

ゲノム解析を基盤とした神経疾患の病因・病態機序の解明

●辻 省次¹⁾ ◆後藤 順¹⁾ ◆高橋 祐二¹⁾ ◆百瀬 義雄¹⁾ ◆村山 繁雄²⁾ ◆小野寺 理³⁾

1) 東京大学医学部 2) 東京都老人総合研究所 3) 新潟大学脳研究所

<研究の目的と進め方>

本研究の目的は、大規模ゲノム解析に基づき、遺伝性神経疾患の病因遺伝子の同定と孤発性神経変性疾患の病態機序の解明を進め、疾患の予防や治療に向けて結び付けていくことである。

単一遺伝子疾患—多遺伝子疾患の幅広いスペクトルを考慮し、多発家系、同胞発症例など連鎖解析のアプローチを取り入れ、孤発例を対象とした大規模関連解析とともに総合的に進めていく。また、分子病態機序を解明する立場から、正常脳、疾患脳、さらに疾患によっては、末梢血、末梢神経、筋肉などの組織を含め包括的な遺伝子発現プロファイリングに基づき解析を行なっていく。

診療への応用については DNA microarray を基盤とした resequencing microarray 及びオリゴ array CGH (aCGH) を用いたハイスループット遺伝子解析システムを開発し臨床に応用し、ゲノム解析を行なっていく。

研究を進める上で基礎となる臨床情報、ゲノムリソースについてはコンソーシアム体制を基盤とし収集していく。

遺伝性神経変性疾患の治療法開発を目指し、DRPLA モデルマウスの病態解析、治療実験と DRPLA 蛋白の分子細胞生物学的解析を進める。

<2007 年度の研究の当初計画>

I. 孤発性疾患、common diseaseのゲノム解析

多系統萎縮症について、国内 15 施設との多施設共同研究体制 (Japan MSA research Consortium; JAMSAC) により、臨床情報・ゲノムリソースの収集及び関連解析を進める。

片頭痛について、多施設共同体制によるリソース収集体制の確立と解析を開始する。

II. ハイスループット連鎖解析実行用パイプラインシステムの構築と、多発家系の連鎖解析・原因遺伝子探索

本研究で開発したマイクロアレイの大量 SNP データを直接インポートし、連鎖解析を実行できるパイプラインシステムの改良と、家族性 MSA、家族性 ALS、紀伊 ALS/PDC 等、これまでに収集している家系の連鎖解析及び原因遺伝子同定を進める。

III. ハイスループット遺伝子解析システムの構築と応用

遺伝子診断の高い需要に対応し、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、家族性痙性対麻痺などを対象として resequencing microarray 及びオリゴ aCGH を用いたハイスループット遺伝子解析システムを開発し、臨床に応用する。同時に疾患関連遺伝子探索を目的とした解析を行なう。

オリゴ aCGH を用いて、AR-JP の PARK2 遺伝子の欠失・重複を塩基配列レベルで決定し、変異機序の解明につなげる。

IV. DRPLAモデルマウス及びDRPLA蛋白の解析

疾患の病態機序の解明、疾患パスイエイの解明を目的に、ポリグルタミン病のモデル動物 (全長のゲノム遺伝子を単一コピーで導入し、CAG repeat 長が異なる DRPLA トランスジェニックマウ

ス) を用いて、網羅的な遺伝子発現プロファイリングを行ない、時間依存性に CAG repeat 長依存性に発現が変化する遺伝子を見出し、疾患の病態機序解明を目指す。

DRPLA 蛋白の機能について分子細胞生物学的解析を進める。

<2007 年度の成果>

I. 孤発性疾患、common diseaseのゲノム解析

多系統萎縮症 (MSA) について、現在までに、患者検体を 159 例、コントロール検体を 76 例収集した (2007 年 10 月末)。過去検体と合わせて、MSA 検体 230 例、コントロール検体 294 例を用いて Affymetrix 社の GeneChip Human Mapping 500K array による全ゲノムスキャンを終了した。アレイにおける平均 8.5kb ごとにある約 50 万個の SNP 座位ごとの call rate が MSA 群、正常対照者群共に 95% 以上得られた。MAF(minor allele frequency) \geq 5%、正常対照者群にて Hardy-Weinberg 平衡を満たす SNP ($p > 0.01$) について関連解析を施行し、 χ^2 検定で、有意差の認められる SNP 数は、総数 230,360 中、 $p < 0.05$ が 12,999、 $p < 0.01$ が 2,932、 $p < 0.00001$ が 102、 $p < 0.0000001$ が 83 であった。

片頭痛について、多施設共同体制によるリソース収集体制の確立と解析を開始した。

II. ハイスループット連鎖解析実行用パイプラインシステムの構築と、多発家系の連鎖解析・原因遺伝子探索

ハイスループット連鎖解析を実現すべく、100K、500K などの microarray で得られた SNP データを直接インポートし、parametric および model-free 連鎖解析プログラム (mlink 及び allegro) を実行可能なパイプラインシステムを構築し、改良を進めている。

LGMD、VWMD 家系の遺伝子同定に有用であった。

家族性 MSA、家族性 ALS、紀伊 ALS/PDC、色素網膜変性症を伴う後索性運動失調症、OPDM などの連鎖解析、病因遺伝子の探索を進めている。色素網膜変性症を伴う後索性運動失調症については、興味ある候補遺伝子が絞られ、さらなる検討を進めている。

III. ハイスループット遺伝子解析システムの構築と応用

マイクロアレイ・ハイスループット遺伝子解析システムによって、家族性パーキンソン病 150 例、筋萎縮性側索硬化症 60 例、副腎白質ジストロフィー 30 例、遺伝性痙性対麻痺 100 例の網羅的解析を行った。家族例における遺伝子診断に加え、孤発例においても、原因遺伝子の変異が同定される例が存在し、孤発例の分子病態解明においても、有用である。さらに、網羅的遺伝子解析により新規塩基置換が予想以上に多く認められる。孤発例の筋萎縮性側索硬化症 50 例における 12 遺伝子の解析において、33 種類の塩基置換が認められたが、そのうち 11 種類 (33%) は新規の塩基置換であった。網羅的リサーチエンシングにより、疾患に関連する新たな塩基置換を同定する可能性があると考えられる。

AR-JP 193 例について PARK2 遺伝子の欠失または重複範囲を、オリゴ aCGH と direct sequencing にて決定した。欠失の break

points を計 148、重複の break points を計 14 決定した。Break points は、Ch6: 1,624,800,000-1,628,800,000 の範囲に集中し、common fragile site 6E に重なっていた。

オリゴ aCGH を用いて SCA15 家系の欠失変異の範囲を塩基配列レベルで同定した。

IV. DRPLAモデルマウス及びDRPLA蛋白の解析

DRPLA トランスジェニックマウスについて、CAG リピート長に依存して表現型が重症化する。Q76, Q113, Q129 を用いて、詳細な発現プロファイリングを行い、CAG リピート長および時間依存性に発現が変動する遺伝子群を同定した。さらに、Affymetrix および Agilent の array を用いて、cross-platform 解析を行ったところ、Q129 について、両者において発現プロファイルが一致する correlation coefficient が、0.83 (4 週齢), 0.79 (8 週齢), 0.79 (12 週齢) と高い相関を示し、cross-platform 解析により信頼性の高い発現プロファイル解析が可能であることを示された。さらに、4 例のヒト DRPLA 死後脳発現プロファイリングを行い、cross-species 解析を行ったところ、ヒトと Q129 で共に低下した遺伝子として、大脳で 136、小脳で 128、共通のものとして 27 の遺伝子を同定した。

DRPLA 蛋白の核移行に関連する分子機構について、核移行シグナル等の知見を得た。

<国内外での成果の位置づけ>

I. 孤発性疾患、common disease のゲノム解析

多系統萎縮症(MSA)については、国際的にみてリソースの規模として大きく、関連解析において重要な位置を占めると推察される。また、多発家系についての連鎖解析を進めており、独創的である。

II. ハイスループット連鎖解析実行用パイプラインシステムの構築と、多発家系の連鎖解析・原因遺伝子探索

我々が開発したハイスループット連鎖解析のためのパイプラインシステムでは、データを直接インポートでき、既存の連鎖解析ソフトウェア (mlink 及び allegro) に含まれる機能が実装されているだけでなく、SNP データの選択を柔軟に行うことができる機能が付加されている。海外の同様のものでは、我々のシステムと同等の機能を装備しているものはない。

III. ハイスループット遺伝子解析システムの構築と応用

網羅的な遺伝子診断システムは、これまでになく、構築したハイスループット遺伝子解析システムは、有用性も高い。

また、rare variant と疾患との関係を意識した解析が行え、今後の疾患についてのゲノム解析の端緒となるもので、独創的である。

100 例以上の多数例について、塩基配列レベルで欠失・重複の構造を解析して研究はこれまでなく、AR-JP についての我々の解析は、欠失・重複発生機序を解明する上で重要である。

IV. DRPLAモデルマウス及びDRPLA蛋白の解析

DRPLA モデルマウスは、全長のヒト DRPLA 遺伝子を単一コピーで挿入したマウスで、これまでに同一挿入部位であって、異なる CAG リピート長のマウス (Q76, Q96, Q113, Q129) が得られており、CAG リピート長のみ異なる複数の系統を、病態解析や治療実験に用いることができ、すぐれている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

家族性 MSA、紀伊 ALS/PDC は complex trait と考えられ、ノンパラメトリック (model-free) 連鎖解析を進めているが、結論を得るためには、さらに多数の家系の集積が必要と考えられ、追加

の検体を含めた解析を進めている。

<今後の課題>

1. 多系統萎縮症 (MSA) については、少なくともこれまでと同規模のリソースの収集を行い、レプリケーションスタディーを行うこと、また海外との連携を検討することが課題である。
2. 組織の包括的な遺伝子発現プロファイリングに基づき解析を行ない、ゲノム情報その他と総合した病態を解明。
3. ハイスループット連鎖解析のためのパイプラインシステムについて、様々な SNP 解析プラットフォームからのデータインポートを可能にすること、現在使用可能な連鎖解析ソフトウェア (mlink 及び allegro) 以外にも対応できるようにすること、近接する SNP データにおける連鎖不平衡を考慮したマーカー選択を行う機能を実装することを実現し、公開する。
4. これまでの、common disease-common variant 仮説に加えて、common disease-multiple rare variant 仮説に基づく網羅的リサーチの研究手法を組みこんでいく必要がある。
5. データベース等の公開。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. Takahashi T, Tada M, Igarashi S, Koyama A, Date H, Yokoseki A, Shiga A, Yoshida Y, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O. Aprataxin, causative gene product for EAOH/AOA1, repairs DNA single-strand breaks with 3 f-phosphate and 3 f-phosphoglycolate ends. *Nucleic Acids Res.* 2007;5(11):3797-809.(17519253)
2. Shimohata T, Hara K, Sanpei K, Nunomura J, Maeda T, Kawachi I, Kanazawa M, Kasuga K, Miyashita A, Kuwano R, Hirota K, Tsuji S, Onodera O, Nishizawa M, Honma Y. Novel locus for benign hereditary chorea with adult-onset maps to chromosome 8q21.3-q23.3 *Brain* 2007;130(9):2302-9 (17405764)
3. Hara K, Momose Y, Tokiguchi S, Shimohata M, Terajima K, Onodera O, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Hirasawa M, Mizuno Y, Ogata K, Goto J, Kanazawa K, Nishizawa M, and Tsuji S. Multiplex families with multiple system atrophy *Arch. Neurol* 2007;64(4): 545-51 (0705161056)
4. Martins, S, Calafell, F, Gaspar, C, Wong, VCN, Silveira, I, Nicholson, GA, Brunt, ER, Tranebjaerg, L, Stevanin, G, Hsieh, M, Soong, B, Loureiro, L, Duerr, A, Tsuji, S, Watanabe, M, Jardim, LB, Giunti, P, Riess, O, Ranum, LPW, Brice, A, Rouleau, GA, Coutinho, P, Amorim, A, Sequeiros, J. Asian Origin for the Worldwide-Spread Mutational Event in Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol.* 2007; 64(10):1502-8
4. Arai, N, Kishino, A, Takahashi, Y, Morita, D, Nakamura, K, Yokoyama, T, Watanabe, T, Ida, M., Goto, J, Tsuji, S. Familial cases presenting very early onset autosomal dominant Alzheimer's disease with I143T in presenilin-1 gene: Implication for genotype-phenotype correlation. *Neurogenetics* (in press) *Neurogenetics.* (in press)
5. Hara, K, Shiga, A, Nozaki, H, Mitsui, J, Takahashi, Y, Ishiguro, H, Yomono, H, Kurisaki, H, Goto, J, Ikeuchi, T, Tsuji, S, Nishizawa, M, Onodera, O. Total deletion and a missense mutation of ITPR1 in Japanese SCA15 families. *Neurology* (in press)