

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860874

研究課題名(和文)全エクソーム解析を用いたPFAPA症候群疾患原因遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of the candidate gene for PFAPA syndrome

研究代表者

中島 光子(Nakashima, Mitsuko)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20541965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PFAPAを呈する12家系、45検体について全エクソーム解析を施行した。まず遺伝性周期発熱の原因遺伝子である6遺伝子(MEFV, MVK, TNFRS1A, LPIN2, NOD2, ELANE)について病的変異の検索を行ったが、これらの遺伝子において疾患原因となりうる病的変異は認められなかった。次に各家系毎に候補変異の絞り込みを行ったところ、常染色体優性遺伝形式を示す家系では26～98個、孤発家系においては1～3個の候補遺伝子が絞り込まれた。そのなかで、疾患候補遺伝子と考えられる遺伝子の検索を行ったものの、複数家系において共通して変異が認められる遺伝子は同定できなかった。

研究成果の概要(英文)：We performed whole exome analysis for 45 samples of 12 families with PFAPA. Firstly, we searched the mutations in 6 known candidate genes(MEFV, MVK, TNFRS1A, LPIN2, NOD2, ELANE) for hereditary autoinflammatory syndromes, but we could not detect any pathogenic mutations in these genes. Narrowing down the candidate variants in each family, we detected 26-98 candidate variants in the families with autosomal dominant inheritance model and 1-3 candidate variants in the sporadic families. We then searched the candidate genes whose variants were found in two or more families. However, we could not find any common genes having pathological mutations.

研究分野：遺伝学

キーワード：全エクソーム解析 小児周期発熱

1. 研究開始当初の背景

(1) PFAPA 症候群 (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis syndrome) は 1987 年に Marshall らによって初めて報告された疾患であり、本邦では 2001 年以降報告されるようになった。本疾患は 5 歳未満で発症し、3~8 週間周期で規則的に繰り返す発熱発作とそれに付随するアフタ性口内炎、咽頭・扁桃炎、頸部リンパ節炎などを主症状とする自己炎症性疾患である。本邦における周期性発熱症候群の中で最も頻度が高いといわれており、罹患者数は少なくないと考えられる。しかし、その疾患概念は一般小児科医にあまり浸透しておらず、また本症に特異的な検査所見がなく、診断が困難な疾患である。また、他の遺伝性周期性発熱症候群との鑑別診断は遺伝子検査によるところが大きい。

(2) 患児は繰り返す原因不明の高熱発作によりその都度休学や入院を余儀なくされ、日常生活に著しい不利益を被る。発熱発作時の特異的な治療法はなく、通常ステロイドやシメチジンの投与が行われ、難治例には扁桃摘出術なども施行される。しかし、多くの症例では成長につれて発作間隔の延長・随伴症状の軽減がみられ、成人前に自然寛解に至ることが多く、成長・発達障害を認めない。ゆえに、疾患の早期診断を行い幼小児期の発熱発作期間を短縮させ、患児の QOL を向上させることが重要である。

(3) 近年多数の遺伝性周期性発熱症候群において原因遺伝子が同定されており、病態解明と新規治療法の開発が進んでいる。一方、PFAPA 症候群は発症例の多くが孤発例であることから、非遺伝性疾患と考えられていた。しかし、国内外で家族発症例の報告がみられることから、遺伝的要因の関与が示唆されているが、本疾患の原因遺伝子の同定には至っていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、遺伝的要因の関与が強く示唆される PFAPA 症候群の家系列について全エクソーム解析を行い、疾患責任遺伝子を同定することを目的とする。

(2) さらに、遺伝形式が不明な孤発例についても解析を行い、新生変異や劣性遺伝性変異の検索を行う。

3. 研究の方法

(1) PFAPA 疾患責任遺伝子の同定

全エクソーム解析は、全ゲノムの約 2% を占める蛋白翻訳領域のみを選択的にキャプチ

ャし、遺伝子配列の中で蛋白質アミノ酸配列に影響を及ぼす領域のみを網羅的に解析する手法である。この手法では罹患者と非罹患者検体を解析することで罹患者に特異的な変異を容易に特定することができる。PFAPA 症候群をきたす患者およびその家族から血液資料を採取し、DNA の抽出を行う。その後、Agilent 社の SureSelect Human All Exon V5 Kit を用いてライブラリーの作成を行い、Illumina 社の HiSeq2000 においてシーケンスを施行した。得られたゲノム配列情報は、パイオインフォーマティクス手法を用いて参照配列にマッピングし、さらに参照配列と比較することにより一塩基変異 (SNV) や欠失/挿入変異 (InDel) の検出を行う。一人のエクソーム解析で検出される変異は数万個に上るため、これらの中からタンパクに影響を与える変異等を予測する。また、dbSNP135 や 1000 ゲノムプロジェクトの情報をもとに一般集団における頻度の高いバリエーションを除外し、150~200 個/個人まで変異の絞り込みを行っている。本研究では、12 家系、45 検体について解析を施行した。

他疾患候補遺伝子変異の検索

罹患者のエクソーム解析から得られたデータから、現在までに遺伝性周期性発熱の疾患原因遺伝子として報告のある 6 遺伝子 (MEFV, MVK, TNFRS1A, LPIN2, NOD2, ELANE) の病的変異の有無を検索した。

疾患候補遺伝子変異の絞りこみ

まず、各家系において予想される遺伝形式から候補遺伝子の変異の絞り込みを施行した。8 家系は常染色体優性遺伝形式、1 家系は常染色体劣性遺伝形式が疑われ、3 家系は孤発例であった。その後、複数家系において共通して変異がみられる候補遺伝子の検索を行った。

サンガーシーケンスでの変異確認

次世代シーケンスで特定された変異のうち、カバレッジの低い変異には偽陽性のものが含まれている可能性がある。そのため、エクソーム解析によって同定された候補遺伝子内の変異については、偽陽性検証のためにより正確性の高いサンガーシーケンシングを行い、真に存在する変異であることを確認する。

4. 研究成果

(1) PFAPA 疾患責任遺伝子の同定

エクソーム解析によって得られたシーケンスデータは平均 read depth が 131.12、20 × カバレッジの平均が 91.8% であり、良好な

データが得られたといえる。

sample_ID	Mean depth	%_bases_above_20
1	139.82	91.9
2	126.45	90.9
3	164.37	92.8
4	139.84	91.7
5	116.69	90.3
6	134.37	91.6
7	125.67	91.1
8	142.52	91.9
9	142.33	91.9
10	140.63	92
11	125.96	91
12	130.56	91.8
13	137.2	91.8
14	142.07	91.9
15	99.49	88.4
16	115.56	89.9
17	119	90.5
18	122.14	90.7
19	103.85	89
20	149.19	92.3
21	136.13	91.8
22	154.53	91.8
23	153.22	91.9
24	159.37	91.9
25	157.2	92
26	145.85	92
27	154.7	92.3
28	144.89	92
29	139.48	91.7
30	162.07	92.2
31	164.53	92.1
32	147.02	91.6
33	121.24	89.9
34	148.55	91.4
35	163.23	92.2
36	183.38	92.9
37	105.99	93.2
38	109.34	93.7
39	110.86	93.4
40	89.71	93
41	101.69	93.8
42	91.56	92.9
43	105.2	93.5
44	84.11	92
45	93.9	92.8

他疾患候補遺伝子変異の検索
遺伝性周期発熱の原因遺伝子として報告のある 6 遺伝子(MEFV, MVK, TNFRS1A, LPIN2,

NOD2, ELANE)について全罹患者のデータから病的変異の検索を行った。しかし、これらの遺伝子において疾患原因となりうる病的変異は認められなかった。このことは本疾患が既知の遺伝性周期発熱疾患とは異なる遺伝的要因によって引き起こされていることを示している。

疾患候補遺伝子変異の絞りこみ

まず、家系発症例について家系毎に候補変異の絞り込みを行った。常染色体優性遺伝形式を示す家系では 26~98 個まで候補変異が絞り込まれたが、常染色体劣性遺伝形式を示す家系においては有力な候補遺伝子は検出されなかった。そのなかで、疾患候補遺伝子と考えられる遺伝子の検索を行ったものの、複数家系において共通して変異が認められる遺伝子は同定できなかった。また、孤発家系においては罹患者特異的な新規変異や劣性形式の変異の検索を行った結果、1~3 個の候補遺伝子が絞り込まれた。これらの遺伝子についても、家系例との比較を行ったが、両者で共通して変異がみられる遺伝子は同定されなかった。このことから、本疾患の遺伝的背景には多様な要因が関与している可能性を示唆するものであると考えられる。

Family	遺伝形式	候補変異数
Family 1	優性	71
Family 2	優性	38
Family 3	劣性	0
Family 4	優性	33
Family 5	優性	26
Family 6	孤発	2
Family 7	優性	35
Family 8	優性	73
Family 9	優性	33
Family 10	優性	98
Family 11	孤発	3
Family 12	孤発	1

サンガーシーケンスでの変異確認

孤発例で同定された新規変異および劣性形遺伝性変異はサンガーシーケンスにてすべて真の変異であることが確認された。

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)

Mitsuko Nakashima, Hirofumi Kashii,

Yoshiko Murakami, Mitsuhiro Kato et al., Novel compound heterozygous *PIGT* mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia seizures syndrome 3. *Neurogenetics*, 査読有, 15, 2014, 192-200
DOI: 10.1007/s10048-014-0408-y

Mitsuko Nakashima, Kyoko Takano, Hitoshi Osaka, Noriko Aida et al., Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. 査読有, *Journal of Human Genetics*, 59, 2014, 471-474
DOI: 10.1038/jhg.2014.51

Mitsuko Nakashima, Masakazu Miyajima, Hidenori Sugano, Yasushi Imura et al., The somatic GNAQ mutation c.548G>A (p.R183Q) is consistently found in Sturge-Weber syndrome. *Journal of Human Genetics*, 査読有, 59, 2014, 691-693
DOI: 10.1038/jhg.2014.95

A novel PITX2 mutation causing iris hypoplasia. Masashi Kimura, Yoshihito Tokita, Naomichi Matsumoto & Mitsuko Nakashima et al., *Human Genome Variation*, 査読有, 1, 2014, 14005, DOI:10.1038/hgv.2014.5

ゲノム多様性と希少疾患。 中島 光子, 松本 直通 細胞、査読有, 45, 128-30, 2013.

ケロイド。 中島 光子, 前佛 均 *Surgery Frontier*, 査読有, 20:178-83, 2013.

[学会発表](計 2件)

中島光子、宮嶋雅一、新井一、加藤光広、松本直道 Sturge-Weber syndrome における *GNAQ* 体細胞変異の同定、第 59 回日本人類遺伝学会、2014 年 11 月 22 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Mitsuko Nakashima, Hirofumi Kashii, Yoshiko Mjurakami Mitsuhiro Kato et

al., Novel compound heterozygous *PIGT* mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia seizures syndrome 3, The American Society of Human Genetics, 2014 meeting, 2014 年 10 月 19 日 ~ 21 日, San Diego (CA, USA)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中島 光子 (NAKASHIMA MITSUKO)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号 : 20541965