

脊髄小脳変性症の診断支援・未診断疾患の原因同定に関する研究

研究分担者: 高嶋 博 鹿児島大学大学院 脳神経内科・老年病学講座

研究協力者: 樋口雄二郎¹⁾, 安藤匡宏¹⁾, 崎山佑介¹⁾, 橋口昭大¹⁾, 吉村明子¹⁾, 岡本裕嗣¹⁾, 松浦英治¹⁾, 中川正法²⁾, 石浦浩之³⁾, 三井 純³⁾, 戸田 達史³⁾, 辻 省次³⁾, 村山 圭⁴⁾, 原 太一⁵⁾, 山口政光⁶⁾

1) 鹿児島大学病院神経内科

2) 京都府立医科大学附属北部医療センター神経内科

3) 東京大学医学部附属病院 神経内科

4) 千葉県こども病院代謝科

5) 早稲田大学人間科学学術院 健康福祉科学科 細胞制御学

6) 京都工芸繊維大学 応用生物学系・染色体工学研究室

研究要旨

大規模な原因未同定の遺伝性ニューロパチーおよび脊髄小脳変性症(SCD)症例を対象にエクソーム解析を実施しSCDの新規原因遺伝子 *COA7* (Cytochrome C Oxidase Assembly Factor 7) を同定した。*COA7* はミトコンドリア呼吸鎖複合体アッセムブリに参与し、*COA7* 変異 7 症例の臨床的検討にて小脳失調症以外に軸索型ニューロパチー、錐体外路障害、痙性、認知機能障害、ミオパチーなど多系統の障害をきたすことを明らかにし、spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy type 3 (SCAN3) と命名し新しい臨床病型を確立した。また、生化学的および細胞生物学的解析、ショウジョウバエ疾患モデルを用いた機能解析を行い、*COA7* 異常はミトコンドリア機能障害に起因してさまざまな病態を引き起こすことを解明した。一方、SCDの網羅的遺伝子解析では、既知のリピート伸張異常陰性の原因未同定SCD96例を対象に全エクソーム解析を実施し、既報告の病的変異10例(10%)、新規の病的変異18例(19%)を同定し、SCDの包括的な遺伝子診断支援を行った。

A. 研究目的

当研究班の対象疾患である脊髄小脳変性症(SCD)の新規原因遺伝子探索および診断支援を行う。新規原因遺伝子に関しては、SCDおよび遺伝性ニューロパチー(IPN)患者の遺伝子検査を行い、原因未同定の症例を対象に全エクソーム解析を実施し、新規候補遺伝子を探索し、その病態および臨床的特徴などを明らかにする。診断支援については、第一に既知のSCDのリピート

伸張異常を行い、陰性例では次世代シーケンサーを用いた(whole exome sequencing; WES)を行い包括的な診断支援を行い、個々の症例の遺伝子異常およびその頻度などを明らかにする。

B. 研究方法

SCDおよびIPNの新規候補遺伝子を同定するため、IPNもしくはSCDが疑われた症例1369例のDNA検体を収集し、次世代シーケンサーを

用いた遺伝子解析を行った。既知遺伝子異常のない原因未同定の症例を選出し、その一部を対象に WES を行った。大量の WES データから効率よく候補遺伝子を同定するために、ESVD システム (exome-based shared variants detection system) という解析ソフトを独自に開発した。このシステムを用いて、大量の WES データの中からミスセンス変異やナンセンス変異、スプライス部位変異など蛋白機能に強い影響を与えると予想される変異を選択的に抽出し、さらに複数の症例間で共有する変異を抽出することで、*COA7* 遺伝子を同定した。*COA7* 変異症例は最終的に 7 家系 (自験例 6 例、海外症例 1 例) され、臨床的特徴を臨床経過、神経所見、神経画像所見、電気生理学的所見、病理学的所見などから詳細に検討した。また、*COA7* 変異の病的意義および病態メカニズムを検証するために、生化学的および細胞生物学的解析、ショウジョウバエ疾患モデルを用いた機能解析を行った。具体的には、患者由来の皮膚組織から培養した線維芽細胞を用いて、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 (MRC complexes) の酵素活性を測定した。また HeLa 細胞を用いて *COA7* 変異体の細胞内での発現解析を行った。また、*dCOA7* をノックダウンしたショウジョウバエの疾患モデルを作成し、運動機能解析や神経筋接合部のシナプス形態へ及ぼす影響を評価した。

一方、SCD の網羅的遺伝子解析では、これまでに当施設に遺伝子検査依頼のあった遺伝性小脳失調症患者の症例 (1406 例) の中から SCA1、2、3、6、78、12、31、DRPLA のリピート伸張異常を認めず、またプリオン遺伝子 (*PRNP*) に異常を認めなかった症例を選出した。その中から家族歴の有無や血族婚の有無、臨床経過などにより遺伝性小脳失調症の可能性が強く示唆される 96 症例を選出・対象とし、次世代シーケンサー (Ion Proton) を用いた WES を行った。得られた変異は既報告の変異と新規変異に分類し、新規変異に関しては ACMG ガイドラインにそって

Pathogenic もしくは likely pathogenic 変異を選出した。

(倫理面への配慮)

これらの実験に使用する DNA 検体の使用については、鹿児島大学のヒトゲノム使用研究に関する倫理委員会で承認され、使用目的 (遺伝性神経疾患の遺伝子診断検査、研究目的での原因検索の施行および厳重な保存) について患者または家族全員に十分に説明し、文書で遺伝子検査に関する同意書を得ている。

C. 研究結果

新規原因遺伝子探索では、WES データと ESVD システムを用いて *COA7* を同定した。*COA7* 変異症例の臨床的検討では、小脳失調症と軸索型ニューロパチーが主要徴候であり、一部の症例で錐体外路症状 (ジストニア/パーキンソニズム)、認知機能障害、白質脳症、脊髄萎縮、痙性、ミオパチーを認め、*COA7* 異常により多系統の障害が引き起こされることが明らかになった。末梢神経病理では慢性の軸索変性所見を呈しており、筋病理では ragged red fiber や CCO 欠損線維を認め、mitochondrial myopathy に矛盾しない所見を呈していた。HeLa 細胞を用いた解析では、*COA7* 蛋白はミトコンドリア内に局在していることを明らかにした。また変異 *COA7* タンパク質の細胞内局在への明らかな影響は認められなかった。生化学的解析では、患者由来の皮膚線維芽細胞ではミトコンドリア呼吸鎖複合体である complex I もしくは complex IV の酵素活性ないし発現低下を認めた。ショウジョウバエ疾患モデルでは、複眼の形態異常や運動機能の低下、寿命の短縮、神経筋接合部のシナプス形態異常が誘導されることを明らかにした。

遺伝性小脳失調症 96 症例の全エクソーム解析においては、10 例 (10.4%) に既報告の病的変異を、18 例 (18.8%) に新規変異を認めた。既報告の

病的変異は、*CACNA1A*、*KCND3*、*GRID2*、*DNMT1*、*PEX10*、*NOTCH3*、*KIF5A*、*PMP22* (deletion)、*SH3TC2* であり、新規変異は *ELOVL4*、*TMEM240*、*CACNA1A*、*CCDC88C*、*KCNA1*、*SPG7*、*SPG21*、*SPAST*、*KIF1A*、*AP5Z1*、*GRM1*、*ERCC6*、*ANO10*、*SYNE1*、*PTRH2* であった。

D. 考察

COA7 タンパクはミトコンドリア呼吸鎖複合体のアセンブリ(集合)に重要な役割をもち、神経系においては小脳や大脳皮質、基底核など中枢神経系および末梢神経系に発現していることが分かっている。本研究では、COA7異常によりニューロパチーおよび小脳失調症以外に錐体外路症状、痙性、認知機能障害、ミオパチーなど、多系統の障害をきたすことが分かった。COA7異常症の病態解明は、遺伝性ニューロパチーや脊髄小脳変性症を含むさまざまな神経変性疾患に共通する神経変性メカニズムのさらなる病態解明および今後の治療開発に貢献するものと思われる。

また、96例の全エクソーム解析で同定された病的変異は全体で28例(29%)であった。同定した遺伝子の中には、Charcot-Marie-Tooth病の原因遺伝子(*SH3TC2*)や遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子(*SPAST*、*SPG7*、*SPG21*、*KIF5A*、*KIF1A*、*AP5Z1*)など、脊髄小脳変性症以外の遺伝子変異も複数同定された。これらの遺伝子の変異では小脳失調を呈する表現型も報告されていることから、遺伝性失調症と鑑別を要する疾患は多岐にわたると考えられる。したがって、網羅的な遺伝子解析には、全エクソーム解析が非常に有用であった。一方、原因未同定の遺伝性小脳失調症がまだ多数存在し、今後は新規原因遺伝子の探索を進める。

E. 結論

COA7異常は小脳失調、ニューロパチー、錐体外路徴候、痙性、認知機能障害、ミオパチーなど多

系統の障害を引き起こす。COA7異常症の病態解明は、遺伝性ニューロパチーや脊髄小脳変性症を含むさまざまな神経変性疾患に共通する神経変性メカニズムのさらなる病態解明および今後の治療開発に貢献するものと思われる。リポート伸長異常が同定されない遺伝性小脳失調症においては、引き続き全エクソーム解析を継続して実施し、今後は新規原因遺伝子の探索を進める。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higuchi Y, Okunushi R, Hara T, Hashiguchi A, Yuan J, Yoshimura A, Murayama K, Ohtake A, Ando M, Hiramatsu Y, Ishihara S, Tanabe H, Okamoto Y, Matsuura E, Ueda T, Toda T, Yamashita S, Yamada K, Koide T, Yaguchi H, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Doi K, Morishita S, Sato K, Nakagawa M, Yamaguchi M, Tsuji S, Takashima H: Mutations in COA7 cause spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Brain*. 2018 Jun 1;141(6):1622-1636. doi: 10.1093/brain/awy104. PMID: 29718187
- 2) Yoshimura A, Yuan JH, Hashiguchi A, Ando M, Higuchi Y, Nakamura T, Okamoto Y, Nakagawa M, Takashima H: Genetic profile and onset features of 1005 patients with Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Sep 26. pii: jnnp-2018-318839. doi: 10.1136. PMID: 30257968
- 3) Yoshimura M, Yuan JH, Higashi K, Yoshimura A, Arata H, Okubo R, Nakabeppu Y, Yoshiura T, Takashima H: Correlation

- between clinical and radiologic features of patients with Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (Pro102Leu). *J Neurol Sci.* 2018 Aug 15;391:15-21. doi: 10.1016/j.jns.2018.05.012. Epub 2018 May 17. PMID: 30103963
- 4) Miyabayashi T, Ochiai T, Suzuki N, Aoki M, Inui T, Okubo Y, Sato R, Togashi N, Takashima H, Ishiura H, Tsuji S, Koh K, Takiyama Y, Haginoya K: A novel homozygous mutation of the TFG gene in a patient with early onset spastic paraplegia and later onset sensorimotor polyneuropathy. *J Hum Genet.* 2019 Feb;64(2):171-176. doi: 10.1038/s10038-018-0538-4. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30467354
- 5) Takanashi M, Funayama M, Matsuura E, Yoshino H, Li Y, Tsuyama S, Takashima H, Nishioka K, Hattori N: Isolated nigral degeneration without pathological protein aggregation in autopsied brains with LRR K2 p.R1441H homozygous and heterozygous mutations. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Oct 17;6(1):105. doi: 10.1186/s40478-018-0617-y. PMID: 30333048
- 6) Nishikura N, Yamagata T, Morimune T, Matsui J, Sokoda T, Sawai C, Sakaue Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, Takashima H, Takeuchi Y, Maruo Y: X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 5 with recurrent weakness after febrile illness. *Brain Dev.* 2019 Feb;41(2):201-204. doi: 10.1016/j.braindev.2018.08.006. Epub 2018 Aug 31. PMID: 30177296
- 7) Sakiyama Y, Matsuura E, Maki Y, Yoshimura A, Ando M, Nomura M, Shinohara K, Saigo R, Nakamura T, Hashiguchi A, Takashima H: Peripheral neuropathy in a case with CADASIL: a case report. *BMC Neurol.* 2018 Aug 31;18(1):134. doi: 10.1186/s12883-018-1131-3. PMID: 30170552
- 8) Yamaguchi M, Takashima H: Drosophila Charcot-Marie-Tooth Disease Models. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1076:97-117. doi: 10.1007/978-981-13-0529-0_7. Review. PMID: 29951817
- 9) 竹丸 誠, 下江 豊, 佐藤 恒太, 橋口 昭大, 高嶋 博, 栗山 勝: 一過性の繰り返す大脳白質病変を示し, GJB1 遺伝子点変異ヘテロ接合体の X連鎖 Charcot-Marie-Tooth 病の女性例. *臨床神経学.* 2018 May 25;58(5):302-307. doi: 10.5692/clinicalneuro.cn-001138. Epub 2018 Apr 28. Review. Japanese. PMID: 29710024
- 10) Fujisaki N, Suwazono S, Suehara M, Nakachi R, Kido M, Fujiwara Y, Oshiro S, Tokashiki T, Takashima H, Nakagawa M: The natural history of hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P) in 97 Japanese patients. *Intractable Rare Dis Res.* 2018 Feb;7(1):7-12. doi: 10.5582/irdr.2017.01084. PMID: 29552439
- 11) Dung VM, Suong DNA, Okamoto Y, Hiramatsu Y, Thao DTP, Yoshida H, Takashima H, Yamaguchi M: Neuron-specific knockdown of Drosophila PDHB induces reduction of lifespan, deficient locomotive ability, abnormal morphology of motor neuron terminals and photoreceptor axon targeting. *Exp Cell Res.* 2018 May 15;366(2):92-102. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.035. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29501567
- 12) Tanabe H, Higuchi Y, Yuan JH, Hashiguchi A, Yoshimura A, Ishihara S, Nozuma S, Okamoto Y, Matsuura E, Ishiura H, Mitsui J, Takashima R, Kokubun N, Maeda K, Asano Y,

- Sunami Y, Kono Y, Ishigaki Y, Yanamoto S, Fukae J, Kida H, Morita M, Tsuji S, Takashima H: Clinical and genetic features of Charcot-Marie-Tooth disease 2F and hereditary motor neuropathy 2B in Japan. *J Peripher Nerv Syst.* 2018 Mar;23(1):40-48. doi: 10.1111/jns.12252. Epub 2018 Feb 14. PMID: 29381233
- 13) Yuan JH, Hashiguchi A, Okamoto Y, Yoshimura A, Ando M, Shiomi K, Saito K, Takahashi M, Ichinose K, Ohmichi T, Ichikawa K, Tadashi A, Takigawa H, Shibayama H, Takashima H: Clinical and mutational spectrum of Japanese patients with recessive variants in SH3TC2. *J Hum Genet.* 2018 Mar;63(3):281-287. doi: 10.1038/s10038-017-0388-5. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29321516
- 14) 浜田 恭輔, 武井 藍, 崎山 佑介, 森山 宏遠, 橋口 昭大, 高嶋 博: 広範な脳萎縮と髄液 IL-6 上昇を伴いインフリキシマブを使用した慢性進行型神経ペーチェット病の 1 例. *臨床神経学.* 2018 Jan 26;58(1):30-34. doi: 10.5692/clinicalneurology-001086. Epub 2017 Dec 22. Japanese. PMID: 29269695
- 15) Minami K, Takahashi S, Nihei Y, Oki K, Suzuki S, Ito D, Takashima H, Suzuki N: The First Report of a Japanese Case of Seipinopathy with a BSCL2 N88S Mutation. *Intern Med.* 2018 Feb 15;57(4):613-615. doi: 10.2169/internalmedicine.8765-16. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29269637
- 16) Hikiami R, Yamashita H, Koita N, Jingami N, Sawamoto N, Furukawa K, Kawai H, Terashima T, Oka N, Hashiguchi A, Takashima H, Urushitani M, Takahashi R: Charcot-Marie-Tooth disease type 2A with an autosomal-recessive inheritance: the first

report of an adult-onset disease. *J Hum Genet.* 2018 Jan;63(1):89-92. doi: 10.1038/s10038-017-0353-3. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29215088

2.学会発表

- 1) ○樋口雄二郎¹⁾、橋口昭大¹⁾、袁 軍輝¹⁾、吉村 明子¹⁾、岡本裕嗣¹⁾、松浦英治¹⁾、上田 健博²⁾、石浦浩之³⁾、三井 純³⁾、戸田 達史²⁾³⁾、辻 省次²⁾、高嶋 博¹⁾ *COA7*は小脳失調を伴う軸索型ニューロパチーの新規原因遺伝子である . 第 29 回日本末梢神経学会学術集会, 2018 年 9 月 8 日.
- 2) ○樋口雄二郎, 橋口昭大, 袁 軍輝, 吉村明子, 岡本裕嗣, 松浦英治, 高嶋 博. 遺伝性ニューロパチーの 2 つの新規遺伝子 *MME* と *COA7* の同定、第 60 回日本神経学会学術大会、2019 年 5 月.
- 3) ○Yujiro Higuchi, Akihiro Hashiguchi, Akiko Yoshimura, Yuji Okamoto, Eiji Matsuura, Hiroshi Takashima, *COA7* cause spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. The American Society of Human Genetics 2019 Annual Meeting, Houston, USA, 2019

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1.特許取得

遺伝性疾患の検出方法 (特許第 6378529 号, 出願日: 平成 26 年 4 月 28 日、取得年月日: 平成 30 年 8 月 3 日、利権者: 高嶋 博、樋口雄二郎)

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

