

令和元年6月5日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06994

研究課題名(和文)体細胞モザイク変異を原因とする脳奇形の遺伝的原因の解明

研究課題名(英文)Elucidation of genetic basis for the brain malformations caused by somatic mosaic mutations.

研究代表者

藤田 京志(Fujita, Atsushi)

横浜市立大学・医学研究科・特任助手

研究者番号：20805113

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文): 難治性てんかんを発症する視床下部過誤腫または限局性皮質異形成の原因となる変異を検出し新規の原因遺伝子を同定することを目的に解析を行なった。

視床下部過誤腫においては次世代シーケンシングとマイクロアレイによる詳細な解析により、新規の疾患原因遺伝子を同定した。これらは視床下部過誤腫の原因としてすでに知られている遺伝子と同様にソニックヘッジホッグシグナリングや線毛に関連した遺伝子(KIAA0556、DYNC2H1)であったが、RAS/MAPKシグナリングに関連した遺伝子であるPTPN11も認められた。

限局性皮質異形成は次世代シーケンシングを用いて解析を行っているが新規の疾患原因遺伝子は同定されていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部過誤腫の発生の原因遺伝子としてソニックヘッジホッグシグナリングや線毛に関連した遺伝子が知られているが、本研究により同定された3つの遺伝子のうち2つはソニックヘッジホッグシグナリングや線毛に関連した遺伝子であった。残りの1つはRAS/MAPKシグナリングに関連した遺伝子であり、視床下部過誤腫の新しい発生機序の可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文): Hypothalamic hamartoma (HH) and focal cortical dysplasia (FCD) are associated with intractable epileptic seizures. In order to identify new causal genes for HH and FCD, we performed comprehensive and precise genetic analyses for the patients. We identified three new causal genes of HH using next generation sequencing and SNP array. Two of them, KIAA0556, DYNC2H1, are associated with Sonic Hedgehog signaling and cilia as known causal genes in HH, while somatic mutations of PTPN11 which are belonging to RAS/MAPK signaling were also identified and it might suggest a new mechanism involving development of HH. In FCD, we have not identified any new causal genes using next generation sequencing.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：体細胞変異 単一遺伝子疾患 ディープシーケンシング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 対象疾患：体細胞変異により発症する難治性てんかん

視床下部過誤腫 (Hypothalamic hamartoma, HH) は胎生期の発生異常による脳の奇形で薬物難治性てんかんや笑い発作などを認める疾患である。20万人に1人の有病率であると推測されている。外表奇形などを伴わない非症候性の場合には過誤腫組織の体細胞変異が原因として報告されており、ソニックヘッジホッグ (SHH) シグナルパスウェイに関連した疾患責任遺伝子が同定されている。これまでに本疾患では SHH 関連遺伝子に着目し解析がされているが、他臓器の過誤腫には PI3K/AKT3/mTOR パスウェイ関連遺伝子が原因として報告され、同パスウェイの関与の可能性も高い。

限局性皮質異形成 (Focal cortical dysplasia, FCD) は異形細胞や皮質の層構造の異常による局所の大脳皮質形成異常であり、薬物難治性てんかんの原因となる。近年、脳組織における PI3K/AKT3/mTOR パスウェイ関連遺伝子の体細胞変異が FCD の原因として報告されている。

#### (2) 次世代シーケンスによる体細胞変異検出

病変部組織のすべての細胞が変異を有していない可能性が高いため、DNA 中の変異アレル頻度が低下してしまい、真の変異とアーチファクトの区別が困難な場合がある。そのため、正確性を向上させるために生殖細胞系列変異検出の場合よりも読み取り深度を厚くして解析を行い、可能な限りアーチファクトを除外する。しかし、それでも数十から数百個の体細胞バリエーション候補が検出されるため、症例間で検出されたバリエーションを比較検討することが重要である。

### 2. 研究の目的

当研究室に集積された HH と FCD 症例において原因となる変異の同定率は約 25% で、残りの 75% の症例は変異を特定できていない。本研究では両疾患の変異未同定、新規症例を対象に変異アレル頻度 0.5% 以上の低頻度体細胞変異、あるいは染色体異常を含めた網羅的かつ詳細な解析を行い新規疾患責任遺伝子の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 分子バーコードを用いたターゲットキャプチャー

既知の当該疾患原因遺伝子と PI3K/AKT3/mTOR パスウェイ関連遺伝子を含む 56 遺伝子をキャプチャーする Haloplex HS (Agilent) を用いた。本法は PCR 実施前に 100 万種類の分子バーコードをランダムに DNA 断片へ付加し、データ解析時に分子バーコードから同じ DNA 分子由来のリードであることを識別して PCR・シーケンスエラーを除去する。Miseq (Illumina) でシーケンスを行い、読み取り深度は 3,000× を目標に実施した。解析は専用ソフトの Surecall (Agilent) を使用し、変異アレル頻度 0.5% までを検出した。検出されるバリエーションが少ないため、血液由来 DNA は用いずに脳組織由来 DNA のみで実施し、変異検証の際に患者血液と比較する。新規症例は先に Haloplex HS で解析を行った。

#### (2) 全エクソームシーケンス解析

脳組織特異的に認められる体細胞変異を網羅的に検出するため、患者脳組織と血液のペアサンプルを使用して解析を実施した。エクソームキャプチャーは Sureselect Human All Exon kit (Agilent) を用いて行い、Hiseq 2000 または 2500 (Illumina) で次世代シーケンスを行った。読み取り深度は生殖細胞系列変異検出の場合 (60-100×) よりも厚い、150-200× を目標に施行した。データの解析は当研究室の全エクソーム解析フローに加えて、2 つの体細胞変異検出ソフト Mutect2、Varscan2 (Koboldt et al. 2012) を用いて変異アレル頻度 5% までの低頻度体細胞変異を検出し、2 つのソフトで共通する真陽性と考えられるバリエーションの遺伝子について症例間で比較を行い、新規疾患責任遺伝子の同定を試みた。

#### (3) 変異の検証

候補となる体細胞変異が認められた場合には当該変異を含む PCR 産物と Miseq を用いてディープシーケンスで変異の検証を行った。サンプルは健常コントロール血液、患者血液と脳病変由来の DNA を使用した。健常コントロールは塩基配列に依存したアーチファクトの除外や、患者血液に脳組織よりも低頻度にモザイク変異が存在する場合の比較検討のために使用した。

#### (4) マイクロアレイ解析

体細胞変異が検出されない場合には病変部特異的な染色体異常の可能性を考慮し、体細胞モザイクの遺伝子コピー数変化 [Copy number variation (CNV)] とヘテロ接合性の消失 [Loss of heterozygosity (LOH)] 領域の検出を行った。解析は病変部の脳組織由来 DNA を用いて SNP アレイの Cytoscan HD を使用し Chromosome Analysis Suite (ChAS) ソフトウェア (共に

Affymetrix) で行った。

#### (5) 体細胞 LOH の検証

マイクロアレイによって LOH が検出された場合には病変部組織特異的な体細胞 LOH が生殖細胞系列の LOH かどうかの検証を 2 つの方法で行った。1 つ目は血液と脳組織由来 DNA の全エクソームシーケンズデータを用いてホモ接合性バリエーションが連続した領域を検出するソフトである Homozygosity mapper による解析、2 つ目は血液と脳組織由来 DNA を使用し当該染色体のマイクロサテライトマーカーを複数用いて検証を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 視床下部過誤腫 (HH) の新規疾患責任遺伝子の同定

原因となる変異が未同定の症例または新規症例を含めた 38 症例を対象に解析を行った。すでに全エクソームシーケンズで解析が行われている症例に対してはターゲットキャプチャーを実施し、新規症例に対しては始めにターゲットキャプチャーを実施して、疾患の原因となる変異が検出されない場合には全エクソームシーケンズを実施した。どちらの方法でも変異が検出されない場合にはマイクロアレイによる解析を行った。全エクソームシーケンズの平均読み取り深度は血液のみ取得できた症例では  $95 \times$  (51–210 $\times$ )、脳組織由来 DNA を取得できた症例は体細胞変異検出を行うため血液のみの症例より厚く  $148 \times$  (75–210 $\times$ ) であった。また、ターゲットキャプチャーでは同一の分子バーコードのシーケンズリードでコンセンサスリードを作成した後の平均読み取り深度は  $1057 \times$  (613–1561 $\times$ ) であった。

解析の結果、HH で報告されていなかった新規疾患責任遺伝子 *KIAA0556*、*PTPN11*、*DYNC2H1* を同定した(図 1)。HH の原因としてすでに報告されている *GLI3*、*OFD1*、*CPLANE1* と近年報告された *PRKACA* の変異も他の HH 症例に認めた。これら 4 遺伝子はソニックヘッジホッグ (SHH) シグナルパスウェイや線毛に関連していることが知られている。新規疾患責任遺伝子の *KIAA0556* は線毛に関連した多発奇形症候群である Joubert 症候群患者の 2 家系において生殖細胞系列変異が報告されており(図 1A)、本研究においても HH と Joubert 症候群の臨床症状を有する患者に病原性が高いと予測される生殖細胞系列変異が検出された。すでに報告されている *KIAA0556* 変異を有する Joubert 症候群患者において HH は認められていないが、症例数が少ないため今後の患者の集積により HH を有する患者が認められる可能性が高いと考えられる。

*PTPN11* は 2 名の HH 患者の病変部脳組織に体細胞変異が検出された。それぞれの変異は異なっているが、どちらも血液腫瘍で病原性のある変異として報告されている。当該遺伝子変異は SHH シグナルパスウェイにおいては線毛異常の報告が少数あるが、RAS/MAPK シグナリングにおいて機能獲得型の変異として広く知られており、HH の新しい発生機序が示唆される。

*DYNC2H1* は生殖細胞系列変異と体細胞変異または体細胞 LOH の 2-hit が 2 名に認められた(図 1、2)。*DYNC2H1* は線毛においてモータータンパク質として働くダイニンをコードしており、ロックアウトにより、SHH シグナリングの活性の低下が引き起こされることがすでに知られている。また、当該遺伝子は常染色体劣性遺伝性の生殖細胞系列変異が Short-rib thoracic dysplasia type 3 (OMIM: 613091) の原因として知られているが、これらの症例のうち HH を認めた症例は報告されていない。Short-rib thoracic dysplasia type 3 を認める患者に検出された生殖細胞系列変異はタンパク質が短縮する変異(フレームシフト変異、ナンセンス変異、スプライスサイト変異)を 2 変異有していないが、HH においては体細胞と

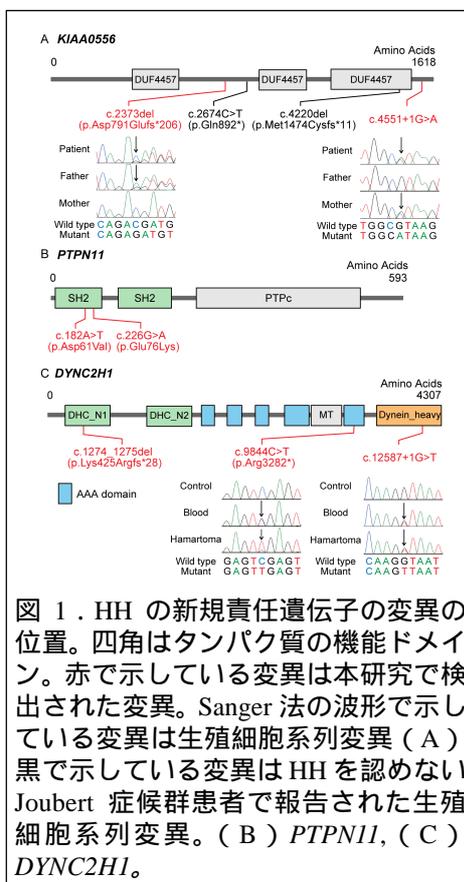


図 1. HH の新規責任遺伝子の変異の位置。四角はタンパク質の機能ドメイン。赤で示している変異は本研究で検出された変異。Sanger 法の波形で示している変異は生殖細胞系列変異 (A) 黒で示している変異は HH を認めない Joubert 症候群患者で報告された生殖細胞系列変異。(B) *PTPN11*、(C) *DYNC2H1*。

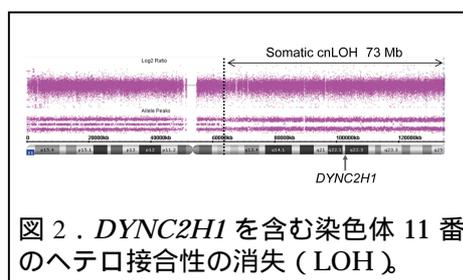


図 2. *DYNC2H1* を含む染色体 11 番のヘテロ接合性の消失 (LOH)。

生殖細胞系列の2変異ともにタンパク質短縮型変異を認めている。この違いによって、HHの発生に差が出てくる可能性が示唆された。また、本研究では生殖細胞系列変異と体細胞変異の2-hitが認められた。限局性皮質異形成や片側巨脳症では生殖細胞系列変異と体細胞変異との2-hitの変異が原因となることが報告されているが、HHにおいては本症例が初めての報告となる。

## (2) 限局性皮質異形成 (FCD) の新規責任遺伝子探索

FCDでは変異が未同定または新規症例を含めた44症例を対象に解析を行った。HHと同様に全エクソームシーケンスを実施し、変異が検出されていない症例においては脳組織由来DNAとターゲットキャプチャーを用いて、読み取り深度を増やした高感度な解析を行い、新規症例においてはターゲットキャプチャーを始めに実施した。原因となる変異の同定率は30%程度であり、現時点では新規責任遺伝子の候補は認めていない。CNVの検索は実施できなかったため、CNVの解析により新規責任遺伝子の同定の可能性が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- (1) [Fujita, A.](#), Higashijima, T., Shirozu, H., Masuda, H., Sonoda, M., Tohyama, J., Kato, M., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Mitsuhashi, S., Mizuguchi, T., Takata, A., Miyatake, S., Miyake, N., Fukuda, M., Kameyama, S., Saitsu, H. & Matsumoto, N. Pathogenic variants of DYNC2H1, KIAA0556, and PTPN11 associated with hypothalamic hamartoma. *Neurology*, (2019), 査読有, in press
- (2) Iwasawa, S., Yanagi, K., Kikuchi, A., Kobayashi, Y., Haginoya, K., Matsumoto, H., Kurosawa, K., Ochiai, M., Sakai, Y., [Fujita, A.](#), Miyake, N., Niihori, T., Shiota, M., Funayama, R., Nonoyama, S., Ohga, S., Kawame, H., Nakayama, K., Aoki, Y., Matsumoto, N., Kaname, T., Matsubara, Y., Shoji, W. & Kure, S. Recurrent de novo MAPK8IP3 variants cause neurological phenotypes. *Ann Neurol* 85, (2019) 927-933, 10.1002/ana.25481. 査読有
- (3) Saida, K., Silva, S., Solar, B., [Fujita, A.](#), Hamanaka, K., Mitsuhashi, S., Koshimizu, E., Mizuguchi, T., Miyatake, S., Takata, A., Miyake, N. & Matsumoto, N. SOFT syndrome in a patient from Chile. *Am J Med Genet A* 179, (2019) 338-340, 10.1002/ajmg.a.61015. 査読有
- (4) Hamanaka, K., Takata, A., Uchiyama, Y., Miyatake, S., Miyake, N., Mitsuhashi, S., Iwama, K., [Fujita, A.](#), Imagawa, E., Alkanaq, A.N., Koshimizu, E., Azuma, Y., Nakashima, M., Mizuguchi, T., Saitsu, H., Wada, Y., Minami, S., Katoh-Fukui, Y., Masunaga, Y., Fukami, M., Hasegawa, T., Ogata, T. & Matsumoto, N. MYRF haploinsufficiency causes 46,XY and 46,XX disorders of sex development: bioinformatics consideration. *Hum Mol Genet*, (2019) 10.1093/hmg/ddz066. 査読有
- (5) Hamanaka, K., Sugawara, Y., Shimoji, T., Nordtveit, T.I., Kato, M., Nakashima, M., Saitsu, H., Suzuki, T., Yamakawa, K., Aukrust, I., Houge, G., Mitsuhashi, S., Takata, A., Iwama, K., Alkanaq, A., [Fujita, A.](#), Imagawa, E., Mizuguchi, T., Miyake, N., Miyatake, S. & Matsumoto, N. De novo truncating variants in PHF21A cause intellectual disability and craniofacial anomalies. *Eur J Hum Genet* 27, (2019) 378-383, 10.1038/s41431-018-0289-x. 査読有
- (6) Uchiyama, Y., Yanagisawa, K., Kunishima, S., Shiina, M., Ogawa, Y., Nakashima, M., Hirato, J., Imagawa, E., [Fujita, A.](#), Hamanaka, K., Miyatake, S., Mitsuhashi, S., Takata, A., Miyake, N., Ogata, K., Handa, H., Matsumoto, N. & Mizuguchi, T. A novel CYCS mutation in the alpha-helix of the CYCS C-terminal domain causes non-syndromic thrombocytopenia. *Clin Genet* 94, (2018) 548-553, 10.1111/cge.13423. 査読有
- (7) Takeguchi, R., Haginoya, K., Uchiyama, Y., [Fujita, A.](#), Nagura, M., Takeshita, E., Inui, T., Okubo, Y., Sato, R., Miyabayashi, T., Togashi, N., Saito, T., Nakagawa, E., Sugai, K., Nakashima, M., Saitsu, H., Matsumoto, N. & Sasaki, M. Two Japanese cases of epileptic encephalopathy associated with an FGF12 mutation. *Brain Dev* 40, (2018) 728-732, 10.1016/j.braindev.2018.04.002. 査読有

- (8) Suzuki, T., Behnam, M., Ronasian, F., Salehi, M., Shiina, M., Koshimizu, E., [Fujita, A.](#), Sekiguchi, F., Miyatake, S., Mizuguchi, T., Nakashima, M., Ogata, K., Takeda, S., Matsumoto, N. & Miyake, N. A homozygous NOP14 variant is likely to cause recurrent pregnancy loss. *J Hum Genet* 63, (2018) 425-430, 10.1038/s10038-018-0410-6. 査読有
- (9) Miyatake, S., Schneeberger, S., Koyama, N., Yokochi, K., Ohmura, K., Shiina, M., Mori, H., Koshimizu, E., Imagawa, E., Uchiyama, Y., Mitsushashi, S., Frith, M.C., [Fujita, A.](#), Satoh, M., Taguri, M., Tomono, Y., Takahashi, K., Doi, H., Takeuchi, H., Nakashima, M., Mizuguchi, T., Takata, A., Miyake, N., Saito, H., Tanaka, F., Ogata, K., Hennessey, T. & Matsumoto, N. Biallelic COLGALT1 variants are associated with cerebral small vessel disease. *Ann Neurol* 84, (2018) 843-853, 10.1002/ana.25367. 査読有
- (10) Hamanaka, K., Miyatake, S., Zerem, A., Lev, D., Blumkin, L., Yokochi, K., [Fujita, A.](#), Imagawa, E., Iwama, K., Nakashima, M., Mitsushashi, S., Mizuguchi, T., Takata, A., Miyake, N., Saito, H., van der Knaap, M.S., Lerman-Sagie, T. & Matsumoto, N. Expanding the phenotype of IBA57 mutations: related leukodystrophy can remain asymptomatic. *J Hum Genet* 63, (2018) 1223-1229, 10.1038/s10038-018-0516-x. 査読有
- (11) Hamanaka, K., Miyatake, S., Koshimizu, E., Tsurusaki, Y., Mitsushashi, S., Iwama, K., Alkanaq, A.N., [Fujita, A.](#), Imagawa, E., Uchiyama, Y., Tawara, N., Ando, Y., Misumi, Y., Okubo, M., Nakashima, M., Mizuguchi, T., Takata, A., Miyake, N., Saito, H., Iida, A., Nishino, I. & Matsumoto, N. RNA sequencing solved the most common but unrecognized NEB pathogenic variant in Japanese nemaline myopathy. *Genet Med*, (2018) 10.1038/s41436-018-0360-6. 査読有
- (12) Fukuda, H., Imagawa, E., Hamanaka, K., [Fujita, A.](#), Mitsushashi, S., Miyatake, S., Mizuguchi, T., Takata, A., Miyake, N., Kramer, U., Matsumoto, N. & Fattal-Valevski, A. A novel missense SNAP25b mutation in two affected siblings from an Israeli family showing seizures and cerebellar ataxia. *J Hum Genet* 63, (2018) 673-676, 10.1038/s10038-018-0421-3. 査読有
- (13) [Fujita, A.](#),\* Tsukaguchi, H.,\* Koshimizu, E.,\* Nakazato, H., Itoh, K., Kuraoka, S., Komohara, Y., Shiina, M., Nakamura, S., Kitajima, M., Tsurusaki, Y., Miyatake, S., Ogata, K., Iijima, K., Matsumoto, N. & Miyake, N. Homozygous splicing mutation in NUP133 causes Galloway-Mowat syndrome. *Ann Neurol* 84, (2018) 814-828, 10.1002/ana.25370. (\*These authors equally contributed to this work.) 査読有
- (14) Enya, T., Okamoto, N., Iba, Y., Miyazawa, T., Okada, M., Ida, S., Naruto, T., Imoto, I., [Fujita, A.](#), Miyake, N., Matsumoto, N., Sugimoto, K. & Takemura, T. Three patients with Schaaf-Yang syndrome exhibiting arthrogyrosis and endocrinological abnormalities. *Am J Med Genet A* 176, (2018) 707-711, 10.1002/ajmg.a.38606. 査読有
- (15) Cho, K., Yamada, M., Agematsu, K., Kanegane, H., Miyake, N., Ueki, M., Akimoto, T., Kobayashi, N., Ikemoto, S., Tanino, M., [Fujita, A.](#), Hayasaka, I., Miyamoto, S., Tanaka-Kubota, M., Nakata, K., Shiina, M., Ogata, K., Minakami, H., Matsumoto, N. & Ariga, T. Heterozygous Mutations in OAS1 Cause Infantile-Onset Pulmonary Alveolar Proteinosis with Hypogammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 102, (2018) 480-486, 10.1016/j.ajhg.2018.01.019. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 藤田 京志、Different X-linked *KDM5C* mutations in affected male siblings、日本人類遺伝学会第 62 回大会、2017
- (2) 藤田 京志、Comprehensive genetic analysis of somatic and germline mutations in individuals with hypothalamic hamartoma、日本人類遺伝学会第 63 回大会、2018