

201442075A

厚生労働科学研究委託費業務

難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ（PKD）の発症メカニズム
の解明及び新規治療薬の開発に関する研究

(26310301)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 黒滝直弘

平成27(2015)年3月

委託業務成果報告書への標記について

委託業務に係る成果報告書の表紙裏に、次の標記を行うものとする。

本報告書は、厚生労働省の厚生労働価格研究委託業務による委託業務として、国立大学法人長崎大学が実施した平成26年度「発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKD) の発症メカニズムの解明及び新規治療薬の開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）		
発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ（PKD）の発症メカニズムの解明及び 新規治療薬の開発に関する研究	-----	1
黒滝直弘		
II. 委託業務成果報告（業務項目）		
1. 発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ(PKD)の臨床症状の解析及び 検体の収集に関する研究	-----	5
黒滝直弘 齋藤加代子 白石裕一		
2. 次世代シーケンサーを利用したproInE-rICH trAnsmEmBrAnE protEIn 2 (PRRT2) 遺伝子解析法の改良	-----	11
吉浦孝一郎		
3. 遺伝性神経疾患の分子病態に基づく治療法開発に関する研究に関する研究	-----	19
齋藤伸治		
4. PKDの発症メカニズムに関する研究に関する研究	-----	23
城谷圭朗 岩田修永		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	53

I. 託業務成果報告（総括）

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費

(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業))

「発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKD) の発症メカニズムの解明及び新規治療薬の開発」

研究総括報告書

研究代表者：

黒滝 直弘 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科精神神経科学 講師

研究分担者：

吉浦孝一郎 長崎大学原爆後障害医療研究所 教授

齋藤加代子 東京女子医科大学・遺伝子医療センター 教授

齋藤伸治 名古屋市立大学大学院医学研究科小児神経学 教授

白石裕一 長崎大学医学部医学科臨床医学内科学第一 助教

城谷圭朗 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬品生物工学研究室 准教授

岩田修永 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬品生物工学研究室 教授

研究要旨

本研究は発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKD)において PRRT2 遺伝子以外の原因遺伝子を同定し、対処療法に留まる現在の治療方法を進展させることが主たる目的である。中国から PKD の原因遺伝子は PRRT であることが報告された(CHEN Et Al, 2011)後、PKD は良性家族性乳児けいれんとアレル病であること(Ono Et Al, 2012)、PRRT 遺伝子の変異が熱性けいれんや、片側麻痺性片頭痛の原因と報告された。これらのことから PRRT2 遺伝子は、神経疾患でも大きな関与を及ぼしていることが示唆され、極めて大きな発見であると 2 年連続して NAture REvIEW NEuroloGy で報告されるに至った。現況で、私達は前回の疫学調査を進展させ、これまで不詳であった PRRT2 遺伝子の機能解を主とした発症機序そのものの解明が極めて重要であると考た。患者の血液検体を用いて、PRRT2 遺伝子だけではなく全エクソーム解析による遺伝解析を実施し、その結果を用いた診断や重症度分類を作成する点と創薬に詳しい薬学研究者との連携は独創的な点である。本研究は、長崎大学ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認のもとで実施される単年度研究である。

「発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKD)の重症度評価及び QOL に関する研究 ((H26-難治等 (難) -一般-005))」のアンケートにおいて、研究協力が可能と回答した施設に対して、症例の収集を依頼する。その後、長崎大学人類遺伝学教室において、PRRT2 遺伝子のシーケンス解析を行うと同時に、PRRT2 遺伝子に変異のない症例においては、両親を加えたトリオの検体を用いて全エクソーム解析を実施し、同定された遺伝子機能を解析し、PKD の新たな診断方法を確立する。一方で長崎大学大学院薬品生物工学研究室において、PRRT2 蛋白の機能を解析することによって PKD 発症メカニズムを探索し新たな治療法の開発を目指す。期間は 1 年間で予定している。

A. 研究目的

PKDは、思春期に発症する運動時の不随意運動を特徴とする遺伝性神経疾患である。原因遺伝子は、16番染色体のPRRT2遺伝子と同定された(Chen Et Al., 2011、Ono Et Al., 2012)。PKDの臨床症状は、運動開始時におこる、主に四肢を中心とした発作性のアテトーゼ様不随意運動である。重度になると日常生活に大きな支障をきたす。しかしながら、私達は平成21年度の難治性疾患克服研究事業において、PKDは必ずしも認知されている疾患とはいえず、誤診されている可能性すら否定できないことを明らかにした。本研究では、原因遺伝子の同定を機に、アンケートを実施した医師の中で、遺伝子検査に協力を了承の意を表明した患者から採取した血液DNAでPRRT2遺伝子の解析を行い、変異のない症例に関して次世代型シーケンサーによるエキソーム解析を実施して、PRRT2以外の原因遺伝子を探索する。並行してPRRT2蛋白の機能解析を遂行しPKDの発症機序を解明する。PKDの原因であるPRRT2遺伝子は、多岐にわたる神経疾患において変異が確認されており、患者における合併症や家族歴の情報が必須である。PKDは遺伝子診断には至っていないが、今後の診断方法に向けてAnGEImAn症候群(AS)が疑われた例を対象として、系統的遺伝学的診断の可能性を探索した。

B. 研究方法

本研究期間は、単年度申請である。研究遂行の研究体制は1)全国の神経内科医、からの臨床情報の収集及び、血液検体の採取(黒滝、白石、齋藤加代子、齋藤伸治)、2)診断に結びつく可能性のある分子遺伝学解析(吉浦、黒滝担当)、3)治療に直結するであろうPRRT2蛋白の機能解析(岩田、城谷担当)、

4)遺伝子診断の可能性の検討(齋藤伸治)である。研究は、遵守すべき研究に関する指針に従い、特に遺伝解析は長崎大学ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会承認の元、実施される。

1)本研究に先んじて行った、「発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKD)の重症度評価及びQOLに関する研究((H26-難治等(難)-一般-005))」において研究可能と回答いただいた臨床医からの臨床情報の収集(黒滝、齋藤加代子、齋藤伸治担当):臨床医を通じてPKDと臨床診断されている患者の血液を5ml採取し、DNAを抽出する。

2)分子遺伝解析(吉浦、黒滝担当):DNAを用いて、まず初めに現時点での唯一の原因遺伝子とされるPRRT2遺伝子の変異解析をABI3700を用いて行う。その中で変異の種類と臨床症状の関係を解析するとともに、同遺伝子に変異のない症例はその両親を加えトリオを形成しイルミナ社HISEq2500システムを使用して全エキソーム解析を実施する。10組のトリオの解析を目標とする。エクソンの変異はデータベースと比較することで患者特異的な変異を抽出する。加えて、シーケンス情報から構造異常を抽出する。

3)PRRT2蛋白の機能解析(岩田、城谷担当):PRRT2に変異を持つ患者にはナトリウムチャネルブロッカーであるカルバマゼピンが発作を予防する効果があること、そしてPRRT2に変異のある患者と症状や薬物反応性の似ている良性家族性新生児乳児けいれんの患者にはナトリウムチャネルの $\alpha 1$ サブユニットに変異があることから、PRRT2とナトリウムチャネルとの相互作用が強く示唆される。以上のことより、PRRT2が

直接ナトリウムチャネルと結合してナトリウム透過性を制御しているという仮説を立てた。そこで本研究では、PRRT2にどのタイプのナトリウムチャネルが結合するかを膜タンパク質の免疫沈降法 (SHIrotAnI ら 2007) で明らかにすることを第一の目的とする。一方、PRRT2 は分子全体の 70%以上が細胞外に突き出ているという特徴があるので、細胞外部位で他のリガンド分子と結合することでナトリウム透過性を調節している可能性も考えられる。そこで PRRT2 の細胞外部位に結合するリガンドを同定することを第二の目的とする (タンパク質の細胞外に結合するリガンドを同定する一連の実験法は研究代表者の研究室で確立済)。以上の研究により PRRT2 タンパク質の機能および変異による発症機構解明のための基礎的データをとる。

4) 遺伝子疾患における系統的遺伝子診断の可能性の検討 (斎藤伸二、担当) : PKD は平成 21 年度の研究で明らかになったように臨床診断が困難である時がある。そこでアンジェルマン症候群 (AS) を PKD の遺伝学的な診断方法のモデルとして提案し臨床診断と遺伝子診断の関連性の解析を試みた。

5) 日本語、英語のホームページの作成
これまで長崎大学病院 (<http://www.mED.nAGAsAKI-u.AC.Jp/psyCHtry/KurotAKI/InDEx.Html>)
及び難病センター (<http://www.nAnByou.or.Jp/Entry/616>) に作成していたホームページを日本語、及び英語の両方で更新し、情報を国内外に発信する。

以上の研究を遂行することによって5年以

内にPKDの新たな治療薬を開発する予定である。

(倫理面への配慮)

本研究の試料収集は、すべて長崎大学のヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理委員会の許可を得て行う。全ての患者および家系構成員に対して、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除、カウンセリングの受診などの詳細な説明を行い、書面により同意を得たうえ(インフォームド・コンセント)で採血を行う予定である。リンパ芽球の保存に関しても同意書を記入してもらう予定である。

C. 研究結果

黒滝、白石、斎藤加代子は本研究の総括とともに全国の神経内科医、小児神経科医に呼びかけてアンケート形式で症例を収集し特に合併症に着目した臨床症状を解析するとともに DNA の収集を行った。

全国の神経内科 (4952 名) および小児神経 (1051 名) を専門とされる先生方 (計 6003 名) に記銘式アンケートをご依頼した。その結果、回答を得られたのは 2382 名 (2382/6003) で、全体の 39.7%であった。その中で実際に症例を持っている医師に対して (治療中である)、各症例ごとに症状、遺伝負因、合併症などを自由記載方で記入してもらった。情報の得られた総患者数は合計、426 名である。現在その中で 60 名の採血を終え DNA を採取しており遺伝子変異の解析中である。

吉浦はゲノム変異解析-HyBrIDizAtIon 濃縮法本法を用いた基礎研究を行った。濃縮された患者 DNA 断片を鋳型としてシーケンズランは、IllumInA HISEq2500 の RApID MoDE にて、96 sAmplE / run で塩基配列情報を取得、今後の PKD 患者 DNA の遺伝解

析の実験方法を確立した。

城谷、岩田はPRRT2の機能解析を担当した。ヒトPRRT2の野生型CDNA（アミノ酸340個をコードする）を入手し、C.649DupC変異型（アミノ酸223個をコードする）を作製した。作製した発現ベクターをマウス神経芽細胞腫NEuro2A細胞もしくはヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞に導入し、PRRT2タンパク質のウェスタンブロット分析を行った。またPRRT2とナトリウムチャンネルとの相互作用が明らかになった。

斎藤伸二はアンジェルマン症候群（AS）をPKDの遺伝学的な診断方法のモデルとして提案し、系統的な遺伝的診断の可能性を探索した。典型的な欠失例をのぞいた86例の臨床的にASが疑われた例を対象にして遺伝学的診断を行ったところ、38%のみがASと確定診断されたに留まり、約6割は確定されなかった。特に乳児期ではASと類似したRETT症候群やCDKL5異常症を臨床的に区別することは困難である。今回の検討ではASは臨床診断のみでは半数以上が必ずしも正確な診断には至っていないことが示唆された。

PKDも同様に臨床診断の不確定さが示唆されるものである。

D. 考察

アンケートの回収率は（2382/6003名）であり研究そのものについての問い合わせのメールは200件以上に及んだ。臨床医の本疾患への深い関心を示すものと考ええる。また臨床情報の得られた426名の中で本研究の最も重要な視点の一つである合併症の併存率は35%（147/426名）であった。一見、PKDは対処療法がある程度確立されており、発作がコントロールされていれば問題は大きくないという意見を散見するが、このような臨床情報を詳細に解析すると単に随意

運動に伴うアテトーゼのコントロールだけではなく合併症の治療にも臨床的観点での関わりが重要であること、臨床遺伝学の基づいた遺伝カウンセリングの必要性が強く示唆される。現在入手した60名のDNA検体についてはサンガー法によるキャピラリーシーケンス及び次世代型シーケンサー解析による遺伝子型の解析を実施中であり、城谷らのPRRT2遺伝子の機能解析の結果を合わせて本年5月までには結果を得る予定である。PKDの遺伝子診断には慎重でなければならないことがASの系統的遺伝診断で明らかになった。

E. 結論

PKDは発作のコントロールを一義的に考えれば必ずしも難病とは言い難いが、実はPKDの4割近くにてんかんや精神疾患を主とする合併症があり、治療ではその点に十分留意をする必要があることが判明した。家族例の報告があり遺伝カウンセリングの際には考慮すべきである。研究開始時の予想を超えて全国の臨床医からの回答をいただき、臨床場面で関心の高い疾患であるといえる。今後、遺伝子型と合併症を主とした臨床症状の関連性を詳細に検討していく必要があるが、次世代型シーケンサーによる解析方法の条件の検討を終了した。現在行われている臨床診断が妥当であるか否か、遺伝子診断は可能であるか否か、等の点で検討すべき余地が残った。PKDの原因となるPRRT2蛋白はナトリウムチャンネルと結合すること、PRRT2遺伝子変異によってその結合状態に異常が起きることが示唆された。これらの点を踏まえて本研究は研究期間を延長しさらに継続する必要があるのではないかと考える。

F. 健康危険情報

なし。

II. 託業務成果報告（業務項目）

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業))
「発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKD) の発症メカニズムの解明
及び新規治療薬の開発」
研究分担報告書

分担責任者：黒滝直弘 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 講師
斎藤加代子 東京女子医科大学・遺伝子医療センター 教授
白石裕一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教

研究要旨

30 年近く継続している長崎大学の PKD の研究において新たな疫学的及び分子遺伝学治験を得、患者の診断と治療に有用な所見を得ることを目的としている。そのために黒滝は、日本精神神経学会、日本神経学会、日本小児神経学会の学会の承認を得、全国にアンケートを行った。「(「発作性運動誘発性舞踏アテトーゼの重症度評価及び QOL に関する研究 (26070101)」による) その中で把握した PKD の患者 462 名に対し十分な説明の下同意を得て血液検体を収集し DNA を抽出。遺伝解析を実行している。

A. 研究目的

PKD は、思春期に発症する運動時の不随意運動を特徴とする遺伝性神経疾患である。原因遺伝子は、16 番染色体の PRRT2 遺伝子と同定された(Chen Et Al., 2011、Ono Et Al., 2012)。PKD の臨床症状は、運動開始時におこる、主に四肢を中心とした発作性のアテトーゼ様不随意運動である。重度になると日常生活に大きな支障をきたす。しかしながら、私達は平成 21 年度の 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 PKD の有効治療開発のための分子メカニズムの解明に関する研究 平成 22 年度 総括研究報告書において、PKD は必ずしも認知されている疾患とはいえ、誤診されている可能性すら否定できないことを明らかにした。

本研究では、原因遺伝子の同定を機に、アンケートを実施した医師の中で、遺伝子検査に協力に了承の意を表明した患者から採取した血液 DNA で PRRT2 遺伝子の解析を行い、変異のない症例に関して次世代型シーケンサーによるエキソーム解析を実施して、PRRT2 以外の原因遺伝子を探索する。PKD の原因である PRRT2 遺伝子は、多岐にわたる神経疾患において変異が確認されており、患者における合併症や家族歴の情報が必須であり(文献 2)それらの情報を収集、管理し遺伝子型と、臨床症状特に合併症との関連性を調べるのが本研究の目的である。

B. 研究方法

全国の神経内科医、小児神経科医に対して

行った、厚労科研による「発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKD)の重症度評価及びQOLに関する研究((H26-難治等(難)-一般-005))」の中で、患者からの血液検体の採取が可能と判断された患者から血液検体を集める。クローラホルム方法や透析膜法にて抽出したDNAに対して、まずPRRT2変異の有無に関してのスクリーニングを行う。次に変異のない症例に関して次世代型シーケンサーによるエキソーム解析を実施する。また「黒滝直弘 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKD)の分子メカニズム 神経内科 79(6): 719-725, 2013」で報告したようにPKDにおけるPRRT2変異の80%は同一の変異(C.649DupC)である。この変異部位はシトシン(C)が9個連続している不安定な部位であることからこの変異が一般集団にあるか否かの検証も併せて行う。

(倫理面への配慮)

上記の研究は長崎大学医歯薬学総合研究科ヒトゲノム・遺伝子研究解析計画(許可番号第140407279 発作性舞踏アテトーゼ(PKD)遺伝子解析研究とエピジェネティクス解析)および長崎大学医歯薬学総合研究科倫理委員会(承認番号14121243 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKD)の重症度評価及びQOLに関する研究)の承認を受け、ホームページに情報を公開している。

また、本研究は黒滝の所属する日本精神神経学会(理事長 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室 教授)、日本神経学会(代表理事 高橋良輔 京都大学大学院医学研究科臨床神経学 教授)、日本小児神経学会(理事長 高橋孝雄 慶應義塾大学医学部小児科 教授)の承認の下行われた。

C. 研究結果

全国のアンケートで臨床症状の把握できたPKDの症例は426名である。無論これは現在神経内科医や小児神経科医の勤務する医療機関での実情であって、正確な本症の発症率を示すものではない。426名中で合併症の有病率は35%(147/426名)である。PKDの合併症として、乳児けいれんが22%と最も多いという結果を得た。乳児期のけいれんは、てんかん、脳炎・脳症のほかにも、感染、頭部外傷、低酸素、毒素、心不整脈などの全身性障害や、胃腸炎関連けいれんなど原因は多岐にわたる。PKDは約3割で、乳児けいれん、乳児良性けいれん、てんかんなどのけいれん発作を認めており、けいれん発作の鑑別診断の際には、PKDを念頭におく必要がある。

さらに、自閉症、双極性障害、解離性障害といった神経伝達物質の関与が考えられる疾患の合併がみられ、一般集団より頻度が高いと思われる。PKDの障害部位は大脳基底核—視床—大脳皮質のループに関連していると推定されており、発達障害を含めた精神機能への影響も考えられる。PKDは思春期に好発し、特異的な神経学的所見を伴わないため、見逃されやすい疾患であるが、精神症状にも着目し、心理発達面の継続的なフォローが必要であると考えられる。PKDは常染色体優性遺伝形式をとる疾患であり、その遺伝カウンセリングにおいては、本疾患が予後良好であること、抗てんかん薬であるカルバマゼピンが著効することを示した上で、その遺伝についての情報提供を行う必要がある。可能性の考えられる家系員には遺伝カウンセリングにおいて十分な理解を促すことが重要である。さらに家系内

の情報により、PKDの早期発見のメリットがあると考えられる。現在60名の採血を終えDNAを採取しており遺伝子変異の解析中である。なお一般集団200名の中には、PRRT2の変異(C.649DupC)は同定できなかった。

D. 考察

まず第一に本研究期間を1年間としたのは見通しが甘いと言わざるをえない。なぜならば今もなお(平成27年3月1日現在)、全国の医師から研究についての問い合わせが相次いでおり、臨床現場からの関心は極めて高いと考えるからである。精神疾患の合併例の報告があり、特に家族例において、父親と長男が発症しており、故に近隣からの偏見を受けているという報告は、臨床精神科医として常にスティグマ(偏見)と対峙する黒滝には本研究の意義を強く自覚させるものであった。検体数が予想を超え現時点では全ての遺伝子解析は終了していない。平成27年度には本研究を延長し発展させるために再度、厚労省への研究費の申請を行う予定である。なお、一般集団でのPRRT2変異が少なくともまだ同定されていないことはやはりこの変異が疾患特異的であることを示唆するものである。

E. 結論

当初予定していた研究期間が短すぎた点に関しては、1)臨床現場からの関心が非常に高いこと、2)患者の通院間隔が比較的長く検体の収集に時間を要していること、などが要因であり、黒滝は平成27年度での研究期間延長に向けて申請準備中である。PRRT2の変異(C.649DupC)は疾患特異的であるが、

他の合併症との関連に関しては今後の詳細な解析を必要とする。

PKDはカルバマゼピンを主とする抗てんかん薬による対処療法がある程度確立している。しかし、PKDには様々な合併症が多いことを考慮すると、単にアテトーゼのコントロールだけでなく合併症に対する対応が極めて重要であることが示唆される。また合併症の有無と遺伝子型との関連研究が急務である。なお合併症自体の詳細は本研究に先んじて行った、「発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKD)の重症度評価及びQOLに関する研究((H26-難治等(難)-一般-005))」の補助金業務報告書に記載している。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 久保達哉, 森本芳郎, 田中大三, 大橋愛子, 杉本流, 黒滝直弘, 小澤寛樹, ベンゾジアゼピン系薬およびmECTでの治療にて改善した緊張病(カタトニア)症候群の2症例, 精神科 24(4): 468-492, 2014.
- ② 黒滝直弘, ソトス症候群, 日本臨床(0047-1852)別冊神経症候群IV 697-702, 2014.
- ③ HArAHAp NI, TAKEuCHI A, YusOFF S, TomInAGA K, OKInAGA T, KItAI Y, TAKArADA T, KuBo Y, SAItO K, SA'ADAH N, NurputrA DK, NIsHImurA N, SAItO T, NIsHIo H. TrInuCIeotIDE InsErtIon In tHE SMN2 promotEr mAy not BE rElAtED to tHE CIInIcAl

- pHEnoType oF SMA. BrAIn DEv.2014; In prEss.
- ④ KAto N, SA'ADAH N, RoCHmAH MA, HArAHAp NI, NurputrA DK, SAto H, NIsHImurA N, SADEwA AH, AstutI I, HArYAnA SM, SAItO T, SAItO K, NIsHIo H, TAKEuCHI A. SMA SCrEEEnInG SystEm UsInG DrIED Blood Spots on FilTEr PApEr : AppLICAtIon oF COP-PCR to tHE SMNI DEIEtIon TESt. KoBE J.MED.SCI.2014; In prEss.
- ⑤ SAItO T, NurputrA DK, HArAHAp NI, InDrA S.K.HArAHAp , YAmAmoto H, MunESHIGE E, NIsHIzono H, MATsumurA T, FuJIImurA H, SAKoDA S, SAItO K, NIsHIo H. A stuDY oF vAlproIC ACID For pAtIEnts wItH spInAl musCulAr AtropHy. NEuroloGy AnD ClInICAl NEuroSCIEnCE.2014:1-9.
- ⑥ ArAKAwA M, ArAKAwA R, TAtsumI S, AoKI R, SAItO K, Nomoto A. A novEl EvAluAtIon mEtHoD oF survIvAl motor nEuron protEIn As A BIomArKEr oF spInAl musCulAr AtropHy By ImAGInG Flow CytomEtry. BIoCHEm BIopHys REs Commun.2014;453(3):368-374.
- ⑦ IsHIurA H, TAKAHAsHI Y, HAYAsHI T, SAItO K, FuruyA H, WAtAnABE M, MurAtA M, SuzuKI M, SuGIurA A, SAwAI S, SHIBuyA K, UEDA N, ICHIKAwA Y, KAnAzAwA I, Goto J, TsuJI S. MoIECulAr EpIDEmIoloGy AnD ClInICAl spECtrum oF HErEDItArY spAstIC pArApLEGIA In tHE JApAnEsE populAtIon BAsED on ComprEHEnsIvE mutAtIonAl AnAlYsEs. J Hum GENEt 2014;59:163-172.
- ⑧ YAmAmoto T, MENCArEIII A, DIMArCo C, MuCCIolo M, VAsCotto M, BAIEstrI P, GErArD M, MATHIEu-DrAmArD M, AnDrIEux J, BrEunInG M, HoFFEr MJV, RuIVEnKamp CAL, SHImADA S, SAnGu N, SHImoJIImA K, UmEzu R, KAwAmE H, MATsuo M, SAItO K. REnIEr AI, MARl F. OvErIAppInG mICroDEIEtIons InvolVInG 15q22.2 nArrow tHE CrItICAl rEGIon For IntElIEctual DIsAbIlItY to NARG2 AnD RORA. Eur J MED GENEt 2014;57:163-168.
- ⑨ NAKAJImA Y, MEIJEr J & DoBrItzSCH D, Ito T, MEInsmA R, ABElInG NGGM, RoEloFsEn J, ZoEtEKouw L, WAtAnABE Y, TAsHIro K, LEE T, TAKEsHIImA Y, MItsuBuCHI H, YonEyAmA A, OHtA K, Eto K, SAItO K, KuHArA T, vAn KullEnBurG ABP. ClInICAl, BIoCHEmICAl AnD moIECulAr AnAlYsIs oF 13 JApAnEsE pAtIEnts wItH β -urEIDopropIonAsE DEFICIEnCy DEMonstrAtEs HIGH prEvAIEnCE oF tHE C.977G > A (p.R326Q) mutAtIon. J InHERIt METAB DIs 2014;37:801-812.
- ⑩ YAmADA Y, NomurA N, YAmADA K, MATsuo M, SuzuKI Y, SAmEsHIImA K,

- KImurA R, YAmAmoto Y, FuKusHI D, FuKuHArA Y, ISHIHArA N, NIsHI E, ImAtAKA G, SuzumurA H, HAmAno S-I, SHImIzu K, IwAKosHI M, OHAmA K, OHtA A, WAKAmoto H, KAJItA M, MlurA K, YoKoCHI K, KosAKI K, KuroDA T, KosAKI R, HIrAKI Y, SAItO K, MIZuno S, KurosAwA K, OKAmoto N, WAKAmatsu N. THE SpECtrum of ZEB2 MutAtIons CAUsInG tHE MowAt-Wilson SynDromE In JApAnEsE PopulAtIons. Am J MED GEnEt PART A.2014;164:1899-1908.
- ⑪ YAmAmoto T, SAto H, LAI PS, NurputrA DK, HArAHAp NI, MorIKAwA S, NIsHImurA N, KurAsHIGE T, OHsHitA T, NAKAJImA H, YAmADA H, NIsHIDA Y, ToDA S, TAKAnAsHI J, TAKEuCHI A, ToHyAmA Y, KuBo Y, SAItO K, TAKEsHImA Y, MATsuo M, NIsHIo H. IntrAGEnIC mutAtIons In SMN1 mAy ContrIButE morE sIGNIFICAntly to ClInICAl sEvErItY tHAn SMN2 Copy numBErs In somE splnAl musCulAr AtrophY (SMA) pAtIEnts. BrAIn DEv.2014; 36(10):914-920.
- ⑫ IwAsAKI N, FuKAwA K, MATsuo M, UrAno M, WAtAnABE M, Ono Y, TAnABE K, TAnIzAwA Y, OGAtA M, IDE R, TAKIzAwA M, NAGAtA S, OsAwA M, UCHIGAtA Y, SAItO K. A sIBlInG CasE oF WolFrAm synDromE wItH A novEl mutAtIon Y652X In WFS1. DIABETol Int.2014; 5:148-153
- ⑬ SAto Y, YAmAuCHI A, UrAno M, KonDo E, SAItO K. CortICostEroID tHErApy For DuCHennE musCulAr DystropHy: ImprovEmEnt oF psyCHomotor FunCtIon. PEDIAtR NEUrol.2014; 50:31-37.
- ⑭ 重症筋無力症診療ガイドライン 2014 日本神経学会「重症筋無力症診療ガイドライン」作成委員会
白石裕一 福留隆泰 本村政勝
- ⑮ 重症筋無力症-診療 NEw StAnDArDs: IVIG ClInICAl NEuroSCIEnCE 32 (9) 1054-1055, 2014
2. 学会発表
- ① 黒滝直弘(シンポジスト), 有床総合病院精神科における身体合併症医療・精神科リエゾンチーム加算算定病院の立場から, 第110回日本精神神経学会学術総会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 6月26日, 2014.
- ② 山口尚宏, 森本芳郎, 小野慎治, 松本一隆, 松本俊二, 中根秀之, 今村明, 黒滝直弘, 吉本静志, 中根允文, 岡崎祐士, 小澤寛樹: O15-2. マウスにおける低濃度リチウム長期投与による衝動性の変化の検討, 第36回日本生物学的精神医学会, 奈良文化会館(奈良県奈良市), 10月1日, 2014.
- ③ 吉田真太郎, 山口尚宏, 橋口知喜, 楠本優子, 岩倉由佳, 黒滝直弘, 小澤寛樹: 長

崎大学病院精神神経科におけるラモトリギンの使用状況～抗うつ薬の減量効果をふまえて～, 第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 11月20日, 2014.

④ 小林典子, 田山達之, 鬼塚芙美, 久保達哉, 黒滝直弘, 小澤寛樹: 留学生のメンタルヘルスにおける問題点～双極性感情障害を発症し入院に至った一例から～, 第67回九州精神神経学会, 第60回九州精神医療学会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 12月5日, 2014.

⑤ TosHIKAzu SAITO, HAI-Gwo HWU ,

KAzuyosHI YAMAMOTO, Yosuke MATSUMOTO, CHEnG LEE, NAoHiro KUROTAki: GEnDEr IDEntItY DIsoRDEr (GID) In AsIA, SymposIum 10, 第5回アジア精神医学会, CEntEnnIAI HAll KyusHu UnIvErsItY SCHool oF MEDICInE (福岡県福岡市), 3月4日, 2015.

⑥ 山本和儀, 黒滝直弘, 緒方勤, 宮島英一: 性差構築からみる同一障害の治療戦略 StrAtEGIEs oF GID MEDICInE BAsED on SEx DIFFErEnCEs, GID学会第17回研究大会, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (大阪府堺市), 3月21日, 2015.

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費

(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業))

「次世代シーケンサーを利用した *prolInE-rICH trAnsmEmBrAnE protEIn 2 (PRRT2)*

遺伝子解析法の改良」

研究分担報告書

分担責任者：吉浦孝一郎

長崎大学原爆後障害医療研究所 人類遺伝学 教授

研究要旨

研究目的は、次世代シーケンサーを活用して PRRT2 遺伝子変異スクリーニング実施態勢を作ることである。キャピラリーシーケンサーによるスクリーニングによって見落とされるイントロン変異や構造異常等を含めて、全ての PRRT2 変異を同定し種々のてんかん性疾患患者の遺伝子スクリーニング検査を提供する。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いて PRRT2 遺伝子を含むゲノム領域 16p11.2, (CHr16: 29,822,000 - 29,828,000) のイントロン、プロモーターも含めて網羅的に解析することを目的とした。

PRRT2 遺伝子変異は、発作性運動誘発性ジスキネジア (pAroxysmal KInEsIGEnIC DysKInEsIAs: PKD), 良性家族性乳児てんかん (BFIE)、良性乳児てんかん (BIE) など多くの良性けいれん性疾患の原因遺伝子であると報告されている。C.649DupC が最も多い変異として報告されて、第一のスクリーニング法は、本変異の有無を確認し、無い場合に遺伝子全体変異解析を行う。PCR プライマーを設定し増幅、キャピラリーシー

ケンサーでデータ取得し、目視で変異解析するのはヒューマンエラーが入り込む余地がある。

今回のスクリーニング法改良は、イントロン変異や構造変化も含めて全ての変異を明らかにし、ロボットにより機械的に処理スクリーニングできる態勢の構築を目指した。

B. 研究方法

1) ゲノム変異解析-HyBridIzAtIon 濃縮法

PRRT2 遺伝子は、基本的にはエクソン 3 個から構成され、イントロンと UTR を含めて約 3.5 Kilo-BAsE pAIr (KB) にわたり、16p11.2 上に存在している。PRRT2 の 3'側にある MAZ 遺伝子、5'側にある PAGR1 遺伝子には、明瞭なヒストン H3 の 27 番目のリ

2) 解析対象試料

解析対象は、スクリーニングセットアップのために対照 DNA を用いた。

C. 結果

図 1 に示す最も上段の黒い部分が、DEpth 情報であり、塩基配列情報が得られた部分である。PRRT2 遺伝子領域について、DEpth > 300 の情報を得ることが出来ていた。本実験システムが十分に機能していることを示している。取得情報がない部分はない。

2) 変異データ情報処理

NovoAlign ソフトを使用し、塩基配列情報を参照配列に対して整理させ、GATK にて配列調製を行い、変異コールを行った。

D. 考察

本 CApturE 法でイントロンも含めたゲノム解析(塩基変異同定, 構造異常同定等全てのゲノム変異)が, 同定可能と思われる。本実験は, 1 本のチューブで~24 試料は, 解析可能であるから, 分類不能の良性けいれんのスクリーニングは可能と思われる。

PRRT2 遺伝子は, 小さな遺伝子で高々4 KB のゲノム領域を解析対象とすれば全塩基配列を得られる。従って, LonG RAnGE PCR を応用して全遺伝子領域を増幅した後に, 次世代シーケンサーを利用すれば全遺伝子欠損以外の構造異常と塩基配列変化は同定できると考えられる。この, LonG

1) ゲノム変異データ取得

Illumina HiSeq2500 の RApID MoDE の 1 回のランに 96 試料分の塩基配列データを得た。

RAnGE PCR -> 次世代シーケンサーの手順も試して, 十分に機能している。

E. 結論

HyBRIDizAtlon法による濃縮からの PRRT2 遺伝子領域の網羅的変異解析と LonG RAnGE PCR 法による濃縮からの PRRT2 遺伝子領域の網羅的変異解析は共に効率良く解析可能である。他の疾患も含めて, コストダウンを図るためには, HyBRIDizAtlon 濃縮法と pErsonAl 型の次世代シーケンサーの組み合わせがよいであろう。

——達成度について——

解析技術および情報処理も含めて, 方法論に関しては順調に開発できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

- ① KAnAmE T, KI CS, NIIKAwA N, BAIIIIE GS, DAy JP, YAmAmurA KI, OHtA T,

- NiSHimurA G, MAstuurA N, KIm OH, SoHn YB, KIm HW, CHo SY, Ko AR, LEE JY, KIm HW, Ryu SH, RHEE H, YAnG KS, Joo K, LEE J, KIm CH, CHo KH, KIm D, YAnAGI K, NARItomI K, YosHIurA KI, KonDoH T, NII E, TonoKI H, HouslAy MD, JIn DK. HEtErozyGous mutAtions In CyClIC AMP pHospHoDIEstErAsE-4D (PDE4D) AnD protEIn KInAsE A (PKA) provide nEw InsIGHts Into tHE moleCulAr pAtHoloGy oF ACroDysostosis. *CELL SIGnAl*. 2014 Nov; 26(11): 2446-2459. DoI: 10.1016/J.CELLsIG.2014.07.025.
- ② NAGAtA E, KAno H, KAtO F, YAmAGuCHI R, NAKAsHIImA S, TAKAyAmA S, KosAKI R, TonoKI H, MIzuno S, WAtAnABE S, YosHIurA KI, KosHo T, HAsEGAwA T, KImIzuKA M, SuzuKI A, SHImIzu K, OHAsHI H, HAGA N, NumABE H, HorII E, NAGAI T, YosHIHAsHI H, NiSHimurA G, ToDA T, TAKADA S, YoKoyAmA S, AsAHArA H, SAno S, FuKAmI M, IKEGAWA S, OGAtA T. JApAnEsE FounDER DuplICAtions/trIPlicAtions InvolvinG BHLHA9 ArE AssoCIAtED wItH splIt-HAnD/Foot mAlFormAtion wItH or wItHout lonG Bone DEFICIEnCy AnD Gollop-WolFGAnG ComplEx. *OrPHAnEt J RArE Dis*. 2014 Oct 21; 9(1):125.
- ③ MIurA K, MorIsAKI S, ABE S, HIGAsHIJImA A, HAsEGAwA Y, MIurA S, TAtEIsHI S, MIshImA H, YosHIurA K, MAsuzAKI H. CirCulAtInG lEvEls oF mAtErnAl plAsmA CEll-FrEE prEGnAnCy-AssoCIAtED plACEntA-spECIFIC miCroRNAs ArE AssoCIAtED wItH plACEntAl wEIGHt. *PlACEntA*. 2014 Oct; 35(10):848-851. DoI: 10.1016/J.plACEntA.2014.06.002.
- ④ MIurA K, HAsEGAwA Y, ABE S, HIGAsHIJImA A, MIurA S, MIshImA H, KInosHIItA A, KAnEuCHI M, YosHIurA K, MAsuzAKI H. ClInICAl AppLIcAtions oF AnAlYsIs oF plAsmA CirCulAtInG ComplEtE HyDAtIDIForm mole prEGnAnCy-AssoCIAtED mIRNAs In GEstAtionAl tropHoBlAstIC nEoplAsIA: A prEllmInArY InvEstIGAtion. *PlACEntA*. 2014 SEp; 35(9):787-789. DoI: 10.1016/J.plACEntA.2014.06.004.
- ⑤ MIurA K, MIshImA H, KInosHIItA A, HAYAsHIDA C, ABE S, ToKunAGA K, MAsuzAKI H, YosHIurA KI. GENomE-wIDE AssoCIAtion stuDY oF HPV-AssoCIAtED CErvICAl CAnCEr In JApAnEsE womEn. *J MED ViroL*. 2014 Jul;86(7):1153-1158. DoI: 10.1002/Jmv.23943.

- ⑥ MATsumoto H, TsuCHIYA T, YosHIurA K, HAYAsHI T, HIDAka S, NAnAsHIImA A, NAGAyAsu T. ABCC11/MRP8 ExprEssIon In tHE GAstroIntEstInAl TrACt AnD A NovEl RolE For PEpsInoGEn SECrEtIon. ACtA HIstoCHEm CytoCHEm. 2014 Jun 28; 47(3):85-94. DoI: 10.1267/AHC.13040.
- ⑦ TsurusAKI Y, KosHIImIzu E, OHAsHI H, PHADKE S, Kou I, SHIIInA M, SuzuKI T, OKAmoto N, ImAmurA S, YAmAsHIItA M, WAtAnABE S, YosHIurA K, KoDErA H, MIyAtAKE S, NAKAsHIImA M, SAItsu H, OGAtA K, IKEGAWA S, MIyAKE N, MATsumoto N. DE novo SOX11 mutAtIons CAUSE CoFFIn-SIrIs synDromE. NAt Commun. 2014 Jun 2;5:4011. DoI: 10.1038/nComms5011.
- ⑧ MIurA K, HIGAsHIJImA A, MIurA S, MIshImA H, YAmAsAKI K, ABE S, HAsEGAWA Y, KAnEuCHI M, YosHIDA A, KInosHIItA A, YosHIurA K, MAsuzAKI H. PrEDomInAntly plACEntA-ExprEssED mRNAs In mAtErnAl plAsmA As prEDICtIvE mArKers For twIn-twIn trAnsFusion synDromE. PrEnAt DIAGn. 2014 Apr; 34(4):345-349. DoI: 10.1002/pD.4307.
- ⑨ ABE S, MIurA K, KInosHIItA A, MIshImA H, MIurA S, YAmAsAKI K, HAsEGAWA Y, HIGAsHIJImA A, Jo O, YosHIDA A, KAnEuCHI M, YosHIurA K, MAsuzAKI H. SInGLE HumAn pApIllomAVirus 16 or 52 InFEctIon AnD lAtEr CytoloGICAl FInDInGs In JApAnEsE womEn wItH NILM or ASC-US. J Hum GEnEt. 2014 MAY; 59(5):251-255. DoI: 10.1038/JHG.2014.9.
- ⑩ AmAnI D, KHAIInEzHAD A, GHADERl A, NIIKAWA N, YosHIurA KI. TrAnsFormInG Growth FACTor BEtA1 (TGFβ1) polymorpHIsms AnD BrEAsT CAnCEr rIsK. Tumour BIol. 2014 MAY; 35(5):4757-4764.
- ⑪ TsuKAmoto O, MIurA K, MIshImA H, ABE S, KAnEuCHI M, HIGAsHIJImA A, MIurA S, KInosHIItA A, YosHIurA K, MAsuzAKI H. IDEntIFICAtIon oD EnDomEtrIoID EnDomEtrIAl CARCInomA-AssoCIAtED miCroRNA In tIssuE AnD plAsmA. GynECol. OnCol. 2014 MAR; 132(2): 715-721.

2) 学会発表

国際学会

なし

国内学会等

招待講演

- ① 平成25年度長崎県医師会母体保護法指定医師研修会 平成26年3月2日(日),