

学位論文題名

Associations between Multiple System Atrophy and Polymorphisms of *SLC1A4*, *SQSTM1*, and *EIF4EBP1* Genes

(多系統萎縮症と *SLC1A4*, *SQSTM1*, *EIF4EBP1* 遺伝子との相関)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 多系統萎縮症(multiple system atrophy; MSA)は成人発症の孤発性神経変性疾患である。その臨床像は自律神経障害, levodopa 治療に抵抗性のパーキンソン症候群, 小脳性運動失調症を三主徴とするが一様ではなく, 運動症状においてパーキンソン症候群が前景にたつ例をMSA-P, 小脳性運動失調症が前景にたつ例をMSA-Cと分類している。病理像では乏突起神経膠細胞内にみられる α -synuclein を含む細胞質内封入体が特徴的である。そのため, MSA はパーキンソン病やレビー小体型痴呆とともに α -synucleinopathy と分類されている。MSA の病因は不明であるが, 遺伝的背景が発症素因として存在していることが疑われている。近年の研究により nitric oxide や superoxide が α -synucleinopathy の発症や進行に関与することが推測されている。そのため, これらのストレスに対する反応に関与する遺伝子は MSA の発症や進行に影響を及ぼす可能性があることが推測される。私達はこの仮説に基づき酸化ストレスに関与すると推測される遺伝子の多型と MSA との関連解析を行った。候補遺伝子は Holtz らの報告を基に選定した。彼らは培養ドパミン神経細胞に酸化ストレスを惹起する 6-hydroxydopamine 又は 1-methyl-4-phenylpyridinium を暴露した際に多数の遺伝子の発現量が増加したことを報告している (Holtz et al. *J Biol Chem.* 2003;278:19367-77)。これらの遺伝子群は酸化ストレス反応に関与し, 神経細胞やグリア細胞を保護, もしくは傷害を強める可能性があることが推測される。本研究の目的は酸化ストレス反応に関与すると推測される遺伝子の多型が MSA の発症に及ぼす影響を患者-対照比較研究により検討することである。

【対象と方法】 対象患者群は 119 (男性 59, 女性 60) 名, 平均発症年齢 59.4 ± 8.5 (41-79) 歳, MSA-C 93 名, MSA-P 26 名, 診断基準では 75 名が probable, 44 名が possible に該当した。正常対照群は 123 (男性 61, 女性 62) 名, 平均年齢 58.7 ± 8.9 (41-83) 歳。解析する遺伝子は前述のように Holtz らの報告から CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, activating transcription factor 3, CCAAT/enhancer-binding protein- β , sequestosome 1 (*SQSTM1*), cysteinyl-tRNA synthetase, solute carrier family 1A4 (*SLC1A4*), activating

transcription factor 4, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (EIF4EBP1) の 8 遺伝子を選択した。一次解析では 1 遺伝子につき 3〜7 箇所の一塩基多型 (SNP) を解析した。一次解析において有意な相関又はその傾向を示した遺伝子について、二次解析として解析 SNP を増やして遺伝子全体を網羅する連鎖不平衡マッピングを行い、それに基づいたハプロタイプ相関解析を行った。SNP のジェノタイピングは SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems)を用いたプライマー1 塩基伸長法にて行った。二群間の SNP データの評価には分割表とカイ二乗テストを用いた。全ての SNP データは Hardy-Weinberg 平衡から逸脱していない事を確認した。ハプロタイプは Expectation-Maximization algorithm を用いて推定した。連鎖不平衡マッピングは連鎖不平衡尺度 D' 値と r -square 値に基づいた。 $|D'| > 0.9$ 又は $r\text{-square} > 0.5$ を強い連鎖不平衡とみなした。統計学的検定には Bonferroni 補正 (P_c ; 補正後 p 値) を用いた。有意水準は $p\text{-value} < 0.05$ とした。

【結果】 一次解析では、2つのSNP, SLC1A4 SNP +28833 (V398I, rs759458, genotype: $p = 0.00132$, allele: $p = 0.00217$) と SQSTM1 SNP +890 (intron 1, rs502729, genotype: $p = 0.0291$, allele: $p = 0.0123$) にMSAとの有意な相関を認めた。前者はBonferroni補正後も有意な相関を示した ($K = 7$, genotype: $P_c = 0.00930$, allele: $P_c = 0.0151$) が、後者の有意性は消失した。ハプロタイプに基づいた相関解析では有意な相関を示す遺伝子は認めなかったが、EIF4EBP1 のハプロタイプに有意な相関を示す傾向のあるものを見出した ($p = 0.0739$) 。

二次解析では、一次解析において有意な相関又はその傾向を示したSLC1A4及びSQSTM1, EIF4EBP1の3遺伝子を検討した。SLC1A4では、連鎖不平衡マッピングからSNP -1793, +6992, +26627, +28833をtag-SNPに選定しハプロタイプ解析を行い、ハプロタイプ “T-C-G-C” 及び “T-C-T-A” に有意な相関を認めた ($P_c = 0.0261$, 0.000768)。また、一次解析にて有意な相関を示したSNP +28833は解析した全14 SNPであらためてBonferroni補正を行った後も有意性を保った (genotype: $P_c = 0.0186$, allele: $P_c = 0.0303$)。SQSTM1では、SNP +890と+12643によるハプロタイプ解析を行い、ハプロタイプ “C-T” 及び “A-T” に有意な相関を認めた ($P_c = 0.0136$, 0.0369)。EIF4EBP1では、SNP -606, +14426, +20787, +29758から構成されるハプロタイプ “C-T-G-C” に有意な相関を認めた ($P_c = 0.0480$)。また、追加解析したSNP単独での関連解析では有意な相関を示すものは認めなかった。

【考察】 SLC1A4 は細胞膜に存在する中性アミノ酸輸送体であり、神経栄養因子であるセリンの代謝に重要な役割を果たしていることが推測されている。SQSTM1 はユビキチン結合蛋白であり、MSA 剖検脳にてグリア細胞質内封入体に認められることも報告されている。EIF4EBP1 は mRNA の翻訳の調整 (cap dependent translation) に関与している。これらは機能的な面からも MSA 疾患感受性候補遺伝子であると考えられる。

【結論】 SLC1A4, SQSTM1 及び EIF4EBP1 の遺伝子多型は MSA と有意な相関を示した。

これら 3 遺伝子が MSA の疾患感受性候補遺伝子であることが遺伝学的に示された.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 雅 彦

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 佐々木 秀 直

学 位 論 文 題 名

Associations between Multiple System Atrophy and Polymorphisms of *SLC1A4*, *SQSTM1*, and *EIF4EBP1* Genes

(多系統萎縮症と *SLC1A4*, *SQSTM1*, *EIF4EBP1* 遺伝子との相関)

多系統萎縮症(MSA)は成人発症の孤発性神経変性疾患である。その病因は不明であるが酸化及び酸化ストレス反応に関与する遺伝子が影響を及ぼすことが推測される。本論文ではこの仮説に基づき酸化ストレスに関与すると推測される遺伝子の多型とMSAとの関連解析を行った。対象患者群は119名、性年齢調整対照群は123名であり、解析遺伝子はCHOP, ATF3, CEBPB, *SQSTM1*, CARS, *SLC1A4*, ATF4, *EIF4EBP1* の8遺伝子を選択した。一次解析では1遺伝子につき3~7箇所の一塩基多型(SNP)を解析し、有意な相関又はその傾向を示した遺伝子について、二次解析として遺伝子全体を網羅する連鎖不平衡マッピングに基づいたハプロタイプ相関解析を行った。一次解析では、*SLC1A4* SNP +28833 (V398I, rs759458) にMSAとの有意な相関を、*SQSTM1* SNP +890 (intron 1, rs502729) にその傾向を認めた。ハプロタイプ解析では*EIF4EBP1* にて有意な相関を示す傾向にあった。二次解析では*SLC1A4*, *SQSTM1*, *EIF4EBP1* の3遺伝子を検討したが、いずれもハプロタイプ解析にて有意な相関を認めた。本論文では、相関解析にて*SLC1A4*, *SQSTM1* 及び*EIF4EBP1* の遺伝子多型とMSAとの有意な相関を認めたことを報告した。

副査の畠山鎮次教授から、相関が認められた遺伝子のSNPはそのタンパクにおいてどのような構造的及び機能的差異を生み出す事が予測されるのか、という点について質問があった。申請者は、中性アミノ酸トランスポーターをコードする*SLC1A4* ではアミノ酸置換を伴うSNPであるため、トランスポーターの構造に差異が生じる可能性があり、SNPの遺伝子における位置からセリンに対する感受性に差異が生じる可能性が予測されることをスライドや文献を引用し回答した。また、*SQSTM1* ではintronに位置するSNPのために予測が難しいことも回答した。また、副査の畠山教授から、*SLC1A4* におけるセリンに対する感

受性について、更には、どのような基礎的実験が疾患との関連性を証明でき得るのか、という質問があった。申請者は、前者についてはスライドや文献を引用し回答し、後者については、SLC1A4では発現解析による SNP 型での機能の差異を検討する実験が証明に繋がる可能性を回答した。副査の畠山教授から、今後の発展としての発現解析やタンパクの機能解析についてアドバイスがあった。

次いで副査の佐々木秀直教授から、統計学的解析における偽陽性の可能性について、また、それを克服するための方策について質問があった。申請者は、偽陽性の確率を明らかにする指標は不明ではあるが、検出力については 0.15 と低く、偽陽性・偽陰性の確率は低くないこと、また、これを克服するためには解析対人数を増やす必要があることをスライドや文献を引用し回答した。次いで、結果の信頼性を高めるためには、別個の MSA コホートによる解析にて同様の結果が見出されることが重要であるとのアドバイスがあった。

最後に主査の渡辺雅彦教授から、対象人数をどの程度に増やした場合に偽陽性・偽陰性の可能性を許容できるレベルにまで低くすることができ、信頼でき得るデータとなるのか、という質問があった。申請者は、偽陰性の指標となる検出力については、対象数が 1000 人程度であれば充分許容でき得る程度にまで高めることができると予測されることを、文献を引用し回答した。主査の渡辺教授から、セリンの中枢神経における重要性、神経変性疾患との関連についてアドバイスがあった。

この論文は、MSA の原因解明の手がかりの一つとして高く評価され、今後の機能解析研究による発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。