

- 17). Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: Systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod.* 30(3):499-506, 2015
  - 18). Ruiz-Arana IL, Hübner A, Cetingdag C, Krude H, Grüters A, Fukami M, Biebermann H, Köhler B. A Novel Hemizygous Mutation of MAMLD1 in a Patient with 46,XY Complete Gonadal Dysgenesis. *Sex Dev* 2015 in press
  - 19). Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Kohri K, Ogata T, Fukami M. Novel Splice Site Mutation in MAMLD1 in a Patient with Hypospadias. *Sex Dev* 2015 in press
  - 20). Igarashi M, Mikami H, Katsumi M, Miyado M, Izumi Y, Ogata T, Fukami M. *SOX3* Overdosage Permits Normal Sex Development in Females with Random X Inactivation. *Sex Dev* 2015 in press
  - 21). Katsumi M, Ishikawa H, Tanaka Y, Saito K, Kobori Y, Okada H, Saito H, Nakabayashi K, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M, Miyado M. Microhomology-Mediated Microduplication in the Y Chromosomal Azoospermia Factor a (AZFa) Region in a Male with Mild Asthenozoospermia. *Cytogenetic and Genome Research* 2015 in press
  - 22). 五十嵐麻希, 深見真紀. 日常診療における性分化の診かた。性分化疾患と遺伝子異常。小児内科 2014
  - 23). 深見真紀. Campomelic dysplasia 日本臨床 神経症候群 IV その他の神経疾患を含めて. 2014
2. 学会発表
    - 1). Naiki Y, Katsumata N, Onodera M, Fukami M. Extra-adrenal expression of Cyp21a for gene therapy of CAH. Joint 16th International Congress of Endocrinology and 96th Annual Meeting of the Endocrine Society, June 21-24, 2014, Chicago
    - 2). Ayabe T, Fukami M, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Kikuchi N, Amemiya S, Sugihara S. Environmental factor(s) affecting the age of type 1 diabetes onset in Japanese children. 40th Annual Meeting International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes, September 3-6, 2014, Toronto
    - 3). Igarashi M, Horikawa R, Nakabayashi K, Hata K, Ogata T, Fukami M. Identification of a missense MAP3K1 mutation in a patient with hypospadias. 53<sup>th</sup> annual ESPE meeting, September 18-20, 2014, Dublin
    - 4). Kon M, Igarashi M, Izumi Y, Kato-Fukui Y, Mizuno K, Hayashi Y, Kohri K, Kojima Y, Nonomura K, Ogata T, Fukami M. Mutation analysis of KDM3A (lysine-specific demethylase 3A) in patients with hypospadias. 53<sup>rd</sup> Annual ESPE Meeting, September 18-20, 2014, Dublin
    - 5). Saito K, Yoshida A, Kobori Y, Tanaka Y, Katsumi M, Miyado M, Ogata T, Kubota T, Saito H, Fukami M, Okada H. Genomic Variation in the AZF Region Associated with the Risk of Azoospermia. ASRM 2014 annual meeting, October 18-22, 2014, Hawaii
    - 6). 深見真紀: 成長障害の遺伝子解析. Norditropin SGA 5<sup>th</sup> anniversary lecture, 新横浜, 2014年7月23日
    - 7). 泉陽子, 鈴木江莉奈, 神崎晋, 八ツ賀秀一, 金城さおり, 中林一彦, 梅澤明弘, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀, 丸山哲夫, 末岡浩, 吉村泰典: 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 58例の網羅的遺伝子解析. 第32回日本受精着床学

会, 東京, 2014年7月31日

- 8). 後藤元秀, 山本幸代, 齋藤玲子, 荒木俊介, 久保和泰, 川越倫子, 河田泰定, 楠原浩一, 中村明枝, 佐野伸一朗, 深見真紀: 偶然に発見された低カルシウム血症を契機に偽性副甲状腺機能低下症(PHP)Ibと診断した一男児例. 第14回日本内分泌学会九州地方会, 佐賀, 2014年8月23日
- 9). 永田絵子, 鹿野博亀, 加藤芙弥子, 中島信一, 山口理恵, 佐野伸一朗, 高田修治, 深見真紀, 池川志郎, 緒方勤: BHLHA9を含む者約200kbの同一領域の日本人創始者コピー数増加は四肢形成不全発症の顕著な感受性因子である. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月25日
- 10). 泉陽子, 西岡淳子, 八ツ賀秀一, 鈴木江莉奈, 佐野伸一朗, 中林一彦, 梅澤明弘, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀: 複合型下垂体ホルモン不全症患者における *WDR11* スプライスサイト変異の同定. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月25日
- 11). 丸尾良浩, 長崎啓祐, 松井克之, 森麻美, 筒井英美, 柴田正美, 深見真紀, 竹内義博: Dual oxidase 2(DUOX2)異常症の病型の多様さと遺伝子変異. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 12). 島彦仁, 梅木郁美, 加賀元宗, 上村美季, 箱田明子, 菅野潤子, 泉陽子, 深見真紀, 藤原幾磨: 成長ホルモン補充開始後に低血糖発作が改善し, *WDR11* 変異を認めた *Septo Optic Dysplasia* の一例. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 13). 内木康博, 堀川玲子, 勝又規行, 小野寺雅史, 深見真紀: 先天性副腎皮質過形成における副腎皮質外への遺伝子導入による遺伝子治療の試み. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 14). 鏡雅代, 松原圭子, 佐野伸一朗, 中村明枝, 水野誠司, 濱嶋直樹, 永井敏郎, 深見真紀, 緒方勤: Silver-Russell 症候群に対する包括的メチル化解析から明らかになったこと. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 15). 松原圭子, 伊藤順庸, 榎本啓典, 中林一彦, 佐野伸一朗, 中村明枝, 緒方勤, 深見真紀, 齋藤伸治, 鏡雅代: PWS/AS 責任領域の非典型的な欠失を有する症例に対する網羅的メチル解析. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 16). 松原圭子, 片岡直樹, 荻田聡子, 佐野伸一朗, 緒方勤, 深見真紀, 勝又規行: 8番染色体片親性アイソダイソミーにより顕在化した *CYP11B1* 遺伝子変異による  $11\beta$  水酸化酵素欠損症例. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 17). 中村明枝, 堀川玲子, 内木康博, 畑郁江, 松原圭子, 佐野伸一朗, 緒方勤, 深見真紀, 鏡雅代: 原因不明のSGA性低身長症例に対する包括的メチル化解析. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 18). 綾部匡之, 深見真紀, 竹原健二, 掛江直子, 松井陽, 横谷進: 小児慢性特定疾患治療研究事業データを用いた小児内分泌疾患の出生季節性解析. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 19). 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸真美, 田中葉子, 岡田弘, 小堀善友, 吉田淳, 石川博通, 緒方勤, 久保田俊郎, 深見真紀: 非閉塞性無精子症・乏精子症患者におけるY染色体構造解析. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 20). 勝見桃理, 齊藤和毅, 宮戸真美, 田中葉子, 岡田弘, 小堀善友, 吉田淳, 石川博通, 緒方勤, 深見真紀: 無精子症・乏精子症患者のゲノムコピー数変化の同定. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月26日
- 21). 山澤一樹, 鏡雅代, 松原圭子, 中村明枝, 深見真紀: メチル化異常に起因するヒトインプリンティング異常症においてヒドロキシメチル化の果たす役割の解明. 第48回日本小児内分泌学

- 会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 22). 中島信一, 大石彰, 高田史男, 河村秀樹, 小野裕之, 五十嵐麻希, 深見真紀, 緒方勤: SRY(+)<sub>46,XX</sub> 精巢性分化疾患4症例における性分化決定因子と転座発症機序の解析. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 23). 渡辺聡, 伊達木澄人, 近河日智, 中富明子, 木下英一, 吉浦孝一郎, 深見真紀, 緒方勤, 森内浩幸: 中枢神経奇形を合併した複合型下垂体機能低下症の2例: trio exome 解析による新規原因遺伝子同定の試み. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 24). 長崎啓祐, 志原大蔵, 佐藤英利, 小川洋平, 宮戸真美, 深見真紀: 遺伝性女性化乳房症に対するアロマターゼ阻害剤治療効果の検討. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 25). 山口理恵, 檜村哲生, 加藤芙弥子, 永田絵子, 中島信一, 馬場崇, 諸橋憲一郎, 五十嵐麻希, 深見真紀, 緒方勤: SOX9 frameshift mutation in a patient with acampomelic campomelic dysplasia: the second case. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 26). 加藤芙弥子, 松本直通, 鶴崎美徳, 小崎里華, 中島信一, 深見真紀, 緒方勤: SKI 遺伝子変異が同定された Shprinzen-Goldberg 症候群の男児. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 27). 富田雄一瑠, 石黒寛之, 兵頭裕美, 入月浩美, 長崎啓祐, 深見真紀: 低身長を契機に発見された新規 IGSF1 遺伝子異常症男性の臨床像. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 28). Matsubara K, Kataoka N, Ogita S, Sano.S, Ogata T, Fukami M, Katsumata N. Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a *CYP11B1* mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 29). 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀: マウス分娩の開始と完了における Mamld1 機能の解明. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 30). 福井由宇子, 野口-永久井祐子, 深見真紀: マウスポリコム遺伝子群 Cbx2/M33 による成長期下肢長管骨および頭蓋骨形成制御. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 31). 五十嵐麻希, 三上仁, 勝見桃理, 泉陽子, 緒方勤, 深見真紀: 46,XX 精巢性分化疾患を伴わない母娘例における SOX3 重複の同定. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 32). 佐野伸一朗, 松原圭子, 中村明枝, 深見真紀, 緒方勤, 鏡雅代: 分子遺伝学的診断に基づく偽性副甲状腺機能低下症の臨床的特徴. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 33). 綾部匡之, 永井爽, 大戸佑二, 松原圭子, 土屋貴義, 田中百合子, 深見真紀, 村上信行, 松原知代, 永井敏郎: プラダー・ウィリー症候群患者への成長ホルモン補充が身長、肥満度、糖尿病へ与える長期的効果の検討. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 34). 今雅史, 室谷浩二, 長谷川行洋, 長崎啓祐, Dung Vu Chi, 上岡克彦, 大戸佑二, 五十嵐登, 三井貴彦, 鈴木江莉奈, 五十嵐麻希, 福井由宇子, 守屋仁彦, 野々村克也, 緒方勤, 深見真紀: 非症候性尿道下裂発症における単一遺伝子変異の寄与の解明. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 35). 鈴木江莉奈, 泉陽子, 緒方勤, 深見真紀: 特発性思春期早発症女児における *ESR1* 遺伝子イントロン内欠失多型の検討. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日

- 36). 内木康博, 堀川玲子, 勝又規行, 小野寺雅史, 深見真紀: 副腎皮質過形成症における副腎皮質外への遺伝子導入による遺伝子治療の試み. 第22回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 東京, 2014年11月3日
- 37). 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀: 妊娠マウスにおける黄体退縮調節因子の同定. 第22回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 東京, 2014年11月3日
- 38). 鏡雅代, 松原圭子, 中林一彦, 秦健一郎, 嘉村浩美, 中村明枝, 緒方勤, 深見真紀: 14番染色体インプリンティング異常症20例に対する網羅的なDMRメチル化状態の検討. 第59回人類遺伝学会, 東京, 2014年11月20日
- 39). 松原圭子, 伊藤順庸, 中林一彦, 佐野伸一朗, 中村明枝, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀, 斎藤伸治, 鏡雅代: PWS/AS責任領域の非典型的な欠失を有する症例に対する網羅的メチル解析. 第59回人類遺伝学会, 東京, 2014年11月20日
- 40). 中村明枝, 堀川玲子, 内木康博, 畑郁江, 曾根田瞬, 松原圭子, 佐野伸一朗, 緒方勤, 鏡雅代, 深見真紀: 原因不明のSGA性低身長に対する包括的メチル化解析. 第59回人類遺伝学会, 東京, 2014年11月20日
- 41). 泉陽子, 武者育麻, 鈴木江莉奈, 堀川玲子, 雨宮伸, 緒方勤, 深見真紀, 大竹明: SOX10半量不全は、Kallmann症候群とWaardenburg症候群を招く. 第59回人類遺伝学会, 東京, 2014年11月20日
- 42). 深見真紀: 先天性疾患の遺伝子診断. 第59回日本人類遺伝学会ランチョンセミナー, 東京, 2014年11月22日
- 43). 鈴木江莉奈, 泉陽子, 神崎晋, 八ツ賀秀一, 金城さおり, 五十嵐麻希, 中林一彦, 梅澤明弘, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀: 疾患遺伝子パネルを用いた低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の遺伝子診断. 第59回人類遺伝学会, 東京, 2014年11月22日
- 44). 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀: 妊娠マウスの卵巣におけるMAMLD1の役割. 第37回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2014年11月27日
- 45). 福井由宇子, 深見真紀: Cbx2/M33による骨髄脂肪細胞系列制御-マウス骨髄由来間葉系ストローマ細胞ST2による解析. 第37回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2014年11月27日
- 46). 五十嵐麻希, 今雅史, 泉陽子, 福井由宇子, 和田友香, 宮戸真美, 緒方勤, 深見真紀: ヒト性分化異常症の網羅的遺伝子変異解析. 第37回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2014年11月27日
- 47). 勝見桃理, 齊藤和毅, 宮戸真美, 田中葉子, 岡田弘, 小堀善友, 吉田淳, 石川博通, 緒方勤, 深見真紀: 無精子症・乏精子症発症に関与するゲノムコピー数変化の解明. 第37回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2014年11月27日
- 48). 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸真美, 岡田弘, 小堀善友, 吉田淳, 田中葉子, 石川博通, 緒方勤, 齊藤英和, 久保田俊郎, 深見真紀: 非閉塞性無精子症・乏精子症患者におけるMLPA法を用いたY染色体構造解析. 第59回日本生殖医学会, 東京, 2014年12月4日
- 49). 泉陽子, 鈴木江莉奈, 佐野伸一朗, 中林一彦, 梅澤明弘, 秦健一郎, 末岡浩, 田中守, 緒方勤, 深見真紀: 思春期早発症女児2例におけるNMUR2機能低下多型の同定. 第59回日本生殖医学会, 東京, 2014年12月5日
- 50). Miyado M, Miyado K, Saito K, Katsumi M, Ogata T, Fukami M: *Mamld1* deficient female mice exhibit delayed parturition. Young Scientist Meeting for Sexual Differentiation, 静岡, 2014年12月9日
- 51). Igarashi M, Kon M, Izumi Y, Kato-Fukui Y, Suzuki E, Wada Y, Miyado M, Ogata T, Fukami M: Systematic mutation analysis of patients with disorders of sex development. Young

Scientist Meeting for Sexual Differentiation, 静岡, 2014年12月9日

- 52). Katsumi M, Saito K, Miyado M, Tanaka Y, Okada H, Kobori Y, Yoshida A, Ishikawa H, Ogata T, Fukami M: Copy number variations associated with a risk of azoospermia and oligospermia. Young Scientist Meeting for Sexual Differentiation, 静岡, 2014年12月9日
- 53). 泉陽子, 鈴木江莉奈, 佐野伸一朗, 中林一彦, 梅澤明弘, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀: 思春期早発症女兒2例におけるNMUR2機能低下多型の同定. 第19回日本生殖内分泌学会学術集会, 大阪, 2015年1月10日
- 54). 鈴木江莉奈, 泉陽子, 神崎晋, 八ツ賀秀一, 金城さおり, 五十嵐麻希, 中林一彦, 梅沢明弘, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀: 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症58例の網羅的遺伝子解析. 第19回日本生殖内分泌学会学術集会, 大阪, 2015年1月10日
- 55). Kagami M, Hayano K, Hosomich K, Fukami M, Ogata T, Inoue I: Methylome analysis of the 14q32.2 imprinted region in patients with imprinting defects on human chromosome 14. International Symposium on Genome Science 2015, 東京, 2015年1月20日
- 56). 深見真紀: 成長障害の遺伝子解析. 第13回東北成長フォーラム, 宮城, 2015年1月29日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 新生児消化管アレルギー児の腸内細菌のメタゲノム解析

研究分担者	松本 健治	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部
研究協力者	松田 明生	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部
	野村伊知郎	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部
	森田 英明	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部
	正田 哲雄	国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部

### 研究要旨

近年の研究から、腸内細菌叢が宿主の免疫系の成熟や特定のリンパ球の選択的な分化誘導に関わっていることが報告されている。たとえば、経口的に摂取した食物に対する免疫の不应答性（経口免疫寛容）は腸内細菌がないマウスでは誘導されないこと、腸内細菌を新生児期に一度除去すると、その後 IgE 抗体産生が亢進する、クロストリジウム属の細菌群が制御性 T 細胞の分化には必須である、ことなどが明らかとなっている。

小児期の食物アレルギーの 95%以上は、抗原特異的な IgE 抗体を介してマスト細胞や好塩基球を活性化することで症状が発現する、IgE 依存性食物アレルギーである。一方、ごく少数（東京都の全数調査による頻度は約 0.2%程度）ではあるが、IgE 抗体が全く検出されず、消化管のみに症状を呈する食物アレルギーを消化管アレルギーと呼ぶ。当研究部では、消化管アレルギーに着目して全国規模のオンライン患者登録システムを樹立し、これまでに約 500 症例を登録、解析を行ってきた。その結果、消化管アレルギーの一部の症例では、症状発現開始が生後 4 から 12 日であることを見いだした。これらの症例の感作は胎内での経胎盤感作が疑われるが、その証拠はまだ無い。また、これらの症例の腸内細菌叢の影響についても全く不明である。

本研究では、患児の便を採取し、日齢、分娩方法、栄養方法を一致させた対照児の便と共にメタゲノム解析を行う予定である。

### A. 研究目的

近年の研究から、腸内細菌叢が宿主の免疫系の成熟や特定のリンパ球の選択的な分化誘導に関わっていることが報告されている。たとえば、経口的に摂取した食物に対する免疫の不应答性（経口免疫寛容）は腸内細菌がないマウスでは誘導されないこと、腸内細菌を新生児期に一度除去すると、その後 IgE 抗体産生が亢進する、クロストリジウム属の細菌群が制御性 T 細胞の分化には必須である、ことなどが明らかとなっている。

小児期の食物アレルギーの 95%以上は、抗原特異的な IgE 抗体を介してマスト細胞や好塩基球を活性化することで症状が発現する、IgE 依存性食物アレルギーである。一方、ごく少数（東京都の全数調査による頻度は約 0.2%程度）ではあるが、IgE 抗体が全く検出されず、消化管のみに症状を呈する食物アレルギーを消化管アレルギーと呼ぶ。当研究部では、消化管アレルギーに着目して全国規模のオンライン患者登録システムを樹立し、これまでに約 500 症例を登録、解析を

行ってきた。その結果、消化管アレルギーの一部の症例では、症状発現開始が生後 4 から 12 日であることを見いだした。これらの症例の感作は胎内での経胎盤感作が疑われるが、その証拠はまだ無い。また、これらの症例の腸内細菌叢の影響についても全く不明である。患児の便を採取し、日齢、分娩方法、栄養方法を一致させた対照児の便と共にメタゲノム解析を行う予定である。

### B. 研究方法

国立成育医療研究センターを受診した新生児消化管アレルギー患児、および平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業））「新生児期から高年期まで対応した、好酸球性消化管疾患および稀少消化管持続炎症症候群の診断治療指針、検査治療法開発に関する研究（26070201）」で構築したオンライン患者登録システムに登録され、発症時の便を成育医療研究センターに送付された検体と、国立成育医療研究センターで出生し

た健常児を対象とする。

患児と対照児の便を採取して DNA を抽出し、便中の細菌叢のプロファイリングを、16S リボゾームの増幅・シーケンスしてメタゲノム解析を行う。対照は患児と日令、分娩方法（自然分娩・帝王切開）、栄養方法（母乳・人工乳）を一致させた便を比較して、腸内細菌の中で、患児と対照児を比較して、異なる細菌群を同定する。

### C. 研究結果

本研究に係わる倫理は既に「新生児、乳児消化管アレルギー（Food-Protein Induced Enterocolitis Syndrome ; N-FPIES）の診断検査法開発、病態解明に関する研究（受付番号 365）」班で承認を得ている。

本年度、患者検体を 30 検体、対照児を 400 検体収集した。来年度以降、順次 case-control の解析を行う予定である。

### D. 考察

消化管アレルギー患者および健常児の便の採取は順調に進んでおり、日令・分娩方法・栄養方法をマッチさせた検体を解析する予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Yano M, Imamura T, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu S, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Kawasaki H, Hori H, Kosaka Y, Kato K, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Matsumoto K, Kiyokawa N, Oda M, Sato A. An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with 2 overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014; 53(10):815-23.
- Watanabe-Takano H, Takano K, Sakamoto A, Matsumoto K, Tokuhisa T, Endo T, Hatano M. DA-Raf-dependent inhibition of the Ras-ERK signaling pathway in type 2 alveolar epithelial cells controls alveolar formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(22):E2291-300.
- Unno H, Futamura K, Morita H, Kojima R, Arae K, Nakae S, Ida H, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Silica and double-stranded RNA synergistically induce bronchial epithelial apoptosis and airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014.
- Shoda T, Futamura K, Kobayashi F, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Expression of thymus and activation-regulated chemokine (TARC) by human dermal cells, but not epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2014; 76(2):90-5.
- Matsumoto K, Saito H. Eczematous sensitization, a novel pathway for allergic sensitization, can occur in an early stage of eczema. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134(4):865-6.
- Matsumoto K, Izuhara K. The "long and winding road" to our goal of primary prevention of allergic diseases. *Allergol Int*. 2014; 63(1):1-2.
- Matsumoto K. [Antenatal exposure of several factors and development of allergic diseases in offspring]. *Alerugi*. 2014; 63(6):737-42.
- Masuzawa A, Kiyotani C, Osumi T, Shioda Y, Iijima K, Tomita O, Nakabayashi K, Oboki K, Yasuda K, Sakamoto H, Ichikawa H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Mori T. Poor responses to tyrosine kinase inhibitors in a child with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with SNX2-ABL1 chimeric transcript. *Eur J Haematol*. 2014; 92(3):263-7.
- Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, Iwaya K, Tsuda H, Nonoyama S, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. *PLoS ONE*. 2014; 9(1):e86106.
- Kobayashi K, Mitsui K, Ichikawa H, Nakabayashi K, Matsuoka M, Kojima Y, Takahashi H, Iijima K, Ootsubo K, Oboki K, Okita H, Yasuda K, Sakamoto H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Ohara A. ATF7IP as a novel PDGFRB fusion partner in acute lymphoblastic leukaemia in children. *Br J Haematol*. 2014; 165(6):836-41.
- Inage E, Kasakura K, Yashiro T, Suzuki R, Baba Y, Nakano N, Hara M, Tanabe A, Oboki K, Matsumoto K, Saito H, Niyonsaba F, Ohtsuka Y, Ogawa H, Okumura K, Shimizu T, Nishiyama C. Critical roles for PU.1, GATA1, and GATA2 in the expression of human Fc{varepsilon}RI on

- mast cells: PU.1 and GATA1 transactivate FCER1A, and GATA2 transactivates FCER1A and MS4A2. *J Immunol.* 2014; 192(8):3936-46.
12. Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 134(4):824-30 e6.
13. Ando T, Xiao W, Gao P, Namiranian S, Matsumoto K, Tomimori Y, Hong H, Yamashita H, Kimura M, Kashiwakura J, Hata TR, Izuhara K, Gurish MF, Roers A, Rafaels NM, Barnes KC, Jamora C, Kawakami Y, Kawakami T. Critical role for mast cell stat5 activity in skin inflammation. *Cell Rep.* 2014; 6(2):366-76.

## 2.学会発表

なし

## 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



分担研究課題

遺伝性眼疾患の遺伝子変異の検索

研究分担者 東 範行（国立成育医療研究センター 眼科医長 視覚科学研究室長）

研究要旨

次世代シーケンサを用いて、先天網膜変性における網膜変性関連遺伝子の解析を開始し、genotype-phenotype correlationを検討する予定である。また、視神経・硝子体形成異常の家系を解析し、候補遺伝子を絞り込んでいる。

A. 研究目的

眼科領域にはさまざまな遺伝性疾患があり、原因や機序が不明なものも多い。次世代シーケンサを用いて、これらの解析を行う。

B. 研究方法

1) 先天網膜変性の解析

Leber 先天黒内障を含む先天網膜変性の患者を集積し、詳細な臨床検査を行うとともに、ゲノム DNA を次世代シーケンサで解析する。

2) 視神経・硝子体形成異常の家系の解析

視神経形成異常と硝子体血管遺残を伴う大規模家系について、Agilent Sureselect Human All Exon V5 kit (21,000 の遺伝子)を用い、理研ジェネシスのプログラムで解析した。

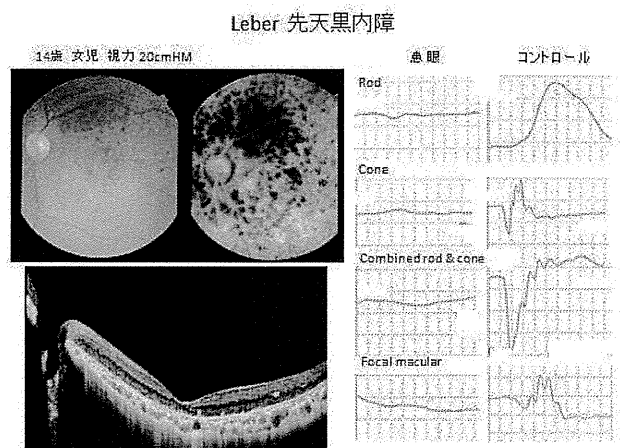
（倫理面への配慮）

解析対象疾患の遺伝子解析は、既に国立成育医療研究センター（受付番号 518 平成 24 年 8 月承認）倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) 先天網膜変性の解析

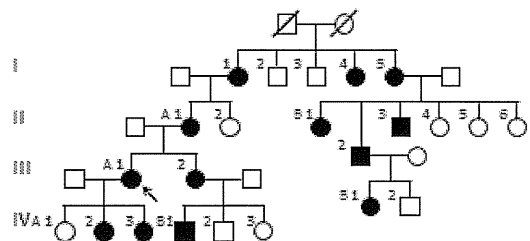
Leber 先天黒内障を含む先天網膜変性を 30 例以上集積し、蛍光眼底造影、光断層干渉計、網膜電図を含む詳細な臨床検査を行った。ゲノム DNA を集積し、既知の Leber 先天黒内障原因遺伝子 17、網膜色素変性症約 70 を含む網膜変性関連遺伝子につき、網羅的解析を始めた。



2) 視神経・硝子体形成異常の家系の解析

現在候補を絞り込み、PLXNB1 (receptor for SEMA4D, axon guidance)、GAB2(cytokine receptor 膜蛋白)、USP2 等が挙げられており、サンガー法を含めて検討、機能解析予定である。

視神経・硝子体形成異常の家系



D. 考察

眼は複雑な構造をした器官であり、原始的な動物でも 4,000 を超える形態形成遺伝子が関与していると言われている。網膜も多くの細胞から構成されているので、先天性の網膜、視神経、硝子体

異常は、さまざまな新規の疾患概念が含まれており、未知の原因遺伝子も多くあると推測される。現在、genotype と phenotype を詳細に調べる方法と、未知の遺伝子を検索する方法の両方から検討を行っており、遺伝性眼疾患において新たな概念が得られることが期待される。

3. その他  
なし

#### E. 結論

次世代シーケンサを用いて、先天網膜変性と視神経・硝子体形成異常の家系を解析している。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tanaka M, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Noda E, Ito M, Azuma N. Three Cases of rhegmatogenous retinal detachment associated with regressed retinoblastoma after conservative tumor therapy. *Reina Cases Brief Rep* 2014; in press
- 2) Yamane T, Yokoi T, Nakayama Y, Nishina S, Azuma N. Surgical outcomes of progressive tractional retinal detachment associated with familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 2014; in press.
- 3) Tanaka T, Yokoi T, Tamalu F, Watanabe S, Nishina S, Azuma N. Generation of retinal ganglion cells with functional axons from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2015 Feb 10;5:8344.

##### 2. 学会発表

- 1) 東 範行. 特別講演 小児の眼底が教えてくれること -疾患の理解から未来の医療へ-. 第 68 回日本臨床眼科学会 2014 11 14 神戸.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

網膜神経節細胞の作製方法. (特願 2014-230157)

##### 2. 実用新案登録

なし

## 分担研究課題

### 先天性免疫不全症の情報収集と解析

研究分担者 藤原成悦（国立成育医療研究センター研究所母児感染研究部 部長）  
研究分担者 小野寺雅史（国立成育医療研究センター研究所成育遺伝研究部 部長）

#### 研究要旨

慢性活動性EBウイルス（EBV）感染症（CAEBV）は原因不明の稀少疾患であり、遺伝的素因に基づく限局的な免疫不全によりEBV感染T細胞あるいはNK細胞の増殖が許容されることが根本原因であると考えられる。この遺伝的素因を解明するために9名の患者、18名の家族の合計27名の全エクソン配列解析を行い複数の背景遺伝子候補を同定した。候補遺伝子の1つの稀少variantのhomozygoteは野生型のhomozygoteと比較してオッズ比が5.58（95% confidence interval=1.58-20.5）であった。

#### A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス（EBV）感染症（CAEBV）は原因不明・予後不良の希少疾患である。EBV は通常 B 細胞に感染するが、本疾患では T 細胞あるいは NK 細胞に感染しその著明な増殖を誘発している。しかし、通常の伝染性単核症においても EBV 感染 T 細胞あるいは NK 細胞がしばしば認められることから、これらの細胞への感染自体がこの疾患に直結するのではなく、何らかの免疫異常により EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖が許されることが根本原因であると推測されている。実際に、本疾患では免疫能（主に NK 細胞と T 細胞の機能）に限局的な不全が認められている。また、EBV が感染した T 細胞・NK 細胞は B 細胞よりも抗原性が弱いことが知られている。地域内或いは家族内の流行が知られていないことや、度重なる解析によっても疾患特有のウイルス遺伝子型が見つからないことから、本疾患に特有のタイプの EBV が存在する可能性はきわめて低いと考えられる。患者の発生が日本、韓国、中国北部などの東アジアや中南米のネイティブアメリカンにほぼ限局されることは、CAEBV の発症に宿主の遺伝的素因が大きく関わることを示唆している。最近になり、分類不能型免疫不全症（common variable immunodeficiency (CVID)）の患者 199 名のうち 4

名が CAEBV と区別できない臨床像を呈することが報告され、遺伝子の異常による免疫不全が本疾患の発症につながりうることが確実となった。従って、CVID との合併症例以外の CAEBV 患者においても、何らかの遺伝子異常により限局的な免疫不全状態となり、EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖が許容されることが強く疑われる。以上よりエクソーム解析により原因遺伝子或いは背景遺伝子の解明が可能であると考えている。

#### B. 研究方法

##### 1. CAEBV 患者

CAEBV の診断は EB ウイルス感染症研究会が策定した診断指針によった。患者 8 名とその家族 19 名の合計 27 名から提供を受けた DNA を用いてエクソーム解析を行った。また、エクソーム解析により見出された候補遺伝子について、さらに 34 名の CAEBV 患者においてサンガー法による解析を行った。

##### 2. DNA 採取

CAEBV においては EBV 感染 T あるいは NK 細胞がモノクローナルあるいはオリゴクローナルに増殖しており、末梢血中にはこのような感染細胞が多数含まれている。これらの細胞は多数回の分裂を経ているためすでに体細胞変異を蓄積してい

る可能性が高い。体細胞変異の存在は発症の根本的原因となる germ line あるいは de novo 変異 (variation) の検出を困難にすると考えられるため、本研究では唾液から Oragene DNA 採取キットを用いて抽出した DNA を用いた。また、継続的な DNA 使用を可能とするため末梢血から EBV によるリンパ芽球様細胞株を樹立した。

### 3. 全エクソン配列解析

全エクソン領域のライブラリー作成には Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 キットを用いた。エクソン部分の配列解析は illumina 社 HiSeq 1000 を用いた。得られた配列データをアラインメントプログラム BWA によりヒトゲノム配列 hg19 上に位置づけ、Genome analysis toolkit (GATK) などにより 1,000 ゲノムプロジェクト、dbSNP、HapMap、in house database などのデータと照合し、変異を検出した。検出された変異については、SIFT や PolyPhen2 等のプログラムにより、その変異が蛋白質機能に与える影響を推定した。(倫理面への配慮)

全エクソン配列解析は「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に則って行われた。研究計画書は国立成育医療研究センターおよび DNA 採取機関の倫理審査委員会により承認されている。患者本人あるいは保護者に対して本研究に関する十分な説明を文書と口頭で行い、同意書への自由意思による署名を得ることでインフォームドコンセントとした。試料、DNA 配列データおよび臨床情報は匿名化され、患者の個人情報 は厳重に管理された。血液の提供を受ける場合は、通常の診療に必要とされる採血の際に研究に用いる分を同時に採取することにより、針刺しによる苦痛の軽減を図った。

### C. 研究結果

CAEBV 患者 8 名、家族 19 名の計 27 名の全エクソン配列解析を完了した。1 名の患者において免疫関連遺伝子 A の蛋白質コード領域に non-synonymous な稀少 variation が homozygous の状態で検出された。この variant ではコードさ

れる蛋白質の機能が大きく変化していることが、解析プログラムにより推測された。この variation を他の 34 名の患者で Sanger 法により解析したところ、さらに 2 名が homozygous な variation を有していた。この variation の homozygote の野生型 homozygote に対するオッズ比は 5.58 (95% confidence interval=1.58-20.5) と算定された。

### D. 考察

遺伝子 A は CAEBV の有力な原因 (背景) 遺伝子候補と考えられる。現在この variant がコードする蛋白質の機能解析を行っている。

CAEBV は、発症年齢、進行のスピード、合併症の有無とその種類などについてきわめて多様性に富んでいる。従って、この疾患の原因遺伝子は複数存在する可能性が高い (genetic heterogeneity)。また、de novo 変異が関わる可能性や、複数の遺伝子や環境因子も関与する多因子疾患である可能性も否定はできない。今後エクソーム解析の対象患者数を増やし、さらに原因 (背景) 遺伝子の同定を進める計画である。

### E. 結論

CAEBV 患者の全エクソン配列解析により、オッズ比 5.58 (95% confidence interval=1.58-20.5) の背景遺伝子候補を同定した。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Yoshimori M, Imadome KI, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus infection through LMP1 in T or NK cells and mediates survival promoting signals. PLoS ONE, 2014 Nov 19;9(11):e112564.

- 2) Fukuda A, Imadome K-I, Sakamoto S, Shigeta T, Uchida H, Matsunami M, Sasaki K, Kanazawa H, Kawano F, Nakazawa A, Fujiwara S, and Kasahara M. Evaluation of the Immune Function Assay in Pediatric Living Donor Liver Transplantation. *Pediatr Transplant*. 2014 Nov 23. doi: 10.1111/ptr.12402. [Epub ahead of print]
- 3) Siddiquey MN, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome KI, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2014; 105(6):713-22.
- 4) Liao H, Lee J-H, Kondo R, Katata M, Imadome K, Miyado K, Inoue N, Fujiwara S, and Nakamura H. The Highly conserved HCMV UL136 ORF generates multiple Golgi-localizing protein isoforms through differential translation initiation. *Virus Res* 179: 241-246, 2014.
- 5) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama, E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr Int*, 56:159-66. 2014.
- 6) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr virus infection and pathogenesis in humanized mice. *Immune Network* 14: 1-6, 2014.
- 7) Fujiwara S, Imadome K, and Takei M. Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp Mol Med* 47, e136; doi:10.1038/emm.2014.102 Published online 23 January 2015.
- 8) Matsuda G, Imadome K-I, Kawano F, Mochizuki M, Ochiai N, Morio T, Shimizu N, and Fujiwara S. Cellular immunotherapy with ex vivo expanded cord blood T cells in a humanized mouse model of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Immunotherapy*, 2015, in press.
- 9) Jinta M, Imadome K, Komatsu H, Yoshimori M, Kurata M, Fujiwara S, Miura O, Arai A. L-Asparaginase monotherapy for EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases: A pilot Study. *Journal of Medical and Dental Sciences*. 2015 in press.
2. 学会発表
- 1) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the evaluation of novel therapies. 16th International Symposium on EBV and Associated Diseases. Brisbane, 16-19 July, 2014.
- 2) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
- 3) Liao H, Lee J-H, Kondo R, Katata M, Imadome K, Miyado K, Inoue N, Fujiwara S, Nakamura H. The highly conserved human cytomegalovirus UL136 ORF generates multiple Golgi-likalizing protein isoforms through differential translation initiation. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
- 4) Siddiquey M, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome K, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer-cell lymphoma. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
- 5) Nagasawa Y, Natsumi I, Nozaki T, Inomata H, Imadome K-I, Iwata M, Kitamura N, Fujiwara S, Takei M. Human Osteoclasts are Mobilized in Erosive Arthritis of Epstein-Barr Virus-infected Humanized NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$  null Mice. American College of Rheumatology Annual meeting, Boston, November 14-19, 2014.

6) Komatsu H, Imadome K-I, Shibayama H, Yada T, Yamada M, Yamamoto K, Koyama T, Fujiwara S, Miura O, Arai A. STAT3 is activated by EBV in EBV-T/NK-LPDs leading to development of the disorders. December 6, 2014, American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, CA, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 分担研究課題

### 胆道閉鎖症、細胞医療に用いる細胞の安全性評価

研究分担者 田上昭人（国立成育医療研究センター薬剤治療研究部 部長）

#### 研究要旨

胆道閉鎖症の病因解明を目的に、胆道閉鎖症特異的遺伝子発現プロファイルを検討するため、胆道閉鎖症、先天性代謝性肝疾患、健常肝移植ドナー余剰肝における遺伝子発現をマイクロアレイにて解析し、各群における遺伝子発現動態を比較した。その結果、胆道閉鎖症特異的に発現が変動している遺伝子230個を見出した。さらに、胆道閉鎖症において肝移植時年齢と遺伝子発現動態が相関することを見出した。肝移植時年齢が1歳以下の胆道閉鎖症患者で特異的に発現動態が異なる5遺伝子を同定した。また、DNAメチル化異常と胆管細胞死との関連を検討し、DNAメチル化の異常が胆管細胞死を惹起する可能性を見出した。

行った。

#### A. 研究目的

胆道閉鎖症においては最終的に肝移植が唯一の治療法である。我が国の肝移植手術の特殊性として、大多数が両親などの近親者を臓器提供者とする生体部分肝移植であり、必然的にドナーのリスクも伴う。したがって、胆道閉鎖症患者の治療、QOLの向上はもちろん、移植による健常ドナーへのリスク回避の観点からも、肝移植に依らない胆道閉鎖症の治療法の開発が求められており、治療法開発のための胆道閉鎖症の発症、病態進行機序の解明が必要である。

本研究の目的は、治療法開発につながる、胆道閉鎖症の病因、病態進行機構を明らかにすることにある。さらに、胆道閉鎖症の肝移植に依らない治療法として、細胞移植療法の安全性を検討する。本年度は特に、胆道閉鎖症特異的に発現変動し、胆道閉鎖症の病因・病態進行と関連する遺伝子の同定のため、胆道閉鎖症および代謝性疾患を対象とした生体肝移植により摘出されるドナー余剰肝およびレシピエント疾患肝での遺伝子発現変動を比較し、胆道閉鎖症特異的に発現変動している遺伝子を見出すことを目的とした。また、胆管閉塞の分子機序の解明を目指し、胆管細胞におけるDNAメチル化変動と細胞死について検討を

#### B. 研究方法

①胆道閉鎖症（10症例、年齢5か月～34歳）、代謝性肝疾患（9症例、年齢6か月～17歳）、生体肝移植健常ドナー肝（8症例、年齢21歳～39歳）の摘出肝（移植・病理検査等に用いない廃棄予定の組織片）よりtotal RNAを抽出し、Agilent Expression Array（SuperPrint G3 Human GE 8X60K Microarray）にてmRNA発現を検出した。得られた結果を用いて主成分分析を行い、各群における遺伝子発現動態がそれぞれの群に特異的であることを確認した。さらに、群間比較を行い、胆道閉鎖症特異的に発現の変動が認められるプローブを抽出した。同時に、胆道閉鎖症群の中で特に肝移植時年齢が1歳以下の群で特異的に発現変動が認められる遺伝子を抽出した。

②これまでの報告から、胆道閉鎖症とDNAメチル化異常との関連が指摘されていることから、培養胆管細胞にDNAメチル化阻害剤を添加し、胆管細胞死について検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究実施においては、対象患者個人のプライバシーをはじめと人権擁護を最優先とし、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセント

およびアセント)を徹底した。採取された肝組織を本研究に用いることは、国立成育医療研究センターの倫理審査委員会にて承認を得ている(「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・培養・保存」(受付番号 385 平成 21 年 12 月 8 日承認))。提供して頂く組織は、生体肝移植手術を行った方から提供されるものであり、通常は医療廃棄物として廃棄される組織である。国立成育医療研究センター研究所薬剤治療研究部においては、連結不可能匿名化され管理番号のみ附された検体を受け入れた。本研究は、平成 10 年厚生科学審議会答申が定める「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」に従い研究を遂行した。また遺伝子解析研究においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。

### C. 研究結果

①胆道閉鎖症、代謝性肝疾患、生体肝移植健常ドナー肝の遺伝子発現を比較し、有意に発現変動していた 6,987 プローブを用いて、主成分分析を行った。各群が明確に分離しており、今回用いた検体により、各群間の正確な遺伝子発現比較分析が可能であると判断された。また、胆道閉鎖症においては患者年齢(肝移植時年齢)順に遺伝子発現プロファイルが配列していることが判明した(図 1)。

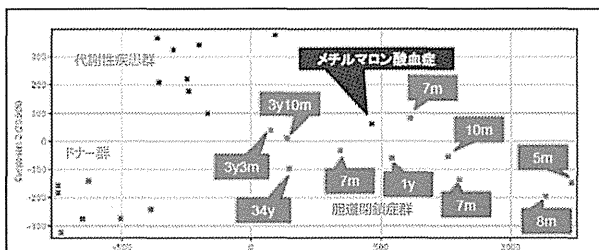


図 1 胆道閉鎖症・代謝性疾患・健常ドナー間における遺伝子発現の有意差検定を用いた主成分分析(赤;胆道閉鎖症、茶;代謝性肝疾患、青;健常ドナー)

胆道閉鎖症群において、肝移植時年齢に相関して特異的に発現変動する遺伝子を同定するため、肝移植時年齢が 3 歳以上の群と 1 歳以下の群での

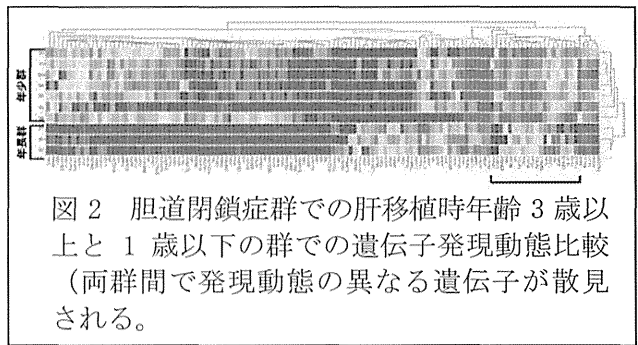


図 2 胆道閉鎖症群での肝移植時年齢 3 歳以上と 1 歳以下の群での遺伝子発現動態比較(両群間で発現動態の異なる遺伝子が散見される。)

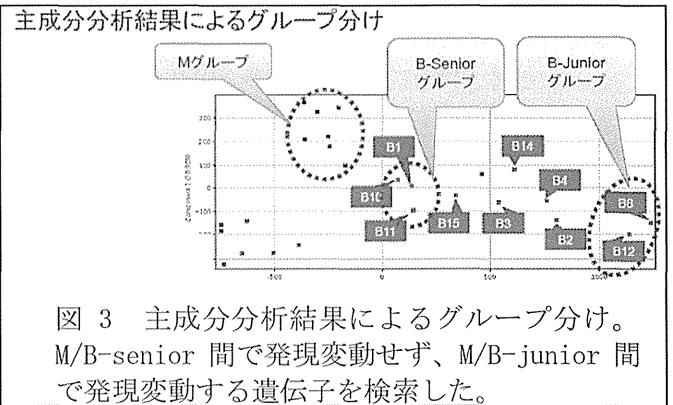


図 3 主成分分析結果によるグループ分け。M/B-senior 間で発現変動せず、M/B-junior 間で発現変動する遺伝子を探索した。

遺伝子発現を比較した(図 2)。同時に、今回行った主成分分析において、胆道閉鎖症群内で最も遺伝子発現動態の異なる 2 グループ間(B-junior(低年齢群)/B-senior(高年齢群))での遺伝子発現を比較した。さらに胆道閉鎖症群においてより肝移植時年齢に遺伝子発現動態を検出するため、代謝性疾患群(M)との遺伝子発現変動を比較し、M/B-senior 間では発現変動せず、M/B-junior 間で発現変動する遺伝子を探索した(図 3)。その結果、胆道閉鎖症群において移植時年齢が 3 歳以上の群と 1 歳以下の群との間で特異的に遺伝子発現動態が異なり、かつ代謝性疾患群と B-senior 群では発現変動せず、代謝性疾患群と B-junior 群間で特異的に発現変動する遺伝子として表 1 に示す 5 遺伝子を同定した。

②ヒト胆管癌由来細胞株を用いて、DNA メチル化阻害とヒト胆管細胞死との関連を検討した。DNA メチル化阻害剤は胆管細胞に対して、細胞死の誘導を示した。DNA メチル化阻害剤により胆管細胞の DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT)発現は低下し、両細胞の DNA メチル化状態に変化が認められた。また、siRNA による DNMT1 の発現抑制は両細胞において細胞死を惹起した。これらの結果から、DNMT の抑制は DNA の脱メチル化を介し



て、胆管細胞死を惹起すると考えられた。

表 1 胆道閉鎖症において肝移植移植時年齢が低い患児で特異的に発現している遺伝子

GeneSymbol	Molecular function	Fold change
SPP1	Cell adhesion molecule activity	10.7
CFTR	Auxiliary transport protein activity	8.9
EPS8L1	Molecular function unknown	7.8
TESC	Calcium ion binding	5.63
DMKN	Cytokine activity	4.8

#### D. 考察

①本検討により胆道閉鎖症特異的に発現変動が見られ、さらに肝移植時の年齢が低い患児において特異的に発現が亢進している遺伝子として、5 遺伝子を同定した。

SSP1 はオステオポンチン (Osteopontin : OPN) をコードする遺伝子であり、OPN は分子量約 32 kDa のポリペプチドを骨格に持つ分泌型の糖タンパク質である。OPN がトロンピンで切断されると、N 端側の開裂部位は  $\alpha 9$ 、 $\alpha 4$  等のインテグリンとの結合部位と結合し、好中球の遊走または炎症細胞の侵入に関与することが報告されている。これまでも胆道閉鎖症患者の血中 OPN レベルが増加していると報告されており、本検討はこれまでの知見を支持するものであった。また、OPN 発現の亢進は、炎症細胞の侵入と関連して、肝内胆管閉塞や肝病変を生じる可能性が考えられる。

CFTR 遺伝子は、第 7 染色体 (7q31) に局在し 27 のエクソンをもつ 250kb の遺伝子である。これに由来する CFTR タンパクはアミノ酸 1,480 個からなる 12 回細胞膜貫通型の糖タンパクで、6 個の疎水性膜貫通構造と 2 個の ATP 結合部 (NBD)

および PKA によるリン酸化を受ける調節 (R) ドメインの繰り返しモチーフからなる。CFTR の最も重要な機能は cAMP 依存性の Cl<sup>-</sup>チャンネルとしての機能であり、cAMP 依存性 PKA による R ドメインのリン酸化の後、NBD に ATP が結合してチャンネルが活性化されることでチャンネルが開口して Cl<sup>-</sup>の排泄が起こる。この他にも、外向き整流性 Cl<sup>-</sup>チャンネル (ORCC) などの他のチャンネルの制御能があることが知られている。

肝内において CFTR は肝内胆管上皮細胞に発現しており、ラット胆管結索モデルにおいて、肝内肝上皮細胞における CFTR 発現亢進が示されている。上述のように CFTR は多くの機能を持つたんぱく質であり、CFTR 発現の亢進は、細胞内外の環境を変化させるとともに、他の膜タンパク質やチャンネルタンパク質の機能制御に寄与し、肝硬変といった肝病変を生じる細胞内シグナルを惹起している可能性が考えられる。

今後の上述の 5 遺伝子の発現亢進と肝内胆管閉塞・肝硬変との関連を検討するとともに、これら 5 遺伝子を中心として遺伝子解析研究を進めることにより、胆道閉鎖症の病因・病態進行機構の解明を目指す。

②本研究により、DNA メチル化の異常は胆管細胞死を惹起することが示唆された。胆道閉鎖症の病因は未だ不明であり、肝外胆管閉塞の機序は明らかになっていない。これまでに、ゼブラフィッシュへの DNA メチル化阻害剤投与は胆道閉鎖に類似した病変を惹起することが報告されており、本研究と合わせて、胆道閉鎖症発症と DNA メチル化異常が関連する可能性が示唆された。

今後、胆道閉鎖症における DNA メチル化変動の検討を行い、DNA メチル化異常と胆道閉鎖症との関連を検討する。

#### E. 結論

本年度の本研究により得られた成果は複数の遺伝子が胆道閉鎖症特異的な発現変動を示し、胆道閉鎖症の発症・病態進行に関与している可能性を示す。また、DNA のメチル化といったエピジェ

ネットィックな遺伝子発現制御の異常と胆道閉鎖症との関連が示唆された。これまでに本研究者のグループによる胆道閉鎖症由来肝細胞のマウス移植実験により、胆道閉鎖症においては早期の葛西術により胆汁うっ滞性肝硬変への進行を抑制し、また肝内胆管の病変を抑制できれば、自己の肝細胞により肝機能を維持することが可能であることが示唆されており、本研究成果を基に、肝内胆管病変の抑制療法を検討することが重要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nakamura K, Nakabayashi K, Kyaw Htet Aung, Aizawa K, Hori N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A. DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces human cholangiocarcinoma cell death through alteration of DNA methylation status. PLOS ONE, 2015, in press.

##### 2. 学会発表

1) 中村和昭、中林一彦、Kyaw Htet Aung、秦健一郎、田上昭人、DNA メチル化阻害剤ゼブラリンのヒト胆管癌細胞に対する抗腫瘍活性、第 37 回日本分子生物学会

#### 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

分担研究課題

**難治性・先天性皮膚疾患に関する全エクソーム解析**

研究分担者 新関寛徳（国立成育医療研究センター皮膚科 医長）  
研究協力者 久保亮治（慶應義塾大学医学部皮膚科 講師）  
佐々木貴史（慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター 講師）

研究要旨

難治性・先天性皮膚疾患の診断と新規疾患の探索を目的に、ゲノムDNAの集積と遺伝子診断を行った。230例（113家系）のゲノムDNAを集積し、53例（49家系）についてカスタムメイドのエクソームシーケンシングまたはTaqMan解析を行い、既知の原因遺伝子がみつかったのは、31例（27家系）（55%）であった。診断率については昨年度との比較や、他の分野との比較が今後の課題である。また、新規疾患を疑い全エクソームシーケンシングを行った症例は39例（26家系）であった。昨年度までのシーケンシングデータも合わせてゲノムインフォマティクス解析を行い、現在までに3つの新規疾患／原因遺伝子候補を同定し、解析中である。

A. 研究目的

難治性・先天性皮膚疾患の正確な診断目的に各種遺伝子診断を行う。また、原因遺伝子未知の疾患の場合や、既知の原因遺伝子に変異を認めない場合は、全エクソームシーケンシングを行い、新規疾患／新規原因遺伝子を探索する。

B. 研究方法

慶應義塾大学医学部皮膚科（久保亮治）が症例集積をおこなった。下記の11施設より症例の紹介もしくは検体の提供を受けた。Agilent社のHaloplex法を用いて、既知の遺伝性皮膚疾患の原因遺伝子546種についてカスタムメイドエクソームシーケンシングを行った。

（協力施設名）

東邦大学皮膚科、四国子どもとおとなの医療センター、岡山大学皮膚科、京都大学皮膚科、東京医科大学皮膚科、群馬大学皮膚科、高知大学皮膚科、琉球大学皮膚科、近畿大学皮膚科、産業医科大学皮膚科、国立成育医療研究センター皮膚科

（倫理面への配慮）

国立成育医療研究センターおよび慶應義塾大学医学部において倫理審査による承認を得た。

C. 研究結果

既知の遺伝性皮膚疾患の原因遺伝子546種について、カスタムメイドエクソームシーケンシングによる網羅的な遺伝子変異検索手法を確立した。また、先天性・遺伝性疾患が疑われる230例（113家系）について、ゲノムDNAを採取し集積した。

① 遺伝子解析を行った症例数

カスタムメイドエクソームシーケンシング：  
36例（36家系）

TaqManプローブによる遺伝子診断：  
17例（13家系）

全エクソーム解析：39例（26家系）  
解析総数：86例（73家系）

② 診断のついた症例数（既知の遺伝子）

ハロプレックス解析：14例（14家系）

TaqMan解析：17例（13家系）

エクソーム解析：現在解析中。

確定診断総数：31例（27家系）

③ 診断のついた診断名リスト

ADAR変異による遺伝性対側性色素異常症（遠山）  
MC1R変異による多発性雀卵斑  
TSC1変異によるMultiple Fibrous papules of the nose  
OCA2変異による眼皮膚白皮症 2型  
CYP4F22変異による非水疱性魚鱗癬様紅皮症  
COL7A1変異による栄養障害型先天性表皮水疱症  
KRT5変異による単純型表皮水疱症  
KRT5変異による色素異常を伴う単純型表皮水疱症

KRT14変異による単純型表皮水疱症  
NF1変異による神経線維腫症  
KRT1変異による掌蹠角化症  
ATP2A2変異によるダリエ病  
COL17A1変異による接合部型先天性表皮水疱症  
SERPINB7変異による長島型掌蹠角化症  
FLG変異による尋常性魚鱗癬  
LMX1B変異によるNail Patella症候群

#### ④ 新規原因遺伝子候補を同定したもの

H26年度に全エクソームシーケンシングをおこなったものは現在解析中である。

H25年度までに全エクソームシーケンシングをおこなったものについて、H26年度にゲノムインフォマティクス解析をおこない、以下の3疾患において新規原因遺伝子候補を同定している。

- ・新規の掌蹠角化症：  
（新規の表皮細胞間接着分子）
- ・新規の非進行性の対称性紅斑角化症：  
（細胞内トランスポーター）
- ・新規の早老症／mosaic variegated aneuploidy症候群：（細胞分裂チェックポイント分子）

#### ⑤ 診断保留症例数

診断保留症例数：55例（46家系）

#### D. 考察

我々は、既知の遺伝性皮膚疾患の原因遺伝子546種についてカスタムメイドエクソームシーケンシングを行っている。特に、遺伝的多様性のある疾患や、原因遺伝子が巨大で通常のSangerシーケンシングでは解析が非常に困難な症例を対

象として実施しており、今年度は36例中14例（39%）において遺伝子診断を確定することができ、逆に3例について遺伝性疾患を否定することができた。診断確定率39%が妥当であるかどうかは、今後の年度ごとの比較や、他の疾患分野との比較、他施設での皮膚科学分野での実績との比較を行なうことで可能であるので来年以降の課題としたい。

#### E. 結論

遺伝的多様性に富む疾患や、原因遺伝子が巨大な疾患の遺伝子診断は、シーケンシングの困難さのために臨床の場でおこなうことがこれまで困難であった。カスタムメイドエクソームシーケンシングによる遺伝子診断法は、これらの疾患の遺伝子診断に有用であることが示された。また、原因遺伝子未知の疾患について全エクソームシーケンシングを行い、3つの新規原因遺伝子候補を同定しており、現在解析中である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Takeshita M, Hirakiyama A, Okuyama T, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J: The novel *SLCO2A1* heterozygous missense mutation p.E427K and nonsense mutation p.R603\* in a female patient with pachydermoperiostosis with an atypical phenotype. *Br J Dermatol* 2014;170(5):1187-9.

2) Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Kosaki K, Ogo A, Yamada T, Miyasaka M, Matsuoka K, Hirakiyama A, Okuyama T, Matsuda M, Nakabayashi K, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J: The complete type of pachydermoperiostosis: A novel nonsense mutation p.E141\* of the *SLCO2A1* gene. *J Dermatol Sci.* 2014;75(3):193-5.