

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10080

研究課題名(和文) 傍シルビウス裂症候群の包括的なゲノム解析

研究課題名(英文) Comprehensive genomic analysis on perisylvian syndrome

研究代表者

宮武 聡子 (Miyatake, Satoko)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：50637890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：傍シルビウス裂症候群は大脳のシルビウス裂周辺に多少脳回などの脳形成異常や機能異常を呈する難治性疾患である。本研究は日本人の本疾患コホートに対して次世代シーケンサーを駆使した包括的なゲノム解析を行い、本疾患の責任遺伝子の同定と病態解明を目的とした。2018年に新規疾患責任遺伝子であるSCN3Aを同定しAnnals of Neurology誌に発表した。2019-2020年にかけて、第2の新規疾患責任遺伝子Aを同定し学術雑誌に研究成果論文を投稿中である。そのほか、複数の新規疾患責任遺伝子を同定し細胞やモデル動物を用いた機能検証実験を他施設と共同で進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本疾患は、その原因として胎児期の環境要因と並んで遺伝学的要因が想定されているが、遺伝学的要因についてはその多くは原因不明である。今回の研究で、新たな疾患責任遺伝子SCN3Aを同定したことは、その病態を理解し治療法について検討する第一歩であり社会的意義は大きい。本遺伝子は細胞膜に局在する電位依存性ナトリウムチャネルの構成分子をコードする。これまでてんかんの責任遺伝子として知られていたが、脳構造異常をきたすことは知られていなかった。今回の発見により、イオンチャネル遺伝子と脳形成異常との関連が示唆されたことは学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Perisylvian syndrome is a rare disorder of the brain in which cortical malformation, usually polymicrogyria, occurs around the Sylvian fissures, and characterized by pseudobulbar palsy, intellectual disability or epilepsy. This study aimed to identify the genetic cause of perisylvian syndrome by comprehensive genome analyses on Japanese patients with this disease. We have identified and reported SCN3A, novel gene associated with polymicrogyria in 2018. We have also detected novel genes A, B, C, and D, for this disease, and are now doing in vitro, and/or in vivo analyses to confirm them in collaboration with other research institutes.

研究分野：臨床遺伝学

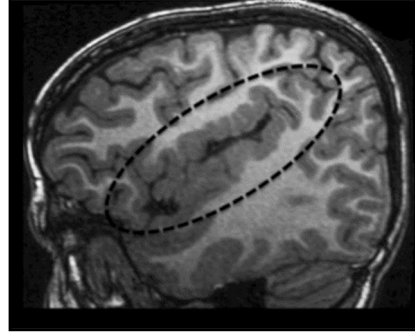
キーワード：全エクソーム解析 傍シルビウス裂症候群 多少脳回

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

傍シルビウス裂症候群とは、大脳外側に存在するシルビウス裂周辺に脳構造異常や機能異常を呈するまれな症候群である。脳構造異常としては多小脳回(図1)が最も多い。原因として、周産期異常、脳血管障害、感染症などが想定されてきた。また、近年染色体微細欠失(22q11.2や1p36.3など)や単一遺伝子異常が報告され、遺伝学的背景を有する一群があることが知られるようになってきた。ただし現在まで、遺伝的要因の多くは不明である。

図1 本疾患の頭部MRI画像
(シルビウス裂周辺の多小脳回)



傍シルビウス裂症候群は、解剖学的な特徴に基づいて1つの疾患カテゴリーとして分類されているが、原因や脳構造異常の表現型は多彩で雑多な疾患群を包含している。本症候群の中で遺伝学的原因によるものについて、その遺伝学的要因を明らかにすれば、遺伝子診断が可能になったり、病態の解明や治療法の探索に貢献できる、といったメリットがあり、本症候群の遺伝学的原因を解明することは有用であると考えられた。

2. 研究の目的

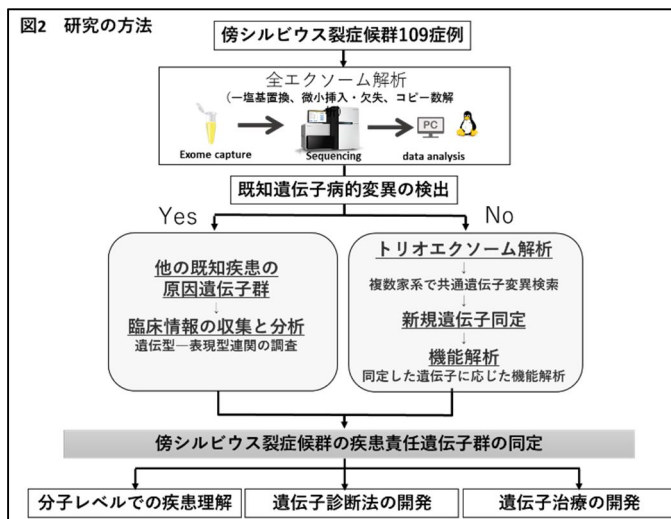
本研究は、日本人の本疾患コホートに対して次世代シーケンサーを駆使した包括的なゲノム解析を行い、本疾患の新規責任遺伝子の同定し病態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

対象は傍シルビウス裂症候群 109 症例である。

方法(図2)は、(1)全エクソーム解析、(2)臨床情報の収集と分析、(3)機能解析(細胞系、モデル動物系、たんぱく質結晶構造解析など)である。

(1)全エクソーム解析: 対象となる血液検体から白血球由来のDNAを抽出後、Agilent社のSureSelect Human All Exon V5 or V6 kitを用いてエクソーム分画を濃縮したあと、Illumina社のHiSeq2000/2500もしくは、NovaSeqを用いて網羅的な配列解析を実施した。取得したデータは教室で構築したデータ解析パイプラインを用いてリードのマッピング、ジェノタイピング、アノテーション、バリエーションの頻度情報に基づくフィルタリング等の計算処理を行ったのち、遺伝子のコーディング領域を中心に、塩基置換、微小欠失や挿入配列変化、もしくはコピー数異常などを検索した。データ解析の手順は、まず症例サンプルに対して全エクソーム解析を行い、既知疾患責任遺伝子に病的配列が検出された場合は、症例の臨床情報の収集と分析を行い、臨床的妥当性について検討した。既知疾患責任遺伝子に病的配列がない場合、新規遺伝子に原因があると想定し、両親サンプルで全エクソーム解析を追加で施行し、両親データとの比較から、疾患と共分離する病的所見の絞り込みを行った。次に上記の方法で絞りこまれた病的所見を全該当症例について集め、複数の症例で同じ遺伝



子に変異を持つような遺伝子を検索した。

(2)臨床情報の収集と分析：主治医と連携して主にカルテなどを用いて情報収集を行い、症例がどのような臨床的徴候を共有しているのか、発症年齢、主な症状、重症度と予後、どのような治療がなされているか、他臓器の合併症状の有無、などについて調査した。

(3)機能解析：現在投稿中の新規遺伝子 A については、A 遺伝子がコードするたんぱく質の構造モデル解析を行ったり、A 遺伝子の野生型と変異型の cDNA 発現ベクターを構築しヒト由来細胞を用いていくつかの機能検証実験を行った。またゼブラフィッシュを用いて、今回同定した変異によって症例の表現型を裏付ける所見が再現されるか確認した。

4. 研究成果

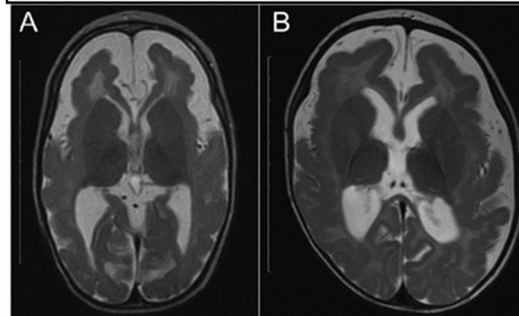
(1)コホート全体の解決率

109 例中、既知疾患責任遺伝子の病的変化を認めたのは 40 例で解決率は 36.6%であった。

(2)新規責任遺伝子 *SCN3A*

109 例のコホートの中で、既知遺伝子に病的所見を認めなかった 2 例に対して両親検体を用いた全エクソーム解析を追加試行した。症例と両親のデータを比較し疾患と共分離するバリエーションを検索したところ、*SCN3A* 遺伝子に、症例のみに共通のバリエーション(c.2624T>C (p.I1e875Thr))を検出した。サンガー法により、両家系において、この変異が新生突然変異であることを確定した。症例 1 は、解析時 5 歳男児で、出生時小頭症 (-2.0SD) が見られた。生後 1 日に全般性けいれんが出現し抗てんかん薬投与を受けていたが、その後もけいれん発作が続いた。重度の精神運動発達遅滞が見られた。寝返り、眼を合わせる、ソーシャルスマイル、などは見られなかった。脳波上てんかん波が見られ、頭部 MRI で多少脳回が見られた。症例 2 は解析時 6 か月の男児で、出生時軽度の小頭症 (-1.3SD) が見られた。生後 1.5 か月時に點頭てんかんが出現。ACTH 療法を受けるも難治となった。生後 6 か月時の脳波でヒプスアリスミアと認め、頭部 MRI で多少脳回が見られた。2 症例の脳 MRI 図(図 3、A:症例 1、B:症例 2)は、T2 強調画像、軸位断の画像である。ともに大脳皮質の肥厚を伴う両側前頭葉優位の多少脳回が見られた。また大脳萎縮、側脳室拡大、および大脳白質の髄鞘化遅延も見られた。*SCN3A* 遺伝子は細胞膜に局在する電位依存性ナトリウムチャネルの構成分子をコードする。これまで本遺伝子はてんかんの責任遺伝子として知られていたが、脳構造異常をきたすことは知られていなかった。今回の発見は、*GRIN2B*, *GRIN1* などといった遺伝子と同様、てんかんを引き起こすイオンチャネル遺伝子と脳形成異常との関連を想起させる。時期を前後して海外からも乳児期発症の難治性てんかん、重度の発達遅滞、小頭症を伴う多少脳回の症例が見つかっており、またモデル動物(フェレット)を用いた疾患の再現も報告され^{1,2}、今回の結果³も併せて、*SCN3A* 遺伝子の p.I1e875Thr 変異が脳皮質形成異常をきたす特殊な変異であることが強く示唆された。

図3
SCN3A関連多小脳回の2症例
MRI画像



んかん薬投与を受けていたが、その後もけいれん発作が続いた。重度の精神運動発達遅滞が見られた。寝返り、眼を合わせる、ソーシャルスマイル、などは見られなかった。脳波上てんかん波が見られ、頭部 MRI で多少脳回が見られた。症例 2 は解析時 6 か月の男児で、出生時軽度の小頭症 (-1.3SD) が見られた。生後 1.5 か月時に點頭てんかんが出現。ACTH 療法を受けるも難治となった。生後 6 か月時の脳波でヒプスアリスミアと認め、頭部 MRI で多少脳回が見られた。2 症例の脳 MRI 図(図 3、A:症例 1、B:症例 2)は、T2 強調画像、軸位断の画像である。ともに大脳皮質の肥厚を伴う両側前頭葉優位の多少脳回が見られた。また大脳萎縮、側脳室拡大、および大脳白質の髄鞘化遅延も見られた。*SCN3A* 遺伝子は細胞膜に局在する電位依存性ナトリウムチャネルの構成分子をコードする。これまで本遺伝子はてんかんの責任遺伝子として知られていたが、脳構造異常をきたすことは知られていなかった。今回の発見は、*GRIN2B*, *GRIN1* などといった遺伝子と同様、てんかんを引き起こすイオンチャネル遺伝子と脳形成異常との関連を想起させる。時期を前後して海外からも乳児期発症の難治性てんかん、重度の発達遅滞、小頭症を伴う多少脳回の症例が見つかっており、またモデル動物(フェレット)を用いた疾患の再現も報告され^{1,2}、今回の結果³も併せて、*SCN3A* 遺伝子の p.I1e875Thr 変異が脳皮質形成異常をきたす特殊な変異であることが強く示唆された。

(3) 新規責任遺伝子 A

新規疾患責任遺伝子 A を確定し、論文投稿中である。本遺伝子は、機能性脳疾患の原因遺伝子として知られているが、従来大脳の形成異常は伴わないと考えられていたので、今回の発

見は臨床的に非常に重要と考えられる。7症例に7種類の病的変異を同定した。結晶構造モデル解析や *in vitro* の機能解析から、すでに知られている機能性脳疾患の原因変異とは、もたらず病的効果異なることを明らかにした。またモデル動物を用いて、今回同定した変異によって患者さんの表現型を裏付ける所見を確認し、さらにその病態が示唆される結果も得ている。

(3) その他の新規責任遺伝子

上記以外に3つの新規疾患責任遺伝子の候補を同定した。ヒト由来細胞やモデル動物を用いた機能検証実験を他施設と共同で進めている。

(4) 今後の展望

本研究により2個の新規疾患遺伝子が同定できた。3個の遺伝子についても今後検証を進めて確定させる。今後、これらの遺伝子に関連する傍シルビウス裂症候群について、臨床上的特徴を分析してまとめ、実臨床への遺伝子診断の実装、治療法の探索に貢献したいと考える。

参考文献

1. Zaman T, Helbig I, Bozovic IB, et al. Mutations in SCN3A cause early infantile epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2018;83(4):703-717.
2. Smith RS, Kenny CJ, Ganesh V, et al. Sodium Channel SCN3A (NaV1.3) Regulation of Human Cerebral Cortical Folding and Oral Motor Development. *Neuron*. 2018;99(5):905-913 e907.
3. Miyatake S, Kato M, Sawaishi Y, et al. Recurrent SCN3A p.Ile875Thr variant in patients with polymicrogyria. *Ann Neurol*. 2018;84(1):159-161.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計55件（うち査読付論文 55件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hamanaka Kohei, Miyatake Satoko, Koshimizu Eriko, Matsumoto Naomichi, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 RNA sequencing solved the most common but unrecognized NEB pathogenic variant in Japanese nemaline myopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genetics in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41436-018-0360-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyatake Satoko, Schneeberger Sacha, Koyama Norihisa, Yokochi Kenji, Ohmura Kayo, Henet Thierry, Matsumoto Naomichi, et al	4. 巻 84
2. 論文標題 Biallelic COLGALT1 variants are associated with cerebral small vessel disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 843 ~ 853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ana.25367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamanaka Kohei, Miyatake Satoko, Zerem Ayelet, Lev Dorit, Blumkin Luba, Yokochi Kenji, Fujita Atsushi, Imagawa Eri, Iwama Kazuhiro, Nakashima Mitsuko, Mitsuhashi Satomi, Mizuguchi Takeshi, Takata Atsushi, Miyake Noriko, Saito Hiroto, van der Knaap Marjo S., Lerman-Sagie Tally, Matsumoto Naomichi	4. 巻 63
2. 論文標題 Expanding the phenotype of IBA57 mutations: related leukodystrophy can remain asymptomatic	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1223 ~ 1229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-018-0516-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyatake Satoko, Kato Mitsuhiro, Sawaishi Yukio, Saito Takashi, Nakashima Mitsuko, Mizuguchi Takeshi, Mitsuhashi Satomi, Takata Atsushi, Miyake Noriko, Saito Hiroto, Matsumoto Naomichi	4. 巻 84
2. 論文標題 Recurrent SCN3A p.I1e875Thr variant in patients with polymicrogyria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 159 ~ 161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ana.25256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyatake Satoko, Koshimizu Eriko, Shirai Ikuko, Kumada Satoko, Nakata Yasuhiro, Kamemaru Aiko, Nakashima Mitsuko, Mizuguchi Takeshi, Miyake Noriko, Saitsu Hiroto, Matsumoto Naomichi	4. 巻 33
2. 論文標題 A familial case of PDE10A-associated childhood-onset chorea with bilateral striatal lesions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 177 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.27219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyatake Satoko, Okamoto Nobuhiko, Stark Zornitza, Nabetani Makoto, Tsurusaki Yoshinori, Nakashima Mitsuko, Miyake Noriko, Mizuguchi Takeshi, Ohtake Akira, Saitsu Hiroto, Matsumoto Naomichi	4. 巻 62
2. 論文標題 ANKRD11 variants cause variable clinical features associated with KBG syndrome and Coffin-Siris-like syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 741 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/jhg.2017.24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 宮武聡子
2. 発表標題 脳小血管病の新たな疾患責任遺伝子 COL4A1/COL4A2
3. 学会等名 第37回日本神経治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮武聡子
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたコピー数解析
3. 学会等名 第26回臨床細胞遺伝学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮武 聡子
2. 発表標題 MYPN関連ミオパチー.
3. 学会等名 日本小児神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoko Miyatake, Mitsuhiro Kato, Yukio Sawaishi, Takashi Saito, Naomichi Matsumoto
2. 発表標題 The de novo hotspot variant in SCN3A in patients accompanying polymicrogyria
3. 学会等名 第63回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮武 聡子
2. 発表標題 女性医師、研究者のキャリアパスについて
3. 学会等名 第63回日本人類遺伝学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮武 聡子
2. 発表標題 ミオパチーのエキソーム解析
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoko Miyatake, Satomi Mitsuhashi, Yukiko K. Hayashi, Atsuko Nishikawa, Mikiya Suzuki, Kana Yatabe, Yuzo Tanaka, Katsuhisa Ogata, Satoshi Kuru, Ikuya Nonaka, Ichizo Nishino, Naomichi Matsumoto
2. 発表標題 Biallelic mutations in MYPN cause childhood-onset, slowly progressive nemaline myopathy
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脳小血管病の確定診断法	発明者 松本直通、宮武聡子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-194803	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----