

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10367

研究課題名(和文) 全エクソーム解析を用いた脳奇形疾患における体細胞変異の同定

研究課題名(英文) The screening of somatic mutations using whole exome sequencing in brain malformations

研究代表者

中島 光子 (Nakashima, Mitsuko)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20541965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は体細胞変異に起因する疾患について遺伝子変異の検索を施行した。その結果、Sturge-Weber症候群におけるGNAQ遺伝子および限局性皮質異形成症におけるMTOR遺伝子の体細胞変異の同定に成功した。MTOR遺伝子はmTOR経路に関与するたんぱく質をコードする遺伝子であり、本遺伝子変異がmTOR経路の活性化を惹起することを明らかにした。このMTOR遺伝子変異によるmTOR経路の活性化は免疫抑制剤の一つであるラパマイシンによって抑制されることが示されており、ラパマイシンをMTOR遺伝子変異に起因する難治性てんかんの治療薬として応用できる可能性が期待されており、現在臨床試験が進められている。

研究成果の概要(英文)：We performed whole exome sequencing using paired samples from Sturge Weber syndrome and FCD Type IIb subjects and further investigated using deep sequencing. We identified lesion-specific somatic GNAQ mutation in individuals with Sturge Weber syndrome and MTOR mutations in individuals with FCD Type IIb. Functional analyses showed that phosphorylation of ribosomal protein S6 in FCD Type IIb brain tissues with MTOR mutations was clearly elevated compared with control samples. Transfection of any of the four MTOR mutants into HEK293T cells led to elevated phosphorylation of 4EBP, the direct target of mTOR kinase. These findings suggest that mutations in MTOR are likely to cause hyperactivation of the mTOR signaling pathway and induce dysregulation of growth of neurons and glia, or presumably of their progenitors during brain development. MTOR mutations are sensitive to rapamycin, therefore, mTOR inhibitors would be able to alleviate intractable epilepsy caused by MTOR mutations.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：体細胞変異 全エクソーム解析 TAS変異 droplet digital PCR GNAQ MTOR ラパマイシン

1. 研究開始当初の背景

(1) 体細胞変異とは生殖細胞以外の細胞が分裂する時に生じる DNA 変異であり、変異細胞が分裂・増殖したクローン細胞にのみ同変異が認められる。そのため 1 個体内に遺伝的背景が異なる細胞が混在する状態となる (体細胞モザイク)。先天性遺伝性疾患の多くは生殖細胞に生じた変異に起因すると考えられているが、一部には体細胞変異が発症原因となる疾患が知られている。

(2) 近年次世代シーケンサーの普及により、生殖細胞変異のみならず体細胞変異の同定も可能となってきており、これまでに Sturge-Weber 症候群、限局性皮質異形成症、結節性硬化症など複数の先天性疾患において疾患の原因となる体細胞変異が同定されている。これらの疾患は、いずれも薬剤抵抗性の難治性でんかんの原因となっており、罹患者は日常生活に著しい不利益を被ることとなる。これまで収集可能な検体が少数であることから体細胞変異の検出は困難であった。しかし、近年の解析手法の進歩により、より高感度に低頻度の体細胞変異が検出となったことから、体細胞変異が疑われる様々な疾患において原因遺伝子変異の検索が可能となり、これらの疾患の分子病態を解明する一助となると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では体細胞変異に起因すると強く疑われている複数の疾患について病変組織と正常組織のペア検体を入手し、全エクソーム解析を用いて未知の体細胞変異を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

体細胞変異に起因すると考えられている疾患について、腫瘍・正常組織ペア検体を研究協力機関より集積する。各ペア検体について全エクソーム解析 (WES) を行い、複数検体に共通して異常がみられる遺伝子を検索した。また、Targeted amplicon sequencing (TAS) 解析を用いて特定の遺伝子について集中的にシーケンシングし、カバレッジを厚くすることでより正確性の高い変異アレル頻度の検証を行った。特定された原因遺伝子についてはその遺伝子機能に合わせた機能解析を行い、その機能評価を行った。

(1) WES データを用いた体細胞変異解析

エクソーム解析とは、次世代シーケンサー全ゲノムの約 2% を占める遺伝子配列の中で蛋白配列に影響を及ぼす領域 (コーディング領域) のみを網羅的に解析する手法である。先天性遺伝性疾患の多くは単一遺伝子疾患であり、特に重要なタンパクをコードする遺伝子の変異によって生ずると推定されるため、本手法を用いてタンパク翻訳領域のみを

選択的に解析することで、効率よく疾患原因遺伝子の特定が可能となる。

腫瘍組織、正常組織それぞれから抽出した DNA をもとにコーディング領域のみを濃縮したライブラリーを作成し、次世代シーケンサーで解析することで、膨大な量の短い配列情報を得ることができる。得られた塩基配列情報はバイオインフォマティクス的手法を用いてヒトの参照配列にマッピングし、さらにデータの正確性を高めるために重複した配列の除去、欠失/挿入のある配列の再調整、塩基配列精度の再校正を行い解析に必要な塩基配列情報を含むファイルを作成した (BAM file)。作成された BAM file は染色体の位置情報に合わせて整列する。一人の患者の腫瘍/正常組織それぞれから作成された BAM file を Mutect と VarScan 2 という 2 つ体細胞変異検出ツールにて比較することにより、腫瘍組織に特異的な一塩基変異 (SNV) や欠失/挿入変異 (InDel) のコールを行った。一人のエクソーム解析で検出される変異は数千個に上るため、これらの中からタンパクに影響を与える変異等の予測を行った。また、dbSNP データベースや日本人健常コントロールのエクソームデータをもとに一般集団において頻度の高いバリエーションを除外し、数十~数百個/個人まで変異の絞り込みを行った。

(2) TAS 解析による変異スクリーニング

腫瘍組織は腫瘍細胞のみならず多くの正常細胞 (間質細胞や免疫細胞など) を含んでおり、変異細胞の割合によってエクソーム解析でコールされる変異アレル頻度が左右される。そのため、低頻度モザイクの検体では偽陽性のバリエーションが多数コールされている可能性がある。そこで、エクソーム解析によって同定された候補遺伝子変異については、より正確な方法で再現性の検証を行う必要がある。TAS 解析は候補変異を含む特異的配列を PCR 法によって増幅させ、これを次世代シーケンサーによって集中的にシーケンシングカバレッジを厚くすることでより正確性の高い変異アレル頻度の検証を行う方法である。すべての候補変異は本手法により変異が真に存在することを確認した。また、本法は遺伝子全長をターゲットとして解析することが可能であるため、候補遺伝子内の新規変異のスクリーニングをエクソーム解析より正確・迅速かつ安価に行うことが可能である。同定された候補遺伝子については、本手法を用いて追加検体での変異スクリーニングを施行した。

(3) 疾患原因遺伝子の機能解析

同定された遺伝子変異が蛋白機能に及ぼす影響を検討する。原因遺伝子の野生型および変異型蛋白発現ベクターを作成し、各ベクターを導入した細胞株における関連蛋白の発現・局在の変化や標的蛋白への影響などを、Western blot や組織・細胞免疫染色等を用い

て解析した。

4. 研究成果

(1) Sturge-Weber 症候群における *GNAQ* 遺伝子変異の同定

Sturge-Weber syndrome (SWS) は、顔面皮膚の毛細血管奇形（ポートワイン母斑）、脳髄膜の血管病変、脈絡膜の血管病変を主症状とする稀な先天性疾患である。

我々は SWS 症候群患者 15 人から病変組織（脳）および健常組織（血液）のペア検体を採取し、全エクソーム解析を用いて体細胞変異の検索を行った。その結果、15 人中 12 人（80%）において *GNAQ* 遺伝子の低頻度モザイク（c.548G>A, p.R183Q）変異を同定した（下表 1）。本変異は Shirley ら（N Engl J Med. 368:1971-9, 2013）によって報告された変異と一致していた。その後、droplet digital PCR を用いた解析によって、WES で変異が同定されなかった 2 症例においても、超低頻度（0.14-0.2%）の体細胞モザイク変異が存在することが確認された（Uchiyama Y, Sci Rep. 2016 Mar 9;6:22985.）。現在 *GNAQ* 遺伝子の c.548G>A (p.R183Q) 変異は SWS の診断基準の一つとなっており、本研究結果が同疾患の臨床評価に大きく貢献したと考えられる。

表 1. SWS 患者における *GNAQ* 変異アレル頻度

Sample	Read depth		Mutant allele Frequency (%)	
	Affected	Normal	Affected	Normal
1	289,312	2,676,243	5.69	0.03
2	1,170,532	561,208	4.03	0.05
3	566,890	1,128,199	0.03-0.06	0.03
4	996,691	1,556,151	0.16-0.28	0.03
5	490,977	471,499	5.04	0.04
6	930,173	409,196	6.14	0.04
7	639,834	635,419	4.11	0.04
8	1,277,805	1,128,803	7.59	0.03
9	622,186	1,128,803	8.06	0.01
10	387,543	432,693	0.03-0.04	0.03
11	65,437	20,297	3.77	0.04
12	253,920	230,876	6.17	0.44
13	611,093	441,137	3.91	0.03
14	578,857	1,244,217	8.94	0.04
15	739,125	887,628	3.66	0.03

(2) 限局性皮質異形成症(FCD)における *MTOR* 遺伝子の体細胞変異の同定

限局性皮質異形成（focal cortical dysplasia: FCD）は脳の細胞構築の異常により皮質層構造の崩壊および神経細胞の配列異常をきたす疾患であり、薬剤抵抗性の難治性てんかんの原因となっている（図 A）。FCD は大きくに 3 型に分類されており、さらに組織学的特徴や付随疾患によって亜型に分類される。今回我々は、FCD 患者の中でも特徴的な組織像を示す「FCD IIb 型」症例（図 B）に注目し、この 13 症例の脳組織（病変部位）と血液組織（正常部位）から採取した DNA を用いて解析を行った。まず 9 症例について全エクソーム解析を行い、両者の遺伝子配列を比較した結果、2 症例において *MTOR* 遺伝子の体細胞モザイク変異を同定した。さらに、TAS

解析を用いて詳細な解析を行ったところ、FCD IIb13 症例中 6 症例において *MTOR* 遺伝子の体細胞モザイク変異が同定された（図 C）。全ての変異は mTOR 蛋白の重要な機能ドメイン上に存在し、コンピューターを用いた立体構造予測では蛋白に何らか機能的変化をもたらす変異であることが予想された。そこで、*MTOR* 変異を有する患者の脳組織検体における mTOR 経路の活性化を評価したところ、*MTOR* 変異陽性の FCD IIb 症例においては、他の疾患の脳組織と比較して mTOR 経路の著しい活性化が認められた（図 D）。また、同定された各変異が mTOR 経路に及ぼす影響をヒト培養細胞株を用いて検討したところ、*MTOR* 変異体を発現するプラスミドをトランスフェクションした細胞株は *MTOR* 正常体を発現するプラスミドをトランスフェクションした細胞株に比べて、mTOR 経路の活性が著名に上昇していた。このことから、これらの変異はすべて PI3K-AKT3-mTOR 経路を賦活化する活性型変異であることが示唆された。

mTOR 蛋白は免疫抑制剤の一つであるラパマイシン（Rapamycin）の標的蛋白であり、mTOR にラパマイシンが結合することでその活性化を抑制する機能を持つことが知られている（図 E）。ラパマイシンの投与が *MTOR* 遺伝子変異による mTOR 経路の活性化を抑制することが示されており、ラパマイシンおよびそのラパログを *MTOR* 遺伝子変異に起因する難治性てんかんの治療薬として応用できる可能性が期待されており、現在臨床試験が進められている。

図 A. FCD IIb を呈する 2 症例の MRI 画像。矢頭で示す部分が病変部位。

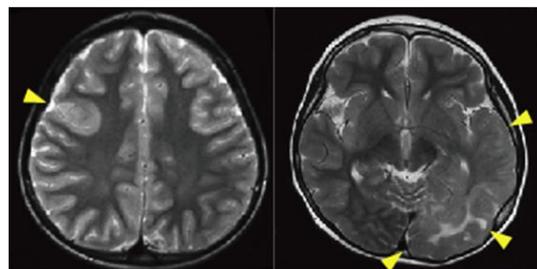


図 B. FCD IIb 型の組織像。矢印が異形ニューロン、アスタリスクがバルーン細胞。

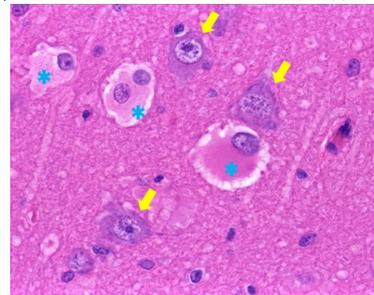


図 C. FCD 症例で認められた *MTOR* 遺伝子のモザイク変異。4 つの変異はいずれも哺乳類からゼブラフィッシュまで高度に保存されたアミノ酸を置換する変異であった。

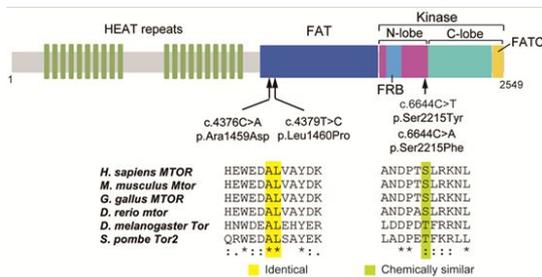


図 D. FCDIIb 症例(左)と FCD 以外のてんかん症例(Control)の脳組織の免疫染色像。褐色に濃く染まっている細胞は S6 キナーゼのリン酸化が促進されている。

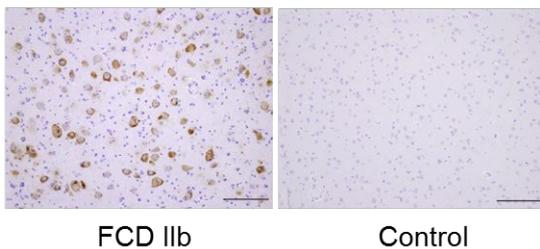
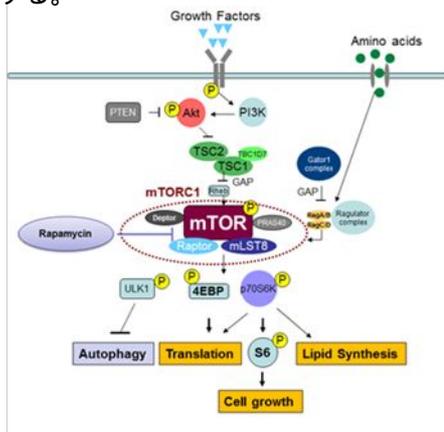


図 E. PI3K-AKT3-mTOR 経路の模式図。MTOR が活性化することにより、細胞増殖・脂質生成、蛋白翻訳が促進され、細胞死が抑制される。ラパマイシン(Rapamycin)は MTOR の活性を抑制する。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Yoshida M[#], Nakashima M[#], Okanishi T, Kanai S, Fujimoto A, Itomi K, Morimoto M, Saitsu H, Kato M, Matsumoto N, Chiyonobu T*. (#Co-First author) Identification of novel BCL11A variants in patients with epileptic encephalopathy: Expanding the phenotypic spectrum. Clin Genet. 93(2):368-373, 2018 (査読有)

Hiraide T[#], Nakashima M[#], Yamoto K, Fukuda T, Kato M, Ikeda H, Sugie Y, Aoto K, Kaname T, Nakabayashi K, Ogata T, Matsumoto N*, Saitsu H*. (#Co-First author) De novo variants in SETD1B are associated with intellectual disability, epilepsy

and autism. Hum Genet. Jan;137(1):95-104, 2018 (査読有)

Nakashima M, Takano K, Tsuyusaki Y, Yoshitomi S, Shimono M, Aoki Y, Kato M, Aida N, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Osaka H, Saitsu H, Matsumoto N* WDR45 mutations in three male patients with West syndrome. J Hum Genet 61(7):653-61, 2016 (査読有)

Nakashima M, Kouga T, Lourenço CM, Shiina M, Goto T, Tsurusaki Y, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Osaka H, Matsumoto N* De novo DNMI mutations in two cases of epileptic encephalopathy. Epilepsia 57(1):e18-23, 2016 (査読有)

Nakashima M[#], Saitsu H[#], Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A*, Matsumoto N* (#Co-First author) Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. Ann Neurol. 78(3):375-86, 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)
(国外)

WDR45 mutations in three male patients with West syndrome (Poster) Nakashima M, The American society of human genetics, 2016

Somatic mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia Type IIb. Nakashima M, The American society of human genetics, 2015

(国外)

全エクソーム解析を用いた希少難治性てんかん 1230 例の包括的遺伝子解析 中島光子、日本人類遺伝学会、2017

De novo DNMI mutations in two cases of epileptic encephalopathy. Nakashima M, International Conference on Human Genetics, 2016

限局性皮質異形成(FCD)IIb 型における MTOR 体細胞変異の同定 中島光子、日本人類遺伝学会、2015

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中島光子 (Nakashima, Mitsuko)
浜松医科大学・医学部・医化学・准教授
研究者番号: 20541965