

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09778

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の進行、予後に関連する因子を基にした治療法開発

研究課題名(英文)Therapeutic development based on factors affecting progression and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

熱田 直樹(Atsuta, Naoki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90547457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：病型や重症度スケール(ALSFRS-R)低下率など多彩なALS患者の進行予後と関連する臨床的因子の解析と同一、進行予後予測バイオマーカーとしての髄液中ADMA/L-arginine比の同一、ALS患者の予後と関連する遺伝子多型の検証、新規ALS関連遺伝子の我が国における検証が行われた。これらは治療介入の手がかりや治験デザイン策定に寄与する。また、ランダム化比較試験が困難な治療介入(気管切開を用いた人工換気)を、蓄積された縦断的臨床データを用いて検討し、予後に与える影響や年齢などの因子による治療介入効果の違いを検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経疾患患者への治療介入は発症からやや時間がたってからの開始となるため、進行、予後に関連する複数の因子への介入が、治療効果を上げるうえで重要である。本研究では、多彩なALS患者の進行予後と関連する因子の解析と同一が行われ、複数のALS関連遺伝子、遺伝子多型の同一、検証が行われた。これらは治療開発の標的としての手がかりや治験を計画する際の登録基準や割付因子として寄与することができる。また、ALS患者に対する治療介入にはランダム化比較試験が難しいものもあるが、その検証に縦断的臨床データを用いた解析が有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We identified clinical factors affecting progression and prognosis of ALS patients such as disease type and decline rate of the severity scale (ALSFRS-R). We also identified ADMA/L-arginine ratio in cerebrospinal fluid as a biomarker for predicting prognosis of ALS patients. The gene polymorphisms related to the prognosis of ALS patients were verified, and the novel ALS-related genes were verified in Japanese population. These contribute to therapeutic intervention clues and clinical trial design. In addition, the effects of therapeutic intervention (tracheostomy invasive ventilation therapy), which is difficult to verify in randomized controlled trials, on the prognosis of ALS patients were examined using accumulated longitudinal clinical data.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 予後因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位および下位運動ニューロンが選択的に変性脱落することを特徴とする代表的な神経難病であり、根治的治療法は存在しない。その治療法開発は喫緊の課題である。ALS 患者に対する治療法開発のためには、治療標的となるような病態関連遺伝子・分子や、進行予後に関わる因子の同定が重要である。大部分を占める孤発性 ALS の病理所見は均一な特徴 (TDP-43 pathology) を持つが、その臨床経過は症例ごとに相当に多彩であることが示されている。この多彩な前向き臨床像、予後に影響を与える因子は治験デザインの策定や適切な診療介入を行うための重要な手がかりとなる。

研究代表者は多施設共同の ALS 患者経時的臨床情報収集、ゲノム遺伝子収集システムである JaCALS の立ち上げ、長期縦断的フォローアップシステムの確立 (熱田直樹ら BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 2011)、運営、症例登録に事務局代表祖父江のもとで中心的に関わってきた。この前向き臨床情報の解析から ALS 患者の頸部筋力低下と予後との関連 (Nakamura R, Atsuta N, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013)、孤発性 ALS 患者の生命予後と日常生活活動度 (ADL) の低下に關与する因子 (Watanabe H, Atsuta N, et al. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2015)、ALS 患者の発症年齢が臨床像、予後に与える影響 (Yokoi D, Atsuta N, et al. *J Neurol*. 2016) を明らかにしてきた。また、孤発性 ALS 患者の重症度スケール進行パターンとゲノムワイド塩基多型 (SNPs) タイピングデータとの関連解析から、TTN 発現低下が孤発性 ALS のうち症状が急速に進行する型と関連する (Watanabe H, Atsuta N, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016) ことを示した。

2. 研究の目的

本研究では ALS の進行・予後や多彩な臨床像に関わる因子を同定し、ALS の治療開発、診療の向上に寄与することを目的とする。ALS の経過、予後に関連する臨床的因子、バイオマーカーについても探索、同定を行う。前向き臨床像として蓄積された大規模 ALS 臨床データおよび遺伝子多型データを用い、生存期間との関連解析により、予後関連遺伝子多型の探索も行う。

神経疾患患者への治療介入は発症からやや時間がたってからの開始となるため、進行、予後に関連する因子への介入が、治療効果を上げるうえでのカギとなる可能性がある。ALS に対する治療開発は難航しており、多くの治験が無効の結果に終わっている。リルゾールとエダラボンの 2 剤が認可に至っているが、その予後改善効果はわずかである。孤発性 ALS の病態に関連する遺伝子、分子は数多くあることが想定され、疾患克服のためには、複数の機序で治療介入できる手がかりをつかむ必要がある。進行・予後関連の臨床的因子は治験デザインのカギとなるが、その点についても本研究が貢献できる。

3. 研究の方法

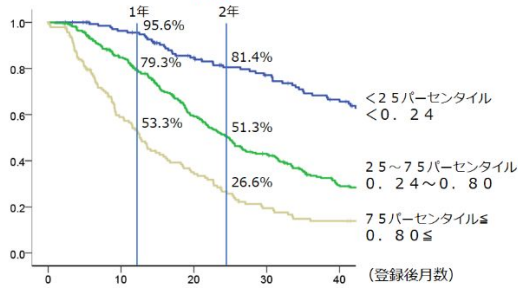
名古屋大学医学部附属病院における新規診断 ALS 患者連続例について、文書による同意が得られた例について、逐次登録および検体採取を行う。対象患者は当院における精査にて ALS と診断し、本人に告知した患者とし、臨床情報シートで改訂版 El Escorial 診断基準への適合度を判定できるようにする。JaCALS 登録患者については、経時的臨床情報解析、ALS 関連遺伝子解析およびゲノムワイド遺伝子多型解析による ALS 関連遺伝子探索同定の文書同意が得られている。DNA および血清について、通常の静脈採血により得られた血液検体から抽出を行い凍結保存する。名古屋大学医学部附属病院脳神経内科では新規に ALS と診断する際に、髄液検査は鑑別診断のために必須としており、検査の際に余った分を凍結保存している。この凍結保存された髄液を本研究のために保存する。髄液については研究目的のみでの採取は行わない。DNA、血清および髄液の検体はすべて匿名符号のみを付して保存する。患者由来 iPS 細胞作製について、既に名古屋大学医学部倫理委員会に承認された書式に基づき同意が得られた患者について、血液細胞を採取し、連携研究者による iPS 細胞作製に供する。

前向き臨床情報とゲノムワイド SNPs タイピング情報を用いて、発症からの生存期間 (死亡もしくは永続的呼吸器装着に至る期間) との関連解析を行う。この解析によりさらなる予後関連遺伝子が探索されれば、TTN 同様の解析、検証を行う。

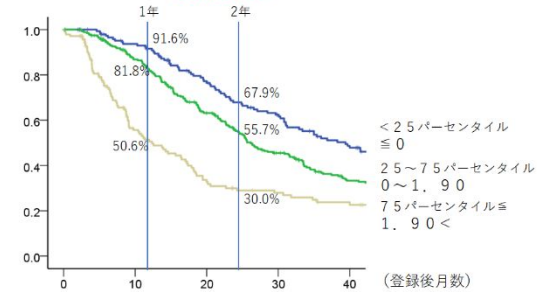
4. 研究成果

ALS 患者の経時的臨床情報の解析から、病型別の予後を明らかにした。発症から死亡もしくは永続的な人工換気導入までの期間の中央値が上肢型では 46.9 カ月、下肢型では 50.9 カ月、球麻痺型では 36.9 カ月、頸部筋型では 34.9 カ月と有意な違いが認められた。また、患者登録時からの情報で生存期間や重症度スケールの低下率を予測する指標の検討を行った。登録後 3 か月と 1 年の時点で ALSFRS-R の評価を行った 565 例について、発症から登録時までの ALSFRS-R 低下率 (Δ FS) および登録から 3 か月間の ALSFRS-R 低下率 (3M 低下率) について、発症年齢、病型、性別を共変量として生存期間への影響を Cox 比例ハザードモデルで、登録 1 年後までの ALSFRS-R 低下率への影響は multivariate linear regression を用いて解析した。その結果、生存期間の予測には Δ FS と 3M 低下率が共に強力な予測因子であり、登録 1 年後までの ALSFRS-R 低下率の予測には 3M 低下率が優れていることが示された。治験デザインの構築において有用な検討と考えられる。

登録～エンドポイント（死亡or侵襲的人工換気導入）の予測
ΔFS 生存曲線



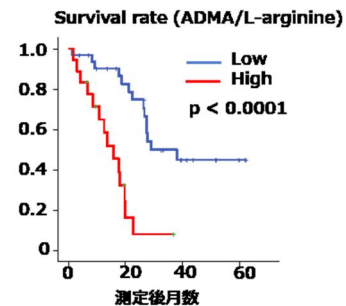
登録～エンドポイント（死亡or侵襲的人工換気導入）の予測
3M低下率 生存曲線



多施設共同 ALS 患者コホート JaCALS に蓄積されたゲノム遺伝子検体を活用し、我が国の孤発性 ALS 患者における *TBK1* 遺伝子変異の頻度と特徴を明らかにした。713 例の孤発性 ALS と 800 例の正常コントロールにおいて *TBK1* 遺伝子の変異はオッズ比 10.2 で孤発性 ALS 患者に多いことを示した。(Neurobiol Aging. 2018;64:158.e15-158.e19.)

52 例の ALS 患者において、髄液中の Asymmetric dimethyl L-arginine (ADMA)、L-arginine の測定を行った。ALS の病態には複数の RNA 結合タンパクが関わっていると考えられているが、アルギニンのメチル化はそれらの共通する翻訳語修飾 (posttranslational modification) の一つである。まず剖検検体の脊髄前角細胞における免疫組織染色で、アルギニンのメチル化を行う酵素である Protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) の発現と Asymmetric dimethylated proteins (ASYM) を検討し、どちらも ALS 患者においてコントロールと比べて増加していることが示された。また、髄液中の ADMA は ALS 患者ではコントロールに比べて増加していた。さらに ADMA/L-arginine 比と測定時点以降の生存期間 (死亡もしくは気管切開を伴う人工呼吸器装着まで) との関連を調べると、図に示すように有意に ADMA/L-arginine 比が大きいほど予後不良であることが示された。改訂版 ALS 機能評価スケール (ALSFRS - R) の変化とも関連することを示した。この指標が ALS 患者の進行、予後を予測するバイオマーカーとなる可能性がある。(Neurology. 2019 ;92(16):e1868-e1877.)

ALS患者の髄液中ADMA/L-arginine 比と予後（測定～死亡または永続的 人工換気導入までの期間）



孤発性 ALS 患者 1241 例において、HumanOmniExpressExome による SNP アレイデータおよび imputation により得られた SNPs データを用いた解析により、p 値 10^{-10} 台と 10^{-8} 台で強く孤発性 ALS 患者の生存期間 (予後) と関連する SNPs を 2 領域に見出した。これら SNPs と関連する遺伝子発現の解析を患者由来不死化細胞を用いて行っている。

KIF5A 遺伝子内の日本人における variant の頻度を次世代シーケンサーを用いて検討した。807 例の孤発性 ALS 患者において、loss of function variant を 1 例 (0.12%) に認めた。

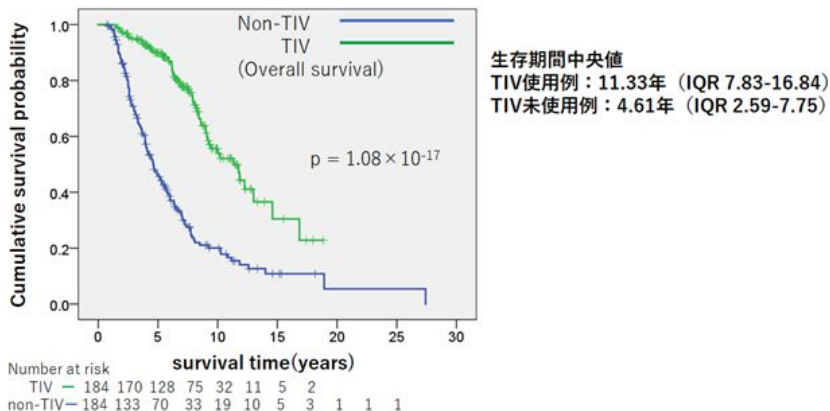
縦断的臨床情報を用いた治療介入検証として、気管切開を用いた人工換気 (tracheostomy invasive ventilation: TIV) 療法の ALS 患者の生存期間に与える影響への検討を行った。ALS 患者の死因の大部分は筋力低下、筋萎縮が呼吸筋に至ることによる呼吸不全であるため、気管切開を行って呼吸器を装着 (TIV) すると生存期間を延長することができる。しかし、TIV 療法を行っても ALS 自体は進行するため、身体はどこも動かず、コミュニケーションが困難な状態 (閉じ込め症候群) になっていく可能性があることもあり、TIV 療法の導入を選択する ALS 患者は 2 - 3 割である。インフォームドコンセントにおいて重要な情報であるが、実際に ALS 患者に対して TIV 療法がどのくらい生存期間に影響するのは、十分に検証されていない。TIV 療法について、ランダム化比較試験を行うことは倫理的にも実務的にも不可能であることは自明であり、縦断的臨床像の蓄積を用いた検討の意義がある。

ALS レジストリの 1429 例の ALS 患者のうち、データ不備があった患者や、登録以前に TIV を導入していた患者などを除き、TIV 導入群 190 名、TIV 非導入群 1093 名を対象とした。この 2 群では発症年齢、経管栄養の使用率、非侵襲的換気療法 (NIV) の使用率、リルゾールの使用率などが異なっていた。そこで、この患者群に対して、年齢、性別、発症病型、家族歴の有無、経管栄養の有無、リルゾールの有無、NIV の有無・改訂 El Escorial 診断基準適合度をパラメータとして傾向スコアマッチング (Propensity score matching) (非復元抽出の 1:1 の最近傍マッチング、caliper=0.2) を行い、導入群 184 名、非導入群 184 名を抽出し、比較検討した。その結果パラメータに関する背景の揃った TIV 群 184 例と TIV 未使用例 184 例を抽出できた。

マッチング後の背景は、これらのパラメーターすべてで有意差はなかった。

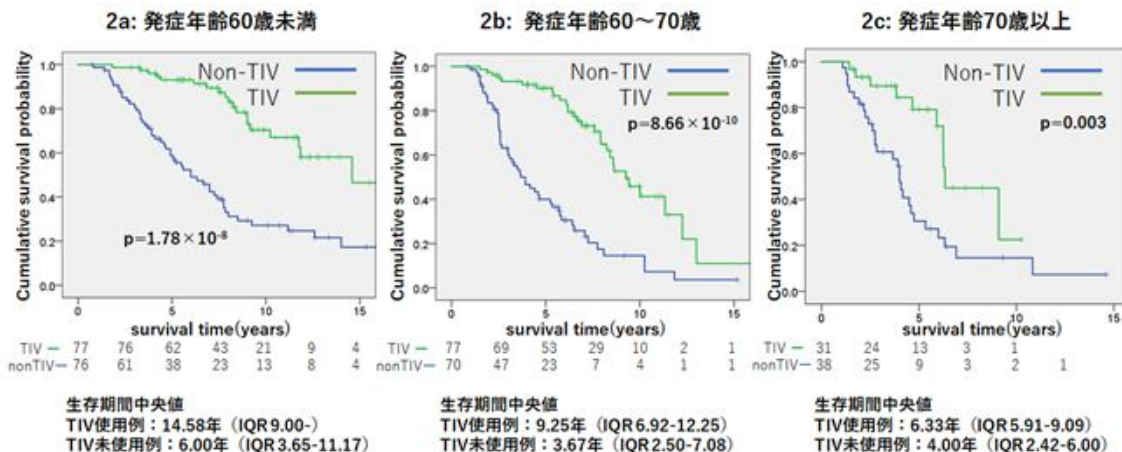
これらのパラメーターは ALS 患者における既知の予後因子であり、予後因子の背景がそろった 2 群を抽出することができた。この 2 群における生存期間の比較を、 Kaplan-Meier 法を用いて行った。生存曲線の違いは Log-rank 法により検定した。

TIV 使用例と TIV 未使用例の生存期間の比較



以上の結果から、TIV 療法は約 7 年間 ALS 患者の生存期間を延長していると考えられた。次に発症年齢別の生存曲線を検討した。

発症年齢で分けた TIV 使用例と TIV 未使用例の生存期間の比較



ALS 患者における TIV 療法の生存期間延長効果は発症年齢が若いほうが顕著であり、発症年齢 60 歳未満群では生存期間中央値が 8 年半以上延長されるのに比して、発症年齢が 70 歳以上の群では 2 年強しか延長されないことが示された。

TIV 導入群に関して TIV を導入してから死亡するまでの期間について Cox 比例ハザードモデルによる解析を行ったところ、呼吸筋麻痺型・高齢発症がそれぞれ独立した予後不良因子として抽出された ($p < 0.01$)。観察期間中に TIV 導入群の死亡は 62 例あり、死因は多い方から肺炎 (25.8%)、原因不明 (22.6%)、窒息・呼吸不全 (16.1%) の順であった。導入後の経過と死因には明らかな傾向はみられなかった。TIV 療法の導入により、ALS 患者の生存期間は有意に改善し、特に若年発症では長期の生存を得られる可能性が高いことが示された。ただし、高齢発症、呼吸筋麻痺型では TIV を導入しても生存期間は比較的短いことも示された。

(*J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(3):285-290.)

多彩な ALS 患者の進行予後と関連する因子の解析と同定が行われ、ALS 関連遺伝子の我が国における検証も進捗があった。また、縦断的臨床データを用いた治療介入の検証も実施し、論文発表に至った。ALS 患者に対する今後の治療開発、診療の改善に寄与するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Imai E, Nakamura T, Atsuta N, Nakatochi M, Suzuki M, Harada Y, Nakamura R, Hayashi N, Sobue G, Katsuno M.	4. 巻 online ahead of print
2. 論文標題 A nerve conduction study predicts the prognosis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00415-020-09858-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Vucic S, Higashihara M, Sobue G, Atsuta N, Doi Y, Kuwabara S, Kim SH, Kim I, Oh KW, Park J, Kim EM, Talman P, Menon P, Kiernan MC; PACTALS Consortium.	4. 巻 94
2. 論文標題 ALS is a multistep process in South Korean, Japanese, and Australian patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e1657-e1663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/WNL.0000000000009015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hayashi N, Atsuta N, Yokoi D, Nakamura R, Nakatochi M, Katsuno M, Izumi Y, Kanai K, Hattori N, Taniguchi A, Morita M, Kano O, Shibuya K, Kuwabara S, Suzuki N, Aoki M, Aiba I, Mizoguchi K, Oda M, Kaji R, Sobue G.	4. 巻 91
2. 論文標題 Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis patients undergoing tracheostomy invasive ventilation therapy in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurol Neurosurg Psychiatry.	6. 最初と最後の頁 285-290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jnnp-2019-322213.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Atsuta N, Nakamura R, Hayashi N, Tohnai G, Katsuno M, Sobue G.	4. 巻 71
2. 論文標題 The Role of Patient Registry in the Care and Therapeutic Development for Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: JaCALs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Nerve	6. 最初と最後の頁 1215-1225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1416201431.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikenaka K, Atsuta N, Maeda Y, Hotta Y, Nakamura R, Kawai K, Yokoi D, Hirakawa A, Taniguchi A, Morita M, Mizoguchi K, Mochizuki H, Kimura K, Katsuno M, Sobue G.	4. 巻 92
2. 論文標題 Increase of arginine dimethylation correlates with the progression and prognosis of ALS.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology.	6. 最初と最後の頁 e1868-e1877.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000007311.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tohnai G, Nakamura R, Sone J, Nakatochi M, Yokoi D, Katsuno M, Watanabe H, Watanabe H, Ito M, et al. Atsuta N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS).	4. 巻 64:158
2. 論文標題 Frequency and characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurobiol Aging.	6. 最初と最後の頁 e15-e19.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2017.12.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanikawa Chizu, Ueda Koji, Suzuki Akari, Iida Aritoshi, Nakamura Ryoichi, Atsuta Naoki, Tohnai Genki, Sobue Gen, Saichi Naomi, Momozawa Yukihide, Kamatani Yoichiro, Kubo Michiaki, Yamamoto Kazuhiko, Nakamura Yusuke, Matsuda Koichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Citruillination of RGG Motifs in FET Proteins by PAD4 Regulates Protein Aggregation and ALS Susceptibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 1473 ~ 1483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.01.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Naoki Atsuta, et al.
2. 発表標題 Prognosis and clinical features of ALS patients in Japan
3. 学会等名 30th International Symposium on ALS/MND 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熱田直樹、横井大知、平川晃弘、林直毅、中村亮一、伊藤瑞規、渡辺宏久、勝野雅央、和泉唯信、森田光哉、谷口彰、狩野修、桑原聡、青木正志、金井数明、小野寺理、梶龍兒、祖父江元、JaCALS
2. 発表標題 ALS患者の生存期間に与える非侵襲的換気補助療法の影響 レジストリを用いた解析
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熱田直樹、中村亮一、林直毅、横井大知、伊藤瑞規、渡辺宏久、勝野雅央、和泉唯信、森田光哉、谷口彰、織田雅也、阿部康二、狩野修、桑原聡、青木正志、金井数明、服部信孝、梶龍兒、祖父江元、JaCALS
2. 発表標題 ALSFRS-Rを用いた筋萎縮性側索硬化症患者の進行、予後予測と治験デザイン
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoki Atsuta, Daichi Yokoi, Ryoichi Nakamura, Hazuki Watanabe, Naoki Hayashi, Mizuki Ito, Hirohisa Watanabe, Masahisa Katsuno, Yuishin Izumi, Mitsuya Morita, Akira Taniguchi, Masaya Oda, Koji Abe, Kouichi Mizoguchi, Osamu Kano, Satoshi Kuwabara, Masashi Aoki, Nobutaka Hattori, Ryuji Kaji, & Gen Sobue, JaCALS
2. 発表標題 Prognosis of Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis according to motor phenotype
3. 学会等名 PACTALS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoki Atsuta, Daichi Yokoi, Ryoichi Nakamura, Hazuki Watanabe, Naoki Hayashi, Mizuki Ito, Hirohisa Watanabe, Masahisa Katsuno, Yuishin Izumi, Mitsuya Morita, Akira Taniguchi, Masaya Oda, Koji Abe, Kouichi Mizoguchi, Osamu Kano, Satoshi Kuwabara, Masashi Aoki, Nobutaka Hattori, Ryuji Kaji, & Gen Sobue, JaCALS
2. 発表標題 Prognosis of Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis according to motor phenotype
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 亮一 (Nakamura Ryoichi) (80723030)	名古屋大学・医学系研究科・特任助教 (13901)	
研究分担者	藤内 玄規 (Tohnai Genki) (00748353)	名古屋大学・医学系研究科・特任助教 (13901)	
研究分担者	勝野 雅央 (Katsuno Masahisa) (50402566)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	祖父江 元 (Sobue Gen) (20148315)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授 (13901)	