

201135008A

厚生労働科学研究補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野)

次世代シーケンサーを用いた遺伝性ミオパチーの原因解明

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成24年(2012年)3月

## 厚生労働科学研究補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野)

次世代シーケンサーを用いた遺伝性ミオパチーの原因解明

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成24年(2012年)3月

# 目次

## I. 総括研究報告

次世代シーケンサーを用いた遺伝性ミオパチーの原因解明	1
----------------------------	---

西野一三【(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部 部長】

## II. 分担研究報告

1. エクソーム解析による新規原因遺伝子解明システム構築	7
------------------------------	---

西野一三【(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部 部長】

2. 次世代シーケンサーによる遺伝性筋疾患の新規遺伝子変異同定のための高速実証実験系の確立	10
---	----

野口 悟【(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部 室長】

3. 次世代シーケンサーを用いた先天性ミオパチーの原因解明	15
-------------------------------	----

林 由起子【(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部 室長】

4. ミトコンドリアミオパチーの原因解明	17
----------------------	----

後藤 雄一【(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部 部長】

5. 次世代シーケンサーを用いた遺伝性ミオパチーの原因解明に関する臨床情報の集積	21
--	----

小牧 宏文【(独) 国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科 医長】

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))  
総括研究報告書

「次世代シーケンサーを用いた遺伝性ミオパチーの原因解明」

研究代表者 西野 一三

(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第一部 部長

研究要旨

次世代シーケンサーは平成23年度末に納入され、本格稼働ができる体制が整った。今後展開される遺伝性筋疾患を対象とした次世代解析に備えるべく、次世代型シーケンサーを用いたゲノム情報を網羅的に取得し、候補遺伝子を抽出する系を構築した。また、複数の解析プログラムによる結果の比較検討、サンガー法での検証については予備実験をおこなった。また、今後解析が進むと多数の遺伝子変異候補が得られると予測されるが、家系情報を持たない日本人患者においては、統計解析により変異候補を絞り込むことは不可能である。そこで、劣性型遺伝形式をとる自己貪色空胞性ミオパチーを例に、培養細胞を用いた、再現性の良く、ハイスループット可能な実証実験の可能性を探った。また、遺伝子ノックダウン法を用いて、劣性遺伝性筋疾患のモデルマウス的高速作成と解析方法の構築を行った。一方、原因遺伝子が同定されていても原因遺伝子が巨大であるなどの理由から、多くの先天性ミオパチーは診断が未確定となっている。これを解決すべく、次世代シーケンサーを活用し、既知疾患原因遺伝子の網羅的変異スクリーニングを効率的におこなう方法を確立した。現在、変異スクリーニングを進めるとともに、貴重な患者組織を可能な限り保存しうるゲノムDNAの調整方法を検討中である。またこれと同時に、今後遺伝子変異情報が集積してきた段階で問題になるであろう遺伝子型・表現型相関を明らかにすべく、先天性ミオパチーの臨床データの集積も進めつつある。ミトコンドリアミオパチーに関しては、凍結筋と同時に筋芽細胞/線維芽細胞が同時に登録されている約200例を対象として、エクソーム解析を行うことで研究成果が確実に出ると思われる疾患を選別し優先順位を付けた。

研究分担者

野口 悟 ・ (独)国立精神・神経医療研究  
センター 神経研究所疾病研  
究第一部 室長

林 由起子 ・ (独)国立精神・神経医療研究  
センター 神経研究所疾病研  
究第一部 室長

後藤 雄一・(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部 部長

小牧 宏文・(独)国立精神・神経医療研究センター 病院小児神経科 医長

#### 研究協力者

舟山 亮・東北大学大学院医学系研究科附属創生応用医学研究センター 助教

辻 省次・東京大学 教授

松本 直通・横浜市立大学 教授

佐藤有希子・(独)国立精神・神経医療研究センター 病院外来部遺伝カウンセリング室 遺伝カウンセラー

#### A. 研究目的

原因不明の遺伝性ミオパチー例に対して、次世代シーケンサーを用いたエクソームのリシーケンス解析を行って原因遺伝子を同定し、分子病態を明らかにする。

#### B. 研究方法

(1) エクソーム解析による新規原因遺伝子解明システム構築

国立精神・神経医療研究センター (NCNP) 骨格筋レポジトリ登録検体のうち診断未確定の先天性ミオパチー約600例のうち、既知疾患原因遺伝子で判別不能な検体を解析対象としてゲノムDNAを抽出した。3 $\mu$ gのゲノムDNAを200bpsの長さで断片化後アダプター分子を接合し、エクソンの部分配列DNAをプローブとし、ヒト全エクソームを濃縮した。得られたDNAライブラリーを用いて、ゲノム情報を収集した。今回は予備実験のため、1配列当たりの塩基長は、通常の1/4、50bps

の設定で解析した。得られたゲノム情報より、バイオインフォマティクスによる解析系を構築するために、開発または市販の解析プログラムを準備した。

(2) 先天性ミオパチーの網羅的既知遺伝子スクリーニング法確立

NCNP 骨格筋レポジトリの中で遺伝学的診断のついていない先天性ミオパチー症例を対象として、ゲノムDNAを抽出した。先天性ミオパチーで明らかになっている既知疾患原因遺伝子を網羅的にスクリーニングするため、カスタマイズしたエクソンキャプチャーキットを設計し、次世代シーケンサーを用いた変異スクリーニングを効率的に行う方法論を確立した。特に骨格筋からDNAを抽出する場合、貴重な患者組織を温存することを考慮し、次世代シーケンス解析に適切なDNAの調整方法について検討した。

(3) 先天性ミオパチー診断未確定例の臨床情報収集システム確立

家族歴、妊娠分娩歴、出生時の状況、合併症状、臨床経過などを網羅的に把握するとともに、CK値などの生化学的所見、筋電図、末梢神経伝導検査などの所見、病理所見を把握する。国立精神・神経医療研究センターの脳病態統合イメージングセンター (IBIC) が独自に開発・提供するオンラインサポートシステムであるIBISSを通じ、診療の一環として撮影された骨格筋画像を既存の患者臨床情報とともに収集する。得られた画像データおよび臨床情報は統合的に解析に供される。

(4) 自己貪色空胞性ミオパチー培養細胞を用いた実証実験解析系の構築

変異の明らかとなっている自己貪色空胞性ミオパチー患者由来の初代皮膚培養繊維芽細胞継代培養し、リソソーム内pH測定、mTORCの局在変化と活性化解析を行った。

(5) 遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患モデルマウスの作成  
自己貪色空胞性ミオパチー原因遺伝子であるVma21遺伝子とミオチューブラーミオパチーの原因遺伝子であるMtm

1を標的とし、翻訳阻害を引き起こす Vivo-Morpholino (MVMA21-1 および MMTM1-1) を設計し、C57Black6/J マウスに投与し、呼吸筋機能と単離横隔膜の収縮力を測定するとともに組織学的評価を行った。

(6) ミトコンドリアミオパチー症例の選別

NCNP レポジトリに登録されているミトコンドリアミオパチー約 1500 例の中から、ミトコンドリア DNA の全周シーケンスおよびミトコンドリア機能検査などの詳細な解析が終了している例を抽出した。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリ検体は、検体採取時に、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た書式を用いて、各種診断への同意とともに、神経・筋疾患の病態解明と治療法開発研究に対する検体利用に対してインフォームドコンセントを得ている。この同意を得た検体は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た研究に対してのみ使用される。研究を行う際には、全ての検体は匿名化されて、各種試料は検体番号で管理される。結果の発表に際しても個人情報は一切提示されない。

すべての動物実験は、(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い、同研究所小型実験動物倫理問題検討委員会にて審査・承認を得ている。

また、IBISS を用いた画像集積に関しても国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

(1) エクソーム解析による新規原因遺伝子解明システム構築

エクソーム濃縮 kit に付属している index が 12 検体対応しかいないため、12 検体/週でエクソームを濃縮し、DNA ライブラリーを作成した。現在、順次 DNA ライブラリーの作成を進めている。以下の解析パイプラインを構築した。HiSeq 1000 で得られたゲノム断片情報より、信頼性の高い配列 (Quality Score > 30) を抽出し、得られた断片配列は、hg19 を参照配列として、BWA を用いてマッピングする。Samtools を用いて一塩基変異多型 (SNPs) を抽出し、遺伝子情報、変異情報を付加する。得られた SNPs 情報を、dbSNP や 1000Genome 等の公共データベースを用いて比較し、未報告の新規の SNPs のみを抽出する。その変異が引き起こすと予想されるアミノ酸非同義置換またはフレームシフトが、タンパク質の機能にどのような影響を及ぼすかを、PolyPhen-2、Sorting Intolerant from Tolerant という 2 種類の web-interface のプログラムを用いて解析する。CLC Genomics Workbench (Filgen 社) との比較検討を行ったが、解析結果は同一であった。

(2) 先天性ミオパチーの網羅的既知遺伝子スクリーニング法確立

NCNP 骨格筋レポジトリ約 12,600 検体を検索した結果、診断確定のされていない先天性ミオパチー約 600 例を抽出した。このうち研究利用が可能で、かつゲノム DNA の抽出可能なサンプルを選出し、順次 DNA の抽出を開始している。また、貴重な組織サンプルを可能な限り保存するため、骨格筋から抽出した DNA については、増幅処理をおこなった。この増幅した DNA を用いて、次世代シーケンス解析の際の問題点についての検討をおこなっている。網羅的エクソームシーケンスを行うべく SureSelect を用いたカスタムキットを設計、作製し、イルミナ社 Miseq を用いて現在解析を開始している。

(3) 先天性ミオパチー診断未確定例の臨床情報収集システム確立

今年度は研究計画を立案し、倫理申請を

行った。次年度以降に画像、臨床データの集積を行っていく予定である。

#### (4) 自己貪色空胞性ミオパチー培養細胞を用いた実証実験解析系の構築

初代培養繊維芽細胞のリソソーム内 pH 測定では、自己貪色空胞性ミオパチー患者由来細胞で、自己貪色空胞性ミオパチー患者由来細胞では pH4.5、正常コントロール細胞では pH3 であった。自己貪色空胞性ミオパチー患者由来細胞では、アミノ酸を再添加しても、mTORC はアミノ酸除去時と同様の局在を示した。

#### (5) 遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患モデルマウスの作成

C57Black6J マウス生後 3 日齢より Vivo-Morpholino を投与した。MMTM1-1 投与マウスは、投与開始後 10 日から体重増加の鈍化が認められた。MVMA21-1 は生理食塩水投与と同様の体重増加を示した。Vivo-Morpholino を 4 週間投与を行った後、呼吸測定を行った。一回換気量に差異が認められた(コントロールマウス:  $0.22 \pm 0.01$  ml、MMTM1-1 投与:  $0.18 \pm 0.01$  ml、MVMA21-1 投与:  $0.20 \pm 0.01$  ml)。分時換気量には差異が認められず、呼吸頻度が上昇していることが示された。横隔膜筋の Ex vivo 収縮測定においては、単位断面積あたりの収縮力では、コントロールマウスで等尺性収縮:  $42.1 \pm 16.4$  mN/mm<sup>2</sup>、強縮:  $137.5 \pm 30.5$  mN/mm<sup>2</sup>、MMTM1-1 投与群では等尺性収縮:  $12.8 \pm 6.0$  mN/mm<sup>2</sup>、強縮:  $62.6 \pm 21.9$  mN/mm<sup>2</sup>、MVMA21-1 投与群では  $16.7 \pm 5.6$  mN/mm<sup>2</sup>、強縮:  $75.5 \pm 20.8$  mN/mm<sup>2</sup> と筋力低下が確認された。横隔膜の筋病理解析では、MMTM1-1 投与群で腹腔側に小さな中心核線維が認められた。peripheral halo も観察された。MVMA21-1 投与群では、中心核線維は認められるものの、筋壊死に伴う、再生線維が一部に認められた。

#### (6) ミトコンドリアミオパチー症例の選別

骨格筋及び筋芽細胞で、詳細な機能解析が終了しているびまん性シトクローム c 酸化酵素欠損症 8 例を抽出した。ま

た最も代表的なミトコンドリア病である MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes) で、ミトコンドリア DNA 異常が確実に否定されている症例、さらに Leigh 脳症の臨床病型でミトコンドリア DNA 変異が否定されている症例を次に続く対象とすべく準備中である。

## D. 考察

次世代シーケンサーは平成 23 年度末に納入され、本格稼働ができる体制が整った。今年度は、本格稼働に備えるべく解析システムならびに実証実験解析系の確立に主眼を置いた。

次世代シーケンサーの SNPs データ解析パイプラインの構築を終えた。ただし、解析ソフトは日進月歩であるため、今後、既存のプログラムが改良になった場合や新規のプログラムが開発された場合は試行する予定である。

サンガー法での検証については、候補遺伝子が多数に及ぶ場合、効率的、かつ迅速に解析する必要がある。プライマー作成、遺伝子増幅、シーケンスの作業工程について、時間短縮し自動化できるところは、今後、機器を導入して解析にあたりたい。

先天性ミオパチーの既知遺伝子スクリーニングも、次世代シーケンサー導入を待つ状態であったが、カスタマイズしたエクソンキャプチャーキットを設計し、その準備はほぼ完了したと言える。今後は、多数の症例の診断を効率的に確定することが可能となり、極めて有用であると考えられる。

自己貪色空胞性ミオパチー培養細胞を用いた実証実験解析系の構築においては、患者細胞での表現型の回復への相補性試験を利用する方法が有効であることが示された。しかしながら、この方法は、表現型の回復を目的としているため、患者細胞で観察される特徴的な表現型を見いだすことが必須である。そのため、解析対象となる患者がその臨床的特徴や病理学的特徴が充分解析されていることが前提となる。



その情報を元に、患者の病態を想定し、発症機序を推測して、細胞での特徴的な表現型をとらえる実験系を組む必要がある。本研究では、モデルケースとして自己貪食空胞性ミオパチーを取り上げ、患者細胞におけるリソソーム内pHの測定、アミノ酸添加におけるmTORCのリソソームへの局在変化および活性化を解析した。これらすべての細胞表現型は、原因遺伝子の変異から予想されたものであり、同様の臨床症状および骨格筋病理像を示し、既知遺伝子変異のない患者群における変異検索には利用出来るものと考えられた。

別のアプローチとして、劣性型遺伝疾患を、高速でマウスにて再現することを試みた。今回用いた方法は、マウスに対して、生後3日齢から4週齢まで、腹腔内にVivo-Morpholinoを導入することで、横隔膜にて遺伝子をノックダウンする方法を用いた。この方法の利点として、胎児期の発生に関わる遺伝子の機能を障害しないこと、その一方で、遺伝子をノックダウンすることでより高速に強い表現型が得られることを期待した。さらに、生後間もないマウスを用いることで、高価なVivo-Morpholinoの量を節約出来る。腹腔内へのVivo-Morpholinoの導入により、呼吸機能の低下、横隔膜の収縮力低下および筋病理変化が引き起こされることがわかった。今回2つの疾患モデルを用いたが、3つの測定データに関連性が見られた。また、ヒト患者に見られる筋病理を再現しているだけでなく、重篤度の違いをも再現していると考えられた。この解析には高速であることが求められるが、今回の解析ではVivo-Morpholinoの設計からマウスでの解析終了まで、3ヶ月で完了することが出来た。これを従来のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成・解析と比較しては無論のこと、ウイルスベクターを用いてのノックダウン手法と比較しても、より高速化されており、有用な方法であると考えられた。

## E. 結論

次世代シーケンサーを用いた遺伝性筋疾患

のエクソーム解析パイプラインの立ち上げが完了した。また、先天性ミオパチーの既知遺伝子に対する網羅的既知遺伝子スクリーニング法の立ち上げも完了した。加えて、患者培養細胞での表現型に対する相補性を利用したスクリーニング系ならびにVivo-Morpholinoのマウスフック内投与による表現型検証による高速な変異病原性確認法を確立した。今後は、NCNP骨格筋レポジトリ内の検体を順次解析する予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

(国際学会)

Sato Y, Ikegami Y, Minami N, Okamoto N, Mori M, Murata M, Goto Y. Predictive testing for adult-onset neuromuscular diseases. 12th International Congress of Human Genetics, 61st American Society of Human Genetics Annual Meeting, 11-15 Oct 2011, Montreal

Matsushima Y, Goto Y, Laurie S, Kaguni. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep. 4, 2011

Ishiyama A, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. Mitochondrial Disease with unusual exocrine pancreatic manifes-

tations. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep. 4, 2011

Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with the m.3243A>G mutation in the mitochondrial tRNA-Leu (UUR) gene. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Kagoshima, Japan, Aug. 31-Sep. 4, 2011

後藤雄一. ミトコンドリア病の基礎と臨床. 第 114 回日本小児科学会、東京、8. 13, 2011

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))  
分担研究報告書

「 エクソーム解析による新規原因遺伝子解明システム構築 」

研究分担者 西野 一三  
(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部 部長

**研究要旨**

近年、次世代型シーケンサーが導入され、ゲノム情報を網羅的に取得し、大容量のゲノム情報を解析する技術が開発されている。今年度、我々は、次世代型シーケンサーを用いたゲノム情報を網羅的に取得し、候補遺伝子を抽出する系を構築した。また、複数の解析プログラムによる結果の比較検討、サンガー法での検証については予備実験をおこなった。次年度は、NCNP骨格筋レポジトリーより該当する症例の解析を行う予定である。解析プログラムについては、今後、アルゴリズム変更のため、改良される可能性があり、情報収集を継続していく予定である。

**A. 研究目的**

近年、次世代型シーケンサーが導入され、ゲノム情報を網羅的に取得し、大容量のゲノム情報を解析する技術が開発されている。また、効率的なヒトのエクソーム解析法も開発され、疾患の原因遺伝子探索法は発展著しい研究分野の一つである。本研究では、従来の手法に次世代型シーケンサーによる解析技術を取り入れて、疾患の病態の理解を深めることを目的としている。今年度、我々は、次世代型シーケンサーを用いたゲノム情報を網羅的に収集し、候補遺伝子を抽出する系を構築した。

**B. 研究方法**

(1) エキソーム濃縮

NCNP骨格筋レポジトリーの中で、診断確定のされていない先天性ミオパチー約600例のうち、既知疾患原因遺伝子で判別不能な検体を解析対象とする。筋組織

あるいは血液からゲノムDNAを抽出する。3 $\mu$ gのゲノムDNAを200bpsの長さで断片化し、アダプター分子を接合する。エクソンの部分配列DNAをプローブとし、ヒト全エクソームを濃縮した。

(2) Hiseq1000を用いたゲノム情報収集  
上記で得られたDNAライブラリーを用いて、ゲノム情報を収集した。今回は予備実験のため、1配列当たりの塩基長は、通常の1/4、50bpsの設定で解析した。

(3) バイオインフォマティクスによる解析系

得られたゲノム情報より、バイオインフォマティクスによる解析系を構築するために、開発または市販の解析プログラムを準備した。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。国立精神・神経医療研究センターの筋レポジ

トリー検体は、検体採取時に、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た書式を用いて、各種診断への同意とともに、神経・筋疾患の病態解明と治療法開発研究に対する検体利用に対してインフォームドコンセントを得ている。この同意を得た検体は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た研究に対してのみ使用される。研究を行う際には、全ての検体は匿名化されて、各種試料は検体番号で管理される。結果の発表に際しても個人情報は一切提示されない。

## C. 研究結果

### (1) エクソーム濃縮について

現時点では、エクソーム濃縮 kit に付属している index が 12 検体対応しかないので、12 検体/週でエクソームを濃縮し、DNA ライブラリーを作成している。現在、供与を受けた検体を順次、DNA ライブラリーの作成を進めている。

### (2) 解析パイプラインの構築

我々が構築した解析パイプラインを説明する。Hiseq 1000 で得られたゲノム断片情報より、信頼性の高い配列 (Quality Score >30) を抽出する。ヒト染色体 DNA の参照配列は、University of California Santa Cruz Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) が提供している hg19 を用いる。得られた断片配列は、BWA を用いて参照配列に位置づける。Samtools を用いて一塩基変異多型 (SNPs) を抽出し、遺伝子情報、変異情報を付加する。得られた SNPs 情報を、dbSNP や 1000Genome 等の公共データベースを用いて比較し、未報告の新規の SNPs のみを抽出する。その変異が引き起こすと予想されるアミノ酸非同義置換またはフレームシフトが、タンパク質の機能にどのような影響を及ぼすかを、PolyPhen-2、Sorting Intolerant from Tolerant という 2 種類の web-interface のプログラムを用いて解析する。以上の解析パイプライン

を構築した。

### (3) 他の解析プログラムとの比較検討

我々は、市販解析プログラム、CLC Genomics Workbench (Filgen 社) を用いて、上記手順と同様に、SNPs を抽出し比較検討を行った。解析結果は同一であった。

### (4) サンガー法での検証について

我々は、市販の遺伝情報処理プログラム、GENETYX (ゼネティックス社) を用いて、プライマーデザインをした。PCR 法によって、複数の遺伝子について増幅することを確認した。

## D. 考察

バイオインフォマティクスによる手法は日進月歩、開発更新されている。実験によって得られた現象を数式によって理論的に証明することは困難である。そのため、我々は、複数の web-interface プログラムや市販プログラムを用いて、次世代シーケンサーによって得られた結果を検証する必要があると考えている。複数の解析プログラムを用いて共通する新規の SNPs が同定された場合、信頼性が高いと予想される。また、これらの情報に、その変異がタンパク質の機能にどのような影響を及ぼすかを考え併せると、原因遺伝子の特定、さらに疾患の病態、病因が予測できると期待される。このような解析プログラムも多種、開発されており、どのアルゴリズムが正しいのか結論が得られていない。よって、今後、既存のプログラムが改良になった場合、試行する予定である。また、新規のプログラムが開発された場合も試行する必要があると考えている。

サンガー法での検証について、候補遺伝子が多数に及ぶ場合、効率的、かつ迅速に解析する必要がある。プライマー作成、遺伝子増幅、シーケンスの作業工程について、時間短縮し自動化できる場所は、今後、機器を導入し、解析にあたりたい。

## E. 結論

筋疾患において、世界中に、ゲノム情報の収集、病理学診断、実験科学的手法、小動物での検証、と包括的に解析している研究組織は少ない。我々は、従来の実験科学的手法に加え、ゲノム科学、情報科学、計算科学、ポストゲノム科学等の最新の技術を取り入れて、次世代型シーケンサーを用いて、筋疾患におけるゲノム情報の収集と解析の効率化を試みている。さらに、実験科学的手法、小動物を使って検証し、疾患病態の解明に極めたいと考えている。

F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))  
分担研究報告書

「次世代シーケンサーによる遺伝性筋疾患の新規遺伝子変異同定のための  
高速実証実験系の確立」

研究分担者 野口 悟

(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病第一部 室長

研究要旨

次世代シーケンサーによる遺伝性筋疾患の新規遺伝子変異の探索では、たくさんの遺伝子変異候補が得られる。しかしながら、家系情報を持たない日本人患者においては、統計解析により変異候補を絞り込むことは不可能である。変異を証明するためには、疾患特異的な実証実験を行う必要がある。本研究では、劣性型遺伝形式をとる自己食色空胞性ミオパチーを例に、培養細胞を用いた、再現性の良く、ハイスループット可能な実証実験の可能性を探った。また、遺伝子ノックダウン法を用いて、劣性遺伝性筋疾患のモデルマウス的高速作成と解析方法の構築を行った。

A. 研究目的

遺伝性疾患の原因遺伝子変異を知ること、診断法の開発やその病態を知る上で不可欠であるばかりでなく、発症予防法や治療法の開発の基礎となる非常に重要な事柄を含んでいる。しかしながら、依然として多数の患者において遺伝子変異が同定されていないのが実情で、まずはこれらの患者での遺伝子変異を知ることが、遺伝性疾患の克服に向けた厚生労働行政の課題となっている。近年、DNAシーケンス技術は、標的配列を設定し解析していく手法（サンガー法）から、ゲノムレベルで網羅的に遺伝子変異を解析していく手法（次世代シーケンサー）へと目覚ましい発展をとげ、原因遺伝子の糸口さえ掴めない遺伝性疾患に対して、その原因遺伝子または変異を発見しうる可能性を提供するものである。しかしながら、現在の方法は、様々な問題を抱えている。

1. 読み取り配列（リード長）が短く、その

ように短いリードを、変異を許容しつつ参照配列にマッピングする技術が開発されていないこと、2. 日本人筋疾患患者はほとんどが孤発例であり、大家系をもたないため、遺伝的統計解析を用いることが出来ないこと、3. 日本人のゲノム参照配列が整備されていないこと、4. 健常日本人の遺伝子バリエーションに対する情報がほとんどないこと、等が挙げられる。そのため、これまで報告の無い新規疾患において、取得したデータのみから真の変異の同定に至ることは極めて難しい。また、このような網羅的な遺伝子変異解析は、患者サンプルさえあれば容易に解析を開始することが可能であるため、全く分野外の研究グループにより、遺伝子が偶然に同定されてしまう可能性や間違った情報が発表されてしまう可能性もある。

我々は、遺伝性筋疾患の新規遺伝子同定システムを確立することを目的としている

が、次世代シーケサーから得られる情報から如何に真の遺伝子変異を導き出すのか、国際競争の中で如何に迅速にそのような検証作業を進めるのかが非常に重要なポイントである。

本研究は、変異の特異性を示しつつ、高速かつ多検体を同時に解析しうる実証実験系を構築することを目的とする。

今年度は、①劣性型遺伝形式をとる自己貪色空胞性ミオパチーにおいて培養細胞を用いた実証実験の可能性を探るとともに、②遺伝子ノックダウン法を用いて劣性遺伝性筋疾患のモデルマウスを高速に作成すること、またその解析方法の構築を試みた。

## B. 研究方法

### ①自己貪色空胞性ミオパチーにおいて培養細胞を用いた実証実験解析系の構築

#### 細胞培養

変異の明らかとなっている自己貪色空胞性ミオパチー患者由来の初代皮膚培養繊維芽細胞は、タイプ I コラーゲンコートディッシュ上で、10%FBS/DMEM-F12 にて継代培養した。

#### リソソーム内 pH 測定

リソソーム内 pH 測定は、リソソーム内に取り込まれた Oregon green 514-dextran

(Invitrogen) の蛍光比率によって測定した。カバーガラスボトムディッシュまたはプラスチックフィルムボトムディッシュにて培養した患者皮膚由来初代培養細胞は、10%FBS/DMEM-F12 にて増殖培養した。80%コンフルエントにて、低血清培地

(2%FBS/DMEM) 40 分処理後、0.1-0.5mg/ml の Oregon green 514-dextran /10%FBS/DMEM を添加し、一晚取り込ませた。2 時間、増殖培地にてチェース後、PBS にて培地中の dextran を洗浄した。レシオメトリーは、440nm または 490nm での励起波長、530nm の蛍光波長にて測定し、両方の蛍光強度の比を求めた。リソソームの pH 検量線は、イオノフォアである nigericin 存在下で、pH3-6 に調製した MES 緩衝液で処理した細

胞のリソソーム内 Oregon green 514-dextran 測定することで作成した。

#### mTORC の局在変化と活性化

患者皮膚由来初代培養細胞は、ガラスボトムディッシュ上で培養した。培地をアミノ酸不含 DMEM に変え、50 分培養後、アミノ酸添加 DMEM に戻し、10 分間培養した。アミノ酸不含 DMEM 及びアミノ酸添加 DMEM 培養細胞は、PFA にて固定し、mTORC のリソソームへの局在を、抗 mTORC 抗体 (CST) と Lamp2 との二重染色により調べた。また、mTORC の下流分子の活性化を測定するため、p70S キナーゼのリン酸化をウエスタンブロットにより解析した。

### ②遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患モデルマウスの作成

#### Vivo-Morpholino の設計

Vivo-Morpholino は、Gene tool 社より購入した。自己貪色空胞性ミオパチー原因遺伝子である Vma21 遺伝子とミオチューブラーミオパチーの原因遺伝子である Mtm1 を標的とした。マウス遺伝子配列にて、ともに翻訳阻害を引き起こす Vivo-Morpholino を設計した。以下に配列は示した。

MVMA21-1: GCGCTGCTTATCAAGACGCTCCAT  
MMTM1-1: ACTTAGATGCTGATGCAGAAGCCAT

#### マウスへの投与

マウスは C57Black6/J を用いた。各 3 匹ずつを解析に用いた。

Vivo-Morpholino (0.16mM 生理食塩水溶液) は、12.5mg/kg 体重の用量にて週 2 回腹腔内投与した。生後 3 日齢より開始し、4 週齢まで計 9 回投与した。コントロールとして、生理食塩水を投与した。

#### 呼吸筋測定

生体での呼吸筋機能測定は、バクスコ社の温湿度補正付きの plethysmography 装置を用いた。200 ミリ秒毎のデータ取得にて、10 分間のバックグラウンド測定 (安静への待ち時間) の後、30 分間の本測定を行った。データ解析は、2 分間毎に積算した平均値



を用いて評価した。解析パラメーターとして、一回換気量を用いた。

単離横隔膜の収縮力は、Peterson らの方法を用いた。内側の健と外側の肋骨とともに挟まれた幅約 2mm の短冊状の横隔膜を単離した。収縮力測定は、Muscle tester (Scientific Instruments Heidelberg)を用いた。Force transducer は KG4(range 0-50 mN, resolution 0.3mN)を用い、健側を mounting device にて transducer に固定し、肋骨側をフックにてマイクロメーターに固定した。収縮測定は、2,3-Butanedione monoxime を含む溶液にて 30 処理後、21°C にて、95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>にて平衡化した 150mM NaCl/4mM KCl/2mM CaCl<sub>2</sub>/1mM MgCl<sub>2</sub>/ 5.6mM glucose/5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH7.4)/0.02mM D-tubocurarine 中にて行った。矩形電気刺激を与え、単収縮力(刺激時間 1 ms)と強縮力 (180Hz、刺激時間 300ms)を測定した。最大単収縮力を示す筋肉長にて、mounting device 間の距離と筋重量、比重から筋断面積を計算した。収縮力は、筋断面積あたりの収縮力 (比収縮力) で評価した。

#### 筋病理観察

横隔膜は、定法にもとづき、イソペンタン/液体窒素中にて凍結した。クライオスタットにて新鮮凍結切片を作成し、染色に用いた。ヘマトキシリン-エオジン染色、ゴモリトリクローム変法、NADH-TR 染色を行った

#### (倫理面への配慮)

本研究に使用したすべてのヒト試料は、全例について、生検時に、(独) 国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を受けた「診断と検体の研究使用に関する承諾書」を用いて、インフォームドコンセントを得ており、「神経・筋疾患の病態解明と治療法開発」を目的とした研究への検体使用が許可されている。本申請研究は、(独) 国立精神・神経医療研究センター倫理委員会に「自己貪食空胞性ミオパチーの病態解明」として承認を受けている。

すべての動物実験は、(独) 国立精神・

神経医療研究センター神経研究所動物実験に関する倫理指針に従い、同研究所小型実験動物倫理問題検討委員会にて審査・承認を得ている。

### C. 研究結果

#### ①自己貪食空胞性ミオパチーにおいて培養細胞を用いた実証実験解析系の構築

患者由来初代繊維芽細胞のリソソーム内 pH 測定

Oregon green 514-dextran の取り込みによる初代培養繊維芽細胞のリソソーム内 pH 測定では、自己貪食空胞性ミオパチー患者由来細胞で、Ex440nm/490nm での蛍光強度比は、約 0.5 であり、正常コントロール細胞では約 1 であった。検量線からは、自己貪食空胞性ミオパチー患者由来細胞では pH4. 5、正常コントロール細胞では pH3 と見積もられた。カバーガラスボトムディッシュとプラスチックフィルムボトムディッシュの比較では、プラスチックボトムのほうが、細胞接着性が向上し、比較的蛍光強度が高く、感度よく測定出来た。そのため、Oregon green 514-dextran 濃度が 0. 1mM でも良好に測定することが可能となった。

#### mTORC の局在変化と活性化

アミノ酸除去により、mTORC はリソソームから離れ、細胞内に分散した局在を示した。アミノ酸含有培地を添加することで、正常コントロール細胞では mTORC はリソソーム膜上に高度に集積することが示された。しかしながら、自己貪食空胞性ミオパチー患者由来細胞では、アミノ酸を再添加しても、mTORC はアミノ酸除去時と同様の局在を示した。また、正常細胞では、mTORC のリソソーム膜上への集積に伴い、下流分子である p70 S6 キナーゼのリン酸化が認められたが、自己貪食空胞性ミオパチー患者由来細胞でのリン酸化は認めなかった。

#### ②遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患モデルマウスの作成

## 表現型の解析

C57Black6J マウス生後3日齢より Vivo-Morpholino を投与した。MMTM1-1 投与マウスは、投与開始後10日から体重増加の鈍化が認められた。MVMA21-1 は生理食塩水投与と同様の体重増加を示した。

Vivo-Morpholino は4週間投与を行った後、呼吸測定を行った。一回換気量に差異が認められた(コントロールマウス:  $0.22 \pm 0.01$  ml, MMTM1-1 投与:  $0.18 \pm 0.01$  ml, MVMA21-1 投与:  $0.20 \pm 0.01$  ml)。分時換気量には差異が認められず、呼吸頻度が上昇していることが示された。

## 横隔膜筋の Ex vivo 収縮測定

単回電気刺激による等尺性収縮(単収縮)と反復刺激による強縮を測定した。単位断面積あたりの収縮力では、コントロールマウスで等尺性収縮:  $42.1 \pm 16.4$  mN/mm<sup>2</sup>、強縮:  $137.5 \pm 30.5$  mN/mm<sup>2</sup>、MMTM1-1 投与群では等尺性収縮:  $12.8 \pm 6.0$  mN/mm<sup>2</sup>、強縮:  $62.6 \pm 21.9$  mN/mm<sup>2</sup>、MVMA21-1 投与群では  $16.7 \pm 5.6$  mN/mm<sup>2</sup>、強縮:  $75.5 \pm 20.8$  mN/mm<sup>2</sup> であった。

## 筋病理解析

横隔膜の筋病理解析では、MMTM1-1 投与群で腹腔側に小さな中心核線維が認められた。この中心核線維は浸潤細胞を伴わない物であった。NADH-TR 染色では、これらの中心核線維には peripheral halo が認められるものも存在した。一方、MVMA21-1 投与群では、中心核線維は認められるものの、その近傍は繊維化と浸潤細胞が認められ、筋壊死に伴う、再生線維であると考えられた。

## D. 考察

本研究では、遺伝性筋疾患患者での新規遺伝子変異の解析時に次世代シーケンサーによって得られる変異遺伝子候補を高速で効率的にスクリーニングする方法の確立を目指した。日本人患者は特に孤発例であることから、欧米での大家系での遺伝情報に基づく統計解析に代わる方法論を作成す

る必要性が考えられた。

まず第一に、患者細胞での表現型の回復への相補性試験を利用する方法が有効であると考えられた。この方法は、患者細胞を用いていることから、特異性を発揮する唯一の方法であると考えられる。しかしながら、この方法は、表現型の回復を目的としているため、患者細胞で観察される特徴的な表現型を見いだすことが必須である。そのため、解析対象となる患者がその臨床的特徴や病理学的特徴が充分解析されていることが前提となる。その情報を元に、患者の病態を想定し、発症機序を推測して、細胞での特徴的な表現型をとらえる実験系を組む必要がある。逆に言えば、対象患者細胞での特徴的な表現型を如何に捉えるのかによって、研究全体の成否が決まると言っても過言ではない。本研究では、モデルケースとして自己貪食空胞性ミオパチーを取り上げ、患者細胞におけるリソソーム内 pH の測定、アミノ酸添加における mTORC のリソソームへの局在変化および活性化を解析した。これらすべての細胞表現型は、原因遺伝子の変異から予想されたものであり、同様の臨床症状および骨格筋病理像を示し、既知遺伝子変異のない患者群における変異検索には利用出来るものと考えられた。

ここで解析に用いる表現型は、簡便かつ迅速に引き出すことが可能であること、再現性の高いことなどが必須である。また、候補遺伝子変異は多数同定されることから、ハイスループットにも対応可能であることも要求される。また、相補性試験であるが、劣性型遺伝性疾患の細胞へ遺伝子を導入して、表現型が回復するのかどうかの予備実験が進行中である。遺伝子の導入には比較的調製が簡便なレンチウイルスベクターを用いており、試験解析の結果では、3日あれば、高タイターのウイルスの調製が可能であり、増殖性細胞ばかりでなく、最終分化した非増殖性細胞への導入も可能であった。

二番目のアプローチとして、劣性型遺伝疾患を、高速でマウスにて再現することを試みた。今回用いた方法は、マウスに対して、生後3日齢から4週齢まで、腹腔内に

Vivo-Morpholinoを導入することで、横隔膜にて遺伝子をノックダウンする方法を用いた。この方法の利点として、胎児期の発生に関わる遺伝子の機能を障害しないこと、その一方で、遺伝子をノックダウンすることでより高速に強い表現型が得られることを期待した。さらに、生後間もないマウスを用いることで、高価なVivo-Morpholinoの量を節約出来る。腹腔内へのVivo-Morpholinoの導入により、呼吸機能の低下、横隔膜の収縮力低下および筋病理変化が引き起こされることがわかった。今回2つの疾患モデルを用いたが、3つの測定データに関連性が見られた。また、ヒト患者に見られる筋病理を再現しているだけでなく、重篤度の違いをも再現していると考えられた。この解析には高速であることが求められるが、今回の解析ではVivo-Morpholinoの設計からマウスでの解析終了まで、3ヶ月で完了することが出来た。これを従来のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成・解析と比較しては無論のこと、ウイルスベクターを用いてのノックダウン手法と比較しても、より高速化された方法であると思われる。

#### E. 結論

再現性がよく、ハイスループット解析も可能な培養細胞を用いた相補性試験と遺伝子ノックダウン法を用いたモデルマウス作成は、次世代シーケンサーから得られる遺伝子変異候補の実証に有用であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))  
分担研究報告書

「次世代シーケンサーを用いた先天性ミオパチーの原因解明」

研究分担者 林 由起子

(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病第一部 室長

**研究要旨**

原因遺伝子が巨大であるなどの理由から、多くの先天性ミオパチーは診断が未確定となっている。そこで次世代シーケンサーを活用し、既知疾患原因遺伝子の網羅的変異スクリーニングを効率的におこなう方法を確認した。NCNP骨格筋レポジトリより該当する症例を抽出し、変異スクリーニングを進めている。また貴重な患者組織を可能な限り保存しうるゲノムDNAの調整方法を検討中である。

**A. 研究目的**

原因遺伝子が巨大であるなどの理由から、多くの先天性ミオパチーは診断が未確定となっている。これらの診断のついていない先天性ミオパチー症例に対して、次世代シーケンサーを用いた既知疾患関連遺伝子についてエクソームのリシーケンス解析を行って原因遺伝子を同定し、その臨床病理学的特徴を明らかにする。さらに既知遺伝子に変異のない症例を集積し、全エクソーム解析を行い、新規疾患原因遺伝子の同定を試み、その分子病態を明らかにする。

**B. 研究方法**

NCNP 筋レポジトリから、遺伝学的診断のついていない先天性ミオパチー症例を抽出し、筋組織あるいは血液からゲノムDNAを抽出する。先天性ミオパチーで明らかになっている既知疾患原因遺伝子を網羅的にスクリーニングするため、カスタマイズしたエクソンキャプチャーキットを設計し、

次世代シーケンサーを用いた変異スクリーニングを効率的に行う方法を確認する。特に骨格筋からDNAを抽出する場合、貴重な患者組織を温存することを考慮し、次世代シーケンス解析に適切なDNAの調整方法について検討する。

次世代シーケンス解析で見いだした変異はサンガー法で検証し、診断を確定する。さらに詳細に臨床病理学的検討を加える。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリ検体は、検体採取時に、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た書式を用いて、各種診断への同意とともに、神経・筋疾患の病態解明と治療法開発研究に対する検体利用に対してインフォームドコンセントを得ている。この同意を