

研究テーマ

ゲノムワイド関連解析によるナルコレプシーの疾患感受性遺伝子の探索

1. 緒言

睡眠障害は個人の健康にとって大きな問題であるだけでなく、睡眠障害による生産性の低下や交通事故による日本の経済損失は数兆円にのぼり、大きな社会問題でもある。睡眠障害の中で遺伝要因が関与するものとしてナルコレプシーがある。ナルコレプシーは睡眠発作、情動脱力発作、入眠時幻覚及び睡眠麻痺を主症状とする過眠症であり、日本人における有病率は0.16~0.18%とされている。また、ナルコレプシーは複数の遺伝要因と環境要因が作用し発病にいたる多因子疾患であると考えられている。これまでに明らかにされた遺伝要因として、ヒト白血球抗原 (HLA)-DRB1*1501-DQB1*0602 ハプロタイプがあり、日本人ナルコレプシー患者はほぼ100%、ヨーロッパ系集団の患者においても86%がこのハプロタイプを保有している。しかし、健常者もこのハプロタイプを比較的高い頻度で保有すること（日本人集団12%及びヨーロッパ系集団22%）および遺伝統計学の結果から、HLA以外の遺伝子がナルコレプシーに関与することが報告されている。また、ナルコレプシー患者の視床下部におけるオレキシン産生細胞の変性、及び髄液中のオレキシン濃度の低下が確認されている。しかし、オレキシン遺伝子およびその受容体遺伝子内にオレキシン産生や構造に影響を与えうる変異は、1例の早期発症重症例を除き、見つかっていない。このように、ナルコレプシーの発症に至るプロセスには不明な点が多く、それを解明するためには、疾患感受性遺伝子を同定することが重要と考えられている。これまで先行研究で行われてきた候補遺伝子アプローチは、発症機序や病態が明確でないナルコレプシーにとって、限界があった。そこで、検出力が高く、ゲノム全域を探索できる方法であるゲノムワイド関連解析を行い、ナルコレプシーの疾患感受性遺伝子を探索することとした。

2. 方法

日本人ナルコレプシー患者222例と健常者389例を用いて、ゲノムワイド関連解析を行った。タイピングキットとしてAffymetrix社の50万SNPタイピング用のアレイを用いた。また、50万SNP全ての遺伝子型が正確にタイピングされているとは限らないことが知られているため、そのような不正確なSNPの情報を排除し、約25万SNPを選別した。次に、ゲノムワイド関連解析の結果より得られた候補SNPの再現性を確認するために、独立の日本人サンプルセット（ナルコレプシー患者159例、健常者190例）を用意し、再度関連解析 (Replication study) を行った。さらに、再現性が確認されたSNPに関しては、韓国人サンプルセット（ナルコレプシー患者115例、健常者309例）及び日本人真性過眠症候群（ナルコレプシーと同様に日中の耐え難い眠気を主な症状とするが、情動脱力発作を起こさない点がナルコレプシーとは異なる）137例を用いた関連解析も行った。再現性の得られたSNPが、その近傍に存在する遺伝子のmRNAの発現量に影響を与えるか検討するために、白血球から抽出されたRNAを用いて合成したcDNAを鋳型として、リアルタイムRT-PCRを行った。

3. 結果

ゲノムワイド関連解析の結果、疾患に関連し得ると予想される新規候補SNPを30個選別した。なお、ナルコレプシーは、既に6番染色体上のHLA領域との強い関連が知られているため、HLA領域のSNPは今回の解析から除外したが、予想通り極めて強い関連が認められた。これら30個の新規候補SNPの再現性を確認するために、独立の日本人サンプルセットを用いて、Replication Studyを行った。その結果、22番染色体に位置するSNP (rs5770917) で再現性を確認した。ゲノムワイド関連解析におけるrs5770917 (T/C) のCアリルの頻度はナルコレプシー患者25.9%、健常者16.8%、Replication studyではナルコレプシー患者24.2%、健常者13.9%であった。両解析を統合した結果のP値は 4.4×10^{-7} (オッズ比1.79) となり、ナルコレプシー患者においてCアリルの頻度が有意に増加していた。韓国人サンプルセットを用いた関連解析も行い、同様にナルコレプシー患者においてCアリルが有意に増加していた (ナルコレプシー患者24.8%、健常者19.1%、 $P = 0.03$ 、オッズ比1.40)。東アジア系集団 (日本人および韓国人データ) におけるメタ解析の結果、P値が 1.4×10^{-7} (オッズ比1.68) となった。次に、rs5770917に関し、ナルコレプシーの類縁疾患である真性過眠症候群を対象とした関連解析を行い、同様に患者群でCアリルが有意に増加していることを確認した (真性過眠症候群患者22.6%、健常者15.8%、 $P = 3.6 \times 10^{-3}$ 、オッズ比1.56)。

rs5770917の周辺の連鎖不平衡構造を明らかにするために、周辺に存在する多型 (主にtagSNP) を用いて、さらに解析を行った。その結果、rs5770917を含む連鎖不平衡ブロック内には、*CPT1B*および*CHKB*の二つの遺伝子が存在することを確認した。次に、連鎖不平衡ブロック内に存在するSNPを用いてハプロタイプ解析を行い、rs5770917又はそれと強い連鎖不平衡にある多型が、一義的な感受性変異であることを明らかにした。

次に、rs5770917と*CPT1B*および*CHKB*のmRNAの発現量に関連が認められるか検討するためにリアルタイムRT-PCRを行った。その結果、Cアリルを持つ群でこの二つの遺伝子のmRNA発現量が、有意に低いことを確認した。

また、国際共同研究にも参画し、ヨーロッパ系集団のナルコレプシー患者を対象としたゲノムワイド関連解析により同定された14番染色体上のT細胞レセプターの α 鎖の遺伝子 (*TCRA*) に位置するSNP (rs1154155) が日本人のナルコレプシー患者およびHLA-DRB1*1501-DQB1*0602ハプロタイプを保有する真性過眠症候群患者と関連することも見出した。

4. 考察

CPT1B (carnitine palmitoyltransferase 1B) は β 酸化に関わる律速酵素であり、脂肪酸から生成されたアシル-CoAとカルニチンを結合させ、アシルカルニチンとする。脂肪酸はアシルカルニチンの形でミトコンドリアの内膜を通過し、マトリックスに移動する。これまでに β 酸化やカルニチンシステムが睡眠の制御に関わるといった報告がなされている。絶食時に全身性のカルニチン欠乏を起こすJuvenile visceral steatosis (JVS) マウスは、睡眠および覚醒の分断化を示す。興味深いことに、神経ペプチドのオレキシンはナルコレプシー患者で髄液中の濃度が低下することで知られているが、絶食させたJVSマウスでもオレキシン神経の活性の低下およびオレキシンの発現量の抑制を示す。また、 β 酸化の第一段階を担う酵素である短鎖アシルCo-A脱水素酵素 (Acads) を欠損したマウスは、

REM睡眠の特徴である海馬 θ 波が徐波化していた。このマウスに脂肪酸の代謝異常を緩和することが知られているアセチル-L-カルニチンを経口投与したところ、徐波化していた θ 波が回復することが示され、 β 酸化は θ 波周波数を調節する物質的基盤のひとつであることが判明した。これらの事実から、*CPT1B*の発現量の低下が、オレキシンを介してREM睡眠に影響を与える可能性が考えられる。

CHKB (choline kinase beta) はコリンの代謝に関わる酵素である。コリンは、神経伝達物質のアセチルコリン、脳循環・代謝改善薬の一つであるCDP-コリンなどの合成材料である。*CHKB*の発現量が低下することで、これら脳の活動に重要な働きを示す物質の合成量に変化する可能性が考えられる。

ナルコレプシーのゲノムワイド関連解析において同定されたrs5770917は、真性過眠症候群とも関連していることを見出した。このことから、*CPT1B*や*CHKB*はナルコレプシーだけでなく、真性過眠症候群ひいては過眠症全般における疾患感受性遺伝子である可能性が示唆される。

今後、*CPT1B*および*CHKB*の詳細な解析を行い、ナルコレプシーや過眠症の病態を明らかにしたいと考えている。

5. 発表論文

Miyagawa, T., M. Honda, M. Kawashima, M. Shimada, S. Tanaka, Y. Honda, and K. Tokunaga. 2009. Polymorphism located in TCRA locus confers susceptibility to essential hypersomnia with HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 haplotype. *J Hum Genet.* In press.

Hallmayer, J., J. Faraco, L. Lin, S. Hesselton, J. Winkelmann, M. Kawashima, G. Mayer, G. Plazzi, S. Nevsimalova, P. Bourgin, S.S. Hong, Y. Honda, M. Honda, B. Hogl, W.T. Longstreth, Jr., J. Montplaisir, D. Kemlink, M. Einen, J. Chen, S.L. Musone, M. Akana, T. Miyagawa, J. Duan, A. Desautels, C. Erhardt, P.E. Hesla, F. Poli, B. Frauscher, J.H. Jeong, S.P. Lee, T.G. Ton, M. Kvale, L. Kolesar, M. Dobrovolna, G.T. Nepom, D. Salomon, H.E. Wichmann, G.A. Rouleau, C. Gieger, D.F. Levinson, P.V. Gejman, T. Meitinger, T. Young, P. Peppard, K. Tokunaga, P.Y. Kwok, N. Risch, and E. Mignot. 2009. Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nat Genet* 41: 708-711.

Miyagawa, T., M. Honda, M. Kawashima, M. Shimada, S. Tanaka, Y. Honda, and K. Tokunaga. 2009. Polymorphism located between *CPT1B* and *CHKB*, and HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 haplotype confer susceptibility to CNS hypersomnias (essential hypersomnia). *PLoS One* 4: e5394.

Miyagawa, T., M. Kawashima, N. Nishida, J. Ohashi, R. Kimura, A. Fujimoto, M. Shimada, S. Morishita, T. Shigeta, L. Lin, S.C. Hong, J. Faraco, Y.K. Shin, J.H. Jeong, Y. Okazaki, S. Tsuji, M. Honda, Y. Honda, E. Mignot, and K. Tokunaga. 2008. Variant between *CPT1B* and *CHKB* associated with susceptibility to narcolepsy. *Nat Genet* 40: 1324-1328.

Miyagawa, T., N. Nishida, J. Ohashi, R. Kimura, A. Fujimoto, M. Kawashima, A. Koike, T. Sasaki, H. Tanii, T. Otowa, Y. Momose, Y. Nakahara, J. Gotoh, Y. Okazaki, S. Tsuji, and K. Tokunaga. 2008. Appropriate data cleaning methods for genome-wide association study. *J Hum Genet* 53: 886-893.