

## くも膜下出血の SNP 解析

井ノ上逸朗

東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断部門

## Application of SNPs onto the Genetic Analysis of Subarachnoid Hemorrhage

Ituro Inoue

Division of Genetic Diagnosis, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

## はじめに

最近ではいわゆる生活習慣病, common disease といわれる高血圧, 糖尿病などの頻度の高い一般的な疾患の遺伝解析が盛んで, 以前からわれわれが“体質”, “家族歴あり”としていた漠然とした概念に対して, 遺伝学的手法を用い直接的なアプローチが可能となっている. 特にゲノム時代を迎え, 全ゲノムにわたるマイクロサテライト, 1 遺伝子多型(SNP), 遺伝子配列情報など遺伝解析をおこなうツールが配備されているので, 今後ともさらに疾患遺伝子解析の加速化が予測できる. 今回は発症後, 半数近くが死にいたる重篤な疾患, くも膜下出血の遺伝解析について紹介したい. くも膜下出血はそのほとんどが脳動脈瘤の破裂を原因とする. かつ脳動脈瘤発生に遺伝要因の関与が知られているので, 実際には脳動脈瘤を対象として遺伝解析をおこなった.

## SNP とは

遺伝解析の重要なツールとして, SNP(1 塩基置換, single nucleotide polymorphism) が重要視されている. SNP とは, 集団内で 1% 以上の頻度で存在するゲノム上の一塩基多型と便宜上定義される. Polymorphism とはギリシャ語を語源とし, *poly*(many), *morph*(shape), まさしく多型という意味である. 個人差を SNP の違いとして捉えることにより, 個人に即した新しい医学・医療の展開が期待されている. ゲノム医学の目標であり, オーダーメイド医療である. SNP はゲノム上に高頻度(数百から 1 キロベースに一つ)に分布し, ゲノム上には 300~1,000 万個の SNP が存在するので, 既存のマイクロサテライト等の多型マーカーに比べて格段に多くの情報量をもたらす. ゲノム

全域におよぶ SNP データベースを整備し, 疾患遺伝子解析に有効利用するという試みが始まっている. 2001 年 6 月現在でデータベース上に公開されている数は SNP コンソーシアムで 103 万 SNPs (<http://snp.cshl.org>), NCBI の SNP home (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) では 297 万が登録されている. これらのデータベースでは日本人では多型のない SNP が多く, 日本人独自のデータベースも必要とされる. 本邦では東京大学医科学研究所のヒトゲノム解析センターで公開している JSNPs([http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index\\_ja.html](http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html)) が 7 万 7 千 SNPs となっている. このようなデータベースの整備に伴い, どのようにタイピングをおこなうかが重要となる(表 1). 大量, 安価, 確実, 簡単にタイピングできる技術が求められる. タイピング技術の進歩は目覚ましいものの, それぞれ短所, 長所があり, 研究者の目的にあわせた手法の選択が必要となる.

## 脳動脈瘤の遺伝因子と家族性脳動脈瘤の特徴

脳動脈瘤の発生の原因は明らかではないが, くも膜下出血の好発年齢のピークが中年以降にあることから高血圧, 喫煙, ヘモダイナミックストレスなどの後天的因子がその発生に重要な要因であることは明らかである. 一方, 脳動脈瘤の家族発症例の報告, 脳動脈瘤を合併し易い遺伝性疾患の報告など, 遺伝因子がその発生に関与することを示唆する報告も多い. くも膜下出血の臨床的特徴を表 2 にまとめた.

ある疾患の発生, 発症に遺伝因子がどの程度関与しているかを知る目安のひとつとして相対危険度(relative risk:  $\lambda_s$ )がある. これは, 家系内でのその疾患の発症頻度を一般人口でのそれと除した値で, インスリン非依存性糖尿病のその値は 2 から 3 とされている. Schievink WI らの報告<sup>1</sup>によると, 脳動脈瘤の  $\lambda_s$  は 4

表1 SNP (single nucleotide polymorphism) の現状

|   |
|---|
| ゲノムに存在する塩基置換(数 100 塩基にひとつ)<br>個人の遺伝情報を網羅できるので、疾患感受性および進展の予測、薬剤感受性などを<br>知ることができる。<br>現状：<br>2,227 SNPs (Science, 1998, 280 : 1077-1082)<br>60,000 SNPs by the end of 1998 (Cohen et al.)<br>100,000 SNPs (one in 30 kb) (NHGRI)<br>150,000 cSNPs by the end of 2001 (ミレニアム・プロジェクト, 日本)<br>1,400,000 SNPs (The International SNP Map Working Group, Nature 2001) |
| 問題点：<br>大量サンプルを安価、簡単、迅速そして確実にタイピングできる方法の確立<br>SNP はおそらく原因変異ではない。<br>連鎖不平衡マッピング、ハプロタイプ解析の必要性   |

で、同胞間での相対危険度( $\lambda_s$ )は6と比較的高い値と考えられている。また、Rokainen Aらの報告<sup>2</sup>でも2人以上の脳動脈瘤患者のいる85家系438人をスクリーニングしたところ、38人に脳動脈瘤を認め一般人口での発症率の4倍であったとしている。一般に、家族性脳動脈瘤の臨床的特徴としては、若い年齢で発症する、兄弟発症例では同年代で発症する、同じ部位ないし対称的な部位に生じ易い、中大脳動脈に多く、前交通動脈に少ない、女性により多い、多発性の症例が多いなどとされているが、報告により結果が異なることもある。

**脳動脈瘤の感受性(原因)遺伝子座の同定**

現在、われわれは、罹患同胞対連鎖解析法を用いて、ゲノム全域を対象とした脳動脈瘤の感受性遺伝子座の同定を行っている。前述のように、脳動脈瘤の同胞での相対危険度から最低限必要なサンプル数は、80~100同胞対と考えた。これだけの数の生存している同胞発症例を一つの脳神経外科施設で集めることは困難なため、日本脳神経外科学会認定の全国の約1,100施設に協力を依頼し、当初目標とした90同胞対以上のサンプルの収集ができた(表3)。患者さんにはそれぞれの施設の受け持ち医師から、研究の主旨、この主旨以外にサンプルを使用しない、プライバシーに関わる個人的な情報の秘匿、末梢血液採取時の危険性、この研究に協力しなくても何ら不利益を被らない、などを私達が用意した文面をもとに説明して頂き、文書で研究協力の承諾を得た。また、今回の脳動脈瘤の遺伝解析研究は、東京女子医科大学倫理委員会の承認を得ている。

全ゲノムに平均距離10cMの間隔でデザインされた合計400個のマイクロサテライトマーカー(Applied Biosystems: Linkage Mapping Set ver. 2)を使用

表2 くも膜下出血の特徴

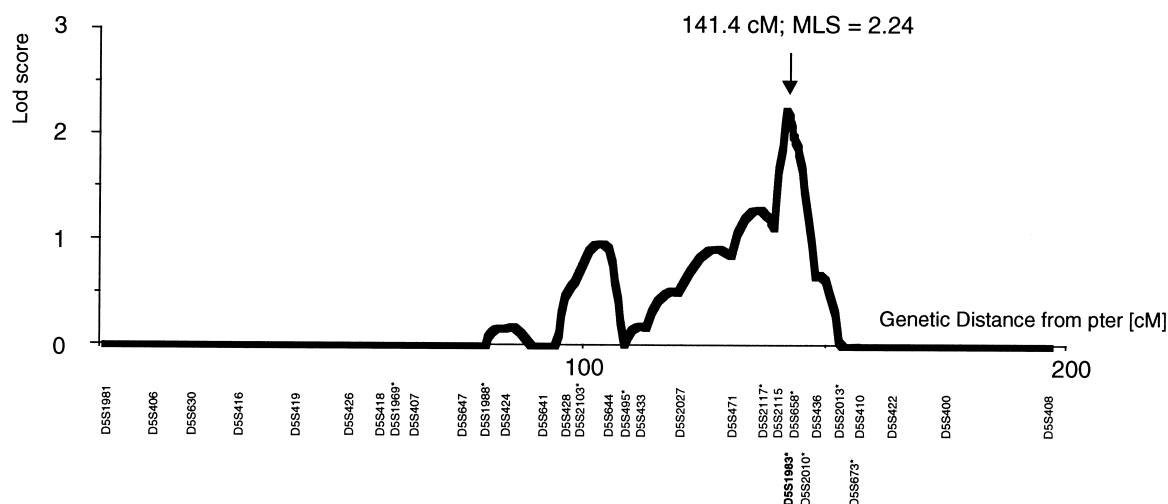
|   |
|---|
| 80%以上が脳動脈瘤の破裂を原因とする<br>40, 50歳代の働き盛りを予兆なしに突然襲う<br>高い死亡率<br>(50%発症後死亡, うち半数は医療処置をうける前に死亡)<br>後遺症(特に高齢者では寝たきりになるケースが多い)<br>発症頻度は年間12-20人/10万人で女性に多い<br>剖検例では脳動脈瘤は4.6%に存在<br>脳ドック等検査では検査を受けた人の3-6%に存在<br>比較的高い遺伝背景(相対危険率 $\lambda_s$ :6) |
|---|

表3 脳動脈瘤罹患同胞の収集

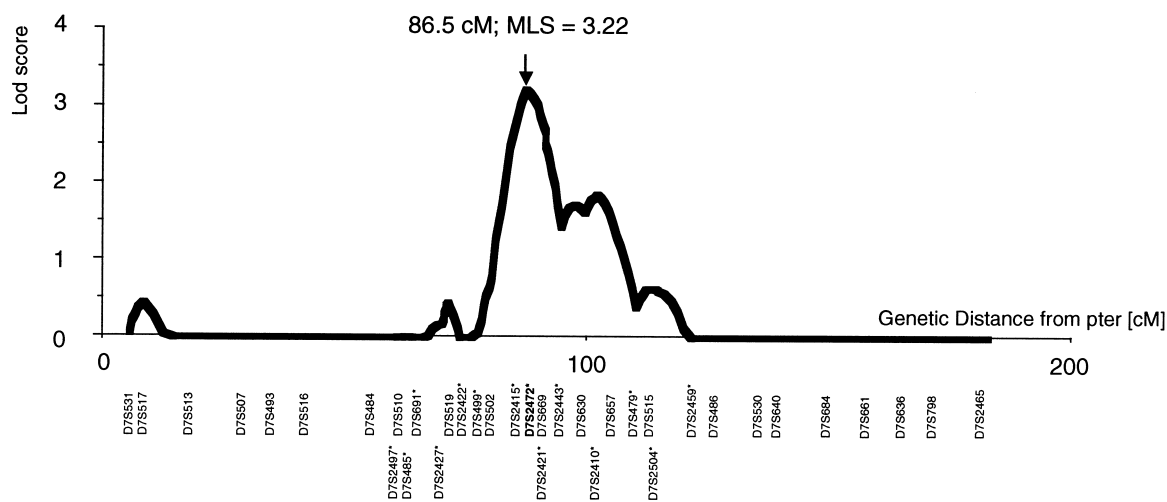
| Families  | Individuals |        | Sibpairs |
|-----------|-------------|--------|----------|
|           | SAH(+)      | SAH(-) |          |
| 77 pairs  | 68          | 9      | 77       |
| 7 trios   | 4           | 3      | 21       |
| 1 quartet | 1           | 0      | 6        |
| 85        | 73          | 12     | 104      |

した。この遺伝マーカーの特徴は、情報量に富む(平均ヘテロ接合性:0.7以上)2塩基繰り返し配列で、蛍光色素でラベルしたプライマーを用いることにより、PCR法(polymerase chain reaction)で簡便に遺伝子のタイピングが可能なことである。Applied Biosystemsが提示している平均ヘテロ接合性は白色人種のサンプルを解析したもので、そのまま日本人には使用できないため、まず、400個の遺伝マーカーについてそれぞれ、一般日本人の遺伝子頻度を調べた。400個のうち1割約40個のマーカーはヘテロ接合性が低く、日本人には使用できないことが判明し、それを補うため新たに40個以上のマーカーを追加した。以下の2つの解析

## a Chromosome 5



## b Chromosome 7



## c Chromosome 14

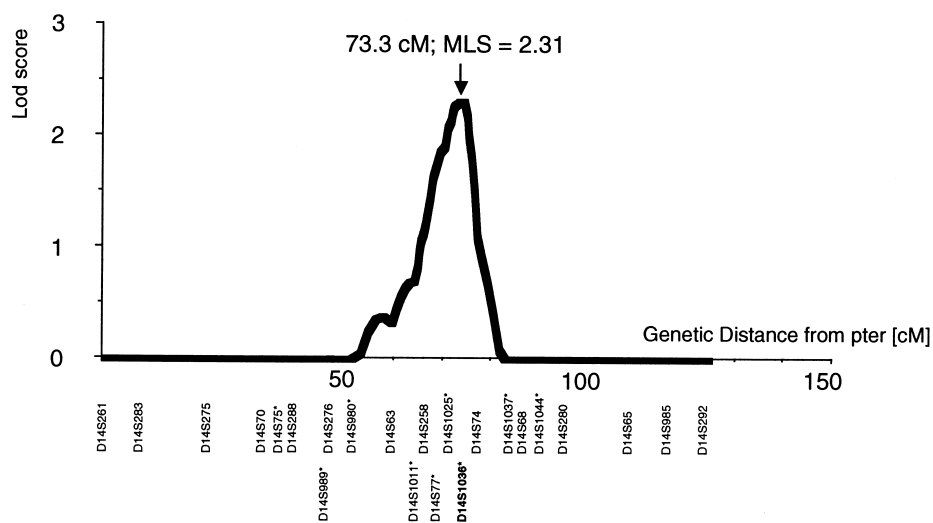


図1 脳動脈瘤罹患同胞対連鎖解析の結果. 104 対の脳動脈瘤罹患同胞対を用いて連鎖解析をおこなった. 連鎖の検定はノンパラメトリック連鎖解析法である GENEHUNTER 法を用いている. 第 5, 7, 14 番染色体で連鎖を認め, それぞれの最大 LOD 値が示されている.

プログラムを使用し、連鎖解析を行っている。

SIBPAL: SAGE: Statistical Analysis for Genetic Epidemiology, release 2.2. Department of Biometry and Genetics. LSU Medical Center, New Orleans, LA.

GENEHUNTER: Kruglyak L, et al: Am J Hum Genet 1996; 58: 1347-1363.

すでにゲノム全域での連鎖解析を終了し、隣接して2つ以上有意差を認めたマーカー近傍に、新たに高密度のマイクロサテライトマーカーを設定し解析を行っている。これまでのところ第7番染色体にもっとも強い連鎖を認めている。その他、第5番染色体、第14番染色体でも連鎖を認めることができた(図1)。

### 脳動脈瘤の感受性(原因)遺伝子の同定

連鎖解析により得られた感受性遺伝子座の情報をもとに、その近傍にマッピングされている既知遺伝子のなかから候補遺伝子を選択し、SNPによる患者・対照関連解析を逐次行っている。パラメトリック連鎖解析法では数センチモルガンの範囲に遺伝子座を限定できるが、罹患同胞対連鎖解析法では、遺伝マーカーと疾患遺伝子座の距離が推定できないため、遺伝子座を狭い範囲に絞り込めず、通常、10~20センチモルガン程度のかかなり広い範囲で連鎖を認める。また、用いた遺伝マーカーの情報度などに解析結果は左右されるため

に、最も高い有意差を認めた遺伝マーカー近傍に原因遺伝子があるとは限らない。10~20センチモルガンは物理的な距離では、およそ $10 \sim 20 \times 10^6$ 塩基対に相当し、現在、そこから効率的に原因遺伝子を同定する確立された方法はない。実際にポジショナルクローニングの成功例としても糖尿病の例があるだけである。そこで、領域に存在する候補遺伝子をひとつずつ検討する手法をもちいている。SNPデータベースが整備されているので、ほとんどの遺伝子についてSNP情報を得ることができるので、大分加速して解析できている。患者・対照関連解析により有意な差を認める遺伝子を同定できているものの、今後さらに詳細な検討が必要であろう。

### 文 献

1. Schievink WI, Schaid DJ, Michels VV, et al: Familial aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a community-based study. J Neurosurg 1995; 83: 426-429.
2. Ronkainen A, Hernesniemi J, Puranen M, et al: Familial intracranial aneurysms. Lancet 1997; 349: 380-384.

(受付: 2001年7月24日)

(受理: 2001年8月16日)