

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:71-74.

平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 16) 半導体マイクロチップ型シーケンサー対応original custom panel 導入による本邦へモクロマトーシス新規感受性遺伝子の探索研究

土岐 康通

16) 半導体マイクロチップ型シーケンサー対応
original custom panel 導入による本邦ヘモクロマ
トローシス新規感受性遺伝子の探索研究

研究代表者 土岐 康通

[背景・目的]

鉄過剰症は、本邦では大部分が輸血後鉄過剰症と考えられてきた。平成 22 年 (2010 年) 度「ヘモクロマトーシスの実態調査および診断基準作成」班 (班長: 高後裕) の全国調査¹⁾ から原因が特定できない鉄過剰症が 1089 症例中 76 症例 (7.0%) で、予想以上に多いことが判明した。しかし、2011 年 11 月までに、これまでに報告されてきた遺伝性ヘモクロマトーシス (hereditary hemochromatosis: HH) の責任遺伝子群である *HFE*、*HFE2*、*HAMP*、*TFR2*、*SLC40A1*、*FTH1* のサンガー・シーケンス解析を実施した 12 例においては、それら HH 責任遺伝子上に特徴的な変異は確認されず、病態原因診断がついていないのが現状である。このような原因不明のヘモクロマトーシスに対して、ゲノムワイドの探索を目的とした次世代シーケンサーを用いた大規模解析は大変有望である。ただし、膨大な情報量のゲノムからの読取り (whole genome sequencing: WGS) には大型次世代シーケンサー専用オペレーターの常駐が必須であり、かつ 1 ランあたりの高額な費用とデータ取得まで長時間を要するという問題があり、これまで誰もが簡便に取り扱うことができなかった。そこでこの問題を克服すべく、近年開発されたパーソナル・タイプの次世代シーケンサーを導入し、WGS に代わる whole exon sequencing を行うことで、蛋白質の機能や発現に影響を与える一塩基変異 (SNVs) や小さな挿入/欠損 (InDels) を信頼性の高いデータとして抽出することとした。さらに、次世代シーケンサーのハイスループット能力を最大限に発揮する手法として custom panel による ampli sequencing が有効な解析手段であると考えられることから、本研究では、鉄代謝関連遺伝子を含めた original custom panel による網羅的遺伝子解析法のパイプ・ラインを構築し、原因不明のヘモクロマトーシス症例に対する鉄過剰症関連新規感受性遺伝子を探索した。

[材料・方法]

1. 次世代シーケンサー

センサーウェル数が 1.65 億ウェルの Ion Proton I

チップに対応した半導体マイクロチップ型シーケンサー Ion Proton (Ion Torrent/Life Technologies) を使用した。

2. 標的遺伝子探索用パネル

鉄代謝関連遺伝子 65 種類に、糖代謝関連遺伝子、癌関連遺伝子などを含めた 1,031 遺伝子を対象とし、約 12,000 箇所を標的としたプライマーペアによるオリジナル・カスタム・パネルを設計・構築した。全プライマーペアが 5 種類のプール済みセットに分けられ、5 プール・1 セットとなっている。

3. 網羅的遺伝子探索

末梢血単核球を分離後、Genomic DNA を抽出し、100 ng の genomic DNA から Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Ion Torrent/Life Technologies) および 5 種類のプール済みプライマーペアを用いてターゲット領域の PCR 増幅を行い、ライブラリーを調製した。ここで得られた 5 種類のライブラリーのそれぞれの DNA 濃度が同等になるよう調整したのち、5 種類のライブラリーを 1 本のチューブにまとめた。Ion OneTouch 2 Instrument (Ion Torrent/Life Technologies) を用いて、ライブラリーをビーズに固定化した後、エマルジョン PCR にて増幅を行った。Ion One Touch ES (Ion Torrent/Life Technologies) を用いて、ビーズの濃縮と精製を行い、シーケンス用テンプレートとした。このテンプレートを Ion Proton I チップにロードし、Ion Proton シーケンサーで塩基配列を解読した。Torrent Suite 解析ソフトを用いて、ベースコールを行い、得られた全データから有効なシーケンス・データを取り出し、1,031 遺伝子のリファレンス・データにマッピングした。

4. データ解析ソフト

1,031 遺伝子のリファレンス・データにマッピングされた遺伝子情報から、一塩基変異 (SNVs) や小さな挿入/欠損 (InDels) の効率良い絞り込みと様々な条件下でのこれら変異の評価を行うため、3rd Party ソフトウェアとして Genomics Workbench (CLC bio) を導入した。

5. 倫理面への配慮

旭川医科大学倫理委員会の承認を得たのち、イン

フォームド・コンセントを取得した患者および健康人ボランティアを対象とした。

[結果・考察]

オリジナル・カスタム・パネルを構成する 1,031 遺伝子のうち、本研究の対象遺伝子である鉄代謝関連遺伝子 65 種類について、その gene symbol とコードされるタンパク質の情報を表 1 に示した。

3 例の鉄過剰症患者に対して、それぞれ Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 を用いてオリジナル・カスタム・パネルに対応したライブラリーを作製し、シーケ

表 1 鉄代謝関連遺伝子の遺伝子名とコードされるタンパク質名

Gene symbol	description
ABCB7	ATP-binding cassette, sub-family B, member 7
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G 2
ACO1	IRP1
ALAD	aminolevulinatase
ALAS1	aminolevulinatase, delta-, synthase 1
ALAS2	aminolevulinatase, delta-, synthase 2
BMP2	bone morphogenetic protein 2
BMP4	bone morphogenetic protein 4
BMP6	bone morphogenetic protein 6
BMPRIA	bone morphogenetic protein receptor, type IA
BMPRIIB	bone morphogenetic protein receptor, type IB
CACNA1F	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1F
CACNA1S	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S
CP	ceruloplasmin
CPOX	coproporphyrinogen oxidase
CYBRD1	cytochrome b reductase 1
EPO	erythropoietin
EPOR	erythropoietin receptor
EXOC6	exocyst complex component 6
FDX1	ferredoxin 1
FDX1L	ferredoxin 1-like
FDXR	ferredoxin reductase
FECH	ferrochelatase
FLVCR1	feline leukemia virus subgroup C cellular receptor 1
FTH1	ferritin H
FTL	ferritin L
FTMT	ferritin mitochondrial
FURIN	furin
FXN	frataxin
GDF15	growth differentiation factor 15
HAMP	hepcidin
HBA1	hemoglobin alpha1
HBA2	hemoglobin alpha2
HBB	hemoglobin beta
HEPH	hephaestin
HFE	hemochromatosis
HFE2	hemojuvelin
HMBS	hydroxymethylbilane synthase
HMOX1	heme oxygenase1
HMOX2	heme oxygenase2
HPX	hemopexin
HRG	histidine-rich glycoprotein
IREB2	IRP2
LCN1	lipocalin 1
LCN2	lipocalin 2
NEO1	neogenin 1
NFS1	nitrogen fixation 1 homolog
PCK1	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1
PCK2	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2
PCK4	proprotein convertase subtilisin/kexin type 4
PCK5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
PCK7	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7
SLC11A1	NRAMP1
SLC11A2	DMT-1
SLC25A37	mitochondrial iron transporter
SLC39A14	ZIP14
SLC40A1	ferroportin
SLC46A1	folate transporter 1
STEAP3	Six transmembrane epithelial antigen of prostate protein 3
TF	transferrin
TFR2	transferrin receptor 2
TFRC	transferrin receptor 1
TMPRSS6	Transmembrane protease, serine 6
TWSG1	twisted gastrulation homolog 1
UROS	uroporphyrinogen III synthase

ンス解析を行った。表1に示した65種類の鉄代謝関連遺伝子上のSNVsおよびInDels結果を表2-4にまとめた。

表2に示した症例1の鉄過剰症患者では、*SLC39A14* 遺伝子上の missense mutation は、コードされる ZIP14、亜鉛トランスポーターの304番目のアミノ酸がリジンからグルタミン酸に置換されることを示唆するものである。この変異はこれまで報告がなく、

今回新たに発見されたものである。一方、*SLC40A1* 遺伝子上の deletion を図1に示した。3塩基の欠失は、コードされる ferroportin 1、細胞外鉄汲出し輸送体の162番目のアミノ酸であるバリンの欠失を示唆するものである。この欠失はフェロポルチン病の原因因子として報告があり、ヘテロ接合性であってもフェロポルチンの機能不全を誘導するハプロ不全である^{2,3)}。

表3に示した症例2の鉄過剰症患者では、*ACO1*

表2 症例1における鉄代謝関連遺伝子上の変異情報

Gene symbol	Type	Reference	Allele	Length	Variation ID	Zygoty	Amino acid change
<i>SLC39A14</i>	SNV	A	G	1	(-)	heterozygous	p.Lys304Glu
<i>SLC40A1</i>	Deletion	CAA	(-)	3	(-)	heterozygous	p.Val162_Ala163delinsAla

表3 症例2における鉄代謝関連遺伝子上の変異情報

Gene symbol	Type	Reference	Allele	Length	Variation ID	Zygoty	Amino acid change
<i>ACO1</i>	SNV	C	T	1	rs150373174	heterozygous	p.Thr318Met
<i>ALAS1</i>	SNV	G	A	1	rs201359123	heterozygous	p.Arg490Gln

表4 症例3における鉄代謝関連遺伝子上の変異情報

Gene symbol	Type	Reference	Allele	Length	Variation ID	Zygoty	Amino acid change
<i>ACO1</i>	SNV	C	T	1	rs150373174	heterozygous	p.Thr318Met
<i>EPOR</i>	SNV	C	G	1	(-)	heterozygous	p.Val182Leu
<i>PCSK7</i>	SNV	C	T	1	(-)	heterozygous	p.Arg254His

表5 健常人31名を対象とした鉄代謝関連遺伝子上の変異出現頻度

Gene symbol	Amino acid change	Frequency
<i>SLC39A14</i>	p.Lys304Glu	0/31
<i>SLC40A1</i>	p.Val162_Ala163delinsAla	0/31
<i>ACO1</i>	p.Thr318Met	1/31
<i>ALAS1</i>	p.Arg490Gln	0/31
<i>EPOR</i>	p.Val182Leu	0/31
<i>PCSK7</i>	p.Arg254His	0/31

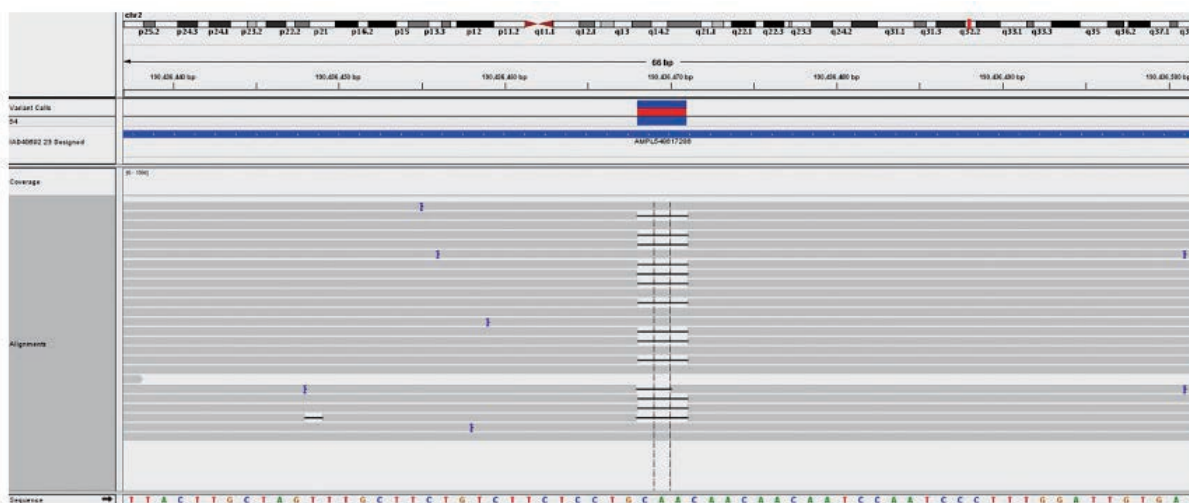


図1 *SLC40A1* 遺伝子上のヘテロな3塩基欠失を示すアライメント情報

遺伝子上の missense mutation は、コードされる aconitase、クエン酸脱水酵素の 318 番目のアミノ酸がスレオニンからメチオニンに置換されることを示唆するものである⁴⁾。この missense mutation は variation ID:rs150373174 としてすでに登録されている polymorphism であった。さらに、*ALAS1* 遺伝子上の missense mutation は、コードされる aminolevulinate, delta-, synthase、デルタアミノレブリン酸合成酵素の 490 番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンに置換されることを示唆するものである。この missense mutation は variation ID:rs201359123 として登録済みの polymorphism であった。

表 4 に示した症例 3 の鉄過剰症患者では、症例 2 で検出された同じ *ACO1* 遺伝子上の SNV が確認された。加えて、症例 1 および症例 2 では存在せず、症例 3 で確認された SNVs として *EPOR* 遺伝子と *PCSK7* 遺伝子が挙がってきた。*EPOR* 遺伝子上の missense mutation は、コードされる erythropoietin receptor、エリスロポエチン受容体の 182 番目のアミノ酸がバリンからロイシンに置換されること、*PCSK7* 遺伝子上の missense mutation は、コードされる proprotein convertase subtilisin/kexin type 7、前駆タンパク質転換酵素 7 型の 254 番目のアミノ酸がアルギニンからヒスチジンに置換されることをそれぞれ示唆するものである。これら 2 種類の変異はこれまで報告がなく、今回新たに発見された SNVs である。今回、鉄過剰症患者で検出された SNVs について、健常人における出現頻度を表 5 にまとめた。*SLC39A14*、*SLC40A1*、*ALAS1*、*EPOR* および *PCSK7* においては 0/31 で、変異は全く検出されなかった。*ACO1* に関しても 31 例中 1 例と極めて低い頻度であった。このように、鉄過剰症患者で発見された新規の SNVs が、健常人では検出されなかったことを考え合わせると、当該 SNVs が病態の表現に何らかの関連性を有していると考えられる。

これまでに登録されていない新規 SNVs が検出され、アミノ酸置換による当該タンパク質の機能がどのように変化し、表現型の変異に影響を及ぼすか否かは、今後の研究課題である。今回は、鉄代謝関連遺伝子 65 種類についての遺伝子変異探索であったが、糖代謝関連遺伝子や癌関連遺伝子など、他の遺伝子上の変異も検出されていることから、相互の関連性による

鉄代謝関連遺伝子の表現型に変化を及ぼす可能性もあり、本研究の継続が必須である。また、今回の研究から、将来、臨床現場への応用を考えた場合、custom panel 解析は広く導入可能なシステムであることが明らかになった。

[謝 辞]

平成 25 年度の“独創性のある生命科学研究”に採択して頂き、このような研究機会を与えて頂きましたこと、この場を借りて心よりお礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、本学消化器・血液腫瘍制御御内科学分野の生田克哉講師、ならびに消化管再生修復医学講座田中宏樹特任講師に多大なご指導を頂きましたことを心より感謝申し上げます。

[文 献]

- 1) 高後裕「ヘモクロマトーシスの実態調査と診断基準作成」研究報告書 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 2011 年 3 月
- 2) Wallace DF, et al., Novel mutation in *ferroportin1* is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood*, 2002;100:692-694.
- 3) Devalia V, et al., Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the *ferroportin 1* gene (*SLC11A3*). *Blood*, 2002;100:695-697.
- 4) de Ligt J, et al., Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*, 2012;367:1921-1929.