

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

染色体微細構造異常に着目したミトコンドリア呼吸鎖異常症の新規原因遺伝子同定

研究代表者 平田 智子 (ゲノム医学研究センター)

緒言

ミトコンドリア呼吸鎖異常症 (以下ミトコンドリア病) は劣性遺伝形式が中心と考えられている難病であり、200を超える既知遺伝子が知られているが、いまだ患者の60%が病因診断に至っていない。遺伝的な原因の大部分はミトコンドリアゲノムではなく、核にコードされた遺伝子の異常と考えられている。

我々はこれまで140例を超える希少疾患の網羅的ゲノム解析を行ってきた。特に難病であるミトコンドリア病の中でも重篤なケースが多い小児例を中心に解析をし、この集団からこれまで6つの新規原因遺伝子を明らかにしてきた (Kohda, Hirata, et al. PLOS Genet 2015)。小児ミトコンドリア病のゲノム解析では世界でもっとも多検体での成果であり、35%と高い原因同定率を達成した。また国内の東北メディカルメガバンクを始め、国外のミトコンドリア病研究グループともコラボレーションしつつ成果を生み出すことに成功してきた。新規データを含めたこれらの成果は申請者およびコアメンバーにより学会でも報告した (Hirata, et al. 日本ミトコンドリア学会年会 2015)。

近年、国外においても高速シーケンサーを用いた同様の試みが報告されつつある。このような国際的な動向の中で、本プロジェクトでこれまでに報告のない発見が幾つかあった。その中の1つが、ミトコンドリア病患者における染色体の微細構造異常である。我々は通常の染色体検査よりも高解像度に染色体の微細構造異常を捉えられるSNPマイクロアレイを適用し、ミトコンドリア病で今までに報告例のない染色体微細構造異常を全検体の約10%から同定した。

本研究の目的は、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の患者から新規に同定された染色体微細構造異常に注目して新規の原因遺伝子を明らかにすることである。現在までに蓄積した検体由来細胞リソース、ミトコンドリア呼吸鎖活性の測定技術に加え、遺伝子ノックアウトによる解析を行う。これにより微細構造異常領域に含まれるどの遺伝子が直接的に疾患を引き起こしている原因であるのかを明らかにする。さらに、新規に同定した遺伝子がこれまで知られていないミトコンドリア関連の機能を持つことを新たに

解明していく。これらの結果は、劣性遺伝形式で発症すると考えられてきたミトコンドリア病がハプロ不全によっても引き起こされることを新たに証明することにつながる。

材料と方法

Affymetrix社製のマイクロアレイ (SNP Array 6.0) を用いて染色体微細構造異常の検出を行った。解析ソフトはAffymetrix社製のGenotyping Consoleを用いた。Genotypingを行った後にCNV解析を実施し、染色体全域に渡ってコピー数を算出した。データベース (リファレンスデータ) と照らし合わせ、健常者にも見られる (疾患とは関連しない) バリエントを取り除き、病因となりうるコピー数変異領域の探索を合計163名のミトコンドリア病症例で実施した。検出された染色体微細構造異常については、OMIMやDECIPHERなどのデータベースに登録がないかについても検証した。

結果

ミトコンドリア呼吸鎖異常症の163症例中、28症例で微細な染色体構造異常が検出された。その中で、血縁関係のない独立した患者2名において同じ6q24.3-25.1領域に1.7 Mbの欠失 (コピー数1) の染色体微細構造異常が見つかった (図1)。欠失領域に含まれる遺伝子もすべて同一であった。この6q24.3-25.1領域を両親についてもマイクロアレイ解析を行い、その結果いずれの両親にもこの欠失は

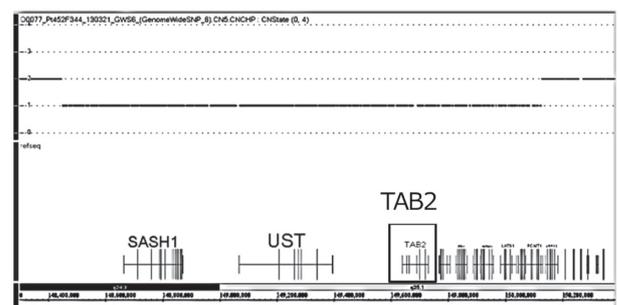


図1. 欠失している6q24.3-q25.1領域に含まれる遺伝子。TAB2 (先天性心疾患に関与) など11個の遺伝子を含んでいる。

見られなかったことから、患者2人ともに突然変異で欠失していることが判明した(図2)。この1.7 Mbの6q24.3-25.1領域内にはTAB2など11個の遺伝子が含まれていたが、そのいずれもミトコンドリア関連としては知られていない遺伝子であった。

考察

同じ領域の突然変異による染色体微細構造異常が、疾患とは関係なく独立した2人のミトコンドリア病患者に偶然に存在する可能性は極めて低く、この6q24.3-25.1領域の染色体微細構造異常がミトコンドリア病の発症に関与している可能性が高いと考えられる。この領域に含まれる11個の遺伝子は現在までにミトコンドリア関連として知られておらず、新規のミトコンドリア病原因遺伝子を同定できると考えている。さらに、これまで関連が知られていないミトコンドリア病と先天性心疾患(6q24.3-25.1は先天性心疾患の責任領域の1つ)の関係が分子レベルで明らかにできると期待される。どの遺伝子が発症に関与しているかを特定するための方法として、患者で欠失を受けている領域に含まれる遺伝子をCRISPR/Cas9システムを用いて1個ずつノックアウトし、SDS-PAGEによる呼吸鎖複合体の測定を行い、患者において量の減少が見られる呼吸鎖複合体への影響を検証する。このとき、ヘテロ欠失、ホモ欠失クローンを個別に検証し、ヘテロ欠失クローンでも呼吸鎖複合体の異常

が見られるかを確認してハプロ不全での発症の可能性についても検証することができると期待される。

重篤なミトコンドリア病小児患者のほとんどが劣性遺伝による発症と考えられている。しかし、我々が同定した患者らは、片側の染色体欠失によるハプロ不全が原因による発症であると考えられ、このことが証明できれば本疾患の研究領域においてこれまでに報告例がない原因遺伝子のハプロ不全によるミトコンドリア病の発症という重要な発見になる。劣性遺伝が多いとされる本疾患において、優性遺伝形式が原因として有り得る事実を示すことは、疾患の発症頻度の高さに直結してくるため、大変重要で意義のあることであると言える。さらに、染色体微細構造異常がミトコンドリア病を引き起こすという新しい機序を証明することもできる。また、染色体微細構造異常からゲノム編集技術によるノックアウト法によって原因遺伝子を同定するアプローチ法を確立できる。

本研究によって染色体微細構造異常の領域に含まれる遺伝子の中から疾患に直接関わる新規の原因遺伝子を見出すアプローチが正しいことを証明できれば、今まで染色体微細構造異常と疾患との関連性が考えられていなかったミトコンドリア病以外の数多くの原因遺伝子未解明な疾患においてもその検討の重要性を示すことができ、遺伝性疾患研究に新たな知見をもたらすことが期待できる。

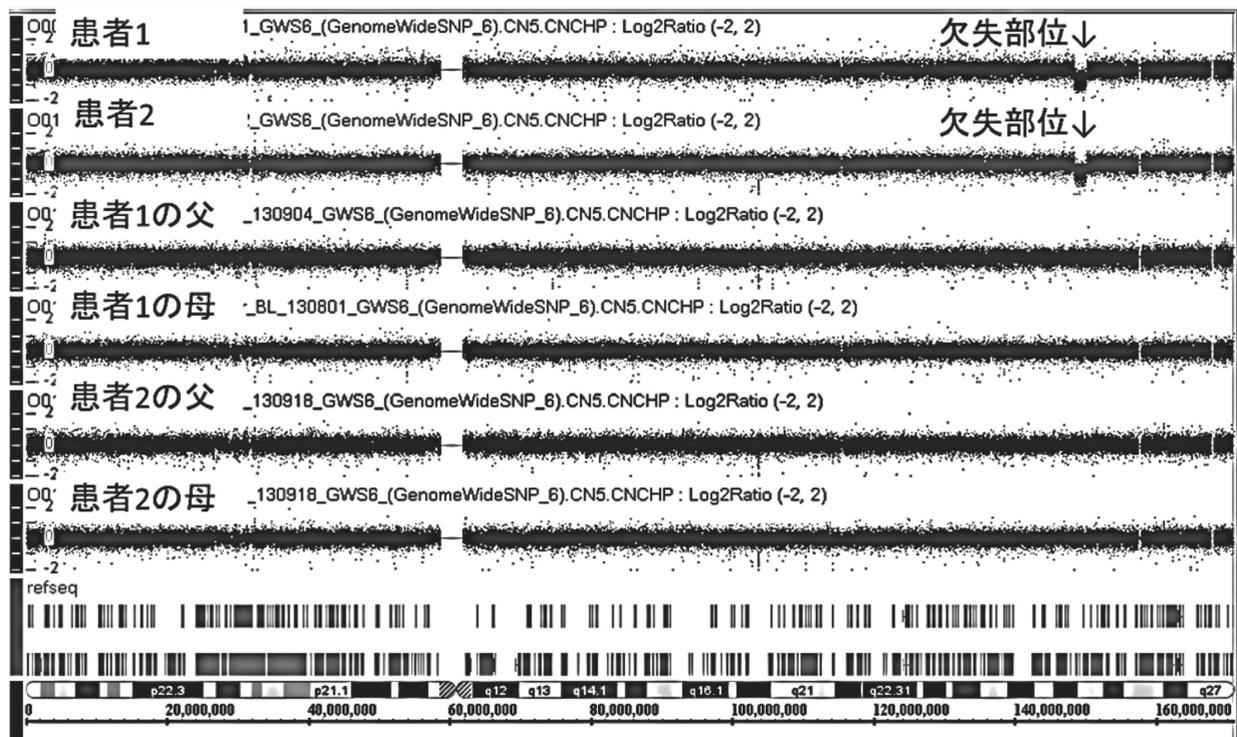


図2. マイクロアレイによるトリオ解析。患者1と2に見つかった6q24.3-q25.1欠失はともに、両親には見られない(de novo)ことを確認できた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ゲノム医学研究センターゲノム科学部門の岡崎康司教授、トランスレーショナルリサーチ部門の神田将和助教に多大なご協力を頂きました。深く感謝申し上げます。

研究成果リスト

学会発表

- 1) Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Yamashita-Sugahara Y, Mizuno Y, Nakachi Y, Moriyama Y, Hirata T, et al. A comprehensive genomic analysis for mitochondrial respiratory chain disorder, 米国人類遺伝学会年会, 2015