

論文の内容の要旨

論文題目 網羅的ゲノム解析に基づく筋萎縮性側索硬化症遺伝子の探索, およ

びストレス顆粒の関与に関する研究

氏名 成瀬紘也

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は, 上位および下位の運動神経細胞の選択的な変性・脱落から, 進行性に全身の筋力低下をきたす, 成人発症の神経変性疾患である. その進行は早く, 発症から平均 3~4 年で死亡または人工呼吸器装着が必要となり, 根治療法が見いだされていない代表的な神経難病の一つである. 約 5%は家系内に発症者を有する家族性 (familial ALS: FALS) であるが, 残りの大多数は孤発性 (sporadic ALS: SALS) である. ALS の病因遺伝子は, 次世代シーケンサー等の遺伝子解析能力の向上に伴い近年数多く報告され, 現在までに 20 個以上の ALS の病因遺伝子および疾患感受性遺伝子が同定されている. 一方でその病態は十分には明らかになっておらず, 病態解明に必要な病因・疾患感受性遺伝子の同定は大きな課題である. 次世代シーケンサーによる exome 解析データを用いることで, ALS の病因遺伝子の網羅的な変異解析が可能である. 本研究では, 網羅的ゲノム解析情報に基づき, 日本人の ALS のゲノム基盤を明らかにすることを目的とした.

第一に, 単一遺伝子疾患としての ALS という側面からの解析として, 網羅的ゲノム解析情報に基づき, FALS で見出された病因遺伝子における病原性変異を同定し, 日本人の ALS の分子疫

学の解明を目指した。

FALS 症例 (87 家系) について exome 解析を含む網羅的ゲノム解析から ALS の病因遺伝子の探索を実施した。スクリーニング解析として、一部の ALS 病因遺伝子 (*SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *OPTN*, *ERBB4*) のサンガーシーケンス法による解析と、*C9ORF72* の 6 塩基反復配列の異常伸長の検出のため repeat-primed PCR 法での解析を実施し、*SOD1* (32 例), *FUS* (8 例), *TARDBP* (3 例), *ERBB4* (1 例), *C9ORF72* (2 例) の病原性変異を検出した。さらに exome 解析データから ALS の病因遺伝子の変異解析を実施し、*HNRNPA1*, *TBKI*, *VCP* の各遺伝子の新規変異を日本人の FALS 家系で同定した。この新規変異を同定した 3 家系について、臨床病型の検討に加え、変異の健常対照例での頻度、変異の部位 (特定のドメイン・疾患変異の好発部位)、機能予測による変異の有害性の評価、培養細胞を用いた機能解析実験での病原性の評価等を検討した結果、いずれも病原性変異の可能性が高いと考えられた。当科の FALS 症例における網羅的な遺伝子解析の結果、FALS の 87 家系のうち 49 家系 (56.3%) に ALS 病因遺伝子の病原性変異を同定し、exome 解析による網羅的な遺伝子解析の有用性を示した。当科の日本人 FALS の集団において、*SOD1* (36.8%) が最も多く FALS の病因遺伝子として同定された。一方で *C9ORF72* 変異 (2.3%) の頻度は低く、欧米の ALS 集団で同遺伝子変異が最多であるのとは対照的で、集団による ALS の分子疫学の違いが示された。

特に新規に同定した変異のうち、*HNRNPA1* 遺伝子のヘテロ接合性点変異 (p.P288A/340A) を、日本人の FALS 家系の 2 世代の 2 例で同定したことに着目した。本家系の 2 例の臨床病型は、いずれも認知機能障害やその他の多系統のシステムに及ぶ障害は見られないという既報告とは異なる点があり、*HNRNPA1* 変異を伴う ALS を含む疾患の臨床的多様性が示唆された。*hnRNPA1* は ALS の病態に関わるストレス顆粒 (stress granule: SG) の形成に関与することが報告されており、更なる大規模な遺伝子解析による *HNRNPA1* 変異の症例の蓄積と変異型 *hnRNPA1* の機能解析が、ALS の病因遺伝子としての *HNRNPA1* 遺伝子の変異に伴う ALS の病態と臨床スペクトラムの解明のために必須であると考えられた。

既報告の FALS の *HNRNPA1* の変異型 (p.D262V) では、その変異が hnRNPA1 のプリオン様ドメイン(prion-like domain: PrLD) に位置するのに対し、本研究で新規に同定した変異 (p.P288A) は hnRNPA1 の核局在シグナル (nuclear localization signal: NLS) ドメインに位置していた。既報告の PrLD 内に位置する変異型 (p.D262V) では、ストレス負荷時において hnRNPA1 の SG への動員が増強しており、PrLD がもつ凝集して hnRNP 原線維 (fibril) を形成する内因的な性質が、PrLD 内の疾患変異によってさらに増強されるという仮説が提示されている。一方で本研究の変異型 (p.P288A) (PrLD の外の NLS 内に位置) では、hnRNPA1 の核局在が阻害されることが推定されたが、ストレス非負荷時においても、変異型の hnRNPA1 を発現させた細胞において SG 形成が野生型よりも多く観察された。次に hnRNPA1 の NLS の機能障害が既報告の *in vitro* での検討から明らかにされている変異型 (p.P275A と p.G274A) の hnRNPA1 を発現させた細胞では、今回の変異型 (p.P288A) と同様に、SG 形成が高頻度に観察されることを見出した。一方で NLS の機能に影響しない変異型 ([p.G282L;p.G283L]) を発現させた細胞では、SG 形成の頻度は、野生型と同等であった。すなわち、NLS の機能が保持あるいは障害される変異型でそれぞれの SG の形成量を比較すると、NLS の機能が障害される変異の導入によってより多くの SG が観察されるという結果であった。さらに FALS の既報告の変異型 (p.D262V) (PrLD 内で NLS 外に位置) を発現させた細胞では、ストレス非負荷時における SG 形成の頻度について、野生型との有意な差は見られなかった。これらの観察結果は、*HNRNPA1* 遺伝子の NLS に位置する変異による SG 形成の増加には、従来とは異なるメカニズムが関与していることを示唆する。hnRNPA1 の NLS の障害に伴う細胞質への動員という局在の変化が、細胞質の hnRNPA1 の fibril への集簇という内在性の性質を増強することにつながり、SG 形成の増加に至った仮説が考えられる。本結果は、NLS の機能障害が SG 形成の増加を通して、ALS の病態に重要な役割を果たす新たな可能性を示すものと考えられた。

続いて、SALS 症例 (377 例) について exome 解析を含む網羅的ゲノム解析に基づく ALS の病因遺伝子の探索を実施した。Exome 解析データを用いた網羅的解析により、SALS の 12 例 (3%)

に ALS の病因遺伝子の既知の病原性変異を検出した。SETX 遺伝子の既知の病原性変異を 1 例で同定し、若年発症である点を含め既報告の臨床病型と合致しており、*de novo* 変異の可能性が考えられた。一方、その他の SALS の症例の大部分で ALS 遺伝子の病原性変異が検出されないことから、大規模な exome 関連解析に基づいて、疾患感受性遺伝子の探索を進めていく必要性が考えられた。

そこで第二に、多因子疾患としての ALS という側面からの解析を実施した。

最近の大規模 exome 関連解析により、LoF (loss of function: 機能喪失型) バリエントと SALS 症例との関連が見出された NEKI, TBKI 遺伝子について、日本人の SALS 症例でも同様に関連が見られるかを検討した。具体的には、当科の SALS 症例の exome 解析データに基づき、これらの遺伝子の LoF バリエント (挿入・欠失 (insertion/deletion (indel)), ナンセンス (nonsense), スプライス部位に位置するバリエント) の頻度を、健常対照 800 例と併せて検討した。その結果、SALS 群で有意に多くの LoF バリエントが検出され ($p = 0.005$, Fisher's exact test), これらの遺伝子の ALS の病態への関与が示唆された。

さらに、網羅的 exome 解析により得られた情報を用いて、FALS で見出された病因遺伝子上の複数のバリエントが臨床病型を修飾するかどうかについての検討を行った。ALS の病因遺伝子の、病原性変異と考えられるバリエントおよび deleterious と考えられる稀なバリエントを解析対象とした。その結果、FALS 症例の 56 例 (64.4%), SALS 症例の 78 例 (20.7%) に ALS の病因遺伝子の稀なバリエントを検出した。稀なバリエントが 2 個以上重複して検出された症例は、FALS の 7 例、SALS の 6 例で認められ、これらの症例の臨床病型についてまとめた。今後も、ALS の病因遺伝子の deleterious と考えられる稀なバリエント数と臨床病型の関連について引き続き検討するとともに、特に SALS の症例の大部分で病原性変異が検出されないことから、多因子疾患として位置づけ、大規模な exome 関連解析を用いた更なる疾患感受性遺伝子の探索を進め、ALS の病態機序の解明を目指す必要がある。