

## 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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22241049

研究課題名（和文） 大規模GWASで得られた脳動脈瘤感受性遺伝子の病態への関与

研究課題名（英文） Large scale GWAS and exome analyses of intracranial aneurysms

## 研究代表者

井ノ上 逸朗（INOUE ITURO）

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号：00192500

## 研究成果の概要（和文）：

脳動脈瘤の感受性遺伝子の全貌をゲノム全域アソシエーションスタディであきらかにするとともに、次世代シーケンサーを用い20人患者でのエクソーム解析による全エクソームスクリーニングにおける希少変異の関与について、また9p21ターゲット領域についてより詳細な変異スクリーニングを行った。

## 研究成果の概要（英文）：

Genome-wide association study for intracranial aneurysm was performed and identified four loci with strong statistical values. Among them, we next focused on 9p21 region, which is also associated with many phenotypes including cardiac infarction. About 250 Mb region was sequenced by next generation sequencers and several SNPs were identified with strong statistical significance. We also performed exome analyses to identify rare variants that explain the pathogenesis of IA in some patients.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2010 年度 | 17,100,000 | 5,130,000 | 22,230,000 |
| 2011 年度 | 6,800,000  | 2,040,000 | 8,840,000  |
| 2012 年度 | 6,800,000  | 2,040,000 | 8,840,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 30,700,000 | 9,210,000 | 39,910,000 |

研究分野：ゲノム医科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：脳動脈瘤、ゲノム全域、アソシエーション・スタディ

## 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループでは、脳動脈瘤における国際多施設共同ゲノム全域関連解析を実

施し、人種を越えて脳動脈瘤形成に関与する複数の遺伝子座を同定してきた。これらの成果は脳動脈瘤の発症メカニズムの解明に向

けた基盤的知見となりうるものであるが、脳動脈瘤はその破裂・未破裂が患者の転帰に決定的な差をもたらす疾患であることから、脳動脈瘤の将来の破裂リスクと関連する分子表現型を特定する必要がある。

本研究では、破裂脳動脈瘤および未破裂脳動脈瘤組織を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、若年と高齢患者で破裂脳動脈瘤組織での遺伝子発現パターンの差異を明らかにしたい。

## 2. 研究の目的

脳動脈瘤は破裂により致死性のくも膜下出血をきたす。脳卒中の死亡率は昭和 40 年以降順調に低下し、脳卒中の制圧はほぼ成功したと言えるが、くも膜下出血の死亡率に限ればこの 10 年変化がなく、研究の立ち遅れが指摘されており、くも膜下出血の原因となっている脳動脈瘤発生メカニズム解明が求められている。我々の研究グループでは、脳動脈瘤における国際多施設共同研究として、症例 2,885 例、対照 23,820 例でのゲノム全域関連解析を実施し、人種を越えて脳動脈瘤形成に関与する遺伝子座を同定してきた (Bilguvar et al. Nat Genet 2008, Yasuno et al. Nat Genet 2010, Yasuno et al. PNAS 2011)。これらの成果は脳動脈瘤の発症メカニズムの解明に向けた基盤的知見となりうるものであるが、一般的なタイプの脳動脈瘤感受性遺伝子の疾患への寄与はオッズ比で 1.2-1.4 程度と小さいものであり、これらの知見だけでは病態に迫ることはできず、治療法開発にもつながらない。

本研究では、エクソーム解析による家族性脳動脈瘤遺伝子同定を試みた。また、脳動脈瘤はその破裂・未破裂が患者の転帰に決定的な差をもたらす疾患であることから、脳動脈瘤の将来の破裂リスクと関連する分子表現型の同定が重要であると考え、脳動脈瘤病変部位での網羅的遺伝子発現解析を行った。エクソーム解析と網羅的遺伝子発現解析の結果を統合することで脳動脈瘤破裂病態の理解へとつなげる。

## 3. 研究の方法

家族性脳動脈瘤遺伝子同定のため、二世以上により患者三名以上を有する家系における患者 20 例につきエクソーム解析を行った。エクソームキャプチャには Agilent SureSelect Human All Exon Kit を用い、Illumina HiSeq2000 で患者検体の全エクソン

塩基配列決定を行った。バイオインフォマテックス解析により、データのクオリティコントロール、変異同定、変異の機能的アノテーションを行った。家族性脳動脈瘤感受性遺伝子探索には VAAST (Yandell et al. Genome Res 2012) を用い、患者 20 例・対照 149 例による関連解析を行い、症例についてアミノ酸置換を伴う変異が有意に集積している遺伝子を同定した。

脳動脈瘤の破裂メカニズム解明を目的として、破裂および未破裂脳動脈瘤の間で発現量に差のある遺伝子発現プロファイル同定を試みた。破裂脳動脈瘤 9 検体、未破裂脳動脈瘤 7 検体および浅側頭動脈 12 検体につき、Agilent の Whole Human Genome Array 44K を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

複数の異なる解析結果に基づき遺伝子に序列付けを行うことが可能な統計手法である rank aggregation 法により、エクソーム解析と網羅的遺伝子発現解析の両者の有意性を同時に考慮したランキングを決定した。

## 4. 研究成果

Agilent SureSelect Human All Exome Kit によるターゲット領域について、depth 20 以上でのカバー率は 83.0%~85.8%、平均 depth は 93.0~118.8 であり、20 検体で安定して高品質なデータが得られた。Genome Analysis Tool Kit を用いて同定した SNV (一塩基多型) 数は 12 検体の平均で約 35,000 SNVs、エクソン領域の SNV は約 18,000 (非同義置換が 8,500)、splice site SNV 数は約 60 であった。dbSNP に未登録の非同義置換 SNV は各検体で約 500 サイト検出された。VAAST による関連解析の結果、症例においてアミノ酸置換を伴う変異が有意に集積している遺伝子を複数同定した。

破裂脳動脈瘤および未破裂脳動脈瘤病変組織を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果として、破裂脳動脈瘤検体は発症時年齢によって若年と高齢で異なる遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになった。若年の破裂脳動脈瘤と未破裂脳動脈瘤検体を比較することで、発現量に有意差が認められる遺伝子群を同定した。破裂脳動脈瘤で発現が上昇している遺伝子は、炎症反応、免疫反応やエピジェネティックな発現制御のパスウェイに関わる遺伝子が集積していること、一方、破裂脳動脈瘤で発現が減少している遺伝子は、細胞接着、細胞外マトリックスや成長調節に関わっている遺伝子が多く含まれていた。

Rank aggregation 法により両解析の有意性に基づき全遺伝子について序列を決定し、上位にランクされた遺伝子について、多数サンプルを用いたターゲットリシーケンシングを行い、新たな脳動脈瘤感受性遺伝子同定に向けた研究を進めている。

本研究の成果として、脳動脈瘤サンプルを類似した遺伝子発現プロファイルを持つサブグループに分類することが可能であること示した（破裂脳動脈瘤の発症群と高齢発症群、未破裂脳動脈瘤）。今回の研究ではマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったが、近年急速に関心が高まっている次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンシング技術を用いることによって、マイクロアレイのプラットフォームにはデザインされていない新規の転写産物の同定・解析、アレル特異的な発現解析、選択的スプライシングの全体像の解明が可能となる。RNA シーケンシングで得られるノンコーディング RNA や組織特異的スプライスバリエーションの情報により、疾患サブグループの特徴を表す分子表現型がさらに明確化され、臨床的に積極的に治療介入を行うべき症例と経過観察が必要な症例との間に分子機序の違いが存在することを明らかに出来る。

本研究では手術で採取した脳動脈瘤組織を用いているが、将来的な血中バイオマーカーの探索に有益な情報をもたらすと考えられる。脳動脈瘤は破裂未破裂による患者の転帰の差異が顕著な疾患であるため、先制医療に向けたモデル疾患として重要な知見が得られるものと考えられる。

## 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 22 件）

以下の主要な論文については、すべて査読有。

- ①Nakaoka H, Mitsunaga S, Hosomichi K, Liou S-Y, Sawamoto T, Fujiwara T, Tsutsumi N, Suematsu K, Shinagawa A, Inoko H, Inoue I. Detection of ancestry informative HLA alleles confirms the admixed origins of Japanese populations. *PLoS One* 8, e60793, 2013.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0060793
- ②Mitsunaga S, Shimizu S, Okudaira Y, Oka A, Tanaka M, Kimura M, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Improved loop-mediated isothermal amplification for HLA-DRB1

genotyping using RecA and a restriction enzyme for enhanced amplification specificity. *Immunogenet* 65(6), 405-415, 2013.  
DOI: 10.1007/s00251-013-0690-0

- ③Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet* 57, 621-632, 2012.  
DOI: 10.1038/jhg.2012.91
- ④Yasuno K, Bakircioglu M, Low SK, Bilguvar K, Gaal E, Ruigrok YM, Niemela M, Hata A, Bijlenga P, Kasuya H, Jaaskelainen JE, Krex D, Auburger G, Simon M, Krischek B, Ozturk AK, Mane S, Rinkel GJ, Steinmetz H, Hernessniemi J, Schaller K, Zenbutu H, Inoue I, Palotie A, Cambien F, Nakamura Y, Lifton RP, Gunel M. Common variant near the endothelin receptor type A (EDNRA) gene is associated with intracranial aneurysm risk. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 19707-19712, 2011.  
DOI: 10.1073/pnas.1117137108
- ⑤Roder C, Kasuya H, Tatagiba M, Inoue I, Krischek B. Meta-analysis of microarray gene expression studies on intracranial aneurysms. *Neuroscience* 201, 105-113, 2012.  
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.033
- ⑥Nakaoka H, Cui T, Oka A, Mitsunaga S, Kashiwase K, Homma Y, Sato S, Suzuki Y, Inoko H, Inoue I. A systems genetic approach provides a bridge from discovered genetic variants to biological pathways in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 6, e25389, 2011.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0025389
- ⑦Mitsunaga S, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Shiina Y, Inoue I, Inoko H. Particular human leukocyte antigen alleles are associated with biochemical traits in the Japanese population. *Hum Immunol* 72, 566-570, 2011.  
DOI: 10.1016/j.humimm.2011.03.011
- ⑧Yamaguchi T, Hosomichi K, Narita A, Shirota T, Tomoyasu Y, Maki K, Inoue I. Exome resequencing combined with

- linkage analysis identifies novel PTH1R variants in a primary failure of tooth eruption in Japanese. *J Bone Miner Res* 26, 1655–1661, 2011.  
DOI: 10.1002/jbmr.385
- ⑨Yoshihara K, Tajima A, Adachi S, Quan J, Kase H, Yahata T, Inoue I, Tanaka K. Germline copy number variations in BRCA1-associated ovarian cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 50, 167–177, 2011.  
DOI: 10.1002/gcc.20841
- ⑩Imaizumi T, Tanaka H, Tajima A, Yokono Y, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Aizawa-Yashiro T, Hayakari R, Inoue I, Ito E, Satoh K. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  Synergistically Induce microRNA-155 Which Regulates TAB2/IP-10 Expression in Human Mesangial Cells. *Am J Nephrol*. 32, 462–468, 2010.  
DOI: 10.1159/000321365
- ⑪Kurata R, Nakaoka H, Tajima A, Hosomichi K, Shiina T, Meguro A, Mizuki N, Ohono S, Inoue I, Inoko H. TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's disease independently of HLA-B\*51 and -A\*26. *Biochem Biophys Res Commun*. 401, 533–537, 2010.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.09.088
- ⑫Roder C, Nayak NR, Khan N, Tatagiba M, Inoue I, Krischek B. Genetics of Moyamoya disease. *J Hum Genet* 55, 711–716, 2010.  
DOI: 10.1038/jhg.2010.103
- ⑬Cui T, Inoue I, Shin HD. Genome wide association analysis of copy number variation in subarachnoid aneurismal hemorrhage. *J Hum Genet* 55, 726–730, 2010.  
DOI: 10.1038/jhg.2010.97
- ⑭Akiyama K, Narita A, Nakaoka H, Cui T, Takahashi T, Yasuno K, Tajima A, Krischek B, Yamamoto K, Kasuya H, Hata A, Inoue I. Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J Hum Genet* 55, 656–661, 2010.  
DOI: 10.1038/jhg.2010.82
- ⑮Sato K, Nakagawa H, Tajima A, Yoshida K, Inoue I. ANRIL is implicated in the regulation of nucleus and potential transcriptional target of E2F1. *Oncology Rep*. 24, 701–707, 2010.  
DOI: 10.3892/or\_00000910
- ⑯Nakaoka H, Takahashi T, Akiyama K, Cui T, Tajima A, Krischek B, Kasuya H, Hata A, Inoue I. Differential Effects of chromosome 9p21 variation on subphenotypes of intracranial aneurysm: site distribution. *Stroke* 41, 1593–1598, 2010.  
DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.586529
- ⑰Krischek B, Tajima A, Akagawa H, Narita A, Ruigrok Y, Rinkel G, Wijmenga C, Feigi 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, 339–343, 2010.  
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.002
- ⑱Cui TL, Nakaoka H, Akiyama K, Kamura H, Hosomichi K, Bae J, Cheong H, Shin H, Yada T, Inoue I. Positional effects of polymorphisms in probe-target sequences on genoplot images of oligonucleotide microarrays. *Genet Mol Res* 9, 524–531, 2010.  
DOI: 10.4238/vol9-1gmr737
- ⑲Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Kee ALS, Krischek B, Auburger G, Simon M, Krex D, Arlier Z, Nayak N, Ruigrok Y, Niemela M, Tajima A, Frauberg M, Tamas D, Wirjatijasa F, Hata A, Jordi B, Oszvald A, Kasuya H, Gulam Z, Schoch B, Pankaj S, Stuer C, Roelof R, Beck J, Sola T, Ricciardi F, Aromaa A, Illig T, Schreiber S, Duijin CM, Berg LH, Claire P, Carole P, Roder C, Ozturk A, Gaal E, Jeremy W, Berg D, Geisen C, Christoph F, Paul S, Alex F, State MW, Wichmann HE, Breteler MMB, Wijmenga C, Mane S, Juan JE, Sandalcioglu IE, Meyer B, Raabe A, Daniel R, Jaaskelainen A, Hemesniemi J, Rinkel GJE, Zewnbutsu H, Inoue I, Palotie A, Cambien F, Nakamura Y, Lifton RP, Guenel M. Genome-wide association study of intracranial aneurysms identifies 5 risk loci. *Nat Genet* 43,

420-425, 2010.  
DOI: 10.1038/ng.563

〔図書〕（計 1 件）

井ノ上逸朗、技術評論社、病気はどこで生まれるのか 進化医学でさぐる病気のしくみ（知りたい！サイエンス）、2012、223

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井ノ上 逸朗（INOUE ITURO）  
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授  
研究者番号：00192500

### (2) 研究分担者

吉田 健一（YOSHIDA KENICHI）  
明治大学・農学部・生命科学科・准教授  
研究者番号：20345036  
（平成 22 年度のみ）

田嶋 敦（TAJIMA ATSUSHI）  
徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス  
研究部・人類遺伝学分野・准教授  
研究者番号：10393864  
（平成 22 年度のみ）

### (3) 連携研究者

なし