

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249048

研究課題名（和文）

変異グルコセレブロシダーゼによるパーキンソン病発症の病態機序の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanisms of Parkinson disease based on comprehensive nucleotide sequence analysis of glucocerebrosidase gene.

研究代表者

辻 省次 (TSUJI SYOJI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70150612

研究成果の概要（和文）：孤発性パーキンソン病の発症に関与する遺伝的要因を明らかにすることを目的として、日本人パーキンソン病患者 534 例，日本人健常対照者 544 例について glucocerebrosidase 遺伝子 (*GBA*) の全エクソン，splice 部位の塩基配列解析を行い，*GBA* のヘテロ接合性変異がパーキンソン病発症の強い遺伝的要因であることを明らかにした（オッズ比は 28.0 倍 (95%信頼区間 7.3-238.3)， p 値は 6.9×10^{-14})。さらに，国際的な共同研究に基づき，*GBA* のヘテロ接合性変異が，人種を越えてパーキンソン病発症の強い遺伝的要因であることを確定した。この成果は，孤発性パーキンソン病の発症に関与する遺伝的要因の探索には，これまでの common disease-common variants 仮説では不十分であり，common disease-multiple rare variants 仮説に立つアプローチ，すなわち，網羅的な塩基配列解析の重要性を示した。multiple rare variants の探索方法として，次世代シーケンサーを用いたアプローチについて検討をし，6 検体を pool した pooled DNA を用いた解析により，allele 頻度の推定が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate susceptibility genes for sporadic Parkinson disease. Comprehensive resequencing analysis of *GBA* (glucocerebrosidase gene) has been conducted using 534 Japanese cases of sporadic Parkinson disease and 544 Japanese healthy controls. We found that the frequency of cases of Parkinson disease with heterozygous variants of *GBA* was 9.4%, which was significantly more frequent than that of controls (0.37%) with the odds ratio of 28.0 (95% CI: 4.3-238.3, $p = 6.9 \times 10^{-14}$). We furthermore conducted international collaboration to explore whether heterozygous variants of *GBA* confer such a strong risk for Parkinson disease irrespective of ethnicity. We confirmed that heterozygous variants of *GBA* confers a strong risk for Parkinson disease irrespective of ethnicity. These results strongly indicate that comprehensive resequencing analysis is necessary to identify rare variants. To enable comprehensive resequencing of large data sets, we applied next generation sequencers to analyze pooled DNA. We demonstrated that we can sensitively and accurately determine the allele frequencies of variants using pooled genomic DNA consisting of 6 samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	21,300,000	6,390,000	27,690,000
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
総計	37,600,000	11,280,000	48,880,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：パーキンソン病、神経変性、孤発性疾患、疾患感受性遺伝子、Gaucher 病

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病の発症機構については、これまで、メンデル遺伝形式を取る家族性パーキンソン病の病因遺伝子の解明により進められてきた。その結果、*PARK2*, *SNCA*, *LRKK2*, *DJ1*, *PINK1* などの病因遺伝子が見出され、家族性パーキンソン病の病態機序の解明が進んできている。

一方、パーキンソン病の大部分を占める孤発性パーキンソン病の発症機構については不明のままであった。臨床遺伝学的な研究からは、パーキンソン病患者の同胞の発症リスクは、一般のそれに対して5.0倍も高いことが知られており、その発症に何らかの遺伝的要因が強く関与することが示されていた。

このような遺伝的要因を解明する手法としては、ゲノム上で、それぞれの領域を代表するような、比較的頻度の高い多型性（1塩基多型, single nucleotide polymorphisms (SNPs)) を用いた探索により、疾患感受性遺伝子を探索できるという、“common disease-common variants 仮説” が有力視されていた。この“common disease-common variants 仮説” に立って、ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study, GWAS) と呼ばれる手法を用いて、パーキンソン病を含めて多くの孤発性疾患の疾患感受性遺伝子の探索が行われてきた。GWASにより多くの疾患感受性遺伝子が見出されたものの、そのオッズ比は通常1.5以下程度と小さく、疾患の病態機序全体を理解するには至っていなかった。

このような背景から、孤発性疾患の発症に関与する遺伝的要因の探索は行き詰まった状態になってきていた。

一方、これまでの臨床遺伝学的観察から、パーキンソン病の発症に、グルコセブレロシダーゼ遺伝子 (*glucocerebrosidase*, *GBA*) が関与するかもしれない、という考え方が示唆されていた。すなわち、Gaucher 病患者家系内にパーキンソン病患者が比較的高頻度に見られるという臨床的観察が報告されていた。

パーキンソン病患者において、*GBA* ヘテロ接合変異の頻度が高いのではないかとする報告はこれまでにいくつか存在したが、次のような問題点があった。すなわち、1. これまでの研究は、大規模研究が少なく、*GBA* 変異の正確な評価が定まっていない。2. Gaucher 病患者で見られる既知の変異についての解析が多く、パーキンソン病患者の *GBA* を直接的に網羅的に解析した研究はあまり見あたらない。3. ユダヤ人に多い N370S がよく調べられているが、患者及び健常者集団の人種背景によって、odds ratio の評価が影

響を受けやすいこと、さらに、この N370S は日本人ではこれまでに見いだされていない。以上の問題点があり *GBA* ヘテロ変異の意義が確立されていなかった。

このような背景から、本研究では、日本人のパーキンソン病患者を対象に、*GBA* のヘテロ接合性変異がパーキンソン病発症のリスクとなるかどうかについて、*GBA* の全エクソン、splice 部位の resequencing を行うことにより検討し、さらに、国際的な大規模共同研究により、*GBA* が人種にかかわらず、パーキンソン病発症の普遍的な発症リスクとなるかどうかを検討した。

2. 研究の目的

本研究は、*GBA* のヘテロ接合性変異がパーキンソン病発症の強い遺伝的要因となっているかどうかを明らかにすることを目的とした。まず、日本人のパーキンソン病患者、健常者集団を対象に、大規模な検体を用いて、*GBA* の全エクソン、splice 部位について、塩基配列解析を行い、パーキンソン病患者集団、健常者集団にみられる variants (通常、“多型” という言葉は頻度 1%以上のものをさすが、ここでは、1%未満の低頻度のものも含めた総称として、variants という言葉を用いることとする) を網羅的に検出し、それぞれの頻度を統計学的に検討する。

次に、国際的な共同研究により、人種を越えて、*GBA* がパーキンソン病発症の遺伝的リスクとなっているかどうかを明らかにする。

さらに、このような頻度の低い variants が疾患発症に関与するという考え方 (common disease-multiple rare variants 仮説と呼ばれる) に立って、パーキンソン病発症に関与する遺伝的要因を探索するために、次世代シーケンサーを活用したアプローチについても検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

534名の日本人パーキンソン病症例および544名の日本人健常者を対象として、*GBA* の全エクソン、splice 部位の配列を、直接塩基配列解析法により解析した。*GBA* には、同じ第1染色体上に pseudogene が存在し、その pseudogene 上には、多数の mutation が存在することが知られているので、PCR 増幅においては、pseudogene を増幅しないように、primer design に配慮を行った。

国際的な共同研究については、米国 NIH の Dr. Sidransky と共同して、大規模なメタ解析を進めた。

頻度の稀な variants を効率よく探索する方法として、pooled DNA を調整し、次世代シーケンサー (SOLiD) を用いて deep

resequencing を行い, variant allele の存在比率を定量的に測定する方法について検討を行なった.

4. 研究成果

日本人PD患者 534 例, 日本人対照者 544 例について *GBA* の全エクソン, splice 部位の直接塩基配列解析を行った. その結果, 合計 27 種類の変異を同定した. うち 11 種類は Gaucher 病の原因変異として報告のある変異 (病原性変異), 16 種類は Gaucher 病の病原性変異として報告のない変異 (非病原性変異) であった. 個々の変異別に検討すると, R120W, L444P, RecNciI の 3 種類はキャリア頻度が PD 群で有意に高かった (それぞれ $p < 0.0001$, 0.0035 , 0.0020). これら 3 種類の変異は全て *GBA* 病原性変異であるため, *GBA* 病原性変異に注目したところ, R120W, L444P, RecNciI 以外の 8 種類の *GBA* 病原性変異は, 全例 PD 患者群でのみ認められ, 対照群には認めなかった. 合計すると PD 患者 534 例中 50 例 (9.4%), 対照者 544 例中 2 例 (0.37%) で *GBA* 病原性変異をヘテロ接合性に認めた. 全 *GBA* 病原性変異の PD 患者に対するオッズ比は 28.0 倍 (95% 信頼区間 7.3-238.3) となり, p 値は 6.9×10^{-14} と有意だった. 一方, *GBA* 非病原性変異では個別でも合計しても PD 群と対照群の間に有意な関連は認めなかった.

次に, *GBA* 病原性変異キャリアである PD 患者 50 例の臨床的特徴について検討した. 発症年齢を検討したところ, *GBA* 病原性変異キャリア群の平均発症年齢は 52.5 歳で, 非キャリア群の 58.8 歳と比べて有意に若年化していた. *GBA* 病原性変異キャリア 50 例のうち 49 例については臨床情報を入手可能だった. 49 例中 41 例 (83.7%) では抗パーキンソン病薬 (レボドパ, ドパミン受容体アゴニスト) が有効であった. 33 例で PD の補助診断で用いられる [^{123}I]-metaiodobenzylguanidine (MIBG) 心筋シンチグラフィ検査が施行されていた. 検査が施行されていた 33 例中 29 例 (87.9%) では心筋への取り込みが低下しており, 一般的な PD に矛盾ないと考えられた. 49 例中 13 例 (26.5%) で認知障害 (clinical dementia scale 18 1 以上), 17 例 (34.7%) で幻視をきたしていた. 非キャリア群の臨床的特徴が十分得られなかったため, 有意かどうか結論できなかったが, キャリア群では認知障害や幻視の頻度が高い可能性があると考えた.

GBA 病原性変異キャリア群の家族歴に注目したところ, 50 例中 11 例 (22.0%) では両親または同胞の血縁者に PD 患者が一人ずついることが分かった. うち 3 例については発症者の DNA 解析が可能であり, 解析を行ったところ家系内の発症者全例で発端者の持つ *GBA* 病原性変異と同じ変異を共有していた.

GBA 病原性変異が孤発性 PD だけではなく, 家族性 PD にも関与している可能性を考えて, 両親または同胞内に PD 発症者がいる多発家系 34 家系について, *GBA* 遺伝子の resequencing 解析を行った. 34 家系中 5 家系 (14.7%) で *GBA* 病原性変異を認めた. 全家系において発症者は *GBA* 病原性変異を共有し, 非発症者では変異を認めないことが分かった. 関連解析で同定された家系と合わせて, 計 8 家系において, PD 発症と *GBA* 病原性変異の共分離が確認された (*Arch Neurol* 66:571-6, 2009).

国際的な共同研究により, *GBA* のヘテロ接合変異が, 人種を超えて, パーキンソン病発症の強い遺伝的リスクとなっているかどうかについて検討した. 16 の研究機関が協力して行った. 解析はそれぞれの研究機関で行い, パーキンソン病患者 5,691 名, 健常者 4,898 名の genotype が得られた. *GBA* の全エクソン, splice 部位の塩基配列解析が行われた 1,883 名のパーキンソン病患者では, 7% がヘテロ接合変異を有していることが見出され, パーキンソン病発症のオッズ比は 5.43 であった. 以上の結果から, *GBA* は人種を問わず, 普遍的な, パーキンソン病発症の強い遺伝的要因であることが確認できた (*New Engl. J. Med.* 361:1651-1661, 2009).

以上の結果が示すことは, 孤発性疾患の発症に強く関与する遺伝的要因の探索には, 頻度の高い SNP を用いた GWAS では不十分であり, 塩基配列解析により, 頻度の低い variants を含めた網羅解析が必須であるということである. この考え方は, 従来の common disease-common variants 仮説に立つアプローチでは不十分であり, common disease-multiple rare variants 仮説に立った, 網羅的な塩基配列解析が必須である事を示している (*Hum. Mol. Genet.* 19: R65-70, 2010 (doi: 10.1093/hmg/ddq162, 2010)).

このような multiple rare variants の探索は, 多数例について, 塩基配列解析を実施することが必要となるが, これまでの Sanger 法を用いた解析では, 労力, コストの点で実現は非常に困難であった. 最近になり, 次世代シーケンサーが実用化され, シーケンス解析のスループットは著しく高くなってきており, 大規模な塩基配列解析が可能となってきた. しかしながら, コストの点では, まだまだ高額な費用を要することから, 多数の DNA 検体を混合して pooled DNA を調整し, *GBA* を PCR による選択的に増幅し, deep resequencing を行うことにより, pooled DNA 中に存在する *GBA* の variant allele の頻度を推定することが可能ではないかと考えられた. 一方, 技術的な面からは, 次世代シーケンサーには一定頻度の error read が含まれる可能性があり, このことが variant

allele の頻度推定の上で障害になる可能性が考えられた。このような点を考慮して、pooled DNA を調製し、variant allele の推定が可能かどうかについて、次世代シーケンサーを用いた研究を大なした。pooled DNA を調整し、GBA を選択的に増幅、barcode indexing の後に、次世代シーケンサー (SOLiD) を用いて塩基配列解析を行った。

6 検体を pool した検体を用いた解析で、1912-6732 の read depth が得られた。予備的な検討の結果、error read の頻度の高い塩基もあり、error read をいかに排除するかが課題となった。error read の分析から、cycle number-dependent error, sequence context-dependent error が見出された。cycle-dependent error については、最初の 10 塩基、後半の 15 塩基の error rate が高いことが明らかとなり、11-35cycle (塩基) を用いることにより、error read を 503 から 173 に減じることができた。また、この条件では、bona fide SNV の検出力を減じることがなかった。sequence context-dependent error については、塩基配列の解析 strand によって大きなバイアスが生じていることが判明し、strand bias 値を 0.17-0.76 の範囲のものに限ることにより、error read を 173 から 27 に減じることができた。また、この条件では、bona fide SNV の検出力を減じることがなかった (*J. Hum. Genet.* 55: 448-455, 2010)。

以上の解析から、6 検体の pooled DNA (12 alleles) を用いた解析では、そこに存在する variant allele 頻度を十分な感度、精度で検出することが可能となった。ただし、このような pooling の方法 (一次元の pooling) では、6 検体の pooling が限界で、それ以上の pooling では、error read の排除のためのフィルターを工夫しても、error read の問題が無視できなくなることが明らかとなった。この問題を解決するためには、2 次元の pooling の方法を検討する必要があると考えられる。2 次元の pooling では、sequence context-dependent error の排除がしやすくなり、pool size を大きく取ることが可能となると期待される。一方、次世代シーケンサーを用いた解析のコストは低減してきており、特に exome 解析と呼ばれ、全ゲノム上のエクソン部分を濃縮することが可能となっており、多数の検体の exome 解析により、ゲノムワイドに rare variants を含めた網羅的解析が可能になってきているので、今後このような手法を駆使して、パーキンソン病発症の遺伝的要因の網羅的な解明が飛躍的に発展するものと期待される。

以上、本研究では、孤発性パーキンソン病発症の重要な遺伝的リスクファクターとしての GBA の確立に大きな貢献をした。GBA が

どのような機序で、パーキンソン病発症に関与するかについては、glucocerebrosidase 活性の部分的な低下がパーキンソン病発症に関与するという haploinsufficiency の考え方と、変異 glucocerebrosidase が神経細胞に対して何らかの傷害作用を有しているという、gain-of-toxic-function の考え方がある。前者については、最近の研究成果から、ミトコンドリアの品質管理に autophagy が関与していることが見出されており (mitophagy)、autophagy の場が lysosome であることから、GBA のヘテロ接合性変異が autophagy のプロセスにおいて何らかの障害をもたらしている可能性も考えられる。

分子遺伝学的観点からは、本研究は、common disease-multiple rare variants 仮説に立つアプローチの重要性を示した点でも意義がある (*Hum. Mol. Genet.* 19: R65-70, 2010 (doi: 10.1093/hmg/ddq162, 2010))。multiple rare variants の検出には、塩基配列解析が必須であり、次世代シーケンサーの実用化により、大規模検体についての網羅的塩基配列解析が可能になりつつある。しかしながら、現時点では、コストの点では大量検体の網羅的解析には多額の費用を必要とすることからこの点をいかに効率化するかが今後の課題となる。本研究で示した、pooled DNA を用いた解析はこのような課題を克服する一つの可能性を示したものである。一方、exome 解析の実用化により、網羅的な塩基配列解析の効率も改善されてきており、common disease-multiple rare variants 仮説に立った網羅的なゲノム配列解析により、孤発性パーキンソン病発症の遺伝的要因を網羅的に明らかにすることが今後最も重要な方向性になると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Mitsui J, Fukuda Y, Azuma K, Tozaki H, Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, and Tsuiji S. Multiplexed resequencing analysis to identify rare variants in pooled DNA with barcode indexing employing next-generation sequencer Running Title: Multiplexed resequencing analysis of pooled DNA. *J. Hum. Genet.* 55: 448-455, 2010 (査読有り)
2. Tsuiji S. Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing. *Hum. Mol. Genet.* 19: R65-70, 2010 (doi: 10.1093/hmg/ddq162, 2010) (査読有り)

3. Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, Yoshino H, Minami N, Smith DI, Lesage S, Aburatani H, Nishino I, Brice I, Hattori N, and Tsuji S. Mechanisms of genomic instabilities underlying two common fragile site-associated loci, PARK2 and DMD, in germ cell and cancer cell lines. *Amer J Hum Genet* 87: 75-89, 2010 (査読有り)
4. Matsumoto L, Takuma H, Tamaoka A, Kurisaki H, Date H, Tsuji S, and Iwata A. CpG Demethylation Enhances Alpha-Synuclein Expression and Affects the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *PLoS One* 5:e15522, 2010 (査読有り)
5. Mitsui, J, Mizuta, I, Toyoda, A, Ashida, R, Takahashi, Y, Goto, J, Fukuda, Y, Date, H, Iwata, A, Yamamoto, M, Hattori, N, Murata, M, Toda, T and Tsuji, S. Mutations for Gaucher disease confer a high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 66:571-6, 2009 (査読有り)
6. 390. Sidransky E, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, Chen C-M, Clark ON, Condroyer C, De Marco EV, Dürr A, Eblan MJ, Fahn S, Farrer M, Fung H-C, Gan-Or Z, Gasser T, Gershoni-Baruch R, Giladi N, Griffith A, Gurevich T, Januario C, Kropp R, Lang AE, Lee-Chen G-J, Lesage S, Marder K, Mata IF, Mirelman A, Mitsui J, Mizuta I, Nalls MA, Nicoletti G, Oliveira C, Ottman R, Orr-Urtreger A, Pereira LV, Quattrone A, Rogaeva E, Rolfs A, Rosenbaum H, Rozenberg R, Samii A, Samaddar T, Schulte C, Sharma M, Singleton A, Spitz M, Tan E-K, Tayebi N, Toda T, Troiano A, Tsuji S, Wittstock M, Wolfsberg TG, Wu Y-R, Zabetian CP, Zhao Y, and Ziegler SG. International multi-center analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease. *New Engl J. Med.* 361:1651-1661, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計1件)

1. Mitsui, J, Mizuta, I, Toyoda, A, Ashida, R, Takahashi, Y, Goto, J, Fukuda, Y, Date, H, Iwata, A, Yamamoto, M, Hattori, N, Murata, M, Toda, T and Tsuji, S. Heterozygous Rare Variants Associated with Gaucher Disease Confer Robust Susceptibility to Parkinson Disease.

The 60th American Academy of Neurology Annual Meeting. Philadelphia, The United States of America (2008年4月12日-19日)

[図書] (計0件)
該当無し

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)
該当無し

○取得状況 (計0件)
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 省次 (TSUJI SYOJI)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：70150612

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし