

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10690

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる重症胎児疾患の原因解明と遺伝子ライブラリーの確立

研究課題名(英文) Cause elucidation of the severe fetal disease by the next-generation sequencer and establishment of the gene library

研究代表者

松岡 隆 (Matsuoka, Ryu)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：20349111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：水頭症、無脳児、骨系統疾患の原因追求のため、遺伝カウンセリングを含めた体制確立の基盤となる研究を行った。4回連続で無脳児のゲノム構造の精査を行ったが極めて稀な変異(多型)あるいはde novo変異のみで病気との因果関係を示すに至らなかった。骨系統疾患4例、全前脳胞症2例に対して遺伝カウンセリングの下、遺伝学的解析を行い、全前脳胞症は染色体分析結果を、骨系統疾患はFibroblast growth factor receptor-3(線維芽細胞増殖因子3)遺伝子のシーケンスの結果をご両親に提示し、疾患原因と次子への再発の情報提供を行うことができ、目的となる検査体制の確立を達成できた。

研究成果の概要(英文)：This study is to establish the system to investigate the genetic cause of rare diseases i.e. hydrocephalus, anencephalia and bone dysplasia. The system also needs genetic counseling. We investigated the genome structure of the 4th repeated anencephalia thoroughly consecutively, but did not come to show the association with the disease only by extremely rare variation (polymorphism) or de novo variation. Perform genetic analysis under the genetic counseling for two holoprosencephaly and four bone dysplasia revealed the abnormal chromosome in holoprosencephaly and abnormal sequences of fibroblast growth factor receptor-3 gene in bone dysplasia. That genetic information was provided to the parents for making decision of subsequent pregnancy. We was able to achieve the establishment of the genetic inspection system for rare diseases.

研究分野：胎児診断

キーワード：骨系統疾患 遺伝子診断 遺伝カウンセリング

1. 研究開始当初の背景

従来であれば数ヶ月から数年を要し、莫大なコストの掛かっていた遺伝学的解析は、近年、次世代シーケンサーによる解析能力の進歩により、結果の獲得にまでに数日から数週間で完了し、なおかつ低コストで実施できる。つまり、これまで原因が不明であった先天性疾患の原因遺伝子の変異の同定を、研究室レベルで、現実的に短期間で可能になり、病気の原因に臨床現場の近くで直接迫ることを可能とした。次世代シーケンサーを使用すれば、両親と対象児の DNA を試料とし、疾患の原因となる突然変異を短期間・低コストで同定することが可能となる (Saundersら, 2012)。その成果は、現在、驚くべきスピードで次々と新規の遺伝性疾患の原因突然変異の同定として発表されている。本研究では、この変異解析方法が産科分野でも同様に有意義と考え、反復する胎児異常(形態的)などの症例で応用し、臨床の方針決定に直接的有用な判断材料になり得ると考えた。無脳症(無頭蓋症)や重度水頭症は胎児期に診断されうる形態学異常でも、重篤で予後不良である。しかし、その発生頻度の低さから原因追及はされず、もしくは染色体異常以上の検索が行われない事が多い。しかし、染色体検査だけではその遺伝学的異常の有無を判断するには不十分であり、次の妊娠に向けての再発率や夫婦の不安除去や人生設計には十分な情報提供を行う必要があると考えられる。また、その遺伝学的検索の施行に於いては、遺伝カウンセリングは不可欠であり医学的・倫理的の双方からのサポートによる意思決定が重要と考える。本研究に於いては羊水染色体検査や SNP マイクロアレイで異常を認めない反復性の胎児形態異常や重篤な胎児奇形症候群についての網羅的な遺伝子エクソーム解析による原因となる遺伝子変異の同定を目的とし、その先には胎児形態学的異常-疾患-遺伝子異常ライブラリーシステムの確立を目標とする。また、疾患の発症に関与するゲノムの変化を把握することは、発症メカニズムの解明に繋がり、ゆくゆく治療法の開発を可能にすると考えられる。

【無脳症：3回連続で無脳児を妊娠したカップルについての症例】

女性 25 歳。第 1 子は無脳児のため妊娠 13 週に中絶手術を行った。夫婦間に近親婚はなく、家族歴もない。遺伝学的検索は行われず、再発予防のために妊娠前より葉酸 400 µg/日を摂取し、第 2 子を妊娠したが、妊娠初期に超音波検査で無脳児を再度疑われ当科に紹介初診となった。妊娠 11 週の超音波検査で、胎児の脊椎上部から後頭部の閉鎖不全、頭蓋および脳実質の低形成の所見を認めたため、無脳児と診断した。予後不良の説明が両親に告知され、妊娠中断が選択された。娩出した児の病理所見は脊椎上部閉鎖不全、頭蓋および脳実質の低形成で臨床的に無脳児と診断した。両親に遺伝カウンセリングを行い、同

意のもと胎児組織より染色体 G-band 核型解析、および高密度 SNP マイクロアレイ(250 万サイトを検索)によるゲノム構造の精査を行った。染色体 G-band 核型の結果は 46,XX の正常核型であり、マイクロアレイで検出可能な範囲では病的な染色体微細欠失・重複は認めなかった。また、葉酸摂取中止後に施行した血中葉酸値、ホモシステイン値は正常であった。無脳児再発症例であったため、次回妊娠に向けてフォリアミン錠 5mg/日を内服開始し再度妊娠が成立。初期より超音波検査で注意深くフォローしたが、妊娠 11 週で前回、前々回同様頭蓋および脳実質の低形成の所見を認め無脳児と診断し告知説明の上、妊娠中断となった。再発を繰り返す無脳児について文献調査を行ったところ、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の遺伝子多型による症例が報告されていたが、その他に特に有力な候補遺伝子の報告は今のところなされていない (Yaliwalら, 2012)。しかしながら (MTHFR) の遺伝子多型はある頻度で本邦に存在し、本症例の様な再発を繰り返す要因としての説明や疾患原因の検索のためには遺伝子解析が必要と思われる。再度遺伝カウンセリングをおこない、同意の下娩出胎児の組織、両親の血液から DNA を抽出した。両親および患児の MTHFR の exon 4,7 についてのシーケンス解析を実施したが、患児に特異的な既報の遺伝子多型は見出されなかった。この症例は、表現型として明らかな同一発生異常を 4 回反復しており、次世代シーケンサーによるエクソーム解析を用いることで原因変異を検出できる可能性は高いと考えている。

2. 研究の目的

胎児奇形は形態学的検査により診断されるが、その根本的原因はなにかしらの遺伝子異常によると考えられている。しかし、染色体検査では微細な欠失、重複、挿入を区別出来ない。一方、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析はその様な微細な遺伝子異常を特定しうる。原因特定は次回の妊娠への言いよれぬ不安を払拭し、再発率の推定により夫婦は現実的将来設計を可能にする。また、発生頻度の低い疾患にこそこのような原因検索は重要である。今回、重篤で致死性の胎児無脳症および胎児水頭症において、罹患児と夫婦の DNA を用いて原因遺伝子異常を検討し、その結果を夫婦の将来設計に役立てることを目的とする。さらに同手法を他の稀発疾患にも適応させ、形態学-疾患-遺伝子異常ライブラリーシステムの確立を行う。また、遺伝カウンセリング体制の確立により検査前後の患者サポートの質向上を目指す。

3. 研究の方法

反復性の無脳症や希少疾患である無脳児、骨系統疾患および反復性的水頭症のような重篤な胎児奇形症候群について、患児および両親の遺伝子解析を行うことで、原因遺伝子変異を探索する。遺伝学的検索においては検査

前後に家族に対して、十分な遺伝カウンセリングを行う。母親および父親を含めた検体を採取し保管している症例について次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム解析をおこない、原因遺伝子変異の探索を中心に研究を実施する。母親、父親および水頭症児の3検体から抽出したDNAについて、次世代シーケンサーを使用し、全ゲノムに渡ってのエクソーム解析を実施する。エクソン領域を選択的に集積することのできるエクソンキャプチャー法を用いて次世代シーケンサーによる解析の効率化を図る。エクソンの選択的濃縮には Nextera Rapid Capture Exome キット(イルミナ社)を使用し、DNA配列の解読にはパーソナル次世代シーケンサーである MiSeq(イルミナ社)を使用する。統計学およびバイオインフォマティクスを駆使して膨大な数のバリエーションから疾患の原因となり得る突然変異候補の数を可能な限り絞り込み、最終的に絞り込まれた変異候補はサンガー法によるシーケンス解析で再度確認を行い、変異を確定する。同定した変異情報に基づき、次子妊娠時に備えて簡易な検査法を確立する。

4. 研究成果

3回連続で無脳児を妊娠したカップルについて両親に遺伝カウンセリングを行い、同意のもと胎児組織より染色体G-band核型解析、および高密度SNPマイクロアレイ(250万サイトを検索)によるゲノム構造の精査を行った。染色体G-band核型の結果は46,XXの正常核型であり、マイクロアレイで検出可能な範囲では病的な染色体微細欠失・重複は認めなかった。葉酸摂取中止後に施行した血中葉酸値、ホモシステイン値は正常であった。無脳児再発症例であったため、次回妊娠に向けてフォリアミン錠5mg/日を内服開始し再度妊娠が成立したが、前回と同様に無脳児であった。両親の血液からDNAを抽出し、両親および患児のMTHFRのexon 4,7についてのシーケンス解析を実施したが、患児に特異的な既報の遺伝子多型は見出されなかった。エクソーム解析で、個々の症例に極めて稀な変異(多型)あるいはde novo変異が見つかったが病型との関連性は不明であった。臍帯血の網羅的DNAメチル化解析で、疾患群で共通したメチル化変化が観察され、低メチル化では細胞接着や細胞骨格に関連する遺伝子が、高メチル化ではアポトーシス関連遺伝子が有意に高い頻度で含まれていた。28年度から希少疾患として骨系統疾患と中枢神経疾患を対象を広げ最終H29年度までに骨系統疾患4例、全前脳胞症2例がエントリー出来た。全ての症例において、十分な体制のもと遺伝カウンセリングを行い遺伝学的検索を行った。遺伝カウンセリング体制の確立は本研究の目的の1つであり、染色体検査だけでは不十分であり、次の妊娠に向けての再発率や夫婦の不安除去や人生設計には十分な情報提供を行う事ができた。骨系統疾

患4例に関して、娩出された児の口腔組織と血液を用いてDNAシーケンス法よりFibroblast growth factor receptor-3(線維芽細胞増殖因子3)遺伝子のシーケンスを行った。ヘテロのc.746C>G(p.Ser249Cys)の遺伝子変異FGR3遺伝子の変異を同定し、タナトフォリック骨異形成症タイプ1であることを遺伝子診断で確定した。最終的診断を両親に開示し、次子の発生リスク遺伝カウンセリングを行った。診断困難なSpondylocostal dysostosis(SCD)疑い症例の骨系統疾患のDNAシーケンスでは典型的Tbx6遺伝子異常を認めずexome解析を進めたが、現時点では有意な結果を得られていない。当施設の奇形を含む子宮内胎児死亡の調査を論文として報告した。胎児異常を中心とした周産期疾患に関する遺伝カウンセリングの図書(周産期遺伝カウンセリングマニュアル、中外医学社、2017年)を発売した。

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 1 件)

1. Takita Hiroko, Hasegawa Junichi, Nakamura Masamitsu, Arakaki Tatsuya, Oba Tomohiro, Matsuoka Ryu, Sekizawa Akihiko. Causes of intrauterine fetal death are changing in recent years, Journal of Perinatal Medicine, 2018 Jan 26; 46(1):97-101. doi:10.1515/jpm-2016-0337. (査読あり)

[学会発表](計 7 件)

1. R. Matsuoka, A. Sekizawa. Case of hypoplasia cerebellar vermis with dynamic ventriculomegaly change. 27th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology. 2017
2. 和泉 美希子, 白土 なほ子, 宮上 景子, 廣瀬 達子, 松岡 隆, 関沢 明彦. NIPTを選択した46,XX,i(21)(q10)/46,XXモザイク女性の1例. 日本産科婦人科学会. 2017
3. 川嶋 章弘, 小出 馨子, 松岡 隆, 関沢 明彦. 母体血漿 cell-free DNAを用いたタナトフォリック骨異形成症II型の無侵襲的出生前検査. 第52回日本新生児・周産期医学会学術集会. 2016
4. Nahoko Shirato, Miwa Sakamoto, Keiko Miyagami, Junko Yotsumoto, Atshko Saito, Tatuko Hirose, Mikiko Izumi, Ryu Matsuoka, Kiyotake Ichizuka, Akihiko Sekizawa.

Effect of the mental background factor of after childbirth women who done prenatal testings. 13th International Congress of Human Genetics, 2016

5 . Keiko MIYAGAMI, Nahoko SHIRATO, Miwa SAKAMOTO, Junko YOTSUMOTO, Atsuko SAITO, Tatsuko HIROSE, Mikiko IZUMI, Ryu MATUOKA, Kiyotake ICHIZUKA, Akihiko SEKIZAWA
Mental background of pregnant women in the viewpoint of delivering facilities, 13th International Congress of Human Genetics, 2016

6 . 和泉 美希子, 白土 なほ子, 廣瀬 達子, 宮上 景子, 松岡 隆, 関沢 明彦 出生前検査に関心を持つ妊婦とそのパートナーの心理状況の調査, 日本遺伝カウンセリング学会、2016

7 . 関沢 明彦, 松岡 隆, 四元 淳子, 白土 なほ子 産婦人科医が関わる遺伝カウンセリングの現状と今後の課題 出生前遺伝学的検査の現状と課題 日本遺伝カウンセリング学会 2015

〔図書〕(計 1 件)

1 . 関沢明彦、四元淳子、松岡隆 他、中外医学社、周産期遺伝カウンセリングマニュアル、2017年、194ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松岡 隆 (MATSUOKA RYU)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：20349111

(2)研究分担者

関沢明彦 (SEKIZAWA AKIHIKO)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：10245839

四元淳子 (YOTSUMOTO JUNKO)

昭和大学・医学部・特別研究生

研究者番号：30553648

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()