

平成28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) 神経疾患の集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究  
(英語) Comprehensive genome analysis focusing on neurological disorders

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学 医学部附属病院 教授 辻 省次  
所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo Hospital, Professor, Shoji Tsuji

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医学部附属病院 神経内科 助教 三井純  
所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo Hospital, Department of Neurology, Assistant Professor, Jun Mitsui

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医学部附属病院 神経内科 助教 石浦浩之  
所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo Hospital, Department of Neurology, Assistant Professor, Hiroyuki Ishiura

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授 森下真一  
所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo, Graduate School of Frontier Sciences, Professor, Shinichi Morishita

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医学部附属病院 神経内科 学術支援専門職員 伊達英俊  
所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo Hospital, Department of Neurology, Project Academic Support Specialist, Hidetoshi Date

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医学部附属病院 神経内科 学術支援専門職員 松川敬志  
所属 役職 氏名： (英語) The University of Tokyo Hospital, Department of Neurology, Project Academic Support Specialist, Takashi Matsukawa

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医学部附属病院 神経内科 特任臨床医 田中真生  
所属 役職 氏名: (英語) The University of Tokyo Hospital, Department of Neurology, Project  
Staff Doctor, Masaki Tanaka

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究は、神経疾患を対象として、次世代シーケンサーを駆使したゲノム配列解析拠点の整備、次世代シーケンサーから得られる膨大なゲノム配列情報を処理するゲノムインフォマティクス拠点の整備により、発症機構が未解明の数多くの神経疾患について、発症に関与する遺伝子を解明し、分子病態機序に基づく治療法開発研究を実現することを目的としている。

この目的のため、ゲノム情報解析、遺伝性神経疾患の病因遺伝子の探索、孤発性神経疾患の病因遺伝子の探索、臨床病型の修飾因子の探索、診断未確定の神経疾患に対する網羅的な遺伝子診断、神経疾患における体細胞変異の定量的解析についての研究を進めており、それぞれの成果の概要を示す。

1. ゲノム情報解析:ゲノム情報解析の情報解析パイプラインを強化し、ゲノム情報解析拠点としての整備を行った。
2. 遺伝性神経疾患の病因遺伝子の探索:遺伝性てんかん、遺伝性痙性対麻痺、多系統萎縮症多発家系について、SNP タイピングに基づく連鎖解析、エクソーム解析・全ゲノム配列解析を行った。候補領域内に存在する変異を網羅的に抽出し、病因遺伝子候補の絞り込みを実施し、遺伝性痙性対麻痺の病因遺伝子を同定した。遺伝性てんかんについては、有力な病因遺伝子の候補を同定した。
3. 孤発性神経疾患の病因遺伝子の探索:多系統萎縮症 1000 例 (日本 650 例, 欧州 150 例, 北米 200 例), 筋萎縮性側索硬化症 300 例, 健常者 1200 例の exome 解析を実施した。多系統萎縮症, 筋萎縮性側索硬化症それぞれの疾患関連遺伝子の候補を抽出した。
4. 臨床病型の修飾因子の探索:副腎白質ジストロフィーの多彩な臨床病型に関与するゲノム上の変異を明らかにすることを目的に、82 例の症例について、exome 解析を実施した。ゲノムワイドの変異情報を網羅的に抽出し、疾患パスウェイ情報、インフォマティクスに基づく機能障害の予測などを参考にして、候補変異を見出した。
5. 診断未確定の神経疾患に対する網羅的な遺伝子診断の提供:exome, target capture などいくつかのプラットフォームで解析を行い、その特徴や精度を比べることで、臨床的に有用な解析方法について検討した。遺伝子診断に活用するため、病因変異の抽出と判定のアルゴリズムを作成した。また、コピー数変異を判定するパイプラインを導入し、実際に診断に適用した。診断未確定の神経疾患症例に対して、網羅的な遺伝子診断の提供を実施した。
6. 神経疾患における体細胞変異の定量的解析:体細胞変異の定量的解析法を確立し、神経疾患の発症において体細胞変異の関与があるかどうかについて明らかにするため、Digital PCR 技術を導入し、体細胞変異の検出方法を検討した。

In this research project, we established the Medical Genome Center at the University of Tokyo Hospital. Using next-generation sequencers and bioinformatics analysis, we aimed to identify novel pathomechanism of intractable neurodegenerative or muscular disorders and to establish treatments on the basis of molecular mechanism of the diseases. We performed several lines of studies described below.

1. We further improved our pipelines for genome analysis and applied them to many fields of genome analysis.
2. To identify causative genes for hereditary epilepsy, hereditary spastic paraplegia, and multiple system atrophy with multiple affected members. Using linkage analysis based on SNP genotyping by microarray and exome/whole-genome analysis, we identified causative genes for hereditary spastic paraplegia. We also identified promising candidate genes for hereditary epilepsy.
3. To identify susceptible genes for sporadic neurodegenerative disorders, we performed exome analysis of 1000 patients with multiple system atrophy, 300 patients with amyotrophic lateral sclerosis, and 1200 control subjects, leading to the identification of novel candidate genes relevant to these diseases.
4. To identify modifying genes for clinical presentations of adrenoleukodystrophy (ALD) or adrenomyeloneuropathy (AMN), we performed exome analysis of 82 patients with ALD/AMN. Considering disease pathways and in silico prediction of functional impairment of variants, we identified novel candidate genes as disease-modifying genes.
5. To establish efficient way of establishing diagnoses for undiagnosed patients, we established an integrated method based on copy number variants, whole exome sequencing and target sequencing.
6. To examine a possibility of impact of somatic mutation in neurodegenerative diseases, we introduced droplet digital PCR methods and applied this technology for evaluating somatic mutations responsible for neurological disorders.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 5 件、国際誌 20 件）

<国際誌>

1. **Tsuji S**, Mitsui J. Letter re: A genome-wide association study in multiple system atrophy. *Neurology*. 2017 Mar 28;88(13):1296. doi: 10.1212/WNL.0000000000003782.
2. Yoshimura A, Yuan JH, Hashiguchi A, Hiramatsu Y, Ando M, Higuchi Y, Nakamura T, Okamoto Y, Matsumura K, Hamano T, Sawaura N, Shimatani Y, Kumada S, Okumura Y, Miyahara J, Yamaguchi Y, Kitamura S, Haginoya K, Mitsui J, Ishiura H, **Tsuji S**, Takashima H. Clinical and mutational spectrum of Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease caused by GDAP1 variants. *Clin Genet*. 2017 Feb 28. doi: 10.1111/cge.13002.
3. Ikeda T, Nakahara A, Nagano R, Utoyama M, Obara M, Moritake H, Uechi T, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Doi K, Kenmochi N, Morishita S, Nishino I, **Tsuji S**, Nunoi H. TBCD may be a causal gene in progressive neurodegenerative encephalopathy with atypical infantile spinal muscular atrophy. *J Hum Genet*. 2017 Apr;62(4):473-480. doi: 10.1038/jhg.2016.149.
4. Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, Tada H, Matsumoto T, Isoda M, Hashimoto R, Hattori N, Takahashi T, Morishita S, **Tsuji S**, Akamatsu W, Okano H. Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines. *Mol Brain*. 2016 Oct 3;9(1):88.
5. Suzuki Y, Korlach J, Turner SW, Tsukahara T, Taniguchi J, Qu W, Ichikawa K, Yoshimura J, Yurino H, Takahashi Y, Mitsui J, Ishiura H, **Tsuji S**, Takeda H, Morishita S. AgIn: measuring the landscape of CpG methylation of individual repetitive elements. *Bioinformatics*. 2016 Oct 1;32(19):2911-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btw360.
6. Williams KL, Topp S, Yang S, Smith B, Fifita JA, Warraich ST, Zhang KY, Farrawell N, Vance C, Hu X, Chesi A, Leblond CS, Lee A, Rayner SL, Sundaramoorthy V, Dobson-Stone C, Molloy MP, van Blitterswijk M, Dickson DW, Petersen RC, Graff-Radford NR, Boeve BF, Murray ME, Pottier C, Don E, Winnick C, McCann EP, Hogan A, Daoud H, Levert A, Dion PA, Mitsui J, Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, Kost J, Gellera C, Gkazi AS, Miller J, Stockton J, Brooks WS, Boundy K, Polak M, Muñoz-Blanco JL, Esteban-Pérez J, Rábano A, Hardiman O, Morrison KE, Ticozzi N, Silani V, de Belleruche J, Glass JD, Kwok JB, Guillemin GJ, Chung RS, **Tsuji S**, Brown RH Jr, García-Redondo A, Rademakers R, Landers JE, Gitler AD, Rouleau GA, Cole NJ, Yerbury JJ, Atkin JD, Shaw CE, Nicholson GA, Blair IP. CCNF mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Nat Commun*. 2016 Apr 15;7:11253. doi: 10.1038/ncomms11253.
7. Higuchi Y, Hashiguchi A, Yuan J, Yoshimura A, Mitsui J, Ishiura H, Tanaka M, Ishihara S, Tanabe H, Nozuma S, Okamoto Y, Matsuura E, Ohkubo R, Inamizu S, Shiraishi W, Yamasaki R, Ohyagi Y, Kira J, Oya Y, Yabe H, Nishikawa N, Tobisawa S, Matsuda N, Masuda M, Kugimoto C, Fukushima K, Yano S, Yoshimura J, Doi K, Nakagawa M, Morishita S, **Tsuji S**, Takashima H. Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2. *Ann Neurol*. 2016 Apr;79(4):659-72. doi: 10.1002/ana.24612.

8. Okuma H, Saito F, Mitsui J, Hara Y, Hatanaka Y, Ikeda M, Shimizu T, Matsumura K, Shimizu J, **Tsuji S**, Sonoo M. Tubular aggregate myopathy caused by a novel mutation in the cytoplasmic domain of STIM1. *Neurol Genet.* 2016 Feb 1;2(1):e50.
9. Mano KK, Matsukawa T, Mitsui J, Ishiura H, Tokushige S, Takahashi Y, Sato NS, Nakamoto FK, Ichikawa Y, Nagashima Y, Terao Y, Shimizu J, Hamada M, Uesaka Y, Oyama G, Ogawa G, Yoshimura J, Doi K, Morishita S, **Tsuji S**, Goto J. Atypical parkinsonism caused by Pro105Leu mutation of prion protein: A broad clinical spectrum. *Neurol Genet.* 2016 Jan 7;2(1):e48.
10. Ichinose Y, Koh K, Fukumoto M, Yamashiro N, Kobayashi F, Miwa M, Nagasaka T, Shindo K, Ishiura H, **Tsuji S**, Takiyama DY. Exome sequencing reveals a novel missense mutation in the KIAA0196 gene in a Japanese patient with SPG8. *Clin Neurol Neurosurg.* 2016 May;144:36-8.
11. Mitsui J, et al. Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015 (doi: 10.1002/acn3.185)
12. Shimazaki H, Honda J, Naoi T, Namekawa M, Nakano I, Yazaki M, Nakamura K, Yoshida K, Ikeda S, Ishiura H, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, **Tsuji S**, Takiyama Y. Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulator gene mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014; 85: 1024-8.
13. Tezenas du Montcel S, Durr A, Bauer P, Figueroa KP, Ichikawa Y, Brussino A, Forlani S, Rakowicz M, Schöls L, Mariotti C, van de Warrenburg BP, Orsi L, Giunti P, Filla A, Szymanski S, Klockgether T, Berciano J, Pandolfo M, Boesch S, Melegh B, Timmann D, Mandich P, Camuzat A; Clinical Research Consortium for Spinocerebellar Ataxia (CRC-SCA); EUROSCA network, Goto J, Ashizawa T, Cazeneuve C, **Tsuji S**, Pulst SM, Brusco A, Riess O, Brice A, Stevanin G. Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *Brain.* 2014; 137: 2444-55.
14. Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Fukuda-Yuzawa Y, **Tsuji S**, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ikeda S, Tanaka F, Matsumoto N, Yoshida K. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous DDHD2 mutation. *Sci Rep.* 2014; 4: 7132.
15. Kanbayashi T, Saito F, Matsukawa T, Oba H, Hokkoku K, Hatanaka Y, **Tsuji S**, Sonoo M. Adult-onset vanishing white matter disease with novel missense mutations in a subunit of translational regulator, EIF2B4. *Clin. Genet.* (doi: 10.1111/cge.12554.)
16. Koh K, Kobayashi F, Miwa M, Shindo K, Isozaki E, Ishiura H, **Tsuji S**, Takiyama Y. Novel mutations in the PNPLA6 gene in Boucher-Neuhäuser syndrome. *J. Hum. Genet.* (doi: 10.1038/jhg.2015.3.)
17. Saigoh K, Mitsui J, Hirano M, Shioyama M, Samukawa M, Ichikawa Y, Goto J, **Tsuji S**, Kusunoki S. The first Japanese familial case of spinocerebellar ataxia 23 with a novel mutation in the PDYN gene. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015; 21: 332-4.

18. Doi K, Monjo T, Hoang PH, Yoshimura J, Yurino H, Mitsui J, Ishiura H, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, **Tsuji S**, Morishita S. Rapid detection of expanded short tandem repeats in personal genomics using hybrid sequencing. *Bioinformatics*. 2014; 30: 815-22.
19. Kazuki Ichikawa, **Shinichi Morishita**. A simple but powerful heuristic method for accelerating k-means clustering of large-scale data in life science. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 2014; 11: 681-92
20. Kishin Koh, Hiroyuki Ishiura, Michiaki Miwa, Jun Yoshimura, Jun Mitsui, Jun Goto, Shinichi Morishita, **Shoji Tsuji**, Yoshihisa Takiyama. Exome sequencing shows a novel de novo mutation in ATL1. *Neurology and Clinical Neuroscience* 2014; 2: 1-4

<国内誌>

1. 三井 純. 多系統萎縮症発症における遺伝因子. 科学評論社, 神経内科 2016年5月 (2016; 84(5): 458-463)
2. 松川 敬志, 石浦 浩之, 三井 純, **辻 省次**. 次世代シーケンサーによるパーソナルゲノム解析の基礎. 分子精神医学 2016年7月 (2016; 16(3): 2-8)
3. **辻 省次**. ゲノム医学の進展. *Medical Science Digest* 2017年3月 (2017; 43: 124-129)
4. 三井 純. 神経疾患におけるゲノム診療. *Medical Science Digest* 2017年3月 (2017; 43: 130-133)
5. 石浦浩之. ゲノムビッグデータの解析. 神経内科 2016年 84巻 585-589.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Searching for a novel causative gene in an undiagnosed hereditary spastic paraplegia family. Miho Kawabe, Hiroyuki Ishiura, Jun Mitsui, Atsushi Iwata, Jun Yoshimura, Koichiro Doi, Shinichi Morishita, Jun Goto, **Shoji Tsuji**. ICHG2016, Kyoto International Conference Center, 2016/4/6, 国際学会
2. Strategies for identifying causative genes of HSP. Hiroyuki Ishiura, Kishin Koh, Haruo Shimazaki, Yuta Ichinose, Jun Mitsui, Yoshihisa Takiyama, Shinichi Morishita, **Shoji Tsuji**. 日本神経学会学術大会, 2016年5月、神戸、国内、シンポジウム、口頭
3. Preliminary genome-wide association analysis of ALS/PDC in Kii Peninsula of Japan. Hiroyuki Ishiura, Yasumasa Kokubo, Shigeki Kuzuhara, Jun Mitsui, Yoko Fukuda, Katsutoshi Tokunaga, Kenju Hara, Masatoyo Nishizawa, Ryozo Kuwano, Jun Goto, **Shoji Tsuji**. 日本神経学会学術大会、2016年5月、神戸、国内、ポスター
4. Molecular epidemiology of HSPs in Japan. Kishin Koh, Hiroyuki Ishiura, Yuta Ichinose, Jun Mitsui, **Shoji Tsuji**, Yoshihisa Takiyama, JASPAC. 日本神経学会学術大会、2016年5月、神戸、国内、シンポジウム、口頭
5. Exome sequencing of singletons from individual families revealed a novel causative gene of autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. Hiroyuki Ishiura, Masaki Tanaka, Jun

- Mitsui, Haruo Shimazaki, Kishin Koh, Yuta Ichinose, Yuji Takahashi, Jun Goto, Jun Yoshimura, Koichiro Doi, Shinichi Morishita, Hidenao Sasaki, Yoshihisa Takiyama, JASPAC, **Shoji Tsuji**. International Conference on Human Genetics, 2016年4月, Kyoto, 国際、口頭
6. Large-scale exome sequencing in patients with hereditary spastic paraplegia (HSP) reveals molecular epidemiology of AR-HSP and related diseases including AR-HSP with mutations in CAPN1. Hiroyuki Ishiura, Masaki Tanaka, Kishin Koh, Haruo Shimazaki, Yuta Ichinose, Yuji Takahashi, Jun Mitsui, Jun Goto, Takashi Matsukawa, Yaeko Ichikawa, Jun Yoshimura, Koichiro Doi, Shinichi Morishita, Reiko Saika, Takayuki Kondo, Sadayuki Matsumoto, Youhei Ohnaka, Koichi Hagiwara, Ryo Yamasaki, Jun-ichi Kira, Motoi Kuwahara, Yusaku Nakamura, Hidenao Sasaki, Gen Sobue, Satoru Miyawaki, Nobuhito Saito, Yoshihisa Takiyama, **Shoji Tsuji**, JASPAC. American Society of Human Genetics, 2016年11月, Vancouver, 国際、ポスター
  7. Morishita S, et al. Completing CpG methylation statuses in human and vertebrate genomes by integrating SMRT sequencing kinetic data. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics
  8. Koike A, et al. Update and expansion of Human Variation Database in Japanese Database Integration Program. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics
  9. Satake W, et al. Exome Association Study and 2nd SNP-GWAS of Japanese Parkinson's disease. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics
  10. Ishiura H, et al. Exome analysis of 116 patients supposed to be autosomal recessive hereditary spastic paraplegia established molecular diagnoses of 49 patients with broad genetic
  11. heterogeneities. The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics
  12. 田中 真生ら. 次世代シーケンサーを用いたミトコンドリア遺伝子変異の高感度定量的解析. 第55回日本神経学会
  13. 松川 敬志ら. 思春期/成人大脳型副腎白質ジストロフィーに対する造血幹細胞移植の臨床的効果の検討. 第55回日本神経学会
  14. 三井 純. 多系統萎縮症の疾患関連遺伝子の探索. 第55回日本神経学会
  15. 石浦 浩之. 常染色体劣性遺伝が疑われた遺伝性痙性対麻痺 104 例の遺伝子解析. 第55回日本神経学会
  16. 野妻 智嗣ら. エクソーム解析を用いた HAM 疾患感受性遺伝子の探索. 第59回日本人類遺伝学会
  17. 田邊 肇ら. Charcot-Marie-Tooth 病におけるミエリン関連蛋白を中心とした新規遺伝子探索の試み. 第59回日本人類遺伝学会
  18. 石原 聡ら. ニューロフィラメントに関連した Charcot-Marie-Tooth 病の新規原因遺伝子同定の試み. 第59回日本人類遺伝学会
  19. 成瀬 紘也ら. Exome 解析を用いた家族性 ALS の分子疫学の解明. 第59回日本人類遺伝学会
  20. 高柳 俊作ら. 家族性腫瘍疾患 VHL 病に対するゲノム医療の展開. 第59回日本人類遺伝学会

21. 佐藤 奈穂子ら. 46,XY gonadal dysgenesis を伴う minifascicular neuropathy における新規遺伝子変異の同定. 第 59 回日本人類遺伝学会
22. 高 紀信ら. Boucher-Neuhauser 症候群の新規 PNPLA6 遺伝子変異. 第 59 回日本人類遺伝学会
23. 大崎 雅央ら. 常染色体劣性遺伝形式を示す spastic ataxia の病因遺伝子の探索. 第 59 回日本人類遺伝学会

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし