

令和元年6月1日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05663

研究課題名(和文)機能性疾患による乳幼児突然死の死因を解明する革新的診断法の確立と予防体制の構築

研究課題名(英文) Establishment of innovative method of diagnosis and prevention for functional diseases

研究代表者

山本 琢磨 (YAMAMOTO, TAKUMA)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50634458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：従来の解剖手法では診断し得なかった乳幼児突然死に対し、clinical exome sequencingを行ったところ、一定の症例で遺伝子診断が可能であった。残った症例において、疾患に間接的に関与すると考えられるvariantに対し、突然死群とコントロール群との頻度を比較したが有意な差は認められなかった。個別のミオパチー症例に対しDNAレベル・RNAレベルでの解析を行い、法医学における突然死究明にRNAseqが有用であることが判明した。一定の症例ではDNAレベルでの変異解析・RNAレベルでのSplicing解析が有用であり今後も続ける必要がある。一方、集団としての原因究明には課題が残る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人が突然亡くなることは避けるべき問題であるにも関わらず、その原因は未だ完全に究明されているわけではない。これを解明することは本人・家族のみならず社会的にも大変有意義なことである。乳幼児や若年性の突然死の多くは遺伝子変異が原因であると考えられてきたが、徹底的に究明されるケースはそれほど多くなく今だ闇のままである。今回、clinical exome sequencing・RNAsequencingの技術を駆使し、究明にチャレンジした。結果的に、一定数の突然死症例がこれらの技術により診断できる可能性が考えられた。今後は、より簡便なより画一化した診断が広まっていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Clinical exome sequencing revealed that six cases had arrhythmia-related gene variants and five cases had metabolic disease-related gene variants among 71 cases of sudden infant death. After these 11 cases were excluded, the remaining cases were defined as molecular autopsy-negative SUD and there were no significant differences in the frequency of arrhythmia-causing variants.

The case of a familial myopathy patient was analyzed. The patient had genetic variant which affected RNA splicing, and abnormal alternative splicing was detected in both cardiac and skeletal muscles. These affected isoforms might have caused the cardiac involvement with myopathy. Analyzing alternative splicing in sudden cardiac death was recommended.

研究分野：法医学

キーワード：機能性疾患 乳幼児突然死 法医学 次世代シーケンサー RNAseq 遺伝子変異

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

乳幼児突然死は、健康な乳幼児が何の前触れもなく死亡する疾患で、今なお多くの乳幼児が亡くなっている。しかし、ほとんどの場合解剖を行うことが出来ず、「死因不詳」や「乳幼児突然死症候群(SIDS)の疑い」で終わることが多いため、個々の症例で確定診断にはほど遠い。解剖されたとしても、現在の死因診断は死後でも診断可能な形態学的変化に重きをおき、代謝疾患や不整脈等の機能的疾患の死後診断は不可能であり、「死因不詳」として見過ごされてきた。まとまった報告も少なく、システム化された解析も行われていないため、現時点ではその治療・予防も不可能である。

我々はこれまでも、従来の解剖手法に加え新たに、「血液・尿中の代謝産物測定、代謝酵素のDNA配列解析・活性測定、死後の線維芽細胞培養等、代謝疾患に焦点」を当てた Metabolic Autopsy の手法を初めて国内に導入してきた。特に遺伝子解析に重きをおいた研究を行っており、先天性代謝異常症の一つ *Carnitine Palmitoyltransferase 2* 遺伝子の F352C 多型が乳幼児突然死に有意に高頻度に存在することを報告した。また、実務面では Metabolic Autopsy の手法により、脂肪酸代謝異常症・ミトコンドリア呼吸鎖異常症を多数診断し、さらにスクリーニングの施行により生前にその診断は可能であり、死を予防し得たことを喚起してその重要性を提唱した(Yamamoto et al.,2011、Yamamoto, Emoto et al.,2012)。しかし、従来のサンガー法による遺伝子解析では一度に限られた遺伝子変異しか検出できず、数多の候補遺伝子を検索するには多大な時間・費用を浪費していたところ、近年、次世代シーケンサー(NGS)による網羅的遺伝子解析により短時間で多数の遺伝子変異を検索することが可能になった。網羅的スクリーニングが必要な突然死診断に適した解析方法である。

2. 研究の目的

個々の事例ごとに解剖の有無・診断の為の検査の種類も様々であった乳幼児突然死症例に対し、診断・治療・予防といった「死体の総合医としての法医学」を掲げ、特に機能性疾患の診断・治療・予防方法の確立を行うことを目的とした。具体的には、小児科をはじめとする臨床各科や遺伝学などの基礎研究室との提携により精度の高い的確な死因診断を目指し、Metabolic Autopsy・molecular autopsy といった機能的疾患をターゲットにした解析を確立・統一化することで、突然死の予防へと導きたい。

3. 研究の方法

(1) Postmortem genetic analysis of sudden unexpected death in infancy: neonatal genetic screening may enable the prevention of sudden infant death

解剖時に、従来の解剖手法で明らかな死因を診断し得なかった 71 例の乳幼児突然死(年齢、性別)を対象とした。血液等より DNA を抽出し、Trusight one パネル (Illumina) を用いて次世代シーケンサー Miseq (Illumina) により clinical exome sequencing を行った。解析遺伝子として、先天性代謝疾患 63 遺伝子と不整脈 66 遺伝子を対象とした。過去に疾患との関連が報告のある変異やアリル頻度等から、突然死に関連があると考えられる変異を抽出した。

(2) No association between cardiac ion channel variants and sudden infant death

上記の検討により遺伝子背景が検出できた 11 症例を除いた 60 例を対象とした。これはいわゆる、Molecular autopsy-negative sudden infant death であり、より真の SIDS に近い集団と考えられる。Pathogenic variant ではないが、disease causing variant として、疾患に間接的に関与すると考えられる variant に対し、突然死群とコントロール群との頻度を比較した。

(3) CTG repeats in DMPK cause sudden cardiac death with congenital fiber type disproportion via LDB3 splicing

乳幼児突然死以外にも、原因不明の若年性突然死症例は法医学の対象となることが多い。その中で、家族性ミオパチー家系の心臓性不整脈による若年性突然死例に対し、原因究明の為に、上記 clinical exome sequencing を行った。次に、心臓・筋肉より RNA を抽出し、RNAseq を行い、splicing variant を検討した。

4. 研究成果

(1)

NGS 解析の結果、ターゲットとしたエクソンでは平均 coverage は 115 reads であり、94.3% で 20 reads 以上の検出が行えた。ターゲットの 129 遺伝子に対して、1 症例あたり不整脈関連遺伝子は 1.4 variant、代謝疾患関連では 1.2 variant が検出された。

過去に不整脈と関連があるとされた変異が検出されたのは Table 1 の通り、71 症例中 6 症例である。一方、代謝疾患では 1 例に NAGS 遺伝子の homozygote 変異、4 例に ACADVL, HMGCL, CPT2 遺伝子に 2 カ所の heterozygote 変異が検出された (Table 2)。

これらの遺伝子変異だけで全てが死因と断定できるわけではないが、死因に対し何らかの関わりを持つ可能性が示唆された。現在日本では、代謝疾患に対し新生児マススクリーニングが

行われており、一部の地域では新生時期の心電図スクリーニングも行われており、実際に発症前に異常を検出することで、発症予防に繋がっている事例も多々報告されている。今回の検討で、突然死の中には一定数の不整脈疾患・代謝性疾患が含まれていることが明らかになった。倫理的な検討が必要ではあるが、現行のスクリーニング体制に遺伝子解析を併せることができれば、さらなる充実が期待される。

(2)

これまでに polymorphism ではあるものの疾患との関連が示唆されていた、KCNE1 G38S, KCNH2 K897T, KCNQ1 G643S, SCN5A H558R, P1090L, R1193Q について検討したところ、いずれも突然死群とコントロール群とで有意な差は認められなかった (Table 3)。

これまで、乳幼児突然死と遺伝子多型について様々な検討がなされてきた。しかし、突然死群の設定根拠は「SIDS と診断されたもの」や「解剖で肉眼的異常が無いもの」など様々であった。一方で、乳幼児突然死の中には不整脈や代謝疾患など molecular autopsy によって初めて診断がつく症例が隠れていることも明らかにされており、つまり、遺伝子多型との検討をする際には、これらの疾患を除外した真の SIDS を突然死群と設定する必要がある。その意味では今回の 60 例はより真の SIDS に近い Molecular autopsy-negative sudden infant death であり、今回の結果より不整脈の遺伝子多型との関連は薄いと考えられた。将来、(1) で述べたような遺伝学的スクリーニングが現実となった際に、スクリーニング基準を構築する必要があるが、その際に有用なデータとなる可能性が考えられる。

(3)

Clinical exome sequencing のより、RNA の splicing に影響を及ぼす遺伝子に変異が検出された。RNAseq を行いコントロールと比較したところ、心臓・筋肉ともに細胞骨格を構成する蛋白のスプライシングに、異常が認められた。従って、本症例の不整脈・ミオパチーの原因として、splicing を制御する蛋白の遺伝子変異による心筋・骨格筋の細胞骨格構成異常であることが推定された。

近年、法医学の分野においても Molecular autopsy が一般的になりつつあるが、従来の Molecular autopsy は遺伝子変異を検出することに主眼がおかれ、RNAseq を検討した研究は多くはない。今後は DNA レベル、RNA レベル双方を視野に入れた解析が必要となると思われる。

先天性の遺伝性疾患による突然死は乳幼児期に限ったことではなく、たとえ健康で小児期を過ごしたとしても、成人になってなんらかの負荷がかかった際に突然死として発症することもある。未来ある小児の突然死もいたたまれない事柄であるが、既に社会におけるつながりを構築している成人の突然死もまた同様で、その解明や予防は必要不可欠である。

しかし、乳幼児期の突然死に代謝疾患が多く含まれるのに対し、成人期での代謝疾患の突然死は稀である。今回のような未発症の潜在性のミオパチーと突然死の関連はそれほど知られておらず、成人の突然死では、遺伝性不整脈だけでなく、ミオパチーも念頭に容れた解析が必要である。

Table 1. Results of known arrhythmia-related variants.

Case	Gene	Substitution	Amino acids
1	<i>KCNH2</i>	C>C/T	R148W
2	<i>SCN10A</i>	T>T/G	F386C
3	<i>SCN3B</i>	G>G/A	V110I
4	<i>KCNE1</i>	G>G/A	D85N
5	<i>KCNQ1</i>	C>C/T	A283V
5	<i>KCNE3</i>	A>A/G	T4A
6	<i>KCNQ1</i>	G>G/A	A283V

Table 2. Results of metabolic disease-related variants.

Case	Gene	Substitution	Amino acids	Zygoty
7	<i>NAGS</i>	T>C/C	V241A	Homozygote
8	<i>ACADVL</i>	G>G/A	G546R	Heterozygote
8	<i>ACADVL</i>	G>G/C	C630S	Heterozygote
9	<i>HMGCL</i>	C>C/G	T205S	Heterozygote

9	<i>HMGCL</i>	A>A/G	M217V	Heterozygote
10	<i>CPT2</i>	T>T/A	c.233+2T>A	Heterozygote
10	<i>CPT2</i>	T>T/A	F383Y	Heterozygote
11	<i>CPT2</i>	T>T/A	c.233+2T>A	Heterozygote
11	<i>CPT2</i>	T>T/A	F383Y	Heterozygote

Table 3. Genotype distributions of the six single nucleotide variants

Gene	Amino acid change	Group	Wild	Heterozygote	Homozygote	p value
<i>KCNE1</i>	G38S	SUD	39	18	3	0.13
		Controls	2234	1755	322	
<i>KCNH2</i>	K897T	SUD	55	5	0	0.93
		Controls	3759	353	9	
<i>KCNQ1</i>	G643S	SUD	52	8	0	0.19
		Controls	855	261	2	
<i>SCN5A</i>	H558R	SUD	53	6	1	0.23
		Controls	3486	778	38	
<i>SCN5A</i>	P1090L	SUD	56	4	0	0.57
		Controls	3983	166	2	
<i>SCN5A</i>	R1193Q	SUD	51	9	0	0.79
		Controls	2805	427	17	

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Yamamoto T, Matsusue A, Umehara T, Kubo SI, Ikematsu K. No association between cardiac ion channel variants and sudden infant death. *Pediatr Int* May;60(5):483-484, 2018 (査読あり)

山本琢磨,法医学の意外な一面 Metabolic autopsy による死から生への還元と稀少疾患との出会い 兵庫医科大学医学会雑誌 42 巻 2 号 Page21-26 2018 年 (査読なし)

Oshima Y, Yamamoto T, Ishikawa T, Mishima H, Matsusue A, Umehara T, Murase T, Abe Y, Kubo SI, Yoshiura KI, Makita N, Ikematsu K. Postmortem genetic analysis of sudden unexpected death in infancy: neonatal genetic screening may enable the prevention of sudden infant death. *J Hum Genet* 62:989-995, 2017 (査読あり)

山本琢磨, 梅原敬弘, 大島友希, 村瀬壮彦, 池松和哉, 死から生への還元－Metabolic autopsy を用いた突然死解明 - 日本 SIDS 学会 16 巻 1 号 15-19 2016 年 (査読なし)

〔学会発表〕(計9件)

山本琢磨 Metabolic Autopsy を用いた機能性疾患の解明, 第 101 次日本法医学会学術全国集会 2017 年

山本琢磨 Metabolic Autopsy を用いた乳幼児突然死の解明－避けられる死を目指して－第 188 回長崎市小児科医会学術研修会 2017 年

山本琢磨, 梅原敬弘, 池松和哉 乳幼児突然死に対する遺伝子解析－検出された変異は de novo 変異か否か－ 第 24 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会 2017 年

山本琢磨, 梅原敬弘, 池松和哉, 西尾元 (兵庫医大、長崎大). 乳幼児突然死に対する

Metabolic autopsy と家族への還元. 第 2 回法医分子病理研究会 2017 年

山本琢磨、石川泰輔、大島友希、安倍優樹、村瀬壮彦、梅原敬弘、蒔田直昌、池松和哉 乳幼児の突然死に対し家系介入を行った 1 症例-遺伝子解析はどこまで行うべきか, 第 100 次日本法医学会学術全国集会 2016 年

山本琢磨、村瀬壮彦、池松和哉 乳幼児突然死に対する Metabolic Autopsy と網羅的遺伝子解析~避けられる死を目指して~, 第 30 回日本小児救急医学会学術集会 2016 年

山本琢磨、大島友希、松末綾、梅原敬弘、村瀬壮彦、安倍優樹、久保真一、池松和哉 突然死に対する新生児マススクリーニング対象疾患遺伝子の網羅的検索, 第 66 回九州地方会 2016 年

山本琢磨、大島友希、松末綾、梅原敬弘、村瀬壮彦、安倍優樹、久保真一、池松和哉 新生児スクリーニングを行うことで如何ほどの突然死が事前に指摘し得るか-突然死に対する網羅的遺伝子解析-, 第 23 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会 2016 年

山本琢磨、三嶋博之、水上創、梅原敬弘、村瀬壮彦、深堀友希、吉浦孝一郎、山口清次、池松和哉 次世代シーケンサーを用いた Metabolic autopsy-不幸の連鎖を止めるために「避けられる死」を提唱したい-, 第 57 回日本先天代謝異常学会 2015 年

〔図書〕(計 1 件)

Yamamoto T, Nishio H. Metabolic Autopsy and Molecular Autopsy in Sudden Unexpected Death in Infancy. Forensic Medicine and Human Cell Research. Takaki Ishikawa (ed). Series: Current Human Cell Research and Applications., pp. 83-103, Springer, 2018

〔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。