

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Genetic and immunological studies on the identification of susceptibility factors in human narcolepsy**  
(ヒトナルコレプシー疾患関連因子の同定に向けた遺伝学的・免疫学的研究)

氏名 豊田 裕美

### <序論>

Narcolepsy-cataplexy (情動脱力発作を伴うナルコレプシー) は、日中の強い眠気、情動脱力発作 (強い感情を契機として引き起こされる脱力)、入眠時幻覚、睡眠麻痺を主徴とする中枢性過眠症である。一般の日本人集団や白人集団における有病率が 0.02-0.18% である一方、患者の第一度近親者における有病率は 1-2% であることから、一般集団と比較して 10-40 倍の発症リスクがあると推定されている。一方で、一卵性双生児一致率は 20-30% 程度であることから、narcolepsy-cataplexy は複数の遺伝要因と環境要因により発症する多因子疾患であると考えられている。

遺伝要因が narcolepsy-cataplexy の発症に強く影響を及ぼすことは多くの研究により示唆されているが、なかでも、典型的な narcolepsy-cataplexy 患者の 88-100% が *HLA-DQB1\*06:02* 対立遺伝子を持つことが報告されている。しかしながら、この *HLA-DQB1\*06:02* 対立遺伝子は健常者でも高頻度で見られる (日本人 12%、白人 22%)。さらに、HLA の遺伝的寄与を  $\lambda$  値であらわすと 2-4 となり、全遺伝要因 (第一度近親者リスク 10-40) に対して 10% 程度を説明するにとどまる。これらのことから、HLA 領域以外の遺伝要因の存在が強く示唆されている。

また、もう一点、narcolepsy-cataplexy 発症のメカニズムを知る上で課題として残されていることがある。90% 以上の narcolepsy-cataplexy 患者の脳髄液中で、神経ペプチドであるヒポクレチンの劇的な減少がみられること、さらに、患者脳で視床下部内にあるヒポクレチンペプチドを産生する神経細胞が 90% 以上消失していることが明らかとなっている。narcolepsy-cataplexy と *HLA-DQB1\*06:02* との関連を考慮すると、最も妥当な narcolepsy-cataplexy 発症機序として、自己免疫システムによるヒポクレチン産生細胞の破壊という可能性が示唆される。しかしながら、明確な答えが得られるには至っていない。

本研究では、① narcolepsy-cataplexy の免疫学的側面 (Chapter 1)、② narcolepsy-cataplexy の遺伝学的側面 (Chapter 2) へのアプローチを通してこれらの課題に取り組んだ。

## < Chapter1 要旨 >

### 【概要】

対象	方法	結果
日本人過眠症患者 { NA 88例 NAwoCA 18例 IHS 11例 日本人健常者 87例	ラジオリガンドアッセイにより anti- TRIB2 autoantibodies anti- TRIB3 autoantibodies を検出	anti- TRIB2 autoantibodies NA: 26.1% 健常者: 2.3% →有意差あり ( $P = 4.8 \times 10^{-6}$ )  anti- TRIB3 autoantibodies 過眠症患者と健常者に有意差なし

NA, narcolepsy-cataplexy (情動脱力発作を伴うナルコレプシー); NAwoCA, narcolepsy without cataplexy (情動脱力発作を伴わないナルコレプシー); IHS, idiopathic hypersomnia with long sleep time (長時間睡眠を伴う特発性過眠症)

【目的】 narcolepsy-cataplexy 発症に自己免疫機序が関与していることが示唆されているが、長年にわたり、自己抗体が同定されるに至っていなかった。2009 年、視床下部ヒポクレチン産生細胞に高発現している tribbles homolog 2 (TRIB2) タンパクに対する自己抗体が、14% のヨーロッパ系 narcolepsy-cataplexy 患者で観察されることが報告された。我々は、白人集団よりも罹患率の高い日本人集団に抗 TRIB2 抗体が検出されるかどうか、より感度の高い測定系 (ラジオリガンドアッセイ) を用いて検討した。

【方法】 家兎網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* 転写翻訳システムにより [<sup>35</sup>S]-TRIB2 組み換えタンパクを合成した。これを抗原として日本人集団の血清とを反応させた。得られた各検体の放射活性を、健常人プール血清の活性を指標としてインデックス化した (ラジオリガンドアッセイ)。抗体陰性・陽性のカットオフ値は健常人平均値+2SD を用いた。用いた検体は、narcolepsy-cataplexy (n = 88)、narcolepsy without cataplexy (n = 18)、IHS (n = 11)、健常者 (n = 87) である。また、コントロールとして TRIB3 も測定した。

【結果】 抗 TRIB2 抗体は narcolepsy-cataplexy 患者 88 例中 23 例 (26.1%、>2SD)、健常者 87 例中 2 例 (2.3%、>2SD) で検出された (Fisher's exact test,  $P = 4.8 \times 10^{-6}$ )。1 例の narcolepsy without cataplexy 患者において抗 TRIB2 抗体が検出されたが、IHS では皆無であった。抗 TRIB2 抗体測定の特異性の確認のため行った抗 TRIB3 抗体測定では、患者と健常者の間に有意差は観察されなかった。さらに半定量 PCR により本研究においてもヒト視床下部での TRIB2 遺伝子の高発現を確認した。また、臨床情報とは有意な相関がなかった。

【考察】 抗 TRIB2 抗体が日本人 narcolepsy-cataplexy 患者において有意に検出され、抗 TRIB2 抗体の人種を超えた narcolepsy-cataplexy への関与を明らかにした。一方で、抗 TRIB2 抗体は他の過眠症ではほとんど検出されず、また、抗 TRIB3 抗体は narcolepsy-cataplexy を含め

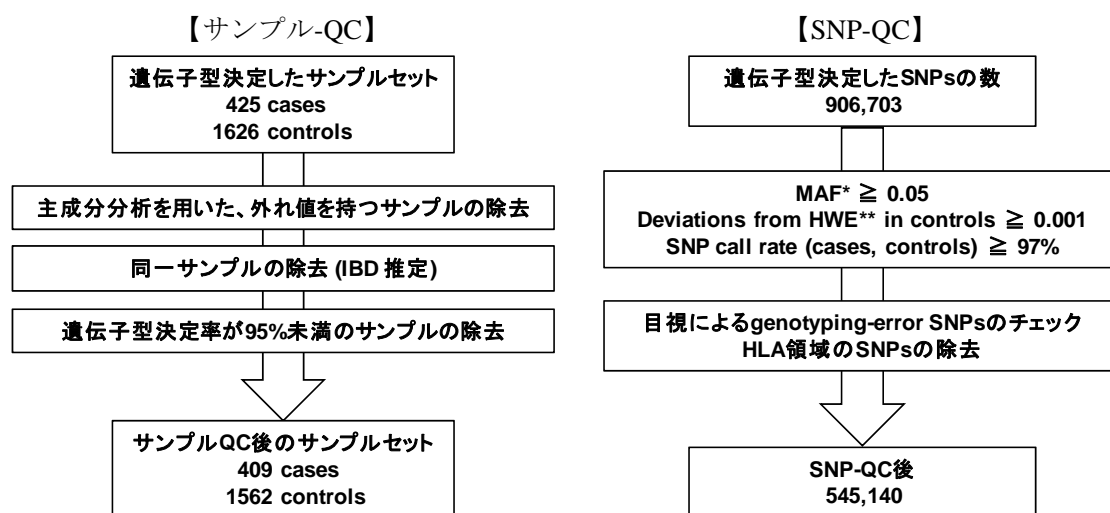
てどの疾患においてもほとんど検出されないことから、抗 TRIB2 抗体の特異性が示唆された。さらに、先行研究や本研究により、TRIB2 がヒト視床下部にも高発現していることが確認された。これらのことより、抗 TRIB2 抗体を介した自己免疫反応が視床下部ヒポクレチン産生細胞を標的とし、その消失に関与していることが示唆される。

## <Chapter2 要旨>

新規疾患遺伝子の同定及び創薬分野への応用の可能性から、将来の特許出願を考えているため、学位論文での詳細な記載を免除願います。

【目的】 narcolepsy-cataplexy は複数の遺伝要因と環境要因により発症する多因子疾患として知られる。典型的な narcolepsy-cataplexy 患者の 88-100%が HLA-DQB1\*06:02 対立遺伝子をもつことが報告されているが、HLA 領域以外の遺伝要因の存在が強く示唆されている。そこで本研究では、narcolepsy-cataplexy の新たな遺伝要因の同定を目的とし、ゲノムワイド関連解析を行った。

【方法】 906,703 の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) について、日本人 narcolepsy-cataplexy 患者 425 名、日本人健常者 1,626 名の遺伝子型を決定した。関連解析に際して、以下のデータ QC (quality control) を行った。また、強い関連が知られている 6 番染色体上の HLA 領域は解析から除外した。



\* MAF, Minor Allele Frequency  
\*\* HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium

次に、データ QC を通過したサンプル (narcolepsy-cataplexy 患者 409 例、健常者 1562 例)、SNP (545,140) を用いて関連解析を行った。さらに、解析により得られた候補 SNPs 周辺のゲノム領域のうち、実験により遺伝子型を決定できなかった SNP の遺伝子型を推定するため、HapMap データベースより得た日本人および中国人の遺伝子型データを reference として、

3つのソフトウェア (MACH 1.0、IMPUTE v2、PLINK 1.07) を用いて imputation を行った。

【結果および考察】 遺伝子型が決定された 906,703 の SNPs のうち、quality control の基準を通過した SNPs は 545,140 個であった。有意水準は、false positive report probability により評価し、 $P = 1.47 \times 10^{-5}$  とした。さらに、 $1.47 \times 10^{-5} < P < 2.94 \times 10^{-5}$  を示す SNPs の中から、機能的に興味深い SNPs を "suggestively significant" として選んだ。

Allelic test において有意水準に達した SNPs は 18 個、10 領域であった。このうち、6 SNPs は、ヨーロッパ系 narcolepsy-cataplexy 患者を用いて行われた GWAS において同定された TCRA 座位に相当し、最も有意な SNP も同じであった (rs1154155;  $P = 1.1 \times 10^{-11}$ ; OR = 1.71)。また、"suggestively significant" として選択した SNPs は 4 個、2 領域であった。最終的に、TCRA 座位を除いた 16 SNPs、11 領域を narcolepsy-cataplexy 関連座位として同定した。これらの領域に対して行った imputation により、元の SNP と同程度、もしくは若干強い関連を示す SNPs が認められたが、元の SNP と連鎖不平衡状態になく、かつ、疾患と強い関連を示す SNPs は認められなかった。

機能 SNP データベースの検索により、候補となった 11 領域のうち、4 領域に興味深い結果が得られた。そのうち 1 領域 (*Gene J1*) は、narcolepsy-cataplexy と関連を示した SNP (3p21-1;  $P = 1.63 \times 10^{-5}$ ; OR = 0.54) が *Gene J1* のプロモーター領域にあり、SNP 3p21-1 がリスクアレルか否かによって結合する転写因子が異なると予測された。さらに、*Gene J1* は免疫反応に関与する遺伝子であった。これまでの知見や Chapter 1 で述べたように、免疫機序の異常が narcolepsy-cataplexy 発症に関与することが示唆されていることから、*Gene J1* の narcolepsy-cataplexy への寄与を追求する必要がある。

残り 3 領域 (*Gene K*、*Gene F*、*Gene H*) は、narcolepsy-cataplexy と関連を示した SNP が各遺伝子のスプライシングパターンに影響を与えると予測された。例えば *Gene K* については、narcolepsy-cataplexy と関連を示した SNP (3q22-1;  $P = 1.55 \times 10^{-5}$ ; OR = 1.43) がリスクアレルか否かによって、*Gene K* の RNA 配列に結合できるスプライシング制御因子が変わることが予測された。3 領域はそれぞれ、神経発生やシナプス形成に関与する遺伝子であった。

今後、これら候補 SNPs について、異なる集団のサンプルを用いて追試を行い、周辺の連鎖不平衡構造を比較することで、疾患感受性 SNP を絞り込んでいく。さらに、今回同定した、免疫応答や神経発生に関与する候補遺伝子については、機能 SNP データベースにより予測された機能を手掛かりとして機能解析を行い、疾患への寄与を明らかにしていく。