

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 04 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591122

研究課題名（和文）

遺伝子検査の社会的要請に応じた簡便な遺伝子変異スクリーニング法の開発と普及

研究課題名（英文）

研究代表者

新井田 要 (NIIDA YO)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・准教授

研究者番号：40293344

研究成果の概要（和文）：我が国においては、既に多くの医師が遺伝子検査を臨床検査の一つとして捉えるようになってきているが、コストが高く特殊な設備を持つ施設でなければ実施できないという理由で現実には普及していない。本研究では CHIPS 法による簡便かつ安価な遺伝子診断システムを構築し、60 疾患(73 遺伝子)に関して迅速遺伝子診断を提供できることを実証した。今後は本システムを用いた遺伝子検査の普及が期待される。

研究成果の概要（英文）：In Japan, many clinicians consider DNA diagnosis is one of the clinical laboratory test. However, because of high cost and requirement of special instruments, DNA diagnosis is not come into wide use. In this study, we developed CHIPS technology as simple, accurate and low cost mutation screening system. We set up CHIPS system to 60 genetic diseases, including 73 genes and demonstrated its utility. We hope spread gene tests by CHIPS among Japanese patients in near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学・遺伝・先天異常

キーワード：遺伝子診断，酵素ミスマッチ法，MLPA 法

1. 研究開始当初の背景

先天性疾患をはじめとし遺伝子診断は既に一般的な診断検査の一つとして臨床応用されている。しかし、最も普及し、ゴールドスタンダードとして行われている方法は対象遺伝子の全ての翻訳領域の塩基配列を PCR 法で増幅し、増幅産物の全てをダイレクトシーケンス法で逐次的に決定し変異を見いだす方法

であり、責任遺伝子が巨大分子である場合には、時間・労力・コストのいずれの観点からでも対応できていない。遺伝子変異スクリーニングのための機器も種々存在するが、いずれも 2 千万円以上の高価なものであり、一般的な研究施設・病院に導入するのは難しく、現実には普及していない。

一方、平成 20 年度診療報酬改定により先

天異常 13 疾患に関して遺伝子検査の保険適応が認められるようになったが、保険上の点数は 2000 点に決められており、原価 2 万円以下で検査を行うことが要求されている。今後、遺伝子診断の需要は益々増えるものと予想されるが、日本では遺伝子検査施設のセンター化は進まず、研究施設毎に対象疾患を絞って行う検査に限られている。また、検査会社も遺伝子検査は採算が合わないために、検査項目は増えていない。

このような現状を打破するために、代表研究者らはどのような施設でも、安価な設備と試薬で高感度かつ high throughput な遺伝子変異スクリーニングを行えるシステムを開発することを着想するに至った。

2. 研究の目的

上記のような現状を打破するために、代表研究者らは新たな遺伝子変異スクリーニングシステムとして2008年にCHIPS (CEL nucleasemediated heteroduplex incision with polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining)法を開発した (Tsuji T, Niida Y. Electrophoresis. 2008 Apr;29(7):1473-83.)。

本研究では、代表的な50 疾患程度の先天異常対象とし、CHIPS 法のさらなる一般化と改良を行うと共に、改良型Multiplex

Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法を加えることで、点変異から巨大欠失・重複まで全てのパターンの遺伝子変異を同定可能なシステムを構築する。本システムは安価かつ簡便で、基本的な機器さえあれば日本中どここの研究施設でも即時実施可能なものであることを目標とする。また、このシステムを普及させ、国内での遺伝子検査を促進する目的で、全ての実験条件の詳細・結果をWeb 上で公開すると同時に、外部施設研究者の必要に応じてPCR プライマーの供給や電子メールによる実験指導を行うことを目指した。

3. 研究の方法

CHIPS 法のさらなる汎用化とMLPA 法の低コスト化を目指し、この2 法の使い分けによる遺伝子変異スクリーニングシステムの確立を行う。

遺伝子解析対象は金沢大学附属病院小児科および子供のこころの診療科通院中の様々な遺伝性疾患50 症例とする。CHIPS 法、MLPA 法各々の特徴を生かすべくこれらの疾患の中には点変異を主体とするものも、重複・欠失変異を主体とするものも含まれている。

CHIPS 法の概略は、PCR で増幅後サーマルサイクラー上で引き続きheteroduplexを形成させ、これをCEL nucleaseで処理すると変異が含まれている場合にのみ切断されるというもので、検出はポリアクリルアミド電気泳動と銀染色で行う。既にいくつかの遺伝子に対し、PCR プライマーや至適条件は確立されており実用段階にある。また常染色体優性遺伝疾患のみならず、X 連鎖遺伝の男性患者や、常染色体劣性遺伝のホモ接合変異に対しても正常コントロールDNA と検体DNA を予め混合することでheteroduplex 形成を起こさせCHIPS 法を適用することが可能である。本研究ではCHIPS法の適応疾患を拡充し、より汎用性の高いシステムとして確立するため、新規に様々な遺伝子に対する解析用のプライマーをPrimer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)を用いて設計し、PCRプロトコル、heteroduplex 形成、CEL nucleaseによるミスマッチ酵素切断、ポリアクリルアミド電気泳動と銀染色による検出の各条件の至適化を行った。

CHIPS 法は点変異や微小欠失・重複変異に対しては100%の検出感度があるが、遺伝子レベルでの大きな欠失や重複はPCR法により増幅されないため原理的に検出することが出来ない。これらの変異を検出する方法としては、現在CGH マイクロアレイ法、定量PCR 法、MLPA 法が使用されているが、CGH アレイはコスト的に高価であり特殊な機器が必要とされる。また定量PCR 法は、既に種々の条件を検討してみたが遺伝子コピー数を正確に判断するほどの精度は得られなかった。MLPA法は比較的安価な方法であり、かつ競合PCR を原理とするために定量性に優れる。ただしMLPA法のプライマーは特殊な手法により合成されており、市販されている試薬は高価である。また長さの長い1本差DNAを用いるため、通常のオリゴヌクレオチド合成では作成できない。そこで、通常のオリゴヌクレオチド合成で作成可能な40mer程度のプライマーを設計し、Taq polymeraseによる合成反応と、Taq ligaseによる結合反応を組み合わせることで、各遺伝子領域に特異的な長さの競合PCR産物を得ることを試みた。

4. 研究成果

CHIPS 法に関し、以下の 60 疾患 (73 遺伝子) を至適化し、実用的な遺伝子診断を可能とした (疾患名のアルファベット順に記載)。
Aarskog syndrome (FGD1), Acrodysostosis (PRKAR1A), Adrenoleukodystrophy (ABCD1), Alagille syndrome (JAG1), Alexander disease (GFAP), Androgen insufficiency

syndrome (AR), Birt-Hogg-Dube disease (FLCN), Biotinidase deficiency (BTD), Boomerang dysplasia (FLNB), Cartilage Hair syndrome (RMRP), CHARGE synd (CHD7), Citrin deficiency (SLC25A13), Clouston syndrome (GJB6), CM-AVM (RASA1), Coffin-Lowry syndrome (RPS6KA3), CPT1 deficiency (CPT1A), CPT2 deficiency (CPT2), Currarino syndrome (MNX1), Distal renal tubular acidosis (ATP6VOA4, ATP6V1B1, SLC4A1), Dravet syndrome (SCN1A), DYT1 (TOR1A), Ellis-Van Creveld syndrome (EVC, EVC2), Epilepsy and mental retardation limited to females (PCDH19), Familial Isolated Hyperparathyroidism (CDC73), FGFR 異常症 (FGFR1, FGFR2, FGFR3), Hereditary angioedema (SERPING1), Holocarboxylase synthetase deficiency (HLCS), Homocystinuria I (CBS), Hypohidrotic ectodermal dysplasia (EDA), I-cell disease (GNPTAB), Leigh syndrome (SURF1), Lynch syndrome (MSH2), Marfan syndrome (FBN1), MEN1 (MEN1), MEN2 (RET), Metachromatic leukodystrophy (ARSA), Menkes disease (ATP7A), MODY (GCK, HNF1A, HNF1B, HNF4A), Mowat-Wilson syndrome (ZEB2), NBCCS (PTCH1), Nance-Horan syndrome (NHS), Neurofibromatosis type I (NF1), Noonan syndrome (PTPN11, RAF1), Oculocutaneous albinism 1 (TYR), Osteogenesis imperfect (COL1A1, COL2A2), Osteopetrosis (CA2, CLC7, TCIRG1), OTC deficiency (OTC), Parkinson disease (PARK2), Pelizaeus-Merzbacher Disease (PLP1), PKAN (PANK2), Protein C deficiency (PROC), Rett syndrome (MECP2), Segawa disease (GCH1), Shimke Immunoosseous dysplasia (SMARCAL1), Stickler syndrome (COL2A1), Tricho-Rhino-Phalangeal syndrome I (TRPS1), Tuberous sclerosis (TSC1, TSC2), Vascular type EDS (COL3A1), Werner syndrome (WRN), Wilson disease (ATP7B).

CHIPS法の基本原理、メソッドの詳細および遺伝子診断に対する高い有用性は、Mol Genet Metab. 2012 Nov;107(3):580-5. に纏められた。また、CHIPS法により、本邦初となる大規模な日本人結節性硬化症患者の遺伝子変異コホート研究がなされ、その成果はJ Hum Genet. 2013 Feb 7. [Epub ahead of print]に公表された。

研究期間中にCHIPS法の実際を学ぶワークショップを2回開催し、計12名の国内の研

究者の参加があった。また、上記遺伝子解析に用いたプライマー配列およびCHIPS法のプロトコールはホームページ上に (<http://chips.is-mine.net/>) 公開されている。

MLPA法の改良に関しては次の方法が有用である事が実証された。まず、標的遺伝子DNAの一方の鎖の適当な間隔(100~300bp)の2箇所にはハイブリダイゼーションするプライマーを設計する。5'側にハイブリダイゼーションしたプライマーから、3'側にハイブリダイゼーションしたプライマーの間をTaq polymeraseで合成する。合成したDNAストランドと3'側のプライマーはTaq ligaseで連結。Taq polymeraseとTaq ligaseは同一バッファー、同一温度で働くためone tube内で反応は可能であり、Linear PCR cycleで定量性を保ちながら効率良く初期テンプレートを増幅できる。5'側プライマーの5'側と3'側プライマーの3'側は共通配列となっており、この配列によりMultiplex PCRが可能である。最終増幅産物は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し銀染色で検出した後、通常のデジタルカメラで撮影。この画像をフリーのデンストメトリーソフトウェア Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)で解析することで遺伝子コピー数を定量する事が出来る。この新法は従来法に比べ格段にコストが安く、また簡便であり特殊な機器を必要としないというメリットがある。今後多くの遺伝子による検証が必要であるが、CHIPS法と組み合わせることにより、点変異から大欠失(或いは重複)まで全ての遺伝子変異が検出可能となる。

本研究により、遺伝子検査の効率化とコストダウンが実現された。次世代シーケンサーによる大規模シーケンス技術が台頭してきているが、機器が高価であり一般普及が難しい事や、シーケンス精度の問題があり変異の確認は最終的にはサンガー法によることなどを考えると、本研究による特異遺伝子配列変異の迅速スクリーニング法は今後も必要な技術として生き残る。今後は本研究の成果を、遺伝子診断の社会実装のために役立てていきたい。

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 10件)

- ① Niida Y, Wakisaka A, Tsuji T, Yamada H, Kuroda M, Mitani Y, Okumura A, Yokoi A. Mutational analysis of TSC1 and TSC2 in Japanese patients with tuberous

sclerosis complex revealed higher incidence of TSC1 patients than previously reported. 査読有, J Hum Genet. 2013 Feb 7. doi: 10.1038/jhg.2013.3. [Epub ahead of print]

- ② Niida Y, Kuroda M, Mitani Y, Okumura A, Yokoi A. Applying and testing the conveniently optimized enzyme mismatch cleavage method to clinical DNA diagnosis. 査読有, Mol Genet Metab. 2012 Nov;107(3):580-5. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.09.008. Epub 2012 Sep 10.
- ③ Niida Y, Kuroda M, Mitani Y, Yokoi A, Ozaki M. Paternal uniparental isodisomy of chromosome 22 in a patient with metachromatic leukodystrophy. 査読有, J Hum Genet. 2012 Oct;57(10):687-90. doi: 10.1038/jhg.2012.97. Epub 2012 Aug 2.
- ④ Yoshimura Y, Nishijima C, Ikeda K, Ikeda K, Niida Y, Inaoki M. Vascular-type Ehlers-Danlos syndrome presenting as recurrent compartment syndrome. 査読有, Eur J Dermatol. 2011 Nov-Dec;21(6):1022-3. doi: 10.1684/ejd.2011.1542.
- ⑤ 中川研, 北楯祥子, 齋藤雅俊, 藤本由貴, 小島好司, 及川卓, 土原一貴, 井口晶晴, 黄寿正, 長内和弘, 梅博久, 新井田要. Birt-Hogg-Dube 症候群の姉弟例. 査読有, 臨床放射線 (0009-9252)56 巻 1 号 Page133-137(2011.01)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 新井田要, 高瀬悦子, 尾崎守, 黒田文人, 三谷裕介, 上野和之, 清水正樹. 母由来 7 番染色体部分片親性ダイソミーにより発症した遠位尿管管性アシドーシスの 1 例, 第 33 回北陸臨床遺伝研究会, 2012 年 11 月 23 日, 福井商工会議所ビル (福井県)
- ② 新井田要, 伊藤順庸, 高瀬悦子, 尾崎守, 黒田文人, 三谷裕介. 遺伝子検査におけるアレル発現テストの意義について. 第 57 回日本人類遺伝学会. 2012 年 10 月 26 日. 京王プラザホテル (東京都)
- ③ 新井田要, 黒田文人, 三谷裕介, 横井彩乃, 池野郁. 父親由来片親性ダイソミーにより発症した後期乳児型異染性白質ジストロフィーの一例, 第 54 回日本小児神経学会, 2012 年 5 月 17 日, ロイトン札幌 (北海道)

- ④ 池野郁, 横井彩乃, 三谷裕介, 黒田文人, 新井田要. 新生児期より dysostosis multiplex を呈し, I-cell 病と診断された 1 例, 第 61 回日本小児神経学会北陸地方会, 2012 年 2 月 5 日, 金沢駅西健康ホール (石川県)
- ⑤ 新井田要. MAP7D2 はヒト X 染色体上の母性刷り込み遺伝子である, 第 56 回日本人類遺伝学会, 2011 年 11 月 11 日, 幕張メッセ (千葉県)
- ⑥ 新井田要, 黒田文人, 脇坂晃子, 辻隆範. 日本人結節性硬化症患者の TSC 遺伝子解析, 第 53 回日本小児神経学会, 2011 年 5 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑦ 新井田要. コラーゲン異常症の遺伝子診断: CHIPS の応, 第 59 回日本小児神経学会北陸地方会, 2011 年 2 月 6 日. 金沢駅西健康ホール (石川県)
- ⑧ 新井田要. 金沢医科大学病院遺伝子医療センターの 2009 年度の活動について, 第 55 回日本人類遺伝学会, 2010 年 10 月 28 日, 大宮ソニックシティ (埼玉県)

[その他]
ホームページ等
<http://chips.is-mine.net/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井田 要 (NIIDA YO)
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・准教授
研究者番号: 40293344

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし