

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16581

研究課題名（和文）ショート&amp;ロングリードシーケンスによる成人白質脳症の包括的解析と新規遺伝子同定

研究課題名（英文）Comprehensive analysis and identification of novel genes in adult leukoencephalopathy by short and long read sequencing.

研究代表者

三宅 綾子（MIYAKE, Ryoko）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10760184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：白質脳症の背景疾患は非常に多岐にわたり、疾患特異的な治療を考慮する上では正確な診断が必須となるが、臨床所見や画像所見のみでの診断は容易ではない。本研究では我々の先行研究で診断未確定であった81症例に対する再解析、および新規収集50症例の遺伝学的解析を通じて成人白質脳症の遺伝学的背景を明らかにすることを目標とした。診断未確定例の再解析では、コピー解析、ロングリードシーケンス解析、RNAシーケンス解析で2例の原因が判明した。追加50症例の解析では神経核内封入体病5例、CADASIL6例を含む14例で遺伝学的原因が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の先行研究、本研究を通じて、成人白質脳症患者160症例の遺伝学的解析を行い、17例がNIID、17例がCADASILであった。その他は稀少疾患でありCSF1R、EIF2B2、POLR3A、L2HGDH、TUBB4A、YWHAE、DARS2、HTRA1、RRM2B、COL4A1解析のバリエーションが原因である症例が1例ずつで、原因が判明したのは44例/160例（27.5%）であった。本研究により成人白質脳症の遺伝学的背景の一端が明らかとなり、成人白質脳症の診断、治療に有益なデータを提供できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The disease background of leukoencephalopathy is very diverse, and an accurate diagnosis is essential to consider its appropriate treatment of the disease. However, it is not easy to make a precise diagnosis based on clinical and imaging findings. In this study, we aimed to clarify the genetic background of adult leukoencephalopathy by reanalyzing 81 cases in which the diagnosis was not confirmed in our previous studies and by performing genetic analysis of 50 newly collected cases. In the reanalysis of the previously undetermined cases, copy number analysis, long read sequence analysis, and RNA sequence analysis allowed us to identify the genetic cause in two cases. Further analysis of newly collected 50 cases identified a genetic cause in 14 cases, 5 of which had neuronal nuclear inclusion body disease and 6 of which had CADASIL.

研究分野：神経内科学

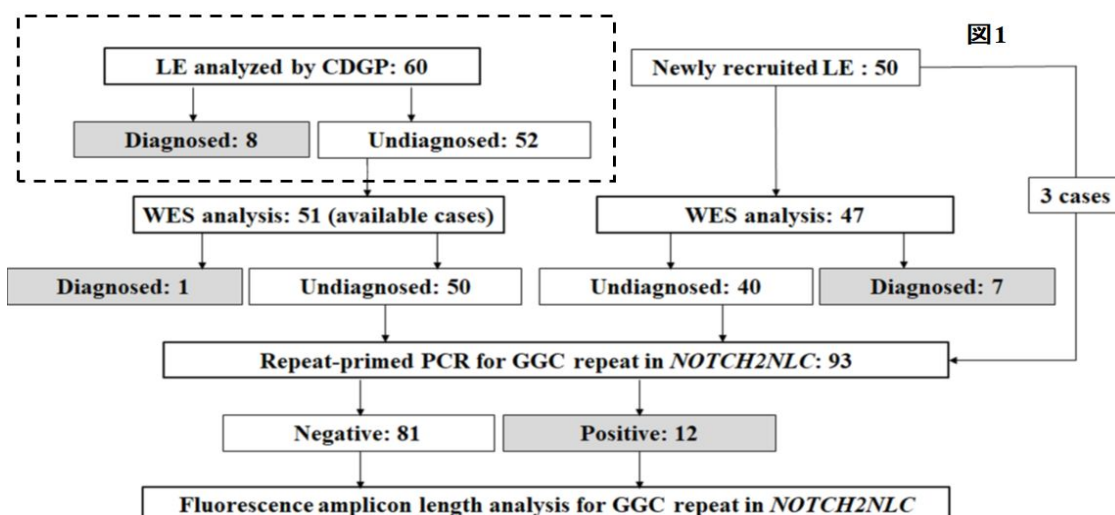
キーワード：leukoencephalopathy genetics

1. 研究開始当初の背景

白質脳症は大脳白質を病変の主座とする疾患の総称である。背景疾患は非常に多岐にわたり、遺伝性疾患だけでも cerebral autosomal dominant/recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL/CARASIL) をはじめとする脳小血管病や、神経核内封入体病 (Neuronal intranuclear inclusion disease: NIID)、Hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids、先天性ライソゾーム病など、全く病態の異なる疾患が含まれる。疾患特異的な治療を考慮する上では正確な診断が必須となるが、同じ遺伝子異常に起因する疾患であってもその変異により発症年齢、症状、重症度などが異なるため、臨床所見や画像所見のみでの診断は容易ではない。そのため、白質脳症では診断未確定のままフォローされてきた症例が少なくないと考えられる。小児白質脳症患者では、全エクソシーケンス (whole exome sequencing: WES) 解析により、約 42% の患者で遺伝学的原因の確定または推定が可能であったと報告されている (Vanderver A, et al., *Ann Neurol*, 2016)。一方、成人白質脳症では、動脈硬化性変化などの後天的な白質変化が加わるため、さらに病態は複雑であることが予想され、純粋に遺伝学的原因の解明を試みた研究はほとんど存在しなかった。しかしながら成人例においても遺伝的背景を解明することは学術的にも、実際の臨床現場においても非常に有益な情報を提供するものであると考えられる。申請者らはこのような学術的背景と臨床的必要性の下、55 種類の白質脳症原因遺伝子を対象に、カスタムキャプチャーキット (custom-designed gene panel: CDGP) を作成し、卓上型次世代シーケンサーを用いた新たな白質脳症の診断方法を開発し解析手法を確立してきた。多発性硬化症などの炎症性疾患、主要性疾患、明らかな動脈硬化性多発脳梗塞など、原因が確定した症例を除外した成人白質脳症症例 60 例の解析の結果、成人白質脳症の 13.3% について我々の方法で遺伝的背景を明らかにすることが出来ることを示した (図 1 破線部、Kunii M, et al., *Clin Genet*, 2018)。申請者らの解析結果は小児白質脳症に比較し、成人白質脳症では遺伝学的原因の確定率が低く、遺伝学的原因以上に環境要因に起因する疾患が多い可能性を示唆するものであった。

直近、NOTCH2NLC の GGC リピート伸長がロングリードシーケンサーによって NIID の原因として同定されるなど (Sone J, et al., *Nat Genet*, 2019) 成人白質脳症の分野においても新たな原因遺伝子が最新のテクノロジーを用いて明らかにされている。申請者らは CDGP による検討で異常が検出されなかった 52 例のうちの解析可能な 51 例と新規に収集した 50 例の成人白質脳症計 101 例について WES 解析と NOTCH2NLC の GGC リピート伸長の検索を行った結果、WES で 8 例、リピート伸長解析で 12 例の遺伝学的原因の診断が可能であった (図 1、Okubo M, et al., *Ann Neurol*, 2019)。この最新の解析を合わせると、成人白質脳症患者においても 110 例のうち 28 例 (25.5%) と比較的高率に原因遺伝子が判明し、その内 12 例が NIID、11 例が CADASIL であり、NIID と CADASIL が成人白質脳症の 2 大疾患であることを明らかにした。

このように申請者らは CDGP 解析、WES 解析および GGC リピート解析によって本邦の成人白質脳症の遺伝的背景解明を目指してきたが、これら解析によっても原因遺伝子の判明していない症例が 81 例 (73.6%、追加解析除外例 1 例) 存在するなど、依然として白質脳症の全貌は明らかでない。



2. 研究の目的

本研究では、上記に述べた診断未確定 81 症例と追加収集検体 (50 例を目標とする) を対象に、白質脳症の遺伝学的原因のさらなる解明、および新規原因遺伝子同定を目指して解析を行い、成人白質脳症の全体像を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規収集例の遺伝学的背景の検索

これまで我々が解析してきた症例と同様に WES 解析、*NOTCH2NLC* の GGC リピート伸長解析を中心とした原因遺伝子同定を試みる。

#### (2) 既知遺伝子に病的バリエーションを認めなかった既存症例の検討

これまでの CDGP 解析、WES 解析、*NOTCH2NLC* の GGC リピート伸長解析で診断がつかなかった 81 例、および上記の新規収集例で診断未確定となった例に対しては、臨床症状ごとにデータを検討する予定である。脳小血管病が疑われるグループに対しては、WES 解析結果を中心に検討する。つまり類似の臨床病型を呈する例において、WES で症例間に共通する遺伝子変化を検索することで、新規原因遺伝子の同定を目指す。白質ジストロフィー、その他稀少疾患が疑われるグループに対しては、コピー数解析、RNA シーケンス解析、ロングリードシーケンス解析を使い、原因遺伝子同定を目指す。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規収集例の遺伝学的背景の検索

本研究期間を通じて 50 例の新規成人白質脳症患者の参加を得ることができた。*NOTCH2NLC* の GGC リピート伸長解析では、5 例で GGC リピート伸長が認められ、NIID と診断された。*NOTCH2NLC* の GGC リピート伸長が認められなかった 45 例については全例 WES 解析を行った。その結果、6 例において *NOTCH3* の病的バリエーションが検出され、CADASIL と診断された。我々の先行研究 (Okubo M, et al., *Ann Neurol*, 2019) と同様に、新規収集例においても NIID および CADASIL が成人白質脳症の 2 大疾患であることが示された。その他、*HTRA1*、*RRM2B*、*COL4A1* の病的バリエーションを持つ症例が 1 例ずつ判明した。新規収集症例において原因遺伝子が判明したのは 14 例/50 例、28% であり、我々の先行研究 (25.5%) とほぼ一致していた。

#### (2) 既知遺伝子に病的バリエーションを認めなかった既存症例の検討

CDGP 解析、WES 解析、*NOTCH2NLC* の GGC リピート伸長解析で診断がつかなかった 81 例のうち 1 例は WES データを用いたコピー数解析の方法を変更することにより、*YWHAE* 欠損が原因であることが判明した。また、白質ジストロフィーが疑われた 1 例に対してはロングリードシーケンサーを用いた全ゲノム解析、リンパ芽球から抽出した RNA に対する RNA シーケンス解析により、*DARS2* の複合ヘテロ接合性バリエーションが原因であることが判明した。

脳小血管病が疑われるグループに対する WES 解析データを用いた検討については、本研究機関で新規原因遺伝子同定に至っていないが、引き続き解析を続ける方針である。

我々の先行研究、本研究を通じて、成人白質脳症患者 160 症例の遺伝学的解析を行い、17 例が NIID、17 例が CADASIL であった。その他は稀少疾患であり *CSF1R*、*EIF2B2*、*POLR3A*、*L2HGDH*、*TUBB4A*、*YWHAE*、*DARS2*、*HTRA1*、*RRM2B*、*COL4A1* 解析のバリエーションが原因である症例が 1 例ずつで、原因が判明したのは 44 例/160 例 (27.5%) であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Doi Hiroshi, Okubo Masaki, Fukai Ryoko, Fujita Atsushi, Mitsuhashi Satomi, Takahashi Keita, Kunii Misako, Tada Mikiko, Fukuda Hiromi, Mizuguchi Takeshi, Miyatake Satoko, Miyake Noriko, Sone Jun, Sobue Gen, Takeuchi Hideyuki, Matsumoto Naomichi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 88
2. 論文標題 Reply to “GGC Repeat Expansion of NOTCH2NLC is Rare in European Leukoencephalopathy”	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 642 ~ 643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25819	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 Takahashi Keita, Takeuchi Hideyuki, Fukai Ryoko, Nakamura Haruko, Morihara Keisuke, Higashiyama Yuichi, Takahashi Toshiyuki, Doi Hiroshi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Case Report: Anti-MOG Antibody Seroconversion Accompanied by Dimethyl Fumarate Treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 625465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.625465	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 -

1. 著者名 Kubota Shun, Doi Hiroshi, Koyano Shigeru, Tanaka Kenichi, Komiya Hiroyasu, Katsumoto Atsuko, Ikeda Shingo, Hashiguchi Shunta, Nakamura Haruko, Fukai Ryoko, Takahashi Keita, Kunii Misako, Tada Mikiko, Takeuchi Hideyuki, Tanaka Fumiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 SGTA associates with intracellular aggregates in neurodegenerative diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00770-1	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 -

〔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 土井宏, 大久保正紀, 深井綾子（深井は旧姓）、他
2. 発表標題 Genetic analysis of adult leukoencephalopathies.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------