

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) 遺伝学的アプローチによるジストニアの革新的治療法開発  
(英語) Forward genetics-based discovery of novel dystonia treatment
- 研究開発担当者 (日本語) 徳島大学・大学院医歯薬学研究部・医科学部門内科系・臨床神経科学分野・  
助教 宮本亮介
- 所属 役職 氏名： (英語) Department of Clinical Neuroscience, Institute of Biomedical Sciences,  
Tokushima University Graduate School. Assistant Professor. Ryosuke  
Miyamoto.
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 遺伝子 X 機能解析・治療薬開発  
開発課題名： (英語) Functional analysis of X gene
- 研究開発分担者 (日本語) 徳島大学・大学院医歯薬学研究部・医科学部門内科系・臨床神経科学分野・  
講師 瓦井 俊孝
- 所属 役職 氏名： (英語) Department of Clinical Neuroscience, Institute of Biomedical Sciences,  
Tokushima University Graduate School. Assistant Professor. Lecturer.  
Toshitaka Kawai.
- 分担研究 (日本語) 遺伝子 Y 解析・治療薬開発  
開発課題名： (英語) Functional analysis of Y gene
- 研究開発分担者 (日本語) 徳島大学大学院・医歯薬学研究部・難治性神経疾患病態研究分野・  
特任教授 後藤 恵
- 所属 役職 氏名： (英語) Department of Neurodegenerative Disorders Research, Institute of  
Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School.  
Professor. Satoshi Goto.

分担研究 (日本語) ジストニア遺伝子研究基盤構築  
開発課題名: (英語) Establishment of a genetic research platform of dystonia  
研究開発分担者 (日本語) 徳島大学大学院・医歯薬学研究部・医科学部門内科系・臨床神経科学分野・  
教授 梶 龍児  
所属 役職 氏名: (英語) Department of Clinical Neuroscience, Institute of Biomedical Sciences,  
Tokushima University Graduate School. Professor. Ryuji Kaji.

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

(日本語)

当研究は、(1)網羅的エクソーム解析、(2)新規に同定した遺伝子の機能解析、(3)DNA サンプル収集とデータベース構築、の相互に関連する3つの構成要素から成る。(1)として、我々は54の家族性ジストニア症例においてエクソーム解析を行った。解析した症例のうち、2例は若年発症の全身性ジストニアで、ミオクロヌスと小頭症を追加の特徴として有していた。症状が非常に重篤であることと家族歴がないことを考慮に入れて、最終的に、両親も合わせてエクソーム解析を行ったところ、この2例において、*KMT2B* 遺伝子上に、それぞれ異なった *de novo* の変異を同定した。また、我々は線条体特異的 *KMT2B* ノックアウトマウスを作成しており、RNA-seq や免疫組織化学染色による機能解析を進める準備が整った。この他のエクソームデータについては、既に dbSNP、1000 ゲノム、Exome Variant Server のデータを基にアノテーションを付加しているが、現時点で候補遺伝子が1つ得られている。この候補遺伝子について、我々のジストニア DNA パネルを用いてスクリーニングを行った。(2)我々は、ジストニアの新たな候補遺伝子として、X と Y という2種類の遺伝子を同定した。遺伝子 X は3世代にわたり一次性ジストニアを生じる家系において同定された。発端者において剖検脳が得られており、高感度の免疫組織化学染色により、線条体のニューロンのうち、ドパミン D1 レセプターを持つストリオソーム細胞 (ストリオソーマル D1 細胞) が選択的に被殻で減少しているが、一方で尾状核では減少していないことを見出した。この所見は、被殻でのストリオソーマル D1 細胞の脱落が、この患者におけるジストニア発症において鍵となる病理であることを示唆している。また、これらの病理所見は、過大な酸化ストレスをリリースするという、これまでに知られている X の機能とも矛盾しないため、同様の病理機構を持つジストニア患者において、抗酸化剤による治療が有望であるかもしれない。我々は、テネシー大学とチャンガン記念病院との共同研究として、1000 検体以上のジストニア DNA サンプルにおいて遺伝子 X の変異をスクリーニングしたが、まだ新たな変異は同定できていない。遺伝子 Y は、若年発症の全身性ジストニアを呈する兄弟例において、劣性モデルの解析によって同定された。免疫組織化学染色により、Y は線条体において、主にコリン作動性ニューロンに発現していることを見出した。また、Y は Z レセプターと共局在していた。コリン作動性ニューロンはジストニアの発生において重要な役割を果たすことが知られているが、我々の所見は、コリン作動性ニューロンの障害が、Z の異常調節を基にして生じる可能性を示唆している。(3)我々は、2013年に、「Japan Dystonia Consortium」を立ち上げて、DNA サンプル蓄積を進めているが、本年度に150サンプルを新しく蓄積し、総 DNA サンプル数は840となった。また、Web-based のジストニアデータベースを来年度から稼働させるための、基盤整備を行った。

(English)

Our research consists of three mutually interacting elements: (1) comprehensive exome analysis, (2) functional analysis of newly identified genes, and (3) DNA sample collection and database building. (1) As for comprehensive exome analysis of dystonia, we performed exome sequencing for 54 familial dystonia cases. Of these analyzed cases, two patients showed early-onset generalized dystonia with myoclonus and microcephaly as additional clinical features. Provided that they had very severe phenotype and no family history, we subsequently performed exome sequencing in the patients and their parents, which identified different de novo *KMT2B* mutations in the patients. We have generated striatum-specific *KMT2B* knockout mice and now they are available for future research including RNA-seq experiment and immunohistochemical analysis. The rest of the exome data has been annotated using dbSNP, 1000 genomes, and Exome Variant Server, in which we have found a strong candidate gene and have been screening for a different mutation in our dystonia DNA panel. (2) We have identified two separate genes, X and Y, as novel candidate genes for dystonia. Gene X was identified in a three-generation family in which multiple members were affected with idiopathic isolated dystonia. We obtained autopsied brain of the index patient, and a highly-sensitive immunohistochemistry disclosed that among the striatal neurons, striosomal cells bearing dopamine D1 receptors (D1-cells) were selectively depleted in the putamen, but not in the caudate nucleus. These findings suggest that putaminal loss of striosomal D1-cells could be a key pathology that underlies the genesis of dystonia in this patient. Also, these pathological findings are consistent with the X's known function of releasing excessive oxidative stress, which suggests antioxidant therapy could be beneficial for dystonia patients sharing the same pathomechanisms. We have screened for a different mutation in X among over 1000 dystonia samples as a collaborative project with The University of Tennessee and Chang Gung Memorial Hospital; however, a different mutation has not been identified so far. Gene Y was identified in two siblings with early-onset idiopathic isolated dystonia from consanguineous parents. Via immunohistochemistry, Y was found to be predominantly expressed in the striatal cholinergic interneurons, which has known to play a crucial role to develop dystonia. Moreover, Y was colocalized with the receptor Z, one of the pivotal neurotransmitters in the striatum. Our findings further support that the dysfunction of striatal cholinergic neurons causes dystonia and suggest that the dysregulation of Z may be a more basic pathophysiology for the disease. (3) We launched "Japan Dystonia Consortium" in 2013 and have collected dystonia DNA samples from many medical institutions all over Japan. In this fiscal year, we collected 150 dystonia samples in addition to 690 previous collected samples. Also, we are building a web-based dystonia database and it will be running from the next fiscal year.

### 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0件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし

(4) 特許出願