

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26242085

研究課題名(和文) 遺伝学的アプローチによる小脳機能障害の解明

研究課題名(英文) Study of cerebellum disturbance by genetic approaches

研究代表者

川上 秀史 (Kawakami, Hideshi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：70253060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：優性遺伝性脊髄小脳変性症の家系から、低電位型カルシウムチャンネルの遺伝子CACNA1Gの一アミノ酸の置換を見出し、原因遺伝子を同定した。臨床的には、純粋小脳型を示したが、一部強い静止時振戦を伴う場合もあった。同変異のノックインマウスを作成し、一部症状の再現に成功した。難聴、原発性無月経、小脳失調を伴うペロー症候群の遺伝子として、ミトコンドリアDNAのヘリケースであるTwinklをコードする遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed two Japanese families with autosomal dominant SCA using linkage analysis and exome sequencing, and identified CACNA1G, which encodes the calcium channel CaV3.1, as a new causative gene. Although most patients exhibited the pure form of cerebellar ataxia, two patients showed prominent resting tremor in addition to ataxia. CaV3.1 is classified as a low-threshold voltage-dependent calcium channel (T-type). The mutation p.Arg1715His, identified in this study, was found to be located at S4 of repeat IV, the voltage sensor of the CaV3.1. Electrophysiological analyses revealed that the membrane potential dependency of the mutant CaV3.1 transfected into HEK293T cells shifted toward a positive potential. Our study also identifies Twinkle mutations as a cause of Perrault syndrome accompanied by neurologic features and expands the phenotypic spectrum of recessive disease caused by mutations in Twinkle.

研究分野：神経内科学

キーワード：脊髄小脳変性症 Ca チャンネル

1. 研究開始当初の背景

申請者は2000名以上の脊髄小脳変性症(SCD)の患者検体を用いて臨床遺伝学的研究に携わってきたが、最近まとめた2121人の患者データから優性遺伝と考えられる家族歴を持つ患者では、772人中205人(155家系)の26.6%が、優性遺伝以外の家族歴のある患者1036人の357人の34.5%がいまだ原因遺伝子不明である。

2. 研究の目的

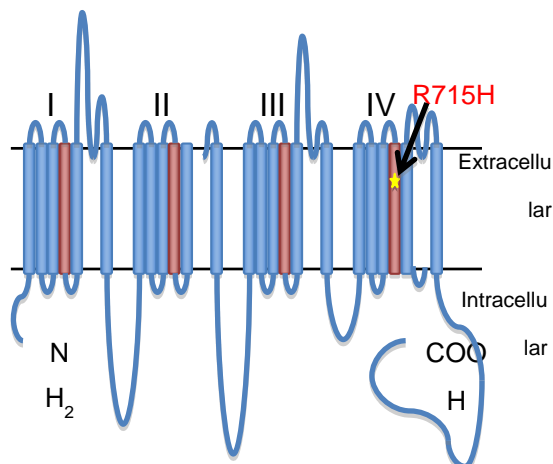
原因遺伝子未同定の遺伝性脊髄小脳変性症患者293家系から、高密度SNPを使った遺伝解析と次世代シーケンサーによる解析により、新規原因遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

脊髄小脳変性症優性遺伝家系および血族婚の明らかな劣性家系を対象にエクソームシーケンスを行い、変異候補を抽出する。高密度SNPタイピングを行い、SNPタイピングから得られたデータは、原因遺伝子が存在する可能性が高い候補領域を絞り込むために用いる。家系解析や他の家系での解析により、原因遺伝子を同定する。さらに網羅的に原因遺伝子不明の脊髄小脳変性症患者のシーケンスを行い、データベースを作製し、コントロールおよび疾患コントロールとの比較により、原因遺伝子を同定する。

4. 研究成果

優性遺伝性脊髄小脳変性症の日本人1家系に対して、全ゲノム塩基多型の解析を行い、連鎖解析及びハプロタイプ解析により、原因遺伝子領域を絞り込んだ。さらに別の1家系においても、同領域に同じハプロタイプを認めた。発症者において、エクソーム解析を行い、共通する変異をカルシウムチャンネルCa_v3.1をコードする遺伝子CACNA1Gに認めた。同じ変異は別の1家系においても存在した。この2家系は同祖であり、この2家系に属する患者の多くは、純粹失調型小脳失調を示したが、2人の患者は、小脳失調に加えて静止時振戦も示した。



Ca_v3.1は、低閾値電位依存性カルシウムチャンネル(T-type)であり、中枢神経系、特に小脳に豊富に存在している。この研究で同定された変異p.Arg1715Hisは、Ca_v3.1チャンネルのrepeat IVのS4の電位センサーの位置に存在する。そこでHEK293T細胞にCa_v3.1チャンネルを発現させた電気生理学の実験を行なったが、変異Ca_v3.1チャンネルの膜電位依存性は陽性電位側に偏位していた。

さらに、我々は、iPS細胞を患者由来線維芽細胞から樹立し、プルキンエ細胞に分化させた。これは、我々が知る限り、患者由来のiPS細胞をプルキンエ細胞に分化させた初めてのケースに当たるが、形態的観察においては患者由来のプルキンエ細胞とコントロールの間では、特に差異を認めなかった。今後、詳細な解析が望まれる。

ヒトの変異を持つノックインマウスをクリスパー法を用いて作成した。そのホモ接合及びヘテロ接合において、時間の経過とともにRota rod及びbeam walking testにおいて、野生型に比べ差を認め、運動失調を再現した。また組織学検討では、ホモ接合及びヘテロ接合において小脳プルキンエ細胞の減少を認めた。RNAの発現を検討すると、野生型の小脳において継時的に増加する群と減少する群があるが、ノックインマウスでは逆の挙動を示すRNAの一群が存在し、特に臨床症状発症前の5ヶ月、6ヶ月目から変動する一群のRNAがあり、神経変性に関わるグループと考えられた。今後、その経路を明らかにする必要がある。

また難聴、原発性無月経、運動失調を伴うPerrault症候群の2家系から、新規の遺伝子として*C10orf2*を同定した。*C10orf2*は、ミトコンドリアのDNA複製に働くヘリケースであるTwinkleをコードするが、各々の家系において、複合ヘテロ変異を見出した。

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: Miyamoto T, Akutsu SN, Fukumitsu A, Morino H, Masatsuna Y, Hosoba K, Kawakami H, Yamamoto T, Shimizu K, Ohashi H, Matsuura S. PLK1-mediated phosphorylation of WDR62/MCPH2 ensures proper mitotic spindle orientation. *Hum Mol Genet.* 2017 Nov15;26(22):4429-4440. doi: 10.1093/hmg/ddx330. 査読有

2: Naito H, Takahashi T, Kamada M, Morino H, Yoshino H, Hattori N, Maruyama H, Kawakami H, Matsumoto M. First report of a Japanese family with spinocerebellar ataxia type 10: The second report from Asia

after a report from China. PLoS One. 2017 May 19;12(5):e0177955. doi: 10.1371/journal.pone.0177955. eCollection 2017. 査読有

3: Ishida Y, Kawakami H, Kitajima H, Nishiyama A, Sasai Y, Inoue H, Muguruma K. Vulnerability of Purkinje Cells Generated from Spinocerebellar Ataxia Type 6 Patient-Derived iPSCs. Cell Rep. 2016 Nov 1;17(6):1482-1490. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.026. 査読有

4: Morino H, Matsuda Y, Muguruma K, Miyamoto R, Ohsawa R, Ohtake T, Otake R, Watanabe M, Maruyama H, Hashimoto K, Kawakami H. A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. Mol Brain. 2015 Dec 29;8:89. doi:10.1186/s13041-015-0180-4. 査読有

5: Gomez CM, Kawakami H. Neurogenetics: The expanding horizons of diagnosis and disease pathogenesis. Neurology. 2015 Mar 17;84(11):1070-1. doi:10.1212/WNL.0000000000001372. 査読有

6: Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. Cell Rep. 2015 Feb 3;10(4):537-50. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.051. 査読有

7: Morino H, Pierce SB, Matsuda Y, Walsh T, Ohsawa R, Newby M, Hiraki-Kamon K, Kuramochi M, Lee MK, Klevit RE, Martin A, Maruyama H, King MC, Kawakami H. Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features. Neurology. 2014 Nov 25;83(22):2054-61. doi:10.1212/WNL.0000000000001036. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 森野豊之, 松田由喜子, 倉重毅志, 六車恵子, 外丸祐介, 橋本浩一, 丸山博文, 川上秀史 SCA42 の臨床と分子病態機序
第 35 回日本神経治療学会総会
大宮 2017 年 11 月 16 日

2. Y. Matsuda, H. Morino, T. Kurashige, T. Matsuoka, Y. Sotomaru, K. Hashimoto, H. Kawakami

A mutation of the spinocerebellar ataxia gene CACNA1G induces cerebellar Purkinje cell death and ataxia in mice.

Neuroscience 2017 Washington 2017 年 11 月 12 日

3. 森野豊之, 松田 由喜子, 六車 恵子, 宮本 涼介, 大澤 亮介, 大竹 敏之, 音部 玲子, 渡辺 雅彦, 丸山 博文, 橋本 浩一, 川上 秀史 低電位活性化型 Ca チャンネル CACNA1G の変異は脊髄小脳変性症の原因である

第 39 回日本神経科学大会 横浜
2016 年 7 月 20 日

4. 倉重毅志, 森野豊之, 城間紀之, 山崎雄高橋哲也, 有広光司, 丸山博文, 伊東秀文, 川上秀史, 松本昌泰

MAPT の新規遺伝子変異を認めた FTDP-1 の一剖検例

第 42 回臨床神経病理懇話会 和歌山
2014 年 11 月 16 日

5. Hiroyuki Morino, Yukiko Matsuda, Ryosuke Ohsawa, Keiko Hiraki, Takashi Kurashige, Yuishin Izumi, Yu Yamazaki, Tetsuya Takahashi, Akihiko Takashima, Yoshiyuki Soeda, Tomohiro Miyasaka, Makoto Higuchi, Naruhiko Sahara, Tetsuya Suhara, Hitoshi Shimada, Hirofumi Maruyama, Hideshi Kawakami

A novel insertion mutation of MAPT causes FTDP-17 with distinct pathology

American Society of Human Genetics
San Diego, CA, USA 2014 年 10 月 20 日
20141116

6. 森野 豊之, 松田 由喜子, 平木 啓子,
倉重 毅志, 和泉 唯信, 山崎 雄, 高橋 哲
也, 丸山 博文, 伊東 秀文, 川上 秀史

FTDP-17の原因となるMAPTの新規挿入変異の
同定 第37回日本神経科学学会学術大会
横浜 2014年9月11日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 遺伝子改変非ヒト動物及び脊髄小脳変
性症の治療薬又は予防薬のスクリーニング
法

発明者: 川上秀史、森野豊之、松田由喜子

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-031706

出願年月日: 平成30年2月26日

国内外の別: 国内

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

川上 秀史 (KAWAKAMI, Hideshi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号: 70253060

(2) 研究分担者

森野 豊之 (MORINO, Hiroyuki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号: 10397953

(3) 研究分担者

大澤 亮介 (Ohsawa, Ryouyuke)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号: 20719356

(4) 研究分担者

福士 雅也 (FUKUSHI, Masaya)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・助教

研究者番号: 50313515

(5) 研究分担者

山本 卓 (YAMAMOTO, Takashi)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号: 90244102

(6) 研究分担者

丸山 博文 (MARUYAMA, Hirofumi)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・教授

研究者番号: 90304443

(7) 研究分担者

外丸 裕介 (SOTOMARU, Yusuke)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号: 90309352