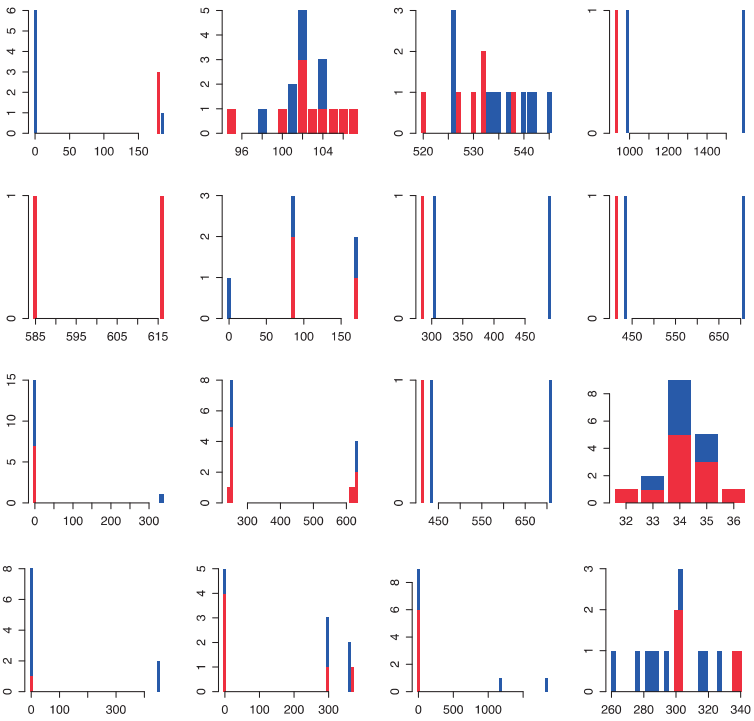
121　多系統萎縮症の原因遺伝子の同定	久米　広大

【目的】多系統萎縮症（multiple system atrophy：MSA）はパーキンソン症状、小脳症状、自律神経障害をきたす神経疾患の一種である。類縁疾患のパーキンソン病と比較して MSA のパーキンソン症状は薬剤の効果が乏しく、その予後は不良であるため、原因の究明および治療法の開発は強く望まれている。MSA はほとんどが孤発性とされ、家族性 MSA の報告はごくわずかのみであり、これまで MSA の明らかな原因遺伝子は同定されていない。本研究では MSA の病態の究明のために原因遺伝子同定を目指す。

【方法】対象は MSA 患者 3 名、家系内健常者 3 名。ナノポア社のロングリードシーケンサー（PromethION）による全ゲノム解析を行った。データ解析は既に構築済みのパイプライン（マッピング：LAST、リピート伸長の解析：tandem-genotypes、構造バリアントの解析：svim、dnarrange、sniffles）を用いた。当施設が保有する検体およびオープンデータベースから入手した健常人データを正常多型を除外するのに用いた。候補領域内に発症者に共通して認められ、家系内外の健常者には無いバリアントを抽出した。

【結果】健常対照者は有しておらず、MSA 患者のみに認められるリピート伸長変異を同定した（図）。患者のみに認められた構造バリアントは無かった。今後は、同定したリピート伸長のスクリーニングを行う予定である。

患者で同定されたリピート伸長バリアント



x-axis: changes of repeat numbers, y-axis: number of sequencing reads

121. 多系統萎縮症の原因遺伝子の同定

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：多系統萎縮症，全ゲノム解析，ロングリードシーケンサー

緒　言

多系統萎縮症（multiple system atrophy：MSA）はパーキンソン症状、小脳症状、自律神経障害をきたす神経変性疾患の一種である。有病率は 10 万人あたり 2～5 人という報告があるが、臨床診断がしばしば困難であることを考慮すると実際はもっと多い可能性がある。類縁疾患のパーキンソン病と同様にαシヌクレインの蓄積を病理学的特徴とするため、パーキンソン病と共にαシヌクレイノパチーと呼ばれる。しかし、パーキンソン病の症状はドパミン補充療法が有効である一方、MSA のパーキンソン症状は薬剤の効果が乏しく、小脳症状や自律神経障害もコントロールが困難であることが多いため、その予後は不良である。特に、自律神経障害による循環障害や呼吸障害は生命予後に大きく影響し、突然死もきたしうる疾患である［1，2］。患者やその家族の苦しみは大きく、原因の究明および治療法の開発は強く望まれている。

MSA はほとんどが孤発性とされ、家族性 MSA の報告はごくわずかのみであり、これまで MSA の明らかな原因遺伝子は同定されていない。2013 年に *COQ2* 遺伝子変異が MSA 家系から見出された［3］。しかし、健常対照群と比較して MSA 群で有意に頻度が高いが、この変異は日本人における頻度は高く、感受性遺伝子というべきものである。2016 年には、MSA 918 人のゲノムワイド関連解析（genome-wide association study：GWAS）が行われ、*FBXO47*、*ELOVL7*、*EDN1*、*MAPT* などが興味深い関連遺伝子として報告されたが、有意水準に達する関連遺伝子は認めなかった［4］。また病理診断例のみを対象とした GWAS では、ZIC1、ZIC4 近傍のバリアントが関連すると報告された［5］。2 つの GWAS の結果を比較しても共通する遺伝子は見出されておらず、MSA と強く関連する遺伝子は存在しないのかもしれない。このように MSA の遺伝学的な原因がほとんど未解明な状況の中、本研究は MSA の病態の究明のために原因遺伝子同定を目指す。

方　法

1. 対象

対象は両親が血族結婚の MSA 患者 3 例および家計内の非発症者 3 名である。これらの症例は既にショートリードシーケンサーによるエクソーム解析を行い、コーディング領域に病原性が疑われる一塩基バリアントや小さい欠失、挿入バリアントが無いことを確認している。また、ホモ接合性マッピングによって原因遺伝子の候補領域を同定している。広島大学のヒトゲノム倫理審査委員会の審査を受けており、すべての検体提供者から同意を得た。

2. DNA 抽出

血液から QuickGene610L（KURABO）を用いて DNA を抽出した。

3. 全ゲノム解析

1μg の DNA を使用し、ナノポアシーケンス用ライブラリー作製キット（LSK-110、Nanopore）を用いて

ライブラリーを作製した。シーケンスは PromethION シーケンサー（Nanopore）を用いて、72 時間行った。データ量を増やすためにシーケンス開始 24 時間後にフローセルの洗浄およびライブラリーの再ロードを行った。1 検体あたり 1 フローセルを使用した。

4. データ解析

マッピングは last（https://github.com/mcfrith/last-rna）を用いて、ヒト参照配列 hg38 に対して行った。リピート長の評価は tandem-genotypes（https://github.com/mcfrith/tandem-genotypes）を用い、構造バリアントの評価は svim（https://github.com/eldariont/svim）、dnarang（https://github.com/mcfrith/dnarrange）、sniffles（https://github.com/ fritzsedlazeck/Sniffles）を用いて行った。同定したバリアントは当施設の健常人のデータベースや、jMorp（Japanese Multi Omics Reference Panel）［6］の構造バリアントデータベースを用いて、健常人には認めないバリアントを抽出した。

結　果

1. 研究対象家系と原因遺伝子候補領域

本研究対象の代表的な 2 家系を図 1a に示す。両家系ともに両親が血族結婚であり、潜性遺伝性の原因遺伝子を有している可能性がある。ホモ接合性マッピングを行ったところ、両家系の患者はホモ接合領域を共有しており、共通の原因遺伝子を有している可能性が考えられた（図 1b）。エクソーム解析では原因と思われるバリアントを有しておらず、ショートリードシーケンサーでは評価が困難なリピート伸長や構造バリアントの検索を行うため、ロングリードシーケンサーを行った。MSA の臨床診断はしばしば困難であることがあり、病理学的に他の疾患であることが判明することがあるが、この患者 2 名のうち、1 名は病理診断例である。

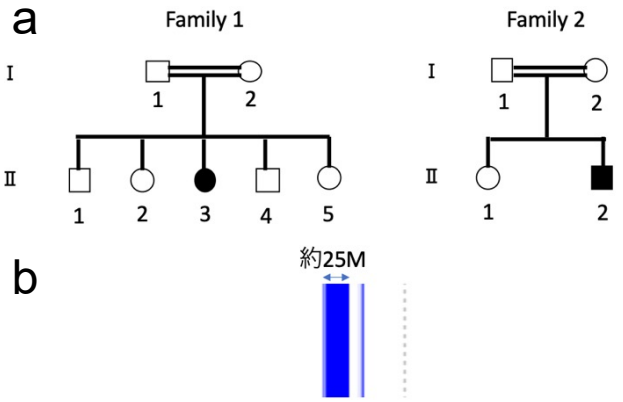


図 1. 研究対象の家系

a）研究対象の代表 2 家系。

b）2 家系の患者が共有するホモ接合性領域。

2. リピート伸長の解析

ヒトゲノム中の合計 2,111,897 座位のリピートを評価することができた。MSA 患者で、健常者の最大リピート数の 2 倍以上に伸長しているリピートを抽出したところ、99,276 座位であった。リピート部位や、リピート数の変化量などから、より病原性が疑われるリピートをランク付けし、上位 16 座位を図 2 に示す。

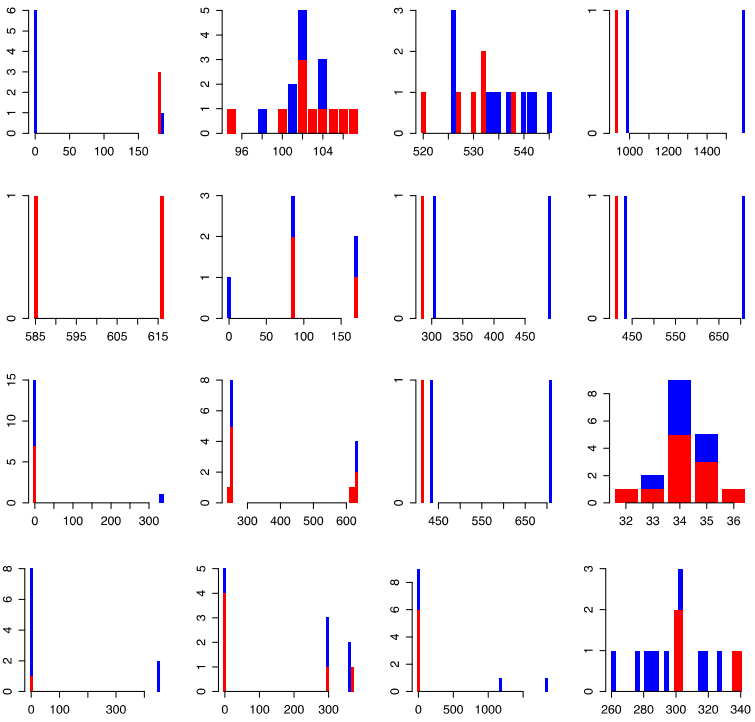


図 2. 同定したリピート伸長

MSA 患者で伸長していたリピートを示す。X 軸は参照配列と比較した時のリピート数の変化量を示し、Y 軸はシークエンスのリード数を示す。また、赤はプラス鎖のリードであり、青はマイナス鎖のリードを意味する。

3. 構造バリアントの解析

3 つのツール（svim、dnarange、sniffles）を用いて解析したが、患者のみに認める構造バリアントは検出されなかった。

考　察

本研究は、両親が血族結婚の家系を対象として、MSA の原因遺伝子の同定を目指した研究である。ほとんどが孤発性とされ、原因遺伝子を同定するのは困難である。そこで我々は、両親が血族結婚の MSA 患者を収集し、解析対象とした。両親が血族結婚の症例では、潜性遺伝性の原因遺伝子を有している可能性が高く、ホモ接合性マッピングという有用な方法を用いることで、原因遺伝子が存在する可能性が高い領域を特定できるからである。実際、図 1 に示したように我々は候補領域を約 25 M 塩基対まで、絞り込むことができた。そして、ロングリードシーケンサーによる全ゲノム解析により、MSA の原因となりうるリピート伸長を同定した（図 2）。

しかし、リピート伸長は多型が多く存在するため、本研究で同定されたリピート伸長は約 10 万と多く、この中から真の原因を特定するのは困難である。リピート座位がエクソン領域にあるものや、より長いリピート伸長を病原性が高い候補として、スクリーニングを現在行っているが、すべてのリピートを評価するのは困難である。今後も血族結婚の MSA 患者を収集し、さらに候補領域を絞り込むことや、健常人のリピート伸長のデータベースの充実、病原性が高いリピート数を予測するアルゴリズムの開発などが必要であると考える。

また構造バリアントについては、候補となるバリアントを同定することができなかった。ロングリードシーケンサーによる構造バリアントの評価は、有望とされながらも、多くのツールが存在し、結果もそれぞれで

異なることが多い。本研究では3つのツールを用いたが、他のツールについても解析を行なっていきたいと考えている。

上記のように、ロングリードシーケンサーによる全ゲノム解析には、ショートリードシーケンサーよりも歴史が浅く、解析方法が確立していないことによる問題がある。常に最新の情報を取り入れながら、解析を行い、引き続きMSAの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分子疫学研究分野の川上秀史、徳島大学大学院医歯薬学研究部臨床神経科学分野の和泉唯信である。

文　献

1） Goh YY, Saunders E, Pavey S, Rushton E, Quinn N, Houlden H, Chelban V. Multiple system atrophy. Pract Neurol. 2023 Jun;23(3):208-221. Epub 2023 Mar 16. PMID: 36927875 DOI: 10.1136/pn-2020-002797.

2） Wenning GK, Stankovic I, Vignatelli L, Fanciulli A, Calandra-Buonaura G, Seppi K, Palma JA, Meissner WG, Krismer F, Berg D, Cortelli P, Freeman R, Halliday G, Höglinger G, Lang A, Ling H, Litvan I, Low P, Miki Y, Panicker J, Pellecchia MT, Quinn N, Sakakibara R, Stamelou M, Tolosa E, Tsuji S, Warner T, Poewe W, Kaufmann H. The Movement Disorder Society Criteria for the Diagnosis of Multiple System Atrophy. Mov Disord. 2022 Jun;37(6):1131-1148. Epub 2022 Apr 21. PMID: 35445419 DOI: 10.1002/mds.29005.

3） Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. N Engl J Med. 2013 Jul 18;369(3):233-44. Epub 2013 Jun 12. Erratum in: N Engl J Med. 2014 Jul 3;371(1):94. PMID: 23758206. DOI: 10.1056/NEJMoa1212115.

4） Sailer A, Scholz SW, Nalls MA, et al. A genome-wide association study in multiple system atrophy. Neurology. 2016 Oct 11;87(15):1591-1598. Epub 2016 Sep 14. PMID: 27629089. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003221.

5） Hopfner F, Tietz AK, Ruf VC, et al. Common Variants Near ZIC1 and ZIC4 in Autopsy-Confirmed Multiple. System Atrophy. Mov Disord. 2022 Oct;37(10):2110-2121. Epub 2022 Aug 23. PMID: 35997131 DOI: 10.1002/mds.29164.

6） Tadaka S, Hishinuma E, Komaki S, Motoike IN, Kawashima J, Saigusa D, Inoue J, Takayama J, Okamura Y, Aoki Y, Shirota M, Otsuki A, Katsuoka F, Shimizu A, Tamiya G, Koshiba S, Sasaki M, Yamamoto M, Kinoshita K. jMorp updates in 2020: large enhancement of multi-omics data resources on the general Japanese population. Nucleic Acids Res. 2021 Jan 8;49(D1):D536-D544. PMID: 33179747 DOI:10.1093/nar/gkaa1034.