

201238015A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）

次世代シーケンサーを用いた孤発性の神経難病の
発症機構の解明に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

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 5月

目 次

I. 総括研究報告	
次世代シークエンサーを用いた孤発性の神経難病の発症機構の解明に 関する研究 -----	1
神戸大学大学院医学研究科神経内科 戸田 達史	
II. 分担研究報告	
1. 次世代シークエンサーによる孤発性パーキンソン病の Rare variant リスクの 探索 -----	11
神戸大学大学院医学研究科神経内科 戸田 達史	
2. ALS 疾患関連遺伝子の探索 -----	13
名古屋大学大学院医学系研究科神経内科 祖父江 元	
3. 次世代シークエンサーを用いた遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子探索 --	17
順天堂大学医学部脳神経内科 服部 信孝	
4. 次世代シークエンサーを用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子解析 -----	20
東北大学大学院医学系研究科神経内科 青木 正志	
5. 次世代シークエンサーを用いた孤発性の神経難病の発症機構の解明に 関する研究 -----	22
鳥取大学医学部脳神経内科 中島 健二	
6. タウオパチーのゲノム解析の意義と、その目的を達成するための効果的な 収集方法についての研究 -----	26
新潟大学脳研究所神経内科 西澤 正豊	
7. 次世代シークエンサーを用いた孤発性の神経難病の発症機構の解明に 関する研究 -----	29
東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク 村山 繁雄	
8. 次世代シークエンサーを用いた孤発性の神経難病の発症機構の解明に 関する解析研究 -----	31
大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 望月 秀樹	
9. 相模原病院神経内科の現状 -----	33
国立病院機構相模原病院神経内科 長谷川 一子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	51

1. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化 研究事業）
総括研究報告書

次世代シーケンサーを用いた孤発性の神経難病の発症機構の解明に関する研究
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

パーキンソン病の、エクソンに存在する Rare ながら強いリスク遺伝子を発見するため、パーキンソン病、とくに患者の大多数を占める孤発性発症の患者ゲノムの大規模全エクソン塩基配列解読をおこなった。400例のパーキンソン病患者ゲノムから、全エクソン（エクソーム）を抽出、HiSeq2000 シーケンサーで超高速・並列シーケンスをおこなった。BWA ソフトウェアで参照配列にマップし、GATK ソフトウェアで、参照配列とことなる SNV (single nucleotide variant) を検出した。400 検体のエクソームデータの平均被覆は 146.6x であり、全エクソン配列の 98.4% のエリアが 10x 以上で被覆された。孤発性パーキンソン病の全エクソン配列データはいまだ論文発表がなく、さらに、数百検体分のデータとなると、国際学会の発表ですらみかけない。今後は、本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強い Rare variant リスクを発見する。パーキンソン病 (PD) は年齢依存的に罹患率が上昇する神経難病であり、超高齢化社会を迎えた本邦において、本疾患の病態解明・新規治療薬の開発並びに根治療法の開発を推進し早急に克服すべき疾病である。PD は稀に家族性に発症し、それらの家系について分子遺伝学的手法を用いて原因遺伝子を単離し、その機能と病態を明らかにすることは、家族性のみならず通常の孤発性 PD の病態機序解明への礎となる。本研究では原因遺伝子未同定の常染色体劣性遺伝性 PD 家系において連鎖解析と次世代シーケンサーによる全エクソン配列解析を組み合わせ、原因遺伝子の単離を目指す。本年度は対象家系 3 家系 6 例について、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を実施し、全エクソン領域の塩基配列データを得た。その結果、4 家系から合計 24 種の候補遺伝子変異を見出した。今後見出された候補遺伝子変異について検証し原因遺伝子単離を行う。本研究により次世代シーケンサーを用いたゲノム解析は同時に複数の PD 発症に関与する新規遺伝子を単離可能である事が示唆される。大阪大学遺伝子診療部に家族性パーキンソン病外来設立、パーキンソン病の原因疾患である α -synuclein の機能解析を中心に、展開している。具体的には、 α -synuclein 凝集機序のひとつに SNAP-25 が関与していることを報告した。また、現在標的分子をもとに網羅的薬剤候補化合物探索を開始し、幾つかの候補薬剤を見つけ、現在関連薬剤に関して検討中である。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は代表的な神経難病で根治的治療法はなく、その開発は喫緊の課題である。ALS の 90% 以上は孤発性であり、病態に関連する遺伝子・分子の同定から病態解明に至る道筋は未確立である。我々は ALS 患者の大規模前向きコホート (JaCALS) を立ち上げ、既に孤発性 ALS 患者 760 例の前向き臨床情報、ゲノム DNA を蓄積した。本研究では、この研究資源を基に次世代シーケンサーを応用して精度の高い ALS 関連遺伝子の同定を行い、ALS の発症・病態機構の解明と治療法開発を推進する。孤発性 ALS の疾患関連遺伝子の探索について、全エクソン配列解析を進め、得られた variant 情報から ALS 発症あるいは臨床経過に影響を及ぼす遺伝子の同定を目指す。東北大学神経内科では、継続して家族性 ALS 患者の遺伝子検査を行っており、Superoxide dismutase 1 (SOD1) および Fused in sarcoma/translated in liposarcoma (FUS/TLS) の遺伝子変異を報告してきた。当科で収集した常染色体優性遺伝の遺伝形式が疑われる家族性 ALS

の104家系においてSOD1, FUS/TLS, TDP43, VCP, C9ORF72, Profilin1 (PFN1)についての解析を行った。その結果26家系にSOD1遺伝子変異、10家系にFUS/TLS遺伝子変異を認めたが、TDP43, VCP, C9ORF72, PFN1遺伝子異常は認めなかった。現在、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析法を検討しつつある。さらには今回、原因遺伝子が同定できなかった約65%の家系については新たな原因遺伝子の検索を進めていく。

タウオパチーとされる進行性核上性麻痺 (PSP) や大脳皮質基底核変性症 (CBD) を含むパーキンソン症候群 (PS), 前頭側頭葉変性症 (FTLD) は、通常は孤発性であり、中年期以降に発症する緩徐進行性の変性疾患である。未だ有効な根治療法はなく、各疾患の関連や相違など疾患分類位置づけに関しても多くの議論がなされてきている。本研究では、各疾患の診断、病態解明、治療法の開発に寄与する臨床情報の整ったPS・FTLDの、遺伝子試料収集体制の整備を行うことを目的とし、鳥取県において地域での遺伝子試料収集体制の整備を進めると共に、全国多施設共同研究体制の整備を進めてきた。昨年までの進捗状況を踏まえ、共同研修施設の拡大、ならびに、診断基準や試料の取り扱いに関する整備を進めた。進行性核上性麻痺 progressive supranuclear palsy:PSP や大脳皮質基底核変性症 corticobasal ganglionic degeneration: CBD などのタウオパチーの診断、病態把握、病因の研究のためには、バイオリソースの整備が必要である。国立病院機構相模原病院は変性性神経疾患の症例数が多く、かつ、神経病理学的検討により、病理診断による確定診断をもととしたバイオリソースの収集が可能な施設である。本年度は当院の現状と神経病理学的検討結果について報告した。現時点での患者実数はPSP 22症例、CBD 8症例で随時同意取得中である。剖検症例数はPSP3名、CBD2名でそれぞれ1症例ずつ、臨床的には典型的CBDであったが、病理診断PSP、臨床診断(他院)PSP、病理診断CBDであった。生前でのバイオリソースを収集するためには、診断基準の整備が必要と思われた。高齢者ブレインバンクは、高齢者在宅支援総合救急病院連続開頭剖検例と、他施設稀少神経変性疾患剖検例中、ブレインバンク登録同意を得た症例により構成されている。本研究の協力のため、ブレインバンクリソース提供のかたちで、倫理委員会承認を得た。DNAが保存された症例中、孤発性特定疾患例を提供することで、研究協力していく予定である。タウオパチーのゲノム解析の意義と、その目的を達成するための効果的な収集方法について明らかにする。文献的に現在のタウオパチーのゲノム研究の現状とそれを本邦で行うことの意義について検討し、有意義な結果を出すための試料収集方法について考察した。まず、タウオパチーノ一種である進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD) は、特定のタウ遺伝子領域のハプロタイプ (H1) が危険因子となる事が知られている。さらにPSPに関しては極めて相関の高い一塩基多型が知られている。この欧米の報告ではすでに1000例以上の病理にて診断されたPSPを用いてこの解析が行われており、本邦で世界に寄与する研究成果をあげるためには、同等の症例数を集める必要がある。しかし、症例数だけであれば、これをクリアすることは困難である。それでは本邦での活路はどこになるのであろうか。それは同領域の構造の相違にあると考える。欧米人と日本人ではH1ハプロタイプの頻度が異なる。欧米人では一定の割合でH2ハプロタイプが存在するが、日本人をはじめとするアジア系人種ではほとんどがH1ハプロタイプである。さらにH1は複数のサブハプロタイプに分類されるが、このサブハプロタイプの頻度も異なる。欧米人と日本人のPSP, CBD患者で共通して認められる構造多型が疾患の危険因子となっている可能性が推察される。両者を詳細に比較することにより、この共通した遺伝子配列、ゲノム構造が同定できる可能性がある。今後、病理診断で確定診断のついた症例について、タウ遺伝子領域の詳細な構造解析を行うことの意義はある。この研究の為に病理診断例のゲノムを全国レベルで集積する必要がある。

研究分担者	
祖父江 元	名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科・教授
服部 信孝	順天堂大学脳神経内科・主任教授
青木 正志	東北大学大学院医学系研究科神 経内科・教授
中島 健二	鳥取大学医学部脳神経内科・教授
西澤 正豊	新潟大学脳研究所神経内科・教授
村山 繁雄	東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク・研究部長
望月 秀樹	大阪大学大学院医学系研究科神 経内科学・教授
長谷川 一子	国立病院機構相模原病院神経内 科・医長

A. 研究目的

本研究は「希少性、原因不明、効果的な治療法未確立、生活面への長期にわたる支障」の4要素を満たす神経難病のうち、「大部分は孤発性だが一部家族性・メンデル遺伝をとるパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、進行性核上性麻痺 (PSP)、大脳皮質基底核変性症 (CBD) といった代表的な神経難病」を対象にする。パーキンソン病は中高年に発症し、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し、PSP、CBD とパーキンソン症候群を形成する。一方、ALS は進行性の筋萎縮と筋力低下をきたし平均3-4年で死亡に至る過酷な神経難病であり、その重篤さと患者および家族に課せられる過酷な運命から、難病中の難病と言われており、その克服は喫緊の課題となっている。

これらの神経難病では、根治療法や予防法は一つとして無く、その多くは病因も不明であり、発症機序は何れも未解明であり、診断法や診断基準も未だ十分ではない。またこれらの遺伝背景について一部は明らかになってきたものの、SNP だけでは遺伝率は説明できず、次世代シー

クエンサーを用いて寄与度の高い rare variants を見いだすことが重要である。また単一遺伝性患者においても、まだ約半数は原因遺伝子は発見されていない。

本研究ではパーキンソン病、ALS、PSP・CBD を含めたタウオパチー遺伝子を発見すべく、拠点研究班との連携のもとで、次世代シークエンサーを世界に先駆け孤発性神経難病に応用する

1) 豊富な検体を収集済みのパーキンソン病 (2,400 検体) および ALS (550 例)、その中でも特に強い疾患リスク遺伝子をもつと推測される血族婚患者および多発家系の患者に焦点をあて、多数検体の全エクソームシーケンス解析を行い、メンデル遺伝を引き起こす原因変異や強い疾患リスクとなる Rare variant を発見、2) 新たに発見される遺伝子について、大部分を占める孤発性発症の検体をリシーケンスし、孤発性パーキンソン病の遺伝子リスクに迫る、3) さらに孤発性パーキンソン病、孤発性 ALS を数百例全エクソームシーケンス解析して孤発性リスクを見いだす、4) より希少性疾患であるために収集が困難な PSP、CBD を含めたタウオパチーの収集体制を整備し収集し解析、5) 得られた variants と前向き臨床情報との関連を解析し、真に臨床に結びついた遺伝子の同定、これを診断および予後予測マーカーさらには治療法開発へと展開すること、を行う。

B. 研究方法 C. 研究結果

①次世代シークエンサーによる孤発性パーキンソン病の Rare variant リスクの探索 (戸田)

400 例のパーキンソン病患者血液から、標準的な方法でゲノム DNA を抽出した。Sureselect V4 試薬 (アジレント社) により、各ゲノム DNA から全エクソン配列 (エクソーム) を抽出した。えられたエクソームを、HiSeq2000 シークエン

サーで超高速並列シーケンスをおこなった。

参照配列 hg19 へ BWA ソフトウェアでマッピングした。GATK ソフトウェアで、参照配列とことなる SNV (single nucleotide variant) を検出した。

400 検体のエクソームデータの平均 depth は 146.6x であった。全エクソン配列の 98% のエリアが 10x 以上で被覆された。

また、各検体の平均 depth と、全エクソンのうち x1, x5, x10, x20 で被覆されるエクソン領域の割合をプロットしたところ、平均 depth が高いほど、十分な被覆度でカバーされるエクソン領域の割合が高かった。さらに、single nucleotide variant の検出に必要なとされる x10 での被覆についてみると、平均 depth 80 程度のデータ量をとった検体では、全エクソンの 95% 以上が解読されたと考えられた。

②次世代シーケンサーを用いた遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子探索（服部）

家族性パーキンソン病の 3 家系 6 例について、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を実施し、全エクソン領域の塩基配列データを得た。9 家系について SNP array を用いたゲノムワイドジェノタイピングを行い、オート接合性マッピングならびに連鎖解析を並行して実施し、複数の候補遺伝子領域の絞り込みを行った。エクソーム解析の結果、合計約 25 万種類の多型を得た（1 例平均 4 万種類）。得られた多型からアミノ酸置換を伴う新規（未報告）の多型を選別、さらにオート接合体領域または連鎖領域内に存在する多型について家系内での解析を行い病因性の検証を行った。その結果、4 家系から合計 24 種の候補遺伝子変異を見出した。

③次世代シーケンサーを用いたパーキンソン病の発症機構の解明に関する解析研究（望

月）

PKC によるリン酸化を受けない *Snap25*^{S187A/S187A} マウス（変異マウス）の線条体を用いて、免疫組織化学的及び生化学的解析を行い、SNARE 複合体の機能異常が α Syn の存在様式に影響を及ぼす可能性について検討した。 α シヌクレインの凝集過程について独自の視点から解析し、マウスの線条体において、SNAP-25 の変異に起因した SNARE 複合体の機能障害により、VGLUT1 陽性の神経終末部において α Syn の集積がみられた。その一部はリン酸化を受けており、これらの蛋白の発現量の増加もみられた。 α Syn の集積は DLB の初期病変として示唆されている神経終末部での α Syn 集積に SNARE 複合体の機能異常が関与する可能性を示唆するものであり、病態形成機序を考える上で新たな知見を提示するものと考えられた。また、現在標的分子をもとに網羅的薬剤候補化合物探索を開始し、幾つかの候補薬剤を見つけ、現在関連薬剤に関して検討中である

④ALS 疾患関連遺伝子の探索（祖父江）

多施設共同前向き ALS 患者コホートである JaCALS (Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research) の体制整備、拡大、運営を行った。孤発性 ALS 患者ゲノムを用いて 60 万 SNPs を用いたゲノムワイド多型解析を行った。この多型データについて、進行速度など ALS 患者の臨床像に影響を与えている可能性のある多型を探索した。

全国 28 施設が参加する ALS 患者の大規模前向きコホート (JaCALS) 登録数は、平成 25 年 3 月の時点で 760 例にまで至っている。また、正常対照（コントロール）は 226 例分が連結不可能匿名化の状態で保存されている。このリソースでは、前向き臨床情報、DNA、B cell line を蓄積している。

孤発性 ALS の次世代シーケンサーを用いた

遺伝子配列解析については、平成 25 年 1 月末の時点で、92 例のエクソームシーケンスが完了しており、平成 24 年度中には、約 220 例のシーケンスを完了する見込みである。得られたシーケンスリードを標準配列にマッピングし、多型・変異の検出を順次進めている。日本人の標準配列、および SNV データベースが整備された暁には、これらの情報と比較検討を行う事により、孤発性 ALS の疾患関連因子の同定を目指す。また、家族性 ALS の病因遺伝子や、孤発性 ALS の病態に関与することが報告されている既知の病態関連遺伝子について、比較的安価にスクリーニングを行うシステムを構築した。Agilent 社の HaloPlex システムを用いて、目的とする ALS 疾患関連遺伝子のエクソン部分のみをヒトゲノムから抽出、増幅してライブラリを作成し、Life Technology 社の Ion PGM™ システムを用いて網羅的に解析するシステムを構築した。

ゲノムワイド大規模 SNPs 情報と臨床像との相関について、220 例 60 万 SNPs を用いた解析により、ALS 患者生存期間との関連を示す SNPs を p 値 10^{-7} 台を一つと 10^{-6} 台を 15 個見出し、追加検体による検証を進めている。

⑤次世代シーケンサーを用いた孤発性 ALS 遺伝子解析（青木）

当該科で収集した常染色体優性遺伝の遺伝形式が疑われる家族性 ALS 104 家系について遺伝子解析を行った。SOD1, FUS, TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP43)、Valosin-containing protein (VCP) に加えて C9ORF72, Profilin1 (PFN1) についての解析を加えて行った。

これまでに遺伝子解析を行った 104 家系において、26 家系に SOD1 異常、10 家系に FUS/TLS 遺伝子異常を認めた。TDP43, VCP, C9ORF72, PFN1 遺伝子については 104 家系内では遺伝子変異は認めなかった。検討を行った患者における

平均年齢は 50.0 ± 15.2 歳、SOD1 変異を伴う例 52.0 ± 12.9 歳、FUS/TLS 変異を伴う例 39.6 ± 14.4 歳であった。FUS/TLS 遺伝子変異を伴う家系の中で、10 家系の内訳は点変異が 6 種類 9 家系 (p. K510E, p. S513P, p. R514S, p. H517D, p. H517P, p. R521C)、挿入変異が 1 家系 (c. 1420_1421insGT) であった。その一方で、68 家系 (約 65%) の家系では検索した遺伝子には異常を認めなかった。現在、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析法を用いて、既報告の全ての遺伝子について遺伝子異常の有無を再確認中である。

⑥PSP・CBD を含めたタウオパチー（中島）

PS・FTLD の患者登録を行なうとともに、2013 年 2 月までに、PSP 26 例、CBD 11 例、FTLD 6 例について臨床情報と共にゲノム DNA を収集した。2012 年に本研究計画について、鳥取大学医学部倫理委員会に申請し、承認を受け、“神経変性班” 所属施設や、その他の PS・FTLD などの神経変性疾患の診療・研究に積極的に取り組んでいる施設に本研究協力を依頼した。2013 年 2 月の時点で、15 施設について共同研究機関として承認を得た。参加各施設の倫理委員会でも本研究の承認を進めており、3 施設において倫理委員会での承認を得ている。なお、臨床診断に基づく収集を進めたが、病理診断例における収集についても、その体制の構築について検討を進めている。既往の PS や FTLD の診断基準を包括する本研究における収集対象の診断基準の作成、ならびに、試料の取り扱いに関する整備を進めている。遺伝子試料収集においては、正確な診断例を収集することが重要であるが、PS や FTLD のなかには、臨床診断が困難である場合がある。そこで、血液や脳脊髄液を用いた臨床診断に有用な診断マーカーの開発を進めている。

⑦PSP・CBDを含めたタウオパチー（長谷川）

進行性核上性麻痺 progressive supranuclear palsy:PSP や大脳皮質基底核変性症 corticobasal ganglionic degeneration: CBD などのタウオパチーの診断、病態把握、病因の研究のためには、バイオリソースの整備が必要である。当院は変性性神経疾患の症例数が多く、かつ、神経病理学的検討により、病理診断による確定診断をもととしたバイオリソースの収集が可能な施設である。本年度は当院の現状と神経病理学的検討結果について報告した。現時点での患者実数は PSP 22 症例、CBD 8 症例で随時同意取得中である。剖検症例数は PSP3 名、CBD2 名でそれぞれ 1 症例ずつ、臨床的には典型的 CBD であったが、病理診断 PSP、臨床診断（他院）PSP、病理診断 CBD であった。生前でのバイオリソースを収集するためには、診断基準の整備が必要と思われた。

⑧PSP・CBDを含めたタウオパチー（村山）

高齢者ブレインバンクは、高齢者在宅支援総合救急病院連続開頭剖検例と、他施設稀少神経変性疾患剖検例中、ブレインバンク登録同意を得た症例により構成されている。本研究の協力のため、ブレインバンクリソース提供のかたちで、倫理委員会承認を得た。DNA が保存された症例中、孤発性特定疾患例を提供することで、研究協力していく予定である。

⑨タウオパチーのゲノム解析の意義と、その目的を達成するための効果的な収集方法についての研究（西澤）

タウオパチーのゲノム解析の意義と、その目的を達成するための効果的な収集方法について明らかにした。文献的に現在のタウオパチーのゲノム研究の現状とそれを本邦で行うことの意義について検討し、有意義な結果を出すための試料収集方法について考察した。まず、タ

ウオパチーノ一種である進行性核上性麻痺（PSP）、皮質基底核変性症（CBD）は、特定のタウ遺伝子領域のハプロタイプ（H1）が危険因子となる事が知られている。さらに PSP に関しては極めて相関の高い一塩基多型が知られている。この欧米の報告ではすでに 1000 例以上の病理にて診断された PSP を用いてこの解析が行われており、本邦で世界に寄与する研究成果をあげるためには、同等の症例数を集める必要がある。しかし、症例数だけであれば、これをクリアすることは困難である。それでは本邦での活路はどこになるのであろうか。それは同領域の構造の相違にあると考える。欧米人と日本人では H1 ハプロタイプの頻度が異なる。欧米人では一定の割合で H2 ハプロタイプが存在するが、日本人をはじめとするアジア系人種ではほとんどが H1 ハプロタイプである。さらに H1 は複数のサブハプロタイプに分類されるが、このサブハプロタイプの頻度も異なる。欧米人と日本人の PSP、CBD 患者で共通して認められる構造多型が疾患の危険因子となっている可能性が推察される。両者を詳細に比較することにより、この共通した遺伝子配列、ゲノム構造が同定できる可能性がある。今後、病理診断で確定診断のついた症例について、タウ遺伝子領域の詳細な構造解析を行うことの意義はある。この研究の為に病理診断例のゲノムを全国レベルで集積する必要がある。

D. 考察

孤発性パーキンソン病の全エクソン配列データはいまだ論文発表がなく、さらに、数百検体分のデータとなると、国際学会の発表ですらみかけない。今後は、本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の、新たな、強い疾患リスクとなる Rare variant リスクを発見する。

本研究では我々が保有する 3000 例以上の PD

ゲノムバンクから新規 PD 原因遺伝子単離出来る可能性の高い上位 4 家系について解析を実施した。その結果、それぞれの家系から複数の候補遺伝子変異を同定することに成功した。今後これらの候補変異を検証し原因遺伝子単離を行うと同時に検査未実施の候補家系についても順次次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を推進し、同時に複数の PD 原因遺伝子単離を目指す。

興味深いことに、本所見の発現の有無は神経細胞の種類によって異なっており、パーキンソン病で障害を受ける黒質由来のドーパミン作動性の神経終末部ではみられず、大脳皮質から投射したグルタミン酸作動性の神経終末部で観察された。このことは、同じように α Syn の集積・凝集が原因と考えられる疾患においても、各々で病態発現メカニズムに違いがある可能性を示唆するものと考えられる。

大規模な臨床情報、遺伝子検体リソースの組み合わせと大規模 SNPs、次世代シーケンサーを用いた解析により、代表的な難病である孤発性 ALS の病態関連遺伝子、分子の同定が期待できる。ALS ゲノムの multiple rare variants を同定するための次世代シーケンサー利用と、莫大なデータを扱うゲノム情報処理を、有機的連携を計りつつ推進する体制が構築でき、順調に進行中である。我々は、国内随一の ALS のゲノムリソースと前向き臨床情報を有し、疾患関連遺伝子の発現を動物モデルへ展開し、病態解析、治療法開発へとつなげてきた数々の実績がある。この体制により ALS 克服へ向けての新たな戦略を開拓することができると考えられる。

次世代シーケンサーの登場にて新規 ALS の原因遺伝子の報告が続いている。私たちの解析で、特に欧米で頻度が高い C90RF72 遺伝子変異を認めなかったことは人種差を示すものと考えられた。今回の 104 家系の解析のうち 68 家系では遺伝子異常を認めなかった。現在、次世

代シーケンサーを用いた網羅的な解析法を用いて既知の全ての遺伝子異常を再確認中である。この作業が終わり次第、エクソームなどを用いて新たな原因遺伝子の同定を行う予定である。

鳥取県においては鳥取県難病相談・支援センターと連携し、地域における生体試料収集研究体制を整備した。PS・FTLD 患者の遺伝子試料収集が進めば国際的にも意義ある研究が可能となることが期待される。本研究を継続することにより一層の遺伝子試料収集が進み、国際的研究に発展するものとする。今後、“神経変性班”の構成班員施設などの PS・FTLD の診療・研究に積極的に関与してきている施設に本研究への協力を依頼し、各施設で倫理委員会の承諾を得て頂き、多施設での収集を進める。PS や FTLD は、臨床診断が困難である場合も少なくなく、病理診断例の収集を行うことが望ましい。現在、PS や FTLD 症例を広く収集し、剖検によって診断を確定していく。あるいは、病理によって診断が確定した症例の剖検脳から遺伝子を収集することによって、病理診断例の遺伝子試料を収集する体制を構築中である。

バイオリソースの構築には症例数の確保のみならず、正確な臨床診断が求められる。広報活動を行う事により、症例数は増加するが、正確な臨床診断には必要十分な診断指針が必要である。旧厚生省の PSP、CBD に関する診断指針は 1990 年代のものであり、その後の診断学的技法の刷新、病理診断の精度向上が得られたことに対して、十分な対応ができないことが明らかとなってきている。もとより、CBD と PSP は FTD も含むタウオパチーの範疇にあり、臨床上也病理学上也移行症例が見受けられるのも知られている。临床上誤診となった自験 2 症例についてもそれぞれの臨床診断指針、画像所見からは臨床診断についての矛盾点を見いださずにいたものの、病理学的には誤っていた。こ

のような症例は文献上も散見し、また、神経病理学会でも時に話題となる。CBD については最近の AAN の臨床診断指針にも記載されている様に、研究レベルではより診断指針を厳しくし、臨床レベルでは緩くしても、CBD についての診断指針は極めて曖昧となる。この論文は病理学的診断での確実例 267 症例の臨床像を分析したものであるが、わが国の神経専門医と神経病理施設を総合することでほぼ同数の患者数を得ることができると考えられ、画像診断などを加えた、臨床診断指針が策定できると思われる。今後のバイオリソースを収集するにあたり、診断指針の再策定が望まれる。

CBD / PSP については、臨床診断の信頼性がないことが知られている。剖検診断確定 PSP バンクとしては、Cure PSP による生前同意登録制に基づく PSP バンクが Mayo Clinic Jacksonvil に設置されており、900 例以上の症例が存在する。日本人はタウの PSP の危険因子である H1 ハプロタイプよりなっており、高齢者ブレインバンク登録例でのパーキンソン病 (PD) との相対比率は 1:10 であり、施設バイアスを考慮しても、PSP- P が PD として剖検されない結果、頻度が低く評価されている可能性が高い。本研究において、人種背景を元に、本邦独自の成果をあげるためには、本研究に加盟している各拠点の協力なしに対抗は不可能である。本研究においても、各拠点間の協力の下に、ブレインバンク生前同意登録制度を促進することが、症例数の確保には必須である。

PSP/CBD は、特定のタウ遺伝子領域のハプロタイプ (H1) が危険因子となる事が知られている。この H1 ハプロタイプは構造多型であり、ある特定の領域の複数の遺伝子の配列が逆向になっている。それに加えて一部の遺伝子領域が繰り返され、極めて多様性に富む構造多型を持っている。さらに PSP に関しては極めて相関の高い一塩基多型が知られている。しかし、こ

の多型と、構造多型との関連は不明である。これらの事実は、4R タウを規定する特定の遺伝子配列もしくは従来の考え方を超えた長い領域の遺伝子構造の多型が寄与する可能性を示唆する。特にクロマチン構造を考える場合、このような構造多型の存在は極めて理にかなっている。欧米の報告ではすでに 1000 例以上の病理にて診断された PSP を用いてこの解析が行われた (Gunter U Hoglinger et al. Nature Genetics 2011) 。この事実は、少なくとも世界に寄与する研究成果をあげるためには、同等の症例数を集める必要がある。しかし、今の日本の現状では、症例数の面、システムの面でかなり悲観的にならざるを得ない。それでは日本で今からこれらの研究に参入するに当たっての勝算はあるのであろうか？我々は決してないとは思わない。このリスクハプロタイプの人種差に我々の勝算があると考えている。欧米人と日本人では H1 ハプロタイプの頻度が異なる。欧米人では一定の割合で H2 ハプロタイプが存在するが、日本人をはじめとするアジア系人種ではほとんどが H1 ハプロタイプである。さらに H1 は複数のサブハプロタイプに分類されるが、このサブハプロタイプの頻度が異なることも判明している (Steinberg et al Nature Genetics 2012)。日本人でも特定の一塩基多型が疾患の発症と相関していることが推察されている。このことは、欧米人と日本人の PSP, CBD 患者で共通して認められる構造多型が疾患の危険因子となっている可能性を示唆する。両者を詳細に比較することにより、この共通した遺伝子配列、ゲノム構造が同定できる可能性がある。その意味で、病理診断で確定診断のついた症例について、タウ遺伝子領域の詳細な構造解析を行うことの意義はあるかもしれない。この研究の為には病理診断例のゲノムを全国レベルで集積する必要があることを強く訴えたい。

E. 結論

本年度は、孤発性パーキンソン病の大規模な全エクソン塩基配列解読実験を行い、成功した。次年度、非患者配列と比較し、新規の、強いパーキンソン病遺伝子、rare variant の発見を行う。

大規模家族性 PD ゲノムリソースを用いて、連鎖解析と次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を組み合わせることで、同時に複数の PD 新規原因遺伝子を単離可能である。

α シヌクレインの凝集過程について独自の視点から解析した。マウスの線条体において、SNAP-25 の変異に起因した SNARE 複合体の機能障害により、VGLUT1 陽性の神経終末部において α Syn の集積がみられた。その一部はリン酸化を受けており、これらの蛋白の発現量の増加もみられた。 α Syn の集積は DLB の初期病変として示唆されている神経終末部での α Syn 集積に SNARE 複合体の機能異常が関与する可能性を示唆するものであり、病態形成機序を考える上で新たな知見を提示するものと考えられた。また、現在標的分子をもとに網羅的薬剤候補化合物探索を開始し、幾つかの候補薬剤を見つけ、現在関連薬剤に関して検討中である。

次世代シーケンサーの急速な発展は、個人の莫大なゲノム情報を短時間に取得可能なレベルに至っている。本研究では、この最先端技術を大規模患者コホートによる前向き臨床情報と結び付けて解析を行う点が特色である。ゲノム情報と臨床情報が両輪となることで、真に患者に根差した次世代医療への展望が開けるものと思われる。

東北大学にて遺伝子検査を行った 104 家系について検討した。今後も患者家系を増やしつつ、次世代シーケンサーを用いた解析を進めていく。

PS・FTLD の遺伝子試料収集研究体制の整備を

行った。今後、本研究をさらに推進することにより、多数例での遺伝子試料収集が望まれる。タウオパチーのバイオリソースの構築にあたり、広報活動を行った。相模原病院倫理審査委員会に本研究について受審し、研究遂行の承認を得た。バイオリソースの採取を開始した。剖検例からみたタウオパチーについては臨床診断指針の整備が必要と思われた。

CBD/ PSP を対象とする場合、米・英と対抗するためには、ブレインバンクへの生前同意登録、各拠点の協力が不可欠である。高齢者ブレインバンクはその面で協力をしていく予定である。

欧米人と日本人の PSP, CBD 患者で共通して認められる構造多型が疾患の危険因子となっている可能性を示唆する。両者を詳細に比較することにより、この共通した遺伝子配列、ゲノム構造が同定できる可能性がある。病理診断で確定診断のついた症例について、タウ遺伝子領域の詳細な構造解析を行うことの意義はある。この研究の為に病理診断例のゲノムを全国レベルで集積する必要性がある。

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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

II. 分担研究報告

次世代シーケンサーによる孤発性パーキンソン病の Rare variant リスクの探索
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

パーキンソン病の、エクソンに存在する Rare ながら強いリスク遺伝子を発見するため、パーキンソン病、とくに患者の大多数を占める孤発性発症の患者ゲノムの大規模全エクソン塩基配列解読をおこなった。400 例のパーキンソン病患者ゲノムから、全エクソン（エクソーム）を抽出、HiSeq2000 シーケンサーで超高速・並列シーケンスをおこなった。BWA ソフトウェアで参照配列にマップし、GATK ソフトウェアで、参照配列とことなる SNV (single nucleotide variant) を検出した。400 検体のエクソームデータの平均被覆は 146.6x であり、全エクソン配列の 98.4% のエリアが 10x 以上で被覆された。孤発性パーキンソン病の全エクソン配列データははまだ論文発表がなく、さらに、数百検体分のデータとなると、国際学会の発表ですらみかけない。今後は、本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強い Rare variant リスクを発見する。

A.研究目的

著しい進歩をとげている次世代シーケンサーのゲノム解読能を本症に応用。多発家系や血族婚例について、全エクソン 5000 万塩基 の配列を読み解く。また、孤発性 PD について、数百検体のエクソーム解読による、大規模エクソーム関連解析を行うことにより、家族性 PD 遺伝子や強い PD リスク遺伝子 (Rare variant 等) を同定、パーキンソン病の遺伝背景を説明することを目指す。

本年度は、患者の大多数を占める孤発性発症のパーキンソン病患者について、大規模な全エクソン配列解読を行った。

B.研究方法

400 例のパーキンソン病患者血液から、標準的な方法でゲノム DNA を抽出した。Sureselect V4 試薬 (アジレント社) により、各ゲノム DNA から全エクソン配列 (エクソーム) を抽出した。えられたエクソームを、HiSeq2000 シーケンサーで超高速並列シーケンスをおこなった。

参照配列 hg19 へ BWA ソフトウェアでマッピングした。GATK ソフトウェアで、参照配列とことなる SNV

(single nucleotide variant) を検出した。

(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

400 検体のエクソームデータの平均 depth は 146.6x であった。全エクソン配列の 98% のエリアが 10x 以上で被覆された。

また、各検体の平均 depth と、全エクソムのうち x1, x5, x10, x20 で被覆されるエクソン領域の割合をプロットしたところ、平均 depth が高いほど、十分な被覆度でカバーされるエクソン領域の割合が高かった。さらに、single nucleotide variant の検出に必要とされる x10 での被覆についてみると、平均 depth 80 程度のデータ量をとった検体では、全エクソムの 95% 以上が解読されたと考えられた。

D. 考察

孤発性パーキンソン病の全エクソン配列データはいまだ論文発表がなく、さらに、数百検体分のデータとなると、国際学会の発表ですらみかけない。今後は、本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の、新たな、強い疾患リスクとなる Rare variant リスクを発見する。

E. 結論

本年度は、孤発性パーキンソン病の大規模な全エクソン塩基配列解読実験を行い、成功した。

次年度、非患者配列と比較し、新規の、強いパーキンソン病遺伝子、rare variant の発見を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

・ Sharma M. *et al.* Large-scale replication and

heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. *Neurology*. 79, 659-667 (2012).

・ Lill CM. *et al.* Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genetics*, 8, e1002548 (2012).

2. 学会発表

・ The 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders.

・ The American Society of Human Genetics 62th Annual Meeting.

G. 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

ALS 疾患関連遺伝子の探索

研究分担者 祖父江 元

名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は代表的な神経難病で根治的治療法はなく、その開発は喫緊の課題である。ALS の 90%以上は孤発性であり、病態に関連する遺伝子・分子の同定から病態解明に至る道筋は未確立である。我々は ALS 患者の大規模前向きコホート（JaCALS）を立ち上げ、既に孤発性 ALS 患者 760 例の前向き臨床情報、ゲノム DNA を蓄積した。本研究では、この研究資源を基に次世代シーケンサーを応用して精度の高い ALS 関連遺伝子の同定を行い、ALS の発症・病態機構の解明と治療法開発を推進する。孤発性 ALS の疾患関連遺伝子の探索について、全エクソン配列解析を進め、得られた variant 情報から ALS 発症あるいは臨床経過に影響を及ぼす遺伝子の同定を目指す。

A. 研究目的・背景

ALS は、運動ニューロンが選択的に変性脱落する成人発症の神経変性疾患であり、発症から平均 3-4 年で死亡または永続的な人工呼吸器装着が必要となる。現在のところ根治的治療法はなく、その開発は喫緊の課題である。

ALS 患者の 90%以上は孤発性であり、5~10%は家族性である。家族性 ALS は SOD1、TDP-43、FUS など複数の病因遺伝子が同定されており、これらの遺伝子を手掛かりに疾患モデルを構築するなど病態解明研究が進められている。一方、大多数を占める孤発性 ALS については、複数の疾患感受性遺伝子や環境要因が複合的に関与して発症すると想定され、病態に関連する遺伝子・分子の同定から病態解明研究に至る道筋は、はるかに困難で未確立である。

我々はこれまで、孤発性 ALS の病態関連遺伝子に対して、患者剖検組織からの網羅的遺伝子発現解析 (Ann Neurol 2005)を行い、神経変性過程初期より発現低下をきたしている遺伝子を同定 (J Neuropathol Exp Neurol 2007)して、孤発性 ALS のモデル開発を行ってきた。

本研究では、我々が推進してきたこのような ALS 病態関連遺伝子の同定と、それらを病態解析と治療

法開発へ展開するという実績を進展させ、新世代のゲノム医学を応用したより精度の高い疾患感受性遺伝子の同定に基づき、ALS の発症・病態機構の解明と治療法開発を推進する。

B.研究方法

多施設共同前向き ALS 患者コホートである JaCALS (Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research) の体制整備、拡大、運営を行った。

孤発性 ALS 患者ゲノムを用いて 60 万 SNPs を用いたゲノムワイド多型解析を行った。この多型データについて、進行速度など ALS 患者の臨床像に影響を与えている可能性のある多型を探索した。

孤発性 ALS 症例に関しては、ゲノム DNA を抽出後、名古屋大学理学部遺伝子実験施設の次世代シーケンサー SOLiD5500xl を利用し、Agilent 社の Sureselect ターゲットエンリッチメントシステムを用いて、ゲノムライブラリを作成後、全エクソンの遺伝子配列解析を行うシステムを構築し、現在運用、解析に入っている。ライブラリ作成に関しては、Covaris 社の超音波破碎システム Covaris S220 および Life Technology 社の Library builder を導入し、

高品質なライブラリをハイスループットで作成出来る体制を整えた。得られた遺伝子配列のデータ解析に関しては、CLCbio 社の CLC Genomic

Workbench ソフトウェアを導入し、SOLiD 5500xl で得られた遺伝子リード配列をヒト標準配列

(hg19) にマッピングし、その後、標準配列との比較により Variant 情報を収集、さらに dbSNP を始めとするデータベースとの比較検討を行う事によって、新規の SNVs (single nucleotide variants) を抽出できるシステムを構築した。

(倫理面への配慮)

研究はヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針および臨床研究に関する倫理指針を遵守して実施した。ALS 患者コホートの構築、網羅的ゲノム解析については、参加するすべての施設で倫理委員会承認を得た。研究対象者には倫理委員会にて承認された説明書・同意書を用いて十分な説明を行い、文書同意を得て参加いただいた。検体・資料を分析する際には、氏名・住所・生年月日などの個人情報を取り除き、匿名符号をつけ、連結可能匿名化して厳重に管理した。

C. 研究結果

全国 28 施設が参加する ALS 患者の大規模前向きコホート (JaCALS) 登録数は、平成 25 年 3 月の時点で 760 例にまで至っている。

JaCALS参加施設 (28施設)

東北大学	加藤昌昭 青木正志	宮城病院	今井尚志
新潟大学	石原 智彦 西澤正豊	岡山大学	山下徹、阿部康二
自治医科大学	森田光哉 中野今治	国立精神神経センター	村田美穂
東京都立神経病院	川田明広 林秀明	京都府立医科大学	滋賀健介 中川正法
静岡てんかん神経医療センター	溝口功一	三重大学	谷口彰
東名古屋病院	櫻場郁子	相模原病院	長谷川一子
名古屋大学	祖父江元	東京大学	高橋祐二 辻省次
ビハラー花の里病院	日地正典 織田雅也	京都大学	山下博史 高橋良輔
	和泉唯信	鳥取大学	渡辺保裕 中島健二
順天堂大学	富山弘幸 大垣光太郎	山梨大学	長坂高村 瀧山嘉久
	服部信孝	東京病院	相澤仁志
徳島大学	和泉唯信 梶籠晃	北海道大学	加納崇裕 佐々木秀直
鈴鹿病院	酒井素子 小長谷正明	東邦大学大森病院	狩野修 岩崎泰雄
拓海会神経内科クリニック	藤田拓司	千葉大学	蒔谷和幹 桑原聡
群馬大学	池田将樹 岡本幸市	九州大学	林信太郎 吉良潤一

また、正常対照 (コントロール) は 226 例分が連結不可能匿名化の状態で作成されている。このリソースでは、前向き臨床情報、DNA、B cell line を蓄積

している。

孤発性 ALS の次世代シーケンサーを用いた遺伝子配列解析については、平成 25 年 1 月末の時点で、92 例のエクソームシーケンシングが完了しており、平成 24 年度中には、約 220 例のシーケンシングを完了する見込みである。得られたシーケンシングリードを標準配列にマッピングし、多型・変異の検出を順次進めている。日本人の標準配列、および SNV データベースが整備された暁には、これらの情報と比較検討を行う事により、孤発性 ALS の疾患関連因子の同定を目指す。また、家族性 ALS の病因遺伝子や、孤発性 ALS の病態に関与することが報告されている既知の病態関連遺伝子について、比較的安価にスクリーニングを行うシステムを構築した。Agilent 社の HaloPlex システムを用いて、目的とする ALS 疾患関連遺伝子のエクソン部分のみをヒトゲノムから抽出、増幅してライブラリを作成し、Life Technology 社の Ion PGM™ システムを用いて網羅的に解析するシステムを構築した。

ゲノムワイド大規模 SNPs 情報と臨床像との相関について、220 例 60 万 SNPs を用いた解析により、ALS 患者生存期間との関連を示す SNPs を p 値 10^{-7} 台を一つと 10^{-6} 台を 15 個見出し、追加検体による検証を進めている。

D. 考察

大規模な臨床情報、遺伝子検体リソースの組み合わせと大規模 SNPs、次世代シーケンサーを用いた解析により、代表的な難病である孤発性 ALS の病態関連遺伝子、分子の同定が期待できる。ALS ゲノムの multiple rare variants を同定するための次世代シーケンサー利用と、莫大なデータを扱うゲノム情報処理を、有機的連携を計りつつ推進する体制が構築でき、順調に進行中である。

我々は、国内随一の ALS のゲノムリソースと前向き臨床情報を有し、疾患関連遺伝子の発現を動物モデルへ展開し、病態解析、治療法開発へとつなげてきた数々の実績がある。この体制により ALS 克服へ向けての新たな戦略を開拓することができると思

られる。

E. 結論

次世代シーケンサーの急速な発展は、個人の莫大なゲノム情報を短時間に取得可能なレベルに至っている。本研究では、この最先端技術を大規模患者コホートによる前向き臨床情報と結び付けて解析を行う点が特色である。ゲノム情報と臨床情報が両輪となることで、真に患者に根差した次世代医療への展望が開けるものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. *Nat Med.* 2012;18:1531-8.

Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med.* 2012;18:1136-41.

Katsumata R, Ishigaki S, Katsuno M, Kawai K, Sone J, Huang Z, Adachi H, Tanaka F, Urano F, Sobue G. c-Abl Inhibition Delays Motor Neuron Degeneration in the G93A Mouse, an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One.* 2012;7:e46185.

Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y,

Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet.* 2012;91:320-9.

Mano T, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Hashizume A, Tanaka F, Sobue G. Cross-sectional and longitudinal analysis of an oxidative stress biomarker for spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 2012;46:692-7.

Hashizume A, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Mano T, Atsuta N, Oe H, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Longitudinal changes of outcome measures in spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain.* 2012;135:2838-48.

Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13:1225-38.

Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa J, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis.* 2012;45:862-70.

Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R, Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Fujita K, Izumi Y, Kaji R, Hattori N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with

amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*.
2012;33:2527.e11-6.

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain*. 2013 Feb 28. [Epub ahead of print]

Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Iguchi Y, Kobayashi K, Kimata T, Waza M, Tanaka F, Mori I, Sobue G. dnc-1/dynactin 1 Knockdown Disrupts Transport of Autophagosomes and Induces Motor Neuron Degeneration. *PLoS One*. 2013;8:e54511.

Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, Nakai A, Sobue G. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun*. 2013;4:1405.

Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med*. 2013;5:221-34.

H.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得 特記なし。
- 2.実用新案登録 特記なし。

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化 研究事業）
分担研究報告書

次世代シークエンサーを用いた遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子探索
分担研究者 服部信孝 順天堂大学脳神経内科主任教授

研究要旨

パーキンソン病（PD）は年齢依存的に罹患率が上昇する神経難病であり、超高齢化社会を迎えた本邦において、本疾患の病態解明・新規治療薬の開発並びに根治療法の開発を推進し早急に克服すべき疾病である。PD は稀に家族性に発症し、それらの家系について分子遺伝学的手法を用いて原因遺伝子を単離し、その機能と病態を明らかにすることは、家族性のみならず通常の孤発性 PD の病態機序解明への礎となる。本研究では原因遺伝子未同定の常染色体劣性遺伝性 PD 家系において連鎖解析と次世代シークエンサーによる全エクソン配列解析を組み合わせ、原因遺伝子の単離を目指す。本年度は対象家系 3 家系 6 例について、次世代シークエンサーを用いたエクソーム解析を実施し、全エクソン領域の塩基配列データを得た。その結果、4 家系から合計 24 種の候補遺伝子変異を見出した。今後見出された候補遺伝子変異について検証し原因遺伝子単離を行う。本研究により次世代シークエンサーを用いたゲノム解析は同時に複数の PD 発症に関与する新規遺伝子を単離可能である事が示唆された。

A.研究目的

PD の原因究明に向け、原因遺伝子が未知の常染色体劣性遺伝性パーキンソン病（PD）家系において遺伝子座を決定し、新規原因遺伝子を同定することを目的とする。

B.研究方法

家族性パーキンソン病の 3 家系 6 例について、次世代シークエンサーを用いたエクソーム解析を実施し、全エクソン領域の塩基配列データを得た。9 家系について SNP array を用いたゲノムワイドジェノタイピングを行い、オート接合性マッピングならびに連鎖解析を並行して実施し、複数の候補遺伝子領域の絞り込みを行った。

（倫理面への配慮）

研究対象者に対するプライバシーの保護など、人権擁護上の問題について十分に配慮し、個人情

報の保管体制を整えた。DNA サンプル採取の際は文書でインフォームド・コンセントを得た。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日文科省・厚労省・経済省告示第 1 号）」を遵守し、それに準じた倫理委員会で承認を得た。

C.研究結果

エクソーム解析の結果、合計約 25 万種類の多型を得た（1 例平均 4 万種類）。得られた多型からアミノ酸置換を伴う新規（未報告）の多型を選別、さらにオート接合体領域または連鎖領域内に存在する多型について家系内での解析を行い病因性の検証を行った。その結果、4 家系から合計 24 種の候補遺伝子変異を見出した。

D.考察