

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591253

研究課題名(和文) 遺伝性痙性対麻痺の新規原因遺伝子同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification of the novel genes responsible for hereditary spastic paraplegias

研究代表者

嶋崎 晴雄 (SHIMAZAKI, HARUO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30316517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：複合型と純粋型各2家系の常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺4家系の原因遺伝子同定を行った。複合型2家系では、同胞患者で連鎖解析を行い、1家系でC12orf65遺伝子の新規ナンセンス変異と、もう1家系でLYST遺伝子の新規ミスセンス変異をホモ接合体で同定した。C12orf65変異による患者皮膚線維芽細胞のミトコンドリア機能低下を証明し、SPG55として報告した。また、LYST変異を持つ患者末梢血白血球に巨大顆粒を見出し、Chediak-Higashi症候群と診断した。

次に、純粋型2家系の原因遺伝子変異検索を行った。それぞれの家系で異なった新規遺伝子のミスセンス変異をホモ接合体で同定した。

研究成果の概要(英文)： We attempted to identify the causative gene mutations for the four families that have suffered from autosomal recessive hereditary spastic paraplegias (ARHSP). Using homozygosity mapping and exome sequencing, we could isolate a homozygous nonsense mutation in the responsible gene, C12orf65, in one complicated ARHSP family. HUGO assigned this type of ARHSP as SPG55. We also detected a novel homozygous missense mutation of the LYST gene in another complicated ARHSP family.

We also have investigated the responsive genes in two pure ARHSP families by homozygosity mapping and exome sequencing. We identified two homozygous single nucleotide variants of two genes in the two families. We are verifying whether these variants are the causative mutations or not.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：遺伝性痙性対麻痺 連鎖解析 エクソーム解析 SPG55 C12orf65遺伝子 LYST遺伝子

1. 研究開始当初の背景

遺伝性痙性対麻痺(HSP)は、両下肢の痙性対麻痺を中核症状とし、その他様々な症状を合併しうる症候群である。現在までのところ、その遺伝子座はSPG1~72まで同定されており、そのうち40余りの原因遺伝子が単離されている。遺伝形式は常染色体優性(AD)のものが多く、半数以上の例で原因遺伝子変異が同定されるが、常染色体劣性(AR)のものは少なく、多くは原因遺伝子やその変異が不明である。

2. 研究の目的

我々は、常染色体劣性遺伝と考えられる、両親が近親婚で同胞発症者が存在する4家系について、その遺伝子座と原因遺伝子変異同定を試みた。

3. 研究の方法

両親が従兄弟婚で、視神経萎縮と末梢神経障害を伴う複合型AR-HSP(家系1)、末梢神経障害と小脳症状を伴う複合型AR-HSP(家系2)、純粋型AR-HSP 2家系(家系3,4)を対象とした。

同意が得られた発症者2名の末梢血よりDNAを抽出。患者1-2名と協力が得られた健常者のDNAを用いて一塩基多型を用いた連鎖解析を家系毎に行い、候補遺伝子領域を特定した。また、アレイCGHにて候補領域の遺伝子コピー数異常を検討した。次に、患者1名のDNAのエクソン部分のみを濃縮し、次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行った。さらに、同定された遺伝子の変異が、他の原因未同定の遺伝性痙性対麻痺家系にあるかを直接シーケンス法で検討した。

4. 研究成果

まず、視神経萎縮と末梢神経障害を伴う複

合型AR-HSP(家系1)については、発症者2名で連鎖解析を行い、4つの染色体に連鎖部位を同定した。連鎖部位に遺伝子コピー数の異常は無かった。発症者1名のエクソーム解析を行い、連鎖部位内に、核由来のミトコンドリア翻訳関連遺伝子である、*C12orf65*の新規ナンセンス変異(c.394C>T, p.R132X)をホモ接合体で同定した。この変異は同胞患者にもホモ接合体で存在した。発症者の皮膚線維芽細胞を用いて、ミトコンドリア翻訳機能の低下により複合体IとIVの活性低下を証明した。

*C12orf65*のナンセンス変異は、視神経萎縮と末梢神経障害を伴った複合型AR-HSP家系の原因遺伝子変異と考えた。この変異により短い*C12orf65*蛋白が作られ、ミトコンドリア蛋白生成過程における翻訳停止機構に異常が生じ、ミトコンドリアの機能不全が生じ、疾患を発症したと考えられた。この病型は、HUGOでSPG55に割り当てられた。

次に、末梢神経障害と小脳症状を伴う複合型AR-HSP(家系2)についても、発症者2名で連鎖解析を行い、4つの染色体に連鎖部位を同定した。発症者1名のエクソーム解析を行い、連鎖部位内に、Chediak-Higashi症候群(CHS)の原因遺伝子*LYST*の新規ミスセンス変異(c.4189T>G, p.F1397V)をホモ接合体で同定した。この変異は、種を超えて保存されたアミノ酸を変化させ、家系内で共分離していた。また患者2名の末梢血白血球には、CHSに特徴的な巨大顆粒が認められた。

成人発症で神経症状のみを呈していたが、白血球の巨大顆粒を認めたことより、この家系の神経症状は、成人発症のCHSに由来すると考えられた。劣性遺伝性の痙性対麻痺や小脳失調、末梢神経障害を呈する疾患の鑑別疾患として、CHSも念頭に置くことが必要であ

ると考えられた。

次に、純粋型 AR-HSP 2 家系（家系 3, 4）について、原因遺伝子探索を行った。

家系 3 では、発症者 2 名と非発症者 3 名での連鎖解析の結果、4 つの染色体に連鎖部位を同定した。患者 1 名のエクソーム解析により、その領域内の 2 つの遺伝子にそれぞれホモ接合体で新規一塩基置換（SNV）を同定した。そのうち 1 つの遺伝子 A は中枢神経系に発現しており、その SNV は家系内で共分離しており、正常コントロール 208 名に存在しなかった。さらに AR が疑われる HSP 家系患者 89 例には遺伝子 A の変異は存在しなかった。

家系 4 では、発症者 1 名と非発症者 1 名で連鎖解析の結果、11 の染色体に弱い連鎖部位を認めた。患者 1 名のエクソーム解析により候補領域内の 3 つに遺伝子にホモ接合体の新規 SNV を同定した。うち 1 つの遺伝子 B の SNV が家系内で共分離していた。この変異はコントロール 326 名には存在せず、AR が疑われる HSP 家系患者 89 例と 13 例の近親婚のある HSP 家系にも遺伝子 B に病的変異は同定されなかった。

遺伝子 A, B とその変異が真の病的変異であるか検証するため、transcription activator-like effector nucleases (TALEN) を利用した遺伝子編集技術を用いて遺伝子 A, B の相同遺伝子をそれぞれ破壊し、モデル動物の表現形を観察するなどの機能解析を現在行っている。

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）

嶋崎晴雄：常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺の臨床 - SPG11, ARSACS を中心に - , 特集

/ 遺伝性痙性対麻痺 - update . 神経内科 2011; 74(2): 127-134. (査読無)

瀧山嘉久, 石浦浩之, 嶋崎晴雄, 辻省次, 西澤正豊 . 遺伝性痙性対麻痺の疫学 : JASPAC . 特集 / 遺伝性痙性対麻痺 - update . 神経内科 2011; 74(2): 141- 145. (査読無)

Haga R, Miki Y, Funamizu Y, Kon T, Suzuki C, Ueno T, Nishijima H, Arai A, Tomiyama M, Shimazaki H, Takiyama Y, Baba M.: Novel compound heterozygous mutations of the SACS gene in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. Clin Neurol Neurosurg 2012, 114 (6): 746-747. doi:10.1016/j.clineuro.2011.12.019 (査読有)

Namekawa M, Takiyama Y, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Shimazaki H, Yamagata T, Momoi M, Nakano I. A novel adult case of juvenile-onset Alexander disease: complete remission of neurological symptoms for over 12 years, despite insidiously progressive cervicomedullary atrophy. Neurol Sci 2012, 33 (6): 1389-92. doi:10.1007/s10072-011-0902-z (査読有)

Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I. A homozygous mutation of *C12orf65* causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). J Med Genet 2012, 49 (12): 777-84. doi:10.1136/jmedgenet-2012-101212 (査読有)

嶋崎晴雄, 中野今治：脊髄小脳変性症，多系統萎縮症，進行性核上性麻痺．疾患概念の変遷と，脊髄疾患ならびにパーキンソン病との鑑別 . 脊髄外科 SPINAL SURGERY, 2012, 26 (3) : 278-283. (査読無)

Shimazaki H, Takiyama Y, Honda J, Sakoe K, Namekawa M, Tsugawa J, Tsuboi Y, Suzuki C, Baba M, Nakano I: Middle cerebellar peduncles

and pontine T2 hypointensities in ARSACS. J Neuroimaging 2013, 23 (1): 82-85 . doi: 10.1111/j.1552-6569.2011.00647.x (査読有)

嶋崎晴雄 . 視神経萎縮,末梢神経障害を伴う常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺(SPG55) . 特集 / 脊髄小脳変性症の研究の進歩 . 神経内科 2013, 78(3):283-9. (査読無)

Buchert R, Uebe S, Radwan F, Tawamie H, Issa S, Shimazaki H, Henneke M, Ekici AB, Reis A, Abou Jamra R: Mutations in the mitochondrial gene *C12ORF65* lead to syndromic autosomal recessive intellectual disability and show genotype phenotype correlation. Eur J Med Genet 2013, 56 (11): 599-602. doi: 10.1016/j.ejmg.2013.09.010 (査読有)

Shimazaki H, Honda J, Naoi T, Namekawa M, Nakano I, Yazaki M, Nakamura K, Yoshida K, Ikeda S, Ishiura H, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Takiyama Y. Autosomal recessive complicated spastic paraplegia with a novel *lysosomal trafficking regulator* gene mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2014 (in press) doi:10.1136/jnnp-2013-306981 (査読有)

嶋崎晴雄 . 常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺 . 日本臨床 別冊 神経症候群 II-その他の神経疾患を含めて-第 2 版, pp.438-442, 2014. (査読無)

[学会発表](計 8 件)

嶋崎晴雄, 石浦浩之, 福田陽子, 本多純子, 太田京子, 直井為任, 滑川道人, 迫江公己, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次, 瀧山嘉久, 中野今治. 視神経萎縮,末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺症例の臨床像と, 原因遺伝子検索. 第 52 回日本神経学会総会 .2011 年 5 月 20 日, 名古屋 .

迫江公己, 嶋崎晴雄, 滑川道人, 直井為任, 本多純子, 瀧山嘉久, 中野今治 . SPG4

遺伝子産物 spastin の機能解析 . 第 52 回日本神経学会総会 . 2011 年 5 月 18 日, 名古屋 .

嶋崎晴雄, 石浦浩之, 福田陽子, 本多純子, 迫江公己, 太田京子, 直井為任, 滑川道人, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次, 後藤雄一, 瀧山嘉久, 中野今治 . 視神経萎縮, 末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子同定 . 第 53 回日本神経学会総会 . 2012 年 5 月 23 日, 東京 .

Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Tsuji S, Goto Y, Nakano I. Homozygous nonsense mutations of *C12orf65* gene in patients with spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy (SPG55). 2012 Annual Meeting of American Neurological Association, Oct 7, 2012, Boston.

Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Tsuji S, Yazaki M, Nakano I. Adult Chediak-Higashi syndrome presenting as spastic paraplegia, cerebellar ataxia and neuropathy. American Academy of Neurology 65th Annual Meeting, Mar 21, 2013, San Diego.

嶋崎晴雄, 本多純子, 直井為任, 滑川道人, 石浦浩之, 福田陽子, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次, 矢崎正英, 中村勝哉, 吉田邦広, 池田修一, 瀧山嘉久, 中野今治 . 小脳失調, 末梢神経障害を呈した常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺家系の遺伝子解析 . 第 54 回日本神経学会総会 . 2013 年 5 月 31 日, 東京 .

Shimazaki H, Sugaya R, Honda J, Meguro A, Nakano I. Novel *ATM* mutation in autosomal recessive late-onset cerebellar ataxia with neuropathy. American Society of Human Genetics 2013 Annual Meeting, Oct 24, 2013, Boston.

石浦浩之, 高 紀信, 嶋崎晴雄, 三井 純, 高橋祐二, 吉村 淳, 土井晃一郎, 森下真一, 後藤 順, 瀧山嘉久, 辻 省次, JASPAC . 常染色体劣性遺伝が疑われた遺伝性痙性対麻痺

症例の exome 解析 . 日本人類遺伝学会第 58 回大会 , 2013 年 11 月 22 日 , 仙台 .

〔 図書 〕 (計 1 件)

Shimazaki H and Takiyama Y. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: clinical, radiological and epidemiological aspects. Spinocerebellar Ataxia, pp. 155-172, 2012. Edited by Prof. Jose Gazulla, InTech, Rijeka, Croatia. (ISBN: 978-953-51-0542-8) (査読有)

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔 その他 〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

嶋崎 晴雄 (SHIMAZAKI HARUO)
自治医科大学 ・ 医学部 ・ 講師
研究者番号 : 30316517

(2) 研究分担者

瀧山 嘉久 (TAKIYAMA YOSHIHISA)
山梨大学 ・ 医学部 ・ 教授
研究者番号 : 00245052

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :