

## 総説 (2015年度横浜市立大学医学会賞受賞研究)

次世代シーケンサーを用いた遺伝性難治疾患の  
責任遺伝子の同定および病態解明

鶴崎 美徳

神奈川県立こども医療センター 臨床研究所

**要旨:** 2005年以降, 次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer, NGS) が順次市場に登場し, 主にメンデル遺伝性疾患 (単一遺伝子疾患) の責任遺伝子が次々と同定されている. 特に, NGS を利用した全エクソーム解析 (Whole Exome Sequencing, WES) により, 様々なメンデル遺伝性疾患の解明が, その周辺技術の開発とも相まって, 現在も精力的に行われている. 本総説では, 筆者が携わった遺伝性難治疾患のうち, 原因不明なメンデル遺伝性疾患のWESを用いた責任遺伝子の同定, および病態解明の自験例 (Coffin-Siris症候群, 脊髄性筋萎縮症, 習慣性流産) を紹介する.

**Key words:** メンデル遺伝性疾患 (Mendelian disorders),  
次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer),  
全エクソーム解析 (Whole Exome Sequencing), 責任遺伝子 (Disease genes)

## はじめに

2003年に終了したヒトゲノムプロジェクトにおいて, 初めてヒト全ゲノムシーケンス解読を行うのに要したコストはおおよそ30億ドルで, 13年の歳月を要した<sup>1)</sup>. 現在では, 最新の次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer, NGS) を用いることにより, およそ1,000ドルのコストで1日でヒト全ゲノムシーケンス解読が可能となった.

これまでは, メンデル遺伝性疾患の責任遺伝子の同定には, 大家系を利用した連鎖解析や血族婚家系を利用したホモ接合性マッピング, あるいは合併する染色体構造異常の構造解析などを利用してきた. しかし, 手がかりのない孤発例に対しては有効なアプローチはなかった<sup>2)</sup>. 2005年に世界で初めてNGSが登場し, 2006年にNGSを用いてヒト全ゲノム配列が解読され, 2010年にはメンデル遺伝性疾患の1つであるMiller症候群の3家系を対象に, 全エクソーム解析 (Whole Exome Sequencing, WES) を用いて初めて責任遺伝子の単離がなされた<sup>3)</sup>. 以来, 様々なメンデル遺伝性疾患の責任遺伝子がNGSにて同定され

ている.

我々はこれまでに, NGSを用いた遺伝性難治疾患のゲノム解析研究を行い, 様々な疾患の責任遺伝子の同定を試み, 原因となる遺伝子異常を明らかにしてきた. 本総説では, 責任遺伝子の同定に至った経緯を, 筆者が携わった原因不明なメンデル遺伝性疾患の自験例 (Coffin-Siris症候群, 脊髄性筋萎縮症, 習慣性流産) で紹介する.

## 1) Coffin-Siris 症候群 (Coffin-Siris Syndrome, CSS)

CSSは, 1970年にCoffin医師とSiris医師により, 知的障害, 発育不全, 特異的顔貌, 第5指・趾爪の低形成を伴う症候群として初めて報告された<sup>4)</sup>. その大多数は孤発例で, 遺伝的原因は不明であった<sup>5)</sup>. これまでに, CSSに関連して9p, あるいは7q32-q34のトリソミーなどの染色体構造異常が報告されたが<sup>6-8)</sup>, 責任遺伝子の同定の契機にはならなかった.

我々はCSSを呈する集積された22症例のうち, 臨床症状から典型例5症例のゲノムDNAを, SureSelect Human All Exon 38Mb Kit (Agilent Technologies社) にてエクソームキャプチャーを行い, Genome Analyzer IIX (Illumina

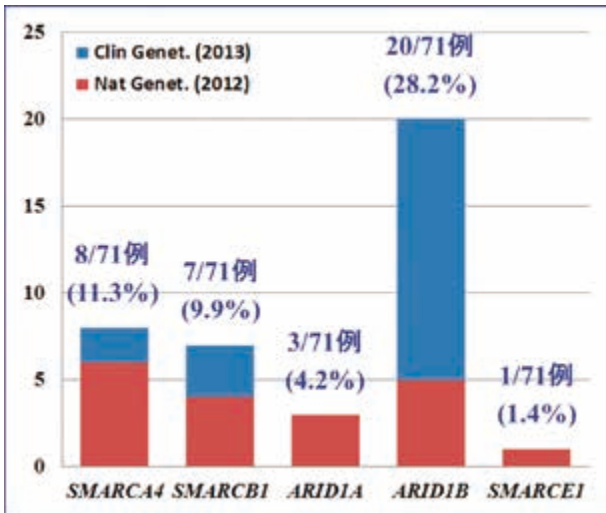


図1

BAF 複合体構成サブユニットの変異。変異同定率は54.9% (39/71例)。

社)にて、ペアエンドリード解析を行った。出力されたシーケンスデータは、Mapping and Assembly with Qualities (MAQ), およびNextGENe解析プログラム (SoftGenetics社)の2種類の解析プログラムを用いて、参照配列にマッピングを行った。コールされた全バリエーションより、Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP131)に登録がないもの、2種類の解析プログラムでコールされた共通のバリエーション、non-synonymous, スプライスサイト(±2)の変異, insertions and deletions (indels), 655名のIn-houseデータベースに登録がないもの、セグメント重複領域内がないものというように、順次候補遺伝子の絞り込みを行った。両親検体が得られた症例に対しては、同様にWESを行い*de novo*変異を検出した。解析した5症例のバリエーションの中で、5症例全てに共通に認められたバリエーション、4症例に共通、3症例に共通、2症例に共通というように階層的な変異候補探索を行うことで、病的意義のある遺伝子変異をピックアップした。これらのバリエーションは、通常のサンガーシーケンスを行い、擬陽性を除外した。その結果、WESにより解析したCSS症例5症例のうち2症例において、遺伝子SMARCB1に*de novo*変異が認められ、責任遺伝子が同定された。本遺伝子は、クロマチンリモデリング因子の1種であるBrg1/Brm-associated factor (BAF)複合体の構成サブユニットをコードするため、残りの症例を対象に、BAF複合体の構成サブユニットをコードする16遺伝子のタンパク質コーディング領域、およびエクソン/イントロン境界(>±10bp)に対して高解像度融解温度曲線解析(High Resolution Melting analysis, HRM)により変異解析を行ったところ、22症例中19症例(86.4%)でSMARCB1(4症例, 18.2%), SMARCA4(6症例, 27.3%), SMARCE1(1症例, 4.5%), ARID1A(3症

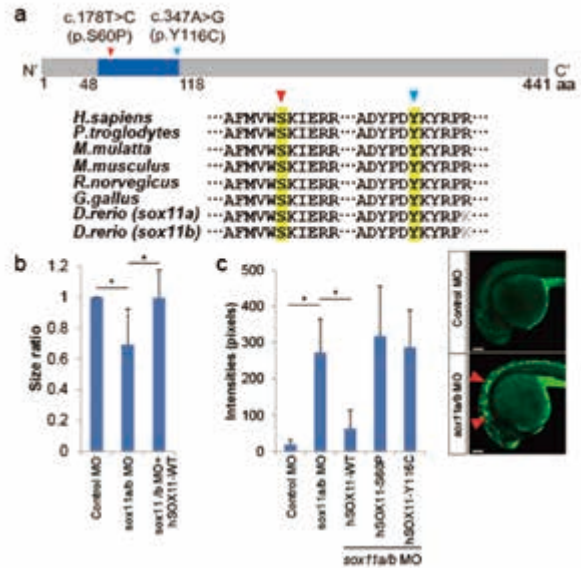


図2 SOX11遺伝子。

- CSS 2例に認められたSOX11の*de novo*変異。両変異共に哺乳類からゼブラフィッシュまで保存されたアミノ酸の変化をもたらす変異であった。
- sox11機能阻害ゼブラフィッシュにおける頭部の縮小。ゼブラフィッシュの相同遺伝子sox11a/bの機能を阻害したゼブラフィッシュ(sox11a/b MO)の頭部は、正常のゼブラフィッシュ(Control MO)と比較して縮小した。この胚に、ヒトの正常型SOX11(hSOX11-WT)を発現させると、頭部のサイズが回復した。
- sox11機能阻害ゼブラフィッシュの中脳神経で生じた細胞死。sox11a/b遺伝子機能を阻害したゼブラフィッシュ(sox11a/b MO)では、正常のゼブラフィッシュ(Control MO)と比べ、中脳神経に顕著な細胞死を認めた(赤い矢尻で表示、グリーン点状シグナル)。この胚に、ヒトの正常型SOX11(hSOX11-WT)を発現させると、細胞死が抑制された。ヒトの変異型SOX11(hSOX11-S60P, hSOX11-Y116C)を発現させると抑制効果は得られなかった(Tsurusakiら<sup>11)</sup>のFigure 1, 4より改変引用)。

例, 13.6%), あるいはARID1B(5症例, 22.7%)のいずれかのサブユニットに変異が認められた<sup>9)</sup>。その中の1症例においては、以前にマイクロアレイにより染色体構造異常(微小欠失)を確認しており、その領域内にARID1Bが含まれていた。

さらに、新たに集積した49症例と前回HRMで変異が認められなかった22症例中3症例のCSS症例を対象に、ゲノムDNAをSureSelect Human All Exon v 4 Kit (51Mb) (Agilent Technologies社)にてエクソームキャプチャーを行い、Genome Analyzer IIx (Illumina社), もしくはHiSeq2000 (Illumina社)にてペアエンドリード解析を行った。8症例に対しては、HaloPlex Target Enrichment System (Agilent Technologies社)にてBAF複合体の構成サブユニットをコードする21遺伝子群をターゲットとしたエンリッチメントを行い、MiSeq (Illumina社)にてペアエンドリード解析を行った。出力されたシーケンスデータは、Novoalign解析プログラムを用いて、参照配列にマッピングを行った。コールされた全バリエーションより、

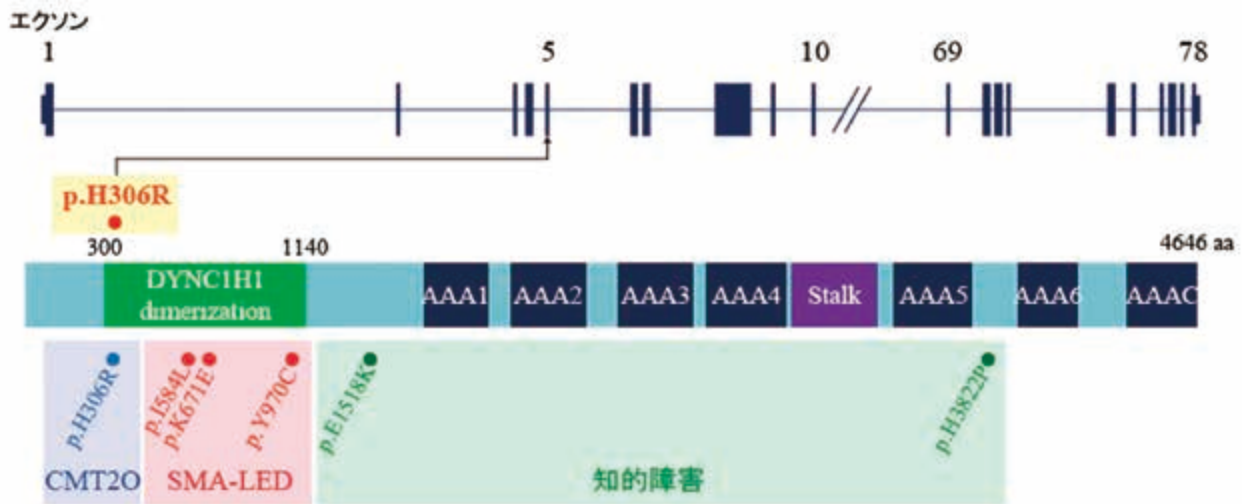


図3 DYNC1H1 遺伝子.

上段：我々が SMA-LED 家系において同定した変異 [p.H306R (c.917A>G)], 中段：タンパク質機能ドメイン, 下段：これまでに報告されている変異, CMT2O: シャルコー・マリー・トゥース病, タイプ 2O (Charcot-Marie-Tooth Disease, Type 2O) (Tsurusaki ら<sup>12)</sup> の Figure 3. より改変引用).

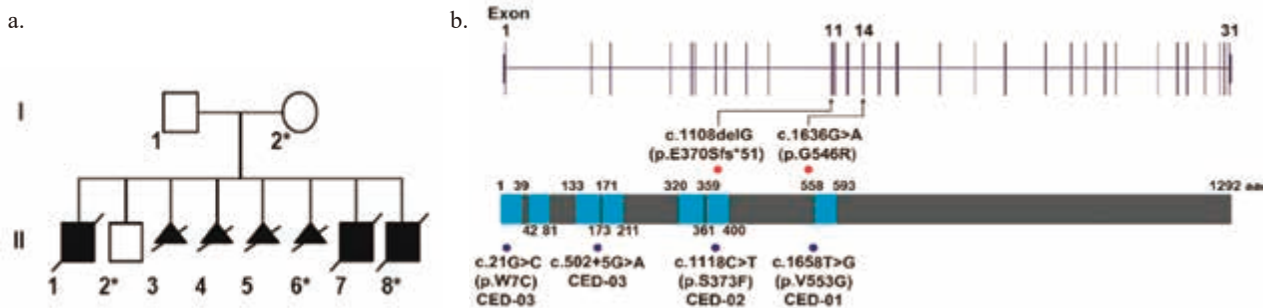


図4 家系図およびIFT122遺伝子.

a. 複数の子宮内胎児死亡, および習慣性流産を伴う1家系. \* DNA 入手.

b. 上段：我々が同定した変異, 中段：タンパク質機能ドメイン (水色: WD40), 下段：これまでに報告されている変異 (Tsurusaki ら<sup>14)</sup> の Figure 1. より改変引用).

dbSNP135, および ESP5400 に登録がないもの, non-synonymous, スプライスサイト ( $\pm 2$ ) の変異, indels, 408名の In-house データベースに登録がないもの, セグメント重複領域内にないものというように, 順次候補遺伝子の絞り込みを行った. さらに, サンガーシーケンスにより擬陽性を除外し, 両親検体が得られた症例に対しては, *de novo* 変異の確認を行った. その結果, 52症例中 20症例で *SMARCB1*, *SMARCA4*, あるいは *ARID1B* の3種のいずれかのサブユニットに変異が認められた<sup>10)</sup>. 最終的に, 71症例中39症例 (54.9%) において *SMARCB1* (7 症 例, 9.9%), *SMARCA4* (8 症 例, 11.3%), *SMARCE1* (1 症 例, 1.4%), *ARID1A* (3 症 例, 4.2%), あるいは *ARID1B* (20症例, 28.2%) のいずれかのサブユニットに変異が認められた (図1).

CSSの54.9%が5つの遺伝子異常で説明可能となったが, それ以外の遺伝子異常の関与も示唆される. そこで,

引き続きBAF複合体の構成サブユニットをコードする遺伝子群に異常を認めないCSS症例を対象に, ゲノムDNAを SureSelect Human All Exon v4 (51Mb), あるいは V4+UTRs Kit (Agilent Technologies社) にてエクソームキャプチャーを行い, HiSeq2000 (Illumina社) にてペアエンドリード解析を行った. 出力されたシーケンスデータは, Novoalign解析プログラムを用いて, 参照配列にマッピングを行った. コールされた全バリエーションより, dbSNP137, および ESP6500 に登録がないもの, non-synonymous, スプライスサイト ( $\pm 2$ ) の変異, indels, 408名の In-house データベースに登録がないもの, セグメント重複領域内にないものというように, 順次候補遺伝子の絞り込みを行った. さらに, サンガーシーケンスにより擬陽性を除外し, 両親検体が得られた症例に対しては, *de novo* 変異の確認を行った. その結果, 2症例において *SOX11* に *de novo* 変異を見出した (図2a). 転写因

子であるSOX11はBAF複合体ネットワークの下流で、神経細胞の分化制御などに重要な役割を果たしていることが報告されている。本遺伝子がヒトの脳組織で発現していることを確認し、モデル実験動物のゼブラフィッシュにおいて、モルフォリノアンチセンスオリゴにより相同遺伝子の機能を阻害したところ、頭部の縮小(図2b)、中枢神経の細胞死(図2c)などの異常が認められ、CSSの症状を模倣していた<sup>11)</sup>。

## 2) 脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy, SMA)

SMAは、脊髄の運動ニューロンが変性することにより、体幹や四肢の筋力低下、筋萎縮を呈する遺伝性筋疾患である。SMA-LED (spinal muscular atrophy with lower extremity predominance) は、下肢近位筋(大腿屈筋、大腿四頭筋)の筋力低下が特徴の常染色体優性遺伝疾患である。我々は、SMA-LEDの罹患者兄弟を対象に、ゲノムDNAをSureSelect Human All Exon 38Mb Kit (Agilent Technologies社)にてエクソームキャプチャーを行い、Genome Analyzer IIX (Illumina社)にて、ペアエンドリード解析を行った。出力されたシーケンスデータは、MAQ、およびNextGENe解析プログラムを用いて、参照配列にマッピングを行った。コールされた全バリエーションより、dbSNP131, 2種類の解析プログラムでコールされた共通のバリエーション、non-synonymous, スプライスサイト(±2)の変異、indels, 33名のIn-houseデータベースに登録がないもの、セグメント重複領域内がないものというように、順次候補遺伝子の絞り込みを行った。さらに、最終的に兄弟共通で認められた62個のバリエーションにまで絞り込んだ。同疾患で得られた家系はこの1家系のみであったため、これ以上の候補の絞り込みは困難を極めたが、全バリエーション中にHuman Genome Mutation Database (HGMD)で登録されていたシャルコー・マリー・トゥース病、タイプ2O (Charcot-Marie-Tooth Disease, Type 2O)の責任遺伝子DYNCH1H1の同変異(p.H306R(c.917A>G))を認めたため、アレリックな疾患であると考えた<sup>12)</sup>。その後、他施設によりSMA-LEDを伴う症例にて同遺伝子の変異が報告され、我々の主張が証明された(図3)<sup>13)</sup>。

## 3) 習慣性流産

骨系統疾患が認められた流産を含む複数の子宮内胎児死亡、および習慣性流産を伴う1家系を対象とした(図4a)。我々は健常母親、健常男児同胞1名、および骨系統疾患が認められた流産検体から得られたゲノムDNAを、SureSelect Human All Exon v4 (51Mb)にてエクソームキャプチャーを行い、HiSeq2000 (Illumina社)にてペアエンドリード解析を行った。出力されたシーケンスデータは、Novoalign解析プログラムを用いて、参照配列

にマッピングを行った。コールされた全バリエーションより、dbSNP135, およびESP5400に登録がないもの、non-synonymous, スプライスサイト(±2)の変異、indels, 749名のIn-houseデータベースに登録がないもの、セグメント重複領域内がないものというように、順次候補遺伝子の絞り込みを行い、最終的に、罹患者特異的なIFT122の複合ヘテロ接合性変異を認めた(図4b)。IFT122は、外胚葉系の異常を合併する常染色体劣性遺伝疾患である頭蓋外胚葉異形成症(Cranioectodermal dysplasia 1, CED1)の責任遺伝子として報告されている。本家系では原因不明の骨系統疾患胎児を1例認めたが、レトロスペクティブにはCED1の表現型と一致していた。さらに、稽留流産(妊娠7週)の胎児の絨毛組織DNAを用いてサンガーシーケンスを行ったところ、同様の変異を認めた。以上のことから、本家系で認められたIFT122の変異により、CED1の最重症の表現型が出現したと考えられた<sup>14)</sup>。

## おわりに

これまでに、多くの疾患責任遺伝子がWESにより同定されており、NGSがメンデル遺伝性疾患を解析するための強力なツールであることは言うまでもない。最近では、NGSによって得られたシーケンスデータを用いて、コピー数異常、転座、逆位などの染色体構造異常解析への応用にも用いられてきており、より包括的な解析環境が整いつつある。さらに、WESを用いても同定に到らない遺伝性疾患においては、非翻訳領域、non-coding RNAといったコーディング領域以外の領域の異常が報告されてきている。今後はこれらの領域に対して有効な全ゲノム解析や新たな技術が開発され、ゲノム解析の研究展開が推進されることが予想される。以上の研究は、横浜市立大学の倫理委員会の承認を得て行った。

## 謝 辞

本研究に際して、研究にご参加いただいた患者様およびご家族の皆様、検体をご提供いただいた諸先生方、およびご指導くださいました横浜市立大学医学部遺伝学教室の松本直通教授と研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Lin X, Tang W, Ahmad S, et al: Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other

- genetic disabilities. *Hear Res*, **288**: 67–76, 2012.
- 2) Ku CS, Naidoo N, Pawitan Y: Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Hum Genet*, **129**: 351–370, 2011.
  - 3) Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al: Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*, **42** ( 1 ) : 30–35, 2010.
  - 4) Coffin G S, Siris E: Mental retardation with absent fifth fingernail and terminal phalanx. *Am J Dis Child*, **119**: 433–439, 1970.
  - 5) Schrier SA, Bodurtha JN, Burton B, et al: The Coffin-Siris syndrome: A proposed diagnostic approach and assessment of 15 overlapping cases. *Am J Med Genet A*, **158A**: 1865–1876, 2012.
  - 6) McPherson EW, Laneri G, Clemens MM, et al: Apparently balanced t ( 1 ; 7 ) (q21.3;q34) in an infant with Coffin-Siris syndrome. *Am J Med Genet*, **71** ( 4 ) : 430–433, 1997.
  - 7) McGhee EM, Klump CJ, Bitts SM, et al: Candidate region for Coffin-Siris syndrome at 7 q32 → 34. *Am J Med Genet*, **93** ( 3 ) : 241–243, 2000.
  - 8) Temtamy SA, Kamel AK, Ismail S, et al: Phenotypic and cytogenetic spectrum of 9 p trisomy. *Genet Couns*, **18** ( 1 ) : 29–48, 2007.
  - 9) Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, et al: Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet*, **44** ( 4 ) : 376–378, 2012.
  - 10) Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, et al: Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. *Clin Genet*, **85** ( 6 ) : 548–554, 2014.
  - 11) Tsurusaki Y, Koshimizu E, Ohashi H, et al: De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Commun*, **5** : 4011, 2014.
  - 12) Tsurusaki Y, Saitoh S, Tomizawa K, et al: A DYNC 1 H 1 mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenetics*, **13** ( 4 ) : 327–332, 2012.
  - 13) Harms MB, Ori-McKenney KM, Scoto M, et al: Mutations in the tail domain of DYNC 1 H 1 cause dominant spinal muscular atrophy. *Neurology*, **78**: 1714–1720, 2012.
  - 14) Tsurusaki Y, Yonezawa R, Furuya M, et al: Whole exome sequencing revealed biallelic IFT122 mutations in a family with CED 1 and recurrent pregnancy loss. *Clin Genet*, **85** ( 6 ) : 592–594, 2014.

### Abstract

#### IDENTIFICATION OF GENES THAT CAUSE MENDELIAN DISORDERS USING NEXT-GENERATION SEQUENCER AND PATHOLOGICAL CLARIFICATION

Yoshinori TSURUSAKI

*Clinical Research Institute, Kanagawa Children's Medical Center*

Genes responsible for Mendelian disorders (single gene disorders) were identified when next-generation sequencers (NGS) appeared on the market after 2005. The elucidation of various Mendelian disorders has been combined with the development of neighboring techniques by whole-exome sequencing (WES) using NGS.

This summary introduces patients with Coffin-Siris syndrome, spinal muscular atrophy, and recurrent abortion in whom genes causing unidentified Mendelian disorders were determined using WES and then pathologically clarified.

