

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16112

研究課題名(和文)病態機序に基づいた副腎白質ジストロフィーの表現型修飾因子の探索研究

研究課題名(英文) Study about modifying factors for phenotypes of adrenoleukodystrophy based on the pathophysiology

研究代表者

松川 敬志 (Matsukawa, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80755760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ALD 108症例におけるexomeデータの解析を行った。表現型毎で比較することで、ALDの病態を修飾する因子を同定することを検討した。原因遺伝子ABCD1に関連した遺伝子群の遺伝子異常がALDの病態を修飾する可能性が示唆されるため、関連した遺伝子群を解析対象として解析を行った。個々の遺伝子では表現型において明らかに有意差のあるvariantは認めなかった。

さらに、各症例のABCD1遺伝子変異として、ミスセンス変異、スプライスサイト変異、欠失変異、挿入変異、挿入欠失変異に加え、複雑な変異を同定し、16が新規変異であった。機能喪失型変異は大脳型だけでなく、非大脳型症例にも認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、副腎白質ジストロフィー(ALD)の臨床をより円滑に行う上で重要な研究成果であったと考える。原因遺伝子ABCD1の遺伝子変異にはサンガーシーケンスでは同定できない複雑な変異があることがわかり、それらを同定可能であったことから、保因者の解析においても有用になると考える。さらに解析を続け、特に予後不良である小児、思春期、成人大脳型ALDの表現型を規定する修飾因子を同定することで、より円滑に造血幹細胞移植の準備を行うことができるようになると思われる。

研究成果の概要(英文)：We performed the analysis of exome data of 108 Adrenoleukodystrophy (ALD) patients. We considered to identify the modifying factors of ALD by comparing the data by each phenotype. We analyzed the exome data focusing on the genes that were related to ABCD1 because the abnormality of ABCD1 related genes seemed to be related to ALD phenotypes. There were no variants which were significantly related to each phenotype.

In addition, as the causative mutations of ALD, we identified not only missense, splicing-site, nonsense, small insertion, small deletion, and small insertion-deletion mutations but also complex mutations such as large duplication and large insertion-deletion mutation. 16 kinds of mutations were novel mutations. The loss-of-function mutations were identified in not only cerebral form patients but also non-cerebral form patients.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：副腎白質ジストロフィー 遺伝子表現型関連 炎症性脱髄 神経遺伝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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 連鎖性劣性遺伝性の進行性の中枢神経障害 (炎症性脱髄) を来す神経変性疾患である。時に副腎不全を来す。様々な臨床病型を呈するが遺伝子表現型連関は明らかでなく、同一家系内でも様々な表現型を呈する。*ABCD1* の変異によって臨床病型を予測することができない (Matsukawa T, et al. Neurogenetics, 2011)。特に大脳型 (小児大脳型、思春期大脳型、成人大脳型) では中枢神経の炎症性脱髄が急速に進行し、数年で植物状態となり予後不良である。一方で Adrenomyeloneuropathy (AMN) 等の非大脳型では緩徐進行性の経過を辿る。発症早期の大脳型に対しては造血幹細胞移植が症状の進行停止に有用であるため、大脳型の発症に関わる背景因子を同定できれば臨床上有用である。臨床の経験上 ALD では近親度が高いほど臨床病型に近い傾向にあり、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)。

ABCD1 の発現産物 adrenoleukodystrophy protein (ALDP) はペルオキシソーム膜に局在しペルオキシソームの物質輸送に関わっている。また *ABCD1* 遺伝子と相同性の高い *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* 遺伝子の存在が知られている。ALDP は half-ATP-binding cassette (ABC) transporter として

homodimer を作る、またはもう一つの ABCD 関連タンパク (*ABCD2* 遺伝子がコードする ALDR) や、(*ABCD3* がコードする PMP70) と heterodimer を作る。

ABCD1 ノックアウトマウスは大脳白質の炎症性脱髄は認めず、生後 15 ヶ月以降に脊髄の非炎症性軸索変性のみを認める軽症の AMN 型に類似の表現型を呈する (図 2)。そのため ALD で大脳白質の炎症性脱髄を生じるためには *ABCD1* 遺伝子変異に加え何らかの追加要因が必要と考える。申請者は、これまでに、*ABCD1* の関連遺伝子である *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* に着目して、40 例の日本人 ALD 症例の解析で *ABCD4* において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 AMN で有意に頻度が低いという結果を得た ($p=0.047$) (Matsukawa T, et al. Neurogenetics, 2011)。しかしフランスにおける独立した ALD 症例 (小児大脳型 118 名、AMN71 例) の解析では日本人 ALD 症例で得られた解析結果は再現されなかった。そのため人種毎に表現型に影響を与える背景因子が異なる可能性があり、日本人 ALD 症例、コントロールのさらなる蓄積、解析が必要であると考えた。

2. 研究の目的

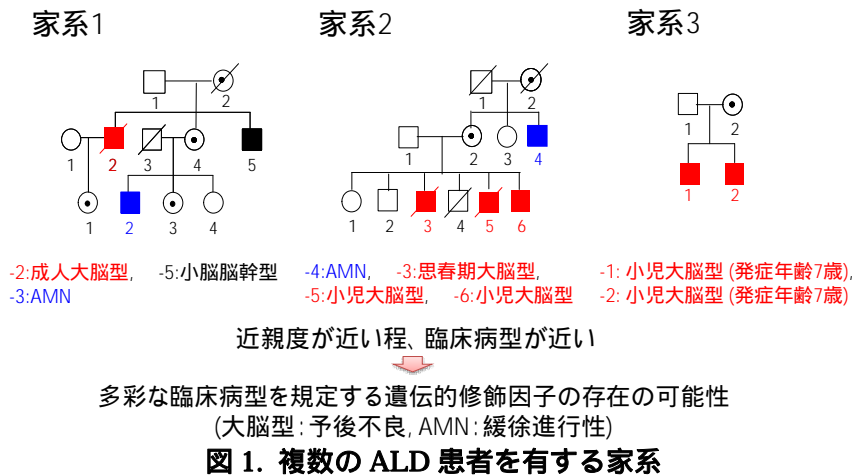
本研究では、これまでに蓄積している 86 例の日本人 ALD 症例について、原因遺伝子 *ABCD1* に関連した遺伝子群について、exome 解析による網羅的な解析を実施し、ALD の臨床病型を修飾する遺伝子を見いだそうとするものである。さらには多面的な解析を行うことを目的として ALD 症例の臨床データベースの構築を目指した。

3. 研究の方法

ALD 86 症例の exome 解析を実施し、表現型に関与する遺伝因子の解明を目指す。Exome 解析については、SureSelect Human All Exon V6+UTRs キット (Agilent) を用いて exon 領域を濃縮、HiSeq2500 (Illumine) を用いてシークエンス後 Burrows-Wheeler Aligner (BWA) でマッピング、samtools で variants のコールを行うことでデータを得た。既に当研究室で得られている 800 例の control の exome データベースを用いて、*ABCD1* に関連した遺伝子群の中で機能障害性が予測される variants について、Fisher の正確検定を実施し、臨床病型との関連を検討した。既知の病因遺伝子変異、フレームシフト変異、スプライスサイト変異、ナンセンス変異に加え、複数の機能予測アルゴリズムで機能障害が予測される機能障害性の rare variants を検出した。併せて ALD 症例の DNA サンプルを蓄積し、ALD 症例についての臨床データベースの構築を継続した。

4. 研究成果

(1) ALD 108 症例 [大脳型 58 例 (小児大脳型 ALD 17 例、思春期大脳型 ALD 7 例、成人大脳型 ALD 12 例、AMN から大脳型への移行例 20 例、小脳脳幹型から大脳型への移行例 2 例)、小脳脳幹型 8 例、AMN 36 例、Addison 病 4 例、未発症 2 例] において exome 解析を実施し、データの解析を行った。シークエンス後、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) でマッピング、samtools で



variants のコールを行うことでデータを得た。Control として、当研究室で集積されている 800 例の日本人 control の exome データベースも利用し比較することで、ALD の病態を修飾する因子を同定することを検討した。ALD の原因遺伝子 *ABCD1* に関連する遺伝子群を解析対象の遺伝子群として設定した解析を行った。個々の遺伝子においては表現型において明らかに有意差のある variant は認めなかった。Exome で検出された rare variants においてはサンガーシーケンスにおいても確認を行った。Quality score, coverage が低い場合は Exome で同定されているもののサンガーシーケンスでは同定できていない場合も多く今後適切な Quality score, coverage のカットオフ値を検討していくことが必要と考えた。

(2) さらに、これまで集積した ALD 症例の原因遺伝子 *ABCD1* 変異、表現型に加え、発症年齢、DNA 抽出時の年齢、家族歴等を集積することで、多面的な解析ができるように臨床データの集積も併せて行った。

(3) *ABCD1* 遺伝子変異は、ミスセンス変異、スプライスサイト変異、欠失変異、挿入変異、挿入欠失変異に加え、複雑な変異(大規模な重複変異, 大規模な挿入欠失変異)を同定し、16 が新規変異であった。機能喪失型変異は大脳型だけでなく、非大脳型症例にも認めた。すなわち *ABCD1* の遺伝子変異のタイプのみでは表現型を規定することができないことを確認した。検出された大規模な重複変異に関しては、サンガーシーケンスでは変異を検出することができず、mRNA から RT-PCR を用いて cDNA を作成し、*ABCD1* 由来の cDNA をターゲットとした exon-exon 境界領域におけるプライマーペアを作成した後に、PCR を行い、電気泳動でコントロールと比較して PCR 増幅産物の長さの違いを検出し、さらにサンガーシーケンス用のプライマーをデザインし、サンガーシーケンスで確認することで初めて検出することが可能であった。女性保因者においては ALD で上昇するとされている極長鎖飽和脂肪酸の上昇が 15%では認められず、保因者診断では *ABCD1* の原因遺伝子の解析が必要となる。複雑な変異(大規模な重複変異, 大規模な挿入欠失変異)の場合は特に保因者の解析を行う場合はサンガーシーケンスのみでは見落とされる可能性があり、まずは家系内の男性の ALD 症例の遺伝子解析を行い同定することが重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

松川 敬志, 白質脳症のゲノム医療, 86 巻, 2017, 654-659

〔学会発表〕(計 3 件)

Takashi Matsukawa, Jun Mitsui, Hiroyuki Ishiura, Tomotaka Yamamoto, Akihito Hao, Miho Kawabe Matsukawa, Masaki Tanaka, Hyangri Chang, Toji Miyagawa, Masashi Hamada, Yuji Takahashi, Toshihiro Hayashi, Atsushi Iwata, Jun Shimizu, Jun Goto, Tatsushi Toda, Shoji Tsuji. HSCT for adult-onset ALD: Background factors leading to early diagnosis of the brain involvement. 第 59 回日本神経学会学術大会, 2018

Takashi Matsukawa, Jun Mitsui, Hiroyuki Ishiura, Yuji Takahashi, Masaki Tanaka, Shin Hayashi, Jun Goto, Johji Inazawa, Shoji Tsuji, Mutational analysis of *ABCD1* in 86 adrenoleukodystrophy patients, including identification of complex mutations. The XXIII World Congress of Neurology, 2017

Takashi Matsukawa, Jun Mitsui, Hiroyuki Ishiura, Yuji Takahashi, Masaki Tanaka, Shin Hayashi, Jun Goto, Johji Inazawa, Tatsushi Toda, Shoji Tsuji. Identification of complex mutations and mutational analysis of *ABCD1* in 88 adrenoleukodystrophy patients. 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 2017

〔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〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。