

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

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：22129004

研究課題名(和文) パーソナルゲノムの高次構造に基づくアルツハイマー病発症病態の解析

研究課題名(英文) Personal genome analysis on Alzheimer's disease

研究代表者

桑野 良三 (Kuwano, Ryozo)

新潟大学・脳研究所・フェロー

研究者番号：20111734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 96,800,000円

研究成果の概要(和文)：双子研究および罹患同胞相対危険率($s=5.0$)から、アルツハイマー病は遺伝的危険因子が関与すると考えられる。SNPベースの全ゲノム相関解析が精力的に行われたが、リスクSNPの効果は小さく家系を基盤とするゲノム解析の重要性が見直された。次世代シーケンサーは、家族内多発家系の稀な変異を検出する新しい解析手段として有効であった。次にエクソンアレイ法や次世代シーケンサーを用いて、老人斑と神経原線維変化を指標に病理診断されたヒト凍結脳における遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現制御の解明にむけて、染色体上離れた遺伝子間相互作用またはマイクロRNAを含む非翻訳RNAの機能を取り入れるべきであろう。

研究成果の概要(英文)：Twin studies and $s (=5.0)$ of Alzheimer's disease indicate that genetic risk factors are thought to contribute the development and progression. SNP-based genome-wide association studies have been intensively done. As the most of risk SNPs identified are only small effect on the disease, the family-based genome analysis has been re-evaluated. The next generation sequencing proved to be a new powerful tool to determine rare variants in patients with family history. In addition to genome sequencing, we performed gene expression analysis of human brains diagnosed as to senile plaques and neurofibrillary tangles by the exon-array and next generation sequencing. It should be innovated the possible mechanism that gene expression is regulated by a gene-gene cluster between distal regions on the same chromosome or on a different chromosome, and alternatively by non-coding RNA including microRNA.

研究分野：神経分子遺伝学

キーワード：アルツハイマー病 パーソナルゲノム 次世代シーケンス 脳組織 遺伝子発現 家族内発症 変異

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化に伴ってアルツハイマー病の有病率罹患率共に急激に上昇している。生活環境の変化に加えて、双子研究による遺伝率が58~70%と見積もられ、また罹患同胞相対危険率(S)が4~5と計算されることから、アルツハイマー病発症に遺伝素因の関与が強く示唆されている。2000年以降、アルツハイマー病の国際的な大規模 GWAS (Genome-wide association study) にもかかわらず、オッズ比が2を超える疾患関連遺伝子は見出せていない。Common disease common variants 仮説に基づいて、比較的頻度の高い SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を選んで100万カ所程度用いたためと考えられ、より頻度が低い多数の変異を検出することが必要となった。Common disease rare variants 仮説が提唱され始めた。ちょうどその時期に次世代シーケンサーが開発され、rare variants の解析が可能になった。

(2) GWAS で同定される疾患関連遺伝子のほとんどがイントロンまたは遺伝子間にある。この非翻訳領域にあるリスク領域の機能の理解が困難であった。解決策の一つとして、次世代シーケンサーを使った新しい染色体高次構造解析の技術開発が報告された。

2. 研究の目的

(1) パーソナルゲノム解析: 遺伝要因が強いと考えられる家族内多発家系または同胞発症を対象として、次世代シーケンサーを用いて rare variants、CNV、in/del 等の包括的全ゲノム情報を取得する。得られた大規模シーケンシングデータを領域内の高度な情報学と共同して、アルツハイマー病の疾患関連遺伝子を同定する。家系をベースとしたゲノム解析の成果を孤発性アルツハイマー病に拡大する。

(2) 脳組織における発現解析: 神経病理学的に診断された凍結脳を用いて、アルツハイマー病の2大特徴である老人斑と神経原線維変化の拡大・進行度を反映する遺伝子発現変化を解析する。これによって発症と進行過程に関わる分子群の同定をめざす。(1)のパーソナルゲノム解析で同定した遺伝子との関連性を明らかにする。

(3) ゲノム高次構造解析: イントロンや遺伝子間に同定されるリスク領域の意義を明らかにするために、DNAメチル化状態ならびに染色体上離れたゲノム間相互作用を明らかにする。このゲノム高次構造に基づく遺伝子発現変動遺伝子を同定し、アルツハイマー病の発症と進行を理解する。

3. 研究の方法

(1) パーソナルゲノム解析: 遺伝的要因が強い若年発症の多発家系および同胞発症例について末梢血 DNA を用いてエクソーム・全

ゲノムシーケンシングを行う。

エクソーム解析: 約 38Mb の全エクソンを選択的にキャプチャーしてゲノムを濃縮し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を解析する。

全ゲノムシーケンシング: エクソン以外の領域に関しては、主として同一家族内に複数発症者と非発症者の研究協力者がいる場合に全ゲノムシーケンシングを行う。

得られる膨大なゲノム情報について、公開データベースを参照しながらインフォマティクス研究グループと共有して解析を加速し、発症者に特有の low variant ~ rare variant 変異を探索・同定する。これらの成果を孤発性アルツハイマー病に拡大して検証を進める。

(2) 発現解析: 絞り込んだアルツハイマー病リスク遺伝子について凍結脳を用いて、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 法または real time RT-PCR 法によって脳組織内 mRNA 発現量解析をおこなう。また、脳内局在に関しては免疫組織化学的に検証する。同時に、非翻訳 RNA 解析としてマイクロ RNA を中心に次世代シーケンサーで網羅的に発現変動する低分子 RNA 情報を取得する。

(3) ゲノム高次構造解析: 得られたアルツハイマー病関連エクソンを含む遺伝子の発現調節を解明するために、凍結脳を用いてその遺伝子近傍のメチル化解析を行う。1回の反応で 600bp 内にあるメチル化/非メチル化 CpG を読み取りプロモーター領域のメチル化状態を検出する。高度な情報学を駆使して、染色体上のシスまたはトランスの位置関係にある遺伝子間相互作用およびアルツハイマー病脳における発現変動遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) GWAS: 日本人における大規模 GWAS の結果、リスク遺伝子 *SORL1* を見出した。欧米人および韓国人のデータを加えてメタ解析を行い、民族共通のリスクであることが確認できた。

(2) 家族性原因遺伝子: 新規 rare variants 探索の前に、研究対象となる家系に常染色体優性遺伝形式の家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である *APP*、*PSEN1*、*PSEN2* に変異があるかを調べた。これと並行して、国内の学会や地方会で報告された日本人の家族性アルツハイマー病原因遺伝子を調査・集計し、ホームページに公開した。

JFAD (Japanese Familial Alzheimer's Disease Database)

(3) 新規 rare variants 解析: 次世代シーケンサーの技術開発として、DNA量、DNA断片化などの前処理、増幅効率、回収率、工

クソンキャプチャーの効率等、基礎条件の検討をし、実際の検体を使ってシーケンズを行った。出力されるデータの品質チェック、公開データの既知配列と比較を行い、シーケンズの精度を確認した。1ランで50億~100億塩基リードする解析技術が定着できたので、同一家系内で複数発症例についてパーソナルゲノムシーケンズを行い、3家系の発症者だけに共通する遺伝子を1つ同定できた。アルツハイマー病と正常対照群合わせて約5000例で確認したところ、新規 rare variant であるが、その頻度は正常対照群も同じであった。偶然3家系の発症者だけが保有して非発症者にはその変異が無かったと思われる。罹患同胞対解析について、連鎖解析およびエクソーム解析は領域内の協力を得て進行中である。

(4) 遺伝子発現解析：神経病理学の分担研究者ならびにブレインバンクからヒト凍結脳組織の提供を受けた。剖検時に神経病理学的に Braak 分類された凍結脳から高品質の RNA を抽出し、エクソアレイと次世代シーケンサーによる mRNA および非翻訳低分子 RNA 情報を取得した。老人斑と神経原線維変化の拡大程度に伴う8種類の mRNA を同定した。

(5) マイクロ RNA：凍結脳組織から非翻訳低分子 RNA を調製し、次世代シーケンサーで解析した。リード数で発現量を計算し、アルツハイマー病脳病変に伴うマイクロ RNA を探索し、発現変動する mRNA との関連を調べている。

(6) ゲノム高次構造解析：脳部位が固有の機能を発揮しているのは、それぞれの細胞に特異的な遺伝子発現によると考えられる。ニューロン由来の SK-N-SH およびグリア由来の U-251MG 培養細胞をモデルに細胞特異的な染色体相互作用が存在することを見出した。イントロンや遺伝子間に転写制御領域があることが推測された。当初計画したゲノムのメチル化状態の解析は、予想以上に困難のため断念した。

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 26 件)

Kasuga K, Kikuchi M, Tokutake T, Nakaya A, Tezuka T, Tsukie T, Hara N, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T. Systematic review and meta-analysis of Japanese familial Alzheimer's disease and FTDP-17. *J Hum Genet*. 査読有、2015、印刷中、DOI: 10.1038/jhg.2015.15

Kutoku Y, Ohsawa Y, Kuwano R, Ikeuchi T, Inoue H, Ataka S, Shimada H, Mori H, Sunada Y. A second pedigree with amyloid-

less familial Alzheimer's disease harboring an identical mutation in the amyloid precursor protein gene (E693delta). *Intern Med*. 査読有、2015、54 巻、205-208. doi: 10.2169/internalmedicine.54.3021.

Miyashita A, Wen Y, Murayama S, Kakita A, Kuwano R 他 (47 人中 47 番目) Lack of genetic association between TREM2 and late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Alzheimers Dis*. 査読有、41 巻、2014、1031—1038. DOI:10.3233/JAD-140225

Miyashita A, Hatsuta H, Kikuchi M, Nakaya A, Saito Y, Tsukie T, Hara N, Ogishima S, Kitamura N, Akazawa K, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Ikeuchi T and Kuwano R. Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry* 査読有、4 巻、2014、e396. DOI: 10.1038/tp.2014.35

Jun G, Asai H, Zeldich E, Drapeau E, Chen C, Chung J, Park JH, Kim S, Haroutunian V, Foroud T, Kuwano R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Lunetta KL, Kim JW, Buxbaum JD, Mayeux R, Ikezu T, Abraham CR, and Farrer LA. PLXNA4 is associated with Alzheimer disease and modulates tau phosphorylation. *Ann Neurol*. 査読有、76 巻、2014、379-392. DOI: 10.1002/ana.24219

Konno T, Tada M, Shiga A, Tsujino A, Eguchi H, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H (2014 Oct). C9ORF72 repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS. *Neuropathol Appl Neurobiol* 査読有、2014、40 巻、783-788. DOI: 10.1111/nan.12157.

Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang LS, Schellenberg GD, Farrer LA, Kuwano R 他 (61 人中 61 番) SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PLoS One*. 査読有、8 巻、2013、e58618. DOI: 10.1371/journal.pone.0058618

Wen Y, Miyashita A, Kitamura N, Tsukie T, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Kakita A, Takahashi H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamaguchi H, Akazawa K, Ihara Y, Kuwano R. SORL1 is genetically associated with neuropathologically characterized late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 査読有、35 巻、2013、387-394. DOI: 10.3233/JAD-122395

Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, (他 68 人中 22 番目), Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl*

J Med. 査読有, 2013, 369 巻, 233-244. DOI: 10.1056/NEJMoal212115.

Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara M, Kato T, Watanabe N, Yamahira A, Kondo C, Yokoseki A, Takahashi M, Kuwano R, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Alteration of POLDIP3 splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. PLoS One. 査読有、7 巻、2012, e43120. DOI: 10.1371/journal.pone.0043120

Mizuno S, Iijima R, Ogishima S, Kikuchi M, Matsuoka Y, Ghosh S, Miyamoto T, Miyashita A, Kuwano R, Tanaka H. AlzPathway: a comprehensive map of signaling pathways of Alzheimer's disease. BMC Syst Biol. 査読有、30 巻、2012, 6:52. DOI: 10.1186/1752-0509-6-52

Ikeuchi T, Imamura T, Kawase Y, Kitade Y, Tsuchiya M, Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Tsukie T, Miyashita A, Sugishita M, Kuwano R, Nishizawa M. Evidence for a Common Founder and Clinical Characteristics of Japanese Families with the MAPT R406W Mutation. Dement Geriatr Cogn Dis Extra. 査読有、1 巻、2011, 267-275. DOI: 10.1159/000331243

〔学会発表〕(計 18 件)

原範和、菊地正隆、宮下哲典、初田裕幸、齊藤祐子、村山繁雄、赤津裕康、池内健、桑野良三。ヒト剖検脳を用いたアルツハイマー病関連マイクロRNAの解析。日本認知症学会 2014年11月29日～12月01日 横浜パシフィコ(神奈川県・横浜市)

春日健作、菊地正隆、徳武孝允、手塚敏之、月江珠緒、原範和、宮下哲典、中谷明弘、桑野良三、池内健。本邦・家族性アルツハイマー病のデータベース(JFADdb)の構築。日本認知症学会 2014年11月29日～12月01日 横浜パシフィコ(神奈川県・横浜市)

菊地正隆、長谷川舞衣、原範和、宮下哲典、中谷明弘、池内健、桑野良三。細胞特異的な遺伝子発現は染色体高次構造の影響を受けるのか? 日本分子生物学会 2014年11月25日～27日 横浜パシフィコ(神奈川県・横浜市)

Miyashita A, Kuwano R, Hatsuta H, Kikuchi M, Nakaya A, Saito Y, Tsukie T, Hara N, Ogishima S, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Ikeuchi T. Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. AAIC, 2014年07月11日～17日 コペンハーゲン(デンマーク)

長谷川舞衣、原範和、菊地正隆、宮下哲典、中谷明弘、池内健、桑野良三。細胞特異的なゲノム高次構造解析法の検討。日本分子生物学会 2013年12月3日～6日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

中谷明弘、宮下哲典、菊地正隆、長谷川舞衣、原範和、西田奈央、徳永勝土、井原康夫、池内健、桑野良三。AD/GD CNVdb:アルツハイマー病のコピー数変異データベース。日本分子生物学会 2013年12月3日～6日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

宮下哲典、温雅南、初田裕幸、村山繁雄、山口晴保、赤津裕康、柿田明美、高橋均、井原康夫、池内健、桑野良三。晩期発症型アルツハイマー病とTREM2の関連解析。日本認知症学会 2013年11月8日～10日 キッセイ文化ホール(長野県・松本市)

池内健、温雅楠、針谷康夫、宮下哲典、中谷明弘、月江珠緒、春日健作、田中晋、西澤正豊、桑野良三。家族性および早発型アルツハイマー病症例におけるAPP重複変異の探索。日本認知症学会 2013年11月8日～10日 キッセイ文化ホール(長野県・松本市)

篠遠仁、桑野良三、島田斉、平野成樹、江口洋子、高野晴成、須原哲也。アミロイド前駆体蛋白遺伝子に新規変異を認めたアルツハイマー病の1家系。日本認知症学会 2013年11月8日～10日 キッセイ文化ホール(長野県・松本市)

Miyashita A, Kuwano R, Schellenberg G, Ihara Y, Kanazawa I, Tsuji S, Yamamoto K, Tokunaga K, Nishida N, Yoshida M, Pericak-Vance M, Haines J, Mayeux R, St. George-Hyslop P, Kim JW, Takahashi S, Wang LS, Jun G, Koike A, Farrer L. SORL1 is Genetically Associated With Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians. AAIC, 2013年7月13日～18日、ボストン(アメリカ)

宮下哲典、温雅楠、月江珠緒、桑野良三。アルツハイマー病とSORL1の関連解析。日本認知症学会、2012年10月26日～28日 つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

Kuwano R, Miyashita A, Koike A, Nishida N, Tokunaga K, Yamamoto K, Ihara Y, Kim JW, Pericak-Vance M, Farrer L, Schellenberg G. Genome-wide association study of Alzheimer's disease: a collaborative genetic study on Alzheimer's disease with Japan, Korea and the Alzheimer's Disease Genetics Consortium. AAIC, 2012年7月14日～19日 バンクーバー(カナダ)

Miyashita A, Saito Y, Hatsuta H, Tsukie T, Nakaya A, Murayama S, Ihara Y, Kuwano R. Gene expression analysis in the postmortem brains classified by Braak NFT-SP staging. AAIC, 2011年7月16日～21日 パリ(フランス)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://alzdb.bri.niigata-u.ac.jp>

日本人の家族性アルツハイマー病のデータベースを公開 (JFAD: Japanese Familiar Alzheimer ' s Disease Database)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 良三 (KUWANO, Ryozo)
新潟大学・脳研究所・フェロー
研究者番号：20111734

(2) 研究分担者

柿田 明美 (KAKITA, Akiyoshi)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：80281012

(3) 連携研究者

宮下 哲典 (MIYASHITA, Akinori)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：60323995