

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号	2023B-3						
研究開発課題名	ゲノム・エピゲノム診断のためのターゲットロングリードシーケンシング法の開発および検証						
分類*	<input type="checkbox"/> ①	<input checked="" type="checkbox"/> ②	<input 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	ダイバーシティ研究室					
	役職	室長					
	氏名	松原 圭子					
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

本研究開発では、以下の2項目について、特に、21水酸化酵素欠損症(21-OHD)とインプリンティング疾患(IDs)を解析対象疾患として研究開発を行う。

研究開発項目1) 「21-OHDおよびID sに対するT-LRS法による解析パイプライン開発」

研究開発項目2) 「新規収集検体または遺伝学的診断の明らかではない症例に対するT-LRS解析」

#### ・臨床検体収集

分子内分泌研究部に収集済の21-OHDうち、14検体を選択した。また、成育病院内分泌代謝科より、新規の21-OHD 2家系の血液検体を収集した。これらに対し、21-OHDの遺伝学的解析手法として一般的に用いられているサンガーシーケンシング法およびMLPA法により遺伝学的原因を解析した。IDsについては、Prader-willi症候群3症例を選択し、MS-MLPA法、マイクロサテライト解析により、遺伝学的原因を解析した。さらに、*PHEX*遺伝子内にコピー数異常を有することがMLPA法により判明しているX連鎖性低リン血症くる病(XLH)1症例の検体も収集した。病的原因が明らかであった検体(21-OHD 10検体、IDs 3検体、XLH 1検体)を陽性コントロール、明らかな病的原因が同定されなかった検体(21-OHD 4検体)を新規解析対象検体とし

て、以後の解析で用いることとした。

- デモデータを用いた解析環境構築および解析パイプライン検証

- コントロール試料を用いたウェット実験プロトコル決定

アダプティブサンプリング (Ada-LRS) およびロングリードアンプリコンシーケンス (Amp-LRS) により T-LRS 解析を行う。当該年度は、健常コントロール検体を用い、実験条件を最適化、解析環境を構築した。その結果、21-OHD の原因遺伝子 *CYP21A2* 解析において、Ada-LRS では、種々の条件検討を経てもマッピングクオリティの高いリードを十分に得ることができず、変異や構造異常の同定が困難であった。したがって、21-OHD では Amp-LRS による解析を、その他の疾患に対しては Ada-LRS による解析を実施することとした。

- 症例に対する解析

XLH 症例に対し Ada-LRS による T-LRS を行い、*PHEX* 遺伝子内の微細重複を同定した。T-LRS で得られた情報をもとに切断点を同定するためのプライマーを設計し、サンガー法により切断点を同定した。