

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15526

研究課題名(和文)小頭症を発症する遺伝性疾患の鑑別診断技術開発

研究課題名(英文)Genetic diagnosis of microcephaly

研究代表者

萩 朋男 (OGI, Tomoo)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：80508317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝性小頭症には、DNA損傷応答・DNA修復システム(DDR)の異常により発症しているケースが見られる。DDRの異常により発症する疾患には先天性小頭症を含み多くの種類が知られているが、それぞれの疾患に症状のオーバーラップが見られること、また個々の疾患が非常にまれであることから、鑑別診断が難しく、長期間診断不能となるケースも多い。我々は、DNA修復活性を精密に評価する技術と次世代ゲノム解析(全エクソーム解析、全ゲノム解析)を併用することで、遺伝性小頭症の鑑別診断技術の開発を目指した。

研究成果の概要(英文)： Primary microcephaly is partially caused by deficiencies in DNA Damage Response system (DDR system). As prevalence of these genetic disorders are very rare and the patients usually display overlapping clinical features, we often face with difficulties in the clinical diagnosis.

In this project, we aimed to develop a system helpful in the differential diagnosis of microcephaly and similar conditions. The developed system comprises next generation DNA sequencing (NGS) as well as DDR activity assays for detecting deficiencies in double strand break (DSB) repair and nucleotide excision repair (NER).

研究分野：人類遺伝学

キーワード：遺伝・先天異常学 遺伝性小頭症

## 1. 研究開始当初の背景

小頭症の発症には様々な要因（遺伝性、感染症、周産期障害など）が考えられるが、遺伝性小頭症では、DNA 損傷応答・DNA 修復システム（DNA Damage Response system: DDR）の異常を発症原因とするケースが多く含まれる。DDR の異常により発症する遺伝性疾患には多種類の疾患が知られている一方で、個別の疾患の有病率は数十万から百万人に一人程度と非常にまれであることから、症例不足による診断の難しさが問題となっている。また、それぞれの疾患の臨床所見にオーバーラップが見られることから、鑑別診断が困難であるだけでなく、誤診のリクスも高い。研究代表者らは、小頭症や低身長などが認められる遺伝性疾患である、コケイン症候群（CS-転写共役ヌクレオチド除去修復機構：TC-NER の異常）や、ゼッケル症候群（SS-DNA 損傷応答/細胞周期チェックポイントの異常）の症例収集と疾患原因遺伝子変異の同定を行いながら、新規 DDR 関連遺伝子の探索を進めていた。

研究開発当時までに、患者由来細胞を用いて TC-NER の活性を簡便かつ迅速に測定する評価法を確立していたほか、レンチウイルスを用いて野生型 TC-NER 関連因子を患者由来細胞に発現させ、欠損した TC-NER 活性の回復を指標として、疾患原因変異を持つ遺伝子を特定するウイルス相補性試験も実現していた。これらの解析法の確立により、既知のヌクレオチド除去修復（NER）関連遺伝子に関しては、DNA 修復活性評価法とサンガーシーケンス法のみで疾患原因変異の同定までを可能にした。また、次世代ゲノム解析と NER 活性を指標としたウイルス相補性試験を併用することで、NER に関連した未知の遺伝子変異の同定も可能となっていた。全エクソーム解析による疾患責任遺伝子変異の一般的な同定率は、地理的人種的に孤立した集団の家系解析あるいはトリオ解析を実施しても約3割程度と言われており、決して高くはない。我々は、次世代ゲノム解析（全エクソーム解析や全ゲノム解析）に、NER を高精度に測定する技術を組み合わせることで、疾患原因特定率の向上を目指し、TC-NER 欠損性疾患の新規疾患責任遺伝子変異同定にも成功していた。

## 2. 研究の目的

遺伝性疾患の発症原因となった DDR 経路の異常が異なる場合、増悪因子や治療方針、予後予測も大きく変わることから、疾患発症原因を正しく知ることは、患者にとって有益である。患者由来細胞を用いて DDR 活性を評価し、疾患原因となっている異常を示す経路を特定する簡便な技術の開発を目指した。また、本法をウイルス相補性試験に応用することで、疾患原因変異を持つ遺伝子を簡便に特定することが可能な方法となるよう検討した。さらに、これらの DDR 活性評価法と次世代ゲ

ノム解析を併用することで、小頭症を示す遺伝性疾患の新規あるいは機能未知の疾患原因遺伝子変異の特定をも可能にする解析方法とし、鑑別診断への応用を目指した。

## 3. 研究の方法

NER の活性評価法については、DNA 修復活性を蛍光値として換算し、蛍光画像を自動で取得・計算する精密プレートリーダーを活用することで、診断を目的とした解析にも応用可能な客観性と精度を備えることに成功した。この NER 活性評価法は、異常を持つサブパスウェイである TC-NER とゲノム全体で働く GG-NER の異常の判別も可能であり、多検体を簡便かつ迅速に比較検討することができる。本 NER 活性評価法を応用して、DNA 二重鎖切断（DSB）修復機構の活性を評価する方法の立ち上げを試みた。指標としては、目視観察の際に使用されている、DSB 誘発後に認められるリン酸化 H2AX あるいは 53BP1 の核内スポット（foci）数の変化を用いることとした。リン酸化 H2AX や 53BP1 の foci は免疫染色により蛍光画像としてとらえることができるため、自動で蛍光画像を取得する顕微鏡内蔵型のプレートリーダー装置を活用することで、多検体比較とデータの客観性の実現を目指した。

遺伝性小頭症が疑われる既存症例で、NER 活性が正常であり疾患原因が特定されていない検体について、新たに立ち上げた DSB 修復機構の活性を評価する方法を用いて、スクリーニングを実施した。また、本研究期間中にも新たに国内外より、小頭症を示す遺伝性疾患の症例収集を進めた。新たに収集された小頭症症例は、まずは NER 活性の評価を実施し、NER 関連疾患（特に CS）であるかの判定を行った後、NER が正常であった検体については、既存症例と同様に DSB 修復活性スクリーニングを進めた。DSB 修復応答に何らかの異常が見られ、新たな疾患責任遺伝子変異が原因で疾患を発症している可能性が高まった場合には、次世代ゲノム解析を実施し、疾患原因の特定を試みた。

## 4. 研究成果

DSB 修復応答を、自動蛍光画像取得装置にて評価する手技の確立に取り組んだ。指標には、顕微鏡下で DSB の変化を目視観察する際に頻繁に利用される、リン酸化 H2AX と 53BP1 の免疫染色を用いた。マルチウェルプレート上に患者由来細胞を播種して評価することで、多検体を同時比較できる方法とした。また、放射線誘発リン酸化 H2AX あるいは 53BP1 の foci を蛍光免疫染色し、自動蛍光画像取得装置にて自動的に計測・定量するシステムとすることで、客観性と観察の際の簡便性・迅速性を高めた。さらに、観察過程を自動化することで、人為的ミスの軽減により正確さが高まったほか、個人間の観察眼の差によるデータの食い違いも解消されたと考えられ

る。本評価法を使用して既知のDSB応答に異常が見られるいくつかの遺伝性疾患の患者由来の細胞を解析したところ、スクリーニングに使用可能な精度でリン酸化H2AXおよび53BP1の変化をとらえることが可能であった。さらに、本患者由来細胞にてウイルス相補性試験を試みたところ、リン酸化H2AXと53BP1いずれの指標を用いた場合でも疾患原因因子の特定が可能であった。次に、細胞周期の指標やRad51の局在変化などを使用することで、DSB修復機能のうち非相同末端結合(NHEJ)と相同組替え(HR)の活性を分離して評価することが可能であるかを検討した。使用している自動蛍光画像取得装置の性能的な限界から、各因子の染め分け方法(多重染色に使用する蛍光色素)の選択や、ポジティブ/ネガティブの境界蛍光値の決定、観察・定量にかかる時間など、いくつかの問題点が残り、目視観察と同程度の精度には達しなかったが、引き続き改良を続けたいと考えている。

遺伝性小頭症が疑われ疾患原因が未同定である症例を対象にDDRスクリーニングを実施した。本研究期間に新たに収集した症例に関しては、まずはGG-NERとTC-NERの修復活性を調査し、NER関連疾患であるかを判定した。NER欠損が認められた症例は、NER関連遺伝子に関するウイルス相補性試験を実施し、既知遺伝子の異常によるNER関連遺伝性疾患であるかの検討を行った。新たに収集した症例にはTC-NER欠損性のCSが多数含まれており、疾患原因変異の特定を完了した。新たに収集した症例および既存症例のうちNERの活性が正常であった検体に関して、DSB応答反応性に関する調査を行った。その結果、DSB応答に異常が認められるものの疾患原因変異を持つ因子が特定できない症例および、NER活性の中間的な欠損が見られる症例等が検出された。これらの症例について、次世代ゲノム解析(全エクソーム解析・全ゲノム解析)により疾患原因変異の同定を試みた。その結果、複数の症例で有力な疾患原因変異の候補が得られ、現在絞り込みを行っている。また、一部の症例では新規の疾患責任遺伝子変異を特定した。本遺伝子とDSB応答機構との関連についてはこれまでに報告がないことから、詳細な機能解析を進めている。

本研究にて、臨床診断にも応用可能なDNA損傷応答・修復活性の評価系を確立し、次世代ゲノム解析およびウイルス相補性試験を組み合わせることで、小頭症を示す疾患原因不明の症例に関して、新規の疾患関連遺伝子の同定が可能であることを示した。今後、さらに技術の改良を進めることで、より幅広い症例にも対応可能な解析方法としてゆきたいと考えている。

## 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6件)

- (1) Doi H, Koyano S, Miyatake S, Nakajima S, Nakazawa Y, Kunii M, Tomita-Katsumoto A, Oda K, Yamaguchi Y, Fukai R, Ikeda S, Kato R, Ogata K, Kubota S, Hayashi N, Takahashi K, Tada M, Tanaka K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ogi T, Aihara M, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F. Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutations. *Journal of Human Genetics*, **63**: 417-423 (2018). doi: 10.1038/s10038-017-0408-5. 査読有
- (2) Calmels N, Botta E, Jia N, Fawcett H, Nardo T, Nakazawa Y, Lanzafame M, Moriwaki S, Sugita K, Kubota M, Obringer C, Spitz MA, Stefanini M, Laugel V, Orioli D, Ogi T, Lehmann AR. Functional and clinical relevance of novel mutations in a large cohort of patients with Cockayne syndrome. *Journal of Medical Genetics*, **55**: 329-343 (2018). doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104877. 査読有
- (3) Okuda M, Nakazawa Y, Guo C, Ogi T, Nishimura Y. Common TFIIH recruitment mechanism in global genome and transcription-coupled repair subpathways. *Nucleic Acids Research*, **45**: 13043-13055 (2017). doi: 10.1093/nar/gkx970. 査読有
- (4) Iwanaga A, Okubo Y, Yozaki M, Koike Y, Kuwatsuka Y, Tomimura S, Yamamoto Y, Tamura H, Ikeda S, Maemura K, Tsuiki E, Kitaoka T, Endo Y, Mishima H, Yoshiura KI, Ogi T, Tanizaki H, Wataya-Kaneda M, Hattori T, Utani A. Analysis of clinical symptoms and ABCC6 mutations in 76 Japanese patients with pseudoxanthoma elasticum. *Journal of Dermatology*, **44**: 644-650 (2017). doi: 10.1111/1346-8138.13727. 査読有
- (5) Takahashi Y, Endo Y, Kusaka A, Nakamura S, Nakazawa Y, Ogi T, Uryu M, Tsuji M, Furue M, Moriwaki S. An XPA gene splicing mutation resulting in trace protein expression in an elderly xeroderma pigmentosum group A patient without neurological abnormalities. *British Journal of Dermatology*, **177**: 253-257 (2017). doi: 10.1111/bjd.15051. 査読有
- (6) Ono R, Masaki T, Mayca Pozo F, Nakazawa Y, Swagemakers SM, Nakano E, Sakai W, Takeuchi S, Kanda F, Ogi T, van der Spek PJ, Sugawara K, Nishigori C. A

10-year follow-up of a child with mild case of xeroderma pigmentosum complementation group D diagnosed by whole-genome sequencing. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, **32**: 174-180 (2016). doi: 10.1111/phpp.12240. 査読有

[学会発表] (計 36 件)

- (1) Ogi T. Very mild Japanese Cockayne syndrome (type-IV) cases with a N-terminal truncation mutation in the ERCC6 / CSB gene. 国際シンポジウム「早老症と関連疾患」, 2018 年
- (2) Ogi T. Human genetic disorders associated with TC-NER deficiency. 第 2 回神戸大学バイオシグナル総合研究センター国際シンポジウム, 2017 年
- (3) Jia N, Guo C, Oka Y, Nakazawa Y, Shimada M, Miyazaki H, Ogi T. Molecular pathogenesis underlying Cockayne syndrome and UV-sensitive syndrome. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
- (4) 岡泰由、中沢由華、荻朋男. マルチオミクス解析による希少遺伝性疾患発症責任因子の同定. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
- (5) 中沢由華、千住千佳子、岡泰由、嶋田繭子、宮崎仁美、郭朝万、賈楠、荻朋男. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の疾患責任遺伝子変異の探索. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
- (6) Senju C, Nakazawa Y, Ogi T. A Novel Gene Mutation of Japanese Xeroderma Pigmentosum Complementation Group F Patients. 第 40 回日本分子生物学会年会, 2017 年
- (7) Jia N, Guo C, Oka Y, Nakazawa Y, Shimada M, Miyazaki H, Ogi T. Very mild CS type-IV cases with mutations in the CSB gene. 第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2017 年
- (8) 荻朋男. DNA 損傷依存的な RNA ポリメラーゼの修飾とヒト疾患. 国立遺伝学研究所・研究集会「染色体構築と安定化を担う分子機構」, 2017 年
- (9) 荻朋男. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患の次世代マルチオミクス解析. 第 7 回名古屋大学医学系研究科・生理学研究合同シンポジウム, 2017 年
- (10) 荻朋男. ミニレクチャー「ゲノム不安定性疾患群を中心とした希少疾患の次世代マルチオミクス病態解析」. 第 12 回東海小児遺伝カンファレンス, 2017 年
- (11) Ogi T. Very mild CS type-IV cases with mutation in the CSB gene. Cockayne Syndrome Meeting. 2017 年
- (12) Ogi T. Human genetics disorders associated with DNA repair deficiency. 6th US-Japan DNA Repair Meeting, 2017 年
- (13) Oka Y, Nakazawa Y, Ogi T. Identification of pathogenic mutations in patients with rare diseases using multi-omics analysis. 日本プロテオーム学会 2017 年大会, 2017 年
- (14) 中沢由華、賈楠、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子、郭朝万、岡泰由、荻朋男. DNA 修復機構欠損性疾患の病態解明研究. 第 2 回放射線災害・医科学研究拠点カンファレンス, 2017 年
- (15) 荻朋男. DNA 修復機構の異常と疾患. 太陽紫外線防御研究委員会第 27 回シンポジウム, 2017 年
- (16) 荻朋男. DNA 修復・損傷応答機構の異常により発症する疾患の病態解明. 奈良先端科学技術大学院大学ワークショップ, 2017 年
- (17) Ogi T. Human genetic disorders associated with deficiencies in the DNA repair system. International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017, 2017 年
- (18) 荻朋男. DNA 修復システムの異常により発症するヒト疾患の分子病態. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- (19) 中沢由華、岡泰由、郭朝万、賈楠、唐田清伸、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の病態解析と新規疾患責任遺伝子変異探索. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- (20) 賈楠、中沢由華、郭朝万、唐田清伸、岡泰由、嶋田繭子、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男. コケイン症候群と紫外線高感受性症候群の分子病態解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- (21) 郭朝万、中沢由華、嶋田繭子、唐田清伸、賈楠、岡泰由、宮崎仁美、千住千佳子、荻朋男. TC-NER 因子 UVSSA による RNA ポリメラーゼ II のユビキチン化に関する分子機能解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- (22) 岡泰由、郭朝万、賈楠、唐田清伸、中沢由華、荻朋男. トランスオミクス解析を用いた希少遺伝性疾患原因因子の新規同定法の開発. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
- (23) 荻朋男. DNA 修復システムの異常とゲノム DNA の不安定化により発症する疾患の分子病態. 第 42 回北里医学学会総会, 2016 年
- (24) Ogi T. Human genetic disorders associated with deficiencies in the DNA repair system. 上海交通大学医学院附属上海新華医院セミナー, 2016 年
- (25) 荻朋男. 新規の DNA 修復因子 WDR4 の欠損により発症する小頭症症例の分子病

態. 国立遺伝学研究所・研究集会「生物ゲノム安定維持の分子機構」, 2016年

- (26) 荻朋男. ヒト WDR4 遺伝子の先天性異常はゲノム不安定性に起因する発育異常を誘発する. 第75回日本癌学会学術総会, 2016年
- (27) 荻朋男. DNA修復の異常により発症するゲノム不安定性疾患の分子病態解明研究. 東北大学学際科学フロンティア研究所 第1回ワークショップ「多様な核酸サイエンス」, 2016年
- (28) 荻朋男. ゲノム不安定性により先天性小頭症を示すヒト遺伝性疾患の症例解析と病態解明研究. 日本遺伝学会第88回大会, 2016年
- (29) 荻朋男. DNA損傷応答と遺伝病疾患. 平成28年度若手放射線生物学研究会専門研究会, 2016年
- (30) 荻朋男. 次世代マルチオミクス解析を用いた希少性難治性遺伝性疾患原因因子の新規同定法の開発. 第29回バイオメディカル分析化学シンポジウム ランチョンセミナー, 2016年
- (31) 荻朋男. Human genetic disorders associated with deficiencies in the DNA repair system. 京都大学放射線生物研究センター第32回国際シンポジウム” Growing Edge of Radiation Biology, from principles to applications”, 2016年
- (32) 荻朋男. 次世代ゲノム解析と精密質量分析を基盤としたマルチオミクスデータの臨床診断へ応用. サーマフィッシュャーサイエンティフィック 質量分析フォーラム2016, 2016年
- (33) 荻朋男. コケイン症候群のゲノム診断. 日本コケイン症候群ネットワーク勉強会, 2016年
- (34) Ogi T. New DNA-repair gene mutations associated with Cockayne syndrome like progeroid disorders. 2016 Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology The 15th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting, 2016年
- (35) 荻朋男. ハイコンテントイメージングシステムを利用した難治性遺伝性疾患の臨床診断. サーマフィッシュャーサイエンティフィック バイオサイエンス事業本部 2016HCA ユーザーミーティング, 2016年
- (36) Ogi T. Genetics disorders associated with defects in transcription coupled nucleotide excision repair. 10th Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease, 2016年

[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

荻 朋男 (OGI, Tomoo)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号: 80508317

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし