

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462203

研究課題名(和文) 表現促進現象を有する家族性もやもや病のCNV解析

研究課題名(英文) Genome-wide CNV array analysis in parent-offspring pairs with Moyamoya disease with and without clinical anticipation

研究代表者

吉本 哲之 (Yoshimoto, Tetsuyuki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：50647493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：成人発症もやもや病の親から、小児もやもや病の子が生まれた場合(臨床的表現促進現象)、子はより顕著なもやもや病の遺伝的素因を保有している可能性がある。もやもや病親子例を対象として、全ゲノム網羅的マイクロアレイ遺伝子コピー数多型(CNV)解析を実施した。もやもや病親子15組中、表現促進を認めた10組では、16番染色体短腕上(16p13.3)の410kbpの領域にCNVを認める頻度が高く、遺伝子コピー数が、親世代より子世代で増幅している傾向を認めた。遺伝子コピー数の世代を超えた増幅が臨床的表現促進現象の背景となりうることが示唆され、次世代シーケンス解析による、より詳細な検証が必要である。

研究成果の概要(英文)：Copy Number Variation (CNV) defining a DNA segment 100 kilobases or larger in size and present at variable copy numbers in comparison with a reference genome were investigated in unbiased 15 parent-offspring pairs with Moyamoya disease (MMD). Clinical anticipation, defining that pediatric patient(s) were born from adult-onset parent(s), was confirmed in 10 pairs. Genome-wide CNV array analysis detected 211 CNV loci throughout the genome except for chr.21. Of these, overlapping CNV loci for more than 3 individuals were seen in 10 segments in autosomes. CNV in a region of chr16p13.3 was a unique locus, in which copy number state between each parent and offspring pairs varied. Notably for this CNV, copy number gain was observed in the offspring with anticipation compared to the parents. Copy number gain on chr16p13.3, containing 14 genes, may contribute to the anticipation of familial MMD by altering gene dosage in variable possible forms, although further validation is necessary.

研究分野：脳血管障害学

キーワード：家族性もやもや病 表現促進現象 遺伝子コピー数多型

1. 研究開始当初の背景

(1) もやもや病は、日本を含む東アジアで高い罹患率を示す、原因不明かつ根本的治療法の確立されていない脳血管疾患である。疾患概念の確立から約半世紀が経過した 2011 年に、もやもや病感受性遺伝子 RNF213 が、初めて同定された。とくに日本人や韓国人もやもや病患者で高頻度に観察される RNF213 遺伝子上の一塩基多型は、その遺伝子型が疾患のバイオマーカーや、東アジア人におけるもやもや病の創始者変異としての意義をもつ。しかし、本遺伝子変異単独では疾患の病態機序が解明されていない。

(2) もやもや病の病因探索の歴史的背景から、遺伝学的アプローチによる病因解明研究の継続が有意義なことは明らかである。特に、もやもや病は、遺伝的素因に何らかの環境因子が作用して発症する多因子疾患と考えられ、その遺伝的素因は 1 つではないことが示唆されており、これまでと異なるアプローチで、もやもや病の遺伝的素因探索を行う意義は高いと考えられる。

(3) 臨床的には以前からよく知られる、もやもや病親子例における表現促進現象(もやもや病の親から生まれた、もやもや病の子供は、親よりも発症年齢が若い)は、もやもや病の遺伝性素因を探索する上で、好対象であると考えられる (extreme trait design)。また、これまでは遺伝子配列上の短い DNA 配列の繰り返し構造や一塩基置換、HLA 多型など特定の遺伝子ファミリーを遺伝性素因の指標として、上記の成果が得られてきたが、微細なゲノム構造多型としての遺伝子コピー数多型 (copy number variation; CNV) に関する検討は限定的であった。

2. 研究の目的

もやもや病親子のうち、とくに表現促進現象を示す親子では、特異的な CNV がゲノム上に存在し、親よりも子で遺伝子コピー数が有意に増幅あるいは減少しているという仮説を立てた。この仮説が正しければ、その特異的な CNV は、もやもや病の発症素因としての意義をもつことになる。CNV 領域に含まれる遺伝子や、関わる分子パスウェイの解析により、もやもや病の病態機序解明に一石を投じることになる。そこで、全ゲノム網羅的に対象となるもやもや病の親子で CNV プロファイルを明らかにすることを第一の目的とする。対象の親子に共通する CNV 領域を探索し、さらに親子間で、遺伝子コピー数に違いを認めるもの、認めないものを整理する。表現促進減少を示す群と、示さない群での比較も行い、最終的に、表現促進現象を示すもやもや病親子に特異的な CNV の特定をめざす。

3. 研究の方法

(1) 対象

北海道大学病院脳神経外科で、1980 年代か

ら 2015 年 2 月までに診療した全もやもや病症例のうち、研究参加への同意を得られた全体的もやもや病親子例を対象とした。

本研究における、表現促進現象の定義は、もやもや病の親子例で、発症あるいは診断時の年齢が、親が成人発症 (20 歳以上) に対し、子が小児期発症 (19 歳以下) の場合とした。無症候型も対象に含めた。

研究期間は、2013 年 8 月～2016 年 3 月までとし、被験者または代諾者から文書による同意の上、末梢血 10-15ml と臨床情報の提供をうけ、個人情報に連結可能匿名化処理のうえ、保護した。本研究は、北海道大学医学部医の倫理委員会の承認を得て実施された。

(2) ゲノムワイド CNV アレイ実験

末梢血白血球から、ゲノム DNA を抽出し、精製と品質チェックを実施した。CytoScan HD™ array (Affymetrix 社製、CNV 解析用に 2.67×10^6 マーカーが含まれる) を使用し、全ゲノム上から CNV を検出した。CNV の検出のアルゴリズムは、メーカー推奨に従った。すなわち、CNV 検出用マーカーごとに、サンプルと、対照健常者ゲノム (Affymetrix 社が保有するコーカサス人種や、日本人を含むアジア人種などの男女から得られたゲノムの集合情報) の signal 値が比較され、各マーカーにおけるコピー数が 0 から 4 の範囲で算出される (健常対照と差がない場合のコピー数は 2 となる)。最終的に、フラグのたった CNV 検出用マーカーが 50 以上含まれ、100kbp 以上の領域が、CNV 領域として検出され、アルゴリズムに基づいて同領域のコピー数が判定される設定とした。以上の行程は、Chromosome Analysis Suite (ChAS) (Affymetrix 提供 Software) を用いて実施し、使用したデータは全てのアレイ実験品質チェックをクリアしたもののみを使用した。

なお、メーカー非推奨ではあったが、CNV には人種特異的な benign CNV の存在も知られているため、対照健常者ゲノムを日本人種のみに限定した上で (日本人男女 4 3 名ゲノム情報) 上記と同様の方法による、CNV 検出も実施した。

なお、この CNV 検出用の高密度アレイには、RNF213 遺伝子配列内には probe が配置されていないが、非常に近接した位置にあるもやもや病感受性遺伝子座にはコピー数多系判定用 probe が配置されている設計である。

上記により検出された全 CNV のうち、3 名以上のもやもや病患者で共通し、その領域が重複する CNV 領域を選定した。最終的に、対照者健常者ゲノムを、全人種とした場合と、日本人に限定した場合で共通して選定された CNV を、もやもや病親子例に共通する CNV として列挙した。

(3) もやもや病親子で共通する CNV と表現促進現象との関連解析

もやもや病親子例に共通する CNV 領域における遺伝子コピー数を、それぞれの親子で比較した。親子で各 CNV 領域における遺伝子コピー数に、差を認めるか検定した (Wilcoxon 符号付順位和検定)。さらに、表現促進現象の有無により、親子間でのコピー数状態に差があるか、それぞれの CNV 領域で検証し、親子でのコピー数の違いを検定した (Mann-Whitney 検定)。

(4) 表現促進現象を有する親子で特異的に認められた CNV 領域の解析

(3)の検討の結果、表現促進現象を示す親子に特異的に認められた CNV 領域に含まれる遺伝子リストをもとに、パスウェイ解析を実施した。パスウェイ解析には、Metacore (Tomson Reuters 社)を用いた。

4. 研究成果

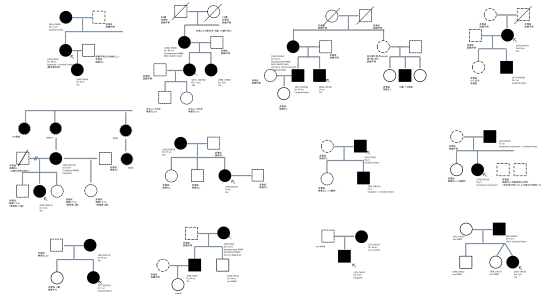
(1) もやもや病親子例の臨床遺伝学的特徴

1980年から2015年2月までに、北海道大学脳神経外科において診療を受けた、もやもや病患者 (類もやもや病を除く) 連続315症例のうち、48家系の家族性もやもや病が確認された。そのうち親子例は、47症例 (14.9%, 47/315) 25親子、22家系 (45.8%, 22/48)であった。47症例のうち、文書による同意取得が得られた、27症例 (57%, 27/47)、15親子 (60%, 15/25)、12家系 (55%, 12/22)を対象とした。詳細な内訳を以下に示す。

表1. 対象症例の内訳

	MMD		P value
	Parents	Offsprings	
number of Patients (One Patient was counted for Parent/Offspring both)	13	15	
Female, n (%)	18 (66.7)		
Asian race, %	100 (All Japanese)	100 (All Japanese)	
Age at onset or diagnosis, mean ± SD, y	38 ± 15	10 ± 10	P < 0.001
Adult MMD at onset, n	11	3	
Asymptomatic MMD	3	0	
Hemorrhagic MMD	2	1	
Unilateral MMD	2	0	
RNF213, SNP type (rs112735431), n			P = 1.0 (for A/G or not, Fisher's exact test)
G/G	1	0	
A/G	12	14	
A/A	0	1	

図1. 対象症例家系図一覧



(●■: 罹患者、○□: 非罹患者、△: 発端者)

破線丸/四角: 当院受診歴なく問診情報のみ)

親世代と比較して、子世代発症年齢は有意に若く、RNF213のSNP(rs112735431)型は、ほとんどがA/Gヘテロ型であり、世代間差を認めなかった。

対象親子15組のうち、表現促進現象を認めたのは10組 (親世代が成人もやもや病、子世代が小児もやもや病)、表現促進現象を認めなかったのは、5組 (親子ともに成人型もやもや病3組、親子ともに小児もやもや病2組)であった。表現促進現象を認めた親子では、母-娘・母-息子・父-娘・父-息子が、それぞれ6・2・1・1組であり、表現促進現象を認めなかった親子では、それぞれ1・3・0・1組であった。表現促進現象の有無と、伝達形式に有意な関連を認めなかった (Fisher 正確確率検定)。また、表現促進現象の有無と、上記のRNF213遺伝子多型の遺伝子型にも関連を認めなかった (表現促進現象を認めた19症例・10組の親子のうち、A/Gヘテロ型を有する症例の割合は89% (17/19)、表現促進現象を認めない10症例・5組の親子のうち、A/Gヘテロ型は100% (10/10))。

(2) 全ゲノム網羅的 CNV アレイ解析

全ゲノム網羅的 CytoScan HD™ array 解析の結果、対象としたもやもや病親子27例のうち、26例でCNVが検出された。検出されたCNVの領域は、21番染色体を除く、すべての染色体上に分布し、合計211箇所検出された。検出されたCNVのうち、既報の17番染色体上のもやもや病感受性遺伝子座 (17q25.3)におけるCNVは認めなかった。

以下に検出されたCNVの一覧を示す。

表2. もやもや病親子例の CNV profile (CNV 判定の健常者比較対照ゲノムデータを、コーカサス・アジア・黒人など、メーカー推奨の混合人種とした場合)

染色体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
検出CNV数	15	2	3	12	4	6	14	23	6	8	3	10	3	26	4	25	4	2	5	4	0	9	20	3
Copy number = 3	10	2	3	7	4	5	10	10	6	8	0	9	2	18	2	21	3	2	2	4	0	9	14	0
Copy number = 4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Copy number = 1	3	0	0	4	0	1	4	8	0	0	3	1	1	3	1	4	1	0	3	0	0	0	1	3
Copy number = 0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Copy number: mosaic gain	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Copy number: mosaic loss	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

判定されたコピー数のうち、モザイク状増加、または減少は、CNVと判定された領域内のCNV判定用probeのコピー数callに、ばらつきが大きかったことを意味する。また、性染色体のコピー数に基づく、コピー数増加または減少の判定は、性別によって異なる。例えば、Y染色体にCNVが検出され、コピー数1であった3名は、すべて女性で、コピー数増加と判定された。

一方、コピー数判定のアルゴリズムに必要な十分な検体数ではないという理由で、メーカー非推奨ではあったが、対照健常者ゲノムを日本人種のみ限定した上で、被験者と対照健常者の人種を一致させてCNV判定を実施

した。その結果、21 番染色体を除く全染色体上に 248 箇所 CNV が検出された。その一覧は以下の通りである。やはりこの中にも、17q25.3 における CNV は見られなかった。

表3. もやもや病親子例の CNV profile (CNV 判定の健常者比較対照ゲノムデータを、日本人に限定した場合)

染色体No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
検出CNV数: N	6	1	3	4	4	7	11	19	4	5	3	7	2	34	3	20	4	1	4	4	0	31	55	16
Copy number = 3	4	1	3	4	3	6	7	4	4	5	0	6	2	28	2	19	3	1	1	4	0	31	25	8
Copy number = 4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Copy number = 5	2	0	0	0	1	1	4	10	0	0	3	1	0	6	1	1	1	0	3	0	0	0	0	0
Copy number = 6	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Copy number mosaic gain	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
Copy number mosaic loss	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

以上のもやもや病親子例の CNV 一覧の中から、3 名以上で共通・重複する CNV 領域をさらに選定した。その結果、健常者比較対照ゲノムデータを、メーカー推奨の混合人種とした場合、15 箇所の CNV 領域がもやもや病親子例に共通する CNV と確認された(表 4)。

表4. もやもや病親子に共通する CNV 一覧(健常者比較対照ゲノムを全人種とした場合)

Chromosome	genomic coordinate: GRCh37/hg19		No. corresponding individuals
	start	end	
1	248688586	248795277	3
4	69367092	69551731	5
7	64568638	65094966	4
8	143473913	143640102	3
8	39226335	39361773	16
9	139840430	139957239	5
14	106329183	106717343	23
14	22849164	22959279	3
16	1135581	1187804	9
16	14913827	15053870	3
16	32588869	33814325	4
16	88744399	88630654	3
19	20568636	20711750	3
20	60880755	61086433	3
22	23146338	23256369	3

一方、日本人のみに健常者対照比較ゲノムデータを限定した場合は、18 箇所の CNV 領域が共通して確認された(表 5)。

表5. もやもや病親子に共通する CNV 一覧(健常者比較対照ゲノムを日本人種に限定した場合)

Chromosome	genomic coordinate: GRCh37/hg19		No. corresponding individuals
	start	end	
7	64638143	65094968	4
8	39247097	39366952	14
9	139840430	139958019	3
14	106329813	106519050	27
14	22747482	22932161	6
16	1137101	1235390	7
16	32570985	33603678	7
19	20611031	20711750	3
20	61008745	61086433	3
22	22928666	23210365	26
X	114929991	115015710	3
X	133071463	133827621	4
X	140641814	140766949	6
X	152707319	152839661	4
X	168547	1908941	9
X	2054638	2247079	3
X	2711570	2674793	3
X	5650853	5755383	3

表 4 および 5 より、2 つの健常対照ゲノムリファレンスデータで重複の確認された CNV 領域は、7q11.21・8p11.22・9q34.3・14q32.33・14q11.2・16p13.3・16p11.2・19p12・20q13.33・22q11.22 の 10 領域であった(表 4、5 中の太斜字で示した部分)。

(3) もやもや病親子で共通する CNV における、世代間コピー数差の検証

もやもや病親子 27 例・15 組で共通した 10 箇所の CNV 領域について、コピー数状態に世代間で差があるか検証した。その結果、検討した CNV 全 10 領域で、世代間での遺伝子コピー数差は認められなかった。

続いて、表現促進現象の有無により、15 組の親子を 2 群に分け、世代間での遺伝子コピー数差の有無を検証した。その結果、上記 10 領域のうち、Ch16.13.3(Genomic coordinate: 1135581 - 1187804)における CNV 領域では、表現促進を認めた親子での親世代のコピー数中央値は 2 であったのに対し、子世代のコピー数中央値は 2.5 であった。この傾向は他の 9 領域には認められなかった。統計学的には、この領域における遺伝子コピー数には、親子で差がある傾向が認められた(P = 0.068)。

表 6 : Ch16p13.3 (Genomic coordinate: 1135581 - 1187804)におけるもやもや病親子のコピー数(健常者比較対照ゲノムを全人種とした場合)

表現促進あり	親	子	difference (コピー数: 親子)
親子 1-1	2	3	-1
親子 1-2	2	2	0
親子 1-3	2	2	0
親子 1-4	2	3	-1
親子 1-5	2	2	0
親子 1-6	2	3	-1
親子 1-7	2	2	0
親子 1-8	2	2	0
親子 1-9	2	3	-1
親子 1-10	3	3	0
median	2.0	2.50	
表現促進なし			
親子 2-1	2	2	0
親子 2-2	3	3	0
親子 2-3	2	2	0
親子 2-4	2	2	0
親子 2-5	2	2	0
median	2.0	2.00	

表 7 : Ch16p13.3 (Genomic coordinate: 1137101 - 1235390)におけるもやもや病親子のコピー数 (健康者比較対照ゲノムを日本人に限定した場合)

表現促進あり	親	子	difference (コピー数: 親子)
親子1-1	2	3	-1
親子1-2	2	2	0
親子1-3	2	2	0
親子1-4	2	2	0
親子1-5	2	2	0
親子1-6	2	3	-1
親子1-7	2	2	0
親子1-8	2	2	0
親子1-9	2	3	-1
親子1-10	2	3	-1
median	2.0	2.0	
表現促進なし			
親子2-1	2	2	0
親子2-2	3	3	0
親子2-3	2	2	0
親子2-4	2	2	0
親子2-5	2	2	0
median	2.0	2.0	

(4)Ch16p13.3におけるCNV領域に含まれる遺伝子とパスウェイの解析

16番染色体短腕上(16p13.3)の410kbpの領域(Gene Coordinate番号994886-1419291)が、もやもや病親子の中でも、表現促進現象を有する場合に、遺伝子コピー数の親子間差を認める傾向がある領域と判明した。この領域には、14遺伝子が含まれていた(LMF1, SOX8, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H, TPSG1, TPSAB1, TPSD1, UBE21, BAIAP3, TSR3, GNPTG, UNKL)。Metacore[®]によるパスウェイ解析を実施した結果、特徴的なパスウェイは検出されなかった。CACNA1H (Calcium channel, voltage dependent subunit)のように、脳内での遺伝子発現も確認されている低電位作動性カルシウムチャンネルの活性に関わる遺伝子が含まれていた。

このCNVの内容が、特定の遺伝子の挿入あるいは重複なのかは今回の検討のみでは明らかにできない。選定されたCNV領域(16p13.3, Gene Coordinate番号994886-1419291)にターゲットを絞り、次世代シーケンサを用いたシーケンス解析により、どのような遺伝子領域の挿入あるいは重複などがコピー数増加に寄与したのか明らかにすることが可能である。この解析により、もやもや病の発症が促進されたメカニズムを、見いだせる可能性がある。したがって、今後の展望としては、より大きな集団で早期発症診断バイオマーカーとしての意義の検証、あるいは次世代シーケンサによるより詳細なレベルでのCNVの意義の検証が必要である。

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](計 3 件)

Bayram AK, Yilmaz E, Per H, Ito M, Uchino H, Doganay S, Houkin K, Unal E: Familial moyamoya disease in two Turkish siblings with same polymorphism in RNF213 gene but different clinical features. Childs Nerv Syst. 32(3):569-573, 2016
doi: 10.1007/s00381-015-2871-7 (査読あり)

Aoki J, Shibasaki K, Ito M, Saji N, Umemura J, Houkin K, Kimura K: Unilateral moyamoya phenomenon with string-of-beads appearance in an elderly patient with the c.14576G>A heterozygous variant of RNF213. Intern Med. 54(8):971-974, 2015
doi: 10.2169/internalmedicine.54.3534 (査読あり)

伊東 雅基、宝金 清博 . もやもや病と遺伝子 . 日医雑誌 第 1 4 3 巻第 9 号 : 94, 2014
<http://www.med.or.jp/cme/jjma/newmag/14309/14309con.html> (査読なし)

[学会発表](計 2 件)

平成 27 年 7 月 4 日 4th International Moyamoya Meeting 2015, (Oral Presentation), Berlin, German
Genome-wide CNV array analysis in parent/offspring pairs with Moyamoya disease with and without clinical anticipation. Ito M, Kazumata K, Hama Y, Uchino H, Hamauchi S, Sasaki H, Houkin K

平成 26 年 10 月 10 日 日本脳神経外科学会第 73 回学術総会, グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区) 一般口演
表現促進現象を示す家族性もやもや病の遺伝子コピー数多型解析 研究デザインとその理論的背景 . 伊東雅基、寶金清博、ほか

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉本 哲之 (YOSHIMOTO, TETSUYUKI)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員
研究者番号 : 50647493

(2)研究分担者

中山 若樹 (NAKAYAMA, NAOKI)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
講師
研究者番号： 40421961

数又 研 (KAZUMATA, KEN)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号： 60634144

七戸 秀夫 (SHICHINOHE, HIDEO)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
特任助教
研究者番号： 80374479

寶金 清博 (HOUKIN, KIYOHIRO)
北海道大学・大学病院・教授
研究者番号： 90229146

佐々木 秀直 (SASAKI, HIDENAO)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号： 80281806

伊東 雅基 (ITO, MASAKI)
北海道大学・大学病院・医員
研究者番号： 10399850