

難治性気道疾患分科会報告

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、機能に関わるさまざまな遺伝子の異常に起因しており、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。遺伝子解析技術の進歩に伴い、40 近くの遺伝子が公的データベースに登録され、現在も次々と新たな原因遺伝子が報告されている。

わが国における効率的な疾患診断システムを構築するため、これまでに過去の症例報告を網羅的にレビューするとともに（投稿中）、米国で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）との連携を深めている。その結果、米国ガイドラインで推奨された方法を用いて、本年度、合計 47 例について鼻腔一酸化窒素濃度、電子顕微鏡による線毛微細構造観察を試み、本症を強く疑わせる 11 例を効率よくスクリーニングすることに成功した。

わが国においては、いまだに原因となる各々の遺伝子の変異部位と頻度が不明であり、優先して検索すべき遺伝子群が明らかにされていない。そこで、昨年までに、欧米で本症の代表的な原因遺伝子とされている 2 遺伝子、ダイニン内腕欠損と微小管構造の乱れを伴うことが知られている 2 遺伝子、ダイニン内腕、外腕ともに欠損する 10 遺伝子の合計 14 遺伝子の解析系を確立し、本年度はそれ以外の 18 遺伝子を加え、合計 32 遺伝子のコーディング領域周辺の変異検出系を確立した。これは、既知の遺伝子群で説明される症例の 90% 以上をカバーすると思われる。これらの情報を統合して、わが国の現状に最適化された、診断システムの開発が望まれる。

A. 研究目的

複数の原因遺伝子に起因する線毛機能不全症候群（primary ciliary dyskinesia; PCD）を的確に診断するためには、効率の良い遺伝子配列同定システムを構築する必要がある。また、従来わが国における本症の特徴を明らかにするとともに、ノースカロライナ大学（M. Knowles 教授）との連携のもとに、鼻腔一酸化窒素（NO）濃度、鼻粘膜生検、遺伝子検査に至る無駄のない PCD 診断系を確立することを目的に症例検討を行っている。

遺伝子解析については、昨年まで、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）欠損型の主要 2 遺伝子、さらにダイニン内腕（inner dynein arms; IDA）欠損に微小管構造の乱れを伴う 2 遺伝子、ODA と IDA 両方の欠損をきたす 10 遺伝子の解析系を構築したが、今年度は、それ以外の 18 遺伝子をパネルに加え、合計 32 遺伝子の解析系を確立した。

B. 研究方法

1. NO 濃度、鼻粘膜生検、遺伝子検査

これまで本研究班の支援のもとにノースカロライナ大学で受けた研修を背景に、PCD 疑い例に対しては、米国ガイドライン推奨法による遺伝子検索、鼻腔 NO 濃度、線毛構造の電子顕微鏡観察を実施した。各症例の臨床所見・背景から、未診断例を効果的に抽出し、診断へ導くアルゴリズムの確立を目指している。書面でインフォームド・コンセントを得て、各種検体、データの提供を受けている。

1) 鼻腔 NO 濃度測定

鼻腔 NO 分析はレジスター法により得られた鼻腔 NO

を、Sievers 280i NO 分析装置（Sievers, Boulder, CO）を用いた化学発光法で濃度測定した。気管支拡張症および副鼻腔炎を呈する症例を「疑い」例として測定した。非結核性抗酸菌症（NTM）症例で慢性鼻副鼻腔炎合併例も同様に測定した。

2) 電子顕微鏡による線毛構造異常分析

ガイドラインに従い、鼻腔 NO 濃度低値を呈する症例や罹病期間の長い副鼻腔気管支症候群症例を中心に検討を行った。鼻粘膜は鼻孔から直接生検ブラシか、専用のプラスチック製の匙により粘膜の一部を擦過、採取した。電子顕微鏡分析は、ノースカロライナ大学の標準作業手順書に従い、複数の観測者により評価した。

2. ターゲット遺伝子の PCR と次世代シーケンサーを用いた 32 遺伝子解析

これまでに PCD に関わる代表的な遺伝子とされている *DNAH5* と *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* と *CCDC40*、ODA と IDA 両方の欠損をきたす 10 遺伝子の合計 14 遺伝子、蛋白質をコードする coding 領域を中心とした 243 エクソン、塩基配列長として合計約 39.6 キロベースの解析系を構築してきたが、本年度は表 1 に示す 18 遺伝子の解析系を新たに構築し、合計 32 遺伝子の変異検出が可能となった。全体で、495 個の coding エクソン（non-coding エクソンを含めると合計 503 エクソン）、塩基配列長として合計約 39.6 kb を解析対象としている。

PCD 疑い患者の血液からゲノム DNA を抽出し、該当する領域を網羅する 253 PCR プライマーセットをマルチプレックス化し、79 PCR に集約して、アガロ

ースゲル電気泳動で 1~5 kb 程度の増幅産物を確認した後、検体ごとにすべての PCR 産物を増幅サイズに応じて同一分子数に調整、混合し、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 hg38 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を確認の上、変異解析を行った。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。

また公的データベース dbSNP、ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)、Ensembl Variant Effect Predictor (http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP?db=core;tl=OYSaTqouja0xkte2-4690284)などを利用して、病原性に関する意義付け情報の取得を行った。

ヒト変異に関わる 1000 Genomes Project (<http://phase3browser.1000genomes.org/index.html>) データベースより、日本人集団におけるアリル頻度、遺伝子型頻度の確認を行った。CLC GenomicsWorkbenchでは自動抽出されないエクソントロン境界領域の変異は、in-house 検出系 (python)を作成して解析を行った。病原性が推定された場合、当該変異を含む 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。

(倫理面への配慮)

本研究では、研究開始時の最新の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、関連施設における倫理委員会の承認を受けている(複倫発 16024 号、RIT/IRB 28-20)。

C. 結果

1. NO 濃度、鼻粘膜生検、遺伝子検査

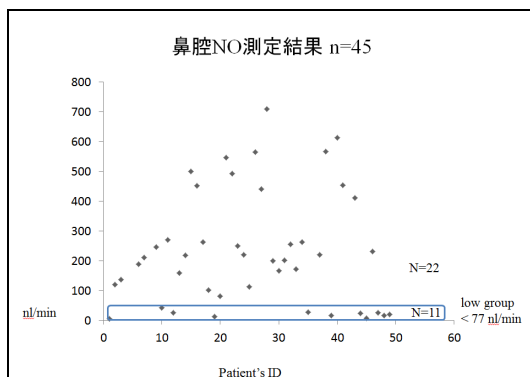


図 1 鼻腔 NO 濃度分布 (PCD 疑い例)

1) これまでに PCD 疑い症例 45 例において鼻腔 NO 測定をおこなった(図)。米国ガイドライン推奨のカットオフ値 77 nl/min を下回る測定値を 11 例に認

めた。気管支拡張症を呈する NTM 症例において、副鼻腔炎を合併した症例を中心に測定したが、明らかな低値を示した症例は認めなかった。

2) そのうち 10 例について、電子顕微鏡による観察を試みている。これまでにダイニン内腕欠損を認める症例があり、microtubule disorganization (MTD)を合併している症例を複数認めている。また、微細形態異常を認めない症例も 3 例存在していた。

2. 32 の PCD 原因遺伝子の変異解析

鼻腔 NO 低値症例を中心に、21 例について遺伝子解析を行い、3 例で病的意義が推定される遺伝子バリエーションのホモ接合性変異(またはヘミ接合)が検出され、1 例で複合ヘテロ接合を示唆する所見が得られた。これらの症例は全て鼻腔 NO 濃度がカットオフ値以下であった。

D. 考察

ノースカロライナ大学 (M. Knowles 教授)との連携を通じて、現行の米国ガイドラインに従って、鼻腔 NO 測定、電子顕微鏡観察、遺伝子解析を実施し、確診例を蓄積した。

今年度、新たに *CFAP300* 遺伝子が PCD 原因遺伝子として報告されヒト疾患遺伝子データベースである OMIM にも登録され、12 月には *DNAH9* が原因遺伝子として報告された (Fassad MR, *et al.* Mutations in Outer Dynein Arm Heavy Chain DNAH9 Cause Motile Cilia Defects and Situs Inversus. *Am J Hum Genet.* 2018 Dec 6;103(6):984-994.)。

PCD の原因遺伝子に関わる知見は、遺伝子解析技術の進歩に伴い、増大し続けているため、本研究においても解析遺伝子パネルを逐次アップデートしていく予定である。

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、構築した診断システムを本年度は実際に稼働させて、複数例の確診例を得ることができた。今後、さらに症例を蓄積することによって、わが国において解析する遺伝子の優先度を考慮した、効果的な PCD 遺伝子パネルを作成し、わが国に適した診断システムを構築することが望まれる。

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) びまん性汎細気管支炎, 慶長直人, 『今日の診断指針 第8版』, 医学書院, 印刷中
- 2) びまん性汎細気管支炎と原発性線毛機能不全症「特集/びまん性肺疾患診療の新しい展開」, 慶長直人, 土方美奈子, 森本耕三. 臨床と研究, 10

月号, 2019. 投稿中

3) Primary Ciliary Dyskinesia in Japan: Systematic review and meta-analysis. Inaba Atsushi, Masanori Furuhata, Kozo Morimoto, Mahbubur Rahman, Osamu Takahashi, Minako Hijikata, Michael R. Knowles, and Naoto Keicho. 投稿中

2. 学会発表:

1) RNA-Seq を用いた肺 MAC 症に関連する気道上皮系遺伝子の網羅的探索. 口頭, 土方美奈子、松下育美、森本耕三、倉島篤行、白石裕治、慶長直人, 第 37 回気道分泌研究会, 札幌, 2018/4/7, 国内.

H. 知的財産権の出願・登録状況: なし

表1 PCD 遺伝子リスト (2018年12月)

| Gene | Location | RefSeq | Coding exons | Translation length (aa) | OMIM (CILD) | Gene Reviews | Invitae Primary Ciliary Dyskinesia Panel | 本研究解析対象遺伝子* |
|----------------|----------|--------------|--------------|-------------------------|-------------|--------------|--|-------------|
| <i>DNAI1</i> | 9p13 | NM_012144 | 20 | 699 | | | | |
| <i>DNAH5</i> | 5p15 | NM_001369 | 79 | 4624 | | | | |
| <i>CCDC39</i> | 3q26 | NM_181426 | 20 | 941 | | | | |
| <i>CCDC40</i> | 17q25 | NM_017950 | 20 | 1142 | | | | |
| <i>DNAAF3</i> | 19q13 | NM_001256714 | 12 | 608 | | | | |
| <i>DNAAF2</i> | 14q21 | NM_018139 | 3 | 837 | | | | |
| <i>DNAAF1</i> | 16q24 | NM_178452 | 12 | 725 | | | | |
| <i>DNAAF5</i> | 7p22 | NM_017802 | 13 | 855 | | | | |
| <i>LRRC6</i> | 8q24 | NM_012472 | 12 | 466 | | | | |
| <i>ZMYND10</i> | 3p21 | NM_015896 | 12 | 440 | | | | |
| <i>DNAAF4</i> | 15q21 | NM_130810 | 9 | 420 | | | | |
| <i>CFAP298</i> | 21q22 | NM_021254 | 7 | 290 | | | | |
| <i>SPAG1</i> | 8q22 | NM_172218 | 18 | 926 | | | | |
| <i>PIH1D3</i> | Xq22 | NM_173494 | 6 | 214 | | | | |
| <i>DNAH11</i> | 7p15 | NM_001277115 | 82 | 4516 | | | | |
| <i>RSPH4A</i> | 6q22 | NM_001010892 | 6 | 716 | | | | |
| <i>RSPH9</i> | 6p21 | NM_152732 | 5 | 276 | | | | |
| <i>DRC1</i> | 2p23 | NM_145038 | 17 | 740 | | | | |
| <i>RSPH1</i> | 21q22 | NM_080860 | 9 | 309 | | | | |
| <i>CCDC65</i> | 12q13 | NM_033124 | 8 | 484 | | | | |
| <i>CCNO</i> | 5q11 | NM_021147 | 3 | 350 | | | | |
| <i>RSPH3</i> | 6q25 | NM_031924 | 8 | 560 | | | | |
| <i>GAS8</i> | 16q24 | NM_001481 | 11 | 478 | | | | |
| <i>DNAJB13</i> | 11q13 | NM_153614 | 8 | 316 | | | | |
| <i>NME8</i> | 7p14 | NM_016616 | 15 | 588 | | | | |
| <i>DNAI2</i> | 17q25 | NM_023036 | 12 | 605 | | | | |
| <i>DNAL1</i> | 14q24 | NM_031427 | 8 | 190 | | | | |
| <i>CCDC103</i> | 17q21 | NM_213607 | 3 | 237 | | | | |
| <i>CCDC114</i> | 19q13 | NM_144577 | 13 | 670 | | | | |
| <i>ARMC4</i> | 10p | NM_018076 | 19 | 1044 | | | | |
| <i>CCDC151</i> | 19p13 | NM_145045 | 13 | 595 | | | | |
| <i>TTC25</i> | 17q21 | NM_031421 | 12 | 672 | | | | |
| <i>HYDIN</i> | 16q22 | NM_001270974 | 85 | 5121 | | | | () |
| <i>DNAH1</i> | 3p21 | NM_015512 | 77 | 4265 | | | | |
| <i>CFAP300</i> | 11q22 | NM_032930 | 7 | 267 | | | | |
| <i>DNAH8</i> | 6p21 | NM_001206927 | 92 | 4707 | | | | |
| <i>MCIDAS</i> | 5q11 | NM_001190787 | 7 | 385 | | | | |
| <i>OFD1</i> | Xp22 | NM_003611 | 23 | 1012 | | | | |
| <i>RPGR</i> | Xp11 | NM_000328 | 19 | 815 | | | | |
| <i>DNAH9</i> | 17p12 | NM_001372 | 69 | 4486 | | | | |

* 本研究で昨年度までに構築された遺伝子解析系の対象遺伝子、今年度追加された遺伝子
 OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man, <https://www.omim.org>
 GeneReviews: Zariwala MA, Knowles MR, Leigh MW. Primary Ciliary Dyskinesia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. GeneReviews(R); Seattle, WA: University of Washington; 1993-2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1122/>. Published Jan 24, 2007 [updated Sept 2015].

Invitae: Invitae corporation, San Francisco, California, United States.

https://www.invitae.com/en/physician/tests/04101/?utm_source=pcd&utm_medium=print&utm_campaign=pcd_card&utm_content=pcd_panel