

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460686

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた赤血球膜異常症の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the red blood cell membrane disorders using next-generation sequencer

研究代表者

山城 安啓 (YAMASHIRO, Yasuhiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50243671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用い赤血球膜蛋白異常症の遺伝子解析を行った。Solid5500による全エクソーム解析は多数の多型、変異が検出されたが、疾患に関連する変異を限定する事が困難であった。広範囲遺伝子欠失は検出できなかった。Ion PGMは6症例の赤血球膜蛋白関連遺伝子20種類の解析を行い、新規のアンキリン遺伝子変異4例を発見した。うち1例はスペクトリンにも変異が存在し、臨床症状の悪化に関連していると考えた。残りの2症例は遺伝子欠失を検索中である。赤血球膜蛋白異常症のように複合ヘテロ接合体や遺伝子欠失も想定される遺伝子疾患の解析には、関連遺伝子に的を絞ったIon PGMの利用が有効である。

研究成果の概要(英文)：Genetic analysis of red blood cell (RBC) membrane protein disorders were carried out using next generation sequencing. Solid5500 gave many polymorphisms and mutations, while determination of disease-related genes or a large deletion was difficult. Using Ion PGM twenty kinds of gene of RBC membrane protein were analyzed for 6 patients, and a novel ankyrin gene mutation was found in four. One of them also had an -spectrin mutation, which may have deteriorated the clinical manifestation. Other two are under search for gene deletion. On genetic analysis of compound heterozygote or gene deletion, like RBC membrane protein disorders, Ion PGM that focuses on the related gene is effective.

研究分野：臨床検査学

キーワード：赤血球膜タンパク異常症 次世代シーケンサー 球状赤血球症 アンキリン スペクトリン Ion PGM

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室は長年、先天性溶血性疾患の原因のなかの血色素異常症（異常ヘモグロビン症およびサラセミア）の解析を行ってきた。しかし、近年、多くの主治医の要望から、**溶血疾患センター**の構想を進めている。福山臨床検査センターを中心に検体を集め1次スクリーニングを行い、疾患ごと血色素異常症は山口大学、酵素異常症は東京女子医大、膜蛋白異常症は川崎医科大学がバックアップを取ることにより、機能の強化を図っている。

しかし、完全には稼動しておらず、現在は、血色素異常症の解析を表に出し解析を行っている。血色素異常症のスクリーニング検査に **Band3** をフローサイトメトリーで測定し、球状赤血球症 (HS) の簡易診断 (事前診断) も行っている。血色素異常症疑いの症例の中にかかなりの頻度で HS が紛れていることから、HS が先天性溶血性疾患のかかなりの割合を占めていることがわかる。また、末梢血標本の形態から楕円赤血球症、卵円形赤血球症が疑われる症例も多数経験している。さらに、サラセミア症と楕円赤血球症のヘテロ接合体との複合ヘテロ接合体により溶血症状をきたした症例も経験した。本来、楕円赤血球症のヘテロ接合体単独では溶血症状をきたさないが、サラセミアと一緒にあったため溶血症状をきたしたものと考えた。このように先天性溶血性疾患の大部分を占める赤血球膜蛋白異常症の解明が必須となってきた。

膜蛋白異常症は川崎医科大学を含め多くの研究者が研究を行い、様々な事実を明らかにしてきた。SDS-PAGEによる解析や単独に遺伝子異常を検索してきた。SDS-PAGEでは、その蛋白定量性には限界がある上に、結果としてどの蛋白が減少しているか分かるが、その原因となる遺伝子異常はわからない。我々がHSの診断に利用している **Band3** の減少も結果であって、原因ではないことが多い。減少している **Band3** が原因であればこの遺伝子

の解析を行うことで終了するのだが、遺伝子異常が見つからない症例が多く、これ以外のアンキリンやスペクトリンなどの異常が考えられる。

表現系の異常から個々の遺伝子異常を検索するには、可能性のある膜蛋白遺伝子を順番に検索していかなくてはならない。現在のシーケンス解析法はエクソン-イントロン間を含み PCR で遺伝子を増幅し解析を行う。しかし、**primer** が部分欠失していると PCR で増幅できず、正常と判断することになる。したがって定量 PCR が必要となる。定量 PCR は欠失を検出できるが変異の検出はできない。現在の方法でプロモーター領域と全てのエクソン領域の遺伝子異常を調べるとなると、全ての領域にシーケンス用と定量用 PCR の **primer** を作成し、1つずつ確認していかなくてはならない。膜蛋白に限らず、多くの巨大な遺伝子の異常を検索することは多大な時間と労力とコストを要する。そこで、日本人に多い変異が報告されているので、この異常を中心に検索することになる。しかし、異常が見つからない場合が多く、見つかったとしても、全ての膜蛋白遺伝子の解析が行われていないため、それ単独で起きた疾患ではなく他の膜蛋白異常と関連している可能性もある。そもそも、頻度が異なる可能性もある。

以上の点から赤血球膜蛋白全ての遺伝子異常を解析することが必要であるが、現在の方法による解析は困難である。

2. 研究の目的

先天性溶血性疾患の原因には膜蛋白異常症、血色素異常症、酵素異常症がある。そのうち約 8 割が赤血球膜蛋白の異常によるもので、球状赤血球症が 70%程度を占めている。楕円赤血球症、卵円形赤血球症などの奇形赤血球症による溶血性疾患も存在する。赤血球膜蛋白の異常による溶血疾患の原因は構成する多くの蛋白が関連しているため複雑である。

さらに、その蛋白は巨大分子のため遺伝子解析は困難を極めている。近年開発された、次世代シーケンサーを利用し、一度に複数の赤血球膜蛋白の遺伝子異常（遺伝子変異および部分欠失）解析を試みる。日本人における赤血球膜蛋白異常のパターンを明らかにすることにより、未知検体の遺伝子診断を簡易にできるようにする。また、赤血球膜機能の相互作用を解明する。

3. 研究の方法

現在、研究室で保有する赤血球膜蛋白異常症の症例解析を、次世代シーケンサーを用いて行った。SOLiD5500 と Ion PEM のデータの信頼性のチェックやデータ処理を比較検討し、安価で確実な方法を模索した。広範囲遺伝子欠失に関してはカバレッジの深さから異なる手法で検索した。また、赤血球膜蛋白の異常が存在を確認するため、SDS-PAGE で蛋白を分離した。異常の確認のため、質量分析計を用い解析を行った。

(1) SOLiD5500 を用いた解析

①全エクソーム解析 (whole exome sequencing: WES)を行った。遺伝子の濃縮 (ターゲットエンリッチメント): SOLiD 5500 用には SureSlect XT カスタム キャプチャーライブラリー (Agilent) を使用し、すべての膜蛋白の遺伝子がキャプチャーできるベイドライブラリーを作成する。ライブラリーの設計には Web 上のフリーツール SureDesign を利用しデザインした。

②SOLiD5500 による解析: 中国地区国立大学の教職員が利用し、操作には熟練した技師が行うため、個人使用はできないため、遺伝子実験施設に解析を依頼した。

(2) Ion PEM を用いた解析

①遺伝子の濃縮 (ターゲットエンリッチメント): Ion PEM の遺伝子濃縮には SOLiD5500 の SureSlect は利用できないため、HoloPlex Target Enrichment Ion PGM 対応 (Agilent)

を使用することとした。ライブラリーの設計には SOLiD5500 と同様、Web 上のフリーツール SureDesign を利用しデザインした。HaloPlex Ion Torrent 対応キットの使用は、Paired-end by Design 方式により、シーケンシング自体は Single end であるが、ターゲット領域の両側からのリードが得られ、Paired-end に匹敵するカバレッジを達成した。

②Ion PEM による解析: SOLiD5500 同様の理由より、遺伝子実験施設に解析を依頼した。得られたデータは Life Scope(life technologies)でマッピングを行った。

(3) 異常膜蛋白の検出

①SDS-PAG によるタンパク分画: 全血 (EDTA) を生理食塩水で洗浄し血漿を除去後、PMSF (プロテアーゼインヒビター) を加えた Lysis 試薬でホワイトゴーストを作成した。巨大分子のアンキリンや α - β -スペクトリンも分画する必要があるため、Fairbanks Buffer System を利用し 3-10%の gradient gel を使用した。

② 質量分析: MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)/TOFMS を使用した。

4. 研究成果

先天性溶血疾患で最も頻度の高い赤血球膜タンパク異常症の遺伝子解析を次世代シーケンサーSOLiD5500 及び Ion PGM を用いて行った。SOLiD5500 を用いた WES では非常に多くの多型及び変異が検出されたが、どの異常が疾患に結びつくのかを限定するのが困難であった。また、点突然変異や短い欠失は検出できるが、カバレッジが低いため広範囲遺伝子欠失は検出できなかった。そこで Ion PGM により赤血球膜タンパク関連遺伝子 20 種類の全エクソン及びエクソン-イントロン結合部位を含めて 92174bp の解析を行った。アンプリコン 677 を作成し、HS が疑われる 6 症例の解析を行った。それぞれの症例はタグ

をつけることで、同一チップで解析可能にした。その結果、新規のアンキリン遺伝子変異による HS が 4 例発見された。そのうち 1 例は α スペクトリンにも遺伝子変異が存在し、臨床症状を悪化させている原因と考えられた。 α スペクトリン異常はヘテロ接合体では表現系として現れないが、複合ヘテロ接合体になることで、臨床症状に影響することが示唆された。残りの 2 症例に関しては、すべての遺伝子に変異が認められなかったため、カバレッジの数の違いから遺伝子欠失を検索中である。アンキリンとスペクトリンには欠失は認められなかったため、他の遺伝子に欠失が存在する可能性が高い。

以上より、複合ヘテロ接合体や遺伝子欠失も想定される赤血球膜タンパク異常症の解析には、関連遺伝子に的を絞った次世代シーケンサー Ion PGM の利用が有効である。

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 1 件)

①Nitta T, Kawano F, Yamashiro Y, Takagi F, Murata T, Tanaka T, Ferania M, Adhiyanto C, Hattori Y. A new Krüppel-like factor 1 mutation (c.947G>A or p.C316Y) in humans causes β -thalassemia minor. Hemoglobin. 査読有、39(2)、2015、121-126

doi: 10.3109/03630269.2015.1008702.

[学会発表] (計 1 件)

①Mori Kentaro, Yamashiro Yasuhiro, Hattori Yukio, Nitta Takenori, Kajiwara Ryosuke, Nakamori Yoshiki, Mella Ferania, Takagi Fumiya、Comprehensive analysis of red cell membrane proteins by the next-generation sequencer、第 77 回日本血液学会、2015 年 10 月 17 日、ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県・金沢市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山城 安啓 (YAMASHIRO, Yasuhiro)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：5 0 2 4 3 6 7 1

(2)研究分担者

田中 経彦 (TANAKA, Tatchiko)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：2 0 1 4 4 9 2 5

(3)連携研究者

なし

研究者番号：

(4)研究協力者

服部 幸夫(HATTORI, Yukio)

新田 孟徳 (NITTA, Takenori)

清水 進弘 (SHIMIZU, Nobuhiro)

メラ フェラーニア (Mella, Ferania)

クリス アディヤント (Chris, Adhiyanto)