

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25461287
研究課題名(和文) 卓上型次世代シーケンサーを用いた白質脳症の遺伝子診断法の開発と遺伝的背景の解明

研究課題名(英文) Establishment of diagnosis method and analysis of genetic background of adult leukoencephalopathy patients with desktop next-generation sequencer

研究代表者
上田 直久 (Ueda, Naohisa)

横浜市立大学・大学病院・准教授

研究者番号：00305442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：白質脳症の原因疾患は多岐にわたることが知られている。我々は55種類の白質脳症原因遺伝子を対象に、Agilent社SureSelectを用いたエクソンキャプチャーキットを設計し、原因不明の白質成人脳症患者60名に対して、次世代シーケンサーMiSeqを用いた塩基配列解析を行った。その結果明らかに病的と判断されるNOTCH3の遺伝子変異を4症例に認め、更に、EIF2B2およびPOLR3Aの既知変異を持つ症例を1例ずつ認めた他、複数症例で病的意義不明の変異を認めた。今回我々の解析系により成人白質脳症患者10%が確定診断に至り、8.3%で未知の遺伝子変異を持ち病態への関与が疑われる変異が同定された。

研究成果の概要(英文)：Leukoencephalopathies comprise all clinical syndromes predominantly affecting the white matter of the brain. We performed capture-based target enrichment followed by next-generation sequencing for the genetic screening of adult leukoencephalopathy patients with unknown causes. We picked up 55 leukoencephalopathy-related genes and designed the bait library with SureSelect technology (Agilent). Genomic DNAs from 60 Japanese adult leukoencephalopathy patients were processed by this library, and the captured DNAs were analyzed by next generation sequencer MiSeq. As results, we detected pathological NOTCH3 mutations in 4 patients, and EIF2B2 and POLR3A mutations in one patient, respectively. Additionally, unreported mutations were detected in some patients. In our study, 10% of adult patients with leukoencephalopathy were definitively diagnosed with known or apparently pathological mutations, and 8.3% of patients had mutations with unconfirmed significance.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：次世代シーケンサー カスタムキャプチャー 白質脳症

1. 研究開始当初の背景

白質脳症 (leukoencephalopathies) は大脳白質を病変の主座とする疾患の総称であり、原因の特定できるものとしては薬剤性白質脳症、放射線性白質脳症、高血圧に起因する脳梗塞、悪性リンパ腫などの腫瘍性病変などが挙げられ、また原因の特定できない白質脳症に関してもその背景疾患は非常に多岐にわたることが知られている。遺伝子異常が明らかとなっている白質脳症に限っても少なくとも 50 種類以上の疾患が知られている。遺伝性の白質脳症には 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近年 CSF1R 変異が同定された 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ており、疾患特異的な治療を考慮する上では、正確な診断を下すことが必須となる。しかし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、重症度が異なるため臨床症状や画像のみでの診断は容易ではなく、一方、既報告の病因遺伝子に限っても従来のサンガー法で候補遺伝子を一ずつ調べていくことは現実的ではない。このため、成人白質脳症例においては、遺伝学的診断がなされていない症例が数多く存在し、これらの症例においてどの程度既知の遺伝子異常を持つものが存在するかについてはほとんど検討がなされていない。

2. 研究の目的

近年は次世代シーケンサーを用いて全エクソンの配列を同時に解析する手法 (エクソーム解析) が、遺伝子座異質性を持つ疾患の診断法として注目され、実際に我々もこれまで国内で全く報告のなかった疾患をこの手法により診断し報告してきた (Higashiyama, et al. Movement Disord 28:552-553, 2013)。本研究ではさらにその方法を発展させ、特定の 55 の白質脳症関連遺伝子の配列をエクソーム解析よりも深い depth で卓上次世代シーケンサー MiSeq (Illumina 社) を用いて解析することにより、通常のエクソーム解析でとらえにくかった微細構造異常を含めて検出する診断方法を開発する。この手法により、成人白質脳症の遺伝学的な背景を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

成人白質脳症患者のうち、高血圧、糖尿病等のリスクに起因する血管障害症例、脱髄性疾患、中毒性、感染性、炎症性、腫瘍性白質病変を持つ症例など、明確な原因診断が可能な症例を除外した 60 例 (男性 25 例、女性 43 例、平均年齢 53.6 歳) を解析対象とした。MRI により障害部位のパターンを diffuse cerebral、subcortical、periventricular、

multifocal に分類し、重症度は Fazekas scale で評価した。

変異により白質脳症の原因となりうる 55 遺伝子に対して、Agilent 社 SureSelect を用いてエクソンキャプチャーキットを設計し、卓上次世代シーケンサー-MiSeq を用いた塩基配列解析を行う。従来の点変異、小欠失、重複だけでなく、解析対象サンプルと同時に解析した他のサンプルのカバー率を比較し、各々のゲノム領域についてカバー率の相対比を計算することで、エクソン欠失などの微細構造異常の検出が可能にする解析系の構築を

[Targeted genes]

gene	disease	depth	% ≥10 x reads
ABCD1	X-linked adrenoleukodystrophy	168.7	100
AIMP1	Leukodystrophy, hypomyelinating, 3	257.8	100
ALDH3A2	Sjögren-Larsson syndrome	223.6	100
APP	cerebral amyloid angiopathy	229.6	100
ARSA	Metachromatic leukodystrophy	139.0	94
ASPA	Canavan disease	187.8	98
CSF1R	Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids (HDL5)	174.3	100
CST3	cerebral amyloid angiopathy	128.3	99
DARS2	Leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation	238.4	100
EGR2	Neuropathy, congenital hypomyelinating, 1	227.7	100
EIF2B1	Leukoencephalopathy with vanishing white matter	217.4	98
EIF2B2	Leukoencephalopathy with vanishing white matter	212.5	100
EIF2B3	Leukoencephalopathy with vanishing white matter	231.5	100
EIF2B4	Leukoencephalopathy with vanishing white matter	210.2	100
EIF2B5	Leukoencephalopathy with vanishing white matter	226.4	100
FAM126A	Leukodystrophy, hypomyelinating, (Hypomyelination and congenital cataract)	275.1	100
GALC	Krabbe disease	231.1	99
GFAP	Alexander disease	175.6	100
GJC2	Leukodystrophy, hypomyelinating, 2 (Pelizaeus-Merzbacher disease(like disease 1))	115.2	89
GLA	Fabry disease	192.5	98
HEPACAM	Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 2A/2B	184.6	100
HSPD1	Leukodystrophy, hypomyelinating, 4	242.8	100
HTRA1	Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)	171.2	85
ITM2B	Familial British dementia	229.6	97
LAMB1	Cobblestone brain malformation	234.2	100
LMNB1	Leukodystrophy, adult-onset, autosomal dominant	184.5	99
MLC1	Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts	193.3	100
MPZ	Neuropathy, congenital hypomyelinating	163.9	100
MTHFR	Homocystinuria	169.8	99
NOTCH3	Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)	153.6	96
PLP1	Leukodystrophy, hypomyelinating, 1 (Pelizaeus-Merzbacher disease)	213.4	99
POLG	Alpers-Huttenlocher syndrome	164.7	100
POLR3A	Leukodystrophy, hypomyelinating, 7 (Pol III-related leukodystrophy)	206.8	99
POLR3B	Leukodystrophy, hypomyelinating, 8 (Pol III-related leukodystrophy)	243.8	100
PROC	Thrombophilia due to protein C deficiency	178.2	100
PROS1	Thrombophilia due to protein S deficiency	237.4	99
PSAP	Metachromatic leukodystrophy	197.1	100
PSEN1	cerebral amyloid angiopathy	249.6	100
PSEN2	cerebral amyloid angiopathy	182.5	100
RNASEH2A	Aicardi-Goutieres syndrome	187.0	100
RNASEH2B	Aicardi-Goutieres syndrome	227.8	99
RNASEH2C	Aicardi-Goutieres syndrome	173.6	100
RNASET2	Leukoencephalopathy, cystic, without megalencephaly	227.4	100
RPIA	Ribose 5-phosphate isomerase deficiency	175.2	99
SAMHD1	Aicardi-Goutieres syndrome	216.9	99
SCP2	Leukoencephalopathy with dystonia and motor neuropathy	244.8	100
SDHAF1	Mitochondrial complex II deficiency	170.5	99
SLC16A2	Pelizaeus-Merzbacher disease	167.2	100
SLC17A5	Salla disease	209.2	99
SOX10	Peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelination, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease (PCWH)	151.6	97
SUOX	Sulfite oxidase deficiency	228.1	100
TREX1	Aicardi-Goutieres syndrome	175.5	98
TUBB4A	Leukodystrophy, hypomyelinating, 6	201.6	99
TYMP	Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)	136.8	95
WRN	X-linked adrenoleukodystrophy	239.8	99

行った。検出された変異のうち、dbSNP137に minor allele frequency (MAF) ≥ 0.01 と登録のあるもの、in-house data baseにおいて、MAF ≥ 0.01 であるものについては、病的でないとして判断した。

4. 研究成果

白質脳症に関する遺伝子として知られる 55 遺伝子を選択し、5' -UTR、3' -UTR を含めた転写産物上の全配列に対象領域を設定した。対象遺伝子のうち、46 遺伝子で解析対象領域の 100%のカバーするベイトの設計が可能であり、残る 9 遺伝子についても 96%以上のカバー率で設計することができた。研究期間内に 60 例について、カスタムキャプチャーキットを用いた塩基配列解析を終了した。結果、対象全遺伝子の depth of coverage は平均 200 ± 5 (range 115-275) とコピーを数解析も十分可能なデータが得られた。また、30 遺伝子でターゲット部位 100%が 10x 以上のリード数であり、全遺伝子においても平均 98.8%の部位が 10x 以上のリード数で解析出来た (前ページ表)。既報告があるもしくは明らかに病的と判断できる変異としては *NOTCH3* 変異 4 例 (未報告変異 1 例を含む)、*EIF2B2* 変異 1 例、*POLR3A* 変異 1 例が同定された (下表)。

Patient ID	Sex	Age at first exam	Pathological mutations				Fazekas grade		MRI Characteristics
			Gene	Nucleotide change	Protein change	frequency in our DB	PVH	DSWMH	
1	M	30	<i>NOTCH3</i>	c.598_610delins AGAAAGCC	p.P200_S204 delinsRTP	0/575	2	3	multifocal
8	F	58	<i>NOTCH3</i>	c.1261C>T	p.R421C	0/575	2	3	multifocal
34	F	59	<i>NOTCH3</i>	c.665G>A	p.C222Y	0/575	3	3	periventricular
47	F	75	<i>NOTCH3</i>	c.224G>C	p.R75P	0/575	3	3	periventricular
40	M	41	<i>EIF2B2</i>	c.254T>A c.268C>T	p.V85E p.R90W	3/575 0/575	2	1	periventricular
46	F	34	<i>POLR3A</i>	c.2668G>T c.2554A>G	p.V890F p.M892V	0/575 0/575	3	3	diffuse cerebral

本研究の条件において収集した白質脳症においては 10%が確定診断され、CADASIL が最も多く、その他の稀少疾患も診断可能であることが示唆された。診断された CADASIL 4 例のうち 2 例については典型的な家族歴や片頭痛、側頭極の T2 高信号病変などを欠き、臨床的に CADASIL と診断することが困難で本解析初めて診断がついた例であり、非典型的な CADASIL については未診断例が多く存在する可能性が示唆された。また、残る症例のうち 8.3%についても既報告の変異でないが、表現型から原因である可能性がある変異が同定された。*NOTCH3* 変異 2 例、*CSF1R* 変異 1 例、*APP* 変異 1 例、*GLA* 変異 1 例を同定した。これらについては今後病的意義を検討する予定である。

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)

Doi H, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyatake S, Miyake N, Saito H, Kawamoto Y, Yoshida T, Koyano S, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Tanaka F, Matsumoto N. Identification of a novel homozygous *SPG7* mutation in a Japanese patient with spastic ataxia: efficient

diagnosis by exome sequencing for autosomal recessive cerebellar ataxia and spastic paraplegia. Intern Med, 査読有, 2013, 52, 1629-1633.

Doi: not available.

Dziewulska D, Doi H, Fasano A, Erro R, Fatehi F, Fekete R, Gatto EM, Pablos EG, Lehn A, Miyajima H, Piperno A, Pellechia MT, Wu YR, Yoshida K, Zarruk JG, Jingli S, Schrag A, McNeill A. Olfactory impairment and pathology in neurodegenerative disorders with brain iron accumulation. Acta Neuropathol, 査読有, 2013, 126, 151-3.

doi: 10.1007/s00401-013-1136-3.

Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saito H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina M, Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Amthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG. Mutations in *KLHL40* are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. Am J Hum Genet, 査読有, 2013, 93, 6-18.

doi: 10.1016/j.ajhg.2013.05.004.

Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Fukuda-Yuzawa Y, Tsuji S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ikeda S, Tanaka F, Matsumoto N, Yoshida K. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous DDHD2 mutation. Sci Rep. 査読有, 2014, 4, 7132.

doi: 10.1038/srep07132

Ueda N, Hakii Y, Koyano S, Higashiyama Y, Joki H, Baba Y, Suzuki Y, Kuroiwa Y, Tanaka F. Quantitative analysis of upper-limb ataxia in patients with spinocerebellar degeneration. J Neurol. 査読有, 261, 2014, 1381-6.

doi: 10.1007/s00415-014-7353-4.

Ishiura H, Takahashi Y, Hayashi T, Saito K, Furuya H, Watanabe M, Murata M, Suzuki M, Sugiura A, Sawai S, Shibuya K, Ueda N, Ichikawa Y, Kanazawa I, Goto J, Tsuji S.

Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses. *J Hum Genet.* 査読有, 59, 2014, 163-72. doi: 10.1038/jhg.2013.139.

Yoshida K, Miyatake S, Kinoshita T, Doi H, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Matsumoto N. 'Cortical cerebellar atrophy' dwindles away in the era of next-generation sequencing. *J Hum Genet.* 査読有, 59, 2014, 589-90. doi: 10.1038/jhg.2014.75.

Ozaki K, Doi H, Mitsui J, Sato N, Iikuni Y, Majima T, Yamane K, Irioka T, Ishiura H, Doi K, Morishita S, Higashi M, Sekiguchi T, Koyama K, Ueda N, Miura Y, Miyatake S, Matsumoto N, Yokota T, Tanaka F, Tsuji S, Mizusawa H, Ishikawa K. A Novel Mutation in *ELOVL4* Leading to Spinocerebellar Ataxia (SCA) With the Hot Cross Bun Sign but Lacking Erythrodermia: A Broadened Spectrum of SCA34. *JAMA Neurol.* 査読有, 72, 2015, 797-805. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0610.

Kunii M, Doi H, Higashiyama Y, Kugimoto C, Ueda N, Hirata J, Tomita-Katsumoto A, Kashikura-Kojima M, Kubota S, Taniguchi M, Murayama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Matsumoto N, Tanaka F. A Japanese case of cerebellar ataxia, spastic paraparesis and deep sensory impairment associated with a novel homozygous *TTC19* mutation. *J Hum Genet.* 査読有, 60, 2015, 187-91. doi: 10.1038/jhg.2015.7.

Koike H, Takahashi M, Ohyama K, Hashimoto R, Kawagashira Y, Iijima M, Katsuno M, Doi H, Tanaka F, Sobue G. Clinicopathologic features of folate-deficiency neuropathy. *Neurology.* 査読有, 84, 2015, 1026-33. doi: 10.1212/WNL.0000000000001343.

Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Akagi T, Hashikawa T, Doi H, Takumi T, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun.* 査読有, 3, 2015, 24. doi: 10.1186/s40478-015-0202-6.

〔学会発表〕(計 7 件)

上田直久, 波木井靖人, 黒岩義之, 田中章景. 渦巻き描記を用いた小脳性運動失調の他

覚的評価法の検討(第7報)第54回日本神経学会学術大会, 東京, 2013, 5.

土井宏, 田中章景: CBSと関連する遺伝子変異, 第54回日本神経学会学術大会(シンポジウム), 東京, 2013.5.

土井宏, 岸田日帯, 東山雄一, 松本直通, 田中章景: 劣性型脊髄小脳変性症・痙性対麻痺6例に対するエクソーム解析, 第54回日本神経学会学術大会, 東京, 2013.5.

上田直久, 波木井靖人, 児矢野繁, 釘本千春, 土井宏, 岸田日帯, 上木英人, 工藤洋祐, 東山雄一, 鈴木ゆめ, 黒岩義之, 田中章景: 脊髄小脳変性症における運動学習障害の評価. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.

土井宏, 吉田環, 釘本千春, 松本直通, 田中章景: *REEP1*にp.Lys32Asn変異を認めた遺伝性痙性対麻痺の2家系例. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014.5.

上田直久, 児矢野繁, 釘本千春, 土井宏, 岸田日帯, 上木英人, 遠藤雅直, 中江啓晴, 木村活生, 東山雄一, 黒岩義之, 田中章景: 脊髄小脳変性症における運動学習障害の評価. 第56回日本神経学会学術大会, 新潟, 2015.5.

土井宏, 吉田邦広, 牛山雅夫, 谷佳津子, 松本直通, 田中章景: Late-onset spastic ataxia phenotype related to a novel homozygous *DDHD2* mutation. 第56回日本神経学会学術大会, 新潟, 2015.5.

〔図書〕(計 2 件)

上田直久, 田中章景, 中山書店、内科学書改訂第8版、神経学的検査法、2013、228-232

土井宏, 田中章景, 中山書店、内科学書改訂第8版、代謝性疾患、2013、361-374

〔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：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 直久 (UEDA, Naohisa)
横浜市立大学附属・市民総合医療センター
神経内科・准教授
研究者番号：00305442

(2) 研究分担者

土井 宏 (DOI, Hiroshi)
横浜市立大学・医学部神経内科・准教授
研究者番号：10326035

田中 章景 (TANAKA, Fumiaki)
横浜市立大学・医学研究科神経内科・教授
研究者番号：30378012

(3) 連携研究者

松本 直通 (MATSUMOTO, Naomichi)
横浜市立大学・医学研究科遺伝学・教授
研究者番号：80325638