

## 孤発性筋萎縮性側索硬化症の遺伝的背景に関する研究

小野寺 理<sup>1)</sup>,

石原 智彦<sup>2)</sup>, 他田 真理<sup>3)</sup>, 柿田 明美<sup>3)</sup>,

1) 新潟大学脳研究所神経内科, 2) 同分子神経疾患資源解析学科, 3) 同 病理学分野,

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症( ALS )は成人発症の代表的な運動神経変性疾患である。運動症状の進行を停止・改善させる有用な治療法は開発されていない。本疾患の 90%は家族歴を有さない孤発性であるが、その場合でもしばしば遺伝子変異を伴う。さらに ALS の原因遺伝子は 20 以上が知られているが、それぞれの症状の進行速度や、臨床的特徴との関連は十分に明らかになっていない。

近年、遺伝子解析技術の進歩により遺伝子中の蛋白質発現領域の網羅的解析（エクソーム解析）の実施がより容易となっている。我々は当施設の保有する ALS 剖検脳組織 54 例より DNA を抽出し、エクソーム解析を実施し、54 例中 5 例で ALS 原因遺伝子変異を見出した。病理学的に裏付けのある ALS 症例において遺伝子変異が同定され、臨床的特徴、病理学的特徴と関連付けて解析が行われることは今後の ALS 病態生理、治療法の解明に有用である。さらに網羅的なエクソーム解析を実施したことにより、今後あらたな ALS 原因遺伝子が同定された場合にも、速やかに確認をする事が可能である。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症：ALS は成人発症の代表的な運動神経変性疾患である。全身の上位下位運動神経の変性により、最終的には嚥下、呼吸障害を呈し、多くは 3-5 年で不幸な転機をたどる。進行速度を抑制する治療薬はあるが、その効果は限定的であり、症状進行を停止、改善させる有用な治療法は開発されていない。

難治性の神経・筋疾患はしばしば遺伝子変異を伴う。この遺伝子変異による病態生理機序を解明することにより、有用な治療法が得られる可能性がある。実際に筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症では、変異遺伝子に対する核酸治療薬による画期的な治療法が開発されている。

さて ALS の 90%は家族歴を有さない孤発性であるが、その場合でもしばしば遺伝子変異を伴うことが知られている。しかし原因遺伝子の数は 20 以上であり、それぞれの頻度も低い。このため個々の遺伝子変異の正確な頻度や、臨床的

特徴との関連は十分に明らかになっていない。

本研究では当施設の保有する ALS 剖検脳組織を対象として、網羅的な遺伝子変異解析を行い、ALS の病態、発症機序の一端を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

新潟大学脳研究所保有の ALS 剖検脳組織を用いて、遺伝子を抽出し、エクソーム解析を行った。本年度は 54 例を対象とした。既に原因遺伝子が判明している症例については、今回の解析から除外している。エクソーム解析はイルミナ社 NovaSeq 6000 を用いた(外注:タカラバイオ社)。エクソーム解析結果を元に、既知の 40 遺伝子(表

表 1 対象40遺伝子

|         |          |         |          |      |         |        |         |
|---------|----------|---------|----------|------|---------|--------|---------|
| TARDBP  | OPTN     | FUS     | SOD1     | TBK1 | SQSTM1  | MATR3  | TUBA4A  |
| NEK1    | HNRNPA2B | VCP     | ELP3     | SETX | HNRNPA1 | CCNF   | PNF1    |
| VAPB    | C21orf2  | CHCHD10 | NEFH     | ANG  | DNCT1   | CHMP2B | POLDIP2 |
| UBQLN2  | FIG4     | PFN1    | ARHGEF28 | ALS2 | SPG11   | EWSR1  | TAF15   |
| SIGMAR1 | ANXA11   | DAO     | ERBB4    | MAPT | TIA1    | GLE1   | PRPH    |

1) について解析を行った。

既報 (Dols-Lcardo O, et al. JNNP, 2018) を参考に、アミノ酸変異を伴う点変異に加え、フレームシフトを来す変異、あるいはスプライシング変異を来す変異を対象とした。遺伝子変異データベース, HGVD および ExAC EAS を参照し、各変異の頻度を確認した。各変異の病的意義の確からしさについて、1) Probable Pathogenic= Allele frequency <0.001 かつ既報あり、2) Possible Pathogenic = Allele frequency <0.00001 かつ既報なしに分類した。既報のある変異でも最近のデータベースで>0.001 の頻度の高い変異については解析から除外した。変異陽性例については、剖検時記録に基づき、臨床情報を参照した。

(倫理面への配慮)

本研究は新潟大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

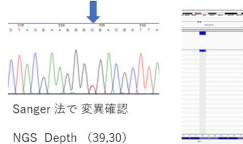
### C. 研究結果

解析対象とした全 54 例について、Exsome 解析を実施できた。約 60 Mb の標的領域において、標的領域における推定リード数は平均 1600000、標的領域の推定平均リード depth は  $\times 122.4$ 、40 倍以上の depth でシーケンスされた割合は平均 90.3% であった

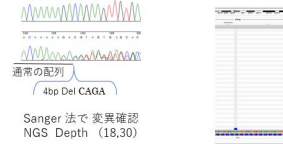
1) Probable Pathogenic mutation として TBK-1 変異例 2 例 (ナンセンス変異 1 例, フレームシフト変異 1 例) (図 1), ANXA11 変異例 1 例 (intron 変異) を認めた。

図1 TBK1遺伝子変異

TBK1 (p.Arg357\*\_c.1069C>T)

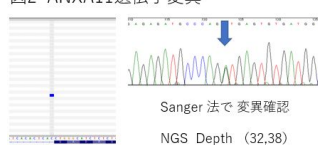


TBK1 (p.Thr462fs\_c.1385\_1388delCAGA)



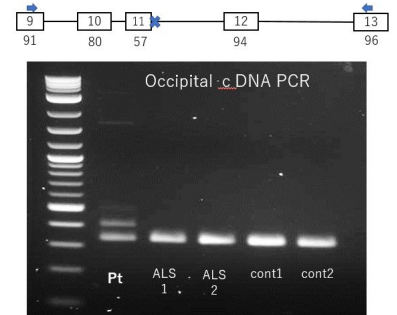
上記のうち ANXA11 変異は c.1086+1G>A 変異で intron 11 冒頭の変異である。同変異についても Sanger 法で変異を確認した (図 2)。さらに当該症例の後頭葉剖検組織か

図2 ANXA11遺伝子変異



ら mRNA を抽出し、これを鋳型として exon 9-13 間で PCR を行った。その結果、変異陽性例のみで特異なスプライシング変異が生じていることが確認できた (図 3)。同スプライシング変異の詳細については、さらに解析を続けている。

図3 ANXA11 mRNA スプライシング評価



2) Possible Pathogenic mutation として OPTN 変異, CHMP2B 変異および GLE1 変異一例 (いずれもミスセンス変異) を認めた。これらの変異も Sanger 法により塩基配列を確認している。このうち GLE1 変異については、同遺伝子のミスセンス変異は正常群でもしばしばみられるという報告 (Hannah M. et al. Hum Mol Genet, 2015) があり、病的意義は乏しいと判断した。

### D. 考察

本解析では 54 例中 5 例で ALS 原因遺伝子変異を見出した。2 症例で陽性であった TBK-1 遺伝子は先行研究においても、本邦で比較的頻度が高いことが報告されており (Tohna G. et al. Neurobiol Aging, 2018), それを裏付ける結果であった。

CHMP2B 変異は当初は類縁疾患である FTD の原因遺伝子として報告されたもので、ALS でも報告がある。従来は同変異陽性 ALS の臨床像は下位運動ニューロン主体とされたが、球症状優位の症例報告もある (Narain P. et al. Neurobiol Aging, 2018)。本例は球症状主体に経過し死亡直前まで歩行が可能であり、Narain らの報告に合致する経過であった。

ANXA11 はこの数年報告が増えている遺伝子である。本邦での報告は渉獵の範囲で認めない。

多くはミスセンス変異の報告であるが、本例同様に intron11 内の変異報告もある(Kathrin M, et al. JNNP, 2018). 本解析では患者後頭葉組織でスプライシング変異が生じている事を確認した(図3). スプライシングは組織特異性が高く、血液検体などでは病態の証明が困難なこともある。本検討は中枢神経組織を用いての検討が可能であり、さらに臨床情報も同時に得られている。これらは剖検組織を用いての実験の大きな利点である。

#### **E. 結論**

病理学的に裏付けのある ALS 症例において遺伝子変異が同定され、臨床的特徴、病理学的特徴と関連付けて解析が行われることは今後の ALS 病態生理、治療法の解明に有用である。さらに網羅的なエクソーム解析を実施したことにより、今後あらたな ALS 原因遺伝子が同定された場合にも、速やかに確認を行う事が可能である。引き続き、症例数を増やし、本邦における ALS の原因遺伝子の同定およびその機能解析を進めていく。

#### **F. 健康危険情報**

特になし。

#### **G. 研究発表**

##### **1. 論文発表**

なし

##### **2. 学会発表**

なし

#### **H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)**

##### **1. 特許取得**

##### **2. 実用新案登録**

##### **3. その他**

特になし。