

## アルツハイマー病を中心とした神経系疾患の多型タイピング体制確立と応用

●桑野 良三 ◆宮下 哲典

新潟大学研究所附属生命科学リソース研究センター

### <研究の目的と進め方>

本研究は、脳神経疾患のゲノム解析を推進するためのヒトタイピングシステム体制の確立とその応用を目的とし、研究支援活動と個別研究の2本柱で研究を進める特色がある。研究支援では、「応用ゲノム」領域と密接に連携してヒト脳神経疾患のタイピングを行う。脳疾患の家族集積性の高い症例については、それぞれの疾患の連鎖解析のためにマイクロサテライトまたはSNPタイピングを行い、依頼元にタイピング結果を報告する。また優性遺伝形式をとる家族性脳疾患については、その原因遺伝子のシーケンスによって変異の同定を行う。個別研究では、タイピングシステムの改良、統計解析法の改良、効率化、高度化を進め、アルツハイマー病の同胞対解析およびアルツハイマー病を含む認知症関連遺伝子を探索する。

研究の進め方：

#### 1. ヒトタイピングシステム体制の確立

中規模タイピングセンターとして効率的なシステムを構築する。①診療情報が付随したゲノム試料をオールジャパン体制で収集する。それらを統一的に取り扱う保存・管理システムの確立を図る。②公開データベースからゲノム多型マーカーを選択し、日本人及び他民族における多型頻度を考慮して、日本人の試料を用いてマーカーに使用できるかを確認する。マイクロサテライトの場合、新しいマーカー検索を行う。③連鎖解析または罹患同胞対解析に用いるマイクロサテライトタイピング並びにゲノムワイド疾患—対照群相関解析を行う高密度SNPによるタイピングを行う。④これらの膨大なゲノム情報のデータベース (Genome DB) を構築し、表現型である症状・病態に基づき疾患関連遺伝子を同定する。⑤公開に向けたデータベース構築並びに、より高度な解析ツールの開発・改良については、遺伝統計学、医療統計学、情報処理の専門家の「ゲノム情報支援班」の支援を得ながらコンピューターによる数値処理を行う。

#### 2. アルツハイマー病その他の脳疾患遺伝子解析の支援

確立したヒトタイピングシステムを応用して、研究支援を行う。脳神経疾患の遺伝子解析は、原則的に「応用ゲノム」から依頼され「ヒト多型タイピングセンター委員会」で審議承認された脳神経疾患を中心にタイピングを行い、解析データを依頼元に報告する。脳神経疾患の家族集積性の高い症例について連鎖解析のためのタイピングを依頼された場合、マイクロサテライト解析を行う。また、臨床研究機関から依頼される認知症多発家系についての遺伝子解析研究を支援する。原因遺伝子及び関連遺伝子の変異を同定するためのシーケンス解析を行い、結果を依頼元に返す。

#### 3. 個別研究

孤発性アルツハイマー病の感受性遺伝子を同定する。全ゲノムを対象に疾患 {2000例}—対照群 {2000例} の大規模SNPタイピングによる相関解析によって感受性遺伝子の探索を行う。大規模ゲノムワイド相関解析 (GWAS: Genome-wide Association Study) を2段階スクリーニングで行う。1次スクリーニングで有意とな

るSNPについて、異なるサンプルセットを異なる多型タイピングプラットフォームを用いるReplication Assayによって候補SNPを確認する。また、それらの周辺のSNPを含めてより密度の高いSNP情報を利用して感受性遺伝子の候補領域を絞り込む。これら疾患感受性ゲノム領域に存在する遺伝子の発現解析データや代謝マップ情報と照らし合わせて感受性遺伝子の意味を考察する。

### <研究開始時の研究計画>

#### 1. ヒトタイピングシステム体制の確立

①統一的な試料の取り扱い、保存・管理、②タイピング用多型マーカーの管理、③タイピング技術の改良、④遺伝統計学のデータベース構築を行う。

① 試料の取り扱いについては、個人情報保護を確保し、試料の保存、管理、遺伝子解析の全行程を連続・統一的に行うために、9桁の数字からなるNGC (Niigata Genotyping Center) ID番号 (2xxxxxxx) を付与し、診療データベース (Clinical DB) に登録する。NGC9桁IDはすべてバーコードで管理する。調製したDNAは96サンプルを単位としてparent BOXに収納し、一定濃度に調整したDNAはchild BOXに保存する。この96サンプルchild BOXを単位としてタイピング作業およびタイピングデータを取得し保管する。

② 多型マーカー：②-1 マイクロサテライトについては、市販のマーカー (ABI社、平均5CM間隔) の間を埋め合わせるために、公開データベースの配列から、新規の2、3、4塩基繰り返し配列を検索するマーカー検索ソフトを作成する。それらのマーカーが染色体毎に一覧できるソフトを作成する。②-2 SNPをゲノムワイド相関解析に使用する。1次スクリーニングは高密度SNPを搭載したGeneChip (Affymetrix社、ver6.0、90万SNP)、2次スクリーニングにはGoldenGate (illumina社) を採用する。推測された候補領域について、個々の多型マーカー (TaqMan法) で領域を絞り込む。

③ タイピング技術の改良：反応プレートの各wellには、個々のゲノムIDで標識されたDNAを入れる。タイピングを行うマーカーと96サンプルの入った反応プレートには別の9桁 (9xxxxxxx) からなるプレートIDで標識する。これら一連の作業はバーコードによって管理する。反応系の改良点は、有限なゲノムDNAを効率良く使用することと、反応試薬を極少量で行うために、DNAを乾燥してSNPタイピングを行う。

④ 高密度SNP解析から得られる膨大なゲノム情報のデータベース (Genome DB) を構築し、表現型である病態に基づき疾患関連遺伝子を同定する。遺伝統計学については医療統計学の専門家の支援を得ながらコンピューターによる数値処理を行う。

#### 2. アルツハイマー病その他の脳疾患遺伝子解析の支援

1. で確立した方法を応用して、連鎖解析、同胞対解析のマイクロサテライト、SNPタイピングの支援を行う。

① 「応用ゲノム」武田班 (大阪大学) と連携して、アルツハイマー

病の同胞発症例を集め、最終目標 100 ペア以上収集を達成し、日本人初のアルツハイマー病大規模罹患同胞対解析を行う。相関解析用の試料を準備・整理する。

- ② 家族集積性の高い神経変性疾患の連鎖解析のためのマイクロサテライトタイピング支援を行う。
- ③ アルツハイマー病並びに家族性が疑われる認知症（若年型アルツハイマー病、前頭側頭葉型認知症、混合型認知症、その他の認知症が疑われる症例）について、認知症の原因遺伝子および関連遺伝子のシーケンス支援を行う。APP, PSEN1, PSEN2、および MAPT, PGRN, TDP43, SNCA の全エクソン及びエクソン/イントロン連結部を含めてシーケンスを行うために、まずシーケンスプライマーを設計する。これらの症例のシーケンス結果は依頼元にその都度報告する。また、アルツハイマー病の最大のリスク遺伝子である APOE 遺伝子型解析の依頼を受けて、TaqMan 法とシーケンスで遺伝子型を決定する。

### 3. 個別研究

- ① GWAS: 孤発性アルツハイマー病に関して全ゲノム網羅的に疾患感受性遺伝子を同定する。ゲノム 4 領域が協力して推進する GWAS の対象疾患にアルツハイマー病が採択された。検体は JGSCAD (The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease) 及び「応用ゲノム」武田班が収集したゲノムを使用する。GWAS の戦術ならびに体制は、(1) アルツハイマー病 1000 例対照群 1000 例を 1 次スクリーニングの対象とする。アルツハイマー病は発症年齢を 60 歳から 85 歳まで、対照群は認知機能が正常な高齢者とする。

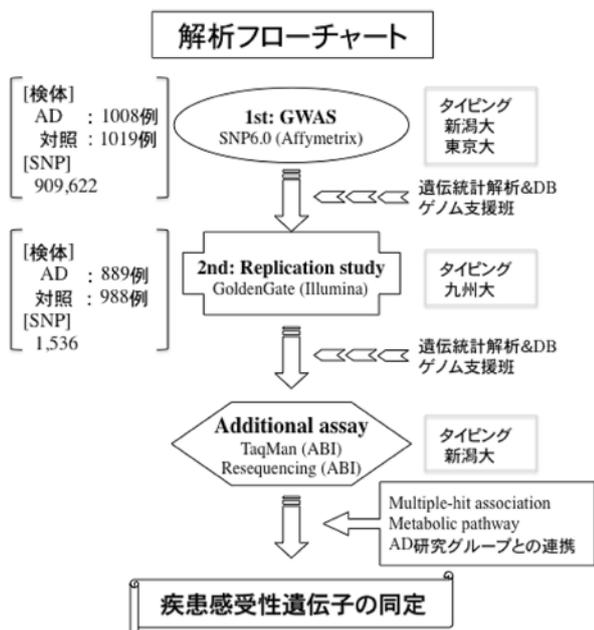


図 1

1 次スクリーニングは高密度 SNP 搭載 GeneChip (Affymetrix 社: ver6.0、90 万 SNP) タイピングを「基盤ゲノム」内のヒトタイピングセンター (GT-3: 新潟大学、東京大学、九州大学) の新潟大学、東京大学が行う。タイピング効率チェック、サンプルのクリーニングを行い、候補 SNP を選定する。(2) 別のサンプルセット (アルツハイマー病 1000 例、対照群 1000 例) を新潟大学が準備する。1 次スクリーニングで選ばれた 1536SNP について、異なるプラットフォーム (Illumina 社、GoldenGate) を用いて Replication を九州大学が行う (図 1)。これらのスクリーニングで候補になった SNP の近傍の SNP を追加して、1 次 2 次の検

体をまとめて TaqMan 法で新潟大学が確認する。タイピングデータの高度な統計解析及びデータベース構築は「ゲノム情報支援班」の支援を受ける。

- ② 感受性遺伝子の解析: ①で候補となった遺伝子に関してその意義について検証する。病理診断されたヒト死後脳における発現解析を行い、GWAS の結果と照らし合わせて、代謝マップからアルツハイマー病発症との関連を考察する。
- ③ 統計解析: アルツハイマー病には強力なリスク遺伝子 APOE が知られているので、この APOE、年齢、性別、臨床心理テストなどと、新たに見つけた感受性遺伝子との交互作用を明らかにするためにロジスティック回帰分析をおこなう。
- ④ これまでに解析してきたマイクロサテライトおよび SNP タイピングデータを整理する。アルツハイマー病の大多数が高齢者であり、その対照群も高齢者である。従って、日本人高齢者の多型情報をマーカー毎に整理し、他民族と比較できるデータベースを構築する。

### <研究期間の成果>

#### 1. 研究支援

脳神経疾患で家族集積性の高い症例について、連鎖解析のための多型情報が多いマイクロサテライトタイピング支援を行い、依頼元に報告した。また、家族性疾患について GeneChip を用いた高密度 SNP タイピングとマイクロサテライトタイピングを同時に行った以下の研究を通して、高密度 SNP タイピングがマイクロサテライトタイピングに匹敵する連鎖解析法として有効であることを証明したのは、「応用ゲノム」と連携した本研究の成果である。

1-1 「応用ゲノム」辻班 (東京大学): ゲノム解析を基盤とした神経疾患の病因・病態機序の解明:

- ① 紀伊半島に集中して発症している ALS/PDC (86 症例) についてゲノムワイドマイクロサテライト (平均 5 cM 間隔) タイピングの支援。
- ② 未解明の家族性 Spinal Muscular Atrophy (17 症例) のゲノムワイド (X 染色体を除く 745 マーカー) マイクロサテライトタイピングの支援。
- ③ 遺伝性の小脳脊髄変性症 (8 症例) の (X 染色体を除く 745 マーカー) マイクロサテライトタイピングの支援。
- ④ Muscular Dystrophy (8 症例) について第 1, 3, 15, 21 番染色体のマイクロサテライトタイピングの支援。
- ⑤ アルツハイマー病候補遺伝子の確認依頼があり、1522 例—対照群 1339 例を対象に SNP タイピングの支援。
- ⑥ 家族性虚血性大脳動脈症のマイクロサテライトタイピングと、その連鎖解析から同定された原因遺伝子の DNA シーケンス支援。

1-2 「応用ゲノム」武田班: アルツハイマー病の関連遺伝子探索研究: アルツハイマー病 1522 例—対照群 1339 例を対象として 20SNP タイピング支援を行った。

#### 1-3 その他脳疾患

アルツハイマー病を中心とした認知症に関連する遺伝子解析を支援するため、原因遺伝子である APP, PSEN1, PSEN2 及びその他の認知症関連遺伝子 MAPT, PGRN, TDP43, SNCA 及びリスク遺伝子 APOE のシーケンスを行った。30 臨床施設及び研究所から合計 504 症例の依頼があった。弘前大学神経内科 (7 例): 秋田大学内科 (2 例): 東北大学老年科 (11 例): 山形大学精神科 (5 例): 群馬大学神経内科 (5 例): 関東中央病院 (1 例): 広尾赤十字病院神経内科 (1 例): 国立精神・神経センター神経内科 (5 例): 順天堂大精神科 (4 例): 浴風会神経内科 (1 例):

東京都老人研 (113例) : 東京都精神研 (6例) : 東京医科歯科大 (1例) : 日本医科大 (1例) : 東海大学神経内科 (4例) : 新潟大学病理 (4例) 神経内科 (109例) 遺伝子 (90例) : 阿賀野病院 (3例) : 金沢大学 (10例) : 福井大学内科 (1例) 名古屋大学神経内科 (1例) : 愛知医科大 (1例) : 今川クリニック (2例) : 三重大学神経内科 (63例) : 大阪市立大学脳神経 (16例) : 鳥取大学神経内科 (18例) : 渡辺病院 (3例) : 岡山大学神経内科 (2例) : 川崎医科大 (7例) : 福岡大学 (7例) から、家族性アルツハイマー病、前頭側頭葉型認知症、及びそれらの類似疾患が疑われる症例について原因遺伝子のシーケンス依頼があった。若年発症家系の一部に *APP*、*PSEN1*、*MATP*、に既知/新規の変異を見つけ (表2)、その結果を依頼元に報告した。

	<i>APOE</i>	<i>APP</i>	<i>PSEN1</i>	<i>PSEN2</i>	<i>MAPT</i>	<i>PGRN</i>	<i>TDP-43</i>	<i>SNCA</i>
エクソン数	4	18	12	12	16	13	6	6
解析総数	319	239	227	216	277	137	1	16
シーケンス数	319	3962	2691	2537	4312	1781	40	6
既知変異	-	2	13	0	8	1	0	0
新規変異	-	9	7	0	5	3	0	0

2005/4/1~2009/11/30まで

表 1

## 2. 個別研究

個別研究としてアルツハイマー病の遺伝子解析を行った。

### ① 罹患同胞対解析

アルツハイマー病感受性遺伝子の同定は、個別研究であると同時に、「応用ゲノム」と共同して罹患同胞対解析を進めた。「先端脳」研究班でこれまでに収集した同胞発症例に追加するため、「応用ゲノム」武田班が同胞発症例収集を精力的に行い、目標の同胞 100 ペアに及ばなかったが、97 対を収集した。同胞発症例の中に家族性アルツハイマー病が含まれている可能性があったので、原因遺伝子変異の有無をシーケンスで確認した。高齢発症のアルツハイマー病のためか原因遺伝子の変異は認められなかった。高密度 SNP タイピング (Affymetrix 社 : ver6.0、90 万 SNP) 結果を「応用ゲノム」辻班員と連携して現在、罹患同胞対解析中である。

### ② 晩期発症アルツハイマー病相関解析

大規模検体を用いて高密度 SNP タイピングによってアルツハイマー病感受性遺伝子の探索の最終段階にある。検体情報は表 2 にまとめた。

### Subject demographics

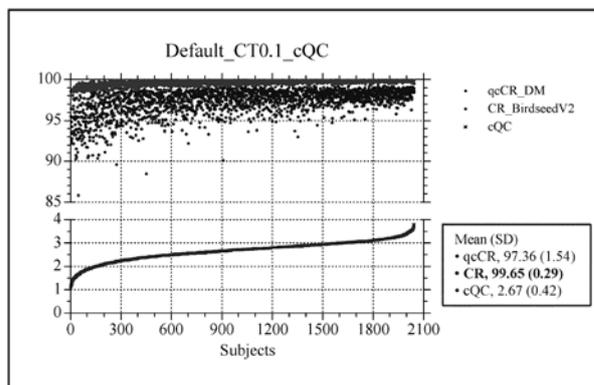
	1st: GWAS		2nd: Replication	
	LOAD	Control	LOAD	Control
No. of subjects	1008	1019	889	988
(Female [%])	(71.8)	(57.7)	(69.5)	(58.0)
AAO/AAE (SD)	73.0 (4.3)	77.0 (5.9)	74.4 (7.0)	73.7 (5.8)
<b><i>APOE</i></b>				
Genotype	$\epsilon$ 2*2	1	2	0
	$\epsilon$ 2*3	26	75	31
	$\epsilon$ 2*4	12	7	11
	$\epsilon$ 3*3	420	772	421
	$\epsilon$ 3*4	446	156	343
	$\epsilon$ 4*4	103	7	83
Allele	$\epsilon$ 2	40	86	42
	$\epsilon$ 3	1312	1775	1216
	$\epsilon$ 4	664	177	520

表 2

1 次 2 次スクリーニングに晩期発症アルツハイマー病 (LOAD)1897 例、その対照として年齢を揃えた健常高齢者 2007 例を解析した。民族を超えたりスクリーニングである *APOE*  $\epsilon$  4 アレルを保有者は、全体 3904 人のうちアルツハイマー病 998 例 (25.6%) に対して健常者 336 例 (8.6%) であった。ア

リル頻度に関しては、アルツハイマー病 1184 例 (15.2%) に対して健常者 350 例 (4.5%) であった。これは米国の縦断研究の結果とよく一致しており、質の高い検体であることが判る。これら検体を解析フローチャートに示したように、「基盤ゲノム」ヒトタイピングセンターが分担して解析を行った。一般的な解析に加えて、より高度な統計解析を「ゲノム情報支援」班の協力を得て、GeneChip1 次スクリーニングで出力された約 18 億タイピングデータの解析を行った (図 2)。

図 2



検体の cleaning、Call rate、P 値、主成分解析及び民族の特徴等を考慮して、有意と思える SNP を上位から 1553 個を選択した。1553 個について GoldenGate2 次スクリーニングを行った。図 3 に示すようにもっとも有意なゲノム領域は、第 19 番染色体の *PVRL2*、*TOMM40*、*APOE*、*APOC1* であったが、この領域は 2 カ所の recombination hot spot には挟まれ、*APOE* と連鎖不平衡の範囲内にあった。その他絞り込んだ SNP を更に TaqMan 法にて確認している。

### Allelic P-values in 1st-step and 2nd-step assays

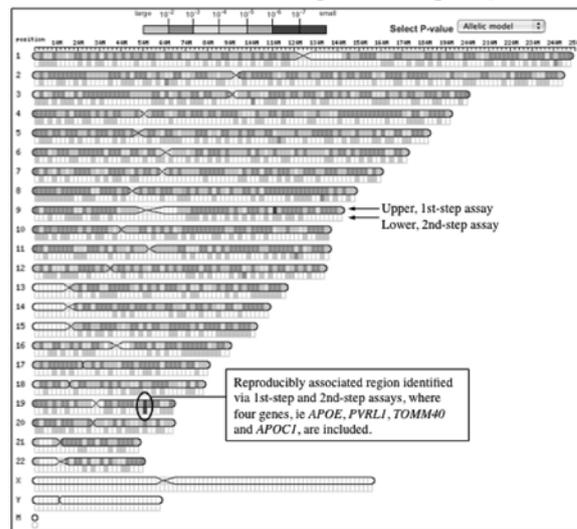


図 3

③アルツハイマー病感受性遺伝子解析研究を進める中で、医療統計学のグループにタイピングデータを提供して、実践的なソフトの開発を行った。まず、疾患感受性遺伝子を同定する方法として統計学的検出力を考慮した R 言語を用いたマルチステージ法による疾患—対照群相関解析法を開発した。開発したプログラムは自由に使用できるようにした。多段階解析法をデザインする際に、replication-based analysis と joint analysis の検体数や候補アレル等を変化させて実践的な統計学的検出力と陽性的中率を分析した。いずれにおいても、検出力と陽性的中率は二段階法より三段階法の方が高かった。

- ⑤ HapMap のデータを用いてハプロタイプ頻度から仮定の疾患群、対照群を作成した。この仮想サンプルを使って疾患—対照群相関解析を繰り返し行い、候補 SNP を 25 % に絞った。この候補 SNP を使った結果は実際の報告や tag SNP を使った結果と良く一致した。この方法は疾患に左右されず経済的に優れた方法である。
- ⑥ 最近の GWAS によって *GAB2* が欧米人で同定された。日本人にとってもリスクとなるか、本研究で収集した大規模検体をリソースに用いて再現性を確認したところ、日本人の集団ではアルツハイマー病のリスクとならなかった。
- ⑦ アルツハイマー病の原因遺伝子 (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) 以外に、*MAPT* 変異が関与するのではないかと考えられている。日本人の 10 家系について、*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *MAPT* の全エクソンのシークエンスを行ったところ、*PSEN1* 変異の他に *MAPT* に変異 (R 406 W) を見つけた。このことはアルツハイマー病の発症機序や治療を考える上で非常に重要である。
- ④ アルツハイマー病感受性遺伝子探索を進める一方、多くの臨床サイトから家族性アルツハイマー病やその他の認知症の遺伝子解析依頼が寄せられた。*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *MAPT*, *PGRN*, *TDP43*, *SNCA* の全エクソンをシークエンスして、未知の変異を見出した (表 1)。これらの成果は、ゲノム情報を基に臨床診断及び病態解明、病期進行を理解する上で大きく貢献した。

#### <国内外での成果の位置づけ>

国内のアルツハイマー病及び関連脳疾患ゲノムリソースは、8000 例を越え国内最大規模である。このリソースを用いて、日本人固有のリスク遺伝子探索のため、大規模 GWAS を進めている。アルツハイマー病に関する国際的な GWAS の主な論文は、J. Pearson *et al.* (Am J Hum Genet. 2007), A. Grupe *et al.* (Hum Mol Genet, 2007), K. Coon *et al.* (J Clin Psychiatry, 2007), E. Reiman *et al.* (Neuron, 2007), L. Bertram *et al.* (Am J Hum Genet. 2008) M. Carrasquillo *et al.* (Nat Genet, 2009) Lambert JC *et al.* (Nat Genet 2009), Harold D *et al.* (Nat Genet, 2009) がある。また多くの相関解析研究で得られる候補遺伝子のメタ解析 (Bertram *et al.* 2007 年 1 月) 結果が AlzForum に掲載されている。Daw (Am J Hum Genet. 2000) によると、*APOE* に匹敵するリスク遺伝子が 4 つはありと推測された。現在、500 以上のリスク遺伝子が報告されているが、*APOE* 以外のリスク遺伝子は確定されていない。これらの GWAS で対象としている欧米の多様な民族集団に比べて、日本人はより単一と考えられるので、疾患遺伝子同定の精度は高いと期待される。民族による遺伝的な寄与には差があると思えるので、日本人における、さらにはアジア人におけるアルツハイマー病のリスク遺伝子探索は、先導的に推進している我々の大規模 GWAS 研究がもたらす貢献が大きい。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

- ① 罹患同胞対解析は効率の良い解析法と考えられるが、アルツハイマー病が高齢発症のために同胞例の検体収集に予想外に時間がかかった。同胞発症の情報が家族から得られても高齢のために亡くなられたり、兄弟姉妹が遠方であったり、世代が変わり家族付き合いが無くなったり、する例が検体収集の困難の理由であった。「応用ゲノム」班の懸命の努力でなんとか 100 ペア近くを収集できた。
- ② 孤発性アルツハイマー病に関しては、臨床診断、心理テスト、発症年齢の欠損値があり、2000 例を準備するのに苦労した。発症年齢については、誤差がおおきい。その理由として、縦

断的に経過を追跡してないので、正確な発症年齢が不明である。認知症に対する認識が家族によって異なる点、数年前より認知症に対して社会一般に関心が高くなるにつれてこれまでより早期に認知機能の障害に気づくようになった点、早期診断技術の進歩等があげられる。

- ③ ゲノム試料は有限であり解析ごとに消費するので、微量な検体は DNA を増幅する必要があった。特に、貴重な同胞発症例で微量になった DNA は増幅した。しかし、この増幅ゲノムが元のゲノムと同じく正しいタイピング結果が得られるかの検証が必要である。

#### <今後の課題、展望>

- ① 質の高いリソースは、疾患ゲノム解析にもっとも重要である。アルツハイマー病は加齢につれて有病率・罹病率ともに増加する。しかし注意しなければならないことは、アルツハイマー病のもっとも高い発症年齢は 70 歳代であり、85 歳以上ではアルツハイマー病とは異なる病理で発症する認知症がむしろ増える点である。世界一の長寿国である我が国において、85 歳以上の高齢者の人口が増加することを考えると、世界に先駆けて、アルツハイマー病とそれ以外の認知症を的確に診断することが課題となってきた。アルツハイマー病は、時間軸に沿って正常—軽度認知障害—早期アルツハイマー病へと移行するので、試料採取時点で正常と判断されても数年後にアルツハイマー病となる可能性がある。ゲノム情報は生まれてから不変であるので、疾患—対照群相関解析によるリスク遺伝子探索の場合、健常者の中に将来アルツハイマー病になる検体が含まれる可能性がある。そのためには、臨床経過や症状を前向きに追跡する Hospital-based 試料収集並びに、食事、運動、生活習慣等疫学調査に基づく Population-based 試料の収集を統一した診断基準に従って行うことが今後の課題である。

これらの質の高い診療・疫学調査データが付随したリソースを大規模に収集して、高密度多型マーカーを使ったゲノム情報を基盤とすれば、アルツハイマー病発症や病態機序の解明が進展し、発症前診断および根本治療法の開発が進むことが期待される。

- ② 明らかに優性遺伝形式をとる家族性アルツハイマー病にも関わらず、原因遺伝子に異常が見出されなかった家系に、原因遺伝子である *APP* にコピー数多型が見つかった。このことは塩基配列だけでなくコピー数多型の解析、微小ゲノムの挿入/欠失解析、メチル化 DNA 等エピゲノム解析およびパーソナルゲノムシークエンス解析が、今後の研究戦略の課題となることを意味している。解析技術は次世代シーケンサーの登場によって、高速に超大量のゲノム情報の取得が可能となった。これら膨大データを効率よく処理する情報分野との連携がますます重要な課題となっている。疾患ゲノム解析に、これらのゲノム医学統計システム体制を導入し確立すれば、これまで不可能であった稀で微小なゲノム変異と疾患との関連を統一的に理解する新しい研究分野が生まれ育つと展望できる。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

- 1) 論文
- 1. 0901091154  
Kitamura N, Akazawa K, Miyashita A, Kuwano R, Toyabe SI, Nakamura J, Nakamura N, Sato T, Hoque MA: Programs for calculating the statistical powers of detecting susceptibility genes in case-control studies based on multistage designs. *Bioinformatics*. 25:272-273. (2009)

2. Takei N, Miyashita A, Tsukie T, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kimura H, Kakita A, Takahashi H, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Odani S, Kuwano R, and the Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer Disease. Genetic association study on in and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. *Genomics*. 93:441-448. (2009)
3. Kasuga K, Ohno T, Ishihara T, Miyashita A, Kuwano R, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Depression and psychiatric symptoms preceding onset of dementia in a family with early-onset Alzheimer disease with a novel PSEN1 mutation. *J Neurol*. 256:1351-1353. (2009)
4. Hara K, Shiga A, Fukutake T, Nozaki H, Miyashita A, Yokoseki A, Kawata H, Koyama A, Arima K, Takahashi T, Ikeda M, Shiota H, Tamura M, Shimoe Y, Hirayama M, Arisato T, Yanagawa S, Tanaka A, Nakano I, Ikeda S, Yoshida Y, Yamamoto T, Ikeuchi T, Kuwano R, Nishizawa M, Tsuji S, Onodera O. Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N Engl J Med*. 360:1729-1739. (2009)
5. Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R. GAB2 is not associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese. *Eur J Hum Genet*. 17:682-686. (2009)
6. Fukuda Y, Nakahara Y, Date H, Takahashi Y, Goto J, Miyashita A, Kuwano R, Adachi H, Nakamura E, Tsuji S. SNP HiTLink: a high-throughput linkage analysis system employing dense SNP data. *BMC Bioinformatics*. 10:121. (2009)
7. Hara K, Kokubo Y, Ishiura H, Fukuda Y, Miyashita A, Kuwano R, Sasaki R, Goto J, Nishizawa M, Kuzuhara S, Tsuji S. TRPM7 Is Not Associated With Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula of Japan. *Am J Med Genet Part B*. (2009) in press.
8. Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, Ohno T, Miyashita A, Kuwano R, Matsumoto N, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Identification of independent APP locus duplication in Japanese patients with early-onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 80:1050-1052. (2009)
9. Hamaguchi T, Morinaga A, Tsukie T, Kuwano R, Yamada M. A novel presenilin 1 mutation (L282F) in familial Alzheimer's disease. *J Neurol*. 256:1575-1577. (2009)
10. 0901091326  
Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R: GAB2 is not associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese. *Eur J Hum Genet*. 17(5):682-685. (2009)
11. 090109125  
Toyabe S, Miyashita A, Kitamura N, Kuwano R, Akazawa K: Prediction of Disease-associated Single Nucleotide Polymorphisms Using Virtual Genomes Constructed from a Public Haplotype Database. *Methods Inf Med*.;47(6):522-528 (2008)
12. 0901091350  
Ikeuchi T, Kaneko H, Miyashita A, Nozaki H, Kasuga K, Tsukie T, Tsuchiya M, Imamura T, Ishizu H, Aoki K, Ishikawa A, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M: Mutational analysis in early-onset familial dementia in the Japanese population. The role of PSEN1 and MAPT R406W mutations. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 26(1): 43-49. (2008)
13. 0801251508  
Tomiyama, T., Nagata, T., Shimada H., Teraoka, R., Fukushima, A., Kanemitsu, H., Takuma, H., Kuwano, R., Imagawa, M., Suzuka Ataka, S., et. *ALA* new amyloid  $\beta$  variant favoring oligomerization in Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol*.63(3):377-387. (2008)
13. 0901091432  
Kitamura N, Akazawa K, Toyabe S, Miyashita A, Kuwano R, Nakamura J: Sample-size properties of a case-control association analysis of multistage SNP studies for identifying disease susceptibility genes. *J Hum Genet*. 53(5):390-400 (2008)
14. Yoshida S, Miyashita A, Kuwano R, Kojima T, Sasaki T, Gang Z, Kanai K, Fujita H, Hirose S, Kaneko S; Epilepsy Genetic Study Group. Genome-wide identification of febrile seizure and related epilepsy phenotype loci. *Epilepsy Seizure*. 1:30-39. (2008)
15. 0801251950  
Shimohata T, Hara K, Sanpei K, Nunomura J, Maeda T, Kawachi I, Kanazawa M, Kasuga K, Miyashita A, Kuwano R, et al. Novel locus for benign hereditary chorea with adult onset maps to chromosome 8q21.3-q23.3. *Brain* 30(Pt 9): 2302-2309 (2007)
16. 0801251036  
Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Matsubara E, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, et al. Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer's disease in females. *Hum Mol Genet*. 16(23), 2854-2869 (2007)
17. Maksimova N, Hara K, Miyashita A, Nikolaeva I, Shiga A, Nogovicina A, Sukhomyasova A, Argunov V, Shvedova A, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kuwano R, Osamu O. Clinical, molecular and histopathological features of short stature syndrome with novel CUL7 mutation in Yakuts: New population isolate in Asia. *J. Med. Genet*. 44:772-778. (2007).
18. 0801251115  
Kaneko H, Kakita A, Kasuga K, Nozaki H, Ishikawa A, Miyashita A, Kuwano R, Ito G, Iwatsubo T, Takahashi H, et al. Enhanced accumulation of phosphorylated alpha-synuclein and elevated  $\beta$ -amyloid 42/40 ratio caused by expression of the presenilin-1 deltaT440 mutant associated with familial Lewy body disease and variant Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 27(48): 13092-13097 (2007)
19. Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y; Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease. Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 15:2170-2182. (2006)
20. 701220906  
Ishikawa, A., Piao, Y.-S., Miyashita, A., Kuwano, R., Onodera, O., Ohtake, H., Suzuki, M., Nishizawa, M. and Takahashi, H.: A Mutant PSEN1 Causes Dementia with Lewy Bodies and Variant Alzheimer's Disease. *Ann Neurol*., 57, 429-434

(2005)

21. Shoji M, Kuwano R, Asada T, Imagawa M, Higuchi S, Urakami K, Arai H, Ihara Y; Japanese Study Group Genome-wide screening for Genes associated Alzheimer's disease; Advanced Brain Science Project. A proposal for diagnostic and clinical assessment criteria for Alzheimer's disease. *RinshoShinkeigaku* 45(2): 128-137. (2005)

## 2) 学会発表

1. Kuwano R, Takei N, Miyashita A, Ihara Y; (JGSCAD): Fine SNP mapping in and around the APOE in late-onset Alzheimer disease. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease (Vienna, Austria)
2. Miyashita A, Saitoh Y, Kakita A, Ogishima S, Tanaka H, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Kuwano R: Gene Expression Profiling of Postmortem Brain Tissues Affected by Alzheimer's Disease. The 11th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (Chicago, USA)
3. Kuwano R; Genetic Association Study for late-onset Alzheimer's Disease in Japan. The 2nd Alzheimer's Association International Conference on Prevention of Dementia (Washington, DC, USA)
4. Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Funamoto S, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y; The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease: Genetic association of dynamin-binding protein gene with late-onset Alzheimer's disease. 第25回日本認知症学会 (International College of Geriatric Psychoneuropharmacology 6th Annual Scientific Meeting と合同開催) (広島)
5. Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Matsubara E, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R (JGSCAD); Gender-related genetic loci associated with late-onset Alzheimer's disease on chromosome 10q. 第26回日本認知症学会 (International Psychogeriatric Association 13th Congress, 第22回老年精神医学会との合同開催) (大阪)

## 3) ソフトウェア

目的とするマイクロサテライト公開データを使いやすく一覧できる手順を開発した。情報支援班の支援を受けて公開した。

### ① pub markerソフトウェア

NCBI公開データに登録のマイクロサテライトを染色体毎にリストを作成する。各マーカーのUniSTS No、position、PCRプライマーの配列、Tm値、PCR産物とその5'及び3'隣接領域のシーケンスが一覧できる。

<http://ocean.cb.k.u-tokyo.ac.jp/homocontig1/test.cgi>

### ② STR検索ソフトウェア

公開シーケンス配列から、2、3、4、5塩基繰り返し配列の回数を指定して検索する。繰り返し配列及び5'隣接領域3'隣接領域それぞれ400塩基のシーケンスを表示する。PCRのプライマーのTm値やPCR長を自在に設計し、独自のプライマーリストを作成し保存できる。それら新規の繰り返し配列のposition並びに既知のマーカーと同じ画面に図示する。

<http://ocean.cb.k.u-tokyo.ac.jp/str21/index.cgi>

## 新聞発表

- ① 2007年1月24日 [朝日新聞]: 「アルツハイマー病関連遺伝子を特定 (新潟大など共同研究)」
- ② 2007年1月30日 [新潟日報]: 「アルツハイマー病発症関連遺伝子を特定 治療法開発へ光明 (新大脳研究所 桑野教授ら)」
- ③ 2007年9月2日 [朝日新聞]: 「アルツハイマー病日本人女性にリスク遺伝子 (新潟大など発見)」
- ④ 2007年10月24日 [新潟日報]: 「脳を究める」