

Long Read Sequence 法を用いた 21水酸化酵素欠損症の遺伝子解析法の開発

国立成育医療研究センター 内分泌・代謝科
鹿島田健一

【背景】

21水酸化酵素欠損症（21OHD）とは

21水酸化酵素欠損症（以下21OHD）は21水酸化酵素（P450c21）をコードする *CYP21A2* 遺伝子の機能喪失によって発症する常染色体劣性遺伝疾患である。21水酸化酵素は副腎におけるコルチゾール、アルドステロン産生に必須の酵素であり、21水酸化酵素活性喪失下では、コルチゾール、アルドステロンの産生が障害され、さらに本来少量分泌される男性ホルモン（テストステロン）が、過形成に伴い過剰分泌されることで胎生期よりアンドロゲン過剰が生じる（図1）。21OHDは異常21水酸化酵素の残存活性に応じて異なる重症度を呈する^{1,2)}。

女性では胎生期アンドロゲン過剰により外性器の男性化、非典型的な外性器をもって生まれ、生下時の性別が外性器から判別できず、その点で性分化疾患の一つに含まれる。また副腎の過剰アンドロゲンは男性女性ともに成人期以降の二次的な中枢性性腺機能低下症をきたすため、成人期では副腎不全予防に加え、妊孕性の確保が大きな問題となる（図1）。21OHDはその点で生殖に深く関わる内分泌疾患である。本疾患は新生児マススクリーニング対象疾患であり、ほとんどの患者は新生児期に発見され、治療が開始される^{3,4)}。

治療は、産生が障害されているコルチゾール、アルドステロンの経口製剤（ハイドロコルチゾン、フルドロコルチゾン）により行う⁵⁾。

21OHDの遺伝子診断における問題点

21OHDの診断は内分泌学的に可能であるとされるが、先天性副腎過形成は6病型あり、さらにその中で21OHD特異的に上昇するとされる17OHPは他の3病型でも上がることが知られ、その診断は必ずしも容易ではない。その点で、遺伝学的検査は確定診断に直接結びつく

検査法としての需要が高い。

21OHDの遺伝学的診断は、遺伝相談をする上でも必須の検査である。しかし、*CYP21A2*遺伝子が位置する領域は頻繁に組み換えが生じること、さらに98%の相同性をもつ偽遺伝子 *CYP21P* が隣接することより、通常のPCR-Sanger法や次世代シーケンサーによる解析が困難な、極めて特殊性の高い遺伝子である（図2）。現在はMultiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法とNested PCR法を組み合わせた複雑な手法による解析方法が一般的である⁶⁾。データの解釈が複雑なことが多く、*CYP21A2*遺伝子解析に熟練した解析者の判読、両親の検体とのトリオ解析を必要とする。簡易的な手法を用いた商業的な受託解析サービスは解析結果の信頼度が低く、しばしば遺伝相談上問題となる。また*CYP21A2*遺伝子に隣接する*TNXB*遺伝子の機能喪失は、エーラススタンロス症候群を生じることが知られ、*CYP21A2*、*TNXB*遺伝子、両遺伝子が欠失する、隣接遺伝子症候群も遺伝学的に重要な鑑別対象である。

われわれは、近年開発された、nano poreを用いたLong Read Sequence法は、理論的に*CYP21A2*遺伝子およびその近傍の構造異常を解析する上で最も適した手法であると考え、簡便かつ経済的に解析できる方法について検討をし、その開発に成功した。

Long Read Sequence法とは

電気抵抗膜に埋め込まれた多数の微小な孔（ナノポア）を備えたフローセルを利用する方法で、各ナノポアは分子が通過するときに生じる微細な電気的変化を検知し、一本鎖のDNAまたはRNAの配列を決定するシステムである（図3）。最大10~20kbまで連続でよみとることができる。従来のSanger法が1kb程度、次世代シーケンサーが200bp程度であることを考えると飛躍的に長い配列を一度に読み込める（図3）。このシーケンサーを

21水酸化酵素欠損症の病態

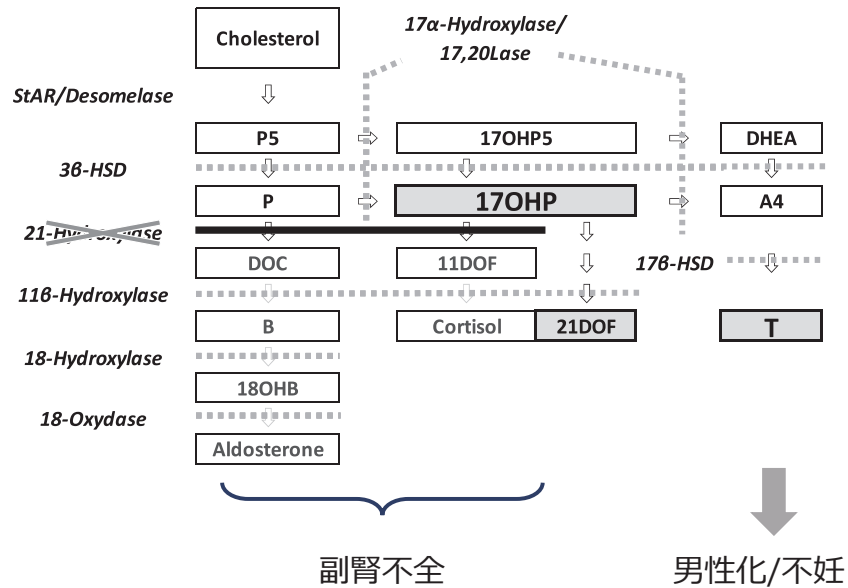


図 1

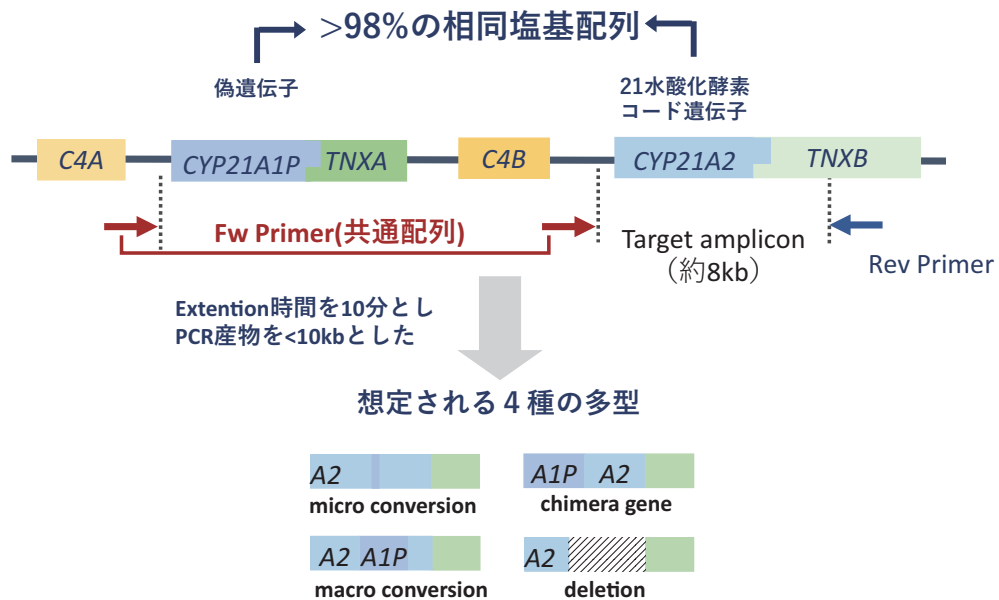


図 2 CYP21A2 遺伝子周辺の構造

1回のアッセイで決定できる塩基数

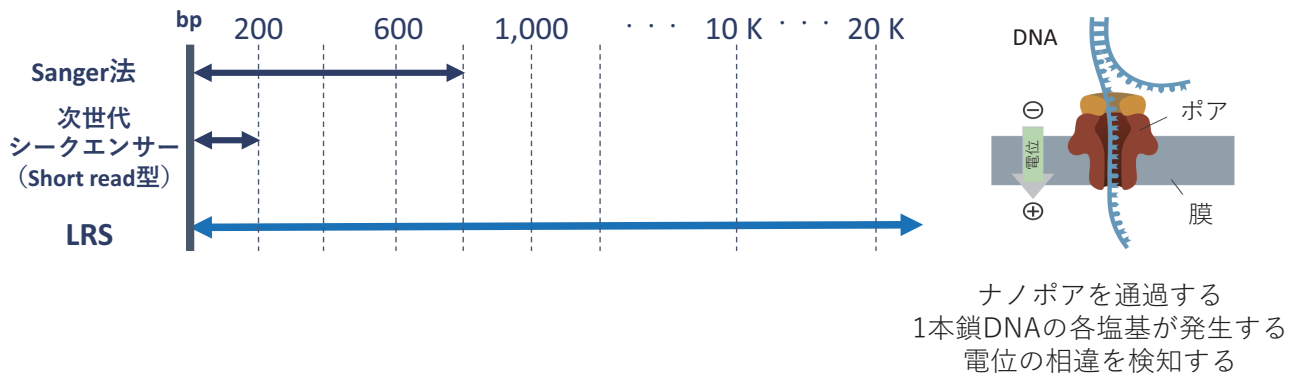


図3

表1 解析結果

病型	塩喪失型	単純男性化型	非古典型	Allele
キメラ・Large conversion	21	3	1	25 (22.7%)
ホットスポット	47	10	2	59 (53.6%)
その他	16	5	5	26 (23.6%)
	84 (76.4%)	18 (16.4%)	8 (7.2%)	110 (55 cases)

MLPA+Nested PCRのトリオ解析 VS LRS (本人のみの検体)
結果は100%一致した

遺伝子検査に用いる利点は

- 1: 微細な構造異常 (欠失や重複) の判別ができる。
- 2: ある特定の配列を1回のアッセイでアレル特異的に読むことができる。

の2点であり、特に偽遺伝子との間でキメラ遺伝子を形成する *CYP21A2* 遺伝子などでは最も威力を発揮するアッセイ方法である^{7,8)}。

21水酸化酵素欠損症患者のLRSを用いた遺伝子解析法の開発

われわれは、偽遺伝子である *CYP21A1P* 遺伝子と *CYP21A2* 遺伝子との組み替えパターンから、1組のPCRプライマーを設計することで、21OHD患者で起こりうる全ての構造異常と配列の異常を検知できると予測した(図2)。プライマーは図2のような位置にデザインし、実際の患者検体を用い、従来のMLPA+NestedPCR法を用いた方法と、その結果について照合を行った⁸⁾。

LRS法を用いた遺伝子解析結果

対象は本疾患と診断がついた55名110アレルで、全ての結果が双方で一致、さらにこれまで本疾患の原因として知られていなかった2つの病的多型を新たに同定した(表1)。

また、Duplex ベースコール法という新たな方法を用いた最新のONT社MinION[®]システム (Flongle フローセル, R10.4.1)で同様の試験を行い、R9.4.1と比較し、著明に改善した精度での塩基配列決定が可能となった⁸⁾。

ライブラリ作成にバーコードを用いることで、1検体あたりにかかる解析費用は、従来のMLPA法とNestedPCR法と比較しても廉価であり、かつ解析にかかる日数も2-3日から1日と減らすことができた。また従来のMLPA法とNestedPCR法では正確な多型を決定する上で両親の検体と合わせて3検体の解析が必要であったが、本法はLRSのアレル特異性をもつ解析方法であることから、本人のみの解析で多型の決定が可能であり、

その点においても極めて有用な方法と考える。

今後に向けて

LRSは遺伝子解析において新たな知見をもたらすと期待され、さまざまな遺伝子疾患に応用されることが考えられる。現在は読み取りの精度の問題もあり、PCRでTarget Sequenceを増幅し、それを読み込む形が一般的である。しかし、今後はさらに精度があがりコストが下がればそうしたプロセスを経ずに直接読み込むこともできるようになると考えられる。

われわれもさらなる21OHD患者の解析を行っており、今後も興味深い知見が得られるものと期待している。

謝 辞

本研究はアメリカ内分泌学会雑誌JCEMに発表しました(文献8)。

本研究はかずさDNA研究所の小原收先生のご指導のもと行い、主な解析は安達恵利子先生がされました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

また本研究はAMEDの支援を受けて行われました(課題番号24ek0109630h0002)。併せて御礼申し上げます。

引用文献

1. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, Meyer-Bahlburg HFL, Miller WL, Murad MH, Oberfield SE, White PC (2018) Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 103 (11): 4043-4088.
2. Ishii T, Kashimada K, Amano N, Takasawa K, Nakamura-Utsunomiya A, Yatsuga S, Mukai T, Ida S, Isobe M, Fukushi M, Satoh H, Yoshino K, Otsuki M, Katabami T, Tajima T (2022) Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency(2021 revision). *Clin Pediatr Endocrinol*, 31 (3): 116-143.
3. Tsuji A, Konishi K, Hasegawa S, Anazawa A, Onishi T, Ono M, Morio T, Kitagawa T, Kashimada K (2015) Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Tokyo, Japan from 1989 to 2013: a retrospective population-based study. *BMC Pediatr*, 15: 209.
4. Tsuji-Hosokawa A, Kashimada K (2021) Thirty-Year Lessons from the Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) in Japan. *Int J Neonatal Screen*, 7 (3).
5. Yogi A, Kashimada K (2023) Current and future perspectives on clinical management of classic 21-hydroxylase deficiency. *Endocr J*, 70 (10): 945-957.
6. Concolino P, Mello E, Minucci A, Zuppi C, Capoluongo E (2011) Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis is useful for diagnosing congenital adrenal hyperplasia but requires a deep knowledge of CYP21A2 genetics. *Clin Chem*, 57 (7): 1079-1080.
7. Ardui S, Ameer A, Vermeesch JR, Hestand MS (2018) Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Res*, 46 (5): 2159-2168.
8. Adachi E, Nakagawa R, Tsuji-Hosokawa A, Gau M, Kirino S, Yogi A, Nakatani H, Takasawa K, Yamaguchi T, Kosho T, Murakami M, Tajima T, Hasegawa T, Yamada T, Morio T, Ohara O, Kashimada K (2024) A MinION-based Long-Read Sequencing Application With One-Step PCR for the Genetic Diagnosis of 21-Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 109 (3): 750-760.