

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08892

研究課題名(和文) 乳幼児突然死の原因究明にむけて：遺伝的背景の検討と新たな遺伝子診断法の開発

研究課題名(英文) Genetic background of sudden unexpected infant deaths

研究代表者

松末 綾 (MATSUSUE, Aya)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70309920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳幼児突然死の場合、解剖によっても死因が特定できない症例も多い。様々な要因がリスク因子として考えられており、環境因子と遺伝的素因の関与が示唆されている。本研究では、原因不明の乳幼児突然死剖検例を対象に、遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子であるSCN5A、RYR2遺伝子並びに先天性脂肪酸代謝異常症の原因遺伝子であるCPTII、VLCAD遺伝子を調べ、新規の変異並びに多型を認めた。さらに、SCN5A遺伝子の変異並びに多型について、健常人における頻度を調べ、地域差の有無を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Some sudden unexpected infant deaths remain unexplained after a complete investigation, which includes an autopsy. There are many genetic and environmental risk factors that may contribute to sudden unexpected infant deaths. We analyzed genes associated with lethal arrhythmias and fatty acid oxidation disorder in autopsy cases of sudden unexpected infant deaths in which the cause of death was not identified. We examined mutations in the SCN5A (sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit), ryanodine receptor 2 (RYR 2), carnitine palmitoyltransferase II (CPT II), and very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) genes and identified novel mutations and polymorphisms in these genes. We compared the frequency of mutations and polymorphisms in the SCN5A gene between Japanese and German populations.

研究分野：法医学

キーワード：乳幼児突然死 遺伝性致死性不整脈 先天性脂肪酸代謝異常症

### 1. 研究開始当初の背景

乳幼児突然死は、複数の原因や要因によって引き起こされると考えられており、環境因子と遺伝的素因の関与が示唆されている。しかし、未だ解明に至らず国内外の専門家によってその原因究明に向けた研究がなされている。

近年、疾病と遺伝子変異との関連が研究され、数々の原因遺伝子が明らかにされている。乳幼児突然死についても原因遺伝子が明らかにされてきており、法医剖検例においても遺伝子変異が検索されている。臨床では、遺伝子異常が致死的不整脈をおこし突然死の原因となることが明らかとなっている。我々は、乳幼児突然死の中にも、これらの致死的不整脈に基づく例が含まれているのではないかと考えた。さらに、ミトコンドリアにおける脂肪酸のβ酸化障害により突然死が引き起こされると考えられていることから、先天性脂肪酸代謝異常症の原因遺伝子変異も乳幼児の突然死を引き起こすと考えた。

### 2. 研究の目的

原因不明の乳幼児突然死症例を対象に、致死性不整脈の原因遺伝子並びに先天性脂肪酸代謝異常症の原因遺伝子の変異並びに多型を探索する。また、健常人における致死性不整脈の原因遺伝子の変異並びに多型の頻度を調査する。さらに、乳幼児突然死と関連があると報告されている Interleukin 10 (IL-10) 遺伝子多型並びに Serotonin transporter 遺伝子多型 (5-HTTLPR) を探索する。

### 3. 研究の方法

原因不明の乳幼児突然死症例 11 例を対象に、血液から DNA を抽出し、遺伝性致死性不整脈の原因遺伝子である *SCN5A* (*Sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit*)、*RYR2* (*Ryanodine receptor 2*) 遺伝子並びに先天性脂肪酸代謝異常症の原因遺伝子である *CPTII* (*Carnitine palmitoyltransferase II*)、*VLCAD* (*Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase*) 遺伝子の変異並びに多型をダイレクトシーケンス法で探索した。*SCN5A* 並びに *VLCAD* 遺伝子は、それぞれのエキソンを増幅するようにプライマーを設計し、PCR で増幅後、ダイレクトシーケンス法で翻訳領域の変異を探索した。*RYR2* 遺伝子は、3つの hot spot region のエキソンを増幅するようにプライマーを設計し、PCR で増幅後、ダイレクトシーケンス法で変異を探索した。*CPTII* 遺伝子は、既報告の方法に従い、全てのエキソンの変異を探索した。

さらに、*SCN5A* 遺伝子の H558R、P1090L、E1784K、V1951L 変異について、判定法を TaqMan 法で検討した。遺伝子型が既に判明している検体を用いて、正確に判定できているか否かを判断し、日本人とドイツ人集団における頻度調査を行った。日本各地：青森(98

人)、新潟(100人)、福岡(200人)、沖縄(196人)並びにドイツ：ミュンヘン(94人)において採取した血液から抽出した DNA を対象に、TaqMan 法を用いて型判定し、頻度を調べた。

原因不明の乳幼児突然死症例 12 例並びに健常人 100 例について、IL-10 の 3 つの多型、-1082A/G (rs1800896)、-819T/C (rs1800871)、-592A/C (rs1800872) 並びに 5-HTTLPR を調べた。IL-10 多型は、制限酵素断片長多型解析で遺伝子型を判定した。それぞれの遺伝子多型を含む領域を PCR で増幅した後、-1082A/G 多型は制限酵素 XagI で 37 1 時間、-819T/C 多型は MaeIII で 55 1 時間、-592A/C 多型は RsaI で 37 30 分間処理し、2% アガロースゲルで電気泳動を行い型判定した。5-HTTLPR は、多型領域を PCR で増幅した後、2% アガロースゲルで電気泳動を行い型判定した。各多型とも、いくつかのサンプルはダイレクトシーケンス法により配列を再確認した。統計処理は Fisher の正確確率検定を用いて行った。

### 4. 研究成果

原因不明の乳幼児突然死症例 11 例中 4 例において、*SCN5A* 遺伝子にヘテロ接合体変異 R1193Q が認められた (Fig. 1)。

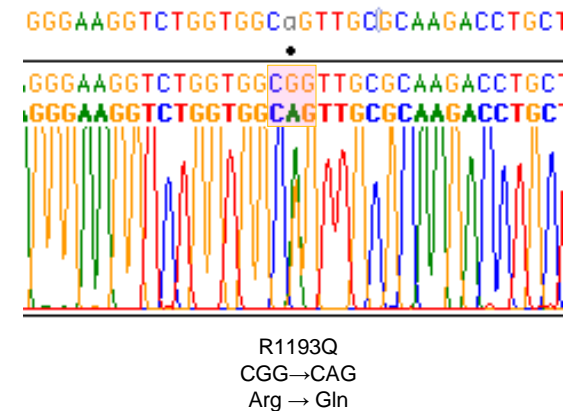


Fig.1 *SCN5A* 遺伝子に認められた多型

*RYR2* 遺伝子にヘテロ接合体変異 N4111H 並びに K4392R が 1 例ずつ認められた (Fig. 2)。*CPTII* 遺伝子では、1 例においてヘテロ接合体変異 F352C を認めた以外は活性変化を伴わない変異であった。*VLCAD* 遺伝子に活性変化を伴う変異は認められなかった。

R1193Q 変異は、Brugada 症候群と QT 延長症候群の患者に認められるとの報告があり、培養細胞を用いた実験系で、Na チャネルの不活性化がおこるとの報告があるが、その影響は未だ不明である。

*RYR2* 遺伝子に認められた変異は、これまでに報告のない変異であった。変異のタンパク質への影響を考察するために、sift と polyphen-2 にて、機能変化の予測を行った。今回認められた変異は、SHIFT SCORE がい

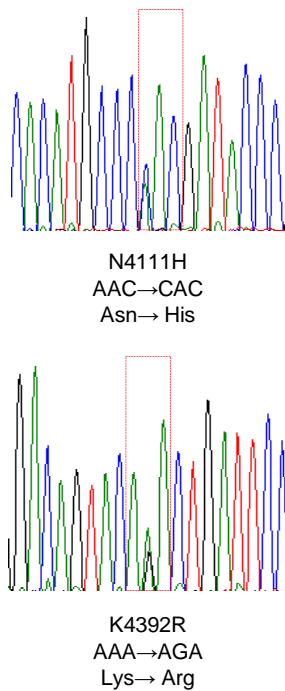


Fig.2 RYR2 遺伝子に認められた変異

いずれも 0.05 以上だったので、タンパク質機能に影響は与えないと考えられた。Polyphen-2 score は、今回認められた変異はいずれも 0 であったため、Polyphen-2 の結果からも、この二つの変異は、タンパク質機能に影響は与えないと考えられた。CPTIII 遺伝子の F352C は、通常の体温、37 度の場合は活性に変化はあまり認められないが、40 度の高温になると活性が大幅に低下することが報告されている。今回 F352C が認められた症例は、体温の上昇は認められていないため、この変異の影響はないものと考えられた。

SCN5A 遺伝子の H558R、P1090L、E1784K、V1951L 変異は、いずれの変異も TaqMan 法で genotype を迅速かつ明確に識別できた。シーケンスにより既に型が判明している検体を用いて、TaqMan 法でタイピングを行ったところ、シーケンスの結果と一致したため、正確な判定ができていると判断した。今回調査した集団は、いずれもハーディー・ワインベルグ平衡に合致した。E1784K 変異は、先天性 QT 延長症候群の原因となる変異として報告されており、日本人患者においても変異が報告されているが、今回調査した日本及びドイツの健常人集団では変異型 allele が認められなかった。H558R、V1951L 並びに P1090L 変異は、個々の SNP 単体ではナトリウムチャンネル透過電流量に影響を与えないが、複数の SNP が組み合わされることにより Brugada 症候群発症の一因となっている可能性が報告されている。V1951L の変異型 allele は青森で 0.0051、福岡で 0.0025、沖縄で 0.0026 の頻度で検出され、新潟とドイツ人集団では認められなかった。P1090L の変異型 allele は、日本人集団でそれぞれ 0.0228 から 0.0313 の頻度で検出されたが、ドイツ人集団では認め

られなかった。H558R の変異型 allele は、ドイツ人集団で 0.2340 と高く、日本人集団では、福岡、沖縄、新潟がそれぞれ 0.1080、0.0969、0.0750 であったが、青森は 0.0365 と低頻度であった。

今回調べた IL-10 の 3 つの遺伝子多型並びに 5-HTTLPR は、いずれもハーディー・ワインベルグ平衡に合致した。統計解析の結果、Recessive、Dominant、Allele 並びに Genotype model において、いずれの多型も乳幼児突然死症例と健常人の間で有意差は認められなかった。また、IL-10 のハプロタイプ解析でも、有意差は認められなかった。今回、調査した乳幼児突然死症例が少なかったため、今後症例を増やして検討する必要がある。

## 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 3 件)

- 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.  
Journal of human genetics, 査読有, 62(11), 2017, 989-995.  
DOI: 10.1038/jhg.2017.79
- Yamamoto T, Matsusue A, Umehara T, Kubo SI, Ikematsu K.  
No association between cardiac ion channel variants and sudden infant death.  
Pediatrics International, 査読有, in press.  
DOI: 10.1111/ped.13532
- Matsusue A, Yuasa I, Umetsu K, Nakayashiki N, Dewa K, Nishimukai H, Kashiwagi M, Hara K, Waters B, Takayama M, Ikematsu N, Kubo S.  
The global distribution of the p.R1193Q polymorphism in the SCN5A gene.  
Legal medicine, 査読有, 19, 2016, 72-76.  
DOI: 10.1016/j.legalmed.2015.07.010

[学会発表](計 2 件)

- 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,2017.3.17-18,津アストホール(三重,津).

2. 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回日本法医学会学術九州地方集会,2016.10.14,久留米大学 筑水会館(久留米).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松末 綾 (MATSUSUE, Aya)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号:70309920

### (2)研究分担者

久保 真一 (KUBO, Shinichi)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号:10205122

原 健二 (HARA, Kenji)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号:00090738

柏木 正之 (KASHIWAGI, Masayuki)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号:70301687

ウォーターズ ブライアン  
(WATERS, Brian)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号:00609480

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし