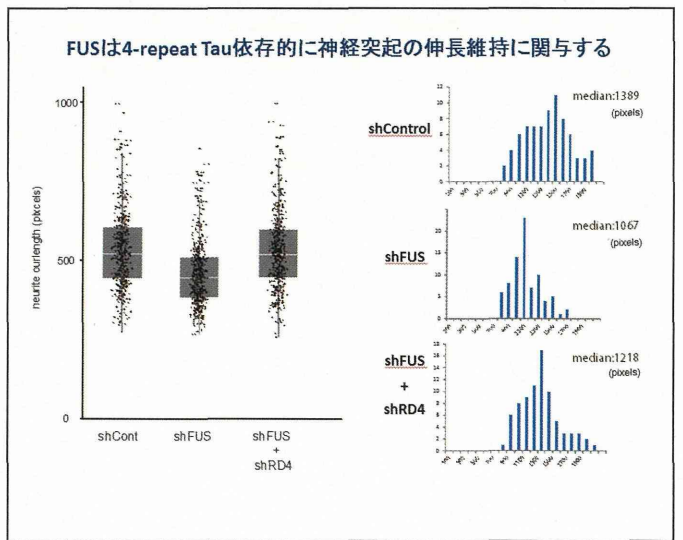
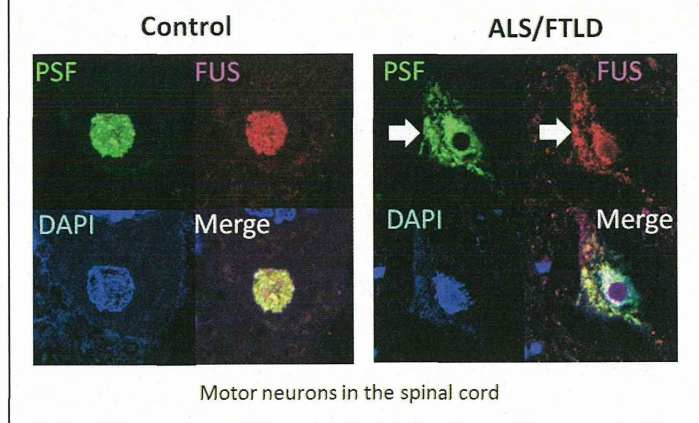


	disease modifier glial cells	cell death in ALS/FTLD motor neurons	cell death in ALS/FTLD cortical neurons	not involved cerebellar neurons
cell type	glia	neuron		
ALS/FTLD relevant		+		
gene expression		many		
alternative splicing (Gene ontology)	immune system	neuronal function		
	Wdr35, Sgce, Fip111	Synj1, Rims1, Scn8a	Mapt, Dlgap1, Snap25	Stxbp1, Kcnp1, Fmr1
non-cell-autonomous toxicity?		ALS		
		FTLD		lesion(-)



ALS/FTLD剖検例におけるFUSとPSFの局在の異常



F. 文献

1: Ishigaki S et al. Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. Sci Rep. (2012) 2:529.

2: Fujioka Y et al. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. Sci. Rep. (2013) 3:2388

TDP-43 と FUS による RNA 制御

河原 行郎¹⁾

1) 大阪大学大学院医学系研究科遺伝子機能制御学

研究要旨

本研究では、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病因解明に向けて、病態に深く関与する2つの RNA 結合蛋白質 TDP-43 と FUS の共通するターゲット RNA の同定を目的として実施した。TDP-43 と FUS を安定的に発現する HEK293T 細胞を材料に、PAR-CLIP 法と網羅的シーケンスを組み合わせて、各蛋白質に結合する RNA を決定した。この結果、TDP-43 は、UG-rich な配列を結合モチーフとして認識することが判明したが、一方で FUS には強い認識配列はなく、GGU 配列に弱い結合傾向を認めるのみであった。TDP-43 及び FUS が制御する遺伝子のうち、30～60%程度の遺伝子は両者による制御下にあると考えられた。また、結合部位単位で比較した場合には、10～20%程度が両方で重複していることが明らかとなった。この中には、パラスペックルの形成に必須の *NEAT1* 遺伝子や、ALS 関連遺伝子である *TARDBP*、*PFN1* や *SQSTM1* などが含まれていた。家族性 ALS で同定されている点変異は、TDP-43 によるターゲット認識能には、大まかには影響しないことも明らかにした。

A. 研究目的

ALS は、運動ニューロンの選択的脱落によって全身の筋力が低下する神経難病である。発症すると数年以内に死に至るが、依然として有効な治療法がなく、一日も早い病態解明が急務である。90%以上が非遺伝性であることから、これまで病態へ迫る手掛かりが乏しかったが、近年 TDP-43 及び FUS（別名 TLS）と呼ばれる2つの RNA 結合蛋白質が、病態に深く関与していることが明らかにされつつある。TDP-43 は、ALS のほとんどのケースで、病変部位にあるユビキチン陽性封入体中に認められる（Neumann et al, Science, 2006）。また頻度は稀ながら ALS の一部に TDP-43 遺伝子点変異が同定されている（Sreedharan et al, Science, 2008）。一方、FUS についても、遺伝子変異が一部の ALS に同定され、FUS が封入体中に蓄積している（Kwiatkowski et al, Science, 2009）。FUS が蓄積している封入体には TDP-43 は認めず、逆に

TDP-43 が蓄積する封入体には FUS を認めないなど、両者を介して ALS 発症に至る分子メカニズムがどこまで共通しているのか依然として不明な点が多い。しかしながら、解析が先行している TDP-43 については、本来核が主要な局在部位であるが、ALS では細胞質封入体中に蓄積すること（Neumann et al, Science, 2006）、ヒト TDP-43 過剰発現マウスは ALS 様症状を呈し、TDP-43 が核から喪失するにも関わらず、細胞質封入体には認めないこと（Wegorzewska et al, PNAS, 2009）、神経細胞死誘導には TDP-43 の RNA 結合部位が必須であること（Voigt et al, PLoS One, 2010）などから loss of function が病態に深く関連していると考えられる。このため、近年 ALS は RNA 制御異常病と考えられるようになってきており、TDP-43 と FUS の持つ RNA 制御機能の全体像を把握することが病態解明への鍵を握っている。TDP-43 と FUS は、ともに hnRNP の一種で、RNA の安定化

やスプライシングなどの RNA 制御に関与していると考えられている。ノックアウトマウスはいずれも胎生致死を呈することから、少なくとも発生段階に必須の生理的機能を果たしている (Sephton et al, JBC, 2009; Hicks et al, Nat Genet, 2000)。しかしながら、具体的にどのような RNA 制御機能を果たしているのかについては断片的な報告しかなく、全体像が見えないのが現状である。このため我々は、FLAG-TDP-43 安定発現細胞株を樹立し、これを用いて TDP-43 に結合する蛋白質の同定を行った。この結果、TDP-43 は Drosha や Dicer など microRNA と呼ばれる機能性 RNA の生成に必須の因子と結合していることを発見し、TDP-43 が microRNA 発現を促進する機能を持つことを報告した (Kawahara et al, PNAS, 2012)。しかしながら、TDP-43 は少なくとも 60 個程度の蛋白質と結合し、そのほとんどが hnRNP ファミリー蛋白質であったことから、結合する蛋白質プロファイル情報だけでは、microRNA 発現制御以外に具体的にどのような RNA 制御に関与するのか把握することは困難であった。このため、TDP-43 と FUS が制御する RNA の量、種類、結合部位、認識配列などを網羅的に同定することが、両者に共通する RNA 制御機能の特定に必要不可欠だと考えに至った。以上から、TDP-43 と FUS それぞれが持つ RNA 制御機能の全体像を把握し、さらに両者に共通したターゲットや連携して果たす機能を同定するため、これまでに得た結合蛋白質プロファイルに加え、ターゲット RNA やその性状を網羅的に同定することから、共通のターゲットを割り出すことを目的とした。

B. 研究方法

(1) Halo タグを付加した TDP-43 および FUS の安定発現細胞株を、HEK293T 細胞を用いて樹立した。また、家族性 ALS で同定されている TDP-43 遺伝子点変異 D169G, G348S を挿入した発現ベクターも作成し、同様の手順で安定発現細胞株を樹立した。

(2) 上記安定発現細胞株の蛋白質抽出液から、Halo タグを利用した免疫沈降を行い、TDP-43 および FUS に対する PAR-CLIP 法 (Hafner et al, Cell, 2010) の樹立を行った。具体的には、細胞培養液中に 4-チオウリジン (4-SU) を添加し、新規に転写される RNA にウリジンの代わりに取り込ませた。次に 365nm の長波長紫外線によって架橋反応を行うと、4-SU を介して強い蛋白質-RNA クロスリンクが生じる。その後、免疫沈降を行い、MNase で断片化後、ラジオアイソトープ (RI) 標識した。この RNA をゲルに電気泳動し、沈降した蛋白質の大きさの位置で強く RI が検出されたので、これをゲルから抽出した。回収された断片化 RNA を用いて RT-PCR を行い、次世代シーケンサーで網羅的なシーケンスを行うためのライブラリーを構築した。

(3) 上記ライブラリーに対して網羅的シーケンス解析を行った。PAR-CLIP 法では、蛋白質と架橋した部分の 4-SU は、逆転写反応中にチミン (T) ではなくシトシン (C) に置換される。このため、シーケンス後にゲノム配列と比較し、T から C への置換が生じているかどうかを確認し、手法が確立されたかどうかを確認した。さらに、その後情報解析を行い、TDP-43 および FUS に結合する RNA の分類、結合モチーフ、共通する遺伝子、共通する結合部位などを解析した。

(4) D169G, G348S 点変異を挿入した TDP-43 変異体についても同様に PAR-CLIP 法で結合 RNA を網羅的にシーケンスし、野生型と比較することによって、プロファイルに変化があるかどうかを検討した。

C. 研究結果

(1) PAR-CLIP 法を用いた TDP-43 および FUS に結合する RNA ライブラリーの樹立: N 端に Halo タグを付加した TDP-43 と FUS の発現ベクターを作成し、HEK293T 細胞に導入することによって、これ

らの安定発現細胞株を樹立した。樹立された安定発現細胞株を培養後、細胞培養液中に 4-チオウリジン (4-SU) を添加し、新規に転写される RNA にウリジンの代わりに取り込ませた。次に 365nm の長波長紫外線によって架橋反応を行い、4-SU を介した強い蛋白質-RNA クロスリンクを行った。その後、Halo タグに対して免疫沈降を行い、RNaseT1 で処理後、ラジオアイソトープ標識し、ゲルに電気泳動すると、沈降した蛋白質の大きさの位置で強くアイソトープが検出

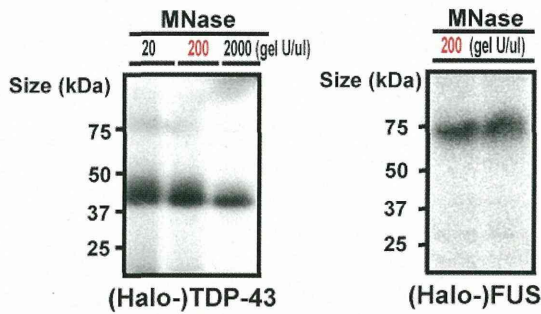


図 1. TDP-43 と FUS に結合する RNA 断片. TDP-43 と FUS の大きさに合致して、ラジオアイソトープで標識した RNA が検出された. その強度は MNase 濃度依存的であった。

された (図 1)。これをゲルから抽出し、回収された RNA を用いて cDNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いた網羅的なシーケンスを行った。両者とも、約 1 億リードのシーケンス結果が得られた。ここから低品質なリードや 20 塩基以下の短いリードを除いた後、hg19 ヒトゲノムに annotation を行った。蛋白質と架橋した部分の 4-SU は、逆転写反応中にチミン (T) ではなくシトシン (C) に置換される。このため、シーケンス後にゲノム配列と比較し、T から C への置換が生じていれば、その部位は TDP-43 及び FUS の認識配列に含まれることを意味している。このため、ライブラリー作成の成功の可否を確認するため、T-to-C 変異の頻度を解析した。その結果、T-to-C 変異は、その他の変異と比べて極めて高く、全体のリードの 40-50% に含まれていることが確認できた (図 2)。

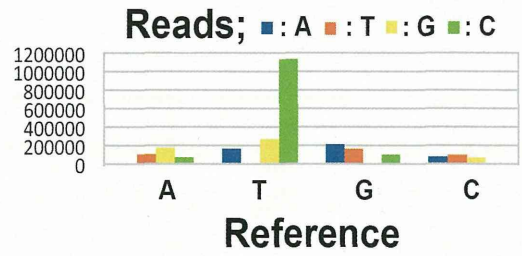


図 2. ゲノムにアノテーションした後に認められた TDP-43 結合 cDNA ライブラリー中の変異頻度 cDNA ライブラリー中の変異頻度

最終的に、TDP-43 では 12,488 カ所、FUS では 5,456 カ所の cluster (結合部位) を同定することができた。

(2) TDP-43 と FUS の結合モチーフ: TDP-43 及び FUS が認識する RNA の一次配列について、cERMIT 法を用いて解析した。TDP-43 は、UG リピートをモチーフとして認識した。従来は、シンプルな UG リピートがモチーフと考えられてきたが、本研究では、GUNUG のように中心に G でない塩基が挿入されている場所をより好んで結合していると考えられた (図 3)。

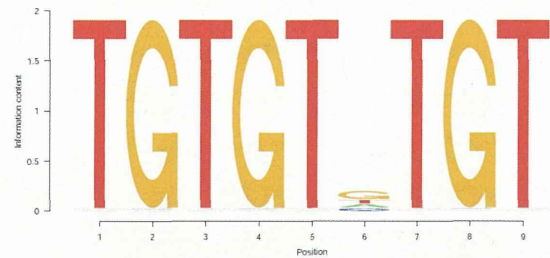


図 3. TDP-43 の結合モチーフ。

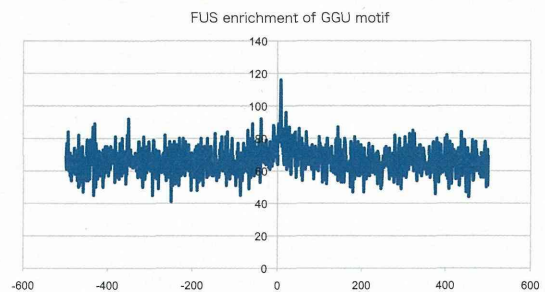


図 4. FUS の結合モチーフ。

一方、FUS については、同様の解析を行ったが、明確なモチーフは認められなかった。過去に GUGGU をモチーフとする報告があったが (Lagie-Tourenne et al, Nat neurosci., 2012)、本ライブラリーでは濃

縮されていなかった。一方、GGU が弱いモチーフだとする報告があったため (Rogeli et al, ScientificReports, 2012)、同モチーフが本解析で用いたライブラリーに含まれるかどうかを解析したところ、弱いながら enrichment されていることが分かった(図4)。他の 3mer では濃縮傾向を認めなかったことから、FUS は GGU 配列に弱い結合傾向を持つと考えられた。

(3) TDP-43 と FUS の結合 RNA プロファイル : annotation 後、T-to-C 変異の入ったリードを含むクラスターだけを結合部位として抽出した。その結果、TDP-43 および FUS とともにその内訳は、両者とも約 60-80%が mRNA 内にあった。さらに mRNA 内での結合部位を解析した結果、TDP-43 では、約 45%がイントロンに結合部位があったのに対し、FUS では、3' UTR や coding region (CDS)の方に多く結合部位が同定された(図4)。

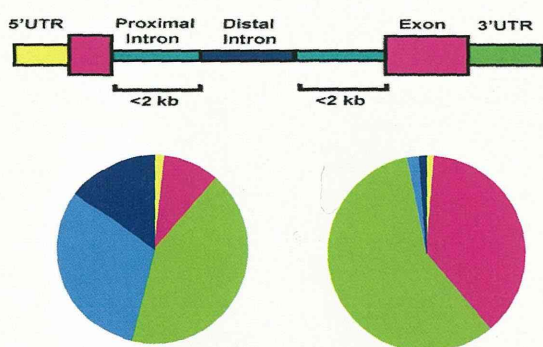


図4. TDP-43 (左)は、約 45%がイントロンに結合していたが、FUS (右)では、3' UTR や coding regions (CDS)が約 90%を占めた。

両者に共通する遺伝子を解析したところ、制御される遺伝子では、FUS で約 60%, TDP-43 で約 30%の遺伝子が両者によって制御されていることが明らかとなった。また、385 箇所が、同じ結合部位として見出された(図5)。

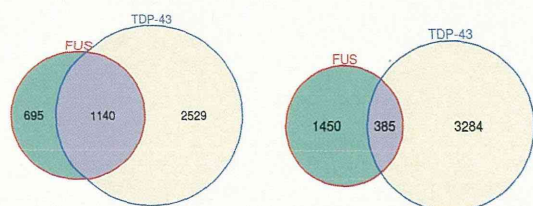


図5. TDP-43 と FUS に共通して制御を受ける遺伝子

(左)と、共通の結合クラスター数(右)。

個々の遺伝子に着目した場合、TDP-43 遺伝子 (*TARDBP*)の 3' UTR には、TDP-43 および FUS の両方の結合部位があり、両者による制御を受ける遺伝子の1つであることが明らかとなった。また、パラスペックルの形成に必須の *NEATI* 遺伝子や、ALS 関連遺伝子である *PFN1* や *SQSTM1* など TDP-43 と FUS による共通の制御下にあることが示唆された。

(4) TDP-43 遺伝子点変異による RNA 結合能への影響 : 最後に、家族性 ALS で同定されている遺伝子点変異によるアミノ酸置換が、RNA 結合能に影響するかどうかを評価した。その結果、D169G, G348S のいずれの点変異を挿入した場合でも、モチーフは変動せず、さらに制御される遺伝子の 95%以上が一致した(図6)。この結果から、点変異は結合する RNA のプロファイルには影響しないと考えられた。

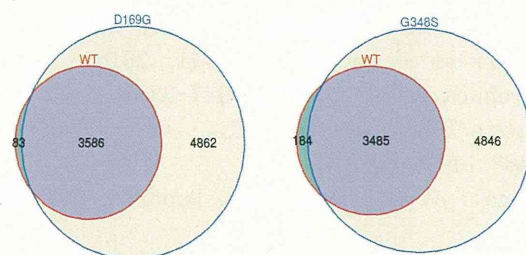


図6. TARDBP 点変異と RNA 結合プロファイルの変動。

D. 考察

本研究を通じて、TDP-43 と FUS が制御する RNA の全体像と共通して制御する遺伝子像が得られた。両蛋白質によって制御される遺伝子数は 1000 以上あり、この中には複数の ALS 関連遺伝子も含まれていた。今後、これらの蛋白質が結合することの生物学的意義を明らかにする必要があるが、mRNA の安定性やスプライシングなどに影響するものと考えられる。また、今後はモデルマウスを用いた個体レベルでの解析も行いたい。

E. 結論

ALS の病態に深く関与する 2 つの RNA 結合蛋白質

TDP-43 と FUS は、非常に多種多様な RNA に結合し、スプライシングや RNA の安定性などを制御しているものと考えられた。両者の共通の制御下にあると考えられる遺伝子だけでも 1000 種類以上あり、これらの中には ALS 関連遺伝子も多く含まれている。このため、TDP-43 や FUS が変性していくニューロンの中で機能を喪失すれば、これら遺伝子の発現制御に異常を来し、その結果神経細胞死が誘導されることが考えられる。今後、これらの蛋白質が結合することの生物学的意義、結合する遺伝子の種類などを更に詳細に解析することで、ALS 病態の解明に繋がることが期待される。

F. 文献

- 1) Hicks et al., Nat Genet, 175-179, 2000
- 2) Neumann et al., Science, 130-133, 2006
- 3) Sreedharan et al., Science, 1208-1211, 2008
- 4) Kwiatkowski et al., Science, 1205-1208, 2009
- 5) Wegorzewska et al., PNAS, 18809-18814, 2009
- 6) Sephton et al., JBC, 6826-6834, 2009
- 7) Voigt et al., PLoS One, e12247, 2010
- 8) Hafner et al., Cell, 129-141, 2010
- 9) Kawahara et al., PNAS, 3347-3352, 2012
- 10) Lagie-Tourenne et al., Nat neurosci, 1488-1497, 2012
- 11) Rogeli et al., Scientific Reports, 603, 2012

II. 研 究 報 告

2013年度 神経変性疾患に関する調査研究【班会議プログラム】

<< 12月20日(金)【1日目】 >>

時間	番号	演 題 名	演 者・研究分担者 ・研究協力者
10:00		研究代表者挨拶	
10:05		厚生労働省疾病対策課御挨拶	
	A1		座長:戸田 達史
10:10	1	孤発性パーキンソン病のゲノム解析	佐 竹 涉・戸 田 達 史
10:25	2	PARK9 (ATP13A2) の分子病態とリソソームの障害	佐 藤 栄 人・服 部 信 孝
10:40	3	メダカを用いたGBA 変異とパーキンソン病の関連性の解析	上 村 紀 仁・高 橋 良 輔
10:55	4	セピアブテリン還元酵素 KO マウスにおける運動障害の解析	一 瀬 宏・長 谷 川 一 子
11:10	5	パーキンの糖化に対するパーキン関連蛋白の関与	牧 由 紀 子・梶 龍 児
	A2		座長:長谷川一子
11:25	6	パーキンソン病における黒質超音波、嗅覚機能検査および MIBG 心筋シンチグラフィの診断的意義	三 輪 英 人・三 輪 英 人
11:40	7	パーキンソン病におけるレム期睡眠行動異常症の意義	野 村 哲 志・中 島 健 二
11:55	8	パーキンソン患者における血中ビタミン濃度について	辻 井 智 明・野 元 正 弘
12:10	9	パーキンソン病の姿勢異常の治療に関する検討	古 澤 嘉 彦・村 田 美 穂
12:25	10	パーキンソン病の幻覚、妄想に対するアリピプラゾールの効果—多施設共同試験	柏 原 健 一・柏 原 健 一
12:40~13:25		昼食、事務連絡	
	A3		座長:中島健二
13:25	11	パーキンソン病の精神症状に対する抑肝散の有効性に関する検討	波 多 野 琢・服 部 信 孝
13:40	12	パーキンソン病におけるイノシン服用の安全性について	岩 城 寛 隆・野 元 正 弘
13:55	13	AADC 遺伝子治療の長期成績と課題	村 松 慎 一・村 松 慎 一
14:10	14	パーキンソン病患者の代替医療利用状況について	藤 本 健 一・藤 本 健 一
14:25	15	[11C]PBB3 PETによる PSP/CBS のタウイメージング	島 田 斉・桑 原 聡
14:40	16	パーキンソン症候群の鑑別診断における Tau imaging の有用性	徳 田 隆 彦・徳 田 隆 彦
	A4		座長:村山繁雄
14:55	17	PSPとCBDの小脳歯状核・上小脳脚病変の病理学的検討 :臨床的鑑別への有用性	辰 己 新 水・吉 田 眞 理
15:10	18	進行性核上性麻痺と臨床診断された病例の背景病理	饗 場 郁 子・饗 場 郁 子
15:25	19	進行性核上性麻痺類似の臨床症状を呈する優性遺伝性神経疾患家系の遺伝子解析研究	矢 部 一 郎・佐 々 木 秀 直
15:40	20	MSA の発症機序に関する免疫組織化学的検討	早 川 英 規・望 月 秀 樹
15:55	21	レビー小体病パイオリソースの構築	村 山 繁 雄・村 山 繁 雄
16:10	22	パーキンソニズムを主病状とした遺伝子プリオン病 (P105L) 4 家系の臨床及び分子遺伝学的研究	興 か が り・辻 省 次
16:25~16:40		コーヒーブレイク	
	A5		座長:郭 伸
16:40	23	特定疾患調査票からみたハンチントン病	長 谷 川 一 子・長 谷 川 一 子
16:55	24	有棘赤血球舞踏病の分子病態 : chorein の機能解析	中 村 雅 之・佐 野 輝
17:10	25	脊髄空洞症のゲノム構造多型 (CNV) 解析	佐 々 木 秀 直・佐 々 木 秀 直
17:25	26	前頭側頭葉変性症と筋萎縮性側索硬化症における筋交感神経活動は類似している	新 藤 和 雅・瀧 山 嘉 久
17:40	27	孤発性 ALS-TDP と遺伝性 ALS とを結ぶ病因関連分子連関について : 孤発性 ALS の疾患特異的分子異常の解析から	郭 伸・郭 伸

2013年度 神経変性疾患に関する調査研究【班会議プログラム】

<< 12月21日(土)【2日目】 >>

時間	番号	演 題 名	演 者	研 究 分 担 者 研 究 協 力 者
	B1			座長:小野寺 理
9:00	28	TDP-mRNA のポリ A 選択とスプライシングを介した自己蛋白量の制御機構	須 貝 章 弘	小 野 寺 理
9:15	29	ALS と FTLD における共通画像マーカーの探索	千 田 讓	祖 父 江 元
9:30	30	ALS を含む通常剖検例の一般諸臓器におけるリン酸化 TDP-43 の蓄積に関する検討	岡 本 幸 市	岡 本 幸 市
9:45	31	筋萎縮性側索硬化症の大脳皮質における TDP-43 の組織学および生科学的解析	竹 内 亮 子	高 橋 均
10:00	32	紀伊 ALS-parkinsonism-dementia complex 家系の臨床病理学的検討	葛 原 茂 樹	葛 原 茂 樹
	B2			座長:辻 省次
10:15	33	<i>SQSTM1</i> 遺伝子に複合ヘテロ 変異を認めた ALS の 1 剖検例	清 水 宏	高 橋 均
10:30	34	約30年意思伝達可能であった呼吸器装着した孤発性筋萎縮性側索硬化症(sALS) :変性が運動ニューロンにほぼ限定され、運動ニューロンに封入体がない 3剖検例	望 月 葉 子	清 水 俊 夫
10:45	35	ALS の進行を規定する因子の探索同定-JaCALS の解析から	祖 父 江 元	祖 父 江 元
11:00	36	日本人家族性 ALS における FUS/TLS 遺伝子変異の重要性について	加 藤 昌 昭	青 木 正 志
11:15	37	筋萎縮性側索硬化症の新規原因遺伝子 <i>ERBB4</i> (ALS19) の同定	高 橋 祐 二	辻 省 次
11:30~11:45		コーヒーブレイク		
	B3			座長:水澤英洋
11:45	38	ALS 患者における TFG 異変のスクリーニングと機能解析	瓦 井 俊 孝	梶 龍 児
12:00	39	紀伊半島の ALS/PDC における脳脊髄液中酸化ストレスの解析	小 久 保 康 昌	小 久 保 康 昌
12:15	40	ALS に関する記述疫学研究	土 井 由 利 子	土 井 由 利 子
12:30	41	筋萎縮性側索硬化症患者における横隔神経伝導検査所見と呼吸機能・生命予後との関連	清 水 俊 夫	清 水 俊 夫
12:45	42	ALS 患者の腰仙髄における下位運動ニューロン障害の進展形式	関 口 輝 彦	水 澤 英 洋
13:00-13:45		昼食、事務連絡		
	B4			座長:梶 龍児
13:45	43	ALS における四肢筋萎縮のパターンとその規定因子	澁 谷 和 幹	桑 原 聡
14:00	44	神経反復刺激法による筋萎縮性側索硬化症と頸椎症性筋萎縮症の鑑別	畑 中 裕 己	園 生 雅 弘
14:15	45	長期 TPPV (気管切開下陽圧換気療法) 施行の孤発性 ALS 患者における機能予後	田 村 拓 也	饗 場 郁 子
14:30	46	ALS マウスモデルにおけるコネクシンの神経病理学的検討	真 崎 勝 久	吉 良 潤 一
14:45	47	ALS マウス脊髄運動ニューロンでは Asidan 関連遺伝子 NOP56 蛋白は発病初期から減少する	山 下 徹	阿 部 康 二
15:00-15:15		コーヒーブレイク		
	B5			座長:祖父江 元
15:15	48	脊髄性筋萎縮症における新規 <i>SMN1</i> 遺伝子解析法による遺伝子変異の同定	久 保 祐 二	斎 藤 加 代 子
15:30	49	下位運動ニューロン徴候のみを呈し、予後良好な経過を示した症例でみいだされた遺伝子変異	益 子 貴 史	中 野 今 治
15:45	50	FUS-ALS モデルショウジョウバエの表現型を修飾する因子の探索	東 裕 美 子	徳 田 隆 彦
16:00	51	GDNF,HGF,IGF-1 発現骨髄間葉系幹細胞による ALS 動物モデル治療-行動解析および病理学的検討	渡 辺 保 裕	中 島 健 二
16:15		研究代表者挨拶		

1演題:発表10分+討論5分(時間厳守でお願いします) *両日とも昼食をご用意しております

総括研究報告書

研究代表者 中野 今治

東京都立神経病院 院長

研究分担者：39 名 研究協力者：7 名

I. はじめに

「神経変性疾患に関する調査研究班」（変性班）は、難治性疾患克服研究事業（厚生労働省）において、運動ニューロン病（MND）の 4 疾患—筋萎縮性側索硬化症（ALS）、球脊髄性筋萎縮症（SBMA）、脊髄性筋萎縮症（SMA）、原発性側索硬化症（PLS）—、Parkinson 病関連の 3 疾患—Parkinson 病（PD）、進行性核上性麻痺（PSP）、大脳皮質基底核変性症（CBD）—、舞踏運動の 2 疾患—Huntington 病（HD）、有棘赤血球舞踏病（ChA）—、および脊髄空洞症（SM）の 10 疾患の病態解明、治療法の開発および実態把握を目指した調査・研究を行っている。このうち、ALS、SBMA、SMA、PD、PSP、CBD、HD の 7 疾患が特定疾患治療研究事業対象疾患（公費対象疾患）である。

2011 年度、2012 年度に続き、今年度も「病態に根ざした ALS の新規治療法開発」分科班（青木正志分科班研究代表者）と連携して研究を実施した。

II. 研究目標

【1】治療法の開発：本研究班の最終目標は当班対象疾患の治療法の開発である。しかしながら、原因遺伝子が見だされた疾患に於いてさえ、発病のメカニズムは明らかにされておらず、根治療法は未開発である。例えば、PD では、病態がかなりの点まで分かっており、多種類の有効薬物が開発されて、深部脳刺激に代表される外科治療も保健適応になっているが、それにおいてさえ病勢の進行は阻止できず、患者は最終的には寝たきり状態となる。PD と同じくパーキンソニズムを呈する PSP と CBD においては臨床診断法も確立しておらず有効な治療薬は皆無である。ALS に於いては、riluzole が唯一の承認薬であるが、その効果は限られており、より有効な治療薬の開発が強く望まれている。このような現状を踏まえると、迂遠のように見えても各疾患の病態を着実に解き明かし、それに基づいて治療法を探っていくのが結局は近道と考えられる。このような考えに立って、本研究班では治療法開発を常に視野に入れながら基礎的研究を続行する。疾患特異的 iPS 細胞はその有力な武器になると考えられ、患者の iPS 細胞から分化樹立した神経細胞を用いて病態を解き明かし、その知見を活用した創薬研究にも力を入れる。一方、現在難病を病む患者とその家族に対しては、その痛苦を多少なりとも緩和できるような対症療法の改善・開発を目指す。

【2】調査研究：疫学調査からは発症率、有病率、発症年齢、発症様式、進行状況、重症

度、自然経過、予後規定因子など、疾患の実態を把握するための種々の有益なデータが得られ、かつこれらを用いて疾患の原因・病態の解明に資することができる。さらには、疫学研究は医療施策を立案するための基礎データを提供し、ひいては患者の福祉向上へと寄与することから、当班の大きな柱に据えてきた。Japanese Consortium of Amyotrophic Lateral Sclerosis (JaCALS) (事務局 名古屋大学医学部神経内科) は、当班班員を主要構成員とし、遺伝子試料を集積すると共に、前向きかつ経時的に臨床情報も収集する ALS の貴重なコホート研究である。さらに、変性班班員を中心にして、PSP と CBD を主な対象疾患とする前向きコホート研究 (JALPAC: Japanese Longitudinal Biomarker Study in PSP and CBD) を立ち上げ、遺伝子および画像 (MRI、tau-PET) 情報を含む各種バイオマーカー収集を 2014 年度に始動する体制を整えた。

【3】診断・認定基準、機能評価方法の改善：神経難病に於いて、実現性の高い治療法は病態抑止療法である。大多数の神経難病の主症状は運動機能の障害である。従って、治療効果判定にはその進行を抑制することの証明が必要であり、正しい機能評価法の確立が求められる。日常生活での動作は欧米と日本人では大きな違いがあることから、欧米の機能評価方法をそのまま日本人に適用することは出来ず、日本人の生活に適した評価法を作成する必要がある。また、治験薬の効果を的確に判定するためには、障害度や症状進行速度が類似した症例群を選ぶことが重要であり、それには正確な診断法の確立が必要である。特に進行の速い ALS では正確な早期診断法の開発が不可欠である。そのためには客観的な判定に使えるバイオマーカーの発見が重要であり、この方面の研究にも力を入れる。

【4】疾患マニュアル、ガイドライン作成：Huntington 病マニュアル「ハンチントン病と生きる」を完成し、関係者に配布した。さらに、その pdf を神経変性班 HP および難病情報センター HP に upload した。日本神経学会が監修し、当班が協力機関となって作成した「筋萎縮性側索硬化症診療ガイドライン 2013」(編集委員長：中野今治) が 2013 年末に発刊された。

III. 今年度の研究成果

【I】運動ニューロン疾患

ALS の疫学調査に於いて有用なデータが得られた。2011 年 3 月の東日本大震災前の 1 年間 (2009 年 4 月 1 日～2010 年 3 月 31 日) に発行された ALS 特定疾患受給者証所持者の人数 (性、年齢階級別) に関する情報提供を全国の都道府県担当課に依頼し、そのデータを解析した (回収率 100%)。年間粗有病率と発生率は 10 万人当たりそれぞれ 9.9 人、2.2 人であった。有病率、発生率のピークはいずれも 70 歳代に有り、男女比は 1.5 であった。新しい集積地域として新潟県とその近傍が抽出された。この調査の回収率は非常に高く、本邦 ALS に関する信頼度の高いデータになると思われる。

1. 基礎

1) ALS-FUS モデルショウジョウバエの表現形を修飾する因子：ショウジョウバエには人の *FUS* ホモログである *Caz* が存在する。このノックダウンショウジョウバエ (*Caz*-KD) と他の遺伝子変異を有するショウジョウバエを交配させたところ、*VCP* (valocin containing protein) のショウジョウバエホモログ *ter94* の変異系統との交配により *Caz*-KD の表現形の増強が見られ、*ter94* 過剰発現系統との交配により、その抑制が認められた。ALS-FUS の病態解明に資すると期待される。

2) TDP-43 mRNA による自己タンパク量の制御：正常細胞の TDP-43 タンパク量は一定に保たれており、その過剰発現は細胞死を来す。この制御機構を HEK293 細胞と TDP-43 の exon 6 を含むミニジーンで解析したところ、TDP-43 mRNA は TDP-43 の量によって poly A 付加部位が変化し、最終エクソン内の 2 箇所ですプライシングが誘発されることが示された。このプライシング機構によりナンセンス変異異存 mRNA 分解機構が惹起され、自己タンパク量が制御されると考えられる。

2. 臨床

1) 遺伝子

(1) 高齢発症の常染色体性優性遺伝性家族性 ALS の 1 家系に於いて、疾患特異的な遺伝子 *ERBB4* を同定した (ALS 19)。本遺伝子の発現産物 ErbB4 は神経細胞の生存に深く関わっていることが示されており、この機能低下が ALS 19 における運動細胞死を惹起することが考えられる。Neuregulin 等による ErbB4 の活性化が ALS の治療に繋がる可能性がある。

(2) ALS 前向きコホート研究 JaCALS では、2013 年 12 月 20 日現在で 882 例の ALS、273 例のコントロールの臨床情報と同数のゲノム遺伝子を集積した。定期的に登録症例の神経症状を把握し、予後予測させる臨床因子の探索を行うと共に、重症度推移情報とゲノム遺伝子を用いて ALS の進行に関係する遺伝子多型の同定を試みた。全ゲノム網羅的な遺伝子多型タイピングの結果と、ALSFRS の経時の変化を混合分布モデルを用いてパターン化し、発症年齢、性、発症部位および遺伝子多型との関連解析を解析したところ、P 値が 10^{-8} 台を示す遺伝子多型が 8 個同定された。

(3) SMA における *SMN1* の新しい検出方法の開発：従来の *SMN1* 検出方法には、cDNA の作成が困難であったり、*SMN1* の一部しか単離できないという不備が存在する。この不備を克服するために、exon 1 から 614pb 上流領域に設計した forward primer を用いた long PCR を開発し、それにより *SMN1* を特異的に増幅することに成功した。この方法により、従来法では診断がつかなかった SMA 症例における変異同定が可能となった。

(4) 予後良好で下位運動ニューロン症候のみを呈した成人発症例の遺伝子的背景：運動ニューロン疾患 302 例の内、初診時から少なくとも 5 年間は下位運動ニューロン症候のみを呈し、呼吸筋麻痺を来さなかった症例 9 例対して *SMN1*、*NAIP* の変異を解析した。そのうち、内 6 例では網羅的遺伝子解析を行った。*SMN1*、*NAIP* の変異は認められなかったものの、1 例で遠位型遺伝性運動ニューロパチーの原因遺伝子である *HSPB1* T1151Q が同定された。成人発症 SMA の中には運動ニューロパチーが含まれるものと思われる。

2) 疫学: 2009年4月1日~2010年3月31日の1年間に発行されたALS特定疾患受給者証所持者の人数(性、年齢階級別)に関する情報提供を全国の都道府県担当課に依頼し、そのデータを解析した(回収率100%)。年間粗有病率と発生率は10万人当たりそれぞれ9.9人、2.2人であった。有病率、発生率のピークはいずれも70歳代に有り、男女比は1.5であった。新しい集積地域として新潟県とその近傍が抽出された。今回の調査で示された本邦のALS発生率は欧米のそれ(4.2~6.6)に比して低く、日本人の遺伝的要因あるいはライフ・スタイルが関与している可能性が考えられる。この調査での回収率は100%であり、本邦ALSに関する信頼度の高いデータになると思われる。

3) 臨床像

(1) 画像: ALSと前頭側頭葉変性症(FTLD)には共通の分子病理基盤が存在すると考えられている。そこで、ALS、画像上判定したALSを伴う前頭側頭葉変性症、ALSを伴わないFTLDそれぞれの多数例に於いて、認知機能検査を実施し、MRIにて大脳萎縮部位を検索した。認知機能正常のALSでも運動野と前頭葉の萎縮があり、軽度認知機能低下のALSで前頭葉の萎縮が進み、ALSを伴うFTLDでは前頭葉萎縮が更に強くなり、ALSを伴わないFTLDでも前頭側頭葉に萎縮が目立って見られるようになった。また、拡散テンソル画像検索では、ALSとFTLDに共通して尾状核でのfractional anisotropyの低下が見られ、両者に共通する画像マーカーとなる可能性が示された。

(2) 日本人*FUS/TLS*変異例の臨床特徴: 8種類の*FUS/TLS*変異が認められた日本人10家系の患者で、その臨床像を解析したところ、例外はあるものの平均発症年齢39歳と若年発症であり、上肢から頸部発症が多く、下位運動ニューロン症候が優位で、進行が速い特徴が見られた。

(3) 長期間TPPV装着ALS患者の機能予後予測: TPPV施行期間が2年以上のALS23例について、発症以降の運動機能の障害度と、ALSFRS-Rの総スコア及び4つのサブスコア(bulbar, fine motor, gross motor, respiratory)が0になるまでの期間と Δ ALSFRS-Rとの関連を解析した。ALSFRS-Rの総スコアとサブスコアがゼロになるまでの期間と Δ ALSFRS-Rは、いずれも都立神経病院が提唱したコミュニケーション障害ステージIIIおよびIVへの移行と相関し、 Δ ALSFRS-Rは同ステージのV(TLS)への移行と相関していた。発症からTPPV導入までの Δ ALSFRS-RはTPPV導入後のコミュニケーション機能の予測因子となる可能性が示された。

4) 電気生理

(1) 横隔神経伝導検査所見と呼吸機能・生命予後: ALS84例に於いて横隔神経のCMAPを記録し、%FVCを含む多因子との交絡を多変量解析で分析したところ、CMAPと%FVCの間に有意の相関が認められた。CMAPの振幅を、0.4mVでカットして2群に分けるとKaplan-Meier生存曲線に有意差が認められたことから、CMAPがこの値を切ると呼吸療法に対する方針決定が早急に求められることになる。

(2) 反復神経刺激法(RNS)によるALSと頸椎症性筋萎縮症(CSA)の鑑別: ALS35例、CSA28

例に対して短母指外転筋、上部僧帽筋、三角筋において RNS を行ったところ、漸減現象はそれぞれの筋で、ALS では 30%、34%、63%、CSA では 4%、0%、13% となり、有意差が見られた(僧帽筋では感度 34%、特異度は 100%)。僧帽筋 RNS は両疾患の鑑別に有用であると考えられる。

5) 病理

(1) 人工呼吸器装着を早期に要する ALS 例は、意思伝達が全くできなくなる totally locked-in state (TLS) になり、病理学的にも脳幹被蓋と多系統の高度萎縮を呈するが、一部の症例では長期間意志伝達可能(ステージ I)である。30 年間ステージ I であった 3 剖検例では、脳幹の変化は軽く、病変は運動ニューロン系に局限しており、TDP-43 封入体は皆無あるいはごく少数であった。このように、TDP-43 proteinopathy とは異なる機序を有する ALS の 1 群が存在する可能性が考えられた。

(2) ALS 大脳皮質の TDP-43 組織像：FTLD-TDP の大脳皮質病変は、pTDP-43 免疫染色パターンからサブタイプ A~D に分類され、運動ニューロン疾患を伴う症例はタイプ B とされている。ALS で海馬歯状回の神経細胞内に TDP-43 封入体を有する群(ALS type 2) 35 例の大脳皮質を TDP-43 抗体で検索したところ、一部ではタイプ B に相当する像を呈したが、他は多くの dystrophic neurites に加えて neuronal cytoplasmic inclusion や threads を伴う多彩な像が認められ、いずれのタイプにも所属せしめ難かった。FTLD-TDP のサブタイプは全ての FTLD-TDP に適用できるとは言えないことが示された。

6) 治療研究

(1) 神経栄養因子発現間葉系幹細胞による治療実験：人工染色体(HAC)技術を用いて樹立した GDNF、IGF-1、HGF を同時発現する骨髄間葉系神経細胞を、SOD1^{G93A} モデルマウスの脳室内に注入したところ、発症 20 日前投与例で有意の延命効果が認められた。今後はこの改変手法の安全性の確認が求められる。

【II】 Parkinson 病(PD)と関連疾患

タウオパチーである PSP と CBD の診断は、現在では脳の病理診断に依らざるをえず、生前診断が不可能である。そのために両者の臨床診断を可能にするバイオマーカーの開発が待たれている。今年度は新に開発されたタウタンパクリガンド [¹¹C]-PBB3 を用いた研究が紹介された。PSP 症候群、CBS(corticobasal syndrome)及び対照例に [¹¹C]-PBB3 PET を実施した結果、 [¹¹C]-PBB3 の高集積が PSP と CBS に共通に認められた部位に加えて、両疾患間で差の見られた箇所も複数観察された。このタウ画像が両疾患の診断および鑑別に有用なマーカーになることが期待される。

1. 基礎

1) オートファジー・ライソゾーム系

(1) GBA 変異メダカ：Gaucher 病の原因遺伝子である glucocerebrosidase gene (GBA) のヘテロ接合変異はパーキンソン病の強い危険因子であるが、その機序は不明である。ホモ接

合型 GBA 変異メダカを検索したところ、脳に於いて α -シヌクレインと p62 蛋白の凝集体、ライソゾーム異常、Gaucher 病に類似した異常が認められた。電顕的にはオートファゴソーム蓄積を伴う spheroid が観察され、免疫電顕ではそこに α -シヌクレインが蓄積していた。これらの所見は、 α -シヌクレイン凝集体形成にオートファジー・ライソゾーム系の異常が存在していることを示しており、GBA 変異パーキンソン病でも類似の機序の存在を示唆している。

(2) 若年発症性パーキンソン病 PARK9(ATP13A2 F182L 変異) : PARK9 の原因遺伝子産物 ATP13A2 は本来リソゾームに局在するが、ATP13A2 変異体を発現させた培養細胞では、変異 ATP13A2 蛋白はライソゾームに局在しないことが判明し、その機能異常を来していることが推測された。ATP13A2 をノックダウンすると神経細胞死、異常なライソゾームの出現、カテプシン D 活性が低下したことから、PARK9 ではオートファジー・ライソゾーム系の異常が存在することが示唆された。

2) ミトコンドリア

(1) パーキンの糖化 : Kloklin 1 は、chondroitin polymerizing factor (ChPF) のスプライシング変異体であり、パーキンの糖化を促進する。His パーキン導入培養細胞に於いて検索した結果、パーキンのレクチンが糖化されており、ミトコンドリア内膜に局在していた。一方、パーキンの E3 活性は *in vivo* 系では ChPF の過剰な発現により抑制された。以上から、パーキンは ChPF により糖鎖が付加されミトコンドリア内膜に運搬されるが、E3 活性は低下することが示唆された。

3) バイオマーカー

(1) タウイメージング : 新しく開発されたタウタンパクリガンド [^{11}C]-PBB3 を用いて、臨床的に診断された PSP9 例と CBS (corticobasal syndrome) 4 例、年齢と性をマッチさせた健常対照者 19 例に [^{11}C]-PBB3 PET を実施した結果、疾患群では大脳皮質、皮質下、脳幹、小脳で [^{11}C]-PBB3 に共通して高集積が認められた。PSP に於いて集積が優位に高い構造は脳幹、上小脳脚、歯状核、視床下核、視床の外側核、被殻・淡蒼球であり、CBS では補足運動野、Roland 野周囲、島を含む大脳皮質、視床背内側核であった。このタウイメージングが両疾患の診断および鑑別に対し、どの程度有用であるかを検証する多施設共同研究が企画されている。

2. 臨床

1) PD に於けるレム睡眠期行動異常症 (RBD) : RBD は PD の前駆症状のみでなく、PD の自律神経症状や認知機能障害の増悪因子とも考えられている。PD82 例 (PD with clinical RBD 27 例、PD with subclinical RBD 23 例、PD with normal REM sleep 32 例) を解析したところ、RBD の存在と内服 L-DOPA 換算量および起立性低血圧が相関し、かつ認知症への有意な関連因子であった。

2) PSP 症候群 (PSPS) の背景病理と臨床像 : 臨床的に PSPS と診断され、病理診断が確定

している 20 例に於いて、PSP に特徴的な臨床像を探った結果、slurred speech、言語障害、face-touching sign、異常言動欠如は PSP を予測させる所見であった。更に多数例での検証で再現性が認められれば、これらは臨床診断の有力な手がかりになると期待される。

3) 治療、副作用

(1) 姿勢異常とその治療：首下がりあるいは上腹部腰曲がりを呈する PD 患者に対して表面筋電図検査を行ったところ、前者では主に斜角筋に、後者では外腹斜筋に放電を認めた。首下がり患者には斜角筋に、上腹部腰曲がり患者には外腹斜筋にリドカインを注入したところ、大多数の患者で姿勢が改善し、3 ヶ月持続した。本手技は PD の姿勢異常治療として期待される。

(2) PD 遺伝子治療の長期成績と課題：AADC 遺伝子搭載 AAV ベクターにて遺伝子治療を行った PD 6 例の 5 年間の長期成績が報告された。1 例 (A-6) は 41 ヶ月後に死亡して剖検された。A-6 及び 2 年後に認知症が出現した A-2 を除く 4 例の UPDRS part III は off 時での悪化は見られなかった。3 例の遺伝子治療 5 年後の PET では、両側被殻の FMT 集積の増加が持続していた。剖検例の注入部では AADC 抗体陽性細胞が多数認められ、炎症細胞の進出は見られなかった。現在、タカラバイオが高濃度 GMP レベルの AAV-AADC を作成中であり、今年中に次の段階に進む予定である。

4) 神経病理

(1) 小脳歯状核・上小脳脚病変の PSP と CBD 間での差異：PSP61 剖検例、CBD25 剖検例で上小脳脚の萎縮と小脳歯状核に於ける細胞脱落を比較した。上小脳脚萎縮は、PSP では通常認められた (4 割で高度萎縮) が、CBD では高度萎縮はなく、PSP に比して有意に軽度であった。小脳歯状核神経細胞脱落、あるいは中脳被蓋の萎縮は両者間で差はなかった。画像上も捉えうる上小脳脚萎縮の差は両者を鑑別する手がかりとなるものと考えられる。

【III】 舞踏運動

1. ハンチントン病：2011 年 4 月 1 日から 2012 年 3 月 31 日までの 1 年間に発行された HD の特定疾患医療受給者証を用いて疫学調査を行った結果、調査票に入力が済んでいたのは 687 (男 293、女 394) 人で、新規登録は 72 人であることが判明した。難病情報センターへの登録人数は 846 人で、これに基づく有病率は人口 10 万人当たり 0.7 人であった。発症年齢は 30~60 歳台が中心で、遺伝子診断実施率は 60%であった。日常生活では全介助・部分介助が 2/3 を占め、介護保険の利用率は 40%と低いものの介護度は 4、5 度が大多数であった。ハンチントン病実態の一面を反映しているデータと思われる。

2. 有棘赤血球舞踏病 (ChAc)：病因は *VPS13A* 変異であり、遺伝子産物 chorein の欠損で発症するが、その機能は不明である。Chorein を強制発現させた培養細胞での研究から α -tubulin や HDAC6 と相互作用する可能性が示され、細胞骨格形成や autophagy/mitophagy に関与しているものと思われた。ChAc は、*VPS13A* 変異によりこれらの作用に障害が生じて

発症するものと推測される。

【IV】 脊髄空洞症 SM

先天性 Chiari 奇形は発達障害の一つであり、これを伴う SM の要因の一つとして遺伝的素因が考えられている。ゲノム構造多型 (CNV) は発達障害の原因の一つである。Chiari I 型 SM 5 例の血液より DNA を抽出して CNV アレイを用いて測定し、測定値を数値化した後に網羅的 CNV 解析を行ったが、患者 5 名にのみ共通して検出される Mbp 単位の DNA 特定構造は同定できなかった。現在、1kbp 程度の短い構造変化について解析を進めている。

【V】 ALS 分科班：分科班使命に特化したワークショップと班会議を独自に開催し、ALS 治療研究に関する諸研究が報告され、活発な意見が交わされた。詳細は分科班の実績報告書を参照されたい。

孤発性パーキンソン病のゲノム解析

研究分担者 戸田達史

研究協力者 佐竹渉¹，安藤祐子¹，富山弘幸²，望月秀樹³，村山繁雄⁴，中島健二⁵，
川上秀史⁶，小幡文弥⁷，長谷川一子⁸，武田篤⁹，辻省次¹⁰，山本光利¹¹，村田美穂¹²，服部信孝²

1)神戸大学神経内科，2)順天堂大学脳神経内科，3)大阪大学神経内科，
4)東京都立健康長寿医療センター研究所，5)鳥取大学脳神経内科，6)広島大学分子疫学，
7)北里大学臨床免疫，8)国立病院機構相模原病院神経内科，9)東北大学神経内科，
10)東京大学神経内科，11)高松神経内科，12)国立精神神経医療研究センター神経内科

研究要旨

エクソンに存在する Rare ながら強いパーキンソン病(PD)ゲノム因子を発見するため、とくに孤発性 PD 患者を中心に、全エクソン塩基配列解読(エクソーム解析)をおこなった。715 例の PD 患者ゲノムから、全エクソン(エクソーム)を抽出、HiSeq2000 シークエンサーで超高速・並列シークエンスをおこなった。BWA ソフトウェアでヒト参照配列 hg19 へマップし、GATK ソフトウェアで、参照配列とことなる SNV (single nucleotide variant)を約 30 万個検出した。715 検体のエクソームデータの平均被覆は 126.1x であり、全エクソン配列の 94.9%のエリアが 10x 以上で被覆された。これは、孤発性 PD 患者 755 人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強い Rare variant リスクを発見する。

A.研究目的

我々は、一塩基多型 SNP を解析したゲノムワイド関連解析を行い、4つの孤発性 PD 遺伝子 (*PARK16*, *BST1*, *α-synuclein*, *LRRK2*) を報告した (Satake *et al*, *Nature Genet* 2009)。これらは、その後の白人での大規模解析でも結果が再現された、確実な孤発性 PD 遺伝子である (表 1: IPDGC, *Lancet* 2011; Lill *et al*, *PLoS Genet* 2012, Do *et al*, *PLoS Genet* 2011 etc)。また、最近、機能的な面からも、*PARK16* 遺伝子 *RAB7L1* の、細胞内輸送の PD 病態への重要性・*LRRK2* との相互作用がしめされた (MacLeod *et*

al, *Neuron* 2013)。

表1

日本人GWAS (Satake *et al*, *Nature Genet* 2009) で同定された4つの孤発性PD遺伝子座
白人集団の数万人規模の大規模研究でPDへの関連が繰り返し再現
⇒東アジア人・白人共通の確実な孤発性PD遺伝子である

PARK16
P = 7.28x10 ⁻⁹ (Sanchez <i>et al</i> , <i>Nature Genet</i> 2009)
P = 1.00x10 ⁻¹² (IPDGC & WTCCC, <i>PLoS Genet</i> 2011)
P = 1.27x10 ⁻⁷ (Do <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2011)
P = 8.00x10 ⁻¹⁰ (Lill <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2012)
BST1
P = 1.79x10 ⁻⁸ (Saad <i>et al</i> , <i>Hum Mol Genet</i> 2011)
P = 1.85x10 ⁻⁸ , 2.43x10 ⁻⁹ (IPDGC, <i>Lancet</i> 2011)
P = 2.3x10 ⁻⁸ (Do <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2011)
P = 1.87x10 ⁻¹⁰ (Lill <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2012)
α-synuclein
P = 2.24x10 ⁻¹⁶ (Sanchez <i>et al</i> , <i>Nature Genet</i> 2009)
P = 7.90x10 ⁻¹⁶ , 4.23x10 ⁻²³ (IPDGC, <i>Lancet</i> 2011)
P = 2.82x10 ⁻⁸ (Saad <i>et al</i> , <i>Hum Mol Genet</i> 2011)
P = 2.29x10 ⁻¹⁹ (Do <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2011)
P = 6.08x10 ⁻¹⁶ (Lill <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2012)
LRRK2
P = 1.55x10 ⁻¹⁶ (Sanchez <i>et al</i> , <i>Nature Genet</i> 2009)
P = 1x10 ⁻⁶ (Saad <i>et al</i> , <i>Hum Mol Genet</i> 2011)
P = 3.23x10 ⁻⁷ , 1.06x10 ⁻⁸ (IPDGC, <i>Lancet</i> 2011)
P = 1.6x10 ⁻⁸ (Do <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2011)
P = 6.44x10 ⁻¹⁵ (Lill <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2012)

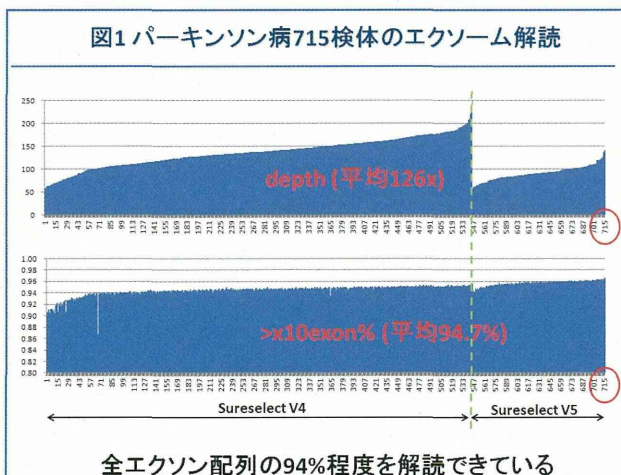
しかし一方、これらだけでは本症の遺伝背景は説明できず、他にも孤発性 PD 遺伝子は存在す

る。そこで本研究では、エクソンに存在する Rareながら強いPDゲノム因子を発見するため、とくに孤発性PD患者を中心に、全エクソン塩基配列解読（エクソーム解析）をおこなった。

B. 研究方法 C. 研究結果

本研究は遺伝子研究倫理委員会の承認をえて行った。

715例のPD患者ゲノムから、全エクソン（エクソーム）を抽出、HiSeq2000 シークエンサーで超高速・並列シークエンスをおこなった。BWAソフトウェアでヒト参照配列hg19へマップし、GATKソフトウェアで、参照配列とことなるSNV (single nucleotide variant)を検出した。715検体のエクソームデータの平均被覆は126xであり、全エクソン配列の94.7%のエリアが10x以上で被覆された(図1)。これは、孤発性PD患者715人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。



さらに、われわれが以前ゲノムワイド関連解析で報告した4つの孤発性PD遺伝子 (*PARK16*, *BST1*, *α-synuclein*, *LRRK2*; Satake *et al*, *Nature genet* 2009) に強い疾患リスクをもった rare variant が存在するかを明らかにするため、PD患者625検体(上述データの一部)と非患者対照259検体のエクソン配列データを比較した。具体的には、PD患者625検体と非患者対照259

検体の全エクソン配列データからエクソン領域に存在するSNV (single nucleotide variant) を抽出し、患者・対照群間で、SNV頻度をFisher's exact testで有意差検定した。

PARK16, *α-synuclein*, *LRRK2* には、遺伝子エクソン領域内に有意なSNVは検出しなかった(図2: すべて $P > 0.01$)。 *BST1* には比較的有意なSNVを検出したが(図2: $P = 0.0005$)、アレル頻度は患者群で46%、対照群で37%であり、強い疾患リスクをもつ rare variant ではなかった。また、この多型は、我々が以前報告した孤発性PD遺伝子 *BST1* のSNV (Satake *et al*, *Nature genet* 2009) とほぼ連鎖不平衡の多型であった。よって、これら孤発性PD遺伝子エクソンには強い rare variant risk は存在せず、イントロンなどのSNVが発症リスクとなっていると考えた。

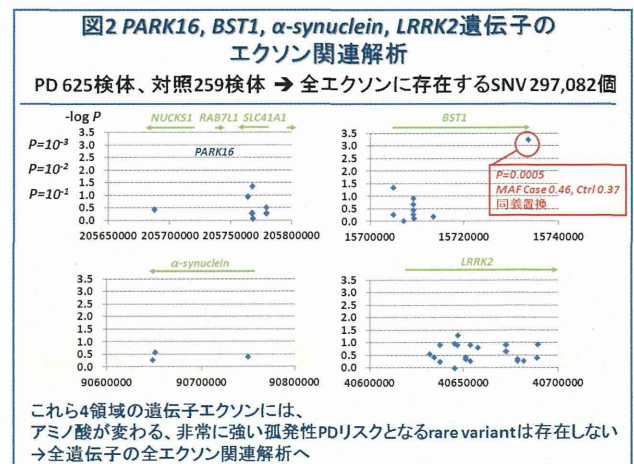


図2 *PARK16*, *BST1*, *α-synuclein*, *LRRK2* 遺伝子のエクソン関連解析
PD 625検体、対照259検体 → 全エクソンに存在するSNV 297,082個

D. 考察 E. 結論

- 孤発性PDの発症ゲノム因子には、
- (1) 強い疾患リスクをもつエクソン領域の rare variant
 - (2) リスクとしては強くはないが頻度は高い塩基多型
 - (3) 非常に強い疾患リスクであり家族性PDを引き起こすような変異の孤発性群への混入がある。