

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890047

研究課題名(和文)新規ナルコレプシー疾患感受性遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a common variant associated with narcolepsy

研究代表者

豊田 裕美 (Toyoda, Hiromi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：90637448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な過眠症であるナルコレプシーは、自己免疫機序の異常が成因のひとつとして示唆されているが詳細は明らかになっていない。研究代表者は日本人ナルコレプシー集団を対象としたゲノムワイド関連解析を行い、遺伝子Aのプロモーター領域に位置するSNPがナルコレプシーと強く関連することを見出した。さらに、ヒト検体を用いた発現解析や、マウスを用いた行動実験により、遺伝子Aが病態へどう寄与するか検討した。ナルコレプシー患者は遺伝子Aの発現が低下しているため、炎症応答時にオレキシン発現量が低下しやすく、覚醒を維持できないということを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Narcolepsy is one of hypersomnias. It has been hypothesized that it is caused by a utoimmune-mediated loss of orexin-producing neurons, although the detailed mechanism remains unknown. In the present study, we identified a novel narcolepsy-associated gene by genome-wide association study and revealed one possible mechanism how this novel gene contributes to the disease development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：睡眠 遺伝学 免疫

1. 研究開始当初の背景

ナルコレプシーは過眠症のひとつであり、日中の強い眠気、情動脱力発作(驚く等の強い感情を契機とした脱力)、入眠時幻覚、金縛りを主徴とする。日本における有病率は0.16-0.18%である。

これまで明らかにされた主な知見として：

(1) 患者の9割以上が *HLA(human leukocyte antigen)-DQB1*0602* 対立遺伝子を有すること

(2) 患者の脳髄液中で、覚醒を維持する神経ペプチドであるオレキシンが減少していること

(3) オレキシンを産生する神経細胞(オレキシン細胞)が患者脳で脱落していること

が挙げられる。既知の多くの自己免疫疾患はHLAと強い関連を示す。また、患者の死後脳には炎症が起こったことを示唆するグリオシスが認められる。

これらの知見から、自己免疫機序がオレキシン細胞を破壊することによりナルコレプシーが発症するという「自己免疫仮説」が示唆されてきた。しかしながら詳細は明らかになっていない。

ナルコレプシーは、複数の遺伝的素因と環境要因により発症する多因子疾患として知られる。代表的な遺伝的素因は、前述の *HLA-DQB1*0602* 対立遺伝子を持つことであるが、この対立遺伝子は健常者にも10-20%と高頻度でみられることや、これまでの遺伝統計学的な解析から、HLA以外の遺伝的素因の存在が強く示唆されている。

研究代表者は、ナルコレプシー感受性遺伝子の同定を目的として、約90万の一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)について、日本人ナルコレプシー患者425名、日本人健常者1626名を対象としたゲノムワイド関連解析を行った。その結果、免疫関連遺伝子Aのプロモーター領域に位置するSNPがナルコレプシーと強く関連することを見出した(OR = 1.86, $P = 1.63 \times 10^{-5}$)。

このSNPは遺伝子Aの転写因子結合部位に含まれるため、遺伝子Aの発現様式に影響を及ぼす可能性がある。遺伝子Aは単球などの免疫細胞に発現し、炎症部位から放出されるリガンドに反応して免疫細胞の遊走性を制御することで、免疫応答の起点となることが知られる。

以上のことから、この新規感受性SNPが、遺伝子Aの発現レベルを制御することで免疫細胞の遊走性に影響を与え、それがオレキシン細胞の脱落を引き起こし、ひいてはナルコレプシー発症につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、疾患感受性SNPが遺伝子Aの発現制御を通して免疫細胞の遊走性に影響を与え、ナルコレプシーの病態に関与するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ゲノムワイド関連解析で得られた結果の再現性実験

独立したサンプルセットを用いて関連解析を行った。本研究で目的としたSNP以外の候補を含め、合計35SNPを対象とした。遺伝子型決定には、DigiTag2法を用いた。

(2) 疾患感受性SNPの遺伝子型と遺伝子Aの機能との関連を検討

患者と健常者の疾患感受性SNPの遺伝子型を決定し、遺伝子Aの発現レベルに関連があるかどうか検討した。遺伝子型決定には、Taqman Genotyping Assaysを用いた。遺伝子Aの発現レベルは、リアルタイム定量PCRにより、末梢血中のmRNAを定量することで比較した。検量線法による絶対定量を行った。

横浜市立大学との共同研究により、疾患感受性SNPの遺伝子型と免疫細胞の遊走性に関連があるか検討した。末梢血より単離した単球を用いて、遺伝子Aのリガンドに対する遊走性を定量した。

血清中に含まれる遺伝子Aのリガンド量に、患者と健常者で差異があるかどうか、マルチプレックス分析システムにより測定して比較した。

(3) 遺伝子Aの睡眠覚醒行動における機能検討

野生型マウス脳の切片を作製し、免疫組織染色により、遺伝子Aの脳内における局在を観察した。

また、遺伝子Aのノックアウトマウスを用いて行動実験を行い、遺伝子Aの機能が睡眠制御に関与するかどうか検討した。行動量の測定は、赤外線センサーを用いてマウスの動きを数値化することで行った。

4. 研究成果

(1) 日本人患者240名、日本人健常者869名を用いて、当該SNPの遺伝子型を決定し、関連解析を行ったところ、このSNPが疾患と関連していることが再現された(OR = 1.36, $P = 0.032$)。

(2) 患者38例および健常者37例の末梢血由来cDNAを用いてリアルタイム定量PCRを行い、遺伝子Aおよび内部標準遺伝子のmRNA量を定量した。結果、患者の遺伝子Aの発現レベルが健常者と比較して有意に低いことを見出した($P = 0.006$)。同時に、これら検体の疾患感受性SNPの遺伝子型を決定し、遺伝子Aの発現レベルとの関連

を検討したところ、この SNP のリスクアレルをホモで持つ人は、そうでない人と比較して、遺伝子 A の発現レベルが低いことも明らかとなった ($P=0.010$)。

61 例の末梢血から単離した単球の遊走性と疾患感受性 SNP の遺伝子型に関連があるか検討した。結果、この SNP のリスクアレルをホモで持つ人は、そうでない人と比較して、リガンドへの単球の遊走性が有意に低かった ($P=0.009$)。

患者 39 例および健常者 39 例の血清を用いて、マルチプレックス分析システムにより、遺伝子 A のリガンド群の量を定量した。結果、患者血清中に含まれるリガンド群の総量が健常者と比較して有意に高かった ($P=0.029$)。

(3) 野生型マウス脳から切片を作製し免疫組織染色を行ったところ、視床室傍核や手綱核で遺伝子 A の発現が強く認められた。視床室傍核は、オレキシン神経系からの投射を受ける部位のひとつである。手綱核は、レム睡眠量を抑制し、睡眠覚醒リズムに重要な役割を持つことが報告されている。

遺伝子 A のノックアウトマウス (A^{-/-}) とその同胞野生型マウス (A^{+/+}) の行動量を測定したところ、明期暗期ともに顕著な差は認められなかった。

そこで次に、両マウスに Lipopolysaccharide (LPS) を腹腔投与することで実験的に炎症を誘発した状態で、同様の行動測定を行った。結果、A^{-/-} マウスの LPS 投与下における暗期の行動量が、A^{+/+} マウスよりも有意に低下していた。

さらに、暗期が終了した直後にマウスから脳を取り出し、視床下部領域におけるオレキシンの発現量をリアルタイム定量 PCR により測定した。結果、LPS 投与下における A^{-/-} マウスのオレキシン発現量が、A^{+/+} マウスよりも有意に低下していた。また、行動量とオレキシン発現量には有意な相関が認められた。

本研究により、以下を明らかにした。

(1) ナルコレプシー患者は遺伝子 A の発現レベルが低下している。

(2) 疾患感受性 SNP のリスクアレルを 2 つもつ人ほど遺伝子 A の発現レベルが低下している。

(3) 疾患感受性 SNP のリスクアレルを 2 つもつ人ほど単球の遊走能が低下している。

(4) ナルコレプシー患者は遺伝子 A のリガンドの量が増加している。

(5) 遺伝子 A をもたないマウスは、炎症誘発時の覚醒期の行動量が減少する。

(6) 遺伝子 A をもたないマウスは、炎症誘発時の覚醒期の視床下部オレキシン発現量が低下する。

以上により、遺伝子 A の発現低下により

免疫細胞の遊走能が低下 何らかの外的原因により炎症を起こしたオレキシン細胞を除去することができない オレキシン細胞の機能が低下する (= オレキシン発現量が低下) ナルコレプシーの発症、という仮説が示唆できる。

疫学的研究から、ナルコレプシー発症と関連を示す要因がいくつか報告されてきたが、中でも近年注目されているのは、インフルエンザワクチン接種との相関である。2009 年の新型インフルエンザ (A/H1N1) のパンデミックの際、AS03 アジュバント添加ワクチン Pandemrix の接種を受けた子供で、接種後 6 ヶ月以内にナルコレプシーを発症するリスクが約 6-8 倍に増大したことが明らかとなった。感染等の外的要因がナルコレプシー発症の引き金になることが強く示唆される。本研究は、ナルコレプシーの遺伝的要因と外的環境要因を結びつける知見である。

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(査読有)](計 2 件)

(1) Yamasaki M, Miyagawa T, Toyoda H, Khor SS, Koike A, Nitta A, Akiyama K, Sasaki T, Honda Y, Honda M and Tokunaga K. Genome-wide analysis of CNV (copy number variation) and their associations with narcolepsy in a Japanese population. *Journal of Human Genetics* (2014) 1-6. doi: 10.1038/jhg.2014.13.

(2) Khor SS, Miyagawa T, Toyoda H, Yamasaki M, Kawamura Y, Tani H, Okazaki Y, Sasaki T, Lin L, Faraco J, Rico T, Honda Y, Honda M, Mignot E, Tokunaga K. Genome-wide association study of HLA-DQB1*06:02 negative essential hypersomnia. *PeerJ* (2013) 1:e66. doi: 10.7717/peerj.66.

[学会発表](計 3 件)

(1) 豊田裕美, 宮川卓, Khor Seik Soon, 川嶋実苗, 山崎茉莉亜, 小池麻子, 田中進, 本多裕, 本多真, 徳永勝土. ゲノムワイド関連解析によるナルコレプシー疾患感受性遺伝子の探索. 日本人類遺伝学会 第 58 回大会. 2013 年 11 月 22 日. 仙台、江陽グランドホテル

(2) 豊田裕美, 宮川卓, Khor Seik Soon, 川嶋実苗, 山崎茉莉亜, 小池麻子, 田中進, 本多裕, 本多真, 徳永勝土. ゲノムワイド関連解析によるナルコレ

プシー疾患感受性遺伝子の探索. 日本人類遺伝学会 第 57 回大会. 2012 年 10 月 25 日. 東京、京王プラザホテル.

- (3) 豊田裕美、宮川卓、Khor Seik Soon、川嶋実苗、山崎茉莉亜、小池麻子、田中進、本多裕、本多真、徳永勝土. ゲノムワイド関連解析によるナルコレプシー疾患感受性遺伝子の探索. 第 21 回日本組織適合性学会大会. 2012 年 9 月 16 日. 東京、明治大学駿河台キャンパス.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 裕美 (Toyoda Hiromi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号 : 90637448