

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390188

研究課題名 (和文) 原因不明の突然死における遺伝的背景について

研究課題名 (英文) Genetic background for sudden and unexpected death of unknown cause

研究代表者

大澤 資樹 (OSAWA MOTOKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90213686

研究成果の概要：法医剖検において、乳幼児と成人男性の睡眠中に多発する原因不明の突然死に対し、遺伝性疾患の関与を遺伝子解析から探った。睡眠時無呼吸発作を主徴とする先天性中枢性肺泡低換気症候群が含まれる可能性は低いと判断され、致死的不整脈をきたしうる QT 延長症との関連では、一部の症例に *SCA5A* 等イオンチャンネル遺伝子に変異が検出され、これが原因で突然死した可能性が示唆された。内因・外因について議論が絶えないが、一部には遺伝的背景をもつものが含まれると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学 7103

キーワード：突然死、乳幼児、QT 延長症、不整脈、無呼吸発作、遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

異状死体の剖検を行う法医学領域では、当初死因が不明ということで内因性急死を多く扱う。これらは突然死に該当し、剖検にて死因が明確に判断される場合と原因がはっきりせず死因不詳とせざるをえない場合とがある。原因不明の突然死は乳幼児と成人男性の睡眠中に好発し、特に乳幼児突然死症候群 (sudden infant death syndrome, SIDS) は広く知られている。診断は肉眼的解剖所見に加え組織学的検査を行い、外因死でないことを確認し除外診断されているのが現状で

ある。診断の精度を向上させる目的で、画像検査や臨床生化学検査が死後診断法として導入され、臨床法医学として展開し始めている。一方、臨床の場においては、先天性疾患に加え、乳癌における BRCA 遺伝子解析など広範に遺伝子診断が導入されている。法医学領域における DNA 検査は、専ら親子鑑定や個人同定の目的で導入されてきたが、診断目的での DNA 検査の可能性を探るべき時期にきている。今回の研究は、原因不明ということで除外診断されてきた突然死に遺伝的背景がないかを探り、検討すべき候補遺伝子を決定することである。

原因不明の突然死においては、家族内発生は少なく、遺伝傾向は低いと考えられてきた。しかし、最近の臨床遺伝学研究から、様々な疾患において減数分裂時の変異 (*de novo* 突然変異) が原因となり発症するものが多数を占め、一般的に優性遺伝の形態をとっていることが明らかにされている。すなわち、遺伝性は低いとされてきた孤発例でも、遺伝的要因が大きく影響していると考えられるべきである。今回の研究においては、法医剖検例において、突然死と関連するとされる遺伝子座を網羅的に解析することを計画した。乳幼児突然死症候群 (SIDS) は、人種差は認めるものの世界中で発生しており、遺伝的背景の研究は国内外を問わず盛んである。また、小児科医の注目もあり、遺伝子解析を死後診断として実施することも試みられており、ドイツ Brinkmann らのグループが、SIDS 症例で検出されたイオンチャンネル遺伝子の変異を報告している。乳幼児や働き盛りの成人の突然死は、家族にとって悲劇的であり、社会的な損失は大きく、これらの一部でも病態を解明し、診断法を確立することには意義があると考えられる。

2. 研究の目的

乳幼児突然死症候群 (SIDS) は、解剖と諸検査において死因が不明のものとして除外診断されている。国内では1歳以下の乳幼児死因の第三位を占め、年間300例程度発生し、病因と病態の解明が重要な課題となっている。背景として推定されることは、うつ伏せ寝に伴う覚醒反応の異常が挙げられるが、一部の症例では先天性遺伝疾患との関連も想定されている。一方で、成人男性に発生する原因不明の突然死 (sudden adult or manhood death syndrome, SADS or SMDS) に関しては、東アジアや東南アジアの国々で好発し、明確な人種差を認めることが特徴である。この現象は、移民からなるカナダやアメリカでの疫学調査でもアジア系移民に原因不明の突然死が多発することが確認されており、遺伝的背景が推定されている。今回の検討では、剖検において有意の所見を得ることが難しい SIDS 及び成人男性型突然死に対し、可能性のある疾患遺伝子の DNA 解析からその異常となりうるゲノム上の変化を見つけ出し、遺伝的背景がないのか検討を加えたい。

臨床においては、突然死をきたしうる循環系・神経系・代謝系疾患に対する心電図・画像・臨床生化学検査など診断方法がほぼ確立されている。しかしながら、これら検査を遺体に行う時には、死後変化の影響から有意な結果を得ることが難しい場合が多く、法医学領域では死後診断に対する検査法の有用性

を様々な角度から検討中といえる。一方で、突然死をきたしうる疾患のうち一部は単一遺伝子疾患であり、遺伝子検査が可能となってきた。抽出された DNA に対し遺伝子診断を行うことは、遺族の承諾を得られれば、死後検査として行うことは、他の検査法に比べむしろ容易かもしれない。Ackerman ら (JAMA 286;2264-2269, 2001) は、この行為を *postmortem molecular analysis* と呼び、今後展開してゆくと思われる。

検討する疾患遺伝子としては、次のような疾患が挙げられる。先天性中枢性肺泡低換気症候群 (congenital central hypoventilation syndrome, CCHS, Ondine の呪い, MIM: 209880) は、新生児期に発症する睡眠時の無呼吸発作を主症状とするもので、中枢神経系の発生異常とされ、*PHOX2B* 遺伝子内ポリアラニン繰り返し異常伸長や *RET* 遺伝子の変異が主な原因となる。成人においてもポリアラニン異常伸長が確認されており、SADS 例に含まれていないか検討が必要である。循環器系疾患としては QT 延長症 (MIM: 192500) が挙げられ、心臓刺激伝導系の機能異常から突然死をきたしうる。特に、心電図上 V1~V3 誘導の ST 上昇と右脚ブロックを主徴とする Brugada 症候群 (MIM: 601144) においては、致死的不整脈から突然死する場合が多いとされている。遺伝子座としては、*SCN5A* や *KCAQ1* 遺伝子など4つのイオンチャンネル遺伝子が知られている。代謝性疾患としては、脂肪酸 β 酸化異常症に成人発症型があるとされ、遺伝子座としては *ACADM* や *CDSF* などが挙げられる。その他、セロトニン発現調節タンパク異常症として *SLC6A4* なども挙げられる。これら候補遺伝子に対しエクソン部を中心に網羅的に配列を検討し、挿入・欠失、ナンセンス変異、非同義置換などを検出し、原因不明とされる SIDS 及び SADS に遺伝的関与がないのか検討を加えてゆく。さらに、検出された変異がタンパク機能に影響を与えるものなのか、変異を導入した組み換えタンパク発現実験まで実施してゆく。

3. 研究の方法

(1) 検体：当施設において剖検となったもので、SIDS 及び SADS と診断された症例の血液 5 ml 程度を検体とした。代諾者である遺族より書面にて同意書を得た上で、検体を使用した。検体としては、SIDS 症例に関しては50検体程度、SADS 症例に関しては30検体程度を目標とした。対照群は、健常成人とし、DNA 検体も同意を得た上で使用した。また、研究に関しては、東海大学医学部「医の倫理委員会」の承認を得ている。

(2) 変異検出: DNA は、血液から定法により抽出した。遺伝子の全塩基配列は既に DDBJ や NCBI のデータベースに登録されているので、それを参考にエクソン及び境界部付近のイントロンを含み、PCR 産物が 300~500 bp 程度になるようにプライマーを設定する。PCR 増幅の後に配列を確認し、分析部分の増幅系を確立する。解析を試みる遺伝子は、突然死を起こしうる神経系・循環系・代謝系異常から *RET*・*PHOX2B*・*SCN5A*・*KCAQ1*・*KCNE1*・*KCNE2*・*KCNH2*・*NOS1AP*・*ZFHX1B*・*EDNRB*・*TPM1*・*ACADM*・*CDSP*・*SLC6A4* 遺伝子である。*PHOX2B* 遺伝子は3つのエクソンから成るが、その他の遺伝子のエクソン数は20~40に及び、遺伝子座全体をPCR増幅する。変異検出法にはいくつかあるが、今回の検討では、500 bp 程度のPCR産物内の変異を9割程度の検出能をもつ、温度勾配を含むHPLC装置を使用した。変異が検出された場合には、ダイレクトシーケンシングを行い、変異部位を確認してゆく。この中で、ミスセンス変異やアミノ酸置換を伴うような非同義置換を認めた場合には、遺伝子異常に伴う突然死の可能性があると判断する。

単に変異を検出するだけでは、本当にその変異が発病に関連しているのか確かではないので、組み換えタンパク発現実験を実施している。*KCAQ1*・*KCNE1*・*KCNE2*・*SCN5A* の cDNA を発現ベクターに組み込み、大腸菌内で変異を導入した。さらに、これら変異源性ベクターにてアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の卵母細胞を形質転換し、タンパクを発現させ、培養液に電位をかけ上で、膜電位の変化を調べた。

PHOX2B 遺伝子内のポリアラニン繰り返し配列の異常伸長に関しては、配列周囲の GC 含量が 93% と高く、PCR 増幅に抵抗性を認めため、我々独自の検出法を開発した。sodium bisulfite 処理は、DNA メチル化の検出目的に利用されるが、メチル化を受けていない DNA のシトシン残基を化学的に脱アミノ化しウラシルに変換する。この反応に伴い GC 含量を低下させる効果が期待でき、ドロップアウト現象などを回避した上で、PCR 増幅が行えると考えた。脱アミノ化 DNA に対し、5' -AGGTGAATTTGGTAAGGGTGG-3'、5' -ACCCA ACCTTATCCAAACCC-3' のプライマーペアを設計し、PCR 増幅を行った。

NOS1AP 遺伝子イントロン 1 内の SNP (rs10494366) の検出に関しては、PCR-RFLP 法にて行った。簡単に述べると、変異を導入した 5' - CAGATATTTATGGGAGGTATCCA -3'、5' - ACTTTGAGTATTTGACATCGTGA -3' のプライマーペアにてPCR増幅を行った後、*Mva* I の制限酵素分解し電気泳動にて検出した。

結果は、t 検定等にて統計処理した。また、最終的には、変異や異常伸長を検出した症例

の経過や組織学的検査などに特徴的な所見はないか再検討を加えた。

4. 研究成果

(1) 先天性中枢性肺胞低換気症候群 (CCHS) との関連性:

睡眠時の無呼吸発作を主症状とする CCHS が SIDS に含まれている可能性は、症状の類似性から以前より指摘されていたが、剖検所見から CCHS を判断することは難しく、関連性は不明のままであった。そこで、死後の DNA 検査から生前の疾病を推定する、いわゆる postmortem molecular analysis を試みるに至った。CCHS は Hirschprung 病と合併する場合がありますが、当初は *RET* protooncogene の解析を試みたが、顕著な成果は得られなかった。その後、Amiel ら (Nat Genet, 33:459-461, 2003) により、CCHS の原因が *PHOX2B* (paired mesoderm homeobox 2b) 遺伝子エクソン 3 内のポリアラニン配列の異常伸長にあると報告があった。そこで、この繰り返し配列の解析を試みたが、GC 含量が大きく、PCR 増幅に抵抗性を認めた。bisulfite 処理による脱アミノ化 DNA を用いた PCR 反応にて検出する改良法を確立し、実際例に適用してみた。その結果を表 1 にまとめてある。

表 1 *PHOX2B* ポリアラニン配列の解析

	20 回以下	異常伸長
CCHS (n = 10)	11* (0.55)	9 (0.45)
SIDS (n = 48)	96 (1.00)	検出なし
健常者 (n = 190)	380 (1.00)	検出なし

*: 1 例に 1 塩基欠損に伴うフレームシフトを検出

臨床的に CCHS と診断され、治療を受けている患者 10 例について、検討を加えたところ、9 例にポリアラニン配列の異常伸長を検出し、残りの 1 例においても 1 塩基欠失を検出した。すなわち、臨床診断を受けた全例にこの *PHOX2B* 遺伝子の異常を検出した。(これらの検体については、山形大学医学部小児科学早坂清教授らより提供を受けたものである。) 一方で、乳幼児突然死 48 例と対照とした健常成人では 1 例もポリアラニンの異常伸長を検出できなかった。すなわち、SIDS にはこの CCHS が含まれる可能性は低いのではないかと推定された。ただし、CCHS の症状は、SIDS の発生状況と酷似しており、検討症例数を増やせば、その中に含まれてくる可能性は否定はできないと考えている。

(2) QT 延長症との関連性

病的な QT 延長に関しては、現在までに少なくとも 4 つの心臓性イオンチャンネル遺伝子が直接的に関連していることが解明されている。特に、特徴的な心電図所見を示す Brugada 症候群においては、*SCN5A* 遺伝子の異常を検出する機会が多いとされている。SIDS と判断された 42 例について、塩基配列の検討を行ったところ、以下の表のとおり、4 例にアミノ酸置換を伴う DNA の非同義変異をヘテロ接合として検出した。特に、1 症例では *KCNH2* と *SCA5A* 遺伝子に変異を認めた。これらのうち、4 つの置換は報告がなく、新規のものとして判断された。

表 2 SIDS 症例に検出された非同義置換

症例	遺伝子	エクソン	変異
62	<i>KCNQ1</i>	15	K598R
9	<i>KCNH2</i>	11	T895M
	<i>SCA5A</i>	18	G1084S
40	<i>SCA5A</i>	28	F1705S
63	<i>SCN5A</i>	12	F532C

KCNQ1 と *KCNH2*cDNA を用いた発現実験において、膜電位の変化を検出し、*SCA5A* では脱分極後の電位回復の遅延を検出した。すなわち、これらのアミノ酸置換が、生体においても心臓刺激伝導系に異常を伴い、不整脈を併発する可能性が示唆された。これら 4 症例について、生前の経過を再検討したが、顕著な傾向は認めなかった。また、この結果は、SIDS 症例の 1 割程度に遺伝子異常が検出されたことを意味しており、この現象は諸外国における報告、例えば Wedekind らの報告 (Int J Legal Med, 120:129-137, 2006) と一致するものであった。

(3) QT 間隔関連遺伝子との連鎖

心電図上の QT 間隔には個人差を認めるが、Arking ら (Nat Genet, 38:644-651, 2006) は、この相違が *NOS1AP* (nitric oxide synthase 1 adaptor protein) 遺伝子イントロン 1 内の SNP (rs10494366) と強く連鎖関係にあると報告している。そこで、この SNP をタイピングすることにより、SIDS 症例との連鎖解析を実施した。この結果をまとめたものが表 3 である。

SIDS 群は、SNP の T と有意の連鎖を認め、特に劣性 (TT) とした時に顕著であった。すなわち、SIDS 発生に、心電図上の QT 間隔が影響する可能性が考えられた。ただし、症例数が限られ、さらに数を増やした上で、最終的には判断する必要があると思われた。

表 3 *NOS1AP* 内 SNP の型判定

遺伝子型	対照群 (n=210)	SIDS (n=42)	Odds ratio (95% CI)
GG	99 (0.47)	16 (0.38)	1.00
GT	97 (0.46)	18 (0.43)	1.15 (0.55-2.38)
TT	14 (0.07)	8 (0.19)	3.54 (1.28-9.77)

χ^2 (P): 6.86 (0.032)

研究の総括としては、原因不明とされ除外診断されている SIDS 症例において、先天性中枢性肺胞低換気症候群 (CCHS) が関連する可能性は低いが、1 割程度には致死的不整脈を合併することのある QT 延長症などの遺伝的要因が関与する可能性があることが示唆された。内因・外因についても議論の絶えない乳幼児の突然死ではあるが、今回の検討から遺伝的要因は必ずしも大きくはないが、一部には内因的かつ遺伝的な疾病も含まれる可能性が改めて確認できたと考える。

また、本研究においては、成人男性発症型の原因不明突然死についても解析する予定であった。現在も進行中ではあるが、期限内には報告できる段階には達しておらず、今後の継続課題と考えている。

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 8 件)

① Osawa M, Kimura R, Hasegawa I, Mukasa N, Satoh F. SNP association and sequence analysis of the *NOS1AP* gene in SIDS. Legal Med 11: S307-308, 2009. 査読有

② Osawa M, Satoh F, Horiuchi H, Tian W, Kugota N, Hasegawa I. Postmortem diagnosis of fatal anaphylaxis during intravenous administration of therapeutic and diagnostic agents: evaluation of clinical laboratory parameters and immunohistochemistry in three cases. Legal Med 10: 143-147, 2008. 査読有

③ Otagiri T, Kijima K, Osawa M, Ishii K, Makita N, Matoba R, Umetsu K, Hayasaka K. Cardiac ion channel gene mutations in sudden infant death syndrome. Pediatr Res 64(5): 482-487, 2008. 査読有

④ Osawa M, Satoh F, Hasegawa I. Acute

death due to hyperextension injury of the cervical spine caused by falling and slipping onto the face. J Forensic Leg Med 15: 457-461, 2008. 査読有

⑤ Kimura R, Ohashi J, Matsumura Y, Nakazawa M, Inaoka T, Ohtsuka R, Osawa M, Tokunaga K. Gene flow and natural selection in oceanic human populations inferred from genome-wide SNP typing. Mol Biol Evol 25:1750-1761, 2008. 査読有

⑥ Kitano T, Umetsu K, Tian W, Osawa M. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. Int J Legal Med 121: 423-427, 2007. 査読有

⑦ 早坂清、木島一己、佐々木綾子、小田切徹州、大澤資樹、的場梁次：先天性中枢性低換気症候群と乳幼児突然死症候群との関係：PHOX2B遺伝子の検索、日本SIDS学会雑誌、6, 33-40, 2006. 査読有

⑧ 大澤資樹：山形県における孤独死の実態、日本警察医会雑誌、1, 34-37, 2006. 査読無

[学会発表] (計7件)

①大澤資樹：乳幼児突然死例に対する死後遺伝子診断の適応、シンポジウム「我が国における乳幼児突然死症候群の現状並びに研究」第93次日本法医学会学術全国集会、2009、大阪

②大澤資樹、武笠菜穂子、木村亮介、戸田小弥可、長谷川巖、佐藤文子：乳幼児突然死とNOS1AP遺伝子多型との関連性。日本DNA多型学会第17回学術集会、2008、東京

③ Osawa M, Kimura R, Hasegawa I, Mukasa N, Satoh F: SNP association and sequence analysis of the *NOS1AP* gene in SIDS. 7th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2008, Osaka, Japan.

④ 大澤資樹：孤独死の実態、長崎県警察嘱託医会第27回総会、2008、長崎

⑤ Osawa M, Sasaki A, Satoh F, Hasegawa I, Kimura R, Hayasaka K: No association of sudden infant death syndrome with congenital central hypoventilation syndrome (Ondine's curse). The American Society of Human Genetics 57th annual meeting, 2007, San Diego, CA, U.S.A.

⑥ Osawa M, Kitano T, Hasegawa I, Satoh F, Umetsu K: Two universal primers on the 12S and 16S ribosomal RNA loci for species identification. The 5th ISABS conference in forensic genetics and molecular anthropology, 2007, Split, Croatia.

⑦ Hasegawa I, Satoh F, Kimura R, Osawa M: Sensitive detection of GC-rich regions by PCR using deaminated DNA: application to sudden infant death syndrome in association with Ondine's curse. The 5th ISABS conference in forensic genetics and molecular anthropology, 2007, Split, Croatia.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 資樹 (OSAWA MOTOKI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：90213686

(2) 研究分担者

長谷川 巖 (HASAGAWA IWAO)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：00433912
木村 亮介 (KIMURA RYOUSUKE)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：00453721

(3) 連携研究者

なし

研究協力者
早坂 清 (HAYASAKA KIYOSI)
山形大学・医学部・教授
的場 梁次 (MATOBA RYOUJI)
大阪大学大学院・医学研究科・教授