

論文の内容の要旨

論文題目 パーキンソン病の分子遺伝学的解析

指導教員 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

三井 純

パーキンソン病(Parkinson disease, PD)は、臨床的に振戦、筋強剛、寡動、姿勢反射障害などの運動障害を主な特徴とする神経変性疾患である。神経変性疾患としてはアルツハイマー病に次いで頻度が高く、60 歳以上の高齢者において 1%程度の頻度である。PD 患者の 90%以上は家族歴が明らかでない孤発性で、5~10%は血縁者に発症者がみられる家族性である。家族性 PD については連鎖解析などポジショナルクローニングによっていくつかの原因遺伝子が報告され、その機能解析により、 α -synuclein 蛋白の病的蓄積、ミトコンドリア機能障害、ユビキチン・プロテアソーム系

の障害, 酸化ストレスなどが孤発性 PD とも共通する発症メカニズムとして推測され, 病態理解・治療法開発に向けた研究が行われている. しかし単一遺伝子性 PD の頻度は稀で, 大多数を占める孤発性 PD や多くの家族性 PD の発症機序は十分に理解されていない. 疫学的研究から推定される同胞の発症率と一般人口の発症率の比は 4.4 倍と有意に高く, 孤発性 PD においても遺伝因子の関与が大きいことが予想されている. 孤発性 PD の感受性遺伝子研究については多型を用いた関連解析が広く行われているが, 同定されている疾患感受性遺伝子は十分でない. 本研究は新たな孤発性 PD の遺伝因子を明らかにし, 病態理解を目指すために, 従来の多型を用いた関連解析では検出が難しいと考えられる遺伝因子に注目して検討を行った.

1. PD と関連する稀で多様な変異の検討

候補遺伝子である *GBA* に resequencing 解析を行い, 塩基置換変異を網羅的に同定して, 患者・対照関連解析を行った. *GBA* は常染色体劣性遺伝性である Gaucher 病の原因遺伝子であり, 変異キャリアと PD 発症との関連が家系報告などから示唆され, 先行して関連を示唆する関連解析の報告があったが, 結論が一定していなかった. その原因としてサンプル規模が小さい, 特定の変異しかスクリーニングしていない, 人種によって変異が多様で分布が異なるなどの理由が考えられた. 本研究では, 日本人 PD 患者 534 例, 対照者 544 例に対して *GBA* の全エクソンおよびエクソン・イントロン

境界域の resequencing 解析を行った。その結果、*GBA* の病原性変異は PD 患者群 534 例中 50 例 (9.4%)、正常対照群 544 例中 2 例 (0.4%) にヘテロ接合性に認めた。オッズ比は 28.0 倍 (95%信頼区間 7.3~238.3)、*p* 値は 6.9×10^{-14} と有意だった。*GBA* 病原性変異キャリアは非キャリアと比べて発症年齢が有意に若かった (52.5 歳 vs. 58.8 歳, $p < 0.001$)。また、*GBA* 病原性変異キャリア 50 例中、11 例は家族歴があり、うち 3 例は家族内発症者の解析が可能で、発症者の共分離が確認された。独立したサンプルの PD 多発家系に対して *GBA* の変異解析を追加して行ったところ、34 家系中 5 家系で *GBA* 病原性変異キャリアが確認され、全例で発症者・非発症者の共分離が確認され、*GBA* 病原性変異が PD の家族内集積性に関与することを示した。さらに国際多施設共同研究にデータを提供し、*GBA* 病原性変異が人種に関わらず見出される強い遺伝因子であることを確認した。これまでのゲノムワイド関連解析では *GBA* の locus は検出されておらず、resequencing を基盤とする関連解析によって、疾患と関連する稀で多様な変異を検出する方法の有用性が示された。

2. PD と関連する欠失・重複変異の検討

候補遺伝子 *PARK2* にオリゴヌクレオチドアレイを用いた競合的ゲノムハイブリダイゼーション (アレイ CGH) 解析を行い、欠失・重複変異を網羅的に同定して、患者・対照関連解析を行った。*PARK2* は常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズム (AR-JP)

の原因遺伝子であり、日本人で同定される病原性変異のほとんどがエクソンの欠失・重複変異である。常染色体劣性遺伝形式をとるが、PD 患者の中に1つのアレルの変異しか確認されない例がしばしば観察されていた。そのため変異キャリアがPD 発症の危険因子である仮説があったが、先行する関連解析では結論が一定していなかった。本研究では、日本人PD 患者144例、対照者148例に対して *PARK2* の欠失・重複変異をアレイCGHにて解析した。その結果、PD 患者144例中10例(ホモ接合性変異4例、複合ヘテロ接合性変異6例)に *PARK2* の欠失・重複変異を2つのアレルに認められた。しかし欠失・重複変異キャリアはPD 患者群・対照群に全く認めなかった。以上より、*PARK2* の欠失・重複変異キャリアの頻度は1%以下である可能性があり、関連を調べるためには少なくとも1,000例以上のサンプル規模が必要であると考えられた。なお、同定されたAR-JP患者10例について検討したところ、血族婚は2例、同胞発症は5例、血族婚も同胞発症もない例は3例だった。AR-JP患者は、若年発症(発症年齢40歳以下)の29.6%を占め、孤発性の若年発症PD患者の中にAR-JPは一定頻度存在すると考えられた。4例はホモ接合性変異(血族婚2例を含む)で、6例は複合ヘテロ接合性変異だった。塩基レベルで検討すると、同定された欠失・重複変異は12種類で、2種類は複数のサンプルで観察された。欠失・重複変異は既報告の通り、エクソン2-4に集中していた。同定された変異の種類が多様であることから、独立して起こる欠失・重複変異の頻度が高いのではないかと予測された。

3. *PARK2*において独立した多様な欠失・重複変異が起こる機序についての検討

関連解析をデザインする上で、集団において創始者効果により頻度の高い変異が多いのか、稀で多様な変異が多いのかを検討することは必要である。先述した関連解析の過程において、*PARK2*に独立した多様な欠失・重複変異が多数起こっていることが疑われたため、その詳細を調べた。本研究では *PARK2* が Common fragile sites (CFSs) の一つ、FRA6E に含まれることに注目した。CFSs は複製ストレスによって染色体上に gap や break が起こる領域であり、癌細胞において高頻度に欠失・重複変異が生じることが知られていたため、生殖細胞系列においても *PARK2* の欠失・重複変異と関連があるのではないかと仮説を立てた。CFSs に含まれる遺伝子でヒトの遺伝性疾患と関連する遺伝子は *PARK2* の他、*DMD* (デュシャンヌ型・ベッカー型筋ジストロフィー、*DMD/BMD* の原因遺伝子) がある。多数の欠失・重複変異を同定するため、生殖細胞系列および体細胞系列に *PARK2* および *DMD* 欠失・重複変異を有する大規模なサンプル (AR-JP 患者 206 例、*DMD/BMD* 患者 207 例、癌細胞系列 125 種類) を収集して、塩基レベルで欠失・重複変異の同定が可能な高密度アレイ CGH による解析を行った。その結果、AR-JP 患者 206 例から 252 アレル・162 種類の *PARK2* 変異、癌細胞系列 125 例から 41 アレル・32 種類の *PARK2* 変異、*DMD/BMD* 患者 207 例から 197 アレル・197 種類の *DMD* 変異を塩基レベルで同定し、以下の知見を得た。

- AR-JP 患者において同定された 162 種類中 140 種類の変異, DMD/BMD 患者において同定された 197 種類中全ての変異が個別のサンプルでのみ認められた. 創始者効果は限定的で, 独立した多様な変異の頻度が高いことが示唆された.
- Breakpoint の分布の検討では, *PARK2*, *DMD* の breakpoint は CFSs 内の特定の領域に集中し, 生殖細胞系列・癌細胞系列で類似していた. 特に *PARK2* では既報告にある CFSs の最も脆弱な領域と一致した.
- Breakpoint junction の検討では, 大多数は 1~8 塩基の microhomology を持っており, 相同配列を有する頻度は低かった. Non-homologous end joining や microhomology-mediated end joining の機序が想定された. また Fork stalling and template switching によると考えられる複雑な変異が 1 例で観察された.
- Breakpoint が集中する領域の検討では, 複製タイミングが遅いこと, 核マトリックス領域に含まれること, また非常に高い flexibility peak, R/G バンド境界が隣接していることが観察された. Flexibility peak や R/G バンド境界は, DNA 複製の障害になることが示唆されており, これらの因子が複製ストレスへの脆弱性をもたらし, 体細胞系列だけではなく生殖細胞系列においても, 多様な欠失・重複変異と関連することが示唆された.

疾患の遺伝因子のうち、単一遺伝子性疾患を引き起こす浸透率の高い変異については家系に基づく連鎖解析が有効であり、影響度の小さい頻度の高い変異については多型を用いた関連解析が有効である。しかしこれまで、その中間に位置すると考えられる影響度の大きい稀な変異については、あまり解明されていなかった。また、欠失・重複変異は検出方法の技術的困難から疾患との関連についてあまり検討されていなかった。本研究で示したように resequencing やアレイ CGH 解析などに基づく大規模サンプルの患者・対照関連解析は、通常の GWAS では検出が難しい遺伝因子の同定に有効である可能性のある方法である。今後、シーケンス技術の進展により解析できるサンプル規模の拡大、範囲の拡大がもたらされることが期待される。