

201331015A

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25年度 総括・分担研究年度終了報告書

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26（2014）年 4月

目 次

I. 総括研究年度終了報告	
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. 分担研究年度終了報告	
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	7
神戸大学大学院医学研究科神経内科 戸田 達史	
2. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 疾患関連遺伝子の探索	9
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新規パーキンソン病原因遺伝子の探索	14
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	18
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	20
鳥取大学医学部脳神経内科 中島 健二	
6. タウオパチーの臨床像の多様性について	23
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	26
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	28
大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 望月 秀樹	
9. 相模原病院のバイオリソース構築に関する研究-2	30
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	31

1. 総括研究年度終了報告

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 (PD) のエクソンに存在する Rare ながら強いパーキンソン病 (PD) ゲノム因子を発見するため、とくに孤発性 PD 患者を中心に、全エクソン塩基配列解読 (エクソーム解析) をおこなった。715 例の PD 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 ソフトウェアでヒト参照配列 hg19 ヘマッパし、GATK ソフトウェアで、参照配列とことなる SNV (single nucleotide variant) を約 30 万個検出した。715 検体のエクソームデータの平均被覆は 126.1x であり、全エクソン配列の 94.9% のエリアが 10x 以上で被覆された。これは、孤発性 PD 患者 755 人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。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。また新規家族性 PD 原因遺伝子を単離した (投稿準備中)。孤発性 PD において関連が指摘されている遺伝子は家族性 PD の発症や合併症状にも影響を及ぼしている。またパーキンソン病の多彩な臨床症状、特に non-motor に関する臨床所見は発症機序から、進行期での影響が大きく、その背景因子の解明を開始している。特に α シヌクレインがキーとなり、患者サンプルと α シヌクレイン凝集を検討するシステムが遂に確立できた。特に多数のサンプルを同時に検討できるシステムであり、今後の治療戦略に有用である。

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。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 919 例の前向き臨床情報、ゲノム DNA を蓄積した。大規模 ALS 疾患コホートにおける遺伝子検体および臨床情報蓄積を基に、孤発性 ALS の進行に有意に影響する遺伝子多型を見出した。また、孤発性 ALS 患者の網羅的シーケンスデータから、細胞にとって有害になりうる rare variants を多数認めた。網羅的ゲノム解析により、孤発性 ALS の病態解明、治療法開発の端緒が開かれつつあると考えられる。また東北大学にて遺伝子検査を行った 115 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。

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、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方法を整備し、全国多施設共同研究体制の整備を進めた。また昨年度に引き続きバイオリソースの構築を

行った。DNA については 7 検体が送付済みで、髄液 15 検体 (PSP8 例、CBD4 例、FTD3 例)、血清 13 検体 (PSP5 例、CBD7 例、FTD1 例)、DNA13 検体 (PSP5 例、CBD7 例、FTD1 例)、剖検例 9 検体 (PSP5 例、CBD3 例、FTD1 例) の収集ができた。臨床解析としては CBD について臨床像と画像との対比を行い、バイオリソースとしての MRI、脳血流シンチグラムについて検討し、臨床像と画像診断との間に有意な関連を認めた。ま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。すでにブレインバンクとしてのゲノム提供を行っていたが本研究への協力のため、進行性核上性麻痺 (PSP) 1、000 例以上、皮質基底核変性症 (CBD) 400 例以上を有する米国メイヨークリニックブレインバンクとの対抗を考慮した。神経病理学的正常コントロールゲノムに加え、発症前 PSP 症例の提供で、独自の貢献が可能となった。また病理学的に確定診断がついた症例を対象とし、CBD の臨床診断基準の感度とその背景病理を明らかとすることを目的とした。日本人 CBS も背景病理は多彩である。発症 2 年に限ると、CBS、CBD いずれの臨床診断基準も感度が低い。

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、次世代シーケ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、次世代シーケ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) より稀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連関を解析し、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 (戸田)

エクソンに存在する Rare ながら強いパーキンソン病 (PD) ゲノム因子を発見するため、とくに孤発性 PD 患者を中心に、全エクソン塩基配列解読 (エクソーム解析) をおこなった。715 例の PD 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 ソフトウェアでヒト参照配列 hg19 ヘマッピングし、GATK ソフトウェアで、参照配列とことなる SNV (single nucleotide variant) を約 30 万個検出した。715 検体のエクソームデータの平均被覆は 126.1x であり、全エクソン配列の 94.9% のエリアが 10x 以上で被覆された。これは、孤発性 PD 患者 755 人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意

味する。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。

②次世代シーケンサーを用いた新規パーキンソン病原因遺伝子の探索 (服部)

パーキンソン病 (PD) の発症に関わる遺伝子を明らかにするため、本研究では家族性 PD を対象に複数の戦略、すなわち家族性 PD の新規原因遺伝子単離と孤発性 PD 発症感受性遺伝子 *glucocerebrosidase (GBA)* の臨床神経学的ゲノム解析を行った。その結果、新規の家族性 PD 原因遺伝子の単離に成功した (投稿準備中)。また、*GBA* 遺伝子ヘテロ変異は家族性 PD においても高頻度に検出され、認知機能障害および幻覚・妄想などの精神症状の合併に強く関連することが明らかとなった。

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)

パーキンソン病の発症及び臨床的多様性には様々な要因が関与している。大阪大学神経内科学では、クリニカルパスを利用した前向きコホート研究に取り組んでいる。パーキンソン病の包括的なデータベース構築具体的には背景因子、臨床・画像・生理学・生化学データの蓄積・解析を構築する。その中で、微量 α シヌクレイン蛋白解析を中心とした High throughput assay of amyloid formation の確立し、解析を開始した。今後は、そのデータを元に発症機序の解明に関する解析研究を行う。

④ALS 疾患関連遺伝子の探索 (祖父江)

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 919 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ゲノム網羅的遺伝子多型タイピング、次世代シーケンサーを応用した精度の高い ALS 関連遺伝子の解析、エクソーム解析を行った。その結果、孤発性 ALS の進行に有意に影響する遺伝子多型を見出した。また、孤発性 ALS 患者の網羅的シーケンズデータから、細胞にとって有害になりうる rare variants を多数認めた。網羅的ゲノム解析により、孤発性 ALS の病態解明、治療法開発の端緒が開かれつつあると考えられる。

⑤次世代シーケンサーを用いた ALS 遺伝子解析 (青木)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は上位および下位運動ニューロンを侵す進行性の神経変性疾患であり、その原因の究明が求められている。発症者の約 5% に家族歴があり、家族性 ALS と呼ばれる。これまで当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 115 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 28 家系に SOD1 遺伝子変異、9 家系に FUS/TLS 遺伝子変異を認めたが、78 家系では検索した遺伝子には異常を認めなかった。これらの家系において次世代シーケンサーを用いたターゲット・リシーケンスおよびエクソーム解析により新たな原因遺伝子の検索を行っている。

⑥PSP・CBD を含めたタウオパチー (中島)

1) 遺伝子試料の収集と遺伝子解析

PS・FTLD の患者登録を行なうとともに、2014 年 2 月までに、PSP 37 例、CBD 13 例、FTLD 7 例について臨床情報と共にゲノム DNA を収集し、東京大学神経内科において次世代シーケンサーによる遺伝子解析を行った。

2) 全国共同研究体制の整備

“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。また、“神経変性班”によって行われている PS 症例の生体試料収集研究との共同事業として、遺伝子試料収集を進める体制を整備した。

2014 年 2 月の時点で、25 施設にお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本研究の承認を進めており、9 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。

3) 診断基準と試料取り扱い方法の整備

既報の 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、試料の取り扱いに方法を整備した。

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)

昨年度に引き続きバイオリソースの構築を行った。平成 26 年 1 月末の時点で、CBD8 症例、PSP20 症例の通院患者が同定されている。入院等でバイオリソースの採取を行っており、髄液 15 検体 (PSP8 例、CBD4 例、FTD3 例)、血清 13 検体 (PSP5 例、CBD7 例、FTD1 例)、DNA13 検体

(PSP5例、CBD7例、FTD1例)、剖検例9検体(PSP5例、CBD3例、FTD1例)の収集ができた。本年度はこれに加えMRIや脳血流シンチグラムとCBDの臨床症状とを検討し、良好な対比を得ることができ、画像所見の有用性が確認できた。

⑧PSP・CBDを含めたタウオパチー(村山)

神経病理学的に変性型老化性変化が僅少であり、脳血管障害性病変を含まず、認知症のない200例をコントロールとして提供した。

CBD/PSP群については、以前に米国PSPバンクよりのゲノム取得幹旋時に東京大学神経内科には提供済みであったこと、米国PSPブレインバンクには1000例以上の病理診断確定PSP例が存在することより、別の貢献の可能性を検討した。

Lewy小体病においては、Lewy小体を有する症例は高齢者ブレインバンク半脳凍結例のほぼ1/3を占め、パーキンソン病(PD)ないしレビー小体型認知症(DLB)と診断されるものは、およそ5%であり、発症前Lewy小体病(pLBD)は臨床的Lewy小体病(PD/DLB)の6倍程度存在する。

当施設連続剖検例中2006年4月から2011年4月までの、当施設連続開頭剖検例324例を、抗4リピートアイソフォーム特異抗体(RD4)を含む変性型老化蓄積異常蛋白の網羅的検索から、tufted astrocyte(図1)が中脳に存在した34例を抽出し、臨床的にCBD/PSPと診断されていた5例を除く29例について、タウ病変分布がPSPに一致することを確認した。これらをpreclinical PSP(pPSP)と定義した。PSPとpPSPの比率は、PD/DLBとPLBDの比にほぼ一致する結果であった。

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)

タウオパチーは、病理学的にタウの蓄積を特徴とし、認知症や運動機能障害を来す、孤発性の神経変性疾患である。本症には代表的な物として進行性核上性麻痺(progressive supranuclear palsy:PSP)と皮質基底核変性症(corticobasal degeneration: CBD)が知られている。有効なバイオマーカーはなく、確定診断は、病理学的検索による。しかし、治療方法の開発の為には、正確な生前診断が必須であるが困難とされ、臨床診断名としてcorticobasal syndrome(CBS)と称されるようになってきている。本研究では、病理学的に確定診断がついた症例において、既報のCBD臨床診断基準の感度とその背景病理を明らかとすることを目的とした。対象は、病理診断済みで、メイヨーCBD診断基準(Boeve BF et al. Annals of neurology, 2003)ないし改訂ケンブリッジCBD診断基準(Mathew R et al. JNNP 2012)を満たした10例(67.9 ± 9.3歳、男:女=6:4)を対象とした。これらの背景病理の内訳はCBD3例、PSP3例、アルツハイマー病3例、非典型的4リピートタウオパチー1例であった。次にメイヨー基準と改定ケンブリッジ基準の診断感度は、発症後2年以内ではいずれも10%であり、全経過を通じるとメイヨー基準では90%、改定ケンブリッジ基準では100%であった。一方Armstrong MJらによる2013年NeurologyのCBD診断基準では、より感度が低く、特異度の上昇も認めなかった。この結果から、PSPとCBDを生前に区別するのは困難であること。また誤診しやすい疾患としてはアルツハイマー病が高頻度であることが明らかとなった。各疾患特有の臨床症状としてはPSPでは開眼失行、小脳性運動失調、さらにアルツハイマー病ではミオクロヌスを認めた。CBSの背景病理は多彩であり、発症2年に限ると臨床診断基準の感度は極めて低く、バイオマーカーの確立が望まれる。

D. 健康危険情報

E.

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. 分担研究年度終了報告

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
研究協力者 佐竹 渉 神戸大学大学院医学研究科神経内科 助教

研究要旨

エクソンに存在する Rare ながら強いパーキンソン病 (PD) ゲノム因子を発見するため、とくに孤発性 PD 患者を中心に、全エクソン塩基配列解読（エクソーム解析）をおこなった。715 例の PD 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 ソフトウェアでヒト参照配列 hg19 へマップし、GATK ソフトウェアで、参照配列とことなる SNV (single nucleotide variant) を約 30 万個検出した。715 検体のエクソームデータの平均被覆は 126.1x であり、全エクソン配列の 94.9% のエリアが 10x 以上で被覆された。これは、孤発性 PD 患者 755 人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。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

我々は、一塩基多型 SNP を解析したゲノムワイド関連解析を行い、4つの孤発性 PD 遺伝子 (*PARK16*, *BST1*, *α -synuclein*, *LRRK2*) を報告した (Satake *et al*, *Nature Genet* 2009)。これらは、その後の白人での大規模解析でも結果が再現された、確実な孤発性 PD 遺伝子である (IPDGC, *Lancet* 2011; Lill *et al*, *PLoS Genet* 2012, Do *et al*, *PLoS Genet* 2011 etc)。また、最近、機能的な面からも、*PARK16* 遺伝子 *RAB7L1* の、細胞内輸送の PD 病態への重要性・*LRRK2* との相互作用がしめされた (MacLeod *et al*, *Neuron* 2013)。

しかし一方、これらだけでは本症の遺伝背景は説明できず、他にも孤発性 PD 遺伝子は存在する。そこで本研究では、エクソンに存在する Rare ながら強い PD ゲノム因子を発見するため、とくに孤発性 PD 患者を中心に、全エクソン塩基配列解読（エクソーム解析）をおこなった。

B. 研究方法

C. 研究結果

715 例の PD 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 ソフトウェアでヒト参照配列 hg19 へマップし、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。715 検体のエクソームデータの平均被覆は 126x であり、全エクソン配列の 94.7% のエリアが 10x 以上で被覆された。これは、孤発性 PD 患者 715 人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。

さらに、われわれが以前ゲノムワイド関連解析で報告した 4つの孤発性 PD 遺伝子 (*PARK16*, *BST1*, *α -synuclein*, *LRRK2*; Satake *et al*, *Nature genet* 2009) に強い疾患リスクをもった rare variant が存在するかを明らかにするため、PD 患者 625 検体（上述データの一部）と非患者対照 259 検体のエクソン配列データを比較した。具体的には、PD 患者 625 検

体と非患者対照 259 検体の全エクソン配列データからエクソン領域に存在する SNV (single nucleotide variant) を抽出し、患者・対照群間で、SNV 頻度を Fisher's exact test で有意差検定した。

PARK16, *α-synuclein*, *LRRK2* には、遺伝子エクソン領域内に有意な SNV は検出しなかった (すべて $P>0.01$)。 *BST1* には比較的有意な SNV を検出したが ($P=0.0005$)、アレル頻度は患者群で 46%、対照群で 37%であり、強い疾患リスクをもつ rare variant ではなかった。また、この多型は、我々が以前報告した孤発性 PD 遺伝子 *BST1* の SNP (Satake *et al*, *Nature genet* 2009) とほぼ連鎖不平衡の多型であった。よって、これら孤発性 PD 遺伝子エクソンには強い rare variant risk は存在せず、イントロンなどの SNV が発症リスクとなっていると考えた。

孤発性 PD の発症ゲノム因子には、

(1) 強い疾患リスクをもつエクソン領域の rare variant

(2) リスクとしては強くはないが頻度は高い一塩基多型

(3) 非常に強い疾患リスクであり家族性 PD を引き起こすような変異の孤発性群への混入がある。

今後、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 リスク発見を目ざす。さらにこれまで蓄積した一塩基多型によるゲノムワイド関連解析データや、家族歴をもつ PD 患者データと比較することにより、孤発性 PD の遺伝背景を解明する。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子研究倫理委員会の承認をえて行った。

D. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Mizuta I *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. Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in *COQ2* in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 369, 233-244, 2013.

2. 学会発表

1. Satake W *et al*, Exome sequencing of Parkinson's disease in order to identify genetic variants with high disease-risk. American society of human genetics, 2013, Boston, USA.
2. Satake W *et al*, Search for rare-variant risks of Parkinson's disease by sequencing of candidate genes and exome sequencing. Movement disorder society, 2013, Sydney, Australia.

E. 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

筋萎縮性側索硬化症（ALS）疾患関連遺伝子の探索

研究分担者：祖父江 元 名古屋大学神経内科 教授

研究協力者：曾根 淳、熱田直樹、中村亮一、渡辺はづき 名古屋大学神経内科

平川晃弘、中枋昌弘 名古屋大学先端医療・臨床研究支援センター

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919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ゲノム網羅的遺伝子多型タイピング、次世代シーケンサーを応用した精度の高いALS関連遺伝子の解析、エクソーム解析を行った。その結果、孤発性ALSの進行に有意に影響する遺伝子多型を見出した。また、孤発性ALS患者の網羅的シーケンズデータから、細胞にとって有害になりうるrare variantsを多数認めた。網羅的ゲノム解析により、孤発性ALSの病態解明、治療法開発の端緒が開かれつつあると考えられる。

A.研究背景・目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は成人発症の神経変性疾患であり、上位および下位運動ニューロンが進行性に変性脱落することが特徴である。その結果、全身の筋萎縮、筋力低下をきたし、平均3年で死亡もしくは永続的な人工換気が必要な状態となる。治療法開発は喫緊の課題であり、そのためには病態関連遺伝子、分子の同定が必要である。

ALSの5-10%は家族性であり、その原因遺伝子の一部が判明している。しかし、大部分を占める孤発性ALS関連遺伝子は十分に分かっていない。従来報告されてきた孤発性ALS関連遺伝子多型はオッズ比1.5以下であり、ここからモデル動物を作製し、病態解析研究を進めることは難しい。より病態寄与度の高い遺伝子を見出し、病態的意義の検証、解析を行う系を確立する必要がある。

我々は神経変性疾患に関する調査研究班（神経変性班）を基にALS患者の大規模前向きコホート（JaCALS）を立ち上げ、既にALS患者919例の前向き臨床情報、DNA、B cell lineを蓄積し

た。この3点が結び付けられた大規模リソースは世界的にも類を見ない。本研究では、この研究リソースを用いて大規模ゲノム解析により孤発性ALSの疾患関連遺伝子を探索同定することを目的とする。

B.研究方法

多施設共同前向きALS患者コホートであるJaCALSの体制整備、拡大、運営を行った。参加施設数は30施設に拡大した。

JaCALS参加施設(30施設)およびメンバー

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		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	中野今治	京都府立医科大学	能登祐一 中川正法
静岡てんかん神経医療センター	小尾智一		三重大学	谷口彰
東名古屋病院	齋藤郁子		相模原病院	長谷川一子
名古屋大学	祖父江元		東京大学	石浦浩之 辻省次
ビハークの里病院	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	中村美恵
徳島大学	和泉唯信	梶龍兒	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
拓海会神経内科クリニック	藤田拓司		千葉大学	渡谷和幹 桑原聡
群馬大学	藤田行雄	池田佳生	九州大学	林信太郎 吉良潤一
静岡富士病院	溝口功一		東京医大	相澤仁志

平成24年度までに、JaCALSに登録した孤発性ALS患者ゲノムDNAについて、Omni Express

Exome Bead Chip を用いたゲノム網羅的遺伝子多型タイピングを実施した。平成 25 年度は得られた遺伝子多型タイピング結果を用いて、縦断的臨床像との関連を網羅的に解析した。また、SOD1、TDP-43、FUS などを含む 28 種類の既知の ALS 関連遺伝子について、以下の手順で網羅的なシーケンズを実施した。Ion AmpliSeq™ Custom Panel を用い、28 遺伝子のエクソン部分を増幅するプライマーペアのセットを作成し、multiplex PCR、アダプターのライゲーションを行い、ライブラリを作成した。作成したライブラリは Ion One Touch™ システムを用いてエマルジョン PCR を行ったのち、テンプレートを精製した。精製したテンプレートを Ion PGM™ シークエンサーを用いて多サンプルを同時に網羅的なゲノム配列解析を行った。

また、Agilent 社の SureSelect ターゲットエンリッチシステムを用いて、全エクソン領域のゲノム解析を行うシステムを構築した。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 LifeTechnology 社の LibraryBuilder 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 Data 解析に関しては、CLCbio 社の CLC GenomicWorkbench ソフトウェアを導入し、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、その後に 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 SNV 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。

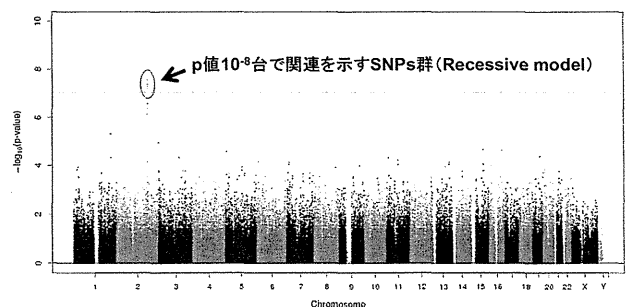
C. 研究結果

JaCALS における ALS 患者登録数は平成 26 年 2 月末時点で 919 例、コントロール検体数は 277 例になった。

ALS 患者に対する臨床研究や治験において世界標準として用いられる重症度スケールである ALSFRS-R について、その経時的変化のパターンを混合分布モデルを用いて類型化を行った。その結果、ALSFRS-R で評価した症状の進行は急速進行型、シグモイド型、単調減少型、緩徐型の 4 型に分類された。

この類型と遺伝子多型 (70 万 SNPs+25 万 exome chip) との関連解析を行った。遺伝子多型関与のモデルとして、Dominant model: メジャーアレルホモの例に対するマイナーアレル保有例のオッズ比、Recessive model: メジャーアレル保有例に対するマイナーアレルホモ例のオッズ比、Additive model: マイナーアレルが一つ増えることに対するオッズ比、以上の 3 パターンを用いた。

その結果、急速進行型と関連する SNPs が Recessive model において見出され、そのうち 7 つが p 値 10^{-8} 台であった。その Manhattan plot を以下に示す。



Haploview4.2 ソフトウェアを用いてハプロタイプ解析を行ったところ、これらの SNPs は強い連鎖不平衡状態にあることが示された。

また、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解

析では、既知の家族性 ALS 原因遺伝子変異を有する例を除いた孤発性 ALS213 例について、28 種類の既知の ALS 関連遺伝子エクソンの網羅的シーケンスを実施した。国際的な遺伝子多型データベースである dbSNP および日本人の遺伝子多型データベースである HGVD との比較検討を行ったところ、どちらのデータベースにも無い新規の variants を 47 例において認めた。さらに Polyphen-2 による解析で probably damaging と判断された variants をそのうち 36 例で認めた。

また、全エクソン領域のゲノム解析については、孤発性 ALS 391 例で完了し、dbSNP および HGVD との比較による variants 解析を実施した。その結果、一例あたり平均 12186 個の non-synonymous variants を認め、それらのうち dbSNP にも HGVD にも存在しない新規 variants を一例あたり平均 162.6 個認めた。

D. 考察

JaCALS においては 900 例以上の ALS 患者登録とゲノム遺伝子および不死化細胞の蓄積がなされ、加えて前向き縦断的な臨床経過の情報を蓄積している点で、世界でも有数の研究リソースが構築できていると考えられる。

本研究による網羅的ゲノム遺伝子解析により、急速進行型 ALS と関連する p 値が 10^{-8} 台を示す遺伝子多型を見出した。ALS の疾患進行過程の解明に極めて重要な知見と考えられる。

ヒトゲノムにおける遺伝子多型には、人種間で大きな差があるとされている。従来、遺伝子多型の大規模データベースは欧米をベースにするものしかなかったが、2013 年 11 月に日本人の大規模ゲノム多型データベースである HGVD が公開され、人種間の差を除いた解析がようやく可能になった。現在のところは個別の遺伝子多型の頻度情報のみの公開となっているが、JaCALS のコントロール検体も用いて日本人 1000 例規模のコントロールエクソームシーケンスデータが蓄積されつつある。本研究により孤発性 ALS 患者に

において probably damaging とされ、データベースには存在しない variants が多数認められており、コントロールエクソームシーケンスデータとの関連解析をへて、該当遺伝子多型を持つ iPS 細胞の作製、遺伝子発現解析などを行い、孤発性 ALS 病態解明につながると期待される。

E. 結論

大規模 ALS 疾患コホートにおける遺伝子検体および臨床情報蓄積を基に、孤発性 ALS の進行に有意に影響する遺伝子多型を見出した。また、孤発性 ALS 患者の網羅的シーケンスデータから、細胞にとって有害になりうる rare variants を多数認めた。網羅的ゲノム解析により、孤発性 ALS の病態解明、治療法開発の端緒が開かれつつあると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, Tatsumi S, Mimuro M, Iwasaki Y, Katsuno M, Iguchi Y, Masuda M, Senda J, Ishigaki S, Udagawa T, Sobue G. Lower motor neurons are commonly involved in TDP-43-related frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurology*. 2014;71:172-9.

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba I, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84: 1365-71.

Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H,

- Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa M, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G; JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown RH Jr, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J, Tsuji S. ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *Am J Hum Genet.* 2013;93:900-5.
- Iguchi Y, Katsuno M, Ikenaka K, Ishigaki S, Sobue G. Amyotrophic lateral sclerosis: an update on recent genetic insights. *J Neurol.* 2013;260:2917-27.
- Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, 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;136:1371-82.
- Takagi S, Iguchi Y, Katsuno M, Ishigaki S, Ikenaka K, Fujioka Y, Honda D, Niwa J, Tanaka F, Watanabe H, Adachi H, Sobue G. RNP2 of RNA recognition motif 1 plays a central role in the aberrant modification of TDP-43. *PLoS One.* 2013;8:e66966.
- Honda D, Ishigaki S, Iguchi Y, Fujioka Y, Udagawa T, Masuda A, Ohno K, Katsuno M, Sobue G. The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons. *FEBS Open Bio.* 2013;4:1-10.
- Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. *Sci Rep.* 2013;3:2388.
- Doi H, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Qiang Q, Tanaka F, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Sobue G. p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar muscular atrophy mouse model. *J Neurosci.* 2013;33:7710-27.
- 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1 特許出現

ALS 疾患関連遺伝子配列解析用の補足
PCR プライマーセット、ALS 疾患関連遺伝子配

列の解析方法、及び ALS 疾患の検査方法 特願

2013-234055

次世代シーケンサーを用いた新規パーキンソン病原因遺伝子の探索

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) の発症に関わる遺伝子を明らかにするため、本研究では家族性 PD を対象に複数の戦略、すなわち家族性 PD の新規原因遺伝子単離と孤発性 PD 発症感受性遺伝子 *glucocerebrosidase (GBA)* の臨床神経学的ゲノム解析を行った。その結果、新規の家族性 PD 原因遺伝子の単離に成功した (投稿準備中)。また、*GBA* 遺伝子ヘテロ変異は家族性 PD においても高頻度に検出され、認知機能障害および幻覚・妄想などの精神症状の合併に強く関連することが明らかとなった。

A.研究目的

パーキンソン病 (PD) の発症機序解明と新たな治療法開発のため、孤発性 PD と比べ遺伝的素因による発症への影響が大きい家族性 PD の遺伝子解析を実施し、新規 PD 関連遺伝子を探索する。また孤発性 PD 発症に関与する *glucocerebrosidase (GBA)* 遺伝子の家族性 PD への影響を調査し、孤発性 PD と家族性 PD の遺伝的連関を明らかにする。

B.研究方法

(1) 家族性 PD の原因遺伝子探索

家族性パーキンソン病患者 8 名 (平均発症年齢 55.5 ± 4.8 歳) および健常兄弟 5 名について、SNP array (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0) を用いたゲノムワイドジェノタイピングを行った。得られた遺伝子型データを用いて SNP HiTLink および MERLIN でパラメトリック連鎖解析を行った。患者 3 名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、1 名について全ゲノムシーケンスを実施し、全エクソン領域および全ゲノムの塩基配列データを得た。Burrows-Wheeler Aligner (BWA) を用いてヒトゲノム配列 (UCSC hg19) にマッピングし SAMtools を用いて変異候補を検出した。

(2) 孤発性 PD 関連遺伝子の検証

144 例の家族性 PD 患者について孤発性 PD との関連が指摘されている *GBA* 遺伝子を PCR ダイレクトシーケンス法で解析した。健常集団との変異の頻度差を調査するため、健常者 100 名についても同様の解析を行った。*GBA* 変異陽性患者と変異陰性患者について、20 項目の臨床症状を統計学的に比較した。

(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

(1) 家族性 PD の原因遺伝子探索

ゲノムワイドパラメトリック連鎖解析の結果ロッドスコア 1 以上の領域を 18 カ所 (合計約 198Mb) 明らかにした。次世代シーケンサーを用いたゲノム解析の結果、この領域には 200,075 種の多型が存在しており、このうち (a) SNP デー

タベースに存在せず、(b) エクソンおよびスプライス部位に存在し、(c) 遺伝形式に矛盾せず、(d) アミノ酸置換が予想される多型で、(e) PCR ダイレクトシーケンス法で確認出来た多型を1種同定した。この多型は家系内で共分離しており、非血縁健常者500人以上で同定されなかった。さらに他の3家系から同遺伝子に変異が確認された。

(2) 孤発性PD関連遺伝子の検証

家族性PD 144家系のうち31家系(21.5%)から合計8種類の*GBA* 遺伝子ヘテロ接合体変異を同定した(表1)。そのうち5種類は*GBA* 変異が原因で発症するゴーシェ病(GD)で同定されている変異だった。2種類は新規変異、1種類は孤発性PDで報告されている変異だった(表1)。家族性PDにおける*GBA* 遺伝子変異の頻度は健常群と比べ有意に高かった(オッズ比(OR)=27.2, $P<0.0001$)。

表1. 本研究で同定された*GBA* 遺伝子変異 (F. 研究発表-1-4より引用)

Mutations	FPD (n=144)	AD (n=85)	AR (n=59)	Control (n=100)	<i>P</i> Value ^a (FPD vs. Control)	OR (95% CI) (FPD vs. Control)
Reported in GD						
p.R120W (%)	9 (6.3)	9 (10.6)	0 (0)	0 (0)	0.01	NA
p.D409H (%)	4 (2.8)	4 (4.7)	0 (0)	0 (0)	0.14	NA
p.L444P (%)	12 (8.3)	7 (8.2)	5 (8.5)	0 (0)	0.002	NA
indel (%)	1 (0.7)	1 (1.2)	0 (0)	0 (0)	NA	NA
RecNcil (%)	1 (0.7)	1 (1.2)	0 (0)	1 (1)	NA	NA
Unreported in GD						
p.G64V (%)	1 (0.7)	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)	NA	NA
p.W393X (%)	1 (0.7)	0 (0)	1 (1.7)	0 (0)	NA	NA
p.I489V (%)	2 (1.4)	1 (1.2)	1 (1.7)	0 (0)	0.51	NA
Total (%)	31 (21.5)	23 (27.1)	8 (13.6)	1 (1)	<0.0001	27.2 (3.6-202.7)

GBA 遺伝子変異陽性群-陰性群間でPDの運動症状および非運動症状の合計20項目について統計学的に比較した結果、*GBA* 遺伝子変異陽性患者は陰性患者と比べ発症年齢に差は無かった。しかしながら認知機能障害および幻覚・妄想などの精神症状の合併率が有意に高かった(表2)。また、*GBA* 遺伝子変異陽性患者は検査した13例全例MIBG心筋シンチグラフィーでの取り込み低下

を認めた。

表2. *GBA* 遺伝子変異陽性患者の臨床的特徴 (F. 研究発表-1-4より引用)

Symptom	<i>GBA</i> mut (+)	<i>GBA</i> mut (-)	<i>P</i> Value ^a
n	34	113	
Age at onset (mean±SD)	49.1±11.7	51.3±14.5	
Resting tremor (%)	18 (52.9)	77 (68.1)	0.151
Bradykinesia (%)	27 (79.4)	99 (87.6)	0.265
Rigidity (%)	29 (85.3)	99 (87.6)	0.772
Gait disturbance (%)	28 (82.4)	95 (84.1)	0.795
Postural instability (%)	20 (58.8)	72 (63.7)	0.687
Wearing off (%)	20 (58.8)	49 (43.4)	0.112
Asymmetry at onset (%)	25 (73.5)	75 (66.4)	0.531
Orthostatic hypotension (%)	5 (14.7)	21 (18.6)	0.798
Incontinence (%)	7 (20.6)	11 (9.7)	0.131
Urinary urgency (%)	10 (29.4)	20 (17.7)	0.150
L-dopa-induced dyskinesia (%)	10 (29.4)	37 (32.7)	0.834
Sleep benefit (%)	3 (8.8)	21 (18.6)	0.288
Dystonia at onset (%)	4 (11.8)	11 (9.7)	0.750
Hyperreflexia (%)	5 (14.7)	17 (15.0)	1.000
Hallucination (%)	14 (41.2)	20 (17.7)	0.009**
Delusion (%)	8 (23.5)	6 (5.3)	0.004**
Other psychosis (%)	13 (38.2)	11 (9.7)	0.0003***
Dementia (%)	12 (35.3)	18 (15.9)	0.027*
Gaze palsy (%)	3 (8.8)	2 (1.8)	0.081

D. 考察

(1) 家族性PDの原因遺伝子探索

ゲノムワイドパラメトリック連鎖解析と次世代シーケンサーを併用したゲノム解析から1種類の非同義置換を同定した。他の家系から同遺伝子変異を合計3種類同定したことから本遺伝子はPDの新規原因遺伝子であると示唆された。

(2) 孤発性PD関連遺伝子の検証

GBA 遺伝子変異を家族性PD集団でも高頻度で認めたことから、*GBA* 遺伝子は孤発性PDのみならず家族性PDにおいても発症感受性遺伝子である可能性が高い。

E. 結論

新規家族性PD原因遺伝子を単離した(投稿準備中)。孤発性PDにおいて関連が指摘されている遺伝子は家族性PDの発症や合併症状にも影響を及ぼしている。

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. Itokawa K, Sekine T, Funayama M, Tomiyama H, Fukui M, Yamamoto T, Tamura N, Matsuda H, Hattori N, Araki N. A case of α -synuclein gene duplication presenting with head-shaking movements. *Mov Disord*. 2013, 28(3):384-7.
2. Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa KI, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya K, Yokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Motoi Y, Tomiyama H, Hattori N. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013, 19(1):15-20.
3. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett*. 2013, 587(9):1316-25.
4. Li Y, Sekine T, Funayama M, Li L, Yoshino H, Nishioka K, Tomiyama H, Hattori N. Clinicogenetic study of GBA mutations in patients with familial Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014, 35(4):935.e3-8. Epub 2013 Oct 12.
5. Wu Z, Sawada T, Shiba K, Liu S, Kanao T, Takahashi R, Hattori N, Imai Y, Lu B. Tricornered/NDR kinase signaling mediates PINK1-directed mitochondrial quality control and tissue maintenance. *Genes Dev*. 2013, 27:157-62.
6. Yamashita C, Tomiyama H, Funayama M, Inamizu S, Ando M, Li Y, Yoshino H, Araki T, Ichikawa T, Ehara Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Hattori N. The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Jan 25. [Epub ahead of print]
7. Nishioka K, Funayama M, Vilariño-Güell C, Ogaki K, Li Y, Sasaki Y, Kokubo Y, Kuzuhara S, Kachergus JM, Cobb SA, Takahashi H, Mizuno Y, Farrer MJ, Ross OA, Hattori N. *EIF4G1* gene mutations are not a common cause of Parkinson's disease in the Japanese population. *Parkinsonism Relat Disord*. in press.
8. Shen Q, Yamano K, Head BP, Kawajiri S, Cheung JT, Wang C, Cho JH, Hattori N, Youle RJ, van der Bliek AM. Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria. *Mol Biol Cell*. 2012, 25:145-59.
9. Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy*. 2012, 10: [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. Hattori N. Impaired Mitochondrial Dynamics and Function in the Pathogenesis of Parkinson's Disease.