

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590989  
 研究課題名（和文） 大量高速ゲノムSNPチップ連鎖解析システムによる遺伝性神経疾患の遺伝子同定  
 研究課題名（英文） Identification of genes for hereditary neurological diseases by the high throughput SNP chip linkage system  
 研究代表者  
 後藤 順（GOTO JUN）  
 東京大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：10211252

研究成果の概要（和文）：SNP チップ解析結果から直接連鎖解析を行えるパイプライン SNP HiTLink を開発した。SNP チップによる家系のタイピングと連鎖解析を含め、最短4日間でマッピングを可能である。SNP 連鎖解析はマイクロサテライトと同等である。放射線雑種細胞による物理的マッピングともよく一致していた。網膜色素変性症を伴う後索性失調症の原因遺伝子を同定した。また、臨床現場で、遺伝子診断の補助として応用できる。

研究成果の概要（英文）：We have developed SNP HiTLink which can directly import SNP chip data to linkage analysis programs including MLINK, Superlink, Merlin and Allegro. SNP genotyping and linkage analysis can be completed minimally 4 days. Results of SNP linkage mapping are similar to those obtained by microsatellites markers and to those of radiation RH mapping. A novel mutation of *FLVCR1* was identified in a Japanese family accompanying with posterior column ataxia with retinitis pigmentosa. Clinical implementation is also useful to improve genetic diagnosis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：連鎖解析、一塩基多型（SNP）、遺伝性疾患、遺伝子同定

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ポジショナルクローニングによって、過去約四半世紀に、数多くの遺伝性神経疾患の原因遺伝子が同定されてきた。しかしながら、すべての疾患の原因遺伝子

が同定されているわけではなく、稀少な疾患家系、小家系の疾患等については、まだ数多くの原因遺伝子が未同定である。

(2) ポジショナルクローニングの前提とな

る疾患遺伝子マッピングにこれまで、マイクロサテライトマーカーが大きな成果を上げてきたが、その解析には、それなりの労力、規模と時間を要した。ハップマップ計画とマイクロアレイ技術の進歩によって、全ゲノムにわたる高密度の一塩基多型 (SNP) チップが開発され、小規模、小労力、短時間での遺伝子マッピングが可能となった。

## 2. 研究の目的

- (1) SNP チップによる遺伝子型タイピングデータをもとにした連鎖解析システムを整備する。
- (2) 遺伝子未同定の家系について、疾患原因遺伝子を同定する。

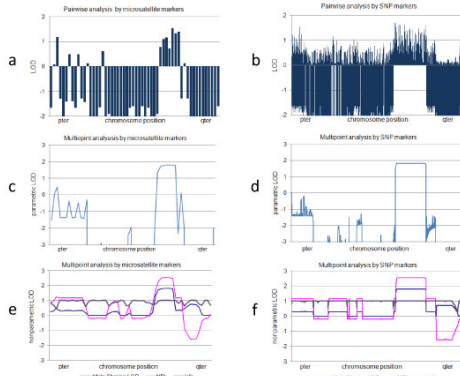
## 3. 研究の方法

- (1) 遺伝子未同定家系について、SNP チップ (Affymetrix 社) にて、全ゲノム SNP タイピングを行う。
- (2) 連鎖解析システムにて、候補領域を決定あるいは、エクスクルージョンマッピングを行う。
- (3) 上記領域の遺伝子より、シーケンシング等にて、原因遺伝子の突然変異を同定する。

## 4. 研究成果

- (1) 大量高速 SNP チップ連鎖解析システム: 福田 (連携研究者) は、SNP HiLink を開発した (*BMC Bioinformatics* 2009; 10:121)。Affymetrix、Illumina 両プラットフォームの SNP アレイに対応して、SNP タイピングの実験結果を、直接 MLINK、Superlink、Merlin 及び Allegro の連鎖解析ソフトに移し解析可能である。家系ゲノムサンプルが用意されていれば、SNP タイピングと連鎖解析と合わせて、最速 4 日間で解析可能である。

図 1 は、掲載論文の Fig. 4 の引用である。SNP マーカーによる解析は、マイクロサテライトマーカーによる解析に遜色ない。



連鎖解析の比較. 左: マイクロサテライト、右: SNP. a, b: 二点解析. c, d: パラメトリック多点解析. e, f: ノンパラメトリック多点解析.

- (2) SNP マッピングと RH マッピング: 海外研究者との共同研究にて、家族性筋萎縮性側索硬化症小家系について、放射性雑種細胞 (RH) マッピングと SNP マッピングとの比較を行った (*PLoS One* 2009;4:e5687)。RH マッピングによる物理的マッピングと SNP マッピングとの結果はよく一致しており、信頼性を確認した。

- (3) 網膜色素変性症を伴う後索性失調症の原因同定: 網膜色素変性症を伴う後索性失調症 (posterior column ataxia with retinitis pigmentosa; PCARP) は常染色体性劣性遺伝形式をとる稀な疾患である。日本人の 1 家系について、SNP マッピングを行い、大量並列短鎖長塩基配列解読機 (次世代シーケンサー) 解析にて、原因遺伝子を同定した (*Neurogenetics*. 2011;12:117-121)。

図 2 は、掲載論文の Fig. 2 の引用である。A に全ゲノムにわたる連鎖解析の結果、B に候補領域の詳細を示している。原因遺伝子は *FLVCR1* であった。

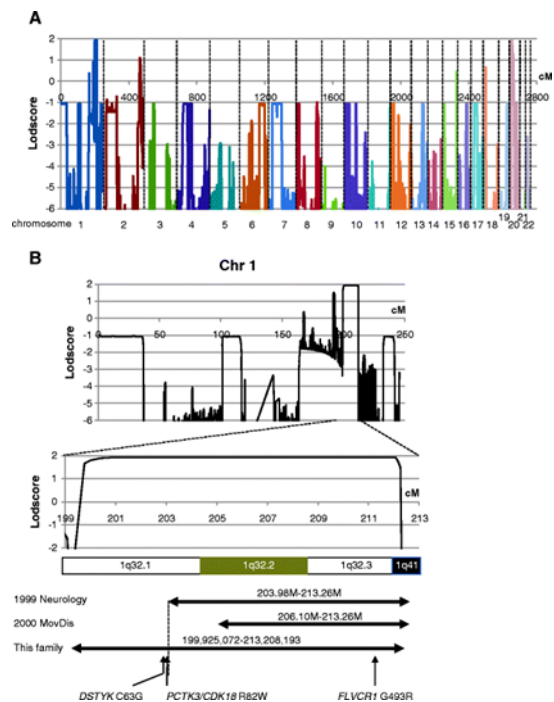


図 2 PCARP 家系の連鎖解析と遺伝子候補領域. A: 全ゲノム連鎖解析. B: 候補領域.

- (4) 臨床応用: 原因遺伝子の既知である遺伝性疾患においても、稀な疾患、遺伝

的異質性の高いものでは、連鎖解析による候補遺伝子の選択、共分離の証明によるミスセンス突然変異の証明に有用である。実際、以下のような応用を行った。

- ① 常染色体劣性遺伝性疾患：血族婚により原因突然変異が自己接合 (autozygote) となっていることが想定される場合には、少数の家系メンバー (患者ひとりでも) で、候補遺伝子の座位についての有用な情報を得られる。Leukoencephalopathy with vanishing white matter の診断に有用であった (*Neurogenetics*. 2011 Apr 12. [Epub ahead of print])。
- ② 常染色体優性遺伝性疾患：成人発症の常染色体優性遺伝形式のネマリンミオパチーについて、家族の協力を得て、連鎖解析を行った。家系規模は大きくなく、遺伝子座位を特定できなかったが、exclusion mapping は可能で、その結果と既知原因遺伝子の座位から、*ACTA1* と *TPM2* が候補として上がり、前者には突然変異を認めず、後者に原因突然変異を認めた (第 60 回米国人類遺伝学会にて発表)。

図 3 は、常染色体優性遺伝のネマリンミオパチー既知原因遺伝子領域の本家系の連鎖解析結果 (多点解析) と突然変異のシーケンシング結果を示す。

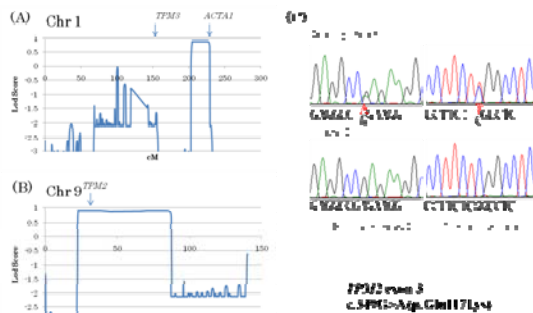


図 3 成人発症ネマリンミオパチー家系の多点連鎖解析と *TPM2* 突然変異。(A) 染色体 1 番の連鎖解析結果。(B) 染色体 9 番の連鎖解析結果。(C) 突然変異解析。

#### 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 16 件)

- ① Matsukawa T, Wang X, Liu R, Wortham NC, Onuki Y, Kubota A, Hida A, Kowa H, Fukuda Y, Ishiura H, Mitsui J,

Takahashi Y, Aoki S, Takizawa S, Shimizu J, Goto J, Proud CG, Tsuji S. Adult-onset leukoencephalopathies with vanishing white matter with novel missense mutations in EIF2B2, EIF2B3, and EIF2B5. *Neurogenetics*. 2011 Apr 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21484434. 査読有

- ② Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. *Neurogenetics*. 2011 May;12(2):117-21. Epub 2011 Jan 26. PubMed PMID: 21267618. 査読有

- ③ Krueger KA, Tsuji S, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Mitsui J, Ishiura H, Dalton JC, Miller MB, Day JW, Ranum LP. SNP haplotype mapping in a small ALS family. *PLoS One*. 2009 May 25;4(5):e5687. PubMed PMID: 19479031; PubMed Central PMCID: PMC2682655. 査読有

- ④ 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*. 2009 Apr 24;10:121. PubMed PMID: 19393044; PubMed Central PMCID: PMC2680848. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① Goto J, Ishiura H, Fukuda Y, Nagashima Y, Shimizu J, Takahashi Y, Ichikawa Y, Tsuji S: A Japanese family of

nemaline myopathy which is caused by *TPM2* mutation. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Washington DC, USA, November 2-6, 2010

- ② Ishiura H, Ahsan B, Mitsui J, Takahashi Y, Fukuda Y, Ichikawa Y, Nakahara Y, Kara K, Takahashi T, Kakita A, Onodera O, Nishizawa M, Goto J, Tsuji S: Siblings of pathologically proven multiple system atrophy: an application of whole genome analysis toward finding strong genetic factors for sporadic diseases. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Washington DC, USA, November 2-6, 2010
- ③ Matsukawa T, Wang X, Liu R, Hida A, Kubota A, Fukuda Y, Kowa H, Takahashi Y, Aoki S, Shimizu J, Goto J, Proud CG, Tsuji S: Adult-onset leukoencephalopathies with vanishing white matter with novel missense mutations in *EIF2B2* and *EIF2B5*, and decreased eIF2B activity. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, Hawaii, USA, October 20-24, 2009
- ④ Fukuda Y, Nakahara Y, Date H, Takahashi Y, Goto J, Hara K, Nishizawa M, Nakamura E, Adachi H, Tsuji S: Development of a high-throughput analysis system and application for the linkage analysis of familial multiple system atrophy (MSA). 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, USA, November 11-15, 2008

〔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

後藤 順 (GOTO JUN)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：10211252

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

高橋 祐二 (TAKAHASHI YUJI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00372392  
市川 弥生子 (ICHIKAWA YAEKO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90341081  
福田 陽子 (FUKUDA YOKO)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：60396744