

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副所長）  
研究協力者 土方美奈子（同上）、森本耕三（公益財団法人結核予防会複十字病院）

研究要旨

原発性線毛機能不全症は、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以上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、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）との連携の結果、この3年間で54例の疑い例について鼻腔一酸化窒素(NO)濃度、電子顕微鏡による線毛微細構造観察を試み、鼻腔NO濃度の低い(<77 nl/min) 12例を効率よくスクリーニングすることに成功した。特筆すべきことは、わが国のPCDの原因遺伝子変異としておそらく最も高頻度に見られるDRC1遺伝子のエクソン1から4までをまたぐ27,748 bpの大規模な欠失事例の存在とそのヒトゲノム上の欠失位置を世界で初めて報告したことである(Morimoto et al. *Mol Genet Genomic Med* 2019)。この欠失は、非アジア人には見られず、アジア人における創始者変異のひとつと位置付けられるものと推測される。

2019年12月までに、ダイニン外腕欠損、10遺伝子、外腕+内腕欠損11遺伝子、内腕欠損+微小管の乱れ2遺伝子、放射状スポーク+中心対微小管欠損7遺伝子、その他15遺伝子の合計35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。その結果、DRC1の大規模欠失以外に、CCDC39のナンセンス変異2例、ARMC4遺伝子のナンセンス変異1例など病原性変異のホモ接合例を同定した。このような症例を蓄積することにより、わが国独自のPCD責任遺伝子変異のカタログ化が可能になるものと推測される。今後、効率的かつ確かな診断体系の確立に向けて、さらなる検討が必要な課題である。

A. 研究目的

現在わかっているだけでも、45以上の原因遺伝子に起因する原発性線毛機能不全症(primary ciliary dyskinesia; PCD)の効率的かつ確かな診断のためには、適切な遺伝子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明らかにするとともに<sup>1)</sup>、ノースカロライナ大学(M. Knowles 教授)との連携により、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た。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(Rhino-Probe®)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35遺伝子解析

2019年12月までに、ダイニン外腕欠損10遺伝子、外腕+内腕欠損11遺伝子、内腕欠損+微小管の乱れ2遺伝子、放射状スポーク+中心対微小管欠損7遺伝子、その他15遺伝子の合計35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。全体で、合計503エクソン、塩基配列長として合計約39.6 kbを解析対象とした。

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312 PCRプライマーセットをマルチプレックス化し、116 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 300 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](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。日本人ゲノム配列のバリエーション頻度情報を集約した TogoVar データベース (<https://togovar.biosciencedbc.jp/?>)より、日本人集団におけるアリル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 スクリーニングツール(python)を用いて解析を行った。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

これまでに PCD 疑い症例 54 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 15 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. 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、その結果、わが国の PCD の原因遺伝子変異としておそらく最も高頻度に見られる *DRC1* 遺伝子のエクソン 1 から 4 までをまたぐ 27,748 bp の大規模な欠失事例の存在とそのヒトゲノム上の欠失位置を世界で初めて報告した(図)<sup>2)</sup>。引き続き、同一の *DRC1* 大規模欠失が、びまん性汎細気管支炎の症例定義に合致する症例の中にも見出されることを、後方視的研究により確認した<sup>3)</sup>。*DRC1* の大規模欠失以外に、*CCDC39* のナンセンス変異 2 例、*ARMC4* 遺伝子のナンセンス変異 1 例など病原性変異のホモ接合例を同定した。

## 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。

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) Inaba A, Furuhata M, Morimoto K, Rahman M, Takahashi O, Hijikata M, Knowles MR, Keicho N. Primary Ciliary Dyskinesia in Japan: Systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med.* Jul 25;19(1):135. doi: 10.1186/s12890-019-0897-4, 2019.
- 2) Morimoto K, Hijikata M, Zariwala MA, Nykamp K, Inaba A, Guo TC, Yamada H, Truty R, Sasaki Y, Ohta K, Kudoh S, Leigh MW, Knowles MR, Keicho N. Recurring large deletion in *DRC1* (*CCDC164*) identified as causing primary ciliary dyskinesia in two Asian patients. *Mol Genet Genomic Med.* 7: e838. doi: 10.1002/mgg3.838, 2019.
- 3) Keicho N, Hijikata M, Morimoto K, Homma S, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S. Primary ciliary dyskinesia caused by a large homozygous deletion including exons 1-4 of *DRC1* in Japanese patients with recurrent sinopulmonary infection. *Mol Genet Genomic Med.* DOI: 10.1002/mgg3.1033, 2019.
- 4) 慶長直人, 土方美奈子, 森本耕三. 特集 / びまん性肺疾患診療の新しい展開. びまん性汎細気管支炎と原発性線毛機能不全症. 臨床と研究. , 2019; 96(10), 57-62(1171-1176).
- 5) 慶長直人, びまん性汎細気管支炎. 『今日の診断指針 第8版』, 医学書院, 印刷中

2. 学会発表：

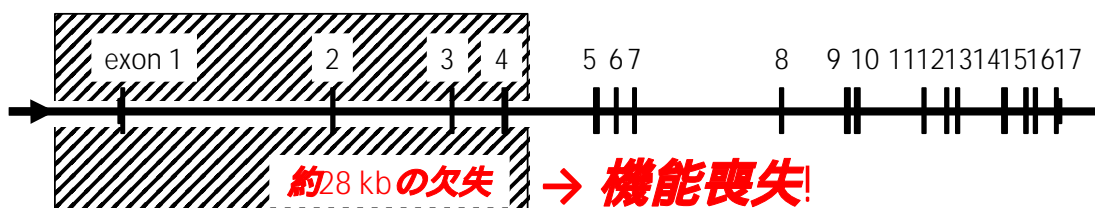
- 1) 稲葉敦, 古畑匡規, 森本耕三, ラーマン マハブール, 高橋理, 土方美奈子, 慶長直人. 本邦における原発性線毛機能不全症候群報告例のシステムティックレビューとメタアナリシス. 第44回難治性気道疾患研究会, 東京, 2018年1月27日
- 2) 土方美奈子, 森本耕三, Chau NQ, Hang NTL,

Phuong PT, Dinh LC, 慶長 直人. 原発性線毛機能不全症候群原因遺伝子のPCR アンプリコン-NGS 解析を用いた変異探索. 第44回難治性気道疾患研究会, 東京, 2018年1月27日

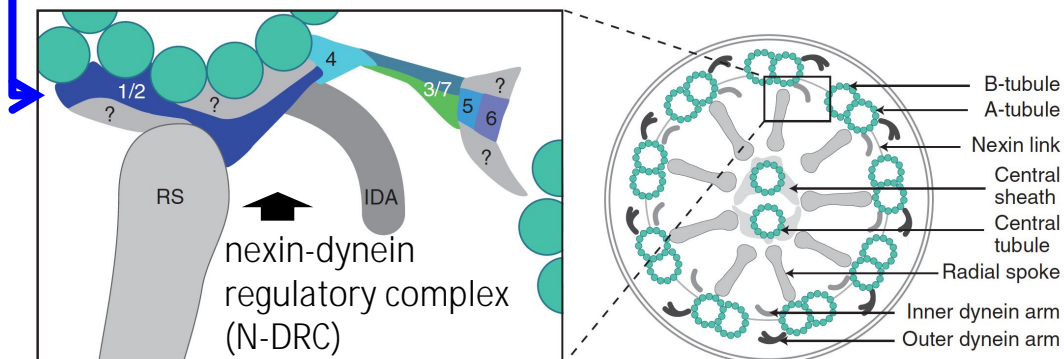
H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

図

## DRC1遺伝子内に見られる大規模欠失(模式図)



## DRC1の本来の局在



Wisshell M et al. Nat Genet. 2013; Morimoto K et al. Mol Genet Genomic Med. 2019 を改変