

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09886

研究課題名(和文) 遺伝子パネルと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解析

研究課題名(英文) Analysis of the disease causing genes of primary ciliary dyskinesia by gene panel and whole exosome analysis

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：原発性線毛運動不全症は線毛に関連する遺伝子の病的バリエーションにより、慢性鼻副鼻腔炎、中耳炎、気管支拡張症、内臓逆位などをきたす遺伝性疾患である。約50の原因遺伝子が知られているが、本邦での原因遺伝子の頻度は不明であった。原因遺伝子は人種によって異なることが知られており、本邦における原因遺伝子を効率的に明らかにする目的で、32の既知遺伝子からなるパネルにて検索し、それで不明の場合、全エクソーム解析にて解析した。その結果、DRC1の両アレルの欠損が最も多く、次にDNAH5が多いことが明らかになった。DRC1は他の人種では頻度が低く、本邦あるいは東アジアに特徴的な原因遺伝子であると推定される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の原発性線毛運動不全症の原因遺伝子として、DRC1の両アレルの欠損とDNAH5の病的バリエーションが多いことが判明した。これにより本邦における遺伝学的検査が推進されると考えられる。また、世界的にみてDRC1の広範囲な欠損は韓国人と日本人で報告されているのみであり、人種による差異があることは興味深い。

本症は小児慢性特定疾病であるが、成人においては指定難病ではない。患者は長期間にわたり呼吸機能障害に悩むので、今回の成果により指定難病申請を行い、指定難病となれば患者にとって得るところが大きい。

研究成果の概要(英文)：Primary ciliary dyskinesia is a hereditary disease that causes chronic nasal sinusitis, otitis media, bronchiectasis, and situs inversus due to pathogenic variants of cilia-related genes. About 50 causative genes are known, but the frequency of causative genes in Japan had been unknown. It is known that the causative gene differs depending on the race, and in order to clarify the causative gene in Japan efficiently, gene analysis by a panel consisting of 32 known genes, followed by whole exome analysis in case the panel failed to reveal the causative genes, was performed. As a result, it was clarified that the deletion of both alleles of DRC1 was the most frequent gene variant, followed by DNAH5. DRC1 is rare in other races and is presumed to be the causative gene characteristic of Japan or East Asia.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：線毛 遺伝子 ゲノム パネル エクソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性線毛運動不全症は、線毛に関連する遺伝子の両アレル(一部は片アレル)の病的バリエーションによって引き起こされる常染色体潜性遺伝疾患(一部 X 連鎖遺伝)である。原因遺伝子については、*DNAH5* の発見から始まり、研究開始の時点で 30 を超える原因遺伝子が同定されている。原因遺伝子の変異を明らかにすることは本症の診断にも重要である。

(2) 本症の遺伝子解析にかかわってきて、既知遺伝子が原因であっても本邦の患者では新規の変異であることも多いこと、また、明らかな臨床症状をもつにもかかわらず、既知遺伝子には変異がみられず、これまで本症の原因遺伝子として報告されていない新規遺伝子が原因となっている可能性が大きいのではないかと考えるに至った。新規の原因遺伝子を見出すことは線毛形成にかかわる新しい知見を見出すことであり、学問的にも魅力的であり、意義は大きい。ただ、新規原因遺伝子を見出すことは長時間を要し、技術的な困難も伴う。そこで、効率よく既知遺伝子の変異を見つけてデータベースを構築しつつ、新規原因遺伝子を見出す方法を考えた時、遺伝子パネルでスクリーニングし、それで原因が見いだせなかった例について全エクソーム解析をするとの 2 段階構えの方法がよいと考えるに至った。

2. 研究の目的

(1) 目的は効率よく既知遺伝子の変異を見つけてデータベースを構築しつつ、新規原因遺伝子を見出すことである。

(2) 本症では半数に内臓逆位を伴うが、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濃度の測定が必要であり、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る。この特殊性を克服する研究体制が必要であり、これまで私たちは、耳鼻咽喉科医を中心として、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できた。臨床検査にかかわる医師とも協力して遺伝子検査を行い、効率的に変異をみだし、可能であれば日本人に特有の新規原因遺伝子を見出すことを目標としているところに本研究の学術的な特色・独創的な点がある。

3. 研究の方法

効率よく本症が疑われる症例をスクリーニングし、検査、研究を進めるために、鼻腔一酸化窒素測定、電子顕微鏡検査による線毛の構造解析、遺伝子変異の解析の 3 つの方法を用いる。

(1) 鼻腔一酸化窒素測定：鼻腔一酸化窒素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(*Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-930.) に従い、250 ppb 未満を低値とする。鼻腔一酸化窒素濃度を正確に測定できる機器である EcoMedics 社製 ANALYZER CLD 88®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一酸化窒素濃度測定を行う。鼻腔一酸化窒素濃度が 250 ppb 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う。

(2) 電子顕微鏡検査による線毛の構造解析：鼻粘膜生検は、成人の場合鉗子を用いて下鼻甲介より行い、小児の場合は細胞診用のブラシを用いる。三重大学電顕室で標本作製と画像撮影を行う。この際、一検体につき 30 本以上の線毛の撮影を行い、形態異常の有無を検討する。

(3) 遺伝子変異の解析：三重大学オーダーメイド医療部にてゲノム DNA を抽出する。本症の原因遺伝子として知られている 32 遺伝子(*ARMC4*, *C21orf59*, *CCDC103*, *CCDC114*, *CCDC151*, *CCDC39*, *CCDC40*, *CCDC65*, *CCNO*, *DNAAF1*, *DNAAF2*, *DNAAF3*, *DNAAF5*, *DNAH1*, *DNAH11*, *DNAH5*, *DNAH8*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAL1*, *DRC1*, *DYX1C1*, *HYDIN*, *LRR66*, *MCIDAS*, *NME8*, *RSPH1*, *RSPH3*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *SPAG1*, *ZMYND10*)について作成した遺伝子パネルにて、エクソンとその周辺塩基配列の解析を行う。

遺伝子変異の有無の検討を行ない、パネルで判明した変異についてはサンガー法による確認を行う。これらに変異がみられない場合、全エクソーム解析のための DNA 増幅を行い、その結果を解析し、原因遺伝子と考えられる変異についてサンガー法による確認を行う。

4. 研究成果

(1) 本症が疑われた患者のうち 89 例(男性 33 名、女性 56 名)にて原因遺伝子を特定できた。

生後1か月から66歳に分布し、中央値は14歳であった。紹介元の科は、呼吸器内科(n=33)が最多で、小児科(n=41)、耳鼻咽喉科(n=14)、遺伝科(n=1)の順だった。

(2)原因遺伝子の内訳は、*DRC1*(n=31)、*DNAH5*(n=29)、*DNAH11*(n=7)、*CCDC39*(n=4)の順に多く、上位を占めた。このほか、*CCNO*、*CCDC40*、*DNAI1*、*DNAI2*、*GAS2L2*、*SPEF2*がそれぞれ2例ずつ、*ARMC4*、*DNAAF3*、*DNAH8*、*DNAH9*、*PIH1D3*、*RSPH4*がそれぞれ1例ずつであった(図1)。紹介元の科別で原因遺伝子の内訳に偏りはなかった。

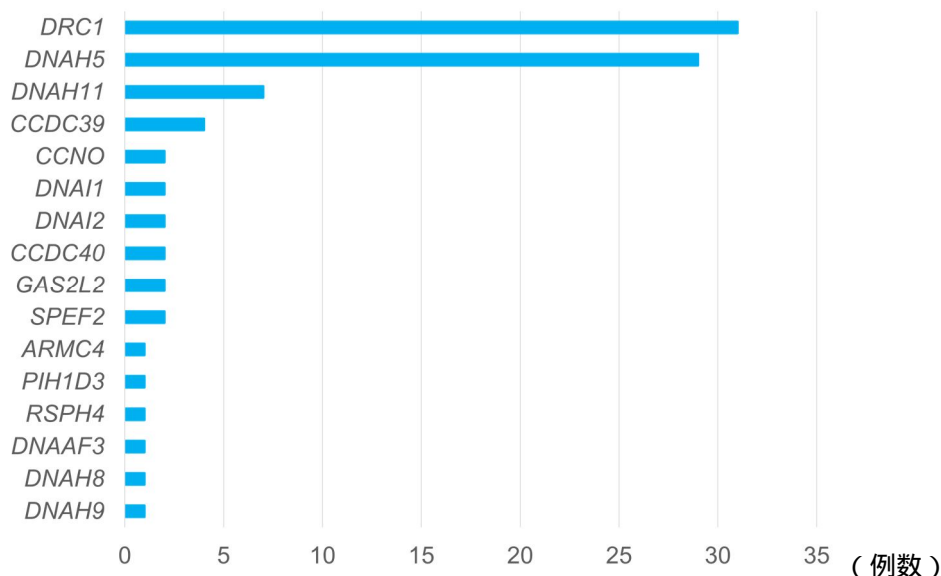


図1 本邦の原発性線毛運動不全症の原因遺伝子の内訳 (n=89)

(3)原因として最多の31例にみられた*DRC1*のバリエントのうち、30例はエクソン1~4を含む27,748塩基の両アレルの欠失であった。サンガー法で確認したが、欠失部位は30例全て(60アレル)で全く同じであった。この欠失が原因である患者の鼻粘膜線毛の形態として、軸糸構造の乱れや中心微小管の欠損など、多彩な構造異常がみられた。また、*DRC1*が原因である症例には内臓逆位が一例もみられなかった。これは、*DRC1*の蛋白が欠損しても内臓の非対称性決定に関与する胎生期のノードにおける一次線毛の機能が保たれるためであると推定した。このため、本邦の患者では内臓逆位が認められる割合が諸外国と比べて低く、診断困難の一因となっていると考えた。

(4)*DRC1*に次いで多かった*DNAH5*の病的バリエントは多彩であった。しかし、表1に示すように頻度の多いものもあり、本邦の患者ではバリエントが生じやすい箇所が共通している可能性が示唆された。

表1 *DNAH5*のバリエントの内訳

頻度	Coding DNA の変化	アミノ酸上の変化	バリエントの種類
7	9018C>T		splice sites
6	5367del	N1790I fs*14	frameshift
6	5563_5564 insA	I1855N fs*6	frameshift
4	9365del	L3122*	nonsense
2	10022T>C	L3341P	missense
2	11028+2T>C		splice sites
2	13837del	V14613fs	frameshift
2	2584T>C	C862R	missense
2	5131C>T	R1711*	nonsense
2	7550_7556del ; 7561_7573del		frameshift
2	9286C>T	R3096*	nonsense

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kazuhiko Takeuchi, Yifei Xu, Satoru Ogawa, Makoto Ikejiri, Kaname Nakatani, Shimpei Gotoh, Satoko Usui, Sawako Masuda, Mizuho Nagao, Takao Fujisawa	4. 巻 8
2. 論文標題 A pediatric case of productive cough caused by novel variants in DNAH9	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Genome Var	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-020-00134-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yifei Xu, Satoru Ogawa, Yuichi Adachi, Naoyuki Sone, Shimpei Gotoh, Makoto Ikejiri, Kaname Nakatani, Kazuhiko Takeuchi	4. 巻 31
2. 論文標題 A Pediatric Case of Primary Ciliary Dyskinesia Caused by Novel Copy Number Variation in PIH1D3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2021.03.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurokawa A, Kondo M, Orimo M, Honda N, Miyoshi A, Akaba T, Tsuji M, Nakatani K, Ikejiri M, Yagi O, Takeyama K, Takeuchi K, Tagaya E	4. 巻 12
2. 論文標題 Multifaceted analysis of Japanese cases of primary ciliary dyskinesia: Value of immunofluorescence for ciliary protein detection in patients with DNAH5 and DNAH11 mutations.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respir Investig	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.resinv.2021.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi K, Xu Y, Kitano M, Chiyonobu K, Abo M, Ikegami K, Ogawa S, Ikejiri M, Kondo M, Gotoh S, Nagao M, Fujisawa T, Nakatani K.	4. 巻 8(3)
2. 論文標題 Copy number variation in DRC1 is the major cause of primary ciliary dyskinesia in the Japanese population.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Genet Genomic Med	6. 最初と最後の頁 e1137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mgg3.1137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Orimo M, Kondo M, Takeyama K, Abe K, Miyoshi A, Honda N, Ichikawa A, Takeuchi K, Tagaya E.	4. 巻 58(16)
2. 論文標題 A Japanese case of primary ciliary dyskinesia with DNAH5 mutations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 2383-2386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chiyonobu Kazuki, Xu Yifei, Feng Guofei, Saso Shun, Ogawa Satoru, Ikejiri Makoto, Abo Miki, Kondo Mitsuko, Gotoh Shimpei, Kubo Hisami, Hosoki Koa, Nagao Mizuho, Fujisawa Takao, Nakatani Kaname, Takeuchi Kazuhiko	4. 巻 49
2. 論文標題 Analysis of the clinical features of Japanese patients with primary ciliary dyskinesia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 248 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2021.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurokawa Atsushi, Kondo Mitsuko, Honda Nahoko, Orimo Mami, Miyoshi Azusa, Kobayashi Fumi, Abe Kazuhiro, Akaba Tomohiro, Tsuji Mayoko, Arimura Ken, Nakatani Kaname, Ikejiri Makoto, Yagi Osamitsu, Takeyama Kiyoshi, Katsura Hideki, Takeuchi Kazuhiko, Tagaya Etsuko	4. 巻 60
2. 論文標題 Analysis of the diagnosis of Japanese patients with primary ciliary dyskinesia using a conditional reprogramming culture	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 407 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2022.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 竹内万彦、千代延和貴、北野雅子
2. 発表標題 本邦の原発性線毛運動不全症の臨床的特徴
3. 学会等名 第82回耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内万彦
2. 発表標題 1 歳未満で原発性線毛運動不全症が疑われ診断に至った 2 症例
3. 学会等名 第15回日本小児耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内万彦、小川 覚、池尻 誠、中谷 中、増田佐和子
2. 発表標題 DNAH9 遺伝子バリエーションによる原発性線毛運動不全症の一例
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuhiko Takeuchi, Yifei Xu, Kazuki Chiyonobu, Hisami Kubo, Feng Guofei, Satoru Ogawa, Makoto Ikejiri, Kaname Nakatani, Satoko Usui, Sawako Masuda, Mizuho Nagao, Takao Fujisawa
2. 発表標題 A pediatric case of productive cough caused by mutations in DNAH9
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内万彦
2. 発表標題 DRC1のcopy number variationは本邦の原発性線毛運動不全症の主要な原因で多彩な線毛構造を呈する
3. 学会等名 第59回日本鼻科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内万彦、北野雅子、池上浩司、小川 覚、池尻 誠、増田佐和子、長尾みづほ、藤澤隆夫、中谷 中
2. 発表標題 本邦の原発性線毛運動不全症患者におけるcopy number variationの解析
3. 学会等名 第64回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内万彦、北野雅子
2. 発表標題 原発性線毛運動不全症患者におけるcopy number variationの検討
3. 学会等名 第58回日本鼻科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徐 軼菲、小川 覚、池尻 誠、中谷 中、竹内万彦
2. 発表標題 原発性線毛運動不全症における線毛形態の解析
3. 学会等名 第177回東海地方部会連合講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内万彦、 Xu Yifei
2. 発表標題 線毛形成に関連するCCNO遺伝子にバリエーションがみられた線毛機能不全症候群の小児例
3. 学会等名 第2回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiko Takeuchi
2. 発表標題 Copy Number Variation in DRC1 is the Major Cause of Primary Ciliary Dyskinesia in the Japanese Population
3. 学会等名 the 18th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiko Takeuchi
2. 発表標題 Evaluation of mucociliary function in primary ciliary dyskinesia
3. 学会等名 The 63rd Annual Congress of Korean Rhinologic Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内万彦、坂井田 寛、北野雅子
2. 発表標題 長期間観察しえた線毛機能不全症候群同胞例の耳科的所見
3. 学会等名 第31回日本耳科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内万彦、足立雄一、池尻 誠、中谷 中
2. 発表標題 PIH1D3 の欠損による線毛機能不全症候群の小児例
3. 学会等名 第66回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhiko Takeuchi
2. 発表標題 Copy Number Variation in DRC1 is the Major Cause of Primary Ciliary Dyskinesia in Japan
3. 学会等名 20th Asian Research Symposium in Rhinology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徐 軼菲、竹内 万彦
2. 発表標題 原発性線毛運動不全症における鼻粘膜線毛の電子顕微鏡所見の検討
3. 学会等名 第1回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内万彦、足立 雄一
2. 発表標題 PIH1D3のコピー数多型による原発性線毛運動不全症例
3. 学会等名 第16回日本小児耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内万彦
2. 発表標題 副鼻腔気管支症候群と原発性線毛運動不全症
3. 学会等名 第96回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内万彦
2. 発表標題 線毛機能不全による鼻副鼻腔炎
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴村美聡, 松脇由典, 竹内万彦
2. 発表標題 DNAH8による原発性線毛運動不全症を背景とした慢性鼻副鼻腔炎例
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北野 雅子 (KITANO Masako) (20378334)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	
研究分担者	藤澤 隆夫 (FUJISAWA Takao) (20511140)	独立行政法人国立病院機構三重病院（臨床研究部）・独立行政法人国立病院機構三重病院・名誉院長 (84103)	
研究分担者	中谷 中 (NAKATANI Kaname) (80237304)	三重大学・医学部附属病院・教授 (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	池尻 誠 (IKEJIRI Makoto)		
研究協力者	小川 寛 (OGAWA Satoru)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関