

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.

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.

Iida A, Takahashi A, Deng M, Zhang Y, Wang J, Atsuta N, Tanaka F, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Morita M, Akimoto C, Nakajima M, Kubo M, Kamatani N, Nakano I, Sobue G, Nakamura Y, Fan D, Ikegawa S. Replication analysis of SNPs on 9p21.2 and 19p13.3 with

amyotrophic lateral sclerosis in East Asians.
Neurobiol Aging. 2011;32:757.e13-4.

Iida A, Takahashi A, Kubo M, Saito S, Hosono N, Ohnishi Y, Kiyotani K, Mushiroda T, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Tsunoda T, Oshima S, Sano M, Kamei T, Tokuda T, Aoki M, Hasegawa K, Mizoguchi K, Morita M, Takahashi Y, Katsuno M, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Kaji R, Nakano I, Kamatani N, Tsuji S, Sobue G, Nakamura Y, Ikegawa S. A functional variant in ZNF512B is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Hum Mol Genet*. 2011;20:3684-92.

Akimoto C, Morita M, Atsuta N, Sobue G,

Nakano I. High-Resolution Melting (HRM) Analysis of the Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) Gene in Japanese Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (SALS) Patients. *Neurol Res Int*. 2011;2011:165415.

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パーキンソン病の網羅的ゲノム解析
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

孤発性パーキンソン病 (PD) のゲノム創薬標的分子を明らかにするため PD ゲノムリソースを拡充し、家族性 PD のゲノム解析および孤発性 PD と家族性 PD の分子遺伝学的関連解析を行った結果、研究期間内に 1000 例以上の PD ゲノムバンク登録を達成し、PD 関連遺伝子多型を合計 39 種同定した。このうち 1 種は 4 家系で共通の遺伝子に変異が同定され、新規 PD 原因遺伝子の単離に成功した。孤発性 PD 発症感受性遺伝子の *glucocerebrosidase (GBA)* は家族性 PD においても高頻度に見出され、精神症状の合併率に影響を及ぼしていることが明らかになった。孤発性 PD と家族性 PD はゲノム解析で見出された遺伝子が関連する共通の分子機構が存在している可能性が高い。

A.研究目的

患者の大多数を占める孤発性パーキンソン病 (PD) の遺伝学的背景を明らかにし新たな創薬シーズを見出すには膨大なサンプル数が必要である一方、何らかの遺伝子の突然変異によって発症する家族性 PD は孤発性 PD に比べ患者数 (家系数) は少ないものの連鎖解析と次世代シーケンサーを併用することで、小サンプル数で目的の遺伝子を単離出来る可能性が高い。さらに、孤発性 PD の大規模ゲノムワイド関連解析の結果明らかになったいくつかの感受性遺伝子は元々家族性 PD の原因遺伝子として報告されていた。従って家族性 PD のゲノム解析を行うことで単一家系の発症原因解明に止まらず広く一般的な孤発性 PD の発症機序解明に大きく寄与する可能性を秘めている。しかしながら家族性 PD のゲノム研究を完遂するに当たり家系内非発症者や他の類似症状を呈する家系集団を含むゲノムリソースの拡充が必須であり、実際研究におけるボトルネックになっている。そこで本研究では (1) 家族性 PD のゲノムリソース拡大、(2) 家族性 PD 新規原因遺伝子の単離、(3) 家族性 PD と孤発性 PD の分子遺伝学的関連解析の 3つを目的として以下の解

析を実施した。

B.研究方法

(1) 家族性 PD のゲノムリソース拡大

全国の神経内科と連携し、家族歴のある PD 患者および孤発性 PD の末梢血を収集した。末梢血から QIAamp DNA Blood Maxi Kit (キアゲン) をもちいてゲノム DNA を抽出した。吸光度で濃度および不純物の有無を確認後、一部をストック用として -20℃ にて保存し、一部を解析用として 4℃ に保管した。

(2) 家族性 PD 新規原因遺伝子の単離

a. 劣性遺伝性 PD の原因遺伝子単離

両親が血族婚の劣性遺伝性 PD 75 例について

Genome-Wide Human SNP Array 6.0

(Affymetrix) を用いたゲノムワイドジェノタイプ

ピングを行った。上記 75 症例の中で複数の同胞

発症者ゲノムが存在する 6 家系 12 症例について

SureSelectXT Human All Exon 50Mb Kit (ア

ジレント・テクノロジー社) をもちいて DNA ライ

ブラリー作製後 HiSeq2000 (Illumina) を用いて

エクソーム解析を行った。得られた塩基配列デー

タを 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。

b. 優性遺伝性 PD の原因遺伝子単離

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 (HiSeq2000) 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。塩基配列の情報処理は上記方法に従い実施した。候補遺伝子変異について PCR ダイレクトシーケンス法で確認し、同様に健常対象群 559 例で検証した。また、優性遺伝性 PD 340 家系および孤発性 PD 517 例について候補遺伝子のエクソンおよびプライム部位を PCR ダイレクトシーケンス法で解析した。

(3) 家族性 PD と孤発性 PD の分子遺伝学的関連解析

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 *glucocerebrosidase (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 のゲノムリソース拡大

研究期間内に 1114 例の PD 患者ゲノム DNA を新たに追加した。

(2) 家族性 PD 新規原因遺伝子の単離

a. 劣性遺伝性 PD の原因遺伝子単離

75 症例のゲノムワイド SNP 解析とオート接合性マッピングの結果、複数の候補原因遺伝子領域を同定した (図 1)。

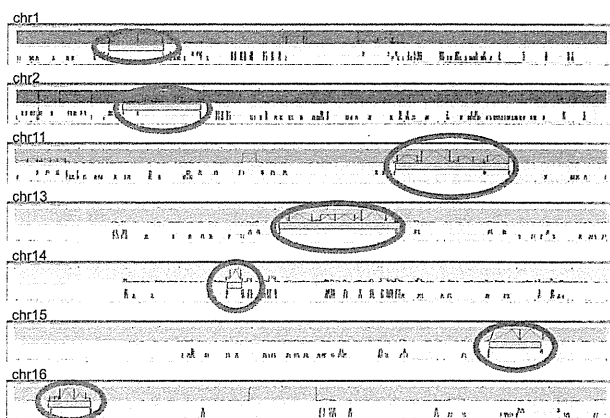


図 1. オート接合性マッピングの 1 例
劣性遺伝性家系同胞発症者についてオート接合性マッピングを行った結果、7 カ所 (丸印) のホモ接合体領域を同定した。

次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析から得られた塩基配列情報とオート接合性マッピングの結果を併せて解析した結果、SNP データベースに未登録のホモ接合体非同義置換多型を合計 38 種同定した。

b. 優性遺伝性 PD の原因遺伝子単離

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エクソーム解析および全ゲノム解析の結

果、連鎖領域には 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、非血縁健常群では同定されなかった。さらに他の 3 家系から同遺伝子に変異が確認された。見出された遺伝子変異当該アミノ酸は種を超えて高度に保存されていた (投稿準備中、図 2)。

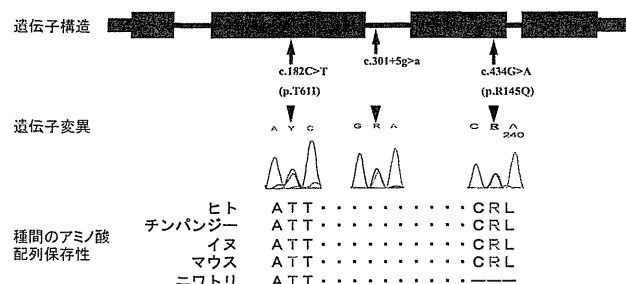


図 2.新規家族性 PD 原因遺伝子の単離

4 家系から 3 種類の新規 PD 原因遺伝子の変異を同定した。2 種類は非同地置換、1 種類はスプライス部位の変異だった。

(3) 家族性 PD と孤発性 PD の分子遺伝学的関連解析

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 で報告されていた変異だった (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, $P<0.0001$)。

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が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 1. 本研究で同定された *GBA* 遺伝子変異 (F. 研究発表-1-42 より引用)

Mutations	FPD (n=144)	AD (n=85)	AR (n=59)	Control (n=100)	P 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
RecNciI (%)	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.L489V (%)	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)

D. 考察

3 年間の研究期間で 1000 例以上の新規 PD ゲノムを収集する事が出来た。今後既報 PD 関連遺伝子について順次スクリーニングを実施し、分子遺伝学的解析を行うことでゲノム創薬を目指した重要なリソースとなると考えられる。家族性 PD の新規原因遺伝子探索は SNP array を用いたゲノムワイド連鎖解析と次世代シーケンサーによる高速塩基配列解析を併用することで短期間のうちに多数の候補原因遺伝子変異を同定可能であることが明らかとなった。本研究で拡充した PD ゲノムリソースを活用し、今後さらに PD 関連遺伝子を同定していく事が可能である。本研究で単離した新規 PD 原因遺伝子については新たな PD 創薬ターゲットとなる可能性があるため、細胞モデルや動物モデルを用いた病態機能解析を行い、有効化合物のスクリーニングを推進する必要がある。また大多数の患者を占める孤発性 PD においてこの遺伝子がどのような影響を及ぼしているか検証する必要がある。孤発性 PD 発症感受性遺伝子である *GBA* は家族性 PD でも高頻度に見出された事から孤発性 PD と家族性 PD 共通の発症メカニズムが存在し、分子遺伝学的解析から見出された遺伝子が深く関与している可能性が明らかとなった。従って今後も孤発性 PD および家族性 PD 両者で分子遺伝学的解析を推進していく必要がある。

E. 結論

ゲノムリソースを拡充し次世代シーケンサーを有効に利用することでPDの分子遺伝学的背景を短期間で明らかに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. Amo, T., Sato, S., Saiki, S., Wolf, A. M., Toyomizu, M., Gautier, C. A., Shen, J., Ohta, S., & Hattori N. (2011). Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiology of Disease*, 41(1), 111-118.
2. Hassin-Baer, S., Hattori N., Cohen, O. S., Massarwa, M., Israeli-Korn, S. D., & Inzelberg, R. (2011). Phenotype of the 202 Adenine Deletion in the parkin Gene: 40 Years of Follow-Up. *Movement Disorders*, 26(4), 719-722.
3. Hayashi, C., Funayama, M., Li, Y., Kamiya, K., Kawano, A., Suzuki, M., Hattori N., & Ikeda, K. (2011). Prevalence of GJB2 causing recessive profound non-syndromic deafness in Japanese children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 75(2), 211-214.
4. Kamagata, K., Motoi, Y., Hori, M., Suzuki, M., Nakanishi, A., Shimoji, K., Kyougoku, S., Kuwatsuru, R., Sasai, K., Abe, O., Mizuno, Y., Aoki, S., & Hattori N. (2011). Posterior hypoperfusion in Parkinson's disease with and without dementia measured with arterial spin labeling MRI. *J Magn Reson Imaging*, 33(4), 803-807.
5. Kawajiri, S., Saiki, S., Sato, S., & Hattori N. (2011). Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci*, 32(10), 573-580.
6. Kawanabe, T., Tanaka, R., Sakaguchi, Y., Akiyama, O., Shimura, H., Yasumoto, Y., Ito, M., Hattori N., & Tanaka, S. (2011). Posterior reversible encephalopathy syndrome complicating intracranial hemorrhage after phenylpropanolamine exposure. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 51(8), 582-585.
7. Morita, A., Okuma, Y., Kamei, S., Yoshii, F., Yamamoto, T., Hashimoto, S., Utsumi, H., Hatano, T., Hattori N., Matsumura, M., Takahashi, K., Nogawa, S., Watanabe, Y., Miyamoto, T., Miyamoto, M., & Hirata, K. (2011). Pramipexole reduces the prevalence of fatigue in patients with Parkinson's disease. *Intern Med*, 50(19), 2163-2168.
8. Noda, K., Fukae, J., Fujishima, K., Mori, K., Urabe, T., Hattori N., & Okuma, Y. (2011). Reversible cerebral vasoconstriction syndrome presenting as subarachnoid hemorrhage, reversible posterior leukoencephalopathy, and cerebral infarction. *Intern Med*, 50(11), 1227-1233.
9. Ogaki, K., Motoi, Y., Li, Y. Z., Tomiyama H., Shimizu, N., Takanashi, M., Nakanishi, A., Yokoyama, K., & Hattori N. (2011). Visual Grasping in Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to Chromosome 17 (Microtubule-Associated with Protein Tau): A Comparison of N-Isopropyl-p-[(123)I]-iodoamphetamine Brain Perfusion Single Photon Emission

- Computed Tomography Analysis with Progressive Supranuclear Palsy. *Movement Disorders*, 26(3), 561-563.
10. Ross, O. A., Soto-Ortolaza, A. I., Heckman, M. G., Aasly, J. O., Abahuni, N., Annesi, G., Bacon, J. A., Bardien, S., Bozi, M., Brice, A., Brighina, L., Van Broeckhoven, C., Carr, J., Chartier-Harlin, M. C., Dardiotis, E., Dickson, D. W., Diehl, N. N., Elbaz, A., Ferrarese, C., Ferraris, A., Fiske, B., Gibson, J. M., Gibson, R., Hadjigeorgiou, G. M., Hattori N., Ioannidis, J. P., Jasinska-Myga, B., Jeon, B. S., Kim, Y. J., Klein, C., Kruger, R., Kyrtzi, E., Lesage, S., Lin, C. H., Lynch, T., Maraganore, D. M., Mellick, G. D., Mutez, E., Nilsson, C., Opala, G., Park, S. S., Puschmann, A., Quattrone, A., Sharma, M., Silburn, P. A., Sohn, Y. H., Stefanis, L., Tadic, V., Theuns, J., Tomiyama H., Uitti, R. J., Valente, E. M., van de Loo, S., Vassilatis, D. K., Vilarino-Guell, C., White, L. R., Wirdefeldt, K., Wszolek, Z. K., Wu, R. M., & Farrer, M. J. (2011). Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*, 10(10), 898-908.
 11. Saiki, S., Sasazawa, Y., Imamichi, Y., Kawajiri, S., Fujimaki, T., Tanida, I., Kobayashi, H., Sato, F., Sato, S., Ishikawa, K., Imoto, M., & Hattori N. (2011). Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy*, 7(2), 176-187.
 12. Saiki, S., Sato, S., & Hattori N. (2011). Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(4), 430-436.
 13. Sato, S., & Hattori N. (2011). Genetic mutations and mitochondrial toxins shed new light on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, 2011, 979231.
 14. Takamatsu, Y., Shiotsuki, H., Kasai, S., Sato, S., Iwamura, T., Hattori N., & Ikeda, K. (2011). Enhanced Hyperthermia Induced by MDMA in Parkin Knockout Mice. *Current Neuropharmacology*, 9(1), 96-99.
 15. Tanaka, R., Sasaki-Ikesawa, K., Shimura, H., Nishioka, K., Hattori N., & Tanaka, S. (2011). Methotrexate leukoencephalopathy mimics acute progressive stroke. *Journal of Neurology*, 258(11), 2083-2085.
 16. Teramoto, S., Miyamoto, N., Yatomi, K., Tanaka, Y., Oishi, H., Arai, H., Hattori N., & Urabe, T. (2011). Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, provides neuroprotection in mice transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(8), 1696-1705.
 17. Usami, Y., Hatano, T., Imai, S., Kubo, S., Sato, S., Saiki, S., Fujioka, Y., Ohba, Y., Sato, F., Funayama, M., Eguchi, H., Shiba, K., Ariga, H., Shen, J., & Hattori N. (2011). DJ-1 associates with synaptic membranes. *Neurobiol Dis*, 43(3), 651-662.
 18. Usui, C., Hatta, K., Doi, N., Kubo, S., Kamigaichi, R., Nakanishi, A., Nakamura, H., Hattori N., & Arai, H. (2011). Improvements in both psychosis

- and motor signs in Parkinson's disease, and changes in regional cerebral blood flow after electroconvulsive therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35(7), 1704-1708.
19. Yamashiro, K., Furuya, T., Noda, K., Urabe, T., Hattori N., & Okuma, Y. (2011b). Convulsive movements in bilateral paramedian thalamic and midbrain infarction. *Case Rep Neurol*, 3(3), 289-293.
 20. Yasuda, T., Hayakawa, H., Nihira, T., Ren, Y. R., Nakata, Y., Nagai, M., Hattori N., Miyake, K., Takada, M., Shimada, T., Mizuno, Y., & Mochizuki, H. (2011). Parkin-Mediated Protection of Dopaminergic Neurons in a Chronic MPTP-Minipump Mouse Model of Parkinson Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(8), 686-697.
 21. Yoritaka, A., Shimo, Y., Inoue, Y., Yoshino, H., & Hattori N. (2011). Nonmotor Symptoms in Patients with PARK2 Mutations. *Parkinsons Dis*, 2011, 473640.
 22. Shimura, H., Tanaka, R., Urabe, T., Tanaka, S., & Hattori N. (2011). Art and Parkinson's disease: a dramatic change in an artist's style as an initial symptom. *J Neurol*. 259:879-881, 2012.
 23. Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, Hattori N. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep*. 2:1002, 2012.
 24. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N. VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. *Mov Disord* 27: 1413-7, 2012
 25. Ujiie S, Hatano T, Kubo S, Imai S, Sato S, Uchihara T, Yagishita S, Hasegawa K, Kowa H, Sakai F, Hattori N. LRRK2 I2020T mutation is associated with tau pathology. *Parkinsonism Relat Disord*. 18(7):819-23, 2012.
 26. Hattori N, Hasegawa K, Sakamoto T. Pharmacokinetics and effect of food after oral administration of prolonged-release tablets of ropinirole hydrochloride in Japanese patients with Parkinson's disease. *J Clin Pharm Ther*. 37:571-7, 2012.
 27. Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R, Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Izumi Y, Kaji R, Hattori N. Sobue G, and the Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with ALS. *Neurobiol of Aging*, 33(10):2527.e11-6, 2012.
 28. Inoue Y, Uchimura N, Kuroda K, Hirata K, Hattori N. Long-term efficacy and safety of gabapentin enacarbil in Japanese restless legs syndrome patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 36:251-7, 2012.
 29. Hattori N, Fujimoto K, Kondo T, Murata M, Stacy M. Patient perspectives on

- Parkinson's disease therapy in Japan and the United States: results of two patient surveys. *Patient Relat Outcome Meas.* 3:31-8, 2012.
30. Shimura H, Mizuno Y, Hattori N. Parkinson and Parkinson disease. *Clin Chem.* 58:1260-1, 2012.
 31. Saiki S, Sato S, Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 83:430-6, 2012.
 32. Hattori N. Autosomal dominant parkinsonism: its etiologies and differential diagnoses. *Parkinsonism Relat Disord.* 18 Suppl 1:S1-3, 2012.
 33. 富施 敦仁, 深江 治郎, 服部 信孝. 遺伝子工学からの恩恵 iPS 細胞の誕生と再生医療への応用. *BIO Clinica.* 27:705-9, 2012.
 34. 船山 学, 服部 信孝. 遺伝子工学からの恩恵 連鎖解析、疾患遺伝子の探索 パーキンソン遺伝子発見の経緯. *BIO Clinica.* 27:294-7, 2012.
 35. 佐藤 栄人, 服部 信孝. 【ミトコンドリア病-up to date】神経疾患、老化とミトコンドリア異常 パーキンソン病. *Clinical Neuroscience.* 30:1047-1050, 2012.
 36. 西岡 健弥, 服部 信孝. 【神経科学新章!脳疾患のバイオマーカーとオプトジェネティクス】(第1部)Biomarker α -シヌクレインを中心としたパーキンソン病研究の現状と課題. *実験医学.* 30:2563-7, 2012.
 37. 船山 学, 服部 信孝. 【パーキンソン病医学・医療の最前線】(第1部)基礎編 遺伝子研究からわかったこと. *Progress in Medicine.* 32:1167-1172, 2012.
 38. 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 FTLN, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord.* 19(1):15-20, 2013.
 39. 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.
 40. 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 FTLN, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013, 19(1):15-20.
 41. 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.
 42. 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.
43. 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]
 44. 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*.
2. 学会発表
1. Funayama M, Kusaka H, Yoshino H, Li Y, Ogaki K, Tomiyama H, Hattori N. Analyses of compound heterozygous rearrangements of parkin. ASHG/ICHG 2011 Meeting. (2011.10.13. Montreal, Canada).
 2. Funayama M, Tomiyama H, Hattori N. Genetic Analysis for Parkinson's Disease in Juntendo University, Tokyo, Japan. 2011 Meeting of the Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease Consortium. (2011.9.19. Chicago, USA).
 3. Tomiyama H, Yoshino H, Ogaki K, Li L, Yamashita C, Li Y, Funayama M, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Hattori N. PLA2G6 in patients with Parkinson's disease / frontotemporal type of dementia. (2011.10.14. The 12th International Congress of Human Genetics, ICHG and the American Society of Human Genetics, ASHG 61st Annual Meeting. Montreal, Canada)
 4. 大垣光太郎、李元哲、高梨雅史、石川景一、小林智則、中西淳、野中隆、長谷川成人、岸雅彦、吉野浩代、船山学、塩屋敬一、横地正之、佐々木良元、小久保康昌、葛原茂樹、本井ゆみ子、富山弘幸、服部信孝. FTDP-17が疑われた日本人75症例におけるPGRNとMAPT遺伝子解析. 第52回日本神経学会学術大会 平成23年10月8日.
 5. 富山弘幸、吉野浩代、大垣光太郎、李林、李元哲、船山学、佐々木良元、小久保康昌、葛原茂樹、服部信孝. 孤発性パーキンソン病におけるPLA2G6 p.P806R. 第4回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ) 平成22年10月8日. 京都
 6. 船山学、李元哲、佐竹渉、吉野浩代、今道洋子、富山弘幸、松浦英治、野元三治、有村公良、高嶋博、戸田達史、水野美邦、服部信孝. SNP chipによる家族性パーキンソン病の連鎖解析と新規原因遺伝子探索. 第52回日本神経学会総会 (2011.5.20. 名古屋).
 7. 船山学、李元哲、佐竹渉、吉野浩代、今道洋子、富山弘幸、松浦英治、野元三治、有村公良、戸田達史、高嶋博、服部信孝. 常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の連鎖解析. 第5回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. (2011.10.7, 東京).
 8. 船山学、日下弘道、吉野浩代、李元哲、富山弘幸、服部信孝. Parkin 遺伝子の pseudo-heterozygous rearrangement 変異. 第56回 日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会共同大会. (2011.11.11, 千葉).
 9. 山下力、李元哲、吉野浩代、船山学、富山弘幸、服部信孝. パーキンソニズム症例での

- PLA2G6 遺伝子の copy number variant (CNV) の検索, 第 5 回 MDSJ, 2011 年 10 月 7 日, 東京
10. 山下力, 李元哲, 吉野浩代, 船山学, 富山弘幸, 服部信孝. 日本人 Parkinsonism 症例における PLA2G6 遺伝子の copy number variant (CNV) の検索, 第 52 回日本神経学会総会, 2011 年 5 月 19 日, 名古屋
 11. 大垣光太郎, 李元哲, 今道洋子, 吉野浩代, 船山学, 高梨雅史, 本井ゆみ子, 富山弘幸, 服部信孝. 日本人患者 24 症例の Frontotemporal dementia における PSEN1 遺伝子解析, 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.23
 12. 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 富山弘幸, 服部信孝. 日本人若年性パーキンソン病における FBXO 7 遺伝子変異解析, 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.25
 13. 吉野浩代, 富山弘幸, 舟辺さやか, 山下力, 李元哲, 船山学, 村山繁雄, 服部信孝. Alpha-Synucleinopathy における PLA2G6 および PANK2 変異解析, 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.25
 14. 山下力, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 富山弘幸, 市川忠, 江原義郎, 石川欽也, 水澤英洋, 服部信孝. 日本人 Parkinson 病患者における polyglutamine(polyQ) 鎖リピート数の調査, 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.25
 15. 船山学, 李元哲, 佐竹渉, 吉野浩代, 富山弘幸, 松浦英治, 野元三治, 有村公良, 戸田達史, 高嶋博, 服部信孝. 常染色体劣性遺伝性パーキンソン病家系の連鎖解析, 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012.5.25
 16. 安藤真矢, 船山学, 李元哲, 柏原健一, 村上善勇, 石津暢隆, 豊田千純子, 野口克彦, 橋本貴司, 中野直樹, 佐々木良元, 小久保康昌, 葛原茂樹, 大垣光太郎, 山下力, 吉野浩代, 波田野琢, 富山弘幸, 服部信孝. 日本人パーキンソン病患者における VPS35 p.D620N 変異の解析, 第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ), 京都, 2012.10.12
 17. Tomiyama H, Yoshino H, Ogaki K, Li L, Yamashita C, Li Y, Funayama M, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, and Hattori N. Mutation analysis for PLA2G6 in patients with Parkinson's disease / frontotemporal type of dementia. Movement Disorders, Dublin, Ireland. 2012.6.17.
 18. Tomiyama H, Ando M, Ogaki K, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Hattori N. Genetic Analysis for Parkinson's Disease in Juntendo University, Tokyo, Japan. 7th Genetics Epidemiology of Parkinson's Disease Annual meeting, Seoul, Korea. 2012.10.8.
 19. Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K, 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. 7th Genetics Epidemiology of Parkinson's Disease Annual meeting, Seoul, Korea. 2012.10.10.
 20. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Tomiyama H, and Hattori N. VPS35 Asp620Asn mutation in Japanese patients with Parkinson disease. 7th Genetics Epidemiology of Parkinson's Disease Annual meeting, Seoul, Korea. 2012.10.10.

21. Tomiyama H, Yamashita C, Sasaki R, Li Y, Funayama M, Hattori N, Kuzuhara S, and Y. Kokubo Y. No association between ATXN2 (SCA2) CAG repeat expansion and amyotrophic lateral sclerosis /parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. The American Society of Human Genetics, ASHG 62nd Annual Meeting. San Francisco, USA. 2012.11.07.
22. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Tomiyama H, and Hattori N. The Asp620Asn mutation of VPS35 in Japanese patients with typical Parkinson disease. ASHG 2012 Meeting, San Francisco, U.S.A. 2012.11.08.
23. 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. Analysis of C9orf72 repeat expansion in Japanese patients with ALS. ASHG 2012 Meeting, San Francisco, U.S.A. 2012.11.09.
24. Li Y, Funayama M, Sekine T, Li L, Yoshino H, Nishioka K, Tomiyama H, Hattori N. Genetic analysis of the GBA gene in Japanese familial Parkinson's disease. ASHG 2012 Meeting, San Francisco, U.S.A. 2012.11.09.
25. Hattori N. Impaired Mitochondrial Dynamics and Function in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. International Symposium on Mitochondria 2013. 2013. 11. 7. Tokyo.
26. 吉野浩代、富山弘幸、今道洋子、李元哲、大垣光太郎、安藤真矢、船山学、水野美邦、服部信孝. 日本人パーキンソン病における網羅的遺伝子解析. 第54回日本神経学会学術大会、2013年5月31日、東京.
27. 大垣光太郎、李元哲、熱田直樹、富山弘幸、船山学、渡邊はづき、中村亮一、吉野英夫、谷藤誠司、田村麻子、内藤寛、谷口彰、藤田浩司、和泉唯信、梶龍兒、祖父江元、服部信孝、JaCALS. Analysis of C9orf72 repeat expansion in Japanese patients with ALS. 第54回日本神経学会学術大会、2013年5月31日、東京.
28. 船山学、安藤真矢、李元哲、柏原健一、村上善勇、石津暢隆、豊田千純子、野口克彦、橋本貴司、中野直樹、佐々木良元、小久保康昌、葛原茂樹、大垣光太郎、山下力、吉野浩代、波田野琢、富山弘幸、服部信孝. 日本人パーキンソン病におけるVPS35 D620N変異の同定. 第54回日本神経学会学術大会、2013年5月31日、東京.
- 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。

次世代シーケンサーを用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子解析

研究分担者氏名： 青木正志¹⁾
共同研究者氏名： 加藤昌昭¹⁾、割田 仁¹⁾、井泉瑠美子¹⁾、
西山亜由美¹⁾、島倉奈緒子¹⁾、安藤里紗¹⁾
所属： ¹⁾ 東北大学大学院 医学系研究科 神経・感覚器病態学講座 神経内科学分野

研究要旨

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。当科では 1991 年から継続して家族性 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。最近では欧米にて孤発例を含めた多数例で C9ORF72 遺伝子異常が報告され注目されている。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 遺伝子変異を認めしたが、その一方で 3 分の 2 にあたる 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 ALS 関連遺伝子のターゲット・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た。

A.研究目的

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%は家族歴を伴い、家族性 ALS とよばれ、これまでにその一部の原因として遺伝子異常が報告されている。当科では 1991 年から家族性 ALS 患者の検体の収集および遺伝子検査を行っており、これまでに 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が、次世代シーケンサーの登場にて新規遺伝子の報告が続いている。最近では欧米にて孤発例を含めた多数例で C9ORF72 遺伝子異常が報告され注目されている。

B.研究方法

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 115 家系について遺伝子解析を行った。SOD1, FUS/TLS, TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP43)、Valosin-containing protein (VCP)、C9ORF72, Profilin1 (PFN1)についてはサンガー法などにて遺伝子解析を行った。これにより遺伝子変異を認めない検体に関しては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を行った。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は東北大学 DNA 組換え実験指針に従い、個人を同定できない形で発表し、個人情報には鍵のかかる戸棚に保管、DNA は連結可能匿名化で保存している。東北大学倫理委員会の承認を受けている。

C.研究結果

これまでに遺伝子解析を行った 115 家系において、28 家系に SOD1 異常、9 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 115 家系内では遺伝子変異は認めなかった。

当科にて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。

9 家系 (8%) に 8 種類の FUS/TLS 遺伝子変異が認められた。発症年齢は平均 39 歳と若年発症で、進行が早く、上肢～頸部からの発症が多く、下位運動ニューロン優位な傾向があった。

特に核移行シグナル部位に変異をもつ K510E, R514S, H517D/P, R521C の 5 つの変異は似た臨床型を呈した。海外の報告例でもこれらの変異をもつ家系の症状は同様であった。

しかし、核移行シグナル分子との接合部から離れた部位にある遺伝子変異を認めた S513P 変異は 60 代以降での発症、下肢からの発症、進行も緩徐といった経過を示した。

その一方で、78 家系 (約 67%) 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ターゲット・リシーケンシングおよびエクソーム解析を行っている。

D.考察

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 C9ORF72 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 115 家系の解析のうち 78 家系では遺伝子異常を認めなかった。

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。連鎖解析を行うことができる家系が少ないために、どのような方法で原因遺伝子を同定するかが課題である。

E.結論

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。

F.健康危険情報

特記事項なし

G.研究発表

1. 論文発表

Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, Tateyama M, Yaginuma C, Sato H, Hayasaka M, Sugawara H, Ito M, Abe-Kondo E, Shimakura N, Ibi T, Kuru S, Wakayama T, Sobue G, Fujii N, Saito T, Matsumura T, Funakawa I, Mukai E, Kawanami T, Morita M, Yamazaki M, Hasegawa T, Shimizu J, Tsuji S, Kuzuhara S, Tanaka H, Yoshioka M, Konno H, Onodera H, Itoyama Y. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84: 433-40

Izumi R, ...Aoki M, Matsubara Y. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet*. 2013; 58: 259-66

2. 学会発表

青木正志、鈴木直輝、割田 仁、加藤昌昭、水野秀紀、島倉奈緒子、今野秀彦、加藤信介、糸山泰人 FUS/TLS 遺伝子異常に伴う日本人家族性 ALS における遺伝子変異と臨床型、病理に関する検討 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月 18-20 日 名古屋

島倉奈緒子、鈴木直輝、加藤昌昭、割田 仁、水野秀紀、今野秀彦、加藤信介、糸山泰人、青木正志 日本人家族性 ALS における遺伝子変異と臨床型、病理に関する検討

第 56 回人類遺伝学会 2011 年 11 月 10-12 日 千葉

県幕張

青木正志

ALS の遺伝学 Update

第 53 回日本神経学会総会 2012 年 5 月 22-25 日 東京

加藤昌昭、割田 仁、鈴木直輝、島倉奈緒子、青木正志

日本人家族性 ALS における遺伝子変異と臨床型の検討

第 53 回日本神経学会総会 2012 年 5 月 22-25 日 東京

加藤昌昭、割田 仁、鈴木直輝、井泉瑠美子、島倉奈緒子、安藤理沙、青木正志

東北大学における家族性 ALS 遺伝子検査の検討

第 54 回日本神経学会総会 2013 年 5 月 29 日~6 月 1 日 東京

Izumi R,...Aoki M, Matsubara Y: A mutation in A-band titin is associated with hereditary myopathy with early respiratory failure in a Japanese family. the 63rd Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Boston, MA, Oct 24, 2013

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

なし

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

研究分担者 中島健二 鳥取大学医学部医学科脳神経医科学講座脳神経内科学分野 教授
研究協力者 瀧川洋史 鳥取大学医学部附属病院神経内科 助教

研究要旨

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、全国多施設共同研究体制の整備を行った。

A.研究目的

パーキンソン病（PD）は、振戦、筋強剛、無動、姿勢反射障害を四徴とした進行性の神経変性疾患である。パーキンソン症候群（PS）は、PDならびに、パーキンソンニズムとして四徴のいずれかを含めた神経徴候を呈する症候群であり、進行性核上性麻痺（PSP）、大脳皮質基底核変性症（CBD）などの神経変性疾患が含まれる。一方、前頭側頭葉変性症（FTLD）は、前頭・側頭葉に限局して進行性の変性を呈し、行動障害や言語障害を主徴とする非アルツハイマー型変性性認知症の一群を指す臨床概念であり、臨床的には、前頭側頭型認知症、意味性認知症、進行性非流暢性失語の3つのサブタイプに分類される。また、FTLDにPSPやCBDも含める考え方もある。さらに、PSP・CBDやFTLDの一部はタウオパチーとしても捉えられている。これらの疾患では、中年以降に発症し、通常は孤発例である。治療法、予後も異なり、鑑別診断が重要であるが、臨床的に鑑別が困難な場合が少なくない。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おり、臨床的、遺伝学的、病理学的、生化学的な詳細な研究の推進が待たれている。

詳細な遺伝子解析を行うには、多数例の遺伝子試

料が必要となるが、PS・FTLDは有病率が低く、遺伝子解析に活用できる多数例の収集は困難である。正確な臨床情報の整った遺伝子試料の収集とともに研究にすぐに活用できる遺伝子試料のバンク設立も求められている。

本研究では臨床調査個人票を活用して経時的変化も把握し、臨床情報を含めたPS・FTLD症例の遺伝子の収集を行う。本研究では、PSP・CBDなどのタウオパチーを中心に、タウオパチー以外のFTLD症例も含めて遺伝子試料収集を進める。収集した遺伝子試料を用いて、各疾患に影響を及ぼす遺伝的要因の候補を明らかにすることにより、病気の進行と共に変化する臨床症状と診断、病態解明、予後予測を可能とし、更に、治療法の開発に寄与し、臨床症状を改善することを目的としている。

B.研究方法

1) 鳥取県における患者登録体制の整備

鳥取県における特定疾患申請患者の把握、医療機関調査を鳥取県難病相談・支援センターと連携して研究を進め、患者登録体制を整備した。

2) 全国PS・FTLD遺伝子試料収集共同研究体制

収集は、臨床診断に基づく例のみならず、病理診

断例における収集体制の構築についても検討を進めた。

a) 厚生労働省科学研究費補助金事業難治性疾克服事業“神経変性疾患に関する調査研究”班（以下，“神経変性班”）との連携による研究体制の整備

“神経変性班”に協力を依頼し、全国的ネットワークによる多施設共同による遺伝子収集研究体制の整備を進めた。

b) 個別参加による医療機関との連携

上記研究班には属さないが、PSやFTLD研究を積極的に進めている施設にも協力を依頼し、広く研究協力が得られる研究体制の整備を開始した。

3) 診断基準と試料取り扱い方法の整備

本研究の収集対象であるPSやFTLDは臨床的に鑑別が困難であることが少なくない。そこで、既報されている各疾患の診断基準を包括するかたちでひろく収集できるように診断基準の整備を進めた。また、試料の均一化を図るべく、試料の取り扱い方法の整備を進めた。

PSやFTLDでは、臨床診断が難しいことがあり、病理診断がなければ診断できないとの指摘もある。しかし臨床診断の精度を高める必要があり、その目的で生化学的診断マーカーの検討も必要であり、本研究においては、生化学的マーカーの開発も行った。

4) 遺伝子試料の収集

同意が得られた患者から臨床情報と共にゲノムDNAを収集した。

5) 次世代シーケンサーによる遺伝子解析

収集したゲノムについて東京大学神経内科にて次世代シーケンサーによる遺伝子解析を行った。

（倫理面への配慮）

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、
「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して研究を実施した。本研究について鳥取大学医学部倫理委員会の承認を得、本研究への参加者には、文書により研究内容や倫理的配慮について詳細に説明した後、書面にて同意を得て研究を実施した。

C.研究結果

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

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。更には、“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、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。

D.考察

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、地域における遺伝子試料収集研究体制を整備した。さらには“神経変性班”の構成班員施設をはじめとした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協力を依

頼し、全国多施設共同による遺伝子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考えられる。

既報されている各疾患の診断基準を包括するかたちでひろく収集できるように診断基準の整備を進めた。また、試料の均一化を図るべく、試料の取り扱い方法の整備を進めた。今後、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。

E. 結論

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、詳細な臨床情報が整った多数例の遺伝子試料収集が望まれる。

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) Uemura Y, et al. Mild Parkinsonian signs in a community-swelling elderly population. J Neurol Sci 304: 61-66, 2011.
- 2) Nomura T, et al. Utility of the REM sleep behavior disorder screening questionnaire (RBDSQ) in Parkinson's disease patients. Sleep Med 12: 711-713, 2011.
- 3) Nomura T, Inoue Y, Högl B, Uemura Y, Yasui K, Sasai T, Namba K, Nakashima K. Comparison of the clinical features of rapid eye movement sleep behavior disorder in patients with

Parkinson's disease and multiple system atrophy. Psychiatry Clin Neurosci, 65: 264-271, 2011.

- 4) Nomura T, et al. Comparison of REM sleep behaviour disorder variables between patients with progressive supranuclear palsy and those with Parkinson's disease. Parkinsonism and Related Disorders 18: 394-396, 2012.
- 5) Wada-Isoe K, et al. Epidemiological Survey of Frontotemporal Lobar Degeneration in Tottori Prefecture, Japan. Dement Geriatr Cogn Disord Extra 2: 381-386, 2012.
- 6) Adachi T, et al. Autopsy-confirmed progressive supranuclear palsy with decreased uptake of metaiodobenzylguanidine. Clinical neurology and neurosurgery 115: 1555-1557, 2013.
- 7) Tanaka K, et al. Impulsive compulsive behaviors in Japanese Parkinson's disease patients and utility of the Japanese version of the Questionnaire for Impulsive-Compulsive Disorders in Parkinson's disease. Journal of the Neurological Sciences 331: 76-80, 2013.
- 8) Mitsui J, et al. Mutations in COQ2 in Familial and Sporadic Multiple-System Atrophy. The new engl and journal of medicine 369: 233-244, 2013.
- 9) 中下聡子, ほか. 多発性の脳微小出血を認めたパーキンソン病. 神経内科 74: 324-326, 2011.
- 10) 古和久典, ほか. Parkinson病患者における葉酸・ビタミンB12補充療法による高ホモシステイン血症は正効果の臨床薬理的検討—栄養障害関連因子の検討を含めて—. 臨床薬理の進歩 32: 46-52, 2011.
- 11) 田中健一郎, ほか. 長期間のせん望状態により