

## 論文の内容の要旨

論文題目 パーキンソン病の遺伝子解析  
——網羅的遺伝子解析システムの構築と *LRKK2* を中心にして——

指導教員 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程  
脳神経医学専攻  
氏名 関 尚美

### 1. 研究背景と目的

パーキンソン病 (Parkinson's Disease; PD) は、振戦・固縮・無動及び姿勢反射障害を四徴とする頻度の高い神経変性疾患である。近年家族性 PD で原因遺伝子が次々と解明されており、その迅速な原因遺伝子解析と変異の同定、疾患関連遺伝子や一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) を明らかにすることは極めて有用であると考えられるが、家族性 PD は遺伝的異質性を有する疾患であり、また従来の解析手法では手間と解析に要する時間は膨大である。これらの背景から、本研究では簡便でハイスループットかつ再現性が高い DNA マイクロアレイを応用し、PD の疾患原因遺伝子と関連遺伝子を網羅的に解析可能なシステムを構築することを目的に研究を行い、構築したシステムを応用して実際に複数の家族性 PD 患者の遺伝子群を網羅的に解析した。またチップでは解析困難な遺伝子の欠失や増幅を検出するために、*PARK2* 及び *SNCA* のゲノム配列から作成したプローブを搭載した Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法を用いた CGH アレイ (aCGH) をデザインして解析した。

### 2. 対象と方法

Resequencing アレイの解析精度とスループットの確認は東京大学神経内科に保存している正常対照検体 1 例を、Resequencing アレイを用いた網羅的解析では常染色体性優性遺伝性パーキンソン病 (autosomal dominant Parkinson's disease; ADPD) の日本人家系 11 家系 11 名と Resequencing アレイを用いた *LRKK2* の全エクソン解析ではカナダ人家系 19 家系

19名を対象とした。疾患の危険因子の可能性が推測される多型については、他に ADPD89名、孤発性パーキンソン病(sporadic Parkinson's disease; SPD)41名、対照例 233名を対象として直接塩基配列決定法で解析した。原因遺伝子 *SNCA*, *PARK2*, *UCHL-1*, *DJ-1*, *NR4A2*, *LRRK2* の coding 配列、発現量が病態に関連することが予想される遺伝子 *SNCA*, *PARK2*, *TH* のプロモーター配列、スプライシングに関連しうる *SNCA* のイントロン配列、疾患に関連する多型(*APOE*, *CHT1*)、また関連遺伝子 *SNCAIP*, *GPR37*, *TH*, *GCH1*, *GBA*, *MTX1* を選択搭載した。Resequencing アレイ解析では、選択遺伝子の目的配列を設計したプライマーを用いてゲノム DNA を PCR で増幅し、各々の PCR 産物を定量後ロボットを用いて各産物が等モルになるよう一本のチューブにプーリングし、それを DNase I で断片化してビオチンでラベルしハイブリダイゼーションを行った後洗浄、ビオチンで染色してスキャンした。aCGH 解析では ADPD の日本人家系 11 家系 11 名を対象とし、制限酵素で消化したゲノム DNA の対照由来サンプルを蛍光色素 Cy3 で、患者由来サンプルを Cy5 でラベリングしアレイにハイブリダイゼーションした。変異の見つかった一家系については breakpoint にプライマーを設計し、PCR と直接塩基配列決定法にて breakpoint を決定した。さらにこの家系の家系内発症者 2 名を、1 名は aCGH で、1 名は PCR と直接塩基配列決定法にて解析した。

### 3. 結果

パーキンソン病原因遺伝子及び関連遺伝子を 99.94%の精度で実働 3 日にて同時に解析することができた。

Resequencing アレイでの解析の結果、全体で 1,398,237 塩基解析して 41 個の variation が得られた。このうち新規は 6 個で、アミノ酸置換のあるものは *LRRK2* で 2 個同定し、直接塩基配列決定法で確認した。その一つ N1221K は対照 233 例では検出されず異種間で良く保存され、変異と考えた。臨床像では発症が 47 歳と若干若く、振戦は目立たず初期から姿勢反射障害が強く、また L-DOPA は有効であるが著効とは言い難いなどの特徴を有していた。もう一つの R1320S は対照例にも検出され、SNP と考えた。原因遺伝子で既知の変異としては *PINK1* でミスセンス変異 R407Q のヘテロ接合体を 1 例で見出した。原因遺伝子でアミノ酸変化のある既知の塩基置換を 11 個、アミノ酸置換を伴わない既知の塩基置換を 12 個、新規を *LRRK2* で 2 個同定した。関連遺伝子でアミノ酸置換を伴う既知の塩基置換を 1 個、アミノ酸置換を伴わない既知の塩基置換を 5 個同定した。*APOE* では E3/E4 を一例同定し、*CHT1* の既知の SNP (I89V) は 4 例同定した。カナダの ADPD19 家系における *LRRK2* 全エクソン解析を行った結果、当初変異と報告のあった R1514Q のヘテロ接合体を一家系で見出した。その他のアミノ酸置換を伴う既知の塩基置換を 5 個同定した。アミノ酸置換のない塩基置換は既知 8 個で新規 2 個を同定した。

アジア人種において PD のリスクファクターとなりうると示唆されている *LRRK2* の多型 G2385R のアレル頻度は ADPD9.0%と対照群の 2.1%より高く、この差は統計学的に有意であった。SPD のアレル頻度は 6.1%であり対照群より高い傾向にはあったが、この差は統計

削除: (

削除:)

学的には有意ではなかった。ADPD と SPD のアレル頻度については、ADPD のほうが 9.0% と SPD の 6.1% より高い傾向にはあるものの、統計学的有意差は得られなかった。同一家系から二人以上の検体を得られた 4 家系で G2385R の共分離の有無を調べた結果 3 家系で共分離は認められなかった。

aCGH による解析では一家系で *PARK2* のエクソン 2 からエクソン 4 を含む領域の duplication を同定し、エクソン 2 からエクソン 4 を含む 408,042bp の duplication とエクソン 3 を含む 60,146bp の deletion との compound heterozygote と判定した。またこの家系の家系内発症者のうち 1 名は同じ変異を有していたが、別の 1 名はこの変異を有していなかった。また、変異を有していた 2 名の臨床像は発症が 20 代後半から 30 代初めでありその他にも常染色体性劣性若年性パーキンソン病 (autosomal recessive juvenile Parkinson's disease; ARJP) 類似の症状を示していたが、変異のなかった 1 名は発症が 70 代と遅く、変異を有する 2 名とは異なっていた。

削除: (

削除: ; ARJP)

#### 4. 考察

Resequencing アレイはハイスループットで精度が高くパーキンソン病の遺伝子診断に有用であり、疾患関連遺伝子の体系的解析といった研究にも威力を発揮すると考えられた。一部判定しにくい配列についてはシグナルパターンの蓄積により高精度に変異を検出できると考えられるが、確実性を高めるためには直接塩基配列決定法など他の方法で確認する必要がある。

Resequencing アレイでの解析の結果得られた 41 個の variation のうち新規は *LRRK2* ではアミノ酸置換を伴う 2 個 (N1221K, R1320S) を含む 5 個あり、*PARK2* では 1 個で、計 6 個認められた。*LRRK2* の N1221K は異種間で比較的良く保存されており、対照群にも見られず変異と考えた。R1320S は対照群にも見られ多型と考えた。カナダの ADPD 家系で見出した *LRRK2* の R1514Q は当初変異と報告されたがその後の報告により多型と考えられた。*LRRK2* の多型 G2385R については pathogenic mutation であるとは結論できなかった。また、ADPD は対照群に対して有意に G2385R の陽性率が高く、本研究や先行研究で報告されている SPD における G2385R の頻度よりも高い傾向があり、家族性に複数の PD 症例が集積する背景因子となっている可能性があったが、ADPD と SPD での陽性率に有意差がないことの意義付けについては明らかではない。PINK1 の R407Q についてはヘテロ接合体でありこれのみで疾患の原因とは考えにくい。

aCGH で同定した *PARK2* の変異例は ARJP に多い臨床的特徴も有してはいたが典型的 PD と区別し難い点も多く、また同一家系内に異なった病因を有する複雑な家系である可能性もあり、遺伝形式と臨床像から原因遺伝子を推定することは困難であることから、網羅的解析を行う意義があったと考える。

以上のように、resequencing アレイによって既知の variation を多数同定することができるのみならず、新規の variation がまだまだ見つかることが示され、疾患に関連する稀な variation を同定することが出来るという resequencing の意義を裏付ける結果で

あると思われる。また、*PARK2*に多い deletion や *SNCA*に多い duplication、triplication は、aCGH によって検出することができる。家族性発症症例については本研究の *PARK2* の症例にも見られたように、得られた臨床情報からだけでは原因遺伝子に照準を合わせた解析が困難な例があり、また *LRRK2*のような巨大遺伝子を直接塩基配列決定法などで解析する煩雑さや時間的制約を考えると、マイクロアレイを用いたこのようなハイスループットな解析システムによって網羅的解析を行うことの意義は今後とも益々重要性を増してゆくものと考えられる。