

6 1. 中皮腫における EZH2 の発現の検討

廣島健三¹、尾崎大介²、中澤匡男¹

(¹八千代医療センター・病理診断科、²千葉労災病院・病理診断科)

〔目的〕 中皮腫と反応性中皮の病理学的鑑別は難しいことが多く、浸潤所見を認める場合に中皮腫と診断できる。私たちは fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による *CDKN2A* のホモ接合性欠失の検討や免疫組織化学による BRCA1 associated protein 1、methylthioadenosine phosphorylase の検討により、浸潤所見を判断できない生検標本や、体腔液細胞診のセルブロック標本でも中皮腫と確定診断を行うことが可能であることを報告した¹⁻³⁾。また、HEG1 が感度、特異度の高い中皮のマーカーであることを報告した³⁻⁴⁾。Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)は、histone H3 をメチル化する methyltransferase で細胞周期、細胞分化、老化などをつかさどる遺伝子を制御する。EZH2 の過剰発現は、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮癌、胃癌、大腸癌、腎臓癌など多くの癌腫で報告されている。本研究では、免疫組織化学により中皮腫と反応性中皮、線維性胸膜炎における enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) の発現率を比較し、上皮様中皮腫と反応性中皮、肉腫様中皮腫と線維性胸膜炎の鑑別に免疫組織化学による EZH2 の発現の検討が有用かどうかを検討する。

〔方法〕 2013 年から 2024 年 1 月の間に千葉労災病院および東京女子医科大学八千代医療センターで生検を行った中皮腫症例 49 例、胸膜炎あるいは良性腫瘍 11 例を抽出した。免疫組織化学には Leica 社の全自動免疫組織化学装置 BOND MAX を用いた。抗 EZH2 抗体は Cell Signaling Technology 社の clone D2C9 を用いた。一部の症例においては、中皮細胞の EZH2 の発現を確認するため、EZH2 と中皮マーカーである HEG1 による 2 重染色を行った。

〔結果〕 胸膜炎あるいは良性腫瘍の EZH2 の発現率は 11 例中 10 例 (91%) が 30%未満であり、40%以上を示す症例はなかった。中皮腫で EZH2 発現率が 40%以上の症例は 42 例中 23 例 (55%)、50%以上の症例は 18 例 (43%) だった (図 1)。

〔考察〕 胸膜炎あるいは良性腫瘍における EZH2 の発現率は、最小値 1.0%、最大値 33.1%、平均値 17.9%、標準偏差 11.6%で、全例、EZH2-low (核の陽性率が 49%以下) であった。したがって、今までの報告⁵⁾と同様に、EZH2-high (核の陽性率が 50%以上) は中皮腫を示唆すると言える。EZH2 の単染色では、腫瘍細胞と炎症性細胞や線維芽細胞の鑑別が難しいことがある。今回、EZH2 と HEG1 の 2 重染色を行うことにより、正確に中皮細胞における EZH2 の発現を評価できることが分かった (図 2)。

〔結論〕 上皮様中皮腫と反応性中皮、肉腫様中皮腫と線維性胸膜炎の鑑別に免疫組織化学による EZH2 の発現の検討が有用である。EZH2 は、中皮腫と反応性中皮の鑑別に有用な補助的検査になりうる。

〔文献〕

- 1) Wu D., Hiroshima K., Matsumoto S., et al. (2013) Am. J. Clin. Pathol. 139(1): 39-46.
- 2) Hiroshima K., Wu D., Hasegawa M., et al. (2016) Diagn. Cytopathol. 44(7): 591-598.
- 3) Hiroshima K., Wu D., Hamakawa S., et al. (2021) Diagn. Cytopathol. 49(5): 622-632.
- 4) Hiroshima K., Wu D., Koh E., et al. (2021) Pathol. Int. 71(9): 604-613.
- 5) Shinozaki-Ushiku A., Ushiku T., Morita S., et al. (2017) Histopathology 70(5): 722-733.

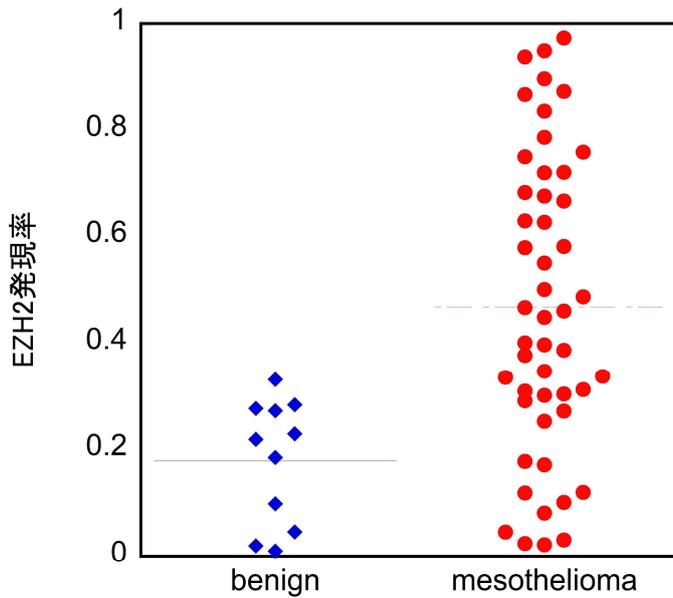


図1. 良性病変と中皮腫における EZH2 の発現率。benign, 反応性中皮または良性腫瘍; mesothelioma, 中皮腫。
※巻末にカラー図掲載

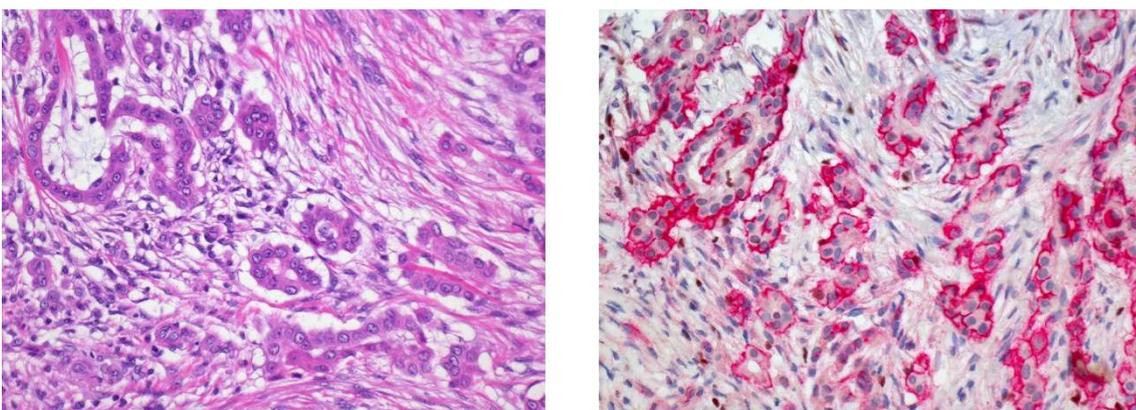


図2. 上皮様中皮腫。左図: HE 染色。右図: EZH2 と HEG1 の 2 重染。HEG1(赤)により、中皮腫細胞と間質細胞を鑑別できる。EZH2-low。

※巻末にカラー図掲載

6 2. 糖鎖分子マーカーを用いた膵腫瘍の高感度診断システムの開発

樋口亮太

(八千代医療センター・消化器外科)

〔背景〕 膵癌は予後不良の癌腫で 5 年生存率は 7.9%、本邦の膵癌死亡者数は 35000 人/年程度で増加傾向と報告されている¹⁾。最新の画像診断を駆使しても早期発見が難しく、転移を起しやすいため進行した状態で診断される症例の多いことが予後不良の一因に挙げられている。膵癌治療の成績改善のためには早期発見と治療が重要であるが、既存の腫瘍マーカーは、炎症病態、胆汁うっ滞、糖尿病、喫煙などの影響を受けること、早期病変での診断精度が低いことから早期発見のためのスクリーニング法として十分とはいえない。腫瘍マーカー Carbohydrate antigen (CA) 19-9 の感度は 70-90%、特異度は 68-91%と報告されている²⁾。

近年、膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN)は、顕微鏡レベルで観察される、膵管内に生じる円柱上皮性の上皮増殖病変で low grade が前癌病変、high grade は早期の膵癌であり、10 年程度で浸潤癌になると考えられている³⁾。PanIN と膵萎縮の関連も指摘され⁴⁾、切除例も増加傾向にある。PanIn を効率よく診断できれば、治療成績の向上に寄与できると思われる。

〔目的〕 膵癌や膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) などの膵腫瘍において、新しい糖鎖分子マーカーである WFA-sialyl MUC1 (Wisteria floribunda agglutinin-sialyl mucin core protein 1, 日本国特許 5704570 号, Hepatology 52:174-182, 2010) を用いて、多数の生体試料による検証を行う。

〔方法〕 複数の医療機関の協力体制のもとに、膵腫瘍の生体試料 (血清, 膵液) と臨床情報を収集してライブラリーを作製し、各症例の血清と膵液における WFA-sialyl MUC1 を測定する。膵腫瘍検体における、従来の腫瘍マーカー、WFA-sialyl MUC1、WFA-sialyl MUC1 と従来の腫瘍マーカー または膵液細胞診のコンビネーション診断の診断感度・特異度の評価、ROC 解析、膵腫瘍検体におけるステージ別の検出率評価、膵癌疑診例/ルイス陰性膵癌検体における診断感度と特異度を検討し、WFA-sialyl MUC1 が膵腫瘍における実用的な分子マーカーとなりえるかを検証する。

〔文献〕

1) https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html 国立がん研究センターがん情報サービス

2) Goonetilleke KS, et al. Eur J Surg Oncol 33: 266-70, 2007.

3) Yachida S, et al. Nature 467: 1114-1117, 2010.

4) Nakahodo J, et al. Pancreatology 20, 1689-1697, 2020.

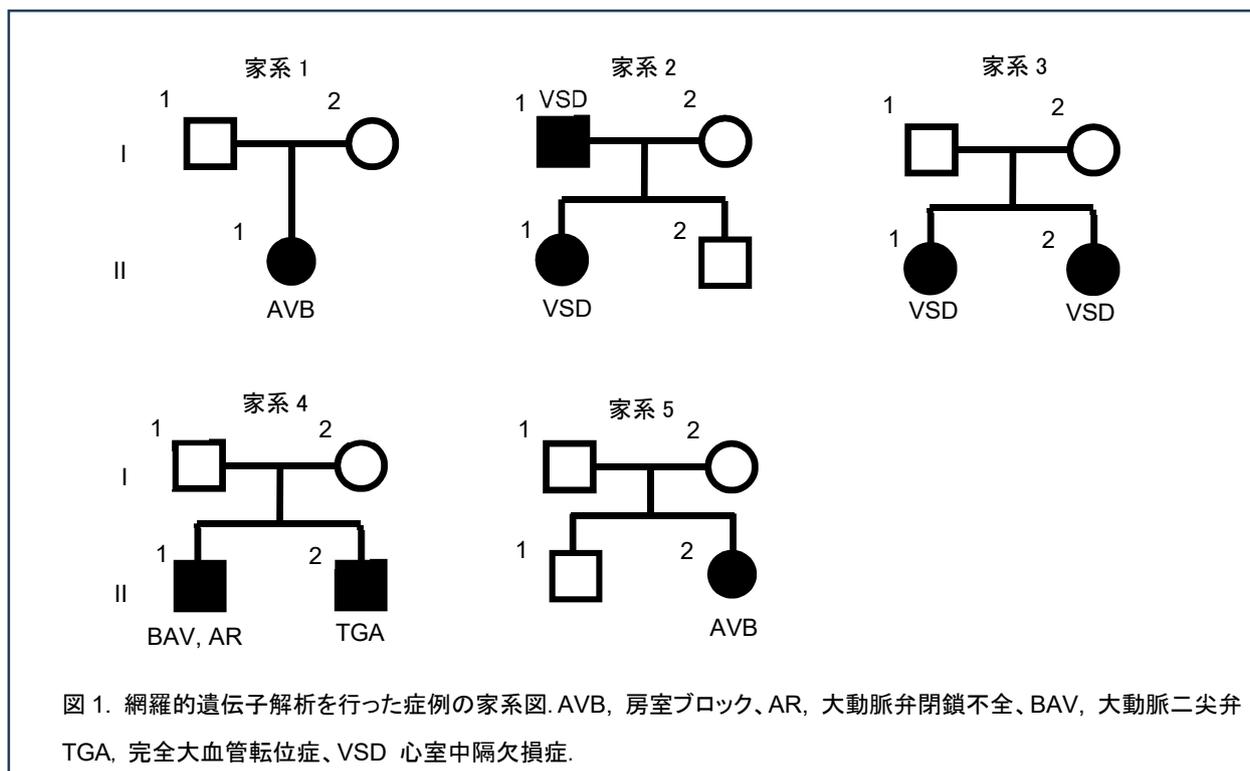
6.3. 先天性心疾患患者を含む5家系の網羅的遺伝子解析

井上忠¹、國松将也^{1,2}、石崎怜奈¹、古谷喜幸³、赤川浩之⁴、古道一樹¹、内田敬子⁵、
山岸敬幸^{1,6}

(¹慶應義塾大学医学部小児科、²千葉大学大学院医学研究院小児病態学、³循環器小児・成人先天性心疾患科、⁴総合医科学研究所、⁵慶應義塾大学保健管理センター、⁶慶應義塾大学医学部予防医療センター)

〔目的〕 多くの先天性心血管疾患（CHD）は、遺伝的要因に環境要因が相互に作用し合って発生すると考えられている。近年、心筋症とその類縁疾患や家族性不整脈の患者において原因遺伝子と考えられる遺伝子変異がわかってきた。しかし、すべての遺伝性心血管疾患のすべての原因が解明されているわけではなく、未知のメカニズムを原因とする遺伝性心血管疾患が存在すると考えられている。本研究では、遺伝性心血管疾患の原因となる新しい遺伝子異常を特定することを通じて、遺伝性心血管疾患の分子レベルでの原因（病態）を解明することを目的とする。

〔方法〕 慶應義塾大学の小児科外来を受診する遺伝性心血管疾患が疑われる5家系（CHDを有する8名とその家族でCHDのない6名）に対して、同意を得た上で、血液検体よりDNAを抽出しWhole Exome Sequence（WES）を行った。各家系における疾患および解析対象者は次の通りである。家系1は長女が高度房室ブロックを認め、両親にCHDは認めなかった。発端者と母親に対してWESを行った。家系2は父親と長女が心室中隔欠損症を認め、母と長男はCHDを認めなかった。心室中隔欠損症を有する父親と長女、健常な母親に対してWESを行った。家系3は長女と次女が心室中隔欠損症を認め、両親はCHDを認めなかった。心室中隔欠損症を有する2名と母親に対してWESを行った。家系4は長男が大動脈二尖弁による大動脈弁閉鎖不全症、次男が完全大血管転位症および心房中隔欠損症を認め、両親はCHDを認めなかった。CHDを有する2名と健常な両親に対してWESを行った。家系5は長女が進行性伝導障害と経過中にQT延長を認め、両親はCHDを認めなかった。発端者と母親に対してWESを行った。ANNOVARを用いてアノテーションを行い、フィルタリングは変異保有頻度を0.1-5%未満とし、変異の種類はナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング領域の変異、アミノ酸置換を伴うミスセンス変異に限定した。ミスセンス変異は7種類のインシリコデータ（SIFT4G、Polyphen2 HDIV、Polyphen2 HVAR、Meta SVM、Meta LR、CADD、GERP++）のうち5つ以上で病的と評価される変異に限定した。さらに観察された変異の保有様式が、該当家系から予測される遺伝様式と合致する変異に限定した。以上から得られた候補遺伝子の変異を文献検索し、心血管発生に関連が推定される変異について、ダイレクトシーケンスにより確認を行った。本研究は、慶應義塾大学倫理委員会（承認番号20170043）および、東京女子医科大学倫理委員会（承認番号313E）で承認を受けて行った。



〔結果（途中経過）〕 家系 1 では発端者と母から 135,190 変異が検出された。変異保有頻度 1%未満、発端者のみに見られる変異に限定したところ、変異保有頻度が十分に低く、かつインシリコデータで病原性が高いと評価された変異の中から、QT 延長症候群 11 型の原因遺伝子とされる *AKAP9* のミスセンス変異を検出した。家系 2 は、3 名において全 156,473 変異が認められた。得られた候補変異のうち、22q11.2 領域に存在し、心臓表現型に関わる可能性が示唆されている *CLDN5* 遺伝子のミスセンス変異、心室中隔欠損を認めることがある Coffin Siris 症候群の病因とされる *BICRA* 遺伝子の non-frameshift 変異、心室中隔欠損症患者において健常者と発現パターンが異なるように観察されることが報告されている *FAM98A* 遺伝子のミスセンス変異を、心室中隔欠損症を有する父親と長女のみ Heterozygous に保有することを確認した。家系 3 は、3 名において全 150,390 変異が認められた。頻度は低いが心室中隔欠損症の報告がある *KAT6A* 遺伝子のミスセンス変異を心室中隔欠損症を有する姉妹において Heterozygous に認めた。家系 4 は、4 名において全 157,669 変異が認められ、フィルタリングにて 13 遺伝子 21 変異に限定された。得られた候補変異は、CHD の見られない症候群の原因遺伝子として知られる遺伝子の変異、もしくは機能が失われても表現型の出ない変異が多数報告されている遺伝子の変異であり、表現型を説明しえる変異は検出されなかった。家系 5 では発端者と母から 139,404 変異が検出された。変異保有頻度 1%未満、発端者のみに見られる変異で絞り込みを行ったが、刺激伝導系の発生や、QT 延長症候群などに関わる遺伝子の変異は候補に挙がらなかった。

〔今後の予定〕 *AKAP9* は房室伝導障害の原因になりうる *KCNQ1* 遺伝子との相互関係が知られており、発端者の表現型との関連について、変異機能解析を検討している。全ての家系についてアノテーションおよびフィルタリング方法を変更して WES 結果を再解析する予定である。

6 4. 構造的かつ網羅的解析による単一遺伝子異常による原因遺伝子の解析

岩崎直子^{1,2,3,4}、田中慧^{3,4}、東剣虹⁴、樋口清香⁴、赤川浩之⁴

(¹八千代医療センター・糖尿病・内分泌代謝内科、²ゲノム診療科、³糖尿病・代謝内科学、⁴総合医科学研究所)

〔目的〕 単一遺伝子異常によって若年で発症する糖尿病の大部分を占めるのは、**MODY**(maturity onset diabetes of the young)であり、本邦の患者数は1.2万人以上と推定される。現状では**MODY**患者の遺伝子診断率は最大で27%¹⁾、昨年我々の検討でも20%であり、2/3の原因遺伝子は不明のままであり、個別化医療の推進を鑑みると問題である。原因遺伝子未同定の**MODY**を対象として機能解析を含めた網羅的解析を行い、本スクリーニング法が診断率の向上に資するか否か検討することを目的とした。

〔方法〕 対象は糖尿病診断時年齢16.5±5.3 (mean±SD)歳、BMI 21.0±1.9 kg/m²の21例。全例に全エクソーム解析 whole exome sequencing (WES)を行い、病的バリエント (P)が検出されない場合は Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)解析を実施。WESで検出された新規バリエントで likely-pathogenic (LP)となったバリエントについては機能解析を行い、機能解析で障害が確認できなかった例も MLPA 解析を実施した。病原性の判定は ACMG Guidelines 2015²⁾ によった。

〔結果〕 WES によって全症例中7例に病的バリエントを検出した。未報告のバリエントで LP 判定となった3例については細胞レベルの機能解析を実施し、うち1例が新規の病的バリエントであることが判明した。残り2例と WES 陰性の11例の計13例について MLPA 解析を行った。その結果、4例に copy number variation (CNV)を見出した。結果は **MODY1** が4例、**MODY2** が2例、**MODY3** が3例、**MODY5** が1例、**MODY13** が1例、**Wolfram** 症候群が1例で、21例中12例 (57.1%) に原因遺伝子を検出した。**MODY1** の4例中3例 (75%)が CNV で WES では検出できないバリエントであった。

〔考察〕 今回の構造的な解析によって、21例中12例 (57.1%) と高率に病的バリエントを同定することができ、検出率は過去の報告と比較して明らかに高かった。その理由として、WESで検出不能の CNV については MLPA 解析を含む解析法で系統的に検討したこと、機能解析を実施したことの2点があげられる。新知見として、今回の病的バリエント12例のうち3例 (25%)を CNV で、**MODY1** が3/4を占めたことがあげられる。**MODY**における CNV 頻度は報告されていないが、**MODY5**に hemizygous deletionが多いことが広く知られているもののそれ以外の **MODY** の CNV に関しては検討されていない。今回の成績から **MODY5** 以外の CNV について検討する必要があることが示唆された。

〔結論〕 単一遺伝子異常が疑われる症例の検討において、WES、MLPA 解析、機能解析を用いた構造的・網羅的な解析の診断率は57.1%と既報に比べて著明に高く、有用な方法だと考えられる。

[文献]

- 1) Hattersley AT, Patel KA. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(5):769-777.
- 2) Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.

[発表論文]

- 1) Satoshi Tanaka, Hiroyuki Akagawa, Kenkou Azuma, Kaoru Watanabe, Sayaka Higuchi and Naoko Iwasaki. A novel pathogenic variant in the glucokinase gene found in a Japanese sibling with maturity-onset diabetes of the young 2. *Endocrine J*, 2023 doi:10.1507/endocrj.EJ22-0541
- 2) 岩崎直子. 単一遺伝子異常による糖尿病の成因研究ならびに臨床への還元. *BIO Clinica* 37(2)261-266.
- 3) 岩崎直子. 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. *糖尿病合併症*. 37 (2) 261-256.
- 4) 田中 慧, 佐藤 康仁, 岩崎 直子. MODY1 および MODY3 患者における個別化医療のアウトカム—7 症例の実践—. *糖尿病* 66 (10) : 742~749, 2023
- 5) 岩崎直子. 遺伝医学アップデート: 基礎医学から臨床現場まで (5) 単一遺伝子異常による糖尿病に対する個別化医療. *東女医大誌* 93(5): 103-112, 2023.10
- 6) Satoshi Tanaka, Hiroyuki Akagawa, Kenkou Azuma, Sayaka Higuchi, Naoko Iwasaki Systematic Genetic Analysis of MODY in Japanese using Whole Exome Sequencing and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. (in preparation)

[学会発表]

- 1) 田中慧, 岩崎直子. 新規 PDX-1 病的バリエーションによる MODY4 家系の臨床増および機能解析. 第 66 回日本糖尿病学会 2023 年 5 月 11 日、鹿児島市
- 2) 岩崎直子, 田中慧, 赤川浩之, 大澤真里, 長谷美智代, 尾形真規子. 遺伝子異常による糖尿病 15 症例に対する GLP1-RA の血糖コントロール改善効果. 第 66 回日本糖尿病学会 2023 年 5 月 11 日、鹿児島市
- 3) 田中慧, 岩崎直子. シンポジウム 17 糖尿病診療における臨床遺伝学 糖尿病の個別化医療の現状と課題. 第 66 回日本糖尿病学会 2023 年 5 月 12 日、鹿児島市
- 4) Naoko Iwasaki. Current issues in the management of monogenic diabetes in our institution. IDF-WPR Congress 2023/15th Scientific Meeting of AASD. July 22, 2023, Kyoto
- 5) 田中慧, 岩崎直子. MODY1 および MODY3 患者における個別化医療のアウトカム. 第 10 回日本糖尿病協会年次学術集. 2023 年 7 月 22 日. 京都
- 6) Satoshi Tanaka, Naoko Iwasaki, Kenko Azuma, Hiroyuki Akagawa, Shohei Mitani. Next Generation Sequencing in Japanese patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Human Genetics Asia* 2023, 12 Oct, 2023 Tokyo

65. 日本人の遺伝性出血性毛細血管拡張症患者における遺伝子変異の機能的特徴

森田修平¹、赤川浩之²

(¹脳神経外科学、²総合医科学研究所)

〔目的〕 Hereditary hemorrhagic telangiectasia ; HHT は常染色体顕性遺伝性の血管形成異常症であり、Curaçao の診断基準に従って臨床的に診断される。病原性バリエントのほとんどが、TGF-β シグナル伝達経路における膜貫通型受容体遺伝子 *ENG* および *ACVRL1* に存在しているが、その大部分は家系に特異的であり、そのため多数の意義不明のバリエント (Variants of Unknown Significance; VUS) が検出され、確定的な遺伝子診断の障壁となっている。本研究では HHT における VUS の簡易かつ効率的な機能解析の方法を提案し、得られた遺伝子診断の結果を提示する。

〔方法〕 対象は 2011 年から 2021 年までに当院で臨床的に HHT と診断された 11 家系 12 名の日本人患者である。シーケンシング解析を行ってバリエントを同定し、その性質に応じてミニジーンアッセイ及び 2 種類の生物発光アッセイを用いて機能解析を行なった。

〔結果〕 *ACVRL1* および *ENG* に合計 11 の異なるバリエントが同定された。うち 3 個はフレームシフトとナンセンス・バリエントであったが、8 個はスプライス部位やミスセンス型のバリエントであった。このうち 3 個は *In silico* でスプライス異常を起こすと予測され、これらはミニジーンアッセイで確認された。残り 5 個のミスセンス・バリエント (*ACVRL1* で 4 個、*ENG* で 1 個) については、翻訳されたそれぞれの変異型蛋白質 (膜貫通型受容体) が①細胞膜に正しく発現するか、②それらを介したシグナル伝達が正しく下流まで伝達されるか、を確認することとした。生物発光アッセイにて簡便かつ高感度な測定を行うため、深海エビ由来の低分子ルシフェラーゼ NanoLuc® (Nluc) を用いた。細胞膜局在アッセイについては 4 種類の変異型 *ACVRL1* のうちの 3 つにおいて、コントロールと比較して 75% 以上の有意な減少が認められた。残り 1 つでは 50% 以下の有意でない減少が示され、1 種類の *ENG* はコントロールと遜色なく発現した。レポーターアッセイは *ACVRL1* がレセプター、*ENG* がコレセプターであることを前提に、TGF-β シグナル伝達経路のリガンドである BMP9 と、そのシグナル伝達が正常に行われた場合に発光するようにデザインしたプラスミドとを用いて行なった。変異型 *ACVRL1* は BMP9 のシグナル伝達を喪失した。また変異型 *ENG* では野生型 *ACVRL1* を同時に発現させ、*ENG* のコレセプターとしての機能を喪失していることを確認した。上記結果から、同定された全てのバリエントが病原性バリエントであると結論づけられ、全ての症例で遺伝子診断が確定した。

①4 種類の変異型 *ACVRL1* のうちの 3 つにおいて、コントロールと比較して 75% 以上の有意な減少が認められた。残り 1 つ (A) は 50% 以下の減少で、1 種類の *ENG* (B) はコントロールと遜色なく発現した。

②*ACVRL1* はレセプター、*ENG* はコレセプターである。TGF-β シグナル伝達経路のリガンドである BMP9 と、そのシグナル伝達が正常に行われた場合に発光するようにデザインしたプラスミドとを用いて生物発光アッセイを行なった。(A) は BMP9 のシグナル伝達を喪失した。(B) では野生型 *ACVRL1* と共発現させると、*ENG* のコレセプターとしての機能を喪失していることを確認した。上記結果から、同定された全てのバリエントが病原性バリエントであると結論づけられ、全ての症例で遺伝子診断が確

定した。

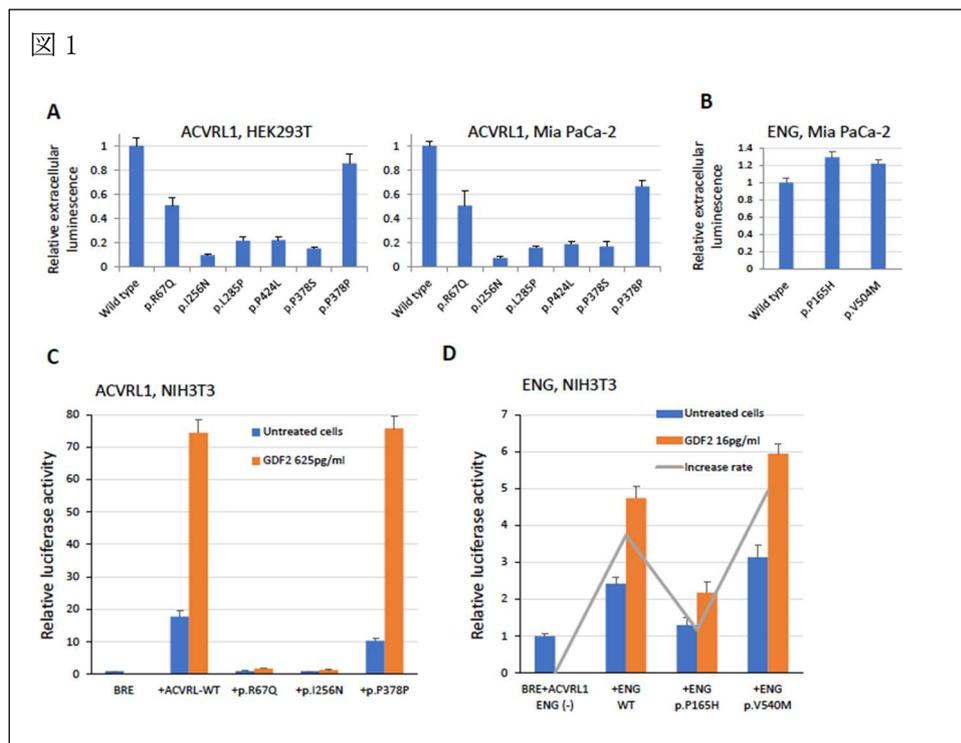


図 1. 細胞局在アッセイとレポーターアッセイの結果

〔考察〕 本研究では、In silico に予測されたスプライシング異常をミニジーンアッセイで証明し、また従来の細胞局在アッセイとレポーターアッセイの両者を同一の Nluc システムでの検出へ改変してその病原性を明らかにした。本研究で提示した方法により、これまで煩雑かつ低感度であった HHT 患者における VUS の機能解析が、より簡易かつ効率的に行えるようになると思われる。

〔結論〕 HHT は早期の確定診断により適切な治療が行われることが重要な疾患である。本研究で示した方法はその助けになるものと考えられる。

〔発表論文〕

1) Shuhei Morita, Shunsuke Nomura, Kenko Azuma, Ayako Chida-Nagai, Yoshiyuki Furutani, Kei Inai, Tatsuya Inoue, Yasunari Niimi, Yuo Iizuka, Yoshiyuki Tsutsumi, Reina Ishizaki, Hiroyuki Yamagishi, Takakazu Kawamata and Hiroyuki Akagawa. Functional characterization of variants found in Japanese patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. Clin Genet. 2024 ; in press.

〔学会発表〕

1) 赤川浩之：「ゲノム解析におけるウェブツール・データベースの利用法」第 7 回ゲノム医学研究会、口演、2024 年 1 月（東京）

66. フラグメント化シーケンスを用いたジストニア遺伝子全長解析

東剣虹¹、堀澤士朗²

(¹総合医科学研究所、²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、中でも遺伝性ジストニアは単一遺伝性疾患として様々な遺伝子 (DYT 遺伝子) が関与することが明らかとなってきた。我々は主に 16 の DYT 遺伝子 (*TOR1A*, *THAP1*, *ANO3*, *GNAL*, *KMT2B*, *GCH1*, *TH*, *SPR*, *TAF1*, *PRKRA*, *ATP1A3*, *SGCE*, *PNKD*, *PRRT2*, *SLC2A1*, *ECHS1*) のターゲットシーケンスを用いてこれまで 190 例に及ぶ遺伝性ジストニア疑い症例の解析を行い、その検出率は約 40%である。数値的には決して悪くないが、問題点として、症状から予想される遺伝子型がある程度はつきりしているのにも関わらず、有意な変異を検出できなかった症例が存在することである。その原因の一つとして、ターゲットシーケンスがマルチプレックス PCR を用いていることが挙げられる。複数のプライマーセットで一つの遺伝子をカバーすることは、特徴的なゲノム配列 (高い GC 含量、繰り返し配列 etc.により PCR 増幅効率が低下する) の影響を受けやすい。また、そういった配列は往々にしてシーケンス効率も低くなりがちである。こうした影響を軽減するため、イントロン配列もリードできるようにするために、遺伝子領域全長を 1 つのフラグメントとして増幅することを考えた。

〔方法〕 解析対象遺伝子として、*KMT2B* (DYT28)を選んだ。*KMT2B*は、近年診断例が増加してきている、様々な病態を呈する小児発症型全身性ジストニアの原因遺伝子である。遺伝子領域を可能な限りシーケンスするために、Long-PCR で上記遺伝子の全長 (21kb) を増幅した後に、酵素断片化法を用いて平均 400bp 長のフラグメントライブラリーを作製した。次世代シーケンサーIonPGM で解析を行った後、マッピング状況の確認とバリエーションの抽出を行った。

〔結果・考察〕 図 1 は *KMT2B* のターゲットシーケンス (Target Seq) とフラグメントシーケンス (Fragment Seq) のリード結果を比較したものである。Target Seq と Fragment Seq のそれぞれエクソン領域の coverage は 58.8%と 96.9%で、後者はほぼ全域を読めたことがわかる。なお、残り 3.1% はエクソン 1 であり、*KMT2B* の exon1 は有数の GC 含量 (83%) を誇るため、現状 Sanger 法を用いてシーケンスする他ない。なお、*PRRT2* の Fragment Seq の coverage はエクソン、イントロンともに 100%となっていた。次に抽出したバリエーションについて。*KMT2B* 疑い症例 2 例にて、それぞれエクソンとイントロンに新しいバリエーションを検出することができた。エクソンの方は frameshift 変異で、イントロンの方は splicing 異常が疑われるバリエーションである (図 2, Sanger 法を用いた確認)。これらいずれも従来の Target Seq ではうまく検出できなかったものである。前者の frameshift 変異は G/C を多く含む繰り返し配列がある領域にあり、従来の Target Seq では勿論のこと、Fragment Seq でもシーケンス効率が低い (図 1 中赤矢印)。しかしながら、Fragment Seq でシーケンスへの持ち込みの調整が容易であるため、持ち込み量を増やすことで本来シーケンス効率が低い箇所をカバーできるだけのリード数を得ることができた。後者の splicing 異常が疑われるバリエーションについて。Splicing の異常は単純にエクソン-イントロンジャンクションにある splice acceptor/donor 配列の変化だけでな

く、そこから離れた位置での配列変化でも起こることがわかってきた。Splice AI を始めとする *in silico* の予測ツールが充実していることから、遺伝子全長をシーケンスし、検出したバリエントをこうしたツールで予測することで、新たに診断がつく症例が出てくると思われる。今後は、他の遺伝子も同様の手法を用いて、未診断の症例を対象に解析を行っていく予定である。

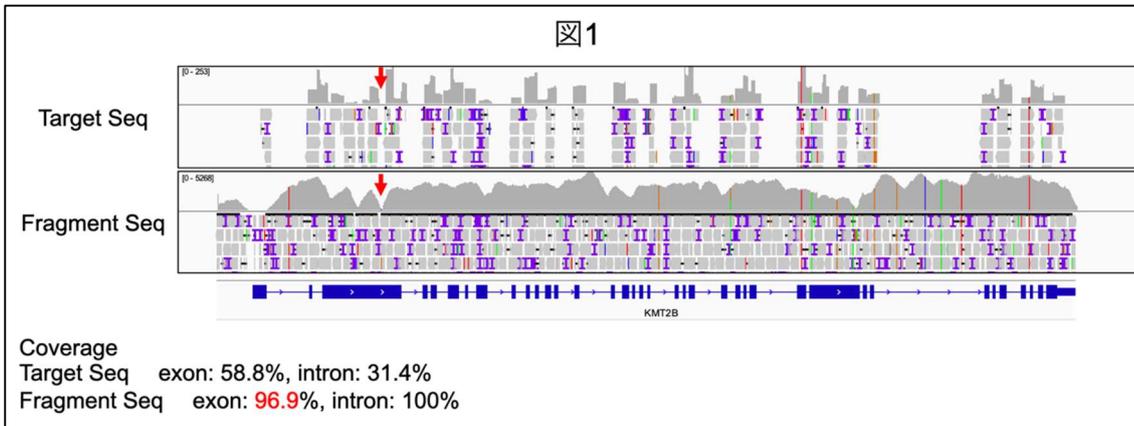


図 1. Target Seq と Fragment Seq のリードの比較

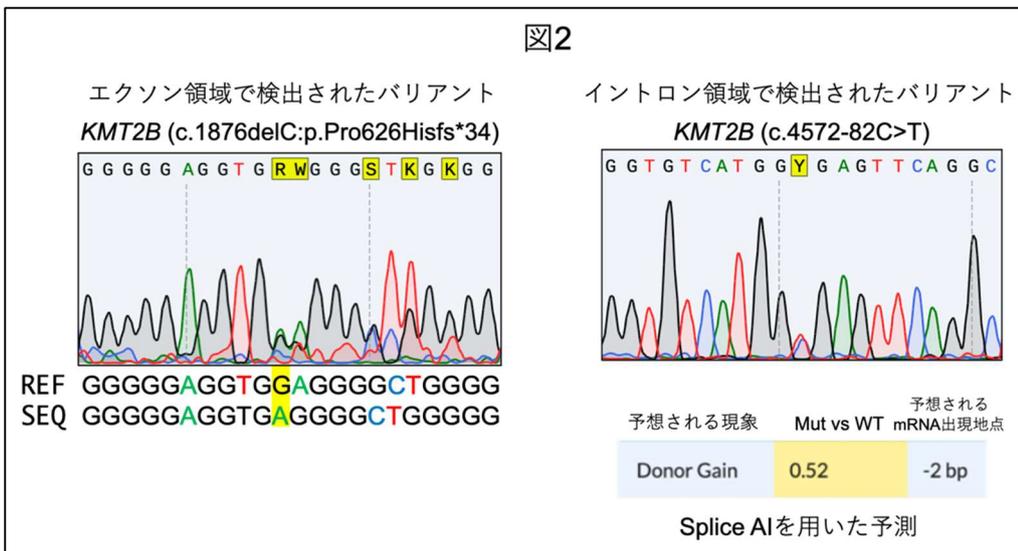


図 2. サンガー法によるバリエントの確認

[学会発表]

- 1) 堀澤士朗 the 13th Scientific Meeting of the Asian Australasian Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery 「Neurosurgical treatments for dystonia」招待講演 4.28-29 2023
- 2) 堀澤士朗 大脳基底核研究会 「小脳深部刺激療法による不随意運動の治療」一般口演 8.19-20 2023
- 3) 堀澤士朗 European Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery 「deep cerebellar stimulation for movement disorder」一般口演 9.26-29 2023
- 4) 堀澤士朗 Hong Kong Society for Functional Neurosurgery 「Lesioning technique in focal dystonia」招待講演 12.23-24 2023

67. 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¹、毛塚由希子²、三谷昌平^{1,3}

(¹総合医科学研究所、²東洋大学大学院総合情報学研究科、³生理学 (分子細胞生理学分野))

〔目的〕 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、年々活動人口が顕著に増加している。海外を中心に、様々な疾患や健常者に対し、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¹⁻⁷⁾。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。そのような現状を打開する為に、本研究では、ヨーガ療法の効果を科学的に検証する目的で、生化学分野の研究者とヨーガ療法士とが共同研究を行った。

〔方法〕 倫理委員会承認後 (承認番号: 2021-0022)、予定数の健常者ボランティア 7 人を募った。また、どのような被験者に対し効果が現れるか調査する目的で、性別・年齢・喫煙歴・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い、その変化を聞き取り調査した。ヨーガ療法プログラム動画 (約 45 分) を作成し、被験者には、この動画を週 1 回視聴しながらヨーガ療法を実施してもらい、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) の検査を実地した。加えて、ヨーガ介入前後での遺伝子発現変化を解析する為、リアルタイム PCR 解析 (qPCR) を行った。遺伝子発現解析の生体サンプルは、被験者の唾液を用いた。

〔結果〕 研究期間を通じて、被験者にヨーガ療法による有害事象は発生しなかった。しかし、2 人の被験者は、研究期間中、自転車事故による負傷・スポーツジムにて筋肉を傷める等の報告があった為、ヨーガ療法による変化の判断が難しいと考えて、結果から除外した。最終的に、どのような人々がヨーガの効果を最も実感しやすいかを判断する為、介入前の心理テスト (STAI・POMS) の結果に基づき、ストレス低レベル (匿名記号: γ 、 δ)、平均レベル (匿名記号: α 、 β)、または高レベル (匿名記号: ϵ) に参加者を分類した。介入前、ストレスが少ない人 (匿名記号: γ 、 δ) は体調が良く不快な症状は報告されなかった。3 か月の介入後も良い体調がそのまま維持された。遺伝子発現解析に於いては、今回調べた各々のマーカー分子、炎症遺伝子 (NF κ B1)・抗炎症遺伝子 (TGFB1・IL10)、活性酸素除去酵素遺伝子 (SOD1・GPX1) の発現が、全体的に低下する傾向にあり、この現象のメカニズムは不明であるが、新たな知見を得た。続いて、ストレスレベルが平均の参加者 (匿名記号: α 、 β) は、介入前のアンケートで報告されていた、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?) 等の不快な症状が、3 か月の介入後、無くなったと回答した。この 2 人については、3 か月の介入後、心理学調査、STAI の状態不安と、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、NF κ B1 の発現が減少しており、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。最後に、ストレスが高かった被験者 (匿名記号: ϵ) は、介入前、肩こり・腰痛・気分が落ち込み気味・疲れが取れない・首こりの不快感が報告され、3 か月のヨーガ介入後も体調に変化はなかった。しかし、被験者 ϵ は、心理学面では大きな改善 (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。遺伝子

発現解析の結果を期待したが、この被験者の唾液からは、十分量の RNA が回収できたにも関わらず、qPCR 解析の実験系では、遺伝子発現解析ができなかった。遺伝子発現解析の手法を変えて、RNA-seq 法 (Poly-A 精製) を用いた網羅的遺伝子発現解析にも挑戦したが、被験者自身の口腔内細菌によると思われる RNA が多数検出され、この口腔内環境の違いが採取日毎に非常に大きく、信憑性のあるデータとして解析する事が難しいとの判断に至った。

〔考察〕 ヨーガ療法実習前の心理検査結果を参考に、被験者をストレスレベル、低・中・高に分けて、アンケート調査、心理学調査、遺伝子発現解析結果を総合的に解析した所、3 か月間の介入によるヨーガ療法は、ストレスが日本人の平均 (中) レベルで、少数の不快な症状を自覚している人に対して、心理的および身体症状を改善し易く、効果を実感し易いのではないかと示唆された。また、ストレスが高かった被験者は、十分量の RNA が回収できたにも関わらず、qPCR 法と RNA-seq 法による遺伝子発現解析ができなかった。RNA-seq 法によるデータ取得段階で、多数のバクテリア RNA が検出された事から、被験者の口腔内細菌が解析の妨げになっている事が伺えた。この結果から、ストレスレベルが非常に高い被験者 (口腔内細菌が多い?) については、唾液採取による遺伝子発現解析の手法は使えない可能性が考えられた。被験者・採取者共に採取時の心理・身体的負担が増すが、血液サンプル等、他の生体部位によるバイオサンプル回収が解析の為に必要かもしれない。もしくは、被験者自身の遺伝子発現変化ではなく、唾液に含まれる口腔内細菌叢の推移を調べる解析 (メタトランスクリプトーム解析) を行う事ができれば、新たな興味深い知見を得る事が出来たかもしれない。

〔結論〕 アンケート調査、心理学調査、遺伝子発現解析を用いて総合的に解析した所、3 か月間のヨーガ療法介入が、特にストレスが日本人の平均 (中) レベルで、少数の不快な症状を自覚している人に対して、心理的および身体症状を改善し易く、効果を実感し易いのではないかとの結論に至った。今後は、事前の心理学調査で被験者のストレスレベルを分類し、ストレスレベルごとの大規模なプログラムによる研究を行い、その影響とメカニズムを慎重に検討する必要がある。

〔文献〕

- 1) Cramer H., Lauche R., Anheyer D., et al. (2018) Review Depress Anxiety. 35(9): 830-843.
- 2) Saeed S. A., Cunningham K., Bloch MR. (2019) Am Fam Physician. 99(10): 620-627
- 3) Sharma H., Datta P., Singh A., et al. (2008) J Psychosom Res. 64(2): 213-8.
- 4) Black S. D., Cole W. S., Irwin R. M., et al. (2013) Psychoneuroendocrinology. 38(3): 348-55.
- 5) Bower E. J., Greendale G., Crosswell D. A., et al. (2014) Psychoneuroendocrinology. 43: 20-9.
- 6) Buric I., Farias M., Jong J., et al. (2017) Front Immunol. 8: 670.
- 7) Adhikari B., Starkweather A., Xu W, et al. (2022) Pilot Feasibility Stud. 8(1): 142.

〔発表論文〕

- 1) Higuchi S., Suehiro Y., Izuhara L., et al. (2023) BCL7B, a SWI/SNF complex subunit, orchestrates cancer immunity and stemness. BMC Cancer 23:811
- 2) Higuchi S, Kezuka Y and Mitani S. (2023) The investigation of changing effects of Yoga therapy on psychological and gene expression states of healthy subjects. Submitted.

68. 全エクソーム解析によるモヤモヤ症候群の遺伝子診断および修飾因子の同定

中村彰一^{1,2}、野村俊介³、赤川浩之²

(¹脳神経外科学、²総合医科学研究所、³八千代医療センター・脳神経外科)

〔目的〕 モヤモヤ病は内頸動脈終末部の狭窄・閉塞に、異常側副血行路発達を伴う多因子遺伝疾患である。ダウン症や神経線維腫症1型 (neurofibromatosis type 1、NF-1)等の原疾患をベースに併発することもあり、その場合を特にモヤモヤ症候群 (moyamoya syndrome、MMS) と呼ぶ。ただしMMSとなるのは一部の症例で、モヤモヤの併発に関わる遺伝的修飾因子の存在が示されてきた。本研究では種々の遺伝性疾患を背景に持つMMS患者について全エクソーム解析を行い、基礎疾患の遺伝子診断を確定させたうえで修飾因子を探索した。

〔方法〕 日本人、中国系マレーシア人およびヨーロッパ人を含むMMS患者13例 (NF-1:6例、ダウン症:3例、多系統平滑筋機能不全症候群:2例、ヌーナン症候群:1例、 α -サラセミア:1例)を対象に全エクソーム解析を行った。原疾患の遺伝子診断を確定させたのち、修飾因子を探索した。モヤモヤ病自体の感受性遺伝子を筆頭に過去に修飾因子と報告された遺伝子のほか、ClinVar等のアノテーション情報をもとに、これまで心血管系異常との関連が報告されている遺伝子を体系的に探索した。

〔結果〕 13例の全エクソームシーケンシングの結果として、ターゲット領域について平均92.8×のリード深度を達成し、10×以上のリード深度でターゲットの98.1%以上の領域をカバーすることができた。これを用いて、まず背景疾患の遺伝子診断を確定させた。NF-1症例のうち2例で検出の変異は、それぞれスプライス・アクセプターおよびドナー部位変異であり、SpliceAIでの予測通り、ミニジーンアッセイにてイントロンリテンションとエクソンスキッピングがそれぞれ確認された。NF-1症例の1例の変異は一見してミスセンス変異であるが塩基置換はエクソン29の3'末端に位置し、SpliceAIではドナー部位の消失が予測された。果たしてミニジーンアッセイにてエクソン29のスキッピングが確認された。NF-1症例の残り3例はフレームシフトやナンセンス変異の検出によりその時点で診断は確定した。ダウン症での21番染色体トリソミーや、 α -サラセミアにおけるヘモグロビンA遺伝子領域の欠失については、カバレッジ情報の主成分分析を利用したXHMMやキャプチャーベイトのオフリード情報を活用したEXCAVATOR2により検出した。多系統平滑筋機能不全症候群とヌーナン症候群では既報の病的ミスセンス変異の検出により診断は確定した。以上より、13例全例で背景疾患の遺伝子診断は確定し、次いでモヤモヤの合併に寄与する遺伝的修飾因子の探索に入った。遺伝的修飾因子として既に報告のあるRNF213遺伝子バリエントが日本人患者より、MRV11遺伝子バリエントがヨーロッパ人患者よりそれぞれ複数検出され、これらの遺伝子が修飾因子であるという既報の再現性が確認された。さらに候補を探るにあたり、ClinVarアノテーションが重要な示唆をもたらした。5例の患者でClinVarバリエントが検出されたが、そのほとんどがモヤモヤ病やモヤモヤ症候群の疾患遺伝子群そのものであり、これらが修飾遺伝子の候補となるのではないかと考えられた。候補として、RNF213、CCER2、DIAPH1、MRV11、JAG1、NOTCH2、NF1、HRAS、KRAS、NRAS、MRAS、RRAS、RRAS2、RIT1、BRAF、RAF1、MAP2K1、MAP2K2、MAPK1、SOS1、SOS2、CBL、LZTR1、SHOC2、PPP1CB、PTPN11、ACTA2の27遺伝子を挙げMM遺伝子群とした。また、1例の患者からは、近年に肺動脈性肺高血圧症

(pulmonary arterial hypertension, PAH) の疾患遺伝子の一つとして報告されている *ABCC8* 遺伝子のスプライス部位変異が検出された。SpliceAI による予測とその後のミニジーンアッセイにより、エクソンスキップやイントロンリテンションを引き起こすことも確認した。PAH の病態機序や遺伝的背景はモヤモヤのそれとオーバーラップすることが知られており、例として、モヤモヤ病の感受性バリエント *RNF213* p.R4810K は PAH のリスク因子にもなっている。これまで PAH の疾患遺伝子として複数 が特定されていて、これらも有望なモヤモヤ症候群の修飾遺伝子と考えられた。*ACVRL1*, *BMPR2*, *CAV1*, *ENG*, *GDF2*, *KCNK3*, *SMAD9*, *SOX17*, *TBX4*, *BMPR1B*, *RNF213*, *ABCC8*, *PTGIS* の 13 遺伝子を挙げ PAH 遺伝子群とした。MM 遺伝子群と PAH 遺伝子群は *RNF213* 遺伝子を起点にリンクしている。全エクソームシーケンシングのデータを、この MM および PAH 遺伝子群でレビューしたところ、やはり複数の機能的バリエントが検出され、関連解析にて有意な関連が示された (患者合計 8/13、対照合計 236/1007、 $P=0.004$ 、フィッシャーの正確確率検定)。

[考察・結論] 本研究課題により、モヤモヤ症候群の新たな感受性遺伝子の候補が明らかになった。この知見は、*RNF213* 遺伝子バリエントでは疾患感受性を説明できない本邦では稀なタイプのモヤモヤ病にも拡大しうると考えられ、モヤモヤ血管症全体の病態解明への有望な糸口となることが期待される。特に、PAH 遺伝子群に関連するモヤモヤ血管症の場合は、PAH の既存薬を治療に応用できる可能性もある。今後、更に検体数を拡大して検証しつつ、*in vitro* や *in vivo* データも蓄積して治療法の開発へつなげていく計画である。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C、19K09537) により実施され、Scientific Reports 誌に掲載の予定である。

[発表論文]

- 1) **Akikazu Nakamura**, **Shunsuke Nomura** and **Hiroyuki Akagawa**, et al. Whole-exome sequencing reveals the genetic causes and modifiers of moyamoya syndrome. Sci Rep. 2024 ; in press.
- 2) Thiparpa Thamamongood, Shoko Hara, and **Hiroyuki Akagawa**, et al. Synergistic Interaction of Thyroid Autoantibodies and *Ring Finger Protein 213* Variant in Moyamoya Disease. Neurol Med Chir (Tokyo). 2023 Dec 6. doi: 10.2176/jns-nmc.2023-0169. Online ahead of print.
- 3) **Shunsuke Nomura**, **Hiroyuki Akagawa**, and **Akikazu Nakamura**, et al. Difference in Clinical Phenotype, Mutation Position, and Structural Change of *RNF213* Rare Variants Between Pediatric and Adult Japanese Patients with Moyamoya Disease. Transl Stroke Res. 2023 Sep 28. doi: 10.1007/s12975-023-01194-w. Online ahead of print.

[学会発表]

- 1) 赤川浩之 : 「もやもや病の感受性遺伝子」 International Seminar of Cerebrovascular Disease ISCV2024、口演、2024 年 2 月 (東京)

69. 空間オミックス解析に向けた繰り返し蛍光免疫染色法の検証

久賀彩楓¹、田邊賢司²

(¹医学部第3学年、²総合医科学研究所)

〔目的〕 細胞の蛍光免疫染色は、細胞内分子の位置情報を解析する上で欠かせない手法となっている。近年の技術開発により、同一サンプルで観察できる分子数が飛躍的に増え、空間情報を含めたオミックス解析の発展に大きな貢献を果たしている^{1) 2)}。その一方、汎用的な抗体や蛍光顕微鏡で観察できる分子数には限界がある。そこで近年他の研究グループにより報告された繰り返し蛍光免疫染色法(4i)を導入し³⁾、その有効性を検証した。

〔方法〕 HeLa 細胞を DMEM/10%FBS/penicillin-streptomycin、37℃、5%CO₂ で培養した。96 ウェルプレートに播種し、24 時間後に 2%paraformaldehyde/PB で固定した。4i は基本的に先行文献に従い、一部改変した。一次抗体として抗 α -tubulin 抗体(シグマ社)あるいは抗 GM130 抗体(BD 社)を、二次抗体として Alexa488 抗マウス IgG 抗体(Invitrogen 社)を用いた。1 度目の抗体染色として抗 α -tubulin 抗体(シグマ社)あるいは抗 GM130 抗体(BD 社)によってそれぞれ微小管あるいはゴルジ体を染色し、溶出処理によって一次抗体および二次抗体を除去したのち、同一もしくは異なる一次抗体によって 2 度目の染色を行った。観察は CellInsight (Thermo 社) を用いて行った。

〔結果と考察〕 4i の各ステップを確認した結果を図 1 に示す。

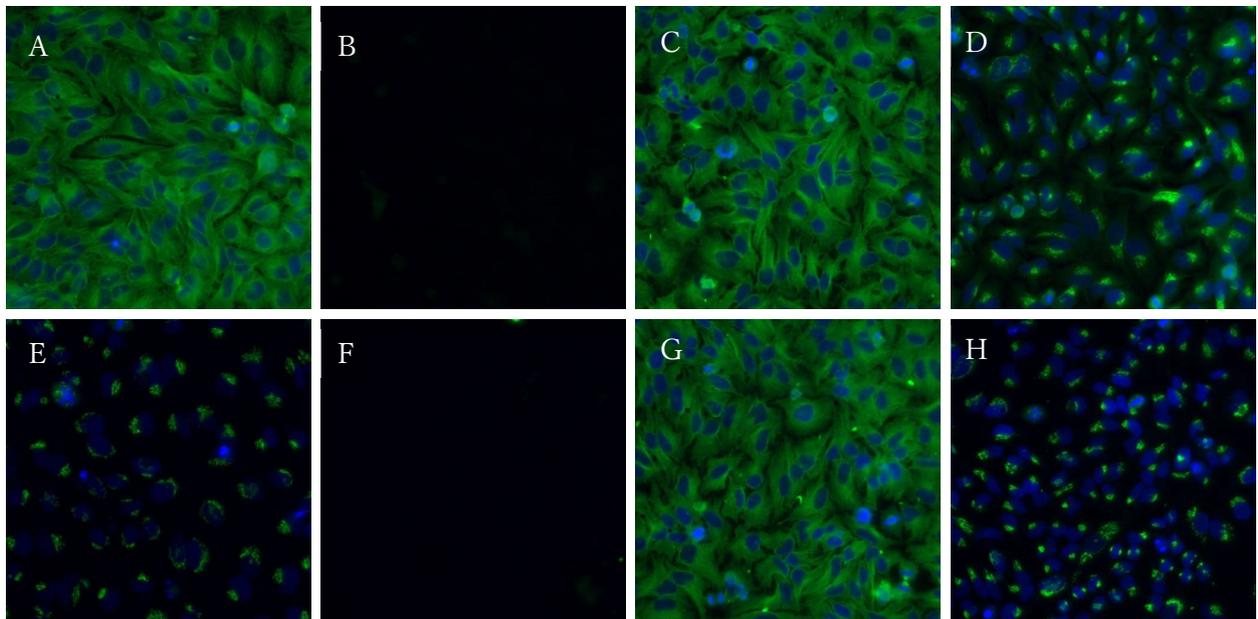


図 1. 繰り返し蛍光免疫染色法による染色像

HeLa 細胞を固定後、1 度目の抗体染色を行った (A-D: 抗 α -tubulin 抗体、E-H: 抗 GM130 抗体)。その後、抗体を除去し (B-D、F-H)、2 度目の抗体染色を行った (C&G: 抗 α -tubulin 抗体、D&H: 抗 GM130 抗体)。

1 度目の抗体染色で観察された微小管とゴルジ体は (図 1 A と E)、溶出処理によって抗体が完全に除去されていた (図 1 B と F)。溶出処理を行ったサンプルでも 2 度目の抗体染色によって問題なく抗体反応が確認された。ただし一部バックグラウンドと思われるシグナルが観察されたサンプルがあり (図 1 D)、1 度目の蛍光観察による抗原-抗体間の共有結合が起こったためと考えられる。今後、蛍光観察時のバッファーを変更することで改善を試みる。

[文献]

- 1) Moffitt J. R., Lundberg E. and Heyn H. (2022) The emerging landscape of spatial profiling technologies. *Nat. Rev. Genet.* 23(12): 741–759
- 2) Longo SK., Guo MG., Ji, A. L., et al. (2021) Integrating single-cell and spatial transcriptomics to elucidate intercellular tissue dynamics. *Nat. Rev. Genet.* 22(10): 627–644
- 3) Gut G., Herrmann MD. and Pelkmans L. (2018). Multiplexed protein maps link subcellular organization to cellular states. *Science* 361(6401): 7042