

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860725

研究課題名(和文) 血族婚のあるパーキンソン病における新規原因遺伝子探索

研究課題名(英文) Search for the causative gene in consanguineous families with Parkinson's disease

研究代表者

李元哲(Li, Yuanzhe)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40549292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は血族婚のあるパーキンソン病4家系においてゲノムワイド連鎖解析とエクソーム解析により25個の候補原因遺伝子変異を同定した。健常者100人において候補遺伝子変異と同じ変異は見られず、単なる遺伝子多型である可能性は低いと考えられる。続いて500例の家族性パーキンソン病において25個の候補原因遺伝子変異解析を実施した。しかし、変異は認められず本研究において原因遺伝子同定の結論には至らなかった。今後、解析対象を増やし引き続き変異スクリーニングを行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：This study identified 25 candidate variants for Parkinson's disease by Genome-wide linkage analysis and whole-exome sequencing in four consanguineous families with Parkinson's disease (FPD). We did not find any of the twenty-five candidate variants in 100 normal Japanese controls. Then, I performed mutation analysis of the 25 candidate variants on 500 patients with FPD. However, we did not detect any mutations. I still cannot conclude whether those 25 variants are the causative mutations for FPD. Therefore, we need further investigations to identify the genes responsible for FPD.

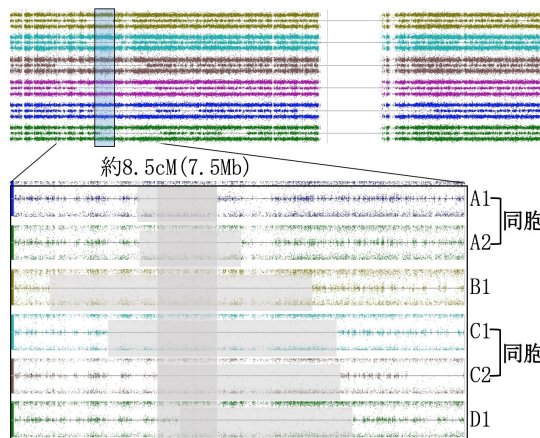
研究分野：分子遺伝学

キーワード：家族性パーキンソン病

1. 研究開始当初の背景

日本でパーキンソン病(PD)はアルツハイマー病に次いで2番目に頻度の高い神経変性疾患である。パーキンソン病は主に中脳黒質緻密部ドーパミン神経細胞が選択的に変性・脱落することによって、振戦、固縮、無動症、姿勢反射障害などの四大臨床症候を呈する。その原因は不明で、根本的治療法も確立されていない。PDの多くは孤発性(SPD)であるが、その5-10%に家族内発症者を認める遺伝性パーキンソン病(FPD)が存在する。これまで FPD の原因遺伝子として *-synuclein, parkin, UCH-L1, DJ-1, PINK1, LRRK2, ATP13A2, GIGYF2, PLA2G6* などが同定・単離されている。これらの遺伝子機能解析が SPD の発症機序解明の有力な手掛かりとなっている。そのため FPD の新規原因遺伝子同定は、分子レベルから PD の全貌を理解する一助となり、PD の新しい治療法の開発に繋がれる可能性が現実味を帯びてくるため、極めて意義深いものといえる。

これまで、研究代表者は約 2000 例の PD について既知の原因遺伝子の解析を行った。若年性劣性遺伝性 PD の約 50%で *parkin* 変異、約 5%で *PINK1* 変異を認める一方、原因遺伝子不明の症例も数多く存在することが分かった。これらの家系に未知の原因遺伝子が隠れていると予想される。しかし、これらの家系はほとんどが小さな家系であるため、連鎖解析を行うためにはマイクロサテライトマーカーより高密度のマーカーを用いることが必需である。近年マイクロアレイ技術の進歩によりゲノムワイド SNPs タイピングが短期間で出来ることにより、高密度の SNPs を用いた連鎖解析が容易にできるようになり、遺伝性疾患の原因遺伝子座が次々と同定されるようになった。このような背景の中、研究代表者は既知の原因遺伝子変異を認めない PD 症例群から同胞発症者が2人以上存在し且つ血族婚のある 14 家系(22 症例)を選出し、アフィメトリクス社の SNP Array 6.0 を用いて 5000 塩基間隔の高密度なゲノムワイド 90 万の SNPs タイピングを行った。SNPs 多型情報を用いてオート接合性マッピングを行った結果、4 家系において 1 番染色体に共通のオート接合性領域を見出した。



さらに発症者が一人のみの 36 家系についてマイクロサテライトマーカーを用いてオート接合性領域のハプロタイプ解析を実施し同領域にリンクしている新たな 2 家系を見出した。

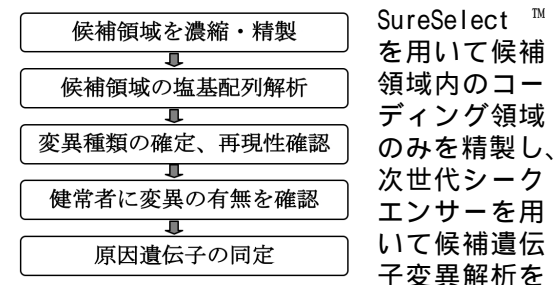
	同胞				同胞				新たな家系							
MS1	4	4	5	5	3	5	1	1	2	5	2	5	4	4	2	6
MS2	3	3	5	5	3	5	2	4	2	2	2	2	3	3	1	3
MS3	3	3	3	3	1	3	2	2	4	4	4	4	1	2	1	5
MS4	3	3	2	2	2	2	1	4	5	5	5	5	1	1	5	5
MS5	5	5	3	3	3	3	4	4	5	5	5	5	1	1	2	2
MS6	1	1	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	1	1
MS7	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1
MS8	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
MS9	2	2	2	2	2	2	4	4	2	5	3	5	2	2	1	1
MS10	2	4	2	2	2	2	1	1	3	5	3	4	1	4	5	5

このうち 2 家系を対象に SureSelect™を用いてターゲット・エンリッチメントの実施により候補領域のコーディング領域のみを精製し、次世代シーケンサーにより塩基配列解析を行った結果、7 箇所の 1 塩基置換 1 箇所の 1 塩基挿入を同定した。

2. 研究の目的

- (1) 解析対象を 4 家系に増加し、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析により候補遺伝子を網羅的に解析し、全コーディングエクソン配列を明らかにする。
 - (2) ミスセンス変異、ナンセンス変異、欠失変異などアミノ酸レベルでの変異種類を確定する。
 - (3) 変異解析データをサンガー法で再現性を確認する。
 - (4) 病的変異候補について、健常者に同じ変異の有無を確認する。
 - (5) 3000 例のパーキンソン病 DNA バンクから解析対象を絞り込み変異解析を行う。同時に新たな家系を発掘する。
- 最終的に家族性パーキンソン病の新規原因遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法



SureSelect™を用いて候補領域内のコーディング領域のみを精製し、次世代シーケンサーを用いて候補遺伝子変異解析を行った。次に、病的変異候補についてサンガー法に基づく従来のキャピラリーによる直接シーケンスを用いて再現性を確認した。病的変異と推定されるものについて、健常者に同じ変異がないことを確認し、500 例の PD を対象に変異解析を行った。

- (1) 新たな 4 家系についてエクソーム解析を実施した。アジレント社の SureSelectXT Human All Exon v4 Kit(アジレント/テクノロジー社)を用い

て標的領域のみを濃縮・精製した。SureSelect™は DNA マイクロアレイから作成される5万種類の120mer RNA ベイト(ビオチン化超長鎖 RNA オリゴライブラリ)を用いて溶液中での高効率なハイブリッド選択を実現し、ターゲット領域を高効率に濃縮することにより、次世代シーケンシングの効率とコストを劇的に改善する新しいゲノム濃縮技術である。

(2)次世代シーケンサーを用いて全ゲノムエクソン領域の塩基配列を取得した。HiSeq 2000(イルミナ社)次世代シーケンステクノロジーは、まずランダムに断片化されたゲノムDNAを回路に付着し増幅させる。次に取り外し可能な蛍光を持つ可逆化ターミネーターを用いたSequence-by-Synthesis法を採用し、同時に30億のテンプレートDNA塩基配列の読み取りを行う。このアプローチにより、従来法では数年かかる変異解析が数カ月で終わる。

(3)得られた塩基配列はBurrows-Wheeler Aligner(BWA)を用い、ヒトゲノム配列(hg19,GRCh37)にマッピングした。Picard MarkDuplicatesによりPCR Duplicatesと思われる塩基配列を除去し、SAMtoolsを用いて変異候補(一塩基変異、短い挿入欠失配列)を検出しヒトゲノムデータベースとのホモログ解析によりミスセンス変異、ナンセンス変異、フレームシフト変異など塩基レベルとアミノ酸レベルでの種類を明らかにした。

(4)サンガー法に基づくキャピラリーシーケンサーにより変異の再現性を確認した。ナンセンス変異、ミスセンス変異の順に再現性を確認確認し、Multiple Sequence Alignment解析を行い、種を超えて保存されている遺伝子変異を優先的に次の解析を行った。シーケンシング解析はBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applide Biosystems)及び3130 Genetic Analyzerを用いて塩基配列を決定した。

(5)日本人健常者100人における候補変異の有無を確認した。再現性が取れた変異候補が病的変異であるかを確認するためにはまず多数の健常者においても解析を行い、それが単なる遺伝子多型であることを排除する必要がある。

(6)3000例のパーキンソン病DNAバンクから臨床症状および遺伝形式から解析対象を500例に絞り込み、順次変異解析を行った。

(7)新たな家系の発掘:研究代表者所属施設に集められたパーキンソン病DNA検体から、臨床症状および既知原因遺伝子変異の有無を確認し、候補となる家系を発掘した。

4. 研究成果

(1)アジレント社のSureSelectを用いて全エクソーム領域のみを濃縮し、イルミナ社のHiSeq2000を用いてエクソーム解析を行った結果、候補領域の約95%の塩基配列情報を取得できた。

(2)SAMtoolsを用いて変異候補を検出し、ヒトゲノムデータベースと比較し、オート適合性領域に位置する、dbSNPデータベースに登録されず、エクソン及びスプライス部位に存在する、ホモ接合体変異である、などの条件で候補遺伝子変異の絞り込みを行った。結果、家系1から4種類(ミスセンス:3種類、フレームシフト:1種類)、家系2から8種類(ミスセンス:7種類、フレームシフト:1種類)、家系3から10種類(ミスセンス:6種類、フレームシフト:2種類、インフレーム:1種類、リードスルー:1種類)、家系4から3種類(ミスセンス:1種類、フレームシフト:1種類、インフレーム:1種類)、合計25種類の候補遺伝子変異が同定された。

SAMtoolsにより検出された変異候補数

	家系1-1	家系1-2	家系2-1	家系2-2	家系3-1	家系3-2	家系4-1	家系4-2
point	144473	152939	136027	149607	145688	155135	148251	159749
insertion	14413	14982	13103	14399	13885	15189	13227	14006
deletion	21590	22658	20008	21450	20839	22923	21081	21759
total	180476	190579	169138	185456	180412	193247	182559	195514

家系1から同定された候補遺伝子変異

chr:position	transcript_id	cover_read	location	effect	effect_type	eval
chr1:54605318	NM_201546	39	exon4	c.1224_1224insC	frameshift	Con
chr2:47233124	NM_020458	30	exon9	p.Q377E	missense	Con
chr2:47380118	NM_001163561	91	exon2	p.G40E	missense	Con
chr12:124097777	NM_020936	63	exon8	p.E268K	missense	Con

家系2から同定された候補遺伝子変異

chr:position	transcript_id	cover_read	location	effect	effect_type	eval
chr1:45446708	NM_001166588	77	exon2	p.R65C	missense	Con
chr11:46342259	NM_052954	225	SS3,exon12	c.1524_1524insG	frameshift	Con
chr19:1863385	NM_031918	11	exon1	p.A38T	missense	Con
chr19:7706944	NM_001127396	297	exon8	p.L201F	missense	Con
chr19:11287353	NM_001136191	148	exon5	p.A562V	missense	Con
chr19:17749947	NM_001080421	28	exon23	p.L1094P	missense	Con
chr19:19049012	NM_001145721	33	exon10	p.S342R	missense	Con
chr19:19666778	NM_153221	45	exon6	p.R1142W	missense	Con

家系3から同定された候補遺伝子変異

chr:position	transcript_id	cover_read	location	effect	effect_type	eval
chr10:34625160	NM_001146785	136	exon18	p.T858S	missense	Con
chr10:37431020	NM_052997	41	exon7	p.A343T	missense	Con
chr10:38126605	NM_001267597	182	exon5	p.I60V	missense	Con
chr2:88751751	NM_001135649	31	exon1	c.302_302insC	frameshift	Con
chr3:128712028	NM_020741	92	exon2	p.K40N	missense	Con
chr3:130285834	NM_001102508	108	exon4	p.S224N	missense	Con
chr3:139969437	NM_001095861	7	exon1	c.59_59insC	frameshift	Con
chr3:149678889	NM_007282	7	stop_codon	p.*382R	readthrough	Con
chr3:154884808	NM_002902	98	exon18	p.N592S	missense	Con
chr8:10467622	NM_178857	497	exon4	c.3985_3985insGAG	noframeshift	Con

家系4から同定された候補遺伝子変異

chr:position	transcript_id	cover_read	location	effect	effect_type	eval
chr10:105110740	NM_001011563	8	exon1	c.83_83insGCCTCC	noframeshift	Con
chr19:53116988	NM_001105549	11	exon6	p.A27TV	missense	Con
chr19:53952880	NM_001008401	220	exon5	c.137_137delC	frameshift	Con

(3)健常者100人において候補遺伝子変異と同じ変異は見られず、単なる遺伝子多型である可能性は低いと考えられた。

(4)候補遺伝子変異についてパーキンソン病500例について変異解析を実施した。しかし新たに変異を認める家系は見出せず原因遺伝子同定までは至らなかった。今後、解析対象をさらに増やし候補遺伝子変異の検証を行い、原因遺伝子の単離を目指す。

本研究は5000塩基間隔の高密度な90万SNPsを用いてゲノムワイド連鎖解析を行うことにより、原因遺伝子座を見逃す確率を最低限に抑えることができた。さらにターゲット・エンリッチメント技術と次世代シーケンサーの組み合わせにより候補遺伝子解析が従来の解析方法より約十倍速く、且つコストは従来の1/10に抑えることが出来た。原因遺伝子単離までは至らなかったがGenome-Wide SNP arrayを用いてのオート接合性マッピングは血族婚のある家系について連鎖解析の有力な手段と考えられる。また、変異スクリーニングを実施中に既知の原因遺伝子変異を認めない優性遺伝性パーキンソン病の1大家系を見出した。同家系から所属研究グループによって新規パーキンソン病原因遺伝子としてCHCHD2が発見された。

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 9 件)

1. FBX07 mutations in Parkinson's disease and multiple system atrophy. Conedera S, Apaydin H, Li Y, Yoshino H, Ikeda A, Matsushima T, Funayama M, Nishioka K, Hattori N. *Neurobiol.Aging*. 査読有 2016 Apr;40:192.e1-5. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.01.003 .
2. Schizophrenia as a prodromal symptom in a patient harboring SNCA duplication. Takamura S, Ikeda A, Nishioka K, Furuya H, Tashiro M, Matsushima T, Li Y, Yoshino H, Funayama M, Morinobu S, Hattori N. *Parkinsonism Relat Disord*. 査読有 2016 Apr;25:108-9. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2016.01.028.
3. Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). *Neurobiol.Aging*. 査読有 2016 Mar;39:219.e1-8. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.030 .
4. Fibromyalgia syndrome and cognitive dysfunction in elderly: a case series. Nishioka K, Hayashi T, Suzuki M, Li Y, Nakayama S, Matsushima T, Usui C, Shibata N, Motoi Y, Tanaka R, Nishioka K, Hattori N. *Int J Rheum Dis*. 査読有 2016 Jan;19(1):21-9. DOI: 10.1111/1756-185X.12734.
5. High frequency of beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) among patients with intellectual disability and young-onset parkinsonism. Nishioka K, Oyama G, Yoshino H, Li Y, Matsushima T, Takeuchi C, Mochizuki Y, Mori-Yoshimura M, Murata M, Yamasita C, Nakamura N, Konishi Y, Ohi K, Ichikawa K, Terada T, Obi T, Funayama M, Saiki S, Hattori N. *Neurobiol.Aging*. 査読有 2015 May 36. 2004.e9-e15. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.020 .
6. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. *Lancet Neurol*. 査読有 2015 Mar;14(3):274-82. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70266-2.
7. P150glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, Hattori N. *PLoS One*. 査読有 2014 Apr 10;9(4):e94645. DOI: 10.1371/journal.pone.0094645.
8. EIF4G1 gene mutations are not a common cause of Parkinson's disease in the Japanese population. Nishioka K, Funayama M, Vilariño-Güell C, Ogaki K, Li Y, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Kachergus JM, Cobb SA, Takahashi H, Mizuno Y, Farrer MJ, Ross OA, Hattori N. *Parkinsonism Relat Disord*. 査読有 2014 Jun;20(6):659-61. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2014.03.004.
9. The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. Yamashita C, Tomiyama H, Funayama M, Inamizu S, Ando M, Li Y, Yoshino H, Araki T, Ichikawa T, Ehara Y, Ishikawa K, Mizusawa H, and Hattori N. *Neurobiol.Aging*. 査読有 2014 Apr;35(4):935.e3-8 DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.022 .

〔学会発表〕(計 1 件)

李元哲, 舩山 学, 李林, 吉野 浩代, 西岡 健
弥, 富山 弘幸, 服部 信孝. GBA 遺伝子変異
を伴う家族性パーキンソン病の臨床遺伝学
的検討. 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014
年 5 月 21 日, 福岡国際会議場, 福岡市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 元哲 (LI, Yuanzhe)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号: 40549292