

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

戸田 達史 (大阪大学大学院医学系研究科 教授)

主たる共同研究者

村田 美穂 (国立精神・神経センター武蔵病院神経内科 部長)

服部 信孝 (順天堂大学医学部 教授)

山本 光利 (香川県立中央病院 主任部長)

平井 圭介 (武田薬品工業(株)創薬第三研究所 主席研究員)

3. 研究内容及び成果

パーキンソン病(PD)はドパミンニューロンの変性により運動障害を主症状とする神経変性疾患であり、近年多因子遺伝性疾患と認知されるようになった。家族性PDの原因遺伝子として α -synuclein や parkin、DJ-1、PINK1、LRRK2、NR4A2 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。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に基づく大規模関連解析、または罹患者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(メンデル遺伝も含む)、2)SNPと各薬剤への反応性、副作用との関連を明らかにしテラーメイド治療法を確立する、3)同定された疾患感受性遺伝子の機能解析、蛋白構造解析などに基づく網羅的薬剤候補化合物探索と日本発のパーキンソン病創薬、を行うことを目標とした。

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は、27,158個の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、候補領域280ヶ所を抽出した。これらについて個別DNA検体を用いたタイピングを行い、 $P < 0.001$ のMSマーカーを7箇所同定した。1個のMSはSNPとしても 10^{-8} の有意な領域である。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た。

多数の候補遺伝子SNP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・対照関連解析にて、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。二次スクリーニングとして、残った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、 α -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い、さらに関連解析にて、そのSNPと高い r^2 値(> 0.85)をとる周囲の計6個のSNPsが全てPDと強い関連($p=2.0 \times 10^{-9}$ - 1.7×10^{-11})を示すことを見出した。これらのSNPの各遺伝子型ごとにSNCA発現をみたところ、剖検脳にてPD associated alleleの数に応じ、SNCA遺伝子発現が増加していた。すなわち268SNPsのスクリーニングから、 α -synuclein (SNCA)が確実なPD感受性遺伝子であることを報告した。その他Calbindin、FGF20など数個の遺伝子のSNPsで、 $P=10^{-3}$ - 10^{-4} の有意な相関を見出した。

また50万個のSNPからなるイルミナHap550アレイを用いて、患者1000人のGenome wide association (GWAS)の実験を行った。現在データ解析中であるが、Call rateは、99%以上を維持しており、synuclein以外に新規のものが同定され有望である。

単一遺伝子異常で起こる家族性パーキンソン病の原因遺伝子とその機能解析では、劣性遺伝性パーキンソン病の約4割がparkin変異によるがparkin陰性例も少なからず存在することからPARK6、PARK7の遺伝子変異

解析を行ったところPARK6のPINK1変異を8家系について認めた。更に約650例について解析し、7種の新規遺伝子変異を見出した。parkin、PINK1変異陰性例の症例については血縁結婚が認められる9家系について連鎖解析を行い、2ヵ所に遺伝子座を絞込むことが出来た。現在原因遺伝子同定に向けて解析中である。優性遺伝性パーキンソン病では、SNCAのduplication症例が5家系存在している事が分かり、1剖検例にてtriplication症例同様Glial cytoplasmic inclusions (GCI)を認めた。またわが国でもPark9と連鎖する1家系を見出し、ATP13A2変異を見出した。アジア人特有の遺伝子多型については、LRRK2のG2385Rを見出した。この遺伝子多型は白人には認められずアジア人特有のものとして単離された。

Parkin機能については、ユビキチンリガーゼのnegative regulatorである14-3-3 の同定に成功した。またparkinのknock downによりドパミンキノン体の増加が認められ、その増加は正常SNCAで抑制された。またパーキンノックアウトマウスについてD1、D2のbinding potentialの増加、methamphetamine処理前後によるracloprideのBPの変化などドパミン遊離異常を来していた。またparkinがPINK1とミトコンドリア外膜で結合していることがFRETによる方法で示され、parkinが存在するとPINK1が安定し、この安定作用は、parkin遺伝子変異症例でも確認できた。PINK1はparkinの上流で機能することが指摘されているが、この所見からは同じカスケードにこの遺伝子産物が関与していることが示唆された。

さらに共同研究者の村田が臨床的に抗パーキンソン作用を発見した抗てんかん薬Zonisamide (ZNS)について、わが国で大規模な二重盲検試験を行い、50mg/日という少量(抗てんかん薬としての維持量300-600mg)で明らかな抗パーキンソン効果を確認し、現在、効能追加の申請中である。進行期PD患者においてZNS 投与4-7年の長期例での効果を検討したところ、投与開始後1年後の効果はほとんどの症例で4年間は維持できることを明らかにした。テーラーメイド医療を目指し、まず著効例に特徴的な臨床像を抽出すべく、二重盲検試験の結果の層別解析を行ったが、性、年齢、パーキンソン病の罹患期間、併用薬剤、薬量などでは効果に明らかな差異はなく、遺伝的素因によると結論付けた。著効例と、比較的效果の少ない例について、ZNSを投与されたPD患者DNAにて、現在イルミナHap550アレイを用いて、解析中である。またパーキンソン病でドパミンアゴニストの治療時に麦角系アゴニストであるカベルゴリンは弁逆流の頻度が有意に高いことを報告した。

さらにパーキンソン病同様神経変性疾患であるポリグルタミン病において、構造生物学的解析にて、ポリグルタミンの分子構造がシート単量体に変化した段階ですでに毒性を獲得していることを見出し、凝集阻害ペプチドQBP1がその構造変化をブロックすることを見出した。神経変性疾患共通の治療薬の開発のターゲットとなるような蛋白質の構造変化を見出した。

パーキンソン病の確実に発症リスクを高める遺伝因子は現在まで確認されていなかった。研究チームによって同定された -synuclein (SNCA)遺伝子はp値も 10^{-11} と極めて強い相関を示しこのようなものは初めてで、はじめて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、といえる。本研究および今後のGWASにより多くのパーキンソン病疾患感受性遺伝子が同定され、それらから我が国から根本的なパーキンソン病薬が開発されれば、全世界にインパクトをあたえることができよう。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本研究では、ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析、候補遺伝子SNPに基づく大規模関連解析等により、パーキンソン病の疾患感受性遺伝子を同定し、同定した遺伝子の機能解析、蛋白構造解析などに基づく創薬を目指すとともに、SNPと各種薬剤との反応性、副作用との関連を明らかにしてテーラーメイド医療に貢献することを目的とした。

研究領域の趣旨に沿った系統的な取り組みにより、1) 候補遺伝子SNP解析から孤発性パーキンソン病の原因遺伝子として、 -synucleinを極めて高い相関係数で世界に先駆けて同定した。同時に、数個の遺伝子でも

有意な相関が見出されており、ゲノムワイドマイクロサテライト関連解析からも、候補マーカーを7箇所同定している。また、2) 家族性のパーキンソン病では、原因遺伝子であるParkin陰性の症例の解析からPARK6のPINK1変異を同定し、さらにParkinの機能を明らかにした。更に、3) 抗てんかん薬Zonisamideに抗パーキンソン作用を発見し、現在追加効能を申請中である。また、パーキンソン病同様神経変性であるポリグルタミン病で、ポリグルタミンの分子構造がシート単量体に変化した段階で既に毒性を獲得しており、凝集阻害ペプチドQBP1がその構造変化をブロックすることを見出した。これらの研究成果は、多数の論文(原著論文123編及び口頭、ポスター発表68件)として発表されている。特記すべきは、 α -synucleinの同定であり、世界で初めて孤発性パーキンソン病疾患感受性遺伝子を同定したことは高く評価されるべきである。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

確実な統計手法に基づくゲノム解析による、世界で初めての孤発性パーキンソン病疾患感受性遺伝子の同定は科学的に極めて重要であるが、同時に α -synuclein遺伝子を標的にした薬剤評価系を既に立ち上げており、新しい概念による薬剤開発に向けた具体的な成果としても高く評価できる。また、上述のように、PINK1変異が同定され、候補遺伝子、候補マーカーも多数見出されていることから、今後パーキンソン病に関連する多数の遺伝子の同定・解析が行われ、パーキンソン病発症の機序が明らかにされるとともに、新しい創薬標的遺伝子が同定される可能性を示すものとして注目される。また、Zonisamideに抗パーキンソン作用を見出し、著効例と非著効例についてSNP解析を進めるなど、テーラーメイド医療を強く意識した研究の進め方は、領域の目的にかなっていると評価できよう。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

今後の検討では、大きな遺伝的要因ではなく、小さな遺伝的要因の組み合わせを考える必要がある。症例を増やした検討での更なる展開を期待し、あわせて実用化検討における迅速な展開を期待する。

戸田達史:平成19年度朝日賞

山本光利:Poster award in 16th International Congress of Parkinson s disease and related disorders. M. Yamamoto & T. Uesugi. Dopamine agonists and valuvulopathy in parkison s disease