

平成 22 年 3 月 14 日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007 年 ～ 2008 年
課題番号：19500314
研究課題名（和文） 大規模ゲノム関連解析を用いた筋萎縮性側索硬化症感受性遺伝子の単離・同定
研究課題名（英文） Large-scale genome association study of amyotrophic lateral sclerosis in Japanese
研究代表者
飯田 有俊 (Iida Aritoshi)
独立行政法人理化学研究所・骨関節疾患研究チーム・上級研究員
研究者番号： 10277585

研究成果の概要：

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は、大脳と脳幹、脊髄の運動ニューロンが選択的かつ進行的に変性・脱落する神経変性疾患である。本研究では、一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)を用いて大規模ゲノム関連解析を行い、ALS と有意な相関を示す SNP を発見した ($P=7.6 \times 10^{-10}$)。SNP 周辺の詳細なゲノム解析を行い、新規 ALS 感受性遺伝子として *ALSCI* を同定した。本研究で発見した SNP は、本邦のみならず、アジアで初めて発見された ALS 関連 SNP である。

交付額（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経解剖学・神経病理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症、大規模ゲノム関連解析、ゲノムスクリーニング、一塩基多型、感受性遺伝子、候補遺伝子

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は、大脳皮質運動野と脳幹、脊髄の運動ニューロンが選択的かつ進行的に変性・脱落する神経変性疾患である。2-3 年の経過で四肢や顔面、舌などの筋肉の萎縮と筋力低下が進行し、人工呼吸器を用いなければ呼吸筋の麻痺により 2-4 年で死に至ると

言われている。有病率は人口 10 万人あたり 5-6 人で、本邦の患者数は、約 7,000 人と推定されている。

ALS は、臨床的に家族性 ALS と孤発性 ALS に分類される。疫学的研究から、ALS は遺伝因子と環境因子の相互作用により発症する

と考えられているが、現在まで発症機構は殆ど何も分かっていない。近年、遺伝子解析により家族性 ALS において SOD1 をはじめ幾つかの遺伝子で遺伝子変異が同定されているが、頻度は非常に低い。一方、ALS 全体の 90% を占める孤発性 ALS については、候補遺伝子アプローチが行われ、主に国外で 30 遺伝子以上の結果が報告されてきた (Schymick *et al. Hum Mol Genet* 2007)。しかし、どれも解析規模が小さく、その結果の再現性も否定的なものばかりであった。また、最近、GWAS (genome wide association study) が国外行われ、現在までに 9 つの結果が報告された (Dunkley *et al. N Engl J Med* 2007 ; van Es *et al. Nature Genet* 2007, 2009 など)。しかし、そのうちの 6 つの報告は統計的有意水準を満しておらず、残りの 3 つの報告も同定された SNP と ALS の相関が必ずしも再現されない。国内における ALS の研究は、少数の臨床検体を用いて行う既知遺伝子の変異解析や、SOD1 変異モデル動物による解析が主体で、ALS 遺伝子に対する戦略的、包括的なアプローチは皆無である。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、ALS 患者における負担や苦しみを少しでも軽減できるような、もしくは重篤化を防ぐような新しい治療法の開発である。本研究では将来の ALS 治療に向けての第一歩、つまり、ALS の原因を探るために大規模ゲノム関連解析を行い、未知の ALS 感受性遺伝子の単離・同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNA 検体

日本 ALS 協会の協力のもと、バイオバンクジャパンに提供された 703 例の DNA 検体について解析を行った。さらに、日本 ALS 研究コンソーシアム (JaCALS) より分与された 278

検体について解析を行った。対照例については、日本人一般集団由来の 3 千以上の検体を解析した。

(2) 一塩基多型について

本研究で使用する一塩基多型 (SNP) は、東京大学医科学研究所、科学技術振興機構、そして理化学研究所遺伝子多型研究センター (現、ゲノム医科学研究所) で単離した 20 万 SNP の中の 52,608 SNP であり、それらはすべて遺伝子領域内、もしくは遺伝子のプロモーター領域にマップされる。これらの SNP は、日本人標準多型データベース (JSNP データベース) で公開されている。

(3) ゲノムスクリーニング

JSNP データベースの 52,608 SNP をマルチプレックス PCR-インバーダー法でタイピングし、段階的スクリーニングで関連解析を行った。すなわち、1 次スクリーニングは、ALS92 例と対照群 239 例を用いて解析を行った。ここで $P < 0.01$ を示した 1,039 SNP について、ALS 363 例、対照群 726 例を追加して 2 次スクリーニングを行った。

(4) 候補 SNP の評価

$P < 0.001$ を示した SNP に関して追加セット 1 (ALS 249 例 対 対照群 1,030 例) を用いてスクリーニング結果の妥当性を検討した。さらに、追加セット 2 (JaCALS278 例と対照群 1,881 例) を用いて解析を行った。

(5) ALS 感受性遺伝子領域の限局化

国際ハップマッププロジェクトのデータをもとにして、有意な相関を示した SNP 周辺のゲノム領域における連鎖不平衡ブロックを決定し、ALS 感受性遺伝子領域を限局化した。

(6) ALS 感受性遺伝子領域の構造解析

当該領域をゲノムシーケンスして、遺伝子地図に基づく SNP 地図の構築を行った。

以下に、SNP 地図に構築について概略を示した。

まず、当該 SNP を含むゲノム領域について米国 NCBI データベースを用いて塩基配列を抽出した。その後、当該遺伝子の cDNA 配列とゲノム配列の比較により遺伝子構造を決定し、候補 SNP との位置関係を明らかにした。次に遺伝子領域から反復配列をデータベースで予測し除去した。残りのユニークな配列に PCR プライマーセットを設計し、当該遺伝子全領域を網羅するような PCR アンプリコンを整列した。順次、複数の DNA サンプルを用いて、PCR 法にて当該領域を増幅後、シーケンス法とコンピュータ解析により SNP を同定した。同定したすべての SNP を先に構築した遺伝子地図上にマッピングし、SNP 地図を構築した。そして、それぞれの SNP について ALS 候補 SNP と連鎖不平衡があるか否かを解析した。最終的に、ALS 患者群と対照群で遺伝統計学的解析を行い、最も ALS と関連のある SNP を同定した。

(7) 候補 SNP の機能解析

本研究では、候補 SNP の機能解析について、ルシフェラーゼアッセイやゲルシフトアッセイを用いて、アレル間での転写活性の違いや各アレルに対する DNA 結合因子の結合能の違いを調べた。

① ルシフェラーゼアッセイ

pGL3 ベーシックベクターのレポータープラスミドに遺伝子のプロモーター領域を連結し、当該 SNP を含むイントロン領域をクロニングした。培養細胞にトランスフェクションして数日間培養後、細胞を回収して、ピッ

カジーンデュアル・シーパンジーキットを用いてエンハンサー活性を測定した。

② ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイ法を用いて、未知の DNA 結合因子の結合能が SNP 間で違いがあるか否かを調べた。培養細胞から核抽出液を回収後、蛍光ラベル標識したオリゴ DNA を混合して、アクリルアミドゲル電気泳動を行った。メンブレンにトランスファーしたのち、各アレル間での核タンパク質との結合能を解析した。

4. 研究成果

(1) 大規模ゲノム関連解析による ALS 関連 SNP の同定

JSNP データベースの 52,608 SNP をマルチプレックス PCR-インバーダー法でタイピングし、段階的スクリーニングで関連解析を行った。1 次スクリーニングは、ALS92 例と対照群 239 例を用いた。ここで $P < 0.01$ を示した 1,039 SNP について、ALS 363 例、対照群 726 例を追加して 2 次スクリーニングを行った。段階的スクリーニングにおいて $P < 0.001$ の SNP を 9 つ同定した。次いで、この 9 SNP に関して追加セット 1 (ALS 249 例 対 対照群 1,030 例) を用いて候補 SNP の評価を行った。その結果、SNP-5 について関連を認めた。さらに、追加セット 2 として JaCALS 検体 278 例と対照群 1,881 例を用いて解析を行い、SNP-5 と ALS との関連を再確認した。最終的に、すべての結果を Mantel-Haenszel 法でメタ解析し、SNP-5 が ALS と有意な関連を示すことを見出した ($P = 7.6 \times 10^{-10}$)。

候補 SNP を含むゲノム領域について連鎖不平衡地図を構築し、候補領域を 111 kb まで絞り込んだ。次に、その候補領域にマッピングされていた 5 つの遺伝子座をゲノムシーケンス法で解析し、24 SNP を同定した。そし

て、新たに SNP 地図を構築した。それらの SNP について再度関連解析を行い、SNP-5 が ALS 関連 SNP であることを確定した。

さらに詳しくゲノム領域の構造解析を行った結果、SNP-5 は、機能未知の遺伝子のイントロン 12 に存在することがわかった。そして、この候補遺伝子を *ALSCI* と名づけた。*ALSCI* は、ゲノムサイズ 13 kb の遺伝子で、17 個のエキソンより構成されていた。*ALSCI* mRNA は、脳、心臓、肺、脊髄等のあらゆる組織で発現していた。アミノ酸の一次構造より、転写因子の可能性が示唆された。

ALS 関連 SNP が *ALSCI* のイントロン 12 にあったことから、SNP がエンハンサー活性に影響を与えているのではないかと考えて、先ずルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、リスクアレル C において、ノンリスクアレル T と比較して 10–20%エンハンサー活性が低下することがわかった。さらにゲルシフトアッセイにより、同様にリスクアレル C において、ノンリスクアレル T よりも未知の DNA 結合因子の結合能が低下することがわかった。

以上の結果から、

- ① SNP を用いた大規模関連解析により、ALS 感受性遺伝子を発見し、有意な相関を示す SNP を同定した ($P=7.6 \times 10^{-10}$)。
- ② 本研究で同定した SNP はアジア人で初めて発見された ALS 関連 SNP であった。
- ③ 二つの独立したサンプルセットでも相関が確認され、遺伝統計学的に非常に確からしいものであった。
- ④ 機能解析の結果、SNP による *ALSCI* の発現低下が ALS の発症・進展に関与することが示唆された。
- ⑤ 今後、同定した ALS 感受性遺伝子の機能解析により、関連する遺伝子及びそのシグナル経路を解明することが可能になる。

⑥ 今後、相互作用する遺伝子産物やその経路の解析により、ALS に対する論理的な新たな治療戦略を生み出すと共に、画期的な治療薬創出への seed を提供することになるであろう (以上、論文作成中)。

(2) 候補遺伝子アプローチによる解析

大規模ゲノム関連解析において解析精度を上げるため、既知の ALS 原因遺伝子について解析を行った。以下に、概要を示す。

① TDP-43 遺伝子の遺伝子変異の同定

TDP-43 は、前頭側頭葉変性症および ALS の神経細胞封入体に沈着する主要な構成成分として同定された分子である。この遺伝子の寄与度は日本人集団でどの程度かを調べるために、700 例の ALS 検体を用いて遺伝子変異、遺伝子多型の両面から、ALS に対するこの遺伝子の重要性を調べた。イントロンにプライマーを設計して、コーディング領域についてシーケンス解析を行った。その結果、3 例の ALS 患者において 2 種類のミスセンス変異を同定した。共に過去の報告で遺伝子変異ホットスポットと呼ばれる領域に存在し、遺伝子産物の機能阻害が示唆された。以上の結果より、TDP-43 遺伝子の変異は、日本人の ALS 症例では非常に頻度が低く、一部の ALS 患者のみの原因になっている可能性が示唆された (論文投稿中)。

② アンギオゲニン遺伝子領域の解析

アイルランド及びスコットランド人の ALS 患者から同定された遺伝子で、血管新生に関連する分子と言われている。日本人 ALS 症例について関連解析を行ったが、ALS と当該領域の SNP での関連は認められなかった。少数の患者で塩基置換を発見した。

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)

〔学会発表〕（計3件）

本研究に関するものだけを示した。

(1) 飯田有俊、高橋篤、大西洋三、鎌谷直之、中村祐輔、大規模ゲノム関連解析による筋萎縮性側索硬化症(ALS)感受性遺伝子の単離・同定、第48回日本神経学会総会、2007年5月18日、名古屋

(2) 飯田有俊、高橋篤、大西洋三、鎌谷直之、中村祐輔、大規模ゲノム関連解析を用いた筋萎縮性側索硬化症(ALS)感受性遺伝子の単離・同定、日本人類遺伝学会第52回大会、2007年9月14日、東京

(3) 飯田有俊、高橋篤、大西洋三、鎌谷直之、中村祐輔、池川志郎、大規模相関解析を用いた筋萎縮性側索硬化症感受性遺伝子の同定、日本人類遺伝学会第53回大会、2008年9月30日、横浜

〔その他〕

(1) 講演

飯田有俊、ゲノム解析に基づく孤発性ALSの病因解明、厚生労働省「筋萎縮性側索硬化症の画期的診断・治療法に関する研究」班主催、ワークショップALS研究の最前線、2007年9月7日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 有俊 (Iida Aritoshi)

独立行政法人理化学研究所・骨関節疾患研究チーム・上級研究員

研究者番号： 10277585