

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23790384

研究課題名（和文） 次世代シーケンサーを用いたパーキンソン病の遺伝因子に関する研究

研究課題名（英文） Elucidation of genetic factors for Parkinson disease employing next-generation sequencer

研究代表者

三井 純 (MITSUI JUN)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70579862

研究成果の概要（和文）：

疾患と関連する稀な変異を効率よく検出するため、DNA サンプルをプーリングしたうえで、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。パーキンソン病患者の DNA 64 サンプルを 8 行 8 列のマトリックスに配置し、各行各列で 8 サンプルのプーリングを行い、計 16 セットのプーリング DNA を作成した。各セットについて候補遺伝子領域を PCR で増幅し、GAIIX を用いてシーケンスした。整数計画法を用いて各行各列で変異のアレル数の推定値を求めることで、候補となる新規変異を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We applied resequencing of pooled DNA using a next-generation sequencer to identification of disease associations with rare variants. Sixteen sets of pooled DNAs from eight pooled DNA samples were prepared. Each set of pooled DNAs was subjected to polymerase chain reaction to amplify the target gene, pooled into one tube with barcode indexing, and then subjected to extensive sequence analysis using the Illumina GAIIX. With the optimization of data processing to solve integer programming problems, we were able to extract novel variants from 64 samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：人類遺伝学

科研費の分科・細目：ゲノム医科学

キーワード：関連解析, ゲノム

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病（以下、PD）は 60 歳以上の高齢者の約 1%に発症する、アルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患である。患者の 5-10%程度に家族歴、つまり血縁者に罹患者がいることが知られている。PD 患者の家族集積性の調査によって、遺伝率は約 60%と推定されており、罹患同胞相対危険率 (λ_s) は 4~5 倍と推定されている。これらの数字は、これまでに知られている単一遺伝子性 PD 患者の頻度では説明ができない大きさであり、孤発性患者を含めた PD 患者全体

において遺伝因子が大きく関与していることが示唆される。従来、孤発性患者の遺伝因子研究は一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) をマイクロアレイ上で大規模にタイピングする技術を利用して、患者群と対照群で多型の頻度を比較することで疾患と関連する感受性遺伝子を探索する方法が行われてきた。候補となる遺伝子・領域だけではなく、全ゲノム上の多型を広範囲に探索できることから、このアプローチは全ゲノム関連解析 (genome-wide association study, GWAS) と呼ばれ、多くの疾患で検討

が行われた。新たな発見も多かったが、孤発性疾患の遺伝因子の大部分が解明できるのではないかという期待には届かず、まだ解明されていない遺伝因子 (missing heritability) が残されている。PD を例にとると、GWAS で検出されている疾患感受性変異の個々のオッズ比は高々1.5 倍程度であり、家族内集積性の高さが十分に説明できていない。

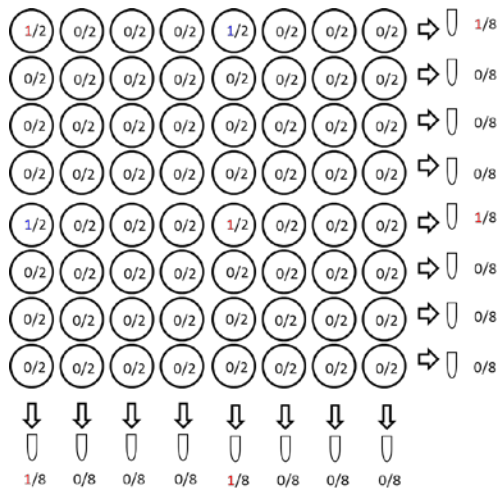
申請者らは GBA 遺伝子が、変異キャリアーのオッズ比が 28 倍と非常に強く、孤発性 PD の約 10% がキャリアーという影響度を持つ PD の遺伝因子であることを示した (Mitsui J, et al Arch Neurol 2009)。GBA 遺伝子の変異頻度は非常に低く、多様であるため、GWAS では検出が困難であり、稀な変異の同定にはリシーケンスに基づく関連解析が必要である。

2. 研究の目的

ライソゾーム関連遺伝子が PD と関連するという仮説は蓋然性が高いと考えており、それを踏まえてライソゾーム関連遺伝子にリシーケンスに基づく関連解析を拡大して解析を行う。

3. 研究の方法

パーキンソン病患者 64 例のゲノム DNA サンプルを 8×8 の二次元マトリックスに配置し、8 行 8 列ごとにサンプルの pooling を行い、計 16 セットの pooled DNA を作成した。



<Pooling の模式図>

それぞれのセットごとに標的となるライソゾーム遺伝子 7 領域 (ARSA, GBA, IDUA, PPGB, GLB1, NPC1, GLA) を PCR で増幅し、Illumina GAIIx, single end, 100 bp で配列解析を行った。

Disease	Gene	Exon	Amplicon
MLD	ARSA	8	2
Gaucher	GBA	11	3
Hurler/Scheie	IDUA	14	3
Galactosialidosis	PPGB	14	3
GM1 gangliosidosis	GLB1	15	11
Nieman-Pick type C	NPC1	25	14
Fabry	GLA	7	4

<標的となった遺伝子とエクソンの数>

アレルあたり 1,000~2,000 の depth に相当する塩基配列が得られた。得られたリードを BWA で標的領域の参照配列に対してマッピングした。変異の検出にあたっては、サイクル数や quality value などフィルターをかけ、質の高い配列を採用し、整数計画法を用いて二乗誤差が最小になるような各行各列で変異のアレル数の推定値を求めた。特に dbSNP130 に多型として登録のない変異に注目した。

4. 研究成果

検索した範囲で 4 個の変異が同定され、いずれも 64 例中 1 例にヘテロ接合性に認められた。

うち 1 個はファブリー病との関連が示唆される機能的変異 (GLA 遺伝子, E66Q 変異) で、1 個は Nieman-Pick type C の病原性と考えられる機能的変異だった (NPC1 遺伝子, S1004L 変異)。残り 2 個は多型・病原性変異データベースに登録のない変異だった (ARSA 遺伝子, V328M 変異と PPGB 遺伝子, R326H 変異)。

この結果を踏まえて、今回はファブリー病との関連も示唆されている機能的変異であることから、GLA 遺伝子に注目して、サンプル数を増やして GLA 遺伝子のシーケンス解析を行い、同定された変異で関連解析を行った。

対象はパーキンソン病患者 182 例 (男性 104 例, 女性 78 例)、対照者 275 例 (男性 151 例,

女性 124 例) である。GLA 遺伝子の全エクソンのシーケンス解析を行ったところ、E66Q 変異のみが同定された。同変異はパーキンソン病患者群で 260 アレル中 4 アレル (アレル頻度 1.5%) (ヘミ接合性 1 例, ヘテロ接合性 3 例), 対照者群 399 アレル中 2 アレル (アレル頻度 0.5%) (ヘミ接合性 1 例, ヘテロ接合性 1 例) で認められた。

同変異はパーキンソン病患者群でやや多い傾向があったが, 関連性を Fisher exact test で検討すると p 値は 0.34 と有意な関連は示されなかった。

本研究において, サンプル群の中から効率よく, 頻度の低い変異を同定する方法を確立できた。得られた候補変異について, 関連解析を行ったが, サンプル規模の小ささもあり, 統計学的な有意差は得られなかった。

今後はサンプル数の拡大を図るとともに, 候補遺伝子によるアプローチだけではなく, 全エクソーム解析など, 網羅的なシーケンス解析に範囲を広げていきたい。

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 11 件)

1. Mitsui J, Ishiura H, Tsuji S. Present efforts in the medical genome center at the university of Tokyo hospital. *Brain Nerve*. 2013 Mar;65(3):247-55. (査読無)
2. Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, Yamashita S, Kimura S, Oguni H, Morishita S, Tsuji S, Sasaki M, Hirose S. Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PLoS One*. 2013;8(2):e56120. doi: 10.1371/journal.pone.0056120. (査読有)
3. Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Higasa K, Yoshimura J, Saito TL, Ahsan B, Takahashi Y, Goto J, Iwata A, Niimi Y, Riku Y, Goto Y, Mano K, Yoshida M, Morishita S, Tsuji S. CSF1R mutations identified in three families with autosomal dominantly inherited leukoencephalopathy. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2012 Dec;159B(8):951-7. doi: 10.1002/ajmg.b.32100. (査読有)
4. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet*. 2012 Aug 10;91(2):320-9. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.07.014. (査読有)
5. Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ranum LP, Tamaoki T, Ichikawa Y, Date H, Goto J, Tsuji S. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol*. 2012 Sep;69(9):1154-8. doi: 10.1001/archneurol.2012.1219. (査読有)
6. Taira M, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Hayashi T, Shimizu J, Matsukawa T, Saito N, Okada K, Tsuji S, Sawamura H, Amano S, Goto J, Tsuji S. Clinical features and haplotype analysis of newly identified Japanese patients with gelsolin-related familial amyloidosis of Finnish type. *Neurogenetics*. 2012 Aug;13(3):237-43. doi: 10.1007/s10048-012-0330-0. (査読有)
7. Mitsui J. Genetics of sporadic disease: insights from high-throughput sequencing --Parkinson disease. *Rinsho Shinkeigaku*. 2011 Nov;51(11):973-4. (査読無)
8. Ichikawa Y, Goto J, Nakahara Y, Mitsui J, Tsuji S. Therapeutic trial design issues for future disease-modifying therapy of multiple system atrophy. *Rinsho Shinkeigaku*. 2011 Nov;51(11):910-3. (査読無)
9. Maeda MH, Mitsui J, Soong BW, Takahashi Y, Ishiura H, Hayashi S, Shirota Y, Ichikawa Y, Matsumoto H, Arai M, Okamoto T, Miyama S, Shimizu J, Inazawa J, Goto J, Tsuji S. Increased gene dosage of myelin protein zero causes Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol*. 2012 Jan;71(1):84-92. doi: 10.1002/ana.22658. (査読有)
10. Mitsui J. Genetic basis of sponadic Parkinson disease: common disease-multiple rare variants. *Rinsho Shinkeigaku*. 2010 Nov;50(11):865-6. (査読無)
11. 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
Aug;12(3):259-61. doi:
10.1007/s10048-011-0284-7. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 三井 純. パーキンソン病における GLA
解析 第 7 回日本ファブリー病フォーラ
ム 2011 年 7 月 10 日 東京
2. 三井 純. ファブリー病の診断における
問題点～E66Q に関連して～ 第 8 回日本
ファブリー病フォーラム 2012 年 7 月 22
日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 純 (MITSUI JUN)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70579862