

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07893

研究課題名(和文) 家族性パーキンソン病の新規遺伝子の単離と機能解析

研究課題名(英文) Aim to identify a novel gene related to familial Parkinson's disease

研究代表者

西岡 健弥 (Nishioka, Kenya)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：40348933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病家系の原因遺伝子単離に向けて3名の発症者から、Whole Exome Sequencingを行い、46種類の遺伝子が候補となった。常染色体優性遺伝形式の家族性パーキンソン病のDNA144名を抽出し追加解析を行い、内6つの遺伝子が候補(FSD1, CDRT15L2, AP2A2, TALD01, SLC22A3, FBLN2)となったが、いずれも病的変異は認めなかった。次にWhole Genome Sequencingでも変異を絞り込めなかった。構造多型も考え、横浜市立大学遺伝学教室と共同研究を開始し、Long Read Sequencingを施行し、候補遺伝子の絞り込みを行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三世代に渡り同一家系内に濃厚な発症者をもつ一家系に焦点を絞り、解析を行った。Whole genome sequencingとwhole exome sequencingを用いて候補領域を同定し、また候補となった遺伝子には、DNA bankからのサンプルとtargeted resequencingを施行したが、病的遺伝子の同定には至らなかった。点変異では説明の付かない変異の可能性を考え、次に構造多型に注目し、現在PacBio社のSequel IIシーケンサーを利用したLong Read Sequencingを行っている。新たなパーキンソン病の原因遺伝子の同定に向けて解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：We performed the DNA analyses for a familial Parkinson's disease (PD) with autosomal dominant inheritance, along with targeted sequencing, whole genome sequencing and whole exome sequencing. We identified six candidate genes (FSD1, CDRT15L2, AP2A2, TALD01, SLC22A3, FBLN2), however our additional analyses did not prove the pathogenicity among them. Next, we aim to analyze structural variants using long read sequencing, collaborating with Yokohama city university.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：Parkinson's disease Whole genome sequencing Long read sequencing Whole exome sequencing

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

常染色体優性遺伝子パーキンソン病の一家系で、既存の病的遺伝子内に変異はなく、かつ家族集積の色濃い家系を対象とし、新規の病的遺伝子の単離を目指す。

### 2. 研究の目的

新規の病的遺伝子を同定することにより、新しいパーキンソン病の分子病態の解明を目指し、原因タンパク質が同定できれば、それに対する治療法の開発に繋げることを目的とした。

### 3. 研究の方法

3世代に渡る発症者を持つパーキンソン病家系の原因遺伝子単離に向けて6名の発症者のうち、追跡可能であった3名の末梢血よりDNAを抽出し、既知のパーキンソン病(PD)原因遺伝子のスクリーニングを行い、変異がないことを確認した上で、Whole Exome Sequencing(WES)を行った。grCh38常染色体優性遺伝形式を想定し、3名に共通し、公共データベースでアレル頻度が0.0001未満の変異を抽出したところ、46種類の遺伝子が候補として残った。順天堂大学PDゲノムバンクから常染色体優性遺伝形式のサンプル144名を抽出し、上記46種類の遺伝子について、targeted resequencingを行った。その結果、6遺伝子が144例中1例に変異が見られ、候補遺伝子の上位と考えた。そのうち、*CDRT15L2*と*FSD1*については既知のメンデル遺伝性疾患と関連がなく、さらにゲノムバンクの常染色体優性遺伝形式のサンプルをサンガー法によって、遺伝子スクリーニングを行った。*FSD1*は7種類の変異が見つかったが、うち1家系において家系内発症者の変異の共連鎖が見られなかった。*CDRT15L2*は変異をもついずれの家系においても、追跡可能な発症者が他になかった。他人種における*CDRT15L2*における頻度を確認するため、台湾とルクセンブルクの共同研究者に依頼し、解析を行ったが、コントロール群と比較し、rare variantの頻度に優位差がなく、病原性を支持するデータを得られなかった。また剖検脳を用いた、*CDRT15L2*の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、免疫染色ではPD群とコントロール群と有意差は見られなかった。上記解析より、*FSD1*と*CDRT15L2*が病原遺伝子である可能性は低いと判断した。

残り4種類の候補遺伝子(*AP2A2*, *TALD01*, *SLC22A3*, *FBLN2*)についても同様にゲノムバンクを利用した遺伝的スクリーニングを行ったが、いずれの遺伝子も頻度に差はなく、病原性を強く疑う遺伝子を同定できなかった。

WESで同定できない変異の可能性を考え、3名の発症者に対してWhole Genome Sequencingを追加した。単塩基変異についてはWESと同様に変異を絞り込むことができなかった。構造多型の可能性を考え、WGSのデータを用いて、4種類のStructural Variant Caller (CNVnator, ERDS, LUMPY, Manta)を利用した解析を行った。それぞれ数種類から10数種類の変異を同定したが、すべてのVariant Callerで共通する変異はなかった。

従来short read sequencingで解析できない、構造多型が原因である可能性を検討し、横浜市立大学遺伝学教室松本直通教授と共同研究を開始し、PacBio社のSequel IIシーケンサーを利用したLong Read Sequencingを行った。3名の罹患者に対して、Coverageは20-30xと十分なデータを取得し、pbsv(<https://github.com/PacificBiosciences/pbsv>)とtandem genotypes(<https://github.com/mcfritth/tandem-genotypes>)を利用し、構造多型とrepeat expansionの検出を行った。構造多型に関し、以下の条件(1)一般集団における頻度情報、2)3名で共通、3)エクソン内、4)これまでにPDとの関連が報告されている遺伝子)を利用し、フィルタリングを行った。フィルタリングの結果、*EPPK1*の1602bpの欠失が唯一の候補として残った。ただ*EPPK1*は上皮細胞においてケラチン中関係フィラメントのネットワークを維持するために機能していると考えており、現時点ではPDの原因遺伝子としての根拠は十分に集まっていない。

現在はPDとの関連が報告されていない遺伝子も含めて改めて候補遺伝子の絞り込みを行っている。絞り込んだのちには家族性PDゲノムバンクにおいて、スクリーニングを実施する方針としている。

### 4. 研究成果

上記の通り、通常的手法では同定困難な家系であった。現在Long read sequencingを取り入れながら、病的遺伝子の同定に向けて解析を続けている。

西岡 健弥

基盤研究 C

課題番号 20K07893

研究課題名 家族性パーキンソン病の新規遺伝子の単離と機能解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kei-Ichi Ishikawa, Mayu Ishiguro, Yuanzhe Li, Kenya Nishioka, Nobutaka Hattori, Wado Akamatsu	4. 巻 60
2. 論文標題 Generation of three hiPSC clones from a Parkinson's disease patient with a heterozygous variant of VPS35 p.D620N	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2022.102739.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiroyo Yoshino, Yuanzhe Li, Kenya Nishioka, et al.	4. 巻 114
2. 論文標題 Genotype-phenotype correlation of Parkinson's disease with PRKN variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 117-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2021.12.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mayu Ishiguro, Hiroyo Yoshino, Yuanzhe Li, Aya Ikeda, Manabu Funayama, Kenya Nishioka, Nobutaka Hattori	4. 巻 88
2. 論文標題 Genetic analysis of ATP10B for Parkinson's disease in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parkinsonism and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 10-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2021.05.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jun Ogata, Kentaro Hirao, Kenya Nishioka, Arisa Hayashida, Yuanzhe Li, Hiroyo Yoshino, Soichiro Shimizu, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai	4. 巻 22
2. 論文標題 A Novel LRRK2 Variant p.G2294R in the WD40 Domain Identified in Familial Parkinson's Disease Affects LRRK2 Protein Levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3708-3719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073708.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mayu Ishiguro , Yuanzhe Li , Hiroyo Yoshino , Kensuke Daida , Yuta Ishiguro , Genko Oyama , Shinji Saiki , Manabu Funayama , Nobutaka Hattori , Kenya Nishioka	4. 巻 84
2. 論文標題 Clinical manifestations of Parkinson's disease harboring VPS35 retromer complex component p.D620N with long-term follow-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parkinsonism and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 139-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2021.02.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kensuke Daida , Kenya Nishioka , Yuanzhe Li , et al.	4. 巻 97
2. 論文標題 PLA2G6 variants associated with the number of affected alleles in Parkinson's disease in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2020.07.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arisa Hayashida , Yuanzhe Li , Hiroyo Yoshino , Kenya Nishioka , et al.	4. 巻 97
2. 論文標題 The identified clinical features of Parkinson's disease in homo-, heterozygous and digenic variants of PINK1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2020.06.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogata J, Hirao K, Nishioka K, Hayashida A, Li Y, Yoshino H, Shimizu S, Hattori N, Imai Y.	4. 巻 In press
2. 論文標題 A Novel LRRK2 Variant p.G2294R in the WD40 Domain Identified in Familial Parkinson's Disease Affects LRRK2 Protein Levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073708.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishiguro M, Li Y, Yoshino H, Daida K, Ishiguro Y, Oyama G, Saiki S, Funayama M, Hattori N, Nishioka K.	4. 巻 In press
2. 論文標題 Clinical manifestations of Parkinson's disease harboring VPS35 retromer complex component p.D620N with long-term follow-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parkinsonism and related disorders	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2021.02.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mishima T, Fujioka S, Nishioka K, Li Y, Sato K, Houzen H, Yabe I, Shiomi K, Eriguchi M, Hara H, Hattori N, Tsuboi Y.	4. 巻 In press
2. 論文標題 Meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in Perry disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parkinsonism and related disorders	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2020.12.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daida K, Nishioka K, Li Y, Yoshino H, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 PLA2G6 variants associated with the number of affected alleles in Parkinson's disease in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging.	6. 最初と最後の頁 147.e1-147.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2020.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashida A, Li Y, Yoshino H, Nishioka K, Hattori N. et al.	4. 巻 97
2. 論文標題 The identified clinical features of Parkinson's disease in homo-, heterozygous and digenic variants of PINK1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 146.e1-146.e13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2020.06.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kensuke Daida , Shotaro Shimonaka , Kahori Shiba-Fukushima , Jun Ogata , Hiroyo Yoshino , Ayami Okuzumi, Taku Hatano, Yumiko Motoi, Manabu Funayama, Tomoki Hirunagi, Kentaro Sahashi , Masao Katsuno , Kenya Nishioka, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori.
2. 発表標題 SNCA p.V15A a novel pathogenic variant for familial Parkinson ' s disease
3. 学会等名 第63会日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aya Ikeda, Manabu Funayama, Mari Yoshida, Kenya Nishioka, et al.
2. 発表標題 Two novel variants in CHCHD2 associate with TDP-43 pathology among amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 第63会日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuanzhe Li, Hiroyo Yoshino, Manabu Funayama, Kenya Nishioka, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Genetic screening by panel sequencing of glucosylceramidase beta variants for Parkinson ' s disease
3. 学会等名 第62会日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenya Nishioka, Yoshio Hashizume, Masashi Takanashi, et al.
2. 発表標題 Pathological findings in a patient with alpha-synuclein p.A53T and familial Parkinson's disease
3. 学会等名 第62会日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------