

131. 遺伝性筋萎縮性側索硬化症の新規原因遺伝子の同定

久米 広大

*広島大学 原爆放射線医科学研究所 分子疫学研究分野

Key words : 筋萎縮性側索硬化症, 神経遺伝学, 次世代シーケンサー

緒言

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis : ALS) は上位および下位運動神経の変性によって特徴づけられる神経変性疾患の一種である。ALSは根本的な治療法が確立されていない神経難病であるというだけでなく、特殊な病型を除いて認知機能が侵されることなく運動機能が奪われるという極めて過酷な疾患である。また、高齢化に伴いALSの有病率は増加傾向であることから、その治療法の確立は医学的な急務である。

約10%のALS患者が家族性とされ、これまでに原因遺伝子および感受性遺伝子が20以上報告されている。しかし、本邦の家族性ALSの半数近くは原因遺伝子が同定されず、未同定の原因遺伝子が多く存在すると考えられる。新規原因遺伝子を同定することでALSの分子病態を明らかにすることは、ALSの病態の解明や治療法の開発にとって重要であると考えられる。

このような状況の中、私たちはALSの症例を集積し、新規原因遺伝子の探索に取り組んできた。そして予備的検討で共通の原因遺伝子を有している可能性が高い優性遺伝性ALS2家系を対象に今回の研究を計画した。この2家系は同一地域由来であり、ハプロタイプ解析で共有するハプロタイプを認めている。この領域には既知のALS原因遺伝子は無く、新規原因遺伝子を有している可能性が高い。

以上のように、本研究では優性遺伝性ALS2家系を対象として、ALSの新規原因遺伝子同定を目的とする。そしてALSの病態の解明、治療法の開発の礎とする。

方法

1. 対象

対象は優性遺伝性のALS2家系であった。それぞれの家系で5名と2名がALSを発症していた。ALS計7名と家系内健常者5名の同意を得て研究に参加頂いた(図1)。

2. 高密度SNPタイピングと連鎖解析およびハプロタイプ解析

Affymetrixのマイクロアレイを用いて約90万のSNPタイピングを行った。得られたSNPタイピングデータの連鎖解析はMerlin、ハプロタイプ解析はHHAnalysisを用いて解析した。

3. エクソーム解析

ゲノムDNAを超音波で断片化し、AgilentあるいはNimbleGenのエクソームキャプチャキットで濃縮し、アダプタ配列を付けフローセルにライブラリーを構築した。IlluminaのHiSeq2500でシーケンスを行った。得られたシーケンスデータを解析ツールであるBWA、SAMtools、Picard、GATK、Annovarからなるパイプラインで解析を行い、原因と考えられる変異を抽出した。

4. 全ゲノム解析

Ligation sequencing kit (SQK-LSK109)を用いてライブラリーを作製し、MinIONでシーケンスを行った。データ解析は以下のように行った。まず、FAST5ファイルからguppyを用いてベースコールを行った。次に、FASTQファイルをFASTAファイルに変換し、LASTを用いてマッピングを行った。基準ゲノム配列はhg38を使用した。そしてMAFファイルからのリピートの評価をtandem-genotypesを用いて行った。さらにdnarrangeを用いて構造

*現在の所属：香川大学 医学部 自治体病院支援・推進医学講座

多型を評価した。また、MAF ファイルは BAM ファイルに変換し、IGV で可視化できるようにした。

結 果

1. エクソーム解析

ALS3 例 (図 1、家系 1 II-6、家系 2 III-3、III-5) それぞれで同定したバリエントは 83,997、82,044、85,329 個であった。3 例に共通するバリエントは 14,187 個であり、その中で非同義置換は 6,378 個であった。オープンデータベースおよび当研究室のデータベースのバリエントを除くと 2 つのバリエントに絞られたが、連鎖解析やハプロタイプ解析の結果から同定した候補領域には無かった。また ALS の既知の原因遺伝子 (*SOD1*、*NEFH*、*SETX*、*ALS2*、*DCTN1*、*VAPB*、*ANG*、*CHMP2B*、*TARDBP*、*FUS*、*ELP3*、*FIG4*、*SQSTM1*、*UBQLN2*、*VCP*、*OPTN*、*SPG11*、*HNRNPA1*、*HNRNPA2B1*、*CHCHD10*、*MATR3*、*TUBA4A*、*TBK1*、*C21orf2*、*NEK1*、*CCNF*) [1] にバリエントを認めなかった。

2. 全ゲノム解析

Nanopore platform で家系 1 II-1、II-2、家系 2 III-5 の全ゲノム解析を行った。Tandem-genotypes で 3 人に共通するリピート延長を同定した。その中で有害と予想されるものから上位 50 個を抽出した (図 2)。構造多型については、3 人に共通し、コントロールにないバリエントを抽出したが、遺伝子内にあるバリエントを認めなかった。

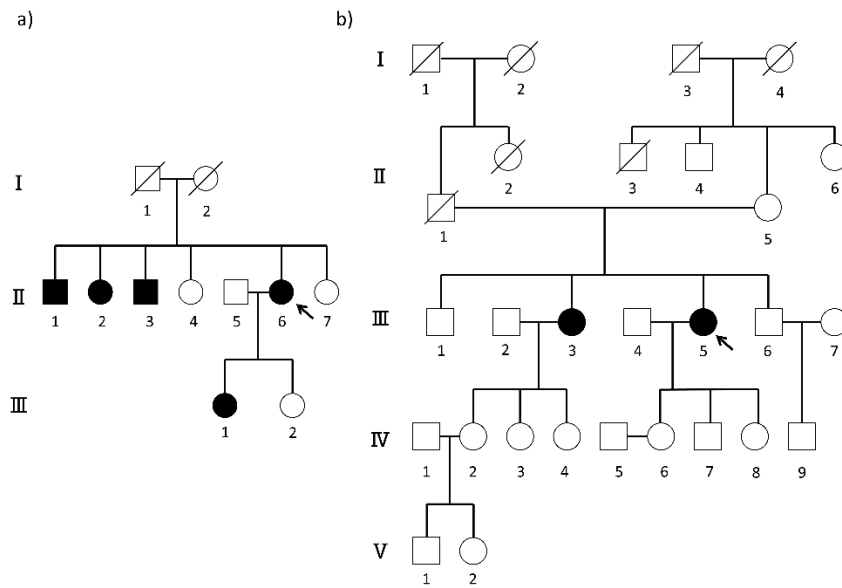


図 1. 家系図

a) 家系 1。対象は II-1、II-2、II-3、II-4、II-6、III-1、III-2 である。

b) 家系 2。対象は II-5、III-1、III-3、III-5、III-6 である。

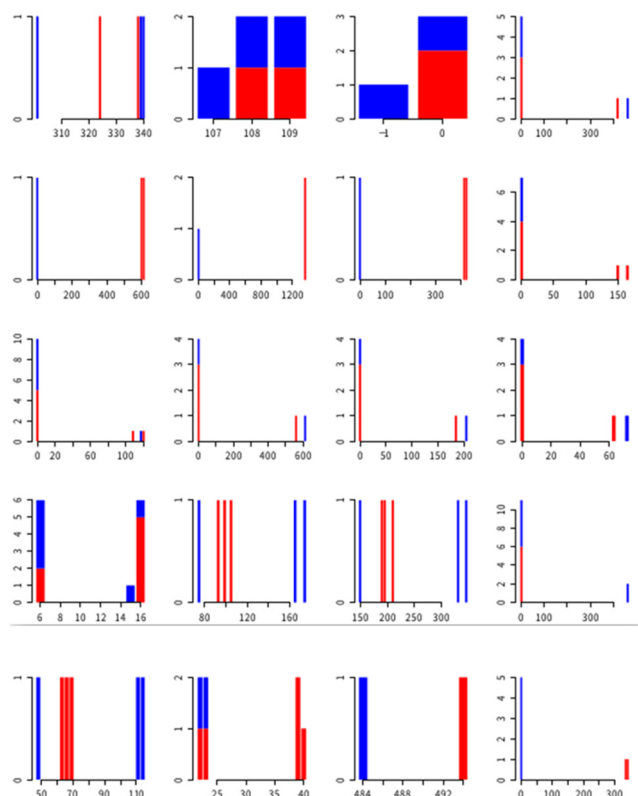


図2. 同定した延長リピート

発症者3名に共通して認めた延長リピート。より有害と判定されるものから上位20個を示す。

考 察

同一の原因遺伝子変異を有していると考えられる ALS2 家系の遺伝学的解析を行った。Nanopore platform のシーケンサーにより、候補となる延長リピートを同定した。しかし、原因を決定することはできず、現在、候補バリエーションのスクリーニングを行っている。

次世代シーケンサーの導入により疾患原因遺伝子の探索は飛躍的に進歩した。特に原因バリエーションが多く存在することが想定されるエクソンをシーケンスするエクソーム解析により多くの原因遺伝子が同定されてきた。しかし、その診断率は 30~50%程度であり、エクソン以外のバリエーションやリピートの延長、構造多型を多く見落としている可能性があった。

近年、ロングリードシーケンサーが用いられるようになり、リピートの延長の発見が相次いで報告されている [2~5]。本研究で原因遺伝子の同定には至らなかったが、ロングリードシーケンサーのデータ解析パイプラインを構築し、候補となるリピート延長を同定することができた。引き続き、候補となったバリエーションの検討を進めて行く予定である。

ロングリードシーケンサーを用いた疾患原因遺伝子の探索は、今後ますます重要になると考える。本研究で構築した解析手順で新規原因遺伝子の同定に取り組んでいきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、広島大学原爆放射線医科学研究所の川上秀史、森野豊之、および呉医療センター中国がんセンターの倉重毅志である。

文献

- 1) Chia R, Chiò A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol.* 2018 Jan;17(1):94-102. PMID: 29154141 DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30401-5.
- 2) Ishiura H, Doi K, Mitsui J, et al. Expansions of intronic TTTC A and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2018 Apr;50(4):581-590. PMID: 29507423, DOI: 10.1038/s41588-018-0067-2.
- 3) Cortese A, Simone R, Sullivan R, et al. Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia. *Nat Genet.* 2019 Apr;51(4):649-658. PMID: 30926972, DOI: 10.1038/s41588-019-0372-4.
- 4) Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet.* 2019 Aug;51(8):1222-1232. PMID: 31332380, DOI: 10.1038/s41588-019-0458-z.
- 5) Sone J, Mitsunashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet.* 2019 Aug;51(8):1215-1221. PMID: 31332381, DOI: 10.1038/s41588-019-0459-y.