

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19485

研究課題名(和文) 候補遺伝子の網羅的シーケンスによる孤発性ALS病態関連遺伝子の同定

研究課題名(英文) Comprehensive genetic analysis of ALS-related genes in Japanese sporadic ALS patients

研究代表者

中村 亮一 (NAKAMURA, Ryoichi)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80723030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療法開発には病態関連分子の同定が重要であるが、大部分を占める孤発性ALSの病態関連遺伝子は十分に解明されていない。本研究ではALS患者コホートで収集した多数の孤発性ALS患者のDNAを次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析を施行し、3.0%に既知の遺伝子変異を、6.8%に新規の病原性が疑われる遺伝子多型を認め、ALS疾患関連遺伝子の遺伝子多型は孤発性ALSにも重要な役割を果たしていると考えられた。また、遺伝子変異の頻度を欧米と比較し、C9orf72変異の頻度が低く、SOD1変異の頻度が高いことが判明し、日本のALSでは欧米と遺伝的背景が異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the frequency and contribution of variants of the 28 known amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related genes in Japanese ALS patients, we designed a multiplex, PCR-based primer panel to amplify the coding regions of the 28 ALS-related genes and sequenced DNA samples from Japanese sporadic ALS patients using an Ion Torrent PGM sequencer. We identified the known ALS pathogenic variants and predicted the functional properties of novel non-synonymous variants in silico. These variants were confirmed by Sanger sequencing. Known pathogenic variants were identified 14 (3.0%) of the 469 sporadic ALS patients. Thirty-two sporadic ALS patients (6.8%) harbored one or two novel non-synonymous variants of ALS-related genes that might be deleterious. This study reports the first extensive genetic screening of Japanese ALS patients. These findings are useful for developing genetic screening and counseling strategies for such patients.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ALS 次世代シーケンサー 網羅的遺伝子解析 遺伝子変異 分子疫学

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は代表的な神経難病であり、根治的治療法は存在しない。その病態解明と治療法開発は喫緊の課題であるが、そのためには、ALSにおける病態関連分子の同定が重要である。ALS患者の5-10%程度は家族性であるが、近年家族性ALSの遺伝子研究に著しい進展がみられ、20種をこえる原因遺伝子が同定されている。しかしながら、大部分を占める孤発性ALSの病態関連遺伝子は十分に解明されていない。これまでに多数例の孤発性ALS患者と正常コントロールのDNA検体に対して一塩基多型(SNPs)を用いたゲノムワイド関連解析(GWAS)により、孤発性ALS関連遺伝子多型は複数報告されているが、いずれもオッズ比は1.3前後であり、国や民族の違いにより再現性が得られないなど、病態解析に進むには困難がある。そこで一般人口では稀ではあるが、孤発性ALS患者で数倍以上の頻度で見られる病態寄与度の高い変異(rare variants)が重要であると考えられている。また、孤発性ALSと認識されている患者の中に、家族性ALSの遺伝子変異を有する例が一部で存在することが知られているが、我が国では、これらの遺伝子についての網羅的な解析は行われておらず、遺伝子変異の頻度は十分に明らかにされていない。

名古屋大学神経内科が事務局となり構築された多施設共同のALS患者コホートであるJapanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS)においては、多数のALS患者遺伝子とコントロール遺伝子が蓄積され、合わせて前向きALS患者臨床情報が収集、蓄積されている。名古屋大学神経内科では次世代シーケンサーを導入し、多数のALS患者のDNA検体に対してALS疾患関連遺伝子の網羅的シーケンスを行うシステムが構築されている。

2. 研究の目的

(1) 20種以上の既知のALS関連遺伝子の配列を決定し、わが国の孤発性ALS患者における既知のALS疾患関連遺伝子変異の頻度を明らかにする。

(2) 正常コントロール検体について同様の遺伝子配列決定を行い、発症を決定する遺伝子変異のみならず、発症リスクを数倍上げるようなリスクとなっている遺伝子変異(rare variants)を探索する。

(3) 遺伝子解析データと前向き臨床データを比較検討する事によって、病型、発症年齢、進行速度などの臨床像に影響する遺伝子多型、遺伝子変異を検索する。

3. 研究の方法

SOD1, ALS2, SETX, SPG11, FUS, VAPB, ANG, TARDBP, FIG4, OPTN, VCP, UBQLN2, SIGMAR1, DAO, NEFH, DCTN1, TAF15, EWSR1, PRPH, GRN, CHMP2B, ZNF512B, PFN1, ATXN2, TFG, C9orf72, RNF19A, SQSTM1、以上の28のALS疾患関連遺伝子を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析するシステムを構築しており、これを活用する。上記遺伝子群のエクソン領域をmultiplex PCRで増幅し、Ion PGM™シーケンサーを用いて配列解析を行った。また、SureSelectターゲットエンリッチシステムを用いて、Exome解析を行っているALS患者もあり、上述の28のALS疾患関連遺伝子のエクソン領域に絞ってvariantを抽出した。得られたvariantからアミノ酸置換を伴うvariantを抽出し、dbSNPやExAC, HGMDなどのデータベースと比較し、既知の遺伝子変異、ALS発症には無関係と判明しているもの、またそのどちらでもないものに分類した。さらにPolyPhen-2やSIFTを用いて病原性を予測した。

4. 研究成果

(1) JaCALS に登録された孤発性 ALS 469 例、家族性 ALS 39 例、正常コントロール 191 例を解析対象として日本人 ALS 患者における既知の ALS 疾患関連遺伝子変異の頻度を解析したところ、孤発性 ALS の 3.0% にあたる 14 例と家族性 ALS の 48.7% にあたる 19 例に既知の遺伝子変異を同定した (図 1、図 2)。

図 1. 孤発性 ALS における既知の遺伝子変異の割合

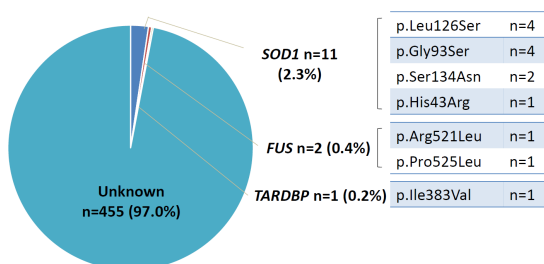
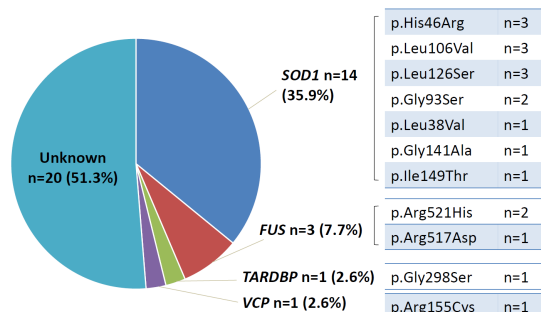


図 2. 家族性 ALS における既知の遺伝子変異の割合



ALS の遺伝子変異の頻度は孤発例、家族例とも SOD1 遺伝子変異の頻度が最も多く、2 番目に FUS 遺伝子変異の頻度が多かった。SOD1 遺伝子変異のうち、現在までに日本からの報告が多い p.Leu126Ser 変異や p.Gly93Ser 変異、p.His46Arg 変異を多く認め、これらの変異陽性者は下肢発症で下位運動ニューロン徴候が主体で緩徐進行性の経過をたどるといった共通した臨床症状を認めた。欧米人で孤発性 ALS、家族性 ALS において最も頻度の高い C9ORF72 遺伝子の 6 塩基リピートの異常伸長は日本では稀であり、ALS の遺伝的背景には人種差があることが示唆された (図 3、図 4)。

図 3. 日本と欧米の孤発性 ALS における既知の遺伝子変異の割合

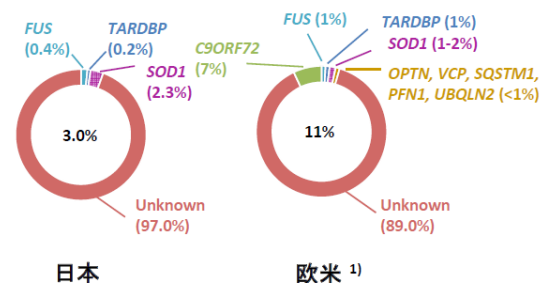
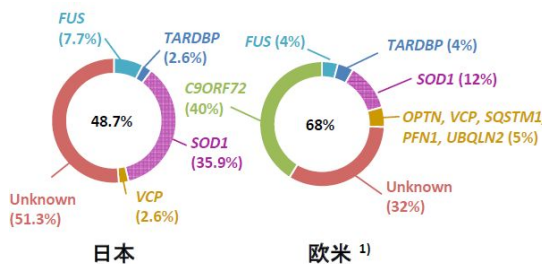


図 4. 日本と欧米の家族性 ALS における既知の遺伝子変異の割合



(2) 次世代シーケンサーによる遺伝子解析で得られた variant のうち正常コントロールや、dbSNP や HGVD、1000 genome など既存のデータベースに存在せず、PolyPhen-2 や SIFT といったアミノ酸変異の病原性予測ソフトウェアを用いて病原性が疑われる variant を抽出したところ、孤発性 ALS の 6.8% にあたる 32 例と家族性 ALS の 15.4% にあたる 6 例に新規の病原性が疑われる variant を認めた。これらの variant は単独で ALS を発症させる新規の遺伝子変異の可能性、単独では ALS を発症させないが、ALS の発症に寄与する rare variant の可能性などが考えられ、ALS 疾患関連遺伝子の variant は孤発性 ALS にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3) 臨床像と遺伝子多型、遺伝子変異の関連を探索するために追加で遺伝子解析を施行し、孤発性 ALS 589 例の遺伝子解析データと臨床像を比較した。

40 歳未満で発症した 29 例のうち 5 例 (17.2%) で FUS 遺伝子変異を、1 例 (3.4%)

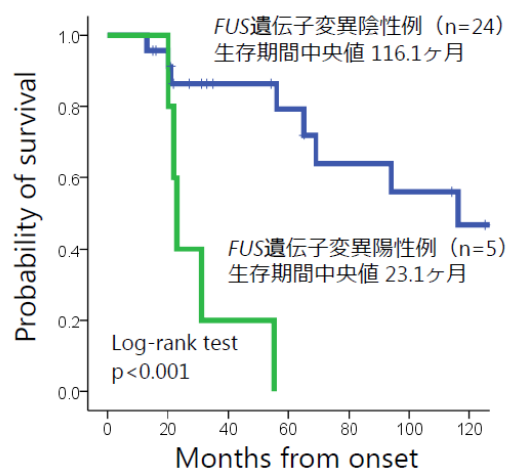
で *TARDBP* 遺伝子変異を認めた。40 歳代で発症した 66 例のうち 6 例 (9.1%) で *SOD1* の遺伝子変異を認めた。50 歳代で発症した 143 例では 6 例 (4.2%) で *SOD1* の遺伝子変異を認め、発症年齢が上昇するほど、遺伝子変異の割合が減少する傾向にあった(図 5)。

図 5. 発症年齢毎の既知の遺伝子変異の割合

| Age at Onset | N | <i>SOD1</i> | <i>FUS</i> | <i>TARDBP</i> | Total | Frequency (%) |
|--------------|-----|-------------|------------|---------------|-------|---------------|
| <40 | 29 | - | 5 | 1 | 6 | 20.7 |
| 40-50 | 66 | 6 | - | - | 6 | 9.1 |
| 50-60 | 143 | 6 | - | - | 6 | 4.2 |
| 60-70 | 224 | 2 | - | 1 | 3 | 1.3 |
| 70< | 127 | 1 | - | - | 1 | 0.8 |

40 歳未満発症症例において *FUS* 遺伝子変異陽性例の割合が高く、比較的進行の早い症例が多かったことから、死亡または人工呼吸器導入をエンドポイントとして生存解析を行うと、*FUS* 遺伝子変異陽性例は陰性例と比較して有意にエンドポイントまでの期間が短かった(図 6)。若年発症例で急速に進行する症例の場合、孤発例であっても *FUS* 遺伝子変異が存在する可能性がある。

図 6. 40 歳未満発症例における生存曲線



<引用文献>

1) Renton AE, Chio A, Traynor BJ. State

of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat Neurosci* 2014; 17: 17-23.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Masuda M, Senda J, Watanabe H, Bagarinao E, Tanaka Y, Imai K, Riku Y, Li Y, Nakamura R, Ito M, Ishigaki S, Atsuta N, Koike H, Katsuno M, Hattori N, Naganawa S, Sobue G.

Involvement of the caudate nucleus head and its networks in sporadic amyotrophic lateral sclerosis – frontotemporal dementia continuum. ***Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.*** 17:571-9, 2016. DOI:10.1080/21678421.2016.1211151.

査読有

Yokoi D, Atsuta N, Watanabe H, Nakamura R, Hirakawa A, Ito M, Watanabe H, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Oda M, Abe K, Mizoguchi K, Kano O, Kuwabara S, Kaji R, Sobue G, JaCALS.

Age of onset differentially influences the progression of regional dysfunction in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. ***J Neurol.*** 263:1129-36, 2016.

DOI:10.1007/s00415-016-8109-0. 査読有

Watanabe H, Atsuta N, Hirakawa A, Nakamura R, Nakatochi M, Ishigaki S, Iida A, Ikegawa S, Kubo M, Yokoi D, Watanabe H, Ito M, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Kanai K, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Kawata A, Aoki M, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G.

A rapid functional decline type of amyotrophic lateral sclerosis is linked to low expression of TTN. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 87:851-8, 2016.

DOI:10.1136/jnnp-2015-311541 査読有

Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS).

Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging*. 39:219.e1-8, 2016.

DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.030

査読有

Watanabe H, Atsuta N, Nakamura R, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Tomiyama H, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Aoki M, Tsuji S, Nakano I, Kaji R, Sobue G.

Factors affecting longitudinal functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 16:230-6, 2015.

DOI:10.3109/21678421.2014.990036.

査読有

中村亮一、祖父江元

前頭側頭葉変性症と遺伝子変異

臨床精神医学 44 巻 10 号 1393-1402, 2015.

査読無し

Tsuboi T, Watanabe H, Tanaka Y, Ohdake R, Yoneyama N, Hara K, Nakamura R, Watanabe H, Senda J, Atsuta N, Ito M, Hirayama M, Yamamoto M, Fujimoto Y, Kajita Y, Wakabayashi T, Sobue G.

Distinct phenotypes of speech and voice disorders in Parkinson's disease after subthalamic nucleus deep brain stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 86:856-64, 2015. DOI:

10.1136/jnnp-2014-308043. 査読有

中村亮一、熱田直樹、祖父江元

実地医家が活用すべき神経内科疾患の診療の進歩と実際 筋萎縮性側索硬化症 **Medical Practice** 32 巻 6 号 957-961, 2015.

査読無し

〔学会発表〕(計 5 件)

中村亮一、曾根淳、熱田直樹、藤内玄規、横井大知、中朽昌弘、渡辺宏久、伊藤瑞規、勝野雅央、和泉唯信、森田光哉、谷口彰、服部信孝、織田雅也、狩野修、桑原聡、阿部康二、梶龍兒、祖父江元、JaCALS.

孤発性筋萎縮性側索硬化症患者における発症年齢と遺伝学的背景に関する検討

第 57 回日本神経学会学術大会、2016 年 5 月 18 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

中村亮一、曾根淳、中朽昌弘、藤内玄規、勝野雅央、熱田直樹、祖父江元

次世代シーケンサーを用いた ALS 疾患関連遺伝子多型の探索

平成 27 年度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と治療法開発に関する研究班会議、2016 年 3 月 4 日、神戸大学医学部附属病院(兵庫県神戸市)

Ryoichi Nakamura, Jun Sone, Naoki Atsuta, Genki Tohnai, Hazuki Watanabe, Daichi Yokoi, Masahiro Nakatochi, Hirohisa Watanabe, Mizuki Ito, Masahisa Katsuno, Fumiaki Tanaka, Nobutaka Hattori, Yuishin Izumi, Mitsuya Morita, Akira Taniguchi, Koji Abe, Masaya Oda, Koichi Mizoguchi, Ryuji Kaji, Gen Sobue.
Comprehensive genetic screening of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort
26th International Symposium on ALS/MND, Dec. 11, 2015, Orland (USA)

中村亮一、曾根淳、熱田直樹、藤内玄規、中朽昌弘、渡辺はづき、横井大知、渡辺宏久、伊藤瑞規、勝野雅央、田中章景、服部信孝、和泉唯信、森田光哉、谷口彰、阿部康二、織田雅也、溝口功一、梶龍兒、祖父江元
日本における ALS 疾患関連遺伝子の網羅的解析
第 33 回日本神経治療学会、2015 年 11 月 28 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

中村亮一、曾根淳、熱田直樹、中朽昌弘、渡辺はづき、横井大知、藤内玄規、渡辺宏久、伊藤瑞規、田中章景、服部信孝、和泉唯信、森田光哉、谷口彰、阿部康二、織田雅也、溝口功一、梶龍兒、祖父江元、the Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research: JaCALS
Sequencing of the familial ALS causative genes in Japanese ALS patients
第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 21 日、新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 亮一 (NAKAMURA, Ryoichi)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：80723030