

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⁾ ◆村山 繁雄²⁾ ◆小野寺 理³⁾ ◇後藤 順¹⁾ ◇高橋 祐二¹⁾

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。

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。

<2008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 (MSA) について国内 18 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

本研究で開発したハイスループット連鎖解析システムの改良と、家族性 MSA、家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 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 (PD)、ALS、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。同時に次世代シーケンサーを用いた候補領域あるいは exon capture によるゲノムワイドな resequencing を通じて家族性疾患の原因遺伝子および孤発性疾患の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、DMD/BMD の DMD 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、疾患パスウェイの解明を目的に、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、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。

V. 疾患関連リシークエンスデータベースの開発

これまでに蓄積された疾患関連遺伝子のリシークエンシング

データを、臨床情報を盛り込みつつデータベース化し、今後の遺伝子診断や個別化医療に役立てる。

<2008年度の成果>

I. 孤発性疾患、common disease のゲノム解析

MSA について現在までに患者検体を 197 例、コントロール検体を 94 例収集した (2008 年 12 月末)。過去検体と合わせて、MSA 検体 209 例、コントロール検体 220 例を用いて Illumina HumanHap 550K Genotyping BeadChip[®] による全ゲノムスキャンを終了した。タイピングされた約 56 万個の SNP にて Locus ごとの call rate が MSA 群、正常対照者群共に 98% 以上得られ、正常対照者群にて Hardy-Weinberg 平衡を満たす SNP ($p > 1E-6$) に基づいて選別された 544,148 個の SNP のうち、 χ^2 検定の p 値における有意差の認められる SNP 数は $p < 0.05$: 24,024, $p < 0.01$: 4,748, $p < 0.001$: 482, $p < 0.0001$: 47 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

100K、500K の SNP チップデータに加え、約 1M のデータを搭載した SNP6.0 チップも新たにサポートされ、解析が可能となった。また連鎖不平衡にあるマーカーを除去するため、D' や r^2 といったパラメータを直接設定する機能を追加した。また現在公開の準備を進めている。多発家系について、新たに ALS、封入体筋炎等の家系が追加され、連鎖解析による候補領域の同定、遺伝子のリシークエンシングを進めている。

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 PD 150 例、ALS 160 例、副腎白質ジストロフィー 30 例、遺伝性痙性対麻痺 220 例、ミトコンドリア遺伝子 19 例の網羅的解析を行った。

遺伝性痙性対麻痺では、マイクロアレイを用いた resequencing と aCGH、サンガー法を効率よく用いた遺伝子解析システムを構築し、計 13 遺伝子について網羅的な解析システムを構築した。結果、常染色体優性遺伝を呈する症例のうち 64% で遺伝子変異を同定し、全体で約 1/3 で遺伝子診断が可能となった。孤発例においても、約 5-10% で遺伝子変異を同定し、孤発例の少なくとも一部は単一遺伝子疾患症例であることを確認した。またマイクロアレイでのミトコンドリア全遺伝子解析により、稀なものや新規変異も含めて 4 例で病因変異を同定した。うち 3 例は孤発例であり、網羅的解析が有効であった。

上述の如く、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。孤発例の筋萎縮性側索硬化症 160 例における原因遺伝子 7 遺伝子の解析において、35 種類の塩基置換が認められたが、そのうち 20 種類 (57%) は新規の塩基置換であった。アミノ酸変化を伴い、データベース上報告がなく、コントロール 260 例において認めず、putative pathogenic mutation と考えられたのが 10 種類同定され

た。

孤発例の PD 534 例における GBA 遺伝子の解析において、50 例 (9.4%) に Gaucher 病病因変異を認め、正常対照者では 544 例中 2 例 (0.37%) しか認めず、オッズ比 28.0 倍ときわめて強い関連を得た。個々の変異は多様で極めて稀であるため、SNP typing array を利用した GWAS では検出が困難である。

AR-JP 193 例について *PARK2* 遺伝子、DMD/BMD 144 例について *DMD* 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。多数の欠失・重複を塩基レベルで同定し、断端が特定の領域に強く集中していることを発見し、common fragile site との関連が強く疑われるデータを得た。

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

18F-FDG PET を用いて DRPLA トランスジェニックマウス脳の糖代謝を経時的に検討した。Q129 の 4 週齢及び 12 週齢個体 6 匹を用いて平均画像を作成し正常対照と比較を行った。Q129 マウスは正常マウスに比し線条体、視床および視床下部、中脳、橋、小脳等で糖代謝の低下がみられた。その差は 4 週齢に比べ 12 週齢において著明であり、12 週齢の Q129 では小脳において約 11% の低下がみられた。

HEK293 細胞を用いて、DRPLA protein の核移行経路を解析した。DRPLA protein の核移行シグナルは、既報の配列を含めて 3 つのセグメントが核移行に必要であることを確認した。DRPLA protein と変異型 Ran(Q69L) を共発現すると DRPLA protein の核移行を阻害したことから、DRPLA protein は、古典的な核移行経路で核に移行していることが判明した。さらに免疫沈降法により、importin alpha3, alpha5 を介して核移行していることを確認した。DRPLA protein の核移行シグナルのペプチドを合成し、DRPLA protein 定常発現株にその合成ペプチドをマイクロインジェクションし、DRPLA protein の核移行を阻害した。

V. 疾患関連リシークエンスデータベースの開発

今年度は ALS について基本的なデータベースの枠組みが構築された。本研究で蓄積されたリシークエンスデータおよび既知の変異、SNP、文献情報などが網羅され、リストとして表示されるほか、変異データは exon/intron 構造やアミノ酸、mRNA 配列上にマップされ、多角的に閲覧可能となるようデザインされている。

<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・DMD/BMD 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。

V. 疾患関連リシークエンスデータベースの開発

神経疾患関連では最大規模のデータベースを目指しており、個別化医療の実現へ向けて、個々のリシークエンスの成果を網羅するという試みは革新的である。また統合データベース事業の一環となる、疾患データベースの一部を構成しており、重要な役割を担っている。

<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、日本人集団で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、また海外との連携により他の民族の患者集団、健康者集団でのレプリケーションスタディーを進めていく。
2. 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、Merlin などにも対応できるようにすることが望まれる。
3. 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シークエンスの研究手法を組みこんでいく必要がある。

<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. 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*. 2008;71(8):547-51 (18579805)
2. Takahashi Y, Seki N, Ishiura H, Mitsui J, Matsukawa T, Kishino A, Onodera O, Aoki M, Shimozawa N, Murayama S, Itoyama Y, Suzuki Y, Sobue G, Nishizawa M, Goto J, Tsuji S. Development of a high-throughput microarray-based resequencing system for neurological disorders and its application to molecular genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2008; 65(10): 1326-32 (18852346)
3. Jun Mitsui, Ikuko Mizuta, Atsushi Toyoda, Ryo Ashida, Yuji Takahashi, Jun Goto, Yoko Fukuda, Hidetoshi Date, Atsushi Iwata, Mitsutoshi Yamamoto, Nobutaka Hattori, Miho Murata, Tatsushi Toda, and Shoji Tsuji. Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease *Arch Neurol* (in press)