

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 パーキンソン病の一塩基多型を基盤とした疾患感受性遺伝子の同定と personalized medicine の構築に関する研究

指導教官 金澤一郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 百瀬義雄

### 1.はじめに

パーキンソン病（以下 PD）は主に中脳黒質から線条体に至るドパミンニューロンが障害され、病理学的には Lewy 小体の出現を特徴とする神経変性疾患である。振戦、筋固縮、寡動、姿勢反射障害を四主徴とし、一部の症例では痴呆や自律神経症状を合併する。本邦における有病率は 10 万人中約 100 人であり、神経変性疾患の中ではアルツハイマー病に次いで遭遇する機会が多い。好発年齢は 60 歳前後であり社会の高齢化に伴い患者数の増加が予想されている。

PD 発症における遺伝因子の存在に関しては近年まで議論があったが、1) 遺伝形式の推定可能な大家族の存在、2) 約 10%の PD 患者の第一度近親内に PD 患者が存在すること、3) subclinical な症例を含んだ positron emission tomography (PET) による研究の結果では一卵性双生児の疾患一致率が約 60%もあり二卵性の約 3 倍であること、などから多因子遺伝性疾患であることが示唆されている。さらに 2000 年にアイスランド国民を対象とした大規模な疫学的調査の結果が発表され、50 歳以上発症の PD 患者の同胞、子供、甥あるいは姪の risk ratio はそれぞれ 6.7、3.2、2.7 であった。患者の配偶者の発症率は統計学的に高くはなく、PD 発症には遺伝因子が強く影響していることが示された。

一部のメンデル遺伝形式をとる家族性パーキンソニズムについては $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子やパーキン遺伝子、ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) 遺伝子の変異が発見された。一方、症例的には大多数(90%以上)の孤発性PDの原因は現時点では不明である。現在まで種々の遺伝子多型により関連解析が行われてきたが、Alzheimer型老年痴呆におけるAPOE遺伝子 $\epsilon$ 4多型のような確実に発症リスクを高める遺伝因子はPDにおいては現在まで確認されていない。

PDは神経疾患の中でも特に治療薬の種類が豊富で新規薬剤が次々と開発されており、その効果も臨床症状ごとに若干異なる。また、脳定位手術が再び見直されて来ており、治療の選択肢は益々広がる傾向がある。一方、抗PD薬による副作用の出現は個々人によって差があり、wearing-off現象(薬効のある時間が短縮し、次の内服時間まで効果が続かないこと)、dyskinesiaや悪性症候群の出現しやすい群が存在する。薬剤の選択や投与量の決定は臨床家の経験的知識に頼る部分が大きかったが、今日個人個人のゲノム情報を裏付けとしたpersonalized medicineが必要とされている。

一塩基多型、すなわちSNPs(single nucleotide polymorphisms)はDNA配列上に存在し、個人差を決定する一塩基の差異である。多因子疾患の疾患感受性遺伝子探索において関連解析の重要性が指摘され、解析の手段としてSNPsが注目されている。また薬剤に対する反応性の個人差を決定する多型マーカーとしても応用が期待されている。PDの疾患感受性遺伝子の同定とpersonalized medicineの確立を目的としてSNPsを基盤とした関連解析を行った。

## 2. 対象・方法

患者診察時のデータシートを作成し、振戦優位型や姿勢反射障害型などの特異な臨床病型の抽出を図った。

SNPタイピングの対象はPD患者232名(男114名、女118名)と対象249名(男127名、女122名)である。患者から血液検体を採取する際には先程のデータシートを用い、問診と診察を十分に行い臨床情報を得るようにした。発症年齢は54.1 $\pm$ 10.5(平均 $\pm$ SD)歳[24~80歳]。18名は40歳未満発症であり、13名には家族歴が認められた。古典的なASO法でタイピングを行うとともに、SNaPshot<sup>TM</sup>法、Pyrosequencing<sup>TM</sup>法、TaqMan<sup>TM</sup>法の比較検討を行い、最もハイスループットな方法としてTaqMan<sup>TM</sup>法を選択した。TaqMan<sup>TM</sup>法での解析には他施設の検体も含めPD患者436名、対照440名にまで増やした。PDの臨床診断にあたっては症候性パーキンソニズムは極力除外するように努めた。検体の採取においては各患者から文

書によって同意を得た。

ゲノム DNA は白血球より通常の方法により抽出し、SNP のタイピングは主にアレル特異的オリゴヌクレオチド (ASO) 法を用い、その他 PCR-RFLP 法、TaqMan™ 法を行った。統計処理には  $\chi^2$  検定を用い、観察値が 10 未満の際には Yates の補正を行い  $p < 0.05$  を有意とした。SNP 情報の多くは Web 上に公開されている Whitehead Institute for Biomedical Research や Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee、東京大学医科学研究所のデータベースより得た。

### 3.結果

PD の発症や薬剤への反応性に関与する可能性のある 21 遺伝子の 24SNPs について検討した。検討した遺伝子は以下の 4 つのカテゴリーに分かれる。すなわち：(1) ドパミン関連：aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC); catechol-O-methyltransferase (COMT); dopamine -hydroxylase (DBH); dopamine receptor D3 (DRD3); dopamine receptor D5 (DRD5); and solute carrier family 6, member 3 = dopamine transporter (SLC6A3=DAT1) (2) 神経栄養因子関連：brain-derived neurotrophic factor (BDNF); ciliary neurotrophic factor (CNTF); nerve growth factor, beta polypeptide (NGFB); and neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type1 (NTRK1). (3) 毒物代謝・輸送関連：cytochrome P450 1A2 (CYP1A2); cytochrome P450 2E1 (CYP2E1); cytochrome P450 2C9 (CYP2C9); paraoxonase1 (PON1); 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR); diaphorase 4 (DIA4); and ATP-binding cassette, sub-family B, member 1 = multidrug-resistance 1 (ABCB1) (4) 家族性パーキンソンニズム：ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1); dystonia1 (DYT1), G protein-coupled receptor 37 = parkin-associated endothelin receptor-like receptor (GPR37 = Pael receptor); ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3 (UBE2L3)である。ABCB1, DYT1, GPR37, UBE2L3 の SNP 以外はすべてアミノ酸の変化を伴う coding SNP であるが、ABCB1 の SNP も messenger RNA の安定性に変化が生じることが判っている。

検討した 24SNPs のうち 7 つには変異が見い出されなかった。BDNF 遺伝子 G196A (Val66Met) の AA ホモ接合体が PD 患者では正常対照に比し有意に頻度が高かった ( $\chi^2=5.46, p=0.019$ )。また UCH-L1 遺伝子 C53A (Ser18Tyr) の C アレルが PD で有意に頻度が高いことが確認された ( $\chi^2=5.41, p=0.020$ )。

さらに患者の階層化を行い、それぞれの SNP について wearing-off 易出現群、dyskinesia 易出現群、悪性症候群易出現群との関連について検討したが、有意なものは見つからなかった。振戦優位型や姿勢反射障害型などの層化を行うにはさら

に症例数を増やす必要があった。

#### 4.考察

神経栄養因子 BDNF は中枢神経系、末梢神経系においてニューロンの生存、成長を助け、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) のような神経毒からドパミンニューロンを保護する。また、PD 患者の黒質では BDNF が減少することが知られている。今回検討した BDNF の Val66Met 多型は翻訳後に切り離される proBDNF 上に存在するが、proBDNF 自体にも生理活性が存在することが最近判明した。BDNF 遺伝子 G196A (Val66Met) の AA ホモ接合体が PD 患者で有意に頻度が高いという結果が得られたが、もしこの SNP が発症に関与するとすれば、proBDNF のプロセッシングに影響が生じるか、proBDNF 自体の生理活性の変化が生じる可能性が考えられる。また、この SNP が他の疾患感受性を有する SNP と連鎖不平衡にある可能性もある。

一方、UCH-L1 は脳可溶性蛋白分画の 1~2% を占める脱ユビキチン化酵素の 1 つであり、ポリユビキチンの加水分解に関与する。UCH-L1 遺伝子の Ile93Met 変異が家族性パーキンソンニズムの原因として知られるが、Ser18Tyr 変異が孤発性パーキンソン病の発症に対し、抑制的に働くという報告が複数のグループよりなされている。これには反論も存在するが、我々の検討でも Ser18Tyr 変異は PD 患者で有意に頻度が少ないという結果が得られた。神経変性疾患におけるユビキチン-プロテアーゼ系の重要性を考えると UCH-L1 の役割は大変興味深い。

以上まとめると、我々は SNPs を基盤とした関連解析により PD 発症において BDNF の SNP (G196A, Val66Met) が関与している可能性を初めて示唆し、UCH-L1 の SNP (C53A, Ser18Tyr) が発症に対し抑制的に働いていることを確認することができた。PD 発症における遺伝因子の解明と personalized medicine の構築を目指し、さらに解析を進めて行く予定である。