

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590990  
 研究課題名（和文） パーキンソン病の発症・薬剤感受性に関連する SNP の探索と機能解析  
 研究課題名（英文） Analysis of SNPs susceptible to Parkinson's disease  
 研究代表者  
 水田 依久子（MIZUTA IKUKO）  
 大阪大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：80397760

## 研究成果の概要：

孤発性パーキンソン病(PD)の発症には、複数の遺伝子および環境因子が関与すると考えられている。これまで我々は 121 個の候補遺伝子上の 268 個の SNPs（一塩基多型）を用いた大規模な関連解析により、 $\alpha$ -synuclein ( $P = 5.1 \times 10^{-14}$ , オッズ比 OR = 2.23)を確実なパーキンソン病感受性遺伝子として同定し、報告した。また、白人で PD との関連が報告されていた *FGF20* ( $P = 0.0053$ , OR = 1.24)の日本人での再現性も確認した。本研究では、新たな PD 遺伝子同定のために、さらに候補遺伝子を増やして合計 137 個の候補遺伝子上の 302 個の SNPs の関連解析を行った。遺伝子型タイピングは患者 1403 人、対照 1938 人を対象に TaqMan 法で行った。その結果、新たな PD 感受性遺伝子 *calbindin1* を同定した ( $P = 7.1 \times 10^{-5}$ , OR = 1.34)。さらに、 $\alpha$ -synuclein, *calbindin1*, *FGF20* の 3 個の PD 遺伝子のうち、最も強く PD と関連する  $\alpha$ -synuclein を中心にして、統計学的組み合わせ解析を行った。*calbindin1* は  $\alpha$ -synuclein のリスクを持たない群で PD と強く相関し(OR = 1.70)、逆に *FGF20* は  $\alpha$ -synuclein のリスクアレルを持つ群で PD とより強く関連した(OR = 1.76)。*Calbindin1* はカルシウム結合蛋白であり、PD 患者の黒質で *calbindin1* 陰性神経の脱落が陽性神経の脱落よりも強いことから、神経保護作用を持つと考えられている。組み合わせ解析から、*calbindin1* は  $\alpha$ -synuclein とは独立に、一方、*FGF20* は  $\alpha$ -synuclein と相乗的に、PD 発症に関与していることが示唆される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、一塩基多型、疾患感受性遺伝子、関連解析

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は振戦、固縮、緩慢、姿勢反射障害を四主徴とする神経変性疾患で

ある。殆どが孤発例であり、50才以降に好発する。我が国には約12万人の患者がおり、アルツハイマー病に次いで高齢者に多い神経変性疾患である。

血縁再発率の研究から、孤発性 PD の発症には複数の遺伝因子と環境因子が関わると考えられている。特徴的な病理所見は中脳黒質ドーパミン神経の脱落であるがその機序については不明である。

臨床面では、L-ドーパやドーパミンアゴニストを中心とした薬物治療の発達により、大きな延命効果が得られた。しかしながら、病気の進行を抑える治療法が無いことから、長期にわたる服薬に伴う様々な副作用（精神症状、ウェアリングオフ現象、悪性症候群など）が問題となる。したがって、患者の QOL を高めるためには、病因・病態解明並びに最適な薬剤の選択が不可欠である。このため、PD の発症及び薬剤感受性に関連する遺伝子の解明が必要である。

PD 関連遺伝子同定のために不可欠なのが遺伝子多型情報とタイピング技術である。情報については、近年 JSNP, dbSNP などの SNP（一塩基多型）データベース構築が飛躍的に進んだ。さらに 2002 年に国際プロジェクトが発足し、2005 年 10 月から公開された HapMap データベースは、4 つのヒト集団における、SNP 遺伝子型と連鎖不平衡データが含まれている。HapMap により、ゲノムワイドに、tag SNP を選ぶことが可能となった(Nature 437:1299-1320, 2005)。タイピング技術も発展し、従来の TaqMan 法、Invader 法などに加えて、今や、1 検体につき、一度に 50 万個もの SNP をチップでタイピングできる時代になった。このような状況の中、チップを用いて 20 万個の SNP (Am. J. Hum. Genet. 77:685-693, 2005)、30 万個の tag SNP(Lancet Neurology, 2006, published online) をタイピングするというゲノムワイド関連解析がアメリカから相次いで報告され、解析データは Web で公開された。関連 SNP については今後の追試が待たれるが、現在のところ再現性ありとの報告は無い (Am. J. Hum. Genet. 78:1081-1094, 2006)。

我々は SNP データベースが未熟な頃から候補遺伝子アプローチによる関連解析に着手した。総 SNP 数 268, 遺伝子数 121, 患者 882 人、対照 938 人という、当時は世界でも類をみない規模であった。その結果、22 個の有意な SNPs をスクリーニングで得ることができた。それらの解析の中で、 $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -シヌクレイン) という遺伝子上の SNP にそれまでの世界中の報告のなかで最も強い関連( $p=1.7 \times 10^{-11}$ )を見出した。Genotype ごとの定量 RT-PCR 解析も進めて、多型が剖検脳での  $\alpha$ -synuclein 遺伝子発現量と関連する傾向を示し、論文発表をした (Hum. Mol. Genet. 15:1151-1158, 2006)。

## 2. 研究の目的

本研究では、前述の大規模な候補遺伝子関連解析を進展させて、新たな PD 感受性遺伝子の同定し、PD 関連 SNP の機能解析を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

遺伝子型タイピングは患者 1403 人、対照 1938 人を対象に TaqMan 法で行った。以前の候補遺伝子関連解析に 34SNPs を追加した。統計解析には SNPalyze, 及び R を用いた。DNA 収集のための研究協力者からの採血の際には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文科省・厚労省・経産省告示第 1 号、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正)」を遵守し、文書によるインフォームドコンセントを得た。なお、本研究は大阪大学倫理委員会の承認を得ている。

(1) 患者対照各 190 人による一次スクリーニングの拡大: 既に 268 個の SNP のスクリーニングが終了し  $p < 0.05$  の 22 個の有意な SNP が残った。PD の病態メカニズムに関するこれまでの研究報告・論文からさらに別 17 個の候補遺伝子を選び、各遺伝子上計 34SNPs を dbSNP データベースから選出し、総数 137 個の候補遺伝子上の 302 個の SNPs をスクリーニング対象とした。

(2) 患者 882 人対照 935 人による二次スクリーニング: 一次スクリーニングで残った SNP について、検体を増やして有意性を確認する。この段階で  $p$  値が極めて小さければ ( $10^{-6}$  オーダー) ほぼ確実な感受性遺伝子であると考えられる。

(3) 別の患者対照群による Replication study: (2) で残った SNP および、二次スクリーニングで中程度の関連 ( $p$  値が  $10^{-4}$  から  $10^{-5}$  オーダー) を示した SNP については、別の集団 (患者 521 人対照 1003 人) による関連解析を行った。有意差の再現性を示した SNP を確実な結果と解釈する。

(4) 連鎖不平衡解析、ハプロタイプ解析: 上記の結果有意と判定された SNP 周辺領域の連鎖不平衡解析、ハプロタイプ解析を行い、PD と最も強く関連する SNP またはハプロタイプを同定する。その際、HapMap データベースを利用して tag SNP を選出する。

(5) PD 関連 SNP の機能解析: 以上の解析で得られた SNP がどんな機構で遺伝子の機能に関わるかを調べるために、ルシフェラーゼアッセイやゲルシフトアッセイなどの *in vitro* の実験により、転写調節活性や結合タ

ンパクの検出を行った。

#### 4. 研究成果

合計 137 個の候補遺伝子上の 302 個の SNPs の関連解析、および連鎖不平衡解析により、*α-synuclein* に続く第 2 の PD 遺伝子として、*calbindin1* を同定した ( $P=7.1 \times 10^{-5}$ , オッズ比 1.34)(図 1)。さらに、*α-synuclein* ( $P=5.1 \times 10^{-14}$ , オッズ比 2.23), *calbindin1*, *FGF20* ( $P=0.0053$ , オッズ比 1.24)のうち、最も強く PD と関連する *α-synuclein* を中心にして、これらの遺伝子の組み合わせ解析を行った。*α-synuclein* のリスクアレルを 2 つ持つ群では *calbindin1* と PD との関連の有意差は見られなくなったが、*FGF20* と PD との関連はより強くなった ( $P=5.9 \times 10^{-6}$ , オッズ比 1.76)。これに対して、*α-synuclein* のリスクアレルを持たない群では、*calbindin1* と PD との関連はより強くなり(オッズ比 1.70), *FGF20* と PD との関連は有意差が無くなった(図 2)。ステップワイズロジスティック回帰解析では、*α-synuclein*, *FGF20* の相互作用の項は有意であったが、*α-synuclein*, *calbindin1* の相互作用の項は有意ではなかった。

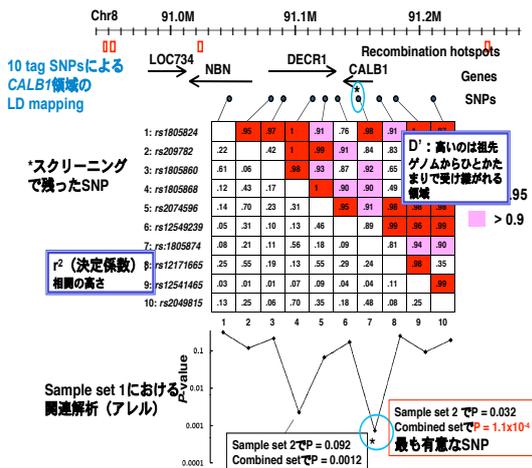


図 1

今回同定した新規の PD 感受性遺伝子 *calbindin1* はカルシウム結合蛋白をコードしている。PD 患者の黒質で *calbindin1* 陰性神経の脱落が陽性神経の脱落よりも強いことから、この蛋白は神経保護作用を持つと考えられている。統計学的には、*calbindin1* と *α-synuclein*、*FGF20* と *α-synuclein* との間に興味深い関係が見られた。生物学的にこれらの蛋白の相互作用を示した例はほとんど無い。しかしながら、*FGF20* と *α-synuclein* の統計学的相互作用については、最近 *FGF20* の 3'UTR の SNP が microRNA との結合に関係して *FGF20* の発現量に影響し、さらに *α-synuclein* の発現レベルにも関連するという報告があり大変興味深い (Wang G et al.,

Variation in the miRNA-433 binding site of *FGF20* confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet* 82:283-289, 2008.)。

また、*α-synuclein* の PD 関連 SNP については、ゲルシフトアッセイにより、アレル特異的な結合蛋白の存在を確認している。

#### SNCAで階層化したCALB1, FGF20のカイニ乗解析

CALB1: SNCAのリスクが少ない場合に強く関連する						
	Case	Control		OR (95% CI)	p	
<b>CALB1</b>						
	AA	AC+CC	AA	AC+CC		
SNCA	CC	381	205	381	227	1.11 (0.87-1.40) 0.4
	CT	393	203	531	386	1.41 (1.14-1.74) 0.0017
	TT	102	44	201	147	1.70 (1.12-2.56) 0.012
<b>FGF20</b>						
	GG	GC+CC	GG	GC+CC		
SNCA	CC	225	360	159	448	1.76 (1.38-2.25) 5.9x10 <sup>-6</sup>
	CT	178	429	281	629	0.93 (0.74-1.16) 0.52
	TT	51	98	96	247	1.34 (0.89-2.02) 0.16

リスクアレル: C (SNCA), A (CALB1), G (FGF20)

FGF20: SNCAのリスクが強い場合にのみ、より強く関連する(相乗効果)

図 2

#### 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 4 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, Tsuji S. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 66: 571-576, 2009. (査読有り)

(2) Tomiyama H, Mizuta I, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Li L, Murata M, Yamamoto M, Kubo SI, Mizuno Y, Toda T, Hattori N. LRRK2 P755L variant in sporadic Parkinson's disease. *J Hum Genet* 53: 1012-1015, 2008. (査読有り)

(3) Mizuta I, Tsunoda T, Satake W, Nakabayashi Y, Watanabe M, Takeda A, Hasegawa K, Nakashima K, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Calbindin 1, fibroblast growth factor 20, and *α-synuclein* in sporadic Parkinson's disease. *Hum Genet*. 124:89-94, 2008. (査読有り)

(4) 水田依久子、戸田達史 孤発性パーキンソン病のメカニズム 成人病と生活習慣病 (東京医学社) 38: 887-892, 2008. (査読無し)

[学会発表] (計 5 件)

(1) W. Satake, Y. Nakabayashi, I. Mizuta, T. Kawaguchi, T. Tsunoda, M. Kubo, S. Sakoda, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, Y. Nakamura, T. Gasser, A.B. Singleton, T. Toda Genome-wide association study of Parkinson's disease by

550K SNP Array. The American Society of Human Genetics 58th Annual Meeting 2008年11月14日 Philadelphia, Pennsylvania, USA

(2) 水田依久子、佐竹渉、角田達彦、渡邊雅彦、武田篤、長谷川一子、中島健二、山本光利、服部信孝、村田美穂、戸田達史 パーキンソン病感受性遺伝子の同定および統計学的相互作用解析 第49回日本神経学会総会 2008年5月17日横浜 パシフィコ横浜

(3) 水田依久子、佐竹渉、角田達彦、長谷川一子、渡邊雅彦、武田篤、服部信孝、山本光利、村田美穂、戸田達史 多数の候補遺伝子アプローチによるパーキンソン病感受性遺伝子 calbindin1 の同定 日本人類遺伝学会第52回大会 2007年9月14日東京 京王プラザホテル

(4) I. Mizuta, W. Satake, T. Tsunoda, M. Watanabe, A. Takeda, K. Hasegawa, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, T. Toda. Multiple candidate gene analysis identifies CALB1(calbindin1) as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting October 26<sup>th</sup>, 2007 San Diego Convention Center, San Diego, USA

(5) W. Satake, I. Mizuta, Y. Hirota, A. Oka, M. Watanabe, A. Takeda, K. Hasegawa, S. Sakoda, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, H. Inoko, T. Toda. Association between FGF20 and Parkinson's disease and Genome-wide association study using 27,158 microsatellite by The Japanese PD Susceptibility Gene Consortium. The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting October 26<sup>th</sup>, 2007 San Diego Convention Center, San Diego, USA.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

水田 依久子 (MIZUTA IKUKO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80397760

### (2)研究分担者

無し

### (3)連携研究者

無し