

|                        |                                                 |                                                                                                     |
|------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| No.                    | 25-2164                                         |                                                                                                     |
| Project Title          | ロングリード・シークエンサーを用いた新規血友病遺伝子検査法の確立                |                                                                                                     |
| Principal Investigator | Ei Kinai ( Tokyo Medical University・Professor ) |                                                                                                     |
| Project Member(s)      | IMSUT Host Researcher                           | Kiyoshi Yamaguchi ( The Institute of Medical Science, The University of Tokyo・Associate professor ) |
|                        | Project Member (s)                              | 木内 英 ( 東京医科大学 臨床検査医学分野・主任教授 )                                                                       |
|                        | Project Member (s)                              | 稲葉 浩 ( 東京医科大学 臨床検査医学分野・准教授 )                                                                        |
|                        | Project Member (s)                              | 篠澤 圭子 ( 東京医科大学 臨床検査医学分野・講師 )                                                                        |
|                        | Project Member (s)                              | 三橋 彩乃 ( 東京医科大学 臨床検査医学分野・研究補助員 )                                                                     |
|                        | Project Member (s)                              | 山口 貴世志 ( 臨床ゲノム腫瘍学分野・准教授 )                                                                           |
|                        | Project Member (s)                              | 古川 洋一 ( 臨床ゲノム腫瘍学分野・教授 )                                                                             |
|                        | Project Member (s)                              | 井元 清哉 ( 健康医療インテリジェンス分野・教授 )                                                                         |

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業  
共同研究報告書（年次終了・研究完了）【国内】

## 共同研究報告（年次終了）

## 研究の背景

血友病は先天的に凝固第Ⅷ因子（F8）・第Ⅸ因子（F9）の欠乏もしくは異常により出血傾向をきたす疾患で、X染色体連鎖潜性（劣性）遺伝形式をとる。血友病の診断は凝固因子活性によって定義されるが、保因者診断においては遺伝子診断が最も精度の高い検査であることから遺伝子解析の需要が急増している。

血友病Aは多様な遺伝子変異と異常メカニズムをもち、イントロン22/1逆位・大欠失などの構造変異などの多様な変異が知られている。こうした多様な遺伝子バリエーションを解析するためには、ダイレクトシーケンス法のみならず、逆位解析やMLPA法、次世代シーケンサー（NGS）でイントロン深部の解析が必要になり、複雑な遺伝子検査が保因者診断の普及の障害になっている。

Oxford Nanopore Technologies社のナノポアシーケンサーでは、理論的にF8のような巨大遺伝子でも逆位など大きな構造変異の検出や、複数のバリエーションのハプロタイプを決定することが可能であり、血友病Aのように多様なバリエーションを有する疾患の遺伝子解析が飛躍的に省力化できると期待される。

## 当該年度の進捗状況

Adaptive sampling、Cas9エンリッチメント法、Long PCR法によりF8遺伝子領域のDNA断片を濃縮し、MinIONを用いたナノポアシーケンシングを実施した。エンリッチメント後、実際の逆位保有者（男性血友病および女性保因者）を解析したところ、上記3手法すべてにおいて、標的領域に対応するDNA断片の濃縮がIntegrative Genomics Viewer（IGV）上で確認された。しかし、SeverusやSnifflesなどの構造異常検出ソフトウェアでは当該逆位は検出されなかった。そこで、シーケンサーをMinIONからPromethION 2 Integrated（P2i）に変更し、Adaptive samplingを再試行したところ、シーケンスのアウトプット量が大幅に向上した。Type1およびType2の逆位を有する男性血友病患者サンプルについて、P2iを用いてシーケンス解析を実施したところ、Type1逆位ではnpInv（非アレル性相同組換え由来逆位に特化した解析ツール）により検出され、ブレイクポイントも正確に同定された。さらに、Sniffles2においても同様に逆位として検出された。一方、Type2逆位については、npInvでは検出されず、Sniffles2では欠失としてコールされた。同一領域に大規模欠失の既報が存在しないこと、およびIGV上でのsoft-clippedリードのパターンを考慮すると、本来は逆位であるにもかかわらず、欠失として誤ってコールされた可能性が高いと考えられた。Cas9エンリッチメントやLong PCRと違い、Adaptive samplingでは逆位特異的なプライマーが不要なことから、ナノポアシーケンサーによる単一プロトコルによる逆位検出が可能であることが示された。今後は①type 2逆位の別サンプルでの再検、②保因者における逆位の検出、③他主要な構造変異・単変異の検討を行い、論文化を目指す。