

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462662

研究課題名(和文) 原発性線毛運動不全症の診断精度向上に関する研究

研究課題名(英文) Research in the improvement in diagnostic accuracy for primary ciliary dyskinesia

研究代表者

竹内 万彦 (TAKEUCHI, Kazuhiko)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50206942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に本症が疑われる患者21名を対象に、電子顕微鏡にて100本あるいはそれに近い多数の線毛を観察することにより、10名の患者で明らかな線毛構造の異常を見出した。また、臨床的に本症が疑われる患者21名を対象に遺伝子検査を行い、4名で病的変異と考えられる遺伝子変異を見出した。具体的には、ダイニン外腕の欠損がみられる男児にDNAH5の複合ヘテロ変異が、ダイニン外腕欠損のみられる同胞例でDNA11のホモの変異が、構造上異常のない男児にDNAH11にヘテロのミスセンス変異がみられた。これら4つの変異は全て既知遺伝子であったが、新規変異であり、日本人に特有の遺伝子変異と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The diagnosis of primary ciliary dyskinesia (PCD) requires the presence of the characteristic clinical phenotypes and either: 1) specific ciliary ultrastructural defects identified by transmission electron microscopy; or 2) identification of mutation in one of the genes known to be associated with PCD. The diagnosis of PCD is not easy. We have identified ciliary ultrastructural defects in ten out of 21 PCD suspected patients, by assessing about 100 cilia per patient before reaching a diagnosis. Moreover, we have conducted genetic analysis in 21 patients with suspicion of PCD and found disease causing mutations in four patients. The analysis of their genomic DNA revealed compound heterozygous mutations in DNAH5 in one patient, homozygous mutations in DNA11 in two siblings, and heterozygous missense mutation in DNAH1 in one patient. Although these four mutations we found were from known PCD causing genes, all the four were novel mutations and probably unique to Japanese populations.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科

キーワード：線毛 遺伝子変異 電子顕微鏡 一酸化窒素 常染色体劣性遺伝 滲出性中耳炎 慢性副鼻腔炎 気管支拡張症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 小児で難治性の慢性副鼻腔炎に時に遭遇し、咳嗽を主訴とし、滲出性中耳炎や気管支拡張症を伴うものがあり、精査の結果、原発性線毛運動不全症であることを明らかにし、学会での発表や論文発表をしてきた。原発性線毛運動不全症は、先天的な線毛の機能異常により粘液線毛輸送機能が障害され、慢性副鼻腔炎、滲出性中耳炎、気管支拡張症、不妊を呈する稀な常染色体劣性遺伝の疾患である。内臓逆位を伴う例は Kartagener 症候群と呼称され診断は比較的容易であるが、内臓逆位を伴わない軽症例、非典型例の診断は容易ではなく、診断されていない症例が相当数あるものと思われる。その頻度はおよそ 15,000 ~ 30,000 に一人といわれ、本邦に 4000 ~ 8000 人の患者の存在が推定される。

(2) その診断には一般に電子顕微鏡検査による線毛の構造的異常を証明するか、線毛運動に関連する遺伝子の変異を証明する必要がある。しかしながら、このどちらも容易なものではないことを経験してきた。電子顕微鏡による検討に関しては、一患者の生検試料中にある線毛の構造はかなり多様であり、線毛を 2、3 本観察しただけでは正確な診断はできず、100 本近い線毛を観察して常に観察される構造的変化を探さないと正確な診断に至らないのではないかと考えるに至った。また、遺伝子変異についてはこれまで 12 の遺伝子が本疾患の原因であると報告されているが、全体の 30% 前後しか判明していない。また、その多くは欧米からの報告であり、人種差のために本邦では変異部位が同一遺伝子内でも欧米のものとは異なる可能性がある。これは、同じ原因遺伝子でも民族によって高頻度に見出される変異が異なるのは、それぞれ異なる共通先祖の存在によるものであることが明らかになっているからである。以上の経緯より、本邦において原発性線毛運動不全症の診断を進める必要があること、そのためには電子顕微鏡検査での診断の精度を上げる必要があり、また、遺伝子検査も積極的にすすめ、本邦における患者の遺伝子変異を明らかにしてゆく必要があると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

(1) 電子顕微鏡による解析において、各症例 100 本以上の線毛を観察することにより、各症例において確実に構造的異常の有無および異常の内容を明らかにすることを目標とする。これまでの経験より、慢性副鼻腔炎などの炎症により同一試料の線毛においてもかなり多様な線毛構造が観察されることが判明した。多くの線毛を観察することにより、どのような構造変化が遺伝子変異によるものであり、いかなるものが炎症による二次的なものかを明らかにする。また、遺伝子変異を同時に解析することにより、いかなる

遺伝子変異で線毛構造のどの部位に異常が出現するののかの関連も明らかになるものと期待される。

(2) 遺伝子の変異に関しては、これまでの研究により原因遺伝子としては次の 12 が判明している：*DNAI1*, *DNAH5*, *NME8*, *DNAH11*, *DNAI2*, *DNAAF2*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *DNAAF1*, *CCDC39*, *CCDC40*, *DNALI1*。このうち特に変異の頻度が多いとされている *DNAI1*, *DNAH5* について、ダイレクトシーケンスによる変異の同定、シーケンス、チップを用いての deletion, duplication の検索を行い、原因遺伝子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) スクリーニング。鼻腔一酸化窒素(NO)は本症の患者では低値を示すとされており、非侵襲的に短時間で測定できるためスクリーニングとして有用である。測定は ATS/ERS 標準法に従い、250ppb 未満を低値とした。鼻腔 NO を正確に測定できる機器である EcoMedics 社製 ANALYZER CLD 88<sup>®</sup>は、県内には三重病院に導入されている。そこで三重病院で鼻腔 NO を行った。鼻腔 NO が 250ppb 未満の患者は三重大学耳鼻咽喉科にて診察し、電子顕微鏡による検査のための鼻粘膜生検と遺伝子検査のための採血を行った。

(2) 電子顕微鏡検査による線毛の構造異常の検討。鼻粘膜生検は、鉗子を用いて下鼻甲介より行った。三重大学電顕室で標本作製と画像撮影を行った。この際、一検体につき 100 本以上の線毛の撮影を行い、形態異常の有無を検討した。

(3) 遺伝子検査による線毛運動に関連する遺伝子の変異の解析。三重大学オーダーメイド医療部にてゲノム DNA を抽出した。本疾患に関連することが報告されている *DNAI1* 遺伝子のエクソン 1, 13, 16, 17 とその周辺塩基配列および *DNAH5* 遺伝子のエクソン 34, 50, 63, 76, 77 とその周辺塩基配列の解析を行ない、遺伝子変異の有無の検討を行なった。これらに変異がみられない場合、全エクソーム解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 臨床的に本症が疑われる患者 21 名を対象に鼻粘膜を生検し、電子顕微鏡にて一人の患者につき 100 本あるいはそれに近い多数の線毛を観察することにより、10 名の患者で明らかな線毛構造の異常を見出した。その内訳は、ダイニン外腕の欠損あるいは短縮(図 1)が 8 名と最多であった。ダイニン内腕と外腕の欠損(図 2)が 1 名、ダイニン内腕と外腕および中心微小管の欠損(図 3)が 1 名にみられた。

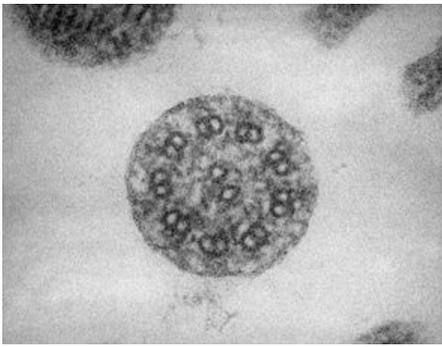


図1 ダイニン外腕欠損例

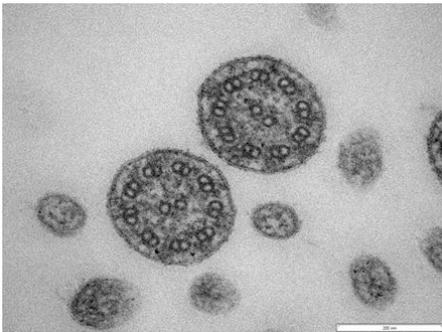


図2 ダイニン外腕と内腕欠損例

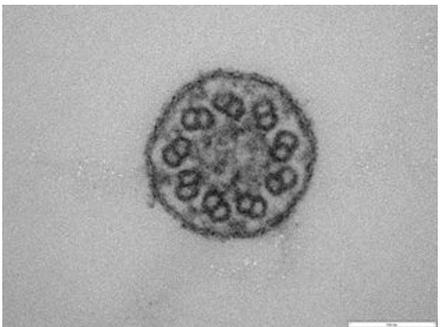


図3 ダイニン外腕内腕、中心微小管欠損例

(2)臨床的に本症が疑われる患者21名を対象に遺伝子検査を行い、4名で病的変異と考えられる遺伝子変異を見出した。次にこれらを具体的に述べる。

(3)ダイニン外腕の欠損がみられた9歳男児にDNAH5の複合ヘテロ変異がみられた。鼻腔NOは0.2 ppbと著しく低値であった。遺伝子検査の結果、患児にはc.5983C>T: p.R1995Xとc.9101delG: p.G3034VfsX22(参照配列NM\_001369.2)の2つのヘテロの変異がみられ、両親のサンガー法による塩基配列の検索により、前者は父より、後者は母から受け継いだ複合ヘテロ変異であることが判明した。

(4)ダイニン外腕欠損のみられる同胞例でDNAI1においてc.1163G>A: p.R388Y(参照配列NM\_012144)のホモの変異がみられた。

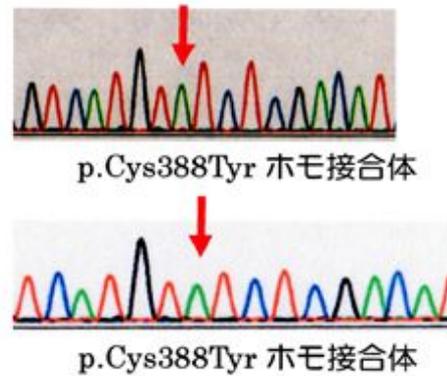


図4 同胞例にみられたDNAI1のホモのミスセンス変異(上段が姉、下段が弟)

(5)構造上異常のない男児において、DNAH11にヘテロのミスセンス変異c.12712C>A: p.L4238I(参照配列NM\_001277115.1)がみられた。

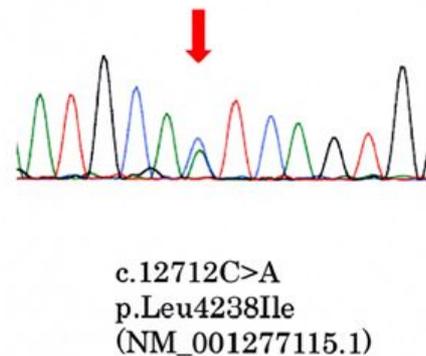


図5 DNAH11のミスセンス変異(ヘテロ)

(6)これら4つの変異は全て既知遺伝子であったが、新規変異であり、日本人に特有の遺伝子変異と考えられた。

#### 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7件)

Kano G, Tsujii H, Takeuchi K, Nakatani K, Ikejiri M, Ogawa S, Kubo H, Nagao M, Fujisawa T. Whole-exome sequencing identifies novel DNAH5 mutations in a Japanese boy with primary ciliary dyskinesia. Molecular Medicine Reports 査読有 2016(in press)

Orimo K, Kondo M, Arimura K, Takeyama K, Takeuchi K, Tamaoki J. Primary ciliary dyskinesia with complex abnormalities including cleavage of B-subfibers. Respirology Case Reports, 査読有 2016,4 (2), e00150  
doi: 10.1002/rcr2.150. eCollection 2016.

Takeuchi K, Kitano M, Ishinaga H, Kobayashi M, Ogawa S, Nakatani K, Masuda

S, Nagao M, Fujisawa T. Recent advances in primary ciliary dyskinesia. *Auris Nasus Larynx*. 査読有 2016, 43:229-236  
doi: 10.1016/j.anl.2015.09.012.

竹内 万彦. 線毛運動障害:軽症から重症まで. *小児科診療* 査読無 2015,78:903-911.

坂井田 寛、坂井田 麻祐子、北野 雅子、柴田 丈夫、小川 覚、竹内 万彦. Kartagener症候群の2症例. *耳喉頭頸* 査読有 2014,86:1121-1125.

竹内 万彦. 原発性線毛運動不全症 最近の進歩. *耳鼻臨床* 査読無 2014,10:345-353.

竹内 万彦. 気道疾患と鼻副鼻腔病変 原発性線毛運動不全症と鼻副鼻腔病変 JOHNS 査読無 2013,2:e877-882.

〔学会発表〕(計6件)

竹内 万彦、増田 佐和子、中谷 中、原発性線毛運動不全症の遺伝子解析、日本地類遺伝学会 第60回大会、2015年10月14日~17日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

Takeuchi K, Primary ciliary dyskinesia in the Japanese populations. The 13<sup>th</sup> Japan-Taiwan conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2015年12月4日、一橋ホール(東京都・千代田区)

竹内 万彦、粘液線毛機能に関連する検査、第54回日本鼻科学会、2015年10月2日 広島国際会議場(広島県・広島市)

松田恭典、石戸谷淳一、竹内万彦、びまん性汎細気管支炎を合併した原発性線毛運動不全症の一例、第54回日本鼻科学会、2015年10月2日 広島国際会議場(広島県・広島市)

竹内万彦、北野雅子、坂井田 寛、中村 哲、異なる臨床所見を呈した原発性線毛運動不全症の同胞例、第76回耳鼻臨床学会、2014年6月26-27日、盛岡グランドホテル(岩手県・盛岡市)

竹内万彦、西森 久史、坂井田 寛、原発性線毛運動不全症の確定診断に至らなかった同胞例、2013年6月20-21日、前橋テルサ(群馬県・前橋市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/otolaryngology/study/index.html#study01>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 万彦(TAKEUCHI, Kazuhiko)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 50206942

### (2) 研究分担者

北野 雅子(KITANO, Masako)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 20378334

藤澤 隆夫(FUJISAWA, Takao)  
独立行政法人国立病院機構三重病院(臨床研究部)・小児科・アレルギー科・院長  
研究者番号: 20511140

中谷 中(NAKATANI, Kaname)  
三重大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 80237304

### (3) 研究協力者

小川 覚(OGAWA, Satoru)