

## 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>,

畠野 雄也<sup>1)</sup>, 石原 智彦<sup>1)</sup>, 他田 真理<sup>2)</sup>, 柿田 明美<sup>2)</sup>,

1) 新潟大学脳研究所神経内科, 2) 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難治性運動神経変性疾患である。運動症状の進行を停止・改善させうる治療法は開発されていない。ALS の原因遺伝子は 30 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。

我々は当施設の保有する ALS 剖検脳組織 140 例より DNA を抽出し、網羅的解析 (エクソーム解析) を実施し、うち 9 例で新規変異を含む 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。見出された新規変異蛋白質の凝集性検討、細胞内分布評価を進めている。また複数例で見出された予後影響遺伝子変異候補についても評価を進めていく。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実用化されている。

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 30 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 140 例の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。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 1) に

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	ARHGFB28	ALS2	SPG11	EWSR1	TAF15
SIGMAR1	ANXA11	DAO	ERBB4	MAPT	TIA1	GLE1	PRPH

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ミスセンス変異、フレ

ームシフト変異, スプライシング異常を来す変異, ストップコドンを生じるナンセンス変異を対象とした . 遺伝子変異データベース ,HGVD および ExAC EAS/All 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

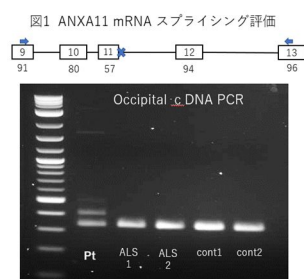
解析対象とした全 140 例について, Exsome 解析を実施した . 約 60 Mb の標的領域において, 標的領域における推定リード数は平均 1336101, 標的領域の推定平均リード depth は  $\times 104.7$ , 40 倍以上の depth でシークエンスされた割合は平均 82.1% であった

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), *ANXA11* 変異例 1 例 (intron 変異) および既知の *SQSTM1* ミスセンス変異 1 例を認めた .

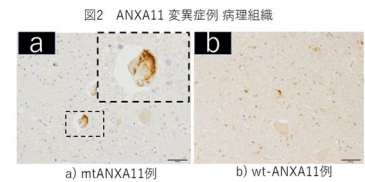
上記のうち *ANXA11* 変異は 57 歳発症, 全経過 1 年 7 か月の孤発性 ALS 症例で見出された .

c.1086+1G>A 変異で intron 11 冒頭の変異である . 当該症例の後頭葉剖検組織から mRNA を抽出し, 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を確認した (図 1) .

さらに同症例の脳



皮質剖検組織において, *ANXA11* 陽性の skein 様封入体を多数認めている (図 2) . 本変異



の発現ベクターを作成し, 培養細胞発現時の凝集性, 細胞局在変化を確認している .

2) Possible Pathogenic mutation として *OPTN* ( 2 例), *CHMP2B*, *MART3* および *CCNF* 遺伝子変異例 (いずれもミスセンス変異) を認めた .

3) 本研究では, probable/possible 変異の定義を満たさない遺伝子変異を複数症例で認めている . 2 症例では *FUS* 遺伝子変異が見出されたが, 病理組織は TDP-43 封入体を認め, *FUS* 陽性封入体は認めなかったことから, 病原的意義の無い変異と判断した .

4) Probable/Possible 変異を有する 9 症例の平均罹病期間は 23.4 カ月であり, ALS 関連遺伝子 ( Probable/Possible 以外も含む) 変異を有さない 103 症例 (平均 41.9 カ月) と比して有意に予後不良であった . さらに 9 症例にて遺伝子 X の同一 exon 内変異をみとめ, これらの症例は平均罹病期間 13.9 カ月とさらに予後不良であった .

### D. 考察

本解析では 140 例中 9 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 (Tohnai G. et al. Neurobiol Aging, 2018), それを裏付ける結果であった .

*ANXA11* はこの数年報告が増えている遺伝子である . 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ことを確認した (図 1) . 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(図2)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。

また140例中2例で*FUS*ミスセンス変異症例が見出された。血液由来のDNAを用いた通常のエクソーム解析では、病的意義を伴う変異と判断されうる。しかし、いずれも病理学的に*FUS*陽性封入体を伴わず、病原的意義の無い変異と判断しえた。これも病理組織に由来する本研究の利点を示すといえる。

#### 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

- 1) Y.Haatano et al. A novel splicing variant of *ANXA11* in Japanese sporadic ALS patients. (2019) 30th International Symposium on ALS/MND (パーズ)
- 2) T.Ishihara et al. Exome analysis in 54 autopsied Japanese sporadic ALS patients.. (2019) 30th International Symposium on ALS/MND (パーズ)

#### 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。