

「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」
平成14年度採択研究代表者

戸田 達史

(大阪大学大学院医学系研究科 ゲノム機能分野 教授)

「ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬」

1. 研究実施の概要

パーキンソン病 (PD) は多因子遺伝性疾患と考えられ、家族性PDの原因遺伝子として α -synuclein や parkin、DJ-1、PINK1、NR4A2 遺伝子が発見されたが、患者の大部分を占める孤発性PDでは疾患感受性遺伝子は同定されていない。

また孤発例では、振戦を主体とする群、抗パーキンソン病薬で副作用を起こしやすい群など、その経過・中心となる症状・薬剤の効果は患者により異なり、このことは従来PDとして一括して行われていた遺伝解析に階層化を可能にし、遺伝子多型によって患者個人個人に必要な薬剤を必要な量投与するオーダーメイド医療が可能であることを意味する。

本研究では、1) ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析、多数の候補遺伝子SNPに基づく階層化を考慮した大規模関連解析、または罹患同胞対法などのノンパラメトリック連鎖解析などを行い、疾患感受性遺伝子を同定する (メンデル遺伝も含む)、2) SNPと各薬剤への反応性、副作用との関連を明らかにしテーラーメイド治療法を確立する、3) 同定された疾患感受性遺伝子の機能解析、蛋白構造解析などに基づく網羅的薬剤候補化合物探索と日本発のパーキンソン病創薬、を行う。

本研究によりパーキンソン病疾患感受性遺伝子が同定され我が国から根本的なパーキンソン病薬が開発されれば、全世界にインパクトを与えることができると考える。

2. 研究実施内容

(目的)

パーキンソン病 (PD) は、ドパミンニューロンの変性により運動障害を主症状とする神経変性疾患であり、近年多因子遺伝性疾患と認知されるようになった。家族性PDでは α -synuclein や parkin、DJ-1、NR4A2 遺伝子などが発見されたが、大部分を占める孤発性PDでは疾患感受性遺伝子は証明されていない。本研究では、ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析、多数の候補遺伝子SNPに基づく階層化も考慮した関連解析、または罹患同胞対法などのノンパラメトリック連鎖解析などを行い、疾患感受性遺伝子を同定する、多因子疾患の感受性遺伝子同定のための有効なアプローチを探索する、ことを行う。

(方法)

日本神経学会専門医が、Calneの診断基準でdefiniteと臨床診断したパーキンソン病患者946人から採血した。薬剤反応性、薬剤副作用などを含む臨床データを詳細に収集し、臨床像からの階層化を可能にした。尚、採血に際しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、十分なインフォームドコンセントを行った。また、本研究は、大阪大学大学院医学系研究科、東京大学大学院医学系研究科、順天堂大学医学部、香川県立中央病院、東海大学医学部の各倫理委員会により承認を得て行った。

ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析では、一次スクリーニングとして、a) 患者124人と、性別をマッチさせた対照124人のゲノムDNAを厳密に定量した後、均等量混合してpooled DNAを作成した。b) pooled DNAを鋳型とし、平均100kb間隔で分布する約27,000個の多型マイクロサテライトマーカープライマーをもちいてPCR反応を行った。c) PCR産物をGeneScan™、pickpeak（東海大分子生命科学2が独自に開発）により解析し、患者対照間で統計学的検討（ 2×2 、 $2Xm$ Fisher's exact probability test）を行った。

候補遺伝子SNP解析では、PD候補遺伝子上のSNPをデータベースから探し、multiplex PCR、Invader法によりタイピングしてカイニ乗検定により関連解析を行う。一次スクリーニングとして患者190人・対照190人を対象にした。

(結果)

1. ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析

約27,000個全てのマイクロサテライト多型に関して1次スクリーニングが終了し、各染色体において5-12%のマイクロサテライト多型で $p < 0.05$ を認めた。他施設より連鎖領域として既報告である第1染色体上の領域に位置するマーカーは、 $p = 3.9 \times 10^{-6}$ であり、これらと連鎖不平衡にある遺伝子が孤発性パーキンソン病の発症に関与している可能性がある。

2. 多数の候補遺伝子SNPに基づく大規模関連解析

数百個の候補遺伝子上SNP（一塩基多型）マーカーを用いた患者・対照関連解析を開始した。まず各群190人を対象とした一次スクリーニングを行った。現在までに、家族性PD、ドーパミン、タンパク質分解などに関連する123個の候補遺伝子上の計276SNPsを解析終了した。その結果、アレル頻度カイニ乗検定で $p < 0.05$ のSNPは、NDUFV2、FGF2、DRD3、TGFAなどの12の遺伝子上にみられた。これらは検体数を増やして二次スクリーニングを行うとともに、さらに多数の遺伝子・SNPを解析していく。またこれまでにDNAサンプルを約960収集した。また高齢発症のため同胞発症例の収集が困難であるが、専門医にアンケートして約270家系が存在する回答が得られた。うち約80家系を採血した。

3. 単一遺伝子異常で起こる家族性パーキンソン病の原因遺伝子

劣性遺伝性パーキンソン病の約6割弱が*parkin*変異によることが判明している。一方で*parkin*陰性例も少なからず存在することから発症年齢及び臨床型に類似性のあるPARK6, 7に連鎖の可能性のある家系39家系について両遺伝子座についてハプロタイプを決定した。うち8家系についてはPARK6に連鎖の可能性があった。候補領域からPARK6の近傍にある

PARK9により近い領域で複数の候補遺伝子をセレクションし、PARK6にマップされた家系について遺伝子変異の有無を検討した。候補遺伝子のうちPINK1が原因遺伝子であることが分かった。PINK1の報告についてはPARK6のマップに成功したグループが我々とは独立に単離成功しており、Scienceに発表している。PINK1変異解析では8家系中6家系に変異を認めた。Parkin陰性の39家系のうち6家系にPINK1変異（15%）が陽性であった。DJ-1変異についてはPARK7に連鎖していると予想される家系でも一例も変異は存在していなかったことより、PINK1変異はparkinについて頻度の高い原因遺伝子であることが分かった。現在劣性遺伝性でかつparkin変異陰性例について遺伝子解析を行っている。更にparkin, PINK1陰性例については新規遺伝子座の同定及び原因遺伝子単離に向けて解析中である。

4. ゲノムマーカーのスタンダード整備

初期の30000個のマーカーより、1) 互いに密な間隔に位置しているマイクロサテライトを取捨選択して、ほぼ100 kbに1個の間隔でマイクロサテライトを再設定し、2) 対立遺伝子が2～3個で多型性が乏しいマイクロサテライトを除き、3) 効率良くPCR増幅可能なプライマーを再設計して、新たなマイクロサテライトのセットを作成した。

(結論)

Pooled DNA法によるゲノムワイド関連解析においては1次スクリーニングにて統計学的に有意差のあったマーカーを用いて、さらに他の集団により作成したpooled DNAで、体系的網羅的に、二次、三次スクリーニングを行い候補領域を絞り込む。候補領域内でSNPを用いた連鎖不平衡マッピングを行い、孤発性パーキンソン病の疾患感受性遺伝子を同定し、病態解明を目指す。

候補遺伝子をさらに増やし、有意差がみられたSNPについては、900人前後の疾患・対照群を用いて2次スクリーニングを行う。並行してハプロタイプ解析も行う。

3. 研究実施体制

ゲノムワイド解析・総括グループ

- ① 研究分担グループ長：戸田 達史（大阪大学 大学院医学系研究科 ゲノム機能分野）
- ② 研究項目：総括、ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析、多数の候補遺伝子による大規模なSNP関連解析、DNAチップによる疾患関連遺伝子の探索

マイクロサテライト基盤整備グループ

（平成16年3月31日離脱）

- ① 研究分担グループ長：猪子英俊（東海大学 医学部 分子生命科学遺伝情報部門／生物情報解析研究センター）
- ② 研究項目：ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析とゲノムマーカーのスタンダード整備

ターゲット遺伝子解析・検体収集グループ

研究分担グループ長：村田美穂（国立精神神経センター武蔵病院 神経内科）

研究項目：PD弧発例のさらなる収集・細分化とターゲット遺伝子多型について焦点をあてた危険因子の同定、患者の症状、薬剤効果、副作用などに寄与するSNP探索

研究分担グループ長：服部信孝（順天堂大学 医学部 脳神経内科）

研究項目：PD弧発例のさらなる収集・細分化とターゲット遺伝子多型について焦点をあてた危険因子の同定、患者の症状、薬剤効果、副作用などに寄与するSNP探索

研究分担グループ長：山本光利（香川県立中央病院 神経内科）

研究項目：PD弧発例のさらなる収集・細分化

パーキンソン病創薬グループ

研究分担グループ長：平井圭介（武田薬品工業（株） 創薬第一研究所研究所）

研究項目：同定された疾患感受性遺伝子に基づいたパーキンソン病創薬

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin M-C, Gasser T, Krüger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, de Andrade M, Rocca WA, the UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 55:512-521, 2004
- Inzelberg R, Hattori N, Nisipeanu P, Abo Mouch S, Blumen SC, Carasso RL, Mizuno Y. Camptocoemia, axial dystonia, and parkinsonism: Phenotypic heterogeneity of a parkin mutation. *Neurology* 60:1393-1394, 2003
- Nagano Y, Yamashita H, Takahashi T, Kishida S, Nakamura T, Iseki E, Hattori N, Mizuno Y, Kikuchi A, Matsumoto M. Siah-1 facilitates ubiquitination and degradation of synphilin-1. *J Biol Chem* 278:51504-51514, 2003
- Kim SJ, Sung JY, Um JW, Hattori N, Mizuno Y, Tanaka K, Paik SR, Kim J, Chung KC. Parkin cleaves intracellular alpha-synuclein inclusions via the activation of calpain. *J Biol Chem* 278:41890-41899, 2003
- Rawal N, Periquet M, Lohmann E, Lucking CB, Teive HA, Ambrosio G, Raskin S, Lincoln S, Hattori N, Guimaraes J, Horstink MW, Dos Santos Bele W, Brousolle E, Destee A, Mizuno Y, Farrer M, Deleuze JF, De Michele G, Agid Y, Durr A, Brice A. French Parkinson's Disease Genetics Study Group: European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. New parkin mutations and atypical phenotypes in families with autosomal recessive

parkinsonism. *Neurology* 60:1378-1381, 2003

- Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, Kikuchi J, Yokoyama S, Yamada S, Kawahara H, Yokosawa H, Hattori N, Mizuno Y, Tanaka K, Kato K. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep* 4:301-306, 2003
- Gouider-Khouja N, Larnaout A, Amouri R, Sfar S, Belal S, Ben Hamida C, Ben Hamida M, Hattori N, Mizuno Y, Hentati F. Autosomal recessive parkinsonism linked to parkin gene in a Tunisian family. Clinical, genetic and pathological study. *Parkinsonism Relat Disord* 9:247-251, 2003
- Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, Higashiyama H, Popiel HA, Rahadian J, Yamaguchi M, Strittmatter WJ, Burke JR, Toda T. Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 12:1253-1259, 2003
- Popiel HA, Nagai Y, Onodera O, Inui T, Fujikake N, Urade Y, Strittmatter WJ, Burke JR, Ichikawa A, Toda T. Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 317:1200-1206, 2004
- Liu W, Goto J, Wang YL, Murata M, Wada K, Kanazawa I. Specific inhibition of Huntington's disease gene expression by siRNAs in cultured cells. *Proc Japan Acad* 79 SerB:293-298, 2003
- Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Manyu H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12:527-534, 2003
- Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS. The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats. *Am J Hum Genet* 72:733-738, 2003
- Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 53:392-396, 2003
- Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12:595-600, 2003
- Li M, Ishikawa K, Toru S, Tomomotsu H, Takashima M, Goto J, Takiyama Y, Sasaki H, Imoto I, Inazawa J, Toda T, Kanazawa I, Mizusawa H. Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant ataxia (ADCA) type

III in Japan. *J Hum Genet* 48:111-118, 2003

- Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 12:1449-1459, 2003
- Manya H, Sakai K, Kobayashi K, Taniguchi K, Kawakita M, Toda T, Endo E. Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 306:93-97, 2003
- Zhang W, Vajsar J, Cao P, Brenningstall G, Diesen C, Dobyns W, Herrmann R, Lehesjoki A-E, Steinbrecher A, Talim B, Toda T, Topaloglu H, Voit T, Schachter H. Enzymatic diagnostic test for muscle-eye-brain type congenital muscular dystrophy using commercially available reagents. *Clin Biochem* 36:339-344, 2003
- Akasaka-Manya K, Manya H, Kobayashi K, Toda T, Endo T. Structure-function analysis of human protein O-linked mannose • 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1, POMGnT1. *Biochem Biophys Res Commun* 320:39-44, 2004
- Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, Kimura A, Bahram S, Inoko H. Identification of IkBL as the second major histocompatibility complex-linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 72:303-312, 2003
- Tsuji H, Okamoto K, Matsuzaka Y, Iizuka H, Tamiya G, Inoko H. SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris. *Genomics* 81:26-33, 2003
- Oka A, Hayashi H, Tomizawa M, Okamoto K, Hui J, Kulski JK, Beilby J, Inoko H, Tamiya G. Localization of a non-melanoma skin cancer susceptibility region within the major histocompatibility complex by association analysis using microsatellite markers. *Tissue Antigens* 61:203-210, 2003
- Hashiguchi K, Niizeki H, Naruse T, Yokoyama M, Inamoto N, Urushibara T, Yamazaki Y, Inoko H, Nishikawa T. The clinical feature is associated with a specific haplotype of the TNF region in Japanese patients with palmoplantar pustulosis. *Hum Immunol* 264:530-537, 2003
- Nomura A, Sato M, Suemizu H, Watanabe T, Kimura T, Yabuki K, Goto K, Ito N, Bahram S, Inoko H, Mizuki N, Ohno S, Kimura M. Hypokeratosis and leukocytosis in transgenic mice carrying MHC class I chain-related gene b (MICB). *Tissue Antigens* 61:300-307, 2003

- Anzai A, Shiina T, Kimura N, Yanagiya K, Kohara S, Shigenari A, Yamagata T, Kulski JK, Naruse TK, Fujimori Y, Fukuzumi Y, Yamazaki M, Tashiro H, Iwamoto C, Umehara Y, Tmanishi T, Meyer A, Ikeo K, Gojobori T, Bahram S, Inoko H. Comparative sequencing of human and chimpanzee MHC class I regions unveils insertions/deletions as the major path to genomic divergence. *Proc Nat Acad Sci USA* 100:7708-7713, 2003
- Taniguchi Y, Moriuchi T, Inoko H, Kimura M. HOXD3 mediates the switchover of cadherin 4 to $\alpha 3$ integrin gene expression in human erythroleukemia HEL cells. *Biomedical Research* 24:133-140, 2003
- Niizeki H, Yokoyama M, Inamoto N, Nishikawa T, Naruse T, Inoko H, Hashigucci K. Lack of association of the interleukin-1 receptor antagonist gene with palmoplantar pustulosis in Japanese. *Eur J Immunogenet* 30:249-252, 2003
- Dunn SD, Inoko H, Kulski JK. Dimorphic Alu element located between the TFIID and CDSN genes within the major histocompatibility complex. *Electrophoresis* 24:2740-2748, 2003
- Uenishi H, Hiraiwa H, Yamamoto R, Yasue H, Takagaki Y, Shiina T, Kikkawa E, Inoko H, Awata T. Genomic structure around joining segments and constant regions of swine T-cell receptor alpha/delta (TRA/TRD) locus. *Immunology* 109:515-526, 2003
- Romphruk AV, Oka A, Romphruk A, Tomizawa M, Choonhakarn C, Naruse TK, Puapairoj C, Tamiya G, Leelayuwat C, Inoko H. Corneodesmosin gene: no evidence for PSORS 1 gene in North-eastern Thai psoriasis patients. *Tissue Antigens* 62:217-224, 2003
- Dunn DS, Ota M, Inoko H, Kulski JK. Association of MHC dimorphic Alu insertions with HLA class I and MIC genes in Japanese HLA-B48 haplotypes. *Tissue Antigens* 62:259-262, 2003
- Ikewaki N, Yamada A, Inoko H. Depolymerization of actin filament by cytochalasin E induces Interleukin 8 production and up-regulates CD54 in the Hela epithelial cell line. *Microbiol Immunol* 47:775-783, 2003
- Zierhut M, Mizuki N, Ohno S, Inoko H, Gul A, Onoe K, Isogai E. Human genome and disease: Immunology and functional genomics of Behcet's disease. *Cell Mol Life Sci* 60:1903-1922, 2003
- Takeshima S, Saitou N, Morita M, Inoko H, Aida T. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene* 316:111-118, 2003
- Ando A, Kawata H, Shigenari A, Anzai T, Ota M, Katsuyama Y, Sada M, Goto

- R, Takeshima SN, Aida Y, Iwanaga T, Fujimura N, Suzuki Y, Gojobori T, Inoko H. Genetic polymorphism of the swine major histocompatibility complex (SLA) class I genes, SLA-1, -2 and -3. *Immunogenetics* 55:583-593, 2003
- Vienne A, Shiina T, Abi-Rached L, Danchin E, Vitiello V, Cartault F, Inoko H, Pontarotti P. Evolution of the proto-MHC ancestral region: more evidence for the plesiomorphic organisation of human chromosome 9q34 region. *Immunogenetics* 55:429-436, 2003
- Okamoto K, Matsuzaka Y, Yoshikawa Y, Takaki A, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H. Identification of NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase 3 gamma-like (IDH3GL) gene and its genetic polymorphisms. *Gene* 323:141-148, 2003
- Shigenari A, Ando A, Renard C, Chardon P, Shiina T, Kulski JK, Yasue H, Inoko H. Nucleotide sequencing analysis of the swine 433-kb genomic segment located between the non-classical and classical SLA class I gene clusters. *Immunogenetics* 55:695-705, 2004
- Hui J, Oka A, Tomizawa M, Tay GK, Kulski JK, Penhale WJ, Isachi SPA, Tamiya G, Inoko H. Identification of two new C4 alleles by DNA sequencing and evidence for a historical recombination of serologically defined C4A and C4B alleles. *Tissue Antigen* 63:263-269, 2004
- Li S, Kawata H, Katsuyama Y, Ota M, Morishima Y, Mano S, Kulski JK, Naruse T, Inoko H. Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. *Tissue Antigens* 63:362-368, 2004
- Koishi S, Yamazaki K, Yamamoto K, Koishi S, Enseki Y, Nakamura Y, Oya A, Yasueda M, Asakura A, Aoki Y, Atsumi M, Inomata J, Inoko H, Matsumoto: Notch4 gene polymorphisms are not associated with autism in Japanese population. *Am J Med Genet* 125B:61-62, 2004
- Ohtsuka M, Kikuchi N, Nogami M, Inoko H, Ozato K, Kimura M. Rapid screening of a novel arrayed medaka (*Oryzias latipes*) cosmid library. *Mar Biotechnol (NY)* 4:173-178, 2004
- Hurt P, Walter L, Sudbrak R, Klages S, Müller I, Shiina T, Inoko H, Lehrach H, Günther W, Reinhardt R, Himmelbauer H. The genomic sequence and comparative analysis of the rat major histocompatibility complex. *Genome Res* 4:631-639, 2004
- Imanishi T, Tamiya G, Inoko H, Gojobori T, Sugano S. Integrative Annotation of 21,037 Human Genes Validated by Full-Length cDNA Clones. *PLoS Biol* 2:1-20, 2004

- Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, Kohara S, Watanebe S, Hanzawa K, Beck S, Kulski JK, Inoko H. Comparative genome analysis of two avian (Quail and Chicken) MHC regions. *J Immunol* 172:6751-6763, 2004
- Mano S, Yasuda N, Katoh T, Tounai K, Inoko H, Imanishi T, Tamiya G, Gojobori T. Notes on the maximum likelihood estimation of haplotype frequencies. *Ann Hum Genet* 68:257-264, 2004
- Ohtsuka M, Kikuchi N, Ozato K, Inoko H, Kimura M. Comparative analysis of a 229 kb medaka genomic region, containing that *zic1* and *zic4* genes, with Fugu, human, and mouse. *Genomics* 83:1063-1071, 2004

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：2件）