

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患政策研究事業)
神経変性疾患領域の基盤的調査研究 分担研究報告書

GWASによるゾニサミド反応性のファーマコジェノミクスおよびパーキンソン病における α シヌクレインオリゴマーの脳内分布と認知機能障害への影響と脳内鉄蓄積を伴う神経変性症(NBIA)の検討、PDの検討、不随意運動グループ統括に関する研究

研究分担者： 戸田達史

東京大学医学部附属病院 脳神経内科

研究要旨

レボドパによるパーキンソン病 (PD) の長期治療は、運動合併症の「ウェアリングオフ」につながる。ゾニサミドは非ドーパミン作動性の抗パーキンソン病薬であり、「ウェアリングオフ」を改善することができるが、治療への反応は個人によって異なる。GWASによるゾニサミド反応性のファーマコジェノミクスを行った。SNP rs16854023 (MDM4) は、「オフ」時間の短縮とゲノムワイドな有意な関連を示した ($P_{\text{Adjusted}} = 4.85 \times 10^{-9}$)。レスポンダー遺伝子型の保因者は、非保因者と比較して平均「オフ」時間の7分の1以上の減少を示した (1.42時間対0.19時間; $P = 2.71 \times 10^{-7}$)。インシリコeQTLデータは、ゾニサミド感受性がMDM4高発現と関連していることを示した。これは、抗パーキンソン病薬に関する最初のゲノムワイドな薬理遺伝学研究であり、この結果は、遺伝子型に基づくゾニサミド治療によるPDの「ウェアリングオフ」の管理を改善するための基盤を提供している。

簡易遺伝子診断システムを構築し、static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA) の3症例、neuroferritinopathyの1例について解析を行い、原因遺伝子の変異を検出できることを確認した。各種疾患の鑑別、進展様式、臨床症状・病理との対比を行う。

本年度はパーキンソン病において α シヌクレインの早期凝集体である α シヌクレインオリゴマーが脳内でどのように分布しているかを明らかにした。これまで、 α シヌクレインの晩期凝集体であるレビー関連病理がパーキンソン病の病理学的ホールマークと考えられてきた。しかし、今回の検討の結果、 α シヌクレインオリゴマーがレビー関連病理よりも早い段階から脳全体に広がっている可能性が示され、 α シヌクレイン凝集体をターゲットにした治療戦略を考えるうえでの症例選択の重要性が示唆された。

A. 研究目的

レボドパによるパーキンソン病 (PD) の長期治療は、運動合併症の「ウェアリングオフ」につながる。ゾニサミドは非ドーパミン作動性の抗パーキンソン病薬であり、「ウェアリングオフ」を改善することができるが、治療への反応は個人によって異なる。GWASによるゾニサミド反応性のファーマコジェノミクスを行う。

NBIAは各種病型、遺伝子が存在する。NBIAの網羅的遺伝子診断を行い、各種疾患の鑑別、進展様式、臨床症状・病理との対比を行い、診療ガイドラインを作成し、臨床症状把握と診断基準作成、病態解明、予後予測を可能とさせる。

NBIAは希少疾患であり、正確な診断の上での臨床情報収集、バイオマーカー探索が求められる。しかし非典型例も多く存在するため、臨床情報のみでの確定診断は困難である。我々は、NBIA確定診断症例の蓄積を目指し、簡易エクソームを用いた遺伝子解析を行った。

パーキンソン病 (PD) では α シヌクレイン (α SYN) 陽性の凝集体であるレビー小体やレビーニューライトといったレビー関連病理が病理学的特徴とされる。レビー関連病理は α SYN晩期凝集体であるが、近年、 α SYN早期凝集体である α SYNオリゴマーの神経毒性が報告されている。本研究の目的は、PD脳における α SYNオリゴマーの脳内分布を

検討し、臨床症状との相関を検討することである。

B. 研究方法

ゾニサミド反応性の遺伝的基礎を明らかにするために、12週間のゾニサミド治療後に「オフ」時間が1.5時間以上減少した67人のレスポonderと133人のノンレスポonderを含む、プラセボ対照臨床試験の200人のPD患者を対象にゲノムワイド関連研究(GWAS)を実施した。611,492の一塩基多型(SNP)と「オフ」時間の短縮との関連を遺伝子型決定して評価した。また、GWASデータの全ゲノムimputation、遺伝子ベースおよびパスウェイベースの解析も実行した。有望なSNPについては、GTExデータベースの単一組織発現量の形質遺伝子座(eQTL)データを調べた。

ターゲットキャプチャーには、NBIA関連の遺伝子を比較的多くカバーしているfocused exomeを選択し、カバーされていない領域は直接シーケンス法で補った。シーケンスにはMiSeqを用い、sure callを用いて解析を行った

PD 8例とコントロール5例の剖検脳を用いた。大脳皮質と大脳辺縁系、基底核、脳幹において、近接ライゲーションアッセイ(proximity ligation assay, PLA)を応用した α SYN-PLA染色により α SYNオリゴマーを、リン酸化 α SYN免疫染色によりレビー関連病理を、それぞれ検出した。さらに、認知機能障害のあるPD症例と認知機能障害のみられなかったPD症例(それぞれ4例ずつ)について、海馬のレビー関連病理と α SYNオリゴマーの重症度を比較した。

(倫理面への配慮)

研究は、神戸大学医学部倫理委員会に承認を受けて実施し、すべての対象者は文書により説明を受けて同意を受けた。

C. 研究結果

SNP rs16854023 (MDM4)は、「オフ」時間の短縮とゲノムワイドな有意な関連を示した($P_{\text{Adjusted}} = 4.85 \times 10^{-9}$)。レスポonder遺伝子型の保因者は、非保因者と比較して平均「オフ」時間の7分の1以上の減少を示した(1.42時間対0.19時間; $P = 2.71 \times 10^{-7}$)。インシリコeQTLデータは、ゾニサミド感受

性がMDM4高発現と関連していることを示した。

臨床的にNBIAが疑われた10症例について、簡易エクソームを用いた遺伝子解析を行い、うち4症例をNBIAとして遺伝子診断した。1例目はWDR45遺伝子にc.662_663delTT (p.Phe21*)の変異をヘテロ接合性に検出し、NBIA5と診断した。2例目はFTL遺伝子にc.190G>A (p.Glu64Lys)の変異をヘテロ接合性に検出し、NBIA3(神経フェリチン症)と診断した。3例目はC19orf12にc.278delG (p.Pro93Leufs*26)の変異をヘテロ接合性に検出し、NBIA4

(MPAN)と診断した。通常は常染色体劣性遺伝形式をとる疾患であるが、常染色体優性遺伝形式の症例も複数報告されており、c.278delGの変異も既報告がある(Parkinsonism Relat Disord.2021 Jan;82:84-86) 4例目はWDR45遺伝子にc.694C>T (p.Arg232Cys)の変異をヘテロ接合性に検出し、NBIA5と診断した。

レビー関連病理に比べて、 α SYNオリゴマーは脳内に広範に分布していた。PD症例のうち4例では大脳皮質にレビー関連病理がみられなかったが、それらの症例においても一定量の α SYNオリゴマー蓄積が観察された。 α SYNオリゴマーとレビー関連病変には分布の違いがあり、 α SYNオリゴマーは大脳新皮質で有意に多く、レビー関連病理は脳幹で多かった。また、認知機能障害を呈したPD症例では、認知機能障害がなかったPD症例と比べ、海馬の α SYNオリゴマーが有意に多かったが、レビー関連病理には有意差は認められなかった。

D. 考察

「オフ」時間に大きく影響する37のパスウェイの中で、カルシウムとグルタミン酸のシグナル伝達は、ゾニサミドの抗てんかん効果とも関連している。MDM4はp53の負の調節因子である。運動変動の改善とMDM4のアップレギュレーションとの関連は、p53阻害することがドーパミン作動性ニューロンの喪失とその結果としての運動症状を予防する可能性があることを意味している。

NBIAが疑われた5例の解析を行った。SENDAを1例、神経フェリチン症を1例、新規に診断した。残りの3例は、簡易エク

ソームでは病原性が示唆される変異を検出することができなかつた。この3例については、臨床経過が古典的 NBIA としては非典型的であった。

本研究では、PD 患者の剖検脳を用いて、レビー関連病理と α SYN オリゴマーの脳内分布を検討した。PD 症例のうち4例では大脳皮質にレビー関連病理がみられなかったが、それらの症例においても一定量の α SYN オリゴマーが認められ、 α SYN オリゴマーが早期から脳全体に分布していることがわかった。このことは α SYN を標的とした PD 治療を考えるうえで重要であり、より早期の段階から治療介入を行う必要性が示唆された。また、レビー関連病理が脳幹に多かったのに対して、大脳新皮質では α SYN オリゴマーが多くみられた。この観察結果から、早期から障害される脳領域においてはレビー関連病理の形成に伴って α SYN オリゴマーが減少に転じていることが示唆された。これまでに α SYN オリゴマーの毒性については多数の報告があったが、ヒトの臨床症状への相関はよくわかっていなかった。本研究では、認知機能障害を呈した PD 症例で海馬に多くの α SYN オリゴマー蓄積がみられ、PD の認知機能障害に α SYN オリゴマーが関与している可能性が考えられた

E. 結論

これは、抗パーキンソン病薬に関する最初のゲノムワイドな薬理遺伝学研究であり、この結果は、遺伝子型に基づくゾニサミド治療による PD の「ウェアリングオフ」の管理を改善するための基盤を提供している。

簡易エクソームは、新規変異の検出には課題があるが、古典的な NBIA の診断には有用と考えられる。遺伝子診断例を蓄積し、臨床情報の収集やバイオマーカー探索に繋げたい。

PD において早期から脳全体に α SYN オリゴマーが分布していることが示唆された。海馬における α SYN オリゴマーが PD の認知機能障害を来している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2020/4/1~2023/3/31 発表)

1. 論文発表

1. Sekiya H, Tsuji A, Hashimoto Y, Takata M, Koga S, Nishida K, Futamura N, Kawamoto M, Kohara N, Dickson DW, Kowa H, **Toda T**. Discrepancy between distribution of alpha-synuclein oligomers and Lewy-related pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2022 Sep 6;10(1):133. doi: 10.1186/s40478-022-01440-6.
2. Naito T, Satake W, Ogawa K, Suzuki K, Hirata J, Foo JN, Tan EK, **Toda T**, Okada Y. Trans-Ethnic Fine-Mapping of the Major Histocompatibility Complex Region Linked to Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2021 Aug;36(8):1805-1814. doi:10.1002/mds.28583.
3. Cha PC, Satake W, Ando-Kanagawa Y, Yamamoto K, Murata M, **Toda T**. Genome-wide association study identifies zonisamide responsive gene in Parkinson's disease patients. *J Hum Genet.* 2020 Aug;65(8):693-704. doi: 10.1038/s10038-020-0760-8.

2. 学会発表

1. 2020年2月, Pan American Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, Hiroaki Sekiya, Hisatomo Kowa, Yuki Hashimoto, Mairko Takata, Riki Matsumoto, and Tatsushi Toda, Discrepancy of the distribution of alpha-synuclein oligomers and Lewy bodies in Parkinson's disease brain
2. 2020年9月, International Parkinson and Movement Disorder Society, MDS Virtual Congress 2020, Hiroaki Sekiya, Hisatomo Kowa, Yuki Hashimoto, Mairko Takata, Riki Matsumoto, and Tatsushi Toda, Difference in distribution between alpha-synuclein oligomers and Lewy bodies in Parkinson's disease brain
3. 2020年10月, 日本神経病理学会総会学術研究会, Hiroaki Sekiya, Hisatomo Kowa, Yuki Hashimoto, Mairko Takata, Riki Matsumoto, and Tatsushi Toda, Discrepancy of the Distribution of alpha-synuclein oligomers and Lewy bodies in Parkinson's Disease Brain,
4. 2021年5月, 日本神経学会学術大会, Hiroaki Sekiya, Hisatomo Kowa, Yuki Hashimoto, Mariko Takata, Riki Matsumoto, and

Tatsushi Toda, Distribution
Discrepancy of alpha-synuclein oligomers
and Lewy bodies in
Parkinson's Disease Brain

5. 2022年6月, Annual Meeting of American Association of Neuropathologists,
Hiroaki Sekiya, Asato Tsuji, Yuki Hashimoto, Mariko Takata, Shunsuke Koga, Katsuya Nishida, Naonobu Futamura, Itaru Funakawa, Kenji Jinnai, Michi Kawamoto, Nobuo Kohara, Hisatomo Kowa, Tatsushi Toda, and Dennis W. Dickson. Distribution difference between alpha-synuclein oligomers and Lewy pathologies in Parkinson's disease brain
6. 2022年6月, International Lewy Body Dementia Conference 2022, Hiroaki Sekiya, Asato Tsuji, Yuki Hashimoto, Mariko Takata, Katsuya Nishida, Naonobu Futamura, Itaru Funakawa, Kenji Jinnai, Michi Kawamoto, Nobuo Kohara, Shunsuke Koga, Dennis W. Dickson, Hisatomo Kowa, and Tatsushi Toda. Distribution Discrepancy between alpha-synuclein oligomers and Lewy bodies in Parkinson's disease brain.
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし