

＜シンポジウム 14—3＞神経ゲノミクスの最先端

神経筋疾患解明のための大規模シーケンシング

石浦 浩之 辻 省次

(臨床神経 2010;50:957-958)

Key words : 大規模シーケンシング, 全ゲノム配列解析, 多系統萎縮症

はじめに

近年の分子遺伝学の進歩にともない、数多くの疾患の原因遺伝子が同定され、病態に関する理解は日増しに深まっている。とくに、神経内科学領域においてはハンチントン病、筋ジストロフィーを始めとして多くの疾患の診断が可能となり日常臨床に役立てられている一方で、一部の疾患については治療の試みまでなされるようになってきている。しかしながら、高齢発症や低浸透率などの理由で大家系がえづらい疾患（筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病など）については家族性であったとしても十分な理解はなされていない上に、孤発性の神経変性疾患の原因に関してはほとんど手をつけることができないのが大きな問題となっている。

ここ数年、次世代シーケンサーの進歩にともないシーケンシングのスループットは驚くべき早さで増大し、今日では個人ゲノムの配列解析も可能となった。この技術の出現によって、従来の方法ではアプローチ困難な小家系や孤発性神経変性疾患の分子基盤を解明し、病態生理に関する重要な知見がえられることのできる素地が整ったと考えられる。

今回われわれは、日本人の全ゲノム配列解析をおこなった経験について概説する。

多系統萎縮症

多系統萎縮症 (MSA) は小脳失調、パーキンソニズム、自律神経障害、錐体路徴候を主徴とする神経変性疾患である。病理学的には、オリゴデンドログリア内に α -synuclein 陽性の封入体 (Glial cytoplasmic inclusion, GCI) をみとめることが特徴であるが、その病態生理については不明な点が多い。MSA は基本的に孤発性の疾患であるが、一部にまれながら家族集積性を示す例が存在することが報告されてきた^{1)~4)}。そのような家族性の MSA (familial MSA, fMSA) の原因を解明することは、MSA の疾患パスウェイの理解につながり、最終的に通常の孤発性 MSA の病態生理の解明に近づく可能性が高いと考えられ、全ゲノム配列解析をおこなった。

実際の解析

症例は fMSA1 家系 (文献 1 の A 家系と同一)。臨床的な特徴については文献 1 に報告されているが、両親はいとこ婚で、同胞 2 名が病理学的に診断された MSA-P である。2 名の発症者に関しては、網膜色素変性症も合併している。

発症者 2 名、非発症者 1 名に関して、まずは一塩基多型 (SNP) アレイをもちいた連鎖解析を施行した。具体的には、Affymetrix の Genomewide SNP 6.0 アレイをもちいて genotyping 後、SNP-HiTLINK をもちいて SNP の選択をおこない、Allegro をもちいて解析をおこなった。常染色体劣性モデル、浸透率=1 としたパラメトリック多点連鎖解析では LOD スコアが 1.9 となる合計約 70Mb の候補領域をみとめた。

次に、発症者一名について全ゲノム配列解析をおこなった。具体的には、100bp 長のペアエンド法をもちいてイルミナ Genome Analyzer IIx で計 4run の解析をおこない、合計 189Gb の短鎖配列をえた。BWA をもちいて参照配列 (UCSC の hg18) へのアラインメントをおこなった後、重複した箇所にアラインメントされるリードを除き、最後 SAMtools をもちいて variant をコールした。

平均カバレッジは 58X で、10X 以上となる塩基が 99.4%、20X 以上となる塩基が 98.4% と十分な量のデータがえられたと考えられた。一塩基置換については全ゲノムで約 350 万個存在した。SNP6.0 アレイでタイピングされた SNP との比較をおこなうと、99.83% について一致をみた。すべての一塩基置換のうち、エキソン内の非同義置換かつ dbSNP に存在しないものが原因になっていると考え、フィルタリングをおこなうと約 800 個が最終的に候補として残った。今回、連鎖解析から示される候補領域内の一塩基置換に絞ると、10 個以下となった。

結論と今後の課題

われわれの今回の経験から、次のことを指摘することができる。①全ゲノム配列解析を実際におこなった ②一部の反復配列や構造変化 (structural variant) の領域を除くと、正確に配列を解析することができた ③連鎖解析のデータは、候

補を絞りこむ際に非常に有用であった ④他の個人ゲノムのデータ同様、本研究では日本人個人ゲノム配列にも約300万個の一塩基置換が存在することが明らかとなった。

本研究のように貴重な家系の解析により、従来未解明であった疾患パスウェイの同定から孤発性疾患の理解につながっていくことが期待され、今後研究をさらに進めていくことが重要である。

また、本家系においては、連鎖解析の情報がえられたが、今後必ずしもそのような状況があるわけではなく、とくに孤発性疾患の理解を進めるためには、非常に多くの variants の中から連鎖解析のデータなしに疾患の原因を探索することが要求される。コントロール集団での variant の頻度情報 (1000ゲノムプロジェクトなど⁵⁾) が豊富になることでもある程度の絞りこみが可能になると思われるが、一方でヒトゲノムには予想以上にまれな variant が多いということが指摘されている⁵⁾。Variant を意義づけし、疾患と関係したものを選択する方法論の開発は一つの大きな課題であると考えられる。

また大規模シーケンサーの登場によって、そのスループットの高さから、複数の variants が相乗効果を示して疾患の発症に寄与している可能性 (epistasis) の検討や、ゲノムワイドな DNA 修飾 (epigenome, メチル化など) の検討が可能

になりつつある。これらの機序がどの程度孤発性神経変性疾患の発症に寄与しているかも非常に興味深いところである。

このように、大規模シーケンサーの登場により様々な方向から今後更に疾患遺伝子研究が加速していることは確実であり、多数の疾患の病態生理の解明から治療法の開発に結び付くことが望まれる。

文 献

- 1) Hara K, et al. Multiplex families with multiple system atrophy. *Arch Neurol* 2007;64:545-551.
- 2) Wüllner U, et al. Definite multiple system atrophy in a German family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:449-450.
- 3) Wüllner U, et al. Probable multiple system atrophy in a German family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:924-925.
- 4) Soma H, et al. Heredity in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 2006;240:107-110.
- 5) 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010;467:1061-1073.

Abstract

Massively parallel sequence analysis for revealing causes of neuromuscular disorders

Hiroyuki Ishiura, M.D. and Shoji Tsuji, M.D.

Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Molecular genetic studies, positional cloning in particular, contributed to progresses in neurology. However, because of a bottleneck of low sequence analysis throughput, large proportions of small families, especially of late-onset hereditary diseases, still remain to be elucidated. The massively parallel sequencers are expected to identify causative genes in such a small but meaningful families and to reveal pathophysiology of the diseases.

Multiple system atrophy (MSA) is a neurodegenerative disorder. Pathophysiology of MSA remains largely uncertain despite many studies. Generally, MSA is a sporadic disorder, but there are rare familial aggregations which would provide a strong clue to understand pathophysiology of MSA.

With the backgrounds, we analyzed an MSA family with 2 pathologically proven siblings born with consanguineous parents. Linkage study revealed a candidate 70Mb regions in four chromosomes. We carried out whole-genome resequencing of the proband using Illumina GAIIX. Mean depth was 58X, and a total of 3.5 million single nucleotide variations were found.

Although the new technologies are highly powerful, to find a mutation from a number of variations, a challenge with bioinformatics should be overcome. Coping with the problem, the high-throughput sequence technologies will further contribute to a breakthrough in neurology.

(*Clin Neurol* 2010;50:957-958)

Key words: Massively parallel sequence, whole genome sequence, multiple system atrophy