

脳動脈瘤関連遺伝子の探索

●井ノ上 逸朗

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

<研究の目的と進め方>

本研究では、脳動脈瘤（くも膜下出血）の発症に関連する遺伝子の同定を目指す。くも膜下出血は、そのほとんどが脳動脈瘤の破裂を原因としており、致死率が高く、後遺症も重篤であり、社会的損失の大きい疾患である。脳動脈瘤そのものは無症状のことが多く、高頻度に存在していることも知られている（50歳以上の3-6%に存在する）。疾患感受性遺伝子を同定することで、脳動脈瘤発生メカニズムの全容が解明され、予防法、治療法の開発へ向けた大きな前進が期待できる。さらに、糖尿病や高血圧などと同様、脳動脈瘤もまた多因子疾患の一つであり、複数の遺伝因子や環境因子が複雑な形でその発生リスクに関与していると考えられる。したがって、脳動脈瘤発生に関するメカニズムの全容解明のためには、ゲノム全域を対象とした罹患同胞対連鎖解析法、およびアソシエーション・スタディによる体系的な遺伝子同定に加え、遺伝子間、もしくは遺伝子-環境間相互作用を検出する新たなアプローチを採用、または開発しつつ、戦略を立てることが重要である。

本研究では、ゲノム全域を対象とした罹患同胞対連鎖研究、および集団ベースのサンプルを用いた症例対照研究において遺伝子間相互作用を含む体系的な関連解析を行い、さらに、単一遺伝子のみでなく、遺伝子間相互作用までを視野に入れた病因の解明を目指す。

<2008年度の研究の当初計画>

本研究では、50以上の炎症関連遺伝子を候補として、アソシエーション・スタディによる感受性遺伝子の同定を試みる。

また、遺伝子間相互作用解析を目的として、多変量の関連構造をネットワークグラフによって表す統計的手法であるグラフィカルモデリングに着目し、その一種である path consistency (PC) アルゴリズムを実装、ソフトウェア化する（生命システム情報堀本先生との共同研究）。同時に、その有効性を検証するため、アルツハイマー病コンソーシアムより御供与頂いた、遅発性アルツハイマー病 (LOAD) のデータを二次利用し、本手法を適用した（基盤ゲノム桑野先生との共同研究）のち、脳動脈瘤のデータの解析に着手する。

<2008年度の成果>

炎症関連遺伝子を候補としたアソシエーション・スタディでは、炎症細胞の糖鎖修飾に関連する酵素遺伝子、FUT9 で $P=2.43 \times 10^{-4}$ 、odds ratio=1.43 の有意差を得ている。

また、遺伝子間相互作用解析を目的とした PC アルゴリズムを実装、ソフトウェア化し、その有効性を検証するため、LOAD の症例・対照データ（3,192名、新潟大学脳研究所の研究グループより供与）を二次利用し、解析を行った。解析の対象である遺伝子多型は、LOAD と有意な関連性を示すアポリポタンパク質 E 遺伝子 (APOE、19q13.2)、および第 10 番染色体上に位置する

18SNP であり、SNP の連鎖不平衡構造のほか、これらの遺伝子多型と LOAD との性特異的な関連を再現することができた。この部分について、現在論文を作成中である。なお、本アルゴリズムによるデータの解析、特に SNP のような離散変数のデータの解析は、世界的にもほとんど例がなく、バイオインフォマティクスの観点からも、極めて重要な意味を持つものと言える。

また、ゲノムワイド関連解析が近年精力的に進められていることは周知の通りであるが、そのように大規模なデータであっても、本アルゴリズムが有効であるかを検証するため、加齢黄斑変性症 (AMD) に関するゲノム全域 116,204SNP のデータ (146名、米・Yale 大学の研究グループより供与) を同様に二次利用し、解析を行った。このデータでは、関連解析により、補体 H 因子 (CFH、1q32) 上の rs380390 が、感受性 SNP としてすでに同定されている (Klein ら、2005)。ただし本データのように、被験者の数に対して SNP の数が極端に大きい場合、過度にエッジが削除される、すなわち、保守的な結果を与える傾向にあることが知られている。本研究でも、rs380390 と AMD との関連を再現するには至らなかった。そこで、事前情報として、明らかに関連性が認められる変数間のエッジを固定する、もしくは関連性のない変数間のエッジをあらかじめ削除することが、偏りのある結果を回避するための有効な方法として提唱されている。本データの解析においても、AMD と rs380390 の関連を固定することにより、CFH、CFHR1、および CFHR4 に位置し、rs380390 と相互作用すると考えられる計 5SNP がとらえられた。

このネットワークグラフが示唆する生物学的な意味については、別途理論的および実験的検証が必要であるが、本手法により、疾患と SNP の相対的な関係性がより理解しやすい形で視覚化され、多因子疾患を支配する複雑なメカニズムの解明の一助となることが期待される。

<国内外での成果の位置づけ>

近年のゲノムサイエンスの目覚ましい発展により、染色体全域に存在する数十万単位の SNP（一塩基多型）をタイピングできるプラットフォームが開発され、そこから得られる膨大な情報を用いた連鎖解析や関連解析などを通じて、様々な疾患に関与する感受性 SNP が同定され、ここ数年の間に、世界屈指の科学雑誌を中心に、驚異的な数の報告がなされている。

しかしながら前述の通り、脳動脈瘤をはじめとする多因子疾患については、それらの多型が単純に発症リスクに寄与しているのではなく、非遺伝性因子との相互作用を通じて、より複雑なネットワークを形成していると考えられる。

今後、世界的な研究の関心は、感受性多型の同定から、それらを含む様々な因子の相互作用の解明にシフトしていくものと予想される。そのような意味で、本研究は新時代の到来に向けた先駆的な試みと位置付けられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

遺伝子間相互作用解析について、PC アルゴリズムは有効な手段となり得ることを示したが、一方でその保守性により、特にゲノム全域のデータに適用した場合、他の遺伝子多型の影響で、目的とする相互作用が正確に把握できない可能性が懸念された。

また、アルゴリズムの実装、ソフトウェア化、および有効性の検証に大部分の時間が割かれ、脳動脈瘤のデータで詳細な相互作用解析を行うに至らなかったことは、反省点として留意しなくてはならない。

<今後の課題>

上記の問題を踏まえ、今後は条件付独立性検定における計算の一部を変更し、より検出力の高いアルゴリズムへの改良を検討する。また、ネットワークグラフの一部の関連をあらかじめ固定、削除する機能の向上や、欠損値への対応など、ソフトウェア自体の改良にも併せて対処する。

また、複数の SNP を同時に評価する手法として、stepwise ロジスティック回帰法などの変数選択法が従来広く用いられてきたが、解析の対象となる SNP の飛躍的な増加に伴い、計算負荷などの面で、これらの手法はもはや現実的とは言い難い。近年、変数選択法に代わるモデルの最適化法として、shrinkage 法が提唱され、特に量的形質データへの適用が盛んに行われつつある。本手法は、変数選択法と比較してはるかに多くの、しかも互いに相関を示す説明変数を同時に考慮することが可能であり、今後、閾値モデルと組み合わせて、疾患・対照データにも積極的に適用していく必要がある。

<成果公表リスト>

1. Bilguvar K, Yasuno K, Niemelä M, Ruigrok YM, von Und Zu Fraunberg M, van Duijn CM, van den Berg LH, Mane S, Mason CE, Choi M, Gaál E, Bayri Y, Kolb L, Arlier Z, Ravuri S, Ronkainen A, Tajima A, Laakso A, Hata A, Kasuya H, Koivisto T, Rinne J, Ohman J, Breteler MM, Wijmenga C, State MW, Rinkel GJ, Hernesniemi J, Jääskeläinen JE, Palotie A, Inoue I, Lifton RP, Günel M. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. *Nat Genet* 40, 1472-1477, 2008.
2. Nishida N, Koike A, Tajima A, Ogasawara Y, Ishibashi Y, Uehara Y, Inoue I, Tokunaga K. Evaluating the performance of Affymetrix SNP Array 6.0 platform with 400 Japanese individuals. *BMC Genomics* 9, 431, 2008.
3. Krischek B, Kasuya H, Tajima A, Akagawa H, Sasaki T, Yoneyama T, Ujiie H, Kubo O, Bonin M, Takakura K, Hori T, Inoue I. Network-based gene expression analysis of intracranial aneurysm tissue reveals role of antigen presenting cells. Network-based gene expression analysis of intracranial aneurysm tissue reveals role of antigen presenting cells. *Neuroscience* 154, 1398-1407, 2008.
4. Sasahara A, Kasuya H, Krischek B, Tajima A, Onda H, Sasaki T, Akagawa H, Hori T, Inoue I. Gene expression in a canine basilar artery vasospasm model: a genome-wide network-based analysis. *Neurosurg Rev* 31, 283-290, 2008.
5. Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tamura R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *BMC Genomics* 9, 90, 2008.
6. Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, Inoue I. Integration of hepatitis B virus DNA into the MPP (mixed lineage leukemia) 4 gene and rearrangements of *MLL4* in human hepatocellular carcinoma cells. *Hum Mutat* 29, 703-708, 2008.