

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) ゲノム医療実現推進プラットフォーム事業 先端ゲノム研究開発  
(英語) The Platform Program for Promotion of Genome Medicine (P3GM),  
Advanced Genome Research and Bioinformatics Study to Facilitate  
Medical Innovation (GRIFIN)
- 研究開発課題名 : (日本語) パーキンソン病に対する真の意味のオーダーメイド治療を目指した研究  
(英語) Research aimed at ordermade-therapy in the true sense for Parkinson's  
disease
- 研究開発担当者 (日本語) 神戸大学大学院医学研究科・教授・戸田 達史  
所属 役職 氏名 : (英語) Tatsushi Toda, Professor, Kobe University Graduate School of Medicine
- 実施期間 : 平成 28年 9月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 研究総括・ゲノム手法を駆使した孤発性および家族性パーキンソン病の治  
療最適化研究  
(英語) Research management and optimization of treatment for sporadic and  
familial Parkinson's disease using genome analysis
- 研究開発分担者 (日本語) 戸田 達史・神戸大学大学院医学研究科・教授  
所属 役職 氏名 : (英語) Tatsushi Toda, Professor, Kobe University Graduate School of Medicine
- 分担研究 (日本語) ハイスループットゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子多様性のカタロ  
グ化に基づく新規創薬基盤形成  
開発課題名 : (英語) Exploring genetic varieties of Parkinson's disease using high-throughput  
analysis.
- 研究開発分担者 (日本語) 服部 信孝・順天堂大学大学院医学研究科・教授  
所属 役職 氏名 : (英語) Nobutaka Hattori, MD, PhD, Professor, Department of Neurology,  
Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan
- 分担研究 (日本語) パーキンソン病バイオマーカーとゲノムデータを用いた早期診断と創薬  
開発

開発課題名：（英 語）Exploration of the early diagnostic and therapeutic strategy using biological samples and genome information.

研究開発分担者 （日本語）望月 秀樹・大阪大学大学院医学系研究科・教授

所属 役職 氏名：（英 語）Hideki Mochizuki, Professor, Osaka University, School of Medicine

分担研究 （日本語）遺伝統計解析によるパーキンソン病の疾患病態解明・バイオマーカー探索・ゲノム創薬

開発課題名：（英 語）Biology elucidation, biomarker screening, and drug discovery of Parkinson's disease by statistical genetics

研究開発分担者 （日本語）岡田 随象・大阪大学大学院医学系研究科・教授

所属 役職 氏名：（英 語）Yukinori Okada, Professor, Department of Statistical Genetics, Osaka University Graduate School of Medicine

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究総括・ゲノム手法を駆使した孤発性および家族性パーキンソン病の治療最適化研究において、戸田らは、孤発性および家族性パーキンソン病に新規 rare variant の解明、では、エクソンに存在する Rare ながら強いパーキンソン病 (PD) ゲノム因子を発見するため、とくに孤発性 PD 患者を中心に、全エクソン塩基配列解読（エクソーム解析）を行う。平成 28 年度は、GATK best practice に即して、エクソーム解析パイプラインの構築と最適化を行い、>200 エクソーム/月を解析できるようになった。エクソームキャプチャーと次世代シーケンサーによるシーケンス実験が進行中である。fastq を取得後、構築した解析パイプラインで解析を進めていく。抗パ薬の薬剤感受性 SNP による副作用予測、効能予測では、ゾニサミドの効能に関する SNP を GWAS で同定しスコアによる予測を行った。インフォマティクスを用いた新手法による新規抗パ薬発見では、*in vitro* と MPTP 動物モデルにおいて、神経細胞死抑制効果を示す薬剤を手にした。疾患 iPS 細胞、マイクロアレイ解析を用いた新規抗パ薬発見では、患者と正常同胞 1 組から iPS 細胞を作製した。また iPS 細胞由来のドパミンニューロンにおいて、SNCA A53T 変異による遺伝子発現変化を打ち消す候補薬剤を *in silico* 解析で抽出した。

ハイスループットゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子多様性のカタログ化に基づく新規創薬基盤形成において、服部らは、パーキンソン病に関連する疾患関連遺伝子を high-throughput で解析するために、ThermoFisher の IonTorrent を導入した。解析用のチップを作成し、下記 23 種類の関連遺伝子のスクリーニングを開始している。(SNCA, PARK2, Uchl1, PINK1, DJ-1, LRRK2, ATP13A2, GIGYF2, HTRA2, PLA2G6, FBXO7, VPS35, EIF4G1, DNAJC6, SYNJ1, DNAJC13, CHCHD2, GCH1, MAPT, NR4A2, VPS13C, PSEN1, GRN) 1 検体あたりすべてのエクソン、エクソン-イントロン間の変異やバリエーションを網羅的に解析することが可能となり、手短により大規模なデータを構築することを目指している。すでに実験系は開始されており、順次変異を同定しつつある。あと 1 年の時間があれば、具体的な結果として出て来ることが予想される。

パーキンソン病バイオマーカーとゲノムデータを用いた早期診断と創薬開発において、望月らは、パーキンソン病関連疾患患者のバンク構築を引き続き行った。髄液、血清、血漿を平成 28 年度は約 50 例保存し、非匿名化した番号付与により臨床データ・画像結果と比較可能となっている。バイオマーカーとして、超音波アミロイド形成促進装置 (HANABI) を用いたアミロイド凝集性を

検出する髄液診断方法の確立を行った。髄液中シヌクレインの凝集性は、対象患者に比べて、パーキンソン病患者において亢進していた。また、チオフラビン T によるアミロイドモニタリングを指標に、FDA 認可化合物 1300 種類のスクリーニングを行っており、現在継続中である。

遺伝統計解析によるパーキンソン病の疾患病態解明・バイオマーカー探索・ゲノム創薬において、岡田らは、遺伝統計解析手法 HLA imputation 法および MIGWAS に関して、手法の改良を実施した。HLA imputation 法については、次世代シーケンサーにより非古典的 HLA 遺伝子型の同定を高精度に実施する解析パイプラインを構築し、従来の古典的 HLA 遺伝子のみならず、非古典的 HLA 遺伝子においても日本人集団の HLA imputation 法の実装を行った。MIGWAS に関しては、解析アルゴリズムのパッケージ化による高速化と、FANTOM5 コンソーシアムとの国際共同研究を通じた細胞種特異的マイクロ RNA 発現情報の統合を実施した。創薬データベースのとのドラッグ・リポジショニング解析については、複数の創薬データベースから最新の創薬標的遺伝子を抽出し、Anatomical Therapeutic Chemical Classification System (ATC) 分類に基づく対象治療薬との紐付けを実施した。

Toda et al perform research management and optimization of treatment for sporadic and familial Parkinson's disease using genome analysis. In elucidation of novel rare variant in sporadic and familial Parkinson 's disease, in order to discover a strong Parkinson' s disease (PD) genomic factor existing in exons, especially in sporadic PD patients, Toda et al perform all exon nucleotide sequence analysis (exome analysis). In FY2016, according to GATK best practice, it has become possible to analyze > 200 exomes / month by constructing and optimizing an exome analysis pipeline. Sequence experiments by exome capture and next generation sequencer are ongoing. After obtaining fastq, we will proceed with the analysis using the constructed analysis pipeline. For antiparkinsonian drug-sensitivity and efficacy prediction by SNP, SNPs on zonisamide's efficacy were identified by GWAS and predicted by score. In the discovery of novel antiparkinson medicine by a new method using informatics, we acquired a drug that show neuronal cell death suppression effect in vitro cell models and MPTP animal models. iPS cells were prepared from patients and normal siblings in the discovery of novel antiparkinson drug using iPS cells and microarray analysis. Candidate agents that cancels gene expression change by SNCA A53T mutation in iPS cell derived dopaminergic neurons were extracted by in silico analysis.

Hattori et al have established high-throughput genetic analysis for familial Parkinson's disease (PD). We have already set Ion Torrent (ThermoFisher) and made chip including the genes of SNCA, PARK2, Uchl1, PINK1, DJ-1, LRRK2, ATP13A2, GIGYF2, HTRA2, PLA2G6, FBXO7, VPS35, EIF4G1, DNAJC6, SYNJ1, DNAJC13, CHCHD2, GCH1, MAPT, NR4A2, VPS13C, PSEN1, GRN. These genes strongly relate to PD or atypical parkinsonism. We have established DNA bank in our department and collected DNAs of familial PD. Now we have started genetic screening using this system. We try to characterize the genetic-phenotype associations in each gene in familial PD. If we detected the candidate gene or mutations with high association of PD, next we will try to make cell models, animal models, and iPS and evaluate the pathogenicity and biomechanisms *in vitro*.

Mochizuki et al obtained about 50 new participants to our cohort study of Parkinson's disease in last year. In order to compare the disease progression and severity with the concentration of CSF synuclein aggregations, we have developed a new device named HANABI (HANdai Amyloid Burst Inducer), by which the synuclein aggregation in CSF can be amplified and quantified by monitoring ThT fluorescent. They found that aggregated synuclein were increased in the Parkinson's disease patients compared to the disease control patients.. We also performed the drug screening of anti-amyloid drug of synuclein using FDA approved drug library.

Okada et al. updated the analytical methods of (i) HLA imputation, (ii) MIGWAS, (iii) drug target gene database. We extended targets of HLA imputation into non-classical HLA gene polymorphisms, by utilizing next-generation sequencing technology. We integrated cell type-specific miRNA expression profiles into the MIGWAS pipeline through international collaborations with FANTOM5 consortium. We updated that drug target list, drug list, and indicated disease list, so that we can pinpoint candidate repositioning drugs and diseases from the disease genome information.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 10 件、国際誌 12 件)

1. Wang L, Heckman MG, Aasly JO, Annesi G, Bozi M, Chung SJ, Clarke C, Crosiers D, Eckstein G, Garraux G, Hadjigeorgiou GM, Hattori N, Jeon B, Kim YJ, Kubo M, Lesage S, Lin JJ, Lynch T, Lichtner P, Mellick GD, Mok V, Morrison KE, Quattrone A, Satake W, Silburn PA, Stefanis L, Stockton JD, Tan EK, Toda T, Brice A, Van Broeckhoven C, Uitti RJ, Wirdefeldt K, Wszolek Z, Xiromerisiou G, Maraganore DM, Gasser T, Krüger R, Farrer MJ, Ross OA, Sharma M, GEOPD Consortium. Evaluation of the interaction between LRRK2 and PARK16 loci in determining risk of Parkinson's disease: analysis of a large multicenter study. *Neurobiol Aging*. 2016, 49, 217.e1-217.e4.
2. 戸田 達史. 【パーキンソン病の基礎と臨床の最先端】 (No. 1)パーキンソン病の病態と治療 パーキンソン病の遺伝的因子(解説/特集). 脳 21. 2016, 19 巻 4 号, pp. 324-329.
3. 上田 健博, 戸田 達史. 【神経内科疾患の trends & topics 2017】 パーキンソン病(解説/特集). Mebio. 2016, 33 巻 11 号, pp. 10-17.
4. 戸田 達史. パーキンソン病の原因遺伝子 (特集: パーキンソン病) 日本臨牀. 2017, 75 巻 1 号, pp. 21-27.
5. Matsushima T, Conedera S, Tanaka R, Li Y, Yoshino H, Funayama M, Ikeda A, Hosaka Y, Okuzumi A, Shimada Y, Yamashiro K, Motoi Y, Nishioka K, Hattori N. Genotype-phenotype correlations of cysteine replacement in CADASIL. *Neurobiol Aging*. 2017 Feb;50:169.e7-169.e14.
6. Ikeda A, Matsushima T, Daida K, Nakajima S, Conedera S, Li Y, Yoshino H, Oyama G, Funayama M, Nishioka K, Hattori N. A novel mutation of CHCHD2 p.R8H in a sporadic case of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017 Jan;34:66-68.
7. Takeshita Y, Shibata N, Kasanuki K, Nagata T, Shinagawa S, Kobayashi N, Ohnuma T, Suzuki A, Kawai E, Takayama T, Nishioka K, Motoi Y, Hattori N, Nakayama K, Yamada H, Arai H. Genetic association between RAGE polymorphisms and Alzheimer's disease and Lewy body

- dementias in a Japanese cohort: a case-control study. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2016 Oct 4.
8. Takamura S, Ikeda A, Nishioka K, Furuya H, Tashiro M, Matsushima T, Li Y, Yoshino H, Funayama M, Morinobu S, Hattori N. Schizophrenia as a prodromal symptom in a patient harboring SNCA duplication. *Parkinsonism Relat Disord*. 2016 Apr;25:108-9.
  9. Suzuki A, Shibata N, Kasanuki K, Nagata T, Shinagawa S, Kobayashi N, Ohnuma T, Takeshita Y, Kawai E, Takayama T, Nishioka K, Motoi Y, Hattori N, Nakayama K, Yamada H, Arai H. Genetic association between presenilin 2 polymorphisms and Alzheimer's disease and dementia of Lewy body type in a Japanese population. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2016 Mar 16;6(1):90-7.
  10. Conedera S, Apaydin H, Li Y, Yoshino H, Ikeda A, Matsushima T, Funayama M, Nishioka K, Hattori N. FBXO7 Mutations in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Neurobiol Aging*. 2016 Apr;40:192.e1-5.
  11. 西岡健弥, 池田彩, 服部信孝 第 17 番染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う前側頭葉型認知症 (FTDP-17) *Clinical Neuroscience* 2016, Vo.35 No.3.
  12. 松島隆史、西岡健弥、服部信孝 家族性パーキンソン病 update, Annual review 神経 2016 中外医学者
  13. Li G, Cunin P, Wu D, Diogo D, Yang Y, Okada Y, Plenge RM, Nigrovic PA. (The Rheumatoid Arthritis Risk Variant CCR6DNP Regulates CCR6 via PARP-1. *PLoS Genet* 2016, 12:e1006292.
  14. Mahajan A, Rodan AR, Le TH, Gaulton KJ, Haessler J, Stilp AM, Kamatani Y, Zhu G, Sofer T, Puri S, Schellinger JN, Chu PL, Cechova S, van Zuydam N; SUMMIT Consortium; BioBank Japan Project, Arnlov J, Flessner MF, Giedraitis V, Heath AC, Kubo M, Larsson A, Lindgren CM, Madden PA, Montgomery GW, Papanicolaou GJ, Reiner AP, Sundström J, Thornton TA, Lind L, Ingelsson E, Cai J, Martin NG, Kooperberg C, Matsuda K, Whitfield JB, Okada Y, Laurie CC, Morris AP, Franceschini N. Trans-ethnic Fine Mapping Highlights Kidney-Function Genes Linked to Salt Sensitivity. *Am J Hum Genet* 2016, 99:636-646.
  15. Li Z, Xia Y, Feng LN, Chen JR, Li HM, Cui J, Cai QQ, Sim KS, Nairismägi ML, Laurensia Y, Meah WY, Liu WS, Guo YM, Chen LZ, Feng QS, Pang CP, Chen LJ, Chew SH, Epstein RP, Foo JN, Liu J, Ha J, Khoo LP, Chin ST, Zeng YX, Aung T, Chowbay B, Diong CP, Zhang F, Liu YH, Tang T, Tao M, Quek R, Mohamad F, Tan SY, Teh BT, Ng SB, Chng WJ, Ong CK, Okada Y, Raychaudhuri S, Lim ST, Tan W, Peng RJ, Khor CC, Bei JX. Genetic risk of extranodal natural killer T-cell lymphoma: a genome-wide association study. *Lancet Oncol* 2016, 17:1240-1247.
  16. Kanai M, Tanaka T, Okada Y. Empirical estimation of genome-wide significance thresholds based on the 1000 Genomes Project data set. *J Hum Genet* 2016, 61:861-866.
  17. Jing J, Pattaro C, Hoppmann A, Okada Y, CKDGen Consortium, Fox CS, Köttgen A. Combination of mouse models and genomewide association studies highlights novel genes associated with human kidney function. *Kidney Int* 2016, 90:764-773.
  18. 岡田随象 ゲノム創薬 アレルギー 2016, 65:1231-1232.
  19. 岡田随象 自己免疫疾患における大規模ヒトゲノム解析の現状 アレルギー 2016, 65:921-925
  20. 坂上 沙央里、岡田随象 遺伝統計学による創薬 腎臓内科・泌尿器科 2016, 5:82-86.
  21. 岸川 敏博、岡田随象 ゲノム医療時代のバイオインフォマティクス 医学のあゆみ 2016,

22. 岡田随象 概論－「ゲノム情報」＋「遺伝統計学」＝「ゲノム医療」！？ 実験医学 2016, 34:2630-2635.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Genome-wide Analysis and Molecular Targeting Therapy for Neuro-Muscular disease, 口頭, Toda T, 2016 Taiwan-Japan Joint Conference on Genomic Studies and Annual Retreat of Taiwan Genomics and Genetics Society. 2016/12/16, 国外.
2. Kenya Nishioka, Hiroyo Yoshino, Takashi Matsushima, Aya Ikeda, Manabu Funayama, Nobutaka Hattori. Analysis of *GCH1* mutations in the patients with Parkinson's disease in Japanese population. 11th Annual Meeting of the Genetic Epidemiology of Parkinson's disease (GEOPD) Consortium 6-8 October 2016 at Campus Belval, Luxembourg, 海外.
3. Dosage Contribution of a Non-Classical HLA Gene, HLA-DOA, to the Risk of Rheumatoid Arthritis, 口頭, Yukinori Okada, 2016 ACR/ARHP Annual Meeting, 2016/11/14, アメリカ合衆国.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. パーキンソン病, 戸田達史, 神戸市難病連主催第 66 回医療相談会, 2016/12/4, 国内
2. Statistical genetics, disease biology, and drug discovery, 口頭, 岡田随象, 2017 International Symposium on Joint Research Project of the Institute of IMS-UT, 2017/3/21, 国内.
3. Statistical genetics, disease biology, and drug discovery, 口頭, 岡田随象, Genome Evolution at Mishima 2017, 2017/3/28, 国内.

(4) 特許出願