

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06185

研究課題名(和文) リピート配列の新規解析法による神経変性疾患のリスク因子・治療標的候補の探索

研究課題名(英文) Development of a novel method for analyzing repeat sequences

研究代表者

尾崎 心(Ozaki, Kokoro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10754765

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)：本研究では、ヒトゲノム上に存在する繰り返し配列に着目し、新規の解析方法の開発とその病的な意義の解明を目指したものです。繰り返し配列は、その分子生物学的な性質から解析が難しく、その長さ(繰り返し配列長)を決定する手法は不十分でした。本研究では、既存の技術に改良を加えて、その測定方法を大きく改善することに成功しました。また、それのみならず、新規方法をさらに発展させ技術的試行を行いました。また、ヒト神経変性疾患での繰り返し配列長の決定を行い、病的意義を検討し、統計的には十分な有意差は得られませんでしたが一定の傾向があることが分かりました。

研究成果の概要(英文)：In order to find clinically important repeat sequences in human genome, I exploited a bioinformatics approach, which resulted in significantly important repeat sequences. I further developed a novel method to accurately measure the length of the repeat sequences. For that purpose, I had to develop standard repeat libraries, which will be of use in the future studies. In addition, I tried measuring repeat lengths in a human neurodegenerative disorder. The analysis did not give a significant result. In summary, I found a repeat sequence as a possible risk factor for a human neurodegenerative disorder.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：神経内科学 ゲノム医科学

### 1. 研究開始当初の背景

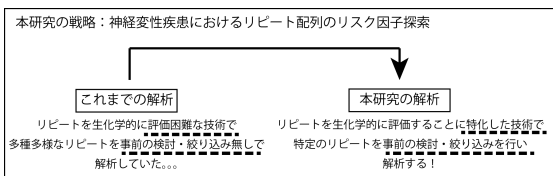
ヒトゲノム中には繰り返し配列(リピート配列)が多数存在している。そのうち CAG リピートなどは遺伝性疾患の原因となることが分かっている(具体的には、脊髄小脳失調症 1,2,3,6 型などや、ハンチントン病など)。特殊なリピートとしては、欧米での家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子であり、孤発性筋萎縮性側索硬化症のリスク因子である c9orf72 遺伝子におけるイントロンにおける GGGGCC リピートなどが知られている。

こうした配列の解析においては技術的にリピート配列長の精確な長さの決定をすることが難しく、これまでの疾患との大規模な関連解析などでは十分に解析が行なえていなかった。これは情報学的な取り扱いの難しさもあるが、主には生化学的もしくは分子生物学的な測定方法自体の不完全さが原因であった。

未だに病態不明な疾患(特に神経変性疾患など、特にアルツハイマー病などの社会的にも重要な疾患)との関連が一部の研究では示唆されていたが、十分とは言えなかった。具体的には、アルツハイマー病において、TOMM40 というミトコンドリアに局在するタンパクをコードする遺伝子においてポリ T 配列の長さが発症年齢と関係するという、かならずしも確立はしていないが興味深い研究が報告されている。また、ミトコンドリア遺伝子の D ループ領域においてやはり繰り返し配列の長さが糖尿病の発症と関係しうるとのややこれも不確定ではあるが先行報告がなされている。

本研究の観点からは、過去の研究では、どのようなリピートがヒトの疾患、特に神経変性疾患のリスク因子として重要か、という点からの取り組みが不十分であり、このこともリピート配列がヒトゲノム上でどのような意義を有するかの研究が進まない理由の 1 つにもなっている、と考えた。

### 2. 研究の目的



本研究では、ヒトゲノム上に存在する(特に遺伝子領域に存在するような)リピート配列のうち、どれが病的意義を持ちうるかという点について、まずヒトゲノム全体を対象として(ゲノムワイドに)集合的な、生命情報学的なアプローチを用い解析し、その生化学的もしくは分子生物学的な測定方法を開発し、さらにヒトの神経変性疾患において、実際のヒト検体を用いて、臓器間におけるゲノム DNA 中でのリピート配列長の差異があるかどうかを明らかにし、さらにその(神経変性疾患における)病的意義を追求することを目

的とした。

### 3. 研究の方法

ヒトゲノム上で生じうるリピートについて生命情報学的なアプローチから重要なリピート配列を統計的に評価した。具体的にはリピート配列を持つ遺伝子の意義を調べること、その遺伝子機能が変化すると仮定して、個別のリピートの意義を評価した。この方法から、統計的に多重検定を考慮しても有意に特定のリピート配列(リピート甲とする)が重要であると判明した。

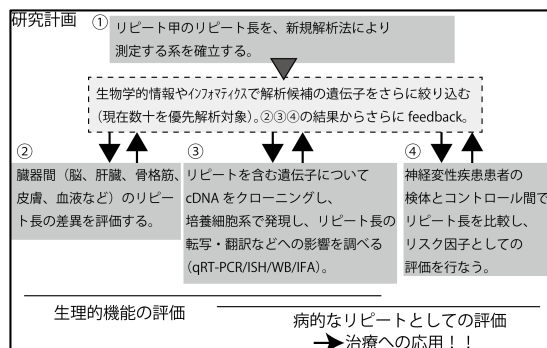
具体的には、NCBI データベースにおけるヒトゲノムデータを利用してリピートの存在部位を明らかにし、遺伝子領域において存在するリピートについて、その遺伝子機能との対応を調べた。統計的処理を行い多重検定を考慮しても医学生物学的に重要性が高いリピート甲を見出すことに成功した。

このリピート甲について、既存の方法を改良することでそのリピート長を精確に測定する方法を見出した(特許申請検討中)。

リピート甲のリピート長を測定するには測定技術単体では正確性が担保されないため、別方法で調べたリピート長をもつ、標準ライブラリーが必要であるが、これを作成し、概ねヒトゲノム上で重要と考えられる範囲で測定できる系を完成した。

これまでの生物学的なコンテキストから関連が示唆されたヒト検体(ある神経変性疾患 B)における、そのリピート長解析を行なったところ、統計的有意差には達しなかったが、リピート長と疾患の有無が関連しうることが示唆されたため、現在検体数を増やして検討中である。

また、リピート甲について、臓器間の差があるかどうかをいくつかの組織を用いて検討した。過去の報告から、いくつかのリピートについては臓器間の差が存在し、それが疾患の発症と関係しうることが判明している。この際には、各臓器より標準的方法でゲノム DNA を抽出し、リピート測定については本研究で開発した方法を用いた。



### 4. 研究成果

(1)ヒトゲノム上で、一部のリピート配列(特にリピート甲)が重要な機能を担っている可能性があること、そして新しい情報学的なアプローチを提案した(投稿準備中)。このようなアプローチはこれまでほとんど例がなく、今後のゲノム医学に対して寄与するものと思われる。

(2)そのリピート甲について、精確な測定方法を樹立した(あわせて投稿準備中)。

具体的には既存の生化学的測定技術の改良であるが、理論的にありうる反応安定化作用を有する物質を加えることで大幅な解析精度向上が見られることが判明した。それを種々の実験条件を試みることで最適な反応条件・酵素系を選択することに成功した。

具体的成果としては、既存方法ではリピート長を常に1-数リピート以上ほぼ必ず短く測定してしまうことが分かっていたが、本方法ではヒトゲノム上でリピート甲がとりうる範囲ではほぼ正確にリピート長を測定できることが分かった。

(3)臓器間でのリピート甲の繰り返し配列の長さの差があるかどうかについて検討し、一部の検体を除いては同一個体(ヒト)においては、リピートの長さが同一であることが判明した。

また、ヒト検体を使用してその疾患との関連性(発症の単一原因ではないが、寄与するリスク因子)を証明には至らなかったものの可能性を示唆した。

#### 【上記成果の意義】

(1)(2)これまで(本研究で見出された)リピート甲については簡便かつ精確な評価方法は確立されておらず、次世代シーケンシング法などでも評価が困難であった。本研究の成果により、神経疾患のみならず広い分野での応用・解析が期待される。

例えば癌組織などでもジヌクレオチドリピートなどのマイクロサテライト(リピート)が変化することが知られており、癌の体細胞遺伝学や、分子遺伝学全体にも貢献すると考える。

また、同様のアプローチ方法で、他の意義が十分に分からないほかのリピート配列についても精確な長さを測定する条件を検索することが出来ると考えられる。

上記(2)の成果から、次世代シーケンシング法との融合を図るため、文部科学省科学研究費助成事業「先進ゲノム支援」(H28年度)に採択され、共同研究者の支援を得て解析方法のvalidationおよび次世代シーケンシング法との融合を試みることとなった。

(3)リピート甲については、既報告とも照らし、同一個体の中では臓器間でのリピート長の差異が少なくとも大きくはなく、恐らく同一であることが示唆され、このことはリピート甲が発達途上において大きな不安定性が

無いことを示唆する可能性がある。どのようなメカニズムがあればリピート甲のような配列が病的課程に関与しうるのかについてはさらなる解析が必要と考えられる。

さらにリピート甲の生理的な機能や神経変性疾患との関わりはこれまで全く未知であり、かつリピートと神経変性疾患との関係は現在注目され、リピートの評価が渴望されている状況であるため、興味深い結果であると考えられる。

今後の研究の進展により、疾患との関連が統計的に有意であれば病態解明と治療法の開発(例:核酸医薬などの治療法や、特異的反応経路の低分子化合物によるターゲット治療)にとり重要な知見となることが予想される。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

尾崎 心 (OZAKI, Kokoro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10754765

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

該当なし

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

該当なし

(4)研究協力者

( )

該当なし