

## 様式 C-19

# 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21591067

研究課題名（和文） 多系統萎縮症におけるゲノム網羅的コピー数多型（CNV）の研究

研究課題名（英文） Genome-wide screening of CNV in Multiple System Atrophy

研究代表者

佐々木 秀直（SASAKI HIDENAO）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80281806

研究成果の概要（和文）：

ヒトゲノムには数 kb～Mb 単位の繰り返しと配列の多様性に富む領域があり、近年 CNV として知られるようになった。この部分は構造的特徴から、既存のシーケンス技術では解析が容易ではない。我々は多系統萎縮症（MSA）を対象に、アレイ CGH を用いて疾患と CNV との関係を検討し、疾患にコピー数減少をきたす頻度の高い領域を複数特定した。この候補領域に MSA の素因遺伝子がある可能性がある。

研究成果の概要（英文）： We studied CNV in the genome of MSA patients, and found several areas showing selective loss in MSA. The gene locating there and expressing in CNS must be a candidate gene susceptible for MSA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：多系統萎縮症、コピー数多型、ゲノム構造多型、素因遺伝子、脊髄小脳変性症

### 1. 研究開始当初の背景

我が国の脊髄小脳変性症の約 70%は遺伝性疾患であり、後者の 60%以上を多系統萎縮症が占めている。すなわち、広義の脊髄小脳変性症においては 40%以上を占めている最も頻度の高い疾患である。特定疾患医療受給者証の交付数を調べてみると、平成 22 年度末の全国統計では 11000 人前後の登録されている。

多系統萎縮症は成年期以降に発病する非遺伝性疾患である。脳内に不溶化した  $\alpha$  シヌクレイン（SNCA）が神経細胞や乏突起膠細胞

に過剰に発現、蓄積し、封入体を形成する。その機序や原因は現時点では特定されていない。何らかの環境因子が関与していると推定されるが、その根底には MSA に罹患し易い素因遺伝子かあるいはエピジェネティクス機序の寄与などが考えられる。事実、多系統萎縮症の主な前駆症候はパーキンソンニズムであるのに対して、日本では圧倒的に小脳性運動失調である。この大きな相違の背景には食習慣など環境因子よりも、何らかの遺伝

的背景の相違があると考えられている。

素因遺伝子を探索する研究手法としては遺伝子の一塩基多型(SNP)による全ゲノム網羅的関連解析、マイクロアレイや次世代シーケンサを用いた解析により行われている。SNPによる関連解析はゲノム構造が安定している領域の解析には有効である。しかし、構造多型は突然変異率がSNPの1000倍も高率であり、不安定なゲノム領域である。

構造多型は数Kb以上のゲノム単位が繰り返したり、配列順位が入れ替わったり、繰り返し配列の中に別な配列が挿入しているなど、複雑さと規模の大きさ故に、現性能の次世代シーケンサも含めて既存の手法では解析できない領域である。特殊な例として一卵性双生児で片方のみ発病している例が示すように、一部にはゲノム構造変換など従来には知られていない機序の関与が想定される。

そこで、構造解析に特化したCNVアレイを用いてMSA素因遺伝子の探測を計画した。CNVアレイは微細な染色体検査を目的に開発されたものであり、当初は奇形、染色体の形態解析を目的に用いられていたが、近年は、癌など非遺伝性 common disease の解析に用いられ始め、体細胞のゲノム異常の解明に威力発揮している。精神神経疾患に素因解析には自閉症関連疾患、統合失調症の素因遺伝子解析に威力を発揮している。

## 2. 研究の目的

多系統萎縮症の発病に関与していると推定される素因遺伝子を探索、同定し、その分子の神経系での発現と機能解析を行う。また候補分子についてバイオインフォマティクス技術を用いたネットワーク解析を行って、関連分子も検索し、MSAの発症機序を検討することである。最終的には、創薬候補の標的分子同定へと展開させることが目的である。

## 3. 研究の方法

対象は片方のみ多系統萎縮症を発病した一卵性双生児2組、非血縁の患者33例、神経疾患に罹患していない成人対照群100例である。コピー数多型(CNV)の解析は研究開始当初はdeCODE/illumina製の57K CNVゲノムワイドチップを用いた。対照群と比較して患者群にコピー数の偏りを認めた領域について、高密度カスタムアレイCGHチップを作成して

非血縁の多系統萎縮症患者32例、対照群25例、片方のみ発症した一卵性双生児1組を解析した。一卵性双生児の遺伝学的検証には1組は300K SNPアレイ、もう1組は620Kアレイを用いた。2組の一卵性双生児のゲノムワイドCNV解析にはアジレント400K G3 CNVアレイを用いた。

研究は医の倫理委員会の承認を得て行っ

た。試料提供には研究の趣旨を説明し、文書で同意を得た。

## 4. 研究成果

Odds比 $>4$ で多系統萎縮症に頻度の高いコピー数減少を示す領域17領域を特定した(Odds比:4~264)。一卵性双生児2組のSNP一致率は99%以上あり、遺伝学的にも一卵性であることを確認した。1組の一卵性双生児男性例の間でG3アレイにより検出された欠失領域は複数あり、その中で非血縁患者と対照群との比較で検出された候補領域との重複領域は19p13であった。

同領域のカスタムアレイの詳細な解析により、一卵性双生児間と非血縁のMSA患者のコピー数領域を調べ、対照群25例と対比したところ、MSA患者33例中11例でコピー数減少を認めた。対照群25例には同領域のコピー数を認めなかった。同領域の中で神経系に発現している遺伝子をゲノムデータベースで検索した結果、SHC transforming protein 2 (SHC2)が、コピー数減少領域の重複域にコードされていた。以上の結果に元づいて、SHC2を多系統萎縮症の素因遺伝子候補の一つとして報告した。現在、他の候補遺伝子と候補領域について、検討を進めている。

最近経験したもう1組の一卵性双生児のCNV400KのG3アレイでは、双子間で欠失領域を検出できなかった。2組目は現在、先と同一の高密度カスタムアレイ解析を施行中である。

SHC2は神経栄養因子の膜受容体アダプタータンパクである。コピー数減少はSHC2遺伝子の発現減少をもたらすと推定されるが、それがどのような機序で多系統萎縮症の分子病態と繋がっているのか現時点では明らかではない。また、SHC2のコピー数減少は多系統萎縮症の1/3に認められたのに過ぎない。例えSHC2が素因遺伝子であったとしても、対象患者の2/3はSHC2のコピー数減少を伴っていないことから、SHC2の役割は多系統萎縮症の発病に必須なものでは無い推定される。

多系統萎縮症の素因遺伝子は複数あるものと推定される。今回の研究では候補領域は複数同定されているので、他の領域についても引き続き検討を進めている。

今回の研究で明らかになったように、多系統萎縮症の発症基盤には、ゲノム構造多型があること、その不安定さに起因したコピー数減少が複数のゲノム領域で個体発生の過程で生じていること、それに外因が作用した結果、発病に至ると推定される。今回の結果は多系統萎縮症は遺伝性疾患ではないが、発病基盤にはゲノム構造の不安定さを有する、いわゆる genomic disorder である示唆される。

SHC2が素因遺伝子であることを検証する

ためには、多数例について各々の候補遺伝子のコピー数を定量する実験系の構築が必要であり、現在、取り組んでいるところである。

#### 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)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ①高橋育子, 佐々木秀直: 晩発性小脳皮質萎縮症 (LCCA). *Clinical Neuroscience*, 査読無、2012;30(8)に掲載予定
- ②松島理明, 佐々木秀直: Friedreich 病. 査読無、*Clinical Neuroscience* 2012;30(9)に掲載予定
- ③矢部一郎, 佐々木秀直: 脊髄小脳変性症の治療の進歩. *神経治療学*, 査読無、2012;29(4)に掲載予定
- ④佐久嶋 研, 佐々木秀直: 腫瘍性および肉芽腫性疾患の治療の進歩. *神経治療学*, 査読無、2012;29(4)に掲載予定
- ⑤西澤正豊, 佐々木秀直, 水澤英洋 (司会): 脊髄小脳変性症の克服を目指して-脊髄小脳変性症をいかに克服するか-. *最新医学*, 査読無、67 巻、2012、7(1053)-18(1064)
- ⑥佐藤和則, 佐々木秀直: 通常の変異による脊髄小脳失調症 (SCA11, SCA14, SCA15, SCA35). *最新医学*, 査読無、67 巻、2012、7(1116)-75(1121)
- ⑦Yabe I, Tha KK, Yokota T, Sato K, Soma H, Takei A, Terae S, Okita K, Sasaki H: Estimation of skeletal muscle energy metabolism in Machado-Joseph disease using (31)P-MR spectroscopy. *Mov Disord*, 査読有、26 巻、2012、165-8
- ⑧Sasaki H, Emi M, Iijima H, Ito N, Sato H, Yabe I, Kato T, Utsumi J, Matsubara K: Copy number loss of (src homology 2 domain containing) - transforming protein 2 (SHC2) gene: discordant loss in monozygotic twins and frequent loss in patients with multiple system atrophy. *Mol Brain*, 査読有、4 巻、2011、24(p1-10)
- ⑨佐々木秀直, 江見 充: 多系統萎縮症の新しい発症メカニズム、医学のあゆみ、査読無、239 巻、2011、1216-1217
- ⑩佐々木秀直: 【特集: 多系統萎縮症 (MSA) の対処療法】診断・治療・療養の現状及び原因解明への取り組み、難病と在宅ケア、査読無、16 巻、2010 年、7-10
- ⑪ Inaba H, Yabe I, Yashima M, Soma H, Nakamura Y, Houzen H, Sasaki H: Unusual retinal phenotypes in an SCA7 family. *Intern Med*, 査読有、48 巻、2009 年、

1461-1464

- ⑫佐藤和則, 矢部一郎, 相馬広幸, 安井建一, 伊藤瑞規, 下畑亨良, 小野寺 理, 中島健二, 祖父江 元, 西澤正豊, 佐々木秀直: 新しい小脳性運動失調の重症度評価スケール Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) 日本語版の信頼性に関する検討、*Brain and Nerve*, 査読有、61 巻、2009 年、591-595
- ⑬Tha KK, Terae S, Yabe I, Miyamoto T, Soma H, Zaitzu Y, Fujima N, Kudo K, Sasaki H, Shirato H: Microstructural white matter abnormalities of multiple system atrophy: in vivo topographic illustration by using diffusion-tensor MR imaging. *Radiology*, 査読有、255 巻、2010、563-9
- ⑭ Sato K, Yabe I, Fukuda Y, Soma H, Nakahara Y, Tsuji S, Sasaki H: Mapping of autosomal dominant cerebellar ataxia without pathogenic PPP2R2B mutation to the locus for spinocerebellar ataxia 12. *Arch Neurol*, 査読有、67 巻、2010、1257-62

[学会発表] (計 5 件)

- ①佐々木秀直, 矢部一郎, 加藤丈夫, 江見 充, 飯島 寛, 伊東紀子, 佐藤秀則: 一卵性双生児 CNV 解析による多系統萎縮症のゲノムコピー数異常の同定、第 52 回日本神経学会学術大会、2011 年 5 月 20 日、名古屋国際会議場 (名古屋)
- ②石井美穂, 江見 充, 飯島 寛, 伊東紀子, 佐藤秀則, 加藤丈夫, 矢部一郎, 佐々木秀直: 多系統萎縮症 (MSA) における SHC2 遺伝子コピー数 (CNV) 異常、日本人類遺伝学会第 56 回大会、2011 年 11 月 11 日、幕張メッセ (千葉)
- ③相馬広幸, 佐藤和則, 矢部一郎, 佐々木秀直: MSA 疾患感受性候補遺伝子の関連解析、第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 20 日、東京国際フォーラム (東京)
- ④佐藤和則, 矢部一郎, 相馬広幸, 佐々木秀直, 福田陽子, 三井 純, 中原康雄, 辻 省次: SCA12 遺伝子座に連鎖しているが PPP2R2B の変異を認めない ADCA の 1 家系、第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 22 日、東京国際フォーラム (東京)
- ⑤佐藤和則, 相馬広幸, 矢部一郎, 佐々木秀直: 日本語版 SARA を用いた多系統萎縮症の経時的評価、第 50 回日本神経学会総会、2009 年 5 月 20 日、仙台国際センター (仙台)

[図書] (2 件)

- ①矢部一郎, 佐々木秀直、メジカルビュー社、改訂第 3 版 EBM に基づく脳神経疾患の基本、2010 年、663 (461-467)
- ②矢部一郎, 佐々木秀直、中外医学社、2009-2010EBM 神経疾患の治療、2009 年、

673 (314-319)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：神経変性疾患の検査方法  
発明者：佐々木秀直、矢部一郎  
権利者：国立大学法人北海道大学  
種類：特許  
番号：特願 2011-034802  
出願年月日：2011 年 2 月 21 日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 秀直 (SASAKI HIDENAO)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：80281806

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

矢部 一郎 (YABE ICHIRO)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：60372273

秋本 幸子 (AKIMOTO SACHIKO)  
北海道大学・病院・助教  
研究者番号：60374328

新野 正明 (NIINO MASAACKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：00443961