

次世代シーケンサーを用いた新規膵炎関連遺伝子異常の探索

研究分担者 下瀬川 徹 東北大学消化器病態学分野 教授

研究要旨

新たな膵炎関連遺伝子異常を同定することを目的に、次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行った。既知の膵炎関連遺伝子異常を認めない遺伝性膵炎・家族性膵炎3家系、7症例について全エクソーム解析を行い、膵炎関連候補遺伝子10個を同定した。一方、新たなトリプシン関連遺伝子異常として、キモトリプシンC (*CTRC*) 遺伝子異常の日本人慢性膵炎患者における変異解析を行い、新規のミスセンス変異を5個同定した。*CTRC* 遺伝子異常の日本人膵炎患者における頻度や分布は、欧米やインドのものと異なっていた。次世代シーケンサーを用いたアプローチは膵炎関連遺伝子異常の同定に有用な可能性が示された。

研究協力者

正宗 淳（東北大学消化器病態学分野 准教授）

条 潔（同 助教）

濱田 晋（同 助教）

中野 絵里子（同 大学院生）

られる。本研究では、次世代シーケンサーを用いて新たな膵炎関連遺伝子異常を同定することを目的とした。あわせて、新たなトリプシン関連遺伝子異常として、キモトリプシンC (*CTRC*) 遺伝子異常の日本人慢性膵炎患者における解析を行った。

A. 研究目的

急性膵炎は重症化すると致死率が8%となる難治性の疾患である。重症急性膵炎は厚生労働省の特定疾患（難病）に指定されている。一方、慢性膵炎は腹痛発作を繰り返したのち、進行すると膵外内分泌障害により消化吸収障害や糖尿病を発症する。急性膵炎、慢性膵炎のいずれもアルコール性が最大の成因であるが、原因不明の特発性膵炎の症例も少なくない。

膵炎発症に関連する遺伝子異常としては、1996年に遺伝性膵炎の疾患遺伝子としてカチオニックトリプシノーゲンが報告¹⁾されて以来、トリプシンの活性化と不活性化に関わる遺伝子異常が報告されてきた。例えば、膵腺房細胞で生成され、トリプシン活性を阻害する膵分泌性トリプシンインヒビター(*SPINK1*) 遺伝子のp.N34S変異やc.194+2T>C変異は、遺伝性膵炎、家族性膵炎や特発性膵炎、特に若年発症の症例に少なからず認められる²⁾。しかし濃厚な家族歴を有するにもかかわらず、原因遺伝子の明らかでない家系もみ

B. 研究方法

研究1: 次世代シーケンサーを用いた膵炎家系の遺伝子解析

既知の遺伝子異常を認めない、遺伝性もしくは家族性膵炎の3家系7症例(家系1: 親、子2人; 家系2および家系3: 親子)7サンプルにつき、Illumina社HiSeq2000を用いて全エクソーム解析を行った。

研究2: トリプシン関連遺伝子異常の解析

CTRC 遺伝子の全8エクソンを各エクソンに特異的なプライマーを用いてPCRで増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

なお本研究は東北大学遺伝病学分野松原洋一教授、青木洋子准教授、新堀哲也助教、細胞増殖制御分野中山啓子教授、舟山 亮助教、西田有一郎助教、長嶋剛史助教との共同研究として遂行された。

(倫理面への配慮)

検体採取、遺伝子解析にあたっては、書面を用いた

十分な説明のもと書面による同意を得て行った。本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認（承認番号 2009-403、2011-260）に基づいて行われた。

C. 研究結果

研究 1: 各サンプル平均 1.76 億リードが得られた。エクソン、スプライスサイトに含まれる多型を抽出し、dbSNP、1000Genomes に含まれるものを除外し、さらに家系内に共通してみられる 1348 個を候補遺伝子多型とした。その機能と発現部位などを確認し、さらに候補を絞り込んだ。その結果、膵炎との関連が予測された 10 個の遺伝子を抽出した。10 個の内訳は、膵消化酵素あるいは膵発現蛋白 4 個、細胞内 Ca 関連 2 個、ユビキチンプロテアソーム 2 個、小胞体ストレス関連 2 個であった。これら候補遺伝子につき、慢性膵炎患者における頻度などを現在解析中である。

研究 2: *CTRC* 遺伝子の新規 5 ミスセンス変異を同定した（表 1）。ヨーロッパで高頻度とされる ³c.738_761del24 (p.K247_R254del) は認めず、p.R254W 変異も 1 例に認めるのみであった。一方、インドで高頻度とされる ⁴c.217G>A (p.A73T) および c.703G>A (p.V251I) 変異も認めず、欧米やインドとは *CTRC* 遺伝子変異の分布が異なること、すなわち膵炎の遺伝的背景の地域差が示唆された。

D. 考察

本研究は次世代シーケンサーを用いた全エクソームの網羅的解析により、新たな膵炎関連遺伝子異常を同定しようとするものである。日本における遺伝性膵炎家系の検討では、約 30% の家系で *PRSSI* や *SPINK1* といった既知の膵炎関連遺伝子異常が同定されない⁵⁾。本研究においては、そのような家系を対象とし、遺伝様式や機能、発現部位などに基づき 10 個の膵炎関連候補遺伝子を抽出した。膵炎関連遺伝子異常の同定は、疾患の成因や病態を明らかとするものであり、特に若年発症の特発性（原因不明）膵炎症例の診療においては、無用な検査を避ける点でも大きな意義がある。

これまで、トリプシンの活性化・不活性化に関わる遺伝子異常を中心に膵炎関連遺伝子異常の解析が進められてきた。日本人膵炎患者における *CTRC* 遺伝子

異常の頻度や分布は、欧米やインドにおけるそれらと異なっており、地域差や人種差が示唆された。このため、欧米などで報告された既知の遺伝子変異のみをスクリーニングする方法では、新しい遺伝子異常の同定には限界があることが予想される。この観点からも次世代シーケンサーを用いた包括的解析は、合理性がある。今回抽出した遺伝子異常につき、膵炎患者における頻度や機能解析の結果をもとに、膵炎との関連を検討中である。

E. 結論

膵炎関連候補遺伝子を遺伝性膵炎家系に同定した。次世代シーケンサーを用いたアプローチは膵炎関連遺伝子異常の同定に有用な可能性が示された。

F. 参考文献

1. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 1996; 14:141-145.
2. Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, et al. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet;* 2000; 25: 213-216.
3. Rosendahl J, Witt H, Szmola R, et al. Chymotrypsin C (*CTRC*) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2008;40:78-82.
4. Paliwal S, Bhaskar S, Mani KR, et al. Comprehensive screening of chymotrypsin C (*CTRC*) gene in tropical calcific pancreatitis identifies novel variants. *Gut* Published Online First: 12 May 2012. doi:10.1136/gutjnl-2012-302448.
5. Masamune A, Nishimori I, Kume K, Shimosegawa T. Geographical differences in genetics of pancreatitis: the nationwide survey of hereditary pancreatitis in Japan.

Pancreatology 2013, in press.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masamune A, Nakano E, Kume K, Kakuta Y, Ariga H, Shimosegawa T. Identification of novel missense CTSC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. Gut Published Online First: 7 Nov 2012. doi:10.1136/gutjnl-2012-303860.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

表 1. 日本人慢性膵炎患者における CTRC 遺伝子異常 (ミスセンス変異)

CTRC 変異	全症例	アルコール性	非アルコール性	健常対照群
エクソン 2				
c.86G>A (p.R29Q)	2/506	1/244	1/262	0/274
エクソン 6				
c.627C>G (p.I209M)	0/506	0/244	0/262	1/274
エクソン 7				
c.715T>G (p.S239A)	1/506	0/244	1/262	0/274
c.716C>G (p.S239C)	1/506	0/244	1/262	0/274
c.739A>G (p.K247E)	3/506	1/244	2/262	0/274
c.760C>T (p.R254W)	1/506	0/244	1/262	0/274
全ミスセンス変異	8/506 (1.6%)	2/244 (0.8%)	6/262 (2.3%)	1/274 (0.4%)

遺伝性疾患症例の収集とマイクロアレイ染色体解析

研究分担者 福嶋 義光 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座 教授

研究要旨：

難治性疾患克服研究事業の既存班と協同で、患者支援団体、臨床診断支援グループ、遺伝子医療部門、遺伝学的検査部門、次世代シーケンサー解析部門、等とのネットワークを構築すること、および原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群（MCA/MR syndrome）症例を対象にマイクロアレイ染色体解析を行うことにより、次世代シーケンサー解析の対象となる症例の集積を行った。

研究協力者

涌井敬子（信州大学医学部 遺伝医学・予防医学講座）
古庄知己（信州大学医学部附属病院遺伝子診療部）
小泉二郎（希少難病患者支援事務局；SORD）

A. 研究目的

次世代シーケンサー解析の候補となる症例収集のひとつの方法として、患者支援団体との協力システムを構築する。さらに、収集した原因不明の遺伝性疾患症例について、ゲノムの微細欠失・重複に起因する症例を除外するためにマイクロアレイ染色体解析を行う。特定の遺伝子領域に新規のゲノムコピー数異常を検出した患者、あるいはゲノムコピー数異常のない患者で同一の疾患に罹患している、あるいは同様の臨床症状を有する複数の患者を抽出し、候補症例を絞り込む。

B. 研究方法

1) 症例収集

原因不明の遺伝性難病は数多くあり、次世代シーケンサー解析を用いたその疾患の責任遺伝子同定（原因解明）はその後の治療法開発の第一歩となる。しかし、原因不明の遺伝性難病の多くはそれぞれ頻度が低いため、研究協力の得られる患者の確保は容易ではない。

今回、日常の遺伝医療のなかで遭遇する患者以外から症例を収集する方法のひとつとして、H24年度の難治性疾患克服研究事業として新たに設けられた研究課題「患者および患者支援団体等による研究支援体制の構築に関わる研究」に採択された「疾病中心から患者中心の希少難治性疾患研究を可能とする患者支援団体と専門家集団とのネッ

トワーク構築」(SORD) 班（研究代表者：福嶋義光）と連携し、患者自らが登録するシステムを有するSORDのデータベースを利用し、次世代シーケンサー解析の対象となる症例を見つけ出すためのシステムを構築する。自らが罹患している疾患の研究推進を希望しているSORD登録患者の臨床情報を検討し、確定診断に関する支援を行いつつ、研究対象候補となりうる症例を抽出する。

2) マイクロアレイ染色体解析（Cytogenetic microarray）

次世代シーケンサー解析技術は、近年、多くの原因不明の遺伝性疾患の原因解明に威力を発揮している。しかしながら、非特異的症状の組み合わせであることが多い、臨床所見から確定診断にいたっていない患者がまだまだ多いことも事実で、そのような患者の解析は現在解析候補としての優先順位は低い。小児科領域では、小児の希少遺伝性難病の一つである、疾患名が確定できない原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群（MCA/MR syndrome）に対して、核型分析による全ゲノムを俯瞰する染色体検査（解析精度：>3~10Mb、*全ゲノム対象）を広く実施し、検出された特定の染色体異常を有する患者を見直して、特定の染色体異常症の概念が確立してきた歴史がある。しかし、従来の染色体G分染法では、約3%程度しか染色体異常を検出できなかった。一方、FISH法（解析精度：>数十kb、*特定領域対象）による確定診断が可能となった疾患は増加しており、新たに一部の奇形症候群が疾患単位として確立してきた。さらに、MCA/MR syndromeの約20%の症例に病的なゲノムの量的変化を検出できるマイクロアレイ染色体検査法（解析精度：>十数

kb、*全ゲノム対象)が臨床検査として普及してきた諸外国においては、従来の臨床症状から疑う疾患の確定診断目的に遺伝学的検査を実施するという流れを、“Genotype First”すなわち、非特異的な症状を有する原因不明の MCA/MR syndrome の患者は、まずマイクロアレイ染色体検査法により全ゲノムのコピー数変化をスクリーニングすることにより、特定のゲノムコピー数異常に起因する疾患(染色体異常症)を特定しようとする流れに変わりつつある。現時点でも、数十kb~数Mbのゲノム領域のコピー数変化の検出には不向きな次世代シーケンサー解析に先んじて、原因不明の MCA/MR syndrome の患者に対してマイクロアレイ染色体検査を実施する戦略が、国際的にとられている。上記により症状と関連すると考えられるゲノムコピー数を認めなかった患者のなかで、共通する臨床症状を有する患者がいないかどうかについて再検討する。

今年度は、新規に MCA/MR syndrome 患者 40 名、患者家族 28 名から試料を収集し、マイクロアレイ染色体解析を行った。

C. 研究結果

1) 症例収集

SORD 班の活動の一環として、SORD にて進められていた災害手帳システムを改良し、新しい研究・災害手帳システムを構築した。災害手帳は、患者自身が自身の疾患・生活に関する情報をクラウド上に登録・保存しておき、大規模災害の発生による情報の紛失時や研究への活用時など必要なときにその情報を取り出し活用するものであった。この災害手帳の機能を利用し、研究アンケートを加え、研究・災害手帳とした。「自分(と家族)の試料と診療情報を利用し、研究を進めてほしい」と研究協力を希望した方について、SORD から提供される基本情報をもとに一例ごとに確定診断のための方向性を定める。数回にわたる SORD を介しての患者・主治医との情報交換、および必要な場合に実施する遺伝学的検査の結果、既知の遺伝性疾患ではなく、次世代シーケンサー解析・研究を行う意義があると考えられる場合には、拠点研究班にサンプルおよび臨床データを提供しようとするシステムである。現在、SORD に登録されている 300 例以上の患者について検討を開始しており、数例の候補があがっている。

2) マイクロアレイ染色体解析 (Cytogenetic microarray)

新規 40 名の MCA/MR syndrome 患者のうち、38 名についてマイクロアレイ染色体解析を終了した。そのうち、7 例(18%)に以下のゲノムコピー数異常症候群が検出された。

- 1q21.1 Distal microdeletion 症候群
- Mowat-Wilson Syndrome 領域を含む 2q22 欠失
- Albright hereditary osteodystrophy-like/Brachydactyly with intellectual disability syndrome 領域を含む 2q37 欠失
- mosaic trisomy 14 症候群
- 16p11.2 microdeletion 症候群
- Smith-Magenis 症候群 (17p11.2 欠失)
- 22q11.21 Microduplication

これらの症例以外に、14 例(37%)に症状との関連している可能性のあるゲノムコピー数異常を認めた。症状とは関係のないあるいは可能性の低いコピー数異常 (benign CNV: bCNV) のみであった症例が 17 例(45%)であり、これらの症例が次世代シーケンサー解析の対象となる。しかしながら、孤発例の解析には共通する症状を有する患者が少なくとも 3 家系必要である。17 例の臨床症状を慎重に見直したが、本年度に収集した症例だけで現時点で次世代シーケンサー解析の候補症例を抽出することはできなかった。

D. 考察

現在行われている次世代シーケンサー解析は、主に原因不明の遺伝子検索を目的に実施しているが、遠くない将来、診断目的に既知の疾患遺伝子を次世代シーケンサー解析によりスクリーニングする遺伝学的検査が普及すると考えられている。

希少遺伝性難病の原因解明をめざした次世代シーケンサー解析の実施には、まず解析候補にふさわしい症例を選択することが重要である。本研究では、希少難治性疾患患者支援団体との連携による症例収集システムを構築するとともに、収集した MCA/MR syndrome 症例を対象にマイクロアレイ染色体解析を実施し、既知のゲノムコピー数異常症候群をまず除外し、次世代シーケンサー解析を行うにふさわしい症例を選択することに努めた。

難治性疾患克服研究事業に未採択の疾患や未分類の稀少疾患においては、今まで研究推進のた

めの有効な手立てはなかったが、患者支援団体、臨床診断支援グループ、遺伝子医療部門、遺伝学的検査部門、次世代シーケンサー解析部門、等とのネットワークを構築することにより、希少遺伝性難病の原因究明が飛躍的に進むことが期待される。

マイクロアレイ染色体解析により、明らかな病的変異のゲノムコピー数異常が検出されなかったMCA/MR syndrome症例から、次世代シーケンサー解析の候補となる症例がないかについて慎重に検討し、適応と考えられた症例については主治医へ本研究への協力を改めて呼びかけている。次年度以降、さらに新規症例の収集に努めながら、過去にマイクロアレイ染色体検査でbCNVのみであった症例の臨床症状の見直しも繰り返していることにより、次世代シーケンサー解析の候補となる症例を増加させることが重要である。

E. 結論

難治性疾患克服研究事業の既存班と協同で、次世代シーケンサー解析の対象となるMCA/MR syndrome症例の収集を行った。次世代シーケンサー解析に適した候補症例をさらに絞り込むため、収集症例にはゲノムコピー数異常に起因する既知の症候群を除外する目的でマイクロアレイ染色体検査を実施した。

F. 健康危険情報

特になし。(あれば書いてください)

G. 研究発表

1. 論文発表

Yanagi K, Kaname T, Wakui K, Hashimoto O, Fukushima Y, Naritomi K. Identification of Four Novel Synonymous Substitutions in the X-Linked Genes Neuroligin 3 and Neuroligin 4X in Japanese Patients with Autistic Spectrum Disorder. *Autism Res Treat.* 2012;2012:724072. Epub 2012 Jul 16.

Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y. Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2012 Feb;158A(2):412-6.

Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *Am J Med Genet A.* 2012 Apr;158A(4):861-8.

2. 学会発表

福嶋 義光. シンポジウム3：希少難病患者支援と遺伝カウンセリング「難治性疾患克服研究事業と遺伝カウンセリング」. 第36回日本遺伝カウンセリング学会. 2012年6月8-10日, 松本

福嶋 義光, 松原 洋一, 野村 文夫, 斎藤 加代子, 高田 史男, 小杉 眞司, 玉置 知子, 櫻井 晃洋, 関島 良樹, 涌井 敬子, 加藤 光広, 小泉 二郎. 疾病中心から患者中心の希少難治性疾患研究を可能とする患者支援団体と専門家集団とのネットワーク構築. 日本人類遺伝学会第57回大会, 10月25-27日, 東京

涌井 敬子, 古庄 知己, 鳴海 洋子, 大橋 博文, 清水 健司, 岡本 伸彦, 水野 誠司, 黒澤 健司, 高田 史男, 川目 裕, 佐村 修, 服部 重人, 福嶋 義光. ゲノムコピー数異常の情報のみでは正確な染色体再構成の確認はできない -核型分析技術を含む細胞遺伝学的視点の必要性-. 日本人類遺伝学会第57回大会, 10月25-27日, 東京

鳴海 洋子, 清水 健司, 鮫島 希代子, 数川 逸郎, 中村 恒一, Yumie Rhee, Yoon-Sok Chung, 古庄 知己, Ok-Hwa Kim, 福嶋 義光, Woong-Yang Park, 西村 玄. NOTCH2 遺伝子エキソン34 変異における臨床像の検討. 日本人類遺伝学会第57回大会, 10月25-27日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし (あれば書いてください)

先天代謝異常・遺伝性疾患の症例収集に関する研究

研究分担者 山口 清次 島根大学医学部小児科 教授

研究要旨

我々は質量分析等を用いて、先天代謝異常症の診断を行っている。その中で疾患が特定できないものの遺伝性(家族性)の疑われる症例に遭遇することがある。乳幼児突然死(SIDS)または小児急性危急事態(ALTE)に類似した症例に絞って検討したところ、140例中6例に先天代謝異常症が特定されたが、一方で原因は特定できないものの遺伝性の疑われる症例を3例見出した。発症から時間が経っているため、サンプル採取ができなかった。また代謝プロフィールから特定の生化学診断ができて複数の原因の考えられる例がある。生化学診断はできたものの正確な原因診断に至っていない 3-ヒドロキシイソ酪酸尿症の兄弟例について検索中である。さらに、ミトコンドリア病に類似した臨床症状(糖尿病、慢性腎不全、難聴、白内障、脊髄小脳変性症、痙性対麻痺、精神発達遅滞、低身長)の合併を示しながら、これまでのところ疾患が特定できていない2家族についてNGS解析を依頼中である。また繰り返す脳症を伴う発熱発作、門脈圧亢進症を合併する孤発例についても NGS による家族解析を依頼中である。代謝異常を中心に家族性の疑われる症例を前方視的に収集し、NGS による新しい疾患の発見を目指したい。

研究協力者

竹谷 健（島根大学医学部小児科）
福田誠司（島根大学医学部小児科）

A. 研究目的

我々の施設では、質量分析あるいは酵素・遺伝子検査による先天代謝異常症の診断について国内外から相談を受けている。臨床的に先天代謝異常を含む遺伝性疾患が疑われながら、最終診断に到達できない症例が少なくない。次世代シーケンサー(NGS)を駆使して、このような症例の原因を同定することを目的として、島根大学に依頼された症例を検討し症例収集を行った。

B. 研究方法

1. 症例の収集

これまで島根大学に先天代謝異常の有無について検索依頼のあった症例のうち、先天代謝異常症、または遺伝性疾患が疑われ、かつ家族性の可能性が高い症例を収集した。

2. 乳幼児突然死、原因不明の脳症患者の検討

2004年1月～2010年12月の7年間に乳幼児突然死(SIDS)、または小児急性危急事態(ALTE)を理由にGC/MSまたはタンデムマスによる代謝検索を依頼された症例計140例(SIDS 67; ALTE 73例)の遺伝背景を検討した。背景疾患の判明した症例、および家族性の疑われる症例を収集した。

(倫理面への配慮)

質量分析による代謝異常検査は、臨床検査として依頼されたものでありインフォームドコンセントの対象外である。遺伝子解析のための検体採取にあたっては、島根大学倫理委員会承認された「先天異常疾患の遺伝子解析」(島根大学医学部倫理委員会第1038号、平成24年6月24日承認)の研究計画に従って家族と患者の同意を文書で得た。

C. 研究結果

1. 遺伝性疾患が疑われるが原因不明の特定できない症例の収集

(1) 症例1: 18歳男性

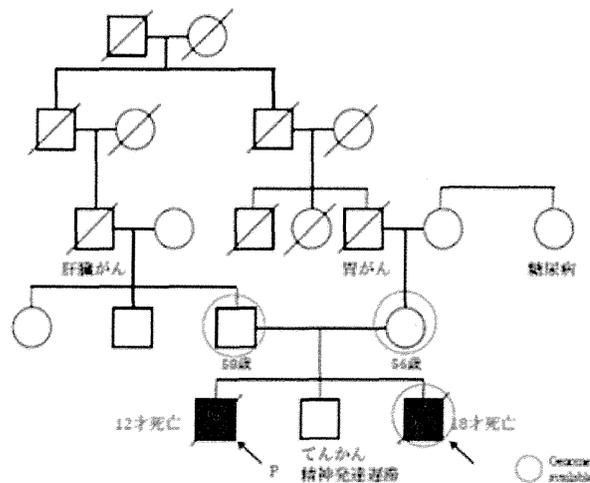
診断：糖尿病、慢性腎不全、難聴、白内障、脊髄小脳変性症、痙性対麻痺、精神発達遅滞、低身長を合併する家族例

経過：出生時は異常に気付かれなかったが、乳児期に治療抵抗性ネフローゼ症候群（巣状糸球体硬化症）、糖尿病（インスリン依存性）、難聴、白内障を発症し、1歳以後に脊髄小脳変性症、痙性対麻痺が出現した。精神発達は1歳まで正常であったが、その後の発達は遅れており、身長も3歳から成長曲線から大きく下回っている。尿検査・血液検査では腎機能障害に関わる検査値の異常を認めるだけで、有機酸・脂肪酸は正常。画像検査では、頭部MRIで脳幹・小脳半球、大脳の萎縮、淡蒼球の低信号域(T2, FLAIR)、皮質下白質の斑

状の高信号域(T2, FLAIR)を認めている。筋生検の病理所見は異常なく、染色体は正常男性核型、ミトコンドリア遺伝子異常は認めていない。10歳時腹膜透析を開始したが18歳時に硬化性腹膜炎で死亡した。

家族歴（図1）：父と母が血族婚。家系内に糖尿病が1人いる（母の母方おば）。同胞は3人で、第1子（兄）が患児と同様の症状（糖尿病、慢性腎不全、難聴、白内障、脊髄小脳変性症、痙性対麻痺、精神発達遅滞、低身長）を示して、12歳の時、腹膜炎で死亡した。第2子（次兄）は、てんかんおよび精神発達遅滞を合併しているが、その他の症状は認めていない。両親と患者のDNAを採取してNGS解析を依頼している症例である。（図1の丸印はDNAを採取した家族）

図1. 症例1の家系図



(2) 症例2：18歳女性

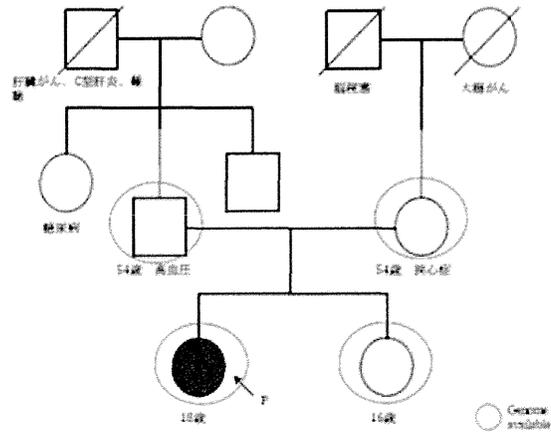
臨床診断：糖尿病、慢性腎不全、難聴、白内障、脊髄小脳変性症、痙性対麻痺、精神発達遅滞、低身長を合併する孤発例

経過：出生時は異常なく、乳児期より治療抵抗性ネフローゼ症候群（膜性腎症）、糖尿病（インスリン依存性）、難聴、白内障を発症した。1歳以後に痙性対麻痺、発達遅滞が徐々に進行して、3歳ごろから脊髄小脳変性症、低身長が現れた。尿検査・血液検査、有機酸・脂肪酸、頭部MRI、筋生検所見は、症例1と同様であった。染色体は正常女性核型、ミトコンドリア遺伝子は調べた範囲では異常を認めなかった。14歳

の時、腹膜透析を開始したがコントロール不良で、16歳で母親からの生体腎移植にふみきり、QOLは改善している。

家族歴（図2）：血族婚なし。家族内に糖尿病、難聴1名ずついるが、その他の同様の症状を呈する者はいない。両親と患者のDNAを採取してNGS解析を依頼している症例である。（図2の丸印がDNA検体を採取した家族）

図2. 症例2の家系図



(3) 症例3：5歳男児

臨床診断：繰り返す脳症を伴う発熱発作、門脈圧亢進症を合併する弧発例

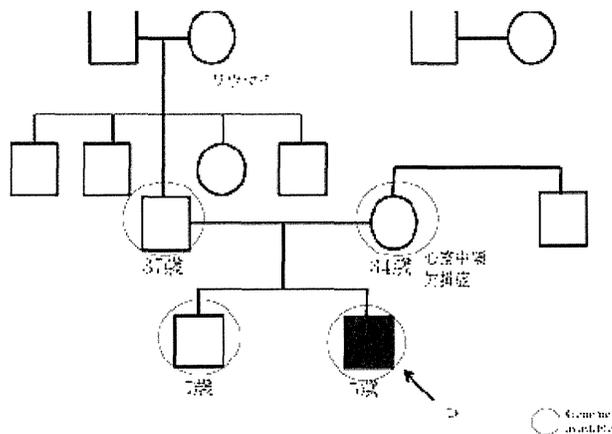
経過：生後7カ月から現在まで20回の発熱（40度前後のけい留熱が1週間前後、1～6か月間隔）を繰り返している。発熱発作の原因として、病原体が同定された発熱は4回（マイコプラズマ、キャンピロバクター、アデノウイルス、水痘）のみで、それ以外は発熱の契機は不明である。発熱時、下肢痛および下痢を併発する。抗菌薬やグロブリンに反応なく、ステロイドが有効である。身体所見として、肝脾腫を認める以外異常なし。貧血、血小板減少、凝固障害、ビリルビン・AST・LDHの高値、アンモニア上昇を認める。腎機能は正常で、各種自己抗体は陰性、補体低下以外の免疫検査は正常である。内分泌・代謝（甲状腺機能、有機酸・脂肪酸、アミノ酸）も異常なし。自己炎症性症候群および家族性血球貪食症候群に關与する遺伝

子異常も認めていない。

また、2歳から発熱時、脳症を合併することが4回あった。それぞれの脳症の原因として、水痘、アデノウイルス、キャンピロバクターが検出されたことがあるが、原因不明のこともあった。脳症の集学的治療（ステロイド、免疫グロブリン、脳低体温療法など）により症状が改善している。2歳頃より、ビリルビンおよびアンモニア高値が出現し、脾腫も出現。血管造影および血管カテーテル検査で門脈圧亢進と診断。肝生検では門脈域が線維性に拡大しており、門脈の拡張と増加、肝動脈の壁肥厚を伴う径の増大、中心静脈も拡張と壁肥厚あり。5歳現在、発熱発作が重篤化しており、発熱時に脳症を伴う頻度も増えてきた。

家族歴（図3）：血族婚なし。家族内に同様の症状のヒトは存在しない。両親、同胞（健全な兄）と患者のDNAを採取してNGS解析を依頼している症例である。（図3の丸印がDNA検体を採取した家族）

図3. 症例3の家系図



(4) 症例 4 : 1 才 2 か月男児

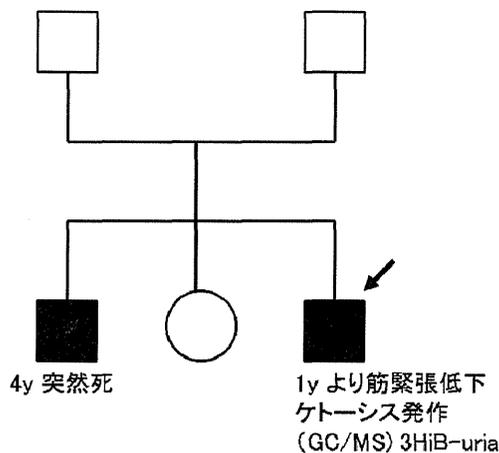
臨床診断 : 3-ヒドロキシイソ酪酸尿症

経過 : 生後 1 才 2 か月児、運動発達遅滞を主訴に来院した。ハイハイが 14 か月、独り歩きが 19 か月であった。生後 15 か月にケトアシドーシス発作が起り、尿中有機酸分析で、3-ヒドロキシイソ酪酸尿症と生化学診断された。高乳酸 (LA 39.4 mg/dL; normal < 14.9)、高ピルビン酸 (PA 2.14 mg/dL; normal < 0.99)、低カルニチン血症 (free 16.2 umol/L; normal 36~74) がみられた。生後 30 か月時の MRI 検査 (T2

強調) で右白質後部に高輝度域がみられた。以後カルニチン 100 mg/kg/日を投与された。現在成人しているが、知的発達遅滞を持っている。

家族歴 (図 4) : 血族婚なし。第 1 子が生後 20 か月に発達遅滞、軽度筋緊張低下を指摘され、また 4 才から嘔吐発作を繰り返す症状がみられ、4 才 6 か月にけいれん重積とともに突然死した。同胞 3 人で第 2 子 (姉) の知的発達は正常範囲である。

図 4. 症例 4 の家系図



2. SIDS、ALTE、およびインフルエンザ脳症脳症患者の収集

日齢 7~3 歳の年齢で SIDS or ALTE 症例の計 140 例 (SIDS 67 ; ALTE 73 例) のうち、先天代謝異常の判明した症例は 6 例あった。内訳は表 1 に示すように、SIDS 様症状の患者では、中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (MCAD) 欠損症 1 例発見された。ALTE 様症状 5 例の内訳は、メチルマロン酸血症 (MMA) 3 例、シトルリン血症 1 例、およびミトコンドリア三頭酵素 (TFP)

欠損症 1 例であった。

家族性の疑われた症例は 3 例発見された。内訳は、表 2 に示すように ALTE 様症状 1 例、SIDS 様症状 2 例であった。症例 1 は、兄 (7 才) が突然死、祖父が突然死という家族歴があった。症例 2 は 2 歳男児で、インフルエンザ罹患 4 日目に突然死した。この症例は双胎であったが、もう一方の小児が新生児期に低血糖発作が見られていた。症例 3 は、4 才男児で、兄が 2 歳児インフルエンザ罹患 2 日目に突然死した。

表 1. SIDS または ALTE を主訴に代謝検索で先天代謝異常症の判明した 6 例

症例	年齢	性別	臨床診断	診断方法		最終診断名
				GC/MS	MS/MS	
1	8日	女	ALTE	○	○	シトルリン血症
2	1ヶ月	男	ALTE	○	○	TFP欠損症
3	8ヶ月	男	ALTE	○	○	MMA
4	1歳8ヶ月	女	ALTE	○	○	MMA
5	1歳8ヶ月	男	SIDS	○	○	MCAD欠損症
6	1歳10ヶ月	男	ALTE	○	○	MMA

表 2. 家族性の疑われた SIDS または ALTE の 3 症例

	1	2	3
診断	ALTE	突然死	突然死
発症年齢	2か月男	2歳男	4才男
経過	生後1か月より哺乳不良 ▲2か月より嘔吐	▲インフル4日目死亡 肝機能障害	▲インフル4時間後に死亡 アシドーシス
タンデムマス	C12~C14	短~長鎖AC	特異所見なし
GC/MS	特異所見なし	特異所見なし	特異所見なし
家族歴	●兄突然死(7才) ●叔父突然死	●双胎の別の子が新生児低血糖	●兄インフル罹患時死亡(2才)

D. 考察

最近、質量分析（タンデムマス、GC/MS）の普及によって、以前は診断できなかった先天代謝異常症が容易に診断できるようになった。同時にこれらの分析のニーズが増え、診療現場からの質量分析依頼件数も年々増加傾向にある。しかし原因の特定できない症例も少なくない。

タンデムマスや GC/MS で診断される代表的疾患として、有機酸・脂肪酸代謝異常がある。これらは、急性脳症や突然死のような急性経過で発症することが多いため、小児救急の場で遭遇することが多い。SIDS、または ALTE 症状のために代謝異常診断を依頼された症例 140 例を検討したところ、6 例に先天代謝異常症が特定された。小児救急の場で代謝異常症の視点の重要性を示す。一方原因が特定できなかったものの、病歴から遺伝性疾患の存在の疑われる症例を 3 例に見出した。既に時間が経過してゲノム解析を家族に依頼することが困難であった。NGS を組み合わせた原因を検索するためには、今後前方視的に検討する必要がある。

質量分析によって生化学診断される病名は必ずしも欠損酵素を特定していない。その一つの例として「3-ヒドロキシイソ酪酸尿症 (3HiB 尿症)」を検討した。3HiB 尿症の原因としてこれまで 3-OH-イソブチリル-CoA ヒドラターゼ、3-OH-イソ酪酸脱水素酵素、およびメチルマロン酸セミアルデヒド脱水素酵素

(MMSDH) の 3 つが知られているが、この症例では、前 2 者の酵素活性は正常で、MMSDH 欠損症の臨床症状と合致しない。この症例は兄弟例であり、遺伝性疾患の可能性が高い。NGS 検索について検討する予定である。

また症例 1 と症例 2 は全く血縁のない家族であるが、臨床的にはほぼ同一の疾患の可能性が高い。症例 1 は兄弟例である。糖尿病、慢性腎不全、難聴、白内障、脊髄小脳変性症、痙性対麻痺、精神発達遅滞、低身長を合併する点は、ミトコンドリア病の症状に類似するが、これまでのところ疾患が特定できていない。NGS によって疾患単位が明らかにされることが期待される。症例 3 は、繰り返す脳症を伴う発熱発作、門脈圧亢進症を合併する弧発例であるが、NGS によって疾患の特定に迫ることが期待される。

E. 結論

質量分析を使って有機酸・脂肪酸代謝異常症のハイリスクスクリーニングを行っている。異常所見のみられないために原因の特定できない症例もあるし、代謝プロフィールに異常を示す症例もある。代謝プロフィールに何らかの一定の異状を示す症例で、病歴から家族性の疑われる症例を前方視的に収集することが、NGS による新しい疾患の発見につながる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Yamada K, Furui M, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Taketani T, Fukao T, Fukuda S: Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders: Evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay. *Molecular Genetics and Metabolism* 107: 87-91, 2012 (September)
- 2) Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Fukao T, Yamaguchi S: Clinical and molecular aspects of Japanese children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 107: 237-240, 2012 (September)
- 3) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Takayanagi M, Fukao T, Fukuda S, Yamaguchi S: Intracellular in vitro probe acylcarnitine assay for identifying deficiencies of carnitine transporter and carnitine palmitoyltransferase-1. *Anal Bioanal Chem* 10: Online, 2012 (November)
- 4) Ihara K, Yoshino M, Hoshina T, Harada N, Kojima-Ishii K, Makimura M, Hasegawa Y, Watanabe Y, Yamaguchi S, Hara T: Coagulopathy in patients with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in remission state: A previously unrecognized complication. *Pediatrics*: Online, 2012 (December)
- 5) 山口清次: 新しい新生児マススクリーニング: タンデムマス法について. *臨床検査* 56(7): 770-776, 2012 (7月)
- 6) 山口清次: タンデムマス法を導入した新生児マススクリーニングの現状. *小児科* 53: 1101-1110, 2012 (7月)
- 7) 山口清次: 新生児マススクリーニングの新たな展開 タンデムマス法の導入. *公衆衛生* 76(11): 853-857, 2012 (11月)

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: Current topics in diagnosis and treatment of mitochondrial fatty acid oxidation disorders. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease Symposium. Seoul, Korea, April 2012
- 2) Purevsuren J, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S: Clinical and molecular aspects of Japanese children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. Seoul, Korea, April 2012
- 3) Takahashi T, Hattori M, Furui M, Yamada K, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukuda S, Ohtake A, RJA W, Yamaguchi S: Chemical diagnosis of methylmalonate semialdehyde dehydrogenase (MMSDH) deficiency: A first case report in east Asia. The 2nd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases & The 12th Asian-European Workshop on Inborn Errors of Metabolism & The 12th Korean Congress of Inherited Metabolic Disease. Seoul, Korea, April 2012
- 4) Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamada K, Takahashi T, Yamaguchi S: Application of in-vitro probe acylcarnitine assay using tandem mass spectrometry for the evaluation of mitochondrial fatty acid oxidation. 19th International Mass Spectrometry Conference. 京都, September 2012
- 5) Yamaguchi S, Purevsuren J, Yamada K, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Takayanagi M, Fukuda S: Intracellular acylcarnitine profiling using in vitro probe

assay at various CO concentrations selectively identifies CPT-1 deficiency and primary carnitine deficiency. Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Annual Symposium 2012. Birmingham, UK, September 2012

- 6) 山口清次: タンデムマス法を導入した新生児マススクリーニングの新時代. 第 48 回日本周産期・新生児医学会 講演. 埼玉, 2012 年 7 月
- 7) 山口清次: 質量分析を応用した有機酸・脂肪酸代謝異常の診断と病態解析に関する研究. 第 37 回

日本医用マススペクトル学会年会. 名古屋, 2012 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

希少遺伝性難病の精神発達に関する病態解明のための網羅的分子遺伝学的研究

研究分担者 富田 博秋 東北大学災害科学国際研究所災害精神医学分野 教授

研究要旨： 希少遺伝性難病には精神発達の障害を伴う疾患が多く、希少遺伝性難病にみられる精神発達の障害の病態を解明することは、各疾患の病態解明のみならず、精神発達障害全体の病態の理解にも繋がるのが期待される。このような疾患の一つであるソトス症候群は小児期の顕著な過成長、特異的頭顔面、精神発達障害を中心に多様な症状を呈する出生率 1-2万人に1人程度の常染色体優性遺伝性疾患である。本症の責任遺伝子であるNuclear receptor SET Domain containing protein 1 (NSD1)遺伝子はヒストン修飾活性、転写調節に関わることが知られるが機能の詳細は不明である。これまでに、NSD1の下流で引き起こされる遺伝子発現障害を特定することを試み、包括的遺伝子発現解析により、疾患群に特異的に発現変化をきたす胞間信号伝達、発生、細胞分化、神経発達、アポトーシスに関与する生理機能を有する遺伝子群を候補遺伝子としてリストアップし、定量PCR法などにより、発現異常を確認した。本年度は、病態解明のため今後多くの検体集積し研究を進めていく上で必要となる、現在遺伝子診断に使用されているNSD1遺伝子のおよび定量PCR法およびFISH（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション）法による微小欠損の検出、HRM（高解像度融解曲線分析）法により微小変異を検出する系を本研究室で立ち上げ、これらの遺伝子の発現異常とNSD1遺伝子の変異、欠損との関係をソトス罹患患者で発現異常が確認された遺伝子との関係を調査した。同検体で今後、次世代シーケンサーによるChIP-seq解析やde novo変異検出解析等を用いて更にソトス症候群を始めとする精神発達障害を呈する疾患の病態メカニズムを解明することで、精神発達障害の病態解明と治療法開発に繋がることが期待される。

研究協力者：

福與なおみ（東北大学病院 発生発達医学講座 小児病態学分野）

小野 千晶（東北大学災害科学国際研究所 災害精神医学分野）

兪 志前（東北大学災害科学国際研究所 災害精神医学分野）

A. 研究目的

次世代シーケンサーによるChIP-seq解析等の網羅的分子遺伝学的解析技術を用いてソトス症候群を始めとする精神発達障害を呈する疾患の病態メカニズムを解明することで、精神発達障害の病態解明と治療法開発に繋げることを目指す。ソトス症候群の病態において責任遺伝子であるNuclear receptor SET Domain containing protein 1 (NSD1)遺伝子のハプロ不全により、NSD1の下流で引き起こされる遺

伝子発現障害を網羅的分子遺伝学的解析により特定し、病態の中でも、ソトス症候群にみられる精神発達遅滞、注意欠陥・多動性障害(ADHD)やてんかんなどの中枢神経系障害の病態のメカニズムを解明し、ソトス症候群の病態の理解のみならず中枢神経の発達の障害のメカニズムの解明に繋げることを具体的な目的とする。これまでに、NSD1の下流で引き起こされる遺伝子発現障害を網羅的分子遺伝学的解析により特定することを試みている。ソトス症候群罹患患者と健常対照者由来のリンパ芽球を用いた包括的遺伝子発現解析により、疾患特異的遺伝子発現変化をスクリーニングし、疾患群に特異的に発現変化をきたす胞間信号伝達、発生、細胞分化、神経発達、アポトーシスに関与する生理機能を有する遺伝子群を候補遺伝子としてリストアップし、定量PCR法などにより、発現異常を確認した。本年度は、病態解明のため今後多くの検体集積していく上で必須となるであろう、現在遺伝子診断に使用されているNS

D1遺伝子のSybrGreen法による定量PCRおよびFISH（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション）法による微小欠損解析、HRM（高解像度融解曲線分析）による微小変異を解析する系を本研究室で立ち上げ、これらの遺伝子の発現異常とNSD1遺伝子の変異、欠損との関係を調査することを目的とした。また、次年度以降に計画している罹患者の血液検体を対象とする次世代シーケンサーによるChIP-seq解析、*de novo*変異検出等を用いた転写調節機構の研究を行うために血液検体、臨床情報の集積を行った。

B. 研究方法

ソトス罹患者で特異的に発現が変化する遺伝子と、NSD1遺伝子の変異/欠損との関係を調査した。包括的遺伝子発現解析で使用したソトス症候群罹患者12名と健常者12名の株化リンパ芽球を同時に解凍して経代培養をおこない、DNAを抽出し解析に用いた。解析はDouglasら(2003)の報告を基に設計した9組のプライマーを用いたSybr Greenによる定量PCR法およびSRL社への外部委託よりFISH（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション）法による微小欠損解析と、Douglasら(2003)の報告を基に設計した Exon 2から23までを網羅するの40組のプライマーを用いたHRM（高解像度融解曲線分析）で微小変異解析を行った。さらにHRM解析で微小変異が確認された検体に関して、ダイレクトシーケンスにより変異の特定を行った。この結果と遺伝子発現解析において疾患特異的発現変化をした遺伝子と比較を行った。また、次年度以降、ソトス症候群罹患者の新鮮血を対象とする遺伝子発現異常を確認し、さらに発現調節異常のEpigeneticなメカニズムを解明するための次世代シーケンサーを用いたChIP-seq研究および*de novo*変異検出を行うため、ソトス症候群罹患者の臨床データと新鮮血検体の集積を行った。

C. 研究結果

昨年度、包括的遺伝子発現解析で使用したソトス症候群罹患者12名と健常者12名の株化リンパ芽球を同時に解凍して経代培養を始めたものからDNAを抽

出し、定量PCR法による微小欠損解析と、HRMによる微小変異解析を行った。結果、微小変異が3検体でExon5の全て異なる位置で確認された。微小欠損に関しては7組のプライマー、8検体で確認された。さらに外部委託によるFISH解析により再度確認を行いPCR法で確認された8検体で欠損が認められた。包括的遺伝子発現解析見出された疾患特異的に発現が異なる遺伝子の発現は、NSD1の微小変異または微小欠損の違いによる違いは認められなかった。また、罹患者群で発現が最も増加する遺伝子と減少する遺伝子との比を取った場合、全ての健常対象者で比が1未満であり、一方罹患者群では90%以上の確率で1以上の値を示し、ソトス症候群特異性がみとめられた。

D. 考察

病態解明のため今後多くの検体集積していく上で必須となるであろう、現在遺伝子診断に使用されているNSD1遺伝子のSybrGreen法による定量PCRおよびFISH法による微小欠損解析、HRMによる微小変異を診断する系を本研究室で立ち上げた。健常対照者では高発現するのに対し、ソトス症候群罹患者では発現しない遺伝子や、逆にソトス症候群罹患者では高発現する遺伝子は、NSD1遺伝子の変異、または欠損に関係なく疾患特異的マーカーとしての利用や病態解明に有用である可能性が示唆された。

次年度以降、ソトス症候群罹患者の新たなコホートからの新鮮血を対象として、下流で発現異常を呈する分子の特定を行うための次世代シーケンシングによるメチル化異常部位の特定やNSD1に異常が検出されない症例に関しては両親と罹患者のDNAの次世代シーケンシングによる*de novo*変異検出を行うことで、ソトス症候群の疾患メカニズムと精神発達障害の病態メカニズムの解明、更には治療法に繋がることを期待される。

E. 結論

ソトス症候群がNSD1の欠失、変異いずれにおいても、アポトーシス制御などに関与する幾つかの分子

の発現に顕著な影響を及ぼすことで、精神発達障害を含む本症候群の多彩な症状が惹起されるメカニズムが示唆された。次年度以降、次世代シーケンサーによるChIP-seq解析、de novo変異検出等を用いて更にソトス症候群を始めとする精神発達障害を呈する疾患の病態メカニズムを解明することで、精神発達障害の病態解明と治療法開発に繋がることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, **Tomita H**, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features. *J Hum Genet.* 57(3):207-11. 2012. (Mar)
2. Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, **Tomita H**, Ozawa H, Niikawa N, Kurotaki N. Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. *J Hum Genet.* 57(6):399. 2012. (June)
3. Kada T, Hashimoto R, Yamamori H, Umeda-Yano S, Yasuda Y, Ohi K, Fukumoto M, Ikemoto K, Kunii Y, Tomita H, Ito A, Takeda M. Expression analysis of a novel mRNA variant of the schizophrenia risk gene ZNF804A. *Schizophr Res.* 2012 Nov;141(2-3):277-8. doi: 10.1016/j.schres.2012.08.015.
5. 富田博秋、鈴木大輔：災害によるPTSDの疫学とリスクファクター。特集 災害ストレスとPTSD；災害医療の観点から。Pharma Medica 30 (12), 2012 (in press).

2. 学会発表等

1. Ono C, Yu Z, Ishii N, Tomita H. Gene expression profiling of specific immune cells in peripheral blood samples as a tool for neuropsychimmunological bases of traumatic stress-related diseases. International Society Traumatic Stress Studies 28th Annual Meeting Los Angeles, USA. Nov 2 2012
2. Ueda Y, Suzuki D, Tsukita M, Kin Y, Tsuji I, Tomita H. The influence of individual physical-social characteristics on mental health among the Great East Japan Earthquake victims. International Society Traumatic Stress Studies 28th Annual Meeting Los Angeles, USA. Nov 2 2012
3. Tsukita M, Ueda Y, Suzuki D, Kin Y, Tsuji I, Tomita H. Social network and mental health conditions among the Great East Japan Earthquake victims. International Society Traumatic Stress Studies 28th Annual Meeting Los Angeles, USA.

Nov 2 2012

4. Suzuki D, Tsukita M, Ueda Y, Kin Y, Tsuji I, Tomita H. The habitual drinking and smoking among survivors of the Great East Japan Earthquake related to their mental health. International Society Traumatic Stress Studies 28th Annual Meeting Los Angeles, USA. Nov 2 2012
5. Yu Z, Ono C, Tomita H. Molecular conformational changes in microglia and differentiated monocytic cells induced by therapeutic concentrations of lithium. Collegium internationale neuropsychopharmacologicum 28th congress, Stockholm, Sweden. June 3-7, 2012.
6. 富田博秋. 精神神経免疫相関が関与する精神疾患病態のマイクロエンドフェノタイプの解明. 第35回日本神経科学大会 名古屋[2012/9/19]
7. 築田美沙, 上田 譲, 鈴木大輔, 金 吉晴, 辻 一郎, 富田博秋「人のつながり」と被災者の精神的健康. 第11回日本トラウマティック・ストレス学会 福岡 [2012/6/10]
8. 上田 譲, 鈴木大輔, 築田美沙, 金 吉晴, 辻 一郎, 富田博秋. 「沿岸部被災者の精神的健康に対する生活状況および個人的特性の影響」第11回日本トラウマティック・ストレス学会 福岡 [2012/6/10]
9. 鈴木大輔, 築田美沙, 上田 譲, 金 吉晴, 辻 一郎, 富田博秋. 被災者の飲酒・喫煙習慣と精神的健康との関連. 第11回日本トラウマティック・ストレス学会 福岡 [2012/6/10]
10. 小野千晶, 兪 志前, 石井直人, 富田博秋. 末梢血中の特定の免疫細胞の遺伝子発現プロファイリング解析～トラウマ性ストレス関連疾患の精神神経免疫相関機序解明への応用を見据えて～. 第11回日本トラウマティック・ストレス学会 福岡 [2012/6/10]
11. 富田博秋. 災害精神医学と被災地精神保健の現状と展望第11回日本トラウマティック・ストレス学会 福岡 [2012/6/10]
12. 小野千晶, 兪志前, 國井泰人, 和田明, 松本純也, 日野瑞城, 池本桂子, 曾良一郎, 丹羽真一, 富田博秋. 微量脳組織におけるpH測定とその組織内発現プロファイルへの影響 ～死後脳研究とブレインバンク運営に有用な方法論の検討～ 第7回統合失調症学会. 名古屋 [2012/3/16-17]
13. 第108回日本精神神経学会学術総会 精神医学研修コース 精神科臨床と病態解明研究に必要な神経病理学的アプローチ：神経病理診断・死後脳研究・日本版ブレインバンクの方法論. 札幌[2012/ 5/26]
14. 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク精神疾患拠点チュートリアル「体験学習型死後脳研究チュートリアル」仙台[2012/7/27]

G. 知的所有権の取得状況（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

次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究

研究分担者 布施 昇男 東北大学東北メガバンク機構ゲノム解析分野 教授

研究要旨

現在我が国における緑内障有病率（40歳以上）は約5%とされ、分子遺伝学的原因検索においては、開放隅角緑内障、落屑緑内障、発達緑内障早発型が重要である。その中でも特に失明になりやすい緑内障は、落屑緑内障及び発達緑内障早発型である。

発達緑内障早発型は希少遺伝性難病であり、生後早期から発症する。*CYP11B1* 遺伝子が唯一発見されている原因遺伝子であるが、我々は新規遺伝子解析のために、次世代シーケンサーで症例・家系のエクソーム解析を開始し、候補遺伝子を抽出した。

一方、落屑緑内障は、60歳代から発症し手術介入をしても予後は不良である。今回 Toll-like receptor 4 (*TLR4*) 遺伝子、*CNTNAP2* 遺伝子をスクリーニングし、落屑緑内障と相関することを始めて明らかにした。また、染色体2番領域をスクリーニングし、開放隅角緑内障のサブタイプである正常眼圧緑内障がNK2遺伝子、NCK2遺伝子と相関していることを明らかにした。

研究協力者

高野 良真（東北大学大学院医学研究科眼科学分野）

清水 愛（東北大学大学院医学研究科眼科学分野）

石 棟（東北大学大学院医学研究科眼科学分野、中国医科大学眼科病院）

A. 研究目的

現在我が国における緑内障有病率（40歳以上）は約5%とされ、人口から概算して緑内障患者数は約400万人にもなる。病型別に見てみると原発開放隅角緑内障の比率が高い。しかし、その中でも失明になりやすい緑内障は、発達緑内障早発型及び落屑緑内障である。特に、発達緑内障早発型は、積極的に介入しても予後不良な症例が数多く存在し、その病態解明は急務の課題である。発達緑内障早発型は、生後早期から発症することが多く、常染色体劣性遺伝と考えられてきた疾患である。今回唯一の原因遺伝子である *CYP11B1* 遺伝子をスクリーニングし、変異の頻度を探索すること、*CYP11B1* 遺伝子陰性の症例の掘り起しを行い、次世代シーケンサーで解析するに適する症例・家系の掘り起しを行い、新規遺伝子を同定することを目的とした。

また、近年ゲノムワイドアソシエーションスタディ（GWAS）を用いて緑内障の病態解析がされている。以前、落屑緑内障と *LOXLI* 遺伝子と相関があると我々は報告している（*Mol Vis* 2007）が、いまだ診断に応用できる感度でない。落屑緑内障の早期発見、発症前診断のために、免疫応答を担う Toll-like receptor 4 (*TLR4*) 遺伝子、欧米で落屑緑内障との相関が発表された *CNTNAP2* 遺伝子をスクリーニングし、落屑緑内障と関連解析することを目的とした。

最後に、現在失明原因の第一位を占める開放隅角緑内障のサブタイプである正常眼圧緑内障に関し、常染色体2番領域のスクリーニングを行い、感受性遺伝子の同定を行うことを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、東北大学病院眼科緑内障外来において収集した発達緑内障早発型、落屑緑内障、開放隅角緑内障患者検体を用いた。

発達緑内障早発型：発達緑内障早発型（家系例、孤発例）59例に対して、原因遺伝子である *CYP11B1* 遺伝子に関し、3つのエクソンの翻訳領域を増幅できるようにプライマーを設定しPCR条件を設定した。PCRダ

イレクトシーケンス法にて、一塩基多型 (SNP) やミスセンス変異が無いかどうか確認した (シーケンサー、ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer)。

CYP1B1 遺伝子陰性の症例について、ゲノムDNAをSureSelect Human All exon kit (Agilent社)を用いて、濃縮とライブラリ調整を行った。このサンプルを次世代シーケンサーHiSeq2000 (Illumina社)を用いて、エクソーム解析を行った。得られたデータは、BWA、GATKを用いて解析した。

嚢性緑内障：Toll-like receptor 4 (*TLR4*) 遺伝子上の8個の一塩基多型 (SNP)、CNTNAP遺伝子上の8個のSNPを選択、プライマーを設定し、PCRダイレクトシーケンス法にて、各々109例、108例SNPタイピングを行った。アリル頻度、遺伝子型頻度について、正常対照約200例との関連解析を行った。

開放隅角緑内障：常染色体2番の緑内障遺伝子座GLC1B領域上のSNP669個を用い、(狭義)開放隅角緑内障POAG123例、開放隅角緑内障(正常眼圧緑内障NTG)121例、正常対照120例で第一段階のスクリーニング、関連解析を行った。統計学的に有意なSNPに関して、POAG187例、NTG286例、正常対照271例で第二段階のスクリーニングを行った。また、統計学的に有意なSNPに関して、表現型との関連解析を行った。

尚、標本は、遺伝子型と表現型 (臨床型) を後に解析できるように、臨床データがきちんと整備された貴重な標本である。

(倫理面への配慮)

なおこの研究課題の計画にあたり、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、倫理委員会に緑内障遺伝子の解明のために東北大学眼科外来にてDNA検体を採取することについて申請しその承認を得てある。対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を十分考慮し、説明と同意 (インフォームド・コンセント) を得た。

C. 研究結果

発達緑内障早発型：59例のスクリーニングにおいて20例が、*CYP1B1* 遺伝子陰性であった。そのうち5例を選択し、エクソーム解析を行った。1000 Genomes、変異の種類、遺伝様式に基づく絞り込み

を行い、候補遺伝子を抽出した。その結果、ホモ接合体変異を47個、ヘテロ接合体変異を386個抽出した。de novo 変異も原因の候補であることが明らかとなった。引き続き、遺伝子発現、遺伝子機能の点から引き続き絞り込みを行っている。

落屑緑内障：*TLR4* 遺伝子上のSNPに有意差を認めた。rs1927914、rs1927911、rs12377632、rs2149356のアリル頻度 ($p=0.019, 0.021, 0.038, 0.015$, χ^2 テスト)。また、ハプロタイプ解析でも、 $p=0.014$ と有意差を認め、落屑緑内障と*TLR4* 遺伝子に相関を認め、落屑緑内障の発症に免疫応答も関与することを明らかとした (Am J Ophthalmol, 2012)。また、CNTNAP 遺伝子上のrs1404699, rs7803992に有意差を認め (アリル頻度 $p=0.0086, 0.00054$)、神経のカリウムチャネルの安定性に関わるCNTNAP 遺伝子が、落屑緑内障に関連していることを明らかとした (Mol Vis 2012)。

常染色体2番の緑内障遺伝子座GLC1B領域の一次スクリーニングからは、6個の陽性のSNPが得られ、引き続き二次スクリーニングからHK2 遺伝子、NCK2 遺伝子内のSNPがNTGと相関していることを明らかとした。また、これらの遺伝子はマウスを用いた免疫組織学的検査から、神経節細胞層に発現していることが確認され、緑内障の病態に関連していることを示した (PLoS ONE 2013)。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた解析により、既知の発達緑内障原因遺伝子*CYP1B1* 遺伝子陰性の症例をスクリーニングすることによって、新規原因遺伝子の候補を抽出することができた。以前から、常染色体劣性遺伝と考えられてきたが、de novo 変異もその原因である可能性と、遺伝的異質性の高いことが示唆された。今後、家系情報と追加症例の解析により、新規原因遺伝子探索の可能性が高いと考えられた。

TLR ファミリーは、自然免疫機構で中心的な役割を果たし、外因性のリガンドを認識し自己、非自己を区別するパターン認識受容体である。また、CNTNAP 遺伝子は、その構造に上皮増殖因子様部位、ラミニンG部位を持ち、慢性の感染や炎症、接着機能の変化が落屑緑内障の発症を誘発しうると推測された。

正常眼圧緑内障に関しては、ミトコンドリア内膜の代謝に関係する *HK2* 遺伝子、アダプター分子をコードする *NCK2* 遺伝子が関係しており、新たな分子発症機序であると考えられた。

E. 結論

- 1) 日本人発達緑内障早発型では、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析にて、新規原因遺伝子の探索の可能性がある。
- 2) *TLR4* 遺伝子、*CNTNAP2* 遺伝子と落屑緑内障とは相関する。
- 3) *HK2* 遺伝子、*NCK2* 遺伝子正常眼圧緑内障とは相関し、新たな原因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

1. Shimizu A, Takano Y, Shi D, Yokokura S, Yokoyama Y, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nakazawa T, **Fuse N**. Evaluation of *CNTNAP2* gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese. *Mol Vis*. 18; 1395-1401, 2012.
2. Takano Y, Shi D, Shimizu A, Funayama T, Mashima Y, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nishida K, Nakazawa T, **Fuse N**. Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in Japanese subjects with primary open angle, normal tension, and exfoliation glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 154; 825-832, 2012.
3. Shi D, Funayama T, Mashima Y, Takano

Y, Shimizu A, Yamamoto K, Mengkegale M, Miyazawa A, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Nishida K, Nakazawa T, Richards JE, **Fuse N**. Association of *HK2* and *NCK2* with Normal Tension Glaucoma in the Japanese Population. *PLoS ONE*. 8; e54115, 1-11, 2013.

2. 学会発表

1. Shimizu A, **Fuse N**, Takano Y, Shi D, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nakazawa T. Evaluation for *CNTNAP2* gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese. The 84th annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ft. Lauderdale, FL, 2012.5.10
2. **Fuse N**. Hot topics. Genetics and Biomarkers in Glaucoma. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. Busan, Korea, 2012.4.13
3. **Fuse N**. Molecular Genetic Analysis for Glaucoma using Next-Generation Sequencing Technology. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology. Subspecialty Symposium. Hyderabad, India, 2013.1.18
4. 清水愛、**布施昇男**、高野良真、石棟、鄭曉東、白石敦、大橋裕一、中澤徹 日本人における落屑症候群と *CNTNAP2* 遺伝子多型の関連について 日本眼科学会総会 2012.4.6
5. 高野良真、**布施昇男**、清水愛、石棟、中澤徹 開放隅角緑内障、嚢性緑内障における *CAV1*、*CAV2* 遺伝子の評価 日本眼科学会 2012.4.6
6. **布施昇男** 遺伝と診断 第23回緑内障学会シンポジウム 小児緑内障、金沢、2012.9.28

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし