

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390177

研究課題名(和文)原因不明の突然死に対する網羅的ゲノム解析

研究課題名(英文)Comprehensive genomic analysis to sudden unexpected deaths due to unknown causes

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：原因が特定できない突然死において、死後に遺伝学的検査を実施して生前の疾病を推定する試みである。対象疾患や原因遺伝子は多数あり、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を乳幼児突然死症候群に適用し、いくつかの症例で原疾患の推定が可能であった。例えば、インフルエンザ感染乳児の突然死において、KCNQ1遺伝子に変異を検出し、QT延長症の関与が示唆された。また、Brugada症候群に罹患した成人の突然死でも原因変異が特定できた。今後は他の領域を含めた体制の整備が必要になる。

研究成果の概要(英文)：This study of postmortem genetic testing aimed to deduce the cause of death in sudden unexpected deaths from unknown causes. Because of a number of genes responsible for various inheritable diseases, a comprehensive analysis using the next generation sequencer was applied to cases of sudden infant death syndrome. The analysis successfully revealed ante-mortem diseases in several cases. For instance, in an infant sudden death who suffered by influenza virus infection, one base insertion of C was evident in the KCNQ1 gene, indicating the relation to long QT syndrome. Responsible mutation was detected in adult sudden death who had Brugada syndrome. The multidisciplinary approach including cardiologist and genetic counselor must be developed further.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ゲノム解析 突然死 QT延長症 次世代シーケンサー 乳幼児突然死症候群

1. 研究開始当初の背景

剖検を行った上で死因が特定できない原因不明の突然死が、乳幼児や青年男性を中心に発生する。特に、正常な発育過程の乳幼児が睡眠中に状態が急変する乳幼児突然死症候群 (sudden infant death syndrome, SIDS) は有名である。これらの症例の中に、致死的不整脈の原因となりうる QT 延長症などの遺伝性疾患が一部に含まれていることは、これまでの遺伝学的解析から明らかにされてきている。一方で、原因となりうる関連遺伝子は多数あり、従来は解析に時間と経費がかかっていた。今回の研究では、次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析を実施することにより、短時間で遺伝子異常を検出する系を確立するとともに、実際例に応用し、法医解剖における病態解析への利用を試みる。DNA は死後でも比較的安定なことから、全ゲノム解析が様々な状態の法医剖検例に活用できないか検討することを目的としている。また、諸外国では死後診断に遺伝学的検査の導入が進んでいるが、わが国では取り組みが遅れている実態がある。遺伝学的検査においては、倫理面の配慮が不可欠なために、外国の情勢も文献を通して調べる必要性も高い。

2. 研究の目的

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、死因がはっきりせず原因不明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、診断は肉眼的解剖所見に加え組織学的検査や中毒検査を行い、外因死でないことを確認する程度にとどまっている。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が、臨床の場における診断手法をそのまま適応できない限界も多い。法医学領域において、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、死因診断の目的で DNA 検査の可能性を探ることが本研究の最大の目的である。このような死後の遺伝学的検査を postmortem genetic testing ないし molecular autopsy と呼び、諸外国では既に実施され始めている。将来的には、診断方法が一般化され、死後診断法として普及する可能性がある。突然死の病態解明は、法医学領域においては重要な課題であり、かつ学術的な意味があると考えられる。

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、臨床遺伝学の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あり、一般的に常染色体優性の遺伝形式

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、やはり遺伝性疾患が含まれている可能性を考慮すべきである。実際に、SIDS と診断を受けた症例の 1 割程度に QT 延長症が関連している可能性が指摘されている。乳幼児や働き盛りの成人の突然死は、家族の喪失感に加えて、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の意義は大きいと考える。

突然死をきたしうる疾患のうち多くは単一遺伝子疾患であり、抽出された DNA に対し遺伝学的検査を行うことは、比較的容易である。検討する疾患遺伝子としては、次のようなものが挙げられる。循環器系疾患としては QT 延長症と ST 上昇と右脚ブロックを示す Brugada 症候群があり、致死的不整脈への移行から突然死をきたす。遺伝子座としては、*SCN5A* や *KCAQ1* 遺伝子などナトリウムチャンネルが知られている。代謝性疾患としては、脂肪酸酸化異常症が挙げられ、遺伝子としては *ACADM* や *CDSP* などやはり多数ある。その他、先天性中枢性肺胞低換気症候群 (congenital central hypoventilation syndrome, CCHS) は、乳幼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、*PHOX2B* 遺伝子内ポリアラニン繰り返しの異常伸長が主な原因となる。これら候補遺伝子に対しエキソン部を中心に網羅的に配列を検討し、挿入・欠失、ミスセンス変異などを検出し、原因が特定できなかった乳幼児と成人発症突然死に遺伝的関与がないのか検討を加えてゆく。今回の研究では、次世代シーケンサーを用いた網羅的 DNA 配列解析を実施することで、大量の配列情報を獲得し、多数ある候補遺伝子の中から、原因となりうる変異を検出するシステムを開発し、突然死パネルを確立してゆく必要がある。

次に、SIDS に限らず、常に突然死発生のリスクファクターとして挙げられる喫煙に関して、ニコチン代謝の中心となる *CYP2A6* 遺伝子多型について、症例群と健常者群で連鎖解析を実施してみた。最後に、死後遺伝学的検査における制度上ないし倫理上の問題点について、諸外国の文献を参考に考察を加えたい。

ゲノム医学が開こうとする現在、遺伝学的診断技術を法医学領域でも取り込み、新たな手法として発展させてゆく必要があると考えている。

3. 研究の方法

(1) 検体の収集

SIDS の診断に関しては、日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会が公表する診断基準に従って判断した。成人発症型突然死に関しては、定義に必ずしも明確なものがある訳ではないが、10 代後半から 30 歳代男性における原因不明の突然死例を対象とした。法

医解剖時に採取した血液を 10 ml 程度冷凍保存し、検体とした。

本研究に関しては、東海大学医学部医の倫理委員会に承認を得ており、検体についても、遺族の書面による同意を得た上で使用してした。また、連結可能匿名化した状態で使用した。今回の検討では、24 例に対して循環器系疾患に関連した遺伝子群を網羅的に解析したが、8 例に次世代シーケンサーを適用でき、残りはサンガー法にて配列解析を行った。ニコチン代謝に関連する *CYP2A6* 遺伝子多型の連鎖解析に関しては、それ以前に収集した 43 例も含めて解析を実施している。

(2) 次世代シーケンサー解析

次世代シーケンサーは、Ion PGM System (Life Technologies) 装置を利用し、Ion AmpliSeq Inherited Disease Panel を用いて、循環器系疾患関連遺伝子の網羅的配列解析を行っている。抽出された DNA 200 ng を制限酵素分解の後、アダプターを結合させ増幅してライブラリーを作成した。これをマイクロチップに限界希釈法にて展開させ、装置でランを行った。得られたデータの解析処理から、変異検出を実施した。このパネルは、神経系及び循環器系疾患合計 328 遺伝子を一度に解析できるが、今回の研究では、QT 延長症と Brugada 症候群を中心に調べることを目的としており、関連した 16 遺伝子 (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *ANK2*, *CACNA1C*, *CAV3*, *KCNE1*, *KCNE2*, *SCN4B*, *SNTA1*, *AKAP9*, *KCNJ2*, *CACNB2*, *KCNE3*, *SCN1b*, *GPD1L*) のみを対象とした。他のデータは利用しなかった。

(3) 連鎖解析

剖検により SIDS が疑われた症例 (n = 67) と健康成人 (n = 225) の血液より DNA を抽出し、Nakajima ら (FEBS Lett. 569:75-81, 2004) の方法に従い、PCR-RFLP 法にて型判定を行った。有意差は、二乗と Fisher's exact test にて検定した。

4. 研究成果

(1) Channelopathy

QT 延長症、Brugada 症候群等の疾患群では、torsades de pointes と呼ばれる致死的不整脈に移行し、突然死が起こることはよく知られている。形態学的な変化は全般に少なく、Romano-Ward 症候群など優性遺伝形式が多く、有病率も比較的高いことから、これらの疾患に対する死後遺伝学的検査が、最も期待される対象である。この疾患群の特徴は、単一遺伝子疾患であるが、複数の関連遺伝子が存在することである。

解析のきっかけとなったのは、実際に経験した症例からであった。40 歳代男性が、深夜睡眠中にウーとうなり声をあげ容態が急変し、救急搬送から処置を受けるが死亡した。剖検では、急死の所見以外に心臓に著変を認めず、既往歴として、健康診断に

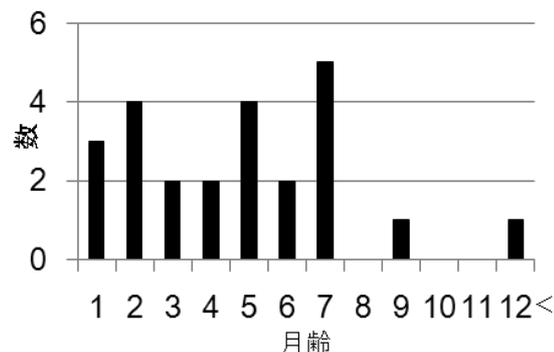
て Brugada 症候群様の心電図異常 (coved type) を指摘され、専門医の診察をすすめられていたが、受診していなかった経緯がある。

この症例に対して、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を実施したところ、584 ケの SNP や indel が検出され、対象とした遺伝子の翻訳領域に検出されたミスセンス変異は 12 ケであった (表 1)。Brugada 症候群に最も関連する *SCN5A* には変異は検出されず、サンガー法にて確認したところ、1 塩基の indel はすべてエラーであった。残りも SNP で、唯一 *KCNH2* に候補となりうる変異を検出した。検出された変異は、まず SNP を除外し、possible と definitive class に分けるとされるが、possible class と判断した。

表 1 Brugada 症候群の次世代配列解析

Gene	Variant	AAchange	Class (PolyPhen-2)
<i>MYLK</i>	G>C, homo	Leu496Val	SNP (Benign)
<i>ANK2</i>	C>T, hetero	Pro2835Ser	SNP (-)
<i>AKAP9</i>	delA, homo	Frameshift	Error
	delG, homo	Frameshift	Error
<i>KCNH2</i>	G>C, homo	Pro1122Arg	Possible (Damaging)
<i>KCNQ1</i>	C>G, hetero	Pro448Arg	SNP (Benign)
<i>CACNA1C</i>	C>T, hetero	Pro1868Leu	SNP (Benign)
	A>G, hetero	Met1869Val	SNP (Benign)
	A>G, homo	Arg1893Lys	Error
<i>STARDB3</i>	G>A, hetero	Arg117Gln	SNP (Benign)
<i>DSC2</i>	delC, homo	Frameshift	Error
<i>SCN1B</i>	T>C, hetero	Leu210Pro	SNP (-)

今回、配列解析を実施した SIDS 疑い 24 例の月齢分布は図 1 のとおりで、平均月齢は 5.1 ヶ月、男児 13 例、女児 11 例であった。全例に次世代シーケンサー解析が実施できたわけではないが、目的とした循環器系 16 遺伝子を全例で実施した。



これらのうちで、definitive class と判断してもよいと思われたのは 2 例あった。

1 例は 5 ヶ月女児に検出できた *SCA5A* エキソン 16 に新規に確認できた R975Q 置換で IIS6-IIS1 ドメイン内に存在した。

他方は、QT 延長症に伴う致死的不整脈が強く推測された例で、1 歳 4 ヶ月男児が、

39度の発熱と風邪症状で、近医にてA型インフルエンザ感染症と診断される。自宅にて夜間睡眠中に、意識のないことに気付かれ救急搬送から処置を受けるが死亡する。死後遺伝学的検査において、*KCNQ1* のカルボキシ終末付近にC1塩基の欠失(P631fs/19)をヘテロ接合で検出した。この変異は、QT延長症の患者で二度報告されている病原性のある既知の変異であった。発熱を引き金に致死的不整脈に移行したと考えられた。

法医剖検例は、生前に十分な臨床診断を受けていないものばかりなので、新奇の変異を検出しても余り意味はなく、病原性を伴う既知の変異を検出して始めて診断的価値を有する。この点において、疾病関連変異のデータベースはまだまだ充実しておらず、今後の臨床側でのデータの蓄積が待たれるところである。

(2) 連鎖解析

親の喫煙が乳幼児突然死発生の危険因子であることは、これまでの疫学研究で繰り返し示されている。母親の喫煙歴について記載があったのは45例で、喫煙群では、妊娠週数が短く、母親の年齢が低い傾向にあったが、有意差はなかった(表2)。

表2 SIDS発症例における親の喫煙

	非喫煙 (n = 33)	喫煙 (n = 12)	P
SIDS発症週	19.9 ± 11.3	21.8 ± 12.6	0.62
出生時体重(g)	2933 ± 446	2734 ± 634	0.24
妊娠週数	38.6 ± 1.3	37.5 ± 3.5	0.11
母親年齢	27.7 ± 5.5	24.9 ± 5.7	0.13

喫煙の分子成分であるニコチンは、胎盤通過性や胎児発育への影響があるとされ、肝臓でCYP2A6によりcotinineに代謝される。CYP2A6には遺伝子多型が認められ、ニコチン代謝の個人差が存在する。法医解剖でSIDSが疑われた症例に対し、この多型との連鎖解析を行った。

PCR-RFLP法にてCYP2A6*1A、*1B、*4Aの3アリルに型判定可能で、*4Aはnull alleleでホモ接合はニコチン代謝の欠損症に相当する。東アジア人集団では0.1~0.2と他の民族集団に比べて高い頻度で検出される。コントロール群における*1A、*1B、*4Aの遺伝子頻度は0.44、0.36、0.20で、Hardy-Weinberg平衡にあった($\chi^2 = 1.66$)。遺伝型をみた時に、二群間で*1A/*1AのORを1とし、その他の遺伝型のORと95%CIを求めたが、有意差を認めなかった。*4Aを優性とした時にも、同様の結果であった。ただし、本来ならば両親の喫煙例に限定して解析を実施すべきであるが、そのような事例を多数集めることに困難があった。

(3) 体制と倫理

遺伝性疾患が対象となるので、家族との共有性が、他の法医検査と根本的に異なる点である。CCHSでは*de novo*突然変異の割合は90%と高く、血縁者が変異を共有している可能性は低いが、QT延長症患者では*de novo*突然変異の割合は12%と報告されており、家族が共有している可能性は高い。すなわち、遺体をしらべているつもりが、家族も検査しているのと変わりはないことが、特殊な状況となりうる。

スイスにおける死後遺伝学的検査の実施体制では、司法からの囑託があれば、死因を求める目的の範囲内で検査は実施可能であり、結果を得た後に遺族と対応してゆくとしている。その際には、家族に対してリスクを警告する義務(duty to warn)が強く主張されている点が特徴である。一方で、この体制では剖検を囑託する立場の者がどこまで遺伝性疾患の特殊性を理解した上で指示しているのかが問題となる。豪州・NZでは、コローナや法医に向けたガイドラインが公表されており、対象疾患の説明、剖検上の注意点等を含み、よい試みである。欧州でも、2010年には不整脈疾患が疑われる急死例に対する剖検時のガイドラインを提案しており、わが国でもこれらを参考に、手順書の作成が必要となるであろう。突然死そのものを扱うのは法医学であるが、家族への対応も考えた時に、循環器医、臨床遺伝医、遺伝カウンセラー等の異なる分野の専門家が集まって対応するmultidisciplinary approachが重要となり、新たな体制作りが必要となるだろう(図2)。

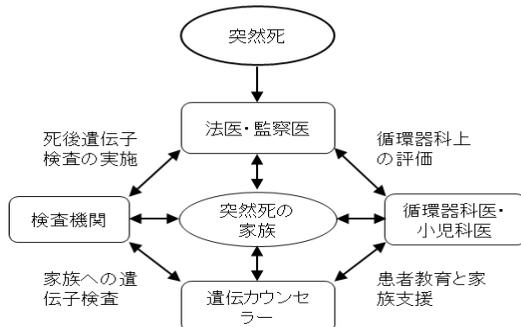


図2 多方面からのアプローチ

臨床遺伝学分野の進展は急速で、わが国でもQT延長症の遺伝学的検査は、すでに保険診療に取り入れられている。内因性急死に対する死後遺伝学的検査は、これまで研究目的で実施されてきたが、海外では遺族の求めで実施され、実用段階に入っている。法医学領域でも、遺伝学的検査に対する鑑定実務上の必要性や社会的な需要に、どう対応してゆくのか考えなければならない時期にきている。

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7件)

Osawa M, Inaoka Y, Nakatome M, Miyashita K, Ochiai E, Kakimoto Y, Satoh F, Matoba R. Association analysis of CYP2A6 polymorphism to sudden and unexpected death of infants. Integr Mol Med 査読有 2(2): 142-144, 2015. (DOI: 10.15761/IMM.1000129)

Satoh F, Seto Y, Tsuboi A, Osawa M. Regressive changes of the myocardial sleeves in elderly victims of sudden bathtub death. Forensic Medicine and Anatomy Research 査読有 3; 57-65, 2015.

(DOI:org/10.4236/fmar.2015.32011)

Osawa M, Inaoka Y, Ochiai E, Hasegawa I, Satoh F. Variable single C repetitive tract in KCNQ1: Postmortem molecular testing in a sudden and unexpected death. Exp Clin Cardiol 査読有 20(7):927-930, 2014. (<http://www.cardiologyacademicpress.com/>)

Satoh F, Nakamura T, Hayashi K, Ochiai E, Osawa M. Left ventricular non-compaction of myocardium in forensic autopsy. J Clin Pathol Forensic Med 査読有 5(2):17-22, 2014. (DOI: 10.5897/JCPFM2013.0049)

Satoh F, Osawa M, Hasegawa I, Seto Y, Tsuboi A. "Dead in hot bathtub" phenomenon: accidental drowning or natural disease? Am J Forensic Med Pathol 査読有 34(2):164-168, 2013. (DOI: 10.1097/PAF.0b013e31828d68c7)
Tamura T, Osawa M, Kimura R, Inaoka Y, Tanaka S, Satoh F, Sato I. Evaluation of the allele-sharing approach, known as the IBS method, in kinship analysis. J Forensic Leg Med 査読有 20(1):112-116, 2013. (DOI: 10.1016/j.jflm.2012.05.005.)

佐藤文子、大澤資樹: 入浴中の急死の実態、賠償科学、査読有 39(1): 39-45, 2013. (<http://www10.showa-u.ac.jp/~baisyo/kikan-shi/Frameset-ks1.html>)

[学会発表](計14件)

大澤資樹. 内因性急死に対する遺伝学的病態解析。(特別講演)日本法医学会第99次総会(2015,6,11)高知市文化プラザかるぽーと、高知県高知市。

大澤資樹, 落合恵理子, 宮下京子, 垣本由布, 佐藤文子. Postmortem genetic testing 実施における課題。第21回日

本 SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会(2015,3,6)松本市中央公民館、長野県松本市。

Ochiai E, Satoh F, Miyashita K, Kakimoto Y, Osawa M. Postmortem genetic testing to sudden and unexpected deaths using the next generation sequencing. XII International Conference. (2014.12.18) Bangkok, Thailand.

大澤資樹, 中留真人, 落合恵理子, 宮下京子, 垣本由布, 佐藤文子. 疾病診断目的の死後遺伝子検査における倫理面の一考察。日本DNA多型学会第23回学術全国集会(2014,11,26)ウインク愛知、愛知県名古屋市。

大澤資樹, 中留真人, 落合恵理子, 宮下京子, 松島裕, 垣本由布, 佐藤文子. 原因不明の突然死に対する遺伝子検査。日本人類遺伝学会第59回大会(2014.11.22)タワーホール船堀、東京江戸川区。

大澤資樹, 稲岡斉彦, 中留真人, 佐藤文子, 落合恵理子, 的場梁次. 乳幼児突然死と喫煙との関連:ニコチン代謝個体差との連鎖解析。第20回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会(2014.3.7)大宮ソニックシティ、埼玉県さいたま市。

落合恵理子, 稲岡斉彦, 鈴木進悟, 尾崎有紀, 宮下京子, 椎名隆, 大澤資樹. 次世代シーケンサーを用いたHLA型判定。第82回日本法医学会関東地方集会。(2013.10.19)はまぎんホールヴィアマーレ、神奈川県横浜市。

大澤資樹, 宮下京子, 落合恵理子, 佐藤文子. 原因不明の突然死に対する遺伝子検査。日本DNA多型学会第22回学術集会(2013.11.23)戦後復興記念館、宮城県仙台市。

Osawa M, Inaoka Y, Suzuki S, Ozaki Y, Ochiai E, Miyashita K, Shiina T. HLA typing from sequence data originated by the advanced technology. 25th Congress of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) (2013.9.6) Melbourne, Australia.

大澤資樹, 稲岡斉彦, 中留真人, 佐藤文子, 長谷川巖, 的場梁次. 乳幼児突然死例におけるCCHS及びLQTSに関連した遺伝子解析。第18回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会(2012.3.3)日本科学未来館、東京都江東区。

大澤資樹, 稲岡斉彦, 田村友紀, 坪井秋男, 佐藤文子. ゲノムワイドSNPデータに基づく血縁関係推定の試み。日本DNA多型学会第21回学術集会(2012.11.8)京都教育文化センター、京都府京都市。

Inaoka Y, Nakatome M, Satoh F, Hasegawa I, Fujita M Q, Osawa M.

Association analysis of CYP 2A6 polymorphism in SIDS. American Society of Human Genetics 2012 Annual Meeting. (2012.11.9) San Francisco, USA.

大澤資樹, 中留真人, 稲岡齊彦, 佐藤文子, 中西亜由美. 原因不明の突然死に対する死後遺伝子診断の試み. 日本人類遺伝学会第57回大会(2012.10.24) 東京プラザホテル、東京都新宿区.

Osawa M, Satoh F, Inaoka Y, Hasegawa I, Nakanishi A. Postmortem molecular testing to sudden deaths from unknown cause. 22th Congress of the International Academy of Legal Medicine (2012.7.5), Istanbul, Turkey.

〔図書〕(計3件)

「死体検案ハンドブック」(改訂3版、2014) 金芳堂, 的場梁次, 近藤稔和編, 14章 乳幼児突然死症候群, 218-223, 分担

大澤資樹, 宮下京子, 落合恵理子, 佐藤文子. 原因不明の突然死に対する死後遺伝子検査. DNA多型. 2014; 22: 144-145. (東洋出版, ISBN 978-4-86459-119-5)

Osawa M, Inaoka Y, Satoh F. Postmortem molecular testing to sudden death from unknown causes: variable single C repetitive tract in KCNQ1. International Proceedings Division from the 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine 2013; 313-318. (Medimond, ISBN 978-887587-676-0)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://forensic.med.u-tokai.ac.jp/>

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

尾崎 有紀 (OZAKI, Yuki)

東海大学・医学部・研究員

研究者番号: 80636118

中留 真人 (NAKATOME, Masato)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号: 90263251

(3) 連携研究者

佐藤 文子 (SATOH, Fumiko)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 70328128