

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861291

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる脳動脈瘤の多発性嚢胞腎遺伝子ターゲットリシーケンス解析

研究課題名(英文)Targeted next-generation sequencing of PKD1 and PKD2 in familial intracranial aneurysms

研究代表者

広田 健吾 (HIROTA, KENGO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10532690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は、脳動脈瘤を高率に(約10%)合併する遺伝性疾患である。既に、PKD1 遺伝子とPKD2 遺伝子の原因遺伝子が同定されている。我々は、家族性脳動脈瘤患者を対象に次世代シーケンサーを用いて、PKD1遺伝子とPKD2遺伝子のエクソン領域のターゲットリシーケンスを行った。その結果、家族性脳動脈瘤群に有意に多くのPKD遺伝子変異を認めた。特にPKD1 遺伝子の細胞外ドメインに多数集積する傾向も認められた。以上からPKD1遺伝子、PKD2遺伝子は脳動脈瘤の有力な疾患候補遺伝子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the genetic disorder most commonly associated with increased risk of intracranial aneurysms (IA), and caused by deleterious mutations in PKD1 and PKD2. In this study, we tested whether IAs without obvious renal diseases also share a part of genetic backgrounds with ADPKD. We performed next generation sequencing of PKD1 and PKD2 in familial IA patients without ADPKD. Putatively functional variants were identified more frequently in the IA patients than in non-IA controls. Especially, the difference in extracellular region of PKD1 was more evident. This is the first report that PKD1 and PKD2 may be susceptibility genes of IA even in patients without ADPKD.

研究分野：脳神経外科学

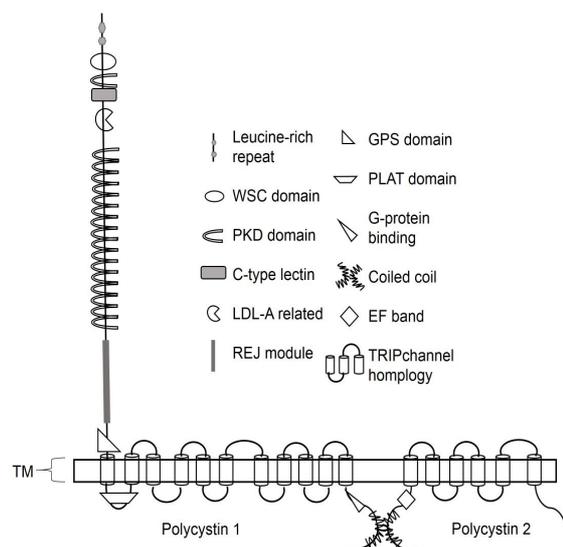
キーワード：脳動脈瘤 多発性嚢胞腎 次世代シーケンサー 遺伝子 レアバリエント

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤は脳血管にできる嚢状の病的な血管の膨らみで、その破裂はくも膜下出血を生じる。脳卒中の中でもくも膜下出血は特に死亡率が高く、患者の転帰はその半分以上が死亡または重大な後遺症を遺す重篤なものである。脳動脈瘤は、多因子疾患と考えられ、複数の遺伝要因と環境要因が相互に作用して発症に関与すると考えられている。遺伝要因の存在の根拠としては、多数の脳動脈瘤患者を有する家系が存在すること、常染色体優性多発性嚢胞腎 (Autosomal dominant polycystic kidney disease: ADPKD) に代表される単一遺伝子疾患に脳動脈瘤合併することが挙げられる。脳動脈瘤の成因の解明を目指し、以前よりその遺伝要因の解析が盛んに行われてきた。その解析手法として、脳動脈瘤罹患者家系を用いた連鎖解析と、脳動脈瘤患者集団と対照集団を比較した関連解析が主に用いられてきた。ゲノム全域を対象とした連鎖解析は、我々のグループが世界に先駆けて行い、2001年に発表した第5、7、14番染色体の連鎖領域の報告を皮切りに、その後、国内外で多数の報告がなされた (Am J Hum Genet 69:804-819, 2001)。また近年、高密度マイクロアレイを用いた大量遺伝子タイピングが普及し、数千から1万を超えるサンプルを対象に、10万から400万個の single nucleotide polymorphism (SNP) を用いた、ゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) が可能となった。脳動脈瘤においても、2008年にエール大学を中心としたグループにより初めての GWAS が行われた。同グループはさらにサンプルサイズを増やした検討も継続し、最終的にはヨーロッパ人や我々の日本人サンプルを含む5,891例の患者群と14,181例の対照群において、832,000 SNPsでの解析が行なわれた。このうち特に再現性の高い結果として、第8番染色体にある *SOX17* 遺伝子 (8q11.23-q12.1; $P = 1.3 \times 10^{-12}$, オッズ比 1.28) および第9番染色体にある *CDKN2A-CDKN2B* 遺伝子領域 (9p21.3; $P = 1.5 \times 10^{-22}$, オッズ比 1.31) などが特定された。さらに同グループは、日本人患者に注目したサブ解析により、第4番染色体にある *EDNRA* 遺伝子も特定している (4q31.23, $P = 2.2 \times 10^{-8}$, オッズ比 1.22)。この3つの遺伝子は再現性、信頼性の高い感受性遺伝子である。しかしながら GWAS の結果、いくつかの問題がでてきた。特定される SNP の効果サイズが小さいことや連鎖不平衡を代表する比較的頻度の高い (5%以上) SNP (tagging SNP) を用いた GWAS では、構造多型 (structural variation: SV) や頻度が低い rare variant が解析できない問題点である。このような common variant の解析では捕まえきれなかった遺伝要因に迫るため、近年、次世代シーケンサーが実用化され、common disease multiple rare variants (CDmRVs) 仮説に基

づいた効果サイズの大きい rare variant の検索に注目が集まっている。

常染色体優性多発性嚢胞腎は、両側の腎臓に多数の嚢胞が進行性に発生、増大し、腎臓以外の種々の臓器にも障害が生じる常染色体優性遺伝型の遺伝性疾患である。単一遺伝性疾患の中では最も頻度が高く (400~1000人に1人)、脳動脈瘤を高率に (約10%) 合併する。既に、*PKD1* 遺伝子 (16p13.3) と *PKD2* 遺伝子 (4q21)、2つの原因遺伝子が同定されている。遺伝子産物の Polycystin-1 と 2 は血管平滑筋細胞でも複合体として発現し、Polycystin-1 は、細胞・細胞間の接着蛋白、あるいは細胞膜上での受容体として細胞増殖や細胞内シグナル伝達に関与し、Polycystin-2 は、細胞膜あるいは細胞内小器官内でイオンチャンネルとして機能していると報告されている (図1)。多発性嚢胞腎における脳動脈瘤の特徴として 1) 脳動脈瘤保有率が、一般人口2.5%に対して6.3-12.4%と高く、さらに脳動脈瘤の家族歴があるとその頻度は21.2%に及ぶ 2) 脳動脈瘤破裂は通常のものより若年で起こる 3) 破裂率も高く、くも膜下出血も家族内で集積する傾向がある、などが知られている。また過去の研究では、多発性嚢胞腎患者における *PKD1* 遺伝子の5'側に変異を有しているほうが3'側に変異を有しているよりも脳動脈瘤合併の頻度が高いことも明らかにされ、非常に有力な脳動脈瘤候補遺伝子と考えられている (Lancet 361:2196-2201, 2003)。しかし、現在まで脳動脈瘤患者での PKD 遺伝子変異保有率の報告はない。



(図1)

2. 研究の目的

本研究では、遺伝的背景が濃厚な家族性脳動脈瘤患者を対象に *PKD1* 遺伝子と *PKD2* 遺

伝子のターゲットリシーケンスによる変異スクリーニングを行い、家族性脳動脈瘤患者群において、PKD1 遺伝子と PKD2 遺伝子の変異がどの程度発症に寄与するのかを検討した。

3. 研究の方法

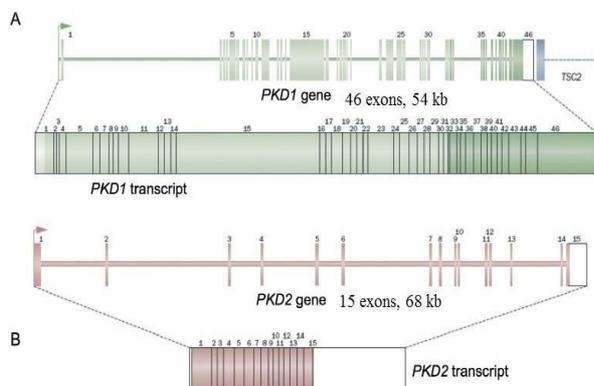
(1) 対象

日本人の家族性脳動脈瘤患者 148 例を対象にした。対象の内訳は、男性 40 例、女性 108 例、年齢は 29 歳から 88 歳 (平均年齢 59 歳)、多発性脳動脈瘤症例は 33 例、くも膜下出血症例は、88 例であった。

(2) Ion PGM Sequencing

PKD1 遺伝子と PKD2 遺伝子合わせて約 120kb の領域に対し、Ion AmpliSeq™ Designer (Life Technologies 社) を用いてターゲットライブラリー作成に必要なプライマープールを設計した(図 2)。作成したプライマープールを使用しマルチプレックス PCR 反応を行い、シーケンスで使用するプライマーアダプターとバーコードアダプターをライゲーションし、ターゲットライブラリーを作成した。Low throughput NGS である Ion PGM™ シーケンサー(Life Technologies 社)を用いて PKD1 遺伝子と PKD2 遺伝子の全てのエクソンをリシーケンスした。

PKD1, PKD2 遺伝子の構造と転写産物



(図 2)

(3) データ解析

上記得られた結果より、1000 人ゲノムプロジェクト (<http://browser.1000genomes.org/i-index.html>) にある日本人 89 例のデータよりアレル頻度 1%以下の rare variants を抽出した。次に、コンピューターによる変異機能解析を行うため、wANNOVAR (<http://wannovar.usc.edu/>) を用いて、最新の変異機能解析ツールである CADD(<http://cadd.gs.washington.edu/home>) によるスコアリングを行い C-score が 10 点以上の variants を抽出した。さらに得ら

れた variants が、人種特異的な遺伝多形であることを否定するため、我々が保有している非脳動脈瘤患者 96 例を用いて抽出された variants のサンガーシーケンス法を行い、rare variants であることを確認した。

4. 研究成果

家族性脳動脈瘤患者 148 例の PKD1 遺伝子と PKD2 遺伝子のターゲットリシーケンスを施行した。結果、12 箇所、19 例 (12.8%) に機能的 rare variants を認めた。19 例の変異体のうち 14 例が PKD1 遺伝子の、5 例が PKD2 遺伝子の変異体であった。PKD2 遺伝子の 1 箇所を除き (p.Q924X) いずれもミスセンス変異であった。多発性嚢胞腎が発症せず脳動脈瘤を発症した背景のひとつとも考えられる。このうち、PKD 遺伝子変異の詳細なデータベースである (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Mutation Database, PKD foundation, <http://pkdb.mayo.edu/>) や ClinVar

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) に登録のない新規変異を 6 例で認めた。また家族性脳動脈瘤群と非罹患コントロール群 185 例 (1000 人ゲノムプロジェクト日本人 89 例+非罹患コントロール 96 例) で比較を行ったところ、患者群で有意に多くの機能的 rare variants が検出されていた (P=0.019)。これらは特に PKD1 遺伝子の細胞外ドメインに集積する傾向があった。以上より、PKD1 遺伝子と PKD2 遺伝子は脳動脈瘤の有力な疾患感受性遺伝子と考えられ、また現在まで脳動脈瘤患者での PKD 遺伝子変異保有率の報告はなく、非常に興味深い新規知見であると考えられる。今後、孤発性脳動脈瘤患者にも対象を拡大して PKD 遺伝子のターゲットリシーケンスを行い、脳動脈瘤患者全体において PKD 遺伝子変異がどの程度発症に寄与するかを検証していきたい。

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 2 件)

Moteki Y, Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Okada Y, Hirota K, Mukawa M, Nariyai T, Mitani S, Akagawa H. Systematic Validation of RNF213 Coding Variants in Japanese Patients With Moyamoya Disease. J Am Heart Assoc. 2015 May 11;4(5). doi: 10.1161/JAHA.115.001862.

笹原篤、谷茂、萩原信司、大淵英徳、広田健吾、新井直幸、黒井康博、花大洵、鈴木一史、糟谷英俊：重症くも膜下出血患者における予後予測：CT perfusion(CTP)の有用性 脳卒中の外科 46:269-275, 2013

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

広田健吾 (HIROTA KENGO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10532690