

論文内容の要旨

論文題目

ハイスループット遺伝子解析法の開発に基づく
遺伝性痙性対麻痺の分子基盤の解明

指導教員 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

石浦浩之

遺伝性痙性対麻痺 (**Hereditary spastic paraplegia, HSP**) は進行性の下肢筋力低下、痙性を主徴とする症候群である。臨床的には、下肢痙性と、軽度の深部覚障害、膀胱直腸障害を合併する純粋型と、それ以外に視神経萎縮、網膜変性、難聴、構音障害・嚥下障害、筋萎縮などの症状を合併する複合型に分類される。臨床遺伝学的には、常染色体優性 HSP (ADHSP)、常染色体劣性 HSP (ARHSP)、X 染色体連鎖 HSP と全ての遺伝形式が存在し、現在まで SPG1~48 の遺伝子座と 20 以上の原因遺伝子が同定され、非常に **heterogeneous** な疾患群であることが判明している。また家族例と区別はつかないものの家族歴の全くない孤発例も多く存在し、孤発例の病因は不明である。HSP 研究において、以下のような問題点が存在する。

- ①本邦の HSP の分子疫学についてほとんど明らかとなっていない
 - ②原因遺伝子数が多いために、網羅的な遺伝子解析を提供するシステムが存在しない
 - ③孤発例のうち原因遺伝子に変異のある症例の頻度が不明
 - ④HSP の病態生理に関する理解が完全ではない
- このような問題点を解決するために、本研究ではまずハイスループット遺伝

子解析法の開発を行い、①～③の問題点を解決することを目指した。具体的には、**resequencing microarray** (Affymetrix) を設計し、一人の患者あたり 13 遺伝子～17 遺伝子を解析できるようにした。Affymetrix の提供する GDAS2.0 もしくは GSEQ4.0 を用いて主に解析を行ったが、変異の検出感度向上のため、自作のプログラムを作成した。このプログラムは検出感度の向上に寄与することができた。また、**resequencing microarray** は挿入・欠失変異の検出が悪いことが判明したため、挿入・欠失変異の頻度の高い遺伝子については、直接塩基配列決定法による解析を行うこととした。最後に、大きな重複・欠失 (**rearrangement**) を検出するために、カスタムで高密度オリゴ **comparative genomic hybridization (CGH) array** (Agilent) を作成し検討を行った。

結果、**resequencing microarray** は一塩基置換の検出感度は非常に良好であった。また、CGH アレイにより 4.6kb～170kb 以上の大きい重複・欠失を見出すことができた。当初 128 例において本邦の HSP の分子疫学の大枠について検討し、さらにハイスループットな網羅的遺伝子解析システムにするために解析手順を改善し、残りの症例について解析を行った。

実際には、合計 151 名の HSP 症例について検討を行った。内訳は、ADHSP が 58 症例、同胞発症かつ両親の近親婚があり ARHSP と考えられる症例が 11 例、家族歴があるものの遺伝形式が同定し得ない 7 例、両親に近親婚のある孤発例が 10 例、両親に近親婚のない孤発例が 65 例である。男女比は 1.4 : 1 であった。純粋型は 97 例 (64.2%) で、ADHSP に多く ARHSP に少なかった。発症年齢は 0～70 歳で、二峰性の分布を呈した。

本網羅的解析法を用いることで、51 例 (33.8%) から 54 個の変異を検出することができた。うち 24 個は **resequencing microarray** 解析から、23 個は直接塩基配列解析から、8 個は CGH アレイ解析から見出した。Resequencing microarray は一塩基置換の検出力が高く、一塩基置換の検出に関してはできる限り **resequencing microarray** を用いることが望ましいと考えられた。一方、小さな挿入・欠失変異については直接塩基配列決定法の感度が比較的よく、小さな挿入・欠失変異の頻度の高い遺伝子については直接塩基配列決定法を用いる必要があると考えられた。大きな重複・欠失についてはやはり CGH アレイが好ましく、結果として目的の遺伝子の変異の種類を知り、最適な遺伝子解析方法を選択することでスループットを上げることができると判明した。

ADHSP 症例からは、37 例の SPG4、2 例の SPG31、2 例の SPG8、1 例の SPG3A、1 例の SPG17 を認め、合計 65.5% で診断を下すことが可能になった。特に、SPG8 と SPG31 については本邦初の報告となった。

SPG4 には 70.2% で null 変異を認め、また missense 変異の 90% は AAA カセット内にあることから、病態機序として haploinsufficiency が考えられた。SPG4

は基本的に純粋型で、発症年齢は 10 代と 40 代にピークを持つ二峰性の分布を呈した。SPG3A と SPG31 は若年発症の純粋型 HSP であった。SPG8 には 4.6kb の欠失を認め、haploinsufficiency の機序が考えられた。また、従来 SPG8 は比較的若年発症で重症と言われてきたが、本邦で見出された SPG8 は 50~60 代と高齢発症であり、phenotypic variability を示すことができた。

ARHSP としては合計 6 例の SPG11 と 1 家系の SPG21 が見出された。SPG11 は脳梁菲薄化と認知機能障害を呈する HSP として最多 (35.7%) であった。SPG21 は Amish の一家系で Mast 症候群として報告されている、青年期発症で脳梁菲薄化と認知機能障害、小脳失調、錐体外路症状、嚥下障害を呈し Mast 症候群とも呼ばれるが、本邦で見出された SPG21 は高齢発症であり、Mast 症候群とは異なった臨床型を呈していた。ARHSP においては、ADHSP に比較すると診断がつく割合が低く、locus heterogeneity が高いと考えられた。

孤発例からは、結果的に 8 例 (4 例の SPG4、1 例の SPG3A、3 例の SPG11) が見出され、孤発例の 10.7% を占めることが判明した。

このように、本研究において前例にない規模で本邦における HSP の分子疫学と本邦の HSP の特徴が明らかとすることができた。

次に、診断未確定例に関するアプローチとして、家系収集と連鎖解析を行った。従来マイクロサテライトを用いた連鎖解析では、遺伝マーカーのタイピングに非常に長い時間がかかったため、連鎖解析を気軽に行うことは非常に困難であった。そのため、小家系において連鎖解析を行うことはほとんど考えられなかった。近年、高密度一塩基多型 (SNP) タイピング法の発展と、本研究室で開発された高速連鎖解析システム (SNP-HiTLink) の開発により非常に高速に連鎖解析を行うことができるようになった。具体的には、SNP タイピング (100K~900K の SNP, Affymetrix) に 4 日間、その後 Mendelian inconsistency を認めるマーカーの排除、タイピング効率の悪いマーカーの排除 (コントロールサンプルでの call rate、コントロールサンプルでの Hardy-Weinberg 平衡の p 値) を行い、多点解析の際には連鎖不平衡にある SNP を投入しないように、適切なマーカー間隔 (約 100kb~200kb) を設定し SNP を選択した。多点解析については、Allegro v2 を用いて解析した。解析結果については自作スクリプトを用いて Excel ファイルとしてインポートして、その後の解析を行った。

連鎖解析を行ったのは、3 家系 (発症者 3 名、非発症者 7 名)。1 家系については Affymetrix GeneChip Mapping 100K set (GeneChip Mapping 50K Xba & 50K Hind)、2 家系については Affymetrix genome-wide SNP array 6.0 を用いた。データについては GTYPE もしくは Genotyping Console を用いて解析を行った。4 家系とも常染色体劣性遺伝モデルで解析を行い、浸透率は 1、disease allele frequency を 0.001 に設定した。

HSP-F2 家系においては最大 LOD スコア 1.44 を認める約 2Mb の領域を第 9 番染色体見出した。既知の ARHSP の遺伝子座は存在せず、新規遺伝子座と考えられた。

HSP-F3 家系においては第 5 番染色体と第 20 番染色体に最大 LOD スコア 2.0 を認めた。既知の ARHSP の遺伝子座は存在せず、新規遺伝子座と考えられた。

HSP-F5 家系においては最大 LOD スコア 1.2 を示す領域を多数認めた。唯一 SPG24 の候補領域とのオーバーラップが認められたが、臨床型が異なるため、新規病型である可能性があると考えられた。

結果として、非常に小さな家系においても、特に近親婚がある劣性家系であれば、連鎖解析を行うことで効率よく候補領域を絞り込むことが可能となった。また、2 家系に関しては ARHSP に関しては既知の遺伝子座とのオーバーラップが認められず、ARHSP は遺伝的多様性がここでも明らかとなった。

以上のように、本研究ではマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析法を開発し、本邦の 151 名の HSP 症例の解析を行い分子疫学について新規の知見を得た。また、この遺伝子解析法で原因遺伝子が同定されなかった症例に関しては連鎖解析を行い、候補領域の絞りこみを行った。今後は、新たな原因遺伝子の同定と HSP の病態機序のさらなる解明を目指し、研究を続ける必要がある。近年の超並列シーケンサーにより、シーケンスのスループット向上とヒトゲノムバリエーションのデータベースの充実に伴い、本研究で行ったような小家系における連鎖解析からも原因遺伝子を同定できるようになると考えられる。本研究はそのように HSP の病態機序を解明する際の基盤として大きな位置づけを持つと考えられる。今後研究を推進し、HSP の病態機序が解明され、最終的に各症例に最適化された治療法が開発できるようになることが望まれる。