

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：17701
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K16604
研究課題名(和文) 我が国で発見された遺伝性ニューロパチーの新規原因遺伝子から探る病態機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathological mechanism of hereditary neuropathy based on novel causative genes discovered in Japan

研究代表者
樋口 雄二郎 (Yujiro, Higuchi)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：10867724
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)：新規のCMT患者500人の遺伝子検査を継続して実施し、これまでに解析したCMT患者累計2598例の臨床的・遺伝学的特徴をまとめ学術論文として報告した。我々が同定した新規原因遺伝子であるCOA7変異を有する7家系を同定し、表現型を詳細に評価し、ニューロパチー、小脳失調だけでなく、錐体外路徴候、痙攣など多彩な神経徴候を呈することを明らかにした。新規候補遺伝子Gene Xについては、計5家系を同定し、表現型の解析、家系分析データ、機能解析を進めた。Gene XのショウジョウバエKDモデルは樹立・解析を完了し、病態メカニズムを解明した。さらにノックインマウスモデルの樹立し、表現型解析を進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シャルコー・マリー・トゥース(CMT)病は末梢神経系が主に障害される遺伝性神経疾患である。本研究では、全国から依頼のあった新規のCMT患者500人の遺伝子検査を継続して実施し、これまでに解析した累計2598例の臨床的・遺伝学的特徴をまとめ学術論文として報告した。また、我々が同定した新規原因遺伝子であるMMEおよびCOA7変異を有する家系を多数同定し、表現型の多様性を明らかにした。さらに新規候補遺伝子については、計5家系を同定し、表現型の解析、家系分析データ、機能解析を進めた。本研究の成果は、本邦のCMT患者の遺伝子診断を確定し、CMTの病態解明や有効な治療法開発に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：We have continued genetic testing of 500 new CMT patients and reported the clinical and genetic characteristics of a cumulative total of 2598 CMT patients in our laboratory. We identified seven families with novel mutations in COA7, a novel causative gene we identified, and evaluated their phenotypes in detail. We revealed a wide variety of neurological signs, including neuropathy, cerebellar ataxia, extrapyramidal signs and spasticity. Regarding the new candidate gene "Gene X", we identified a total of five families and proceeded with phenotypic analysis, segregation analysis and functional analysis. The Drosophila knock down model of Gene X has been established and analyzed, and the pathogenetic mechanism has been elucidated. In addition, a knock-in mouse model has been established and phenotypic analysis is ongoing.

研究分野：シャルコー・マリー・トゥース病

キーワード：シャルコー・マリー・トゥース病 Charcot-Marie-Tooth病 遺伝性ニューロパチー MME ネプリライ
シン COA7 エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

遺伝性ニューロパチー(Inherited peripheral neuropathy: IPN)の代表である Charcot-Marie-Tooth 病(CMT)は末梢神経系が主に障害される遺伝性神経疾患である。2500 名に 1 名と比較的頻度の高い疾患で厚生労働省の指定難病にも認定されている。申請者らの研究室は、2007 年に厚生労働省の班において CMT の遺伝子診断を任され以来、一貫して本邦の遺伝子検査を継続し、多くの病型や新疾患を報告してきた。また近年、申請者は大規模エクソーム解析により、2 つの CMT/IPN の新規原因遺伝子 *MME*・*COA7* を同定し報告した。その他にも複数の新規候補遺伝子を同定している。CMT/IPN は非常に多様であり、まだ未解明な部分が多く、有効な治療法も確立しておらず、病態解明および革新的な新薬の開発が急務である。本研究では、CMT の包括的な遺伝子検査を継続しつつ、新規原因遺伝子を同定し、臨床的・遺伝学的・病理学的解析を行い、さらに病態モデル細胞・疾患モデル生物(ショウジョウバエ・マウス)を樹立・解析することで、CMT の病態解明および治療法開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、CMT/IPN 患者の包括的な遺伝子検査を継続しつつ、新規原因遺伝子を同定し、病理学的解析や機能解析を行い、CMT の病態解明および治療法開発を目指すことを目的とする。以下のように研究を進めていく。

(1) CMT/IPN 患者の包括的な遺伝子検査の対象遺伝子に、申請者が新規発見した *MME*・*COA7* の変異スクリーニングを追加し、遺伝的・臨床的特徴を明らかにしていく。

(2) 検査陰性例を対象にエクソーム解析を継続して実施し、申請者らが独自に開発した候補遺伝子絞り込むための ESVD システム(exome-based shared variants detection system)を用いて、新規原因遺伝子を同定する。

(3) *MME* および *COA7*、その他の候補遺伝子については、病理学的解析や細胞実験、生物モデルを用いて CMT の病態解明すめ、薬剤スクリーニング系を確立し治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、CMT の包括的な遺伝子検査を活用して症例を蓄積し、新規原因遺伝子を同定し、病態解明および治療法開発を目指す。以下の手順で研究を進める。

(1) CMT の包括的な遺伝子検査

CMT 既知遺伝子に加え、申請者が新規発見した *MME* や *COA7*、その他複数の候補遺伝子を含む遺伝子を解析するためのパネル化した包括的遺伝子解析システムを用いて変異スクリーニングを行う。申請者が新規発見した *MME*・*COA7* 変異症例および候補遺伝子変異症例をさらに蓄積し、各遺伝子毎の頻度や遺伝的・臨床的特徴を明らかにする。

(2) 新規原因遺伝子を同定

800 名を超える原因未同定の CMT 患者を対象に大規模エクソーム解析がすでに終了しているが、さらに追加症例を増やし解析を継続する。得られた膨大な変異データから、効率よく候補遺伝子を絞り込むため、申請者らが *MME* や *COA7* を同定する過程で独自に開発した ESVD システムを利用し、新規の候補遺伝子を同定する。同定した個々の新規の候補遺伝子変異については、病的意義を検証するために、segregation analysis(家系内の分離解析)や conservation analysis(生物種を超えて保存されている領域かどうかを検証する配列比較解析)、In silico analysis (mutation-prediction software を用いた蛋白機能障害予測評価)などの遺伝学的解析を行う。

(3) 病態解明および治療法開発

臨床的・病理学的解析

新規に同定した *MME* および *COA7* 変異症例だけでなく、CMT 新規候補遺伝子 (Gene X) 変異症例について、個々の神経所見や電気生理学的所見、神経画像所見、そして病理学的所見を詳細に検討する。特に病理学的解析では、患者から採取した末梢神経組織の形態変化だけでなく、候補遺伝子の翻訳蛋白の発現の有無や細胞内局在への影響などを免疫染色や Western blot 法などを用いて解析する。

病態モデル細胞・疾患モデル生物の作製と病態発症機構の解明

CMT 新規候補遺伝子(Gene X)の発見に基づいて、引き続き早稲田大学・京都工芸繊維大学と連携し Gene X 欠損細胞や疾患関連変異タンパク質発現細胞、ノックアウトショウジョウバエモデルを樹立し、細胞生物学的解析および表現型解析を行い病態解明を進めていく。また遺伝学的手法を用いて、複数の CMT 原因遺伝子が共通に関連する遺伝子やシグナル伝達経路を同定することにより、新規創薬ターゲットや開発に役立てる。

4. 研究成果

(1) 本研究期間中に新規の CMT 患者 500 人の遺伝子検査を継続して実施した。新規原因遺伝子 *MME* の変異症例は、累計 28 例まで症例を蓄積することができた。これらの解析結果と、これまでに当実験室で解析してきた CMT 患者を累計 2598 例の臨床的・遺伝学的特徴をまとめ学術論文として報告した(*Journal of Human Genetics*, 2022)。また新規原因遺伝子である *COA7* 変異を有する 7 家系を同定し、表現型を詳細に評価し、ニューロパチー、小脳失調だけでなく、錐体外路徴候、痙性など多彩な神経徴候を呈することを明らかにした。新規候補遺伝子 Gene X については、計 5 家系を同定し、表現型の解析、家系分析データ、機能解析を進めた。

(2) ESVD システムおよび R 言語を用いた解析システムを用いて候補遺伝子の検索を行った。ミトコンドリア関連核遺伝子(*PDHB*, *MTPAP*, *HADHB*, *SUCLA2*)の新規変異を同定し、ミトコンドリア関連ニューロパチーの遺伝的・臨床的多様性を明らかにした(*Journal of Neurology*, 2022)。

PTRH2 変異による IMNEPD(infantile-onset multisystem neurologic, endocrine, and pancreatic disease)症例の本邦初の症例を同定し、症例報告した(*Neurological Sciences*, 2022)。

TTR 変異による家族性アミロイドポリニューロパチーの 10 症例を同定し、高齢発症の CMT 患者との臨床的・電気生理学的所見を比較検討し、CIDP との鑑別の重要性などを明らかにした(*Journal of Human Genetics*, 2022)。

NEFH 変異による日本人初の 4 家系を同定し、臨床的・遺伝学的スペクトラムを明らかにした。これらの 4 家族はすべて鹿児島県に居住しており、ハプロタイプ解析により創始者効果が強く示唆された(*Journal of Human Genetics*, 2022)。

(3) 新規候補遺伝子 Gene X については、最終年度までに新規 2 家系を含む計 5 家系を同定し、表現型の解析、家系分析データの蓄積などを進めた。臨床的には、若年発症であり運動障害の重症度が高く、脳神経系の障害を伴っていた。また全例で軸索型ニューロパチーを呈し、共通の表現型を呈していた。segregation analysis では、全家系にて候補バリエーションが家系内で共分離されていることを確認し、conservation analysis では候補バリエーションが他の生物でも高度に保存されていた。In silico analysis では候補バリエーションの大部分が病原性が高いと評価された。Gene X のショウジョウバエ KD モデルは樹立後の表現型解析も完了し、複眼の形態異常、寿命短縮、クライミングアッセイによる運動能力の低下、またそれに対応した神経筋接合部のシナプス形態変化などを確認できた。一方で、患者で確認された Gene X ミスセンス変異の生体への影響を解析するために、Gene X ホモログ点変異細胞モデルの樹立を検討したが、該当部位のアミノ酸配列の保存性が低く、ゲノムサイズが巨大であることからゲノム編集が困難であった。代替案として、早稲田大学との共同研究にて CRISPR/Cas9 を用いたノックイン(KI)マウスモデルを樹立し、現在は、交配により個体数を増やし、表現型解析および病理学的解析を進行中表現型の解析を行い、病態メカニズムを明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Higuchi Yujiro, Takashima Hiroshi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Clinical genetics of Charcot-Marie-Tooth disease | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Human Genetics | 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/s10038-022-01031-2 | 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 Higuchi Yujiro, Ando Masahiro, Yoshimura Akiko, Hakotani Satoshi, Koba Yuki, Sakiyama Yusuke, Hiramatsu Yu, Tashiro Yuichi, Maki Yoshimitsu, Hashiguchi Akihiro, Yuan Junhui, Okamoto Yuji, Matsuura Eiji, Takashima Hiroshi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Prevalence of Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome in Patients with Cerebellar Ataxia in Japan | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Cerebellum | 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） 10.1007/s12311-021-01323-x | 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 Hiramatsu Yu, Okamoto Yuji, Yoshimura Akiko, Yuan Jun-Hui, Ando Masahiro, Higuchi Yujiro, Hashiguchi Akihiro, Matsuura Eiji, Takashima Hiroshi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Complex hereditary peripheral neuropathies caused by novel variants in mitochondrial-related nuclear genes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurology | 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） 10.1007/s00415-022-11026-w | 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 Ando Masahiro, Higuchi Yujiro, Okamoto Yuji, Yuan Junhui, Yoshimura Akiko, Takei Jun, Taniguchi Takaki, Hiramatsu Yu, Sakiyama Yusuke, Hashiguchi Akihiro, Matsuura Eiji, Nakagawa Hiroto, Sonoda Ken, Yamashita Toru, Tamura Akiko, Terasawa Hideo, Mitsui Jun, Ishiura Hiroyuki, Tsuji Shoji, Takashima Hiroshi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 An NEFH founder mutation causes broad phenotypic spectrum in multiple Japanese families | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Human Genetics | 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/s10038-022-01019-y | 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 Taniguchi Takaki, Ando Masahiro, Okamoto Yuji, Yoshimura Akiko, Higuchi Yujiro, Hashiguchi Akihiro, Matsuda Nozomu, Yamamoto Mamoru, Dohi Eisuke, Takahashi Makoto, Yoshino Masanao, Nomura Taichi, Matsushima Masaaki, Yabe Ichiro, Sanpei Yui, Ishiura Hiroyuki, Mitsui Jun, Nakagawa Masanori, Tsuji Shoji, Takashima Hiroshi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Elderly patients with suspected Charcot-Marie-Tooth disease should be tested for the TTR gene for effective treatments | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Human Genetics | 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/s10038-021-01005-w | 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 Ando Masahiro, Higuchi Yujiro, Takeuchi Mika, Hashiguchi Akihiro, Takashima Hiroshi | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 The first case of infantile-onset multisystem neurologic, endocrine, and pancreatic disease caused by novel PTRH2 mutation in Japan | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Neurological Sciences | 6. 最初と最後の頁 2133 ~ 2136 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10072-021-05817-8 | 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 Taniguchi Takaki, Ando Masahiro, Okamoto Yuji, Yoshimura Akiko, Higuchi Yujiro, Hashiguchi Akihiro, Shiga Kensuke, Hayashida Arisa, Hatano Taku, Ishiura Hiroyuki, Mitsui Jun, Hattori Nobutaka, Mizuno Toshiki, Nakagawa Masanori, Tsuji Shoji, Takashima Hiroshi | 4. 巻 99 |
| 2. 論文標題 Genetic spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease associated with myelin protein zero gene variants in Japan | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Genetics | 6. 最初と最後の頁 359 ~ 375 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.13881 | 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 Higuchi Yujiro, Ando Masahiro, Yoshimura Akiko, Hakotani Satoshi, Koba Yuki, Sakiyama Yusuke, Hiramatsu Yu, Tashiro Yuichi, Maki Yoshimitsu, Hashiguchi Akihiro, Yuan Junhui, Okamoto Yuji, Matsuura Eiji, Takashima Hiroshi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Prevalence of Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome in Patients with Cerebellar Ataxia in Japan | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Cerebellum | 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) 10.1007/s12311-021-01323-x | 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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 樋口雄二郎 |
| 2. 発表標題 ニューロパチーの遺伝学 最新の知見（シンポジウム 日本初 遺伝性神経筋疾患 最新の発見） |
| 3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

〔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 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|