

委託業務報告書(業務項目)

遺伝性ミオパチーの次世代型統合的診断拠点形成

1. 既知遺伝子のハイスループット解析

業務主任者 三橋 里美 疾病研究第一部 室長
後藤 雄一 疾病研究第二部 部長

研究要旨

診断未知の筋疾患について、遺伝性筋疾患の原因となることが知られている遺伝子群を臨床病理学的特徴より4つのカテゴリーに分類した筋疾患遺伝子パネルを作成し、次世代シーケンサーIonPGMを用いて、網羅的にシーケンス解析を行った。約25%の症例で原因と考えられる遺伝子変異を同定することができた。これまで同定できた遺伝子変異は、本邦ではじめての報告となる遺伝子や、新規変異、または、臨床症状からは疑われていなかった疾患であることが判明したものなどがあり、網羅的解析の重要性が示された。診断が確定できなかった症例については、エクソームシーケンスを行い、さらなる解析を行う。

ミトコンドリア病については、約800のミトコンドリア関連タンパク質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®を用いた解析を生化学的に複数の呼吸鎖酵素複合体の活性低下が認められる2症例に試みた。その結果、それぞれに病因の可能性の高い遺伝子変異が、コンパウンドヘテロ接合体で見いだされ、そのうち1例では表現系回復実験を行い病因と確定した。この方法の有用性が確認できた。今後はミトコンドリア機能異常が確定している症例についての解析を継続させるとともに、臨床診断への応用も視野に入れた活用方法を追求する。

A. 研究目的

遺伝性筋疾患の原因となる遺伝子は、報告されているだけでも100種類以上あり、巨大な遺伝子も多数存在する。これらの遺伝子を従来のサンガーシーケンス法でシーケンスすることは、コストも人員も時間もかかり、網羅的解析はほぼ不可能であった。よって、これまでの遺伝子変異解析は、スポット的な方法に限られていた。本研究では、近年の次世代シーケンサー技術の進歩を利用し、次世代シーケンサーIonPGMを用いて、効率的で網羅的な遺伝性筋疾患の遺伝子解析を目指す。

B. 研究方法

国立精神・神経医療研究センターに筋病理診断および、遺伝子解析の依頼された検体のうち、遺伝的に未診断の遺伝性ミオパチーに対して、4種類の筋疾患遺伝子パネルを使った、次世代シーケンサーIonPGMを用いて、既知遺伝子変異のターゲットリシーケンス解析を行った。このパネルは、これまでに遺伝性筋疾患の原因として報告されている遺伝子をほぼ全て含み、筋ジストロフィー(65遺伝子)、先天性ミオパチー(42遺伝子)、代謝性ミオパチー(45遺伝子)、異常タンパク質の凝集や緑取り空胞を特徴とするミオパチー(36遺伝子)の4種類に

分類してあり（括弧内は含まれる遺伝子数）、コーディング領域およびスプライス部位に対して、97%のカバー率を持っている。対象となる症例を、筋病理診断および臨床診断によって、いずれかのカテゴリーに分類し、解析を行った。

ミトコンドリア病については、これまで患者で報告のある200近くの遺伝子に加えて、800近くのミトコンドリア関連遺伝子を調べる目的で、総計7368領域をキャプチャーできるように設計したHaloplex®によって関心領域をキャプチャーした上で、次世代シーケンサーMiSeqによりターゲットリシーケンスを行った。過去30年以上の期間に収集したmtDNAに病的変異を持たない患者骨格筋は、おおよそ1000検体を保有しており、その中で、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性を測定する生化学検査において複数の呼吸鎖酵素活性低下及びミトコンドリアDNA由来タンパク質の翻訳活性の低下している2検体を選定した。患者1は1歳9ヶ月の男児でLeigh症候群を呈し、患者2は1歳5ヶ月の女児で高乳酸血症を呈している。いずれの患者の両親も血族婚ではなかった。翻訳活性に関しては、エメチンで各DNAの翻訳活性を抑制した後に、35Sメチオニンでラベルした13個のミトコンドリアタンパク質をPAGEで検出した。次世代シーケンサーはMiSeq (illumina社)を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究において使用するヒト試料は、共同研究施設であるNCNP倫理委員会で承認された所定の承諾書を用いて、患者あるいはその親権者から遺伝子解析を含む研究利用に対する検体の使用許可を得たものを用いた。

C. 研究結果

IonPGMを用いて、380検体の解析を行った。88症例で、病気の原因の可能性のある遺伝子変異を同定することができた。この中には、-dystroglycanopathyの原因遺伝子であるPOMT2, POMGNT2, ISPDの新規変異や、世界で報告が2例目となるTRAPPC11変異、報

告が非常にまれなMATR3の新規変異などを同定し、学会報告した。また、呼吸不全などの特徴的な臨床像を示さず、確定診断が付かなかった症例において、既報告のTTN変異を見出し、HMERFという診断が得られたため、今後の臨床経過の予測に貢献することができた。また、原因遺伝子が不明であった症例のうち、83症例を含む、192例をHiSeq1000シーケンサーでエクソーム解析中である。

ミトコンドリア病については、患者1でECHS1の、患者2で遺伝子Xの複合ヘテロ接合型変異を見いだした。患者1由来の筋芽細胞では、HCHS1蛋白質の発現が低下していた。患者2では蛋白質Xの発現に変化は見られなかったが、蛋白質X葉酸代謝に関与しており、ミトコンドリアのtRNAの修飾に関する基質の代謝に寄与することから、その基質の不足によってmtDNAの翻訳異常が引き起こされる可能性について今後解析を行う予定である。

D. 考察

遺伝子診断が未知の遺伝性筋疾患に対して、筋疾患遺伝子パネルによる、次世代シーケンサーIonPGMを活用することにより、効率のよい遺伝子診断が可能である。しかし、網羅的変異解析にもかかわらず、未だ70%の症例で、原因遺伝子が判明していない。この原因として、ターゲット領域以外の変異、もしくはリピート、欠失や挿入などの検出が難しい変異である可能性や、遺伝性疾患という臨床診断が間違っている可能性もあるが、新規の筋疾患原因遺伝子による疾患である可能性が高いと考えている。これらの症例に対しては、エクソームシーケンスによる、遺伝情報の蓄積を行うことで、新規の筋疾患原因が明らかとなると考えられる。

ミトコンドリア病については、1例で病因確定を行い投稿論文として報告した。今後ECHS1の欠損とミトコンドリアの翻訳異常、呼吸鎖複合体の活性低下の関連について更に解析を行う予定である。

E. 結論

IonPGM を用いて、既知の筋疾患原因遺伝子を網羅的に解析することが可能であるとともに、新規遺伝子の発見につながる結果を示した。今後は、さらに解析症例を増やし、診断未知の筋疾患エクソームデータベースを構築し、新規遺伝子発見と疾患病態解明に繋げて行くことが期待される。

ミトコンドリア病については、これまで病因変異の不明であったミトコンドリアミオパチー患者の核 DNA コードの原因遺伝子の同定を行うことに成功し、約 800 の遺伝子をターゲットしたターゲットリシーケンス解析の有用性を示した。今後は機能解析（機能回復実験）が可能な試料をもつ患者を中心に症例を重ねてその研究的意義を高めつつ、臨床の現場にどのように応用させるかについての研究も行うことが肝要と考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Uruha A, Hayashi YK, Oya Y, Mori-Yoshimura M, Kanai M, Murata M, Kawamura M, Ogata K, Matsumura T, Suzuki S, Takahashi Y, Kondo T, Kawarabayashi T, Ishii Y, Kokubun N, Yokoi S, Yasuda R, Kira JI, Mitsuhashi S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Necklace cytoplasmic bodies in hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [Epub ahead of print]

Kida H, Sano K, Yorita A, Miura S, Ayabe M, Hayashi Y, Nishino I, Taniwaki T. First Japanese case of muscular dystrophy caused by a mutation in the anoctamin 5 gene. *Neurol and Clin Neurosci*. [Epub ahead of print]

Mukai M, Sugaya K, Ozawa T, Goto Y, Yanagishita A, Matsubara S,

Bokuda K, Miyakoshi A, Nakao I. Isolated mitochondrial stroke-like episodes in an elderly patient with MT-ND3 gene mutation. *Neurol Clin Neurosci*. [Epub ahead of print]

Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto Y. ECHS1 mutations cause combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome. *Hum Mut* 36: 232-239, 2015

Ohnuki Y, Takahashi K, Iijima E, Takahashi W, Suzuki S, Ozaki Y, Kitao R, Mihara M, Ishihara T, Nakamura M, Sawano Y, Goto Y, Izumi S, Kulski J-K, Shiina T, Takizawa S. Multiple deletions in mitochondrial DNA in a patient with progressive external ophthalmoplegia, leukoencephalopathy and hypogonadism. *Inter Med* 53: 1365-1369, 2014

2. 学会発表

三橋里美, 次世代シーケンサーを用いた筋疾患の遺伝子診断システムについて, 第三回骨格筋研究会, 3.7.2015

Wen-Chen Liang, Wenhua Zhu, Satomi Mitsuhashi, Ichizo Nishino, Yuh-Jyh Jong, An 8-year-old girl with congenital cataracts and motor development delay, 14th AOMC ANNUAL SCIENTIFIC MEETING 2015, バンコク, 3.4.2015

Wenhua Zhu, Jantima Tanboo, Takashi Ito Satomi Mitsuhashi, Ichizo Nishino, A 35-year-old man with distal muscle weakness, contractures, and persistent hyperCKemia, 14th AOMC ANNUAL SCIENTIFIC MEETING 2015, バンコク, 3.4.2015

Wen-Chen Liang, Wenhua Zhu, Satomi Mitsuhashi, Satoru Noguchi, Ichizo Nishino, A case report of TRAPPC11 disease: a wider clinical spectrum with

multiple systemic involvement. The 4th Oriental Congress of Neurology, 上海, 3.28.2015

Sakai C, Matsushima Y, Sasaki M, Miyamoto Y, Goto Y: Targeted exome sequencing identified a novel genetic disorder in mitochondrial fatty acid -oxidation. Euromit 2014, Tampere, Finland, 6.16, 2014

Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita E, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y. Leigh-like syndrome associated with calcification of the bilateral basal ganglia caused by compound heterozygous mutations in mitochondrial poly(A) polymerase. Euromit 2014, Tampere, Finland, 6.16, 2014

Goto Y: Mitochondrial Disease . Asian & Oceanian Epilepsy Congress 2014. Singapore, 8.7, 2014

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