

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591233

研究課題名(和文) 拡張型心筋症を伴う常染色体優性遺伝性ネマリンミオパチーの新規原因遺伝子同定

研究課題名(英文) Exploring gene for a Japanese family of an autosomal dominant nemaline myopathy associated with dilated cardiomyopathy

研究代表者

市川 弥生子 (Ichikawa, Yaeko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90341081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： 拡張型心筋症を伴う常染色体優性遺伝性ネマリンミオパチーの本邦一家系について解析を行った。連鎖解析にて候補領域(約800Mb)を定めた。発症者の網羅的ゲノム解析で得られたアミノ酸置換を伴う変異について、直接塩基配列解析にて家系内での変異を確認。日本人ゲノム変異データベース(Human Genetic Variation Database)、当院における正常対照および症例コントロールのインハウスデータベースにて検索した。これらのデータベースに存在せず、家系内で発症者にのみ共通している変異は2個に絞り込まれた。これらの変異について、機能解析を行い、病的変異の可能性について検討を行っている。

研究成果の概要(英文)： This study is about molecular genetics of a Japanese family of an autosomal dominant nemaline myopathy associated with dilated cardiomyopathy. Multipoint parametric linkage analysis revealed the target region spanning approximately 800Mb. Massively parallel sequencing for the proband was accomplished. Subsequently, the novel nonsynonymous variants were subjected to direct nucleotide sequence analysis for confirmation, and screened by Japanese genetic variation database (Human Genetic Variation Database) and in-house database of normal and disease control. The two of those variants were remaining as candidate pathogenic mutations. We are studying about which variant is the causative mutation of this family by functional analysis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ネマリンミオパチー 拡張型心筋症 網羅的ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

ネマリンミオパチーは、1963年に初めて報告された筋線維内に糸屑状の異常構造物(ネマリン小体)が散在する先天性ミオパチーで、先天性ミオパチーの中で最も頻度の高い疾患である。一般にネマリンミオパチーでは心筋障害の合併は稀とされている。

本研究の対象家系は、常染色体優性遺伝形式をとり、稀な拡張型心筋症を伴う本邦の一家系である。ネマリンミオパチーは孤発性が多いが、遺伝性のもに関しては研究開始当初7つの疾患原因遺伝子が同定されていた。既報告にもとづく遺伝子変異解析では変異は明らかではなく、本家系の疾患原因遺伝子は未同定であった。

本家系のような小家系では従来の連鎖解析の適用が困難であったが、研究代表者が所属する研究室において小家系の解析にも適用可能なSNPマイクロアレイを用いたハイスループット連鎖解析システム SNP HiTLinkを開発した(Fukuda et al., BMC Bioinformatics. 2009)。

ゲノム解析技術の進歩により次世代シーケンサーを駆使した網羅的ゲノム配列解析が可能となった。研究代表者の所属施設内にも次世代シーケンサーが設置された。

以上の背景により、本家系においても、連鎖解析、網羅的ゲノム配列解析により、疾患原因遺伝子を同定することが現実的となり、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

拡張型心筋症を伴うネマリンミオパチーの本邦一家系を対象に、連鎖解析、網羅的ゲノム配列解析を行い、疾患原因遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

本家系の発症者2名(発端者およびその親)、非発症者2名、発端者の親(married in)を対象に当科で開発したSNP HiTLinkを用いて連鎖解析を行い、候補領域を定めた。

発症者2名(発端者およびその親)、発端者の親(married in)について、次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析を行い変異を検出。検出された変異のうち、候補領域内にあるアミノ酸置換を伴う変異を選び出し、さらに既存のデータベース(dbSNP等)を用いてふるいにかけ絞りこむ。絞りこまれた変異については、直接塩基配列解析にて、家系内での変異の有無を確認した。家系内で発症者にもみ共通する変異について日本人ゲノム変異データベース(Human Genetic Variation Database)、当院における正常対照および症例コントロールのインハウスデータベースにて検索し、候補変異をさらに絞り込む。

絞りこまれた変異については、変異を培養細胞系に導入して機能解析を行う。

4. 研究成果

本家系の発症者2名(発端者およびその親)、非発症者2名、発端者の親(married in)を対象に当科で開発したSNP HiTLinkを用いて連鎖解析を行い、候補領域を定めた。ロッドスコア0.6まで上昇を示している候補領域は約800Mbであった。

発症者2名(発端者およびその親)、発端者の親(married in)について、次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析を行った。発端者の全ゲノム解析の結果、既知のデータベース(dbSNP等)に認めない塩基置換変異、挿入/欠失変異は11708個で、候補領域内にある変異は67個であった。このうち、married inの親のexome解析で検出された30個の変異を除き、発症者の親にも共通している変異は16個あった。これらの変異について直接塩基配列解析にて、家系内での変異を確認した。日本人ゲノム変異データベース(Human Genetic Variation Database)、当院における正常対照および症例コントロールのインハウスデータベースにて検索を行った。その結果、これらのデータベースに存在せず、家系内で発症者にもみ共通している変異は2個に絞り込まれた。これらの2個の候補変異については、変異を培養細胞に導入して機能解析を行い、病的変異の可能性について検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in *FLVCR1*. Neurogenetics. 12:117-21, 2011

Saito N, Hida A, Koide Y, Ooka T, Ichikawa Y, Shimizu J, Mukasa A, Nakatomi H, Hatakeyama S, Hayashi T, Tsuji S. Culture-negative brain abscess with *Streptococcus intermedius* infection with diagnosis established by direct nucleotide sequence analysis of the 16s ribosomal RNA gene. Intern Med. 51:211-6, 2012

Maeda MH, Mitsui J, Soong BW, Takahashi Y, Ishiura H, Hayashi S, Shirota Y, Ichikawa Y, Matsumoto H, Arai M, Okamoto T, Miyama S, Shimizu J, Inazawa J, Goto J, Tsuji S. Increased gene dosage of myelin protein zero causes Charcot-Marie-Tooth disease. Ann Neurol. 71:84-92, 2012

Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ranum LP, Tamaoki T, Ichikawa Y, Date H, Goto J, Tsuji S. *C9ORF72* Repeat Expansion in Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Kii Peninsula of Japan. *Arch Neurol*. 69:1154-8, 2012

Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet*. 91:320-9, 2012

Lee YC, Durr A, Majczenko K, Huang YH, Liu YC, Lien CC, Tsai PC, Ichikawa Y, Goto J, Monin ML, Li JZ, Chung MY, Mundwiler E, Shakkottai V, Liu TT, Tesson C, Lu YC, Brice A, Tsuji S, Burmeister M, Stevanin G, Soong BW. Mutations in *KCND3* cause spinocerebellar ataxia type 22. *Ann Neurol*. 72:859-69, 2012
Yamamoto T, Yokota K, Amao R, Maeno T, Haga N, Taguri M, Ohtsu H, Ichikawa Y, Goto J, Tsuji S. An open trial of long-term testosterone suppression in spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 47:816-22, 2013

Multiple-System Atrophy Research Collaboration (74 人中 5 番目). Mutations in *COQ2* in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med*. 369:233-44, 2013

Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H, Kanazawa I, Doi K, Yoshimura J, Morishita S, Goto J, Tsuji S. Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. *J Neurol Sci*. 331:158-60, 2013

Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa M, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G; JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P,

Brown RH Jr, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J, Tsuji S. *ERBB4* Mutations that Disrupt the Neuregulin-ErbB4 Pathway Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 19. *Am J Hum Genet*. 93:900-5, 2013

Doi K, Monjo T, Hoang PH, Yoshimura J, Yurino H, Mitsui J, Ishiura H, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Tsuji S, Morishita S. Rapid detection of expanded short tandem repeats in personal genomics using hybrid sequencing. *Bioinformatics*. 30:815-22, 2014

〔学会発表〕(計 9 件)

Ichikawa Y, Ishiura H, Goto J, Kowa H, Oya Y, Date H, Tsuji S. A Japanese family of a novel autosomal dominant nemaline myopathy associated with dilated cardiomyopathy. American Academy of Neurology 63rd Annual Meeting. April 13, 2011, Honolulu, Hawaii

Y. Ichikawa, H. Ishiura, J. Mitsui, T. Matsukawa, Y. Takahashi, H. Naruse, M. Taira, S. Tsuji, J. Goto. Assessment of clinical usefulness of genetic diagnosis in neurology department of hospital. 12th International Conference of Human Genetics. Oct 13, 2011, Montreal, Canada

市川弥生子, 百瀬 義雄, 中原 康雄, 後藤 順, 辻 省次, JAMSAC (Japan MSA research consortium). 多系統萎縮症の運動機能における経時的推移. 第 52 回日本神経学会学術大会. 2011 年 5 月 18 日. 名古屋

市川弥生子, 後藤 順, 中原康雄, 三井純, 辻 省次. 神経内科領域における前方向的コホート研究から見えてきたもの. MSA に対する disease-modifying therapy 実現のための臨床治験デザイン. 第 52 回日本神経学会学術大会シンポジウム. 2011 年 5 月 19 日. 名古屋

市川弥生子, 中原 康雄, 百瀬 義雄, 後藤 順, 辻 省次. 多系統萎縮症の早期症例における診断基準の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月 24 日. 東京

Y. Ichikawa, J. Goto, H. Ishiura, Y. Oya, H. Kowa, J. Shimizu, H. Date, S. Tsuji. A four-generation Japanese family with autosomal dominant nemaline myopathy associated with dilated cardiomyopathy 17th International congress of the world muscle society, Oct 11, 2012, Perth, Australia

市川弥生子, 西垣昌和, 今井 靖, 平田
恭信, 辻 省次, 後藤 順. 神経内科・循
環器内科領域における遺伝子診断の状
況. 第 57 回日本人類遺伝学会大. 2012
年 10 月 25 日. 東京.

市川弥生子, 西垣昌和, 今井 靖, 平田
恭信, 辻 省次, 後藤 順. 神経内科領
域における遺伝子診断の現況と課題. 第
54 回日本神経学会学術大会. 2013 年 5
月 24 日. 東京

市川弥生子, 石浦浩之, 三井 純, 松川
敬志, 田中真生, 高橋祐二, 後藤 順,
辻 省次. 神経・筋疾患における遺伝子
検査の有用性. 第 20 回日本遺伝子診療
学会大会. 2013 年 7 月 20 日, 浜松

〔図書〕(計 3 件)

市川弥生子: Annual Review 神経 2012
各種疾患 変性疾患 「MSA update」中
外医学社 p231-240 (2012)

市川弥生子: カラー版 内科学「脊髄小
脳変性症」p1615-1620 (2012)

市川弥生子: アクチュアル 脳・神経疾患
の臨床 小脳と運動失調「JAMSAC 研
究」中山書店 p160-165 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川弥生子 (ICHIKAWA YAEKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 90341081

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者