

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791615

研究課題名（和文）家族性脳動脈瘤のエクソーム解析による疾患遺伝子の同定

研究課題名（英文）Exome sequencing of a pedigree segregating intracranial aneurysm

研究代表者

米山 琢 (YONEYAMA TAKU)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90318105

研究成果の概要（和文）：脳動脈瘤を多発する単一家系を対象に、罹患者 4 人を含む 7 名の家系メンバーについて、エクソーム解析を行った。出力データのクオリティ・コントロールとフィルタリングを行い、有望な候補遺伝子の同定に至った。患者 241 例と非脳動脈瘤対象 244 例を用いた関連解析にて有意な関連が認められた。変異体および野生型の機能差異を DsRed 融合タンパクにて検証したところ、変異体では易凝集性を示すことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Whole-exome sequencing of a large IA pedigree and following case-control association study identified a susceptibility gene for IA. Transfection analysis showed that the mutant gene product obtained a trend to form dot-like aggregations in cytoplasm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳血管障害学

キーワード：脳動脈瘤、遺伝子、rare variant

## 1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤の破裂はクモ膜下出血をきたす。クモ膜下出血は重篤疾患で、約半数は初回出血で死亡する。さらに、手術で救命しえても意識障害や片麻痺といった重度の後遺症を残すことも少なくなく、出血前診断・治療に対する社会的要請が最も高い疾患のひとつといえる。脳動脈瘤やクモ膜下出血を多発する家系が存在すること、また、脳動脈瘤を合併する遺伝性疾患が存在することから、脳動脈瘤には遺伝的な要因が高く関与していることが示されてきた。これを受け、我々は世界に先駆けて全ゲノム領域での罹患者同胞対連鎖解析を行い、5 番、7 番、14 番染色体上に脳動脈瘤感受性領域を同定した(Onda et

al. *Am J Hum Genet* 69:804-819, 2001)。この研究が口火となり、現在では世界中で脳動脈瘤関連遺伝子の研究が行われるようになった。連鎖解析以降も、我が研究班がこの研究を世界的にリードし、多くの業績を残してきた。まずこれらの連鎖領域に注目し、ポジショナル候補遺伝子解析による感受性遺伝子の同定を進めてきた。14 番染色体の候補遺伝子解析では疾患との優れた関連は見出せなかったが(Yoneyama et al. *Stroke* 35(12):e376-8, 2004)、5 染色体連鎖領域の解析では *FGFI* 遺伝子近傍に原因変異のある可能性を示した(Yoneyama et al. *J Hum Genet* 48(6):309-14, 2003)。特に、最も強い連鎖を認めた 7 番染色体連鎖領域においては、

Collagen Type I  $\alpha 2$  (*COL1A2*) 遺伝子を疾患感受性遺伝子として同定することに成功した。*COL1A2* 分子の triple-helical domain に位置する 459 番目のアラニンがプロリンに置換する非同義の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が疾患と有意に関連することを見出したのである。この 459 番目のアミノ酸がプロリンに置換されると、コラーゲン分子の triple-helix 構造が不安定化し、血管壁の脆弱性を惹起して脳動脈瘤の形成を促すのである (Yoneyama et al. *Stroke* 35(2):443-8, 2004)。この業績は内外から高く評価され、第 62 回日本脳神経外科学会総会優秀演題賞および第 11 回日本脳神経外科学会奨励賞の受賞論文となった。

しかしながら、この知見は Polygenic disease と考えられる脳動脈瘤の遺伝的要因の一部を説明できているに過ぎない。他の遺伝的要因の検索も進められてきたが、連鎖解析からのポジショナル候補遺伝子の検索といったアプローチでは限界があった。この限界を解消すべく登場したのが Genome Wide Association Study (GWAS) であった。脳動脈瘤においても、我々とエール大学、オランダ、フィンランドの共同研究で 2100 例の動脈瘤患者と 8000 例の対照を用いた GWAS が行われ、いくつかの信頼性の高い感受性領域が特定された (Bilguvar et al. *Nature Genet* 40(12):1472-7, 2008)。しかし、GWAS で検出された関連 SNP はあくまで疾患関連連鎖不平衡を代表するマーカーとしての意味合いが強く、それ自体が遺伝子の機能変化に関わって疾患発症に寄与するわけではない。さらに、信頼性はかなり高い反面、どれも効果サイズが小さく (オッズ比 1.5 未満)、これらが GWAS の抱える問題点として強く認識されるようになってきた。

近年、次世代高速シーケンサーが実用化のレベルに達し、個人の全ゲノム配列までも決定することが可能となった。さらには、遺伝子のコーディング領域を効率よく抽出し、高精度に配列決定を行うことも可能になっている (targeted capture and massively parallel sequencing 法、exome sequencing 法) (Ng et al. *Nature* 461: 272-6, 2006)。これにより、疾患発症に直接的に寄与する原因遺伝子変異そのものを同定することが可能となった。本学においても次世代高速シーケンサー SOLiD<sup>TM</sup>4 (life technologies 社) の

稼働が本格化したのを受け、多数の罹患者を有する大家系に注目して解析すれば、有望な疾患遺伝子変異を同定できるのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

我々は先のゲノムワイド連鎖解析でも使用した家族性脳動脈瘤 90 家系のサンプルを有している。本研究では、このうち 3 世代にわたり計 7 人の罹患者が存在する 1 家系に注目した。サンプリング可能なメンバー全てで次世代高速シーケンサー SOLiD<sup>TM</sup>4 (life technologies 社) を用いた全エクソン領域のシーケンシングを行い、責任遺伝子変異の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

今回の解析の対象となる家系は、先のゲノムワイド連鎖解析に使用した家系の長期追跡により選定した。この家系は家系内に罹患者を 7 名有する大家系であり、この家系からサンプリング可能であった罹患者 4 名および非罹患者 3 名、合計 7 名のサンプルをエクソーム解析に供した。シュアセレクト・ターゲットエンリッチメントシステム (Agilent technologies 社) により全エクソン領域の濃縮およびキャプチャーを行い、次世代高速シーケンサー SOLiD4 (life technologies 社) により大量並列シーケンシングを行った。大量の出力結果から、スプライス部位や、アミノ酸置換、フレームシフトをきたす配列変化を抽出した。このうち、i) 複数の罹患者で共有され、ii) Common SNP としてデータベースに登録されていないもの、iii) 非同義置換については、遺伝子機能変化を来す可能性が高いものを様々なバイオインフォマティクス・ツールを用いて抽出した。

同時に、SOLiD データのクオリティコントロールと連鎖解析を行う目的でイルミナ社 SNP array を用いて、高密度の SNP ジェノタイプピングも行った。

## 4. 研究成果

7 個体のエクソームにより、述べ 229,776 個の 1 塩基置換 (single nucleotide variant, SNV) と 14,587 個の小さな欠失・挿入 (indel) が検出された。このうち、ミスセンス、ナンセンスおよびスプライス部位の SNV は計 47,903 個あり、コーディング領域の indel は

計 1,208 個であった。ここから、1000 人ゲノム データベース (<http://www.1000genomes.org/>) を参照の上、多型を除去した。さらに、UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) で公開されている GREP や phastCon スコアを用いて、種間で保存されていない部位の塩基置換を除去し、2 名以上の罹患者で共有されている variant を抽出したところ、1,724 個の SNV と 92 個の indel にまで絞り込むことができた。ここから更に注目すべき遺伝子を抽出するためには、連鎖解析を行い、LOD 値が正の領域を採用するというのが一般的な手法として浸透している。本家系内でもイルミナ社の高密度 SNP chip を用いたゲノムワイド連鎖解析を行い、いくつかの連鎖領域が検出された。このうち、脳動脈瘤で現在までに報告されている連鎖領域とのオーバーラップをみても、唯一、染色体 13q14 領域が該当した。この領域内で検出された variant のうち、遺伝子機能変化を来す可能性が高いものを PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) を用いて抽出したところ、ただ 1 つの遺伝子変異のみが該当した。(論文発表準備中のため、ここでは遺伝子名は記述しない。) 有力な候補遺伝子をひとつ特定することができたので、次に、別家系および対照サンプルでのリシーケンシングを行った。本家系発端者も含め、患者 241 例と非脳動脈瘤対象 244 例を用い、当該遺伝子の全てのコーディング領域及びエクソン-イントロン間隙をサンガー法によりリシーケンスした。その結果、3 種の新規機能障害性変異 (HumDiv score > 0.95) が患者群にのみ検出され、統計学的にも有意な関連が認められた (患者群 5 例/241 例 vs. 対照群 0 例/244 例、Fisher exact 両側検定 P=0.030)。特に家族性脳動脈瘤患者に注目して解析を行うと、より強い関連が認められた (患者群 4 例/142 例 vs. 対照群 0 例/244 例、Fisher exact 両側検定 P=0.018)。3 つの機能障害性変異のうち、エクソーム解析を行った家系で同定されたミスセンス変異のみ、家族性例と孤発例の両方で検出されており、別の罹患者を有する家系においても疾患との co-segregation が確認された。

□ 1 つの有力な候補遺伝子が同定できたので、次いで機能解析を試みた。まず、手術により採取された脳動脈組織で免疫組織染色を行

ったところ、当該遺伝子は脳動脈平滑筋細胞に発現していることがわかった。RT-PCR にて脳動脈平滑筋細胞に発現していることを確認している。組織での発現が確認できたので、次いで本家系で検出された変異の機能解析に移った。変異体および野生型の DsRed 融合発現ベクターを作成し、COS7 細胞に一過性にトランスフェクションした。ともに細胞質に局在したが、変異体では有意に多数の点状凝集体を形成することが示された。Chou-Fasman 法を用いた 2 構造予測では、この変異により周辺の 2 次構造が beta sheet に変わることが予想されている。さらにこの beta sheet は、PASTA (Prediction of Amyloid Structure Aggregation, <http://protein.cribi.unipd.it/pasta>) による予測によると、cross-beta 凝集モチーフを獲得しうることが予想されている。脳血管平滑筋細胞での当該蛋白の凝集が、脳動脈瘤の発生にどのようにかわるのか今後さらなる検討が必要ではあるが、本研究により未だ脳動脈瘤との関連が報告されていない新規の感受性遺伝子を同定することができた。現在、論文報告に向けて準備を行っているところである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Liu C, Roder C, Schulte C, Kasuya H, Akagawa H, Nishizawa T, Yoneyama T, Okada Y, Khan N, Tatagiba M, Berg D, Krischek B. Analysis of *TGFBI* in European and Japanese Moyamoya disease patients. *Eur J Med Genet.* 55(10):531-4. 2012.

② Yoneyama T, Kawashima A, Sugiura M, Yamaguchi K, Itou K, Namioka A, Kawamata T, Kubo O, Okada Y. Technical options for the surgical management of extracranial carotid artery aneurysms. Three case reports. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 52(4):208-12. 2012.

[学会発表] (計 1 件)

① Hiroyuki Akagawa, Taku Yoneyama, Hideaki Onda, Boris Krischek,

Tsutomu Nishizawa, Hidetoshi Kasuya.  
Confirmation of an association of  
*TNFRSF13B* sequence variants with  
intracranial aneurysms in Japanese  
patients. 2011 AANS 79th Annual Scientific  
Meeting, April 9-13, 2011, Colorado  
Convention Center, Denver, Colorado

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米山 琢 (YONEYAMA TAKU)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90318105