

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790622  
 研究課題名（和文）ハプロタイプマッピング法による遺伝性痙性対麻痺の新規原因遺伝子の同定  
 研究課題名（英文）Identification of the gene responsible for hereditary spastic paraplegia by homozygosity haplotype mapping  
 研究代表者  
 神田 将和（KOHDA MASAKAZU）  
 埼玉医科大学・医学部・研究員  
 研究者番号：20415417

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では遺伝性痙性対麻痺の家系から原因遺伝子の同定を試みた。研究は4段階に分け、1) 継続的なサンプル収集、2) 既知遺伝子変異の検索、3) 染色体の構造異常解析、4) 候補領域の限定、を実施した。結果として既知遺伝子に異常はなく、新規遺伝子の可能性が高いことを確認できた。また当初予定した3世代分の収集には至らなかったが、発端者の家族以外の親戚からも協力を得て、候補領域を2箇所まで絞り込むことが出来た。今後、候補領域内の変異検索を高出力シーケンサーにより進めていく。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to identify the gene responsible for hereditary spastic paraplegia (HSP). The research was carried out as follows: 1) Continuous sampling, 2) Searching for mutations by sequencing, 3) Analysis of structural chromosome aberrations, 4) SNP array analysis for gene discovery. As a result, we confirmed that well-known causative genes do not cause HSP of this family. Furthermore, our analysis narrowed down candidate regions for disease-phenotypes to two chromosomal regions. This has led to the second set of experiments, we will conduct mutation search at the two candidate regions by using high throughput sequencers.

## 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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4160,000

研究分野：医歯薬学  
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・7206  
キーワード：遺伝子疾患、単一遺伝子疾患

## 1. 研究開始当初の背景

### 遺伝性痙性対麻痺の背景

遺伝性痙性対麻痺，進行性の下肢痙縮と筋力低下を主体とする症候群である。本邦におけるHSPの頻度は，人口10万人あたり約0.2程度の有病率であると推定されている。病理学的には脊髄の錐体路，後索，脊髄小脳路の系統変性を主病変とする。均一な疾患ではなく，臨床的には下肢痙性に加えて軽度膀胱直腸障害や深部感覚障害，上肢深部反射亢進などに症状がとどまる純粋型(pure form)と高次機能障害や眼症状，筋萎縮，嚥下障害，てんかん，難聴などを伴う複合型(complicated form)があり，様々である。

### 既知の原因遺伝子と候補領域

分子遺伝学的研究の進歩に伴い，HSPの遺伝子座としては現在までに36領域が報告されている。2006年に新たに2つの新規遺伝子が同定され，現在までに原因遺伝子として15個が同定されている。遺伝形式により優性遺伝を示すタイプが9個、劣性遺伝を示すタイプが4個、X伴性を示すタイプが2個となっている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝性痙性対麻痺 (hereditary spastic paraplegia: HSP) の家系サンプルを用いてその原因遺伝子を同定することである。今回我々は HSP 家系を対象として、サンプル収集と homozygosity

haplotype 解析による原因遺伝子の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

研究計画は大きく分けると3つのアプローチから成る。

### (1) 継続的なサンプル収集

対象とした優性HSPの家系図を示す(図1)。矢印は既にDNAを受け取っているサンプルである。家系に存在する発症者の出現頻度から、遺伝と発症率において高い浸透率があることが見いだされる。優性遺伝形式を示す場合、人種に関わらず *SPAST* (*Spastin*) 遺伝子の変異が最も多く(約40%)報告されている。また現在までに日本人での確認が報告されているのは、*SPAST*、*SPG3A* (*Spastic Paraplegia 3A homolog*)、*NIPA1* (*Non Imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1*) の3遺伝子に限られている。



### (2) マイクロアレイを用いた原因領域の抽出

DNA の提供を受けた後は速やかにマイクロアレイを用いたゲノムワイドな多型データ

を取得し以下の解析を行う。

ハプロタイプマッピング法により患者間のみで共有されている原因遺伝子を含むゲノム領域の抽出を行う。抽出された候補領域に既知の HSP 原因遺伝子があれば、それらを優先してシーケンスを行う(研究方法の 3)。HSP 原因遺伝子が候補領域にない場合、疾患の特徴から脳・神経組織特異的な発現パターンを示す遺伝子を遺伝子発現データベースで絞り込み、遺伝子に付与されているアノテーションによる絞込みなどバイオインフォマティクスを駆使したランク付けを行った後、候補遺伝子としてシーケンスを行う。

### (3) シーケンスによる変異検索

SPG3A、SPAST、NIPA1 の 3 遺伝子について日本人での変異が報告されているので、マイクロアレイ実験と平行してシーケンスによりアミノ酸置換を起こす多型を検索する。

マイクロアレイ実験終了後、日本人で報告のない既知遺伝子が候補領域に含まれていた場合はそれらを優先してシーケンスを行う。

## 4. 研究成果

研究の実施は以下のように行い、それぞれの結果を得た。

(1) 継続的なサンプルの収集: 2 年間で 1 家系 2 世代のサンプルを発症者、非発症者を含めて 9 例を集めた。急逝・本人の意思を尊重したケースが生じた分、当初の見込みとした 3 世代分に届かなかった。

(2) シーケンスによる変異検索: SPG3A、SPAST、NIPA1 の 3 遺伝子については日本人での変異が報告されている。今回の研究でもアミノ酸置換・スプライシング変異を起こしうる変異の検索を行った。NIPA1 遺伝子の N 末

端においてアミノ酸置換変異を同定したが収集した発症ケースで変異を持たないものがいたため、最終的にはこの家系での原因変異ではないと判断した。

(3) 染色体構造異常解析: 今回、発症者共通の同祖領域を求めるために用いた SNP アレイのデータから染色体構造異常解析も行ったが、疾患の原因変異と考えられる構造異常はなかった。また SPAST 遺伝子では欠損例も報告されているが、今回の実験結果は否定的であった。

(4) SNP アレイを用いた原因遺伝子の探索: 最終的に集められた 9 例のうち、非血縁のものを除いた 8 例で同祖領域の探索を行った。結果として染色体 1 番と 22 番の一部に候補領域が絞られた。1 番染色体の候補領域は 593 遺伝子を含み、過去に報告例がある HSP の SPG29 候補領域と重複していた(重複内に存在する遺伝子数は 134)。

まとめると、候補領域を 2 箇所に限定することが出来た。当初見込んでいた三世代からの DNA 収集は果たせなかったが、それ以外については発症者の家族以外の親戚からも協力を得ることが出来た。さらに上記サンプルからの homozygosity haplotype mapping 解析結果と既知遺伝子シーケンスの結果から、今回の家系が新規の HSP である可能性が高いことも確認できた。

特に発症者と考えられるサンプルを最終的に 7 例集め、領域を限定できたことは大きい。今後、次世代高出力シーケンサーを利用し、候補領域内のアミノ酸置換変異を中心に探索を進めていくことが現実的に可能となったので推進していく。

## 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)

[学会発表](計1件)

糸川かおり、神田将和、新井誠、糸川昌成、  
福井海樹、田村直俊、岡崎康司、荒木信夫、  
島津邦男

未知の遺伝子変異の関与が示唆される常染色体優性家族性痙性対麻痺の1家系  
日本神経学会総会 (2008.5.15-17)  
パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神田 将和 (KOHDA MASAKAZU)  
埼玉医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：20415417

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし