

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：29-17

課題名：クロマチン制御因子と希少疾患-新規原因遺伝子の探索と病的意義の解明-

福井 由宇子

国立研究開発法人・国立成育医療研究センター
研究所・分子内分泌研究部・特任研究員

(研究成果の要約) 本研究課題では頭部顔面に多様な小奇形を伴う希少疾患原因遺伝子解析を行った。成育医療研究センター病院における検体収集は分担研究者・遺伝診療科・小崎医長、また国内他機関との連携による検体の収集には分担研究者・成育医療研究センター研究所・分子内分泌研究部・深見部長、小崎医長が遂行した。2019年度は、*CHD7* 翻訳領域変異陰性と確認した5名の*CHARGE* 症候群患者を対象に、より詳細なエクソーム解析をおこなった。14の新規原因候補遺伝子バリエーションを3名に確認した。これらの多数の有力変異の病原性検証のために、ゲノム編集による変異マウス作成技術改変を分担研究者高田部長とともにを行い、新たな変異候補の病原性検証実験を開始した。

1. 研究目的

クロマチン構造変換・制御因子群遺伝子は、近年頭部顔面小奇形を伴う症候性希少疾患の原因遺伝子として、相次いで報告されている。しかし、これらの疾患の表現型は多様であり、各々の疾患の境界は明確ではない。クロマチン構造変換・制御因子群は共通の遺伝子を制御すると想定されるため、これはいわば必然の結果であり、複数の遺伝子変異が同一疾患の原因、あるいは一つの遺伝子の変異が複数の疾患の原因になる可能性を示唆される。主任研究者が行ってきたモデル動物マウスにおけるクロマチン制御因子の機能解析では、複数のクロマチン制御因子が頭部顔面形成を制御することを見いだしてきた。これらの独自の研究成果に基づき、病原変異未同定の頭部顔面小奇形を伴う希少疾患において、クロマチン構造変換・制御因子群の遺伝子変異による疾患のダイバーシティを検証する。

2. 研究組織

- ・研究者: 福井 由宇子
所属施設: 国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・研究所・分子内分泌研究部
- ・研究者: 小崎 里華
所属施設: 国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・器官病態系内科部・遺伝診療科
- ・研究者: 高田 修治
所属施設: 国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・研究所・システム発生・再生医学研究部
- ・深見 真紀
国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・研究所・分子内分泌研究部

3. 研究成果

国立研究開発法人 国立成育医療研究センター・小崎医長と深見真紀は、国内他施設に広くネットワークを広げた。本研究課題遂行期間、多くの国内施設(北海道大学、

東北大学、東京医科歯科大学、浜松医科大学、久留米大学、聖マリアンナ医科大学、大津市民病院、岐阜総合医療センターなど) より検体が提供された。一次解析では *CHD7* 変異が認めることができなかった 17 名の **CHARGE** 症候群あるいは **CHARGE** 症候群が疑われる患者の照会が主治医よりあった。ところが驚くことに、この内 12 名の *CHD7* タンパクの変異が予想される変異を同定した。5 名の真の *CHD7* 変異陰性患者を対象としてエクソーム解析をおこない、患者が持ち、in house 8 名の正常コントロールは持たない全変異 1630 から、1000G、HGVD、ToMMo、ExAC、GnomAD などによる一般集団中の頻度解析、CADD、PP2 による変異の有害性予測、クロマチン構造変換・制御機能、転写調節機能への関与の予想を推定し、新規原因候補遺伝子バリエントを抽出した。最終的に 3 名に 14 の新規原因候補遺伝子バリエントを選出した。これらのバリエントはいずれも ExAC などのデータベースではほとんど登録がなく、機能予測 CADD では 23 以上のかかなり有害なバリエントであった [表 1 参照]。

[表 1]

1) CADD は

<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D886/5146191> による。我々は、>20 を有害と判定する。

2) ヘテロ接合性機能欠失変異 (LoF) 変異の有害性を判定する pLI 値は ExAC Exome Aggregation Consortium web site <http://exac.broadinstitute.org> より得た。

患者番号	遺伝子名	変異 (ヘテロ接合性変異)	CA DD 1)	ヘテロ病原性予測 2) (EXAC などの頻度)
------	------	---------------	----------	--------------------------

1	ZNF609	Chr.15:p.N271K	23.2	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有) (無し)
	NEDD4L	Chr.18:p.E655Q	23.4	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有) (無し)
	HYAL2	Chr.3:p.R234C p.F60S	26.1	pLI=0.02 (ヘテロ病原性無) (1/245684, 無し)
28.3				
2	INTS10	Chr.8:p.E79X	41	pLI=0.98 (ヘテロ病原性有) (無し)
	KMT2CL	Chr.7:p.P1530L	27.7	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有) (無し)
	TAOK1	Chr.17:27857638 +2G>A, splicing 変異	27	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有) (無し)
	TLE4	Chr.9:G376E	33	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有) (無し)
	HIRA	Chr.22:p.K329R	22.8	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有) (無し)
3	DOCK4	Chr.7:p.S456C	28.7	pLI=0.83 (ヘテロ病原性有) (無し)

KIF11	Chr.10: p.I333V	25.2	pLI=1.00 (ヘテロ病原 性有) (無し)
VPS18	Chr.15: p.R608C	25.1	pLI=0.94 (ヘテロ病原 性有) (3/125568)
TAL2	chr9: p.A21T	33	pLI=0.49 (ヘテロ病原 性無) (1/250792)
THOC6:	chr16: p.E188K	27.7	pLI = 0.00 (ヘテロ病原 性無) (無し)
TRMT5	chr14: 6144660 7 -3 T>A, splicing 変異	?	pLI = 0.97 (ヘテロ病原 性無) (無し)

エクソーム解析を行った5名中1名には嗅覚異常を伴う低ゴナドトロピン性性腺機能低下症原因遺伝子 *WDR11* 遺伝子にヘテロ接合性ミスセンス変異 R703Q を認めた。これまでに CHARGE 症候群患者での *WDR11* 遺伝子変異の報告はない。そのため、主治医とともに症例報告を行った。さらに、5名中他の1名には *PTPN11* の既報病原変異 p.E139D が認められた。本変異はヌーナン症候群原因変異であり、本症候群の表現型の多様性を示すものである。

また、本研究課題では、エクソーム解析を行うため、多くの候補遺伝子バリエーションを解析対象にせざるをえない。より効率的で、かつオフターゲットでの組換えの少ない改変が必要である。分担研究者・成育医療研究センター研究所システム発生・再生医学研究部・

高田部長は、CAS9 タンパクを用いて高効率ゲノム編集が可能であることを確認してきた。これまでに、多くの遺伝子座において、予想通りの変異マウスを得ている。本研究課題では、エクソーム解析を行うため、多くの候補遺伝子変異を解析対象にせざるをえない。そのためにより多くの遺伝子座でのゲノム編集が必要である。

分担研究者高田部長は、国立成育医療研究センター内の多くの共同研究を通じ、遺伝子座に左右されない、様々な変異(点突然変異、フレームシフト変異、微小欠失変異など)を忠実に導入し、成果は多くの論文として発表されている。そこで、従来のクローニングステップが不要な化学合成 *tracrRNA* (*trans-activating crisper RNA*) と 改変型 Cas9 タンパク *fCas9*(*FokI-dCas9*) を併用した実験系を開発し、従来法に比較して効率良く、かつより正確な変異導入を確認した。

一方、マウス表現型解析に必要な *CHD7* 変異マウスを Knockout Mouse Project (KOMP) Repository より導入した。一方クロマチン構成タンパク *Cbx2* KO マウスでは、成長障害、耳介形態異常、左右非対称の顔面、嚥下困難などの表現型を観察し、一部の成果は、2019 年度報告した。

CHARGE 症候群は、出生児 20,000 名に 1 名程度の頻度で発症する、希少疾患である。また、これまでの欧米の解析により、CHARGE 症候群患者の約 7 割が *CHD7* 遺伝子に病的変異を有するとの報告がある。これら頻度から推計すると、新規国内患者数は年間 50 名と予想でき、*CHD7* 遺伝子変異陰性患者数は日本国内で 10 名程度であると予測できる。このように本研究課題は、非常に稀な検体の収集を行なった。*CHD7* 遺伝子は 37 エクソンにまたがる、遺伝子コード領域が比較的長い遺伝子であることから、正確なダイレクトシーケンシング

には時間と労力を要する。本研究課題への依頼は依頼施設側にも大きなメリットがあったと推測する。

4. 研究内容の倫理面への配慮

遺伝子解析はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守して下記承認課題にて行った。

組換え DNA 実験はカルタヘナ法を厳守し申請により下記承認を受けている。

[国立成育医療センター遺伝子組換え実験安全委員会・実験計画番号(06-7, 07-7)]

[承認番号 2013-001, 2016-001]

動物実験は 3R (refinement, replacement, reduction)の原則を遵守して当センター研究所の規定に準じて下記承認課題にておこなった。

[先天奇形症候群における遺伝的要因の探索

(課題番号 518;代表 深見真紀)]

本研究課題では、研究への参加および撤回が自由意思で決定されること、検体が匿名化された後に解析されることが定められている。同意は書面で行われ、同意書、患者-匿名化番号の対応表は個人情報管理者居室の鍵付きキャビネットで保管される。検体試料の採取を行う各施設においても本課題が承認されている。