

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06601

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる大脳皮質基底核変性症の新規原因遺伝子探索

研究課題名(英文) Searching a causative gene of corticobasal degeneration with next generation sequencing

研究代表者

大垣 光太郎 (OGAKI, Kotaro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20459035

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)：申請者は大脳皮質基底核変性症(CBD)の原因遺伝子を単離可能と思われる遺伝性CBD家系を見出した。世界的に見ても、CBDの姉妹発症例は稀である。父親も同様の症状を呈していた。家族性の単一遺伝子変異によって発症していると推定し、平成27年度は本家系の患者・家族を調査し、詳細な家系図・神経学的所見・画像解析・遺伝子採血を8名で施行した。そのうち発症者2名と非発症者2名のDNAを用い、次世代シーケンサーを用いエクソーム解析(ヒトゲノムのタンパク質コーティング領域であるエクソン部分の高速塩基配列決定を行う解析)を行った。平成28年度はデータ解析を行い、候補遺伝子の絞り込みを行った。

研究成果の概要(英文)：Corticobasal degeneration (CBD) and corticobasal syndrome (CBS) are rare neurodegenerative disorders. Furthermore, familial CBS is extremely rare. We found familial CBS in which two siblings have CBS and their father had similar symptom. We hypothesized that one causative gene caused this familial disease. In 2015 and 2016, we examined the detailed familial history, neurological examination, neuroimaging and blood sampling for eight members in the family. We extracted DNA from lymphocyte of those eight members. Exome sequencing (high-throughput DNA sequencing for all of the expressed genes in a genome) was done in two siblings with CBS and two healthy family members. In 2016 and 2017, we analyzed genetic data and reduced the number of candidate genes.

研究分野：神経内科

キーワード：神経内科 大脳皮質基底核変性症 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質基底核変性症(CBD)は、平均 60 歳代で発症する進行性の神経変性疾患である。前頭側頭葉変性症の1つに位置付けられ、神経病理学的にはアルツハイマー病・前頭側頭型認知症・進行性核上性麻痺と同様にタウが沈着するタウオパチーに分類される。高次脳機能障害・認知症・パーキンソン病が進行し、経過は早く多くの症例は6-8年で死亡する重篤な神経難病である。しかしながら、進行抑制・根治(完治)治療法はなく、現状では対症療法の選択肢も殆どない。実際、抗パーキンソン病薬の L-dopa が有効な患者は10-30%と少なくその効果もわずかである。CBD は厚生労働省の定める特定疾患治療研究事業対象疾患に認定されており、治療法の早期開発が望まれているが、現状としては病態解明のためには何らかのブレイクスルーが必要である。

CBD はアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などと同様に、神経変性疾患に分類される。神経変性疾患では、病態機序の解明と根治療法の開発を目指し、様々な研究が行われているが、その1つとして家族性神経変性疾患の原因遺伝子の研究が挙げられる。遺伝性のアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などで原因遺伝子が単離・同定され、その原因遺伝子の機能にスポットライトを当てることで該当疾患の研究分野は飛躍的に進歩してきた。しかしながら、CBD は前述の3疾患などと比べ患者数が少なく、更に家族性に見られることは極めて稀である。これまで MAPT と GRN が関連遺伝子として報告されているものの(Acta Neuropathologica 2014; Brain 2006)、MAPT や GRN 変異患者の多くは CBD とは異なり前頭側頭型認知症を呈すことから、純粋な CBD の原因遺伝子は未だ単離されておらず、その同定・単離が待ち望まれている。

2. 研究の目的

このような背景の中、申請者は CBD の原因遺伝子を単離可能な遺伝性 CBD 家系を見出した。世界的に見ても、CBD の姉妹発症例は稀で父親にも同様の症状が認められていた様だが、神経内科医の診察や診断は行われていない。父親も CBD と考えると優性遺伝性(単一遺伝子のヘテロ変異 = 1 アレル変異によって発症している)である可能性がある。父親が非発症者であれば、劣性遺伝性(単一遺伝子のホモ接合体変異 = 2 アレル変異)であると考えられる。CBD 姉妹患者の遺伝子解析にて、CBD ないし前頭側頭葉変性症関連遺伝子(MAPT, GRN, C9orf72, TDP-43, CHMP2B, VCP)に変異がないことを既に確認しており、本家系の家族性 CBD は新規原因遺伝子によって発症している可能性が高

い。しかしながら、遺伝形式や遺伝子解析可能なメンバーの数から連鎖解析による候補遺伝子座同定は難しいと考えられた。そこで、本研究ではこの家系について次世代シーケンサーを用いた全エクソン領域を網羅的に高速解析する「エクソーム解析」を実施することで、新規 CBD 原因遺伝子を単離・同定することを目標とする。また、本家系における原因遺伝子が、コピー数多型(CNV: Copy Number Variation, ある集団のなかで1細胞あたりのコピー数が個人間で異なるゲノムの領域のことを言う。重複・欠損などがある。)である可能性も否定できないため、ゲノムワイド SNP アレイによる遺伝子型タイピングも行い、CNV 異常が原因となっていないかも確認する。

これまで家族性神経変性疾患の原因遺伝子単離に関する論文は、Nature 誌、Science 誌をはじめトップレベルの学術誌に掲載されており、この分野の注目の高さや競争の激しさを示している。近年のアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの研究では、多発家系の原因遺伝子単離・同定から孤発例での大規模関連解析にシフトしつつある。その理由に、多発家系が世界的にみても非常に稀である事が一因として挙げられる。CBD は上記3疾患と比べ、孤発例ですら稀であるため未だにゲノムワイド関連研究もなされておらず、CBD の遺伝子研究は殆ど皆無と言わざるを得ない。このような背景の中で、家族性 CBD 家系を発掘し、原因遺伝子同定を目標とする本研究は他の施設では実行できない世界的にみても特色ある研究課題と言える。

興味深いことに、神経変性疾患(特にパーキンソン病)では優性遺伝性原因遺伝子である α -synuclein・LRRK2・CHCHD2 は孤発性パーキンソン病の感受性遺伝子として証明されている(Nature Genetics 2009, Lancet Neurology 2015)。本研究で対象となる家系は、優性遺伝形式を呈している可能性が高く、本研究で単離される家族性 CBD の原因遺伝子は、孤発性 CBD の感受性遺伝子である可能性がある。すなわち、本研究の成果は稀な一家系の研究に留まらず、広く疾患全体の病態解明や本邦発の新たな研究に繋がる事が期待できる。予想される結果として、タウの脳内凝集に関わる新規タンパク質をコードする遺伝子の発見などが期待される。原因遺伝子を単離後には、その機能解析や発症機序の解明に向けての準備等も大きなアドバンテージをもって進めることで、日本発の新規治療法開発(例えばタウの脳内凝集抑制薬)など世界的にも優れた研究結果を残すであろう。既に induced pluripotent stem cell (iPSc)bank にて、本家系 CBD 患者の iPSc は作成されており、原因遺伝子の機能解析においても詳細な解析を実施することが可能である。本研究は CBD の多彩な臨床的

特徴に共通する失行・失認・失語・認知症やパーキンソニズムの病態解明にも寄与し、広くタウオパチー研究全般に貢献する可能性を秘めている。さらに、認知症やパーキンソニズムの発症予防・臨床応用への展開により、増加傾向にある患者とその介護者を救済するなど、社会的にも大きな波及効果が望める。

3. 研究の方法

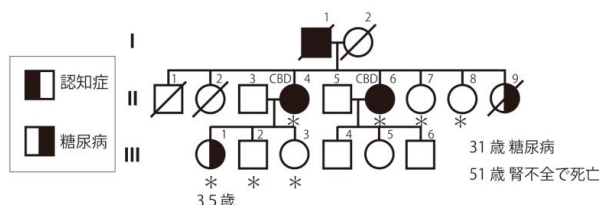


図:対象家系の家系図 *は診察および採血(ゲノム DNA, RNA 抽出)済みのメンバー

エクソーム解析をもちいた CBD 新規原因遺伝子の単離

研究対象の家系は浸透率が高い遺伝性大脳皮質基底核変性症(CBD)と考えられる(図)。患者 -4 と -6 は 40 歳頃より糖尿病を発症し、それぞれ 50 歳、55 歳で発症した CBD 姉妹患者である。父(I-1)は姉妹らと同様の症状を認めたが、神経内科医の専門的な診断を得ることなく、60 歳で亡くなっている(少なくとも糖尿病と認知症を認めた)。兄弟 -7, -8 は現在 68 歳・63 歳であり、本家系における CBD 発症年齢を十分に超えており非発症者と推定された。患者 -4 と -6 と非発症兄弟 -7, -8 の DNA を用い、エクソーム解析を行った。エクソーム解析は、全エクソン領域を濃縮した後、次世代シーケンサーで配列決定をすることで、サンガー法と比べ、安価かつ高速で全タンパクコード領域のゲノム配列を解読することができる。全ゲノム解析と比べ、エクソーム解析は安価に解析を行える。よって本研究に最も適した手法と考える。

(A) ターゲット領域濃縮

1. ゲノム DNA を断片化し、ゲノムライブラリーを作成した。
2. SureSelect Human All Exon V5+UTRs Kit (Agilent Technologies 社)をもちいてターゲット領域(exon 領域)のゲノム DNA 断片を濃縮した。

(B) 次世代シーケンサーを用いた高速ゲノムシーケンシング

1. HiSeq2500 システム (illumina 社)を用いてシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。
2. シーケンシングは 100b ペアエンド (6 Gb シーケンシング/サンプル) を実施した。

(C) マッピングと変異解析

得られた塩基配列を参照ゲノム配列に対して bwa によるマッピング・アラインし、Strand NGS (トミーデジタルバイオロジー社)を用いて解析を行った。

また、CNV 異常が本家系における発症原因である可能性も否定できないため、Illumina Omni 2.5M array を用いて、発症者 2 名で認められ、非発症者 2 名では認められない CNV 異常を検索した。

4. 研究成果

平成 27 年度は本家系の患者・家族を調査し、詳細な家系図・神経学的所見・画像解析・遺伝子採血を 8 名で施行した。そのうち発症者 2 名と非発症者 2 名の DNA を用い、次世代シーケンサーを用いエクソーム解析と CNV 解析を行った。平成 28 年度はデータ解析を行い、候補遺伝子の絞り込みを行った。以下、発表までは具体的な遺伝子名は控えさせて頂き、絞り込んだ遺伝子の個数を記載する。

家系図からは、父親も CBD であると仮定し、優性遺伝形式として解析を行うのが、最も適した解析方法と考えられる。ヘテロ接合体の遺伝子変異を候補遺伝子として解析すると、以下の結果が得られた。ヘテロ接合体のタンパクコーディング多型/スプライシング多型で、東アジア人の一般人口におけるマイナーアレル頻度が 1%以下の rare variant を、Exome aggregation consortium (ExAC : <http://exac.broadinstitute.org/>) のデータを用い解析すると、合計 224 の候補遺伝子が同定された。白人を含めた、ExAC に登録されている全ての population において、1%以下の rare variant は 127 個の候補遺伝子に絞られた。

父親は非発症者であると仮定し、劣性遺伝形式として、候補遺伝子を解析すると、以下の結果が得られた。ホモ接合体のタンパクコーディング多型/スプライシング多型で、東アジア人の一般人口におけるマイナーアレル頻度が 1%以下の rare variant を、ExAC のデータを用い解析すると、合計 39 個の候補遺伝子が同定された。白人を含めた、Ex AC に登録されている全ての population において、1%以下の rare variant は 7 個の候補遺伝子に絞られた。

CNV 解析では、ヘテロ接合体の欠損が 1 箇所 (2 つの遺伝子を含む)、2 箇所のヘテロ接合体の重複 (それぞれ 1 つの遺伝子を含む) が共有されていた事がわかった。

本家系の興味深い特徴として、家族性の糖尿病を合併している事が挙げられる。CBD 患者

は、全員糖尿病に罹患していることから、CBDの原因遺伝子は、糖尿病関連遺伝子の近傍に位置している可能性がある。さらには、CBD原因遺伝子そのものが糖尿病の risk 遺伝子である可能性もある。過去に報告されている糖尿病遺伝子は、少なくとも 100 以上あるが、CNV 解析で同定された、ヘテロ接合体遺伝子欠損に含まれる遺伝子 X は、糖尿病関連遺伝子として知られており、大変興味深い。

今後の方針

家系図の第 3 世代の 4 名の DNA を用いたエクソーム解析・CNV 解析は終了した。同世代では、これ以上サンプル数を増やす事ができない。今後、更に候補遺伝子を狭め、1つの原因遺伝子を単離していくためには、第 3 世代を解析に加えていく必要がある。本家系における CBD 発症年齢は 50 歳-55 歳であり、第 3 世代の現在の年齢は 44 歳-52 歳となり、CBD 平均発症年齢に近づきつつある。健常者 -1, -2, -3, -5 のいずれかで、CBD の発症が認められた際には、エクソーム解析を追加する事で、候補遺伝子数が大幅にせばめられる可能性がある。そのため、臨床的な経過観察が重要となる。候補遺伝子変異を 1~数種に絞り込んだ後は、申請者の留学先であったメイヨークリニックが所有する世界最大級の CBD 遺伝子バンクの DNA(500 サンプル)で候補遺伝子の大規模スクリーニングを行い、他の CBD 患者における候補遺伝子変異の有無を精査し、最終的に CBD の原因遺伝子を確認する。

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 7 件) 記載は 5 件

1. Mitochondrial targeting sequence variants of the CHCHD2 gene are a risk for Lewy body disorders. Ogaki K, Koga S, Heckman MG, Fiesel FC, Ando M, Labbé C, Lorenzo-Betancor O, Moussaud-Lamodière EL, Soto-Ortolaza AI, Walton RL, Strongosky AJ, Uitti RJ, McCarthy A, Lynch T, Siuda J, Opala G, Rudzinska M, Krygowska-Wajs A, Barcikowska M, Czyzewski K, Puschmann A, Nishioka K, Funayama M, Hattori N, Parisi JE, Petersen RC, Graff-Radford NR, Boeve BF, Springer W, Wszolek ZK, Dickson DW, Ross OA. *Neurology*. 85:2016-25, 2015. 査読あり
2. Cerebellar ataxia in progressive supranuclear palsy: An autopsy study of PSP-C. Koga S, Josephs KA, Ogaki K, Labbé C, Uitti RJ, Graff-Radford N, van Gerpen JA, Cheshire WP, Aoki N, Rademakers R, Wszolek ZK, Ross OA,

Dickson DW. *Mov Disord*. 31:653-62, 2016. 査読あり

3. MAPT haplotype diversity in multiple system atrophy. Labbé C, Heckman MG, Lorenzo-Betancor O, Murray ME, Ogaki K, Soto-Ortolaza AI, Walton RL, Fujioka S, Koga S, Uitti RJ, van Gerpen JA, Petersen RC, Graff-Radford NR, Younkin SG, Boeve BF, Cheshire WP Jr, Low PA, Sandroni P, Coon EA, Singer W, Wszolek ZK, Dickson DW, Ross OA. *Parkinsonism Relat Disord*. 30:40-5, 2016. 査読あり
4. Heterozygous PINK1 p.G411S increases risk of Parkinson's disease via a dominant-negative mechanism. Puschmann A, Fiesel FC, Caulfield TR, Hudec R, Ando M, Truban D, Hou X, Ogaki K, Heckman MG, James ED, Swanberg M, Jimenez-Ferrer I, Hansson O, Opala G, Siuda J, Boczarska-Jedynak M, Friedman A, Kozirowski D, Aasly JO, Lynch T, Mellick GD, Mohan M, Silburn PA, Sanotsky Y, Vilarino-Güell C, Farrer MJ, Chen L, Dawson VL, Dawson TM, Wszolek ZK, Ross OA, Springer W. *Brain*. 140:98-117, 2017. 査読あり
5. The PINK1 p.I368N mutation affects protein stability and ubiquitin kinase activity. Ando M, Fiesel FC, Hudec R, Caulfield TR, Ogaki K, Górka-Skoczylas P, Kozirowski D, Friedman A, Chen L, Dawson VL, Dawson TM, Bu G, Ross OA, Wszolek ZK, Springer W. *Mol Neurodegener*. 24:12:32, 2017. 査読あり

[学会発表](計 1 件)

1. Mitochondrial targeting sequence variants of the CHCHD2 gene are a risk for Parkinson's disease. 大垣 光太郎, 古賀 俊輔, Michael G. Heckman, Fabienne C. Fiesel, 安藤 真矢, 西岡 健弥, 船山 学, Bradley F. Boeve, Wolfdieter Springer, Zbigniew K. Wszolek, Dennis W. Dickson, 服部 信孝, Owen A. Ross. 第 57 回日本神経学会学術大会、神戸コンベンションセンター、神戸、2016 年 5 月 18 日

[図書](計 1 件)

1. 大垣光太郎, 西岡健弥, 服部信孝, 遺伝子医学 MOOK 別冊シリーズ: 最新遺伝子医学研究と遺伝子カウンセリングシリーズ 2 「最新精神・神経遺伝医学研究と遺伝子カウンセリング」パーキンソン病の遺伝子研究, page 125 ~ 131, 2017

年, メディカルドゥ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大垣 光太郎 (OGAKI, Kotaro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号 : 20459035