

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16921

研究課題名(和文) 早期発症型てんかんの新規責任遺伝子同定および発症機序の解明

研究課題名(英文) Identification of a novel gene for early-onset epilepsy and elucidation of its pathogenic mechanism

研究代表者

今村 江里子(輿水江里子)(IMAMURA (KOSHIMIZU), Eriko)

横浜市立大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：80637877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：発達性およびてんかん性脳症を引き起こす患者6,045例の全エクソーム解析データを用いて遺伝子変異を探索した。その結果、5例から新規遺伝子であるSEMA6Bにde novoのフレームシフト変異を検出した。これらの遺伝子変異はタンパク質短縮型となり、全てナンセンス変異依存性メッセンジャーRNA分解を受けない最終エクソンに存在した。ゼブラフィッシュを用いたin vivoモデルにより変異の効果を検証した結果、神経細胞の異常を認め、ヒトのミオクローヌステんかん様行動が観察された。以上より、SEMA6B遺伝子変異によって異常な短縮型タンパク質が産生されることが、本疾患の原因であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかんの発症はイオンチャンネルに関わる遺伝子の異常が主な原因とされているが、本研究により新たに同定されたSEMA6B遺伝子は、神経軸索ガイダンスの伸長抑制作用を持つ。SEMA6B遺伝子を新規責任遺伝子として同定したことで、てんかんを引き起こす新たな発症経路が中枢神経系の発達と関連していることを明らかにした。本研究の成果は、早期発症型てんかんの分子診断や病態メカニズムの解明、治療薬の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：In order to identify for novel candidate genes causing developmental and epileptic encephalopathies, we searched for genetic mutations using whole-exome sequencing data of 6,045 patients. As a result, we detected de novo mutations in SEMA6B, a novel gene, in five patients. These mutations resulted in a truncated protein and were all located in the last exon, which was prevented nonsense mediated mRNA decay. The effect of the mutations was verified by an in vivo model system using zebrafish, which mimicked neuronal abnormalities and myoclonus epilepsy-like behavior in humans. Thus, we hypothesized that the production of an abnormal truncated form of SEMA6B protein by the gene mutation is the cause of this disease.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：進行性ミオクローヌステんかん 全エクソームシーケンス ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

乳幼児期に発症する早期発症型てんかんは難治性に移行することが多く、乳幼児の脳神経系の発達に重大な影響を及ぼす。早期発症型てんかんは遺伝的要因によって発症することが強く示唆され、責任遺伝子が明らかになりつつある。申請者らは、これまでに42症例から病因となる遺伝子変異の全エクソーム解析を実施し、責任遺伝子を探索した結果、てんかん発作と重度の知的障害を呈した1家系から新規候補遺伝子となる *SEMA6B* を単離した。さらに、当研究室の診断未確定症例からの追加で、計3家系から異常なトランケート型タンパク質の発現が予想される3種類のフレームシフト変異を見出した。*SEMA6B* は細胞間の情報伝達に関わるタンパク質である膜貫通型セマフォリンの1つで、中枢神経系の発達に関与すると考えられるが、これまで疾患責任遺伝子としての報告はない。*SEMA6B* が関わるてんかん発症の分子メカニズムは不明であり、原因の究明が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、*SEMA6B* を早期発症型てんかんの新規責任遺伝子として同定するために、さらなる症例の収集に加え、培養細胞による *in vitro* 解析および *in vivo* モデルによる表現型の検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *SEMA6B* 遺伝子変異を有する症例の追加検討

公共の発達障害エクソームデータベース (Deciphering Developmental Disorders (DDD) study) に登録された、てんかんを呈する4,293家系のデータを検証し、*SEMA6B* 遺伝子変異を検索した。

てんかん症例および関連疾患症例(1,752例)に対し全エクソーム解析を施行し、*SEMA6B* 遺伝子変異の探索を行った。

(2) *SEMA6B* 遺伝子変異がプレキシン受容体に及ぼす影響の評価

SEMA6B はセマフォリンファミリーに属する膜結合型タイプの1つである。セマフォリンは神経成長円錐を退縮させ軸索の伸長を抑制する因子として同定された内因性のタンパク質であり、プレキシン受容体が結合することにより活性化される (Nogi *et al.*, 2010)。*SEMA6B* と受容体である *PLXNA4* の結合性を確認するために、共免疫沈降を行った。野生型および3種類の *SEMA6B* 変異発現ベクターを作製し、HEK293T細胞およびCOS1細胞で発現させた。

(3) ゼブラフィッシュを用いた発症機構の解析

ヒトの野生型およびトランケート型 *SEMA6B* を一過性に過剰発現させ、表現型の評価を行った。上記で作製した *SEMA6B* 変異発現ベクターより mRNA を合成し、ゼブラフィッシュ受精卵に注入した。モルフォリノアンチセンスオリゴを用いた *SEMA6B* ノックダウンによる効果を検証した。

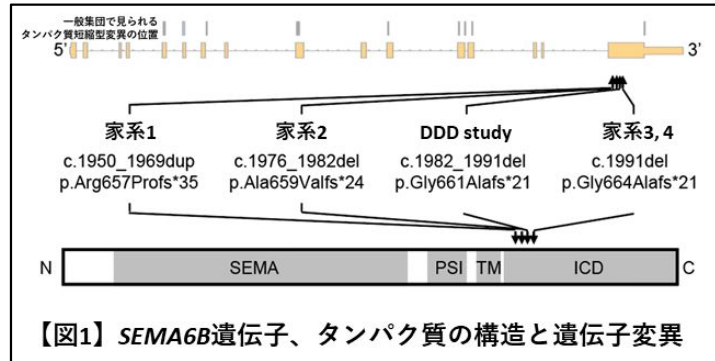
CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトゼブラフィッシュの作製を行った。トランケート型の異常な *sema6b* タンパク質を蓄積させるよう、最終エクソンを gRNA の標的とした。crRNA/tracrRNA および Cas9 タンパク質を、ゼブラフィッシュ受精卵に注入した。

神経細胞の発生に及ぼす影響は、免疫染色を行い、形態を観察した。DanioVision 行動解析システムを用いて痙攣・てんかん様異常行動の有無を評価した。

4. 研究成果

発達性およびてんかん性脳症を呈する患者1,752例の全エクソーム解析データおよび DDD study に登録された、てんかんを呈する4,293例の全エクソーム解析データから疾患の原因が疑

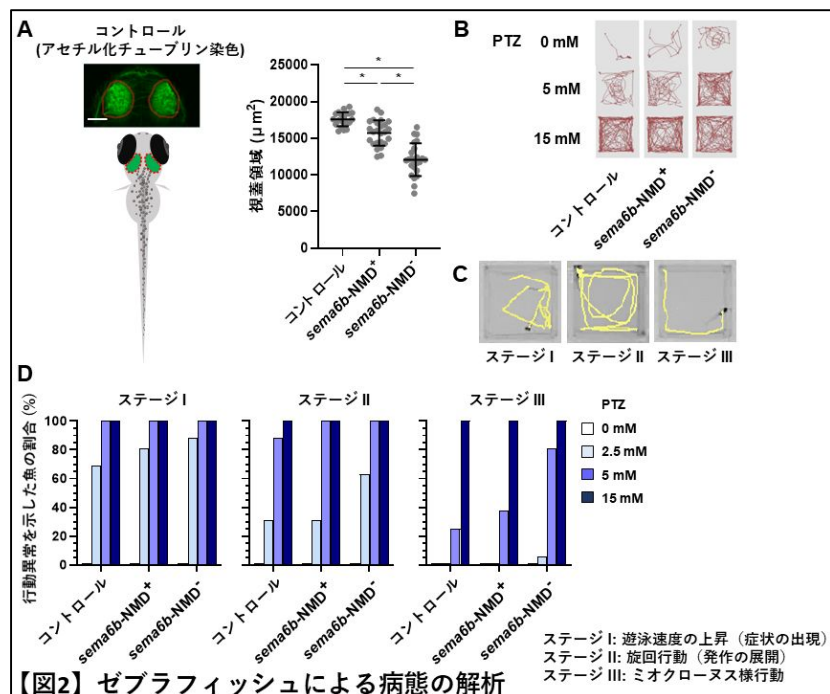
われる遺伝子変異を探索した。その結果、5家系5症例から4種類の *SEMA6B* にフレームシフトを伴うトランケート型のヘテロ接合性変異を検出した(家系3および家系4は同じ変異)【図1】。見出された変異は全ての家系において *de novo* で生じていた。これらの遺伝子変異は、全てナンセンス変異依存性メッセンジャーRNA分解(NMD)を受けない最終エクソンに存在した。



NMD の効果を検証するために、患者由来のリンパ芽球様細胞を用いて RT-PCR を行った結果、変異アレルは NMD による分解を受けず、野生型アレルと同等に発現していた。これらのフレームシフト変異は *SEMA6B* の C 末端をコードする細胞内領域 (ICD: intracellular domain) の途中で終始コドンを生じさせるため、細胞内領域が欠損したトランケート型の *SEMA6B* タンパク質が産生されると考えられた。一方で、一般集団の遺伝子バリエーションデータベースに登録されているトランケート型変異は、NMD を受ける領域に存在した【図1】。以上より、*SEMA6B* の細胞内領域をコードする C 末端が欠損したトランケート型の異常な *SEMA6B* が産生されることが、本疾患の原因である可能性が示唆された。

SEMA6B と *PLXNA4* における結合性が、*SEMA6B* の変異効果により影響を受けるか検証した結果、*SEMA6B* の野生型と変異体において結合能力に差は認められなかった。セマフォリンは、受容体と結合することで他の膜貫通タンパク質と相互作用することが知られている (Battistini *et al.*, 2016)。この相互作用はセマフォリンの ICD を介してリバースシグナル伝達を生じるが、ICD が欠損した場合このシグナル伝達に異常を来す (Perez-Branguli *et al.*, 2016)。患者より検出された変異も同様に、リバースシグナル伝達異常を引き起こすことが示唆されるため、今後さらなる検証が必要と考える。

モデル実験動物のゼブラフィッシュを用いて、変異の病原性を検証した。過剰発現およびノックダウンでは効果が得られなかったため、CRISPR/Cas9 システムにより *sema6b* 変異体を作製した。その結果、*sema6b* の細胞内領域が欠損したモザイク変異体 (F0 世代) の中枢神経において、神経細胞の減少が観察された【図2-A】。また、ペンチレンテトラゾール (PTZ: けいれん誘発剤) を使用した実験を行い、*sema6b* 変異体の行動をモニタリングした。NMD を受けない (NMD-) *sema6b* モザイク変異体では、NMD を受ける (NMD+) 変異体よりも行動量が増加した【図2-B】。NMD-変異体では、体を横倒しにした異常遊泳、不随意運動のようなヒトのミオクローヌスに類似した行動が顕著に認められた【図2-C, D】。



以上の解析結果から、*SEMA6B* が進行性ミオクローヌスてんかんの新規責任遺伝子であることを明らかにした。今後の展望としては、ICD が欠損することによる病態メカニズムの解明、モデル動物を利用した治療法の開発が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lehalle Daphne, Vabres Pierre, Sorlin Arthur, Torti Erin, Abe Yuichi, Koshimizu Eriko, Miyakate Sakoto, St-Onge Judith, Thevenon Julien, Verdura Edgard, Whelan Habela Christa, Zacher Pia, Riviere Jean-Baptiste, Thauvin-Robinet Christel, Betschinger Joerg, Faivre Laurence, et al.	4. 巻 57
2. 論文標題 De novo mutations in the X-linked TFE3 gene cause intellectual disability with pigmentary mosaicism and storage disorder-like features	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 808 ~ 819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmedgenet-2019-106508	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 Itai Toshiyuki, Miyatake Satoko, Taguri Masataka, Nozaki Fumihito, Ohta Masayasu, Osaka Hitoshi, Morimoto Masafumi, Koshimizu Eriko, Mitsuhashi Satomi, Mizuguchi Takeshi, Takata Atsushi, Miyake Noriko, Tsurusaki Yoshinori, Doi Hiroshi, Nakashima Mitsuko, Saitsu Hiroto, Matsumoto Naomichi, et al.	4. 巻 0
2. 論文標題 Prenatal clinical manifestations in individuals with COL4A1/2 variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmedgenet-2020-106896	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 Sakamoto Masamune, Iwama Kazuhiro, Sekiguchi Futoshi, Mashimo Hideaki, Kumada Satoko, Ishigaki Keiko, Okamoto Nobuhiko, Behnam Mahdiyeh, Ghadami Mohsen, Koshimizu Eriko, Miyatake Satoko, Mitsuhashi Satomi, Mizuguchi Takeshi, Takata Atsushi, Saitsu Hiroto, Miyake Noriko, Matsumoto Naomichi, et al.	4. 巻 66
2. 論文標題 Novel EXOSC9 variants cause pontocerebellar hypoplasia type 1D with spinal motor neuronopathy and cerebellar atrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 401 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-00853-2	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 Itai Toshiyuki, Hamanaka Kohei, Sasaki Kazunori, Ries Markus, Kobayashi Yu, Koshimizu Eriko, Mizuguchi Takeshi, Takata Atsushi, Miyake Noriko, Taguri Masataka, Antonarakis Stylianos E., Nakashima Mitsuko, Saitu Hiroto, Miyatake Satoko, Matsumoto Naomichi, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 De novo variants in CELF2 that disrupt the nuclear localization signal cause developmental and epileptic encephalopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 66 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.24130	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 Uchiyama Yuri, Yamaguchi Daisuke, Iwama Kazuhiro, Miyatake Satoko, Hamanaka Kohei, Tsuchida Naomi, Itai Toshiyuki, Saida Ken, Fukuda Hiromi, Sekiguchi Futoshi, Sakamoto Masamune, Kato Mitsuhiro, Koshimizu Eriko, Fujita Atsushi, Takata Atsushi, Miyake Noriko, Mizuguchi Takeshi, Matsumoto Naomichi, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 Efficient detection of copy number variations using exome data: Batch and sex based analyses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 50 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.24129	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 Miyatake Satoko, Kato Mitsuhiro, Kumamoto Takuma, Hirose Tomonori, Koshimizu Eriko, Mizuguchi Takeshi, Miyake Noriko, Suzuki Atsushi, Ohga Shouichi, Saitu Hiroto, Takahashi Hidehisa, Tanaka Fumiaki, Ogata Kazuhiro, Ohtaka-Maruyama Chiaki, Matsumoto Naomichi, et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd2368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamanaka Kohei, Imagawa Eri, Koshimizu Eriko, Miyatake Satoko, Tohyama Jun, Yamagata Takanori, Miyauchi Akihiko, Ekhelevitch Nina, Nakamura Fumio, Kawashima Takeshi, Takata Atsushi, Miyake Noriko, Matsumoto Naomichi et al.,	4. 巻 106(4)
2. 論文標題 De Novo Truncating Variants in the Last Exon of SEMA6B Cause Progressive Myoclonic Epilepsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 549, 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2020.02.011	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥水江里子, 濱中耕平, 今川英里, 高田篤, 遠山潤, 山形崇倫, 宮内彰彦, Nina Ekhlilevitch, Gaik-Siew Ch'ng, 中島光子, 才津浩智, 水口 剛, 宮武聡子, 三宅紀子, 松本直通
2. 発表標題 SEMA6B遺伝子変異は進行性ミオクローヌスてんかんを引き起こす
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>進行性ミオクローヌスてんかんの原因遺伝子を明らかに! https://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/news/202003hamanaka_AJHG.html 進行性ミオクローヌスてんかんの原因遺伝子を明らかに https://www.amed.go.jp/news/release_20200313.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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
イスラエル	Rambam Health Care Campus			
マレーシア	Hospital Kuala Lumpur			