

論文内容の要旨

論文題目 **Newly Detected Candidate Regions for Human Narcolepsy in Genome-wide Association Study**

ゲノムワイド関連分析によるヒトナルコレプシーの新規感受性領域の同定

指導教官 徳永 勝士 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月進学

博士後期課程

国際保健学専攻

川嶋 実苗

ナルコレプシーは代表的な過眠症で、日中に起こる反復性の耐え難い眠気（睡眠発作）、感情の強い動きを契機に突然筋肉の力を喪失する情動脱力発作、入眠直後に REM 睡眠が見られる REM 睡眠異常に特徴付けられる。10 歳代に発症することが多く、性差は見られず、日本人における有病率は 0.16-0.18%である。また、一卵性双生児一致率は 25-31%、第一近親発症率は 1-2%と言われている。そのためナルコレプシーは、遺伝要因と環境要因とが相互に関与し合い発症にいたる多因子疾患と考えられている。今までに明らかにされた遺伝要因の一つはヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA) 領域に存在する *HLA-DRB1*1501-DQB1*0602* ハプロタイプで、日本人ナルコレプシー患者が 100%このハプロタイプを持つことより（健常者集団では約 10%）、疾患との強い関連が知られている。しかし、このハプロタイプをもつ全てのヒトがナルコレプシーに罹患するわけではなく、特にアフリカ系集団ではこのハプロタイプを持たない患者例もある。従って、*HLA-DR-DQ* ハプロタイプはヒトナルコレプシーとの強い関連があるものの、十分条件ではないと考えられる。一方、ヒトナルコレプシーにおける λ_s は 12 と報告されている。今回解析した個別試料の HLA タイピング結果より、*HLA-DR-DQ* ハプロタイプのみが疾患に関与すると仮定した場合の λ_s を推定したところ、5.15 であった。以上のことより、*HLA-DR-DQ* ハプロタイプ以外にも疾患感受性遺伝子が存在する可能性が考えられる。

多因子疾患の疾患感受性遺伝子探索方法として、複数の患者が存在する多数の小家系を対象とするノンパラメトリック連鎖解析（罹患同胞対分析）、1 人の患者が存在する多数家系を対象とした伝達不平衡テスト (transmission disequilibrium test: TDT)、家系データのない個体集団を対象とした患者-対照関連解析の 3 つの方法が主に用いられる。ヒトナル

コレプシーでは多発家系が少なく、罹患同胞対解析には適していない。また、TDT に比べ患者-対照関連解析の方がより高い検出力を示すため、患者-対照関連解析を採用しようと考えた。しかし、ナルコレプシーのように発症・病態メカニズムが明らかではない疾患に対して候補遺伝子を挙げることは困難であり、また、既知遺伝子しか解析対象に出来ないという問題点がある。そこで、“マイクロサテライトマーカを用いた pooled DNA によるゲノムワイドな関連分析法”という新たな戦略を採用した。すなわち、ゲノムワイドに等間隔で設定した多数のマイクロサテライトマーカを用いて関連解析を行うことにより、高い検出力を保ちつつ網羅的な解析が行えると考えた。マイクロサテライトマーカはヘテロ接合度が高く、単一塩基置換 (single nucleotide polymorphisms : SNPs) よりも広い範囲の連鎖不平衡を検出できると期待されるため、より少ない種類数でゲノム全域の連鎖不平衡マッピングを行う事が出来ると考えられる。また、候補遺伝子探索過程の1次、2次スクリーニングにおいて、各々のサンプルを等量ずつ混合した pooled DNA を用いることで、個別試料を用いるよりも実験規模、時間、コストの大幅な軽減が期待された。

日本人ナルコレプシー患者のゲノム DNA 各 110 名分を等量ずつプールした pooled DNA を 2 プール作成し、それぞれ 1st セット、2nd セットとした。同様に、対照健常者のゲノム DNA 各 210 名分を等量ずつプールした pooled DNA を 2 プール作成した。1st セット pooled DNA は 1 次スクリーニングのため、また、2nd セットは偽陽性を取り除くための 2 次スクリーニングに用いた。pooled DNA を鋳型に用いた増幅産物の解析は GeneScan ソフトウェアによる自動シークエンサーによりおこなった。

まず、pooled DNA 法の信頼性を確認した。HLA class I 領域内から 1 つ (C1_3_2)、HLA class II 領域内から 2 つ (M2_2_22、M2_4_25)、計 3 つのマイクロサテライトマーカを使用し、pooled DNA のタイピング結果より推定されたアリル頻度と、pooled DNA に用いた全個別試料 (患者 220 名、対照者 420 名) のタイピング結果から導かれたアリル頻度をカイ二乗検定により比較した。その結果、有意な差は見出されなかった。また、pooled DNA タイピング結果間において高い再現性が見られた。次に、1st セット、2nd セット間のサンプリングエラーがないことを確認するため、患者群どうし、対照者群どうしのアリル頻度の差を検定した結果、有意差はなかった。これら 3 マーカは HLA 領域に存在するため、ナルコレプシーとの関連を検出できるか否かも確認した。1st セットに用いた個別試料のタイピング結果をもとに関連解析を行ったところ、M2_2_22、C1_3_2 マーカでは有意差を示したが ($p=0.0061$, $p=0.0020$)、M2_4_25 マーカでは有意差に至らなかった。続いて、2nd セットに用いた個別試料のタイピング結果を用いて関連解析を行ったところ、全てのマーカにおいて有意差を示した ($p<0.0001$, $p=0.0036$, $p=0.037$)。同様に、pooled DNA の推定アリル頻度をもとにカイ二乗検定 ($2 \times m$ 分割表) を用いた関連解析を行ったところ、全てのマーカについて有意差は検出されなかった。一方、Pooled DNA 法の検定法として見出された統計量である ΔTAC 法を用いたところ、全てのマーカにおいて有意差が認められた。以上の結果より、pooled DNA を解析する際には個別試料用の統計解析法だけではなく、pooled

DNA法の検定法である Δ TAC法も用いる必要があることが分かった。

次に、本研究の戦略によりHLAとナルコレプシーとの関連を検出できるか否かの評価をするため、6番染色体上の1,265個のマイクロサテライトマーカー（平均間隔125.7kb）を用いた関連解析を行った。一次スクリーニングの結果、202のマーカーで少なくとも1つの統計解析法について有意差を示した。それら202マーカーを対象として2次スクリーニングを行ったところ、42マーカーにおいて依然として有意差が見られ、また、期待通りHLA-DR-DQ遺伝子近傍マーカーにおいて両スクリーニングを通して強い関連が見出された（ $p < 10^{-34}$ ）。HLA領域を詳しく解析するため、さらに細かく設定したマイクロサテライトマーカーを使用して解析したところ、5.5メガベースをカバーする30マーカーのうち22マーカーで有意差を示し、HLA-A, B, C4A遺伝子近傍マーカーにおいても有意差が見られた（ $p < 10^{-6}$, $p < 10^{-9}$, $p < 10^{-24}$ ）。以上の結果より、およそ100kb毎に設定したマイクロサテライトマーカーを用いた関連解析によって、疾患感受性候補領域を検出することが可能であると考えられた。

最後に、ゲノムワイドに分布した23,381マイクロサテライトマーカー（平均間隔130.3kb）（Figure1）を対象とした関連解析を行い、そこで関連が確認されたマイクロサテライトマーカー周辺のfine mappingを行うことで候補領域を狭めた。一次スクリーニング終了後、3,077マーカーで少なくとも1つの統計解析法について有意差を示した。それら3,077マーカーを使用して2次スクリーニングを行った結果、339マーカーにおいて依然として有意差が確認され、また、1次スクリーニングの結果との再現性も確認できた。

pooled DNAを使用した関連解析で検出された有意差を確認するため、一次、二次両スクリーニングにおいて有意差を示し、かつ、高い再現性を示した91マーカーについて、患者95名、対照者95名の個別試料をタイピングした。その結果、依然として有意差を示した14マーカーに対して全個別試料のタイピングを行ったところ、3つのマイクロサテライトマーカー（マーカー名：NA1.3, NA2.3, NA3.4）で顕著に低いp値を示した（ $p < 0.001$ ）。3マーカーのうち、2マーカー（NA1.3, NA3.4）は21番染色体上に、1マーカー（NA2.3）は2番染色体上に存在した。その3マーカー周辺500-700kbをカバーする領域をさらに詳細に設定したマイクロサテライトマーカーを用いて検討したところ、3マーカーのごく近傍マーカーにおいても同様に有意差を示した。特に、NA3.4マーカーから70kb離れたマーカー（NA3.L）は、NA3.4マーカーよりも強い関連を示した（ $p = 0.00045$ ）。以上のマイクロサテライトマーカーを用いた解析から、マーカーNA1.3周辺42kb、NA2.3周辺100kb、NA3.4周辺70kbを候補領域とした。さらにこれらの候補領域を狭めるため、平均10kb間隔で設定したSNPを使用し患者190名、対照者190名の個別試料を用いて解析を行ったところ、3マーカー近傍において有意差に至るSNPsを見出した。特に強い関連を示したNA3.Lマーカー近傍の2つのSNPs（C-7: $p = 0.0010$, C-4: $p = 0.0016$ ）について全個別試料を用いた解析を行った結果、マイクロサテライトマーカーよりも強い関連を示した（ $p = 0.0002$, OR=5.4, $p < 0.0001$, OR=7.02）。さらにD'を指標として連鎖不平衡がどの程度及んでいるかを検討したところ、

NA3.L マイクロサテライトマーカーと近傍の 2 つの SNPs は 1 つの連鎖不平衡ブロックに入ることがわかった。したがって、このブロックの中に何らかのナルコレプシー感受性遺伝子が存在する可能性が示唆された。このブロックの中には既知の遺伝子は存在しないが、同じ位置に複数の EST や mRNA がデータベースに報告されていることから (Figure 2)、新規遺伝子の存在が示唆される。今後、この EST や mRNA がヒトの脳内で発現しているか検討するとともに、発現や機能に影響を及ぼすような機能 SNP を探索し、その SNP が疾患に関与するか検討していく必要があると考えられる。

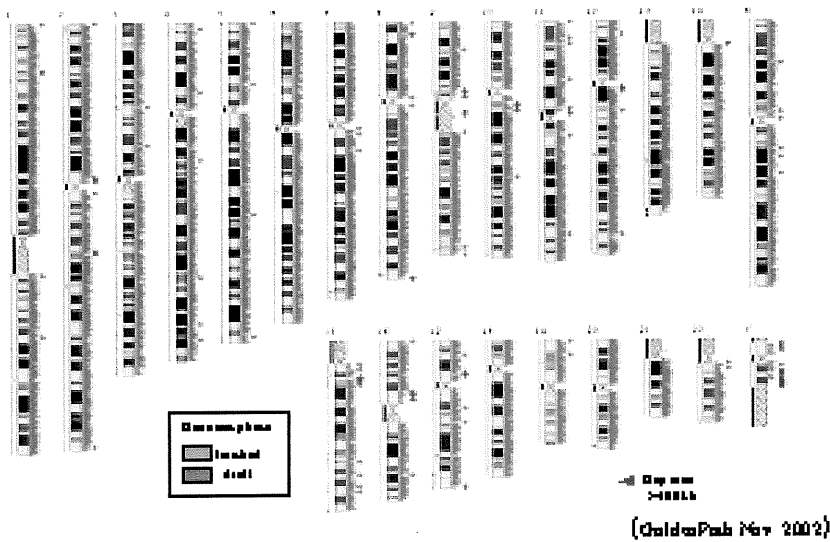


Figure 1. Mapping of 23,381 microsatellite markers on human genome

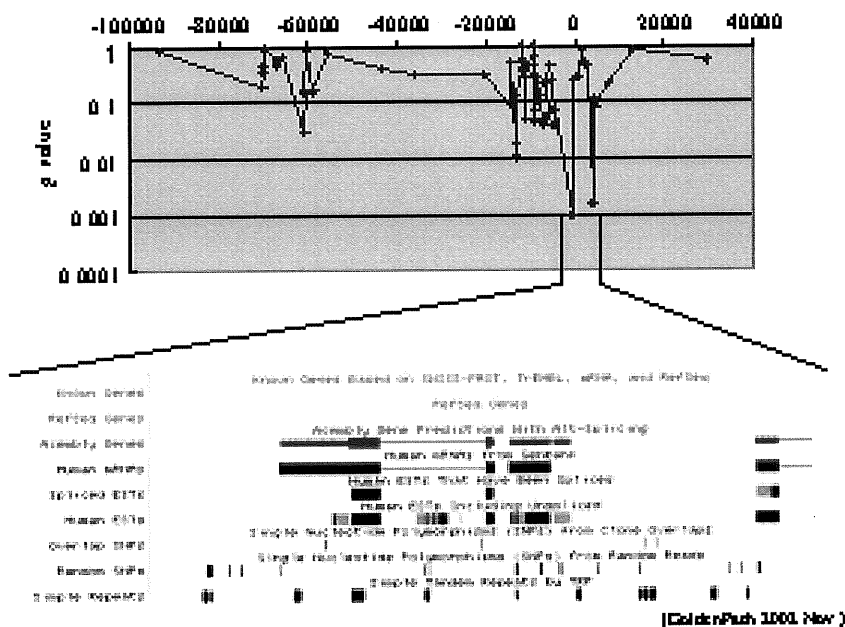


Figure 2. Assembly around the candidate 3 region