

## 運動神経変性疾患の遺伝的背景に関する研究

小野寺 理<sup>1)</sup>，

石原 智彦<sup>1)</sup>，畠野 雄也<sup>1)</sup>，他田 真理<sup>2)</sup>，柿田 明美<sup>2)</sup>，熱田 直樹<sup>3)</sup>，祖父江 元<sup>3)</sup>

1) 新潟大学脳研究所神経内科，2) 同 病理学分野，3) 名古屋大学

### 研究要旨

本研究は運動神経変性疾患の遺伝的背景解明を目的とする。初年度は脊髄性筋萎縮症（SMA）の原因遺伝子 *Survival motor neuron: SMN1* の欠損および *SMN2* の copy number status (CNS) 研究を行った。本邦の ALS 遺伝子データバンク JaCALS および、当施設保有の遺伝子検体を用いて、SMN 遺伝子 CNS 解析を行い、ALS における SMN 遺伝子 CNS の影響を見出した。2年度、最終年度は筋萎縮性側索硬化症（ALS）の遺伝的背景研究を行った。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。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

本邦での代表的な運動神経変性疾患（MND）として、成人発症の筋萎縮性側索硬化症（ALS）および小児発症の脊髄性筋萎縮症（SMA）がある。本研究はこれらの疾患の遺伝的因子の解析を進め、臨床に反映させることを目的とする。

1) SMA は小児発症の MND であり、原因遺伝子である SMN 遺伝子の copy 数多型 (CNS) により規定される。相同遺伝子 *SMN1* の欠損が SMA の原因となり、*SMN2* の copy 数が発症年齢、重症度を規定する。本疾患については核酸治療薬による画期的な治療法が実用化されている。この SMN 遺伝子 CNS が他の MND に与える影響を明らかにする事を、本研究の目的の一つとした。

2) ALS は成人発症の代表的な MND である。全身の上位下位運動神経の変性により、3-5 年で不幸な転機をたどる。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。90% の ALS は孤発性に発症するが、10% では家族内発

症がみられ、原因遺伝子が明らかになる例も多い。ALS 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した。

### B. 研究方法

1) Droplet digital PCR (ddPCR) を用いた *SMN1,2* 遺伝子の CNS 測定方法を確立した。さらに本邦の ALS データバンク JaCALS および当施設保有遺伝子検体から ALS 501 例、PMA 50 例、コントロール 399 例の解析を行った。

2) 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 1) 2) とともに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

### 1) SMN CNS の検討

*SMN1* が 0 copy の症例は control 群, ALS 群とも 0 例であり, SMA 症例は見出されなかった. また *SMN1* を 1 copy のみ持つ例, 即ち SMA キャリアの割合は, コントロール群では 1.3% で, ALS 群でも 1.2% と同等であった. SMA I 型の罹患率は出生 2 万人に対して 1 人前後, II 型の罹患率は 10 万人あたり 1~2 人とされている (難病情報センター HP). 本研究はこの発症頻度と矛盾しない結果であった.

*SMN2* CNS の検討では, ALS コントロール群に統計学的に有意な差異を認めた. *SMN2* 遺伝子を 1 copy のみ有する例は, ALS 診断群で 191/501 例 (38.1%), コントロール群では 123/399 例 (30.8%) であり, ALS 群で有意に多く認められた (オッズ比 ALS 1.38 : 1.04-

1.81,  $p < 0.05$ ).

### 2) ALS 剖検例 エクソーム解析

解析対象とした全 140 例について, Exsome 解析を実施した. 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). さらに同症例の大脳皮質剖検組織において, *ANXA11* 陽性の skein

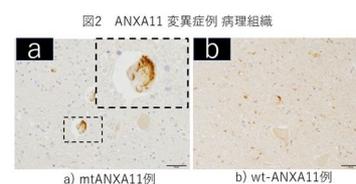
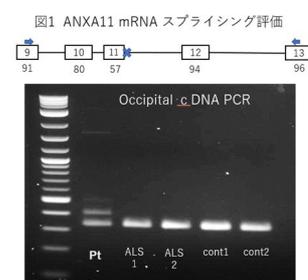
様封入体を多数認めている (図 2). 本変異の発現ベクターを作

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. 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.

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.

## D. 考察

1) 今回の検討では ALS 診断群には, *SMN1* 欠損例, すなわち SMA 症例は存在しなかった. SMA



成人例は ALS と比較して、稀な疾患と考えられる。診断の確定は遺伝子検査にてなされるが、効率的な検査のために SMA 成人例の臨床的な特徴を解析する必要がある。

一方で ALS・PMA 群では対照群と比して、*SMN2* 遺伝子コピー数の減少が有意に多く認められ、発症のリスクファクターであることが示唆された。*SMN* CNS と ALS 発症については、海外からも複数の報告があるが相反する結果となっている (Wang, J Neurol Sci, 2015)。これは、*SMN* CNS の地域差が存在することや (Sangare, Ann Neurol, 2014), *SMN* 以外の ALS の原因遺伝子の頻度が地域によって異なるため (Majounie E. Lancet Neurol 2012) と考えられる。この結果について論文投稿を進めている。

2) 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り、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 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、臨床の特徴、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) T.Ishihara et al. The *SMN2* gene copy number states can affect the onset risk and survival time in Japanese ALS. (2019) 28th International Symposium on ALS/MND (ポス トン)

2) Y.Haatanen et al. A novel splicing variant of *ANXA11* in Japanese sporadic ALS patients. (2019) 30th International Symposium on ALS/MND (パース)

3) T.Ishihara et al. Exome analysis in 54 autopsied Japanese sporadic ALS patients.. (2019) 30th International Symposium on ALS/MND (パース)

## 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。