

201238008A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成25年(2013年)5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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西野 一三

平成25年(2013年)5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. 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	9
---	---

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】

2. 先天性ミオパチーの原因解明	14
------------------	----

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】

3. 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】

4. 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	22
--	----

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】

5. 次世代型シーケンズデータ解析プログラムの比較検討	26
-----------------------------	----

本村 和嗣 【(独)国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナルメディカルセンター  
臨床開発部 室長】

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】

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	30

# 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

次世代型シーケンサーを用い、ヒトゲノム全エクソンまたはターゲット遺伝子全エクソンのシーケンス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。国立精神・神経医療研究センター骨格筋レポジトリ登録検体のうち診断未確定の遺伝性筋疾患例140例について全エクソーム解析を行った。近親婚があり解析に適した、tubular aggregatesを伴う肢帯型筋ジストロフィーのアラブ人家系については原因遺伝子変異を絞り込むことが可能であった。既報の遺伝子ではあったが、良い検体があればシステム自体は機能することが証明された。

主に先天性ミオパチーを対象として、MiSeqを用いて網羅的既知遺伝子スクリーニング法確立を試みた。計120例の変異未確定の先天性ミオパチーについてゲノムDNAを用いた網羅的に既知原因遺伝子の変異スクリーニングを行った。その結果、約半数で変異を同定し、その威力を発揮している。一方で、問題点も見いだされ、現在対策を講じている。ミトコンドリア病に関しては、7368箇所の領域を解析するシステムを構築し、呼吸鎖酵素複合体I機能低下症の2例に試みた。その結果、それぞれに病因の可能性の高い遺伝子変異が、それぞれコンパウンドヘテロ接合体とホモ接合体で見いだされ、病因確定のために表現系回復実験を行っている。

これらの解析を行い候補遺伝子変異が得られても、その病原性を証明するためには、疾患特異的に実証実験を行う必要がある。そこで、エキソスキップによる遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患のモデルマウス的高速作成の試みと得られたマウスの表現型の解析を行い、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構築を行っている。

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

本村 和嗣・(独) 国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナルメディカルセンター臨床開発部先端診断開発室 室長

#### 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

佐藤孝俊・(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 研究生

清水玲子・(独) 国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナルメディカルセンター 臨床開発支援部 流動研究員

竹内美美・(独) 国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経診療部 研究生

竹下絵里・(独) 国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経診療部 レジデント

#### A. 研究目的

原因不明の遺伝性ミオパチー一例に対して、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

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遺伝性筋疾患例140例についてゲノムDNAを抽出した。3 $\mu$ gのゲノムDNAを200bpsの長さの断片化後アダプター分子を接合し、エクソームの部分配列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。得られたゲノム情報を構築したパイプラインを用いて解析した。ヒト染色体DNAの参照配列は、hg19を用いた。BWAを用いてマッピングを行い、Samtoolsを用いて一塩基変異多型 (SNPs) を抽出し、さらに、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のみを抽出するパイプラインを構築した。

##### (2) 網羅的既知遺伝子スクリーニング法確立

先天性ミオパチーの遺伝子診断は臨床病理学的類縁疾患が多い、巨大遺伝子が多いなどの理由により困難を伴う場合が多い。そこで遺伝子診断を効率的に進めることを目的に、パーソナル型次世代シーケンサーMiSeqを用いた変異スクリーニング方法の確立を目指した。計120例の変異未確定の先天性ミオパチーについてゲノムDNAを用いた網羅的に既知原因遺伝子の変異スクリーニ

ングを行った。

(3) 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

遺伝性ミオパチーの病因は多因性であり、かつ未だ病因が不明な例も多く存在する。また遺伝性ミオパチーでこれまでに同定されている原因遺伝子の多くが、Nebulin や RYR1 などの巨大遺伝子であり、例えば原因遺伝子が判明している疾患であっても従来のサンガー法では遺伝子診断を行うことは困難である。そこで遺伝性ミオパチーの原因解明の基礎となる臨床データの集積を行った。

(4) 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

候補遺伝子変異の病原性を証明するためには、疾患特異的に実証実験を行う必要がある。本研究では、エキソンスキップによる遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患のモデルマウス的高速作成の試みと得られたマウスの表現型の解析を行った。

(5) ミトコンドリアミオパチーの原因解明

約 800 のミトコンドリア関連タンパクをコードする遺伝子配列を調べるために、7368 箇所の領域をキャプチャーする Haloplex® を用いた解析システムを構築した。生化学的に呼吸鎖酵素複合体 I 機能低下症と診断されたものの原因遺伝子が解明できていない 2 症例を対象として解析を行った。

(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

これまでに、tubular aggregates を伴う肢帯型筋ジストロフィーと診断されたサウジアラビア人一家系について全エクソーム解析し、原因遺伝子変異を決定することが出来たが、既に、tubular aggregates を伴う遺伝性筋疾患の原因遺伝子として近年報告されている遺伝子 *GFPT1* であった。この結果から、参照配列を hg19+decoy 配列を用いて、BWA-picard-GATK-annovar の解析パイプラインで、効率よく、信頼性の高い結果が得られることが示された。

(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 検体をのうち、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、この



うち DNA 抽出が可能など、現実的に解析可能な例を絞り込んで、計 120 例の変異未確定の先天性ミオパチーについてゲノム DNA を用いた網羅的に既知原因遺伝子の変異スクリーニングを行った。その結果、約半数で変異を同定し、その威力を発揮している。一方で、問題点も多々、見いだされ、現在少しずつ対策を講じているところである。よりよい遺伝子診断法の確立にはさらなる工夫が必要である。

### (3) 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

遺伝性ミオパチーの原因解明の基礎となる臨床データの集積を行っている。実際に集められた情報を参考にしつつ、先天性ミオパチーを初めとする疾患の解析を進めている。

### (4) 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

脂質蓄積性ミオパチー（原発性カルニチン欠損症）の原因遺伝子である *Octn2*、ミオチューブラーミオパチーの原因遺伝子である *Mtm1*、および II 型糖原病の原因遺伝子である *Gaa* を対象に、イントロン-エキソン境界を含む Vivo-Morpholino を設計し、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と、解析方法の構築を試みた。Vivo-Morpholino の投与により表現型が確認され、本方法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可能性が示された。

### (5) ミトコンドリアミオパチーの原因解明

生化学的に呼吸鎖酵素複合体 I 機能低下症と診断されたものの原因遺伝子が解明できていない 2 症例を対象とし

て解析を行ったところ、それぞれに病因の可能性の高い遺伝子変異が、コンパウンドヘテロ接合体とホモ接合体で見いだされた。現在、病因確定のために表現系回復実験を続行中である。今後はこの方法でさらにミトコンドリア機能異常が確定している症例について解析を行い、原因解明を進める予定である。

## 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。

次世代シーケンサーの SNV データを解析すべく、BWA や Samtools を組み合わせたパイプラインを構築した。これまでに 140 例のエクソームを終え、その内、tubular aggregates を伴う肢帯型筋ジストロフィーと診断されていたアラブ人家系については、原因遺伝子変異を絞り込むことに成功した。これは、我々の構築したシステムが機能していることを示している。これはアラブ人家系が近親婚を伴い、同胞発症者も存在するなど解析を行うのに好都合な条件が整ったことも大きな要因であると考えられる。一方、他の例では原因変異の絞り込みに成功していない。これは、大半が孤発例であり、家系情報を解析に活用することが出来ないこと、更には、公開多型データベース上に日本人多型がほとんど含まれていないことに原因があると考えられた。今後は、血族婚や家族歴がある例を積極的に対象とすること、また、拠点班との協力による日本人正常多型データベースの構築が必要と考えられた。

先天性ミオパチーを中心とする既知遺伝子のハイスループット変異スクリーニングに着いては、約半数例で何らかの変異が同定された。ただし、劣性遺伝が想定されるにも関わらず、ヘテロ接合体変異が一つしか見出されない例などもあり、診断が確定できたと考えられるのは、全体の約 1/3 であった。今後診断スクリーニングへと臨床応用を目指すに当たっては、更なるシステム

改良が必要と考えられる。

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については、次世代シーケンサー解析に併せて対象症例の臨床情報を順調に集積しつつある。

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においては、マウス腹腔内に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。具体的には、原発性カルニチン欠損症の原因遺伝子である*0ctn2*、ミオチューブラーミオパチーの原因遺伝子である*Mt1*、およびII型糖原病の原因遺伝子である*Gaa*を対象にVivo-Morpholinoを設計し、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と、解析方法の構築を試みたところ、確かにVivo-Morpholinoの投与により表現型が確認され、本方法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。

ミトコンドリアミオパチーの原因解明については、Haloplex®を用いて7368箇所の領域をキャプチャーするシステムを構築し、生化学的に呼吸鎖酵素複合体I機能低下症と診断されている例2症例に対して解析を試みたが、それぞれに病因の可能性の高い遺伝子変異がどうていされたことから、システムが有効に機能している可能性があると考えられた。ただし、病因確定のためには機能解析が必要であり、現在、表現系回復実験を行っている。

## E. 結論

次世代シーケンサーを用いた遺伝性筋疾患の全エクソーム解析パイプラインの構築が完了した。また、先天性ミオパチーを中心とする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ほぼ完了した。

ただし、それでも原因遺伝子変異が同定できない例が多々あり、戦略の変更と更なるシステムの向上が求められる。Vivo-Morpholinoのマウス腹腔投与により確かに表現型を呈することが証明できた。ミトコンドリア病の核遺伝子についても、探索的に施行した解析において、有力候補となる劣性変異が2例において見出された。今後は変異原性に関する更なる検討が必要である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ramachandran N, Munteanu I, Wang P, Ruggieri A, Rilstone JJ, Israelian N, Naranian T, Paroutis P, Guo R, Ren ZP, Nishino I, Chabrol B, Pellissier JF, Minetti C, Udd B, Fardeau M, Taylor CS, Mahuran DJ, Kissel JT, Kalimo H, Levy N, Manolson MF, Ackerley CA, Minassian BA: VMA21 deficiency prevents vacuolar ATPase assembly and causes autophagic vacuolar myopathy. *Acta Neuropathol.* 125 (3): 439-457, Mar, 2013

Kakisaka Y, Haginoya K, Takahashi Y, Ochiai T, Fujiwara I, Kikuchi A, Wakusawa K, Kobayashi S, Kikuchi H, Ichihara Y, Takahashi S, Nishino I: Additional evidence that the ryanodine receptor gene (RYR1) causes malignant hyperthermia and severe skeletal malformations. *Am J Med Genet A.* 161 (1): 234-235, Jan, 2013

Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, Nishino I, Hayashi YK: The C2A domain in dysferlin is important for association

with MG53 (TRIM 72). PLoS Curr.  
4:e5035add8caff4. Nov, 2012

Boyden SE, Mahoney LJ, Kawahara G, Myers JA, Mitsuhashi S, Estrella EA, Duncan AR, Dey F, Dechene ET, Blasko-Goehring JM, Bonnemann CG, Darras BT, Mendell JR, Lidov HG, Nishino I, Beggs AH, Kunkel LM, Kang PB: Mutations in the satellite cell gene MEGF10 cause a recessive congenital myopathy with minicores. *Neurogenetics*. 13 (2): 115-124, May, 2012

Miyake N, Yano S, Sakai C, Hatakeyama H, Matsushima Y, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mut* 34:446-452, 2013

Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I, and Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC). A homozygous mutation of *Cl2orf65* causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J Med Genet* 49: 777-784, 2012

Kim SJ, Kwon M, Ryu MJ, Chung HK, Tadi S, Kim YK, Kim JM, Lee SH, Park JH, Kweon GR, Ryu SW, Jo YS, Lee CH, Hatakeyama H, Goto Y, Yim YH, Chung J, Kong YY, Shong M. CRIF1 is essential for the synthesis and insertion of oxidative phosphorylation polypeptides in the mammalian mitochondrial membrane. *Cell Metabolism* 16: 274-283, 2012

Sangatsuda Y, Nakamura M, Tomiyasu A,

Deguchi A, Toyota Y, Goto Y, Nishino I, Ueno A, Sano A. Heteroplasmic m.1624C>T mutation of the mitochondrial tRNA-Val gene in a proband and his mother with repeated consciousness disturbances. *Mitochondrion* 12: 617-622, 2012

Furukawa R, Yamada Y, Matsushima Y, Goto Y, Harashima H. The manner in which DNA is packed with TFAM has an impact on transcription activation and inhibition. *FEBS OpenBio* 2: 145-150, 2012

後藤雄一. ミトコンドリア病、「希少疾患/難病の診断・治療と製品開発」、(株)技術情報協会、東京、pp. 999-1005、2012

後藤雄一. ミトコンドリア病 (ミトコンドリア脳筋症)、「すべての内科医が知っておきたい神経疾患の診かた、考え方とその対応」、羊土社、東京、pp. 282-289、2012

後藤雄一. ミトコンドリア脳筋症。「疾患・症状別 今日の治療と看護」、南江堂、東京、pp. 771-773、2011

後藤雄一. ミトコンドリア病の治療と最新ケアの情報. 難病と在宅ケア 18:28-30, 2012.

後藤雄一. ミトコンドリア病の解明、生体の科学 63: 440-441, 2012

## 2. 学会発表

(国際学会)

Sato T, Hayashi YK, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: DNAJB6 myopathy in Japanese cohort. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10.9-10.13, 2012

Sato T, Hayashi YK, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: DNAJB6 myopathy in Japanese cohort. The 11th Annual Meeting

of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6. 6-6. 8, 2012

Goto Y. Mitochondrial disease. Joint Congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 5. 27-6. 1, 2012

Goto Y., Mimaki M, Hatakeyama H, Komaki H, Yokoyama M, Arai H, Kirino K, Suzuki T, Nishino I, Nonaka I. Reversible infantile respiratory chain deficiency: a clinical and molecular study. The 11th Asian Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, 6. 7, 2012

Sato Y, Goto Y. Furnishing appropriate information on mitochondrial disease to patients and their families. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11. 7, 2012

Hayashi YK: Japanese family phenotypes. NEMALINE MYOPATHY SATELLITE WORKSHOP. Perth, Australia, 10. 14, 2012

Ishiyama A, Hayashi YK, Kajino S, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital fiber type disproportion with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei is caused by RYR1 mutation. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6. 6-6. 8, 2012

Ishiyama A, Hayashi YK, Kajino S, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital fiber type disproportion with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei is caused by *RYR1* mutation. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth,

Australia, 10. 9-10. 13, 2012

佐藤有希子, 後藤雄一: ミトコンドリア病に関する情報ツール作成の試み. 第54回日本小児神経学会総会, 札幌, 5. 18, 2012

佐藤有希子, 後藤雄一: ミトコンドリア病に関する情報提供の充実に向けた取り組み. 第36回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 松本, 6. 9, 2012

後藤雄一. ミトコンドリアと老化. ART FORUM 2012, 大阪, 8. 30, 2012

末岡浩, 佐藤卓, 水口雄貴, 泉陽子, 高橋香織, 佐藤健二, 中林章, 吉村泰典, 後藤雄一. ミトコンドリア遺伝病における着床前遺伝子診断の不効率例に対する新たな対策の必要性. 第57回日本人類遺伝学会, 東京, 10. 26, 2012

後藤雄一. ヒトミトコンドリアの特性-ヒト疾患の病態基盤. 第12回日本ミトコンドリア学会, 筑波, 12. 21, 2012

石山昭彦, 林由起子, 小牧宏文, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 西野一三: 内在核と筋原線維間網の異常を有し二峰性筋線維不均等を示す先天性ミオパチーはRYR1変異が原因である. 第54回日本小児神経学会総会, 札幌, 5. 17, 2012

林由起子: 筋ジストロフィー研究の進歩. 東京医科大学総合研究所主催シンポジウム (第12回医学総合研究所セミナー), 東京, 6. 26, 2012

本村和嗣, 林由起子, 野口悟, 内海貴夫, 森澤学, 西野一三, “次世代型シーケンサーを用いた遺伝性筋疾患の病態解明の試み” 第二回 NGS 現場の会 2012. 05. 24, 大阪

内海貴夫, 森澤学, 本村和嗣, 西野一三, “次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾

患の原因遺伝子の探索法について 1”第二  
回 NGS 現場の会 2012. 05. 24, 大阪

森澤学、内海貴夫、本村和嗣、西野一三、  
“次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾  
患の原因遺伝子の探索法について 2”第二  
回 NGS 現場の会 2012. 05. 24, 大阪

#### 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

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

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

**研究要旨**

遺伝性筋疾患の遺伝子変異解析において、現在、次世代シーケンサーは広く使われている。しかしながら、家系情報を持たない日本人患者の解析においては、遺伝情報と統計学的手法のみで新規変異遺伝子を見つけ出すことはほぼ不可能である。候補遺伝子変異の病原性を証明するためには、疾患特異的に実証実験を行う必要がある。本研究では、エキソンスキップによる遺伝子ノックダウン法を用いた劣性遺伝性筋疾患のモデルマウス的高速作成の試みと得られたマウスの表現型の解析を行った。

**A. 研究目的**

遺伝性疾患の原因遺伝子変異を知ることは、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ある。遺伝性疾患の克服に向けては、これらの患者での遺伝子変異を正確に知ることが課題となっている。近年の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、遺伝子変異解析に革命をもたらした。この技術を用いることで、原因遺伝子の糸口さえ掴めない遺伝性疾患に対して、その原因遺伝子変異を発見することが可能になった。しかしながら、現在の次世代シーケンサー方法には、依然として様々な問題を抱えている。1. 読み取り配列(リード長)が短い、そのように短いリードを、変異を許容しつつ参照配列に正確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、大規模な遺伝的統計解析を用いることが出来ないこと、3. 日本人の参照ゲノム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、取得した配列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があるものの、間違った情報が発表されてしまう可能性も含んでいる。我々はこの研究事業で、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、次世代シーケン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真の遺伝子変異であることを検証するのか、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。

昨年度は、翻訳開始配列を標的とした

モルフォリノオリゴによる遺伝子ノックダウン法を試みた。遺伝子ノックダウン効率の測定がウエスタンブロットによるため、用いた抗体により客観的な評価がむずかしかった、そこで、今年度は、モルフォリノオリゴを用いてエキソンスキップを誘導した遺伝子ノックダウン法により、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と、解析方法の構築を試みた。

## B.研究方法

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。脂質蓄積性ミオパチー（原発性カルニチン欠損症）の原因遺伝子である *Octn2*、ミオチューブラーミオパチーの原因遺伝子である *Mtm1*、および II 型糖原病の原因遺伝子である *Gaa* を対象にした。マウス遺伝子配列にて、イントロン-エキソン境界を含む Vivo-Morpholino を設計した (図)。以下に配列は示した。

mOCTN2-1:ATAAGTGCTGGACACCTTACCTGTC

MMTM1-2: TAGACCCACAA-GCTCCTTACCAGTA

mGAA-1: GCCTCAGGTAAC-CAACTCACAAACAC

骨格筋株化細胞 C2C12 への投与

C2C12 の培養、分化の誘導は既報の方法にて行った。誘導 4 日目に Vivo-Morpholino を 8 $\mu$ g/ml の濃度にて分化培地に添加し、24 時間培養した。

マウスへの投与

投与マウスは正常マウス (C57Black6/J、5 週齢雌) を用いた。一つの条件あたり各 3 匹ずつを解析に用いた。

骨格筋内投与: 10 $\mu$ g Vivo-Morpholino/40 $\mu$ l 生理食塩水溶液をマウス前脛骨筋 (両側) に投与した。

尾静脈投与: 120 $\mu$ g Vivo-Morpholino/100 $\mu$ l

生理食塩水溶液を、週 2 回合計 5 回投与した。

コントロールとして、市販のコントロール Vivo-Morpholino を同様に投与した。

運動能力試験

トレッドミルでの走行試験は、既報の方法にて、運動能力、持久力を測定した。マウスを装置に馴化させるため、一週間軽い運動を与えた後、運動能力テストとして、初速度 10m/分にて 5 分間走行させた後、1 分ごとに 10m/分増加させ、走行可能な最大速度を計測した。最大速度はそれまでの移動距離として表した。

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。

筋収縮力測定

骨格筋の収縮力は、骨格筋内投与では前脛骨筋を、尾静脈投与では、前脛骨筋および腓腹筋を用いた。定法に従って、腓腹筋および前頸骨筋を腱から骨まで完全な状態で単離し、両端に糸を結びつけ、トランスデューサーと連結させた。生理検査溶液中で、最大単収縮長での単収縮力 (3ms) と 10-200Hz (300ms) での強縮力を測定した。

RT-PCR

細胞および骨格筋より total RNA を Trizol および Pure link RNA kit により調製した。RNA のスプライシングの解析では RT-PCR 産物を、アガロース電気泳動にて分離後、GR Green での染色により染色した。各バンドの蛍光強度をデンストメーターにて測定し、スプライシング高率を計測した。*Octn2* はエキソン 1-3、*Mtm1* は、エキソン 2-6 を、*Gaa* はエキソン 2-4 に相当する領域を増幅した。



## 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、Oilred O 染色を行った。

## (倫理面への配慮)

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

骨格筋株化細胞でのエキソンスキッピング C2C12 分化細胞で vivo-morpholino によるエキソンスキッピングでは、*Octn2* 遺伝子産物として、通常のスプライシング産物に加え、フレームシフトしたエキソン 2 がスキップしたフレームシフト産物が得られた(図参照)。

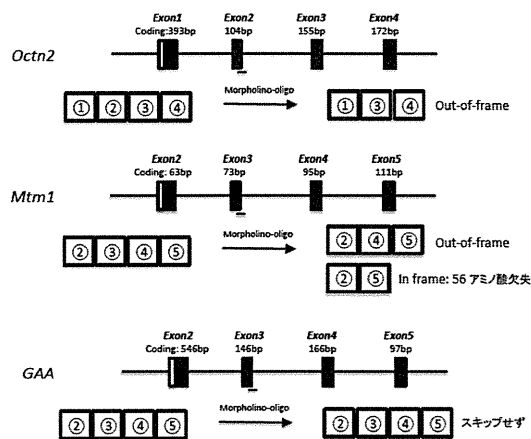


図 vivo-morpholino による C2C12 分化筋管細胞におけるエキソンスキッピング

*Mtm1* 遺伝子産物では、通常のスプライシング産物に加え、エキソン 3 スキップ産物(フレームシフト)とエキソン 3 及び 4 がスキップした 168 塩基 (56 アミノ酸) 欠失

産物が得られた。この 56 アミノ酸欠失では、N 末端付近の GRAM 領域の大半がうしなわれていると予測された。しかしながら、スプライシング効率は *Octn2* 遺伝子産物に比べ、低かった。一方、*GAA* 遺伝子では、通常のスプライシング産物しか得られなかった。

## 表現型の解析

骨格筋内投与および尾静脈投与マウスの体重には変化が認められなかった(骨格筋内投与: コントロールマウス  $19.2 \pm 1.6$ g; *Octn2* マウス  $18.6 \pm 1.2$ g; *Mtm1* マウス  $19.4 \pm 1.3$ g; *Gaa* マウス  $18.8 \pm 0.2$ g、尾静脈投与: コントロールマウス  $20.1 \pm 0.4$ g; *Octn2* マウス  $19.7 \pm 0.6$ g; *Mtm1* マウス  $21.3 \pm 0.5$ g; *Gaa* マウス  $19.8 \pm 0.5$ g)。その他、外見上の異常は認められなかった。

尾静脈内投与マウスのトレッドミルでの走行試験では、*Octn2* マウスと *Gaa* マウスで運動機能の低下が認められた。呼吸筋測定では、いずれのマウスにおいても、呼吸パラメータの変化は認められなかった。

## 骨格筋測定

筋重量の変化では骨格筋投与マウスで、*Octn2* vivo-morpholino 投与マウスの前脛骨筋重量に変化が認められた。コントロールマウス  $40.7 \pm 1.5$ mg; *Octn2* 投与マウス  $34.8 \pm 1.5$ mg ( $p < 0.005$ ); *Mtm1* 投与マウス  $37.2 \pm 3.4$ mg ( $p > 0.05$ ); *Gaa* 投与マウス  $42.0 \pm 1.9$ mg ( $p > 0.05$ )。尾静脈投与では、いずれのマウスにおいても、前脛骨筋および腓腹筋において、統計学的な変化が認められなかった。

骨格筋投与マウスの前脛骨筋の収縮力は、コントロールマウスで単収縮力:  $42.7 \pm 10.9$  mN、強縮力:  $257.7 \pm 52.3$  mN/mm<sup>2</sup>、*Octn2* 投与マウスでは単収縮力:  $24.5 \pm 14.9$  mN ( $p < 0.05$ )、強縮力:  $114.5 \pm 40.8$  mN ( $p < 0.05$ )、*Mtm1* 投与マウスでは単収縮力:  $46.4 \pm 10.0$  mN ( $p > 0.05$ )、強縮力:  $209.3 \pm 35.3$  mN ( $p > 0.05$ )、*Gaa* 投与マウスでは単収縮力:  $57.5 \pm 4.7$  mN ( $p > 0.05$ )、強縮力:

240.3±10.0 mN ( $p>0.05$ )であった。尾静脈投与では、いずれのマウスにおいても、前脛骨筋および腓腹筋の収縮力に、統計学的に有意な変化が認められなかった。

#### 筋病理解析

骨格筋投与マウスの前脛骨筋の病理解析では、*Octn2*投与マウスで中心核線維及び萎縮線維の増加が認められた。また、HE染色ゴモリ染色及びNADH-TR染色では筋線維内にドット上の構造が認められた。*Oilred O*では、明瞭な染色は観察されず、脂質が蓄積は極めて少ないと考えられた。*MTM1*投与マウスでは中心核線維及び萎縮線維の増加が認められたが、NADH-TR染色において peripheral halo 様の染色分布を示す筋線維は極めて少なかった。*GAA*投与マウスでは、縁取り空胞の形成は認められなかった。コントロール Vivo-Morpholino 投与マウスでは骨格筋に病理変化は認められなかった。

#### Vivo-Morpholino 投与マウス骨格筋におけるエキソンスキップ

投与マウスの骨格筋での各遺伝子産物のエキソンスキップ効率を測定した。骨格筋内投与群では、*Octn2*投与マウスでは55-68%の産物がエキソン2をスキップし、*Mtm1*投与マウスでは、27%の産物がエキソン3-4をスキップしていた。*Mtm1*投与マウスでエキソン3の単独スキップは見られなかった。また、*Gaa*投与マウスでのエキソンスキップはみられなかった。一方、尾静脈投与群では、すべてのマウスにおいて正常スプライシング産物しかえられなかった。

#### 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。孤発例の多い日本人患者での解析では、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整備する必

要性が考えられた。

昨年にひきつづき、劣性型遺伝疾患をモデルに、マウスにて高速に病態を再現することを試みた。今回用いた方法は、昨年度よりも、より確実な方法の構築を目指した。第一にノックダウンの効率を簡単に測定しうる方法に変更した。第二に、成体のマウスを用いることで、投与に伴う事故の危険性を回避した。第三に、骨格筋または全身性に投与し、マウスの行動解析及び後肢骨格筋の測定を可能にした。今回の解析では、骨格筋と尾静脈からの全身投与の2つの投与を試したが、どちらの場合にも、多少の体重の増減はあるものの、生命に関わるような重大な事故は起こらなかった。非常に安全な方法であると考えられた。

Vivo-Morpholino のエキソンスキップの効率を培養筋細胞にて、事前に評価出来ることがわかった。細胞実験と骨格筋投与マウスの実験で各遺伝子のエキソンスキップの効率は一致していた。これにより、事前に細胞にて複数のMorpholinoの性能を評価してから、最も効果のある配列で、Vivo-Morpholino を合成するのがコスト的にも重要であるかもしれない。

今回の解析では、Vivo-Morpholinoのたった一回の骨格筋投与が非常に高いエキソンスキップ効果と筋力低下、筋萎縮を示した。投与量は前脛骨筋にたった10 $\mu$ gであった。これは全身投与に比較して10%以下の量であり、反復的に投与したとしても、高価なVivo-Morpholinoの量を相当節約出来る方法である。また、今回は投与後3週間後にすべての解析を行ったが、たった3週間で明瞭な筋力、筋重量の低下が引き起こされていたことは特筆に値する。このスケジュールでは、2か月間でVivo-Morpholinoの発注、投与、解析のすべてが終了した。たとえ、反復投与したとしても、目標の3ヶ月ですべての解析が終了する。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、非常に高速化された方法であると思われる。

また、今回の解析ではVivo-Morpholino

が投与されたマウスの骨格筋間での表現型の違いとエキソンスキップ効率の違いも観察された。これは、マウスの匹数を増やす、または、投与の回数を増やすことで解決できると考えている。骨格筋への投与時の注射針による、物理的な骨格筋破壊の影響は、非常に小さいことが示された。

## E. 結論

エキソンスキップにより、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

## 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 疾病研究第一部 室長  
研究協力者 佐藤 孝俊 (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 研究生

### 研究要旨

先天性ミオパチーの遺伝子診断は臨床病理学的類縁疾患が多い、巨大遺伝子が多いなどの理由により困難を伴う場合が多い。そこで遺伝子診断を効率的に進めることを目的に、パーソナル型次世代シーケンサーを用いた変異スクリーニング方法の確立を目指した。計120例の変異未確定の先天性ミオパチーについてゲノムDNAを用いた網羅的に既知原因遺伝子の変異スクリーニングを行った。その結果、約半数で変異を同定し、その威力を発揮している。一方で、問題点も多々、見いだされ、現在少しずつ対策を講じているところである。よりよい遺伝子診断法の確立にはさらなる工夫が必要である。

### A. 研究目的

先天性ミオパチーの原因遺伝子は相次いで同定されているが、原因不明のものが大多数である。この理由として、複数の遺伝子の変異が類似の臨床病理所見を呈すること、原因遺伝子の中にはきわめて巨大な遺伝子が複数含まれていること、などの理由から、候補遺伝子を絞っても直接シーケンス法を用いて遺伝子変異を同定するのは困難である場合が多い。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いて、既知疾患原因遺伝子のコード領域を網羅的に解析し、効率的に遺伝子変異部位を同定する手法を確立し、遺伝子診断の効率を上げることを目的とした。

### B. 研究方法

NCNP 骨格筋レポジトリーの中から、こ

れまでに遺伝子診断のついていない先天性ミオパチー、計120例について、骨格筋あるいは血液よりゲノムDNAを抽出した。アジレント社に作製を依頼した既知の筋疾患原因遺伝子に対するプローブを用いて SureSelect あるいは HaloPlex を用いてライブラリーを作製し、イルミナ社製 MiSeq にて変異スクリーニングを行った。検出された遺伝子変化について、候補を絞り、サンガー法による直接シーケンス法で遺伝子変化の確認を行った。解析結果を比較検討し、改善点について検討した。

(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