

ゲノムコピー数多型による多系統萎縮症発症素因の解析

研究分担者 佐々木秀直（北海道大学神経内科）
共同研究者 浜 結香、松島理明、矢部一郎（北海道大学神経内科）
瀧川一学（同 創成研究機構研究部）
内海 潤（公益財団法人 がん研究会）

研究要旨

多系統萎縮症(MSA)の素因遺伝子として報告した19p13領域についてqPCRでの定量解析は、同領域の400KCNVアレイデータと一致しなかった。現在、その原因を検討中である。解析手順の見直しの過程で、試料として精製したdsDNAを用いることによりアレイデータのノイズを減らしてCNV解像度を上げることができた。そこで新たに、MSA-C20名と神経疾患に罹患していない正常対照群20名を対象に、400K CNVアレイ解析を行ない、両群を比較検討した。CNV領域の同定にはCytogenomics®(Agilent)に加えて、研究グループで独自に開発したソフトでも解析し、両者を比較検討した。群間比較で $p < 0.06$ で差を示したCNV領域はCytogenomics®で31領域、独自開発のソフトでは13領域が候補として残った。

A. 研究目的

多系統萎縮症(MSA)は成年期に発症する非遺伝性の神経変性疾患であり、我が国の脊髄小脳変性症(SCD)の中では最も患者数の多い疾患である。その発症素因の一つとして、*COQ2*変異の関与が報告されている。推定されているのみであり、本研究では、遺伝子のゲノムコピー数多型を解析することにより発症素因の解明を目的とした。

B. 研究方法

神経疾患に罹患していない成人対照群22例、MSA患者20例、片方のみMSAを発病している一卵性双子の発症者3例を対

象とし、白血球より抽出したゲノムDNAを用いてTaqMan probe(Life Technologies)でリアルタイムPCRを行い、候補遺伝子のコピー数解析を行なった。さらに、対照群20例とMSA-C患者21例を対象として、SurePrint G3 Human CNV 400Kアレイ(Agilent)により全ゲノム網羅的解析を行なった。ゲノムDNA試料は13%ポリエチレングリコール6,000を用いてdsDNAの純度を90%程度に精製したものを使用した。データ解析にはAgilent CytoGenomics®(ver.2.7.8.0)及び北大独自に開発したアルゴリズムを用いた。MSAに関係するCNV候補領域は、連続する3つのプローブが群間比較で $p < 0.06$ のレ

ベルで差のあるものを選択した。

また、日本神経学会会員を対象に片方のみ MSA を発症した一卵性双生児の経験について全国調査を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究は医の倫理委員会の承認を得て行なった。被験者には口頭に加えて文書で説明し、文書で同意を得た。

C. 研究結果

今回のアレイデータは全て高純度 dsDNA を精製して、再構築したものである。それを基に以前に我々が deCODE CNV アレイ解析でコピー数減少が MSA に多いと報告した 19p13 の SHC2 領域 (Mol Med 2013;6:31)につて検討した。再構築した 400K アレイデータでは、MSA 群と対照群を比較して、この領域に CNV 変化を検出できなかった。同領域を qPCR で定量解析した結果では、両群共に短腕末端側よりコピー数減少を示す領域が認められた。その頻度は MSA 群に多い傾向は有るが、400K aCGH の解析結果と qPCR の結果が一致しなかったことが課題として残った。

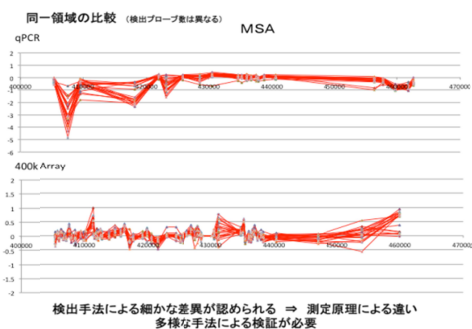


図 1. 19p13 領域の SHC2 近傍のコピー数解析

患者群 (MSA-C, n=21) と成人対照群

(n=20)について 400K aCGH データを 2 つの方法で解析し比較した。Agilent CytoGenomics では常染色体から 31 領域、北大独自のアルゴリズム解析からは 13 領域が選択された。両者は必ずしも一致はしなかった(図 2)。

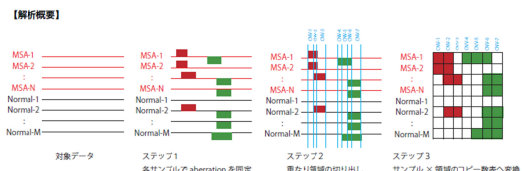


図 2. 北大の CNV 解析アルゴリズムの原理

これまでの研究で、アレイ基盤により結果の異なることを見いだした。これは既に文献的にも指摘されている。解析技術の基盤を見直し、新たなアレイ解析で候補領域の探索を行ない複数の領域を検出することができた。今後は更に、対象を増やして詳細な解析を行なうと共に、複数の異なった解析手技を併用して候補領域の検証を行い、病型など臨床指標との相関解析も行なう予定である。

一卵性双生児の全国調査は昨年度の今年度の二回行った。累計で 4 組の報告が有り、うち 3 組を確認した。

D. 考察

MSA 素因遺伝子解析の一つの方法として CNV に取り組む契機は、片方のみ MSA を発症した一卵性双生児例の経験である。全国調査で既に 3 組が確認された。このような例は、メンデル遺伝学の理論では非発症者はいずれ発症に至るとされるが、事実は発症していない。それを説明する機序としては MSA 発症の原因には、環境因子、多因子遺伝、エピジェネティクス機

構、そして CNV などの関与が想定される。何らかのゲノム因子が関与するにしても、MSA は通常は非遺伝性疾患であるので、親子の伝達過程で遺伝しないこと説明できる論理的モデルが必要である。これを十分に説明できる仮説はまだ知られていない。

ゲノム構造多型とは～Kb 以上の規模を有するゲノム領域の重複、配列順、挿入、欠失などの個体差を現すゲノム多型の包括的な概念である。その多型の在り方によっては遺伝子発現に様々な影響の有ることが知られつつある。規模の大きさのため次世代シーケンサを含めて通常の塩基配列解析では十分な解析のできていない領域である。ゲノム構造多型 (CNV) は SNP に比べて変異率が高いこと、動原体近傍と染色体末端側近傍に頻度の高いこと、等の特徴が有る。最近の知見では、CNV は個体発生、特に胚発生の早期に起きやすく、三胚葉に分化した後は安定とされている。同様の傾向は iPS 作成の過程でも指摘されている。CNV の安定化、不安定化の機序についてはよくわかっていない。我々は CNV の解析に aCGH を用いている。この解析の再現性と解析精度を向上させるには、試料としてのゲノム DNA に mRNA などの混在をできるだけ少なくして、dsDNA の純度を高めた試料を用いることにより、解析でターの質と再現性を高める事ができた。残された課題として、CNV の解析は使用するアレイ基盤や情報解析ツールによりその検出領域は必ずしも一致しないことが指摘されているので、原理の異なった解析手法を複数組み合わせ確認する必要がある。

E. 結論

CNV は MSA 素因遺伝子の同定に有力な研究手段である。候補領域は手数例で検証する必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐々木秀直：多系統萎縮症の自律神経障害について．自律神経 2013;50(4):255-257
- 2) 佐々木秀直：脊髄小脳変性症 最近の進歩．日本内科学会雑誌 2013;102(9):2375-2381
- 3) 矢部一郎，佐々木秀直：脊髄小脳変性症の治療の進歩．神経治療学 2013;30(4):411-415
- 4) The Multiple-System Atrophy Research Collaboration：Mutations in COQ2 in Familial and Sporadic Multiple-System Atrophy. N Eng J Med 2013;369:233-244
- 5) Sasaki H, Matsushima M, Hama Y, Sakushima K, Nakamura M, Yabe I, Oba K, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J: Plasma matrix metalloproteinase-3 correlates with the clinical severity in men with multiple system atrophy. Neurol Clin Neurosci 2013;1(2):69-77

2. 学会発表

- 1) 佐々木秀直: 脊髄小脳変性症 最近の進歩. 第110回日本内科学会講演会, 2013年4月12日, 東京
- 2) 松嶋藻乃, 伊藤さやか, 吉田篤司, Sergey Kurkin, 矢部一郎, 佐々木秀直, 田中真樹: 知覚的予測における小脳の役割 (Contribution of the cerebellum to perceptual prediction). 第36回日本神経科学大会-Neuro2013, 2013年6月20日-23日, 京都
- 3) 松嶋理明, 矢部一郎, 佐久嶋 研, 大庭幸治, 水戸泰紀, 武井麻子, 保前英希, 津坂和文, 吉田一人, 丸尾泰則, 佐々木秀直: 多系統萎縮症における症状評価スケールの比較 (中間報告). 第54回日本神経学会学術大会, 2013年5月29日-6月1日, 東京
- 4) 佐々木秀直, 松嶋理明, 矢部一郎, 浜結香, 中村雅一, 佐久嶋 研, 大庭幸治, 丹治邦和, 森 文秋, 若林孝一, 柿田明美, 高橋 均, 内海 潤: 多系統萎縮症における MMP-3, MMP-9, TIMP-1 の検討 (第二報). 第54回日本神経学会学術大会, 2013年5月29日-6月1日, 東京
- 5) 松嶋理明, 矢部一郎, 廣谷 真, 加納崇裕, 佐々木秀直: SCOPA-AUT 日本語版の信頼性の検討. 第31回日本神経治療学会総会, 2013年11月21日~23日, 東京
- 6) 若林孝一, 森 文秋, 柿田明美, 高橋均, 佐々木秀直, 内海 潤: ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた神経変性疾患の microRNA 解析. 第55回日本神経病理学会総会, 2014年6月3-5日, 東京
- 7) 松嶋理明, 矢部一郎, 佐久嶋 研, 大庭幸治, 水戸泰紀, 武井麻子, 保前英希, 津坂和文, 吉田一人, 丸尾泰則, 佐々木秀直: 多系統萎縮症における症状評価スケールの比較 第2報. 第55回日本神経学会学術大会, 2014年5月21~24日, 福岡
- 8) Matsushima M, Yabe I, Sakushima K, Oba K, Mito Y, Takei A, Houzen H, Tsuzaka K, Yoshida K, Maruo Y, Sasaki H: Comparison of different symptom assessment scales for multiple system atrophy -second report. 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Jun 8-12, 2014, Stockholm
- 9) Matsushima M, Yabe I, Sakushima K, Oba K, Mito Y, Takei A, Houzen H, Tsuzaka K, Yoshida K, Maruo Y, Sasaki H: Comparison of different symptom assessment scales for multiple system atrophy in 1 year. 14th Asian & Oceanian Congress of Neurology, Mar 2-5 2014, Macao, China.
- 10) Sakushima K, Nishimoto N, Nojima M, Matsushima M, Yabe I, Sato S, Mori M, Sasaki H: Epidemiology of Multiple System Atrophy in Hokkaido - the northern most island of Japan: HoRC-MSA project: 14th Asian & Oceanian Congress of Neurology, Mar 2-5 2014, Macao, China.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

発明の名称：オートファジーを調節するマイクロ RNA

出願日：2013 年 9 月 11 日

出願番号：特願 2013-188234

発明者：佐々木秀直、内海 潤、
若林孝一

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

CNV解析によるMSA素因遺伝子の探索

