

# アルツハイマー病を中心とした神経系疾患の多型タイピング体制確立と応用

●桑野 良三 ◆宮下 哲典

新潟大学研究所附属生命科学リソース研究センター

## <研究の目的と進め方>

本研究の目的：

本研究は、脳神経疾患のゲノム解析を推進するためのヒトタイピングシステム体制の確立とその応用である。「応用ゲノム」領域と密接に連携してヒト脳神経疾患のタイピング支援を行う。脳疾患の家族集積性の高い症例については、連鎖解析のためマイクロサテライトタイピング、SNPタイピングまたは原因遺伝子の同定を行い、依頼元に結果を報告する。個別研究では、タイピングシステムの改良、統計解析法の改良、効率化、高度化を進め、アルツハイマー病を含む認知症関連遺伝子を探索する。

研究の進め方：

### 1.ヒトタイピングシステム体制の確立

中規模タイピングセンターとして効率的なシステムを構築する。①統一的な試料の取り扱い、保存・管理、②ゲノム多型マーカーの管理、③連鎖解析または罹患同胞対解析にマイクロサテライト、疾患—対照群関連解析には高密度 SNP によるタイピングを行う。④膨大なゲノム情報データベース (Genome DB) を構築し、表現型である症状・病態に基づき疾患関連遺伝子を同定する。⑤公開に向けたデータベース構築とより高度な解析ツールの開発・改良については、遺伝統計学、医療統計学、情報処理の専門家の支援を得ながらコンピューターによる数値処理を行う。

### 2.ヒトタイピングシステムの応用

脳神経疾患の遺伝子解析は、原則的に「応用ゲノム」から依頼され「ヒト多型タイピングセンター委員会」で審議承認された家族集積性の脳神経疾患について、そのタイピングを行い、解析データを依頼元に報告する。

### 3.アルツハイマー病その他の脳疾患遺伝子診断の支援

臨床研究機関から依頼される認知症多発家系についての遺伝子解析を支援する。原因遺伝子及び関連遺伝子の変異を同定するためのシーケンス解析を行い、結果を依頼元に返す。

### 4.個別研究

孤発性アルツハイマー病の感受性遺伝子を同定する。全ゲノムを対象に疾患—対照群の SNP タイピングによる相関解析によって感受性遺伝子の探索を行う。大規模ゲノムワイド相関解析 (GWAS) のプラットフォームは、GeneChip (Affymetrix 社 ver6.0、90 万 SNP) を採用する。異なる検体で Replication を行い、感受性遺伝子の候補領域を絞り込み、周辺の SNP を含めてより密度の高い SNP を利用して感受性遺伝子を同定する。一方、発現解析や代謝マップ情報と照らし合わせて感受性遺伝子の意味を考察する。

## <2008 年度の研究の当初計画>

### 1.アルツハイマー病

①リソース：「応用ゲノム」と連携して、同胞発症例を集め、最終目標100ペア以上を達成し、日本人初のアルツハイマー病大規模罹患同胞対解析を行う。相関解析用の試料を準備・整理する。

②GWAS：孤発性アルツハイマー病に関して全ゲノム網羅的に疾患感受性遺伝子を同定する。本年度のゲノム4領域が協力して推

進するGWASの対象疾患にアルツハイマー病が採択された。GWAS戦術ならびに体制は、i) アルツハイマー病1000例対照群1000例を1stスクリーニングの対象とする。1stスクリーニングは高密度SNP搭載GeneChip (Affymetrix社：ver6.0、90万SNP) タイピングを「基盤ゲノム」内のタイピングセンター (GT-3：新潟大学、東京大学、九州大学) の新潟大学、東京大学が行う。タイピング効率、サンプルのクリーニングを行い、候補SNPを選定する。ii) 別のサンプルセットを新潟大学が準備して、選ばれた1536SNPについて、異なるタイピングプラットフォーム (Illumina 社) を用いてReplicationを九州大学が行う。タイピングデータの高度な統計解析及びデータベース構築は情報支援班の支援を受ける。

③発現解析：病理診断されたヒト死後脳における発現解析を行い、GWASの結果と照らし合わせて、代謝マップからアルツハイマー病発症との関連を考察する。

④原因遺伝子シーケンス：家族性が疑われる認知症 (若年型アルツハイマー病、前頭側頭葉型認知症、混合型認知症、その他の認知症が疑われる症例) について、原因遺伝子である *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, および *MAPT*, *PGRN*, *TDP43* の全エクソンのシーケンスを行う。これらの症例のシーケンス結果は依頼元にその都度報告する。

⑤統計解析：アルツハイマー病には強力なリスク遺伝子 *APOE* が知られているので、この *APOE*、年齢、性別、臨床心理テストなどと、新たに見つけた感受性遺伝子との交互作用を明らかにするためにロジスティック回帰分析をおこなう。

### 2.その他脳疾患

脳神経疾患で家族集積性の高い症例について、連鎖解析のためのタイピングを依頼された場合、マイクロサテライト解析を行う。

### 3.データベース

これまでに解析してきたマイクロサテライトおよび SNP タイピングデータを整理する。アルツハイマー病の大多数が高齢者であり、その対照群も高齢者である。従って、日本人高齢者の多型情報をマーカー毎に整理し、他民族と比較できるデータベースを構築する。

## <2008 年度の成果>

### 1.支援活動：

#### ①罹患同胞対解析

家族性脳疾患について連鎖解析は、多型情報が多いマイクロサテライトをマーカーに用いてタイピングを行ってきた。GeneChip を用いた SNP タイピングで連鎖解析の方法も可能である。「先端脳」と「応用ゲノム」班が収集した同胞発症例をまとめた SNP タイピングを行い、統計解析の段階である。

#### ②その他脳疾患

脳神経疾患で家族集積性の高い症例について、連鎖解析のためのタイピング支援として、今年度は「応用ゲノム」辻班員から紀伊半島に集中して発症している ALS/PDC86 検体についてマイクロサテライト (平均 5 cM 間隔) タイピング依頼があり、現在

進行中である。

③アルツハイマー病を中心とした認知症に関連する遺伝子解析に対応するため、原因遺伝子である*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*及び認知症関連遺伝子*MAPT*, *PGRN*, *TDP43*のシーケンスを行った。弘前大学 (1例)、関東中央病院 (1例)、東京都精神研 (2例)、広尾赤十字病院 (1例)、国立精神・神経センター (3例)、順天堂大 (4例)、東京都老人研 (50例)、新潟大学 (55例)、阿賀野病院 (1例)、金沢大学 (4例)、鳥取大学 (2例)、川崎医科大 (3例) 福岡大学 (4例) から、家族性アルツハイマー病、前頭側頭葉型認知症、及びそれらの類似疾患が疑われる症例について原因遺伝子のシーケンス依頼があった。若年発症家系の一部に*APP*, *PSEN1*, *MAPT*に変異を見つけ、その結果を依頼元に報告した。

## 2. 個別研究

①疾患感受性遺伝子を同定する方法として統計学的検出力を考慮したR言語を用いたマルチステージ法による疾患-対照群相関解析法を開発した。開発したプログラムは自由に使用できる。(0901091154)

②HapMapのデータを用いてハプロタイプ頻度から仮定の疾患群、対照群を作成した。この仮想サンプルを使って疾患-対照群相関解析を繰り返し行い、候補SNPを25%に絞った。この候補SNPを使った結果は実際の報告やtag SNPを使った結果と良く一致した。この方法は疾患に左右されず経済的に優れた方法である。(0901091258)

③最近のGWASによって*GAB2*が欧米人で同定された。日本人にとってもリスクとなるか、大規模検体を用いて再現性を確認したところ、日本人の集団ではアルツハイマー病のリスクとならなかった。(0901091326)

④アルツハイマー病の原因遺伝子 (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) 以外に、*MAPT*変異が関与するのではないかと考えられている。日本人の10家系について、*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *MAPT*の全エクソンのシーケンスを行ったところ、*PSEN1*変異の他に*MAPT*に1変異 (R406W) を見つけた。このことはアルツハイマー病の発症機序や治療を考える上で非常に重要である。(0901091350)

⑤多段階解析法をデザインする際に、replication-based analysisとjoint analysisの検体数や候補アリル等を変化させて実践的な統計学的検出力と陽性的中率を分析した。いずれにおいても、検出力と陽性的中率は二段階法より三段階法の方が高かった。(0901091432)

### <国内外での成果の位置づけ>

国内のアルツハイマー病及び関連脳疾患ゲノム収集は、7000例を越え国内最大規模である。この試料を用いて、日本人固有のリスク遺伝子探索を進めるため、大規模GWASを進めている。アルツハイマー病に関する国際的なGWASは、SNP(J.Pearson *et al.* 2007, A.Grupe *et al.* 2007, K.Coon *et al.* 2007, E.Reiman *et al.* 2007, H.Li *et al.* 2008, L.Bertram *et al.* 2008, M. Carrasquillo, *et al.* 2008), またはマイクロサテライト (F.Liu *et al.* 2007) による研究が見られる。多くの相関解析研究で得られる候補遺伝子のメタ解析 (Bertram *et al.* 2007年1月) 結果がAlzForumに掲載されている。現在なお、APOE以外のリスク遺伝子は確定されていない。これらのGWASで対象としている欧米の多様な民族集団に比べて、日本人はより単一と考えられるので、疾患遺伝子同定の精度は高いと期待される。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

高齢発症のために同胞例の検体収集に予想外に時間がかかるので、現有試料で解析を開始することにした。ゲノム試料は有限であり消費する。貴重で微量になったDNAも増幅が可能である

が、正しいタイピング結果になるか検証の必要がある。

### <今後の課題>

加齢につれて正常-軽度認知障害-早期アルツハイマー病へ変化する。それらの臨床経過や症状を追跡する Hospital-based 試料並びに、食事、運動、生活習慣等疫学調査に基づく Population-based 試料の収集を行う。これらを総合してゲノム情報を基盤とした発症前診断の開発を推進する。*APP*にコピー数多型が見つかったので、塩基配列だけでなくコピー数多型の解析、および個人全ゲノムシーケンス解析システム体制を確立する。個人情報保護を保護したデータベースの構築と充実に課題である。

### <成果公表リスト>

#### 1) 論文

##### ① 0901091154

Kitamura N, Akazawa K, Miyashita A, Kuwano R, Toyabe SI, Nakamura J, Nakamura N, Sato T, Hoque MA: Programs for calculating the statistical powers of detecting susceptibility genes in case-control studies based on multistage designs. *Bioinformatics*. Nov 28. [Epub ahead of print] (2008)

##### ② 0901091258

Toyabe S, Miyashita A, Kitamura N, Kuwano R, Akazawa K: Prediction of Disease-associated Single Nucleotide Polymorphisms Using Virtual Genomes Constructed from a Public Haplotype Database. *Methods Inf Med*;47(6) :522-528 (2008)

##### ③ 0901091326

Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R: GAB2 is not associated with late-onset alzheimer's disease in Japanese. *Eur J Hum Genet*. Oct 15. [Epub ahead of print] (2008)

##### ④ 0901091350

Ikeuchi T, Kaneko H, Miyashita A, Nozaki H, Kasuga K, Tsukie T, Tsuchiya M, Imamura T, Ishizu H, Aoki K, Ishikawa A, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M: Mutational analysis in early-onset familial dementia in the Japanese population. The role of PSEN1 and MAPT R406W mutations. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 26(1) : 43-9. [Epub 2008 Jun 28.] (2008)

##### ⑤ 0901091432

Kitamura N, Akazawa K, Toyabe S, Miyashita A, Kuwano R, Nakamura J: Sample-size properties of a case-control association analysis of multistage SNP studies for identifying disease susceptibility genes. *J Hum Genet*. 53(5) :390-400 (2008)

#### 2) ソフトウェア

目的とするマイクロサテライト公開データを使いやすく一覧できる手順を開発した。情報支援班の支援を受けて公開した。

##### ① pub markerソフトウェア

NCBI公開データに登録のマイクロサテライトを染色体毎にリストを作成する。各マーカーのUniSTS No、position、PCRプライマーの配列、Tm値、PCR産物とその5'及び3'隣接領域のシーケンスが一覧できる。

<http://ocean.cb.k.u-tokyo.ac.jp/homocontig1/test.cgi>

##### ② STR検索ソフトウェア

公開シーケンス配列から、2、3、4、5塩基繰り返し配列の回数を指定して検索する。繰り返し配列及び5'隣接領域3'隣接領域それぞれ400塩基のシーケンスを表示する。PCRのプライマーのTm値やPCR長を自在に設計し、独自のプライマーリストを作成し保存できる。それら新規の繰り返し配列のposition並びに既知のマーカーと同じ画面に図示する。

<http://ocean.cb.k.u-tokyo.ac.jp/str21/index.cgi>