

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16580

研究課題名（和文）遺伝性筋萎縮性側索硬化症の新規原因遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of a novel causative gene for genetic amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

久米 広大（Kodai, Kume）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：20592314

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の2家系のロングリードシーケンサーを用いた遺伝学的解析により、ALSの新規原因遺伝子を同定した。スクリーニングを行い、別の2家系、孤発例2例に同定したバリエーションを見出した。さらに、ロングリードシーケンサーによるシーケンスにより、リピート配列を決定した。DNAメチル化についての解析では、リピート周囲のDNAメチル化に変化を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症の病態については未解明な部分が多くあり、根本的な治療法がないのが現状である。本研究により、新規の原因遺伝子が同定されたことにより、筋萎縮性側索硬化症の新たな分子病態の解明につながる可能性がある。

また、本研究で用いた古典的な遺伝学的手法とロングリードシーケンサーを用いた解析は、他の遺伝性疾患にも応用可能であり、ショートリードシーケンサーでは同定できないバリエーションの同定の成功例として意義がある。

研究成果の概要（英文）：We performed genetic analysis using long-read sequencer for two familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and identified a novel causative gene of ALS. Genetic screening revealed that another two families and two sporadic cases had the variants. Using long-read sequencing, we determined the sequence of repeat. DNA methylation analysis showed no changes of DNA methylation around the repeat.

研究分野：神経遺伝学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 次世代シーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は、運動神経の変性を特徴とする神経変性疾患であり、進行期には四肢の筋力低下により寝たきり状態となり、呼吸筋麻痺のため人工呼吸器が必要となる過酷な疾患である。その有病率は増加傾向であり、高齢化に伴い、今後もさらに増加することが予想される。しかし、その病態の多くが未解明であり、根本治療はない。以上より、ALS の病態の解明、新規治療法の開発は強く望まれている。

1993 年に ALS の原因遺伝子として SOD1 が同定されて以来、これまでに多数の原因遺伝子および感受性遺伝子が同定されてきた (NEFH, SETX, ALS2, DCTN1, VAPB, ANG, CHMP2B, TARDBP, FUS, ELP3, FIG4, C9orf72, SQSTM1, UBQLN2, VCP, OPTN, ATXN2, SPG11, PFN1, HNRNPA1, HNRNPA2B1, CHCHD10, MATR3, TUBA4A, TBK1, C21orf2, NEK1, CCNF)。これらの遺伝子の同定とともに ALS の病態の解明は飛躍的に進んできた。特に、孤発性 ALS で認められる封入体の主要な構成タンパクである TDP-43 をコードする TARDBP の変異の発見は、TDP-43 が ALS 発症の一次的な役割を担うことを明らかにした。また、その他の原因遺伝子である FUS, C9orf72, HNRNPA1, HNRNPA2B1, ELP3, SETX とともに RNA 代謝に関与していることから、ALS の病態に RNA 代謝の異常が関与していることが示唆されている。多くの原因遺伝子が同定され、ALS の病態が明らかになりつつある一方、本邦の ALS の遺伝子スクリーニングの報告では、家族性の ALS で原因遺伝子が同定されたのは約 50% にしかすぎない。まだ未知の ALS 原因遺伝子が多く存在すると考えられる。ALS の新規の原因遺伝子を同定することは、更なる ALS の病態解明および新規治療法の開発にとって重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、同一地域を由来とする顕性遺伝性 ALS の 2 家系を用いて、ALS の新規原因遺伝子の同定することである。予備的検討から、この 2 家系は同祖であり、共通の原因遺伝子を有していると考えられる。また、ハプロタイプ解析による候補領域に既知の原因遺伝子はなく、新規の原因遺伝子である可能性が高い。

本研究の遂行により、ALS の新規原因遺伝子が同定できれば、新たな ALS の病態の解明につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

同一地域で ALS を発症している 2 家系の発症者 7 名および非発症者 4 名である (図 1)。

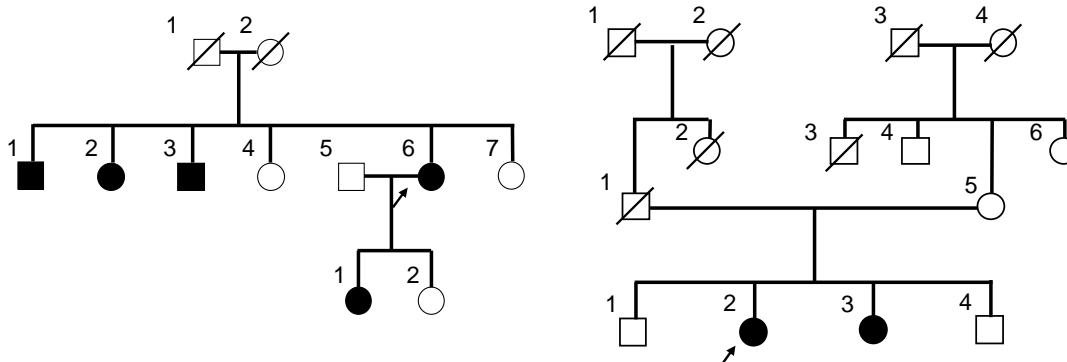


図 1. 研究対象の 2 家系

#### (2) SNP タイピング

約 90 万の SNP を搭載したマイクロアレイ (Affymetrix® Genome-wide Human SNP Array 6.0) を用いて SNP タイピングを行った。

#### (3)連鎖解析

SNP タイピングデータを連鎖解析用ソフトウェア Allegro を用いて解析した。

#### (4)エクソーム解析

ゲノム DNA を超音波で断片化し、SureSelect Human All Exon V6 を用いて、ライブラリを作成し、イルミナシーケンサーでシーケンスを行った。シーケンスデータの解析は、まずデータのクオリティチェックを行い (FastQC)、クオリティが低いリードやアダプタ配列を除去した (Trimmomatic)。次にヒトゲノムリファレンス配列 (hg38) にマッピングし (BWA)、ファイル形式変換 (SAMtools) および重複リードの除去 (Picard) を行った。最後に変異の検出 (GATK)、変異の注釈付け (ANNOVAR) を行った。同定した変異のフィルタリングは、当施設およびオープン

データベースの頻度情報をもとに未知あるいは極めて頻度の少ないもの、発症者に共通するもの、連鎖解析およびハプロタイプ解析で候補領域にあるもの、アミノ酸変化を伴うもの、病原性が高いと予測されるもの (CADD score、MutationTaster、PolyPhen-2、SIFT) を抽出した。

#### (5) 全ゲノム解析

エクソーム解析に加え、Illumina シーケンサーおよびロングリードシーケンサーである MinION を用いて、発症者の全ゲノム解析を行なった。Illumina シーケンサーのデータ解析は、エクソーム解析と同様に行なった。ロングリードシーケンサーのデータ解析は、マッピングを last を用いて行い、リピート伸長の評価には tandem-genotypes を用い、構造バリエーションの評価には、dnarrange、sniffles、svim を用いた。

#### (6) 同定したバリエーションのスクリーニング

当研究室で保有する 1038 名の ALS および 853 名の対照サンプルを用いてスクリーニングを行った。

#### (7) Cas9 によるターゲットシーケンス

同定したリピート伸長について、Cas9 によるリピート配列部のターゲットシーケンスを発端家系内の発症者および非発症者に対して行なった。リピート部のリードを MAFFT を用いてアラインメントし、コンセンサス配列を作成した。また、リピート部周囲の DNA メチル化を guppy と nanopolish を用いて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 原因遺伝子の同定

まず初めにハプロタイプ解析および連鎖解析の結果により候補領域を同定した。そして、エクソーム解析およびショートリードシーケンサーによる全ゲノム解析により、発症者に共通するバリエーションを抽出したが、候補領域に原因を考えられるバリエーションは見出せなかった。

そこで、原因バリエーションは、ショートリードシーケンサーでは同定が困難なリピート伸長や、構造バリエーションである可能性があると考え、ロングリードシーケンサーを用いた全ゲノム解析を行なった。

そして、tandem-genotypes によるリピート伸長の解析により、発症者に共通するリピート伸長を同定した。PCR により家系内の発症者のすべてがリピート伸長を有しており、また、非発症者がリピート伸長を有していないことを確認した (図 2)。

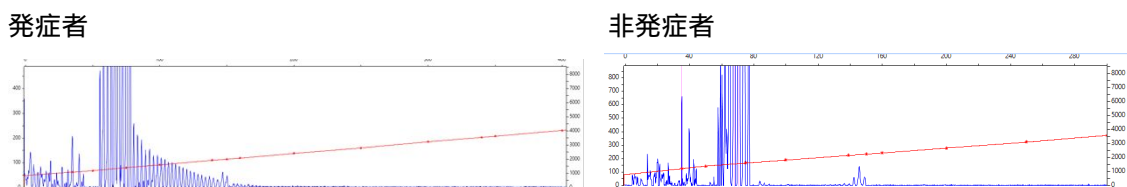


図 2. 家系内の発症者および非発症者の Repeat-primed PCR

#### (2) 同定したバリエーションのスクリーニング

次に同定したリピート伸長を孤発性および家族性 ALS 約 1000 例の検体を用いて、スクリーニングを行なった。そして、家族性の 2 家系および孤発性 2 例にこのリピート伸長を見出した。

#### (3) リピート配列および DNA メチル化の解析

さらに、発端となった家系の発症者、非発症者に対して、Cas9 を用いたリピート部のターゲットシーケンスを行なった。これは目的部位の DNA を Cas9 で切り出し、ロングリードシーケンサーでシーケンスを行う方法であり、PCR が困難であり、エラーが入る可能性が高いリピート配列の決定に有効な方法である。この方法でシーケンスを行い、発症者および非発症者それぞれのリピート配列を決定した。これにより、発症に至るリピート数を知ることができ、また発症者はリピート配列が変化していることを確認した。

また、ロングリードシーケンサーのデータを用いてリピート部周囲のメチル化の変化を解析したが、ALS 患者でメチル化は変化していなかった。

以上のように、家族性 ALS の 2 家系から新規原因遺伝子を同定した。今後はこのリピート伸長がどのような機序で ALS を発症させるのか解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Kodai Kume, Masaki Kamada, Yoshimitsu Shimatani, Tadayuki Takata, Yuishin Izumi, Hideshi Kawakami         | 4. 巻<br>430          |
| 2. 論文標題<br>Novel monoallelic variant in ERLIN2 causes spastic paraplegia converted to amyotrophic lateral sclerosis | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Journal of the Neurological Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>119984 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jns.2021.119984.   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-            |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|