

平成21年 6 月 18 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2006 ~ 2008
 課題番号： 18790752
 研究課題名 (和文) 先天性代謝異常の遺伝子検査システムの開発
 研究課題名 (英文) Developing for Genetic Testing System for Inborn Error of Metabolisms
 研究代表者 右田 王介 (MIGITA OHSUKE)
 国立成育医療センター (研究所)・生殖・細胞医療研究部・共同研究員
 研究者番号： 20425721

研究成果の概要：

先天代謝異常症では、近年造血幹細胞移植や酵素補充療法といった根本的治療が可能となり、早期診断が急務となってきている。しかし、病因遺伝子が明らかであり遺伝子検査が未発症もしくは発症早期の診断の有力な根拠となりうるにもかかわらず、実際的な低コスト・迅速な遺伝子検査体制については、いまだ検討段階にある。本研究では遺伝子変異の新しい検査方法について検討し、将来の遺伝子検査体制の開発をめざした。

・遺伝子変異スクリーニング法の確立

10 の遺伝子 (*ATP8B1, ABCB11, JAG1, OTCD, IDS, GUSB, IDUA, FGFR3, DMD, FCMD*) について PCR 増幅法を確立した。簡便な検査を目指すため全エクソンに対し温度設定、使用ポリメラーゼなどについて、まったく同一条件とした PCR 条件の確立をめざした。全てのアンプリコンを全く同一の条件に統一することはできなかったが、1 遺伝子あたり 1-3 条件に集約できた。これにより、予め PCR 反応に必要なプライマーのセットを準備し、患者 DNA 検体と PCR 試薬の混合物を添加するだけで半自動的に遺伝子変異探索の検討ができるようになった。

・スクリーニング法の評価

これまでに遺伝子解析が行われた既知の遺伝子変異をもつ DNA 検体を用いて、DHPLC 法およびリシーケンシング・アレイ法による変異検索の検出検討を行った。直接シーケンス法による遺伝子変異の検出率と比較した。研究申請段階では、未確立であったアレイ技術によるリシーケンシング・アレイ法による解析についても検討し、キャピラリー式の直接シーケンス法と同等の検出力をもつことが確認できた。

・遺伝子検査システムの確立

これら新規遺伝子解析法を併用した遺伝子検査システムを、遺伝子変異が未知の検体へ応用を開始した。全国の医療施設からのムコ多糖症、OTC 欠損症など受け入れて検査を開始した。

・遺伝子検査システムの応用

本研究では、PCR 条件を画一化することによって半自動化した検査体制の確立が期待できることを検証した。各疾患の病因遺伝子にある全エクソンのプライマーセットをあらかじめ準備した PCR 用プレートを作製し、臨床的にある遺伝性疾患が疑われた際に、患者 DNA サンプルと PCR 試薬のミックスをこのプレートに投入することで、遺伝子の検討を迅速に行える。この方法は、アレイ技術による解析にも応用でき有用な方法と考えられた。今後もより迅速で確実な先天疾患の遺伝子診断システムの拡充にむけた検討が必要と思われる

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	700,000	0	700,000
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝・先天異常学

1. 研究開始当初の背景

先天代謝異常症を代表とする単一遺伝性疾患は、いまだ体系化された検査体制がない。疾患の多くは病因遺伝子が古くから明らかであり、遺伝子検査が診断の根拠となりうるにもかかわらず、検査の最適化がなされておらず膨大な労力と時間が必要である。特に治療法の開発がすすみ、疾病本態への治療として臓器移植や酵素補充療法といった新規治療法が実現されつつある現状では、病型を確定し、より適切な治療法が選択することは患者の最大の利益となる。さらに、酵素製剤は早期に使用を開始するほど効果的であり、発症前・早期の確実な診断が必要である。遺伝子検査は発症前に診断を確定する最も有用なツールであり、これらの新しい治療法の運

表1 遺伝子診断の特徴

- ・ 遺伝子診断の利点
 - 臨床診断の確定および確認が可能
 - 発症前の診断ができる
 - 保因者診断、出生前診断へ繋がる情報となる
- ・ 遺伝子診断の問題点
 - 結果が家系内に共有される(遺伝カウンセリングが必要)
 - 標準化された検査法がない(コスト、時間)

用のため遺伝子検査の効率化を図り、検査体制を確立することは現代の緊急の課題である。さらに、迅速な遺伝子検査による遺伝子診断を可能にすれば、早期治療だけでなく、遺伝情報は発症者の診断の確定や確認だけでなく、家系内の保因者診断に応用できる。保因者診断は、出生前診断や家族間での臓器移植治療を検討する際の資料としても意義

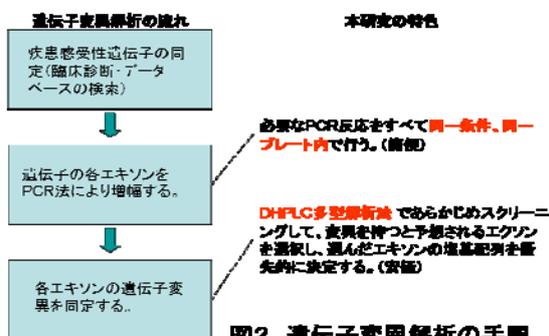


図2 遺伝子変異解析の手順

が高い。保因者診断には倫理的に重大な問題をはらんでいるがその技術的手法の開発は患者本人だけでなく家族にとって有用なも

のとなる。

2. 研究の目的

遺伝子検査を標準化し迅速かつ安価に行うことをめざした。また、遺伝子カウンセリングへの基礎的な試料となる情報提供のあり方も検討し、遺伝子検査を臨床の現場で利用できるようなシステムの構築をめざした。具体的については3に述べるが、DHPLC法ならびにマイクロ・アレイを応用したリシーケンシング・アレイ法による解析を検討した。これらの手法の特色は、遺伝子検査の迅速化とコストの低減がはかられる。キャピラリー型シーケンス法で検討する際には、400bp程度のPCR産物(1アンプリコン)あたりおよそ3000円のコストがかかるが、DHPLC法のコストは1アンプリコンあたり600円程度と概算される。また、リシーケンシング・アレイ法では、数千から数万の配列を一度に解析できる。リシーケンシング・アレイ法は、検査の迅速化に有用であることは間違いないが、直接シーケンス法との手法が大きく異なるため直接的なコスト比較には無理があるが、リシーケンシング・アレイ1解析で10万円程度と試算される。数十を超えるアンプリコンを解析する場合には、解析検体を減らし、コスト低減が期待される。

3. 研究の方法

高感度かつ高スループットであるDHPLC法ならびに、リシーケンシング・アレイ法を利用することにより、迅速な遺伝子検査を行うことを目指した。両手法で解析を実施するすべての遺伝子領域のPCR増幅を可能な限り同一条件に最適化し、半自動化した検査システムを確立した。ヘテロデュプレックス法を応用しdenaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)法により変異の有無をスクリーニングする。DHPLC法は、液体クロマトグラフィーの原理でPCR産物の変異の有無の検討ができる方法である(文献1)。病因遺伝子の翻訳領域全域を幾つかの領域に分け、変異の有無を検索し遺伝子変異の質的評価のための直接シーケンス法を行う対象を絞り込むことで、迅速かつ安価に検

査を行うことを目指す。DHPLC 法では、遺伝子配列に置換、挿入、欠失があれば泳動パターンに変化を検出できる (図 1)。

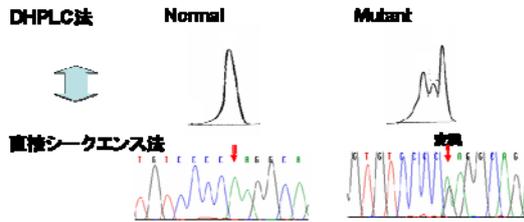


図1 DHPLC法の結果イメージ

リシーケンシング・アレイ法は、配列解析法のひとつであるが、対象配列の中央1塩基のみA, T, G, Cと4種に異なった塩基配列をもつプローブを作成し、マイクロ・アレイ技術により、各プローブひとつひとつをチップ上にスポットとして並べたアレイチップ (GeneChip) を作成する。検体のDNAをハイブリダイズすると、中央の1塩基まで配列が同一で完全に相補的な配列をもつ場合にのみハイブリダイズできる。ハイブリダイズしたDNAに蛍光修飾を加え、その蛍光を測定することでDNA配列を決定できる。多数の配列を迅速に決定する手法として近年注目されている。先天性代謝異常疾患のなかには、病因遺伝子によって病系分類がなされるような疾患群も存在する。これら疾患では、遺伝子検査による診断には複数の遺伝子について配列決定が必要となり、このリシーケンシング・アレイ法は、これらの問題の解決として期待されている。ただし、一方でアレイ解析は配列の欠失や重複が検出できない点や検出力について詳細なデータがないなど、検討課題もある。今回、胆汁うっ滞性肝障害を引き起こす肝細胞代謝にかかわる遺伝子についてリシーケンシング・アレイ法を応用した診断法について検討されているBezerra博士ら (文献2) と共同して研究代表者が収集した検体を解析し、その検出力を検討した。

参考:

文献1. Underhill, PA et al, Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) *Genome Res.* 7巻,p.996-1005,1997年

文献2. Liu C, Bezerra JA et al. Novel resequencing chip customized to diagnose mutations in patients with inherited syndromes of intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology.* 132巻, p.119-26, 2007年

4. 研究成果

・遺伝子変異スクリーニング法の確立
7の遺伝子 (*ATP8B1*, *ABCB11*, *JAG1*, *OTCD*, *IDS*, *GUSB*, *IDUA*) については全エクソン、3つの遺伝子 (*FGFR3*, *DMD*, *FCMD*) についてはホットスポットのPCR増幅法を確立した。簡便な検査を目指すため全エクソンに対し温度設定、使用ポリメラーゼなどについて、まったく同一条件としたPCR条件の確立をめざした。全てのアンプリコンを全く同一の条件に統一することはできなかったが、1遺伝子あたり1-3条件に集約できた。これにより、予めPCR反応に必要なプライマーのセットを準備し、患者DNA検体とPCR試薬の混合物を添加するだけで半自動的に遺伝子変異探索の検討ができるようになった。

・スクリーニング法の評価

これまでに遺伝子解析が行われた既知の遺伝子変異をもつDNA検体を用いて、DHPLC法およびリシーケンシング・アレイ法による変異検索の検出検討を行った。研究申請段階では、未確立であったアレイ技術によるリシーケンシング・アレイ法による解析についても5つの遺伝子について検討し、キャピラリー式の直接シーケンシング法と同等の検出力をもつことが確認できた。これら2つの方法を併用することでほぼすべての変異がリシーケンシング・アレイ法でも検出できると考えられた。ただし、ひとつあたりの疾患の症例数が数例に留まり検出力について検討するには至らなかった。

・遺伝子検査システムの確立

これらスクリーニングを併用した遺伝子検査システムを、遺伝子変異が未知の検体へ応用を開始した。全国の医療施設からのムコ多糖症、OTC欠損症など受け入れて検査を開始した。

・遺伝子検査システムの応用

本研究では、PCR条件を画一化することによって半自動化した検査体制の確立が期待できることを検証した。各疾患の病因遺伝子にある全エクソンのプライマーセットをあらかじめ準備したPCR用プレートを作製し、臨床的にある遺伝性疾患が疑われた際に、患者DNAサンプルとPCR試薬のミックスをこのプレートに投入することで、遺伝子の検討を迅速に行える。この方法は、アレイ技術による解析にも応用でき有用な方法と考えられた。今後もより迅速で確実な先天疾患の遺伝子診断システムの拡充にむけた検討が必要と思われる。なお、本研究を通し、*ATP8B1* 遺伝子などで新規病因遺伝子と考えられる遺伝子変異を確認した。これらをまとめ、現在投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

- ① Kosaki R, Migita O, Takahashi T, Kosaki K.
Two distinctive classic genetic syndromes, 22q11.2 deletion syndrome and Angelman syndrome, occurring within the same family. American Journal of Medical Genetics. 149A(4): 702-705, 2009
- ② Hayashi S, Mizuno S, Migita O, Okuyama T, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa
The CASK gene harbored in a deletion detected by array-CGH as a potential candidate for a gene causative of X-linked dominant mental retardation. American Journal of Medical Genetics. 146A(16): 2145-2151, 2008
- ③ Kosaki R, Okuyama T, Tanaka T, Migita O, Kosaki K. Monozygotic twins of Smith-Magenis syndrome. American Journal of Medical Genetics. 143: 768-789. 2007
- ④ 右田王介、奥山虎之. 染色体・遺伝子異常症・染色体の数の異常. Medical Technology. 35:1121-1125. 2007
- ⑤ 右田王介、梅澤明弘: 下垂体発生異常. 日本臨床, 別冊新領域別症候群No.1 pp. 206-211. 2006
- ⑥ Zhang J, Migita O, Koga M, Shibasaki M, Arinami T, Noguchi E.: Determination of structure and transcriptional regulation of CYSLTR1 and an association study with asthma and rhinitis. Pediatr Allergy Immunol. 17(4):242-9. 2006

〔学会発表〕(計10件)

- ① 右田王介、小澤伸晃、李紅蓮、柿島裕樹、小田絵里、田中藤樹、小須賀基通、林聡、左合治彦、小崎里華、奥山虎之: PCR法を基本とした分析技術による周産期異常の遺伝学的解析. 第53回日本人類遺伝学会, 横浜, 2008年
- ② 須磨崎亮、右田王介: 小児期の肝疾患における診断・治療の現状と未来 小児期の胆汁うっ滞における新知見. 第111回日本小児科学会 東京, 2008年
- ③ 小田絵里、田中藤樹、右田王介、岡田美智代、小須賀基通、小崎里華、大澤真木子、奥山虎之: ポンベ病スクリーニング; 日本人特有の遺伝子多型の影響. 第50回日本先天代謝異常学会総会. 米子, 2008年
- ④ 岡田美智代、小田絵里、三原喜美恵、右田王介、田中藤樹、小須賀基通、小崎里華、左合治彦、奥山虎之: ムコリビドーシスII型(I-cell病)の出生前診断. 第13回日本ライソゾーム病研究会. 東京 2008年
- ⑤ 右田王介、岡田美智代、田中藤樹、三原喜美恵、小崎里華、奥山虎之. ムコ多糖症の遺伝

子検査とその臨床的意義: 第110回日本小児科学会 2007年

- ⑥ Migita O, Hayashi S, Okada M, Tanaka T, Kosaki R, Niida K, Inazawa J, Okuyama T: A 1Mb DELETION INVOLVING IDURONATE-2-SULFATASE GENE OF A PATIENT WITH HUNTER SYNDROME (MPSII). The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari, Japan, 2006.9.13-9.16
- ⑦ 右田王介、三原喜美恵、岡田美智代、田中藤樹、小崎里華、林聡、左合治彦、小澤伸晃、久保隆彦、北川道弘、奥山虎之: 国立成育医療センターにおける胎児遺伝子診断. 第10回胎児遺伝子診断研究会, 東京, 2007.2.24
- ⑧ 右田王介、田中藤樹、福原康之、岡田美智代、小崎里華、奥山虎之、網塚貴介、安保亘、長尾雅悦: オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の出生前診断. 第109回日本小児科学会学術集会, 金沢, 2006.4.21
- ⑨ Migita O, Tanaka T, Kosaki R, Fukuhara Y, Okuyama T. Enzyme Replacement Therapy for Hurler Syndrome, the 9th Annual MPS Society Scientific Symposium Lido, Italy. 2006年
- ⑩ 岡田美智代、福原康之、右田王介、田中藤樹、柿島裕樹、小崎里華、奥山虎之: ムコ多糖症の遺伝子診断とその臨床的意義について. 第11回日本ライソゾーム病研究会, 東京, 2005年

〔図書〕(計1件)

- ① 齊藤 理恵子, 早坂 素子, 西海 真理 (編集). 小児看護ポケットナビ 中山書店. 2008年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

なし

(3) 連携研究者
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

右田王介 (MIGITA OHSUKE)

国立成育医療センター (研究所) ・
生殖・細胞医療研究部 ・ 共同研究員
研究者番号 : 20425721

(2) 研究分担者