

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06526

研究課題名(和文) 網羅的解析で家族性ALSに見出した新規遺伝子変異の病原性解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenicity of novel gene mutations detected through comprehensive genetic analysis in familial ALS

研究代表者

西山 亜由美 (Nishiyama, Ayumi)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：50805413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、原因未解明の筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)家系に新たに見出した遺伝子変異の病原性を検証し、検証された病原性がもたらす運動ニューロンの変性機構を解明することを目的とする。継続して集積した日本人家族性ALS家系(全134家系)において、次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析を行い、集積した全家系のおよそ半数に既知変異を同定した。原因遺伝子未解明の家系において、新たな候補遺伝子変異を複数見出しており、その病原性を検証している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1991年より有数規模の日本人・家族性ALSサンプルを収集し、続々と追加試料を得て研究対象を集積している。また、次世代シーケンサーとバイオインフォマティクス技術を駆使して、多検体を効率的に解析する体制を確立している。本研究は、単なる遺伝子解析にとどまらず、創薬に活用できるALS細胞モデル作出にもつながり、新しい変性機構の解明によって、広く神経変性疾患の病態解明と治療法開発に波及効果をもち得る。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to reveal the pathogenicity of gene mutations detected in familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and the underlying mechanism of selective motor neuron degeneration. We performed comprehensive genetic analysis using next-generation sequencer in a consecutive series of 134 Japanese familial ALS pedigrees. We identified known mutations in approximately half of all cases. In the remaining genetically unidentified cases, we have found novel candidate mutations and perform validation of their significance.

研究分野：神経変性

キーワード：遺伝子 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は本邦で約 1 万人、運動ニューロンが系統的に変性・脱落してゆく成人発症の神経変性疾患である。数年で全身の骨格筋萎縮と筋力低下が進み、ついには呼吸筋麻痺となる致死性疾患でありながら、病態解明は不十分で根本的治療法がない。ALS 全体の 5-10% を占める家族性 ALS において初めて銅/亜鉛スーパーオキシド・ジスムターゼ遺伝子 (*SOD1*) 変異が発見されて以来 (Rosen ら, 1993; Aoki ら, 1993)、2006 年に *FUS*、2008 年に *TARDBP* といった原因遺伝子が家族性 ALS に同定されてきた。近年、次世代シーケンサー開発に伴い二十以上の原因遺伝子が続々と報告されている。

このように病因解明が家族性 ALS から病態関連分子を見出すアプローチで進む中、本研究代表者らは遺伝性 ALS が疑われる日本人家系を国内でも有数の 111 家系収集し、直接塩基配列決定法により 32% に *SOD1* 変異、11% に *FUS* 変異を同定し報告してきた⁽²⁾。さらに最近、ALS および他の運動ニューロン疾患関連 35 遺伝子を標的とした網羅的解析を加え、全体の約半数の家系に原因遺伝子を明らかにした⁽¹⁾。この結果を既報と比較することで、欧米人・家族性 ALS 家系では 30% 近くに見出される *C9ORF72* 遺伝子の反復配列異常伸長が自験家系には存在しないといった、欧米人とは異なる日本人 ALS の遺伝学的背景を明瞭に示した⁽¹⁾。このような現状において、原因未解明の日本人・家族性 ALS に遺伝子解析をおこない、新たな ALS 原因遺伝子変異を発見すれば ALS 病態のさらなる解明につながる可能性がきわめて高い。残る半数の自験家系では未だ原因遺伝子変異が解明されておらず、その中には 111 家系の 16% に見出された病原性未確定の候補遺伝子変異 (variants of unknown significance, VUS) が病的意義をもつ可能性と、未知の ALS 原因遺伝子に変異が存在する可能性がある。しかし、ALS 候補遺伝子変異の病原性検証には下記の課題がある：

- (1) 主に 60 歳代発症、平均罹病期間 3~5 年の致死性疾患であるため、診断時に複数の同一家系構成員から罹患者 DNA 試料を得ることが困難
- (2) 遺伝子型が同じ家系内でも表現型に多様性がみられる他、浸透率が低い場合もある
- (3) (1)・(2)のため、同一家系内での伝播性証明が困難

そこで、候補遺伝子変異の機能解析システムが重要となるが、従来の不死化培養細胞株への強制発現など過剰発現系のみでは、ヒト運動ニューロンの選択的変性機構にせまるには不十分である。実際、*FUS* や *TARDBP* は RNA 結合蛋白をコードし、野生型でもタンパク量増大によって病的表現型を示してしまうことが知られている。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究では、家族性 ALS における網羅的遺伝子解析研究の推進と、新規候補遺伝子変異の ALS 病原性を検証し得る病原性検証システムの開発をおこなう。さらに、検証された病原性がもたらす ALS 運動ニューロンの選択的変性機構を解明する。

【具体的な目的】

全国から集積した日本人・家族性 ALS 家系 (111 家系) に新規家系を加え、(1) 原因未解明の約半数に全エクソン解析を実施、(2) バイオインフォマティクスにより新たな候補遺伝子変異を抽出、(3) それらを培養細胞株、あるいは iPS 細胞より分化誘導したヒト運動ニューロンに導入して細胞形質を解析する。この病原性検証プラットフォーム確立により、新たな ALS 発症メカニズムの解明と治療標的の発見をめざす。

3. 研究の方法

本研究では以下を計画した：

(1) 日本人/家族性 ALS 家系 DNA 試料の継続的収集，(2) ターゲットリシーケンス解析による既知 ALS 関連遺伝子のスクリーニング，および 全エクソン（エクソーム）解析による既知・未知の候補遺伝子変異の探索，(3) パイオインフォマティクス解析による新規候補遺伝子変異の絞り込み，(4) 病原性検証システムとしての培養細胞アッセイ系の確立。

(1) 日本人・家族性 ALS 家系 DNA 試料の継続的収集

試料収集を継続し、家系内のできる限り多くの罹患者、非罹患者も含めサンプル収集をおこない、臨床的特徴を抽出、正確な家系図から遺伝形式を推定する。

(2) ターゲットリシーケンス解析およびエクソーム解析

ALS 関連遺伝子スクリーニングパネルを随時更新し、新規家系ではまず HaloPlex target enrichment system で DNA からライブラリー作製後、既知変異スクリーニングを行う。次世代シーケンサー（MiSeq）を用いてシーケンスを行い、パイオインフォマティクスにより得られた塩基配列のマッピング、パリアントコール、パリアントに対する情報付与を行う。既知変異の有無は遺伝性疾患における遺伝子変異のデータベース（Human Gene Mutation Database, HGMD）を検索する。上記スクリーニングで変異が未同定の家系ではエクソーム解析を行う。ライブラリー作製は全エクソン翻訳領域を網羅的にカバーする SureSelect Human All Exon kit を用いエクソン領域抽出後、次世代シーケンサー（HiSeq 2500 platform）でシーケンスを行い、パイオインフォマティクス解析を加える。本邦では稀であるが、*C9ORF72* 非翻訳領域における ALS 関連変異（GGGGCC 反復配列異常伸長）の有無は repeat-primed PCR 法で明らかにする。

(3) 新規候補遺伝子変異の絞り込み

エクソーム解析より得たシーケンスデータで重複・欠失解析を行う。多検体での比較検討、表現型、各種データベースのアレル頻度や機能的変化予測、相互作用・関連分子機構に基づくソフトウェア、Exomiser（Smedley ら, 2015）を用い絞り込むことで、罹患者共通の新規候補遺伝子変異を抽出する。大規模家系で複数検体収集可能な場合には連鎖解析により変異遺伝子座位を照合し、家系内で疾患に連動して伝播することを確認し、最終的にサンガーシーケンスで同定する。

(4) 新規候補遺伝子変異の抽出と機能解析法の確立

部位特異的変異導入にて変異プラスミドを作成、competent cell に形質転換し目的の変異置換を確認後、クローニングサイトを制限酵素処理し、発現用プラスミドベクターに挿入する。遺伝子変異体を樹立後、リポフェクションもしくは電気穿孔法により野生型（対照）および変異体を培養細胞に導入する。病原性が高いと想定される新規候補遺伝子変異による運動ニューロン選択的な解明のため、健常ヒト由来 iPS 細胞（*京都大学 iPS 細胞研究所）から胚様体を介し神経幹細胞、運動ニューロン前駆細胞、ついで運動ニューロンへと分化誘導する（Ichiyanagi ら, 2016 を一部改変）。運動ニューロン特異的な *HB9* プロモーター制御下に蛍光蛋白を発現するレポーター遺伝子をレンチウイルスベクターによって導入し、運動ニューロンを純化する。上記プラスミドベクターの導入効率がよくない場合には、*HB9* プロモーター制御下の導入遺伝子組換え体を作製しウイルスベクターにより導入する。過剰発現が問題となる場合には CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集（ノックイン）を計画する。細胞形質（表現型）を解析し、病原性を検証する。

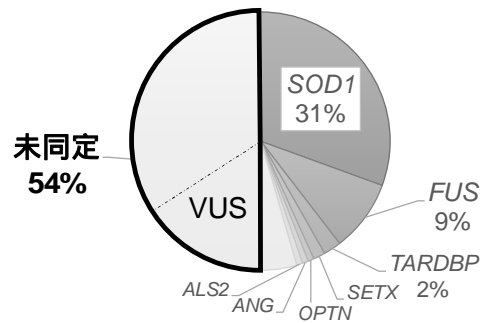
4 . 研究成果

1991年より全国から集積した有数規模の日本人家族性ALS家系(111家系)に、平成29年度に12家系、平成30年度新たに11家系の追加DNA試料を得た。次世代シーケンサーを用いて、全63遺伝子を対象としたターゲットリシーケンス解析を行い、既知変異のスクリーニングを効率的に行った。その結果、新規集積検体のうち6家系で既知変異を同定した。

SOD1遺伝子、TARDBP遺伝子においてこれまで本邦では報告のなかった変異を同定することができた。既知変異を同定した家系においては、その臨床像、表現型の確認を行い、全41家系(31%)に同定したSOD1遺伝子変異の特徴について、国内学会での報告を併せて行った。これまでの解析データを合わせ、集積した全家系のおよそ半数に既知変異を同定することができた(図1)。原因遺伝子変異未解明の家系においては、現時点でその19%に候補遺伝子変異を見出している。

原因遺伝子変異未同定の家系においては、引き続きエクソーム解析を実施し、パイオインフォマティクスを用いて、新たな候補遺伝子変異を抽出し絞り込みを行った。現時点で複数の家系で異なる疾患候補遺伝子変異を見出している。疾患に連動して伝搬する変異であることを確認するため、候補遺伝子変異を有する家系内での遺伝子解析を進めている。また、培養細胞株に候補遺伝子変異を導入した形質の解析を行い、病原性が高いと想定される疾患候補遺伝子変異に対しては、人工多能性幹細胞(iPS細胞)由来運動ニューロンに目的変異を導入した細胞種選択的な病態の解明に取り組み、病原性検証プラットフォームの確立を目指している。

図1. 家族性ALS全134家系



<引用文献>

- (1) Nishiyama A, Niihori T, Warita H, *et al.* Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2017; 53: 194.e1-194.e8.
- (2) Akiyama T, Warita H, Kato M, ... Nishiyama A, *et al.* Genotype-phenotype relationships in familial amyotrophic lateral sclerosis with FUS/TLS mutations in Japan. *Muscle Nerve* 2016; 54(3): 398-404.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

なし

〔学会発表〕(計3件)

西山亜由美、Genotype-phenotype analysis of Japanese familial ALS pedigrees with SOD1 mutations, 第59回日本神経学会学術大会、2018

西山亜由美、Targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis, 日本人類遺伝学会第 62 大会、2017

西山亜由美、TARGETED NEXT-GENERATION SEQUENCING IN JAPANESE FAMILIAL AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS REVEALS DIFFRENCES IN THE GENETIC VARIATIONS ACROSS POPULATIONS, 第 23 回世界神経学会議 (国際学会) 2017

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 なし

○取得状況 なし

〔その他〕

ホームページ等

家族性 ALS の遺伝学的背景の解明

<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/group.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されま

す。