

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500433

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症感受性遺伝子の単離と発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis based on genome analysis

研究代表者

飯田 有俊 (IIDA, ARITOSHI)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：10277585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症機構を解明するために、(1)大規模関連解析によって発見したZNF512B遺伝子産物と結合するタンパクの検索を行い、2種類の候補を同定した。ケース・コントロール関連解析の結果、一方の遺伝子内SNPがALSと高い関連を示した。また、(2)ゲノムワイド関連解析(GWAS)を行い、現在までにALSと関連する33 SNPsを同定した。

研究成果の概要(英文)：I employed several genetic approaches to understand the molecular pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) more precisely. I identified two proteins (Z512BP-1 and Z512BP-2) as binding partners of ZNF512B. Case control association study showed that a SNP in Z512BP-1 is highly associated with susceptibility to ALS. In addition, I performed genome wide association studies (GWAS) and finally identified a total of 33 SNPs highly associated with ALS susceptibility. The associations between these SNPs and ALS require confirmation in further replication studies.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：ゲノム解析 筋萎縮性側索硬化症 感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS) は、大脳皮質運動野、脳幹、脊髄の運動ニューロンが選択的かつ進行的に変性・脱落する神経難病である。ALS は、臨床遺伝学的には家族性 ALS と孤発性 ALS に分類される。家族性 ALS の原因遺伝子については、*SOD1* を始め、*ANG*、*FUS*、*TARDBP* などが知られているが、ほんの一部の患者、あるいは、ある地域の家系に認められるだけである。また、孤発性 ALS は、ALS 全体の 90% を占め、遺伝子因子と環境因子の相互作用によって発症すると考えられているが、現在まで広く認められた感受性遺伝子はない。

2. 研究の目的

(1) 先にゲノム解析により新規の ALS 感受性遺伝子 *ZNF512B* (Tentative name: *ALSCI*) を同定した。*ZNF512B* は、元々、ヒトゲノムプロジェクトで単離された注釈付きの遺伝子で、機能は不明であった。我々は、先の研究で ALS 感受性 SNP の機能性を見出し、*ZNF512B* タンパクが神経保護シグナル経路に関与することを明らかにしてきた。本研究では、*ZNF512B* を孤発性 ALS 研究の新たな糸口として考え、*ZNF512B* タンパクの機能解析、特に結合タンパクの同定、その遺伝子解析から、新規 ALS 感受性遺伝子の単離を試みた。

(2) 第一世代のスクリーニング系を 10 倍に拡張したプラットフォームでゲノム関連解析を行い、新たな孤発性 ALS の遺伝的素因 (疾患感受性遺伝子) を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *ZNF512B* 結合タンパクの解析

プロテオミクス解析や候補遺伝子アプローチにより結合タンパクの同定を行った。得られた候補タンパクの結合は、免疫沈降法

などを用いて確認した。結合が確認できたタンパクについて、遺伝子領域の詳細なゲノム解析を行った。高密度な SNP 地図を作成し、次いでケースコントロール関連解析を行った。さらに、当該遺伝子領域について、日本人 ALS 症例由来の DNA を用いてエキソン、イントロン領域をすべてシークエンスして、SNP および他の塩基置換を検索した。

(2) ALS の GWAS

本研究は、ALS 950 例、対照 3,393 例の検体について GWAS を行った。ALS 検体は、バイオバンクジャパンおよび Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research から提供された。SNP チップは、61 万種類の SNP を搭載した Illumina 社製 610 k アレイを使用した。全例について SNP 型を判定した後、データの品質管理を行った (Hardy-Weinberg 平衡検定値、call rate、マイナーアレル頻度等)。Identity-by-state 法により近親者がいないことを確認した。同時に各集団内における階層化を調べるために、QQ プロットの作成や主成分分析等を行った。最終的に相関値 (P 値) を用いて SNP のランキングを行った。候補 SNP については、ゲノム領域の構造解析、追加集団の検体を用いて相関の再現性を解析した。

さらに、追加日本人 ALS 検体 340 例について解析した。対照には、日本人一般集団 7,784 例を用いた。SNP アレイは、Illumina 社製 Human OmniExpress Exome BeadChip を使用した。Hardy-Weinberg 平衡検定値、call rate 値などからデータの品質管理を行った。Identity-by-state 法により近親者がいないことを確認した。遺伝統計学的解析の際には、imputation 解析を行った。最終的に関連値 (P 値) を用いて SNP をランキングし、多重検定値による有意水準を満たす SNP を候補とした。

4. 研究成果

(1) ZNF512B 結合タンパクの解析を行った。*ZNF512B* は、本邦における大規模関連解析から、ALS 感受性遺伝子として同定されたものである。*ZNF512B* の機能と病態カスケードを解明するために、結合するタンパク質の探索を行った。プロテオミクス解析、および文献・データベース検索より候補タンパクを抽出した。18 種の候補タンパクを候補として解析した。結果、2 種類の結合タンパク (*Z512BP-1* と *Z512BP-2*) が候補に挙げられた。共に核タンパクであった。

Z512BP-1 遺伝子領域について、SNP 地図を構築し、42 種のタグ SNP を用いて関連解析を行った。追加検体を用いて解析し、多重検定値をクリアする SNP ($P=1.2 \times 10^{-4}$, オッズ比 1.27, 95%CI 1.12-1.45) を見出した。しかし、*Z512BP-2* についても同様の解析を行ったが、関連は認められなかった。

さらに、*Z512BP-1* に関して、日本人 ALS376 症例を用いた全エキソンについて変異解析を行った。しかしながら、現在まで明らかな変異や未知の ALS 関連多型は発見できていない。*ZNF512B* が関係する ALS 病態カスケードの一端が明らかになった。

(2) GWAS に関しては、610K SNP アレイを用いて解析を行った。まず、データの品質管理を行った。その結果、 10^{-6} を示す SNP が 5 種類、 10^{-5} のものは、38 種類見つかった。さらに、初期発症部位によるサブグループを四肢型と球麻痺型に分けて解析した。興味深い幾つかの遺伝子座は発見できたが、明らかな関連を示す SNP は未だ見つかっていない。

また、過去の報告において、ヨーロッパ人集団の孤発性 ALS と有意な関連を示した SNP 全てについて解析を行ったが、いずれの SNP も本邦の集団とは関連を認めなかった。アレル頻度が大きく異なり、ALS の発症には人種差が存在することが示唆された。

加えて、臨床データを用いた総合的な解析から、患者における遺伝子型と病像・経過・予後との関連を解析し、*ZNF512B* が予後規定因子であることを示した。

さらに、新規 ALS 検体 340 例について GWAS を行った。対照には、日本人一般集団 7,784 例を用いた。SNP アレイは、Illumina 社製 Human OmniExpress Exome BeadChip を使用した。有意な関連を認める 33 種の SNPs を発見した。それらは、アレル頻度の低い新規の SNP であった。なお、そのうちの数種の SNP は、これまでに GWAS 以外の方法で発見された ALS 関連遺伝子の遺伝子領域に存在するものであった。これまで蓄積した SNP データを全て統合したメタ解析を行う。

(3) その他、最近、本邦で発見された新規 ALS 原因遺伝子 *OPTN* について変異検索を行った。点変異の解析に合わせて、*OPTN* 遺伝子領域のゲノム構造異常を調べた。その結果、遺伝子領域の欠失を同定し、新規変異機構を見出した。710 例の ALS を解析し、5 例の欠失を発見した。全ての症例において切断点を明らかにした。*OPTN* 遺伝子領域の欠失は、本邦において点変異よりも頻度が高く、それらの欠失は、全て Alu mediated recombination によって生じていた。

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 6 件)

1. Tetsuka S, Morita M, Iida A, Uehara R, Ikegawa S, and Nakano I. *ZNF512B* gene is a prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Journal of Neurological Sciences*, (査読有), 324, (2013), 163-166.
2. Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T,

- Oshima S, Tokuda T, Kubo M, Nakamura Y, and Ikegawa S. Novel deletion mutations of OPTN in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese, *Neurobiology of Aging*, (査読有), 33, (2012), 1843e19-1843e24, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.037.
3. Iida A, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Nakamura Y, and Ikegawa S. Large-scale screening of TARDBP mutation in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese, *Neurobiology of Aging*, (査読有), 33, (2012), 786-790.
 4. Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Kubo M, Nakamura Y, and Ikegawa S. Optineurin mutations in Japanese amyotrophic lateral sclerosis, *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, (査読有), 83, (2012), 233-235.
 5. Iida A, Takahashi A, Kubo M, Saito S, Hosono N, Ohnishi Y, Kiyotani K, Mushiroda T, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Tsunoda T, Oshima S, Sano M, Kamei T, Tokuda T, Aoki M, Hasegawa K, Mizoguchi K, Morita M, Takahashi Y, Katsuno M, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Kaji R, Nakano I, Kamatani N, Tsuji S, Sobue G, Nakamura Y, and Ikegawa S. A functional variant in ZNF512B is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese, *Human Molecular Genetics*, (査読有), 20, (2011), 3684-3692.
 6. Iida A, Takahashi A, Deng M, Zhang Y, Wang J, Atsuta N, Tanaka F, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Morita M, Akimoto C, Nakajima M, Kubo M, Kamatani N, Nakano I, Sobue G, Nakamura Y, Fan D, and Ikegawa S. Replication analysis of SNPs on 9p21.2 and 19p13.3 with amyotrophic lateral sclerosis in East Asians, *Neurobiology of Aging*, (査読有), 32, (2011), 757e13-757e14, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.011.
- 〔学会発表〕(計5件)
- 学会発表
1. Tetsuka S, Morita M, Iida A, Ikegawa S, and Nakano I. ZNF512B gene serves as prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. 23rd International Symposium on ALS/MND, Chicago, USA, December 6, 2012.
 2. 飯田有俊、細野直哉、佐野元規、亀井徹正、大嶋秀一、徳田虎雄、中島正宏、久保充明、中村祐輔、池川志郎、筋萎縮性側索硬化症におけるoptineurin遺伝子の欠失、日本人類遺伝学会第57回大会、新宿、日本、2012年10月27日
 3. 手塚修一、森田光哉、飯田有俊、池川志郎、中村祐輔、中野今治、当院におけるZNF512B 遺伝子を持つ ALS 患者についての検討、第53回日本神経学会学術大会、東京、日本、2012年5月25日
 4. 飯田有俊、田中章景、中村祐輔、祖父江元、池川志郎 新規 ALS 感受性遺伝子ALSC1 は、TGF-β シグナルのポジティブレギュレーターである第84回 日本生化学会大会 京都、日本、2011年9月23日
 5. 飯田有俊、高橋篤、久保充明、亀井徹正、佐野元規、大嶋秀一、徳田虎雄、青木正志、梶龍兒、中野今治、辻省次、祖父江元、中村祐輔、池川志郎 大規模ゲノム関連解析を用いた 新規 ALS 感受性遺伝子の同定 第52回 日本神経学会学術大会 名古屋、日本、2011年5月18日
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計1件)

名称：ZNF512B 遺伝子の一塩基多型に基づく
筋萎縮性側索硬化症の検査方法

発明者：飯田有俊、池川志郎、中村祐輔、祖父江元

権利者：理化学研究所、国立大学法人名古屋
大学、有限責任中間法人徳洲会

種類：特許

番号：特願 2009-206279

出願年月日：2009/9/7

国内外の別：国内

6．研究組織

(1) 研究代表者

飯田有俊（ARITOSHI IIDA）

独立行政法人 理化学研究所 統合生命医
科学研究センター上級研究員

研究者番号：10277585