

「乳幼児突然死症候群(SIDS)および乳幼児突発性危急事態(ALTE)の  
病態解明等と死亡数減少のための研究」

平成 26 年度～28 年度 分担研究報告書

研究課題：乳幼児の突然死に対する網羅的遺伝子解析

研究分担者：山本琢磨（長崎大学大学院医歯薬総合研究科法医学分野）

研究要旨

我々は代謝疾患・心臓不整脈疾患の観点から乳幼児突然死を解析してきた。

初年度は、ミトコンドリア異常症について検討した。過去に、ミトコンドリア呼吸鎖異常症と思われる症例を見出した。しかし、酵素活性についての検討は不十分であり、死後変化か否かについては検討できていなかった。本研究により、心臓・肝臓の酵素活性は死後には不安定であることが示唆され、酵素活性のみならず遺伝子解析までも含めた検討が必要であることが考えられた。

次に、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の観点から検討した。突然死は幅広い疾患の集合体であるが故、単一遺伝子解析ではなく多数の遺伝子を網羅的に解析することが必要であり、この手法により従来の方法では診断困難であった代謝疾患による突然死を診断し得た。

最終年度には、突然死本人のみならず家族解析を行った。遺伝子異常が存在する場合、単に変異を持つことが病気であることにはならず、さらにその意義まで踏み込んで検索してこそ意味のあるものとなると考える。

平成 26 年度

#### A. 研究目的

過去に我々はミトコンドリア呼吸鎖異常症の観点から乳幼児突然死を解析し、線維芽細胞を用いた **Metabolic autopsy** を用いミトコンドリア呼吸鎖異常症と思われる症例を見出した。また、心臓・肝臓の酵素活性が、突然死症例において低下していることも報告したが、死後変化か否かについては検討できていなかった。

#### B. 研究方法

長崎大学の倫理委員会の承認を得て、当教室で解剖された成人症例(ミトコンドリア異常症の既往のないもの、および肉眼的に同疾患を疑わせないもの) 10 例を検討した。心臓を解剖時ただちに凍結保存し、既報に基づきミトコンドリア呼吸鎖酵素活性を測定した。推定死後経過時間と酵素活性との関連を検討した。

#### C. 研究結果

推定死後経過時間は約 8 時間から 48 時間であった。ミトコンドリア呼吸鎖の各複合体の酵素活性の CS 比は **Figure 1** の通りであった。

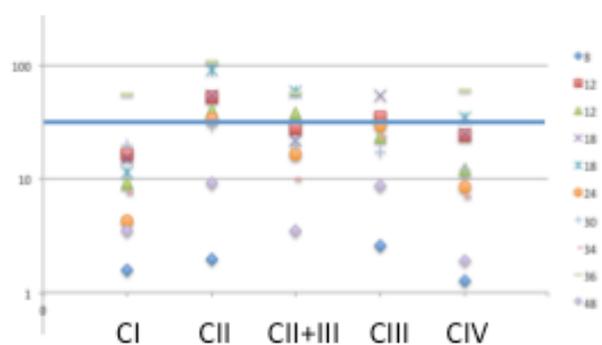
#### D. 考察

近年、法医学領域・救急領域では、死後画像検査をはじめ、様々な死後の解析が新たに行われてきている。乳幼児突然死に対しても **Metabolic autopsy** の手法が浸透し、死後に代謝疾患を診断・除外することが広まっている。

救急外来等で行われる死後早期の検体採取ならまだしも、解剖時の採取では死後ある程度の時間が経過してしまい、死後変化の問題が常につきまとう。しかし、死後変化を詳細に検討した報告はこれまでのところ見当たらない。

今回我々は、非ミトコンドリア病における心臓の死後の呼吸鎖酵素活性測定を行った。**Figure 1** に示すように、死後経過非依存的に、大半の症例で呼吸鎖酵素活性の低下が認められた。従って、乳幼児突然死症例において低下していた呼吸鎖酵素活性測定は必ずしも生前の状態を反映しているとは限らないことが考えられた。

培養線維芽細胞で低下している症例は、生前より低下していると思われ、死後の解析を行う際には必ず線維芽細胞を採取・利用することが望まれる。また、生体の解析の際にも、採取後早期の凍結保存・迅速な輸送体制といった検体の取り扱いには十分な注意が必要である。



**Figure 1**

#### F. 健康危険情報

なし

平成 27 年度

### A. 研究目的

近年、Metabolic autopsy の概念が広まり、突然死症例に応用されることで、脂肪酸代謝異常症をはじめとした代謝疾患が乳幼児突然死の原因の一つを占めることが知られている。代謝疾患は早期の発見・的確な治療により治療可能なことも多いため、残された同胞のためにも適切な診断が望まれる。

我々もこれまでに乳幼児突然死と代謝疾患について検討し、脂肪酸代謝異常症やミトコンドリア呼吸鎖異常症の症例を見いだした。しかし、症状からある程度候補疾患が絞り込める臨床患者とは異なり、突然死症例は症状や所見に乏しいため候補疾患が絞り込めず、網羅的な解析が必要となる。

近年、次世代シーケンサーの登場により短時間・低労力で多くの遺伝子を一斉に解析することが可能になってきた。今回我々は過去の突然死症例に対し、次世代シーケンサーを用いた代謝疾患関連遺伝子解析を行った。

### B. 研究方法

乳幼児突然死 49 例に対し、TrueSeq custom amplicon (Illumina) 及び HaloPlex Target Enrichment System (Agilent Technologies)により脂肪酸代謝疾患関連遺伝子を対象(表 1)に、ターゲットシーケンス (Illumina, Miseq) を行った。

また、2 カ所のヘテロ接合変異が見いだ

された症例に対しては、家族解析あるいはサブクローニングを行うことで複合ヘテロ接合か否かを確認した。

なお、本研究は長崎大学の倫理委員会の承諾を得て行った。

表 1：対象遺伝子

Gene	Exon	Disease
<i>SLC22A5</i>	10	Primary carnitine deficiency
<i>CPT1A</i>	19	CPT I deficiency
<i>CPT2</i>	5	CPT II deficiency
<i>SLC25A20</i>	9	CACT deficiency
<i>ACADVL</i>	20	VLCAD deficiency
<i>ACADM</i>	12	MCAD deficiency
<i>ACADS</i>	10	SCAD deficiency
<i>HADHA</i>	20	LCHAD, MTP deficiency
<i>HADHB</i>	16	MTP, LCKAT deficiency
<i>HADH</i>	8	HAD deficiency
<i>ETFA</i>	12	
<i>ETFB</i>	6	MAD deficiency
<i>ETFDH</i>	13	

### C. 研究結果

49 例中 1 例に *CPT2* 遺伝子、1 例に *ACADVL* 遺伝子の複合ヘテロ接合が認められた。また、*SLC22A5*, *ACADS* の各遺伝子に 2 例ずつ、*CPT2*, *ETFA*, *ACADM*, *HADHA* の各遺伝子にそれぞれ 1 例ずつ Heterozygous 変異が認められた。病理組

織検査や代謝産物測定をあわせ 1 例は CPT II 欠損症と確定診断した。また、家族内検索を行い、本児のきょうだいには遺伝子異常は認められなかったことを確認し、次子の妊孕の際には遺伝カウンセリングを受けることができるようにした。もう 1 例は VLCAD 欠損症の可能性が高いと考えられた。代謝疾患の多くは劣性遺伝形式であり、残りの症例は Heterozygous 変異のため、確定診断には至らなかったが、代謝経路に何らかの影響を及ぼした可能性は考えられた。

表 2：検出結果

Gene	Case	Variant	
<i>ACADVL</i>	1m M	G546R	C607S
<i>CPT2</i>	11m F	F323fs	V605L

#### D. 考察

これまでの研究・診断では、代謝産物解析によってある程度の疾患を絞り込み、遺伝子変異をサンガー法で確認していた。しかし、この方法では、代謝産物の死後変化により偽陽性・偽陰性が生じ、遺伝子変異と対応しないことも多く見られた。また、該当疾患が絞り込めた場合でも遺伝子によってはエクソンが長大なものもあり、サンガー法で一つ一つ確認するのは現実的ではなかった。

近年、次世代シーケンサーの登場とともに、短時間で多くの遺伝子を一斉に解析することが可能になった。症状からある程度疾患を絞り込める臨床患者とは異なり、突然死症例は症状・所見に乏しく網羅的解析が必要であったため、次世代シーケンサーは突然死症例の解析に最適であると考えられる。

また、本法を応用し診断できたことで、

1 例は家族内検索を行い、遺伝情報を還元することができた。一方でもう 1 例は遺伝子情報を還元することができなかった。死後早期の家族への説明・同意取得が大切であり、悔やまれる症例であった。

このように、代謝疾患は乳幼児突然死の中心を占める疾患ではないのかもしれない。しかし、的確に診断することで家族内解析や発症予防も可能であり、見逃すことは出来ない。助かる命を救うためにも、このような疾患を見逃さずに拾い上げる試みが必要であると考えられる。

次世代シーケンサーによる遺伝子解析により、少なくとも 2 例の脂肪酸代謝異常症による突然死を診断した。遺伝性疾患では、同胞や次子の早期発見・発症前診断につながるため、死因を的確に診断することが肝要である。本研究を進めることで得られる成果により、避けられる死があることを提唱したい。

#### F. 健康危険情報

なし

平成 28 年度

### A.研究目的

我々はこれまでに、代謝疾患、とくに脂肪酸代謝異常症・ミトコンドリア呼吸鎖異常症の観点から乳幼児突然死を解析してきた<sup>1)2)</sup>。なかでも遺伝子変異に着目し、遺伝子解析を行うことで初めて確定診断できた症例を多々経験した。近年は次世代シーケンサーを活用した網羅的一括遺伝子解析を行い、乳幼児突然死における遺伝子変異を報告してきた<sup>3)</sup>。

一方、次世代シーケンサーの登場によって、多くの症例に多数の遺伝子変異が検出されるようになった。それに伴い、単に「変異がある」ことが「死因」となりうるわけではないことも多々報告されてきた。

今回、乳幼児突然死における遺伝子解析を行ううえで、突然死症例だけでなくその家族の遺伝子解析もあわせて行うことで、疾患原因となりうる変異の有無を検討した。

### B.対象と方法

長崎大学法医学教室で行われた乳幼児突然死の解剖症例で、家族内解析の同意が得られた 4 例を対象とした(表 1)。

表 1：対象症例

Case	Sex	Age
1	Female	3 month
2	Male	5 month
3	Female	3 month
4	Female	3 month

解剖時あるいは解剖後に家族へ口頭で説明、文書にて同意を得た。突然死症例は解剖時に採取した血液より、両親は口腔内細胞より遺伝子を抽出し、次世代シーケンサー(Miseq, Illumina)を用い、網羅的遺伝子解析を行った。(Case2 は家族の次世代解析実施できず)

対象遺伝子は、代謝疾患・不整脈疾患をはじめ、既知疾患関連遺伝子約 5000 遺伝子 (Illumina, Trusight One パネル)とした。

解析は Illumina 社 Variant studio を用い、検出された変異はサンガー法を用いて確認した。

なお、本研究は長崎大学の倫理委員会の承諾を得て行った。

### C.研究結果

約 5000 遺伝子の遺伝子解析を行ったところ、1 症例あたり総変異数 7768 カ所、Indel 数 372 カ所が検出された。

家族の遺伝子解析をあわせて行ったところ、1 症例あたり de novo 変異 74 遺伝子、劣性遺伝疾患変異 25 遺伝子が認められた。

心臓不整脈疾患関連遺伝子では、Case1 に *KCNH2* 遺伝子・*KCNE1* 遺伝子の変異、Case2 に *KCNQ1* 遺伝子・*KCNE3* 遺伝子の変異が認められた(表 2)。

表 2：検出遺伝子変異

Case	Gene	Heredity
1	<i>KCNH2</i>	Maternal
1	<i>KCNE1</i>	Maternal
2	<i>KCNQ1</i>	Both
2	<i>KCNE3</i>	Maternal

代謝疾患関連遺伝子変異は認められなかった。

心臓不整脈疾患関連変異が認められた Case1・Case2 に対し、さらなる解析を行った。

Case1 では、過去に不整脈との関連の報告のあった変異が認められた。家族の遺伝子解析の結果、この 2 カ所の変異はともに母由来であった。母親の安静時心電図を施行したところは正常であり、また母親に症状はなかった。潜在性に不整脈を持っている可能性も考え、運動負荷心電図検査を行ったが、正常であった。現在、経過観察中である。

Case2 では、過去に不整脈との関連の報告のあった変異が認められた。家族の遺伝子解析の結果、うち 1 つは両親由来、うち 1 つは母由来であった。両親ともに現在無症状であり、これ以上の検索は希望されなかった。

#### D. 考察

近年、次世代シーケンサーの登場等で遺伝子解析が時間・費用ともに手軽に行えるようになってきた。この手法は死後の解析にも応用され、その有用性が報告されている。しかし、対象遺伝子が増えるとともに検出される変異も多くなり、その解釈も

困難となることも予想される。

今回突然死 4 症例に対し、本人ならびに家族の遺伝子解析を行った。うち Case3, 4 の 2 症例は病因となる不整脈・代謝疾患関連変異は認められなかった。Case1 では不整脈との関連が過去に報告のある変異が認められ、遺伝学的には不整脈も疑われた。しかし、同じ変異を持つ母親に対する心電図検索を行ったところ異常は認められず、逆に疾患との関連は否定的であった。Case2 でも同様に、突然死症例に認められた遺伝子変異は健康な母親にも認められたため、疾患との関連は積極的には指摘し得なかった。

原因不明の突然死症例に対し死後の検索を行うことは当然必要である。遺伝性疾患の場合、家族内発症も高頻度に認められることから、予防へ向け、可能な限り遺伝子解析を行うことも望まれるが、遺伝子解析を行った際には単に変異があっただけでなく、さらにその意義まで踏み込んで検索してこそ意味のあるものとなると考える。関係各科との連携体制を整え、詳細に検討することが必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1.論文発表

1) Yamamoto T., Tanaka H., Emoto Y., Umehara T., Fukahori Y., Kuriu Y., Matoba R., Ikematsu K. Carnitine palmitoyltransferase 2 gene polymorphism is a genetic risk factor for sudden unexpected death in infancy. *Brain Dev*, 36, 479-483, 2014

2) Yamamoto T., Mishima H., Mizukami H., Fukahori Y., Umehara T., Murase T., Kobayashi M., Mori S., Nagai T., Fukunaga T., Yamaguchi S., Yoshiura K., Ikematsu K. Metabolic autopsy with next generation sequencing in sudden unexpected death in infancy: Postmortem diagnosis of fatty acid oxidation disorders, *Mol Genet Metab Reports*, 26-32, 2015

3) 深堀友希、梅原敬弘、山本琢磨、的場梁次、池松和哉、次世代シーケンサーを活用した乳幼児突然死症例の包括的な心筋イオンチャンネル遺伝子解析、DNA 多型、22、201-202、2014

4) 山本琢磨、梅原敬弘、深堀友希、村瀬壮彦、池松和哉、脂肪酸代謝異常症からみた乳幼児突然死症例の遺伝子解析、DNA 多型、23、171-173、2015

5) 山本琢磨、梅原敬弘、大島友希、村瀬壮彦、池松和哉、死から生への還元ーMetabolic autopsy を用いた突然死解明ー、日本 SIDS 学会、16 (1)、15-19、2016

6) 山本琢磨、梅原敬弘、村瀬壮彦、深堀友希、池松和哉、乳幼児突然死：死因究明

から発症前診断へ、長崎市医師会報、48 巻 10 号、8-12、2014

### 2.学会発表

2014 年

深堀友希、梅原敬弘、山本琢磨、的場梁次、池松和哉 次世代シーケンサーを活用した乳幼児突然死症例の包括的な心筋イオンチャンネル遺伝子解析、第 20 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会

藤浪綾子、村山圭、伏見拓矢、市本景子、鶴岡智子、森雅人、山本琢磨、岡崎康司、高柳正樹、大竹明 突然死、ALTE におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症の現状、第 20 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会

Takuma Yamamoto, Jasper C Komen, Alysha Eibl-Geldart, Bi-Xia Ke, Adrienne Laskowski, Takahiro Umehara, Kazuya Ikematsu, David R Thorburn Bezafibrate treatment of an OXPHOS disorder mouse model of Leigh Syndrome 2014 9th ISALM

Yuki Fukahori, Takahiro Umehara, Takuma Yamamoto, Ryoji Matoba, Kazuya Ikematsu Comprehensive analysis of cardiac ion channel gene of sudden infant death cases utilizing the next generation sequencer 2014 9th ISALM

山本琢磨, 梅原敬弘, 深堀友希, 村瀬壮彦, 池松和哉 脂肪酸代謝異常症からみた乳幼児突然死症例の遺伝子解析, 第 64 回九州地方会

松永綾子, 村山圭, 伏見拓矢, 志村優, 市本景子, 鶴岡智子, 山本琢磨, 森雅人, 岡崎康司, 大竹明 日本における突然死、ALTE(乳幼児突発性危急事態)の原因としてのミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症, 第 56 回日本先天代謝異常学会

山本琢磨, 梅原敬弘, 深堀友希, 村瀬壮彦, 池松和哉 脂肪酸代謝異常症からみた乳幼児突然死症例の遺伝子解析 日本 DNA 多型第 23 回学術集会

#### 2015 年

山本琢磨, 石川泰輔, 深堀友希, 梅原敬弘, 村瀬壮彦, 蒔田直昌, 池松和哉 不整脈が原因と疑われた乳幼児突然死の一症例 第 21 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会

大崎琢弥, 山本琢磨, 石川泰輔, 三嶋博之, 深堀友希, 梅原敬弘, 村瀬壮彦, 吉浦孝一郎, 蒔田直昌, 池松和哉 乳幼児突然死症例に対する次世代シーケンサーを用いた脂肪酸代謝異常症の遺伝子解析, 第 65 回九州地方会

山本琢磨, 三嶋博之, 水上創, 梅原敬弘, 村瀬壮彦, 深堀友希, 吉浦孝一郎, 山口清次, 池松和哉 次世代シーケンサーを

用いた Metabolic autopsy-不幸の連鎖を止めるために「避けられる死」を提唱したい-, 第 57 回日本先天代謝異常学会

松永綾子, 村山圭, 田鹿牧子, 志村優, 伏見拓矢, 市本景子, 鶴岡智子, 山本琢磨, 岡崎康司, 大竹明 突然死、ALTE の原因としてのミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症 - Microscale oxygraphy を用いた検討-, 第 57 回日本先天代謝異常学会 2015 年

#### 2016 年

山本琢磨, 梅原敬弘, 大島友希, 村瀬壮彦, 池松和哉 死から生への還元-Metabolic autopsy を用いた突然死解明-, 第 22 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会

松永綾子, 千葉文子, 伏見拓矢, 田鹿牧子, 志村優, 市本景子, 村山圭, 堀江弘, 山本琢磨, 岡崎康司, 大竹明, 高柳正樹 乳幼児突然死の原因としての先天代謝異常症-診断ネットワークの構築-, 第 22 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会

Takumi Osaki, Takuma Yamamoto, Takehiko Murase, Takahiro Umehara, Kazuya Ikematsu Genetic analysis of inherited metabolic diseases in sudden unexpected death in infancy by next-generation sequencing, 2016 International academy of legal medicine

山本琢磨, 石川泰輔, 大島友希, 安倍優樹,

村瀬壮彦、梅原敬弘、蒔田直昌、池松和哉  
乳幼児の突然死に対し家系介入を行った  
1 症例-遺伝子解析はどこまで行うべきか、  
第 100 次日本法医学会学術全国集会

Congenital Arrhythmia and Metabolic  
Disease  
40<sup>th</sup> autumn conference of the Korean  
Society for legal medicine 2016.11.25

Takumi Osaki, Takuma Yamamoto,  
Yuki Oshima, Yuki Abe, Takehiko  
Murase, Takahiro Umehara, Kazuya  
Ikematsu Next-Generation Sequencing  
for Inherited Metabolic Disease in  
Sudden Unexpected Death in Infancy,  
第 100 次日本法医学会学術全国集会

H.知的財産権の出願・登録状況  
なし

山本琢磨、村瀬壮彦、池松和哉 乳幼児突  
然死に対する Metabolic Autopsy と網羅  
的遺伝子解析～避けられる死を目指して  
～、第 30 回日本小児救急医学会学術集会

山本琢磨、大島友希、松末綾、梅原敬弘、  
村瀬壮彦、安倍優樹、久保真一、池松和哉  
突然死に対する新生児マススクリーニン  
グ対象疾患遺伝子の網羅的検索、第 66 回  
九州地方会

松永綾子、村山圭、田鹿牧子、志村優、伏  
見拓矢、千葉文子、猪口剛、山本琢磨、岡  
崎康司、大竹明 乳児・小児突然死におけ  
るミトコンドリア呼吸鎖異常症-法医学教  
室との連携の利点と課題-、第 58 回日本  
先天代謝異常学会

Kazuya Ikematsu, Takehiko Murase,  
Takahiro Umehara, Takuma Yamamoto  
Forensic Molecular Diagnosis in