

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：29-23

課題名：社会実装を目指した迅速な疾患原因遺伝子解析法の開発

主任研究者名 柳 久美子 (所属施設) 国立成育医療研究センター  
(所属・職名) ゲノム医療研究部・研究員

(研究成果の要約) ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いて確実に迅速により安価に解析する遺伝子解析方法を開発し、標準手順書を作成した。作成した手順書に従って、臨床的に原発性線毛機能不全症候群を診断された症例の遺伝子解析を行ったところ、9例中6例で原因遺伝子バリエントを特定することができた。これらの遺伝子バリエントは全てサンガーシーケンスで確認され、本手法を用いた遺伝子解析の精度が担保されていることを示した。本手法では解析遺伝子の追加、削除などに制限はなく、臨床からの需要に応えうるものとなっている。次に、リアルタイムで1分子DNAを解析することが可能な新型シーケンサーの遺伝学的解析への実用化を目指し、欠失やバリエント検出、Target cDNA シーケンスでの精度評価を行い、欠失やスプライシングパターンの検出(定性的)に強力な手段となることを明らかにした。ただし、塩基置換バリエントの検出に関しては精度向が今後の課題である。

### 1. 研究目的

従来の遺伝子解析における技術的な問題を抜本的に見直し、調べたい遺伝子を必要な領域のみ確実に迅速により安価に解析する遺伝子解析方法の開発を目指す。確立した解析方法は最終的に標準手順書(SOP)にまとめ、クリニカルシーケンスへの移行を見据えたものとする。臨床からの要望に柔軟に対応可能な汎用性のあるプロトコル開発を目指す。

### 2. 研究組織

柳久美子 国立成育医療研究センター  
要 匡 国立成育医療研究センター  
守本倫子 国立成育医療研究センター  
福原康之 国立成育医療研究センター

### 3. 研究成果

ライブラリ調製からシーケンスデータ解析までの全ステップで迅速化をはかるために、PCR増幅に適する品質のDNAを数分程度で抽出するための低浸透圧DNA抽出法を開発した。次に、Long PCRのマルチプレックス反応化の至適条件を検討し、1つのチューブ内で2~3領域(のべ増幅領域30~45 Mb)を同時に増幅する系を確立した。さらに、シーケンスデータからバリエント検出まで

自動化するための解析パイプラインの構築を行い、解析時間短縮を図ることができた。全解析工程の標準手順書を作成し、臨床的に原発性線毛機能不全症候群を診断された症例の遺伝子解析を行ったところ、9例中6例で原因遺伝子バリエントを特定することができた。これらのバリエントは全て、サンガーシーケンスでも検出され、精度よく遺伝子バリエントを検出できることを確認した。また、数キロ程度のごく低頻度のバリエントの検出にも対応可能であることを示した。ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた解析プロトコル開発は、ほぼ計画どおりに開発することができた。今後の課題として、既存データベースに登録されているバリエント情報(SNPおよび病的バリエント情報)と組み合わせることで、検出バリエントの病的意義判定まで対応した解析パイプラインに強化したい。

最新型ポータブルシーケンサーをヒトの遺伝学的解析に応用する例はまだ多くない。そこで、様々な欠失バリエントや、cDNAシーケンスでの精度評価を行い、最新型ポータブルシーケンサーでは、欠失やスプライシングパターンの検出(定性的)に強力な手段となることを示した。ただし、1塩基置換バリエント検出には精度の面で課題が

残った。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成 20 年 12 月改訂、文部科学省・厚生労働省・経済産業省）及び「臨床研究に関する倫理指針」（平成 21 年 4 月、厚生労働省）に沿って実施する。