

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬・テラーメード研究
研究分担者 服部 信孝 順天堂大学 脳神経内科 教授

研究要旨

パーキンソン病 (PD) のテラーメー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。

A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) 患者のほとんどは孤発性であるが、5-10%は家族歴を有する。これら家族性 PD を分子遺伝学的に解析し、発症に関わる遺伝子を単離・同定し、病態機序を明らかにすることで PD のテラーメード医療および新規治療薬の開発の礎を築くことを目的とする。

B. 研究方法

同一地域出身の血族婚のある 2 家系の常染色体劣性遺伝性 PD 家系患者計 7 名および未発症兄弟計 4 名について Genome-Wide SNP Array 6.0 (Affymetrix) をもちいてジェノタイピングした後、SNP HiTLink および Allegro をもちいてパラメトリック多点連鎖解析を行った。HLOD > 1 を候補領域とし、候補領域について SNP Array のジェノタイピングデータの抽出および近傍に位置するマイクロサテライトのジェノタイピングを行い、ハプロタイプ解析を行った。連鎖解析およびハプロタイプ解析の結果同定された候補領域に存在している遺伝子について PCR-direct sequence 法による変異解析を行った。さらに 1 家系につき 2 名の患者 (合計 4 名) について、SureSelectXT Human All Exon 50 Mb Kit (Agilent) をもちいて全エクソン領域を濃縮した

後、HiSeq2000 (Illumina) で高速シーケンスを実施した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析については順天堂大学医学部倫理委員会で承認されており (順大医倫第 2011026 号)、ヘルシンキ宣言の内容と精神に従って実施した。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守し、採血時には医師による十分な説明と患者本人、もしくは患者本人が意思疎通困難の場合は保護者または後見人から書面にて同意を得て行った。

C. 研究結果

(1) 連鎖解析

家系 1 の解析の結果、これまで検討していた遺伝子領域と異なる領域に連鎖が見つかった。Allegroでのパラメトリックロッドスコアは最大で 1.3 だった (図 1)。この領域についてマイクロサテライトと SNPs をもちいたハプロタイプ解析を行った結果、患者のみが homozygous であることが明らかとなり連鎖解析の結果が確認された。

家系 2 の解析の結果、最大ロッドスコア 1.9 の領域を同定した (図 1)。2 家系共通の候補領域は同

定されなかった。

家系1の新規候補領域には6種の遺伝子、また家系2の新規候補領域には8種の遺伝子が存在しており、現在これらの遺伝子について変異解析中である。

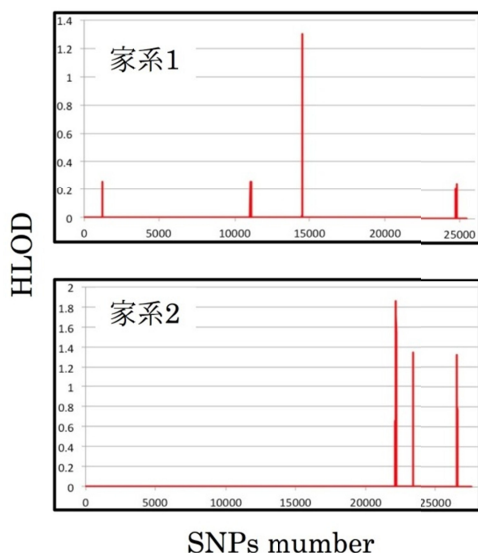


図1. パラメトリック多点連鎖解析

Genome-Wide SNP Array のジェノタイピングデータを Allegro をもちいて多点連鎖解析した結果、家系1 (上段) は1カ所、家系2 (下段) は3カ所で $HLOD > 1$ の領域を見出した。2家系共通の連鎖領域は見出されなかった。

(2) 全エクソン解析

家系1および家系2のPD患者2名ずつ、合計4名について全エクソン解析を実施した。

解析した4名とも良好な配列情報を得ることが出来た。20回以上配列を解析出来た塩基は全エクソン中91.1~92.6%であり、得られた塩基配列情報を元に遺伝子変異解析が十分に可能であることを示した (表1)。

表1. 全エクソン解析の成績

	家系1		家系2	
	患者1	患者2	患者3	患者4
マッピングリード数	112,195,755	108,667,598	106,093,521	123,927,751
on targetリード数	74,289,522	72,536,231	70,045,311	82,210,822
on target率 (%)	66.21	66.75	66.02	66.34
平均Depth	141.244	137.845	133.229	156.303
カバー率 > x3 (%)	98.7	98.4	98.4	98.8
カバー率 > x20 (%)	92.4	92.1	91.1	92.6
カバー率 > x40 (%)	84.9	84.6	82.8	85.8

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

研究代表者 服部信孝

1) Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N. VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. *Mov Disord* 27: 1413-7, 2012

2) Hattori N, Fujimoto K, Kondo T, Murata M, Stacy M. Patient perspectives on Parkinson's disease therapy in Japan and the United States: results of two patient surveys. *Patient Relat Outcome Meas*. 3: 31-8, 2012

2. 学会発表

研究代表者 服部信孝

- 1) 大垣光太郎、李元哲、今道洋子、吉野浩代、舩山学、高梨雅史、本井ゆみ子、富山弘幸、服部信孝 . 日本人患者 24 症例の Frontotemporal dementia における PSEN1 遺伝子解析、第 53 回日本神経学会学術大会、東京、2012.5.23
- 2) 李元哲、舩山学、吉野浩代、富山弘幸、服部信孝 . 日本人若年性パーキンソン病における FBX07 遺伝子変異解析、第 53 回日本神経学会学術大会、東京、2012.5.25
- 3) 吉野浩代、富山弘幸、舟辺さやか、山下力、李元哲、舩山学、村山繁雄、服部信孝 . Alpha-Synucleinopathy における PLA2G6 および PANK2 変異解析、第 53 回日本神経学会学術大会、東京、2012.5.25
- 4) 山下力、李元哲、舩山学、吉野浩代、富山弘幸、市川忠、江原義郎、石川欽也、水澤英洋、服部信孝 . 日本人 Parkinson 病患者における polyglutamine(polyQ) 鎖リピート数の調査、第 53 回日本神経学会学術大会、東京、2012.5.25
- 5) 舩山学、李元哲、佐竹渉、吉野浩代、富山弘幸、松浦英治、野元三治、有村公良、戸田達史、高嶋博、服部信孝 . 常染色体劣性遺伝性パーキンソン病家系の連鎖解析、第 53 回日本神経学会学術大会、東京、2012.5.25
- 6) 安藤真矢、舩山学、李元哲、柏原健一、村上善勇、石津暢隆、豊田千純子、野口克彦、橋本貴司、中野直樹、佐々木良元、小久保康昌、葛原茂樹、大垣光太郎、山下力、吉野浩代、波田野琢、富山弘幸、服部信孝 . 日本人パーキンソン病患者における VPS35 p.D620N 変異の解析、第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres(MDSJ)、京都、2012.10.12
- 7) Tomiyama H, Yoshino H, Ogaki K, Li L, Yamashita C, Li Y, Funayama M, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, and Hattori N. Mutation analysis for PLA2G6 in patients with Parkinson's disease / frontotemporal type of dementia. Movement Disorders, Dublin, Ireland. 2012.6.17.
- 8) Tomiyama H, Ando M, Ogaki K, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Hattori N. Genetic Analysis for Parkinson's Disease in Juntendo University, Tokyo, Japan. 7th Genetics Epidemiology of Parkinson's Disease Annual meeting, Seoul, Korea. 2012.10.8.
- 9) Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya K, Yokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Motoi Y, Tomiyama H, Hattori N. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. 7th Genetics Epidemiology of Parkinson's Disease Annual meeting, Seoul, Korea. 2012.10.10.
- 10) Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Tomiyama H, and Hattori N. VPS35 Asp620Asn mutation in Japanese patients with Parkinson disease. 7th Genetics Epidemiology of Parkinson's Disease Annual meeting, Seoul, Korea. 2012.10.10.
- 11) Tomiyama H, Yamashita C, Sasaki R, Li Y, Funayama M, Hattori N, Kuzuhara S, and Y. Kokubo Y. No association between ATXN2 (SCA2) CAG repeat expansion and amyotrophic lateral sclerosis /parkinsonism-dementia complex of

the Kii peninsula, Japan. The American Society of Human Genetics, ASHG 62nd Annual Meeting. San Francisco, USA. 2012.11.07.

3.その他
なし

12) Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Tomiyama H, and Hattori N. The Asp620Asn mutation of VPS35 in Japanese patients with typical Parkinson disease. ASHG 2012 Meeting, San Francisco, U.S.A. 2012.11.08.

13) Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R, Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Fujita K, Izumi Y, Kaji R, Hattori N, Sobue G. Analysis of C9orf72 repeat expansion in Japanese patients with ALS. ASHG 2012 Meeting, San Francisco, U.S.A. 2012.11.09.

14) Li Y, Funayama M, Sekine T, Li L, Yoshino H, Nishioka K, Tomiyama H, Hattori N. Genetic analysis of the GBA gene in Japanese familial Parkinson's disease. ASHG 2012 Meeting, San Francisco, U.S.A. 2012.11.09.

G.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