

令和元年5月27日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04709

研究課題名(和文)ナルコレプシーの感受性遺伝子の探索及び個別化治療への応用

研究課題名(英文) Searching for susceptibility genes for narcolepsy, and their application for precision 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・主席研究員

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)：ナルコレプシーを対象としたゲノムワイド関連解析及びゲノムワイドメチル化解析を実施した結果、ナルコレプシーはCCR3遺伝子近傍のSNP及びメチル化プローブとの有意な関連を見出した。このSNPとメチル化プローブはmeQTL関係にあり、CCR3遺伝子の発現量が患者で低下していた。ポリジェニック解析の結果、ナルコレプシーとHLA-DQB1*06:02陽性真性過眠症は遺伝的共通性が確認された。HLA-DQB1*06:02陰性真性過眠症を対象としたオミックス解析を実施し、CRAT遺伝子近傍のSNPとの有意な関連を確認し、さらに本疾患の原因の候補物質としてスクシニルカルニチンを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果からナルコレプシーにおけるオレキシン産生神経の脱落にはCCR3を介した免疫異常が関わることが示唆された。ナルコレプシーの発症前後に起きている免疫異常を抑えることで、オレキシン産生神経の脱落を防ぐことが可能であると推測される。HLA-DQB1*06:02を遺伝マーカーとして真性過眠症の病態が異なることがわかり、これは個別化医療につながる結果であった。HLA-DQB1*06:02陰性の真性過眠症には代謝異常が関わり、その原因物質の候補としてスクシニルカルニチンを同定できた。これは創薬のターゲットにもなる結果であった。

研究成果の概要(英文)：We performed genome-wide and epigenome-wide association studies in narcolepsy, identifying that a SNP and a DNA methylation probe in the CCR3 gene region were associated with narcolepsy. meQTL was identified through a significant association between the SNP and the DNA methylation probe. Expression levels of the CCR3 were significantly lower in patients with narcolepsy than in controls. A polygenic analysis using genome-wide SNP data revealed that patients with HLA-DQB1*06:02-positive essential hypersomnia (EHS) were estimated to possess higher shared genetic background to narcoleptic patients. In addition, we found a significant association between HLA-DQB1*06:02-negative EHS and a SNP in the CRAT gene region, and succinylcarnitine as a candidate biomarker for HLA-DQB1*06:02-negative EHS.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：ナルコレプシー ゲノム ゲノムワイド関連解析 睡眠 過眠症 アシルカルニチン 人類遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナルコレプシーは代表的な過眠症であり、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主症状とする。その有病率は日本では 0.16~0.18%、欧米では 0.02~0.06%と推定されている。ナルコレプシーは遺伝要因や環境要因が複雑に作用し合って、発病に至る多因子疾患である。約 90%のナルコレプシー患者で脳脊髄液中のオレキシン(ヒポクレチン)濃度が著しく低下していること、及び後部視床下部に存在するオレキシンを産生する神経が脱落していることが判明しており、オレキシン神経系の機能不全がナルコレプシーの病態に大きく関わっていることがわかっている。しかし、なぜナルコレプシー患者においてオレキシン産生神経が脱落するかわかっていない。ナルコレプシーの遺伝要因として、ヒト白血球型抗原(human leukocyte antigen; HLA)との強い関連が知られており、90%以上のナルコレプシー患者が *HLA-DQB1*06:02* を保有していることがわかっている。*HLA* との関連から、ナルコレプシー患者におけるオレキシン産生神経の脱落には免疫が関わることが想定される。我々はナルコレプシーのゲノム研究を以前より実施し、*CPT1B* (carnitine palmitoyltransferase 1B) を感受性遺伝子として報告した。*CPT1B* は酸化に関わる律速酵素をコードする。機能解析を実施した結果、脂肪酸酸化の機能低下がナルコレプシーのリスクになることが考えられた。また、ナルコレプシー以外の過眠症として、真性過眠症が知られている。ナルコレプシーとの大きな違いとしては、真性過眠症は情動脱力発作が認められないことである。真性過眠症の正確な有病率は不明であるが、ナルコレプシーより少ないと推測されている。一部の患者を除き、真性過眠症はオレキシン神経系との関連は無いものと考えられている。

2. 研究の目的

背景で述べた *HLA* や *CPT1B* だけではナルコレプシーの全ての遺伝要因を説明できないことがわかっている。*HLA-DQB1*06:02* は特に強いナルコレプシーの遺伝要因ではあるが、*HLA-DQB1*06:02* は一般集団でもコモンなアリルでもある(日本人では12%の人が *HLA-DQB1*06:02* を保有する)。ポリジェニック解析も実施したが、効果の弱い多くの遺伝要因がナルコレプシーには存在することもわかった。そこで、本研究では新規のナルコレプシー感受性遺伝子を同定するために、ゲノムワイド関連解析(GWAS)及びゲノムワイドメチル化解析(EWAS)を行った。さらにGWASとEWASを統合した解析も新たな試みとして実施した。同定した感受性遺伝子に関しては、機能解析を実施し、ナルコレプシーの病態解明を目指した。真性過眠症の感受性遺伝子はほとんど報告されておらず、その病態はナルコレプシー以上に不明である。そこで真性過眠症のGWASを実施することで、感受性遺伝子の同定を目指した。

3. 研究の方法

ナルコレプシーを対象としたGWASは患者409例及びコントロール約1,562例、EWASは患者26例及びコントロール20例のサンプルサイズで実施した。さらにGWAS、EWAS及びmeQTL(methylation quantitative trait loci)の情報を用いた統合解析を行った。真性過眠症のGWASは患者157例及びコントロール1,582例のサンプルサイズで実施した。GWASはAffymetrix社のSNPアレイ、EWASはillumina社のメチル化アレイを用いた。真性過眠症の解析では、GWASの結果の再現性を確認するためにReplication studyを実施した(真性過眠症:患者283例及びコントロール433例)。Replication studyにおけるSNPタイピングは、Taqman法を用いた。GWASではPCA(principal component analysis)や全サンプルのペアのIBD(identical by descent)推定等を実施し、適切なデータを用いた関連解析を行った。EWASに関しても、データのフィルタリングや標準化を行うことで、最大限偽陽性又は偽陰性な結果の排除に努めた。またGWASデータを用いて、遺伝率や各疾患の遺伝的背景のオーバーラップを評価するために、ポリジェニック解析を実施した。その際、ネガティブコントロールとして、パニック症患者376例及び自閉症スペクトラム障害患者213例のGWASデータも利用した。

4. 研究成果

ナルコレプシーのGWAS、EWAS及び統合解析の結果、ナルコレプシーの感受性遺伝子として *CCR3* (chemokine receptor 3) を同定した。具体的には、SNP(rs60939770)はナルコレプシーと有意な関連があり、*CCR3* 近傍のメチル化プロンプ cg04111761 も患者、健常者間でメチル化率に差があった。また rs60939770 と cg04111761 は meQTL 関係にあった。さらに我々は *CCR3* の遺伝子の発現量がナルコレプシー患者群で低下していることを確認している。これらの結果から、本研究により見つかったメチル化部位 cg04111761 が *CCR3* の発現に寄与している可能性が示唆された。別の研究ではあるが、*Ccr3* のノックアウト(KO)マウスのオレキシン産生神経への影響を解析した結果、*Ccr3* KO マウスではオレキシン産生神経数がワイルドタイプに比べ、減少していることを確認している。

GWAS データを用いたポリジェニック解析の結果、ナルコレプシーは *HLA-DQB1*06:02* だけではその遺伝性を説明することができず、効果量の小さい疾患関連変異が数多く存在していることがわかった。そして、以前より真性過眠症は *HLA-DQB1*06:02* を保有する患者(陽性)と保有しない患者(陰性)でその病態が異なり、*HLA-DQB1*06:02* 陽性真性過眠症は病態としてはナルコレプシーに近いと言われてきたが、その直接的な証拠はなかった。今回ポリジェニック解析を行ったところ、ナルコレプシーと *HLA-DQB1*06:02* 陰性真性過眠症では遺伝的共通性が小さい

が、ナルコレプシーと *HLA-DQB1*06:02* 陽性真性過眠症においては遺伝的共通性が存在することがわかり、これまでの仮説を支持する研究結果を得た。そして、真性過眠症のゲノム関連研究を行う際は、*HLA-DQB1*06:02* 陽性と陰性で、解析を層別する必要があることもわかった。なお、ナルコレプシーはパニック症及び自閉症スペクトラム障害とは遺伝的なオーバーラップは観察されなかった。

*HLA-DQB1*06:02* 陰性真性過眠症を対象とした GWAS を再度実施し、その後の Replication study により、*HLA-DQB1*06:02* 陰性真性過眠症において *CRAT* (carnitine acetyltransferase) の近傍の SNP (rs10988217) の G アリルの頻度がゲノムワイドレベルで有意に高いことを明らかにした。当該領域の SNP と代謝物の関連を探索するために、公開されている健常者集団のメタボローム GWAS データを解析したところ (Shin. Nature Genetics 2014)、rs10988217 の G アリル群で血中スクシニルカルニチン値 (炭素鎖 4 の短鎖アシルカルニチン) がゲノムワイドレベルで有意に高いことがわかった。興味深いことに本領域で最も強い関連を示す SNP が、*HLA-DQB1*06:02* 陰性真性過眠症とスクシニルカルニチンの両解析において同じ rs10988217 であった。このスクシニルカルニチンは *HLA-DQB1*06:02* 陰性真性過眠症の原因物質の候補となることが考えられるため、患者及びコントロールの血液及び脳脊髄液のサンプルを用いて、測定する必要性が考えられた。

これまで GWAS を実施したが、GWAS によってゲノムワイドレベルに到達する SNP を検出することは決して容易ではなかった。ナルコレプシー以外の中枢性の過眠症は稀な疾患であるため、大規模な GWAS を実施することは容易ではなく、今後は頻度の低い変異に着目した解析を実施する必要があると考えた。現在、予備的な研究であるが、よく知られた時計遺伝子である *PER2* (period circadian regulator 2) 上に、アミノ酸置換を伴う変異 (p.Val1205Met) を同定し、この変異が中枢性の過眠症と関連することがわかった。今後、時計遺伝子や睡眠関連遺伝子上の頻度の低いアミノ酸置換を伴う変異を網羅的に解析し、各種過眠症等と関連するか、検討する予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

1. [Miyagawa T](#), [Tokunaga K](#): Genetics of narcolepsy. *Human Genome Variation*, 査読有, 6: 4, 2019
DOI: 10.1038/s41439-018-0033-7
2. [Miyagawa T](#), Khor SS, [Toyoda H](#), Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Ariyoshi Y, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Ikegami A, Wada Y, Takami M, Higashiyama Y, Miyake R, Kondo H, Fujimura Y, Tamura Y, Taniyama Y, Omata N, Tanaka Y, Moriya S, Furuya H, Kato M, Kawamura Y, Otowa T, Miyashita A, Kojima H, Saji H, Shimada M, Yamasaki M, Kobayashi T, Misawa R, Shigematsu Y, Kuwano R, Sasaki T, Ishigooka J, Wada Y, Tsuruta K, Chiba S, Tanaka F, Yamada N, Okawa M, Kuroda K, Kume K, Hirata K, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, [Tokunaga K](#): A variant at 9q34.11 is associated with *HLA-DQB1*06:02* negative essential hypersomnia. *Journal of Human Genetics*, 査読有, 63(12): 1259-1267, 2018
DOI: 10.1038/s10038-018-0518-8
3. Shimada M, [Miyagawa T](#), Toyoda H, [Tokunaga K](#), Honda M: Epigenome-wide association study of DNA methylation in narcolepsy: an integrated genetic and epigenetic approach. *Sleep*, 査読有, 41(4): zsy019, 2018
DOI: 10.1093/sleep/zsy019
4. Shimada-Sugimoto M, Otowa T, [Miyagawa T](#), Umekage T, Kawamura Y, Bundo M, Iwamoto K, Ikegame T, Tochigi M, Kasai K, Kaiya H, Tanii H, Okazaki Y, [Tokunaga K](#), Sasaki T: An epigenome-wide methylation study of healthy individuals with or without depressive symptoms. *Journal of Human Genetics*, 査読有, 63(3): 319-326, 2018
DOI: 10.1038/s10038-017-0382-y
5. [Toyoda H](#), Honda Y, Tanaka S, [Miyagawa T](#), Honda M, Honda K, [Tokunaga K](#), Kodama T: Narcolepsy susceptibility gene *CCR3* modulates sleep-wake patterns in mice. *PLoS One*, 査読有, 12(11): e0187888, 2017
DOI: 10.1371/journal.pone.0187888
6. Shimada-Sugimoto M, Otowa T, [Miyagawa T](#), Umekage T, Kawamura Y, Bundo M, Iwamoto K, Tochigi M, Kasai K, Kaiya H, Tanii H, Okazaki Y, [Tokunaga K](#), Sasaki T: Epigenome-wide association study of DNA methylation in panic disorder. *Clinical Epigenetics*, 査読有, 9: 6, 2017
DOI: 10.1186/s13148-016-0307-1
7. Yamasaki M, [Miyagawa T](#), [Toyoda H](#), Khor SS, Liu X, Kuwabara H, Kano Y, Shimada T, Sugiyama T, Nishida H, Sugaya N, Tochigi M, Otowa T, Okazaki Y, Kaiya H, Kawamura Y, Miyashita A, Kuwano R, Kasai K, Tanii H, Sasaki T, Honda Y, Honda M, [Tokunaga K](#): Evaluation of polygenic risks for narcolepsy and essential hypersomnia. *Journal of Human Genetics*, 査

読有, 61(10): 873-878, 2016

DOI: 10.1038/jhg.2016.65

8. Hoshino A, Saitoh M, Miyagawa T, Kubota M, Takanashi JI, Miyamoto A, Tokunaga K, Oka A, Mizuguchi M: Specific HLA genotypes confer susceptibility to acute necrotizing encephalopathy. *Genes and Immunity*, 査読有, 17(6): 367-369, 2016

DOI: 10.1038/gene.2016.32

9. Liu J, Ye Z, Mayer JG, Hoch BA, Green C, Rolak L, Cold C, Khor SS, Zheng X, Miyagawa T, Tokunaga K, Brilliant MH, Hebring SJ: Phenome-wide association study maps new diseases to the human major histocompatibility complex region. *Journal of Medical Genetics*, 査読有, 53(10): 681-689, 2016

DOI: 10.1136/jmedgenet-2016-103867

10. Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Miyagawa T, Khor SS, Omae Y, Toyo-oka L, Sugaya N, Kawamura Y, Umekage T, Miyashita A, Kuwano R, Kaiya H, Kasai K, Tanii H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T: Polymorphisms in the TMEM132D region are associated with panic disorder in HLA-DRB1*13:02-negative individuals of a Japanese population. *Human Genome Variation*, 査読有, 3: 16001, 2016

DOI: 10.1038/hgv.2016.1

11. Nakauchi A, Wong JH, Mahasirimongkol S, Yanai H, Yuliwulandari R, Mabuchi A, Liu X, Mushiroda T, Wattanapokayakit S, Miyagawa T, Keicho N, Tokunaga K: Identification of ITPA as a susceptibility gene to young-onset Tuberculosis on Chromosome 20. *Human Genome Variation*, 査読有, 3: 15067, 2016

DOI: 10.1038/hgv.2015.67

12. Miyagawa T, Toyoda H, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Ikegami A, Wada Y, Takami M, Fujimura Y, Tamura Y, Omata N, Masuya Y, Kono H, Moriya S, Furuya H, Kato M, Kojima H, Kashiwase K, Saji H, Khor SS, Yamasaki M, Ishigooka J, Wada Y, Chiba S, Yamada N, Okawa M, Kuroda K, Kume K, Hirata K, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K: An association analysis of HLA-DQB1 with narcolepsy without cataplexy and idiopathic hypersomnia with/without long sleep time in a Japanese population. *Human Genome Variation*, 査読有, 2: 15031, 2015

DOI: 10.1038/hgv.2015.31

13. Toyoda H, Miyagawa T, Koike A, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Imai M, Fujimura Y, Tamura Y, Ikegami A, Wada Y, Moriya S, Furuya H, Takeuchi M, Kirino Y, Meguro A, Remmers EF, Kawamura Y, Otowa T, Miyashita A, Kashiwase K, Khor SS, Yamasaki M, Kuwano R, Sasaki T, Ishigooka J, Kuroda K, Kume K, Chiba S, Yamada N, Okawa M, Hirata K, Mizuki N, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K: A polymorphism in CCR1/CCR3 is associated with narcolepsy. *Brain, Behavior, and Immunity*, 査読有, 49: 148-155, 2015

DOI: 10.1016/j.bbi.2015.05.003

14. Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Miyagawa T, Khor SS, Kashiwase K, Sugaya N, Kawamura Y, Umekage T, Kojima H, Saji H, Miyashita A, Kuwano R, Kaiya H, Kasai K, Tanii H, Tokunaga K, Sasaki T: Immune-related pathways including HLA-DRB1*13:02 are associated with panic disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 査読有, 46: 96-103, 2015

DOI: 10.1016/j.bbi.2015.01.002

15. Khor SS, Yang W, Kawashima M, Kamitsuji S, Zheng X, Nishida N, Sawai H, Toyoda H, Miyagawa T, Honda M, Kamatani N, Tokunaga K: High-accuracy imputation for HLA class I and II genes based on high-resolution SNP data of population-specific references. *The Pharmacogenomics Journal*, 査読有, 15(6): 530-537, 2015

DOI: 10.1038/tpj.2015.4

16. Liu X, Kawashima M, Miyagawa T, Otowa T, Latt KZ, Thiri M, Nishida H, Sugiyama T, Tsurusaki Y, Matsumoto N, Mabuchi A, Tokunaga K, Sasaki T: Novel rare variations of oxytocin receptor (OXTR) gene in autism spectrum disorder individuals. *Human Genome Variation*, 査読有, 2: 15024, 2015

DOI: 10.1038/hgv.2015.24

[学会発表](計 18 件)

1. 宮川 卓 他、A variant affecting levels of succinylcarnitine is associated with HLA-DQB1*06:02-negative essential hypersomni、The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2018、2018 年 10 月 18 日

2. 宮川 卓 他、A variant affecting levels of succinylcarnitine is associated with HLA-DQB1*06:02-negative essential hypersomnia、日本人類遺伝学会第 63 回大会、2018 年 10 月 11 日

3. 宮川 卓 他、A variant in CRAT is associated with HLA-DQB1*06:02-negative essential

hypersomnia, The 9th Congress of Asian Sleep Research Society (ASRS)、2018年7月12日及び13日

4. 宮川 卓、ナルコレプシーの感受性遺伝子の探索、日本睡眠学会第43回定期学術集会(シンポジウム)、2018年7月12日
5. 宮川 卓 他、A missense variant in PER2 is associated with delayed sleep-wake phase disorder, The European Conference of Human Genetics 2018、2018年6月18日
6. 宮川 卓 他、PER2 遺伝子上のミスセンス変異と睡眠相後退症候群との関連、日本人類遺伝学会第62回大会、2017年11月17日
7. 宮川 卓 他、A missense variant in PER2 is associated with delayed sleep phase disorder, The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2017、2017年10月18日
8. 宮川 卓 他、A genetic variant in CRAT is associated with HLA-DQB1*06:02 negative essential hypersomnia, World Sleep 2017、2017年10月9日
9. 宮川 卓、真性過眠症の新規疾患関連遺伝子、日本睡眠学会第42回定期学術集会(シンポジウム)、2017年6月30日
10. 宮川 卓、ゲノム解析によって見出された過眠症とカルニチンとの関連、第17回日本抗加齢医学会総会(シンポジウム)、2017年6月3日
11. 宮川 卓 他、特発性過眠症の感受性遺伝子の探索、第25回日本組織適合性学会大会、2016年10月23日
12. 宮川 卓 他、A polymorphism in CRAT is associated with HLA-DQB1*06:02 negative essential hypersomnia, The European Human Genetics Conference 2016、2016年5月23日
13. 宮川 卓 他、A polymorphism in CRAT is associated with HLA-DQB1*06:02 negative essential hypersomnia, The 13th International Congress of Human Genetics、2016年4月6日
14. 宮川 卓 他、HLA-DQB1*06:02 陰性の真性過眠症候群の感受性遺伝子の探索、第48回精神神経系薬物治療研究報告会、2015年12月4日
15. 宮川 卓 他、HLA DQB1*06:02 陰性の真性過眠症候群を対象としたゲノムワイド関連解析、日本人類遺伝学会第60回大会、2015年10月16日
16. 宮川 卓 他、A polymorphism in CRAT is associated with HLA-DQB1*06:02 negative essential hypersomnia. The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2015、2015年10月7日
17. 宮川 卓 他、HLA DQB1*06:02 陰性の真性過眠症候群を対象としたゲノムワイド関連解析、第24回日本組織適合性学会大会、2015年9月10日
18. 宮川 卓 他、Association analysis of narcolepsy without cataplexy and idiopathic hypersomnia, The European Human Genetics Conference 2015、2015年6月7日

〔図書〕(計3件)

1. 宮川 卓、徳永 勝士、社会を変える健康のサイエンス 健康総合科学への21の扉、東京大学出版会、2016年
2. 宮川 卓、臨床精神医学、睡眠の遺伝学：ナルコレプシーの感受性遺伝子(特集 精神神経疾患のゲノム研究：失われた遺伝率の謎を求めて) Genetic studies in sleep disorders：susceptibility genes for narcolepsy、株式会社アークメディア、2015年
3. 宮川 卓、医学のあゆみ、HLA 領域における HLA-DQB1*06:02 以外のナルコレプシー関連遺伝子、医歯薬出版株式会社、2015年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/sleep/>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：徳永 勝士

ローマ字氏名：TOKUNAGA, katsushi

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院医学系研究科（医学部）

職名：教授

研究者番号（8桁）：40163977

研究分担者氏名：豊田 裕美

ローマ字氏名：TOYODA, hiromi

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院医学系研究科（医学部）

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：90637448

(2)研究協力者

研究協力者氏名：嶋多 美穂子

ローマ字氏名：SHIMADA, mihoko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。