

SNP アレイを活用した ALS の遺伝統計学的詳細解析

研究分担者 氏名 中柄 昌弘
名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）はその 90～95%が孤発性であるが、孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子を同定し病態解析を進める道筋は未確立である。本研究では、SNP アレイデータを活用し、ALS 発症に関わるエクソン SNP の探索、ALS の病勢進行を評価する指標である ALS Functional Rating Scale R（ALSFRS-R）の経時変化に関連する SNP 及び ALS の発症から生存又は人工換気までの期間と関連する SNP 近傍領域の連鎖不平衡解析と Imputation 法による高密度探索をそれぞれ実施した。その結果、については、Quality control が完了した。については、ALSFRS-R および生存期間のそれぞれと関連する SNP について、近傍領域の LD ブロックを同定し、更に Imputation 法によりその領域内で複数の関連 SNP を同定した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）はその 90～95%が孤発性であり、平均 3～4 年で死に至る代表的な神経難病である。治療法開発は喫緊の課題であり、病態解明、治療法開発のためには疾患関連遺伝子、分子の同定が必須である。しかし孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子を同定し、病態解析を進める道筋は未確立である。本研究は SNP アレイデータ解析により孤発性 ALS の病態関連遺伝子を同定することを目的とする。ALS の発症に関わる遺伝子を探索するために、ケース（ALS）- コントロールの関連解析を実施する。さらに大規模前向き臨床像情報を生かして、病像・経過・予後と関連する遺伝子多型を探索同定することにより、病態解明や治療法開発の手がかりとなる遺伝子・分子の同定を行う。

B. 研究方法

本研究では、Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research（JaCALS）と呼ばれる ALS の前向きコホートを用いる。本コホートは、2006 年 2 月に症例登録が開始され、現在、全国 30 施設において登録体制が整えられており、運

営事務局は名古屋大学に設置されている。臨床調査票および血液検体は、すべて各研究参加施設内において連結可能匿名化を行ったうえで、血液検体は DNA 抽出と細胞株化をおこない、名古屋大学内に設置した臨床データベースおよびゲノム遺伝子保存センターに保管されている。ALS であると本人に診断告知された症例を対象とし、改訂版 El Escorial 診断基準への適合度は臨床調査票にて確認できるようにしている。すべての登録患者から書面でのインフォームドコンセントを取得している。また、すべての参加施設で倫理委員会の承認を得ている。

2014 年 1 月末時点で、JaCALS には 905 例の症例が登録されている。登録症例の内、745 例に対し、SNP アレイ（Illumina HumanOmniExpressExome）が測定されており、約 70 万のコモン SNP と約 25 万のエクソン SNP のジェノタイプが決定されている。

本研究における解析では、当該集団から、家族歴のある症例、遺伝子異常が認められている症例、El Escorial 診断基準が suspected の症例、登録時点で人工呼吸器を導入している症例、データ欠測等により解析に不適合と判断された症例等を除外した上で実施した。また一部症例では、ALS の病勢進行

を評価する指標としてALS Functional Rating Scale R (ALSFRS-R) が測定された。ALSFRS-R は、言語・嚥下・構音・動作・歩行等の機能を定量化した病勢進行に関する総合的指標であり、最も病勢が進行した状態は0点（最小値）、いずれの機能にも症状がない状態であれば48点（最大値）となる。このALSFRS-R は、3 カ月に一度、臨床研究コーディネーターから患者もしくは主介護者に対して電話インタビューにより収集される。

【目的1】

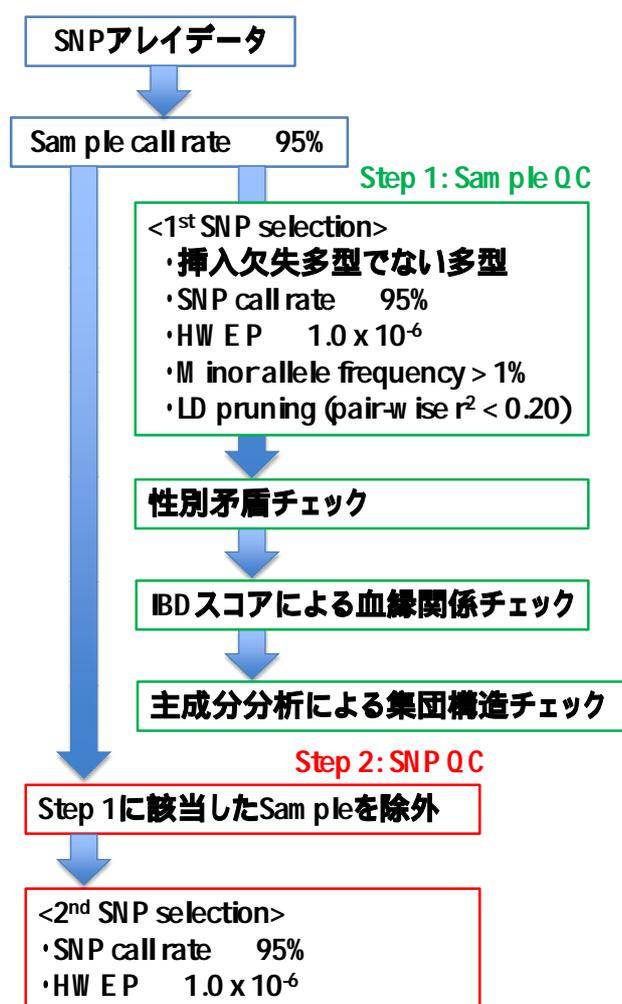
研究目的 1 は、ALS の発症に関わる遺伝子やエクソン SNP をケース (ALS) コントロールの関連解析を用いて同定する事である。

ケース群には、JaCALS に登録され、SNP アレイが測定された 563 例を対象とした。また、コントロール群には、東京都健康長寿医療センター研究所 (Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, TMIG) の協力の元、TMIG の保有する 2,360 例を使用した。これらのサンプルは、全てエクソン SNP アレイ (Illumina HumanExome) が測定されており、約 25 万のエクソン SNP のジェノタイプが決定されている。この内、ALS が未発症であると確認された 2,082 例を以降の対象とした。本研究では、これらケース・コントロール両群の SNP アレイで共通して測定されている約 25 万種類のエクソン SNP を用いて、ALS と関連するエクソン SNP を探索する事を目的とする。

本解析では、上記 SNP アレイデータの Quality Control (QC) を実施した。本 QC は右図の通り 2 段階のステップで実施した。最初のステップ 1 では、サンプルの QC を実施した。具体的には、サンプル call rate (ジェノタイプが決定された割合) が低い者を除外した後、SNP アレイデータに基づいた、SNP の性別情報と登録時の性別情報の一致性チェック、IBD スコアによる血縁関係個体のチェック、主成分分析による集団構造のチェックを実施した。ステップ 2 では、ステップ 1 のチェックで該当したサンプルを除外して、SNP 単位の QC を実施した。具体的

には、call rate が低い SNP と Hardy Weinberg 平衡 (HWE) の逸脱が疑われる SNP を除外した。ケース、コントロールで、測定している SNP アレイのプラットフォームが異なっている事から、それぞれの群で QC を行った。

ソフトウェアとして、主成分分析以外の処理を PLINK v1.07、主成分分析を EIGENSOFT version 4.2 で使用した。



図：SNP アレイデータの QC の流れ

【目的2】

研究目的 2 は、ALSFRS-R の経時変化の類型を規定しているコモン SNP やエクソン SNP を同定することである。同研究分担者である平川が、JaCALS に登録され、ALSFRS-R と SNP アレイが測定された 459 例を用いて、類型と SNP の関連をロジステ

ック回帰分析で確認した結果、急降下型(発症から2年以内にスコアが急激に減少する類型)と有意な関連を示すSNPが7つ同定された。更にこれらのSNPは同一座位に存在していた(以上、平川担当分)。本解析では、これら7つのSNP間の連鎖不平衡関係と、ハプロタイプを明らかにするため、連鎖不平衡解析とハプロタイプ解析を実施した。更に、急降下型の類型と関連するSNPをより高密度に探索するため、同定されたSNPを中心とした前後約1.5Mbpの領域に対してImputation法を実施した。Imputation法のreferenceとして、1000人ゲノムプロジェクト フェーズIIIのアジア人286名の情報を用いた。

連鎖不平衡解析とハプロタイプ解析にはHaploview 4.2を使用した。Imputationソフトウェアには、mach 1.0.18、minimac-2013.07.17を使用した。

【目的3】

研究目的3は、死亡又は気管切開をともなう人工換気までの期間に関連しているコモンSNPやエクソンSNPを同定することである。同研究分担者である平川が、JaCALSに登録され、SNPが測定された522例のデータ(以下、GWASデータと呼ぶ)を用いてCox回帰分析を実施した結果、有意な関連を示す座位が同定された。また、本解析にはおいては、独立した292例のALS症例(以下、Validationデータと呼ぶ)でも同系列のSNPアレイが測定済みである事から、Validationデータを用いて、GWASデータで同定された座位を検証した所、Validationデータにおいても有意な関連が2座位確認された(以上平川担当分)。本解析では、これらの座位におけるSNP間の連鎖不平衡関係を明らかにするため、連鎖不平衡解析を実施した。またSNP Imputation法を実施する事で、これらの座位の中にある関連SNPをより高密度に探索した。

連鎖不平衡解析、Imputation法は【目的2】と同様の条件で実施した。

C.研究結果

目的1について、ケース群・コントロール群それぞれでQC作業を完了した。マイナーアレル頻度1%未満のエクソンSNPが15万種類以上確認された。現在は、両群のQCで残ったエクソンSNPについて、ケース・コントロール間の関連解析を進めている。

目的2について、ALSFRS-Rの急降下型を規定しているSNPについて、連鎖不平衡解析を実施した結果、7つのSNPが存在する周辺領域全体で連鎖不平衡ブロックを形成している事が確認できた。更にハプロタイプ解析の結果、観測された全ハプロタイプの内、これら7つのSNP全てがマイナーアレル(急降下型へ寄与するアレル)であるハプロタイプが約30%、全てメジャーアレル(急降下型へ寄与しないアレル)であるハプロタイプが約60%と全体の90%以上を占めている事が確認できた。また、Imputation法により推定したジェノタイプと急降下型と関連するSNPを探索した所、recessive modelで 10^{-8} オーダーのP値を持つSNPが更に37種類確認された。現在は、Imputation法のreferenceとして1000人ゲノムプロジェクトの最新データ(SHAPEITによるタイピングデータ)を使用する事で、よりImputation精度を高めた関連解析を実施中である。目的3について、連鎖不平衡解析を実施した結果、2座位それぞれのSNPを中心としたLDブロックを特定できた。2種類のSNPアレイデータに対してImputation法により推定した結果、片方の座位において、強い連鎖不平衡にあるSNPを更に同定した。現在は、目的2と同様の方法で、よりImputation精度を高めた関連解析を実施中である。

D.考察

目的1について、エクソンSNPアレイを使用したALSの関連解析研究は、世界的にも初の試みである。今後、関連解析を進める事で、これまで報告されていないALS関連SNP又は遺伝子が同定されることが期待される。ケース・コントロール両群において、マイナーアレル頻度(MAF)が1%未満のエク

ソン SNP が非常に多く存在した。アミノ酸変異を伴う SNP の頻度は、他の領域の SNP と比べて低頻度である事、同様の傾向がエクソンアレイを使用した他の表現型に注目した研究でも報告されている事 (Atherosclerosis 2013; 229(1): 155-160)から、本データの信頼性を裏付けている。

目的 2 について、ALSFRS-R の急降下型と関連している 7 種類の SNP について、これらが同一の連鎖不平衡ブロックに存在している事が確認された。また、これら 7 つの SNP のハプロタイプは、7 つの SNP 全てがマイナーアレル(急降下型へ寄与するアレル)であるハプロタイプと全てメジャーアレル(急降下型へ寄与しないアレル)であるハプロタイプが全ハプロタイプの 90%以上を占めていた。更に、Imputation 法により推定した SNP の関連解析を進めた所、同一 LD ブロック内で更に多くの SNP が同定された。これらの結果は、これら全ての SNP が急降下型へ寄与しているのではなく、この LD ブロック内に急降下型の原因となる SNP が少数存在していると考えられる。

目的 3 について、生存又は人工換気までの期間と関連している 2 か所の座位について、連鎖不平衡関係を明らかにできた。今後より最新の reference データを使用する事でより高精度な関係が明らかになると期待される。

E. 結論

本研究では、ALS 発症関連エクソン SNP の探索のための Quality control(QC)、ALSFRS-R の経時変化の中で発症から 2 年以内にスコアが急激に減少する類型と関連するコモン又はエクソン SNP 及び、生存又は人工換気までの期間に影響するコモン SNP 又はエクソン SNP の連鎖不平衡解析と Imputation 法による高密度探索をそれぞれ実施した。いずれの解析においても、最新のゲノムワイド関連解析研究で使用されている遺伝統計学的解析手法を適用している事から、本解析で得られた結果の妥当性は高いと言える。今後、については、関連解析を進めていく事で、有用なエクソン SNP が得

られることが期待される。については、近年のゲノム研究の目覚ましい発展により、新しい情報が日々公開されている事を鑑み、最近公開された 1000 人ゲノムプロジェクトの最新データ (SHAPEIT によるタイピングデータ)を reference とした Imputation 法の実施により、より高精度な結果が得らえると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wu Y*, Gao H*, Li H*, Tabara Y*, **Nakatochi M***, Chiu YF*, Park EJ*, Wen W*, Adair LS, Borja JB, Cai Q, Chang YC, Chen P, Croteau-Chonka DC, Fogarty MP, Gan W, He CT, Hsiung CA, Hwu CM, Ichihara S, Igase M, Jo J, Kato N, Kawamoto R, Kuzawa CW, Lee JJ, Liu J, Lu L, McDade TW, Osawa H, Sheu WH, Teo Y, Vadlamudi S, Van Dam RM, Wang Y, Xiang YB, Yamamoto K, Ye X, Young TL, Zheng W, Zhu J, Shu XO, Shin C, Jee SH, Chuang LM, Miki T, Yokota M, Lin X, Mohlke KL, Tai ES. A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin level in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2. Human Molecular Genetics 2014; 23(4): 1108-1119. (*equal contributors)
2. Ichihara S, Yamamoto K, Asano H, **Nakatochi M**, Sukegawa M, Ichihara G, Izawa H, Hirashiki A, Takatsu F, Umeda H, Iwase M, Inagaki H, Hirayama H, Sone T, Nishigaki K, Minatoguchi S, Cho MC, Jang Y, Kim HS, Park JE, Tada-Oikawa S, Kitajima H, Matsubara T, Sunagawa K, Shimokawa H, Kimura A, Lee JY, Murohara T, Inoue I, Yokota M. Identification of a glutamic acid repeat polymorphism of ALMS1 as a novel

genetic risk marker for early-onset myocardial infarction by genome-wide linkage analysis. *Circulation Cardiovascular Genetics* 2013; 6(6): 569-578.

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

3. Lee JY, Lee BS, Shin DJ, Park KW, Shin YA, Kim KJ, Heo L, Lee JY, Kim YK, Kim YJ, Hong CB, Lee SH, Yoon D, Jung HK, Oh IY, Kim BJ, Lee J, Park SJ, Kim J, Kawk HK, Lee JE, Park HK, Lee JE, Nam HY, Park HY, Shin C, Yokota M, Asano H, **Nakatochi M**, Matsubara T, Kitajima H, Yamamoto K, Kim HL, Han BG, Cho MC, Jang Y, Kim HS, Park JE, Lee JY. A genome-wide association study of a coronary artery disease risk variant. *Journal of Human Genetics* 2013; 58(3): 120-126.
4. **Nakatochi M**, Katayama M, Kato R, Okochi M, Takase T, Yoshida Y, Kawase M, Honda H. Comprehensive combination analysis for screening of significant peptide epitopes using slide glass type-exclusive peptide array from milk protein. *Kagaku Kougaku Ronbunshu* 2013; 39(1): 40-45. Japanese.

2.学会発表

1. Wu Y, Gao H, Li H, Tabara Y, **Nakatochi M**, Chiu YF, Park EJ, Vadlamudi S, Fogarty M, Wen W, Shu XO, Shin C, Jee SH, Chuang LM, Miki T, Yokota M, Lin X, Mohlke KL, Tai ES, Asian Genetic Epidemiology Network (AGEN) Adiponectin Working Group: A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin level in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2, *American Society of Human Genetics* 2013, Boston, America, October 22-26, 2013.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1.特許取得