

Title	Adaptive samplingによる長鎖型シーケンサーの臨床応用の実現
Sub Title	Clinical approach of long read sequencing using adaptive sampling technique.
Author	山田, 茉未子(Yamada, Mamiko)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2023
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>ゲノム構造異常の解析には長鎖型シーケンサーを用いた解析の有用性が期待されるが、点変異検出時の誤判定率や解析コストの高さが問題となっていた。申請者は長鎖型シーケンサーを用いた解析において、解析対象範囲を限定するAdaptive sampling手法を用いることで、点変異と構造変異を検出可能なシステムのより実用的な構築を目指した。</p> <p>申請者は本研究を通じて、①均衡型転座における転座切断点の解析、②メチル化異常症(プラダーウィリー症候群およびアンジェルマン症候群)の解析への有用性を示した。①新生突然変異による3番染色体7番染色体の均衡型転座の患者に対して本解析手法を実装し、正確な転座切断点を決定し、切断点上に存在する遺伝子を特定し、患者の症状の成因を解明することができた。②メチル化異常症の代表例であるプラダーウィリー症候群とアンジェルマン症候群の患者に対して本解析手法の実装により、両者を明確に区別し診断することができた。染色体15q11.2上のSNRPNのプロモーター領域を挟むCpGアイランドには、母方由来のアレルでは完全にメチル化され、父方由来のアレルではメチル化されていないCpG部位が存在する。正常な個体では、メチル化アレルと非メチル化アレルの両方が観察される。プラダーウィリー症候群の患者ではメチル化アレルのみが、アンジェルマン症候群の患者では非メチル化アレルのみが観察される。申請者はナノポアリードから生成される電流強度の違いにより、15q11.2のメチル化CpG部位と非メチル化CpG部位を識別できるロングリードシーケンスアッセイを開発した。従来、両疾患の区別には複数の解析手法を組み合わせる必要があったため、一元的に解析できる本手法の有用性が示された。本研究により検証された解析手法は、遺伝性疾患の診断効率を高めることに寄与できると考えられた。</p> <p>Analysis of genomic structural variants using long-read sequencing is expected to be useful, but the false positive rate in detecting single nucleotide variants and the high cost of analysis have been problems. We aimed to construct a practical system that can detect both single nucleotide variants and structural variants by using an adaptive sampling method that limits the target area of analysis in long-read sequencing analysis. In this study, we demonstrated the usefulness of adaptive sampling methods for (1) analysis of translocation breakpoints in balanced translocations and (2) analysis of methylation abnormalities (Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome). (1) We applied this method to a patient with a de novo balanced translocation of chromosomes 3 and 7, determined the exact breakpoint of the translocation, identified the gene located at the breakpoint, and elucidated the cause of the patient's symptoms. (2) Using this analytical method, we were able to clearly distinguish and diagnose both diseases in patients with Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome, which are representative examples of methylation abnormalities. The CpG island flanking the promoter region of SNRPN on chromosome 15q11.2 contains a CpG site that is completely methylated in alleles of maternal origin and unmethylated in those of paternal origin. Both methylated and unmethylated alleles are observed in normal individuals. Only methylated alleles are observed in patients with Prader-Willi syndrome, and only unmethylated alleles are observed in patients with Angelman syndrome. We have developed a long-read sequencing assay that can discriminate between methylated and unmethylated CpG sites on 15q11.2 based on differences in current intensity generated from nanopore reads. The utility of this method, which allows for centralized analysis, was demonstrated, as previously it was necessary to combine multiple analysis methods to distinguish between the two diseases. The analysis method validated in this study is expected to help improve the efficiency of genetic disease diagnosis.</p>
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-20220003-0043

研究代表者	所属	医学部クラスター部門	職名	助教(有期・医学部)	補助額	1,500 千円
	氏名	山田 茉未子	氏名(英語)	Mamiko Yamada		
研究課題(日本語)						
Adaptive samplingによる長鎖型シーケンサーの臨床応用の実現						
研究課題(英訳)						
Clinical approach of long read sequencing using adaptive sampling technique.						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
山田茉未子(Mamiko Yamada)		医学部・臨床遺伝学センター・助教				
1. 研究成果実績の概要						
<p>ゲノム構造異常の解析には長鎖型シーケンサーを用いた解析の有用性が期待されるが、点変異検出時の誤判定率や解析コストの高さが問題となっていた。申請者は長鎖型シーケンサーを用いた解析において、解析対象範囲を限定する Adaptive sampling 手法を用いることで、点変異と構造変異を検出可能なシステムのより実用的な構築を目指した。</p> <p>申請者は本研究を通じて、①均衡型転座における転座切断点の解析、②メチル化異常症(プラダーウィリー症候群およびアンジェルマン症候群)の解析への有用性を示した。①新生突然変異による3番染色体7番染色体の均衡型転座の患者に対して本解析手法を実装し、正確な転座切断点を決定し、切断点上に存在する遺伝子を特定し、患者の症状の成因を解明することができた。②メチル化異常症の代表例であるプラダーウィリー症候群とアンジェルマン症候群の患者に対して本解析手法の実装により、両者を明確に区別し診断することができた。染色体15q11.2上のSNRPNのプロモーター領域を挟むCpGアイランドには、母方由来のアレルでは完全にメチル化され、父方由来のアレルではメチル化されていないCpG部位が存在する。正常な個体では、メチル化アリルと非メチル化アリルの両方が観察される。プラダーウィリー症候群の患者ではメチル化アリルのみが、アンジェルマン症候群の患者では非メチル化アリルのみが観察される。申請者はナノポアリードから生成される電流強度の違いにより、15q11.2のメチル化CpG部位と非メチル化CpG部位を識別できるロングリードシーケンスアッセイを開発した。従来、両疾患の区別には複数の解析手法を組み合わせる必要があったため、一元的に解析できる本手法の有用性が示された。本研究により検証された解析手法は、遺伝性疾患の診断効率を高めることに寄与できると考えられた。</p>						
2. 研究成果実績の概要(英訳)						
<p>Analysis of genomic structural variants using long-read sequencing is expected to be useful, but the false positive rate in detecting single nucleotide variants and the high cost of analysis have been problems. We aimed to construct a practical system that can detect both single nucleotide variants and structural variants by using an adaptive sampling method that limits the target area of analysis in long-read sequencing analysis. In this study, we demonstrated the usefulness of adaptive sampling methods for (1) analysis of translocation breakpoints in balanced translocations and (2) analysis of methylation abnormalities (Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome). (1) We applied this method to a patient with a de novo balanced translocation of chromosomes 3 and 7, determined the exact breakpoint of the translocation, identified the gene located at the breakpoint, and elucidated the cause of the patient's symptoms. (2) Using this analytical method, we were able to clearly distinguish and diagnose both diseases in patients with Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome, which are representative examples of methylation abnormalities. The CpG island flanking the promoter region of SNRPN on chromosome 15q11.2 contains a CpG site that is completely methylated in alleles of maternal origin and unmethylated in those of paternal origin. Both methylated and unmethylated alleles are observed in normal individuals. Only methylated alleles are observed in patients with Prader-Willi syndrome, and only unmethylated alleles are observed in patients with Angelman syndrome. We have developed a long-read sequencing assay that can discriminate between methylated and unmethylated CpG sites on 15q11.2 based on differences in current intensity generated from nanopore reads. The utility of this method, which allows for centralized analysis, was demonstrated, as previously it was necessary to combine multiple analysis methods to distinguish between the two diseases. The analysis method validated in this study is expected to help improve the efficiency of genetic disease diagnosis.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Yamada M, Okuno H, Okamoto N, Suzuki H, Miya F, Takenouchi T, and Kosaki K	Diagnosis of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome by targeted nanopore long-read sequencing.	The European Journal of Medical Genetics	2023 Feb			
Yamada M, Suzuki H, Miya F, Kosugiyama K, Ujiie T, Tonoki H, and Kosaki K.	Precise definition of the breakpoints of an apparently balanced translocation between chromosome 3q26 and chromosome 7q36: Role of KMT2C disruption.	Congenital Anomalies	2023 In Press			
山田茉未子、鈴木寿人、外木秀文、小杉山清隆、氏家武、宮冬樹、武内俊樹、小崎健次郎	デノボ均衡型相互転座における非特異的な知的障害の病因を長鎖型シーケンサーにより読み解く	第45回日本小児遺伝学会学術集会	2023年1月28日			

Mamiko Yamada, Hisato Suzuki, Hidefumi Tonoki, Kiyotaka Kosugiyama, Takeshi Ujiie, Fuyuki Miya, Toshiki Takenouchi, Kenjiro Kosaki	Whole-genome long-read sequencing for breakpoint analysis of de novo balanced reciprocal translocations	第 67 回日本人類遺伝学会	2022 年 12 月 15 日
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------	------------------