

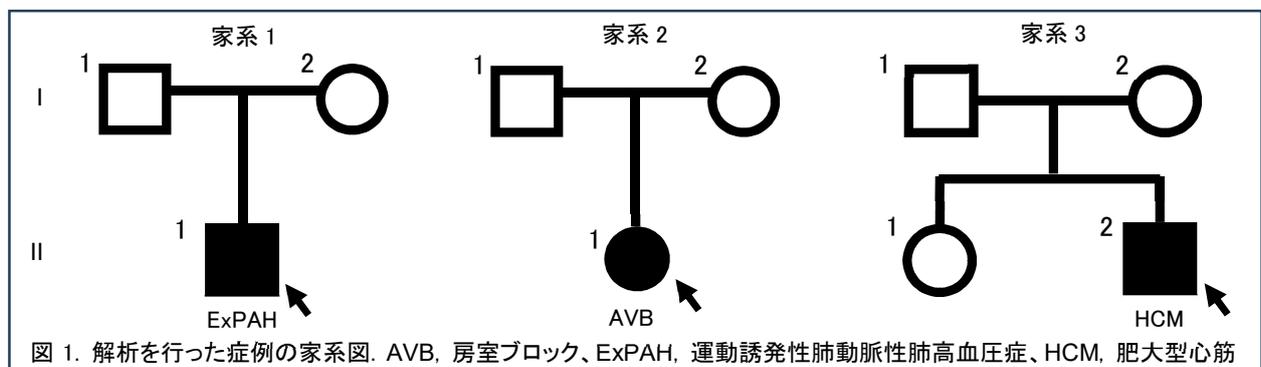
6 1. 遺伝性心血管疾患が疑われる 3 家系の網羅的遺伝子解析

井上忠¹、國松将也^{1,2}、古谷喜幸³、赤川浩之⁴、古道一樹^{1,5}、内田敬子^{1,6}、山岸敬幸^{1,7}

(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東京都立大塚病院小児科、⁶東京医科大学細胞生理学分野、⁷東京都立小児総合医療センター)

〔目的〕 多くの先天性心血管疾患 (congenital heart defect; 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、肺動脈性肺高血圧症や家族性不整脈、心筋症とその類縁疾患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原因 (病態) を分子レベルで解明することを目的とする。

〔方法〕 遺伝性心血管疾患が疑われる 3 家系 (疾患を有する 3 名とその家族で心血管疾患のない 5 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 は長男に運動誘発性肺動脈性肺高血圧症 (exercise induced pulmonary artery hypertension; ExPAH) と下肢に特徴的所見を認め、両親に CHD は認めなかった。家系 2 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。家系 3 は長男に肥大型心筋症、少顎症、四肢の痙性麻痺、眼位の異常、難聴、精神発達の遅れを認め、両親と同胞の長女には CHD は認めなかった (図 1)。いずれの家系も同意の得られた発端者および非発端者 (家系 1 は発端者のみ、2 は発端者と両親、家系 3 は発端者と両親と長女) 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 0.1-1%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) で承認を得て行った。



〔結果（途中経過）〕 家系 1 では、発端者に 112,069 バリエントが検出された。フィルタリングの結果残った 97 バリエントに、肺高血圧症の疾患関連遺伝子である *TBX4* に欠失挿入によるフレームシフトバリエントをヘテロ接合性に認めた。このバリエントは、国内外において新規のバリエントであり、塩基配列の変化から、ナンセンス変異依存性 mRNA 分解機構が予測された。また、翻訳されるバリエントタンパク質は野生型 *TBX4* に存在する 3 つの機能ドメインを全て失うことから、病原性の高いバリエントであることが推定された。さらに、家系 1 II-1 が *TBX4* バリエントを持つ症例に特徴的な症状を有していたことから、本 *TBX4* バリエントが遺伝的原因と考えられた。他に肺高血圧症の疾患関連遺伝子の病的なバリエントは検出されなかった。家系 2 は発端者と母から 162,066 変異が検出された。しかし、フィルタリング後のバリエントに、発端者の臨床症状と関連するバリエントは認められなかった。家系 3 は解析した 4 名から全 156,473 変異が認められた。同様にフィルタリングを行った結果、肥大型心筋症や難聴の疾患関連遺伝子として知られる *MYO6* にインフレームバリエントを認めた。しかし、サンガーシーケンスでは本バリエントは認めなかった。

〔考察〕 ExPAH とは、安静時には目立たないが運動時に肺血流量が増加し肺動脈性肺高血圧症が顕在化する病態である。その発症機序の一つに肺血管床の不足が知られる。私たちの研究室では、マウス肺において *TBX4* の発現を抑制すると、肺の発生・発育障害きたすことを報告した¹⁾。家系 3 II-1 は、*TBX4* の機能喪失型バリエントまたはハプロ不全により肺の発生・発育障害が起こり、運動による心拍出量の上昇に伴って肺血流も増加すると、増加した分の血液を受け止めるだけの十分な血管床が不足しているために、ExPAH を発症するという機序が考えられた。

〔今後の予定〕 家系 1 は、両親の遺伝子型の解析を行う。また、検出された *TBX4* バリエントタンパク質の細胞局在の変化、発現量の変化、転写活性について細胞免疫染色・ウェスタンブロッティング・ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて評価する。家系 2、3 については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。

〔文献〕

1) Yoshida Y., Uchida K., Kodo K., et al. (2022) J Mol Cell Cardiol. 171: 105-116

〔学会発表〕

1) 井上忠、神野太郎、丸山篤志、住友直文、小柳喬幸、古道一樹、内田敬子、山岸敬幸. 学校心臓検診で見つかった *TBX4* 新規バリエントを伴う運動誘発性肺高血圧症の 1 例. 第 37 回東京循環器小児科治療 Agora、東京、2024/8

6 2. 頸動脈狭窄症におけるもやもや病感受性遺伝子 *RNF213* の関連解析

三谷優衣^{1,2}、大淵英徳³、赤川浩之^{1,3}

(¹総合医科学研究所、²医学部医学科 3 年、³足立医療センター・脳神経外科)

〔目的〕 もやもや病感受性遺伝子として 2011 年に同定された *RNF213* (ring finger protein 213) はリングフィンガードメインを有する E3 ユビキチンリガーゼをコードしており、血管リモデリングや血管新生の制御に関与すると考えられている。特に日本人においては p.R4810K バリエント (rs112735431) は約 8 割のもやもや病患者から検出されるが、近年、*RNF213* 遺伝子バリエントはもやもや病以外にも様々な血管障害と関連することが報告されている。今回、動脈狭窄という点でもやもや病と類似の病態を呈する頸動脈狭窄症に焦点を当て、*RNF213* 遺伝子との関連を解析した。

〔方法〕 頸動脈狭窄症患者は、2016 年 5 月から 2023 年 6 月の期間に本院、足立医療センターおよびその関連施設で加療を行った者で、NASCET 法 (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial) により算出した狭窄率 30%を超える者を対象とした。対照として日本人 289 例のシーケンシングデータを用いて比較を行った。289 例の対照データの内訳は、1000 人ゲノムプロジェクトの日本人 104 例の公開データに、本学でこれまでに蓄積してきた対照シーケンシングデータ 185 例分を加えたものである。これらの臨床検体を用いた研究にあたっては、東京女子医科大学倫理審査委員会の承認 (承認番号 324B、310B) のもと、被験者より書面による同意を取得して実施した。

被験者より採取された末梢血 DNA を用い、*RNF213* 遺伝子のコーディングエクソン全領域およびエクソン-イントロン間隙を、次世代シーケンサー Ion PGM システム (Thermo Fisher Scientific) にてシーケンシングした。候補バリエントの抽出基準として、一般人口におけるアレル頻度が 0.01 未満で、Combined Annotation Dependent Depletion (CADD バージョン 1.6) のスコアが 13.19 以上のものを対象とした。これは、もやもや病の感受性バリエントとして多数の研究報告で確立されている p.R4810K のアレル頻度と CADD スコアを基準にした閾値である。これにより抽出された候補バリエントについては、3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いてサンガー法による確認を行った。

〔結果〕 頸動脈狭窄症患者群 (n=72) と対照群 (n=289) から検出された疾患感受性候補バリエントを下表に示す。患者群でのバリエントありの割合が 16.7%であったのに対し、対照群では 7.27%であり、有意な関連が認められた (Fisher の正確確率検定 $p = 0.0207$ 、オッズ比は 2.54、95%信頼区間 1.08-5.77)。オッズ比は 2.54 であった。これは、*RNF213* 遺伝子バリエントが頸動脈狭窄症における遺伝的リスク因子であることを示す結果である。

これらの検出バリエントのうち、exon26:c.5600C>T (p.P1867L) および exon29:c.7250T>G (p.I2417S) は、同一の患者から検出されたため、さらに詳細に検討を行った。これらのバリエントの相 (複合ヘテロ接合なのか同一のアレル上に存在するのか) を決定するため、近隣の SNP 情報を活用した。p.P1867L と p.I2417S はゲノム上では 5.6kb と距離が離れており、また、両親のゲノム DNA の採取が困難なためである。まず、次世代シーケンシングのリードデータにより、p.I2417S は近接する SNP である c.7245G>C:p.P2415P (rs4890012) と同一のフラグメントに存在していることが判明した。また、p.P1867L に関しては、クローニングにより隣接する 2 つの SNPs (rs34002630 および rs869150591)

と連鎖の関係にあることがわかった。次に、1000 人ゲノムデータベースの 104 人分の日本人データから、rs4890012 から rs34002630 までの間で 10 SNPs の遺伝子型情報を抽出した。全ての SNPs の組み合わせで連鎖不平衡の係数 $|D'|$ を算出したところすべて >0.97 と強固な連鎖不平衡を示した。これにより、日本人集団では、rs34002630 と rs4890012 が共にヘテロ接合の個体では必ず、G-G と A-C ハプロタイプのヘテロ接合をとることが明らかになり、本症例では p.P1867L および p.I2417S バリエントは同一のアレル上に存在してハプロタイプを形成するすることがわかった。本例は左頸動脈狭窄症に加え、左頭蓋内内頸動脈狭窄症、腸骨動脈の閉塞性動脈硬化症、さらに冠動脈狭窄も合併した重症例であった。

表 1. 頸動脈狭窄症患者群と対照群における *RNF213* バリエント

【患者群】					【対照群】				
塩基置換 (アミノ酸置換)	dbSNP151 rs-ID	頸動脈狭窄症 (n = 72)	gnomAD最大 アレル頻度	CADD v1.6 C-score	塩基置換 (アミノ酸置換)	dbSNP151 rs-ID	対照 (n = 289)	gnomAD最大 アレル頻度	CADD v1.6 C-score
c.1588G>A (p.A530T)	rs373877122	1	0.0002	16.89	c.1052C>T (p.A351V)	rs148593553	2	0.0004	17.07
c.2440_2448del (p.V817_N819del)	.	1	0	14.67	c.3067C>T (p.R1023W)	rs777013389	1	0.0002	13.51
c.3478C>T (p.L1160F)	rs1358284903	1	0	14	c.3212T>C (p.L1071P)	.	1	0	18.74
c.4103T>C (p.L1368P)	.	1	0	24.3	c.4590A>T (p.E1530D)	.	1	0	22.1
c.5597C>T (p.T1866I)	rs546687179	2	0.0034	13.77	c.4865C>T (p.A1622V)	rs534665632	1	0.0018	20.4
c.5600C>T (p.P1867L)	rs775867186	1*	0	21	c.5597C>T (p.T1866I)	rs546687179	3	0.0034	13.77
c.6265C>T (p.R2089W)	rs775006151	1	0.0000088	25.7	c.7066C>T (p.L2356F)	rs200724769	1	0.0002000	17.09
c.7250T>G (p.I2417S)	rs181965032	1*	0.0084	27.9	c.7250T>G (p.I2417S)	rs181965032	1	0.0084	27.9
c.7319G>A (p.G2440D)	rs761027115	1	0.0003	16.54	c.8111G>A (p.R2704Q)	rs146486225	1	0.0002	21
c.14429G>A (p.R4810K)	rs112735431	2	0.0028	13.19	c.8389C>T (p.R2797C)	rs776731965	1	0.0002	25.4
c.15062C>T (p.A5021V)	rs138130613	1	0.0042	14.47	c.9013G>A (p.E3005K)	rs147076172	1	0.0003	17.76
	変異個体数 12 (16.7%)				c.10044G>T (p.W3348C)	.	1	0	19.43
	*1例が2つのバリエントを保有				c.14429G>A (p.R4810K)	rs112735431	5	0.0028	13.19
					c.15095T>C (p.L5032P)	rs994892122	1	0	26.2
					変異個体数 21 (7.27%)				

【考察・結論】 頸動脈狭窄症患者群 (72 例) と対照群 (289 例) を対象に、*RNF213* 遺伝子のシーケンシング解析を行った結果、複数の *RNF213* バリエントが患者群で有意に高頻度に検出された ($P=0.021$ 、オッズ比 2.54)。2 つのバリエントを有する例もあり、バリエントの相互作用による重症化が考えられた。*RNF213* はこれまでももやもや病のほか、冠動脈疾患や肺高血圧症、腎動脈狭窄など様々な動脈狭窄性疾患との関わりが示されてきたが、今回はじめて頸動脈狭窄症との関連が明らかになった。

本研究の一部は 2024 年度の医学部 3 年生研究プロジェクトの中で実施され、2025 年に学生を筆頭演者とする学会発表が計画されている。

【学会発表】

- 1) 赤川 浩之：「さまざまな脳血管疾患における *RNF213* 遺伝子の関連」第 24 回日本分子脳神経外科学会、シンポジウム、2024 年 7 月 19 日 (佐賀)
- 2) 大淵英徳：「複合ヘテロ型もやもや病感受性バリエントを有した遺伝性不整脈合併モヤモヤ症候群の 1 例」第 42 回 The Mt. Fuji Workshop on CVD、口演、2024 年 8 月 31 日 (札幌)
- 3) 三谷優衣：「頸動脈狭窄症におけるもやもや病感受性遺伝子 *RNF213* の関連解析」令和 6 年度医学部 3 年生研究プロジェクトポスター発表会、2025 年 1 月 17 日 (本学)

6.3. 日本人成人 MODY 患者における全エクソームシーケンス及び Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification 法を用いた網羅的解析

岩崎直子^{1,2,3,4}、田中慧^{3,4}、東剣虹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、MODY患者の遺伝子診断率は最大で27%¹⁾、昨年の我々の検討でも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〕 臨床的にMODYと診断された(35歳未満の糖尿病発症、抗GAD抗体陰性、BMI<25kg/m²のいずれも満たす)21名の非血縁患者を対象とした。患者末梢血からgDNAを抽出、WESを施行し病原性バリエントを検索した。検出されたバリエントの病原性はACMG/AMPガイドライン2015²⁾に基づき判定した。これまでに報告がなく、かつ病原性が高いと考えられる遺伝子バリエントはヒト細胞株HEK293Tに発現させ機能解析を行った。また、WESで原因遺伝子の特定に至らなかった参加者にMLPA解析を追加しコピー数変異(Copy Number Variation, CNV)の特定を行った。

〔結果〕 WESによる解析で、21例中12例に病原性バリエントを検出した。内訳は既報のMODY病原性バリエントが6例(*HNF1A* c.327-1G>A, p.Gln176Ter, p.Arg131Trp, *GCK* p.Cys382Ter, *HNF4A* p.Arg112Gln, *ABCC8* p.Gly1478Arg)、さらに4例にこれまでに未報告の病原性バリエント(*WFS1* p.Asn746Lysfs*13)、および病原性の可能性が高いバリエント3種類(*GCK* p.Asp363Gly, p.Ser445Arg, *PDX1* p.Glu145Lys)を認めた。これら3種類について細胞株HEK293Tへバリエント*GCK* p.Asp363Gly, p.Ser445Arg, *PDX1* p.Glu145Lysを強制発現させ野生型と比較したところ、*GCK* p.Asp363Glyで*GCK*の細胞内発現低下が認められ、*GCK* p.Asp363Glyは機能喪失性バリエントと考えられた。次に病原性バリエントが未同定の13例に対しMLPA解析を施行したところ、4例にMODY関連遺伝子(*HNF4A*, *HNF1B*)のCNV(エクソン欠失)が認められた。

〔考察〕 日本人MODY患者の検出率は、日本人小児のコホート研究においてパネルシーケンシングとMLPAによる検出率が47.6%であったとの報告がある³。患者の選択基準やVUSの詳細な機能解析とCNV検索はMODYの診断率の向上に寄与する可能性がある。

〔結論〕 WESおよびMLPAを用いたMODY遺伝学的スクリーニングと新規バリエントの機能解析により高い頻度でMODY原因遺伝子を同定することができた。

〔文献〕

1) Hattersley AT, Patel KA (2017) Precision diabetes: learning from monogenic diabetes.

Diabetologia 60(5): 769-777.

- 2) Richards S, Aziz N, Bale S, et al. (2015) 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. 17(5): 405-424.
- 3) Yorifuji T, Watanabe Y, Kitayama K, Yamada Y, Higuchi S, Mori J, Kato M, Takahashi T, Okuda T, Aoyama T (2023) Targeted gene panel analysis of Japanese patients with maturity-onset diabetes of the young-like diabetes mellitus: Roles of inactivating variants in the ABCC8 and insulin resistance genes. J Diabetes Investig 14(3): 387-403.

[著書]

- 1) CQ64 ミトコンドリア糖尿病 *in* ミトコンドリア病診療マニュアル 2023 初版 共著、村山 圭、小坂 仁、三牧正和編、p226-228 総ページ 280、診断と治療社、東京、2023 年 6 月 5 日

[発表論文]

- 1) Tanaka, S., Akagawa, H., Azuma, K., Higuchi, S., Ujiie, A., Hashimoto, K., Iwasaki, N. (2024). High prevalence of copy number variations in the Japanese participants with suspected MODY. Clinical genetics, 106(3): 293–304.
- 2) Satoshi Tanaka^{1,2}, Hiroyuki Akagawa^{1,3}, Michiyo Hase⁴, Naoko Iwasaki. Two novel pathogenic variants of pancreatic duodenal homeobox-1 gene in two Japanese families with maturity-onset diabetes of the young: a case report with review of literature. (submitted, in Revision)

[学会発表]

- 1) 佐藤 裕子, 岩崎 直子, 田中 慧, 浦野 真理, 山本 俊至, 齋藤 加代子 Current status of genetic counseling for MODY in our hospital 日本人類遺伝学会第 69 回大会、札幌、2024 年 10 月
- 2) 田中 慧, 赤川 浩之, 岩崎 直子 Whole Exome Sequencing revealed a novel PDX1 missense variants Arg148Leu in Japanese MODY4 patients 日本人類遺伝学会第 69 回大会、札幌、2024 年 10 月
- 3) 田中 慧, 赤川 浩之, 岩崎 直子 全エクソームシーケンシングで診断に至った日本人 MODY1 患者 5 家系についての検討 第 67 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2024 年 5 月 18 日
- 4) Satoshi Tanaka, Hiroyuki Akagawa, Naoko Iwasaki. Systematic Genetic Analysis achieved 57.1% of detection rate in Japanese MODY patient. 9th Meeting of the Study Group on Genetics of Diabetes (SGGD)、英国、2024 年 4 月
- 5) 岩崎直子 単一遺伝子異常による糖尿病 第 58 回糖尿病学の進歩、京都、2024 年 2 月 16 日
- 6) Yasuki Hatayama, Makoto Arai, Yukiko Shima, Yoshitaka Nishino, Harutoshi Sugiyama, Yusuke Kawamoto, Tadashi Konoshita, Honda Goro Naoko Iwasaki. Continuous glucose monitoring in a patient with insulinoma before and after the operation. 米国内科学会日本支部 2024 年次学術集会、東京、2024 年 6 月 22 日
- 7) 田中 慧, 岩崎 直子. 新規 MODY 遺伝子の同定と既知 MODY 遺伝子レアバリエント併存例における病因的意義の検討 第 11 回 JADEC 年次学術集会、京都、2024 年 7 月 20 日

6 4. 線虫 *C. elegans* の凍結融解耐性制御と高浸透圧耐性の関係

大野奈緒子^{1,2}、吉名佐和子²、三谷昌平²

(¹総合医科学研究所、²生理学 (分子細胞生理学分野))

〔目的〕 線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下線虫と呼ぶ) は、多細胞生物でありながら個体丸ごとを簡便に凍結保存することができるという特徴を持つ。線虫の凍結保存法は1974年に紹介されて¹⁾以降、効率的な線虫研究を支え続けてきたが、線虫の高い凍結融解耐性がどのように実現されているのかはこれまでよくわかっていなかった。そこで、本研究では、線虫の凍結融解耐性を制御する分子基盤を解明することを目的に研究を進めた。

〔方法〕 前年度までに、線虫のクチクラコラーゲンの変異体の一部において、凍結融解後の生存率が低いことを明らかにしていた。クチクラコラーゲンの一部は、高浸透圧耐性が高いことが知られていた²⁾ため、高浸透圧耐性と凍結融解耐性に関係がある可能性を検討した。まず、線虫の細胞外マトリックス構成因子である、*osr-1* 変異体、*osm-7* 変異体の凍結融解耐性を調べた。これらの遺伝子はクチクラコラーゲンをコードしないが、機能欠失により高浸透圧耐性に異常を示すことが知られている³⁾。通常培養した L1 幼虫をトレハロース入り凍結保存液 (M9 バッファ+トレハロース凍結保存液ストック [NaCl 100 mM, リン酸カリウムバッファ (pH6.0) 50 mM, トレハロース 1M] を1:1で混合したもの) を加えて-80°Cで緩慢冷却して凍結し、2日後に解凍して生存率を調べた。また、これまでに凍結融解耐性を調べてきたクチクラコラーゲン変異体について、高浸透圧溶液中での遊泳行動を観察することで高浸透圧耐性を評価した。トレハロース凍結保存液に線虫を暴露し、一定時間経過後の線虫の10秒あたりの体の屈曲回数を計測した。

〔結果〕 高浸透圧耐性を示す *osr-1 (tm1469)*、*osm-7(tm2256)*変異体ともに、凍結融解後に有意に低い生存率を示した (野生型 6.5% に対し、*osr-1 (tm1469)* 0.03%、*osm-7(tm2256)* 0%)。*osr-1 (tm1469)*、*osm-7(tm2256)*のこの生存率は、これまでに調べてきた *dpy-2*、*dpy-3*、*dpy-7*、*dpy-10*などのクチクラコラーゲン変異体と同程度であった。また、クチクラコラーゲン変異体、高浸透圧耐性変異体において、高浸透圧溶液中での屈曲行動を調べたところ、野生型や野生型と同程度の凍結融解耐性を示す *dpy-5*、*dpy-13* 変異体株では、高浸透圧溶液に暴露すると2-5分で著しく動きが悪くなることがわかった。一方、凍結融解後の生存率が低い *dpy-7*、*osr-1* などの変異体は、高浸透圧溶液暴露後20分経過後も比較的活発に動いており、高い凍結融解耐性を示すことが確認できた。先行研究では調べられていなかった *dpy-3(tm9013)*変異体についても、高い高浸透圧耐性を示した。

〔考察〕 高浸透圧液暴露後に高い運動性を示した高浸透圧耐性株は、凍結融解後の生存率が低く、高浸透圧耐性の低い株は、凍結融解後の生存率が比較的高かった。高浸透圧耐性と凍結融解耐性には相関があることが示唆される。

〔結論〕 線虫において、高浸透圧耐性が高い株では低い凍結融解耐性を示す傾向が見られた。

〔文献〕

- 1) Brenner S., (1974) *Genetics* 77(1): 71-94
- 2) Wheeler JM, Thomas JH., (2006) *Genetics* 174(3): 1327-36
- 3) Solomon, A., S. Bandhakavi, S. et al., (2004) *Genetics* 167(1): 161-70

〔学会発表〕

- 1) Naoko Sakai, Sawako Yoshina, Shohei Mitani. Elucidation of Factors Affecting Freeze-Thaw Tolerance in *C. elegans*. 24th International *C. elegans* Conference, online, 2023/6
- 2) 酒井奈緒子, 吉名佐和子, 三谷昌平. 線虫 *Caenorhabditis elegans* の凍結融解耐性を制御する遺伝子の探索. 線虫研究の未来を創る会 2023. 兵庫. 2023/8

6 5. 全ゲノムシーケンス解析を利用した順遺伝学解析における原因遺伝子決定の簡易化手法の開発と応用

末廣勇司¹、三谷昌平²

(¹総合医科学研究所、²生理学 (分子細胞生理学分野))

〔目的〕 近年では次世代シーケンスが安価に実施できるようになったことから、順遺伝学解析における原因遺伝子の同定に、全ゲノムシーケンスを利用する研究も増えてきた。しかし、化学物質などによる変異導入を行うとゲノムに多数の変異が生じることから、原因遺伝子の特定が困難になることも多い。そこで、実験動物の戻し交配を行うことで、原因遺伝子と連鎖した領域の変異頻度を相対的に上昇させることで、効率的に原因遺伝子を特定しようという実験が試みられた。私はこれまで線虫を対象に構造変異を検出して、遺伝子アノテーションを行うプログラムの開発を行ってきた¹⁾。この解析システムを利用して、上記の動物サンプルから原因遺伝子座の候補を簡便に検出し、出力するパイプラインを構築して、その実用性を確認した。

〔方法〕 Ethyl methanesulfonate (EMS) で変異導入を行った線虫を戻し交配して、目的遺伝子と連鎖した領域の変異頻度が相対的に高い株を複数取得した。これらの株からゲノムを抽出して混合し、ionProton(サーモフィッシャーサイエンティフィック)を利用して全ゲノムシーケンスを実施した。シーケンスデータは、機器に付属のTorrentSuiteを用いて小サイズの変異検出に利用した。イルミナ社のシーケンスデータがあるサンプルについては、一般的なパイプライン²⁾を利用した変異検出結果を利用した。構造変異は過去に作成したプログラム¹⁾を利用して検出し、小サイズの変異情報と統合した。得られた変異について、変異原非処理群のデータがある場合は差分をとった。既存多型の除去を行ったのち、さらに原因遺伝子座を絞り込むため、EMSで頻発するGC⇒AT型の変異のみを抽出、CDS変異のみを抽出、および変異頻度の高低を可視化するプラグイン群を作成して適用した。

〔結果〕 線虫のRNA干渉に関わる遺伝子を順遺伝学により同定しようと試みた二例の研究において、本プログラムを使用した。結果、RNA干渉に異常をきたすことが既知の変異体 *rsd-3* の表現型を抑圧する遺伝子の探索で本プログラムを使用した研究では、新規のRNA干渉関連遺伝子の WBGene00032612 の同定に至った。もう1つの研究例でも、RNA干渉に異常を示す株のシーケンス結果から、WBGene00009322 と WBGene00021440 の同定に至った。

〔考察〕 今回作成したプログラムが、順遺伝学における原因遺伝子の特定に十分実用的であることが分かった。とくに戻し交配による実験的な手法と、適切なバイオインフォマティクス解析を組み合わせることで、次世代シーケンスを利用した順遺伝学解析の敷居は劇的に下がることが予想される。現在、このプログラムをクラウドサービス上で利用できるよう拡張し、かつグラフィックインターフェースを利用して、ユーザがボタンを押すだけで解析が可能になっている。実際に、バイオインフォマティクス経験のない共同研究者から、当該プログラムを利用して原因遺伝子の特定に至ったという報告も受けており(私信、未発表データ)、本プログラムが順遺伝学解析の促進と生命科学研究の貢献につながると期待している。

〔結論〕 順遺伝学解析において、変異原処理後の動物に戻し交配を行って変異頻度に偏りが生じているゲノムを対象としたとき、小サイズの変異と構造変異をまとめてフィルタリングしたうえで頻度情報を利用することで、簡易に原因遺伝子の特定を可能にするプログラムを構築できた。

〔文献〕

- 1) Suehiro Y, Yoshina S, Motohashi T, et al. Efficient collection of a large number of mutations by mutagenesis of DNA damage response defective animals. *Sci Rep*. 2021 Apr 7;11(1):7630.
- 2) Koboldt DC. Best practices for variant calling in clinical sequencing. *Genome Med*. 2020 Oct 26;12(1):91.

〔発表論文〕

- 1) Dejima K, Imae R, Suehiro Y, et al. An endomembrane zinc transporter negatively regulates systemic RNAi in *Caenorhabditis elegans*. *iScience*. 2023 May 19;26(6):106930.
- 2) Yoshida K, Suehiro Y, Dejima K, et al. Distinct pathways for export of silencing RNA in *Caenorhabditis elegans* systemic RNAi. *iScience*. 2023 Sep 28;26(10):108067.
- 3) Yoshida K, Suehiro Y, Mitani S. Protocol for forward genetic screening to identify novel factors involved in a biological process in *Caenorhabditis elegans*. *STAR Protoc*. 2024 Jun 21;5(2):103114.

〔学会発表〕

- 1) Suehiro Y, Mitani S. New pipeline to detect “intermediate size” variants and evaluation of the significance of those variants on biological function., 12th Informatics in Biology, Medicine and Pharmacology, Chiba, 2023.

6.6. フラグメントシーケンスの応用

東剣虹¹、堀澤士朗²、寺田麻貴子¹、田中慧¹、岩崎直子³

(¹総合医科学研究所、²脳神経外科学、³八千代医療センター・糖尿病・内分泌代謝内科)

〔目的〕 前年度、遺伝子解析手法にフラグメントシーケンスを導入することで結果として従来のターゲットシーケンスでは検出が難しいシーケンス効率の低い箇所をカバーすることができたことを報告した。今年度は引き続き、様々な疾患遺伝子を対象にフラグメントシーケンスの系を立ち上げ、それによる解析の可能性を広げる方向に進めた。

〔方法〕 さまざまな長さの遺伝子で Long-range PCR→フラグメントシーケンスの手法が可能かどうかを検証した。具体的には、若年発症成人型糖尿病の原因遺伝子の一つである *HNF4A* (28kb)、ミオクローヌスジストニアの原因遺伝子 *SGCE* (71kb)、そして、もやもや病の原因遺伝子の一つである *RNF213* (138kb)を対象に一括あるいは分割するようにプライマーを設計して、PCR をかけた。なお、迅速且つ効率的な Long-range PCR を可能にするために、1kb/10sec で増幅可能な KOD One (東洋紡)を導入した。また、シーケンス解析においては、マッピングに問題はないかの確認と共に、たとえば大きな欠失がどのように検出されるかを、既に欠失があることが確認されている検体を用いて確認した。

〔結果・考察〕 30kb 以下の遺伝子については、問題なく 1 ペアのプライマーで Long-range PCR がかかることを確認し、フラグメントシーケンスの結果も良好だった。図 1 には *HNF4A* のフラグメントシーケンスのマッピングと、以前 MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法で exon5-7 欠失と診断された検体がフラグメントシーケンスでも同様の結果を得たことを示している。なお、フラグメントシーケンスの利点としては、ブレイクポイントが特定できる点にある。今回、exon5-7 欠失と診断された検体では、具体的に exon4 の 5'から 56 塩基目の C と exon7 の 3'から 42 番目の A の間が欠失していることが明らかとなった。

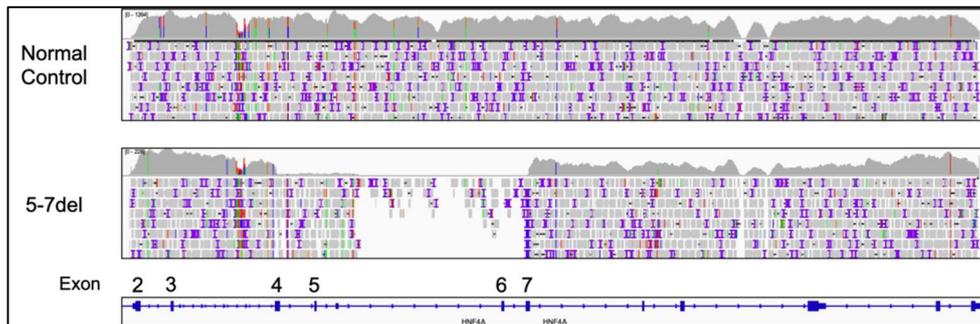


図 1. *HNF4A* のフラグメントシーケンスと欠失の検出

Long-range PCR が安定してかかるのは 30kb 長クラスまでということが検討の段階で判明していたため、40kb を超える遺伝子については互いにオーバーラップするように分割して Long-range PCR を行った。代表例として、*SGCE* を対象に行った結果を図 2 に示す。全長 70kb を超える *SGCE* を二分割するようにプライマーを設計し (図 2A)、Long-range PCR をかけた結果、目的の大きさのバンドを泳動にて確認することができた (図 2B)。その後、フラグメントシーケンスで得られたリードをマッピングしたところ、エクソン、イントロン共に高いカバレッジであることを確認できた (図 2C)。なお、①

が②よりも全体的にカバレッジが低いように見受けられたのは、②よりも①のアンプリコンの濃度が低かったことと、非特異バンドの影響だと思われる。これについては、プライマーの位置を変えたり、PCRの条件を Step-down に変えたりすることで解決できる見込みである。

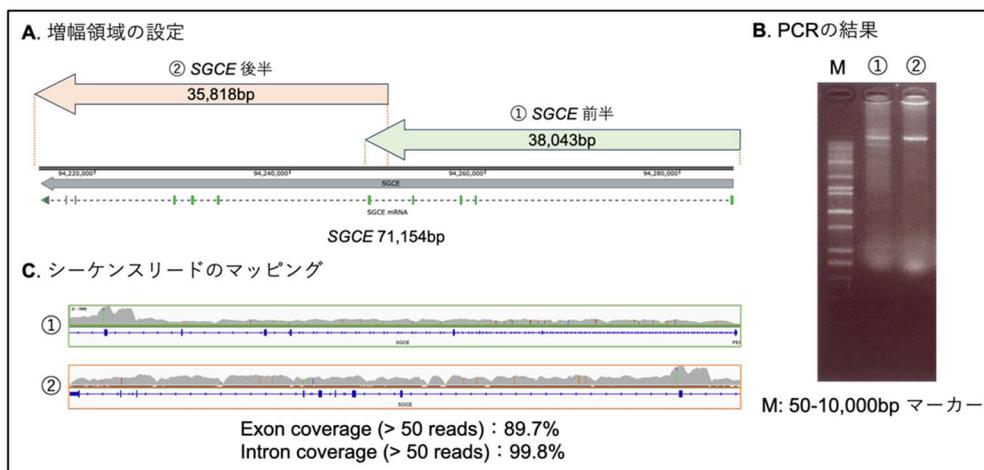


図 2. SGCE フラグメントシーケンスのデザインと結果

*RNF213*についても、*SGCE*と同じ要領で各 30kb 弱に五分割して Long-range PCR を行い、フラグメントシーケンスを行った。詳細はスペースの都合上省くが、Exon coverage (> 50 reads) : 76.7%、Intron coverage (> 50 reads) : 94.4%という結果を得ることができた。エクソンのカバレッジが少し低かった理由として、UTR を一部含んでいないことと、PCR の増幅が悪かった領域が影響していると考えられる。

〔結論〕 以上のことから、Long-range PCR からのフラグメントシーケンスという手法は改良の余地を残しながらも、遺伝子のサイズに関係なく可能であることと、これまで MLPA や全ゲノム解析でしかうまく検出できなかった大きな欠失を容易に検出することが可能であることが示された。

〔発表論文〕

- 1) [Tanaka T](#), [Akagawa H](#), [Azuma K](#), [Higuchi S](#), [Ujiie A](#), [Hashimoto K](#), [Iwasaki N](#). “High prevalence of copy number variations in the Japanese participants with suspected MODY.” *Clin Genet*. 2024 106(3):293-304
- 2) [Morita S](#), [Nomura S](#), [Azuma K](#), [Chida NA](#), [Furutani Y](#), [Inai K](#), [Inoue T](#), [Niimi Y](#), [Iizuka Y](#), [Tsutsumi Y](#), [Ishizaki R](#), [Yamagishi H](#), [Kawamata T](#), [Akagawa H](#). “Functional characterization of variants found in Japanese patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia.” *Clin Genet*. 2023 105(5):543-548
- 3) [Tanaka T](#), [Akagawa H](#), [Azuma K](#), [Watanabe K](#), [Higuchi S](#), [Iwasaki N](#). “A novel pathogenic variant in the glucokinase gene found in two Japanese siblings with maturity-onset diabetes of the young 2.” *Endocr J*. 2023 70(6):629-634

6 7. 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}、赤川浩之²

(¹脳神経外科学、²総合医科学研究所)

〔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。すなわち、MMS は遺伝的修飾因子と原発性遺伝病の原因変異の組み合わせにより発症すると考えられる。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く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 (ダウン症:3 例、NF1:6 例、ヌーナン症候群:1 例、HbH 型サラセミア:1 例、多系統平滑筋機能不全症候群:2 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実施の後、修飾因子を探索した。因子の関連を検討するための対照データとして 1000 人ゲノムプロジェクトの個体データを利用した。in silico 解析で機能障害の可能性が高いバリエーションについては培養細胞を用いた機能解析実験も実施した。

〔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* 遺伝子バリエーションが日本人患者より、*MRVI1* 遺伝子バリエーション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 バリエーションが検出されたが、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*、*MRVI1*、*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 c.4412-2A>G 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）。MM 遺伝子群で検出されたものは低機能バリエントであったのに対し、PAH 遺伝子群から検出された 5 つのバリエントのうち 4 つでは（*ABCC8* c.4412-2A>G, *SMAD9*:p.E30K, *BMPR2*:p.M356I, *PTGIS*: p.P500S）、培養細胞による機能解析実験を実施し有意な機能低下を検出した。

〔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 誌への掲載とともに本学からプレスリリースも行っている。

【プレスリリース】 もやもや症候群の原因遺伝子を解明！

<https://www.twmu.ac.jp/univ/news/detail.php?kbn=1&ym=202410&cd=1419>

〔発表論文〕

- 1) **Akikazu Nakamura**, and **Hiroyuki Akagawa**, et al. Whole-exome sequencing reveals the genetic causes and modifiers of moyamoya syndrome. *Sci Rep.* 2024;14(1):22720.
- 2) 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.* 2024;15(6):1142-1153.

〔学会発表〕

- 1) 赤川 浩之：「Whole-exome sequencing reveals the genetic causes and modifiers of moyamoya syndrome」日本人類遺伝学会第 69 回大会、口演、2024 年 10 月 12 日（札幌）

68. マルチプレックスイメージングによる薬剤耐性細胞の発生予測

田邊賢司

(総合医科学研究所)

〔目的〕 これまでに多くの抗がん剤が開発され、臨床の場で高い成果を上げてきた。しかし、その一方で、薬剤耐性細胞の発生はがんの完全寛解に向けた大きな障壁となっている¹⁾。耐性細胞は均質な細胞集団からも発生するが、その発生機序は未だ明らかでない。仮にその予測が可能になれば、耐性獲得の詳細な分子機構の解明につながり、がんの完全寛解に貢献すると期待される。本研究では、一過性の薬剤耐性細胞である Drug-tolerant persister cells (DTPs)⁵⁾に着目し、細胞イメージング解析による表現型の定量評価法²⁾と、繰り返し蛍光免疫染色^{3),4)}を組み合わせ、DTPsの発生予測を試みる。

〔方法〕 1. BH3 mimetics によるアポトーシス誘導と DTPs 発生のライブイメージング

U-2 OS 細胞 (HTB-96, ATCC) に BH3 mimetics (ABT737, S63845, Cellect) を 6 時間加えてアポトーシスを誘導し、一過性の薬剤耐性細胞である DTPs の発生を促した⁵⁾。その発生過程を Caspase-3/9 Green ReadyProbes (Invitrogen) でアポトーシスを可視化し、Biostation IM-Q (Nikon) を用いてライブイメージングで観察した。

2. DTPs 発現のマルチプレックスイメージング

U-2 OS 細胞を 384 ウェルプレートに播種し、BH3 mimetics を加え 5~10 分おきに 4% パラホルムアルデヒドにて固定した (0~120 分)。固定した細胞は透過処理後に 4i³⁾ および Cyclic IF⁴⁾ を改変した方法にて多重蛍光染色を行った。染色した細胞は LSM-900 (Carl Zeiss) にて撮影した。撮影画像は Matlab (Mathworks) で光量補正⁶⁾ および Registration 処理を行なった。

〔結果および考察〕 1. BH3 mimetics 添加後の U-2 OS 細胞の明視野画像および蛍光画像を示す (図 1)。薬剤添加後、細胞の形態変化と Cas3/9 のシグナルが認められ、アポトーシスの誘導が確認できた (図 1A)。その中で、わずかながら耐性細胞が発生していることが確認される。これらの細胞を薬剤不含培地で一定時間培養後、再び薬剤に暴露すると薬剤耐性を維持していることから、U-2 OS 細胞における DTPs 発生が確認できた (図 1B)⁵⁾。

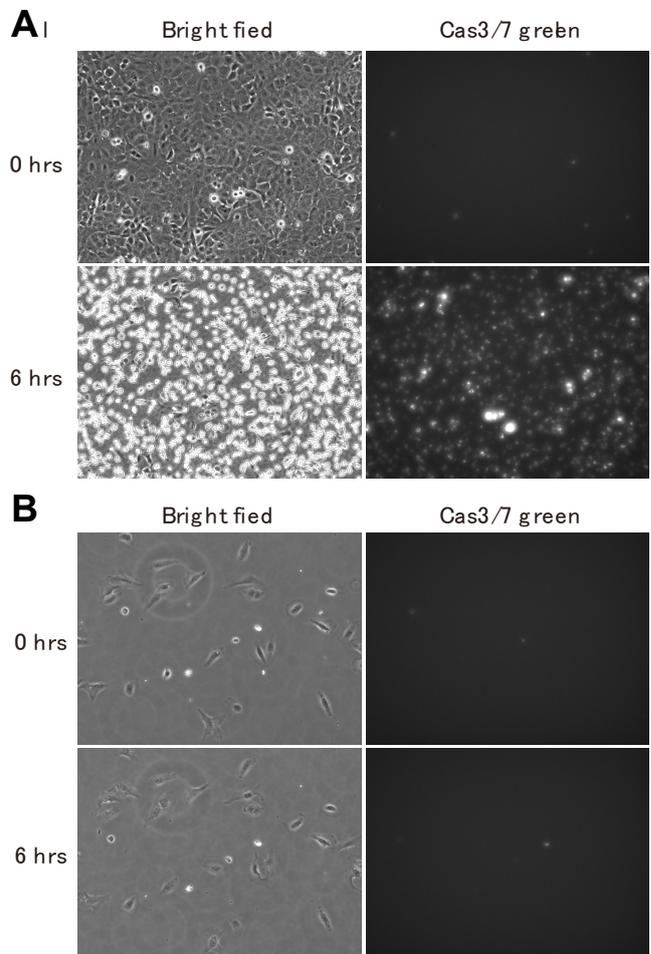


図1. DTPs 発生のライブイメージング

U-2 OS 細胞に BH3 mimetics および Cas3/7 green を添加し、6 時間培養した (A)。生存した細胞を薬剤不含培地で 18 時間培養した後、再度薬剤処理を 6 時間行った (B)。左列は明視野、右列は緑色蛍光を示す。

2. 薬剤添加後 0~120 分まで 5~10 分おきに細胞を固定した。Duplicate を含む全 28 サンプルについて 4i または Cyclic IF によって 24 回の繰り返し蛍光染色を行い、合計 53 種類の細胞内分子を可視化した。全ての染色において 1 サンプルあたり 5,000 程度の細胞を撮影した。結果の一部 (20 種類) を図 2 に示す。連続した染色であっても細胞に明らかなダメージは認められず、各々の抗体・染色剤に特有の染色像が得られた。

〔結論〕 U-2 OS 細胞でも薬剤耐性細胞 DTPs の発現が確認され、細胞の評価に必要な画像が収集できた。今後はこれらの画像の解析を進め、得られた結果をもとに DTPs の発生予測を試みる。

〔文献〕

- 1) Guilbaud, E. & Galluzzi, L. (2023) Adaptation to MOMP drives cancer persistence. *Cell Res.* 33: 93–94
- 2) Tanabe, K. (2016) Image-based compound profiling reveals a dual inhibitor of tyrosine kinase and microtubule polymerization. *Scientific Reports* 6: 25095
- 3) Gut, G., Herrmann, M. D. & Pelkmans, L. (2018) Multiplexed protein maps link subcellular organization to cellular states. *Science* 361: eaar7042
- 4) Lin, J. R., Fallahi-Sichani, M. & Sorger, P. K. (2015) Highly multiplexed imaging of single cells using a high-throughput cyclic immunofluorescence method. *Nature Communications* 6:
- 5) Kalkavan, H., Chen MJ., Crawford JC. et al. (2022) Sublethal cytochrome c release generates drug-tolerant persister cells. *Cell* 185: 3356-3374
- 6) Peng, T., Thorn K., Schroeder T. et al. (2017) A BaSiC tool for background and shading correction of optical microscopy images. *Nature Communications* 8: 14836

〔学会発表〕

- 1) Tanabe K. Image-based phenotypic profiling of a chemogenomic screening library identifies novel targets of known inhibitors, American Association for Cancer Research, Miami, USA, 2023/4

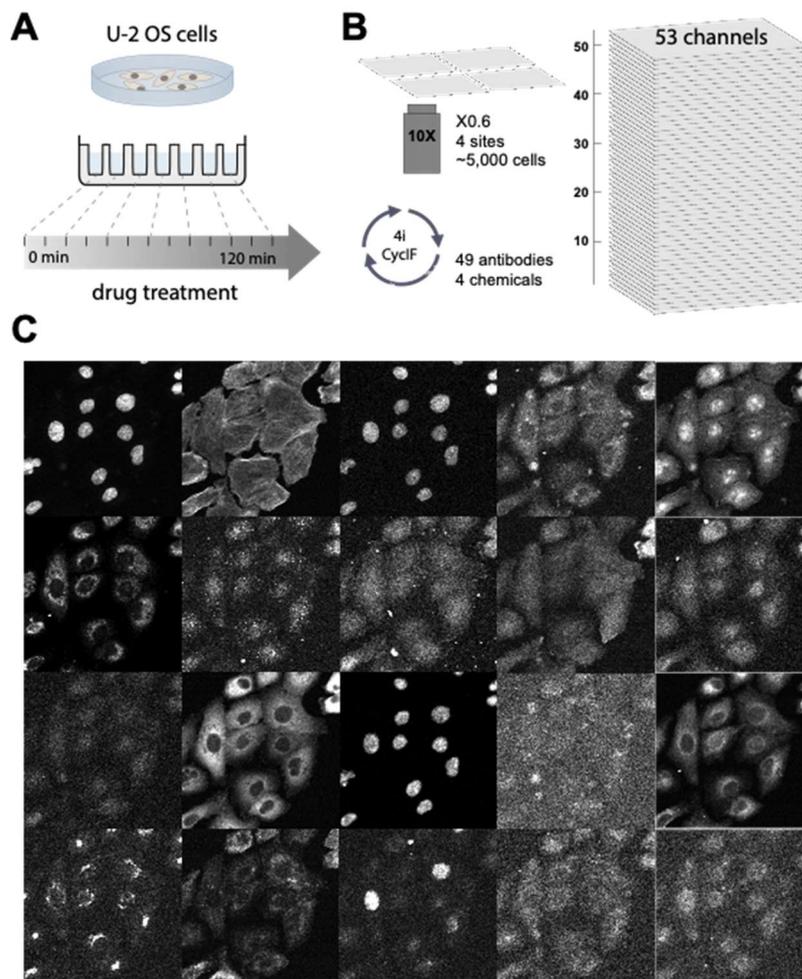


図 2. 繰り返し蛍光染色によるマルチプレックスイメージング

U-2 OS 細胞に薬剤を添加し、一定時間経過後に固定した(A)。蛍光染色、撮影、抗体剥離または蛍光失活を繰り返し行い、53 種類の細胞内分子の画像を取得した(B)。取得した画像の一部を示す(C)。