

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592109

研究課題名(和文)次世代高速シーケンサーを用いたエクソーム塩基配列決定による家族性もやもや病の解析

研究課題名(英文)Genetic analysis of familial moyamoya disease using next generation sequencer

研究代表者

恩田 英明(ONDA, HIDEAKI)

東京女子医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60185692

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)：最近、RNF213遺伝子変異R4810Kともやもや病との強い関連が複数報告されたが、この変異の生物学的意義は不明のため、単なる代理マーカーで、真の機能的変異が他に存在するという仮説を立て研究を行った。R4810K変異ホモの検体5例を対象にR4810K変異を中心に約1.5Mbの遺伝子領域のターゲットリシーケンスを行った。その結果、この変異を超える関連が、隣接のENDOV遺伝子およびそのテロメア側のハプロタイプで検出された($p=8.36 \times 10^{-13}$)。ENDOV遺伝子と未知の遺伝子BC033347が5'側の転写エレメントを伴ってマップされたこの領域に、真の機能的変異の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, some papers reported a strong association between moyamoya disease and a R4810K variant in RNF213 gene. However, pathophysiological mechanism of the variant is not entirely clear. The variant might be a surrogate genetic marker and we hypothesized that there exists an actual causal variant in linkage disequilibrium with it. We conducted target re-sequencing a region occupying 1.5Mb of DNA around the R4810K variant of five moyamoya disease patients with homozygous R4810K alleles. As a result, stronger association was detected with the haplotype composed of adjacent ENDOV gene and the telomeric region ($p=8.36 \times 10^{-13}$) than with the R4810K variant. ENDOV and BC033347 unknown gene with 5' transcription regulatory elements are mapping in this haplotype region and it was suggested that there was actual functional variant within this haplotype.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：もやもや病 遺伝解析 次世代シーケンサー RNF213 ハプロタイプ ターゲットリシーケンス

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は、両側内頸動脈末梢の進行性狭窄とそれに伴う異常血管網増生により、脳梗塞・脳出血やてんかんを引き起こす原因不明の難病である。世界的に見ると東アジア（日本、韓国、中国）に多く、本邦では罹患率は年間人口 10 万人あたり 0.35-0.94 人、有病率は年間人口 10 万人あたり 3.16-10.5 人と報告されている。家族性もやもや病が 10 - 15%に見られ、同胞に罹患者がいると疾患発生頻度が通常より約 40 倍高くなることから、疾患発生には遺伝的背景が強く関連していると考えられている。

本研究申請時（2010 年 10 月）までに、もやもや病遺伝子同定のために連鎖解析や候補遺伝子解析が行われていたが、原因遺伝子はいまだ同定されていなかった。本疾患により脳卒中を発症すると、麻痺などの重度な後遺症を残す場合が少なくなく、また、病状も進行性に悪化するため、国指定の難病医療費等助成対象疾病となっている。したがって、病態解明に対する社会的要請は高く、もやもや病関連遺伝子を同定することが本研究の目的であった。

ところが、我々が交付申請を行った後、もやもや病遺伝解析研究に重要な進展があった。つまり、2011 年 1 月にゲノムワイド関連解析により（Kamada F, et al. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet.* 56(1):34-40. 2011）2011 年 7 月にエクソーム塩基配列解析により（Liu W, et al. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One.* 6(7):e22542. 2011）第 17 番染色体長腕（17q25.3）に存在する RNF213 遺伝子変異がもやもや病の原因であると報告された。特に後者の報告は、我々が立案していた次世代高速シーケンサーを用

いた全ゲノムエクソン配列解析法と同じ解析方法であったため、研究方法の再検討、変更が必要となった。

2. 研究の目的

家族歴が濃厚なもやもや病家系を対象に、全ゲノム上の遺伝子をコードしている領域（エクソーム）をすべて抽出し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を決定することにより、機能的意義の明確なもやもや病関連遺伝子変異を同定することを目的としていたが、前述のようにもやもや病と強い関連を認めた RNF213 遺伝子の R4810K 変異が報告された。

この変異は、アミノ酸置換をきたす変異で高い有意差とオッズ比が観察されたことから、この変異を含む RNF213 が疾患遺伝子であると結論されたが、この変異によりもたらされる生物学的意味合いについては未だ不明である。また、この遺伝子領域では、疾患特有の強固な連鎖不平衡が隣接する複数の遺伝子を巻き込んで存在している。このことから、本研究では、この変異を含む領域のターゲットリシーケンスを行い、以下の可能性につき精査することを目的とした。R4810K 変異以上に疾患リスクを説明しうるものは他に存在せず、この変異が真の病因変異である、R4810K は代理マーカーで、真の病因変異が遺伝子発現調節領域等に存在する、R4810K 変異は近傍の機能的変異とハプロタイプを形成し、synergic effect で疾患リスクに寄与する。

また、RNF213 遺伝子の R4810K 変異を認めない症例が少なからず存在した（もやもや病 103 例中 27 例）が、その遺伝解析も目的とした。

3. 研究の方法

(1) RNF213 遺伝子の R4810K 変異の再現解析
今迄の報告とは重複のない我々の独立サ

ンプル(もやもや病 103 例、コントロール 184 例)を対象に、サンガー法シーケンスによる RNF213 遺伝子の R4810K 変異の遺伝子タイピングを施行し、再現解析を行った。

(2) 次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンス

RNF213 遺伝子の R4810K 変異のホモ接合体 5 サンプルとこの変異を持たないコントロール 1 サンプルを対象に詳細なリシーケンスを行った。具体的にはアジレント・テクノロジー社の SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムを用いて R4810K 変異を中心に約 1.5Mb をカバーする遺伝子領域を濃縮し、ライフテクノロジー社の次世代シーケンサー SOLiD system による高速ターゲットリシーケンスを行った。

(3) RNF213 遺伝子の R4810K 変異陰性もやもや病の遺伝解析

R4810K 変異陰性症例を対象に RNF213 遺伝子の全 68 エクソンのサンガー法によるリシーケンスを行い、RNF213 遺伝子に他の変異がないかを詳細に調べた。

4. 研究成果

(1) RNF213 遺伝子の R4810K 変異の再現解析

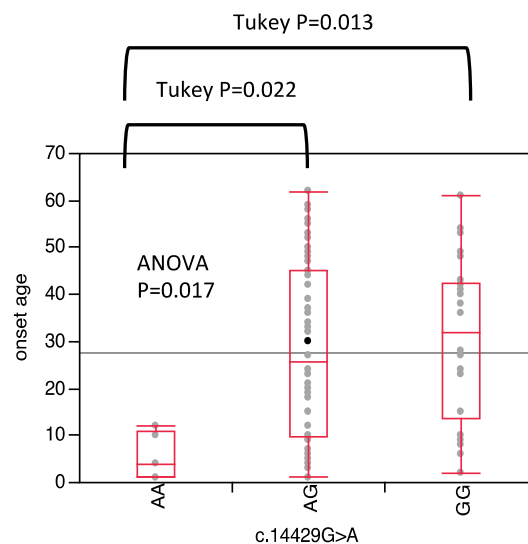
今迄の本邦から報告(文献 1,2,3)とは重複のない我々の独立サンプル(もやもや病 103 例、コントロール 197 例)を対象に、サンガー法シーケンスによる RNF213 遺伝子の R4810K 変異(c.14429G>A, rs112735431)の遺伝子タイピングを施行し、再現解析を行った。結果を表に示す(表 1)。

表 1. 日本人における RNF213 R4810K 変異ともやもや病との関連

Study population	Case genotype			Control genotype			Additive mode Logistic regression	Odds Ratio (95% CI)
	AA	AG	GG	AA	AG	GG		
Kamada F, et al. 2011	1	45	17	0	6	423	$P=1.33 \times 10^{-25}$	186.7 (70.1-497.4)
Liu W, et al. 2011	10	135	16	1	9	374	$P=2.58 \times 10^{-44}$	265.5 (121.3-581.2)
Miyatake S, et al. 2012	15	153	36	0	5	278	$P=3.56 \times 10^{-29}$	236.5 (91.0-614.9)
Present study	5	71	27	0	3	194	$P=1.81 \times 10^{-16}$	170.2 (50.1-578.1)
Total	31	404	96	1	23	1269	$*P_{meta}=3.52 \times 10^{-110}$	224.1 (141.9-369.6)

* Combined p value was calculated using fixed effect model.

図 1. R4810K 変異(c.14429G>A) 遺伝子型ともやもや病発症年齢との関係



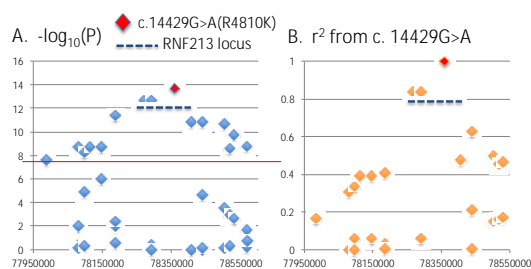
本研究を含めた全ての報告において、再現性を持ってこの変異がもやもや病と関連していることが示された。いずれも非常に高い有意差とオッズ比を呈し、固定効果モデルでメタ解析を行うと、 $P_{meta}=3.52 \times 10^{-110}$ 、オッズ比 224.1 (95%信頼区間 141.9-369.6)であった。我々の患者サンプルで R4810K 遺伝子型と発症年齢の関係をみてみると、リスクアレルをホモ接合で有すると有意に早期発症することも示された(図 1)。今回、遺伝形式を additive mode として検定を行なったが、その妥当性を示すデータといえる。以上から、この遺伝子座は日本人もやもや病における感受性遺伝子座として間違いないことを我々のサンプルでも示すことができた。また、我々のサンプルが他の研究とは異質なサンプリングによるものではないことも同時に示され(heterogeneity $I^2=0$)、以降の詳細な解析に十分に使用可能であることがわかった。

(2) 次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンス

RNF213 遺伝子 R4810K 変異のホモ接合体 5 例とこの変異を持たないコントロール 1 例を対象に詳細なリシーケンスを行った。R4810K

変異ホモ接合体 5 例のうち、4 例はもやもや病患者である。もう 1 例はもやもや病については非罹患であるが若年性易再発性冠動脈狭窄を有し、2 人の子供と父方の叔父がもやもや病を発症している。実際の方法としては、アジレント・テクノロジー社の SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムを用いて R4810K 変異を中心に約 1.5Mb をカバーする遺伝子領域を濃縮し、ライフテクノロジー社の次世代シーケンサー SOLiD 5500x1 により高速ターゲットリシーケンスを行った。一般人口におけるアレル頻度が 2%未満または新規のバリエーションが 3 例以上で陽性であったものが 15 個検出された。TBC1D16~RPTOR 遺伝子 582kb 領域に相当し、いずれのバリエーションにても関連解析(患者 102 人 vs. 対照 142 人)で P 値が 5×10^{-8} 未満の有意な関連を示した。このうち特に RNF213 遺伝子とそのテロメア側近傍に疾患関連連鎖不平衡 ($r^2 > 0.45$) が保たれていることがわかった(図 2)。

図 2 . RNF213 領域 (TBC1D16~RPTOR 遺伝子) ともやもや病との関連



次に、ターゲット領域の約 30%に及んだオプベイト領域精査の目的で、アレル頻度閾値を 20%未満に上げてマーカーを選定、マーカー各々での検定に加えハプロタイプスキャンによる精査(患者 101 人 vs. 対照 95 人)も行なった。その結果、RNF213 遺伝子 R4810K を超える関連のシグナルが、隣接の ENDOV 遺伝子のバリエーションおよびそのテロメア側に伸びるハプロタイプで検出された ($p = 8.36 \times 10^{-13}$)。論文投稿準備中の未発表データのため

詳細は割愛するが、このハプロタイプ領域には ENDOV 遺伝子、そして現状では転写産物の存在のみが確認されている未知の遺伝子 BC033347 が 5' 側の転写エレメントを伴ってマップされており、上記仮説、の存在を支持するデータとなった。

(3) RNF213 遺伝子の R4810K 変異陰性もやもや病の遺伝解析

先にも示したように、この RNF213 座位では疾患特有の高い連鎖不平衡が形成されているが、これは裏を返せば、R4810K は果たして真の病因バリエーションなのか、それとも真の病因バリエーションと連鎖不平衡にあるマーカーなのか、という問題も提起している。この点については、Liu らも論文で言及しており、アレイ CGH および RNF213 近傍領域の BAC クローンを用いた網羅的リシーケンスにより、ノンコーディング領域のバリエーションや structural variant が真に疾患と関連する可能性も精査している。しかし、R4810K 以上に疾患と関連するバリエーションは検出されず、このことから R4810K そのものが disease causative variant であると結論している(文献 2) 一方で、日本人において、この R4810K 変異が陰性の患者は 18.7% (我々のもやもや病サンプルでは 26.2%) と少なからず存在した。R4810K 変異が病因変異ならば、これらの陰性患者では RNF213 遺伝子の別変異が罹患に寄与するか、RNF213 遺伝子とは別の疾患感受性遺伝子が存在する可能性が最も考えられよう。そこで本研究では、この R4810K 変異が陰性のもやもや病患者 27 例にも注目して、RNF213 遺伝子コーディング領域全てをダイレクトシーケンス法によりリシーケンスした。患者サンプルのみのリシーケンスでは観察バイアスが問題になるため、1000 人ゲノムプロジェクトのデータベースより日本人 89 人 (JPT パネル) のデータを抜き出し、これも利用した。さらに、日本人サンプルを対象に RNF213 全コーディング領域のリシーケ

ンスが行われている研究を参照し(文献 1,3) これらも加えることにより、日本人患者・対照における網羅的な RNF213 遺伝子バリエーションのリストとした。その結果、一般人口でのアレル頻度が 1%未満のミスセンス変異が R4810K 以外で合計 36 種類観察された。これらのミスセンス変異について、Tennessen らの方法(文献 4)に若干の改変を加えて機能障害度のスコアリングを行い、スコア 4 以上のものを機能的変異とした。実際の方法としては、現在一般的に使用されている 10 種類の機能予測ツール(アミノ酸置換障害度に基づく PolyPhen2、SIFT、LRT、Mutation Taster、Mutation Assessor、FATHMM、および塩基保存度に基づく PhyloP、phastCons、GERP、SiPhy)において機能的閾値を超えたツール数をスコアとした。R4810K 変異のスコアも 4 であり、その他の変異でスコア 4 以上のものは 14 種であった。これらについて我々の患者サンプル 103 名および一般人口対照 95 名全てでジェノタイピングを行い、前出の日本人サンプルを使用した論文データ(文献 1,3)と結合して患者・対照間で比較を行った。その結果、日本人もやもや病患者計 370 例中 13 例で R4810K とは別の機能的変異が観察され、日本人対照計 760 例での検出数 7 例に比し有意に高い割合であることが示された($P=0.00026$ 、オッズ比 5.44、95%信頼区間 2.15-13.9)。我々の患者サンプル 103 例の中でみると、T3316I、Q3020L、R4062Q、および E4750K の 4 つの変異が高い障害度スコアをもって患者特有に検出された。このうち、Q3020L および E4750K は R4810K と複合ヘテロ接合をなして観察され、T3316I および R4062Q はヘテロ接合で観察された。R4062Q 変異体は家族歴陽性例であり、血縁罹患患者である父方の伯母も同一変異のヘテロ接合体であった。さらに、ヨーロッパ人由来の患者 56 例と健康人対照 106 例で検討すると、1 例ではあるがヨーロッパ患者からも同一の変異がヘテ

ロ接合で検出された。このように R4062Q 変異については、同一家系内罹患患者で共有され、人種を超えて患者特有に検出されていることから disease causative mutation である可能性が高いと考えられた。これら患者特有の新規変異体については、今後も注意深い家系追跡が必要であろう。以上の観察は RNF213 遺伝子がもやもや病感受性遺伝子であることをさらに強固に支持した。一方、R4810K 変異陰性患者 27 例のうち、25 例については RNF213 遺伝子の機能的変異が陰性であることがわかり、座位異質性、すなわち他の疾患遺伝子が存在することが明らかになった。

(4) 本研究課題における成果の総括

本課題ではもやもや病遺伝子座 RNF213 領域について多方面から検証を加えた。領域のターゲットリシーケンシングにより、RNF213 遺伝子はそのテロメア側の遺伝子を巻き込んで、患者特有の疾患関連連鎖不平衡を形成していることがわかった。そして、R4810K 変異のそれを超える最大関連シグナルがテロメア側近傍の遺伝子領域に検出された。

一方、R4810K 変異陰性患者に注目した解析では、RNF213 遺伝子のその他の機能的 rare variant が疾患に関連していることも統計学的有意差をもって示された。R4810K 変異ではかなりの不完全浸透が観察されているが、その他の患者特有な機能的変異体(T3316I、Q3020L、R4062Q、および E4750K)においても家系内に非罹患キャリアが明らかに存在した。

以上の観察により、次のよう考察した。R4810K をはじめとした RNF213 遺伝子の機能障害性変異はそれ自体で機能的疾患感受性を有するが、浸透率は高くない。テロメア側近傍の遺伝子あるいは遺伝子発現調節領域にも高い疾患関連シグナルが検出されていることから、これらが RNF213 遺伝子と synergic effect を形成し、浸透率をコントロールしていると考えられる。この意味にお

いて、テロメア側近傍の *ENDOV* 遺伝子は興味深い。種を超えて良く保存されたエンドヌクレアーゼであり、種々の環境要因によりもたらされる核酸ダメージの修復に深く関わっている。もやもや病では、かねてよりその特異な遺伝様式から遺伝要因に加えて環境要因も発症に深くかかわっていると考えられてきたが、今回見出された *ENDOV* リスクアレルは何らかの環境負荷に対する耐性を減弱させ、未だ機能未知な *RNF213* 遺伝子異常の効果を高めるのではないかと想定される。現在、このメカニズムの検証に向けて解析を継続しているところである。

(文献)

1. Kamada F, et al. A genome-wide association study identifies *RNF213* as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet* 2010;56:34-40.
2. Liu W, et al. Identification of *RNF213* as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One* 2011;6:e22542.
3. Miyatake S, et al. Homozygous c.14576G>A variant of *RNF213* predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology* 2012;78:803-810.
4. Tennessen JA, et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science* 2012;337:64-69.

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0件)

[学会発表](計2件)

恩田英明、赤川浩之、茂木陽介、成相直、岡田芳和、糟谷英俊 もやもや病の遺伝解析 第21回河田町脳神経外科懇話会 平成25年3月9日 京王プラザホテル 43階スターライト

茂木陽介、赤川浩之、恩田英明、糟谷英俊、岡田芳和 R4859K陰性もやもや病家系における新たな原因変異の検索 日本脳神経外科学会第72回学術総会 平成25年10月16日 パシフィコ横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

恩田 英明 (ONDA, Hideaki)

東京女子医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60185692

(2)研究分担者

糟谷 英俊 (KASUYA, Hidetoshi)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50169455

赤川 浩之 (AKAGAWA, Hiroyuki)

東京女子医科大学・医学部・テニュアトラック准教授

研究者番号：60398807

(3)連携研究者

成相 直 (NARIAI, Tadashi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00228090

武川 麻紀 (MUKAWA, Maki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90463918