

# 総説：遺伝性疾患

イルミナテクノロジーを使用した研究論文の概要

## 目次

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| はじめに .....                      | 3  |
| 概説 .....                        | 4  |
| 疾患カテゴリー .....                   | 5  |
| 希少疾患およびメンデル遺伝性疾患 .....          | 5  |
| 複合性疾患 .....                     | 8  |
| ミトコンドリア病 .....                  | 11 |
| エピジェネティクス疾患およびインプリンティング疾患 ..... | 12 |
| 診断未確定の遺伝性疾患 .....               | 14 |
| 性と生殖に関する健康 .....                | 16 |
| 保因者検査 .....                     | 16 |
| 出生前診断 .....                     | 17 |
| 新生児診断 .....                     | 20 |
| 遺伝子変異のタイプ .....                 | 20 |
| <i>De novo</i> 変異 .....         | 20 |
| 構造変異 .....                      | 22 |
| 解析手法 .....                      | 25 |
| ゲノムベースの解析 .....                 | 25 |
| トランスクリプトーム解析 .....              | 26 |
| 細胞遺伝学 .....                     | 27 |
| パスウェイ解析 .....                   | 28 |
| 参考文献一覧 .....                    | 30 |

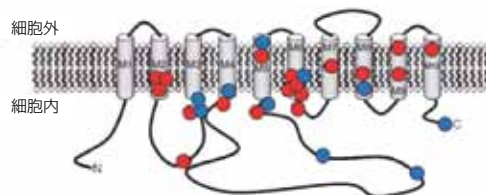
## はじめに

次世代シーケンサーテクノロジー<sup>1</sup>は、メンデル遺伝性疾患および希少疾患の原因解明に著しい成功を収めてきました。メンデル型遺伝の研究には、2名以上の非血縁患者または少なくとも1家系での連鎖の証拠を要します。近年の研究では次世代シーケンサーを用いて、1名の患者からでも希少な遺伝子疾患の原因が同定されています<sup>2, 3</sup>。複合性疾患は、遺伝、環境および生活様式などの要因が重なって起こります。複合性疾患には、アルツハイマー病、強皮症、喘息、パーキンソン病、多発性硬化症、骨粗鬆症、結合組織疾患、腎臓病、自己免疫疾患、その他多くの疾患があります<sup>4, 5</sup>。臨床の場で診断が確定しない遺伝性疾患においては、*de novo*変異がその根底原因になっている可能性について認識が高まっています。通常このような患者は多様な臨床症状を呈し、メンデル遺伝性疾患を前提として作られた診断ツールでは診断が確定されません。

次世代シーケンサーは、患者のゲノムを個人ごとに客観的に解析し、疾患原因となる可能性を持つ変異を検出できるツールとして、高い関心を集めています。次世代シーケンサーは新規突然変異またはペネトランスの高い希少疾患の発見に最適ですが、同時に複合性疾患の解明において長年待ち望まれていたブレイクスルーをもたらす可能性を持っています。加えて、判断が難しい臨床症状の解釈に、共通の標準化されたアプローチを提供するという大きな利点があります<sup>6</sup>。

遺伝子診断にまつわる倫理的な問題については幅広く議論が行われていますが<sup>7</sup>、本稿では触れません。端的に述べると、疾患の家族歴によって患者の疾患リスクがかなり明らかになる一方、シーケンス解析の詳細な特性および結果の解釈に関する曖昧さに懸念が寄せられています。遺伝性疾患に対する理解が深まり、遺伝子診断が日常的なものになるにつれ、そのような懸念が払拭され、患者が画期的なテクノロジーの恩恵を受けられるようになることが望まれます。

イルミナのシーケンスおよびマイクロアレイテクノロジーについての詳細は[www.illumina.co.jp](http://www.illumina.co.jp)を参照してください。



**1遺伝子から2種の病状。**ATP1A3遺伝子内の*denovo*変異およびコードされたタンパク質の変異は、小児交互性片麻痺AHC（赤色）および急性発症型ジストニア・パーキンソニズムDYT12（青色）に関与しています。次世代シーケンサーにより、我々の遺伝子疾患の捉え方が変わりつつあります。Heinzen et al. (2012) Nat Genet.

<sup>1</sup> Next Generation Sequencing (NGS) and Massively Parallel Sequencing MPS are often used interchangeably to refer to high throughput sequencing technologies. Sequencing by Synthesis (SBS) refers specifically to Illumina sequencing technology.

<sup>2</sup> Worthey, E. A., Mayer, A. N., Syverson, G. D., Helbling, D., Bonacci, B. B., et al. (2011) Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med* 13: 255 - 262

<sup>3</sup> Choi, M., Scholl, U. I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I. R., et al. (2009) Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19096 - 19101

<sup>4</sup> Hunter, D. J. (2005) Gene - environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 6: 287 - 298

<sup>5</sup> Dempfle, A., Scherag, A., Hein, R., Beckmann, L., Chang - Claude, J., et al. (2008) Gene - environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Genet* 16: 1164 - 1172

<sup>6</sup> Need, A. C., Shashi, V., Hitomi, Y., Schoch, K., Shianna, K. V., et al. (2012) Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet* 49: 353 - 361

<sup>7</sup> Chadwick, R. (2011) Personal genomes: no bad news? *Bioethics* 25: 62 - 65

以下の参考文献は、次世代シーケンサーおよびその診断への応用の可能性について紹介している概説です。

**Bras, J., Guerreiro R. and Hardy J. (2012) Use of next - generation sequencing and other whole - genome strategies to dissect neurological disease. Nat Rev Neurosci 13: 453 - 464**

この文献は、神経疾患の研究における次世代シーケンサー使用の成功事例および制約に関して、広範囲にわたり概説しています。

**Green, E. D., Guyer M. S. and National Human Genome Research I. (2011) Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. Nature 470: 204 - 213**

この論文は最近NIHから発表されたもので、ゲノミクスの将来展望を述べています。ゲノム医療の時代に向けて次世代シーケンサーの進む道および必須要件について記述されています。またその必須要件には、ゲノミクスに基づいた診断のルーチン化、疾患における遺伝的な要素の解明、がんゲノム特性の網羅的な解析、臨床における実用的なゲノムインフォマティクスのシステム開発、および健康や疾患におけるヒトマイクロバイオームの役割の解明が挙げられています。

**Maxmen, A. (2011) Exome sequencing deciphers rare diseases. Cell 144: 635 - 637**

この文献はNIHの未診断疾患プログラム (Undiagnosed Diseases Program) のプロGRESSレポートです。未診断疾患プログラムは臨床の現場にゲノミクスを持ち込むことから始まり、39の希少疾患の診断につながりました。これは、次世代シーケンサーの将来的な臨床応用を示唆する事例です。多くの点で、現在の臨床的アプローチでは解明できない疾患を次世代シーケンサーによって理解するモデルケースと捉えることができます。

**Majewski, J., Schwartzenruber J., Lalonde E., Montpetit A. and Jadoo N. (2011) What can exome sequencing do for you? J Med Genet 48: 580 - 589**

この文献では、ヒト疾患の全エクソームシーケンスに関して、現在および将来における次世代シーケンサーの使用について概説しています。著者らはエクソームシーケンスの性能、制約および倫理的問題に焦点を合わせています。



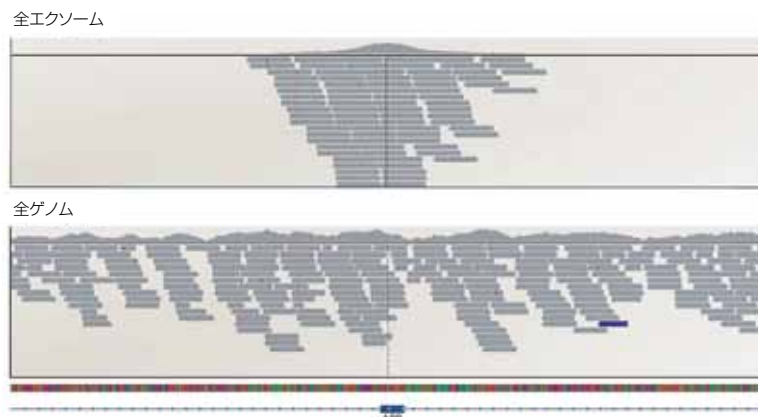
## 疾患カテゴリー

### 希少疾患およびメンデル遺伝性疾患

希少疾患は生涯にわたる疾患で、遺伝的な要素を持つ可能性があり、米国には200,000名弱の患者がいます<sup>8</sup>。現在の臨床診療において、遺伝子診断は確認検査であり、患者本人あるいは両親との対話によって臨床的な症候群が確定した後に実施されています<sup>9</sup>。典型的なケースでは、疾患への関与が疑われる遺伝子を増幅し、サンガー法によるシーケンスを行います。その結果、シーケンスを行った領域に存在する変異については確固とした記述が得られます。しかし、疑われた共通の原因を最初に除外しなければならない場合、希少遺伝性疾患の患者にとって診断までは長い道のりとなります。*De novo*変異が希少遺伝性疾患の原因になっている可能性について認識が高まることにより、これらの疾患に対する捉え方も大きく変化しています<sup>10</sup>。

メンデル遺伝性疾患は通常、疾患の原因となりうる単一遺伝子の変異で定義され、その変異はメンデルの法則に従って遺伝します。Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) データベースには、これらの疾患原因遺伝子および遺伝性疾患の全てが登録されています<sup>11</sup>。

希少疾患およびメンデル遺伝性疾患において、エクソームシーケンスは遺伝的な異常を同定するのに効果的な手法として確立されつつあります。メンデル遺伝性疾患の原因となる変異は、その85%が、ゲノムの約1~1.5%を占めるエクソン領域に存在すると推定されています<sup>12</sup>。エクソームシーケンスを行っても診断が確定しなかった場合には、全ゲノムシーケンスを行います。エクソームシーケンスというアプローチをとることで、臨床症状が曖昧な場合であっても分子診断によって診断される患者数が大幅に増えると期待できます<sup>13</sup>。



エクソームシーケンスはコスト効率がよく、またターゲット領域を深い深度でカバーします。このため解析がよりシンプルであり、非常に信頼性の高い結果を得られます。変異領域がエクソーム外に存在する場合には、全ゲノムシーケンスを行うことでゲノムの全体像を得られます。アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子の1つのエクソンについて、全エクソームシーケンスおよび全ゲノムシーケンスの典型的な結果を示します。J. Bras et al. (2012). Nat Rev Neurosci 13:453-64より。

<sup>8</sup> <http://rarediseases.info.nih.gov>

<sup>9</sup> Raffan, E. and Semple, R. K. (2011) Next generation sequencing -- implications for clinical practice. Br Med Bull 99: 53 - 71

<sup>10</sup> Ku, C. S., Polychronakos, C., Tan, E. K., Naidoo, N., Pawitan, Y., et al. (2012) A new paradigm emerges from the study of *de novo* mutations in the context of neurodevelopmental disease. Mol Psychiatry

<sup>11</sup> <http://omim.org/>

<sup>12</sup> Majewski, J., Schwartzenuber, J., Lalonde, E., Montpetit, A. and Jabado, N. (2011) What can exome sequencing do for you? J Med Genet 48: 580 - 589

<sup>13</sup> Maxmen, A. (2011) Exome sequencing deciphers rare diseases. Cell 144: 635 - 637

総説：

**Lines, M. A., Huang L., Schwartzentruber J., Douglas S. L., Lynch D. C., et al. (2012) Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. Am J Hum Genet 90: 369 - 377**

著者らは、非血縁患者4名を対象に全エクソームシーケンスを行い、4名全員でEFTUD2におけるヘテロ変異を同定しました。EFTUD2にコードされるタンパク質は、高度に保存されたスプライセオソームGTPアーゼであり、スプライセオソームの主要な調節的役割を果たします。

**イルミナ技術：**HiSeq 2000システムによるエクソームシーケンス（100bpペアエンドリード）、サンプルあたり12Gb以上のデータを産出

**Zankl, A., Duncan E. L., Leo P. J., Clark G. R., Glazov E. A., et al. (2012) Multicentric carpotarsal osteolysis is caused by mutations clustering in the amino - terminal transcriptional activation domain of MAFB. Am J Hum Genet 90: 494 - 501**

著者らは、多中心性の手根足根骨溶解症（MCTO）の非血縁患者5名において、MAFB遺伝子の1つのエクソンの51塩基対領域に集中して存在するミスセンス変異を同定しました。さらにこれと同じ領域において、単純型MCTOの非血縁患者6名および常染色体優性遺伝MCTOの2家系内の罹患者も、これまで報告されていなかった変異をヘテロで有していました。MAFBがコードする転写調節因子はRANKLによって誘導される破骨細胞形成を負に制御し、また正常な腎臓の発生に不可欠なものです。

**イルミナ技術：**Genome Analyzer<sub>II</sub>による56bpペアエンドリードのエクソームシーケンス

**Polvi, A., Linnankivi T., Kivela T., Herva R., Keating J. P., et al. (2012) Mutations in CTC1, encoding the CTS telomere maintenance complex component 1, cause cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts. Am J Hum Genet 90: 540 - 549**

著者らは石灰化と嚢胞を伴う脳網膜微血管症（CRMCC）の非血縁患者4名で、CTC1遺伝子内に、劣性遺伝性の複合ヘテロ変異を発見しました。CTC1はCTS telomere maintenance complex component 1をコードします。サンガーシーケンスにより、さらに8名の非血縁患者において、新たに7か所の複合ヘテロ変異が明らかにされました。

**イルミナ技術：**Genome Analyzer<sub>IIx</sub>による100bpペアエンドのエクソームシーケンス

**Hood, R. L., Lines M. A., Nikkel S. M., Schwartzentruber J., Beaulieu C., et al. (2012) Mutations in SRCAP, encoding SNF2 - related CREBBP activator protein, cause Floating - Harbor syndrome. Am J Hum Genet 90: 308 - 313**

著者らは、散発性フローティングハーバー症候群（FHS）の非血縁患者5名において、SRCAP内にヘテロ接合型の短縮型変異を発見しました。サンガーシーケンスにより、さらに8名の患者でSRCAPの変異が同定されました。両親のDNAを解析できた6例においては、全てが*de novo*変異でした。SRCAPはSNF2関連クロマチンリモデリング因子で、CREB結合タンパク質（CREBBP、CBPという名称でよく知られており、ルビンシュタイン・テイビ症候群 [RTS] の主な原因）のコアクチベーターとして働きます。

**イルミナ技術：**HiSeq 2000による100bpペアエンドのエクソームシーケンス、データ産出量35~40Gb

**Ostergaard, P., Simpson M. A., Mendola A., Vasudevan P., Connell F. C., et al. (2012) Mutations in KIF11 cause autosomal - dominant microcephaly variably associated with congenital lymphedema and chorio-retinopathy. Am J Hum Genet 90: 356 - 362**

全エクソームシーケンスにより、ヘテロ接合型のKIF11変異が、小頭症およびリンパ浮腫を併発した患者3名において明らかになりました。さらに、リンパ浮腫または脈絡網膜症の一方あるいは両方を伴う非血縁の15名の小頭症発端者においてKIF11のシーケンスを行ったところ、そのうち12名の患者で新たなヘテロ接合型の変異が同定されました。

**イルミナ技術：**Genome Analyzer<sub>IIx</sub>による76bpペアエンドのエクソームシーケンス

- Audo, I., Bujakowska K., Orhan E., Poloschek C. M., Defoort-Dhellemmes S., et al. (2012) Whole-exome sequencing identifies mutations in GPR179 leading to autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *Am J Hum Genet* 90: 321-330
- Gibson, W. T., Hood R. L., Zhan S. H., Bulman D. E., Fejes A. P., et al. (2012) Mutations in EZH2 cause Weaver syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 110-118
- Huppke, P., Brendel C., Kalscheuer V., Korenke G. C., Marquardt I., et al. (2012) Mutations in SLC33A1 cause a lethal autosomal-recessive disorder with congenital cataracts, hearing loss, and low serum copper and ceruloplasmin. *Am J Hum Genet* 90: 61-68
- Johnston, J. J., Gropman A. L., Sapp J. C., Teer J. K., Martin J. M., et al. (2012) The phenotype of a germline mutation in PIGA: the gene somatically mutated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hum Genet* 90: 295-300
- Jones, M. A., Ng B. G., Bhide S., Chin E., Rhodenizer D., et al. (2012) DDOST mutations identified by whole-exome sequencing are implicated in congenital disorders of glycosylation. *Am J Hum Genet* 90: 363-368
- Lee, H., Graham J. M., Jr., Rimoin D. L., Lachman R. S., Krejci P., et al. (2012) Exome sequencing identifies PDE4D mutations in acrodysostosis. *Am J Hum Genet* 90: 746-751
- Lim, Y. M., Koh I., Park Y. M., Kim J. J., Kim D. S., et al. (2012) Exome sequencing identifies KIAA1377 and C5orf42 as susceptibility genes for monomelic amyotrophy. *Neuromuscul Disord* 22: 394-400
- Michot, C., Le Goff C., Goldenberg A., Abhyankar A., Klein C., et al. (2012) Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *Am J Hum Genet* 90: 740-745
- Sorte, H., Morkrid L., Rodningen O., Kulseth M. A., Stray-Pedersen A., et al. (2012) Severe ALG8-CDG (CDG-Ih) associated with homozygosity for two novel missense mutations detected by exome sequencing of candidate genes. *Eur J Med Genet* 55: 196-202
- Velinov, M., Dolzhanskaya N., Gonzalez M., Powell E., Konidari I., et al. (2012) Mutations in the gene DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease in a proportion of cases: study of the Parry family and 8 other families. *PLoS ONE* 7: e29729

## 複合性疾患

大部分の遺伝性疾患はこのカテゴリーに分類されます。アルツハイマー病、強皮症、喘息、パーキンソン病、多発性硬化症、骨粗鬆症、結合組織疾患、腎臓病、自己免疫疾患、その他多くの疾患が例として挙げられます<sup>14, 15, 16</sup>。また、これらの疾患に関するGWAS研究の結果は完全に目録化されデータベースに収められています<sup>17, 18</sup>。ほとんどの場合、これらの複合性疾患の原因となるのは遺伝的要因、環境要因、および生活要因の組み合わせです。このような疾患の研究および治療にあたっては、全ての要因を考慮に入れる必要があります。

次世代シーケンサーは複合性疾患の研究に必要な手法を包括的に提供します。全ゲノムシーケンスおよびエクソームシーケンスにトランスクリプトームシーケンス (RNA-Seq) を組み合わせ、発現レベルを測定し、変異トランスクリプトおよびスプライスバリエントが発現しているか調べることができます。これらのツールの組み合わせによって、複合性疾患を研究するための総合的なアプローチが提供されます。

<sup>14</sup> Hunter, D. J. (2005) Gene - environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 6: 287 - 298

<sup>15</sup> Dempfle, A., Scherag, A., Hein, R., Beckmann, L., Chang - Claude, J., et al. (2008) Gene - environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Genet* 16: 1164 - 1172

<sup>16</sup> Johnson, A. D. and O' Donnell, C. J. (2009) An open access database of genome - wide association results. *BMC Med Genet* 10: 6

<sup>17</sup> <http://www.genome.gov/gwastudies/>

<sup>18</sup> <https://www.gwascentral.org/>

## 総説：

Bras, J., Guerreiro R. and Hardy J. (2012) Use of next-generation sequencing and other whole-genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 13: 453-464

Casals, F., Idaghmour Y., Hussin J. and Awadalla P. (2012) Next-generation sequencing approaches for genetic mapping of complex diseases. *J Neuroimmunol* 248: 10-22

Ku, C. S., Cooper D. N., Wu M., Roukos D. H., Pawitan Y., et al. (2012) Gene discovery in familial cancer syndromes by exome sequencing: prospects for the elucidation of familial colorectal cancer type X. *Mod Pathol* 25: 1055-1068

## 参考文献：

**Tennessen, J. A., Bigham A. W., O' Connor T. D., Fu W., Kenny E. E., et al. (2012) Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science* 337: 64 - 69**

この研究では、ヨーロッパ系およびアフリカ系の2,440名において15,585遺伝子のシーケンスが行われました。500,000個を超すSNVのうち大部分はレアバリエーション（86%がマイナーアレル頻度<0.5%）、新規バリエーション（82%）、および集団特異的バリエーション（82%）でした。平均すると、機能的に重要だと予想されるSNVの約95.7%がレアバリエーションでした。

**イルミナ技術：** Genome AnalyzerIlluminaまたはHiSeq 2000による、76bpまたは50bpのペアエンドリード

**Kiezun, A., Garimella K., Do R., Stitzel N. O., Neale B. M., et al. (2012) Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nat Genet* 44: 623 - 630**

著者らは、438名から得たエクソームシーケンスのデータを解析し、それに基づいて、シーケンスの生データ解析プロセスおよびクオリティコントロールを再検討し、エクソームシーケンス研究の統計的性質を評価しました。その結果、複雑な形質の遺伝的基盤の研究においてエクソームシーケンスが脚光を浴びている一方、その解析には慎重を要すると結論しています。その理由として、十分な統計学的検出力を得るにはおよそ10,000検体以上の解析を要するという見解を述べています。

**イルミナ技術：** Genome Analyzerによるエクソームシーケンス



## ゲノムワイド関連解析 (GWAS)

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) 研究は、心疾患、糖尿病、自己免疫疾患および精神疾患といった一般的な複合性疾患と、患者間で共通する一塩基多型 (SNP) との相関を解析するために設計されました<sup>19</sup>。GWAS研究から多くの科学的小および生物学的発見が得られたものの、大部分の遺伝力は説明できませんでした<sup>20, 21</sup>。全てのヒト疾患において、個人的または集団的な遺伝力の大部分を共通のリスクバリエーションで説明できるという前提は、これらの疾患の複雑性を説明するには適切でない可能性があります。GWAS研究のために開発された大規模コホートおよび厳密な統計解析手法は、今後、次世代シーケンサーのような新しいテクノロジーを用いた研究に役立つと考えられます。大規模コホートの全ゲノムシーケンスを手頃なコストで実施できるようになれば、新たな遺伝子、パスウェイ、および生物学的知見を発掘するとともに原因変異を発見できる可能性を生むと考えられます<sup>22</sup>。

| 疾患または特性       | これまでのGWASで得られた関連 SNPの組み合わせで説明できる割合 (%) |
|---------------|--|
| 1型糖尿病         | 60 (GWAS以前に明らかになった影響をもつ遺伝子座を含む)        |
| 2型糖尿病         | 5~10                                   |
| 肥満 (BMI)      | 1~2                                    |
| クローン病         | 10                                     |
| 潰瘍性大腸炎        | 5                                      |
| 多発性硬化症        | 10                                     |
| 強直性脊椎炎        | 20                                     |
| 統合失調症         | 1                                      |
| 双極性障害         | 2                                      |
| 乳がん           | 8                                      |
| フォン・ヴィレブランド因子 | 13                                     |
| 身長            | 10                                     |
| 骨ミネラル濃度       | 5                                      |
| QT間隔          | 7                                      |
| HDLコレステロール    | 10                                     |
| 血小板数          | 5~10                                   |

From P. M. Visscher, M. A. Brown, et al. (2012) Five years of GWAS discovery. Am J Hum Genet 90:7-24.

### 総説:

Krueger, F., Kreck B., Franke A. and Andrews S. R. (2012) DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. Nat Methods 9: 145-151

Visscher, P. M., Brown M. A., McCarthy M. I. and Yang J. (2012) Five years of GWAS discovery. Am J Hum Genet 90: 7-24

Cirulli, E. T. and Goldstein D. B. (2010) Uncovering the roles of rare variants in common disease through wholegenome sequencing. Nat Rev Genet 11: 415-425

Ku, C. S., Loy E. Y., Pawitan Y. and Chia K. S. (2010) The pursuit of genome-wide association studies: where are we now? J Hum Genet 55: 195-206

<sup>19</sup> A Catalog of Published Genome - Wide Association Studies. Available at: [www.genome.gov/gwastudies](http://www.genome.gov/gwastudies)

<sup>20</sup> McClellan, J. and King, M. C. (2010) Genetic heterogeneity in human disease. Cell 141: 210 - 217

<sup>21</sup> Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorf, L. A., et al. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. Nature 461: 747 - 753

<sup>22</sup> Visscher, P. M., Brown, M. A., McCarthy, M. I. and Yang, J. (2012) Five years of GWAS discovery. Am J Hum Genet 90: 7 - 24

## 参考文献：

- International Stroke Genetics, C., Wellcome Trust Case Control C., Bellenguez C., Bevan S., Gschwendtner A., et al. (2012) Genome - wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke. *Nat Genet* 44: 328 - 333
- Manning, A. K., Hivert M. F., Scott R. A., Grimsby J. L., Bouatia - Najj N., et al. (2012) A genome - wide approach accounting for body mass index identifies genetic variants influencing fasting glycemic traits and insulin resistance. *Nat Genet* 44: 659 - 669
- Sasayama, D., Hiraishi A., Tatsumi M., Kamijima K., Ikeda M., et al. (2012) Possible association of CUX1 gene polymorphisms with antidepressant response in major depressive disorder. *Pharmacogenomics J*
- Sobrin, L., Ripke S., Yu Y., Fagerness J., Bhangale T. R., et al. (2012) Heritability and Genome - Wide Association Study to Assess Genetic Differences between Advanced Age - Related Macular Degeneration Subtypes. *Ophthalmology*
- Sun, L., Rommens J. M., Corvol H., Li W., Li X., et al. (2012) Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 44: 562 - 569

## ミトコンドリア病

ミトコンドリア病はミトコンドリアの機能異常が原因となって起こる疾患で、ミトコンドリア病の患者では200種類を超える様々な分子欠損が報告されています<sup>23</sup>。これらの異常の原因として、ミトコンドリアゲノム (mtDNA) 内、またはミトコンドリアのコンポーネントをコードする核内遺伝子内における、偶発性または遺伝性の突然変異の存在が考えられます。mtDNAがコードするのは、呼吸鎖複合体のうち13種のタンパク質のみであり、1,500種と予測されているミトコンドリアタンパク質の大部分は核内遺伝子によってコードされています。ミトコンドリアの欠損症は、しばしば複数の組織に影響を及ぼし、やがて多様な表現型を示す多臓器疾患を引き起こします<sup>24</sup>。このような特性、また候補遺伝子の多さおよび臨床症状の多様性から、ミトコンドリア病は診断が困難であることでよく知られています<sup>25</sup>。

ターゲットを絞った次世代シーケンサーは、ミトコンドリアゲノムをシーケンスするのに非常に効果的なアプローチです。ターゲットシーケンスにより、ディープシーケンスが可能となり、低レベルのヘテロプラスミーを検出できます。

## 総説：

- Chinnery, P. F., Elliott H. R., Hudson G., Samuels D. C. and Relton C. L. (2012) Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol* 41: 177 - 187

<sup>23</sup> Chinnery, P. F., Elliott, H. R., Hudson, G., Samuels, D. C. and Relton, C. L. (2012) Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol* 41: 177 - 187

<sup>24</sup> Scharfe, C., Lu, H. H., Neuenburg, J. K., Allen, E. A., Li, G. C., et al. (2009) Mapping gene associations in human mitochondria using clinical disease phenotypes. *PLoS Comput Biol* 5: e1000374

<sup>25</sup> Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., et al. (2012) Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next - generation sequencing. *Sci Transl Med* 4: 118ra110

## 参考文献：

**Calvo, S. E., Compton A. G., Hershman S. G., Lim S. C., Lieber D. S., et al. (2012) Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next - generation sequencing. *Sci Transl Med* 4: 118ra110**

著者らはミトコンドリアDNA (mtDNA) およびミトコンドリアタンパク質をコードする約1,000の核内遺伝子のエクソムの「MitoExome」シーケンスを行いました。ミトコンドリア酸化的リン酸化障害の臨床的証拠および生化学的証拠を有する、血縁のない乳児42名のうち、10名 (24%) の患者で診断を確定することができ、これらの患者ではこれまでに疾患との関連が知られていた遺伝子で変異が見つかりました。13名 (31%) の患者では、これまで疾患と関連付けられていなかった核内遺伝子に変異が存在しました。

**イルミナ技術：** Genome Analyzer<sub>II</sub> による76bpペアエンドリードのエクソームシーケンス

Mayr, J. A., Haack T. B., Graf E., Zimmermann F. A., Wieland T., et al. (2012) Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 314-320

Gunnarsdottir, E. D., Li M., Bauchet M., Finstermeier K. and Stoneking M. (2011) High-throughput sequencing of complete human mtDNA genomes from the Philippines. *Genome Res* 21: 1-11

Mayr, J. A., Zimmermann F. A., Fauth C., Bergheim C., Meierhofer D., et al. (2011) Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation. *Am J Hum Genet* 89: 792-797

Pierson, T. M., Adams D., Bonn F., Martinelli P., Cherukuri P. F., et al. (2011) Whole-exome sequencing identifies homozygous AFG3L2 mutations in a spastic ataxia-neuropathy syndrome linked to mitochondrial m-AAA proteases. *PLoS Genet* 7: e1002325

## ヘテロプラスミー

ほとんどの真核細胞には数百ものミトコンドリアと数百コピーのmtDNAが存在します。ヘテロプラスミーは、mtDNAの一部のコピーでのみ変異が起こり、残りのコピーには変異がないときに起きる現象です。ヘテロプラスミーは、ミトコンドリア病において重要な役割を果たしている可能性があります。一部のわずかなミトコンドリアのみが変異の影響を受けている場合、ヘテロプラスミーによって病状の重症度が変わる可能性があるからです。次世代シーケンサーで得られる深いカバレッジにより、低レベルのヘテロプラスミーでも容易に検出できます。次世代シーケンサーテクノロジーを活用した研究の結果、ヘテロプラスミーは従来考えられていたよりもはるかに一般的な現象であることが明らかになりました<sup>26</sup>。

Guo, Y., Cai Q., Samuels D. C., Ye F., Long J., et al. (2012) The use of next generation sequencing technology to study the effect of radiation therapy on mitochondrial DNA mutation. *Mutat Res* 744: 154-160

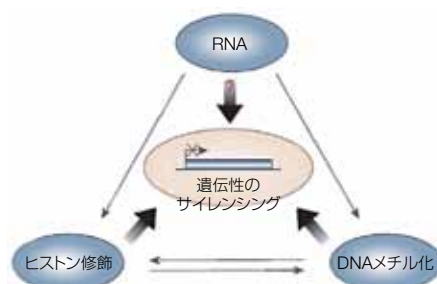
Grant, S. F., Glessner J. T., Bradfield J. P., Zhao J., Tirone J. E., et al. (2012) Lack of relationship between mitochondrial heteroplasmy or variation and childhood obesity. *Int J Obes (Lond)* 36: 80-83

Sondheimer, N., Glatz C. E., Tirone J. E., Deardorff M. A., Krieger A. M., et al. (2011) Neutral mitochondrial heteroplasmy and the influence of aging. *Hum Mol Genet* 20: 1653-1659

<sup>26</sup> He, Y., Wu, J., Dressman, D. C., Iacobuzio - Donahue, C., Markowitz, S. D., et al. (2010) Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 464: 610 - 614

## エピジェネティクス疾患およびインプリンティング疾患

エピジェネティクスとは、ゲノムDNA配列の変化を伴わない、ゲノム機能の変化を指します。エピジェネティクス機構の異常と関連付けられている疾患は、プラダー・ウィリー症候群、アンジェルマン症候群、レット症候群、ルビンシュタイン・テイビ症候群、コフィン・ローリー症候群と多岐にわたります<sup>27, 28</sup>。



遺伝性のサイレンシングにおける、RNA、ヒストン修飾、およびDNAメチル化の相互作用

### DNAメチル化

NGSテクノロジーの登場により、数々のDNAメチローム解析が1塩基の解像度で行われるようになりました<sup>29</sup>。DNAメチル化は、分化したヒトゲノムのCpGジオヌクレオチドで主に起こります。胚性幹細胞における多能性の維持には、異なるDNAメチル化機構による転写制御が使われている可能性があります<sup>30</sup>。

### ヒストン修飾

次世代シーケンサーによるChIP-Seqが開発されたことにより、ヒストン修飾のゲノムワイドなマッピングが初めて可能になりました。その結果、H3K27、H3K9、H4K20、H3K79、およびH2BKのモノメチル化という活性マークが同定されました<sup>31</sup>。また、PolIIおよびPolIIIのエピジェネティックな発現制御がマッピングされました<sup>32</sup>。これらは、ChIP-Seqから得られる情報の一例です。

### 総説：

Krueger, F., Kreck B., Franke A. and Andrews S. R. (2012) DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. *Nat Methods* 9: 145-151

Ku, C. S., Naidoo N., Wu M. and Soong R. (2011) Studying the epigenome using next generation sequencing. *J Med Genet* 48: 721-730

<sup>27</sup> Portela, A. and Esteller, M. (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28: 1057 - 1068

<sup>28</sup> Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457 - 463

<sup>29</sup> Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., et al. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315 - 322

<sup>30</sup> Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., et al. (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471: 68 - 73

<sup>31</sup> Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., et al. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823 - 837

<sup>32</sup> Barski, A., Chepelev, I., Liko, D., Cuddapah, S., Fleming, A. B., et al. (2010) Pol II and its associated epigenetic marks are present at Pol III transcribed noncoding RNA genes. *Nat Struct Mol Biol* 17: 629 - 634

## 参考文献：

**Jones, W. D., Dafou D., McEntagart M., Woollard W. J., Elmslie F. V., et al. (2012) De Novo Mutations in MLL Cause Wiedemann - Steiner Syndrome. Am J Hum Genet 91: 358 - 364**

著者らは肘部多毛症の患者6名中5名において、MLL遺伝子の *de novo* 変異を同定しました。この患者らは低身長、知的障害、および特徴的な顔貌を伴っており、ウィデマンスタイナー症候群の診断に合致します。MLLはヒストンメチルトランスフェラーゼをコードしており、この酵素はヒストンH3K4メチル化の触媒作用を通してクロマチン介在性の転写を制御します。5つの変異はそれぞれ、ヒストンメチルトランスフェラーゼの発現を途中で終止させると予想されています。

イルミナ技術：HiSeq 2000による、100bpペアエンドリードのエクソームシーケンス

**Simpson, M. A., Deshpande C., Dafou D., Vissers L. E., Woollard W. J., et al. (2012) De novo mutations of the gene encoding the histone acetyltransferase KAT6B cause Genitopatellar syndrome. Am J Hum Genet 90: 290 - 294**

著者らはGenitopatellar症候群（GPS）の患者5名において、KAT6B内に *de novo* 変異を発見しました。KAT6Bは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼのMYSTファミリーのメンバーに属するタンパク質をコードします。著者らは、患者から得た細胞において、ヒストンH3およびH4アセチル化レベルが低下していることを示しました。これはヒストンアセチル化の調節異常が、GPSアレルの機能による結果であることを示唆します。

イルミナ技術：Genome Analyzer<sub>ix</sub> によるシーケンス

Campeau, P. M., Kim J. C., Lu J. T., Schwartzentruber J. A., Abdul-Rahman O. A., et al. (2012) Mutations in KAT6B, encoding a histone acetyltransferase, cause Genitopatellar syndrome. Am J Hum Genet 90: 282-289

Freson, K., Izzi B. and Van Geet C. (2012) From genetics to epigenetics in platelet research. Thrombosis research 129: 325-329

Gordon, L., Joo J. E., Powell J. E., Ollikainen M., Novakovic B., et al. (2012) Neonatal DNA methylation profile in human twins is specified by a complex interplay between intrauterine environmental and genetic factors, subject to tissuespecific influence. Genome Res 22: 1395-1406

Li, J., Harris R. A., Cheung S. W., Coarfa C., Jeong M., et al. (2012) Genomic hypomethylation in the human germline associates with selective structural mutability in the human genome. PLoS Genet 8: e1002692

Meng, L., Person R. E. and Beaudet A. L. (2012) Ube3a-ATS is an atypical RNA polymerase II transcript that represses the paternal expression of Ube3a. Hum Mol Genet 21: 3001-3012

Radford, E. J., Isganaitis E., Jimenez-Chillaron J., Schroeder J., Molla M., et al. (2012) An unbiased assessment of the role of imprinted genes in an intergenerational model of developmental programming. PLoS Genet 8: e1002605

Teichroeb, J. H., Betts D. H. and Vaziri H. (2011) Suppression of the imprinted gene NNAT and X-chromosome gene activation in isogenic human iPS cells. PLoS ONE 6: e23436

Bell, C. G. and Beck S. (2010) The epigenomic interface between genome and environment in common complex diseases. Brief Funct Genomics 9: 477-485

Kong, A., Steinthorsdottir V., Masson G., Thorleifsson G., Sulem P., et al. (2009) Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. Nature 462: 868-874



## 診断未確定の遺伝性疾患

現在、検査を受ける患者のうち、半数以下で分子診断が確定しないと推定されています<sup>33</sup>。NIHの未診断疾患プログラムは目覚ましい成果を挙げ、39の希少疾患の診断に成功し、2つの新規疾患を同定しました。この事例は、全ゲノムおよび全エクソームシーケンスの臨床的な有用性を示しています。診断未確定の遺伝性疾患患者は、多様な臨床症状を示す傾向があり、同じような表現型を示す患者集団で共通の欠損遺伝子を探るよりも、患者のゲノムを個人単位で考慮する必要が多々あります。そのようなアプローチを用いて、Needらはこれまで診断未確定だった12名の発端者のうち6名について信憑性のある遺伝子診断結果を得ました<sup>34</sup>。次世代シーケンサーが臨床検査の一部としてルーチン化するまでには対処しなければならない問題が多数ありますが、これまでの結果からは今のところ、次世代シーケンサーが遺伝性疾患において強力な診断ツールになる可能性が示されています。

| ステップ | フィルター   |
|------|---|
| 1    | 発端者においてホモ接合型（X染色体のヘミ接合型バリエーションを含む）であり、対照群でホモ接合型（劣性およびX染色体関連バリエーションを含む）でない |
| 2    | 発端者においてヘテロ接合型であり、両親および対照群には存在しない（推定 <i>de novo</i> 変異）                    |
| 3    | 発端者に存在する2つのレアバリエーション（MAF<0.03）が、両親および対照群では存在しない（複合ヘテロ接合体）                 |

各小児の症状に寄与する可能性があり、ペネトランスの高いジェノタイプを同定するための、変異の優先順位付け。  
Need et al. (2012) J Med Genet 49: 353-361より。

### 総説：

#### Raffan, E. and Semple R. K. (2011) Next generation sequencing - implications for clinical practice. Br Med Bull 99: 53 - 71

この文献は、主要な次世代シーケンサーテクノロジーに関する総説です。著者らは、新しいテクノロジーとこれまでに確立された臨床診療との一致および不一致について論じています。また、次世代シーケンサーが診断法の一部として普及するまでに克服しなければならない問題点について概説しています。さらにこの総説では、予見されていなかった遺伝性疾患が次世代シーケンサーによって発見された例について表にまとめてあります。

<sup>33</sup> Ng, S. B., Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., et al. (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. Nat Genet 42: 30 - 35

<sup>34</sup> Need, A. C., Shashi, V., Hitomi, Y., Schoch, K., Shianna, K. V., et al. (2012) Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. J Med Genet 49: 353 - 361

## 参考文献：

Need, A. C., Shashi V., Hitomi Y., Schoch K., Shianna K. V., et al. (2012) Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet* 49: 353 - 361

著者らは、原因不明の遺伝性疾患と思われる患者12名とその健常な両親において、全エクソームシーケンスを行った試験的プログラムについて報告しています。患者は、過去に行ったマイクロアレイベースの解析では陰性の結果でした。全エクソームシーケンスにより、12名中6名の発端者で信憑性のある遺伝子診断結果を得、メンデル遺伝性疾患の原因となることが知られている4遺伝子内に原因変異と思われる変異を同定しました。この研究は、臨床の場でも次世代シーケンサーが高い成功率で結果を出せる証拠を提示すると同時に重要な問題点を浮き彫りにしています。また、既知のメンデル遺伝性疾患の症状も、現在認識されているより数かはるかに多くなる可能性を示唆しています。著者らは、遺伝性疾患の疑いが強いが従来の遺伝子診断では陰性であった症例全てにおいて、次世代シーケンサーの使用を積極的に検討すべきであると結論しています。さらに、少なくとも一部の症例においては、多くの患者家族が現在経験している診断までの長い過程と比べ、次世代シーケンサーのほうが高速かつ低コストであると考えられます。

**イルミナ技術：**HiSeq 2000によるシーケンス

Dias, C., Sincan M., Cherukuri P. F., Rupps R., Huang Y., et al. (2012) An analysis of exome sequencing for diagnostic testing of the genes associated with muscle disease and spastic paraplegia. *xHum Mutat* 33: 614 - 626

Leidenroth, A., Sorte H. S., Gilfillan G., Ehrlich M., Lyle R., et al. (2012) Diagnosis by sequencing: correction of misdiagnosis from FSHD2 to LGMD2A by whole - exome analysis. *Eur J Hum Genet* 20: 999 - 1003

Selmer, K. K., Gilfillan G. D., Stromme P., Lyle R., Hughes T., et al. (2012) A mild form of Mucopolysaccharidosis IIIB diagnosed with targeted next - generation sequencing of linked genomic regions. *Eur J Hum Genet* 20: 58 - 63

Maxmen, A. (2011) Exome sequencing deciphers rare diseases. *Cell* 144: 635 - 637

## 性と生殖に関する健康

### 保因者検査

保因者スクリーニングでは、疾患の発症に2コピーを要する遺伝子を1コピー保持している健常者の同定を行います。メンデル遺伝性疾患は、小児死亡率のおよそ20%、および小児入院の約10%を占めています<sup>35</sup>。保因者の遺伝カウンセリングを伴う受胎前スクリーニングの実施により、テイ・サックス病のように重篤な劣性疾患のいくつかでは、発症数が著しく減っています<sup>36</sup>。

保因者スクリーニングには、少数のマーカーのスクリーニングから全エクソームシーケンスまで、いくつかの手法がとられています。Bellらは、437遺伝子を標的としたシーケンスを行い、コスト効率がよく感度および特異度が非常に高い結果を得られることを示しています<sup>37</sup>。

<sup>35</sup> Kumar, P., Radhakrishnan, J., Chowdhary, M. A. and Giampietro, P. F. (2001) Prevalence and patterns of presentation of genetic disorders in a pediatric emergency department. *Mayo Clin Proc* 76: 777 - 783

<sup>36</sup> Kaback, M. M. (2000) Population - based genetic screening for reproductive counseling: the Tay - Sachs disease model. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 3: S192 - 195

<sup>37</sup> Bell, C. J., Dinwiddie, D. L., Miller, N. A., Hateley, S. L., Ganusova, E. E., et al. (2011) Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next - generation sequencing. *Sci Transl Med* 3: 65ra64

## 総説：

Jackson, L. and Pyeritz R. E. (2011) Molecular technologies open new clinical genetic vistas. *Sci Transl Med* 3: 65ps62

Grody, W. W. (2011) Expanded carrier screening and the law of unintended consequences: from cystic fibrosis to fragile X. *Genet Med* 13: 996-997

## 参考文献：

**Johnston, J. J., Gropman A. L., Sapp J. C., Teer J. K., Martin J. M., et al. (2012) The phenotype of a germline mutation in PIGA: the gene somatically mutated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hum Genet* 90: 295 - 300**

この研究では、発作性夜間ヘモグロビン尿症という希少疾患において、X染色体の全エクソンを標的としたターゲットリシーケンスを行っています。この希少疾患は単一家系で見つかり、女性の保因者を対象にターゲットリシーケンスが行われました。

**イルミナ技術：** Genome Analyzerによる、カバレッジ $10^7$ ×でのX染色体のエクソームシーケンス

**Bell, C. J., Dinwiddie D. L., Miller N. A., Hateley S. L., Ganusova E. E., et al. (2011) Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next - generation sequencing. *Sci Transl Med* 3: 65ra64**

著者らは、小児の重篤な劣性疾患448種において受胎前保因者スクリーニングについて報告しています。スクリーニングにはNGSを用い、437の標的遺伝子の7717領域をシーケンスしています。この手法では平均で160×のカバレッジが得られ、変異検出/ジェノタイプでは、置換、挿入/欠失、スプライシング、大規模欠失の変異およびSNPについて約95%の感度と約100%の特異度を実現しました。このターゲットスクリーニングは、小児の重篤な劣性疾患においてコスト効率がよいスクリーニング方法であることを示しています。

**イルミナ技術：** Genome Analyzer<sub>1lx</sub> による50bpリードおよびHiSeqによる150bpリードのシーケンスライブラリー

Bolton, K. L., Chenevix-Trench G., Goh C., Sadetzki S., Ramus S. J., et al. (2012) Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA* 307: 382-390

## 出生前診断

妊婦の血漿中に存在するセルフリーDNAには胎児の全ゲノムが含まれていることが明らかになり、非侵襲性遺伝子検査の可能性が開かれました<sup>38, 39</sup>。最初に用いられたアプリケーションの1つが、NGSによる胎児染色体異数性の決定です<sup>40, 41</sup>。初期の所見は、より大きなデータセットおよび異なる集団においても再現されました<sup>42, 43, 44, 45</sup>。このアプローチは、トリソミーだけでなくRh式血液型不適合妊娠のような分野にも適用できると考えられています<sup>46</sup>。



妊娠第一期および第二期に、父親のDNAがなくても出生前の全ゲノムを非侵襲的にシーケンスすることができます。Fan et al. Nature 487:320-4. 2012

### 総説：

Chitty, L. S., Hill M., White H., Wright D. and Morris S. (2012) Noninvasive prenatal testing for aneuploidy-ready for prime time? *Am J Obstet Gynecol* 206: 269-275

Jackson, L. and Pyeritz R. E. (2011) Molecular technologies open new clinical genetic vistas. *Sci Transl Med* 3: 65ps62

Evans, M. I. and Kilpatrick M. (2010) Noninvasive prenatal diagnosis: 2010. *Clin Lab Med* 30: 655-665

Lee, C. (2010) The future of prenatal cytogenetic diagnostics: a personal perspective. *Prenat Diagn* 30: 706-709

Chiu, R. W., Cantor C. R. and Lo Y. M. (2009) Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends Genet* 25: 324-331

<sup>38</sup> Lo, Y. M., Chan, K. C., Sun, H., Chen, E. Z., Jiang, P., et al. (2010) Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome - wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2: 61ra91

<sup>39</sup> Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L. and Quake, S. R. (2010) Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell - free DNA by paired - end sequencing. *Clin Chem* 56: 1279 - 1286

<sup>40</sup> Chiu, R. W., Chan, K. C., Gao, Y., Lau, V. Y., Zheng, W., et al. (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20458 - 20463

<sup>41</sup> Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L. and Quake, S. R. (2008) Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16266 - 16271

<sup>42</sup> Ehrich, M., Deciu, C., Zwiefelhofer, T., Tynan, J. A., Cagasan, L., et al. (2011) Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 204: 205 e201 - 211

<sup>43</sup> Chiu, R. W., Sun, H., Akolekar, R., Clouser, C., Lee, C., et al. (2010) Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Clin Chem* 56: 459 - 463

<sup>44</sup> Fan, H. C. and Quake, S. R. (2010) Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. *PLoS ONE* 5: e10439

<sup>45</sup> Chu, T., Bunce, K., Hogge, W. A. and Peters, D. G. (2010) Statistical considerations for digital approaches to non - invasive fetal genotyping. *Bioinformatics* 26: 2863 - 2866

<sup>46</sup> Moise, K. J., Jr. (2008) Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol* 112: 164 - 176

## 参考文献：

### Fan, H. C., Gu W., Wang J., Blumenfeld Y. J., El - Sayed Y. Y., et al. (2012) Non - invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature* 487: 320 - 324

著者らは、妊娠第一期および第二期に、父親のDNAがなくても出生前の全ゲノムを非侵襲的にシーケンス可能であることを示しています。また、エクソームシーケンスを用い、父親由来または*de novo*生殖細胞変異の、臨床的に重要なアレルおよび有害アレルの検出を行いました。胎児ゲノムの非侵襲的なシーケンスは、究極的には全ての遺伝性疾患および*de novo*遺伝性疾患の診断を押し進める可能性を持ちます。

**イルミナ技術：** Genome Analyzer<sub>II</sub> およびHiSeq 2000による約52.7xカバレッジでの全ゲノムシーケンス。  
HiSeq 2000によるエクソームシーケンス、妊娠第一、二、三期において、3億3,200万、3億4,400万、9億3,000万のアライメントされたリード

### Kitzman, J. O., Snyder M. W., Ventura M., Lewis A. P., Qiu R., et al. (2012) Noninvasive whole - genome sequencing of a human fetus. *Sci Transl Med* 4: 137ra176

この文献で著者らは、妊娠中の母親のDNA、父親のDNAおよび妊娠中の母親の血漿から得たセルフリーDNAなどを含む、妊娠第二期に非侵襲的に得た検体を用いて、ヒト胎児の全ゲノム配列を再構築しました。この文献のキーポイントは、胎児ゲノムの新規変異を高感度に検出でき、検証のためのトリアージが可能であった点です。

**イルミナ技術：** HiSeq 2000による、9bpのインデックスリードを含む101bpペアエンドリードのシーケンス

### Chiu, R. W., Akolekar R., Zheng Y. W., Leung T. Y., Sun H., et al. (2011) Non - invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 342: c7401

この文献では、血漿DNAを用いた胎児21トリソミースクリーニングの実現可能性試験について述べられています。コホートは、胎児21トリソミーのリスクが高い753名の妊婦からなります。このうち全核型分析による確定診断を受け、86名が21トリソミーの胎児を妊娠していました。著者らは8プレックスおよび2プレックスのインデックス化プロトコルを採用し、2プレックスインデックス化のほうが優れていることを見出しました。2プレックスのプロトコルを用いた場合、感度100%および特異度97.9%で胎児の21トリソミーを検出し、陽性的中率96.6%、陰性的中率100%を達成しました。著者らは、シーケンス検査の結果に基づいて羊水穿刺や絨毛膜標本採取を行うようにすれば、侵襲的な診断の約98%は実施する必要がなくなると結論しています。

**イルミナ技術：** Genome Analyzer<sub>II</sub> およびGenome Analyzer<sub>IIx</sub> によるシーケンス

### Sehnert, A. J., Rhee B., Comstock D., de Feo E., Heilek G., et al. (2011) Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell - free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem* 57: 1042 - 1049

この文献は、シーケンスラン内およびラン間のばらつきを最小にするためのノーマライゼーション法について述べています。著者らは26の異常な核型を持つ71検体からなるトレーニングセットを用いてアルゴリズムを開発しました。その後、分類過程の検証を、27の異常な核型を持つ48検体からなる独立したテストセットを用いて行いました。その結果、T21（13例中13例）およびT18（8例中8例）を100%正確に分類できました。また著者らは、新規の染色体異常を発見しました。

**イルミナ技術：** Genome Analyzer<sub>IIx</sub> による36bpリードのシーケンス



Liao, G. J., Lun F. M., Zheng Y. W., Chan K. C., Leung T. Y., et al. (2011) Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles. *Clin Chem* 57: 92 - 101

Palomaki, G. E., Kloza E. M., Lambert - Messerlian G. M., Haddow J. E., Neveux L. M., et al. (2011) DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 13: 913 - 920

次世代シーケンサーによる非侵襲的な検査の精度をテストするため、ダウン症のリスクが高い4664の妊娠例をコホートとした研究が行われました。内的妥当性確認済みの、研究室で開発された次世代シーケンサーをベースとした検査法と、胎児核型分析の比較を、212例のダウン症および1484例のマッチング正倍数性妊娠例で行いました。盲検化コホート内症例対照研究の結果、ダウン症の検出率は98.6% (209例/212例)、偽陽性率は0.20% (3例/1471例)でした。13例 (0.8%) では検査結果を得られませんでしたでしたが全て正倍数性でした。検査の複雑性および必要となる検査体制を考慮した上で、ダウン症のリスクが高いと判定された妊婦に対して次世代シーケンサーを提供することを著者らは支持しています。検査の結果がでるまでに要する時間は、95%の患者では、現在行われている羊水細胞または絨毛膜標本採取といった細胞遺伝学的な手法と同等のものでした。次世代シーケンサーが利用可能になれば、血清/超音波スクリーニングのカットオフを下げることができ、より高確率でダウン症を検出できるようになります。

**イルミナ技術:** HiSeq 2000によるシーケンス

Dan, S., Chen F., Choy K. W., Jiang F., Lin J., et al. (2012) Prenatal detection of aneuploidy and imbalanced chromosomal arrangements by massively parallel sequencing. *PLoS ONE* 7: e27835

Jensen, T. J., Dzakula Z., Deciu C., van den Boom D. and Ehrich M. (2012) Detection of microdeletion 22q11.2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma. *Clin Chem* 58: 1148-1151<sup>47</sup>

Norton, M. E., Brar H., Weiss J., Karimi A., Laurent L. C., et al. (2012) Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 207: 137 e131-138

Sparks, A. B., Struble C. A., Wang E. T., Song K. and Oliphant A. (2012) Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 206: 319 e311-319

Sparks, A. B., Wang E. T., Struble C. A., Barrett W., Stokowski R., et al. (2012) Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 32: 3-9

Chen, E. Z., Chiu R. W., Sun H., Akolekar R., Chan K. C., et al. (2011) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS ONE* 6: e21791

<sup>47</sup> Baker, K. and Vorstman, J. A. (2012) Is there a core neuropsychiatric phenotype in 22q11.2 deletion syndrome? *Curr Opin Neurol* 25: 131 - 137

## 新生児診断

早期診断および介入によって、治療の選択肢は大いに広がり、転帰も改善します。ここに紹介する文献は、早期診断および介入アプローチの例です。

### Bonnefond, A., Durand E., Sand O., De Graeve F., Gallina S., et al. (2010) Molecular diagnosis of neonatal diabetes mellitus using next - generation sequencing of the whole exome. PLoS ONE 5: e13630

単一遺伝子非自己免疫性新生児糖尿病（NDM）患者の看護においては、分子診断が非常に重要な意味を持ちます。KCNJ11またはABCC8に変異を持つ患者の場合、インスリン療法の代わりにスルホニル尿素剤の経口投与による治療が可能だからです。この文献で著者らは、従来の検査でKCNJ11、ABCC8およびINS遺伝子に変異がなく、染色体6q24に異常がないと判定された永続性NDM患者の診断における、全エクソームシーケンスの可能性を評価しました。その結果、ABCC8に新規のノンシノニマスな変異（c.1455G>C/p.Q485H）を発見し、サンガー法により検証しました。全ゲノムエクソームシーケンスは、NDM患者の変異発見においてコストパフォーマンスに優れ、迅速なアプローチであると結論付けられています。

イルミナ技術：Genome Analyzer<sub>ix</sub>による76bpペアエンドリードのシーケンス、カバレッジは65×。  
イルミナ Human1M-Duo アレイによる検証。

## 遺伝子変異のタイプ

### De novo 変異

最近の膨大なゲノムシーケンスによる発見の中で驚くものの1つが、外見上正常な個人でもエクソーム中に20,000から40,000の変異を持つという事実です。1000ゲノムプロジェクトでは、各人が、アノテートされた遺伝子内の機能喪失変異をおよそ250~300、および遺伝性疾患に関連することで知られる変異を50~100保持していました。さらに、塩基置換型の*de novo*生殖細胞変異は、1世代1塩基あたりおよそ $10^{-8}$ 個でした<sup>48</sup>。*De novo*変異および微小変異は、マイクロアレイベースの手法では解析できないため、その頻度または遺伝性疾患への寄与については、次世代シーケンサーが到来するまでほとんど明らかにされていませんでした<sup>49</sup>。

*De novo*変異を報告している論文のほとんどはエクソームシーケンスによるものです。非常に小さいコホートから、容易に変異を検出する性能は素晴らしいものです。また、長期間にわたり次から次へと検査をしなければならない従来の診断過程に比べれば、エクソームシーケンスはコスト効率にも優れています。



同一の疾患を持つ患者集団において、*de novo*変異は通常1つの遺伝子の様々な部位で起こります。変異のある部位はマイクロアレイに載っていないため、マイクロアレイで検出することはできません<sup>50</sup>。

<sup>48</sup> Genomes Project, C. (2010) A map of human genome variation from population - scale sequencing. Nature 467: 1061 - 1073

<sup>49</sup> Ku, C. S., Polychronakos, C., Tan, E. K., Naidoo, N., Pawitan, Y., et al. (2012) A new paradigm emerges from the study of *de novo* mutations in the context of neurodevelopmental disease. Mol Psychiatry

<sup>50</sup> Jones, W. D., Dafou, D., McEntagart, M., Woollard, W. J., Elmslie, F. V., et al. (2012) *De Novo* Mutations in MLL Cause Wiedemann - Steiner Syndrome. Am J Hum Genet 91: 358 - 364

## 総説：

Iossifov, I., Ronemus M., Levy D., Wang Z., Hakker I., et al. (2012) *De novo* gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74: 285-299

Ku, C. S., Polychronakos C., Tan E. K., Naidoo N., Pawitan Y., et al. (2012) A new paradigm emerges from the study of *de novo* mutations in the context of neurodevelopmental disease. *Mol Psychiatry*

## 参考文献：

**Heinzen, E. L., Swoboda K. J., Hitomi Y., Gurrieri F., Nicole S., et al. (2012) De novo mutations in ATP1A3 cause alternating hemiplegia of childhood. *Nat Genet***

著者らは、小児交代性片麻痺（AHC）の患者7名とその健常な両親においてエクソームシーケンスを行い、7名全員のATP1A3遺伝子にアミノ酸変異を伴う*de novo*変異を同定しました。さらに98名のAHC患者についてシーケンス解析を行い、そのうち少なくとも74%の症例ではATP1A3の変異が原因である可能性が高いことを見出しました。さらに、1例の家族性AHCにおいて、遺伝性の変異を1つ発見しました。注目すべきなのは、ほとんどのAHC症例において、ATP1A3に7つある反復突然変異のうちの1つが原因となっている点です。この変異のうち1つは36名の患者で見られました。ATP1A3の変異は急性発症ジストニア・パーキンソンズムを引き起こすことが知られています。AHCの原因となる変異の場合、タンパク質発現レベルに影響しない、ATPアーゼ活性の低下が見られました。

**イルミナ技術：** Genome Analyzer<sub>ix</sub> およびHiSeq 2000による平均90xカバレッジでのエクソームシーケンス

**Jones, W. D., Dafou D., McEntagart M., Woollard W. J., Elmslie F. V., et al. (2012) De Novo Mutations in MLL Cause Wiedemann - Steiner Syndrome. *Am J Hum Genet* 91: 358 - 364**

著者らは肘部多毛症の患者6名中5名において、MLL遺伝子の*de novo*変異を同定しました。この患者らは低身長、知的障害、および特徴的な顔貌を伴っており、ウィデマンスタイナー症候群の診断に合致します。MLLはヒストンメチルトランスフェラーゼをコードしており、この酵素はヒストンH3K4メチル化の触媒作用を通してクロマチン介在性の転写を制御します。5つの変異はそれぞれ、ヒストンメチルトランスフェラーゼの発現を途中で終止させると予想されています。

**イルミナ技術：** HiSeq 2000による100bpペアエンドリードのエクソームシーケンス

**Hood, R. L., Lines M. A., Nikkel S. M., Schwartzentruber J., Beaulieu C., et al. (2012) Mutations in SRCAP, encoding SNF2 - related CREBBP activator protein, cause Floating - Harbor syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 308 - 313**

著者らは、散発性フローティングハーバー症候群（FHS）の非血縁患者5名において、SRCAP内にヘテロ接合型の短縮型変異を発見しました。サンガーシーケンスにより、さらに8名の患者でSRCAPの変異が同定されました。両親のDNAを解析できた6例においては、全てが*de novo*変異でした。SRCAPはSNF2関連クロマチンリモデリング因子であり、CREB結合タンパク質（CREBBP、CBPという名称でよく知られており、ルビンシュタイン・テイビ症候群 [RTS] の主な原因）のコアクチベーターとして働きます。

**Hood, R. L., Lines M. A., Nikkel S. M., Schwartzentruber J., Beaulieu C., et al. (2012) Mutations in SRCAP, encoding SNF2 - related CREBBP activator protein, cause Floating - Harbor syndrome. *Am J Hum Genet***

著者らは、小児における一塩基多型の変異率の多様性は、受胎時の父親の年齢が要因となっていることを示しました。29.7歳時の平均*de novo*変異率が1塩基1世代あたり $1.2 \times 10^{-8}$ から始まり、1年ごとにおよそ2つの変異が加わっていきます。指数モデルによる推計では16.5年ごとに父親由来の変異が倍になるとされています。このことから、遺伝性疾患のリスクにおいては、受胎時の父親の年齢が重要であることが示されます。

**イルミナ技術：** Genome Analyzer<sub>ix</sub> およびHiSeq 2000による全ゲノムシーケンス

Lee, J. H., Huynh M., Silhavy J. L., Kim S., Dixon-Salazar T., et al. (2012) *De novo* somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet* 44: 941-945

O'Roak, B. J., Vives L., Girirajan S., Karakoc E., Krumm N., et al. (2012) Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of *de novo* mutations. *Nature* 485: 246-250

Riviere, J. B., Mirzaa G. M., O'Roak B. J., Beddaoui M., Alcantara D., et al. (2012) *De novo* germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* 44: 934- 940

## 構造変異

構造変異は非常に一般的に見られ、複雑な変異であり<sup>51</sup>、遺伝性疾患および*de novo*疾患の表現型に寄与する可能性があります<sup>52</sup>。複雑な変異の中には、複数の染色体に存在する異なる領域間で著しく入り組んだリアレンジメントを示すものもあれば、単一領域でのわずかな変化を示すものもあります<sup>53</sup>。

コピー数変異 (CNV) は 遺伝的多様性の大きな源であり、SNPベースの研究では遺伝性が見出されなかったケースの原因である可能性があります。CNVは神経疾患において特に重要な役割を果たすと考えられており、自閉症スペクトラム障害、精神遅滞および統合失調症を含む、神経行動学的な表現型の疾患感受性に寄与することが示されています<sup>54</sup>。

アレイベースのアプローチにより注目すべき成果が挙がっており、特にCNVのマッピングに成功しています。しかしながら、アレイでは平衡転座は検出できず、FISH (蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション) は解像度に限界があります。健常者および罹患者で実際にどの程度の平衡転座が起こっているかについては、次世代シーケンサーが登場して初めて明らかになりました。ペアエンドおよびメイトペアシーケンスはゲノムのリアレンジメントをマッピングするのに特に効果的な手法です<sup>55</sup>。

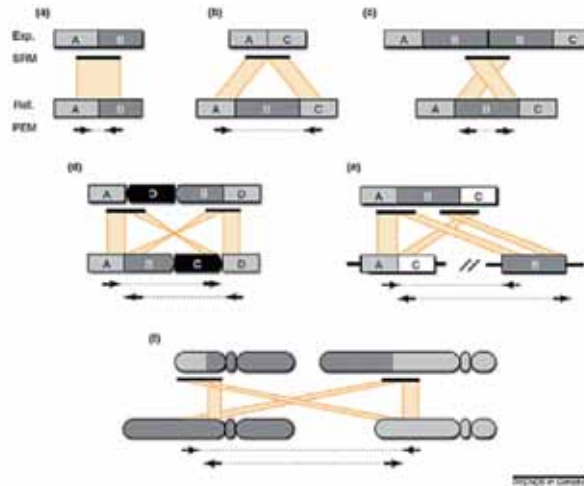
<sup>51</sup> Pang, A. W., MacDonald, J. R., Pinto, D., Wei, J., Rafiq, M. A., et al. (2010) Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. *Genome Biol* 11: R52

<sup>52</sup> Zhang, F., Gu, W., Hurles, M. E. and Lupski, J. R. (2009) Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10: 451 - 481

<sup>53</sup> Quinlan, A. R. and Hall, I. M. (2012) Characterizing complex structural variation in germline and somatic genomes. *Trends Genet* 28: 43 - 53

<sup>54</sup> Pinto, D., Pagnamenta, A. T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., et al. (2010) Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 466: 368 - 372

<sup>55</sup> Quinlan, A. R. and Hall, I. M. (2012) Characterizing complex structural variation in germline and somatic genomes. *Trends Genet* 28: 43 - 53



シーケンスによる、簡素化した構造変異 (SV) ブレイクポイントの検出。実験サンプル (Exp.) のゲノムから得た DNA 配列をリファレンス (Ref.) ゲノムにアライメントすると、構造変異の型によってそれぞれ異なるアライメントのパターンを示します。ペアエンドマッピング (PEM) およびスプリットリードマッピング (SRM) で見られるパターンを、両ゲノムが全く同じ構造を持つ場合 (a) および実験サンプルのゲノムに欠失 (b)、タンDEM重複 (c)、逆位 (d)、トランスポゾン挿入 (e)、相互転座 (f) がある場合について、それぞれ図示してあります。PEMは、シーケンスされなかった部分 (点線) がSVブレイクポイントにかかっているリードペアを利用します。リファレンスゲノムにアライメントしたときに、そのようなリードペアのアライメントの距離および方向から、どのようなリアレンジメントが起こったか知ることができます。プラス鎖にマップされたリードは右向き矢印で、マイナス鎖にマップされたリードは左向き矢印で示してあります。例は全てイルミナのペアエンドシーケンスのデータを示しており、SVがないとき、左端のリードはプラスの向き、右端のリードはマイナスの向きです。イルミナのメイトペアライブラリーまたはSOLiDのような他のシーケンスプラットフォームでは、予想される向きが異なることに注意してください。欠失 (b) の場合、リードペアの末端はDNAライブラリーから予想されるよりもずっと離れた位置にアライメントされます。PEMに比べ、SRMは、SVブレイクポイントを含む、連続した配列を利用します。その結果、ブレイクポイントの前後にあるシーケンスはリファレンスゲノム上のばらばらな位置にアライメントされます。PEMに比べ、ブレイクポイントが1塩基の解像度で同定されます。Quinlan, A. R. and Hall I. M. (2012) Trends Genet 28: 43-53より。

## 総説：

Quinlan, A. R. and Hall I. M. (2012) Characterizing complex structural variation in germline and somatic genomes. Trends Genet 28: 43-53

## 参考文献：

**Griswold, A. J., Ma D., Cukier H. N., Nations L. D., Schmidt M. A., et al. (2012) Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder - associated pathways. Hum Mol Genet 21: 3513 - 3523**

この研究で著者らは、コーカサス系人種の自閉症スペクトラム障害 (ASD) 非血縁患者813名および対照群592名を解析したところ、ASD患者では欠失の数およびサイズ、変異遺伝子の数が顕著に上回ることを見出しました。見つかった欠失のうち18個は1Mbより長く、患者群でのみ検出されました。変異により影響を受けていた遺伝子の一部は、他の神経発達および神経精神疾患で発見されたものとオーバーラップしていました。

**イルミナ技術：** Human1M v1 BeadChipおよびHuman1M-Duo v3 BeadChipを使用したInfinium IIアッセイ

**Luo, R., Sanders S. J., Tian Y., Voineagu I., Huang N., et al. (2012) Genome - wide Transcriptome Profiling Reveals the Functional Impact of Rare De Novo and Recurrent CNVs in Autism Spectrum Disorders. Am J Hum Genet 91: 38 - 55**

この研究は、自閉症スペクトラム障害 (ASD) において、病因となる構造変異がトランスクリプトームの変化を通して機能的な影響を及ぼす証拠を示しています。ここでは、遺伝子発現と変異のデータを統合し、病因の可能性のある変異によって損なわれた遺伝子の優先順位付けを行い、その有用性を示しています。ほとんどの症例では脳組織が入手できないため、著者らは不一致の同胞を有する244家族においてリンパ芽球の遺伝子発現を調べました。その結果、発現の異常が起こっている遺伝子は、大部分の病理性CNVに集まっていることがわかりました。

**イルミナ技術：** 全ゲノムHumanRef-8 Expression BeadChip



**Iossifov, I., Ronemus M., Levy D., Wang Z., Hakker I., et al. (2012) De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. Neuron 74: 285 - 299**

1人の自閉症小児と少なくとも1人の健康な同胞がいる343家族においてエクソームシーケンスを行い、*de novo*の小さな挿入・欠失および点置換を発見し、それが主に父方から年齢に依存した様式で由来することを示しました。

**イルミナ技術**：HiSeq 2000による100bpペアエンドリードのエクソームシーケンス

Amor, D. J., Burgess T., Tan T. Y. and Pertile M. D. (2012) Questionable pathogenicity of FOXP1 duplication. Eur J Hum Genet 20: 595-596; author reply 596-597

Chow, M. L., Pramparo T., Winn M. E., Barnes C. C., Li H. R., et al. (2012) Age-dependent brain gene expression and copy number anomalies in autism suggest distinct pathological processes at young versus mature ages. PLoS Genet 8: e1002592

Demichelis, F., Setlur S. R., Banerjee S., Chakravarty D., Chen J. Y., et al. (2012) Identification of functionally active, low frequency copy number variants at 15q21.3 and 12q21.31 associated with prostate cancer risk. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 6686-6691

Fernandez, T. V., Sanders S. J., Yurkiewicz I. R., Ercan-Sencicek A. G., Kim Y. S., et al. (2012) Rare copy number variants in tourette syndrome disrupt genes in histaminergic pathways and overlap with autism. Biol Psychiatry 71: 392-402

Hochstenbach, R., Poot M., Nijman I. J., Renkens I., Duran K. J., et al. (2012) Discovery of variants unmasked by hemizygous deletions. Eur J Hum Genet 20: 748-753

Holt, R., Sykes N. H., Conceicao I. C., Cazier J. B., Anney R. J., et al. (2012) CNVs leading to fusion transcripts in individuals with autism spectrum disorder. Eur J Hum Genet

Leblond, C. S., Heinrich J., Delorme R., Proepper C., Betancur C., et al. (2012) Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. PLoS Genet 8: e1002521

Li, J., Harris R. A., Cheung S. W., Coarfa C., Jeong M., et al. (2012) Genomic hypomethylation in the human germline associates with selective structural mutability in the human genome. PLoS Genet 8: e1002692

Zhao, Q., Li T., Zhao X., Huang K., Wang T., et al. (2012) Rare CNVs and Tag SNPs at 15q11.2 Are Associated With Schizophrenia in the Han Chinese Population. Schizophr Bull

Kirov, G., Pocklington A. J., Holmans P., Ivanov D., Ikeda M., et al. (2012) *De novo* CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. Mol Psychiatry 17: 142-153

Liu, Y., Gibson J., Wheeler J., Kwee L. C., Santiago-Turla C. M., et al. (2011) GALC deletions increase the risk of primary open-angle glaucoma: the role of Mendelian variants in complex disease. PLoS ONE 6: e27134

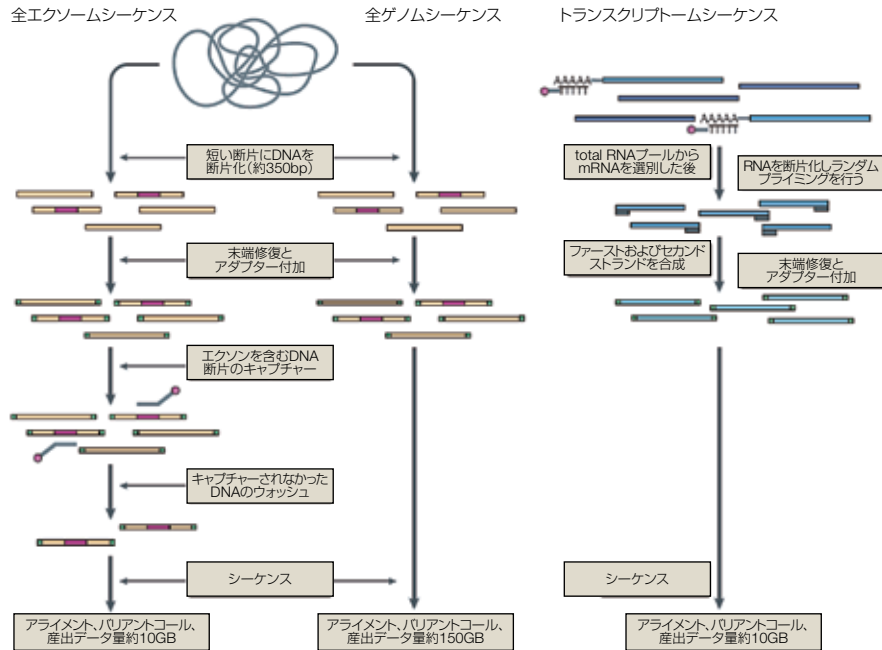
Salyakina, D., Cukier H. N., Lee J. M., Sacharow S., Nations L. D., et al. (2011) Copy number variants in extended autism spectrum disorder families reveal candidates potentially involved in autism risk. PLoS ONE 6: e26049

Veenma, D., Brosens E., de Jong E., van de Ven C., Meeussen C., et al. (2012) Copy number detection in discordant monozygotic twins of Congenital Diaphragmatic Hernia (CDH) and Esophageal Atresia (EA) cohorts. Eur J Hum Genet 20: 298-304

## 解析手法

### ゲノムベースの解析

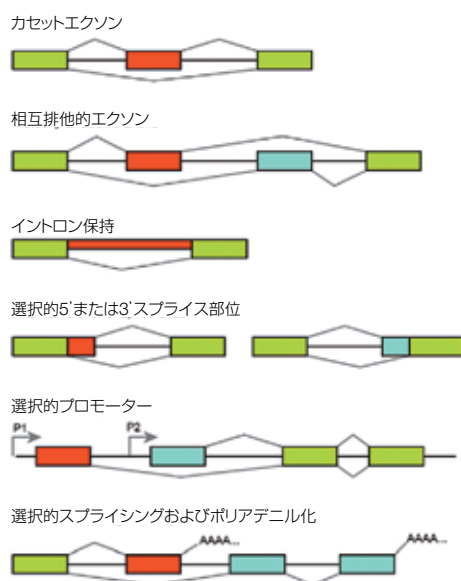
次世代シーケンサーのワークフローはシンプルであり、全エクソーム、全エクソーム、トランスクリプトーム、ChIP-Seq、およびエピゲノムシーケンスを含む様々なタイプの解析を可能にしています。



全エクソーム、全ゲノム、およびトランスクリプトームシーケンスのためのシンプルなワークフロー。最初のサンプル調製は全エクソームと全ゲノムシーケンスで共通です。ゲノムDNAを短いフラグメントに切断し、シーケンスアダプターを付加します。このアダプターにより、シーケンス反応が行われるフローセル上にDNAフラグメントがハイブリダイズできるようになります。全エクソームシーケンスのプロトコルでは、ゲノム上の全ての既知エクソンに対する相補的なプローブとDNAフラグメントのハイブリダイゼーションを行います。プローブをキャプチャーして残りのDNAは洗い流し、エクソンを含むフラグメントのプールのみが残ります。全ゲノムシーケンスでは、アダプター付加後に追加のステップは不要で、直ちにシーケンス可能なライブラリーが得られます。トランスクリプトームシーケンスでは、最初のサンプル調製以外のステップは他の2プロトコルと同じです。ここでは通常total RNAのプールから開始し、そこからmRNAをキャプチャーしてフラグメンテーションを行い、cDNAを合成します。このステップではライブラリー調製およびシーケンスは他の2プロトコルに従います。J. Bras, R. Guerreiro, et al. (2012). Nat Rev Neurosci 13:453-64より。

## トランスクリプトーム解析

発現解析は、遺伝性疾患における遺伝子異常の影響を解釈するのに、新たなレベルの情報を付加します。変異アレルが発現していれば、それが原因変異であることを示す新たな証拠となります<sup>56</sup>。また発現解析は遺伝的、エピジェネティックおよびRNAプロセッシングの機構<sup>57</sup>およびスプライスバリエーション<sup>58</sup>の機能性を調べることであります。RNAトランスクリプトのシーケンス（RNA-Seq）は、RNA配列の変化による影響を受けず、遺伝子発現とRNA変異の両方を解析するための客観的ツールとなります。



異なるタイプの選択的スプライシング。直線はイントロン、長方形はエクソンを示します。構成的エクソンは灰色で示してあります。プロモーターは矢印、ポリアダニル化はAAAAで示します。J. D. Mills and M. Janitz (2012) Neurobiol Aging 33:1012 e11-24.

### 総説：

Costa, V., Aprile M., Esposito R. and Ciccodicola A. (2012) RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives. Eur J Hum Genet

Mills, J. D. and Janitz M. (2012) Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases. Neurobiol Aging 33: 1012 e1011-1024

<sup>56</sup> Li, G., Bahn, J. H., Lee, J. H., Peng, G., Chen, Z., et al. (2012) Identification of allele-specific alternative mRNA processing via transcriptome sequencing. Nucleic Acids Res 40: e104

<sup>57</sup> Mills, R. E., Pittard, W. S., Mullaney, J. M., Farooq, U., Creasy, T. H., et al. (2011) Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. Genome Res 21: 830 - 839

<sup>58</sup> Lines, M. A., Huang, L., Schwartzenuber, J., Douglas, S. L., Lynch, D. C., et al. (2012) Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. Am J Hum Genet 90: 369 - 377

## 参考文献：

Luo, R., Sanders S. J., Tian Y., Voineagu I., Huang N., et al. (2012) Genome - wide Transcriptome Profiling Reveals the Functional Impact of Rare De Novo and Recurrent CNVs in Autism Spectrum Disorders. *Am J Hum Genet* 91: 38 - 55

この研究は、自閉症スペクトラム障害（ASD）において、病因となる構造変異がトランスクリプトームの変化を通して機能的な影響を及ぼす証拠を示しています。ここでは、遺伝子発現と変異のデータを統合し、病因の可能性のある変異によって損なわれた遺伝子の優先順位付けを行い、その有用性を示しています。ほとんどの症例では脳組織が入手できないため、著者らは不一致の同胞を有する244家族においてリンパ芽球の遺伝子発現を調べました。その結果、発現の異常が起こっている遺伝子は、大部分の病原性CNVに集まっていることが分かりました。

イルミナ技術： HumanRef-8 Expression BeadChip

Holt, R., Sykes N. H., Conceicao I. C., Cazier J. B., Anney R. J., et al. (2012) CNVs leading to fusion transcripts in individuals with autism spectrum disorder. *Eur J Hum Genet*

Li G, Bahn JH, Lee JH, Peng G, Chen Z, Nelson SF, Xiao X; (2012) Identification of allele-specific alternative mRNA processing via transcriptome sequencing. *Nucleic Acids Res* 40: e104

Lines, M. A., Huang L., Schwartzentruber J., Douglas S. L., Lynch D. C., et al. (2012) Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. *Am J Hum Genet* 90: 369-377

## 細胞遺伝学

細胞遺伝学は、遺伝学の一分野であり、細胞核内のDNAの構造および機能を研究します。細胞遺伝学にはG-band染色体解析（核型解析）、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）および比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）が含まれます。これらの手法の使用には相当のスキルが必要であり、解像度にも限度があります。アレイベースおよびシーケンスベースのマッピングによって大幅に精度が向上し、将来的には従来法に代わるものとなることが予想されます<sup>59</sup>。

| 手法           | 長所                                  | 短所   |
|--------------|-------------------------------------|--|
| FISH         | • 確立された手法                           | • 相当のスキルを要する<br>• 目的の領域に対するプライマーが必要<br>• 解像度が限られる      |
| アレイベースのマッピング | • 低コスト<br>• 高速かつ自動化が可能<br>• 事前情報が不要 | • 平衡転座またはリアレンジメントを検出できない<br>• 場合によりアレイを人種特異的に用意する必要がある |
| 次世代シーケンサー    | • 高解像度<br>• 人種バイアスがない<br>• 事前情報が不要  | • 膨大なデータ解析を要する   |

<sup>59</sup> Sato - Otsubo, A., Sanada, M. and Ogawa, S. (2012) Single - nucleotide polymorphism array karyotyping in clinical practice: where, when, and how? *Seminars in oncology* 39: 13 - 25

## 総説：

Sato-Otsubo, A., Sanada M. and Ogawa S. (2012) Single-nucleotide polymorphism array karyotyping in clinical practice: where, when, and how? *Seminars in oncology* 39: 13-25

## 参考文献：

**Yang, Y., Wang C., Wang F., Zhu L., Liu H., et al. (2012) Novel chromosomal translocation t(11;9)(p15;p23) involving deletion and duplication of 9p in a girl associated with autism and mental retardation. *Gene* 502: 154 - 158**

著者らはp9にリアレンジメントが見られる患者4名について報告しています。4例全てのリアレンジメントは、当初従来の細胞生物学によって示されていたよりもはるかに複雑なものでした。患者の異常部位の精確なマッピングおよび完全な分子的解析を行うことは、表現型-核型の相関を解明し、候補遺伝子を同定するのに重要であることが示されています。

イルミナ技術：HumanCytoSNP-12 BeadChip

Bystricka, D., Sarova I., Zemanova Z., Brezinova J., Lizcova L., et al. (2012) Recurrent chromosomal breakpoints in patients with myelodysplastic syndromes and complex karyotype versus fragile sites. *Leuk Res* 36: e125-127

Chiang, C., Jacobsen J. C., Ernst C., Hanscom C., Heilbut A., et al. (2012) Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat Genet* 44: 390-397, S391

Lathi, R. B., Loring M., Massie J. A., Demko Z. P., Johnson D., et al. (2012) Informatics enhanced SNP microarray analysis of 30 miscarriage samples compared to routine cytogenetics. *PLoS ONE* 7: e31282

Zollino, M., Orteschi D., Murdolo M., Lattante S., Battaglia D., et al. (2012) Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. *Nat Genet* 44: 636-638

## パスウェイ解析

ほとんどの遺伝学的研究において、目標の中心となるのは、疾患の発症および病理に関わる病理生物学的なメカニズムを理解することです<sup>60</sup>。パスウェイに基づく解析は、ある生物学的なパスウェイに影響を与える複数の関連遺伝子の同定を目的としており、疾患における特定のパスウェイの関与だけでなく、他の潜在的なリスク遺伝子に関する情報を得ることができます<sup>61</sup>。一例となるのが、アルツハイマー病分野の研究で、2つの大規模なGWAS研究の結果、疾患関連遺伝子の著しい過剰発現が、コレステロール代謝および免疫応答のパスウェイにおいても見出されました<sup>62</sup>。生物学的なパスウェイおよびパスウェイ間の相互作用に関する我々の理解は、完全なものからはほど遠く、これらの研究結果は仮説として扱うべきであり、より厳密な解析を行う余地が残っています。

## 総説：

Bras, J., Guerreiro R. and Hardy J. (2012) Use of next - generation sequencing and other whole - genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 13: 453 - 464

<sup>60</sup> Bras, J., Guerreiro, R. and Hardy, J. (2012) Use of next - generation sequencing and other whole - genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 13: 453 - 464

<sup>61</sup> Holmans, P., Green, E. K., Pahwa, J. S., Ferreira, M. A., Purcell, S. M., et al. (2009) Gene ontology analysis of GWA study data sets provides insights into the biology of bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 85: 13 - 24

<sup>62</sup> Jones, L., Holmans, P. A., Hamshere, M. L., Harold, D., Moskvina, V., et al. (2010) Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 5: e13950

## 参考文献：

- Chung, R. H. and Chen Y. E. (2012) A two-stage random forest-based pathway analysis method. *PLoS ONE* 7: e36662
- Fehring, G., Liu G., Briollais L., Brennan P., Amos C. I., et al. (2012) Comparison of pathway analysis approaches using lung cancer GWAS data sets. *PLoS ONE* 7: e31816
- Fernandez, T. V., Sanders S. J., Yurkiewicz I. R., Ercan-Sencicek A. G., Kim Y. S., et al. (2012) Rare copy number variants in tourette syndrome disrupt genes in histaminergic pathways and overlap with autism. *Biol Psychiatry* 71: 392-402
- Fernandez, T. V., Sanders S. J., Yurkiewicz I. R., Ercan-Sencicek A. G., Kim Y. S., et al. (2012) Rare copy number variants in tourette syndrome disrupt genes in histaminergic pathways and overlap with autism. *Biol Psychiatry* 71: 392-402
- Griswold, A. J., Ma D., Cukier H. N., Nations L. D., Schmidt M. A., et al. (2012) Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Hum Mol Genet* 21: 3513-3523
- Li, D., Duell E. J., Yu K., Risch H. A., Olson S. H., et al. (2012) Pathway analysis of genome-wide association study data highlights pancreatic development genes as susceptibility factors for pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 33: 1384-1390



- Amor, D. J., Burgess, T., Tan, T. Y. and Pertile, M. D. (2012) Questionable pathogenicity of FOXG1 duplication. *Eur J Hum Genet* 20: 595 - 596; author reply 596 - 597
- Audo, I., Bujakowska, K., Orhan, E., Poloschek, C. M., Defoort - Dhellemmes, S., et al. (2012) Whole - exome sequencing identifies mutations in GPR179 leading to autosomal - recessive complete congenital stationary night blindness. *Am J Hum Genet* 90: 321 - 330
- Baker, K. and Vorstman, J. A. (2012) Is there a core neuropsychiatric phenotype in 22q11.2 deletion syndrome? *Curr Opin Neurol* 25: 131 - 137
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., et al. (2007) High - resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823 - 837
- Barski, A., Chepelev, I., Liko, D., Cuddapah, S., Fleming, A. B., et al. (2010) Pol II and its associated epigenetic marks are present at Pol III - transcribed noncoding RNA genes. *Nat Struct Mol Biol* 17: 629 - 634
- Bell, C. G. and Beck, S. (2010) The epigenomic interface between genome and environment in common complex diseases. *Brief Funct Genomics* 9: 477 - 485
- Bell, C. J., Dinwiddie, D. L., Miller, N. A., Hateley, S. L., Ganusova, E. E., et al. (2011) Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next - generation sequencing. *Sci Transl Med* 3: 65ra64
- Bolton, K. L., Chenevix - Trench, G., Goh, C., Sadetzki, S., Ramus, S. J., et al. (2012) Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA* 307: 382 - 390
- Bonnefond, A., Durand, E., Sand, O., De Graeve, F., Gallina, S., et al. (2010) Molecular diagnosis of neonatal diabetes mellitus using next - generation sequencing of the whole exome. *PLoS ONE* 5: e13630
- Bras, J., Guerreiro, R. and Hardy, J. (2012) Use of next - generation sequencing and other whole - genome strategies to dissect neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 13: 453 - 464
- Bystricka, D., Sarova, I., Zemanova, Z., Brezinova, J., Lizcova, L., et al. (2012) Recurrent chromosomal breakpoints in patients with myelodysplastic syndromes and complex karyotype versus fragile sites. *Leuk Res* 36: e125 - 127
- Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., et al. (2012) Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted nextgeneration sequencing. *Sci Transl Med* 4: 118ra110
- Campeau, P. M., Kim, J. C., Lu, J. T., Schwartzenruber, J. A., Abdul - Rahman, O. A., et al. (2012) Mutations in KAT6B, encoding a histone acetyltransferase, cause Genitopatellar syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 282 - 289
- Casals, F., Idaghdour, Y., Hussin, J. and Awadalla, P. (2012) Next - generation sequencing approaches for genetic mapping of complex diseases. *J Neuroimmunol* 248: 10 - 22
- Chadwick, R. (2011) Personal genomes: no bad news? *Bioethics* 25: 62 - 65
- Chen, E. Z., Chiu, R. W., Sun, H., Akolekar, R., Chan, K. C., et al. (2011) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS ONE* 6: e21791
- Chiang, C., Jacobsen, J. C., Ernst, C., Hanscom, C., Heilbut, A., et al. (2012) Complex reorganization and predominant non - homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat Genet* 44: 390 - 397, S391
- Chinnery, P. F., Elliott, H. R., Hudson, G., Samuels, D. C. and Relton, C. L. (2012) Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol* 41: 177 - 187
- Chitty, L. S., Hill, M., White, H., Wright, D. and Morris, S. (2012) Noninvasive prenatal testing for aneuploidy - ready for prime time? *Am J Obstet Gynecol* 206: 269 - 275
- Chiu, R. W., Chan, K. C., Gao, Y., Lau, V. Y., Zheng, W., et al. (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20458 - 20463
- Chiu, R. W., Cantor, C. R. and Lo, Y. M. (2009) Non - invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends Genet* 25: 324 - 331
- Chiu, R. W., Sun, H., Akolekar, R., Clouser, C., Lee, C., et al. (2010) Maternal plasma DNA analysis with massively parallel sequencing by ligation for noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Clin Chem* 56: 459 - 463
- Chiu, R. W., Akolekar, R., Zheng, Y. W., Leung, T. Y., Sun, H., et al. (2011) Noninvasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 342: c7401
- Choi, M., Scholl, U. I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I. R., et al. (2009) Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19096 - 19101

- Chow, M. L., Pramparo, T., Winn, M. E., Barnes, C. C., Li, H. R., et al. (2012) Agedependent brain gene expression and copy number anomalies in autism suggest distinct pathological processes at young versus mature ages. *PLoS Genet* 8: e1002592
- Chu, T., Bunce, K., Hogge, W. A. and Peters, D. G. (2010) Statistical considerations for digital approaches to non - invasive fetal genotyping. *Bioinformatics* 26: 2863 - 2866
- Chung, R. H. and Chen, Y. E. (2012) A twostage random forest - based pathway analysis method. *PLoS ONE* 7: e36662
- Cirulli, E. T. and Goldstein, D. B. (2010) Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole - genome sequencing. *Nat Rev Genet* 11: 415 - 425
- Costa, V., Aprile, M., Esposito, R. and Ciccodicola, A. (2012) RNA - Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives. *Eur J Hum Genet*
- Dan, S., Chen, F., Choy, K. W., Jiang, F., Lin, J., et al. (2012) Prenatal detection of aneuploidy and imbalanced chromosomal arrangements by massively parallel sequencing. *PLoS ONE* 7: e27835
- Demichelis, F., Setlur, S. R., Banerjee, S., Chakravarty, D., Chen, J. Y., et al. (2012) Identification of functionally active, low frequency copy number variants at 15q21.3 and 12q21.31 associated with prostate cancer risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 6686 - 6691
- Dempfle, A., Scherag, A., Hein, R., Beckmann, L., Chang - Claude, J., et al. (2008) Gene - environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *Eur J Hum Genet* 16: 1164 - 1172
- Dias, C., Sincan, M., Cherukuri, P. F., Rupps, R., Huang, Y., et al. (2012) An analysis of exome sequencing for diagnostic testing of the genes associated with muscle disease and spastic paraplegia. *Hum Mutat* 33: 614 - 626
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457 - 463
- Ehrich, M., Deciu, C., Zwielfhofer, T., Tynan, J. A., Cagasan, L., et al. (2011) Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 204: 205 e201 - 211
- Evans, M. I. and Kilpatrick, M. (2010) Noninvasive prenatal diagnosis: 2010. *Clin Lab Med* 30: 655 - 665
- Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L. and Quake, S. R. (2008) Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16266 - 16271
- Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L. and Quake, S. R. (2010) Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell - free DNA by paired - end sequencing. *Clin Chem* 56: 1279 - 1286
- Fan, H. C. and Quake, S. R. (2010) Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. *PLoS ONE* 5: e10439
- Fan, H. C., Gu, W., Wang, J., Blumenfeld, Y. J., El - Sayed, Y. Y., et al. (2012) Non - invasive prenatal measurement of the fetal genome. *Nature* 487: 320 - 324
- Fehring, G., Liu, G., Briollais, L., Brennan, P., Amos, C. I., et al. (2012) Comparison of pathway analysis approaches using lung cancer GWAS data sets. *PLoS ONE* 7: e31816
- Fernandez, T. V., Sanders, S. J., Yurkiewicz, I. R., Ercan - Sencicek, A. G., Kim, Y. S., et al. (2012) Rare copy number variants in tourette syndrome disrupt genes in histaminergic pathways and overlap with autism. *Biol Psychiatry* 71: 392 - 402
- Freson, K., Izzi, B. and Van Geet, C. (2012) From genetics to epigenetics in platelet research. *Thrombosis research* 129: 325 - 329
- Genomes Project, C. (2010) A map of human genome variation from population - scale sequencing. *Nature* 467: 1061 - 1073
- Gibson, W. T., Hood, R. L., Zhan, S. H., Bulman, D. E., Fejes, A. P., et al. (2012) Mutations in EZH2 cause Weaver syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 110 - 118
- Gordon, L., Joo, J. E., Powell, J. E., Ollikainen, M., Novakovic, B., et al. (2012) Neonatal DNA methylation profile in human twins is specified by a complex interplay between intrauterine environmental and genetic factors, subject to tissue - specific influence. *Genome Res* 22: 1395 - 1406
- Grant, S. F., Glessner, J. T., Bradfield, J. P., Zhao, J., Tirone, J. E., et al. (2012) Lack of relationship between mitochondrial heteroplasmy or variation and childhood obesity. *Int J Obes (Lond)* 36: 80 - 83
- Green, E. D., Guyer, M. S. and National Human Genome Research, I. (2011) Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature* 470: 204 - 213
- Griswold, A. J., Ma, D., Cukier, H. N., Nations, L. D., Schmidt, M. A., et al. (2012) Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder - associated pathways. *Hum Mol Genet* 21: 3513 - 3523
- Grody, W. W. (2011) Expanded carrier screening and the law of unintended consequences: from cystic fibrosis to fragile X. *Genet Med* 13: 996 - 997
- Gunnarsdottir, E. D., Li, M., Bauchet, M., Finstermeier, K. and Stoneking, M. (2011) High - throughput sequencing of complete human mtDNA genomes from the Philippines. *Genome Res* 21: 1 - 11

- Guo, Y., Cai, Q., Samuels, D. C., Ye, F., Long, J., et al. (2012) The use of next generation sequencing technology to study the effect of radiation therapy on mitochondrial DNA mutation. *Mutat Res* 744: 154 - 160
- He, Y., Wu, J., Dressman, D. C., Iacobuzio - Donahue, C., Markowitz, S. D., et al. (2010) Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 464: 610 - 614
- Heinzen, E. L., Swoboda, K. J., Hitomi, Y., Gurrieri, F., Nicole, S., et al. (2012) De novo mutations in ATP1A3 cause alternating hemiplegia of childhood. *Nat Genet*
- Hochstenbach, R., Poot, M., Nijman, I. J., Renkens, I., Duran, K. J., et al. (2012) Discovery of variants unmasked by hemizygous deletions. *Eur J Hum Genet* 20: 748 - 753
- Holmans, P., Green, E. K., Pahwa, J. S., Ferreira, M. A., Purcell, S. M., et al. (2009) Gene ontology analysis of GWA study data sets provides insights into the biology of bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 85: 13 - 24
- Holt, R., Sykes, N. H., Conceicao, I. C., Cazier, J. B., Anney, R. J., et al. (2012) CNVs leading to fusion transcripts in individuals with autism spectrum disorder. *Eur J Hum Genet*
- Hood, R. L., Lines, M. A., Nikkel, S. M., Schwartzenuber, J., Beaulieu, C., et al. (2012) Mutations in SRCAP, encoding SNF2 - related CREBBP activator protein, cause Floating - Harbor syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 308 - 313
- Hunter, D. J. (2005) Gene - environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 6: 287 - 298
- Huppke, P., Brendel, C., Kalscheuer, V., Korenke, G. C., Marquardt, I., et al. (2012) Mutations in SLC33A1 cause a lethal autosomal - recessive disorder with congenital cataracts, hearing loss, and low serum copper and ceruloplasmin. *Am J Hum Genet* 90: 61 - 68
- International Stroke Genetics, C., Wellcome Trust Case Control, C., Bellenguez, C., Bevan, S., Gschwendtner, A., et al. (2012) Genome - wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke. *Nat Genet* 44: 328 - 333
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., et al. (2012) De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74: 285 - 299
- Jackson, L. and Pyeritz, R. E. (2011) Molecular technologies open new clinical genetic vistas. *Sci Transl Med* 3: 65ps62
- Jensen, T. J., Dzakula, Z., Deciu, C., van den Boom, D. and Ehrich, M. (2012) Detection of microdeletion 22q11.2 in a fetus by nextgeneration sequencing of maternal plasma. *Clin Chem* 58: 1148 - 1151
- Johnson, A. D. and O' Donnell, C. J. (2009) An open access database of genome - wide association results. *BMC Med Genet* 10: 6
- Johnston, J. J., Gropman, A. L., Sapp, J. C., Teer, J. K., Martin, J. M., et al. (2012) The phenotype of a germline mutation in PIGA: the gene somatically mutated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hum Genet* 90: 295 - 300
- Jones, L., Holmans, P. A., Hamshere, M. L., Harold, D., Moskvina, V., et al. (2010) Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer' s disease. *PLoS ONE* 5: e13950
- Jones, M. A., Ng, B. G., Bhide, S., Chin, E., Rhodenizer, D., et al. (2012) DDOST mutations identified by whole - exome sequencing are implicated in congenital disorders of glycosylation. *Am J Hum Genet* 90: 363 - 368
- Jones, W. D., Dafou, D., McEntagart, M., Woollard, W. J., Elmslie, F. V., et al. (2012) De Novo Mutations in MLL Cause Wiedemann - Steiner Syndrome. *Am J Hum Genet* 91: 358 - 364
- Kaback, M. M. (2000) Population - based genetic screening for reproductive counseling: the Tay - Sachs disease model. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 3: S192 - 195
- Kiezun, A., Garimella, K., Do, R., Stitzel, N. O., Neale, B. M., et al. (2012) Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nat Genet* 44: 623 - 630
- Kirov, G., Pocklington, A. J., Holmans, P., Ivanov, D., Ikeda, M., et al. (2012) De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 17: 142 - 153
- Kitzman, J. O., Snyder, M. W., Ventura, M., Lewis, A. P., Qiu, R., et al. (2012) Noninvasive whole - genome sequencing of a human fetus. *Sci Transl Med* 4: 137ra176
- Kong, A., Steinthorsdottir, V., Masson, G., Thorleifsson, G., Sulem, P., et al. (2009) Parental origin of sequence variants associated with complex diseases. *Nature* 462: 868 - 874
- Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., et al. (2012) Rate of de novo mutations and the importance of father' s age to disease risk. *Nature* 488: 471 - 475
- Krueger, F., Kreck, B., Franke, A. and Andrews, S. R. (2012) DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. *Nat Methods* 9: 145 - 151
- Ku, C. S., Loy, E. Y., Pawitan, Y. and Chia, K. S. (2010) The pursuit of genome - wide association studies: where are we now? *J Hum Genet* 55: 195 - 206
- Ku, C. S., Naidoo, N., Wu, M. and Soong, R. (2011) Studying the epigenome using next generation sequencing. *J Med Genet* 48: 721 - 730
- Ku, C. S., Cooper, D. N., Wu, M., Roukos, D. H., Pawitan, Y., et al. (2012) Gene discovery in familial cancer

- syndromes by exome sequencing: prospects for the elucidation of familial colorectal cancer type X. *Mod Pathol* 25: 1055 - 1068
- Ku, C. S., Polychronakos, C., Tan, E. K., Naidoo, N., Pawitan, Y., et al. (2012) A new paradigm emerges from the study of de novo mutations in the context of neurodevelopmental disease. *Mol Psychiatry*
- Kumar, P., Radhakrishnan, J., Chowdhary, M. A. and Giampietro, P. F. (2001) Prevalence and patterns of presentation of genetic disorders in a pediatric emergency department. *Mayo Clin Proc* 76: 777 - 783
- Lathi, R. B., Loring, M., Massie, J. A., Demko, Z. P., Johnson, D., et al. (2012) Informatics enhanced SNP microarray analysis of 30 miscarriage samples compared to routine cytogenetics. *PLoS ONE* 7: e31282
- Leblond, C. S., Heinrich, J., Delorme, R., Proepper, C., Betancur, C., et al. (2012) Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genet* 8: e1002521
- Lee, C. (2010) The future of prenatal cytogenetic diagnostics: a personal perspective. *Prenat Diagn* 30: 706 - 709
- Lee, H., Graham, J. M., Jr., Rimoin, D. L., Lachman, R. S., Krejci, P., et al. (2012) Exome sequencing identifies PDE4D mutations in acrodysostosis. *Am J Hum Genet* 90: 746 - 751
- Lee, J. H., Huynh, M., Silhavy, J. L., Kim, S., Dixon - Salazar, T., et al. (2012) De novo somatic mutations in components of the PI3K - AKT3 - mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet* 44: 941 - 945
- Leidenroth, A., Sorte, H. S., Gilfillan, G., Ehrlich, M., Lyle, R., et al. (2012) Diagnosis by sequencing: correction of misdiagnosis from FSHD2 to LGMD2A by whole - exome analysis. *Eur J Hum Genet* 20: 999 - 1003
- Li, D., Duell, E. J., Yu, K., Risch, H. A., Olson, S. H., et al. (2012) Pathway analysis of genome - wide association study data highlights pancreatic development genes as susceptibility factors for pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 33: 1384 - 1390
- Li, G., Bahn, J. H., Lee, J. H., Peng, G., Chen, Z., et al. (2012) Identification of allelespecific alternative mRNA processing via transcriptome sequencing. *Nucleic Acids Res* 40: e104
- Li, J., Harris, R. A., Cheung, S. W., Coarfa, C., Jeong, M., et al. (2012) Genomic hypomethylation in the human germline associates with selective structural mutability in the human genome. *PLoS Genet* 8: e1002692
- Liao, G. J., Lun, F. M., Zheng, Y. W., Chan, K. C., Leung, T. Y., et al. (2011) Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles. *Clin Chem* 57: 92 - 101
- Lim, Y. M., Koh, I., Park, Y. M., Kim, J. J., Kim, D. S., et al. (2012) Exome sequencing identifies KIAA1377 and C5orf42 as susceptibility genes for monomelic amyotrophy. *Neuromuscul Disord* 22: 394 - 400
- Lines, M. A., Huang, L., Schwartzentruber, J., Douglas, S. L., Lynch, D. C., et al. (2012) Haploinsufficiency of a spliceosomal GTPase encoded by EFTUD2 causes mandibulofacial dysostosis with microcephaly. *Am J Hum Genet* 90: 369 - 377
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., et al. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315 - 322
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., et al. (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471: 68 - 73
- Liu, Y., Gibson, J., Wheeler, J., Kwee, L. C., Santiago - Turla, C. M., et al. (2011) GALC deletions increase the risk of primary openangle glaucoma: the role of Mendelian variants in complex disease. *PLoS ONE* 6: e27134
- Lo, Y. M., Chan, K. C., Sun, H., Chen, E. Z., Jiang, P., et al. (2010) Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome - wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2: 61ra91
- Luo, R., Sanders, S. J., Tian, Y., Voineagu, I., Huang, N., et al. (2012) Genome - wide Transcriptome Profiling Reveals the Functional Impact of Rare De Novo and Recurrent CNVs in Autism Spectrum Disorders. *Am J Hum Genet* 91: 38 - 55
- Majewski, J., Schwartzentruber, J., Lalonde, E., Montpetit, A. and Jabado, N. (2011) What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48: 580 - 589
- Manning, A. K., Hivert, M. F., Scott, R. A., Grimsby, J. L., Bouatia - Naji, N., et al. (2012) A genome - wide approach accounting for body mass index identifies genetic variants influencing fasting glycemic traits and insulin resistance. *Nat Genet* 44: 659 - 669
- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorf, L. A., et al. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461: 747 - 753
- Maxmen, A. (2011) Exome sequencing deciphers rare diseases. *Cell* 144: 635 - 637
- Mayr, J. A., Zimmermann, F. A., Fauth, C., Bergheim, C., Meierhofer, D., et al. (2011) Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal - onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation. *Am J Hum Genet* 89: 792 - 797
- Mayr, J. A., Haack, T. B., Graf, E., Zimmermann, F. A., Wieland, T., et al. (2012) Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 314 - 320
- McClellan, J. and King, M. C. (2010)

- Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 141: 210 - 217
- Meng, L., Person, R. E. and Beaudet, A. L. (2012) Ube3a - ATS is an atypical RNA polymerase II transcript that represses the paternal expression of Ube3a. *Hum Mol Genet* 21: 3001 - 3012
- Michot, C., Le Goff, C., Goldenberg, A., Abhyankar, A., Klein, C., et al. (2012) Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *Am J Hum Genet* 90: 740 - 745
- Mills, J. D. and Janitz, M. (2012) Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 33: 1012 e1011 - 1024
- Mills, R. E., Pittard, W. S., Mullaney, J. M., Farooq, U., Creasy, T. H., et al. (2011) Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome Res* 21: 830 - 839
- Moise, K. J., Jr. (2008) Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol* 112: 164 - 176
- Need, A. C., Shashi, V., Hitomi, Y., Schoch, K., Shianna, K. V., et al. (2012) Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *J Med Genet* 49: 353 - 361
- Ng, S. B., Buckingham, K. J., Lee, C., Bigham, A. W., Tabor, H. K., et al. (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42: 30 - 35
- Norton, M. E., Brar, H., Weiss, J., Karimi, A., Laurent, L. C., et al. (2012) Non - Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 207: 137 e131 - 138
- O' Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., et al. (2012) Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485: 246 - 250
- Ostergaard, P., Simpson, M. A., Mendola, A., Vasudevan, P., Connell, F. C., et al. (2012) Mutations in KIF11 cause autosomal dominant microcephaly variably associated with congenital lymphedema and chorioretinopathy. *Am J Hum Genet* 90: 356 - 362
- Palomaki, G. E., Kloza, E. M., Lambert - Messerlian, G. M., Haddow, J. E., Neveux, L. M., et al. (2011) DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 13: 913 - 920
- Pang, A. W., MacDonald, J. R., Pinto, D., Wei, J., Rafiq, M. A., et al. (2010) Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. *Genome Biol* 11: R52
- Pierson, T. M., Adams, D., Bonn, F., Martinelli, P., Cherukuri, P. F., et al. (2011) Whole - exome sequencing identifies homozygous AFG3L2 mutations in a spastic ataxia - neuropathy syndrome linked to mitochondrial m - AAA proteases. *PLoS Genet* 7: e1002325
- Pinto, D., Pagnamenta, A. T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., et al. (2010) Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 466: 368 - 372
- Polvi, A., Linnankivi, T., Kivela, T., Herva, R., Keating, J. P., et al. (2012) Mutations in CTC1, encoding the CTS telomere maintenance complex component 1, cause cerebrotelomeric microangiopathy with calcifications and cysts. *Am J Hum Genet* 90: 540 - 549
- Portela, A. and Esteller, M. (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28: 1057 - 1068
- Quinlan, A. R. and Hall, I. M. (2012) Characterizing complex structural variation in germline and somatic genomes. *Trends Genet* 28: 43 - 53
- Radford, E. J., Isganaitis, E., Jimenez - Chillaron, J., Schroeder, J., Molla, M., et al. (2012) An unbiased assessment of the role of imprinted genes in an intergenerational model of developmental programming. *PLoS Genet* 8: e1002605
- Raffan, E. and Semple, R. K. (2011) Next generation sequencing - implications for clinical practice. *Br Med Bull* 99: 53 - 71
- Riviere, J. B., Mirzaa, G. M., O' Roak, B. J., Beddaoui, M., Alcantara, D., et al. (2012) De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* 44: 934 - 940
- Salyakina, D., Cukier, H. N., Lee, J. M., Sacharow, S., Nations, L. D., et al. (2011) Copy number variants in extended autism spectrum disorder families reveal candidates potentially involved in autism risk. *PLoS ONE* 6: e26049
- Sasayama, D., Hiraishi, A., Tatsumi, M., Kamijima, K., Ikeda, M., et al. (2012) Possible association of CUX1 gene polymorphisms with antidepressant response in major depressive disorder. *Pharmacogenomics J*
- Sato - Otsubo, A., Sanada, M. and Ogawa, S. (2012) Single - nucleotide polymorphism array karyotyping in clinical practice: where, when, and how? *Seminars in oncology* 39: 13 - 25
- Scharfe, C., Lu, H. H., Neuenburg, J. K., Allen, E. A., Li, G. C., et al. (2009) Mapping gene associations in human mitochondria using clinical disease phenotypes. *PLoS Comput Biol* 5: e1000374
- Sehnert, A. J., Rhees, B., Comstock, D., de Feo, E., Heilek, G., et al. (2011) Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell - free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem* 57: 1042 - 1049
- Selmer, K. K., Gilfillan, G. D., Stromme, P., Lyle, R., Hughes, T., et al. (2012) A mild form of Mucopolysaccharidosis IIIB diagnosed with targeted next - generation sequencing of linked genomic regions. *Eur J Hum Genet* 20: 58 - 63



- Simpson, M. A., Deshpande, C., Dafou, D., Vissers, L. E., Woollard, W. J., et al. (2012) De novo mutations of the gene encoding the histone acetyltransferase KAT6B cause Genitopatellar syndrome. *Am J Hum Genet* 90: 290 - 294
- Sobrin, L., Ripke, S., Yu, Y., Fagerness, J., Bhangale, T. R., et al. (2012) Heritability and Genome - Wide Association Study to Assess Genetic Differences between Advanced Age - Related Macular Degeneration Subtypes. *Ophthalmology*
- Sondheimer, N., Glatz, C. E., Tirone, J. E., Deardorff, M. A., Krieger, A. M., et al. (2011) Neutral mitochondrial heteroplasmy and the influence of aging. *Hum Mol Genet* 20: 1653 - 1659
- Sorte, H., Morkrid, L., Rodningen, O., Kulseth, M. A., Stray - Pedersen, A., et al. (2012) Severe ALG8 - CDG (CDG - lh) associated with homozygosity for two novel missense mutations detected by exome sequencing of candidate genes. *Eur J Med Genet* 55: 196 - 202
- Sparks, A. B., Struble, C. A., Wang, E. T., Song, K. and Oliphant, A. (2012) Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell - free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 206: 319 e311 - 319
- Sparks, A. B., Wang, E. T., Struble, C. A., Barrett, W., Stokowski, R., et al. (2012) Selective analysis of cell - free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn* 32: 3 - 9
- Sun, L., Rommens, J. M., Corvol, H., Li, W., Li, X., et al. (2012) Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 44: 562 - 569
- Teichroeb, J. H., Betts, D. H. and Vaziri, H. (2011) Suppression of the imprinted gene NNAT and X - chromosome gene activation in isogenic human iPS cells. *PLoS ONE* 6: e23436
- Tennessen, J. A., Bigham, A. W., O' Connor, T. D., Fu, W., Kenny, E. E., et al. (2012) Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science* 337: 64 - 69
- Veenma, D., Brosens, E., de Jong, E., van de Ven, C., Meeussen, C., et al. (2012) Copy number detection in discordant monozygotic twins of Congenital Diaphragmatic Hernia (CDH) and Esophageal Atresia (EA) cohorts. *Eur J Hum Genet* 20: 298 - 304
- Velinov, M., Dolzhanskaya, N., Gonzalez, M., Powell, E., Konidari, I., et al. (2012) Mutations in the gene DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease in a proportion of cases: study of the Parry family and 8 other families. *PLoS ONE* 7: e29729
- Visscher, P. M., Brown, M. A., McCarthy, M. I. and Yang, J. (2012) Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet* 90: 7 - 24
- Worthey, E. A., Mayer, A. N., Syverson, G. D., Helbling, D., Bonacci, B. B., et al. (2011) Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med* 13: 255 - 262
- Yang, Y., Wang, C., Wang, F., Zhu, L., Liu, H., et al. (2012) Novel chromosomal translocation t(11;9)(p15;p23) involving deletion and duplication of 9p in a girl associated with autism and mental retardation. *Gene* 502: 154 - 158
- Zankl, A., Duncan, E. L., Leo, P. J., Clark, G. R., Glazov, E. A., et al. (2012) Multicentric carpotarsal osteolysis is caused by mutations clustering in the amino - terminal transcriptional activation domain of MAFB. *Am J Hum Genet* 90: 494 - 501
- Zhang, F., Gu, W., Hurles, M. E. and Lupski, J. R. (2009) Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10: 451 - 481
- Zhao, Q., Li, T., Zhao, X., Huang, K., Wang, T., et al. (2012) Rare CNVs and Tag SNPs at 15q11.2 Are Associated With Schizophrenia in the Han Chinese Population. *Schizophr Bull*
- Zollino, M., Orteschi, D., Murdolo, M., Lattante, S., Battaglia, D., et al. (2012) Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. *Nat Genet* 44: 636 - 638



イルミナ株式会社

[www.illumina.co.jp](http://www.illumina.co.jp)

---

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illumina*Dx*, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPRO, DASL, DesignStudio, Eco, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は Illumina, Inc の商標または登録商標です。その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. publication\_genetic-j 24JUN2013

**illumina**<sup>®</sup>