

令和元年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09678

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた新規パーキンソン病原因遺伝子の単離

研究課題名(英文) Aim to detect a novel pathogenic mutation in a familial Parkinson's disease

研究代表者

西岡 健弥 (Nishioka, Kenya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40348933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は常染色体優性遺伝形式をとり、既知の遺伝子変異を持たないPDの一家系に注目し、全ゲノムシーケンスを施行し、これまでに10の候補遺伝子まで絞り込んでいる。最終目標は、新規候補遺伝子の単離を目指すことである。家族集積が濃厚な常染色体優性遺伝形式の一家系に注目した。患者3名(II-1, II-3, III-1)は典型的なPD症状を呈しており、結果、病的遺伝子候補に相当するrare variantを同定した(AHDC1, AP2A2, FBLN2, KIAA0947, NRAP, OLFML2B, TM6SF1, FLG-AS1, HMCN2, MUC19)。今後これらの解析を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病(PD)は、振戦、固縮、歩行困難、動作緩慢といった運動症状を主体とした加齢が重要な危険因子の疾患である。超高齢社会に伴い、その患者数は今後益々増加することが予想される。人口構成の高齢化に伴い、その有病率は増加の一途を辿っている。更なる病態解明と分子レベルにおける新規治療薬の開発そして疾患修飾療法が望まれる。これまで遺伝性PD研究は孤発型PDの病態解明へ重要なヒントを提供しており、病態解明への近道である。今回我々は常染色体優性遺伝形式をとり、既知の遺伝子変異を持たないPDの一家系に注目し、全ゲノムシーケンスを施行し、病的遺伝子の探索を行う。

研究成果の概要(英文)：We aim to detect a novel pathogenic mutation among a family presenting a high concentration of Parkinson's disease (PD). We used whole genome sequencing (HiSeq2500 sequencer) and focus on 46 candidate gene from the family. Following, we established ion Torrent system to screen 46 candidate gene for 50 familial PD. As a result, we detected 10 genes as a further candidate pathogenic gene, which are AHDC1, AP2A2, FBLN2, KIAA0947, NRAP, OLFML2B, TM6SF1, FLG-AS1, HMCN2, MUC19. Next, we will plan to add more samples to confirm the genetic risk factor of the onset of PD.

研究分野：神経学

キーワード：パーキンソン病 遺伝子 神経変性疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は、振戦、固縮、歩行困難、動作緩慢といった運動症状を主体とした加齢が重要な危険因子の疾患である。超高齢社会に伴い、その患者数は今後益々増加することが予想される。PD の有病率は人口 10 万人あたり 100-150 人と推定されており、人口構成の高齢化に伴い、その有病率は増加の一途を辿っている。iPS 細胞を用いた細胞移植療法の治験も開始されたが、根治は困難であり、更なる病態解明と分子レベルにおける新規治療薬の開発そして疾患修飾療法が望まれる。これまで遺伝性 PD 研究は孤発型 PD の病態解明へ重要なヒントを提供しており、病態解明への近道である。今回我々は常染色体優性遺伝形式をとり、既知の遺伝子変異を持たない PD の一家系に注目し、全ゲノムシーケンスを施行し、これまでに 10 の候補遺伝子まで絞り込んでいる。最終目標は、新規候補遺伝子の単離を目指すことであり、その新規分子病態を解明することである。

2. 研究の目的

既知の変異を持たない常染色体優性遺伝性パーキンソン病の家系から新規の遺伝子単離を目指す。単離できた場合には、その遺伝子に対して、機能解析を加え、その病的な度合いを詳細に解析する。

3. 研究の方法

グループは PD 病的遺伝子の網羅的なスクリーニング解析を ion PGM を用いた high-throughput 解析にて継続して行っている。それでもなお家族性 PD の約 3/4 は原因遺伝子が同定されていない (図 2)。今回、家族集積が濃厚な既知の病的遺伝子変異を持たない常染色体優性遺伝形式の一家系に注目した。患者 3 名 (II-1, II-3, III-1) の平均発症年齢は 50 歳前後であり、病初期には無動、固縮、振戦、動作緩慢といった典型的な PD 症状を呈しており、レボドパへの反応は良好、認知症のない経過を辿っていた。この家系の proband は、既知の病的変異を持っておらず、この家系は既知の病的遺伝子は持っていないことを確認した。その後、この 3 名に対して全ゲノムシーケンスを施行した。具体的な施行として、アジレント社 SureSelectXT Human AllExon V5+UTRs Kit を用いてエクソン領域を濃縮し、イルミナ社 HiSeq2500 シーケンサーで 100 bp pair end シーケンスを実施した。すべての variant を拾い上げ、Burrows-Wheeler Aligner と GRCh37 human reference genome を使用して、シーケンス配列をアライメントし、GATK (version 4.0.1.1) と ANNOVAR を使用して variant のアノテーションを行った。病的変異の抽出法として、non-synonymous variant 頻度 0.1% 以下 heterozygous variant 患者 3 名で共通の variant を絞り込んだ結果、46 の候補遺伝子を同定した。

次にこの 46 の候補遺伝子について、他の常染色体優性遺伝形式の PD 家系群にどの程度存在するのかを見るために、候補遺伝子全てのエクソン領域をカバーするプライマーを設計し、IonPGM を用いて 50 名の家族性 PD について変異スクリーニングを行った。結果、50 名中 17 名の患者から 10 の病的遺伝子候補に

相当する rare variant を同定した (*AHDC1*, *AP2A2*, *FBLN2*, *KIAA0947*, *NRAP*, *OLFML2B*, *TM6SF1*, *FLG-AS1*, *HMCN2*, *MUC19*)。平成 31 年度は、これらの 10 の病的候補遺伝子に対して、Sanger 法にて実際に変異があるのかどうか確認を行った。家族性 PD の症例数も 100 程度増やして解析を行った。公共データベースや web database も活用しながら病的遺伝子かどうかの確認を行った。正常対象にほとんどなく、家族性 PD の中に数例出現した場合には、新規遺伝子の可能性が高いと判断する。

4 . 研究成果

10 個の rare variant に対して、ionTorrent を用いてパネルを作成し、high-throughput 解析を施行した。当院に保存されている PD DNA bank の中から、常染色体優性遺伝形式をとり、既知の遺伝子変異を持たない 50 例を対象とした。この対照群の中から、一つの遺伝子内に独立した家系から 2 つ以上の遺伝子変異が同定されたものは、FLG, HMCN2, MUC19 であった。このうち、Polyphen2, SIFT の解析から disease causing, damaging といった病的にタンパク質変性を来す可能性があるものを調べると、FLG, HMCN2 は病的変異の可能性が高いと判断された。現在予算やマンパワーの問題もあり、現段階ではこれ移行の解析が進めていないが、今後さらなる資金獲得を行い、病的遺伝子変異の存在について、詳細に解析を行っていく予定である。遺伝学的には解析症例数を上げて、病的変異の可能性について検討を行っていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 24 件)

1. Ikeda A, Shimada H, Nishioka K, Takanashi M, Hayashida A, Li Y, Yoshino H, Funayama M, Ueno Y, Hatano T, Sahara N, Suhara T, Higuchi M, Hattori N. Clinical heterogeneity of FTDP-17 caused by MAPT N279K mutation in relation to tau PET features. *Mov Disord.* in press, 2019.

2. Yoshino H, Nishioka K, Li Y, Oji Y, Oyama G, Hatano T, Machida Y, Shimo Y, Hayashida A, Ikeda A, Mogushi K, Shibagaki Y, Hosaka A, Iwanaga H, Fujitake J, Ohi T, Miyazaki D, Sekijima Y, Oki M, Kusaka H, Fujimoto K, Ugawa Y, Funayama M, Hattori N. GCH1 mutations in dopa-responsive dystonia and Parkinson's disease. *J Neurol.* 265:1860-1870, 2018

3. Yoshino H, Hirano M, Stoessl AJ, Imamichi Y, Ikeda A, Li Y, Funayama M, Yamada I, Nakamura Y, Sossi V, Farrer MJ, Nishioka K, Hattori N. Homozygous alpha-synuclein p.A53V in familial Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 57:248.e7-248.e12, 2017.

4. Matsushima T, Conedera S, Tanaka R, Li Y, Yoshino H, Funayama M, Ikeda A, Hosaka Y, Okuzumi A, Shimada Y, Yamashiro K, Motoi Y, Nishioka K, Hattori N.

Genotype-phenotype correlations of cysteine replacement in CADASIL. Neurobiol Aging. 50:169.e7-169.e14, 2017.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 第 60 回日本神経学会学術大会 2019 年 5 月大阪

Aya Ikeda, Hongrui Meng, Kenya Nishioka, Masashi Takanashi, Yuanzhe Li, Hiroyo Yoshino², Tsuyoshi Inoshita, Kahori Shiba-Fukushima, Akio Mori, Risa Nonaka, Nana Izawa, Keiichi Ishikawa, Hidemoto Saiki, Masayo Morita, Manabu Funayama, Masato Hasegawa, Hideyuki Okano, Wado Akamatsu, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori. Analyses of CHCHD2 pathophysiology by human brain, iPSC, and mutated drosophila model.

2. 第 59 回日本神経学会学術大会 2018 年 5 月北海道

Kenya Nishioka, Yuanzhe Li, Hiroyo Yoshino, Arisa Hayashida, Aya Ikeda, Manabu Funayama, Nobutaka Hattori. Digenic mutations of parkin/PINK1 or LRRK2/PINK1 in familial Parkinson's disease.

国際学会

3. Genetic epidemiology of Parkinson's disease 2018

Kenya Nishioka, Aya Ikeda, Hongrui Meng, Masashi Takanashi, Hiroyo Yoshino, Yuanzhe Li, Yuzuru Imai, Manabu Funayama, Nobutaka Hattori. Brain pathology, functional analysis and fly models of CHCHD2 p.T61I.

4. Genetic epidemiology of Parkinson's disease 2017

Kenya Nishioka, Hiroyo Yoshino, Takashi Matsushima, Aya Ikeda, Silvio Conedera, Manabu Funayama, Nobutaka Hattori. Analysis of GCH1 mutations in the patients with Parkinson's disease in Japanese population.

5. XXIII World congress of Neurology, SEP/16-21/2017

Kenya Nishioka, Makito Hirano, A. Jon Stoessl, Hiroyo Yoshino, Yoko Imamichi, Aya Ikeda, Yuanzhe Li, Manabu Funayama, Ikuko Yamada, Yusaku Nakamura, Vesna Sossi, Matthew J. Farrer, Nobutaka Hattori. Homozygous alpha-synuclein A53V in familial Parkinson's disease.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（**8**桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：