

＜シンポジウム (4)-12-2＞孤発性疾患における遺伝子異常の探索法

染色体構造変化：多系統萎縮症でのアプローチ

矢部 一郎¹⁾ 佐々木秀直¹⁾

要旨：ヒトゲノム不安定領域は全ゲノムの10%を占め、Kb～Mb単位の配列からなる多様な構造変化をきたす。この構造多型はコピー数多型 (CNV) と称され、その変異率は高く孤発性疾患の素因として注目されている。CNVによって、そのCNV領域内の遺伝子の翻訳産物量が変化するのみならず、CNV以外の領域にある遺伝子の転写産物量にも変化をもたらす。その機序としてCNV内のmiRNAなどを介した転写やsplicing機構が明らかになっている。最近、われわれはMSA発症者と健常者の組み合わせである一卵性双生児例を経験した。この例をふくめたMSAにおけるCNV解析の実例について本論文で紹介した。

(臨床神経 2013;53:1333-1335)

Key words：染色体構造変化, copy number variation, 多系統萎縮症

染色体構造多型の概要

一般的に遺伝性疾患のばあいには家系を対象とした連鎖解析やエクソーム解析などの手法により原因遺伝子同定がなされるが、環境因子の影響が予想される孤発性疾患のばあいには、関連解析がおこなわれる。発症にかかわる素因遺伝子は、遺伝性疾患では、そのアレル頻度は低いものそれによる浸透率は高いことが想定されるが、孤発性疾患では、そのアレル頻度は高いものの浸透率は一般的に低いと考えられる。しかしながら、一部の孤発性疾患では、その中間型、すなわち rare variant-common disease 仮説に該当するばあいやアレル頻度および浸透率ともに低いばあいなども想定される¹⁾。

各疾患の素因遺伝子を同定するために多型解析が有用であるが、その多型マーカーとして、RFLPやVNTR, microsatelliteやSNPなどが従来知られていた。それらに加えて、2000年頃より染色体構造変化であるコピー数多型 {copy number variation (CNV)} が知られるようになった。CNVは全ゲノムの約10%強を占め動原体周辺と染色体末端側のようなヒトゲノムの不安定領域に存在し、Kb～Mb単位のゲノム配列からなり、くりかえし、重複と欠失、挿入など多様なゲノム構造変化を呈する。CNVにはモザイク現象があることが知られており、一卵性双生児間で違いがあることや、個体の臓器や組織間でも違いがあり、加齢によりモザイクの程度も増加するとされる。このCNVの頻度はSNPの $10^2 \sim 10^4$ 倍高率で個人間の差としてはSNPが2.4MBであるのに対し、CNVは4～24MBとされる²⁾³⁾。それゆえに孤発性疾患の発症素因として近年注目されている。現在、国際多型データベースには60,000以上のCNVが登録されており、登録されている全多型の2/3を占める。CNVは従来のSNPアレイ

での解析は困難で、高密度化されたCNVアレイやCNVチップなどでの解析が必要であり、近年1～10kb程度の短いCNVが多くみだされ報告されている。

CNVの生成機序

CNVは主に組み替えにより生成される。組み替えには相同染色体間で行われるhomologous recombination (HR)と同一染色体の異なった部位間で起こるnon-allelic HR、ことなる染色体間で起こるnon-HRが存在することが知られている。HRは損傷ゲノム修復の基本機構であり、300bp程度のhomologyがHRの契機となり通常は構造変化をきたさないが、loss of heterozygosity (LOH)がこの機構で修復されるとuniparental disomy (UPD)となる。Non-allelic HRは200Kb程度の低頻度反復配列(LCRs)が契機となりduplicationやtriplication, rearrangementなどを生成する。Non-HRは欠失、逆位、転座などの構造変化をきたす⁴⁾。

疾患とCNV

CNVが発症に関与する神経疾患としてCMT1AにおけるPMP22重複に始まり、SMAにおけるSMN遺伝子、PARK4におけるSNCA遺伝子、SCA20におけるDAGLA遺伝子をふくむ領域などが知られている。最近では孤発性ALSの一部にCNVが関与すると報告されている⁵⁾。CNVと病態との関係は複雑で、重複もしくは欠失によるばあいは、当該領域に存在する遺伝子効果やハプロ不全として説明されるが、それのみならずより広範なtranscriptomの変化をきたす。ゲノムとmRNA間の調節機構はながらく不明であったが、近年snRNAやmiRNAなどを介した転写やsplicing機構の解明が

¹⁾ 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学 [〒060-8638 北海道札幌市北区北十五条西7丁目]
(受付日：2013年6月1日)

進んだ結果, CNV 領域には多数の miRNA が存在し分子機構かく乱の一因となっていることが解明されつつある⁶⁾. とくに発達障害や自閉症では, 疾患ゲノムデータベースおよび miRNA データベースやネットワーク解析をもちいた分析がおこなわれ, CNV 領域の miRNA 量変化にともなうその標的 mRNA ネットワーク変化が発症に強く関与していると報告されている⁷⁾.

多系統萎縮症発症における CNV 解析の例 —発症および非発症一卵性双生児 (discordant monozygotic twin) 例を対象として⁸⁾

われわれは最近, 片方のみ多系統萎縮症 (MSA) を発症し, 他方は健常のままである discordant monozygotic twin (DCMT) 例を経験した. このような例は epigenetics 機構で従来説明されてきたが, 先に述べたように一卵性双生児間で CNV に相違があることから, CNV が発症に関与している可能性もある. われわれはまず最初に, 57K deCODE beadchip により対照 100 例, MSA33 例について CNV 解析をおこなった結果, MSA 群でコピー減少を示す領域複数をみいだした. ついで, この DCMT 例で Illumina 300K SNP array にてミスマッチ SNP がわずか 0.0017% であり, 分子遺伝学的に一卵性双生児であることを確認した後に, 400 kCNV アレイをもちいて, この DCMT 例を加えて解析をおこない, DCMT 発症例と MSA 群の 1/3 の症例で 19p13 に位置する SHC2 遺伝子にコピー数減少がみとめることを報告した⁸⁾. しかしながら, 解析数が少ないこともあり, 現在他の手法により検証を進めているところである.

CNV 解析の問題点

CNV 解析が頻繁になされるようになって, 検出感度がアレイ間で大きくことなることも明らかになっている⁹⁾. また, 最近では次世代シーケンサーをもちいそのカバレッジ率から推計することによる CNV 解析もおこなわれている. この手法でもアルゴリズムの違いによりノイズ補正がことなることにより, 結果に若干の違いがでることが報告されている¹⁰⁾. したがって CNV 解析には十分な検証作業が不可欠である.

おわりに

CNV はその頻度の高さより孤発性疾患の発症素因に関与する遺伝因子として注目されており, 今後の研究の進捗が期待される.

※本論文に関連し, 開示すべき COI 状態にある企業, 組織, 団体はいずれも有りません.

文 献

- 1) Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009;461:747-753.
- 2) Scherer SW, Lee C, Birney E, et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet* 2007;39:S7-15.
- 3) Lupski JR. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet* 2007;39:S43-47.
- 4) 塩見春彦. ゲノムワイドな転写, miRNA- 標的 RNA ネットワーク, そして CNV- 脳神経疾患との関連. *医学のあゆみ* 2011;239:687-692.
- 5) Kato T, Emi M, Sato H, et al. Segmental copy-number gain within the region of isopentenyl diphosphate isomerase genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402:438-442.
- 6) Marcinkowska M, Szymanski M, Krzyzosiak WJ, et al. Copy number variation of microRNA genes in the human genome. *BMC Genomics* 2011;12:183.
- 7) Vaishnavi V, Manikandan M, Tiwary BK, et al. Insights on the functional impact of microRNAs present in autism-associated copy number variants. *PLoS One* 2013;8:e56781.
- 8) Sasaki H, Emi M, Iijima H, et al. Copy number loss of (src homology 2 domain containing)-transforming protein 2 (SHC2) gene: discordant loss in monozygotic twins and frequent loss in patients with multiple system atrophy. *Mol Brain* 2011;4:24.
- 9) Pinto D, Darvishi K, Shi X, et al. Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants. *Nat Biotechnol* 2011;29:512-520.
- 10) Duan J, Zhang JG, Deng HW, et al. Comparative studies of copy number variation detection methods for next-generation sequencing technologies. *PLoS One* 2013;8:e59128.

Abstract**Chromosomal structural variation — An approach for multiple system atrophy**Ichiro Yabe, M.D., Ph.D.¹⁾ and Hidenao Sasaki, M.D, Ph.D.¹⁾¹⁾Department of Neurology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

The human genome contains unstable regions that account for 10% of the entire genome and are eccentrically located around centromeres and telomeres. They consist of several kb or Mb of genome sequence, and present a variety of alterations that occur during the replication process, such as repetitions, duplications, deletions, and insertions. These structural polymorphisms are called copy number variations (CNV). The mutation rate of CNV is 10^2 - 10^4 times higher than that of single-nucleotide polymorphisms (SNP), and has attracted attention as a basis for sporadic disease. The relationship between CNV and clinical conditions is complicated. While models based on duplication or deletion can be explained as resulting from genetic effect or haploinsufficiency, CNV result in a greater range of transcription anomalies, in addition to that of a gene coded in the region. Recent studies have revealed the mechanisms of transcription and splicing through snRNA and miRNA in the CNV regions. Recently, we experienced discordant monozygotic twin (DMZT) cases in which the patients developed unilateral multiple system atrophy (MSA). Here, we introduced the recent progress regarding CNV and neurodegenerative diseases as it concerns the above DMZT cases and other sporadic MSA cases.

(Clin Neurol 2013;53:1333-1335)

Key words: chromosomal structural variation, copy number variation, multiple system atrophy
