

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860896

研究課題名(和文) 精神遅滞・広汎性発達障害における病因既知遺伝子の網羅的解析および機能検証

研究課題名(英文) Targeted capture sequence analysis and functional study of candidate genes for mental retardation and pervasive developmental disorder

研究代表者

和賀 央子 (WAGA, Chikako)

帝京大学・理工学部・研究員

研究者番号：80462795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：知的障害(精神遅滞)および広汎性発達障害の発症は双生児研究から遺伝的要因が示唆されているものの、これまでに600以上もの関連遺伝子が報告されていることから、原因の特定に至っていない患者が多く存在する。本研究では知的障害患者における原因遺伝子の特定を目的とし、16名を対象にMiseq次世代シーケンサーを用いて病因既知遺伝子(681遺伝子)の解析を行い、3例(18.75%)で原因遺伝子を特定した。この結果は、本方法が原因遺伝子を特定するために有用であることを示すと同時に、知的障害における神経病態理解のための基礎データ蓄積へとつながる重要なものである。

研究成果の概要(英文)：Previous twin studies have suggested that the gene mutation is a leading cause of intellectual disability (mental retardation) and pervasive developmental disorder. However, it is difficult to identify the responsible gene for each patient by using Sanger sequencing since there are a large number of candidate genes (over 600) for these diseases. The purpose of this study is to determine the responsible gene for the patients with intellectual disability. We performed the target sequencing of the exonic regions of 681 candidate genes in the 16 patients with intellectual disability by employing Miseq next generation sequencing, and identified the responsible gene in 3 patients (18.75%). The results indicate that the method in this study is useful for identification of the responsible gene, and lead to understanding of neuropathology of intellectual disability.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：知的障害(精神遅滞) 遺伝子検査 ターゲットシーケンス 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

精神遅滞 (Mental Retardation: MR) および自閉症を含めた広汎性発達障害は中枢神経系の発達の機能獲得不全をきたしている疾患であり、両疾患の合計罹患率は出生100人に1人と非常に多く、小児科領域の重要な疾患の一つである。双生児研究によりMRや広汎性発達障害は遺伝的要因が大きく関与していると考えられており、ニューロリジンやニューレキシンやSHANKなどシナプス機能にかかわる分子などの他、中枢神経系に発現する遺伝子が多数報告されている (Garber, Science, 2007, Kelleher RJ 3rd et al. cell, 2008)。申請者はこれまでに、重度言語障害を呈する128例の広汎性発達障害患者においてシナプス機能分子の一つであるSHANK3遺伝子のゲノム解析を行い新規の変異を6例に見出し報告した (Waga et al. Psychiatr. Genet. 2011) 他、X連鎖性精神遅滞に着目し、X染色体上のMR関連既知遺伝子13遺伝子の解析を行い、SYP遺伝子で1例、JARID1C遺伝子で3例そしてRPL10遺伝子で1例の陽性所見を見出した。しかしながら各遺伝子における陽性所見の検出頻度は低く、原因の特定に至らない患者も存在する。近年の遺伝子解析技術の向上により、これら疾患の原因として400以上の遺伝子が報告されていることから、原因は患者個々で異なり、同じ遺伝子が原因による症例が少ない。そのため原因特定のために検査すべき遺伝子数が膨大となり、従来のサンガー法を用いたキャピラリーシークエンサーでは困難であると考えられる。その結果、日本におけるMR・広汎性発達障害患者は原因不明であることが多く、病態解明、治療法開発に必要な基礎データの蓄積に至っていないのが現状である。

国立精神・神経医療研究センターではMR・広汎性発達障害患者およびその家族の血液細胞より細胞株が樹立され、約450家系が家系情報 (家族歴) と共にゲノムDNAとリンパ芽球が保存・管理されている。さらに次世代シークエンサーの導入により、大規模なシークエンシス解析が可能となった。また次世代シークエンシスにおけるアプリケーション技術の発達により、遺伝子の目的領域を特異的にキャプチャーする技術が開発されたことで、全ゲノムシークエンシスを行うより、解析時間が短縮でき、比較的安価に目的の遺伝子を網羅的に解析できるようになった。

2. 研究の目的

MRの病態解明と治療法の開発を目指して、本研究ではMR患者のゲノムDNAおよび次世

代シークエンサーを用いて病因既知遺伝子の網羅的な解析を行い、原因不明の患者における原因遺伝子を特定することを目的とした。また、本研究で使用するターゲットシークエンシスが原因特定に有効であるか否かについても検討した。

(以下、名称の改正に伴い精神遅滞を知的障害に記載を変更する)

3. 研究の方法

(1) 次世代シークエンサーによる病因既知遺伝子キャプチャー解析

解析する病因既知遺伝子と解析対象の選定

解析する遺伝子は日本バイオベース株式会社が提供する Human Gene Mutation Database (HGMD) を利用し、過去に知的障害 (精神遅滞)・広汎性発達障害との関連を報告した論文を基に選定した。また解析対象として、国立精神・神経医療研究センターに保存されている約450家系のうち、1) これまでの染色体を含む遺伝子解析で原因の明らかとなっていない患者 2) 家系内で両親を含む複数のゲノムDNAが保存されている家系の患者の条件を満たす16名 (#1 - #16) の知的障害患者を対象とし、血液由来のゲノムDNAを用いた解析を行った。

SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムを用いた Miseq 次世代シークエンサーによる遺伝子の網羅的解析

アジレントテクノロジー社が提供する SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムを用いて、1)-1で選定した遺伝子のエクソンに対するプローブを作成し、プロトコルに順じてサンプルを調整した。その後イルミナ社の Miseq 次世代シークエンサーおよび Miseq v2 Reagent Kit 300cycle を用いてシークエンシスを行った。

データ解析による原因遺伝子候補の絞り込み

シークエンシス後のデータは BWA-GATK-ANN OVAR システムを用いて解析し、解析後に検出された全

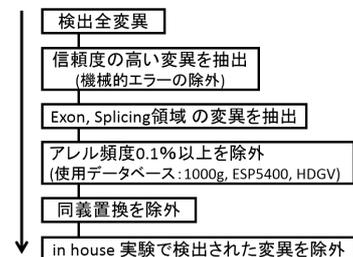


図1. 原因候補遺伝子変異絞り込みにおけるフローチャート

ての遺伝子変異のデータは図1のフローチャートに従い、患者個々の原因遺伝子変異候補の絞り込みを行った。

(2) サンガーシークエンスによる患者および家族のゲノム解析

(1)- において絞り込んだ原因候補遺伝子について、患者および患者の家族・兄弟における変異の有無をサンガーシークエンスにより確認し、以下の点に留意して、更なる原因遺伝子の絞り込みを行った。

兄弟に知的障害患者がいる場合、次世代シークエンサーによって解析した患者と同じ遺伝子変異を有している。

劣性遺伝およびX連鎖性を除いて、健常両親は患者と同じ変異を有していない (de novo もしくはモザイク) また、健常兄弟も変異を有していない。

全く同じ変異が過去に知的障害患者から検出され、文献において報告されており、かつ、 の条件を満たしている。

(3) 患者由来リンパ芽球細胞を用いたスプライシング異常有無の確認および原因候補遺伝子の mRNA およびタンパク質の発現解析

患者由来のリンパ芽球細胞を用いて、RT-PCR 法、サンガーシークエンス法によるスプライシング異常の有無の確認を、また、リアルタイム PCR 法ウエスタンブロット法を用いて mRNA およびタンパク質の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 次世代シークエンサーによる病因既知遺伝子キャプチャー解析

解析する病因既知遺伝子の選定結果

申請時 (図 2: 2012.07) 知的障害・広汎性発達障害 (主に自閉スペクトラム症: 以下自閉症) 合わせて 406 であった疾患関連遺伝子は自閉症のみにおいて、その報告数が 5.6 倍 (報告数 143 遺伝子から 796 遺伝子) に増加していることが明らかとなった。本研究で用いる Miseq 次世代シークエンサーによる解析では知的障害関連遺伝子と自閉症関連遺伝子を合わせた約 1400 遺伝子の解析はその数の多さから 1 度に解析できる人数が少なくなることから、両疾患候補遺伝子同時の解析が困難であると判断した。よって知的障害に特化した解析遺伝子を再度検討し、結果 681 の解析する遺伝子を決定した。

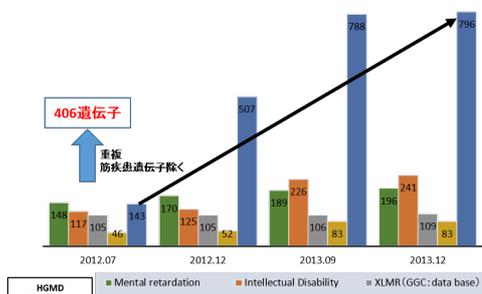


図2. 知的障害および自閉症関連報告遺伝子数の推移 (2012.7-2013.12)
HGMD 検索キーワードとして精神遅滞、知的障害、X連鎖性精神遅滞 (XLMR)、発達遅滞、自閉症などを使用

SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムを用いた Miseq 次世代シークエンサーによる遺伝子の網羅的解析

681 遺伝子のキャプチャープローブ作成結果、プローブ総数 42953、解析領域はすべて合わせて 2.981Mbp となったことから、4 サンプルをプールし、1 回のシークエンスで解析した。その結果、表 1 に示すように、解析結果の信頼度が高くなる Depth 10 以上のターゲット領域のカバー率は、すべてのサンプルで 99.8% 以上となり、1 回のシークエンスにおける解析人数が妥当であったことが示された。

表 1. 知的障害患者 16 例における検出遺伝子変異数

サンプルNo.	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
Depth10以上のターゲット領域のカバー率	98.90%	99.00%	98.80%	99.00%	99.00%	98.90%	98.90%	98.90%
検出全変異数	1804	1858	1888	1883	1901	1920	1788	1833
信頼度の高い変異の数	1557	1638	1661	1606	1670	1669	1545	1637
Exon, Splicing 領域の変異数	97	10	109	112	97	100	89	110
アレル頻度0.1%以下の変異数	42	104	46	44	34	43	37	48
同義置換を除外した変異の数	22	41	27	32	27	28	23	24
in house 実験で検出されなかった変異の数	13	24	17	22	19	22	17	21

サンプルNo.	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16
Depth10以上のターゲット領域のカバー率	98.80%	98.90%	98.40%	98.80%	99.00%	98.60%	99.10%	98.10%
検出全変異数	1771	1954	1672	1845	1853	1804	1866	1895
信頼度の高い変異の数	1571	1714	1651	1625	1605	1585	1622	1644
Exon, Splicing 領域の変異数	81	102	98	105	88	98	114	100
アレル頻度0.1%以下の変異数	25	41	34	42	23	43	46	33
同義置換を除外した変異の数	17	23	22	24	15	24	25	18
in house 実験で検出されなかった変異の数	11	16	10	17	10	14	19	11

データ解析による原因遺伝子候補の絞り込み結果

シークエンスの結果、検出した全変異の数および全変異から各項目でフィルタリングを行い、残った遺伝子変異の数を表 1 に示した。681 遺伝子解析の結果、1 人当たり約 1,850 もの遺伝子変異が検出された。そして、方法 (1) - の図 1 のフローチャートに従い、各項目でフィルタリングを行った結果、約 20 まで、疾患原因候補遺伝子を絞り込むことができた。

(2) サンガーシークエンスによる患者および患者家族のゲノム解析

(1)- で絞り込んだ疾患原因候補遺伝子変異を患者および患者家族ゲノムについて、サンガーシークエンス法で変異の有無を確認した結果、以下の 3 例について原因として有力と思われる遺伝子変異を検出した。

#1: 男児 SLC9A6 遺伝子におけるスプライシング制御領域の変異

#1 の解析から、SLC9A6 遺伝子 (chr. Xq26.3, total exon 16) exon4 直上流のイントロン領域に AG の欠失 (IVS4-2delAG) が認められた (図 3)。#1 の健常両親および罹患兄弟 (男児) 1 名においてサンガーシークエンスによる変異の有無を確認した結果、罹患兄弟から 1 同様の遺伝子変異、また母親が保因者 (ヘテロ接合体) であることが明らかとなった。

本遺伝子は X 染色体に存在することから、母親では X 染色体不活化の影響により、母親は健常であると考えられる。

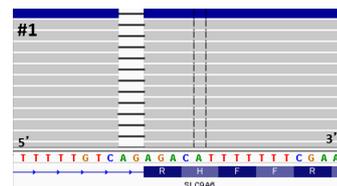


図3. SLC9A6 遺伝子における解析結果 (#1)
図上: 患者のシークエンス配列。灰色・青色のリードはリファレンス配列と同じことを示し、Exon 直前の黒線は AG 欠失を示している。
図下: リファレンスゲノム配列

#11: 男児 *GATAD2B* 遺伝子 de novo ミスセンス変異

#11 の解析から、*GATAD2B* 遺伝子 (chr.1q21.3) において c.T1330C: p.C444R (図 4: 3' -5' 表記) 変異が認められた。#11 の健常両親および健常兄弟 (男児) 1 名においてサンガーシーケンスによる変異の有無を確認したところ、健常両親、健常兄弟共に 11 で検出された本変異を有していないことがわかり、de novo 変異であることが明らかとなった。

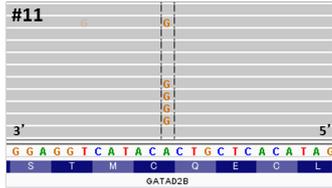


図4. *GATAD2B* 遺伝子における解析結果 (#11)
 図上: 患者のシーケンス配列。灰色のリードの中にリファレンス配列と異なる塩基が検出されている (c.T1330C: p.C444R)
 図下: リファレンスゲノム配列

#12: 男児 *WDR62* 遺伝子 複合ヘテロ接合体変異

#12 の解析から、*WDR62* 遺伝子 (chr.19q13.12) に、c.C275T: p.Q918X のナンセンス変異 (図 5: #12-I)、c.3310dupA: p.Q1103fs53X のフレームシフト変異 (図 5: #12-II) の二つの変異が認められた。#12 の健常両親および罹患兄弟 (男児) 1 名においてサンガーシーケンスによる変異の有無を確認した結果、健常父親において #12-I のナンセンス変異、健常母親において #12-II のフレームシフト変異の保因者 (いずれもヘテロ接合体) そして罹患兄弟においては 12 同様、これら 2 つの遺伝子変異を有していることが明らかとなった。

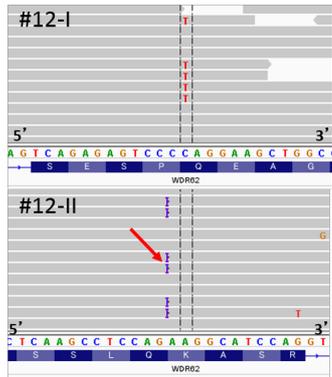


図5. *WDR62* 遺伝子における解析結果 (#12)
 図上 #12-I: 患者のシーケンス配列。灰色のリードの中にリファレンス配列と異なる塩基が検出されている (c.C275T: p.Q918X)
 図下 #12-II: 患者のシーケンス配列 (c.3310dupA: p.Q1103fs53X)
 赤矢印がAの挿入を示している

これまでの報告から、*WDR62* 遺伝子による知的障害は常染色体劣性の遺伝形式であり、その症状は小頭症、皮質形成異常、中等度の知的障害であると報告されている (OMIM: 613583)。本解析結果から、患者における父由来 (c.C275T: p.Q918X) および母由来 (c.3310dupA: p.Q1103fs53X) の *WDR62* 遺伝子は共に正常な *WDR62* タンパク質が作られないことが考えられたため、本疾患の原因である可能性が高いと考えられた。また、遺伝形式が劣性遺伝ということから正常と変異遺伝子のヘテロ接合体である両親は健常であると考えられた。

(3) 患者由来リンパ芽球細胞を用いたスプライシング異常有無の確認および原因候補遺伝子の mRNA およびタンパク質の発現解析

#1 および #11 の 2 家系で検出した変異について、患者由来リンパ芽球細胞を用いて、スプライシング異常の有無、mRNA およびタンパク質の発現解析を行った結果を以下に示した。

#1: *SLC9A6* 遺伝子変異 (IVS4-2delAG) における異常スプライシングの検出

患者由来のリンパ芽球細胞から totalRNA を抽出し、cDNA 合成後、RT-PCR およびサンガーシーケンスによる解析の結果、健常者 (図 6 左) では、*SLC9A6* 遺伝子 exon3 から exon4 へと通常のスプライシングが起こるのに対し、*SLC9A6* 遺伝子 IVS4-2AGdel の患者 (図 6 右) においては、exon4 の 5' 側の AG が欠失して、スプライシングが起こっていることが明らかとなった。これは、正常なスプライシングに必要なイントロン-エクソン境界部にある AG が欠いたことにより、exon4 の 5' 側にある AG がスプライシングの制御に使用されたためと考えられる。このことから exon4 からフレームシフトが起こり、61 アミノ酸の後、stop コドンとなることが明らかとなった。その結果、患者において正常な *SLC9A6* タンパク質は作られないことが考えられることから #1 の患者において *SLC9A6* 遺伝子が原因である可能性が高いと考えられた。

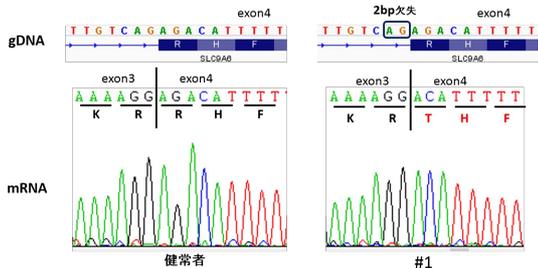


図6. *SLC9A6* 遺伝子変異 (IVS4-2delAG) によるスプライシングへの影響
 図上: *SLC9A6* 遺伝子リファレンスゲノム配列
 図下: 健常コントロール (左)、#1 患者 (右) における *SLC9A6* mRNA (cDNA) 配列
 健常コントロールでは exon3, exon4 と続くのに対し、#1 では exon4 AG が欠失している

#11: *GATAD2B* 遺伝子 c.T1330C: p.C444R de novo ミスセンス変異における *GATAD2B* 遺伝子の mRNA およびタンパク質の発現

GATAD2B 遺伝子 c.T1330C: p.C444R ミスセンス変異が *GATAD2B* mRNA およびタンパク質の発現量に対する影響をリアルタイム PCR およびウエスタンブロット法を用いて検討した結果、健常者と比較して mRNA (図 7a) の発現量に統計学的差は認められなかった。また同様にタンパク質 (図 7b) においても顕著な

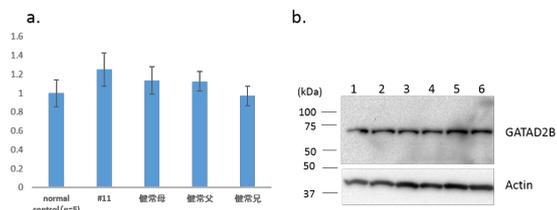
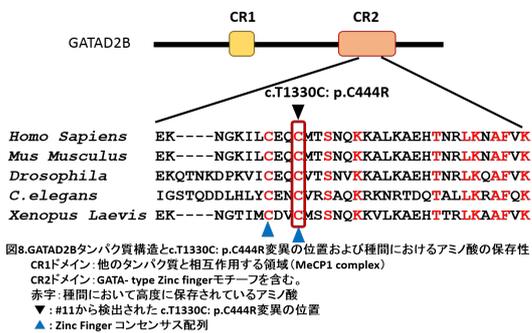


図7. リンパ芽球細胞を用いた患者および患者家族と健常者における *GATAD2B* mRNA (a) およびタンパク質 (b) の発現量の比較
 (a) リアルタイムPCRによる *GATAD2B* 遺伝子の発現。縦軸には倍率を表示し normal control (n=5) とした。コントロールと比較して統計学的有意差なし
 (b) ウエスタンブロットによる *GATAD2B* タンパク質の発現
 レーン 1, 2: 健常コントロール; 3: #11 (患者); 4: 健常母; 5: 健常父; 6: 健常兄



差は認められなかった。しかしながら、*GATAD2B* 遺伝子における c.T1330C: p.C444R 変異は、*GATAD2B* の CR2 ドメイン内に存在し (図 8) さらにヒトから線虫まで、幅広い種間において高度に保存されていること、そして CR2 ドメイン内に存在する Zinc finger のコンセンサス配列 (Feng Q, Mol. Cell. Biol., 2002) の一つである (図 8) ことから、転写制御因子 (抑制) として知られている (Brackertz M, J. Biol. Chem. 2002) *GATAD2B* の機能面に、に何らかの影響を及ぼす可能性が高いと考えられた。

これまで *GATAD2B* 遺伝子異常における知的障害は常染色体優性遺伝の遺伝形式であることが報告されている (OMIM:614998)。本症例において c.T1330C: p.C444R が de novo の変異であることさらに *GATAD2B* の機能的に重要な位置に変異が存在していることから原因遺伝子変異である可能性が高いと考えられた。

以上の結果より、本研究ではこれまで原因不明であった 16 名の知的障害患者のうち 3 例の患者で原因と考えられる遺伝子変異を特定した (論文投稿準備中)。今回の原因特定率が 18.75% (16 名中 3 名) であり、本方法が患者原因と特定するため有効であることが示された。特定に至らなかった 13 名についても、原因遺伝子を絞り込むフィルタリング内容を変更することで原因特定に至る可能性も考えられるため、今後再検討する予定である。

本研究期間において、機能検証まで至らなかったが、今後も引き続き遺伝子変異における機能的意義についても検証を続け、遺伝子異常に基づいた知的障害における神経病態を一つ一つ明確にしていくことが、基礎データの蓄積となり、知的障害における神経病態解明へとつながると考えられる。また、今回特定した *GATAD2B*、*WDR62* 遺伝子異常による知的障害の症例は世界で 30 症例以下と少ない (Faheem M., BMC Med Genomics, 2015, HGMD)。本研究結果が加わることで、症例が増え、その臨床情報が医療の現場における早期原因特定への情報となることも期待できることから、本研究は非常に重要で意義深いものであったと考えられる。

本研究は、ヒトゲノムに関する倫理指針に則って行われており、国立精神・神経医療研究センターの設置する倫理委員会の承認を

得ている。申請者は平成 26 年 4 月より所属機関が国立精神・神経医療研究センターから帝京大学へと変更したが国立精神・神経医療研究センターの研究生であり、ヒトゲノムに関する実験は国立精神・神経医療研究センターにて実施している。

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 1 件)

Waga C, Asano H, Sanagi T, Suzuki E, Nakamura Y, Tsuchiya A, Itoh M, Goto YI, Kohsaka S, Uchino S. Identification of two novel Shank3 transcripts in the developing mouse neocortex. J Neurochem. 2014, 128(2): 280-293. (査読有)

[学会発表](計 1 件)

和賀央子、竹下絵里、中川栄二、後藤雄一、X連鎖性精神遅滞患者における関連遺伝子解析、Neuro2013 (第35回日本神経科学大会、第56回神経化学大会、第23回日本神経回路学会大会合同年会) 2013年06月22日、京都国立国際会議場、(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和賀 央子 (WAGA, Chikako)
 帝京大学・理工学部・研究員
 研究者番号: 80462795