

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09066

研究課題名(和文) Long-read sequenceによるヒルシュスプルング病の包括的遺伝子解析

研究課題名(英文) Comprehensive genetic analysis of Hirschsprung disease by long-read sequence

研究代表者

照井 慶太(Terui, Keita)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70375773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Hirschsprung病(HSCR)は一部の腸管の神経節細胞が完全に欠如した先天性疾患である。本研究の目的はHSCRの遺伝子診断による診断率を高め、遺伝子診断の汎用性を向上させることである。そのため、多施設において症例をリクルートし、詳細な患者情報を含んだデータベースとそれに紐づいた遺伝子バンクを作成した。現在、20家系異常を含む80検体のDNAを解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HSCR発症と関連のある遺伝子変異は既に複数発見されている。しかし最も有名なRET遺伝子の変異でさえ、家族性HSCRの50%、孤立性HSCRの15-20%を説明できるにすぎず、他の遺伝性疾患の診断率と比較して著しく低い。多くのHSCR患児の原因に関しては依然不明であるため、HSCRの遺伝子検査は汎用性が低く、今までの研究成果が臨床現場で十分に活用されていない。また遺伝的な診断が確定しにくいいため、HSCRの病型・臨床経過の多様性と遺伝的背景との関連についても、研究が進みにくい状況にある。本研究は、これらの問題点を解決するための糸口となるものである。

研究成果の概要(英文)：Hirschsprung's disease (HSCR) is a congenital disorder in which some intestinal ganglion cells are completely absent. The purpose of this study is to increase the diagnostic yield of HSCR by genetic diagnosis and to improve the versatility of genetic diagnosis. To this end, we recruited cases at multiple institutions and created a database containing detailed patient information and a gene bank associated with the database. Currently, 80 DNA samples including 20 genealogical abnormalities are being analyzed.

研究分野：Pediatric surgery

キーワード：gene analysis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異には、1bp (SNV: Single Nucleotide Variation) ~ 数 bp レベルの小さな変異と、構造多型 (数百 ~ 数万塩基レベルの逆位、転座、欠失、重複) とがある。近年、ヒトには 10K bp ~ 1M bp の領域に及ぶ構造多型が従来の予想よりも高頻度に存在することが明らかになってきた。正常なヒト遺伝子の 10% 以上の領域に構造多型が認められ (Nature 444, 444-54, 2006)、ヒトの形質差に広く関与している可能性があることが示されている。現在広く行われている短鎖型のハイスループットシーケンサでは、サンプル DNA を短い断片で解析するため (Short-read sequence)、100 塩基を超える構造多型を検出することはできない。近年、Long-read sequence 技術の確立と共に、より大きな遺伝子の変異を検出できるようになってきている。実際、遺伝性疾患の新たな原因として構造多型によるものが報告されていきおり (Borràs, Hum Mutat 2017; Merker, Genet Med 2017)、特に神経疾患で有用であることが知られている。Long-read sequence による構造多型の解析が、従来型の SNV 解析に加え、原因遺伝子探索研究に新たな可能性を引き出すことが期待されている。

Hirschsprung 病 (HSCR) は 1/5000 人に発症し、腸管遠位部における腸管神経節の欠如により腸内容の通過障害をきたす先天性疾患である。家族内発生 (20%)、染色体異常への合併 (12%)、先天異常の合併 (20-35%)、様々な症候群との合併、発症頻度の人種差などを認めることから、HSCR の病因には遺伝的因子が関与しているとされる。現在まで HSCR の原因遺伝子として多数が報告されており、それらは 4 群に分類できる: GDNF シグナル経路 (RET とそのリガンドである GDNF・NRTN)、エンドセリンシグナル経路 (EDNRB とその関連遺伝子である EDN3・ECE1)、NRG シグナル経路 (NRG1 および NRG3)、SEMA シグナル経路 (SEMA3C および SEMA3D) である。中でも RET は最も強い浸透率を示し、動物実験においてノックアウトによる機能解析も進んでいる極めて重要な遺伝子である。実際に HSCR 発症と関連のあるエクソン領域の変異が複数発見されている。しかし RET の変異は家族性 HSCR の 50%、孤立性 HSCR の 15-20% を説明できるにすぎず (1-3)、他の遺伝性疾患の診断率と比較して著しく低い。多くの HSCR 患児の原因に関しては依然不明であるため、HSCR の遺伝子検査は汎用性が低く、今までの研究成果が臨床現場で十分に活用されていない。また遺伝的な診断が確定しにくいいため、HSCR の病型・臨床経過の多様性と遺伝的背景との関連についても、研究が進みにくい状況にある。

2. 研究の目的

従来の遺伝子解析にて原因未知の場合、原因を同定する仕組みを構築する。

本邦における HSCR の診断率は明確でなく、診断体制もない。そのため、HSCR の遺伝子診断率を明らかにし、開かれた遺伝子診断のサポート体制を構築する。

原因座位によって病型・臨床経過が異なることが予想されるため、対象コホートの継時的な病態変化を把握し、遺伝情報と臨床情報とが連動した HSCR 情報バンクを構築し、公開する。

3. 研究の方法

【検体採取・診療情報収集】

千葉大学生命倫理審査委員会による承認を得た後、十分な説明と同意を得た上で、HSCR 罹患者及び家系内の罹患者から血液及び摘出大腸の検体提供を受ける。家系内非罹患者からは血液の提供を受ける。

【遺伝子解析】

Short-read sequencer による既知遺伝子の検索

エクソーム解析 (イルミナ社 TruSight One) を行い、HSCR の原因遺伝子として既に知られている遺伝子変異の有無を検索し、従来法で診断不能な症例を選定する。

Long read sequence による既知遺伝子の探索

Short-read sequencer による検索で既知遺伝子の変異が認められなかった検体に対し、Irys® ゲノムマッピング解析により構造多型の検出を行い、Long-read sequencer を用いた既知遺伝子の Target sequence により、構造多型を検出する。

診断方法の確立

より、HSCR 発症に関連する遺伝子変異を検出するシステムを作成し、「高い検出率の HSCR 診断法」を確立する。遺伝子診断可能な HSCR 児の割合が増加すれば、遺伝子診断の汎用性が高まり、HSCR 遺伝子診断サポート体制を構築することが可能となる。開かれた遺伝子診断体制を整備し、遺伝子診断を広く提供する。

HSCR 情報バンクの構築

遺伝子解析と並行して、前方視的に対象症例の病型と臨床経過を 10 年間追跡し、遺伝情報と連動した HSCR 情報バンクを構築する。得られた膨大な情報は、通常の解析方法では結果を得ることが困難なため、人工知能を用いて臨床情報と遺伝情報との相互関係を推定する。これにより病

型や臨床経過と変異遺伝子との関連について人知では予測不可能な新たな知見を得ることが期待できる。

4．研究成果

多施設において症例をリクルートし、詳細な患者情報を含んだデータベースとそれに紐づいた遺伝子バンクを作成した。現在、20家系異常を含む80検体のDNAを解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	関根 章博 (Sekine Akihiro) (30425631)	千葉大学・予防医学センター・教授 (12501)	
研究分担者	竹村 亮 (Takemura Ryo) (50747516)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師 (32612)	
研究分担者	齋藤 武 (Satio Takeshi) (20406044)	千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ がん遺伝創薬研究室・主任医長 (82504)	
研究分担者	真下 陽一 (Mashimo Youichi) (90422253)	千葉大学・大学院医学研究院・技術専門職員 (12501)	

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