

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03588

研究課題名(和文)メタボローム・ゲノム解析を中心としたナルコレプシーの病態解明と個別化医療への応用

研究課題名(英文)Elucidating the pathogenesis of narcolepsy through metabolome and genome analyses and its application in personalized medicine

研究代表者

宮川 卓 (MIYAGAWA, Taku)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・副参事研究員

研究者番号：20512263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナルコレプシー患者及びコントロールの脳脊髄液(CSF)及び血液を対象にメタボローム解析を実施した。CSFのメタボローム解析では、コントロール群に比べて、ヒスチジンの濃度がナルコレプシー群で有意に高く、逆にヒスタミン濃度はナルコレプシー群で有意に低いことがわかった。血液のメタボローム解析ではアシルカルニチン解析を実施し、複数の長鎖アシルカルニチンの濃度が、ナルコレプシー群において、低値を示していることを確認し、統計的な有意差を認めた。血液ベースのトランスクリプトーム解析(RNA-seq)を実施し、カルニチンシャトルや脂肪酸代謝に関わる遺伝子やパスウェイが検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナルコレプシー患者では、CSF中のヒスチジン濃度が高いにもかかわらず、ヒスタミン濃度が低かった。このことから、ヒスチジンからヒスタミンへの合成が適切に行われていないことが示唆された。この結果は、ナルコレプシー治療薬(日本未承認)であるヒスタミンH3受容体拮抗薬/逆作動薬の薬理作用を間接的に支持するものである。血液サンプルを用いたアシルカルニチン解析及びRNA-seqの結果から、ナルコレプシーの病態生理に長鎖脂肪酸の代謝の機能低下が関わることが判明した。今後、このような血液中における代謝物や遺伝子発現の変動が、脳の睡眠中枢にどのような影響を与えているかを解明する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Metabolomic analysis was performed on cerebrospinal fluid (CSF) and blood from narcoleptic patients and controls; CSF-based metabolome analysis showed that histidine levels were significantly higher in the narcoleptic group than in the control group, while histamine levels were significantly lower in the narcoleptic group than in the control group. Blood-based metabolome analysis of acylcarnitine confirmed that the concentrations of several long-chain acylcarnitines were lower in the narcolepsy group, a difference that was statistically significant. Blood-based transcriptome analysis (RNA-seq) was performed and genes and pathways involved in carnitine shuttle and fatty acid metabolism were detected.

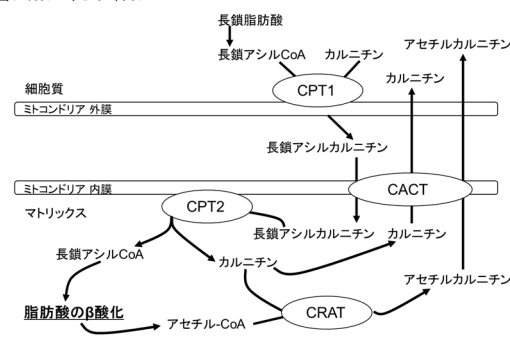
研究分野：人類遺伝学

キーワード：ナルコレプシー ゲノム 睡眠 過眠症 アシルカルニチン 脂肪酸代謝 人類遺伝学

1. 研究開始当初の背景

ナルコレプシーは睡眠発作、情動脱力発作(カタプレキシー)、睡眠麻痺及び入眠時幻覚を特徴とする過眠症で、レム睡眠と密接に関連する。主症状の一つである情動脱力発作は情動の変化を契機に筋肉の脱力を引起す。ナルコレプシーの発症機構として、視床下部において神経ペプチドのオレキシンを産生する神経の脱落が明らかにされているが、なぜ脱落するかわかっていない。ナルコレプシーは遺伝要因や環境要因が作用し合って発病に至る多因子疾患であり、その有病率は0.02-0.18%と言われている。これまでにナルコレプシーやその他の過眠症のゲノムワイド関連解析(GWAS)を実施し、感受性遺伝子としてCPT1B(カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1B)遺伝子やCRAT(カルニチンアセチルトランスフェラーゼ)遺伝子を見出してきた。CPT1Bは長鎖アシルCoAとカルニチンを結合させ、長鎖アシルカルニチン(炭素数(C)が16個から18個)とする律速酵素であり、CRATは短鎖アシルカルニチンを形成し、短鎖アシルCoA/CoA比の調整に関わる代謝経路上の酵素であり、両酵素とも脂肪酸代謝、酸化やエネルギー代謝で重要な働きをする(図1)。さらにゲノムワイドメチル化解析も実施した結果も合わせて、その病態に脂肪酸代謝、酸化やエネルギー代謝経路の異常が関わることを明らかにしてきた。これはこれまで原因としては予想されていないものであった。そこで本研究では疾患発症の原因物質を同定するためにメタボローム解析を実施することとした。

図1 カルニチンシャトル



CPT1: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1
 CPT2: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ2
 CACT: カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ(SLC25A20遺伝子がCACTをコードする)
 CRAT: カルニチンアセチルトランスフェラーゼ

2. 研究の目的

ナルコレプシーと関連すると想定されなかった脂肪酸代謝、酸化やエネルギー代謝の異常という病態機構が存在し、それにより過眠が引き起こされているのではないかという仮説を立てた。ナルコレプシーは睡眠障害であることから、より病態の本質に近づくため、血液だけでなく脳脊髄液(CSF)をサンプルとして用いた。そして、患者及びコントロールの血液及びCSFを対象にメタボローム解析を実施することで、ナルコレプシーと関連する代謝物及び代謝パスウェイの同定を目指した。また詳細な病態解明を目指し、次のようなオミックス解析を実施した。メタボローム解析を実施した症例に関しては、代謝物濃度に影響を与える遺伝要因を探索するために、ゲノムワイドな一塩基多型(SNP)タイピングを行い、各代謝物とSNPとの相関解析を行った。また、トランスクリプトーム解析としてRNAシーケンシング(RNA-seq)を行い、遺伝子代謝プロファイルを評価した。

3. 研究の方法

CSFを用いたメタボローム解析に関しては、CSF中の代謝物の濃度が血液中よりも低いため、これまでメタボローム解析が容易ではなかった。しかし近年キャピラリー電気泳動と高分解能質量分析計を接続した新たな方法(CE-HRMS)が開発されたことから、この方法を用いて代謝物を解析した。まずナルコレプシー14例とコントロール17例のCSFを我々は有していたことから、1次解析としてCE-HRMSにて測定した。有意な代謝物に関しては、再現性研究(Replication study)を行うために、追加で得られたCSF(合計ナルコレプシー18例とコントロール28例)も含め、高効率液体クロマトグラフィー(HPLC)によりCSF中の濃度を測定した。

CSFのメタボローム解析のデータを用いたオミックス解析を行うために、ゲノムワイドにSNPタイピングを同じサンプルにて実施した。このオミックス解析により、CSF中の各代謝物濃度に影響を与える遺伝要因を同定することが可能となる。SNPと関連する代謝物の探索するために、年齢、性別、疾患情報及びBMI(Body Mass Index)を共変量として回帰分析を実施した。

血液サンプルをベースとした解析も実施し、ナルコレプシー57例とコントロール61例を対象として、25種類のアシルカルニチンの測定を行い、年齢、性別及びBMIを調整した回帰分析を実施した。さらに、ナルコレプシー42例とコントロール42例の血液中からmRNAを抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的なトランスクリプトーム解析(RNA-seq)を実施した。

4. 研究成果

CSFのメタボローム解析の結果、268種類の代謝物の測定が可能であることがわかった。測定された各代謝物を患者コントロール間で比較したところ、必須アミノ酸の一つであるヒスチジ

ンの濃度がナルコレプシー群で有意に高いことがわかった。そこで、再現性研究を実施するため、追加で得られた CSF も含め、ヒスチジンとヒスタミンに標的を絞って HPLC により濃度を測定した。その結果、ヒスチジンの濃度がナルコレプシー群で有意に高いことが再現され ($P=2.0 \times 10^{-3}$)、逆にヒスタミン濃度はナルコレプシー群で有意に低いことがわかった ($P=6.1 \times 10^{-4}$) (図 2)。ヒスチジンは、ヒスチジン脱炭酸酵素によりヒスタミンに合成される(図 3)。今回の結果のように、ナルコレプシー患者ではヒスチジン濃度が高いにもかかわらず、ヒスタミン濃度が低いということは、ヒスチジンからヒスタミンへの合成が適切に行われていないことが示唆された。またこの結果は、ナルコレプシー治療薬(日本では未承認)であるヒスタミン H3 受容体拮抗薬/逆作動薬の pitolisant の薬理作用を間接的に支持するものとも考えられる。次にナルコレプシー群とコントロール群間で差が認められる代謝物を用いてパスウェイ解析を実施したところ、最も有意なパスウェイとしてグリシン、セリン、トレオニンの代謝パスウェイが検出された。興味深いことにナルコレプシーと関連したアミノ酸は、全て糖原性アミノ酸であり、さらにコントロール群に比べナルコレプシー群で同様に高い濃度を示していた。

図2 脳脊髄液中(CSF)のヒスチジンとヒスタミンの測定結果

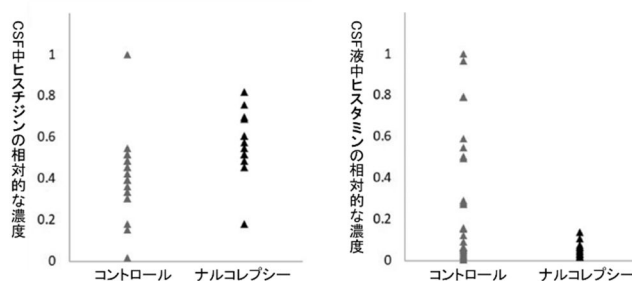
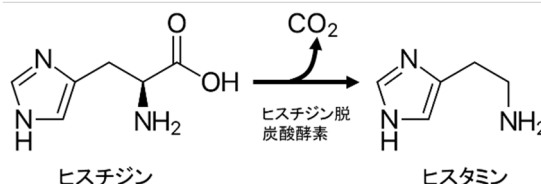


図3 ヒスチジンからヒスタミンへの合成



CSF 中の各代謝物濃度に影響を与える遺伝要因を同定するためのオミックス解析では、18 の代謝物と SNP のペア (10 種類の代謝物と 17 個の SNP) がゲノムワイド有意な関連を示した。これら 17 個の SNP の中で 4 個の SNP は、近傍遺伝子の発現量に影響を与えていることも明らかにした。

血中のアシルカルニチン解析では、複数の長鎖アシルカルニチン(炭素数(C)が16個から18個のアシルカルニチン)の濃度が、ナルコレプシー群において、低値を示していることを確認し、統計的に有意差を認めた。次に、CPT1 活性を測定するために、遊離カルニチン値(C0)を長鎖アシルカルニチンの合計の値で割った値を算出した。その結果、コントロール群と比較して、ナルコレプシー群において CPT1 活性が有意に低いことが判明した ($P=6.4 \times 10^{-4}$)。

血液ベースの RNA-seq においても、カルニチンシャトルに関わる遺伝子である *SLC25A20* 遺伝子 (CACT をコード) と *CPT2* 遺伝子の発現量が、ナルコレプシー群において低く、全検出遺伝子の中で、それぞれ 2 番目と 5 番目に低い P 値を示した。パスウェイ解析及び Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) によって、有意なパスウェイとしてカルニチンシャトルや脂肪酸代謝が検出された。一方、ナルコレプシーの GWAS において同定された *CPT1B* 遺伝子は、ナルコレプシー群とコントロール群で有意な差がなかった。しかし、*CPT1B* 遺伝子近傍の SNP の rs5770917 は、ナルコレプシーの発症と関連があるだけでなく、rs5770917 のリスクアリルは *CPT1B* 遺伝子の発現量低下と関連する。つまり発症と関連する遺伝要因によって *CPT1B* 遺伝子の発現量は抑制されていることがわかる。*SLC25A20* 遺伝子と *CPT2* 遺伝子近傍にはナルコレプシーと関連する SNP は存在しないことを確認した。本研究で見出されたナルコレプシー群における *SLC25A20* 遺伝子と *CPT2* 遺伝子の発現低下は、遺伝要因ではない、別の要因によって、引き起こされていると考えられた。さらに、GSEA によっても脂肪酸代謝に関わる多くの遺伝子の発現量も低下していることが判明し、今後これら発現低下の原因となる要因を同定する必要があると考えられる。

血中の解析(アシルカルニチン解析及び RNA-seq)の結果からも、長鎖脂肪酸の代謝の機能低下がナルコレプシーの病態生理に深く関わることがわかった。このような血液中での変化が、脳の睡眠中枢にどのような影響を与えているかを解明することが今後の課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Honda Makoto, Shigematsu Yosuke, Shimada Mihoko, Honda Yoshiko, Tokunaga Katsushi, Miyagawa Taku	4. 巻 45
2. 論文標題 Low carnitine palmitoyltransferase 1 activity is a risk factor for narcolepsy type 1 and other hypersomnia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sleep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/sleep/zsac160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyagawa Taku, Tanaka Susumu, Shimada Mihoko, Sakai Noriaki, Tanida Kotomi, Kotorii Nozomu, Kotorii Tatayu, Ariyoshi Yu, Hashizume Yuji, Ogi Kimihiro, Hiejima Hiroshi, Kanbayashi Takashi, Imanishi Aya, Ikegami Azusa, Kamei Yuichi, Hida Akiko, Wada Yamato, Miyamoto Masayuki, Takami Masanori, Kondo Hideaki et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 A rare genetic variant in the cleavage site of prepro-orexin is associated with idiopathic hypersomnia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41525-022-00298-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimada Mihoko, Miyagawa Taku, Kodama Tohru, Toyoda Hiromi, Tokunaga Katsushi, Honda Makoto	4. 巻 43
2. 論文標題 Metabolome analysis using cerebrospinal fluid from narcolepsy type 1 patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sleep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/sleep/zsaa095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamasaki Maria, Makino Takashi, Khor Seik-Soon, Toyoda Hiromi, Miyagawa Taku, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Sensitivity to gene dosage and gene expression affects genes with copy number variants observed among neuropsychiatric diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Medical Genomics	6. 最初と最後の頁 55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12920-020-0699-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮川 卓, 田中 進, 嶋多 美穂子, 酒井 紀彰, 西野 精治, 三島 和夫, 徳永 勝士, 本多 真
2. 発表標題 オレキシン前駆体遺伝子の稀な変異と特発性過眠症との関連
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮川卓
2. 発表標題 特発性過眠症感受性遺伝子の同定
3. 学会等名 日本睡眠学会第47回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miyagawa Taku, Tanaka Susumu, Shimada Mihoko, Sakai Noriaki, Nishino Seiji, Mishima Kazuo, Tokunaga Katsushi, Honda Makoto
2. 発表標題 A rare genetic variant in the cleavage site of prepro-orexin is associated with idiopathic hypersomnia
3. 学会等名 アメリカ人類遺伝学会（ASHG）2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮川卓
2. 発表標題 ナルコレプシーのCSFメタボローム解析
3. 学会等名 日本睡眠学会第46回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮川卓
2. 発表標題 過眠症の遺伝要因とHLA研究所の意義
3. 学会等名 日本睡眠学会第44回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北條 浩彦、宮川 卓	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 リアルタイム・デジタルPCR実験スタンダード 「TaqManプローブを使ったタイピングの実際」	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特発性過眠症を検出するためのマーカー	発明者 宮川卓、田中進、本多真	権利者 公益財団法人 東京都医学総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2020-121336	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

公益財団法人東京都医学総合研究所 睡眠プロジェクト https://www.igakuken.or.jp/sleep/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------