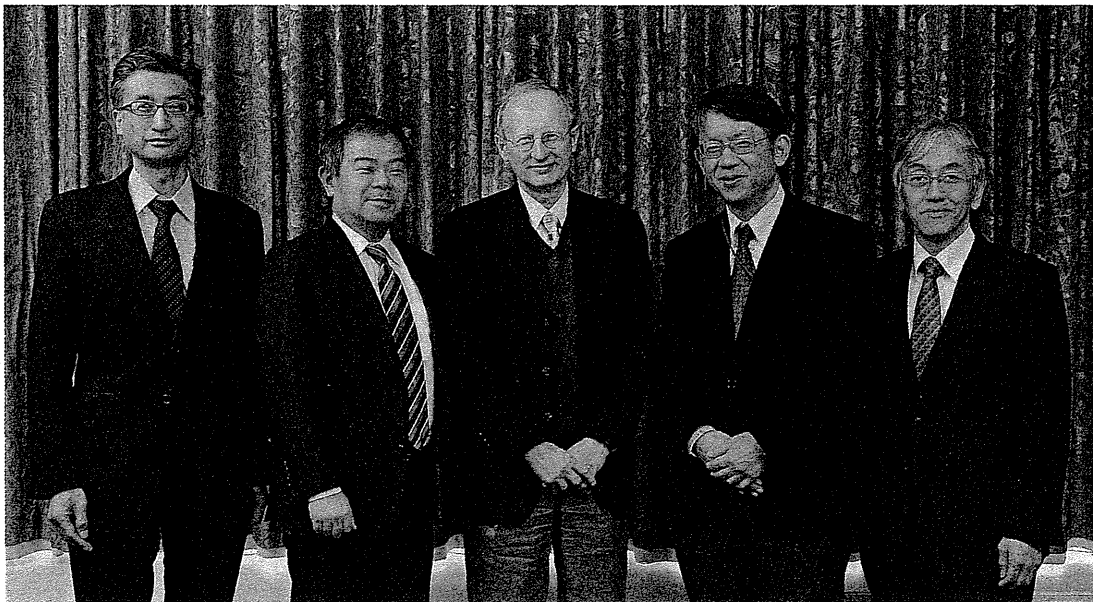


パーキンソン病遺伝子に関する最新の知見

パーキンソン病 (PD) の原因はいまだ不明であり、症状を改善する治療法は出てきているものの、根本的な治療法は確立されていない。PD の進行過程には、家族性 PD の原因となる遺伝子異常の関与や、環境因子の影響が明らかとなっており、現在、根本的な治療を目指した遺伝的側面からの PD 遺伝子研究が進められている。

今回、米国・フロリダ州 Jacksonville の Mayo Clinic Florida で顧問、Mayo Clinic 医科大学で神経学の教授を務めておられる Wszolek 先生をゲストに迎え、日本で PD 遺伝子に関する研究を積極的に行っていらっしゃる先生方と、PD 遺伝子に関する最新の知見についてディスカッションを行った。



●ご司会

望月 秀樹 先生	戸田 達史 先生	Dr. Zbigniew K. Wszolek	高橋 良輔 先生	坪井 義夫 先生
Hideki Mochizuki	Tatsushi Toda	Professor, Department of	Ryosuke Takahashi	Yoshio Tsuboi
大阪大学大学院医学系	神戸大学大学院医学研究科	Clinical Neurosciences, Mayo	京都大学大学院医学研究科	福岡大学医学部
研究科神経内科学 教授	神経内科学 教授	Clinic Florida, USA	臨床神経学 教授	神経内科学 教授



高橋 良輔 先生

■ 家族性パーキンソン病研究の現状

根治療法を目指して

高橋 本日は、フロリダ州 Jacksonville の Mayo Clinic Florida から Wszolek 先生をお迎えし、パーキンソン病 (PD) 遺伝子に関する最新の知見について皆さんにお話を伺っていきたいと思います。まず、Wszolek 先生、PARK 遺伝子の分類についてお話しください。

Wszolek 既知遺伝子の大半は α -シヌクレインの病変、すなわち孤発性 PD の病理学的特徴と関連しています。当然のことながら、 α -シヌクレインの病変は α -シヌクレイン遺伝子の点突然変異と重複変異の両方をもつ患者にみられます。しかし興味深いことに、一部の患者ではタウの病変も報告されています。さらに最近では、TDP-43 の病変も明らかになってきました。

PD に関連する第 2 の常染色体優性遺伝性パーキンソン病 PARK8 を起こす LRRK2 遺伝子変異例の 80% 以上は、 α -シヌクレインの病変と関連性があります。しかし同時に、タウオパチーも一部に認められ、まれですが TDP-43 も同定されています。

高橋 孤発性 PD 患者から得た検体で行われたゲノムワイド関連解析 (genome-wide association studies : GWAS) の研究についてご紹介ください。

Wszolek GWAS はこれまでに 10 件以上行われていますが、すべての研究において α -シヌクレインおよびタウ遺伝子が同定されています。その他のパーキンソン症候群の場合、主な病変が大脳皮質基底核変性症 (corticobasal

degeneration : CBD) と進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy : PSP) で認められます (表 1)。これらはタウの病変です。これ以外のパーキンソン症候群 (多系統萎縮症, PD を伴う認知症, びまん性レヴィ小体病) は α -シヌクレインと関連しています。したがってこの場合も、 α -シヌクレインとタウの 2 つの病変がパーキンソン症候群と大いに関係があります。こうした非定型の PD 様疾患と関連する家族性症例に注目すると、前頭側頭型認知症 (FTDP-17T) のようにタウの病変と関連する症例もあれば、最近同定されたミトコンドリア蛋白質関連神経変性症 (mitochondrial protein-associated neurodegeneration : MPAN) や、PLA2G6 関連神経変性症のように α -シヌクレインと関連する症例もあります。PLA2G6 関連神経変性症には、 α -シヌクレインとタウ病変の若干のオーバーラップが認められます。

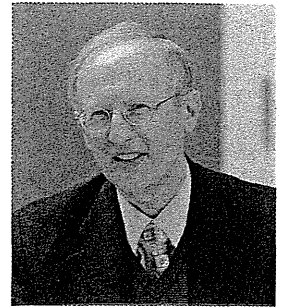
以上をもとに、我々は Jacksonville の Mayo Clinic が保有する脳の病理標本を精査し、 α -シヌクレインとタウの双方の病変に関連する追加遺伝子を探索するよう提案しています。プロジェクトは 2 つあり、PD におけるタウの役割を解明する研究と、 α -シヌクレインとタウの病変の遺伝的決定因子を探索する研究です。

このプロジェクトへの取り組み方は従来とは大きく異なります。従来は診察室の患者から出発して家系図を作り、家族に集まってもらって血液検体を採取し、可能で

表 1 パーキンソン症候群

症候群/疾患	領域	遺伝子	病変
FTDP-17T	17q21.1	<i>MAPT</i>	Tauopathy
MPAN	19q12	<i>C19ORF12</i>	Synucleinopathy
PLA2G6-associated neurodegeneration	22q13.1	<i>PLA2G6</i>	Synucleinopathy, まれに tau pathology
MPAN : mitochondrial protein-associated neurodegeneration.			
症候群/疾患	領域	遺伝子	病変
CBD	-	-	Tauopathy
MSA	-	-	Synucleinopathy
PDD/DLB	-	-	Synucleinopathy
PSP	-	-	Tauopathy

あれば死後剖検、以後はさらに多くの家系を探し、検体を採取して最終的に遺伝子の発見に至ります。しかし、我々の方法は剖検例から出発します。α-シヌクレインとタウ双方の病変に関連する既知遺伝子を調べ、既知遺伝子をもつ症例を除外して既知の遺伝子座をもたない症例だけに集中します。次に家系に戻り、家系の範囲を広げて患者の家族全員から血液検体を採取します。そしてα-シヌクレインとタウの病変に関連する遺伝子をさらに数多く見つけていきます。本研究は、PDの新しい遺伝子を発見し、根治療法を見出すという最終目標に近づける方法であり、PD領域の明るい未来を築くための有力な方法のひとつになるでしょう。



Zbigniew K. Wszolek 先生

状についてお話しいたします。

坪井 Perry 症候群の家系「FUK-1」は、2002年に日本人初の Perry 症候群家系として我々が報告しました。その後2009年になって、この家系から dynactin 1の変異が見つかりました。この家系の臨床経過は Perry¹⁾が1975年に最初に報告した家系と非常によく似ています。この家系における最も印象的な検査所見は睡眠ポリグラフ検査結果でした。発端例の睡眠ポリグラフ検査結果(図1)では、夜間にきわめて不規則な呼吸が認められ、検査中の変動は非常に激しく、睡眠ステージにも異常が認められ

Perry 症候群の研究の現状

FUK-1と OMT-1

高橋 次に、Perry 症候群について長年 Wszolek 先生と共同研究されている坪井先生から、Perry 症候群研究の現

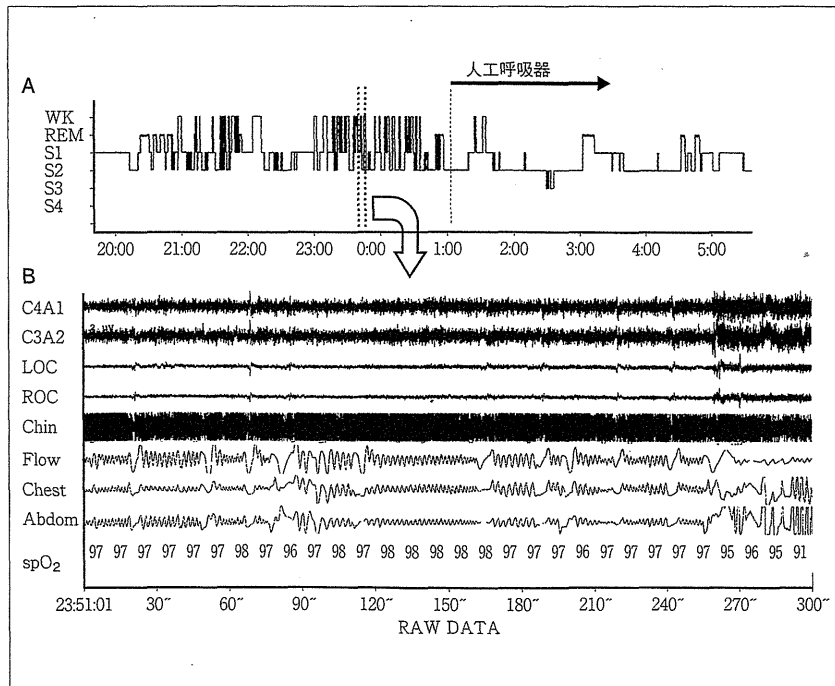


図1 Perry 症候群の睡眠ポリグラフ検査結果
(文献2より引用)



坪井 義夫 先生

ました。また、突然の呼吸停止も1例で認められました。心臓シンチグラフィーではPerry症候群患者の3分の2にMIBG (3 (meta)-iodobenzylguanidine) の取り込み減少がみられます。

また、最近新しく発見されたOMT家系があります。OMT家系はPerry症候群としては最大の家系のひとつです。この家系においては新しい突然変異、ヘテロ接合型点突然変異が見つかりました。

変異型 p150^{glued} の微小管に対する親和性を、野生型と比較しました。新しい変異は、これまで報告されたPerry症候群の変異と比較すると、微小管に対する親和性の低下が軽度でした。

Perry症候群の遺伝様式は、常染色体優性遺伝です。臨床の特徴は孤発性PDとの違いはあるものの、類似点も多くあります。さらに検査所見(脳のMRI、MIBG心筋シンチグラフィー)については、孤発性PD患者と非常によく似ています。

病理学的特徴としては、少量のTDP-43陽性細胞質内神経封入体が主に黒質または脳幹と大脳基底核に認められました。また、dynactin 1の変異を形質導入した培養細胞を野生型と比較した際、細胞内の蛋白質分布の異常が認められました。これまでの知見から、dynactinの機能がオートファジーの経路に関係していることが判明したので、dynactinの変異により、オートファジーの経路のどこかが妨害を受けているのではないかと推測しています。

孤発性PDの危険因子について

高橋 次に、戸田先生から孤発性PDの危険因子についてお話しいただきます。

戸田 ご存じの通り、メンデルの法則に従って遺伝するPD遺伝子が同定されており、その中には α -シヌクレイン、パーキンなどがあります。しかし、孤発性PDは複雑な疾患で、複数の遺伝および環境因子を原因としています。孤発性PD(多数:90~95%)において、PDに影響を及ぼす遺伝子がほとんど同定されていない中、我々は孤発性PD遺伝子の探索を行ってきました。

候補遺伝子として、我々はPDの最初の確定的(P値が 10^{-8} 未満)の感受性遺伝子 α -シヌクレインを同定しました。 α -シヌクレインの3'UTR(非翻訳領域)のいくつかのSNPのP値は 10^{-9} から 10^{-11} でした。これらのSNPは α -シヌクレイン遺伝子の3'UTRとイントロン4に位置しています。

GWASにより感受性遺伝子座はPARK16などが見つかりました³⁾。これは新しい遺伝子座で、P値は 10^{-12} です。このPARK16遺伝子座は大きな連鎖不平衡ブロックで、NUCKS1、RAB7L1、SLC41A1の3つの遺伝子を含んでいます。2013年2月に、RAB7L1がLRRK2と相互作用してニューロン内の蛋白質ソーティングとPDの危険度を修飾することが明らかになりました⁴⁾。RAB7L1は低分子量GTP蛋白質で、PARK16の産物である可能性が疑われています。

我々のGWASデータを白人のGWAS研究と比較したところ、当初は α -シヌクレイン、LRRK2、PARK16、BST1はアジア人で陽性、 α -シヌクレインとタウは白人で陽性でした。しかしその後再現研究がなされ、集団による相違はPDの遺伝的不均一性の背景となっているものの、原因遺伝子は集団間で共通するものが主でMAPTのみが白人集団に特異的です。さらに、変異を通じて常染色体優性遺伝のパーキンソニズムの原因となる遺伝子は、SNPを通じて孤発性PDのリスクも付与しています。

Gaucher病の原因となるGBA遺伝子変異はまれなバリ

アントですが、我々がPD患者遺伝子の再シーケンシングを行ったところ、患者500例以上のうち50例がGaucher遺伝子変異の保因者でした。対照例のGaucher遺伝子保因者はわずか2例、オッズ比は28でした。したがって、Gaucher病遺伝子の変異はPDの危険因子である可能性があります。

図2は多因子疾患のモデルです。全部のブロックを合計すると、積み上げた高さが閾値に達し、患者は発症すると考えられます。 α -シヌクレインやLRRK2は非常に強力な因子で、たった1個の遺伝子変異でも発症の閾値に達してしまいます。しかし、患者数は非常に少ない。したがってブロックの幅が非常に狭いのです。Gaucher遺伝子はまれなバリエーションで、影響は中程度です。PD患者の約10%がGaucher病の原因となるGBA変異をもっているため幅が中程度になっています。シヌクレイン、LRRK2、BST1、およびPARK16のSNPによる影響は軽度ですが、ほとんどすべての患者がもっています。このように、遺伝的危険因子の中にも3種類あるといえます。



戸田 達史 先生

α -シヌクレインとシナプス機能

DLB, MSA, PDにおける
 α -シヌクレインの蓄積

高橋 最後に、望月先生から α -シヌクレインとシナプス機能についてお話しいただきます。

望月 レヴィ小体型認知症 (dementia with Lewy bodies: DLB), 多系統萎縮症 (multiple system atrophy: MSA), PDにおける α -シヌクレインの蓄積についてお話しさせていただきます。

Spillantiniら⁵⁾は切断 α -シヌクレインをもつトランスジェニックマウスを作成し、初期イベントとして線条体

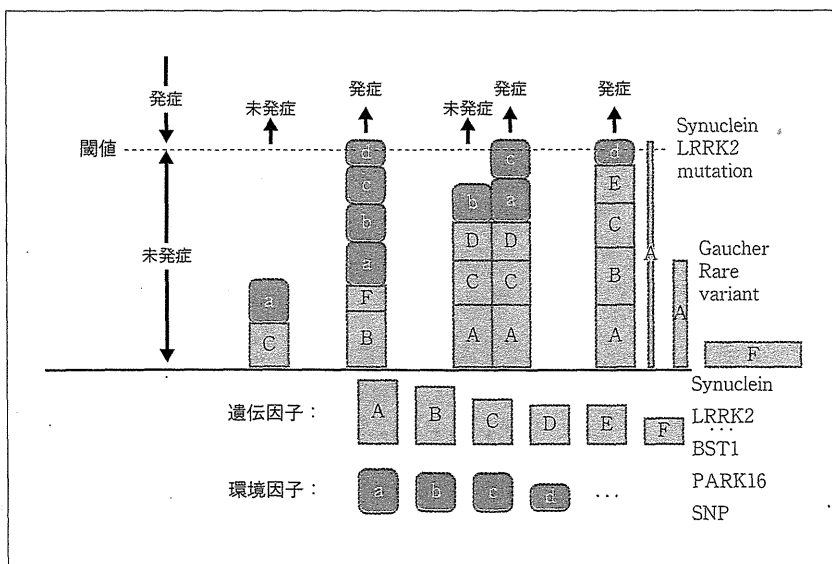


図2 多因子遺伝病のモデル



望月 秀樹 先生

内で SNARE 蛋白のひとつである SNAP-25 の再分布が起こっていることを示しました。その後 Burré ら⁶⁾ は α -, β -, γ -シヌクレインのトリプルノックアウトマウスからニューロンの培養を行い、レンチウイルスベクターを用いて α -シヌクレイン遺伝子を徐々に導入しました。このトリプルノックアウトマウスの培養細胞中の SNARE 複合体は、 α -シヌクレインとともに増大し、 α -シヌクレインが SNARE 複合体形成のエンハンサーとして機能している可能性を示唆しました。

そこで我々は、SNARE 複合体が α -シヌクレインの発現を調節している可能性に注目しました。SNAP-25 の条件突然変異をもつノックインマウスを作成し⁷⁾、SNARE 複合体と SNAP-25 を調べたところ、変異マウスでは SNAP-25 と SNARE 複合体が減少していました。

次に、これらのマウスにおける α -シヌクレインの発現に興味をもち、線条体における α -シヌクレインの免疫組織化学染色を行いました。11週では野生型マウスと変異マウスの間に差は認められませんが、60週では変異マウスの線条体に α -シヌクレインの蓄積を認めました。さらにウエスタンブロットにより、変異マウスの線条体において α -シヌクレインとリン酸化 α -シヌクレインがわずかに増大していることがわかりました。

ドパミン作動性ニューロンは黒質から線条体に向かって投射しているので、ドパミン作動性ニューロンと線条体における α -シヌクレインとドパミンの共局在に注目しました。皮質脊髄路と視床線条体神経路に着目し、それぞれのニューロンのシナプス小胞に特異的なグルタミン酸トランスポーターの、VGLUT1 と VGLUT2 を用いた免

疫組織化学法により調べました。その結果、 α -シヌクレインの蓄積は VGLUT1 陽性の神経突起内に限られ、皮質からのニューロンに特異的であることを明らかにしました。この結果は電子顕微鏡観察でも裏付けられました。

以上のことから、SNARE の機能不全により内在性の α -シヌクレインが皮質線条体系の神経終末に限って蓄積することが明らかになりました⁸⁾。Tong ら⁹⁾ は、PD、MSA、PSP、および家族性 PD 患者の線条体中の SNAP-25 を調べた結果、MSA 患者に限り、被殻における SNAP-25 含有量の減少を認めています。進行した MSA では皮質のニューロンに α -シヌクレインの蓄積が認められることから、MSA における SNAP-25 の減少により、皮質のニューロンに α -シヌクレインが蓄積したのではないかと推測されます。

総合討論

家族性 PD の研究の方向性について

高橋 PD 遺伝子の機能について、最新情報をたくさん聞かせていただきました。そこで、現段階ではどの遺伝子が一番重要で、PD の原因となっているか、Wszolek 先生のご意見をお伺いします。

Wszolek そうですね、歴史的には α -シヌクレインが孤発性症例のレヴィ小体と関連性があり、PD にも何らかの関係があるとされてきました。また、 α -シヌクレイン遺伝子の変異が PD の発症に繋がっている家族性症例も存在します。これは、 α -シヌクレインが PD の病因において重要な役割を果たしている証拠です。しかし α -シヌクレインが唯一の要因と言い切ることはできません。

GWAS 研究において、タウはほとんど常に存在し、マンハッタンプロットで α -シヌクレインをしのぐこともあるほど高いピークを示し、レヴィ小体を発現しています。今後、我々が見つけた蛋白質よりさらに重要な蛋白質が同定され、他の蛋白質や遺伝子との関係や繋がりが解明されていくことを期待しています。現在は未解決の問題がたくさん残っており、簡潔にお答えできない状況です。

坪井 PDの特徴は黒質の変性にありますが、それぞれの原因遺伝子の局在性は必ずしも黒質特異的とは限りません。どの遺伝子の場合も黒質が傷害されるのはなぜでしょうか。

Wszolek あらゆるPD様疾患において、黒質が影響を受けています。いずれの疾患においても、黒質におけるニューロンの消失とネクローシスが認められています。何らかの理由でニューロンが攻撃に対して脆弱になっているのでしょうか。攻撃にはMPTPのような環境因子によるものもあれば、我々が発見している遺伝子変異のような遺伝因子によるものもあります。たとえ疾患は異なっても共通点がひとつあって、それは黒質が影響を受けることです。理由は私にはわかりません。ノーベル賞級の難問ですね。

坪井 もう1つの可能性は、黒質特異的な未知の蛋白質でPD遺伝子と関係するものが存在することでしょう。

望月 そうでしょうね。未知の蛋白質を解明していけば、個々のPD遺伝子との関係がよりわかってくるでしょう。たくさんの経路を見つけていきたいですね。

高橋 見つけるなら最終的な共通経路を見つけないですかね。Wszolek先生、すべてのPDをひとつの疾患にまとめて扱えるとお考えでしょうか？ それとも分けたままにすべきでしょうか。

Wszolek ひとまとめにはできません。同じような機序を共有している可能性はあるでしょうが、異なった機序もっており、その結果それぞれが独自の病像を呈することになるでしょう。

高橋 本日は、PD遺伝子に関する最新知見について幅広いお話をいただきました。先生方、どうもありがとうございました。

REFERENCES

- 1) Perry TL, Bratty PJ, Hansen S, et al: Hereditary mental depression and Parkinsonism with taurine deficiency. *Arch Neurol* 32: 108-113, 1975
- 2) Tsuboi Y, Wszolek ZK, Kusahara T, et al: Japanese family with parkinsonism, depression, weight loss, and central hypoventilation. *Neurology* 58: 1025-1030, 2002
- 3) Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, et al: Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41: 1303-1307, 2009
- 4) MacLeod DA, Rhinn H, Kuwahara T, et al: RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk. *Neuron* 77: 425-439, 2013
- 5) Spillantini MG, Goedert M: The α -synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci* 920: 16-27, 2000
- 6) Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, et al: α -synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science* 329: 1663-1667, 2010
- 7) Kataoka M, Yamamori S, Suzuki E, et al: A single amino acid mutation in SNAP-25 induces anxiety-related behavior in mouse. *PLoS One* 6: e25158, 2011
- 8) Nakata Y, Yasuda T, Fukaya M, et al: Accumulation of α -synuclein triggered by presynaptic dysfunction. *J Neurosci* 32: 17186-17196, 2012
- 9) Tong J, Wong H, Guttman M, et al: Brain α -synuclein accumulation in multiple system atrophy, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: a comparative investigation. *Brain* 133: 172-188, 2010

神経疾患と遺伝子

Neurologic disorder and gene

佐竹 渉 Wataru Satake / 戸田達史 Tatsushi Toda

神経疾患の発症様式は、遺伝学的に、①明確な家族歴を示す単一遺伝性疾患（ハンチントン病、デュシェンヌ型筋ジストロフィーなど）、②一部には家族性発症もあるが大多数は孤発性に発症する多遺伝性疾患（パーキンソン病、アルツハイマー病など）、に大きく分けられる。本稿ではこれら神経疾患遺伝子の研究、臨床面での動向を示す。

■ 単一遺伝性の神経疾患

ほとんどの疾患で、原因不明で難攻不落であったが、1980年代になって状況は一変した。1983年、疾患原因遺伝子が染色体上のどこにあるかを遺伝学的に決め、遺伝子を単離するポジショナルクローニング法を用いて、ハンチントン病の原因遺伝子が4番染色体に存在することが報告された。これは、まったく手がかりのない疾患に対して遺伝学からアプローチできることを示した最初の例で、当時ニューヨークタイムズ紙の1面トップで報道され、強烈なインパクトを与えた。また、1986年には、ポジショナルクローニング法を用いて遺伝子単離まで成功した最初の例（厳密に言えば隣に存在する慢性肉芽腫症につき2番目）として、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子ジストロフィンが発見された。また、たとえばハンチントン病遺伝子ハンチンチンの発見がポリグルタミン病の疾患概念へつながるなど、遺伝子発見を突破口にして病態の解明が進んだ疾患も多く、神経疾患と遺伝子のかかわりは深い（詳細は各疾患項を参照されたい）。さらに最近では進展著しい次世代シーケンサー・エクソーム解読技術による全エクソン配列解読が可能となり、疾患遺伝子の同定がさらに加速している。

また、神経疾患は臨床検査としての遺伝子検査のニーズも高い。遺伝学的検査は2006

年に初めて保険収載されたが、その対象疾患はデュシェンヌ型・福山型筋ジストロフィーであった。現在では染色体検査以外に36疾患で保険収載されているが、そのなかには、表1のように、神経症状を示す疾患が多く含まれる。副腎白質ジストロフィー（酵素補充療法、骨髄移植）、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（エクソンスキッピング療法）、家族性アミロイドポリニューロパチー（肝移植）など有効な治療法の開発が進んでいる疾患もあり、今後は、治療の面でも遺伝子診断が重要となってこよう。

■ ほとんどが孤発性、まれに家族性に発症する神経疾患

パーキンソン病やアルツハイマー病は、頻度の高い神経変性疾患である。これら疾患は、非常にまれながら明確な疾患家系が存在し、その連鎖解析から単一遺伝性の疾患遺伝子同定が進んでいる。しかしながら、これら疾患の大多数は孤発性に発症し、一部（5%程度）にはなんらかの家族歴のある患者が存在する。こういった疾患を、“多遺伝性疾患”といい、複数の疾患リスク遺伝子がかかわり発症する。21世紀のゲノム科学の進展を応

表1 保険収載されている神経筋疾患

デュシェンヌ型筋ジストロフィー
ベッカー型筋ジストロフィー
福山型先天性筋ジストロフィー
家族性アミロイドーシス
脊髄性筋萎縮症
中枢神経白質形成異常症
(ペリツェウス・メルツバッヘル病)
ムコ多糖症I型
ムコ多糖症II型
ゴーシェ病
ファブリ病
ボンベ病
ハンチントン病
球脊髄性筋萎縮症
筋強直性ジストロフィーなど

(社会保険研究所：医科点数表の解釈。平成24年4月版、社会保険研究所、東京、2012より引用)

用し、一塩基多型 SNP を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) が可能となり、近年複数の孤発性リスク遺伝子が発見されている。

パーキンソン病

単一遺伝性については、 α -シヌクレイン、*LRRK2* (常染色体優性遺伝性)、*parkin*、*PINK1* (常染色体劣性遺伝性) が知られている。孤発性のリスク遺伝子として、日本人の大規模 GWAS (筆者ら) で、*PARK16*、*BST1*、 α -シヌクレイン、*LRRK2* が発見された。 α -シヌクレインタンパクは、パーキンソン病の病理的な特徴であるレビー小体の主要構成成分である。また *parkin* や *PINK1* は、パーキンソン病病態で重要なミトファジー (ミトコンドリアの分解・除去) に関与する。 α -シヌクレイン、*LRRK2* は、その変異により家族性の、多型により孤発性の発症リスクとなっている。まれな多型として、ゴーシェ病遺伝子 *GBA* のヘテロ変異があり、この変異を 2 アレル持つとゴーシェ病を発症するが、1 アレルではパーキンソン病の強いリスクとなる。このように、ひとことに疾患遺伝子といってもその発症への強弱や頻度は多様であり、非常にまれながら非常に強い疾患変異 (この場合、単一遺伝性疾患となる) も

あれば、疾患リスクとしては弱いが多数の患者に関係するもの (リスク遺伝子) もあり、その中間のもの (rare variant) も存在する。これらにより疾患の遺伝背景がつけられているわけである (図 1)。

アルツハイマー病

これまで 3 つの常染色体優性遺伝性の原因遺伝子 (*APP*、*PSEN1*、*PSEN2*) が同定されている。アルツハイマー病の病理的特徴である老人斑の主要成分はアミロイド β であるが、これは、*APP* が β セクレターゼ (*PSEN1*) と γ セクレターゼ (*PSEN2*) によって切り出されて生じたものである。また孤発性 AD のリスク遺伝子としては、アポリポタンパク E 遺伝子 (*APOE*) が重要である。*APOE* 遺伝子には 3 種類の多型 ($\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$) が存在するが、このうち $\epsilon 4$ が発症のリスク因子となる。*APOE* の病態へのかかわりは不明であるが、 $A\beta$ 凝集、脂質代謝、抗酸化作用などへの関与が示唆されている。また、最近の GWAS により、*BINI*、*CLU*、*ABCA7*、*CR1* などがリスク遺伝子として発見されており、その病態機序の解明が待たれる。

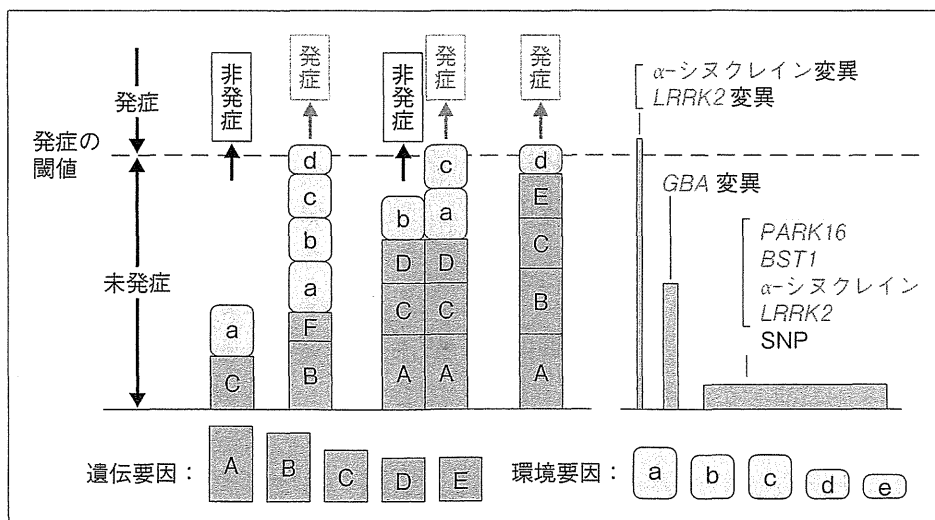


図 1 孤発性パーキンソン病のゲノム背景

パーキンソン病、アルツハイマー病、または生活習慣病を含むほとんどの疾患は、複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和が、ある閾値を超えたとき発症する多因子疾患と考えられている。メンデル遺伝性変異以外に、common variant として *PARK16*、*BST1*、 α -シヌクレイン、*LRRK2*、rare variant として *GBA* が重要である。

パーキンソン病の臨床遺伝学

戸田達史 (神戸大学大学院医学研究科神経内科学教授)

Point

- 連鎖解析などからメンデル遺伝性PD原因遺伝子(α -synuclein、parkin、LRRK2遺伝子など)が明らかにされ、ミトコンドリア障害、酸化ストレス障害の病態への関与に加え、ユビキチン・プロテアソーム系の機能低下、蛋白分解異常からドパミン細胞死に至る経路の重要性が示された。次世代シーケンサーによるエクソーム解析が展開されている。
- 患者の95%を占める孤発性PDは多因子遺伝性疾患である。ゲノムワイド関連解析により、PD発症に関わる2つの新しい遺伝子座PARK16、BST1、常染色体優性遺伝性PDの原因遺伝子SNCA、LRRK2が同定された。国際共同研究によるGWASメタ解析が行われ、より多くの感受性遺伝子が同定されている。
- ゴーシェ病変異も、頻度は低いが発症への寄与が大きいrare variantとして重要である。

パーキンソン病(PD)症例の90%以上は孤発性発症であるが、5~10%は家族性(その一部はメンデル遺伝性)に発症する。メンデル遺伝性PD家系の連鎖解析などから、6つのメンデル遺伝性PD原因遺伝子(α -synuclein、parkin、LRRK2遺伝子など)が明らかにされた。それらを切り口にして孤発性PDの病態解明が進んでおり、ミトコンドリア障害、酸化ストレス障害の病態への関与に加え、新たにユビキチン・プロテアソーム系の機能低下、つまり蛋白分解異常からドパミン細胞死に至る経路の重要性が示された¹⁾。

一方、ゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study; GWAS)が2007年ごろより実用的な戦略となり、現在多数の疾患でリスク遺伝子の発見が相次いでいる。

本稿では、PDの分子遺伝学について、家族性PDだけでなく孤発性PDのリスク遺伝子にも目を向け概説する。

●メンデル遺伝性PDの臨床遺伝学(表1)

PARK1/4(α -synuclein)

PARK1は α -synucleinの点変異により常染色体優性遺伝形式で発症する²⁾。家系により差はあるが、経過がやや早く、認知機能障害を伴い

シンボル	遺伝子座	遺伝形式	遺伝子	Lewy小体
PARK1、4	4q21	AD	<i>α-synuclein</i>	+
PARK2	6q25:2-q27	AR	<i>parkin</i>	-(+のこともあり)
PARK3	2p13	AD	?	+
PARK5	4p14	AD	<i>UCH-L1</i>	?
PARK6	1p35-p36	AR	<i>PINK1</i>	? (+のこともあり)
PARK7	1p36	AR	<i>DJ-1</i>	?
PARK8	12q12	AD	<i>LRRK2</i>	+/-
PARK9	1p36*	AR	<i>ATP13A2</i>	?
PARK11	2q36-37	AD	<i>GIGYF2</i>	?
PARK13	2p12	AD	<i>HtrA2/Omi</i>	?
PARK14	22q13.1	AR	<i>PLA2G6</i>	?
PARK15	22q12-q13	AR	<i>FBX07</i>	?
PARK17	16q11.2	AD	<i>VPS35</i>	+

表1 メンデル遺伝性PD(PARK遺伝子)

やすい点を除くと、孤発性PDに類似している。病理像は黒質の神経細胞脱落と、黒質、青斑核にLewy小体がみられ、皮質型Lewy小体も伴うことが多い。PARK1自体はまれな家系であるが、 α -シヌクレインがLewy小体の主要構成蛋白であることがわかって以来、PDの病因に大きく関与していることが推測されている。変異を起こした α -シヌクレインは異常リン酸化を認め、凝集傾向を亢進させ、Lewy小体形成を促進されることが推測されている。その凝集過程において毒性を発揮すると考えられている¹⁾。

PARK4は α -synucleinの重複(duplication、triplication)で発症する³⁾。triplicationは、発症年齢は若く、PD症状に加え認知機能障害を呈し、Lewy小体型認知症の特徴をもち、皮質型Lewy小体を認め、びまん性Lewy小体病の病理像を呈す。duplicationは孤発性PDに類似し、発症年齢はtriplicationよりも遅く、認知機能障害はある例とない例がある⁴⁾。 α -synucleinのgene dosageと重症度は相関することを示唆する。

PARK2/PARK6(*parkin*、*PINK1*)

*parkin*の変異により常染色体劣性遺伝形式で

若年発症するPDであり、わが国で臨床病型の報告と遺伝子単離がなされた⁵⁾。常染色体劣性遺伝性で若年発症であれば50%の症例で変異がみられ、わが国に比較的多い家族性PDである。臨床症状はパーキンソニズムに加え、下肢のジストニアがやや多く、日内変動や睡眠効果がみられる。少量のL-ドパにもよく反応する反面、L-ドパ誘発性ジスキネジアやwearing off現象が早期から出やすい。MIBG心筋シンチで取り込み低下がなく、病理学的にLewy小体はみられない。*parkin*はubiquitin ligase機能をもつことから、PDの原因にユビキチン-プロテアソーム系の異常が指摘されるようになった⁶⁾。

PARK6は*PINK1*の変異により常染色体劣性遺伝形式で若年発症し、PARK2と類似する⁷⁾。*PINK1*と*parkin*によるmitochondrial autophagy(ミトファジー)についての報告が注目されている。傷害されたミトコンドリアの外膜に、*PINK1*と*parkin*が細胞質から移行し、*PINK1*存在下で*parkin*はミトコンドリアにおいて何らかの蛋白質を基質としてユビキチン化する。そのユビキチン化蛋白質をp62蛋白質が認識し、オートファジーを誘導させ傷害ミトコンドリアを分解・除

去し、ミトコンドリアの品質を保つというメカニズムであり、この機構の破綻が孤発性PDの発症原因にも関与していることが考えられている^{8,9)}。

PARK8 (LRRK2)

常染色体優性PDの大家系が1978年にわが国から報告され、臨床症状は孤発性PDと類似している。この家系は第12染色体に連鎖し、PARK8として登録された。その後、2004年に原因遺伝子としてLRRK2遺伝子が同定された¹⁰⁾。その後、多種類の変異が報告されており、LRRK2遺伝子変異は優性遺伝性のPDのうち最も多く、5~15%に上ると推定されている。

LRRK2蛋白質は2,527個のアミノ酸からなる巨大な蛋白質であり、配列の解析から多くの機能性ドメインをもつことが判明してきた。活性の中心となる部位はGTP-binding Ras of complex (ROC)ドメイン、carboxy-terminal of ROCドメインとキナーゼドメインなどが中心となる。R1441C、R1441G、R1441H、Y1699C変異はGTPaseの活性を減少させる。G2019S変異はキナーゼ活性が上がる事が判明している。それ以外の部位にはleucine-rich repeatsとWDドメインが存在し、別の蛋白質と結合することが推定されている。

マイクロRNA(miRNA)は細胞内に存在する20~25塩基ほどの1本鎖RNAであり、相補的なmRNAと結合し、その蛋白生成を制御する機能をもつ。変異性LRRK2はmiRNAの翻訳阻害が不能となり、E2F1/DPという蛋白の過剰産生を引き起こす。E2F1/DP蛋白は細胞周期などに関与しており、これらの蛋白の過剰発現が神経細胞死を起こす可能性があることが報告された¹¹⁾。

PARK17 (VPS35)

近年、優性遺伝性PD家系のエクソーム解析により、VPS35遺伝子変異が同定された¹²⁾。VPS35はエンドゾームからゴルジ体への逆行輸送を司るレトロマー複合体のサブユニットの1つである。この変異により、蛋白質の適切なリサイク

ルが行われず、過剰に溜まってしまふことによつて、PDの一因となることが考えられる。

● 孤発性PDのリスク遺伝子

PDは多因子遺伝性疾患

症例的には大多数(95%)の孤発性PDの原因は現時点では不明であるが、環境因子と1つ1つは影響力の弱い遺伝因子(おそらく数10個)によつて成り、その総和が、ある閾値を超えたとき発症するという多因子疾患であると考えられている。アイスランド国民を対象とした大規模な疫学的調査の結果が発表され、同胞再発危険率は6.7で、PD発症には遺伝因子が影響していることが示された¹³⁾。

PDのゲノムワイド関連解析(GWAS)

われわれは、PDの遺伝リスク因子を明らかにしようとし、大規模の患者対照集団と、56万個の一塩基多型(SNP)を搭載したイルミナHap550アレイを用いて、GWASと、2つの独立な再現研究を行い、全検体(PD 2,011検体、対照18,381検体)の解析にて、絶対的な有意水準 $p < 5 \times 10^{-8}$ をクリアする4つのPD感受性遺伝子座をみいだした¹⁴⁾。

まず2つの新しいPD感受性座を、1q32(PARK16と命名、 $p = 1.52 \times 10^{-12}$)と4p15($p = 3.94 \times 10^{-9}$)に発見した。PARK16領域は、3つの遺伝子(NUCKS1、RAB7L1、SLC41A1)を含む連鎖不平衡ブロックである。また、4p15領域は、BST1のみを含んでいた。さらに、常染色体優性遺伝性PDの原因遺伝子である、 α -synuclein(4q22、 $p = 7.35 \times 10^{-17}$)とLRRK2(12q12、 $p = 2.72 \times 10^{-8}$)の領域を同定した。うち α -synucleinは最もp値が低く、孤発性PDのSNPとしては最強である。常染色体優性遺伝性PDの原因遺伝子が片や変異により遺伝性PDを引き起こし、片やSNP多型により孤発性PDにきいてくるのは、興味深い¹⁴⁾。

遺伝子座	多型	位置 (hg18)	マイナーアレル頻度	アレル	n (データセット)	n (全症例)	オッズ比 (95%CI)	p	I ² (95%CI)
<i>GBA</i>	N370S	chr1:153451576	0.01	G vs. A	15	44,851	3.51 (2.55-4.83)	1.44×10 ⁻¹⁴	38 (0-66)
<i>SYT11/RAB25</i>	chr1:154105678	chr1:154105678	0.02	T vs. C	6	17,300	1.73 (1.48-2.02)	2.35×10 ⁻¹²	0 (0-52)
<i>PARK16</i>	rs947211	chr1:204019288	0.23	A vs. G	12	69,262	0.91 (0.88-0.94)	8.00×10 ⁻¹⁰	0 (0-66)
<i>STK39</i>	rs2390669	chr2:168800188	0.13	C vs. A	14	35,159	1.19 (1.12-1.25)	1.37×10 ⁻⁰⁹	18 (0-56)
<i>MCCC1/LAMP3</i>	rs11711441	chr3:184303969	0.14	A vs. G	25	46,502	0.86 (0.82-0.91)	9.20×10 ⁻¹⁰	18 (0-50)
<i>DGKQ</i>	rs11248060	chr4:954359	0.12	T vs. C	10	57,716	1.21 (1.15-1.27)	3.04×10 ⁻¹²	11 (0-52)
<i>BST1</i>	rs11724635	chr4:15346199	0.43	C vs. A	26	46,586	0.88 (0.84-0.91)	1.87×10 ⁻¹⁰	43 (10-64)
<i>SNCA</i>	rs356219	chr4:90856624	0.41	G vs. A	31	79,494	1.29 (1.25-1.33)	6.06×10 ⁻⁶⁵	16 (0-46)
<i>ITGA8</i>	rs7077361	chr10:15601549	0.12	C vs. T	11	61,036	0.88 (0.84-0.92)	1.51×10 ⁻⁰⁸	0 (0-55)
<i>LRRK2</i>	rs1491942	chr12:38907075	0.21	G vs. C	21	34,123	1.17 (1.13-1.22)	6.44×10 ⁻¹⁵	0 (0-38)
<i>CCDC62/HIP1R</i>	rs10847864	chr12:121892551	0.39	T vs. G	23	38,367	1.15 (1.11-1.18)	4.37×10 ⁻¹⁷	0 (0-35)
<i>MAPT/STH H1H2</i>		chr17:4213181841149582	0.20	H2 vs. H1	37	50,389	0.78 (0.75-0.80)	7.97×10 ⁻⁵²	0 (0-29)

表2 現在のところの最大規模のGWASのメタ解析によるPDリスク遺伝子のリスト(文献15より引用)

さらにLillらは、各国のGWASを集めてメタ解析(メタGWAS)を行い(計患者16,452名、対照48,810名)、新規に*ITGA8*(インテグリンα8遺伝子)を同定した。表2に示したものが計12個となり、現在のところのPDリスク遺伝子のリストといえよう(表2)¹⁵⁾。

リスクSNPと病態との関連性

これらの同定されたリスク遺伝子の病態との関連はまだほとんどわかっていない。まずなぜα-synucleinの3'非翻訳領域のSNPが疾患の発症にかかわるのか？ われわれは転写因子YY1がSNPのアレル特異的にその領域に結合し、SNCAおよび逆向きに存在するnoncoding RNAの量に関係することを示した¹⁶⁾。

*PARK16*領域には、先述した3つの遺伝子が存在するが、最近これら3つのうち低分子量GTPアーゼファミリーで空胞輸送に関係する*RAB7L1*が患者脳での発現が低下していること、*LRRK2*変異パーキンソンモデルの表現型をレスキューし、エンドゾームからゴルジ体への逆行輸送を司るレトロマーに関連すること、この異常は別なまれな家族性PDの病因遺伝子の産物であるレトロマー複合体のサブユニットの1つ、VPS35の発現により回復することが示された¹⁷⁾。

まれな多型(rare variant)とゴーシェ病遺伝子*GBA*

ゴーシェ病は、常染色体劣性遺伝性疾患で、リソソーム内酵素グルコセブレロシダーゼ(*GBA*)

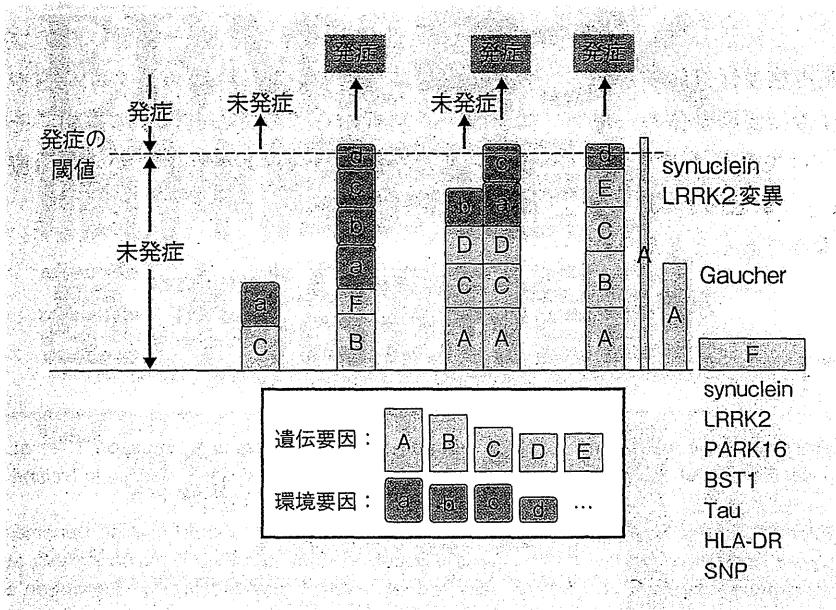


図1 孤発性PDは多遺伝子遺伝性疾患

PD、アルツハイマー病、または生活習慣病を含むほとんどの疾患は、複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和が、ある閾値を超えたとき発症すると考えられている。メンデル遺伝性変異以外に、common variantとして α -シヌクレイン、PARK16、BST1、LRRK2、Tau、HLA-DRのSNPが、またrare variantとしてゴーシェ遺伝子が重要。

の変異による酵素活性低下により、グルコシルセラミドが体内に蓄積し、肝脾腫、貧血などを引き起こす脂質代謝異常症である。

1990年代後半からPD症状を合併するゴーシェ病患者の存在や、ゴーシェ病家系内にPD患者が多発するとの報告が散見されていた。ユダヤ人のPD患者について孤発性PD群では、*GBA* 変異のヘテロ保因者が対照群に比べ有意に多く、*GBA* が孤発性PDのリスク遺伝子であることが報告された¹⁸⁾。その後、この研究の再現研究が世界中で行われ、*GBA* 変異が日本人でもPD感受性をもつことが示され、*GBA* 遺伝子変異をヘテロでもつ保因者はPD患者534名中50名(9.4%)、対照544名中2名(0.37%)であり、PDと*GBA* 変異は強く関連していた($p = 6.9 \times 10^{-14}$ 、オッズ比28.0)¹⁹⁾。世界多施設共同研究で、計約10,000名の患者対照集団とのメタ解析により、原著のユダヤ人に限らず、どの人種でも*GBA* 遺伝子はリスクとなり、平均オッズ比は5であり、確実なPDリスク遺伝子であることが示された²⁰⁾。

*GBA*の基質であるグルコシルセラミドの蓄積により、神経毒性をもつとされる可溶性 α -シヌクレインオリゴマーが増加すること、可溶性 α -

シヌクレインオリゴマーの増加により*GBA*の小胞体-ゴルジ輸送が阻害されることによりさらに*GBA*活性が低下し、可溶性 α -シヌクレインオリゴマーのさらなる増加につながる、といったポジティブフィードバックの経路が報告された²¹⁾。さらに*GBA*変異をもつPD患者だけでなく、もたない孤発性PD患者でも*GBA*活性が低下していることが示され興味深い²²⁾。

PDのゲノム背景

PD、アルツハイマー病、または生活習慣病を含むほとんどの疾患は、複数の遺伝因子と複数の環境因子の積み木の総和がある閾値を超えたとき発症すると考えられている。そのモデルを図1に示す。メンデル遺伝性PDを引き起こす α -synucleinや*LRRK2*の変異はそれ1つだけで閾値に到達し発症するが、対象患者はほとんど存在しないので積み木の幅はとても狭い(とてもまれ)。ゴーシェ病遺伝子*GBA*などのrare variantリスクは中等度の高さをもつが、10%以下の患者にしか当てはまらないため幅は狭い。一方、SNPはそれ自体のオッズ比は低いが多量の患者に当てはまるため、積み木の幅は広い。い

ずれも重要である(図1)。

GWASによって多数の疾患感受性遺伝子が同定されたものの、それらは遺伝要因全体の一部しか説明できないことから(失われた遺伝性、missing heritability)、ゴーシェ病遺伝子 *GBA* などの rare variant リスクが重要であると考えられ

ており、次世代シーケンサーを用いたアプローチが展開されている。今後のメタGWASやエクソーム解析からさらなる遺伝子の解明、そこから新たな疾患バリエーションとそこから治療薬開発が期待される。

文献

- 1) Farrer MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 306-18.
- 2) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-7.
- 3) Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al. α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841.
- 4) Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, et al. Clinical heterogeneity of α -synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 298-309.
- 5) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605-8.
- 6) Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25: 302-5.
- 7) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304: 1158-60.
- 8) Matsuda N, Sato S, Shiba K, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin to mitophagy. *J Cell Biol* 2010; 189: 211-21.
- 9) Okatsu K, Oka T, Iguchi M, et al. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun* 2012; 3: 1016.
- 10) Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004; 44: 601-7.
- 11) Gehrke S, Imai Y, Sokol N, et al. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* 2010; 466: 637-41.
- 12) Vilarino-Guell C, Wider C, Ross OA, et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 162-7.
- 13) Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, et al. Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 2000; 343: 1765-70.
- 14) Satake W, Nakayabashi Y, Mizuta I, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 2009; 41: 1303-7.
- 15) Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, et al. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002548.
- 16) Mizuta I, Takafuji K, Ando Y, et al. YY1 binds to α -synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. *J Hum Genet* (in press).
- 17) MacLeod DA, Rhinn H, Kuwahara T, et al. RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk. *Neuron* 2013; 77: 425-39.
- 18) Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2004; 351: 1972-7.
- 19) Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, et al. Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 2009; 66: 571-6.
- 20) Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009; 361: 1651-61.
- 21) Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 2011; 146: 37-52.
- 22) Gegg ME, Burke D, Heales SJ, et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol* 2012; 72: 455-63.

福山型筋ジストロフィーの病的スプライシング異常とアンチセンス療法

谷口 (池田) 真理子, 小林千浩, 戸田達史

福山型筋ジストロフィー (FCMD) は日本に多い重症の神経・筋疾患であり治療法がない。ほとんどのFCMD患者は、原因遺伝子の3'非翻訳領域にSVA型レトロトランスポソンの挿入をもつが発症機序は不明であった。われわれはFCMDがSVA挿入に誘導されるスプライシング異常症であることを見出し、異常スプライシングを制御するアンチセンス核酸の投与により患者細胞およびモデルマウスでの治療に成功した。

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は日本特有の疾患であり先天性筋ジストロフィー、II型滑脳症、眼奇形の3症状を示す常染色体劣性の遺伝性疾患である¹⁾。日本で2番目に多い小児の筋疾患で10代のうちに死にいたる重篤な疾患だが根本的治療法がない。われわれのグループはFCMDの疾患責任遺伝子であるフクチン (fukutin) を1998年にポジショナルクローニング法により同定した²⁾。ほとんどの患者は、フクチンの3'非翻訳領域に、動く遺伝子である約3 kbのSVA (SINE-VNTR-Alu) 型レトロトランスポソンの挿入型変異を認める。この変異は約100世代前、日本人祖先の1人に生じたとされ、現在日本人の88人に1人が保因者であり、約3万出生に1人発症する。また糖転移酵素POMGnT1が類縁疾患muscle-eye-brain病の原因であることを明らかにし³⁾、これら患者の骨格筋では細胞膜と基底膜をつなぐ糖タンパク質 α -ジストログリカン (α DG) のO-マンノース型糖鎖修飾に欠損があり、この糖鎖を介する細胞膜-基底膜間の結合が破綻するために重度の筋ジストロフィーが発症するこ

とも明らかにされた⁴⁾。フクチンタンパク質はゴルジ体に局在し、既知の糖転移酵素とのアミノ酸配列相同性より α DGの糖鎖修飾に関与する糖転移酵素ではないかと考えられているが、その機能を含め未知である。またFCMDの発症機序も未解明のままであった。

FCMDはスプライシング異常症である

フクチンは10個のエクソンと長い3'非翻訳領域 (3'-UTR) をもつ。ほとんどのFCMD患者は、原因遺伝子の3'非翻訳領域にSVA型レトロトランスポソン (以降SVA) の挿入をもつ。過去のデータではノーザンハイブリダイゼーション法によっては患者のフクチンmRNAは検出されなかった²⁾。そこで今回われわれは、フクチン内の全エクソン、SVA挿入配列、および3'-UTR領域の全域にわたる発現解析を再度検証し対照と比較した。その結果、フクチンの5'側の翻訳領域部分、および3'-UTRのうちSVA挿入配列3'側の遺伝子発現は対照と患者間でほとんど変化がない一方、

Pathogenic splicing and antisense therapy in Fukuyama muscular dystrophy

Mariko Taniguchi-Ikeda^{1) 2)} / Kazuhiro Kobayashi¹⁾ / Tatsushi Toda¹⁾ : Department of Neurology/Molecular Brain Science, Kobe University Graduate School of Medicine¹⁾ / Department of General Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine²⁾ (神戸大学大学院医学研究科神経内科学/分子脳科学¹⁾ / 神戸大学大学院医学研究科小児科こども急性疾患学²⁾)

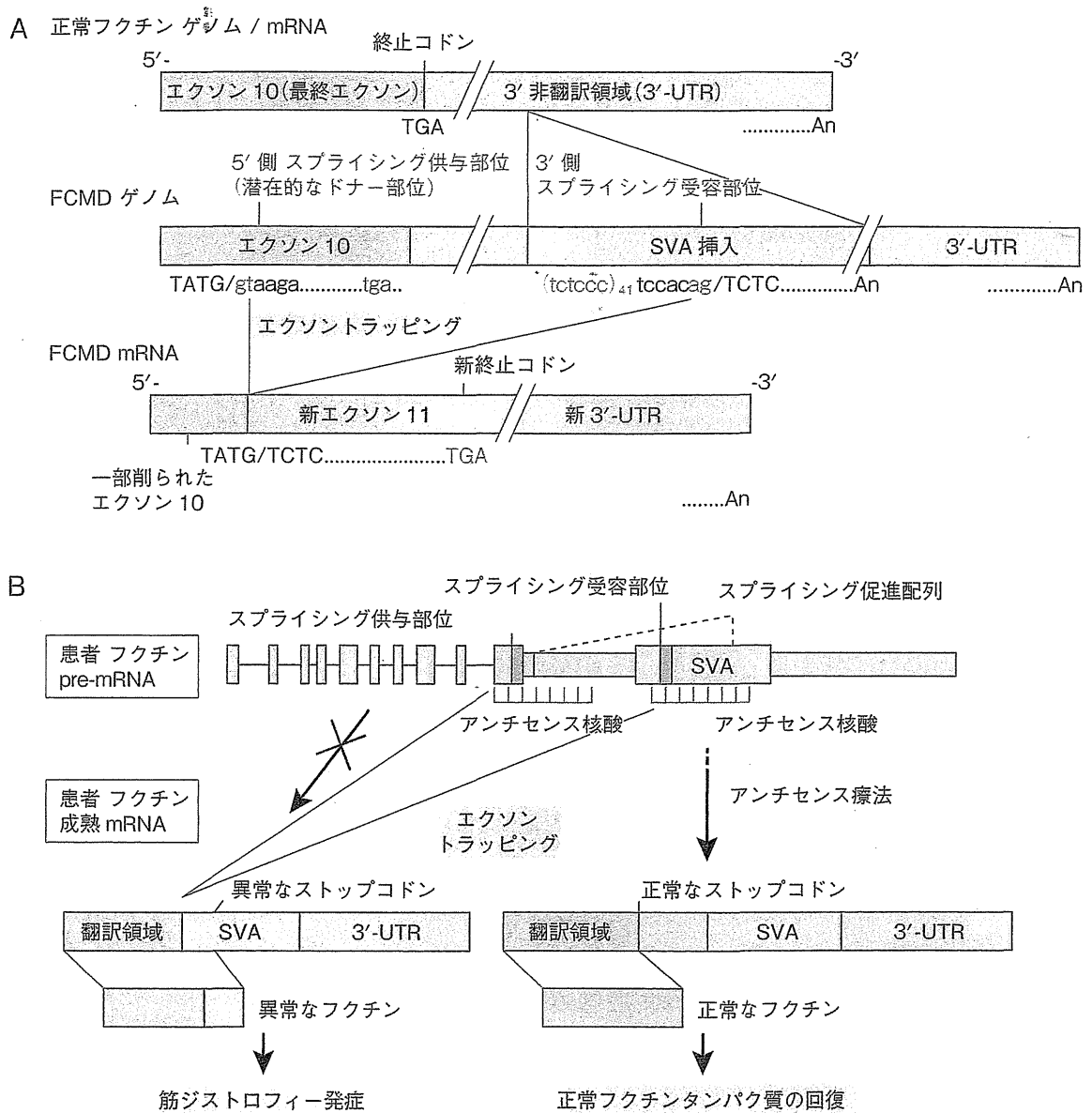


図1 FCMDのSVA型レトロトランスポゾン挿入によるエクソントラッピングがもたらすスプライシング異常とアンチセンス治療の構想

A) FCMDではSVA内の強力な3'側スプライシング受容部位により最終エクソン内の潜在的ドナー部位が強力に活性化されエクソントラッピングが起きスプライシング異常をひき起こす。B) 異常スプライシングを促進する配列に相補的なアンチセンス核酸を設計し、スプライシング配列をマスクすることにより異常スプライシングを阻止する

その配列に挟まれる領域での遺伝子発現は患者でのみ激減していた。よって、患者のmRNAでは翻訳領域およびSVAの挿入のあいだのどこかでスプライシングが起きているのではないかと考えた。そこで、発現の激減している配列をはさむ部分にPCRプライマーを設計し、患者および対照のmRNA由来のcDNAを鋳型にPCRを行ったところ患者特異的に対照よりも短い遺伝子産物を検出した。この遺伝子産物の塩基配列の解析

より、やはり患者ではフクチン mRNAが異常なスプライシングを受けていたことがわかった。この異常スプライシングは、SVA挿入配列内に存在する強力なスプライシング受容部位が、タンパク質をコードする最終エクソン内の潜在的なスプライシング供与部位を新たに活性化すること(エクソントラッピング)が原因となっていた(図1A)⁵⁾。次にこの異常スプライシング由来の配列をもつコンストラクトを作製し、HeLa細胞

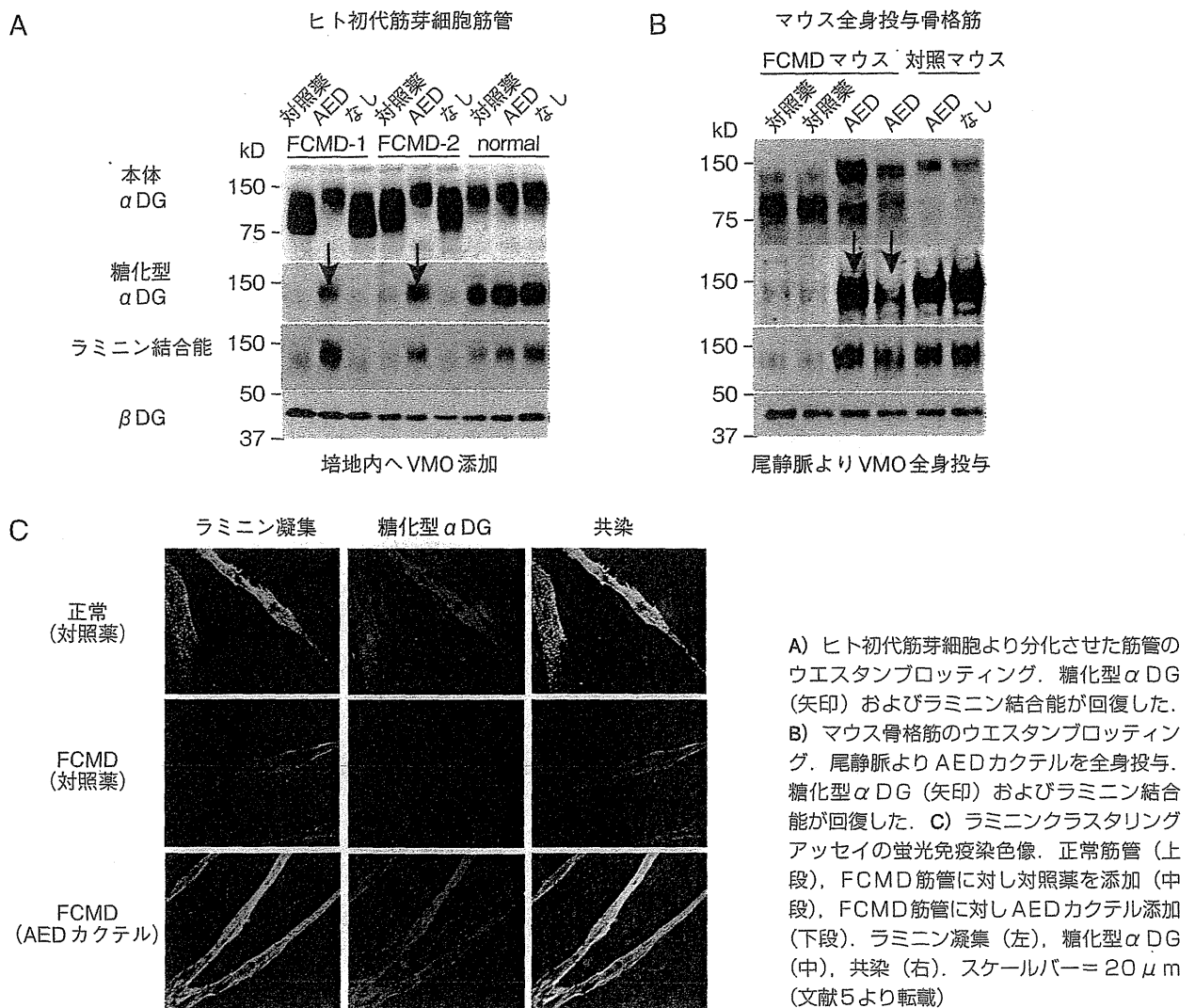


図2 FCMDに対するAEDカクテル療法によりヒト筋管およびマウス骨格筋において α DGの糖化およびラミニン結合能が回復した

へ導入し強制発現させたところ、スプライシング由来のフクチンの局在が、正常においてみられるゴルジ体局在から小胞体へ変化していた。これらより、FCMDはSVAのエクソントラップ機能がもたらすスプライシング異常症であることが証明された⁵⁾。

SVAによるエクソントラッピングとヒトの進化、多様性、疾患

次にわれわれは、SVA挿入を認める他の2つの遺伝性疾患、1つは原因遺伝子*LDLRAP1*のイントロン1に約2.6 kbのセンス鎖のSVA配列が挿入されている常染色体劣性遺伝性高コレステロール血症、もう1つは原因遺伝子*PNPLA2*のエクソン3内に約1.9 kbのセン

ス鎖のSVA配列の挿入を認める中性脂肪蓄積ミオパチーにおいてFCMDと同様のエクソントラッピングを確認した。またチンパンジーにはないヒト特異的なSVA挿入を認める新規遺伝子(*AB627340*)のエクソントラッピング由来の遺伝子産物をヒト脳において同定した。SVAは進化的に最も新しいレトロトランスポゾンであり、霊長類に特異的である。そしてゲノムのなかで進化とともにその数が増し、ヒトには約2,700コピー存在するといわれている⁶⁾。SVAがエクソントラッピングにより、新たな機能をヒト脳において獲得し、進化や脳の高次脳機能獲得に関与しているかもしれない。よってエクソントラッピングはヒトの疾患だけでなく進化、多様性にも関与している可能性があり

非常に興味深い結果であった⁵⁾。

FCMD に対するアンチセンス療法

SVA が挿入された患者のフクチンは、異常スプライシングさえ受けなければ、正常のフクチンをコードする正常なエクソン配列をもっている。そこで、この異常スプライシングを阻止する目的で、異常スプライシングの標的配列に対し、アンチセンス核酸を pre-mRNA レベルで結合させ、正常なスプライシングに戻す、「アンチセンス療法」が有効ではないかと考えた (図 1 B)。そこで、これらの標的配列に対し有効なアンチセンス核酸を網羅的に設計し、さまざまな細胞系に投与しスプライシングの是正を検討し、アンチセンス核酸のカクテル、AED (以降 AED カクテル) を選出した。次にわれわれはビボモルフォリノ (octa-guanidine morpholino : VMO) というアンチセンス核酸を用い、AED カクテルをモデル動物および患者細胞に投与し治療効果を検討した。患者筋芽細胞に対し、AED カクテルを投与したところ、非投与マウスと比較し、糖鎖の回復を示唆する糖化型 α DG の分子量の劇的な増加がみられた (図 2 A)⁵⁾。また尾静脈経由のモデルマウスへの AED カクテル全身投与においても、Oマンノース型糖鎖の劇的な回復がみられた (図 2 B)⁵⁾。最後に、患者由来筋芽細胞を使い AED カクテル投与によるラミニン凝集アッセイを行った。患者筋芽細胞では筋管での α DG の発現は激減している。しかし AED カクテル投与により、患者由来の筋管は α DG の糖鎖が正常レベルに回復し、正常と同程度の典型的なラミニンの凝集が観察された (図 2 C)⁵⁾。これらの結果は AED カクテル投与により、筋管が機能的にも回復したことを示唆する。

アンチセンス核酸を用いたスプライシング操作を標的とした治療法の 1 つに、もっとも頻度の高い筋ジストロフィーであるデュシェンヌ型筋ジストロフィーに対するエクソンスキップ療法があげられる。この治療法は現在国際治験が進行しており最も実現可能な治療薬剤として注目されている⁷⁾。FCMD に対するアンチセンス療法は、日本のすべての FCMD の患者を対象に同一の方法で行えるものであり、今後医療応用の実現を目指したい⁵⁾。

おわりに

現時点では、このアンチセンス療法は脳や心筋組織への移行が困難である点、また脳の形成異常を治療するためには胎児治療が必要になる点など、解決すべき問題が多いが、まずは筋力を回復する治療が実現され、患者およびその家族の QOL の上昇につながればと考える。今後は臨床応用の実現にむけ、核酸化合物の至適化や毒性試験などを行う予定である。また SVA 挿入が同様の機序で引き起こす疾患や、この機序がヒトの進化、多様性、疾患を生み出すレトロトランスポソンの機能解明に関しても興味深いデータが得られ、さらなる研究の発展につながることを期待したい。

文献

- 1) Fukuyama, Y. et al. : Congenital progressive muscular dystrophy of the Fukuyama type - clinical, genetic and pathological considerations. *Brain Dev.*, 3 : 1-29, 1981
- 2) Kobayashi, K. et al. : An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*, 394 : 388-392, 1998
- 3) Yoshida, A. et al. : Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell*, 1 : 717-724, 2001
- 4) Michele, D. E. et al. : Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*, 418 : 417-422, 2002
- 5) Taniguchi-Ikeda, M. et al. : Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature*, 478 : 127-131, 2011
- 6) Cordaux, R. & Batzer, M. A. : The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Rev. Genet.*, 10 : 691-703, 2009
- 7) Goemans, N. M. et al. : Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. M.*, 364 : 1513-1522, 2011

● 筆頭著者プロフィール ●

谷口 (池田) 真理子 : 1997 年、高知大学医学部卒業、大阪大学医学部小児科入局、2001 年、小児科専門医。'05 年、日本人類遺伝学会認定臨床遺伝専門医。'06 年 3 月、大阪大学医学部博士課程修了 (戸田達史教授)。'06 年 4 月～大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学教室 (同教授) 特任研究員。'08 年 10 月～大阪大学大学院グローバル COE オルガネラネットワーク医学創成プログラム (同教授) 特任助教。'10 年 3 月～現在、神戸大学小児科子ども急性疾患学講座特命助教 (竹島泰弘教授)、神経内科学/分子脳科学 研究員兼任 (戸田達史教授)。

4 福山型筋ジストロフィー の分子標的治療

とだ たつし 1)
 ■ 戸田 達史
 たにぐち いけだ まりこ 1,2)
 谷口(池田) 真理子
 こばやし かずひろ 1)
 小林 千浩

1) 神戸大学大学院医学研究科 神経内科学 / 分子脳科学
 2) 神戸大学大学院医学研究科 こども急性疾患学



戸田 達史
 1985年 東京大学医学部卒業
 神経内科入局
 1994年 東京大学人類遺伝学助手
 1996年 東京大学医科学研究所助教授
 2000年 大阪大学臨床遺伝学教授
 2008年 神戸大学神経内科学/
 分子脳科学教授
 日本人類遺伝学会賞, 日本神経学会賞,
 朝日賞, 文部科学大臣表彰
 研究テーマ: 神経疾患の分子遺伝学・治療

Key words : 福山型筋ジストロフィー, エクソントラッピング,
 アンチセンス治療, ジストログリカノパチー

Abstract

福山型筋ジストロフィー (FCMD) は日本に多い重症の神経・筋疾患であり治療法がない。殆どのFCMD患者は、原因遺伝子の3'非翻訳領域にSVA型レトロトランスポソンの挿入を持つが発症機序は不明であった。我々はFCMDがSVA挿入に誘導されるスプライシング異常症であることを見出し、異常スプライシングを制御するアンチセンス核酸の投与により患者細胞及びモデルマウスでの治療に成功した。

はじめに

福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy; FCMD) は1960年福山らにより発見された常染色体劣性遺伝疾患である。わが国の小児期筋ジストロフィー中ではデュシャンヌ型の次に多く、日本人の約90人に1人が保因者とされる。日本に1,000～2,000人位の患者が存在すると推定され、日本人特有の疾患とされていたが、近年海外からの報告が相次いでいる。本症は重度の筋ジストロフィー病変とともに、多小脳回を基本とする高度の脳奇形(数石(2型)滑脳症)が

共存し、さらに最近では近視、白内障、視神経低形成、網膜剥離などの眼症状も注目されている。すなわち本症は遺伝子異常により骨格筋-眼-脳を中心に侵す一系統疾患である¹⁾。われわれは最近、福山型筋ジストロフィーの根本的治療法につながる分子メカニズムと治療法を発見した²⁾。本稿では、福山型の新たな分子病態、治療戦略を中心に解説する。

1. フクチン遺伝子と SVA型レトロトランスポソン挿入

我々はポジショナルクローニングにより原因遺伝子を同定し、遺伝子産物をフクチンと命名した³⁾。正常型のフクチンcDNAは約7kbで、骨格筋、心筋、脳で優位に発現している。ほとんどの患者ゲノムDNAでみられた約3kbの挿入配列は、この遺伝子の3'非翻訳領域に挿入されていた「利己的」な動く遺伝因子であるSVA型レトロトランスポソンであった。古代から伝わったレトロトランスポソンがヒトの遺伝性疾患の原因であることがわかったのは世界で初めてである。日本人患者のほとんどすべては、レトロトランスポソン挿入型染色体のホモ接合体、または挿入型染色体と他の変異(フレームシフト、ノンセンス、ミスセンスなど)との複合へ

Molecular targeting therapy for Fukuyama muscular dystrophy :
 Tatsushi Toda¹⁾, Mariko Taniguchi-Ikeda^{1,2)}, Kazuhiro Kobayashi¹⁾,
 Divisions of Neurology/Molecular Brain Science¹⁾, General Pediatrics²⁾, Kobe University Graduate School of Medicine