

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17019006

研究課題名（和文） ゲノム解析を基盤とした神経疾患の病因・病態機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanisms of neurological diseases based on genome analysis

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：7015012

研究成果の概要（和文）：

本研究は、大規模ゲノム解析に基づき、遺伝性及び孤発性神経疾患の病因遺伝子及び病態機序の解明を進め、疾患の予防や治療に向けて結び付けていくことを目的とした。単一遺伝子疾患から多因子疾患まで幅広く研究対象として研究を進めた。単一遺伝子疾患家系、多発家系に対して、DNA microarray を用いたハイスループット連鎖解析システムを構築し多くの疾患の研究に応用した。単一遺伝子疾患については、cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL) の病因遺伝子の同定を達成した。多因子疾患については、パーキンソン病について、オッズ比の非常に高い疾患感受性遺伝子を同定し、common disease-multiple rare variants 仮説へのパラダイムシフトの重要性を提唱した。

研究成果の概要（英文）：

This study has focused on elucidation of molecular mechanisms of neurological diseases based on genome analysis, and, eventually, to develop disease-modifying therapy for neurological diseases. This study focused on the broad range of neurological diseases ranging from single gene diseases to polygenic diseases. To facilitate the linkage study for familial diseases, a high throughput linkage analysis system (SNP HiTLink) employing SNP microarrays has been developed and applied for many diseases. Regarding single gene diseases, we have discovered the causative gene for cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL). For sporadic diseases, we have identified a strong disease susceptibility gene for Parkinson disease. The result emphasizes the paradigm shift from common disease-common variants hypothesis to common disease-multiple rare variants hypothesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	223,700,000	0	223,700,000
平成18年度	163,400,000	0	163,400,000
平成19年度	161,400,000	0	161,700,000
平成20年度	166,200,000	0	166,200,000

平成21年度	156,400,000	0	156,400,000
総計	871,400,000	0	871,400,000

研究分野：ゲノム医科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：ゲノム、脳神経疾患、遺伝子、遺伝学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム配列の解読を受け、ゲノム多様性が疾患発症にどのように関連するかを明らかにすることが課題となった。単一遺伝子疾患に対しては、家系を用いた連鎖解析により候補遺伝子領域を絞り込み病因遺伝子を解明するポジショナルクローニングの手法が重要である。頻度の高い孤発性疾患については、**common disease-common variants** 仮説に立った、全ゲノム関連解析により疾患感受性遺伝子を明らかにする。また、このようなゲノム医科学研究の成果を臨床に応用していくことが求められている。

2. 研究の目的

本研究では、大規模ゲノム解析に基づき、遺伝性及び孤発性神経疾患の病因遺伝子及び病態機序の解明を進め、その成果を、疾患の予防や治療に向けて結び付けていくことを目的とした。対象とする疾患は、単一遺伝子疾患から多因子疾患まで幅広いスペクトルを考慮に入れて研究を進めた。

単一遺伝子疾患に対しては、連鎖解析が重要な位置を占めることから、ハイスループットの連鎖解析システムが必須のものとなる。これを実現するために、SNP解析用のDNA microarrayを用いて、ハイスループットに連鎖解析が実施できるシステムの構築を目指す。病因遺伝子のポジショナルクローニングについては、候補遺伝子領域を連鎖解析による効率よく絞り込み、候補領域についてはハイスループットリシーケンシングを適用して、病因遺伝子の解明を目指した。

多因子疾患については、多系統萎縮症、パーキンソン病などを対象として、大規模の研究リソース基盤の構築を行い、これを基板として、全ゲノム関連解析を適用して、疾患感受性遺伝子の同定を目指した。

ゲノム医学研究の成果を診療に応用するために、**resequence microarray** やアレイ CGH 解析システムの開発を行い、診療への応用を

目指した。

3. 研究の方法

ゲノム医学研究のリソースの収集については、多系統萎縮症、片頭痛について多施設共同研究体制を構築し、リソースの収集を行った。さらに、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、家族性の神経疾患などの研究リソースの収集を進めた。

ハイスループット連鎖解析システムは、DNA microarray による SNP 解析データを直接的にインポートして連鎖解析プログラムを稼働させるパイプラインを構築した。SNP解析の利点を最大限に生かすように、**informative** な marker を選択する機能、連鎖不平衡にある marker は排除する機能、**Mendelian inconsistency** のあるデータを排除する機能、marker 間距離を柔軟に選択できる機能などを盛り込んだ。

単一遺伝子疾患については、家族性多系統萎縮症、紀伊 ALS/PDC, **cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)** を始めとして多数の家族性神経疾患の連鎖解析、ポジショナルクローニングを進めた。

多系統萎縮症については、コンソーシアム (**JAMSAC**) を構築して、多系統萎縮症のリソース収集を進めた。全ゲノム関連解析を実施し、疾患感受性遺伝子の探索を進めた。

resequence microarray, aCGH を用いて、非常に効率がよく感度の高い遺伝子診断システムを構築し、診療への応用を進めた。

4. 研究成果

リソースの収集

多系統萎縮症、片頭痛について多施設共同研究体制を構築し、リソースの収集を行った。多系統萎縮症においては国内 21 施設とともに多施設共同研究体: **Japan multiple system atrophy consortium (JAMSAC)** を構築し、これまでに患者 225 検体、正常対照者 102 検体を収

集した。片頭痛についても、多施設共同研究「Japan Migraine Genome Investigation Consortium (J-MAGIC)」を構築し、これまでに患者検体 170 検体を収集した。また、神経変性疾患（筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、痙性対麻痺）、多発性硬化症、脳血管障害についてリソースの収集を行った。

孤発例に関するゲノムワイド関連解析

多系統萎縮症(MSA)について、約 55 万個の SNP による一次スクリーニング(MSA 検体 209 例, 正常対照者検体 220 例)に加え、追加解析検体として 2nd set(MSA 検体 174 例, 正常対照者検体 171 例)について、Illumina Human660K BeadChipR にてタイピングを行い、解析を施行した。χ² 検定の p 値における有意差の認められる SNP 数は(1st set: p < 0.05: 24,024, p < 0.01: 4,748, p < 0.001: 482, p < 0.0001: 47, 2nd set: p < 0.05: 24,516, p < 0.01: 4,945, p < 0.001: 478, p < 0.0001: 4)であった。今後更なる replication に向けて、同規模の MSA 症例の収集をしていくと共に、海外の MSA 症例を用いた replication study も並行して進めていく必要がある。

ハイスループット連鎖解析用パイプラインシステムの構築と多発家系の連鎖解析・原因遺伝子探索

SNP チップデータを直接インポートし、parametric および model-free 連鎖解析プログラムを実行可能なハイスループット連鎖解析システム (SNP-HiTLink) を構築した。本年度は、これまでに解析可能であった Affymetrix 社チップに加え、新たに Illumina 社製チップへの対応を進め、ほぼ実用化することができた。

SNP-HiTLink を用いて、常染色体劣性肢体型筋ジストロフィー、常染色体優性ネマリンミオパチー、vanishing white matter disease 家系において連鎖を認める領域内に原因遺伝子を同定することができた。

同システムを用いて、家族性筋萎縮性側索硬化症家系、家族性多系統萎縮症、遺伝性痙性対麻痺家系、脊髄小脳変性症、眼咽頭遠位型ミオパチー、脳萎縮と腸管運動障害を伴う眼咽頭型ミオパチー、網膜色素変性症を伴う後索型失調症、家族性封入体筋炎、Neuronal ceroid lipofuscinosis、先天的感覚ニューロパチー、紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソンニズム認知症複合、片頭痛、IgA 腎症、occult macular dystrophy 家系について連鎖解析を行い、それぞれ候補領域を同定した。

特に家族性筋萎縮性側索硬化症家系においては SNP による連鎖解析がマイクロサテライトによる連鎖解析と haploid cell line の解析に比して遜色ないことを示すことができ

た。

病因遺伝子同定

CARASIL については、診断された 5 家系（発症者 5 名、非発症者 6 例、全て両親の血族婚あり）に対して、全常染色体を網羅する 763 個のマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行った。その結果、10 番染色体長腕上の D10S587, D10S1656 において最大ロッドスコア (3.97, 3.59) が得られた。さらに高密度マイクロサテライトマーカーによりホモ接合性マッピングを行い、候補領域は 2.4Mb に絞られた。この領域には 17 個の既知の遺伝子が存在したが、CARASIL の臨床症状に対応する血管、皮膚、骨に発現している HtrA1 遺伝子を解析したところ、2 つのミスセンス変異 (V297M, A252T) と 2 つのナンセンス変異 (R302X, R370X) が発見された。これらの変異は正常 125 サンプルには認められず、HtrA1 が CARASIL の原因遺伝子と考えられた。次に HtrA1 はセリンプロテアーゼの一種であり、2 つのミスセンス変異がセリンプロテアーゼドメインの中に含まれていたことから、これら変異体のプロテアーゼ活性を測定したところ、V297M, A252T, R302X のプロテアーゼ活性の低下を認めた。一方、R370X 変異体ではプロテアーゼ活性低下は認めなかったが、R370X 変異を有する患者の皮膚線維芽細胞では mRNA の発現が正常の 6% に低下しており、nonsense-mediated decay によるものと考えられる。HtrA1 はプロテアーゼとして機能する他、TGF-β ファミリーのシグナル伝達を抑制することが知られている。そこで、HtrA1 変異体の TGF-β ファミリーの伝達への影響をルシフェラーゼアッセイにより調べた結果、変異体では TGF-β ファミリーへのシグナル伝達抑制が不能となっていた。また患者剖検脳では、TGF-β シグナルで発現が起る細胞外マトリックス fibronectin および versican について免疫染色を行ったところ、脳細小動脈周囲に fibronectin および versican の過剰発現が認められた。以上の結果より、CARASIL の脳細小動脈では、HtrA1 遺伝子変異により TGF-β 1 シグナル伝達への抑制効果が減弱し、TGF-β 1 シグナル伝達への亢進が起こっていると考えられている。

SCA15 については、診断された 2 家系（発症者 10 例、非発症者 5 例）に対して、マイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行った。その結果、3 番染色体短腕上の D3S1620, D3S3691 間において最大ロッドスコア 3.30 が得られた。さらに高密度マイクロサテライトマーカーにより検討したところ、1 家系において M4497-M4832 のヘテロ接合性が失われていた。その領域には、ITPR1 遺伝子と SUMF1 遺伝子が含まれていたため、

定量的 PCR 解析, アレイ CGH 解析を行ったところ ITPR1 遺伝子の全領域および隣接する SUMF1 のエクソン 1 の欠失を認めた. さらにもう 1 家系においては ITPR1 遺伝子のミスセンス変異を認めた. ITPR1 のホモ接合性ノックアウトマウスでは小脳失調と痙攣をきたし, ヘテロ接合性のマウスでは軽度の小脳失調をきたすことが知られていたが, ITPR1 のハプロ不全あるいはミスセンス変異により起こるヒトの疾患が初めて同定された.

ハイスループット遺伝子解析システムの構築と応用

マイクロアレイ・ハイスループット遺伝子解析システムを用い, 筋萎縮性側索硬化症 180 例, 遺伝性痙性対麻痺 230 例, ミトコンドリア病 20 例等の網羅的解析を行った. 遺伝性痙性対麻痺については, JASPAC (Japan Spastic Paraplegia Research Consortium) での検体についても解析を行っており, 国内最大級の遺伝子解析研究となった. Resequencing microarray, comparative genomic hybridization array, Sanger 法を効率よく組み合わせた遺伝性痙性対麻痺診断システムは非常に効率よく, また世界に類を見ないものである. 網羅的な解析により, 常染色体優性遺伝例においては約 60% で診断が可能となった. 全症例においても, 約 30% で診断をつけることができるようになり, 本邦における分子疫学の解明に寄与することができた.

また, 網羅的遺伝子解析により新規塩基置換が予想以上に多く認められる. 孤発例の筋萎縮性側索硬化症 160 例における家族性 ALS の原因遺伝子 7 遺伝子の解析において, 35 種類の塩基置換が認め, うち 20 種類(57%) は新規の塩基置換であった. 病因的と想定される変異が 11 種類同定された.

Resequencing microarray の解析には多大な困難を要したが, 支援班の支援を得て resequencing microarray の情報解析に関する新規システムを作成中である.

DNA マイクロアレイを用いた副腎白質ジストロフィーの原因及び関連遺伝子解析

日本人の副腎白質ジストロフィー (ALD) 24 例に対し, 特異的ゲノム PCR 及び DNA マイクロアレイによる遺伝子解析システムを用いて原因遺伝子 ABCD1 を解析し, 遺伝子診断を行った. また, これらの症例に加え, ABCD1 の既知変異を有し, 小児大脳型, 思春期・成人大脳型, Adrenomyeloneuropathy (AMN) のいずれかの臨床型を呈する合計 40 例において ABCD1 と相同性の高い ABCD2, ABCD3, ABCD4 を解析し, 表現型との関連を検討した. その結果 ALD 24 例全例において ABCD1 変異を同定した. また ABCD4 における完全連鎖不平衡にある 5 つの SNP は大

脳型においては control に比べ有意に頻度が高かったが, フランスの 189 症例における replication study では有意な差は認められなかった. ALD の表現型に影響を与える遺伝子の同定については, さらに大規模な症例での検討が必要と考えた.

common disease-multiple rare variant 仮説に基づくパーキンソン病に関する強い関連遺伝子の同定

パーキンソン病疾患関連候補遺伝子 GBA に対してパーキンソン病 534 例, 対照者 544 例の resequencing 解析を行い, パーキンソン病患者 534 例中 50 例 (9.4%), 対照者 544 例中 2 例 (0.37%) に変異のキャリアを認め, オッズ比 28.0 倍の強い危険因子であることを示した. さらに国際多施設共同でデータのメタ解析を行い, GBA が人種を問わずパーキンソン病の強い危険因子であることを示した. キャリア患者は有意に発症年齢が若年化しており, 認知障害の頻度が高いことを示した. さらに家族歴の頻度が有意に高く, 多発家系の一部に GBA 変異の共分離を確認した.

Common fragile site における重複, 欠失の機構の解明

欠失・重複変異の頻度が高い PARK2, DMD 遺伝子に対して array CGH 法を用いて欠失・重複変異を塩基レベルで解析し, 機序を考察することを目的に AR-JP 患者 206 例, DMD/BMD 患者 207 例, 癌細胞系列 125 例の解析を行った. AR-JP 患者において計 162 種類(欠失 148 種類, 重複 14 種類), DMD/BMD 患者において計 197 種類(欠失 160 種類, 重複 37 種類) 癌細胞系列において PARK2 遺伝子を解析して計 32 種類(欠失 31 種類, 重複 1 種類) を塩基レベルで同定した. AR-JP 患者における 162 種類の欠失・重複のうち, 複数家系で観察されたのは 22 種類のみ, 140 種類は単独でのみ観察された DMD/BMD 患者における 197 種類の欠失・重複は全て単独でのみ観察された. PARK2, DMD 遺伝子の欠失・重複変異では, 多くの変異は独立して繰り返り起こっていることが推測された. 欠失・重複変異の断端配列の検討にて microhomology の頻度が高い(60-65%) こと, その分布は PARK2, DMD の生殖細胞系列でも, PARK2 の生殖細胞・癌細胞系列でも非常に類似していることが分かった. 欠失・重複変異の断端位置の検討にて特定の領域にきわめて強い集中が確認され, common fragile site である FRA6E の center と一致し, FRAXC に含まれることが分かった. その領域の特徴について検討したところ, ①. 複製タイミングが遅い, ②. Flexibility peaks, R/G バンド境界に隣接する, LADs に含有される, などが分かった.

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) モデルマウス及び DRPLA タンパクの解析

DRPLA トランスジェニックマウスは、CAG リピート長に依存して表現型が重症化する。発現プロファイリング、薬剤反応性、PET スキャンなどによる病態解明を進めている。

HEK293 細胞を用いて、DRPLAp の核移行経路を解析した。DRPLAp の核移行シグナルは、既報の配列を含め、3 つのセグメントが核移行に必要である。DRPLAp と変異型 Ran(Q69L)を共発現にて DRPLAp の核移行を阻害され、DRPLAp は古典的な核移行経路で核に移行することを確認した。これまでの研究で、DRPLA タンパクの機能部位が細胞核であること、さらにこれまでの研究で伸長ポリグルタミン鎖を有する変異タンパクが時間依存性に、部位特異的に核内集積することが、病態機序として重要であることを見出している。従って、DRPLA タンパクの核移行阻害が本疾患の治療法の一つになるという考えから、本疾患の治療候補薬剤を探索する目的で、アメリカ食品医薬品局 (FDA) により USA で臨床試験にまで到達した化合物のライブラリー1040 (US-drug Collection. Micro Source Discovery Systems, Inc) を用いて GFP-DRPLA protein の定常発現株に添加し、DRPLA タンパクの局在変化と GFP 蛍光強度を指標として screening を進めている。現在までのスクリーニングで、核移行阻害、あるいは核内局在を変化させる化合物が見出された。今後、ライブラリーの化合物の screening を完了させると共に、これらの化合物の作用を詳細に解析し、DRPLA トランスジェニックマウスを用いた治療研究に発展させていく。

CAG リピート長に依存して表現型が重症化する DRPLA トランスジェニックマウス系統 Q76, Q113, Q129 を用いて、大脳、小脳の詳細な発現プロファイリングを行い、CAG リピート長および時間依存性に発現が変動する遺伝子群を同定した。特に大脳では視床下部由来の神経ペプチド類の CAG リピート長及び週齢依存性低下が認められ、臨床症状に関与している可能性があり、ヒト症例血液を用いた測定が進行中である。さらに、Affymetrix および Agilent の array を用いて、cross-platform 解析を行ったところ、Q129 について、両者において発現プロファイルが一致する correlation coefficient が、0.83 (4 週齢)、0.79 (8 週齢)、0.79 (12 週齢) と高い相関を示し、cross-platform 解析によりより信頼性の高い発現プロファイル解析が可能であることを示された。さらに、4 例のヒト DRPLA 死後脳の発現プロファイリングを行い、cross-species 解析を行ったところ、ヒトと

Q129 で共に低下した遺伝子として、大脳で 136、小脳で 128、共通のものとして 27 の遺伝子を同定した。

小動物用 PET 装置を用い、DRPLA トランスジェニックマウスに 18F-FDG を投与して脳の局所糖代謝を経時的に検討した。Q129 の 4,8,12 週齢個体各 6 匹、同週齢の正常対照 6 匹をスキャンし、比較を行った。Q129 マウスは正常マウスに比し線条体、視床および視床下部、橋、小脳等で週齢依存性の糖代謝低下の進行がみられ、特に 12 週齢の Q129 では小脳において正常マウスに比し約 11% の低下がみられた。

疾患関連リシークエンスデータベースの開発

ALS、パーキンソン病、認知症、痙性対麻痺、脊髄小脳変性症、副腎白質ジストロフィー、片頭痛の原因遺伝子と疾患関連遺伝子における、変異情報及びドメイン情報、アミノ酸保存性、タンパク質の三次元構造などの遺伝子関連情報と、文献から抽出した、家族歴、性別、発症年齢、経過、初発症状等の臨床情報とを統合したデータベースを構築。データベースには、既存の書誌的情報を網羅的に格納するのみならず、新規のリシークエンスデータと臨床情報を登録するシステムを実装。ALS についてはデータベースを一部公開した。

<https://reseq.lifesciencedb.jp/resequence/>

ALS mutation database に対し、127 の文献情報を利用し、600 の data entry、独立な変異としては 180 の変異を格納。文献情報から抽出した情報としては、発症年齢について 329 件 (発症年齢 6-94 歳)、経過期間について 294 件 (0.9-20 年)、臨床型について 39 件、初発部位について 229 件、人工呼吸器使用までの期間について 23 件 (1 箇月-23 年) が抽出された。さらに、新規に ALS 210 例 (家族性 ALS 31 例、孤発性 ALS 179 例) のリシークエンスデータ及び臨床情報を登録した。

次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析研究

次世代シーケンサーを用いてバーコード化してプールされたサンプルの解析を行い、一定のシーケンサーエラーの存在を明らかにするとともに、バーコード化されたサンプル解析の限界を示すことができた。

上記の経験をもとに、ハイスループット連鎖解析システムで候補領域を狭めた家系に関して、Nimblegen のアレイによって whole exon capture を行い、次世代シーケンサー (454, solid, illumina) による解析を行った。また家族性筋萎縮性側索硬化症及び家族性多系統萎縮症患者に関しては全ゲノム解析

も開始し、疾患遺伝子同定が期待される。

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)

Hara K, Shiga A, Fukutake T, Nozaki H, Miyashita A, Yokoseki A, Kawata H, Koyama A, Arima K, Takahashi T, Ikeda M, Shiota H, Tamura M, Shimoe Y, Hirayama M, Arisato T, Yanagawa S, Tanaka A, Nakano I, Ikeda S, Yoshida Y, Yamamoto T, Ikeuchi T, Kuwano R, Nishizawa M, Tsuji S, Onodera O. Familial Ischemic Cerebral Small-Vessel Disease, Alopecia, and Spondylosis Caused by Mutations in the HTRA1 Gene. *New Engl J Med* 360; 1729-1739, 2009

[雑誌論文] (計 42 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel diseases.

発明者: 辻省次,

小野寺理

権利者: The University of Tokyo

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2010/057323

出願年月日: 2010 年 4 月 20 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome-sci.jp/>

https://www.genome-sci.jp/modules/content1/rewrite/tc_5.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 省次 (TSUJI SHGOJI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 7015012

(2) 研究分担者

小野寺 理 (ONODERA OSAMU)

新潟大学大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 20303167

村山, 繁雄 (MURAYAMA SHIGEO)

東京都高齢者研究福祉振興財団・東京都老人総合研究所臨床科学研究グループ・参事

研究員

研究者番号: 50183653

(3) 連携研究者

後藤 順 (GOTO JUN)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 10211252

高橋 祐二 (TAKAHASHI YUJI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 00372392