

「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 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、280 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ヶ所の $P < 0.0001$ 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。患者対照各 500 人の、100 K SNP 関連解析を、超短期間・低コストで行うことを可能にするプール SNP array 手法を開発した。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―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―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―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―全てに関して関連解析を行い、8%のマーカ―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―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―が p<0.05 を示し、最低3ヶ所で 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 マーカ―を用いた患者・対照関連解析では、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 を解析し、二次スクリーニングとして、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、剖検脳にて 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。これらの SNPs について、ルシフェラーゼアッセイや EMSA による機能解析を進行中である。

PD として過去の関連解析はサンプル数も 200–300、p 値も 0.01–0.001 程度で、追試で反対の結

果が出たりするなど、確実に発症リスクを高める遺伝因子は現在まで確認されていなかった。今回同定された α -synuclein 遺伝子は p 値も 10^{-11} と極めて強い相関を示しこのようなものは初めてで、はじめて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、といえる。

さらに、二次スクリーニングで $P=10^{-3}$ – 10^{-4} の SNPs についてはさらに検体を増やして再現性を確認していく。

100 K SNP array と pooled DNA を用いた関連解析

アレル頻度が既知の混合検体を作成し、100 K SNP array の定量性を観察したところ、RAS 値と、アレル頻度は強い正の相関を示した。PD 患者 500 人と対照 500 人から成る pooled DNA を作成し、100 K SNP array のシグナル強度より、RAS 値を算出、推定アレル頻度を算出し、関連解析を行った。有意な関連が予想された SNP について、個別検体を用いて、TaqMan 法で関連を検証したところ、 $P = 6.6 \times 10^{-4}$ の関連を示す SNP を見出した。さらに、周辺の Tag SNP 解析により、 $P = 5.7 \times 10^{-5}$ の関連を示す SNP を発見した。このように、本手法は、患者対照各 500 人の、100 K SNP 関連解析を、超短期間・低コストで行うことを可能にした。

新規 PARK 家系の発見

中国において、AD 形式で 3 世代にわたり連鎖する PD 大家系を見出した。既知の AD-PD 遺伝子は、SNCA、LRRK2 のみであるが、これら近傍（数百 kb 内）の MS を用いて連鎖解析を行ったところ、本家系との連鎖は棄却され、本家系は新規 PARK 家系であると考えられた。現在全ゲノム連鎖解析中である。

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

優性遺伝性パーキンソン病では、SNCA の Duplication の家系は、更に 3 家系存在していることが分かった。発症者と未発症者についての違いに関しては、終夜脳波、PET による検討を行った。終夜脳波では、発症者のうち一人に REM Sleep Behavior Disorders (RBD) の所見を呈していたが、未発症者は全例正常であった。FDG-PET による検討では、パーキンソニズムを呈していない未発症者は全て正常パターンを示した。認知症の有無に関係なく後頭葉における代謝低下を認めた。SNCA の duplication においては認知症のリスクが高いと想定された。Duplication の症例のうち一例について剖検を得ることができ詳細な神経病理学的検討を行った。病理学的には、びまん性レビー小体病の様相を呈していた。興味深いことに Glial cytoplasmic inclusions (GCI) が観察された。 α -Synuclein の過剰発現が、多系統萎縮症の誘発因子である可能性が示唆された。

In vitro 系における機能解析については、parkin が PINK1 とミトコンドリア外膜で結合していることが FRET による方法で示された。結合の意義としては、parkin が存在すると PINK1 が安定することが分かった。この安定作用は、parkin 遺伝子変異症例でも確認できた。PINK1 は parkin の上流で機能することが指摘されているが、この所見からは同じカスケードにこの遺伝子産物が関与していることが示唆された。

新規常染色体劣性晩発性パーキンソン病家系の遺伝子座同定については、血縁結婚が認められる9家系について連鎖解析を行い、2カ所に遺伝子座を絞込むことが出来た。現在原因遺伝子同定に向けて解析中である。

アジア人特有の遺伝子多型については、LRRK2 の G2385R を見出した。この遺伝子多型は白人には認められずアジア人特有のものとして単離された。創始者効果が指摘されており、実に4000年以上も前に存在した可能性が示唆されている。

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 (ZNS) 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、効能追加の申請中である。進行期PD患者において ZNS 投与4-7年の長期例での効果を検討したところ、投与開始後1年後の効果はほとんどの症例で4年間は維持できることを明らかにした。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115例収集した。今後さらに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。

パーキンソン病における臨床的問題点

MIBG 心筋シンチの検査を継続して行った。MAOB 阻害薬は MIBG の心臓交感神経への取込を阻害することを明らかにした。

また、パーキンソン病でドパミンアゴニストの治療時に麦角系アゴニストであるカベルゴリンは弁逆流の頻度が有意に高いことを報告した。

3. 研究実施体制

(1)「ゲノムワイド解析・総括グループ」

①研究者名

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

(2)「ターゲット遺伝子解析・検体収集グループ」

①研究者名

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

(3)「パーキンソン病創薬グループ」

①研究者名

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Murata M. Pharmacokinetics of L-dopa special reference to food and aging. *J Neurol* 253[Suppl 3]:III/47-III/52, 2006
- Yamamoto S, Fukae J, Mori H, Mizuno Y, Hattori N. Positive immunoreactivity for vesicular monoamine transporter 2 in Lewy bodies and Lewy neurites in substantia nigra. *Neurosci Lett* 396:187-191, 2006
- Matsuda N, Kitami T, Suzuki T, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K. Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple monoubiquitylation in vitro. *J Biol Chem* 281:3204-3209, 2006
- Sato S, Chiba T, Sakata E, Kato K, Mizuno Y, Hattori N, Tanaka K. 14-3-3 eta is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J* 25:211-221, 2006
- Kubo S, Hattori N, Mizuno Y. Recessive Parkinson's disease. *Mov Disord* 21:885-893, 2006
- Akagawa M, Ito S, Toyoda K, Ishii Y, Tatsuda E, Shibata T, Kawai Y, Ishino K, Kishi Y, Adachi T, Tsubata T, Takasaki Y, Hattori N, Matsuda T, Uchida K. Bispecific antibodies against modified protein and DNA with oxidized lipids *Proc Natl Acad Sci* 103:6160-6165, 2006
- Ishihara L, Gibson RA, Warren L, Amouri R, Lyons K, Wielinski C, Hunter C, Swartz JE, Elango R, Akkari A, Leppert D, Surh L, Reeves KH, Thomas S, Ragone L, Hattori N, Pahwa R, Jankovic J, Nance M, Freeman A, Gouider-Khouja N, Kefi M, Bouar M, Sassi SB, Yahmed SB, Euch-Fayeche EG, Middleton L, Burn DJ, Watts RL, Hentati F. Clinical features of Parkinson's patients with and without LRRK2 mutations. *Arch Neurol* 63:1250-1254, 2006
- Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C. Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Collaborative analysis

- of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 296:661-670, 2006
- Yamamoto M, Uesugi T, Nakayama T. Dopamine agonists and cardiac valvulopathy in Parkinson disease: A case-control study. *Neurology* 67:1225-1229, 2006
 - Nakamura A, Kitami T, Mori H, Mizuno Y, Hattori N. Nuclear localization of the 20S proteasome subunit in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 406:43-48, 2006
 - Sato S, Chiba T, Nishiyama S, Kakiuchi T, Tsukada H, Hatano T, Fukuda T, Yasoshima Y, Kai N, Kobayashi K, Mizuno Y, Tanaka K, Hattori N. Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice shown by ex vivo autoradiography. *J Neurosci Res* 84:1350-1357, 2006
 - Sato K, Hatano T, Yamashiro K, Kagohashi M, Nishioka K, Izawa N, Mochizuki H, Hattori N, Mori H, Mizuno Y; Juntendo Parkinson Study Group. Prognosis of Parkinson's disease: time to stage III, IV, V, and to motor fluctuations. *Mov Disord* 21:1384-1395, 2006
 - Funayama M, Li Y, Tomiyama H, Yoshino H, Imamichi Y, Yamamoto M, Murata M, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. LRRK2 G2385R variant is a risk factor for parkinson disease in Asian population. *Neuroreport* 18:273-275, 2007
 - Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I, The Japan Zonisamide on PD Study Group. Zonisamide improves motor function in Parkinson disease. A randomized, double-blind study. *Neurology* 68:45-50, 2007
 - Ishihara L, Gibson RA, Warren L, Amouri R, Lyons K, Wielinski C, Hunter C, Swartz JE, Elango R, Akkari PA, Leppert D, Surh L, Reeves KH, Thomas S, Ragone L, Hattori N, Pahwa R, Jankovic J, Nance M, Freeman A, Gouider-Khouja N, Kefi M, Zouari M, Ben Sassi S, Ben Yahmed S, El Euch-Fayeche G, Middleton L, Burn DJ, Watts RL, Hentati F. Screening for Lrrk2 G2019S and clinical comparison of Tunisian and North American Caucasian Parkinson's disease families. *Mov Disord* 22:55-61, 2007
 - Ihara M, Yamasaki N, Hagiwara A, Tanigaki A, Kitano A, Hikawa R, Tomimoto H, Noda M, Takanashi M, Mori H, Hattori N, Miyakawa T, Kinoshita M. Sept4, a Component of Presynaptic Scaffold and Lewy Bodies, Is Required for the Suppression of alpha-Synuclein Neurotoxicity. *Neuron* 53:519-533, 2007
 - Kono S, Shirakawa K, Ouchi Y, Sakamoto M, Ida H, Sugiura T, Tomiyama H, Suzuki H, Takahashi Y, Miyajima H, Hattori N, Mizuno Y. Dopaminergic neuronal dysfunction associated with parkinsonism in both a Gaucher disease patient and a carrier. *J Neurol Sci* 252:181-184, 2007
 - Ephraty L, Porat O, Israeli D, Cohen OS, Tunkel O, Yael S, Hatano Y, Hattori N, Hassin-Baer S. Neuropsychiatric and cognitive features in autosomal-recessive early parkinsonism due to PINK1 mutations. *Mov Disord* (in press)
 - Satake W, Mizuta I, Suzuki S, Nakabayashi Y, Ito C, Watanabe M, Takeda A, Hasegawa K, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Fibroblast growth factor 20 gene and

Parkinson's disease in the Japanese population. Neuroreport (in press)

- Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, Hasegawa K, Urade Y, Goto Y, Naiki H, Toda T. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. Nat Struct Mol Biol (in press)
- 馬場正之, 村田美穂, 横地房子. Parkinson 病に対するプラミペキソールの長期継続投与試験. 神経内科 65:575-580,2006
- Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Hayashi YK, Nishino I, Murakami T, Nonaka I, Togashi K, Tanaka S, Takayanagi M, Yokoyama H, Sakamoto O, Abe T, Toda T, Inuma K. A case of Fukuyama-type congenital muscular dystrophy with a very mild mental deficit. Neuromuscul Disord 16:274-276, 2006
- Mori T, Kurahashi H, Shinka T, Nakahori Y, Taniguchi M, Toda T, Iwamoto T. Candidate genes for male factor infertility-validation. Fertil Steril 86:1553-1554, 2006
- Xiong H, Kobayashi K, Tachikawa M, Many H, Takeda S, Chiyonobu T, Fujikake N, Wang F, Nishimoto A, Morris GE, Nagai Y, Kanagawa M, Endo T, Toda T. Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of α -dystroglycan. Biochem Biophys Res Commun 350:935-941, 2006
- Shikishima C, Ando J, Ono Y, Toda T, Yoshimura K. Registry of adolescent and young adult twins in the Tokyo area. Twin Res Hum Genet 9:811-816, 2006
- Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, Toda T. Protein transduction domain-mediated delivery of QBP1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in vivo. Mol Ther 15:303-309, 2007
- Saito F, Masaki T, Saito Y, Nakamura A, Takeda S, Shimizu T, Toda T, Matsumura K. Defective peripheral nerve myelination and neuromuscular junction formation in fukutin-deficient chimeric mouse. J Neurochem (in press)
- Chiyonobu T, Hayashi S, Kobayashi K, Morimoto M, Miyanomae Y, Nishimura A, Nishimoto A, Ito C, Imoto I, Sugimoto T, Jia Z, Inazawa J, Toda T. Partial tandem duplication of *GRIA3* in a male with mental retardation. Am J Med Genet (in press)

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:2 件)