

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合分担研究報告書

ALD の遺伝子表現型連関

分担研究者：辻 省次 東京大学神経内科 教授

研究要旨

副腎白質ジストロフィー(ALD)は, *ABCD1* を原因遺伝子とし, 多彩な表現型を認めるが, 遺伝子表現型連関は明らかではない. 表現型修飾因子同定のため, まずは, *ABCD1* と相同性の高い *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* を候補遺伝子として, 検出された variants と表現型との関連解析を行った. 日本人 ALD 症例の表現型との関連が示唆される variants が同定されたものの, 十分な結果とはいえず, 次に, ペルオキシソームで機能する遺伝子群を表現型修飾因子の候補遺伝子と考え, Exome 解析を行い, 検出された variants と表現型との関連解析を行うこととした. コントロール 369 例での解析が終了し, 今後 ALD 症例の解析も行う予定.

分担研究者氏名：

- ・松川 敬志 東京大学神経内科 大学院生
- ・三井 純 東京大学神経内科 特任助教
- ・石浦 浩之 東京大学神経内科 助教
- ・Budrul Ahsan 東京大学神経内科
特任研究員
- ・吉村 淳 東京大学大学院新領域創成科学研究科 特任助教
- ・土井 晃一郎 東京大学大学院新領域創成科学研究科・特任講師
- ・後藤 順 東京大学神経内科 准教授
- ・鈴木 康之 岐阜大学医学教育開発センター
教授
- ・下澤 伸行 岐阜大学生命科学総合研究支援センター 教授
- ・小野寺 理 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター 教授
- ・西澤 正豊 新潟大学脳研究所神経内科 教授
- ・森下 真一 東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授

A . 研究目的

ALD は多彩な臨床病型を呈するが, 遺伝子表現型連関は明らかではない. 予後不良な大脳型 ALD に対しては, 早期の造血幹細胞移植が有効である可能性があり, 大脳型を発症しやすい背景因子を同定すれば, 臨床上有用である. 多彩な臨床病型を規定する遺伝的修飾因子の探索を行うことが目的である.

B . 研究方法

Step1 として, *ABCD1* の機能に影響を与える可能性のある遺伝子群として, *ABCD1* と相同性の高い *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* を臨床病型を規定する修飾因子の候補遺伝子と考え, *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* の全エキソン, 5' UTR, 3' UTR の配列を PCR にて増幅. *ABCD2* に関しては DNA マイクロアレイを用いて, *ABCD3*, *4* に関しては直接塩基配列決定法で遺伝子の塩基配列を決定し, variants の検出を行った.

Step2 として, 発現産物である adrenoleukodystrophy protein (ALDP) は, ペル

オキシソームで機能することから、他のペルオキシソームで機能する遺伝子群を、臨床病型を規定する修飾因子の候補遺伝子と考え、対象者のエキソーム解析を行い、候補遺伝子内の variants を選択。新規 variants については直接塩基配列法で確認を行った。

これらの候補遺伝子内の variants について、表現型毎の出現頻度に有意な差のある場合、修飾因子としての可能性が指示されると考え、表現型との関連を検討した。

Step1 の対象者は、ALD 症例 75 例(小児大脳型 16 例, 思春期大脳型 8 例, 成人大脳型 11 例, 大脳型への移行例 13 例, 小脳脳幹型 3 例, AMN21 例, Addison 病 1 例, 未発症 2 例), 検出された variants については、日本人コントロール 96 例でも解析を行った。

Step2 の対象者は、ALD 症例 67 例(小児大脳型 13 例, 思春期大脳型 6 例, 成人大脳型 10 例, 大脳型への移行例 12 例, 小脳脳幹型 3 例, AMN19 例, Addison 病 1 例, 未発症 2 例), 日本人コントロール 369 例とした。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、所属機関の研究倫理審査委員会の承認を得て実施をした。検体は全て書面による同意を得ており、匿名化の上、解析された。

C. 研究結果

Step1. *ABCD2* に関しては有意差を持って表現型と相関を示す Variants は認められなかった。

ABCD3 に関しては成人大脳型 ALD 症例 1 例についてのみ、1 つのアミノ酸置換を伴う新規 Single nucleotide variant (SNV) を同定した。

ABCD4 においては完全連鎖不平衡にある 5 つの既知の SNP において、コントロールと比較して

AMN で有意に頻度が低かったが ($p=0.011$), フランスにおける ALD の独立した被験者集団では有意差を認めなかった

日本人 ALD 症例の表現型との関連が示唆される variants が同定されたものの、十分な結果とはいえないことから Step2 の解析を行うこととした。

Step2. コントロール 369 例の解析が完了。

ペルオキシソームで機能する遺伝子群で検出された variants の中で、既知の病因変異、Nonsense, frameshift, splice sites mutations, 新規 non-synonymous SNV を有する症例は、コントロール 369 例中、194 例(52.5%)であった。

新規 non-synonymous SNV の中で、Polyphen-2, SIFT, Mutation Taster, LRT, PhyloP の 5 つの SNV 機能予想アルゴリズムの合計点が 4 点以上(5 点が最も機能変化が大きい)の SNV (deleterious SNV) に絞った場合は、コントロール 369 例中、133 例(36.0%)が有していた。

D. 考察

ABCD1 と相同性の高い *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4*, 及びペルオキシソームで機能する遺伝子群において、アミノ酸置換を伴う新規の non-synonymous variants は、多数同定され、coding region の non-synonymous variants は未知のものが依然として存在すると考えられ、網羅的な塩基配列解析は重要と考える。

E. 結論

今後 ALD 症例における Exome 解析も進め、検出された variants における ALD の各表現型及び Control における頻度の比較 (関連解析) を行う予定である。併せて、ALD 症例 DNA 検体のさらなる集積を行う。

F . 研究発表

1. 論文発表

1) Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, et al. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics* 12:41-50, 2011

2. 学会発表

1) T. Matsukawa, Y. Takahashi¹, J. Goto¹, Y. Suzuki, N. Shimozwa, H. Takano, O. Onodera, M. Nishizawa, S. Tsuji. omprehensive resequencing of PEX5 gene in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) and association studies with the phenotypes of ALD. American Society of Human Genetics, Washington, DC, 2010. 11

2) 松川 敬志, 高橋祐二, 後藤順, 鈴木康之, 下澤伸行, 高野弘基, 小野寺理, 西澤正豊, 辻省次. 副腎白質ジストロフィー患者における PEX5 遺伝子の全塩基配列解析及び表現型における関連解析第. 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011. 5

3) T. Matsukawa, Y. Takahashi¹, J. Goto¹, Y. Suzuki, N. Shimozawa, H. Takano, O. Onodera, M. Nishizawa, S. Tsuji. omprehensive resequencing of PEX5, PEX13 and PEX14 gene in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) and association studies with the phenotypes of ALD. International Congress of Human Genetics, Montreal, 2011.10

G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし