

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 温 雅楠
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 558 号
学位授与の日付 平成 25 年 9 月 20 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 晩期発症型アルツハイマー病と SORL1 のゲノム関連解析

論文審査委員 主査 小野寺 理
副査 池内 健
副査 五十嵐 博中

博士論文の要旨

背景・目的

アルツハイマー病 (AD: Alzheimer's disease) は認知機能障害を中核症状とする神経変性疾患である。その 9 割以上は 65 歳以上で発症する孤発性の晩期発症型 AD (LOAD: late-onset AD) であり、遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合っ発症する。LOAD の強力な感受性遺伝子として *APOE* (apolipoprotein E) があるが、*APOE* で全ての LOAD を説明することはできない。*APOE* 以外の LOAD 感受性遺伝子の存在が示唆されており、それを探索する試みが現在精力的に進められている。

臨床検体による大規模ゲノムワイド関連解析 (GWAS: genome-wide association study) によって、*SORL1* (Sortilin-Related Receptor, L [DLR Class] A Repeats Containing) が LOAD と相関することが報告された (PLoS One. 8:e58618. 2013)。臨床診断された検体のみならず、神経病理学的に診断された検体においても、*SORL1* が LOAD と遺伝統計学的に相関するかどうかを調べることは重要である。そこで本研究では神経病理学的に確定診断された検体を解析対象として、*SORL1* と日本人 LOAD との関連を遺伝統計学的に検討した。また、ヒト死後脳 (前頭葉) で *SORL1* の遺伝子発現レベルが LOAD と対照の間で異なるかどうかを解析した。

方法

神経病理学的に診断された孤発性 LOAD 213 例と対照 370 例の計 583 例を用いた。*APOE* の遺伝型 ($P_{\text{genotype}} = 9.78\text{E-}25$)、及びアレル ($P_{\text{allele}} = 1.60\text{E-}27$) の頻度は両群間で明らかに異なっていた。LOAD 脳と対照脳は AD に特徴的な病変である老人斑と神経原線維変化の有無で組織学的に評価した。レビー小体型認知症、前頭側頭葉変性症、パーキンソン病と診断された症例を除き、さらに AD に特徴的な神経病理所見を認めない症例を対照とした。解析したサンプル数はオッズ比 1.4~2.2 を有するリスクアレルを検出するのに十分であると推定された (リスクアレル頻度の範囲 = 0.1~0.9, 有意水準 = 0.05, 検出力 = 80%)。本研究は新潟大学遺伝子論理審査委員会、及び参加研究機関の全ての承認を得て行った。検体は匿名化した上で使用した。

Rogaeva ら (Nat Genet. 39:168-177. 2007) によって解析された 29 SNP から 11 SNP、GWAS から 8 SNP をそれぞれ選び計 19 SNP の遺伝型を TaqMan 法で決定した。ハーディー・ワインバーグ平衡解析、ファイ

ッシャーの正確確率検定による疾患-対照群相関解析、連鎖不平衡解析、ロジスティック回帰解析、ハプロタイプブロック推定、ケースコントロールハプロタイプ解析を行った。

SORL1 の遺伝子発現レベルを比較するために、アルツハイマー病脳 19 例 (平均年齢 83.0 歳) と対照脳 24 例 (平均年齢 (75.2 歳) の前頭葉を用いて全 RNA を抽出して、RiboGreen で濃度測定した。2100 バイオアナライザーで RNA 品質評価指標である RIN (RNA integrity number) を算出した。200ng の全 RNA を用いて逆転写反応を行ない、cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて TaqMan 法により定量的リアルタイム PCR を行った。

結果

解析した 19 SNP のうち 5 SNP は多重比較補正後も LOAD と有意に相関することが分った ($P_{\text{allele}} < 2.63E-03 [=0.05/19]$)。年齢、性別、*APOE-e4* アレルの有無を補正したロジスティック回帰解析でも 5 SNP は有意であった。HapMap データベースの日本人 SNP を用いた *in silico* 解析から *SORL1* には二つの大きな連鎖不平衡 (LD: linkage disequilibrium) 領域がありそれらは組み換えホットスポットで分割されていることが分った。有意な相関を示した 5 SNP のうち 3 SNP (rs985421, rs12364988, rs4598682) は *SORL1* の 5' 側の LD 領域に位置し、残りの 2 SNP (rs3781834, rs3781836) は 3' 側の LD 領域に位置していた。各 LD 領域内の SNP 間では強力な LD が認められたことから、*SORL1* には LOAD と相関する領域が 2カ所あることが明らかになった。*SORL1* の遺伝子発現解析では、LOAD と対照の間に遺伝子発現量の有意差は認められなかった。

結論

神経病理学的に診断された検体による解析でも *SORL1* は日本人 LOAD と遺伝統計学的に有意に相関することが再現できた。従って、*SORL1* は LOAD の有力な感受性遺伝子の 1 つであると考えられる。

論文審査の要旨

本論文において申請者は、晩期発症型アルツハイマー病の遺伝学的リスクとしての *SORL1* の一塩基置換 (SNP) について解析を行った。臨床診断されたアルツハイマー病患者を対象としたゲノム相関関連解析により *SORL1* はアルツハイマー病の感受性遺伝子であることが報告されている。しかしながら、病理診断された患者サンプルを用いたアルツハイマー病と *SORL1* の相関解析は未だ十分検討されていない。本申請者は、神経病理学的に診断された孤発性アルツハイマー病 213 例と対照者 370 例の計 583 例を用い本研究を行った。*SORL1* 領域の 19 個の SNP の遺伝型について TaqMan 法を用い決定した。解析した 19 個の SNP のうち 5 個の SNP は晩発型アルツハイマー病患者と有意に相関した。年齢、性別、*APOE4* アレルの有無で補正したロジスティック回帰解析においても 5 個の SNP は有意であった。このことから、病理学的に確認された晩発型アルツハイマー病患者を対象とした解析でも *SORL1* はアルツハイマー病の感受性遺伝子となることが示された。次に、*SORL1* mRNA 発現を解析するために前頭葉の凍結組織から RNA を抽出し、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR にて *SORL1* 発現の定量解析を行った。孤発性アルツハイマー病患者 (n=19) と対照者 (n=24) には *SORL1* の遺伝子発現量に有意な差は認めなかった。病理学解析により確定診断された多数の日本人アルツハイマー病において *SORL1* が遺伝学的な感受性遺伝子であることを明らかにした点に、本論文を学位論文としての価値を認める。