

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05085

研究課題名(和文)高精度ゲノム配列解析による神経筋疾患の病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Comprehensive whole genome sequence analysis using a long read sequencer for delineating molecular mechanism of neurological diseases

研究代表者

石浦 浩之 (Ishiura, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40632849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：良性成人型家族性ミオクローヌスてんかんの原因が、SAM12、TNRC6A、RAPGEF2という3遺伝子のイントロンに存在するTTTCA並びにTTTTAリピート伸長変異であることを発見した。複数のロングリードシーケンサーを用いて、リピート伸長変異の全長解読を行った。リピート伸長に着目した解析の有用性を明らかとし、本手法を応用し、神経核内封入体病、白質脳症を伴う眼咽頭型ミオパチー、眼咽頭遠位型ミオパチーにおいて、NOTCH2NLC、LOC642361/NUTM2B-AS1、LRP12にCGGリピート伸長変異を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

良性成人型家族性ミオクローヌスてんかんの原因が、タンパク質に翻訳されない部分に存在するリピート伸長変異であることを発見した。また、3つの別個の遺伝子に存在するリピート伸長変異が同様の疾患を引き起こすという、てんかんにおける新しい機序を発見した。

同様の手法を応用し、神経核内封入体病、白質脳症を伴う眼咽頭型ミオパチー、眼咽頭遠位型ミオパチーについてもリピート伸長変異を新たに同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME), expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats were identified in SAM12, TNRC6A, and RAPGEF2. A new concept of repeat motif-phenotype correlation was proposed. The finding strongly indicates the gain-of-function of the expanded repeats is pathomechanism of BAFME.

The study also indicate the importance of genetic analysis focusing on repeat expansions. By applying this strategy to neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngeal myopathy with leukoencephalopathy, and oculopharyngodistal myopathy, CGG repeat expansions were identified in NOTCH2NLC, LOC642361/NUTM2B-AS1, LRP12, respectively.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：リピート伸長変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん (benign adult familial myoclonus epilepsy, BAFME) は手指のミオクローヌスと全般性てんかんを主徴とする常染色体優性遺伝疾患である。本邦からその疾患概念が確立され(稲月ら.精神経誌 1990、Ikeda et al. Neurology 1990、Yasuda et al. Kawasaki Med J 1991)、本邦において多くの症例が報告されている。

本邦から報告された BAFME 家系については、第 8 番染色体への連鎖が示されている(Plaster et al. Neurology 1999, Mikami et al. Am J Hum Genet 1999, 鈴木ら.新潟医学会誌 2002、Mori et al. J Hum Genet 2011)。Mori らは、候補領域内のエクソンについて塩基配列解析を行っているものの、現在まで原因遺伝子は明らかになっていない。

申請者はこれまで 4 家系 18 名の検体から連鎖解析を行い、従来指摘されていた第 8 番染色体への連鎖を確認した(最大 cumulative LOD スコア=3.1)。1 名の全ゲノム配列解析では、候補領域内に翻訳領域の変異は先行研究(Mori et al.)と同様見いだすことができなかった。候補領域内の非翻訳領域に、リピート伸長変異などの変異が存在するという可能性が示唆される。本研究では、BAFME の原因変異を同定し、その病原性について検討するとともに、てんかんを引き起こす病態機序について明らかにする。また、得られた手法を、原因未同定の神経筋変性疾患にも応用する。

2. 研究の目的

良性成人型家族性ミオクローヌスてんかんの分子病態の解明

3. 研究の方法

(1) BAFME1 型の原因変異の同定

候補領域をさらに狭めるために、6 家系について高密度 SNP タイピングを行い、疾患ハプロタイプを構築し、ハプロタイプ解析を行った。最小候補領域内に、全ゲノム配列解析で示唆された変異を、Sanger 法を用いて確認を行った。

伸長リピートについては、repeat-primed PCR 法を用いて確認を行った。リピート長の確認のために、伸長リピート近傍の unique な配列をプローブとして設計し、genomic DNA を用いてサザンブロットを行った。収集した多数例について、リピート長と発症年齢について検討を行った。

(2) BAFME1 型の伸長リピートのロングリードシーケンサーによる配列決定

通常の BAFME1 型症例と、リピート構造の異なった別の BAFME1 型症例について、当該領域の BAC クローンを取得して PacBio シーケンサーでロングリード解析を行った。また、両サンプルについて、nanopore シーケンサーを用いて 1d² 法全ゲノム配列解析を行った。

(3) *SAMD12* に変異を有さない BAFME 家系における 5 塩基リピート伸長変異探索

SAMD12 に変異を有さない 2 家系については、リピート配列(TTTCA)からなるオリゴヌクレオチドプローブを用いたサザンブロットを行い、TTTCA リピート伸長配列の存在について検討を行った。続いて、ショートリード全ゲノム配列解析を行い、TTTCA リピート伸長配列を探索した。

(4) 他疾患における、リピート伸長変異に着目した変異同定

神経核内封入体病は、白質脳症、末梢神経障害などを主徴とする常染色体優性遺伝疾患である。その臨床像が脆弱 X 関連振戦・失調症候群に類似していること、脆弱 X 関連振戦・失調症候群は FMR1 の CGG リピート伸長によって生じることから、同様の CGG リピート伸長変異が別

の遺伝子に存在するのではないかと考えられた。白質脳症を伴う眼咽頭型ミオパチーは、神経核内封入体病と類似した MRI における白質病変を呈すること、眼咽頭遠位型ミオパチーは白質脳症を伴う眼咽頭型ミオパチーと筋罹患分布が類似していることなどから、やはり CGG リピート伸長変異の可能性を考えて全ゲノム配列解析を行い、TRhist を用いてリピート伸長変異について探索を行った。

4. 研究成果

(1) BAFME1 型の原因の同定

6 家系についてハプロタイプ解析を行うことで、候補領域を 4.2 Mb から 134 kb に絞りこむことが出来た。この中にはエクソン内の変異を認めなかったため、イントロン変異について Sanger シーケンスで確認をしていたところ、*SAMD12* のイントロン 4 に存在する TTTCA 並びに TTTTA リピート伸長変異を同定した。本変異は、repeat-primed PCR 法を用いた解析で 51 家系中 48 家系で陽性であることが確認された。リピート長は 2.2 kb~18.4 kb であることがサザンプロットで確認され、てんかんの発症年齢と有意に逆相関することが明らかとなった。対照者では TTTTA リピート伸長のみ認めることはあるが、TTTCA リピート伸長変異を認めたものはなく、TTTCA リピートが病態に強く関与しているものと考えられた。

(2) BAFME1 型の伸長リピートのロングリードシーケンサーによる配列決定

BAC クローンの PacBio シーケンスと、nanopore シーケンサーによる全ゲノム配列解析により、通常は (TTTTA)_{exp}(TTTCA)_{exp} の配列を呈していることが確認された。Repeat-primed PCR で TTTCA リピート伸長変異が確認出来なかった 1 家系では、(TTTTA)_{exp}(TTTCA)_{exp}(TTTTA)_{exp} の構造を呈していることが明らかとなり、やはり TTTCA リピート伸長変異の存在が明らかとなった。2 つの変異の周囲のハプロタイプは共通しており、共通祖先の存在が示唆された。

(3) *SAMD12* に変異を有さない BAFME 家系における 5 塩基リピート伸長変異探索

残り 2 家系では、*SAMD12* にリピート伸長変異を認めなかった。同様のリピート伸長変異が他の遺伝子に存在する可能性を考えて、リピート配列 DIG-(TTTCA)₉ をプローブとしてサザンプロットを行ったところ、2 家系ではどちらもシグナルが認められ、ゲノム上のどこかに TTTCA リピート伸長変異が存在することが示唆された。全ゲノム配列解析と TRhist を用いて解析したところ、1 家系では *TNRC6A* のイントロンに、最後の家系では *RAPGEF2* のイントロンに TTTCA ならびに TTTTA リピート伸長変異が存在することが明らかとなった。対照者ではやはり、TTTTA リピート伸長のみを呈することはあったが、TTTCA リピート伸長を呈した例はいなかった。これまでの研究から、リピートモチーフと表現型の間に強い関連があると考えられた。

(4) 他疾患における、リピート伸長変異に着目した変異同定

本手法を用いて、神経核内封入体病、白質脳症を伴う眼咽頭型ミオパチー、眼咽頭遠位型ミオパチーにおいて CGG リピート伸長変異を探索したところ、それぞれ *NOTCH2NLC*、*LOC642361/NUTM2B-AS1*、*LRP12* に CGG リピート伸長変異を見いだした。大変興味深いことに、神経核内封入体病、眼咽頭遠位型ミオパチーは孤発例も多いが、家族例と同様の変異が存在することが明らかとなった。

従来別個の疾患と考えられてきたこれらの疾患には、臨床的にオーバーラップする点があり、同一のリピートモチーフの伸長配列が存在する。ここにもリピートモチーフと表現型の間に強い関連があり、このことはこれらの疾患に共通の病態が存在することが強く示唆するものと考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishiura H et al.	4. 巻 50
2. 論文標題 Expansions of intronic TTCA and TTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 581 ~ 590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-018-0067-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cen Zhidong, Jiang Zhengwen, Chen You, Zheng Xiaosheng, Xie Fei, Yang Xiaodong, Lu Xingjiao, Ouyang Zhiyuan, Wu Hongwei, Chen Si, Yin Houmin, Qiu Xia, Wang Shuang, Ding Meiping, Tang Yelei, Yu Feng, Li Caihua, Wang Tao, Ishiura Hiroyuki, Tsuji Shoji, Jiao Chuan, Liu Chunyu, Xiao Jianfeng, Luo Wei	4. 巻 141
2. 論文標題 Intronic pentanucleotide TTCA repeat insertion in the SAMD12 gene causes familial cortical myoclonic tremor with epilepsy type 1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 2280 ~ 2288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awy160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamaguchi Nanaka, Mano Tatsuo, Ohtomo Ryo, Ishiura Hiroyuki, Almansour M. Asem, Mori Harushi, Kanda Junko, Shiota Yuichiro, Taira Kenichiro, Morikawa Teppei, Ikemura Masako, Yanagi Yasuo, Murayama Shigeo, Shimizu Jun, Sakurai Yasuhisa, Tsuji Shoji, Iwata Atsushi	4. 巻 57
2. 論文標題 An Autopsy Case of Familial Neuronal Intranuclear Inclusion Disease with Dementia and Neuropathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3459 ~ 3462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1141-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Corbett MA, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Intronic ATTC repeat expansions in STARD7 in familial adult myoclonic epilepsy linked to chromosome 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12671-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Florian RT, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Unstable TTTTA/TTTCA expansions in MARCH6 are associated with Familial Adult Myoclonic Epilepsy type 3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12763-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishiura H, et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1222 ~ 1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-019-0458-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 石浦 浩之
2. 発表標題 ロングリードシーケンサーを用いた遺伝性疾患の原因遺伝子の解明
3. 学会等名 ゲノムテクノロジー第164委員会 第56回研究会「ロングリード・シーケンシングの医学応用・技術展望・情報解析」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石浦 浩之
2. 発表標題 良性成人型家族性ミオクローヌスてんかんの分子遺伝学的研究
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石浦 浩之
2. 発表標題 Pentanucleotide repeat expansion mutations in benign adult familial myoclonic epilepsy
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Fujiyama A, Kakita A, Qu W, Ichikawa K, Shibata S, Mitsue A, Ichikawa Y, Takahashi Y, Abe K, Koike R, Yasuda T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S.
2. 発表標題 Expansions of intronic TTTC A and TTTTA repeats in three genes cause benign adult familial myoclonic epilepsy
3. 学会等名 American Society of Human Genetics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiura H, Doi K, Mitsui J, Yoshimura J, Matsukawa MK, Fujiyama A, Kakita A, Qu W, Ichikawa K, Shibata S, Mitsue A, Abe K, Koike R, Yasuda T, Sano A, Ikeda A, Goto J, Morishita S, Tsuji S.
2. 発表標題 Expansions of intronic TTTC A and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy
3. 学会等名 5th RNA metabolism in Neurological Disease Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiura H.
2. 発表標題 New genetics of myoclonus epilepsy
3. 学会等名 Joint MSN-JSN symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiura H.
2. 発表標題 Genetics of non-coding repeat expansion diseases.
3. 学会等名 2018 NTU-U Tokyo Joint Conference (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsukawa M et al.
2. 発表標題 Genetic anticipation and clinical features of 32 patients with Benign Adult Familial Myoclonic Epilepsy (BAFME).
3. 学会等名 The XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishiura H et al.
2. 発表標題 Linkage and haplotype analyses of families with benign adult familial myoclonic epilepsy.
3. 学会等名 The XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsukawa M et al.
2. 発表標題 Genetic anticipation of 32 patients with benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME)
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishiura H et al.
2. 発表標題 Linkage analysis of benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME) families suggests further genetic heterogeneity
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishiura H et al.
2. 発表標題 Linkage and haplotype analyses of families with benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME)
3. 学会等名 American Society of Human Genetics 2017 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 DIAGNOSTIC METHOD OF BENIGN ADULT TYPE FAMILIAL MYOCLONUS EPILEPSY	発明者 石浦浩之、辻省次	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、62/628,324	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 DIAGNOSTIC METHOD OF BENIGN ADULT TYPE FAMILIAL MYOCLONUS EPILEPSY	発明者 石浦浩之、辻省次	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、62/628,324	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>てんかんの新しい発症機構の解明 繰り返し配列の異常伸長によっててんかんが生じることを発見 https://www.amed.go.jp/news/release_20180306-04.html てんかんに認められたイントロンにおけるリピートの伸長変異 http://first.lifesciencedb.jp/archives/18095 てんかんの新しい発症機構の解明 繰り返し配列の異常伸長によっててんかんが生じることを発見 http://www.h.u-tokyo.ac.jp/vcms_lf/release_20180306.pdf てんかんの新しい発症機構の解明 繰り返し配列の異常伸長によっててんかんが生じることを発見 http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press_archives/20180306.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----