

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

線毛機能不全症候群の遺伝子診断へ向けて

研究分担者 慶長直人（公益財団法人結核予防会結核研究所部長）

研究要旨

線毛機能不全症候群は、線毛の構造、機能タンパクの遺伝子異常に起因する、主に常染色体劣性遺伝形式をとる先天性疾患として知られている。本疾患の原因遺伝子として、現在、30 数個の遺伝子が公的データベースに登録されているが、わが国においては、責任遺伝子の変異部位と頻度が不明であるため、これらを明らかにして、効率の良い遺伝子変異同定システムを構築する必要がある。この目的のため、わが国における本症の症例報告を網羅的にレビューし（投稿準備中）、米国でコンソーシアムを構築し、本症の遺伝子診断システムを統括している、ノースカロライナ大学（M. Knowles 教授）との連携を通じて、診断システムの確立を行った。次世代シーケンサーを用いて、既に構築した欧米で最多の DNAI1 と DNAH5 の 2 遺伝子、ダイニン内腕(inner dynein arms, IDAs)に微小管構造の乱れを伴う CCDC39 と CCDC40 の 2 遺伝子のエクソン解析系に加えて、今年度は新たに ODA と IDA 両方の欠損をきたす 10 遺伝子のエクソン解析系を構築した。今後、これらの情報を統合して、わが国の現状に最適化された、遺伝子解析システムの開発が望まれる。

A. 研究目的

線毛機能不全症候群 (primary ciliary dyskinesia; PCD)について、わが国で適切な診断を行うための必須事項のひとつとして、原因遺伝子が多数存在する本症の遺伝子異常を検索するため（表 1）効率の良い塩基配列同定システムを構築する必要がある。わが国における本症の特徴を系統的レビューにより明らかにして、ノースカロライナ大学（Knowles 教授）との連携から、鼻腔 NO から鼻粘膜生検、遺伝子検査に至る PCD 診断系モデルを確立することを目的に検討を進めた。

実験室では、次世代シーケンサーを用いて、欧米で最多のダイニン外腕(outer dynein arms; ODA)欠損型の PCD 原因遺伝子 DNAI1 と DNAH5、ダイニン内腕(inner dynein arms; IDA)欠損に微小管構造の乱れを伴う CCDC39 と CCDC40 の合計 4 遺伝子のエクソン解析系を既に構築したが、今年度は新たに ODA と IDA 両方の欠損をきたす 10 遺伝子のエクソン解析系を構築した。

B. 研究方法

【本邦における原発性線毛機能不全症候群のシステムティック・レビュー】

1985 年～2015 年に報告された原著論文、学会報告を対象とした。文献検索およびデータ入力担当は当研究部所属の 2 名（稲葉 敦、古畑匡規）が独立して行った。プロトコルおよび検索方法は PROSPERO (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>[CRD42017076336])に登録した。検索式の作成は聖路加国際大学 臨床疫学センター 高橋 理先生に指導いただいた。

【ノースカロライナ大学との連携】

北米コンソーシアム (the Genetic Disorders of Mucociliary Clearance Consortium; GDMCC)の中核

施設である、ノースカロライナ大学 Michael R. Knowles 教授のもとで米国各施設に指導を行っている専門家から、鼻腔 NO 測定および鼻粘膜生検、電子顕微鏡検査に至る一連の検査について助言、指導を受けた。

【ターゲット遺伝子の PCR と次世代シーケンサーを用いた解析 protocol 作製】

これまでに PCD に関わる代表的な遺伝子とされている DNAH5, DNAI1, IDA 欠損と微小管構造の乱れを伴うことが知られている CCDC39, CCDC40 の 4 遺伝子、合計 144 エクソン、cDNA 長にして 25 kb の解析系を既に構築した（図 1）。今年度は、これらに加え ODA と IDA 両方の欠損をきたす 10 遺伝子、合計 119 エクソン、cDNA 長にして 24 kb の解析を試みた。10 遺伝子には 2017 年に新しく報告された PIH1 domain containing 3 遺伝子(PIH1D3)を含む。内臓逆位を伴い、PCD 疑いの 4 名の患者由来のゲノム DNA から上記 119 エクソン領域を含むようにデザインされた 58 PCR を行い、アガロースゲル電気泳動で 1 kb～5 kb 程度の増幅産物を確認した後（図 2）、検体ごとにすべての PCR 産物を、増幅サイズに応じて分子数が揃うようにプールして精製した。QIAseq FX DNA Library Kit (キアゲン)を用いてライブラリー作製を行い、MiSeq v2 500 サイクル nano キット(イルミナ)でシーケンスを行い、fastq ファイルを得た。CLC GenomicsWorkbench (キアゲン)を用い、参照配列へのアライメントを行い、ターゲット領域のカバレッジとクオリティーを確認の上、変異解析を行った。CLC GenomicsWorkbench では自動化されていないエクソン-イントロン境界領域の変異の検出系を作成した。

【倫理面への配慮】

ベトナム ハノイ市における慢性上下気道感染症の

有病率調査および遺伝的背景を探索する国際共同研究を、バックマイ病院および日本側の所属施設の倫理委員会での承認の上、平成 23 年より開始し、患者のサンプル集積を終了している。本研究では、研究開始時の最新の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守、またベトナムとの共同研究では、ベトナムの生物医学研究に対する倫理審査委員会の組織と運用に関する規則（2002 年 12 月 19 日可決番号 5129/2002/QD-BYT に伴って公布、2008 年に一部改正、保健省）を遵守している。既に集積された DNA 検体の遺伝子解析について、当研究所の遺伝子解析に関する倫理委員会、および現地倫理委員会の承認を受けている。

C. 結果

【PCD の系統的レビュー】

論文と症例の重複を確認しつつ解析を行ったところ、562 件（PubMed 120 件、EMBASE 11 件（1985 年～2015 年））が検索され、重複の除外などにより、329 件（315 例）を解析対象とした。男性 171 例（54.3%）、女性 144 例（45.7%）で診断時の年齢中央値は 26 歳（0-83）であり、1 歳以下での診断は 24 例（7.6%）にとどまった。

診断時検査は、鼻腔 NO 測定 6 例、サッカリンテスト 33 例、遺伝子検査は 5 例、電子顕微鏡 230 例であり、Kartagener の 3 徴候が揃っていれば、それ以上の診断根拠を求めない症例も多く認められた。HSVM や IF を用いた報告は無かった。現行の米国ガイドラインに従って鼻腔 NO、電子顕微鏡、遺伝子検査を総合的に評価し診断している症例は無かった。また欧米で注目される新生児期呼吸不全についての記載は 12.7%にとどまった。電子顕微鏡所見では IDA 欠損が 60 例（28.7%）と最も多く、IDA+ODA 欠損 57 例（27.3%）、MTD 33 例（15.8%）が続き、IDA 欠損および IDA+ODA 欠損の割合が高いことが示された。

【ノースカロライナ大学 PCD 検査システム】

前年度に北米コンソーシアム（the Genetic Disorders of Mucociliary Clearance Consortium; GDMCC）の中核施設であるノースカロライナ大学（Michael R. Knowles 教授）で、3 日間の研修を受けた。本年度も引き続き当施設から診断システム確立のためのサポート・指導を受け、鼻腔 NO、鼻粘膜生検、遺伝子検査に至る診断システムを確立した。鼻腔 NO は NO-Probe を用い測定する手法であり、フローメーターを用い nl/min 表記としている。鼻粘膜生検は専用キュレットにより行い、検体固定手法については米国手法と国内手法を併用しつつ、検体分析に最適化した手法を選択することとしている。今後、診断精度を上げるべく、症例毎に共同で評価を行っていく方針である。

【ODA と IDA の欠損をきたす 10 遺伝子の変異解析】各検体ごとにリスト化された解析対象範囲の全ての変異情報から、非同義置換を伴う変異を抽出し、ま

た、イントロン-エクソン境界領域に存在する変異の存在の有無を全対象エクソンにわたり確認した。塩基ごとに全リード数に対する変異を有するリードの割合を得て、ホモ接合、ヘテロ接合の判定を行った。得られた変異については、dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>)、ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) などの公的データベースから病原性に関する意義付け情報の取得を行い、BENIGN と記載されているものを除外した。1000 Genomes Project (<http://phase3browser.1000genomes.org/index.html>) でのアリル頻度、遺伝子型頻度の確認を行った。

1 例で、今年度対象にした 10 遺伝子の一つで、過去に報告、データベース上の登録のない、新しい非同義置換変異のホモ接合が見出された。この変異を含む PCR 産物のサンガー法によるシーケンスを行い、両方向から変異の存在を確認した。アミノ酸変異が蛋白質に与える影響を予測するプログラム SIFT (<http://sift.jcvi.org>) で DAMAGING、PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>) で POSSIBLY DAMAGING の予測結果が得られた。

D. 考察

わが国における本症の症例報告を網羅的にレビューし、現行の米国ガイドラインに従って鼻腔 NO、電子顕微鏡、遺伝子検査を全て実施、評価し診断評価している症例がほぼ見られないこと、電顕異常所見として、IDA 欠損が特徴的であることなどが特徴的に見られた。米国でコンソーシアムを構築し、本症の遺伝子診断システムを統括している、ノースカロライナ大学（M. Knowles 教授）との連携を通じて、鼻腔 NO 測定および鼻粘膜生検については、本年度、パイロット的な検討を開始することができた。

遺伝子解析に関しては、今年度、ODA と IDA 両方の欠損をきたす 10 遺伝子、合計 119 エクソン塩基配列の決定を、long-range PCR による増幅とイルミナ社の次世代シーケンサー解析を組み合わせることで実施した。解析対象のうち一つの遺伝子で、非同義置換変異のホモ接合が見出されたため、公的データベースの登録の検索を行い、過去に報告、データベース上の登録のない新しい変異であることがわかった。変異が見出された時に、その変異が既知の病原性変異であれば、直ちに判定が可能であるが、多くの場合は、見出された変異は新規の変異であることが想定される。わが国における責任遺伝子とその変異部位を明らかにする上では、新規病原性変異であることを確かめるために、さらに実験的な機能解析が必要であるが、今後、遺伝子解析の結果を臨床に還元する時の方向性としては、図 3 に示すように、公的データベースとの照合、これから本研究班を中心に構築される日本の PCD の原因変異のデータベースとの照合、変異の機能予測を行い、変異を分類し、NO 測定や電子顕微鏡所見と合わせて総合判断が可能

になるような診断の流れの構築が必要であると考えられる。

今後、さらにわが国の PCD 症例の特徴に合わせて、解析対象遺伝子数を増やした幅広いスクリーニング系を開発する必要がある。このような PCR による増幅と次世代シーケンサーを組み合わせた手法であれば、PCR プライマーの設計と増幅条件を検討するだけで、簡単に解析対象の遺伝子領域を増やしたり、組み換えたりすることができるため、応用性が高い。それらスクリーニングの範囲で変異が見出されなかった場合には、全エクソーム解析へ進む必要があると考えられる。

E. 文献：なし

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wada T, Hijikata M, Maeda S, Hang NTL, Thuong PH, Hoang NP, Hung NV, Keicho N. Complete genome sequences of three representative

Mycobacterium tuberculosis Beijing family strains belonging to distinct genotype clusters in Hanoi, Vietnam, during 2007- 2009. Genome Announc, 2017 in press.

2. Wada T, Hijikata M, Maeda S, Hang NTL, Thuong PH, Hoang NP, Hung NV, Keicho N. Complete genome sequence of a Mycobacterium tuberculosis strain belonging to the EAI family in the Indo-Oceanic lineage, isolated in Hanoi, Vietnam. Genome Announc, 2017 in press.

3. 土方美奈子, 森本耕三, 稲葉敦, 慶長直人. 副鼻腔気管支症候群：遺伝子研究の現在. 呼吸器内科, 2017; 31(5): p. 487-492.

4. 土方美奈子, 森本耕三, 稲葉敦, 慶長直人. 原発性線毛機能不全症候群. 呼吸器内科, 2017; 31(1): p. 84-87.

2. 学会発表：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

図1 PCD原因遺伝子と線毛構造（電顕所見）の対応

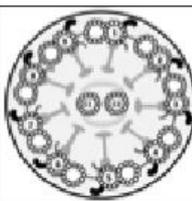
PCD原因遺伝子と線毛構造 (電顕所見)の対応	
	<p>ODA欠損 <i>DNAI1, DNAH5, NME8, DNAH2, DNAH1, CCDC114, AFMCM4, CCDC161, TTC25, CCDC163</i></p> <p>ODA+IDA欠損 <i>DNAAF1, DNAAF2, DNAAF3, DNAAF5, LRRC6, ZMPND10, DYX101, CE1ORF58, SPAO1</i></p> <p>IDA欠損+微小管構造の乱れ <i>CCDC39, CCDC40</i></p> <p>放射状スポーク~中心対微小管欠損 <i>RSPH1, RSPH2, RSPH4, RSPH9, HYDIN, DNAJB13</i></p> <p>微細構造(ほぼ)正常、動きの異常のみ <i>DNAH11</i> <i>CCDC164 (ORC7), CCDC85 (ORC2, GASE)</i></p>

図2 次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンス法によるPCD原因遺伝子の変異探索

表 ヒトの遺伝性疾患のデータベースOMIMに2017年6月現在で登録されている33のPCD原因遺伝子

OMIM登録番号	原因遺伝子名, 染色体位置	exon数	cDNA長 (nt)	OMIM登録年	電子顕微鏡所見
CILD1 (244400)	<i>DNAI1</i> , 9p13.3	20	2605	1986	ODA欠損
CILD3 (608644)	<i>DNAH5</i> , 5p15.2	79	15588	2004	ODA欠損
CILD6 (610852)	<i>NME8 (TXNDC3)</i> , 7p14.1	18	2327	2007	ODA欠損
CILD9 (612444)	<i>DNAI2</i> , 17q25.1	17	2255	2008	ODA欠損
CILD16 (614017)	<i>DNAL1</i> , 14q24.3	10	8584	2011	ODA欠損
CILD17 (614679)	<i>CCDC103</i> , 17q21.31	4	1736	2012	ODA欠損
CILD20 (615067)	<i>CCDC114</i> , 19q13.33	20	3234	2013	ODA欠損
CILD23 (615451)	<i>ARMC4</i> , 10p12.1	30	3637	2013	ODA欠損
CILD30 (616037)	<i>CCDC151</i> , 19p13.2	14	1867	2014	ODA欠損
CILD35 (617092)	<i>TTC25</i> , 17q21.2	13	3200	2016	ODA欠損
CILD2 (606763)	<i>DNAAF3</i> , 19q13.42	12	2302	2002	ODA+IDA欠損
CILD10 (612518)	<i>KTU</i> , 14q21.3	3	2832	2009	ODA+IDA欠損
CILD13 (613193)	<i>DNAAF1</i> , 16q23.3-q24.1	15	2451	2009	ODA+IDA欠損
CILD18 (614874)	<i>HEATR2</i> , 7p22.3	13	3424	2012	ODA+IDA欠損
CILD19 (614935)	<i>LRRC6</i> , 8q24.22	17	1888	2012	ODA+IDA欠損
CILD22 (615444)	<i>ZMYND10</i> , 3p21.31	12	1786	2013	ODA+IDA欠損
CILD25 (615482)	<i>DYX1C1</i> , 15q21.3	11	1905	2013	ODA+IDA欠損
CILD26 (615500)	<i>C21ORF59</i> , 21q22.11	7	1427	2013	ODA+IDA欠損
CILD28 (615505)	<i>SPAG1</i> , 8q22.2	21	3958	2013	ODA+IDA欠損
CILD36 (300991)	<i>PIH1D3</i> , Xq22	8	1678	2017	ODA+IDA欠損
CILD14 (613807)	<i>CCDC39</i> , 3q26.33	20	3894	2011	IDA欠損+MT disorganisation
CILD15 (613808)	<i>CCDC40</i> , 17q25.3	25	3562	2011	IDA欠損+MT disorganisation
CILD5 (608647)	<i>HYDIN</i> , 16q22.2	91	15746	2004	放射状スポーク~CC欠損
CILD11 (612649)	<i>RSPH4A</i> , 6q22.1	9	2858	2009	放射状スポーク~CC欠損
CILD12 (612650)	<i>RSPH9</i> , 6p21.1	8	1014	2009	放射状スポーク~CC欠損
CILD24 (615481)	<i>RSPH1</i> , 21q22.3	9	1331	2013	放射状スポーク~CC欠損
CILD32 (616481)	<i>RSPH3</i> , 6q25.3	9	2201	2015	放射状スポーク~CC欠損
CILD34 (617091)	<i>DNAJB13</i> , 11q13.4	16	1875	2016	放射状スポーク~CC欠損
CILD29 (615872)	<i>CCNO</i> , 5q11.2	3	1485	2014	oligocilia
CILD7 (611884)	<i>DNAH11</i> , 7p15.3	82	13896	2008	正常
CILD21 (615294)	<i>DRC1</i> , 2p23.3	17	2519	2013	ほぼ正常
CILD27 (615504)	<i>CCDC65</i> , 12q13.12	8	1792	2013	ほぼ正常
CILD33 (616726)	<i>GAS8</i> , 16q24.3	15	3185	2016	ほぼ正常
		656	124042		

**33遺伝子
656 exons
合計cDNA長
124,042 塩基**

ILLUMINA社
TruSeq Custom
Ampliconの場合

+ ILLUMINA社
+ Sequence Kit
約10万円

図3 PCD原因遺伝子の変異解析の流れ

