

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461533

研究課題名(和文)エクソームシーケンスによる髄鞘化関連遺伝子の解析

研究課題名(英文)Whole exome sequencing analysis in infants with a hypomyelinating leukodystrophy

研究代表者

植松 貢 (Uematsu, Mitsugu)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：90400316

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)：髄鞘化障害は大脳の髄鞘化が障害される疾患群でその原因は多彩である。本研究で29例の髄鞘化障害症例を収集し、アレイCGHやエクソームシーケンス(WES)などの遺伝学的検査を施行した。解析の結果、対象29例中19例(65.5%)で原因を同定できた。Pelizaeus-Merzbacher病と18q-症候群が最多で、それぞれ3例(11%)であった。WESにて6遺伝子(TUBB4A, POLR3B, KCNT1, MCOLN1, AHDC1, 新規候補遺伝子X)、計8症例に病的変異を認め、髄鞘化障害の原因同定にWESが有用であることが確認できた。今後本研究で同定できた新規遺伝子の解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Hypomyelinating leukodystrophy is a heterogeneous group of diseases. We studied 29 patients with hypomyelinating leukodystrophy to uncover their genetic etiology through chromosomal analyses, targeted gene analyses, array comparative genomic hybridization (aCGH) assay and whole-exome sequencing (WES). The presumptive diagnoses were confirmed in 62.1% of the enrolled patients (18/29). The most frequent backgrounds were 18q deletion syndrome and Pelizaeus-Merzbacher disease, with an incidence of 11% (3/29) for both. The diagnostic rate of aCGH was 6.9% (2/29). Using WES, the following causative genes of hypomyelination were identified in eight individuals (27.6%, 8/29): TUBB4A, POLR3B, KCNT1, MCOLN1, AHDC1 and X. Our findings suggest heterogeneous genetic backgrounds in patients with persistent white matter lesions. These data also indicate that WES may be a rapid and useful tool for identifying the underlying genetic causes of undiagnosed leukodystrophies.

研究分野：小児神経学

キーワード：髄鞘化障害 エクソームシーケンス ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

先天性髄鞘化障害(先天性大脳白質形成不全症)は精神運動発達障害や眼振、てんかんなど多彩な臨床症状を呈する疾患である。頭部 MRI 検査で比較的容易に診断可能であるが、proteolipid protein1(PLP1)遺伝子異常(Pelizaus-Merzbacher 病)が最も多いものの、多くの髄鞘化障害の原因は未だ不明である。

申請者は平成 19 年度よりシーケンス法と MLPA 法を用いて、平成 22 年度からは CGH アレイ法による解析も加えて、これまでに全国から検体を収集してこれまで先天性髄鞘化障害 27 例の解析を行ってきた。PLP1 遺伝子異常 3 例、GJC2 ヘテロ変異 1 例、18q-症候群 3 例、MCT8 遺伝子異常 1 例を確定できたが、他の 19 例は原因遺伝子確定できなかった。近年、次世代シーケンサーを用いた髄鞘化障害の責任遺伝子同定が相次いでなされ、2012 年に申請者の関連する研究室に次世代シーケンサーが導入された。申請者のこれまでの研究で収集した症例に兄弟症例が 2 家系含まれており、常染色体劣性遺伝形式が示唆されることから、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析が原因不明の症例の髄鞘化障害の責任遺伝子同定に有用と考えた。

2. 研究の目的

先天性髄鞘化障害の症例収集を継続し、これまでに研究者が確立した通常のシーケンス法と MLPA 法を併用した解析系を用いて、PLP1、GJC2、MBP 遺伝子について解析を行い、いずれも異常を認めなかった症例に対し、さらに CGH アレイ法により 18 番長腕を含む全染色体の微細なコピー数異常の検索を行い、網羅的な髄鞘化障害の責任領域解析を行う。また、これまでに解析した症例のうち原因遺伝子が不明の兄弟症例 2 家系について、次世代シーケンサーを用いた候補遺伝子の解析を行う。見つかった候補遺伝子について、収集した他症例を解析して遺伝子異常の有無を確認し、原因遺伝子としての確認を行う。解析中にさらに候補遺伝子が見つかった場合には同様の方法で確認を行う。

3. 研究の方法

新たに収集した先天性髄鞘化障害の症例については、PLP1、GJC2、MBP 遺伝子のスクリーニング解析(MLPA 法+シーケンス法)を行い、いずれも異常を認めなかった症例に対し、CGH アレイを用いて網羅的に全染色体の微細欠失や重複の解析を行った。また、これまで解析済みの 27 例のうち、まず兄弟症例 2 家系について次世代シーケンサーによるエクソームシーケンスを行った。これまでの申請者の研究で得られた知見を参考に候補遺伝子を選定し、他の髄鞘化障害症例の候補遺伝子異常の有無を、サンガー法によるシーケンスを行って確認し、原因遺伝子を

同定した。

(1) 対象

対象は年齢、性別を問わず、頭部 MRI 検査にて非進行性の髄鞘化障害を認める症例で、明らかな原因が不明のものとした。原因不明とは、先天代謝異常疾患が臨床所見、検査所見などで否定され、基礎疾患が明らかでないものとした。

(2) 症例の収集

当院および当院関連病院、小児神経科医のメーリングリストなどを通じて研究についての周知を行い症例を収集した。東北大学医学系研究科の遺伝子検査に関する指針などに従って作成した同意書を用いて、主治医が患者もしくは家族よりインフォームドコンセントを得た後、末梢血約 10ml を EDTA2Na の試験管に採取した。患者の家族については血液あるいは唾液を採取し、当院当科で DNA を抽出して保存し、以後の検査にあてた。

(3) 解析方法

収集した症例の臨床的特徴について、患者のデータベースを作成して解析を行った。

遺伝子解析について、まず MLPA 法による解析を平成 19-20 年度の科研費援助を受けて確立したプローブセットを用いて行った。上記で遺伝子異常が見つからなかった症例の CGH アレイ解析を、Agilent Technologies の 180K+SNP 用の解析キットを用いて行った。これらで原因が特定できなかった症例に対し、両親の検体も加えて次世代シーケンサーによるエクソームシーケンスを行い、候補遺伝子の検索を行った。候補遺伝子絞り込みは、髄鞘化関連遺伝子の gene panel を作成しスクリーニング、頻度やアミノ酸置換のない多型と考えられるバリエーションの除外、バリエーションの機能予測ツールである SIFT、PolyPhen-2、MutationTaster を用いた病的変異解析、を行い原因遺伝子の同定を行った。

新規に同定された候補遺伝子 X について、ウエスタンブロットを用いて蛋白の発現を確認した。さらにミトコンドリア機能解析として GDF-15 の測定と、ミトコンドリア治療薬による機能回復について検討した。

4. 研究成果

(1) 患者の臨床像

全国から収集した先天性髄鞘化障害患者 29 名の臨床的特徴について検討を行った。発症月齢の中央値は 4 カ月(0-36 カ月)で、ほとんどの患者(79%, 23/29 人)が生後 1 年以内に発症していた。男女比は、男性:女性=22:7 であった。血族婚の家系はなかった。最多の初発症状は、精神運動発達遅滞で 16 人に認められた。次に、痙攣 5 名、眼振 5 名、発育不良 5 名であった。そのほか、経過中に認められた主な神経学的異常所見は、痙性麻痺

11名,不随意運動10名,小頭症10名であった。頻度の低い症状には,失調,性腺機能低下,白内障,肝機能障害,オプソクローヌスなどが挙げられた。聴性脳幹反応は,結果を確認できた22名中,64%で異常所見を呈していた。一部の患者は,MRI所見上,脳梁の低形成や大脳あるいは小脳の萎縮を伴っていた。

(2) 遺伝子異常について

施行した検査および判明した遺伝子異常についての概説を下図に示す。全体では,29人中19人(65.5%)が診断に至った。病因と考えられる遺伝学的異常は,18人で判明した。皮膚線維芽細胞の紫外線感受性試験が陽性であることからコケイン症候群と診断された症例が1例あった。

染色体G分染法および18番染色体高度分染法によって,18番染色体長腕欠失を3名に認めた。さらなる検査として,MBP遺伝子のMLPAあるいはアレイCGHを施行したところ,患者1および患者2においては先天性大脳白質形成不全症の病因遺伝子と推定されているMBP遺伝子の1コピー欠失を認めたが,患者3ではMBP遺伝子の欠失は認めず,正常の2コピーを有することが判明した。この患者ではMBP遺伝子を含まない領域の18番染色体長腕欠失およびX染色体上のXq28の重複を認めた。

MRI上のびまん性白質病変に随伴して甲状腺機能異常を呈した患者では,SLC16A2のヘミ接合変異c.1609_1611delCCC(a.537delPro),頭蓋内石灰化を呈した患者ではTRESK遺伝子の複合ヘテロ接合が認められた。

MLPA,サンガー法による既知遺伝子のスクリーニングによってPLP1遺伝子に異常を認め,Pelizaeus-Merzbacher病の診断に至った患者が3名であった。ミスセンス変異1例,PLP1遺伝子欠失が2例であった(論文3)。GJC2およびMBPには,病的意義を有すると思われる異常は認めなかった。

アレイCGHで異常が判明した患者は2名であった。それぞれ,15番染色体長腕のヘテロ接合性喪失,EIF2B2遺伝子の欠失を認めた。

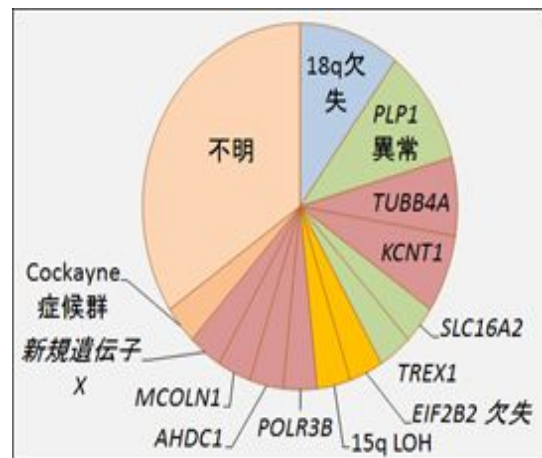
染色体検査,既知遺伝子のスクリーニング,アレイCGHによる検査で異常を指摘されなかった患者は18名であった。これらに対して全エクソームシーケンスを施行した。発端者9名,家系解析が9家系(trio8家系,quartet1家系)であった。解析によって病的意義を有すると推測される変異が判明したのは6遺伝子(TUBB4A,POLR3B,KCNT1,AHDC1,MCOLN1,PNPT1),計8症例であった。いずれの変異もサンガー法で確認した。

患者2名においてTUBB4Aの変異が判明した。TUBB4A(NM_006087.3)はチュブリン-4aをコードする遺伝子であり,4型ジストニアあるいは大脳基底核および小脳萎縮を伴う大脳白質形成不全(hypomyelination

with atrophy of the basal ganglia and cerebellum)の病因遺伝子である。患者1名には高頻度変異であるc.745G>A(p.Asp249Asn)変異を認めた。もう1名の患者にはこれまでに報告のないde novo変異c.743C>A(p.Ala248Asp)が判明した。

常染色体劣性遺伝形式で先天性大脳白質形成不全症を発症する病因遺伝子であるPOLR3B(NM_018082.5)の複合ヘテロ接合変異を1名に認めた。KCNT1遺伝子のヘテロ接合変異を2名に認めた。KCNT1遺伝子(NM_020822.2)は,ナトリウム依存性カリウムチャネルをコードする遺伝子である。新規のc.2718G>T(p.Pro906His)のde novo変異を1名に,c.862G>A(p.G288Ser)変異をもう1名に認めた(両親のサンプルなし)。AHDC1遺伝子(NM_001029882.3)のc.2197G>T(p.Ala733Ser)のヘテロ接合変異が1名で判明した。また,Mucopolysaccharidosis IV型の責任遺伝子であるMCOLN1(NM_020533.2)に複合ヘテロ接合変異を1名に認めた。c.410T>C(p.Leu137Pro)のミスセンス変異が父由来,c.802_803del(p.Ser268del)のフレームシフト変異が母由来であった。この2変異はいずれも新規変異であった(論文1)。10症例では今回の研究では原因遺伝子を同定できなかった。髄鞘化障害の原因同定にWESが有用であることが証明された。

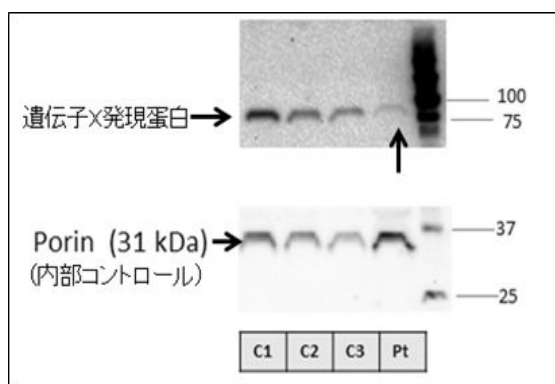
< 29 症例の遺伝子解析結果のまとめ >



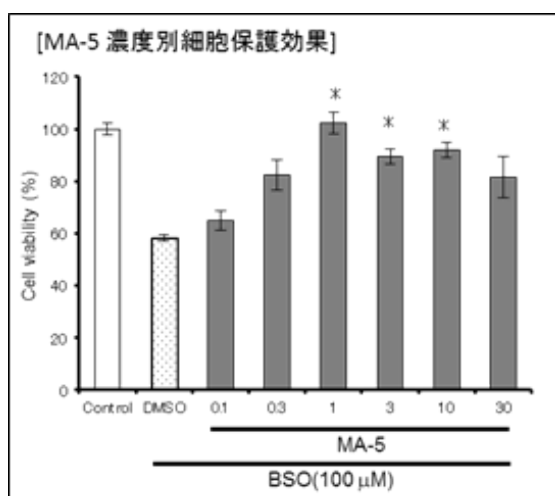
同胞罹患の1家系で新規候補遺伝子Xに複合ヘテロ接合変異を認めた。新規の疾患候補遺伝子Xは細胞質内tRNAのミトコンドリア内への輸送に関与することが分かっているが,髄鞘化障害に関連する報告はない。平成27年度では主に新規候補遺伝子Xの機能解析とこれまでの解析データの整理,および論文作成を行った。まず,ウエスタンブロットにて患者の線維芽細胞におけるX遺伝子の蛋白発現低下していることを確認。次に患者の線維芽細胞を用いてミトコンドリア機能を反映するとされているGDF-15を測定したところ著明に低下していることが確認された。さらに酸化ストレスによる患者線維芽細胞の

脆弱性が、ミトコンドリア治療薬 MA-5 にてレスキューできることを確認し、ミトコンドリア機能異常を証明することができた。

<ウエスタンブロットにより、新規候補遺伝子 X の発現低下を確認>



<症例の線維芽細胞を用いて、ミトコンドリア治療薬 MA-5 により細胞を酸化ストレスから回復できることを確認>



WES を用いた網羅的な髄鞘化障害解析の研究成果について、学術雑誌に論文投稿を行い受理された (Hum Genet. 2016 Jan; 135(1):89-98, 論文 2)。さらに 2016 年 5 月にアムステルダムで行われた国際小児神経学会でも、本研究の一部について成果発表を行った。

(3) 今後の展望

今後、本研究で同定できた新規遺伝子が髄鞘化へどのように関与しているのか、症例の線維芽細胞を用いた神経培養系の確立や、遺伝子 X のノックアウトマウスを作製してさらに機能解析を行っていき、ミトコンドリア機能と髄鞘化の関連、さらには治療薬のスクリーニングを行う系の開発を行っていく予定である。

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 3 件)

1) Shiihara T, Watanabe M, Uematsu M (8 人中 7 番目) et al., *Mucopolipidosis IV: A milder form with novel mutations and serial MRI findings*, *Brain and Development*, 2016, in press, 査読有
DOI: 0.1016/j.braindev.2016.02.0091

2) Arrai-Ichinoi N, Uematsu M (11 人中 2 番目), Kure S et al., *Genetic heterogeneity in 26 infants with a hypomyelinating leukodystrophy*, *Human Genetics*, 2016, 135: 89-98, 査読有
DOI: 10.1007/s00439-015-1617-7

3) Shiihara T, Watanabe M, Moriyama K, Uematsu M, Sameshima K, *A novel PLP1 frameshift mutation causing a milder form of Pelizaeus-Merzbacher disease*, *Brain and Development*, 2015, 37: 455-458, 査読有
DOI: 10.1016/j.braindev.2014.06.011.

[学会発表](計 2 件)

1) Mitsugu Uematsu, *Genetic heterogeneity in 26 infants with a hypomyelinating leukodystrophy*, 第 14 回国際小児神経学会議, 2016 年 5 月 1~5 日 アムステルダム(オランダ)

2) 植松 貢, *先天性白質形成不全症の遺伝子解析*, 第 57 回日本小児神経学会学術集会, 2015 年 5 月 28~30 日 大阪(帝国ホテル大阪)

[その他]

ホームページ等

東北大学医学部小児科

<http://www.ped.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植松 貢 (UEMATSU, MITSUGU)

東北大学・病院・講師

研究者番号: 90400316