

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790829

研究課題名（和文） 新規家族性パーキンソン病の原因遺伝子探索と機能解析

研究課題名（英文） Identification of new gene for familial parkinsonism

研究代表者

船山 学 (FUNAYAMA MANABU)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70468578

研究成果の概要（和文）：同一地域出身の二家系の高齢発症の常染色体劣性遺伝性パーキンソン病家系についてゲノムワイド連鎖解析とエクソーム解析を実施した。その結果 2 家系はそれぞれ別の創始者をもつ可能性が高いことが明らかとなった。エクソーム解析から得られた多型について、連鎖領域にあり、新規のホモ接合体変異という条件で絞り込んだ結果、家系 1 から 6 種類、家系 2 から 19 種類の候補遺伝子変異を同定した。

研究成果の概要（英文）：To identify new genes for familial parkinsonism, two families with late-onset autosomal recessive parkinsonism, who were from the same town, were investigated. Genome-wide linkage analysis and exome analysis showed that these families have uncommon founders. Filtering of variants from exome analysis identified 6 candidate variants for family 1 and 19 candidate variants for family 2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子遺伝学

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：遺伝子、変異、連鎖、エクソーム、パーキンソン病、多型

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病のほとんどは孤発性であるが一部（5-10%）に家族歴を認める。これら家族性パーキンソン病の分子遺伝学的研究の成果によって、これまで様々な分子がパーキンソン病発症に関与することが明らかになってきた。しかしながら患者の大多数を占

める孤発性パーキンソン病の発症機序解明と根治療法の確立には未だ不明な点が多く、新たなブレイクスルーが必要とされている。このような背景の中、研究代表者は臨床的、さらには発症機序を考察する上で孤発性パーキンソン病に近いと考えられる家族性パーキンソン病として、常染色体劣性遺伝性でな

おかつ高齢発症の家族性パーキンソン病家系に注目し数年前から原因遺伝子を単離すべく解析を行ってきた。その結果、対象家系のうち一家系（発症者3名、健常兄弟4名のゲノムDNAを採取済）から2つの有力な遺伝子変異を同定した。さらに同一地域出身のもう一家系と共に連鎖解析を行った結果、対象二家系に共通した新たな候補座位を同定した。この候補座位には7種の遺伝子が存在していることが明らかとなっており、前出の2遺伝子と合計すると候補遺伝子は9種に絞り込まれた。

2. 研究の目的

対象家系（家系1：発症者3名、健常兄弟4名のゲノムDNAを採取済、家系2：発症者3名、健常兄弟1名のゲノムDNAを採取済）の原因遺伝子を単離し、その機能解析を行うことで家族性だけでなく、孤発性パーキンソン病の病態機序解明に寄与する。対象家系は人口流動の比較的少ない同一地域出身で、臨床的にも非常に類似しているため、共通の遺伝子変異によってパーキンソン病を発症している可能性が高い。しかしながら先に同定した2種の候補遺伝子変異は家系1のみから見つかっており、対象の二家系は別の創始者である可能性も残されている。したがって様々なパターンで多角的に解析を行う必要がある。

3. 研究の方法

(1) ゲノムワイド連鎖解析

ゲノムワイドSNPs多型解析はアフィメトリクス社のSNP6.0アレイをもちいた。ゲノムワイド連鎖解析はSNPHiTLink、merlin、およびallegroソフトウェアをもちいロードスコアの算出を行った。

(2) シークエンス

シークエンス解析はBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems) をもちいて塩基配列を決定した。

(3) エクソーム解析

一部の患者についてはSureSelectXT Human All Exon 50Mb Kit (Agilent) をもちいてエクソン領域を濃縮し、HiSeq2000 (イルミナ) で高速シークエンスを行った。得られた塩基配列 (リード) はBWAもちいてヒトゲノム参照配列 (hg19) にマッピングした。変異の検出にはSAMtools およびPicard をもちいた。

4. 研究成果

(1) 連鎖解析

研究実施期間途中で家系1の非発症兄弟1名

がごく初期のパーキンソン病を発症していることが明らかになった。家系1は発症者4名、健常兄弟3名となり、その平均発症年齢は 65.3 ± 6.4 歳となった。この情報を元に約2万のSNPs多型情報をもちいてゲノムワイド連鎖解析を行った。その結果、10カ所の領域でロードスコアが1以上である事が明らかとなった (図1)。

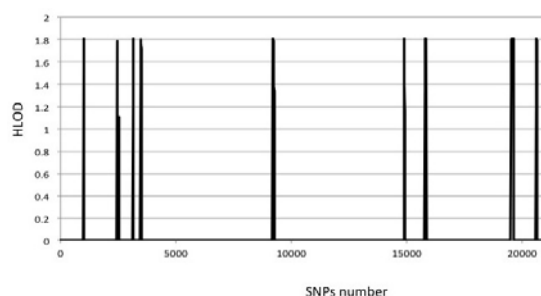


図1. 家系1のパラメトリック連鎖解析

一方、家系2について家系1と同様の連鎖解析を行った結果、14カ所の領域でロードスコアが1以上である事が明らかとなった (図2)。

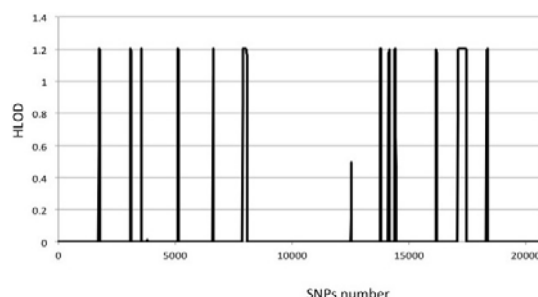


図2. 家系2のパラメトリック連鎖解析

家系1から新たな発症者が見出された事で、研究開始当初に候補として挙がっていた遺伝子に関しては、対象家系の原因であることが否定された。

また、家系1と家系2は同一地域出身であるため、二家系合計して連鎖解析を行った結果、7カ所の領域でロードスコアが1以上となった (図3)。

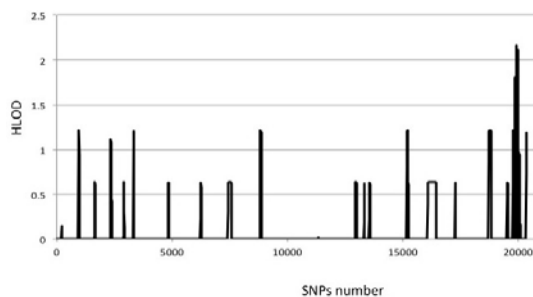


図3. 2家系合計のパラメトリック連鎖解析

(2) 候補遺伝子変異の同定

対象家系の原因遺伝子を明らかにするため、家系1および家系2の患者それぞれ2名ずつ、合計4名について全エクソン解析を実施した。得られた多型から(a)連鎖領域に存在する、(b) dbSNP データベースに登録されていない新規の変異である、(c) エクソンおよびスプライス部位に存在する、(d) ホモ接合体変異である、という条件で候補遺伝子変異の絞り込みを行った。その結果、二家系に共通する変異は見出されなかった。したがって対象家系は別々の創始者をもつ家系である可能性が高い事が明らかとなった。

個別の家系について同様の絞り込みを行った結果、家系1からは6種類(UTR:4種、ミスセンス:2種)の候補遺伝子変異を同定した(表1)。家系2からは19種類(UTR:17種、ミスセンス:1種、フレームシフト:1種)の候補遺伝子変異を同定した(表2)。今後これらの候補遺伝子変異について、家系内、非血縁健常群、および他の遺伝性パーキンソン病家系で検証を行い、原因遺伝子の単離を目指す。

表1. 家系1から同定された候補遺伝子変異

		Variants	Not in dbSNP	exon/ss	Homo cons	
rs10494331-rs10759	chr1:159,582,103-163,046,351	1005	171	16	3	UTR
rs927541-rs674896	chr2:290,032,200-97,410,249	955	259	5	0	
rs1356873-rs11593106	chr2:189,636,921-189,484,614	16	5	0	0	
rs1966469-rs6704763	chr2:230,319,228-233,592,487	715	112	6	0	
rs9386048-rs633891	chr6:144,125,035-152,592,751	937	165	3	0	
rs141170-rs7907262	chr6:151,360,187-15,541,869	137	59	3	0	
rs10744212-rs10747098	chr12:126,818,490-133,746,801	1188	216	7	0	
rs6507881-rs12969387	chr18:46,499,292-41,108,190	1365	248	12	1	UTR
rs3622911-rs6015839	chr20:54,087,963-55,372,363	516	134	4	0	
rs4823530-rs609945	chr22:48,804,567-51,080,213	941	138	9	4	missense-2, silent-2

表2. 家系2から同定された候補遺伝子変異

		Variants	Not in dbSNP	exon/ss	Homo cons	
rs7526719-rs12750069	chr1:244,266,817-349,069,190	813	94	4	0	
rs1946834-rs3816448	chr2:171,308,909-175,613,059	533	107	21	0	
rs10931416-rs219067	chr2:231,802,518-234,612,005	142	45	0	0	
rs11714089-rs9851529	chr2:184,872,794-191,206,432	992	174	12	2	UTR
rs1377834-rs6848851	chr4:177,273,400-180,688,000	131	20	0	0	
rs7709309-rs17967778	chr5:142,264,976-166,386,227	1939	328	26	0	
rs2271751-rs10885113	chr10:105,175,131-112,989,177	579	99	9	3	UTR
rs4265560-rs16934571	chr11:15,790,903-17,673,137	241	51	0	0	
rs996344-rs984371	chr11:45,254,931-55,277,698	1406	233	6	1	missense
rs931162-rs7139557	chr13:10,059,244-23,496,139	811	134	4	0	
rs7141411-rs11627633	chr14:32,269,806-77,693,815	4970	1001	20	9	UTR
rs1045001-rs130005	chr16:107,275,3,828,348	1977	279	41	4	fs.1, UTR.3
rs761248-rs2748817	chr20:17,848,206-23,059,285	627	110	3	0	
rs2823730-rs2826726	chr21:17,643,185-22,359,949	210	42	0	0	

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. Funayama M, Yoshino H, Li Y, Kusaka H, Tomiyama H, Hattori N. Pseudo-heterozygous rearrangement mutation of parkin. Mov Disord. 査読有, 2012 Feb 5. [Epub ahead of print].
2. Usami Y, Hatano T, Imai S, Kubo S, Sato S, Saiki S, Fujioka Y, Ohba Y, Sato F, Funayama M, Eguchi H, Shiba K, Ariga

H, Shen J, Hattori N. DJ-1 associates with synaptic membranes. Neurobiol Dis. 査読有, 2011, 43:651-62.

3. Tomiyama H, Yoshino H, Ogaki K, Li L, Yamashita C, Li Y, Funayama M, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Hattori N. PLA2G6 variant in Parkinson's disease. J Hum Genet. 査読有, 2011, 56:401-403.
4. Hayashi C, Funayama M, Li Y, Kawano A, Suzuki M, Hattori N, Ikeda K. Prevalence of GJB2 Causing Recessive Profound Non-Syndromic Deafness in Japanese Children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 査読有, 2011, 75:211-214.
5. Sekine T, Kagata H, Funayama M, Li Y, Yoshino H, Tomiyama H, Hattori N. Clinical course of the first Asian family with parkinsonism related to SNCA triplication. Mov Disord. 査読有, 2010, 25:2871-2875.
6. Funayama M, Tomiyama H, Wu RM, Ogaki K, Yoshino H, Mizuno Y, Hattori N. Rapid screening of ATP13A2 variant with high-resolution melting analysis. Mov Disord. 査読有, 2010, 25:2434-2437.
7. Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, Ogaki K, Li Y, Funayama M, Hashimoto T, Takashima S, Hattori N. Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. Neurology 査読有, 2010, 75:1356-1361.
8. Oyama G, Yoshimi K, Natori S, Chikaoka Y, Ren YR, Funayama M, Shimo Y, Takahashi R, Nakazato N, Kitazawa S,

Hattori N. Impaired in vivo dopamine release in parkin knockout mice. *Brain Research* 査読有, 2010, 1352:214-222.

9. Li L, Funayama M, Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Mizuno Y, Hattori N. No evidence for pathogenic role of GIGYF2 mutation in Parkinson disease in Japanese patients. *Neurosci Lett.* 査読有, 2010, 479:245-248.

[学会発表] (計9件)

1. 船山 学, 日下 弘道, 吉野 浩代, 李元哲, 富山 弘幸, 服部 信孝. 第56回 日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会共同大会, *Parkin*遺伝子の pseudo-heterozygous rearrangement 変異. 2011年11月11日, 幕張メッセ (千葉).
2. 船山 学, 李元哲, 佐竹 涉, 吉野 浩代, 今道 洋子, 富山 弘幸, 松浦 英治, 野元 三治, 有村 公良, 戸田 達史, 高嶋 博, 服部 信孝. 第5回 パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の連鎖解析. 2011年10月7日, 品川プリンスホテル (東京).
3. Funayama M, Kusaka H, Yoshino H, Li Y, Ogaki K, Tomiyama H, Hattori N. ASHG/ICHG 2011 Meeting, Analyses of compound heterozygous rearrangements of *parkin*. 2011年10月13日, モントリオールコンベンションセンター (モントリオール, カナダ).
4. Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K, Kobayashi T, Nakanishi A, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Shioya K, Yokochi M,

Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Motoi Y, Tomiyama H, Hattori N. ASHG/ICHG 2011 Meeting, Clinicogenetic study of patients with FTDP-17 (MAPT) in Japan. 2011年10月13日, モントリオールコンベンションセンター (モントリオール, カナダ).

5. Funayama M, Tomiyama H, Hattori N. 2011 Meeting of the Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease Consortium, Genetic Analysis for Parkinson's Disease in Juntendo University, Tokyo, Japan. 2011年9月19日, ノースショア大学 (シカゴ, アメリカ合衆国).
6. 船山 学, 李元哲, 佐竹 涉, 吉野 浩代, 今道 洋子, 富山 弘幸, 松浦 英治, 野元 三治, 有村 公良, 高嶋 博, 戸田 達史, 水野 美邦, 服部 信孝. 第52回日本神経学会総会, SNP chipによる家族性パーキンソン病の連鎖解析と新規原因遺伝子探索. 2011年5月20日, 名古屋国際会議場 (名古屋).
7. 船山 学, 関根 威, 加賀谷 肇, 李元哲, 吉野 浩代, 富山 弘幸, 服部 信孝. 日本人類遺伝学会 第55回大会, アジア初の α -synuclein 遺伝子三重複変異. 2010年10月29日, 大宮ソニックシティ (大宮).
8. 船山 学, 関根 威, 加賀谷 肇, 李元哲, 吉野 浩代, 富山 弘幸, 服部 信孝. 第4回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, SNCA 三重複変異の同定. 2010年10月8日, 京都ホテルオークラ (京都).
9. 船山 学, 吉野 浩代, 今道 洋子, 李元哲, 松浦 英治, 有村 公良, 高嶋 博, 野元 三治, 富山 弘幸, 水野 美邦, 服

部 信孝. 第 51 回日本神経学会総会,
SNP chipによる家族性パーキンソン病の
linkage解析 (続報). 2010 年 5 月 20 日,
東京国際フォーラム (東京) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船山 学 (FUNAYAMA MANABU)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 704468578