

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830135

研究課題名(和文) 小脳・脳幹部低形成を伴う発達遅滞を呈する疾患群の包括的病態解明

研究課題名(英文) Investigation of comprehensive etiology of microcephaly with pontocerebellar hypoplasia (MICPCH)

研究代表者

林 深(Hayashi, Shin)

東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンター・特任講師

研究者番号：50596244

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)：小頭症・小脳脳幹部低形成を伴う精神遅滞(MICPCH)の機序を包括的に明らかにすることを目的とし、典型例40例を収集して主たる原因遺伝子CASKの変異解析ならびに次世代シーケンサーを用いた新規疾患原因遺伝子探索を行った。CASKのハプロ不全28例の他、既知の原因遺伝子ITPR1、新規疾患原因遺伝子候補RELN、Gene A、Gene B変異を4例に検出した。さらに神経由来セルラインに対する発現抑制系を用いてGene Bの神経細胞分化への関与とGene AがGene Bの発現を正に制御している可能性を示し、両遺伝子がともにハプロ不全となることでMICPCHの原因となる機序を予想した。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate an etiology of microcephaly with pontocerebellar hypoplasia (MICPCH) we analyzed mutation of CASK, which is a major causative gene of MICPCH, and investigated novel causative gene using next-generation sequencer for a cohort of 40 patients with typical MICPCH. Besides haploinsufficiency of CASK in 28 patients, we identified mutation of ITPR1 as a known causative gene, and RELN, Genes A and B as a candidate causative gene. Moreover we identified Gene B was corresponding to neural differentiation and Gene A potentially activated an expression of Gene B through a suppression of expression of Gene A and/or Gene B on cell-line from neuroblastoma, suggesting that haploinsufficiency of both genes could cause MICPCH.

研究分野：遺伝学

キーワード：CASK MICPCH 小頭症 小脳脳幹部低形成 疾患関連遺伝子 疾患コホート 次世代シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、種々のゲノムアレイを用いた先天異常疾患スクリーニングから Xp11.4 に座位する CASK 遺伝子のハプロ不全が小頭症・小脳脳幹部低形成を伴う精神遅滞 (intellectual disability and microcephaly with pontocerebellar hypoplasia; MICPCH) の原因となっている症例を世界で初めて報告したことを受け、症例の収集解析を継続的に行い、MICPCH の疾患原因を包括的に明らかにすることを目的とする研究を行ってきた。この過程で、研究開始当時までに 33 例中 20 例に疾患原因となる CASK 変異を見出す一方で、典型的な MICPCH であるにもかかわらず CASK 異常を見出さない少数の症例を経験してきた。

例えば、CASK 変異陰性であった MICPCH の 1 症例は 6 番染色体上に微細欠失を有しており、当該領域に座位する Gene A, B はたがいに隣接し、Gene A が立遺伝子の発現調節を行う機能を有していること、Gene B は中枢神経系で強く発現し、ノックアウトマウスが小脳の低形成を呈することなどが報告されており、ともに MICPCH の新規原因遺伝子として有力であった。

また、CASK が MICPCH を引き起こす機序は十分には解明されていないが、TBR1 と共役して中枢神経の migration に関与する RELN 発現を促進することが報告されている [Hsueh et al. Nature. 2000]。RELN は小脳低形成を伴う滑脳症の疾患原因遺伝子であり [Hong et al. Nat Genet. 2000]、TBR1 ノックアウトマウスは脳の層構造形成異常を示すことなどから [Hevner et al. Neuron. 2001]、CASK-TBR1-RELN パスウェイの破綻が中枢神経の形成異常を来す病態が予想された。

以上の知見より、MICPCH の包括的な病態理解は中枢神経発生発達の機序の解明に寄与し、臨床症状予測、治療法の開発、療育に益する情報の集積といった総合的な意義を持つと考えられた。

## 2. 研究の目的

MICPCH は弁別が容易な phenotype であるにもかかわらず、疾患原因などには不明な点が多く、臨床的にも独立した疾患単位としての認知が浅い。

本研究は、特に CASK 異常を伴わない MICPCH 症例の疾患原因を探索し、genotype-phenotype の連関を明らかにして新規症候群を確立し、診断・治療・療育に寄与する成果を上げることを目的とした。具体的には、下記の目標を設定した。

- (1) **新規症例の収集と genotype/phenotype 情報の集積**
- (2) **MICPCH の原因となる CASK 以外の新規疾患原因遺伝子の特定**
- (3) **MICPCH における Gene A, B の機能解析**

## 3. 研究の方法

- (1) **新規症例の収集と genotype/phenotype 情報の集積**

新規 MICPCH 症例の収集を継続し、サンガーシーケンスによる CASK 全エクソンのシーケンス並びに SNP アレイによる CASK を含むゲノムコピー数変化 (copy number variant; CNV) のスクリーニングを継続するとともに、genotype, phenotype 情報を蓄積して、MICPCH の疾患コホートを形成した。

- (2) **MICPCH の原因となる CASK 以外の新規疾患原因遺伝子の特定**

CASK 変異陰性症例に対し、次世代シーケンサーを用いた下記の方法でスクリーニングを行い、疾患に関連する遺伝子変異を探索した。

- i) プロモーター領域やイントロンを含めた CASK の全領域ならびに、従来報告されてきた小脳脳幹部低形成の原因遺伝子と前述した疾患原因遺伝子候補

TBR1, RELN などの合計 16 遺伝子の全エクソンを標的としたターゲットリシーケンス

ii) 患者並びに両親のトリオを対象とした全エクソンシーケンス

それぞれのスクリーニングで患児における de novo の変異または複合ヘテロとなる変異を検出し、既知の SNP 等を除外して疾患原因候補遺伝子を探索した。

### (3) MICPCH における Gene A, B の機能解析

これらの候補遺伝子のヘテロ欠失によるプロ不全が神経細胞の発達に及ぼす影響を評価するため、候補遺伝子の発現が高く、かつ神経細胞に分化することが確認できているセルラインとしてヒト由来神経芽細胞種に由来するセルライン IMR-32 を選択した。siRNA 導入による発現抑制または CRISPR 導入によるゲノム編集を行い、ターゲット遺伝子の発現を低下させ、細胞増殖や神経分化を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 新規症例の収集と genotype/phenotype 情報の集積

研究終了時までには MICPCH の典型例 40 例を収集し、CASK の変異解析を行った。従前の結果と併せ、CASK の点変異例 18 例、CASK を含む CNV10 例を検出した。この中には、男性における CASK のミスセンス変異や体細胞モザイク例が含まれており、男性における CASK の機能不全が致死であるという従来の予想に貴重な知見を付け加えることができた。これらの結果は各臨床施設に報告して診断ならびに遺伝カウンセリングの一助とした。

### (2) MICPCH の原因となる CASK 以外の新規疾患原因遺伝子の特定

CASK 変異陰性であった 12 症例のうち、  
i) ターゲットリシーケンスにより、RELN のミスセンス変異を 2 例に検出した。また、ii) 全エクソンシーケンスにより、既知の疾患原因遺伝子として、spinocerebellar ataxia (SCA) 29 の疾患原因遺伝子であることが知られている ITPR1 のミスセンス変異を見出した。SCA29 は乳幼児期に発症し、小脳低形成を来すことが報告されていることから、本症例の疾患原因と考えられた。また、従来のサンガー法では見落とされていた、CASK における連続するグアニンへの一塩基挿入も検出された。以上の解析により新たに 4 例の疾患原因を明らかにし、結果として合計 32 例(76.2%)に疾患原因につながるゲノム異常を検出した。

### (3) MICPCH における Gene A, Gene B の機能解析

ヒト神経芽細胞種由来の IMR-32 細胞株に siRNA を導入して両遺伝子の発現抑制を行い神経分化を評価したところ、Gene B 発現抑制下では細胞数と神経突起の伸長が低下した。さらに、Gene A を単独でノックダウンすると Gene B タンパク発現が低下する傾向が見られた。また、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集で Gene A, B の発現抑制株を作成したところ、特に Gene B の発現レベル依存的に神経突起の伸長が抑制されることが見出された。以上の結果より、Gene A は Gene B の発現を正に制御していること、Gene B は神経細胞の分化に関与している可能性が示されたことから、両遺伝子がともにハプロ不全となることで Gene B の発現がより強く抑制され、MICPCH の病態を引き起こしている機序が予想された。

以上の結果より、本研究は MICPCH の疾患

コホートを形成し、疾患原因を明らかにすることで原因不明症例の診断に寄与してきただけではなく、CASK 以外の新規疾患原因遺伝子の検出ならびに神経の発生発達における機能解析を行い、新規症候群としての治験を蓄積し、予後予測や療育方針の決定に寄与した。

## 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3件) いずれも査読あり

1. Hayashi S, Yagi M, Morisaki I, Inazawa J. Identical deletion at 14q13.3 including PAX9 and NKX2-1 in siblings from mosaicism of unaffected parent. *Journal of Human Genetics*. 60:203-206, 2015.
2. Matsumoto H, Zaha K, Nakamura Y, Hayashi S, Inazawa J, Nonoyama S. Chromosome 9q33q34 microdeletion with early infantile epileptic encephalopathy, severe dystonia, abnormal eye movements, and nephroureteral malformations. *Pediatr Neurol*. 51:170-5, 2014.
3. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, Noji H, Kitamura K, Eto T, Takahashi T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama H, Hase M, Li L, Johnson K, Lazarowski A, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y. Genetic Variants in C5 and Poor Response to Eculizumab in PNH. *N Eng J Med*. 370:632-9, 2014.

[学会発表] (計7件)

1. ダニエラチアキウエハラ, 林深, 水野誠司, 稲澤譲治. A de novo 40-kb deletion encompassing the Angelman

Syndrome imprinting center in a patient with some major features of Prader-Willi Syndrome. 日本人類遺伝学会 59 回大会 (東京), 2014 年 11 月 21 日.

2. 林深, 岡本伸彦, 高梨潤一, 稲澤譲治. 小脳脳幹部低形成を伴う小頭症 (MICPCH)41 例に対する CASK 遺伝子その他の包括的疾患原因探索. 日本人類遺伝学会 59 回大会 (東京), 2014 年 11 月 21 日.
3. Hayashi S, Okamoto N, Takanashi J, Inazawa J. Comprehensive investigation of CASK and other relevant Genes in 41 patients with intellectual disability, microcephaly and disproportionate pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH) using next-Generation sequencing. The American Society of Human Genetics 64th annual meeting, San Diego, Oct 18-22, 2014. (**platform**)
4. 林深, 岡本伸彦, 高梨潤一, 稲澤譲治. 小脳脳幹部低形成 (MICPCH)の原因となる多彩な病態の探索. 日本人類遺伝学会 58 回大会 (仙台), 2013 年 11 月 23 日.
5. ダニエラチアキウエハラ, 林深, 井本逸勢, 蒔田芳男, 羽田明, 稲澤譲治. SNP arrays analysis of 430 patients with intellectual disability and multiple congenital anomalies (ID/MCA) of unknown etiology. 日本人類遺伝学会 58 回大会 (仙台), 2013 年 11 月 22 日.
6. Hayashi S, Nobuhiko O, Takanashi J, Inazawa J. Investigation of CASK Gene aberrations in 38 patients with severe intellectual disability, microcephaly and disproportionate pontine and cerebellar hypoplasia.

The American Society of Human  
Genetics 63rd annual meeting, Boston,  
Oct 22-26, 2013. **(platform)**

7. 林深, 岡本伸彦, 稲澤譲治. 小児遺伝小  
脳脳幹部低形成 (MICPCH)の原因とな  
る多彩なゲノム異常. 日本小児遺伝学会  
36回大会 (広島), 2013年4月18日.

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

- ・本研究の成果は染色体異常の国際的データ  
ベースである DECIPHER に登録済である。
- ・症例の収集にご協力いただいていた大阪母  
子保健センターの岡本伸彦先生のご尽力に  
より、患者会を形成し、患児・両親間の交流  
を図るなど、臨床面における成果も得られた。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 深 (Hayashi, Shin)

東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンタ  
ー・特任講師

研究者番号：50596244

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし