



Two novel cases of biallelic SMPD4 variants with brain structural abnormalities

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2025-05-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 青木, 伸太郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/0002000412

博士（光医工学）青木 伸太郎

論文題目

Two novel cases of biallelic *SMPD4* variants with brain structural abnormalities
(両アレル性 *SMPD4* 変異を有する脳形成異常症 2 症例)

論文の内容の要旨

[はじめに]

脳形成異常は胎児期の正常な脳形成過程が何らかの原因によって障害され、形態的な異常をきたした疾患である。脳形成のどの時期に障害が発生したかにより、神経管閉鎖障害、脳胞形成障害、神経細胞移動障害、神経増殖・分化障害、髄鞘化障害に分類される。また、その病態には遺伝的要因が大きく関与しており、近年の遺伝学的研究によって細胞の増殖とアポトーシス、神経細胞の移動、移動後の発達といった脳の発達における主要な段階に関わる多くの遺伝子の異常が脳形成異常症の原因となることが報告されている。本研究では、脳形成異常症例のうち原因遺伝子変異が未同定であった症例について網羅的遺伝子解析を施行し、2 症例において *SMPD4* (Sphingomyelin phosphodiesterase 4) 遺伝子の新規バリエントを同定した。また、1 症例で同定された新規のスプライスサイトバリエントについては、ミニジーン機構を用いて変異アレルから発現される転写産物の変化をより詳細に検証した。

[患者ならびに方法]

本研究は昭和大学倫理委員会の承認(承認番号 G219-N, G220-N)および浜松医科大学臨床研究倫理委員会の承認(承認番号 15-282, 17-163, 20-207)を得て施行された。

書面によるインフォームドコンセントを取得後、患者およびその両親の末梢血からゲノム DNA を抽出後、エクソーム解析を実施した。スプライスサイトバリエントに起因する RNA スプライシングの変化を検証するために、家族 2 および健常対照者の末梢全血から total RNA を抽出し Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を施行後、増幅産物を TA クローニング法にてプラスミドベクターに挿入し、コロニー PCR にて目的のサイズに一致する増幅断片を Sanger 法にてシークエンスを行った。ミニジーン解析においては、制限酵素配列を付加したプライマーを用いて患者 2 のゲノム DNA から *SMPD4* のエクソン 12 から 15 におよぶ 2187bp の DNA 断片を増幅し、制限酵素切断後に EGFP-N2 ベクターにクローニングした。コロニー PCR にて野生型および変異型プラスミドベクターを選別した。HEK293T 細胞に野生型または変異型プラスミドをトランスフェクションし、48 時間のインキュベーション後に細胞から total RNA を抽出し RT-PCR を施行した。

[結果]

2 例において *SMPD4* (NM_017951.5) 遺伝子の両アレル性バリエントを同定した。患者 1 はホモ接合性バリエント(c.740_741del, p.(Val247Glufs*21))を有し、先天性の奇形を伴わず、重度の知的障害、肝腫大、単純脳回、薄い脳梁を呈した。患者 2 は複

合ヘテロ接合性バリエント(c.2124_2125del, p.(Phe709*))および c.1188+2dup)を有し、発育遅延、筋緊張低下、呼吸窮迫、関節拘縮、インスリン依存型糖尿病、感音難聴、顔面異形、脳萎縮、髄鞘形成不全、小脳低形成など多様な症状を呈した。

c.1188+2dup バリエントは RNA スプライシングの異常をきたすことが予想されたことから、末梢血全血由来の RNA を用いた RT-PCR を施行した。その結果、本バリエントによって *SMPD4* 遺伝子のエクソン 13 のスキップをきたし、367 番目以降のアミノ酸置換と 6 残基下流の早期終止コドン(p.Ala367Ser*6)を生じることが明らかになった。

ミニジーンシステムを用いた *in vitro* 転写解析では、変異型コンストラクトから野生型および変異型の 2 つの転写産物が生成されており、これらの塩基配列は正規の転写産物とエクソン 13 のスキップを生じた転写産物と一致していた。電気泳動の結果において、変異型転写産物は野生型に比べて優位に発現していることが示唆された。以上の結果から、変異型 mRNA は変異アレルから優位に発現しているが、ナンセンス依存性 mRNA 分解機構(NMD)によって分解されている可能性が示唆された。

[考察]

SMPD4 は膜スフィンゴミエリンの加水分解を触媒してホスホリルコリンとセラミドを形成する Mg^{2+} 依存性中性スフィンゴミエリナーゼをコードする。近年の研究では、両アレル性 *SMPD4* バリエントが、小頭症、関節拘縮、および脳構造異常を伴う神経発達障害(MIM #618622) の原因となることが報告されている。既報では約 30%の症例が呼吸障害によって1歳未満で死亡しているが、ホモ接合性ミスセンスバリエント、あるいは複合ヘテロ接合性ミスセンスおよびスプライス領域変異を持つ患者は、より長く生存する傾向があり、比較的軽度の表現型を示した。本研究の 2 症例はいずれも短縮型バリエント有しており重度の神経学的表現型を呈したがいずれも学齢期まで生存しており、*SMPD4* 関連症候群の遺伝子型に基づく予後予測は容易ではないことを示唆している。また、本疾患は顔面異形、先天性関節拘縮、子宮内発育遅延、持続性呼吸窮迫、インスリン依存型糖尿病など特徴的な所見を呈する。今回の 2 症例のうち患者 2 は多くの上記臨床的特徴との一致がみられた。インスリン依存型糖尿病は、乳児期を過ぎて生存した患者における特徴的所見であり、本症例も 6 歳でインスリン依存型糖尿病を発症した。一方、患者 1 にはこれらの特徴的所見が認められなかった。

本研究ではスプライスサイトバリエントに起因する mRNA の変化について、患者由来の RNA 解析とミニジーンシステム由来の RNA 解析の両者を行い検証した。両者における変異型 RNA の発現パターンを比較することで、本症例における変異型 RNA の発現低下が NMD によるものであり、片アレル性発現となっている可能性を明らかにした。ミニジーンシステムは mRNA 解析のための試料が得られない場合や、遺伝子発現の組織特異性が高く容易に入手できない組織(神経細胞など)に特異的に発現している場合などにおいて、RNA 配列変化の検証に有用なシステムである。

[結論]

本研究では、先天性小頭症、異常な脳回、脳梁低形成、てんかん、重度の全般性

発達遅滞を呈する2人の日本人患者において、3つの新規の機能喪失型 *SMPD4* バリエントを同定した。本研究は *SMPD4* 関連疾患の表現型の多様性の拡大に貢献するものであるが、遺伝型に基づく予後予測は非常に困難であることから、遺伝型と表現型との相関関係を解明するにはさらなる症例の集積が必要である。