

## 6 1. 性腺モザイクによる NKX2-5 機能喪失型変異が病因と考えられた房室ブロック合併左室心筋緻密化障害の兄弟例

國松将也<sup>1,2</sup>、古道一樹<sup>1</sup>、丸山篤志<sup>1</sup>、神野太郎<sup>1</sup>、湯浅絵理佳<sup>1</sup>、井上忠<sup>1</sup>、住友直文<sup>1</sup>、石崎怜奈<sup>1</sup>、小柳喬幸<sup>1</sup>、内田敬子<sup>1</sup>、古谷喜幸<sup>3</sup>、赤川浩之<sup>4</sup>、山岸敬幸<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>慶應義塾大学医学部小児科、<sup>2</sup>千葉大学大学院小児病態学、<sup>3</sup>循環器小児・成人先天性心疾患科、<sup>4</sup>総合医科学研究所)

〔目的〕 左室心筋緻密化障害 (LVNC) には多様な病態と病因が報告されており、転写因子 NKX2-5 の遺伝子変異も散見される<sup>1),2)</sup>。NKX2-5 は心房中隔欠損および房室ブロックの疾患原因遺伝子として知られているが<sup>3),4)</sup>、LVNC の発症に関連する遺伝子型-表現型関連は未だ明らかではない。今回、LVNC に房室ブロックを合併した兄弟例の遺伝子解析と過去の文献検索により、LVNC と房室ブロックに関連する NKX2-5 遺伝子型-表現型関連を明らかにすることを目的とした。

〔方法〕 LVNC に房室ブロックを合併した家族例として、罹患した兄弟の表現型を診療録をもとに調査し、遺伝学的原因を追求するために、両親および兄弟の末梢血より DNA を抽出し、全エクソン解析を実施した。

〔結果〕 自験例は 26 歳と 24 歳の兄弟。両親に先天性心疾患、心筋症、房室ブロックの家族歴なし。兄は大動脈縮窄症、大動脈二尖弁、心房中隔欠損症の修復術後、9 歳時に I 度房室ブロック、10 歳時に LVNC を指摘された。弟は 12 歳時に Wenckebach 型および 2 : 1 房室ブロックが見られ、15 歳時に失神発作、Holter 心電図上高度房室ブロックに伴う 8 秒のポーズが認められ、ペースメーカー留置後、16 歳時に LVNC を指摘された。

本家系の全エクソン解析により合計 156,279variants が検出され、一般人口での保有頻度 1%未満で病原性の可能性が高い variants として 1,244variants が残った。本家系の遺伝様式からは常染色体潜性遺伝、性染色体顕性遺伝、de novo 変異が考えられ、それぞれ 0 個、1 個、9 個の variants が候補として残った。これら 10variants から LVNC と房室ブロックに関与する変異の最有力候補として、NKX2-5 フレームシフト変異 (c.177delinsTCTGG) を検出した。この変異は、一般人口では報告がなく、新規の変異だった。また、兄弟には同一に認められ、両親には認められなかったことから、de novo 変異の性腺モザイクと考えられた。

〔考察〕 過去の文献から LVNC に認められた NKX2-5 変異の報告例をできる限り検索したところ、フレームシフトまたはナンセンス変異により、変異部位より C 端側が欠失する変異だった。1 例の例外は、Homeodomain 内のミスセンス変異によって引き起こされていた。そして、1 例の例外を除いて、すべての LVNC 症例に房室ブロックが認められていた。また、過去の多数例の検討で、房室ブロックに認められる NKX2-5 変異は、C 末端側が欠失するナンセンス変異または Homeodomain のミスセンス変異が多いことが示されており、今回の家族例と合わせて、NKX2.5 変異により発症する LVNC には、遺伝子型-表現型関連の見地からも、高率に房室ブロックを合併することが示唆された。これを支持す

る *in vivo* の実験として、胎生期に NKX2-5 を欠失したマウスで進行性伝導障害と心筋収縮障害を呈することが示されている<sup>5)</sup>。

〔結論〕 LVNC をきたす NKX2-5 の新規変異を発見した。性腺モザイクによる NKX2-5 変異の兄弟例を世界で初めて報告した。LVNC をきたす NKX2-5 の変異は高率に房室ブロックをきたすことを明らかにした。

〔文献〕

- 1) Clin Chim Acta. 2011; 412(1-2): 170-175
- 2) Circ Cardiovasc Genet. 2014 ;7(4):423-433
- 3) Science. 1998 Jul 3;281(5373): 108-111
- 4) Lab Invest. 2009; 89(9): 983-993
- 5) J Clin Invest. 2004;113(8): 1130-1137

〔学会発表〕

- 1) 國松将也、他. 性腺モザイクによる NKX2-5 機能喪失型変異が病因と考えられた房室ブロック合併左室心筋緻密化障害の兄弟例. 第 41 回日本小児循環動態研究会・第 31 回日本小児心筋疾患学会 合同学術集会、静岡県、 2022/10

## 6 2. ロングリード・シーケンスによる染色体再構成の切断・融合点の解析

田村豪良<sup>1</sup>、山本圭子<sup>2</sup>、山本俊至<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>大学院医学研究科先端生命医科学系専攻遺伝子医学分野、<sup>2</sup>輸血・細胞プロセッシング科、<sup>3</sup>ゲノム診療科)

〔目的〕 染色体異常はしばしば先天性疾患や発達遅滞の原因となっていることがある。血液の悪性腫瘍においても、染色体再構成が発症の引き金となっている場合があることはよく知られている。それらのうち共通して認められるものについては、切断・融合点が明らかになっており、融合遺伝子が発症と関わっている場合がある。しかしながら、新規の稀な染色体構造異常については、切断・融合点を確認することは非常に難易度が高く、遺伝子のクローニング目的以外ではほとんど報告がなかった。近年、ショート・リードに続く新しい技術による第3世代のロングリード・シーケンサーの登場により、ブレイクスルーが起きている。我々は、これまでの研究で明らかにしてきた稀な染色体構造異常の切断・融合点を確認する手段としてロングリード・シーケンスを行った。

〔方法〕 これまでの研究で染色体上の近傍で複数の染色体構造異常が認められた4サンプルについて、過去の報告に従い、Oxford Nanopore社製 Nanopore シーケンスを用いて切断・融合点を解析した<sup>1),2)</sup>。Integrative Genomics Viewer (IGV)を用いて切断点を同定した。切断点近傍に融合部分を増幅させるための primer を設計し、Sanger シーケンスにより塩基レベルで切断点を確認した。

〔結果〕 同じ染色体腕内で2つ以上の染色体変化を示した4サンプル全てにおいて、切断・融合点を確認できた。それらは互いに複雑に絡み合っており、結果として全体的な複雑な染色体再編成を形成していた。2つの連続する欠失を示したサンプルにおいては切断・融合点には microhomology が認められ、chromothripsis によって生じたことが示唆された。一方、欠失と重複が認められた2サンプルにおいては平滑末端と非テンプレート挿入が認められた。このことは、ポリメラーゼシータに関連するメカニズムである alternative non-homologous end-joining によってのみ説明できた。

〔考察〕 クラスター化された複数の染色体異常が同じ染色体腕内で観察される場合、複雑な再編成が生じていることを考慮する必要があることが示唆された。

〔結論〕 本研究によって複雑な構造異常が疑われる場合は、ロングリード・シーケンスによるより詳細な分析が推奨される。

〔文献〕

1) Imaizumi T., Yamamoto-Shimojima K., Yanagishita T., et al. (2020) Hum. Genet. 139:1555-1563

2) Imaizumi T., Yamamoto-Shimojima K., Yanagishita T., et al. (2020) J. Hum. Genet. 65:735-741

[発表論文]

- 1) Tamura T., Shimojima Yamamoto K., Okamoto N., et al. (2022) Long-read sequence analysis for clustered genomic copy number aberrations revealed architectures of intricately intertwined rearrangements. Am J Med Genet A in press

[学会発表]

- 1) 田村豪良、下島圭子、谷ヶ崎博、他. ロングリード・シーケンスによる連続する2つの微細欠失の構造解析. 日本人類遺伝学会第66回大会・第28回日本遺伝子診療学会、神奈川、2021/10

### 6 3. 単一遺伝子異常による MODY 原因遺伝子の網羅的解析と個別化医療の実践

岩崎直子<sup>1,2,3,4</sup>、田中慧<sup>3,4</sup>、東剣虹<sup>4</sup>、赤川浩之<sup>4</sup>

(1成人医学センター、<sup>2</sup>ゲノム診療科、<sup>3</sup>糖尿病・代謝内科学、<sup>4</sup>総合医科学研究所)

〔目的〕 単一遺伝子異常によって発症する糖尿病の大部分を占める MODY(maturity onset diabetes of the young)患者数は1.2万人以上と推定される。患者 QOL 向上に資する個別化医療の実践のために MODY 遺伝子の効率的な解析方法が必須である。原因遺伝子不明の MODY を対象として、網羅的に病因となる variant を検討することを目的とした。

〔方法〕 昨年度に引き続き、whole exome sequencing (WES)を継続した。今年度は72例を対象として diabetes をキーワードに持つ OMIM の既知遺伝性疾患座位 ID を持つ63遺伝子 (MODY 遺伝子14種類を含む) を検討した。eXome Hidden Markov Model (XHMM)を用いて Copy number variation (CNV)を検討し、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)で確認した。必要に応じて細胞レベルの機能解析を行い、ACMG Guidelines 2015により病原性を判定した。

〔結果〕 症例数は72例で新規症例14例(New sample)と、サンガー法を用いた候補遺伝子検討で原因遺伝子が未同定で、単一遺伝子異常による糖尿病が強く疑われる58例(Old sample)である。New sample は WES 解析から検討を開始、Old sample は今回 WES 解析を実施した。72例全体の診断年齢は16.8±5.3、MODY が疑われる前は1型糖尿病や2型糖尿病として治療されていた。New sample14例中8名(57%)に病的 variants を同定できたが、出現率の高い MODY 以外に MODY12 および Wolfram 症候群(novel variants、compound heterozygote)を同定し得た(発表論文1)。Old sample 58例中7例(12%)に原因遺伝子を同定できた。内訳は、MODY4、インスリン受容体異常症に加え、サンガー法では検出不能の CNV 症例が XHMM を用いた CNV スクリーニングによって、(MODY1)HNF4A 遺伝子の片アレル欠失と exon 5-7 の片アレル欠失を各1例ずつ検出することができ、MLPA によって検証した。さらに、複数家系において新規候補遺伝子の pathogenic variants が検出されており、本研究からアジア人特有の新規 MODY 遺伝子が同定できる可能性があるため、さらなる検討を進める予定である。本研究は東京女子医科大学倫理審査委員会の承認を受けて実施された。

〔考察〕 CNV を含めた解析が必要であることが示された。糖代謝に関連する新規の候補遺伝子も複数家系で検出されており、新規の MODY 遺伝子を同定できる可能性がある。

〔結論〕 全体では15/72症例(20.8%)に原因遺伝子を同定した。WES に XHMM 解析を加えた網羅的解析手法が有用と考えられる。

〔発表論文〕

1) Satoshi Tanaka<sup>1</sup>, Hiroyuki Akagawa<sup>1</sup>, Kenkou Azuma<sup>1</sup>, Kaoru Watanabe<sup>2</sup>, Sayaka Higuchi<sup>1</sup>, Naoko Iwasaki<sup>1,3,4</sup>. (2022) Identification of novel variants of Wolfram syndrome 1 gene in a patient with suspected maturity-onset diabetes of the young. (in revision)

- 2) Atsushi Ujiie<sup>1</sup>, Naoko Iwasaki<sup>2,3,4,5\*</sup>, Hiroyuki Akagawa<sup>3</sup>, et al. (2022) A novel pathogenic variant in the glucokinase gene found in a Japanese sibling with maturity-onset diabetes of the young 2. (in revision)
- 3) 岩崎直子. (2022) 遺伝医学. 朝倉内科学 第12版1巻:19-28 朝倉書店 東京 ISBN 978-4-254-32280-4
- 4) 岩崎直子. (2022) ミトコンドリア糖尿病(MIDD). ガイドライン以内糖尿病薬物をガイドする 第1版:126-133 新興医学出版社 東京 ISBN 978-4-88002-920-7
- 5) 岩崎直子. (2022) 単一遺伝子異常による糖尿病の診断—MIDD、MODYなどの遺伝子診断をどのように進めるか—. 糖尿病・内分泌代謝科 55 6:728-735 ISSN2435-1946
- 6) 岩崎直子. (2021) ルーブリック評価概論. 遺伝子医学 11 4:66-70
- 7) 岩崎直子. (2021) 医療従事者を対象とした教育 臨床遺伝専門医テキストシリーズ I 臨床遺伝学総論 154-156 ISBN 978-4-7878-2367-0
- 8) 岩崎直子. (2021) 一般啓発活動 臨床遺伝専門医テキストシリーズ I 臨床遺伝学総論 157-158 ISBN 978-4-7878-2367-0
- 9) 岩崎直子. (2021) 臨床遺伝専門医テキストシリーズ IV成人編 編集・監修 ISBN 978-4-7878-2516-2

[学会発表]

- 1) 岩崎直子. 糖尿病のprecision medicineを目指して—MODYの御診断による患者QOL向上のために—. 第56回糖尿病学の進歩. 富山 (Web開催)、2022/2
- 2) 田中慧、赤川浩之、馬場園哲也、岩崎直子. 成人期に診断された新規バリエーションによる MODY2 の姉妹例. 第65回日本糖尿病学会. 神戸、2022/5
- 3) 岩崎直子、田中慧、赤川浩之、尾形真規子、井出理沙、馬場園哲也、齋藤加代子. MODY5疑い症例のスクリーニングにより同定された15例のMODY5症例におけるgenotype-phenotypeの検討. 第65回日本糖尿病学会、神戸、2022/5
- 4) Tanaka S, Iwasaki N. Outcome of Providing the Precision Medicine in Patients with Monogenic Diabetes. American College of Physicians Japan Chapter 年次総会・講演会 Kyoto (Web開催) 2022/6
- 5) Tanaka S, Akagawa H, Ogata M, Iwasaki N. Genetic screening for monogenic diabetes using whole exome sequencing in a single hospital cohort in Japan. 58th European Association for the Study of Diabetes Annual meeting, Stockholm, Sweden,2022/9
- 6) 岩崎直子. <シンポジウム⑥ 予防に活かす 最新の臨床研究の成果>糖尿病治療における個別化医療の重要性. 第60回日本糖尿病学会、九州地方会、博多、2022/10
- 7) 岩崎直子. シンポジウム8「糖尿病および合併症の遺伝素因」 単一遺伝子異常による糖尿病の個別化医療に向けた展望. 第37回日本糖尿病合併症学会、京都、2022/10
- 8) 田中慧、赤川浩之、岩崎直子. 日本人MODY1患者の全エクソームシーケンシング解析. 日本人類遺伝学会 第67回大会、横浜、2022/12
- 9) 岩崎直子. 次世代シーケンサーを用いたMonogenic diabetesのスクリーニング. 第66回日本人類遺伝学会、横浜、2022/12

#### 6 4. ジストニア症例を対象とした DYT 遺伝子群の変異頻度および傾向の解析

東剣虹<sup>1</sup>、堀澤士朗<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>総合医科学研究所、<sup>2</sup>脳神経外科学)

〔目的〕 ジストニアは大脳基底核をはじめ、視床、小脳、大脳皮質等の異常によって生じる、筋肉の異常収縮をきたす病態を表した病名であり、様々な遺伝子 (DYT 遺伝子) が関与することが明らかとなってきた。今回、その中でも振戦やミオクローヌス(痙攣の一種)を併発するミオクローヌスジストニアに関与する *SGCE* についての研究をまとめた。

〔方法〕 本院、並びに都立神経病院など提携を結んでいる病院から紹介された遺伝性ジストニア疑い症例を対象に、代表的なジストニア原因遺伝子についてのターゲットシーケンスを行い、CADD スコアや ClinVar, Polyphen2 などのツールを用いて、有意と思われるバリエーションの抽出を行った。また、スプライシングバリエーションや一部の VUS(臨床的意義不明なバリエーション)については、Minigene アッセイや HiBiT システムを用いて、スプライシング異常の解析と、タンパク質の発現・局在解析を行った。

〔結果・考察〕 165 例の遺伝性ジストニア疑い症例の中の 10 家系 13 症例において、9 種類の有意と思われる *SGCE* バリエーションを検出した(図 1)。図中のアミノ酸表記(p.)に Ter の表記があるものはナンセンスかフレームシフトによる終止コドンの挿入を意味している。

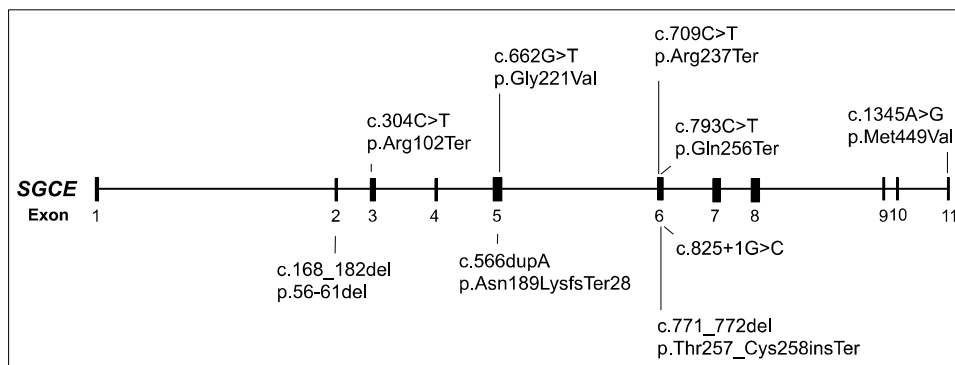


図 1. *SGCE* で検出されたバリエーション

一方、上記以外のバリエーションについて。まず、c.662G>T と c.825+1G>C に着目した。この 2 つのバリエーションはそれぞれエクソン 5 とエクソン 6 の splicing donor 領域に局在するものである。そこで、Minigene アッセイを用いて *in vitro* で解析を行った。その結果、いずれのバリエーションも変異型の方では splicing 異常が起きて、エクソンが欠失することが明らかとなった(図 2)。アミノ酸への影響としては、c.662G>T:p.Asp155AlafsTer25 と c.825+1G>C:p.Val222LeufsTer12 となる。

次に、インフレーム欠失の c.168\_182del とミッセンズバリエーション c.1345A>G に関する解析について。一見、この 2 つのバリエーションは VUS であることから、*SGCE* がコードする ε-サルコグリカンの発現量解析を以て評価することにした。その結果、いずれのバリエーションも ε-サルコグリカンの発現量を低下させることが明らかとなった(図 3)。

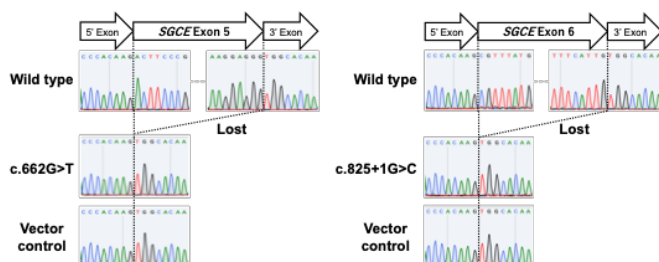


図 2. 逆転写産物のシーケンス結果

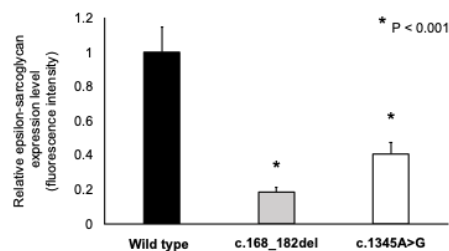


図 3. 発現解析結果

以上の結果を踏まえて、改めてバリエーションの解釈をすると、前者の 2 つのバリエーションはいずれも **splicing** 異常を引き起こし、その結果フレームシフトが起こることが示唆された。一方、後者の 2 つのバリエーションはいずれもタンパク質レベルでの発現低下に寄与することが示唆された。また、今回検出されたナンセンスやフレームシフトバリエーションについても、そのいずれもがエクソン 7 より前に終止コドンが出現するため、エクソン 7 とそれ以降にコードされている膜貫通領域と細胞局在領域が失われてしまうことが予想される。よって、これらバリエーションは全て **loss-of-function** であることが示唆された。以上の内容は論文として、**Clinical Genetics** にアクセプトされた(論文 1)。

[論文(降順)]

- 1) Azuma K, Horisawa S, Mashimo H, Fukuda M, Kumada S, Kawamata T, Taira T, Akagawa H. “Loss-of-function mutations in SGCE found in Japanese patients with myoclonus dystonia.” *Clin Genet.* 2022 doi: 10.1111/cge.14233
- 2) Shimazaki R, Ikezawa J, Okiyama R, Azuma K, Akagawa H, Takahashi K. “Dystonic Tremor in Adult-onset DYT-KMT2B.” *Inter Med.* 2022 61(15):2357-2360

[学会発表]

- 1) 東剣虹、堀澤士朗、眞下秀明、福田光成、熊田聡子、川俣貴一、平孝臣、赤川浩之. 「ミオクローヌス-ジストニア症例群における機能欠失型変異の同定」. 日本人類遺伝学会第 65 回大会 (口頭発表) O25-3 横浜



## 6 5. ヨーガ療法が健常者に及ぼす心理変化と遺伝子発現変化の解析

樋口清香<sup>1</sup>、毛塚由希子<sup>2</sup>、三谷昌平<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>総合医科学研究所、<sup>2</sup>日本ヨーガ療法学会、<sup>3</sup>生理学 (分子細胞生理学分野))

〔目的〕 現代の医療体制では、西洋医学が抜きん出た地位にあるが、相補 (補完) / 代替療法も太古より並走する形で現在に至る。ヨーガは代表的な代替医療 (心身相関療法) に位置付けられており、疾患の有無を問わず、健康な成人においても、近年活動人口が顕著に増加している。海外を中心に、近年、様々な疾患を持つ患者や健常者に対し、ヨーガの効果を科学的に検証しようという試みもなされてきている<sup>1)5)</sup>。しかし、日本では、ヨーガ療法は、一般的な医療の現場に浸透していない。また、科学の分野においても、効果の検証に殆どの機関が乗り出していないのが実状である。この現状を打開する為に、本研究では、ヨーガ療法士と生化学分野の研究者とが共同研究を行い、ヨーガ療法の健常者に対する効果を心理調査、遺伝子発現解析を用い科学的検証を行う事を目的とした。

〔方法〕 倫理委員会承認後、研究に参加して下さる健常者ボランティア7人を募集した。どのような被験者に対し効果が現れるのか調査する目的で、性別・年齢・喫煙歴・(健常者であるけれども) 病院へ通う程ではないが現在不調に感じている事について事前にアンケート調査を行った。不調があると回答した被験者に対しては、その不調の変化をヨーガ療法介入期間終了後、聞き取り調査した。ヨーガ療法の実地は、日本ヨーガ療法学会公認ヨーガ療法士の毛塚由希子氏が、45分のヨーガ療法プログラム動画を作成し、被験者には、この動画を週1回視聴し実施してもらい、3か月間介入した。また、心理面の客観データとして、心理調査として実績のある、POMS (気分プロフィール検査)、STAI (状態—特性不安検査) の検査を盛り込んだ。また、ヨーガの効果と遺伝子発現変化を検証する為、リアルタイム PCR 解析を行い、科学的検証の一助とした。遺伝子発現解析の生体サンプルは、唾液に含まれる口腔内細胞を用いた。また、口腔内 pH は、虫歯のなりやすさやストレスと関係が示唆されており、口腔内 pH データも測定した。最後に、ヨーガ療法が及ぼす心身への影響を考察した。

〔結果〕 研究期間を通じて、被験者にヨーガによる有害事象は無かった。年齢や性別による効果の偏りも見られなかった。また、全ての被験者の唾液 pH は、ヨーガ療法介入の前後で特に変化は無かった。更に、7人中2人は、研究期間中大きな環境変化 (自転車事故による怪我等) が起きた為に、ヨーガ療法効果の判断が難しいとした。また別の2人は、研究期間を通じて、心身共に健康であり、ヨーガ療法が彼らに与えた利益・不利益は未知数であった。残りの3人について、身心又は心理面において、大きな改善が認められた。その3人の内2人は、ヨーガ療法介入前にアンケート用紙に書かれていた、病院に行くほどではないが不調に感じている身体症状、月経前症候群 (PMS) ・寝つきが悪い・背中が痛くなる (ぎっくり背中?) の症状が、3か月の介入の後、無くなったと回答した。この2人については、心理学調査、STAI 状態不安の低下と、POMS のストレスレベルが下がっていた。更に、前者については、炎症系シグナル分子である、NFkB1 の発現が激減しており、後者に於いては、活性酸素除去酵素 SOD1 と抗炎症シグナル分子として知られる IL10 の発現上昇が見られた。もう1人の被験者は、心理学面では POMS 調査で大きな改善 (心療内科に通う事を進めるレベルのストレス値からの改善) が認められた。また、介入前にアンケートに記載されていた不調 (肩こり・腰痛・気分が落ち込み気味・疲

れが取れない・首こり)は、介入後も現状維持と回答を得たが、ヨーガ療法の介入期間を通じて、リフレッシュできる、深く眠れた、みぞおちのリンパが柔らかくなる等の身体変化が報告された。この被験者の唾液からは、残念ながらリアルタイム PCR 解析の実験系では、遺伝子発現解析ができなかった。

〔考察〕 ヨーガ療法介入により身心又は心理面において、改善が認められた3人について考察する。まず初めに、ヨーガ療法介入により心理学検査と体調面が共に改善し、遺伝子発現解析も行えた2人について考察する。1人は、炎症系シグナル分子である、NFkB1 の発現が激減しており、もう1人は、活性酸素除去酵素 SOD1 と抗炎症シグナル分子として知られる IL10 の発現上昇が見られた。被験者ごとに異なる遺伝子の発現変化が顕著であった事から、健常者に於いて、身体の不快な症状を癒す為に動く遺伝子群は、その時と場合により、各個人に適した遺伝子の発現が調整されているのではないかと示唆された。次に、被験者の唾液成分が特殊だった為かりリアルタイム PCR 解析が上手くいかず、遺伝子発現解析が行えなかった残り1人の被験者について考察する。POMS 心理学調査では大きな心理面の改善が認められた。しかし、身体症状においては、被験者本人が自覚する身体への好影響は報告されたものの、事前のアンケートに記載されていた、肩こり・腰痛・疲れが取れない・首こりの症状が介入期間後もそのまま維持された。元々ストレスレベルが高く、健常者とはいえ、既に身体への不調を複数自覚している被験者は、身心の健康を取り戻すまでに3か月間の介入では足りず、長い期間のヨーガ療法介入が必要だと考えられた。

〔結論〕 今回の研究で有害事象は無く、被験者にも好意的に受け入れられた事から、ヨーガ療法は、健常者へ安全に介入できる療法であると考えられた。ヨーガ療法介入で、身体の不調改善、心理検査の改善に加え、NFkB1、SOD1、IL10 の遺伝子発現が変化する被験者が確認された。ヨーガ療法は、身心にゆるやかに作用すると考えられ、介入前の心身の健康状態が大きく乱れている人は、改善に要する介入期間が長く必要であると示唆された。

#### 〔文献〕

- 1) Buric I., Farias M., Jong J., *et al.* (2017) *Front Immunol.* 8: 670
- 2) Black S. D., Cole W. S., Irwin R. M., *et al.* (2013) *Psychoneuroendocrinology.* 38(3): 348-55
- 3) Bower E. J., Greendale G., Crosswell D. A., *et al.* (2014) *Psychoneuroendocrinology.* 43: 20-9
- 4) Sharma H., Datta P., Singh A., *et al.* (2008) *J Psychosom Res.* 64(2): 213-8
- 5) Epel E. S., Puterman E., Lin J., *et al.* (2016) *Transl Psychiatry.* 6(8): e880

#### 〔学会発表〕

- 1) Sayaka Higuchi, Yukiko Kezuka, Shohei Mitani. The investigation of changing effects of Yoga therapy on psychological and gene expression states of healthy subjects. The 19th Congress of the Asian College of Psychosomatic Medicine (ACPM), IRKUTSK, RUSSIA, 23-24 August 2022

## 6 6. 日本人脳動脈瘤罹患家系の全エクソーム解析による新規感受性遺伝子の同定

前川達哉<sup>1,2</sup>、糟谷英俊<sup>1</sup>、赤川浩之<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>足立医療センター・脳神経外科、<sup>2</sup>総合医科学研究所)

〔目的〕 脳動脈瘤はくも膜下出血を引き起こし、しばしば予後不良の転機をたどる。脳動脈瘤は多因子疾患であり、様々な危険因子のなかには遺伝的要因も含まれる。この遺伝的要因を解明するためにはゲノムワイド関連解析 (GWAS) が標準的な手法であり、近年の大規模 GWAS によって脳動脈瘤の遺伝力のおよそ半分が特定されるに至った。しかし、GWAS では特定し得ない遺伝力が残されており、そこにはレア・バリエントの寄与が想定されている。我々はこれまで家族性動脈瘤の家系を収集してきたが、このうち 3 世代にわたって 7 人の患者を生じた大家系に注目した。次世代シーケンシングにより網羅的にレア・バリエントを抽出し、脳動脈瘤の成因解明のため新規感受性遺伝子の探索を行った。

〔方法〕 本家系の罹患患者 4 人・非罹患患者 3 人に全エクソーム解析を行った。併せて一塩基多型 (SNP) アレイによるゲノムワイド SNP ジェノタイプピングも行って、連鎖解析および identity by descent (IBD) セグメントの共有パターンを明らかにすることにより、効率的かつ高精度に候補バリエントの抽出を行った。罹患患者で共有される有害なレア・バリエントについては培養細胞を用いた変異機能解析を行い、さらに追加患者 500 例、対照 323 例を用いてレア・バリエント関連解析も行った。

〔結果〕 罹患患者 4 人全員で共有された 2 個の有害な遺伝子変異に着目した。一方は *NPNT* (Nephronectin) 遺伝子のスプライスドナー部位バリエント c.1515+1G>A で、minigene assay により第 10 エクソンの skipping を来すことが確認された。これによりフレームシフトが起こり直後に停止コドンを生じる (p.Gly450ArgfsTer5)。もう一方は *CBY2* (Chibby family member 2) 遺伝子のミスセンスバリエント p.Pro83Thr で、赤色蛍光タグによる生細胞イメージングにより細胞質内で点状の異常凝集を生じることが確認された。PASTA2 プログラムによる解析では p.Pro83Thr 置換によって同部位周辺に逆平行凝集モチーフが獲得されるとの予測であった。この p.Pro83Thr バリエントは別家系の罹患同胞でも共有が確認されたということもあり、*CBY2* についてはコーディング領域全域を追加患者 500 例、対照 323 例でリシーケンシングしてレア・バリエント関連解析も行った。その結果、PloyPhen2 と SIFT で再現性をもって有害と判定されるバリエント 3 種類 (p.Arg55His, p.Pro83Thr, p.Leu192Arg) が患者特有に検出され有意な関連を示した (患者合計 8/501、対照合計 0/323、P=0.026、フィッシャーの正確確率検定)。

〔考察〕 *NPNT* がコードする細胞外マトリクス Nephronectin は既に血管内皮機能や血管新生に関わる分子であることが知られている。一方、*CBY2* はこれまで疾患との関わりが報告されていない新規分子であったが、免疫組織学的検討や組織由来 RNA を用いた逆転写 PCR 法により脳血管平滑筋に発現していることを確認した。本家系では *NPNT* と *CBY2* の異常がそれぞれ脳血管内皮および平滑筋細胞の機能障害を惹起し、脳動脈瘤の発生に寄与すると考えられた。*CBY2* 蛋白は相同蛋白 *CBY1* とともに細胞の 1 次繊毛(primary cilia)の形成に重要な polycystin-2 蛋白と交絡することが報告されている。polycystin-2 をコードする *PKD2* 遺伝子は脳動脈瘤を高率に合併することでも知られる常染色体顕性遺

伝性多発嚢胞腎症 (ADPKD) の原因遺伝子である。この点からも、*CBY2* は脳動脈瘤の成因にかかわる重要な分子パスウェイの一員であることが支持される。その一方で、*NPNT* や *CBY2* の病的バリエントを有する患者は少数であり、脳動脈瘤の高度な座位異質性を反映した。今後、脳動脈瘤を多発する家系の分析データを蓄積していくことで、脳動脈瘤の複雑な多因子構造が解明されていくだろう。

以上の結果は下記文献 1) にて論文報告した。本学ホームページ上でもより詳細な内容についてプレスリリースしているので参照されたい (足立医療センターホームページ <https://twmu-amc.jp/hottopics/>)。

[結論] 日本人脳動脈瘤家系の解析により新たな脳動脈瘤感受性遺伝子 *NPNT* および *CBY2* 遺伝子を特定した。複数の遺伝要因の重責による発症メカニズム、そして高度な座位異質性も示され、家族性脳動脈瘤の遺伝的背景は複雑であることが確認された。

[文献]

- 1) Tatsuya Maegawa, Hiroyuki Akagawa, Hideaki Onda, Hidetoshi Kasuya. Whole-exome sequencing in a Japanese multiplex family identifies new susceptibility genes for intracranial aneurysms. PLoS One. 2022;17(3):e0265359

[発表論文]

- 1) Shoko Hara, Maki Mukawa, Hiroyuki Akagawa, Thiparpa Thamamongood, Motoki Inaji, Yoji Tanaka, Taketoshi Maehara, Hidetoshi Kasuya, Tadashi Nariai. Absence of the RNF213 p.R4810K variant may indicate a severe form of pediatric moyamoya disease in Japanese patients. J Neurosurg Pediatr. 2021;29(1):48-56
- 2) Keiko Yamamoto-Shimajima, Hiroyuki Akagawa, Kumiko Yanagi, Tadashi Kaname, Nobuhiko Okamoto, Toshiyuki Yamamoto. Deep intronic deletion in intron 3 of PLP1 is associated with a severe phenotype of Pelizaeus-Merzbacher disease. Hum Genome Var. 2021;8(1):14

[学会発表]

- 1) 前川達哉、赤川浩之、恩田英明、糟谷英俊：「日本人脳動脈瘤罹患家系に対する全エクソーム解析と新規感受性遺伝子の発見」日本脳神経外科学会第 79 回学術総会、口演、岡山、2020/10
- 2) 赤川浩之、前川達哉、恩田英明、糟谷英俊、久保田有一：「日本人脳動脈瘤家系に対する全エクソーム解析と新規感受性遺伝子の同定」第 22 回日本分子脳神経外科学会、シンポジウム、金沢、2022/7

## 67. オートファゴソームの蓄積によるがん細胞の排除

Eilma Akter<sup>1</sup>、昆俊亮<sup>1</sup>、田邊賢司<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>東京理科大学生命医科学研究所、<sup>2</sup>総合医科学研究所)

〔目的〕 正常細胞の集団内において、がん細胞の発生は日常的に起こっていることが示されている。しかしながら、生体内には発生したがん細胞を排除する機構が備わっているため（細胞競合）、多くの場合でがんの発病には至らない。一方、がん発生の初期においてはオートファジーが抗腫瘍的に働くことが示唆されており、本研究では細胞競合とオートファジーの関係に着目して解析を行った。

〔方法と結果〕 活性化型 Ras 変異体 (RasV12) を MDCK 細胞に発現させ (MDCK-pTR GFP-RasV12)、単独培養もしくは正常 MDCK 細胞との混合培養 (1:50) を行った。テトラサイクリン添加による GFP-RasV12 の発現を促すことで混合培養における細胞競合を誘導し、24 時間後に固定した。GFP-RasV12 の発現確認は蛍光顕微鏡で行い、該当する細胞を透過電子顕微鏡により観察した。代表的な写真を図 1 に示す。混合培養した GFP-RasV12 発現細胞ではオートファゴソームが顕著に増加していた。なかでも電子密度の高いオートリソソームとみられる構造体が多数観察され、オートファジーの機能不全が起こっていることが示唆された (図 1)。

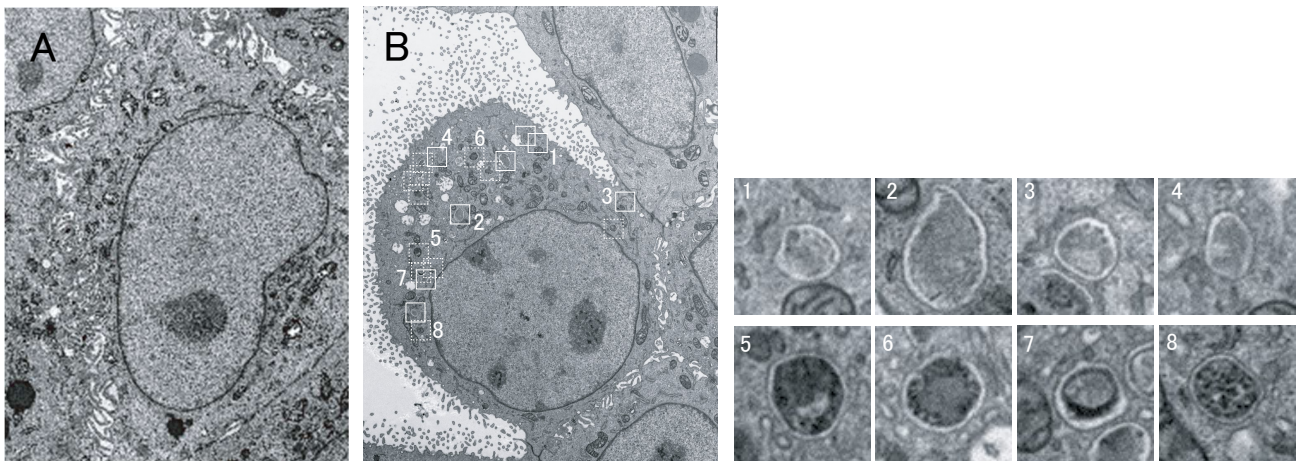


図1. 細胞競合におけるオートリソソームの増加

Ras 変異体発現 MDCK 細胞の単独培養(A)と正常 MDCK 細胞との混合培養(B)におけるオートファゴソームを透過型電子顕微鏡で観察した。混合培養ではオートファゴソーム(1-4)とオートリソソーム(5-8)の顕著な増加が認められた。

〔文献〕

1) Kon S., Ishibashi K., Katoh H., et al. (2017) Nat. Cell Biol. 19: 530-541

〔発表論文〕

1) Eilma A., Tasaki Y., Mori Y., et al. (2022) Non-degradable autophagic vacuoles are indispensable for cell competition. Cell Reports 40(9): 111292