

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：22701
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：24790893
研究課題名(和文) 遺伝子未同定脊髄小脳変性症のエクソーム解析

研究課題名(英文) Exome analysis of spinocerebellar ataxias

研究代表者

土井 宏 (DOI, Hiroshi)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：10326035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子未同定の常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症(ARSCA)2家系および、常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症(ADSCA)2家系を対象としてエクソーム解析で新規責任遺伝子の同定を試みた。ARSCAの1家系については遺伝子Xのホモ接合性変異が原因であると同定した。先行報告がなされたため、他機関との共同研究で遺伝子X産物の酵素活性の測定を行い、酵素活性低下が発症に重要であることを確認し、現在報告準備中である。さらに本解析を通じて新たに収集したARSCA8家系のエクソーム解析を行い、本邦で報告のなかったSPG7変異例、SCARB2変異例を同定し報告した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify the novel causative genes of spinocerebellar ataxia (SCA) by analyzing the exomes of two autosomal recessive SCA (ARSCA), and two autosomal dominant SCA families. As the results, we identified a homozygous mutation of GeneX as the causative agent in one of the ARSCA families. Because GeneX was reported as causative gene for ARSCA-related disease during our study, we added the experiments and revealed that loss of enzymatic activity of GeneX product is the cause of the disease. In relation to this study, we corrected DNAs of 8 ARSCA-suspected families, and conducted exome sequencing for the index cases. We identified and reported the first Japanese case of SPG7 and myoclonus epilepsy with SCARB2 mutation.

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：エクソーム 脊髄小脳変性症

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症 (spinocerebellar Ataxia: SCA) は、およそ 60% は孤発性、30-40% は優性遺伝性、数% が劣性遺伝性である。常染色体優性型 (ADSCA) は遺伝学的解明が進み、2011 年の研究応募当時において 29 の責任遺伝子座 (SCA36 まで分類) と 22 種類の責任遺伝子が単離されていたが、依然原因遺伝子不明な一群が存在することが知られていた。常染色体劣性型 (ARSCA) では当時で 20 種類以上の責任遺伝子が知られ、欧米で頻度の高い Friedreich 失調症は日本人の報告例がなく、欧米と本邦で遺伝的背景は異なることが明らかではあるが、欧米では約半数が原因遺伝子不明と報告されており (Anheim, M. et al. Neurogenetics, 2010)、本邦においても同様の状況と推察された。近年高密度の SNP アレイ解析が可能となって以降、常染色体劣性遺伝性疾患遺伝子座マッピングは飛躍的に進歩した。高密度アレイを用いたホモ接合性マッピングを行うことにより、比較的小規模の家系解析によっても責任遺伝子座マッピングが可能となり、高密度アレイのマッピング情報と次世代シーケンサーを用いた包括的なエクソン領域の解析 (エクソーム解析) の併用による、責任遺伝子単離の報告が近年急増しているという研究背景があった。研究代表者は、このようなテクニックをいち早く取り入れており、両親が血族婚により発症した ARSCA3 家系を研究対象として、高密度アレイを用いたホモ接合性マッピングと次世代シーケンサーの併用解析を行ってきた。その結果、3 家系のうち、罹患者 2 名の 1 家系から *SYT14* のミスセンス変異を疾患責任遺伝子として同定し、論文報告を行っていた。残りの ARSCA2 家系について責任遺伝子の単離を試みることで、さらに既知の ADSCA 責任遺伝子に変異を認めないことが確認されている ADSCA2 家系も解析対象として追加し、更なる新規疾患責任遺伝子を同定することを目的に研究を開始した。

2. 研究の目的

今回の研究においては既知の遺伝子異常が検出されなかった ARSCA2 家系 (家系 A および家系 B とする)、ADSCA2 家系 (家系 C および家系 D とする) の次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行って、SCA の新規疾患責任遺伝子を同定することを目的とした。検出した罹患者のもつ遺伝子変化について、手元に収集してある SCA150 症例の DNA を対象にした変異スクリーニングを行い、複数例で変異が認められるかの確認、正常日本人コントロールで認められないかどうかの解析を行って疾患責任遺伝子であるか確定することとした。さらに単離された SCA 責任遺伝子の性状に応じた機能解析と変異の影響解析を進め遺伝子変異が来す疾患発症機序の解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

血族婚が明らかな ARSCA2 家系では高密度 SNP アレイを用いたホモ接合性マッピングによる候補遺伝子座の絞り込みと次世代シーケンサーによるエクソーム解析の併用、ADSCA2 家系では連鎖解析とエクソーム解析の併用を行った。エクソーム解析においては Agilent 社 SureSelect Human All Exon kit を用いてエクソン濃縮を行い、Illumina 社次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いて配列を解析した。次世代シーケンサーで検出された遺伝子変異・多型の中では dbSNP137 で minor allele frequency < 1% または疾患原因変異として登録のある変異のみを候補として抽出した。さらにその中から当大学で蓄積してきた 500 例以上の正常日本人コントロールのエクソームデータをリファレンスとして、正常日本人におけるアレル頻度が 1% 以下であるもののみを候補として抽出した。病的である可能性が高い変異を持つ遺伝子については SCA 150 例において変異スクリーニングを行った。さらにもともと解析対象とした 4 家系に加えて、両親が血族婚である症例、運動失調症または痙性対麻痺を呈した症例、両親の世代または子の世代に明らかに類症を認めない、という 3 条件を満たす 8 家系を ARSCA 疑い家系として発端者のエクソーム解析を追加し、同一遺伝子の変異が複数家系で見られるかを確認した。エクソームで検出不可能なりピート病については、信楽園病院に遺伝子診断を依頼した。

4. 研究成果

家系 A については高密度 SNP アレイを用いたホモ接合性マッピングと上記のアルゴリズムを用いたエクソーム解析の結果から、遺伝子 X のホモ接合性変異を責任遺伝子候補として同定した。しかし他施設から遺伝子 X 変異が類縁疾患である常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺 (ARHSP) の原因であるとの報告が平成 24 年 12 月に論文掲載されたため、研究方針を変更し、当該例の臨床的特徴を明らかにすること、および発症メカニズムを究明すべく、遺伝子 X 産物の酵素活性の測定を他機関との共同研究で行うこととした。結果、われわれの家系で認められた変異および他報告で認められた変異ともに、遺伝子 X 産物の酵素活性の低下をきたすことが証明された (論文を作成中)。家系 B、C、D については、次世代シーケンサーによるエクソーム解析で検出された変異について、上記アルゴリズムを用いて原因遺伝子候補を絞り込んだ。その変異をもつ遺伝子について SCA 患者 DNA150 例のスクリーニングを、MiSeq を用いて行った。しかし、現時点では遺伝子同定に至っていない。本解析を通じて新たに ARSCA 疑い 8 家系 (E~L) の DNA を収集した。これら 8 家系についてもエクソーム解析を追加したところ、そ

のうち2家系は本邦でまったく報告のなかった *SPG7* 変異例、*SCARB2* 変異例であることを同定し、それぞれ筆頭著者または責任著者として英文論文で報告した(業績 および 参照)。上記条件のもと収集した8家系のうち3家系(H、I、K)は優性遺伝性疾患であることが判明した。

家系	検出された既知のSCA/HSP 疾患関連遺伝子	診断
A	なし(遺伝子X)	遺伝子X関連 SCA
B	なし	
C	なし	
D	なし	
E	<i>SPG7</i> mutation (homozygous)	Spastic paraplegia 7
F	<i>SCARB2</i> mutation (homozygous)	Progressive myoclonus epilepsy
G	<i>SACS</i> mutation (homozygous)	Spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay
H	<i>SCA31</i> mutation (heterozygous)	SCA 31
I	<i>SCA8</i> mutation (heterozygous)	SCA 8
J	なし	unknown
K	<i>REEP1</i> mutation (heterozygous)	SPG31
L	なし	unknown

新たに収集したJ家系においては既知の疾患関連遺伝子ではない遺伝子のホモ接合性ナンセンス変異を同定した。この症例は成人発症の認知機能障害を伴うARSCAであり、認められたホモ接合性ナンセンス変異は全てのアイソフォームで翻訳されるエクソン1に存在し、高密度 SNP アレイを用いたホモ接合性マッピングで疾患責任遺伝子候補領域に存在することを確認した。また日本人正常コントロールエクソームデータ約500例およびThe National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) exome variant serve (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) のエクソームデータ約6500例において、一例も保持していないことを確認している変異であるため病的である可能性が濃厚である。さらに既報告で当該遺伝子のノックアウトマウスが遅発性の神経細胞脱落をきたす可能性が示唆され、運動機能障害および行動障害が認められていることを合わせて考えると、責任遺伝子であることが非常に有力である。これまでにヒトの疾患との関わりは全く報告されていないが、新規責任遺伝子として

有力な候補であるため SCA150 例でスクリーニングを行っている。

謝辞: リピート病の遺伝子診断をいただきました信楽園病院神経内科田中一先生に深謝申し上げます。

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20件)

Doi H, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Kawamoto Y, Yoshida T, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Tanaka F and Matsumoto N. Identification of a novel homozygous *SPG7* mutation in a Japanese patient with spastic ataxia: efficient diagnosis by exome sequencing for autosomal recessive cerebellar ataxia and spastic paraplegia. *Intern Med*, 査読有、2013、52(14):1629-1633

Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG. Mutations in *KLHL40* are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet*, 査読有、2013. 93(1):6-18

Dziewulska D, Doi H, Fasano A, Erro R, Fatehi F, Fekete R, Gatto EM, Pablos EG, Lehn A, Miyajima H, Piperno A, Pellechia

MT, Wu YR, Yoshida K, Zarruk JG, Jingli S, Schrag A, McNeill A. Olfactory impairment and pathology in neurodegenerative disorders with brain iron accumulation. *Acta Neuropathol*、査読有、2013、126(1):151-3

Higashiyama Y, Doi H, Wakabayashi M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ohba C, Fukai R, Miyatake S, Joki H, Koyano S, Suzuki Y, Tanaka F, Kuroiwa Y, Matsumoto N. A novel *SCARB2* mutation causing late-onset progressive myoclonus epilepsy. *Mov Disord*、査読有、2013、28(4):552-553

Miyake N, Yano S, Sakai C, Hatakeyama H, Matsushima Y, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Goto Y, Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mutat*、査読有、2013、34(3):446-452

Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu S, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Kumagai T, Hirai S, Nabetani M, Saitoh S, Hattori A, Yamasaki M, Kumakura A, Sugo Y, Nishiyama K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H. Phenotypic spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol*、査読有、2013、73(1):48-57

Tsurusaki Y, Kobayashi Y, Hisano M, Ito S, Doi H, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N. The diagnostic utility of exome sequencing in Joubert syndrome and related disorders. *J Hum Genet*、査読有、

2013、58(2):113-115.

Miyatake S, Touho H, Miyake N, Ohba C, Doi H, Saitsu H, Taguri M, Morita S, Matsumoto N. Sibling cases of moyamoya disease having homozygous and heterozygous c.14576G>A variant in RNF213 showed varying clinical course and severity. *J Hum Genet*、査読有、2012、57(12):804-806

Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N. Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome. *Ann Neurol*、査読有、2012、72(2):298-300

Miyatake S, Miyake N, Doi H, Saitsu H, Ogata K, Kawai M, Matsumoto N. A novel SACS mutation in an atypical case with autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Intern Med*、査読有、2012、51(16):2221-2226

〔学会発表〕(計3件)

土井宏、田中章景、CBS と関連する遺伝子変異、第54回日本神経学会学術大会(シンポジウム)、2013年5月29日、国際フォーラム(東京)

〔図書〕(計1件)

土井宏、田中章景、中山書店、内科学書改訂第8版、代謝性疾患、2013、361-374

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 宏 (DOI Hiroshi)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号：10326035

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし