

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460411

研究課題名(和文) 第1番染色体に連鎖する新規遺伝性ニューロパチーの分子基盤解明

研究課題名(英文) Genetic analysis of novel hereditary neuropathy mapping to chromosome 1

研究代表者

三浦 史郎 (SHIROH, MIURA)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：00441650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的・遺伝的に新規の家族性ニューロパチー(通常の種類と異なり、下肢近位筋優位の筋力低下、排尿障害、発作性乾性咳嗽を特徴とする)の責任遺伝子変異を同定するための遺伝解析を、1家系19人を対象として行った。連鎖解析の結果、責任遺伝子変異は第1番染色体の37.1 Mbの領域内に存在することがわかった。また、エクソーム解析により、IQGAP3遺伝子のイントロン27のスプライスサイトの点変異が候補として残った。この塩基の進化的保存性をみたところ、脊椎動物全般で保存されていた。さらに、患者ではIQGAP3のスプライス異常が生じていることが特異的PCRによって示され、責任遺伝子変異であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To identify the causative variation for a clinically and genetically new type of autosomal dominant motor and sensory neuropathy with proximal dominance in the lower extremities, urinary disturbance, and paroxysmal dry cough, we studied a Japanese pedigree with the disease consisted with 19 family members including 9 patients in 5 generations. On multipoint linkage analysis of the pedigree, maximum LOD scores of > 2.0 was obtained on 1p13.3-q23 (LOD = 2.24). The exome sequencing upon seven patients and one healthy relative from the pedigree revealed one causative single nucleotide variant (SNV) located in IQGAP3 which is associated with neurite outgrowth. The SNV is highly conserved among vertebrates. Real time quantitative PCR analysis of peripheral blood samples showed the mRNA expression level of IQGAP3 was significantly higher in a patient. The SNV alters the splicing of IQGAP3 and also located within a non-coding RNA which may affect the expression of IQGAP3.

研究分野：神経内科

キーワード：IQGAP3 遺伝性ニューロパチー エクソーム 連鎖解析

### 1. 研究開始当初の背景

Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) に代表される遺伝性運動感覚ニューロパチー (hereditary motor and sensory neuropathy; HMSN) は未だに根治療法のない、heterogeneous な進行性神経変性疾患である<sup>1)</sup>。近年、本邦において近位筋優位の HMSN が proximal dominant form (HMSN-P) として注目されており、原因遺伝子として第 3 番染色体上の *TFG* 遺伝子が報告されている<sup>2)</sup>。2008 年、われわれは下肢近位筋優位の筋力低下、神経因性膀胱、発作性乾性咳嗽をきたす常染色体優性遺伝形式をとる HMSN-P 家系を報告した<sup>3)</sup>。家系内 15 名 (患者 8 名・健常者 7 名) での連鎖解析の結果、本疾患の責任遺伝子変異が第 1 番染色体に連鎖する可能性が浮上し (LOD = 2.706)、本疾患が臨床的のみならず遺伝学的に新規な疾患であると考えられた。

次にわれわれは家系内罹患者 5 名 (図 1 の 3, 5, 6, 8, 12 番) および家系内健常者 (図 1 の 7 番) の検体を用い、エクソーム解析を行った。その結果、罹患者 5 名が持ち、健常者 1 名が持たない SNV (single nucleotide variant) は 2,526 個存在した。さらにその中で、新規かつ非同義置換であり、連鎖領域内に位置する SNV は 21 個存在した。その後、家系内全体 (この時点では図 1 の 1 番 ~ 15 番) でサンガーシーケンスを行い、当該変異が間違いなく存在すること、および疾患の共分離していることを確認し、共分離していないものは除外。さらに健常者 520 検体でのスクリーニングを行い、変異アレルが 1 個でも見つければ除外するという検討を加えた結果、3 つの SNV が本疾患の候補変異として考えられた。中でも、神経突起成長や細胞増殖の制御に関与されるとされる *IQGAP3* の点変異についてわれわれは注目している<sup>4)5)</sup>。

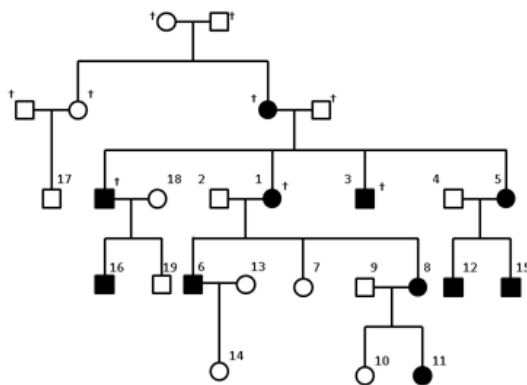


図 1 : 本家系図 (一部抜粋)

### 2. 研究の目的

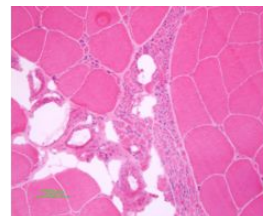
本研究では本疾患の臨床像 (病理所見) を明らかにし、家系内構成員のさらなる検体収集を行ったうえで連鎖解析、エクソーム解析、フラグメント解析などにより本疾患の責任遺伝子変異を同定することを目的としている。これにより、本難治性疾患の治療法開発に寄与することが期待される。

### 3. 研究の方法

- (1) 筋生検、末梢神経生検を行い、本疾患の病理像を明らかにする。
- (2) 家系構成員の検体をさらに収集し、責任遺伝子の連鎖領域を絞り込む。
- (3) エクソーム解析はリピート伸長の検出に向いていないため、該当連鎖領域内にリピート伸長があるか否かについての検証を行う。
- (4) エクソーム解析はコピー数多型といった大規模な遺伝子の構造的変化は検出できないため、Array CGH により患者特異的なコピー数異常の有無を調べる。
- (5) SureSelect Version 1 (旧キット) を用いて行ったエクソーム解析では、ターゲット領域の平均カバー率は 100x 以上を達成していたが、bait オリゴのデザインに依存すると思われるカバー率ゼロの領域がターゲット領域の 6% 程度存在していたため、責任遺伝子変異がこの 6% のブランク内に存在する可能性を憂慮し、その後キャプチャー効率が大幅に改善されたエクソームキャプチャーキット (SureSelect Human All Exon Kit version 5) を用いてエクソーム解析を行う。
- (6) *IQGAP3* の当該変異が intron 27 の 6 bp 下流の一塩基置換であったことから、患者検体に *IQGAP3* の異常プライス RNA 産物が存在するかどうか確認を行う。
- (7) 患者と健常者で *IQGAP3* 発現に差があるかどうかリアルタイム PCR にて確認する。

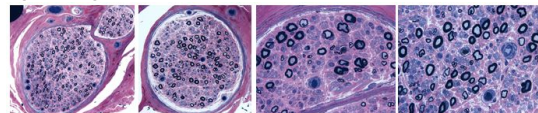
### 4. 研究成果

- (1) 患者の筋生検では群性萎縮といった神経原性変化が認められ (図 2)、腓腹神経生検



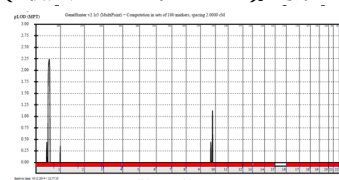
では、大小有髄線維の中等度減少し、菲薄化ミエリンが散見された。オニオンバルブや炎症細胞は認められなかった (図 3)。

(図 2) 筋生検



(図 3) 腓腹神経生検

- (2) 家系内構成員の検体は 19 検体に増えた。この 19 検体を用い、平均 0.1 cM 間隔の SNP マーカーを用いて連鎖解析を行ったところ、責任遺伝子変異の連鎖領域が rs1341580 から rs16837709 の 37.1 Mb の領域に狭められた (最大 LOD 値 2.24)。我々が注目している



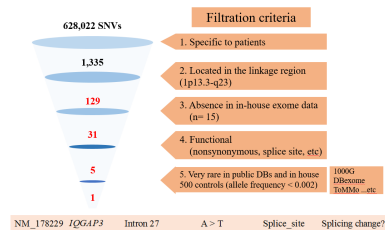
*IQGAP3* 遺伝子はこの領域内に存在していた (図 4)。

(図 4) 常染色体の LOD plot

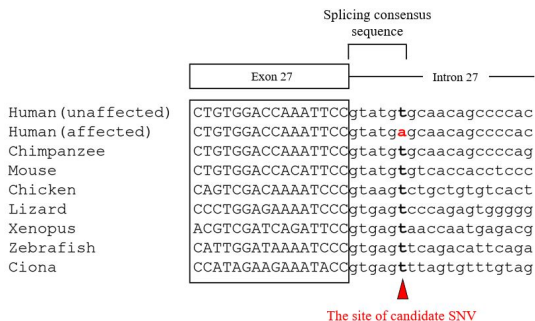
(3) CTG/CAG が 10 リピート以上の部位は連鎖領域内に 5 カ所あったため、これらすべてについてフラグメント解析を行ったが、患者と健常者と違いは認められなかった。

(4) 400 kbp の均一マーカーを使った Array CGH を患者と健常者の DNA で行ったが、患者特異的な病的と考えられるコピー数多型は認められなかった。

(5) 家系内患者のみが共通して保有している遺伝子変異 1p13.3-q23 の領域内にある遺伝子変異 すでにエクソームシーケンシング data がある in-house control 15 検体にみられない遺伝子変異 非同義置換やスプライスサイトなどの機能的遺伝子変異 ExAC などの Public database や in-house control のサンガーシーケンスにおいてアレル頻度が 0.2% 未満の遺伝子変異、という要領で絞り込みを行った結果、IQGAP3 遺伝子の intron 27 の splice site の点変異 (c.3422+6T>A) のみが候補責任遺伝子変異として残った (図 5)。この塩基は脊椎動物全般で保存されていた (図 6)。



(図 5) 責任候補遺伝子変異の絞り込み



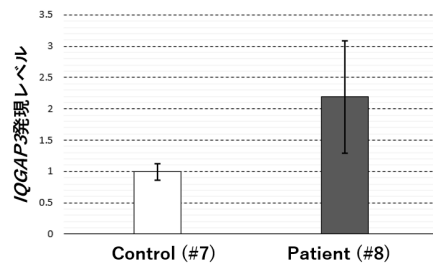
(図 6) 当該塩基の保存性

(6) exon 27 と exon 28 にプライマーペアを設計し PCR を行ったところ、intron 27 がスプライスされた産物が家系内健常者 cDNA およびコントロール cDNA では存在することが確認されたが、患者 cDNA および患者・健常者の genomic DNA では増幅が得られなかった (図 7)。このことは、患者でスプライス異常が生じていることを示唆している。



(図 7) exon 27、exon 28 内のプライマーペアによる PCR

(7) 末梢血由来の cDNA 作成に異常がないことを RT-PCR で確認した後にリアルタイム PCR を行ったところ、患者では IQGAP3 発現レベルが高い傾向にあった (図 8)。



(図 8) 末梢血中の IQGAP3 mRNA 発現量

### まとめ

本疾患の責任遺伝子は IQGAP3 と思われる。患者では IQGAP3 の発現が増加しているようであるが、スプライス産物全長が検出できず、別の角度からの検証が必要と考えられた。現在、zebrafish での疾患モデルの作成にとりかかっているところである。

### <引用文献>

- 1) Jerath NU, Shy ME. Hereditary motor and sensory neuropathies: understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852: 667-678.
- 2) Ishiura H, Sako W, Yoshida M, et al. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 320-329.
- 3) Miura S, Shibata H, Kida H, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominance in the lower extremities, urinary disturbance, and paroxysmal dry cough. *J Neurol Sci* 2008; 273: 88-92.
- 4) Wang S, Watanabe T, Noritake J, et al. IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *J Cell Sci* 2007; 120: 567-577.
- 5) Nojima H, Adachi M, Matsui T, et al. IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signaling cascade. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 971-978.

### 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 4 件)すべて査読あり

- 1) Miura S, Morikawa T, Fujioka R, Kosaka K, Yamada K, Hattori G, Motomura M, Taniwaki T, Shibata H. A novel frameshift mutation of DDHD1 in a Japanese patient with autosomal recessive spastic paraplegia. *Eur J Med Genet* 2016; 59: 413-416. doi: 10.1016/j.ejmg.2016.05.010.
- 2) Hauser MA, Aboobakar IF, Liu Y, Miura S,

Whigham BT, Challa P, Wheeler J, Williams A, Santiago-Turla C, Qin X, Rautenbach RM, Ziskind A, Ramsay M, Uebe S, Song L, Safi A, Vithana EN, Mizoguchi T, Nakano S, Kubota T, Hayashi K, Manabe S, Kazama S, Mori Y, Miyata K, Yoshimura N, Reis A, Crawford GE, Pasutto F, Carmichael TR, Williams SE, Ozaki M, Aung T, Khor CC, Stamer WD, Ashley-Koch AE, Allingham RR. Genetic variants and cellular stressors associated with exfoliation syndrome modulate promoter activity of a lncRNA within the LOXL1 locus. Hum Mol Genet 2015; 24: 6552-6563. doi: 10.1093/hmg/ddv347.

- 3) Sano K, Miura S, Fujiwara T, Fujioka R, Yorita A, Noda K, Kida H, Azuma K, Kaieda S, Yamamoto K, Taniwaki T, Fukumaki Y, Shibata H. A novel missense mutation of RYR1 in familial idiopathic hyper CK-emia. J Neurol Sci 2015; 356:142-147. doi: 10.1016/j.jns.2015.06.035.
- 4) Kida H, Sano K, Yorita A, Miura S, Ayabe M, Hayashi Y, Nishino I, Taniwaki T. First Japanese case of muscular dystrophy caused by a mutation in the anoctamin 5 gene. Neurol Clin Neurosci 2015; 3: 150-152. doi: 10.1111/ncn3.175.

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) Morikawa T, Miura S, Kosaka K, Fujioka R, Sano K, Yorita A, Aoki K, Uchiyama Y, Taniwaki T, Shibata H. Heterozygous missense mutation in SEC24A encoding a coat protein complex II vesicle associated with autosomal dominant spinocerebellar ataxia. American Society of Human Genetics Annual Meeting 2016; Oct/21/2016: Vancouver, Canada.
- 2) Fujioka R, Miura S, Yamada K, Morikawa T, Motooka H, Uchiyama Y, Aso Y, Kimura N, Sano K, Yamamoto K, Taniwaki T, Shibata H. A missense mutation in the PPIG gene encoding the peptidyl-prolyl isomerase G in patients with autosomal dominant benign adult familial myoclonic epilepsy. American Society of Human Genetics Annual Meeting 2016; Oct/19/2016: Vancouver, Canada.
- 3) Morikawa T, Miura S, Yamada K, Hattori G, Kosaka K, Fujioka R, Motomura M, Taniwaki T, Shibata H. Homozygous 4-bp deletion in the DDHD1 gene, resulting the complete deletion of DDHD domain, as a causative variant in a SPG28 patient. International Congress of Human Genetics 2016; Apr/05/2016: Kyoto, Japan.
- 4) Miura S, Sano K, Kosaka K, Fujioka R, Saitsu H, Taniwaki T, Yamamoto K, Shibata H. Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominance in the lower extremities, urinary disturbance, and

paroxysmal dry cough maps to chromosome 1p13.3-1q23. American Society of Human Genetics Annual Meeting 2015; Oct/09/2015: Baltimore, USA.

- 5) Sano K, Miura S, Fujiwara T, Yamamoto K, Yorita A, Noda K, Kida H, Azuma K, Kaieda S, Taniwaki T, Fukumaki Y, Shibata H. A novel missense mutation of RYR1 in familial idiopathic hyper CK-emia. American Society of Human Genetics Annual Meeting 2014; Oct/19/2014: San Diego, USA.

〔図書〕  
(なし)

〔産業財産権〕  
○出願状況(なし)  
○取得状況(なし)

〔その他〕  
(なし)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

三浦 史郎 (MIURA, Shiroh)  
久留米大学医学部・講師  
研究者番号：00441650

### (2)研究分担者

柴田 弘紀 (SHIBATA Hiroki)  
九州大学・生体防御医学研究所・准教授  
研究者番号：80315093