

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）研究事業

神経系疾患の集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する拠点研究 に関する研究

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 辻 省次

平成26（2014）年 3月

総合研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告 神経系疾患の集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する拠点研究 に関する研究 辻 省次	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11

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

神経系疾患の集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する拠点研究

研究代表者：所属機関 東京大学医学部附属病院
氏名 辻 省次
研究分担者：所属機関 東京大学医学部附属病院
氏名 後藤 順, 高橋 祐二
所属機関 東京大学・新領域創成科学研究科
氏名 森下 真一

本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム配列解析拠点、および、高度のゲノムインフォマティクス拠点を整備し、神経疾患の病因・病態機序を解明することである。活動方針としては、1. 拠点としての技術開発、研究の推進、2. 一般研究拠点との連携に基づく研究、3. 難治性疾患克服研究事業の研究班との連携に基づく研究、4. 日本人ゲノムの variation database の構築、5. ゲノムインフォマティクス研究、をテーマとして研究を進めた。次世代シーケンサーを用いた解析拠点を構築し、総計で 5,565 件の解析を実施し、遺伝性神経疾患、孤発性神経疾患の発症に関与する新規の遺伝子を3つ見出したこと、診断未確定の疾患について、網羅的な全エクソン配列解析により、64 例について診断を確定できた。

A.研究目的

本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム配列解析拠点、および、高度のゲノムインフォマティクス拠点を整備し、神経疾患の病因・病態機序を解明することである。さらに、神経系疾患のゲノム解析拠点として、本研究事業の一般研究（以下、一般研究）や他の難治性疾患克服研究事業の研究班との連携のもとに、神経系疾患の病因、病態機序の解明、診断未確定の神経難病の解明に貢献することを目的としている。本研究では、の特色は、遺伝性神経疾患、孤発性神経疾患の病因の解明を実現するために、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム配列解析に基づく研究を強力に推進するという点にある。

遺伝性神経疾患については、家系が小規模である、家系数が少ないなどにより病因の解明が実現していない疾患が数多く存在するが、本研究により、候補領域の絞り込みが十分にできない場合であっても、効率よくその病因遺伝子の解明をめざす。

孤発性神経疾患については、これまでに行われているゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study, GWAS) では発症機構の解明は困難であり、ゲノム上の全遺伝子について、大規模ゲノム配列解析を行うことにより、GWAS では見出し得なかった、疾患に対する影響度の大きいゲノム要因（疾患感受性遺伝子）を解明するという点に特長・独創性がある。孤発性神経疾患の病因の解明には、GWAS の理論的支

柱である common disease-common variants 仮説では不十分であり、最近の研究成果に基づき、common disease-multiple rare variants 仮説に立つアプローチ、すなわち、低頻度の variants を含め、網羅的なゲノム配列解析に基づき、孤発性神経疾患の病因、病態機序を解明することを目的としている。次世代シーケンサーは、最近になりようやく実用化されたが、膨大な規模のデータが得られ、ゲノム配列の 30-50 倍以上の冗長度でデータを取得し、高度なゲノムインフォマティクス解析を実施する必要がある、ゲノムインフォマティクス拠点を含めて、大規模ゲノム配列解析拠点を整備し、本研究を強力に推進する。

B.研究方法

次世代シーケンサーの最先端の機器である HiSeq2500 を 2 台の整備、次世代シーケンサーでの解析に必要な robotics の整備などにより、ゲノム解析のスループットの高いパイプラインを構築し、大規模サンプルの解析を可能にした。ゲノムデータの解析に関しても、次世代シーケンサーから産生される膨大なデータを処理するために必要なサーバーシステムを構築した。サーバーシステムは 73 nodes x 12 cores + 5 nodes x 24 cores + 2 nodes x 48 cores = 1,092 cores, memory 96GB x 73 + 128GB x 4 + 256GB x 2 + 512GB x 1 = 8,544 GB, HDD 2PB で構成されるシステムを整備した。その結果

として、インフォマティクス解析を含め、288 exome/month, 16 WG/month 以上のスループットを実現することができた。

近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチー (HMSN-P)、多系統萎縮症、筋萎縮性側鎖孤硬化症などの疾患について、連鎖解析による候補領域の絞り込みと、exome-シーケンシング、全ゲノムシーケンシングを実施し、候補領域内の病原性変異の探索を進めた。多系統萎縮症については、多系統萎縮症多発家系で見出された病原性遺伝子について、孤発性多系統萎縮症および健常コントロールの大規模サンプルを用いて、関連解析を行った。

(倫理面への配慮)

ゲノム解析研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って適切に実施した。

C.研究結果

本研究では、1. 拠点としての技術開発、研究の推進、2. 一般研究拠点との連携に基づく研究、3. 難治性疾患克服研究事業の研究班との連携に基づく研究、4. 日本人ゲノムの variation database の構築、5. ゲノムインフォマティクス研究、をテーマとして研究を進めた。

1. 拠点としての技術開発、研究の推進：

次世代シーケンサーの拠点を整備し、平

成 26 年 1 月の段階で、全ゲノム配列解析を 79 件、全エクソーム配列解析を 4,657 件、RNA 配列解析を 88 件、Target シーケンシングとして 723 件を実施している。

A. ゲノムインフォマティクスの解析パイプラインの構築：

まずサンプルから解読されたリードを BWA を使って標準ゲノムへとアラインメントする。ヒトゲノムから収集した DNA 断片配列をヒト標準ゲノムへと写像するため、ミスマッチ率は低く想定できるので高速に写像できる。次にアラインメントされたリードの率、PCR duplication 率、挿入長の頻度分布、Quality Value の頻度分布をみて、配列を高品質に解読できたか否かを品質チェックする。つづいて single nucleotide variation (SNV) もしくは大規模な構造変異の検出をおこなう。マルチプルアラインメントを分析して SNV を抽出できるようにし、信頼性の高い SNV を残し、ホモ接合、ヘテロ接合へ分類できるようにした。

新生突然変異解析の場合は、両親になく子供の DNA に入った突然変異や、生殖細胞になく、体細胞の DNA に入った突然変異を探索する。偽陽性の変異が非常に多いことが検討課題で、変異の候補を減らさず、偽陽性を去する精度の高い手法を確立した。

B. 遺伝性神経疾患の病因遺伝子の解明、 孤発性神経疾患の疾患発症に関連する

遺伝子の解明。

遺伝性神経疾患については、家族性筋萎縮性側索硬化症、家族性認知症疾患、家族性てんかん、家族性ミオパチーをはじめとして、研究を進めており、これまでにわれわれが開発したハイスループットの連鎖解析システム (SNP HiTLink) を用いた連鎖解析と、exome/全ゲノム解析を統合的に進めた。

これまでに、近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチー (HMSN-P) (Ishiura et al. *Amer. J. Hum. Genet.* 2012)、多系統萎縮症 (Mitsui et al. *New Engl J Med* 2013)、筋萎縮性側鎖硬化症 (Takahashi et al. *Am J Hum Genet* 2013) の病因遺伝子の解明を達成した。

近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチー (HMSN-P)：

連鎖解析に基づき、第 3 番染色体セントロメア周辺に、最大 LOD スコアが 5 を認める 31.4 Mb の領域を見出した。ハプロタイプ解析により、この領域内に 3.3 Mb の創始者ハプロタイプを認め、これが最少候補領域と考えられた。エクソーム解析により、201,223 個の variants が検出されたが、最少候補領域内の新規のアミノ酸置換を伴う変異として、TRK-fused gene (TFG) の c.854C>T (p.Pro285Leu) を見出した。本変異は 4 家系全てにおいて認められ、共分離が確認された。本変異は日本人対照者 482 名に存在しなかった。ハプロタイプ解析から

は、2つの独立した創始者が想定された。最少領域内に存在し、エクソーム解析により十分な配列情報が取得できなかったエクソンについては、個別にPCRによる増幅、Sanger法による直接塩基配列解析を行ったが、上記以外の変異は認めなかった。以上より、TFGが病因遺伝子であることを明らかにした。

多系統萎縮症：

稀に存在する多系統萎縮症多発家系6家系について、連鎖解析を行い、候補領域を80 Mbの範囲にまで絞り込むことができた。発症者1例に対して全ゲノム解析を行ったところ、全ゲノム中に参照配列と異なる変異は3,492,429個得られ、うち連鎖解析による候補領域中には54,306個得られた。この中から、遺伝子の翻訳領域にあり、アミノ酸置換を伴う変異は78個に絞られた。家族性MSAの頻度が極めて稀であることから、原因変異は既存のデータベースに存在しない新規の変異である可能性が高いと考え、変異データベースであるdbSNP130に登録がない変異を探したところ4個の変異に絞り込まれた。さらに日本人の健常者180人のサンプルを用いて変異の頻度を確認したところ、COQ2遺伝子のM78Vホモ接合性変異のみがデータベースにも日本人健常者180人にも見られないことが分かった（COQ2遺伝子にはM78V変異の他、比較的頻度の低いV343A変異も同定された）。以上より、COQ2遺伝子のM78V-V343A変

異が発症に関わっている可能性が最も高いと考えられた。残りの5家系についても、COQ2遺伝子をシーケンスしたところ、もう1家系で発症者2例にR337X/V343Aの複合ヘテロ接合性変異が独立して確認され、家系内の共分離も確認された。COQ2遺伝子は、体内でコエンザイムQ10を合成する酵素の一つであり、実際にM78V-V343Aホモ接合性変異患者の凍結脳組織やR337X/V343A複合ヘテロ接合性変異患者のリンパ芽球様細胞では、コエンザイムQ10の組織内濃度が低下していることが確認された。

次に、家族性MSAの原因遺伝子であるCOQ2遺伝子が、孤発性のMSAとも関連するかどうかを検討するため、患者・対照群に対してCOQ2遺伝子をシーケンスして変異の関連解析を行った。日本国内のコンソーシアム、北海道大学神経内科、鹿児島大学神経内科などから提供を受けたMSA患者群363例と対照群520例、ヨーロッパのコンソーシアムから提供を受けたMSA患者群223例と対照群315例、北米のコンソーシアムから提供を受けたMSA患者群172例と対照群294例を解析対象とした。COQ2遺伝子の全エクソンをシーケンスしたところ、患者群・対照群で合わせて13種類の変異（P22L, F29L, P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, N336H, R337Q, V343A）が検出された。ほとんどの変異は、1例にしか見られない

稀な変異であったが、V343A の頻度は比較的高く日本人サンプルにのみ観察された。

V343A のアレル頻度でみると、患者群で 4.8%、対照群で 1.6%であり、オッズ比 3.05、 p 値 1.5×10^{-4} と有意な関連があることが分かった。また、V343A 変異をヘテロ接合性に持っている MSA 患者と COQ2 変異を持たない健常者のリンパ芽球様細胞からミトコンドリア分画を抽出して酵素活性を比べてみると、V343A 変異キャリアーMSA 患者例の酵素活性は、変異を持たない健常例と酵素活性と比べて活性が低下していることが確認された。このことから V343A は実際に機能障害性に働く変異であることが分かった。

その他の稀な 12 種類の変異 (P22L, F29L, P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, N336H, R337Q) については意義付けが不明であったため、変異体の機能を解析するために酵母を用いた機能補完アッセイを行った。coq2 遺伝子を欠失させた酵母は電子伝達系を利用したエネルギー産生ができなくなるため、グリセロールなど非発酵性炭素源を培地にして培養すると増殖できない。この coq2 欠失酵母に対して、ヒト COQ2 遺伝子の cDNA を用いて形質転換すると、非発酵性炭素源における増殖能力が回復する。このような機能補完現象を利用して、各々の変異体 cDNA を導入した時に機能補完が起きるかどうかを検討した。その結果、9 種類の変異 (P49H, S57T,

R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, R337Q) の cDNA を導入した coq2 欠損酵母では、十分な増殖能の回復が見られず、これらの変異は機能が障害されていると考えられた。9 種類の機能障害性変異のうち、8 変異が 8 例の患者に見られ、1 変異が 1 例の対照に見られた。日本、ヨーロッパ、北米の全サンプルを混ぜて検討すると、758 例の MSA 患者中 8 例、1129 例の対照者中 1 例に機能障害性変異がヘテロ接合性に認められたこととなり、オッズ比 11.97、 p 値 0.004 と有意な関連があることが分かった。

筋萎縮性側索硬化症：

連鎖解析及び全ゲノム配列解析により、病原性変異の可能性が高いものとして ERBB4 c.2780G>A (p. Arg927Gln) を同定した。FALS 364 例、SALS818 例の変異スクリーニングにより、カナダ人家系で同一変異を、また日本人孤発例で de novo 変異 c.3823C>T (p. Arg1275Trp) を同定した。孤発例においては、本人および両親の SNP genotyping により家族関係を確認した。ハプロタイプ解析により、c.2780G>A 変異は日本人家系とカナダ人家系で独立に生じていることを確認した。変異が認められたアミノ酸は、種を越えて保存されており、PolyPhen-2 を用いたアミノ酸置換の影響予測では Probably damaging と判定された。ErbB4 は受容体チロシンキナーゼであり、Neuregulin (NRG) の結合により二量体化して自己リン酸化され、下流のシグナルを

活性化する。COS-7 を用いた発現実験により、NRG-1 による ErbB4 の自己リン酸化が、変異特異的に低下していることが判明した。以上より、ERBB4 が家族性筋萎縮性側索硬化症の病因遺伝子であると結論し、ALS19 と命名した (OMIM #615515, <http://omim.org/entry/615515>),

C. 診断未確定の疾患の診断への応用：

次世代シーケンサーを用いた全エクソーム配列解析を、診断未確定の疾患の診断に応用をした。これまでに、診断を確定できた症例は、脊髄小脳変性症 6 例、家族性痙性対麻痺 40 例、運動ニューロン疾患 1 例、遺伝性末梢神経疾患 1 例、遺伝性筋疾患 8 例、プリオン病 2 例、スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 4 例、遺伝性脳小血管病 1 例、副腎白質ジストロフィー 1 例であった。

2. 一般研究拠点との連携に基づく研究：

遺伝性末梢神経疾患 (Charcot-Marie-Tooth 病), HAM の 591 例について exome 解析を完了し、一般研究拠点にデータの返却を完了しており、そのデータに基づく研究が一般研究拠点の方で順調に進んでいる。

進行性核上性麻痺についても、検体収集体制の構築が行われ、現在までに、51 件の全エクソーム配列解析を実施した。

3. 難治性疾患克服研究事業の研究班との連携に基づく研究：

これまでに神経変性班、運動失調班などとの連携が進んでおり、あわせて、exome 81 例、全ゲノム解析 1 例の実績があり、各研究機関の研究を支援する機能を果たしている。

4. 日本人ゲノムの多様性データベースの構築と公開

次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析の結果の解釈には、日本人ゲノムの多様性に関するデータベースが必須となる。これまでに構築されている欧米のデータベースには、日本人ゲノムの情報はわずかにしか登録されておらず、日本人を対象とした研究の推進において、変異情報を適切に解釈する上で困難な面があった。このような背景から日本人の大規模健常者集団の variation database は、本研究班のみならず、わが国のゲノム医学研究においても必須の研究リソースとなると考えられる。そこで、他の 4 拠点と連携をして、1,208 名規模の日本人ゲノムの variation database を整備し、公開した (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>)。

5. ゲノムインフォマティクス研究：

次世代シーケンサーから得られる配列は、基本的に 100-150bp の short read であり、リ

ピート配列伸長や、構造変異の検出力は弱い。次世代シーケンサーで得られた short read から、リピート伸長配列の存在を検出するために、リピートモチーフ毎に集計しその分布を明らかにするアルゴリズムを開発した。さらに、paired end read を利用して、そのリピートモチーフのゲノム上の位置を推定するアルゴリズムを開発した。つづいて推定した位置の DNA を PCR 増幅し Pacific Biosciences 社のシーケンサー RS II により平均長 5000 塩基の DNA 断片を解読しアセンブリすることにより、1000～5000 塩基長のリピートモチーフを明らかにすることができる。実際 SCA31 を 11 サンプル解読することにより長さが 2800～3800 塩基の多様なリピート伸長を同定できた (Doi K, et al. *Bioinformatics* 2013)

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた解析拠点を構築することができ、総計で 5,565 件の解析を実施し、遺伝性神経疾患、孤発性神経疾患の発症に関与する新規の遺伝子を 3 つ見出したこと、診断未確定の疾患について、網羅的な全エクソン配列解析により、64 例について診断を確定できたことは本拠点の成果である。

病因遺伝子の探索研究においては、目的に応じて、連鎖解析、全ゲノム配列解析、全エクソン配列解析を柔軟に適用できるシステムを構築したことが重要であった。ま

た、神経疾患に多く見られるリピート配列伸長に対しても新たな解析アルゴリズムを発表した点など、ゲノムインフォマティクスの面でも貢献ができた。

一般研究班との連携も積極的に行い、642 件の解析実績を上げた点も特筆できる。さらに、多くの難治性疾患克服研究事業の研究班との連携も積極的に行い、新規病因遺伝子の探索、診断未確定の症例に対する、診断確定で貢献するなどの実績を上げた。

次世代シーケンサーを用いた解析拠点構築は、1. パイプラインを整備することにより、安定して精度の高いゲノム配列を得る事ができる、2. インフォマティクスのパイプラインの整備により、高度のゲノムインフォマティクス解析を実現できる、3. データの集積ができ、日本人ゲノムの情報をデータベース化することにより、次世代シーケンサーで得られるデータの解釈に対して重要な情報を提供できる、という点で、大きな意義があるものであり、今後、このような拠点がさらに発展することが、わが国の研究者コミュニティの研究全体の推進にとって重要である。

1,208 人の日本人健康者について、日本人ゲノムの多様性に関する頻度情報を公開したが、このようなデータは、わが国の研究者コミュニティが積極的にそれぞれの研究に活用でき、その意義は大きいと考え、この点でも、本研究拠点（5 拠点）の成果として重要である。

次世代シーケンサーを用いた解析のニーズは今後ますます増大すると予測される。ゲノム解析のパイプライン、ゲノムインフォマティクスのパイプライン、充実したデータベースを参照することにより、ゲノム配列の解釈が格段に強化される点などで、このような拠点の構築、維持、発展は、わが国の研究者コミュニティのそれぞれの研究にも大きく貢献するところである。今後の研究の方向性として、クリニカルシーケンシングと呼ばれる分野、すなわち、次世代シーケンサーを診断未確定の難病の診断に積極的に応用していくことが重要になる。また、医療制度の上でも、最先端のゲノム解析を診療に応用する場合、保険収載、laboratory-developed test (LDT) としてどのように位置づけるか、薬事承認を含めて検討をしていく必要がある。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた解析拠点の構築を行い、遺伝性神経疾患、孤発性神経疾患の発症に関わる新規の遺伝子を3つ見出した。また、数多くの診断未確定の疾患に対して診断を確定することができた。一般研究、難治性疾患克服研究事業の研究班と積極的に連携し、次世代シーケンサーを用いた解析を行い、拠点としての役割を果たした。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

- 1) 国内
口頭発表 9件
原著論文による発表 0件
それ以外（レビュー等）の発表 2件
そのうち主なもの

論文発表

- 辻 省次, 石浦 浩之, 三井 純. 神経変性疾患解明への次世代シーケンサーの応用. **Annual Review神経2012**. 2012:112-121. 中外医学社.
- 三井 純, 石浦 浩之, 辻 省次. 東大病院ゲノム医学センターにおける取り組み. **Brain and Nerve**. 2013; 65(3): 247-55.

学会発表

- 三井 純, 土井 晃一郎, 石浦 浩之, 高橋 祐二, 後藤 順, 森下 真一, 辻 省次. 疾患と関連する稀で多様な変異の検出を目的としたpooled DNA解析. **第52回神経学会総会**, 名古屋, 2011年5月19日.
- 石浦浩之, 辻省次. 次世代シーケンサーを用いた遺伝性神経疾患の研究. **第52回神経学会総会シンポジウム**, 名古屋, 2011年5月19日.
- 三井 純, 石浦 浩之, 市川 弥生子, 後藤 順, 辻 省次. 家族性MSAおよびMSA・PD多発家系の全ゲノム解析. **第53回神経学会総会**, 東京, 2012年5月25日.
- 三井 純. Exome解析による孤発性疾患の疾患関連遺伝子の探索. **第54回神経学会学術大会シンポジウム**, 東京, 2013年6月1日.
- 石浦浩之, 辻省次. 近位筋優位運動感覚ニューロパチー(HMSN-P)の病因遺伝子. **第54回神経学会学術大会シンポジウム**, 東京, 2013年5月31日.
- 三井 純, 後藤 順, 辻 省次. エクソーム解析による遺伝的異質性の高い疾患に対する遺伝子検査. **第20回日本遺伝子診療学会大会**, 浜松, 2013年7月19日.
- 三井 純, 辻 省次. パーソナルゲノム解析が医療を変貌させる. **第85回日本遺伝学会市民公開講座**, 横浜, 2013年9月21日.
- 三井 純, 松川 敬志, 石浦 浩之, 福田 陽子, 市川 弥生子, 伊達 英俊, Budrul Ahsan, 中原 康雄, 百瀬 義雄, 高橋 祐二, 岩田 淳, 後藤 順, The MSA Research Collaboration, 辻 省次. COQ2変異は家族性・孤発性多系統萎縮症と関連する. **第58回日本人類遺伝学会**,

- 仙台, 2013年11月22日.
9. 石浦浩之, 高紀信, 嶋崎晴雄, 三井純, 高橋祐二, 後藤順, 吉村淳, 土井晃一郎, 森下真一, 佐々木秀直, 瀧山嘉久, 辻省次, JASPAC. 常染色体劣性遺伝が疑われた遺伝性痙性対麻痺症例のexome解析. 第58回日本人類遺伝学会, 仙台, 2013年11月23日

2) 海外

- | | |
|------------------|------|
| 口頭発表 | 5 件 |
| 原著論文による発表 | 23 件 |
| それ以外 (レビュー等) の発表 | 1 件 |
- そのうち主なもの

論文発表

1. Mitsui J, Fukuda Y, Azuma K, Tozaki H, Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, and Tsuji S. Multiplexed resequencing analysis to identify rare variants in pooled DNA with barcode indexing employing next-generation sequencer Running Title: Multiplexed resequencing analysis of pooled DNA. *J. Hum. Genet.* 55: 448-455, 2010
2. Tsuji S. Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing. *Hum. Mol. Genet.* 19: R65-70, 2010 (doi: 10.1093/hmg/ddq162, 2010)
3. Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, Yoshino H, Minami N, Smith DI, Lesage S, Aburatani H, Nishino I, Brice I, Hattori N, and 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: 75-89, 2010
4. Matsukawa T, Wang X, Liu R, Onuki Y, Kubota A, Hida A, Kowa H, Fukuda Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Aoki S, Takizawa T, Shimizu J, Goto J, Proud CG and Tsuji S. Adult-onset leukoencephalopathies with vanishing white matter with novel missense mutations in EIF2B2, EIF2B3, and EIF2B5. *Neurogenetics* 12: 259-61, 2011
5. Hashimoto Maeda M, Mitsui J, Soong B-W, Takahashi Y, Ishiura H, Hayashi S, Shiota Y, Ichikawa Y, Matsumoto H, Arai M, Okamoto T, Miyama S, Shimizu J, Inazawa J, Goto J and Tsuji, S. Increased gene dosage of myelin protein zero causes Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol.* 71: 84-92, 2012
6. Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, Goto J, Suzuki Y, Shimozawa N, Takano H, Onodera O, Nishizawa M, Aubourg P and Tsuji S. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3 and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics* 12: 41-50, 2011
7. Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. *Neurogenetics* 12:117-21, 2011
8. Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Higasa K, Yoshimura J, Saito TL, Ahsan B, Takahashi Y, Goto J, Iwata A, Niimi Y, Riku Y, Goto Y, Mano K, Yoshida M, Morishita S, Tsuji S. CSF1R mutations identified in three families with autosomal dominantly inherited leukoencephalopathy. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 159B: 951-7, 2012
9. 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.* 91: 320-9, 2012
10. Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ranum LP, Tamaoki T, Ichikawa Y, Date H, Goto J, Tsuji S. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol.* 69: 1154-8, 2012
11. Taira M, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Hayashi T, Shimizu J, Matsukawa T, Saito N, Okada K, Tsuji S, Sawamura H, Amano S, Goto J, Tsuji S. Clinical features and haplotype analysis of newly identified Japanese patients with gelsolin-related familial amyloidosis of Finnish type. *Neurogenetics* 13: 237-43, 2012
12. Hida A, Ishiura H, Arai N, Fukuoka H, Hasuo K, Goto J, Uesaka Y, Tsuji S, Takeuchi S. Adult-onset Alexander disease with an R66Q mutation in GFAP presented with severe vocal cord paralysis during sleep. *J Neurol.* 259: 2234-6, 2012
13. Tsuji S. Neurogenomics view of neurological diseases. *Arch. Neurol.* 70:689-94, 2013 PubMed PMID: 23571861
14. Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I, and Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC). A homozygous

- mutation of C12orf65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J. Med. Genet.* 49:777-784, 2012
15. Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, Yamashita S, Kimura S, Oguni H, Morishita S, Tsuji S, Sasaki M, Hirose S. Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PLOS One* 8:e56120, 2013
 16. Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang L-S, Takahashi S, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Kosaka K, Yamamoto T, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Morihata T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Fujisawa Y, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuriha T, Serikawa T, Yoshimoto S, Nakagawa R, Kim J-W, Ki C-S, Won H-H, Na DL, Seo SW, Mook-Jung I, The Alzheimer Disease Genetics Consortium, St. George-Hyslop P, Mayeux R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yoshida M, Nishida N, Tokunaga K, Yamamoto K, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Schellenberg GD, Farrer LA. and Kuwano R. SORL1 Is Genetically Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PLoS ONE* 8: e58618, 2013
 17. Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H, Kanazawa I, Doi K, Yoshimura J, Morishita S, Goto J, Tsuji S. Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. *J. Neurol. Sci.*;331:158-60, 2013.
 18. Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee V M-Y, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Ozelius L, Foroud T, and Tsuji S. Mutations of COQ2 in familial and sporadic multiple system atrophy. *New Engl. J. Med.* 369:233-44, 2013
 19. Landouré G, Zhu PP, Lourenço CM, Johnson JO, Toro C, Bricceno KV, Rinaldi C, Meilleur KG, Sangaré M, Diallo O, Pierson TM, Ishiura H, Tsuji S, Hein N, Fink JK, Stoll M, Nicholson G, Gonzalez MA, Speziani F, Dürr A, Stevanin G, Biesecker LG; NIH Intramural Sequencing Center, Accardi J, Landis DM, Gahl WA, Traynor BJ, Marques W Jr, Züchner S, Blackstone C, Fischbeck KH, Burnett BG. Hereditary spastic paraplegia type 43 (SPG43) is caused by mutation in C19ORF12. *Human Mutation* 34:1357-60, 2013
 20. Isojima T, Doi K, Mitsui J, Oda Y, Tokuhiko E, Yasoda A, Yorifuji T, Horikawa R, Yoshimura J, Ishiura H, Morishita S, Tsuji S, and Kitanaka S. A recurrent de novo FAM111A mutation causes Kenny–Caffey syndrome type 2. *J Bone Mineral Res* (in press)
 21. Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Morisada N, Iijima K, Takada S, Araki A, Tanabe Y, Arai H, Yamashita S, Ohashi T, Oda Y, Ichiseki H, Hirabayashi S, Yasuhara A, Kawawaki H, Kimura S, Shimono M, Narumiya M, Suzuki M, Yoshida T, Oyazato Y, Tsuneishi S, Ozasa S, Yokochi K, Dejima S, Akiyama T, Kishi N, Kira R, Ikeda T, Oguni H, Zhang B, Tsuji S and Hirose S. Genotype–Phenotype Correlations in Alternating Hemiplegia of Childhood *Neurology* (in press)
 22. Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Astuta N, Sobue G, Shimozaawa N, Inuzuka T, Tsuji S, and Hozumi I. Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurol.* (in press)
 23. Ishiura H, Takahashi Y, Hayashi T, Saito K, Furuya H, Watanabe M, Murata M, Suzuki M, Sugiura A, Sawai S, Shibuya K, Ueda N, Ichikawa Y, Kanazawa I, Goto J, Tsuji S. Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses. *J. Hum. Genet.* (in press)
- 学会発表
1. Mitsui J, Morishita S, Tsuji S. Establishment of a pipeline for whole-exome sequencing of genes for

- lysosomal diseases –Application for association studies of multiple system atrophy (MSA)-. *4th International Forum for lysosomal storage disorders*, Tokyo, October 5th 2012
2. 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 (HMSN-P). *American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting*, San Francisco, November 7th 2012
 3. Matsukawa T, Yamamoto T, Seo S, Kumano K, Ichikawa M, Takahashi Y, Ishiura H, Mitsui J, Tanaka M, Goto J, Kurokawa M, Tsuji S. Hematopoietic stem cell transplantation for adolescent and adult onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting*, San Francisco, November 7th 2012
 4. JAMSAC (Japan Multiple System Atrophy Research Consortium), Jun Mitsui, Yaeko Ichikawa, Jun Goto, Shoji Tsuji. Molecular genetics of multiple system atrophy: results from the Japan Multiple System Atrophy Research Consortium. *17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorder*, Sydney, June 2013.
 5. Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Goto J, Yamamoto Y, Shirahige K, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Kondo T, Murayama S, Japan Multiple System Atrophy Consortium, Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer Disease, Japanese Parkinson Disease Susceptibility Gene Consortium, Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S for NAMSASG, and Tsuj S. Mutations of COQ2 in Familial and Sporadic Multiple System Atrophy. *American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting*, Boston, October 24th 2013

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1 特許取得
多系統萎縮症リスクの検査方法, 検査キット, 及び多系統萎縮症の治療又は予防薬(特願 2013-20763)

2.実用新案登録

該当無し

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Mitsui J, Fukuda Y, Azuma K, Tozaki H, Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, and Tsuji S.	Multiplexed resequencing analysis to identify rare variants in pooled DNA with barcode indexing employing next-generation sequencer Running Multiplexed resequencing analysis of pooled DNA. Title:	<i>J. Hum. Genet.</i>	55	448-455	2010
Tsuji S.	Genetics of neurodegenerative diseases: insights from high-throughput resequencing.	<i>Hum. Mol. Genet</i>	19	R65-70	2010
Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, Yoshino H, Minami N, Smith DI, Lesage S, Aburatani H, Nishino I, Brice I, Hattori N, and Tsuji S.	Mechanisms of genomic instabilities underlying two common fragile site-associated loci, PARK2 and DMD, in germ cell and cancer cell lines.	<i>Am J Hum Genet</i>	87	75-89	2010
Matsukawa T, Wang X, Liu R, Onuki Y, Kubota A, Hida A, Kowa H, Fukuda Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Aoki S, Takizawa T, Shimizu J, Goto J, Proud CG and Tsuji S.	Adult-onset leukoencephalopathies with vanishing white matter with novel missense mutations in EIF2B2, EIF2B3, and EIF2B5.	<i>I. Neurogenetics</i>	12	259-61	2011
Hashimoto Maeda M, Mitsui J, Soong B-W, Takahashi Y, Ishiura H, Hayashi S, Shirota Y, Ichikawa Y, Matsumoto H, Arai M, Okamoto T, Miyama S, Shimizu J, Inazawa J, Goto J and Tsuji, S.	Increased gene dosage of myelin protein zero causes Charcot-Marie-Tooth disease.	<i>Ann Neurol.</i>	71	84-92	2012

Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, Goto J, Suzuki Y, Shimozawa N, Takano H, Onodera O, Nishizawa M, Aubourg P and Tsuji S.	Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3 and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes.	<i>Neurogenetics</i>	12	41-50	2011
Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S.	Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1.	<i>Neurogenetics</i>	12	117-21	2011
Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Higasa K, Yoshimura J, Saito TL, Ahsan B, Takahashi Y, Goto J, Iwata A, Niimi Y, Riku Y, Goto Y, Mano K, Yoshida M, Morishita S, Tsuji S.	CSF1R mutations identified in three families with autosomal dominantly inherited leukoencephalopathy.	<i>Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.</i>	159B	951-7	2012
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.	<i>Am J Hum Genet.</i>	91	320-9	2012
Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ranum LP, Tamaoki T, Ichikawa Y, Date H, Goto J, Tsuji S.	C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan.	<i>Arch Neurol.</i>	69	1154-8	2012
Taira M, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Hayashi T, Shimizu J, Matsukawa T, Saito N, Okada K, Tsuji S, Sawamura H, Amano S, Goto J, Tsuji S.	Clinical features and haplotype analysis of newly identified Japanese patients with gelsolin-related familial amyloidosis of Finnish type.	<i>Neurogenetics</i>	13	237-43	2012
Hida A, Ishiura H, Arai N, Fukuoka H, Hasuo K, Goto J, Uesaka Y, Tsuji S, Takeuchi S.	Adult-onset Alexander disease with an R66Q	<i>J Neurol.</i>	259	2234-6	2012

	mutation in GFAP presented with severe vocal cord paralysis during sleep.				
Tsuji S.	Neurogenomics view of neurological diseases.	<i>Arch. Neurol.</i>	70	689-94	2013
Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I, and Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC).	A homozygous mutation of C12orf65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55).	<i>J. Med. Genet.</i>	49	777-784	2012
Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, Yamashita S, Kimura S, Oguni H, Morishita S, Tsuji S, Sasaki M, Hirose S	Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients.	<i>PLOS One</i>	8	e56120	2013
Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang L-S, Takahashi S, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Kosaka K, Yamamoto T, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Moriaha T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Fujisawa Y, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuriha T, Serikawa T, Yoshimoto S, Nakagawa R, Kim J-W, Ki C-S, Won H-H, Na DL, Seo SW, Mook-Jung I, The Alzheimer Disease Genetics Consortium, St. George-Hyslop P, Mayeux R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yoshida M, Nishida N, Tokunaga K, Yamamoto K, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Schellenberg GD, Farrer LA, and Kuwano R.	SORL1 Is Genetically Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians.	<i>PLoS ONE</i>	8	e58618	2013
Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H, Kanazawa I, Doi K, Yoshimura J, Morishita S, Goto J, Tsuji S.	Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal	<i>J. Neurol. Sci.</i>	331	158-60	2013

	recessive 1.				
Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee V M-Y, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Ozelius L, Foroud T, and Tsuji S.	Mutations of COQ2 in familial and sporadic multiple system atrophy.	<i>New Engl. J. Med.</i>	369	233-44	2013
Landouré G, Zhu PP, Lourenço CM, Johnson JO, Toro C, Bricceno KV, Rinaldi C, Meilleur KG, Sangaré M, Diallo O, Pierson TM, Ishiura H, Tsuji S, Hein N, Fink JK, Stoll M, Nicholson G, Gonzalez MA, Speziani F, Dürr A, Stevanin G, Biesecker LG; NIH Intramural Sequencing Center, Accardi J, Landis DM, Gahl WA, Traynor BJ, Marques W Jr, Züchner S, Blackstone C, Fischbeck KH, Burnett BG.	Hereditary spastic paraplegia type 43 (SPG43) is caused by mutation in C19ORF12.	<i>Human Mutation</i>	34	1357-60	2013
Isojima T, Doi K, Mitsui J, Oda Y, Tokuhiko E, Yasoda A, Yorifuji T, Horikawa R, Yoshimura J, Ishiura H, Morishita S, Tsuji S, and Kitanaka S.	A recurrent de novo FAM111A mutation causes Kenny–Caffey syndrome type 2.	<i>Bone Mineral Res</i>			(in press)
Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Morisada N, Iijima K, Takada S, Araki A, Tanabe Y, Arai H, Yamashita S, Ohashi T, Oda Y, Ichiseki H, Hirabayashi S, Yasuhara A, Kawawaki H,	Genotype–Phenotype Correlations in Alternating Hemiplegia of Childhood	<i>Neurology</i>			(in press)

Kimura S, Shimono M, Narumiya M, Suzuki M, Yoshida T, Oyazato Y, Tsuneishi S, Ozasa S, Yokochi K, Dejima S, Akiyama T, Kishi N, Kira R, Ikeda T, Oguni H, Zhang B, Tsuji S and Hirose S.					
Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Astuta N, Sobue G, Shimozawa N, Inuzuka T, Tsuji S, and Hozumi I.	Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan.	<i>Neurol</i>			(in press)
Ishiura H, Takahashi Y, Hayashi T, Saito K, Furuya H, Watanabe M, Murata M, Suzuki M, Sugiura A, Sawai S, Shibuya K, Ueda N, Ichikawa Y, Kanazawa I, Goto J, Tsuji S..	Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses.	<i>Hum. Genet.</i>			(in press)

