

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07534

研究課題名（和文）フェノムワイド関連解析及び日本人特異的変異による過眠症の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Phenome-wide association analysis and elucidation of the molecular basis of hypersomnia by Japanese-specific genetic variants

研究代表者

児玉 亨（KODAMA, Tohru）

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・研究員

研究者番号：20195746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：特発性過眠症のゲノム解析を実施し、その関連変異としてオレキシン前駆体遺伝子の切断サイトに位置するアミノ酸置換を伴う変異（p.Lys68Arg）を同定した。新たな特発性過眠症のサンプルセットを用いて、その関連が再現されることを確認したところ、本変異陽性患者群では重症度が高い傾向を示していた。次に、東北メディカルメガバンク機構より分譲された変異情報及び睡眠情報を用いた解析により、本変異を有する健常者の睡眠表現型に特徴が存在するかを調査したが、有意な相関を示す睡眠表現型は確認されなかった。その代わりにオレキシン2受容体遺伝子上の変異（rs188018846）が日中の眠気と有意に相関することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性過眠症はヘテロジニアスな疾患であり、その原因もほとんどわかっていない。本研究により、特発性過眠症や日中の眠気の原因の一つにオレキシンのパスウェイが関わることを明らかにした。オレキシンは睡眠覚醒制御に関わる神経ペプチドとして知られている。これまでナルコレプシーの発症にオレキシンが寄与すると考えられ、ナルコレプシー治療薬の重要なターゲットとされてきた。本研究の結果から、オレキシンが特発性過眠症の治療薬の候補ともなり得る。また、特発性過眠症や日中の眠気と関連した二つの変異は、どちらもヨーロッパ系集団やアフリカ系集団では、ほとんど認められない変異であり、集団特異的な解析の重要性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：Association analyses were performed to identify genetics variants associated with idiopathic hypersomnia (IH). We found a significant association between IH and a rare missense variant located in the cleavage site of prepro-orexin gene (p.Lys68Arg). We confirmed that the association was replicated by a different sample set (IH and healthy control). Subjective sleepiness severity was higher in the orexin mutation-positive patients. Functional analyses of this missense variant revealed that the cleavage efficiency of the mutant allele was significantly lower and the non-cleaved form had significantly lower pharmacological activity. We conducted an association analysis genotype data and self-reported sleep data in Japanese individuals from the Tohoku Medical Megabank Project cohort. No significant association was observed between p.Lys68Arg and sleep phenotypes. However, a rare variant (rs188018846) located in orexin receptor-2 gene was significantly associated with daytime sleepiness.

研究分野：睡眠学

キーワード：睡眠 特発性過眠症 オレキシン ゲノム 変異 ナルコレプシー 東北メディカルメガバンク機構

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

睡眠表現型に関わる遺伝要因の探索研究は、多くがヨーロッパ系の一般集団において行われており、大規模なゲノムワイド関連解析により関連する多型が同定されているが、その多くはオッズ比が 1.1 以下と効果の弱いものであった。ヨーロッパ系に比べ、日本人を対象とした睡眠の遺伝研究は小規模なものしか行われていない。しかし、代表的な過眠症のナルコレプシーの日本人の有病率は、欧米人よりも 5 倍程度高いことが分かっており、日本人特異的な変異が睡眠表現型に大きな影響を与えている可能性が高いと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、各種過眠症（特に特発性過眠症）の解析、及び東北メディカルメガバンク機構（TOMMO）より分譲された遺伝子型情報と睡眠表現型情報の解析を実施することで、日本人の過眠症の睡眠表現型に大きな影響を与えている変異を同定することを目的とする。過眠症と関連する変異が同定された際は、その変異が、睡眠の客観的検査である MSLT（Multiple Sleep Latency Test：睡眠潜時反復検査）夜間 PSG（Polysomnography:睡眠ポリグラフ検査）及び患者が訴える症状と関連を示すか評価する。これにより、ヘテロジニアスな過眠症のサブタイプを、変異という分子レベルで層別化する基盤データを得る。また同定した変異に関しては、機能的な影響を評価するために、in silico 解析又は in vitro 解析を実施する。

### 3. 研究の方法

特発性過眠症と関連する変異を同定するために、特発性過眠症患者 195 例を対象にエクソーム解析及びその後の関連解析（特発性過眠症患者 440 例及び健常者 8380 例）を一次解析として実施した。その結果、有意であった変異に関しては、特発性過眠症患者 158 例及び健常者 1,446 例による再現性研究（Replication study）を行った。変異陽性の患者と変異陰性の患者で、遺伝的背景に違いが存在するかを検証するために、SNP アレイから得られたゲノムワイドな遺伝子型情報を用いた主成分分析を実施した。同様に変異陽性の患者と変異陰性の患者において、MSLT、PSG 及び JESS（Japanese version of Epworth Sleepiness Scale：エプワース眠気尺度日本語版）等の臨床情報を解析することで、臨床上的違いが認められるか、また認められた場合、その特徴を明らかにすることを目指した。同定した変異に関しては、その機能的な影響を評価するために、in silico 解析又は in vitro 解析を実施した。また、本変異に関しては、下記に示す TOMMO のデータにおいて、一般集団における睡眠表現型に影響を及ぼしているかを確認した。

TOMMO の遺伝子型情報（3.5KJPNv2 及び SNP アレイ）と睡眠表現型情報を用いて、KEGG や各種データベースで抽出した睡眠遺伝子上の変異と睡眠表現型に関連性が認められるか、統計解析を行った。TOMMO の遺伝子型情報の具体的な内容は、全ゲノムリファレンスパネル（シークエンス）の 3.5KJPNv2 より得られた遺伝子型情報（対象症例数：1,519 例）及び SNP アレイより得られた遺伝子型情報（対象症例数：14,329 例）となる。統計解析では、年齢、性別、夜間の睡眠時間及び BMI（body mass index）を共変量として調整した回帰分析を行った。この TOMMO のデータは一般集団から得られた結果であることから、この TOMMO の解析において、睡眠表現型と関連を示した変異に関しては、各種過眠症患者（特発性過眠症患者 478 例、ナルコレプシータイプ 1 患者 509 例、ナルコレプシータイプ 2 患者 223 例）を対象にタイピングし、過眠症と関連するかを評価した。

#### 4. 研究成果

特発性過眠症の関連変異としてオレキシン前駆体遺伝子のクリベージサイトに位置するアミノ酸置換を伴う変異である p.Lys68Arg ( rs537376938 ) を同定した。一次解析における患者群の本変異のマイナーアレル頻度 (MAF) は 1.59 % であるのに対し、健常者群での本変異の MAF は 0.30% であり、オッズ比 5.40、P 値  $2.5 \times 10^{-6}$  と有意な関連を示した。Replication study においても、特発性過眠症との有意な関連が再現されることを確認した (患者群 MAF1.89%、健常者群 MAF0.41%、オッズ比 4.62、P 値  $6.0 \times 10^{-3}$ )。一次解析と Replication study を統合した結果、オッズ比 5.36、P 値  $2.7 \times 10^{-8}$  とゲノムワイド有意な関連を示した。本変異は、ヨーロッパ、ラテン、アフリカ集団においては観察されない変異であり、東アジア人特異的な変異であった。

次に、本変異陽性の患者 13 例と本変異陰性の患者 116 例の DNA から SNP アレイによるゲノムワイドな遺伝子型データを得て、主成分分析を実施したが、両群間で遺伝的背景の違いは確認されなかった。変異陽性の患者と変異陰性の患者における MSLT、PSG 及び JESS 等の臨床情報を比較した結果、変異陰性群に比べ、変異陽性群で JESS のスコアが有意に高い (日中の眠気が強い) ことが分かった (表 1)。また、他の睡眠検査値に関しても、統計的な有意差には到達しなかったが、変異陽性群で重症度が高い傾向を示した。本変異の機能的な影響を検討するため、様々な in silico 解析を実施した結果、そのほとんどで有害な変異であるとの判定であった。次に、変異体と野生型のオレキシン前駆体ペプチドを用いて、切断酵素の PC1/3 及び PC2 による切断活性を評価した。その結果、変異体はほとんど切断されないことを確認し、切断されなかったオレキシン前駆体の受容体結合活性を in vitro で検討した結果、薬理的活性が低いことも確かめた。

表 1. オレキシン前駆体遺伝子の変異 (p.Lys68Arg) と特発性過眠症患者の臨床情報との関連

	IH 変異陽性	IH 変異陰性	P 値 (変異陽性 vs. 変異陰性)
平均睡眠潜時 Mean sleep latency (MSLT), min (n)	4.52 ± 0.69 (18)	5.53 ± 0.18 (452)	0.18
入眠時レム睡眠期数 Number of SOREMP (MSLT) (n)	0.44 ± 0.24 (18)	0.34 ± 0.03 (473)	0.69
睡眠効率 (PSG), % (n)	90.72 ± 1.39 (17)	89.32 ± 0.52 (351)	0.37
無呼吸低呼吸指数 Apnea hypopnea index (PSG), events/hour (n)	3.60 ± 0.85 (19)	2.78 ± 0.18 (436)	0.37
睡眠潜時 Sleep latency (PSG), min (n)	11.47 ± 2.92 (19)	11.44 ± 0.76 (434)	0.99
周期性下肢運動指数 PLMI (PSG), events/hour (n)	0.61 ± 0.31 (17)	1.14 ± 0.22 (353)	0.18
覚醒反応指数 Arousal index (PSG), events/hour (n)	13.64 ± 0.91 (16)	11.53 ± 0.31 (348)	0.046
未治療時における JESS (n)	17.53 ± 0.82 (15)	15.64 ± 0.28 (298)	0.049
HLA-DQB1*06:02 陽性率, % (n)	20.0 (20)	15.2 (572)	0.56

HLA-DQB1\*06:02 陽性率以外は、平均値と標準誤差 (SE: standard error) を表記した。

IH: 特発性過眠症 (Idiopathic Hypersomnia)、JESS: エプワース眠気尺度日本語版 (Japanese version of Epworth Sleepiness Scale)、MSLT: 睡眠潜時反復検査 (Multiple Sleep Latency Test)、PLMI: 周期性下肢運動指数 (periodic limb movement index)、PSG: 睡眠ポリグラフ検査 (Polysomnography)、SOREMP: 入眠時レム睡眠期 (Sleep Onset Rapid Eye Movement Period)

なお、特発性過眠症のエクソーム解析により、オレキシン 2 受容体遺伝子上に二つのアミノ酸置換を伴う変異 p.Arg168Trp ( rs141639071 ) 及び p.Arg213His ( rs200068306 ) も特発性過眠症患者で検出されたが、その後の関連解析により、これら二つの変異は、特発性過眠症と有意な関

連は示さなかった。

TOMMO より分譲されたデータを活用し、特発性過眠症と関連したオレキシン前駆体遺伝子の変異 (p.Lys68Arg) が、一般集団の睡眠表現型と関連するかを検討した。しかし 3.5KJPNv2 における本変異の MAF は 0.3%、SNP アレイにおける本変異の MAF は 0.04%と大きな頻度差が観察された。解析データの中で、3.5KJPNv2 と SNP アレイの両方で本変異がタイピングされている症例があるが、3.5KJPNv2 と SNP アレイでタイピングの結果が不一致な症例が存在することを確認した。SNP アレイでは、本変異は直接タイピングされておらず、Imputation での推定遺伝子型となる。これらのことから、本変異の Imputation が正確ではない可能性が考えられ、SNP アレイの本変異の解析結果は採用できないと判断した。また 3.5KJPNv2 の遺伝子型データは、シーケンスされたものであることから、タイピング結果の信頼性が高いと考えられる。統計解析の結果は、有意な相関は認められなかったが、本変異はレアな変異であり、3.5KJPNv2 の症例数 1519 例と規模が小さく、今回の解析を実施するための統計学上の十分なサンプルサイズを有していない可能性が高い。今後サンプルサイズを拡大したシーケンスベース又は直接タイピングのデータが必要となると考えられる。

上記のオレキシン前駆体遺伝子の変異以外の、睡眠表現型と関連する新規変異を同定するために、TOMMO の遺伝子型情報 (3.5KJPNv2 及び SNP アレイ) と睡眠表現型情報の解析を実施した。その結果、オレキシン 2 受容体遺伝子上の頻度の低い変異 (rs188018846、MAF0.35%) が、日中の眠気と有意に関連することを見出した (P 値  $8.4 \times 10^{-5}$ ) (表 2)。夜間の睡眠時間は特に日中の眠気に影響することが知られているため、症例数は少なくなるが 7 時間以上の夜間の睡眠時間を確保している症例のみを対象とした解析も実施した。その結果、rs188018846 と日中の眠気との有意な関連が再現された (P 値  $1.2 \times 10^{-4}$ )。本変異は、ヨーロッパ、アフリカ集団においては観察されない変異であった。次に、rs188018846 と中枢性過眠症との関連解析を実施した。なおコントロールは上記 14,329 例の rs188018846 の遺伝子型情報とした。その結果、統計学的な有意差は確認できなかったが、特発性過眠症患者において rs188018846 の変異アリルの頻度が高い傾向が観察された (患者群 MAF0.73%、オッズ比 2.07、P 値 0.09)。

表 2. オレキシン 2 受容体遺伝子上の頻度の低い変異 (rs188018846) と日中の眠気との関連

	日中の眠気のカテゴリにおけるマイナーアリル頻度 (MAF)				
	全症例 (n = 14,329)	全くない (n = 3,814)	少しある (n = 9,726)	かなりある (n = 719)	非常にある (n = 70)
rs188018846	0.35%	0.17%	0.40%	0.70%	0.72%

## 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 Shimada Mihoko, Omae Yosuke, Kakita Akiyoshi, Gabdulkahev Ramil, Hitomi Yuki, Miyagawa Taku, Honda Makoto, Fujimoto Akihiro, Tokunaga Katsushi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of region-specific gene isoforms in the human brain using long-read transcriptome sequencing	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadj5279
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adj5279	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 -
1. 著者名 Miyagawa Taku, Tanaka Susumu, Shimada Mihoko, 他35名, Kodama Tohru, Inoue Yuichi, Nishino Seiji, Mishima Kazuo, Tokunaga Katsushi, Honda Makoto	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 Miyagawa Taku, Shimada Mihoko, Honda Yoshiko, Kodama Tohru, Tokunaga Katsushi, Honda Makoto	4. 巻 67
2. 論文標題 A variant in orexin receptor-2 is associated with self-reported daytime sleepiness in the Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 377 ~ 380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-022-01015-2	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 Tanida Kotomi, Shimada Mihoko, Khor Seik-Soon, Toyoda Hiromi, Kato Kayoko, Kotorii Nozomu, Kotorii Tatayu, Ariyoshi Yu, Kato Takao, Hiejima Hiroshi, Ozone Motohiro, Uchimura Naohisa, 他15名, Kodama Tohru, Inoue Yuichi, Mishima Kazuo, Honda Makoto, Tokunaga Katsushi, Miyagawa Taku	4. 巻 20
2. 論文標題 Genome-wide association study of idiopathic hypersomnia in a Japanese population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sleep and Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 137 ~ 148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s41105-021-00349-2	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 宮川 卓、嶋多 美穂子、本多 真
2. 発表標題 A genetic variant in prepro-orexin is associated with idiopathic hypersomnia
3. 学会等名 3rd Asian Narcolepsy & Hypersomnolence Society Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

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 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

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 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 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 睡眠プロジェクト <a href="https://www.igakuken.or.jp/sleep/">https://www.igakuken.or.jp/sleep/</a>
---

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
研究分担者	宮川 卓  (MIYAGAWA Taku)  (20512263)	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   (82609)	
研究分担者	嶋多 美穂子  (SHIMADA Mihoko)  (50792727)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・ゲノム医科学プロジェクト 上級研究員   (82610)	

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
---------	---------