

201331015B

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）

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

総合研究報告書

（平成23年度～平成25年度）

研究代表者 戸田 達史

神戸大学大学院医学研究科神経内科学

平成27（2015）年 4月

# 目 次

I. 総合 総括研究報告	
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. 総合 分担研究報告	
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 -----	11
神戸大学大学院医学研究科神経内科 戸田 達史	
2. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 疾患関連遺伝子の探索 -----	16
名古屋大学大学院医学系研究科神経内科 祖父江 元	
3. 次世代シークエンサーを用いたパーキンソン病の網羅的ゲノム解析-----	22
順天堂大学医学部脳神経内科 服部 信孝	
4. 次世代シークエンサーを用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子解析 -----	32
東北大学大学院医学系研究科神経内科 青木 正志	
5. 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に 関する研究 -----	35
鳥取大学医学部脳神経内科 中島 健二	
6. タウオパチーの解明に向けた戦略と臨床像の多様性について-----	39
新潟大学脳研究所神経内科 西澤 正豊	
7. 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に 関する研究 -----	42
東京都健康長寿医療センター 神経内科 村山 繁雄	
8. 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に 関する解析研究 -----	44
大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 望月 秀樹	
9. 相模原病院のバイオリソース構築に関する研究 -----	46
国立病院機構相模原病院神経内科 長谷川 一子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	77

# I. 総合 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化 研究事業）  
（総合）総括研究報告書

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  
研究代表者 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 Rare ながら強いパーキンソン病 (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。715 例の PD 患者ゲノムから、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。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。本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強い Rare variant リスクを発見する。

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。

パーキンソン病患者の層別化に寄与する様々な臨床指標を取り入れた包括的なデータベースの構築が重要である。そのために、遺伝子診療部に家族性パーキンソン病外来を、クリニカルパスを利用した前向きコホート研究を開始した。さらにその発症機構解明のために遺伝子改変マウスモデルを用いて、加齢に伴い  $\alpha$  シヌクレイン凝集を生じうる機序を解明した。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は代表的な神経難病で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、既に孤発性 ALS 患者 919 例の前向き臨床情報、ゲノム DNA を蓄積した。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、エクソーム解析を行った。その結果、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。

また東北大学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・リシーケンシング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。

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。

高齢者ブレインバンクは、高齢者在宅支援総合救急病院連続開頭剖検例と、他施設剖検例中ブレインバンク登録同意を得た症例により構成されている。すでにブレインバンクとしてのゲノム提供を行っていたが本研究への協力のため、進行性核上性麻痺 (PSP) 1,000 例以上、皮質基底核変性症 (CBD) 400 例以上を有する米国メイヨークリニックブレインバンクとの対抗を考慮し、変性疾患網羅的検討の成果として、正常コントロール、PSP に加え、pPSP を抽出し、ゲノム研究リソースを構築できた。

本邦からタウオパチーに関する発信をするには症例の全国レベルでの集積が必要である。ゲノム構造解析に可能性がある。日本人 CBS も背景病理は多彩である。発症 2 年に限ると、CBS、CBD いずれの臨床診断基準も感度が低い、ことを明らかにした。

研究分担者  
祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科  
神経内科・教授  
服部 信孝 順天堂大学脳神経内科・主任教授  
青木 正志 東北大学大学院医学系研究科神  
経内科・教授  
中島 健二 鳥取大学医学部脳神経内科・教授  
西澤 正豊 新潟大学脳研究所神経内科・教授  
村山 繁雄 東京都健康長寿医療センター  
高齢者ブレインバンク・研究部長  
望月 秀樹 大阪大学大学院医学系研究科神  
経内科学・教授  
長谷川 一子 国立病院機構相模原病院神経内  
科・医長

法未確立、生活面への長期にわたる支障」の 4 要素を満たす神経難病のうち、「大部分は孤発性だが一部家族性・メンデル遺伝をとるパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、進行性核上性麻痺 (PSP)、大脳皮質基底核変性症 (CBD) といった代表的な神経難病」を対象にする。パーキンソン病は中高年に発症し、ドパミンニューロンの変性により振戦、筋固縮など運動障害を主症状とし、PSP、CBD とパーキンソン症候群を形成する。一方、ALS は進行性の筋萎縮と筋力低下をきたし平均 3-4 年で死亡に至る過酷な神経難病であり、その重篤さと患者および家族に課せられる過酷な運命から、難病中の難病と言われており、その克服は喫緊の課題となっている。

#### A. 研究目的

本研究は「希少性、原因不明、効果的な治療

これらの神経難病では、根治療法や予防法は一つとして無く、その多くは病因も不明であり、

発症機序は何れも未解明であり、診断法や診断基準も未だ十分ではない。またこれらの遺伝背景について一部は明らかになってきたものの、SNP だけでは遺伝率は説明できず、次世代シーケンサーを用いて寄与度の高い rare variants を見いだすことが重要である。また単一遺伝性患者においても、まだ約半数は原因遺伝子は発見されていない。

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シス解析を行い、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シスし、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シス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関連を解析し、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) パーキンソン病の、エクソンに存在する Rare

ながら強い遺伝子リスクを発見するため、多発家系について、次世代シーケンサーによるエクソームシーケンシス (全エクソン塩基配列の解読) を行った。試験的に、同胞例 2 検体について、次世代シーケンサーによる全エクソン解読を行った。参照配列へのマッピングと多型・変異の検出などのパーソナルゲノム情報解析を行い、検出した多型・変異から既知の多型・変異を引き算したところ、同胞に共通する新規の多型・変異を、321 個検出した。多発家系の次世代シーケンサー解析により候補遺伝子が絞り込まれたが、1 つの小家系のみからでは、まだ候補が多すぎるので、今後、より多くの家系・検体を重ねていく必要がある。また、絞られた候補を孤発例で検証する (サンガー・次世代シーケンサー) ことにより孤発例への広がりをしらべ、さらに、自験のゲノムワイド関連解析データをつかうことにより、家族例・孤発例を統合したゲノム解析をおこなって、パーキンソン病遺伝子同定を目指す。

エクソンに存在する Rare ながら強いパーキンソン病 (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。715 例の PD 患者ゲノムから、全エクソン (エクソーム) を抽出、HiSeq2000 シーケンサーで超高速・並列シーケンシスをおこなった。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) を約 30 万個検出した。715 検体のエクソームデータの平均被覆は 126.1x であり、全エクソン配列の 94.9% のエリアが 10x 以上で被覆された。これは、孤発性 PD 患者 755 人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。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。孤発性パーキンソン病の全エクソン配列データはいまだ論文発表がなく、さらに、数百検体分のデータとなると、国際学会の発表ですらみかけない。本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強いRare variant リスクを発見する。

#### ②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 (服部)

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。

#### ③次世代シーケンサーを用いたパーキンソン病の発症機構の解明に関する解析研究 (望月)

次世代シーケンサーを用いた孤発性パーキンソン病の原因解明のため、パーキンソン病患者の層別化に寄与する様々な臨床指標を取り入れた包括的なデータベースの構築が重要である。そのために、大阪大学では遺伝子診療部に家族性パーキンソン病外来を神経内科学

では、クリニカルパスを利用した前向きコホート研究を開始した。さらにその発症機構解明のために遺伝子改変マウスモデルを用いて、加齢に伴い $\alpha$ シヌクレイン凝集を生じうる機序を解明した。今後は、さらに治療戦略を推進する。

#### ④ALS疾患関連遺伝子の探索 (祖父江)

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は代表的な神経難病で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、既に孤発性ALS患者919例の前向き臨床情報、ゲノムDNAを蓄積した。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、エクソーム解析を行った。その結果、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、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。

#### ⑤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 (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。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、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。

#### ⑥PSP・CBD を含めたタウオパチー（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。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。

#### ⑦PSP・CBD を含めたタウオパチー、相模原病院のバイオリソース構築に関する研究（長谷川）

質の良いバイオリソースシステムを構築することは疾患の発症機構などを検討するに際し重要な事項である。当科では臨床診断能力の向上に努め、最終確認を病理学的検討により行っている。現在までにタウオパチーを来す症例群について臨床情報の収集、画像所見の撮像、生理学的検査所見の収集を行ってきており、DNA は 7 検体、髄液 15 検体（PSP8 例、CBD4 例、FTD3 例）、血清 13 検体（PSP5 例、CBD7 例、FTD1

例）、DNA13 検体（PSP5 例、CBD7 例、FTD1 例）、剖検例 9 検体（PSP5 例、CBD3 例、FTD1 例）の収集ができた。病理学的所見による最終確認では臨床像との対比において、2 症例で不一致であった。これには診断基準の改変を含めて今後の検討が必要である。

#### ⑧PSP・CBD を含めたタウオパチー（村山）

高齢者ブレインバンクは、高齢者在宅支援総合救急病院連続開頭剖検例と、他施設剖検例中ブレインバンク登録同意を得た症例により構成されている。すでにブレインバンクとしてのゲノム提供を行っていたが本研究への協力のため、進行性核上性麻痺（PSP）1,000 例以上、皮質基底核変性症（CBD）400 例以上を有する米国メイヨークリニックブレインバンクとの対抗を考慮した。神経病理学的正常コントロールゲノムに加え、発症前 PSP 症例の提供で、独自の貢献が可能となった。

#### ⑨タウオパチーの解明に向けた戦略と臨床像の多様性について（西澤）

タウオパチーは病理学的にタウの蓄積を特徴とし、認知症や運動機能障害を来す、孤発性の神経変性疾患である。本症には代表的な物として進行性核上性麻痺（progressive supranuclear palsy: PSP）と皮質基底核変性症（corticobasal degeneration: CBD）が知られている。有効なバイオマーカーはなく、確定診断は、病理学的検索による。これらでは特定のタウ遺伝子領域のハプロタイプ（H1）が危険因子となる事が知られている。欧米人と日本人では H1 ハプロタイプの頻度が異なる。欧米人では一定の割合で H2 ハプロタイプが存在するが、日本人ではほとんどが H1 ハプロタイプである。H1 は複数のサブハプロタイプに分類されるが、このサブハプロタイプの頻度も人種間で異なる。欧米人と日本人の PSP、CBD 患者で



共通して認められる構造多型が疾患の危険因子となっている可能性が推察され、両者を詳細に比較することにより、本症に共通した遺伝子配列、ゲノム構造が同定できる可能性がある。今後、病理診断例のゲノムを全国レベルで集積する必要がある。

治療方法の開発の為には、正確な生前診断が必須であるが困難とされ、臨床診断名として corticobasal syndrome (CBS) と称されている。メイヨーCBD 診断基準 (Boeve BF et al. *Annals of neurology*, 2003) ないし改訂ケンブリッジ CBD 診断基準 (Mathew R et al. *JNNP* 2012) を満たした 10 例 (67.9 ± 9.3 歳, 男:女=6:4) の背景病理の内訳は CBD 3 例、PSP 3 例、アルツハイマー病 3 例、非典型的 4 リピートタウオパチー 1 例であった。次にメイヨー基準と改定ケンブリッジ基準の診断感度は、発症後 2 年以内ではいずれも 10% であった。一方 Armstrong MJ らによる 2013 年 *Neurology* の CBD 診断基準では、より感度が低く、特異度の上昇も認めなかった。この結果から、PSP と CBD を生前に区別するのは困難であること、また誤診しやすい疾患としてはアルツハイマー病が高頻度であることが明らかとなった。CBS の背景病理は多彩であり、発症 2 年に限ると臨床診断基準の感度は極めて低く、バイオマーカーの確立が望まれる。

#### D. 考察

孤発性パーキンソン病の全エクソン配列データはいまだ論文発表がなく、さらに、数百検体分のデータとなると、国際学会の発表ですらみかけない。今後は、本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の、新たな、強い疾患リスクとなる Rare variant リスクを発見する。

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。

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ことから孤発性 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。

遺伝性及び孤発性のパーキンソン病の多彩な臨床症状を解明するために、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推進している。これらの蓄積は、新規薬剤や新たな検査法が確立したために発症機構解明にさらに有用な手法となりうる。遺伝性疾患を扱う場合には、遺伝学の情報提示や心理的援助などが要求される。我々は、遺伝子診療部に家

族性パーキンソン病専門の外来を設けて対応している。また、基礎研究では $\alpha$ シヌクレインを加齢にともなって凝集するモデルマウスを確立したことにより、その発症機構をさらに検討しているところである。

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ズ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ズ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。

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。

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する。

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。当科の目的とする症例数については到達できたといえる。今後の展望としては、タウのハプロタイプが欧米人と異なる点に着目した解析方法を行っていく必要がある。我が国の独自性が明らかになれば、タウオパチーの病態解明について新たな視点が得られ、疾患の原因究明、

病態解明に寄与することが期待できる。

米国 PSP ブレインバンク蓄積 1000 例以上に対抗するため、pPSP を抽出した。当施設内で既に提供した PSP 例に加え、新たな 5 例と 29 例の pPSP は、厳密な正常コントロールに加え、Lewy 小体病ゲノム研究への貢献と同様、PSP ゲノム研究に貢献しうると考えられる。ただ、PSP の進行速度を考えた時、Lewy 小体病とほぼ同じ比率であるのは、過剰抽出の可能性がある点には留意が必要である。

欧米人と日本人では H1 ハプロタイプの頻度が異なる。欧米人では一定の割合で H2 ハプロタイプが存在するが、日本人をはじめとするアジア系人種ではほとんどが H1 ハプロタイプである。さらに H1 は複数のサブハプロタイプに分類されるが、このサブハプロタイプの頻度も異なる。欧米人と日本人の PSP、CBD 患者で共通して認められる構造多型が疾患の危険因子となっている可能性が推察され、両者を詳細に比較することにより、この共通した遺伝子配列、ゲノム構造が同定できる可能性がある。今後、病理診断で確定診断のついた症例について、タウ遺伝子領域の詳細な構造解析を行うことの意義はあり、この研究の為には、病理診断例のゲノムを全国レベルで集積する必要性がある。

この結果からは、治療介入が有効と考えられる早期に診断することは極めて困難であることが示唆される。一方 2013 年 *Neurology* に発表された CBD 診断基準 (Armstrong MJ et al. *Neurology* 2013;80;496-503) についても検討したが感度、特異度共に不十分であった。この事から、日本人において、いずれの臨床診断基準も十分な診断感度を持たないことが示された。臨床症状では、CBD に特異的な臨床症状は見いだせなかった。また PSP のみで、開眼失行、小脳性運動失調を、アルツハイマー病では全例でミオクローヌスを認めた。これらの所見は CBD との鑑別に有用である可能性がある。

## E. 結論

パーキンソン病の、エクソンに存在する Rare ながら強い遺伝子リスクを発見するため、多発家系について、次世代シーケンサーによるエクソームシーケンス (全エクソン塩基配列の解読) を行い、成功した。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。

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。

パーキンソン病の発症機構の解明には、詳細な臨床情報、臨床サンプルの蓄積に基づき、次世代シーケンサーなどを駆使してその発症機序に取り組む。また、同時に主要蛋白である  $\alpha$  シヌクレインを解析することにより、発症機構から治療戦略まで期待できる。

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。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。

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。

タウオパチーのバイオリソースの構築に寄与することができた。高齢者ブレインバンクの、変性疾患網羅的検討の成果として、正常コント

ロール、PSPに加え、pPSPを抽出し、ゲノム研究リソースを構築できた。

本邦からタウオパチーに関する発信をするには症例の全国レベルでの集積が必要である。ゲノム構造解析に可能性がある。日本人CBSも背景病理は多彩である。発症2年に限ると、CBS、CBDいずれの臨床診断基準も感度が低い。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)  
(研究分担者の項参照)

2. 学会発表  
(研究分担者の項参照)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得 なし  
2. 実用新案登録 なし  
3. その他 なし

## II. 総合 分担研究報告

## 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

研究代表者 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

パーキンソン病の、エクソンに存在する Rare ながら強い遺伝子リスクを発見するため、多発家系について、次世代シーケンサーによるエクソームシーケンス（全エクソン塩基配列の解読）を行った。試験的に、同胞例 2 検体について、次世代シーケンサーによる全エクソン解読を行った。参照配列へのマッピングと多型・変異の検出などのパーソナルゲノム情報解析を行い、検出した多型・変異から既知の多型・変異を引き算したところ、同胞に共通する新規の多型・変異を、321 個検出した。多発家系の次世代シーケンサー解析により候補遺伝子が絞り込まれたが、1つの小家系のみからでは、まだ候補が多すぎるので、今後、より多くの家系・検体を重ねていく必要がある。また、絞られた候補を孤発例で検証する（サンガー・次世代シーケンサー）ことにより孤発例への広がりをしらべ、さらに、自験のゲノムワイド関連解析データをつかうことにより、家族例・孤発例を統合したゲノム解析をおこなって、パーキンソン病遺伝子同定を目指す。

またエクソンに存在する Rare ながら強いパーキンソン病 (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。715 例の PD 患者ゲノムから、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) を約 30 万個検出した。715 検体のエクソームデータの平均被覆は 126.1x であり、全エクソン配列の 94.9% のエリアが 10x 以上で被覆された。これは、孤発性 PD 患者 755 人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。まず前述の 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、*LRK2* 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 ( $P \sim 10^{-4}$ )。 *LRK2* 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。孤発性パーキンソン病の全エクソン配列データはいまだ論文発表がなく、さらに、数百検体分のデータとなると、国際学会の発表ですらみかけない。本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強い Rare variant リスクを発見する。

#### A. 研究目的

著しい進歩をとげている次世代シーケン

サーのゲノム解読能を本症に応用。多発家系や血  
族婚例について、全エクソン 5000 万塩基 の配列

を読み解く。また、孤発性 PD について、数百検体のエクソーム解読による、大規模エクソーム関連解析を行うことにより、家族性 PD 遺伝子や強い PD リスク遺伝子 (Rare variant 等) を同定、パーキンソン病の遺伝背景を解明することを目指す。

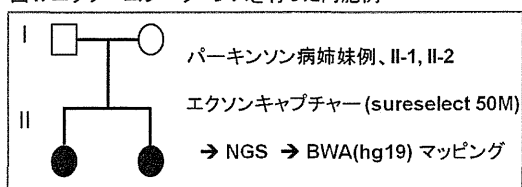
我々は、一塩基多型 SNP を解析したゲノムワイド関連解析を行い、4つの孤発性 PD 遺伝子 (*PARK16*, *BST1*,  $\alpha$ -*synuclein*, *LRRK2*) を報告した (Satake *et al*, *Nature Genet* 2009)。これらは、その後の白人での大規模解析でも結果が再現された、確実な孤発性 PD 遺伝子である (IPDGC, *Lancet* 2011; Lill *et al*, *PLoS Genet* 2012, Do *et al*, *PLoS Genet* 2011 etc)。また、最近、機能的な面からも、*PARK16* 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

姉妹発症例の患者 2 症例 (II-1, II-2) のゲノム DNA を標準的な方法で抽出した。これらゲノム DNA から、SureSelect Human All Exon 50Mb (Agilent) を用いて、全エクソン (エクソーム) を抽出、次世代シーケンサー (Illumina 社、HiSeq2000) により全エクソームシーケンスを行った。シーケンスデータについて、reference ゲノム配列 (hg19) に対して BWA ソフトウェアでマッピングを行い、GATK ソフトウェアで、参照配列との相違 (Alternative allele, ALT) を検出した。その後、dbSNP データベースに登録されている既知の SNP を取り除くことにより、新規の ALT を抽出した。

図1. エクソームシーケンスを行った同胞例



### (倫理面への配慮)

なお、ヒト遺伝子解析については、倫理委員会の承認を得ており、プライバシーの保護、人権擁護上等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、文書でインフォームドコンセントの得られた試料を用い、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」等関係法令を遵守した。

400例のパーキンソン病患者血液から、標準的な方法でゲノム DNA を抽出した。Sureselect V4 試薬 (アジレント社) により、各ゲノム DNA から全エクソン配列 (エクソーム) を抽出した。えられたエクソームを、HiSeq2000 シーケンサーで超高速並列シーケンスをおこなった。

参照配列 hg19 へ BWA ソフトウェアでマッピングした。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。

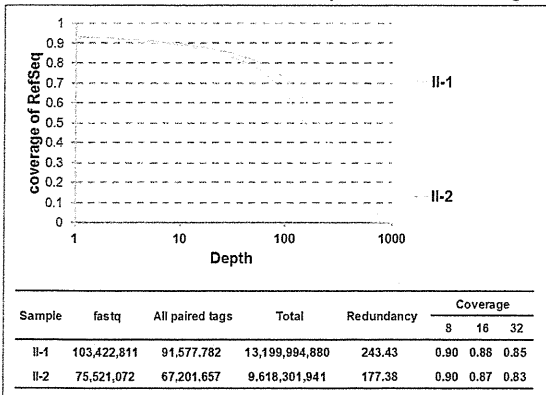
### (倫理面への配慮)

なお、ヒト遺伝子解析については、倫理委員会の承認を得ており、プライバシーの保護、人権擁護上等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、文書でインフォームドコンセントの得られた試料を用い、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」等関係法令を遵守した。

## C. 研究結果

2 検体のエクソーム解読データは、平均 depth がそれぞれ 243, 177 であった。また、RefSeq のエクソンの 87% 以上の領域を coverage16 以上で被覆しており、十分な deep sequencing を達成、可及的に高精度のシーケンスデータを得ることができていると判断した (図 2)。

図2. エクソームシーケンスデータのRefseqエクソンに対するcoverage



新規のALTは、II-1で690個、II-2で694個検出した。本家系の原因変異は、患者で共通していると考えられるので、これら2検体の患者での共通ALTの数を検討したところ、優性モデルで295個、劣性モデルで20個であった(図3)。

図3. 同胞でみられた参照配列(Ref)との相違配列(ALT)と、同胞間で一致するALTの数の検討

	II-1	II-2	II-1	II-2	No of SNV
Ref/SNV	648	660	Ref/SNV	Ref/SNV	295
SNV/SNV	42	34	Ref/SNV	SNV/SNV	2
total	690	694	SNV/SNV	Ref/SNV	4
			SNV/SNV	SNV/SNV	20
			total		321

dbSNPにないSNVは、1検体あたり650個程度、検出される  
姉妹例であるので、SNVは約半分共有されている

400検体のエクソームデータの平均depthは146.6xであった。全エクソン配列の98%のエリアが10x以上で被覆された。

また、各検体の平均depthと、全エクソンのうちx1, x5, x10, x20で被覆されるエクソン領域の割合をプロットしたところ、平均depthが高いほど、十分な被覆度でカバーされるエクソン領域の割合が高かった。さらに、single nucleotide variantの検出に必要とされるx10での被覆についてみると、平均depth 80程度のデータ量をとった検体では、全エクソンの95%以上が解読されたと考えられた。

715例のPD患者ゲノムから、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。715検体のエクソームデータの平均被覆は126xであり、全エクソン配列の94.7%のエリアが10x以上で被覆された。これは、孤発性PD患者715人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。

さらに、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)に強い疾患リスクをもったrare variantが存在するかを明らかにするため、PD患者625検体(上述データの一部)と非患者対照259検体のエクソン配列データを比較した。具体的には、PD患者625検体と非患者対照259検体の全エクソン配列データからエクソン領域に存在するSNV(single nucleotide variant)を抽出し、患者・対照群間で、SNV頻度をFisher's exact testで有意差検定した。

*PARK16*, *α-synuclein*, *LRRK2*には、遺伝子エクソン領域内に有意なSNVは検出しなかった(すべて $P > 0.01$ )。*BST1*には比較的有意なSNVを検出したが( $P = 0.0005$ )、アレル頻度は患者群で46%、対照群で37%であり、強い疾患リスクをもつrare variantではなかった。また、この多型は、我々が以前報告した孤発性PD遺伝子*BST1*のSNP(Satake *et al*, *Nature genet* 2009)とほぼ連鎖不平衡の多型であった。よって、これら孤発性PD遺伝子エクソンには強いrare variant riskは存在せず、イントロンなどのSNVが発症リスクになっていると考えた。

さらにコントロールを増やして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リスクを検出しな



った。

孤発性 PD の発症ゲノム因子には、

(1) 強い疾患リスクをもつエクソン領域の rare variant

(2) リスクとしては強くはないが頻度は高い一塩基多型

(3) 非常に強い疾患リスクであり家族性 PD を引き起こすような変異の孤発性群への混入がある。

今後、本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強い Rare variant リスク発見を目ざす。さらにこれまで蓄積した一塩基多型によるゲノムワイド関連解析データや、家族歴をもつ PD 患者データと比較することにより、孤発性 PD の遺伝背景を解明する。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子研究倫理委員会の承認をえて行った。

#### D. 考察

これらの中に、本家系の疾患原因変異が存在すると期待される。1つの小家系のみ、絞り込みがたらず疾患遺伝子に達せないが、こういった家系を多数重ね合わせるにより、家族性遺伝子や強い疾患リスクとなる Rare Variant を同定できると考えている。また、全エクソン塩基配列解読を孤発性 PD に応用することで、これまで技術的にアプローチの困難であった、Rare ではあるが強い PD リスクを同定できると推定された。

孤発性パーキンソン病の全エクソン配列データはいまだ論文発表がなく、さらに、数百検体分のデータとなると、国際学会の発表ですらみかけない。今後は、本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の、新たな、強い疾患リスクとなる Rare variant リスクを発見する。

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

パーキンソン病の、エクソンに存在する Rare ながら強い遺伝子リスクを発見するため、多発家系について、次世代シーケンサーによるエクソームシーケンス（全エクソン塩基配列の解読）を行った。多発家系の次世代シーケンサー解析により候補遺伝子が絞り込まれたが、1つの小家系のみからでは、まだ候補が多すぎるので、今後、より多くの家系・検体を重ねていく必要がある。また、絞られた候補を孤発例で検証する（サンガー・次世代シーケンサー）ことにより孤発例への広がりをしらべ、さらに、自験のゲノムワイド関連解析データをつかうことにより、家族例・孤発例を統合したゲノム解析をおこなって、パーキンソン病遺伝子同定を目指す。

孤発性パーキンソン病の大規模な全エクソン塩基配列解読実験を行い、成功した。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。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
  - ・ Taniguchi-Ikeda M et al, Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478:127-31, 2011
  - ・ Sharma M et al, Role of sepiapterin reductase gene at the PARK3 locus in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 32:2108. e1-5, 2011
  - ・ Kuga A et al, Endoplasmic reticulum stress response in P104L mutant caveolin-3 transgenic mice. *Hum Mol Genet* 20:2975-83,

2011

- Chihara N et al, Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Proc Natl Acad Sci 108:3701-6, 2011
- Sun H et al, Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. J Hum Genet 56:330-4, 2011
- Kruger R et al, A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease. Neurobiol Aging 32:548. e9-548. e18, 2011
- Sharma M et al, Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. Neurology 79:659-67, 2012
- Lill CM et al, Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. PLoS Genetics 8:e1002548, 2012
- Mizuta I et al, YY1 binds to  $\alpha$ -synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. J Hum Genet 58:711-9, 2013
- Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. N Engl J Med 369:233-44, 2013

## 2. 学会発表

- 日本人類遺伝学会第56回大会
- 日本神経学会第52回総会
- The American Society of Human Genetics 61<sup>th</sup> Annual Meeting
- The 16<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders.
- The American Society of Human Genetics 62<sup>th</sup> Annual Meeting
- The American Society of Human Genetics 63<sup>rd</sup> Annual Meeting
- The 17<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders
- 4<sup>th</sup> Asian and Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress
- The American Society of Human Genetics 64<sup>th</sup> Annual Meeting
- 4<sup>th</sup> Asian and Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress
- The 12<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders

## 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

## 筋萎縮性側索硬化症（ALS）疾患関連遺伝子の探索

研究分担者：祖父江 元 名古屋大学神経内科 教授

研究協力者：曾根 淳、熱田直樹、中村亮一、渡辺はづき 名古屋大学神経内科

平川晃弘、中枳昌弘 名古屋大学先端医療・臨床研究支援センター

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は代表的な神経難病で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、既に孤発性ALS患者919例の前向き臨床情報、ゲノムDNAを蓄積した。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プング、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、エクソーム解析を行った。その結果、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。

### A. 研究背景・目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は成人発症の神経変性疾患であり、上位および下位運動ニューロンが進行性に変性脱落することが特徴である。その結果、全身の筋萎縮、筋力低下をきたし、平均3年で死亡もしくは永続的な人工換気が必要な状態となる。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。

ALSの5-10%は家族性であり、その原因遺伝子の一部が判明している。しかし、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。従来報告されてきた孤発性ALS関連遺伝子多型はオッズ比1.5以下であり、ここからモデル動物を作製し、病態解析研究を進めることは難しい。より病態寄与度の高い遺伝子を見出し、病態的意義の検証、解析を行う系を確立する必要がある。

我々は神経変性疾患に関する調査研究班（神経変性班）を基にALS患者の大規模前向きコホート（JaCALS）を立ち上げ、既にALS患者919例の前向き臨床情報、DNA、B cell lineを蓄積し

た。この3点が結び付けられた大規模リソースは世界的にも類を見ない。本研究では、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

多施設共同前向きALS患者コホートであるJaCALSの体制整備、拡大、運営を行った。参加施設数は30施設に拡大した。

#### JaCALS参加施設(30施設)およびメンバー

東北大学	加藤昌昭 青木正志	宮城病院	今井尚志
新潟大学	石原智彦 西澤正豊	岡山大学	山下徹、阿部康二
自治医科大学	森田光哉	国立精神神経センター	村田美穂
東京都立神経病院	川田明広 中野今治	京都府立医科大学	能登祐一 中川正法
静岡てんかん神経医療センター	小尾智一	三重大学	谷口彰
東名古屋病院	豊場郁子	相模原病院	長谷川一子
名古屋大学	祖父江元	東京大学	石浦浩之 辻省次
ビハール花の里病院	日地正典 織田雅也	京都大学	山下博史 高橋良輔
	和泉唯信	鳥取大学	渡辺保裕 中島健二
順天堂大学	富山弘幸 大塚光太郎	山梨大学	長坂高村 瀧山嘉久
	服部信孝	東京病院	中村美恵
徳島大学	和泉唯信 梶龍児	北海道大学	加納崇裕 佐々木秀直
鈴鹿病院	酒井素子 小長谷正明	東邦大学大森病院	狩野修
拓海会神経内科クリニック	藤田拓司	千葉大学	澁谷和幹 桑原聡
群馬大学	藤田行雄 池田佳生	九州大学	林健太郎 吉良潤一
静岡富士病院	溝口功一	東京医大	相澤仁志

JaCALSに登録した孤発性ALS患者ゲノムDNAについて、Omni Express Exome Bead

Chip を用いたゲノム網羅的遺伝子多型タイピングを実施した。得られた遺伝子多型タイピング結果を用いて、縦断的臨床像との関連を網羅的に解析した。また、SOD1、TDP-43、FUS などを含む 28 種類の既知の ALS 関連遺伝子について、以下の手順で網羅的なシークエンスを実施した。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し、multiplex PCR、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 を行ったのち、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、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。ライブラリ作成に関しては、Covaris 社の超音波破碎システム Covaris S220 および LifeTechnology 社の LibraryBuilder を導入し、高品質なライブラリをハイスループットで作成出来る体制を整えた。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 を始めとするデータベース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。

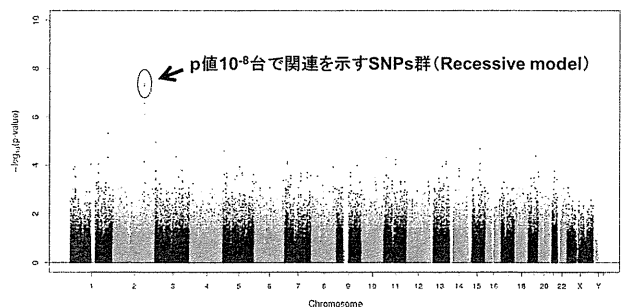
#### C.研究結果

JaCALS における ALS 患者登録数は平成 26 年 2 月末時点で 919 例、コントロール検体数は 277 例になった。

ALS 患者に対する臨床研究や治験において世界標準として用いられる重症度スケールである ALSFRS-R について、その経時的变化のパターンを混合分布モデルを用いて類型化を行った。その結果、ALSFRS-R で評価した症状の進行は急速進行型、シグモイド型、単調減少型、緩徐型の 4 型に分類された。

この類型と遺伝子多型 (70 万 SNPs+25 万 exome chip) との関連解析を行った。遺伝子多型関与のモデルとして、Dominant model: メジャーアレルホモの例に対するマイナーアレル保有例のオッズ比、Recessive model: メジャーアレル保有例に対するマイナーアレルホモ例のオッズ比、Additive model: マイナーアレルが一つ増えることに対するオッズ比、以上の 3 パターンを用いた。

その結果、急速進行型と関連する SNPs が Recessive model において見出され、そのうち 7 つが p 値  $10^{-8}$  台であった。その Manhattan plot を以下に示す。



Haploview4.2 ソフトウェアを用いてハプロタイプ解析を行ったところ、これらの SNPs は強い連鎖不平衡状態にあることが示された。

また、次世代シークエンサーを用いた遺伝子解析では、既知の家族性 ALS 原因遺伝子変異を有