

令和 6 年 5 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15724

研究課題名（和文）オートファジー障害による新規ALS発症機序の解明と治療薬の探索

研究課題名（英文）Uncovering ALS mechanisms and drug targets linked to autophagy disturbances

研究代表者

成瀬 紘也（Naruse, Hiroya）

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20898241

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの選択的細胞死により運動機能が失われる代表的な神経難病の一つである。その病態には不明な点が多く現時点で根治療法は見出されていない。本研究では新規のALS関連遺伝子の同定とALS発症メカニズムの解明を目指し、当科で収集した孤発性および家族性ALS症例について、全エクソンシーケンス解析および全ゲノムシーケンス解析などによる網羅的ゲノム解析を実施した。その結果、ALSに関連する新規遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の家族性ALS症例の約4割、孤発性ALS症例の約96%において、ALSの原因遺伝子の病原性バリエーションが見出されておらず、遺伝的病因の解明は引き続き重要な課題である。本研究で今回ALSの新規原因遺伝子の病原性バリエーションを家族性ALSおよび孤発性ALS症例で見出したことは、ALSのさらなる病態解明のためにも重要な知見である。さらに脂質代謝に重要な遺伝子の病原性バリエーションを同定したことから、特定の脂質代謝異常を是正することによりALSの治療が可能になることも期待される。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a representative neurodegenerative disease characterized by the selective cell death of motor neurons, which results in the loss of motor functions. Many aspects of its pathogenesis remain unclear, and no curative treatment has yet been discovered. In this study, we aimed to identify novel genes related to ALS and to elucidate the mechanisms underlying its onset. We conducted comprehensive genomic analyses, including whole-exome sequencing and whole-genome sequencing, on sporadic and familial ALS cases collected by our department. As a result, we identified a novel gene associated with ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症

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。

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, 以下 ALS) は、上位および下位の運動ニューロン (神経細胞) の選択的な変性・脱落から、進行性に全身の筋力低下をきたす、成人発症の神経変性疾患である。その進行は早く、典型的な症例では発症から 2 年から 5 年で呼吸不全から死亡または人工呼吸器装着が必要となる。病態には不明な点が多く、根治療法が見出されていない代表的な神経難病の一つである。一般に ALS 症例の 5-10% は、家系内に患者本人以外にも ALS 発症者がいる、すなわち家族歴のある家族性 ALS (familial ALS, FALS) であるが、残りの大多数は明らかな家族歴のない孤発性 ALS (sporadic ALS, SALS) であるとされる。

SOD1 遺伝子などの ALS に関連する遺伝子と病原性バリエーションの同定とともに、ALS の分子遺伝学的研究は飛躍的に発展してきた。ALS の遺伝的病因の解明は、運動ニューロン変性の病態基盤の理解を深め、ALS の疾患モデルの作成や治療法の開発につながってきた。近年の次世代シーケンサーによる遺伝子解析能力の飛躍的な向上により、40 個以上の ALS の原因遺伝子や疾患感受性遺伝子が同定されている。

我々は全エクソン解析を含む網羅的なゲノム解析情報を駆使して、日本人 ALS のゲノム基盤の解明を進めてきた (Naruse et al. *Neurobiol Aging*, 2018, Naruse et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2019 など)。2020 年度時点で、当科の家族性 ALS の約 61%、孤発性 ALS の約 4% の症例において、ALS の原因遺伝子の病原性バリエーションを同定した。その一方で、日本人の家族性 ALS の約 4 割、孤発性 ALS の大部分の症例において、上記のような網羅的変異解析でも ALS の原因遺伝子の病原性バリエーションの同定には至らず、特に孤発性 ALS の遺伝的病因の解明は十分に進んでいるとは言えない。そして欧米の ALS 集団において最も高頻度に認められる *C9ORF72* 遺伝子の GGGGCC リピート配列の異常伸長変異は、日本人 ALS 集団ではほとんど検出されず、地域的背景によって ALS の遺伝的病因は大きく異なることがわかってきている。ALS の遺伝的病因の解明に基づき新規発症メカニズムを明らかにすることは引き続き喫緊の課題であると同時に、根治療法がない ALS において、その病態に応じた ALS の新規治療法の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、ALS の発症に関わる新規 ALS 関連遺伝子の同定と検出された遺伝子のバリエーションが寄与する具体的な ALS 発症メカニズムの解明を目的とする。ALS 関連遺伝子の同定と病態メカニズムの解明は、病態に基づく ALS 治療薬の開発につながるものである。

ALS は発症後の急性の経過という疾患の重篤性からその生命予後に対する影響が大きく、家系内の複数発症者の遺伝子検体収集が難しい。そのため新規バリエーションの病原性を検討する際に、共分離の確認が困難である。そして新規バリエーションを同定した場合にも、個別に生物学的機能解析を実施し、その病原性を確認することは容易ではないという課題がある。

本研究で我々は、当科で継続して収集した家族性 ALS および孤発性 ALS 症例の分子疫学を明らかにするとともに、典型的な ALS とは異なる特徴的な臨床病型を呈する症例にも着目した。全エクソンシーケンス解析などによる網羅的ゲノム解析情報を駆使し、ALS 関連遺伝子を同定するための遺伝学的解析を実施した。ALS の分子疫学を明らかにし、ALS の新規治療法の確立につなげるための、ALS の病態解明を目指した。

3. 研究の方法

当科で継続的に収集した孤発性 ALS および家族性 ALS 症例の中でも、特に発症後に急性の経過を示す症例や認知機能低下などの複雑な臨床病型を伴う症例、若年発症の症例など、特徴的な臨床病型を呈する症例に着目して、全エクソンシーケンス解析などによる網羅的ゲノム解析を実施した。家族性 ALS 症例では、家系内で複数の発症者や非発症者の検体が得られている家系に注目して解析した。孤発性 ALS 症例では、*de novo* 解析を実施し、同定された新規の遺伝子バリエーションが位置する生物学的パスウェイに着目した解析を組み合わせ、ALS 発症への寄与を検討した。ここで用いた *de novo* 解析は、発症者と非発症の両親を含む親子トリオの全エクソンシーケンス解析データに基づいた遺伝学的解析を行い、発症者のみに認められる *de novo* (新生突然) 変異を検出する手法である。

実際に同定した ALS の新規関連遺伝子とそのバリエーションについて、ALS 発症へ寄与するか、その病原性の詳細な評価を実施した。健常対照者の全エクソンシーケンス解析データや公共データベースのアレル頻度、*in silico* の機能予測、cDNA を用いた機能解析実験、構造解析、脂質分析なども駆使して、バリエーションの病原性を検討した。

さらに本研究では ALS 症例のみにとどまらず、類似した臨床病型を呈する様々な神経変性疾患についても検体を収集し、遺伝学的解析を幅広く実施した。

4 . 研究成果

前頭側頭型認知症 (FTD) の孤発例において、*VCP* 遺伝子の病原性バリエーションを同定し、その臨床症状や画像所見と併せて報告した (Kobayashi and Naruse et al. BMC Neurol. 2022)。ALS と FTD の両疾患は、TDP-43 proteinopathy として同一の疾患スペクトラムとして捉えられており、今回の報告は、ALS および FTD を含む神経変性疾患の病態解明に寄与するものである。

また家族性 ALS の一家系の同胞 2 例で、オートファジーに重要な役割をもつ *TBK1* 遺伝子のスプライス部位に位置する新規ヘテロ接合性変異を同定した。患者由来のリンパ芽球を用いた機能解析実験を行い、合成した cDNA の解析から、変異によるスプライシング異常により変異アレルが NMD (nonsense-mediated mRNA decay) の機序で分解されることを示した。同家系の発症者の一人は ALS を発症する前にパーキンソン症を呈しており、*TBK1* 遺伝子変異による臨床症状は従来考えられていたよりも幅広い可能性が考えられた (in submission)。

遺伝性運動性ニューロパチー (distal hereditary motor neuropathy: dHMN) の一家系の検討で、*HSPB1* 遺伝子の p.Pro39Leu 変異を同胞 2 例に同定し、特徴的な臨床症状と電気生理検査所見を既報告と併せて報告した (Naruse et al. J Peripher Nerv Syst. 2023)。

さらに若年発症の ALS 家系に着目した解析を実施した。ALS と FTD の原因遺伝子として、脂質代謝に重要な *SPTLC2* 遺伝子を同定した。脂質分析により、同遺伝子の変異を有する患者血漿において、スフィンゴ脂質の合成が亢進していることを明らかにした。特定の脂質代謝異常を是正することにより ALS の治療が可能になることが期待される (Naruse et al. Ann Clin Transl Neurol. 2024)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4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 Naruse Hiroya, Ishiura Hiroyuki, Esaki Kayoko, Mitsui Jun, Satake Wataru, Greimel Peter, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 SPTLC2 variants are associated with early onset ALS and FTD due to aberrant sphingolipid synthesis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 946 ~ 957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.52013	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 Naruse Hiroya, Okubo So, Sudo Atsushi, Mitsui Jun, Mikata Takashi, Ishiura Hiroyuki, Morishita Shinichi, Tsuji Shoji, Toda Tatsushi	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical features of a family with late onset distal hereditary motor neuropathy harboring p.Pro39Leu variant of HSPB1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Peripheral Nervous System	6. 最初と最後の頁 518 ~ 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jns.12567	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 Kawamoto Norifumi, Hamada Yuichi, Kobayashi Shunsuke, Naruse Hiroya, Ishiura Hiroyuki, Matsukawa Takashi, Mitsui Jun, Tsuji Shoji, Sonoo Masahiro, Toda Tatsushi	4. 巻 28
2. 論文標題 Noncanonical splice site variant in peripheral myelin protein 22 gene (PMP22) in a patient with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Peripheral Nervous System	6. 最初と最後の頁 513 ~ 517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jns.12558	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 Li Dan, Johmura Yoshikazu, Morimoto Satoru, Doi Miyuki, Nakanishi Keiko, Ozawa Manabu, Tsunekawa Yuji, Inoue-Yamauchi Akane, Naruse Hiroya, Matsukawa Takashi, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 LONRF2 is a protein quality control ubiquitin ligase whose deficiency causes late-onset neurological deficits	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 1001 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-023-00464-4	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 Kobayashi Ryota, Naruse Hiroya, Kawakatsu Shinobu, Iseki Chifumi, Suzuki Yuya, Koyama Shingo, Morioka Daichi, Ishiura Hiroyuki, Mitsui Jun, Ohta Yasuyuki, Tsuji Shoji, Toda Tatsushi, Otani Koichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Valosin-containing protein Asp395Gly mutation in a patient with frontotemporal dementia: a case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Neurology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-022-02951-4	査読の有無 無
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 Yamakawa Kaoru, Nishijima Hironobu, Kubota Akatsuki, Naruse Hiroya, Baba Shintaro, Fujimaki Yoko, Kondo Kenji, Toda Tatsushi, Yamasoba Tatsuya	4. 巻 50
2. 論文標題 Clinical and electrophysiological findings of facial palsy in a case of hereditary gelsolin amyloidosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 305 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2022.02.003	査読の有無 無
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 0件)

1. 発表者名 Hiroya Naruse
2. 発表標題 Genetic analysis and role of rare variants in ALS-causing genes in the Japanese ALS series
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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