

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19640

研究課題名(和文) 分子バーコード法を用いた自己炎症性疾患の低頻度モザイク検出パイプラインの構築

研究課題名(英文) Detection of Low frequent mosaicism in autoinflammatory diseases using molecular barcode method

研究代表者

井澤 和司 (Izawa, Kazushi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90634931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自己炎症性疾患は、原発性免疫不全のひとつに分類され、主に自然免疫分子の遺伝子異常によって生じる遺伝性疾患である。一部の自己炎症性疾患はモザイク変異によって発症する。通常のサンガーシーケンスでは低頻度のモザイク変異の検出は困難である。そのため次世代シーケンサーを用いることが多いが、臨床レベルで用いるためには正確な検出が必須である。我々は、分子バーコード法を用いることで、既知のモザイク変異を正確に検出することが可能であった。また、欠失やコピー数異常を検出する系の構築を目指して研究を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床の現場では、幼少期から自己炎症性疾患と類似の症状を呈するが、遺伝子変異が検出されない例を多数経験する。これらの疾患の中には、新規責任遺伝子を同定するために全エクソーム検査が行われることが増えてきているが、それでも原因遺伝子が同定されないことが多い。その中には低頻度モザイク変異や遺伝子の欠失・コピー数異常により発症している疾患がまぎれている可能性がある。本研究において低頻度モザイク変異や遺伝子の欠失・コピー数異常を高い精度で検出可能な系を確立させることで、これまで未診断となっていた患者の診断・治療に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Autoinflammatory diseases are classified as one of primary immune disorders, and are inherited diseases mainly caused by genetic abnormalities of innate immune molecules. Some autoinflammatory diseases are caused by somatic mosaicism. Although it is difficult with Sanger sequencing, detection of a mosaic mutations is often performed using a next-generation sequencer, but accurate detection is essential for use at a clinical level. Using molecular barcode methods, we could accurately detect mosaic mutations. In addition, methods to detect deletions and copy number abnormalities are under investigation.

研究分野：小児科

キーワード：自己炎症性疾患 遺伝子変異 モザイク変異 分子バーコード

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己炎症性疾患は、原発性免疫不全のひとつに分類され、主に自然免疫分子の遺伝子異常によって生ずる遺伝性疾患である。代表的自己炎症性疾患であるクリオピリン関連周期熱症候群 (CAPS) は *NLRP3* 遺伝子の機能獲得型変異によって発症し、常染色体優性遺伝形式もしくは *de novo* 変異で発症する。我々のグループは、CAPS の重症型である CINCA 症候群/NOMID において、*NLRP3* 遺伝子のモザイク変異により発症することを世界で初めて報告し、その後国際共同研究を行い、*NLRP3* 遺伝子にヘテロ変異を認めない患者の約 7 割がモザイク変異で発症することを報告した (Tanaka, Izawa, Arthritis Rheum, 2011)。検出可能であった最も低い変異アリル頻度は 4.2%であった。

モザイク変異の検出は、通常のサンガーシーケンスでは困難であり、上記の国際共同研究においては PCR 産物のサブクローニングを行ったが、多大な費用と労力を要し、恒常的な検出法としては問題があった。そこで、2012 年には次世代シーケンサーを用いた、*NLRP3* モザイク変異検出のパイプラインを構築した (Izawa, DNA Res, 2012) が、この際問題となったのは、次世代シーケンサーにはシーケンスエラーが多いということであった。そのため、健常人とプラスミドを用いたモザイクなしと考えられるコントロール検体との比較を行い、統計的な優位差をもとにモザイク変異検出を試みた。その結果、*NLRP3* 遺伝子の全エクソンと近傍イントロンの 98.1%の領域において 99.9%の確率で頻度 1%までの塩基置換変異が検出可能となった。ただしこれは健常人との比較においてという制限があること、一部の塩基配列においては、その精度は頻度 1-5%のモザイク変異検出までという限界があった。加えて、近年シーケンス技術の進歩に伴い自己炎症性疾患の新規責任遺伝子、モザイク変異の報告が増え、新規責任遺伝子が報告されるたびに新しい健常人コントロールデータを収集するのは多大な労力と費用が必要である。そこで、健常人との比較においてモザイク変異を検出するのではなく、より高い精度で低頻度モザイクと遺伝子欠失・コピー数異常を検出可能なシステムが必要である。

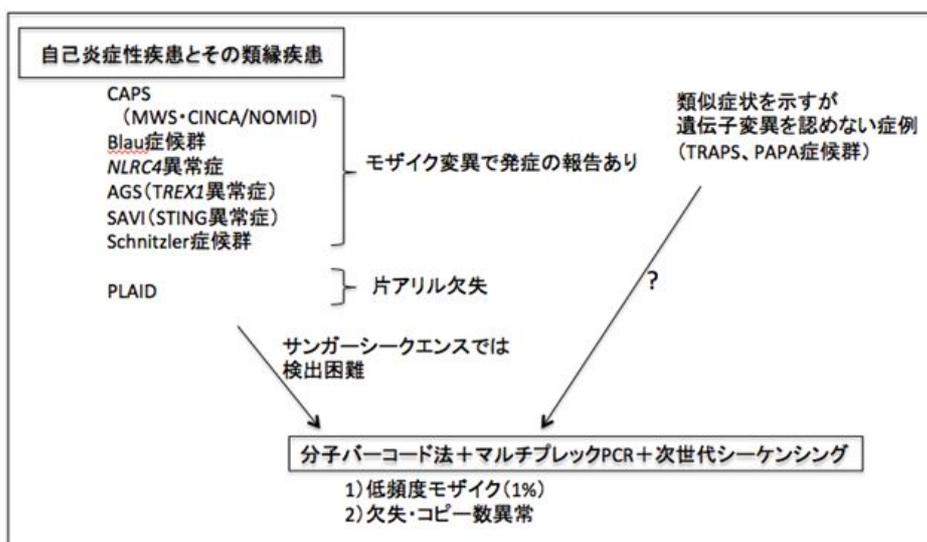
2. 研究の目的

最近、分子バーコードを用いた低頻度モザイク検出方法が報告された。この検出方法は、1 分子に特異的なバーコード配列を両端に付加することで、検出された変異が異なる鋳型の二本鎖 DNA に存在したかどうかを判別可能であるとともに、変異アリルの絶対数をカウントすることができる (Shiroguchi K, PNAS, 2012, Kennedy SR, Nat Protoc, 2014)。この方法を自己炎症性疾患とその類縁疾患の遺伝子検査に応用することで、1) 低頻度モザイク変異、2) 欠失、コピー数異常を検出可能になることが期待される。

3. 研究の方法

自己炎症性疾患とその類縁疾患を対象に、分子バーコード法と次世代シーケンサーを用いて 1) 低頻度モザイク変異、2) 欠失、コピー数異常を検出するパイプラインを構築する。DNA 混合実験や既存のモザイク検体を用いて妥当性を検討し、これまでのモザイク検出パイプラインとの比較を行う。

分子バーコード法は PCR 施行前あるいはその PCR 反応の初期に各 DNA 断片に特異的なバーコード配列を付加することで、観察された変異が異なる鋳型二本鎖 DNA に存在したものを判別可能とする技術である。分子バーコードはそれぞれ 10 塩基配列からなる。分子バーコードは、シーケンスには、次世代シーケンサー (MiSeq) を用いる。解析には、シーケンス解析ソフトは研究協力者の小原らが開発したパイプライン (verkeeper) を用いる。



4. 研究成果

モザイク変異の検出

ハイブリキャプチャー法を試みた結果、健康人コントロールにおいて、キャプチャープローブとハイブリダイズさせる事により目的領域の濃縮を行うことが可能であった。また既知の *NLRP3* モザイク検体において、正確に検出することが可能であった。また、新規検体において、新規のモザイク症例は認められなかった。

欠失・コピー数異常の検出

まずは遺伝子の部分重複を認める既知の検体において検出をこころみた。家族性血球貪食症候群の責任遺伝子である *UNC13D* 遺伝子において、重複を認める検体を用いた。その結果、重複を検出することは可能であった。*ADA2* 遺伝子変異によって結節性多発動脈炎様の症状を認める *ADA2* 欠損症において、*ADA2* 活性が低下しており、臨床的には *ADA2* 欠損症と確定診断されている症例にて、片アリルの変異が同定されていない検体について検討した。mRNA レベルにおいて、片アリルの発現がないことは確認された。片アリルの欠失が疑われ、この検体を用いて欠失の検出を試みたが、構造異常を検出することはできなかった。

A20 ハプロ不全症における *TNFAIP3* 遺伝子の欠失

A20 ハプロ不全症は、*TNFAIP3* 遺伝子変異によってベーチェット病様症状を認める自己炎症性疾患である。臨床検体の解析により、*TNFAIP3* 遺伝子の一部に欠失を認める症例を経験した。これは MLPA 法によって確認済みである。これをポジティブコントロールとして、臨床的には A20 ハプロ不全症が疑われる検体に対して遺伝子欠失が認められないか、検出を試みており、現在解析をすすめている。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 6 件)

Nakayama, M., H. Oda, K. Nakagawa, T. Yasumi, T. Kawai, K. Izawa, R. Nishikomori, T. Heike and O. Ohara (2017). "Accurate clinical genetic testing for autoinflammatory diseases using the next-generation sequencing platform MiSeq." *Biochemistry and biophysics reports* 9: 146-152.

Hiejima, E., H. Shibata, T. Yasumi, S. Shimodera, M. Hori, K. Izawa, T. Kawai, M. Matsuoka, Y. Kojima, A. Ohara, R. Nishikomori, O. Ohara and T. Heike (2018). "Characterization of a large *UNC13D* gene duplication in a patient with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3." *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 191: 63-66.

Shibata, H., T. Yasumi, S. Shimodera, E. Hiejima, K. Izawa, T. Kawai, R. Shirakawa, T. Wada, R. Nishikomori, H. Horiuchi, O. Ohara, E. Ishii and T. Heike (2018). "Human CTL-based functional analysis shows the reliability of a *munc13-4* protein expression assay for *FHL3* diagnosis." *Blood* 131(18): 2016-2025.

Ono, S., M. Nakayama, H. Kanegane, A. Hoshino, S. Shimodera, H. Shibata, H. Fujino, T. Fujino, Y. Yunomae, T. Okano, M. Yamashita, T. Yasumi, K. Izawa, M. Takagi, K. Imai, K. Zhang, R. Marsh, C. Picard, S. Latour, O. Ohara and T. Morio (2018). "Comprehensive molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative diseases using next-generation sequencing." *International journal of hematology* 108(3): 319-328.

Boisson, B., Y. Honda, M. Ajiro, J. Bustamante, M. Bendavid, A. R. Gennery, Y. Kawasaki, J. Ichishima, M. Osawa, H. Nihira, T. Shiba, T. Tanaka, M. Chrabieh, B. Bigio, H. Hur, Y. Itan, Y. Liang, S. Okada, K. Izawa, R. Nishikomori, O. Ohara, T. Heike, L. Abel, A. Puel, M. K. Saito, J.-L. L. Casanova, M. Hagiwara and T. Yasumi (2019). "Rescue of recurrent deep intronic mutation underlying cell type-dependent quantitative *NEMO* deficiency." *The Journal of clinical investigation* 129(2): 583-597.

Nakaseko, H., N. Iwata, K. Izawa, H. Shibata, R. Yasuoka, T. Kohagura, N. Abe, S. Kawabe and R. Nishikomori (2019). "Expanding clinical spectrum of autosomal dominant pyrin-associated autoinflammatory disorder caused by the heterozygous *MEFV* p.Thr577Asn variant." *Rheumatology (Oxford, England)* 58(1): 182-184.

〔学会発表〕(計 2 件)

柴田 洋史, 日衛嶋 栄太郎, 下寺 佐栄子, 井澤 和司, 河合 朋樹, 八角 高裕, 西小森 隆太, 小原 収, 平家 俊男, UNC13D 遺伝子の exon duplication による家族性血球貪食性リンパ組織球症 3 型の 1 例, 第 45 回 日本臨床免疫学会総会, 2017 年 9 月

伊佐 真彦, 井澤 和司, 仁平 寛士, 常念 大輔, 芝 剛, 柴田 洋史, 日衛嶋 栄太郎, 田中 孝之, 河合 朋樹, 八角 高裕, 西小森 隆太, 今井 耕輔, Spondylometaphyseal dysplasias with cone-rod dystrophy(SMD-CRD)の兄妹例, 第 27 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 2017 年 10 月

常念 大輔, 井澤 和司, 西谷 真彦, 仁平 寛士, 柴田 洋史, 日衛嶋 栄太郎, 田中 孝之, 河合 朋樹, 八角 高裕, 谷内江 昭宏, 西小森 隆太, 自己免疫性肝炎を伴う反復性関節炎の 1 男児例, 第 27 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 2017 年 10 月

笹原 洋二, 井澤 和司, 梅林 宏明, 中野 直子, 金兼 弘和, 森尾 友宏, 平家 俊男, 呉 繁夫, 本邦における Adenosine Deaminase 2 欠損症の臨床のおよび遺伝学的解析, 第 121 回日本小児科学会, 2018 年 2 月

田中 孝之, 西小森 隆太, 井田 弘明, 柴田 洋史, 井澤 和司, 河合 朋樹, 八角 高裕, 齋藤 潤, 平家 俊男, 患者由来 iPS 細胞を用いた家族性地中海熱の病態解明, 第 121 回日本小児科学会, 2018 年 2 月

山田 早紀, 井澤 和司, 西谷 真彦, 仁平 寛士, 柴田 洋史, 田中 孝之, 河合 朋樹, 八角 高裕, 平家 俊男, 西小森 隆太, 早期に治療介入をおこなったが, のちに陳旧性脳梗塞が判明した ADA2 欠損症の乳児例, 第 31 回近畿小児科学会, 2018 年 3 月

Kazushi Izawa, Hiroshi Nihira, Takahiro Yasumi, Ryuta Nishikomori, Early Diagnosis of an Infant with DADA2-Japanese Cohort, The Second International Conference on Deficiency of ADA2, 2018 年 11 月

〔図書〕(計 3 件)

井澤 和司, 仁平 寛士, 西小森 隆太, 【自己炎症性疾患-最新の基礎・臨床知見-】 狭義の自己炎症性疾患 アデノシンデアミナーゼ-2(ADA2)欠損症 日本臨床(0047-1852)76 巻 10 号 Page1804-1808(2018.10)

井澤 和司, 仁平 寛士, 西小森 隆太, 【自己炎症性疾患-病態解明から診療体制の確立まで】 病態解明・治療法確立にむけての新展開 アデノシンデアミナーゼ-2(ADA2)欠損症, 医学のあゆみ, 267 巻 9 号, 713-717, 2018

井澤 和司, 西小森 隆太, 【自己炎症性疾患における最近の展開】 自己炎症性疾患の診療ガイドライン, 分子リウマチ治療, 巻 1 号, 4-6, 2019

〔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:
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。