

令和元年5月24日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16116

研究課題名(和文) 孤発性ALSにおける高次機能障害に影響する遺伝要因の同定

研究課題名(英文) Analysis of genes affecting cognitive function in sporadic ALS

研究代表者

中村 亮一 (Nakamura, Ryoichi)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80723030

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)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の患者は約半数に高次脳機能障害を認め、約10-15%は前頭側頭型認知症(FTD)の診断基準を満たし、ALS-FTDと診断されることが分かっている。ALS713例に対して次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析を施行し、TBK1遺伝子変異を9例(1.26%)に認め、一部の症例はALS-FTDと診断されていた。また、3例にVCP遺伝子変異を認めた。3例中の2例は家族に封入体ミオパチーやFTDの患者を認め、残り1例は行動異常を伴い、ALS-FTDと診断されていた。これらの結果から、高次脳機能障害を伴うALSの遺伝的背景としてTBK1やVCP遺伝子変異の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ALS患者の約50%に認知機能障害や遂行機能障害といった高次脳機能障害を認め、ALS患者の10-15%は前頭側頭型認知症(FTD)の診断基準を満たし、ALS-FTDに分類されることが分かっている。また、ALSとFTDは共通の病理基盤を持ち、連続した疾患スペクトラムと考えられている。高次脳機能障害に影響を与える遺伝子は臨床像に影響を与える遺伝子ならびに進行を規定する蛋白の解明につながり、症状の進行を規定する蛋白の解明はその蛋白の働きを阻害する薬剤の開発につながり、孤発性ALSの病態解明、治療薬開発に大きく道を開く可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that about 50% of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have some cognitive impairment, and approximately 10-15% of ALS patients meet the clinical criteria of frontotemporal dementia (FTD) and are diagnosed as ALS-FTD. We performed genetic analysis on 713 ALS patients using a next-generation sequencer. Among the 713 ALS patients, 9 cases (1.26%) harbored a mutation of the TBK1 gene, and some cases with the TBK1 mutation were diagnosed as ALS-FTD. Moreover, other 3 cases harbored a mutation of the VCP gene. Of the 3 cases, 2 cases had inclusion body myopathy or FTD patients in their families. The remaining one had behavioral disturbance and was diagnosed as ALS-FTD. These results suggested that the mutations of the TBK1 and VCP genes are important in the genetic background of ALS with cognitive dysfunction.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 高次脳機能障害 前頭側頭葉変性症 次世代シーケンサー 網羅的解析 ALS
FTD

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(ALS)は代表的な神経難病であり、その病態解明と治療法開発は喫緊の課題である。近年、ALS 患者の約 50%に認知機能障害や遂行機能障害をはじめとする高次脳機能障害を認め、さらに ALS 患者の 10-15%は前頭側頭型認知症(FTD)の診断基準を満たし、ALS-FTD に分類されることがわかっている¹⁾。また、TAR DNA-binding protein 43kDa (TDP-43)が ALS、前頭側頭葉変性症(FTLD)双方において主要な疾患関連蛋白であることがわかり、両疾患は共通の分子病態、病理基盤を持ち、連続した疾患スペクトラム上にあると考えられているが、認知症などの表現型を規定する遺伝的背景は不明である。

ALS 患者の 5-10%程度は家族性であるが、近年家族性 ALS の遺伝子研究に著しい進展がみられ、20 種をこえる原因遺伝子が同定されている。また、*C9orf72*, *VCP*, *CHCHD10*, *SQSTM1*, *TBK1* など同じ遺伝子の変異で同一家系内でも ALS、FTLD およびその両方を呈する遺伝子変異が明らかとなっている。しかしながら、大部分を占める孤発性 ALS の疾患関連遺伝子は十分に解明されておらず、高次脳機能障害との関連も明らかでない。

名古屋大学脳神経内科では 300 例を超える ALS 患者遺伝子と、200 例のコントロール遺伝子、詳細な高次脳機能検査データ、脳画像データ、あわせて前向き ALS 患者臨床情報が収集、蓄積されている。名古屋大学脳神経内科では次世代シーケンサーである Ion PGM[™]シーケンサーを導入し、多数の ALS 患者の DNA 検体に対して ALS 疾患関連遺伝子の網羅的シーケンスを行うシステムが構築されており、それらを活用して解析を行う。

2. 研究の目的

(1) ALS について、既知の ALS および FTLD 疾患関連遺伝子、認知症関連遺伝子の配列を決定し、それらの遺伝子変異がどのような頻度で存在しているかを探索する。

(2) 遺伝子解析データと高次脳機能検査データ、画像データ、前向き臨床データを比較検討する事によって、ALS の高次脳機能に影響する遺伝子多型、遺伝子変異を検索する。

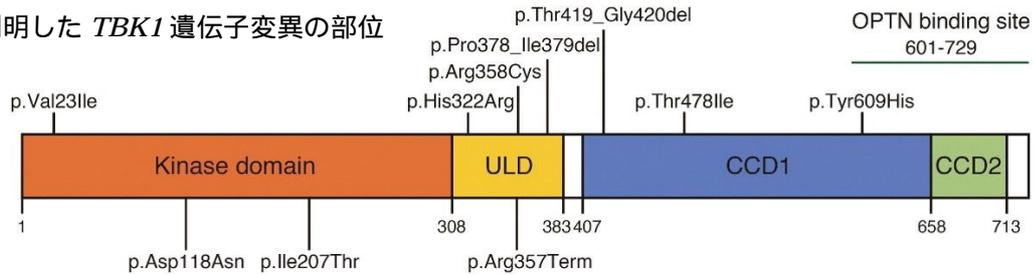
3. 研究の方法

SOD1, *ALS2*, *SETX*, *SPG11*, *FUS*, *VAPB*, *ANG*, *TARDBP*, *FIG4*, *OPTN*, *VCP*, *UBQLN2*, *SIGMAR1*, *DAO*, *NEFH*, *DCTN1*, *TAF15*, *EWSR1*, *PRPH*, *ZNF512B*, *PFN1*, *ATXN2*, *TFG*, *MATR3*, *TUBA4A*, *C9orf72*, *CHCHD10*, *SQSTM1*, *TBK1* など ALS 疾患関連遺伝子に加え、*GRN*, *MAPT*, *CHMP2B*, *TMEM106B* など FTLD 関連遺伝子、*APP*, *PSEN1* など認知症関連遺伝子を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析するシステムを構築しており、これを活用する。Ion AmpliSeq[™] Custom Panel を用いて上記遺伝子群の主にエクソン部分を PCR 増幅する為のプライマーペアのセットを設計し、作成した。これを用いて multiplex PCR を行い、Ion PGM[™]を用いてシーケンス反応を行なった。シーケンサーから得られた配列データを、ヒト標準配列(hg19)を比較検討することにより、標準配列と異なる部分を variant として抽出した。また、SureSelect ターゲットエンリッチシステムを用いて、Exome 解析を行っている ALS 患者もあり、上述の遺伝子のエクソン領域に絞って variant を抽出した。得られた variant からアミノ酸置換を伴う variant を抽出し、dbSNP や ExAC, gnomAD, HGMD などのデータベースと比較し、既知の遺伝子変異、ALS や FTLD の発症には無関係と判明しているもの、またそのどちらでもないものに分類した。さらに PolyPhen-2 や SIFT を用いて病原性を予測した。

4. 研究成果

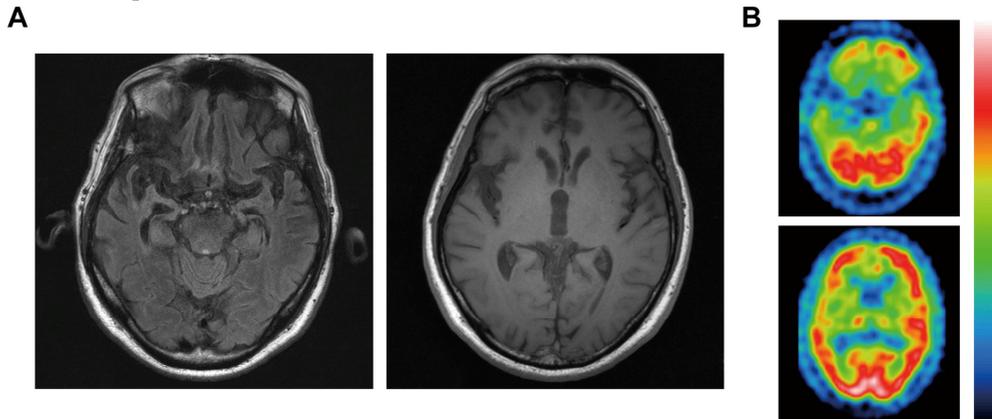
(1) 孤発性 ALS 713 例に対して次世代シーケンサーを用いて網羅的に遺伝子解析を施行し、近年、ALS 及び前頭側頭葉変性症(FTLD)の原因遺伝子のひとつとして判明した TANK-binding kinase 1 (*TBK1*) 遺伝子変異を 1.26%にあたる 9 例に認めた。9 例に判明した 9 種類の変異のうち、4 つは既報告のない新規ミスセンス変異(p.Val23Ile, p.His322Arg, p.Arg358Cys, p.Thr478Ile)であり、3 つはナンセンス変異(p.Arg357Term)やフレームシフト変異(p.Pro378_Ile379del, and p.Thr419_Gly420del)などの機能喪失変異であった(図1)。

図1. 判明した *TBK1* 遺伝子変異の部位



p.Val23Ile 変異を持つ症例に関しては、56 歳時に右上肢の筋力低下で発症し、経過中に脱抑制的な行動異常や無関心、病識欠如が目立ち、頭部 MRI で両側前頭葉、側頭葉の萎縮(図 2A)、脳血流シンチで両側側頭葉の血流低下を認め(図 2B)、ALS-FTD と診断されており、高次機能障害を伴う ALS の遺伝的背景として *TBK1* 遺伝子変異の重要性が示唆された。

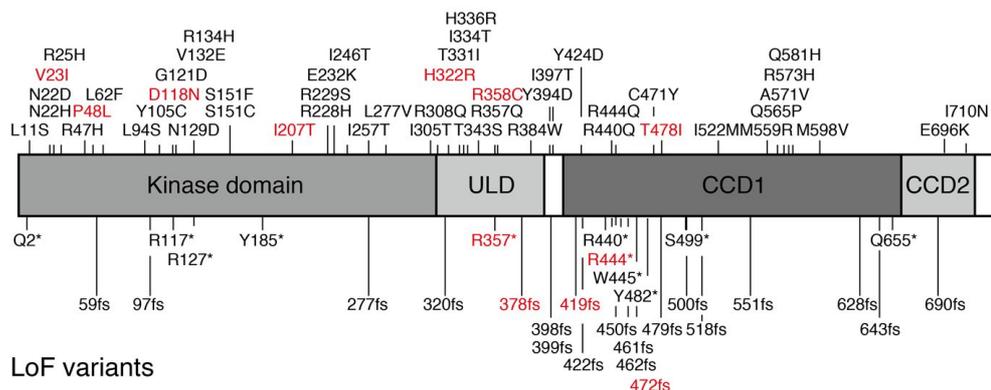
図2. *TBK1* p.Val23Ile 変異を有する症例の頭部 MRI 画像(A)と脳血流シンチ画像(B)



判明した遺伝子変異の部位を欧米や他の東アジア地域における ALS 患者で判明した *TBK1* 遺伝子変異の部位や頻度と比較したところ、*TBK1* 遺伝子変異の頻度は地域による差は認めなかったが、東アジアでは *TBK1* 遺伝子の UKD 領域の変異の頻度が多いことが判明した(図3)。

図3. 既報告の *TBK1* 遺伝子変異の部位(上段がミスセンス変異、下段が機能喪失変異。赤字は東アジアで見つかった変異)

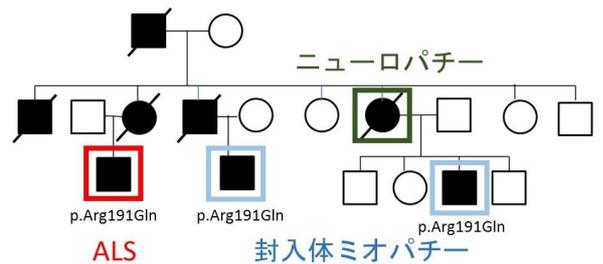
Missense variant



(2) ALS 患者の遺伝子解析データから 3 例に VCP 遺伝子変異を認めた。3 例のうち、2 例は既知の遺伝子変異であり、家族に封入体ミオパチーや FTL D の患者を認めた。残りの 1 例は行動異常を伴い ALS-FTD と診断されており、VCP 遺伝子に新規の病原性が疑われる遺伝子変異を認めた。下記にそれぞれの症例の詳細を示す。

図 4 . VCP 遺伝子 p.Arg191Gln 変異の一家系

症例 1 : 53 歳男性。両下肢遠位筋優位の筋力低下で発症し、1 年後に神経内科受診。CK 上昇を認め、下肢の深部腱反射は低下していたが、筋病理は神経原性変化の所見であった。その後、舌の萎縮や四肢の深部腱反射亢進が出現し、ALS と診断した。家系内に下肢の筋力低下による歩行障害を呈する症例を複数認めたことより、網羅的遺伝子解析を施行したところ、VCP 遺伝子に p.Arg191Gln 変異を認めた。従兄弟が 43 歳で下肢筋力低下を発症し、CK 値は軽度上昇しており、針筋電図では神経原性と筋原性変化が混在していた。右上腕二頭筋の筋生検では rimmed vacuole を認め封入体ミオパチーと診断された。別の従兄弟も 42 歳から下肢の筋力低下があり、筋生検にて rimmed vacuole ・筋線維の大小不同を認め、同疾患と考えられた。母親は 53 歳で下肢の筋力低下を発症し、神経伝導検査にてニューロパチーの所見を認めた (図 4) 。



症例 2 : 35 歳女性。父親は性格変化、認知症を先行症状とする ALS と診断されていた。右上肢の筋力低下で発症し、3 ヶ月で頸部、四肢の筋力低下、舌の fasciculation、四肢深部腱反射亢進が出現し、ALS と診断した。発症 4 ヶ月で NPPV 導入、5 ヶ月で人工呼吸器導入となった。網羅的遺伝子解析で VCP 遺伝子に p.Arg155Cys 変異を認めた (図 5) 。その後、兄が 43 歳で進行性の失語症を発症し、他院で加療されている

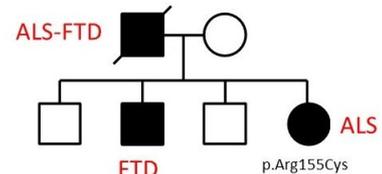


図 5 . p.Arg155Cys 変異の一家系

症例 3 : 63 歳男性。父親は 60 歳代で ALS を発症し、72 歳で永眠されている。58 歳時から右下肢の筋力低下が緩徐に進行し、転倒が頻回となった。さらに性格変化や無気力さ、反応の鈍さが目立つようになり、当院に精査入院となった。右下肢近位筋優位に四肢の筋力低下と筋萎縮、下顎反射亢進、Babinski 徴候陽性であり、針筋電図でびまん性に脱神経所見を認めた。高次機能検査では前頭葉機能中心に全般性に機能低下を認め、ALS-FTD と診断した。VCP 遺伝子に新規の病原性が疑われる変異を認めた。

VCP 遺伝子変異を有する 3 例の ALS 患者とその家族の臨床像を解析し、主に ALS、FTD、封入体ミオパチーを呈する症例を多く認めたが、同一家系内に末梢神経障害を呈した症例も認めた。VCP 遺伝子変異陽性例では、同一家系内でも多彩な臨床像を呈することが明らかとなり、高次機能障害を伴う ALS の遺伝的背景として VCP 遺伝子変異の重要性が示唆された。

1) Goldstein LH, Abrahams S. Changes in cognition and behaviour in amyotrophic lateral sclerosis: nature of impairment and implications for assessment. Lancet Neurol 2013; 12: 368-380.

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 9 件)

- 1 . Ikenaka K, Atsuta N, Maeda Y, Hotta Y, **Nakamura R**, Kawai K, Yokoi D, Hirakawa A, Taniguchi A, Morita M, Mizoguchi K, Mochizuki H, Kimura K, Katsuno M, Sobue G. Increase of arginine

- dimethylation correlates with the progression and prognosis of ALS. *Neurology*. 査読有, 2019 in press, doi.org/10.1212/WNL.0000000000007311.
- 2 . Tohnai G, **Nakamura R**, Nakatochi M, Atsuta N, Katsuno M, Sobue G. Multi-Ethnic Comparison of the Characteristics of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Related *TBK1* Gene Variants. *J Neurol Neuromedicine*. 査読有, 2019.4;7-11. doi.org/10.29245/2572.942X/2019/1.1236.
 - 3 . Masuda M, Watanabe H, Tanaka Y, Ohdake R, Ogura A, Yokoi T, Imai K, Kawabata K, Riku Y, Hara K, **Nakamura R**, Atsuta N, Katsuno M, Sobue G. Age-related impairment in Addenbrooke's cognitive examination revised scores in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 査読有, 2018;19:578-584. doi: 10.1080/21678421.2018.1510009.
 - 4 . Fujimori K, Ishikawa M, Otomo A, Atsuta N, **Nakamura R**, et al. Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat Med*. 査読有, 2018 24:1579-1589. doi: 10.1038/s41591-018-0140-5.
 - 5 . Tanikawa C, Ueda K, Suzuki A, Iida A, **Nakamura R**, Atsuta N, Tohnai G, et al. Citrullination of RGG Motifs in FET Proteins by PAD4 Regulates Protein Aggregation and ALS Susceptibility. *Cell Rep*. 査読有, 2018;22:1473-1483. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.031.
 - 6 . Tohnai G, **Nakamura R**, Sone J, Nakatochi M, Yokoi D, Katsuno M, (他 29 名), Atsuta N, Sobue G; Frequency and characteristics of the *TBK1* gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 査読有, 2018;64:158.e15-158.e19. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.12.005.
 - 7 . **中村亮一**、熱田直樹、祖父江元.【臨床応用に向けた疾患シーケンス解析】オミックス解析を通じて希少難治性疾患の医療に貢献する基盤研究 大規模臨床、ゲノム、不死化細胞リソースを基盤としたオミックス解析による孤発性 ALS 治療法開発. 遺伝子医学 MOOK 34 号 55-61, 査読無, 2018.
 - 8 . Senda J, Atsuta N, Watanabe H, Bagarinao E, Imai K, Yokoi D, Riku Y, Masuda M, **Nakamura R**, Watanabe H, Ito M, Katsuno M, Naganawa S, Sobue G. Structural MRI correlates of amyotrophic lateral sclerosis progression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 査読有, 2017;88:901-907. doi: 10.1136/jnnp-2016-314337.
 - 9 . **中村亮一**、藤内玄規、熱田直樹、勝野雅央、祖父江元.【神経疾患のゲノム医療】筋萎縮性側索硬化症のゲノム医療. 神経内科 86 号 678-685, 査読無, 2017.

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1 . 勝野雅央、**中村亮一**、村上あゆ香、野田成哉、木村正剛、熱田直樹: 封入体筋炎におけるエクソーム解析. 多系統蛋白質症(MSP)の疾患概念確立および診断基準作成、診療体制構築に関する研究会議. 2019.
- 2 . **Nakamura R**. Genetics of ALS and related disorders. The first joint symposium of the Neurological Institute of VGHTPE and Department Neurology of Nagoya University, 2019.
- 3 . **Nakamura R**, Atsuta N, Tohnai G, Nakatochi M, Hayashi N, Yokoi D, Watanabe H, Katsuno M, et al. Validation of genetic factors affecting survival in Japanese ALS patients. 29th International Symposium on ALS/MND, 2018.

4. 熱田直樹、中村亮一、林直毅、横井大知、伊藤瑞規、渡辺宏久、勝野雅央ら：ALSFRS-Rを用いた筋萎縮性側索硬化症患者の進行、予後予測と治験デザイン、第59回日本神経学会学術大会. 2018.
5. 中村亮一、熱田直樹、藤内玄規、中枋昌弘、林直毅、横井大知、渡辺宏久、勝野雅央ら：Validation of genetic factors affecting survival in Japanese ALS patients. 第59回日本神経学会学術大会. 2018.
6. 藤内玄規、中村亮一、曾根淳、中枋昌弘、横井大知、勝野雅央、和泉唯信、森田光哉、谷口彰、桑原聡、阿部康二、溝口功一、青木正志、服部信孝、辻省次、梶龍兒、熱田直樹、祖父江元、JaCALS. Frequency and characteristics of the *TBK1* gene variants in Japanese patients with sporadic ALS. 第59回日本神経学会学術大会. 2018.
7. 加藤隼康、山下典生、渡辺宏久、大嶽れい子、田中康博、小倉礼、川畑和也、梶田道人、横井孝政、原一洋、中村亮一、熱田直樹、勝野雅央、祖父江元. 前頭側頭葉変性症の早期診断へ向けた尾状核体積自動測定システムの開発、第59回日本神経学会学術大会. 2018.
8. 林直毅、熱田直樹、横井大知、中村亮一、伊藤瑞規、渡辺宏久、勝野雅央ら. 多施設共同前向きコホートでみたALS患者に対する気管切開下陽圧換気療法の予後、第59回日本神経学会学術大会. 2018.
9. 中村亮一、安藤孝志、原一洋、熱田直樹、勝野雅央. *VCP* 遺伝子変異が認められた4家系の臨床像. 多系統蛋白質症(MSP)の疾患概念確立および診断基準作成、診療体制構築に関する研究会議. 2018.
10. Nakamura R., Atsuta N, Tohnai G, Yokoi D, Watanabe H, Hayashi N, Sone J, Ito M, Watanabe H, Katsuno M, et al. Clinical characteristics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients with G93S mutation in the *SOD1* gene. World Congress of Neurology. 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件) 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

勝野 雅央 (KATSUNO, Masahisa)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授 研究者番号：50402566

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

藤内 玄規 (TOHNAI, Genki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教 研究者番号：00748353

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。