

「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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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、国立精神・神経センター、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

pooled DNA法によるゲノムワイドマイクロサテライト関連解析で約27,000マーカー全てに関して関連解析を行い、8%のマーカーで関連 ( $p < 0.05$ ) を認めた。これらに関して各250人ずつの全く別のプール検体で、2次ついで3次スクリーニングを行い、候補領域を絞り込んでいる。現在71マーカーが得られ、個別タイピングにて検証中であり、いよいよ全ゲノムから少数の領域に絞られてきた。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122個の候補遺伝子上の計267SNPs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16個の遺伝子上の計22個のSNPsにみられた。現在各900人ずつの多数検体で二次スクリーニング中である。またこれまでにDNAサンプルを約1000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。

また研究分担者が新たに抗パーキンソン作用を発見したzonisamideについて、著効例と、

比較的効果の少ない例について、SNPの関連解析を行うために、ZNS投与されたPD患者DNAを収集した。約100例の収集が終了したので、ドパミン代謝酵素遺伝子などを中心に解析を進める予定である。

### 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。今までのところ劣性遺伝性パーキンソン病においては、*Parkin*, *PINK1*併せて60%弱が既知の原因遺伝子変異であることが分かったが、残り40%については依然原因遺伝子が不明である。更に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。

#### (結論)

Pooled DNA法によるゲノムワイド関連解析においては一次、二次、三次スクリーニング、さらに個別タイピングにて最終的に10-20個程度に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い、同定されたマーカーの連鎖不平衡マッピング、機能解析を行う。

### 3. 研究実施体制

#### ゲノムワイド解析・総括グループ

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）

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)

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）

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

- Ohtake H, Limprasert P, Fan Y, Onodera O, Kakita A, Takahashi H, Bonner LT, Tsuang DW, Murray IV, Lee VM, Trojanowski JQ, Ishikawa A, Idezuka J, Murata M, Toda T, Bird TD, Leverenz JB, Tsuji S, La Spada AR.  $\beta$ -synuclein gene alterations in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 63:805-811, 2004
- Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng Ar, Rosales RL, Hassin-Bear S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu Chou YH, Atac FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 63:1482-1485, 2004
- Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Ng Ar, Rosales RL, Hassin-Bear S, Shinar Y, Lu CS, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:424-427, 2004

- Hattori N, Mizuno Y. Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* 364:722-724, 2004
- Higashi Y, Asanuma M, Miyazaki I, Hattori N, Mizuno Y, Ogawa N. Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem* 89:1490-1497, 2004
- Tanaka K, Suzuki T, Hattori N, Mizuno Y. Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim Biophys Acta* 1695:235-247, 2004
- Takahashi R, Imai Y, Hattori N, Mizuno Y. Parkin and endoplasmic reticulum stress. *Ann NY Acad Sci* 99:101-106, 2004
- Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res* 14:1832-1850, 2004
- Longman C, Mercuri E, Cowan F, Allsop J, Brockington M, Jimenez-Mallebrera C, Kumar S, Rutherford M, Toda T, Muntoni F. Antenatal and postnatal brain magnetic resonance imaging in muscle-eye-brain disease. *Arch Neurol* 61:1301-1306, 2004
- Kurahashi H, Inagaki H, Yamada K, Ohye T, Taniguchi M, Emanuel BS, Toda T. Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. *J Biol Chem* 279:35377-35383, 2004
- Kariya S, Hirano M, Nagai Y, Furiya Y, Fujikake N, Toda T, Ueno S. Humanin attenuates apoptosis induced by DRPLA proteins with expanded polyglutamine stretches. *J Mol Neurosci* 25:165-170, 2005
- Kurahashi H, Taniguchi M, Meno C, Taniguchi Y, Takeda S, Horie M, Otani H, Toda T. Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in fukutin-null mice. *Neurobiol Dis* 19:208-217, 2005

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：3件）