

Supplementary Table 3. Real-time RT-PCR analysis of miR-29a expression in the frontal cortex of human neurodegenerative diseases

Experiment Sets	Samples	RNU6B		miR-29a	
		Ct (Mean ± SD)	2 <sup>-ΔΔCt</sup> Ratio (Mean ± SD)	Relative Expression Level (Mean ± SD)	
Exp-1	Universal Reference	31.32 ± 0.25	0.97 ± 0.03	1.00 ± 0.03	
	NC1	29.74 ± 0.35	4.81 ± 0.36	4.93 ± 0.37	
	NC2	29.56 ± 0.20	4.25 ± 0.16	4.36 ± 0.17	
	NC3	30.47 ± 0.13	5.32 ± 0.81	5.46 ± 0.84	
	NC4	30.41 ± 0.13	5.22 ± 0.69	5.36 ± 0.71	
Exp-2	Universal Reference	31.17 ± 0.19	1.08 ± 0.11	1.00 ± 0.10	
	ALS1	30.18 ± 0.18	6.67 ± 0.44	6.19 ± 0.41	
	ALS2	30.23 ± 0.03	8.12 ± 0.95	7.54 ± 0.88	
	ALS3	29.77 ± 0.17	5.32 ± 0.29	4.94 ± 0.27	
	ALS4	28.92 ± 0.03	3.43 ± 0.21	3.18 ± 0.20	
	ALS5	29.48 ± 0.33	8.64 ± 0.73	8.02 ± 0.68	
	ALS6	30.05 ± 0.06	15.21 ± 0.34	14.11 ± 0.31	
	AD1	27.54 ± 0.22	2.18 ± 0.19	2.02 ± 0.18	
	AD2	28.95 ± 0.29	4.91 ± 0.62	4.55 ± 0.57	
	AD3	27.92 ± 0.18	2.39 ± 0.59	2.22 ± 0.55	
	AD4	28.50 ± 0.36	3.59 ± 0.09	3.33 ± 0.08	
	AD5	29.35 ± 0.25	5.94 ± 0.53	5.51 ± 0.49	
	AD6	29.48 ± 0.25	3.85 ± 0.22	3.58 ± 0.21	
AD7	27.52 ± 0.06	2.55 ± 0.10	2.36 ± 0.09		
Exp-3	Universal Reference	31.15 ± 0.04	1.07 ± 0.06	1.00 ± 0.06	
	PD1	29.87 ± 0.10	7.42 ± 0.39	6.94 ± 0.36	
	PD2	28.70 ± 0.16	3.21 ± 0.26	3.00 ± 0.24	
	PD3	28.15 ± 0.14	1.88 ± 0.20	1.76 ± 0.18	
	PD4	29.14 ± 0.10	5.10 ± 0.42	4.77 ± 0.39	

To quantify miRNA expression levels, TaqMan microRNA assay-based quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) was performed on the 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems), following the Delta-Delta Ct method. RNU6B was utilized for an endogenous reference to standardize miRNA expression levels. All the data were calibrated by the universal reference (AM6810) data.



# ゲノムワイド解析により同定された多発性硬化症のリスクアレル

Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study

多発性硬化症(MS)では臨床的に明らかな遺伝的要因の関与を認める。本研究ではDNAマイクロアレイによるゲノムワイド関連(GWA)解析で、MSリスクアレルを同定した。931家系トリオのSNPをスクリーニングし、別の609家系トリオ、2,322孤発例MS、789コントロールと2種類の外部データベースコントロールで再現性を検証した。全12,360データを統合し、MSリスクの統計学的有意性を算出した。その結果、931家系トリオの334,923 SNPsにお

けるTDTで、49 SNPsとMSの関連が示唆され、38 SNPsで検証した。931家系トリオ患者と2,431健常者間で差異を呈する32 SNPsを同定、110 SNPsで検証した。最終的に、IL-2受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子(IL2RA) ( $p=2.96 \times 10^{-8}$ )、IL-7受容体 $\alpha$ 鎖遺伝子(IL7RA) ( $p=2.94 \times 10^{-7}$ )、HLA-DRA遺伝子座( $p=8.94 \times 10^{-81}$ )のSNPsのアレルがMSと強く関連し、MSリスク遺伝因子と考えられた。

## GWA 解析の対象

MSは若年成人では最も多い中枢神経系炎症性自己免疫疾患である。MS双生児・兄弟例の解析から、何らかの遺伝因子がMS疾患感受性に影響していることが分かった。候補遺伝子解析で、主要適合性複合体(MHC)遺伝子座の多型とMSの関連が示唆された。730家系2,692サンプル4,506 SNPsの連鎖解析で、MHC遺伝子座との強い連鎖(LODスコア11.66)が証明された。しかし過去の研究では、統計学的検出力が不十分で、MSと連鎖するnon-MHC遺伝子を同定できなかった。

本研究では、バイアスや仮説の影響を受けないゲノムワイド関連(genome-wide association; GWA)解析により、MSリスクnon-MHC SNPアレルの同定を試みた。International MS Genetics Consortium (IMSGC)を立ち上げ、MS家系トリオと孤発例MSの血液サンプルはUK(全土)とUS(UCSF MS Center,

San FranciscoとBWH MS Center, Bostonを中心)の研究グループが収集、ジェノタイピングにはAffymetrix社GeneChip Human Mapping 500K arrays(500,000 SNPs)を用いた。MSはMcDonald基準で診断したが、clinically isolated syndrome(CIS)(臨床的 attack 1回)が4%(86症例)含まれている。コントロールサンプルは、BWH、UCSFで慢性炎症性疾患既往歴のない非ヒスパニック系白人より収集した。また外部データベースWellcome Trust Case Control Consortium(WTCCC), National Institute of Mental Health(NIMH)の双極性障害GWA研究のAffymetrix 400K SNPデータをコントロールとして取り込んだ。GWA解析は、I型・II型糖尿病、炎症性腸疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスのリスクnon-MHC SNPsの同定に成功している。

## GWA 解析のステージ化

本研究ではジェノタイピング効率化のため、解析をステージ化した。品質管理(QC)ステージでは、1,003家系トリオをタイピングし、ジェノタイピング率、Hardy-Weinberg平衡、Mendelianエラーの基準を満たすヨーロッパ系家系のサンプルを選択、対象を931家系トリオの334,923 SNPsに絞り込んだ。スクリーニングステージでは、931家系トリオの患者と両親を伝達不平衡テスト(TDT)で比較し、MSに関連する78 SNPs( $p < 1 \times 10^{-4}$ )を同定した。931家系トリオの患者と2,431コントロール(WTCCC 1,475, NIH 956)をCochran-Mantel-Haenszelテストで解析し、MSに関連する63 SNPs

( $p < 0.001$ )を同定した。自己免疫疾患感受性遺伝子座近傍の24 SNPs( $p < 0.01$ )を追加解析した。再現性検証ステージでは、QC基準を満たす110 SNPsに関して、スクリーニングとは別の609家系トリオ、2,322孤発例MS(UK 928, US 1,394), 2,987コントロール(IMSGC 789, WTCCC 1,475, NIH 723)を追加、Sequenom社iPLEX Gold MassArrayを用いて解析した。最後に全ステージ12,360サンプル(1,540家系トリオ、2,322孤発例MS、5,418コントロール)のデータを統合、UNPHASEDソフトで解析した。

## MS リスクに関連する non-MHC SNPs の意義

MHC遺伝子座HLA-DRB1\*1501のSNP rs3135388 Aアレル( $p=8.94 \times 10^{-81}$ )が最も有意にMSリスクに関連していたが、他に比較的有意と判断された16 non-MHC SNPs: IL2RA

(CD25)第1イントロンrs12722489 Cアレル( $p=2.96 \times 10^{-8}$ )とrs2104286 Tアレル( $p=2.16 \times 10^{-7}$ )、IL7RA(CD127)第6エクソンのアミノ酸置換(T244I)を伴うrs6897932 Cアレル

( $p=2.94 \times 10^{-7}$ )、KIAA0350 (CLEC16A) rs6498169 G アレル ( $p=3.83 \times 10^{-6}$ )、CD58 rs12044852 C アレル ( $p=1.90 \times 10^{-5}$ ) などを検出した(表)。IL2RAはI型糖尿病やバセドウ病との連関が報告されている。種々の自己免疫疾患でCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>制御性T細胞の機能不全を認める。抗IL2RA抗体(rituximab)はMSで臨床試験中である。3つの候補遺伝子解析研究でも、IL7RAとMSの連関が報告されている。IL-7はメ

モリーT細胞プールの維持や $\gamma\delta$ T細胞の分化に重要なサイトカインである。IL7RA T244Iバリエントは可溶型と膜型受容体の構成比に関与し、I型糖尿病発症との連関が報告されている。本研究では、初めてnon-MHC SNPsとMSリスクとの連関を証明できた点に意義がある。

佐藤 準一(明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス教授)

表 ● GWA解析で同定したMSリスクSNPとアレル

No.	染色体	遺伝子	塩基多型(SNP)	リスクアレル	リスクアレル頻度	スクリーニング試験		確認試験		統合データ		アレル層別解析			
						931家系トリオの患者と両親の比較	931家系トリオ患者と2,431コントロールの比較	2,322患者・609家系トリオと2,987コントロールの比較	全サンプル	ORB1* (501) 陽性者(n=531)	ORB1* (501) 陰性者(n=460)				
						p値	オッズ比(95%信頼区間)	p値	オッズ比(95%信頼区間)	p値	オッズ比(95%信頼区間)	p値	p値		
1	6p21	HLA-DRA	rs3135388	A	0.23					$8.94 \times 10^{-11}$	1.99 (1.84-2.15)				
2	10p15	IL2RA	rs12722489	C	0.85	$1.28 \times 10^{-3}$	1.35 (1.13-1.62)	$9.61 \times 10^{-4}$	1.30 (1.11-1.52)	$4.66 \times 10^{-4}$	1.19 (1.08-1.31)	$2.96 \times 10^{-9}$	1.25 (1.16-1.36)	$8.50 \times 10^{-3}$	$6.19 \times 10^{-2}$
3	10p15	IL2RA	rs2104286	T	0.75	$3.25 \times 10^{-3}$	1.26 (1.08-1.47)	$2.85 \times 10^{-4}$	1.26 (1.11-1.43)	$1.49 \times 10^{-4}$	1.16 (1.08-1.25)	$2.16 \times 10^{-7}$	1.19 (1.11-1.26)	$3.19 \times 10^{-2}$	$4.44 \times 10^{-2}$
4	5p13	IL7RA	rs6897932	C	0.75	$5.78 \times 10^{-3}$	1.24 (1.07-1.44)	$1.65 \times 10^{-3}$	1.17 (1.03-1.32)	$2.75 \times 10^{-6}$	1.18 (1.09-1.27)	$2.94 \times 10^{-7}$	1.18 (1.11-1.26)	$1.17 \times 10^{-1}$	$1.53 \times 10^{-2}$
5	16p13	CLEC16A	rs6498169	G	0.37	$2.90 \times 10^{-2}$	1.16 (1.02-1.33)	$6.51 \times 10^{-3}$	1.17 (1.04-1.31)	$1.89 \times 10^{-5}$	1.16 (1.09-1.24)	$3.83 \times 10^{-6}$	1.14 (1.08-1.21)	$9.50 \times 10^{-2}$	$1.60 \times 10^{-1}$
6	1p22	RPL5	rs6604026	C	0.29	$4.45 \times 10^{-4}$	1.29 (1.11-1.50)	$2.34 \times 10^{-4}$	1.25 (1.11-1.40)	$9.58 \times 10^{-4}$	1.13 (1.05-1.22)	$7.94 \times 10^{-6}$	1.15 (1.08-1.22)	$2.06 \times 10^{-2}$	$7.42 \times 10^{-3}$
7	9q33	DBC1	rs10984447	A	0.77	$1.18 \times 10^{-1}$	1.36 (1.16-1.59)	$2.13 \times 10^{-1}$	1.09 (0.95-1.24)	$1.27 \times 10^{-3}$	1.14 (1.05-1.24)	$8.46 \times 10^{-9}$	1.17 (1.09-1.25)	$2.07 \times 10^{-2}$	$1.23 \times 10^{-1}$
8	1p13	CD58	rs12044852	C	0.92	$9.71 \times 10^{-1}$	1.48 (1.17-1.87)	$3.01 \times 10^{-1}$	1.54 (1.26-1.89)	$2.06 \times 10^{-3}$	1.20 (1.07-1.35)	$1.90 \times 10^{-6}$	1.24 (1.12-1.37)	$4.52 \times 10^{-3}$	$3.57 \times 10^{-1}$
9	2p23	ALK	rs7577363	A	0.03	$1.14 \times 10^{-4}$	2.14 (1.43-3.20)	$1.21 \times 10^{-2}$	1.44 (1.08-1.92)	$3.15 \times 10^{-3}$	1.34 (1.11-1.62)	$7.37 \times 10^{-5}$	1.37 (1.17-1.61)	$9.22 \times 10^{-1}$	$1.38 \times 10^{-1}$
10	1p22	FAM69A	rs7538563	A	0.38	$2.53 \times 10^{-5}$	1.34 (1.16-1.55)	$2.48 \times 10^{-2}$	1.14 (1.02-1.27)	$2.17 \times 10^{-3}$	1.08 (1.01-1.16)	$9.12 \times 10^{-5}$	1.12 (1.06-1.18)	$5.09 \times 10^{-4}$	$1.39 \times 10^{-1}$
11	1p22	FAM69A	rs11164838	C	0.57	$6.01 \times 10^{-5}$	1.32 (1.15-1.52)	$3.28 \times 10^{-3}$	1.18 (1.06-1.32)	$1.30 \times 10^{-2}$	1.09 (1.02-1.16)	$1.91 \times 10^{-4}$	1.11 (1.05-1.18)	$3.56 \times 10^{-4}$	$4.23 \times 10^{-2}$
12	9p24	ANKRD15	rs10975200	G	0.18	$8.05 \times 10^{-3}$	1.26 (1.06-1.50)	$9.95 \times 10^{-6}$	1.37 (1.19-1.58)	$2.12 \times 10^{-2}$	1.11 (1.02-1.21)	$3.23 \times 10^{-4}$	1.14 (1.06-1.23)	$1.62 \times 10^{-1}$	$1.62 \times 10^{-2}$
13	1p22	EV15	rs10735781	G	0.38	$2.21 \times 10^{-1}$	1.29 (1.12-1.50)	$6.05 \times 10^{-3}$	1.17 (1.05-1.30)	$2.01 \times 10^{-2}$	1.08 (1.01-1.16)	$3.35 \times 10^{-4}$	1.11 (1.05-1.18)	$1.93 \times 10^{-2}$	$3.33 \times 10^{-3}$
14	1p22	EV15	rs6880578	T	0.38	$3.46 \times 10^{-1}$	1.29 (1.11-1.49)	$4.88 \times 10^{-3}$	1.17 (1.05-1.31)	$1.86 \times 10^{-2}$	1.09 (1.01-1.16)	$5.00 \times 10^{-4}$	1.11 (1.04-1.17)	$2.19 \times 10^{-2}$	$4.21 \times 10^{-3}$
15	12p13	KLRB1	rs4763655	A	0.38	$4.55 \times 10^{-2}$	1.15 (1.00-1.32)	$2.16 \times 10^{-3}$	1.19 (1.07-1.33)	$1.83 \times 10^{-2}$	1.09 (1.01-1.16)	$6.85 \times 10^{-4}$	1.10 (1.04-1.17)	$2.61 \times 10^{-1}$	$7.65 \times 10^{-2}$
16	3q13	CBLB	rs12487066	T	0.73	$7.65 \times 10^{-3}$	1.22 (1.05-1.41)	$4.09 \times 10^{-5}$	1.29 (1.14-1.46)	$3.53 \times 10^{-2}$	1.08 (1.00-1.16)	$5.43 \times 10^{-3}$	1.09 (1.03-1.16)	$1.14 \times 10^{-1}$	$2.32 \times 10^{-2}$
17	1p31	PDE4B	rs1321172	C	0.49	$8.77 \times 10^{-2}$	1.12 (0.98-1.27)	$9.57 \times 10^{-3}$	1.15 (1.04-1.26)	$3.95 \times 10^{-2}$	1.07 (1.01-1.14)	$6.06 \times 10^{-3}$	1.08 (1.02-1.14)	$2.36 \times 10^{-1}$	$2.16 \times 10^{-1}$

## Remark

### 日本人MSには適応が難しい

佐藤 準一

多因子疾患は、複数の遺伝子変異と環境因子の相互作用により発症が規定される。個々の疾患関連遺伝子多型(SNP)は単独では浸透率が低く、発症を誘導しない。しかしこのようなSNPsと環境因子が複数共存すると、疾患としての表現型(phenotype)が誘導される。従来の研究では、罹患者を2人以上有する家系(罹患同胞対など)を多数収集し、マイクロサテライトマーカー(全ゲノムで数万個)を指標に候補遺伝子座(ロッドスコア>3.0)を同定する連鎖解析(linkage analysis)が主流であったが、多数の家系が必要で検出感度が低かった。SNP(対立遺伝子の頻度の低いアレルの頻度が1%以上)はゲノム上に高密度に存在(全ゲノムで数百万個)し、マイクロアレイが普及してハイスループットスクリーニングが可能となり、ゲノムワイ

ドの関連解析が容易となった。本研究ではヨーロッパ系非ヒスパニック白人MSと健常者の膨大なサンプルで統計学的検出力を高めてGWA解析を行い、IL2RA、IL7RAのSNPとMSの連関を見いだした。しかし同定された個々のnon-MHC SNPsはp値が高く、関与は軽微と判断された。

MSは再発を反復し、多巣性病巣を認める中枢神経系炎症性脱髄疾患と定義されるが、不均一な病因に起因する疾患群と考えられる。本研究ではRRMS、SPMS、PPMS、CIS(MRIで視神経・脊髄・脳幹・小脳に2病巣以上)を一括してMSとしたが、これらが同一のgenetic backgroundを有するというエビデンスはない。また抗AQP4抗体を測定していないため、neuromyelitis optica(NMO)混入の可能性を否定できない。したがってサブグループ別のGWA解析が必要となる。またSNPアレル頻度の人種差(ethnic differences)を考慮すると、本研究の結果は日本人MSには適応困難と思われる。

