

孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テーラーメイド研究
研究代表者 戸田達史 神戸大学大学院医学研究科神経内科 教授

研究要旨

rs356219 は ncRNA/SNCA の発現調節を介して PD 感受性に関与する可能性がある。なるべく多くの孤発例のエクソームシーケンスを行い、新規の rare variant の発見を目指した。ゲノムワイド SNPs Array による連鎖解析と全エクソン解析を行うことで、PD の原因遺伝子を同時に複数単離することが可能である。パーキンソン病における衝動性障害スクリーニング質問票 (QUIP) の日本語版作成と妥当性の検証を行った。運用には臨床心理士の関与が望ましいと考えられた。ICD は PD 患者の 27% に認められ、病型分類の要素として有用であると考えられた。MoCA は MMSE では十分に明らかに出来ない異なった大脳皮質の認知機能を検出できる可能性があると考えられた、MoCA の有用性の検証がさらに多数例で行われる必要がある。

研究分担者

服部 信孝 順天堂大学脳神経内科・主任教授
村田 美穂 国立精神・神経センター病院・部長
山本 光利 高松神経内科クリニック・院長
(前 香川県立中央病院神経内科・主任部長)

ら、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 -synuclein や parkin 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ほとんど証明されていない。

A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) は、中高年に発症し、ドパミンニューロンの変性により振戦、筋固縮など運動障害を主症状とするアルツハイマー病とともに多い神経変性疾患であり、我が国には現在約 14 万人以上の患者がいるが、加齢に伴い発症率が増すため今後の患者の増加が予想される。神経変性疾患としては唯一治療薬が豊富であるが、多くの薬剤はドパミンの補充が主体であり根本的な治療ではなく、真の原因や発症の引き金を突きとめることが重要である。

PD における遺伝子の重要性は意見が分かっていたが、近年になって一卵性双生児の疾患一致率が約 60% もあり二卵性の約 3 倍、他などが

一方で孤発例では、精神症状を起こす群、抗パ剤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それには卓越した専門家の目が必要であり、また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テーラ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) 全ゲノム関連解析を行い、疾患感受性遺伝子を数 10 個同定する、2) 超高速シーケンサーを用いたメンデル型原因遺伝子、Rare variant の同定を目指す、3) 同時に日本で発見された抗パーキンソン薬ゾニサミドを中心に抗パーキンソン薬の反応性、副作用

と SNP の関連を明らかにしテラーメイド治療法を確立する、4) 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。

B. 研究方法 C. 研究結果

-synuclein 3' -flanking SNP の孤発性パーキンソン病感受性への機序に関する研究 (戸田)
-synuclein(SNCA) は孤発性パーキンソン病 (PD) の感受性遺伝子であるが、多型が疾患感受性に関与する機序については未だに解明されていない。我々は、*SNCA 3' -flanking* SNP rs356219 において、*in vitro* で allele 特異的な効果を見だし、protective allele に結合する転写因子を同定した。本研究では、この転写因子を SH-SY5Y 細胞に強制発現して *SNCA* および *SNCA* 下流に存在する antisense noncoding RNA (ncRNA) の発現を real-time RT-PCR で解析した。その結果、*SNCA* 発現レベルはほとんど変化しないが、ncRNA 発現レベルは数十倍に上昇した。さらに剖検脳 (前頭葉: Lewy body 群 21 例、対照群 18 例) における *SNCA*、ncRNA の発現レベルと rs356219 genotype との関連を調べた。rs356219 の disease allele が増えるほど *SNCA* 発現レベルは上昇する傾向を示したが、ncRNA については allele との関連性は殆ど見られなかった。*SNCA* と ncRNA の coexpression は、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

孤発性・家族性パーキンソン病の高速シーケンスによる解析 (戸田)
家族性パーキンソン病の研究を更に発展させるべく、既知の原因遺伝子変異を見つけていない、さらに 50 家系以上のパーキンソン病家族例を、次世代シーケンサーでエクソーム配列を解析し、新規のメンデル遺伝性パーキンソン病原因遺

伝子を発見することを行った。またパーキンソン病において rare variant はリスク遺伝子として重要な位置を占めるとされるため、なるべく多くの孤発例のエクソームシーケンスを行い、新規の rare variant の発見を目指した。

原因遺伝子が未知の常染色体劣性晩発性 PD 家系遺伝子 (服部)
パーキンソン病 (PD) のテラーメイド医療を実現するために、標的となる遺伝子を単離する目的で 2 家系の常染色体劣性遺伝性 PD についてゲノムワイド連鎖解析および全エクソン解析を実施した。連鎖解析の結果、2 家系の候補原因遺伝子領域を同定することに成功した。対象の 2 家系は同一地域出身で臨床的・遺伝学的考察から同一祖先であると考えられたが、同定した候補領域はそれぞれ異なる染色体に位置していた。したがって、本研究でもちいた解析手法によって複数の PD 原因遺伝子を同時に単離可能であることが示唆された。

パーキンソン病における衝動性障害スクリーニング質問票 (QUIP) の日本語版作成と妥当性の検証 (村田)
パーキンソン病の層別分類の指標として非運動症状のうちとくに衝動性障害 (ICD) に注目し、スクリーニング質問紙法の QUIP (Questionnaire for Impulsive-Compulsive Disorders in Parkinson's disease) の日本語版を作成し、パーキンソン病患者 118 人を対象に構造化面接により妥当性を検証した。病的賭博については、感度/特異度/positive predictive value (PPV)/area under the curve (AUC) は、病的賭博 0.71/0.95/0.5/0.84 と妥当性を検証できた。何等かの ICD は 27% に認め、層別解析の指標の一つになると考えられた。

パーキンソン病における認知障害検出方法の検討 (MoCA, MMSE の比較) (山本)

パーキンソン病 (PD) における認知症の早期診断と検出は療養生活上重要であるので、臨床診断としてモントリオール認知機能評価票 (MoCA) とミニメンタルステート (MMSE) の有用性を検討した対象となった PD 患者数は 145 例であった。MoCA と MMSE の間には有意な正の相関を認めた ($r=0.70$, $p<0.01$) が、両者の得点は MoCA 平均得点 = 23.7 ± 4.0 , MMSE 平均得点 = 28.5 ± 2.3 であり MoCA の点数は MMSE と比較して有意に低く、両者は異なった認知機能を検出する可能性が示唆された。

D. 考察

H-SY5Y の実験結果と、既報告のルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイの結果を合わせると、転写因子が rs356219 の protective allele に結合して ncRNA の発現を刺激したと推測される。剖検脳において ncRNA 発現レベルと genotype との関連性が見いだせなかった点については、剖検脳では転写因子を強制発現するような動的な変化を調べることが困難であり、そのため allele との関連性が検出できない可能性があると考えられる。antisense ncRNA に関する最近の知見によると (Nat Rev Mol Cell Biol 10:637;2009)、今回解析対象とした ncRNA が SNCA 発現に何らかの影響を及ぼす可能性は十分にある。剖検脳における SNCA と ncRNA の coexpression は、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

本研究では同一地域出身で、臨床的・遺伝学的に類似した 2 家系について同一祖先であると仮説し分子遺伝学的解析を実施した。しかしながら、この 2 家系は同一祖先ではない事が明らかになった。このことは、本研究で行った解析手法をもちいることで、複数の PD 原因遺伝子を同時に単離可能であることを示唆する。PD は複数の遺伝的素因と環境因子が複合的に関与し発症すると考えられている。本研究では原因遺伝子単離には至らなかったが、テーラーメイド医療の標的となる

遺伝子の単離を目指す本研究において重要な知見を得た。

QUIP の感度が十分でなかった理由としては、質問紙の文章の理解不足、患者の病識不足、隠ぺい特性などが考えられた。趣味への没頭などは本人は問題行動とは考えていないために比較的抽出しうやすいが、賭博や、性的逸脱行動については、隠す傾向にあり、注意深く、適切な面接技法が必要であることから、わが国では自記式ではなく、質問紙法の運用に臨床心理士を入れるべきと考えられた。いずれかの ICD は PD 患者の 27% に認め、病型分類の要素として十分有用と考えられた。ICD については、PD 以外の病的賭博や、薬物中毒の感受性遺伝子との関連が興味深いと考えた。

MoCA 平均得点 = 23.7 ± 4.0 , MMSE 平均得点 = 28.5 ± 2.3 であり MoCA の点数は MMSE と比較して有意に低かった。MoCA は MMSE とは下位項目での相違が認められたが、MoCA は質問としては MMSE より難題の可能性はあるが、認知機能の検索では優れている可能性があると考えられた。MoCA は MMSE では十分に明らかに出来ない異なった大脳皮質の認知機能を検出すると考えられた。

E. 結論

rs356219 は ncRNA/SNCA の発現調節を介して PD 感受性に関与する可能性がある。

ゲノムワイド SNPs Array による連鎖解析と全エクソン解析を行うことで、PD の原因遺伝子を同時に複数単離することが可能である。

パーキンソン病における衝動性障害スクリーニング質問票 (QUIP) の日本語版作成と妥当性の検証を行った。運用には臨床心理士の解除が望ましいと考えられた。ICD は PD 患者の 27% に認められ、病型分類の要素として有用であると考えられた。

MoCA は MMSE では十分に明らかに出来ない異なった大脳皮質の認知機能を検出できる可能性があると考えられた、MoCA の有用性の検証が

さらに多数例で行われる必要がある。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
(研究分担者の項参照)

2. 学会発表

(研究分担者の項参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし