

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07272

研究課題名（和文）ALSのTDP-43病理多型を規定する遺伝的因子の探索

研究課題名（英文）Exploring genetic factors that define TDP-43 pathological polymorphisms in ALS.

研究代表者

石原 智彦（Ishihara, Tomohiko）

新潟大学・脳研究所・特任准教授

研究者番号：70612232

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）：本研究の主目的は神経変性疾患のALS（筋萎縮性側索硬化症：amyotrophic lateral sclerosis）剖検例由来DNAを用いた網羅的遺伝子解析（エクソーム解析）を行い、TDP-43病理多型を規定する因子を見出すことである。3年間の期間中に23症例の病理検体よりDNAを抽出し新規エクソーム解析を実施した。過去解析例約137例を含めた解析にて遺伝子Xの特定エクソン内の変異を9症例にて見出している。これらの9症例は急速進行型の予後不良例（生存期間中央値15カ月）かつ、5例でTDP-Type2a病理を示した。すなわち同変異はALSの病理タイプおよび予後を規定する因子である可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは根治的治療が未開発の進行性運動神経変性疾患である。本邦の症例はおよそ10,000人と推測され、多くの例では3-5年で死亡ないし持続的な人工呼吸器使用が必要となる。一方で本疾患の進行速度は症例により多様であり、急速進行例から10年以上の長期経過例までさまざまである。ALSでは30以上の原因遺伝子が同定されており、遺伝性背景の重要な疾患である。本研究で実施した進行速度に影響しうる遺伝子的背景を解析することは、その病態生理の理解、予後評価、治療法開発に貢献しうるものである。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to perform a comprehensive genetic analysis (exome analysis) using DNA from amyotrophic lateral sclerosis (ALS) autopsy cases to identify factors that define TDP-43 pathological polymorphism. In 3 years of this study period, we performed exome analysis in 23 new cases. In this analysis, including 137 previously analyzed cases, we found mutations in specific exons of gene X in 9 cases. These 9 cases were rapidly progressive with poor prognosis (median survival: 15 months), and 5 cases showed TDP-Type2a pathology. Thus, the mutation may be a determinant of the type of pathology and prognosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ALS TDP-43 エクソーム解析 テキストマイニング

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (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、難治性致死性の運動神経変性疾患であり、多くの症例は発症後5年以内に呼吸不全を来し、不幸な転機をたどる。このことからALSの病態機序に則った根治的治療法開発が望まれている。ALSの特徴として、遺伝的背景が重要であることが知られており、その原因遺伝子はTARDBP、FUS、SOD1、C9orf72など30以上が同定されている。ALSの10%は遺伝性で、孤発性ALSのうち約10%でも遺伝子変異が同定される。この遺伝的要因、すなわち原因遺伝子の生理的機能や変異による影響を解析することは病態解明に寄与する。しかし大多数の孤発性ALSの発症に寄与する遺伝的要因は未同定である。

孤発性ALSは病理学的にはTDP-43蛋白質陽性細胞質内封入体を特徴とする(Ling, SC, Neuron, 2013)。当施設は多数のALS剖検組織を有し、同封入体の中枢神経内分布による病理多型が認知症の有無、生命予後に関与することを見出している(Takeuchi R, Tada M, Acta Neuropathol commun, 2016)。すなわちDP-43蛋白質陽性封入体の中枢神経内分布により、封入体が運動神経領域に限局するType1、側頭葉海馬を含む広範な大脳皮質に分布し高率に認知症が合併するType2(Nishihira Y, Acta Neuropathol, 2008)に分類される。さらにType2病理は側頭葉でthreads状の神経突起の多い2bと少ない2aに分類されることを我々のグループは報告してきた(Takeuchi R, Tada M, Acta Neuropathol commun, 2016)。これらの病型間では、Type1とType2の間では認知症の有無に相異があり(Nishihira Y, Acta Neuropathol, 2008)、Type2bは他病型と比して有意に進行が早く、Type1>2a>2bと予後不良な傾向があった。(Takeuchi R, Tada M, Acta Neuropathol commun, 2016)。これらの病型を決定する因子が特定できれば、ALSのTDP-43病変の広がりを規定する機序の解明、さらには進行を制御する新たな標的分子となる可能性がある。

しかしSALSの病理学的多型を規定する遺伝的要因に注目した研究はされていなかった。そこで申請者は、詳細な病理学的評価がなされている当施設保有の剖検例を対象としたエクソーム解析により、TDP-43病変分布による病理多型を規定する遺伝的因子の解明が可能であると着想した。

2. 研究の目的

本研究は当施設保有のALS剖検例を対象として網羅的遺伝子解析(エクソーム解析)を実施し、見出された変異とTDP-43病理Typeの関連を明らかにすることを目的とする。詳細な臨床歴および病理学的な検討結果を有する剖検組織を使用することで、予後との関連を正確に評価し、実際の患者組織を用いた遺伝子発現、細胞内局在、蛋白凝集性などの機能解析を行うことができる。

3. 研究の方法

1) テキストマイニングによる新規遺伝子変異検索

本研究の解析対象遺伝子として、既知の原因遺伝子に加えてArtificial intelligence(AI)を用いた新規手法で見出した新規候補遺伝子を解析対象とした。これはAIによるテキストマイニングで大量の既存論文を解析し、既存の疾患原因遺伝子との関連性の高い新規候補遺伝子を同定する手法である(Nadine B. Acta Neuropathol. 2018)。われわれのグループも、アルゴリズムfastTextおよびWord2vecを用いたテキストマイニングを実施し、ALSの既知の原因遺伝子

に関連する 163948 論文 (PubMed より引用) を用いた解析で、複数の候補遺伝子同定をすすめている。これら新規候補遺伝子についてエクソーム解析、病理学的検討を行い真に原因遺伝子たりうるかを検討する。

2) 剖検例からの遺伝子網羅的解析

ALS 剖検症例を対象に網羅的遺伝子解析を行う。当研究所病理学分の既保有例および研究開始後の新規剖検症例を対象とする。ゲノム DNA は剖検中枢組織より QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN 社) を用いて採取した。DNA 品質確認、および網羅的解析として illumina NovaSeq 6000 によるエクソーム解析を外注で行った (マクロジェン社)。

3) 見出された遺伝子変異の解析, 病的意義確認 (2022, 2023 年度)

正常対照として Genome Reference Consortium Human Reference 37 (GRCh37) を使用する。同定した遺伝子変異は既報 (Dols L, JNNP. 2018, Richards S, Genet Med, 2015) を参考とし、遺伝子変異データベース (HGVD, ExAC) での変異のアレル頻度 (allele frequency: AF) 、既報の有無、変異の種類を基とした病的意義分類を行う。これらの変異保有例と TDP-43 病理分類との関連を解析する。

4. 研究成果

1) テキストマイニングによる新規遺伝子変異検索

ALS 新規原因遺伝子候補を検索するため、テキストマイニングと Pubmed データベースでの抄録を用いた解析を行い、8 種類の ALS 原因遺伝子候補を選定した。さらに当科 ALS 剖検エクソーム解析例中で、既知原因遺伝子に変異が見出されない 117 例中 10 例で、これらの原因候補遺伝子の変異を認めた。

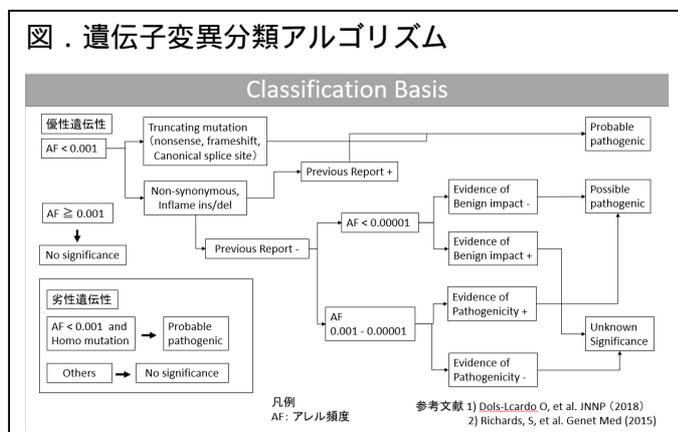
興味深いことに、このうちの 1 つ、遺伝子 A は当施設で 2 症例、別研究機関の家族性 ALS レジストリーにも 1 症例で変異保有例が同定され、うち 1 変異は両グループで共通していた。両グループの症例群に血縁関係は存在しない。このことから遺伝子 A の変異は ALS での病的意義が高いものと想定される。

当施設での同変異例の剖検病理を持ちいた免疫染色を行っている。蛋白質 A は核局在性蛋白質であるが、その局在変化および特徴的な病的凝集体が存在することを見出した。さらに同検体を用いたウェスタンブロットにて、蛋白 A の断片化に特徴的な変化を見出している。本変異群の生存期間は平均的な ALS と同等であり、予後に著明な影響を与えるものではないが、新規遺伝子の同定は ALS の病態機序を解明する上で重要な意義をもつ。これらの結果については、論文投稿を目指し、引き続き研究を続けている。

2) 剖検例からの遺伝子網羅的解析

既存の 137 例に加えて、3 年間で新たに 23 症例の ALS 剖検例エクソーム解析を実施した。このうち 2 症例で事前に定めた分類基準 (右図) にのっとり、Possible pathogenic と分類される既知 ALS 原因遺伝子変異 (ミスセンス変異) をあらたに見出した。1 例は CCFN 遺伝子変異、1 例は

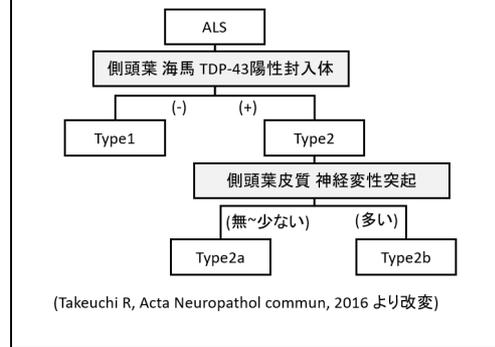
図. 遺伝子変異分類アルゴリズム



DNAJC7 遺伝子変異例であり、いずれも既知のデータベースには記載のない変異であった。

3) 見出された遺伝子変異の解析，病的意義確認
過去解析例約 137 例を含めた解析にて遺伝子 X の特定エクソン内の変異を 9 症例にて見出している。これらの 9 症例は急速進行型の予後不良例（生存期間中央値 15 カ月）かつ、5 例で TDP-43 Type2a 病理（右図）を示した。2 例は Type1 病理、2 例は特定不能であった。一般的に、ALS 症例の多数例は Type1 病理を呈する。すなわち本解析で見出された遺伝子 X 上の変異群は ALS の病理タイプを Type2a に規定し、かつ予後不良因子である可能性がある。

図 封入体の広がりによる病型



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ishihara Tomohiko, Koyama Akihide, Hatano Yuya, Takeuchi Ryoko, Koike Yuka, Kato Taisuke, Tada Mari, Kakita Akiyoshi, Onodera Osamu	4. 巻 178
2. 論文標題 Endogenous human retrovirus-K is not increased in the affected tissues of Japanese ALS patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 78 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2022.01.009	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Hatano Yuya, Ishihara Tomohiko, Onodera Osamu	4. 巻 24
2. 論文標題 Accuracy of a machine learning method based on structural and locational information from AlphaFold2 for predicting the pathogenicity of TARDBP and FUS gene variants in ALS	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12859-023-05338-5	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Sainouchi Makoto, Oginezawa Shinya, Tada Mari, Ishihara Tomohiko, Onodera Osamu, Kakita Akiyoshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Slow disease progression and characteristic TDP 43 inclusions in a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying a <i>TARDBP</i> G357S variant	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neuropathology and Applied Neurobiology	6. 最初と最後の頁 e12966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nan.12966	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomohiko Ishihara
2. 発表標題 MOVA: A method of missense variant pathogenicity using AlphaFold2
3. 学会等名 Human Genetics Asia 2023 (HGA2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	他田 真理 (Tada Mari) (30646394)	新潟大学・脳研究所・准教授 (13101)	

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
---------	---------