

20/224/23A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

神経・筋疾患分野

原因不明の精神遅滞の病態解明を目指した
統合的ゲノム解析に関する研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 林 深

平成25（2013）年 5月

目次

1. 総括研究報告書 1
原因不明の精神遅滞の病態解明を目指した統合的ゲ
ノム解析に関する研究
研究代表者：林 深
研究分担者：稲澤 讓治

2. 研究遂行に関連する資料一覧 8

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
総括研究報告書

原因不明の精神遅滞の病態解明を目指した統合的ゲノム解析に関する研究

研究代表者：

林深 東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンター 特任講師

研究分担者：

稲澤譲治 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝学 教授

研究要旨

精神遅滞(mental retardation; MR)は全人口の1~3%に存在し、長期的な医療ケアや療育を必要とするが、臨床的に診断がつくのは全体の約2割である。本研究の目的は、原因不明のMR症例から疾患原因遺伝子を同定して病態をゲノムレベルで明らかにし、新規疾患概念を確立することである。平成24年度は、下記のような成果が得られた。

病態不明であるMRの425症例に加えて新規に収集した23症例、合計448症例を対象にSNPアレイを用いた解析を施行し、病態との関連が疑われるゲノムコピー数変化(CNV)を62ヶ所に、片親性ダイソミー(UPD)を1ヶ所に検出した。これらのゲノム構造変化を端緒として、特に単一遺伝子が疾患原因となっている可能性が高い複数の疾患原因遺伝子候補を指摘した。具体的には、シナプス安定への関与が動物モデルで示唆されているがヒトにおける疾患との関連は未報告であるGene X、エピゲノム修飾に関わるGene Yである。これらの遺伝子については、その機能喪失変異が細胞レベルでどのような影響を引き起こすか、機能解析を継続している。また、CNVの対側アレルに座位する遺伝子のシーケンスを施行し、てんかんを伴うMR症例において対側アレルのGene Zにナンセンス変異を検出したことから、Gene Zの複合ヘテロが疾患原因となっている可能性を考え、Gene Zを、てんかんを伴うMRの原因遺伝子候補として指摘した。現在では、類似する臨床症状を呈する約200症例を新たに収集し、Gene Zの遺伝子変異を施行している。

一方で、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いたCNVの再解析により、疾患に関連するCNV(pCNV)の生成機構を塩基レベルで考察した。具体的にはpCNVを有するMR症例23例を対象に、オリゴヌクレオチドアレイによる再解析を行い、切断点近傍の配列をシーケンスし、構造の特徴を塩基レベルで明らかにした。この結果、非症候性MRの原因となるpCNVは、特定の繰り返し配列に依存する組み替え機構よりも、配列非依存的に生じる偶発的なゲノム再構成によってより生じやすいことが示唆された。

これらの成果を基盤として、次年度は疾患原因遺伝子候補の機能解析を併せて行い、MRの病態を包括的に明らかにしてゆく予定である。

研究分担者 氏名 所属機関 職名

稲澤謙治

東京医科歯科大学 難治疾患研究
所分子細胞遺伝学 教授

A. 研究目的

精神遅滞(mental retardation, MR)は発達期における知的能力の障害によって特徴づけられる。全人口の約1~3%に存在し、長期的な医療ケアを必要とするにも関わらず、表現型(phenotype)から臨床診断がつくのは全体の約2割とされている[Hunter.2000]。これらの未診断症例を遺伝形質(genotype)の面から病態解明してゆくことは、臨床・研究の両面において重要な課題であると考えられる。また、近年体細胞におけるエピゲノム変化と遺伝子発現・中枢神経系機能変化との関連が報告されており[Guo et al. 2011]、ゲノム・エピゲノムの包括的理解はMR病態理解の基盤となることが期待される。

申請者らは全国の医療施設の協力を得てMR症例を収集し、ゲノムアレイを用いた解析を行ってきた。原因不明の多発奇形を伴う精神発達遅滞646例の解析で130例(20.1%)に、X連鎖性発達遅滞が疑われる144家系の解析で10家系(6.9%)に疾患原因となるゲノムコピー数変化(pathogenic copy number variant; pCNV)を検出した[Hayashi et al.2010; Honda et al.2010]。本研究で得られた疾

患関連遺伝子については詳細な解析を行い、例えば小頭症・小脳脳幹部低形成を伴うMRの原因遺伝子としてCASKを指摘するとともに新規10症例を収集・解析し、新規疾患概念確立の契機となる報告をした[Hayashi et al. 2011]。また、父母子供のトリオ100家系を対象としたアレイ解析により日本人健常者集団におけるCNVデータベースを構築しweb上に公開した。

本研究の目的は、以上の研究により申請者らが蓄積してきたMR800症例以上のバイオリソース、genotype/phenotype情報、各種アレイや高速シークエンサーなどのゲノム解析技術の蓄積を基盤に、原因不明のMR症例から疾患原因遺伝子を同定して病態を明らかにし、新規疾患概念を確立することである。

本研究により、臨床的・学術的には、精神遅滞・発達障害・学習障害などもっばら臨床症状から定義されていた症例を個別に再評価し、治療や療育につなげることが期待できる。各症例におけるゲノム異常の観点からの病態把握は、治療方法や症状緩和ケアの開発、治療薬やコンパニオン診断薬の開発の大切な基盤情報になる。医療行政の観点からは、各患者に最適な個別医療体制を策定する基盤となることが期待される。

また、正確な病態把握は、医療資源の適切な使用に貢献する。診断を確定し治療・療育方針を決定することで、重複する検査やオーバーセラピーを抑制できる。

患者やその家族の観点からも、適切な医療を受けられるメリットだけではなく、診断が定まらないことによる医療機関の過剰受診を回避することが期待できる。

本研究全体図を図1に示す。

平成24年度達成目標：上記解析を遂行し、疾患原因遺伝子候補を数個程度に絞り込む

B. 研究方法

1. 種々のゲノム解析手法による原因不明のMR症例の解析

これまでの解析で病態不明であるMRの425症例を対象に、原因解明を目的とするゲノム解析を行った。具体的には、illumina社のSNPアレイ (Human OmniExpress)を用いたスクリーニングを行い、微細CNVや片親性ダイソミー (uniparental disomy; UPD)を検出した。

この結果を、従来当教室で行ってきたアレイ解析や公的データベース、過去の論文報告などを参照して、疾患との関連を評価した。また、必要に応じて両親屋同胞の解析を行い、検出されたゲノム構造変化が有意であるかどうかの病的意義を併せて鑑別した。以上の検討を経て、疾患関連CNV, UPDを抽出した。

2. ゲノム構造変化を端緒とした疾患原因遺伝子探索

1. のスクリーニングで検出されたCNV, UPDなどのゲノム構造変化を端緒

として、疾患原因遺伝子を探索した。

① CNVに含まれる遺伝子

CNVなどのゲノム構造変化による機能喪失が疾患原因となり得る遺伝子を文献、データベースなどを参照して抽出し、候補遺伝子とした。

② CNVの対側アレルにおける変異探索

多くの遺伝子を含むCNVは疾患原因となりえる可能性が高い一方で、実際に病態の原因となる遺伝子の特定は困難である。そのため、CNVのヘテロ欠失を対象とし、対側アレルに座位する遺伝子のcompound heterozygousの原因となるような変異の探索を行った。候補遺伝子に大したサンガー法によるシーケンスを行い、疾患特異的な変異を検索した。

③ オリゴヌクレオチドアレイを用いたCNV再解析とゲノム構造異常の探索

疾患に関連する可能性の高いpathogenic CNV (pCNV)を有するMR症例から70例程度を対象に、切断点近傍の詳細なシーケンスを行い、CNVが生成する機構を明らかにした。具体的には、Roche-Nimblegen社の高密度オリゴヌクレオチドアレイ (Human CGH Array 2.1Mb)を用いてpCNVを再解析し、切断点近傍をシーケンスして特異的な配列を明らかにし、ゲノム構造の面からMR発症の機序を塩基レベルで考察した。同時に、オリゴアレイにより解析されたCNVの中でphenotypeを (additiveに/epistaticに)修飾する可

能性のある微細 CNV を探索した。

[倫理面への配慮]

ヒト由来試料を用いる本研究では、「個人情報保護法」ならびに改訂「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成 17 年 6 月 29 日一部改正)を遵守し、東京医科歯科大学に設置された倫理委員会の承認を得ている(承認番号 2011-019)とともに、インフォームドコンセントの得られた症例のみを解析する体制をすでに整えている。個人情報の保護については、試料収集施設において個人情報連結可能匿名化が行われ、連結に必要な照合情報は当該施設長が任命した個人情報管理者によって適正に管理されている。

また、本研究の動物実験については「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省)、組換え DNA 実験については「組換え DNA 実験指針」(文部科学省)に基づき、東京医科歯科大学に設置された動物実験委員会ならびに組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て実施している。

C. 研究結果

1. 種々のゲノム解析手法による原因不明の MR 症例の解析

平成 24 年度は、病態不明である MR の 425 症例に加えて新規に収集した 23 症例、合計 448 症例を対象に illumina 社の SNP

アレイ (HumanOmniExpress)を用いた解析を施行した。その結果、病態との関連が疑われる CNV を 62 ヶ所に、UPD を 1 ヶ所に検出した。

2. ゲノム構造変化を端緒とした疾患原因遺伝子探索

① CNV に含まれる遺伝子

上記の検索から、特に単一遺伝子が疾患原因となっている可能性が高いものとして、シナプス安定への関与が動物モデルで示唆されているがヒトにおける疾患との関連は未報告である Gene X の部分欠失、エピゲノム修飾に関わる Gene Y の欠失を見いだした。この Gene X, Y を MR の原因遺伝子候補として、これらの機能喪失が細胞レベルでどのような影響を引き起こすか、機能解析を施行している。

② CNV の対側アレルにおける変異探索

1. で検出された CNV の対側アレルに座位する遺伝子のシーケンスを合わせて施行した。その結果、てんかんを伴う MR 症例において対側アレルの Gene Z にナンセンス変異を検出し、Gene Z の複合ヘテロが疾患原因となっていることを強く示唆していた。

この結果を受けて、類似する臨床症状を呈する約 200 症例を新たに収集し、Gene Z の遺伝子変異を施行している。現在までに、新たな変異を 2 症例に検出した。スクリーニングを継続するとともに、Gene Z の機能解析を施行する予定である。

③ オリゴヌクレオチドアレイを用いた CNV再解析とゲノム構造異常の探索
pCNVを有するMR症例81例を対象に、Roche-Nimblegen社のオリゴヌクレオチドアレイ (Human CGH Array 2.1Mb)による再解析を行った。ここで見いだされた微細な CNV が臨床症状を付加的に修飾する可能性を考察した。

また、23例においては切断点近傍の配列をシーケンスし、構造の特徴を塩基レベルで明らかにした。この結果、相同配列を起因とする non-allelic homologous recombination (NAHR)によって生じた CNV が3例、数 bp の一致である microhomology に起因する microhomology mediated break-induced replication (MMBIR)が14例、DNA二本鎖切断を修復する過程で生じる non-homologous end joining (NHEJ)が6例であった。

D. 考察

研究結果1. と2. ①②に示したように、SNPアレイを用いたスクリーニングにより、448例に疾患に関連する62ヶ所の CNV と1ヶ所の UPD を検出したことから、効率よく原因不明の MR の疾患原因を探索し得たと考えられる。また、ここから3個の単一の疾患原因遺伝子候補を見いだすことができた。

一方、2. ③に示したように、pCNV

を生成する機構としては、特定の繰り返し配列に依存する NAHR よりも、配列非依存的に生じると考えられる MMBIR や NHEJ の方が効率に存在していることが示された。このことは、非症候性である MR の原因となる pCNV は、偶発的なゲノム再構成が原因となっているとする従来の説を裏付けるものであった。

E. 結論

計画通りに原因不明である MR 症例のスクリーニングを行うとともに Gene X, Y, Z の3遺伝子を疾患原因遺伝子候補として検出し、平成24年度達成目標「疾患原因遺伝子候補を数個程度に絞り込む」は、ほぼ達成されたと考えられる。

これらの結果を受けて、平成25年度(3年計画の2年目)は、スクリーニングを継続するとともに、各臓器由来の RNA やマウス胎児標本を用いた発生段階における発現解析、モデル細胞を用いた過剰発現・抑制系の作成、モデル動物として申請者らに経験のあるゼブラフィッシュを用いたノックダウンモデルの作製などを通じ、疾患原因遺伝子候補の機能解析を施行し、遺伝子機能と表現型との関連を明らかにして行く予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takanashi J, Okamoto N, Yamamoto Y, Hayashi S, Arai H, Takahashi Y, Maruyama K, Mizuno S, Shimakawa S, Ono H, Oyanagi R, Kubo S, Barkovich AJ, Inazawa J.: Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations. *Am J Med Genet A*. 158A:3112-8, 2012.
2. Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J.: The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup(X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. *Am J Med Genet A*. 158A:1292-303, 2012.
3. Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J.: Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes

with marked midfacial hypoplasia. *J Hum Genet*. 57:191-6, 2012.

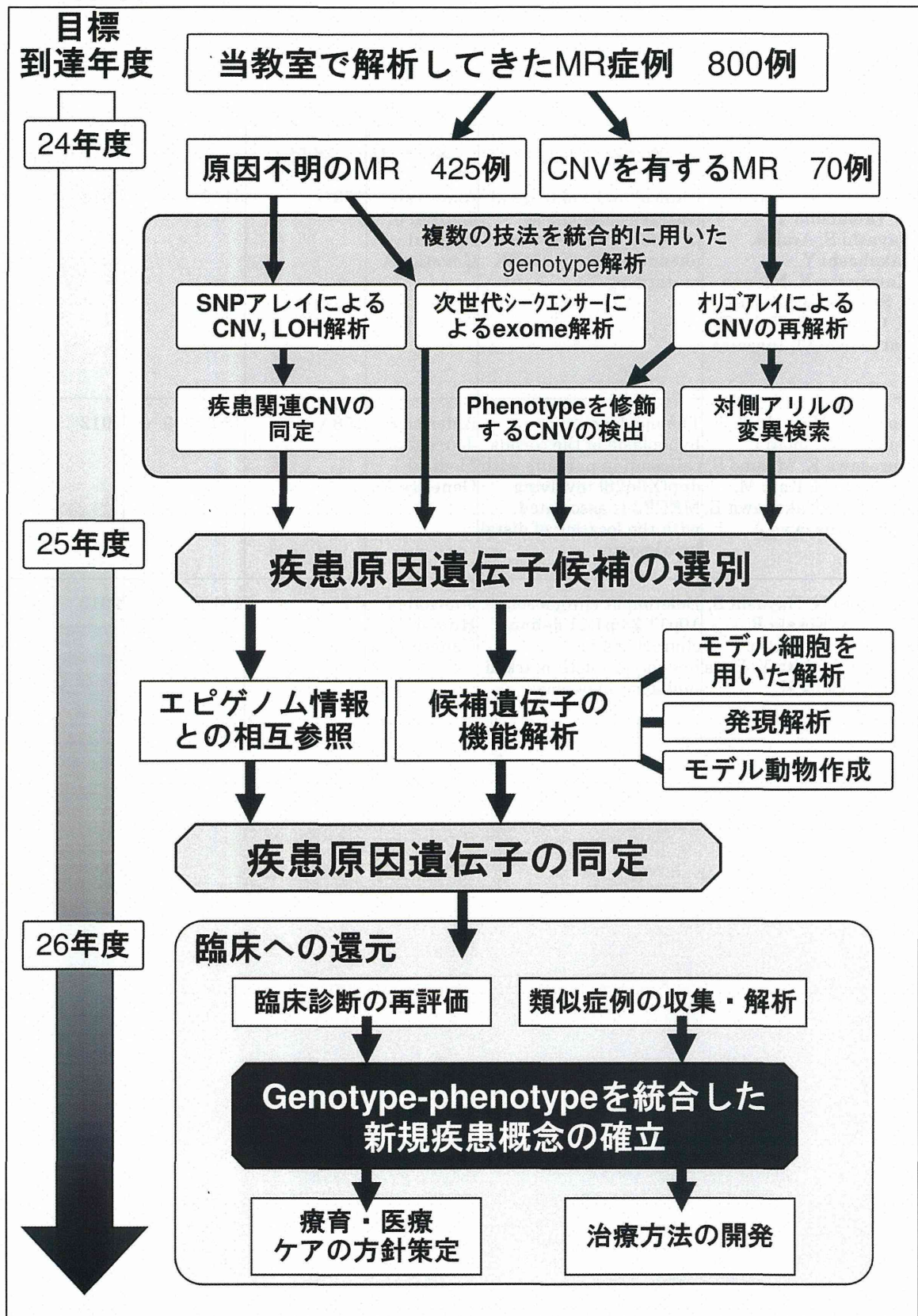
2. 学会発表

1. 長縄光代, Daniela Tiaki Uehara, 林深, 稲澤譲治. 先天異常疾患における pathogenic CNV の生成機構と由来する両親アレルの探索. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 (東京), 2012 年 10 月 27 日.
2. Hayashi S, Naganawa M, Uehara DT, Inazawa J. Investigation of the Parental Origin and Genomic Mechanisms Involved in de novo Pathogenic CNVs in Congenital Disorders. The American Society of Human Genetics 62nd annual meeting, San Fransisco, Nov 7-10, 2012. (poster)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

図1. 原因不明の精神遅滞の病態解明を目指した統合的ゲノム解析に関する研究
流れ図



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌	巻号	ページ	出版年
Takanashi J, Okamoto N, Yamamoto Y, Hayashi S, Arai H, Takahashi Y, Maruyama K, Mizuno S, Shimakawa S, Ono H, Oyanagi R, Kubo S, Barkovich AJ, Inazawa J	Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations.	American Journal of Medical Genetics A	158A	3112-8	2012
Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J.	The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup(X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints.	American Journal of Medical Genetics A	158A	1292-303	2012
Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J.	Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes with marked midfacial hypoplasia.	Journal of Human Genetics	57	191-6	2012

