

# 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技術開発、技術改良、および統計解析法の改良、効率化、高度化を行い、その解析技術を応用して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タイピング用多型マーカーの管理、③遺伝統計学のデータベース構築と解析ツールの開発・改良を行う。①試料の取り扱いについては、個人情報保護を保護して、試料の保存、管理、遺伝子解析の全行程が連続、統一に行えるように9桁の数字からなるNGC (Niigata Genotyping Center)ID番号(2xxxxxxx)を付与し、診療データベース (Clinical DB) に登録する。②多型マーカーについて、連鎖解析、罹患同胞対解析には、マイクロサテライトを用いる。③高密度 SNP 解析から得られる膨大なゲノム情報のデータベース (Genome DB) を構築し、表現型である病態に基づき疾患関連遺伝子を同定する。遺伝統計学については医療統計学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、マイクロサテライトマーカーを用いてタイピングを行い、その解析データを依頼元に報告する。アルツハイマー病に関して「応用ゲノム」と連携して、同胞発症症例を集め、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

### 3. アルツハイマー病遺伝子診断の支援

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。既知の分子群をベースとした候補遺伝子アプローチは行わず、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。ゲノムワイド相関解析のプラットフォームは Affymetrix 社の高密度 SNP を搭載した GeneChip を採用する。GeneChip によるスクリーニング後、候補領域の絞り込みには、周辺の SNP を含めてより密度の高い SNP を利用して TaqMan 法による個別タイピングで行う。

## <2007 年度の研究計画>

### 1. アルツハイマー病

リソース：

罹患同胞対解析を目的として、領域「応用ゲノム」武田班と共同して同胞発症の検体収集し、保存管理する。引き続き JGSCAD (The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease) のメンバーの協力を得て検体収集を行う。

SNPタイピング：

孤発性アルツハイマー病に関して、戦術的には①クロモゾームワイドに TaqMan 法を採用した 2 段階 SNP タイピング、②全ゲノムを対象に高密度 SNP 搭載 GeneChip (500 K) タイピング法による疾患感受性遺伝子の候補座位をスクリーニングする。①では、サンプルを Exploratory サンプルセット、Validation サンプルセットに分ける。最初、Exploratory Sample でスクリーニングを行い、 $\chi^2$  乗テストで有意であった SNP について、Validation Sample Set で再現性を確認する。候補領域が連鎖解析 (文献から) および代謝マップからアルツハイマー病発症に関連するか公開データを利用して検索する。

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など) について、原因遺伝子である *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *MAPT*, *PGRN* について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。

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。対象としているアルツハイマー病は高齢者が殆どであり、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。

## <2007 年度の成果>

支援活動：

### ①罹患同胞対解析

これまで家族性脳疾患についてマイクロサテライトをマーカーに用いたタイピングは多型情報が多くて連鎖解析に威力を発揮してきた。タイピング効率及びコストの面から、96 穴プレートを反応の基本単位としてシステムを組み、まとまった数 (90 サンプル程度) で解析している。しかし、「連鎖解析では 1 疾患につき 10 数例から 30 数例なので、96 穴プレートを満たすだけの症例数を集めるには時間がかかり、タイピング依頼元の期待に応え

られない。そこで500 K GeneChipを用いたSNPに基づく連鎖解析法を導入して、「症例数待ち」を解消し、迅速に結果を依頼元に返す体制に改善する。」ことが2006年度の課題であった。応用ゲノム辻班員から、500 K GeneChipを用いた連鎖解析の方法を開発したので旧来のマイクロサテライトタイピングの連鎖解析と比較したいと依頼があった。1家系8人、4染色体(染色体1番, 13番, 15番, 21番の98マーカー)のマイクロサテライトを用いたタイピング支援を行った。

②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, MAPT, PGRNのシーケンスを行った。金沢大学、弘前大学、日本医科大学、鳥取大学、愛知医科大学、三重大学、青森県立保健大学、川崎医科大学、東京都老人研、新潟大学脳研究所、阿賀野病院、大阪市立大学、福岡大学から、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。

③常染色体優性遺伝形式をとる新規の成人発症良性遺伝性舞蹈病(BHC2)の2家系のマイクロサテライトマーカーによるゲノム網羅的な連鎖解析の支援を行なった。本疾患の原因遺伝子座が染色体8q21.3-q23.3であることを報告した。(0801251950)

個別研究:

①孤発性アルツハイマー病で最も強力な感受性遺伝子としてAPOE ε 4アリルが認められている。疫学調査またはモデル動物を用いた研究から、有病率、罹患率とも女性が高いことが知られている。これらを背景にAPOE ε 4アリルの影響を受けず性差を反映するリスク遺伝子探索を目的として、APOE ε 3 \* 3遺伝子型だけからなるサンプルを男女で層別化して解析した。スクリーニングの精度を上げるためにExploratoryサンプルセットとValidationサンプルセットを準備し2段階スクリーニング法によって染色体10番長腕に1330SNPを設定してクロモソームワイドSNP相関解析を行った。2つのサンプルセット共に統計学的に有意であったSNPがCTNNA3のイントロンにMultiple hitsした。続いて全APOE遺伝子型を含むサンプルを対象としてSNP再タイピングを行った。年齢、性別、APOE遺伝子型、リスクSNPによるロジスティック回帰解析を行い、CTNNA3は高齢の日本人女性に強いリスクとなる遺伝子であることが判った。(0801251036)

②レヴィー小体型認知症と変異型アルツハイマー病を併発した症例で見つけたPSEN1の新規変異delT440に対して、培養細胞を用いた機能解析を行なった。その結果、delT440変異はベータアミロイドタンパク42/40比のみならず、リン酸化α-シヌクレインの蓄積上昇を脳内で引き起こす可能性が示唆された。(0801251115)

③ある家族性アルツハイマー病の原因遺伝子(APP, PSEN1, PSEN2)をシーケンスしたところ、APPの(E693Δ)アリルホモ接合体であること、同一家系の健常者4例はヘテロ接合体であることを見出した。そこで、E693Δを検出できるTaqManプローブを合成し、保管中の5310例について検索した結果、新たにアルツハイマー病1例にアリルホモ接合体、健常者2例にヘテロ接合体を見つけた。E693Δによる変異AβはAβオリゴマー形成を促進するが不溶性の繊維状とならない。このことは近年提唱されているAβオリゴマーによる認知機能障害の分子機構解明に重要な知見を与える。(0801251508)

<国内外での成果の位置づけ>

引き続き検体収集をすすめているが、30万人の「バイオバンクジャパン」にはアルツハイマー病が含まれていない。従って国内のアルツハイマー病ゲノム収集は我々の6000例を越える試料

が最大規模といえる。これは共通診断基準に基づいて収集し診療情報が付随した「質」の高い試料である。現在、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、100万SNP搭載のGeneChipを使用して大規模ゲノムワイド相関解析(GWAS)を進めている。さらに他民族で同定されたリスク遺伝子の再現性を日本人で確認することが可能である。国外では、プールDNAを用いたGWAS(J.Pearson et al. 2007年1月)及び17,343遺伝子の機能的SNPのタイピング(A.Grupe et al. 2007年2月)、剖検脳1086例の500KGeneChip解析(K.Coon et al. 2007年4月)同グループが臨床例を追加してアルツハイマー病861例—対照550例を解析しGAB2を同定(E.Reiman et al. 2007年6月)した。しかし、約3000例を調べたが日本人では有意とならなかった。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

アルツハイマー病患者数及びλsからすれば罹患同胞対解析は短期間に達成は可能と思われたが、同胞例の検体収集に予想外の時間がかかっている。高齢者のため同胞の片方が死亡、高齢のため臨床医が家族歴を聴かない又は家族間の情報が希薄である等により、他疾患に比べて検体収集に困難であると思われる。

<今後の課題>

①SNPタイピングをベースとしたコピー数多型解析が可能な1000 K GeneChip(Affymetrix社)が利用できる。家族性アルツハイマー病に原因遺伝子(APP)のコピー数多型が見つかったので、日本における家族性アルツハイマー病についてもコピー数多型の解析が出来るようにシステム体制を確立する必要がある。

②民族固有のゲノム多型が、疾患の発症、病勢進行、治療薬に対する応答性が異なることが判ってきた。現在進行中の日本人の特に高齢者の遺伝子多型情報を整理して、利用可能なデータベースの構築に向けて早急にまとめる必要がある。そのためには、統計学、システムサイエンス、バイオインフォマティクスの支援を受けながら進めることが今後の大きな課題である。

<成果公表リスト>

論文

1. 0801251950

Shimohata T, Hara K, Sanpei K, Nunomura J, Maeda T, Kawachi I, Kanazawa M, Kasuga K, Miyashita A, Kuwano R, et al. Novel locus for benign hereditary chorea with adult onset maps to chromosome 8q21.3-q23.3. *Brain* 30(Pt 9): 2302-2309 (2007)

2. 0801251036

Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Matsubara E, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, et al. Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer's disease in females. *Hum Mol Genet.* 16(23), 2854-2869 (2007)

3. 0801251115

Kaneko H, Kakita A, Kasuga K, Nozaki H, Ishikawa A, Miyashita A, Kuwano R, Ito G, Iwatsubo T, Takahashi H, et al. Enhanced accumulation of phosphorylated alpha-synuclein and elevated β-amyloid 42/40 ratio caused by expression of the presenilin-1 deltaT440 mutant associated with familial Lewy body disease and variant Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 27(48):13092-13097 (2007)

4. 0801251508

Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., Takuma, H., Kuwano, R., Imagawa, M., Suzuka Ataka, S., et al. A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol.*(2007) in press