

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005 ～ 2009
 課題番号：17020004
 研究課題名（和文）アルツハイマー病を中心とした神経系疾患の多型タイピング体制確立と応用
 研究課題名（英文）Genotyping and its use for brain diseases

研究代表者
 桑野 良三 (KUWANO RYOZO)
 新潟大学・脳研究所・教授
 研究者番号：20111734

研究成果の概要（和文）：

病気は遺伝素因に環境因子が影響して発症すると考えられる。病気に罹りやすい遺伝子型を決めるタイピングシステム体制を確立した。その技術を神経疾患に応用した研究支援活動並びにアルツハイマー病の遺伝的危険因子探索の 2 本柱で研究を進めた。研究支援依頼があった家族性認知症やその他の神経疾患に関する原因遺伝子及び候補遺伝子領域を同定した。大規模検体を対象としてアルツハイマー病リスク遺伝子の候補領域を見出した。

研究成果の概要（英文）：

The goal of this project is to establish the genotyping system and its use for brain diseases. We supported microsatellite and SNP typing for sib pair analysis and linkage studies on familiar brain diseases such as Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. We identified susceptibility loci associated with late-onset Alzheimer disease by a large-scale genome-wide association study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	46,900,000	0	46,900,000
2006 年度	37,400,000	0	37,400,000
2007 年度	37,400,000	0	37,400,000
2008 年度	37,400,000	0	37,400,000
2009 年度	37,800,000	0	37,800,000
総計	196,900,000	0	196,900,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：

キーワード：タイピング支援、アルツハイマー病、遺伝子多型解析、ゲノムワイド相関解析

1. 研究開始当初の背景

国際ヒトゲノムプロジェクトが疾患遺伝子解析研究の飛躍的な進展をもたらした。高齢者 5 大疾患の克服を目指すミレニアムプロジェクトが 2000 年にスタートした。「日本人におけるアルツハイマー病感受性遺伝子

の探索研究」が特定領域「脳科学の先端的研究」のゲノム班に設けられ、オールジャパン体制で試料を収集するために北海道から九州までの認知症の診療に従事している医療機関を中心に The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer Disease (JGSCAD)

が組織された。孤発性アルツハイマー病（約2000例）、同胞発症（57ペア）、健常高齢者（約2000例）のゲノムを収集し、新潟大学脳疾患タイピングセンターにて保管・解析する体制が整った。大規模検体を対象とするマイクロサテライト多型およびSNPによるゲノムワイド相関解析、原因遺伝子同定のシーケンス解析が可能な機器が設置された。孤発性アルツハイマー病検体収集は比較的容易であるが、同胞発症例の検体収集は非常に困難で目標の100ペアに達しなかった。遺伝因子を探索する上で同胞発症例は非常に貴重であるため、引き続きゲノム特定領域研究「応用ゲノム」と協力して収集することにした。解析方法では10万、50万、100万SNPを同時に検出できるDNAチップが開発されSNPタイピングの大規模・高速化の時代になった。

2. 研究の目的

本研究は、「応用ゲノム」との密接な連携のもとに、アルツハイマー病を中心に神経系疾患関連遺伝子の解明と支援を行なう。脳神経疾患のゲノム解析を推進するために、ヒト遺伝子多型マーカーを用いた大規模タイピングシステムの改良、統計解析法の改良、効率化、高度化を進め、タイピングシステム全体の体制を確立する。このタイピングシステムを活用して、神経変性疾患、精神疾患など他の神経系疾患に拡大する研究支援活動と個別研究の2本柱で研究を進める。

研究支援では、「応用ゲノム」領域と密接に連携して脳神経疾患のタイピングを行う。脳疾患の家族集積性の高い疾患については、連鎖解析のためのマイクロサテライト多型解析またはSNPタイピングを行い、依頼元にタイピング結果を報告する。また優性遺伝形式をとる家族性脳疾患については、その原因遺伝子のシーケンシングによって変異の同定を行う。

個別研究では、高齢発症孤発性アルツハイマー病の大規模相関解析並びに同胞対解析によって、日本人固有のアルツハイマー病感受性遺伝子の同定を行う。その他の認知症関連遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

(1) ヒトタイピングシステム体制の確立

中規模タイピングセンターとして効率的なシステムを構築する。①診療情報が付随したゲノム試料を統一的に取り扱う保存・管理システムの確立を図る。②公開データベースをもとに日本人の多型マーカーに使用できるかを確認する。③マイクロサテライトタイピングおよび高密度SNPによるタイピングを行う。④これらの膨大なゲノム情報と表現型で

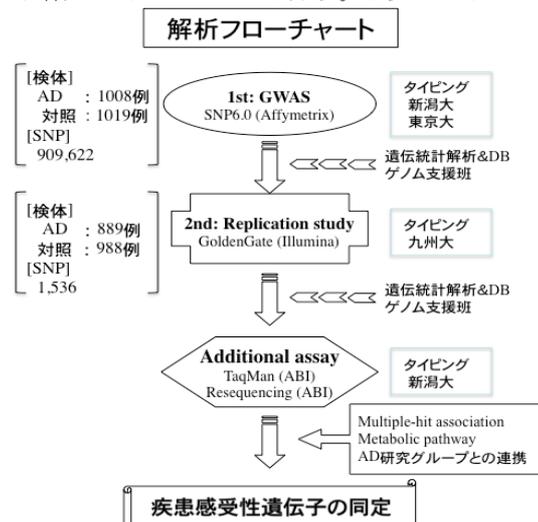
ある症状・病態に基づき疾患関連遺伝子を同定する。⑤公開に向けたデータベース構築、より高度な解析ツールの開発・改良については、遺伝統計学、医療統計学、情報処理の専門家の「ゲノム情報支援班」の支援を受ける。

(2) アルツハイマー病その他の脳疾患遺伝子解析の支援

確立したヒトタイピングシステムを応用して、研究支援を行う。脳神経疾患の遺伝子解析は、原則的に「応用ゲノム」から依頼され「ヒト多型タイピングセンター委員会」で審議承認された脳神経疾患を中心にタイピングを行い、解析データを依頼元に報告する。家族集積性の高い症例について連鎖解析タイピングを依頼された場合、マイクロサテライト解析を行う。また、臨床研究機関から依頼される認知症多発家系について原因遺伝子及び関連遺伝子の変異を同定するためのシーケンス解析を行い、結果を依頼元に返す。

(3) 個別研究

孤発性アルツハイマー病{2000例}-対照群{2000例}のSNPによるゲノムワイド相関解析(GWAS: Genome-wide Association Study)によって感受性遺伝子の探索を行う。GWASは2段階スクリーニングで行う。1次スクリーニ



ングで有意となるSNPについて、異なるサンプルセットを準備して異なるタイピングプラットフォームを用いてReplication Assayを行う。また、それらの周辺のSNPを利用して感受性遺伝子の候補領域を絞り込む。これら疾患感受性ゲノム領域に存在する遺伝子の発現解析データや代謝マップ情報と照らし合わせて感受性遺伝子の意味を考察する。

4. 研究成果

(1) 研究支援

神経疾患で家族集積性の高い症例の連鎖解析のために、多型情報が多いマイクロサテライトタイピング支援を行い、依頼元に報告し

た。また、家族性疾患について GeneChip を用いた高密度 SNP タイピングとマイクロサテライトタイピングを同時に行った。以下の研究を通して、高密度 SNP タイピングがマイクロサテライトタイピングに匹敵する連鎖解析法として有効であることを証明したのは、「応用ゲノム」と連携した本研究の成果である。

①紀伊半島に集中して発症している ALS/PDC (86 症例) についてゲノムワイドマイクロサテライト (平均 5 cM 間隔) タイピング支援。

②未解明の家族性 Spinal Muscular Atrophy (17 症例) のゲノムワイド (X 染色体を除く 745 マーカー) マイクロサテライトタイピング支援。

③遺伝性の小脳脊髄変性症 (8 症例) の (X 染色体を除く 745 マーカー) マイクロサテライトタイピング支援。

④Muscular Dystrophy (8 症例) について第 1, 3, 15, 21 番染色体のマイクロサテライトタイピング支援。

⑤アルツハイマー病候補遺伝子の確認依頼があり、1522 例-対照群 1339 例を対象に SNP タイピング支援。

⑥家族性虚血性大脳動脈症のマイクロサテライトタイピングと、その連鎖解析から同定された原因遺伝子の DNA シークエンス支援。

⑦「応用ゲノム」武田班: アルツハイマー病の関連遺伝子探索 研究: アルツハイマー病 1522 例-対照群 1339 例を対象として 20 SNP タイピング支援。

⑧その他脳疾患

アルツハイマー病を中心とした認知症に関連する遺伝子解析を支援するため、原因遺伝子である *APP*, *PSEN1*, *PSEN2* 及びその他の認知症関連遺伝子 *MAPT*, *PGRN*, *TDP43*, *SNCA* 及びリスク遺伝子 *APOE* のシークエンスを行った。30 臨床施設及び研究所から合計 504 症例の依頼があった。弘前大学神経内科 (7 例): 秋田大学内科 (2 例): 東北大学老年科 (11 例): 山形大学精神科 (5 例): 群馬大学神経内科 (5 例): 関東中央病院 (1 例): 広尾赤十字病院神経内科 (1 例): 国立精神・神経センター神経内科 (5 例): 順天堂大精神科 (4 例): 浴風会神経内科 (1 例): 東京都老人研 (113 例): 東京都精神研 (6 例): 東京医科歯科大 (1 例): 日本医科大 (1 例): 東海大学神経内科 (4 例): 新潟大学病理 (4 例) 神経内科 (109 例) 遺伝子 (90 例): 阿賀野病院 (3 例)、金沢大学 (10 例): 福井大学内科 (1 例) 名古屋大学神経内科 (1 例): 愛知医科大 (1 例): 今川クリニック (2 例): 三重大学神経内科 (63 例): 大阪市立大学脳神経 (16 例): 鳥取大学神経内科 (18 例): 渡辺病院 (3 例): 岡山大学神経内科 (2 例): 川崎医科大 (7 例): 福岡大学 (7 例) から、

家族性アルツハイマー病、前頭側頭葉型認知症、及びそれらの類似疾患が疑われる症例について原因遺伝子のシークエンス依頼があった。若年発症家系の一部に *APP*, *PSEN1*, *MAPT* に既知/新規の変異を見つけ、その結果を依頼元に報告した。

	<i>APOE</i>	<i>APP</i>	<i>PSEN1</i>	<i>PSEN2</i>	<i>MAPT</i>	<i>PGRN</i>	<i>TDP-43</i>	<i>SNCA</i>
エクソン数	4	18	12	12	16	13	6	6
解析総数	319	239	227	216	277	137	1	16
シークエンス数	319	3962	2691	2537	4312	1781	40	6
既知変異	-	2	13	0	8	1	0	0
新規変異	-	9	7	0	5	3	0	0

2005/4/1~2009/11/30まで

(2) 個別研究

個別研究としてアルツハイマー病の遺伝子解析を行った。

①罹患同胞対解析。

「応用ゲノム」と共同して罹患同胞対解析を進めた。「先端脳」研究班でこれまでに収集した同胞発症例に追加するため、「応用ゲノム」武田班が同胞発症例収集を精力的に行い、目標の同胞 100 ペアに及ばなかったが、91 対を収集した。同胞発症例の中に家族性アルツハイマー病が含まれている可能性があったので、原因遺伝子変異の有無をシークエンスで確認した。高齢発症のアルツハイマー病のためか原因遺伝子の変異は認められなかった。高密度 SNP タイピング (Affymetrix 社: ver6.0, 90 万 SNP) 結果を「応用ゲノム」辻班員と連携して現在、罹患同胞対解析中である。

②晩期発症アルツハイマー病相関解析。

大規模検体を用いて高密度 SNP タイピングによってアルツハイマー病感受性遺伝子の探索の最終段階にある。検体情報は下記の表にまとめた。

Subject demographics

	1st: GWAS		2nd: Replication		
	LOAD	Control	LOAD	Control	
No. of subjects	1008	1019	889	988	
(Female [%])	(71.8)	(57.7)	(69.5)	(58.0)	
AAO/AAE	73.0	77.0	74.4	73.7	
(SD)	(4.3)	(5.9)	(7.0)	(5.8)	
<i>APOE</i>					
Genotype	$\epsilon 2^*2$	1	2	0	2
	$\epsilon 2^*3$	26	75	31	85
	$\epsilon 2^*4$	12	7	11	13
	$\epsilon 3^*3$	420	772	421	735
	$\epsilon 3^*4$	446	156	343	146
	$\epsilon 4^*4$	103	7	83	7
Allele	$\epsilon 2$	40	86	42	102
	$\epsilon 3$	1312	1775	1216	1701
	$\epsilon 4$	664	177	520	173

1 次 2 次スクリーニングに晩期発症アルツハイマー病 (LOAD) 1897 例、その対照として年齢を揃えた健常高齢者 2007 例を解析した。民族を超えたリスク遺伝子である *APOE* $\epsilon 4$ アリルを保有者は、全体 3904 人のうちアルツ

ハイマー病 998 例 (25.6%) に対して健常者 336 例 (8.6%) であった。APOE ϵ 4 アリル頻度は、アルツハイマー病 1184 アリル (15.2%) に対して健常者 350 アリル (4.5%) であった。これは米国の結果とよく一致していた。解析フローチャートに従って解析を行った。

より高度な統計解析については「ゲノム情報支援」班の協力を得て、GeneChip1 次スクリーニングで出力された約 18 億タイピングデータの解析を行った。検体の cleaning、Call rate、P 値、主成分分析及び民族の特徴等を考慮して、有意と思える SNP を上位から 1553 個を選択した。1553 個について GoldenGate2 次スクリーニングを行った。もっとも有意なゲノム領域は、第 19 番染色体の PVRL2、TOMM40、APOE、APOC であったが、この領域は 2 カ所の recombination hot spot には挟まれ、APOE と連鎖不平衡の範囲内であった。その他有意な SNP について TaqMan 法にて確認している。

③ バイオインフォマティクス。

アルツハイマー病感受性遺伝子解析研究を進める中で、医療統計学のグループにタイピングデータを提供して、実践的なソフトの開発を行った。まず、疾患感受性遺伝子を同定する方法として統計学的検出力を考慮した R 言語を用いたマルチステージ法による疾患-対照群相関解析法を開発した。開発したプログラムは自由に使用できるようにした。

多段階解析法をデザインする際に、replication-based analysis と joint analysis の検体数や候補アリル等を変化させて実践的な統計学的検出力と陽性的中率を分析した。いずれにおいても、検出力と陽性的中率は二段階法より三段階法の方が高かった。

HapMap のデータを用いてハプロタイプ頻度から仮定の疾患群、対照群を作成した。この仮想サンプルを使って疾患-対照群相関解析を繰り返し行い、候補 SNP を 25% に絞った。この候補 SNP を使った結果は実際の報告や tag SNP を使った結果と良く一致した。この方法は疾患に左右されず経済的に優れた方法である。

⑤ 欧米人リスク遺伝子を日本人で確認。

最近の GWAS によって GAB2 が欧米人で同定された。日本人にとってもリスクとなるか、本研究で収集した大規模検体をリソースに用いて再現性を確認したところ、日本人の集団ではアルツハイマー病のリスクとならなかった。

⑥ 原因遺伝子解析。

アルツハイマー病の原因遺伝子 (APP、PSEN1、PSEN2) 以外に、MAPT 変異が関与するのではないかと考えられている。日本人の 10 家系について、APP、PSEN1、PSEN2、MAPT の全エ

クソンのシーケンスを行ったところ、PSEN1 変異の他に MAPT に変異 (R406W) を見つけた。このことはアルツハイマー病の発症機序や治療を考える上で非常に重要である。

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 21 件)

1. Takei N, Miyashita A, Tsukie T, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kimura H, Kakita A, Takahashi H, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Odani S, Kuwano R, and the Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer Disease. Genetic association study on and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. *Genomics*. 93:441-448. (2009) 査読有
2. Kasuga K, Ohno T, Ishihara T, Miyashita A, Kuwano R, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Depression and psychiatric symptoms preceding onset of dementia in a family with early-onset Alzheimer disease with a novel PSEN1 mutation. *J Neurol*. 256:1351-1353. (2009) 査読有
3. Hara K, Shiga A, Fukutake T, Nozaki H, Miyashita A, Yokoseki A, Kawata H, Koyama A, Arima K, Takahashi T, Ikeda M, Shiota H, Tamura M, Shimoe Y, Hirayama M, Arisato T, Yanagawa S, Tanaka A, Nakano I, Ikeda S, Yoshida Y, Yamamoto T, Ikeuchi T, Kuwano R, Nishizawa M, Tsuji S, Onodera O. Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N Engl J Med*. 360:1729-1739. (2009) 査読有
4. Kitamura N, Akazawa K, Miyashita A, Kuwano R, Toyabe SI, Nakamura J, Nakamura N, Sato T, Hoque MA: Programs for calculating the statistical powers of detecting susceptibility genes in case-control studies based on multistage designs. *Bioinformatics*. 25:272-273. (2009) 査読有
5. Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R. GAB2 is not associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese. *Eur J Hum Genet*. 17:682-686. (2009) 査読有
6. Fukuda Y, Nakahara Y, Date H, Takahashi Y, Goto J, Miyashita A, Kuwano R, Adachi H, Nakamura E, Tsuji S. SNP HiTLink: a high-throughput linkage analysis system

- employing dense SNP data. *BMC Bioinformatics*. 10:121. (2009) 査読有
7. Toyabe S, Miyashita A, Kitamura N, Kuwano R, Akazawa K: Prediction of Disease-associated Single Nucleotide Polymorphisms Using Virtual Genomes Constructed from a Public Haplotype Database. *Methods Inf Med*. 47(6):522-528 (2008) 査読有
 8. Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., Takuma, H., Kuwano, R., Imagawa, M., Suzuka Ataka, S., *et. Al.* A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol*. 63(3):377-387(2008) 査読有
 9. Ikeuchi T, Kaneko H, Miyashita A, Nozaki H, Kasuga K, Tsukie T, Tsuchiya M, Imamura T, Ishizu H, Aoki K, Ishikawa A, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M: Mutational analysis in early-onset familial dementia in the Japanese population. The role of PSEN1 and MAPT R406W mutations. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 26(1): 43-49. (2008) 査読有
 10. Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Matsubara E, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R. Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer ' s disease in females. *Hum Mol Genet*. 16(23), 2854-2869 (2007) 査読有
 11. Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y; Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer ' s Disease. Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer ' s disease. *Hum Mol Genet*. 15:2170-2182. (2006) 査読有

[学会発表] (計 18 件)

1. Kuwano R, Takei N, Miyashita A, Ihara Y; (JGSCAD): Fine SNP mapping in and around the APOE in late-onset Alzheimer disease. The 12th International Conference on Alzheimer ' s Disease (Vienna, Austria) 2009 年 7 月 15 日
2. Miyashita A, Saitoh Y, Kakita A, Ogishima S, Tanaka H, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Kuwano R: Gene Expression Profiling of Postmortem Brain Tissues Affected by Alzheimer ' s Disease. The 11th International Conference on

Alzheimer ' s Disease and Related Disorders (Chicago, USA) 2008 年 7 月 29 日

3. Kuwano R; Genetic Association Study for late-onset Alzheimer ' s Disease in Japan. The 2nd Alzheimer ' s Association International Conference on Prevention of Dementia (Washington, DC, USA) 2007 年 6 月 11 日

[その他]

(1) ホームページ等

目的とするマイクロサテライト公開データを使いやすく一覧できる手順を開発した。情報支援班の支援を受けて公開した。

① pub marker ソフトウェア

NCBI 公開データに登録のマイクロサテライトを染色体毎にリストを作成する。各マーカーの UniSTS No、position、PCR プライマーの配列、Tm 値、PCR 産物とその 5' 及び 3' 隣接領域のシーケンスが一覧できる。
<http://ocean.cb.k.u-tokyo.ac.jp/homocon/tig1/test.cgi>

② STR 検索ソフトウェア

公開シーケンス配列から、2、3、4、5 塩基繰り返し配列の回数を指定して検索する。繰り返し配列及び 5' 隣接領域 3' 隣接領域それぞれ 400 塩基のシーケンスを表示する。PCR のプライマーの Tm 値や PCR 長を自在に設計し、独自のプライマーリストを作成し保存できる。それら新規の繰り返し配列の position 並びに既知のマーカーと同じ画面に図示する。

<http://ocean.cb.k.u-tokyo.ac.jp/str21/index.cgi>

(2) 報道関連情報

- ① [朝日新聞]:「アルツハイマー病関連遺伝子を特定 (新潟大など共同研究)」2007 年 1 月 24 日
- ② [新潟日報]:「アルツハイマー病発症関連遺伝子を特定 治療法開発へ光明 (新大脳研究所 桑野教授ら)」2007 年 1 月 30 日
- ③ [朝日新聞]:「アルツハイマー病日本人女性にリスク遺伝子 (新潟大など発見)」2007 年 9 月 2 日
- ④ [新潟日報]:「脳を究める」2007 年 10 月 24 日
- ⑤ [日経産業新聞]:「アルツハイマー病関連遺伝子 患者の 4 割保持」2010 年 1 月 13 日

(3) アウトリーチ活動

- ①市民公開 [ゲノム研究勢ぞろい 2008 in 名古屋]:「ゲノム解析でアルツハイマー病予備軍を探す」2008 年 10 月 25-26 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 良三 (KUWANO RYOZO)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20111734

(2) 研究分担者

宮下 哲典 ((MIYASHITA AKINORI)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：60323995