

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-

主任研究者名: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

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研究分担者・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研究分担者・成育医療研究センター研究所・分子内分泌研究部・深見部長が小崎医長とともに遂行した。平成 29 年度は、一次解析において *CHD7* 変異陰性と診断された 5 名の CHARGE 症候群患者を対象にエクソーム解析をおこない、4 名に *CHD7* 遺伝子変異を同定し各病院施設に検査報告を行った。これらの中には *CHD7* 遺伝子の非典型的スプライス変異が含まれていた。一方において、ゲノム編集による変異マウス作成技術改変を研究分担者高田部長が行い、新たな変異候補の病原性を検証する技術基盤を整備した。

1. 研究目的

本研究の目的

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、クロマチン構造変換・制御因子群遺伝子が近年相次いで同定されている。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する。主任研究者が行ってきたモデル動物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た。これら知見に基づき、病原性のある変異未同定の頭部顔面小奇形を伴う希少疾患遺伝子診断を通じて、クロマチン構造変換・制御因子群遺伝子

変異による疾患ダイバーシティーを検証する。

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

3. 研究成果

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対象とした。成育医療研究センター病院における検体収集は研究分担者・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は小崎医長ならびに研究分担者・成育医療研究センター研究所・分子内分泌研究部・深見部長が遂行した。平成29年度は、一次解析により *CHD7* 変異陰性と診断された5名の CHARGE 症候群患者を対象にエクソーム解析をおこない、4名に *CHD7* 遺伝子変異を同定し各病院施設に検査報告を行った。これらの中には *CHD7* 遺伝子の非典型的スプライス変異が含まれていたため、早急に論文報告をした。ゲノム編集による変異マウス作成技術改変を研究分担者高田部長が行い、新たな変異候補の病原性を検証する技術基盤を整備した。

【1年目(平成29年度)】

一次解析では *CHD7* 遺伝子変異解析陰性とされた、CHARGE 症候群5名を対象に、エクソーム変異解析を予定通り行った。解析は研究分担者・成育医療研究センター研究所・分子内分泌研究部・深見部長とともに主任研究者が行った。5名のうち4名に *CHD7* 遺伝子変異を認めた(表1)。

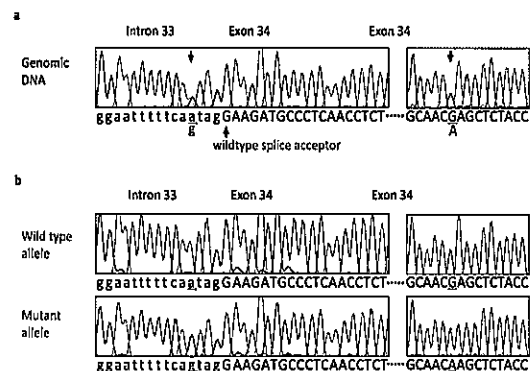
【表1】

検体番号	CHD7 変異	一次スクリーニング変異陰性の原因
4845	c.2143dupA: p.Val714fs	Nextera カバレッジ不足

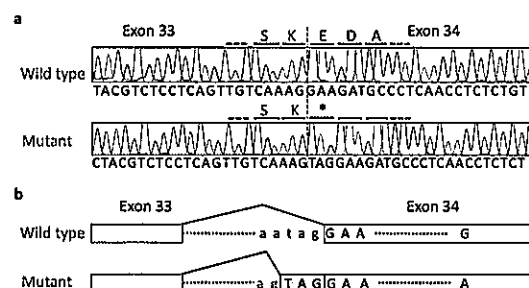
4849	c.2288_2289insGGAG:p.Lys763fs	Nextera カバレッジ不足
6218	c.C1300T:p.Gln434X	Nextera カバレッジ不足
6573	c.7165-4A>G	非典型的スプライシング変異

次世代シーケンサーを用いた Nextera 解析においてリード数が少ない領域の変異であったこと、あるいは非典型的スプライシング変異に該当したことが一次解析変異陰性の原因であった。本非典型的スプライシング変異は10年以上前より4名の患者に変異が認められながら、病原性の有無の判断は保留されてきた。cDNA 解析により、本変異により新たなスプライシングアクセプターと終止コドンが形成されることを明らかにし、Human Genome Variation に報告した (KatoH-Fukui Y et al., 2018)(図1,2)。

【図1】



【図2】



CHD7に変異のなかった男児1名には、X染色体上の AMMECR1 遺伝子に病原性の高いミスセンス変異 Arg173Gly を認めた(表2)。AMMACR1 は近年 AMME 複合 (Alport 症候群, 精神遅滞, 顔面中央部低形成, 橢円赤血球症)隣接遺伝子症候群の原因遺伝子候補として報告された(Andreoletti et al., J Med Genet, 2017)。AMMACR1 の分子特性は未解明である。本疾患は橢円赤血球が特徴の一つであることから、担当医に問い合わせたが、そのような症状は検査結果にないことが判明した。同患者には WDR11 にもミスセンス変異 Arg703Gln が認められ、一般集団での変異頻度並びに予測病原性から判断して原因遺伝子である可能性が否定できない。今後両遺伝子変異を候補遺伝子変異として検討する。その他の遺伝子変異の中にクロマチン構造変換・制御因子の稀な変異は見出せなかった(表2)。

[表2]

遺伝子名	変異	疾患原因	表現型・病原性有無
AMMECR1	chrX:109444183T>C R173G, スプライシングドナー変異 母由来	有	難聴、低身長、口蓋裂、斜視、哺乳不良、筋緊張低下、橢円赤血球等
DHRS1	Chr.14:p.V78fs (ヘテロ)	無	pLI0.00 (ヘテロ病原性無)
KBTBD3	Chr.11:p.S8fs (ヘテロ)	無	pLI0.00 (ヘテロ病原性無)
KLHL41	Chr.2:p.V430fs (ヘテロ)	無	pLI0.00 (ヘテロ病原性無)

POLE	Chr.12:p.F1571fs (ヘテロ)	無	pLI0.00 (ヘテロ病原性無)
WDR97	Chr.8:p.V590fs (ヘテロ)	無	pLI0.00 (hetero 病原性無)
DNAH17	R1398C, D284N	無	pLI0.00 (ヘテロ病原性無)

現在さらに、8名の CHARGE 症候群患者検体を新たに受け入れ、2名に CHD7 遺伝子ナンセンス変異、1名に CHD7 遺伝子フレームシフト変異、1名に CHD7 遺伝子典型的スプライシング変異を認めた。CHD7 に変異のなかった4名はエクソーム解析を開始している。また、本年度は研究分担者・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5割以上の高効率ゲノム編集が可能であることを確認した。さらに、tracrRNA (trans-activating crisper RNA) と fCas9(FokI-dCas9)を用いた効率的かつエラーの少ない正確な変異導入基盤を整備した。

4. 研究内容の倫理面への配慮

遺伝子解析はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(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。