

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22129005

研究課題名（和文）パーソナルゲノム解析に基づくALSの疾患関連遺伝子探索と病態解明

研究課題名（英文）Exploration of disease-related genes based on personal genome analysis and elucidation of pathogenesis in ALS

研究代表者

田中 章景 (Tanaka, Fumiaki)

横浜市立大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：30378012

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 39,800,000円

研究成果の概要（和文）：家族性ALSの網羅的遺伝子診断システムを開発し、孤発性ALS 469例について解析を行ったところ、対象とした家族性ALS関連28遺伝子のエクソン領域内で、既知の変異が14例に、新規多型が115個認められた。このうち病原性の疑われる多型は30例で計35個であった。また、孤発性ALS患者、コントロール合わせて800例のエクソームシーケンズを行い、データ解析を進めている。JaCALSの前向き臨床情報とリンクさせることで、進行・予後に関わるSNPsの同定をすすめ、少なくとも2つのSNPsにおいてminor alleleを有する患者が急速に進行することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We developed a comprehensive genetic diagnostic system of the familial ALS including 28 genes related to familial ALS and 469 sporadic ALS samples were analyzed. We identified known mutations in 14 samples and 115 novel polymorphisms or mutations. Among these, 35 mutations in 30 cases were suspected to be disease-causing. We performed exome sequencing of 800 samples including sporadic ALS and control cases and data analysis is ongoing. In addition, we identified at least 2 SNPs related to rapid progression of sporadic ALS by combinational analysis of genetic information and prospective clinical data of Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS).

研究分野：神経内科学

キーワード：ALS 次世代シーケンサー エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、我が国では、ゲノム情報を含めた神経疾患コホートの構築が必ずしも十分に行われているとは言い難い状況であった。この中で、最も過酷な神経難病の1つである ALS について、我々は Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis (JaCALS) という疾患コホートを立ち上げ 300 例以上の患者 DNA、株化細胞、経時的臨床情報を集積していた。主として孤発性 ALS 例のコホートであり、家族性 ALS については十分な例数が集積されているとは言い難い状況であったが、この優れたリソースを基盤とし、ゲノム解析による ALS の疾患関連遺伝子の探索を目指した。

2. 研究の目的

家族性 ALS においては、病因遺伝子未同定の 6 家系のゲノム解析を通じ、新規 ALS 病因遺伝子を同定することを目的とした。一方、病因遺伝子未同定のさらなる家族性 ALS 症例を集積するために SOD1、TDP-43、FUS などを含む 28 種類の既知の ALS 疾患関連遺伝子について、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子診断システムを構築することを目的とした。孤発性 ALS については、case, control についてエクソームシーケンスを行うことで、GWAS では検出しえない発症に関わる multiple rare variants を同定することを旨とした。また、一方で、common variants である SNPs 解析も同時に進め、JaCALS の縦断的臨床情報を活用し、進行・予後に関わる SNPs の同定を進めた。

3. 研究の方法

病因遺伝子未同定の家族性 ALS 6 家系において、患者および非発症者をあわせた 11 名のゲノム解析を平成 22 年度のゲノム支援プロジェクトを利用しエクソーム解析を

行った。

家族性 ALS の網羅的遺伝子診断システム構築においては、Ion AmpliSeq™ Custom Panel を用い、既知の家族性 ALS 病因 28 遺伝子のエクソン部分を増幅するプライマーペアのセットを作成、ライブラリを作成し、Ion One Touch2™ システム、Ion PGM™ シークエンサーを用いて網羅的なゲノム配列解析を行った。

孤発性 ALS の遺伝子解析においては、Agilent 社の SureSelect ターゲットエンリッチシステムを用いて、全エクソン領域のゲノム解析を行うシステムを構築した。得られた遺伝子 Data 解析に関しては、CLCbio 社の CLC GenomicWorkbench ソフトウェアを導入し、得られた遺伝子リード配列をヒト標準配列(hg19)にマッピングし、その後に variant 情報を収集、さらに dbSNP、HGVDなどを始めとするデータベース上の variant 情報との比較検討を行う事によって、新規の SNV を抽出できるシステムを構築し、それらの変異について、Polyphen2, SIFT, CADD にて生理的な機能の与える影響の大きさを検討した。

進行・予後に関わる SNPs の同定については、孤発性 ALS 292 例については、発症から死亡または呼吸器装着までの期間と 70 万個の SNPs およびエクソーム解析で明らかになっている 25 万個の変異との関連を解析した。

4. 研究成果

病因遺伝子未同定の家族性 ALS 6 家系の解析では、家系によって違いはあるが、サンプル数が比較的確保できている家系については病因遺伝子候補を SNV で数十カ所、indel で数カ所まで絞り込んだ。この結果を発展させるべく、家系内のサンプル集積をさらに進めたが、すでに死亡していたり、協力が得られないなどの問題のため、さら

なる絞り込みには至らなかった。

家族性ALSの網羅的遺伝子診断システムを用い、孤発性ALS 469例について解析を行ったところ、スクリーニングを行った28遺伝子のエクソン領域内で、既にALS発症の原因と関連すると報告されている既知のvariant が14例で認められた。内訳は、SOD1 11例、FUS 2例、TARDBP 1例であった。さらに、28遺伝子のエクソン領域内で、dbSNP、HGVDなどのデータベース上に存在しない、新規のvariantについて検討を行い、115個の新規variantを抽出した。さらにPolyPhen2でpossibly or probably damaging またはSIFTでDamagingと判定された病原性の疑われるvariantを抽出し、Sanger sequence法で確認したところ、最終的に30例で計35個のvariantを確認した。内訳は、ALS2 1例、ATXN2 1例、C9ORF72 1例、DAO 1例、DCTN1 5例、FIG4 3例、PRPH 2例、RNF19A 3例、SETX 4例、SPG11 8例、TAF 15 1例、TFG 1例、ZNF512B 4例であった。

孤発性ALS患者の全エクソンシーケンスについては、case, control 合わせて800サンプル弱のエクソームシーケンスを行い、順次データ解析を進めているところである。ヒト標準配列であるhg19と比較し、dbSNP、HGVDなどのデータベース上に存在しない、新規のvariantを抽出し、CADDにて解析を行ったところ、CADD score 20以上を示す強い病原性を持つと推測されるrare variant が8個明らかとなった。

進行・予後に関わるSNPsの同定についてはJaCALSの前向き臨床情報とリンクさせることで、少なくとも2つのSNPsにおいてminor alleleを有する患者は急速に進行することが明らかとなった。さらにこのSNPsのminor alleleを有する患者では当該遺伝子の発現が、患者不死化リンパ球において低下していることも明らかにした。すなわち、この遺伝子が、ALSの進行を規定する

重要な遺伝子として治療ターゲットになりうる可能性があると考えられた。

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20件)

1. Kunii M, Doi H, Higashiyama Y, Kugimoto C, Ueda N, Hirata J, Tomita-Katsumoto A, Kashikura-Kojima M, Kubota S, Taniguchi M, Murayama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N, Tanaka F. A Japanese case of cerebellar ataxia, spastic paraparesis and deep sensory impairment associated with a novel homozygous TTC19 mutation. *J Hum Genet.* 60:187-191, 2015 査読有 doi: 10.1038/jhg.2015.7.
2. Doi H, Ushiyama M, Baba T, Tani K, Shiina M, Ogata K, Miyatake S, Fukuda-Yuzawa Y, Tsuji S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Ikeda S, Tanaka F, Matsumoto N, Yoshida K. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous DDHD2 mutation. *Sci Rep.* 4:7132, 2014 査読有 doi: 10.1038/srep07132.
3. Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba I, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. Neck weakness is a potent prognostic

- factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 84:1365-1371, 2013 査読有
doi: 10.1136/jnnp-2013-306020.
4. Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Iguchi Y, Kobayashi K, Kimata T, Waza M, Tanaka F, Mori I, Sobue G. dnc-1/dynactin 1 knockdown disrupts transport of autophagosomes and induces motor neuron degeneration. *PLoS One*. 8:e54511, 2013 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0054511.
5. Iida A, Takahashi A, Kubo M, Saito S, Hosono N, Ohnishi Y, Kiyotani K, Mushiroda T, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Tsunoda T, Oshima S, Sano M, Kamei T, Tokuda T, Aoki M, Hasegawa K, Mizoguchi K, Morita M, Takahashi Y, Katsuno M, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Kaji R, Nakano I, Kamatani N, Tsuji S, Sobue G, Nakamura Y, Ikegawa S. A functional variant in ZNF512B is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Hum Mol Genet*. 20:3684-3692, 2011 査読有
doi: 10.1093/hmg/ddr268.
6. 田中 章景, 曾根 淳, 熱田 直樹, 中村 亮一, 土井 宏, 児矢野 繁, 祖父江 元. 次世代シーケンサーによる神経変性疾患の解析と展望: ALSのパーソナルゲノム解析. *BRAIN and NERVE* 65: 257-265, 2013 査読無

[学会発表](計 29 件)

1. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno K, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba A, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K,

Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2014.10.18-10.22, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 章景 (TANAKA, Fumiaki)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 30378012

(2)研究分担者

土井 宏 (DOI, Hiroshi)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号 : 10326035

熱田 直樹 (ATSUTA, Naoki)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 90547457

(3)連携研究者

祖父江 元 (SOBUE, Gen)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 20148315