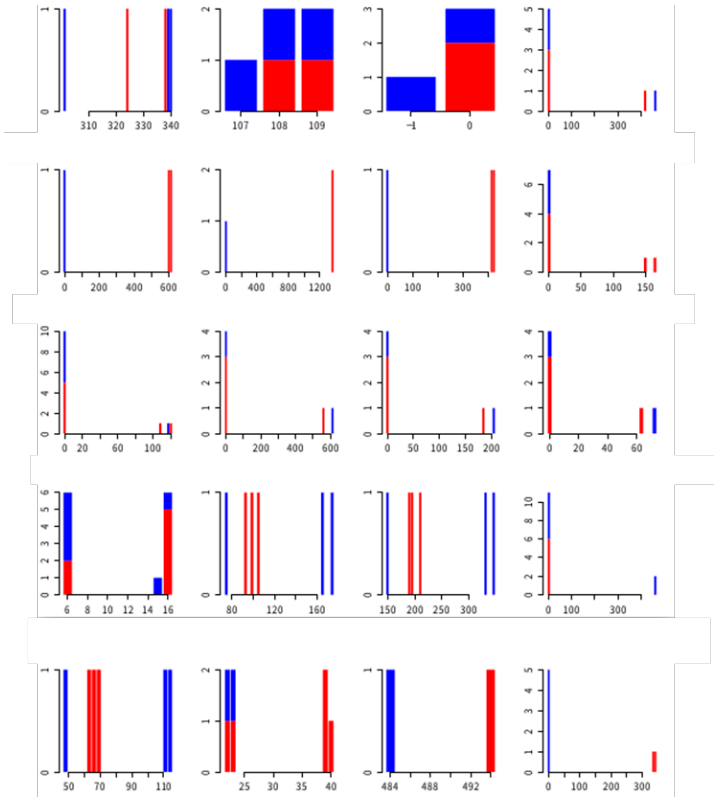
131　遺伝性筋萎縮性側索硬化症の新規原因遺伝子の同定	久米　広大

【目的】筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis：ALS）は、運動神経の変性を特徴とする神経変性疾患であり、その病態の多くは不明であり、根本的な治療法は無い。約 10%の ALS 患者が家族性とされ、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。本研究は、同一地域に由来する ALS2 家系を対象として ALS の新規原因遺伝子を同定することを目的とする。

【方法】対象は ALS の 2 家系（家系 1：ALS 5 名、健常者 2 名、家系 2：ALS 2 名、健常者 3 名）。まずはじめに、マイクロアレイを用いて高密度 SNP タイピングを行い、連鎖解析、ハプロタイプ解析を行った。次に、エクソーム解析を Illumina platform で行い、全ゲノム解析を Nanopore platform を用いて行った。マッピングには、Illumina platform のデータには BWA を、Nanopore platform には LAST を用いた。バリアントの検出には、一塩基置換や小さい挿入欠失の検出には GATK、リピート延長の検出には tandem-genotypes、構造多型の検出には dnarrange を用いた。全エクソーム解析および全ゲノム解析により同定したバリアントを連鎖解析およびハプロタイプ解析で同定した候補領域を用いて抽出した。

【結果】エクソーム解析では、原因となり得るバリアントを同定することができなかった。Nanopore platform による全ゲノム解析で候補となるリピート延長を同定した（図）。ただし、原因遺伝子を 1 個に絞りこむことはできず、現在、家系内分離解析および ALS 検体でのスクリーニングを行っている。

同定したバリアント



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 ALS 2 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 ALS 2 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 でシークエンスを行った。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

ALS 3 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アントは 83,997、82,044、85,329 個であった。3 例に共通するバリアントは 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アントを除くと 2 つのバリアントに絞られたが、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］にバリア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アントを抽出したが、遺伝子内にあるバリアントを認めなかった。

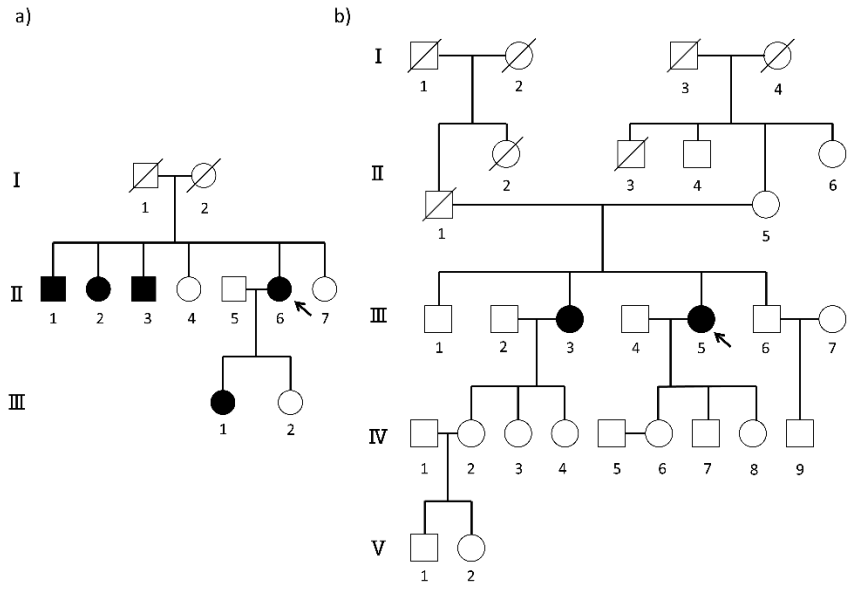


図 1. 家系図

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。

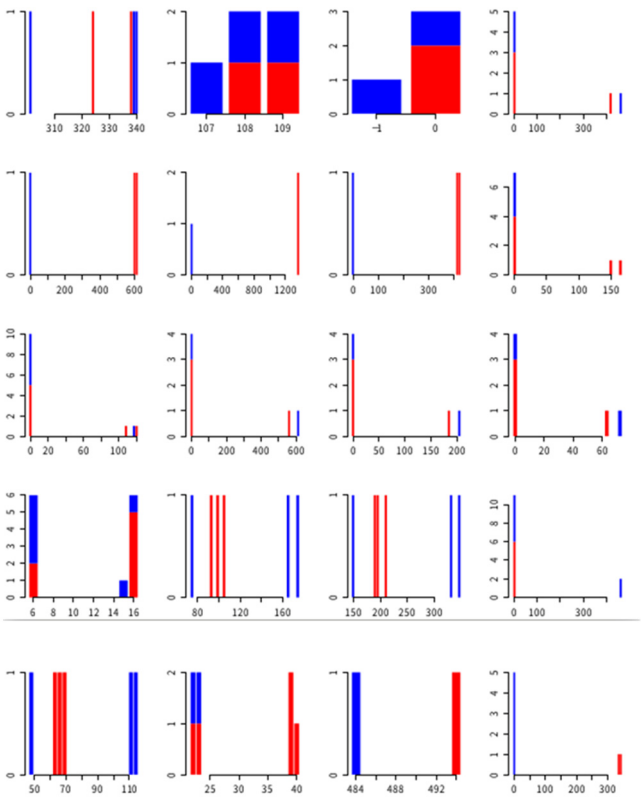


図 2. 同定した延長リピート

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 のシークエンサーにより、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、候補バリアント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。特に原因バリアントが多く存在することが想定されるエクソンをシークエ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アントやリピートの延長、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、候補となったバリアント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 TTTCA 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, Mitsuhashi 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.