

201231010B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テーラーメイド研究

総合研究報告書

（平成22年度～平成24年度）

研究代表者 戸田 達史

神戸大学大学院医学研究科神経内科学

平成25（2013）年 4 月

目 次

I. 総合 総括研究報告	
孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テーラーメイド研究 -----	1
神戸大学大学院医学研究科神経内科	戸田 達史
II. 総合 分担研究報告	
1. 孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テーラーメイド研究 -----	7
神戸大学大学院医学研究科神経内科	戸田 達史
2. ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬・テーラーメイド研究-----	13
順天堂大学医学部脳神経内科	服部 信孝
3. パーキンソン病のテーラーメイド医療をめざして パーキンソン病の病型分類 に関する研究 -----	26
国立精神・神経医療研究センター病院	村田 美穂
4. ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬・テーラーメイド研究 ----	33
高松神経内科クリニック 院長	山本 光利
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	59

I. 総合 総括研究報告

孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テーラーメイド研究
研究代表者 戸田達史 神戸大学大学院医学研究科神経内科 教授

研究要旨

パーキンソン病 (PD) の感受性遺伝子を同定するため、患者約 1000 人、対照 2500 人について、50 万 SNP によるゲノムワイド関連解析を行い、Nat Genet の論文で示した上位 300SNP でなく有意な SNP 上位 9000 個を抽出した。これら SNP について、別の患者集団約 1000 検体で、再現研究を行い、ゲノムワイド水準で有意な遺伝子を 1 個発見した。

近親婚例 11 検体について、SNP array をもちいたホモ接合性マッピングを行い、3 検体で重複して、ホモ接合性をみとめる領域を、3 領域抽出した。

エクソンに存在する Rare ながら強い遺伝子リスクを発見するため、脂質代謝カスケードの遺伝子、および、パーキンソニズムを部分症として示す疾患の遺伝子、の原因変異について検討したが、有意な関連を示す結果を得なかった。またなるべく多くの孤発例のエクソームシーケンスを行い、新規の rare variant の発見を目指した。

α-synuclein (SNCA) は孤発性パーキンソン病 (PD) の感受性遺伝子であるが、多型が疾患感受性に関与する機序については未だに解明されていない。我々は、*SNCA* 3' -flanking SNP rs356219 において、*in vitro* で allele 特異的な効果を見だし、protective allele に結合する転写因子 YY1 を同定した。rs356219 は ncRNA/*SNCA* の発現調節を介して PD 感受性に関与する可能性がある。

稀な遺伝性 PD 家系のゲノム解析を実施し原因遺伝子を単離することでテーラーメイド医療の基盤となる情報を得ることを目的とした。その結果、複数の遺伝性 PD 家系において詳細な連鎖解析と全エクソン解析を組み合わせることで、複数の遺伝性 PD 原因遺伝子を同時に単離可能である事が明らかとなった。

PD を対象に長期継続的な臨床情報評価収集システムを構築した。PD 疾患感受性遺伝子の検索で PD の多様性の機序を解明する手段として、うつ、RBD, 嗅覚障害など先行しうる症状および、姿勢異常、衝動性障害はよい指標となると考えた。

パーキンソン病における姿勢異常と薬剤の関連は明確でないが、明らかに薬剤誘発例が存在しているため、薬理作用の検討や遺伝的背景等を含めての調査が必要である。MoCA は MMSE では十分に明らかに出来ない異なった大脳皮質の認知機能を検出できる可能性があると考えられた、MoCA の有用性の検証がさらに多数例で行われる必要がある。

研究分担者

服部 信孝 順天堂大学脳神経内科・主任教授
村田 美穂 国立精神・神経センター病院・部長
山本 光利 高松神経内科クリニック・院長
(前 香川県立中央病院神経内科・主任部長)

A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) は、中高年に発症し、ドパミンニューロンの変性により振戦、筋固縮など運動障害を主症状とするアルツハイマ

一病とともに多い神経変性疾患であり、我が国には現在約14万人以上の患者がいるが、加齢に伴い発症率が増すため今後の患者の増加が予想される。神経変性疾患としては唯一治療薬が豊富であるが、多くの薬剤はドパミンの補充が主体であり根本的な治療ではなく、真の原因や発症の引き金を突きとめることが重要である。

PDにおける遺伝子の重要性は意見が分かれていたが、近年になって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、他などから、多因子遺伝性疾患と認知されるようになった。家族性PDでは α -synucleinやparkin遺伝子が発見されたが、患者の大部分を占める孤発性PDでは疾患感受性遺伝子はほとんど証明されていない。

一方で孤発例では、精神症状を起こす群、抗パ剤で副作用を起こしやすい群など、その経過・中心となる症状・薬剤の効果は患者により異なり、このことは従来PDとして一括して行われていた遺伝解析に階層化を可能にしそれには卓越した専門家の目が必要であり、また遺伝子多型によって患者個人個人に必要な薬剤を必要な量投与するテーラーメイド医療が可能であることを意味する。

本研究では、1)全ゲノム関連解析を行い、疾患感受性遺伝子を数10個同定する、2)超高速シーケンサーを用いたメンデル型原因遺伝子、Rare variantの同定を目指す、3)同時に日本で発見された抗パーキンソン薬ゾニサミドを中心に抗パーキンソン薬の反応性、副作用とSNPの関連を明らかにしテーラーメイド治療法を確立する、4)同定された疾患感受性遺伝子の機能解析、蛋白構造解析などに基づく網羅的薬剤候補化合物探索と日本発

のパーキンソン病創薬、を行う。

B. 研究方法 C. 研究結果

①50万 SNP chipによる全ゲノム関連解析(戸田)

パーキンソン病(PD)の感受性遺伝子を同定するため、患者約1000人、対照2500人について、50万SNPによるゲノムワイド関連解析を行い、Nat Genetの論文で示した上位300SNPでなく有意なSNP上位9000個を抽出した。これらSNPについて、別の患者集団約1000検体で、再現研究を行い、ゲノムワイド水準で有意な遺伝子を1個発見した。

②メンデル遺伝性PDについて(戸田)

パーキンソン病の近親婚例11検体について、SNP arrayをもちいた、SNP genotypingを行い、genotypingが終了、genotyping精度は良好であった。さらに、ホモ接合性マッピングを行い、3検体で重複して、ホモ接合性をみとめる領域を、3領域抽出した。

③rare variantの発見をめざした脂質代謝異常症やパーキンソニズムのリシークエンスとエクソームシーケンシング(戸田)

パーキンソン病の、エクソンに存在するRareながら強い遺伝子リスクを発見するため、候補遺伝子のエクソームのサンガーシーケンシングによる関連解析をおこなった。脂質代謝カスケードの遺伝子、および、パーキンソニズムを部分症として示す疾患の遺伝子、の原因変異についてサンガーシーケンシングで検討したが、有意な関連を示す結果を得なかった。強いRare Variantリスクは、家系に濃縮されていると思われるので、多発家系について、次世代シーケンサーによるエクソームシーケンシング(全エクソン塩基配列の解読)を行う必要がある。またなるべく多くの孤発例のエクソームシーク

エンスを行い、新規の rare variant の発見を目指した。

④ α -synuclein 3' -flanking SNP のアレル特異的な転写因子の結合 (戸田)

α -synuclein (*SNCA*) は孤発性パーキンソン病 (PD) の感受性遺伝子であるが、多型が疾患感受性に関与する機序については未だに解明されていない。我々は、*SNCA* 3' -flanking SNP rs356219 において、in vitro で allele 特異的な効果を見だし、protective allele に結合する転写因子 YY1 を同定した。本研究では、この転写因子 YY1 を SH-SY5Y 細胞に強制発現して *SNCA* および *SNCA* 下流に存在する antisense noncoding RNA (ncRNA) の発現を real-time RT-PCR で解析した。その結果、*SNCA* 発現レベルはほとんど変化しないが、ncRNA 発現レベルは数十倍に上昇した。さらに剖検脳 (前頭葉: Lewy body 群 21 例、対照群 18 例) における *SNCA*、ncRNA の発現レベルと rs356219 genotype との関連を調べた。rs356219 の disease allele が増えるほど *SNCA* 発現レベルは上昇する傾向を示したが、ncRNA については allele との関連性は殆ど見られなかった。*SNCA* と ncRNA の coexpression は、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

⑤ 原因遺伝子が未知の常染色体劣性晩発性 PD 家系遺伝子 (服部)

常染色体劣性遺伝性 PD 家系において、患者およびその家族の末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出し連鎖解析を行い、原因遺伝子の存在する領域を同定した。この領域に存在する遺伝子につき塩基配列を決定すべく、エクソーム解析を行った。常染色体劣性遺伝性 PD 家系での連鎖解析により、新たな候補遺伝子領域を複数同定した。エクソーム解析の結果に基づき、劣性

遺伝性 PD 家系から、病的変異の存在が疑われる約 20 個の候補原因遺伝子を同定した。

ゲノムワイド SNPs Array による連鎖解析と全エクソン解析を行うことで、PD の原因遺伝子を同時に複数単離することが可能である。本研究の対象家系の原因遺伝子単離に成功すれば、PD のテーラーメイド医療およびゲノム創薬の基盤となる標的遺伝子を同定する事が可能である。

⑥ パーキンソン病の病型分類に関する研究 (村田)

パーキンソン病の遺伝情報を基にしたテーラーメイド医療を目標とした創薬のために、十分な臨床情報を伴う患者 DNA 収集と、その臨床情報による層別分類をするための指標を確立することを目標とした。1 年目はパーキンソン病およびその関連疾患患者の長期継続的な臨床情報を評価収集するためのシステムを構築し、2, 3 年目はそのシステムに沿って患者情報を収集した。さらに 2 年目は層別分類の指標として非運動症状による分類について検討し、非運動症状のうち、うつ、REM 睡眠行動障害 (RBD)、嗅覚障害については①PD 運動症状発症前より存在、②運動症状発症後 5 年以内に発症、③運動症状発症 5 年目以降に発症の 3 群に分けて検討すべきことを明らかにした。さらに、3 年目は非運動症状のうちとくに衝動性障害 (ICD) に注目し、スクリーニング質問紙法の QUIP (Questionnaire for Impulsive-Compulsive Disorders in Parkinson's disease) の日本語版を作成し、構造化面接により妥当性を検証した。何等かの ICD は 27% に認め、層別解析の指標の一つになると考えられた。

⑦ テーラーメイド医療の基礎となる PD 患者の臨床症状 (精神病、姿勢異常) の検討 (山本)

パーキンソン病 (PD) は複数の遺伝的素因と環境因子が複雑に関与し発症すると考えられており、PD の遺伝的素因を見出すことはテーラード医療を実現するために重要である。本研究はテーラード医療の基礎となる PD 患者の臨床症状 (精神病、姿勢異常) の頻度と、認知機能障害における検査法の検討は、PD の病態との関連の解析を行いゲノム解析等に関連させる基礎データを集積した。

1) 「パーキンソン病治療したにおける薬物性精神障害発現予知のための SNP 解析」:

パイロット研究では 60 例のパーキンソン病患者で、幻覚妄想の頻度では幻視は 100% の患者で最低 1 度は経験していたが、現在も持続している患者は 23% であった。頻度とその程度に関しては多数症例での検討が必要である。

2) 「ドパミンアゴニストと姿勢異常の検討」: PD 患者で生活上支障となる程度の姿勢異常を示した患者は約 15% であり、重症ほど割合は増加した。また脊椎の圧迫骨折が危険因子としてあげられた。薬剤による誘発、悪化例が 3 例認められた。

3) 「パーキンソン病における認知障害検出方法の検討 (MoCA, MMSE の比較)」:

調査対象 PD 患者数は 145 例であった (男性 61 名、女性 84 名、平均年齢 67.4 ± 7.8 歳)。MoCA 平均得点 = 23.7 ± 4.0, MMSE 平均得点 = 28.5 ± 2.3 であり MoCA の点数は MMSE と比較して有意に低かった。MoCA と MMSE の間には有意な正の相関を認めた ($r=0.70$, $p<0.01$)。A 群 (MoCA, MMSE 共に 26 点以上)、B 群 (MoCA = 26 点未満, MMSE = 26 点以上) と区分すると、以下の下位項目の得点は trail making test ($p<0.05$), number counting ($p<0.05$), phonological word recall ($p<0.001$), similarity ($p<0.001$) で A 群よりも B 群の方が有意に低得点であった。連続引き算では両群での差はなかった。

(倫理面への配慮)

検体収集に際しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、文章によるインフォームドコンセントを得た。

D. 考察

全ゲノム関連解析では今後、9000SNP の統計学的検討を行い、PD 感受性 SNP を同定、機能解析へと進める。またシンガポール、中国、韓国 の GWAS グループとアジアメタ GWAS を行う。近親婚症例では、今後、これらホモ領域を中心に着目し、エクソームシーケンスと合わせて、疾患原因変異を同定する。

本研究で検討した脂質代謝異常症のカスケードに関わる遺伝子群 714 個の変異および多型においては、アレル頻度に患者対照間で有意差を認めず、PD リスクは検出されなかった。このことは、本研究の 13 遺伝子が、PD リスクではないことを示唆しているのかもしれない。しかし一方で、本研究においては、既知の変異および多型のみしか検討できておらず、これら遺伝子における全く新規の変異が PD リスクとなっている可能性は否定できない。

メンデル遺伝型 PD の *SNCA* 遺伝子重複家系では、重複回数が増えると *SNCA* の発現が上昇し臨床症状も重篤になることが報告されている。従って、孤発性 PD においても *SNCA* の高発現が疾患感受性をもたらすと考えられている。以上のことから、rs356219 がアレル特異的に結合する転写因子を介して *SNCA* の転写レベルを調節している可能性が示唆される。SH-SY5Y の実験結果と、既報告のルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイの結果を合わせると、転写因子が rs356219 の protective allele に結合して ncRNA の発現を刺激したと推測される。剖検脳において ncRNA 発現レベルと genotype との関連性が見いだせなかった点については、剖検脳では転写因子を強制発現するような動的な

変化を調べることが困難であり、そのため allele との関連性が検出できない可能性があると考えられる。antisense ncRNA に関する最近の知見によると (Nat Rev Mol Cell Biol 10:637;2009)、今回解析対象とした ncRNA が *SNCA* 発現に何らかの影響を及ぼす可能性は十分にある。剖検脳における *SNCA* と ncRNA の coexpression は、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

本研究では同一地域出身で、臨床的・遺伝学的に類似した 2 家系について同一祖先であると仮説し分子遺伝学的解析を実施した。しかしながらゲノムワイド多点連鎖解析の結果、この 2 家系は同一祖先ではない事が明らかになった。このことは、本研究で行った解析手法をもちいることで、複数家系の原因遺伝子を同時に単離可能であることを示唆する。PD は複数の遺伝的素因と環境因子が複合的に関与し発症すると考えられている。本研究では原因遺伝子単離には至らなかったが、テーラーメイド医療の標的となる遺伝子の単離を目指す本研究において重要な知見を得た。対象家系の原因遺伝子を単離するまでには至っていないが、今後詳細な連鎖解析結果と全エクソン解析結果を統合し検討することで、対象家系の原因遺伝子を単離し、テーラーメイド医療への基盤となる遺伝子を明らかにする。

我々はこれまで、パーキンソン病にはいくつかの病型があることを主張してきたが、最近ようやく国際的にもパーキンソン病の病型が注目されるようになってきた。パーキンソン病のように経過の長い疾患においては、横断的な所見のみならず経過を加味した診察及び検査所見がその病態の把握、患者の特性把握に極めて重要である。本研究ではまず長期的な臨床評価システムの構築を行い、詳細な臨床情報のある DNA 収集を進めた。さらに新たな有用な病型分

類法として、薬物の影響を受けにくい非運動症状に注目した。RBD, うつは PD の発症に先行する症状として知られており、これと SNP との関連を検索することは PD の多様性の機序を考えるうえで極めて有用である。ただし、これらの症状は発症後に出現することもあることから、①病歴上 PD 発症前に存在、②PD 発症後 5 年以内に存在、③PD 発症 5 年以上経過しても存在しない、の 3 種類に分類して検討すべきと考えた。患者数としては、どの時期かはともかくとして全患者数の 30%程度は存在するため、十分評価、分類に耐えられると考えられた。比較的薬剤効果の少ない症候は、それぞれ 10%程度の有病率であった。しかし、PD の有病率を考慮すると十分評価検討に耐えうる人数と考えている。ICD については、PD 以外の病的賭博や、薬物中毒の感受性遺伝子との関連が興味深いと考えられた。QUIP の感度が十分でなかった理由としては、質問紙の文章の理解不足、患者の病識不足、隠ぺい特性などが考えられ、わが国では自記式ではなく、質問紙法の運用に臨床心理士を入れるべきと考えられた。

PD における症候は多彩である。これらの発現頻度、重症度、治療薬剤との関連を調査して遺伝子解析を勧めていくことはテーラーメイド医療の実現に重要である。本研究では精神病、姿勢異常、認知機能障害の検出は重要である。本研究はプレリミナリーな研究であるが精神病の高頻度発現、姿勢異常の頻度、認知期の障害の検出方法として MoCA の有用性とその使用上の注意点が明らかにされた。この成果を基にさらに多数例での検証が必要と考えられた。

E. 結論

α -synuclein 3' -flanking SNP はアレル特異的な転写因子の結合を介してパーキンソン病感受性に影響することを示した。rs356219 は ncRNA/*SNCA* の発現調節を介して PD 感受性に関与する可能性がある。また全ゲノム関連解析第

2 弾、アジアメタ GWAS やエクソーム解析も進行中である。

脂質代謝異常症のカスケードに関わる遺伝子群にリスクが検出されなかったことは、*GBA* の PD リスクが、脂質代謝カスケードの異常に起因するのではなく、*GBA* の変異による活性低下がもたらすグルコシルセラミドの蓄積こそが、PD リスクの原因であるかもしれない。

ゲノムワイド SNPs Array による連鎖解析と全エクソン解析を行うことで、PD の原因遺伝子を同時に複数単離することが可能である。本研究の対象家系の原因遺伝子単離に成功すれば、PD のテーラーメイド医療およびゲノム創薬の基盤となる標的遺伝子を同定する事が可能である。

PD を対象に長期継続的な臨床情報評価収集システムを構築した。PD 疾患感受性遺伝子の検索で PD の多様性の機序を解明する手段として、うつ、RBD、嗅覚障害など先行しうる症状および、姿勢異常、衝動性障害はよい指標となると考えた。

パーキンソン病における姿勢異常と薬剤の

関連は明確でないが、明らかに薬剤誘発例が存在しているので、薬理作用の検討や遺伝的背景等を含めての調査が必要である。MoCA は MMSE では十分に明らかに出来ない異なった大脳皮質の認知機能を検出できる可能性があると考えられた、MoCA の有用性の検証がさらに多数例で行われる必要がある。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
(研究分担者の項参照)

2. 学会発表

(研究分担者の項参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

II. 総合 分担研究報告

孤発性パーキンソン病遺伝子同定と創薬・テラーメード研究
研究代表者 戸田達史 神戸大学大学院医学研究科神経内科 教授

研究要旨

パーキンソン病 (PD) の感受性遺伝子を同定するため、患者約 1000 人、対照 2500 人について、50 万 SNP によるゲノムワイド関連解析を行い、Nat Genet の論文で示した上位 300SNP でなく有意な SNP 上位 9000 個を抽出した。これら SNP について、別の患者集団約 1000 検体で、再現研究を行い、ゲノムワイド水準で有意な遺伝子を 1 個発見した。

近親婚例 11 検体について、SNP array をもちいたホモ接合性マッピングを行い、3 検体で重複して、ホモ接合性をみとめる領域を、3 領域抽出した。

パーキンソン病の、エクソンに存在する Rare ながら強い遺伝子リスクを発見するため、候補遺伝子のエクソンのサンガーシーケンスによる関連解析をおこなった。脂質代謝カスケードの遺伝子、および、パーキンソニズムを部分症として示す疾患の遺伝子、の原因変異についてサンガーシーケンスで検討したが、有意な関連を示す結果を得なかった。強い Rare Variant リスクは、家系に濃縮されていると思われるので、多発家系について、次世代シーケンサーによるエクソームシーケンス（全エクソン塩基配列の解読）を行う必要がある。またなるべく多くの孤発例のエクソームシーケンスを行い、新規の rare variant の発見を目指した。

α-synuclein (SNCA) は孤発性パーキンソン病 (PD) の感受性遺伝子であるが、多型が疾患感受性に関与する機序については未だに解明されていない。我々は、*SNCA* 3' -flanking SNP rs356219 において、*in vitro* で allele 特異的な効果を見だし、protective allele に結合する転写因子 YY1 を同定した。本研究では、この転写因子 YY1 を SH-SY5Y 細胞に強制発現して *SNCA* および *SNCA* 下流に存在する antisense noncoding RNA (ncRNA) の発現を real-time RT-PCR で解析した。その結果、*SNCA* 発現レベルはほとんど変化しないが、ncRNA 発現レベルは数十倍に上昇した。さらに剖検脳(前頭葉:Lewy body 群 21 例、対照群 18 例)における *SNCA*, ncRNA の発現レベルと rs356219 genotype との関連を調べた。rs356219 の disease allele が増えるほど *SNCA* 発現レベルは上昇する傾向を示したが、ncRNA については allele との関連性は殆ど見られなかった。*SNCA* と ncRNA の coexpression は、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) 患者の 90%以上は孤発性発症であるが、10%は家族性に発症する。家族性 PD 遺伝子としては、少なくとも 6 つの遺伝

子が見つかっている。孤発性 PD のリスク遺伝子 (感受性遺伝子) は、*α-synuclein*, *LRRK2*, *PARK16*, *BST1*, *Tau*, *GBA* など確立されているが、これだけでは本症の遺伝背景は説明できず、ま

だ未知の PD 遺伝子が存在する。

本研究では、1) 全ゲノム関連解析を行い、疾患感受性遺伝子を数10個同定する、2) 超高速シーケンサーを用いたメンデル型原因遺伝子、Rare variant の同定を目指す、3) 同時に日本で発見された抗パーキンソン薬ゾニサミドを中心に抗パーキンソン薬の反応性、副作用と SNP の関連を明らかにしテラーメイド治療法を確立する、4) 同定された疾患感受性遺伝子の機能解析、蛋白構造解析などに基づく網羅的薬剤候補化合物探索と日本発のパーキンソン病創薬、を目的とする。

脂質代謝異常症の1つである Gaucher 病 (常染色体劣性遺伝性) 家系内に PD 患者が多いことから、ユダヤ人の PD 患者で、Gaucher 病遺伝子 *GBA* の変異のヘテロ保因者が有意に多く、*GBA* が PD のリスク遺伝子となることが報告された。また、Gaucher 病患者での PD 症状 (パーキンソニズム) が確認されている。そこで、本研究において、他の脂質代謝異常症やパーキンソニズムを部分症状としてきたす疾患の原因遺伝子が、PD のリスク遺伝子となるかを検討した。

α-synuclein (SNCA) は孤発性パーキンソン病 (PD) の確実な感受性遺伝子であるが (Mizuta

et al., Hum Mol Genet, 2006; Satake et al., Nat Genet, 2009)、多型が疾患感受性に関与する機序については未だに解明されていない。我々は、*SNCA* 3' -flanking SNP rs356219 において、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイで allele 特異的な効果を見だし、protective allele に結合する転写因子を同定した (平成22年度本学会議)。本研究は、我々の得た新しい知見をもとに、rs356219 の PD 感受性への機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

- 1、50万 SNP chip による全ゲノム関連解析
患者約 1000 人、対照 2500 人について、50万 SNP によるゲノムワイド関連解析を行い、Nat Genet の論文で示した上位300SNP でなく有意な SNP 上位 9000 個を抽出した。
- 2、メンデル遺伝性 PD について、パーキンソン病の近親婚例 11 検体について、SNP array をもちいた、SNP genotyping を行った。
- 3、メンデル遺伝病である、脂質代謝異常症 (GM1-gangliosidosis, Tay Sacks 病, Sandhoff 病, Fabry 病, Metachromatic leukodystrophy, Krabbe 病, Niemann-Pick 病, Adrenoleukodystrophy) と、パーキンソニズムを示す疾患

表1.PD発症の疾患リスクとなるか検討した遺伝子およびエクソン

疾患	遺伝子名	検索したエクソン	病原アレルのカバー率*
脂質代謝異常症			
GM1-gangliosidosis	<i>GLB1</i>	2 (10)	48
Tay-Sacks	<i>HEXA</i>	6 (10)	85
Sandhoff	<i>HEXB</i>	7 (2), 11 (6), 13 (5)	29**
Fabry	<i>GLA</i>	1 (40), 2 (37), 3 (49), 4 (13), 5 (50), 6 (58), 7 (46)	82
Metachromatic leukodystrophy	<i>ARSA</i>	2 (5), 4 (12), 8 (15)	61
Krabbe	<i>GALC</i>	2 (5), 7 (7), 8 (7), 16 (2), 17 (5)	69
Niemann-Pick	<i>NPC1</i>	9 (11)	40
Adrenoleukodystrophy	<i>ABCD1</i>	1 (118), 5 (4)	39
パーキンソニズムを部分症状としてもつ疾患			
Wilson	<i>ATP7B</i>	8 (36), 13 (29)	60
Creutzfeldt-Jacob	<i>PRNP</i>	2 (58)	100
FTDP-17	<i>MAPT</i>	1 (5), 9 (11), 10 (19), 11 (4), 12 (9), 13 (5)	100**
Hallervorden-Spatz	<i>PANK2</i>	2 (25), 3 (17), 6 (5)	91**
Choreacanthocytosis	<i>CHAC</i>	34 (2), 37 (4)	31

カッコ内は、HGMDおよびdbSNPに記載されている変異および多型の数をしめす

* 各疾患患者において、検索したエクソンの変異に含まれる病原変異の割合をしめす

** 非日本人の病原変異の頻度データを参照

(Wilson 病, Creutzfeldt-Jacob 病, FTDP-17, Hallervorden-Spatz 病, Choreacanthocytosis) の原因遺伝子について、文献、HGMD データベース、および dbSNP データベースを参考に、各疾患の患者における頻度の高い変異を含む 34 個のエクソンと、これらに含まれる 714 個の既知の病原変異および多型を抽出した (表 1)。

これらのエクソンおよび変異・多型に関して、PD 患者 541 例 (孤発性発症 500 例, 家族性発症 41 家系 41 例) の遺伝子をリシーケンスした。シーケンスには、3730xL (ABI 社) を用い、標準的なゲノムシーケンスを行った。シーケンスデータからの変異・多型情報の抽出には、Variant Reporter ソフトウェア version1.1 (ABI 社) を用いた。さらに、PD 群で検出された変異や多型に関して、dbSNP のアレル頻度情報やアミノ酸変化等を考慮し、対照群での検討が必要と判断された変異・多型に関しては、対照群 500 検体でのリシーケンスを行い、PD 群と対照群間について χ^2 検定を行った。

4、rs356219 に結合する転写因子を SH-SY5Y 細胞に強制発現して *SNCA* mRNA の発現を定量する。なお、rs356219 の位置は、最近データベースに登録された antisense noncoding RNA の intron にも相当するので、この ncRNA についても同様の解析を行った。剖検脳 (前頭葉: Lewy body 群 21 例、対照群 18 例) における *SNCA*、ncRNA の発現レベルを real-time RT-PCR で定量し、rs356219 の genotype との関連を調べた。

(倫理面への配慮)

なお、ヒト遺伝子解析については、倫理委員会の承認を得ており、プライバシーの保護、人権擁護上等の問題について十分に配慮し、個人情報情報の保管体制を整え、文書でインフォームドコンセントの得られた試料を用い、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」等関係法令を遵守した。

C. 研究結果

1、50万 SNP chip による全ゲノム関連解析
患者約 1000 人、対照 2500 人について、50 万 SNP によるゲノムワイド関連解析を行い、Nat Genet の論文で示した上位 300SNP でなく有意な SNP 上位 9000 個を抽出した。これら SNP について、別の患者集団約 1000 検体で、再現研究を行っている。SNP 型 genotyping が終了し、genotyping 精度は良好であった。うちゲノムワイド水準で有意な遺伝子を 1 個発見した。

2、メンデル遺伝性 PD について

パーキンソン病の近親婚例 11 検体について、SNP array をもちいた、SNP genotyping を行い、genotyping が終了、genotyping 精度は良好であった。さらに、ホモ接合性マッピングを行い、3 検体で重複して、ホモ接合性をみとめる領域を、3 領域抽出した。

3、脂質代謝異常症やパーキンソニズムのリシーケンス

PD 群でのリシーケンスの成功率は、平均 94% (80-98) であった。PD 患者 541 検体のリシーケンスで、下記の 7 つの遺伝子 (表 2)、*HEXB* (rs28942073/CM952224, アレル頻度 0.00754), *GLA* (CM920310, 0.00760; CM940850, 0.00127), *ARSA* (CM940112, 0.00100), *GALC* (CM970569, 0.00533), *ATP7B* (rs7325983, 0.02201), *PRNP* (rs1799990/CM890104, 0.02935; CM930660, 0.00115; rs1800014/CM984155, 0.05059), *MAPT* (rs11568305, 0.01547; rs63751395, 0.00407) において、PD 群で既知の変異および多型が検出された。一方、残りの 6 つの遺伝子、*GLB1*, *HEXA*, *NPC1*, *ABCD1*, *PANK2*, *CHAC* では、検出されなかった。

CM940112 は、検出された既知の変異および多型がわずか 1 つであったので、これ以上検討し

表2. リシークエンスによって検出された病原変異および多型

疾患	遺伝子	エクソン	dbSNP・HGMD No	種類	パーキンソン病群			対照群			P値
					変異・多型の アレルカウント	全アレル カウント	変異・多型の アレル頻度	変異・多型の アレルカウント	全アレル カウント	変異・多型の アレル頻度	
Sandhoff	<i>HEXB</i>	11	rs28942073/CM952224	Pro417Leu	7	928	0.00754	7	888	0.00788	0.934
Fabry	<i>GLA</i>	2	CM920310 CM940850	Glu66Gln Arg112His	6	789	0.00760	6	686	0.00875	0.808
					1	790	0.00127	0	663	0.00000	0.359
Matachromatic leukodystrophy	<i>ARSA</i>	8	CM940112	Thr409Ile	1	996	0.00100	-	-	-	-
Krabbe	<i>GALC</i>	16	CM970569	Leu618Ser	5	938	0.00533	12	958	0.01255	0.097
Wilson	<i>ATP7B</i>	13	rs7325983	junction	21	954	0.02201	-	-	-	0.990*
Creutzfeldt-Jacob	<i>PRNP</i>	2	rs1799990/CM890104	Met129Val	27	886	0.02935	10	646	0.01548	0.059
			CM930660	Val180Ile	1	872	0.00115	2	784	0.00255	0.502
			rs1800014/CM984155	Glu219Lys	43	850	0.05059	29	800	0.03625	0.154
FTDP-17	<i>MAPT</i>	9 10	rs11568305	synonymous	16	1034	0.01547	-	-	-	-
			rs63751395	synonymous	4	984	0.00407	-	-	-	-

* 対照群は、dbSNPに公表されている一般日本人集団のデータを参照し検定した

なかった。rs7325983 は、PD 群のアレル頻度と dbSNP に公表されている一般日本人のアレル頻度 (0.022) の間に、有意差が認められなかった ($P=0.990$)。rs11568305 および rs63751395 は、同義置換であったので、病原性は低いと考えた。

そこで、これら以外の rs28942073/CM952224, CM920310, CM940850, CM970569, rs1799990/CM890104, CM930660, rs1800014/CM984155 について、対照群 500 検体をリシークエンスしたところ、対照群でのアレル頻度は、それぞれ 0.00788, 0.00875, 0.00000, 0.01255, 0.01548, 0.00255, 0.03625 であった。アレル頻度について、患者対照群間で統計学的検討を行ったところ、有意水準は、それぞれ、 $P=0.934$, 0.808, 0.359, 0.097, 0.059, 0.502, 0.154 であった。

4. α -synuclein 3' -flanking SNP のアレル特異的な転写因子の結合

我々およびドイツからの関連解析の報告を比較し、アジア人とヨーロッパ人に共通な PD 関連 *SNCA* SNP を選出した。これらの SNP に対して SH-SY5Y 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイを行った。両アッセイでアレル間の違いが明らかにみられた SNP については、アレル結合蛋白を DNA アフィニティービーズで精製し、質量分析で同定した。解析した 4 つの SNPs のうち rs356219 の

protective allele におけるルシフェラーゼ活性は disease allele の約 1.6 倍に有意に増加していた。さらに、ゲルシフトアッセイでは、rs356219 の protective allele に特異的に結合する核蛋白の存在が示され、転写因子 YY1 であることが同定された。

我々が同定した rs356219 結合転写因子 YY1 の強制発現により、SH-SY5Y における *SNCA* 発現レベルはほとんど変化しなかったが、*SNCA* 下流の ncRNA 発現レベルは数十倍に上昇した。剖検脳においては、rs356219 の disease allele が増えるほど *SNCA* 発現レベルは上昇する傾向を示したが、ncRNA については allele との関連性は殆ど見られなかった。しかしながら、*SNCA* と ncRNA の発現レベルは強い正の相関を示した。

5. エクソームシークエンス

家族性パーキンソン病の研究を更に発展させるべく、既知の原因遺伝子変異を見つけていない、さらに 50 家系以上のパーキンソン病家族例を、次世代シーケンサーでエクソーム配列を解析し、新規のメンデル遺伝性パーキンソン病原因遺伝子を発見することを行った。またパーキンソン病において rare variant はリスク遺伝子として重要な位置を占められるため、なるべく多くの孤発例のエクソームシークエンスを行い、新規の rare variant の発見を目指した。

D. 考察

全ゲノム関連解析では今後、9000SNP の統計学的検討を行い、PD 感受性 SNP を同定、機能解析へと進める。またシンガポール、中国、韓国の GWAS グループとアジアメタ GWAS を行う。近親婚症例では、今後、これらホモ領域を中心に着目し、エクソームシーケンスと合わせて、疾患原因変異を同定する。

メンデル遺伝型 PD の *SNCA* 遺伝子重複家系では、重複回数が増えると *SNCA* の発現が上昇し臨床症状も重篤になることが報告されている。従って、孤発性 PD においても *SNCA* の高発現が疾患感受性をもたらすと考えられている。以上のことから、rs356219 がアレル特異的に結合する転写因子を介して *SNCA* の転写レベルを調節している可能性が示唆される。

本研究で検討した脂質代謝異常症のカスケードに関わる遺伝子群 714 個の変異および多型においては、アレル頻度に患者対照間で有意差を認めず、PD リスクは検出されなかった。このことは、本研究の 13 遺伝子が、PD リスクではないことを示唆しているのかもしれない。しかし一方で、本研究においては、既知の変異および多型のみしか検討できておらず、これら遺伝子における全く新規の変異が PD リスクとなっている可能性は否定できない。

SH-SY5Y の実験結果と、既報告のルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイの結果を合わせると、転写因子が rs356219 の protective allele に結合して ncRNA の発現を刺激したと推測される。剖検脳において ncRNA 発現レベルと genotype との関連性が見いだせなかった点については、剖検脳では転写因子を強制発現するような動的な変化を調べるのが困難であり、そのため allele との関連性が検出できない可能性があると考えられる。antisense ncRNA に関する最近の知見によると (Nat Rev Mol Cell

Biol 10:637;2009)、今回解析対象とした ncRNA が *SNCA* 発現に何らかの影響を及ぼす可能性は十分にある。剖検脳における *SNCA* と ncRNA の coexpression は、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

E. 結論

α -synuclein 3' -flanking SNP はアレル特異的な転写因子の結合を介してパーキンソン病感受性に影響することを示した。また全ゲノム関連解析第 2 弾、アジアメタ GWAS やエクソーム解析も進行中である。

脂質代謝異常症のカスケードに関わる遺伝子群にリスクが検出されなかったことは、*GBA* の PD リスクが、脂質代謝カスケードの異常に起因するのではなく、*GBA* の変異による活性低下がもたらすグルコシルセラミドの蓄積こそが、PD リスクの原因であるかもしれない。

rs356219 は ncRNA/*SNCA* の発現調節を介して PD 感受性に関与する可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- ・Tan EK et al, Analysis of GWAS-linked loci in Parkinson disease reaffirms PARK16 as a susceptibility locus. *Neurology* 75:508-512, 2010
- ・Sun H et al, Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. *J Hum Genet* 56: 330-334, 2011
- ・Taniguchi-Ikeda M et al, Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478:127-131, 2011
- ・Sharma M et al, Role of sepiapterin reductase gene at the PARK3 locus in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 32:2108. e1-5, 2011

- ・ Kuga A et al, Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice. *Hum Mol Genet* 20:2975-2983, 2011
- ・ Chihara N et al, Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci* 108:3701-3706, 2011
- ・ Sun H et al, Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. *J Hum Genet* 56:330-334, 2011
- ・ Kruger R et al, A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 32:548. e9-548. e18, 2011
- ・ Sharma M, Hattori N, Murata M, Toda T et al (GEOPD consortium), A multi-centre clinico-genetic analysis of the VPS35 gene in Parkinson disease indicates reduced penetrance for disease-associated variants. *J Med Genet* 49:721-726, 2012
- ・ Sharma M, Toda T et al (GEOPD consortium), Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. *Neurology* 79:659-667, 2012
- ・ Lill CM, Satake W, Toda T et al, Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet* 8:e1002548, 2012
- ・ Mizuta I, Satake W, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T, et al. YY1 binds to α -synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. *J Hum Genet* 58: 711-719, 2013

2. 学会発表

日本人類遺伝学会第55回大会

日本神経学会第51回総会

The American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting

日本人類遺伝学会第56回大会

日本神経学会第52回総会

The American Society of Human Genetics 61th Annual Meeting

日本人類遺伝学会第57回大会

G. 知的財産権の出願・登録状況

発明者：戸田達史

パーキンソン病発症リスクマーカー

出願番号：特願 2010-112507

出願日：平成 22 年 5 月 14 日

ゲノム解析によるパーキンソン病遺伝子同定と創薬・テーラーメイド研究
研究分担者 服部 信孝 順天堂大学 脳神経内科 教授

研究要旨

パーキンソン病 (PD) は複数の遺伝的素因と環境因子が複雑に関与し発症すると考えられており、PD の遺伝的素因を見出すことはテーラーメイド医療を実現するために重要である。本研究は稀な遺伝性 PD 家系のゲノム解析を実施し原因遺伝子を単離することでテーラーメイド医療の基盤となる情報を得ることを目的とした。その結果、複数の遺伝性 PD 家系において詳細な連鎖解析と全エクソン解析を組み合わせることで、複数の遺伝性 PD 原因遺伝子を同時に単離可能である事が明らかとなった。

A.研究目的

パーキンソン病 (PD) は多くの遺伝的素因と環境因子が複雑に関与し発症すると考えられている。さらに基本的な臨床症状は類似性が認められるものの、症状の程度および進行速度、治療薬の効果などは多様であり、個々の PD 患者に対応するテーラーメイド型治療の開発は喫緊の課題である。PD の大半は孤発性であるが、患者の 5-10% には何らかの家族歴がある。これら家族性 PD は単一の遺伝子変異が発症の原因と推察され、家族性 PD 患者のゲノム解析を行うことで PD 発症に直接関与する重要な遺伝子の情報を得ることができる。そこで本研究では同一地域出身の高齢発症 PD 家系 2 家系について分子遺伝学的解析を行うことで、原因遺伝子を単離しテーラーメイド医療とゲノム創薬の基盤となる情報を得ることを目的とし、以下の研究を実施した。

B.研究方法

(1) 対象

同一地域出身の高齢発症 PD 家系 2 家系。2 家系共に両親が従兄弟婚である常染色体劣性遺伝性 PD。家系 1 は、PD 患者 4 名、未発症者 3 名、家系 2 は PD 患者 3 名、未発症者 1 名の末梢血からゲノム DNA を抽出した。

(2) ゲノムワイド連鎖解析

2 家系の PD 患者計 7 名および未発症者計 4 名に

ついて Genome-Wide SNP Array 6.0

(Affymetrix) をもちいてジェノタイピングした後、SNP HiTLink および Allegro をもちいてパラメトリック多点連鎖解析を行った。HLOD $>$ 1 を候補領域とし、候補領域について SNP Array のジェノタイピングデータの抽出および近傍に位置するマイクロサテライトのジェノタイピングを行い、ハプロタイプ解析を行った。

(3) 候補原因遺伝子探索

連鎖解析およびハプロタイプ解析の結果同定された候補領域に存在している遺伝子について PCR-direct sequence 法による変異解析を行った。さらに 1 家系につき 2 名の患者 (合計 4 名) について、SureSelectXT Human All Exon 50 Mb Kit (Agilent) をもちいてゲノム DNA の全エクソン領域を濃縮した後、HiSeq2000 (Illumina) で高速シーケンスを実施した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析については順天堂大学医学部倫理委員会で承認されており (順大医倫第 2011026 号)、ヘルシンキ宣言の内容と精神に従って実施した。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守し、採血時には医師による十分な説明と患者本人、もしくは患者本人が意思疎通困難の場合は保護者または後見人から書面

にて同意を得て行った。

C. 研究結果

(1) 対象家系の臨床神経学的解析

PD 患者は 45~74 歳発症で 2 家系の患者 8 名の平均発症年齢は 65.3 ± 6.4 歳だった (図 1)。

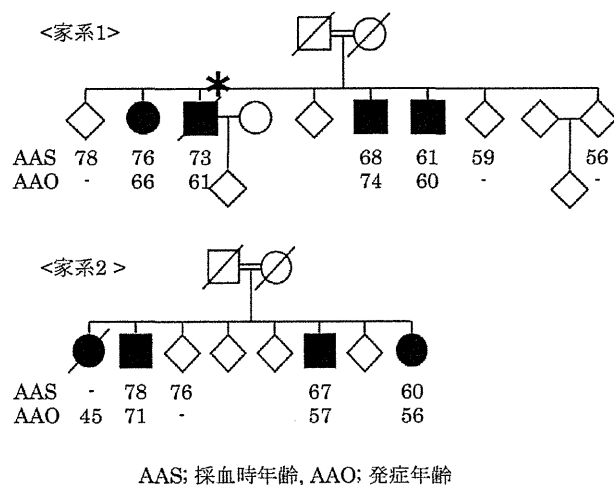


図 1. 対象家系の家系図

AAS のある家系メンバーについて、分子遺伝学的解析を実施した。家系 1 の※の患者について神経病理学的解析を実施した。

家系 1 の患者 1 名について神経病理学的解析を行った結果、加齢変化以外に特徴的な所見は見出されなかった (図 2)。

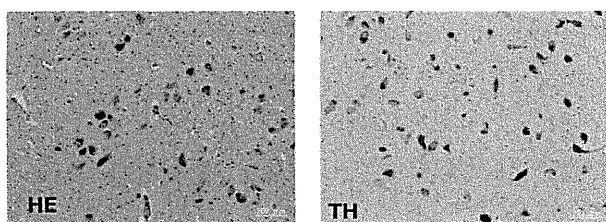


図 2. 対象家系患者の神経病理学的検討

※患者中脳の前角質のヘマトキシリン・エオジン染色 (HE)、およびチロシン水酸化酵素免疫染色 (TH)。

(2) 連鎖解析

対象家系 2 家系について約 90 万カ所の SNPs について遺伝子型を決定した。得られた SNPs の情

報を元にゲノムワイド多点連鎖解析を行った。対象家系は共通の祖先であると推察されたが、先ず個々の家系についてロッド値の算出を行った。家系 1 の解析の結果、1 カ所の連鎖領域を同定した。Allegro でのパラメトリックロッド値は最大で 1.3 だった (図 3)。この領域についてマイクロサテライトと SNPs をもちいたハプロタイプ解析を行った結果、患者のみが homozygous であることが明らかとなり連鎖解析の結果が確認された。家系 2 の解析の結果、最大ロッド値 1.9 の領域を同定した (図 1)。予想に反して 2 家系共通の候補領域は同定されなかった。

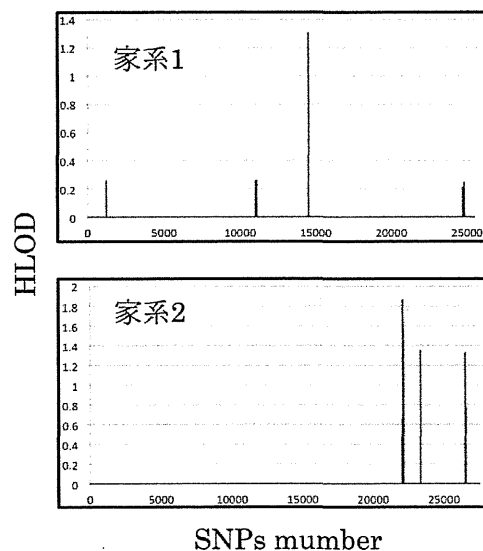


図 3. パラメトリック多点連鎖解析

90 万カ所の SNPs 情報から約 2 万 6 千 SNPs を抽出し、allegro で HLOD 値を算出した。Allegro のパラメータは以下の通りである。

frequency wt: 0.999/mut: 0.001, penetrance: 1, minimum HWE-test P-value: 0.05, minimum call rate: 1, maximum confidence: 0.02, minimum MAF: 0.2, LD D' : 0.2/ R^2 : 0.2.

(3) 候補原因遺伝子探索

対象家系の原因遺伝子を単離するため、家系 1 および家系 2 の PD 患者 2 名ずつ、合計 4 名について全エクソン解析を実施した。解析した 4 名とも良好な配列情報を得ることが出

来た。20 回以上配列を解析出来た塩基は全エクソン中 91.1~92.6%であり、得られた塩基配列情報を元に遺伝子変異解析が十分に可能であることを示した (表 1)。

表 1. 全エクソン解析の成績

	家系1		家系2	
	患者1	患者2	患者3	患者4
マッピングリード数	112,195,755	108,667,598	106,093,521	123,927,751
on target リード数	74,289,522	72,536,231	70,045,311	82,210,822
on target 率 (%)	66.21	66.75	66.02	66.34
平均Depth	141.244	137.845	133.229	156.303
カバー率 > x3 (%)	98.7	98.4	98.4	98.8
カバー率 > x20 (%)	92.4	92.1	91.1	92.6
カバー率 > x40 (%)	84.9	84.6	82.8	85.8

D. 考察

本研究では同一地域出身で、臨床的・遺伝学的に類似した 2 家系について同一祖先であると仮説し分子遺伝学的解析を実施した。しかしながらゲノムワイド多点連鎖解析の結果、この 2 家系は同一祖先ではない事が明らかになった。このことは、本研究で行った解析手法をもちいることで、複数家系の原因遺伝子を同時に単離可能であることを示唆する。PD は複数の遺伝的素因と環境因子が複合的に関与し発症すると考えられている。本研究では原因遺伝子単離には至らなかったが、テーラーメイド医療の標的となる遺伝子の単離を目指す本研究において重要な知見を得た。対象家系の原因遺伝子を単離するまでには至っていないが、今後詳細な連鎖解析結果と全エクソン解析結果を統合し検討することで、対象家系の原因遺伝子を単離し、テーラーメイド医療への基盤となる遺伝子を明らかにする。

E. 結論

ゲノムワイド SNPs Array による連鎖解析と全エクソン解析を行うことで、PD の原因遺伝子を同時に複数単離することが可能である。本研究の対象家系の原因遺伝子単離に成功すれば、PD のテーラーメイド医療およびゲノム創薬の基盤となる標的遺伝子を同定する事が可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- [1] Miyamoto N, Tanaka Y, Ueno Y, Tanaka R, Hattori N, Urabe T. Benefits of Prestroke Use of Angiotensin Type 1 Receptor Blockers on Ischemic Stroke Severity. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 21(5):363-368, 2010.
- [2] Funayama M, Tomiyama H, Wu RM, Ogaki K, Yoshino H, Mizuno Y, Hattori N. Rapid screening of ATP13A2 variant with high-resolution melting analysis. *Mov Disord.* 25(14):2434-7, 2010.
- [3] Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, Ogaki K, Li Y, Funayama M, Hashimoto T, Takashima S, Hattori N. Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology.* 75(15):1356-61, 2010.
- [4] Tanaka Y, Tanaka R, Liu M, Hattori N, Urabe T. Cilostazol attenuates ischemic brain injury and enhances neurogenesis in the subventricular zone of adult mice after transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 171(4):1367-76, 2010.
- [5] Sekine T, Kagaya H, Funayama M, Li Y, Yoshino H, Tomiyama H, Hattori N. Clinical course of the first Asian family with Parkinsonism related to SNCA triplication. *Mov Disord.* 2010. [Epub ahead of print].
- [6] Fukae J, Tanaka S, Hattori N. Retroperitoneal fibrosis secondary to pergolide therapy. *Intern Med.* 49(15):1687, 2010.
- [7] Noda K, Tani M, Fukae J, Fujishima K, Hattori N, Okuma Y. Isolated proximal leg

- paresis due to a small cortical infarction. *Intern Med.* 49(15):1633-6, 2010.
- [8] Watanabe M, Kimura K, Iguchi Y, Shibazaki K, Urabe T, Hattori N. Peripheral arterial atherosclerosis in patients with extracranial, not intracranial, arterial stenosis. *Intern Med.* 49(15):1515-9, 2010.
- [9] Shiotsuki H, Motoi Y, Nakamura S, Mizuno Y, Hattori N. Dopamine deficiency may lead to capgras syndrome in Parkinson's disease with dementia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* Summer;22(3):352i.e14-352.e15, 2010.
- [10] Tanaka R, Kawanabe T, Yamauchi Y, Shimura H, Tanaka Y, Miyamoto N, Ueno Y, Urabe T, Hattori N, Tanaka S. Economy Class Stroke Syndrome after a Long Drive. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 21(2):155-157, 2010.
- [11] Li L, Funayama M, Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Mizuno Y, Hattori N. No evidence for pathogenic role of GIGYF2 mutation in Parkinson disease in Japanese patients. *Neurosci Lett.* 479(3):245-8, 2010.
- [12] Oyama G, Yoshimi K, Natori S, Chikaoka Y, Ren YR, Funayama M, Shimo Y, Takahashi R, Nakazato T, Kitazawa S, Hattori N. Impaired in vivo dopamine release in parkin knockout mice. *Brain Res.* 1352:214-22, 2010.
- [13] Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M, Nakada K, Shitara H, Sou YS, Kimura M, Sato S, Hattori N, Komatsu M, Tanaka K, Matsuda N. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells.* 15(8):887-900, 2010.
- [14] Kawajiri S, Machida Y, Saiki S, Sato S, Hattori N. Zonisamide reduces cell death in SH-SY5Y cells via an anti-apoptotic effect and by upregulating MnSOD. *Neurosci Lett.* 481(2):88-91, 2010.
- [15] Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, Yoshino H, Minami N, Smith DI, Lesage S, Aburatani H, Nishino I, Brice A, Hattori N, Tsuji S. Mechanisms of genomic instabilities underlying two common fragile-site-associated loci, PARK2 and DMD, in germ cell and cancer cell lines. *Am J Hum Genet.* 87(1):75-89, 2010.
- [16] Xu Z, Ichikawa N, Kosaki K, Yamada Y, Sasaki T, Sakai LY, Kurosawa H, Hattori N, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition. *Matrix Biol.* 29(6):461-70, 2010.
- [17] Miyamoto N, Tanaka Y, Ueno Y, Tanaka R, Hattori N, Urabe T. Comparison of clinical backgrounds with anterior versus posterior circulation infarcts. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 19(5):393-7, 2010.
- [18] Ueno Y, Shimada Y, Tanaka R, Miyamoto N, Tanaka Y, Hattori N, Urabe T. Patent foramen ovale with atrial septal aneurysm may contribute to white matter lesions in stroke patients. *Cerebrovasc Dis.* 30(1):15-22, 2010.
- [19] Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, Hattori N, Tanaka K. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J*