

53. 筋萎縮性側索硬化症の新規遺伝子の機能解析

川上 秀史

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, リピート病, ロングリードシーケンス, iPS 細胞

緒言

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動神経の変性による筋力低下、呼吸筋麻痺を呈する神経変性疾患である。現在、進行を停止させる治療法は無く、病態の解明が望まれる。およそ 10%が家族性といわれ、*SOD1* はじめとしていくつかの遺伝子が同定されてきた [1]。我々は、血族婚からなる ALS 家系より *OPTN* を同定し (Nature2010)、同蛋白がオートファジーのアダプター蛋白として働くことより、ALS の病態の 1 つとして蛋白代謝の異常が寄与していることが明らかになった [2]。しかしながら、未だ 30~50%程度の多くの家族性 ALS の遺伝子が不明であり、これらの解明に新規なアプローチが求められている。これまで *C9orf72* のイントロン 1 の GGGGCC リピート伸長が白人の ALS の主要な原因であることが知られていたが、日本人では極めて稀である [1~4]。我々は日本人 2 家系の家族性 ALS の遺伝学的解析を行い、さらに long-read sequencer を用いて、新規原因遺伝子にリピート伸長変異を見出した。この変異はそのリピート配列が *C9orf72* とは異なっているため、新たな機序で ALS を発症させている可能性がある。本研究では、ALS 患者多数例の解析と患者由来 iPS 細胞を用いた機能解析により、新規リピート伸長変異がどのように筋萎縮性側索硬化症に関わるかについて明らかにする。

方法

1. 遺伝子解析

遺伝子未同定の 2 家系を対象にエクソーム解析を行った。その結果を用いて、連鎖解析を行った。さらに患者 DNA を long-read sequencer として MinION および R9.4.1 flow cell (Nanopore Oxford 社製) により解析した。Tandem-genotypes により、異常リピート伸長候補を検出 [5]、蛍光 PCR や Cas9-mediated target sequencing により伸長を確認した。

2. iPS 細胞による解析

患者者末梢血由来単球へ *OTX2*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, *EBNA1*, and *p53* carboxy-terminal dominant-negative fragments を含むエピゾーマルベクターを用いて、iPS 細胞を樹立した。piggyBac ベクター epB-Bsd-TT-NIL を用いて *Ng2*, *Isl1*, and *Lhx3* を導入し、運動ニューロンに分化させ、組織化学的に検討した。

結果

1. 遺伝子解析

2 家系に共通して、患者特異的に、新規遺伝子 A のリピートの伸長を認めた。さらに広島大学の ALS コホート 1,000 人をスクリーニングすると、3 人で 60~90 内でリピートの伸長を認めた (図 1)。うち、2 人は孤発性

で1人は、家族性であった。さらに東北大学の家族性ALSコホート40家系のうち、2家系においてリピートの伸長を認めた。

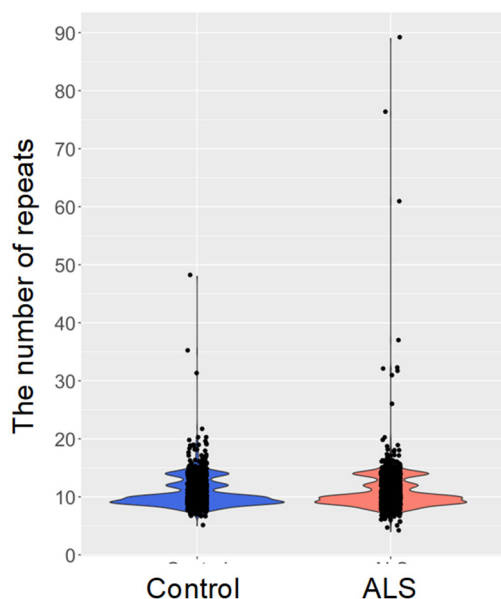


図1. コントロールおよびALS患者におけるCGGリピートの数50以上のリピートを持つものは、コントロールに存在しないが、ALSには3名存在した。

2. iPS細胞からの解析

患者由来iPS細胞から分化させた運動ニューロンでは、核外にリン酸化TDP-43を認め、さらに核内には、リピートを含むRNA封入体を認めた。

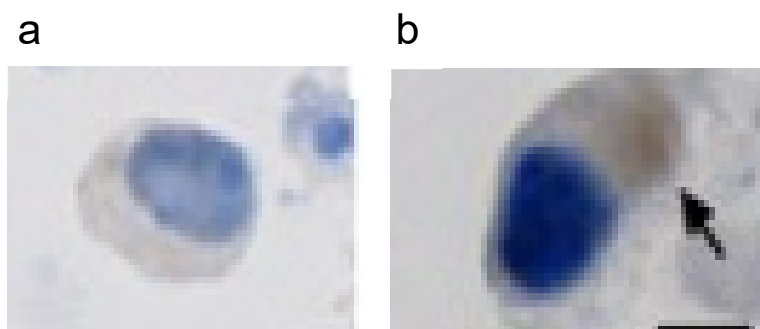


図2. iPS細胞から分化させた運動ニューロン

a) 正常コントロール由来。青は核染色、茶はリン酸化TDP-43の抗体染色。

b) ALS患者由来。染色は上記と同じ。矢印はリン酸化TDP-43。

スケールバーは10 μ m。

考 察

家族性 ALS の原因遺伝子を解明することは、そのメカニズムの解明につながるのみならず、将来の遺伝子変異に基づいた治療法の開発にとっても重要である。

我々は、今回日本人 ALS 患者から、新規リピート伸長を同定した。このリピート伸長は、遺伝子未同定の家系では、5%の頻度で認められたが、主に孤発例からなる 1,000 人からなるコホートでは 3 人と、1%以下であり、主として家族性として存在することを明らかにした。伸長したリピートを持つ患者由来の iPS 細胞から分化させた運動ニューロンでは、リン酸化 TDP-43 の核外脱出を認め、他の原因遺伝子の多くや孤発性 ALS と共通の病態をしめすことが明らかになった。

この iPS 由来運動ニューロンを *in vitro* モデル系として、さらにマウスにこのリピート伸長を導入しモデル動物を作製、解析することにより *in vivo* モデル系として、難治性疾患である ALS の治療法の開発が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の主たる共同研究者は、広島大学原爆放射線医科学研究所分子疫学研究分野の久米広大准教授、呉医療センター脳神経内科学の倉重毅志医師、関西医科大学医学部 iPS・幹細胞応用医学講座の六車恵子教授、東北大学の青木正志教授、徳島大学の和泉唯信教授である。

文 献

- 1) Goutman SA, Hardiman O, Al-Chalabi A, Chió A, Savelieff MG, Kiernan MC, Feldman EL. Recent advances in the diagnosis and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurol.* 2022 May;21(5):480-493. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00465-8. Epub 2022 Mar 22. PMID: 35334233
- 2) Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 2010 May 13;465(7295):223-6. doi: 10.1038/nature08971. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20428114
- 3) DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011 Oct 20;72(2):245-56. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21944778
- 4) Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011 Oct 20;72(2):257-68. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.010. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21944779
- 5) Mitsuhashi S, Frith MC, Mizuguchi T, Miyatake S, Toyota T, Adachi H, Oma Y, Kino Y, Mitsuhashi H, Matsumoto N. Tandem-genotypes: robust detection of tandem repeat expansions from long DNA reads. *Genome Biol.* 2019 Mar 19;20(1):58. doi: 10.1186/s13059-019-1667-6.