

## ＜シンポジウム 13—3＞次世代シーケンサーによる神経疾患の解明

### 遺伝性神経疾患の研究

#### —Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa—

石浦 浩之<sup>1)2)</sup> 辻 省次<sup>1)</sup>

(臨床神経 2011;51:970-972)

**Key words** : 連鎖解析, 次世代シーケンサー, 網膜色素変性症を伴う後索失調症, ターゲットキャプチャー解析, 全ゲノム配列解析

#### はじめに

次世代シーケンサーの登場を機に, シーケンス技術において大きな変革の時代を迎えた。絶え間ない技術刷新により, 主にシーケンス長と並列度の増大に伴って, シーケンスのスループットは指数関数的に増大し, シーケンスコストも目覚ましい勢いで低下している。現時点においては, exome 解析に必要な 3~10Gb (3~10×10<sup>9</sup>bp) どころか, 全ゲノム配列解析に必要とされる約 100Gb (10<sup>11</sup>bp) が 2 週間以内に得られるようになり, ヒト全ゲノム配列解析も完全に実用化段階に入ったといえる。本稿では, この技術が神経疾患の解明という点でどのようなインパクトをもたらしたかについて議論する。

#### 遺伝性神経疾患の解析方法 ～連鎖解析とポジショナルクローニング～

従来から, 遺伝性疾患の解析方法として, 連鎖解析とポジショナルクローニングが行われてきた。これは大家系が得られた場合には非常に強力な方法であるが, 一家系サイズが小さい場合には, 連鎖解析を行っても場合によっては数十 Mb から数百 Mb におよぶ候補領域にしか絞りこむことができず, その中に存在する数百遺伝子の数千エクソンの塩基配列解析を行うことはほとんど不可能な場面が多かった。つまり, シーケンスのスループットがボトルネックとなっていたため, 非常に大きな家系を除いて原因遺伝子を同定することは困難だった。そういった事情も相まって, 家系サイズが大きくなりづらい, 成人～高齢発症の家族性神経疾患の原因遺伝子は必ずしも全て解明されていないというのが現状である。自検例では, 家族性筋萎縮性側索硬化症の場合 48%<sup>1)</sup>で, 常染色体優性遺伝の遺伝性痙性対麻痺では 43% でその原因遺伝子が同定できていない。これら遺伝子未同定家系の解明は, 疾患の病態生理の理解を進展させることは想像にかたくない。

次世代シーケンサーはこのボトルネックを解消し, 遺伝性神経疾患の解析法のパラダイムシフトをおこした。次項でわれわれの経験した例を示す。

#### 遺伝性神経疾患の小家系の解析

われわれは, 常染色体劣性遺伝性疾患である posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (PCARP) という疾患の家系について解析を行った。PCARP は若年発症の網膜色素変性症とその後緩徐に進行する後索失調を主体とした疾患で, アメリカとスペインから 2 家系が報告され, 共に第一染色体長腕に連鎖を認めていたが, 原因遺伝子は同定されていなかった。われわれは本邦において臨床的に PCARP と診断した家系について, 次世代シーケンサーを用いて原因遺伝子同定に向けて解析を行った。

発端者は 5 歳時より夜盲を呈し, その後歩行障害が進行している 30 代女性。神経学的に網膜色素変性症と後索失調を認めた。同胞 2 名中に 1 名に類症を認め, 両親はいとこ婚であった。同胞 3 名と両親に関して Affymetrix 50K Xba/50K Hind アレイを用いて SNP タイピングを行い, SNP-HiTLINK<sup>2)</sup> と Allegro を用いてパラメトリック多点連鎖解析を施行した。結果, 第 1, 第 20 染色体に最大 LOD スコア 1.93 を認める合計約 30Mb の領域を見いだした。第 1 染色体については, すでに PCARP の遺伝子座として報告されている領域とのオーバーラップを認めた。しかしながら, 完全にオーバーラップした 7.1Mb の領域内に限っても 60 以上もの遺伝子が存在し, 全てを従来の方法で塩基配列解析することは現実的ではなかったが, 次世代シーケンサーの登場により, この領域を全て解析する方針を取ることができるようになった。

まず, この 30Mb の領域について, Nimblegen 2.1M array を用いて target capture を行い, 候補領域のゲノム DNA の濃縮を行った。次にこの濃縮された領域を Illumina GAIIX の 2 レーンを用いて塩基配列解析を行った。合計 3.4Gb のマップ可能な短鎖長配列 (100bp) が得られ, bwa<sup>3)</sup>を用いて

<sup>1)</sup> 東京大学神経内科 [〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1]

<sup>2)</sup> 日本学術振興会

(受付日: 2011 年 5 月 19 日)

ヒトゲノム参照配列にアラインメントを行った。87.0% のリードは参照配列の特定の領域にマップされ、79.9% は標的領域内に位置した。平均冗長度は 89.6X だった。標的領域内に 24,161 個の variants を認め、新規のアミノ酸置換を伴う変異は 3 個であった。既報の PCARP の原因遺伝子座と重なるものは、唯一 FLVCR1 の c.1477G>C (p.G493R) であった。この変異は家系内で共分離を認め、コントロール 192 染色体に存在せず、G493 は膜貫通ドメイン内の進化的に非常に保存されたアミノ酸であった。以上の結果より、FLVCR1 が PCARP の原因遺伝子であると結論づけた<sup>4)</sup>。同時並行に、もともとの 2 家系をふくむ、欧米の PCARP 3 家系においても FLVCR1 変異が認められたことが報告され、原因遺伝子を独立に確認した形となった<sup>5)</sup>。

このように、小さな家系で連鎖解析による絞りこみが十分にできない場合であっても、次世代シーケンサーを用いた網羅的塩基配列解析により病因遺伝子を同定することが十分に可能であることが判明した。

一方で、FLVCR1 遺伝子が PCARP の原因であると証明するために、別の家系において FLVCR1 の別変異が存在することが確認することができれば非常に強い根拠となる。今回われわれは残念ながら別家系を見いだすことができなかったが、リソース収集と共同研究体制の構築がこれからますます研究の進展のための鍵となると考えられた。

### 次世代シーケンサーを用いた解析による パラダイムシフト

前項で述べたように、塩基配列解析自体は以前と比較すると非常に容易になった。従来は、候補領域内の遺伝子の解析自体が難しかったが、次世代シーケンサーを用いると解析自体は容易になり、むしろ多く検出されてくる variation の意義づけをどのように検討するかが目下の課題となっている。一例を挙げると、日本人全ゲノム配列解析を行うことで、ゲノム上に一塩基置換だけでも約 350 万個存在することが明らかとなっている。その中で、エキソン内に存在するものが約 2 万個とされ、非同義置換に限っても 1 万個程度にしか絞れない。今回のわれわれの経験のように、稀な疾患の原因遺伝子変異は、データベースに登録されていないものであると考えられるため、さらにデータベース未登録のものに絞りこむことが可能であると考えられる。しかしながらそうしたとしても、300 個～500 個前後の候補 variant が残る計算となる。その中から *in silico* で疾患の原因遺伝子を絞りこむことは現状不可能であり、通常は連鎖解析の情報や他の家系的情報を総動員することで原因をさらに絞りこむこととなる。つまり、他の家系メンバーにおける共分離の有無を検討することは何物にも代えがたい貴重な情報となるため、小家系といってもできる限り家系メンバーのご協力を得ることは重要である。今後、vari-

ation の意義づけの問題に関して、バイオインフォマティクス方面からのさらなるアプローチが発展することが強く望まれるところである。

### まとめ

次世代シーケンサーの登場により、遺伝性神経疾患の解析に際して如何にしてシーケンスするか、ではなく如何にして病的変異を絞りこむか、如何にして病的変異を他の家系で確認するか、という方向へのパラダイムシフトが起きている。今後、稀な疾患もふくんだ神経疾患の解明に向けて、パラダイムシフトを意識した研究の体制の再構築が望まれる。バイオインフォマティクスの発展に伴い variation の意義づけに関しさらに知見が得られるようになれば、さらに小さな家系や孤発例の解明に大きく寄与すると考えられる。

家系が小さかったり家系数が少なかったりするために病因遺伝子の解明が達成できていない遺伝性疾患は少なくなく、このような家系は次世代シーケンサーの応用分野の一つとして重要である。一つ一つは稀な疾患であったとしても、多数の疾患が解明され多数の病原遺伝子が解明されれば、今以上に疾患の病態機序の解明・治療法開発研究に貢献するに違いない。

謝辞：本研究にご協力いただきました、患者様とご家族様に感謝申し上げます。本研究にお世話になりました多くの先生方、特に症例をご紹介いただきました姫野病院神経内科の酒井徹雄先生に深謝します。

### 文 献

- 1) Takahashi Y, Seki N, Ishiura H, et al. Development of a high-throughput microarray-based resequencing system for neurological disorders and its application to molecular genetics of amyotrophic lateral sclerosis. Arch Neurol 2008;65:1326-1332.
- 2) Fukuda Y, Nakahara Y, Date H, et al. SNP HiTLink: a high-throughput linkage analysis system employing dense SNP data. BMC Bioinformatics 2009;10:121.
- 3) Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. Bioinformatics 2009; 25:1754-1760.
- 4) Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, et al. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. Neurogenetics 2011;12:117-121.
- 5) Rajadhyaksha AM, Elemento O, Puffenberger EG, et al. Mutations in FLVCR1 cause posterior column ataxia and retinitis pigmentosa. Am J Hum Genet 2010;87:643-654.

**Abstract****Next-generation analysis on hereditary neurodegenerative disorders using next-generation sequencers**Hiroyuki Ishiura, M.D., Ph.D.<sup>1)2)</sup> and Shoji Tsuji, M.D., Ph.D.<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Department of Neurology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo<sup>2)</sup>The Japan Society for the Promotion of Science

With the throughput of next-generation sequencers, even whole genome analysis is a reality. Traditionally, it was important to collect as many samples as possible and to perform sequence analysis of many genes in candidate regions. There has been a paradigm shift in the era of next-generation sequencing; to reveal the significance of variants produced by next-generation sequencers rather than just to perform sequence analysis becomes the key to elucidate causes of disorders.

We performed target capture and next-generation sequencing analyses of a small consanguineous family in which only two members were affected by posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (PCARP). We successfully identified a causative mutation in *FLVCR1* which cosegregated with the disease. The fact that we could identify the causative gene even from a small family means that the advent of next-generation sequencers has brought us to a next-generation analysis on hereditary disorders.

In the near future, many causative genes of hereditary neurodegenerative disorders particularly with small number of affected members will be revealed, which must provide considerable insights into pathogenesis. Approaches utilizing bioinformatics to further narrow down the numerous variations produced by next-generation sequencers are demanded in order to study remaining small families, or sporadic diseases.

(Clin Neurol 2011;51:970-972)

**Key words:** Linkage analysis, next-generation sequencer, posterior column ataxia with retinitis pigmentosa, target capture analysis, whole genome analysis

---