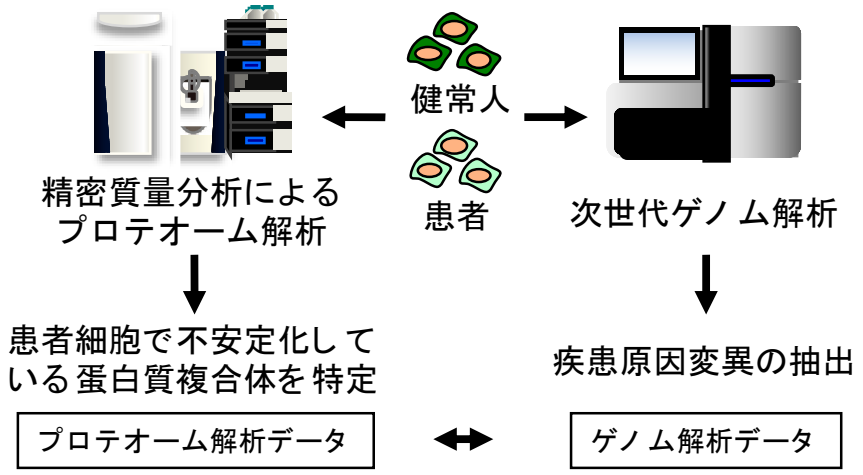
120　遺伝性小頭症の発症に関わる責任因子の探索	岡　泰由

【目的】発症頻度が極めて低い遺伝性疾患で、弧発症例のゲノム解析データのみを用い、過去に報告の無い疾患発症原因となる遺伝子変異を絞り込むことは極めて困難である。そこで、次世代ゲノム解析のみでは候補遺伝子の絞り込みに至らなかった小頭症を伴う希少遺伝性疾患に関して、精密質量分析装置を利用したプロテオーム解析を実施し、ゲノム解析から得られたデータと統合することで、疾患発症因子の同定を行う。

【方法】精密質量分析装置を用いたプロテオーム解析を行うことで、健常人と遺伝性小頭症患者由来の細胞内に発現している蛋白質を網羅的かつ定量的に測定し、次世代ゲノム解析結果と統合することで、疾患発症に関わる因子の絞り込みを行う。

【結果】プロテオーム解析により、トリオの全エキソーム解析では同定に至らなかった遺伝性小頭症発症患者の疾患原因が RNASEH2 複合体の発現量低下であることを明らかとした。*RNASEH2B* のイントロン深部にスプライス供与部位の挿入を確認した。以上の結果から、患者は *RNASEH2B* の RNA スプライシング異常により発症したアイカルディ・ゴーティエ症候群であることが示唆された。

遺伝性疾患発症因子同定のためのマルチオミクス解析



120. 遺伝性小頭症の発症に関わる責任因子の探索

岡　泰由

名古屋大学 環境医学研究所 発生遺伝分野

Key words：遺伝性疾患，小頭症，ゲノム解析，プロテオーム解析，DNA 損傷応答機構

緒　言

昨今の大規模ゲノム解析研究の結果から、健常人にも遺伝子変異／バリアントが無数に存在し、蛋白質の機能変化を生じる可能性のあるアミノ酸置換を伴うホモ接合変異が、数十個程度存在することが明らかとなってきた。そのため、発症頻度が極めて低い遺伝性疾患で、弧発症例のゲノム解析データのみを用い、新規の疾患発症原因となる遺伝子変異を絞り込むことは非常に困難である。事実、希少遺伝性疾患患者とその近親者の全エキソーム解析を行ったとしても、確定診断に至るのは25～30%程度といわれている。また、遺伝子発現はゲノム解析のみでは予想が困難な、DNA のメチル化やヒストンの翻訳後修飾などのエピジェネティックな制御を受けている。上記の理由により、責任因子の同定に至っていない希少遺伝性疾患の症例が数多く存在しており、これらの疾患発症要因を特定するための新たな解析アプローチが必要とされている。

ゲノム DNA は生体内の代謝反応で生じる活性酸素や、DNA 複製中に起きるエラー、あるいは化学物質、紫外線などの外的要因によって絶えず損傷を受けている。現在までの研究結果から、数多くの蛋白質が秩序立ち、かつ協調して働くことにより、DNA 損傷部位を認識し、修復することで、ゲノムの安定性が維持されていることが明らかとなってきている。ゲノム安定化維持機構に関与する DNA 損傷応答蛋白質をコードする遺伝子の異常は様々な遺伝性疾患（色素性乾皮症、ウエルナー症候群、コケイン症候群、ファンコニ貧血、ゼッケル症候群など）で報告されており、これら遺伝性疾患の臨床症状は若年高発がん性、発育発達異常、早期老化など、多岐に渡ることが知られている［1，2］。次世代ゲノムシーケンサーの普及により、上記遺伝性疾患の疾患責任遺伝子変異が同定されてきたが、未だ多くの症例で責任因子の特定に至っていないのが現状である。

本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いて得られたゲノム解析結果と精密質量分析装置を用いて得られたプロテオーム解析データとを統合することで、ゲノム解析のみでは候補遺伝子を絞り込むことができなかった、DNA 損傷応答機構の異常によって発症した、小頭症を伴う希少遺伝性疾患の発症原因因子を特定し、分子病態の解明を目指すことである。

方法および結果

1. 対象患者の臨床所見

対象患者は日系ブラジル人家系の女児、33 週齢にて出産、生下時体重は 978 g、胎児期から発育不全、小頭症、大脳基底核と脳室周囲の石灰化、多発関節脱臼、動脈管開存症、血球減少（血小板減少、貧血）、両側難聴、出生後も成長障害、TORCH 症候群は陰性。両親はいとこ婚。父の兄と母の姉も夫婦で、その間の 3 人の子どもは全員死産。以上のことから、劣性遺伝性疾患であることが強く疑われ、ゼッケル症候群と診断された。患者とその両親の DNA から次世代ゲノム解析（全エキソーム解析）を行ったが、既知の病的変異は見つからず、候補因子を絞り込むことはできなかった。

2. プロテオーム解析により同定したアイカルディ・ゴーティエ症候群発症関連因子の発現量低下

安定同位体アミノ酸ラベル法を実施するため、健常人由来の不死化血球系細胞を Light アミノ酸含有培地（12C6 L-Lysine と 12C6/14N4 L-Arginine）で、患者由来の不死化血球系細胞を Heavy アミノ酸含有培地（13C6 L-Lysine と 13C6/15N4 L-Arginine）で培養した。安定同位体アミノ酸ラベルされた健常人と患者由来の細胞から蛋白質を回収し、

トリプシン分解・ペプチド精製を行い、精密質量分析装置を用いてショットガン解析を実施した。その結果、患者細胞内での RNASEH2A、RNASEH2B、RNASEH2C 蛋白質の発現量が健常人と比較して著しく減少していた（図 1A）。ウエスタンブロッティング法にて、これら蛋白質の発現量低下を確認した（図 1B）。定量 PCR を行った結果、*RNASEH2B* の mRNA レベルが低下していることが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いた全エキソーム解析では *RNASEH2B* 遺伝子上に変異は検出されなかったため、非典型例のイントロン上の変異によるスプライシング異常の可能性を検討した。その結果、*RNASEH2B* のイントロン深部にホモ接合型のスプライス供与部位の挿入が確認された。また、患者細胞の cDNA 断片の解析から、スプライス供与部位の挿入により、*RNASEH2B* のスプライシング異常が引き起こされていることが明らかとなった。

（A）

Protein Name	SILAC ratio (log2 H/L)
RNASEH2A	-2.74
RNASEH2B	-12.58
RNASEH2C	-13.29

（B）



図 1. プロテオーム解析による RNASEH2 複合体の患者細胞での発現量低下
健常人由来の細胞を Light アミノ酸含有培地（L）、患者由来の細胞を Heavy アミノ酸含有培地（H）で培養した。それぞれの細胞から蛋白質を抽出し、トリプシン分解・ペプチド精製を行い、精密質量分析装置を用いて解析した（A）。健常人と患者由来の細胞から蛋白質を抽出し、ウエスタンブロット法により RNASEH2A、RNASEH2B、RNASEH2C の蛋白質発現量を比較した（B）。★は非特異的なバンド。

考　察

RNASEH2A、*RNASEH2B*、*RNASEH2C* はアイカルディ・ゴーティエ症候群の発症関連遺伝子としてすでに報告されている。アイカルディ・ゴーティエ症候群の発症に関連する遺伝子は *RNASEH2A*、*RNASEH2B*、*RNASEH2C* の他に 4 個の遺伝子が報告されており、これらは全て細胞内核酸代謝に関与していることが知られている。興味深いことに、Rice らの報告によると、*RNASEH2B* 遺伝子変異が原因となり発症したアイカルディ・ゴーティエ症候群患者 104 症例の変異パターンを検討した結果、機能喪失型変異は 1 例も見つからなかった［3］。また、現在までに報告され

ている *RNASEH2B* 遺伝子変異が原因となり発症したアイカルディ・ゴーティエ症候群患者と本症例の臨床所見は相違点が幾つかあり、本症例の方がより重篤であった。これは、患者細胞の RNASEH2A、RNASEH2B、RNASEH2C の発現量が健常人と比較して著しく低下していたためであると考えられる。また、*Rnaseh2b* 欠損マウスは、DNA 複製中に取り込まれるリボヌクレオチドを除去することができず、ゲノム不安定性が誘導され、胎生致死になると考えられている［4］。今後、本症例の患者細胞をより詳細に解析することで、ヒト発達過程における RNASEH2B の詳細な機能が明らかとなることが期待される。

本研究では、全エキソーム解析のみでは疾患発症因子の同定に至らなかった症例について、プロテオーム解析を実施することで、原因因子を特定することが可能となった。希少遺伝性疾患の遺伝子診断率は、その近親者の全エキソーム解析を行ったとしても、およそ 3 割程度と言われている。全エキソーム解析に加えて、全ゲノム解析、RNA シーケンス解析、本研究で実施した、患者細胞内で発現している蛋白質の網羅的な発現データを取得するプロテオーム解析を組み合わせたマルチオミクス解析を実施することにより、診断率の向上ならびに未診断遺伝性疾患の病態解明へと繋がることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科小児科学の村松友桂子助教、名古屋大学環境医学研究所発生遺伝分野の荻朋男教授である。本研究にご支援くださいました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1） McKinnon PJ. DNA repair deficiency and neurological disease. Nat Rev Neurosci. 2009 Feb;10(2):100-12. PMID: 19145234 DOI: 10.1038/nrn2559.

2） Rivera B, Polak P, Foulkes WD. Monogenic Diseases of DNA Repair. N Engl J Med. 2018 Feb 1;378(5):491. PMID: 29394477 DOI: 10.1056/NEJMc1716072.

3） Crow YJ, Chase DS, Lowenstein Schmidt J, Szynkiewicz M, Forte GM, Gornall HL, Oojageer A, Anderson B, Pizzino A, Helman G, Abdel-Hamid MS, Abdel-Salam GM, Ackroyd S, Aeby A, Agosta G, Albin C, Allon-Shalev S, Arellano M, Ariaudo G, Aswani V, Babul-Hirji R, Baildam EM, Bahi-Buisson N, Bailey KM, Barnerias C, Barth M, Battini R, Beresford MW, Bernard G, Bianchi M, Billette de Villemeur T, Blair EM, Bloom M, Burlina AB, Carpanelli ML, Carvalho DR, Castro-Gago M, Cavallini A, Cereda C, Chandler KE, Chitayat DA, Collins AE, Sierra Corcoles C, Cordeiro NJ, Crichiutti G, Dabydeen L, Dale RC, D'Arrigo S, De Goede CG, De Laet C, De Waele LM, Denzler I, Desguerre I, Devriendt K, Di Rocco M, Fahey MC, Fazzi E, Ferrie CD, Figueiredo A, Gener B, Goizet C, Gowrinathan NR, Gowrishankar K, Hanrahan D, Isidor B, Kara B, Khan N, King MD, Kirk EP, Kumar R, Lagae L, Landrieu P, Lauffer H, Laugel V, La Piana R, Lim MJ, Lin JP, Linnankivi T, Mackay MT, Marom DR, Marques Lourenço C, McKee SA, Moroni I, Morton JE, Moutard ML, Murray K, Nabbout R, Nampoothiri S, Nunez-Enamorado N, Oades PJ, Olivieri I, Ostergaard JR, Pérez-Dueñas B, Prendiville JS, Ramesh V, Rasmussen M, Régal L, Ricci F, Rio M, Rodriguez D, Roubertie A, Salvatici E, Segers KA, Sinha GP, Soler D, Spiegel R, Stödberg TI, Straussberg R, Swoboda KJ, Suri M, Tacke U, Tan TY, te Water Naude J, Wee Teik K, Thomas MM, Till M, Tonduti D, Valente EM, Van Coster RN, van der Knaap MS, Vassallo G, Vijzelaar R, Vogt J, Wallace GB, Wassmer E, Webb HJ, Whitehouse WP, Whitney RN, Zaki MS, Zuberi SM, Livingston JH, Rozenberg F, Lebon P, Vanderver A, Orcesi S, Rice GI. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. Am J Med Genet A. 2015 Feb;167A(2):296-312. PMID: 25604658 DOI: 10.1002/ajmg.a.36887.

4) Reijns MA, Rabe B, Rigby RE, Mill P, Astell KR, Lettice LA, Boyle S, Leitch A, Keighren M, Kilanowski F, Devenney PS, Sexton D, Grimes G, Holt IJ, Hill RE, Taylor MS, Lawson KA, Dorin JR, Jackson AP. Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. Cell. 2012 May 25;149(5):1008-22. PMID: 22579044 DOI: 10.1016/j.cell.2012.04.011.