

総説 (2017年度横浜市立大学医学会賞受賞論文)

## 神経筋疾患 (単一遺伝子疾患から rare variant disease まで) の遺伝学的解析

宮 武 聡 子

横浜市立大学附属病院 遺伝子診療科

**要 旨:** 次世代シーケンサーの登場によって, ゲノム医学は長足の進歩を遂げ, 疾患責任遺伝子の同定が加速した. 遺伝性疾患を考えると, その遺伝学的モデルは, 単一遺伝子疾患から, rare variant disease, あるいは多因子疾患まで幅広く, 加えて疾患特異性を考慮する必要がある. 本研究は, 最新のゲノム技術を駆使し, 様々な遺伝学的モデルを想定して神経筋疾患の遺伝学的解析を行ったものであるが, 本稿では, もやもや病発症に関わる *RNF213* 遺伝子の R4810K 多型の臨床遺伝学的関連, およびネマリンミオパチーの2つの新規疾患責任遺伝子 (*KLHL40*, *MYPN*) の同定について紹介する.

**Key words:** 次世代シーケンサー (next generation sequencer),  
全エクソーム解析 (whole exome sequencing), もやもや病 (moyamoya disease),  
ネマリンミオパチー (nemaline myopathy)

### はじめに

ゲノム医学において, シーケンス技術は必須であり, ゲノム医学の進歩は, シーケンス技術の革新によるところが大きい. シーケンス技術発展の歴史としては, まず1977年に開発されたサンガー法<sup>1)</sup>によって, 塩基配列が決定できるようになり, ゲノムの構造解析や連鎖解析などから疾患に関連付けられた特定領域や遺伝子のシーケンス解析を行うことが可能となった. そして1998年に, 現在使われているキャピラリーシーケンサーが開発され, シーケンス産出量が飛躍的に増加した<sup>2)</sup>. さらに2005年より, 次世代シーケンサーが登場し超並行的な配列解析が可能となって全エクソームや全ゲノムなどの網羅的な塩基配列決定が可能となった. これによって, 従来の遺伝学的解析手法ではアプローチ困難であった, 小家系, もしくは家系を形成しない孤発性疾患においても, その疾患責任遺伝子が同定可能となった.

遺伝性疾患のモデルは, メンデル遺伝に厳密に従う単一遺伝子疾患から, 頻度が低く病的インパクトが強いいくつかの rare variant によって規定される rare variant

disease, または高頻度低インパクト variant の集積が罹患の閾値を越えて発症する多因子疾患まで幅広い. また一部の神経疾患においては, 成人期以降の発症である, などといった特徴もあり, 原因解明を複雑にしている. 本研究はさまざまな遺伝学的モデルを想定し, 最新のシーケンス技術を駆使して神経筋疾患の解析を行ったものである. 本稿では, もやもや病, ネマリンミオパチーについての筆者の研究について紹介する.

### (1) *RNF213* 遺伝子のホモ接合性 R4810K (p.Arg4810Lys) 多型は, 重症型のもやもや病の遺伝マーカーである

もやもや病は, 特定の脳主幹動脈の狭窄・閉塞と脳底部の異常血管網をきたす疾患で<sup>3)</sup>, 若年性の脳卒中の原因として重要である<sup>4)</sup>. 慢性進行性に経過し, くり返す脳虚血や脳出血による神経学的機能障害や知的機能の低下を来すが, 発症年齢が早く, 初発時より重篤な脳梗塞を来し, 急速進行性の予後不良の群が存在することが臨床的に知られていた<sup>5)</sup>. 遺伝学的背景が想定されていたが, 2010年にもやもや病の疾患感受性遺伝子として *RNF213* 遺伝子が同定された<sup>6)</sup>. そこで, *RNF213* 遺伝子

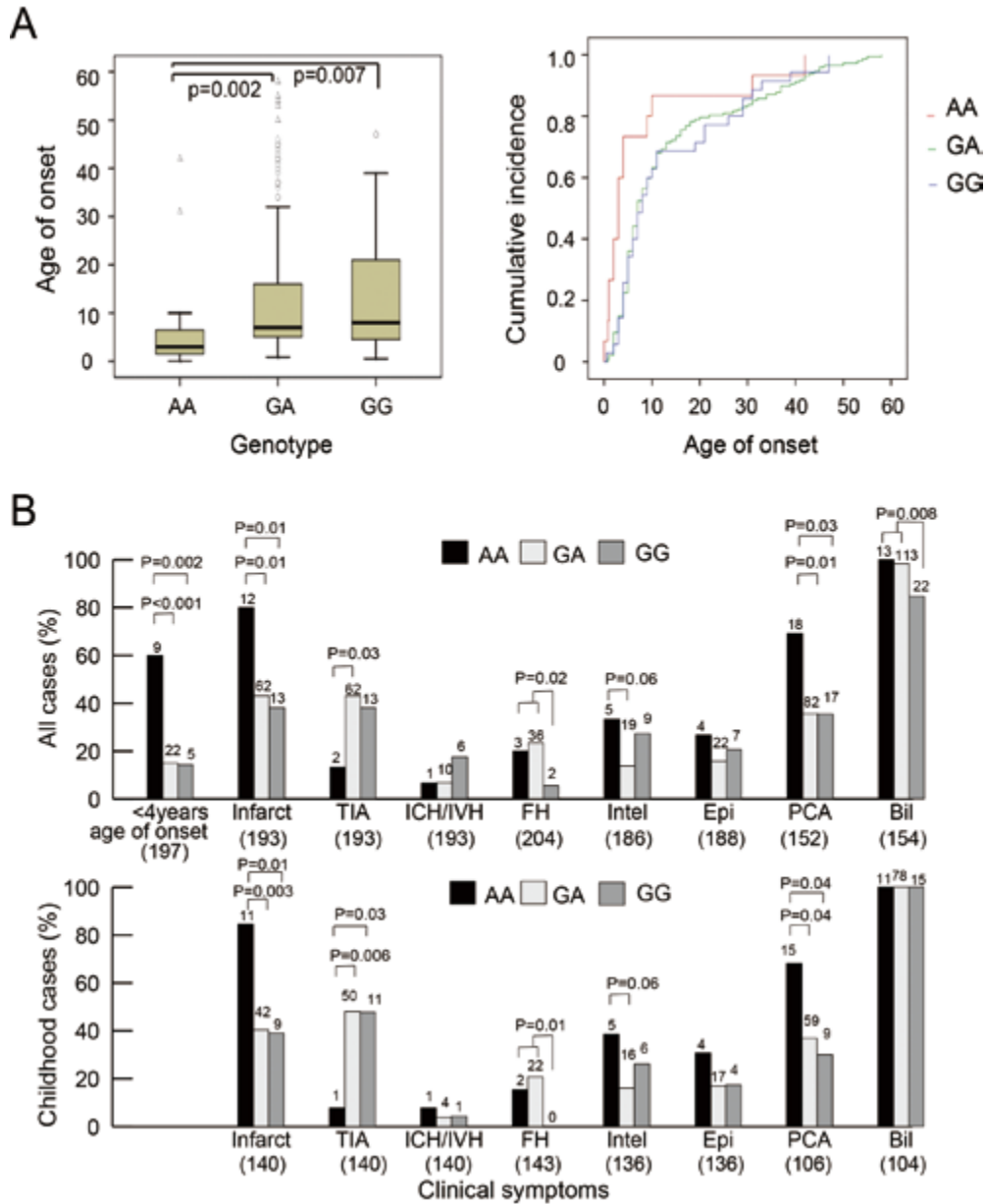


図1 RNF213遺伝子R4810K多型ともやもや病との臨床遺伝学的関連

A: 左図はR4810K多型の遺伝型がホモ接合性(AA), ヘテロ接合性(GA), 野生型(GG)である3つの症例群について、それぞれの発症年齢の分布について箱ひげ図を示した。(○)(△)は外れ値を表す。右図は3つの症例群におけるもやもや病の累積発症のグラフである。B: 上図は204名のもやもや病症例において、R4810K多型がホモ接合性(AA), ヘテロ接合性(GA), 野生型(GG)である3つの症例群における様々な臨床症候の頻度を棒グラフで示した。各々の臨床症候があるかないかについては、その臨床記録が存在する症例の合計数を棒グラフの下段に( )で示し、各症例群において各々の症候を有する症例の数を各々の棒グラフの上に表示した。Infarct: 脳梗塞, TIA: 一過性脳虚血, ICH/IVH: 脳出血/脳室内出血, FH: 家族歴あり, Intel: 知的機能の低下, Epi: てんかん, PCA: 後大脳動脈の病変合併, Bil: 両側性の血管病変。下図は15歳未満で発症した症例について、上図と同様の内容を棒グラフで提示した(図は, Miyatake S et al., 78 (11):803-10, 2012, Neurologyより改変)。

の遺伝型ともやもや病の臨床表現型の相関について解析を行った。

もやもや病患者204名を対象とし、RNF213遺伝子の全コーディング領域のDNA配列を高解像度融解法とSanger法を用いて決定した。検出されたvariantは、62組の患者の両親、13人の母親、4人の父親、及び283人の

健常日本人コントロールについても検索した。患者の臨床情報は、主治医の記録から収集した。遺伝型—臨床型連関は統計学的に解析した。

R4810K多型を含む19個のmissense variantを同定した。R4810K多型は家族性もやもや病患者の95.1%、孤発性もやもや病患者の79.2%、健常日本人の1.8%に見られた。

本多型をヘテロ接合性もしくはホモ接合性に持つ場合のOdds比は259 ( $P < 0.001$ )で、もやもや病との強い相関が再現された。統計学的手法を用いると、ヘテロ接合性を持つ場合の生涯発症確率はベイズの定理により1.44–3.77%と見積もられる一方、本多型をホモ接合性を持つ場合のもやもや病発症確率は二項分布により少なくとも78%と計算され、ホモ接合体群は、ヘテロ接合体群に比べ発症リスクが極端に大きくなると考えられた。またホモ接合性患者は、それ以外の患者に比べ、有意に発症年齢が早かった(ホモ接合性症例の発症年齢中央値 = 3歳, ヘテロ接合性症例の発症年齢中央値 = 7歳, 多型をもたない症例の発症年齢中央値 = 8歳)(図1A)。ホモ接合性症例の60%は4歳未満でもやもや病と診断されており、その全症例の初発症状は脳梗塞であった。初発時の症状が脳梗塞であることや、後大脳動脈にも病変が及んでいることは、どちらももやもや病の予後不良因子として知られているが、これらは、ホモ接合性にこの多型を有する症例で有意に頻度が高かった(図1B)。R4810K多型以外の多型は臨床表現型との相関は明らかではなかった。以上の解析から、R4810K多型は、もやもや病発症と強い関連があり、特にホモ接合性多型は、早期発症、重症で広範な脳血管病変を有することが示された<sup>7)</sup>。

## (2) ネマリンミオパチーの新規疾患責任遺伝子同定

ネマリンミオパチーは先天性ミオパチーの中で頻度が高く、約5万人出生に1人程度見られる<sup>8)</sup>。筋病理学的には筋線維内のネマリン小体の出現を特徴とする<sup>9)</sup>。臨床的には筋緊張低下、筋力低下、呼吸障害や嚥下障害などが見られる。心筋障害や外眼筋障害はまれである<sup>8)</sup>。研究を始めた当初は7つの疾患責任遺伝子が知られていたが、これらの既知遺伝子では説明できない症例が30–50%程度存在するとされていた<sup>10)</sup>。

### KLHL40遺伝子関連ネマリンミオパチー

KLHL40遺伝子変異の同定は、2人の罹患同胞のいる重症先天型の1家系の解析に端を発した。常染色体劣性遺伝形式を想定し連鎖解析で疾患関連領域を絞り込んだ後、全エクソーム解析によって、KLHL40遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を同定した。その後日本(国立精神神経医療研究センター)、アメリカ、フィンランド、オーストラリアで国際共同研究を行い、重症ネマリンミオパチーの143家系の解析から28家系(19.6%)に本遺伝子変異が同定され、本遺伝子の変異が多民族で共有されるネマリンミオパチーの原因であり、その頻度が高いことを見出した。日本人は、創始者変異(c.1582G>A, p.Glu528Lys)を保有するため、本遺伝子変異の検出率はさらに高頻度であった(図2A上)。3D構造モデル解析では、ほとんどのミスセンス変異はKelchドメインやBTB-BACKドメ

イン上に存在し、アミノ酸の置換により、ドメイン構造が不安定になることが予想された(図2A下)。病理学的には、筋線維の大小不同、間質の増生とともに径の小さい線維が目立ち、ネマリン小体は砂状で時に電顕でのみ確認できた(図2B)。臨床上的特徴としては、胎児期から無動や羊水過多などの症状が70–80%程度に見られ、新生児期から重度の筋力低下があり、90%以上の症例で呼吸障害や嚥下障害がみられ平均死亡月齢は5か月であること、などが挙げられ、重度先天型の表現型をとることが明らかとなった。

KLHL40遺伝子は、主に骨格筋に発現し、サルコメア関連タンパク質をコードしているが、それまで知られていたネマリンミオパチー関連タンパク質とは異なり、A帯に局在していた。また本遺伝子に変異を持つ患者では、このタンパク質が筋線維内でほとんど消失していた(図2C)。ゼブラフィッシュにおいても筋肉前駆細胞や骨格筋で本遺伝子が発現していることを確認し、モルフォリノアンチセンスオリゴによってKLHL40遺伝子のオーソログをロックダウンさせると、変異体では体幹が湾曲し頭部が小さくなり(図2D)、筋線維の構造異常が起こっていた(図2E)。電顕上、筋原線維の配列の乱れや幅広のZ帯がみられ、患者の病態が再現された(図2F)<sup>11)</sup>。

### MYPN遺伝子関連ネマリンミオパチー

MYPN遺伝子変異は、血族婚家系で、筋病理学的に核内棒状封入体をもつ小児期発症のネマリンミオパチー症例の解析から同定された。核内棒状封入体ミオパチー(intranuclear rod myopathy)はネマリンミオパチーのサブタイプで、これまではACTA1遺伝子変異をもつ重症例のみで見られるとされていた<sup>12)</sup>。発端者についてACTA1の変異解析を行ったが、変異が認められなかったため、常染色体劣性遺伝を想定しホモ接合性マッピングを行った後、全エクソーム解析を行い、候補領域内に存在するMYPN遺伝子の劣性変異を見出した。その後病理学的にネマリンミオパチーと診断され、遺伝学的原因が不明の54家系について本遺伝子の変異解析を行い、3家系(5.6%)に本遺伝子の劣性変異を同定した。これらはすべてtruncating変異(アミノ酸を短縮させる変異)であった(図3A)。Exome Aggregation Consortium(ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>)に登録された本遺伝子のtruncating variantの一般頻度から推定すると、MYPN遺伝子に関連するネマリンミオパチーは、本疾患全体の約1–2%を説明すると想定された。

MYPN遺伝子変異を同定した4家系は、いずれも小児期発症で進行は緩徐であり、比較的軽症の表現型を呈していた。また2家系で心筋障害の合併があり、2家系の筋病理所見で核内棒状封入物が認められたことは非常に特徴的で本遺伝子検査を考慮する際のマーカーになりえ



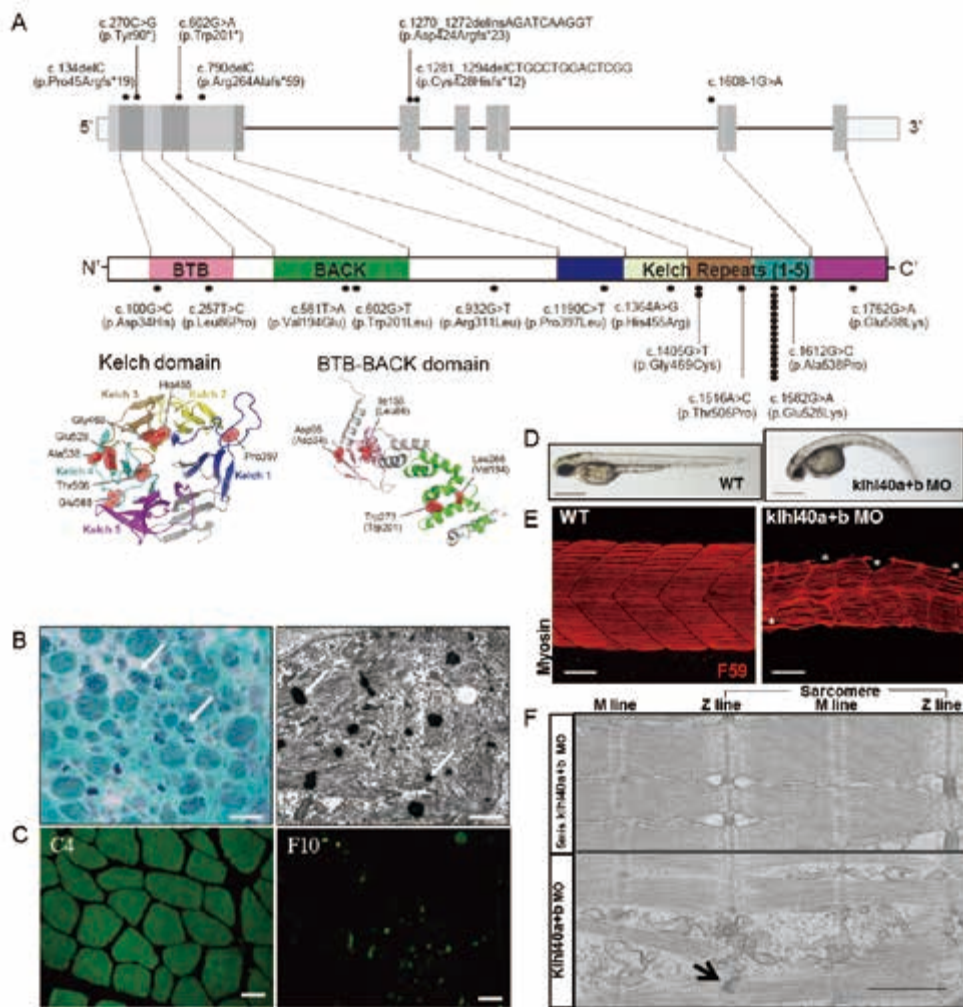


図2 KLHL40遺伝子関連ネマリンミオパチー

A : 上図は国際共同研究で同定された *KLHL40* 遺伝子の全変異とアミノ酸の変化を示す。上段にアミノ酸を短縮させる変異、下段にミスセンス変異を●で示す。●の数が、変異を保有していた患者の数を示す。c.1582G>A は日本人で高頻度に同定された。下図は、3D 構造解析の図で、ミスセンス変異の位置を示す。B : 左図は *KLHL40* 遺伝子に変異をもつ患者の筋病理像(ゴモリトリクローム変法染色)。砂状のネマリン小体が豊富にみられる(矢印)。右図は電子顕微鏡でみたネマリン小体(矢印)。C 左図 : 正常人の筋線維には緑色に染色される *KLHL40* タンパク質が存在。右 : *KLHL40* 遺伝子に変異をもつ患者の筋線維では *KLHL40* タンパク質が消失。D : ゼブラフィッシュ疾患モデルを作成し筋肉への影響を解析。左図は正常のゼブラフィッシュ。右図はモルフォリノアンチセンスオリゴによって *KLHL40* 遺伝子のオーソログ (*klhl40a/klhl40b*) をノックダウンさせたゼブラフィッシュ (*klhl40 morphant*)。体幹が湾曲し小さい。E : 筋線維の Myosin 染色像。左図は正常のゼブラフィッシュ。右図は *klhl40 morphant*。 *klhl40 morphant* では筋線維が不均一でギャップ (\*) を生じている。F : 上段はコントロール、下段は *klhl40 morphant* の筋線維の電顕写真。 *klhl40 morphant* で筋原線維の配列の乱れ、幅の広がった Z 帯 (矢印) がみられる(図は、Rvenscroft G, Miyatake S, et al., 93(1):6-18, 2013, American Journal of Human Genetics より改変)。

る所見と考えている(図3B a, b)。

*MYPN* 遺伝子は筋サルコメアを構成する *MYPN* タンパク質をコードする。このタンパク質は筋サルコメアにおいては Z 帯タンパク質である  $\alpha$ -actinin と共局在するが、核内に移行して転写の調節にも関わると想定されている。患者の骨格筋免疫染色では健常で Z 帯に見られた *MYPN* は筋線維内でほとんど消失していた(図3B c, d)。本遺伝子のヘテロ接合性変異が低浸透性に心筋症に関連することが報告されており、その病態は優性阻害であると考えられている。一方両アレル性の機能喪失型の変異はネマリンミオパチーを起こすのでこの両者の病態は異なる

と考えられる。本遺伝子のナンセンス変異をホモ接合性にもつマウスモデルにおいて、その骨格筋は、HE 染色ではコントロールと比べ著明な変化はないものの電子顕微鏡下には、筋サルコメア構造異常や、ネマリン小体様の凝集物が確認され、比較的軽症であるヒトでの表現型と合致した病態が再現された<sup>13)</sup>(図3C a-f)。

おわりに

もやもや病に関する研究については、*RNF213* 遺伝子のホモ接合性の R4810K 多型が、重症型のもやもや病に関

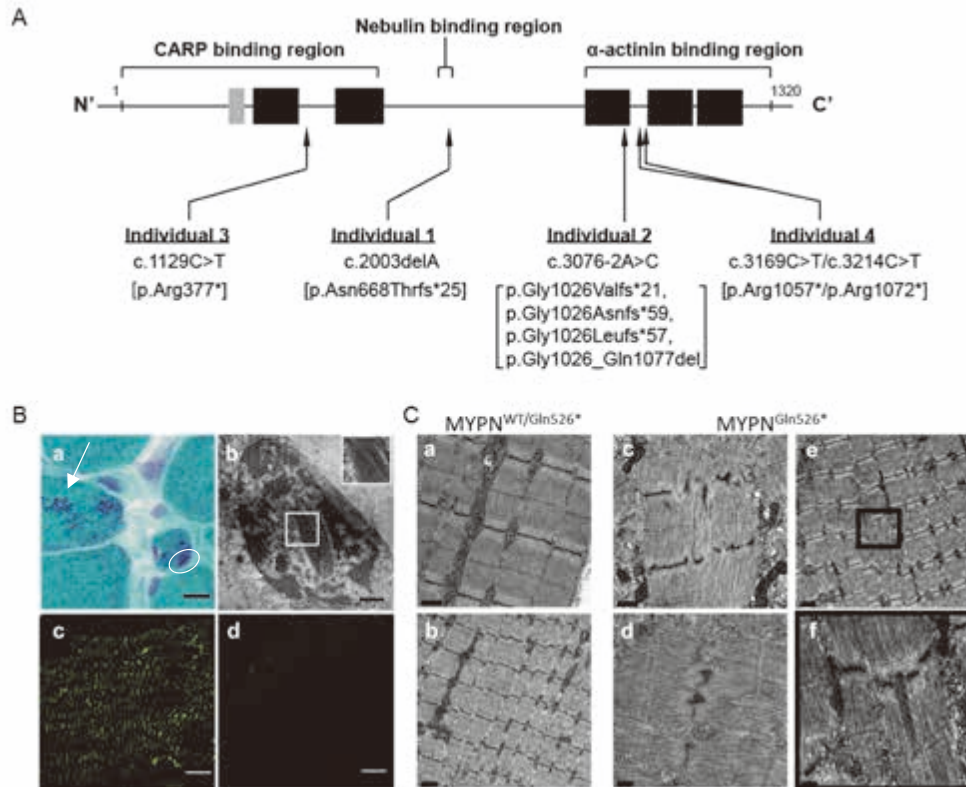


図3 MYPN遺伝子関連ネマリニンミオパチー

A: MYPN タンパク質と同一した変異の図. B: a 患者の骨格筋ゴモトリクローム変法染色像. ネマリニン小体 (矢印) や核内棒状封入物 (丸で囲んだ部分) が見られた. b 核内棒状封入体の電顕像. 右上に封入体の拡大像 (格子状の構造物). cd 健常コントロール (c) および患者 (d) の骨格筋の免疫組織化学染色像. 健常コントロールの筋線維には緑色に染色される MYPN タンパク質が存在. 患者では消失. C: 疾患モデルマウスにおける骨格筋解析. 左 a, b: *Mypn* ナンセンス変異をヘテロ接合性に有するモデルマウスの骨格筋電子顕微鏡像. 筋サルコメア構造は正常. 右 c, d, e, f: *Mypn* ナンセンス変異のホモ接合性マウスでは筋サルコメア構造が乱れ (c, d), ネマリニン小体様の凝集物がみられた (e とその拡大像 f) (図は, Miyatake S, Mitsuhashi S, et al., 100(1): 169-178, 2017, American Journal of Human Genetics より改変).

連していることが示されたことは、臨床現場で役に立つ知見である。患者のみならず at risk 者について、本多型を検索することで、疾患のモニタリング方法の検討や、予防的治療に関する新たな戦略を提供する可能性がある。一方で遺伝学的には、R4810K 多型では、もやもや病の発症は十分説明できず、その病態も不明であり、診断、治療へつながる知見はまだ得られていない。発症を規定するものが何か、またその病態を明らかにできるように研究を継続したい。

ネマリニンミオパチーに関する研究については、本疾患を引き起こす分子を新たに複数同定したことは、ネマリニンミオパチーの分子病態の解明の手がかりとなる。臨床への還元という観点では、ネマリニンミオパチーの新規責任遺伝子の同定により、これまで原因不明とされた同疾患の患者さんの 5% 程度が遺伝学的に診断可能となったと考えられる。遺伝子検査を利用した早期診断によって早期の適切な治療介入に貢献できる可能性がある。また遺伝子レベルで原因を特定できることで、罹患者の家族への適切な遺伝カウンセリングも可能となる。

## 謝 辞

本研究は、横浜市立大学倫理委員会の承認を得て行った。本研究にあたり、研究にご協力いただいた患者様とご家族の皆様、共同研究していただいた諸先生方、およびご指導いただきました横浜市立大学医学研究科遺伝学教室の松本直通教授と研究室の先生方に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, **74**(12): 5463 – 5467, 1977.
- 2) Kircher M, Kelso J: High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. Bioessays, **32**(6): 524 – 536, 2010.
- 3) Suzuki J, Takaku A: Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of

- brain. *Arch Neurol*, **20**(3): 288 – 299, 1969.
- 4) Bigi S, Fischer U, Wehrli E, et al.: Acute ischemic stroke in children versus young adults. *Ann Neurol*, **70**(2): 245 – 254, 2011.
  - 5) Scott RM, Smith ER: Moyamoya disease and moyamoya syndrome. *N Engl J Med*, **360**(12): 1226 – 1237, 2009.
  - 6) Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, et al.: A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet*, **56**(1): 34 – 40, 2011.
  - 7) Miyatake S, Miyake N, Touho H, et al.: Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology*, **78**(11): 803 – 810, 2012.
  - 8) Romero NB, Sandaradura SA, Clarke NF: Recent advances in nemaline myopathy. *Curr Opin Neurol*, **26**(5): 519 – 526, 2013.
  - 9) Nance JR, Dowling JJ, Gibbs EM, Bonnemann CG: Congenital myopathies: an update. *Curr Neurol Neurosci Rep*, **12**(2): 165 – 174, 2012.
  - 10) Gupta VA, Ravenscroft G, Shaheen R, et al.: Identification of KLHL41 Mutations Implicates BTB-Kelch-Mediated Ubiquitination as an Alternate Pathway to Myofibrillar Disruption in Nemaline Myopathy. *Am J Hum Genet*, **93**(6): 1108 – 1117, 2013.
  - 11) Ravenscroft G\*, Miyatake S\*, Lehtokari VL, et al.: Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. *Am J Hum Genet*, **93**(1): 6 – 18, 2013. (\* denotes equal contribution.)
  - 12) Laing NG, Dye DE, Wallgren-Pettersson C, et al.: Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA 1 ). *Hum Mutat*, **30**(9): 1267 – 1277, 2009.
  - 13) Miyatake S\*, Mitsuhashi S\*, Hayashi YK, et al.: Biallelic Mutations in MYPN, Encoding Myopalladin, Are Associated with Childhood-Onset, Slowly Progressive Nemaline Myopathy. *Am J Hum Genet*, **100**(1): 169 – 178, 2017. (\* denotes equal contribution.)

### Abstract

## GENETIC ANALYSIS OF NEUROMUSCULAR DISEASES USING DIFFERENT GENETIC MODELS

Satoko MIYATAKE

*Clinical Genetics Department, Yokohama City University Hospital*

After the introduction of next generation sequencing technology in the beginning of this century, around 2005, it became possible to examine, with greater details, approximately 20,000 known genes that constitute the human genome. Numerous mutant genes have been found responsible for genetic disorders of unknown etiologies using Whole Exome Sequencing, where all known coding exonic regions are sequenced for a given individual genome. In this study, we investigated possible genetic causes for two neuromuscular diseases: moyamoya disease and nemaline myopathy; using modern sequencing technologies, combined with different genetic models consideration.