

日本人ジスフェルリン異常症の遺伝子検索への次世代シーケンサーの導入

研究分担者 青木 正志¹⁾

研究協力者 高橋 俊明²⁾, 鈴木 直輝¹⁾, 井泉 瑠美子^{1),3)}, 八木沼 智香子⁴⁾, 小野 洋也¹⁾,
島倉 奈緒子¹⁾, 新堀 哲也³⁾, 片山 望⁵⁾, 齋藤 京之⁶⁾, 谷口 さやか²⁾, 大泉 英樹²⁾,
田中 洋康²⁾, 吉岡 勝^{2),4)}, 武田 篤²⁾, 青木 洋子³⁾, 三橋 里美⁷⁾, 西野 一三⁷⁾

研究要旨

三好型遠位型ミオパチーおよび肢帯型筋ジストロフィー 2B 型は dysferlin 遺伝子の異常が原因であり dysferlinopathy と総称される。東北大学では臨床的もしくは病理学的に dysferlinopathy が疑われる患者の遺伝子解析を SSCP および直接塩基配列決定法により行ってきた。本研究では次世代シーケンサーの導入により dysferlinopathy の解析の効率化を図ってきた。日本人の dysferlinopathy の臨床像・病理像・表現型について明らかにし、臨床試験が計画されている変異様式について概算した。今後はこれらの遺伝子診断結果をベースとした国内患者把握を行い、将来的な臨床試験に備えていくことが重要である。

A. 研究目的

三好型遠位型ミオパチーおよび肢帯型筋ジストロフィー 2B 型は dysferlin 遺伝子の異常が原因であり dysferlinopathy と総称される。東北大学では臨床的もしくは病理学的に dysferlinopathy が疑われる患者の遺伝子解析を 1998 年より行ってきた。PCR-SSCP (single strand conformational polymorphism) 法によるスクリーニングにより、156 例中 98 例 (62.8%) に dysferlin 変異が確認されてきたが、残りの 58 例 (37.2%) の症例には変異が検出されていなかった。これらの症例では、dysferlin 以外の筋疾患関連遺伝子変異が関連している可能性が考えられるが、筋疾患関連遺伝子の変異の有無を網羅的に解析することは従来の方法のみでは困難であった。また病理学的な dysferlin 染色性の変化と遺伝子変異の関係についても明らかではなかった。

本研究では継続した次世代シーケンサーの解析により新規 dysferlinopathy 患者の遺伝子診断を行うと共にその変異様式別の治療法の適応可能性について推定することとした。

B. 研究方法

1. 既知の筋疾患関連遺伝子の解析

次世代シーケンサーを用いてターゲットリシーケンス解析を行う。解析対象としては、既知の筋疾患関連遺伝子である dysferlin を含む 42 遺伝子の検索を行った。

2. エクソーム解析

既知の筋疾患関連遺伝子に変異を認めない場合に行った。罹患者についてエクソンキャプチャー法を用いて抽出した全エクソン領域を、次世代シーケンサーにて配列解析する。家系内の非罹患者を解析する場合、罹患者と比較することで疾患に関連した変異のみを抽出する。必要に応じてアレイ CGH や連鎖解析を行い、照合することで候補遺伝子を絞り込むこととした。

本年度は新規解析 41 例を対象として、dysferlin を含む既知の筋疾患関連 42 遺伝子における変異の有無を網羅的に解析するターゲットリシーケンス解析を行った。臨床的な dysferlinopathy 疑いが 25 例、骨格筋生検標本での免疫染色低下・欠損例が 16 例含まれている。

1) 東北大学大学院 医学系研究科 神経内科学

2) 国立病院機構 仙台西多賀病院 神経内科

3) 東北大学大学院 医学系研究科 遺伝科

4) 国立病院機構 仙台西多賀病院 臨床検査科

5) 国立病院機構 仙台西多賀病院 リハビリテーション科

6) 国立病院機構 仙台西多賀病院 薬剤科

7) 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

3. 変異様式別の解析

これまでに dysferlin 変異を認めた 180 家系において、変異様式別に新規治療の適応の対象となる症例がどの程度いるかを検討した。具体的にはミスセンス・ナンセンス変異数について計数した。

(倫理面への配慮)

患者からの臨床情報の取得および DNA の採取に関しては東北大学医学系研究科の倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得ている。

C. 研究結果

機能的変化予測や遺伝形式、臨床情報との照合などを総合して最終的な絞り込みを行った結果、既報告もしくは疾患との関連が疑われる変異が検出されたのは、新規解析 41 例中 29 例であった。そのうち、dysferlin 変異を検出した症例は 24 例であり、dysferlin 以外の筋疾患関連遺伝子に変異を検出した症例は 5 例であった。昨年度、ターゲットリシーケンス解析の導入により、dysferlin 変異検出率は、62.8% (156 例中 98 例) から 70.5% (156 例中 110 例) まで改善したと報告したが、本年度の新規症例においても変異同定率は約 70% (41 例中 29 例) であった。

病理学的に dysferlin の免疫染色での異常が検出された例、昨年度までとあわせて 106 例についての遺伝的背景を検証すると、70% で dysferlin の遺伝子変異が同定できた。他は calpain3 が 8% と dysferlin についで多かった。さらに myotilin, caveolin3, anoctamin5, GNE の遺伝子変異も二次性の病理学的な dysferlin 欠損を起こすことがわかった。これらの dysferlin の染色性は patchy であり、一次性的な dysferlin 変異症例とは異なった染色パターンであると考えられた。

日本人の dysferlinopathy の遺伝子確定例 180 家系において変異様式別の解析を行った。同一のミスセンス変異のホモ接合は 30 家系、異なるミスセンス変異の複合ヘテロは 12 家系、ミスセンス変異が片アレルのみに見られるものが 46 家系存在した。また同一のナンセンス変異のホモ接合は 27 家系、異なるミスセンス変異の複合ヘテロは 6 家系、ミスセンス変異が片アレルのみに見られるものが 30 家系存在した。合計するとミスセンス変異は 48.8%、ナンセンス変異は 35.0% をしめることがわかった。

D. 考察

今回解析した症例で、従来の解析方法で検出できていなかった dysferlin 変異の検出や、遠位型ミオパチーと類似の臨床・病理像をとる他の筋関連遺伝子の変異を

同定することができた。遺伝子変異と病理学的背景との関連も明らかにすることができた。今後、変異の病的意義を考える上では、解析症例の蓄積やデータベース化も重要である。さらにターゲットリシーケンスでも変異が見いだせない症例のうち、解析に同意が得られた 10 例に関しては、エクソーム解析を進めている。またミスセンス変異を呈した 48.8% の家系では蛋白分解系阻害による dysferlin 蛋白の増加のストラテジーが、35.0% のナンセンス変異例に対してはリードスルー療法のストラテジーが、適応となる可能性がある。

E. 結論

ターゲットリシーケンス解析は効率的・効果的な遺伝子診断に有用であることが明らかとなった。今後更なる診断率の向上をめざし、実用的で有用な診断システムとなるよう検討を継続していく。また、病因変異が同定されなかった症例では新規原因遺伝子同定を目指しエクソーム解析を行う。

遺伝子解析結果に関して 2015 年度に *Neurol Genet* 誌に報告した(参考文献 5)。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi T, et al. Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy: relationship to phenotype. *Neurology* 60:1799-804, 2003.
- 2) Takahashi T, et al. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:433-40, 2013.
- 3) Izumi R, et al. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet* 58:259-66, 2013.
- 4) Izumi R, et al. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord* 24:1068-72, 2014.
- 5) Izumi R, et al. Genetic profile for suspected dysferlinopathy identified by targeted next-generation sequencing. *Neurol Genet* 1:e36, 2015.

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