

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26670507  
研究課題名(和文) Gillespie症候群の原因遺伝子同定と病態解明  
  
研究課題名(英文) Molecular genetic study of Gillespie syndrome  
  
研究代表者  
齋藤 伸治 (Saitoh, Shinji)  
  
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
  
研究者番号：00281824  
  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Gillespie症候群(GS)は小脳失調、知的障害、無虹彩を特徴とする稀な疾患である。原因は不明であったが、私たちは日本人GS患者を集積し、全エクソーム解析を行い、原因遺伝子Aを同定した。同定された変異はすべてde novo変異であり、遺伝子AのC末端側に集積していた。C末端以外の場所の変異では小脳失調は起こすが、無虹彩は合併しない。そこで、私たちは遺伝子AのC末端には虹彩発生に関連するアイソフォームが存在するとの仮説を立て、マウスを用いた一連の実験を行った。その結果、遺伝子AのC末端に虹彩特異的転写産物を見だし、仮説が正しいことを証明した。

研究成果の概要(英文)：Gillespie syndrome (GS) is characterized by cerebellar ataxia, intellectual disability, and aniridia. We have performed whole exome sequencing in Japanese patients with GS, and identified de novo mutations in gene A. The identified mutations were clustered in the C terminal region of gene A, suggesting the presence of the iris specific isoform because mutations located at other than the C terminal region did not cause aniridia. We introduced V5 tag to the C terminal of mouse homolog of gene A, and investigated C terminal transcripts. Then, we successfully identified the iris specific transcript which would underly the pathogenesis of GS.

研究分野：小児科

キーワード：Gillespie症候群 小脳萎縮 虹彩欠損

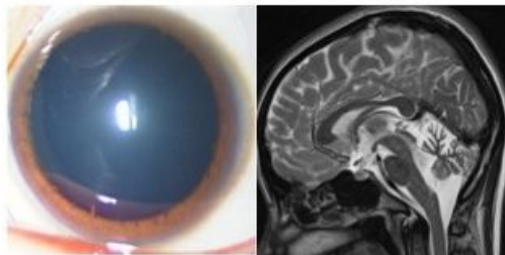
## 1. 研究開始当初の背景

Gillespie 症候群 (GS) は小脳失調、知的障害、無虹彩を特徴とする稀な疾患である (Hingorani. Eur J Hum Genet 2012)。GS の多くは孤発例であるが、稀な家族例も報告されている。そのため、遺伝要因が重要と考えられているが、原因は未だに明らかにされていない。小脳失調をきたす疾患は数多いが、無虹彩を示す疾患は少なく、無虹彩の原因遺伝子としては *PAX6*、*FOXC1*、*PITX2*、*PITX3* しか同定されていない。その中でも *PAX6* 以外は極めて稀である。このように、GS の原因遺伝子が同定されれば、虹彩の発生について重要な知見となる。さらに、小脳失調や知的障害の成因の理解に寄与することが期待できる。

## 2. 研究の目的

私たちは日本人 GS 患者 4 例を集積し、全エクソーム解析を実施した。その結果、4 名全員で遺伝子 A の C 末端領域に de novo 変異を同定した。遺伝子 A の C 末端領域以外の変異はすでに、小脳萎縮を来す疾患において同定されていた。しかし、これらの患者では虹彩病変は報告されていない。そこで、本研究においては、C 末端領域に集積した変異が虹彩病変を引き起こすメカニズムの解明を目的とする。

同時に、遺伝子変異解析系を確立し、GS に対する遺伝子診断法を確立する。この診断法により患者集積を進め、GS の臨床的全体像を明らかにし、診断基準の作成とそれに基づく治療管理指針の作成を目的とする。



GS患者での無虹彩(左)と小脳萎縮(右)

図 1. GS 患者における無虹彩と小脳萎縮

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子 A 変異解析システムの確立

遺伝子 A はエクソンが 50 個以上の大きな遺伝子であり、従来法のサンガー法でのシーケンスが困難である。そこで、Ion Torrent PGM (Life technologies) を用いた高速シーケンス法を確立した。AmpSeq (Life technologies) を用いてカスタムライブラリーを作成し、Ion PGM にてシーケンスを行う系を確立した。

### (2) 遺伝子 A の C 末端に V5 tag をノックインしたマウスの作成

最初にマウス C 末端蛋白特異的な抗体作成を試みた。しかし、特異性が十分な抗体が得られなかった。そこで、マウス遺伝子 A の C 末端に V5 tag を挿入したノックインマウスを作成した。

### (3) 遺伝子 A がコードする C 末端転写産物の解析

マウス胎児の脳および眼球から RNA を抽出し、ライブラリーを作成し、Illumina HiSeq 2000 にて RNA seq を行った。転写開始点の同定には Clontech 社 SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing kit を使用した。

### (4) 遺伝子 A がコードする C 末端蛋白の解析

マウス胎児の脳および眼球から蛋白を抽出し、上述した抗 V5 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。さらに、免疫組織化学にて蛋白の存在部位を解析した。

### (5) 変異遺伝子と野生型遺伝子の細胞導入と解析

野生型および GS 患者に同定された変異を導入した遺伝子 A を発現ベクターにクローニングし、COS-7 および HEK293 細胞に導入した。すべての変異体は蛋白量としては同等に発現した。さらに、野生型、変異型ともに細胞内局在として小胞体に局在することが確認された。したがって、GS 変異は機能的な障害を示すことが示唆された。これら導入した細胞を用いて、電気生理学的解析を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 患者由来変異の同定

全エクソーム解析で同定した 4 例に加えて、Ion PGM を用いた解析により新たに 1 例に変異を同定した。その結果、5 例の GS 患者を集積することができた。これらの変異はすべて C 末端に集中していた。

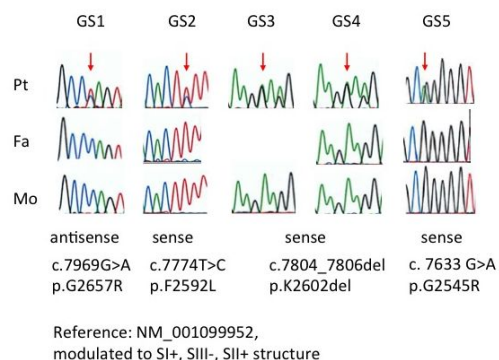


図 2. GS 患者 5 例で同定した変異

(2) V5 tag をノックインしたマウスの作成

遺伝子 A の C 末端に V5 tag を挿入したノックインマウスの作成に成功した。ノックインマウスは表現型が野生型と変わらず、生殖能力も問題なかった。そのため、遺伝子 A、特に C 末端配列の発現における役割を解析する上で強力なツールを得ることができた。

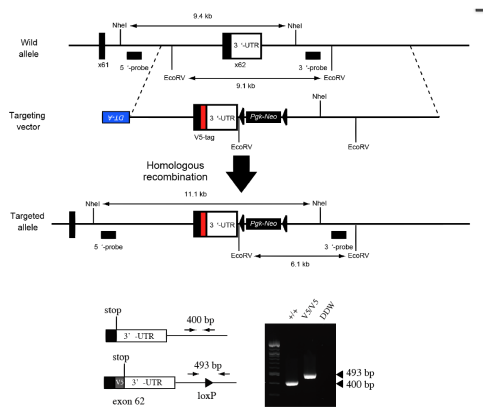


図 3. ノックインマウスのターゲットベクターの解説

(3) 遺伝子 A がコードする C 末端転写産物

V5 ノックインマウスの胎児眼球由来 RNA から転写開始点を同定した。その結果、遺伝子 A の exon 57 内に眼球特異的転写開始点を同定した。

(4) 遺伝子 A がコードする C 末端蛋白

遺伝子 A は脳において豊富に発現している。マウス胎児眼球由来蛋白を用いて、ウエスタンブロットを行ったところ、眼球では完全長の蛋白は発現が見られず、短い蛋白のみを認めた。V5 ノックインマウスを用いた実験においても同様の結果であり、胎児眼球での遺伝子 A の発現は C 末端由来の短い配列が優位であることが示された。

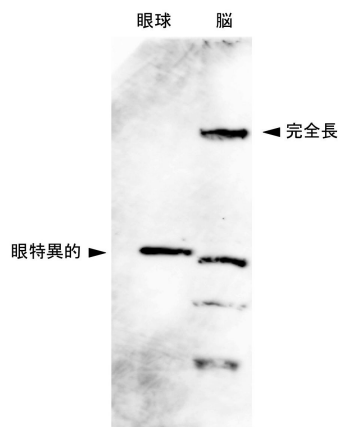


図 4. 眼球および脳に対するウエスタンブロット解析

この結果は、C 末端蛋白は発生特異的、領域特異的に機能していることを示唆している。

次に、胎児眼球における遺伝子 A の発現を抗 V5 抗体を用いて検討した。その結果、胎児期の虹彩において V5 抗体に反応する信号を同定した。虹彩以外の部分での発現は少なく、遺伝子 A が眼球発生において、特に虹彩の発生に深く関与している可能性が示唆された。

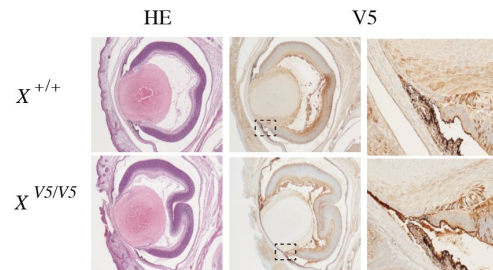


図 5. ノックインマウス胎児眼球での遺伝子 A の発現。上が野生型、下が V5 ノックインマウス

(5) 変異遺伝子のチャンネル機能への影響

完全長蛋白 A はカルシウムチャンネルとしての機能を有することが知られている。神経細胞においてはカルシウムチャンネルとしての機能が主たる働きと考えられる。患者で同定された変異を導入した解析では、野生型と比較してチャンネル機能はあまり変化を認めなかった。これらの結果は GS 患者における完全長蛋白 A の機能障害は軽微であると考えられることができる。

(6) これまでの成果のまとめと今後の課題

GS の原因遺伝子を同定し、発症機構について解析を行った。原因変異はすべて C 末端領域に存在していた。マウス遺伝子 A の C 末端に V5 tag をノックインしたマウスの作成に成功した。このマウスを用いた検討において、C 末端に眼球特異的な転写開始点を同定し、眼球において C 末端蛋白が発現していることを明らかにした。この C 末端蛋白は胎児眼球の虹彩に発現しており、虹彩発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

GS 患者に対する遺伝子解析を行う系を確立した。次世代シーケンサーを用いることで、短時間の解析が可能となった。この系を用いて新たに 1 名の患者を同定し、有用性が示された。稀な疾患のために、患者集積に時間がかかるため、診断基準の策定にはさらな

る患者集積が必要である。

今後の課題は、マウスの実験においては、同定した C 末端蛋白が虹彩発生における役割を明らかにするために、虹彩発生のマスター遺伝子である PAX6 との相互作用など、C 末端蛋白の機能を明らかにするための実験を予定している。患者解析としては、開発した遺伝子診断システムを用いて、患者集積を進め、臨床症状の全貌を明らかにし、治療方針の策定を進めたい。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし。

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

齋藤 伸治 (SAITOH, Shinji)

名古屋市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00281824

##### (2)研究分担者

吉浦 孝一郎 (YOSHIYRA, Koichiro)

長崎大学・

原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：00304931

井原 義人 (IHARA, Yoshito)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70263241