

16. T. Shimizu, T. Horie, H. Kuwahara, S. Ishikawa, C. Tsuda, T. Kaneko, S. Tahara, Y. Noda, D. Morikawa, H. Nojiri, T. Shirasawa. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009.12.9-12. 本農芸化学会2010年度大会、東京、2010.3.28-30.
17. C. Tsuda, H. Nojiri, Y. Saita, T. Miyazaki, Y. Ozawa, D. Morikawa, T. Shimizu. Copper/zinc superoxide dismutase deficiency causes low turnover osteopenia. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009.12.9-12. H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
18. Y. Noda, C. Tsuda, T. Horie, T. Shimizu. CuZn-SOD insufficiency impairs luteal formation and progesterone secretion leading to reduced fertility in female mice. 第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009.12.9-12. 1.特許取得
なし
19. 野田義博、清水孝彦. 酸化ストレスはマウスの黄体機能不全による低受胎性を引き起こす。日本実験動物技術者協会関東支部第35回懇話会、さいたま市民会館、2010.2.27. 2.実用新案登録
なし
20. 村上一馬, 堀越(櫻庭)優子, 村田央, 野田義博, 増田裕一, 木下憲明, 初田裕幸, 村山繁雄, 白澤卓二, 清水孝彦, 入江一浩. アミロイドβの毒性コンホマーを標的とした立体構造特異的抗体。日 3.その他
なし.

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

病理解剖バイオリソースのプロテオーム研究における有用性に関する研究

分担研究者 戸田年総 東京都健康長寿医療センター研究副部長

研究要旨

本年度は、病理解剖で採取され凍結状態で保存された高齢者の腎組織および血管組織のプロテオーム解析を実施し、バイオマーカー探索における病理解剖バイオリソースの有用性について検討を行なった。その結果、カルボニル化タンパク質を標的にしたプロテオーム解析においては血液成分の混入による影響を排除することが今後の課題ではあるものの、病理解剖バイオリソースは加齢や疾患に伴い組織中に蓄積される酸化タンパク質をバイオマーカーとして探索する研究において極めて有用であることが確認された。

A.研究目的

プロテオーム研究による疾患バイオマーカーの探索においては、培養細胞やモデル動物を用いた基礎的検討だけでは不十分であり、やはりヒトの病理組織を直接分析することが重要である。本年度は酸化ストレスが発症の要因の一つとなっている高齢者の慢性疾患において、実際に組織中に蓄積されたカルボニル化タンパク質のプロテオーム解析を行い、バイオマーカー探索における病理解剖バイオリソースの有用性を確認する。

B.研究方法

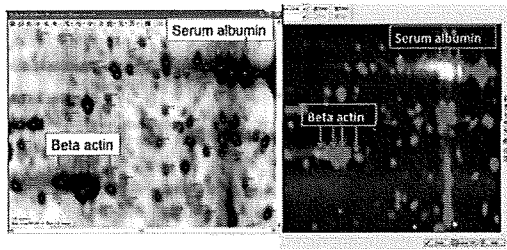
病理解剖において採取され、直ちに凍結保存された高齢者の腎組織および血管組織より尿素変性条件下でタンパク質を抽出。カ

ルボニル基特異的蛍光標識試薬（Cy5-hydrazide）で前処理を行なった後に二次元電気泳動で分離。レーザー走査型のスキャナーで蛍光画像を読み取り、画像解析および質量分析によるプロテオーム解析を行なった。

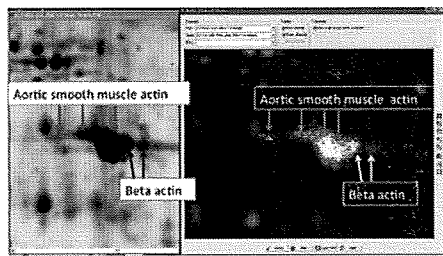
C.研究結果

主要なカルボニル化タンパク質はとしてアルブミンなどの血液成分に加え、腎臓ではβアクチンが、血管組織では血管平滑筋に特異的なアクチン成分がカルボニル化を受けていることがわかった。

高齢者腎組織中のカルボニル化タンパク質



高齢者腹部大動脈内膜組織中のカルボニル化タンパク質



D. 考察

これらの組織では、血液由来のタンパク成分の酸化変性による蓄積も考えられるが、大部分は単なる混入であるものと思われる。今後、病理組織標本を用いてプロテオーム研究を行なう場合、血液成分をいかに排除するかが課題となるが、組織に固有のタンパク質の翻訳後修飾を疾患のバイオマーカーとして探索するプロテオーム研究において、病理解剖バイオリソースより提供される組織の有用性が確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toda, T., Nakamura, M., Yamada, M.,

Nishine, T., Torii, T., Ikenaka, K.,

Hashimoto, R., Mori, M.

Glycoproteomic analysis of abnormal

N-glycosylation on the kappa chain of

cryocrystalglobulin in a patient of

multiple myeloma. *J. Electroph.* 53(1),

1-6, 2009.

2. Nakamura, M., Morisawa, H.,

Imajoh-Ohmi, S., Takamura, C., Fukuda,

H., Toda, T. Proteomic analysis of

protein complexes in human SH-SY5Y

neuroblastoma cells by using blue-native

gel electrophoresis: An increase in lamin

A/C associated with heat shock protein

90 in response to

6-hydroxydopamine-induced oxidative

stress. *Exp. Gerontol.* 44(6-7),

375-382, 2009.

3. Tadokoro, T., Ikekita, M., Toda, T.,

Ito, H., Sato, T., Nakatani, R.,

Hamaguchi, Y., Furukawa, K.

Involvement of Galectin-3 with Vacular

Cell Adhesion Molecule-1 in Growth

Regulation of Mouse BALB/3T3 cells.

J. Biol. Chem. 284(51), 35556-35563,

2009.

4. Akama, K., Horikoshi, T., Sugiyama, A.,

Nakahata, S., Akitsu, A., Niwa, N., Intoh,

A., Kakui, Y., Sugaya, M., Takei, K.,

Imaizumi, N., Sato, T., Matsumoto, R.,

Iwahashi, H., Kashiwabara, S.I., Baba, T., Nakamura, M., Toda, T. Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme. *Biochim. Biophys Acta.* 1804(6), 1272-1284, 2010.

2.学会発表

1. 小川裕子, 三浦ゆり, 金井正美, 秋元義弘, 川上速人, 戸田年総, 遠藤玉夫, 矢ノ下良平. ヒト唾液中のナノサイズ膜小胞のプロテオーム解析. 日本薬学会第129回年会, 2009年3月26-28日, 京都.
2. 今泉紀明, 堀越朋恵, 中山 孝, 大津昌弘, 赤間邦子, 中村 愛, 戸田年総, 近藤 靖, 鈴木 豊, 井上順雄. Neural Stem Sphere 法を用いたサルES細胞から神経への分化における発現比較解析. 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 2009年7月27-28日, 東京.
3. 中村 愛, 森澤 拓, 戸田年総. 酸化ストレス負荷におけるSH-SY5Y細胞のブルーネイティブ二次元電気泳動によるプロテオーム解析(II) 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会, 2009年7月27-28日, 東京.
4. 森澤 拓, 中村 愛, 廣田三佳子, 戸田年総. 質量分析データビューワの改良—プロテオーム研究情報管理のために. 日本ヒトプロテオーム機構第7回会, 2009年7月27-28日, 東京.
5. 戸田年総, 中村 愛, 廣田三佳子, 森澤 拓. 二時限目にTris-Tricine緩衝液系SDS-電気泳動を用いた場合のスタッキング効果に影響を及ぼす緩衝液条件の検討:ミニゲル二次元電気泳動のための泳動条件の最適化. 第60回日本電気泳動学会総会, 2009年9月19-20日, 松本.
6. Tosifusa Toda, Megumi Nakamura, Futoshi shibasaki, Toshihiro Yoshizawa. Proteome Analysis of Carbonyl Proteins in Cerebrospinal Fluid by Cy5-Hydrazide Labeling. HUPO 8th Annual World Congress, 2009年9月26-30, Tronto, Canada.
7. 小川裕子, 三浦ゆり, 原園 景, 金井正美, 戸田年総, 遠藤玉夫, 山口照英, 秋元義弘, 川上速人, 津吹政可, 矢ノ下良平. ヒト唾液中に存在する2種類のエキソソームのプロテオーム解析. 第82回日本生化学会大会, 2009年10月21-24日, 神戸.
8. 秋元義弘, Gerald W. Hart, 三浦ゆり, 戸田年総, 遠藤玉夫, 川上速人. 糖尿病とO-GlcNAc修飾異常. 第82回

- | | |
|---|-------------------------------|
| 日本生化学会大会, 2009年10月21-24日, 神戸. | 1.特許取得
なし |
| 9. 今泉紀明, 堀越朋恵, 中山 孝, 大津昌弘, 赤間邦子, 中村 愛, <u>戸田年総</u> , 近藤 靖, 鈴木 豊, 井上順雄.
Neural Stem Sphere 法を用いたサルES細胞から神経幹細胞への分化過程における発現量変化解析. 第82回日本生化学会大会, 2009年10月21-24日, 神戸. | 2.実用新案登録
なし
3.その他
なし |
| 10. 小川裕子, 金井正美, 三浦ゆり, 原園景, 秋元義弘, 川上速人, <u>戸田年総</u> , 遠藤玉夫, 山口照英, 津吹政可, 矢ノ下良平. ヒト唾液中に存在する2種類のエキソソームの性状解析. 第54回日本唾液腺学会, 2009年12月5日, 東京. | |
| 11. 秋元義弘, Gerald W. Hart, 三浦ゆり, <u>戸田年総</u> , 遠藤玉夫, 川上速人. 糖尿病に伴うタンパク質への糖修飾異常のプロテオミクスによる解析. 第15回日本解剖学会総会全国学術集会, 2010年3月28-30日, 盛岡. | |
| 12. 廣田三佳子, 戸田年総, 森澤拓, 中村愛, 峰下 哲. ストロメクトールによる高齢疥癬患者の薬物治療. 日本薬学会第130回年会, 2010年3月28-30日, 岡山. | |

H. 知的財産権の出願・登録状況

高齢者ブレインバンクの構築

分担研究者 村山繁雄 東京都健康長寿医療センター研究所研究部長

研究要旨

老化に関わる運動・認知機能障害の解明・克服を目的に、アルツハイマー病・パーキンソン病を含むヒト老化を対象に、剖検例全例について、臨床情報、神経放射線画像・バイオマーカーリソース、凍結半脳・脊髄、パラフィンブロックと標本、詳細な神経病理所見よりなる、オープンリソースとしての高齢者ブレインバンクを構築した。認知症とパーキンソン症候群の、長期縦断臨床研究と組み合わせることで、血漿・血清・髄液及び、MRI三次元データ、脳血流シンチ、糖代謝、ドーパミン代謝、アミロイドβ PET所見をリソースとして蓄積することも平行して行った。リソースの品質管理には、死後時間、ご遺体が4度に安置されるまでの時間（cooling interval）、RNAの品質指標を用い、研究テーマ毎にどの検体が最適かを判断できるよう配慮した。本リソースの信頼性を確保するため、リソースを用いた病理学的研究を、日本神経病理学会・神経学会・認知症学会、米国神経病理学会、北米神経学会、国際神経病理学会国際誌に発表することを継続した。また、神経病理学会にブレインバンク委員会を設け、その委員長に就任し、日本国内におけるネットワーク作りの努力を行った。さらに、国際的に著明なブレインバンク責任者の視察を受けることで、国際標準における一流性の確認をおこなった。

A.研究目的

高齢者ブレインバンクは、老化に伴う運動・認知機能障害の克服を目的に設立された。当初プロジェクトとして、1999年に発足し、2007年の都知事表彰を経て、2009年独立地方行政法人東京都健康長寿医療センター発足に伴い、高齢者ブレインバンク（the Brain Bank for Aging Research: BBAR）として施設としての承認を経た。

B.研究方法

1. 後方視的病理研究

高齢者ブレインバンクプロジェクトに基づき、連続剖検例の網羅的検索を継続した。病歴の参照と、必要に応じ主治医、主たる介護者へのインタビューに基づき、Clinical Dementia Rating、認知機能とパーキンソン症状の有無を後方視的に決定した。血管障害は画像で病変部位を正確に同定し、病理学的に評価した。特発性正常圧水頭症病変は、画像とタップテスト陽性の情報を元に、脳室上衣病変を評価した。変性型老化性変化につ

いては、抗アミロイドβ蛋白（抗aa11-24抗体）、リン酸化タウ（AT8）、4リピートタウ（RD4）、3リピートタウ（RD3）、リン酸化αシヌクレイン（psyn #64）、リン酸化TDP43（Pser409/410 monoclonal）、ユビキチン抗体（Sigma）免疫染色を全例に施行し、老人斑、神経原線維変化（NFT）はBraakステージ分類を、アミロイドアンギオパチー、レビー小体（LB）、嗜銀顆粒、TDP43沈着は、高齢者ブレインバンクステージ分類で評価した。脊髄は、タウ、αシヌクレイン、TDP43沈着をスクリーニングした。レビー小体病理検索には、交感神経節、心臓左室前壁無髄神経、胃食道移行部粘膜・筋間神経叢、副腎、皮膚、嗅上皮・嗅粘膜・篩板、嗅球を加えた。リソースの品質管理には、RNA Integrity Number（RIN）を用いた。

2. 前方視的臨床縦断研究：

病院もの忘れ・神経内科外来で、認知症・パーキンソン症候群に対し、一次スクリーニングとして、CT、面接・神経所見、MMSE/長谷川式簡易知能スケールを施行した。二次スクリーニングとし

て、神経学的所見(含UPDRS、Rivermead Behavioral Memory Test、Frontal Assessment Battery、Geriatric Depression Scale)、髄液バイオマーカー(タウ、リン酸化タウ、アミロイドβ蛋白1-42、HVA、5HIAA)、MRI(VSRAD)、脳血流シンチグラフィ、SPECT(ECD、eZis 3.0、SVA)、MIBG心筋シンチグラフィ(SPECT)を施行した。神経内科・精神科、リハビリテーション科合同カンファレンスで、診断を確定した。また糖代謝(18F-FDG)、アミロイド(11C-PIB)、ドーパミントランスポーター(11C-CFT)、D2受容体(11C-Raclopride)PETを選択症例に適応した。髄液・血漿・血清の残はバイオマーカーリソースとして、MRI、SPECT、PETデータは神経画像リソースとして、それぞれ蓄積した。

3. 前方視的・後方視的研究

前方視的臨床縦断研究对象例について、後方視的神経病理研究を得られた知見を元に、背景病理を推定し、それに基づく的確な介入を行った。

追跡症例が死亡した場合、出来る限り剖検を得る努力を行うことで、前方視的縦断研究と、後方視的神経病理研究とを結合する努力を継続した。

4. リソースの供給

リソースを使用する研究希望者の申請に対し、内部委員による事前審査の後、守秘義務下の外部委員の審査の上、採否を決定した。ブレインバンク委員会承認、センター倫理委員会の承認、センター内での共同研究希望者のセミナーを行った後、最適の資源を選択し、研究リソースとして提供した。

C. 研究結果

1. 後方視的病理研究

1972年度よりの蓄積開頭剖検例の蓄積を継続し、最終的に約7,000例、うちDNA保存例は約2,000例、うち半脳凍結例は約800例に達した。

2. 前方視的臨床縦断研究

神経内科外来、もの忘れ外来を通じ、神経心理

検査約1,000例、MRI VSRAD約3,600例、脳血流シンチグラフィ(ECD-SPECT, eZis 3.0, SVA)約1,500例、髄液検査約2,000例、PET検査約400例の蓄積が出来た。

3. 前方視的・後方視的研究

VSRAD施行剖検例22例、髄液検査施行剖検51例、PET検査施行剖検例40例の蓄積が得られた。また、高齢者タウオパチーの、アルツハイマー病・パーキンソン病に匹敵する重要性が、確認された。

4. リソースの供給

3年間に共同研究としてリソースを提供したのは、1. 東北大学大学院医学系研究科CJD早期診断・治療法開発分野、2. 東北大学大学院農学研究科、分子細胞科学講座、分子酵素学研究室、3. 東京大学大学院医学系研究科 神経内科、4. 同 神経病理、5. 同 病理、6. 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 細胞応答化学分野、7. 東京医科歯科大学大学院神経内科、8. 同 神経病理、9. 自治医科大学医学部生化学、10. 筑波大学医学部神経内科、11. 順天堂大学医学部神経内科、12. 新潟大学脳研究所分子遺伝学、13. 滋賀医科大学分子神経科学研究センター、14. 同志社大学生命医科学部、15. 京都大学医学系大学院神経内科、16. 大阪大学医学系大学院発達医学、17. 同 臨床遺伝学教室、18. 同 神経内科、19. 岡山大学医学部精神科、20. 鳥取大学医学部神経内科、21. 三重大学医学部神経内科、22. 徳島大学医学部神経内科、23. 宮崎大学医学部第三内科(神経内科)、24. 産業技術総合研究所脳神経情報研究部門、25. 東京都精神医学総合研究所精神疾患研究分野、26. 東京都神経科学総合研究所臨床病理部門、27. 同 神経科学部門、28. 国立精神神経センター神経研究所アルツハイマー病ミレニアムプロジェクト、29. 国立精神神経センター病院臨床検査部、30. 理化学研究所(和光市)アルツハイマー病研究チーム、31. 同 精神疾患動態研究チーム、32. 自然科学研究機構・生理学

研究所分子神経生理、33. 長寿医療センター（大府）アルツハイマー病研究チーム、34. 同 アイソトープ研究所、35. 宇多野病院神経内科、36. 大阪バイオ研究所プロスタグランディン研究チーム、37. 神戸薬科大学生化学研究室、38. 独立行政法人国立病院機構鳥取西療養所アルツハイマー病研究チーム、39. 当研究所内 アルツハイマー病糖鎖関連遺伝子ゲノム解析、40. 同 アルツハイマー病アミロイドβ蛋白沈着機構、41. 同 プロテオーム：ユビキチン化蛋白の同定、42. 同 高齢者癌研究チームであった。

D. 考察

高齢者ブレインバンクプロジェクトにより、アルツハイマー病、パーキンソン病の発症機構に迫られただけでなく、高齢者タウオパチーと我々が命名した、アミロイドβ蛋白の蓄積を前提としない、第三の変性型老化の存在と重要性を明らかにすることができた。

またパーキンソン病が全身疾患であることを、脳と全身臓器が同時に検索できるバイオバンクの特徴をいかすことで、明らかにすることができた。

さらに、一次皮質野に特異的に発現する、形質決定蛋白の決定に関する研究、神経再生の検出と治療への応用の研究にも、リソースの神経病理学的検索並びにリソースの提供において、貢献をすることができた。

E. 結論

高齢者ブレインバンクプロジェクトにより、老化に伴う運動・認知障害の克服をめざすプロジェクトに加え、神経科学的基礎研究への貢献も行うことができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuda M, Kanou F, Shimada N, Sawabe M, Saito

- Y, Murayama S, Hashimoto M, Maruyama N, Ishigami A: Elevated levels of 4-hydroxynonenal-histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease. *Biomed Res* 2009; 30: 227-233
2. Tokumaru A, Saito Y, Murayama S, Kanemaru K, Sakiyama Y, Toyoda M, Yamakawa H, Terada H: Imaging-Pathologic Correlation in Corticobasal Degeneration. *Am J Neuroradiol* 2009; 30: 1884-1892
3. Sato N, Amino T, Kobayashi K, Asakawa S, Ishiguro T, Tsunemi T, Takahashi M, Matsuura T, Flanigan KM, Iwasaki S, Ishino F, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Hashizume Y, Takahashi Y, Tsuji S, Shimizu N, Toda T, Ishikawa K, Mizusawa H: Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGA)n. *Am J Hum Gen* 85; 5: 544-557
4. Akasaka-Manyu K, Manyu H, Sakurai Y, Wojczyk B, Kozutsumi, Y, Saito Y, Taniguchi N, Murayama S, Spitalnik S, Endo T: Protective effect of N-glycan bisecting GlcNAc residues on β-amyloid production in Alzheimer's disease. *Glycosilation* 2010; 20: 99-106
5. Ishibashi K, Saito Y, Murayama S, Kanemaru K, Oda M, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K: Validation of cardiac 123I-MIBG scintigraphy in patients with Parkinson's disease who were diagnosed with dopamine PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009.7.25 Epub
6. Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K: Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate. *Acta Neurol Scand* 2009.10.7 Epub
7. Ishibashi K, Kanemaru K, Saito Y, Murayama S, Oda K, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K: Cerebrospinal fluid metabolite and nigrostriatal dopaminergic function in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* (in press)
8. Shishido T, Ikemura M, Obi T, Yamazaki K, Terada T, Sugiura A, Saito Y, Murayama S, Mizoguchi K: α-Synuclein accumulation in skin nerve fibers revealed by skin biopsy in pure autonomic failure. *Neurology* (in press)
9. Kobayashi S, Saito Y, Maki T, Murayama S: Cortical propagation of Creutzfeldt-Jakob disease with codon 180 mutation. *Clin Neurol Neurosurg* (in press)
10. 杉原毅彦, 木村直樹, 村山繁雄, 新井富生, 井藤英喜, 稲松孝思, 大田雅嗣, 原田和昌: 顕微鏡的多発性血管炎に対してステロイド療法中、原因不明の発熱が出現し、死亡した1例。老年内科2009; 47 (3): 387:396
11. 村山繁雄、齊藤祐子、徳丸阿耶:リハの基礎となる動的神経病理(画像・病理連関)。脳血管障害。 *Journal of Clinical Rehabilitation* 2009; 18: 100

12. 村山繁雄、齊藤祐子、徳丸阿耶:リハの基礎となる動的神経病理(画像・病理連関)。頭部外傷。Journal of Clinical Rehabilitation 2009; 18: 192-196
13. 村山繁雄、齊藤祐子、徳丸阿耶:リハの基礎となる動的神経病理(画像・病理連関)。アルツハイマー病。Journal of Clinical Rehabilitation 2009; 18: 292-296
14. 齊藤祐子、足立正、村山繁雄:リハの基礎となる動的神経病理(画像・病理連関)。パーキンソン病。2009; 18: 392-396
15. 村山繁雄: MCIを考える。高齢者ブレインバンクプロジェクトの経験から。老年精神医学雑誌2009; 29: (増刊号I) 35-40
16. 村山繁雄、齊藤祐子: 大脳白質の機能解剖学。分子脳血管病2009; 8: 131-136
17. 村山繁雄、齊藤祐子: 異常タンパク蓄積と神経変性、アルツハイマー病を中心に。実験医学2009; 27: 1356-1360
2. 学会発表
1. Murayama S: Neuropathological Technique in Brain Banking. Japanese Society of Neuropathology 2009; 29 suppl: 46
2. 宮川統爾、齊藤祐子、足立正、村山繁雄: 多系統萎縮症における嗅球・扁桃核病変の検討。第50回日本神経病理学会総会学術研究会、高松、2009.6.4-6
3. 橋本明子、森田茂樹、古和久朋、岩田淳、清水潤、辻省次、福嶋敬宜、深山正久、村山繁雄: 未分化悪性腫瘍を伴い、前角・脳幹を中心としたconglomerate inclusion の多発を認めた63歳剖検例。第50回日本神経病理学会総会学術研究会、高松、2009.6.4-6
4. 栗崎博司、四茂野はるみ、井上里美、板東充秋、村山繁雄: 推定背景病理としてのDLB第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
5. 広吉祐子、仁科裕史、金丸和富、初田裕幸、齊藤祐子、村山繁雄: 高齢者神経・筋生検における、国際標準処理の有用性の検討。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
6. 山崎峰雄、森啓、山崎昌子、新井裕至、村山繁雄、片山泰朗: 認知症専門病院における16年連続剖検159例の病理学的検討。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
7. 舟辺さやか、齊藤祐子、足立正、初田裕幸、高梨雅史、服部信孝、村山繁雄: 腸管神経叢のリン酸化 α -synucleinの沈着の検討(会)。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
8. 初田裕幸、齊藤祐子、佐藤進、福武敏夫、森啓、村山繁雄: 経過19年のSODI 変異を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症74歳剖検例。第50回日本神経病理学会総会学術研究会、高松、2009.6.4-6
9. 初田裕幸、齊藤祐子、足立正、舟辺さやか、新井富生、沢辺元司、桑野良二、森啓 and 村山繁雄: アミロイドアンギオパチーの進展ステージ(会)。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
10. 仁科裕史、古田光、徳丸阿耶、金丸和富、石井賢二、村山繁雄: 扁桃核腫大を伴い、認知症が進行する一群の検討。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
11. 石井賢二、石橋賢士、石渡喜一、齊藤祐子、徳丸阿耶、金丸和富、村山繁雄: 前頭側頭型認知症におけるアミロイド蓄積。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
12. 石橋賢士、金丸和富、齊藤祐子、村山繁雄、川崎敬一、織田圭一、石渡喜一、水澤英洋、石井賢二: パーキンソン病での髄液HVA濃度と11C-CFT PETで測定した黒質線条体機能との関連。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
13. 仙石錬平、齊藤祐子、V. J. Paul、村山繁雄: 高齢者ブレインバンクと米国ブレインバンクとの差異。第50回日本神経病理学会総会学術研究会、高松、2009.6.4-6
14. 仙石錬平、齊藤祐子、J. P. Vonsattel、村山繁雄: ブレインバンクの日米比較。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
15. 足立正、江口桂、齊藤祐子、徳丸阿耶、石井賢二、金丸和富、沢辺元司、中島健二、北本哲之、村山繁雄: 病初期よりFDG-PETにて賢明な糖代謝低下を認めたCreutzfeldt-Jakob病の1剖検例。第50回日本神経病理学会総会学術研究会、高松、2009.6.4-6
16. 足立正、齊藤祐子、初田裕幸、徳丸阿耶、金丸和富、石井賢二、沢辺元司、中島健二、村山繁雄: 嗜銀顆粒性疾患(AGD)は、左右差を原則として呈する。第50回日本神経病理学会総会学術研究会、高松、2009.6.4-6
17. 足立正、齊藤祐子、徳丸阿耶、金丸和富、石井賢二、沢辺元司、中島健二、村山繁雄: 嗜銀顆粒性疾患の左右差と臨床画像診断(会)。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
18. 村山繁雄、齊藤祐子、初田裕幸、足立正、舟辺さやか、沢辺元司: 脊髄バンクの構築。第50回日本神経病理学会総会学術研究会、高松、2009.6.4-6
19. 村山繁雄、齊藤祐子、清水潤、秋山治彦: 原発性TDP43蓄積症死後脳・脊髄資源の構築。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
20. 野崎一郎、浜口毅、篠原もえ子、中村好一、北本哲之、水澤英洋、佐藤猛、森若文雄、志賀裕正、三條伸夫、黒岩義之、西澤正典、武田雅俊、犬塚貴、黒田重利、村井弘之、村山繁雄、太組一朗、調漸、立石潤、山田正仁: CJD患者における髄液中の異常プリオンタンパクの検出。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22

21. 有馬邦正, 久野貞子, 塚本忠, 山村隆, 森秀生, 村山繁雄, 佐藤啓造, 河原直人, 秋口一郎: パーキンソン病ブレインバンク Progress Report 2008. 第50回日本神経病理学会総会学術研究会、高松、2009.6.4-6
22. 齊藤祐子, 宮下哲典, 初田裕幸, 足立正, 舟辺さやか, 桑野良二, 村山繁雄: 高齢者ブレインバンク年次報告。第50回日本神経病理学会総会学術研究会、高松、2009.6.4-6
23. 齊藤祐子, 仙石鍊平, 舟辺さやか, 足立正, 初田裕幸, 村山繁雄: レヴィー小体病理における嗅球扁桃核進展経路の提唱(会)。第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
24. Adachi T, Saito Y, Hatsuta H, Funabe S, Murayam S: Laterality in argyrophilic grain disease. 2009 Annual Meeting of the American Association for Neuropathologists, 2009.7. 13, San Antonio, U.S.A, JNEN 2009; 68: 573
25. Murakami K, Horikoshi-Sakuraba Y, Murata N, Noda Y, Masuda Y, Kinoshita N, Murayama S, Shirasawa T, Shimizu T, Irie K: Development of a monoclonal antibody against the toxic conformer of the 42-mer amyloid β protein. 2009 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2009.10.17-21, Chicago, U.S.A.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
新井富生	主要ながんの年齢別罹患率・死亡率	井藤英喜・大島伸一・鳥羽研二	統計データでみる高齢者医療	文光堂	東京	2009	54
新井富生	乳頭腺癌	深山正久, 大倉康男	腫瘍病理鑑別診断アトラス胃癌	文光堂	東京	2009	49-54
新井富生	その他の癌(絨毛癌, 未分化癌)	深山正久, 大倉康男	腫瘍病理鑑別診断アトラス胃癌	文光堂	東京	2009	129-132

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada Y, Fuku N, Tanaka M, Aoyagi Y, <u>Sawabe M</u> , Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Kato K, Watanabe S, Nozawa Y, Hasegawa A, Kojima T.	Identification of CELSR1 as a susceptibility gene for ischemic stroke in Japanese individuals by a genome-wide association study.	Atherosclerosis	207(1)	144-149	2009
Tsuda Y, Noguchi T, Mochizuki H, Makino F, Nanjo Y, <u>Sawabe M</u> , Takahashi H.	Patients with mild-to-moderate asthma may develop clinically significant chronic obstructive pulmonary disease.	Respirology	14(4)	529-536	2009
Takubo K, Vieth M, Aida J, <u>Sawabe M</u> , Kumagai Y, Hoshihara Y, <u>Arai T</u> .	Differences in the Definitions Used for Esophageal and Gastric Diseases in Different Countries. Endoscopic Definition of the Esophagogastric Junction, the Precursor of Barrett's Adenocarcinoma, the Definition of Barrett's Esophagus, and Histologic Criteria for Mucosal Adenocarcinoma or High-Grade Dysplasia.	Digestion	80(4)	248-257	2009

Takubo K, Aida J, Naomoto Y, <u>Sawabe M</u> , <u>Arai T</u> , Shiraishi H, Matsuura M, Ell C, May A, Pech O, Stolte M, Vieth M.	Cardiac rather than intestinal-type background in endoscopic resection specimens of minute Barrett adenocarcinoma.	Hum Pathol	40(1)	65-74	2009
Sebastiani P, Montano M, Puca A, Solovieff N, Kojima T, Wang MC, Melista E, Meltzer M, Fischer SE, Andersen S, Hartley SH, Sedgewick A, Arai Y, Bergman A, Barzilai N, Terry DF, Riva A, Anselmi CV, Malovini A, Kitamoto A, <u>Sawabe M</u> , <u>Arai T</u> , Gondo Y, Steinberg MH, Hirose N, Atzmon G, Ruvkun G, Baldwin CT, Perls TT.	RNA editing genes associated with extreme old age in humans and with lifespan in <i>C. elegans</i> .	PLoS One.	4(12)	e8210	2009
<u>Sawabe M</u> , Tanaka N, Nakahara K, Hamamatsu A, Chida K, <u>Arai T</u> , Harada K, Inamatsu T, Ozawa T, Naka MM, Matsushita S.	High lipoprotein(a) level promotes both coronary atherosclerosis and myocardial infarction: a path analysis using a large number of autopsy cases.	Heart.	95(24)	1997-2002	2009
<u>Sawabe M</u> , <u>Arai T</u> , Araki A, Hosoi T, Kuchiba A, Tanaka N, Naito T, Oda K, Ikeda S, Muramatsu M.	Smoking confers a MTHFR 677C>T genotype-dependent risk for systemic atherosclerosis: results from a large number of elderly autopsy cases that died in a community-based general geriatric hospital.	J Atheroscler Thromb	16(2)	91-104	2009
Liu M, Kurosaki T, Suzuki M, Enomoto Y, Nishimatsu H, <u>Arai T</u> , <u>Sawabe M</u> , Hosoi T, Homma Y, Kitamura T.	Significance of common variants on human chromosome 8q24 in relation to the risk of prostate cancer in native Japanese men.	BMC Genet	10	37	2009
Kurosaki T, Suzuki M, Enomoto Y, <u>Arai T</u> , <u>Sawabe M</u> , Hosoi T, Homma Y, Kitamura T.	Polymorphism of cytochrome P450 2B6 and prostate cancer risk: a significant association in a Japanese population.	Int J Urol	16(4)	364-368	2009

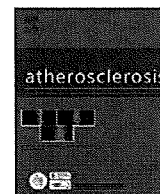
Konstantinou K, Yamamoto K, Ishibashi F, Mizoguchi Y, Kurata M, Nakagawa Y, Suzuki K, <u>Sawabe M</u> , Ohta M, Miyakoshi S, Crawley JT, Kitagawa M.	Angiogenic mediators of the angiopoietin system are highly expressed by CD10-positive lymphoma cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma.	Br J Haematol.	144(5)	696-704	2009
Kato T, Kimura Y, <u>Sawabe M</u> , Masuda Y, Kitamura K.	Cervical tuberculous lymphadenitis in the elderly: comparative diagnostic findings.	J Laryngol Otol.	123(12)	1343-1347	2009
Hoshikawa M, Mochizuki H, Saito M, Noguchi T, <u>Sawabe M</u> , Takahashi H.	Contralateral cervicomediastinal lymph node metastases from clinically occult adenocarcinoma of the lung.	Clin Lung Cancer.	10(4)	249-251	2009
Honma N, Takubo K, <u>Sawabe M</u> , <u>Arai T</u> , Akiyama F, Sakamoto G, Utsumi T, Yoshimura N, Harada N.	Alternative use of multiple exons 1 of aromatase gene in cancerous and normal breast tissues from women over the age of 80 years.	Breast Cancer Res.	11(4)	R48	2009
Hinohara K, Ohtani H, Nakajima T, Sasaoka T, <u>Sawabe M</u> , Lee BS, Ban J, Park JE, Izumi T, Kimura A.	Validation of eight genetic risk factors in East Asian populations replicated the association of BRAP with coronary artery disease.	J Hum Genet.	54(11)	642-646	2009
Hinohara K, Nakajima T, Yasunami M, Houda S, Sasaoka T, Yamamoto K, Lee BS, Shibata H, Tanaka-Takahashi Y, Takahashi M, Arimura T, Sato A, Naruse T, Ban J, Inoko H, Yamada Y, <u>Sawabe M</u> , Park JE, Izumi T, Kimura A.	Megakaryoblastic leukemia factor-1 gene in the susceptibility to coronary artery disease.	Hum Genet.	126(4)	539-547	2009
Hinohara K, Nakajima T, Sasaoka T, <u>Sawabe M</u> , Lee BS, Ban JM, Park JE, Izumi T, Kimura A.	Validation of the association between AGTRL1 polymorphism and coronary artery disease in the Japanese and Korean populations.	J Hum Genet.	54(9)	554-556	2009

Hinohara K, Nakajima T, Sasaoka T, <u>Sawabe M</u> , Lee BS, Ban J, Park JE, Izumi T, Kimura A.	Replication studies for the association of PSMA6 polymorphism with coronary artery disease in East Asian populations.	J Hum Genet.	54(4)	248-251	2009
Fukuda M, Kanou F, Shimada N, <u>Sawabe M</u> , Saito Y, <u>Murayama S</u> , Hashimoto M, Maruyama N, Ishigami A.	Elevated levels of 4-hydroxynonenal-histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease.	Biomed Res	30(4)	227-233	2009
Shiraishi H, Mikami T, Aida J, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, <u>Arai T</u> , Watanabe M, Okayasu I, Takubo K.	Telomere shortening in Barrett's mucosa and esophageal adenocarcinoma and its association with loss of heterozygosity.	Scand J Gastroenterol	44 (5)	538-544	2009
<u>Toda, T.</u> , Nakamura, M., Yamada, M., Nishine, T., Torii, T., Ikenaka, K., Hashimoto, R., Mori, M.	Glycoproteomic analysis of abnormal N-glycosylation on the kappa chain of cryocryoglobulin in a patient of multiple myeloma.	J. Electroph.	53(1)	1-6	2009
Nakamura, M., Morisawa, H., Imajob-Ohmi, S., Takamura, C., Fukuda, H., <u>Toda, T.</u>	Proteomic analysis of protein complexes in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by using blue-native gel electrophoresis: An increase in lamin A/C associated with heat shock protein 90 in response to	Exp. Gerontol.	44(6-7)	375-382	2009
Tadokoro, T., Ikekita, M., <u>Toda, T.</u> , Ito, H., Sato, T., Nakatani, R., Hamaguchi, Y., Furukawa, K.	Involvement of Galectin-3 with Vacular Cell Adhesion Molecule-1 in Growth Regulation of Mouse BALB/3T3 cells.	J. Biol. Chem.	284(51)	35556-35563	2009
Kawakami, S., Matsuda, A., Sunagawa, T., Noda, Y., Kaneko, T., Tahara, S., Hiraumi, Y., Adachi, S., Matsui, H., Ando, K., Fujita, T., Maruyama, N., Shirasawa, T., <u>Shimizu, T.</u>	Antioxidant, EUK-8, prevents murine dilated cardiomyopathy.	Cir J	73	2125-2134	2009

Shimijo, Y., Kosaka, K., Noda, Y., <u>Shimizu, T.</u> , Shirasawa, T.	Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and lifespan in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurosci Res	88	896-904	2009
Lustgarten, M., Jang, Y., Liu, Y., Muller, F., Qi, W., Steinhilber, M., Brooks, S., Larkin, L. M., <u>Shimizu, T.</u> , Shirasawa, T., McManus, L., Bhattacharya, A., Richardson, A., Van Remmen, H.	Conditional knockout of MnSOD targeted to type IIB skeletal muscle fibers increases oxidative stress and is sufficient to alter aerobic exercise capacity.	Am J Physiol	297	C1520-1532	2009
Chiba, T., Kamei, Y., <u>Shimizu, T.</u> , Shirasawa, T., Katsumata, A., Shiraishi, L., Sugita, S., Ogawa, Y., Miura, S., Ezaki, O.	Overexpression of FOXO1 in skeletal muscle does not alter longevity in mice.	Mech Ageing Dev	130	420-428	2009
Masuda, Y., Uemura, S., Ohashi, R., Nakanishi, A., Takegoshi, K., <u>Shimizu, T.</u> , Shirasawa, T., Irie, K	Identification of Physiological and Toxic Conformations in Abeta42 Aggregates.	Chembiochem	10	287-295	2009
Murakami, K., Inagaki, J., Saito, M., Ikeda, Y., Tsuda, C., Noda, Y., Kawakami, S., Shirasawa, T., <u>Shimizu, T.</u>	Skin atrophy in cytoplasmic SOD-deficient mice and its complete recovery using a vitamin C derivative.	Biochem Biophys Res Commun	382	457-61	2009
<u>Shimizu, T.</u> , Shirasawa, T.	Anti-aging effects by caloric restriction.	Nippon Rinsho	67	1366-1371	2009
Tokumar A, Saito Y, <u>Murayama S</u> , Kanemaru K, Sakiyama Y, Toyoda M, Yamakawa H, Terada H	Imaging-Pathologic Correlation in Corticobasal Degeneration.	Am J Neuroradiol	30	1884-1892	2009
Sato N, Amino T, Kobayashi K, Asakawa S, Ishiguro T, Tsunemi T, Takahashi M, Matsuura T, Flanigan KM, Iwasaki S, Ishino F, Saito Y, <u>Murayama S</u> , Yoshida M, Hashizume Y, Takahashi Y, Tsuji S, Shimizu N, Toda T, Ishikawa K, Mizusawa H	Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA) _n .	Am J Hum Gen	85(5)	544-557	2009

Ishibashi K, Saito Y, <u>Murayama S</u> , Kanemaru K, Oda M, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K	Validation of cardiac 123I-MIBG scintigraphy in patients with Parkinson's disease who were diagnosed with dopamine PET.	Eur J Nucl Med Mol Imaging	37	3- 11	2009
Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-ura K, <u>Murayama S</u> , Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K	Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricular pentosan polysulphate.	Acta Neurol Scand	121	127- 30	2009
Aida J, Izumo T, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Matsuura M, Poon SS, Fujiwara M, Sawabe M, <u>Arai T</u> , Takubo K.	Telomere lengths in the oral epithelia with and without carcinoma.	Eur J Cancer	46	430-438	2010
Akama, K., Horikoshi, T., Sugiyama, A., Nakahata, S., Akitsu, A., Niwa, N., Intoh, A., Kakui, Y., Sugaya, M., Takei, K., Imaizumi, N., Sato, T., Matsumoto, R., Iwahashi, H., Kashiwabara, S.I., Baba, T., Nakamura, M., <u>Toda, T.</u>	Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme.	Biochim. Biophys Acta	1804(6)	1272-1284	2010
<u>Shimizu, T.</u> , Shirasawa, T.	Anti-aging research using Mn-SOD conditional knockout mice.	Yakugaku Zasshi	130	19-24	2010
<u>Shimizu, T.</u> , Kawakami, S., Nojiri, N., Shirasawa, T.	Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) gene.	Geriatr Gerontol Int		In press	2010
Murakami, K., Masuda, Y., Shirasawa, T., <u>Shimizu, T.</u> , Irie, K.	The turn conformation at positions 22 and 23 in the 42-mer amyloid beta peptide: emerging role in the pathogenesis of Alzheimer's disease.	Geriatr Gerontol Int		In press	2010

Akasaka-Manyu K, Manyu H, Sakurai Y, Wojczyk B, Kozutsumi, Y, Saito Y, Taniguchi N, <u>Murayama S</u> , Spitalnik S, Endo T	Protective effect of <i>N</i> -glycan bisecting GlcNAc residues on beta-amyloid production in Alzheimer's disease.	Glycosilation	20	99-106	2010
Shishido T, Ikemura M, Obi T, Yamazaki K, Terada T, Sugiura A, Saito Y, <u>Murayama S</u> , Mizoguchi K	α -Synuclein accumulation in skin nerve fibers revealed by skin biopsy in pure autonomic failure.	Neurology	74	608- 10	2010
Ishibashi K, Kanemaru K, Saito Y, <u>Murayama S</u> , Oda K, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K	Cerebrospinal fluid metabolite and nigrostriatal dopaminergic function in Parkinson's disease.	Acta Neurol Scand		In press	2010
荻原唯子, 森聖二郎, 金原嘉之, 田村嘉章, 荒木厚, 井藤英喜, 岩間水輝, <u>沢辺元司</u> , 金澤伸郎, 古田光	原因不明の低血糖発作を頻発し脾臓サルコイド結節摘除により低血糖発作が消失した1例	日本内科学会雑誌	98	2882-2884	2009
坪光雄介, 牧尚孝, 徳丸阿耶, 五條理志, 井藤英喜, 原田和昌, 勝野太郎, 豊田昌子, 山川通隆, 宮腰重三郎, <u>沢辺元司</u> , 新井富生, 初田裕幸, 坂口秀仁, 稲松孝思.	心肺停止し autopsy imaging (Ai: 死亡時画像病理診断) が死因特定に役立った高齢女性の1例.	内科	104 (5)	893-903	2009
初田裕幸, 仁科裕史, 砂川昌子, 徳丸阿耶, <u>新井富生</u> , <u>村山繁雄</u>	後縦靭帯骨化症病変にはほぼ局限したサルコイドーシス77歳男性剖検例	脊椎脊髓ジャーナル	22(12)	1337-1344	2009
<u>新井富生</u> , 笠原一郎, <u>沢辺元司</u> , 本間尚子, 相田順子, 田久保海誉	社会問題となった疾患と病理. 大腸癌の病理学.	病理と臨床	27 臨時増刊号	230-237	2009
<u>新井富生</u>	消化管がんに対する分子標的治療薬とその適応を決めるための病理学的検査	病理と臨床	27 (6)	592-593	2009
<u>新井富生</u>	大腸低分化腺癌の亜分類について	大腸癌 FRONTIER	2(2)	43	2009
<u>新井富生</u>	腸管環周率の臨床病理学的意義	大腸癌 FRONTIER	2(2)	44	2009
<u>新井富生</u> , 玉橋うらら, 明石巧	Small round cell tumor の病理学的特徴	臨床画像	26(1)	4-14	2010



Identification of *CELSR1* as a susceptibility gene for ischemic stroke in Japanese individuals by a genome-wide association study

Yoshiji Yamada^{a,*}, Noriyuki Fuku^b, Masashi Tanaka^b, Yukitoshi Aoyagi^b, Motoji Sawabe^c, Norifumi Metoki^d, Hidemi Yoshida^e, Kei Satoh^e, Kimihiko Kato^f, Sachiro Watanabe^g, Yoshinori Nozawa^h, Aki Hasegawaⁱ, Toshio Kojimaⁱ

^a Department of Human Functional Genomics, Life Science Research Center, Mie University, 1577 Kurima-machiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

^b Department of Genomics for Longevity and Health, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan

^c Department of Pathology, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo, Japan

^d Department of Internal Medicine, Hirosaki Stroke Center, Hirosaki, Japan

^e Department of Vascular Biology, Institute of Brain Science, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Hirosaki, Japan

^f Department of Cardiovascular Medicine, Gifu Prefectural Tajimi Hospital, Tajimi, Japan

^g Department of Cardiology, Gifu Prefectural General Medical Center, Gifu, Japan

^h Gifu International Institute of Biotechnology, Kakamigahara, Japan

ⁱ Genomic Sciences Center, RIKEN, Yokohama, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2009

Received in revised form 26 March 2009

Accepted 26 March 2009

Available online 5 April 2009

Keywords:

Ischemic stroke

Cerebral infarction

Polymorphism

Genetics

Genome-wide association study

ABSTRACT

Objective: We have performed a genome-wide association study (GWAS) to identify genetic variants that confer susceptibility to ischemic stroke.

Methods: A total of 6341 individuals from three independent populations was examined. Subject panel A comprised 131 individuals with ischemic stroke and 135 controls; subject panel B comprised 790 individuals with ischemic stroke and 3435 controls; and subject panel C comprised 71 individuals with ischemic stroke and 1779 controls. A GWAS for ischemic stroke was performed in subject panel A with the use of the GeneChip Human Mapping 500K Array Set (Affymetrix).

Results: The relation of 100 single nucleotide polymorphisms (SNPs) selected by the GWAS to ischemic stroke was examined in 705 subjects with ischemic stroke and 3426 controls selected from subject panel B. Three SNPs (rs1671021 of *LLGL2*, rs9615362 of *CELSR1*, and rs753307 of *RUVBL2*) were significantly ($P < 0.05$) associated with ischemic stroke. After DNA sequencing of linkage disequilibrium blocks containing these SNPs, three tag SNPs (rs6007897 of *CELSR1*, rs1671021 of *LLGL2*, and rs1062708 of *RUVBL2*) and a nonsynonymous SNP (rs4044210 of *CELSR1*) were examined for their relation to ischemic stroke in subject panels B and C. Both rs6007897 (A → G, Thr2268Ala) and rs4044210 (A → G, Ile2107Val) of *CELSR1* as well as rs1671021 (T → C, Phe479Leu) of *LLGL2* were significantly associated with ischemic stroke in subject panel B. The rs6007897 and rs4044210 polymorphisms of *CELSR1* were also significantly associated with ischemic stroke in subject panel C.

Conclusion: *CELSR1* is a susceptibility gene for ischemic stroke in Japanese individuals, although the functional relevance of the identified SNPs was not determined.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Stroke is a complex multifactorial disorder that is thought to result from an interaction between a person's genetic background and various environmental factors. It is a common and serious condition, with about 780,000 individuals having experienced a new or recurrent stroke and 150,000 deaths having occurred from stroke-related causes in the United States in 2004. The prevalence

of stroke in the United States is about 5.8 million. Of all such events, 87% are ischemic stroke, 10% are intracerebral hemorrhage, and 3% are subarachnoid hemorrhage [1]. In Japan, the prevalence of stroke is about 1.4 million (61% ischemic stroke, 25% intracerebral hemorrhage, 11% subarachnoid hemorrhage, 3% others), with nearly 133,000 deaths having occurred from this condition in 2005 (Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan). Despite recent advances in acute stroke therapy, stroke remains the leading cause of severe disability and the third leading cause of death, after heart disease and cancer, in Western countries and Japan [2]. The identification of biomarkers for stroke risk is important both for risk prediction and for intervention to avert future events.

* Corresponding author. Tel.: +81 59 231 5387; fax: +81 59 231 5388.
E-mail address: yamada@gene.mie-u.ac.jp (Y. Yamada).

Although genetic epidemiological studies have implicated several genetic variants as risk factors for ischemic stroke [3–6], the genetic determinants of this condition remain largely unknown. We have now performed a genome-wide association study (GWAS) for ischemic stroke with ~520,000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a total of 6341 Japanese individuals. The purpose of the present study was to identify genetic variants that confer susceptibility to ischemic stroke and thereby to contribute to the personalized prevention of this condition.

2. Methods

2.1. Study subjects

A total of 6341 individuals (992 subjects with ischemic stroke and 5349 controls) from three independent populations was examined. Subject panel A comprised 266 individuals (131 subjects with ischemic stroke and 135 controls) who either visited outpatient clinics of or were admitted to participating hospitals (Gifu Prefectural General Medical Center and Gifu Prefectural Tajimi Hospital) between October 2002 and March 2004 because of various symptoms or for an annual health checkup. Subject panel B comprised 4225 individuals (790 subjects with ischemic stroke and 3435 controls) who either visited outpatient clinics of or were admitted to participating hospitals (Gifu Prefectural General Medical Center, Gifu Prefectural Tajimi Hospital, Yokohama General Hospital, Hirosaki University Hospital, Reimeikyo Rehabilitation Hospital, Hirosaki Stroke Center, and Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital) between October 2002 and March 2008 because of various symptoms or for an annual health checkup. Subject panel C comprised 1850 community-dwelling individuals, including 71 subjects with a history of ischemic stroke and 1779 controls, who were recruited to a population-based prospective cohort study of aging and age-related diseases in Gunma Prefecture and Tokyo. The diagnosis of ischemic stroke was based on the occurrence of a new and abrupt focal neurological deficit, with neurological symptoms and signs persisting for more than 24 h; it was confirmed by positive findings in computed tomography or magnetic resonance imaging (or both) of the head. The type of stroke was determined according to the Classification of Cerebrovascular Diseases III [7]. Individuals with cardiogenic embolic infarction, lacunar infarction alone, transient ischemic attack, hemorrhagic cerebral infarction or hemorrhagic stroke, cerebrovascular malformations, moyamoya disease, cerebral venous sinus thrombosis, brain tumors, or traumatic cerebrovascular diseases were excluded from the study, as were those with atrial fibrillation in the absence or presence of valvular heart disease. The control subjects were recruited from consecutive individuals who visited outpatient clinics of the participating hospitals for an annual health checkup or who were community-dwelling individuals recruited to the prospective cohort study. The absence of stroke history was evaluated by a detailed questionnaire and was confirmed by the absence of a history of neurological deficit. They either had or did not have conventional risk factors for stroke, including hypertension (systolic blood pressure of ≥ 140 mmHg, diastolic blood pressure of ≥ 90 mmHg, or taking of antihypertensive medication), diabetes mellitus (fasting blood glucose concentration of ≥ 7.00 mmol/L, hemoglobin A_{1c} content of $\geq 6.5\%$, or taking of antidiabetes medication), or hypercholesterolemia (serum total cholesterol concentration of ≥ 5.72 mmol/L or taking of lipid-lowering medication). These subjects also had no history of ischemic or hemorrhagic stroke or other cerebral diseases; coronary heart disease, peripheral arterial occlusive disease, or other atherosclerotic diseases; or other thrombotic, embolic, or hemorrhagic disorders. The study proto-

col complied with the Declaration of Helsinki and was approved by the Committees on the Ethics of Human Research of Mie University Graduate School of Medicine, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Gifu International Institute of Biotechnology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, RIKEN, and participating hospitals. Written informed consent was obtained from each participant.

2.2. Genome-wide association study

A GWAS for ischemic stroke was performed in subject panel A with the use of the GeneChip Human Mapping 500K Array Set, consisting of *StyI* and *NspI* chips (Affymetrix, Santa Clara, CA) and including ~520,000 SNPs distributed throughout the entire genome. Genotyping data with a call rate of <93% were discarded. The mean call rate for the remaining data in the present study was 98.0%. We examined the relation of allele frequencies of each SNP to ischemic stroke by the chi-square test and selected 894 SNPs with *P* values of $<1.0 \times 10^{-20}$. Searching of the NCBI dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) resulted in the selection of 499 SNPs with a gene annotation. We next examined the relation of haplotypes of each haploblock to ischemic stroke and selected 455 haploblocks with *P* values of $<1 \times 10^{-20}$. Searching of the dbSNP database yielded 238 haploblocks with a gene annotation. We then selected 194 SNPs that were included in these haploblocks. We confirmed that the genotype distributions of these SNPs in control subjects were all in Hardy–Weinberg equilibrium. Finally, we discarded 94 SNPs for which the distribution of hybridization signals on the SNP chips deviated significantly ($P < 0.001$) from a normal distribution, and we examined the remaining 100 SNPs in the replication studies.

2.3. Genotyping of SNPs

Venous blood (7 mL) was collected into tubes containing 50 mmol/L EDTA (disodium salt), the peripheral blood leukocytes were isolated, and genomic DNA was extracted from these cells with a DNA extraction kit (Genomix; Talent, Trieste, Italy). Genotypes of SNPs were determined at G&G Science (Fukushima, Japan) by a method that combines the polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probes with suspension array technology (Luminex, Austin, TX). Primers, probes, and other conditions for genotyping of SNPs are shown in Supplementary Table 1. Detailed genotyping methodology was described previously [8].

To evaluate the reproducibility of genotyping by suspension array technology in the present study, we selected DNA samples from 23 subjects and genotyped 95 polymorphisms by chip-based matrix-assisted laser desorption–ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry [9]. Only four of the total of 2185 genotypes determined by this approach differed from those identified by suspension array technology. We then determined these four discrepant genotypes by DNA sequencing with a fluorescence-based automated DNA sequencer after amplification and cloning of polymorphic regions. All four genotypes determined by DNA sequencing were identical to those determined by suspension array technology, demonstrating the high reproducibility of the latter approach in the present study. Although we did not genotype samples in duplicate, the overall call rate for genotyping was 99.2%.

2.4. Statistical analysis

Quantitative data were compared between subjects with ischemic stroke and controls by the unpaired Student's *t*-test. Categorical data were compared by the chi-square test. Allele frequencies were estimated by the gene counting method,

Table 1
Characteristics of the 6341 study subjects.

Characteristic	Subject panel A (n = 266)		Subject panel B (n = 4225)		Subject panel C (n = 1850)	
	Ischemic stroke	Controls	Ischemic stroke	Controls	Ischemic stroke	Controls
No. of subjects	131	135	790	3435	71	1779
Age (years)	65.9 ± 9.1 [*]	75.4 ± 4.3	69.4 ± 11.3 [*]	65.4 ± 11.2	72.2 ± 6.0	71.7 ± 5.5
Sex (male/female, %)	65.7/34.3 [†]	47.8/52.2	58.0/42.0 [*]	44.8/55.2	50.7/49.3	52.5/47.5
BMI (kg/m ²)	23.5 ± 3.5	22.6 ± 3.7	22.6 ± 4.2 [*]	23.4 ± 3.3	23.5 ± 2.8	23.2 ± 3.0
Current or former smoker (%)	13.0	10.3	31.3 [*]	22.6	36.6	37.3
Hypertension (%)	90.1 [†]	75.7	63.3 [*]	38.4	54.9	42.4
Diabetes mellitus (%)	48.1	37.5	34.4 [*]	13.0	9.9	7.7
Hypercholesterolemia (%)	57.3 [§]	40.4	25.4	24.6	25.4	22.1

Age and BMI values are means ± SD.

^{*} $P < 0.0001$ versus corresponding controls.

[†] $P = 0.0032$ versus corresponding controls.

[‡] $P = 0.0016$ versus corresponding controls.

[§] $P = 0.0059$ versus corresponding controls.

^{||} $P = 0.0383$ versus corresponding controls.

and the chi-square test was used to identify departure from Hardy–Weinberg equilibrium. Allele frequencies of SNPs were compared between subjects with ischemic stroke and controls by the chi-square test. Multivariable logistic regression analysis was performed with ischemic stroke as a dependent variable and independent variables including age, sex (0 = woman, 1 = man), body mass index (BMI), smoking status (0 = nonsmoker, 1 = smoker), the prevalence of hypertension, diabetes mellitus, and hypercholesterolemia (0 = no history of these conditions, 1 = positive history), and genotype of each SNP. Each genotype was assessed according to dominant (0 = wild-type homozygote, 1 = heterozygote = variant homozygote) and recessive (0 = wild-type homozygote = heterozygote, 1 = variant homozygote) genetic models, and the P value, odds ratio, and 95% confidence interval were calculated. The similar analysis was performed with ischemic stroke as a dependent variable and independent variables including covariates except genotypes. We also performed a stepwise forward selection procedure to examine the effects of genotypes as well as other covariates on ischemic stroke. The P levels for inclusion in and exclusion from the model were 0.25 and 0.1, respectively. In the stepwise forward selection procedure, each genotype was examined according to a dominant or recessive model on the basis of statistical significance in the multivariable logistic regression analysis. Unless indicated otherwise, a P value of < 0.05 was considered statistically significant. Statistical tests were performed with JMP Genomics version 3.2 software (SAS Institute, Cary, NC) and SNPalyze version 6 software (Dynacom, Yokohama, Japan).

3. Results

The characteristics of the 6341 subjects enrolled in the study are shown in Table 1. In subject panel A, the frequency of men and the prevalence of hypertension and hypercholesterolemia were greater, whereas age was younger, in subjects with ischemic stroke than in controls. In subject panel B, age, the frequency of men, and the prevalence of smoking, hypertension, and diabetes mellitus were greater, whereas BMI was smaller, in subjects with ischemic stroke than in controls. In subject panel C, the prevalence of hypertension was greater in subjects with ischemic stroke than in controls. Relations of conventional risk factors to ischemic stroke were examined in subject panels A, B, and C separately by multivariable logistic regression analysis with adjustment for covariates (Supplementary Table 2). Obesity was defined as a BMI of ≥ 25 kg/m² on the basis of the criteria for Japanese and other Asian populations [10]. In subject panel A, hypertension was a risk factor for, whereas age was protective against ischemic stroke because healthy elderly individuals were selected as controls. In subject panel B, age, male, hypertension, and diabetes mellitus were risk factors for, whereas obesity was protective against ischemic stroke. In subject panel C, age was a risk factor for this condition.

We examined the relation of 100 SNPs selected from the GWAS with SNP chips in subject panel A to ischemic stroke in 4131 individuals (705 subjects with ischemic stroke and 3426 controls) selected from subject panel B by the chi-square test (Supplementary Table 3). Three SNPs – rs1671021 of *LLGL2* ($P = 0.0196$ and 0.0052 for geno-

Table 2
Relation of four SNPs to ischemic stroke determined by the chi-square test in subject panel B.

Gene	SNP (dbSNP)	Ischemic stroke ^a	Controls ^a	P (genotype)	P (allele)
<i>CELSR1</i>	A → G (rs6007897)			0.0077	0.0082
	AA	750 (95.2)	3300 (97.1)		
	AG	38 (4.8)	100 (2.9)		
<i>CELSR1</i>	GG	0 (0)	0 (0)	0.0069	0.0074
	A → G (rs4044210)				
	AA	748 (94.9)	3294 (96.9)		
<i>LLGL2</i>	AG	40 (5.1)	106 (3.1)	0.0444	0.0142
	GG	0 (0)	0 (0)		
	T → C (rs1671021)				
<i>RUVBL2</i>	TT	615 (77.9)	2527 (73.6)	0.4351	0.2370
	TC	163 (20.6)	841 (24.5)		
	CC	12 (1.5)	67 (2.0)		
	C → T (rs1062708)				
<i>RUVBL2</i>	CC	246 (31.2)	1018 (29.9)	0.4351	0.2370
	CT	391 (49.6)	1662 (48.9)		
	TT	151 (19.2)	720 (21.2)		

^a Numbers in parentheses are percentages.