

令和元年6月24日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09700

研究課題名（和文）神経変性疾患におけるCHCHD2遺伝子の関連解明

研究課題名（英文）Mutational analysis of the CHCHD2 gene in neurodegenerative diseases

研究代表者

李元哲（Li, Yuanzhe）

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・特任助教

研究者番号：40549292

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：我々は最近、高齢発症優性遺伝性PDの新規原因遺伝子としてCHCHD2遺伝子を単離した。本研究は筋萎縮性側索硬化症(ALS) 944例について、CHCHD2遺伝子のシーケンス解析を実施した。CHCHD2遺伝子のシーケンス解析を実施した結果、1つの新規バリエーションと3つの既報バリエーションを同定した。検出された3つのバリエーションについてヒト遺伝子公共データベースのアレル頻度と比較し統計学的解析を行った結果、有意な相関は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHCHD2はさまざまな疾患の関連が示唆されているものの、ゲノム解析からアプローチした報告は不十分である。本研究ではこれまで全く研究報告のないミトコンドリア機能低下が病態に重要であると指摘されているALSについて大規模のゲノム解析を行った。カスタムパネルの作成より構築されたパーキンソン病関連遺伝子を網羅的に解析できるシステムはパーキンソン病の臨床-ゲノムデータベースの基盤となるゲノム情報蓄積に非常に有用である。

研究成果の概要（英文）：We recently identified mutations in the coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2) gene in Japanese families with autosomal dominant Parkinson's disease. We obtained 944 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients from Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research. The CHCHD2 gene was assessed in these patients by Sanger sequence. And we screened for variants and evaluated allele frequency. We referred allele frequency of control subjects in Human Genetic Variation Database to compare with that of ALS. We found four variants on the CHCHD2 region in ALS patients. We identified one novel variant in untranslated region and three variants that had been previously reported. Allele frequencies of three variants did not differ between ALS patients and control subjects.

研究分野：臨床神経分子遺伝学

キーワード：CHCHD2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は静止時振戦・筋固縮・無動症・姿勢反射障害などを呈する神経難病で、現在日本には約 16 万人の患者が存在する。PD の第 1 の発症リスクは加齢であり、60 歳以上の 100 人に 1 人が PD を発症すると推定されており、超高齢化社会へ突入しつつある日本では早急に克服しなければならない疾病の 1 つである。PD は中脳黒質のドーパミン産生神経細胞が選択的に変性することで発症し、残存神経細胞にレビー小体と言われる封入体が観察される。ドーパミン産生神経細胞選択的細胞死の原因やメカニズムは不明であるが、これまでの研究の結果ミトコンドリア機能障害が大きなイベントのひとつであることが指摘されている。PD はほとんどが孤発性だが全患者の 5-10%には家族歴がある。このような遺伝性 PD を対象に分子遺伝学研究を行った結果、PD 発症に関わるさまざまな遺伝子が単離されている。

我々は最近、高齢発症優性遺伝性 PD の新規原因遺伝子として

coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2) を単離した (LANCET Neurology, 2015)。現在までに 4 家系の日本人優性遺伝性 PD から病的遺伝子変異が同定されており、世界中で変異解析が活発に行われている。また、CHCHD2 遺伝子上にある 2 つの SNPs が孤発性 PD の発症リスクとなることも明らかになっている (LANCET Neurology, 2015)。さらに、最近我々のグループは、CHCHD2 遺伝子変異陽性患者 1 例の病理検体を得て、検討した結果、脳幹、辺縁系、帯状回、大脳新皮質に多数のレビー小体やレビー neuritis を認めた。広範囲にレビー小体の出現を呈している像は、PD ではなくむしろレビー小体型認知症 (DLB) に類似するものであった (未発表データ、論文投稿準備中)。CHCHD2 はミトコンドリア複合体膜間腔に局在し、ミトコンドリア複合体 IV の活性調節を担っていることが示唆され、長年指摘されてきた PD とミトコンドリアを直接つなぐ初めての分子として、PD の病態生理解明や新規治療薬の標的として注目されている。

一方、CHCHD2 はハンチントン病患者由来神経幹細胞や低酸素負荷後の培養細胞で発現量が増加し (Hum Mol Genet, 2012, Nucl Acids Res, 2013)、骨肉腫細胞ではアポトーシスを調節し (Cell Death Differ, 2014)、滑脳症患者由来 iPS 細胞から分化させた神経細胞では発現量が低下している (Genomics, 2015) などの報告があり、CHCHD2 はさまざまな疾患に関与している可能性が非常に高い。しかしながら現在、CHCHD2 の遺伝学的意義が明らかになっている疾患は我々が発見した PD のみで、上述したような疾患やその他の神経変性疾患ではまったく検討されていない。

### 2. 研究の目的

新規優性遺伝性パーキンソン病 (PD) 原因遺伝子 CHCHD2 は家族性パーキンソン病の原因であるだけでなく、孤発性 PD の発症感受性遺伝子でもある。CHCHD2 はハンチントン病、低酸素負荷 (脳血管障害)、がん、滑脳症などさまざまな疾患で発現量の変化が報告されているが、ゲノムのアプローチから疾患を解析した例は我々が発表した PD に関する報告のみである。本研究では CHCHD2 と神経変性疾患のゲノムの関連を明らかにする目的で、筋萎縮側索硬化症パーキンソン病について大規模ゲノム解析を実施する。

### 3. 研究の方法

パーキンソン病 (PD) 800 例、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 944 例について、CHCHD2 遺伝子のシーケンス解析を実施する。自家コントロール 835 例の配列データと各疾患の配列データを比べ、CHCHD2 遺伝子多様性と各疾患の関連を統計学的に比較し明らかにする。in silico 解析によってバリエーションによるタンパク質の病的影響が予測されるか否かを検討した。

	Patients with ALS (N=944)	In-house control (N=559)	JaCALS control (N=276)	Patients with PD (N=800)
Gender (male, female)	578, 366	217, 342	105, 171	418, 382
Age at sampling (mean $\pm$ SD, range)	61.30 $\pm$ 11.66 (20-89)	58.74 $\pm$ 11.72 (28-89)	61.17 $\pm$ 10.38 (26-84)	49.7 $\pm$ 14.8 (16-88)

#### (1) サンガー法シーケンス解析

CHCHD2 の各エクソンを特異的に増幅するプライマーは既報の配列を使用した。サンガー法シーケンス解析は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) 及び 3130 Genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific) を用いて塩基配列決定を行った。

#### (2) Amplicon Sequence 解析

ターゲットシーケンシングのためにカスタムパネルを作成した。Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) 次世代シーケンサーシステムを使用し効率的かつ低コストで高精度の遺伝情報を取得した。また、Ion Chef, Ion GeneStudio S5, Ion Reporter の連携運用によりライブラリ作成からプレート作成およびデータ解析まで全自動で行うシステムを構築した。

### (3) バイオインフォマティクス解析

検出したバリエーションについて 公共データベース (1000 Genomes, dbSNP138, Human Genetic Variation Database, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Exome Sequencing Project (ESP) 等) にその多様性が登録されているか否かを確認した。(2) Polyphen2, MutationTaster, SIFT 等をもちいて多様性による CHCHD2 タンパク質の病的影響が予測されるか否かを確認した。(3) ホモロジー検索による異種間のアミノ酸保存性を解析した。バリエーションについては患者群と対象群でアレル頻度を比較し、疾患との関与を統計学的に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 筋萎縮性側索硬化症について CHCHD2 遺伝子の解析の結果。

筋萎縮性側索硬化症 944 例、正常対照群 835 名について、CHCHD2 遺伝子のシーケンス解析を実施した。結果、正常対照群では認めず、データベースに登録のない 2 つの rare variant をそれぞれ 1 例ずつ同定した。そのうち一例は典型的な孤発型 ALS であり、明らかなパーキンソンニズムや認知症はなく、病理診断では ALS TAR DNA binding protein(TDP)43 proteinopathy, Alzheimer's disease, Lewy body disease(Braak staging 3) であった。凍結脳での CHCHD2 発現解析の結果、mRNA レベル、タンパクレベル共に著明に低下していた。また、ALS 944 例において 3 つの既報バリエーションを同定した。検出された 3 つのバリエーションについて統計学的解析を行った結果、顕著な差は認められず有意な相関は認められなかった。

	Detected variants			Minor allele frequencies		ALS vs. controls	
	cDNA	Amino acid	rs number	ALS (N=944)	Control (N=835)	OR (95% CI)	P value
chr7:56174115	-9T>G	5' UTR	rs10043	0.041	0.027	1.55 (1.07-2.26)	0.0192
chr7:56174102	5C>T	Pro2Leu	rs142444896	0.013	0.008	1.65 (0.86-3.17)	0.128
chr7:56169419	*125G>A	3' UTR	rs8406	0.019	0.031	0.61 (0.39-0.93)	0.021

### (2) ハイスループット遺伝子解析法を構築。

Thermo Fisher Scientific 社の次世代シーケンサープラットフォームを用いてパーキンソン病関連遺伝子パネルを独自で開発した。次世代シーケンサー難読領域をサンガー法で補完することで 100%のカバー率のハイスループット遺伝子解析法を構築した。Ion Torrent システムを用いた次世代シーケンス解析の結果、On Target Rate (=目的遺伝子の全配列に対する解読率) は 99%以上、Mean Depth (=1塩基あたりの平均解読数) が 2000 以上の良好なデータが得られた。パーキンソン病について Ion Torrent システムを用いて CHCHD2 を含むパーキンソン病関連遺伝子を網羅的に解析した結果数多くのパーキンソン病患者特有のレアバリエーションが検出された。レアバリエーション検出率は病的遺伝子変異陽性頻度の高い一部の遺伝子領域のみを解析したサンガー法による従来法と比較して倍以上の成績であり約半数の PD 患者でレアバリエーションが検出された。

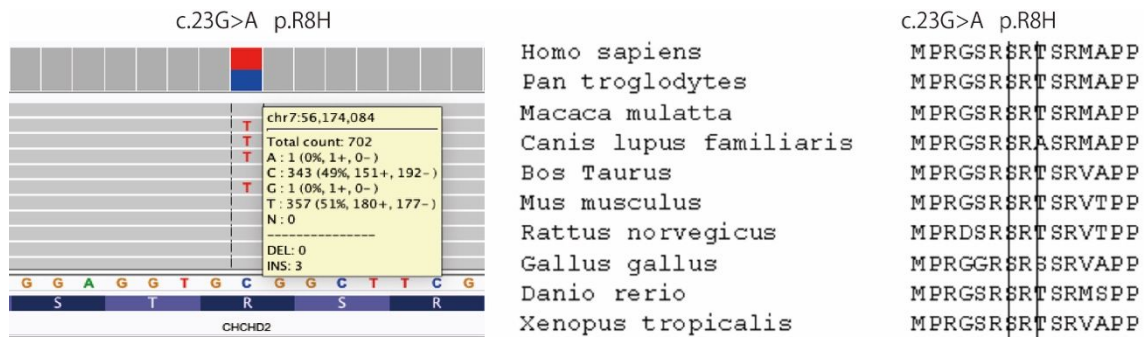
### (3) パーキンソン病について CHCHD2 遺伝子の解析の結果。

PD800 例において CHCHD2 遺伝子解析の結果 3 つの既報バリエーションを同定した。検出された 3 つのバリエーションについて統計学的解析を行った結果、2 つのバリエーションが PD 群で明らかに多く検出され、有意な相関が認められた。このバリエーションを持っていると持っていない人に比べて 1.7 倍パーキンソン病を発症しやすいことが判明した。また、2 つのバリエーションを同時に持っている患者が多いことから 2 つのバリエーションが連鎖していることが示唆された。

	Detected variants			Minor allele frequencies		PD vs. controls	
	cDNA	Amino acid	rs number	PD (N=800)	Control (N=835)	OR (95% CI)	P value
chr7:56174115	-9T>G	5' UTR	rs10043	0.046	0.027	1.75 (1.02-2.55)	0.0043
chr7:56174102	5C>T	Pro2Leu	rs142444896	0.011	0.008	1.27 (0.62-2.58)	0.6307
chr7:56169419	*125G>A	3' UTR	rs8406	0.052	0.031	1.70 (1.19-2.42)	0.0038

### (3) CHCHD2 変異を 2 例検知した

パーキンソン病 800 例について CHCHD2 遺伝子の配列解析を実施した結果、正常対照群では認めず、データベースに登録のない c.23G>A(p.R8H) を 2 例において同定した。ホモロジー検索により置換されたアミノ酸は種をこえて高度に保存されており、Polyphen2, SIFT 等をもちいた解析の結果 CHCHD2 タンパク質に病的影響が予測された。本研究結果の 1 例については既に論文発表を済ませた。



(4) 変異スクリーニングを実施中に GCH1 変異陽性例を見出し、解析結果について報告した。また、パーキンソン病においてヘテロ接合体の ARSA 遺伝子変異を見出した。解析結果によりヘテロ接合体の ARSA 遺伝子変異がパーキンソン病の発症リスクになり得ることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 21 件)

1. Takanashi M, Funayama M, Matsuura E, Yoshino H, Li Y, Tsuyama S, Takashima H, Nishioka K, Hattori N. Isolated nigral degeneration without pathological protein aggregation in autopsied brains with LRRK2 p.R1441H homozygous and heterozygous mutations. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Oct 17;6(1):105.
2. Yoshino H, Nishioka K, Li Y, Oji Y, Oyama G, Hatano T, Machida Y, Shimo Y, Hayashida A, Ikeda A, Mogushi K, Shibagaki Y, Hosaka A, Iwanaga H, Fujitake J, Ohi T, Miyazaki D, Sekijima Y, Oki M, Kusaka H, Fujimoto KI, Ugawa Y, Funayama M, Hattori N: GCH1 mutations in dopa-responsive dystonia and Parkinson's disease. *J Neurol.* 2018 Aug;265(8):1860-1870.
3. Tohnai G, Nakamura R, Sone J, Nakatochi M, Yokoi D, Katsuno M, Watanabe H, Watanabe H, Ito M, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Onodera O, Naruse H, Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Ishiura H, Morishita S, Yoshimura J, Doi K, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Atsuta N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS): Frequency and characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2018 Apr;64:158.e15-158.e19.
4. Ikeda A, Matsushima T, Daida K, Nakajima S, Conedera S, Li Y, Yoshino H, Oyama G, Funayama M, Nishioka K, Hattori N: A novel mutation of CHCHD2 p.R8H in a sporadic case of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2017 Jan;34:66-68.
5. Takanashi M, Li Y, Hattori N: Absence of Lewy pathology associated with PINK1 homozygous mutation. *Neurology.* 2016 Jun 7;86(23):2212-3.

[学会発表](計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：池田 彩

ローマ字氏名：IKEDA, aya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。