

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15459

研究課題名（和文）成人白質脳症の臨床・遺伝学的背景の解明と新規遺伝子同定

研究課題名（英文）Clinical and genetic analysis and identification of causative genes for adult leukoencephalopathy

研究代表者

三宅 綾子（Miyake, Ryoko）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10760184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：白質脳症は大脳白質を病変の主座とする疾患の総称である。我々は、110例の日本人成人白質脳症患者の遺伝学的異常について、カスタムキャプチャーキット（CDGP）、エクソーム解析（WES）、神経核内封入体病（NIID）の原因として同定されたNOTCH2NLCのGGCリピート伸長解析（Repeat-primed PCR: RP-PCR）を行い、原因同定を試みた。

CDGP、WESを用いた解析では11例においてNOTCH3変異を、RP-PCRでは12例でNOTCH2NLCのGGCリピート伸長を同定した。日本人成人白質脳症患者においては、NIIDとCADASILが2大疾患であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人白質脳症において多検体を用いて遺伝学的背景の解明を試みた研究は少なく、イギリス、ブラジルの施設で行われた研究（Lynch DSらBrain 140, 1204-1211, 2017）以外ほとんど見当たらない。我々は日本人成人白質脳症患者において110例（先行研究と合わせての症例数）のうち28例（25.5%）において原因遺伝子を明らかにし、12例がNIID、11例がCADASILでNIIDとCADASILであることを示した。上記2疾患が日本人成人白質脳症の2大原因であることを明らかにした（Okubo Mら、業績参照）ことは、実臨床に非常に有益な情報を与えるものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Leukoencephalopathies comprise a broad spectrum of disorders, but the genetic background of adult leukoencephalopathies has rarely been assessed. We analyzed 110 Japanese patients with adult leukoencephalopathy using custom-designed gene panel (CDGP), whole-exome sequencing (WES) and repeat-primed PCR (RP-PCR) for detecting GGC expansion in NOTCH2NLC, which was identified as the cause of neuronal intranuclear inclusion disease (NIID). As for CDGP and WES, the patients with “likely pathogenic” and “pathogenic” variants were picked up according to American College of Medical Genetics guidelines.

As the results of CDGP and WES, we found 11 patients with “likely pathogenic” / “pathogenic” NOTCH3 variants as the major cause of adult leukoencephalopathy detectable by short-read sequencing. As the result of RP-PCR, we found 12 patients with GGC expansion in NOTCH2NLC. Our results indicate that NIID and CADASIL are two major causes of Japanese adult non-acquired leukoencephalopathy.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：leukoencephalopathy exome NOTCH2NLC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白質脳症は脳白質を病変の主座とする疾患の総称である。背景疾患は非常に多岐にわたり、遺伝性の白質脳症に限っても、全く病態の異なる疾患が含まれる。疾患特異的な治療を考慮する上では、正確な診断を下すことが必須となるが、臨床所見や画像所見のみでの診断は容易ではなく、これまで診断未確定のままにされてきた症例が少なくないと考えられる。しかし、小児白質脳症患者におけるエクソーム解析(1)、成人白質脳症におけるイギリスおよびブラジルの施設で行われたエクソーム解析(2)以外は系統的な報告がなかった。我々はこのような背景のもと 55 種類の白質脳症原因遺伝子を対象にした、カスタムキャプチャーキット (Custom-designed gene panel: CDGP) を作成し、卓上型次世代シーケンサーを用いた新しい白質脳症の診断方法を開発し解析手法を確立し、解析してきた(3)。

2. 研究の目的

我々の行ってきた先行研究においては(3)、成人白質脳症症例 60 例の解析の結果、成人白質脳症の 8 例 (約 13.3%) について我々の方法で遺伝的背景を明らかにすることが出来た (図)。我々の解析結果は小児白質脳症に比較し、成人白質脳症では遺伝学的診断の確定率が低く、遺伝学的素因以上に環境要因に起因する疾患が多い可能性を示唆するものであった。しかし近年、白質脳症の分野においても新たな原因遺伝子が次々に明らかにされており(4)、CDGP による検討で未診断であった症例についてさらなる検討の必要性が生じている。本研究では、先行研究で収集した特定 55 種類の遺伝子に異常が認められなかった症例、および新たに収集した 50 例についてエクソーム解析 (whole exome sequencing: WES) を通じた更なる検討を進め、成人白質脳症の全体像を明らかにしていくことを目的とした。

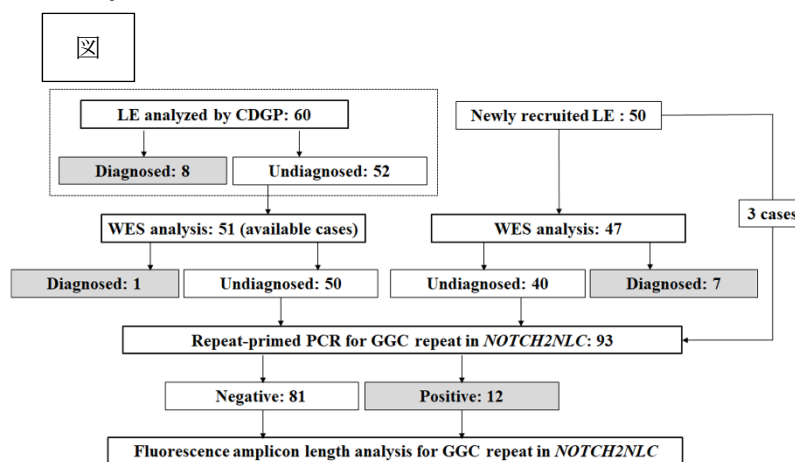
3. 研究の方法

CDGP で原因同定に至らなかった 52 症例のうち、解析可能な 51 例、および新規に収集した 50 例のうち 47 例に対し WES 解析を行った。WES 解析においては American College of Medical Genetics guidelines (ACMG) の基準 (5) で “likely pathogenic” または

“pathogenic” variants と判定できたものについて、疾患原因の可能性が高い変異と判断した。本研究施行中に成人白質脳症の原因となりうる神経核内封入体病 (neuronal intranuclear inclusion disease: NIID) の原因として *NOTCH2NLC* の GGC リピート伸長が同定されたため、リピート伸長を検出する Repeat-primed PCR 法を原因不明な全例に対し施行した。新規収集した症例においては RP-PCR を WES 解析より優先し、3 例において *NOTCH2NLC* 異常が検出されたため WES 解析を行っていない。

4. 研究成果

① CDGP で原因同定に至らなかった 52 症例のうち、解析可能な 51 例の WES 解析においては 1 例において *L2HGDH* ホモ接合性変異を同定することができた。新規収集した 50 例のうち WES 解析を行った 47 症例では、6 例において、*NOTCH3* 変異を検出した。これは我々の先行研究 (60 例中 5 例で検出) とほぼ同様の頻度であった。これらの結果を総合すると 110 例中 11 例で *NOTCH3* 変異が検出されたこととなり、成人白質脳症においては「皮質下梗塞と白質脳症を伴う常染色体優



性脳動脈症 (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarct and Leukoencephalopathy: CADASIL)」がショートリードシーケンスで検出できる最も頻度の高い疾患であることが再度確認された。

② これまでに CDGP、WES 解析で疾患原因を同定できなかった症例においては 12 例において RP-PCR で異常が検出され、NIID であることが確認された。

以上から、我々の研究により、日本人成人白質脳症においては、CADASIL と NIID が 2 大疾患であることが示唆された。

③ 遺伝学的に診断された NIID12 例の臨床所見、MRI 画像を再度精査すると、3 例で少なくとも初期においては、NIID の特徴とされる皮髄境界部の拡散強調画像高信号が認められないことが確認され、NIID 画像所見の多様性が示唆された。

以上の成果は英文論文として発表した(6)。

表：WES で検出された病的と考えられる single nucleotide variants (SNVs)

Gene	Mutations	ACMG criteria/ category	PolyPhen-2		Mutation taster		Allele frequency	
	Nucleotide/ Protein/ Status		Score	Prediction	Value	Prediction	In-house Japanese database	ExAC/ gnomAD
<i>L2HGDH</i> <i>NM_024884</i>	c.845G>A/ p.Arg282Gln Homozygous	Pathogenic/ PS1, PM2, PM3, PP3, PP4	1.000	Probably damaging	0.999	Disease- causing	0/575	0.00002471/ 0.00002526
<i>NOTCH3</i> <i>NM_000435</i>	c.871T>C/ p.Cys291Arg/ Heterozygous	Likely pathogenic/ PM1, PM2, PM5, PP3, PP4	1.000	Probably damaging	0.999	Disease- causing	0/575	0/0
<i>NOTCH3</i>	c.853T>C/ p.Cys285Arg/ Heterozygous	Likely pathogenic/ PM1, PM2, PP3, PP4	1.000	Probably damaging	0.999	Disease- causing	0/575	0/0
<i>NOTCH3</i>	c.328C>T/ p.Arg110Cys/ Heterozygous	Pathogenic/ PS1, PM1, PM2, PP3, PP4	0.999	Probably damaging	0.999	Disease- causing	0/575	0/0
<i>NOTCH3</i>	c.1630C>T/ p.Arg544Cys Heterozygous	Likely Pathogenic/ PS1, PM1, PP3, PP4	0.843	Possibly damaging	0.952	Disease- causing	0/575	0.0002675/ 0.0002947
<i>NOTCH3</i>	C421C>T/ p.Arg141Cys/ Heterozygous	Pathogenic/ PS1, PM1, PM2, PP3, PP4	1.000	Probably damaging	0.999	Disease- causing	0/575	0/0
<i>NOTCH3</i>	c.619C>T/ p.Arg207Cys/ Heterozygous	Likely Pathogenic/ PS1, PM1, PP3, PP4	0.990	Probably damaging	0.999	Disease- causing	0/575	0.000008321/ 0.000007990
<i>TUBB4A</i> <i>NM_006087</i>	c.1088T>C/ p.Met363Thr/ Heterozygous <i>de novo</i>	Likely Pathogenic/ PS2, PM1, PM2, PP4	0.008	Benign	0.999	Disease- causing	0/575	0/0

これまでに疾患原因として報告のない SNV は太字で示した。PolyPhen-2 score は 0.000 (most probably benign) から 0.999 (most probably damaging)、Mutation Taster value は 1 に近いほど予想の精度が高い。ExAC: Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>); gnomAD: Genome Aggregation Database (<http://gnomad.broadinstitute.org/>).

<引用文献>

1. Vanderver A, et al. Whole exome sequencing in patients with white matter abnormalities. *Ann Neurol.* 2016;79(6):1031-7.

2. Lynch DS, et al. Clinical and genetic characterization of leukoencephalopathies in adults. *Brain*. 2017;140(5):1204-11.
3. Kunii M, et al. Genetic analysis of adult leukoencephalopathy patients using a custom-designed gene panel. *Clin Genet*. 2018;94(2):232-8.
4. Bugiani M, et al. Cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy (CARASAL). *Neurology*. 2016;87(17):1777-86.
5. Richards S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
6. Okubo M, et al. GGC Repeat Expansion of *NOTCH2NLC* in Adult Patients with Leukoencephalopathy. *Ann Neurol*. 2019;86(6):962-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okubo M, Doi H, Fukai R, et al.	4. 巻 86
2. 論文標題 GGC Repeat Expansion of NOTCH2NLC in Adult Patients with Leukoencephalopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 962 ~ 968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25586	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 Fukai R, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Non-traumatic Acute Epidural Hematoma in Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.00763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okuzono S, Fukai R, et al.	4. 巻 41
2. 論文標題 An acute encephalopathy with reduced diffusion in BRAF-associated cardio-facio-cutaneous syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 378 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2018.10.012	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 Kunii M, Doi H, Ishii Y, Ohba C, Tanaka K, Tada M, Fukai R, et al.	4. 巻 94
2. 論文標題 Genetic analysis of adult leukoencephalopathy patients using a custom designed gene panel	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Genetics	6. 最初と最後の頁 232 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.13371	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 K, Takahashi K, Miyatake S, Mitsuhashi S, Hamanoue H, Miyaji Y, Fukai R, et al.	4. 巻 94
2. 論文標題 Confirmation of SLC5A7 related distal hereditary motor neuropathy 7 in a family outside Wales	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Genetics	6. 最初と最後の頁 274 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.13369	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 Doi H, Koyano S, Miyatake S, Nakajima S, Nakazawa Y, Kunii M, Tomita-Katsumoto A, Oda K, Yamaguchi Y, Fukai R, et al.	4. 巻 63
2. 論文標題 Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 417 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-017-0408-5	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 Komiya H, Takasu M, Hashiguchi S, Uematsu E, Fukai R, et al.	4. 巻 5
2. 論文標題 A Case of McLeod Syndrome with A Novel XK Missense Mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Movement Disorders Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 333 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mdc3.12614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----