

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 25年 6月 3日現在

機関番号：13101
 研究種目：新学術領域研究
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21200041
 研究課題名（和文） 遺伝子コピー数異常（CNV）に着目した神経疾患における新規遺伝子変異の探求
 研究課題名（英文） Mutations associated with copy number variation in neurological disorders
 研究代表者
 池内 健（IKEUCHI TAKESHI）
 新潟大学・研究推進機構・准教授
 研究者番号：20372469

研究成果の概要（和文）：

ヒトゲノム DNA には遺伝子コピー数の変化（copy number variation: CNV）が存在することが明らかにされている。その中の幾つかのコピー数の変化が疾患発症の原因となることが最近見出されており、普遍的な遺伝子変異として注目されている。本研究では、原因となる遺伝子変異が未同定な神経疾患を有する家族発症例に対して、網羅的な CNV の検索を行った。健康人においても、複数の CNV 領域を同定したが、疾患の発症に関連すると思われる CNV 異常を同定した。

研究成果の概要（英文）：

It has been demonstrated that a number of regions in human genome shows copy number variation. Some of them are apparently associated with disease conditions. In this study, we performed genome-wide survey to detect CNVs associated with disease condition using samples from familial cases with neurological disorders with unknown etiology. This analysis revealed that there are several regions with CNV in normal controls. In addition, we also found apparently pathogenic CNV in familial case with dementia.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 8,200,000 | 2,460,000 | 10,660,000 |
| 2010年度 | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |
| 2011年度 | 7,300,000 | 2,190,000 | 9,490,000 |
| 総計 | 23,000,000 | 6,900,000 | 29,900,000 |

研究分野：臨床神経学

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：神経疾患，遺伝子コピー数，アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム DNA には遺伝子コピー数の変化（copy number variation: CNV）が存在することが明らかにされている。その中の幾つかのコピー数の変化が、特定の疾患の発症に関与することが明らかにされており、普遍的な遺伝子変異として注目されている。一方、遺伝性疾患の新規原因遺伝子の同定に至る標準的な方法としてポジショナルクロー

ニングがあるが、ポジショナルクローニングに必要な連鎖解析を行うには、大規模な家系もしくは同一疾患の多数の家系を集積する必要があった。このような標準的なアプローチにより、多くの原因遺伝子の同定が行われてきた経緯がある一方で、十分な規模の家系員の集積が困難な小家系（現実にはこのタイプの家系の方が多い）は、原因遺伝子の探索に課題を残している。最近の次世代シーク

エンサーを用いたエクソーム解析により小家系においても塩基の質的变化（点変異や微小欠失など）を伴う遺伝子変異の同定が可能になったが、CNVの有効な検出は未だ困難な状況である。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子コピー数の変化による変異メカニズムにフォーカスを絞り、最新のゲノム解析技術を用いることで、CNVに関連する遺伝子変異を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) オリゴヌクレオチドプローブを用いたマイクロアレイ解析

全ゲノム領域を増幅（1000倍以上）し、断片化処理により300-600bpのフラグメントを作成した。ビーズチップとのハイブリダイゼーションを行い、ポリメラーゼによる伸長反応の後、蛍光標識を行い、スキャナーでデータを取り込んだ。マイクロアレイは、Human Omni Express BeadChip Kitを用いて解析を行った。このbeadsには733,202個のマーカが配置されており、全ゲノムを平均4.1kbで網羅している。得られたデータは、KaryoStudioを用いてCNV領域を可視化した。

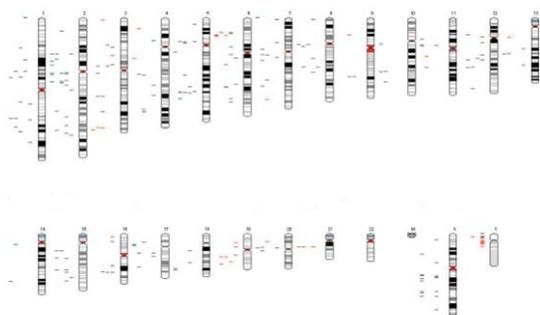
(2) 全ゲノム SNP アレイを用いた解析

遺伝子コピー数と関連解析を結びつけることが可能な Genome-wide Human SNP Array 6.0 を用いて解析を行った。解析で得られた SNP 多型を Genotype Console を用いて遺伝子コピー数を算出した。

4. 研究成果

(1) オリゴヌクレオチドプローブを用いたマイクロアレイ解析による健常者における CNV 検出

健常者5名のゲノム DNA の全ゲノムの CNV を検討したところ、下図のような複数のゲノム領域に CNV を認めた。症例間によっても CNV の分布が異なっており、CNV は健常者でも多様性をもって存在していた。



(2) 家族性認知症家系における CNV 異常の検出

家族性認知症家系の中で、下図に示すように第21番染色体に遺伝子コピー数の増加をしめす領域が認められた。

△gain (>100kb), ▽loss (>100kb)



遺伝子コピー数の増加を示した遺伝子領域は951kbであり、この領域にはアミロイド前駆体タンパク（APP）遺伝子が含まれていた。

(3) リアルタイム PCR を用いた遺伝子コピー数の解析

上記の SNP アレイで検出した CNV 異常を確認するために、APP のエクソン7、16、20およびイントロン2にプローブを設定しリアルタイム PCR により遺伝子量を決定した。コントロールに比し、家族性認知症発症者では遺伝子量が約1.5倍に増加しており、APP に重複が生じていることが示唆された。

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15件）

- 1) Miyashita A, Koike A, Jun G (13名略), Ikeuchi T, (42名略), Kuwano R. SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasian. *PLOS One* 査読有(in press)
- 2) Riku Y, Ikeuchi T, Yoshino H, Mimuro M, Mano K, Goto Y, Hattori N, Sobue G, Yoshida M. Extensive aggregation of α -synuclein and tau in juvenile-onset neuroaxonal dystrophy: an autopsied individual with a novel mutation in the PLA2G6 gene-splicing site. *Acta Neuropathologica Communication* 査読有(in press)
- 3) Omoto M, Suzuki S, Ikeuchi T, Ishihara T, Kobayashi T, Tsuboi Y, Ogasawara J, Koga M, Kawai M, Iwaki T, Kanda T. Autosomal

- dominant tauopathy with parkinsonism and central hypoventilation. *Neurology* 査読有 78:752-764, 2012
- 4) Ikeuchi T, Katsui T, Kasuga K, Hirose M, Nishizawa M. Parkinsonian features in a patient with diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNFC). *Parkinsonism & Related Disorders* 査読有 18:649-650, 2012
 - 5) Kobayashi J, Kuroda M, Kawata A, Mochizuki Y, Mizutani T, Komori T, Ikeuchi T, Koide R. Novel G37V mutation of SOD1 gene in autopsied patient with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 査読有 14:570-572, 2012
 - 6) Kasuga K, Nishizawa M, Ikeuchi T. α -Synuclein as CSF and Blood Biomarker of Dementia with Lewy Bodies. *International Journal of Alzheimer's Disease* 査読有 437025, 2012
 - 7) Shiga A, Nozaki H, Nihonmatsu M, Kawata H, Arima K, Ikeda S, Tanaka A, Nakano I, Ikeuchi T, Nishizawa M, Onodera O. Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls TGF- β 1 signaling via cleavage of proTGF- β 1. *Human Molecular Genetics* 査読有 20:1800-1810, 2011
 - 8) Kasuga K, Ikeuchi T, Arakawa K, Yajima R, Tokugake T, Nishizawa M. Predominant executive cognitive deficit and cerebral white matter lesion in a patient with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) *Case Reports in Neurology* 査読有 3:118-123, 2011
 - 9) Yokoseki A, Ishihara T, Yamada M, Murakami C, Tsuchiya M, Date H, Sato T, Tada M, Ikeuchi T, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O. Genotype-phenotype correlations in early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia. *Brain* 査読有 134:1387-1399, 2011
 - 10) Ikeuchi T, Imamura T, Kawase Y, Kitade Y, Tokutake T, Yajima R, Tsukie T, Miyashita A, Sugishita M, Kuwano R, Nishizawa M. Clinical characteristics and evidence for a common founder in Japanese families with MAPT R406W mutation. *Dementia Geriatric* *Cognitive Disorders EXTRA* 査読有 1:267-275, 2011
 - 11) Shimizu H, Yamada M, Toyoshima Y, Ikeuchi T, Onodera O, Takahashi H. Involvement of Onuf's nucleus in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathologica* 査読有 120:439-448, 2010
 - 12) Hasegawa A, Ikeuchi T, Koike R, Mataubara N, Tsuchiya M, Nozaki H, Homma A, Idezuka J, Nishizawa M, Onodera O. Long-term disability and prognosis in dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA): a correlation with CAG repeat length. *Movement Disorders* 査読有 25:1694-1700, 2010
 - 13) Fu Y, Nishihira Y, Kuroda S, Toyoshima Y, Ishihara T, Shinozaki M, Miyashita A, Piao YS, Tan CF, Tani T, Koide R, Iwanaga K, Tsujihata M, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M, Kakita A, Ikeuchi T, Takahashi H. Sporadic four-repeat tauopathy with frontotemporal lobar degeneration, parkinsonism and motor neuron disease: a distinct clinicopathological and biochemical disease entity. *Acta Neuropathologica* 査読有 120:21-32, 2010
 - 14) Okazaki K, Fu Y-J, Nishihira Y, Endo M, Fukushima T, Ikeuchi T, Okamoto K, Onodera O, Nishizawa M, Takahashi H. Alzheimer's disease: Report of two autopsy cases with a clinical diagnosis of corticobasal degeneration. *Neuropathology* 査読有 30:140-148, 2010
 - 15) Kasuga K, Tokutake T, Ishikawa A, Uchiyama T, Tokuda T, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Differential levels of α -synuclein, β -amyloid, and tau in cerebrospinal fluid between patients with dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 査読有 81:608-610, 2010
- [学会発表] (計 12 件)
- 1) 他田正義, 今野卓哉, 他田真理, 荒川武蔵, 小山哲秀, 野崎洋明, 針谷康夫, 西宮仁, 松永晶子, 米田誠, 吉倉延亮, 犬塚貴, 石原健司, 河村満, 高橋均, 小野寺理, 西澤正豊, 池内 健. 神経軸索スフェロイドを

- 伴う白質脳症 HDLS の臨床・遺伝学的解析. 第 54 回日本神経学会 2013.5.31 東京
- 2) 今野卓哉, 他田正義, 小山哲秀, 他田真理, 荒川武蔵, 野崎洋明, 針谷康夫, 西宮仁, 松永晶子, 米田誠, 吉倉延亮, 犬塚貴, 石原健司, 河村満, 高橋均, 小野寺理, 西澤正豊, 池内 健. 神経軸索スフェロイドを伴う白質脳症 HDLS における CSF-1R シグナル伝達異常の解析. 第 54 回日本神経学会 2013.5.31 東京
 - 3) 池内 健. 第 53 回 日本神経学会学術大会. Late Breaking Symposium 「新たな若年性認知症: 神経軸索ジストロフィーを伴う遺伝性白質脳症 (HDLS). HDLS の分子病態と白質を主病変とする他疾患との異常. 2012. 5. 25. 東京
 - 4) 今野卓哉, 他田正義, 小山哲秀, 荒川武蔵, 岡崎健一, 柿田明美, 高橋均, 西澤正豊, 小野寺理, 池内 健. 若年性認知症を呈する白質脳症: HDLS 患者の CSFIR 変異, MRI 所見, 臨床像, 病理像の検討. 第 31 回日本認知症学会 2012.10.26. つくば市
 - 5) 西野香織, 矢島隆二, 徳武孝允, 手塚敏之, 西澤正豊, 池内 健. リポタンパク受容体 LR11 によるアポリポ蛋白 E (ApoE) アイソフォーム依存性の調節機構. 第 35 回分子生物学会. 2012.12.14. 福岡
 - 6) 須貝章弘, 石井賢二, 赤岩靖久, 本間篤, 藤田信也, 田中晋, 豊原潤, 石渡喜一, 西澤正豊, 池内 健. 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の臨床的多様性: 画像所見, APOE, 血中 A β 抗体. 第 31 回日本認知症学会 2012.10.26. つくば市
 - 7) 池内 健, 平山哲, 三井田孝, 深町勇, 矢島隆二, 徳武孝允, 金子博之, 春日健作, 海老沼宏幸, 田久保耕平, 武城英明, 西澤正豊. アルツハイマー病患者・髄液中における可溶性 LR11 の増加. 第 52 回日本神経学会 2011.5.20 名古屋
 - 8) 徳武孝允, 池内 健, 春日健作, 矢島隆二, 石原智彦, 西澤正豊. β アミロイドによる誘発されるタウリン酸化におけるインスリンシグナル障害の関与. 第 52 回日本神経学会 2011.5.19 名古屋
 - 9) 池内 健, 春日健作, 宮下哲典, 川瀬康裕, 杉下守弘, 桑野良三, 西澤正豊. 健忘主体の臨床徴候を呈するタウ遺伝子 R406W 変異を伴う家族性認知症. 第 51 回日本神経学会 2010.5.20 東京
 - 10) 徳武孝允, 池内 健, 春日健作, 篠崎 真, 小野寺理, 西澤正豊. β アミロイド依存性タウリン酸化カスケードにおけるインスリンシグナル障害の関与. 第 51 回日本神経学会 2010.5.20 東京
 - 11) 徳武孝允, 春日健作, 矢島隆二, 石川厚, 内山剛, 徳田隆彦, 西澤正豊, 池内 健. レビー小体型認知症 (DLB) の新規バイオマーカー: 髄液 α シヌクレインの ELISA 定量. 第 29 回日本認知症学会学術集会 2010.11.5 名古屋
 - 12) 池内 健, 平山哲, 三井田孝, 深町勇, 矢島隆二, 徳武孝允, 春日健作, 金子博之, 田久保耕平, 海老沼宏幸, 武城英明, 西澤正豊. アルツハイマー病患者・髄液中では可溶性 LR11 が増加する. 第 29 回日本認知症学会学術集会 2010.11.5 名古屋
- [図書] (計 4 件)
- 1) 池内 健, 他. 中外医学社, 認知症診療 Q&A, 2012
 - 2) 池内 健, 他. Progranulin. 日本臨床, 認知症学 (上), 2011, 103
 - 3) 池内 健. 総合臨牀認知症の疫学・遺伝学. 2011, 1809
 - 4) 池内 健, 他. 最新医学生化学マーカー, 遺伝子. 2011, 2122
- [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

池内 健 (IKEUCHI TAKESHI)
新潟大学・研究推進機構・准教授
研究者番号：20372469

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：

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