

nervous system was due not to hypoxia but to the anti-Hu syndrome.

The characteristic pathological findings of anti-Hu syndrome with pulmonary SCC are neuronal loss with reactive gliosis, microglial proliferation, and perivascular lymphocytic cuffing (9). In the present case, neuronal loss with gliosis and lymphocytic infiltration in the brain including brain stem, cerebellum, and spinal cord was confirmed. It was indicated that neuropathological features in anti-Hu paraneoplastic neurological syndromes caused by esophageal SCC were similar to those by pulmonary SCC.

During the course of the anti-Hu syndrome, multiple areas of the nervous system became involved in 70% of the patients (2, 3). However, only a limited number of neuropathological studies of anti-Hu syndrome with multiple areas involvement has been reported (6, 7). Multiple neuropathological lesions correlated with the multiple clinical symptoms were confirmed in the present case. Neurological complications, mostly ventilatory failure and dysautonomia, appear to be the most common causes of death (3), as in the present case.

Because the symptoms of anti-Hu syndrome tend to occur before tumor detection, it is important to know the candidate organs for the primary site. Esophageal SCC is one of the common sites of extrapulmonary SCC (10). However, there have been reports of a few paraneoplastic syndrome cases with esophageal carcinoma (11-15). Moreover, anti-Hu syndrome with esophageal carcinoma was reported in only 1 of 200 patients without pathological study (2). Therefore, to the best of our knowledge, this is the first detailed report of anti-Hu syndrome related to esophageal SCC. The present case showed that esophageal SCC could be a cause of the anti-Hu syndrome. It is necessary to consider esophageal SCC as a candidate primary lesion responsible for anti-Hu syndrome.

The authors state that they have no Conflict of Interest (COI).

Acknowledgement

The authors would like to thank Dr. Osamu Watanabe in Kagoshima University for measurement of anti-VGKC antibody.

References

1. Sillevs Smitt P, Grefkens J, de Leeuw B, et al. Survival and outcome in 73 anti-Hu positive patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. *J Neurol* **249**: 745-753, 2002.
2. Graus F, Keime-Guibert F, Reñe R, et al. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* **124**: 1138-1148, 2001.
3. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine (Baltimore)* **71**: 59-72, 1992.
4. Remick SC, Ruckdeschel JC. Extrapulmonary and pulmonary small-cell carcinoma: tumor biology, therapy, and outcome. *Med Pediatr Oncol* **20**: 89-99, 1992.
5. Levenson RM Jr., Ihde DC, Matthews MJ, et al. Small cell carcinoma presenting as an extrapulmonary neoplasm: sites of origin and response to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* **67**: 607-612, 1981.
6. Heidenreich F, Schober R, Brinck U, Hartung HP. Multiple paraneoplastic syndromes in a patient with antibodies to neuronal nucleoproteins (anti-Hu). *J Neurol* **242**: 210-216, 1995.
7. Yamada M, Inaba A, Yamawaki M, et al. Paraneoplastic encephalo-myelo-ganglionitis: cellular binding sites of the antineuronal antibody. *Acta Neuropathol* **88**: 85-92, 1994.
8. Tanaka M, Maruyama Y, Sugie M, Motizuki H, Kamakura K, Tanaka K. Cytotoxic T cell activity against peptides of Hu protein in anti-Hu syndrome. *J Neurol Sci* **201**: 9-12, 2002.
9. Farrugia ME, Conway R, Simpson DJ, Kurian KM. Paraneoplastic limbic encephalitis. *Clin Neurol Neurosurg* **107**: 128-131, 2005.
10. Kim KO, Lee HY, Chun SH, Shin SJ, et al. Clinical overview of extrapulmonary small cell carcinoma. *J Korean Med Sci* **21**: 833-837, 2006.
11. Cox PM, Vazir MH, Petty RK, Law S, Dhillon AP. Cerebellar cortical degeneration in association with small-cell carcinoma of the oesophagus. *Neuropathol Appl Neurobiol* **15**: 175-183, 1989.
12. Gritzman MC, Fritz VU, Perkins S, Kaplan CL. Motor neuron disease associated with carcinoma. A report of 2 cases. *S Afr Med J* **63**: 288-291, 1983.
13. Sutton II, Fursdon Davis CJ, Esiri MM, Hughes S, Amyes ER, Vincent A. Anti-Yo antibodies and cerebellar degeneration in a man with adenocarcinoma of the esophagus. *Ann Neurol* **49**: 253-257, 2001.
14. Dodgson MC, Hoffman HL. Sensory neuropathy associated with carcinoma of the esophagus; report of a case. *Ann Intern Med* **38**: 130-135, 1953.
15. Khealani BA, Qureshi R, Wasay M. Motor neuronopathy associated with adenocarcinoma of esophagus. *J Pak Med Assoc* **54**: 165-166, 2004.

MYOSITIS WITH ANTIMITOCHONDRIAL ANTIBODIES DIAGNOSED BY RECTUS ABDOMINIS MUSCLE BIOPSY

TAKESHI UENAKA, MD,¹ HISATOMO KOWA, MD, PhD,¹ KENJI SEKIGUCHI, MD, PhD,¹ KAKUYA NAGATA, MD,¹ YOSHIHISA OHTSUKA, MD,¹ FUMIO KANDA, MD, PhD,¹ and TATSUSHI TODA, MD, PhD¹

Division of Neurology, Kobe University Graduate School of Medicine and Kobe University Hospital, 7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-Ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan

Accepted 14 November 2012

ABSTRACT: *Introduction:* Antimitochondrial antibodies are autoantibodies detected in 90% of primary biliary cirrhosis (PBC) patients. Some PBC cases are complicated by myositis, which is difficult to confirm due to minimal histological evidence of inflammation in limb muscles. *Methods:* Our aim was to determine the extent of inflammatory changes in a truncal muscle biopsy specimen from a PBC patient. *Results:* A 48-year-old woman with a 5-year history of atrial fibrillation and chronic heart failure was evaluated for elevated serum creatine kinase level. Antimitochondrial M2 antibodies were detected, and PBC was diagnosed. A biceps brachii biopsy specimen showed mild, non-specific myogenic changes; a second biopsy was performed on the rectus abdominis muscle, which showed typical inflammatory changes. Myositis with antimitochondrial M2 antibodies was confirmed. *Conclusions:* In myositis patients with antimitochondrial M2 antibodies, muscles of the extremities are involved to a lesser extent. Radiological and histological examination focusing on truncal muscles, including a biopsy, is important.

Muscle Nerve 47:766–768, 2013

Primarily biliary cirrhosis (PBC) is known to be associated with a rare complication of myositis. Recently, a small number of patients with myositis and PBC have been reported in the literature, with clinical characteristics that differ from those of classical polymyositis (e.g., some reports showed only sparse infiltrates in biopsy specimens from the extremities^{1–4} and more severe heart/respiratory failure^{5,6}). In this report, we describe a 48-year-old woman with mild muscle weakness and severe heart failure who was diagnosed by histological study of a rectus abdominis muscle biopsy specimen.

CASE REPORT

In August 2006, a 48-year-old Japanese woman visited a local hospital complaining of palpitation and dyspnea on exertion. She was diagnosed with atrial fibrillation that recovered to normal sinus rhythm with cardioversion. Her serum creatine kinase concentration was elevated at that time (600–

1000 IU/L). In July 2007, she was admitted for catheter ablation for relapse of atrial fibrillation. Six months later she was readmitted for congestive heart failure. In 2010, the patient felt increasing fatigue after standing and lifting bags. In December 2010, she was admitted again for treatment of an exacerbation of chronic heart failure. After further examination, she was diagnosed with cardiomyopathy of unknown etiology (the coronary angiogram was normal, and a biopsy specimen from the myocardium showed non-specific fibrosis). Systemic myopathy was suspected as the potential cause of the cardiomyopathy, and the patient was referred to our department for intensive examination and treatment.

Physical examination indicated irregular heart sounds without murmur. The patient's abdomen was flat and mildly firm without any tenderness. Neurological examination revealed mild weakness in proximal limb and trunk muscles (grade 4/5 on manual muscle testing), with slightly reduced deep tendon reflexes. She did not complain of any problems with standing, routine gait, or autonomic failure. Warfarin, furosemide, spironolactone, sodium ferrous citrate, and candesartan were prescribed.

Laboratory findings were as follows: white blood cell count 4000 cells/mm³; hemoglobin 9.2 g/dl; platelets 79 × 10³ platelets/mm³; total bilirubin 1.2 mg/dl; aspartate aminotransferase 37 IU/L; alanine aminotransferase 33 IU/L; alkaline phosphatase 790 IU/L; C-reactive protein 0.5 mg/dl, and erythrocyte sedimentation rate 62 mm/h. Serum creatine kinase and aldolase levels were 351 IU/L (normal 46–168 IU/L) and 8.9 IU/L (normal 2.2–5.5 IU/L), respectively, and brain natriuretic peptide levels were elevated (121.04 pg/ml). Vitamin B₁₂ levels were low (192 pg/ml). Results were negative for antinuclear antibodies, anti-U1-ribonucleoprotein, anti-SS-A, anti-SS-B, and anti-Jo-1. The patient had positive antimitochondrial antibodies at a titer of >1:80 and antibodies to mitochondrial M2 at titers of 137.3 IU/L (normal <7.0 IU/L). Arterial blood gas analysis showed mild hypercapnea of 46.8 mm Hg (normal 32–46

Abbreviations: FEV₁, forced expiratory volume in 1 second; PBC, primary biliary cirrhosis; VC, vital capacity

Key words: antimitochondrial antibody; anti-M2 antibody; cardiac complication; polymyositis; primary biliary cirrhosis

Correspondence to: T. Uenaka; e-mail: onlytan@med.kobe-u.ac.jp

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 21 November 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/mus.23730

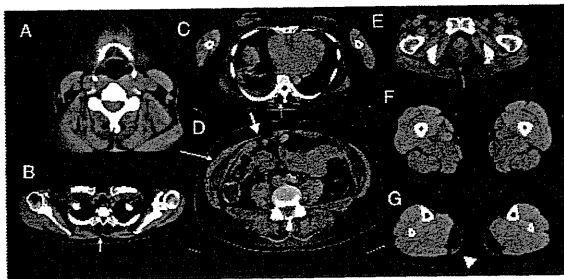


FIGURE 1. Limb and abdominal computed tomography shows bilateral fatty displacement of the rectus abdominis (short, thick arrow), abdominal obliques (long, thin arrow), paravertebral (short, thin arrow), and gastrocnemius (arrow head) muscles. Slices are at the levels of thyroid cartilage (A), acromion (B), mid-thoracic (C), hypogastrium (D), pubic symphysis (E), mid-thigh (F), and upper third of the leg (G), respectively.

mm Hg; i.e., 4.27–6.00 kPa), and electrocardiography showed atrial fibrillation. Furthermore, chest radiography and computed tomography indicated cardiomegaly and congestion in both lungs, but there was no interstitial pulmonary fibrosis.

Echocardiography showed dilation of the left atrium, hypokinesis of the posterior–inferior region beyond 1 coronary territory, low ejection fraction (44%), and mild pulmonary hypertension (44 mm Hg). A respiratory function test showed reduced vital capacity (1520 ml, VC = 49.7%) and normal forced expiratory volume in 1 second ($FEV_1 = 78.3\%$). Abdominal ultrasonography showed mild hepatomegaly with splenomegaly, and the patient was diagnosed clinically to have primary biliary cirrhosis (PBC) based on elevated hepatic enzymes and anti-M2 antibodies. Splenomegaly was probably due to PBC. She did not accept a liver biopsy. Needle electromyography of proximal muscles showed mild fibrillation potentials and positive sharp waves. Abdominal and limb computed tomography showed fatty replacement of bilateral rectus abdominis, abdominal oblique, paravertebral, and gastrocnemius muscles (Fig. 1).

Histological study of a muscle biopsy specimen taken from the patient's left biceps brachii showed near-normal morphology, with no necrosis or regenerative fibers and few mononuclear-cell infiltrations. Subsequently, an additional biopsy specimen was taken from the rectus abdominis muscle and showed necrotic and regenerating fibers with 1 large infiltrate of CD4-positive mononuclear cells and fat (Fig. 2).

We started treatment with prednisolone (1 mg/kg/day) and ursodeoxycholic acid (600 mg/day). Subsequently, the patient had marked improvement in dyspnea on exertion, serum muscle enzyme levels, and ejection fraction (60% 1 month after treatment). Two months later, her VC also

improved (2150 ml, VC = 70.3%). Her anemia and low platelet count improved after intravenous vitamin B₁₂ supplementation, suggesting that her pancytopenia was due to vitamin B₁₂ deficiency.

DISCUSSION

Maeda *et al.*⁷ reported that myositis with anti-M2 antibodies accounts for 10% of all inflammatory myopathy cases. Anti-M2 antibody-related myositis exhibits specific features, such as a chronic clinical course, cardiomyopathy with arrhythmia and left ventricular systolic dysfunction, muscle atrophy primarily in truncal muscles, improved symptoms with prednisolone administration (monophasic course), and arrhythmia that worsens when left untreated. Our patient showed similar characteristics of myositis with anti-M2 antibodies, including moderate congestive heart failure and refractory arrhythmia, and the time period from onset of arrhythmia to diagnosis of myositis with anti-M2 antibodies was 5 years.⁷

In a case of inflammatory myopathy, histological confirmation of the diagnosis is essential before initiating immunosuppressive treatment with glucocorticoids due to the possibility of associated side effects. The muscle biopsy specimen typically shows a mixture of necrosis and regeneration of muscle fibers with lymphocytic infiltration. Although inflammatory myopathies are systemic disorders, pathological processes develop heterogeneously. In some cases, typical findings of myositis are not seen in muscle biopsy specimens due to sampling error. Consequently, biopsy site localization is important to obtain useful information for histological diagnosis.

In patients with myositis with anti-M2 antibodies, abnormal clinical and pathological findings are often more evident in truncal muscles than in the extremities. In some reports,^{2,4} biopsy of the biceps/quadriceps did not show any characteristics of active inflammatory changes; the investigators suspected that chronicity of the condition (i.e., the biopsy was performed too late) and/or immunosuppressive therapy affected the findings. In our patient the first muscle biopsy performed on her

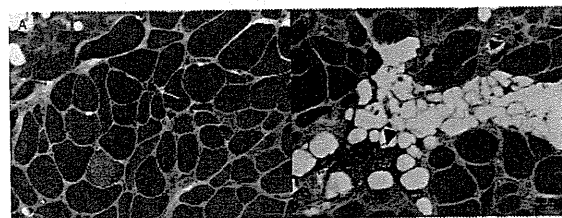


FIGURE 2. (A, B) Rectus abdominis muscle biopsy shows necrotic (black arrow) and regenerating fibers (yellow arrow) with endomysial infiltration (black arrow head) of mononuclear cells and fat. There were many fibers with internal nuclei. (hematoxylin and eosin stain; original magnification $\times 200$). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

left biceps brachii provided no useful diagnostic information. In myositis patients with anti-M2 antibodies, frequent truncal muscle involvement by has been reported, as demonstrated by computed tomography.⁷ In addition, the fatty changes in her gastrocnemius muscles were so extensive that we could not expect to find specific inflammatory changes. Thus, we performed the second muscle biopsy on the rectus abdominis and obtained characteristic findings that confirmed our diagnosis. Immunotherapy using glucocorticoids immediately improved the patient's clinical symptoms and laboratory data. Her cardiac and respiratory failure also improved promptly with treatment.

Myositis with anti-M2 antibodies is difficult to diagnose because of its complex clinical features and unusual distribution of inflammatory changes in the affected muscles. For accurate diagnosis, it is essential to obtain an appropriate sample for histological assessment. After myositis with anti-M2 antibodies is confirmed, treatment with glucocorticoids is effective to address not only muscle symptoms but also cardiac complications.

The authors thank Dr. Meiko Hashimoto Maeda and Dr. Jun Shimizu (Department of Neurology, University of Tokyo) for their valuable suggestions, information, and discussion. We also thank Chiyomi Ito and Dr. Motoi Kanagawa for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Sato T, Kato J, Sato Y, Iyama S, Takada K, Oku T, et al. A case of primary biliary cirrhosis with HLA-DR 8 complicated by polymyositis. *Liver* 2003;44:455–459.
2. Saitoh S, Yamada S, Takagi H, Abe T, Takezawa J, Nagamine T, et al. A male autopsy case of primary biliary cirrhosis associated with polymyositis and congestive cardiomyopathy. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1988;85:287–291.
3. Kurihara Y, Shishido T, Oku K, Takamatsu M, Ishiguro H, Suzuki A, et al. Polymyositis associated with autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, and autoimmune thrombocytopenic purpura. *Mod Rheumatol* 2011;21:325–329.
4. Migucletto BC, Neto AE, Domingus EZ, Neves de Castro PP, Stocker H, Marie SK, et al. Primary biliary cirrhosis and myopathy: an uncommon association. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1999;54:165–168.
5. Varga J, Heiman-Patterson T, Munoz S, Love LA. Myopathy with mitochondrial alterations in patients with primary biliary cirrhosis and antimitochondrial antibodies. *Arthritis Rheum* 1993;36:1468–1475.
6. Matsui K, Aizawa Y, Inoue K, Yaguchi H, Toda G. Polymyositis with marked paravertebral muscle atrophy in patients with primary biliary cirrhosis. *Rinsho Shinkeigaku* 2000;40:694–700.
7. Maeda MH, Tsuji S, Shimizu J. Inflammatory myopathies associated with anti-mitochondrial antibodies. *Brain* 2012;135:1767–1777.

THE FROMENT–RAUBER NERVE: A CASE REPORT AND REVIEW

JOSEPH H. KAMERATH, MD,¹ DAVID K. EPSTEIN, MD,² and KEVIN F. FITZPATRICK, MD³

¹Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Walter Reed National Military Medical Center, Bethesda, Maryland, USA

²Department of Neurology, Naval Medical Center Portsmouth, Portsmouth, Virginia, USA

³Mount Vernon Rehabilitation Medicine Associates, Alexandria, Virginia, USA

Accepted 27 November 2012

ABSTRACT: *Introduction:* The Froment–Rauber nerve is a rarely described anomalous nerve arising from 1 of the terminal branches of the radial nerve that provides innervation to intrinsic hand muscles. We describe a 26-year-old man who had a traumatic radial nerve injury that resulted in first dorsal interosseous muscle wasting. He presented to our clinic 2.5 years post-injury, after having had unnecessarily undergone surgical exploration of the ulnar nerve. *Methods:* The patient's history, clinical examination, and multiple electrodiagnostic tests were reviewed. *Results:* All findings were consistent with a diagnosis of anomalous innervation via a Froment–Rauber nerve. *Conclusions:* Understanding this rare phenomenon may aid in diagnosing confusing clinical cases and prevent unnecessary procedures.

Muscle Nerve 47:768–771, 2013

Abbreviations: AIN, anterior interosseous nerve; CMAP, compound motor action potential; EDx, electrodiagnostic examination; FDI, first dorsal interosseous muscle; PIN, posterior interosseous nerve; SRN, superficial radial nerve

Disclosure: The authors thank Eleni H. Aldridge and Thomas R. Piers for their artwork. The views expressed in this article are those of the authors and do not necessarily reflect the official policy or position of the Department of the Army, Department of the Navy, Department of Defense, nor the U.S. Government.

Key words: anomalous innervation; first dorsal interosseous; Froment–Rauber nerve; posterior interosseous neurectomy; superficial radial nerve

Correspondence to: J.H. Kamerath, 3615 Holiday Drive SE, Olympia, WA 98501; e-mail: jkamerath@gmail.com

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.
Published online 29 November 2012 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/mus.23741

Variations in innervation of the intrinsic hand muscles are well known and include the Martin–Gruber and Riche–Cannieu anastomoses. Understanding these variations is important for proper diagnosis and treatment. The Froment–Rauber nerve is a lesser known variant in intrinsic hand innervation. It is a rarely described anomalous branch of either the posterior interosseous nerve (PIN) or superficial radial nerve (SRN) that provides innervation to intrinsic hand muscles, typically the first dorsal interosseous (FDI), but other muscles may also receive innervation from this anomaly.¹

CASE REPORT

We describe a 26-year-old, right-hand-dominant man who had a gunshot wound to the right arm resulting in a humeral fracture. He underwent surgical exploration and fracture repair. The operative report was not available, and there was no record of nerve injury. He was noted to have a wrist drop and was referred for electrodiagnostic examination (EDx) 3 months after his injury.



パーソナルゲノム研究と神経疾患 — overview

Personal Genome Research and Neurological Diseases: Overview

戸田 達史*

Tatsushi Toda*

Abstract

Neurological diseases include those caused by a single defective gene, e.g., Huntington's disease, other polyglutamine diseases, and muscular dystrophies, and those that are mostly sporadic but rarely show Mendelian inheritance in some families, e.g., Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and epilepsy. The latter diseases are considered polygenic disorders. Both sporadic and Mendelian cases of these diseases are believed to share some common pathological mechanisms. Since the detection of causal genes for the Mendelian cases, studies have been initiated on disease pathology. SNPs and rare gene variants play important roles in common neurological diseases. From a technological perspective, next-generation sequencers have become widely available and have contributed to the advancement of research based on individual genome sequences (personal genome). This paper presents an overview, as well as a historical context, of the contribution of personal genome research to neurological disease studies.

Key words : GWAS, rare variant, next-generation sequencer, neurological disease, personal genome

はじめに

神経疾患には、ハンチントン病など各種のポリグルタミン病、各種の筋ジストロフィーなどのように単一遺伝子の異常によるものと、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、てんかんなどのように、患者の大部分は孤発性だが一部にメンデル遺伝をとる家系が存在するものがある。後者は生活習慣病などと同様に多因子遺伝性疾患と考えられている。後者のうち孤発性のももメンデル遺伝性のもも、一部共通の発症メカニズムが存在していると考えられ、このうちメンデル遺伝を示すものは原因遺伝子が明らかにされており、それらを切り口にして病態解明が進んでいる。一方、テクノロジーの進展はめざましく、次世代シーケンサーが実用化され個々のゲノム配列（パーソナルゲノム）をもとにした研究が展開されるようになってきている。本稿ではパーソナルゲノム研究が神経疾患解明に与えるものにつ

いて歴史的な経緯も含めて述べる。

I. 単一遺伝性神経変性疾患原因遺伝子の同定と共通の分子機構

1990年代以降ポジショナルクローニングによって、単一遺伝性疾患としての遺伝性神経変性疾患の病因遺伝子の解明は急速に進んだ。単一遺伝子による遺伝性疾患に関しては、染色体上に存在する遺伝マーカーを用いた連鎖解析により原因遺伝子の存在場所が決定され、それが狭められ、続いてその領域に存在する遺伝子で患者家系の変異解析が行われる手法で、多数の原因遺伝子が同定されてきた。この種の連鎖解析法では遺伝形式、遺伝子頻度、浸透率などのパラメーターを必要とするのでパラメトリック連鎖解析と呼ばれる。

遺伝学上の歴史的なものとしてデュシェンヌ型筋ジストロフィー原因蛋白ジストロフィン、ハンチントン病原因蛋白ハンチンチンなどが挙げられるが、他に、家族性

* 神戸大学大学院医学研究科神経内科学〔〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-1〕Division of Neurology, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan

アルツハイマー病, 前頭側頭型認知症, 家族性パーキンソン病, 脊髄小脳変性症, 筋萎縮性側索硬化症など枚挙にいとまがない。ハンチントン病原因遺伝子などから CAG リピート病の概念も生まれ, さらに各種の脊髄小脳変性症原因遺伝子も同定されていった。CAG はグルタミンをコードするため, 翻訳領域内にみられるものはポリグルタミン病とも総称される。筆者らも日本に特異的に多い福山型筋ジストロフィーの原因遺伝子フクチンを同定し, 本症が約 100 世代前の 1 人の祖先に起きたレトロトランスポゾン変異が広がった初めての疾患であることを見出した。

単一遺伝性疾患については, 数多くの病因遺伝子が同定されたことを受けて, 研究の焦点は, その病態機序を解明することに移ってきており, 原因療法の開発が射程距離に入ったものも多い。ポリグルタミン病では異常伸長ポリグルタミン鎖はコンフォメーション変化を生じた結果, 異常伸長鎖特異的な蛋白質間相互作用を獲得したり, あるいは難溶性のポリグルタミン蛋白質凝集体からなる細胞内封入体を形成することが明らかにされている。つまり異常伸長ポリグルタミン鎖の凝集体を形成しやすい性質と細胞毒性とは密接に関連していると考えられている。この現象は, 凝集体の構成成分は異なるが, アルツハイマー病, パーキンソン病, 筋萎縮性側索硬化症, プリオン病などで共通しており, 異常蛋白質の凝集・蓄積が神経変性を引き起こすという共通の分子機構が考えられている。アルツハイマー病ではアミロイド β 凝集阻害をめざした抗体療法¹⁾, 筋ジストロフィーではスプライスを変更させ正常化するアンチセンス療法^{2,3)}などが試みられており, 一部はフェーズ III に至っているものもある。

II. 多因子疾患と common disease-common variants 仮説

このような分子遺伝学的研究の成果は, これまでは主として単一遺伝子疾患に対して得られてきていたが, 最近では, 遺伝性が明確でない, 孤発性の疾患に対しても研究が進んでいる。その背景には, ヒトゲノムの多様性が, さまざまな疾患の発症や, 薬効, 薬剤副作用に関する個人差に関わっているとの考えがあるからである。

生活習慣病で代表されるような多因子疾患については, common disease-common variants 仮説に基づいた関連解析 (ゲノムワイド関連解析 genome-wide association study: GWAS) により, 疾患感受性遺伝子の同定をめざした研究が盛んになってきている。Fig. 1 に

ゲノム配列の多様性からみた疾患の発症機構を示す⁴⁾。

単一遺伝子疾患では, 特定の遺伝子に病因となる変異が生じることで発症する。このような疾患では, 遺伝子変異によるオッズ比は非常に高いことになる。一方, 高血圧, 糖尿病などの生活習慣病と呼ばれる疾患は, 複数の遺伝的な要因 (疾患感受性遺伝子) と生活習慣などの環境要因が複合的に作用して発症すると考えられている。このような頻度の高い疾患では, 誰もがこのような疾患感受性遺伝子の多型をある程度有している可能性が高いと考えられ, 疾患感受性遺伝子に関連する多型による疾患発症のオッズ比は低いものとなる。このように, 誰もが持っているような多型性が, 疾患の発症に関与するという考え方は, common disease-common variants 仮説と呼ばれる (Fig. 1)。

III. ゲノムワイド関連解析 (GWAS)

2006 年以降, common disease の感受性遺伝子の探索研究は新しい段階を迎えた。これをもたらした主要因は 2 つの基盤整備である。まず情報基盤として, dbSNP や HapMap 計画で代表されるように, ヒトゲノム全域にわたる膨大な多様性情報が集積されてきた。次に技術基盤として, 数十万種の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を数千もの個体について並列解析できるプラットフォームが市販化された。

HapMap 計画によると, 日本人と白人は約 25 万~30 万個のタグ SNP (これを調べれば連鎖不平衡で結ばれた近傍の多くの SNP の代表になる) で, ほぼ全ゲノムの遺伝子がカバーされる。つまり約 30 万個のタグ SNP を患者と対照で調べれば, ほぼ全ゲノムの遺伝子を調べたことになる。そこで具体的には, 例えば患者 1,000 人, 対照 1,000 人, 計 2,000 人のそれぞれ 50 万個の SNP の遺伝子型を決定する。すなわち SNP チップとして 2,000 枚の実験を行う。それぞれ SNP-1, SNP-2, …… , SNP-500000 ずつ, 患者, 対照におけるそれぞれのアレルの出現頻度を合計し, 偏りがないかどうかの検定を行うのである。

これらを活用することによって, GWAS が実用的な戦略となり, 2007 年には『Nature』『Science』誌などに立て続けに成果が発表されることとなった。その後の GWAS による疾患感受性遺伝子の発見ラッシュには目を見張るものがあり, すでに 200 以上の疾患について, ゲノムワイド有意水準 $P < 5 \times 10^{-8}$ をクリアする 1,000 編以上の論文が発表されている。

パーキンソン病を例にとると, 筆者らのグループは患

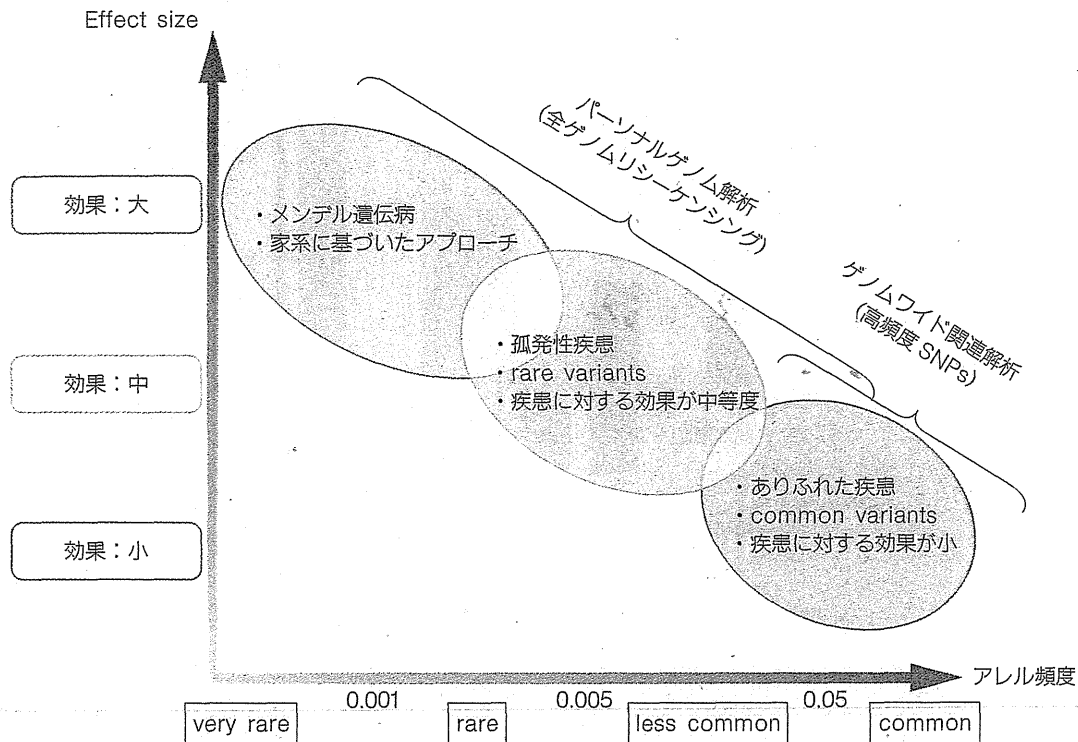


Fig. 1 一般集団における variant の頻度と効果の関係およびそのアプローチのしかた
 左上が単一遺伝性疾患における変異, 右下が SNP, 中間が rare variant を表す。

Tsuji S: Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing. Hum Mol Genet 19(R1): R65-70, 2010 から改変して転載

者の 95% を占める孤発性パーキンソン病のリスク遺伝子を同定するため GWAS を行い, パーキンソン病発症に関わる 2 つの新しい遺伝子座 *PARK16*, *BST1* を同定した。また, 常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子 *α-synuclein*, *LRRK2* の孤発性パーキンソン病への関与を証明した⁹⁾。

さらにパーキンソン病においては, さらなる国際共同研究として欧米の 5 つのグループがそれぞれ独立に行っていた GWAS を合わせてメタ解析を行い (計患者 5,333, 対照 12,019), 有意な SNP をさらに患者 7,053, 対照 9,007 で再現実験を行い, ゲノムワイド有意水準 $P < 5 \times 10^{-8}$ を超える遺伝子を従来の 6 個のほかに, *ACMSD*, *STK39*, *LAMP3*, *SYT11*, *CCDC62* の 5 個同定した⁹⁾。このような圧倒的な数の試料を各地から集めてゲノムワイドメタ解析を行い, より効果サイズの小さなものも同定するという試みが行われだしており, 「第 2 世代の GWAS」ともいわれている。

しかしながら, このような, 頻度の高い common SNPs を用いて見出される疾患感受性遺伝子のオッズ比は多くの場合 2 以下と, あまり大きくなく, 疾患の病態機序の全貌を明らかにするには至っていない (missing

heritability)^{4,7)}。

IV. Missing heritability (失われた遺伝性) と common disease-multiple rare variants 仮説

GWAS によって多数の疾患感受性遺伝子が同定されたものの, それらは遺伝要因全体の一部しか説明できない。

一方, 単一遺伝子疾患と多因子疾患の間には, 単一遺伝子疾患における病因変異ほどではないものの, オッズ比の高い変異が関与する疾患が存在する可能性が考えられる。このような考え方は, common disease-multiple rare variants 仮説と呼ばれる。

ゴーシェ病は, 常染色体劣性遺伝性疾患で, リソソーム内酵素 GBA (グルコセレブロシダーゼ) の遺伝子 *GBA* の変異による酵素活性低下により, グルコシルセラミドをセラミドに分解できず, グルコシルセラミドが体内に蓄積し, 肝脾腫, 貧血, 出血傾向, 骨疾患などを引き起こす脂質代謝異常症である。一見, パーキンソン病とはなんの関係もない疾患ではあるが, 1990 年代後

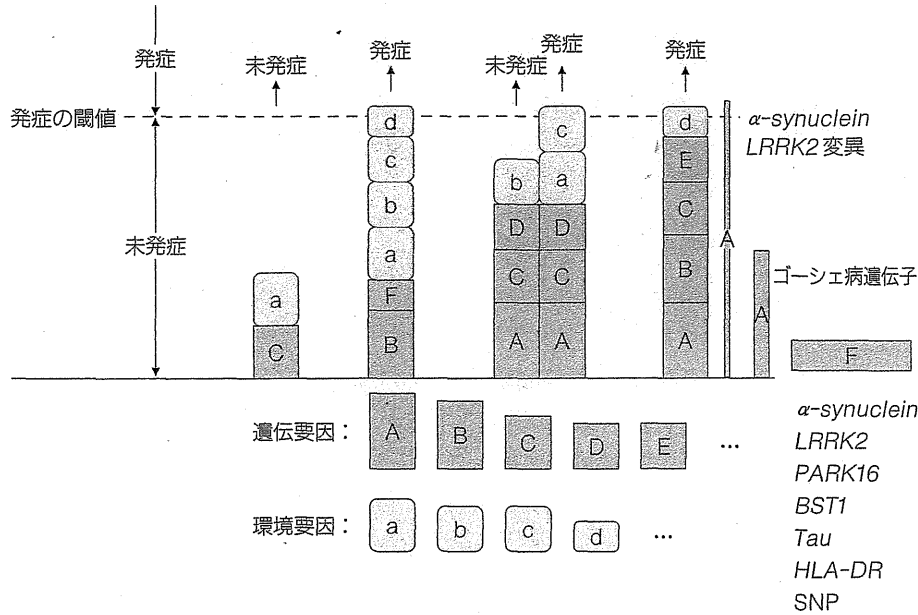


Fig. 2 孤発性神経疾患のモデル

パーキンソン病, アルツハイマー病, または生活習慣病を含むほとんどの疾患は, 複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和が, ある閾値を超えたとき発症すると考えられている。メンデル遺伝性変異以外に, common variantとして *α-synuclein*, *PARK16*, *BST1*, *LRRK2*, *Tau*, *HLA-DR* の SNP が, また rare variantとしてゴーシェ病遺伝子が重要である。

半からパーキンソン病症状を合併するゴーシェ病患者の存在や, ゴーシェ病家系内にパーキンソン病患者が多発するとの報告が散見されていた。そこで, Aharon-Peretzらは, ユダヤ人のパーキンソン病患者について *GBA* 変異の頻度を調べたところ, 孤発性パーキンソン病群では, *GBA* 変異のヘテロ保因者が対照群に比べ有意に多く, *GBA* が孤発性パーキンソン病のリスク遺伝子であることを報告した。

その後, この研究の再現研究が世界中で行われ, 東京大学と筆者らの共同研究グループも, *GBA* 変異が, 日本人でもパーキンソン病感受性を持つことを示す⁹⁾と同時に, 世界多施設共同研究に参画, アメリカ人, フランス人, ポルトガル人, 台湾人などを含む計約 10,000 人の患者対照集団とのメタ解析により, 原著のユダヤ人に限らず, どの人種でも *GBA* 遺伝子はリスクとなり, 平均オッズ比は 5 であり, 確実なパーキンソン病リスク遺伝子であることが示された⁹⁾。*GBA* の基質であるグルコシルセラミドの蓄積により, 神経毒性を持つとされる可溶性 α シヌクレインオリゴマーが増加すること, 可溶性 α シヌクレインオリゴマーの増加により *GBA* の小胞体-ゴルジ輸送が阻害されることによりさらに *GBA* 活性が低下し, 可溶性 α シヌクレインオリゴマーのさらなる増加につながる, といったポジティブフィード

バックの経路が最近報告され, 興味深い¹⁰⁾。

パーキンソン病症例では, 多様な *GBA* のヘテロ接合性変異が見出されており, このような変異は, common SNPs を用いた GWAS では見出しえないもので, リシーケンシングを行ってはじめて見出されたという点に注目したい。

パーキンソン病, アルツハイマー病, または生活習慣病を含むほとんどの疾患は, 複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和がある閾値を超えたとき発症すると考えられている。そのモデルをパーキンソン病を例にとり Fig. 2 に示す。メンデル遺伝性パーキンソン病を引き起こす *α-synuclein* や *LRRK2* の変異はそれ 1 つだけで閾値に到達し発症するが, 対象患者はほとんど存在しないので積み木の幅はととても狭い (とても稀)。ゴーシェ病遺伝子 *GBA* などの rare variant リスクは中等度の高さを持つが, 10% 以下の患者にしか当てはまらないため幅は狭い。一方, SNP はそれ自体のオッズ比は低いがほとんどの患者に当てはまるため, 積み木の幅は広い。いずれも重要である。

V. 次世代シーケンサーの実用化

現在, 次世代シーケンサーという言葉はあちこちで聞

Table 各種次世代シーケンサーのスループット

機種	リード数	リード長	解析塩基数	稼働時間
イルミナ社				
GAIIx	～3億2,000万	150+150	96 Gb	～14日
HiSeq2500	～60億	100+100	600 Gb	～11日
MiSeq	～3,400万	250+250	6～7 Gb	～39時間
ロシュ社				
GS FLX Titanium XL+	100万	700	700 Mb	23時間
GS FLX Titanium XLR70	100万	450	450 Mb	10時間
GS junior	10万	～400	～35 Mb	12時間
ライフテクノロジーズ社				
5500xl SOLiD	>14億	75+35	～180 Gb	8日
Ion PGM	～500万	>100	～1 Gb	～6.8時間
Ion Proton	～8,000万	200	～10 Gb	2～4時間
パシフィックバイオサイエンス社				
PacBio RS	1万	>3,000	5～10 Mb	3.5時間

くし、この特集のテーマにもなっている。次世代シーケンサーには主としてイルミナ社、ロシュ社、ライフテクノロジーズ社のものがあり、それぞれ異なる原理での解析を行っており、また1分子シーケンスと超ロングリードを売りにして2011年に発売されたパシフィックバイオサイエンス社もある。それぞれTableに示すようなスループットを持っている。2003年には1人のゲノムを読むのに、30億ドルの費用と13年の年月がかかったが、今や1回の稼働でヒトゲノム3Gb(1人分)の200倍に相当するような量が読めるのである。

さらに全エクソンをピースで濃縮してエクソンとその周辺を読むエクソーム解析(Fig. 3)と、全ゲノム配列を読む全ゲノム解析がある。ヒトの全ゲノムのリシーケンシングはコスト的にはまだまだ高額であり、現時点ではエクソーム解析が主流であるが、濃縮できない配列もあり、ゲノム解析の技術の進歩には目を見張るものがあるので、将来は全ゲノム解析が中心になると思われる。いわゆる“1,000ドルゲノム”の時代の到来も近い。

代表的なイルミナ社の解析原理を示すと(Fig. 4)、Genome Analyzer (GA) IIxやHiSeq, MiSeqでは、ブリッジPCRという方法を用いて、一本鎖DNA断片のクラスターをフローセル表面に作る。解析の際は、まずサンプルから得たDNA断片の両端に、2種類のアダプター配列(アダプター1, 2)を連結させる。それを一本鎖にして、5'末端(アダプター1の側とする)をフローセル上に固定する。フローセル上には、あらかじめアダプター1, 2と相補的に結合するプライマーが高密度に配置されており、サンプルの一本鎖DNAはアダプター2の側でこのプライマーと補助的に結合することになる(橋がかかったような構造になる)。

この状態でDNAポリメラーゼによる伸長反応のあとに変性させると、フローセル上にはアダプター1側で結合した一本鎖と、アダプター2側で結合した一本鎖ができあがる。この反応を繰り返すことで、狭い面積の中で一本鎖DNAを固定しながら増幅することができる(Fig. 4)。これを鋳型として配列解析を行う。

塩基配列の解析には、蛍光標識したdNTPの取り込みを蛍光顕微鏡によって解析する。このdNTPは3'末端がブロックされており、1回の伸長反応で1塩基しか延ばせない。そのため、1塩基ごとにどのdNTPが取り込まれたかを観察し、蛍光物質とブロックを外して次の伸長反応を行うというステップで、解析を進めていく。シングルリード法ではアダプター1の側からのみ、ペアエンド法ではアダプター1の側と2の側からそれぞれ最大で150bpを解析可能となっている(Fig. 5)。

ヒトなどサイズの大きなゲノムを解析する場合、当然シーケンサーにも大きな総解析塩基数を求められる。イルミナ社のGAIIxやHiSeqが現在市場をリードしているのも、圧倒的な総解析塩基数と、ポリメラーゼによる伸長反応というスタンダードな解析原理を採用しているが故にヒトゲノムのリシーケンスなどに強いためであろう。最近では、イルミナ社のMiSeqやライフテクノロジーズ社のIonシリーズ、ロシュ社のGS juniorなど、総解析塩基数を抑え、アプリケーションを絞る代わりにコストが低く稼働時間が短い次世代シーケンサーが増えている。

VI. 次世代シーケンサーの神経疾患研究への応用

さて、ではこのように隆盛の次世代シーケンサーをど

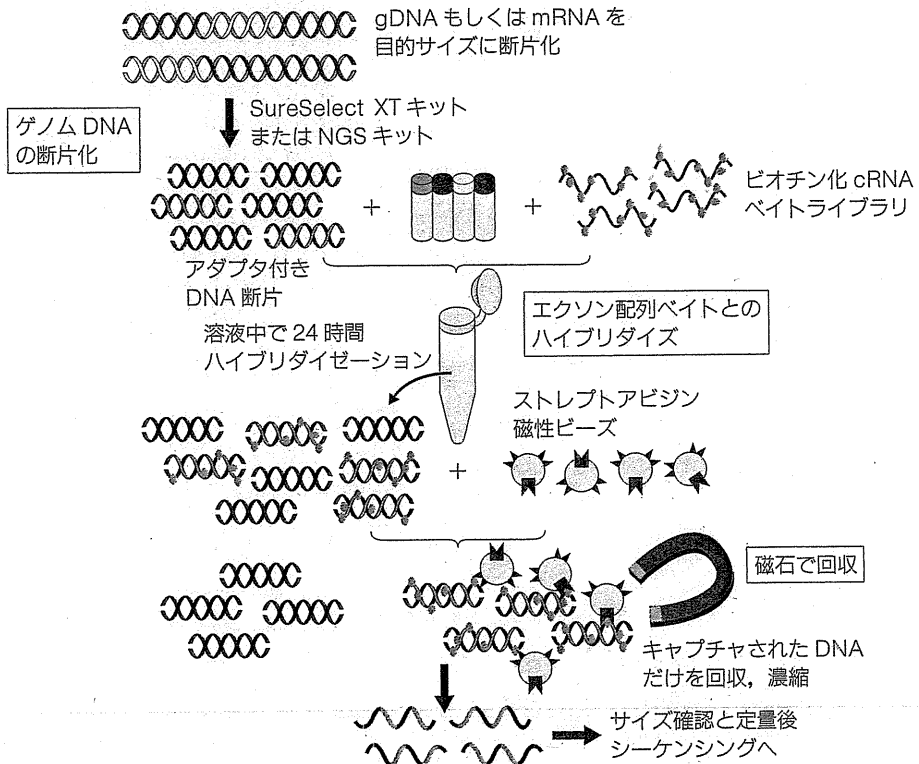


Fig. 3 エクソーム解析の原理

ビーズに全遺伝子の全エクソン配列にほぼ対応するヌクレオチドが搭載されており、解析サンプル DNA を断片化しビーズにハイブリダイズすると、エクソン部分だけが濃縮できる。

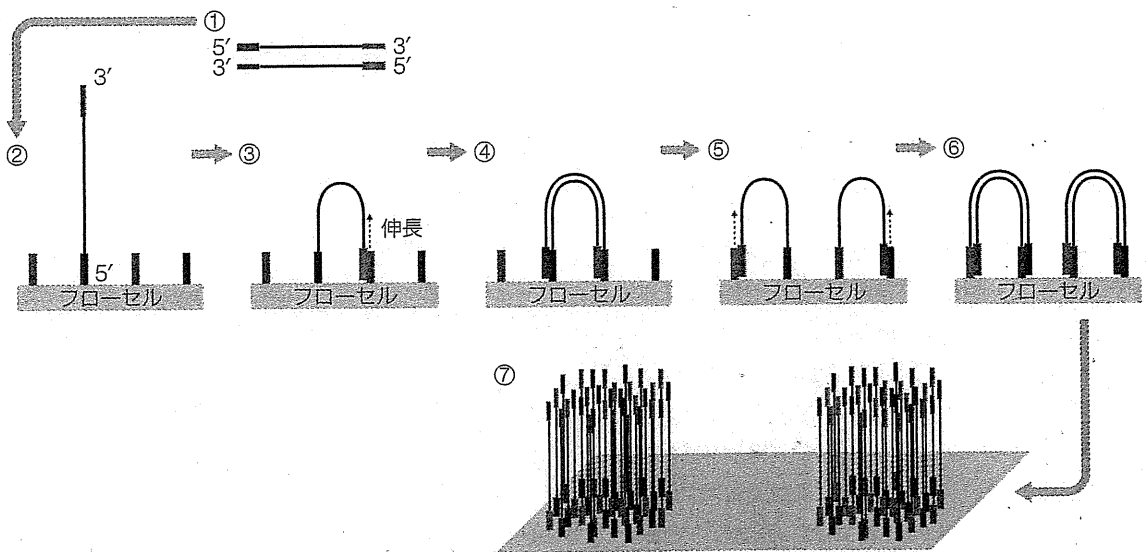


Fig. 4 イルミナ方式 (ブリッジ PCR) の原理

サンプル由来の DNA 断片 (黒線) の両端にアダプター配列を付加し、5' 側アダプター配列を固定したフローセルの上で伸張反応を繰り返す。すると同じ DNA 断片由来のコピー配列が近くに密集し、クラスターを形成する。

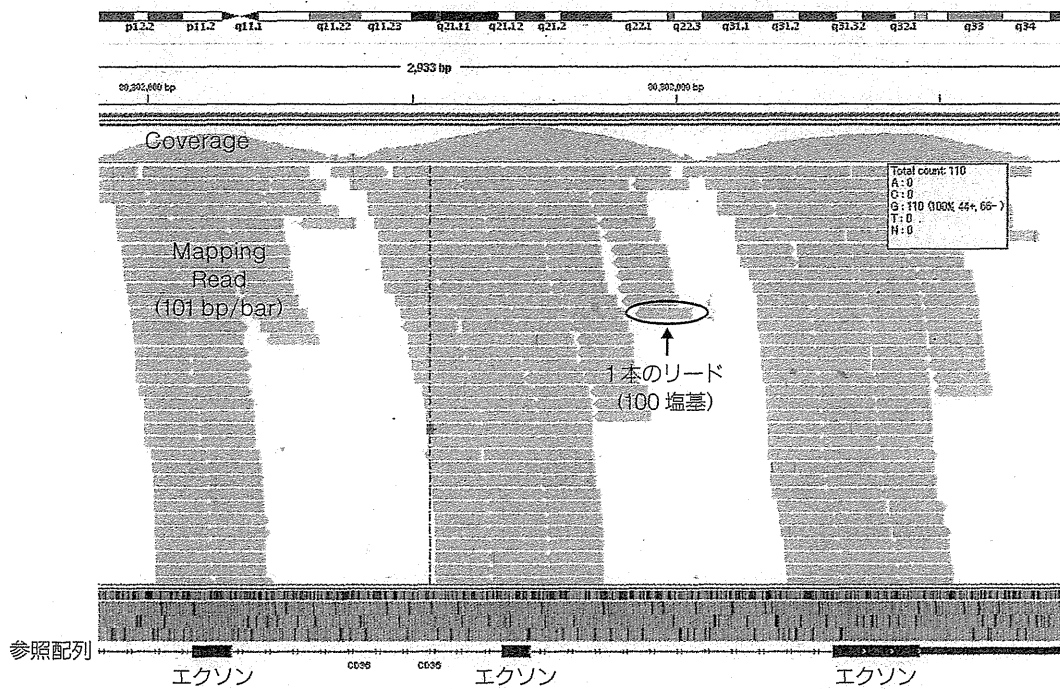


Fig. 5 次世代シーケンサーデータの参照配列へのマッピング

何重にも重複して読む、参照配列へ貼り付けることにより、正確な塩基配列解読と多型および変異の判定を行う。

のように疾患解析に応用するのであろうか。

1. 単一遺伝子疾患

単一遺伝子疾患の病因遺伝子探索については、困難な課題に直面するようになってきていた。それは、1990年代の代表的な疾患ポジショナルクローニングと異なり、疾患遺伝子座を絞り込むのに適した大家系は多くなく、したがって、候補領域の絞り込みが十分できないうえに、これまでのゲノム解析技術では病因遺伝子の同定が著しく困難な疾患が数多く残されている（例えば遺伝性の筋萎縮性側索硬化症やパーキンソン病では50～75%以上が未解明である）。

この問題を克服するためには、候補領域の絞り込みが十分でなくても、いいかえれば家族例の小家系または孤発例だけでも、次世代シーケンサーを駆使した網羅的なゲノム配列解析により、病因遺伝子の同定が可能であると思われる。このようなエクソーム解析により、2010年に、稀なメンデル遺伝病であるミラー症候群¹¹⁾や歌舞伎症候群¹²⁾を皮切りに、単一遺伝子疾患の遺伝子同定が相次いでいる。

神経疾患では、家族性パーキンソン病の *VPS35* 遺伝子¹³⁾、家族性筋萎縮性側索硬化症の新規遺伝子 *profilin 1*¹⁴⁾、近位筋優位の遺伝性運動感覚ニューロパチー (HMSN-P) の疾患遺伝子 TRK-fused gene (*TFG*)¹⁵⁾

などがエクソーム解析によって新規に同定された。

しかしながら、例えば1家系の兄弟例をエクソーム解析しても、共通する一塩基変化 (single nucleotide variation: SNV) は200～300個ほどあるので、連鎖解析などの位置情報や、または症状の非常に似たある程度の数の症例数が必要である。

2. 孤発性多因子疾患

先に述べたように孤発性疾患については、SNPを用いたGWASによる研究が進められている。GWASは成果をあげているものの、見出される疾患感受性遺伝子のオッズ比は1.1～2.0程度と小さく、それらは遺伝要因全体の一部しか説明できず、疾患の病態機序全体の理解が進んでいない。パーキンソン病におけるゴーシェ病遺伝子のように multiple rare variants が疾患発症に関与する場合、このような rare variants の検出は、GWASでは理論上、限界があり (頻度の高いSNPしか用いていないため)、リシーケンシングが必要となる。対象とすべき候補遺伝子が明らかでない場合は、従来型のサンガーシーケンシングで対応できるが、候補遺伝子が明らかでない場合、全ゲノム、全エクソームを対象としたリシーケンシングが必要となる。

次世代シーケンサーが実用化されたことから、このような rare variants の検出が十分可能になるものと期待

されている。今後は、多数例の患者、対照の全ゲノム、全エクソームシーケンスが行われ、rare variant に対してもゲノムワイドに症例対照関連解析を行い同定することがなされるであろう (low frequency variant genome-wide association)。つい最近、アルツハイマー病患者 261 人、対照 504 人のエクソーム、全ゲノムシーケンスから、*TREM2* rare variants のヘテロ接合体がアルツハイマー病のリスクになることが報告された¹⁶⁾。

おわりに

孤発性の神経疾患のメカニズム解明にあたっては、その疾患のメンデル遺伝型の原因遺伝子の研究成果が大きく貢献してきた。今後は、次世代シーケンサーによる未知のメンデル遺伝型遺伝子の同定のみならず、孤発性神経疾患そのものにおいて、第 2 世代の大規模な GWAS や、次世代シーケンサーを用いて疾患の発症に与える効果サイズの大きい rare variant 解析から、新規の感受性遺伝子が同定され、新しい機序、創薬の手がかりがみつかると期待される。

さらに、SNP チップやリシーケンスにより全ゲノム的に薬剤効果に関与する多型が数多く同定され、それらを組み合わせて搭載したカスタムの薬剤効果判定チップの臨床応用が期待される。

今後、髪の毛 1 本から全塩基配列が携帯型のシーケンサーで決定できるという時代になるであろう。その場合には、本特集で述べられる倫理的課題がよりクローズアップされてくる。さらに、その先には、パーソナルゲノム医療という新しい分野、すなわち、患者 1 人 1 人のパーソナルゲノムの解析に基づき、最適な診断と治療、予防を実現するという、近未来の医療パラダイムの実現が期待されよう。将来的には、現在の医療行為を、患者のゲノム配列を読まずに行っていた、と評する時代が来るかもしれない。

文献

- Callaway E: Alzheimer's drugs take a new tack. *Nature* 489: 13-14, 2012
- Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhardt PF, et al: Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 364: 1513-1522, 2011
- Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu CC, Mori K, et al: Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478: 127-131, 2011
- Tsuji S: Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing. *Hum Mol Genet* 19(R1): R65-70, 2010
- Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, et al: Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41: 1303-1307, 2009
- International Parkinson Disease Genomics Consortium; Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, et al: Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 377: 641-649, 2011
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, et al: Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461: 747-753, 2009
- Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, Ashida R, Takahashi Y, et al: Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 66: 571-576, 2009
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, et al: Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361: 1651-1661, 2009
- Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, et al: Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 146: 37-52, 2011
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, et al: Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42: 30-35, 2010
- Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, et al: Exome sequencing identifies *MLL2* mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 42: 790-793, 2010
- Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, et al: *VPS35* mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 89: 162-167, 2011
- Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, et al: Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 488: 499-503, 2012
- Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, et al: The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet* 91: 320-329, 2012
- Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, et al: *TREM2* variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368: 117-127, 2013

特集

1. 神経変性疾患のゲノム・遺伝学研究

孤発性パーキンソン病のリスク遺伝子

佐竹 渉, 戸田 達史

1. はじめに

パーキンソン病 (PD) 症例の 95% は孤発性発症であるが, 5% は家族性 (その一部はメンデル遺伝性) に発症する。PD 多発家系の連鎖解析などから少なくとも 6 つのメンデル遺伝性 PD 原因遺伝子が明らかにされ, ミトコンドリア障害, 酸化ストレス障害の病態への関与に加え, 新たにユビキチン・プロテアソーム系の機能低下, つまり蛋白分解異常からドパミン細胞死に至る経路の重要性が示された (Farrer, 2006)。

一方で, 21 世紀のゲノム科学の進展にともなって, 孤発性に発症する多因子疾患の疾患リスク遺伝子の探索が実現可能となった。PD においては, 患者の大多数を占める孤発性 PD は多因子疾患であると考えられ, 孤発性 PD の疾患リスク遺伝子の発見を目指した研究が行われている。我々は孤発性 PD

の大規模なゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い, 4 つの PD リスク遺伝子を発見した (Satake et al., 2009)。またゴーシェ病遺伝子も PD 発症に関与するまれな多型 (rare variant) として注目されている。本稿ではこれらのデータを中心に, PD の発症リスク遺伝子について概説する。

2. 多因子遺伝性疾患としての孤発性パーキンソン病とリスク遺伝子

単一遺伝性疾患 (いわゆる遺伝病) とは異なり, 症例的には大多数 (95%) の孤発性 PD は, 生活習慣病と同じく多因子遺伝性の疾患であり, 1 つ 1 つは影響力の弱い複数の遺伝因子 (おそらく数十個からなる) と環境因子が組み合わさることによって発症すると考えられている。アイスランド国民を対象とした大規模な疫学的調査で, PD 患者の同胞 (兄弟姉妹), 子供, 甥姪は, 一般集団より, それぞれ 6.7, 3.2, 2.7 倍発症しやすいと報告された。つまり, 本疾患の λ_s (同胞発症危険率, 多因子疾患の遺伝素因の強さをはかる目安に使われる) は 6.7 ということになる。患者の夫あるいは妻の発症率は高くはなく, PD の発症には遺伝因子が強く影響していることが示された (Sveinbjornsdottir et al., 2000)。

Risk genes for sporadic Parkinson's disease

Wataru Satake, Tatsushi Toda

神戸大学大学院医学研究科 神経内科/分子脳科学 [〒 650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1]

Division of Neurology/Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine (7-5-1 Kusunoki-chou, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan)

これらの発症に関わる遺伝子を「疾患リスク遺伝子」といい、それぞれがリスクを1.3倍くらいあげるような影響力（疾患感受性）をもつ。一塩基多型（SNP）などが代表的であり、これは正常にも存在し患者で有意に多い、というような所見となる。単一遺伝性PDの原因遺伝子と異なり、ほとんどの患者がこの「疾患リスク遺伝子」に関係する。

PDのリスク遺伝子を発見するため、ここ10年間、多くの研究がなされてきたが、アルツハイマー病におけるApoE4多型のような確実に発症リスクを高める遺伝因子はなかなか確認されていなかった。2009年時点まで、ゲノムワイド有意水準（ $P < 5 \times 10^{-7}$ ）を満たす確実なものは、 α -synucleinの3'非翻訳領域（Mizuta et al., 2006）とゴーシェ病遺伝子GBA（後述）の2つの遺伝子のみであった。

3. パーキンソン病の大規模ゲノムワイド関連解（GWAS）

そこで筆者らは、世界最大規模の患者対照集団を用いて、56万個の一塩基多型（SNP）によるゲノムワイド関連解析と、2つの独立な再現研究を行い、PDのリスク遺伝子を明示しようとした（Satake et al., 2009）。検体は、国立精神神経センター（村田部長）、順天堂大（服部教授）、香川県立中央病院（山本部長）を中心とする国内11施設からなるコンソーシアム（図1）で収集され、総数としては患者2,011検体、対照18,381検体を用いた。

まず、GWASステージとして、患者1,078検体、対照2,628検体について、それぞれ56万種類のSNP型を決定した。検体およびSNPについて、厳格な品質管理（IBS検定による非日本人・かくれた血縁者の抽出、SNPや検体のジェノタイプ成功率・マイナーアレル頻度・ハーディーワインバーグ平衡の検討）を行った。これらの品質管理フィルターを通過した、高品質な、患者988検体、対照2,521検体の、435,470種のSNPのジェノタイプをもちいて、Cochran-Armitage trend検定による患者・対照群間の有意差検定を行った。GWASステージの検定では、 $P < 5 \times 10^{-7}$ のゲノムワイド有意水準を超える遺伝子

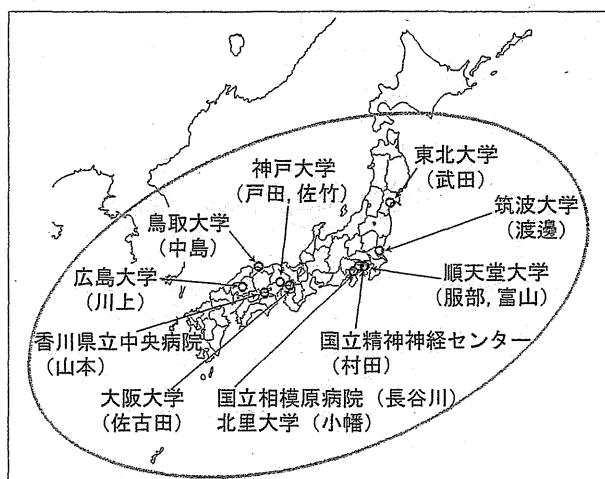


図1. パーキンソン病DNAを収集している国内の11施設のコンソーシアム
2,000人以上の患者さんに協力していただき、ゲノムDNAをあつめた

は α -synucleinのみであった（図2a）ものの、その一方で、Quantile-Quantile解析からは、 α -synuclein以外の領域のSNPにおいても、帰無仮説のもとで予想される χ^2 統計量分布からの、有意、かつ強力なインフレーションを観察した（図2b）。このことは、これらインフレートしたSNPの中に、真なるリスク遺伝子座が存在していること意味している。

そこで、GWASステージでPD発症との関連を示すp値上位から337個のSNPについて、2つの独立した患者・対照検体セットでも有意かを検証する再現研究を行った。これら2つの再現研究でもPD発症との関連を示したSNPについて、さらに、全検体（PD 2,011検体、対照18,381検体）のジェノタイプデータを用いて、Cochran-Mantel-Haenszel検定によるメタ解析を行ったところ、絶対的な有意水準 $P < 5 \times 10^{-8}$ をクリアする4つのPDリスク遺伝子座がハイライトされた（図3）（Satake et al., 2009）。

4. 日本人GWASで発見された孤発性PDのリスク遺伝子

われわれは、2つの新しいPD感受性座を、1q32（PARK16と命名、 $P = 1.52 \times 10^{-12}$ 、図3a）と4p15（ $P = 3.94 \times 10^{-9}$ 、図3b）に発見した。1q32領域は、3つの遺伝子（NUCKS1, RAB7L1, SLC41A1）を含

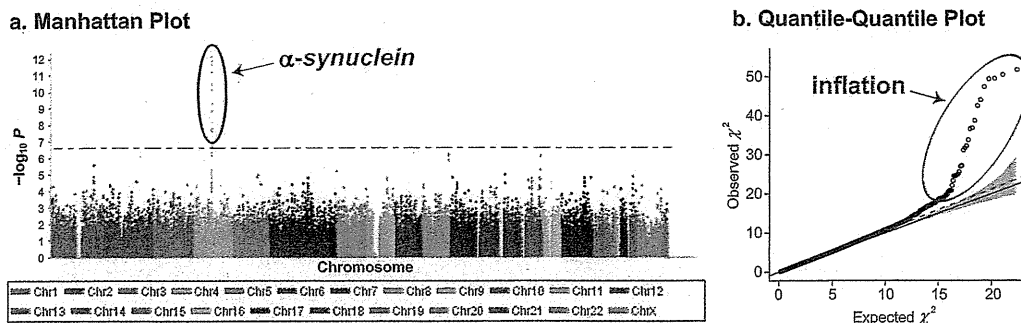


図2. ゲノムワイド関連解析 (GWAS) ステージの結果
 パーキンソン病患者 988 人・対照 2,521 人の, 435,470 種の SNP ジェノタイプ
 グ型を判定し, 患者対照間で有意差検定を行った。
 a. Manhattan Plot. 1つの点が1つの SNP をあらわし, 435,470 個の点がうっ
 である。横軸は染色体上の位置, 縦軸は有意差検定統計値の対数値 ($-\log P$)。つ
 まり上へいくほど, 患者・対照間で SNP 型の頻度の差が大きいことをしめす。GWAS
 ステージでは, α -synuclein のみがゲノムワイド有意水準 ($P < 5 \times 10^{-7}$, 点線) を
 クリアした。
 b. Quantile Quantile Plot. これも, ひとつの点がひとつの SNP をあらわす。横軸が,
 帰無仮説のもとでの有意差検定統計値 (χ^2 値) の期待値, 縦軸が実際の観察値。本
 研究では, Inflation が認められる SNP が存在し (青丸), これらの中に, 真なるリ
 スク遺伝子が存在することが予想された。

む連鎖不平衡ブロックであった。また, 4p15 領域
 に存在するのは, *BST1* のみであった。さらに, 常
 染色体優性遺伝性 PD の原因遺伝子である,
 α -synuclein (4q22, $P = 7.35 \times 10^{-17}$, 図 3c) と *LRRK2*
 (12q12, $P = 2.72 \times 10^{-8}$, 図 3d) の領域を同定した
 (Satake et al., 2009)。* *α -synuclein* は, 我々も以前報
 告した確実な PD リスク遺伝子である (Mizuta et
 al., 2006)。また, 本研究で初めて, *LRRK2* 領域の
 ありふれた多型が, ゲノムワイド水準で PD と感受
 性をもつすることが示された。

PARK16 は, 3つの遺伝子 (*NUCKS1*, *RAB7L1*,
SLC41A1) を含むが, 発現量的形質座解析から,
NUCKS1 が最も有力な責任遺伝子であると考えた。
NUCKS1 は, コンセンサスリン酸化サイトをふく
 む核タンパクであるが, 神経系における機能は, 未
 知であり, 新たな PD 発症のパスウェイを開拓する
 可能性がある (Ostvolod et al., 2001)。

BST1 は, 細胞内 Ca^{2+} 貯蔵からの Ca^{2+} 放出を誘
 発するサイクリック ADP リボースの形成を触媒す
 る酵素であり (Yamamoto-Katayama et al., 2002),
 最近提唱されている, ドパミン細胞死の Ca^{2+} スト
 レス説に関わる可能性がある (Surmeier, 2007)。ま
 た, 免疫・炎症への機序も報告されており興味深い

(Kaisho et al., 1994)。これらは, これまでの PD 病
 態ストーリーにないまったく新規の遺伝子であり,
 従來說にとらわれず, 新規なものを同定できるこ
 ろに, ゲノム解析の強みがある。

LRRK2 の関連のピークは, 上流領域であるの
 (図 3d), プロモーター活性に影響を及ぼしている
 かもしれない。これらは, 新たな治療ターゲットと
 しても注目される。

5. PD リスク遺伝子の白人再現研究と 人種間での相違

次に, 我々は, 我々と併行して, 白人の PD の
 GWAS 研究を行っていた米独のグループと, データ
 を交換した。彼らの研究では, *α -synuclein* 領域,
tau 領域のみに, PD 感受性が検出されていた
 (Simón-Sánchez et al., 2009)。そこで, 我々の発見
 した *PARK16*・*BST1*・*LRRK2* の再現研究を依頼し
 たところ, *PARK16* と *LRRK2* の PD 感受性は強く
 再現された。*BST1* については, 当初彼らの研究で
 は再現されなかったものの, その後の彼らによるさ
 らに大規模な関連解析研究で再現された。それ以後
 も, 日本人 GWAS で発見された 4 遺伝子座 (*PARK16*,

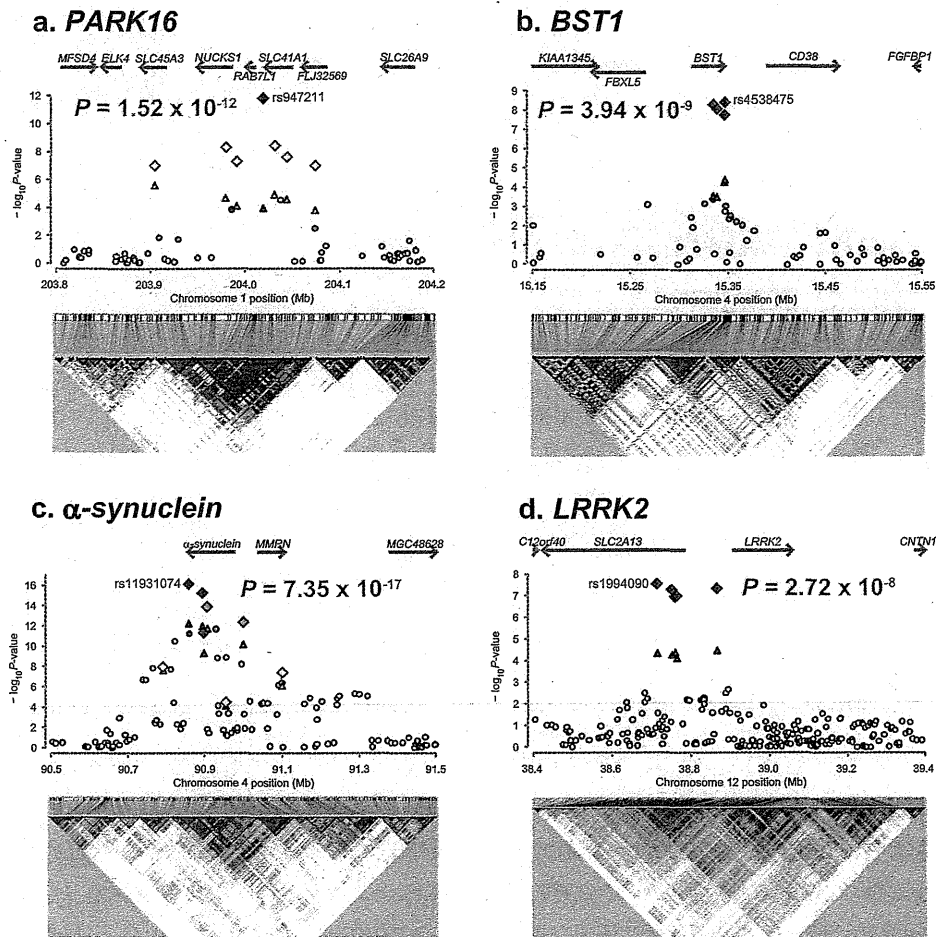


図3. 日本人の孤発性パーキンソン病患者 2,011 検体, 対照 18,381 検体を解析し, 同定された4つのパーキンソン病リスク遺伝子座
 このうち2つ (*PARK16* (a), *BST1* (b)) は全くの新規領域であった. 残り2つは, 常染色体優性遺伝性パーキンソニズムの原因遺伝子 *α-synuclein* (c), *LRRK2* (d) を含む領域が同定された. 1つの点は1つのSNP, 縦軸は $-\log P$ をしめし, すなわち上にいくほどそのSNPのPD感受性が強いことをしめす.

BST1, *α-synuclein*, *LRRK2*) のPD感受性の再現報告が相次いでおり, 現在では, これら4遺伝子座は, 東アジア人・白人共通の, 確実なPDリスク遺伝子と考えられるに至っている (表1).

一方で, 我々は, 米独のグループをはじめ多くの白人のPD関連解析でPDリスク遺伝子として検出されている *Tau* 遺伝子座のPD感受性の再現を試みたが, 日本人ではまったく再現されなかったが (Satake et al., 2009), このことはPDのゲノム背景の人種間の不均一性を考える上で示唆にとむ. *tau* 変異は言わずと知れたFTDP17の責任遺伝子であるが, この遺伝子座には *tau* などの複数の遺伝子を含む900キロ塩基の領域の逆位多型 (H1とH2) が

存在する. H1がもともと存在していたところに, 逆位多型H2が, 中東近辺で発生し, 北側 (ヨーロッパ) へほぼ選択的に拡散したとされており (Stefansson et al., 2005), つまり, 東アジア人にはそもそもH2は存在しない. 白人のPDの関連解析では, H1がPDリスク, H2がPD保護的であると報告しているが, われわれは, H2を持たないのである (Satake et al., 2009).

6. 孤発性PDリスク遺伝子とメンデル遺伝性PD遺伝子の共通性

日本人GWASで同定された4つのPDリスク遺

表 1. 日本人 GWAS で同定された 4 つの PD リスク遺伝子座に関する, 白人集団での主な再現研究の結果

<i>PARK16</i>	
$P=7.29 \times 10^{-8}$	(Sanchez et al., Nature Genet 2009)
$P=1.00 \times 10^{-12}$	(IPDGC & WTCCC, PLoS Genet 2011)
$P=1.27 \times 10^{-7}$	(Do et al., PLoS Genet 2011)
$P=8.00 \times 10^{-10}$	(Lill et al., PLoS Genet 2012)
<i>BST1</i>	
$P=1.79 \times 10^{-6}$	(Saad et al., HMG 2011)
$P=1.85 \times 10^{-8}, 2.43 \times 10^{-9}$	(IPDGC, Lancet 2011)
$P=2.3 \times 10^{-5}$	(Do et al., PLoS Genet 2011)
$P=1.87 \times 10^{-10}$	(Lill et al., PLoS Genet 2012)
<i>α-synuclein</i>	
$P=2.24 \times 10^{-16}$	(Sanchez et al., Nature Genet 2009)
$P=7.90 \times 10^{-26}, 4.23 \times 10^{-23}$	(IPDGC, Lancet 2011)
$P=2.82 \times 10^{-8}$	(Saad et al., HMG 2011)
$P=2.29 \times 10^{-19}$	(Do et al., PLoS Genet 2011)
$P=6.06 \times 10^{-65}$	(Lill et al., PLoS Genet 2012)
<i>LRRK2</i>	
$P=1.55 \times 10^{-5}$	(Sanchez et al., Nature Genet 2009)
$P=3.23 \times 10^{-8}, 1.06 \times 10^{-8}$	(IPDGC, Lancet 2011)
$P=1.6 \times 10^{-4}$	(Do et al., PLoS Genet 2011)
$P=6.44 \times 10^{-25}$	(Lill et al., PLoS Genet 2012)

日本人 GWAS からの 4 つの PD リスク遺伝子座の PD 感受性は, 白人の研究でも繰り返し再現され, 東アジア人・白人共通の, 確実な PD リスク遺伝子であると考えられている。

伝子のうち 2 つは, メンデル遺伝性 PD の原因遺伝子であった。このことは, 孤発性 PD の発症に, 常染色体優性遺伝性 PD の原因遺伝子が, 密に関係していることを明示した。原因変異により常染色体優性遺伝性 PD を引き起こす遺伝子は, そのありふれた多型を通して, 典型的 PD の遺伝リスク (遺伝因子) となったことは興味深い。このような関係は, PD を超えて, ほかの疾患に対しても, あてはまるのかもしれない (Satake et al., 2009)。

7. まれな多型 (rare variant) とゴーシェ病遺伝子 *GBA*

ゴーシェ病は, 常染色体劣性遺伝性疾患で, リソソーム内酵素 *GBA* (グルコセレブロシダーゼ) の変異による酵素活性低下により, グルコシルセラミドをセラミドに分解できず, グルコシルセラミドが体内に蓄積し, 肝脾腫, 貧血, 出血傾向, 骨疾患な

どを引き起こす脂質代謝異常症である。一見, PD とはなんの関係もない疾患ではあるが, 1990 年代後半から, PD 症状を合併するゴーシェ病患者の存在や, ゴーシェ病家系内に PD 患者が多発するとの報告が散見されていた。そこで, Aharon-Peretz らは, ユダヤ人の PD 患者について *GBA* 変異の頻度を調べたところ, 孤発性 PD 群では, *GBA* 変異のヘテロ保因者が対照群に比べ有意に多く, *GBA* が孤発性 PD のリスク遺伝子であることを報告した (Aharon-Peretz et al., 2004)。その後, この研究の再現研究が世界中で行われ, 東京大学辻省次教授らと筆者ら研究室の共同研究グループも, *GBA* 変異が, 日本人でも PD 感受性をもつことを示す (Mitsui et al., 2009) と同時に, 世界多施設共同研究に参画, アメリカ人, フランス人, ポルトガル人, 台湾人などを含め, 計約 10,000 人の患者対照集団とのメタ解析により, 原著のユダヤ人に限らず, どの人種でも *GBA* 遺伝子はリスクとなり, 平均オッズ比は 5 であり, 確実な PD リスク遺伝子であることが示された (Sidransky et al., 2009)。*GBA* の基質であるグルコシルセラミドの蓄積により, 神経毒性をもつとされる可溶性 α -synuclein オリゴマーが増加すること, 可溶性 α -synuclein オリゴマーの増加により *GBA* の ER-Golgi 輸送が阻害されることによりさらに *GBA* 活性が低下し, 可溶性 α -synuclein オリゴマーのさらなる増加につながる, といったポジティブフィードバックの経路が最近報告され, 興味深い (Mazzulli et al., 2011)。

8. パーキンソン病のゲノム背景

パーキンソン病, アルツハイマー病, または生活習慣病を含むほとんどの疾患は, 複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和がある閾値を超えたとき発症すると考えられている。そのモデルを図 4 に示す。メンデル遺伝性 PD を引き起こす α -synuclein や *LRRK2* の変異はそれ 1 つだけで閾値に到達し発症するが, 対象患者はほとんど存在しないので積み木の幅はとても狭い(とてもまれ)。ゴーシェ病遺伝子 *GBA* などの rare variant リスクは中等

度の高さを持つが低頻度であるため幅は狭い。一方 SNP はそれ自体のオッズ比は低いがほとんどの患者に当てはまるため、積み木の幅は広い。いずれも重要である。

図4における積み木の重要度をあらわす指標のひとつに、人口リスク寄与度 (PAR, population attributable risk) がある。これは、もしこの遺伝子リスクが存在しなかったら (もしくは、この遺伝子リスクによる病態機序を治療すれば)、何%の患者が減るか (発症閾値を超えないようになるか) を示す値である。日本人 GWAS で同定の4 遺伝子座の SNP リスクは、低リスクだが高頻度であり、その結果、人口リスク寄与度は 13% (PARK16), 8% (BST1), 18% (α -synuclein), 3% (LRRK2) (Satake et al., 2009), ゴーシェ病遺伝子 GBA では、中等度リスクであるが低頻度 (rare) であるので、GBA 遺伝子内の 11 個の rare variant リスクをすべて足し合わせて 4.6 であった。このことは、PD のゲノム背景の解明と、それにつづく病態解明や患者治療を見するうえで、これら縦長~横長のさまざまな形の積み木が、いずれも重要であることを意味する。

9. さらなる PD リスク遺伝子の発見へむけたアプローチ

PD リスク遺伝子をさらに同定していくためには、積み木の形によって有効な探索手法をもちいる必要がある。

高頻度・低リスクの疾患リスク遺伝子 (横長の積み木) を発見するためには、GWAS をさらに推し進めることが必要である。日本人の PD-GWAS (Satake et al., 2009) は、GWAS ステージでの有望な上位 337 個の SNP のみをさらに別検体セットで関連解析し、4つの遺伝子座を同定することに成功した。しかしながら、まだ未完成であり、上位 337 個を再現研究するのみでは統計的に不十分であり、とりこぼしがある。今後、上位数千個の SNP を別検体セットでの関連解析研究へすすめる必要がある。また、さまざまな人種 (とくにアジア人) での PD-GWAS とデータをあわせて解析すること (「メタ GWAS」) が、PD の SNP リスクを発見するのに有効である。

また、非常に低頻度・非常に高リスクの家族性疾患変異 (縦長の積み木) については、多発家系ベースでの連鎖解析と、進展著しい次世代シーケンサーをもちいた、全ゲノム解析もしくはエクソーム

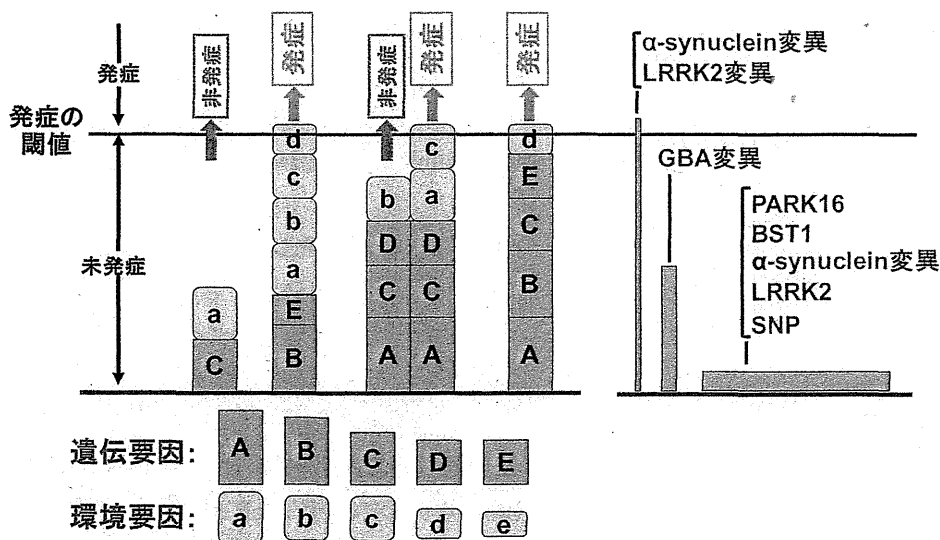


図4. 孤発性パーキンソン病のゲノム背景
パーキンソン病, アルツハイマー病, または生活習慣病を含むほとんどの疾患は、複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和が、ある閾値を超えたとき発症すると考えられている。メンデル遺伝性変異以外に、common variantとして PARK16, BST1, α -synuclein, LRRK2, rare variantとして GBA が重要

解析の組み合わせが有効である (Ng et al., 2010)。「エクソーム解析」とは、ゲノム DNA からハイブリダイズを用いた手法でエクソン領域のみを全て抽出し、次世代シーケンサーを用いて超高速シーケンスする技術であり、エクソン塩基配列解読にはきわめて効果的である。われわれのデータでは、ともに PD を発症した兄弟 2 例をエクソームシーケンスしたところ、データベースに登録なく、かつアミノ酸変化を伴うような変異・多型を、それぞれ、690 個、694 個検出した。これらのうち、この同胞間や、さらにほかの家系にも共通しているものは、家族性の PD 変異であると考えられる。

さらに、低頻度ながら中等度リスクの rare variant リスクは、エクソンに存在すると予想される。この同定のためには、「エクソーム解析」による全エクソン塩基配列解読を、数百検体に対して行い、患者群・対照群間で関連解析を行う、「エクソーム関連解析」が期待され、われわれを含め開始されている。

そういった研究から、新たな疾患パスウェイが発見され、本症の根本的治療薬開発へつながることを、切に願っている。

文 献

- Aharon-Peretz J, et al. (2004) Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 351 : 1972-1977
- Farrer MJ (2006) Genetics of Parkinson disease : paradigm shifts and future prospects. *Nature Rev Genet* 7 : 306-318
- Kaisho T, et al. (1994) BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 5325-5329
- Mazzulli JR, et al. (2001) Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 146 : 37-52
- Mitsui J, et al. (2009) Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 66 : 571-576
- Mizuta I, et al. (2006) Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15 : 1151-1158
- Ng SB, et al. (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nature Genet* 42 : 30-35
- Ostfold AC, et al. (2001) Molecular cloning of a mammalian nuclear phosphoprotein NUCKS, which serves as a substrate for Cdk1 in vivo. *Eur J Biochem* 268 : 2430-2440
- Satake W, et al. (2009) Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genet* 41 : 1303-1307
- Sidransky E, et al. (2009) Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361 : 1651-1661
- Simón-Sánchez J, et al. (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genet* 41 : 1308-1312
- Stefansson H, et al. (2005) A common inversion under selection in Europeans. *Nature Genet* 37 : 129-137
- Surmeier DJ (2007) Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 6 : 933-938
- Sveinbjornsdottir S, et al. (2000) Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 343 : 1765-1770
- Yamamoto-Katayama S, et al. (2002) Crystallographic studies on human BST-1/CD157 with ADP-ribosyl cyclase and NAD glycohydrolase activities. *J Mol Biol* 316 : 711-723

Risk genes for sporadic Parkinson's disease

Wataru Satake, Tatsushi Toda

Division of Neurology/Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine

Parkinson's disease (PD) is a complex disorder caused by multiple genetic and environmental factors. We performed a genome-wide association study (GWAS). We identified two novel susceptibility loci, *PARK16* and *BST1*, and also detected strong associations at *α-synuclein* and *LRRK2*, both of which are implicated in autosomal dominant forms of parkinsonism. By comparing Caucasians' GWAS results, we found *PARK16*, *BST1*, *SNCA* and *LRRK2* as shared risk loci for PD and *MAPT* as loci showing population differences. Heterozygous mutations of *GBA* have relatively high risk as rare variants. Exome sequencing by next generation sequencer is expected to enable the discovery of not only rare causal variants, but also protein-coding risk variants.

Address correspondence to Dr. Wataru Satake, Division of Neurology/Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine (7-5-1 Kusunoki-chou, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan)