

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461549

研究課題名(和文)もやもや病の包括的なエキソーム解析

研究課題名(英文) Whole exome sequencing in moyamoya disease

研究代表者

宮武 聡子 (MIYATAKE, Satoko)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：50637890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：もやもや病は小児～若年成人に好発する進行性の脳主幹動脈閉塞症である。もやもや病の疾患感受性を高める遺伝子としてRNF213遺伝子が知られている。しかし発症には本多型以外に他の遺伝的要因の存在が強く疑われる。そこでRNF213遺伝子以外の責任遺伝子同定を目的に65家系の全エキソーム解析を行い原因遺伝子の検索を継続中である。全エキソーム解析によって既知疾患責任遺伝子に病的変異を有するものが2例あり、もやもや病とこれらの疾患との関連が新たに示された。また本遺伝子が、典型的なもやもや病のみでなく、片側もやもや病や類もやもや病といった周辺の病態とも広く関連することを統計学的に確認した。

研究成果の概要(英文)：Moyamoya disease is a cerebrovascular disease characterized by progressive occlusion of the terminal portion of the carotid arteries and their branches, bilaterally. The p. R4810K variant in RNF213 gene is known to be associated with moyamoya disease, but it is assumed that there may be other genetic factors contributing its onset. We performed whole exome sequencing on 65 pedigrees with moyamoya disease, searching for the mutated gene in this cohort. Two patients had pathogenic mutation in genes associated with specific syndromes, in which moyamoya disease had not been known as their clinical symptom. We found that p.R4810K variant in RNF213 gene is significantly associated with not only moyamoya disease but also unilateral moyamoya disease, akin-moyamoya disease, and moyamoya-like disease in which different portion of carotid arteries are stenotic/occlusive.

研究分野：遺伝学

キーワード：もやもや病 エキソーム解析

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は、小児～若年成人に好発する進行性脳動脈閉塞症である。もやもや病患者の約 10-15%に家族歴があり、何らかの遺伝学的背景が想定されていたが、2011 年にもやもや病の疾患関連遺伝子 RNF213 が同定された。本遺伝子の R4810K 多型は、もやもや病発症に関してオッズ比 100 倍以上の非常に高い効果を持つことが明らかになった。(文献) これまで私たちは 204 名の患者における、本多型の遺伝型 表現型連関の解析から、ホモ接合性の R4810K 多型を有する患者で発症のリスクが特に高く、重症の経過をとること、本多型を有することで、もやもや病の発症リスクは 200 倍以上上昇することを明らかにした。(文献)

表1、もやもや病 204 症例と健常日本人 283

例における R4810K 多型

	野生型	ヘテロ接合型	ホモ接合型
患者群	17.6%	75.0%	7.4%
健常群	98.2%	1.8%	0%
オッズ比		236.3	-
P 値		5.41x 10 ⁻⁸¹	1x 10 ⁻¹³
発症確率		1.4-3.8%	>78%

しかし本多型は、約 1.8%の健常日本人にも見られる比較的高頻度な多型であり、発症のリスク推定は可能であるが、発症そのものを説明しえず、本多型以外に、他の遺伝的要因の存在が考えられた。

もやもや病に関連する新規遺伝学的要因の探索の手がかりとして、私たちは以下の知見を得ていた。

- (1) もやもや病に先天性腎尿路奇形 (Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: CAKUT) を合併した 3 家系の集積。この 3 家系は、もやもや病と CAKUT の発症に関わる変異を共通に持っている可能性がある。
- (2) 染色体構造異常合併もやもや病 1 症例における疾患責任候補領域の同定。候補領域内の遺伝子がもやもや病と関連している可能性がある。

ところで、私たちの 204 名のもやもや病の解析には、片側もやもや病と診断される症例が含まれていたが、この中には R4810K 多型を持つ症例が存在した。(文献) もやもや病は、従来の診断基準では、明らかな基礎疾患がなく、両側性に、特定の脳主幹動脈の狭窄や閉塞をきたすものと分類されているが、片側のみに病変がみられるもの(片側もやもや病)や、基礎疾患を有するもの(類もやもや病)がその周辺の病態として知られている。片側もやもや病患者に R4810K 多型を持つものが存在したということは、これらの病態も、本多型と関連を持つ可能性を示唆するものであった。

2. 研究の目的

研究開始時の背景のもと、以下の 2 点を探索することとした。

- (1) 全エキソーム解析により RNF213 遺伝子 R4810K 多型以外の遺伝的効果の高い rare variant 探索を行いもやもや病発症に関わる新規遺伝子を同定する。
- (2) RNF213 遺伝子 R4810K 多型と、もやもや病の類縁疾患との関連について解析する。

3. 研究の方法

(1) もやもや病の新規責任遺伝子の探索

もやもや病患者と、両親検体が取得できた場合、その両親の全エキソーム解析を行った。エキソームキャプチャーは Agilent Technologies 社の SureSelect Human All Exon kit を用いた。データ解析は、教室内で構築したパイプラインにより行った。概略を示すと、本パイプラインは、Novoalign, Picard, Genome Analysis ToolKit (GATK), GATK unifiedgenotyper, ANNOVAR を用いて、シーケンスリードのマッピング、ジェノタイピング、アノテーションを行う。一般集団に見られる高頻度多型の情報は本解析に不要のため除去する。dbSNP で頻度 1%以上の多型として登録されているもの、及びもやもや病非発症の日本人集団 575 人のデータで 1%以上にみられる多型を高頻度多型と考慮して除去の対象とした。患者とその両親の全エキソームデータがある場合は、トリオとしてまとめて解析した。こうすることで、遺伝形式を考慮しながら病的効果が高いと予想される低頻度多型を抽出することができる。具体的には、各家系で病的インパクトが高い低頻度多型で、新生突然変異であるもの、劣性遺伝形式に従うもの(劣性多型)がそれぞれ抽出される。

のリストの中で既知の責任遺伝子に病的変異がないか確認する。

のリストをマージさせ、複数家系に由来する低頻度多型が、共通する遺伝子に集積していないか検索する。

のリストの中で、3番染色体のモヤモヤ病責任候補領域上にある低頻度多型を抽出する。

モヤモヤ病に CAKUT を合併した3家系の解析では、3家系共通で、低頻度多型が見られる遺伝子を検索する。

～ の作業で、抽出された低頻度多型について病原性を評価する。

(2) RNF213 遺伝子 R4810K 多型と、モヤモヤ病の類縁疾患との関連

症例の R4810K 多型をサンガーシーケンス法で解析する。

症例を表現型ごとに分類(典型モヤモヤ病、片側モヤモヤ病、類モヤモヤ病、その他)し、統計学的な相関を検討する。

4. 研究成果

(1) モヤモヤ病の新規責任遺伝子の探索

患者とその両親の全エキソーム解析を 65 家系(患者 67 人、うち 36 家系でトリオ解析)で行った。

67 人の患者の全エキソーム解析のカバレッジは以下の通りで、全コーディング領域の 95.8%以上が 10x 以上の厚みでシーケンスできており、パフォーマンスは十分であった。

	Mean	>5x	>10x	>20x
	Coverage	(%)	(%)	(%)
	(x)			
Depth of coverage	95.58	96.95	95.82	92.34

(depth は coding region に対して計算)

36 家系のトリオ解析によって、一般集団では低頻度の新生突然変異を 65 個、及び劣性多型を 183 個抽出した。この中で、2 家系で 2 つの共通する遺伝子に新生突然変異が見られた。また 6 家系で 2 つの共通する遺伝子に劣性多型、4 家系で 2 つの共通する遺伝子に劣性多型、2 家系で 10 の共通する遺伝子に劣性多型が同定された。これらの病原性の検証を継続中である。

これまで染色体構造異常を伴う 1 例のゲノム構造解析から、3 番染色体領域にもヤモヤ病責任候補領域を同定している。今回同定した新生突然変異や劣性遺伝形式に従う多型は本候補領域上に存在するものはなかった。

また 2 家系で、既知症候群の責任遺伝子に変異を認めた。1 例は Noonan-like 症候群の責任遺伝子 CBL の新生突然変異であり、(文献) 第一報に続く 3 例目の症例である。CBL 遺伝子は RASopathy 関連の遺伝子で、若年性の白血病の易感受性を持つことがあるとされているが、第一報の 2 家系では白血病はみられておらず、私たちが解析した症例も同様であった。もう 1 例は Cantu 症候群の責任遺伝子 ABCC9 の新生突然変異である。(文献) いずれの遺伝子もこれまでモヤモヤ病との関連は明らかでなく、新たな知見である。

RNF213 遺伝子に注目すると、R4810K 多型を持たない 16 人中 6 人で RNF213 遺伝子に 5 種類の R4810K 多型以外のミスセンス多型が同定され、これらは健常集団では認めなかった。一方 429 人の一般集団中、低頻度多型が 28 人で 23 種類見つかった。症例を集積することで、R4810K 多型以外の RNF213 遺伝子の低頻度多型ともヤモヤ病との有意な相関が見出せる可能性がある。

モヤモヤ病に CAKUT を合併した 3 家系の解析では、RNF213 遺伝子の R4810K 多型をいずれの家系でも同定した。それ以外に 3 家系共通で 1 遺伝子に低頻度多型が見られたが、疾患との関連は明らかではなく、モヤモヤ病と CAKUT と合併する 3 家系の疾患の原因を説明する所見は明らかではなかった。

(2) モヤモヤ病、およびその類縁疾患と RNF213 R4810K 多型との関連解析

モヤモヤ病 266 例、片側モヤモヤ病 22 例、類モヤモヤ病 17 例、特定部位を外れた脳主幹動脈の閉塞 6 例を集積して R4810K 多型の解析を行った。モヤモヤ病 > 特定部位を外れた脳主幹動脈の閉塞症 > 片側モヤモヤ病 > 類モヤモヤ病という勾配をもった関連が統計学的に有意にみられることを確認した。またモヤモヤ病は小児脳梗塞をきたす疾患であるが、モヤモヤ病の脳動脈所見を有さない小児脳梗塞例 4 例では本多型の関連は見られなかった。本多型が関連する脳動脈症としての表現型は従来のもヤモヤ病を主としてさらに広がりをもっている可能性がある。(投稿準備中データ)

< 引用文献 >

- Kamada et al., J Hum Genet. 56(1):34-40, 2011
- Miyatake et al., Neurology. 78(11):803-10, 2012
- Guey et al., J Med Genet. pii: jmedgenet-2016-104432. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-104432. [Epub ahead of print]
- Harakalova et al., Nat Genet.

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 36 件)

Miyatake, S., Mitsuhashi, S., Hayashi, Y.K., Purejav, E., Nishikawa, A., Koshimizu, E., Suzuki, M., Yatabe, K., Tanaka, Y., Ogata, K., Kuru, S., Shiina, M., Tsurusaki, Y., Nakashima, M., Mizuguchi, T., Miyake, N., Saitsu, H., Kawai, M., Towbin, J., Nonaka, I., Nishino, I. & Matsumoto, N. Biallelic Mutations in MYPN, Encoding Myopalladin, Are Associated with Childhood-Onset, Slowly Progressive Nemaline Myopathy. *Am J Hum Genet.* 査読有, 100, 2017, 169-178. DOI : 10.1016/j.ajhg.2016.11.017

Miyatake, S., Okamoto, N., Stark, Z., Nabetani, M., Tsurusaki, Y., Nakashima, M., Miyake, N., Mizuguchi, T., Ohtake, A., Saitsu, H. & Matsumoto, N. ANKRD11 variants cause variable clinical features associated with KBG syndrome and Coffin-Siris-like syndrome. *J Hum Genet.* 査読有, 2017, DOI : 10.1038/jhg.2017.24

Satake, T., Yamashita, K., Hayashi, K., Miyatake, S., Tamura-Nakano, M., Doi, H., Furuta, Y., Shioi, G., Miura, E., Takeo, Y.H., Yoshida, K., Yahikozawa, H., Matsumoto, N., Yuzaki, M. & Suzuki, A. MTCL1 plays an essential role in maintaining Purkinje neuron axon initial segment. *Embo J.* 査読有, 2017, DOI : 10.15252/embj.201695630

Imagawa, E., Higashimoto, K., Sakai, Y., Numakura, C., Okamoto, N., Matsunaga, S., Ryo, A., Sato, Y., Sanefuji, M., Ihara, K., Takada, Y., Nishimura, G., Saitsu, H., Mizuguchi, T., Miyatake, S., Nakashima, M., Miyake, N., Soejima, H. & Matsumoto, N. Mutations in genes encoding polycomb repressive complex 2 subunits cause Weaver syndrome. *Hum Mutat.* 査読有, 38, 2017, 637-648. DOI : 10.1002/humu.23200

Makrythanasis, P., Kato, M., Zaki, M.S., Saitsu, H., Nakamura, K., Santoni, F.A., Miyatake, S., Nakashima, M., Issa, M.Y., Guipponi, M., Letourneau, A., Logan, C.V., Roberts, N., Parry, D.A., Johnson, C.A., Matsumoto, N., Hamamy, H., Sheridan, E., Kinoshita, T., Antonarakis, S.E. & Murakami, Y.

Pathogenic Variants in PIGG Cause Intellectual Disability with Seizures and Hypotonia. *Am J Hum Genet.* 査読有, 98, 2016, 615-626. DOI : 10.1016/j.ajhg.2016.02.007

Uchiyama, Y., Nakashima, M., Watanabe, S., Miyajima, M., Taguri, M., Miyatake, S., Miyake, N., Saitsu, H., Mishima, H., Kinoshita, A., Arai, H., Yoshiura, K. & Matsumoto, N. Ultra-sensitive droplet digital PCR for detecting a low-prevalence somatic GNAQ mutation in Sturge-Weber syndrome. *Sci Rep.* 査読有, 6, 2016, 22985. DOI : 10.1038/srep22985

Imagawa, E., Fattal-Valevski, A., Eyal, O., Miyatake, S., Saada, A., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Saitsu, H., Miyake, N. & Matsumoto, N. Homozygous p.V116* mutation in C12orf65 results in Leigh syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 査読有, 87, 2016, 212-216. DOI : 10.1136/jnnp-2014-310084

Fujita, A., Ando, K., Kobayashi, E., Mitani, K., Okudera, K., Nakashima, M., Miyatake, S., Tsurusaki, Y., Saitsu, H., Seyama, K., Miyake, N. & Matsumoto, N. Detection of low-prevalence somatic TSC2 mutations in sporadic pulmonary lymphangioleiomyomatosis tissues by deep sequencing. *Hum Genet.* 査読有, 135, 2016, 61-68. DOI : 10.1007/s00439-015-1611-0

Miyatake, S., Tada, H., Moriya, S., Takanashi, J., Hirano, Y., Hayashi, M., Oya, Y., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Matsumoto, N. & Saitsu, H. Atypical giant axonal neuropathy arising from a homozygous mutation by uniparental isodisomy. *Clin Genet.* 査読有, 87, 2015, 395-397. DOI : 10.1111/cge.12455

Miyatake, S., Koshimizu, E., Fujita, A., Fukai, R., Imagawa, E., Ohba, C., Kuki, I., Nukui, M., Araki, A., Makita, Y., Ogata, T., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Saitsu, H. & Matsumoto, N. Detecting copy-number variations in whole-exome sequencing data using the eXome Hidden Markov Model: an 'exome-first' approach. *J Hum Genet.* 査読有, 60, 2015, 175-182. DOI : 10.1038/jhg.2014.124

Tsurusaki, Y., Koshimizu, E., Ohashi, H., Phadke, S., Kou, I., Shiina, M., Suzuki, T., Okamoto, N., Imamura, S., Yamashita, M., Watanabe, S., Yoshiura, K., Kodera, H., Miyatake, S.

Nakashima, M., Saitsu, H., Ogata, K., Ikegawa, S., Miyake, N. & Matsumoto, N. De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. Nat Commun. 査読有, 5, 2014, 4011. DOI : 10.1038/ncomms5011

Miyatake, S., Osaka, H., Shiina, M., Sasaki, M., Takanashi, J., Haginoya, K., Wada, T., Morimoto, M., Ando, N., Ikuta, Y., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Ogata, K., Matsumoto, N. & Saitsu, H. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating

leukoencephalopathies. Neurology. 査読有, 82, 2014, 2230-2237. DOI : 10.1212/WNL.0000000000000535

Miyatake, S., Koshimizu, E., Hayashi, Y.K., Miya, K., Shiina, M., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Saitsu, H., Ogata, K., Nishino, I. & Matsumoto, N. Deep sequencing detects very-low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy. Neuromuscul Disord. 査読有, 24, 2014, 642-647. DOI : 10.1016/j.nmd.2014.04.002

Miyatake, S. & Matsumoto, N. Genetics: Clinical exome sequencing in neurology practice. Nat Rev Neurol. 査読有, 10, 2014, 676-678. DOI : 10.1038/nrneurol.2014.213

Doi, H., Ushiyama, M., Baba, T., Tani, K., Shiina, M., Ogata, K., Miyatake, S., Fukuda-Yuzawa, Y., Tsuji, S., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Saitsu, H., Ikeda, S., Tanaka, F., Matsumoto, N. & Yoshida, K. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous DDHD2 mutation. Sci Rep. 査読有, 4, 2014, 7132. DOI : 10.1038/srep07132

〔学会発表〕(計 9 件)

Miyatake S. Whole exome sequencing in congenital myopathy. 第94回日本生理学会大会(招待講演) 3月28日 - 30日, 2017年、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

Miyatake S. Atypical giant axonal neuropathy arising from a homozygous mutation by uniparental isodisomy. 第57回神経学会学術大会, 5月18 - 21日, 2016年、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

Miyatake S. Broadening of ANKRD11-related syndrome. The13th International Congress of Human Genetics. Apr 3-7, 2016, International Conference Center (Kyoto)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ネマリンミオパチーの確定診断法

発明者: 宮武聡子、松本直通

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2016-236425

出願年月日: 2016年12月6日

国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称: RNF213 遺伝子多型による重症もやもや病の予測方法

発明者: 宮武聡子、松本直通

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 5822293 号

取得年月日: 2015年10月16日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

筋肉の障害や筋力低下をきたす難病『先天性ミオパチー(ネマリンミオパチー)』の新たな原因遺伝子を発見

<http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/news/20161226.html>

松本直通教授らの研究成果が、日本で特許として成立しました

http://www.yokohama-cu.ac.jp/res_pro/patent/20151105tokkyoken_matsumoto.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮武聡子 (MIYATAKE, Satoko)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号: 50637890

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

なし ()