

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10119

研究課題名(和文) 乳幼児・小児の原因不明突然死剖検例の網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文) Investigating the Genetic Causes of Sudden Unexpected Death in infants and children.

研究代表者

畑 由紀子 (Hata, Yukiko)

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：30311674

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)：乳幼児突然死症候群(SIDS)および小児突然死(SUDC)と診断された29症例(男性19および女性10、1-13歳、1歳未満は16症例、1歳以上は13症例)について、次世代シーケンス(NGS)解析を実施、表現型に強い影響を与える変異体のみを考慮して解析を行った。その結果、9つの遺伝子における3つの既知の病原性バリエーションと7つの未知の病原性バリエーションが29例中7例で同定された。このうち4例はてんかん性脳症関連遺伝子に、1例は心筋症関連遺伝子に病原性バリエーションを検出した。今回の遺伝子解析では、5例(17.2%)に突然死に関与したと考えられる4つの遺伝子に病原性バリエーションを特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳幼児、小児の突然死は生前無症候で、突然死が初発症状となる場合も少なくないため、患者本人の不幸だけでなく、家族にとっても悲劇的な事態となる。本研究により、乳幼児、小児の原因不明の突然死の遺伝的な背景を詳細に解析することで診断精度の向上が見込まれる。これを基にした乳幼児、小児の突然死予防の取り組みの遂行及び突然死の病態解明が進捗することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed next-generation sequencing (NGS) analysis in 29 sudden infant death syndrome (SIDS) and sudden unexplained death in childhood (SUDC) cases (19 men and 10 women; age 1-13 years, under 1-year-old; 16 cases, over 1-year-old; 13 cases) to identify causal variants in disease-associated genes. Here, we forced simply on obvious pathogenic variants that could increase the power by only considering variants with strong effects on phenotypes. Three known pathogenic variants and 7 unknown pathogenic variants in 9 genes were identified in 7 of the 29 cases. In four cases, heterozygous pathogenic variants in epileptic encephalopathy-related genes were detected. In one case, a pathogenic variant was detected in the cardiomyopathy-related gene. We identified molecular diagnoses in 5 of 29 cases (17.2%) involving 4 genes that have been implicated in sudden death.

研究分野：法医学

キーワード：Sudden unexplained death Autopsy Infants and children Exome sequence

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の死亡者数は約 130 万人/年で、そのうち 5 万人/年が心臓突然死していると推定される。一方、本邦全死亡者の約 15%が異状死体として発見され、法医学分野で解剖、検索されるが、その半数は最終的に病死と判断され、心臓突然死の頻度が最も高い。心臓突然死の剖検において多くの場合、心臓に器質的異常を認めるのが一般的である。しかし、心臓に明らかな構造異常を認めず(Structurally Normal Heart)、解剖所見及び病理組織学的検査による診断、薬物スクリーニング、生前の病歴、死亡時の状況調査を考慮しても、明確な死因を特定できない SUD と診断せざるを得ない症例も一定の割合で存在する。

一方、1 才未満の乳児の原因が明らかにならない突然死については、Sudden Unexplained Death in Infancy(SUDI)と定義され、乳幼児突然死症候群(Sudden Infant Death Syndrome; SIDS)が含まれる概念と考えられる。SUDI は未だその原因が明確ではなく多因子説が唱えられており、いくつかのリスク要因が示唆されている。そのうちの内因性要因には、刺激伝導系の形態異常(Forensic Sci Int 1998,93,143-54, Pediatr Cardiol 1994,15,139-42)、脂肪酸代謝異常(Circulation 1990,100,2248-53)、徐脈や無呼吸(JAMA 2001,285,2199-207, Pediatrics 1994,93,44-9)などの関与が報告されている。

法医学領域において、近年、欧米を中心に SUD 剖検例に対して、死因究明を目的とした遺伝性心疾患関連遺伝子の遺伝子解析、すなわち molecular autopsy が試みられるようになり、発症年齢別に層別化され解析されている。これまで青壮年や小児の SUD 症例においては、主にチャネル異常症に関連する遺伝子異常の関与が報告されている(JACC 2017,69,2134-45, N Engl J Med 2016, 374,2442-52, Eur Heart J 2015,36,1290-6)。また、SUDI 症例においても、チャネル遺伝子異常の関与が報告されている(J Mol Cell Cardiol 2008,44,571-81, Pediatr Cardiol 2009,30,502-9, Heart Rhythm 2007,4,733-9)が、どの年齢層よりも少なく数%に留まる。いずれの年齢層においても LQTS, BrS, CPVT に関連するチャネル遺伝子変異は見つかっているものの、その頻度は高く 20%程度と必ずしも多いとは言えない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、乳幼児・小児の SUD 剖検例の死因究明・病態解明を行うことである。具体的には、乳幼児・小児の SUD 剖検例について、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を施行し、既知の遺伝子異常の診断や新規疾患遺伝子の発見、これら遺伝子異常から致死性不整脈に至る病態の解明を目指した研究を行うものである。

我が国では、乳幼児・小児の SUD 症例の心筋症及びチャネル異常症などを含む遺伝性心疾患の原因遺伝子について網羅的な遺伝子変異解析を行った報告はない。本研究では、チャネル異常症や心筋症関連遺伝子に加え、心臓発生に関与する転写因子、脂質代謝異常症やてんかん関連遺伝子についても行う。解析対象に心疾患関連遺伝子のみならず、心疾患以外の疾患関連遺伝子も加えることにより、乳幼児・小児の SUD 症例の包括的に遺伝的背景を理解することが可能になる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 法医学剖検例から症例の抽出

剖検執刀医西田のもと、死亡時の状況、解剖及び解剖後の検査（薬物など）から乳幼児・小児の SUD 症例を抽出した。

#### (2) 肉眼所見及び病理組織学的所見

肉眼観察の後、心臓の病理組織検体は、Fig. 2 に示す乳頭筋レベルの左右心室横断面すべて及び洞房結節や房室結節-His 束など刺激伝導系の標本を作製した。冠状動脈に関しては、心外膜下冠状動脈の剖出及び横断切片の標本を作製した。脳の病理組織検体は、大脳は前額断、小脳は傍矢状断、脳幹は水平断し、前頭葉、頭頂葉、側坐核、中心前回、側頭葉、基底核、扁桃体、視床、海馬、海馬傍回、内嗅皮質、移行内嗅皮質、後頭葉、小脳皮質、歯状核、中脳、橋、延髄、嗅球の標本を作製した。その他の臓器に関しては、最低 2 か所以上の標本を作成した。これらすべてから病理組織学的所見をまとめる。

#### (3) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

剖検時あらかじめ採取した症例の血液から DNA を抽出し、チャンネル異常症、心筋症に関連する遺伝子のエクソン部位をターゲットにしたパネル AmpliSeq™プライマーを用いて、次世代シーケンサー解析を行う。病原性バリエーションが同定されなかった症例に関しては Agilent technologies 社の SureSelect Human All Exon V6 パネルを用いて全エクソーム解析を行う。

次世代シーケンス解析後、信頼性の高いバリエーション (call quality $\geq$ 50, read depth $\geq$ 15, allele fraction $\geq$ 35) を抽出、ヒト疾患における表現型の異常を記述する Human Phenotype Ontology (HPO) 語彙を用いた疾患関連遺伝子の抽出、日本人の健常人の頻度データベース ToMMo, Human Genetic Variation Database を用いた稀少変異 (頻度 1%以下) の抽出、病的意義のある変異の抽出、疾患のデータベース ClinVar の検索、米国臨床遺伝・ゲノム学会の病原評価基準 (ACMG ガイドライン) に従って評価を行った。また、バリエーションは遺伝子ごとに HPO や Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) などを用いて遺伝形式及び疾患別に分類し評価した。また、検出されたバリエーションはすべてサンガーシーケンスによる変異の確認を行った。

スプライシングバリエーションについて、*in silico*解析として 4 種のスプライシング予測プログラム SpliceSiteFinder, MaxEnt, GeneSplicer および NNSPLICE を用いた。機能解析は、HEK293T 細胞を用いた mini-gene assay を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) Dravet syndrome の 2 剖検例

Dravet syndrome (DS) は、まれならず突然死を来すことが知られているが、神経病理学的所見を含む剖検例の報告は少ない。症例 1: de novo の新規変異 (SCN1A\_Arg187Pro)。症例 2: 遺伝子検索にて intron 23 に de novo の新規変異 (SCN1A\_c.4477-3T>C) を認め、minigene

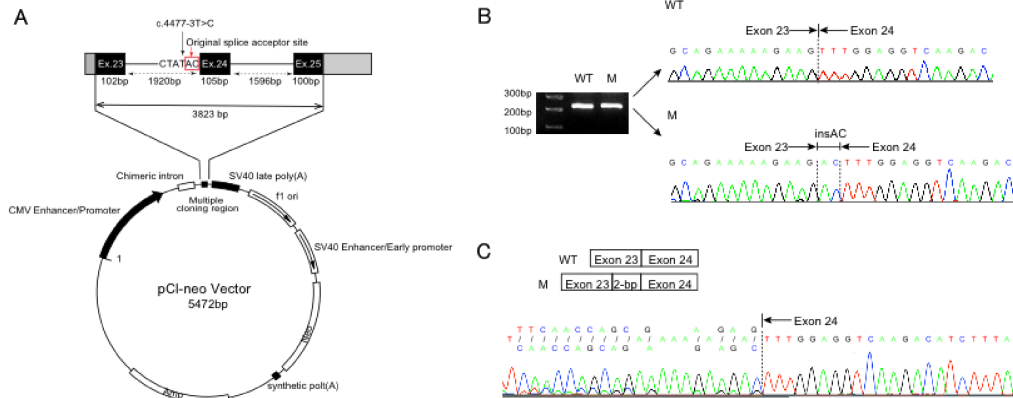
splicing functional assayにて2塩基挿入による frameshift であった。両例ともに死亡前には比較的良好に発作がコントロールされていたと考えられるが、体温上昇にともなう発作に関連して死亡したと考えられた。両例ともに MCD を始めとする中枢神経の器質的異常は不明確であり、遺伝子診断が重要と考えられた (Brain Dev 2020)。

症例2\_SCN1A\_c.4477-3T>C

スプライシングの *in silico* 解析では、予測結果なしであった。Mini-gene assayでは、2塩基挿入を認め、結果的にframeshiftとなるとみられる。

Table 1 Computed splicing prediction.

# locus	gene	transcript	location	Computed splicing prediction Reference / Mutated			
				SpliceSiteFinder [0-100]	MaxEntScan [0-12]	GeneSplicer [0-24]	NNSPLICE [0-1]
chr2:166852630	SCN1A	NM_001165963.1	c.4477-3T>C	- / -	- / -	- / -	- / -



(2) SIDS 例に認めたスプライシングサイト変異の mini-gene assay による機能解析

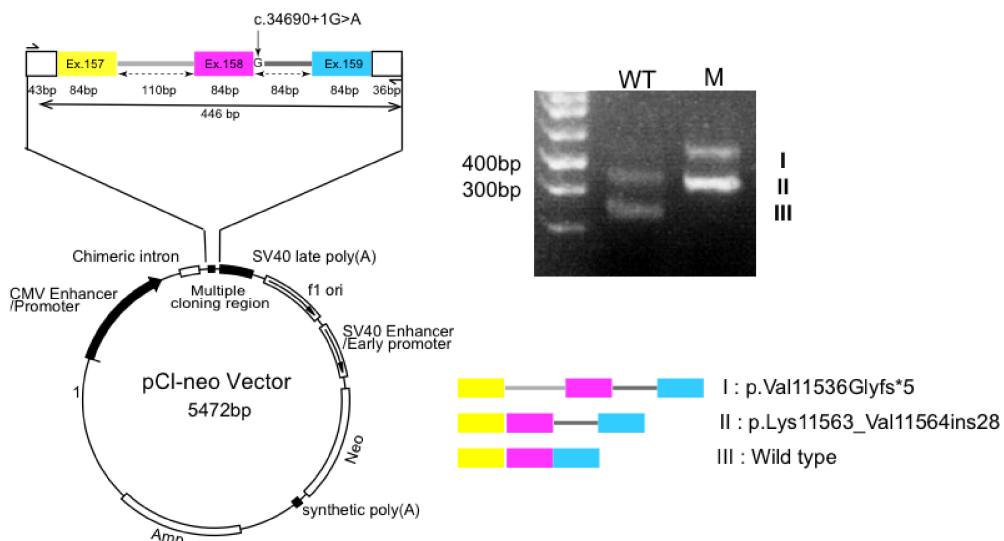
TTN\_c.34690+1G>A のスプライシングバリエーションは、*in silico* 解析では、exon skipping を予測、Mini-gene assay では、イントロンの保持を含む 2 種類の alternative splicing (in-frame insertion 及び frameshift) を認め予測とは異なる結果であった。変異によるスプライシングの影響を正確に把握する上で mini-gene assay を用いた機能解析は、簡単なアプローチであり、機能的および臨床分類のツールになりうることを示した (第 104 次日本法医学会)。

TTN\_c.34690+1G>A

スプライシングの *in silico* 解析では、予測される変化は100%、付近に予測サイトがないことから exon skipping と予測される。Mini-gene assay では、イントロンの保持を含む2種類のalternative splicingを認め、結果的にin-frame insertion及びframeshiftになるとみられる。

Table 1 Computed splicing prediction.

# locus	gene	transcript	location	Computed splicing prediction Reference / Mutated			
				SpliceSiteFinder [0-100]	MaxEntScan [0-12]	GeneSplicer [0-24]	NNSPLICE [0-1]
chr2:179516990	TTN	NM_001256850.1	c.34690+1G>A	71.7 / -	7.1 / -	1.4 / -	0.9 / -



### (3) カスタム AmpliSeq™ パネルで病原性バリエントが同定されなかった症例の全エクソーム解析

表現型に強い影響を与える変異体のみを考慮して解析を行ったところ、2例はてんかん性脳症関連遺伝子に、1例は心筋症関連遺伝子に病原性バリエントを検出した。今回の遺伝子解析では、5例（17.2%）に突然死に関与したと考えられる4つの遺伝子に病原性バリエントを特定した。網羅的な遺伝子解析は、乳幼児・小児の原因不明の突然死の遺伝的背景を評価するために診断的な有用性が示された。しかし、多くの症例で遺伝的原因は不明のままである。今後は、症例の蓄積を行った上での統計解析、バリエントの機能解析など更なる検討が必要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hata Yukiko, Ichimata Shojiro, Nishida Naoki	4. 巻 53
2. 論文標題 Two autopsy cases with injuries to the stomach following cardiopulmonary resuscitation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 101916 ~ 101916
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2021.101916	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirono K, Hata Y, Miyao N, Okabe M, Takarada S, Nakaoka H, Ibuki K, Ozawa S, Origasa H, Nishida N, Ichida F.	4. 巻 13
2. 論文標題 Increased Burden of Ion Channel Gene Variants Is Related to Distinct Phenotypes in Pediatric Patients With Left Ventricular Noncompaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 e002940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCGEN.119.002940	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyao Nariaki, Hata Yukiko, Izumi Hironori, Nagaoka Ryo, Oku Yuko, Takasaki Ichiro, Ishikawa Taisuke, Takarada Shinya, Okabe Mako, Nakaoka Hideyuki, Ibuki Keijiro, Ozawa Sayaka, Yoshida Tomoyuki, Hasegawa Hideyuki, Makita Naomasa, Nishida Naoki, Mori Hisashi, Ichida Fukiko, Hirono Keiichi	4. 巻 15
2. 論文標題 TBX5 R264K acts as a modifier to develop dilated cardiomyopathy in mice independently of T-box pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0227393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hata Yukiko, Oku Yuko, Taneichi Hiromichi, Tanaka Tomomi, Igarashi Noboru, Niida Yo, Nishida Naoki	4. 巻 42
2. 論文標題 Two autopsy cases of sudden unexpected death from Dravet syndrome with novel de novo SCN1A variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 171 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2019.10.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hata Yukiko, Hirono Keiichi, Yamaguchi Yoshiaki, Ichida Fukiko, Oku Yuko, Nishida Naoki	4. 巻 32
2. 論文標題 Minimal inflammatory foci of unknown etiology may be a tentative sign of early stage inherited cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 1281 ~ 1290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41379-019-0274-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hata Yukiko, Ichimata Shojiro, Yamaguchi Yoshiaki, Hirono Keiichi, Oku Yuko, Ichida Fukiko, Nishida Naoki	4. 巻 8
2. 論文標題 Clinicopathological and Genetic Profiles of Cases with Myocytes Disarray? Investigation for Establishing the Autopsy Diagnostic Criteria for Hypertrophic Cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 463 ~ 463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8040463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama R, Kinoshita K, Hata Y, Abe M, Matsuoka K, Hirono K, Kano M, Nakazawa M, Ichida F, Nishida N, Tabata T.	4. 巻 33
2. 論文標題 A mutant HCN4 channel in a family with bradycardia, left bundle branch block, and left ventricular noncompaction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart Vessels	6. 最初と最後の頁 802-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-018-1116-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirono K, Hata Y, Nakazawa M, Momoi N, Tsuji T, Matsuoka T, Ayusawa M, Abe Y, Hayashi T, Tsujii N, Abe T, Sakaguchi H, Wang C, Takasaki A, Takarada S, Okabe M, Miyao N, Nakaoka H, Ibuki K, Saito K, Ozawa S, Nishida N, Bowles NI, Ichida F.	4. 巻 82
2. 論文標題 Clinical and echocardiographic impact of TAZ gene variants on the DCM phenotype of LVNC patients during early infancy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 2609-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-0470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takasaki A, Hirono K, Hata Y, Chang B, Wang, C, Nakaoka H, Miyao N, Ibuki K, Ozawa S, Sekine M, Yoshimura N, Nishida N, Adachi Y, Bowles NE, Ichida F.	4. 巻 84
2. 論文標題 Sarcomere gene variants act as a genetic trigger underlining the development of left ventricular noncompaction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Res	6. 最初と最後の頁 733-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41390-018-0162-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西田尚樹, 畑由紀子, 一萬田正二郎.
2. 発表標題 Two autopsy cases of sudden unexpected death from Dravet syndrome with novel de novo SCN1A variants.
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畑由紀子, 一萬田正二郎, 西田尚樹
2. 発表標題 原因不明の突然死症例に認めたスプライス変異のmini-gene assayを用いた機能解析.
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田尚樹, 畑由紀子, 一萬田正二郎.
2. 発表標題 神経疾患を伴う小児焼死剖検例.
3. 学会等名 第42回日本法医学会学術中部地方会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 西田尚樹, 畑由紀子, 一萬田正二郎.
2. 発表標題 Titin遺伝子のsplice site variantを認めた若年者突然死の1剖検例.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畑由紀子, 廣野恵一, 山口由明, 市田落子, 奥祐子, 一萬田正二郎, 西田尚樹.
2. 発表標題 心筋内微小炎症細胞湿潤巣は遺伝性心筋症の初期病変である.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畑由紀子, 一萬田正二郎, 小野塚昇, 西田尚樹
2. 発表標題 Sudden unexpected death with rare compound heterozygous variants in PRICKLE1.
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田尚樹, 畑由紀子, 一萬田正二郎.
2. 発表標題 Two autopsy cases of sudden unexpected death with Dravet syndrome related to novel de novo SCN1A variants.
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hata Y, Nishida N, Hirono K, Yamaguchi Y, Ichida F.
2. 発表標題 Non-ischemic minimal lesions in the heart may predict to have cardiomyopathy-related genetic variants.
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (IALM) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hata Y, Yamaguchi Y, Hirono K, Ichida F, Nishida N.
2. 発表標題 Non-ischemic minimal lesions in the heart may predict to have early inherited cardiomyopathy with arrhythmogenic potential.
3. 学会等名 第65回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西田尚樹, 畑由紀子
2. 発表標題 心臓突然死のmolecular autopsy
3. 学会等名 第66回日本心臓病学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

富山大学大学院医学薬学研究部 (医学系) 法医学講座 研究業績  
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/legal/publications.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	西田 尚樹  (Nishida Naoki)  (10315088)	富山大学・学術研究部医学系・教授     (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関