

多系統萎縮症の発病素因解析ならびに分子マーカーの開発

業務担当責任者 : 佐々木 秀直 北海道大学大学院医学研究科神経内科学
研究協力者 : 浜 結香¹、松島理明¹、矢部一郎¹、瀧川一学²、内海 潤^{1,3}
1) 北海道大学大学院医学研究科神経内科学
2) 北海道大学大学院情報科学研究科情報理工学専攻知識メディア研究室
3) 公益財団法人がん研究会

研究要旨:

400K CNV アレイによる解析により、非血縁の MSA 患者群(n=24)と成人対照群(n=23)の比較により、MSA に頻度の高い候補領域を複数検出した。また片方のみ MSA を発症した一卵性双生児(DMT)3 組の比較により、発症者のみに共通する CNV 領域を 10 箇所特定した。この 10 箇所は、非血縁の患者群と対照群の解析では、MSA に特異的ではなかった。すなわち、疾患への寄与率の高い領域ではないことが示された。頻度の有意差については、多数例での検証が必要である。

A. 研究目的

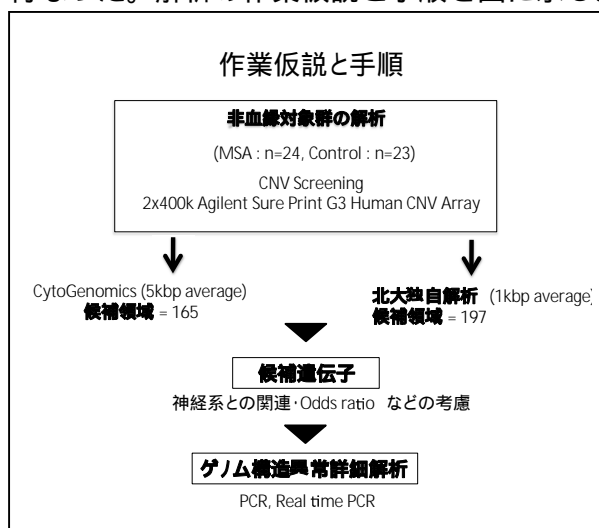
多系統萎縮症(MSA)は成年期以降に発病する非遺伝性の神経変性疾患である。稀に家族性発症のあること、主たる症候に人種差のあることなどから、何らかの発病素因があると考えられる。その素因遺伝子の探索に関する報告は複数あるが、いまだ十分に解明されていない。本研究ではゲノム構造多型(CNV)の観点から素因遺伝子の解明を行うことを目的に、アレイ手法を用いて検討した。これまでにアレイ基盤、測定に使用する検体の品質によりデータが異なり解析結果に違いを生じることを報告してきた。それらを踏まえた実験、解析の工夫により、MSA 群に偏在する複数の CNV 候補領域の同定を目的とした。

B. 研究方法

前回の報告時より検体数を増やし、非血縁 MSA-C 患者 24 名、対照として非血縁の健常人 23 名の白血球ゲノム DNA を用いて、Agilent SurePrint G3 Human CNV 2x400k Array[®]に

より CNV を測定した。結果を CytoGenomics[®]、に加えて、北大独自手法(報告済み)により解析した。候補領域については、患者及び対象群について、より多数例で解析した。JMP[®]を用いて二群間の統計学的有意差を検討した。

非血縁の対象群に加えて、片方のみ MSA を発症した一卵性双生児(discordant monozygotic twin:DMT) 3 組について dye-swap 法により同じく 400K アレイ解析を行なった。解析の作業仮説と手順を図に示した。



(倫理面への配慮)

研究は医学部医の倫理委員会の承認を得て行なった。被検者からの試料提供は口頭での説明に加えて、文書で説明し文書で同意を得た。

C. 研究結果

CytoGenomics®を用いた解析により平均5kbの範囲でコピー数の変化を示した領域はMSA群で165箇所であった。そのうち79箇所のゲノム領域には遺伝子はコードされていない、残りの86箇所には遺伝子がコードされている領域であった。その86箇所の中で神経組織に発現している遺伝子は75箇所であった。さらに、何らかの神経疾患との関連が報告されている遺伝子がコードされている領域は34箇所であった。この領域を一次スクリーニングの対象とした。これら領域について、アレイを用いて確認された領域、ゲノム上の位置、オッズ比などを考慮してMSAとの関連性が高い領域から優先順位を付けた。各々の候補領域についてはPCR法、リアルタイムPCR法、シーケンス解析などから、その領域のコピー数多型解析に適した方法を選択して候補領域の詳細な確認を行なった。現時点の結果ではゲノムの欠失や増幅多型はアレイ解析結果とPCR-ゲル電気泳動やqPCR解析結果とは良好な対応を認めた。

DMT3組の解析において、3組に共通してMSA患者に認められ、かつ非発症者にコピー数変化を認めなかった領域は10箇所であった。その内3箇所のゲノム領域については遺伝子がコードされていたが、残り7箇所は遺伝子がコードされていない領域であった。

片方のみMSAを発症したDMT例については10箇所の候補領域が特定された。これらの領域を非血縁の患者群と、成人対照群との比較した結果ではMSA群のみに特異的な領域は認

められていない。現在、これらの領域について患者群と対照群で頻度に有意差があるか否か、検討中である。

D. 考察

アレイCGH法は次世代シーケンサによる解析が困難な~Kb以上の構造多型解析に有力である。しかし、CNVアレイ解析はpseudo geneの存在や広範囲なメチル化部位などの影響を受けるので、web上のゲノムシーケンスデータベースを参照しながら、複数の解析手法を比べて解釈を進める必要がある。

ゲノムの欠損領域の確認について現時点ではPCR法の増幅とゲル電気泳動による判定が有効であり、多検体を処理できるという利点がある。この方法を用いて、検体数を増やして疾患との関連性の確認を推進中である。CNVアレイ解析でコピー数変化を示したが、リアルタイムPCR法でCNVとの相関が弱かった領域がある。その機序については、メチル化領域やSNPなどの多型が関与している可能性も考慮して原因を検討中する必要がある。

非血縁の患者と対照群の二群比較では、疾患特異的な変化もしくは浸透率の低い素因は、疾患とは直接関連性のない多型に埋没してしまう可能性を考慮しなくてはならない。それを極力排除する方法としてDMTの解析を進めている。現時点ではDMT3組においてMSA患者のみに共通してコピー数増加を示したCNV領域が10箇所認められている。それらの部位を非血縁の患者と対照群で比較した結果、MSA群に特異的ではなかった。ただし、二群間で頻度に相違があるか否かについては現在、解析を進めている。

3組のDMTでCNVが認められたことは、CNVそのものが個体発生早期の過程で生じることを示している。MSAは原則として孤発性疾患である。CNVがMSAの病態に関与してい

ると仮定した場合、メンデル遺伝を示さないことを説明できるモデルの構築が必要となる。

E. 結論

400K CNV アレイによる解析により、非血縁の MSA 患者群と成人対照群の比較により、MSA に頻度の高い候補領域を複数検出した。また片方のみ MSA を発症した一卵性双生児 (DMT)3 組の比較により、発症者のみに共通する CNV 領域を 10 箇所特定した。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsushima M, Yabe I, Uwatoko H, Shirai S, Hirofumi M, Sasaki H. Reliability of the Japanese version of the Berg balance scale. *Inter Med* 53: 1621-1624, 2014
- 2) Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H. Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* 2:173,2014
- 3) Matsushima M, Yabe I, Hirofumi M, Kano T, Sasaki H. Reliability of the Japanese version of the scales for outcomes in Parkinson's disease-autonomic questionnaire. *Clin Neurol Neurosurg* 124:182-4, 2014
- 4) Yasui K, Yabe I, Yoshida K, Kanai K, Arai K, Ito M, Onodera O, Koyano S, Isozaki E, Sawai S, Adachi Y, Sasaki H, Kuwabara S, Hattori T, Sobue G, Mizusawa H, Tsuji S, Nishizawa M,

Nakashima K. *Orphanet J Rare Dis* 9:118,2014

- 5) Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Okumura F, Takeuchi A, Horiuchi K, Takahiro Kano Kanda A, Saito W, Matsumoto M, Nakayama KI, Hatakeyama S, Sasaki H. Identification of anti-Sez6l2 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *J Neurol* 261:224-226,2014
- 6) Miki Y, Mori F, Kon T, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 34:148-158,2014
- 7) Kon T, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. ALS-associated protein FIG4 is localized in Pick and Lewy bodies, and also neuronal nuclear inclusions, in polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases. *Neuropathology* 34: 19-26, 2014
- 8) 矢部一郎, 佐々木秀直. 脊髄小脳変性症の治療の進歩 2013, *神経治療学* 31, 397-404, 2014

2. 学会発表

- 1) Matsushima M, Yabe I, Oba K, Sakushima 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. the 14th Asian and Oceanian Congress of Neurology, Macao, China, 3/2-3/5, 2014

- 2) Matsushima M, Yabe I, Oba K, Sakushima 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, Stockholm, Sweden, 6/8-6/12, 2014
- 3) 松島理明, 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. 福岡, 2014
- 4) 白井慎一, 松島理明, 矢部一郎, 佐々木秀直. 脊髄小脳変性症における歩行分析. 第32回日本神経治療学会総会. 東京, 2014

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し