

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号	2021B - 11						
研究開発課題名	現在の次世代シーケンス解析での未解決領域を解決する技術開発整備： モザイクとスプライシング変異検出						
分類*	<input type="checkbox"/> ①	<input type="checkbox"/> ②	<input checked="" type="checkbox"/> ③	<input type="checkbox"/> ④	<input type="checkbox"/> ⑤	<input type="checkbox"/> ⑥	<input type="checkbox"/> ⑦
区分	<input type="checkbox"/> A	<input checked="" type="checkbox"/> B	<input type="checkbox"/> C	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> S		
主任研究者	所属	ゲノム医療研究部					
	役職	部長					
	氏名	要 匡					
実施期間	2023年 4月 1日 ~ 2024年 3月 31日						

※分類は下記①～⑦より選択

- ① 日本の成育分野の疾患の研究の基盤となる研究
- ② 診断、治療及び予防法の開発に関する研究
- ③ 発症機序や病態の解明等を行う研究
- ④ 診断や治療のための基準の開発等に関する研究
- ⑤ 患児・者のQOL向上に結びつく研究
- ⑥ 研究的視点や技術をもつ医療従事者を育てるための研究
(プロトコル作成のフェージビリティ研究)
- ⑦ 政策提言に結びつく研究

成果の概要

本研究は、現在の短鎖型の次世代シーケンス解析で解析困難な課題について、long-PCR、RNA-seq、DeepSeq、新規検出法等を用いた技術により解決できるシステムを構築することを目的とした。加えて、IRUD等で全エクソーム解析を中心とした網羅的ゲノム解析を行った2,000を超える症例や新規症例のうち、原因未同定症例(約1,000症例)を再検討し、本研究開発での解析が有効と思われる症例をピックアップ、解析を実践することを計画した。

R05年度におけるNGS検出困難領域の変異検出系の開発および新規症例収集

[相同ゲノム領域内の変異検出法開発]

偽遺伝子等、相同ゲノム領域が存在するため、短鎖型NGSデータが複数の領域にマッピングされ、バリエーションの検出が不正確になる場合に関しては、フォンビレブランド欠損症を対象に、確立した解析法を用いて実際の症例でバリエーション検出を行った。本解析により、血小板減少症を呈するが、VWF病的バリエーションが確定した症例、偽遺伝子内のバリエーション検出により否定された症例があった。また、偽遺伝子存在のため、WES解析困難なIKBK遺伝子(免疫不全を伴う外胚葉形成不全症の原因遺伝子)についても、バリエーション検出系を構築した。

[WES検出困難領域の網羅的表示]

現在網羅的解析ではWES解析が主になっているが、偽遺伝子の存在や繰り返し配列の存在等など、正確性が担保されない領域が存在し、場合によっては誤った解釈、結果を引き起こす場合があるため問題となっている。かずさDNA研究所と共同で、エクソームデータの解析を集約

し、マッピング不良領域等の洗い出しを行うことで、検出困難領域領域を抽出し、エクソーム領域全体として俯瞰・表示するデータベースを公開した。

[症状調査、新規患者リクルートと臨床的検討]

下顎形成異常をとともなう患児、頭蓋底形成不全を呈する患児についてリクルートを行い、累計で9家系の症例の情報等収集および解析を行えた。

全エクソーム解析により前年度までに判明した重度の下顎低形成を呈する *GNAI3* 遺伝子の *de novo* の病的バリエントが原因の、Auriculocondylar 症候群 1 型 (ARCND1) の他、全エクソーム解析で有意な原因が見つからない症例について、全ゲノム解析を実施したが、明確な原因と思われる病的バリエントは見出されていない。本研究にて、短鎖型 NGS での解決困難な、領域や構造異常等のバリエントも対象とした長鎖型 NGS による解析のための、高分子ゲノム DNA 抽出を行い、長鎖型 NGS 全ゲノム解析を実施した。加えて、画像データを含めた詳細な臨床症状と相互比較を行うとともに、所見より疾患分類 (カテゴリー化) が可能かについて検討した

[RNA-seq 解析系の構築、整備]

RNA-seq データから、発現変化を捉えるための発現解析パイプライン、スプライシング 変化を捕らえるためのバリエント解析パイプラインを構築した。スプライシング異常が推定されるリンパ管拡張症の患者での全エクソーム解析により、スプライシング変異の可能性のあるバリエントを対象として、株化 B 細胞、血液それぞれの RNA-seq を行い、スプライシング異常や発現変化を認めるか構築パイプラインを用いて検討したが、*ADAMTS3* 遺伝子については、発現が非常に低く、HDAC 阻害剤、レチノイン酸、5Aza-C 等の薬剤刺激による発現変化から解析可能対象遺伝子の拡張を行うための至適添加濃度、培養条件等を検討したが、RNA-seq 解析が困難であった。そこで、前年度構築した解析系によるミニジーンアッセイ+ディーブシーケンス解析でのスプライシング異常の検出を行い、深部イントロンバリエントによるスプライシング異常を証明した。また、Sotos 症候群疑い例におけるスプライシング変化 (異常) の検出を行った。加えて、尿中脱落細胞の培養法の検討を行い、培養に成功した。

[超低頻度モザイクを安定的に検出する解析アルゴリズムの開発]

R05 年度は、1%以下の“超低頻度”モザイクを安定的に検出することを目的として解析アルゴリズムの開発に取り組んだ。

“超低頻度”モザイク検出で『エラー』であるバリエントを効率的に排除するために、シーケンサープラットフォームごとのバリエントデータベースを構築し、フィルタリング過程で『エラー』を排除することを試みた。さらに検出したバリエント周辺のハプロタイプを考慮するアルゴリズムを開発することで、0.1-0.5%の“超低頻度”バリエントの検出が可能となった。実際に、性腺モザイクの検出が困難なため疑義が残されている症例を対象とし、データ再解析を実施し、スタージウェーバー症候群 (指定難病) 疑い症例での血中細胞 DNA において病的バリエントを検出することに成功し診断を確定することができた。