

ポルフィリン症の患者調査、遺伝子変異解析と診療支援、診療ガイドライン の作成に関する研究

研究分担者 諏佐 真治 山形大学・大学院医学研究科・准教授

研究要旨

急性肝性ポルフィリン症は、ポルフィリン並びにその前駆体が体内に異常蓄積し、神経系や皮膚に影響を及ぼす遺伝性疾患で、様々な誘因により、腹痛、神経症状、精神症状などの急性発作を生じる。その発症には、ヘム合成酵素の遺伝子異常の保因者であることが前提である。これまで次世代シーケンサーの活用により、遺伝子変異の保因者の同定はより迅速かつ確実に同定できるようになってきた。しかしながら、遺伝子変異には多様性や複雑性があり、特定の変異によっては同定することが困難な場合もある。従来法で遺伝子変異を同定できなかった症例に対し、エクソーム解析のシーケンスデータを用いたコピー数多型解析により、11番染色体q23.3の領域に約1.2MBpの1コピー欠失を同定した。本システムは遺伝子検査法として臨床応用できる可能性があるが、コスト面で改善が必要と考える。

A. 研究目的

近年、ゲノム多様性として、DNAの量的な変化を生じるコピー数多型（Copy Number Variants: CNV）が、当初考えられていたよりはるかに高頻度ヒトゲノム中に存在し、生活習慣病などのヒトの形質差に影響を与える要因として注目されている。単一遺伝子変異による遺伝性疾患においては、従来、一塩基変異やゲノムサイズが1kbより小さいInDelsと呼ばれる遺伝子変異の解析が主流であるが、最近では、CNVによって発症する遺伝性疾患の報告が散見されるようになってきた。これまで我々は、急性肝性ポルフィリン症の4つの原因遺伝子に対して、カスタムプライマーを作成し、次世代シーケンサーで迅速かつ確実に遺伝子変異を同定するシステムを構築した。しかしながら、このシステムを用いても遺伝子変異を同定できない症例が存在する。

今回我々は、エクソーム解析によるシーケンスデータからCNVを同定するシステムを構築し、家系解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

対象は、急性間欠性ポルフィリン症を発症した1家系。両親と子4人（長男、長女、次女、三女）の家族構成で、三女が発端者。従来の遺伝子解析で原因遺伝子異常を検出できなかった。母は心不全で死亡しているが、30代で腹痛を繰り返し類症の可能性あり。長女も腹痛で入退院を繰り返しているが、遺伝子検査に同意は得られなかった。父親、長男、次女、三女の4名を対象とした。

対象者の白血球DNAを抽出し、Ion Proton™ システムで全エクソームシーケンスを行い、このデータをもとに、(1)bedtools プログラムにより遺伝子エクソンごとのリード深度を算出。以降はRプログラム言語を使用し、(2)性別情報とX染色体リード深度平均値から常染色体遺伝子エクソンのリード深度を補正。(3)補正深度を正規化し、一般健常者176名の正規化値を基に差分を算出してLog2値化。(4)log2値について、隠れマルコフモデルにより欠失と重複を判定した。

（倫理面への配慮）

急性肝性ポルフィリン症の遺伝子診断は、山形大学医学部倫理委員会審査、承認のもと、文章で患者に説明、同意を得た上で行なっている（承認番号:2023-208）。

C. 研究結果

発端者において、11番染色体q23.3の領域に約1.2MBpの1コピー欠失を同定した（図1）。この欠失領域に急性間欠性ポルフィリン症の原因遺伝子であるHMBS遺伝子が存在し、このCNVが原因遺伝子異常と考えられた。父、長男にはこのCNVは存在せず、次女にも同様のCNVが検出され、保因者の可能性が示唆された。

本CNVには、HMBS遺伝子を含め17遺伝子が存在するが、他の遺伝子で顕性遺伝形式の疾患の報告はなく、本CNVが他の疾患を発症する可能性は否定的と考えた。

D. 考察

CNV 解析において、感度、分解能、分析コストなどの観点から一般的に DNA オリゴマイクロアレイが広く用いられている。主に、SNP マイクロアレイと CGH (Comparative Genomic Hybridization) マイクロアレイが用いられているが、SNP マイクロアレイはシグナル/ノイズ比が低い問題があり、rare CNV 検出が困難とされている。CGH マイクロアレイは、より高感度かつ高精度で検出されるシステムであるが、解像度中央値が約 150kbp で、重複は 20kb、欠失は 10kb が最小領域であり、これ以下の CNV は検出できないなどの問題点がある。

シーケンスによる CNV 検出は、シーケンス情報と合わせてよりシームレスな検出が可能であるが、正確な duplication の検出が困難であること、マッピングするリファレンスゲノム配列に 2 倍体の情報がないことなどの問題点が挙げられる。当施設では、一般健常者 176 名のリファレンスシーケンスをもとにこれらの情報を独自に集積し、急性肝性ポルフィリン症の CNV 解析が可能となった。加えて、シーケンスデータからワークフローも確立し、より簡便に解析可能である。

一方、急性肝性ポルフィリン症の遺伝子解析は、5,000 点の保険点数で保険収載され、一般の遺伝子変異は委託検査で検査が可能であるが、CNV 解析には、少なくとも 1 検体に 15 万円程度の費用がかかるため、現実的に商業ベースでは成り立たない。今後はカスタム化を図り、コスト的な問題も改善する必要がある。

E. 結論

従来のカスタムプライマーを用いた次世代シーケンスで遺伝子変異を同定できなかった症例に対し、独自に開発した CNV 解析で、原因となる CNV の同定と家系解析をおこなった。今後はコスト的な問題を改善していく。

F. 健康危険情報

該当なし

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図 1 エクソーム解析データを用いたコピー数多型 (CNV) 解析

