

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860726

研究課題名(和文)新規alpha-synuclein発現調節modifier遺伝子の同定と機能解明

研究課題名(英文)The detection of modifier gens in alpha-synuclein multiplications

研究代表者

西岡 健弥(Nishioka, Kenya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40348933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SNCA duplicationの変異を持つ発症者、非発症キャリアーの2群に分けた。合計20名(6家系、男性：女性=8：12、パーキンソン病発症11名、パーキンソン病非発症キャリア9名)である。AffymetrixのGeneChipを用いて一塩基多型を調べた。LOD scoreの算出とManhattan plotの作成した。連鎖解析ソフトであるMERLINを用いてLOD scoreを算出した。LOD scoreを3以上の領域まで絞り込んだ。その後、絞り込みに困難な点が生じ、University of British Columbiaと共同研究を開始し、より症例数を増やして解析中である。

研究成果の概要(英文)：We enrolled 20 patients harboring SNCA duplication (Male:Female=8:12) derived from six Japanese families. We divided them to two groups of symptomatic carriers and asymptomatic carriers. Genes were analyzed by genechip of Affymetrix and searched all SNPs in exons. We estimated the region having over 3.0 of LOD score, including 18 novel genes. Eventually, we have difficulty to detect the precise candidate genes in this study. We have started to analyze data again adding the 50 samples harboring SNCA duplication, derived from around world, collaborating with University of British Columbia.

研究分野：神経学

キーワード：パーキンソン病 alpha-synuclein SNCA 遺伝子重複 びまん性レビー小体病 認知症

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は有病率 130-150 人/10 万人の我が国で 2 番目に多い神経変性疾患であり、約 80% が孤発性であるが、明瞭な遺伝性をもつ家族性家系が存在する(1)。1997 年に家族性パーキンソン病の原因遺伝子 alpha-synuclein が同定され、以降に同遺伝子の異常と病態生理はより広く検討されており、シナプス機能・ミトコンドリア機能・蛋白分解機構との関連が明らかとなった(2, 3)。現在まで病因遺伝子、候補遺伝子は PARK 分類とされ、総数 PARK22 まで同定されており、今後もさらなる原因遺伝子の同定が期待できる。原因遺伝子が同定できれば、細胞実験、モデル動物の作成、iPS 細胞の作成が可能となり、そこから新たな疾患への理解、より適切な治療法が開発される可能性が出て来る。

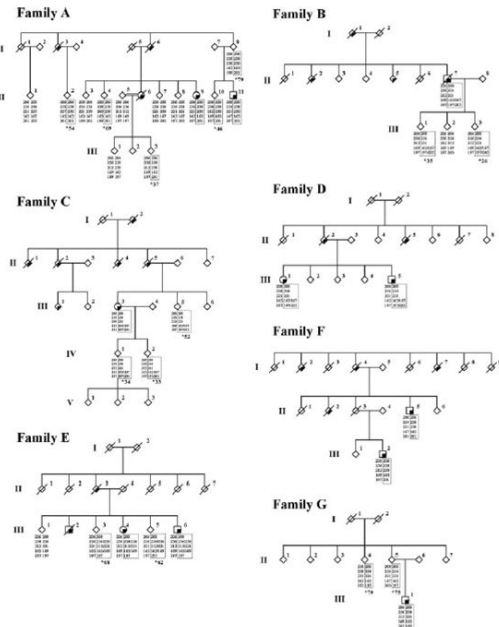
一方、それでもなお、まだこの家族性パーキンソン病と原因遺伝子については不明な点が多い。遺伝性パーキンソン病の重要な遺伝子の 1 つに PARK1(alpha-synuclein, SNCA) がある。PAKR1 にはミスセンス変異と遺伝子重複(2 倍体, 3 倍体)があり、常染色体優性遺伝形式の家族性のパーキンソン病、またはびまん性レビー小体病の原因遺伝子変異である(4)。

臨床的には病初期に無動・固縮・振戦・姿勢反射障害といった典型的パーキンソニズムを呈し、年齢が上がるほど認知症の合併率は上昇し、臨床的に認知症を伴うびまん性レビー小体病、あるいはパーキンソン病に伴う認知症を呈する(5)。これらの疾患群は、分子レベルの病態解明が進み、alpha-synuclein を病理学的特徴とする alpha-synucleinopathy という疾患概念が確立された(6)。

我々はすでに本邦から alphasynuclein 領域の 2 倍体家系を 6 家系同定している(2, 7)。この 6 家系から 20 名の DNA を回収し、それ

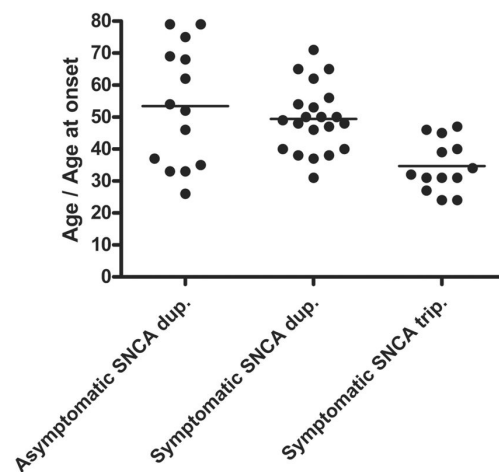
ぞれ発症者キャリアー 11 名と非発症者キャリアー 9 名に分けられることが分かった。またこれらの家系群は 3 つの共通先祖を持つことがハプロタイプ解析で判明している(図 1)。

図 1



非発症者キャリアーには、高齢でありながらも発症してこない 6 名が存在しており、同じ二倍体を持ちながらもパーキンソン病を発症しない(図 2)。

図 2



この 2 群の DNA を比較解析することにより、発症者や非発症者が特有に持つ別の遺伝的な要因が同定できる可能性が考えられた。そ

れらが alpha-synuclein の発現量調整に働き、同じ変異を持ちながらも発症する群、しない群の 2 グループが生み出される可能性が考えられた。またこの modifier 遺伝子を同定することにより、alpha-synuclein の発現調節メカニズムが分かる可能性が考えられていた。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、alpha-synuclein の modifier 遺伝子、発現調整規定遺伝子の同定を目指す。遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物 alpha-synuclein は孤発性パーキンソン病やレビー小体型認知症の病理学的特徴であるレビー小体を構成し病態に深く関与する。本研究では alpha-synuclein 遺伝子 2 倍体、3 倍体変異により発症する家族性パーキンソン病の臨床像の多様性に着目し、同蛋白発現の制御機構を modifier 遺伝子に焦点を当て、網羅的手法を用いて候補 modifier 遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

対象・方法：対象は、SNCA 遺伝子に 2 倍体変異を有した患者合計 20 名(6 家系、男性：女性=8：12、パーキンソン病発症 11 名、パーキンソン病非発症キャリア 9 名)である。同時に詳細な臨床情報も回収した。具体的には、臨床経過の詳細な聴取、Unified Parkinson's Disease Rating Scale、revised-Hasegawa Dementing Scale、Mini-Mental state examination、薬剤反応性、精神疾患の有無、またパーキンソン病の診断に関連する頭部 MRI、MIBG myocardial scintigraphy、brain SPECT、DAT scan といった画像検査である。

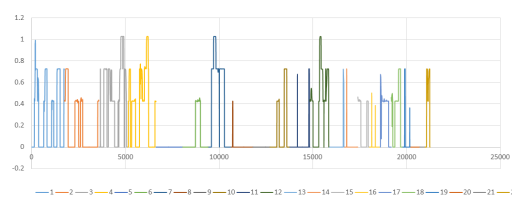
遺伝子解析について

遺伝子発現量の算出と CHP ファイルの作成: Affymetrix の GeneChip (Genome-Wide Human SNP array 6.0) を用いて、各サン

プルにおける一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) を調べた。手順に関しては、Affymetrix のホームページ上で提供されているプロトコルを参照した。各 DNA サンプルを制限酵素で切断し、切断された DNA 末端にアダプターを結合させ、Polymerase chain reaction を行い増幅させた。続いて、増幅させた DNA を GeneChip 上に配列された DNA とハイブリダイゼーションさせ、結合した DNA から発せられる蛍光シグナルを解析することで遺伝子発現量を算出し、各サンプルを CHP ファイルとして出力した。

LOD score の算出と Manhattan plot の作成：各家系の家系図を用い Pedin.pre ファイル、CHP Mapping files を作成し、これらのファイルと上記の方法で作成した CHP ファイルを用い、アプリケーションソフトである SNP HiTLink v1.5.1 (Shoji Tsuji, Yoko Fukuda and DYNACOM.Co.Ltd.) を使用し、lkin file を作成した。この作成した lkin file を基に、連鎖解析ソフトである MERLIN (University of Michigan) を用いて LOD score を算出し、このデータを用いて散布図を作成し、ゲノムワイド関連解析プロット: Manhattan plot の図を作成した (図 3、縦軸は $-\log_{10}(p)$ 、横軸は染色体番号)。

図 3



4. 研究成果

遺伝子解析について

LOD score が 3 以上のものを選択したところ、染色体 1 番に 5 個、3 番に 2 個、7 番に 8 個、12 番に 3 個の領域を同定した。いずれも発症者が有意に持つ領域であり、これらの中に

modifier gene の候補領域が存在する可能性が高い。しかしながら、これ以上の候補領域の同定が困難であった。このため、次に共同研究者である University of British Columbia の Matt Farrer らのグループと国際共同研究を開始し、より SNCA duplication のサンプル数を集め、より大多数の規模で解析を行うこととなった。具体的には 14 ヶ国（オーストラリア、ベルギー、カナダ、英国、フランス、ドイツ、イタリア、韓国、南アフリカ、スウェーデン、チュニジア、トルコ、米国、日本）、22 のリサーチグループと解析のコンソーシアムを結成し、60 名の SNCA duplication/triplication の遺伝子を収集した。同時に臨床情報も集め、illumina multi-ethnic genotyping array (MEGA) を用いて、2 倍体、3 倍体を起こしている領域やブレイクポイントを詳細に検討し、APOE、COMT、GBA、MAPT、SCARB2 といった認知症関連の遺伝子も同時に調べる予定である。

臨床情報について

本邦からの SNCA duplication 家系の発端者については、詳細に臨床情報を集めた。発端者 7 名中、3 名が明瞭な認知症と進行性のパーキンソニズムを呈していた。病初期にはレボドパの効果は得られるが、進行とともに効果を呈さなくなった。ほぼ前例に MIBG 心筋シンチグラムの取り込み低下を認めていた。認知症がない症例も家族内に PDD/DLB 様の発症者を多く持ち、進行とともに重症化する可能性が考えられた。これらも上記 60 名の臨床情報を集めることにより、世界中の duplication/triplication に普遍性を持つ症状、または地域特異性があるのかどうか等比較、検討を随時行っていく。

現在までのところ、本邦の症例群だけでは modifier 遺伝子の同定にまでたどり着いていないが、今後症例数を大幅に増やすことに

より、より正確に候補領域を詰めることができると考えている。

<参考文献>

1. Farrer MJ. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(4):306-18.
2. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H, et al. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2006;59(2):298-309.
3. Goedert M. NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Abeta, tau, and alpha-synuclein. *Science (New York, NY)*. 2015;349(6248):1255-55.
4. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, NY)*. 2003;302(5646):841.
5. McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology*. 2005;65(12):1863-72.
6. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(1):13-24.
7. Nishioka K, Ross OA, Ishii K, Kachergus JM, Ishiwata K, Kitagawa M, et al. Expanding the clinical phenotype of SNCA duplication carriers. *Mov Disord*. 2009;24(12):1811-9.

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5件)

1. Yoshino H, Hirano M, Stoessl AJ, Imamichi Y, Ikeda A, Li Y, Funayama M, Yamada I, Nakamura Y, Sossi V, Farrer MJ, Nishioka K, Hattori N. Homozygous alpha-synuclein p.A53V in familial Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2017 in press.
2. Matsushima T, Conedera S, Tanaka R, Li Y, Yoshino H, Funayama M, Ikeda A, Hosaka Y, Okuzumi A, Shimada Y, Yamashiro K, Motoi Y, Nishioka K, Hattori N. Genotype-phenotype correlations of cysteine replacement in CADASIL. *Neurobiol Aging*. 2017 Feb;50:169.e7-169.e14.
3. Conedera S, Apaydin H, Li Y, Yoshino H, Ikeda A, Matsushima T, Funayama M, Nishioka K, Hattori N. FBX07 Mutations in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Neurobiol Aging*. 2016 Apr;40:192.e1-5.
4. 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. High frequency of beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) among patients with intellectual disability and young onset parkinsonism. *Neurobiol Aging*. 2015 May;36(5).
5. 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. Identification of a gene associated with autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol*. 2015 Mar;14(3):274-82.

[学会発表](計17件)

1. Conedera S, Ikeda A, Nishioka K et al. Schizophrenia as a prodromal symptom in a patient harboring SNCA duplication. 第57回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21. 神戸コンベンションセンター.
2. Yoshino H, Nishioka K, Ikeda A et al. Analysis of GCH1 mutations in the patient with Parkinson's disease in Japanese

- population. 第57回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21. 神戸コンベンションセンター.
3. Matsushima T, Nishioka K, Ikeda A et al. Clinicogenetic study of CADASIL pedigrees with notch3 mutation. 第57回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21. 神戸コンベンションセンター.
4. Ikeda A, Nishioka K, Li Y et al. The analyze of four pedigrees with MAPT N279K mutation accompanying DAT scan and Tau imaging. 第57回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21. 神戸コンベンションセンター.
5. Ogawa T, Nishioka K, Suda A et al. Autoimmune Autonomic Ganglionopathy; a case presentation. 第57回日本神経学会学術大会. 2016/5/18-21. 神戸コンベンションセンター.
6. Nishioka K, Yoshino H, Matsushima T et al. Analysis of GCH1 mutations in the patient with Parkinson's disease in Japanese population. 11th Annual Meeting of the Genetic Epidemiology of Parkinson's disease (GEOPD) Consortium. 2016/10/6-10/8. Luxembourg.
7. 西岡健弥 服部信孝. 遺伝性パーキンソン病と若年発症の認知症. 第35回日本認知症学会学術集会. 2016/12/東京国際フォーラム.
8. Nishioka K, Yoshino H, Li Y et al. The comprehensive study of genetics of Parkinson's disease. 第56回日本神経学会学術大会. 2015/5/20.
9. 西岡健弥 教育講演ベーシック 明日からの臨床に役立つパーキンソン病診断 up to date. 第56回日本神経学会学術大会. 2015/5/19.
10. Nishioka K, Funayama M, Yoshino H et al. High frequency of WDR45 mutation in Japanese patients with beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN). 9th Annual Meeting of the Genetic Epidemiology of Parkinson's disease (GEOPD) Consortium. 2014/9/10-12. Tokyo.
11. 三笠道太, 金井数明, 西岡健弥等. パーキンソン病の家族歴を有する多系統萎縮症患者におけるCOQ2変異解析. 第55回日本神経学会.
12. 竹重遥香, 林徹生, 西岡健弥等. Dopaminetransporter scanで顕著な結合低下を示したN279K変異の前頭側頭葉変性症の5例. 第56回日本神経学会学術大会. 2015/5/19.
13. 松島隆史, 西岡健弥, 藤巻基紀等. 難治性の慢性疼痛を伴ったパーキンソン病患者への脊髄刺激療法. 第55回日本神経学会学術大会. 2015/5/21-24.
14. 中村亮太, 西岡健弥, 山城一雄等. 首下がり症候群. パーキンソン病と多系統萎縮症を対象とした後ろ向き解析. 第55回日本

神経学会学術大会 . 2015/5/21-24.

15. 林徹生 西岡健弥 鈴木通真等 . 認知症と全身に広がる慢性疼痛を合併した症例の解析 . 第 55 回日本神経学会学術大会 . 2015/5/21-24.

16. 城崇之 西岡健弥 原裕子等 . 進行性失語症のバイオロジカルマーカーに基づいた臨床解析 . 第 55 回日本神経学会学術大会 . 2015/5/21-24.

17. Nishioka K, Funayama M, Tomiyama H et al. Genetic Analysis of Parkinson's Disease in the Japanese population. 8th Annual Meeting of the Genetic Epidemiology of Parkinson's disease (GEOPD) Consortium. 2013/10/16-19. Luebeck, Germany.

〔図書〕(計5件)

1. 松島隆史, 西岡健弥, 服部信孝 . 家族性パーキンソン病 update. Annual review 2016 . 中外医学社 .

2. 西岡健弥, 池田彩, 服部信孝 . 第 17 番染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う前側頭葉型認知症 (FTDP-17) . Clinical Neuroscience Vo.35 No. 3, 中外医学社 .

3. 池田彩, 西岡健弥, 服部信孝 . パーキンソン病、パーキンソン症候群における DAT scan の有効性 . 臨床放射線 . 金原出版 .

4. 西岡健弥, 服部信孝 . パーキンソン病と慢性疼痛 . 2015, 痛みの Science and Practice . 文光堂 .

5. 西岡健弥, 服部信孝 . 6 番染色体に連鎖する遺伝性パーキンソン病 (PARK2) . 2013 . 神経症候群 日本臨床 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西岡 健弥 (NISHIOKA, Kenya)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 40348933

(2)研究協力者

服部 信孝 (HATTORI, Nobutaka)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号 : 80218510

船山 学 (MANABU, Funayama)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 70468578

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

戸田達史 (TODA, Tatsushi)
神戸大学・医学部・教授
研究者番号 : 30262025

Matthew J Farrer, Department of Medical Genetics, University of British

Columbia. Canada Excellence Research Chair in Neurogenetics and Translational Neurosciences.

Owen A. Ross, Associate Professor of Neuroscience, Mayo Clinic, Jacksonville.

Rejko Kruger, Clinical & Experimental Neuroscience group, University of Luxembourg.