

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790817

研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症の病像・予後に関連する遺伝子的背景の探索・同定  
 研究課題名（英文）Search and identification of the genetic background for progression and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis patients

研究代表者

熱田 直樹 (NAOKI ATSUTA)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90547457

研究成果の概要（和文）：難病である筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療法開発には病態関連分子の同定が必要である。ALS 患者コホートによる大規模前向き臨床情報と遺伝子多型の解析を行い、ALS の進行と関連ある一塩基多型の探索を行った。その結果、ALS 患者の生存期間、球麻痺症状の出現までの期間に強い影響を与える多型を見出した。今後の検証により、ALS の進行・予後に影響する分子の同定につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To develop therapy for amyotrophic lateral sclerosis, identification of the disease-related genes and molecules is needed. I examined association between the large-scale prospective clinical information and the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the genomic genes in the ALS patient cohort. In the result, several SNPs had strong influences on survival duration or emergence of bulbar symptoms. Additional validations of this result are needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：

キーワード：筋萎縮性側索硬化症、遺伝子多型、前向き臨床像、関連解析

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は代表的な神経難病であり、根治的治療法が存在しない。その病態を明らかにし、治療法開発につながるために、病態に関与する分子群を見つけることが重要である。

1993 年に常染色体優性遺伝を示す ALS の責任遺伝子として SOD1 が同定され、SOD1 遺伝子変異は 20% 程度の家族性 ALS 患者の原因遺伝子となっていることが判明した。

SOD1 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスは ALS を発症することが示され、その後 10 年以上にわたり ALS の病態解明、治療法開発研究が SOD1 モデルマウスを中心に展開されてきた。しかし、SOD1 マウスで治療効果を示した薬剤が、ヒトでの治験においては無効となる結果が相次いでいる。大部分を占める孤発性 ALS に対する治療法開発戦略を立てるためには、孤発性 ALS の病態に関連する分子を定めていくことが必要

である。

ALS 患者の 90%以上は孤発性であり、病態と関連する分子は複数あると想定される。それらを同定し、治療法開発への手がかりをつかむために、孤発性 ALS 患者の臨床情報と遺伝子を蓄積し、ゲノムワイド遺伝子多型解析により関連遺伝子を探索する試みが進んでいる。

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 Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS) は、2006 年 2 月から ALS 患者の登録、遺伝子検体蓄積を行ってきた。全国 25 施設が参加し、前向き臨床情報が収集、蓄積されている。名古屋大学神経内科は事務局としてプロジェクト運営についての中心的な役割を果たしている。

孤発性 ALS の病態には多くの遺伝子が関与していることが想定されるが、これら遺伝子多型情報と JaCALS において蓄積された多彩な前向き臨床情報との関連を解析、検証することにより、ALS の進行や予後に関連する遺伝子を抽出し、関連する分子の探索同定につなげられる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は前向き臨床像として蓄積された ALS 臨床データを用い、ALS 患者の多彩な臨床像を明らかにし、遺伝子多型との関連を解析し、進行や予後に関わる病態関連遺伝子を探索しようとするものである。特に ALS の進行に関連する因子が同定できれば、治療法開発の重要な手がかりとなる可能性がある。

## 3. 研究の方法

臨床情報および、遺伝子検体はすべて文書でのインフォームドコンセントを得て登録、保存された。臨床評価は、病型、初発症状、肺活量、各種神経所見、重症度、各処置の導入時期などにつき行い、日常生活活動度 (ADL) の評価は日本版 ALSFRS-R を用いた。経管栄養導入や呼吸器装着などの病気の進行を示す重要なイベントおよび ALSFRS-R について、3 ヶ月に一度、患者もしくは主介護者に対して電話インタビューによる調査を行った。電話調査の整合性、信頼性について、37 例の ALS 患者で検証した。神経内科専門医の直接診察による ALSFRS-R 値と臨床研究コーディネーター (CRC) の電話調査による値の整合性を級内相関係数 (Intraclass correlation coefficient; ICC) により検証した。また日本版 ALSFRS-R を構成する 12 項目それぞれの一致をカッパ係数により検討した。

縦断像解析のために、プライマリーエンド

ポイントを死亡もしくは気管切開を伴う人工換気 (TPPV) 導入と定義し、セカンダリーエンドポイントとして、「発語不能」は ALSFRS-R の言語項目について 1 以下になった時点 (声以外の伝達手段を会話と併用するようになった時)、「嚥下不能」は ALSFRS-R の嚥下項目について 0 になった時点 (全面的に非経口性栄養になった時)、「上肢機能廃絶」は ALSFRS-R の書字、摂食動作項目のいずれも 0 になった時点 (ペンを握れず、かつ栄養摂取のための動作が全面介助になった時) と定義した。各エンドポイントについて、電話調査または医師による評価で時期を定めた。縦断像の解析には単変量解析として、Kaplan-Meier 法による生存解析および Log Rank 検定を用い、多変量解析として Cox 比例ハザードモデルを用いた。

JaCALS において蓄積された遺伝子リソースについて、独立行政法人理化学研究所ゲノム医科学研究センターにおける一塩基多型 (SNPs) を用いたゲノムワイド関連解析を用いて臨床像との関連を探索した。

## 4. 研究成果

### <縦断的臨床調査の検証>

縦断的臨床調査の信頼性検証についての対象 ALS 患者は男性 25 人、女性 12 人、調査時平均年齢は  $62.6 \pm 11.8$  (mean $\pm$ S.D.) 歳であり、CRC に対する電話調査への回答は 18 人が患者自身、19 人は主介護者が行った。回答した主介護者の内訳は配偶者が 15 人、子が 2 人、嫁が 1 人、籍の入っていない同居人が 1 人であった。

37 人全体について、神経内科専門医による直接診察による ALSFRS-R 日本版スコアと CRC による電話調査の間での ICC は 0.97 (95% CI: 0.94-0.98) と良好な一致 (図 1) を示した。それらのうち患者自身が電話調査に回答した 18 名における ICC は 0.96 (95% CI: 0.89-0.98)、主介護者が電話調査に回答した 19 名における ICC は 0.97 (95% CI: 0.92-0.99) といずれも良好な一致を示した。

各項目のカッパ係数を表 2 に示した。カッパ係数による一致の程度は 0.4-0.6 で moderate、0.6-0.8 で good、0.8-1.0 で excellent と判断され、0.6 以上であれば実質上の一致とみなされる。ALSFRS-R 日本版全 12 項目のカッパ係数は 0.56-0.85 といずれも良好な一致を示した。

図 1 ALSFRS-R 日本版スコア総点、神経内科専門医による直接診察と CRC による電話調査の比較

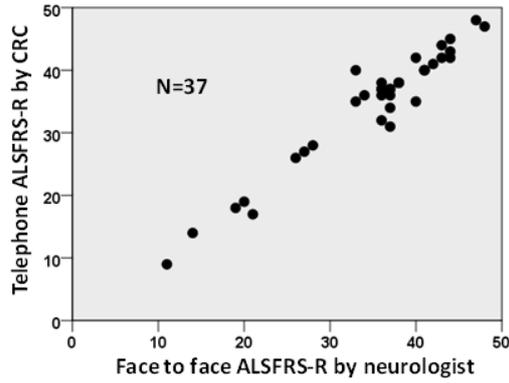


表 2 ALSFRS-R 日本版各項目別、神経内科専門医による直接診察と CRC による電話調査の比較 (カッパ係数)

項目	言語	唾液分泌	嚥下	書字	棋食動作	着衣、身の回りの動作
K値	0.85	0.58	0.85	0.77	0.78	0.62
項目	寝床での動作	歩行	階段登り	呼吸困難	起座呼吸	呼吸不全
K値	0.56	0.66	0.75	0.62	0.76	0.73

<縦断的臨床像の解析>

2009年9月までに JaCALS に登録された 353 例のうち、孤発例で改訂版 El Escorial 診断基準にて definite、probable または probable laboratory supported に該当する 302 例のうち、follow up されていない 23 例を除いた 279 例を対象に縦断像の解析を行った。平均経過観察期間は 1.9 年であった。

発症から各エンドポイントまでの期間に影響する因子として、性別、発症年齢、病型、入院治療を要する外傷歴の有無、全身麻酔を要する手術歴の有無、喫煙歴の有無、改訂版 El Escorial 診断基準適合度を候補として、単変量解析 (Log-rank test) でスクリーニングを行い、p 値が 0.05 を下回った因子について Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った。その結果、発症から死亡または TPPV 導入までの期間 (図 2) には発症年齢が高齢であることが有意なリスク ( $p<0.001$ ) となり、発症から発語不能まで ( $p<0.001$ ) (図 3)、発症から嚥下不能まで ( $p<0.001$ ) (図 4)、発症から上肢機能廃絶まで ( $p=0.019$ ) (図 5) も発症年齢が高齢であることが有意なリスクであった。発症から発語不能になるまでの期間は病型が球麻痺型であることも有意なリスク ( $p<0.001$ ) であった。

図 2

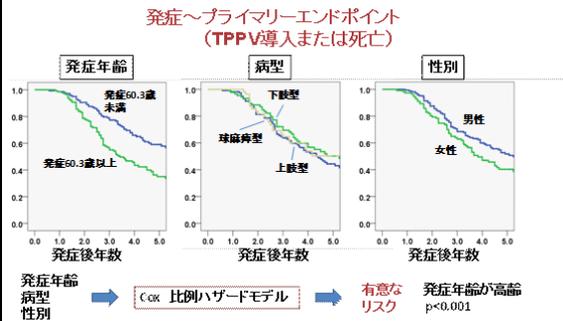


図 3

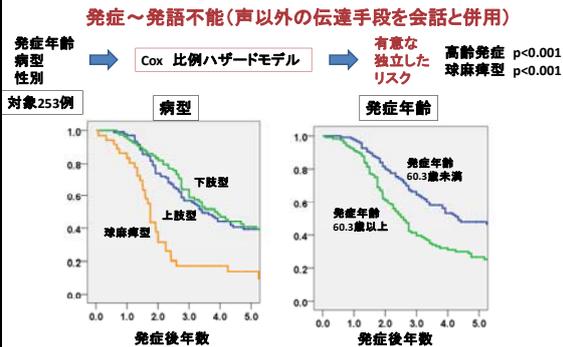


図 4

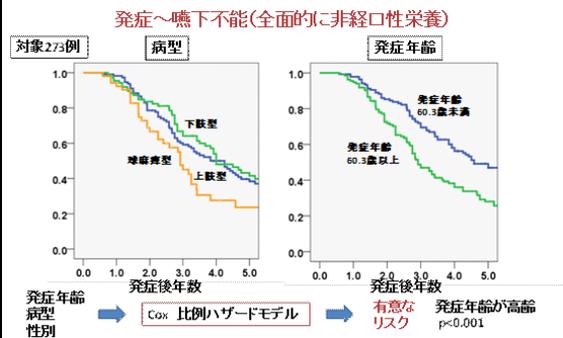
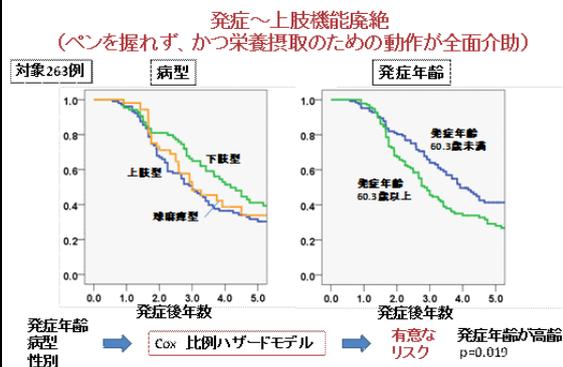


図 5



<遺伝子多型関連解析>

独立行政法人理化学研究所ゲノム医科学研究センターにおける SNPs を用いたゲノム

ワイド関連解析 (GWAS) は、Biobank Japan と JaCALS を合わせた ALS 患者 911 例とコントロール 3396 例について進められており、457,569 SNPs のタイピングが成功している。これらのうち、p 値が  $10^{-6}$  台を示す SNPs が 5 個、 $10^{-5}$  台を示す SNPs が 38 個同定された。

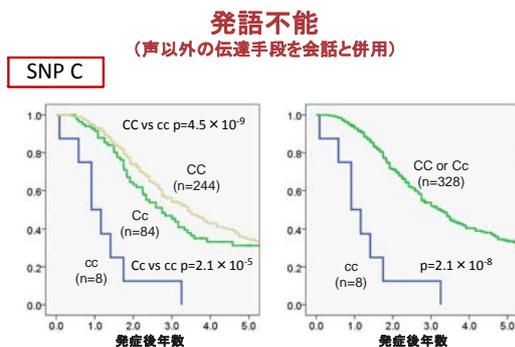
JaCALS 登録例のうち、380 例の縦断像データと遺伝子多型との関連を解析した。ALS との関連が示唆される SNPs 上位 50 個について発症からプライマリーエンドポイントおよびセカンダリーエンドポイントまでの期間に影響を与えていないか検証を行った。結果を表 2 に示す。

表 2 発症から各エンドポイントに到達する期間に影響する SNPs

	プライマリー エンドポイント	発語不能	嚥下不能	上肢機能 廃絶
SNP A	p=0.010	n.s	n.s	n.s
SNP B	p=0.010	p=0.002	p=0.012	n.s
SNP C	n.s	p=2.1 × 10 <sup>-8</sup>	p=0.017	n.s
SNP D	n.s	p=0.010	p=0.016	p=0.008
SNP E	n.s	p=0.012	n.s	n.s
SNP F	n.s	p=0.034	n.s	n.s
SNP G	n.s	n.s	p=0.029	p=0.029
SNP H	n.s	n.s	p=0.050	n.s
SNP I	n.s	n.s	n.s	p=0.028
SNP J	n.s	n.s	n.s	n.s
SNP K	n.s	n.s	n.s	n.s
SNP L	n.s	n.s	n.s	n.s

SNP の臨床経過への影響について代表的なものを図 6 に示す。

図 6



#### < 考察 >

孤発性 ALS の病態関連分子探索において、ALS 患者群と正常コントロール群を比較したゲノムワイド関連解析など様々なアプローチが行われており、一定の成果を上げてきている。ただし、これまでに報告された ALS 関連遺伝子多型は、発症にオッズ比 1.3 程度の影響を示すものであり、ALS 治療介入法開発の手がかりとなるような画期的成果はまだである。本研究では多彩な前向きに蓄積された ALS 臨床像を基に解析を行う点が特徴

であり、病態素因の共通する群を同定できれば、病態寄与度の高い因子を抽出できる可能性がある。

また、ALS 患者×正常コントロールという観点の関連解析のみではなく、ALS を発症した後の進行の違いを左右する分子を探索する観点が特徴である。このことにより、神経変性の病的過程を強く進めてしまう、あるいは病的過程から運動ニューロンを守る働きに関係する分子の同定につながる可能性があり、ALS 患者の治療法開発に対してより直接的な手がかりを提供できる可能性がある。

我々は質の高い縦断的臨床情報の蓄積を行えるシステムを構築し、その信頼性を確認した。このシステムを用いて現在のところ 90% 以上の登録患者について経過観察ができており、その点でも信頼性が高く、質の高い解析を行うことができる。

ALS の進行を左右する遺伝子多型について、いくつか候補を抽出することができた。多重検定の問題があるため、ただちに有意とすることはできず、検体のセカンドセットを用いた検証が必須である。JaCALS による遺伝子検体収集は精力的に継続中であり、今後より多くの検体を用いた解析を推進する予定である。

孤発性 ALS 病態関連分子の同定は、大きな謎である ALS の発症メカニズム、病態機序の解明に道を開く。また、病的な変性過程から運動ニューロンを守るシステムのカギとなる分子を同定することは、その発現を増加させる薬剤のスクリーニングなどを通じて、治療薬開発の端緒となる可能性がある。ALS によって萎縮した筋を回復させる治療の実現までには相当な道のりが想定されるが、この戦略により、ALS を早期に発見すれば相当程度まで進行を遅らせる、あるいは止めることのできる治療法を開発できる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

① Iida A, Takahashi A, Deng M, Zhang Y, Wang J, Atsuta N, Tanaka F, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Morita M, Akimoto C, Nakajima M, Kubo M, Kamatani N, Nakano I, Sobue G, Nakamura Y, Fan D, Ikegawa S. Replication analysis of SNPs on 9p21.2 and 19p13.3 with amyotrophic lateral sclerosis in East Asians. *Neurobiol Aging*. 2011;32:757.e13-4. 査読有

② Akimoto C, Morita M, Atsuta N, Sobue G, Nakano I. High-Resolution Melting (HRM)

Analysis of the Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) Gene in Japanese Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (SALS) Patients. *Neurol Res Int.* 2011;2011:165415. 査読有

③熱田直樹、中村亮一、渡辺はづき、渡辺宏久、伊藤瑞規、千田譲、田中章景、祖父江元.

JaCALS: a prospective multicenter ALS cohort study. *臨床神経学* 2011;51:903-5. 査読無

④熱田直樹、渡辺宏久、伊藤瑞規、中村亮一、千田譲、加藤重典、祖父江元. 日本版 ALSFRS-R を用いた電話調査による ALS 患者の評価 広域的前向き縦断調査への応用 *BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩* 63 巻 5 号 Page491-496, 2011. 査読有

⑤熱田直樹、祖父江元. Japanese consortium for amyotrophic lateral sclerosis research (JaCALS). *臨床神経学* 2010;50:928-30. 査読無

⑥Koike H, Atsuta N, Adachi H, Iijima M, Katsuno M, Yasuda T, Fukada Y, Yasui K, Nakashima K, Horiuchi M, Shiomi K, Fukui K, Takashima S, Morita Y, Kuniyoshi K, Hasegawa Y, Toribe Y, Kajiura M, Takeshita S, Mukai E, Sobue G. Clinicopathological features of acute autonomic and sensory neuropathy. *Brain.* 2010;133:2881-96. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

①熱田直樹 JaCALS; ALS の進行、予後規定因子 第 52 回日本神経学会学術大会シンポジウム 2011 年 5 月 19 日 名古屋

②熱田直樹 Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Workshop Recent advance in motor neuron disease research 2010 年 8 月 30 日 和光市 RIKEN BSI

③熱田直樹 Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS) 第 51 回日本神経学会総会シンポジウム 2010 年 5 月 22 日 東京

④熱田直樹 上位運動ニューロン症候を呈さない ALS の臨床病理学的特徴 第 51 回日本神経学会総会 2010 年 5 月 20 日 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

熱田 直樹 (NAOKI ATSUTA)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90547457

### (2)研究分担者

なし