

厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))

委託業務成果報告(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
2. 全エクソーム解析

業務主任者 西野一三 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

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に対して網羅的解析を行った結果、診断が確定できなかった症例について、エクソームシーケンスを行った。また、臨床病理学的所見から、既知遺伝子の変異では説明できない症例については、直接エクソーム解析を行った。Tubular aggregate myopathyの新規原因遺伝子*OR11*を見出した他、世界第2例目の*DAG1*変異例同定、新たなネマリンミオパチー原因遺伝子*LMOD3*の同定などの成果を上げた。この他にも多数の候補原因遺伝子を見出し、さらに病因解析を進めている。また、インフォマティクス解析パイプラインをGATKv.3.1を用いたものにアップデートするとともに、エクソーム解析のデータベースを横断的に解析するためのデータベースを構築した。今後、さらに効率よく原因遺伝子変異を見出すことが可能となることが期待される。

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種類以上あるが、これらの遺伝子の網羅的解析によっても、原因となる遺伝子変異が確定できない症例が多数存在する。本研究では、これらの症例に対して、エクソーム解析を行い、原因となる遺伝子変異の同定を目指す。

B. 研究方法

国立精神・神経医療研究センターに診断依頼された検体のうちで既知遺伝子変異ハイスループット解析を行ってもなお原因遺伝子不明であった83例および、遺伝子診断未知でいずれのカテゴリーにも属さず新規原因遺伝子が疑われる症例を含めた192例を対象とした。全エクソームキャプチャー

キットを用いてライブラリーを作製し、HiSeq1000にてゲノム情報を取得した。既に構築済みの解析パイプラインを通して、候補遺伝子を絞り込み、候補遺伝子変異は、サンガー法で確認した。バイオインフォマティクスおよび日本人多型の判断に関しては、横浜市立大学・松本直通教授(研究協力者)と連携して進めた。さらに、これまでに解析を行った400例についても、引き続き原因遺伝子の同定を進めている。

(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

これまでにエクソーム解析を行った475例中350例で、解析が終了している。このうち、60の症例で病気の原因である可能性のある遺伝子変異を見出すことができた。この中には、1. tubular aggregate myopathy の新規の変異遺伝子 *ORAI1* の同定、2. -dystroglycanopathy と病理学的に確定された例の中から世界第2例目となる *DAG1* 変異例を同定、3. *LMOD3* 変異がネマリンミオパチーの新たな原因であることを同定、4. *TK2* 変異による筋線維未熟性を伴う先天性ミオパチーの同定、5. 中心核ミオパチーの新規原因遺伝子 *X* の同定（海外の研究者との共同研究のため遺伝子名は未公表）、6. *LMNA* 変異による核内ロッドを伴う先天性ミオパチーの同定、7. 本邦初の *MEGF10* 先天性ミオパチーの同定、8. 本邦初の *ANOS5* 変異の同定、などの成果が含まれ、さらに病因解析を進めている。

Tubular aggregate myopathy では、見いだされた変異を HEK293 細胞に導入し Fura-2 を用いて細胞内カルシウム動態を評価した。その結果、野生型 *ORAI1* を導入した細胞では細胞外カルシウム濃度にかかわらず細胞内カルシウム濃度がほぼ一定に保たれるのに対し、変異体導入細胞では、細胞内カルシウム濃度が順次上昇した。この上昇はストア作動性チャネル特異的阻害剤で正常化されたことから、*ORAI1* 変異が *ORAI1* チャネルを constitute active に変え、常に開口状態にしていることが示された。患者筋管細胞を用いた実験でも同様の結果を得た。

平成26年度は、解析ソフトウェアを更新し、より信頼性の高い結果が得られることが期待される GATKv.3.1 を用いた解析パイプラインを構築した。また解析の省力・省時間化を目指し、これまでに解析した NCNP 内のエクソームデータベースを構築し、横断的に解析するシステムを構築した。これにより、同じ変異をもった症例を容易に見出すことや、病気の原因として疑わしい遺伝子に変異をもつ症例を抽出することが容易に可能となった。

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 によるスクリーニングを行った後、診断未知の筋疾患に対してエクソームシーケンスを行うことで、新規疾患原因遺伝子を見出す方法は、省コスト、省時間を考える上でも有効であると思われる。今後は、変異の病原性についての解析が必要であり、同じ変異を持った症例の蓄積が病原性の証明には大切であることから、今後さらにエクソームシーケンスによる、遺伝情報の蓄積を行い、新規の筋疾患原因が明らかにしていくことが必要である

E. 結論

診断未知の筋疾患患者にたいするエクソーム解析によって、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、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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto YI, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I: Dominant mutations in *ORAI1* cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Hum Mol Genet.* 2015 Feb 1; 24(3): 637-48.

Dong M, Noguchi S, Endo Y, Hayashi YK, Yoshida S, Nonaka I, Nishino I: DAG1 mutations associated with asymptomatic hyperCKemia and hypoglycosylation of -dystroglycan. *Neurology.* 2015 Jan 20; 84(3): 273-9.

Yuen M, Sandaradura SA, Dowling JJ,

Kostyukova AS, Moroz N, Quinlan KG, Lehtokari VL, Ravenscroft G, Todd EJ, Ceyhan-Birsoy O, Gokhin DS, Maluenda J, Lek M, Nolent F, Pappas CT, Novak SM, D'Amico A, Malfatti E, Thomas BP, Gabriel SB, Gupta N, Daly MJ, Ilkovski B, Houweling PJ, Davidson AE, Swanson LC, Brownstein CA, Gupta VA, Medne L, Shannon P, Martin N, Bick DP, Flisberg A, Holmberg E, Van den Bergh P, Lapunzina P, Waddell LB, Sloboda DD, Bertini E, Chitayat D, Telfer WR, Laquerrière A, Gregorio CC, Ottenheijm CA, Bönnemann CG, Pelin K, Beggs AH, Hayashi YK, Romero NB, Laing NG, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Melki J, Fowler VM, MacArthur DG, North KN, Clarke NF: Leiomodin-3 dysfunction results in thin filament disorganization and nemaline myopathy. J Clin Invest. 2014 Nov; 124(11): 4693-708.

Miyatake S, Koshimizu E, Hayashi YK, Miya K, Shiina M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Nishino I, Matsumoto N: Deep sequencing detects very-low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy. Neuromuscul Disord. 2014 Jul; 24(7): 642-7.

2. 学会発表

Endo Y, Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto Y, Miyatake S, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I: Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channels. 19th International Congress of the World Muscle Society, Berlin, Germany (Langenbeck-Virchow-Haus), 10.8, 2014 (10.7-10.11)

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