

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 18 日現在

機関番号：32653
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791359
 研究課題名（和文）
 次世代超高速シーケンサーを用いた脳動脈瘤関連遺伝子領域からの責任変異の同定
 研究課題名（英文）
 Next generation sequencing of susceptibility loci for intracranial aneurysms to identify disease-causal mutations
 研究代表者 赤川 浩之 (AKAGAWA HIROYUKI)
 東京女子医科大学・医学部・テニュアトラック准教授
 研究者番号：60398807

研究成果の概要(和文):脳動脈瘤との連鎖と関連が報告されている染色体 14q23 領域に注目し、脳動脈瘤の大家系を対象に次世代シーケンサーによるターゲット・リシーケンシングを行った。得られた網羅的データに独自のクオリティコントロールを加えて解析を行ったところ、14q22.3～14q24.3 領域に正の連鎖シグナルが再現され、やはりこの領域に感受性遺伝子が存在している可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：A susceptibility locus for intracranial aneurysms on chromosomel4q23 was extensively analyzed with next generation sequencing. Positive linkage signal was successfully replicated in 14q22.3～14q24.3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳血管障害学

キーワード：脳動脈瘤、遺伝子、rare variant

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤の破裂はクモ膜下出血をきたす。クモ膜下出血は重篤疾患で、約半数は初回出血で死亡する。さらに、手術で救命しえても意識障害や片麻といった重度の後遺症を残すことも少なくなく、出血前診断・治療に対する社会的要請が最も高い疾患のひとつといえる。脳動脈瘤やくも膜下出血を多発する家系が存在すること、また、脳動脈瘤を合併する遺伝性疾患が存在することから、脳動脈瘤には遺伝的な要因が高く関与していることが示されてきた。これを受け、我々は世界に先駆けて全ゲノム領域での罹患同胞対連

鎖解析を行い、5番、7番、14番染色体上に脳動脈瘤感受性領域を同定した (Am J Hum Genet 69:804-819, 2001)。この研究が口火となり、現在では世界中で脳動脈瘤関連遺伝子の研究が行われるようになった。連鎖解析以降も、我が研究班がこの研究を世界的にリードし、多くの業績を残してきた。我々の研究で最も強い連鎖を認めた染色体 7q11 領域は、米国の研究班の解析でも連鎖が再現されたことから (Hum Genet 114:250-255, 2004)、まずこの領域に注目し感受性遺伝子の同定を進めてきた。その結果、ELN、LIMK1 遺伝子を含む連鎖不平衡ブロックに疾患遺伝子座

を絞り込むことに成功した。さらにこのブロックを詳細に解析したところ、ELN、LIMK1 遺伝子の転写産物とともに減少させる機能的ハプロタイプが脳動脈瘤形成の一因となっていることを突き止めた。ELN、LIMK1 遺伝子はともに、アクチンの重合を制御することにより血管平滑筋細胞の表現形を決定する同じ signaling pathway に属している。我々が見出したリスク・ハプロタイプは、このシグナルを減弱させることにより血管壁の脆弱性を惹起し、脳動脈瘤の形成を促すのである (Hum Mol Genet 15:15(10):1722-34, 2006)。この業績は内外から高く評価され、第 13 回日本脳神経外科学会奨励賞の受賞論文となった。さらに近年の業績では、この ELN/LIMK1 遺伝子との遺伝子間相互作用により脳動脈瘤の発生に寄与する LOXL2 遺伝子の同定にも成功している (Hum Genet 121(3-4):377-87, 2007)。

しかしながら、これらの知見は Polygenic disease である脳動脈瘤の遺伝的要因の一部を説明できていないに過ぎない。その他の遺伝的要因の検索がまだまだ必要な状況であるが、このような連鎖解析からポジショナルクローニング、あるいは候補遺伝子の検索といった従来のアプローチでは限界がある。そこで、近年、これら従来のアプローチに取って代わってきたのが Genome Wide Association Study (GWAS) である。高密度マイクロアレイを用いて 10 万から 100 万個の single nucleotide polymorphism (SNP) を数千から 1 万を超えるサンプルで大量ジェノタイピングを行い、患者・対照連鎖解析を全ゲノムにわたって行うものである。脳動脈瘤においても、我々とエール大学、オランダ、フィンランドの共同研究で 2100 例の動脈瘤患者と 8000 例の対照を用いた GWAS が行われ、いくつかの信頼性の高い感受性領域が特定された (Nature Genet 40:1472-1477, 2008)。

しかし、GWAS で検出された関連 SNP はあくまで疾患関連連鎖不平衡を代表するマーカーとしての意味合いが強く、それ自体が遺伝子の機能変化に関わって疾患発症に寄与するわけではない。すなわち、GWAS では遺伝子に機能変化をもたらして疾患発症へ直結するような rare variant (責任変異) の検出まではできない。

そこで、次なる研究目標として、以下の条件を満たす領域を最優先ターゲットと定め、そこから責任変異を同定する計画を立案した。すなわち、(1) 2 つ以上の独立した研究で有意な連鎖、または関連が報告されている領域で、(2) 我々の臨床サンプルのデータが結果に含まれているもの、である。この 2 つの条件を満たすものとして、染色体 14q23 の SNP rs767603 領域があがった。この領域は、我々の連鎖解析で 2 番目に高い連鎖を認めた領域

であり、米国の脳動脈瘤家系の解析でも連鎖が再現された (Stroke 37:1021-1027, 2006)。さらに本邦の他研究班で行われた、現在までに報告のあった全ての連鎖領域全域での関連解析 (Locus Wide Association Study) により、SNP rs767603 と、この SNP を組み込んだハプロタイプで有意な関連も再現された (J Hum Genet 53(4):325-32, 2008)。すなわち、我々の研究結果とあわせると異なる 3 集団において有意な連鎖と関連が再現されたことになる。本研究では、この有力な候補染色体領域に注目し、次世代超高速シーケンサー (SOLiDTM4、ライフテクノロジーズ社) をもちいたターゲット・リシーケンシングを行い、疾患への寄与度が高い rare variant の検出を試みた。

次世代超高速シーケンサー SOLiDTM4 を用いたターゲット・リシーケンシングは現在最も注目されている遺伝子解析法のひとつである。脳動脈瘤の遺伝子解析への応用は初めての例になると考えられるが、特に、我々の臨床サンプルからは他施設の研究でも再現性のある遺伝子座が複数検出されており、次世代超高速シーケンサーの応用に最も適した研究であるといえる。本研究により責任変異が同定されれば、未だ不明な点が多い脳動脈瘤の分子生物学的発生機序の一端が解明でき、ひいては遺伝子治療、ゲノム創薬といったテーラーメイド医療への応用も目指すことができると考えられる。

2. 研究の目的

脳動脈瘤のような多因子疾患の遺伝子解析法として、近年は GWAS が信頼できる方法として定着してきている。しかし、GWAS ではアレル頻度の高い SNP が解析の対象となるため、疾患と関連する連鎖不平衡領域は同定できても、疾患への寄与度が高い rare variant の検出ができない。近年、1 回のランで 10~15G 塩基を 99.9%の精度でシーケンス可能な、次世代超高速シーケンサーが当施設に導入され、SNP のみならず rare variant も効率よく同定できる体制が整った。この次世代超高速シーケンサーを用いて、すでに連鎖解析あるいは大規模の患者・対照連鎖解析で同定されている疾患関連領域から脳動脈瘤責任変異を同定するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ターゲット・リシーケンシング

次世代シーケンサー SOLiD システムによるリシーケンシングを計画した。サンプルは、先のゲノムワイド連鎖解析にて第 14 染色体連鎖領域で Identity-by-descent ≥ 1 であった大家系を一つ選定した。この家系は家系内に罹患者を 7 名有する大家系であり、この家系からサンプリング可能であった罹患

者および非罹患患者合計7名のサンプルを解析に供した(詳細は後述)。以下に、リシーケンシングの行程を示す。

①フラグメント・ライブラリーの作成

DNA サンプルをソニケーターにより60~80塩基のフラグメントに断片化し、フラグメントの両端にP1、P2アダプターを結合させる。

②エマルジョンPCR、スライドガラス上にビーズ固定

エマルジョンPCRとは、反応液をオイルに懸濁して限界希釈状態とし、オイル中の水泡内で行うPCR反応である。1 μ m大のビーズ上にP1プライマーが付加されており、このビーズ上でクロナルDNAが増幅される。ビーズ上に伸展されたPCR産物の3'末端を修飾し、ビーズをスライドガラス上に固定する。

③SOLiDTMシステムを用いたライゲーション法によるシーケンシング

蛍光標識した2塩基プローブを鋳型DNAに順次結合させることにより、2塩基ずつ配列を決定していく方法である。1ランで10ギガ塩基以上の配列情報が得られる。また、SOLiDTMシステムでは、独自の2ベースエンコーディング法が採用されており、各塩基を異なったポジションで2回ずつ読み取ることにより、99.9%以上の精度でvariantの検出が可能となっている。

同時に、SOLiDデータのクオリティコントロールを行う目的でイルミナ社SNP arrayを用いて、高密度のSNPジェノタイピングも行った。SOLiDシステムにより抽出されたデータはSNP arrayのデータと照らし合わせてヴァリデーションを行った。SNP arrayに搭載されていない新規のヴァリエーションについてはサンガー法によりシーケンスしヴァリデーションを行った。

(2)データ解析

検出された配列変化について、それがもたらす遺伝子の機能的変化を検証する。WebベースのソフトウェアPolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>)やSorting Intolerant from Tolerant (SIFT; <http://blocks.fhrc.org/sift/SIFT.html>)を用いれば、機能的に病的変異となりうるのかどうかを検証できる。さらに、同定された病的変異については連鎖解析で用いた家系サンプルを用いて疾患とともに家系内で伝達されているかどうかを検証する。

4. 研究成果

まず、染色体14q23のSNP rs767603を患者168例と対照193例でジェノタイピングして関連解析を行った。Tアレル頻度が患者群で14%に対し、対照群では20%でP=0.034と

有意な関連が再現された。やはりこの領域に感受性遺伝子が存在している可能性が高いと考えられた。

次に次世代シーケンサーSOLiDシステムによるリシーケンシングを行った。解析に供したサンプルは先に述べた通り、脳動脈瘤罹患患者を3世代で7名有する大家系からサンプリングした検体である。本家系では不完全浸透の優性遺伝形式が想定され、第2世代から罹患患者3例、保因者1例、非罹患患者2例、そして第3世代から罹患患者1例をサンプリングすることができ、SOLiD解析に供した。同時に同じサンプルで、SOLiDデータのクオリティコントロールおよび、注目した本家系単一で密な連鎖解析を行う目的でイルミナ社SNP arrayを用いて、高密度のSNPジェノタイピングも行った。得られた網羅的遺伝子型データで、本単一家系でパラメトリック連鎖解析を行った。SNP arrayデータ単独、SOLiDデータ単独、そして両方を統合したデータで、それぞれ連鎖解析を行った。その結果、rs862132~rs10148224 (14q22.3~14q24.3)の領域で多点HLOD値が正の連鎖シグナルが再現された。3パターンともに再現性あるデータが得られ、SOLiDデータのクオリティが良好であることが示された。

次に、この連鎖領域でSOLiDデータのフィルタリングを行った。まずは、家系内で疾患とともに伝達しているアミノ酸置換またはスプライス部位の変異で、Common SNPとしてデータベースに登録されていないものを抽出することとした。その結果、これに該当する一塩基置換または小さな欠失挿入はこの連鎖領域には存在しないことが判明した。すなわち、この領域についてはコーディング領域以外で遺伝子発現調節領域も含めた解析が必要なことがわかった。また、大きな欠失・挿入など構造変化(Structural variation, SV)の検討も必要であると考えられた。そのための最も有用な方策はSOLiDによるpaired-end mapping法を用いた全ゲノムシーケンスであり、本家系発端者についてそれを実施した。先に行ったリシーケンスデータと統合すると、14番染色体連鎖領域rs862132~rs10148224 (14q22.3~14q24.3)で、のべ1584個の一塩基置換(single nucleotide variant, SNV)と15個の大きな欠失・挿入が検出できている。現在、SNVについてはサンガー法によるヴァリデーション作業を継続している。また、大きな欠失・挿入については、SNP arrayのデータをもとにComparative Genomic Hybridization法(SNP-CGH)によるヴァリデーション方法の検討に入り解析を進めているところである。

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1件)

Krischek B, Tajima A, Akagawa H, Narita A, Ruigrok Y, Rinkel G, Wijmenga C, Feigl GC, Kim CJ, Hori T, Tatagiba M, Kasuya H, Inoue I. Association of the Jun dimerization protein 2 gene with intracranial aneurysms in Japanese and Korean cohorts as compared to a Dutch cohort. *Neuroscience*. 169(1):339-43. 2010, 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- ① 赤川浩之、米山 琢、恩田英明、西澤 勉、岡田芳和、糟谷英俊. 「脳動脈瘤候補遺伝子の Rare Variant を用いた関連解析」第11回日本分子脳神経外科学会、2010年8月27日、仙台
- ② Hiroyuki Akagawa, Taku Yoneyama, Hideaki Onda, Boris Krischek, Tsutomu Nishizawa, Hidetoshi Kasuya. Confirmation of an association of TNFRSF13B sequence variants with intracranial aneurysms in Japanese patients. 2011 AANS 79th Annual Scientific Meeting, April 9-13, 2011, Colorado Convention Center, Denver, Colorado

□

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤川 浩之 (AKAGAWA HIROYUKI)

東京女子医科大学・医学部・テニユアトラック准教授

研究者番号：60398807