

孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テラーメード研究
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

*-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。また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。

A. 研究目的

*-synuclein(SNCA)*は孤発性パーキンソン病(PD)の確実な感受性遺伝子であるが（Mizuta et al., Hum Mol Genet, 2006; Satake et al., Nat Genet, 2009）、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、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイで 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（平成 22 年度本学会議）。本研究は、我々の得た新しい知見をもとに、rs356219 の PD 感受性への機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

rs356219 に結合する転写因子を SH-SY5Y 細胞に強制発現して *SNCA* mRNA の発現を定量する。なお、rs356219 の位置は、最近データベースに登録された antisense noncoding RNA の intron にも相当するので、この ncRNA についても同様の解析を行

った。剖検脳（前頭葉：Lewy body 群 21 例、対照群 18 例）における *SNCA*、ncRNA の発現レベルを real-time RT-PCR で定量し、rs356219 の genotype との関連を調べた。

（倫理面への配慮）

剖検脳は匿名化し、その研究使用に関しては、神戸大学大学院および東京都健康長寿医療センター研究所の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

我々が同定した rs356219 結合転写因子の強制発現により、SH-SY5Y における *SNCA* 発現レベルはほとんど変化しなかったが、*SNCA* 下流の ncRNA 発現レベルは数十倍に上昇した。剖検脳においては、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。しかしながら、*SNCA* と ncRNA の発現レベルは強い正の相関を示した。

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思われるため、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。

D . 考察

SH-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のが困難であり、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。

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。

F . 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

・ Sharma M, Hattori N, Murata M, Toda T et al (GEOPD consortium). A multi-centre clinico-genetic analysis of the VPS35 gene in Parkinson disease indicates reduced penetrance for disease-associated variants. J Med Genet. 49:721-726;2012.

・ Sharma M, Toda T et al (GEOPD consortium). Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. Neurology 79:659-667;2012.

・ Lill CM, Satake W, Toda T et al., Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. PLoS Genet 8:e1002548;2012.

2. 学会発表

佐竹渉、山本光利、村田美穂、服部信孝、戸田達史、他 候補遺伝子とエクソームシーケンスによるパーキンソン病の rare variant リスクの探索 日本人類遺伝学会第57回大会 2012年、東京

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し