

## ALS 疾患関連遺伝子解析

研究分担者 勝野 雅央  
名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 准教授

研究協力者 曾根 淳、中村亮一  
名古屋大学医学部附属病院 神経内科

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の 90% 以上は孤発性であり、5～10% は家族性である。家族性 ALS の多くは単一遺伝子の変異により引き起こされると考えられ、原因遺伝子は複数同定されている。臨床的には孤発性 ALS と判断される例でも家族性 ALS の原因遺伝子異常が見いだされる例があり、それらの網羅的なスクリーニングが必要である。次世代シーケンサーを用いた既知の ALS 原因遺伝子スクリーニングシステムの構築を行った。

### A. 研究目的・背景

ALS は、代表的な神経難病であり、運動ニューロンの選択的な変性脱落により、発症から平均 3-4 年で死亡または永続的な人工呼吸器装着が必要となる。その病態解明と治療法開発は喫緊の課題である。

ALS 患者の 90% 以上は孤発性であり、5% 程度に家族歴がある。家族性 ALS は SOD1、TDP-43、FUS など複数の病因遺伝子が同定されており、これらの遺伝子を手掛かりに疾患モデルを構築するなど病態解明研究が進められている。

一方、大部分を占める孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子は十分に解明されておらず、病態解明から治療法開発に至る道筋は未確立である。孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子を同定することが、本研究の主目的の一つである。

ALS 患者大規模疾患コホート JaCALS を用いたこれまでの解析にて、日本人の孤発性 ALS の 1.6% で SOD1 遺伝子変異が認められること（Neurol Res Int. 2011;2011:165415.）や、C9ORF72 遺伝子変異が 0.4% で認められる（Neurobiology of Aging. 2012;33 2527.e11-2527.e16）ことが示されている。家族歴が明らかでなく、臨床的には孤発性 ALS と判断される例でも家族性 ALS の原因となる遺伝子異常が認められる例が存在する。家族性 ALS に関連する遺伝子が孤発例にどのように関わっているのか検証する必要がある。

### B. 研究方法

SOD1、TDP-43、FUS などを含む 28 の既知の ALS 関連遺伝子について、検証システム構



築のために、Ion AmpliSeq™ Custom Panel を用いてプライマーペアのセットを作成した。これを用いて multiplex PCR を行い、アダプターのライゲーションを行い、ライブラリを作成した。作成したライブラリは Ion One Touch™ システムを用いてエマルジョン PCR を行い、テンプレートを精製した。精製したテンプレートを Ion PGM™ シークエンサーを用いて配列解析を行った。

#### 倫理面への配慮

研究はヒトゲノム遺伝子解析研究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。研究計画は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得ており、研究対象患者に対しては文書でのインフォームドコンセントを得ることを必須とした。患者臨床情報および遺伝子検体はすべて連結可能匿名化して保存、解析された。

#### C. 研究結果

JaCALS に登録された孤発性 ALS 症例のうち、自治医科大学における HRM 法で、既知の遺伝子異常スクリーニングで既知の家族性 ALS 原因遺伝子変異を認めなかった例のうち、213 例の解析を実施した。

28 遺伝子エクソン領域の網羅的シーケンスにて、アミノ酸変化を伴う variant は大部分の例で存在し、1 例あたり平均 10.2 個認められた。これらのうち、米国 the National Center for Biotechnology Information (NCBI) が提供する遺伝子多型データベース dbSNP および、我が国の大規模遺伝子多型データベースである Human Genetic Variation Database (HGVD) のいずれにも登録の無い variant を認めた例は 36 例 (16.9%) があった。

#### D. 考察

臨床的に孤発性 ALS と判断される例で、家

族性 ALS 原因遺伝子の異常が認められる例があり、その原因としては de novo 変異、家族歴が存在するが認知されていないなど複数の要因が考えられる。一部の例は浸透率の低さなどの理由により、孤発性に見えている可能性もある。十分大きな家系調査により segregation study ができない遺伝子 variant についても、発症への寄与がある可能性がある。iPS 細胞モデル、動物モデル、遺伝子発現解析などによる検証が求められる。

#### E. 結論

孤発性 ALS 病態関連遺伝子・分子の探索を進めるにあたり、既知の家族性 ALS 原因遺伝子のスクリーニングは重要である。引き続き、次世代シーケンサーを用いたスクリーニングシステムによる解析を推進する。

#### F. 健康危険情報

特記なし。

#### G. 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.

- 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.
- 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.

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.

#### **H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**

- 1.特許出願 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
- 2.実用新案登録 特記なし。