

多系統萎縮症の疾患関連遺伝子の探索

研究分担者 辻 省次（東京大学医学部附属病院神経内科）
共同研究者 三井 純、松川 敬志、石浦 浩之、市川 弥生子、Budrul Ahsan
（東京大学医学部附属病院神経内科）
吉村 淳、土井 晃一郎（東京大学大学院新領域創成科学）
後藤 順（東京大学医学部附属病院神経内科）
森下 真一（東京大学大学院新領域創成科学）
Japan Multiple System Atrophy Research Consortium (JAMSAC)

研究要旨

多系統萎縮症（MSA）は原則として孤発性であるが、ごく稀に家系例が存在することが報告されるようになった。家系に対する連鎖解析による病因遺伝子同定と患者・対照者群に対する関連解析による疾患感受性遺伝子同定の2つのアプローチにより疾患関連遺伝子探索を行ってきた。家系に対する連鎖解析から、COQ2 遺伝子のホモ接合性変異（M78V-V343A/M78V-V343A）および複合ヘテロ接合性変異（R337X/V343A）を2家系の発症者で同定した。さらに、COQ2 遺伝子の関連解析から、COQ2 遺伝子変異のキャリアーが、孤発性MSA患者の危険因子であることを明らかにした。患者・対照者群に対する関連解析は、従来のSNPタイピングに加え、エクソーム解析による関連解析を行った。

A. 研究目的

家系に対する連鎖解析による病因遺伝子同定と患者・対照者群に対する関連解析による疾患感受性遺伝子同定の2つのアプローチにより、MSAの遺伝因子を明らかにしたい。

B. 研究方法

家族性MSA、6家系のうち血族婚のある1家系について連鎖解析を行い、発症者1例の全ゲノム解析を行った。日本（患者363例、対照者520例）、欧州（患

者223例、対照者315例）、北米（患者172例、対照者294例）からのサンプル群に対してCOQ2遺伝子の全エクソン配列解析を行った。同定された変異に対して機能解析を行い、機能障害性変異の関連を検定した。

日本（患者602例、対照者374例）からのサンプル群に対してエクソーム解析を行い、変異毎に関連を検定した。

（倫理面への配慮）

本研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、

東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会からの承認を受けて実施する。

C. 研究結果

.6家系のうち,1家系は発症者の両親がいとこ婚であり(FMSA_1),連鎖解析により候補領域が80 Mbの範囲にまで絞り込まれており,原因変異はホモ接合性であることが予想された.このことから,原因変異を同定できる可能性が高いと考え,発症者1例に対して全ゲノム解析を行った.全ゲノム中に参照配列と異なる変異は3,492,429個得られ,うち連鎖解析による候補領域中には54,306個得られた.この中から,遺伝子の翻訳領域にあり,アミノ酸置換を伴う変異は78個に絞られた.家族性MSAの頻度が極めて稀であることから,原因変異は既存のデータベースに存在しない新規の変異だと考え,変異データベースであるdbSNP130に登録がない変異を探したところ4個の変異に絞り込まれた.さらに日本人の健常者180人のサンプルを用いて変異の頻度を確認したところ,COQ2遺伝子のM78Vホモ接合性変異のみがデータベースにも日本人健常者180人にも見られないことが分かった(COQ2遺伝子にはM78V変異の他,比較的頻度の低いV343A変異も同定された).以上より,COQ2遺伝子のM78V-V343A変異が発症に関わっている可能性が最も高いと考えられた.残りの5家系についても,COQ2遺伝子をシーケンスしたところ,もう1家系で発症者2例にR337X/V343Aの複合ヘテロ接合性変異が独立して確認され,家系内の共分離も確認された.COQ2

遺伝子は,体内でコエンザイムQ10を合成する酵素の一つであり,実際にM78V-V343Aホモ接合性変異患者の凍結脳組織やR337X/V343A複合ヘテロ接合性変異患者のリンパ芽球様細胞では,コエンザイムQ10の組織内濃度が低下していることが確認された.

次に,家族性MSAの原因遺伝子であるCOQ2遺伝子が,孤発性のMSAとも関連するかどうかを検討するため,患者・対照群に対してCOQ2遺伝子をシーケンスして変異の関連解析を行うこととした.日本国内のコンソーシアム,北海道大学神経内科,鹿児島大学神経内科などから提供を受けたMSA患者群363例と対照群520例,ヨーロッパのコンソーシアムから提供を受けたMSA患者群223例と対照群315例,北米のコンソーシアムから提供を受けたMSA患者群172例と対照群294例を解析対象とした.COQ2遺伝子の全エクソンをシーケンスしたところ,患者群・対照群で合わせて13種類の変異(P22L,F29L,P49H,S57T,R69H,I97T,P107S,S113F,T267A,S297C,N336H,R337Q,V343A)が検出された.ほとんどの変異は,1例にしか見られない稀な変異であったが,V343Aの頻度は比較的高く日本人サンプルにのみ観察された.V343Aのアレル頻度で見ると,患者群で4.8%,対照群で1.6%であり,オッズ比3.05,p値 1.5×10^{-4} と有意な関連があることが分かった.また,V343A変異をヘテロ接合性に持っているMSA患者とCOQ2変異を持たない健常者のリンパ芽球様細胞からミトコンドリア分画を抽出して酵素活性を比べてみると,V343A変異キャリアーMSA患者例の酵素活

性は、変異を持たない健常例と酵素活性と比べて活性が低下していることが確認された。このことから V343A は実際に機能障害性に働く変異であることが分かった。

その他の稀な 12 種類の変異 (P22L, F29L, P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, N336H, R337Q) については意義付けが不明であったため、変異体の機能を解析するために酵母を用いた機能補完アッセイを行った。coq2 遺伝子を欠失させた酵母は電子伝達系を利用したエネルギー産生ができなくなるため、グリセロールなど非発酵性炭素源を培地にして培養すると増殖できない。この coq2 欠失酵母に対して、ヒト COQ2 遺伝子の cDNA を用いて形質転換すると、非発酵性炭素源における増殖能力が回復する。このような機能補完現象を利用して、各々の変異体 cDNA を導入した時に機能補完が起きるかどうかを検討した。その結果、9 種類の変異 (P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, R337Q) の cDNA を導入した coq2 欠損酵母では、十分な増殖能の回復が見られず、これらの変異は機能が障害されていると考えられた。9 種類の機能障害性変異のうち、8 変異が 8 例の患者に見られ、1 変異が 1 例の対照に見られた。日本、ヨーロッパ、北米の全サンプルを混ぜて検討すると、758 例の MSA 患者中 8 例、1129 例の対照者中 1 例に機能障害性変異がヘテロ接合性に認められたこととなり、オッズ比 11.97, p 値 0.004 と有意な関連があることが分かった。

・日本 (患者 602 例, 対照者 374 例)

からのサンプル群に対するエクソーム解析の結果、189,659 個の変異が同定された。いくつかの仮定に基づく条件 (MAF 5% 以下の変異, 患者群に頻度が高い, in silico 機能予測で機能障害性など) を設定し、10,664 個の変異に絞り、変異毎に関連を検定したところ、最大で p 値 10^{-9} オーダーの変異をはじめとする候補変異を得た。

D. 考察

・COQ2 のホモ接合性または複合ヘテロ接合性変異は家族性 MSA の病原性となり、ヘテロ接合性変異は孤発性 MSA の危険因子となることが分かった。

・エクソーム解析を用いて頻度の低い変異を網羅したゲノムワイドの関連解析を行い、疾患感受性変異の候補をいくつか同定した。ゲノムワイドアプローチによる仮定に基づかない疾患関連遺伝子検索は、遺伝因子の全容解明に必須だが、さらに大規模のサンプルサイズを必要とする。サンプルサイズのいっそうの大規模化を目指すと共に、疾患パスウェイなど、候補や仮定に基づくアプローチを併用することで検討を続ける必要がある。

E. 結論

家系に対する連鎖解析による病因遺伝子同定と患者・対照者群に対する関連解析による疾患感受性遺伝子同定の 2 つのアプローチにより、MSA の遺伝因子の一部を明らかにした。同定された遺伝因子を手掛かりにして新たな治療方法の開発につなげていきたい。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Gen SobueSobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Hananosato MV, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee VM, Parkinson U, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Parkinson U, Ozelius L, Foroud T, Tsuji S: Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 2013; 369: 233-44
- 2) Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H, Kanazawa I, Doi K, Yoshimura J,

Morishita S, Goto J, Tsuji S: Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. *J Neurol Sci* 2013; 331: 158-60

2. 学会発表

- 1) Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Goto J, Yamamoto Y, Shirahige K, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Kondo T, Murayama S, Japan Multiple System Atrophy Consortium, Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer Disease, Japanese Parkinson Disease Susceptibility Gene Consortium, Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S for NAMS-A-SG, and Tsuj S: Mutations of COQ2 in Familial and Sporadic Multiple System Atrophy. American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, October 24th 2013, Boston.
- 2) 三井 純, 松川 敬志, 石浦 浩之, 福田 陽子, 市川 弥生子, 伊達 英俊, Budrul Ahsan, 中原 康雄, 百瀬 義雄, 高橋 祐二, 岩田 淳, 後藤 順, The MSA Research Collaboration, 辻 省次: COQ2 変異は家族性・孤発性多系統萎縮症と関連する. 第 58 回日本人類遺伝学会, 2013 年 11 月 22 日, 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

多系統萎縮症リスクの検査方法，検査キット，及び多系統萎縮症の治療又は予防薬（特願 2013-20763）

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

治療実現化に向けたJAMSACのロードマップ

