

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、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構築、および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）

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。

A. 研究目的

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。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。

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

B. 研究方法

1) 症例収集

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

なゲノムの量的変化を検出できるマイクロレイ染色体検査法（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。

MCA/MR syndrome の患者については、まずマイクロ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ま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

1) 症例収集

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賞例の検討を継続している。

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

MCA/MR syndrome 患者については、H24 年度は新規患者 41 名、患者家族 28 名、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た。これまでにマイクロ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行った。

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と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

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.

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

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, 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. 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, 2012年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, 2012年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, 2012年10月25-27日, 東京

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

次世代シーケンサー（NGS）によって遺伝的な病因を明らかにする目的で、同胞発症例など遺伝性疾患が疑われる症例を収集した。小児の急性脳症や乳児突然死などの背景疾患に遺伝的要因が隠れていることも最近明らかになっている。NGS解析のクライテリアに合致するような遺伝性代謝疾患の疑われる家族7症例の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RNA-seqを応用して、 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）の薬理作用を解析した。BEZは β 酸化酵素を活性化させる高脂血症薬として使用されている。BEZの先天性脂肪酸代謝異常症に対する効果は、peroxisome proliferating activator receptor（PPAR）のアゴニストとして作用し、PPARが β 酸化酵素の遺伝子上流に結合して転写を促進することによって酵素量を増加させ、残存活性を増加させると考えられている。今回の研究によって、BEZは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明らかになった。またCPT1Aも増加させることもわかった。Electron transfer flavoprotein（ETF）またはETF脱水素酵素（ETF_{DH}）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の効果認められたにも関わらず、RNA-seqとリアルタイムPCR（qRT-PCR）解析では、BEZによるETFまたはETF_{DH}のRNAの増加はみられなかった。このことはBEZのGA2に対する効果は、単に酵素タンパクを増加させることではないことを示唆する。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によって明らかになると思われる。

研究協力者

竹谷健、高橋知男、古居みどり、山田健治、小林弘典、長谷川有紀、福田誠司（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）

かに障害がありその隣の酵素が亢進すると、かえって代謝バランスが崩れる可能性もある。BEZの薬理作用を、RNA-seqとリアルタイムPCR（qRT-PCR）によってRNA発現量の面から検討した。

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明らかにするために、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ベザフィブラート（BEZ）の薬理機序を検討した。BEZは高脂血症薬であるが、 β 酸化を促進する作用がある。酵素生成を亢進させて残存酵素活性を上昇させると考えられている。しかし β 酸化は連続した酵素群であり、どこ

1) 遺伝性代謝異常の疑われる家系を調査した。代謝異常の疑われる症状を呈する同胞例、家族例、あるいはインフルエンザ脳症や急性脳症、神経障害などの同胞例で、両親のサンプルが得られる症例を収集した。現在解析中の7症例の概要を表2に示す。

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）の培養細胞を用いた。BEZの存在下と非存在

下でパルミチン酸を基質としてin vitro probe assay (IVP) assayを行い、48時間培養後に細胞内のβ酸化関連遺伝子のRNA量の変化をRNA-seqとリアルタイムPCR (qRT-PCR) で評価した。

(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。

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7例を表1に示す。内訳はミトコンドリア病疑い2家系、周期性発熱、Leigh脳症の同胞例、有馬症候群の同胞例、インフルエンザ脳症(魚鱗癬合併)の同胞例、および糖原病類似疾患の同胞例の各1例の計7家系について両親のサンプルを含めてNGS解析を進めた(最終結果はまだ)。

表1. 2012~13年度に収集した家族例

	臨床診断	同胞	サンプル
1	ミトコンドリア病? 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	①男、12才(死亡) ②男、てんかん、MR ③男、18才(死亡)	父、母 ③
2	ミトコンドリア病? 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	①女、18才(患者) ②女、正常	父、母 ①、②
3	周期性発熱 周期性発熱(19回目)、血小板減少、 溶血、凝固異常、補体低下、 繰り返す脳症、門脈圧亢進	①男、7歳正常 ②男、5才(患者)	父、母 ①、②
4	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、T2high	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
5	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
6	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
7	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RNAの動態

表2と図1に、患者のプロフィール、遺伝子型、in vitro probe assayにおけるBEZの効果、およびGA2症例におけるBEZの臨床的効果を示す。qRT-PCR（4回の平均値）とRNA-seq（1回）による解析結果を表3に示した。その結果、以下の所見が得られた。すなわち、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peroxisome proliferating activator receptor (PPAR)に関しては、BEZによってPPARαとPPARγが増加したが、PPARδの変化はみられなかった。②カルニチン回路の酵素では、CPT1Aは、BEZによって明らかに増加し

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量が増加した。

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、RNA-seqでもqRT-PCRでも、GA2の欠損酵素である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)	BEZ の臨床的効果
VLCAD deficiency	成人型	1144A>C (K382Q)	1339G>A (G447R)	++	n.a.
CPT2 deficiency	中間型	151A>G (R51G)	520G>A (E174K)	++	n.a.
GA2 (ETFDH def.)	中間型	1217G>A (S406N)	1675C>T (R559X)	+++	+++

n.a, 行われていない (not applicable) ; VLCAD, very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase ; CPT2, carnitine palmitoyltransferase- II、およびGA2, glutaric acidemia type II

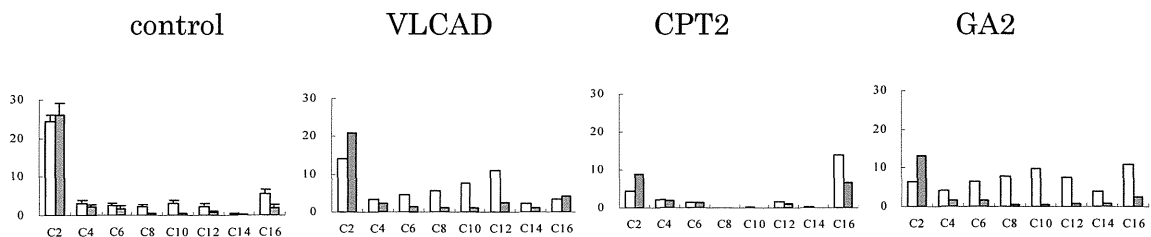


図1. In vitro probe assay の結果

□, BEZ (-)、■, BEZ (+)。縦軸はアシルカルニチン (nmol/mL)。横軸は、アシルカルニチンの炭素鎖数。BEZ 添加後に蓄積したアシルカルニチンが低下している時、代謝が改善したと推測される。

表 3. 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 A	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 B	1.06±0.05	0.95	1.03±0.09	1.07	0.83±0.02	0.84	0.85±0.10	0.89
ETF DH	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 A, and ETF B, a and b-subunits, respectively; ETF DH, 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7家系のNGSによる原因遺伝子の検索は現在進行中である。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。小児の急性脳症やSIDSや原因不明の神経疾患の同胞例では、代謝異常症の隠れている可能性が十分ある。NGS解析が素の病因解明に威力を発揮するものと思われる。

NGSのうちRNA-seqの有用性も知られている。我々

は、 β 酸化の治療薬として注目されつつあるBEZの薬理効果をRNA-seqとqRT-PCRで解析し、結果を比較検討した。RNA-seqの原理を図2に示している。RNA-seqでは、ゲノムワイドな網羅的遺伝子発現解析を行う。 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、どこかに変異タンパクがあり、BEZによって隣の酵素は増加するのに変異タンパクだけが少なくブレーキがかかると、代謝バランスがかえって乱れる可能性がある。

今回のqRT-PCRの結果とRNA-seqによる検討によると、BEZは、PPARのうちPPAR α とPPAR γ を増加させ、PPAR δ は増加させないこと、ETFまたはETFDHは少なくとも増加させないことが観察された。グルタル酸

血症II型は、ETFまたはETFDHの欠損によって起こるが、IVP assay実験でも、臨床的にもBEZの効果が認められている。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。BEZの効果には、他の要因が働いている可能性が高いことが分かった。 β 酸化系の他の酵素、ペルオキシソームの β 酸化酵素、あるいはこの他のエネルギー産生系の酵素に対する作用も網羅的に解析してゆく必要がある。特にETFDHは呼吸鎖のCoQ10を介して複合体IIに直接つながっている。これらの隣接する酵素についても検討する必要がある。

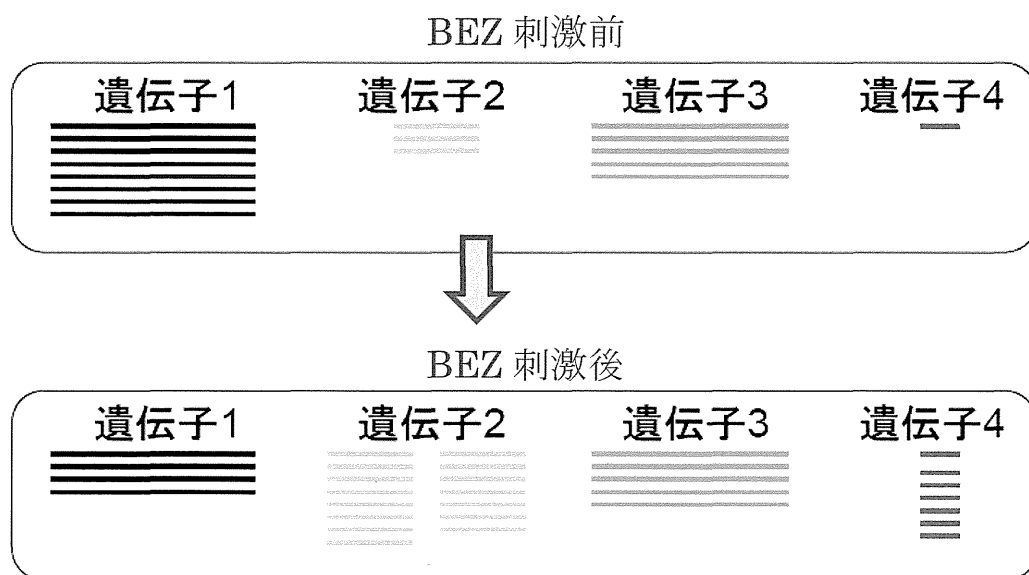


図2. RNA-seqによるBEZ刺激前後の遺伝子（RNA）量の変化
遺伝子1は減少、遺伝子2と4は増加、遺伝子3は変化なし。

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7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）。またベザフィブラート（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の結果は相関すること、BEZはPPAR α

とPPAR γ を増加させること、BEZはグルタル酸血症II型の欠損タンパクであるETFやETFDH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と思われる。

F. 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) 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*: 131(1): e327-330, 2013 (January)
 - 4) 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)
 - 5) 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)
 - 6) 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)
 - 7) 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)
 - 8) 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: 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) Prevsuren 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回日本医用マスペクトル学会年会. 名古屋, 2012年10月
 - 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

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の研究

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。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るが機能の詳細は不明である。そこで、NSD1 の下流で引き起こされる遺伝子発現障害を包括的遺伝子発現解析により特定することを試み、疾患群に特異的に発現変化をきたす遺伝子群を特定した。遺伝子群のプロファイルよりソトス症候群が 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、ソトス症候群特異的に発現増加する遺伝子と減少する遺伝子の発現量をマーカーとしてソトス症候群の診断・スクリーニングを行うことが可能となる検査のプロトコルの開発を行った。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。本研究では、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。ソトス症候群に特異的な遺伝子群に対し、定量 PCR 法などにより、発現異常を確認しさらに、現在遺伝子診断に使用されている NSD1 遺伝子の微小欠損

解析および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、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

NSD1 のハプロ不全の影響で疾患特異的に発現変化する新規分子の探索のためにソトス症候群罹患者 6 名と健常者 6 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総 RNA を抽出してイルミナ社 Human-6 V2 microarray で包括的な遺伝子発現を行ったデータの解析を行った。細胞培養とマイクロアレイ実験は 2 回行い、アーティファクト要因と生物学的変化から来る要因との検討も行った。また、そのデータの妥当性、再現性を検証するために、独立した新規のソトス症候群罹患者 6 名と健常対照者 12 名を対象とする同様のマイクロアレイ実験のデータの解析も行った。各アレイのプロープの信号強度を BeadStudio 3.1 ソフトウェアで解析した。マイクロアレイ解析を行い、データの再現性の検証や、各種機能カテゴリ解析、パスウェイ解析、上流転写調節機構の予測解析などを行った。ソトス症候群の疾患特異的な発現異常を呈する遺伝子のうち、中枢神経系に発現すると考えられる遺伝子群を特定した。また、上記のマイクロアレイデータ解析の結果から、ソトス症候群の病態メカニズムに関係する発現異常を呈する候補遺伝子として注目される遺伝子について特異的なプライマーをデザインし、新たに培養実験を行い、総 RNA を抽出して、SybrGreen 法を用いた定量 PCR 法で詳細な発現解析を行った。さらに、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 18 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 を抽出し変異/欠損解析に用いた。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な発現変化をした遺伝子と比較を行った。また、ソトス症候群罹患者の末梢血単核細胞 (PBMC) 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。

(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

マイクロアレイ解析により、ソトス症候群の 2 つのコホートでともに遺伝子発現が 20%以上増加している遺伝子が 107、20%以上減少している遺伝子が 108 検出され、このうち、両コホートともに倍以上発現が増加している遺伝子が 19、半分以上に発現が減少している遺伝子が 11 特定された。これらの遺伝子の多くは細胞間信号伝達、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ことが知られており、ソトス症候群では NSD1 遺伝子の欠失・変異によりエピジェネティックな転写調節機構を介してこれらの遺伝子群の発現の過剰な誘導、抑制が起こり、本症候群の症状を呈することが想定された。

実験に用いた検体は NSD1 遺伝子微小欠損/変異

解析による診断の確認を行ったが、包括的遺伝子発現解析で見出された疾患特異的発現異常遺伝子の発現は、NSD1 の微小変異または微小欠損の違いによる差は認められなかった。

マイクロアレイ解析により特定されたソトス症候群の疾患特異的に 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発現変化が倍以上あるいは半分以下に変化する遺伝子のうち、特に変化が顕著な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、リンパ芽球の発現変化を定量 PCR で検証した。各マーカー遺伝子について特異的なプライマーをデザインし、新たな培養実験を行って、SybrGreen 法による定量 PCR 実験で検証を行ったところ、ソトス症候群発現誘導遺伝子 A, B は疾患群で 5 倍以上と有意に発現が高く、ソトス症候群発現抑制遺伝子 C は 1/5 以下と有意に発現が低値を示していた。ソトス症候群発現誘導遺伝子 A, B の各々とソトス症候群発現抑制遺伝子 C との比をとると、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 100%、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 では 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 以上の値を示した。

更に、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患者群特有の傾向が確認された。

D. 考察

健常対照者には高発現するのに対し、ソトス症候群罹患患者では発現しない遺伝子や、逆に健常対照者では発現がみられないのに対し、ソトス症候群罹患患者では高発現する遺伝子が特定され、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。ソトス症候群罹患患者のリンパ芽球で発現変化を受ける遺伝子群はアポトーシス関連遺伝子を多く含んでいた。NSD1 ノックアウトマウスではアポトーシスが観察される (Rayasam ら 2003 年) ことなどから NSD1 変異により、アポトーシス関連遺伝子の転写に顕著な変化が生じ、各組織でアポトーシスの異常を引き起こすことで本症の症状が顕在化することが推察された。ソトス症候群罹患患者のリンパ芽球で発現変化を受ける遺伝子群には転写因子 OCT1/POU2F1 に制御されることが知られる遺伝子が多かったが、先行研究から転写因子 OCT1 は NSD1 により修飾を受ける NFκB の p65 の制御を受けることが知られることから、本知見は NSD1 の変異、欠失の下流でおこる病態メカニズムを解明する上で有用と考えられた。

株化細胞に関しては、罹患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。

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児のDNAの次世代シーケンシングによるde novo変異検出を行う準備を整えているが、これらの研究を進めることで、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を期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[英論文]

1. 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. Yoneda Y, Saito 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.
3. 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): 338-341. 2012.
4. Okada 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.* 141(2-3): 277-8. 2012.
5. Yu Z, Ono C, Kim HB, Komatsu H, Tanabe Y, Sakae N, Nakayama KI, Matsuoka H, Sora I, Bunney WE, Tomita H. Four mood stabilizers commonly induce FEZ1 expression in human astrocytes. *Bipolar Disorders*, 13(5-6): 486-499, 2011
6. Yu Z, Ono C, Sora I, Tomita H. Effect of chronic lithium treatment on gene expression profile in mouse microglia and brain dendritic cells. *Japanese Journal of Neuropsychopharmacology*, 31 (2): 101-102, 2011.

[和文論文]

1. 兪志前, 小野千晶, 田邊陽一郎, 小松浩, 松岡洋夫, 曾良一郎, 富田博秋. 双極性障害治療薬のアストロサイトにおける発現プロファイルへの影響. *Bipolar Disorder 研究会年会報*, 9: 13-14, 2011.

[総説]

1. 富田博秋: 第8章 死後脳研究. *メンタル医療～原因解明と診断、治療の最前線～*. シーエムシー出版. 2013
2. 富田博秋: うつ病の死後脳研究によるバイオマーカー探索. *うつ病—治療・研究の最前線*. 医学のあゆみ 244(5), 496-501, 2012.
3. 富田博秋、小野千晶、兪志前: 統合失調症の陰性症状の進行に関わる精神神経免疫学的メカニズムに関する研究. *こころの健康と病気* 2010年版, 財団法人 精神・神経科学振興財団. pp119-131, 2011.
4. 富田博秋: 統合失調症の死後脳研究の現状と展望. *精神科治療学* 26 (12), 1581-1587, 2011.

2. 学会発表

[国際学会]

1. Yu Z, Ono C, Aiba S, Sora I, Tomita H. Lithium stimulates chemokine production in monocytic cells via GSK-3inhibition. Society for Neuroscience 38th annual meeting, San Diego, USA. [2013/11/9]
2. Yu Z, Ono C, Aiba S, Sora I, Tomita H. Lithium stimulates chemokine production in monocytic cells. 3th AsCNP Beijing [2013/9/14]
3. Yu Z, Ono C, Fukushima H, Kida S, Tomita H. Gene expression profiling of monocytic cells in memory reconsolidation and extinction of contextual fear. WFSBP2013 kyoto [2013/6/24]
4. 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
5. Yu Z, Ono C, Tomita H. Molecular conformational changes in microglia and differentiated monocytic cells induced by therapeutic concentrations of lithium. Collegium internationale neuro-psychopharmacologicum 28th congress, Stockholm, Sweden. June 3-7, 2012.

[国内学会]

1. 兪志前, 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回日本臨床精神薬理学会 沖縄 [2013/10/24]
2. Yu Z, Ono C, Fukushima H, Kida S, Tomita H. Gene expression profiling of microglia in memory reconsolidation and extinction of contextual fear. 包括脳チュートリアル [2013/8/29]
3. Yu Z, Ono C, Kunii Y, Wada A, Mastumoto J, Hino M, Ikemoto K, Niwa S, Tomita H. Postmortem brain pH have significant impact on gene expression profiles Neuro2013 kyoto [2013/6/20]
4. 兪志前, 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 東京[2013/4/24]
5. 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]
6. 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]
7. 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]

8. 富田博秋. ソトス症候群についてもっと分かるとよいことは何でしょう? ～基礎研究のめざすところ～. 第2回ソトス症候群の会. 横浜[2011/11/23]
9. 福與なおみ, 黒澤健司, 岡本伸彦, 松本直通, 黒滝直弘, 石川亜貴, 萩野谷和裕, 土屋滋, 呉繁夫, 富田博秋. 本邦におけるソトス症候群の臨床像の検討ーソトス症候群のスクリーニング・診断システム確立にむけてー. 日本人類遺伝学会第56回大会. 横浜[2011/11/11]
10. 兪志前, 小野千晶, 富田博秋. 脳内ミクログリアと末梢単球の遺伝子発現の相関解析 ～統合失調症のミクログリア活性化を介した病態解明に向けた研究手法の開発～. 第6回統合失調症学会. 札幌[2011/7/18]
11. 小野千晶, 兪志前, 小松浩, 曾良一郎, 松岡洋夫, 石井直人, 富田博秋. 統合失調症患者のTh1およびTh2細胞のマイクロアレイ遺伝子プロファイリング. 第6回統合失調症学会. 札幌[2011/7/18]
12. Ono C, Yu Z, Tanabe Y, Ishii N, Tomita H. FACS-microarray study of immune cell from patients with schizophrenia. Neuroscience 2011 (第34回日本神経科学大会). 横浜[2011/9/17]
13. Yu Z, Ono C, Tanabe Y, Sora I, Tomita H. Effect of Chronic Lithium Treatment on Gene Expression Profile in Mouse Microglia and Brain Dendritic Cells. Neuroscience 2011 (第34回日本神経科学大会). 横浜[2011/9/15]
14. 福與なおみ, 富田博秋, 岡本伸彦, 黒澤健司, 松本直通, 黒滝直弘, 石川亜貴, 萩野谷和裕, 植松貢, 土屋滋, 呉繁夫. ソトス症候群のスクリーニング・診断システム確立にむけた実態調査. 第114回日本小児科学会学術集会. 東京[2011/8/12]
15. 福與なおみ, 富田博秋, 岡本信彦, 黒澤健司, 松本直道, 黒滝直弘, 萩野谷和裕, 植松貢, 土屋滋. ソトス症候群のスクリーニング・診断システムの確立に向けた実態調査. 第53回日本小児神経学会総会. 横浜[2011/5/26-8]若手優秀ポスター賞最優秀演題受賞
16. Yu Z, Ono C, Kim HB, Komatsu H, Tanabe Y, Sakae N, Nakayama KI, Matsuoka H, Sora I, Bunney WE, Tomita H. Four mood stabilizers commonly induce FEZ1 expression in human astrocytes. 第33回日本生物学的精神医学会. 東京. [2011/5/20]

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
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、発達緑内障早発型、開放隅角緑内障、落屑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。*CYP1B1* 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、緑内障を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%）。そこで、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 *HK2* 遺伝子、*NCK2* 遺伝子と相関していることを明らかにした。次に、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。

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。

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。また、落屑緑内障においても遺伝子多型の関与が大きいことを明らかとした。

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）
石 棟（東北大学大学院医学研究科眼科学分野）

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、発達緑内障早発型と落屑緑内障である。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。落屑緑内障では、近年ゲノムワイドアソシエーションスタディ（GWAS）を用いてその病態解析もされている。落屑緑内障と *LOXL1* 遺伝子と相関があると我々は報告している（Fuse N, et al. Mol Vis 2007）が、いまだ診断に応用できる感度でない。

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発達緑内障唯一の原因遺伝子である *CYP1B1* 遺伝子をスクリーニングし、*CYP1B1* 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*) 遺伝子をスクリーニングし、落屑緑内障との関連解析をすること ③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。

B. 研究方法

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、PCRダイレクトシーケンス法にて、変異が無いかどうか確認した。*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た。得られたデータは、BWA、GATKと言ったソフトを用いて解析した。

原発開放隅角緑内障：1) 一塩基多型 SNP を用いた関連解析、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。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、主な原因遺伝子を検索した。原因遺伝子陰性の症例について、ゲノム DNA を濃縮とライブラリ調整を行った。このサンプルを発達緑内障早発型と同様に、HiSeq2500 を用いて、エクソーム解析を行った。

嚢性緑内障：Toll-like receptor 4 (*TLR4*) 遺伝子上の 8 個の SNP、*CNTNAP2* 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。

(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

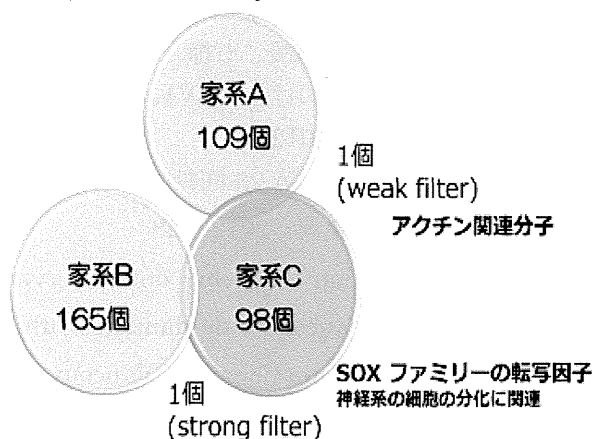
発達緑内障早発型：59 例のスクリーニングにおいて最終的に 32 例が、*CYP11B1* 遺伝子陰性であった。そのうち前年度の 5 例に新たに 1 例を加え、未発症家族 9 例と共にエクソーム解析を行った。エクソン領域の多型が 50,354 個抽出された。1000 genomes で頻度 1%以上の多型は除外し、多型の種類遺伝様式による絞り込みを行った。その結果、ホモ接合体変異を 47 個、ヘテロ接合体変異を 386 個抽出した。全例に共通で、常染色体劣性遺伝型を示し機能も合致する候補遺伝子はなかった。次に各症例を個別に解析した結果、6 例の内 2 例に de novo 変異を疑う候補遺伝子(ステロイド代謝関連遺伝子)を見出した。この遺伝子は、免疫組織染色にて前眼部に発現していることを確認した。引き続き、残りの症例について、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。原発開放隅角緑内障：1) 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)。2) 3 家系 (親子例 2 家系、同胞例 1 家系) を用いてエクソーム解析を行い、緑内障遺伝子の探索を行った。前述の発達緑内障のスクリーニングと同様に参照ゲノムと違う多型を抽出するにあたり、フィルターは 2 種類を作成し行った。

① weak filter; 緩く絞り込むための filter、

ESP5400 データベースおよび 1000Genomes データベースでアレル頻度 0.01 以下

②strong filter; できるだけ絞り込むための filter、ESP5400 データベース、1000Genomes データベース、および dbSNP135 データベースで報告なし。また、アミノ酸置換を伴わない多型は除外した。その結果、候補遺伝子として図のように weak filter では家系 A 109 個、家系 B 165 個、家系 C 98 個、strong filter では家系 A 57 個、家系 B 100 個、家系 C 59 個の候補遺伝子が抽出された。

次に、今述べた 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 (図)。3 家系に共通の候補遺伝子は存在しなかった。



家系 B,C の 2 家系では、strong filter で SOX ファミリーに属する、神経系の細胞の分化に関連する転写因子が共通であり、原因遺伝子の可能性が高いと考えられた。また、家系 A,C の 2 家系では、POAG と NTG の一家系でアクチン関連分子が共通であり、この遺伝子も原因遺伝子の可能性があると考えられた。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた解析により、発達緑内障早発型では、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推察された。

原発開放隅角緑内障に関しては、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。また、新規原因遺伝子の検索においては、家系例のエクソーム解析より新規の原因遺伝子の同定が可能と考えられる。

E. 結論

1. 発達緑内障では数十個の原因候補遺伝子まで絞りこみ、2 例において de novo 変異である候補遺伝子を見出した
2. 発達緑内障は遺伝的異質性が高く、その原因は複数存在すると考えられる
3. 落屑緑内障と *TLR4* 遺伝子、*CNTNAP2* 遺伝子とは関連する
4. 正常眼圧緑内障と *HK2* 遺伝子、*NCK2* 遺伝子とは関連し、新たな原因であると考えられる
5. 原発開放隅角緑内障家系においてエクソーム解析を用い、候補遺伝子を抽出できた
6. 原発開放隅角緑内障家系間に共通の遺伝子が存在し、原因遺伝子となる可能性が考えられる
7. 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は、新規原因遺伝子の同定に有用である

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,