

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860876

研究課題名(和文)先天性ミオパチーの新規原因遺伝子同定と機能解析

研究課題名(英文)Identification and functional analysis of a new candidate gene of nemaline myopathy

研究代表者

今村 江里子(奥水江里子)(IMAMURA, Eriko)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：80637877

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): ネマリンミオパチー患者に対するエクソーム解析によって日本人1家系から、新規の候補遺伝子であるKLHL40の複合ヘテロ接合性変異を同定した。国内外の疾患家系に対して遺伝子変異を検索し、143家系中28家系から、19種類の変異を見出した。結晶構造モデル解析から、本変異は化学結合を低下させ、タンパク質構造を不安定化させることが予測された。患者の筋線維ではKLHL40タンパク質が減少し、機能喪失が示唆された。そこで、ゼブラフィッシュ胚で遺伝子機能を阻害したところ、筋線維に異常が生じ、疾患の表現型が再現された。以上から、本遺伝子変異が筋繊維の異常を誘発し、ネマリンミオパチーを発症させることが示された。

研究成果の概要(英文): By whole exome sequencing, compound heterozygous mutation was identified in new candidate gene KLHL40 from a Japanese family with nemaline myopathy (NEM). A multinational cohort of 143 severe NEM patients lacking genetic diagnosis revealed that 19 mutations in KLHL40 in 28 NEM family. Molecular modeling suggested that the missense mutations would destabilize the protein. Protein studies showed that KLHL40 is a skeletal muscle specific protein that is absent in patient skeletal muscle. In zebrafish, knockdown of klhl40 resulted in disruption of muscle structure. These results indicated that the mutations of KLHL40 gene caused NEM.

研究分野：遺伝学

キーワード：先天性ミオパチー エクソーム解析 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

先天性ミオパチーは、全身の筋緊張低下、筋力低下、運動発達の遅れ、嚥下困難、呼吸不全などを主徴する遺伝性（多くは常染色体性劣性）の疾患群で、新生児期～乳児期早期に発症する。筋の病理学的特徴により命名され、ネマリンミオパチー、セントラルコア病、ミオチューブラーミオパチー、先天性筋線維タイプ不均等症 (CFTD)、その他のミオパチー (fingerprint, multicore, reducing body, sarcotubular myopathy)、筋内特異構造を示さないものなどの疾患に細分類されている (NEUROMUSCULAR DISEASE CENTER ホームページ)。適切な治療のためには、的確な診断が必須であるが、臨床像や筋病理所見は個々の先天性ミオパチーでかなりの共通点があり診断は必ずしも容易ではない。そのため、遺伝子検査は診断のための非常に有用な手段となりうる。現在までに 10 種類以上の原因遺伝子が同定されているが、先天性筋ミオパチーの原因遺伝子解明は連鎖解析が主体であった^①。本邦は欧米と比較して大家系や近親婚が少なく、連鎖解析による原因遺伝子解明研究で不利な状況にあるが、高密度アレイのマッピング情報と次世代シーケンサーを用いた包括的なエクソン領域の解析 (エクソーム解析) の併用による、小規模家系解析からの原因遺伝子単離の報告が近年急増している。当研究室では、ネマリンミオパチー家系を研究対象として、高密度アレイを用いた連鎖解析と次世代シーケンサーの併用解析を行ってきた。その結果、乳児重症型の罹患者 2 名の 1 家系から KLHL40 の複合ヘテロ型ミスセンス変異を疾患原因候補遺伝子として同定した。疾患候補遺伝子の機能解析にはモデル生物の利用が極めて有効である。KLHL40 遺伝子改変マウスは作成されていないため、ゼブラフィッシュを用いた KLHL40 遺伝子の機能解析を行った。ゼブラフィッシュは、発生学および遺伝学のモデル生物としてゲノム情報基盤および胚操作技術が確立されていることから、ヒト相同遺伝子の機能を解析することが可能である。また近年有用な筋疾患モデル生物としてマウスに次ぐ報告がある^②。

2. 研究の目的

先天性ミオパチーは、常染色体劣性もしくは常染色体優性の遺伝性疾患である。現在までに 10 種類以上の原因遺伝子が同定されているが、依然原因遺伝子が不明な病型が存在し、新規原因遺伝子の特定は本疾患の発症機構の更なる解明においても極めて重要である。本研究では、先天性ミオパチー家系における次世代シーケンサーを用いた原因遺伝子の同定およびネマリンミオパチー 1 家系から単離された候補遺伝子 KLHL40 をゼブラフィッシュで欠損させ、ネマリンミオパチーの発症機構を解明し診断・治療に資する。

3. 研究の方法

(1) KLHL40 のスクリーニングおよびネマリンミオパチー新規原因遺伝子の同定

ネマリンミオパチー家系で単離された KLHL40 遺伝子変異が他家系でも認められるか、平成 24 年度までに集積したネマリンミオパチー患者の末梢白血球よりゲノム DNA を抽出し、スクリーニングを行った。さらに日本、アメリカ、フィンランド、オーストラリアの国際共同研究により、ネマリンミオパチー家系に対し KLHL40 の遺伝子変異をスクリーニングした。エクソーム解析の結果得られたデータから SNP 登録のあるものを除外し、当研究室で蓄積した 900 人を超える正常人、他疾患のエクソームデータに認められた変異も除外した。

(2) KLHL40 の変異がタンパク質の構造に及ぼす影響の解析

単離された KLHL40 遺伝子の変異 (構造 repeat 変異) がタンパク質の立体構造や機能に与える影響を FoldX プログラムを使用して明らかにした。

(3) 正常発生ゼブラフィッシュにおける whole mount in situ hybridization

ゼブラフィッシュ klhl40 遺伝子プロンプトを用いた whole mount in situ hybridization を行い発現の局在を解析した。

(4) ゼブラフィッシュ発生初期胚における klhl40 機能欠損によるミオパチーの発症機構解明

モルフォリノアンチセンスオリゴを導入し、klhl40 遺伝子を機能阻害したゼブラフィッシュ胚を作出し、筋肉の発生に及ぼす影響を観察した。このような遺伝子変異体に対して、筋繊維特異的な免疫染色 (抗体: F59, α -actinin) および Phalloidin による F-actin 染色を行い、klhl40 機能欠損が筋繊維の形態に与える影響を解析した。電子顕微鏡によるネマリン小体の解析を行い、klhl40 の機能とネマリンミオパチーとの関連性を調べた。

(5) 遺伝子変異同定と原因遺伝子の確定

同定した疾患原因遺伝子候補に対し、正常コントロール、他の家族例スクリーニングを行い、遺伝学的に原因遺伝子を確定した。さらに、既知のネマリンミオパチー原因遺伝子に変異が認められない他家系において、次世代シーケンサーによる新規原因遺伝子の単離を行った。罹患者のみのエクソーム解析で変異遺伝子同定が困難な場合、非罹患者のエクソーム解析を追加し罹患者特異的な変異の抽出を行った。

4. 研究成果

(1) ネマリンミオパチーを有する家系における原因遺伝子の同定

エクソーム解析の結果乳児重症型の罹患者同胞 2 人、非罹患者 1 人、非罹患者の両親 5 人から成る日本人 1 家系から新規の候補遺伝子 KLHL40 に複合ヘテロ接合性変異を同定した。さらに日本、アメリカ、フィンランド、オー

オーストラリアの国際共同研究により、ネマリンミオパチー家系に対しKLHL40の遺伝子変異をスクリーニングした(図1)。

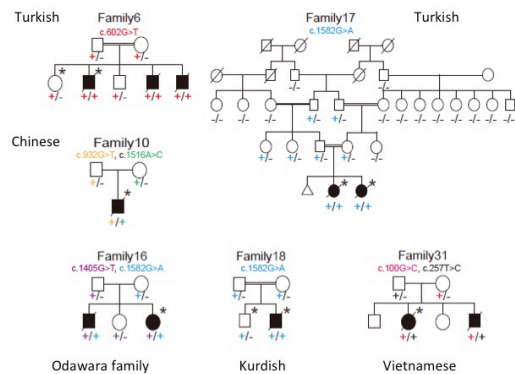


図1 KLHL40に変異を認めた家系図(一部抜粋)

143家系中28家系(19.6%)から19種類の遺伝子変異を同定した(図2)。日本人では創始者変異により本遺伝子変異の検出率はさらに高頻度であった(27.7%)。

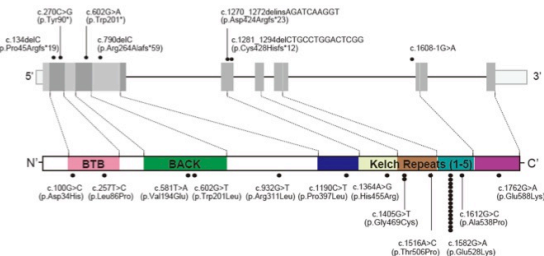


図2 同定されたKLHL40遺伝子の全変異とアミノ酸の変化

(2) KLHL40 遺伝子変異の機能解析

タンパク質の結晶構造モデルから、本変異は機能的リピート上に存在し、化学結合を不安定化させ、ドメイン構造の維持に影響を与えることが予測された(図3)。

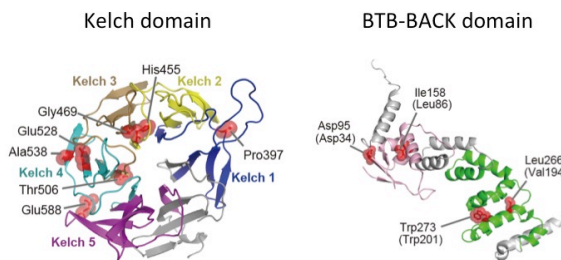


図3 KLHL40の結晶構造モデルと同定された変異

リアルタイムPCRを行い、KLHL40は胎児および成人ヒト組織で骨格筋に強く発現していることを確認した。KLHL40は患者の筋線維でほとんど発現していなかったため、機能喪失が示唆された。

(3) モデル動物を用いた疾患検証

ゼブラフィッシュ *klhl40* の機能を解析した。RT-PCRおよび *in situ hybridization* からゼブラフィッシュ *klhl40* はヒトと同様に筋肉、心臓および筋肉の前駆細胞に強く発現していることを認めた。ゼブラフィッシュ胚にモルフォリンアンチセンスオリゴを導入し、*klhl40* の機能を阻害させ、筋肉の発生に及ぼす影響を観察した。*klhl40* を機能阻害したゼブラフ

イッシュ胚では、筋線維間にギャップが生じ、筋線維の走行異常が認められた(図4)。

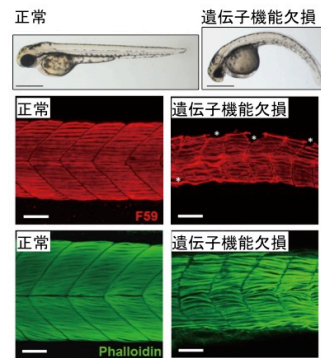


図4 ゼブラフィッシュ疾患モデルにおける筋肉への影響

電子顕微鏡画像からZ線の崩壊も観察されたため、KLHL40の機能喪失がネマリン小体の出現に関与することを推定した。

(4) 責任遺伝子が未同定のネマリンミオパチー症例における遺伝子変異同定と原因遺伝子の確定

責任遺伝子が未同定のネマリンミオパチー症例に対し、エクソーム解析による網羅的遺伝子解析を行い新規の責任遺伝子の単離を試みた。乳児重症型ネマリンミオパチーの2人の罹患同胞と両親に対し全エクソーム解析を施行した結果、罹患同胞のみに既知の原因遺伝子 ACTA1 の新規のヘテロ接合性変異

(c.448A>G, p.Thr150Ala) を同定した。MiSeqを用いたウルトラディープシーケンスを罹患同胞の白血球由来ゲノムDNAと両親の白血球、唾液、髪、爪由来のゲノムDNAに対して施行した。その結果、母親にACTA1の超低頻度体細胞モザイク変異を検出した^③。

<引用文献>

- ①Nance et al., Curr Neurol Neurosci Rep. 12:165-174, 2012
- ② Lin et al., Neuromuscul Disord. 22:673-684, 2012
- ③Miyatake et al., Neuromuscul Disord. 24:642-7, 2014

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7件)

- ① Miyatake S, Koshimizu E, Hayashi YK, Miya K, Shiina M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ogata K, Nishino I, Matsumoto N. Deep sequencing detects very-low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy. Neuromuscul Disord. 査読有, 24(7), 2014, 642-7
DOI: 10.1016

② Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu 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, Sivadurai 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, 11;93(1), 2013, 6-18
DOI: 10.1016

[学会発表] (計 7 件)

① 奥水 江里子. 次世代シーケンサーを用いた超低頻度モザイク変異の検出: ネマリンミオパチーの一例. 日本人類遺伝学会第 59 回大会, 11 月 19 日~11 月 22 日, 2014 年, タワーホール船堀, (東京)

② Koshimizu E. Deep sequencing detects very low-grade somatic mosaicism in the unaffected mother of siblings with nemaline myopathy. *American Society of Human Genetics*, Oct. 18-22, 2014, San Diego, (USA)

③ 林 由起子, 奥水 江里子. ネマリンミオパチーの遺伝子変異解析. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 11 月 21 日~11 月 23 日, 2013 年, 江陽グランドホテル, (宮城県仙台市)

④ 宮武 聡子, 奥水 江里子. ネマリンミオパチーの新規原因遺伝子 KLHL40 の同定. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 11 月 21 日~11 月 23 日, 2013 年, 江陽グランドホテル, (宮城県仙台市)

[その他]

ホームページ等

松本教授ら研究グループが、筋肉の障害、筋力低下をきたす『先天性ミオパチー』の新たな原因遺伝子を発見！

<http://www.yokohama-cu.ac.jp/univ/pr/press/130610.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 江里子 (奥水 江里子)

(IMAMURA, Eriko)

横浜市立大学・医学研究科・博士研究員

研究者番号：80637877

(2) 研究分担者
なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者
なし ()
研究者番号：