

5. 第40回日本毒性学会学術年会 シンポジウム 毒性オミクス「生体システムダイナミクス理解のための統合ゲノミクス解析の将来展望」 小原收 千葉 2013年6月
 6. 第116回日本小児科学会学術集会 「ゲノミクスを基礎とした新しい病因探索法」分野別シンポジウム「原発性免疫不全症：新しい疾患、トピックス」 小原收 広島 2013年4月
 7. 第58回日本人類遺伝学会「次世代シーケンシング技術とゲノミクス解析」シンポジウム：次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患解析の現状と課題 小原收 仙台 2013年11月
 8. 第4回関東甲越免疫不全症研究会 「IgA 単独欠損症として紹介され、TREC/KRECの結果から RAG 1 異常と同定しえた1例」 加藤環、釜江智佳子、本間健一、池川健、横須賀とも子、和田泰三、谷内江昭宏、西田直徳、金兼弘和、満生紀子、小原收、今井耕輔、森尾友宏、野々山恵章 2013年9月
 9. 第41回日本臨床免疫学会総会 「本邦における ICF (Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies) 症候群5例の検討」 藤環、釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、久保田健夫、本間健一、小原收、今井耕輔、野々山恵章 下関 2013年11月
 10. 日本人類遺伝学会第58回大会 「次世代シーケンサーを用いて ICF (Immunodeficiency with centromeric instability and facial anomalies) 症候群と診断した2例」 釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、本間健一、小原收、今井耕輔、久保田健夫、野々山恵章 仙台 2013年11月
 11. 第41回日本臨床免疫学会総会 「BTK 変異をみとめた IgA 単独欠損の解析 (IgA deficiency caused by the missense mutation in the BTK gene)」 満生紀子、今井耕輔、Xi YANG、金兼弘和、小阪嘉之、高田英俊、水谷修紀、小原收、森尾友宏 下関 2013年11月
 12. 15th International Congress of Immunology 2013 “Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles” C. Kamae, N. Nakagawa, H. Sato, K. Honma, N. Mitsuiki, O. Ohara, H. Kanegane, T. Morio, K. Imai and S. Nonoyama, Milan, Italy, Aug, 2013
 13. 3rd Sardinian Summer School “Post-GWAS animal models” Ohara O. Pula, Italy, September, 2013
 14. 第41回日本臨床免疫学会「Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討」中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez-Roca, Juan I. Arostegui、平家俊男 下関、2013年11月27日
 15. 第23回日本小児リウマチ学会 「一般検査データから見た家族性及び二次性血球貪食性リンパ球組織球症の特徴と病態の考察」八角高裕、堀雅之、井澤和司、西小森隆太、小原收、平家俊男 大宮、2013年10月
 16. 第23回日本小児リウマチ学会 “Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討” 中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez-Roca, Juan I. Arostegui、平家俊男 大宮、2013年10月
 17. 第58回日本人類遺伝学会 「エクソンスキップに伴い、非典型的な表現型を呈した Filamin A 異常症の兄弟例」 小田紘嗣、西小森隆太、中川権史、日衛嶋栄太郎、井澤和司、河合朋樹、沼部博直、小原收、平家俊男 仙台 2013年11月
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定も含む）なし

小児難病の遺伝要因解明へ向けての家系収集とエクソーム解析

研究分担者 呉 繁夫 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野 教授

研究要旨

平成 23-24 年度に見出した小児難病家系、先天性髄鞘化障害、慢性増殖性糸球体腎炎、ステロイド依存性ネフローゼ症候群、の各家系を次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を実施し、常染色体劣性遺伝と推定される、先天性髄鞘化障害家系とステロイド依存性ネフローゼ症候群家系では有力な候補遺伝子変異を特定することが出来た。一方、常染色体優性遺伝と推定される、膜性増殖性糸球体腎炎家系では、候補遺伝子 15 個を選定したが、それ以上の絞り込みは困難であった。有力な候補遺伝子を同定できた、先天性髄鞘化障害とステロイド依存性ネフローゼ症候群では孤発例を多く収集し、同じ遺伝子内における変異スクリーニングを実施している。

研究協力者

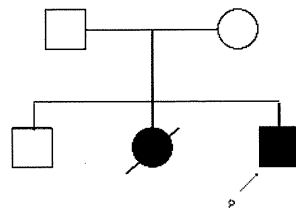
菊池敦生 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野

A. 研究目的

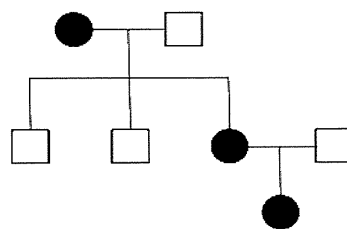
小児難病の遺伝要因を解明するために、収集した家系の DNA 検体を次世代シーケンサーによるエクソーム解析に供した。解析した家系は、1) 先天性髄鞘化障害、2) 慢性増殖性糸球体腎炎、3) ステロイド依存性ネフローゼ症候群、の各家系である。

B. 研究方法

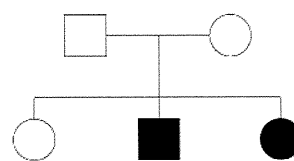
各家族から末梢血を収集し、DNA を抽出してエクソーム解析を行なった。エクソン領域の精製は SureSelect キット(Agilent 社)を用い、シーケンス解析は HiSeq2500(Illumina 社)を用いて実施した。先天性髄鞘化障害家系とステロイド依存性ネフローゼ症候群家系は常染色体劣性遺伝、膜性増殖性糸球体腎炎は常染色体優性遺伝を想定したフィルタリングを実施した。



先天性髄鞘化障害家系



膜性増殖性糸球体腎炎家系



ステロイド依存性ネフローゼ症候群家系

(倫理面への配慮)

本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認を受け、書面でのインフォームドコンセントを得た上で実施している。

C. 研究結果

1) 先天性髄鞘化障害家系：有力な責任候補遺伝子の一つ同定した。この結果をキャピラリー・シークエンサーで確認した。この遺伝子の病因として確定する目的で、先天性髄鞘化障害 30 症例を更に収集し、同定された候補遺伝子の変異スクリーニングを実施している。

2) 膜性増殖性糸球体腎炎：常染色体優性遺伝として 40 個以上の病因候補遺伝子を同定したがそれ以上の絞り込みは困難であった。

3) ステロイド依存性ネフローゼ家系：有力な病因候補遺伝子の一つ同定し、現在ネフローゼ症候群孤発例 100 例を用いて同じ遺伝子について変異スクリーニングを実施している。

D. 考察

先天性髄鞘化障害とステロイド依存性ネフローゼ症候群の家系において、両親が非罹患者であり、かつ罹患者の性別が異なることから、常染色体劣性遺伝が強く示唆される。この二つの家系ではエクソーム解析で有力な候補遺伝子変異を同定することができ、罹患者は複合ヘテロ接合体と考えられた。一方、膜性増殖性糸球体腎炎家系では、罹患者が全て女性であることから、常染色体優性遺伝の他、X連鎖優性遺伝の可能性も考えられる。いずれの遺伝形式によるフィルタリングにおいても候補遺伝子変異は多数存在し、遺伝子同定には至らなかった。

先天性髄鞘化障害の責任遺伝子は、既に複数報告されているが、ステロイド依存性ネフローゼ症候群の疾患感受性遺伝子に関しては、未だ同定に至っていないため、学術的意義は大きい。更にネフローゼ症候群の疾患感受性遺伝子が同定されることで、代表的な小児難病の一つの遺伝子診断法や治療の開発に結びつく可能性があり、社会的意義も大きい。

先天性髄鞘化障害に関しては、同症の孤発症例を多

数収集し、同遺伝子に変異を持つステロイド依存性ネフローゼ症候群の責任遺伝子に関しては、既にノックアウト・マウス作成に着手しており、その詳しい病態解明と疾患モデル動物を用いた治療法開発に結びつけていく計画である。

E. 結論

小児難病である、先天性髄鞘化障害、慢性増殖性糸球体腎炎、ステロイド依存性ネフローゼ症候群、の3疾患の家系を解析し、先天性髄鞘化障害家系とステロイド依存性ネフローゼ症候群家系では有力な候補遺伝子変異を特定することが出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Hirano E, Kure S, Goto YI, Inoue K. Depletion of molecular chaperones from the endoplasmic reticulum and fragmentation of the Golgi apparatus associated with pathogenesis in Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Biol Chem*. 2013 Mar 15;288(11):7451-66.

Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun SL, Sato M, Asao A, Haji Y, Sasahara Y, Candotti F, Tsuchiya S, Kure S, Sugamura K, Ishii N. Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PLoS One*. 2013 Aug 21;8(8):e71594.

Wongkittichote P, Sukasem C, Kikuchi A, Aekplakorn W, Jensen LT, Kure S, Wattanasirichaigoon D. Screening of SLC25A13 mutation in the Thai population. *World J Gastroenterol*. 2013 Nov 21;19(43):7735-42.

Watanabe Y, Sasahara Y, Ramesh N, Massaad MJ, Yeng Looi C, Kumaki S, Kure S, Geha RS, Tsuchiya S. T-cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly downregulation. *J*

Allergy Clin Immunol. 2013 Sep;132(3):648-655.e1.

Kakisaka Y, Ohara T, Hino-Fukuyo N, Uematsu M, Kure S.
Abdominal and lower back pain in pediatric idiopathic
stabbing headache. Pediatrics. 2014 Jan;133(1):e245-7.

Horino S, Sasahara Y, Sato M, Niizuma H, Kumaki S,
Abukawa D, Sato A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi
Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya
S, Kure S. Selective expansion of donor-derived
regulatory T cells after allogeneic bone marrow
transplantation in a patient with IPEX syndrome. Pediatr

Transplant. 2014 Feb;18(1):E25-30.

2. 学会発表

Kure S. Identification of a susceptibility gene for
Moyamoya disease (MMD), RNF213, 3rd International
Moyamoya Meeting, July 12-13, 2013, Sapporo.

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（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

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、膵消化酵素や膵発現蛋白、細胞内Ca関連、小胞体ストレス関連など、膵炎との関連が想定される68遺伝子をカバーするHaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステムを作成し、新たな膵炎関連遺伝子異常として、カチオニックトリプシノーゲン(*PRSS1*)遺伝子の p.G208A 変異を同定した。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。

研究協力者

正宗 淳（東北大学消化器病態学分野 准教授）

桑 潔（同 助教）

濱田 晋（同 助教）

中野 絵里子（同 大学院生）

もかかわらず、原因遺伝子の明らかではない家系も少なからずみられる³⁾。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。

A. 研究目的

急性膵炎は重症化すると致死率が10%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收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多の成因であるが、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

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全エクソーム解析

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: HaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステムを用いた網羅的解析

膵消化酵素や膵発現蛋白、細胞内Ca関連、小胞体ストレス関連など、膵炎との関連が想定される68遺伝子をカバーするHaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステム(Agilent Technologies社)を作成した。汎用型のデスクトップシーケンサー(MiSeq)を用いて、日常的に網羅的解析を行う実験系を立ち上げた。

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。このうち、この検討により、偶然にも国際共同研究として解析中であった、カルボキシペプチダーゼ (*CPAI*) 遺伝子 p.V251M 変異が遺伝性膵炎 1 家系 3 人に同定された⁴⁾。

研究 2: *PRSSI* 遺伝子異常 (p.R122H 変異, p.N29I 変異), 及び *SPINK1* 遺伝子異常 (p.N34S 変異, c.194+2T>C 変異) 陰性の特発性慢性膵炎患者 6 例を解析した。その結果, 68 遺伝子中 62 遺伝子に, 計 174 個の遺伝子異常や多型が同定された。興味深いことに *PRSSI* 遺伝子の p.G208A 変異を認めた。p.G208A 変異はアルコール性慢性膵炎患者 232 人中 8 人 (3.4%), 特発性慢性膵炎患者 198 人中 9 人 (4.5%) に同定され, 健常者 411 人中 1 人 (0.2%) に比較し有意に高頻度であった (表 1)⁵⁾。この変異は中等度の分泌障害から膵腺房細胞内に小胞体ストレスをおこし, 膵炎発症に関連している可能性が示されている⁶⁾。また, p.G208A 変異がみられた慢性膵炎患者 18 人中 2 人にキモトリプシン C (*CTRC*) 遺伝子 p.R29Q 変異を, 1 人に *SPINK1* 遺伝子 p.N34S 変異を認めており, 本変異はアルコールや他の遺伝子異常と相乗的に作用し膵炎を発症させると推測された。

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³⁾。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。偶然にも国際共同研究として解析中であった、カルボキシペプチダーゼ (*CPAI*) 遺伝子 p.V251M 変異が遺伝性膵炎家系 3 人に同定された。本遺伝子異常はトリプシンの活性化や不活性化には影響を与えず、変性タンパク質が膵腺房細胞内に蓄積した結果、小胞体ストレスを引き起こし膵炎発症に至ると考えられている⁴⁾。

このように次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析は新規膵炎関連遺伝子異常の検索に有用と考えられる一方、1 サンプルあたり数万の変異が検出されるため、遺伝様式などによる絞り込みができない場合には、変異の絞り込みに大変な困難を伴う。われわれは、全エクソーム解析の結果や膵炎動物モデルでの知見を踏まえて、膵消化酵素や膵発現蛋白、細胞内 Ca 関連、小胞体ストレス関連など、膵炎との関連が想定される 68 遺伝子をカバーする HaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステムを作成し、日常的に網羅的解析を行う実験系を立ち上げた。すでに *PRSSI* 遺伝子 p.G208A 変異をはじめ、多数の変異、多型を同定しており、特発性膵炎を中心に 80 症例以上の解析が終了している。これらについて、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。なお、HaloPlex™ は新規遺伝子異常の同定のみならず、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) 遺伝子のような 20 以上のエクソンを有する遺伝子の解析にも大きな威力を発揮すると考えられる。

E. 結論

全エクソーム解析ならびに HaloPlex™ ターゲットエンリッチメントシステムにより、新規膵炎関連遺伝子異常を同定した。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

- 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.
- 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.
- Masamune A. Genetics of pancreatitis –The 2014 update-. *Tohoku J Exp Med.* 2014, in press.
- Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, Chandak GR, Masamune A, et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2013;45:1216-20.
- Masamune A, Nakano E, Kume K, Takikawa T, Kakuta Y, Shimosegawa T. PRSS1 c.623G>C (p.G208A) variant is associated with pancreatitis in Japan. *Gut.* 2014;63:366.
- Schnúr A, Beer S, Witt H, Hegyi P, Sahin-Tóth M. Functional effects of 13 rare PRSS1 variants presumed to cause chronic pancreatitis. *Gut.* 2014;63:337-43.

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 CTRC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Gut.* 2013;62:653-4.
- Masamune A, Nakano E, Kume K, Takikawa T, Kakuta Y, Shimosegawa T. PRSS1 c.623G>C (p.G208A) variant is associated with pancreatitis in Japan. *Gut.* 2014;63:366.
- Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, Chandak GR, Masamune A, et al. Variants in CPA1 are

strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2013;45:1216-20.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- Nakano E, Masamune A, Kume K, Kakuta Y, Shimosegawa T. Mutational analysis of the chymotrypsin C (CTRC) and Interferon regulatory factor 2 (IRF2) genes in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Digestive Disease Week 2013.* 2013年5月18–21日 –Orland, FL, USA–
- Kume K, Masamune A, Shimosegawa T. Whole exome sequencening might become the new strategy to identify unknown mutations for pancreatitis. *Digestive Disease Week 2013.* 2013年5月18–21日 –Orland, FL, USA–
- 中野絵里子, 正宗淳, 糸潔, 下瀬川徹. 次世代シーケンサーを用いた膵炎関連遺伝子異常の同定. 第21回日本消化器関連学会週間 2013年10月9–12日 –東京–

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 特許取得 なし
- 実用新案登録 なし
- その他 なし

表 1. 日本人慢性膵炎患者における *PRSS1* 遺伝子 c. 623G>C (p. G208A) 変異の頻度

成因		陽性	頻度	オッズ比 (95%信頼区間)	P 値
アルコール性	n=232	8	3.4%	14.6 (1.8 to 117.8)	0.002
特発性	n=198	9	4.5%	19.5 (2.5 to 155.2)	<0.001
遺伝性	n=34	1	2.9%	12.4 (0.7 to 203.2)	0.15
家族性	n=20	0	0%	1.0 (1.0 to 1.0)	>0.99
慢性膵炎全体	n=484	18	3.7%	15.8 (2.1 to 119.2)	<0.001
コントロール	n=411	1	0.2%		

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

次世代シーケンサー（NGS）解析による希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定・病態解明を効率的に行うため、1) 患者支援団体との協力システムの構築、2) 原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群（MCA/MR syndrome）患者を対象としたマイクロアレイ染色体解析による NGS 解析候補症例の絞り込み、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

希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発を目指し、次世代シーケンサー（NGS）解析の候補となる症例を収集する。そのため患者支援団体との協力システムを構築するとともに、疾患名が確定できない多発奇形/精神遅滞症候群（MCA/MR syndrome）患者を対象に、マイクロアレイ染色体解析を実施し、ゲノムの微細欠失・重複に起因する症例を除外することにより、NGS 解析候補症例の絞り込みを行う。

B. 研究方法

H24 年度の難治性疾患克服研究事業に採択された「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（研究代表者：福嶋義光）」班（SORD 班）と連携し、患者自らが登録するシステムを有する希少難病患者支援事務局（SORD）のデータベースを利用し、NGS 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する、SORD に登録している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。

MCA/MR syndrome の患者については、まずマイクロアレイ染色体解析により全ゲノムのコピー数変化をスクリーニングし、症状と関連すると考えられるゲノムコピー数異常（copy number variations: CNVs）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し、研究対象候補症例を抽出する。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヒトゲノム解析研究であり、インフォームドコンセントの取得、個人情報保護、結果開示の際の遺伝カウンセリングの実施等「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して実施する。

C. 研究結果

H24 年度に、SORD 班の活動の一環として SORD に新しい研究・災害手帳システムを構築した。「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登録者について、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た。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した遺伝学的検査の結果、既知の遺伝性疾患ではなく、NGS 解析・研究を行う意義があると考えられた症例を解析候補とした。現在までに、研究・災害手帳に登録されている 459 名の患者について検討を行い、すでに研究班が構成されている疾患の患者や、多因子

疾患の患者も多く含まれていることが判明した。NGS 解析の対象候補と絞り込まれた数例について詳細に検討した結果、最近、別プロジェクトで原因遺伝子が特定された疾患の患者が1例判明し、その他は類似症状の患者の登録が待たれる候補症例と判断した。新規登録例や主治医への臨床情報の追加確認が必要な症例の検討を継続している。

MCA/MR syndrome 患者については、H25 年度は H26 年1月末までに新規患者 55 名、患者家族 42 名から試料を収集し、H24 年度からの総計は患者 96 名、患者家族 70 名となった。これまでにマイクロアレイ染色体解析を終えた計 86 名の患者のうち 11 例 (12.8%) に以下の既知のゲノムコピー数異常症候群を検出した。1p36.3 欠失, 1q21.1 Distal 微細欠失, 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, 3q27 欠失, 5q35.2-q35.3 欠失 (Sotos 症候群), mosaic trisomy 14, 16p11.2 微細欠失, 17p11.2 欠失 (Smith-Magenis 症候群), 17q12 欠失, 22q11.21 微細重複。新規の疾患との関連が示唆される CNVs が検出された症例、および症状との関連が不確定な症例についてはさらに両親解析による追加解析などによる検証を進めた。検証の結果、症状と関連しない benign CNVs のみであることが判明した症例を NGS 解析候補とした。MCA/MR syndrome は非特異的な症状を示す患者が多いことから、候補症例について、臨床症状について再度評価し共通する症状を有する患者の抽出を試みている。

D. 考察

SORD の登録患者の多くは患者自らが災害手帳システムに登録できる成人であり、研究協力に対する意識も高いが、すでに研究班が構成されている疾患患者や多因子疾患患者も多く含まれていた。また、患者自身による登録のため、候補症例の絞り込みに際して主治医への臨床情報の追加確認が必要な場合が多かった。しかし SORD は、患者にとって非常に稀な疾患の患者同士が出会う場となりえ、また通常受けている対症療法を中心とする医療ではきっかけの少ない、研究参加への道を開く可能性のひとつとなっている。まだ登録

数が少ないが、今後この取り組みが広報され、解析対象症例が増えることが期待される。

MCA/MR syndrome の患者は小児患者が多く、先天異常症の専門医を通じて試料が提供された。健常者について 50bp 以上の DNA 断片のゲノム変異を登録・公開しているデータベースである Database of Genomic Variants (DGV) によると、現時点で 22300 を超えるゲノムから 250 万以上登録されたゲノム変異の断片の大きさは 50bp から 3Mb におよび、44%は数十 kb 以上の CNVs 検出を目的とするマイクロアレイ解析による結果であることが示されている。本研究からも NGS 解析前に、NGS 解析では検出の困難な CNVs による患者を除外しておくことの有用性を確認した。しかしながら、患者には DGV にも登録のない、症状との関連が不確定な CNVs 領域もたびたび検出され、結果の解釈に両親の解析が必須であった症例も少なくなかった。2013 年 11 月に The Human Genetic Variation Database (HGVD) に追加・公表された 1,208 の健常な日本人のエクソームシーケンスデータでも、日本人特有な SNPs が多数あったことが示されたように、CNVs でも同様のことを考慮する必要がある。試料提供の協力を得た症状のない患者の両親に検出された CNVs については、日本人健常人 CNVs として蓄積し活用するためにデータベース化を行うべきである。

NGS 解析による希少遺伝性難病の原因解明には、共通する症状を有する複数患者を同時に解析することが有用であるが、希少遺伝性難病は種類が大変多いにも関わらず、それぞれの患者数が極端に少ないのが特徴であり、確定診断が困難なものも少なくない。英国においてサンガー研究所を中心とし、診断の確定しない 12,000 家系の患者と両親に対してマイクロアレイ解析とシーケンス解析を実施し原因究明しようとする研究 ; Deciphering Developmental Disorders (DDD) study が開始されている。わが国でもマイクロアレイ解析と連携した NGS 解析拠点の整備を進めるとともに、患者・家族に検出されるゲノム情報のデータベース化のみならず、ゲノム情報の解釈や質の高い詳細な臨床症状のデータベース化をすすめるため、ゲノム解析の専門家とともに臨床診断の専門家の育成が求められる。

E. 結論

次世代シーケンサー解析の候補となる症例を収集するために、1) 患者支援団体との協力システムを構築し、2) 原因不明の多発奇形/精神遅滞症候群 (MCA/MR syndrome) 患者について、マイクロアレイ染色体解析により、ゲノムの微細欠失・重複を除外した。希少難治性疾患の克服のためには、本研究をさらに推進させていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Narumi Y, Min BJ, Shimizu K, Kazukawa I, Sameshima K, Nakamura K, Kosho T, Rhee Y, Chung YS, Kim OH, Fukushima Y, Park WY, Nishimura G. Clinical consequences in truncating mutations in exon 34 of NOTCH2: report of six patients with Hajdu-Cheney syndrome and a patient with serpentine fibula polycystic kidney syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Mar;161A(3):518-26.

2. 学会発表

鳴海洋子, 平林伸一, 古庄知己, 涌井敬子, 福嶋義光. AKT シグナル伝達経路異常による MPPH 症候群の臨床像. 日本小児遺伝学会学術集会, 2013 年 4 月 17-18 日, 川崎

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 福嶋義光. CGH アレイ解析のピットフォール - 稀な benign CNV の影響で正確な欠失/重複範囲の特定ができない場合がある -. 日本小児遺伝学会学術集会, 2013 年 4 月 17-18 日, 川崎

E. Nishi, S. Mizuno, Y. Aoki, Y. Saito, Y. Fukushima, Y. Matsubara, T. Kosho; A Novel MEK1 Mutation in a Patient with LEOPARD Syndrome.

European Society of Human Genetics, 2013 年 6 月 8 - 11 日, Paris (ポスター発表)

河村理恵, 松原洋一, 野村文夫, 齋藤加代子, 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, 加賀俊裕, 福嶋義光. 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. 第 37 回日本遺伝カウンセリング学会, 2013 年 6 月 20-23 日, 川崎

涌井敬子, 山口智美, 古庄知己, 福嶋義光. マイクロアレイ染色体解析により検出された日本人成人のゲノムコピー数変化 (CNVs). 次世代シーケンサー現場の会第三回研究会, 2013 年 9 月 4-5 日, 神戸 (ポスター発表)

Y. Narumi, S. Nishina, M. Tokimitsu, Y. Aoki, R. Kosaki, T. Kosho, T. Murata, F. Takada, Y. Fukushima; Missense mutation of MAF in a Japanese family with congenital cataract.. American Society of Human Genetics, 2013 年 10 月 22-26 日, Boston (ポスター発表)

鳴海洋子, 仁科幸子, 時光元温, 青木洋子, 小崎里華, 涌井敬子, 村田敏規, 高田史男, 古庄知己, 福嶋義光. 先天性白内障家系における MAF 遺伝子変異の同定. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013 年 11 月 20-23 日, 仙台 (ポスター発表)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

遺伝性代謝疾患が疑われながら、病因の特定できない家系について全国主要病院にアンケート調査を行い、NGS解析のクライテリアに合致する4症例について両親と患者のDNAサンプルを採取しNGS解析を行った（最終結果はまだ）。またβ酸化異常症の治療薬として注目されているベザフィブラート（BEZ）の薬理効果を、RNA-seqとリアルタイムPCR（qRT-PCR）によって解析した。その結果、β酸化に関連する遺伝子のうち、BEZは、peroxisome proliferating activator receptor（PPAR）のうち、PPAR α とPPAR γ を有意に増加させ、PPAR δ は増加させないことが分かった。またCPT1Aを増加させることも明らかになった。Electron transfer flavoprotein（ETF）またはETF脱水素酵素（ETFDH）の欠損によって起こるグルタル酸血症Ⅱ型（GA2）では臨床的にもin vitro probe assayでも、BEZの効果が認められたにも関わらず、RNA-seqとqRT-PCR解析では、BEZによってETFまたはETFDHのRNAの増加はみられなかった。これまでBEZの薬理効果は、PPARアゴニストとしてβ酸化酵素遺伝子の転写を促進して残存活性の増加させると考えられてきたが、他の機序が働いていることを示唆する。β酸化の他の酵素遺伝子、エネルギー産生に關与する他の代謝系の遺伝子などの網羅的解析が期待される。

研究協力者

高橋知男、古居みどり、山田健治、小林弘典、長谷川有紀（島根大学医学部小児科）
白田信光、深沢元晶、森山陽介、辻季美江（藤田保健衛生大学医学部）
小原収、藤木亮次、長谷川嘉則（かずさDNA研究所）

機序を検討した。すなわち高脂血症薬ベザフィブラート（BEZ）のβ酸化酵素誘導作用による残存酵素活性上昇の機序を、RNA-seqとリアルタイムPCR（qRT-PCR）によってRNA発現量の面から評価した。

B. 研究方法

A. 研究目的

次世代シーケンサー（NGS）によって、未知の遺伝性疾患の病因を解明することを目的として、遺伝性代謝性疾患が疑われながら原因の特定されていない症例を収集した。またRNA-seqを応用して、脂肪酸代謝異常症に効果が期待されている治療薬の薬理

1) 遺伝性代謝異常の疑われる家系の調査：代謝異常の疑われる症状を呈する同胞例で、原因不明の症例を全国の主な医療機関を対象としてアンケート調査した。クライテリアとして表1の内容で調査した。

表1. アンケート調査にあげた症例のクライテリア

- | |
|-------------------------------------|
| ①遺伝性代謝異常の可能性があり、家族例、同胞発症のあった症例 |
| ②同胞例で、インフルエンザ脳症、急性脳症、SIDS様症状のみられた症例 |
| ③原因不明の低血糖発作や神経障害のある同胞例など家族歴のある症例 |
| ④両親同胞等のサンプルを同時に得られる症例 |

2) BEZによる培養細胞中の遺伝子量の変化：① control、極長鎖アシル-CoA脱水素酵素 (VLCAD) 欠損症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-II (CPT2) 欠損症、およびグルタル酸血症II型 (GA2) の培養細胞を用いて、BEZの存在下と非存在下でパルミチン酸を基質としてIVP assayを行い、48時間培養後に細胞からRNAを抽出して、β酸化関連遺伝子のRNA量の変化をリアルタイムPCR (qRT-

PCR) とRNA-seqで測定した。症例の概要を表2に示す。

(倫理面への配慮)

島根大学倫理委員会で承認された研究課題「先天性疾患の遺伝子解析」(承認通知番号 1038号, 平成24年6月12日) に準拠して行った。

表2. 症例の臨床型、遺伝子型、および IVP assay における BEZ に対する反応性

	重症度	遺伝子変異		IVP assay (BEZ 効果)
VLCAD deficiency	成人型	1144A>C (K382Q)	1339G>A (G447R)	++
CPT2 deficiency	中間型	151A>G (R51G)	520G>A (E174K)	++
GA2 (ETFDH def.)	中間型	1217G>A (S406N)	1675C>T (R559X)	+++

C. 研究結果

1) 遺伝性疾患の疑われる家族アンケートと資料収集 (NGS検索中)

クライテリアに合致する症例でDNAサンプルの得られた4例を表3に示す。内訳は1) Leigh脳症の同

胞例とその両親；2) 有馬症候群の同胞例とその両親；3) インフルエンザ脳症 (魚鱗癬合併) の同胞例とその両親；および4) 糖原病類似疾患の同胞例とその両親。これらについてNGS解析が進行中である。

表3. 2013年度アンケートで紹介された症例

	臨床診断	同胞	サンプル
1)	Leigh脳症 (ミトコンドリア病?) 発達遅滞、頭部MRI：大脳基底核T1でlow、T2 high	①流産 ②女、11才正常 ③女、6y (患者) ④男、3才 (正常) ⑤女、1才 (患者)	父、母 ③、⑤
2)	有馬症候群の疑い (同胞例) 発達障害、精神運動発達遅滞、 姉妹の表現形は酷似、網膜色素変性症	①女、正常 ②女、22才 (患者) ③女、正常 ④男、12才 (患者)	父、母 ②、④
3)	インフルエンザ脳症 (同胞例) 魚鱗性症候群、低身長、小頭症、知的障害、 兄は死亡、弟は重症心身障害	①男、正常 ②男、4才 (患者) ③男、5才 (患者)	父、母 ①、③
4)	糖原病類似縁疾患 兄は高乳酸血症、妹は脂肪肝	①男、2才 (患者) ②女、11か月 (患者)	父、母 ①、②

2) BEZ存在下のβ酸化酵素遺伝子の動態

qRT-PCR (4回の平均値、mean±SE) とRNA-seq (1回) の結果を表4に示す。①BEZ受容体でβ酸化

系酵素遺伝子の転写を制御すると考えられているPPARに関しては、BEZによってPPARαとPPARγが増加し、PPARδの増加はみられなかった。これらは、

qRT-PCRもRNA-seqでも同様の結果であった。②カルニチン回路の酵素では、CPT1Aは、BEZによってcontrolでもβ酸化異常症でも増加した。③β酸化回路の酵素では、VLCAD欠損症とCPT2欠損症の細胞において、TFPBのRNAの増加がみられた。④controlとCPT2欠損症細胞において、HAD遺伝子のRNA量が増

加した。VLCAD欠損症細胞では、HAD2のRNA量が増加がみられた。

一方ETFDH欠損によるGA2では、臨床的にもIVP assayでも、BEZの著しい効果がみられたにもかかわらず、GA2細胞でも他の細胞でもETFの2つのサブユニットもETFDHも増加はみられなかった。

表 4. ベザフィブラート存在下のβ酸化関連酵素のRNA量の増加率

	Control		VLCAD deficiency		CPT2 deficiency		GA2	
	qRT-PCR (N=4)	RNA-seq	qRT-PCR (N=4)	RNA-seq	qRT-PCR (N=4)	RNA-seq	qRT-PCR (N=4)	RNA-seq
PPAR α	1.41±0.13*	1.32	1.59±0.20*	1.20	1.34±0.05*	1.35	1.58±0.23*	1.34
PPAR δ	1.19±0.04	1.05	1.04±0.08	1.02	0.92±0.04	1.00	1.26±0.28	1.02
PPAR γ	2.46±0.19*	2.20	1.01±0.17	1.78	1.41±0.06*	2.20	1.98±0.51	1.84
CPT1A	1.39±0.13*	1.24	1.52±0.26*	1.33	1.43±0.08*	1.31	1.36±0.08	1.29
CACT		0.77		1.04		0.99		1.05
CPT2	1.27±0.07	1.21	1.04±0.02	1.06	0.80±0.04	0.94	1.11±0.20	0.93
VLCAD	0.96±0.00	1.14	1.25±0.16	1.06	1.17±0.01	1.29	1.21±0.10	1.17
TFPA		0.96		1.08		1.26		1.07
TFPB	1.30±0.11	1.18	1.28±0.16*	1.30	1.38±0.02*	1.46	1.15±0.02	1.15
MCAD	1.30±0.05	1.16	1.23±0.03*	1.01	0.91±0.03	1.08	1.09±0.27	1.05
SCAD	1.41±0.06*	0.92	1.46±0.09*	0.96	1.37±0.14*	0.91	1.29±0.28	1.18
MH	1.15±0.04*	1.08	1.31±0.15	1.14	1.17±0.05	1.14	1.17±0.23	1.02
HAD	1.91±0.08*	1.50	1.40±0.03	1.14	1.41±0.20	1.21	1.44±0.37	1.12
HAD2	1.09±0.04	0.91	1.37±0.15*	1.20	1.19±0.03	1.19	1.30±0.24	1.10
T1	1.34±0.03*	1.00	1.16±0.03*	1.08	1.01±0.12	1.04	1.24±0.31	1.01
ETF α	1.00±0.10	1.02	1.23±0.13	1.05	1.20±0.03*	1.11	1.12±0.01	1.13
ETF β	1.06±0.05	0.95	1.03±0.09	1.07	0.83±0.02	0.84	0.85±0.10	0.89
ETFDH	1.06±0.04	1.07	0.98±0.08	1.26	0.78±0.05	1.16	1.15±0.25	1.18

qRT-PCRは4回の平均値。網掛けは、qRT-PCRで有意に増加(*印)、RNA-seqでは1.2倍以上。空欄は行っていないことを示す。細胞は、control、very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) 欠損症、carnitine palmitoyltransferase-II (CPT2) 欠損症、および glutaric academia type II (GA2)。数値は、BEZ (+) /BEZ (+) の比。略字：CPT1A, CPT type IA ; CACT, carnitine acylcarnitine translocase ; MCAD, and SCAD, medium-chain, and short-chain acyl-CoA dehydrogenase, respectively ; TFP, trifunctional protein; EH, enoyl-CoA hydratase; HAD and HAD2, 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase and 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, respectively; T1, medium-chain 3-ketothiolase; ETF, electron transfer flavoprotein; ETF α , and ETF β , a and b-subunits, respectively; ETFDH, ETF dehydrogenase。他の略字は本文中にある通り。

D. 考察

遺伝性代謝性疾患の可能性の高い4家系を収集し、NGSによる原因遺伝子の検索を行っているが、現時点で最終結果はまだ出ていない。乳幼児突然死症候群や小児の原因不明の急性脳症の背景疾患として、先天代謝異常（有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症など）が隠れていることが明らかになりつつある。原因不明の心身障害児の背景にも代謝異常症の隠れている可能性が十分ある。同胞例、家族例を中心に症例を集積して、NGS解析によって解明されてゆくと思われる。

NGSの応用としてRNA-seqの有用性も注目されている。我々は、 β 酸化の治療薬として注目されているBEZの薬理効果をRNA-seqで評価し、qRT-PCRの結果と比較検討した。BEZはPPARを介して β 酸化酵素の転写を促進し、変異タンパクも含め β 酸化酵素の産生を増加させると考えられている。 β 酸化系は多数の酵素が連動して進む代謝系であるので、あらゆる酵素が同程度に増加するなら変異タンパクだけブレーキがかかって、代謝バランスがかえって乱れる可能性もある。BEZの安全性を確保するためにもその薬理作用の機序を解明することが必要である。

今回の検討の結果、以下のことが明らかになった。1) qRT-PCRの結果とRNA-seqの結果はおおむね同じ傾向を示す；2) BEZは、PPARのうちPPAR α とPPAR γ を増加させ、PPAR δ は増加させない；3) グルタル酸血症II型の欠損タンパクであるETFまたはETF β は、IVP assay実験でも、臨床的にもBEZの効果がみられたにもかかわらず、BEZはETFもETF β もRNA量としては増加させないことが分かった。このことは、BEZが β 酸化酵素遺伝子の転写を促進するという機序だけでは説明できないことを示す。

E. 結論

NGS解析による遺伝性代謝疾患の病因解明を目的として、遺伝性が疑われるにもかかわらず病因不明の疾患を持つ家系の7症例を収集し、検体の得られた4家族について、NGS解析を行っている

(最終結果はまだ出ていない)。またベザフィブレート (BEZ) の β 酸化異常症に対する薬理作用を、RNA-seqとqRT-PCRで解析したところ、RNA-seqとqRT-PCRの結果とが相関すること、BEZはPPAR α とPPAR γ を増加させること、BEZはETFやETF β は増加させないことが明らかになった。 β 酸化系に関連した他の酵素、ペルオキシソーム β 酸化酵素、あるいは他のエネルギー産生に関わる酵素のRNAの動きを網羅的に解析することによってBEZの薬理作用が明らかになるだろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(4): 1345-1351, 2013 (February)
- 2) Yamaguchi S, Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Taketani T, Fukuda S, Fukao T, Shigematsu Y: Expanded newborn mass screening with MS/MS and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in Japan. *日本マススクリーニング学会誌* 23(3): 270-276, 2013 (12月)

2. 学会発表

- 1) Yamaguchi S: GC-MS for diagnosis of Organic Acidurias. *International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013* 講演. New Delhi, India, April 2013
- 2) Yamaguchi S: Fatty acid oxidation defects. *International Conference on Inborn Errors of Metabolism 2013* 講演. New Delhi, India, April 2013
- 3) Yamaguchi S, Purevsuren J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, Takahashi T, Furui M, Fukao T, Shigematsu Y,

- Fukuda S: Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency and newborn screening in Japan. 2013 Joint Meeting of the Newborn Screening and Genetic Testing Symposium (NBS>S) and the International Society for Neonatal Screening (ISNS). Atlanta, USA, May 2013
- 4) Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Fukuda S, Ito M, Yamaguchi S: Responsiveness of bezafibrate for neonatal onset form of glutaric acidemia type II : comparison with milder form using in vitro probe assay. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013
- 5) Yamaguchi S, Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Purevsuren J, Ohkubo T, Watanabe M, Tsunemi T, Ishii A, Takuma H, Tamaoka A, Shigematsu Y, Fukuda S: Two Japanese cases of adult onset myopathic form of glutaric acidemia type II . 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism. Barcelona, September 2013
- 6) Yamaguchi S: A new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation defects: Bezafibrate, a PPAR agonist. 12th Asian Oceanian Congress on Child Neurology. Riyadh, Saudi Arabia, September 2013
- 7) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: サリチル酸のβ酸化に及ぼす影響: in vitro probe assay による評価. 第38回日本医用マスペクトル学会年会. 神戸, 2013年9月
- 8) 高橋知男, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次: SIDS, ALTE様症状で発症し先天代謝異常症と判明した10例の検討. 第65回中国四国小児科学会. 米子, 2013年11月
- 9) Yamaguchi S: Beriberi (Vitamin B1 deficiency) of young children lurking in modern life: A new approach for biochemical detection. 2013 Joint Meeting of 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition and 40th Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition シンポジウム. 東京, October 2013
- 10) 山田健治, 小林弘典, 高橋知男, 長谷川有紀, 山口清次: グルタル酸血症2型の2例に対するベザフィブラートの治療経験. 第27回日本小児脂質研究会. 福井, 2013年11月
- 11) Yamada K, Kobayashi H, Takahashi T, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Effect and toxicity of high-dose bezafibrate on mitochondrial fatty acid oxidation in cultured cells. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, November 2013
- 12) Liu L, Yamada K, Takahashi T, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S: Hypothermia improves oxidation ability in cultured fibroblasts with fatty acid β-oxidation disorders: Evaluation by vitro probe assay. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD), The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Chiba, November 2013

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 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

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ことが期待される。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ているが機能の詳細は不明である。そこで、本研究では NSD1 の下流で引き起こされる発現変化を来す遺伝子群をソトス症候群罹患者と健常対象者由来の株化リンパ芽球を対象とする網羅的遺伝子発現解析により特定することを試みるものである。本年度は、リンパ芽球の網羅的解析により特定した発現変化が顕著な遺伝子 4 つについて末梢血液由来検体を用いて検証を行い、これらの遺伝子発現変化のソトス症候群の診断・スクリーニングにおける有用性を示唆する結果が得られた。さらに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。本研究の知見は、今後、精神発達遅滞を始めとする精神疾患の病態解明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

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)やてんかんなどの病態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。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目的に、ソトス症候群罹患者と健常対照者からなる独立した 2 つのコホートを対象に、各検体由来のリンパ芽球を用いた包括的遺伝子発現解析を行っている。疾患群に特異的に発現変化をきたす遺伝子群には、細胞間信号伝達、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

遺伝子群が含まれることを特定した。これらの遺伝子群の内、2つの独立するソトス症候群のコホートの両方ともで倍以上の発現増加を認めた遺伝子2つをソトス症候群発現誘導遺伝子 A, B、両方のコホートとともに発現が1/5以下に減少する遺伝子1つをソトス症候群発現抑制遺伝子 C と命名し、定量 PCR 法によりリンパ芽球細胞における3遺伝子の発現異常を確認した。更に、独立したソトス症候群と健常者の末梢血単核細胞 (PBMC) 検体でのこれらのソトス特異的遺伝子の発現の検証を行った。

B. 研究方法

ソトス罹患者および健常対象者末梢血から分離した PBMC から総 RNA を抽出し、逆転写により cDNA を作成した。ソトス罹患者で特異的に発現が増加しているソトス症候群発現誘導遺伝子 A, B、減少しているソトス症候群発現抑制遺伝子 C に関して特異的なプライマーを作成し、定量 PCR を行った。罹患者特異的に発現増加するソトス症候群発現誘導遺伝子 A, B と減少するソトス症候群発現抑制遺伝子 C の比を算出した。また、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た。

(倫理面への配慮)

本研究は、東北大学医学部倫理委員会で承認された研究方法に準じて研究を行った。研究対象者に関しては研究内容、不利益、危険性等を説明の上、同意を得た上で検体採取を行っている。

C. 研究結果

昨年度までの研究で明らかにしてきた NSD1 遺伝子のハプロ不全によりその下流で生じると考えられるソトス症候群発現誘導遺伝子 A, B およびソトス症候群発現抑制遺伝子 C の発現について、末梢血成分である末梢血単核細胞 (PBMC) を用いて定量 PCR 法により測定した。ソトス症候群罹患者で顕著な発現増加を認めるソトス症候群発現誘導遺伝子 A, B と減少しているソトス症候群発現抑制遺伝子 C との比を取った場合、ソトス症候群発現誘導遺伝子 A /ソトス症候群発現抑制遺伝子 C では健常者で 0.041、罹患者で

0.029、ソトス症候群発現誘導遺伝子 B /ソトス症候群発現抑制遺伝子 C は健常者で 0.22、罹患者で 2.85 と、ソトス症候群発現誘導遺伝子 B /ソトス症候群発現抑制遺伝子 C 比で、リンパ芽球で確認されているソトス罹患者群特有の傾向が確認された。さらに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。

D. 考察

ソトス罹患者特異的発現遺伝子のソトス罹患者および健常対象者末梢血から抽出した PBMC での検証を行った。株化細胞に関しては、罹患者群で発現が最も増加しているソトス症候群発現誘導遺伝子 B と減少しているソトス症候群発現抑制遺伝子 C との比を取った場合、ソトス症候群発現誘導遺伝子 B /ソトス症候群発現抑制遺伝子 C は全解析対象者 18 名のうち、89%で健常対象者における比が 1 未満、全罹患対象者 12 名では 1 以上の値を示す傾向がみられている。PBMC 検体を用いた検証では、ソトス症候群発現誘導遺伝子 B /ソトス症候群発現抑制遺伝子 C は健常者で 0.22、罹患者で 2.85 と、ソトス症候群発現誘導遺伝子 B /ソトス症候群発現抑制遺伝子 C 比で、リンパ芽球で確認されているソトス罹患者群特有の傾向が確認され、本マーカーの組み合わせを解析することにより、ソトス症候群の診断、スクリーニングが可能となることが示唆された。今後、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を指標としてソトス症候群のスクリーニング・診断を行うための条件設定を行うとともに、これらの分子の発現変動のメカニズムや分子機能の解明を進めることでソトス症候群の診断法が向上することが望まれる。さらに今後、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ことでソトス症候群の病態の解明、診断・治療法の開発に繋がることが期待される。

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。更にソトス罹患者で特異的に発現が増加しているソトス症候群発現誘導遺伝子 A, B と減少しているソトス症候群発現抑制遺伝子 C の発現を定量し、そのうちソトス症候群発現誘導遺伝子 B/ソトス症候群発現抑制遺伝子 C の比を算出することで、ソトス症候群への罹患の有無を判定できる可能性を示した。本知見はソトス症候群の診療に有益である可能性があるだけでなく、疾患病態解明にも繋がることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomita H, Ziegler ME, Kim HB, Evans SJ, Choudary PV, Li JZ, Meng F, Dai M, Myers RM, Neal CR, Speed TP, Barchas JD, Schatzberg AF, Watson SJ, Akil H, Jones EG, Bunney WE, Vawter MP. G protein-linked signaling pathways in bipolar and major depressive disorders. *Front Genet.* 23(4): 297. 1-12. 2013

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

愈志前、小野千晶、國井泰人、和田明、松本純也、日野瑞城、池本桂子、丹羽真一、富田博秋. 死後脳研究におけるpH 評価の方法論の検討. 第54回

日本神経病理学会総会学術研究会. 日本生物学的精神医学会合同ミニシンポジウム 東京[2013/4/25]

富田博秋. 災害による心的外傷後ストレス反応の生物学的研究. シンポジウムD-3 「トラウマの生物学的研究の現在と将来」第12回トラウマティック・ストレス学会 東京[2013/5/12]

Zhiqian Yu, Chiaki Ono, Yasuto Kunii, Akira Wada, Junya Mastumoto, Mizuki Hino, Keiko Ikemoto, Shinichi Niwa, Hiroaki Tomita. Postmortem brain pH have significant impact on gene expression profiles *Neuro2013 kyoto* [2013/6/20]

Zhiqian Yu, Chiaki Ono, Hotaka Fukushima, Satoshi Kida, Hiroaki Tomita. Gene expression profiling of microglia in memory reconsolidation and extinction of contextual fear. 2013年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ 名古屋市[2013/8/29]

愈志前, 小野千晶, 福島穂高, 喜田聡, 富田博秋. 恐怖記憶の消去に伴うミクログリアにおける遺伝子発現変化の網羅解析第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会 合同年会 宜野湾市[2013/10/24]

富田博秋. 心的外傷後ストレス反応形成メカニズム解明に向けた生物学的研究の動向. 合同シンポジウム 3 「PTSDの神経生物学的メカニズムと治療薬開発の可能性」第23回日本臨床精神神経薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会 合同年会 宜野湾市 [2013/10/25]

Yu Z, Ono C, Aiba S, Sora I, Tomita H. Lithium stimulates chemokine production in monocytic cells via GSK-3 inhibition. *Society for Neuroscience 2013. San Diego, United States.* [2013/11/10]

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 申請準備中

2. 実用新案登録 なし

3. その他

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部門教授

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、発達緑内障早発型、開放隅角緑内障、嚢性緑内障が重要である。

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行い、候補遺伝子を抽出した。

また、病型別に見てみると原発開放隅角緑内障の比率が高い（40歳以上、有病率5%）ことから、原発開放隅角緑内障の家系例のエクソーム解析を行い、家系ごとに候補遺伝子を抽出し、2家系以上で共通する候補遺伝子の変異箇所を検討した。3家系に共通の候補遺伝子は存在しないが、2家系に共通する有力な候補遺伝子を抽出した。

日本人発達緑内障早発型、原発開放隅角緑内障では、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析にて、新規原因遺伝子の同定の可能性が高いと考えられる。

研究協力者

木村 雅恵（東北大学東北メガバンク機構

ゲノム解析部門）

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）

一の原因遺伝子である *CYP11B1* 遺伝子をスクリーニングし、*CYP11B1* 遺伝子陰性の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 ②親子例、もしくは同胞例の原発開放隅角緑内障の症例を収集し、原因遺伝子を絞り込み、同定することを目的とした。

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360万人にもものぼる。その中でも失明になりやすい緑内障は、発達緑内障早発型である。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。生後早期から発症することが多く、常染色体劣性遺伝、もしくは弧発（突然変異）と考えられてきた疾患である。

また、病型別に見てみると原発開放隅角緑内障の比率が高い。外来で原発開放隅角緑内障を診療していて、家族歴を有する症例に遭遇する頻度は経験上10-20%程度ある。緑内障原因遺伝子、緑内障感受性遺伝子が存在することが、個々の疾患に寄与する比率に違いはあるが、強く推察される。今回、①発達緑内障唯

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、原発開放隅角緑内障患者から、末梢血を採取し検体とした。発達緑内障早発型：発達緑内障早発型（家系例、弧発例）59例に対して、原因遺伝子である *CYP11B1* 遺伝子に関し、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）。*CYP11B1* 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、2500（Illumina社）を用いて、エクソーム解析を行っ