

References

- 1 Arnaud L, Haroche J, Mathian A *et al.* Pathogenesis of Takayasu's arteritis: a 2011 update. *Autoimmun Rev* 2011; 11:61–7.
- 2 Yoshida M, Kimura A, Katsuragi K *et al.* DNA typing of HLA-B gene in Takayasu's arteritis. *Tissue Antigens* 1993; 42:87–90.
- 3 Yajima M, Numano F, Park YB *et al.* Comparative studies of patients with Takayasu arteritis in Japan, Korea and India—comparison of clinical manifestations, angiography and HLA-B antigen. *Jpn Circ J* 1994;58:9–14.
- 4 Sahin Z, Bicakcigil M, Aksu K *et al.* Takayasu's arteritis is associated with HLA-B*52, but not with HLA-B*51, in Turkey. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R27.
- 5 Vargas-Alarcon G, Flores-Dominguez C, Hernandez-Pacheco G *et al.* Immunogenetics and clinical aspects of Takayasu's arteritis patients in a Mexican Mestizo population. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:439–43.
- 6 Kimura A, Kitamura H, Date Y *et al.* Comprehensive analysis of HLA genes in Takayasu arteritis in Japan. *Int J Cardiol* 1996;54(Suppl):S61–9.
- 7 Takamura C, Ohhigashi H, Ebara Y *et al.* New human leukocyte antigen risk allele in Japanese patients with Takayasu arteritis. *Circ J* 2012;76:1697–702.
- 8 Eichhorn J, Sima D, Thiele B *et al.* Anti-endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. *Circulation* 1996;94: 2396–401.
- 9 Arend WP, Michel BA, Bloch DA *et al.* The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1129–34.
- 10 Japanese Circulation Society Joint Working Group. Guideline for management of vasculitis syndrome (JCS 2008). *Circ J* 2011;75:474–503.
- 11 Hata A, Noda M, Moriwaki R *et al.* Angiographic findings of Takayasu arteritis: new classification. *Int J Cardiol* 1996; 54(Suppl):S155–63.
- 12 Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25: 1605–12.
- 13 Payami H, Joe S, Farid NR *et al.* Relative predispositional effects (RPEs) of marker alleles with disease: HLA-DR alleles and Graves disease. *Am J Hum Genet* 1989;45: 541–6.
- 14 Burnham KP, Anderson, David R. Model selection and multi-model inference: a practical information-theoretic approach. 2nd edn. New York: Springer-Verlag, 2002.
- 15 Kitamura H, Kobayashi Y, Kimura A *et al.* Association of clinical manifestations with HLA-B alleles in Takayasu arteritis. *Int J Cardiol* 1998;66(Suppl 1): S121–6.
- 16 Appel H, Kuon W, Kuhne M *et al.* The solvent-inaccessible Cys67 residue of HLA-B27 contributes to T cell recognition of HLA-B27/peptide complexes. *J Immunol* 2004;173:6564–73.
- 17 Maenaka K, Maenaka T, Tomiyama H *et al.* Nonstandard peptide binding revealed by crystal structures of HLA-B*5101 complexed with HIV immunodominant epitopes. *J Immunol* 2000;165:3260–7.
- 18 Kumar P, Vahedi-Faridi A, Saenger W *et al.* Structural basis for T cell alloreactivity among three HLA-B14 and HLA-B27 antigens. *J Biol Chem* 2009;284: 29784–97.
- 19 Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Soto ME *et al.* Comparative study of the residues 63 and 67 on the HLA-B molecule in patients with Takayasu's arteritis. *Immunol Lett* 2005;96:225–9.

特集：次世代シーケンサーによる神経変性疾患の解析と展望

東大病院ゲノム医学センターにおける取り組み
パーキンソン病のパーソナルゲノム解析を中心に

三 井 純 石 浦 浩 之 辻 省 次

BRAIN and NERVE

第 65 卷 第 3 号 別刷

2013 年 3 月 1 日 発行

医学書院



特集 ■ 次世代シーケンサーによる神経変性疾患の解析と展望

東大病院ゲノム医学センターにおける取り組み パーキンソン病のパーソナルゲノム解析を中心に

Present Efforts in the Medical Genome Center at the University of Tokyo Hospital

三井 純¹⁾ 石浦 浩之¹⁾ 辻 省次^{1,2)}

Jun Mitsui¹⁾, Hiroyuki Ishiura¹⁾, Shoji Tsuji^{1,2)}

Abstract

Technologies associated with massively parallel sequencing have evolved rapidly over the last several years, making it possible to cost-effectively sequence the whole human genome and exome in a short period of time. These technologies are expected to bring about a better understanding of genetic components underlying monogenic diseases, as well as diseases inherited in a non-Mendelian fashion. They will eventually cause a paradigm shift in clinical practice, where the diagnosis and decision-making for appropriate therapeutic procedures is based on the “personal genome”. In this review, we outline some of our recent efforts in the Medical Genome Center at the University of Tokyo Hospital, including an identification of the causative gene for a Mendelian disease (posterior column ataxia with retinitis pigmentosa), an approach to uncover susceptible genes for a non-Mendelian disease (Parkinson disease), and an application of exome sequencing for the molecular diagnosis of a disease with vast genetic heterogeneity (hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids). We also discuss the advantages and limitations of these emerging technologies.

Key words : massively parallel sequencing, Parkinson disease, common disease- multiple rare variants, personal genome

はじめに

次世代シーケンサーと総称される大規模並列 DNA シーケンシング技術は、最近数年の間に加速的に進化しており、処理速度の向上、コストの低下が進んでいる。次世代シーケンサーが臨床遺伝学にもたらすインパクトとして以下の3つの事柄が挙げられる。

第1は、メンデル遺伝性疾患の原因遺伝子解明が進むことである。連鎖解析による絞り込みを十分に行うことが難しい小さな家系サイズの遺伝性疾患、*de novo* 変異などで生じる重篤で生殖適応度が低い遺伝性疾患など、従来の技術ではアプローチが困難だった遺伝性疾患の解

明が期待される。実際、このようなメンデル遺伝性疾患の原因遺伝子の報告がここ数年で急速に増加している。問題点としては、現在普及している次世代シーケンサーでは、ひとつながりで配列決定できる塩基長（リード長）が高々100塩基程度であり、トリプレットリピート病などに代表される繰り返し配列の延長や挿入変異の検出がしばしば困難なことである。特に遺伝性神経変性疾患ではこの種類の変異が多く知られており、現在の次世代シーケンサーの技術的課題の1つである。

第2は、孤発性疾患の遺伝因子の解明が期待されることである。従来は一塩基多型（single nucleotide polymorphism : SNP）をマイクロアレイ上で大規模にタイピングする技術を利用して、患者群と対照群で多型の頻

1) 東京大学医学部附属病院神経内科〔〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1〕Department of Neurology, the University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

2) 同病院 ゲノム医学センター Medical Genome Center, the University of Tokyo Hospital

度を比較することで疾患と関連する感受性遺伝子探索が行われてきた。候補となる遺伝子・領域だけではなく、全ゲノム上の多型を広範囲に探索できることから、このアプローチは全ゲノム関連解析 (genome-wide association study : GWAS) と呼ばれ、多くの疾患で検討が行われた。新たな発見も多かったが、孤発性疾患の遺伝因子の大部分が解明できるのではないかという期待には届かず、まだ解明されていない遺伝因子 (missing heritability) が残されている¹⁾。

多型マーカーと連鎖不平衡にある疾患感受性アレルを関連解析で検出する手法は、比較的少数の創始者に由来する疾患感受性アレルが、患者群に広く分布するという構造を持つ集団 (common disease-common variants 仮説) に対しては強い検出力を示すが、多数の独立した疾患感受性アレルが個々には稀に患者群に分布するという集団の遺伝的構造 (common disease-multiple rare variants 仮説) に対しては検出が困難になる。また、多型タイピングでは検出できないコピー数変異などの構造変異が寄与している可能性もある。今後、孤発性疾患における遺伝因子の解明を進めていくためには、パーソナルゲノム解析に基づく網羅的な変異の同定が大きな手掛かりになるであろう。

第3に、臨床における遺伝子診断の汎用化が挙げられる。神経内科領域の臨床では遺伝性疾患の占める割合が相対的に高く、需要も高いことから普及が期待される。特に原因遺伝子が多様な表現型・疾患群の遺伝子診断において高い効果を発揮するであろう。問題点としては、上述のように遺伝性神経筋疾患にみられる繰り返し配列の延長 (優性遺伝性脊髄小脳変性症の多く、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、ハンチントン病、球脊髄性筋萎縮症、筋強直性ジストロフィー、フリードライヒ運動失調症、9p21 に連鎖する筋萎縮性側索硬化症・前頭側頭型認知症、眼咽頭筋ジストロフィーなど) の検出は短いリード長では困難であり、フラグメント解析やサザン・ブロッティング解析を併用する必要がある。また、現状ではコスト・パフォーマンスの点からエクソーム解析が選択されることが多いと考えられるが、コピー数変異 (遺伝性神経疾患では *APP*, *SNCA*, *PMP22*, *MPZ* などのコピー数変異による遺伝性疾患が報告されている) や大きな欠失・重複変異 (デュシェンヌ・ベッカー型筋ジストロフィーにおける *DMD* や常染色体劣性遺伝若年性パーキンソニズムにおける *PARK2* の欠失・重複変異など) において、エクソーム解析では検出力が十分でない可能性があり適応に注意が必要である。

本稿では、以上3点について概説し、いくつかの具体

例を挙げる。最後に2011年度に東京大学医学部附属病院の新たな組織として発足したゲノム医学センターの紹介と今後の展望を述べる。

I. メンデル遺伝性疾患へのアプローチ

連鎖解析による候補領域の絞り込みが十分行えず、従来の技術ではアプローチが困難だった小さな家系でも、次世代シーケンサーによってアプローチできる可能性がある。網膜色素変性症を伴う後索運動失調 (posterior column ataxia with retinitis pigmentosa : PCARP) は、常染色体劣性遺伝性・小児期発症で、その名のとおり後索性の運動失調症と網膜色素変性症を特徴とする極めて稀な神経変性疾患である。北米とスペインの家系の連鎖解析から1q31-q32に連鎖することが知られており、原因遺伝子は長らく不明であったが^{2,3)}、2010年末にエクソーム解析によって *FLVCR1* が原因遺伝子であることが報告された⁴⁾。筆者らは、この原因遺伝子が報告される以前にPCARPの1家系について検討する機会があったので、その解析の経緯を紹介する⁵⁾。

家系はFig. 1に示すように両親いとこ婚で、発症者2例、非発症者1例である。Affymetrix社の50K Xba/Hindアレイを用いてSNPジェノタイピングを行い、SNPによる連鎖解析のために開発したパイプラインSNP-HiTLinkを用いて⁶⁾、常染色体劣性遺伝性・完全浸透モデルでパラメトリック多点解析を行った。その結果、染色体1番 (1q32.1-q41, 約13 Mbの範囲) と染色体20番 (20p12.1-p11.23, 約16 Mbの範囲) に高いLODスコア (染色体上のマーカーと病原性変異が連鎖しているかどうかを統計学的に推定するための値。最もスコアの高い領域に病原性変異が存在する可能性が高い) を示す領域が得られ、特に染色体1番の領域は、これまでに報告されていたPCARP連鎖領域とオーバーラップしていた。

次に、この候補領域の配列をキャプチャーするためロシュ・ニンブルジェン社のプラットフォームでカスタムアレイを作製し、候補領域をエンリッチしたDNAサンプルをイルミナ社のGenome Analyzer IIxを用いて100塩基・シングルリードでシーケンスした。得られたリードはbwa (Burrows-Wheeler Aligner) のデフォルト条件で参照配列 (NCBI36/hg18) に対してアライメントを行い⁷⁾、SAMtoolsを用いて変異の検出を行った⁸⁾。染色体1番の候補領域から、13,616個の変異が検出され、そのうち翻訳領域には60個の変異が認められた。PCARPが極めて稀な疾患であることから、原因と

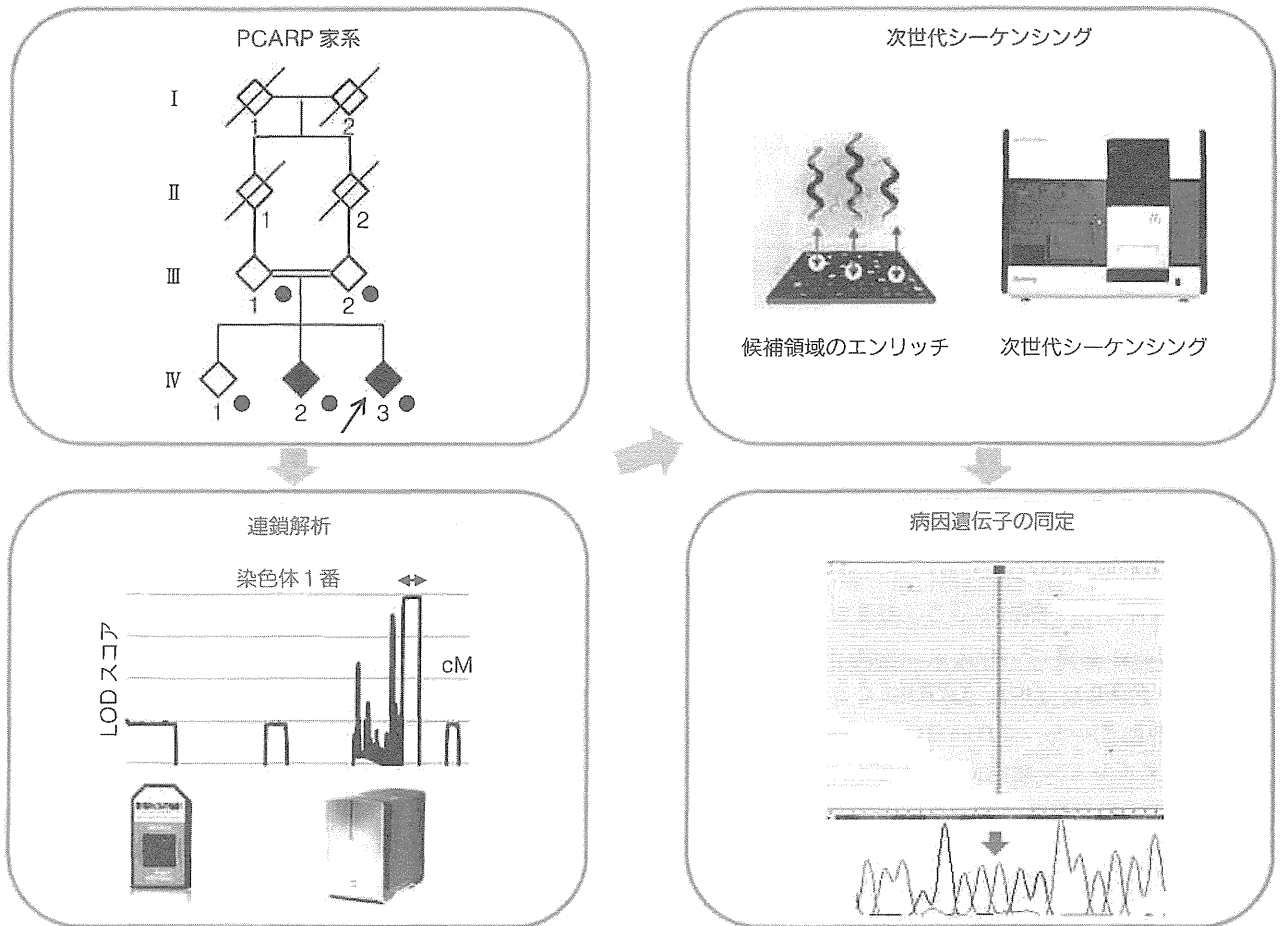


Fig. 1 メンデル遺伝性神経疾患の解明
 [略語] PCARP: 網膜色素変性症を伴う後索運動失調

なる変異は変異データベースに登録されていない可能性が高いと考え、翻訳領域の変異のうち dbSNP131 に登録されていない変異を検索したところ 5 個、そのうちアミノ酸置換を伴う変異は 4 個に絞られた。さらに、これまでに報告されていた PCARP 連鎖領域とオーバーラップする領域に絞り込むと、*FLVCR1* にある G493R ホモ接合性変異のみが残された。

ここまで検討を進め、*FLVCR1* が PCARP の原因遺伝子である可能性が高いと考えられたが、単独の家系ではこれ以上の証明が困難であり、原因遺伝子と断定するためには別の複数家系による報告を待たねばならなかった⁴⁾。次世代シーケンサーによって、候補領域における変異探索の労力は大幅に軽減されたが、その一方で正確な臨床診断に基づいてリソースを収集する臨床家の役割はこれまでと変わらず極めて重要なものである。

シーケンサー側の課題としては、現在主流の次世代シーケンサーが高々 100 塩基のショートリードによる配列解析であるため、繰り返し配列の延長や挿入変異の検

出が難しい点が挙げられる。最近注目を集めている 9p21 に連鎖する筋萎縮性側索硬化症・前頭側頭型認知症における *C9orf71* インtron 部分の 6 塩基繰り返し配列延長変異^{9,10)} など、頻度の高い重要な疾患遺伝子がまだ見つけられていない可能性もある。数塩基繰り返し配列にターゲットを絞った配列アSEMBラーの開発、PacBio RS システムなどによるロングリード配列解析の併用など検討を重ねている。

II. 孤発性神経変性疾患の遺伝因子解明に向けたアプローチ

1. これまでの GWAS の成果と残された課題

孤発性神経疾患の 1 例として、パーキンソン病を挙げる。パーキンソン病は振戦、筋強剛、寡動、姿勢反射障害などの運動障害を主な症候学的特徴とし、認知障害や自律神経障害などさまざまな随伴症状を呈する進行性の神経変性疾患である。神経変性疾患としてはアルツハイ

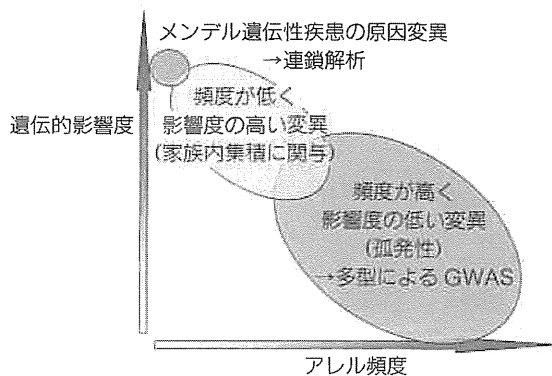


Fig. 2 孤発性神経疾患の遺伝因子解明に向けて

マー病に次いで頻度が高く、60歳以上の高齢者においては1%程度の頻度であり¹¹⁾、高齢化とともに患者数の急増が予想される。

家族性パーキンソン病については家系に対する連鎖解析によって、 α シヌクレイン (SNCA)、パーキン (PARK2)、PINK1、DJ-1、LRRK2などが原因遺伝子として報告されている。これら原因遺伝子の機能解析により、 α シヌクレイン蛋白の過剰発現・病的蓄積、ミトコンドリアの機能障害、ユビキチン・プロテアソーム系の障害、酸化ストレスなどが孤発性パーキンソン病とも共通する病態機序として推測され、病態解明・治療法開発に向けた研究が行われている¹²⁾。しかし現時点での治療法の中心は、中脳黒質・線条体系のドパミン低下に対する補充療法にとどまり、長期的な病態の進行を抑制する方法がない。大部分を占める孤発性パーキンソン病の遺伝因子が解明されれば、病態自体の進行を抑制する新たな治療法の開発が可能になるのではないかと期待されている。

孤発性パーキンソン病の遺伝因子の大きさについては議論があるが、これまでの遺伝疫学研究からは遺伝因子の大きさを表す遺伝率を60%前後と推定している^{13,14)}。これまでの多型をマーカーにしたGWASはヨーロッパ集団からの報告が大部分であるが、SNCA、LRRK2、MAPT、PARK16、BST1、GAK、HLA-DRB5などを含む遺伝子座が報告されている¹⁵⁻²⁰⁾。日本人を対象にした大規模GWASでは、ヨーロッパ集団で報告されているMAPTが検出されなかった一方、新たな遺伝子座PARK16、BST1が検出された事実は、集団によって疾患の遺伝因子の構造が異なっていることを反映している興味深い¹⁷⁾。一方、SNCAなどは日本人集団でもヨーロッパ集団でも共通して再現性よく関連が確認されている。

昨年、ヨーロッパ集団におけるGWASをメタ解析し

た最大規模の研究が報告された²¹⁾。このメタ解析では、これまで報告されていたSNCA、MAPT、LRRK2、PARK16、BST1、HLA、GAKに加えて、新たにSYT11、ACMSD、STK39、MCCC1/LAMP3、CCDC62/HIP1Rがゲノムワイド水準の有意差をもって確認され、これら11遺伝子座に基づく人口寄与リスク割合 (population attribution risk: PAR) を合計で60.3%と推定している。PARはリスクアレルで説明できる疾患患者中の割合を指し、これまで報告されているパーキンソン病の遺伝率に近い数字に達していることは注目される。

もちろん、有意となった遺伝子座のみを集めてくるための確認バイアスや、検出されたマーカーと真の機能性変異の連鎖不平衡の程度があるため、この推定値は過剰に評価されている可能性がある。今後とも、遺伝因子構造の異なるさまざまな人種集団における再現性の確認、遺伝子間相互作用や環境因子に関する評価などさまざまな点を考慮する必要があるが、頻度の高い疾患感受性変異に限れば、GWASによって網羅されつつある状況であると考えられる。

一方、残されている課題としてパーキンソン病の家族内集積性の問題が挙げられる。一般にパーキンソン病患者の5~10%程度に家族歴があることが知られており、家族内集積性に関するメタ解析によると、患者の一親等の発症危険率は3倍程度と推定されている^{22,23)}。ところが、GWASで検出されている疾患感受性変異のオッズ比は高々1.5倍程度であり、家族内集積性のほとんどが説明できていない²¹⁾。筆者らは、このmissing heritabilityについて、頻度が低く疾患への影響度が強い変異が未解明のまま残されていると推測している (Fig. 2)。すなわち、頻度が低すぎてGWASでは検出が難しい一方、浸透率が低すぎて連鎖解析の適応とならないような変異が家族内集積性に寄与していると考えている。このような特徴を持つ遺伝因子の具体例について、以下にグルコセブレロシダーゼ遺伝子を例に述べていく。

2. 孤発性パーキンソン病とグルコセブレロシダーゼ遺伝子

グルコセブレロシダーゼ (glucocerebrosidase) 遺伝子 (GBA) はライソゾームに局在する加水分解酵素グルコセブレロシダーゼをコードし、常染色体劣性遺伝性の先天代謝疾患ゴーシェ病の原因遺伝子である。ゴーシェ病患者は日本国内で100万人に3人程度、病原性変異のキャリア頻度は300人に1人程度と推測される稀な疾患である²⁴⁾。2004年、Goker-Alpanら²⁵⁾により、

Table 同定された GBA 病原性変異の種類と頻度

変異	パーキンソン病患者群の頻度	対照者群の頻度	フィッシャーの正確確率検定	オッズ比 (95%信頼区間)
R120W	15/534	0/544	$P < 0.0001$	
L444P-A456P-V460V (RecNciI)	14/534	2/544	$P = 0.0020$	7.3 (1.7~66.4)
L444P	8/534	0/544	$P = 0.0035$	
N188S	4/534	0/544	有意差なし	
R329C	2/534	0/544	有意差なし	
R496C	2/534	0/544	有意差なし	
R120W-N188R-V191G-S196P-F213I	1/534	0/544	有意差なし	
R131C	1/534	0/544	有意差なし	
G193W	1/534	0/544	有意差なし	
F213I	1/534	0/544	有意差なし	
A456P-V460V	1/534	0/544	有意差なし	
合計	50/534 (9.4%)	2/544 (0.37%)	$P = 6.9 \times 10^{-14}$	28.0 (7.3~238.3)

ゴーシェ病患者の血縁者に何世代かにわたりパーキンソン病を発症する家系がいくつか報告された。これは GBA 変異のキャリアが、パーキンソン病発症の危険因子になる可能性を示唆しており、家系内で複数の発症者が観察されるということは影響度が強い可能性を示唆している。同年、Aharon-Peretz ら²⁶⁾により、アシュケナージ系ユダヤ人を対象に GBA の特定の変異をスクリーニングした関連解析が行われ、キャリア頻度のオッズ比 7.0 倍と高い関連を示す報告がなされた。しかし、特定の変異のみをスクリーニングしている点、サンプル数が比較的少ない点、GBA 変異の分布・頻度が特異なユダヤ人種を対象にしている点で、一般化できるかどうか解釈を困難にしていた。

これらの問題を克服するため、筆者らと神戸大学 戸田達史教授らの研究グループ (Japanese Parkinson Disease Susceptibility Gene Consortium) との共同研究で、日本人大規模サンプルに対して GBA の全エクソン配列解析にて網羅的に変異をスクリーニングする患者-対照関連解析を行った²⁷⁾。サンプル規模はパーキンソン病患者 534 例、対照者 544 例で、合計 27 種類の変異を同定した。うち 11 種類はゴーシェ病の原因変異として報告のある変異 (病原性変異)、16 種類はゴーシェ病の病原性変異として報告のない変異 (非病原性変異) であった。個々の変異別に検討すると、R120W, L444P, RecNciI の 3 種類はキャリア頻度がパーキンソン病患者群で有意に高かった (それぞれ $P < 0.0001$, 0.0035, 0.0020)。これら 3 種類の変異はすべて病原性変異であるため、病原性変異に注目したところ、R120W, L444P, RecNciI 以外の 8 種類の病原性変異は、全例パーキンソン病患者群でのみ認められ、対照群には認めなかった (Table)。合計するとパーキンソン

病患者 534 例中 50 例 (9.4%)、対照者 544 例中 2 例 (0.37%) で病原性変異をヘテロ接合性に認めた。全病原性変異のパーキンソン病患者に対するオッズ比は 28.0 倍 (95%信頼区間 7.3~238.3) となり、 P 値は 6.9×10^{-14} と有意であった。一方、非病原性変異では個別でも合計してもパーキンソン病患者群と対照群の間に有意な関連は認めなかった。

次に、GBA 病原性変異キャリアであるパーキンソン病患者 50 例の臨床的特徴について検討した。発症年齢を検討したところ、GBA 病原性変異キャリア群の平均発症年齢は 52.5 歳で、非キャリア群の 58.8 歳と比べて有意に若年化していた。GBA 病原性変異キャリア 50 例のうち 49 例については臨床情報を入手可能だった。49 例中 41 例 (83.7%) では抗パーキンソン病薬 (レボドパ、ドパミン受容体アゴニスト) が有効であった。33 例でパーキンソン病の補助診断に用いられる [¹²³I]-MIBG (metaiodobenzylguanidine) 心筋シンチグラフィ検査が施行されていた。検査が施行されていた 33 例中 29 例 (87.9%) では心筋への取り込みが低下しており、一般的なパーキンソン病の特徴に矛盾ないと考えられた。49 例中 13 例 (26.5%) で認知障害 (clinical dementia scale 1 以上²⁸⁾)、17 例 (34.7%) で幻視をきたしていた。非キャリア群の臨床的特徴が十分得られなかったため、有意かどうか結論できなかったが、キャリア群では認知障害や幻視の頻度が高い可能性があると考えられた。

さらに同年、筆者らも参加した国際多施設共同解析 (北米 4 施設、南米 1 施設、アジア 3 施設、イスラエル 2 施設、ヨーロッパ 6 施設) の結果が発表され、GBA 変異がパーキンソン病発症に関与する遺伝因子であることが多くの人種で確認された²⁹⁾。この解析でも、GBA

変異キャリアの発症年齢は非キャリアに比べて若年化していることが確認され、さらに認知症を発症する頻度が高いことなどが示された。

3. GBA 変異の家族内集積性への関与

このように GBA 病原性変異は、パーキンソン病発症に対して非常に強い影響度を持つ遺伝因子であることがわかり、パーキンソン病の家族内集積性の一部を説明できるのではないかと考えられている。実際、筆者らの検討でも、GBA 病原性変異キャリア群の家族歴に注目したところ、50 例中 11 例 (22.0%) で両親または同胞の血縁者にパーキンソン病患者が 1 人ずついることがわかった。そのうち 3 例については、発症者の DNA 解析が可能であったため解析を行ったところ、家系内の発症者全例で発端者の持つ変異と同じ変異を共有していることがわかった²⁷⁾。さらに、両親または同胞内にパーキンソン病発症者がいる多発家系 34 家系について GBA の全エクソン配列解析を行ったところ、34 家系中 5 家系 (14.7%) で GBA 病原性変異を認め、家系内で DNA 解析が可能な全サンプルにおいて、発症者は GBA 病原性変異を共有し、非発症者では変異を認めないことが示された。

筆者らの少数例の検討では完全な共分離が確認されたが、発端者が GBA 変異を持つパーキンソン病多発家系 21 家系の共分離を調べた最近の報告では、非発症者の 46% が発端者と同じ GBA 変異を共有する一方、家系内の発症者の 17% が GBA 変異を共有していないことが報告されている³⁰⁾。このことは、GBA 変異を持っていても 100% 発症するわけではないこと、同じ家系内でも遺伝的異質性が一定程度存在することを示している。

それでは、GBA 変異を持っている人のどの程度がパーキンソン病を発症するのであろうか。GBA 変異キャリアにおけるパーキンソン病の年齢別累積発症頻度を調べた報告によると、50 歳で 7.6%、60 歳で 13.7%、70 歳で 21.4%、80 歳で 29.7% と推定されている³¹⁾。このことから、GBA 変異は、メンデル遺伝性疾患ほどの強い浸透率ではないが、GWAS で検出されている疾患感受性変異と比べるとはるかに強い影響度を持っているといえる。

4. パーソナルゲノム解析に基づくパーキンソン病における疾患遺伝子研究

GBA 変異のような特徴を持つ、稀で影響度の強い遺伝因子は、パーキンソン病を含め多くの疾患で未解明の状態にあると考えられる。頻度の高い多型をマーカーに

している GWAS では検出されていないこの領域へのアプローチは、パーソナルゲノム解析に基づく網羅的な変異の同定が前提となるであろう。しかし、頻度の低い変異について変異ごとに関連を検定する従来の GWAS 的手法だと、検出される変異の種類が膨大なものとなることから、個別の変異における関連の検出力がかなり低くなってしまふ。このことから、稀な変異の関連解析に際しては、変異をグループ化して検定する統計的な手法がいくつか提案されている³²⁻³⁸⁾。しかしこれまでのところ、具体的な成功例や標準的といえるアプローチがなく、筆者らも試行錯誤を続けている状況である。

一般論として、グループ化した変異において中立的な変異や、影響する方向の異なる変異 (疾患感受性変異と保護的な変異) が混在している可能性があり、それらによって検出力が低下してしまう懸念があることから、機能的な変異を選択してグループ化するようなアルゴリズムを設定する方向性が考えられる。また、既知の病態パスウェイから候補遺伝子を絞り込んだり、重みづけをしたりする方法も考えられる。あるいは、未解明の遺伝子の多くは、比較的影響度が強いことが予想されることから、孤発性サンプルではなく、同朋例や親子例など家族内集積性のあるサンプルに集中して解析することも有効かもしれない。筆者らはこのようなアプローチのもと、パーキンソン病、多系統萎縮症 (multiple system atrophy: MSA) などの神経変性疾患について解析を進めている。

III. 遺伝子診断への適用とその役割

従来の遺伝子診断と本質的な違いはないが、エクソーム解析・全ゲノム解析では、まず膨大な変異のリストが得られ、その中から既知の原因遺伝子に変異がないか検索するという流れになる。従来は、臨床像などから可能性の高い候補遺伝子に絞って解析を行っていたが、たとえ可能性が低い候補遺伝子でも網羅的に解析できるという利点がある。当科では、遺伝形式・臨床像などからカテゴリーを設けて、検索すべき遺伝子のリストを作成し、エクソーム解析による遺伝子診断の標準化を目指している。神経筋疾患に限定しても、新たな原因遺伝子の発見は続いており、候補遺伝子リストの質の維持が重要である。

本稿では、優性遺伝性の白質脳症・認知症のカテゴリーの中から遺伝子診断がついた例について紹介する。このようなカテゴリーでは、遺伝性脳小血管病 (NOTCH3, COL4A1, TREX1)、ラミン B1 遺伝子の

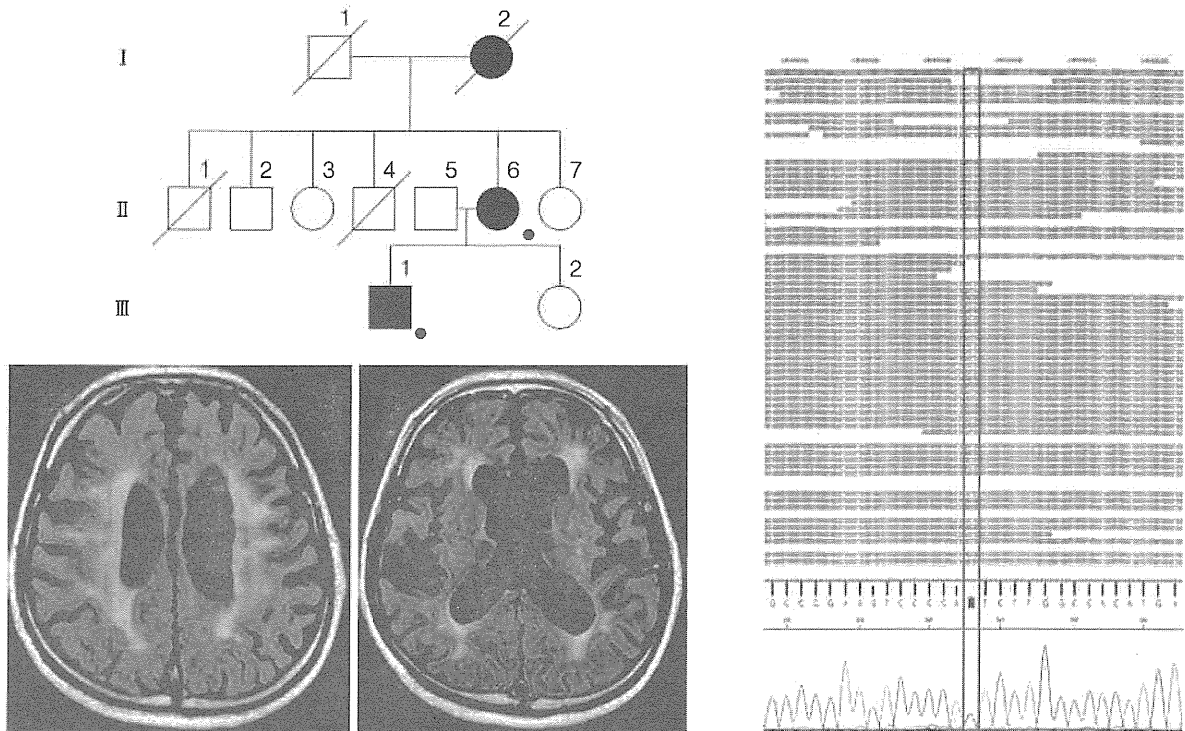


Fig. 3 遺伝子診断への具体的応用

優性遺伝性の家系で、40～50歳代発症の認知症。頭部MRIにて白質病変を認めた。鑑別診断による候補遺伝子の中から、*CSF1R* 変異を検出した。

重複変異、アレクサンダー病 (*GFAP*)、遺伝性脳アミロイド血管症 (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *CST3*, *ITM2B*)、さらに2011年末にスフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids: HDLS) の原因として報告された *CSF1R* などが挙げられる。筆者らは、白質病変・脳萎縮を伴い、進行性の認知障害をきたす原因遺伝子未同定家系についてエクソーム解析を行い、これらの候補遺伝子変異の有無について検索した。その結果、2つの家系で *CSF1R* 遺伝子のチロシンキナーゼ領域にミスセンス変異が同定され、HDLS の診断に至った (Fig. 3)。なお、他の候補遺伝子には、病原性を疑う変異は認められなかった。

HDLS は常染色体優性遺伝性で白質病変を特徴とする成人発症の非常に稀な神経変性疾患であり、中枢神経病理でスフェロイドが多数みられることが特徴である。その臨床症状は多様であり、性格や行動の変化、認知障害、抑うつ、パーキンソニズムなど運動障害、痙攣などが報告されている。また画像所見も初期には虚血性変化でみられるような非特異的所見である。HDLS の臨床所見が多様で非特異的であること、また優性遺伝性の白質脳症・認知症のカテゴリーに属する遺伝性疾患が多様

であることから、従来はこのような状況の遺伝子診断は難しく、エクソーム解析による遺伝子診断が有用であったと考えられる。

エクソーム解析による遺伝子診断はコストの点からも現実化しつつあり、近い将来、一般的な臨床検査に近づくのではないかと考えられる。もちろんトリプレットリピート病をはじめとして、ショートリードのシーケンサーでは検出が難しい変異もあるため、解析方法の特徴と限界を知ったうえで、臨床カテゴリーに応じて適応を判断する必要がある。また、検査が汎用化する過程で、膨大な変異データの解釈をどのように標準化して、診療に役立てていくのかは非常に大きな課題である。例えば、同定された変異が病原性を持つかどうかという判断に限っても、さまざまな状況がありうる。当該変異で病原性を持つという報告が既にされていたり、ナンセンス変異やフレームシフト変異など翻訳される蛋白質の機能に大きな影響を与える変異であったりすれば、病原性の判断は比較的容易かもしれない。しかし、例えばミスセンス変異では、変異の起こった蛋白質ドメインの機能、置換されたアミノ酸の性質、種間の保存性、一般集団における変異の頻度など、病原性の判断についてさまざまな条件が考えられる。

おわりに

数年前から起こっている大規模シーケンシング技術の飛躍的な進歩は目覚ましく、ヒトのエクソーム解析や全ゲノム配列解析はすでに低コストかつ簡便に行えるようになってきている。シーケンシングの低コスト化・大規模並列化のスピードに対して、情報解析のハード面・ソフト面のインフラが追いついておらず、ボトルネックになりつつある。今後、爆発的に増大するパーソナルゲノム情報を医学研究・診療に役立てていくためには、情報解析の基盤づくりは必須である。計算機リソースのハード面の拡充に加えて、日本人における参照配列整備、変異データベースの構築・共有など、ソフト面でも早急な整備が望まれる。さらに、これまで述べたように疾患の遺伝的研究のみならず、診療に果たす役割も大きくなることが予想される。臨床にフィードバックする際には、検査としての信頼度管理、変異解釈の標準化、さらに意図しない偶発的な所見の取り扱いなど、大きな課題が山積している。

東京大学医学部附属病院では、このような背景のもと、病院内の共同利用施設としてゲノム医学センター・ゲノム解析部門を2011年度に発足させた。複数台の次世代シーケンサー（HiSeq2000 2台、5500 XL 1台、PacBio RS 1台、GAIIx 1台、Miseq 1台）およびサンプル調製自動化ロボットを含む周辺機器、さらに大規模計算機と安全性に配慮したネットワークシステムを擁する病院のコア施設の1つである。パーソナルゲノム情報を遺伝的研究および診療に有効に役立てていくためには、情報を安全に管理するしくみと集約化・共有化が必要になっていくであろう。

文献

- 1) Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, et al: Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461: 747-753, 2009
- 2) Higgins JJ, Morton DH, Loveless JM: Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (AXPC1) maps to chromosome 1q31-q32. *Neurology* 52: 146-150, 1999
- 3) Higgins JJ, Klutzman K, Berciano J, Combarros O, Loveless JM: Posterior column ataxia and retinitis pigmentosa: a distinct clinical and genetic disorder. *Mov Disord* 15: 575-578, 2000
- 4) Rajadhyaksha AM, Elemento O, Puffenberger EG, Schierberl KC, Xiang JZ, et al: Mutations in *FLVCR1* cause posterior column ataxia and retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* 87: 643-654, 2010
- 5) Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, et al: Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in *FLVCR1*. *Neurogenetics* 12: 117-121, 2011
- 6) Fukuda Y, Nakahara Y, Date H, Takahashi Y, Goto J, et al: SNP HiTLink: a high-throughput linkage analysis system employing dense SNP data. *BMC Bioinformatics* 10: 121, 2009
- 7) Li H, Durbin R: Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754-1760, 2009
- 8) Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, et al; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup: The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079, 2009
- 9) DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, et al: Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72: 245-256, 2011
- 10) Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, et al: A hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72: 257-268, 2011
- 11) de Lau LM, Breteler MM: Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5: 525-535, 2006
- 12) Saiki S, Sato S, Hattori N: Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 430-436, 2012
- 13) Hamza TH, Payami H: The heritability of risk and age at onset of Parkinson's disease after accounting for known genetic risk factors. *J Hum Genet* 55: 241-243, 2010
- 14) Moilanen JS, Autere JM, Myllylä VV, Majamaa K: Complex segregation analysis of Parkinson's disease in the Finnish population. *Hum Genet* 108: 184-189, 2001
- 15) Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, et al: Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet* 74: 97-109, 2010
- 16) Hamza TH, Zabetian CP, Tenesa A, Laederach A, Montimurro J, et al: Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet* 42: 781-785, 2010
- 17) 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
- 18) Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, et al: Genome-wide association study

- reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* **41**: 1308-1312, 2009
- 19) Saad M, Lesage S, Saint-Pierre A, Corvol JC, Zelenika D, et al; French Parkinson's Disease Genetics Study Group: Genome-wide association study confirms *BST1* and suggests a locus on 12q24 as the risk loci for Parkinson's disease in the European population. *Hum Mol Genet* **20**: 615-627, 2011
 - 20) UK Parkinson's Disease Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Spencer CC, Plagnol V, Strange A, Gardner M, Paisan-Ruiz C, et al: Dissection of the genetics of Parkinson's disease identifies an additional association 5' of *SNCA* and multiple associated haplotypes at 17q21. *Hum Mol Genet* **20**: 345-353, 2011
 - 21) 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
 - 22) Thacker EL, Ascherio A: Familial aggregation of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Mov Disord* **23**: 1174-1183, 2008
 - 23) Shino MY, McGuire V, Van Den Eeden SK, Tanner CM, Popat R, et al: Familial aggregation of Parkinson's disease in a multiethnic community-based case-control study. *Mov Disord* **25**: 2587-2594, 2010
 - 24) Ida H, Rennert OM, Kawame H, Maekawa K, Eto Y: Mutation prevalence among 47 unrelated Japanese patients with Gaucher disease: identification of four novel mutations. *J Inher Metab Dis* **20**: 67-73, 1997
 - 25) Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, et al: Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J Med Genet* **41**: 937-940, 2004
 - 26) Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R: Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* **351**: 1972-1977, 2004
 - 27) 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
 - 28) Morris JC: The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* **43**: 2412-2414, 1993
 - 29) 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
 - 30) Lesage S, Anheim M, Condroyer C, Pollak P, Durif F, et al; French Parkinson's Disease Genetics Study Group: Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **20**: 202-210, 2011
 - 31) Anheim M, Elbaz A, Lesage S, Durr A, Condroyer C, et al; French Parkinson Disease Genetic Group: Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology* **78**: 417-420, 2012
 - 32) Li B, Leal SM: Methods for detecting associations with rare variants for common diseases: application to analysis of sequence data. *Am J Hum Genet* **83**: 311-321, 2008
 - 33) Price AL, Kryukov GV, de Bakker PI, Purcell SM, Staples J, et al: Pooled association tests for rare variants in exon-resequencing studies. *Am J Hum Genet* **86**: 832-838, 2010
 - 34) Madsen BE, Browning SR: A groupwise association test for rare mutations using a weighted sum statistic. *PLoS Genet* **5**: e1000384, 2009
 - 35) Liu DJ, Leal SM: A novel adaptive method for the analysis of next-generation sequencing data to detect complex trait associations with rare variants due to gene main effects and interactions. *PLoS Genet* **6**: e1001156, 2010
 - 36) Wu MC, Lee S, Cai T, Li Y, Boehnke M, et al: Rare-variant association testing for sequencing data with the sequence kernel association test. *Am J Hum Genet* **89**: 82-93, 2011
 - 37) Basu S, Pan W: Comparison of statistical tests for disease association with rare variants. *Genet Epidemiol* **35**: 606-619, 2011
 - 38) Wang Y, Chen YH, Yang Q: Joint rare variant association test of the average and individual effects for sequencing studies. *PLoS One* **7**: e32485, 2012

