

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15863

研究課題名(和文) 新規疾患変異・染色体異常同定ツールを用いたミトコンドリア心筋症の診断率向上

研究課題名(英文) Improvement of diagnostic rate of mitochondrial cardiomyopathy by novel statistical approaches

研究代表者

岡崎 敦子(今井敦子)(Okazaki, Atsuko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70761691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的遺伝子解析を用いたミトコンドリア心筋症の診断率向上を目的として、申請者が開発した新規遺伝統計手法である常染色体劣性疾患変異の同定ツール(Hamming Distance Ratio: HDR法)および同ツールを応用した染色体構造異常同定ツール(HDR-del法)を用いて、計46症例のミトコンドリア心筋症例における核DNA・ミトコンドリアDNA上の疾患変異・染色体構造異常の同定に成功した。さらに原因遺伝子を同定したミトコンドリア病223症例の中で、心筋症合併例は心筋症非合併例と比較して予後不良であり、肥大型心筋症に新生児発症、染色体構造異常が合併すると特に予後が悪い事実を発見し報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリア心筋症はミトコンドリア病の中でも特に生命予後が悪く、小児例では約80%が主に心不全で死亡する重度の高い疾患である。核遺伝子・ミトコンドリアDNAどちらの遺伝子異常でも生じ、また染色体構造異常によっても発症するため、迅速かつ網羅的な遺伝子診断法の確立が望まれていた。申請者が開発した遺伝統計を用いた新規疾患変異・染色体異常同定ツールを活用し、ミトコンドリア心筋症の診断率向上を達成した。

研究成果の概要(英文)：I developed novel statistical genetics methods to identify variants located in segments of identity-by-descent and chromosomal deletions by using Hamming Distance Ratio (HDR). By applying those methods, I succeeded in identifying genetic variants in 46 mitochondrial cardiomyopathy patients. Among 223 consecutive pediatric mitochondrial disease patients aged <18 years with a confirmed genetic diagnosis including 46 cardiomyopathy patients, The overall survival rate was significantly lower in patients with cardiomyopathy than in those without ($p<0.001$, log-rank test). By multivariable analysis, left ventricular (LV) hypertrophy (HR=4.6; 95% CI: 2.8-7.3), neonatal onset (HR=2.9; 95% CI: 1.8-4.5) and chromosomal aberrations (HR=2.9; 95% CI: 1.3-6.5) were independent predictors of all-cause mortality. Patients with LV hypertrophy with neonatal onset and/or chromosomal aberrations had higher mortality (100% in 21 patients) than those with LV hypertrophy alone (71% in 14 patients).

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア病 遺伝統計学 心筋症 網羅的遺伝子解析 ミトコンドリア心筋症

1. 研究開始当初の背景

本研究は、申請者が新規開発した疾患変異・染色体異常同定ツール (HDR 法・HDR-del 法) を用いたミトコンドリア心筋症の診断率向上を目的とする。ミトコンドリア心筋症はミトコンドリア DNA、核遺伝子、染色体構造いずれの異常によっても発症し、近年の網羅的遺伝子検査を用いてもこれらを同時に検出する方法が確立していないため診断が困難である。申請者はこれらの異常を同時に検出するバイオインフォマティクス解析手法を確立し、これまでにミトコンドリア心筋症 46 例中 21 例で原因同定に成功した。さらに新規の遺伝統計手法 (HDR 法・HDR-del 法) を開発し、原因未同定の 25 例中 15 例で疾患候補の同定に成功している。

2. 研究の目的

本研究では、独自に開発した遺伝統計学的手法 (HDR 法・HDR-del 法) を用いて疾患候補の同定に成功しているミトコンドリア心筋症 15 例に対して、候補変異に応じた機能解析を行い、従来の網羅的遺伝子解析が見逃してきたミトコンドリア心筋症の診断率向上を目指す。具体的には、
 (1) 染色体異常候補を同定済みの 3 例：SNP-Chip によるアレイ解析を行い染色体欠失を同定
 (2) ヘテロ変異候補を同定済みの 7 例：全ゲノム/RNA シーケンスを行いエクソン外変異を検出
 (3) ホモ/複合ヘテロ変異候補を同定済みの 5 例：発現解析及び心筋での蛋白消失を確認

3. 研究の方法

解析(1)染色体異常候補 3 例に対する SNP-Chip を用いたアレイ解析による染色体構造異常同定
 HDR-del 法で染色体異常候補を同定した 3 例に対して、これまでに申請者が 4 例の遺伝性疾患家系の染色体構造異常の同定に成功した、確立済みの SNP-Chip を用いたアレイ解析の実験系 (*Hum Mutat.* 2017) を用いて疾患原因となる染色体構造異常を同定する。

解析(2)ヘテロ変異候補 7 例に対する全ゲノム/RNA シーケンスを用いた新規変異の同定

申請者はこれまでに以下の 7 例の若年発症の重症ミトコンドリア心筋症例において、開発したバイオインフォマティクス解析手法を用いて、7 遺伝子の新規ヘテロ変異の同定に成功している。これらの遺伝子はいずれもミトコンドリアの構造・機能に関わるが、これまで心筋症との関連は証明されていないものがほとんどである。若年発症の重症ミトコンドリア心筋症は同一遺伝子内のホモ変異および複合ヘテロ変異により発症するとされており、これらの遺伝子内のエクソーム解析では検出されないエクソン外領域の変異に対してプライス変異を含めて全ゲノム/RNA シーケンスにより探索し、心筋症の新規原因遺伝子の同定を目指す。

解析(3)ホモ/複合ヘテロ変異候補 5 例に対する発現解析・心筋での蛋白実験による病原性証明

申請者は発現解析および心筋での蛋白消失を証明する実験系を用いて、これまで 3 例の心筋症例において新規の機能喪失型変異の病原性の証明に成功してきた (*Int J Cardiol.* 2016)。確立済みの同手法を用いて、ホモ/複合ヘテロ変異候補を同定した 5 例に対して、新規変異の病原性の証明を行う。

4. 研究成果

網羅的遺伝子解析を用いたミトコンドリア心筋症の診断率向上を目的として、申請者が新規開発した常染色体劣性疾患変異の同定ツール (Hamming Distance Ratio: HDR 法) および同ツールを応用した染色体構造異常同定ツール (HDR-del 法) を用いて、計 46 症例のミトコンドリア心筋症例における核 DNA・ミトコンドリア DNA 上の疾患変異・染色体構造異常の同定および変異の病原性に対する各種証明実験に成功し (図 1)、さらにミトコンドリア DNA 変異症例においては心筋における高変異率 (ヘテロプラスミー率) を証明した (図 2)。

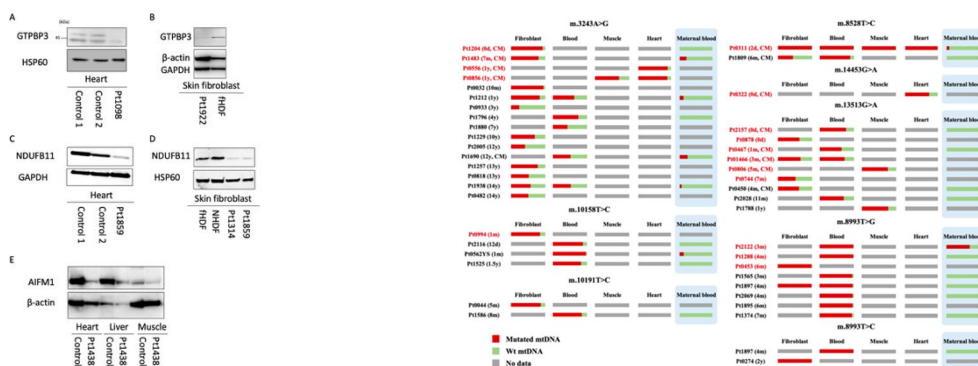


図 1: 新規疾患変異の病原性の証明例 図 2: 心筋におけるミトコンドリア DNA 高変異率の証明
 さらにミトコンドリア病 137 症例の中で心筋症患者は特に予後不良であるという前年度の論文

発表内容をさらに発展させ、原因遺伝子を同定したミトコンドリア病 223 症例の中で、心筋症合併例は 22%と高率であり心筋症非合併例と比較して予後不良である事実を証明し(図 3)、肥大型心筋症に新生児発症、染色体構造異常が合併すると特に予後が悪い事実を発見し報告した(図 4) (*Int J Cardiol.* 2021)。

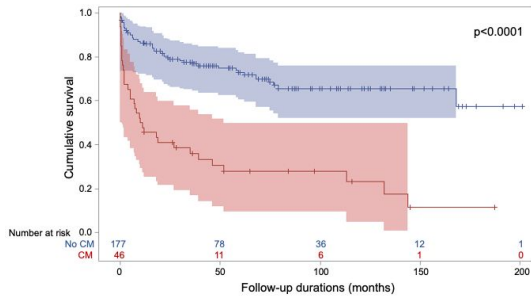
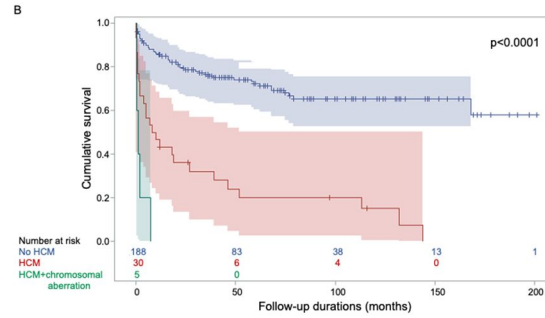
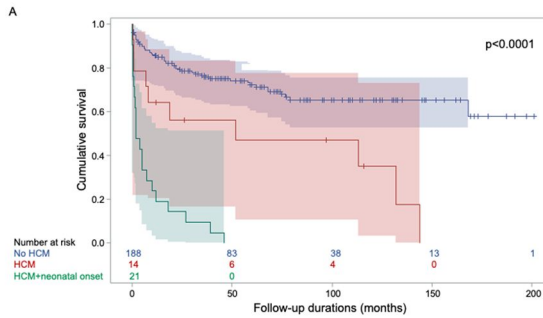


図 3 (左): 心筋症合併例 (赤) と心筋症非合併例 (青) の生存曲線

図 4 (下): 肥大型心筋症に新生児発症合併例 (左図の緑)、染色体構造異常合併例 (右図の緑) の生存曲線



さらに肥大型心筋症に対してミトコンドリア機能を上げると期待される新規薬剤の効果を証明し、特許申請を行った (特願 2021-009754)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Atsuko Imai-Okazaki, Ayako Matsunaga, Yukiko Yatsuka, Kazuhiro R. Nitta, Yoshihito Kishita, Ayumu Sugiura, Yohei Sugiyama, Takuya Fushimi, Masaru Shimura, Keiko Ichimoto, Makiko Tajika, Minako Tominaga, Tomohiro Ebihara, Tetsuro Matsunashi, Tomoko Tsuruoka, Masakazu Kohda, Tomoko Hirata, Hiroko Harashima et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Long-term prognosis and genetic background of cardiomyopathy in 223 paediatric mitochondrial disease patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Cardiol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Okazaki A, Yamazaki S, Inoue I, Ott J.	4. 巻 140
2. 論文標題 Population genetics: past, present, and future	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 231-240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00439-020-02208-5	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 該当する

1. 著者名 Frazier AE, Compton AG, Kishita Y, Hock DH, Welch AE, Amarasekera SSC, Rius R, Formosa LE, Imai-Okazaki A et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Fatal perinatal mitochondrial cardiac failure caused by recurrent de novo duplications in the ATAD3 locus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Med	6. 最初と最後の頁 49-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.medj.2020.06.004.	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 該当する

1. 著者名 Imai-Okazaki A, Yagi N, Nitta KR, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical heterogeneity in patients with m.4412G>A MT-TM mutation and different heteroplasmy levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mito.2021.06.001.	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 Imai-Okazaki A, Li Y, Horpaopan S, Riazalhosseini Y, Garshasbi M, Mosse YP, Zhang D, Schrauwen I, Sharma A, Fann CSJ, Leal SM, Lathrop M, Ott J.	4. 巻 40
2. 論文標題 Heterozygosity mapping for human dominant trait variants.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Mutat.	6. 最初と最後の頁 996-1004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.23765	査読の有無 無
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 Hodatsu A, Fujino N, Uyama Y, Tsukamoto O, Imai-Okazaki A, Yamazaki S, Seguchi O, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S, Yamagishi M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Impact of Cardiac Myosin Light Chain Kinase Gene Mutation on Development of Dilated Cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ESC Heart Fail.	6. 最初と最後の頁 406-415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.12410.	査読の有無 無
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 Ogawa E, Fushimi T, Ogawa-Tominaga M, Shimura M, Tajika M, Ichimoto K, Matsunaga A, Tsuruoka T, Ishige M, Fuchigami T, Yamazaki T, Kishita Y, Kohda M, Imai-Okazaki A, Okazaki Y, Morioka I, Ohtake A, Murayama K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Mortality of Japanese Patients With Leigh Syndrome: Effects of Age at Onset and Genetic Diagnosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Inherit Metab Dis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jimd.12218	査読の有無 無
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 Imai Okazaki A, Li Y, Horpaopan S, Riazalhosseini Y, Garshasbi M, Mosse YP, Zhang D, Schrauwen I, Sharma A, Fann CS, Leal SM, Lathrop M, Ott J	4. 巻 40
2. 論文標題 Heterozygosity mapping for human dominant trait variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Mutat	6. 最初と最後の頁 996-1004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.23765	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 該当する

1. 著者名 Imai-Okazaki A, Kishita Y, Kohda M, Mizuno Y, Fushimi T, Matsunaga A, Yatsuka Y, Hirata T, Harashima H, Takeda A, Nakaya A, Sakata Y, Kogaki S, Ohtake A, Murayama K, Okazaki Y.	4. 巻 279
2. 論文標題 Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease: Prognosis and genetic background.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Cardiol	6. 最初と最後の頁 115-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2019.01.017	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 Takeda A, Murayama K, Okazaki Y, Imai-Okazaki A, Ohtake A, Takakuwa E, Yamazawa H, Izumi G, Abe J, Nagai A, Taniguchi K, Sasaki D, Tsujioka T, Basgen JM.	4. 巻 74
2. 論文標題 Advanced pathological study for definite diagnosis of mitochondrial cardiomyopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Pathol	6. 最初と最後の頁 365-371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206801.	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 該当する

1. 著者名 Imai-Okazaki A, Kishita Y, Kohda M, Yatsuka Y, Hirata T, Mizuno Y, Harashima H, Hirono K, Ichida F, Noguchi A, Yoshida M, Tokorodani C, Nishiuchi R, Takeda A, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y.	4. 巻 193
2. 論文標題 Barth Syndrome: Different Approaches to Diagnosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr.	6. 最初と最後の頁 256-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpeds.2017.09.075.	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 Kishita Y, Shimura M, Kohda M, Akita M, Imai-Okazaki A, Yatsuka Y, Nakajima Y, Ito T, Ohtake A, Murayama K, Okazaki Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 A novel homozygous variant in MICOS13/QIL1 causes hepato-encephalopathy with mitochondrial DNA depletion syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Genet Genomic Med	6. 最初と最後の頁 e1427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.1427	査読の有無 無
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 Borna NN, Kishita Y, Abe J, Furukawa T, Ogawa-Tominaga M, Fushimi T, Imai-Okazaki A, Takeda A, Ohtake A, Murayama K, Okazaki Y.	4. 巻 143
2. 論文標題 NAD(P)HX dehydratase protein-truncating mutations are associated with neurodevelopmental disorder exacerbated by acute illness	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 e54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awaa130.	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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Atsuko Imai-Okazaki, Yoshihito Kishita, Masakazu Kohda, Yosuke Mizuno, Takuya Fushimi, Ayako Matsunaga, Yukiko Yatsuka, Tomoko Hirata, Hiroko Harashima, Atsuhito Takeda, Akihiro Nakaya, Yasushi Sakata, Shigetoyo Kogaki, Akira Ohtake, Kei Murayama, Yasushi Okazaki
2. 発表標題 Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease: prognosis and genetic background
3. 学会等名 2019 ACMG annual clinical genetics meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuko Imai-Okazaki
2. 発表標題 Cost-effective clinical sequencing platform: from screening mitochondrial DNA mutations to chromosomal deletions
3. 学会等名 11th annual NGS and clinical diagnosis conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎 敦子、木下 善仁、神田 将和、水野 洋介、松永 綾子、武田 充人、大竹 明、村山 圭、岡崎 康司
2. 発表標題 小児ミトコンドリア病137症例における心筋症合併例の予後および遺伝学的基盤
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsuko Imai-Okazaki, Atsuhito Takeda, Yasushi Sakata, Shigetoyo Kogaki, Akira Ohtake, Yasushi Okazaki
2. 発表標題 Cardiomyopathy in 137 Children with Mitochondrial Disease: Prognosis and Genetic Background
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuko Imai-Okazaki, Yoshihito Kishita, Masakazu Kohda, Yosuke Mizuno, Takuya Fushimi, Ayako Matsunaga, Yukiko Yatsuka, Tomoko Hirata, Hiroko Harashima, Atsuhito Takeda, Akihiro Nakaya, Yasushi Sakata, Shigetoyo Kogaki, Akira Ohtake, Kei Murayama, Yasushi Okazaki
2. 発表標題 Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease: prognosis and genetic background
3. 学会等名 2019 ACMG Annual Clinical Genetics Meeting
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡田 随象 (編集)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メディカルドゥ	5. 総ページ数 272
3. 書名 遺伝統計学と疾患ゲノムデータ解析-病態解明から個別化医療,ゲノム創薬まで-(遺伝子医学MOOK33号)	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 肥大型心筋症治療剤	発明者 順天堂大学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-009754	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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1件

国際研究集会	開催年 null年
--------	--------------

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			
米国	Rockefeller University			
オーストラリア	University of Melbourne	Monash University	University of Sydney	他17機関