

「テ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臨床遺伝学 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

パーキンソン病感受性遺伝子を同定するため 27,000 マイクロサテライトを用いて 3 段階関連解析を行い、71 個の候補マーカーを得、個別タイピング中であるが現時点で最低 3 ケ所の有意な領域を同定した。多数の候補遺伝子 SNP 関連解析にて約 900 人の患者対照について 1 次 2 次スクリーニングを行い、初めての確実なパーキンソン病疾患感受性遺伝子として α -synuclein 遺伝子 ($p=1.7 \times 10^{-11}$) を同定した。今後感受性遺伝子を数個以上同定し、創薬探索、発症予測、テラーメイド治療へと進める。

2. 研究実施内容

①研究目的

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 の原因遺伝子として α -synuclein や parkin、DJ-1、PINK1、LRRK2、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、を行うことを目標とする。

②方法

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、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、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をもちいて PCR 反応を行った。PCR 産物を GeneScan™、pickpeak（東海大分子生命科学 2 開発）により解析し、患者対照間で統計学的検討を行った。P<0.05 を示すマーカーに関して各 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、毎回のスクリーニングで有意差を示すマーカーを残した。さらにこれらを個別タイピングにて検証し、さらに外国人検体でも有意差を示すものを最終候補領域とし、連鎖不平衡マッピングへと進める。

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、p<0.05 を示す SNP を各約 900 人ずつの多数検体で二次スクリーニングを行い、真の感受性 SNP 候補を同定する。

③結果

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った。3 次スクリーニング終了後、波形を検討し各 624 人として $p < 0.001$ を満たすものとして 71 マーカーが得られた。

これらを現在個別タイピングにて検証中であるが、現時点で 16 個のマーカーが $p < 0.05$ を示し、最低 3 ケ所で $p < 0.001$ の有意な領域が同定されており、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と考えられる。

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・対照関連解析では、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。家族性 PD、ドーパミン、タンパク質分解などに関連する 121 個の候補遺伝子上の計 268SNPs 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。

二次スクリーニングとして、これらの 22 個の SNPs を患者・対照各約 900 人に増やして関連解析した結果、 α -synuclein (SNCA) 遺伝子の intron 4 上に存在する SNP に $p = 5.0 \times 10^{-10}$ という極めて強い関連を見出した。この SNP の周辺で連鎖不平衡マッピングを行い、さらに

関連解析にて、その SNP と高い r^2 値 (>0.85) をとる周囲の計 6 個の SNPs が全て PD と強い関連 ($p=2.0 \times 10^{-9}$ – 1.7×10^{-11}) を示すことを見出した。これらの SNP の各遺伝子型ごとに SNCA 発現をみたところ、リンパ球とは異なり、大脳にて PD associated allele の数に応じ、SNCA 遺伝子発現が増加している傾向がみられた。

まずは 1 個、確実なパーキンソン病疾患感受性遺伝子を同定したことになる。

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とその機能解析

劣性遺伝性パーキンソン病の約 4 割が *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, PARK7 の遺伝子変異解析を行ったところ PARK6 の *PINK1* 変異を 8 家系について認めた。このうち 7 家系は点変異であったが、一家系については世界でも報告がない欠失型変異であった。PARK7 の DJ-1 変異については一例も存在していなかった。更に約 650 例について解析し、7 種の新規遺伝子変異を見出した。更にヘテロ接合体で発症しうる患者群がいることが判明した。

同様に *parkin* 変異については、ヘテロ接合体で発症している家系が 40 家系弱存在しており、その病態にハプロ不全が考えられた。劣性遺伝性のうち約 50% を占める *parkin*, *PINK1* 変異陰性例の症例については現在連鎖解析を行っており、劣性遺伝性で中高年発症の家系が西日本を中心に存在していることが分かった。また優性遺伝性パーキンソン病では、SNCA の duplication 症例が 2 家系存在している事が分かり、しかも 1 症例については痴呆症状が存在しており、その症例の duplication の領域がその発症メカニズムに関与している可能性が考えられた。興味深いことに浸透率が 33% と低く平均発症年齢を超えているにも関わらず全く臨床症状を認めなかった。このことは asymptomatic carrier と発症者との違いが、発症メカニズムのヒントを与えるものと考えられる。

Parkin 機能については、ユビキチンリガーゼの negative regulator である 14-3-3 η の同定に成功している。また *parkin* の knock down によりドパミンキノン体の増加が認められ、その増加は正常 SNCA で抑制されることが分かった。またパーキンソックアウトマウスについて in vivo autoradiography による解析により、行動異常や組織学的検討にて異常は見出せないものの D, D2 の binding potential の増加、methamphetamine 処理前後による raclopride の BP の変化などドパミン遊離異常を来している可能性が示唆された。

Zonisamide の抗パーキンソン作用について

村田が臨床的に抗パーキンソン作用を発見した抗てんかん薬 Zonisamide について、わが国で大規模な二重盲検試験を行い、50mg/日という少量(抗てんかん薬としての維持量 300–600mg)で明らかな抗パーキンソン効果を確認し、現在、効能追加の申請準備中である。テーラーメイド医療を目指し、まず著効例に特徴的な臨床像を抽出すべく、二重盲検試験の結果の層別解析を行ったが、性、年齢、パーキンソン病の罹患期間、併用薬剤、薬量な

どでは効果に明らかな差異はなく、遺伝的素因によると結論付けた。さらに著効例と、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 を投与された PD 患者 DNA を約 100 例収集した。今後サンプル数を増やし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. 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、教授）
- 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

「ターゲット遺伝子解析・検体収集グループ」

- ①研究分担グループ長：村田 美穂（国立精神神経センター、部長）
- ②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

「パーキンソン病創薬グループ」

- ①研究分担グループ長：平井 圭介（武田薬品工業（株）、主席研究員）
- ②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

（1）論文（原著論文）発表

- Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. Hum Mol Genet 15:1151-1158, 2006
- Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y, Yoshino H, Atsumi M, Kitaguchi M, Sasaki S, Kawaguchi S, Miyajima H, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. Neurology 64:1955-1957, 2005
- Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, Mizoguchi K, Murata M, Toda T, Imoto I, Inazawa J, Mizuno Y, Hattori N. Clinical heterogeneity of α -synuclein gene duplication in Parkinson's disease. Ann Neurol 59:298-309, 2006
- Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Hasegawa K, Yoshino H, Kubo S, Sato K, Hattori T, Lu CS, Inzelberg R, Djaldetti R, Melamed E, Amouri R, Gouider-Khouja N,

- Hentati F, Hatano Y, Wang M, Imamichi Y, Mizoguchi K, Miyajima H, Obata F, Toda T, Farrer MJ, Mizuno Y, Hattori N. Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. *Mov Disord* (in press)
- Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL. Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 14:71-84, 2005
 - Suzuki M, Hattori N, Orimo S, Fukumitsu N, Abo M, Kono Y, Sengoku R, Kurita A, Honda H, Inoue K: Preserved myocardial [(123)I] metaiodobenzylguanidine uptake in autosomal recessive juvenile parkinsonism: First case report. *Mov Disord* 20:634-636, 2005
 - Clarimon J, Johnson J, Djaldetti R, Hernandez D, Hattori N, Sroka H, Barhom Y, Singleton A: Mutation of the Parkin gene in a Persian family: Clinical progression over a 40-year period. *Mov Disord* 20:887-890, 2005
 - Inzelberg R, Hattori N, Mizuno Y. Dopaminergic dysfunction in unrelated, asymptomatic carriers of a single parkin mutation. *Neurology* 65:1843, 2005
 - Orimo S, Amino T, Yokochi M, Kojo T, Uchihara T, Takahashi A, Wakabayashi K, Takahashi H, Hattori N, Mizuno Y: Preserved cardiac sympathetic nerve accounts for normal cardiac uptake of MIBG in PARK2. *Mov Disord* 20:1350-1353, 2005
 - Lu CS, Simons EJ, Wu-Chou YH, Fonzo AD, Chang HC, Chen RS, Weng YH, Rohe CF, Breedveld GJ, Hattori N, Gasser T, Oostra BA, Bonifati V: The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11:521-522, 2005
 - Ide M, Yamada K, Toyota T, Iwayama Y, Ishitsuka Y, Minabe Y, Nakamura K, Hattori N, Asada T, Mizuno Y, Mori N, Yoshikawa T: Genetic association analyses of PHOX2B and ASCL1 in neuropsychiatric disorders: evidence for association of ASCL1 with Parkinson's disease. *Hum Genet* 117:520-527, 2005
 - Chiyonobu T, Sasaki J, Nagai Y, Takeda S, Funakoshi H, Nakamura T, Sugimoto T, Toda T. Effects of fukutin deficiency in the developing mouse brain. *Neuromuscul Disord* 15:416-426, 2005
 - Sasaki N, Manya H, Okubo R, Kobayashi K, Ishida H, Toda T, Endo T, Nishihara S. β 4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development. *Biochem Biophys Res Commun* 333:131-137, 2005
 - Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, Kano H, Yamaguchi M, Toda T. Alternative splicing regulates the transcriptional activity of Drosophila heat shock transcription factor in response to heat/cold stress. *FEBS Lett* 579:3842-3848, 2005
 - Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, Kobayashi K, Yokota T, Amino T, Owada K, Fujigasaki H, Sakamoto M, Tomimitsu H, Takashima M, Kumagai J, Noguchi Y, Kawashima Y, Ohkoshi N, Ishida G, Gomyoda M, Yoshida M, Hashizume Y, Saito Y, Murayama S, Yamanouchi H, Mizutani T, Kondo I, Toda T, Mizusawa H. An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene

- encoding a novel protein with spectrin repeat and rho Guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet* 77:280-296, 2005
- Watanabe M, Kobayashi K, Jin F, Park KS, Yamada T, Tokunaga K, Toda T. Founder SVA retrotransposal insertion in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and its origin in Japanese and Northeast Asian populations. *Am J Med Genet* 138:344-348, 2005
 - Kano H, Kurosawa K, Horii E, Ikegawa S, Yoshikawa H, Kurahashi H, Toda T. Genomic rearrangement at 10q24 in non-syndromic split-hand/split-foot malformation. *Hum Genet* 118:477-483, 2005
 - Saito Y, Motoyoshi Y, Kashima K, Izumiyama-Shimomura N, Toda T, Nakano I, Hasegawa M, Murayama S. Unique tauopathy in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *J Neuropath Exp Neurol* 64:1118-1126, 2005
 - Toda T, Chiyonobu T, Xiong H, Tachikawa M, Kobayashi K, Many H, Takeda S, Taniguchi M, Kurahashi H, Endo T. Fukutin and α -dystroglycanopathies. *Acta Myologica* 24:60-63, 2005
 - Kariya S, Hirano M, Uesato S, Nagai Y, Nagaoka Y, Furiya Y, Asai H, Fujikake N, Toda T, Ueno S. Cytoprotective effect of novel histone deacetylase inhibitors against polyglutamine toxicity. *Neurosci Lett* 392:213-215, 2006
 - Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Sese J, Okinaga T, Tsukahara T, Guicheney P, Ozono K, Nishino I, Morishita S, Toda T. Expression profiling of muscles from Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and laminin- α 2 deficient congenital muscular dystrophy; is congenital muscular dystrophy a primary fibrotic disease? *Biochem Biophys Res Commun* 342:489-502, 2006
 - Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Fukudome T, Okinaga T, Tsukahara T, Tajima Y, Ozono K, Nishino I, Nonaka I, Toda T. Aberrant neuromuscular junctions and delayed terminal muscle fiber maturation in α -dystroglycanopathies. *Hum Mol Genet* 15:1279-1289, 2006
 - Mori T, Shinka T, Taniguchi M, Iwamoto T, Nakahori Y, Toda T, Kurahashi H. Mutational analysis of the *spo11* gene in patients with male infertility. *Fertil Steril* (in press)