

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07536

研究課題名(和文)新規パーキンソン病原因遺伝子VPS13Cの病態評価と病的意義の探索

研究課題名(英文)Genetic analysis of VPS13C in Parkinson's disease

研究代表者

吉野 浩代(Yoshino, Hiroyo)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80338417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：VPS13Cのパーキンソン病(PD)における危険因子としての意義の検討を目的に、遺伝子パネルを用いたスクリーニングにて検出されたレアバリエーションの保有率を患者群と健常者群と比較した。その結果、保有率は患者群で有意に高く、更にVPS13Cのパラログ遺伝子であるVPS13B/Dも同様の結果が得られ、VPS13遺伝子はPDの疾患感受性遺伝子の可能性が示唆された。

VPS13Cのレアバリエーションの意義と表現型への影響の探索では、VPS13Cの2アレルレアバリエーションを持つ患者2名の末梢血から樹立したiPS細胞よりドパミン作動性神経を作製し、現在これを用いて組織・形態学的検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会においてパーキンソン病(PD)は重要な疾患であるが、未だ原因は不明であり、根本的治療の確立には発症機序の解明は急務である。VPS13Cの機能は十分に解明されていないが、ミトコンドリア機能やタンパク質分解系への関与が示されており、種々の神経変性疾患の原因遺伝子であるVPS13C遺伝子は、神経細胞死の機序解明において重要な遺伝子である。

本研究にて、VPS13CのみならずVPS13C遺伝子がPDの疾患感受性遺伝子としての可能性が示された。これは加齢や環境要因とともに発症リスクを高める遺伝的要因の一つであり、PDの大部分を占める孤発性PDの発症機序解明の手掛かりが得られた。

研究成果の概要(英文)：VPS13 has four paralog genes namely VPS13A/B/C/D. VPS13 genes relate to several types of neurodegenerative disorders, so we focused on the importance of VPS13 genes in neurodegeneration. To evaluate the significance of VPS13 genes as a risk factor in Parkinson's disease (PD), we assembled a genetic analysis for VPS13 genes in Japanese PD or PD-related disorders patients and controls. Rare variants were defined by minor allele frequency less than 0.5% in the public gene database. There were significant differences in the frequency of rare non-synonymous variant carriers between PD patients and controls in VPS13B, C, D, suggesting that the VPS13 gene may be a disease susceptibility gene for PD.

To evaluate the pathogenesis of rare variants, we established iPS cells from two patients with two-allelic variants of VPS13C and perform a functional study in dopaminergic neurons generated from iPS cells.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：VPS13C VPS13C遺伝子 パーキンソン病 レアバリエーション 発症危険因子 疾患感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease, PD) は、中脳黒質ドパミン神経の選択的変性による運動症状を主体とした神経変性疾患であり、超高齢化社会の我が国では、アルツハイマー病と並び介護や医療費問題に直結する重要な疾患である。しかし発症原因は未だ不明であり、根本的治療法の確立には発症機序や病態の解明は急務である。

PD は遺伝的背景のもと加齢や環境因子の影響を受ける多因子疾患である。多くが中高年で発症する孤発性 PD であるが、一部の家族性 PD における分子遺伝学的研究により多くの原因遺伝子や疾患感受性遺伝子が見出され、これらの遺伝子異常がミトコンドリア機能やタンパク質分解系を傷害する事により神経細胞死が引き起こされる事が示された。

2016年、Lesageらにより新たな常染色体劣性遺伝性 PD の原因遺伝子として vacuolar protein sorting 13C 遺伝子 (*VPS13C*) が報告された (Lesage et al. Am J Hum Genet 2016;98 (3): 500-513)。ここで報告された症例は、若年発症、進行性の rigid-akinesia parkinsonism、及び認知機能障害といった特徴的な臨床症状を呈し、1例の剖検脳では広範囲に広がるレビー小体やシヌクレインの過剰発現が認められ、さらに siRNA による *VPS13C* 蛋白の機能不全の細胞実験では、ミトコンドリア機能の破綻が観察された。

VPS13C が属する *VPS13* 遺伝子は、*VPS13A/B/C/D* の4種のパラログ遺伝子があり、*VPS13A* は有棘赤血球舞踏病、*VPS13B* は重度の精神発達遅滞を伴うコーエン症候群、*VPS13C* は若年発症性 PD、そして *VPS13D* は小脳失調を伴う痙性対麻痺と、いずれも常染色体劣性遺伝性神経変性疾患の原因遺伝子である。*VPS13* 蛋白は、種を越えてアミノ酸が保存された巨大タンパク質であり、その機能は充分には解明されていないが、*VPS13A* と *VPS13C* は細胞小器官の脂質輸送を行い、*VPS13B* はトランスゴルジネットワークへ関与、*VPS13D* はマイトファジーとの関連が示されている。さらにユビキチン関連ドメインやオートファジー関連蛋白の ATG2 に類似した ATG-C ドメインを持つことから、タンパク質分解系における役割も推測されている。

我々は保有する DNA バンクより、最初の報告例の臨床的特徴に類似した 74 例を抽出し、先行論文を発表した Lesage らと共同研究にて、*VPS13C* の複合ヘテロ接合体変異の 2 例を同定し、日本人にも *VPS13C* 変異による若年発症性 PD が存在することを確認した。

さらに 194 例の日本人 PD 患者について追加解析をした結果、多数のバリエーションが検出され、その中にはデータベースにはない新規のレアバリエーションや、バイオインフォマティクスツールによる *in silico* 解析にて有害性が予測されたレアバリエーションが存在した。こうしたバリエーションは PD 発症の危険因子となりうると考え、*VPS13C* をはじめ *VPS13* 遺伝子は神経変性のメカニズム解明における重要な遺伝子として着目した。

2. 研究の目的

本研究では、(1)PD 発症の危険因子となる *VPS13* 遺伝子のリスクバリエーションの探索、及び (2)*VPS13C* レアバリエーションの病的意義の評価と表現型に与える影響の検討を目的とした。

次世代シーケンサーによるスクリーニングは、従来のゲノム関連解析では検出が困難であった疾患発症への影響力が大きいレアバリエーションの検出を可能にした。常染色体劣性遺伝性疾患であるゴーシェ病の原因遺伝子 *GBA* のヘテロ接合体変異は、PD 発症の強力な危険因子である。また、*VPS13C* と同様の常染色体劣性遺伝性 PD の原因遺伝子である *PINK1* のヘテロ接合体変異は、dominant negative 効果により発症リスクを高めているという報告もある。

VPS13C のみならず *VPS13* 遺伝子はいずれも巨大遺伝子であり、データベースには既に多数のバリエーションが登録されていることから、*VPS13* 遺伝子は神経変性疾患の原因遺伝子として神経細胞死に直接的に関わるばかりでなく、疾患感受性遺伝子として PD 発症の相対的寄与因子となる可能性に期待し、病態解明の手掛かりとなるリスクバリエーションの探索を行った。

先行論文にて、*VPS13C* の機能不全がミトコンドリア機能の破綻をもたらす事が示されていることから、我々は *VPS13C* の遺伝子異常による神経変性は、同じくミトコンドリア機能に関わる *PRKN*、*PINK1* あるいは *CHCHD2* と類似した病態メカニズムであると推測した。

患者由来の iPS 細胞から作製した神経細胞では、脳内の現象が再現されている事が明らかとなり (Imaizumi et al. Mol Brain 2012;5:35) 剖検脳でしか解析が出来なかった中枢神経系の探索を可能にした。本研究では、*VPS13C* 変異患者から樹立した iPS 細胞より神経細胞を作製し、これを用いてミトコンドリア機能の変化、先行論文の剖検脳で観察されたレビー小体やシヌクレインの有無を明らかにすることにより、*VPS13C* バリエーションの病的意義を評価するとともに、臨床型にどの様な影響を及ぼすかを検討した。

3. 研究の方法

(1) リスクバリエーションの探索

家族歴の有無や発症年齢には無関係に、我々が保有する DNA バンクより日本人 PD 患者、ジストニア パーキンソニズムや多系統萎縮症などパーキンソニズムを呈するパーキンソン病関連疾患患者 (atypical parkinsonism, aPism) 及び神経変性疾患を持たない健常者 (In-house control, Cont) について、37 種の遺伝子 (PD 関連遺伝子 32 種、認知症関連遺伝子 5 種) を搭載した遺伝子パネルを用いた Ion Torrent システムによるターゲットリシーケンス法にてバリエーションのスクリーニングを施行した。VPS13C スクリーニングは、PD 群 936 名、aPism 群 149 名、Cont 群 324 名を、VPS13A/B/D スクリーニングは、PD 群 558 名、aPism 群 87 名、Cont 群 276 名を解析対象とした。

検出されたバリエーションは、CADD (Combined Annotation Dependent Depletion)、PROVEAN (Protein Variation Effect Analysis)、SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant)、PolyPhen2、Mutation Taster の 5 種のバイオインフォマティクスツールによる in silico 解析にて、病的可能性の有無を予測した。更に 3 種の公共データベース (Japan Whole Genome Aggregation: GEM-JWGA、Tohoku Medical Megabank Organization: ToMMo4.7KJPN、Genome Aggregation Database: gnomAD) のいずれにおいてアレル頻度が 0.5% 未満のバリエーションを抽出し、これをレアバリエーションと定義し、患者群と健常者群におけるレアバリエーションの保有率を比較した。

(2) VPS13C レアバリエーションの評価と表現型に与える影響

病的可能性が予測された VPS13C レアバリエーションを 2 アレル持つ患者 2 名について検討した。患者末梢血から分離した単核球にウイルスベクターを用いてプラスミドを導入し、その後フィーダー細胞へ播種・培養して iPSC 細胞を樹立した。これを低酸素環境で培養して神経細胞を分化誘導し、更に神経幹細胞の細胞塊である一次ニューロスフェアから tyrosine hydroxylase 陽性のドパミン作動性神経へと分化誘導した。分化状態が良好な細胞を選別し、組織・形態学的検討、および分子生物学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) リスクバリエーションの探索

VPS13A/B/C/D のいずれにおいて、多数のバリエーションが検出された (表 1)。アミノ酸置換を伴う非同義置換バリエーション (Non-synonymous variant) や、より重症度が高いナンセンスバリエーションやフレームシフトを起こすプライム部位のバリエーションも含まれていた。In silico 解析において有害性が予想されたバリエーションも多く、その中にはデータベースに登録されていない、あるいは非常にアレル頻度が低い稀なバリエーションもあり、健常者群にはない患者特異的なバリエーションも存在した。しかし、患者群と健常者群でアレル頻度に明らかな差があるバリエーションは認められなかった。

パーキンソン病群 (PD 群)、パーキンソン病関連疾患群 (aPism 群) 及び健常者群 (Cont 群) について、レアバリエーションの保有率を比較した。非翻訳領域を含む全レアバリエーション、あるいは翻訳領域から検出されたレアバリエーションでは患者群と健常者群で保有率に差は認められなかったが、より病的可能性がある非同義置換バリエーションに限ると VPS13B/C/D において PD 群で保有率が有意に高く、VPS13C では aPism 群でも高かった (表 2)。これにより VPS13 遺伝子のレアバリエーションは PD 発症の危険因子であり、疾患感受性遺伝子として PD 発症の遺伝的要因となる可能性が示された。

遺伝型と臨床型の相関について、バリエーションの有害度による発症年齢の違いや、患者特異的な新規バリエーションを持つ症例のより詳細な臨床情報を収集し、その特徴を検討している。

(2) VPS13C レアバリエーションの評価と表現型に与える影響

表 1 本研究における解析対象者数および検出されたバリエーション数

	VPS13A	VPS13B	VPS13C	VPS13D
Number of subjects				
Parkinson's disease (PD)	558	558	936	558
Atypical parkinsonism (aPism)	87	87	149	87
In-house control (Cont)	276	276	324	276
Number of detected variants (Not recorded in public databases)				
Total variants	209 (31)	141 (24)	283 (55)	163 (24)
Non-coding region	144 (25)	70 (14)	171 (31)	68 (11)
Coding region	65 (6)	71 (10)	112 (24)	95 (13)
Non-synonymous variants	39 (3)	45 (5)	83 (19)	66 (11)
Synonymous variants	26 (3)	26 (5)	29 (5)	29 (2)

Rare variants (MAF < 0.005 in public database)	141 (31)	112 (24)	194 (55)	131 (24)

表 2 患者群と健常者群における非同義置換バリエーション保有率の比較

	PD	aPism	Cont	pvalue
VPS13A	4.5% (25)	5.8% (5)	4.7% (13)	PD vs control: 0.8613 aPism vs control: 0.7770 PD vs aPism: 0.5831
VPS13B	7.1% (40)	2.3% (2)	3.3% (9)	PD vs control: 0.0276 (Odd ratio=2.28) aPism vs control: >0.9999 PD vs aPism: 0.2512
VPS13C	8.1% (76)	9.4% (14)	3.1% (10)	PD vs control: 0.0013 (Odd ratio=2.77) aPism vs control: 0.0060 (Odd ratio=3.26) PD vs aPism: 0.6306
VPS13D	9.8% (55)	8.1% (7)	5.8% (15)	PD vs control: 0.0335 (Odd ratio=1.90) aPism vs control: 0.4385 PD vs aPism: 0.6389

VPS13C の 2 アレルバリエーションを持つ患者は、共同研究にて同定された複合ヘテロ接合体変異の 2 例の他、新たにホモ接合体変異の 1 例が同定された (表 3)。3 例より検出された 6 種のバリエーションの内 p.D622E を除く 5 種は、データベースではアレル頻度低く、p.E1055A、p.G1309D、p.F2579C は健常者群にはない患者特異的なバリエーションであった。In silico 解析では有害と予測された事からいずれも病的可能性があるバリエーションと判断した。

臨床像は、若年発症で固縮主体のパーキンソニズム、L-dopa の反応性は良好であり、2 症例では精神発達遅滞を呈し、先行論文の症例に類似していた。

レアバリエーションの評価について、症例 A は既に死亡していたため、症例 B と症例 C の 2 例で検討した。末梢血より樹立した iPS 細胞よりドパミン作動性細胞を作製し、現在これを用いて VPS13C の発現量や細胞局在、および先行論文の剖検例で広範囲に認められたレビー小体や α -シヌクレインの有無について組織・形態学的検討を行っている。

表3 VPS13C2アレルバリエーションを持つ3症例の臨床的特徴

	症例 A	症例 B	症例 C
変異	c.3428A>T(p.H1142L) / c.7736T>G(p.F2579C)	c.1866C>A(p.D622E) c.3164A>C(p.E1055A) / c.3926G>A(p.G1309D)	c.8398A>G(p.I2800V) / c.8398A>G(p.I2800V)
性別	Female	Female	Female
発症年齢	45	44	57
初発症状	左上肢の暮動	右上肢の固縮	頭部ジストニア
L-dopa反応性	あり	あり	著効
ジスキネジア	あり	あり	なし
wearing off	あり	あり	なし
on/off	あり	あり	なし
経過		動作緩慢、歩行障害、姿勢反射障害が出現し、経過6年でYahr on時 4度、off時 5度	軽度の固縮で、Yahr 0-1度で経過
その他の症候	精神発達遅滞、深部腱反射亢進	精神発達遅滞、深部腱反射亢進	
画像所見	前頭・頭頂葉の血流低下	後頭葉の血流低下	DAT scanにて両側基底核の集積低下
MIBG心筋シンチ	取り込み低下	正常	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林田有紗
2. 発表標題 Genotype-phenotype analysis of VPS13C variants with familial Parkinson 's disease in Japan.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林田有紗
2. 発表標題 Genotype-phenotype analysis of VPS13C variants with familial Parkinson 's disease in Japan.
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林田有紗
2. 発表標題 Genotype-phenotype analysis of VPS13C variants with Parkinson 's disease in Japan
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林田有紗
2. 発表標題 Genetics and iPSC analysis of the patients with the variants of vacuolar protein sorting 13C
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉野浩代
2. 発表標題 Genetic analysis of VPS13A/B/D: paralogous genes of VPS13C in Parkinson's disease
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Arisa Hayashida
2. 発表標題 Mutation analysis of VPS13C in Japanese patients with Parkinson's disease
3. 学会等名 13th International Meeting on Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	林田 有紗 (Hayashida Arisa)	順天堂大学大学院医学研究科・神経学・大学院生	

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
---------	---------