2. 研究の目的

頭蓋骨早期癒合に関し、効果的な診断確定およびシグナル伝達にかかる分子の発見を目指し、(1) 頭蓋骨早期癒合を呈する患児について、次世代シーケンサを用いたリシーケンス解析により、プロモーター領域も対象とした遺伝子変異特定を行える診断システムを構築する。(2) 原因不明の頭蓋骨早期癒合を呈する疾患の原因遺伝子をエクソーム解析で特定する。の二つを主要な目的とした。それらをもとに、骨早期癒合が生じる分子病態の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 頭蓋骨早期癒合症に関する次世代ターゲットリシーケンス解析系の構築

頭蓋骨早期癒合を呈する疾患(症候群)のうち、原因遺伝子が特定されたものは、代表的なもので、37疾患(種類)、遺伝子28種類である(表1)。これら遺伝子について、ベンチトップ型次世代シーケンサを用いて全遺伝子およびプロモーター領域解析が行えるように系を構築した。

全遺伝子部分の濃縮(増幅)には、カスタムアレイ等によるキャプチャー法がよく選

択されるが、本研究では、キャプチャー法+PCRベースのアンプリコン法により濃縮・抽出を行うこととする。それは、カスタムキャプチャーは、一度セットすると、解析の際の操作が一定で便利であるものの、新規遺伝子が判明した際に追加することが困難であるのに対し、アンプリコン法では自由度が高く、新規遺伝子等に対処できるためである。

表1の全エクソン数は400程度であり、現在までの経験から、プロモーターを含めても1ランで15人以上を、余裕をもって解析できると思われた。よって、プロモーター領域も解析に加えた。機器は、MiSeq, GS Juniorの両者を場合によって使い分けそれぞれの特性を見出し使用することとした。

本次世代遺伝子一括解析システムの構築を完成させ、広く頭蓋骨早期癒合を呈する患児の遺伝子解析を行った。新規遺伝子が同定された際には本システムに追加することとした。

バリエーションが検出された際には、サンガー型キャピラリーシーケンサで確認するとともに、バリエーションが病的であるか否か、またコントロール中(1000人予定)での頻度、発現確認等も行い、臨床症状と合わせて診断した。

### (2) 原因遺伝子不明患児の網羅的ゲノム解析による原因遺伝子特定

ベンチトップ型次世代リシーケンス解析で異常を認めなかった患児について、全エクソン領域の抽出を行った。エクソンキャプチャーは、SureSelect(Agilent),を使用した。次世代シーケンサは、illumina社HiSeq2500を用い、解読した。解読は、平均depth 80x以上とし、対照ゲノム(健常者コントロール)または、両親、同胞非罹患者のゲノムを同時に解析、SNPデータベースも含めた配列比較によりバリエーション検索を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 頭蓋骨早期癒合症に関する次世代ターゲットリシーケンス解析系の構築と解析  
オンラインメンデル遺伝カタログ (OMIM) に登録されている、頭蓋骨早期癒合等の症状をきたす37疾患の原因遺伝子28種、および、申請者らが同定した Opitz trigonocephaly C 症候群の原因遺伝子 *CD96*、類縁疾患の Bohring-Opitz 症候群の原因遺伝子 *ASXL1* に関連すると思われる遺伝子を含む、領域濃縮用のパネルを作製した。作製は、HaloPlex (Agilent 社) を基本とし、トリアルによるターゲットリシーケンスにより濃縮 (カバー) の低いと判定された領域、プロモーター側の領域について PCR ベースの追加を行い、最終的な遺伝子パネルとした。76 例の解析を実施し、40 例 (52.6%) 病的バリエーションを確認した。病的バリエーションは、*FGFR2*, *FGFR3* (それぞれ p.S252W, p.P250R など), *ASXL1*, *TWST1* の他、*ASXL3* 遺伝子病的バリエーションを1例に確認した。遺伝子変異は、Sanger シーケンスにても確認した。全て単独の遺伝子の病的バリエーションが原因と推定され、今回、用いた遺伝子パネル上で2つ以上の遺伝子に病的バリエーションを認める例はなかった。また、*TWIST1* 遺伝子全長欠失を認める例はあったものの、プロモーター領域のみに病的バリエーションを認める例はなかった。本遺伝子パネルは、他の遺伝子変異の有無も同時に確認できることより、他の遺伝子変異の影響も同時に確認できるため、より正確な診断、および遺伝子病的バリエーション—症状関連の解析に有用であると思われた。

#### (2) 未同定疾患患児の全エクソーム解析

三角頭蓋を呈する患児について、*CD96* 遺伝子、*ASXL1* 遺伝子、*FGFR1* 遺伝子のいずれにも変異を認めない症例が確認された。そこで、本人および両親について、書面による同意の後、トリオにて全エクソーム解析

(HiSeq2500)を行った。絞り込みの結果、1 症例は *ASXL2* 遺伝子の病的バリエーションを認めた。また、1 症例については、*FOXP1* 遺伝子の病的バリエーションとの関連が示唆された。本症例は、非典型例と考えられた。

#### (3) 頭蓋骨早期癒合の分子基盤

病的バリエーションを認めた遺伝子の *in silico* 解析から、頭蓋骨早期癒合は、2つの経路 (*FGFRs* と *ASXLs*) が関与していると考えられた。

#### 〔引用文献〕

Kaname *et al.*: *Am J Hum Genet*, 81:835-841, 2007

#### 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13件)

Kaname T, Ki C-S, Niikawa N, Baillie GS, Day JP, Yamamura K-i, Ohta T, Nishimura G, Mastuura N, Kim O-H, Sohn YB, Hyun Woo Kim HW, Cho SY, Ko A-R, Lee JY, Kim HW, Ryu SH, Rhee H, Yang K-S, Joo K, Lee J, Kim CH, Cho KH, Kim D, Yanagi K, Naritomi K, Yoshiura K, Kondoh T, Nii E, Tonoki H, Houslay MD, Jin DK., Heterozygous mutations in cyclic AMP phosphodiesterase-4D (PDE4D) and protein kinase A (PKA) provide new insights into the molecular pathology of acrodysostosis. *Cell Signal*, 2014, 26:2446-2459. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.07.025 査読有

Kaname T, Yanagi K, Naritomi K., A commentary on the promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*, 2014, 59:117-118. doi: 10.1038/jhg.2014.7 査読有

Ganaha A, Kaname T, Akazawa Y, Higa T, Shinnjou A, Naritomi K, Suzuki M., Identification of two novel mutations in the NOG gene associated with congenital stapes ankylosis and symphalangism. *J Hum Genet*, 2015, 60(1) 27-34. doi:10.1038/jhg.2014.97 査読有

Chinen Y, Kaneshi T, Kamiya T, Hata K, Nishimura G, Kaname T. Progressive hip joint subluxation in Saul-Wilson syndrome. (2015). *Am J Med Genet*, 167A:2834-2838. doi: 10.1002/ajmg.a.37278. 査読有

Kina-Tanada M, Sakanashi M, Tanimoto A, Kaname T, Matsuzaki T, Noguchi K, Uchida T, Nakasone J, Kozuka C, Ishida M, Kubota H, Taira Y, Totsuka Y, Kina SI, Sunakawa H, Omura J, Satoh K, Shimokawa H, Yanagihara N, Maeda S, Ohya Y, Matsushita M, Masuzaki H, Arasaki A, Tsutsui M. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. (2017). *Diabetologia*, 60:1138-1151. doi: 10.1007/s00125-017-4259-6 査読有

Kaname T, Yanagi K. A commentary on ANKRD11 variants cause variable clinical features associated with KBG syndrome and Coffin-Siris-like syndrome. (2017). *J Hum Genet*, *in press*. doi: 10.1038/jhg.2017.58 査読有

Ganaha A, Tono T, Kaname T, Yanagi K, Higa T, Kondo S, Maeda H, Suzuki M. A novel CHD7 variant and cochlear implantation via a suprameatal approach with cartilage protection in a CHARGE patient with Kallmann syndrome phenotype: A Case Report. *Otol Neurotol*, (2017). *Otol Neurotol*, *in press*. doi: 10.1097/MAO.0000000000001481 査読有

要 匡: 次世代シーケンサー、松原洋一 他(編) 子どもの病気 遺伝について聞かれたら、診断と治療社、東京、2014年 査読無

要 匡: Aarskog-Scott 症候群 日本臨床別冊 新領域別症候群シリーズ 29 神経症候群 IV 2014年, 434-436. 査読無

要 匡: 鎖骨頭蓋形成不全症 日本臨床神経症候群 IV 2014年, 725-726. 査読無

要 匡: 「小児の症候群」 Holt-Oram

症候群 小児科診療 2016;79(suppl):37 査読無

要 匡: 「小児の症候群」 Opitz 症候群 小児科診療 2016;79(suppl):50 査読無

要 匡、松原洋一: わが国および欧米における遺伝学的検査の現状 血液フロンティア 2016;26(7):937-943. 査読無

[学会発表](計20件)

T. Kaname, M. Higa, A. Ganaha, K. Teruya, K. Sato, T. Hirano, K. Naritomi: Detection of rare variations in a targeted genomic region in a population by NGS analysis using pooled DNAs. EUROPEAN Human Genetics CONFERENCE 2014, Milano Congressi, Milan, Italy 31 May – 3 June, 2014.

要 匡、柳久美子、澤田浩武、比嘉真紀、園田徹、成富研二: Ohdo 症候群オリジナル症例は KAT6B, MED12 以外の遺伝子が原因である: 日本人類遺伝学会 第59回大会 11月19日(水)~22日(土)タワーホール船堀(東京), 2014.

島袋未美、渡嘉敷良乃、宮城郁乃、石原美紀、名護珠美、建山正男、比嘉真紀、仲宗根勇、要 匡: 次世代シーケンサーを活用した HIV ゲノム薬剤耐性関連遺伝子マイナーアレルの検出: 日本人類遺伝学会 第59回大会 11月19日(水)~22日(土)タワーホール船堀(東京), 2014.

我那覇 章、要 匡: CHD7 遺伝子の新規変異を認めた CHARGE 症候群の一例: 日本人類遺伝学会 第59回大会 11月19日(水)~22日(土)タワーホール船堀(東京), 2014.

知念安紹、西村玄、成富研二、要 匡: 脊椎変形・骨端骨化異常に大泉門開大と特徴的顔貌を伴った症例: 日本人類遺伝学会 第59回大会 11月19日(水)~22日(土)タワーホール船堀(東京), 2014.

Kaname T: Clinical application and its pitfalls of next-generation sequencing (invited), EAUHGS meeting 2015, Seoul, Korea, 2015.11.27

要 匡: 次世代シーケンサーでわか

ること、わからないこと –最近の動向– (特別講演), 第 163 回 染色体研究会, 東京, 2015.10.3.

要 匡: Incidental findings (偶発的所見) を考える (シンポジウム), 日本人類遺伝学会 第 60 回大会, 東京, 2015.10.16.

要 匡: 次世代シーケンサーの最近の動向 (特別講演), 第 4 回 ゲノム懇話会, 東京, 2015.10.15.

Kaname T, Ki C-S, Niikawa N, Baillie GS, Day JP, Nishimura G, Matsuura N, Yanagi K, Naritomi K, Houslay MD, Cho SY, Jin DK.: Mutations in PDE4D and molecular pathology of acrodysostosis without hormone resistance. EUROPEAN Human Genetics CONFERENCE 2015, Glasgow, Scotland, UK, 6-9 June 2015.

Kaname T, Sameshima K, Yanagi K, Kuroki Y, Nishimura G, Naritomi K, Matsubara Y.: A novel mutation of the TWIST1 gene in a family with Baller-Gerold syndrome without poikiloderma American Society of Human Genetics Annual Meeting 2015, Baltimore, MD, USA, 2015.10.7.

T Kaname, K Yanagi, C-S Ki, N Niikawa, G Nishimura, N Mastuura, M Iso, Y Kuroki, S Mizuno, S Y Cho, D-K Jin, Y Matsubara. Novel mutations in PDE4D and molecular pathology of acrodysostosis without hormone resistance. The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016), Kyoto, Japan, 3-7 April 2016.

K Yanagi, M Iso, A Ganaha, T Kaname. Rapid and accurate genetic testing for CHARGE syndrome based on long-range PCR and benchtop Next-Gen high-throughput sequence. The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016), Kyoto, Japan, 3-7 April 2016.

S Song, T Kaname, S Sugano. Next generation sequencing-based cancer precision medicine is on the horizon now. The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016), Kyoto, Japan, 3-7 April 2016.

Y Chinen, J Nitta, T Kinjo, H Masamoto, Y Aoki, T Kaname, Y Chinen. Three Repeated Cases of Fetal Cystic Hygroma in the First Trimester. The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG2016), Kyoto, Japan, 3-7 April 2016.

T Kaname, K Yanagi, A Ganaha, M Higa, M Iso, Y Matsui, F Koiwa, Y Kuroki, M Suzuki, Y Matsubara. Three major mutations and their rapid detection of the SLC26A4 gene in East Asian patients with Pendred syndrome/enlarged vestibular aqueduct syndrome. EUROPEAN Human Genetics CONFERENCE 2016, Barcelona, Spain, 21-24 May 2016.

要 匡: ヒト疾患ゲノム解析ツールとしての次世代シーケンサ (シンポジウム) 日本遺伝学会 第 88 回大会 . 三島 (静岡). 9 月 7 日 2016.

要 匡: 医学における次世代シーケンサの現状と課題 (基調講演) JASIS 2016 . 幕張 . 9 月 9 日 2016.

要 匡: 疾患ゲノム解析の動向 (特別講演) 第 23 回 遺伝性疾患に関する出生前診断研究会 . 長崎 . 9 月 24 日 2016.

T Kaname, Y Chinen, K Yanagi, M Iso, Y Matsui, K Hayashi, Y Kuroki, T Tohma, Y Matsubara. A novel mutation in the VIPAS39 gene found in two families with atypical arthrogryposis, renal dysfunction and cholestasis (ARC) syndrome. The American Society of Human Genetics 2016 Annual Meeting (ASHG2016), Vancouver, Canada, 18-22 October 2016.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

要 匡 (KANAME, Tadashi)

国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・部長

研究者番号 : 4 0 2 6 4 2 8 8

### (4) 研究協力者

成富研二 (NARITOMI Kenji)

琉球大学・名誉教授