

201317109A

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 林 深

平成26（2014）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 譲治

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(intellectual disability, ID)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ID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、病態不明であるIDの合計448症例を対象にSNPアレイを用いた解析を施行し、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を疾患原因遺伝子候補とした。また、CNVの対側アレルに座位する遺伝子の変異解析から、てんかんを伴うID症例におけるGene Zの複合ヘテロを見出し、本遺伝子も原因遺伝子候補として指摘した。さらに疾患に関連するCNV(pCNV)をシークエンスレベルで再評価し、非症候性ID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を示唆した。

平成25年度には上記の結果を基盤に、新たにIDの48症例をSNPアレイによりスクリーニングして、内耳奇形を伴う発達遅滞の原因遺伝子候補Gene Pを見出した。また、てんかん症例212例のコホートを対象としたGene Zのスクリーニングを施行した。さらに、本コホートにおいて見出されたてんかんとIDを発症する家系を対象に次世代シーケンサーによるエキソーム解析を行い、罹患に連鎖する新規疾患候補遺伝子Gene Qを見出した。候補遺伝子の機能解析としてセルラインにおけるGene X, Yの発現抑制系を作製し、神経分化を評価した。特にGene Yについては、共役する可能性のある遺伝子Gene Y'の指摘とともに、Gene Y, Y'両者の発現抑制が神経細胞の増殖と分化の両方を抑制するエビデンスが得られた。このことを基盤に、発現抑制により影響を被る経路の検索を分子レベルで検索し、Gene Yが神経発達に及ぼす影響の探索を継続している。

今後、これまでに見出された5個の候補遺伝子Gene X, Y, Z, P, Qを対象に、今後も機能解析やコホート解析などを通じて、病態解明と新規疾患概念の確立を目指す。

研究分担者	氏名	所属機関	職名
	稲澤譲治	東京医科歯科大学 所分子細胞遺伝学	難治疾患研究 教授

A. 研究目的

精神遅滞(intellectual disability, ID)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ID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ID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ID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ID800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ID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。

*近年、従来用いられてきた mental retardation (MR)に代わって intellectual disability (ID)が用いられつつあり、申請時は MR の語を用いていたが本報告書では ID で統一した。

【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」

【平成25年度】 達成目標：疾患原因遺伝子の機能と表現型との連関の解明

B. 研究方法

1. 種々のゲノム解析手法による原因不明の ID 症例のスクリーニングと疾患原因遺伝子探索

臨床的な検討やこれまでの解析で病態不明である ID 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。

① **SNP アレイによるスクリーニング**
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、必要に応じて両親や同胞の解

析を行い、検出されたゲノム構造変化の病的意義を評価した。以上の検討を経て、疾患関連 CNV, UPD を抽出した。さらに、この CNV や UPD に含まれている遺伝子の中から、従来の論文報告やモデル動物の表現型、発現パターンなどを考慮して、疾患原因遺伝子の候補を抽出した。

② CNV の対側アリ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。また、本研究で対象とした症例の多くは孤発例であることから、常染色体劣性の遺伝形式を取る可能性も予想される。そのため、CNV のヘテロ欠失を対象とし、対側アリルに座位する遺伝子の compound heterozygosity 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 次世代シーケンサーによるエキソーム解析

一部の家系例には次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、新規疾患原因遺伝子候補の検出を試みた。

2. 疾患原因遺伝子の評価

1. のスクリーニングで得られた疾患原因遺伝子候補やゲノム異常に対し、下記の検討を行った。

① セルラインを用いた候補遺伝子の機能解析

候補遺伝子の機能喪失が特に神経の発生発達となる可能性を考え、神経細胞由来のセルラインにおける発現抑制系を作成し、その評価を行った。

② 疾患コホートにおける候補遺伝子のスクリーニング

他施設との協力により、類似する表現型を有する症例のコホートを対象として、候補遺伝子の変異解析を行った。

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 ID 症例を対象に、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 ID 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 ID 症例のスクリーニングと疾患原因遺伝子探索

① SNP アレイによるスクリーニング

平成 24 年度は、病態不明である ID の合計 448 症例を対象に SNP アレイ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。平成 25 年度も本スクリーニングを継続し、新規に ID の 48 症例を解析した。これらのスクリーニングにより

検出された CNV, UPD を端緒として、単一遺伝子が疾患原因となっている可能性が高いものを ID の候補遺伝子とした。

平成 24 年度には、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 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。平成 25 年度には、内耳奇形を伴う発達遅滞の原因遺伝子候補 Gene P を見出した。これらの Gene X, Y, P を ID 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

平成 24 年度には、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 ID 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。

③ 次世代シーケンサーによるエキソーム解析

次項 2 ② で述べるコホートのスクリーニングにおいて、健常な父親とてんかんの既往のある母親とのあいだの同胞 5 人がてんかんと ID を発症している家系が見出された。これら両親と同胞 5 名の合計 7 名を対象に、次世代シーケンサーによるエキソーム解析を行い、罹患に連鎖する新

規疾患候補遺伝子 Gene Q における特徴的なゲノム構造変化を見出した。引き続き、このゲノム変化が蛋白発現に与える影響を評価している。

2. 疾患原因遺伝子の評価

① セルラインを用いた候補遺伝子の機能解析

平成 25 年度に、候補遺伝子の機能解析を行った。具体的には、神経芽腫または褐色細胞腫の中から、候補遺伝子の発現が高く、かつ神経細胞に分化することが確認できているセルラインを選択した。これらのセルラインに対する変異コンストラクトまたは siRNA の導入により、Gene X, Y の発現抑制系を作製し、神経分化を評価した。

Gene X については変異コンストラクトの作製が未完了であり、継続的課題とした。Gene Y については、共役する可能性のある遺伝子 Gene Y' の指摘とともに、Gene Y, Y 両者の発現抑制が、神経細胞の増殖と分化の両方を抑制するエビデンスが得られた。このことを基盤に、発現抑制により影響を被る経路の検索を検索し、また、初代培養細胞における発現抑制系の作製やノックアウトマウスの作製などを計画し、分子レベルで Gene Y が神経発達に及ぼす影響の探索を継続している。

② 疾患コホートにおける候補遺伝子のスクリーニング

Gene Z が見出された発端症例は、乳幼児期発症のてんかんを伴う発達

遅滞という特徴的な表現型を呈していた。そのため、平成 25 年度までに他施設との協力により類似する表現型を呈するてんかん症例 212 例のコホートを対象とした Gene Z のスクリーニングを施行した。このうち 2 例に変異を検出したが、現時点では疾患と直接の関連は指摘できていない。

また、同様のスクリーニングを、内耳奇形を伴う発達遅滞を呈するコホートを対象に、Gene P に対しても施行することを予定している。

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

平成 24 年度には、pCNV を有する ID 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. に示したように、SNP アレイを用いた解析により、のべ 496 例の ID 症例を効率よくスクリーニングすることができた。ここで見出された CNV と、その対側アリルの変異解析により、これまでに 4 個の疾患原因遺伝子候補 (Gene X, Y, Z, P) を見いだすことができた。また、次世代シーケンサーを用いた家系例のエキソーム解析では、臨床症状に連鎖する候補遺伝子 Gene Q を見出した。これらの、ゲノム解析技術を複合的に組み合わせたスクリーニングにより、新規疾患原因候補遺伝子を効率よく見出すことができたと考えている。

これらの結果は研究結果 2. ②に示したように、類似する表現型のコホートを対象とした解析によって genotype-phenotype の連関をより明らかにし、新規疾患単位として確立することが期待できる。

また、研究結果 2. ①に示したように、モデル細胞を用いた *in vitro* の系の確率により、候補遺伝子と表現型との連関を分子レベルで明らかにすることを目標に解析を継続している。

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 ID の原因となる pCNV は、偶発的なゲノ

ム再構成が原因となつてい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 ID 症例のスクリーニングを行うとともに Gene X, Y, P, Q の 5 遺伝子を疾患原因遺伝子候補として検出し、さらに Gene X, Y の機能解析、Gene Z のコホート解析を継続し、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」、平成 25 年度達成目標「疾患原因遺伝子の機能と表現型との連関の解明」は概ね達成されたと考えられる。

これらの結果を受けて、平成 26 年度（3 年計画の 3 年目）は、上記のスクリーニングや遺伝子機能解析、コホート解析を継続するとともに、マウス胎児標本を用いた発生段階における発現解析、ノックアウトマウスの作製などを通じ、遺伝子機能と表現型との関連を明らかにし、新規疾患単位として確立することを目標とする。また、これらの結果を論文、学会発表、インターネット上での好評などを通じて、臨床・研究の両方へと向けて発信してゆく予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, Noji H, Kitamura K, Eto T, Takahashi T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama H, Hase M, Li L, Johnson K, Lazarowski A, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y. Genetic Variants in C5 and Poor Response to Eculizumab in PNH. *N Eng J Med*. 370:632-9, 2014.
2. 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.
3. 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.

4. 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. 林深, 岡本伸彦, 高梨潤一, 稲澤譲治. 小脳脳幹部低形成 (MICPCH) の原因となる多彩な病態の探索. 日本人類遺伝学会 58 回大会 (仙台), 2013 年 11 月 23 日.
2. ダニエラチアキウエハラ, 林深, 井本逸勢, 蒔田芳男, 羽田明, 稲澤譲治. SNP arrays analysis of 430 patients with intellectual disability and multiple congenital anomalies (ID/MCA) of unknown etiology. 日

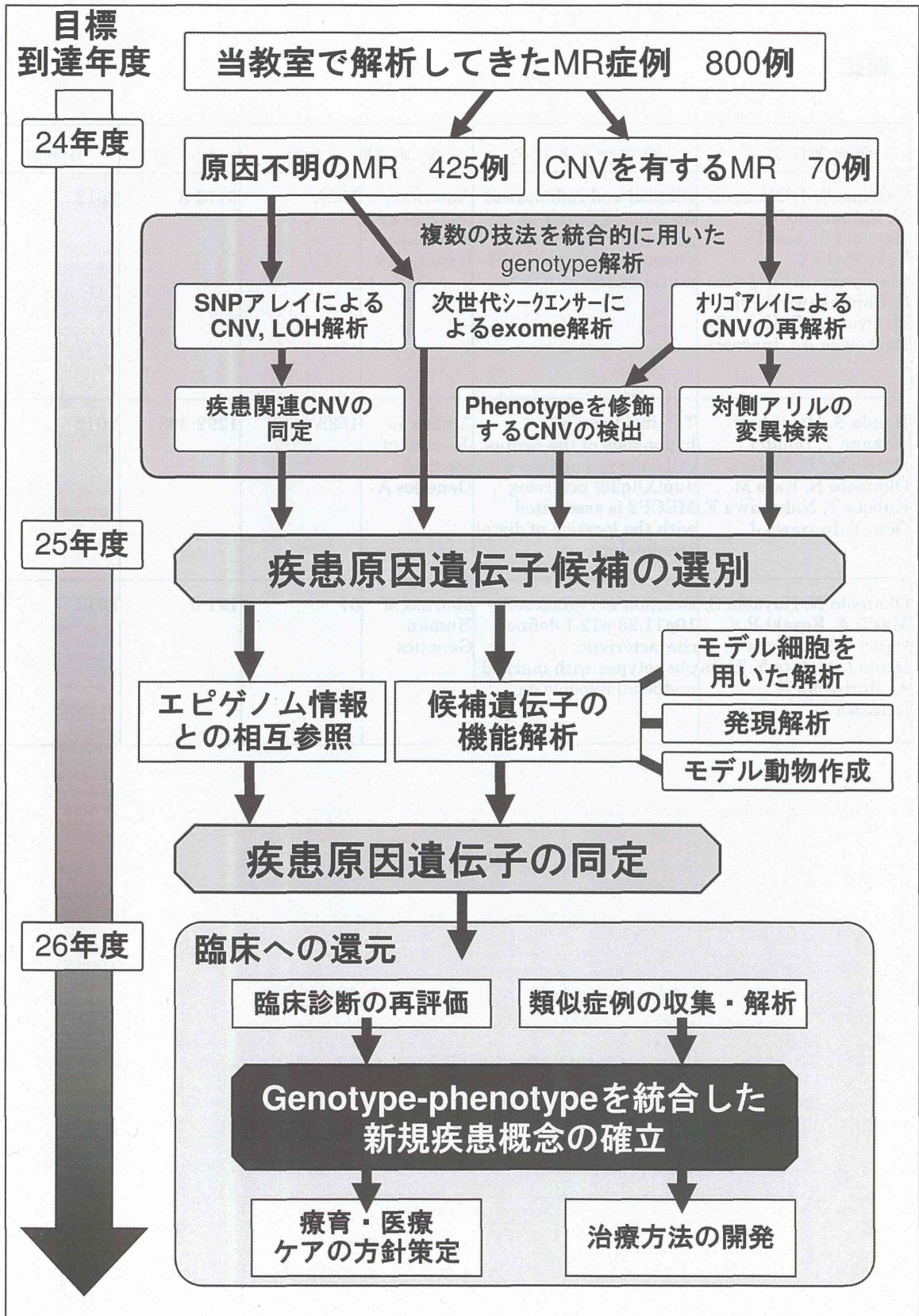
本人類遺伝学会 58 回大会 (仙台), 2013 年 11 月 22 日.

3. Hayashi S, Nobuhiko O, Takanashi J, Inazawa J. Investigation of CASK gene aberrations in 38 patients with severe intellectual disability, microcephaly and disproportionate pontine and cerebellar hypoplasia. The American Society of Human Genetics 63rd annual meeting, Boston, Oct 22-26, 2013. (platform)
4. 林深, 岡本伸彦, 稲澤譲治. 小児遺伝小脳脳幹部低形成 (MICPCH) の原因となる多彩なゲノム異常. 日本小児遺伝学会 36 回大会 (広島), 2013 年 4 月 18 日.

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

