

主論文の要旨

**Frequent intragenic microdeletions of elastin in
familial supraaortic stenosis**

〔 家族性大動脈弁上狭窄症において
遺伝子内微小欠失の頻度は高い 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

早野 聡

【緒言】

大動脈弁上狭窄症 (SVAS; Supravalvular aortic stenosis) は、25,000 出生に 1 人が発症する稀な先天性心疾患であり、上行大動脈の狭窄により左室負荷を生じ心不全に至る。SVAS の 30~50%は、特異顔貌や精神遅滞を伴い、7q11.23 の微小欠失を原因とする Williams-Beuren 症候群 (WBS) に合併することが知られている。一方でこの症候群の症状を伴わず、常染色体優性遺伝を示す、家族性 SVAS という疾患が 1964 年に Eisenberg らによって報告されている。連鎖解析などの遺伝子解析手法が発展すると、家族性 SVAS 症例の解析を通して、WBS の原因となる 7q11.2 領域に含まれる *ELN* (Elastin) が SVAS の原因遺伝子として有力視されるようになった。2000 年代に入ると多数の SVAS 症例に対して *ELN* 遺伝子解析がなされ、病的変異が同定されてきたが、約半数の症例では病的変異が同定されておらず、SVAS の原因が *ELN* 遺伝子だけで説明可能か否かは不明である。我々は全エクソーム解析 (WES; Whole Exome Analysis) を用いて、コピー数解析を含む網羅的遺伝子解析を行い、SVAS の遺伝学的背景を明らかにすることを試みた。

【対象と方法】

検体収集

常染色体優性遺伝を示し、WBS の特徴が無いが、FISH 法で 7q11.23 微小欠失が否定された、家族性 SVAS の 7 家系について遺伝子解析を実施した。全血または唾液から DNA を抽出した。本研究は名古屋大学医学部生命倫理審査委員会の承認を得て行った (承認番号: 2015-0032)。

WES

SureSelect Human All Exon V5 (Agilent Technologies, CA) を用いて DNA 中のエクソーム増幅を行い、HiSeq 2500 platform (Illumina, CA) で測定した。得られた配列データは Burrows-Wheeler Aligner (BWA) を用いて参照配列 (UCSC build hg19) にアライメントした。Picard tools を用いて PCR Duplicate を除去した。変異は VarScan2 を用いてアリル頻度 > 0.20 をカットオフとしてコールした。ANNOVAR と In-house のスクリプトを用いて、コールした変異に頻度情報などのアノテーションを付与した。サンプル毎の全エクソーム平均カバレッジ深度は 111.14 (90.68~127.66) で、検出された変異数は 23,534 個~25,920 個だった。

変異解析

米国臨床遺伝学会ガイドラインに則って、検出された変異の病原性を検討した。ESP 6500、1000 Genomes Project、ExAC、HGVD および In-house データベースにおいて、マイナーアレル頻度 > 1% の高頻度変異は除外した。病原性が高いと思われる変異 (例: ナンセンス変異、フレームシフト挿入または欠失、スプライスサイト変異) について、ABI PRISM 3130xL (Applied Biosystems, Foster City, CA) シーケンサーにてサンガー法を

行い、家系内での共分離を確認した。

コピー数多型(CNV; Copy Number Variant)解析

正常コントロールを用いて正規化した、各エクソンのリード数を比較することによって CNV 解析を行った。正規化したリード数が-3 S.D. 未満または 3 S.D.を超えるエクソンを CNV 候補として抽出した。欠失が疑われた症例については MLPA; Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification 法を用いて家系内の共分離を確認した。プローブは *ELN* 遺伝子中の 10 エクソンを含む (エクソン 1, 3, 4, 6, 9, 16, 20, 26, 27, 33)、SALSA MLPA probe mix P029-WBS probemix (MRC Holland, Netherlands) を用いた。解析には Coffalyser (MRC Holland) ソフトウェアを用いた。

【結果】

常染色体優性遺伝の家族性 SVAS 7 家系に対して、WES を用いた遺伝子変異解析・CNV 解析を実施した (図 1)。3 家系において、*ELN* 遺伝子に病的なヘテロ変異が同定された (家系 A: c.370delT, p.Ser124Leufs*13、家系 B: c.572-1G>A、家系 C: c.218_219insTG, p.Gly74Valfs*49)。これら 3 家系において、検体が入手できた家族について、サンガー法で共分離を確認した。また、別の 3 家系において、*ELN* 遺伝子内に微小欠失が同定された (家系 E: エクソン 33、家系 F: エクソン 6-33、家系 G: エクソン 1-5) (図 2)。これら 3 家系において、検体が入手できた家族について MLPA 法で共分離を確認した (図 3)。残る家系 D の発端者 (D:II-1) について WES と MLPA を実施したが、病的な変異やコピー数異常は同定されなかった。

【考察】

常染色体優性遺伝の家族性 SVAS7 家系において、*ELN* 遺伝子において、3 家系で病的な新規点変異、3 家系で新規微小欠失が同定された。これらの結果により、従来原因不明とされてきた家族性 SVAS の約半数の原因が、*ELN* 遺伝子の微小欠失であることが示唆された。この知見は SVAS の病態における *ELN* 遺伝子の重要性を強調するものである。

本研究において同定された *ELN* 遺伝子の微小欠失は、既存の WBS の診断に用いられる FISH プローブでは同定されないものであった。家族性 SVAS の原因として微小欠失の報告はこれまでに殆ど無い。従って、本疾患の遺伝子検査にあたっては、サンガー法による変異の解析のみならず、MLPA 法や array-CGH 法などを用いて *ELN* 遺伝子内の微小欠失を検索することが必要であると思われる。

本研究において同定された *ELN* 遺伝子の点変異は、解析した家族の殆どにおいて共分離が確認された。同定された点変異は、全て配列の途中で終止コドンを生じる病原性の高い短縮型変異であった。家族性 SVAS に関する既報でも、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構を介した *ELN* 遺伝子の mRNA 産生低下が報告されている。

WBS において *ELN* 遺伝子の片アリル欠損が生じていることから、SVAS の主要な病

態は *ELN* 遺伝子のハプロ不全とされている。一方で *ELN* 遺伝子の片アレルが欠損している WBS においても、心血管病変の重症度には大きな幅や不完全な浸透率がみられる。*ELN* 遺伝子変異と表現型に大きな変動が見られる原因については、明確な説明はなされていない。原因不明症例を含む更に多数の SVAS 患者コホートにおいて遺伝子解析を行うことで、SVAS の分子病態が明らかになることが期待される。

【結論】

常染色体優性遺伝の家族性 SVAS7 家系において、3 家系において新規の微小欠失が同定された。本疾患の遺伝子検査では、サンガー法による変異の解析のみならず、MLPA 法や Array-CGH 法などの定量的な方法を実施すべきである。