

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17942

研究課題名（和文）ジストニア症例におけるDYT遺伝子群の変異頻度及び傾向の集団解析

研究課題名（英文）Population analysis of mutation frequencies and trends of DYT gene groups in dystonia cases

研究代表者

東 剣虹（Azuma, Kenko）

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80724070

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：累計170例の遺伝性ジストニア症例を対象に、16のジストニア関連遺伝子について、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行った。その結果、65例において有意と思われるバリエーションを検出した。傾向としては、検出頻度上位3遺伝子はTOR1A, KMT2B, SGCEの3つで、65症例の72%を占めた。この3つの遺伝子はいずれも特徴的なジストニアの原因遺伝子であり、その中でもバリエーションの局在に特徴があったSGCEについてバリエーションの影響を解析した。その結果、SGCEで検出されたバリエーションのいずれもがダメージングであることを突き止め、それを論文としてClinical Genetics誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少疾患であり、難病指定もされているジストニアの集団的解析は国内初であり、世界的にも数は少ない。今回得られた結果から、遺伝性ジストニアの遺伝子の傾向を見ることができた。今後さらに症例を積み重ねることによって疾患のデータベースの構築に役立つと思われる。遺伝性ジストニアは、症状から原因遺伝子を特定するのが難しい例もあるが、今回の16遺伝子の解析を通して、2.5人に1人の割合で何らかのバリエーションを検出することができたことから、今回の解析結果を省みて、今後方法を工夫することで、さらに割合を高めることができている。

研究成果の概要（英文）：A total of 170 cases of hereditary dystonia were analyzed for 16 dystonia-related genes using next-generation sequencing. As a result, we detected variants that appeared to be significant in 65 cases. As a trend, the top three most frequently detected genes were TOR1A, KMT2B, and SGCE, accounting for 72% of the 65 cases. All three genes are characteristic dystonia-causing genes, and we analyzed the effect of the variants on SGCE, which was characterized by the localization of the variants. As a result, they found that none of the variants detected in SGCE was damaging, which they published in a paper in Clinical Genetics.

研究分野：分子生物学

キーワード：ジストニア 遺伝性疾患 遺伝子解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性ジストニアとは不随意運動や姿勢異常を主要症状とする疾患の総称である。遺伝子解析が行われてきた結果、様々な病態や特徴に対応する16の主な原因遺伝子が同定された(表1)。

(2) ジストニアの診断は主に、発症年齢、罹患部位、随伴症状の3つで行われるが、こうした臨床病型診断と上記した遺伝子診断の結果が必ずしも一貫した対応を示すとは限らない。

(3) 東京女子医科大学は多くのジストニア患者が来院する全国でも有数の脳神経外科を有しており、加えて当研究活動を行う院内の研究所には学外の研究連携医療機関からもジストニア患者のDNAサンプルの提供を受けている。

表1 ジストニア関連遺伝子一覧

ジストニア型	遺伝子	ローカス名	特徴	
孤立性	<i>TOR1A</i>	DYT1	幼少期/青年期発症型、全身性	
	<i>THAP1</i>	DYT6	青年期発症型、頭蓋または全身性	
	<i>ANO3</i>	DYT24	成人発症型、局所性または分節性	
	<i>GNAL</i>	DYT25	成人発症型、局所性または分節性	
	<i>KMT2B</i>	DYT28	早期発症型、全身性、軽度の症候性	
複合性	ジストニア + パーキンソン症候群	<i>GCH1</i>	DYT5a	ドバ反応性
		<i>TH</i>	DYT5b	ドバ反応性
		<i>SPR</i>	-	ドバ反応性、認知障害
		<i>TAF1</i>	DYT3	神経変性
		<i>PRKRA</i>	DYT16	パーキンソン症候群
		<i>ATP1A3</i>	DYT12	突発性
	筋間代癒	<i>SGCE</i>	DYT11	精神疾患
	発作性ジストニア + 運動障害	<i>PNKD</i>	DYT8	発作性非運動誘発性運動障害
		<i>PRRT2</i>	DYT10	発作性運動誘発性運動障害
		<i>SLC2A1</i>	DYT18	発作性労作誘発性運動障害
<i>ECHS1</i>		-	発作性労作誘発性運動障害	

GeneReviews "Hereditary dystonia Overview."より

### 2. 研究の目的

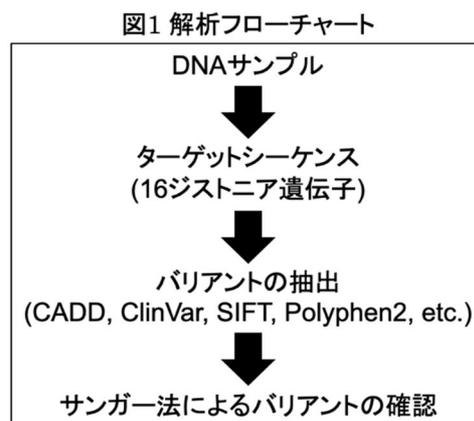
(1) これまでジストニア遺伝子についての網羅的かつ集団的解析は世界でいくつか報告があるのみで、国内に至っては前例がない。本研究では、16の遺伝子を一度に解析できるように次世代シーケンスを用いて解析を行う

(2) 上記の背景で記述したように、本院は国内で最も多くの遺伝性ジストニアのDNAサンプルを有していることから、集団解析を行うことで、関連遺伝子の変異頻度や傾向を明らかにすることができる。

(3) 上記の(1)、(2)を実施することで、臨床への迅速なフィードバックを可能にするだけでなく、得られたデータを蓄積し、変異の機能的影響解析のための基盤形成に繋げる。

### 3. 研究の方法

(1) 対象遺伝子群のターゲットシーケンス。ジストニア関連16遺伝子のそれぞれのコーディング領域をカバーできるように、次世代シーケンス用のライブラリー作成に必要なプライマーを設計する。そうして出来上がったプライマーミックスを用いて、一度に多くの検体をシーケンスできるようにサンプル毎にバーコード配列を付加して識別する。解析は次世代シーケンサー IonPGM を用いて行い、得られたデータは wANNOVAR (<https://wannovar.wglab.org/>) を用いてアノテーション付加を行う。その後、様々なフィルタリングやスコアリングを用いて有意と思われるバリアントの抽出を行う。なお、それらバリアントはサンガー法で偽陽性でないことを確かめる(図1)。



(2) バリアントの機能解析。スプライシングに影響することが疑われるバリアントについては、SpliceAI と呼ばれる予測ツールでスコアリングの後、Minigene アッセイと呼ばれるスプライシング異常解析用のツールを用いて確認する。また、臨床的意義の不明なバリアントについては、HiBiT と呼ばれるタンパク質発現・局在解析ツールを用いて、細胞実験を行う。

### 4. 研究成果

(1) 研究開始当初は70例だったが、3年の研究期間を経て、最終的に遺伝子解析を行なった症例数は170例に達した。16遺伝子におけるバリアントの検出頻度は66/170例(39%)であった。また、バリアントの検出頻度として、*TOR1A*(19例)、*KMT2B*(15例)、*SGCE*(13例)の3つが上位を占めており、それらバリアントの合計が全体の7割強を占めた(図2)。*TOR1A*は全て同一

の既知の病的バリエーションであった。一方、*KMT2B*は遺伝子のコーディング領域全域にバリエーションが散在していたものの、エクソン 27 と 28 に集中していた。*SGCE*については、エクソン 6 付近に集中していた (図 3)。

図2 遺伝性ジストニア疑い症例170例の解析結果

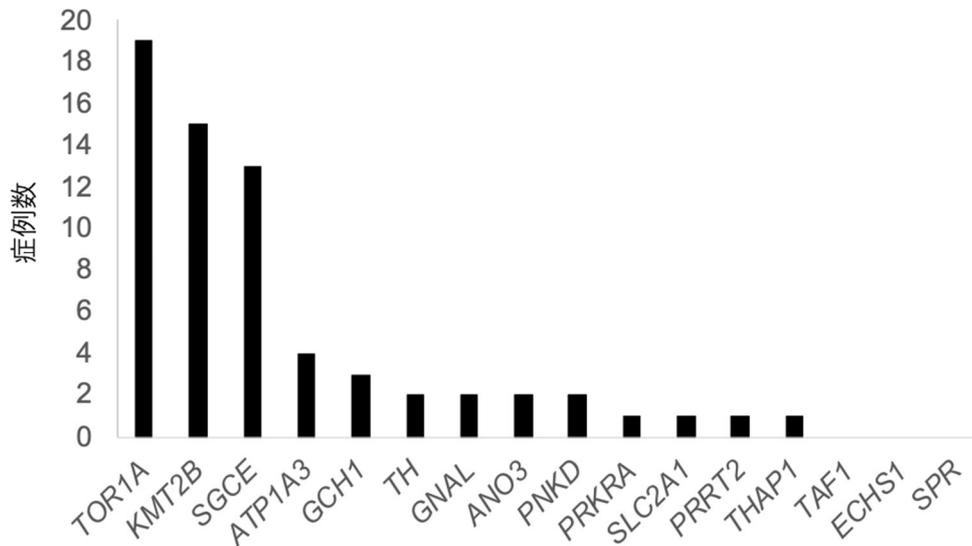
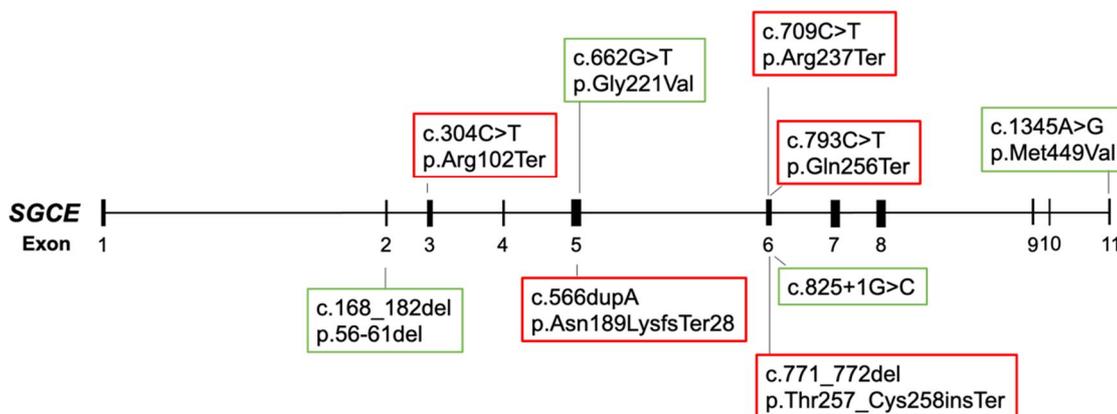


図3 *SGCE*で検出されたバリエーション



(2) 上記の結果のうち、*SGCE* のバリエーションが検出された 13 例が全て特徴的な症例だったため、各々のバリエーションの評価を行った。*SGCE* は膜タンパク質であるイプシロン-サルコグリカンにコードしており、エクソン 7 とそれ以降に膜貫通領域と細胞質局在領域がコードされている。図 3 の結果に示されているバリエーションのうち、フレームシフトバリエーション (図 3 赤枠) はいずれも上記の領域が欠失することが示唆されている。それ以外のバリエーション (図 3 緑枠) については、その影響を解明するために、「3. 研究の方法」の (2) に従って解析を行った。その結果、インフレーム欠失バリエーション (c.168\_182del) とミスセンスバリエーション (c.1345A>G) の 2 つはイプシロン-サルコグリカンの発現を著しく低下させることがわかった (図 4)。一方、スプライシングへの影響が疑われるミスセンスバリエーション (c.662G>T) とイントロンバリエーション (c.825+1G>C) の 2 つは、それぞれエクソン 5 とエクソン 6 の欠失をもたらすことが明らかとなり、結果として、エクソン 7 以降が欠失するフレームシフトを引き起こすことが示唆された (図 5, 図 6)。以上の結果を “Loss-of-function mutations in *SGCE* found in Japanese patients with myoclonus-dystonia” というタイトルで論文にまとめ、*Clinical Genetics* 誌に発表した。

(次頁に図 4、図 5、および図 6 を掲載)

図4 「c.168\_182del」と「c.1345A>G」により、タンパク質の発現が低下した

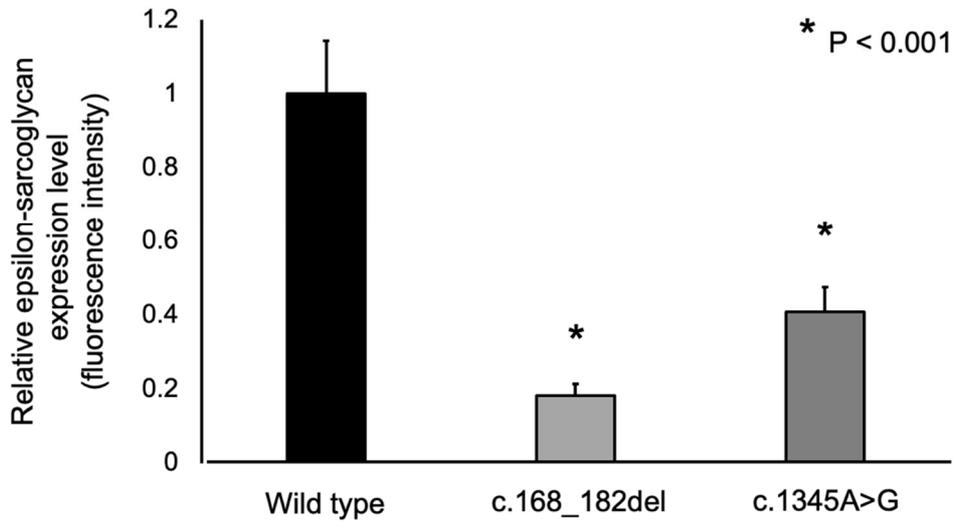


図5 「c.662G>T」と「c.825+1G>C」はスプライシング異常を引き起こした

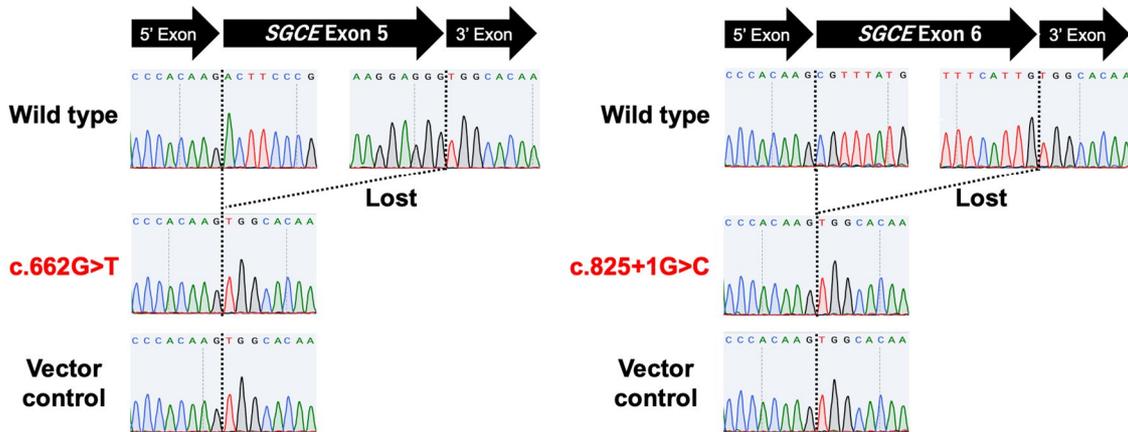
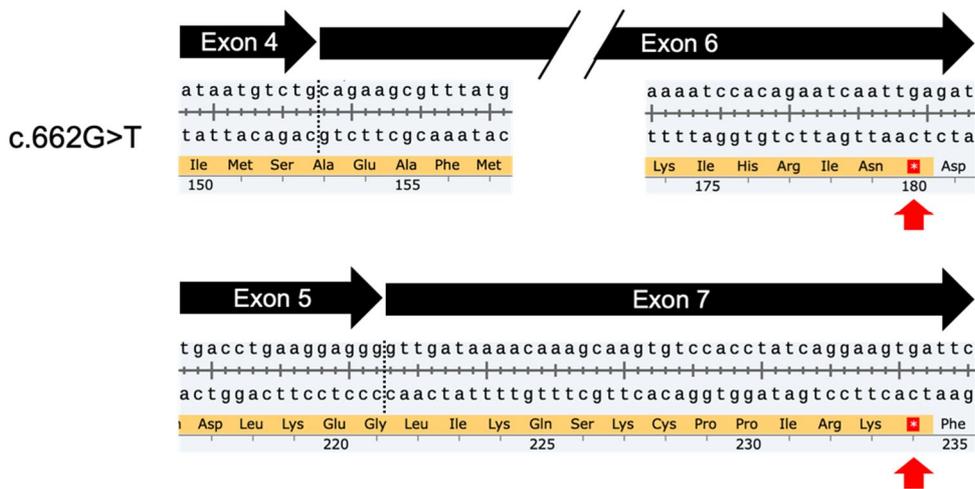


図6 スプライシング異常によるフレームシフト



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Murakami Masato, Horisawa Shiro, Azuma Kenko, Akagawa Hiroyuki, Nonaka Taku, Kawamata Takakazu, Taira Takaomi	4. 巻 12
2. 論文標題 Case Report: Long-Term Suppression of Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia After Bilateral Thalamotomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in 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） 10.3389/fneur.2021.789468	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 Shimazaki Rui, Ikezawa Jun, Okiyama Ryoichi, Azuma Kenko, Akagawa Hiroyuki, Takahashi Kazushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Dystonic Tremor in Adult-onset DYT-KMT2B: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal 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） 10.2169/internalmedicine.8700-21	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 Shiro Horisawa, Kenkou Azuma, Hiroyuki Akagawa, Taku Nonaka, Takakazu Kawamata, Takaomi Taira	4. 巻 7
2. 論文標題 Radiofrequency ablation for DYT-28 dystonia: short term follow-up of three adult cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 2047-2051
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.51170.	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 該当する

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

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
---------	---------