

令和元年5月15日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11210

研究課題名(和文)全エクソーム解析による原発性線毛運動不全症の原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Analysis of gene mutations causing primary ciliary dyskinesia by whole exome sequencing

研究代表者

竹内 万彦 (Takeuchi, Kazuhiko)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50206942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：はじめ全エクソーム解析により解析を開始したが、効率を考え、32の既知遺伝子について遺伝子パネルを作成し、解析を行った。臨床的に本症が疑われる患者93名(年齢3カ月～64歳)について、変異を検討した。その結果、次の変異が判明した。DNAH5では、16の変異が明らかとなった。DNAH11にも9の変異がみられた。また、CCDC40では2つの変異が、DNA11ではひとつの変異が、RSPH4Aではひとつの変異が明らかとなった。以上より、本邦においてもDNAH5、DNAH11が原因遺伝子としての頻度が高いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性線毛運動不全症は常染色体劣性遺伝する疾患で、診断が困難であり、多くの患者は診断がなされていない。これは、診断に電子顕微鏡による線毛の形態の観察と遺伝子検査による複合ヘテロあるいはホモの変異を証明することが必要であるからである。今回臨床的に本症が疑われる患者93名(3カ月～64歳)患者について、変異を検討し、DNAH5(16変異)、DNAH11(9変異)、CCDC40(2変異)、DNA11とRSPH4A(それぞれ1変異)に病的変異があることが判明した。これにより本邦における本疾患の原因遺伝子変異が明らかになり、今後、本症の診断が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We started gene mutation analysis by the whole exome sequencing, but we switched to gene panel analysis for 32 known genes, considering the efficiency of the analysis. We analyzed 93 patients (three months-64 years old) who were suspected of primary ciliary dyskinesia (PCD). As a result, the following mutations were found. c.894C>G, c.1599\_1600insT, c.1631C>T, c.5297C>T, c.5367delT, c.5563\_5564insA, c.5983C>T, c.6053T>C, c.7550\_7556delAGCTGCC, c.7561\_7573delCCAGCGGGGCC, c.9018C>T, c.9101delG, c.10616G>A, c.13286G>A, c.13837delG, c.9286C>T in DNAH5. c.940T>A, c.794G>A, c.1148G>A, c.2874A>C, c.9674T>G, c.10353+1G>A, c.10411G>A, c.12310C>T, c.12331C>T in DNAH11. Thus, it was found that mutations in DNAH5 and DNAH11 are prevalent in the Japanese patients with PCD.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性線毛運動不全症 (PCD) は慢性副鼻腔炎、気管支拡張症、不妊を呈し、常染色体劣性遺伝形式で遺伝する難治性の疾患である。内臓逆位を伴わない症例では診断は困難といわれている。本症の診断には電子顕微鏡検査と遺伝子検査が必要であるが、本邦における遺伝子変異の報告は少なく、欧米に比べて著しく遅れていた。そのため多くの患者は診断がついていないと考えられた。電子顕微鏡にて構造異常もない場合もあり、遺伝子変異の証明は大切である。この研究はエクソーム解析を中心とした遺伝子解析を行うことにより、本邦における本症の遺伝子変異を見出すことを目的とした。研究開始当初では30の原因遺伝子が知られていたが、未知の遺伝子もまだ多いと考えられ、新規遺伝子の発見につながる可能性もあった。

(2) PCD 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。研究開始当初から以前の3年間、「原発性線毛運動不全症の診断精度向上に関する研究」という題目で本症の診断精度向上について取り組んできた。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ことが明らかになった。研究開始までに、臨床症状から本症が疑われる21名の患者について遺伝子検査を行った。そのうち4名については本症の原因として知られている既知遺伝子 (*DNAH5*, *DNAI1*, *DNAH11*) において病的変異と思われる4つの変異を見出していた。

### 2. 研究の目的

(1) 本症の診断において遺伝子検査は線毛の電子顕微鏡検査と並んで大変重要と位置づけられている。遺伝子の検査で病的遺伝子を見出すことは直接本症の確定診断に結びつく。効率的に病的遺伝子を見出すためには、本症の原因の15~29%を占める *DNAH5* と6~9%を占める *DNAI1* の2遺伝子の hot spots (特に変異の多い領域) をダイレクトシーケンスし、これで変異が見出されない場合には全エクソーム解析することが当初の計画であった。本症は比較的稀であり、紹介患者は年間数名であった。また、上記の遺伝子の検査を行っても、病的遺伝子が見出されるのは全体の1~2割であるのが現実であった。よって、3年間のうちに15~20名ほどの患者について遺伝子解析を行い、最低でも2~4名について病的遺伝子を突き止めたいと考えていた。遺伝子解析の技術的向上と解析する側の経験と能力の向上により遺伝子解析の効率は向上することが予想されるので、可能であれば10名で原因遺伝子を突き止める予定であった。既知遺伝子の新規変異が見出されることが多いだろうが、30の既知遺伝子が全体のおよそ半分を占めるであろうことから、新規の原因遺伝子が見つかる可能性もあった。

(2) 本邦においては医師側にも十分な知識がなく、内臓逆位のない例においては、診断されている例が少なく、そのような患者は一生診断されずに難治性の副鼻腔炎と気管支拡張症として医療機関を転々とすることも多い。この原因は、本症が耳鼻科、小児科、内科などの領域にまたがり、本症のスクリーニングに鼻腔一酸化窒素 (NO) 濃度の測定が、診断には電子顕微鏡による線毛の構造の観察、関連遺伝子の変異の証明が必要という特殊性にあった。この特殊性を克服する研究体制が必要であり、耳鼻科を中心として小児科医、遺伝子検査の専門医および電子顕微鏡の技師 (研究協力者) と協力体制を組み、効率的かつ正確に診断を進めるような研究体制を組んだ。また、本研究の成果を学会発表、論文での発表、ホームページでの紹介をすることにより、医師および一般国民への啓蒙が進むものと思われた。頻度から考えて本邦に4,000~8,000人の患者の存在が推定されるが、その多くが診断されていない現状を考えると、啓蒙が進めば多くの患者が診断されるものと期待できた。本症は常染色体劣性遺伝する疾患であるため、両親は保因者であるが無症状であり、子供がなぜ難治性の呼吸器疾患を繰り返すか悩んでいる場合が少なくなかった。確定診断がつくと両親も納得しその後の管理もスムーズになる。本研究により本症の遺伝子検査が効率的にかつ迅速に行われるようになると期待された。

### 3. 研究の方法

(1) スクリーニング。鼻腔 NO 濃度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 GLD 88<sup>®</sup> は、県内には三重病院に導入されていた。鼻腔 NO 濃度の低い症例および正常あるいは高値であっても臨床症状から強く PCD が疑われる症例について電子顕微鏡による線毛の形態の観察と遺伝子変異の検索を行った。

(2) 電子顕微鏡による線毛の構造異常の検討。鼻粘膜生検は、はじめ鉗子を用いて下鼻甲介より行っていたが、細胞診のブラシを用いた方が効率よく線毛が採取できることが判明し、鼻腔にブラシをいれて線毛を採取した。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に努めたが、実際に100本の線毛を見出すことは困難であった。

(3)線毛運動に関連する遺伝子の変異の解析。はじめ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サンガー法にて行ない、遺伝子変異の有無の検討を行なった。しかし、このスクリーニングではほとんど原因遺伝子は見つからず、欧米における原因遺伝子の hot spots と本邦でのそれが異なる可能性が示唆された。次に、何例かにつき全エクソーム解析で原因遺伝子を解析した。全エクソーム解析は、Ion Proton により次の手順で行った。Ion AmpliSeq Exome RDY Kit (Life Technologies) でDNAを増幅、Torrent Variant Caller (TVC, Version 4.6) を用いて変異の calling、Ion Reporter Version 5.0 (Life Technologies) を用いて変異のアノテーション付加をおこなった。しかし、全エクソーム解析で見出したのは *DNAH5* の一例のみであった。そこで、より効率よく原因遺伝子を解析する目的で、遺伝子パネルを作成し原因遺伝子変異を明らかにすることを試みた。Ion Torrent PGM システムを用いて既知の32遺伝子のエクソンとその周辺領域を増幅し、塩基配列を決定し参照配列と比較して変異を同定した。検討した遺伝子は、*ARMC4*, *C21orf59*, *CCDC103*, *CCDC114*, *CCDC151*, *CCDC39*, *CCDC40*, *CCDC65*, *CCNO*, *DNAAF1*, *DNAAF2*, *DNAAF3*, *DNAAF5*, *DNAH1*, *DNAH11*, *DNAH5*, *DNAH8*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAL1*, *DRC1*, *DYX1C1*, *HYDIN*, *LRR6*, *MCIDAS*, *NME8*, *RSPH1*, *RSPH3*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *SPAG1*, *ZMYND10* である。

#### 4. 研究成果

(1) 臨床的に本症が疑われる患者93名(年齢3カ月~64歳)について、変異を検討した。その結果、25名でホモあるいは複合ヘテロ変異を見出すことができた。みられた変異は次の表の通りである。

遺伝子名	遺伝子変異	アミノ酸変異
<i>DNAH5</i>	c.894C>G	N298K
<i>DNAH5</i>	c.1599_1600insT	D534*
<i>DNAH5</i>	c.1631C>T	T544I
<i>DNAH5</i>	c.5297C>T	S1766F
<i>DNAH5</i>	c.5367delT	N1790I fs*14
<i>DNAH5</i>	c.5563_5564insA	I1855N fs*6
<i>DNAH5</i>	c.5983C>T	R1995X
<i>DNAH5</i>	c.6053T>C	I2018T
<i>DNAH5</i>	c.7550_7556delAGCTGCC	E2517G fsX52
<i>DNAH5</i>	c.7561_7573delCCAGCGGGGCC	P2521G fs*46
<i>DNAH5</i>	c.9018C>T	(スプライシング変異)
<i>DNAH5</i>	c.9101delG	G3034V fs*23
<i>DNAH5</i>	c.10616G>A	R3539H
<i>DNAH5</i>	c.13286G>A	R4429Q
<i>DNAH5</i>	c.13837delG	V4613*
<i>DNAH5</i>	c.9286C>T	R3096*
<i>DNAH11</i>	c.940T>A	Y314N
<i>DNAH11</i>	c.794G>A	R265H
<i>DNAH11</i>	c.1148G>A	R383Q
<i>DNAH11</i>	c.2874A>C	K958N
<i>DNAH11</i>	c.9674T>G	L3225R
<i>DNAH11</i>	c.10353+1G>A	(スプライシング変異)
<i>DNAH11</i>	c.10411G>A	E3471K
<i>DNAH11</i>	c.12310C>T	R4104*
<i>DNAH11</i>	c.12331C>T	R4111*
<i>CCDC40</i>	c.580-1G>C	(スプライシング変異)
<i>DNAH11</i>	c.2527C>T	L843F
<i>DNAI1</i>	c.1163G>A	C388Y
<i>RSPH4A</i>	c.102T>G	Y34*

以上より、本邦においても欧米の報告と同様 *DNAH5*, *DNAH11* が原因遺伝子としての頻度が高いことが明らかになった。その変異を詳しくみると、新規遺伝子変異も多くみられ、本邦に特有な変異と思われた。

(2) 当初予定していた症例数よりもはるかに多い患者93名について、変異を検討することができ、その結果、25名で原因遺伝子を特定できた。これは、全エクソーム解析にこだわらず、32遺伝子の遺伝子パネルを作成して解析を始めたことが大きかった。他院や他府県からの紹介も

多くなり、多くの症例について検討することが可能となった。

(3)本症における中耳病変を検討した。確定診断の得られた15名の患者で検討したところ、30例すべての鼓膜に異常を認めた。14名は滲出性中耳炎あるいはその後遺症の鼓膜所見を呈した。残る一名では慢性中耳炎を呈した。標準純音聴力検査の気導聴力レベルの平均は右25.0 dB、左26.4 dBであり、良聴耳22.3 dB、非良聴耳29.0 dBであった。以上より本症の鼓膜は多彩な所見を呈し、これらを知っておくことが本症の発見につながると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

- (1) 竹内万彦. 原発性線毛運動不全症を正しく診断するために. 耳鼻咽喉科臨床. 査読無、2019; 112(2): 73-82.  
DOI : <https://doi.org/10.5631/jibirin.112.73>
- (2) Takeuchi K, Kitano M, Kiyotoshi H, Ikegami K, Ogawa S, Ikejiri M, Nagao M, Fujisawa T, Nakatani K. A targeted next-generation sequencing panel reveals novel mutations in Japanese patients with primary ciliary dyskinesia. *Auris Nasus Larynx*. 査読有、2018;45(3):585-591.  
DOI : [10.1016/j.anl.2017.09.007](https://doi.org/10.1016/j.anl.2017.09.007).
- (3) 竹内万彦、小林正佳、松田恭典. 慢性副鼻腔炎の背景にある原発性線毛運動不全症に気づいていなかった！耳鼻咽喉科・頭頸部外科 査読無、2018;90(12):1018-1023.  
<https://doi.org/10.11477/mf.1411201868>
- (4) 竹内万彦. 難治性鼻副鼻腔炎. *JOHNS* 査読無、2018;34(11): 1555-1560 .
- (5) 竹内万彦. オスラー病と原発性線毛運動不全症. *耳喉頭頸1*, 査読無、2018;90(8):654-659.  
<https://doi.org/10.11477/mf.1411201783>
- (6) 竹内万彦. 原発性線毛運動不全症の臨床. *Therapeutic Research* 査読無、2018 ;39(6):530-532.
- (7) Takeuchi K, Kitano M, Sakaida H, Usui S, Masuda S, Ogawa S, Ikejiri M, Nagao M, Fujisawa T, Nakatani K. Analysis of Otologic Features of Patients With Primary Ciliary Dyskinesia. *Otol Neurotol*. 査読有、2017;38(10):e451-e456.  
DOI : [10.1097/MAO.0000000000001599](https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000001599).
- (8) 竹内万彦. 原発性線毛運動不全症. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科. 査読無 2017;89(12) ;1008-1017.
- (9) 山本小百合, 戸嶋一郎, 竹内万彦, 清水猛史. 難治性慢性鼻副鼻腔炎を契機に診断された原発性線毛運動不全症例. 耳鼻咽喉科臨床、査読無、2017;110(8):531-538.  
<https://doi.org/10.5631/jibirin.110.531>
- (10) 竹内万彦. 原発性線毛運動不全症 診断のヒントー. 小児耳鼻咽喉科、査読無 2017; 38(3);245-252.  
<https://doi.org/10.11374/shonijibi.38.245>
- (11) 竹内万彦. 副鼻腔気管支症候群 - up to date - .日本気管食道科学会専門医通信、査読無 2017;55:8~17.
- (12) 竹内万彦. 原発性線毛運動不全症. 呼吸器内科、査読無、2017; 31(5): 449-457.
- (13) G, Tsujii H, Takeuchi K, Nakatani K, Ikejiri M, Ogawa S, Kubo H, Nagao M, Fujisawa T. Whole-exome sequencing identification of novel DNAH5 mutations in a young patient with primary ciliary dyskinesia. *Mol Med Rep*. 査読有、2016;14(6):5077-5083.  
DOI : [10.3892/mmr.2016.5871](https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5871).

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 竹内万彦、次世代シーケンサーを用いた原発性線毛運動不全症の遺伝子診断、第70回日本気管食道科学会、2018年11月9日、東京都品川区
- (2) 竹内万彦、北野雅子、藤澤隆夫、小川覚、池尻誠、中谷中、遺伝子パネルを用いた原発性線毛運動不全症の遺伝子診断、第25回日本遺伝子診療学会大会、2018年7月14日、三重県伊勢市
- (3) 竹内万彦、遺伝子パネルによる原発性線毛運動不全症の遺伝子変異の解析、第13回日本小児耳鼻咽喉科学会、2018年7月13日、神奈川県横浜市、
- (4) 竹内万彦、原発性線毛運動不全症ー診断のヒントー、第12回日本小児耳鼻咽喉科学会(招待講演) 2017年6月2日、栃木県宇都宮市
- (5) 竹内万彦、北野雅子、次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネルによる原発性線毛運動不全症の診断、第118回日本耳鼻咽喉科学会、2017年5月18日、広島県広島市
- (6) 竹内万彦、北野雅子、遺伝子診断パネルによる原発性線毛運動不全症の診断、日本鼻科学会、2016年10月16日、栃木県・宇都宮市
- (7) Kazuhiko Takeuchi, Kaname Nakatani, Makoto Ikejiri, Satoru Ogawa, Mizuho Nagao, Takao Fujisawa, Koji Ikegami. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia by a Targeted Next-Generation Sequencing Panel in Japanese Patients. The 28th CDB Meeting, Cilia and

Centrosomes (国際学会), 2016年11月27日,兵庫県神戸市

〔図書〕(計1件)

(1)竹山宜典、(中略)竹内万彦、他、名古屋大学消費生活協同組合 印刷部、嚢胞性線維症の診療の手引き(改訂2版)、2018年、125頁(61-62)

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：北野 雅子

ローマ字氏名：(KITANO, Masako)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 20378334

研究分担者氏名：藤澤 隆夫

ローマ字氏名：(FUJISAWA, Takao)

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構三重病院(臨床研究部)

部局名：独立行政法人国立病院機構三重病院

職名：院長

研究者番号(8桁): 20511140

研究分担者氏名：中谷 中

ローマ字氏名：(NAKATANI, Kaname)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学部附属病院

職名：教授

研究者番号(8桁): 80237304

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：小川 覚

ローマ字氏名：(OGAWA, Satoru)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。