

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09344

研究課題名(和文) 脊髄小脳変性症の遺伝背景の解析と新規遺伝子同定に基づく病態解明

研究課題名(英文) Analysis of genetic background and pathomechanism of spinocerebellar degeneration

研究代表者

土井 宏 (DOI, Hiroshi)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10326035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、既知責任遺伝子に変異を認めない家族例、孤発例の脊髄小脳変性症 (spinocerebellar degeneration: SCD) のエクソーム解析を通して、SCDの新規責任遺伝子を解明することを目的とした。我々は常染色体優性遺伝家系において、電位依存性カルシウムチャンネルCACNA1Gのミスセンス変異を同定した。しかしCACNA1G変異例については我々の研究実施中に他グループから論文報告がなされたため、病理所見を中心に論文を作成中である。また、劣性遺伝性家系、孤発性SCD例の解析では、3家系4名においてこれまでにほとんどSCDの原因として報告のないERCC4変異を同定し報告した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify novel genes responsible for spinocerebellar degeneration (SCD), through the exome analysis of familial or sporadic cases with SCD, who did not have known SCD-related mutations. As results of exome analysis for an autosomal dominant SCD family, we identified a missense mutation of CACNA1G, encoding voltage gated calcium channel. However, during our study, the mutation was reported as the novel cause of SCD by other groups. We are preparing a paper focused on the pathology of the patients. As the results of exome analysis for recessive or sporadic SCD cases, we identified four patients from three families of SCD with ERCC4 mutation. We reported ERCC4 mutations as the rare cause of SCD.

研究分野：神経内科学

キーワード：脊髄小脳変性症 exome

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症 (spinocerebellar degeneration: SCD) 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。研究開始当初、常染色体優性型脊髄小脳失調症 (ADSCD) は遺伝学的解明が進み 33 の責任遺伝子座 (SCA40 まで分類) と 27 種類の責任遺伝子が単離されており、常染色体劣性型 (ARSCD) では 20 種類以上の責任遺伝子が知られていた。しかし、孤発例の大部分は原因不明であり、家族例においても依然として責任遺伝子不明な一群が存在することが知られていた。上記の研究を通じて ADSCA および ARSCA の新規責任遺伝子候補を複数同定していた。

2. 研究の目的

本研究は、新規責任遺伝子候補の孤発例、家族例における変異・多型の遺伝子解析、機能解析、剖検を得た家系における病理学的解析を通じて、SCD の責任遺伝子、疾患関連遺伝子を解明し、新たな疾患メカニズムを明らかにすることを目的として開始した。

3. 研究の方法

ADSCD 解析

これまでに新型 DNA シーケンサーで解析不能なりピート配列伸長が原因となる遺伝子について、PCR 法で異常がないことを確認した ADSCD 症例を対象として、全エクソン解析を施行し、東京医科歯科大学との共同研究により有力な候補 (CACNA1G、ELOVL4) を得ていた。当施設では CACNA1G 変異について機能解析を行った。

CACNA1G の発現ベクターを作成しミスセンス変異が細胞局在、タンパク凝集性、タンパク安定性に与える影響を、HEK293 細胞を用いて検討した。

また、CACNA1G 変異の剖検例が得られているため、各種抗体を用いて、詳細な病理学的検討を行った。

ARSCD 解析

これまでに SCD の原因となる既知の遺伝子変異が同定されておらず、家族歴から劣性遺伝が疑われる例、孤発例 55 例の index case について全エクソン解析を施行し、dbSNP137 および我々の持つ日本人エクソームコントロールデータで 1% 未満の minor allele frequency を持ち、フレームシフトまたはナンセンス、または Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、SIFT

(http://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html) で病的と予測されたミスセンス変異を抽出した。さらに劣性遺伝形式として矛盾しない変異、すなわちホモ接合性変異または複合ヘテロ接合性変異の可能性のある変異を持つ候補遺伝子を抽出した。候補遺伝子の変異が 2 人以上の患者で共通し

てみられるかどうかを確認した。

ERCC4 変異を認めた患者に対しては紫外線 UVB に対する The minimal erythema dose (MED) を測定し、また、一例については線維芽細胞培養を行って、An unscheduled DNA synthesis (UDS) assay によってヌクレオチド除去修復能を確認した。

4. 研究成果

ADSCD 家系で同定した T 型電位依存性カルシウムチャンネル CACNA1G のミスセンス変異について、ミスセンス変異が細胞局在、タンパク凝集性については影響を与えないことを確認した。また、構造予測の面からミスセンス変異が、電位依存性チャンネルの電位センサードメインに位置する gating charge residue であることを明らかにし、また剖検例が得られているため、病理学的検討を行って学会報告 (学会報告 2) した。CACNA1G 変異例については我々の研究実施中に他グループから論文報告がなされたため、病理所見を中心に論文を作成中である。

さらに変異ノックインマウスを作成し、症状が再現できることを確認している。引き続き治療モデルの開発を目指して研究を継続中である。

ELOVL4 変異例については東京医科歯科大学との連携により英語論文として報告した (論文 9)。

ARSCD 家系、孤発性 SCD 例の解析においては、2 家系において、これまでにほとんど SCD の原因として報告のない ERCC4 変異例が存在することを明らかにした。一例 (表 1、患者 1) は複合ヘテロ接合性変異 (c.577delT: p.Trp193Glyfs*6 および c.2395C>T: p.Arg799Trp) もう 1 例 (表 1、患者 2) はホモ接合性変異 (c.715G>C: p.Glu239Gln) であった。追加 11 例に解析においてさらに 1 名 ERCC4 のホモ接合性変異 (c.2395C>T: p.Arg799Trp) 例 (表 1、患者 4) を同定し、家族例 (表 1、患者 2) を含めて計 4 例の ERCC4 変異例を同定した。上記変異については全てサンガー法で変異が存在することを確認し、患者 1、2 については両親の DNA 解析で複合ヘテロ接合性変異であることを確認した。臨床症状は前例で類似しており、20~40 代発症の非常に緩徐進行性の小脳性運動失調を認め、全例で舞踏様不随意運動が認められることが特徴であった。また、小脳萎縮に加えて脳室拡大、脳幹萎縮も認められ、軽度の認知機能低下も認められた。

ERCC4 変異は色素性乾皮症 (Xeroderma Pigmentosum: XP) の一病型である complementation group F (XP-F) の原因として知られている。XP は紫外線 (UV) に対する過敏症状を呈し、露出部皮膚の乾燥、色素沈着を呈し、皮膚がんを高率に発生する遺伝疾患として知られている (難病情報センター <http://www.nanbyou.or.jp/entry/217>)。し

かしながら4症例とも皮膚異常に対する自覚がなく、再度の問診を行うことによって4例中3例に小児期に病的な日焼けの経験があることが判明した。また、全例で皮膚露出部の軽度の雀卵斑が認められた。MEDの測定においては4例中3例でMED低下を認め、紫外線過敏が存在することを確認した。患者1では培養線維芽細胞のUDSが低下していることを確認し(図1)、実際に患者が皮膚がんなど、皮膚疾患のリスクにあることを確認した。

表1 ERCC4変異例の特徴

患者 (性別)	1 (female)	2 (female)	3 (female)	4 (male)
変異	c.577del, c.2395C>T	c.2395C>T	c.715G>C	c.2395C>T
血族類	-	-	+	+
発症年齢	30	25	43	28
検査時年齢	38	35	66	66
初発症状	構音障害 不随意運動	構音障害	歩行不安定	歩行不安定 不随意運動
認知機能障害	± MMSE 29/30	□MMSE 30/30	+ MMSE 26/30	+ MMSE 17/30
眼球運動	Saccadic	Smooth	Saccadic	Saccadic
構音障害	+	+	+	+
筋緊張	Hypo	Normal	Hypo	Normal, paratonia+
筋力低下	-	-	-	-
体幹失調	+	+	+	+
四肢失調	+	+	+	+
SARA	9/40	6.5/40	11.5/40	29/40
錐体外路徴候	-	-	-	-
舞踏様不随意運動	+	+	+	+
感覚障害	-	-	振動覚・ 位置覚障害	-
腱反射亢進	+	+	+	+
末梢神経障害	-	-	-	-
膀胱直腸障害	-	-	-	-
病的な日焼け	小児期	小児期	小児期	-
雀卵斑	ごく軽度	軽度	ごく軽度	軽度
皮膚がん	-	-	-	-
MED for UVB (normal ≥ 132 mJ/cm ²)	132	66	66	30
貧血	-	-	-	-
聴覚	-	-	+	+
その他	続発性 無月経	続発性 無月経		てんかん
小脳萎縮	+	+	+	+
大脳萎縮	+	+	+	+
脳幹萎縮	+	+	+	+
脳波	6 Hz phantom +	Normal	NA	Bilateral spikes on photic stimulation

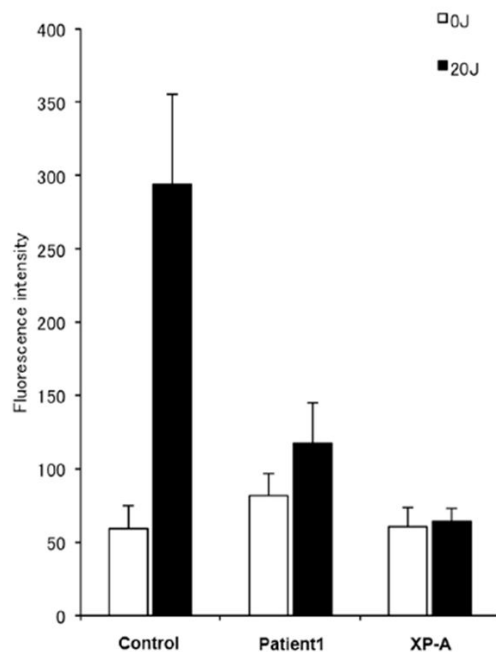
SARA: Scale for the assessment and rating of ataxia

NA: not available.

以上の成果については学会(学会報告1)お

よび英語論文(論文1)として報告した。

図1 患者1の線維芽細胞を用いたUDS assay



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11件)

1. Doi H, Koyano S, Miyatake S, Nakajima S, Nakazawa Y, Kunii M, Katsumoto A, Oda K, Yamaguchi Y, Fukai R, Ikeda S, Kato R, Ogata K, Kubota S, Hayashi N, Takahashi K, Tada M, Tanaka K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake, Saito H, Ogi T, Aihara M, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F. Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutations. J Hum Genet 2018, 63(4):417-423. 査読あり.
2. Tada M, Doi H, Koyano S, Kubota S, Fukai R, Hashiguchi S, Hirama N, Kawamoto Y, Kunii M, Tanaka K, Takahashi K, Ogawa Y, Iwata R, Yamanaka S, Takeuchi H, Tanaka F. Matr3 is a component of neuronal cytoplasmic inclusions of motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Am J Pathol 2018, 188(2):507-514. 査読あり.
3. Joki H, Higashiyama Y, Nakae Y, Kugimoto C, Doi H, Kimura K, Kishida H, Ueda N, Nakano T, Takahashi T, Koyano S, Takeuchi H, Tanaka F. White matter hyperintensities on MRI in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease with dementia, and Alzheimer's disease. J Neurol Sci 2018, 15;385:99-104. 査読あり.
4. Satake T, Yamashita K, Hayashi K, Miyatake S, Tamura-Nakano M, Doi H,

- Furuta Y, Shioi G, Miura E, Takeo YH, Yoshida K, Yahikozawa H, Matsumoto N, Yuzaki M, Suzuki A. MTCL1 plays an essential role in maintaining Purkinje neuron axon initial segment. *EMBO J*. 2017, 36(9):1227-1242. 査読あり .
5. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Doi H, Takumi T, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS acts as an aggregation-dependent modifier of polyglutamine disease model mice. *Sci Rep* 2016, 6:35236. 査読あり .
 6. Nakae Y, Kudo Y, Yamamoto R, Dobashi Y, Kawabata Y, Ikeda S, Yokoyama M, Higashiyama Y, Doi H, Johkura K, Tanaka F. Relationship between cortex and pulvinar abnormalities on diffusion-weighted imaging in status epilepticus. *J Neurol* 2016, 263(1):127-32. 査読あり .
 7. Kunii M, Doi H, Higashiyama Y, Kugimoto C, Ueda N, Hirata J, Tomita-Katsumoto A, Kashikura-Kojima M, Kubota S, Taniguchi M, Murayama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N, Tanaka F. A Japanese case of cerebellar ataxia, spastic paraparesis and deep sensory impairment associated with a novel homozygous *TTC19* mutation. *J Hum Genet* 2015, 60(4):187-91. 査読あり .
 8. Ozaki K, Doi H, Mitsui J, Sato N, Iikuni Y, Majima T, Yamane K, Irioka T, Ishiura H, Doi K, Morishita S, Higashi M, Sekiguchi T, Koyama K, Ueda N, Miura Y, Miyatake S, Matsumoto N, Yokota T, Tanaka F, Tsuji S, Mizusawa H, Ishikawa K. A novel mutation in *ELOVL4* leading to spinocerebellar ataxia (SCA) with the hot cross bun sign but lacking erythrokeratoderma: A broadened spectrum of SCA34. *JAMA Neurol* 2015, 72(7):797-805. 査読あり .
 9. 土井 宏, 田中章景. 筋疾患・神経疾患のジェネティクス 筋萎縮性側索硬化症. *Clin Neurosci* 36: 206-209, 2018. 査読なし .
 10. 土井 宏, 田中章景. 孤発性 ALS の早期診断. *神経内科* 86:9-16, 2017. 査読なし .
 11. 田中章景, 土井 宏, 國井美紗子, 本邦でみられる常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症. *臨床神経* 56:395-399, 2016. 査読なし .

〔学会発表〕(計3件)

1. Doi H, Koyano S, Kunii M, Miyatake S, Nakajima S, Hashiguchi S, Ikeda S,

- Kubota S, Hirama N, Ogawa Y, Takahashi K, Tada M, Tanaka K, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F. Exome analysis of autosomal recessive or sporadic cases of cerebellar ataxia and spastic paraplegia. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, 2017.9.
2. Doi H, Koyano S, Shiina M, Ogata K, Hirashima F, Inoue Y, Hashiguchi S, Kunii M, Kishida K, Yokota T, Mizusawa H, Mitsui J, Tsuji S, Matsumoto N, Ishikawa K, Tanaka F. The clinical and pathological features of autosomal-dominant SCA with *CACNA1G* mutation, , 第57回日本神経学会学術大会口演, 神戸, 2016.5.
 3. Doi H, Yoshida K, Ushiyama M, Tani K, Matsumoto N, Tanaka F. Late-onset spastic ataxia phenotype related to a novel homozygous *DDHD2* mutation. 第56回日本神経学会学術大会ポスター, 新潟, 2015.5.

〔図書〕(計1件)

土井 宏, 田中章景: 前頭側頭葉変性症の療養の手引き, 前頭側頭葉変性症の経過. 平成28年度厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患等政策研究事業「神経変性疾患領域における基盤的調査研究」班研究代表者 中島健二 発行, 祖父江元, 池田 学, 中島健二 監修, 39-42, 2017 .

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし。

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・准教授

研究者番号: 10326035

(2)研究分担者

田中 章景 (TANAKA, Fumiaki)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号: 30378012

(3)研究分担者

田中 健一 (TANAKA, Kenichi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 50722881

(4)研究分担者

國井 美紗子 (KUNII, Misako)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号：80725200

(5)連携研究者

松本 直通 (MATSUMOTO, Naomichi)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：80325638

(6)連携研究者

石川 欽也 (ISHIKAWA, Kinya)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：30313240