

論文の内容の要旨

論文題目 ゲノム解析を基盤とした多系統萎縮症の病因解明へのアプローチ

指導教員 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 中原 康雄

1. 研究背景と目的

多系統萎縮症(Multiple System Atrophy: MSA)は 1969 年に Graham と Oppenheimer が提唱した名称であり、それまで別個の疾患と考えられていた小脳症状を主体とする孤発性オリブ橋小脳萎縮症 (Olivoponto-Cerebellar Atrophy: OPCA) , パーキンソニズムを主体とする線条体黒質変性症(Striato-Nigral Degeneration: SND), 自律神経障害を主体とするシャイ・ドレーガー症候群(Shy-Drager Syndrome: SDS)を包括する疾患概念である。本邦における脊髄小脳変性症(spino-cerebellar degeneration: SCD)の中で、非遺伝性のもは 67.2%を占めるが、さらにその非遺伝性の中で 64.4%が MSA であり、MSA は SCD の中で最も頻度の高い病型である。1989 年には Papp らが、これらの疾患では共通して病理学的に特徴的な嗜銀性封入体である Glial Cytoplasmic Inclusion(GCI)がオリゴデンドログリアに認められることを発表し、MSA の名称のもとに一疾患単位として注目されるようになった。

臨床面では 1998 年には Gilman らにより MSA の診断基準である 'Consensus Statement' が公表され、疾患単位としての輪郭がより明確なものとなり、今日に至っている。Gilman の診断基準では自律神経障害が MSA のベースにある症状と見なされ、SDS の概念は消えさるうとしている。かつての OPCA, SND は、小脳症状を優位とする病型(OPCA とほぼ同義)である MSA-C, パーキンソニズムを優位とする病型(SND とほぼ同義)である MSA-P と称されるようになっている。

これまで、MSA は孤発性の疾患であり、発症に遺伝因子は存在しないと考えられてきたが、近年病理学的に診断された家族発症例が複数確認され、発症に関与する遺伝因子の存

在が注目されている。パーキンソン病やアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患を考えた場合、その9割以上が孤発性だが、一部に家族性のものが存在し、その原因遺伝子が1990年代以降、次々に明らかにされている。例えばアルツハイマー病の場合、家族性の原因遺伝子として、*APP*, *PS1*, *PS2*が見出されており、また遺伝的 *risk factor* として *ApoE4* 多型が見出されている。これらはいずれも $A\beta$ の蓄積というカスケードに繋がることが示されており、孤発性アルツハイマー病の $A\beta$ の蓄積、老人斑の形成というプロセスと重なるところが多いと考えられている。このように、家族性の神経変性疾患の研究と孤発性の神経変性疾患の研究を統合することで、そこに共通するカスケードを明らかにできる可能性がある。MSA の発症においても何らかの遺伝因子が判明し、発症メカニズム解明の端緒となる可能性がある。

MSA の病因解明へのアプローチとして、単一遺伝子疾患-多遺伝子疾患の幅広いスペクトルを考慮に入れ、

1. 孤発性 MSA を対象とした大規模関連解析 (genome wide association study: GWAS)
 2. まれに見られる家族性 MSA に焦点を絞った連鎖解析に基づくアプローチ
- という2つのアプローチを統合して進めている。本報告では多系統萎縮症における関連遺伝子の同定を目標に、ゲノム解析を基盤としたアプローチについて述べる。

2. 対象と方法

多系統萎縮症の遺伝因子を解明することを目的に、「厚生労働省 難治性疾患研究事業 運動失調症の病態および治療に関する研究班」の活動として、JAMSAC (Japan Multiple System Atrophy research Consortium) が設立された。本コンソーシアムは、MSAについて多施設共同研究体制を基盤とした自然歴およびゲノム解析研究を行い、その原因の解明と治療法の確立を目的として設立され、

1. MSA 症例の臨床情報およびゲノム DNA, cell line の収集と管理

2. これらのリソースを共有することにより、全ゲノム解析に基づく疾患関連遺伝子の探索研究を進めるとともに幅広い視点に立つ個別研究を推進する

3. MSA の縦断的な自然歴を明らかにしていく

といった3つを柱として活動を行っている。現在コンソーシアムには18施設が参加し、MSA 検体の収集と臨床情報の収集を行っており、2005年末より検体収集を開始し、MSA 検体に併せ、解析を行っていく上で重要となる正常対照者の検体も収集を行った。文書によるインフォームドコンセントを得て、末梢血液 19mL を採血し、うち 14mL よりゲノム DNA を抽出。必要に応じてゲノム DNA を得るため、残り 5mL から B 細胞リンパ芽球細胞株を樹立し保存。東京大学にて連結可能匿名化し、それら匿名化後の検体を使用し遺伝子解析研究を行った。孤発性 MSA を対象とした GWAS には、JAMSAC にて収集した検体と過去検体を併せ、MSA: 214 検体、正常対照者: 226 検体について Illumina 社の HumanHap 550K Genotyping BeadChip^R による全ゲノム SNP タイピングを施行し、得られた SNP データは、

PLINK(v1.02, 27/Mar/2008)を使用し関連解析を行った。

家族性 MSA に関しては、平成 15 年に日本神経学会専門医を対象としたアンケート調査を行い、同一家系内に複数の MSA 発症例が存在する家系が複数見出され、この調査を契機に、臨床現場で MSA の家族歴に注意が払われるようになり、その後も家族内発症例が見出される機会が増えている。家族性 MSA の検体に関しては、孤発性 MSA と同様に文書によるインフォームドコンセントを得、倫理面への配慮を十分払い収集を行った。その結果、少なくとも本邦では 9 家系の MSA 家族内発症例が、さらに 9 家系の MSA とパーキンソン病の家族内発症例が存在することが明らかとなり、そのうち DNA の存在する 5 家系について Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP 6.0^R による全ゲノム SNP タイピングを施行し、得られた SNP データは、Linkage package の単点解析プログラムである mlink と統合パッケージの Allegro version2 を使用し連鎖解析を行った。

3. 結果

GWAS では、タイピングの行われた MSA: 214 検体, 正常対照者: 226 検体について、検体ごとの Call rate($\geq 99\%$), 近親者や同一検体のチェック (IBD), 染色体異常の有無について調べ、その結果最終解析検体として MSA: 209 検体, 正常対照者: 220 検体について解析を行った。タイピングされた約 56 万個の SNP にて Locus ごとの call rate が MSA 群, 正常対照者群共に 98%以上得られ、正常対照者群にて Hardy-Weinberg 平衡を満たす SNP($p > 1E-6$)に基づいて選別された 544,148 個の SNP のうち、 χ^2 検定 (Allelic test) の p 値における有意差の認められる SNP 数は $p < 0.05$: 24,024 個, $p < 0.01$: 4,748 個, $p < 0.001$: 482 個, $p < 0.0001$: 47 個であった。それぞれ単独で低い p 値を示す SNP に併せ、2q31, 3p24, 3p26, 3q11, 4p13, 5p15, 5q35, 6q23, 8q24, 9q31, 11p15, 11q13, 11q22, 12q13, 13q32, 15q22, 16q23, 18q12, 21q21 といった領域にて近接して連続する低い p 値を示す SNP の連なりが認められた。家族性 MSA における連鎖解析では、5 家系について解析を行い、Locus ごとの call rate が MSA, 非発症者共に 100%得られ、非発症者における Hardy-Weinberg 平衡を満たし ($p > 0.05$)、また親子間矛盾, minor allele frequency (MAF)=0 を除外した SNP について mlink (LINKAGE/Fastlink), Allegro を用い、parametric および non-parametric の連鎖解析を施行した。NPL の上昇の認められる部位は、NPL >2 : 4p15-p16, 6q21-q22, 13q12, 20p12, 2>NPL >1.5 : 1q43, 2p15-p16, 3p24, 3p26, 5q33-q35, 6p21, 7p11, 7p12, 7p15, 7q11, 11p11, 11q12, 11q23, 13q31, 14q32, 15q24, 16p12-p13, 17q25, 20q13 であり、それらの領域に連鎖が示唆された。GWAS, 連鎖解析ともに有意差が認められ、MSA の原因遺伝子, 疾患関連遺伝子に関係する可能性も考えられる領域は、3p24, 3p26, 5q35, 15q22 であった。

4. 考察

本研究では、孤発性 MSA を対象とした GWAS と家族性 MSA に焦点を絞った genome wide linkage study の 2 つのアプローチを統合して進めており、MSA の病因解明へのアプローチ

として、単一遺伝子疾患-多遺伝子疾患の幅広いスペクトルを考慮している点が大きな特色の一つである。GWAS に関しては、1st screening が完了し、国際的にみても順調に計画が進んでいる。また、連鎖解析に関しては、当研究室にて高密度 SNP を搭載した DNA チップに対応した連鎖解析をスムーズに行うためのパイプラインを開発しており、それを MSA の解析にも応用しているといったように、GWAS, 連鎖解析両者において高密度 SNP チップを用いたゲノムワイドな解析によるアプローチを行い、GWAS, 連鎖解析ともに有意差が認められ、MSA の原因遺伝子、疾患関連遺伝子に関係する可能性も考えられる領域を同定した。GWAS の結果では、それぞれ単独で低い p 値を示す SNP に併せ近接して連続する低い p 値を示す SNP の連なりが認められた。これら連鎖が示唆される領域にある locus は、決して conclusive とは言えないものの、suggestive な loci であると考えられる。連鎖解析の結果からは、1 ヶ所に連鎖がまとまらず locus heterogeneity がある可能性についても考慮する必要があると思われる。また、候補遺伝子に基づく Resequencing, aCGH, CAG リピート数測定では、既知の病因遺伝子に変異を認めず、これまでパーキンソン病、脊髄小脳変性症などの関連疾患として知られていない遺伝子の関与が考えられる。しかし、解析におけるサンプルサイズは十分とはいえず、解析検体数は非常に重要なポイントの一つになるという点が常につきまとう。国内での神経変性疾患におけるコンソーシアムでは JAMSAC は先駆けの一つであり、多施設共同研究体制の元、少しでも多くの検体を収集するような研究の枠組みは研究上重要な点であり、そういった点を踏まえ、引き続き検体の収集を行っていく必要がある。また、本研究の GWAS にて有意差の認められた p 値は、Bonferroni の補正や、Bayes 的手法といった有意水準を超える程の有意差を示してはならず、今回の解析結果をすぐに MSA の発症における何らかの遺伝因子への関連に結びつけるのではなく、次の課題としては GWAS においては日本人症例の replication study の実現が重要となってくる。発症の原因としては、common disease common variant 仮説があるが、common disease common variant は見つかっても弱いリスクでしかなく、変異として強い影響をもつ common disease multiple rare variant という考えも大事であり、MSA の原因としては、その双方の仮説をふまえた研究が必要となってくると考えられる。家族性 MSA の連鎖解析についての取り組みに関しては、関連する国内外の研究との比較と位置づけをみても本研究のみで、海外では家族性 MSA の認知が進んでおらず、そういった意味では、このような統合的なアプローチが本研究の大きな特徴であり、今回の結果を踏まえ、今後引き続き家系に関しても集積を行っていく必要がある。孤発性の神経変性疾患の頻度は決して低いものではなく、孤発性神経変性疾患の病態機序を明らかにしていくためには、臨床情報の分析、ゲノム解析の両者共に不可欠であり、そういった観点を踏まえ、多施設共同研究体制のもと、詳細な臨床情報、ゲノムリソースを集積し、大規模ゲノム解析を適用していくことが重要であると考えられる。