

令和元年6月15日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08978

研究課題名(和文) 単一遺伝子疾患バリエーションにおいて多型か変異かを区別する効率的な手法確立

研究課題名(英文) Effective technique establishment to distinguish polymorphisms or mutations for variants in an unifactorial diseases.

研究代表者

中山 智祥 (NAKAYAMA, Tomohiro)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：00339334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Gitelman症候群の患者さんからの末梢血サンプルの収集を継続していき、-70から-80のディープフリーザーに凍結保存するとともに随時核酸抽出を進めた。DNA濃度を測定し、解析に使用できるように一定濃度に調整した。まずはサンガー法によるダイレクトシーケンシングでの塩基配列決定した。新たにハプロタイプを用いた関連解析を実施できる最新のソフトウェアを準備した。ClinVarの記載を最初に参照し、Mutation Taster、PROVEAN、SIFT、ALIGN GVG D、ALIGN GVG D、PANTHERなどwebサイト上で解析できるsoftwareによって確実性を増すことに努めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

常染色体劣性遺伝形式であるGitelman症候群は計34例を収集することができた。ダイレクトシーケンシング法あるいはMLPA法によって多くのサンプルにおいて複合ヘテロ接合体・ホモ接合体の原因バリエーションを検出した。これらが病態に関連しているか否かについてはClinVarの記載を最初に参照し、Mutation Taster、PROVEAN、SIFT、ALIGN GVG D、ALIGN GVG D、PANTHERなどwebサイト上で解析できるsoftwareによって確実性を増すことに努めた。本研究成果によって、病態に確実に影響を与えるようなバリエーション(いわゆる変異)を予測することになり紹介貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We collected the peripheral blood samples from patients for Gitelman syndrome, and stocked them in the deep freezer of -80 from -70. DNAs were extracted from these samples, and were measured the concentration for adjusting them to constant concentration for analyses. Nucleic acid sequencing was performed by the direct sequencing so-called Sanger method. Newly software was prepared for constructing the haplotype. For estimating each variant firstly data of ClinVar were referred, and tried for adding to certainty by software Mutation Taster, PROVEAN, SIFT, ALIGN GVG D, ALIGN GVG D, web site including PANTHER.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：キーワード 単一遺伝子疾患 バリエーション 多型 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) ヒトゲノム解析計画が終了したことによって、臨床遺伝学の研究は単なる塩基配列の解読から遺伝性疾患の原因・病態解明へと移行した。すなわち遺伝性疾患の原因遺伝子がヒトゲノム上に存在する約 22,000 個の遺伝子のどれかという事のみならず、原因変異の同定や変異と疾患の重症度(表現型)などとの関係が究明課題として残された。

(2) 一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)は最も多く検出される個人差としての塩基配列変化として知られ、ヒトゲノム上に 300 万個から 1,000 万個存在すると言われている。SNP は遺伝子マーカーとして網羅的検索を行う genome-wide association study: GWAS に利用され、多因子遺伝性疾患の感受性遺伝子検索に広く応用された。また、単一遺伝子疾患の検索には、次世代シーケンサーと呼ばれる大きなスベックを持つ解析機器が導入されるようになった。

(3) SNP という単語から本来個人差をしめす多型を示す定義であったが、一塩基の変化の中には表現型に影響を与え疾患の原因となるものも含むため、単一遺伝子疾患の原因遺伝子変異を包括する概念となってきた。さて、ヒトゲノムにおけるバリエーションの表記法について国際的な基準として表している Human Genome Variation Society (HGVS)によると、変異(mutation)と多型(polymorphism)という単語を使用しないことが提唱されている。すなわち変異には単に変化を示す時や、疾患原因の変化を示す場合があり、一方多型には疾患原因の変化ではないという意味や一般集団中 1%以上に頻度を示すものという意味があり混乱を来しているからである。よって厳密には SNP という単語も用いないとしている。こうして、多様性を示す多型や変異はバリエーションと言い換えられることが求められている。HGVS (<http://www.hgvs.org/>)ではバリエーションを機能に対する影響の与え方によって 5 つのカテゴリに分類されている。すなわち 1) 機能に影響している場合、2) おそらく機能に影響している場合、3) 機能に影響しているが不明の場合、4) おそらく機能に影響していない場合、5) 機能に影響していない場合である。

(4) 機能や表現型に影響を与えているか否かを調べる方法は、複数存在する。変異を挿入した発現ベクターを作成し、培養細胞での発現を調べることによって疾患に合うような変化が起こっているかを見る。プロモーター領域の場合、転写活性を測定する。遺伝子産物や代謝産物をその変異を持つヒトで測定する。疾患の無いヒトでその variant が検出されないことを確認する。タンパク質の 3 次元構造に影響を与えて機能障害を起こすかを見る。トランスジェニックマウスやノックアウトマウスのデータを参照する。などである。しかし、疾患の原因になっているかの決定・証明の仕方に決まったマニュアルがあるわけではなく、個々の研究者に任されているため効果的な方法論が確立されているわけではない。実験手技としてのボトムアッププロテオミクスという意義も包含し、プロテオミクス、ゲノミクス、臨床データベース解析が個々に解析され、最終的に全体のデータベースとして疾患感受性同定に至るといった研究戦略そのものを指すボトムアップ戦略は今まで例がない。これは研究者間の連携の問題や研究方向性の問題などがあると考えられる。

### 2. 研究の目的

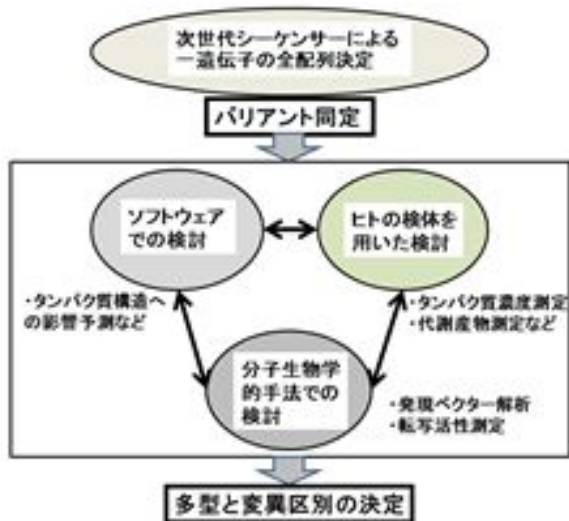
ヒトゲノムには多様性を示すバリエーションがあり、個人差を呈すのみならず、遺伝性疾患の原因となるものもある。前者は多型と称し個人個人異なる塩基配列であり、後者は変異と称し、表現型に病的影響を与え疾患の原因になるような塩基配列とされる。DNA 塩基配列は AGCT の 4 塩基から成っているので、配列変化の情報からのみで表現型に影響を与えるようなもの(原因遺伝子変異)なのか否かを予測することは困難である。このことは遺伝性疾患のうち単一遺伝子疾患では、確定診断に直結する重要な事項であるのにもかかわらず、実際、原因遺伝子変異を決定する方法は一つではなく、また疾患ごとに異なっていることは多くの研究者に多大な労力を強いている。

本申請者のこれまでの様々な単一遺伝子疾患における遺伝学的検査の経験を生かして、新たな方法を試みたい。本研究の目的はいくつかの単一遺伝子疾患の原因遺伝子変異決定法を組み合わせ、多型と変異を区別する効果的手法を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 概要

本研究では単一遺伝子疾患として申請者が今まで解析してきたものの中で多発性内分泌腫瘍



症 1 型および 2 型、常染色体劣性遺伝病である Gitelman 症候群、網膜色素線条症ついてを 対象疾患とする。バリエントが遺伝子機能に影響を与えるか否かは大きく 3 つの方向性から検証する。分子生物学的方法は変異を挿入した発現ベクターや転写活性測定、ヒトでは実際そのバリエントを有する者の遺伝子翻訳産物(タンパク質)レベル測定、代謝産物測定、ソフトウェアを用いての蛋白質 3D や機能に対する影響予測を実施する。また疾患を持たないコントロール群にバリエントが無いことも確認する。このように多角的に解析し、最終

的に多型か変異を区別する効果的手法を確立する。

< 図の説明 >

図 1：多型と変異を区別する効果的手法を確立法の流れ。

## (2) 症例のサンプル収集

今までに本申請者の所属施設で収集した本態性高血圧症、脳梗塞、心筋梗塞、糖尿病の血液検体で関連解析に使用可能なものは合計 6,000 例に及ぶ。また単一遺伝子疾患として多発性内分泌腫瘍症 1 型および 2 型は各 5 例、常染色体劣性遺伝病である Gitelman 症候群は 30 例、網膜色素線条症は 50 例を今までに収集している。これらの DNA は使用可能な状態で保存されている。これら疾患については追加して DNA 収集に取り組み、新たに血清を採取する。血液は EDTA 塩入り試験管とプレーン試験管とにとりわけ前者は DNA 抽出と血漿用、後者は血清用とする。

## (3) 症例の各遺伝子全塩基配列決定

上記単一遺伝子疾患の原因遺伝子である MEN1、RET、SLC12A3、ABCC6 遺伝子のプロモーター領域から 3' 非翻訳領域を含む遺伝子下流まで全塩基配列を次世代シーケンサーによるターゲットシーケンスにて収集された症例について決定する。

## (4) 機能に影響するかどうかの予測とコントロールサンプルでの遺伝型決定

各症例での原因遺伝子の全塩基配列決定によって検出されたバリエントでプロモーター領域、非翻訳領域、exon 領域、スプライシング部位にあるものはもとより、ソフトウェアによって遺伝子機能に影響を与える可能性があるものをすべてピックアップし、コントロールサンプルの中で臨床データから非疾患と考えられるものを 1,000 例について遺伝型決定しコントロール群に疾患群としての遺伝型が存在しないことを確認する。

## (5) ヒトの検体を用いた検討

人体の検体のうち検出できるものでタンパク質濃度測定や代謝産物測定を実施する。そしてバリエントが遺伝子機能に影響を及ぼすかどうかを判定する。特に Gitelman 症候群での尿サンプルでのタンパク質解析は遺伝型に相関を見出したとの報告があるため、血清を含めたプロテオーム解析については既存の MALDI-TOF MS 計を用いて検討する。

## (6) 分子生物学的手法を用いた検討

バリエント部位を含んだ部分を有する発現ベクターを組み込んだミニジーンコンストラクト解析、遺伝子プロモーター領域などの転写活性測定を実施し遺伝子機能に影響を及ぼすかどうかを判定する。

## (7) 発表と論文文化

本研究結果は個々人の Quality of Life に直結し、臨床遺伝学研究にとって重要なデータとなるため積極的に学会発表し、論文文化を行う。

## 4. 研究成果

本研究でのターゲットになっている疾患は単一遺伝子疾患として申請者が今まで遺伝学的検査・解析してきた常染色体優性遺伝病である多発性内分泌腫瘍症 (multiple endocrine neoplasia: MEN) 1 型および 2 型、常染色体劣性遺伝病である Gitelman 症候群、網膜色素線条症である。これら疾患について、末梢血サンプル収集が進んでいる。遠心分離機にて遠心後血漿を分離し、-70 から -80 のディープフリーザーに凍結保存していた。また同検体のパフィーコートからフェノール・クロロホルム法にてゲノム DNA を抽出した。一部の DNA は濃度調整し、今後の解析にすぐに使用可能な状態にした。各検体からの回収量は充分にあり、また分光光度計を用いた吸光度測定において DNA 純度は良好であった。

常染色体優性遺伝病である多発性内分泌腫瘍症 (multiple endocrine neoplasia: MEN) 1 型および 2 型、常染色体劣性遺伝病である Gitelman 症候群、網膜色素線条症の患者さんからの

DNA サンプルの収集を継続していき、血漿を -70 から -80 のディープフリーザーに凍結保存するとともに随時核酸抽出を進めた。同検体のバフィーコートの上清からフェノール・クロロホルム法にてゲノム DNA を抽出した。一部の DNA は濃度調整し、今後の解析にすぐに使用可能な状態にした。各検体からの回収量は充分にあり、また分光光度計を用いた吸光度測定において DNA 純度は良好であった。

遺伝学的検査の前では施設内のクライアントについては研究申請者自ら遺伝カウンセリングを実施し、クライアントのご理解を深めるよう努める。DNA 濃度を測定し、解析に使用できるように一定濃度に調整した。

まずはサンガー法によるダイレクトシーケンシングで塩基配列決定をした。新たにハプロタイプを用いた関連解析を実施できる最新のソフトウェアを準備した。ClinVar の記載を最初に参照し、Mutation Taster、PROVEAN、SIFT、ALIGN GVD、ALIGN GVD、PANTHER など web サイト上で解析できる software によって確実性を増すことに努めた。

本研究成果によって、病態に確実に影響を与えるようなバリエーション（いわゆる変異）を予測することになり貢献できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

鳴瀬 弘、久川 聡、中山 智祥: MLPA 法を用いた Gitelman 症候群のバリエーション解析、第 23 回日本遺伝子診療学会大会、イイノホール&カンファレンスセンター、東京、2016.10.6-10.8 (Oral 10.8)

中山 智祥、鳴瀬 弘: Gitelman 症候群の確定診断率調査、第 39 回日本高血圧学会総会、仙台国際センター、宮城県仙台市、2016.9.30-10.2 (Poster 10.1)

〔図書〕(計 0 件)

〔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: 羽田 明

ローマ字氏名: (HATA Akira)

所属研究機関名: 日本大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 00244541

(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。