

家族集積性の強い脳血管疾患の遺伝解析

●小泉 昭夫

京都大学大学院医学研究科・環境衛生学分野

<研究の目的と進め方>

脳血管疾患は、わが国の死因の第3位を占め人口10万人年当たり100人前後を推移している。本疾患は、救命しえてもQOLを損ない、環境要因と遺伝要因とが発症に関与する生活習慣病の一つであり、遺伝要因の解明が望まれる。

生活習慣病の遺伝素因の解明には、仮説に密接に依存する2つのアプローチが存在する。仮説の一つは、“Common diseases, Common variants, Common pathways”であり、アプローチとして頻度の多い遺伝子多型を用いた患者対照研究である。もう一つの仮説は“Common diseases, Rare variants, Multiple pathways”である。この仮説に基づくアプローチでは、高集積家系を用いて遺伝子変異を見出し、遺伝子変異が攪乱するPathwaysを同定し、そのPathwaysに係る遺伝子群の変異を、網羅的に患者集団で検索する。我々は、脳血管疾患が家族集積性の高いことに注目し、後者のアプローチを採用してきた。

本課題においては、①もやもや病および②脳動脈瘤を家族集積性の高い脳血管疾患のプロトタイプと考え検討を行う。

もやもや病では、多くの動脈で、血管平滑筋細胞の増殖が認められるが、内頸動脈終末部を中心に最も高度に増殖が生じ、血管閉塞の原因となる。本疾患に係る①責任遺伝子、および②病理解析によりPathwaysを同定し、脳動脈硬化の発生基盤となる血管内皮細胞および血管平滑筋細胞のcrosstalkについてシステムの理解を得ることを目的とする

脳動脈瘤においては、家系内に3名以上の未破裂動脈瘤あるいはくも膜下出血を有する家系を対象とし、2001-2003年にかけて29家系に遺伝解析を行った。その結果、17cenに強い連鎖を認めた。今回これら家系を5年以上追跡し、新規の脳動脈瘤あるいはくも膜下出血を観察し、phenotypeをもとに再度連鎖解析を行う。

<2008年度の研究の当初計画>

① もやもや病：既に連鎖解析を行い、候補遺伝子として絞り込んだ少数の遺伝子について、配列決定および構造上の異常を検出する。

さらに家系を拡大し、国内例はもとより中国および韓国の症例の参加を募る。

候補遺伝子について我が国の症例を厳選し、遺伝子intron-exonの配列の決定を行い、さらに候補遺伝子の絞り込みを完了し、BAC cloningを作成する。今後作成が完了した段階で、200Kbの全配列の決定を行う予定である。

絞り込まれた遺伝子について、機能解析を行うとともに、cDNA全長の決定、splicing variantsの決定、発現量の定量化を行う。また、日本人で決定された遺伝子について、各国の患者についても、全Coding領域の変異の検索を行い、候補遺伝子を数個見出している。

病理解析では、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞のcrosstalkに注目し、In vivo およびIn vitroでの検討を行う。中でも血管平滑筋細胞の増殖に至る血管平滑筋細胞と血管内皮細胞のcrosstalkを明らかにし、増殖に至る過程での内皮細胞の役割を明らかにする。このプロセスにおける内皮細胞の役割をもとに、候補遺伝子の機能上の役割を、細胞局在の変化、発現量の変化、種々のマーカー分子の変動(Weibel-Palade body, P-secreitin)などを指標に主に電子顕微鏡および免疫染色を用い分析する。

② 家族性脳動脈瘤：本年度が5年見に当たる2家系についてMRAによる追跡を行う。また、終了後直ちに5年間の追跡をもとにphenotypeの更新を行い、更新されたデータをもとに連鎖解析を行う。連鎖解析では、parametric analysisとnonparametric analysisを行う。

<2008年度の成果>

① もやもや病：17家系のprobandについて、候補領域の大よそ400kbの存在する13遺伝子の全exon領域の配列決定を行った。

現在まで、わが国の家族性もやもや病33家系および孤発例86例、韓国家族性家系4家系8名、孤発例38名合計46名、中国孤発家系15名、Caucasian 26名の参加を得ている。また、リソースとして、上記参加者の血液のほか、もやもや病患者の末梢不活化細胞の株を樹立した。

BAC cloneを現在差作成中であり、被覆率90%で約5.2万クローン、平均長140kbのヒトゲノムDNAライブラリーを作成した。6クローンについては、標的とする3'を含んでいたが、5'については含んでおらず被覆率を95%にまで増加させ再度クローニングを継続している。本年度中の全配列決定を目指している。

病理解析の結果、内皮細胞下には、内弾性板の断裂、平滑筋細胞の血管内への遊走、内皮細胞にストレスファイバーの増加、Weibel Palate bodyの減少、P-secreitinの減少を観察している。また血管内での凝固の亢進が認められた。以上から、平滑筋細胞の増殖の原因として、内皮細胞の障害が考えられた。

② 家族性脳動脈瘤：29家系に加え3家系を5年間にわたり捕捉率70%で追跡できた。これらの家系で、3名3家系で脳動脈瘤が喪失し、6名6家系で脳動脈瘤の新規発症およびSAHを認めた。5年後の追跡に基づく形質をもとにGenomewideの連鎖解析を行った。

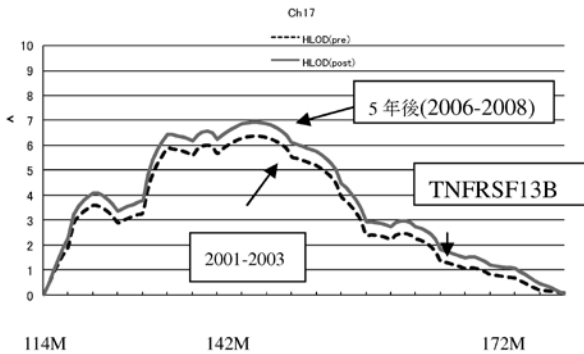
その結果、17centにおいて前回より強い連鎖が認められた(NPL Score 3.04 p=0.00253, HLOD=2.45)。Ch19q13およびChXp22については、前回より減少し、有意な連鎖は認められなかった。

17centにおいてHLODでLocus heterogeneityが想定されたため、連鎖が認められた、32家系中の20家系159名(男性45名年齢の中央値45歳、女性98名年齢の中央値60歳)を対象にFine mappingを行った。この159名では、男性では61名中20名、

女性では、98名中45名が脳動脈瘤あるいはくも膜下出血の既往を有していた。

Fine mappingの結果、LOD score 7.0の高値が得られ(図1)、haplotype解析により114M-142Mが候補領域と考えられた。今後この領域の全遺伝子について配列の決定を行い、segregation analysisを行う。

図1 Ch17cenに連鎖する20家系のHLOD score



<国内外での成果の位置づけ>

もやもや病は、日・韓・中の小児に多い疾患であり、遺伝解析の質において欧米をはるかに凌駕している。欧米からの注目度も高い。

脳動脈瘤に関しては、本年我が国およびフィンランド、オランダの患者を対象とした研究がなされた。本研究では、2100名の患者と8000名におよぶ対照者が参加している。この検討の結果、2q, 8q および9qの遺伝子座が同定され、2q および8qの遺伝子座は新規のものであり、9qは動脈性疾患との相関が報告されてきた。今回の検討で、それぞれの3人種で報告されてきた遺伝子座は、確認されず新たな遺伝子座が見いだされたことは興味深い知見である。

我々の確認した遺伝子座は、多発家系に特有のものであることが考えられ、今後一般人口での寄与率の評価が必要である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

BAC libraryの構築に予想以上に時間を費やした。被覆率90%でほぼカバーできるとの経験から90%を選択したが、得られた6クローンは、5'端を含んでいなかった。さらに被覆率を95%に上げることで標的領域を含んだクローンを得たい。

<今後の課題>

もやもや病については、患者由来のゲノムDNAを用いてBACライブラリーを用いて候補領域の全配列をきめる。

病的に平滑筋あるいは内皮細胞がより発症機転において重要な役割をなすのか検討を継続する。特に、電顕による観察を重点的に行う。

脳動脈瘤については、候補領域に存在する遺伝子についてまずexon領域の配列を決定する。

以上をもってもやもや病の原因遺伝子、および脳動脈瘤の感受性遺伝子の決定を行う。

<成果公表リスト>

Mineharu Y, Liu W, Inoue K, Matsuura N, Inoue S, Takenaka K, Ikeda H, Houkin K, Takagi Y, Kikuta K, Nozaki K, Hashimoto

N, Koizumi A. (0710091546). Autosomal dominant moyamoya disease maps to chromosome 17q25.3. *Neurology*. 2008 May 7.