

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06160

研究課題名(和文) Exome解析を用いた副腎白質ジストロフィーの表現型規定因子の解析研究

研究課題名(英文) Search for modifier factors of adrenoleukodystrophy phenotypes using whole exome sequencing

研究代表者

松川 敬志 (Matsukawa, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・学術支援専門職員

研究者番号：80755760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：副腎白質ジストロフィー(Adrenoleukodystrophy:ALD)はABCD1を原因遺伝子とするX連鎖性劣性の神経変性疾患である。ABCD1の遺伝子検査を行い、症例の蓄積を行うとともに、多彩な表現型を呈するALDの表現型を規定する因子の探索をexome解析を用いて行った。81症例という全国でも有数の症例のDNA検体の蓄積を行うとともに、表現型修飾因子としてABCD1の発現産物と同様にペルオキシソームに局在する遺伝子群に着目して解析を行った。多くの新規のvariantsを有する症例が多数存在することが分かり、今後の表現型を規定する因子の解明に向けての足がかりとなる成果であると考えられる。

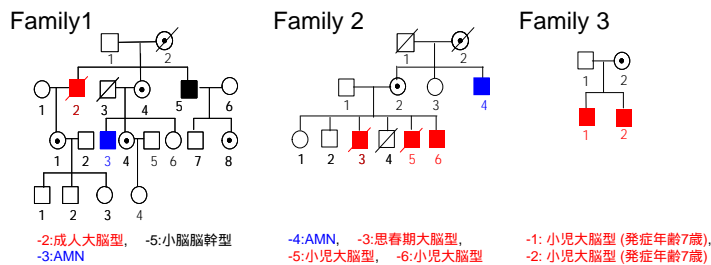
研究成果の概要(英文)：Adrenoleukodystrophy (ALD) is an X-linked recessive neurodegenerative disorder caused by ABCD1 gene. We searched for modifier factors of various ALD phenotypes using whole exome sequencing. We accumulated eighty one ALD patients' DNA. We analyzed genes localized in the peroxisome where ABCD1 gene product is also localized. We found that there were many cases that have novel variants of genes localized in the peroxisome. Our findings will become the base for the elucidation of modifier factors of various ALD phenotypes.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：遺伝子表現型連関 副腎白質ジストロフィー ABCD1

1. 研究開始当初の背景

副腎白質ジストロフィー(ALD)は、*ABCD1* を原因遺伝子とするX染色体劣性遺伝性の神経変性疾患であり、中枢神経の炎症性脱髄を来し、時に副腎不全を来す。多彩な臨床病型を呈するが、遺伝子表現型連関は明らかではない[同一家系内でも多彩な表現型を呈する(図1)]。すなわち、*ABCD1* の変異の種類によって、表現型を予測することができない(Matsukawa T, Neurogenetics, 2011)。これまでの経験から、近親度が高いほど、臨床病型に近い傾向にあり(Takemoto Y, J Hum Genet 2002)、我々は、多彩な臨床病型を規定する遺伝的修飾因子の存在を仮定した(図1)。



近親度が高い場合、表現型に近い傾向

表現型に遺伝要因が関与する可能性

図1.複数のALD発症者を有する家系

ABCD1 の機能に影響を与える可能性のある遺伝子として、*ABCD2*、*ABCD3*、*ABCD4* を考えて、解析を行った。その結果、40例の日本人ALD症例の解析で、*ABCD4* においては完全連鎖不平衡にある5つの既知のSingle Nucleotide Polymorphism (SNP)においてコントロールと比較してAMNで有意に頻度が低いという結果を得た ($p=0.047$)。しかしながら、フランスにおける独立したALD症例(小児大脳型118名、AMN71例)の解析では、日本のALD症例で得られた解析結果は再現されなかった(Matsukawa T, Neurogenetics, 2011)。

他に過去にALDの遺伝的修飾因子の探索を試みた報告として、中枢神経の髄鞘化に必要であるメチオン代謝に関わる遺伝子(*CBS*、*MTHFR*、*MTR*、*TC2*)、抗酸化作用に関連する遺伝子 *SOD2*、T細胞への脂質抗原提示に関連する遺伝子 (*CD1A-E*)に着目した報告が存在するが、いずれも数個の遺伝子における既知の一部のSingle nucleotide polymorphism (SNP)の一部に注目したのみで(Semmler A, J Neurol, 2009, Brose RD, J Neurol, 2012, Barbier M, PLoS One, 2012)、欧米のALD症例で *TC2*、*CBS* 遺伝子の既知のSNPの一つにおいて一部の表現型との関連が示唆されたのみである。

特に大脳型は予後不良であり、数年で寝たきりとなる。大脳型の発症初期に造血幹細胞移植を行うことで、症状の進行を呈することが

報告されており(Peters C, Blood, 2004, Miller WP, Blood, 2011, Hitomi T, Eur J Neurol, 2005)、表現型を規定する因子を同定することは臨床にも有用となる。

2. 研究の目的

ALD症例のDNA検体を蓄積し、原因遺伝子 *ABCD1* の遺伝子変異を検出した。ALDの原因遺伝子 *ABCD1* の発現産物は、ペルオキシソームで機能することから、ペルオキシソームに局在する遺伝子群を表現型修飾の候補遺伝子群と考えて、変異の有無を探索し、表現型毎に比較を行った。

3. 研究の方法

ALDの原因遺伝子 *ABCD1* の遺伝子変異解析は、常染色体(2p11, 10p11, 16p11 and 22q11)に存在する92-96%の相同性を有する偽遺伝子の増幅を避け、*ABCD1* 特異的な増幅ができるようなプライマーを設計して、Polymerase Chain Reaction (PCR)および直接塩基配列法を用いて行った。複雑な変異が疑われた場合は、Reverse Transcription-PCR等の手法を持ちいて解析を行った。

Exome解析についてはSureSelect Human All Exon V4/5+UTRsキット(Agilent)を用いてexon領域を濃縮、HiSeq2500 (illumine)を用いてシーケンス後Burrows-Wheeler Aligner (BWA)でマッピング、samtoolsでvariantsのコールを行うことで得られた81症例の日本人ALD症例[大脳型48例(小児大脳型ALD14例、思春期大脳型ALD6例、成人大脳型ALD11例、Adrenomyeloneuropathy (AMN) 25例、AMNから大脳型への移行例15例、小脳脳幹型から大脳型への移行例2例、小脳脳幹型3例、Addison病2例、未発症3例)、日本人コントロール503例のin-house exomeデータを用いて、解析を行い、Peroxisome database 2.0、The peroxisome knowledge base v1.6で抽出したペルオキシソームに局在する遺伝子群の中から、既知遺伝子変異、新規のナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライスサイト変異、ミスセンス変異を抽出した。

検出された変異についてはサンガーシーケンスによっても確認を行い、偽陽性の変異を除外した。抽出された変異について表現型毎の比較(特に予後不良な大脳型と緩徐進行性のAMN)を行った。

4. 研究成果

全てのALD症例において、原因遺伝子 *ABCD1* の変異を検出することが可能であった。Loss-of-function変異は、予後不良である大脳型及び下肢の痙性を主体とするAMNを含む様々表現型で認められ、*ABCD1* 変異の種類のみでは、表現型を予想することができないことが確認された。

Exome 解析においては、予後不良である大脳型においては 48 症例中 22 症例(45.8%)で、ペルオキシソームに局在する遺伝子群における、既知遺伝子変異、新規のナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライスサイト変異、ミスセンス変異が検出された。下肢の痙性を主な症状とする AMN 症例では 23 症例中 12 症例(52.2%)で上記変異を認めた。コントロールでは 503 例中 279 例で上記変異を認めた。

今回の解析結果からはペルオキシソームの機能に影響を与える可能性のある変異が多く抽出されることが判明した。今回の解析では表現型毎に明らかな差を認めていないものの、大部分はミスセンス変異であったことから、得られた変異において、予測機能アルゴリズムや機能解析を加味して検討を行うことも今後重要と考えられた。今後の ALD の表現型を規定する因子の解明に向けての足がかりとなる成果であると考えられる。

<引用文献>

Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, Goto J, Suzuki Y, Shimozawa N, Takano H, Onodera O, Nishizawa M, Aubourg P, Tsuji S. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics*. 2011;12:41-50.

Takemoto Y, Suzuki Y, Tamakoshi A, Onodera O, Tsuji S, Hashimoto T, Shimozawa N, Orii T, Kondo N. Epidemiology of X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *J Hum Genet*. 2002;47:590-3.

Semmler A, Bao X, Cao G, Köhler W, Weller M, Aubourg P, Linnebank M. Genetic variants of methionine metabolism and X-ALD phenotype generation: results of a new study sample. *J Neurol*. 2009;256:1277-80.

Brose RD, Avramopoulos D, Smith KD. SOD2 as a potential modifier of X-linked adrenoleukodystrophy clinical phenotypes. *J Neurol*. 2012;259:1440-7.

Barbier M, Sabbagh A, Kasper E, Asheuer M, Ahouansou O, Pribill I, Forss-Petter S, Vidaud M, Berger J, Aubourg P. CD1 gene polymorphisms and phenotypic variability in X-linked adrenoleukodystrophy. *PLoS One*.

2012;7:e29872.

Peters C, Charnas LR, Tan Y, Ziegler RS, Shapiro EG, DeFor T, Grewal SS, Orchard PJ, Abel SL, Goldman AI, Ramsay NK, Dusenbery KE, Loes DJ, Lockman LA, Kato S, Aubourg PR, Moser HW, Krivit W. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood*. 2004;104:881-8.

Miller WP, Rothman SM, Nascene D, Kivisto T, DeFor TE, Ziegler RS, Eisengart J, Leiser K, Raymond G, Lund TC, Tolar J, Orchard PJ. Outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for childhood cerebral adrenoleukodystrophy: the largest single-institution cohort report. *Blood*. 2011;118:1971-8.

Hitomi T, Mezaki T, Tomimoto H, Ikeda A, Shimohama S, Okazaki T, Uchiyama T, Shibasaki H. Long-term effect of bone marrow transplantation in adult-onset adrenoleukodystrophy. *Eur J Neurol*. 2005;12:807-10.

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 2 件)

松川 敬志、石浦 浩之、三井 純、辻 省次. 次世代シーケンサーによるパーソナルゲノム解析の基礎. *分子精神医学* 2016, 16:11-17.

松川 敬志. 白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植. *Clinical Neuroscience* 2016, 34:1091-1093.

[学会発表](計 4 件)

Takashi Matsukawa, Tomotaka Yamamoto, Takashi Toya, Akihito Shinohara, Yasuhito Nanya, Sachiko Seo, Keiki Kumano, Motoshi Ichikawa, Yuji Takahashi, Hiroyuki Ishiura, Jun Mitsui, Masaki Tanaka, Jun Goto, Mineo Kurokawa, Shoji Tsuji. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Adolescent/Adult Cerebral and Olivo-Ponto-Cerebellar Adrenoleukodystrophy, American Neurological Association's (ANA) 2016 Annual Meeting, Poster, 2016.10.17,

Baltimore Marriott Waterfront Hotel,
Baltimore (America)

Takashi Matsukawa, Tomotaka Yamamoto, Takashi Toya, Akihito Shinohara, Yasuhito Nanya, Sachiko Seo, Keiki Kumano, Motoshi Ichikawa, Yuji Takahashi, Hiroyuki Ishiura, Jun Mitsui, Masaki Tanaka, Jun Goto, Mineo Kurokawa, Shoji Tsuji. Hematopoietic stem cell transplantation for adolescent and adult onset cerebral adrenoleukodystrophy. 第 57 回日本神経学会学術大会, 口演, 2016.5.18, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

Takashi Matsukawa, Tomotaka Yamamoto, Takashi Toya, Akihito Shinohara, Yasuhito Nanya, Sachiko Seo, Keiki Kumano, Motoshi Ichikawa, Yuji Takahashi, Hiroyuki Ishiura, Jun Mitsui, Masaki Tanaka, Jun Goto, Mineo Kurokawa, Shoji Tsuji. Hematopoietic stem cell transplantation for adolescent and adult onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. 13th International Congress of Human Genetics (ICHG 2016), Poster, 2016.4.6, Kyoto International Conference Center, (京都府京都市)

Takashi Matsukawa. Case Studies in Clinical Genetics, 18 year-old male who presented white subacute onset of loss of motivation, dysarthria and ataxia. 13th International Congress of Human Genetics (ICHG 2016) (招待講演), 2016.4.5, Kyoto International Conference Center, (京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松川 敬志 (MATSUKAWA, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・学術支援専門
職員

研究者番号 : 80755760