

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）  
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班 分担研究報告

## 常染色体劣性遺伝が疑われた遺伝性痙性対麻痺 88 例の exome 解析

**研究分担者** 辻 省次（東京大学神経内科）  
**共同研究者** 石浦浩之（東京大学神経内科）  
高 紀信（山梨大学神経内科）  
嶋崎晴雄（自治医科大学神経内科）  
三井 純、高橋祐二、後藤 順（東京大学神経内科）  
吉村 淳、土井晃一郎、森下真一（東京大学新領域創成科学研究科）  
佐々木秀直（北海道大学神経内科）  
瀧山嘉久（山梨大学神経内科）  
Japan Spastic Paraplegia Research Consortium

### 研究要旨

遺伝性痙性対麻痺は遺伝学的に多様な疾患である。特に常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺は病因遺伝子も多く、従来は病原性変異が見出される確率は低かった。JASPAC で収集した検体のうち、常染色体劣性遺伝が当初疑われた 88 例（両親に近親婚あり、同胞発症で上下の世代に発症者なし、複合型の孤発例のいずれか）について全エキソン解析（exome 解析）を行ったところ、32 例（36%）で病原性変異を見出した。11 例については SPG と番号のつく疾患以外の疾患と判明し、特に複合型の場合鑑別疾患を広く考える必要性があると考えられた。また 5 例は優性遺伝疾患と判明し、家系に関する情報不足、低浸透率、de novo 変異などの可能性が考えられた。

### A. 研究目的

2006 年以降、JASPAC では 370 例以上の遺伝性痙性対麻痺（HSP）検体を収集している。以前より、13 遺伝子を解析可能な resequencing microarray（8 つの AD-HSP、3 つの AR-HSP、2 つの X-linked HSP の病因遺伝子）、16 遺伝子を解析可能な aCGH（9 つの AD-HSP、5 つの AR-HSP、2 つの X-linked HSP の病因遺伝子）による解析、一部の症例に対しては SPAST、REEP1、SPG11 の直接塩基配列決定法を併用した

網羅的遺伝子変異解析を行ってきた。東大神経内科で収集した 129 例の経験では、AD-HSP については 33/49（67.3%）で診断が見出されるものの、AR-HSP が疑われた症例（両親に近親婚がある、同胞発症で上の世代に発症者が認められない、複合型の孤発例）については 10/58 例（17%）で病原性変異の確定ができたのみであった。その後常染色体劣性遺伝 HSP（AR-HSP）については対象となる原因遺伝子が 25 個と増え、直接塩基配列決定法に

よる解析を行うことは膨大な労力を要することから困難となりつつあり、本邦におけるAR-HSPの分子疫学については未解明な点が多かった。今回、常染色体劣性遺伝が疑われるHSP 88症例についてexome解析を施行した。解析可能な遺伝子数が増えることによる診断率の向上についての評価と、本邦におけるAR-HSPの分子疫学を検討した。

## B. 研究方法

対象は88例。両親に近親婚あり同胞発症が存在する16例、両親に近親婚がないものの20例、両親の近親婚はなく同胞発症が認められる24例、複合型もしくは脳梁菲薄化を伴う孤発例28例（複合型27名、純粋型1名）からなり、脳梁菲薄化を伴う症例が20例、小脳萎縮を伴う症例が6例。これらの症例は臨床的にはAR-HSPの可能性が高いと考えた。SureSelect V5+UTR (Agilent)を用いてゲノム上のエクソン領域を濃縮し、HiSeq2500 (Illumina)を用いて101塩基ペアエンド法でゲノム配列解析を施行。ヒト参照配列hg19に対してBWA, SAMtoolsを用いてalignmentとbase callを行った。見出されたvariantについて、RefSeqデータベースを用いてエクソン上の挿入・欠失と非同義置換に加え、スプライス部位のvariantを抽出した。日本人集団におけるアレル頻度は対照者326名のin-house exomeデータベースを用いて算出した。

**病原性変異の候補の抽出**：ナンセンス、挿入・欠失、スプライス、ミスセンスのvariantを病原性変異の候補として抽出した。

### 常染色体劣性遺伝性疾患の病原性変異の

**判定**：上記の病原性変異の候補について、HSPの疾患頻度を考慮し、MAF (minor allele frequency)  $< 0.003$ の変異(326名の対照者において認められないもしくは1アレルのみ認められる)を、2アレル同一遺伝子上に有している場合を病原性変異と考えた。

### 常染色体優性遺伝性疾患の病原性変異の

**判定**：上記の病原性変異の候補について、1アレルに変異が存在し、326名の対照者に存在しないものを病原性変異の候補と考えた。

なお、上記の判定基準に加えて、病原性の判定の精度をより高めることを考慮して、遺伝子上の特定の部位に変異が集中することが報告されている疾患ではこのような条件を判定の際の参考を含め、null変異しか報告のない疾患で検出されたミスセンス変異については判定保留とした。

遺伝子検査の対象遺伝子としては、3段階の設定をした。第1群としては、遺伝性痙攣性対麻痺の病因遺伝子と位置づけられている38遺伝子について検討した。第2群としては、他の遺伝性神経変性疾患の病因遺伝子群(運動ニューロン疾患、脊髄小脳変性症、認知症、パーキンソン病、白質脳症、末梢神経障害を呈する疾患の原因遺伝子と関連遺伝子：合計203個)についても病原性変異の探索を行った。さらに、上記の遺伝子群以外に、アレル頻度が0.3%以下となるエクソン・スプライス部位上のミスセンス・ナンセンス・スプライス・欠失挿入変異がホモ接合もしくは複合ヘテロ接合で存在する場

合は、OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) 上で当該遺伝子が何らかの疾患発症に関連すると登録されているかどうかを確認し、臨床像の類似性が認められ、錐体路徴候を来しうるようであれば病原性変異と考えることとした。逆に、これまでに報告されている臨床像が大きく異なるような場合には、判定を保留とした(第3群)。変異は全て直接塩基配列決定法により確認した。

#### (倫理面への配慮)

本研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会からの承認を受けて実施する。

### C. 研究結果

研究方法で記載した条件に従い判定保留とした遺伝子変異を除くと、第1群の遺伝子について、5例に *SPG11* 変異 (SPG11)、4例に *GBA2* 変異 (SPG46)、2例に *ZFYVE26* 変異 (SPG15)、2例に *DDHD1* 変異 (SPG28) が見出されたのを始めとして、合計19名(21.6%)でAR-HSPの病原性変異が同定された。2例ではAD-HSPの病原性と考えられる変異が見いだされた。第2群については、複合型とされた11症例から変異が見出され、これらの症例はALS2, ARSACS, SCAR10, PARK9, Nasu-Hakola disease, HLD7, polyneuropathy, hearingloss, retinitis pigmentosa, and cataract (PHARC), hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome (3H syndrome)といった、痙性対麻痺を呈

しうる他疾患と考えられた。アルツハイマー病 (*PSEN1* 変異) やスフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (*CSF1R* 変異) を含む常染色体優性遺伝疾患の病原性変異も見出された。第3群からは病原性変異は見いだされなかった。

常染色体優性遺伝疾患と判明した症例では、3例が同胞発症のみ、2例が孤発例であった。

### D. 考察

Exome 解析では、多くの遺伝子の網羅的解析が可能になる一方、対象遺伝子数の規模が大きくなると、見出される低頻度アレルの数が飛躍的に増大するために、病原性変異の判定が困難になる。新規のナンセンス、スプライス部位、挿入・欠失といった明らかな loss-of-function variant については病原性変異と考えたが、新規の稀なミスセンス変異についての評価は難しく、遺伝子毎の検討が必要であった。例えば、現在まで loss-of-function mutation しか報告のない *ZFYVE26* 遺伝子に新規ミスセンス変異を見出した場合や、*NOTCH3*, *CSF1R*, *KIAA0196* などのように既知の変異が遺伝子上の特定の領域に集中したり、特定のアミノ酸に関与したりする傾向があり、その領域からはずれた場所にミスセンス変異が見出された場合は判定保留とした。たとえ新規ミスセンス変異が2アレル見出された場合でも、従来報告とは臨床像が大きく異なる場合は、病原性変異の判定を保留とした(*FAM126A*)。その他、病原性とは言えない非常に多くの稀なミスセンス変異が見出されている *SETX* や

NOTCH3 の場合などでは、既知変異でない限りは判定を保留とした。このような考えで保留として変異については、真の病原性変異である可能性は排除できず、exome 解析で見出される新規の稀な変異の病原性判定の上で今後さらに検討すべき課題であると考えられた。

上記で示したような判定保留とした遺伝子変異を除くと、88 名中、合計 32 名（36 %、劣性遺伝疾患 27 名、優性遺伝疾患 5 名）で病原性変異を同定することができた。合計 22 個の遺伝子（第 1 群からは 21 症例で診断が確定でき、12 個の遺伝子の変異が検出された、第 2 群では 11 症例で診断が確定でき、10 個の遺伝子の変異が検出された）に病原性変異が見出され、解析できる対象遺伝子数が増加したことが病原性変異を見出す確率を上げることに寄与したと考えられた。

HSP は臨床的にも多様であり、一方で SPG と番号のつく疾患の他にも、ALS2 など HSP と同様に痙性対麻痺を呈しうる疾患と鑑別が必要である。臨床的に HSP というカテゴリーに含まれるとして依頼された症例の中で 34.3%はいわゆる SPG の番号が付与されていない疾患であることは、HSP の臨床診断を考える上で、対象疾患を拡大して考える必要があることを示しており、注目すべき点であると考えられた。

## E . 結論

常染色体劣性遺伝が疑われた遺伝性痙性対麻痺症例に対して exome 解析を行い、36%で病原性と考えられる変異を見出すことができた。

## F . 健康危険情報

特になし

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

なし

### 2 . 学会発表

- 1) 石浦ら：常染色体劣性遺伝が疑われた遺伝性痙性対麻痺症例の exome 解析 . 人類遺伝学会，2013 年 11 月，仙台

## H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1 . 特許取得

なし

### 2 . 実用新案登録

なし

### 3 . その他

なし