

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670649

研究課題名(和文)もやもや病遺伝子座17q.25.3の高密度連鎖不平衡解析による疾患感受性の理解

研究課題名(英文) Resequencing analysis of the 19q25.3 locus associated with Moyamoya disease in Japan

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：もやもや病感受性遺伝子座RNF213(17q.25.3)では、創始者変異p.R4810Kが日本人患者の7割以上で陽性となる。しかしながら、これまでその他のレアバリエントの寄与については十分な数理統計学的な検討がなされてこなかった。そこで、レアバリエント関連解析法のひとつである変数閾値テストを新たに最適化して検討したところ、やはりp.R4810Kとは別の機能的レアバリエントもまた疾患と有意に関連していた(permutation $P_{min}=0.045$)。一方で、RNF213遺伝子型では疾患感受性が説明できない日本人患者がおよそ2割存在することもわかり、新たな感受性遺伝子座の存在を示唆した。

研究成果の概要(英文)：A founder variant of RNF213 (p.R4810K) was recently identified as a major genetic risk factor for Moyamoya disease (MMD) in Japan. Although the association of p.R4810K was reported to be highly significant and reproducible, the disease susceptibility of other RNF213 variants remain largely unknown. In this study, we performed resequencing analysis of this locus and evaluated the detected variants for their associations with MMD. A total of 30 rare missense variants with minor allele frequencies <1% were identified among 370 combined patients and 279 combined controls in Japan. The variable threshold test using Combined Annotation-Dependent Depletion revealed that the frequency of potentially functional variants was significantly higher in patients than in controls (permutation $P_{min}=0.045$). Our analysis also revealed that approximately 20% of Japanese MMD patients did not harbor susceptibility variants of RNF213, indicating the presence of other susceptibility genes to MMD.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：もやもや病 感受性遺伝子 連鎖不平衡 ハプロタイプ

1. 研究開始当初の背景

もやもや病は両側内頸動脈の進行性狭窄とそれに伴う異常血管増生により、脳梗塞・脳出血やてんかんを引き起こす難治性疾患である。世界的に見ると東アジア人、そのなかでも特に日本人に多く、本邦での罹患率は人口10万人当たり3.16-10.5人と報告されている。家族歴陽性例が10-15%にみられ、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。このような疫学的背景を受け、本邦の患者集団を用いた研究により感受性遺伝子 *RNF213* (染色体17q25.3) が特定され、創始者変異 p.R4810K (c.14429G>A, rs112735431) が日本人患者の7割以上で陽性となる。この *RNF213* 遺伝子と疾患発症との機能的関連を探るべく、遺伝子改変動物の作成に代表される機能解析が押し進められてきた。ゼブラフィッシュにおいては血管の分岐異常を来す可能性が示された一方で (Liu W, et al. *PLoS One*. 6(7);2011)、ノックアウトマウスや相同変異のノックインマウスでは脳血管系異常の表現型は観察されていない (Sonobe S, et al. *Brain Res*. 1552;2014, Kanoke A, et al. *Brain Res*.1624;2015)。理由として、p.R4810K 変異が遺伝子の機能喪失やハプロ不全を来すものではなく、機能獲得性である可能性、さらには遺伝要因に加え、何らかの環境要因も発症に関わるのではないかということも考察されていた。すなわち、疾患座位を遺伝統計学的に特定はできたものの、肝心の分子生物学的な役割については未知な点が多く残されたままであった。現在も研究がすすめられているが、その状況に変わりはない。

2. 研究の目的

今後、*RNF213* 座位の遺伝子情報を診断や治療への応用に結び付けていくためには、この *RNF213* 座位の成り立ちを詳細に理解しなおすことが必要不可欠であると考えた。ここでは、p.R4810K は病因変異そのものなのか、あるいは領域の連鎖不平衡に起因するタグマーカである可能性はないのか、という議論も含まれ、以下の仮説検証を計画した。

- ① p.R4810K 以上に疾患リスクを説明するものは他に存在せず、この変異が真の病因変異。
- ② p.R4810K はリスクアレルのタグマーカで、真の病因変異が他に存在。その場合は、コーディング領域は網羅的に検索済みなので、5'-3'UTR 領域も含むノンコーディング領域に存在していると考えられる。(さらに先行研究では CGH array により領域に構造多型がないことも示されている。)
- ③ p.R4810K 変異単体でも何らかの遺伝子機能変化をもたらすが、さらに近傍の機能的バリエーションとハプロタイプを形成し、synergic effect で疾患リスクに寄与。

3. 研究の方法

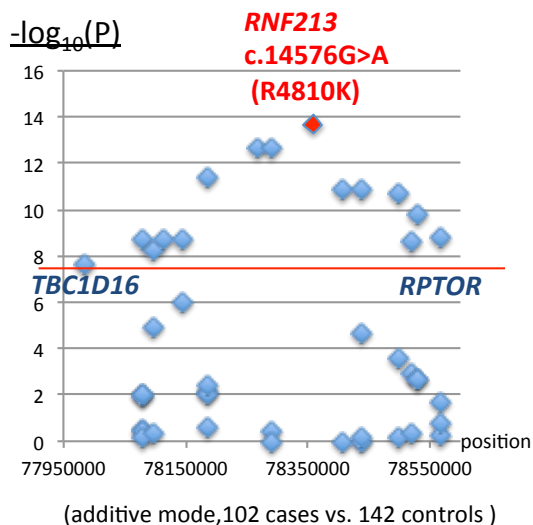
この領域は、当初は日本人もやもや病家系を用いた連鎖解析により特定されていた (Mineharu Y, et al. *Neurology*. 70;2008)。その後、マーカを増やした密な解析により候補領域は狭められ (Liu W, et al. *PLoS One*. 6(7);2011)、この1.3Mbの領域を解析ターゲットとした。まず、領域のハプロタイプ構造を正確に把握するため、p.R4810K のホモ接合体5例についてターゲットキャプチャー (SureSelect、アジレント) による次世代シーケンシング (SOLiD5500xl、ライフテクノロジーズ) を行った。検出されたバリエーションは従来のサンガー法に加えて、Ion PGM シーケンサー (ライフテクノロジーズ) も組み合わせて活用し、SOLiD5500xl によるターゲットリシーケンスでは精度は低くとも可能性のあるバリエーションについては漏らさずバリデーションを行なった。

真陽性と確認されたバリエーションについては多数の患者・対照サンプルでジェノタイピングを行い、患者対照関連解析および連鎖不平衡マッピングを行なった。解析の精度を高めるため、サンプル種集は研究期間内も継続して行ない、遺伝子型データを蓄積していった。

4. 研究成果

下図 (図1) は、領域で検出されたバリエーションのうち42個について患者102例、対照142例で関連解析を行なった結果である。Additive model で検定を行い、covariate として性別情報を用い有意差を調整した。42個のバリエーションのうち、1000人ゲノムデータベース (<http://www.1000genomes.org>) でのアレル頻度が2%未満のものが15個あり、そのいずれもが genome-wide significance (P値が 5×10^{-8} 未満) を超える関連を示した。この関連領域は *TBC1D16*~*RPTOR* 遺伝子までを含む582kb領域に相当した。

<図1>



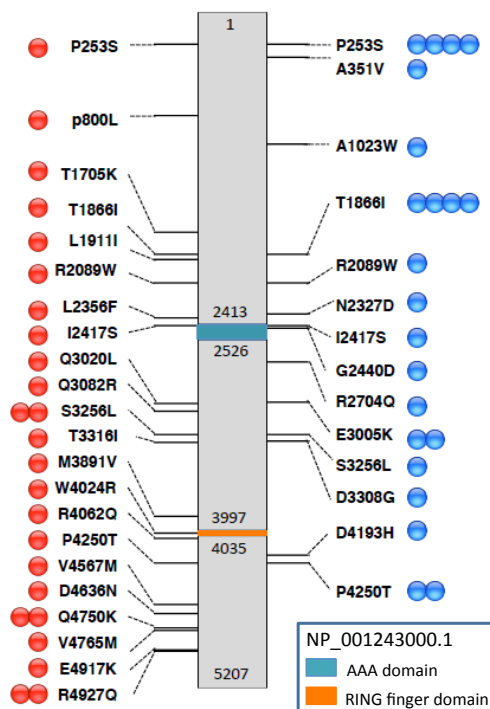
解析すべき領域をさらに狭めることができ、以降はこの領域に注目して解析を進めた。

配列の性質上（繰り返しや GC 含有量）SureSelect（アジレント）によるターゲットキャプチャーが困難であった部分については長鎖 PCR により対応した。ホモ接合体でスクリーニングを行なったため、この過程で数十から百塩基ほどにも及ぶ大きな欠失・挿入バリエーションも少なからず存在することが確認された。これらのうち p.R4810K と強固な連鎖不平衡呈するものも存在した。いずれもノンコーディング・バリエーションではあったが、これらにつきすべてで、患者・対照関連解析を行なった。その結果、*RNF213* p.R4810 変異のそれよりも低い P 値を示すバリエーションが複数存在することがわかった。いずれも p.R4810 のごく近傍に高い連鎖不平衡を保持して存在した。いずれも、近傍遺伝子の mRNA の非翻訳領域 (untranslated region, UTR) とイントロンのスプライス・サイトのバリエーションで形成される機能的ハプロタイプのタグマーカーであった。一方、オッズで示される効果サイズの面で見ると、やはり、*RNF213* p.R4810 変異のそれを超えるものは存在しなかった。以上のことから、当初の仮説③が支持されると結論した。本成果については、現在論文投稿準備中となっているため、具体的なバリエーション名や遺伝子名については明記を避ける。

本研究を遂行する過程で、採取したサンプルについては全例 p.R4810K のジェノタイプングを継続して行なっている。先行研究と同様、高率に陽性となる一方で、陰性例も少なからず存在した。

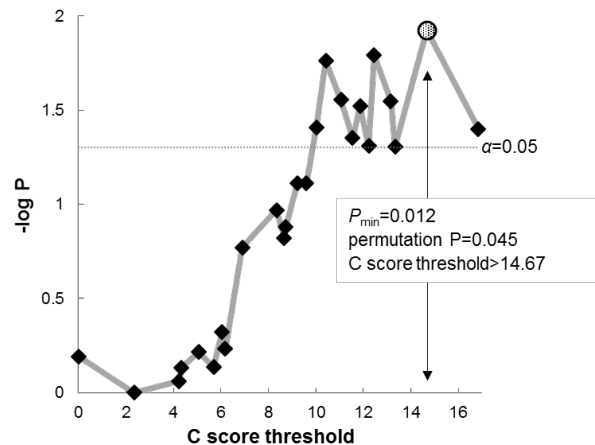
<図 2>

赤丸：変異患者 青丸：変異対照



先行研究では創始者変異 p.R4810K とは別の *RNF213* レアバリエーションの存在が示されているが (Miyatake S, et al. *Neurology*. 78:2012, など)、それらが疾患に関連しているかどうかについては十分な数理統計学的検討がなされてこなかった。そこで、本研究課題で行なったターゲットリシーケンスのデータを存分に活用して解析を行なった。我々の患者 103 例と対照 190 例に加えて、これまでに行なわれた他の研究発表データも統合して検定力を向上させた。合計して日本人患者 370 例と対照 279 例のリシーケンスデータとなった。これら患者および対照より検出されたアレル頻度 1%未満のレアバリエーションを図 2 に示した。患者と対照からほぼ同数のレアバリエーションが検出されており (変異患者 25 例、変異対照 22 例)、単純に比較したのでは全く差がない。この中には遺伝子の機能的には意義の無いあるいは少ないバリエーションが含まれているはずで、これらを効果的にフィルターして検定する必要がある。そこで、アミノ酸置換の障害度を Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD, Kircher et al. *Nat Genet*. 46:2014) によってスコアリングし、レアバリエーション関連解析法のひとつである変数閾値テスト (variable threshold test, Price AL, et al. *Am J Hum Genet*. 86:2010) を新たに最適化して検討を行なった (図 3)。

<図 3> 変数閾値テストの結果



CADD C-score の閾値が 10.02 を超えたところから有意に患者側に多く変異が認められるようになる。閾値 14.67 を超えたところで P 値が最小となり、パーミュテーション法による補正を行なっても有意であることから (permutation $P_{min}=0.045$)、この閾値が遺伝子座特有の病的変異判定の基準として採用される。この新たな方法により、p.R4810K 以外のレアバリエーションもまた疾患と有意に関連することを示すことができた。近年、厚労省の指定難病に係る個人調査票に *RNF213* 遺伝子検査についての記載欄が設けられた。現状では検査結果の詳細

細について記載は求められてはいないものの、一般人口対照からも多くの変異が検出されていることを考慮すると、*RNF213* 遺伝子検査の解釈には十分な注意が必要であると考えられた。本研究により、あくまで参考的な指標にはすぎないが、遺伝子診断基準も提示することができた。また、この基準によれば日本人患者の 20% は *RNF213* により遺伝的リスクが説明できないということになる。第 2 あるいは第 3 の感受性遺伝子の存在が示唆され、これらを特定できれば *RNF213* とは違った視点で病態の解明を行なえるのではないかと期待される。この成果は、下記「主な発表論文等」の②に示した論文として報告した。

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)

- ① Tateoka T, Onda H, Hirota K, Kasuya H, Shinohara T, Kinouchi H, **Akagawa H**:
Unusual case of cerebral small vessel disease with a heterozygous nonsense mutation in *HTRA1*.
J Neurol Sci. 2016;362:144-146.
(査読あり)
- ② Moteki Y, Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Okada Y, Hirota K, Mukawa M, Nariai T, Mitani S, **Akagawa H**:
Systematic Validation of *RNF213* Coding Variants in Japanese Patients With Moyamoya Disease.
J Am Heart Assoc. 2015;4(5):e001862.
(査読あり)
- ③ Okami N, Aihara Y, **Akagawa H**, Yamaguchi K, Kawashima A, Yamamoto T, Okada Y:
Network-based gene expression analysis of vascular wall of juvenile Moyamoya disease.
Childs Nerv Syst. 2015;31(3):399-404.
(査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- ④ **赤川浩之**、恩田英明、米山琢、茂木陽介、武川麻紀、成相直、岡田芳和、糟谷英俊。
Systematic Validation of *RNF213* Coding Variants in Japanese Patients With Moyamoya Disease.
第 16 回に本分子脳神経外科学会、2015 年 8 月 28 日～29 日、アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県浜松市)。
- ⑤ **赤川浩之**、恩田英明、米山琢、茂木陽介、広田健吾、Roder Constantin、Krischek Boris、武川麻紀、成相直、前原健寿、川俣貴一、糟谷英俊。
もやもや病感受性遺伝子のアレル異質性

と座位異質性。

日本脳神経外科学会第 74 回総会、2015 年 10 月 14 日～16 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)。

- ⑥ **赤川浩之**、恩田英明、米山琢、藍原康雄、Krischek Boris、武川麻紀、成相直、前原健寿、川俣貴一、糟谷英俊。

もやもや病の病態に迫る：新規感受性遺伝子の検索。

第 41 回日本脳卒中学会総会、2016 年 4 月 14 日～16 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)。

[図書] (計 1 件)

- ① 広田健吾、**赤川浩之**、糟谷英俊。
「脳動脈瘤の遺伝解析」
(井川房夫・森田明夫編著『未破裂脳動脈瘤 Japan standard』中外医学社) 2015。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤川 浩之 (AKAGAWA, Hiroyuki)

東京女子医科大学・統合医科学研究所・テニューアトラック准教授

研究者番号：60398807

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

