

# 多因子疾患パーキンソン病遺伝子の解明とオーダーメイド医療をめざした至適薬剤の選択

●戸田達史<sup>1)</sup> ◆村田美穂<sup>2)</sup> 佐竹渉<sup>1)</sup> 水田依久子<sup>1)</sup> 服部信孝<sup>3)</sup> 山本光利<sup>4)</sup> 猪子英俊<sup>5)</sup>

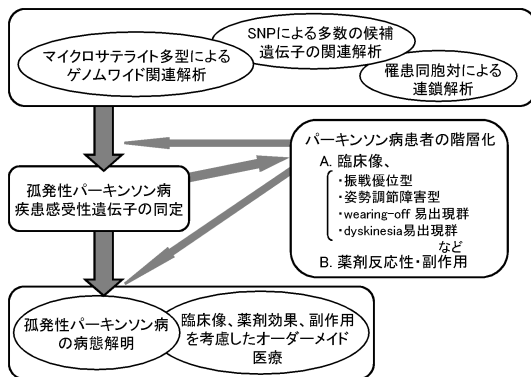
1) 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝 2) 国立精神神経センター武蔵病院神経内科 3) 順天堂大学医学部神経内科  
4) 香川県立中央病院神経内科 5) 東海大学医学部分子生命科学2

## 〈研究の目的と進め方〉

パーキンソン病 (PD) は多因子遺伝性疾患と考えられ、家族性PDの原因遺伝子として  $\alpha$ -synuclein や parkin、DJ-1、NR4A2、PINK1 遺伝子が発見されたが、患者の大部分を占める孤発性PDでは疾患感受性遺伝子は同定されていない。

また孤発例では、振戦を主体とする群、抗パーキンソン病薬で副作用を起こしやすい群など、その経過・中心となる症状・薬剤の効果は患者により異なり、このことは従来PDとして一括して行われていた遺伝解析に階層化を可能にし、遺伝子多型によって患者個人個人に必要な薬剤を必要な量投与するオーダーメイド医療が可能であることを意味する。

本研究では、1) ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析、多数の候補遺伝子SNPに基づく階層化を考慮した大規模関連解析、または罹患同胞対法などのノンパラメトリック連鎖解析などを行い、疾患感受性遺伝子を同定する、2) SNPと各薬剤への反応性、副作用との関連を明らかにしオーダーメイド治療法を確立する、ことを行う。



## 〈研究開始時の研究計画〉

1、pooled DNAによるゲノムワイドマイクロサテライト関連解析→約30000個のマイクロサテライトマーカー、100-300人単位のpooled DNAを用いた大規模なゲノムワイドマイクロサテライト関連解析を行う。一次二次、三次スクリーニングにて有意なマーカーは、個別タイピングまで進め、アソシエーションのある領域を確定する。

2、候補遺伝子SNPs解析では、数百個の候補遺伝子上SNP (一塩基多型) マーカーを用いた患者・対照関連解析を行い、連鎖不平衡マッピング、シーケンス、機能解析により、PD感受性遺伝子の同定を目指す。

3、さらに患者検体の収集に努める。特に兄弟例の検体収集を行い、罹患同胞対解析も行う。

## 〈研究期間の成果〉

### ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析

pooled DNA法によるゲノムワイドマイクロサテライト関連解析で約27,000マーカー全てに関して関連解析を行い、8%のマーカーで関連 ( $p < 0.05$ ) を認めた。これら

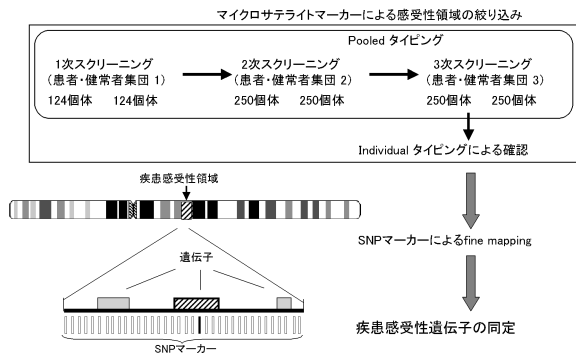
に関して各250人ずつの全く別のプール検体で、2次ついで3次スクリーニングを行った。3次スクリーニング終了後、波形を検討し各624人として $p < 0.001$ を満たすものとして71マーカーが得られた(2)。

これらを現在個別タイピングにて検証中であるが、現時点で16個のマーカーが $p < 0.05$ を示し、最低3ヶ所で $p < 0.001$ の有意な領域が同定されており、いよいよ全ゲノムから少数の領域に絞られてきた。これらと連鎖不平衡にある遺伝子が孤発性パーキンソン病の発症に関与していると考えられる。

(a) 1次Sc  $\xrightarrow{p < 0.2 (2x2 \text{ or } 2xm)}$  2次Sc  $\xrightarrow{p < 0.05 (2x2 \text{ or } 2xm)}$  3次Sc  
6803マーカー 2041マーカー

Chr	マーカー数	タイピング成功		3次スクリーニング	
		マーカー数	率(%)	$p < 0.05(2x2)$	$p < 0.05(2xm)$
1	2241	2226	99.3	76	32
2	2373	2350	99.0	57	26
3	1991	1959	98.4	52	23
4	1740	1728	99.3	48	24
5	1733	1729	99.8	44	26
6	1619	1603	99.0	45	22
7	1399	1370	98.2	38	16
8	1375	1354	98.5	43	19
9	1101	1083	98.4	33	13
10	1281	1246	97.3	32	14
11	1303	1303	100.0	20	14
12	1260	1258	99.8	30	16
13	893	891	99.8	23	12
14	762	755	99.1	25	10
15	689	682	99.0	12	4
16	732	726	99.2	14	9
17	725	707	97.5	20	11
18	750	744	99.2	20	9
19	503	502	99.8	23	18
20	565	563	99.6	15	9
21	324	323	99.7	3	1
22	293	291	99.3	10	6
X	1187	1183	99.7	26	10
Y	119	118	99.2	9	4
	27158	26894	99.0	718	348

染色体	関連マーカー数
1	0
2	2
3	1
4	2
5	1
6	1
7	1
8	1
9	0
10	1
11	1
12	0
13	1
14	1
15	0
16	0
17	0
18	0
19	1
20	1
21	0
22	0
X	1
Y	0
計	16



### 多数の候補遺伝子SNPに基づく関連解析

また数百個の候補遺伝子上SNP (一塩基多型) マーカーを用いた患者・対照関連解析では、まず各群190人を対象とした一次スクリーニングを行った。家族性PD、ドーパミン、タンパク質分解などに関連する121個の候補遺伝子上の計268SNPsを解析終了した。その結果、アレル頻度カイニ乗検定で $p < 0.05$ のSNPは、NDUFV2、FGF2、DRD3、TGFAなどの16個の遺伝子上の計22個のSNPsにみられた。

二次スクリーニングとして、これらの22個のSNPsを患者・対照各約900人に増やして関連解析した結果、 $\alpha$ -synuclein (SNCA) 遺伝子のintron 4上に存在するSNPに $p = 5.0 \times 10^{-10}$ という極めて強い関連を見出した。このSNPの周辺で連鎖不平衡マッピングを行った(1, 3, 投稿中)。

### PD孤発例、家族発症例の収集

これまでに孤発例のDNAサンプルを約1000収集した。また高齢発症のため家族発症例の収集が困難であるが、専門医にアンケートして約270家系が存在する回答が得られた。うち約80家系を採血した(4,6)。

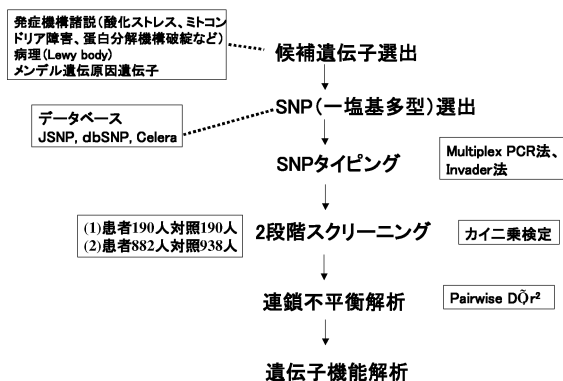


図1 候補遺伝子アプローチ

### 国内外での成果の位置づけ

2001-2002年にかけて、数施設から罹患同胞対法による連鎖領域の報告がはじめてなされた。米国、アイスランド、日本などの数施設がPDの疾患感受性遺伝子を同定すべくしのぎを削っているが、我々のグループでは系統だてて大規模に解析を進めている。

家族例の収集に関しては、現在までに約200施設以上から協力の申し出があり、本研究に対する臨床サイドの関心の高さを感している。

### 達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

家族発症は全患者の約5-10%に認められるが、高齢であること、離れた地域に居住していることより、複数の症例において採血するのは予想外に困難と思われた。

### 今後の課題

$\alpha$ -synuclein (SNCA) 遺伝子周辺の連鎖不平衡マッピングを完成させ、原因SNPを同定する。

また今後PD感受性SNPが同定されてくるにつれて、人種を越えて共通か、という問題が生ずるし、そのようなものを深く解析したい。共同研究により、外国人DNAを入手する。

まずは1個、確実なパーキンソン病疾患感受性遺伝子を同定したことになると思われる。今後感受性遺伝子を数個以上同定し、創薬探索、発症予測、テラーメイド治療へと進める。

### 研究期間の全成果公表リスト

- 0207191950  
Momose Y, Murata M, Kobayashi K, Tachikawa M, Nakabayashi Y, Kanazawa I, Toda T. Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms. *Ann Neurol* 51:133-136, 2002
- 0601311842  
Toda T, Momose Y, Murata M, Tamiya G, Yamamoto M, Hattori N, Inoko H. Toward identification of susceptibility genes for sporadic Parkinson's disease. *J Neurol* 250(supple3):40-43, 2003
- 0404121307  
Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin M-C, Gasser T, Krueger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, de Andrade M, Rocca WA, the UCHL1 Global Genetics Consortium. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 55:512-521, 2004
- 0601311956  
Hatano Y, Li Y, Sato K, Asakawa S, Yamamura Y, Tomiyama H, Yoshino H, Asahina M, Kobayashi S, Hassin-Baer S, Lu CS, Ng AR, Rosales RL, Shimizu N, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56:424-427, 2004
- 0601311959  
Ohtake H, Limprasert P, Fan Y, Onodera O, Kakita A, Takahashi H, Bonner LT, Tsuang DW, Murray IV, Lee VM, Trojanowski JQ, Ishikawa A, Idezuka J, Murata M, Toda T, Bird TD, Leverenz JB, Tsuji S, La Spada AR. b-synuclein gene alterations in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 63:805-811, 2004
- 0601312001  
Hatano Y, Sato K, Eibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR, Rosales RL, Hassin-Baer S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu-Chou YH, Atac FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 63:1482-1485, 2004
- 0601311244  
Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, Asano S, Nakahata T. The IVS4+4 A-T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with a

- severe phenotype in Japanese patients. *Blood* 95:1493-1498, 2000
8. 0601311247  
Jong YJ, Kobayashi K, Toda T, Kondo-Iida E, Huang SC, Shen YZ, Nonaka I, Fukuyama Y. Genetic heterogeneity in three Chinese children with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 10:108-112, 2000
9. 0601311251  
Toda T, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Sasaki J, Nakamura Y. The Fukuyama congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscul Disord* 10:153-159, 2000
10. 0601311353  
Toda T, Kobayashi K, Nonaka I. Congenital muscular dystrophies with special reference to the Fukuyama type. *Neurosci News* 3:39-45, 2000
11. 0601311355  
Saito K, Osawa M, Wang Z-P, Ikeya K, Fukuyama Y, Kondo-Iida E, Toda T, Ohashi H, Kurosawa K, Wakai S, Kaneko K. Haplotype-phenotype correlation in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 92:184-190, 2000
12. 0601311358  
Chadani Y, Kondoh T, Kamimura N, Matsumoto T, Matsuzaka T, Kobayashi O, Kondo-Iida E, Kobayashi K, Nonaka I, Toda T. Walker-Warburg syndrome is genetically distinct from Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 177:150-153, 2000
13. 0601311401  
Villanova M, Mercuri E, Bertini E, Sabatelli P, Morandi L, Mora M, Sewry C, Brockington M, Brown SC, Ferreira A, Maraldi NM, Toda T, Guicheney P, Merlini L, Muntoni F. Congenital muscular dystrophy associated with calf hypertrophy, microcephaly and severe mental retardation in three Italian families: evidence for a novel CMD syndrome. *Neuromuscul Disord* 10:541-547, 2000
14. 0601311404  
Asano Y, Minagawa K, Okuda A, Matsui T, Ando K, Kondo-Iida E, Kobayashi O, Toda T, Nonaka I, Tanizawa T. A case of Walker-Warburg syndrome. *Brain Dev* 22:454-457, 2000
15. 0601311406  
Sasaki J, Ishikawa K, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Fukayama M, Mizusawa H, Takashima S, Sakakihara Y, Nakamura Y, Toda T. Neuronal expression of the fukutin gene. *Hum Mol Genet* 9:3083-3090, 2000
16. 0601311409  
Colombo R, Bignamini AA, Carobene A, Sasaki J, Tachikawa M, Kobayashi K, Toda T. Age and origin of the FCMD 3'-untranslated-region retrotransposal insertion mutation causing Fukuyama-type congenital muscular dystrophy in Japanese population. *Hum Genet* 107:559-567, 2000
17. 0601311411  
Kobayashi K, Sasaki J, Kondo-Iida E, Fukuda Y, Kinoshita M, Sunada Y, Nakamura Y, Toda T. Structural organization, complete genomic sequences, and mutational analyses of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *FEBS Lett* 489:192-196, 2001
18. 0601311414  
Togo M, Toda T, Nguyen LA, Kubota S, Tsukamoto K, Satoh H, Hara M, Iso-o N, Noto H, Kimura S, Nakahara K, Seyama Y, Hashimoto Y. Genetic analysis of phytosterolaemia. *J Inherit Metab Dis* 24:43-50, 2001
19. 0601311416  
Tran TD, Kroepfl T, Saito M, Nagura M, Ichiseki H, Kubota M, Toda T, Sakakihara Y. The gene copy ratios of SMN1/SMN2 in Japanese carriers with type I spinal muscular atrophy. *Brain Dev* 23:321-326, 2001
20. 0601311421  
Toda T, Sasaki J, Tachikawa M, Kano H, Kobayashi K. Molecular genetics of Fukuyama CMD and fukutin. *Acta Myologica* 20:92-95, 2001
21. 0112112021  
Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsushashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T (corresponding author), Endo T. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 1:717-724, 2001
22. 0601311425  
Yoshioka M, Kuroki S, Sasaki H, Baba K, Toda T. A variant of congenital muscular dystrophy. *Brain Dev* 24:24-29, 2002
23. 0601311440  
Chiyonobu T, Yoshihara T, Fukushima Y, Yamamoto Y, Tsunamoto K, Nishimura Y, Ishida H, Toda T, Kasabuchi Y. Sister and brother with Vici syndrome: agenesis of the corpus callosum, albinism, and recurrent infections. *Am J Med Genet* 109:61-66, 2002
24. 0207192001  
Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Manya H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T. Deficiency of a-dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 291:1283-1286, 2002
25. 0207192015  
Tachikawa M, Nagai Y, Nakamura K, Kobayashi K, Fujiwara T, Han H-J, Nakabayashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Nakamura Y, Toda T. Identification of CAG repeat-containing genes expressed in human brain as candidate genes for autosomal dominant spinocerebellar ataxias and other neurodegenerative diseases. *J Hum Genet* 47:275-278, 2002

26. 0601311442  
Zanoteli E, Rocha JC, Narumia LK, Fireman MA, Moura LS, Oliveira AS, Gabbai AA, Fukuda Y, Kinoshita M, Toda T. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: a case report in the Japanese population living in Brazil. *Acta Neurol Scand* 106:117-121, 2002
27. 0601311445  
Horie M, Kobayashi K (equally contributed), Takeda S, Nakamura Y, Lyons GE, Toda T. Isolation and characterization of the murine homologue of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *Genomics* 80:482-486, 2002
28. 0601311448  
Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Manya H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 12:527-534, 2003
29. 0601311814  
Kurahashi H, Shaikh T, Takata M, Toda T, Emanuel BS. The constitutional t(17;22): another translocation mediated by palindromic AT-rich repeats. *Am J Hum Genet* 72:733-738, 2003
30. 0601311818  
Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 53:392-396, 2003
31. 0601311821  
Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, Toda T, Tsujimoto A, Arahata K, Nishino I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12:595-600, 2003
32. 0601311826  
Li M, Ishikawa K, Toru S, Tomomotsu H, Takashima M, Goto J, Takiyama Y, Sasaki H, Imoto I, Inazawa J, Toda T, Kanazawa I, Mizusawa H. Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant ataxia (ADCA) type III in Japan. *J Hum Genet* 48:111-118, 2003
33. 0601311829  
Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, Higashiyama H, Popiel HA, Rahadian J, Yamaguchi M, Strittmatter WJ, Burke JR, Toda T. Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 12:1253-1259, 2003
34. 0601311832  
Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T. Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histiogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 12:1449-1459, 2003
35. 0601311834  
Manya H, Sakai K, Kobayashi K, Taniguchi K, Kawakita M, Toda T, Endo E. Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyltransferase, POMGnT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 306:93-97, 2003
36. 0601311837  
Zhang W, Vajsar J, Cao P, Breningstall G, Diesen C, Dobyns W, Herrmann R, Lehesjoki A-E, Steinbrecher A, Talim B, Toda T, Topaloglu H, Voit T, Schachter H. Enzymatic diagnostic test for muscle-eye-brain type congenital muscular dystrophy using commercially available reagents. *Clin Biochem* 36:339-344, 2003
37. 0601311839  
Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and a-dystroglycanopathy. *Congenit Anom* 43:97-104, 2003
38. 0601311925  
Endo T, Toda T. Glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Biol Pharm Bull* 26:1641-1647, 2003
39. 0601311931  
Toda T, Kobayashi K, Takeda S, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Tachikawa M, Wang F, Nagai Y, Taniguchi K, Taniguchi M, Sunada Y, Terashima T, Endo T, Matsumura K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and abnormal glycosylation of a-dystroglycan. *Basic Appl Myol* 13:287-292, 2003
40. 0601311935  
Popiel HA, Nagai Y, Onodera O, Inui T, Fujikake N, Urade Y, Strittmatter WJ, Burke JR, Ichikawa A, Toda T. Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 317:1200-1206, 2004
41. 0601311938  
Akasaka-Manya K, Manya H, Kobayashi K, Toda T, Endo T. Structure-function analysis of human protein O-linked mannose b1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1, POMGnT1. *Biochem Biophys Res Commun* 320:39-44, 2004
42. 0601311941  
Longman C, Mercuri E, Cowan F, Allsop J, Brockington M, Jimenez-Mallebrera C, Kumar S, Rutherford M, Toda T, Muntoni F. Antenatal and postnatal brain magnetic resonance imaging in muscle-eye-brain disease. *Arch Neurol* 61:1301-1306, 2004

43. 0601311944

Kurahashi H, Inagaki H, Yamada K, Ohye T, Taniguchi M, Emanuel BS, Toda T. Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. *J Biol Chem* 279:35377-35383, 2004