

難病領域の単一遺伝子性疾患に対する全ゲノム解析

横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学・松本直通

研究活動

2010-2013年度網羅的遺伝子解析拠点（厚生労働省難治性疾患克服事業）

2014-2016年度網羅的遺伝子解析拠点（厚生労働省難治性疾患克服事業＞AMED委託費）

2017-2019年オミックス解析拠点（AMED委託費）

2015-2017年度未診断疾患イニシアチブ（IRUD）（AMED委託費）解析センター

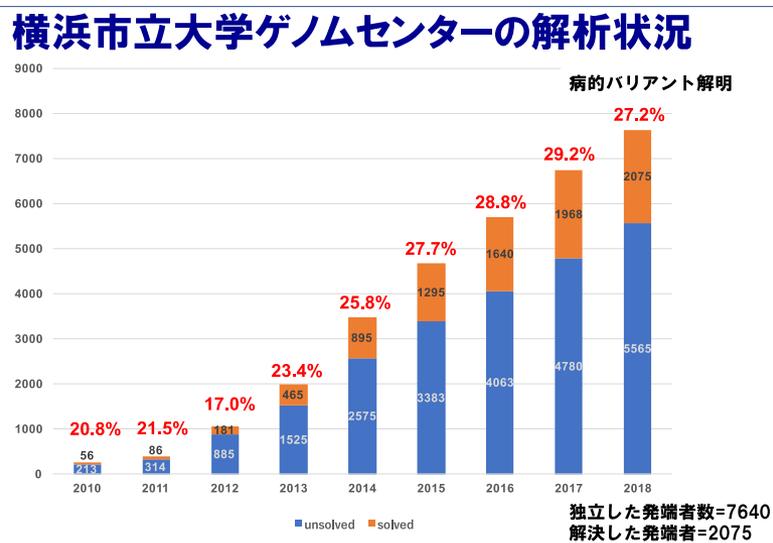
2018 -2019年度未診断疾患イニシアチブ（IRUD）（AMED委託費）解析センター

難病領域において全ゲノム医療推進の目的・必要性

-なぜ全ゲノムが必要？ -なぜ今必要？ -なぜ日本で必要？

横浜市大の希少疾患の原因説明は全エクソーム解析（WES）・世界に先駆けて50疾患の原因説明

Year	Disease	Mutated Gene	Journal	NGS
2002	Sotos syndrome	NSD1	Nat Genet	no
2004	Marfan syndrome II	TGRBR2	Nat Genet	no
2008	Ohtahara syndrome	STXBP1	Nat Genet	no
2010	Weest syndrome	SPTAN1	Am J Hum Genet	no
2010	New Ehlers-Danlos syndrome	CHST14	Hum Mut	no
2011	Microphthalmia syndrome	SMOC1	Am J Hum Genet	no
2012	Porencephaly	COL4A2	Am J Hum Genet	no
2013	Schizencephaly	COL4A1	Ann Neurol	no
2011	AR spinocerebellar ataxia	SYT14	Am J Hum Genet	yes
2011	HCAHC	POLR3A & POLR3B	Am J Hum Genet	yes
2012	Neonatal metabol decomp	UQCRC2	Hum Mut	yes
2012	Coffin-Siris syndrome	5 SWI/SNF genes	Nat Genet	yes
2012	Ohtahara syndrome	KCNQ2 (allelic)	Ann Neurol	yes
2012	Ohtahara syndrome	CASK (allelic)	Epilepsia	yes
2013	SENDA	WDR45	Nat Genet	yes
2013	Nemaline myopathy	KLHL40	Am J Hum Genet	yes
2013	SEMD-JL1	B3GAL T6	Am J Hum Genet	yes
2013	Ohtahara syndrome	GNAO1	Am J Hum Genet	yes
2014	Leigh syndrome	GYG2	Hum Genet	yes
2014	Coffin-Siris syndrome	SOX11	Nat Commun	yes
2015	Glycosylation disorder	COG2	Clin Genet	yes
2015	FCD Type IIb	MTOR (somatic)	Ann Neurol	yes
2015	Steroid-registant nephrotic syndrome	NUP107	Am J Hum Genet	yes
2015	Spinal extradural arachnoid cyst	HOXD4	Plos One	yes
2016	Axial spondylometaphyseal dysplasia	C21orf2	Plos One	yes
2016	Hypothalamic Hamartoma	OFD1 & GLI3 (somatic)	Annals of Clinical and Translational Neurology	yes
2016	Congenital glycosylation disorder	PIGG	Am J Hum Genet	yes
2016	MIRAGE syndrome	SAMD9	Nat Genet	yes
2016	Progressive neurodegeneration	TBCD	Am J Hum Genet	yes
2016	EOEE with optic atrophy	AP3P2	Am J Hum Genet	yes
2017	Pontocerebellar Hypoplasia 7	TOE1	Nat Genet	yes
2017	Weaver syndrome	SUZ12	Hum Mut	yes
2017	EOEE	CAMK2A/B	Ann Clin Transl Neurol	yes
2018	EOEE	SETD1B	Hum Genet	yes
2018	EOEE	CNPY3	Am J Hum Genet	yes
2018	Infantile-onset pulmonary alveolar proteinosis with hypogammaglobulinemia	OAS1	Am J Hum Genet	yes
2018	EOEE or MCA/ID	PPP3CA	Hum Mol Genet	yes
2018	Neurodegeneration with cerebellar hypoplasia	PMPCB	Am J Hum Genet	yes
2018	EOEE	CYFIP2	Ann Neurol	yes
2018	EOEE	ATP6V1A	Brain	yes
2018	Polymicrogyria	SCN3A	Ann Neurol	yes
2018	Neurodevelopmental disorder	FBXO11	Am J Hum Genet	yes
2018	West syndrome	PHACTR1	Brain	yes
2018	Brain small vessel disorder	COLGAL T1	Ann Neurol	yes
2018	Galloway-Mowat syndrome	NUP133	Ann Neurol	yes
2019	Neuronal nuclear inclusion disease	NTOCH2NLC	Nat Genet	yes
2019	Neurodevelopmental deficits and epilepsy	ACTL6B	Am J Hum Genet	yes
2019	46,XX and 46,XY disorders of sex development	MYRF	Hum Mol Genet	yes
2019	Skeletal dysplasia of dysosteoclerosis-Pyle disease spectrum and degenerative encephalopathy with brain malformation	CSF1R	Am J Hum Genet	yes
2019	Spastic diplegia, ID, cerebral atrophy and corpus callosum hypoplasia	MAPK8IP3	Ann Neurol	yes
2019	Syndromic neurodevelopmental disorder	SMARCD1	Am J Hum Genet	yes
2019	Neurodevelopmental disorder	POU3F3	Am J Hum Genet	yes
2019	Liberfarb syndrome	PISD	Genet Med	yes
2019	Congenital glycosylation disorder	PIGB	Am J Hum Genet	yes
2019	Hypothalamic Hamartoma	KIAA0556, PTPN11 & DYNC2H1	Neurology	yes
2019	Noonan	RRAS2	Am J Hum Genet	yes
2019	Develomenta syndrome with Marfanoid habitus	NKAP	Am J Hum Genet	yes
2019	Neuro-ectodermal phenotype	NEP (tentative) (somatic)	Submitted	yes



全エクソーム解析様々な希少遺伝性難病の原因説明を進めているが、全体の原因説明率は27.2%に留まる。

OMIM エントリー

疾患(表現型)	8977
遺伝子説明済	5670 (63.2%)
遺伝子未説明	3307 (36.8%)

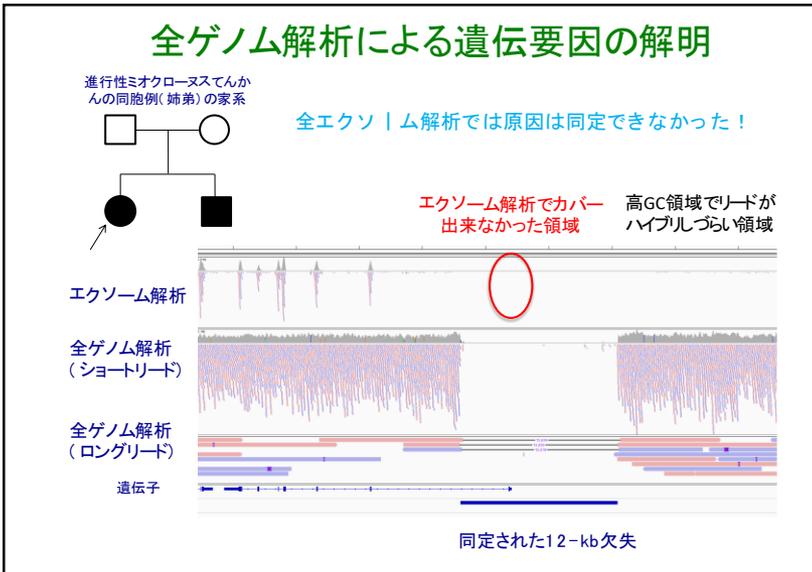
OMIM(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html>)(Sep/10/2019)

国内外でも突出した成果。13900超のWESを施行した。

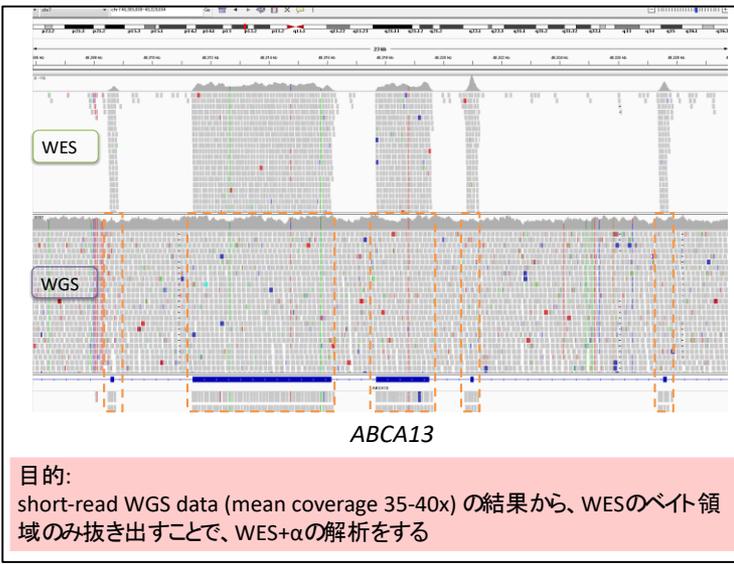
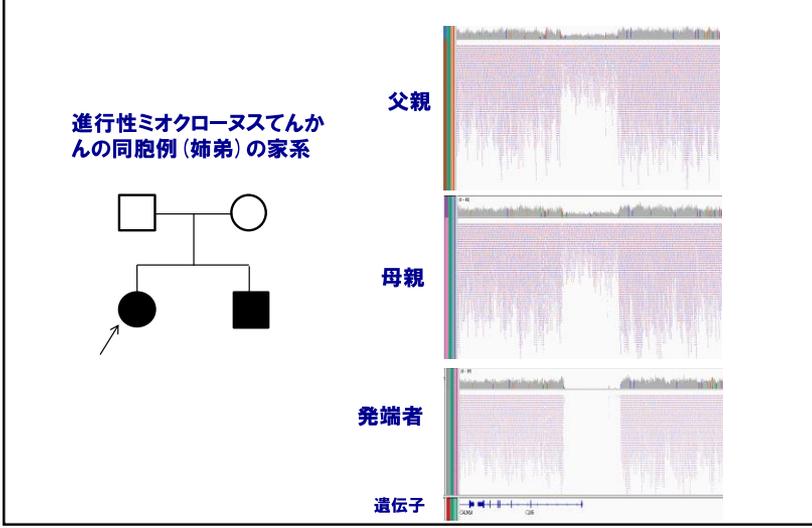
遺伝子未説明の症例は減少しない。

難病領域において全ゲノム医療推進の目的・必要性

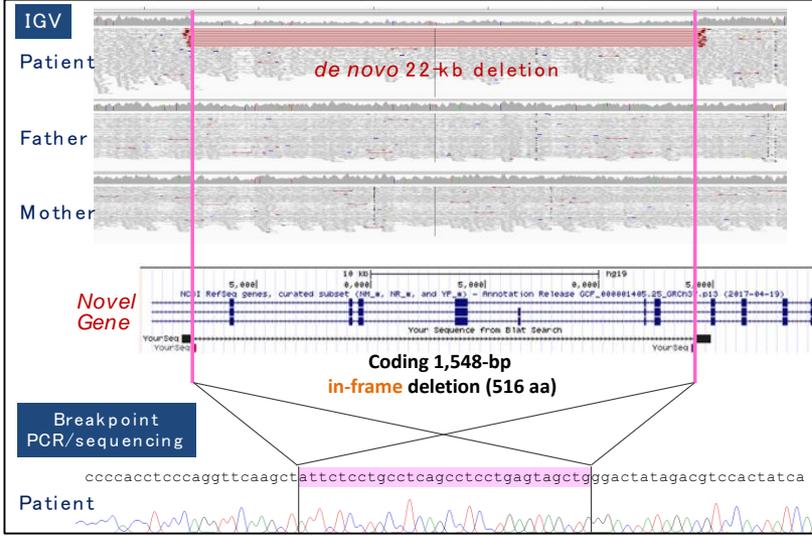
-なぜ全ゲノムが必要？ -なぜ今必要？ -なぜ日本で必要？



常染色体劣性遺伝病の原因と考えられる12kbの欠失 (ショートリードによる全ゲノム解析)



22-kbのde novo欠失を同定



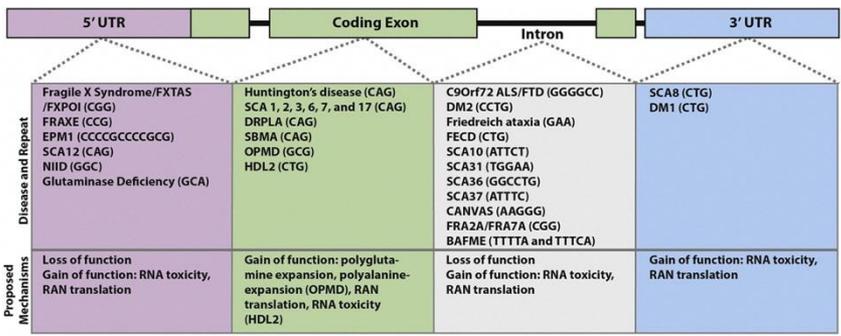
全ゲノム解析 (WGS) は、全エクソーム解析が可能な遺伝子領域の解析 + More

難病領域において全ゲノム医療推進の目的・必要性

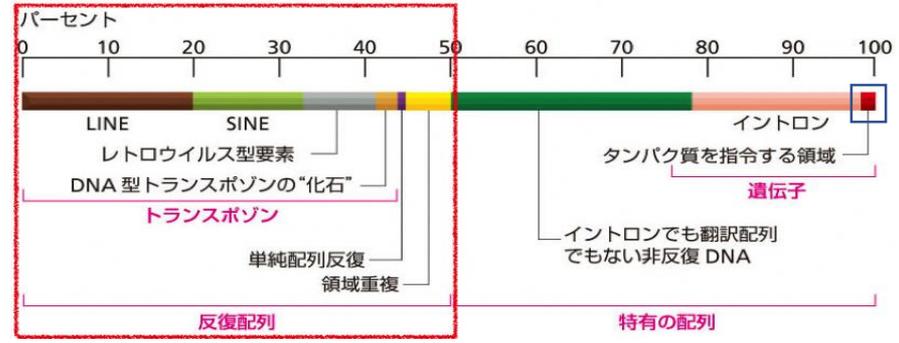
-なぜ全ゲノムが必要？ -なぜ今必要？ -なぜ日本で必要？

長鎖リードWGS vs 短鎖リードWGS

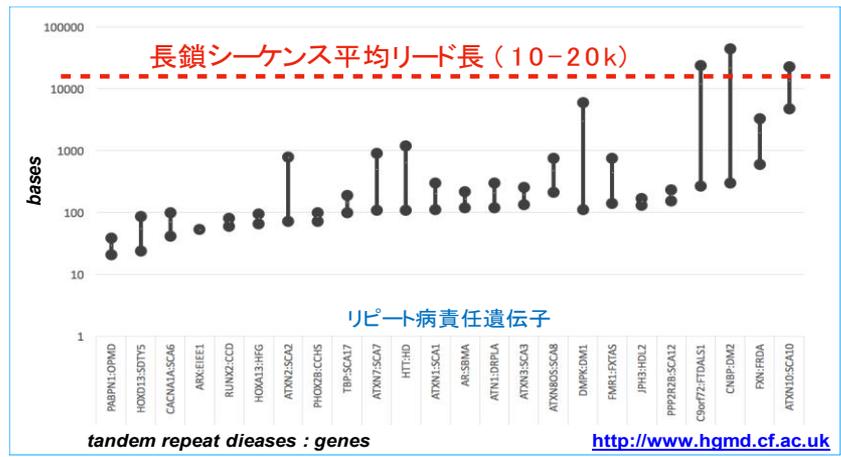
特徴	長鎖シーケンス	短鎖シーケンス
リード長	>10 kb	100-250 bp
PCR増幅	不要（1分子シーケンスのため）	必須
シーケンスの偏り	高GC領域も問題なし	高GC領域は困難
リードエラー率	高い（～85%程度の正確性）	低い
ストランドバイアス	あり（ONT）	なし
コスト	高価格	低価格



Molecular Biology of THE CELL 5th Edition
©2010 Newton Press / ©2008 Garland Science



40種類にも及ぶリピート病（神経疾患多い）



WESはゲノムの2%の領域（CDS）を見るのみ。
反復配列は実にゲノムの50%を占めるが解析対象ではない（ダークマター）

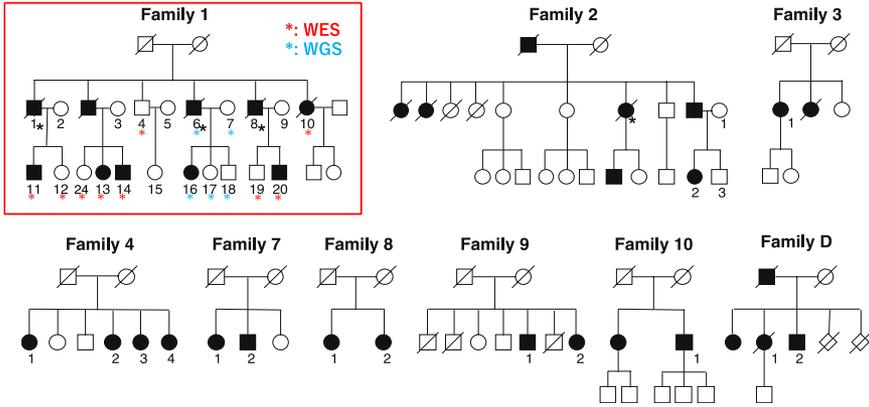
長鎖リードシーケンスで伸長した
リピートはほぼ完全にカバーできる

難病領域において全ゲノム医療推進の目的・必要性

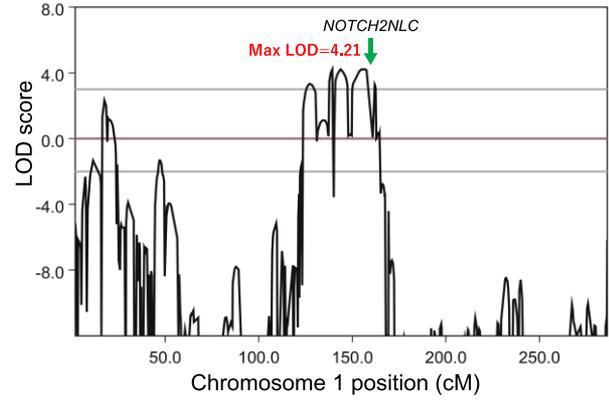
-なぜ全ゲノムが必要？ -なぜ今必要？ -なぜ日本で必要？

長鎖シーケンスで神経核内封入体病 (Nuclear Intranuclear Inclusion Disease, NIID) の原因解明

家族性NIID (9家系)



Family 1 を用いた連鎖解析 > WES/WGS で陰性



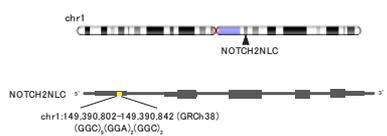
短鎖シーケンスでは同定できない部位の異常？ リpeat領域？

ロングリードシークエンスでNIID症例を解析

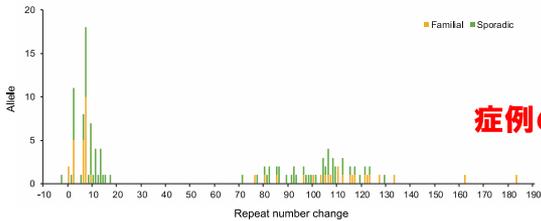
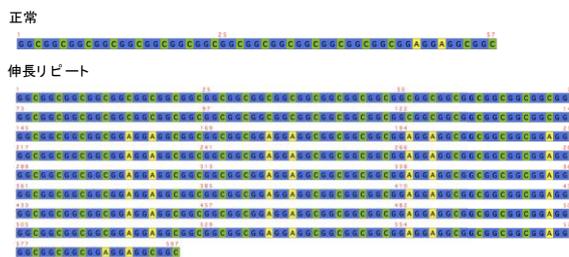
PacBio RSII: 1 症例
 ONT PromethION: 13 症例 + 4 非罹患 (8 家系例)
 全症例にNOTCH2NLCの5'領域にGGC配列の伸長

(GGC)nリpeat伸長の分布

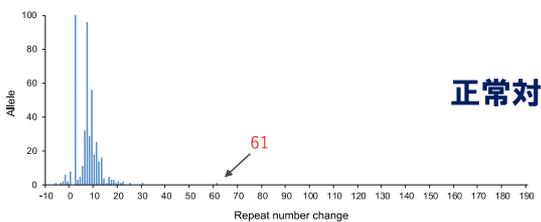
a. NOTCH2NLC 遺伝子の GGC リpeat 伸長



b. ナノポアシーケンスによるリpeat 構造の解析



症例のリpeat伸長: 71~83



正常対照のリpeat数: -6~61

難病領域において全ゲノム医療推進の目的・必要性

-なぜ全ゲノムが必要？ -なぜ今必要？ -なぜ日本で必要？

コストの観点：WES: 6万円・WGS (イルミナ) 12万円・WGS (PacBio or ONT) 24万円

イルミナ短鎖シーケンスのコストは安価になってきた (外注企業等の台頭/海外)
 大出力型長鎖シーケンサーの登場 (ONT PromethION & PacBio Sequel II)

PromethION

Sequel II



2018



2019

PromethIONは50-100 Gb/1フローセル
 Sequel IIは90 Gb/1フローセルの出力
 ヒト全ゲノム3 Gbをほぼ30xでシーケンス (24万円)
本格的始動はこれから (日本のプレゼンスが強く期待)

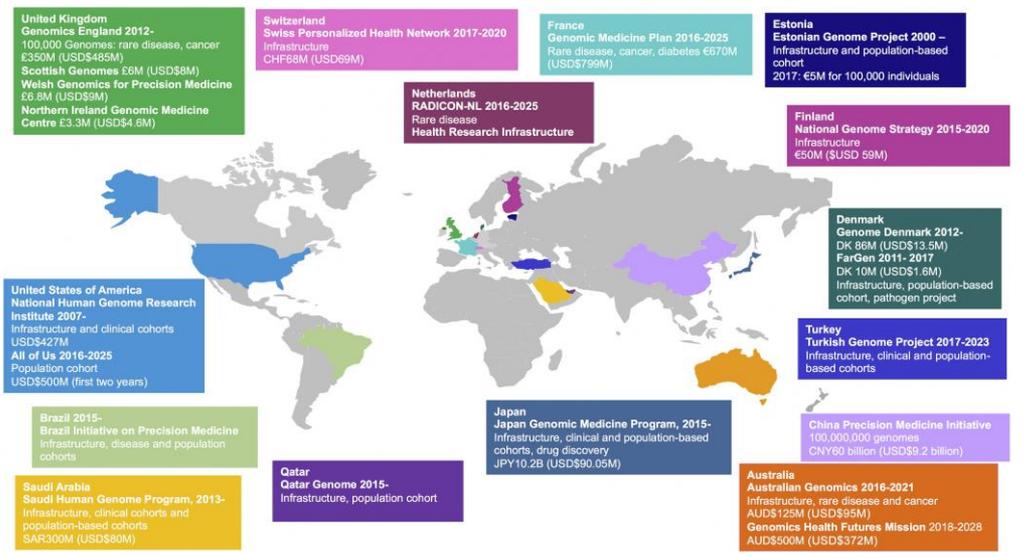
ヘルスケアに向けたゲノム解析の国際動向 (Am J Hum Genet 104: 13-20, 2019)

英：10万ゲノム (100希少疾患 + 7つの一般的な腫瘍) 2018
 500万ゲノム (2019から5年間)

仏：23.5万ゲノム/年 (希少疾患2万例 + 転移性あるいは治療抵抗性腫瘍5万例) 2020

豪：10年間でUSD 372Mを希少疾患、がん、ありふれた病気に

米：100万人のボランティアのあらゆるデータとゲノムUSD 1455M



プライベートセクター: Geisinger+Regeneron MyCode 10万人の保険加入者

難病領域において全ゲノム医療推進の目的・必要性

-なぜ全ゲノムが必要？ -なぜ今必要？ **-なぜ日本で必要？**

ヘルスケアに向けたゲノム解析の国際動向 (Am J Hum Genet 104: 13-20, 2019)

デンマーク：ガンと病原体
US\$ 13.5M に加えて
1500例ゲノム USD 1.6 M

サウジアラビア: 10万人ゲノム USD 80M

トルコ: 10万人ゲノム 2023まで

エストニア：5.2万例ゲノム加えて
10万例 USD\$ 59M (2017-)

中国: 1億ゲノム USD 9200 M

オランダ: small cohortで調査中

カタール：6000例ゲノム

スイス: USD 69M

Genomic-MedicineイニシアチブにおけるCross-Countryプロジェクトが始動

ラージデータからの発見を可能にするプロトコルの検討 (英・豪・米)
新しいシーケンスとコンピューテーション (英・仏)
臨床および表現型データの調和 (豪・英)
ありふれた疾患のバリエーションと疾患遺伝子関連 (米・英・豪)
教育関連 (豪・英)

全ゲノムのラージデータセットを前提とした新たなGenomic-Medicineの地球規模の取り組みが始まっている。なぜ日本で必要という段階でなく、ライフサイエンスや医療、産業等に当然配備する共通のモダリティーで必須の取り組みである。

対象として希少疾患（単一遺伝子病）の条件

- ・ 既知遺伝子異常が同定されている例は除外＞新たな発見には繋がらない＞全エクソーム解析のスクリーニングが終了し未解決例を優先すべき。
- ・ 全くの未解析の全ゲノム解析で既知遺伝子の異常ばかりが見つかるようでは新たな展開が困難＞ただし既知遺伝子の特殊な異常の同定には学問的意義
- ・ 超希少疾患（例えば日本に1例～数例など）を除外すべきではない＞新たな学問的・生物学的知見につながる可能性を有す＞例えばパスウェイを構成する遺伝子の異常など＞Matchmaker Exchange等を通じて国際連携の仕組みは機能するので日本で超希少例でも世界で一定数の症例を確保できる。
- ・ 症例のみの全ゲノム解析では限界があり両親の全ゲノム解析を考慮すべき＞例えば希少疾患3万症例の解析の両親は6万例でその1/2の回収率で3万例。
- ・ 例えば横浜市大オミックス解析拠点等の未解決症例は6000例以上＞両親12000例約半数は回収可能であるため12000例（6000症例と6000例の両親）のサンプルを蓄積
- ・ 10人ゲノムという枠内なら、希少遺伝性疾患で25000症例＋その両親25000例の50000ゲノム（2016からのオミックス解析全拠点・IRUD調査でWES解析は12802症例で7割が未解決とすると9000例程度が残る?）
- ・ 短鎖:長鎖シーケンスの解析を80:20程度に組み込むことが望ましい

2018年12月28日読売新聞夕刊

露の難病少女 治療順調

病因新潟で判明

寝たきり▼座れるまでに

原因不明の難病で寝たきりだったロシアの少女が、新潟市の病院を受診したことで、まれな遺伝子異常とわかり、効果的な治療にたどり着いた。今では自分で座れるまでに症状が改善した。少女と来日した母親は「日本であつた病気がわかった。娘の成長がうれい」と語った。

少女は、ロシア南部アムール州に住むビクトリア・ペリチン(12)。国立病院機構・西新潟中央病院で、年に1回の診察を受けるため、11月27日に5度目の来日をし、12月11日まで滞在した。

以前は座ることも言葉も発することもできなかったが、ベッドに腰掛けるなど、母のエリビラさん(39)に「ママ」と呼びかけ、こころ。「こんなに表情豊かになるなんて」と、主治医の小林悠三さんは喜んだ。ビクトリアさんは、1歳半で原因不明でてんかん発



ビクトリアさん(中央)は母のエリビラさん(右)と来日し、小林さんに診察を受けた。12月10日、新潟市の西新潟中央病院で。

作を起すようになった。それでも発症前までは服薬しただけで、だんだん言葉や表情の変化が現れて歩行が不安定になり、寝たきりになった。

母国で様々な検査を受けた原因がわからないなか、エリビラさんはインターネットで調べ、てんかん治療に実績のある同病院が外国人を受け入れてくれることを知った。娘を助けて



を達成して喜ぶ一騎手(28日、杉本島大撮影)

「コンビニ強盗容疑者」
 宮城県警仙台南署は27日、仙台市太白区四郎丸、同市宮戸バス運転手田健太郎容疑者(27)を強盗容疑で緊急逮捕した。

発表によると、中田容疑者は同日午前2時45分頃、同区のコンビニ店「ファミリーマート四郎丸吹上店」で、男性店員(38)に刃物を突きつけ「金を出せ」と脅し、現金11万5000円を奪った疑い。店内に客はおらず、店員にはなかつ

てもらったとて、ペン、ペンミンの一種である薬液の代用品に關する遺伝子の異常が判明。脳の働きを維持する薬液の不足を薬で補う治療が専門家によると、同じ遺伝子異常の患者は日本人で2人しか報告されていない。外国人が日本で診断されたのは初めてだった。

備留して約2か月後、小林さんから検査結果を治療薬を伝えられると、エリビラさんは原因がわかり、治療が受けられる日が来るなんて。ロシアで治療を始めた、てんかん発作は治まり、徐々に手足が動くようになった。今では自力で座り、食べ物をスプーンで口に運ぶこともできる。

同病院の遠山潤・統括診療部長は「海を越え、『わが子を治したい』という強い気持ちに応えることができた。まれな病気でも見逃さず、治療につなげられるよう努めたい」と話した。



小脳低形成の原因がFOLR1の劣性変異
 >葉酸誘導体の大量経口投与>症状の大幅改善

自治医大のAADC欠損症の遺伝子治療
 Aromatic L-amino acid decarboxylase
 ドパミン・カテコラミン・セロトニン
 合成ができない>ジストニア・不随意運動>アデノ随伴ウイルスベクターに
 夜AADC遺伝子治療>横浜市大で診断

神経核内封入体病(NIID)は60前後で
 認知症を発症する>発症前に確実な
 DNA診断>本邦の認知症集団でのスク
 リーニングによる疫学調査>発症前
 診断>発症予防措置に繋げる

Genomics Englandでの希少疾患で診断
 できることをactionableと位置づけ。
 正確な診断は診断オデッセイを防止し
 不要な医療費を削減し、適切な遺伝カ
 ウンセリングへの導き等の効果。 9

－国民への還元

- ・ 遺伝性高ステロール血症の機能獲得型PCSK9変異が知られていたが、機能喪失型変異が低LDL血症の家系に同定されPCSK9阻害薬（モノクロナル抗体）が開発
- ・ 機能喪失型変異が創薬への契機。
- ・ 超希少難病に対するカスタム治療の例（レトロトランスポゾン挿入によるCLN7スプライシング異常が原因のBatten病（10万人に対し2~4例発症）に対してアンチセンスオリゴヌクレオチド療法）：1例のためのDrug development（Science: <https://www.sciencemag.org/news/2018/10/tailormade-drug-developed-record-time-may-save-girl-fatal-brain-disease>)
- ・ 全ゲノムデータの蓄積（疾患ゲノム＋その両親）>Human Genetic Variation Database（京都データベース）やToMMOを凌駕するデータベースが構築可能。>疾患ゲノム研究の加速>症例解析への還元