

疾患関連遺伝子の系統的な検索法の確立

学位申請者 八木 亮一

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

創生医科学専攻 歯周病態学分野

(主指導：栗原 英見 教授)

2013 年度

謝辞

本研究の御指導および御高覧を賜りました本学応用生命科学部門歯周病態学研究室 栗原 英見 教授に対して謹んで感謝の意を表します。また、研究の遂行ならびに本論文作製において、御教示、御高覧を賜りました、本学基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学研究室 高田 隆 教授、本学基礎生命科学部門細胞分子薬理学 兼松 隆 教授、本学原爆放射線医科学研究所分子疫学研究分野 川上 秀史 教授に深厚なる謝意を表します。さらに、本研究の遂行、および本論文の作製を終始御指導ならびに御高覧を賜りました本学応用生命科学部門 脳神経内科学 丸山 博文 准教授、ならびに本学応用生命科学部門歯周病態学研究室 水野 智仁 博士に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行上および本論文作製上、御助言と御鞭撻ならびに御協力頂きました本学応用生命科学部門歯周病態学研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えてくれると共に、常に私を支えてくれた父・宏明、母・千恵子に心から感謝いたします。

2014年1月

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻

先進医療開発科学講座 歯周病態学分野

八木 亮一

目 次

第1章 緒 論	4
第2章 アルツハイマー病疾患関連遺伝子のスクリーニング	6
第1節 概 要	6
第2節 材料および方法	6
1) 検体	6
2) シークエンス	6
3) amyloid precursor protein (<i>APP</i>)コピー数の確認	18
第3節 結 果	21
1) シークエンスデータ	21
2) 検出した変異	26
3) <i>APP</i> コピー数	29
4) 患者の臨床所見	29
第4節 考 察	31
第3章 総括	34
第4章 参考文献	35

第1章 諸論

多くの遺伝性疾患の確定診断には疾患関連遺伝子の塩基配列の読み取りが必要であるが、近年まではサンガー法が用いられてきた。サンガー法は結果に信頼性があるが、膨大な時間とコストがかかることから診断をルーティンワークとすることは困難であった。しかし、数年前から登場した次世代シーケンサーによって遺伝子診断の様相は一変した。本研究では、Ion Personal Genome Machine (IonPGM) を用いて疾患関連遺伝子の系統的な検索法を確立することを目的とした。IonPGM は半導体チップを利用して、水素イオンが発生する際のpHの変化を電気信号として検出することにより、光学的計測を必要とせず 고속シーケンスを行うことを可能とした卓上型次世代シーケンサーである¹。加えて、サンプルに特異なアダプターを付与することにより複数のサンプルを同時にシーケンスできることも大きな特徴である。

検索対象とする疾患にアルツハイマー病を選択した。日本において認知症は65才以上では15%の人が罹患していると推定されおり、アルツハイマー病はその認知症の原因の半数以上を占めている²。根本的な治療法はまだなく、近年では歯周病によってその発症リスクが増加するという報告もされている³。アルツハイマー病は約25%が遺伝性によるものと報告されており、これまでに原因遺伝子として amyloid precursor protein (*APP*)⁴、presenilin (*PSEN*) *1*⁵、*PSEN2*⁶ が、また主な晩発型アルツハイマー病のリスク遺伝子として apolipoprotein E (*APOE*)^{7,8} が同定されている。アルツハイマー病発症の有力な仮説として「アミロイド仮説」があり、神経細胞の *APP* を *PSEN1,2* がコードしている γ セクレターゼが切断しているが、*PSEN1*、*PSEN2* の変異によって異常なアミロイド β タ

ンパクの産生が増えることとなり、アルツハイマー病の発症を促進するものと考えられている^{9, 10}。また、*APP* 領域の重複とアルツハイマー病との関連性はフランス人家系で初めて報告され、日本人家系においても数例の報告がされている^{11, 12}。晩発性発症型アルツハイマー病に関与する *APOE* だが、130番目のシステインがアルギニンに置換したタンパク質変異を *APOE4* といい、そのようなアミノ酸変異を起こす遺伝子型を *APOEε4* (c.471T>C, p.C130R, rs429358) と呼ぶ。この *APOEε4* の遺伝子型を持つ人は、野生型のそれを持つ人よりもアルツハイマー病を高頻度で発症する統計学的データが報告されている¹³。しかし、未だにアルツハイマー病の約 75%の原因は不明のまま、同定されていない原因遺伝子の存在が考えられる。これら未知の原因遺伝子同定のためにも既知の原因遺伝子をスクリーニングすることは重要である。

本研究において *IonPGM* を用いてアルツハイマー病患者の既知の遺伝子スクリーニングを行うことによって、既知の病原性変異ならびに新規の病原性変異の同定を行うこととした。また、疾患関連遺伝子のスクリーニングと併行して *IonPGM* の欠点についても検討を行い、*IonPGM* を用いた疾患関連遺伝子スクリーニング法がアルツハイマー病や他の疾患の関連遺伝子の系統的な検索法として応用することができるかを検討することとした。

第2章

第1節 概要

アルツハイマー病の原因遺伝子である *PSEN1*, *PSEN2*, *APP* 及び主な疾患感受性遺伝子である *APOE* の新規、あるいは既知の病原性変異のスクリーニングを行った。

第2節 材料および方法

1) 検体

患者は神経内科医によってアルツハイマー病と診断された45人の家族性アルツハイマー病患者(発症年齢40-82歳)と、29人の孤発性早期発症アルツハイマー病患者(発症年齢60歳未満)のゲノムDNAを用いた。またコントロールとして健常者218人のゲノムDNAと、アルツハイマー病患者以外の147人分のエクソームシーケンスデータを用いた。本研究は広島大学倫理委員会の承認のもと、患者、あるいはその家族の同意を得て行われた。

2) シーケンス

Ion AmpliSeq Designer (<https://www.ampliseq.com/browse.action>) を用いて *PSEN1*, *PSEN2*, *APP*, *APOE* の4遺伝子のエクソン領域をカバーできるプライマーを設計した。プライマーはPrimer pool 1,2に分け、それぞれ35個と32個のアンプリコンで構成されている(表1)。また、全エクソン領域中4か所はプライマーでカバーできていなかった(表2)。それぞれのプライマーをIon Ampliseq Library Kit 2.0 (Life Technologies) を用いて(表3)にしたがって調製した後、(表

4) のプロトコルにしたがって PCR を行った。

2 種類の Primer pool で増幅した PCR 産物を混ぜた後、FuPa Reagent (Ampliseq Library Kit 2.0) を $2\ \mu\text{l}$ 加え $22\ \mu\text{l}$ にして混和し (表 5)、のプロトコルにしたがってサーマルサイクラーにかけた。

反応終了後、1 時間以内にサンプルを回収し、(表 6) にしたがって Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 Kit (Life Technologies) と Switch Solution (Ampliseq Library Kit 2.0)、DNA Ligase (Ampliseq Library Kit 2.0) とを混和して、(表 7) の通りにサーマルサイクラーにかけ、サンプルにバーコードを結合させた。

サンプルの精製を行うために室温にしておいた AmPure[®] XP Reagent (Beckman Coulter) をサンプル量の 1.5 倍混ぜ、5 分間放置した。磁気性のラック DynaMag[™]-96 Side Magnet に 2 分ほど置き、ペレットが残るように上清だけを取り除いた。 $150\ \mu\text{l}$ の 70% エタノールでペレットを 2 回洗浄し、エタノールを取り除いて 5 分間室温で乾燥させた。

磁気性のラックからサンプルを外し、 $50\ \mu\text{l}$ の Platinum PCR SuperMix (Ampliseq Library Kit 2.0) と $2\ \mu\text{l}$ の Library Amplification primer Mix (Ampliseq Library Kit 2.0) を加えて混和した。その後サンプルをマグネットラックに戻し、2 分待つてから上清を新しい 96 プレートに移し (表 8)、のプロトコルにしたがってサーマルサイクラーにかけた。

PCR 後サンプル精製を行うためにまず AmPure[®] XP Reagent をサンプル量の 0.5 倍混ぜ、5 分間放置した。磁気性のラックに 5 分ほど置き、サンプルが透明になったことを確認してから求めるアンプリコンを含んでいる上清だけを新しい 96 プレートに移した。次に AmPure[®] XP Reagent をサンプル量の 1.2 倍混ぜ、5 分間放置した。磁気性のラックに 3 分ほど置き、サンプルが透明になったことを確

認してから、アンプリコンが結合しているペレットが残るように上清だけを取り除いた。その後 150 μ の 70%エタノールでペレットを 2 回洗浄し、エタノールを取り除いて 5 分間室温で乾燥させた。乾燥させすぎないうちに磁気性のラックから外して 50 μ の Low TE でペレットを溶かした後、再度磁気性のラックに戻しサンプルが透明になったことを確認してから上清を採取した。

採取した各サンプルを 2100Bioanalyzer (Agilent Technologies) にて濃度測定を行い、濃度が 20pM になるようにサンプルの濃度調整を行った。エクソームシーケンスを行うサンプルを等量ずつ抽出し混和してから Ion OneTouch™ System (Life Technologies) にてテンプレート調整を行い、Ion PGM (Life Technologies) にてアンプリコンシーケンスを行った¹⁴。

またカバーできていなかった 4 か所(表 2)についても Applied Biosystems 3130 DNA sequencer (Life Technologies) を用いたサンガー法にてスクリーニングを行った。

表 1 プライマー配列一覧

Pool 1

Ion AmpliSeq Fwd Primer*	Ion AmpliSeq Rev Primer*	Gene Symbol
GTTATCCGACTGGTCCTCGAA	AGGTTGTCCGTGGAGAAGTAAAAG	PSEN2
TGTCCCCTCCTCACGGT	GGAGCCTCCACCCTCTGT	PSEN2
GCCTCTGAGAATGCTGGTAGA	GATCGCCCAGTCAACTCTGAAA	PSEN2
CAGGCCTACCTCATCATGATCAG	CTCTGCAGAAAGGGATGCAAG	PSEN2
CAGGCTTGGGTATCAGTCTCAG	CCATGTCCACTTGTGCCACAT	PSEN2
CCCCTAGCAGGTCCAGAATCA	GCACCACCAAGAAGATGGTCAT	PSEN2
CTGGTTCCAAAAATCCGTGCATT	CAGGCACAAACAGCATGATCAC	PSEN2
ACAGGCATCTCTTGGAAGCTTT	CATTAGGGACGTCCGCTCAT	PSEN2
TGTGAATGTGTGTCTTTCCCATCT	AGAAGAAACATCCATGGGATTCTAACC	PSEN1
TTCCACTTTCTCTTGAAGGCACA	ACTTTGCAACATAGAGAAATGCACATAC	PSEN1
CCGGAAGCTCAAAGGAGAGTATC	AAATACTTATCTGTGTATTTACTGGGCATTAT	PSEN1
TTATGTTTTTCTTTTTCTAGATTTAGTGGCTGT	TGCTTCAGTTCGATAAATTCTACACT	PSEN1
TCCATTCACTGGAAAGGTCCAC	GGCATTCTGTGACAAACAAATTATCA	PSEN1
GTACTTTTTAAGGGTTGTGGGACCT	GCTTTAAATGATAGCTACACAGCACAAA	PSEN1
GTGGAGCAAGATGAGGAAGAAGA	CCCACTGGCTTTGAGAATAATAAAACAA	PSEN1
CCTTTTCAGAACCTCAAGAGGCTTT	GGGAGATGATAAGTGAATCCAGTCT	PSEN1
TGTGCCAGCGACAATCA	GATGCGTGAAACTTGGTGAATCTTTATTA	APOE

GCGCGGATGGAGGAGATG	GGCTCGAACCAGCTCTTGA	APOE
GCACGGCTGTCCAAGGA	GGCCTGGTACTGCCA	APOE
GGGTCGCTTTTGGGATTACCT	GGCAGAATGAAACCTGGACCT	APOE
CTCACTGGCGGTTGATTGAC	GGAGGTTGAGGTGAGGATGAGA	APOE
CCCCGGCTTCTCTGCATTA	CGGATCCCCTCGCACAG	APP
GCAGGATGCCTTCCTTGGTAT	TGCCTTGGAGCTATGGATACTATAACT	APP
GCTCACCTAAGCAGCGGTA	CCCCTGCCTCAAGTAACAATTGATT	APP
CACGTCCCCAGGAAATCTTCA	GCGGTAAGAACACTGTGATACAGAT	APP
AGATTTTGCATAACAGCAGACTCTGA	ATTCTGCTGATGCGGAGGAG	APP
AAATTCACAAGCATAAGAAGCCTTTT	AGAGTCTGTGGAAGAGGTGGT	APP
GCAAAGAAGGTGATGATGCTGGA	TGTCAGTGGACTCGTGCATTT	APP
CCTTCTTATCAGCTTTAGGCAAGTTCTT	CCTATTAAGTCTGTATTCAAAGGATGAACTGA	APP
GGCTGCTTCCTGTTCCAAAGAT	TGTTGGAATGACTATGCAGTCTTTAGG	APP
GGATTGTCAAAGCTGCAGAAGATG	AGCAGTGTTTTGCACAACTTGAAA	APP
CTCCACGGTGGTTTTTCGTTTC	TGTTACTACCAAAGAGATGGTTTTGT	APP
AGGCTTAAAATGCAGAAAGGAGACA	CCTGCTCGACTATGTTTGGGA	APP
TTTCTTCTTCAGCATCACCAAGGT	ATCCAAATGTCCCCTGCATTTAAGA	APP
CACCGATGGGTAGTGAAGCA	CCATGTTCCACCCTTAAAAGATTGATTTT	APP

Pool 2

Ion AmpliSeq Fwd Primer*	Ion AmpliSeq Rev Primer*	Gene Symbol
CCATCACGTTCTGGGCTCAT	CCAATGAAAATTCCTGCAGCTTG	PSEN2
CTTCTGGGCCAGAGTTTCTCTT	GCAGCTGGACGCATCCC	PSEN2
TGCAGGCAGCCACTGTTA	GAGCTGGGTGCAGGTAGG	PSEN2
GTGACTGGAGAATGAGAATTTGGG	CTCATTTCTCTCCTGGGCAGTT	PSEN2
CTAGGCTGTAATGCCTCCACTG	TTGATGAACACTAGGGCCATGAG	PSEN2
ATGATCAGCGTCATCGTGGTT	TTTTTCTAAAGGCGGCTGTTTCAC	PSEN2
CCTCAAATACGGAGCGAAGCA	GTACAGTGACCAACACAGGCT	PSEN2
ACAGCGAGGAAGAAGTGTGTG	CCGCATCAGGGAATGAATGTCT	PSEN2
TGTGAAATCATAGCAAAGAGTGACCA	AGTTTTGACATTAAGAGCTCTGACACA	PSEN1
ACAGCCCATGCTTTGTGGTTTA	ACAGTGTCTTGTGACTCCCTTTC	PSEN1
TGTTGAACAGTCTTAAGGCAGCAT	CCTTTGAGCTTCCGGGTCT	PSEN1
CCACCAGTTCACCTGCCATTTA	AAGTGGACCTTTCGGACACAAA	PSEN1
GGAAGTGTTTAAAACCTATAACGTTGCT	GATATGCCTGCTGGAGTCGAA	PSEN1
CACTGACCTAGGGCTTTTGTGT	CATAAGAAGAACAGGGTGGAAAGCA	PSEN1
GTTAATCCCAGGTCTAACCGTTACC	GCCATATTTCAATGTCAGCTCCTCA	PSEN1
CGAGGTGAAGGAGCAGGTG	CAGGCTTCGGCGTTCAG	APOE
ATGCCGATGACCTGCAGAA	GTCCGGCTGCCCATCTC	APOE
CCACTGTGCGACACCCT	CGCACACGTCTCCATGTC	APOE

CCTGACCCACCTTGAACCTGTT	GCACCTGCTCAGACAGTGT	APOE
CTGTCTGAGAACAGAGTTTCATCTTACC	TGATCTCAGGGAGTATTCCACAGTT	APP
GGTATGGTGAATCATTAGGAACCAAGA	CAGGGACCAAAACCTGCATTG	APP
CTGCAAGAGTCCAAAACACAGT	CCATCCCCACTTTGTGATTCCC	APP
CCACCAGACATCCGAGTCATC	ACTCACTGTTTTCTCCTTACACTTTGT	APP
GGTGGTTCTCTCTGTGGCTT	TTTTCTGTTATTTGTGTTTGCCTTCACA	APP
GTGGCCAGGCTCGAAGAA	GTGGTTCCCCACATCTCCTC	APP
GCTGAATGATGGAAGAGCCAGA	TGATTATTCTGTTGTTGTTGGCTTTTT	APP
GAACAGCTGAAGTTCATGGGACTA	GGTCATGAGAGAATGGGAAGAGG	APP
GTCTGTGCTGTGACCTGAAGT	CAGCATTTCCAGGAGAAAAGTGGA	APP
GAAAATACATGTCCATGTGCAGCAT	CCTACCCCCAGACATTGTTGAC	APP
CTCTCTCTCTTGACACACGTTA	TGCTCTCATGCCATCTTTGACC	APP
CAGGATGAACCAGAGTTAATAGGTCATT	TGAGTAAACTAATTGGTTGTCCTGCAT	APP
AGAACAACCTGTAACCCAAGCATCA	TCATAGCGACAGTGATCGTCATC	APP

表2 アンプリコンがカバーできないターゲット領域

Chr	Start	End	Gene	Uncovered Bases (bp)
14	73659351	73659379	<i>PSENI</i>	28
14	73673127	73673154	<i>PSENI</i>	27
19	45412264	45412270	<i>APOE</i>	6
21	27394160	27394230	<i>APP</i>	70

表 3

Component	Volume
5x Ion AMpliSeq™ HiFi Master Mix	2 μ
2x Ion AMpliSeq™ Primer pool 1 or 2	5 μ
Genome DNA 10 ng	$\gamma\mu$
Nuclease-free Water	3- $\gamma\mu$
Total	10 μ

表 4

Stage	Step	Temperature	Time
Hold	Activate the enzyme	99°C	2min
19 Cycle	Denature	99°C	15 sec
	Anneal and extend	60°C	4 min
Hold	-	10°C	Hold

表 5

Temperature	Time
50°C	10 min
55°C	10 min
65°C	20 min
10°C	Hold (1 時間まで)

表 6

Component	Volume
Switch Solution	4 μ
Ion P1 Adapter	0.5 μ
Ion Xpress Barcode X*	0.5 μ
Nuclease-free Water	1 μ
DNA Ligase	2 μ
Total volume (22 μ のサンプル含む)	30 μ

表 7

Temperature	Time
22°C	30 min
72°C	10 min
10°C	Hold

表 8

Stage	Temperature	Time
Hold	98°C	2min
5 Cycle	98°C	15 sec
	60°C	1 min
Hold	10°C	Hold

アンプリコンシーケンスの後、各アンプリコンカバレッジを確認した。リード数が 20 未満の部位はカバレッジが不十分であると判断し、該当領域のスクリーニングを Applied Biosystems 3130 DNA sequencer を用いたサンガー法にて行った。

検出された変異は dbSNP137 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)、1000 genomes (<http://www.1000genomes.org/>)、Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database (<http://www.nolgen.ua.ac.be/ADMutations/>) を参照し、新規のものか既知のものかを確認した。また新規の変異は Sorting Intolerant From Tolerant [SIFT] (<http://sift.jcvi.org/>)、Polymorphism Phenotyping v2 [Polyphen2] (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、Pmut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>) といったアミノ酸変異機能予測アルゴリズムで機能予測を行い、アミノ酸変異の影響を評価した。

3) コピー数の確認

APP 領域の重複の存在を確認するために、SYBR® Green real-time PCR assay on the Applied Biosystems StepOnePlus™ System (Life Technologies) を使用して *APP* アレルの定量 PCR を行うこととした。*APP* の intron1,exon7,18 と *GAPDH* のプライマー (表 9) を THUNDER BIRD (Life Technologies) を用いて (表 10) の通りに調整した後、(表 11) のプロトコルにしたがって定量 PCR を行った。*GAPDH* をコントロールとして *APP* のコピー数の増加の有無を確認した¹¹⁾。

表 9

APP intron1 up	CGGATCCCCTCGCACAG
APP intron1 low	GCTTCTCTGCATTAAAGACTTGGG
APP exon7 up	GGTCCCCACATCTCCTCTG
APP exon7 low	GAGAGAGACGAAAGGTGGCC
APP exon18 up	CTGCTTCTCCATGTTCCACCCT
APP exon18 low	GTCCAACCTCAGAGGCTGCT
hGAPDH up	GCCCAATACGACCAAATCC
hGAPDH low	GCTCTGCTCCTCCTGTTC

表 10

Component	Volume
THUNDER BIRD (PCR Master Mix)	5 μ
Primer (2 μ g/ μ l) up	1.5 μ
low	1.5 μ
DNA (10ng/ μ l)	1 μ
Nuclease-free Water	1 μ
Total	10 μ

表 11

Stage	Temperature	Time
Polymerase Activation	98°C	10 min
PCR cycling (40 Cycle)	98°C	10 sec
	60°C	30 sec
Melt curve	95°C	15 sec
	55°C	15 sec
	95°C	15 sec

第3節 結果

1) シークエンスデータ

サンプルあたりのシークエンスデータを (表 12) に示す。Ion314Chip と Ion318Chip において、20 リード以上のカバレッジが得られたのはそれぞれ 93.9% と 93.7% であり、各サンプル平均 2.62 アンプリコンのリード数が 20 未満であった。アンプリコンごとの平均カバレッジを (表 13) に示す。

表 12 シーケンスデータの平均値

Chip	Number of reads	Bases	>= Q20 Bases	Mean read length	Mean read depth
314	24654.98	2846887	2200083.49	116	310.38
318	71112.85	7650168	5573694.54	109	556.61

表 13 アンプリコンごとの平均リード数

Chr	Start	End	Amplicon ID	Gene	Average read depth
1	227069477	227069651	AMPL549268870	PSEN2	612.2
1	227069652	227069819	AMPL526744630	PSEN2	512.9
1	227071348	227071525	AMPL525955156	PSEN2	490.2
1	227071525	227071688	AMPL525967857	PSEN2	39.2
1	227073173	227073335	AMPL526043904	PSEN2	761.2
1	227073336	227073448	AMPL526052192	PSEN2	627.6
1	227075724	227075902	AMPL526021992	PSEN2	378.4
1	227076496	227076674	AMPL526040762	PSEN2	592.5
1	227076671	227076843	AMPL526054433	PSEN2	678.0
1	227077614	227077784	AMPL549268406	PSEN2	509.9
1	227077785	227077918	AMPL526580126	PSEN2	781.4
1	227078942	227079110	AMPL527650963	PSEN2	458.5
1	227079411	227079596	AMPL527151626	PSEN2	639.6
1	227081652	227081837	AMPL528255933	PSEN2	527.7
1	227083034	227083207	AMPL526030208	PSEN2	719.1
1	227083208	227083303	AMPL526045220	PSEN2	1055.7
14	73614691	73614846	AMPL525947290	PSEN1	838.5
14	73637453	73637626	AMPL525976425	PSEN1	435.6
14	73637627	73637768	AMPL525982579	PSEN1	832.2
14	73640260	73640437	AMPL526008474	PSEN1	459.6
14	73653530	73653671	AMPL525940863	PSEN1	491.5

14	73659380	73659458	AMPL526015828	PSEN1	1689.9
14	73659459	73659586	AMPL526031225	PSEN1	1061.1
14	73664596	73664751	AMPL526040558	PSEN1	312.0
14	73664752	73664871	AMPL735850028	PSEN1	962.7
14	73672994	73673127	AMPL525934006	PSEN1	747.5
14	73673155	73673305	AMPL549424210	PSEN1	550.4
14	73678370	73678481	AMPL525992477	PSEN1	547.7
14	73678482	73678650	AMPL526007281	PSEN1	803.5
14	73683802	73683973	AMPL525942228	PSEN1	312.9
14	73685833	73686006	AMPL525936744	PSEN1	454.4
19	45409842	45409966	AMPL528077049	APOE	960.6
19	45411009	45411150	AMPL528067540	APOE	676.1
19	45411138	45411263	AMPL528071549	APOE	1180.4
19	45411771	45411925	AMPL420460538	APOE	195.4
19	45411895	45412082	AMPL420472321	APOE	78.8
19	45412078	45412264	AMPL420402726	APOE	1.6
19	45412271	45412388	AMPL420403636	APOE	496.7
19	45412316	45412503	AMPL420407709	APOE	289.3
19	45412504	45412623	AMPL420420079	APOE	432.5
21	27253939	27254115	AMPL538539316	APP	447.3
21	27263915	27264090	AMPL526021856	APP	411.7
21	27264091	27264265	AMPL526041134	APP	381.6
21	27269840	27270008	AMPL525995983	APP	370.2

21	27277277	27277452	AMPL527343424	APP	427.3
21	27283999	27284167	AMPL527103996	APP	449.0
21	27284168	27284283	AMPL527144892	APP	1218.9
21	27326884	27327028	AMPL527357004	APP	740.8
21	27327923	27328095	AMPL526839353	APP	466.4
21	27347357	27347521	AMPL528011979	APP	656.2
21	27347522	27347654	AMPL528029644	APP	853.0
21	27348161	27348319	AMPL528113655	APP	704.5
21	27348306	27348375	AMPL528119152	APP	794.1
21	27354652	27354822	AMPL526587463	APP	381.1
21	27369612	27369792	AMPL527687132	APP	395.6
21	27372318	27372504	AMPL526930935	APP	556.6
21	27394036	27394160	AMPL527448729	APP	788.6
21	27394231	27394359	AMPL527479682	APP	655.8
21	27423202	27423368	AMPL549357278	APP	461.0
21	27423369	27423511	AMPL527669726	APP	880.4
21	27425519	27425697	AMPL526481062	APP	549.0
21	27462135	27462271	AMPL549268430	APP	725.2
21	27462272	27462408	AMPL526533206	APP	785.6
21	27484189	27484330	AMPL526753846	APP	501.5
21	27484331	27484484	AMPL526773322	APP	853.6
21	27512426	27512559	AMPL526736961	APP	589.8
21	27542803	27542969	AMPL526891230	APP	91.3

2) 検出した候補変異

家族性のグループにおいて、5つのヘテロ接合の変異を認めた(表14)。2つの変異は *PSEN1* で認められ、1つは既知の病原性変異(患者1, 2, and 3: *PSEN1*, c.488 A>G, p.H163R, rs63750590)、もう一つは新規の変異(患者4: *PSEN1*, c.1158C>A, p.F386L, Figure 1)であった。*PSEN1* の新規変異は、2つの機能予測プログラムで病原性ありと判定され、またコントロールサンプルにおいても認められなかった。患者4の父親は認知症を発症していたが、既に死亡している。また母親はすでに80歳であるが認知症の兆候はなく、*PSEN1* の変異も認められなかった。患者4の兄弟は認知症を発症しているが、そのうち長兄の血液サンプルが入手できたため確認すると同一の変異が認められた(図1)。この結果は *PSEN1* の新規変異が疾患発症に関与していることを支持するものであった。

PSEN2 の新規変異(c.773C>T, p.A258V)も認めたが、全てのアミノ酸変異予測プログラムで病因性はないと判定された。

APP においても新規変異(c.1530G>C, p.K510N)を認めたが、コントロールサンプルとエクソームデータベースの両方において同一の変異を認めた。そのためこの変異は病因性変異ではないと判断した。

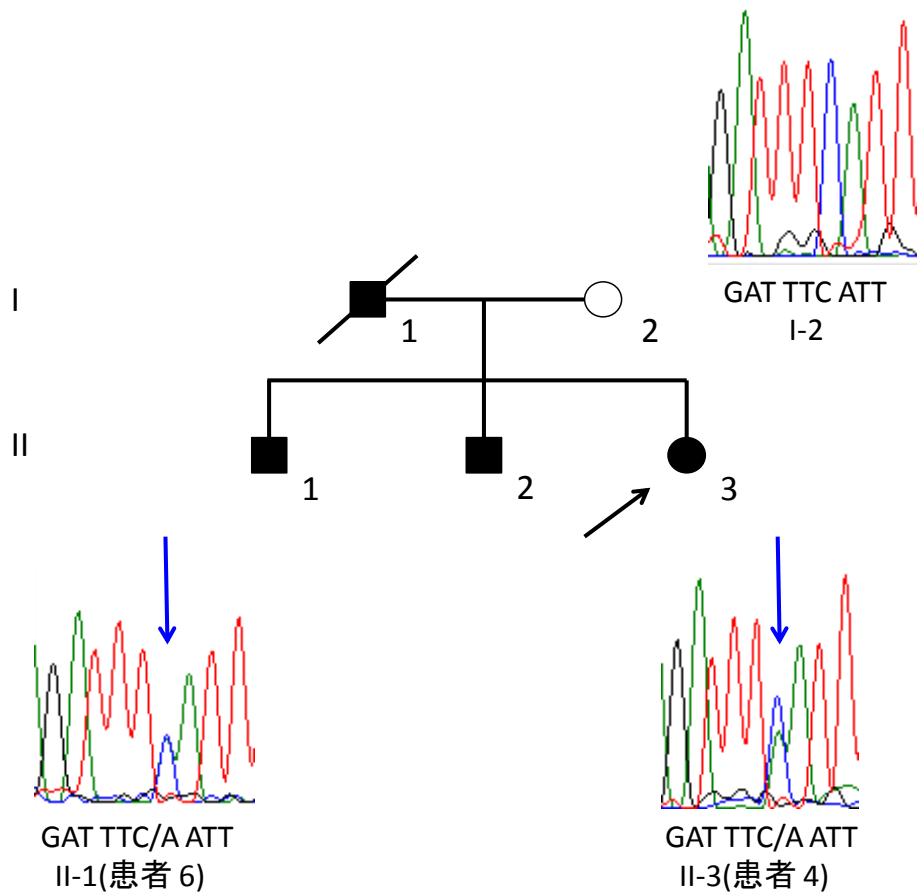
早期発症のグループでは、*PSEN2* の新規変異(c.1262C>T, p.T421M)を認めた(患者5)。

APOE については *APOEε4* (c.471T>C, p.C130R, rs429358)のみが病因性変異として認められた。*APOEε4* アレルを持つ患者は約43%で、早期発症グループ(15/29; 52%)と家族性グループ(17/45; 38%)とでは有意差は認められなかった(P=0.3365)。

表 14

グループ	遺伝子	変異	コントロール 群	アミノ酸変 質機能予測 病因性	ステータス	疾患関連性 (保因者)
家族性	<i>PSEN1</i>	c.772A>G p.H163R	検索せず	Polyphen2 Pmut	rs63750590	causative (患者 1, 2, 3)
		c.1158C>A p.F386L	0	SIFT Polyphen2	新規	causative (患者 4, 6)
	<i>PSEN2</i>	c.773C>T p.A258V	0	なし	新規	neutral
		<i>APP</i>	c.1530G>C p.K510N	1	Polyphen2 Pmut	新規
	<i>APOE</i>	c.388T>C p.C130R	検索せず	Pmut	rs429358	risk
孤発性	<i>PSEN2</i>	c.1262C>T p.T421M	0	SIFT Polyphen2 Pmut	新規	causative (患者 5)

図 1



患者 4, 6 の家系図。■、●：認知症発症。矢印：発端者。母親は 80 歳以上であるが、認知症は発症していない。

3) APP の重複

リアルタイム PCR でコピー数の確認を行った結果、本実験でスクリーニングを行ったアルツハイマー病患者には *APP* 重複は認められなかった。

4) 患者の臨床所見

本研究で *PSEN1*、*PSEN2* において検出された既知あるいは新規の遺伝子変異をもつ患者の臨床情報を (表 15) に示す。遺伝子変異を持つ患者は全員早期発症 (44-55 歳) をしていた。患者 2 と患者 3 は姉妹であり、患者 4 は患者 6 の妹である。また、患者 5 は同一家系内に発症者を認めない孤発性の患者である。

表 15 患者情報

	発症年齢	性別	初発症状	家族歴
患者 1	46	男性	記憶障害	母 伯父
患者 2	41	女性	歩行困難	母 妹 (患者 3)
患者 3	45	女性	記憶障害	母 姉 (患者 2)
患者 4	40	女性	歩行困難	父 兄 (患者 6)
患者 5	55	女性	記憶障害	孤発
患者 6	52	男性	記憶障害	父 妹 (患者 4)

第4節 考察

家族性のグループにおいて、*PSEN1* の新規変異 (c.1158C>A, p.F386L) と、既知の変異 (c.488 A>G, p.H163R, rs63750590) が認められ、変異を持つ患者の割合は 11%であった。家族性アルツハイマー病の主要な原因は *PSEN1* の変異によるものである。アルツハイマー病変異のデータベースには *PSEN2* の 13 種類の変異と *APP* の 33 種類の変異と同様に、*PSEN1* の変異が 185 種類登録されており、多くの変異が報告されている反面、同定されていない変異もいまだ存在している。実際、本研究において 2 種類の新規病源性遺伝子変異を同定することができた。このことから、*PSEN1*、*PSEN2*、*APP* といったアルツハイマー病の既知の原因遺伝子をスクリーニングすることは有益であると考えられる。

PSEN1 の既知の変異 (c.488 A>G, p.H163R, rs63750590) の臨床所見として 40 歳半ばでの発症、鬱症状、そして後期でのミオクローヌスが報告されている¹⁵。私共の患者も 40 歳半ばでの発症、鬱症状が認められたが、まだ症状が中期であるためかミオクローヌスは認められなかった。これには遺伝的、環境的要因の両方を含んだ同定されていない未知の因子が関わっている可能性もある¹⁶。

PSEN1 の新規変異 (c.1158C>A, p.F386L) の 1 塩基前には既知の変異 (c.1157T>C, p.F386S, rs63749860) が報告されている。また本変異は *PSEN1* の第 7 膜貫通領域に位置しているが、 γ -セクレターゼの活性中心を構成する 9 回膜貫通タンパク質のプレセニリンが、ニカストリン、Aph-1、とともに 4 量体を形成することによって初めて活性を持つとされており、その際に *PSEN1* の第 6,7 膜貫通部位が活性されるという報告がある^{17,18,19}。この変異をもつ患者には認知症に加え、下肢のけい縮を伴う対麻痺が報告されているが、私どもの患者には認められなかった¹⁶。

孤発性の患者は 60 歳未満を対象とした。これは過去に行われた大規模調査の結果、家族歴のない患者の遺伝的関与 (*PSEN1*, *PSEN2*, *APP*) を調べるには 58 歳をカットオフ値とするのが望ましいとする報告に基づいた²⁰。本研究の孤発性のグループにおいて、*PSEN2* (c.1262C>T, p.T421M) の新規変異を同定した。この変異を持つ患者は 55 歳に発症しており、進行する認知障害といった典型的なアルツハイマー病の症状を呈していた。この患者は孤発性とされているが、家族の協力が得られなかったためサンプルが入手できず、本変異が *de novo* のものか遺伝したものかは確認できなかった。*PSEN2* の T 421 とその周囲のアミノ酸は多くの種でよく保存されている。また BLAST を用いて *PSEN1* との相同性を確認すると、*PSEN2* の T 421 は *PSEN1* では T440 に当たり、この部位にはこれまでにアルツハイマー病の病因性の *deletion* が報告されている²¹。以上のことから、相同性を示す *PSEN2* の新規変異 (c.1262C>T, p.T421M) は、アルツハイマー病に重要な影響を与えることが強く示唆される。加えて、この *PSEN2* の新規変異を持つ患者は *APOEε4* のアレルを持っていることも確認された。これまでに遺伝性の *PSEN2* の変異を保因する家系において *APOEε4* による発症年齢が早くなることが報告されていることから、私共はこの新規変異と *APOEε4* とが互いに影響しあい早期発症のアルツハイマー病を発症したのではないかと推察した²²。

本研究で *APOEε4* アレルを持つアルツハイマー病患者の割合は約 43%であったが、これはこれまでに報告されている日本人アルツハイマー病患者における割合と近い値を示した²³。

多くのアミノ酸変異機能予測アルゴリズムが存在しているが、結果にはアルゴリズム間で多少の違いが認められる。本実験では SIFT、Polyphen2、Pmut の 3

種類のアプローチでアミノ酸変異機能予測を行い、2種類以上のアプローチで病因性ありと判定されるかどうかを病因性の変異かどうかを決める一助とした。SIFT、Polyphen2、Pmut はそれぞれ異なった方法でアミノ酸の構造変化の影響の評価を行っているが、^{24,25,26} どのソフトでも約8割の正確性があるとされており、複数の予測ソフトを用いて病因性を判定することにより確実性を高めることができると考える²⁷。

アルツハイマー病の治療法の一つである A β ペプチド・ワクチン療法といった A β 療法では神経変性が起こってからではその効果が抑制されてしまうといった報告もあり、よりよい臨床結果を出すためには疾患の早期識別は必要である^{28,29}。アルツハイマー病の発症は臨床所見が認められるより先にバイオマーカーによって確認できるが、バイオマーカーで疾患を識別できる時期ではすでに神経変性は起きてしまっている³⁰。以上のことから、アルツハイマー病を予防するためには早期の遺伝子診断が重要である。

第3章 総括

近年のシーケンス技術の進歩によってより高速で質の高い遺伝子スクリーニングが可能となった。本研究で用いた Ion sequencing technology では Ion 314 chip (100K read)を用いた場合、4つのアルツハイマー病の関連遺伝子を一度に12~20検体を調べることができた。また Chip を変更することによって実験規模を容易に変更することができるため、大規模に行えば行うほど1検体あたりのコストが安くなるという長所がある。一方、GCリッチの領域ではサンガー法で使用するキャピラリーシーケンサーにおいても、遺伝子の変異の検出は困難であるが、IonPGMにおいてもカバレッジが低くなることや、アンプリコンの設計上解析できない領域が存在するという短所も認められた。しかしながら、これらの短所を考慮しても変異のスクリーニングから検出までを短時間で自動的に行う IonPGM のメリットは大変大きいと考えられる。

本研究において IonPGM を用いてアルツハイマー病患者の既知の遺伝子スクリーニングを行うことによって、既知の変異ならびに新規病原性遺伝子変異を同定したが、IonPGM を用いた疾患関連遺伝子スクリーニング法はあらゆる疾患に応用可能であり、疾患関連遺伝子の系統的な検索法を確立することができたと考えられる。

第4章 参考文献

1. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475, 348-352, 2011.
2. 朝田 隆, 泰羅 雅登, 石合 純夫, 清原 裕, 池田 学, 諏訪 さゆり, 角間 辰之. 都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応. 総合研究報告書. 2013.
3. Sparks Stein P, Steffen MJ, Smith C, Jicha G, Ebersole JL, Abner E, Dawson D 3rd. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 8, 196-203, 2012.
4. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706, 1991.
5. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760, 1995.
6. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977, 1995.
7. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurol* 43, 1467-1472, 1993.

8. Maruyama H, Izumi Y, Oda M, Torii T, Morino H, Toji H, et al. Lack of an association between cystatin C gene polymorphisms in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Neurol* 57, 337-339, 2001.
9. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. intervention, Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. 250, 279-82, 1990.
10. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 362, 329-44, 2010.
11. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D et al. App locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genetics*. 38. 24–26. 2006.
12. Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, Ohno T, Miyashita A, Kuwano R, Matsumoto N, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Identification of independent APP locus duplication in Japanese patients with early-onset Alzheimer disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 80, 1050-2, 2009.
13. Toji H, Maruyama H, Sasaki K, Nakamura S, Kawakami H. Apolipoprotein E promoter polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett*. 259, 56-8, 1999.
14. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 475, 348-352, 2011.
15. Gómez-Tortosa, E., Barquero, S., Barón, M., Gil-Neciga, E., Castellanos, F., Zurdo, M., Manzano, S., Muñoz, D.G., Jiménez-Huete, A., Rábano, A., Sainz, M.J.,

- Guerrero, R., Gobernado, I., Pérez-Pérez, J., Jiménez-Escrig, A. Clinical-genetic correlations in familial Alzheimer's disease caused by Presenilin 1 mutations. *J Alz Dis.* 19, 873-884, 2010.
16. Ishizuka, T., Nakamura, M., Ichiba, M., Fujita, S., Takeuchi, K., Fujimoto, T., Sano, A. Different clinical phenotypes in siblings with a presenilin-1 P264L mutation. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 33, 132-140, 2012.
17. Raux, G., Guyant-Maréchal, L., Martin, C., Bou, J., Penet, C., Brice, A., Hannequin, D., Frebourg, T., Campion, D. Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J Med Genet.* 42, 793-795, 2005.
18. Laudon H, Hansson EM, Melén K, Bergman A, Farmery MR, Winblad B, Lendahl U, von Heijne G, Näslund J. A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *Biol Chem.* 280, 35352-60, 2005.
19. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature.* 398, 513-7, 1999.
20. Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature.* 422, 438-41, 2003.
21. Lleó, A., Blesa, R., Queralt, R., Ezquerra, M., Molinuevo, J.L., Peña-Casanova, J., Rojo, A., Oliva, R. Frequency of mutations in the presenilin and amyloid precursor protein genes in early-onset Alzheimer disease in Spain. *Arch Neurol.* 59, 1759-1763, 2002.
22. Ishikawa, A., Piao, Y.S., Miyashita, A., Kuwano, R., Onodera, O., Ohtake, H.,

- Suzuki, M., Nishizawa, M., Takahashi, H. A mutant PSEN1 causes dementia with Lewy bodies and variant Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 71, 458-469, 2012.
23. Maruyama H, Izumi Y, Oda M, Torii T, Morino H, Toji H, Sasaki K, Terasawa H, Nakamura S, Kawakami H. Lack of an association between cystatin C gene polymorphisms in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Neurology.* 57, 337-9, 2001.
 24. Wijsman EM, Daw EW, Yu X, Steinbart EJ, Nochlin D, Bird TD, Schellenberg GD. APOE and other loci affect age-at-onset in Alzheimer's disease families with PS2 mutation. *Neuropsychiatr Genet.* 5, 14-20, 2005.
 25. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 4, 1073-81, 2009.
 26. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 7, 248-9, 2010.
 27. Ferrer-Costa C, Gelpí JL, Zamakola L, Parraga I, de la Cruz X, Orozco M. PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics* 21, 3176-8, 2005
 28. Frousios K, Iliopoulos CS, Schlitt T, Simpson MA. Predicting the functional consequences of non-synonymous DNA sequence variants--evaluation of bioinformatics tools and development of a consensus strategy. *Genomics.* 102, 223-8, 2013.
 29. Sperling RA, Jack CR Jr, Aisen PS. Testing the right target and right drug at the

right stage. *Sci Transl Med.* 3, 111-33, 2011.

30. Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L., Fagan, A.M., Goate A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., Holtzman, D.M., Santacruz, A., Buckles, V., Oliver, A., Moulder, K., Aisen, P.S., G b hetti B, Klunk, W.E., McDade, E., Martins, R.N., Masters, C.L., Mayeux, R., Ringman, J.M., Rossor, M.N., Schofield, P.R., Sperling, R.A., Salloway, S., Morris, J.C.. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *New Engl J Med.* 367, 795-804, 2012.