

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10316

研究課題名(和文) 家族性脳動脈瘤の網羅的ゲノム解析法による感受性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of susceptible genes by genome-wide genetic analysis in patients with familial aneurysms

研究代表者

糟谷 英俊 (Kasuya, Hidetoshi)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50169455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳動脈瘤罹患者7名を含む脳動脈家系を対象に解析を行なった。本家系の罹患者全員で共有される機能的低頻度バリエーション13q14.13に位置するSPERT遺伝子が特定できた。次に、候補遺伝子として、脳動脈瘤を高率に合併するPKD1遺伝子(16p13.3)とPKD2遺伝子(4q21)に注目した。家族性脳動脈瘤患者150例と脳動脈瘤と遺伝性腎疾患がない対照群150例を対象に、次世代シーケンサーを用いてADPKD遺伝子のターゲットシーケンスを行った。結果、患者群で33人に26個、対照群では20人に21個の候補レアバリエーションが検出された(オッズ比1.80、WSS法P値0.026、SKAT法P値0.044)。

研究成果の概要(英文)：Family including 7 affected persons with intracranial aneurysms (IAs) was analyzed and rare functional variant, SPERT at 13q14.13 was found. We investigated whether IAs without obvious renal diseases were also associated with PKD1 (16p13.3) and PKD2 (4q21). We performed next-generation sequencing of the ADPKD genes in 150 Japanese familial IA patients and 150 non-IA controls. A total of 44 rare candidate variants were confirmed by Sanger sequencing; 26 were identified from 33 patients, whereas 21 were identified from 20 controls. The candidate variants were all missense variants, except for one, and showed consistent association with IA in both burden and variance component tests (odds ratio [OR] = 1.80; WSS, P = .026; SKAT, P = .044). This association was largely derived from the variants found in the extracellular structural domains of PKD1 (OR = 2.06; WSS, P = .030; SKAT, P = .029). ADPKD genes are susceptibility genes for IA even in patients without ADPKD.

研究分野：neurosurgery

キーワード：subarachnoid hemorrhage aneurysm gene familial

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤は頭蓋内の主幹動脈の分岐部に生じる囊状の血管の病的な膨らみで、その破裂によりクモ膜下出血を生じる。クモ膜下出血を来した患者の転機は、その半数以上が死亡または重大な後遺症を残す重篤なもので、診断法・治療法が進歩した現在においても、医療上重要な疾患のひとつと考えられている。脳動脈瘤の成因としては、高血圧症、喫煙、血行力学的要因などの環境要因と、家族集積性・脳動脈瘤を合併しやすい遺伝性疾患の存在から遺伝的要因が想定され、これらの複合的作用により発生すると考えられている。このような遺伝的背景の存在から、成因の解明を目的に遺伝的要因の解析が盛んに行われてきた。その解析手法として、かつては罹患家系を用いた連鎖解析が行われ、我々も当時は脳動脈瘤では前例がなかったゲノムワイド連鎖解析を行い、第5、7、14番染色体に連鎖領域を特定した (Am J Hum Genet 69:804-819,2001)。これを皮切りに国内外で多数の連鎖解析や関連解析が相次いだ。サンプル数が少なく結果の信頼性が低いものも多かった。現在では高密度マイクロアレイを用いた大規模コホートでのゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study, GWAS) が主流となり、脳動脈瘤においても我々とエール大学等の多施設国際共同研究により再現性・信頼性の高い感受性領域がいくつか特定されている (Nat Genet 40:1472-1477,2008; Nat Genet 42:420-425,2010; PNAS:108,19707-12,2011)。いずれも機能的にも有望な遺伝子座ではあるが、脳動脈瘤発生のメカニズムとの分子生物学的関わりについてはほとんど検証されていないのが実情である。効果サイズが小さく、リスクアレルによりもたらされる生物学的効果が軽微であるのも一因であろう。近年、画像診断技術の進歩、普及に伴い、未破裂脳動脈瘤が容易に診断されるようになってきた。脳動脈瘤の破裂は働き盛りの人を突然に死に至らしめるため、病態解明およびオーダーメイド医療 (特に偶発的に発見された未破裂脳動脈瘤患者に対して) への社会的な要望は高いと考えられ、そのために効果サイズの高い遺伝的要因の解明が求められている。脳動脈瘤のような多因子疾患においては、GWASのアプローチでは頻度が低く効果サイズが高いバリエーション (いわゆる rare variant) を検出し得ない問題も指摘されている。近年、次世代型シーケンサーの登場により、次々に単一遺伝子疾患の原因遺伝子が特定されているが、多因子疾患においても GWAS では捉えられない遺伝的要因の同定にその応用が期待されている。本研究では、本学で既に稼働の実績がある次世代型シーケンサーを駆使し、ゲノム網羅的解析法による疾患感受性遺伝子の特定を目指す。

2. 研究の目的

脳動脈瘤は重篤な脳卒中をきたす多因子疾患であるが、いまだその成因を十分に説明できるような疾患感受性遺伝子の同定にまでには至っていない。今回、我々は既に保有している多数の家族性脳動脈瘤家系を対象に、ゲノム上の全エクソン配列を抽出し、次世代高速シーケンサーで配列決定を行う (全エクソーム・シーケンシング)。ここから、家系内で疾患とともに伝達している遺伝子変異の検索を行い、さらに多数の患者・対照サンプルを用いた関連解析を加え、脳動脈瘤の成因解明およびオーダーメイド医療につながる感受性遺伝子の同定を目指す。

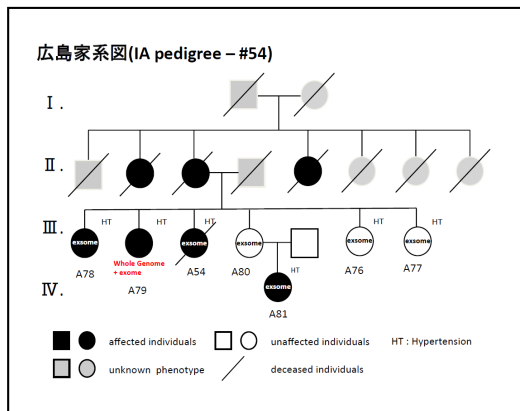
3. 研究の方法

本研究では、今一度、遺伝的背景が濃厚な家系サンプルに立ち返って解析を行う。我々はかつてゲノムワイド連鎖解析を行ったサンプルを中心に 89 の脳動脈瘤家系サンプル (210 罹患メンバー、うち破裂脳動脈瘤 155 例) を保有している。罹患同胞対が主体の小さな家系サンプルではあるが、世界にこれほどまでの数の家系サンプルを有している研究施設は他にないと思われる。これらを対象に本学の最新鋭次世代シーケンサー SOLiD5500 Wildfire システム (LifeTechnologies) による全エクソーム・シーケンシングを行い、疾患と連鎖している機能的 rare variant を明らかにする。これにより得られた候補遺伝子に対し、さらにリシーケンシングによる患者・対象関連解析も行う。関連解析に係るリシーケンシングには SOLiD システムよりも汎用性の高い Ion PGM シーケンサー (LifeTechnologies) を利用して効率をあげる。この種の関連解析では Combined Multivariate and Collapsing 法 (CMC) などを用いても多変量の解析になることが想定され、検定力を確保するためにより多数の検体が必要となる。関連を検定するためのサンプルとして、患者検体 400 例と対象検体 400 例の調整が完了している。

4. 研究成果

家系の抽出と全エクソームシーケンシング

添付の図に示した脳動脈瘤罹患患者 7 名を含む脳動脈家系を対象に解析を行なった。本家系は、我々が世界に先駆けて行なった罹患同胞対連鎖解析に使用した家系である。その当時は、第 III 世代の罹患姉妹 3 例を含めた罹患同胞対連鎖解析を行なっており、この 3 姉妹は有意な連鎖を示した 14 番染色体、7 番染色体のマーカーを共有していた。その後のフォローにより、次の世代に脳動脈瘤患者が生じたことから、次世代シーケンスを用いた網羅的解析に供することとした。第 III 世代の 6 姉妹およびその子の世代の罹患者 1 例で、イルミナ社の SNP アレイ、および HiSeq シーケンサーによる全エクソームシーケンシングを実施した。まず、SNP アレイのデー



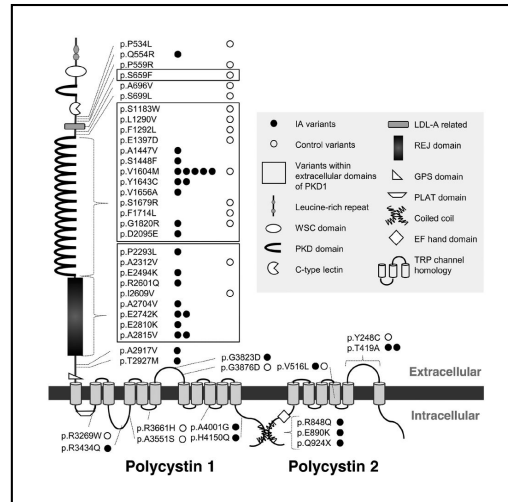
タを用いて本家系で疾患と連鎖している染色体領域を特定し、その領域に存在するレアバリエントを候補とする戦略をとった。

まず、連鎖解析の結果であるが、先に見出した14染色体の連鎖領域は子の世代にも連鎖しており、最も有望な領域と考えられた。しかし、エクソーム解析ではこの領域のエクソンには有望な変異は検出されなかった。今後、ノンコーディング領域も含めた詳細な解析を加える余地はあるものの、今回は他の領域の検索に移ることにした。

かつての罹患同胞対連鎖解析で最も有意な連鎖を認めた7番染色体連鎖領域は、子の世代には伝達していないことが判明した。しかし、A80と付番される第II世代罹患者の親は、脳動脈瘤を発症していないので、脳動脈瘤のようなありふれた疾患ではこのような遺伝様式は十分に想定されうる。第III世代に限定して連鎖している領域で検討してみると、果たして有望な病的変異が検出された。7q21.11に存在するCD36遺伝子のフレームシフト変異である。このCD36遺伝子は近年、冠動脈疾患などの動脈硬化性疾患において重要な役割を果たす分子として注目を集めている。かつての罹患同胞対連鎖解析ではこの遺伝子の異常を捉えていた可能性があり、現在、リシーケンスによる検討を行っているところである。

脳動脈瘤のような多因子疾患では、同一家系においても関連する遺伝要因は単一ではなく、いくつかの相乗効果によって発症に至ると考えられている。そこで、かつての連鎖領域にこだわらず、第III世代と第IV世代でも共有される新たな感受性遺伝子の検索も行った。その結果、本家系の罹患者全員で共有される機能的低頻度バリエントの特定に至った。13q14.13に位置するSPERT遺伝子である。本家系に加え、他の2家系でもこの遺伝子バリエントが検出されたことから、さらに詳細に検討を加えた。SPERTは未だその機能が未知のあらたなロイシンジッパー蛋白をコードし、これが脳血管平滑筋に発現していることをRT-PCR法および免疫染色法で確認した。本家系で検出されたバリエントは、

コイルドコイルドメインに存在するミスセンス変異で、この変異により細胞質においてタンパクの異常凝集が惹起されることを、細胞生物学的実験により証明した。脳血管平滑筋細胞に異常凝集蛋白が蓄積することにより、脳血管平滑筋細胞の障害、ひいては血管壁の脆弱性を来し脳動脈瘤の誘因となる機序が想定された。



PKD1 PKD2 遺伝子の関連解析

候補遺伝子として、脳動脈瘤を高率に合併する常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) の原因遺伝子であるPKD1遺伝子(16p13.3)とPKD2遺伝子(4q21)に注目した。我々は、家族性脳動脈瘤患者150例と脳動脈瘤と遺伝性腎疾患がない対照群150例を対象に、次世代シーケンサーを用いてADPKD遺伝子のターゲットリシーケンスを行った。解析の対象とするレアバリエントは、1000人ゲノムプロジェクトのデータベースとコントロール群150例におけるマイナーアレル頻度が0.5%以下のものと定義した。結果、患者群で33人に26個、対照群では20人に21個の候補レアバリエントが検出され、PKD2遺伝子のナンセンスバリエント(p.Q924X)の1個を除いてすべてミスセンスバリエントであった。Weighted-sum statistic (WSS) と sequence kernel association test (SKAT)の2つの統計解析法において再現性をもって脳動脈瘤との関連を認めた(オッズ比1.80、WSS法P値0.026、SKAT法P値0.044)。この関連は、PKD1遺伝子の細胞外ドメインで強く認められた(オッズ比2.06、WSS法P値0.030、SKAT法P値0.029)。ADPKD遺伝子は、脳動脈瘤の疾患感受性遺伝子であると考えられる。

Table 3. Association of rare variants in ADPKD genes with IA

Set of rare variants	Detected no. of subjects		Odds ratio (95% CI)	P value	
	Familial IA (N = 150)	Controls (N = 150)		WSS	SKAT
NS variants in PKD1 and PKD2	34	21	1.8 (.99-3.26)	.026	.044
Functional NS variants in PKD1 and PKD2	29 (PKD1, 23; PKD2, 6)	17 (PKD1, 19; PKD2, 2)	1.88 (.99-3.56)	.025	.048
NS variants in the extracellular domains of PKD1	21	11	2.06 (.97-4.37)	.030	.029

Abbreviations: ADPKD, autosomal dominant polycystic kidney disease; CI, confidence interval; IA, intracranial aneurysm; NS, nonsynonymous; SKAT, sequence kernel association test; WSS, weighted-sum statistic.

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5件)全て査読有り

Takahashi Y, Sasahara A, Yamazaki K, Inazuka M, Kasuya H: Disturbance of CT perfusion within 24 hours after onset is associated with WFNS grade but not development of DCI in patients with aneurysmal SAH. *Acta Neurochir* 159: 2319-2324, 2017 doi: 10.1007/s00701-017-3362-2.

Miyata H, Koseki H, Takizawa K, Kasuya H, Nozaki K, Narumiya S, Aoki T: T cell function is dispensable for intracranial aneurysm formation and progression. *PLoS One* 2017 Apr 24;12(4):e0175421. doi: 10.1371/journal.pone.0175421.

Aoki T, Saito M, Koseki H, Tsuji K, Tsuji A, Murata K, Kasuya H, Morita A, Narumiya S, Nozaki K; MR Macrophage Imaging Study Investigators: Macrophage Imaging of Cerebral Aneurysms with Ferumoxytol: an Exploratory Study in an Animal Model and in Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26: 2055-2064, 2017 doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.10.026.

Sasahara A, K Suzuki, Takahashi Y, Koseki H, Hirota K, Ohbuchi H, Kasuya H: Prognostic assessment by CT perfusion on arrival of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients with WFNS Grade V. *World Neurosurgery* 92: 1-6, 2016 doi: 10.1016/j.wneu.2016.04.097.

Hirota K, Akagawa H, Onda H, Yoneyama T, Kawamata T, Kasuya H: Association of rare nonsynonymous variants in PKD1 and PKD2 with familial intracranial aneurysms in a Japanese population. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 25: 2900-2906, 2016 doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.08.002.

[学会発表](計9件)

小関宏和、山本梨絵、宮田悠、糟谷英俊、

野崎和彦、青木友浩、成宮周: S1P1 アゴニストによるマクロファージの経内皮的浸潤経路の遮断を介した脳動脈瘤抑制効果 *Stroke* 2018 第43回日本脳卒中学会学術集会 福岡 2018/3/15-18

笹原篤、谷茂、萩原信司、平澤元浩、米山琢、大淵英徳、黒井康博、横佐古卓、吉村知香、稲塚万佑子、山崎圭、糟谷英俊: 高齢者くも膜下出血患者の臨床像の検討 第75回日本脳神経外科学会学術総会 福岡 2016/9/29-10/1

高橋祐一、稲塚万佑子、前川達哉、黒井康博、新井直幸、萩原信司、谷茂、平澤元浩、笹原篤、糟谷英俊: くも膜下出血患者におけるDCIと来院時CT perfusion所見との検討 第74回日本脳神経外科学会学術総会 札幌 2015/10/14-16

笹原篤、高橋祐一、谷茂、萩原信司、平澤元浩、新井直幸、黒井康博、前川達哉、稲塚万佑子、糟谷英俊: 経時的な定量的CT perfusion解析によるくも膜下出血患者のDCIによる脳梗塞発症予測 第74回日本脳神経外科学会学術総会 札幌 2015/10/14-16

広田健吾、赤川浩之、恩田英明、糟谷英俊: 次世代シーケンサーによる家族性脳動脈瘤の多発性嚢胞腎遺伝子ターゲットリシーケンス 第74回日本脳神経外科学会学術総会 札幌 2015/10/14-16

Takahashi Y, Sasahara A, Inazuka M, Maegawa T, Kikuchi A, Yoshimura C, Yokosako S, Arai N, Kuroi Y, Koseki H, Ohbuchi H, Hagiwara S, Hirasawa M, Tani S, Kasuya H: Disturbance of CT perfusion on arrival is associated with WFNS grade and outcome but not development of DCI in patients with aneurysmal SAH. *EANS* 2015, Madrid, 2015/10/18-21

Sasahara A, Suzuki K, Hirota K, Ohbuchi H, Koseki H, Kasuya H: Predicting prognosis by CT perfusion on arrival in aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients with World Federation of Neurosurgical Societies Grade V. *Vasospasm* 2015 Karuizawa, 2015/9/17-19

Takahashi Y, Sasahara A, Inazuka M, Maegawa T, Kikuchi A, Yoshimura C, Yokosako S, Arai N, Kuroi Y, Koseki H, Ohbuchi H, Hagiwara S, Hirasawa M, Tani S, Kasuya H: Disturbance of CT perfusion on arrival is associated with WFNS grade and outcome but not development of DCI in patients with aneurysmal SAH. *Vasospasm* 2015 Karuizawa, 2015/9/17-19

Sasahara A, Tani S, Hagiwara S, Hirasawa M, Yoshimura C, Kikuchi A, Takahashi Y, Maegawa T, Kasuya H:

Predicting prognosis by CT perfusion on arrival in SAH patients with WFNS grade V. 83th AANS, Washington DC, 2015/5/3-6

(4)研究協力者
高橋 祐一 (TAKAHASHI yuichi)

〔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

糟谷 英俊 (KASUYA, hidetoshi)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：50169455

(2)研究分担者

広田 健吾 (HIROTA, kengo)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：10532690

赤川 浩之 (AKAGAWA, Hiroyuki)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60398807

恩田 英明 (ONDA, hideaki)
東京女子医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：60185692

(3)連携研究者

笹原 篤 (SASAHARA atsushi)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：40287371

小関 宏和 (KOSEKI Hirokazu)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：10766546