

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 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790331

研究課題名(和文)アルツハイマー病感受性遺伝子座 *APOE* 周辺領域が制御する遺伝子群とその発現解析研究課題名(英文) Identification and expression analysis of genes controlled by a Alzheimer's disease susceptibility region including *APOE*

研究代表者

宮下 哲典 (MIYASHITA AKINORI)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：60323995

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の病態に関与する遺伝子(群)を同定するために、ヒト死後脳を用いた遺伝子発現解析を行った。Braakらの老人斑(SP)、及び神経原線維変化(NFT)ステージ分類を指標に、AD以外の顕著な脳病変を認めないヒト死後脳71症例を用いた。遺伝子発現解析に加え、*APOE*、一塩基多型、コピー数多型の遺伝型を決定した。Braak SP・NFTステージに依存して発現変動する遺伝子を複数同定し、アノテーション情報の整理、*APOE*遺伝型の寄与等の解析を行なった。これら遺伝子の機能とAD脳病理との関連を、文献情報を加味して検討した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly. Molecular mechanisms underlying the progression of AD neuropathological hallmarks, senile plaques (SP) and neurofibrillary tangles (NFT), in the brain remains to be resolved. To identify genes associated with Braak SP-NFT stage criteria, we conducted a genome-wide gene expression analysis. Postmortem brain tissues from 71 brain donor subjects were used. Genomic DNAs were prepared from the frontal cortices for *APOE* genotyping as well as whole-genome single nucleotide polymorphisms and copy number variation genotyping. Total RNAs were isolated, and then used for expression profiling of whole-exon transcripts. Seventy-one brain donors were grouped into several groups according to Braak SP-NFT stages, and expression levels of each gene were compared in view of *APOE* genotypes. We found that more than 10 genes were significantly associated with Braak SP-NFT stage criteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：ゲノム医科学, アルツハイマー病, 感受性遺伝子, ゲノム

1. 研究開始当初の背景

高齢化率の上昇と共にアルツハイマー病

(Alzheimer's disease, AD)は急増している。ADはありふれた疾患で、一卵性双生児研究

から遺伝要因が 60~80%関与すると推定されている (1)。罹患同胞対解析により、染色体 9 番、10 番、19 番に AD 感受性遺伝子の存在が示唆されている (2)。AD 感受性遺伝子として遺伝統計学的に解析された遺伝子は、現時点で約 650 を数えるが、人種を越え再現性のある遺伝子は染色体 19 番の *APOE* だけである (3)。

1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) によるゲノム網羅的な相関解析 (genome-wide association study, GWAS; 4-7) によって、*APOE* 周辺領域が再び注目されている。ゲノム全体を探索しても、AD と強力に再現良く相関するのは *APOE* 周辺領域しかなかったからである。申請者は *APOE* 周辺領域約 200 kb に渡り高密度に SNP を設定し、遺伝統計学的に解析した (8)。その結果、*PVRL2* から *APOC1P1* にかけて存在する 36 SNP が AD と有意に相関した [図 1, 2]。この AD 相関領域は組換えホットスポットに挟まれ、その広がりには約 55 kb であった [図 2]。遺伝統計学的に考察すると、この領域に含まれる 6 遺伝子のどれもが AD 感受性遺伝子と考えられる。ゲノムは高次構造を形成し、ゲノム領域が相互作用しながら機能を発揮する。従って、この領域全体はどのようなゲノム機能を有するのか？ 遺伝子発現はどうか？ との疑問が湧いた。この問いに答えるべく本研究プロジェクトを立案し、実施した。

[参考文献]

- (1) Gatz M, *Arch Gen Psychiatry*. 2006. 63:168-174. (2) Hamshere ML, *Hum Mol Genet*. 2007. 16:2703-2712. (3) Bertram L, *Nat Genet*. 2007. 39:17-23. (4) Pearson JV, *Am J Hum Genet*. 2007. 80:126-139. (5) Coon KD, *J Clin Psychiatry*. 2007. 68:613-618. (6) Li H, *Arch Neurol*. 2008. 65:45-53. (7) Abraham R, *BMC Med Genomics*. 2008. 1:44. (8) Takei N, *Genomics*. 2009. 93:441-448.

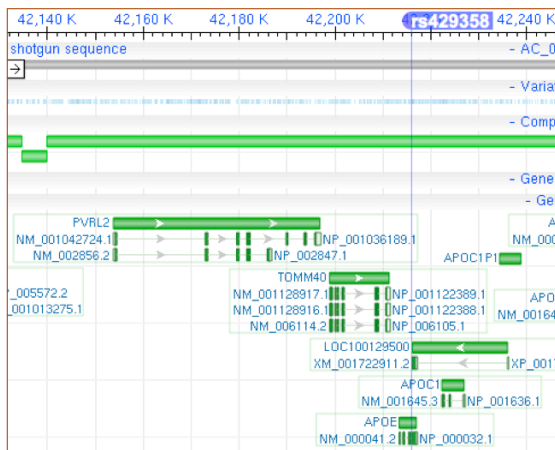


図 1. *APOE* 周辺領域。染色体 19 番長腕

(19q13.2) の *PVRL2* から *APOC1P1* に至る約 100 kb のゲノム領域を示す (NCBI build 36.3)。上流から *PVRL2*, *TOMM40*, *APOE*, *APOC1*, *LOC100129500*, *APOC1P1* の順に並んでいる。*APOC1P1*, *LOC100129500* は最近データベースに登録された。矢印は転写方向を表す。*APOE* のエクソン 4 にあるアミノ酸置換を伴う SNP rs429358 (TGC→CGC, Cys112Arg) は図中で白抜きで表記されている。

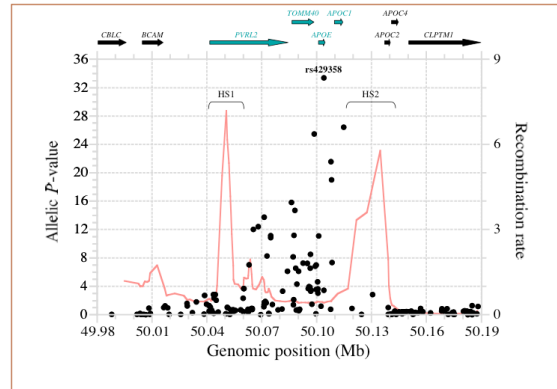


図 2. *APOE* 周辺領域の相関解析。文献(8)の図 1 を改変した。172 SNP のアリル P 値 (-Log₁₀ 変換) がプロットしてある (Y 軸左)。薄い赤線は組み換え率 (4Ner/kb) を示す (Y 軸右)。AD と相関する領域は組換えホットスポット (HS1, HS2) に挟まれていた。その領域には図 1 に示す 6 遺伝子 (*PVRL2*~*APOC1P1*) が位置している。最も有意な SNP は rs429358 で、図中でラベルしている。この図では *LOC100129500* と *APOC1P1* は表記していない。

2. 研究の目的

GWAS によって、ありふれた疾患の感受性遺伝子座が急速に同定されている。今後はそれらの発現レベルや発現制御メカニズムを解析することが、疾患病態を解明する上で重要であろう。疾患感受性遺伝子座の下流遺伝子群を同定するために培養細胞実験系の構築を最終的に掲げた。解析対象遺伝子座として、AD の強力な感受性遺伝子 *APOE* を含むゲノム領域に着目した。

培養系の確立に先立ち、*APOE* 近傍に位置する遺伝子の発現レベルや、SNP・コピー数変異 (copy number variation, CNV) 等のゲノム多型情報が必要であると考えた。従って、本研究プロジェクトではこれらの解析を優先的に行った。

3. 研究の方法

AD 脳の神経病理学的な特徴は、神経細胞外の老人斑 (Senile plaque, SP) と神経細胞内の神経原線維変化 (NFT) である。前者はアミロイド β タンパク、後者は高度にリン酸化されたタウタンパクから主に構成されている。

病気の進行に伴い、これらの病変は一定の方向性を持ち、緩徐に進展する [図 3]。

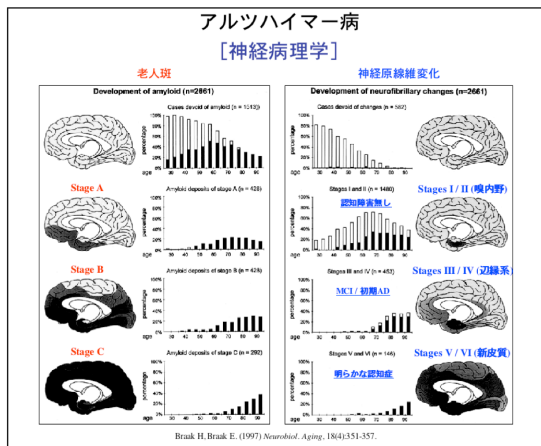


図 3. Braak ら (Neurobiol Aging. [1997] 18:351-357) による SP [左図] と NFT [右図] のステージ分類。[左図] SP はステージ A では、新皮質に少量認められる。ステージ B では海馬でも観察され、ステージ C では脳全体に及ぶ。認知機能障害との相関はない。[右図] NFT はステージ I/II では嗅内野にのみ出現する。臨床的には認知機能は正常である。ステージ III/IV では海馬を含む辺縁系に広がり、認知症の初期症状を示す。ステージ V/VI では新皮質にも達し、明らかな認知症と診断される。

本研究プロジェクトでは、認知機能障害との関連が強い Braak らの NFT ステージ分類を指標に、AD 以外の顕著な脳病変を認めない計 71 症例のヒト死後脳を選択的に選抜し、実験に用いた (東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク提供)。SP や NFT による障害が強く認められる嗅内野 (Entorhinal cortex, EC)、側頭皮質 (Temporal cortex, TC)、前頭葉皮質 (Frontal cortex, FC) に由来する脳組織片を各症例から切り出し、全検体 (71 症例 × 脳部位 3 カ所 = 213 検体) からゲノム DNA (Qiagen: QIAamp DNA Blood Maxi Kit)、全 RNA (Invitrogen: TRIzol® Plus RNA Purification Kit) を抽出した。ゲノム DNA は濃度測定後 (Life Technologies: Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit)、APOE の遺伝型決定と SNP・CNV タイピング (Affymetrix: Genome-Wide Human SNP Array 6.0) に用いた。全 RNA はカラムで精製し、DNaseI 処理を行った。濃度は RiboGreen 法 (Life Technologies: Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit) で測定し、品質は RIN (RNA integrity number) を指標にチェックした。磁気ビーズ法によって rRNA を除去し、逆転写、*in vitro* 転写などを経て、エクソンアレイチップ (Affymetrix: GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array) 上のプローブと反応さ

せた。チップの遺伝子発現強度は RMA (Robust Multi-chip Average) 法で正規化し、Braak NFT・SP ステージ間の遺伝子発現量を比較した。エクソンアレイ解析の検証実験は、定量的リアルタイム PCR 法 (TaqMan 法) で行なった。全 71 症例は新潟大学遺伝子倫理審査委員会の承認を得て使用した。

4. 研究成果

(1) APOE 遺伝型

APOE 遺伝型は、 $e2 \times 2$ と $e2 \times 4$ は 0 例、 $e2 \times 3$ は 4 例 (5.6%)、 $e3 \times 3$ は 55 例 (77.5%)、 $e3 \times 4$ は 9 例 (12.7%)、 $e4 \times 4$ は 3 例 (4.2%) であった。APOE- $e2$ 、 $e3$ 、 $e4$ アリル数はそれぞれ 4 (2.8%)、123 (86.6%)、15 (10.6%) であった。71 症例を Braak NFT・SP ステージ分類でそれぞれ層別化し、 $e4$ アリルの保有者 ($e3 \times 4$ 、 $e4 \times 4$) と非保有者 ($e2 \times 3$ 、 $e3 \times 3$) の頻度を比較したところ、共に有意差を認めた (NFT, $P_{\text{Fisher}} = 0.0113$; SP, $P_{\text{Fisher}} = 0.0049$)。

(2) SNP・CNV ジェノタイピング

Genotyping Console™ ver. 4.1.2 (Affymetrix) を用いて、SNP・CNV ジェノタイピングを行った。71 症例中 70 症例はサンプルレベルの quality control をパスした (contrast QC ≥ 0.4 : 平均 = 2.8, 標準偏差 [SD] = 0.4, 最小値 - 最大値 = 1.8 - 3.6)。

(3) RNA 品質

RIN の平均値は EC で 7.2 (SD = 1.26; 最小値 - 最大値 = 2.9 - 9.0)、TC で 7.5 (SD = 1.04; 最小値 - 最大値 = 3.9 - 9.2)、FC で 7.6 (SD = 1.12; 最小値 - 最大値 = 3.6 - 8.9) であった。RIN は脳部位ではなく個体に依存することが分かった [図 4]。脳部位間で RIN を比較したところ有意差はなかった ($P_{\text{ANOVA}} = 0.1427$)。RIN と死後脳経過時間との相関を各脳部位で調べたところ、EC ($P = 0.0023$) と FC ($P = 0.0479$) で弱い負の相関を認めた。

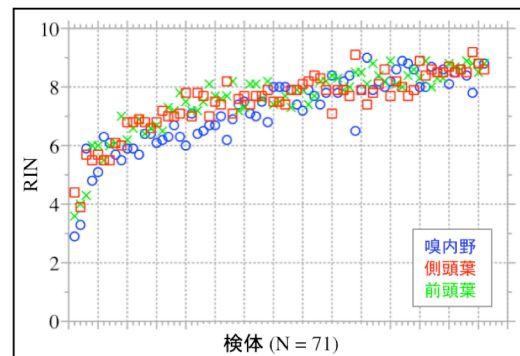


図 4. 症例ごとの RIN。RIN (平均) が低い検体から順番に左から並んでいる。RIN が高いほど RNA の品質は良い。RIN は脳部位ではな

く個体依存的であった。すなわち、どの脳部位でも RIN が低い症例がいる一方、どの脳部位でも高い症例がいた。

(4) APOE 周辺領域の遺伝子発現

APOE、及びその周辺領域に位置する PVRL2、TOMM40、APOC1 の遺伝子発現が Braak NFT・SP ステージ分類に依存して変動するかどうかを調べた。全て有意差を示さなかった。

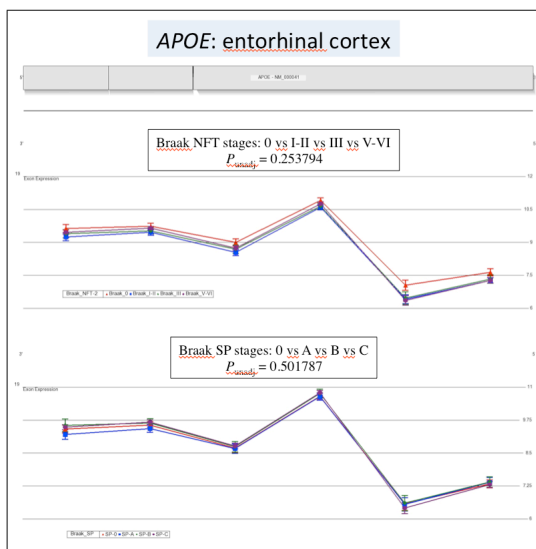


図 5. Gene view の例。EC における APOE の遺伝子発現パターンを示す。上図は Braak NFT・ステージ分類で層別化した場合、下図は Braak SP ステージ分類で層別化した場合。APOE の遺伝子発現はどちらのステージ分類とも相関しなかった。

(5) 今後の展開

APOE 周辺領域の SNP・CNV の遺伝型を決定した後、遺伝子発現量との関連を調べ、培養細胞実験系の確立に役立てる。また、全ゲノムレベルで遺伝子発現量と SNP・CNV との関連を精査し、AD 病巣の進展に関わる遺伝子群を明らかにする。

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 12 件)

- ① Ikeuchi T, Imamura T, Kawase Y, Kitade Y, Tsuchiya M, Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Tsukie T, Miyashita A, Sugishita M, Kuwano R, Nishizawa M. Evidence for a Common Founder and Clinical Characteristics of Japanese Families with the MAPT R406W Mutation. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra*. 1:267-275. (2011) 査読有。
- ② 桑野良三, 宮下哲典. Apolipoprotein E

遺伝子. *日本臨床*. 2011, 69(増刊号 8):93-97. 査読無。

③ 桑野良三, 宮下哲典, 月江珠緒. 検査診断学とバイオマーカー: 概論. *日本臨床*. 2011, 69(増刊号 8):476-483. 査読無。

④ 宮下哲典, 桑野良三. 遺伝子診断とイメージング・ジェネティクス. *日本臨床*. 2011, 69(増刊号 8):565-569. 査読無。

⑤ 宮下哲典, 桑野良三. 認知症のイメージングゲノミクス. 別冊・医学のあゆみ. 2011, 57-61. 査読無。

⑥ Koshy B, Miyashita A, St Jean P, Stirnadel H, Kaise T, Rubio JP, Mooser V, Kuwano R, Irizarry MC. Genetic deficiency of plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 (PLA2G7 V297F null mutation) and risk of Alzheimer's disease in Japan. *J Alzheimers Dis*. 21:775-780. (2010) 査読有。

⑦ Maksimova N, Hara K, Nikolaeva I, Chun-Feng T, Usui T, Takagi M, Nishihira Y, Miyashita A, Fujiwara H, Oyama T, Nogovicina A, Sukhomyasova A, Potapova S, Kuwano R, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O. Neuroblastoma amplified sequence gene is associated with a novel short stature syndrome characterised by optic nerve atrophy and Pelger-Huet anomaly. *J Med Genet*. 47:538-548. (2010) 査読有。

⑧ Adachi T, Saito Y, Hatsuta H, Funabe S, Tokumaru AM, Ishii K, Arai T, Sawabe M, Kanemaru K, Miyashita A, Kuwano R, Nakashima K, Murayama S. Neuropathological Asymmetry in Argyrophilic Grain Disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 69:737-744. (2010) 査読有。

⑨ Fu YJ, Nishihira Y, Kuroda S, Toyoshima Y, Ishihara T, Shinozaki M, Miyashita A, Piao YS, Tan CF, Tani T, Koike R, Iwanaga K, Tsujihata M, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M, Kakita A, Ikeuchi T, Takahashi H. Sporadic four-repeat tauopathy with frontotemporal lobar degeneration, Parkinsonism, and motor neuron disease: a distinct clinicopathological and biochemical disease entity. *Acta Neuropathol*. 120:21-32. (2010) 査読有。

⑩ Hara K, Kokubo Y, Ishiura H, Fukuda Y, Miyashita A, Kuwano R, Sasaki R, Goto J, Nishizawa M, Kuzuhara S, Tsuji S. TRPM7 Is Not Associated With Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula of Japan. *Am J Med Genet Part B*. 153B:310-313. (2010) 査読有。

⑪ 宮下哲典, 桑野良三. 認知症性疾患の遺伝子と病態・認知症の遺伝子異常. 神経内科 (特別増刊号:認知症診療マニュアル). 2010, 72(Suppl. 6):40-45. 査読無.

⑫ 宮下哲典, 桑野良三. 認知症のイメージングゲノミクス. 医学のあゆみ. 2010, 235(6):663-667. 査読無.

[学会発表] (計 17 件)

① Ryozo Kuwano, Tamao Tsukie, Akinori Miyashita, Takeshi Ikeuchi, Akihiro Nakaya, Takeshi Iwatsubo, and The Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Biomarker for diagnosis of Alzheimer's disease. 42nd NIPS International Symposium - NIPS and BRI Niigata University Joint Symposium -. 2012. 3. 6. 岡崎.

② 宮下哲典, 月江珠緒, 中谷明弘, 桑野良三. アルツハイマー病のゲノム・遺伝子発現解析. 新潟脳神経研究会第 294 回例会. 2011. 11. 29. 新潟.

③ 宮下哲典, 齋藤祐子, 初田裕幸, 月江珠緒, 村山繁雄, 井原康夫, 中谷明弘, 桑野良三. アルツハイマー病の遺伝子発現プロファイリング. 第 30 回日本認知症学会. 2011. 11. 11-12. 東京.

④ 宮下哲典, 月江珠緒, 齋藤祐子, 初田裕幸, 中谷明弘, 村山繁雄, 井原康夫, 桑野良三. アルツハイマー病における遺伝子発現解析. BioJapan2011. 2011. 10. 5-7. 横浜.

⑤ Ryozo Kuwano, Akinori Miyashita, Asako Koike, Nao Nishida, Katsusi Tokunaga, Ken Yamamoto, Shoji Tsuji, Yasuo Ihara. Genome-wide association study of late-onset Alzheimer's disease in Japanese. 第 34 回日本神経科学大会. 2011. 9. 16. 横浜.

⑥ Miyashita A, Saito Y, Hatsuta H, Tsukie T, Murayama S, Ihara Y, Kuwano R. Gene expression profiling in the postmortem brains classified by Braak neurofibrillary tangle staging. Alzheimer's Association International Conference 2011. 2011. 7. 17. Paris.

⑦ 宮下哲典, 齋藤祐子, 初田裕幸, 月江珠緒, 村山繁雄, 井原康夫, 桑野良三. 死後脳におけるアルツハイマー病関連遺伝子の発現プロファイリング. 第 29 回日本認知症学会. 2010. 11. 5-6. 名古屋.

⑧ 温雅楠, 宮下哲典, 月江珠緒, 齋藤祐子, 初田裕幸, 村山繁雄, 柿田明美, 高橋均, 北村信隆, 赤澤宏平, 井原康夫, 桑野良三. アルツハイマー病組織における SORL1 の遺伝子発現解析. 第 29 回日本認知症学会. 2010. 11. 5-6. 名古屋.

⑨ 月江珠緒, 宮下哲典, 池内健, 角田伸人, 高橋智, 桑野良三. 脳脊髄液中のアミロイドβ, 総タウ, リン酸化タウ測定条件の検討. 第 29 回日本認知症学会. 2010. 11. 5-6. 名古屋.

⑩ 初田裕幸, 齋藤祐子, 伊藤慎治, 杉山美紀子, 舟辺さやか, 新井富生, 沢辺元司, 金丸和富, 石井賢二, 宮下哲典, 桑野良三, 村山繁雄. 後部帯状回と楔前部におけるアミロイドβ沈着. 第 29 回日本認知症学会. 2010. 11. 5-6. 名古屋.

⑪ 宮下哲典, 月江珠緒, 齋藤祐子, 初田裕幸, 村山繁雄, 桑野良三. アルツハイマー病における遺伝子発現解析. 第 28 回バイオテクノロジーシンポジウム. 2010. 9. 29. 横浜.

⑫ 温雅楠, 宮下哲典, 月江珠緒, 齋藤祐子, 初田裕幸, 村山繁雄, 柿田明美, 高橋均, 北村信隆, 赤澤宏平, 桑野良三; The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease (JGSCAD, 代表: 井原康夫). アルツハイマー病組織における SORL1 の発現解析. 第 40 回新潟神経学夏期セミナー. 2010. 8. 6. 新潟.

⑬ Miyashita A, Saito Y, Hatsuta H, Tsukie T, Kakita A, Iijima R, Ogishima S, Tanaka H, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Kuwano R. Gene expression profiling of postmortem brain tissues with Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference 2010. 2010. 7. 11. Hawaii.

⑭ Koshy B, Miyashita A, StJean P, Stirnadel H, Kaise T, Rubio J, Mooser V, Kuwano R, Irizarry M. Genetic deficiency of plasma lipoprotein phospholipase A2 (Lp-PLA2) and risk of Alzheimer's disease in Japan. Alzheimer's Association International Conference 2010. 2010. 7. 11. Hawaii.

他 3 件

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計 0 件）

なし

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.bri.niigata-u.ac.jp/~idenshi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 哲典 (MIYASHITA AKINORI)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：60323995

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし