

201419092A

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26年度 総括研究報告書

研究代表者 林 深

平成27（2015）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 9

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。

候補遺伝子のスクリーニングとして、平成24-25年度にかけて、病態不明であるIDの合計496症例を対象としたSNPアレイ解析から、エピゲノム修飾に関わるGene A並びに隣接するGene B、内耳奇形を伴う発達遅滞の原因遺伝子候補Gene Cを疾患原因遺伝子候補とした。また、CNVの対側アリルに座位する遺伝子の変異解析から、乳幼児期発症のてんかんを伴うID症例におけるGene D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。また、てんかん症例212例を対象としたGene Dのスクリーニングを施行して新規変異2例を見いだすとともに、本コホートにおいて見出された家系を対象とした次世代シーケンサーによるエキソーム解析を行い、新規疾患候補遺伝子Gene Eを見出した。

研究最終年度である今年度（平成26年度）は、上記候補遺伝子の機能解析と病態との関連の評価を行った。具体的にはヒト由来セルラインにおけるGene A, Bの発現抑制系を作製し、神経分化を評価した。siRNA導入ならびにCRISPR導入によるゲノム編集を行って発現を低下させ、特にGene Bの発現レベル依存的に神経突起の伸長が抑制されることを見出した。また、患者リンパ球由来セルラインを用いた解析で、Gene Eに見いだされた変異が罹患患者に連鎖し、さらに転写レベルでの異常を引き起こすことを証明した。Gene Cについては小規模の類似症例解析を行ったが、新規変異は見いだされなかった。

本研究によりゲノムスクリーニングによる患原因遺伝子候補の抽出、疾患コホート解析、モデル細胞を用いた機能解析、ゲノム構造変化の機序などを明らかにすることで、IDにおけるgenotype-phenotypeの関連の総合的な解明に寄与した。これらの成果を学会・論文などを通じて発表していく予定である。

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 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ケ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など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。また、本研究の年度ごとの目標を以下に示す。

【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

【平成26年度】 達成目標：研究成果の発信と臨床への還元

\* 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。

## 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。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、対側アレ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 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を対象として、候補遺伝子の変異解析を行った。

### ② 患者由来セルラインを用いた家系解析

発達遅滞家系列の両親・同胞のリンパ球に由来するセルラインから、罹患に連鎖する特異的なゲノム構造異常が疾患候補遺伝子の発現に与える影響を評価した。

### ③ 神経細胞由来セルラインを用いた候補遺伝子の機能解析

これらの候補遺伝子が神経細胞の発達に及ぼす影響を評価するため、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 siRNA 導入による発現抑制または CRISPR 導入によるゲノム編集を行い、ターゲット遺伝子の発現を低下させ、細胞増殖や神経分化を評価した。

#### [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 24-25 年度に施行した、病態不明である ID の 496 症例を対象とした SNP アレイを用いた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症例を選択し、ID の候補遺伝子とした。

具体的には、小脳脳幹部低形成・

小頭症を伴う ID においてエピゲノム修飾に関わる Gene A と、ゲノム上で Gene A に隣接しアクチンフィラメント架橋タンパク質をコードする Gene B の欠失、内耳奇形を伴う発達遅滞症例における Gene C の切断を見出した。

平成 26 年度は、これらの原因遺伝子候補に対し、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を見当した。

## 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、てんかんを伴う ID 症例において対側アレルの Gene D にナンセンス変異を検出し、Gene D の複合ヘテロが疾患原因となっている可能性を見出した。

## 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、疾患関連遺伝子をスクリーニングした。

罹患同胞 5 名に共通する 11 箇所の変異のうち、既存の SNP や健常な父親にも存在する変異を除外し、神経の膜タンパクをコードする新規疾患

候補遺伝子 Gene E のエクソン—イントロンジャンクションにおける変異を見出した。

## 2. 疾患原因遺伝子の評価

### ① 疾患コホートにおける候補遺伝子のスクリーニング

Gene D 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 例を収集し、Gene D の各エクソンに対するサンガーシーケンスを行った。この結果 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、内耳奇形を伴う発達遅滞の候補遺伝子として Gene C のスクリーニングを合計 2 例に対して行ったが、発端症例以外に変異は見いだされなかった。

### ② 患者由来セルラインを用いた家系解析

上記 1 ③ で示した家系列の罹患同胞 5 名と両親を対象に、リンパ球由来セルラインを作成した。最初に候補遺伝子 Gene E の連鎖が偶発的なものであることを否定するために前後の SNP が候補変異に連鎖していることを示し、罹患同胞すべてのアレルが母親に由来したものであることを確認した。

また、本変異はエクソン—イントロンジャンクションの 2bp 下流に存

在していることから、セルライン由来の cDNA を用いた RT-PCR から罹患同胞におけるスプライシング異常が生じ、エクソンスキップと終始コドンが生じる転写異常が生じていることを示した。

### ③ 神経細胞由来セルラインを用いた候補遺伝子の機能解析

Gene A, B については、この隣接する 2 遺伝子が欠失することが発端患者者に類似する小脳脳幹部低形成・小頭症を伴う発達遅滞の原因となっている報告があることから、両遺伝子の発現抑制が神経細胞の増殖・分化を抑制する可能性が考えられた。

そのため、ヒト神経芽細胞種由来の IMR-32 細胞株に siRNA を導入して両遺伝子の発現抑制を行い神経分化を評価したところ、Gene B 発現抑制下では細胞数と神経突起の伸長が低下した。さらに、Gene A を単独でノックダウンすると Gene B タンパク発現が低下する傾向が見られた。また、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集で Gene A, B の発現抑制株を作成したところ、Gene B の発現レベル依存的に神経突起の伸長が抑制されることを見出した。

## 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、

その対側アリの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 A-D) 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 E 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。また、本研究において形成された ID 患者の疾患コホートはバイオリソースとして保管し、後年の解析に耐える体制を整えているため、新たな知見に応じてスクリーニングや研究を行うことが可能である。

これらの結果を受け、疾患原因遺伝子候補が新規疾患単位を定義することの確認として、研究結果 2. ①に示したように類似する表現型の患者集団を対象としたスクリーニングを行った。今回のスクリーニングでは Gene C, D の新規変異例を見出すことはできなかったが、ID は heterogeneity な病態であり、より大きな規模の疾患コホート解析によって新たな変異例を検出することも期待できると考えている。

また、研究結果 2 ③に示したように、モデル細胞を用いた *in vitro* の系の確立により、Gene A, B の発現低下が神経細胞の増殖・伸長を抑制する知見が得られた。このことは、発端症例におけるこれらの遺伝子のハプロ不全が疾患原因となっていたことを示唆するのみならず、特に CRISPR を用いたゲノム編集が ID の候補遺伝子の病態を明らかにする手段と



して有用であることを示唆していた。

## 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 A-E の 5 遺伝子を疾患原因遺伝子候補として検出し、特に Gene C, D については疾患コホート解析を実施することができた。また、Gene A, B, E についてはモデル細胞を用いた機能解析を行い、genotype-phenotype の連関をより明らかにすることができた。

以上の成果より、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ており、また、これらの成果は学会発表などを通じて発表しているが、最終的には論文化とデータベース化により平成 26 年度達成目標「研究成果の発信と臨床への還元」も完遂できるものと考えている。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hayashi S, Yagi M, Morisaki I, Inazawa J. Identical deletion at 14q13.3 including PAX9 and NKX2-1 in siblings from mosaicism of unaffected parent. *Journal of Human Genetics*. 60:203-206, 2015.
2. Matsumoto H, Zaha K, Nakamura Y, Hayashi S, Inazawa J, Nonoyama S. Chromosome 9q33q34 microdeletion with early infantile epileptic encephalopathy, severe dystonia, abnormal eye movements, and nephroureteral malformations. *Pediatr Neurol*. 51:170-5, 2014.

### 2. 学会発表

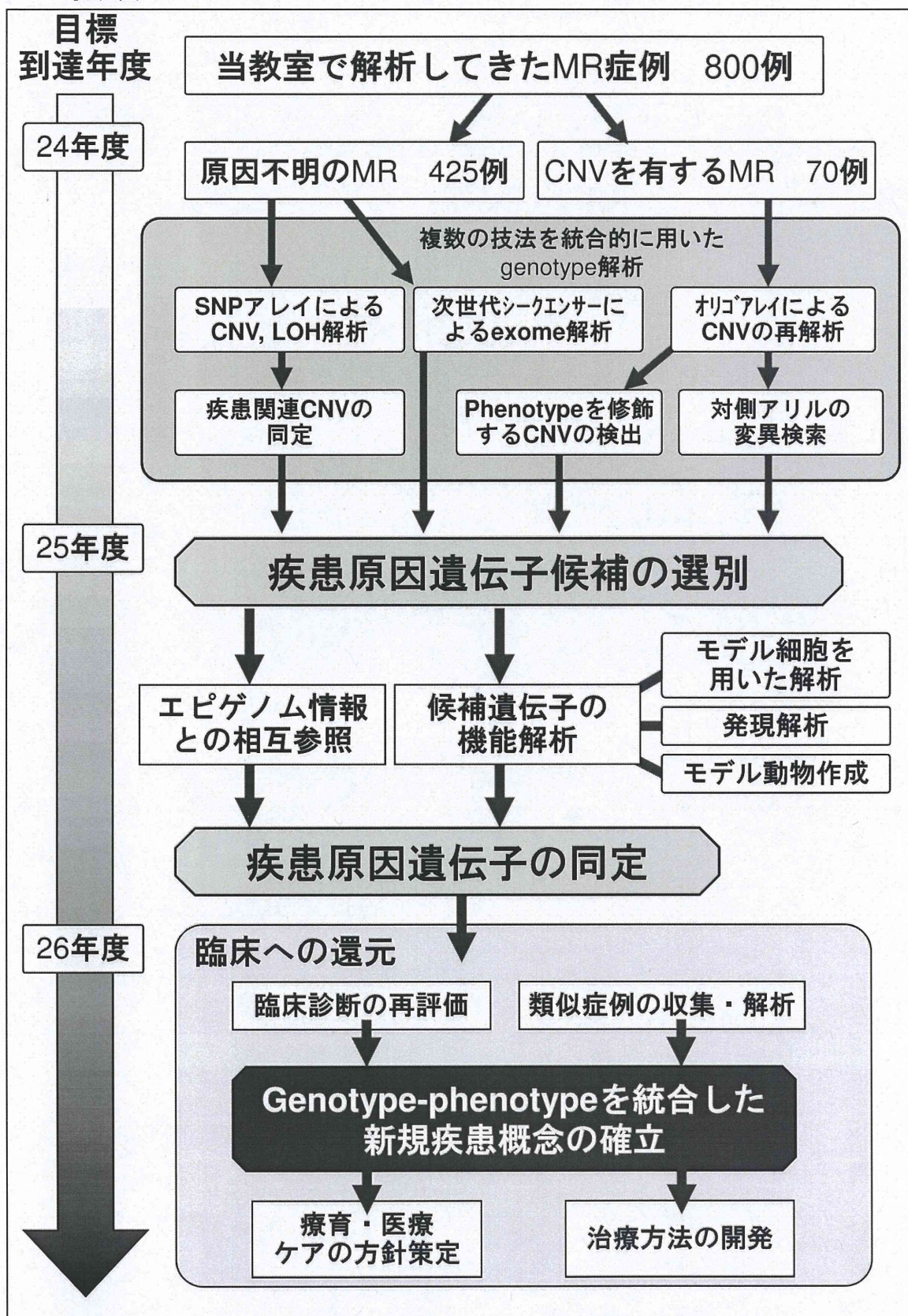
1. ダニエラチアキウエハラ, 林深, 水野誠司, 稲澤譲治. A de novo 40-kb deletion encompassing the Angelman Syndrome imprinting center in a patient with some major features of Prader-Willi Syndrome. 日本人類遺伝学会 59 回大会 (東京), 2014 年 11 月 21 日.
2. 林深, 岡本伸彦, 高梨潤一, 稲澤譲治. 小脳脳幹部低形成を伴う小頭症 (MICPCH)41 例に対する CASK 遺伝子その他の包括的疾患原因探索. 日本人類遺伝学会 59 回大会 (東京), 2014 年 11 月 21 日.
3. Hayashi S, Okamoto N, Takanashi J, Inazawa J. Comprehensive investigation of CASK and other relevant genes in 41 patients with

intellectual disability, microcephaly and disproportionate pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH) using next-generation sequencing. The American Society of Human Genetics 64th annual meeting, San Diego, Oct 18-22, 2014. (platform)

#### 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
Hayashi S, Yagi M, Morisaki I, Inazawa J.	Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK mutations.	Journal of Human Genetics	60	203-6	2015
Matsumoto H, Zaha K, Nakamura Y, Hayashi S, Inazawa J, Nonoyama S.	Chromosome 9q33q34 microdeletion with early infantile epileptic encephalopathy, severe dystonia, abnormal eye movements, and nephroureteral malformations.	Pediatr Neurol.	51	170-5	2014

