

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22129002

研究課題名（和文）パーソナルゲノム情報に基づく脳疾患の発症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular bases of brain diseases based on personal genome information

研究代表者

辻 省次（Tsuji, Shoji）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70150612

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 331,700,000円

研究成果の概要（和文）：次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム配列解析により、遺伝性神経疾患の病因遺伝子の解明、孤発性神経疾患の疾患感受性遺伝子の解明を目指した。遺伝性神経疾患については、近位筋優位型遺伝性運動感覚ニューロパチー、家族性筋萎縮性側鎖硬化症の新規病因遺伝子としてTFG, ERBB4を発見した。孤発性神経疾患については、多発家系に注目することにより、CO2遺伝子が病因遺伝子であること、さらに、孤発性多系統萎縮症においても、COQ2のmultiple rare variantsが多系統萎縮症の発症リスクを高めていることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Applying comprehensive genome sequencing with next generation sequencers, we conducted molecular genetics studies to elucidate molecular bases of hereditary neurodegenerative diseases as well as sporadic neurodegenerative diseases. We discovered the causative gene (TFG) for Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P). We also discovered the causative gene (ERBB4) for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS19). Regarding sporadic neurodegenerative diseases, we discovered that COQ2 is the causative gene for familial multiple system atrophy (MSA), and furthermore, multiple rare variants of COQ2 increase the risk for developing sporadic MSA.

研究分野：神経内科学，分子遺伝学

キーワード：ゲノム 個人ゲノム 脳疾患 インフォマティクス シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

脳疾患の病態解明においては、単一遺伝子疾患の病因遺伝子解明の成果が得られている一方で、候補領域の十分な絞り込みができないために、これまでのゲノム解析技術では病因遺伝子の同定が著しく困難な疾患が少なからず残されている(筋萎縮性側索硬化症では75%以上が未解明)。孤発性疾患については、誰もが持っているようなゲノム多様性が疾患発症に関与するという考え(common disease-common variants 仮説)に立って50-100万個のSNPsを用いたゲノムワイド関連解析研究(GWAS)が精力的に進められてきている。しかしながら、GWASで見出される疾患感受性遺伝子は、odds比が小さく、疾患の病態機序全体を理解するには至っていない。最近になり、疾患の病態機序に大きな役割を果たすゲノム多様性(variants)は、アレル頻度の低いものであって、このような低頻度のvariantsはGWASでは検出し得ないということに気づかれ始めたところである。これらのvariantsの検出はGWASでは理論的に不可能であり、塩基配列レベルの解析が必須となるのである。

次世代シーケンサーの技術開発が進み、最近になりようやく実用化された。次世代シーケンサーの技術については、数多くの課題が存在する。特に、本研究領域との関連では、解析精度が大きな課題となっている。すなわち、ヒトゲノム上に存在するrare variantsを高精度に取得することが大きな課題となっている。

インフォマティクスの分野は、わが国ではもっとも研究者層の薄い領域で、特に、ゲノムインフォマティクス、シーケンシング技術、生物学・医学研究の分野に横断的に精通したインフォマティシャンは極めて限られている。国際的にはこの領域には優れた研究者が多く、わが国が力を入れる必要のある領域である。ヒトゲノム多様性解析での課題は大きく分けて3つある。第1は、20兆塩基対前後の情報量を扱うアルゴリズムと並列DB処理技術の研究開発である。第2は、次世代シーケンサーの威力でrare variantsの検出、逆位、転座などの大規模な構造的変化の検出が可能となったことである。第3は、多様性をいかにして機能的に分類するかという点である。variantsは無数と言えるほど膨大にあり、そこから機能的に重要なvariantsを検出し機能ごとに分類するための統計学、データマイニング、システムズ生物学を組合せた新しい技術を開拓する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、実用化されたばかりである次世代シーケンサーをコアとする最先端のゲノム解析技術研究、次世代シーケンサーによって産出される膨大な情報に対する最先端のインフォマティクス研究、ヒトの代表的な脳疾患(アルツハイマー病、パー

キンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多系統萎縮症など)の高精度の全ゲノム配列解析(パーソナルゲノム解析)に基づいて、疾患の発症に関与するゲノムの多様性(common variantsからrare variantsまでを含む)を明らかにし、発症機構を解明し、治療法開発の基盤構築の実現をめざす。

疾患には、家族性に発症する単一遺伝子疾患から、孤発性疾患まで幅広く存在する。孤発性疾患は、複数の疾患感受性遺伝子や環境要因が複合的に関与して発症するものと考えられている。単一遺伝子疾患の病因遺伝子の研究については、大きな成果を上げてきているものの、一方で、困難な課題に直面するようになってきている。単一遺伝子疾患では、疾患遺伝子の存在領域を明らかにすること(連鎖解析)が出発点となるが、領域を十分に絞り込むためには、診断の確かな大家系の存在が必須となる。この条件を満たす家系は限られており、候補領域の十分な絞り込みができないために、これまでのゲノム解析技術では病因遺伝子の同定が著しく困難な疾患が少なからず残されている(筋萎縮性側索硬化症では75%以上が未解明)。この課題を克服するには、例えば100Mbという広大な領域の全塩基配列を解析し、そこに存在する多様性(variants)をすべて同定し、その中から病因遺伝子を解明していく必要がある。

一方、孤発性疾患については、大規模ゲノム配列解析に基づいてすべてのvariantsを同定する技術を確立し、疾患発症に関与するvariantsを決定、病態機序を解明するというパラダイムシフトが求められている。

このように、現在直面している困難な課題を克服するためには、ゲノム上の特定の広大な領域、さらには、全ゲノムを対象として、高精度のゲノム配列情報を取得し、疾患の病態に大きく影響を与えるvariantsを網羅的に同定することが必須のものとなってきている。

次世代シーケンサーから産出される塩基配列の特性として、100塩基対以下のshort readが膨大な数産生される。これらの膨大な数のshort readから、全ゲノム配列をアセンブルし、そこに存在する多様性(1塩基置換から挿入、欠失、コピー数変化までを含む)を高精度に見つけ出すこと、さらには、見いだされた多様性について、機能的な影響を解釈する技術など、ゲノムインフォマティクス研究の発展が必須のものとなる。シーケンサー技術が発展途上のため高精度(errorを含まない)のゲノム多様性の同定自体がまだ十分ではない。さらには、見いだされた多様性についての機能的解釈技術は未確立である。従って、これらの多様性の中で生物学、医学的に意味のある多様性を抽出するためのインフォマティクス研究を推し進め、配列の種類保存性、機能ドメインの解析からシステムズバイオロジーまで幅広い研究を展開していく。

### 3. 研究の方法

家族性発症する疾患（家族性筋萎縮性側索硬化症，家族性認知症性疾患，家族性多系統萎縮症，家族性痙性対麻痺，家族性脊髄小脳変性症など）については，申請者が開発したハイスループット連鎖解析システム（BMC Bioinformatics 2009）による候補領域の絞り込みとパーソナルゲノム解析を統合した効率の高い病因遺伝子の同定を進めた．孤発性疾患（パーキンソン病，多系統萎縮症など）においては，effect size の大きいゲノム上の variants が存在する場合，多発家系が生じやすいという観点から，多発家系に集中した，連鎖解析と全ゲノム配列を駆使した病因遺伝子の同定，さらに，見出した遺伝子について，孤発性疾患患者と健常者を対象にした関連解析を統合的に進めるアプローチを重点的に行った．

### 4. 研究成果

本研究で得られた主な成果としては，遺伝性神経疾患については，近位筋優位型遺伝性運動感覚ニューロパチー（Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement, HMSN-P），家族性筋萎縮性側索硬化症（ALS19）の病因遺伝子の発見，孤発性神経疾患については，多系統萎縮症の疾患感受性遺伝子として，*COQ2*，*GBA* の発見をあげることができる．

近位筋優位型遺伝性運動感覚ニューロパチー（Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement, HMSN-P）は，わが国で発見されその疾患概念が確立された疾患である．HMSN-P は，常染色体優性遺伝性で，連鎖解析により候補遺伝子領域（第3染色体長腕）を決定した．そして，次世代シーケンサーを用いた exome 配列解析を行い，領域内で見出された single nucleotide variations を詳細に解析した結果，病因遺伝子が *TFG* (TRK-fused gene) であることを明らかにした．4家系で同一の変異が見出されたが，詳細なハプロタイプの解析から，2つの創始者ハプロタイプが観察され，independent に生じた変異であると考えられた．発症者の剖検組織の解析から，*TFG* の封入体が運動神経細胞の細胞質に観察されること，さらに，TDP-43 の細胞質への mislocalization が観察され，運動ニューロンの変性過程に置いては，筋萎縮性側鎖抗硬化症の病態と共通するところがあることを解明した (*Am J Hum Genet* 2012) ．

家族性筋萎縮性側索硬化症の病因遺伝子については，常染色体優性遺伝が考えられる1家系について，SNP typing に基づき連鎖解析を施行し，発症者2名および1名の比発症者について，全ゲノム配列解析を実施した．完全浸透率を想定した場合，候補領域に病原性と考えられる変異を見いだせず，浸透率を下げた連鎖奇跡を実施し，候補領域を広げた．この候補領域内に，発症者に共通し，病原性

が高いと考えられる変異が *ERBB4* 遺伝子に見いだされた．さらに，国内外の多施設共同研究により，稀ではあるものの，*ERBB4* 遺伝子の変異を有する家系が人種を越えて存在すること，孤発性 ALS の中でも de novo 変異（両親に存在せず，本人に突然変異で新たに生じた変異）を有する例が存在することを明らかにした．*ERBB4* 遺伝子によって作られる ErbB4 蛋白質は受容体型チロシンリン酸化酵素であり，神経栄養因子であるニューレギュリン (NRG) に刺激されると自己リン酸化されることでその機能を発揮する．変異した *ERBB4* 遺伝子を導入した細胞では，ErbB4 の自己リン酸化能の低下が認められ，ErbB4 の機能低下が ALS の原因となることが明らかになった．この結果より，NRG のような神経栄養因子により ErbB4 を活性化することが，ALS の根本的な治療につながる可能性が示された (*Am J Hum Genet* 2013) ．

孤発性疾患については，新たな研究パラダイムとして，common disease-multiple rare variants 仮説に立つアプローチが重要になってきているが，rare variants を用いる場合，十分な統計学的な検出力を達成しにくいという課題があり，その解決に向けての検討を進めた．疾患発症に対する effect size が大きい場合には，多発家系が観察されやすくなるという仮説に立ち，多系統萎縮症の多発家系に集中した解析を行い，6家系中2家系で，発症者に *COQ2* 遺伝子の biallelic mutation が存在する事を見出した．さらに，*COQ2* のヘテロ接合性変異が，孤発性多系統萎縮症のリスクアレルであることを発見した (*New Engl. J. Med.* 2013) ．*COQ2* は，coenzyme Q10 合成系の酵素をコードしていることから，Coenzyme Q10 合成の障害が，多系統萎縮症の発症の分子病態機序として作用していると考えられる．この研究成果に基づき，coenzyme Q10 の大量補充による多系統萎縮症の治験へと発展しつつある．さらに，多系統萎縮症はパーキンソン病とともに， $\alpha$ -synulcein の凝集が病態に関与している可能性が想定されており，候補遺伝子アプローチに基づき，*GBA* 遺伝子がパーキンソン病だけでなく多系統萎縮症においても疾患感受性遺伝子であることを発見した (*Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2014) などの成果が得られた．

以上，本研究では，次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム配列解析により，遺伝性神経疾患の病因遺伝子 (*TFG*，*ERBB4*) の発見，孤発性神経疾患の疾患感受性遺伝子 (*COQ2*，*GBA*) を発見することができ，網羅的なゲノム配列解析にもとづく，遺伝性疾患，孤発性疾患の発症に関わる遺伝子発見に対する新しい研究パラダイムの有効性を証明した．さらに，多系統萎縮症の疾患感受性遺伝子 *COQ2* の発見の成果は，医師主導治験の実施へと発展しており，トランスレーショナルリサーチの点でも大きな成果をあげた．

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 11 件)

1. Hashimoto Maeda M, Mitsui J, Soong B-W, Takahashi Y, Ishiura H, Hayashi S, Shirota Y, Ichikawa Y, Matsumoto H, Arai M, Okamoto T, Miyama S, Shimizu J, Inazawa J, Goto J and Tsuji S. Increased gene dosage of myelin protein zero causes Charcot-Marie-Tooth disease. **Ann Neurol** 71:84-92, 2012 査読有
2. Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ranum LPW, Tamaoki T, Ichikawa Y, Date H, Goto J and Tsuji S. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. **Arch Neurol** 69:1154-8, 2012 査読有
3. Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S and Goto J. Mutational Analysis of Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis with OPTN Mutations in Japanese Population. **Amyotrophic Lateral Sclerosis** 13: 562-566, 2012. 査読有
4. Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Higasa K, Yoshimura J, Saito TL, Ahsan B, Takahashi Y, Goto J, Iwata A, Niimi Y, Riku Y, Goto Y, Mano K, Yoshida M, Morishita M and Tsuji S. CSF1R mutations identified in three families with autosomal dominantly inherited leukoencephalopathy. **Am J Med Genet Neuropsych Genet** 159B:951-7, 2012. 査読有
5. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabeb O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa N, Kaji R and Tsuji S. The TRK-fused gene Is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. **Am J Hum Genet** 91: 320-329, 2012. 査読有
6. Tsuji S. Neurogenomics view of neurological diseases. **JAMA Neurol** 70:689-94, 2013. 査読有 Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, Tateyama M, Yaginuma C, Sato H, Hayasaka M, Sugawara H, Ito M, Abe-Kondo E, Shimakura N, Ibi T, Kuru S, Wakayama T, Sobue G, Fujii N, Saito T, Matsumura T, Funakawa I, Mukai, E, Kawanami T, Morita M, Yamazaki M, Hasegawa T, Shimizu J, Tsuji S, Kuzuhara S, Tanaka H, Yoshioka M, Konno H, Onodera H and Itoyama Y. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. **J Neurol Neurosurg Psych** 84:433-40, 2013. 査読有
7. Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H, Kanazawa I, Doi K, Yoshimura J, Morishita S, Goto J and Tsuji S. Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. **J Neurol Sci** 331:158-60, 2013. 査読有
8. Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee V M-Y, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Ozelius L, Foroud T and Tsuji S. Mutations of COQ2 in familial and sporadic multiple system atrophy. **New Engl J Med** 369:233-44, 2013. 査読有
9. Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa N, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G, JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown, Jr. RH, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J and Tsuji S. ERBB4 Mutations that Disrupt the Neuregulin-ErbB4 Pathway Cause Amyotrophic Lateral

- Sclerosis Type 19. **Am J Hum Genet** 93:900-5, 2013. 査読有
10. Koh K, Ishiura H, Miwa M, Doi K, Yoshimura J, Mitsui J, Goto J, Morishita S, Tsuji S and Takiyama Y. Exome sequencing shows a novel *de novo* mutation in ATL1. **Neurol Clin Neurosci** 2: 1-4, 2014. DOI: 10.1111/ncn3.72. 査読有
11. Mitsui J, Matsukawa T, Sasaki H, Yabe I, Matsushima M, Dürr A, Brice A, Takashima H, Kikuchi A, Aoki M, Ishiura H, Yasuda T, Date H, Ahsan B, Iwata A, Goto J, Ichikawa Y, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Tanner CM, Kukull WA, Stern MB, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Ozelius LJ, Foroud T, and Tsuji S. Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. **Ann Clin Transl Neurol** 2: 417-426, 2015. DOI: 10.1002/acn3.185. 査読有

〔産業財産権〕  
出願状況（計2件）

産業財産権の名称：「筋萎縮性側索硬化症の新規病因遺伝子」

発明者：辻省次、高橋祐二

権利者：辻省次、高橋祐二

産業財産権の種類、番号：特許 特願P13-0067

出願年月日：2013年8月2日

国内・外国の別：外国

産業財産権の名称：「多系統萎縮症リスクの検査方法、検査キット、及び多系統萎縮症の治療又は予防薬」

発明者：辻省次、三井純

権利者：辻省次、三井純

産業財産権の種類、番号：

PCT/JP2014/052658

出願年月日：2014年5月2日

国内・外国の別：外国

6. 研究組織

研究代表者 辻 省次 (Shoji Tsuji)

東京大学医学部附属病院・教授

研究者番号：70150612