

連続剖検例を用いたゲノム研究 —高齢疾患の全エクソン領域関連解析—

田中 雅嗣

要約 東京都健康長寿医療センターの連続剖検 2,305 例において全エクソン領域に存在する 24 万個の非同義置換を解析した。剖検例における全エクソン機能的多型解析は、心筋梗塞・脳梗塞・糖尿病などの加齢性疾患のみならず、認知症・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患などの病因解明に貢献できる。この連続剖検研究を百寿研究・長期縦断研究・疾患関連研究と統合することにより、高齢者が健康長寿を達成するための方策を提案することができると期待している。

Key words : 全エクソン領域関連解析, 半導体シーケンサー, 非同義置換, 認知症, 老化促進モデルマウス

(日老医誌 2014; 51: 11-15)

はじめに

次世代シーケンサーの登場によって、単一遺伝子変異に基づく疾患の病因解明が容易になった。家系内において発症者と非発症者を明瞭に区別することが可能であれば、数家系しか報告されていない希少疾病であっても、表現型と遺伝子型の解析によって、病因遺伝変異を特定することができるようになった。一方、多因子疾患は環境要因と遺伝的要因（複数の遺伝子多型）の複合の結果であるので、多数の疾患群と対照群を解析する必要がある。我々はエクソン全領域に存在する非同義置換に注目して、加齢性疾患の関連解析を行っている。我々の最近の取り組みについて紹介する。

次世代シーケンサーによる 全エクソン領域解析

我々は Life Technologies 社の半導体シーケンサー Ion PGM および Ion Proton を導入した。これらの機器は、ヌクレオチド鎖の伸長に伴って発生する水素イオンを pH センサーで検出し、DNA の塩基配列を決定するものである。我々はミトコンドリア病の遺伝子検査体制を確立するために、次世代シーケンサーを用いてミトコンドリア DNA と核 DNA の病因変異の解析を行って

いる。一方、国内および海外のスポーツ選手の遺伝子解析に取り組んでおり¹⁾、瞬発力・持久力に関与する遺伝子多型を解明すると同時に、加齢性筋減弱症（サルコペニア）の病態解明を目指している。

老化促進モデルマウスにおける ミトコンドリア関連遺伝子変異

マウスではそれぞれの系統に特異的な死因がある。純系マウスはヘテロ変異を考慮する必要がなく、ホモ変異に注目して解析を進めることができる。このためヒトのゲノム研究よりマウスのゲノム研究は単純である。我々は老化促進モデルマウスの中で、老化しやすい 6 系統の SMAP (senescence-prone) と老化しにくい 3 系統の SAMR (senescence-resistant) の全エクソンの塩基配列を解析した²⁾。SAMP8 は認知症のモデル動物である。我々は記憶・学習障害を呈する SAMP8/TaSlc において Aifm3 (apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 3) の p.K582N 変異を見いだした。Aifm3 を HEK 293 細胞において過剰発現させるとアポトーシスが誘導される。Lys582 は種間で保存されているので p.K582N 変異が Aifm3 の機能異常を惹起している可能性がある。

高齢者連続剖検例における エクソン全領域関連解析

我々は 1985 年から 2012 年までの 27 年間に東京都健康長寿医療センターで 7,000 例以上の剖検データを蓄積した³⁾。我々は 24 万個のアミノ酸置換を伴う機能的多型

Genomics in consecutive autopsy study at Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital: Exome-wide association study on age-related diseases and longevity
Masashi Tanaka : 東京都健康長寿医療センター臨床検査科

を探索するエクソン全領域関連解析を開始し、現在までに2,305例の解析を終えた。平均的な日本人が如何なる疾患によって死亡したかを病理学的な所見に基づいて最終診断し、その遺伝学的背景を明らかにするのが研究の目的である。剖検時の平均年齢は81歳である。入院時のカルテも保存されているので、喫煙・飲酒など生活習慣や、高血圧・高脂血症・糖尿病などの有無も登録されている。肺気腫の程度、全身の動脈硬化度、臨床的に捉えられなかった潜在癌の数もデータベース化されている。また約90%の症例で脳や脊髄など中枢神経系の組織が保存されているので、病理学・生化学・遺伝学など多様な研究手法を組み合わせ、認知症・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症などの病因解明に取り組むことができる。近年、画像診断技術の発達によって各種の癌や神経変性疾患の臨床診断が容易になった。しかし、癌に対する治療法の選択には生検が必須である。癌細胞がどのような顔をしているか顕微鏡で確認しなければ、治療方針が定まらない。また、脳の中で如何なる異常蛋白質が蓄積しているのか、あるいはどのように神経細胞が死んだかを形態学的に確認する必要がある。実際に、アルツハイマー病で脳に蓄積するβアミロイドを陽電子放射断層撮影法(PET)で早期診断し、治療法・予防法の開発に役立てようとする臨床研究J-ADNI2がある。PETによる臨床画像診断が正しかったかどうかを確認するためには、実際に脳組織において蓄積している蛋白質を免疫染色し、神経病理学的診断によって裏付ける必要がある。過去の生活習慣と形態学的に確認された病変と遺伝子多型の三者の関連を網羅的に探索するこの研究は世界的にも希有なプロジェクトである。

認知症の原因となる神経変性疾患の 全エクソン解析

2012年の厚労省研究班の推計によると、65歳以上の高齢者のうち認知症の人は462万人(15%)で、軽度認知障害(MCI)と呼ばれる「認知症予備軍」が400万人である。厚労省は認知症施策の5カ年計画「オレンジプラン」を策定し、京都などでは「認知症予備軍」が認知症に進むことを阻止するために「オレンジカフェ」の活動が始まっている。認知症の発症を5年遅らせることができれば、介護費および医療費の大きな削減が可能である。運動習慣の導入効果を検証する介入研究の前には、可能な限りAlzheimer病、Lewy小体病、前頭側頭型認知症、嗜銀顆粒性認知症などの鑑別をしておく必要がある。アミロイドPETによる画像診断ならびに死後脳における神経病理診断で病型を確定するのが理想的であ

る。高齢期に発症する認知症に関しては、脳の加齢に伴う生理学的老化と病的老化を明確に区別できるかという根源的問題もはらんでいる。高齢疾患の発症に関与する遺伝因子と環境因子の解明は多元連立方程式を解くことに喩えられる。性・年齢・遺伝子多型・環境因子・画像所見・病理所見の情報を正確・詳細・大規模に収集することは容易ではない。認知症を惹起する疾患群の発症を予測する遺伝子多型が解明されれば、適切な予防法・介入法・治療法を創出できる可能性がある。

剖検2,305例における網羅的全エクソン解析

近年、画像診断技術の発展により、剖検病理解剖の症例数が減少しているが、CTあるいはMRIはマクロ解剖のレベルであり、ミクロの病理組織診断の重要性は低下していない。臨床診断と病理診断に基づいた高齢疾患群の全エクソン解析は高齢者ブレインバンクと連動している。本医療センターでは前方視的臨床縦断研究(認知症パスおよびパーキンソン病パス)が実施されているので、臨床診断・画像診断・病理診断と最新のゲノム解析結果が将来的には統合される。我々が利用しているのはIllumina社のHumanExome BeadChipである。このチップで解析可能な24万個の機能的多型は約12,000人の全エクソン塩基配列解析において少なくとも数人で検出された比較的頻度の低い多型である。欧米では数万人規模で全ゲノム領域関連解析(genome-wide association analysis; GWAS)が実施されているが、大規模なGWASによって発見される頻度の高い多型(common SNP)のオッズ比は1.2~1.5程度であり、幾つかの多型を組み合わせても各疾患の遺伝率の10%程度を説明するにすぎない。このため「失われた遺伝率」としてゲノム研究者の間に失望感が漂っている¹⁾。そこで登場したのが全エクソン領域関連解析(exome-wide association analysis; EWAS)である。出現頻度は低いがアミノ酸置換を伴う機能的多型(functional rare variant)を標的に選んでいる。

HumanExome BeadChipの特徴

Illumina社は搭載されているSNPプローブ数が異なる複数のBeadChipを提供している。このうちHumanExome BeadChipは最も安価であり、その購入価は1試料あたり約7,000円である。これに解析委託費1,000円を加えると、全エクソン多型の解析単価は8,000円となる。24万個所の多型を分析するならば、1多型あたりの分析費は0.03円である。TaqMan法やLuminex法と比較してBeadChipの費用対効果は高い。HumanExome

BeadChip は機能領域のエクソン上の多型を集中的にカバーしている。この BeadChip に搭載されている 24 万個のエクソン領域の多型は、ヨーロッパ・アフリカ・中国・ヒスパニック集団に属する 12,000 人以上の全エクソーム塩基配列および全ゲノム塩基配列から選抜されたものである⁵⁾。2 型糖尿病・癌・代謝疾患・精神疾患に関心をもっている研究者集団がこれらの多型を選択した (http://genome.sph.umich.edu/wiki/Exome_Chip_Design)。HumanExome BeadChip はエクソーム領域に存在する 219,612 個の非同義置換に加えて、5,158 個の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) の多型および 2,061 個のヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) の多型を解析できる。また母系祖先の系統を明らかにするための 177 個のミトコンドリア DNA 多型と父系祖先の系統を明らかにするための 101 個の Y 染色体上の多型を解析することができる。さらに特筆すべき点として、過去の全ゲノム領域関連解析で有意差が報告された 4,762 個の多型を解析可能である⁶⁾。このため LDL コレステロール・HDL コレステロール・中性脂肪などの血中脂質レベルに影響を与える多型が、高齢者における心筋梗塞・脳梗塞の発症に関与しているかどうかを検証できる。

全エクソン多型解析の手順

BeadChip による SNP 検出は 2 段階で行う。まず、試料 DNA を増幅・断片化した後にビーズ上の 50 塩基の DNA プローブとハイブリダイズさせる。次に、酵素による 1 塩基伸長反応を行い、蛍光標識されたヌクレオチドを取り込ませる。チップを解析装置 iScan に挿入し蛍光画像を得る。特定のビーズが緑色あるいは赤色の蛍光を発すれば、野生型ホモあるいは変異型ホモであるとし、そのビーズが緑と赤の両方の蛍光を発し黄色を呈すればヘテロと判定する。これらの蛍光データを GenomeStudio で解析し AA, AG, GG など遺伝子型データに変換する。それぞれのビーズのアドレスは、それぞれのゲノム多型の染色上の位置とアミノ酸置換と紐付けされている。GenomeStudio からの出力データについて最初に品質管理を行う。判定不能率が高いサンプルと他の DNA が混入しているサンプルを除外する。試料の取り違えを検出するために、X 染色体を 1 本しか持たない男性と X 染色体を 2 本有する女性を判定し、これらが試料リストの性別と一致するかどうかを確認する。また、野生型ホモ・ヘテロ・変異型ホモの頻度分布が Hardy-Weinberg 平衡から逸脱していないかどうかを検証し、遺伝子型判定の信頼性を確保する。

低頻度アミノ酸置換の統計解析法

症例-対照比較による全ゲノム関連解析では、検出力を高めるために、アレル頻度のカイ二乗検定が用いられる。我々はアミノ酸置換の出現頻度が低いことを考慮して Fisher の直接確率検定も併用している。個々の多型について、劣性・優性・加算の 3 モデルを仮定して、統計学的確率・オッズ比・95% 信頼限界などを自動計算している。また、特定の遺伝子において複数の異なるアミノ酸多型が病態に関与しているモデルを想定し、疾患群と対照群の間でアミノ酸置換の分布が異なるかどうかを、Fisher の直接確率法と Monte Carlo 法によって検定している。通常、野生型アミノ酸が変異型アミノ酸に置換されるとその蛋白質に機能低下が生じる。アミノ酸置換数が対照群よりも疾患群において有意に高ければ、その遺伝子が病態に関連していると推定できる。

高齢疾患発症における遺伝子型と性差・生活習慣の交絡

蛋白質にアミノ酸置換が生じると機能的変化が生じる。代表的な例はアセトアルデヒド脱水素酵素 ALDH2 の E504K 変異である。剖検例での解析から、ALDH2 E504K 変異を有する男性（お酒に弱い）は心房細動のリスクが低いことが明らかになった。対照群では野生型ホモ EE=421, ヘテロ EK=338, 変異型ホモ KK=60 の頻度分布であったのに対し、心房細動群では EE=82, EK=34, KK=5 であった。優性モードで計算すると、 $p=0.000851$, オッズ比=0.503 (95% 信頼限界 0.336~0.754) であった。504 番のアミノ酸がグルタミン酸である野生型ホモの男性は飲酒しても顔が赤くならないが、習慣性飲酒に陥ってしまうために、高齢期になって心房細動のリスクが高まると推定された。一方、女性では野生型ホモでも習慣性飲酒をしない人が大部分であるので、ALDH2 E504K 変異の有無によって心房細動のリスクに差が認められなかった。このように、遺伝子多型は性別や生活習慣と交絡しながら、高齢者疾患の発症に関与している。

癌と遺伝的体質

癌の頻度は加齢と共に上昇する。細胞において癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異が重積することによって臨床的に検出される癌となる。欧米では家族性乳癌の原因となる BRCA1 および BRCA2 の遺伝子変異が同定されているが、日本ではその頻度は高くない。一般に、どの癌になるかは予測不能であり、交通事故に遭うのと同じだと

言われている。一方、お酒を飲むと赤くなる体質の人が、大量飲酒と大量喫煙をすると食道癌のリスクが何十倍にも高くなることが知られている。どの癌に罹りやすいかを知ることができれば、それに対応して、健診を重点的に受ける、あるいは禁煙するなど、適切な対策を講じることができる。

剖検ゲノム解析と長期縦断研究の連携

加齢によって癌・心筋梗塞・脳梗塞などの疾患リスクが上昇する。年齢別死因統計を見ると、若年層では不慮の事故と自殺が目立つ。癌による死亡は60~65歳が最も高くその後は漸減する。70歳以降には心疾患・脳血管障害の割合が増える。さらに80歳以降には肺炎・老衰の割合が増える。このように死因には年齢依存性がある。癌・心疾患・脳血管障害に罹らなかった人が認知症になり、転倒・骨折・肺炎で死亡する。剖検輯報にはヒトの一生が凝縮された最終診断が記録されている。剖検録には生前のカルテに基づいて臨床診断ならびに生活習慣が記録されているが、環境要因の記載は十分とは言えない。我々の研究所では草津町・中之条町・鳩山町・板橋区の住民3,000人を対象とする長期縦断研究が実施されている。生活習慣・活動量・血液生化学などの膨大な表現型データと全エクソン多型の関連解析が必要である。大府市を中心に実施されている長期縦断研究では、2,000人の地域住民を対象として10年から20年にわたって栄養・運動能・認知能などを調査し、この間に発症した疾患が記録されている。この長期縦断研究に全エクソン解析が導入された。

市民参加による遺伝的体質研究

前述したように高齢者疾患は生活習慣の過去から現在までの積分値と遺伝的要因が複合した結果である。心理学研究の手法として「複線経路等至性モデル」がある。我々は人生の軌跡において色々な局面で進路を決めてきた結果、現状に辿り着いた。ある時点で別の選択をしていたならば、現在の自分とは異なる自分になっていたかもしれない。人生は二度と後戻りできないが、自分の遺伝的体質を十分に知ることによって、生活習慣を改善し、疾患リスクを軽減し、自分の「人生の終え方」を変えることは可能である。ただし自分ひとりで自分の未来を予測しようと考えると答えは得られない。人々がどのように生き、どのように亡くなっているのかを分析する必要がある。数学では多元連立方程式を解くためには未知数と同じだけの等式が必要である。遺伝子と多様な疾患発症の間の関連を分析するには少なくとも2万人から3万

人の協力が必要である。剖検2,500例の遺伝子解析では疾患関連性の検出力が不足している。一人の遺伝子多型解析の原価はDNA抽出費を含めると1万円である。自分の未来を知りたい人が2万円を出資し、1万円で自分自身のDNAを分析し、残りの1万円で一般高齢者あるいは超百寿者の分析をさせて頂く。そうすれば、10~15年後には自分と同じ遺伝子多型を有する高齢者がある疾患で世を去ったか、健康長寿を享受しているかが判明する。それから自分の生活方針を変更しても十分に間に合うだろう。

網羅的な全エクソン非同義置換解析に基づく症例-対照研究

我々は全国の研究機関と共同して全エクソン多型解析を実施している。慶応義塾大学との共同研究として741人の百寿者(男性120人と女性621人)の全エクソン多型解析を開始した。健康長寿の遺伝的要因を解明するのがその目的である。三重大学では5,000人を対象にして心筋梗塞・脳梗塞・糖尿病・メタボリック症候群などに関する症例-対照研究が開始された。名古屋大学では筋萎縮性側索硬化症の病因遺伝子探索のために全エクソン塩基配列解析と全エクソン多型解析を組み合わせている。順天堂大学では家族性パーキンソン病に関する家系研究に加えて全エクソン多型解析を導入した。福井県立大学を拠点として収集された橋本脳症および橋本病に関する病因遺伝子の探索が開始された。東京都医学研究機構との共同研究では喫煙・飲酒・薬物依存症に焦点を当てている。剖検例の網羅的ゲノム研究は、最終的な臨床診断・病理診断が確定しているの、如何なる疾患に関しても約2,000例の対照群を提供できる。共同研究者が400万円ないし800万円の研究予算を投入すれば、500例ないし1,000例の疾患群について全エクソン多型解析を行うことができる。2,000例の対照群と1,000例の疾患群を比較すれば、全エクソン機能的な多型解析によって $p < 1 \times 10^{-7}$ の有意水準に達する多型を捕捉できると期待している。スポーツ研究・百寿研究・連続剖検研究・長期縦断研究、疾患関連研究を統合することによって、高齢者の健康長寿の達成を支援し、加齢性疾患の病因解明を大きく前進させることができる。

なお、この全エクソン多型解析は、東京都健康長寿医療センターの新井富生部長・森聖二郎部長・村山繁雄部長、東京医科歯科大学の沢辺元司教授・村松正明教授、三重大学の山田芳司教授、名古屋大学の祖父江元教授、福井県立大学の米田誠教授、名古屋学芸大学の下方浩史教授、慶応義塾大学の廣瀬信義老年内科長、順天堂大学

の服部信孝教授、国立遺伝学研究所の井ノ上逸朗教授との共同研究として遂行されている。

文 献

- 1) Wang G, Mikami E, Chiu LL, DE Perini A, Deason M, Fuku N, et al: Association Analysis of ACE and ACTN3 in Elite Caucasian and East Asian Swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2013; 45: 892-900.
 - 2) Tanisawa K, Mikami E, Fuku N, Honda Y, Honda S, Ohsawa I, et al: Exome sequencing of senescence-accelerated mice (SAM) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC Genomics* 2013; 14: 248.
 - 3) Sawabe M, Tanaka M, Chida K, Arai T, Nishigaki Y, Fuku N, et al: Mitochondrial haplogroups A and M7a confer a genetic risk for coronary atherosclerosis in the Japanese elderly: an autopsy study of 1,536 patients. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18: 166-175.
 - 4) Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH, et al: Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genetics* 2010; 11: 446-450.
 - 5) Grove ML, Yu B, Cochran BJ, Haritunians T, Bis JC, Taylor KD, et al: Best Practices and Joint Calling of the Human Exome BeadChip: The CHARGE Consortium. *PLoS One* 2013; 8: e68095.
 - 6) Huyghe JR, Jackson AU, Fogarty MP, Buchkovich ML, Stančáková A, Stringham HM, et al: Exome array analysis identifies new loci and low-frequency variants influencing insulin processing and secretion. *Nat Genet* 2013; 245: 197-201.
-