

201442037A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))

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と
治療法開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 戸田 達史
神戸大学大学院医学研究科

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））による委託業務として、国立大学法人神戸大学が実施した平成26年度「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と治療法開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
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と 治療法開発に関する研究 -----	1
神戸大学大学院医学研究科 神経内科 戸田 達史	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
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 -----	9
神戸大学大学院医学研究科 神経内科 戸田 達史	
2. 大規模リソースと次世代シークエンサーを基盤とした孤発性 ALS の発症・ 病態機構解明 -----	11
名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 祖父江 元	
3. 次世代シークエンサーをもちいた新規遺伝性パーキンソン病の単離 -----	14
順天堂大学医学部 神経学講座 服部 信孝	
4. 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・感覚器病態学講座 神経内科学分野 青木 正志	
5. 進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症を含めたタウオパチー、 前頭側頭葉変性症における原因究明の基盤整備に関する研究 -----	20
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 中島 健二	
6. パーキンソン病関連疾患の研究リソース構築と孤発性 ALS 患者における 3' -UTR に注目した TARDBP 塩基配列の解析 -----	23
新潟大学脳研究所 西澤 正豊	
7. 剖検診断された PSP/ CBD/ FTLD- tau の分子病理 -----	26
東京都健康長寿医療センター神経内科・バイオリソースセンター・ 高齢者ブレインバンク（神経病理） 村山 繁雄	
8. PSP, CBD, FTLD などのゲノム収集、病理診断に関する研究 - 相模原病院の平成 26 年度の研究進捗状況と FTLD の病状を示した CADASIL 様の 病状を示した剖検例 - -----	30
国立病院機構相模原病院神経内科 長谷川 一子	
9. パーキンソン病のリソース構築と遺伝子治療研究 -----	33
大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 望月 秀樹	
10. 非運動症状、DAT 画像を含めた臨床情報とリンクした孤発性及び家族性 パーキンソン病患者の DNA 収集に関する研究 -----	35
国立精神・神経医療研究センター病院神経内科 村田 美穂	
III. 学会等発表実績 -----	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	61

1. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等克服研究事業
（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））
委託業務成果報告（総括）

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と
治療法開発に関する研究

業務主任者 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と推定される、Rareながら強いPDゲノム因子を発見するため、次世代シーケンサーによる全エクソン配列解読し、患者・対照関連解析をおこなった（エクソーム関連解析）。まず先述の4つの孤発性PD遺伝子のエクソン配列を関連解析（PD 625例とcontrol 961例）したところ、*LRRK2*領域に、中等度の強さのリスクとなる2つのアミノ酸置換を伴うSNVを検出した（ $P \sim 10^{-4}$ ）。全遺伝子全エクソン配列の関連解析による孤発性PDのゲノム因子発見へつなげる。遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子CHCHD2を発見した。CHCHD2はミトコンドリア電子伝達系に関与し、パーキンソン病治療のための新たな創薬ターゲットとなる可能性がある。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。 α シヌクレイン凝集を検討するシステムを確立できた。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、今後の患者サンプルを用いた解析が展開できる。またこれまでの報告に合致しない臨床経過をとる家族性パーキンソン病の1家系を見出し、現在解析中である。引き続き、臨床情報にリンクした、孤発性及び家族性パーキンソン病患者のDNA収集を進める。

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、進行性に全身の筋力低下が進行する神経難病で、現在有効な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。孤発性ALS 469例に対してALS疾患関連28遺伝子のエクソン領域について網羅的な遺伝子解析を施行し、14例に既知の家族性ALS遺伝子変異を認め、30例に病原性の疑われる新規のvariantを認めた。今後、分子生物学的な検討をすすめていく。常染色体優性遺伝の遺伝形式が疑われる家族性ALSの122家系において遺伝子解析を行い、29家系にSOD1遺伝子変異（24%）、11家系にFUS/TLS遺伝子変異（9%）、1家系にTDP-43変異を認めた。また病理学的に診断を確定したALS 34例にて*TARDBP*の翻訳領域と3'の非翻訳領域の塩基配列を確認した。3例で非翻訳領域に一塩基置換を認めた。

PS・FTLDの遺伝子試料収集研究体制を整備し、遺伝子試料の収集を開始した。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。タウopathyについて患者数確保のための広報活動、説明と同意によるバイオリソースの構築を行った。その結果、血液15検体、髄液3検体、DNA9検体の収集と、FTLDの臨床症例をCARASILと病理診断した。また本年度preclinical (p) PSP/CBD/FTLD-4repeat-tauの抽出を試みた。タウ遺伝子異常なく、神経病理学的、免疫ブロット上で確認された、pPSP 2例、pCBD 1例を抽出できた。パーキンソン病類縁疾患について、剖検組織を集積した。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

祖父江 元	名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学・教授
服部 信孝	順天堂大学医学部 神経学講座・教授
青木 正志	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・教授
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
西澤 正豊	新潟大学脳研究所・教授
村山 繁雄	東京都健康長寿医療センター神経内科・バイオリソースセンター・高齢者ブレインバンク（神経病理） ・部長
長谷川 一子	国立病院機構相模原病院 神経内科医長・長谷川一子
望月 秀樹	大阪大学大学院医学系研究科神経内科学・教授
村田 美穂	国立精神・神経医療研究センター病院神経内科・部長

A.研究目的

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ズ解析を行い、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ズし、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ズ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と推定される、Rareながら強い PD ゲノム因子を発見するため、次世代シーケンサーによる全エクソン配列解読し、患者・対照関連解析をおこなった（エクソーム関連解析）。主成分分析において患者対照間の集団構造化をみとめなかった。まず先述の4つの孤発性 PD 遺伝子のエクソン配列を関連解析 (PD 625 例と control 961 例) したところ、*LRRK2* 領域に、中等度の強さのリスクとなる2つのアミノ酸置換を伴う SNV を検出した ($P \sim 10^{-4}$)。 *LRRK2* 以外の3つの遺伝子座には、アミノ酸置換を伴う強い PD リスクを検出しなかった。全遺伝子全エクソン配列の関連解析による孤発性 PD のゲノム因子発見へつなげる。

②次世代シーケンサーをもちいた新規遺伝性パーキンソン病の単離 (服部)

新規遺伝性パーキンソン病原因遺伝子を単離する目的で、常染色体優性遺伝性パーキンソン病の大家系について次世代シーケンサー

をもちいたゲノム解析を実施した。その結果、*coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2)* 遺伝子 182C>T (Thr611Ile) 変異を同定した。340 家系の常染色体優性遺伝性パーキンソン病患者について *CHCHD2* 遺伝子配列を解析した結果、発端家系に加え 3 家系から *CHCHD2* 遺伝子変異を同定した。さらに孤発性パーキンソン病患者 517 症例、および健常対照者 559 例の *CHCHD2* 遺伝子配列を比較した結果、*CHCHD2* 遺伝子領域内にある 2 つの多型 (-9T>G、および 5C>T) が患者群で有意に頻度が高かった (オッズ比 2.51; $P=0.0004$ 、およびオッズ比 4.69; $P=0.0025$)。したがって *CHCHD2* は稀な遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であるだけでなく、一般的な孤発性パーキンソン病の発症感受性遺伝子にもなりうる事が本研究から明らかになった。*CHCHD2* はミトコンドリア電子伝達系に関与する分子であり、ミトコンドリア機能異常がパーキンソン病の病態の 1 つであると考えられていることから *CHCHD2* は新たなパーキンソン病治療ターゲットになりうる事が強く示唆される。

③パーキンソン病のリソース構築と遺伝子治療研究 (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。

④非運動症状、DAT 画像を含めた臨床情報とリ

ンクした孤発性及び家族性パーキンソン病患者の DNA 収集に関する研究 (村田)

パーキンソン症状及び、REM 睡眠行動異常症 (RBD)、自律神経症状などの非運動症状、DAT SPECT 画像を含めた臨床情報とリンクした孤発性及び家族性パーキンソン病患者 DNA を収集した。今年度は 40 例 (うち、家族例 9 家系、12 例を含む) を収集した。うち一家系は叔父 2 名及び同法 5 名中 4 名が発症者でやや浸透率の低い常染色体性優性遺伝形式が推定される家系で、DAT 画像は著明低下を示したが、経過が長いにも関わらず良好な薬物反応性を示した。既知の遺伝子異常はなく、新たな原因遺伝子について、現在検索中である。

⑤大規模リソースと次世代シーケンサーを基盤とした孤発性 ALS の発症・病態機構解明 (祖父江)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、進行性に全身の筋力低下が進行する神経難病で、現在有効な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、現在も前向き臨床情報、ゲノム DNA の蓄積を進めている。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、エクソーム解析を現在行っている。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。

⑥筋萎縮性側索硬化症の遺伝子解析 (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 122 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 29 家系に SOD1 遺伝子変異 (24%)、11 家系に FUS/TLS 遺伝子変異 (9%)、1 家系に TDP-43 変異を認めたが、残る 81 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。

⑦進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症を含めたタウオパチー、前頭側頭葉変性症における原因究明の基盤整備に関する研究 (中島)

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。遺伝子解析を行うには、多数例の遺伝子試料が必要であり、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が望まれている。本研究では、詳細な臨床情報の整った多数の遺伝子試料を収集し、PS・FTLD の診断、病態解明、治療法の開発を目的としている。共同研究施設の拡充、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による詳細な臨床情報の整った PS・FTLD

の遺伝子試料収集体制が整備され、遺伝子試料収集が開始となった。

⑧PSP, CBD, FTLD などのゲノム収集、病理診断に関する研究 (長谷川)

進行性核上性麻痺 progressive supranuclear palsy:PSP や大脳皮質基底核変性症 corticobasal ganglionic syndrome: CBS, 前頭葉側頭葉認知症 fronto-temporal lobe dementia:FTLD などのタウオパチーの診断、病態把握、病因の研究のためには、バイオリソースの整備が必要である。パーキンソン病患者会、ヘルパー研修会、地域連携の勉強会でパーキンソン病関連疾患の講習を行い、研究状況を紹介した。また、病態に関する総説などによる医師に対する広報活動を行った。これにより患者数の増加が得られた。バイオリソース収集については、平成 24 年度に当院での本研究に関する承認を受けてから収集を開始した。その結果、現在の収集状況は PSP, CBS, 前頭葉側頭葉型認知症は 50 症例以上となった。現時点で、同意を取得し、遺伝子や血漿の中央への送付を行ったのは、平成 26 年度は血液 15 検体、髄液 3 検体、DNA9 検体となった。また、病理学的検討では FTLD と臨床診断した症例の剖検により、遺伝子異常は同定できなかったが、神経病理学的には CARASIL と診断した。これにより FTLD の原因疾患として CADASIL も考慮する必要があることを報告した。

⑨剖検診断された PSP/ CBD/ FTLD- tau の分子病理 (村山)

発症前 (preclinical: p) PSP, CBD の抽出のため、324 例の連続開頭剖検例 (平均 82.5 歳) 中脳をタウアイソフォーム特異抗体免疫染色を用い、4 リピート (R) タウオパチーを抽出した。35 例が抽出され、他の変性疾患を伴わない 7 例を純粋型とした。タウ遺伝子異常は 8 例に

はなく、タウ C 末抗体を用いた免疫プロットでは、PSP パターン 2 例、CBD パターン 1 例であった。独立して行った神経病理学的検討で、2 例が pPSP、1 例が pCBD と診断され、免疫プロットの所見と一致した。残り 5 例は tuft shaped astrocyte を伴っており、より早期の pPSP の可能性が考えられた。

10 パーキンソン病関連疾患の研究リソース構築と孤発性 ALS 患者における 3' -UTR に注目した *TARDBP* 塩基配列の解析 (西澤)

パーキンソン病関連疾患の解明の為に、詳細な臨床病歴を伴った研究リソース、特に剖検脳組織の集積が必要である。本研究では、パーキンソン病類縁疾患について、剖検組織を集積した。加えて、孤発性神経疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関して、剖検にて確認された症例の DNA を集積し、疾患関連遺伝子である *TARDBP* の変異、一塩基置換の有無を検討した。その結果、病理学的に診断が確定したパーキンソン病関連疾患の研究リソースをリストアップした。また、病理学的に診断を確定した ALS 34 例中 3 例にて *TARDBP* の 3' の非翻訳領域に一塩基置換を認めた。

D. 考察

LRRK2 にみられた中等度の強さのリスク variant の頻度は、報告されている集団内頻度と類似していた。このことは我々のエクソーム解読が、関連解析に使用できるレベルで成功していることを示唆している。

本研究の結果、新規遺伝性パーキンソン病原因遺伝子 *CHCHD2* を発見した。*CHCHD2* はミトコンドリアに局在し、電子伝達系に関与することが既に報告されている (Baughman JM et al. PLoS Genet, 2009)。パーキンソン病はミトコンドリア機能不全が発症に密接に関わっていることが指摘されており (Schapira AH et al. LANCET, 2014)、さらに既報の遺伝性パーキンソン病原因遺伝子の

中にもミトコンドリアの品質管理に関与する分子が存在する (Clark IE et al. Nature, 2006)。しかしながらミトコンドリア機能の根幹である電子伝達系に直接関与する分子は *CHCHD2* が初めての発見であり、*CHCHD2* の分子病態機序を明らかにしていくことでパーキンソン病の病態解明、新規治療法の開発につながることを示唆される。さらに *CHCHD2* は稀な遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であるだけでなく、一般的な孤発性パーキンソン病の発症感受性遺伝子にもなりうることに本研究の結果から示唆された。*CHCHD2* と孤発性パーキンソン病の関係をより詳細に解析するために、今後さらに多くの症例数で人種を越えた大規模解析が必要である。

パーキンソン病のパス入院による前向きコホート研究を立ち上げ、背景因子を含めた臨床解析を行いパーキンソン病の臨床的多様性の解析を進める。患者髄液からの α シヌクレイン同定や精製蛋白への影響を解析することで新たな診断マーカーが確立できると期待されている。これを前述の臨床解析の結果と融合することで多様なパーキンソン病を階層化が可能になると考えられる。階層化した患者の血液、髄液サンプルに対して次世代シーケンサーを用いそれぞれの階層に伴う関連因子のスクリーニングを行いパーキンソン病発症機構の解明と治療法開発への道を開いていく。

国立精神神経センターの家系では、遺伝形式が想定され、LRRK2 異常が第 1 に考えられた。しかし LRRK2 (exon41) の direct sequence 解析では、I2012T, G2019S, I2020T のいずれの異常も認めなかった。本家系については、現在、主任研究者のもとでエクソーム解析を進めている。家族例については発端者が 30 歳代等の若年の場合は親の発症時期は比較的新しく (存命の場合もあり)、親の病歴の信頼度は比較的高いと考えられた。しかし発端者が 60-70 歳代の場合は、親の病歴は伝聞のみとなり、今後、より信頼度の高い患者収集に注意する必要があると考えられた。

今回名古屋大学の解析で、孤発性 ALS 患者の中に、14 例で既知の家族性 ALS 遺伝子変異を認めた。これらの変異に関しては、浸透率の低い病原性の遺伝子変異である可能性、あるいは De novo mutation が起こった可能性、あるいは上の世代での発症が見逃されている可能性などが考えられた。また、今回見出した新規の variant に関しては、単独で ALS を発症させる新規の遺伝子変異の可能性、あるいは、単独では ALS を発症させないが、ALS の発症に寄与する rare variant の可能性があると思われる。しかし、発症には寄与しない variant の可能性もあるため、さらに分子生物学的な検討が必要になってくるかと考えられる。

次世代シーケンサーの登場にて新規 ALS の原因遺伝子の報告が続いている。東北大学の解析で、特に欧米で頻度が高い C90RF72 遺伝子変異を認めなかったことは人種差を示すものと考えられた。今回の 122 家系の解析のうち 81 家系では遺伝子異常を認めなかった。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。

筋萎縮性側索硬化症に関しては、新潟大学では、これまでに TDP-43 が自己の pre-mRNA 3' UTR に結合し、polyA 選択を変化させ、exon6 内の翻訳領域と、非翻訳領域に存在する潜在的イントロンのスプライシングを惹起し、それに続くナンセンス依存性 mRNA 分解機構 (NMD) により mRNA を分解し、そのタンパク量を減少していることを明らかにした。この事実から TARDBP の翻訳領域のみならず 3' の非翻訳領域の一塩基置換が、この自己調節機能に影響を与える可能性を検討した。実際同領域内の潜在的イントロンの c. 2076G>A 変異が家族性、及び孤発性 ALS にて報告されている (Acta Neuropathol (2009) 118:633-645)。今回解析した 34 例では、翻訳領域には変異、及び一塩基置換は認めなかった。また非翻訳領域では 2 例で rs148325203 (c. 1098C>GC)、1 例で rs150412704 (c. 2963G>GC) を認めた。いずれも正常対象者に比

して高率であるため、今後更に症例を蓄積し、検討を重ねる必要がある。

鳥取大学を中心とする全国多施設共同研究による遺伝子試料収集研究体制が整備された。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。

バイオソース収集システムについては比較的順調に構築されつつある。剖検例から FTLD の原疾患に CARASIL と病理診断例を見出すことができた。高齢であり、非典型的臨床像を示しているため、今後のさらなる遺伝子検索が必要であること、FTLD を見出した際には血管系の病変を検出することが必要と考えられた。

本研究により、高齢者コホート 324 例のスクリーニングで、分子病理学的に確認できた、pCBD 1 例、pPSP 2 例が抽出された。残り 4 例については、pPSP の極早期の可能性が高いと判断した。高齢者コホート内に pPSP/ CBD の存在は確認できたが、全て合わせても 7/ 324 の頻度であり、AD/ PD で Braak が提出した進展ステージ分類を検討するのに十分な症例数は得られなかった。タウ遺伝子検索とタウ C 末免疫ブロットを併用する現在の PSP/CBD 研究診断基準では、より少数の 3/ 324 の症例数しか得られなかった。より疾患特異性の高い神経病理マーカーの出現が臨まれる。

新潟大学では病理学的にパーキンソン病関連疾患であることが確定した症例 (進行性核上性麻痺 46 例、皮質基底核変性症 7 例) を抽出した。本学は疾患関連の剖検組織を多数保管しているが、その本組織においても、これらの疾患の症例数は必ずしも十分ではない。米国ではすでに数百例に及ぶパーキンソン病関連疾患の剖検組織を保管している。本邦でも、全国で独自に管理されている症例のデータベース化

が必要であると考える。

E. 結論

PD, ALS, タウオパチーなど孤発性の神経難病につき次世代シーケンサーを用いた発症機構の解明と治療法開発に関する研究がすすんだ。

F. (健康危険情報)

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
(委託業務成果報告の項目参照)

2. 学会発表

(委託業務成果報告の項目参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

委託業務成果報告（業務項目）

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

担当責任者 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と推定される、Rareながら強いPDゲノム因子を発見するため、次世代シーケンサーによる全エクソン配列解読し、患者・対照関連解析をおこなった（エクソーム関連解析）。主成分分析において患者対照間の集団構造化をみとめなかった。まず先述の4つの孤発性PD遺伝子のエクソン配列を関連解析（PD 625例とcontrol 961例）したところ、*LRRK2*領域に、中等度の強さのリスクとなる2つのアミノ酸置換を伴うSNVを検出した（ $P \sim 10^{-4}$ ）。*LRRK2*以外の3つの遺伝子座には、アミノ酸置換を伴う強いPDリスクを検出しなかった。全遺伝子全エクソン配列の関連解析による孤発性PDのゲノム因子発見へつなげる。

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

PD患者ゲノム、および対照ゲノムから、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。患者対照間のSNVの相違をtrend検定で統計検定した。

（倫理面への配慮）

研究対象者に対し人権擁護上の配慮し、不利益、危険性の排除・説明をし、インフォームド・コンセントを取得した。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。本研究はヒトゲノム倫理委員会の承認を得ておこなった。

C.研究結果

主成分分析において患者対照間の集団構造化をみとめず、関連解析に適したデータを得ることができたと判断された。

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) のエクソン配列を関連解析 (PD 625例と control 961例) したところ、*LRRK2* 領域に、中等度の強さのリスクとなる2つのアミノ酸置換を伴うSNVを検出した ($P \sim 10^{-4}$)。 *LRRK2* 以外の3つの遺伝子座には、アミノ酸置換を伴う強いPDリスクを検出できなかった。

D. 考察

LRRK2 にみられた中等度の強さのリスク variant の頻度は、報告されている集団内頻度と類似していた。このことは我々のエクソーム解読が、関連解析に使用できるレベルで成功していることを示唆している。

E. 結論

今後は、全遺伝子全エクソン配列の関連解析による孤発性PDのゲノム因子発見へつなげる。

(健康危険情報) なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohtsuka Y *et al*, Fukutin is prerequisite to ameliorate muscular dystrophic phenotype by myofiber-selective LARGE expression, *Sci Rep* 5:8316, 2015
2. Kanagawa M *et al*, Contribution of dysferlin deficiency to skeletal muscle pathology in asymptomatic and severe dystroglycanopathy models: generation

of a new model for Fukuyama congenital muscular dystrophy, *PLoS One* 9 (9):e106721, 2014.

2. 学会発表

1. Satake W *et al*, Japanese Exome Association Study and 2nd SNP-GWAS of Parkinson's disease, アメリカ人類遺伝学会, 2014.
2. Satake W *et al*, Japanese Exome Association Study and 2nd SNP-GWAS of Parkinson's disease, *Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease*, 2014.
3. Satake W *et al*, Exome sequencing of Parkinson's disease in order to identify genetic variants with high disease-risk, *Movement disorder society*, 2014.
4. 佐竹ら、孤発性パーキンソン病のエクソーム関連解析と第2期SNP-GWAS, *日本人類伝学*, 2014.
5. 佐竹ら、孤発性パーキンソン病の遺伝素因とゲノム研究、*国際個別化医療学会*, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

委託業務成果報告（業務項目）

大規模リソースと次世代シーケンサーを基盤とした孤発性ALSの発症・病態機構解明

担当責任者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、進行性に全身の筋力低下が進行する神経難病で、現在有効な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、現在も前向き臨床情報、ゲノムDNAの蓄積を進めている。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、エクソーム解析を現在行っている。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.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の根本的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。家族性ALSの原因遺伝子の一部は既に明らかとなっているが、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。孤発性ALSの病態に関連する遺伝子を見出し、根本的治療法の開発を推進することが求められている。我々はALS患者の大規模前向きコホート（JaCALS）を立ち上げており、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

次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム解析を大規模に行い、ALSの進行や発症と関連する遺伝子多型あるいは、rare variantsを抽出する。サンプルについては、ALS患者大規模前向きコホートJaCALSなどに蓄積されたゲノム遺伝子リソースを活用する。SOD1、TDP-43、FUSなどを含む28種類の既知のALS疾患関連遺伝子について、次世代シーケンサーを用いた網羅的なシーケンシングシステムを構築し、解析を行った。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、multiplex PCR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 Touch2™システム、Ion PGM™シーケ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。また一方で、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。Covaris社の超音波破碎システムCovaris S220およびLifeTechnology社のLibraryBuilderを用いて、高品質なライブラリをハイスループットに作成した。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、HGVDなどを始めとするデータベース上のvariant情報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

孤発性 ALS508 例のうち、家族歴がなく、El Escorial 診断基準で possible 以上と診断され、ALS と関連があるとされる *C9ORF72* 遺伝子の繰り返し配列の延長が認められなかった、孤発性 ALS469 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。その結果、スクリーニングを行った 28 遺伝子のエクソン領域内で、既に ALS 発症の原因と関連すると報告されている既知の variant が 14 例で認められた。内訳は、*SOD1* 11 例、*FUS* 2 例、*TARDBP* 1 例であった。さらに、28 遺伝子のエクソン領域内で、dbSNP、HGVD などのデータベース上に存在しない、新規の variant について検討を行い、115 個の新規 variant を抽出した。さらに PolyPhen2 で possibly or probably damaging または SIFT で Damaging と判定された病原性の疑われる variant を抽出し、Sanger sequence 法で確認したところ、最終的に 30 例で計 35 個の variant を確認した。内訳は、*ALS2* 1 例、*ATXN2* 1 例、*C9ORF72* 1 例、*DAO* 1 例、*DCTN1* 5 例、*FIG4* 3 例、*PRPH2* 例、*RNF19A* 3 例、*SETX* 4 例、*SPG11* 8 例、*TAF15* 1 例、*TFG* 1 例、*ZNF512B* 4 例であった。

D. 考察

今回の解析で、孤発性 ALS 患者の中に、14 例で既知の家族性 ALS 遺伝子変異を認めた。これらの変異に関しては、浸透率の低い病原性の遺伝子変異である可能性、あるいは De novo mutation が

起こった可能性、あるいは上の世代での発症が見逃されている可能性などが考えられた。また、今回見出した新規の variant に関しては、単独で ALS を発症させる新規の遺伝子変異の可能性、あるいは、単独では ALS を発症させないが、ALS の発症に寄与する rare variant の可能性があると思われる。しかし、発症には寄与しない variant の可能性もあるため、さらに分子生物学的な検討が必要になってくるかと考えられる。

E. 結論

孤発性 ALS 469 例に対して ALS 疾患関連 28 遺伝子のエクソン領域について網羅的な遺伝子解析を施行し、14 例に既知の家族性 ALS 遺伝子変異を認め、30 例に病原性の疑われる新規の variant を認めた。今後、分子生物学的な検討をすすめていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. *Hum Mol Genet.* 2015; 24: 314-29

Watanabe H, Atsuta N, Nakamura R, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Tomiyama H, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Aoki M, Tsuji S, Nakano I, Kaji R, Sobue G. Factors affecting longitudinal functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014 [Epub ahead of print]

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 Neuron Involvement in TAR DNA-Binding Protein of 43 kDa-Related Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2014;71:172-9.

Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Nakamura R, Koike H, Sobue G. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open.* 2014; 4:e005213

Araki A, Katsuno M, Suzuki K, Banno H, Suga N, Hashizume A, Mano T, Hijikata Y, Nakatsuji H, Watanabe H, Yamamoto M, Makiyama T, Ohno S, Fukuyama M, Morimoto S, Horie M, Sobue G. Brugada syndrome in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology.* 2014; 82:1813-21

Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Qiang Q, Ding Y, Watanabe H, Yamamoto M, Ohtsuka K, Sobue G. Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2014; 23:3552-65

G.知的財産権の出願・登録状況
特記なし。

委託業務成果報告（業務項目）

次世代シークエンサーをもちいた新規遺伝性パーキンソン病の単離
担当責任者 服部 信孝 順天堂大学医学部 神経学講座 教授

研究要旨

新規遺伝性パーキンソン病原因遺伝子を単離する目的で、常染色体優性遺伝性パーキンソン病の大家系について次世代シークエンサーをもちいたゲノム解析を実施した。その結果、*coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2)* 遺伝子 182C>T (Thr61Ile) 変異を同定した。340 家系の常染色体優性遺伝性パーキンソン病患者について *CHCHD2* 遺伝子配列を解析した結果、発端家系に加え 3 家系から *CHCHD2* 遺伝子変異を同定した。さらに孤発性パーキンソン病患者 517 症例、および健常対照者 559 例の *CHCHD2* 遺伝子配列を比較した結果、*CHCHD2* 遺伝子領域内にある 2 つの多型 (-9T>G、および 5C>T) が患者群で有意に頻度が高かった (オッズ比 2.51; $P=0.0004$ 、およびオッズ比 4.69; $P=0.0025$)。したがって *CHCHD2* は稀な遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であるだけでなく、一般的な孤発性パーキンソン病の発症感受性遺伝子にもなりうるということが本研究から明らかになった。*CHCHD2* はミトコンドリア電子伝達系に関与する分子であり、ミトコンドリア機能異常がパーキンソン病の病態の 1 つであると考えられていることから *CHCHD2* は新たなパーキンソン病治療ターゲットになりうるということが強く示唆される。

A.研究目的

パーキンソン病は全国で約 14 万～15 万人の患者が加療を受けており、高齢化が進む我が国では患者数は増加の一途を辿っている。本疾患の克服、すなわち根治療法の開発は、財政を圧迫している医療費を始めとする社会保障費軽減に直結するため、早急に成し遂げなければならない課題の 1 つである。パーキンソン病の多くは孤発性で発症するが、一部 (5~10%) に遺伝性パーキンソン病が存在する。これら遺伝性パーキンソン病は単一の遺伝子変異によって発症に至っていると予想され、実際多くのパーキンソン病原因遺伝子が遺伝性パーキンソン病の分子遺伝学的解析によって明らかになっている。しかしながら自検例の統計では遺伝性パーキンソン病患者の約 80%は未だ原因遺伝子が不明であり、数多くの未同定遺伝性パーキンソン病原因遺伝子が存在することを強く示唆する。そこで本研究では常染色体優性遺

伝性パーキンソン病の大家系のゲノム DNA をもちいて次世代シークエンサーで解析し、原因遺伝子を単離することを目的として以下の研究を実施した。

B.研究方法

常染色体優性遺伝性パーキンソン病の大家系 (以下家系 A とする) からインフォームド・コンセントの後、末梢血リンパ球からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA が得られた家系メンバーは 3 世代 13 名 (パーキンソン病発症者; 8 名、非/未発症者; 5 名) である。遺伝子解析結果の検証を行うために、常染色体優性遺伝性パーキンソン病 340 家系 (341 症例)、孤発性パーキンソン病患者 517 症例、および健常対照者 559 例をもちいた。家系 A について Genome Wide Human SNP Array 6.0 (アフィメトリクス社) をもちいて全ゲノム SNPs タイピングを行った。次に

SNPHitLink (Fukuda Y, et al. BMC Bioinformatics, 2009) と Merlin (Abecasis GR, et al. Nat Genet, 2002) ソフトウェアをもちいて全ゲノム連鎖解析を行った。家系 A の患者 3 名について全エクソン解析を SureSelect Human All Exon Kit (アジレントテクノロジーズ社) および GA IIx (イルミナ社) をもちいて実施した。家系 A の 1 名の患者について HiSeq2000 (イルミナ社) をもちいて全ゲノム解析を実施した。遺伝子解析結果の検証は 3130 および 3730 Genetic Analyzer (ライフテクノロジーズ社) をもちいてサンガー法で実施した。統計解析は JMP8 (SAS インスティテュート社) をもちいて実施した。

(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、個人情報の保護ならびに漏洩防止のための対策を講じ、運用した。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 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)」を遵守し、それに準じた倫理委員会で承認を得た (順大医倫第 2011026 号、2012157 号)。

C. 研究結果

家系 A の患者 4 名について次世代シーケンサーをもちいたゲノム解析を行った結果、合計で 230 万以上の多様性 (参照配列と異なる配列) を検出した。この中から、(1) 連鎖領域に存在する、(2) 公共データベースに登録されていない、(3) エクソンおよびスプライス部位に存在する、(4) ヘテロ接合体である、(5) アミノ酸置換またはスプライス異常が予想される、(6) サンガー法で変異を確認、(7) 健常群で認められないという条件で絞り込んだ結果、*coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2)* 遺伝子 182C>T (Thr61Ile) 変異を同定した (図 1)。この変異は家系 A の患者 8 名全てから認められた。さ

らに 340 家系の常染色体優性遺伝性パーキンソン病患者の *CHCHD2* 遺伝子配列を解析した結果、家系 A とは別に 3 家系から *CHCHD2* 変異を同定した (図 1、家系 B~D、182C>T; Thr61Ile、434G>A; Arg145Gln、および 300+5G>A)。

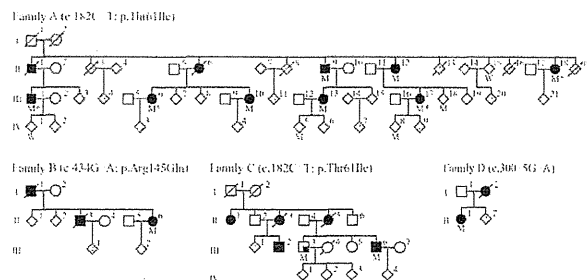


図 1. CHCHD2 遺伝子変異を認めた常染色体優性遺伝性パーキンソン病家系。

孤発性パーキンソン病患者と健常対照者について *CHCHD2* 遺伝子配列を比較した結果、*CHCHD2* 遺伝子領域内にある 2 つの多型 (-9T>G、および 5C>T) が患者群で有意に頻度が高かった (表 1、オッズ比 2.51; $P=0.0004$ 、およびオッズ比 4.69; $P=0.0025$)。

表 1. 本研究で同定された *CHCHD2* 多様性。

Position	Variant	rs#	Alternative minor allele frequency					SPD vs. Control		
			ADHD (n=340)	SPD (n=517)	Control (n=559)	1000 Genomes	1000	HGVD	OR (95% CI)	p-value ²
chr7:56174117	c.-11G>A	5'UTR	rs200226056	0.000	0.000	<0.001	<0.001	ND	-	-
chr7:56174115	c.-9T>G	5'UTR	rs100043	0.041	0.048	0.020	0.134	0.044	2.51 (1.48-4.24)	0.0004
chr7:56174102	c.5C>T	p.P2L	rs142444896	0.035	0.018	0.004	0.008	0.013	4.69 (1.59-13.5)	0.0025
chr7:56172172	c.51-AA>G	splice site	unknown	0.000	<0.001	0.005	ND	0.004	0.19 (0.02-1.66)	0.1189
chr7:56172171	c.51-3C>T	splice site	rs201791444	0.002	<0.001	0.000	<0.001	0.003	-	-
chr7:56172057	c.182C>T	p.T61I	novel	0.006	0.000	0.000	ND	ND	-	-
chr7:56171964	c.255T>A	p.S85R	rs182992574	0.002	0.000	0.000	<0.001	0.002	-	-
chr7:56171914	c.300+5G>A	splice site	novel	0.002	0.000	0.000	ND	ND	-	-
chr7:56170571	c.434G>A	p.R145Q	novel	0.002	0.000	0.000	ND	ND	-	-
chr7:56169419	c.*125G>A	3'UTR	rs8406	0.041	0.048	0.027	0.128	ND	1.85 (1.16-2.94)	0.0112

CHCHD2 遺伝子変異陽性患者は平均発症年齢 56.2 歳でレボドバ反応性のパーキンソン病だった。自律神経症状が観察されないことを除き典型的なパーキンソン病だった。家系 C の兄弟発症例では本態性振戦とパーキンソン病と表現型が異なっていた。

考察

本研究の結果、新規遺伝性パーキンソン病原因遺伝

伝子 *CHCHD2* を発見した。*CHCHD2* はミトコンドリアに局在し、電子伝達系に参与することが既に報告されている (Baughman JM et al. *PLoS Genet*, 2009)。パーキンソン病はミトコンドリア機能不全が発症に密接に関わっていることが指摘されており (Schapira AH et al. *LANCET*, 2014)、さらに既報の遺伝性パーキンソン病原因遺伝子の中にもミトコンドリアの品質管理に参与する分子が存在する (Clark IE et al. *Nature*, 2006)。しかしながらミトコンドリア機能の根幹である電子伝達系に直接関与する分子は *CHCHD2* が初めての発見であり、*CHCHD2* の分子病態機序を明らかにしていくことでパーキンソン病の病態解明、新規治療法の開発につながる事が示唆される。さらに *CHCHD2* は稀な遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であるだけでなく、一般的な孤発性パーキンソン病の発症感受性遺伝子にもなりうる事が本研究の結果から示唆された。*CHCHD2* と孤発性パーキンソン病の関係をより詳細に解析するために、今後さらに多くの症例数で人種を越えた大規模解析が必要である。

E. 結論

遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子 *CHCHD2* を発見した。*CHCHD2* はミトコンドリア電子伝達系に参与し、パーキンソン病治療のための新たな創薬ターゲットとなる可能性がある。

(健康危険情報)

特筆すべき事項なし。

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. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Yuanzhe L, Ogaki K, Ando M, Yoshinon H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo

Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. *CHCHD2* mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *LANCET Neurology*. 2015 Mar;14(3):274-282.

2. Nishioka K, Oyama G, Yoshino H, Li Y, Matsushima T, Takeuchi C, Mochizuki Y, Mori-Yoshimura M, Murata M, Yamasita C, Nakamura N, Konishi Y, Ohi K, Ichikawa K, Terada T, Obi T, Funayama M, Saiki S, Hattori N. High frequency of beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) among the patients with intellectual disability and young onset parkinsonism. *Neurobiol Aging*. in press.
3. Hatano T, Funayama M, Kubo S, Mata IF, Oji Y, Mori A, Zabetian CP, Waldherr SM, Yoshino H, Oyama G, Shimo Y, Fujimoto K, Oshima H, Kunii Y, Yabe H, Mizuno Y, Hattori N. Identification of a Japanese family with LRRK2 p.R1441G-related Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 Nov;35(11):2656.e17-23.
4. Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, Hattori N. P150glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. *PLoS One*. 2014 Apr 10;9(4):e94645.
5. 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*.