

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 臨床データを元にした発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKD) の発症機序の解明  
及び新規治療薬の開発  
(英語) The molecular analysis of Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia(PKD) and the Development  
of novel therapeutic agents based on the clinical features of PKD
- 研究開発担当者  
所属 役職 氏名： (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 精神神経科 准教授 黒滝直弘  
(英語) Department of Neuropsychiatry, Unit of Translation Medicine Nagasaki  
University Graduate School of Biomedical Sciences  
Associate professor Naohiro Kurotaki
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究  
開発課題名： (日本語) 合併症に着目した PKD の臨床医学的検討  
(英語) The clinical analysis of PKD
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 精神神経科 准教授 黒滝直弘  
(英語) Department of Neuropsychiatry, Unit of Translation Medicine Nagasaki  
University Graduate School of Biomedical Sciences  
Associate professor Naohiro Kurotaki
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 教授 斉藤加代子  
(英語) Tokyo Women's Medical University, Institute of Medical Genetics  
Professor Kayoko Saito
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学分野 教授 齋藤伸治  
(英語) Department of Neonatology and Pediatrics, Nagoya City University Graduate  
School of Medical Sciences Professor Shinji Saitoh

- 研究開発分担者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 精神神経科 教授 小澤寛樹  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Neuropsychiatry, Unit of Translation Medicine Nagasaki  
University Graduate School of Biomedical Sciences Professor  
Hiroki Ozawa
- 研究開発分担者 (日本語) 長崎大学病院 脳神経内科 講師 白石裕一  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Neurology and Strokeology, Nagasaki University Hospital  
Assistant Professor Hirokazu Shiraishi
- 研究開発分担者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 公衆衛生看護学 教授 本田純久  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Public Health & Nursing Nagasaki University Graduate School of  
Biomedical Sciences Professor Sumihisa Honda
- 分担研究 (日本語) 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼおよびPRRT2 遺伝子関連疾患における変異解析  
開発課題名 : (英語) Mutation analysis of PRRT2 related diseases including PKD
- 研究開発分担者 (日本語) 長崎大学原爆後障害医療研究所人類遺伝学研究分野 (原研遺伝)  
教授 吉浦孝一郎  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of HUMAN GENETICS, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki  
University Professor Koh-ichiro Yoshiura
- 分担研究 (日本語) PKD 原因遺伝子の機能解析、モデルマウスの作製、治療薬開発  
開発課題名 : (英語) The functional analysis of PRRT2 gene and creating a model mouse of PKD
- 研究開発分担者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 ゲノム創薬学研究室 教授 岩田 修永  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Genome-based Drug Discovery Graduate School of Biomedical  
Sciences Nagasaki University Professor Nobuhisa Iwata
- 研究開発分担者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 ゲノム創薬学研究室 准教授 城谷 圭朗  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Genome-based Drug Discovery Graduate School of Biomedical  
Sciences Nagasaki University Associate professor Keiro Shirogami
- 研究開発分担者 (日本語) 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 分子生理学 教授 蒔田直昌  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Molecular Physiology Nagasaki University Graduate School of  
Biomedical Sciences Professor Naomasa Makita

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### ・ 研究開発代表者による報告の場合

（和文）

研究代表者・黒滝直弘、及び研究分担者で岩田、城谷以外の研究者である長崎大学大学院・小澤寛樹、東京女子医科大学・斎藤加代子、長崎大学病院・白石裕一、長崎大学大学院・本田純久は、昨年度に収集した疫学アンケートの詳細な解析を進めるとともに、一次スクリーニングとして、長崎大学病院検査部の協力の元従来の遺伝解析でホットスポットとされている、PRRT2 遺伝子の c.649dupC のパイロシーケンスによる変異解析を行った。現時点（平成 29 年 4 月 24 日）PKD の患者 211 名の 1 次スクリーニングを終えたところである。性別では男性が 122 名であり女性を上回った。年代は 10 歳台からから 50 歳台まで分布していた。症例の中でトリオは 15 組を収集したが DNA の質と収量の問題で 7 組の解析に留めざるをえなかった（吉浦報告参照）。スクリーニングは継続中であり家族例、孤発例ともに c.649dupC がそれぞれ 40/122、20/76 と予想より低かったのは、昨年も報告したように、1) 診断基準があいまいであったために、他の疾患を収集してしまったこと、2) PKD 自体が実は単一ではなく、複数の疾患の集まりであること、すなわち遺伝的異種性があること、などの可能性が示唆される。一方で遺伝子型と患者の合併症に注目したデータベースをレジストリ構築の一助となるように整理している。長崎大学大学院・吉浦孝一郎は PRRT2 のホットスポット、c.649dupC のないトリオの検体（7 トリオ、計 21 検体）に対して、エキソーム解析を行った。ライブラリ調整は SureSelect Human All Exon V5 (Agilent Technologies, CA, USA) を用いた。シーケンスには HiSeq2500 (Illumina, CA, USA) を用いた。

得られたデータを、GENCODE basic version 19 を用いて、新規の変異を抽出した。その再起に下記 1) ~3) のフィルタリングを行った。

1) 患者特異的 de novo mutation が 2 名以上の患者で見られる遺伝子、2) homo/compound hetero mutation が 2 名以上の患者で見られる遺伝子、3) 既存の神経疾患の報告がある遺伝子である。

その結果、1) の条件を満たす遺伝子は 12 遺伝子、2) の条件を満たす遺伝子は 41 遺伝子、3) の条件を満たす遺伝子は 8 遺伝子であった。

しかしサンガー法で再確認を行ったところ、いずれも「変異なし」との結果であった。今後はエキソーム解析のデータをもとに、XHMM 解析を用いて患者特異的 de novo CNV を検索していく予定である。

長崎大学大学院・岩田修永、長崎大学大学院・城谷圭朗は長崎大学大学院・蒔田の助言を得て同教室大学院・八田大典とともにマウス初代神経培養細胞を用いて神経興奮時の PRRT2 タンパク質の代謝を解析し、PRRT2 がカルシウム依存性プロテアーゼ・カルパインによって 15 kDa フラグメントへ切断されることを明らかにした。この 15 kDa フラグメントは PRRT2 の C 末端部分に相当し、PRRT2 の PKD 変異によって欠失する領域と一致する。従って、PRRT2 は神経興奮依存的なプロセッシングを受けて神経伝達物質の放出等に関連し、PRRT2 変異を持つ PKD 患者ではこの機能に異常が生じている可能性がある。一方、CRISPR/Cas9 法により PKD 患者に高頻度で見つかった変異と同等の変異を導入した遺伝子改変マウスを 6 系統樹立し、そのうち 4 系統で PRRT2 の発現レベルが極端に低下していることを確認した。このマウスの作製は世界初であり、現在 F6 まで繁殖されている。PKD のモデルマウスとしての妥当性の評価を進めている。

(英文)

The head of the research, Naohiro Kurotaki is working with his collaborators about clinical features of Paroxysmal Kinesigenic Dyskinesia(PKD). Also, we collect clinical data and possible extracted DNA of a total of 211 patients and their families. Hotspot analysis, c.649dupC of PRRT2 genes was performed. The number of c.649dupC of PRRT 2 genes are 40/122 in male, 20/76 in female respectively. The results show PKD patients has less c.649dupC of PRRT 2 mutation as expected. We hypothesize that the diagnostic criteria is phage and that PKD has possible genetic heterogeneity. We are constructing patients' database based on both clinical and genetic aspects.

Among of PKD samples without PRRT2 mutation, Ko-ichiro Yoshiura analyzed 7 trio pair samples utilizing next sequencing technology, HiSeq 2500 of Illumina. We are now checking the raw data by GENCODE basic version 19 in order to detect PKD specific mutation of all exons. Until now, unfortunately, we did not find any significant gene alterations.

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 精神神経科 准教授 黒滝直弘

総括研究報告を参照。

研究開発分担者：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 ゲノム創薬学研究室 教授 岩田修永

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 ゲノム創薬学研究室 准教授 城谷圭朗

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 分子生理学 教授 蒔田直昌

(和文)

マウス初代神経培養細胞を用いて神経興奮時の PRRT2 タンパク質の代謝を解析し、PRRT2 がカルシウム依存性プロテアーゼ・カルパインによって 15 kDa フラグメントへ切断されることを明らかにした。この 15 kDa フラグメントは PRRT2 の C 末端部分に相当し、PRRT2 の PKD 変異によって欠失する領域と一致する。従って、PRRT2 は神経興奮依存的なプロセッシングを受けて神経伝達物質の放出等に関連し、PRRT2 変異を持つ PKD 患者ではこの機能に異常が生じている可能性がある。一方、CRISPR/Cas9 法により PKD 患者に高頻度で見つかっている変異と同等の変異を導入した遺伝子改変マウスを 6 系統樹立し、そのうち 4 系統で PRRT2 の発現レベルが極端に低下していることを確認した。このマウスの作製は世界初であり、現在 F6 まで繁殖されている。PKD のモデルマウスとしての妥当性の評価を進めている。

(英文)

We analyzed the metabolism of PRRT2 protein, a causal gene of PKD, in mouse primary cortical neurons, and found that PRRT2 is processed into a 15 kDa fragment by a calcium-dependent protease calpain during neuronal excitation. We also found the 15 kDa fragment corresponds to the C-terminal portion of PRRT2, which is often deleted in PKD patients. This suggests that PRRT2 might be involved in neurotransmitter release by the excitation-dependent processing and that this function might be affected in PKD patients with the PRRT2 mutations. On the other hand, we have successfully established 6 lines of Prrt2 knock-in mice with the mutations found most often in PKD patients by CRISPR/Cas9 system. In the 4 lines we confirmed that levels of PRRT2 protein in the brains are reduced below the detection limit, supporting that the loss of function of PRRT2 causes PKD. To our knowledge, the development and analysis of Prrt2 knock-in mice is the first report. We have backcrossed

the mice to C57BL/6 strain by 6 generations to reduce off-target effects of CRISPR/Cas9 system, and are evaluating the validity of the mice as PKD models.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 3件)

1. Tamura S, Higuchi K, Tamaki M, Inoue C, Awazawa R, Mitsuki N, Nakazawa Y, Mishima H, Takahashi K, Kondo O, Imai K, Morio T, Ohara O, Ogi T, Furukawa F, Inoue M, Yoshiura KI, Kanazawa N. Novel compound heterozygous DNA ligase IV mutations in an adolescent with a slowly-progressing radiosensitive-severe combined immunodeficiency. Clin Immunol. 2015 Jul 11;160(2):255-260. doi:10.1016/j.clim.2015.07.004.
2. Gohda Y, Oka S, Matsunaga T, Watanabe S, Yoshiura K, Kondoh T, Matsumoto T. Neonatal case of novel KMT2D mutation in Kabuki syndrome with severe hypoglycemia. Pediatr Int. 2015 Aug;57(4):726-8. doi: 10.1111/ped.12574.
3. Ohtsuka Y, Higashimoto K, Sasaki K, Jozaki K, Yoshinaga H, Okamoto N, Takama Y, Kubota A, Nakayama M, Yatsuki H, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Yoshiura KI, Soejima H. Autosomal recessive cystinuria caused by genome-wide paternal uniparental isodisomy in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. Clin Genet. 2015 Sep;88(3):261-6. doi: 10.1111/cge.12496.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. The epidemiological and molecular analysis of Paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD) in Japan, ポスター, N.Kurotaki, Y.Morimoto, Y. Kusumoto, K.Shiraishi, N.Iwata, H.Ozawa, K.Yoshiura, ASHG2016, Vancouver convention center (Vancouver Canada) Oct 18th, 2016. 国外
2. 発作性運動誘発性アテトーゼ (PKD) の合併症と PRRT2 変異解との関連解析, ポスター, 黒滝直弘ら, 第 58 回日本小児神経学会学術集会, 京王プラザホテル新宿 (東京都新宿区) 2016/6/3, 国内
3. 日本における発作性運動誘発性アテトーゼ (PKD) における PRRT2 遺伝子の変異解析, ポスター, 黒滝直弘ら, 第 57 回日本神経学会学術大会, 神戸コンベンションセンター・神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市) 2016/5/20, 国内
4. 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ原因遺伝子 PRRT2 の興奮性アミノ酸刺激による切断機序の解析, 口頭, 八田大典, 梶山啓助, 黒滝直弘, 小澤寛樹, 浅井 将, 城谷圭朗, 岩田修永, 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (熊本市) 2015/11/15
5. The epidemiological and molecular analysis of Paroxysmal kinesigenic dyskinesia in Japan, ポスター, H Tange, M Ohishi, N Kurotaki, Y Morimoto, S Ono, Y Kusumoto, S Yamada, K Shirotani N Iwata, K Yoshiura, N Mori, H Ozawa. Neuroscience 2015, Chicago(USA) 2015/10/20
6. 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ原因遺伝子 PRRT2 の細胞内プロセッシングおよび代謝メカニズムの解析, 口頭, 八田大典, 梶山啓助, 浅井 将, 黒滝直弘, 小澤寛樹, 城谷圭朗, 岩田修永, 日本神経精神薬理学会 (東京都) 2015/9/25

7. 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ原因遺伝子 *PRRT2* の発現解析, ポスター, 岩田修永, 八田大典, 梶山啓助, 浅井将, 黒滝直弘, 小澤寛樹, 城谷圭朗, 日本神経精神薬理学会 (東京都) 2015/9/24
8. 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ原因遺伝子 *PRRT2* の細胞内プロセッシングの解析, 口頭, 八田大典, 黒滝直弘, 小澤寛樹, 浅井将, 城谷圭朗, 岩田修永, 日本生化学会九州支部例会 (佐賀市) 2015/5/16

(4) 特許出願