

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
土方美奈子 同上
研究協力者 森本耕三 公益財団法人結核予防会 複十字病院
三重大学 耳鼻咽喉・頭頸部外科 竹内万彦
藤田医科大学呼吸器内科 橋本直純

研究要旨：

線毛機能不全症候群（原発性線毛機能不全症、原発性線毛運動不全症）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、主に常染色体潜性（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、すでに 50 個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、鼻腔一酸化窒素 (NO) 濃度測定、線毛構造の電子顕微鏡観察、遺伝子解析を実施しており、過去 4 年間で 179 例の疑い例について鼻腔 NO 濃度測定を行い、濃度の低い (<77 nl/min) 68 例を効率よくスクリーニングすることに成功した。我々が世界で初めて報告した *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 (Morimoto et al. *Mol Genet Genomic Med* 2019) は、わが国の PCD の原因遺伝子変異として最も高頻度に見られると推定されており、今年度遺伝子解析を実施した低 nNO 値を示す疑い患者 15 名中 5 名 (33%) に、この大規模欠失のホモ接合型が見られた。

これ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、内腕欠損 1 遺伝子、放射状スポーク+中心対微小管欠損 5 遺伝子、その他 13 遺伝子の合計 42 遺伝子のコーディング領域周辺の変異検出系を確立している。その結果、今年度は、*DRC1* の大規模欠失以外に、*CCDC39*, *CCDC40*, *DNAAF1*, *RSPH4A* 遺伝子などに異常が見出されている。またターゲットリシーケンスで遺伝子異常が見出されない症例の診断向上のため、鼻粘膜生検材料の RNA 発現網羅解析を実施し、発現量の異常やスプライシング異常の検出を行い、報告した。

「線毛機能不全症候群（カルタゲナー（Kartagener）症候群を含む。）」を指定難病に追加指定する部会報告案が 2023 年 6 月の厚生科学審議会（疾病対策部会）にて了承され [34]、難病の患者に対する医療等に関する法律の規定に基づき、令和 5 年厚生労働省告示第 294 号により、2024 年（令和 6 年）4 月 1 日から 340 番目の指定難病となることが正式に通知された。今後、効率的かつ的確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、50 個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) の効率的かつ的確な診断のためには、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、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、PCD 遺伝子解析に至る無駄のない PCD 診断系を確立し、わが国における PCD 原因遺伝子の頻度を知ることを目的に症例検討を行った。

B. 研究方法

1. 鼻腔 NO 濃度、鼻粘膜生検、PCD 遺伝子解

析

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、鼻腔 NO 濃度、線毛構造の電子顕微鏡観察、遺伝子検索を実施した。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) 症例で気管支拡張症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 42 遺伝子解析

これまでに、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、内腕欠損 1 遺伝子、放射状スポーク+中心対微小管欠損 5 遺伝子、その他 13 遺伝子の合計 42 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 (図)。全体で、合計 657 エクソンを解析対象とした。

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 376 PCR プライマーセットをマルチプレックス化し、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

micro 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 ver. 22 (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ーを確認の上、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=0YSaTqouja0xkte2-4690284) 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 jMorp データベース 54KJPN: Short-read WGS based SNV/INDEL analysis (<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/>) より、日本人集団におけるアレ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-イ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。

また鼻粘膜生検材料の RNA 発現網羅解析方法を確立し、発現量の異常やスプライシング異常の検出を行った。

(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. 鼻腔 NO 濃度、鼻粘膜生検、遺伝子解析

1) これまでに PCD 疑い症例 178 例において鼻腔 NO 測定をおこなった。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 68 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. PCD 原因遺伝子の変異解析

鼻腔 NO 低値症例を中心に、今年度 26 例について遺伝子解析を行い、これまでの遺伝子解析症例は合計 138 例になった。その結果、*DRC1* 遺伝子のエクソン 1 から 4 までをまたぐ 27,748 bp の大規模な欠失症例は、これまでの検討で 23 例のホモ接合体が確認され、我々の遺伝子解析で明らかになった病原性変異の中で最も多い。我々の検討で日本人健常者において *DRC1* 大規模欠失が 0.2% のアリル頻度で見出されたこと、また Takeuchi らの報告 (Xu Y, et al. *J Hum Genet* 2023) とあわせ、わが国の PCD の原因遺伝子変異として最も高頻度であると思われる。本年度は *DRC1* の大規模欠失以外に、*CCDC39*, *CCDC40*, *DNAFI*, *RSPH44* 遺伝子などの病原性変異を有する例を同定した。鼻粘膜生検材料の RNA 発現網羅解析では、エクソンジャンクションから離れた位置にある変異によるスプライシング異常が効率よく検出可能なことを報告した⁽¹⁾。

2021 年 4 月に日本鼻科学会で「線毛機能不全症候群の診療の手引き作成委員会」を立ち上げ、本症の診療の手引きを作成した⁽²⁾。委員会は 28 名の委員で構成され、6 名の呼吸器内科医と 3 名の小児科医を含む。

指定難病申請は「線毛機能不全症候群の診療の手引き作成委員会 (竹内委員長)」、「びまん性肺疾患に関する調査研究班 (須田班長)」を情報提供元とし、日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会、日本鼻科学会、日本呼吸器学会、日本小児呼吸器学会の 4 学会の連名で厚生省に提出した。その結果、2023 年 3 月の厚生科学審議会 (疾病対策部会指定難病検討委員会) において同疾患を指定難病に追加指定する部会報告案がまとめられ、意見公募手続 (パブリックコメント) を経て、同年 6 月の厚生科学審議会 (疾病対策部会) にて了承され、難病の患者に対する医療等に関する法律の規定に基づき、令和 5 年厚生労働省告示第 294 号により、2024 年 (令和 6 年) 4 月 1 日から 340 番目の指定難病となることが正式に通知された。これに伴い、PCD は障害者総合支援法の対象疾患となることも通知された。

D. 考察

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。

関係各位の多大な努力により、本症が正式に指定難病として追加指定されることになった結果、確定診断には遺伝学的検査の実施と遺伝学的検査の保険収載が求められることが明確になってきており、「難病領域における検体検査の精度管理体制の整備に資する研究班 (難波班長) との連携が開始された。これまでに明らかにされた我が国における原因遺伝子の数と頻度はその際に重要な情報となっている。またそれ以外の特殊検査についても同様の働きかけが必要であることが確認された。

我が国における本症の臨床病態や遺伝子異常は、欧米のものと異なるため、その点を特に呼吸器科医に周知する目的で、解説、総説等を刊行した⁽³⁻⁵⁾。

さらに我々独自の取り組みとして、鼻粘膜生検材料の RNA 発現網羅解析により、スプライシング異常を検出し、その原因となる deep intronic variants を同定することが可能となった。発現量異常の検出やスプライシングの機能解析が、ターゲットリシーケンスだけでは診断できない症例の原因変異特定に大きく貢献することが期待される。

E. 結論

びまん性肺疾患に関する調査研究班を情報提供元として、令和 6 年 4 月 1 日から、本症が指定難病医療助成の対象に追加されることが正式に通知された。これま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) との連携を通じて、構築した診断システムを稼働させ、複数例の確診例を得ることができたことが、これらの成果につながっている。今後、さらに症例を蓄積することによって、わが国に適した診断システムを構築し、我が国における本症の現状と今後の展望を踏まえた研究の推進が望まれる。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- (1) Hijikata M, Morimoto K, Takekoshi D, Shimoda M, Wakabayashi K, Miyabayashi A, Guo TC, Yamada H, Keicho N. Analysis of Aberrant Splicing Events and Gene Expression Outliers in Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2023;68(6):702-705.
- (2) 「線毛機能不全症候群の診療の手引き」『日本鼻科学会会誌』第62巻第1号、日本鼻科学会、2023年、1-108頁、doi:10.7248/jjrhi.62.1。
- (3) Keicho N, Morimoto K, Hijikata M. The challenge of diagnosing primary ciliary dyskinesia: a commentary on various causative genes and their pathogenic variants. *J Hum Genet*. 2023;68(8):571-575.
- (4) Ito M, Morimoto K, Ohfuji T, Miyabayashi A, Wakabayashi K, Yamada H, Hijikata

M, Keicho N. FOXJ1

Variants Causing Primary Ciliary Dyskinesia

with Hydrocephalus: A Case Report from Japan. *Intern Med*. 2023 Oct 6. online

- (5) Keicho N, Hijikata M, Miyabayashi A, Wakabayashi K, Yamada H, Ito M, Morimoto K. Impact of primary ciliary dyskinesia: Beyond sinobronchial syndrome in Japan. *Respir Investig*. 2024;62(1):179-186.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

