

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461277

研究課題名(和文) 孤発性筋萎縮性側索硬化症の進行・病像に関連する遺伝子・分子の探索と同定

研究課題名(英文) Searching for factors associated with progression and prognosis in patients with sporadic 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・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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多施設共同筋萎縮性側索硬化症(ALS)疾患コホートJaCALSに登録された孤発性ALS患者縦断像の解析により、生存期間と重症度スケールの低下に対して発症年齢が共通して強く影響する因子であることを示した。また、発症年齢の影響は身体部位により異なることが明らかとなり、高齢で発症する孤発性ALSと若年で発症する孤発性ALSの背景因子が異なる可能性が示された。ゲノムワイド一塩基多型タイピング結果と重症度経時変化パターンとの関連解析により、症状の急速進行と関連する一塩基多型を明らかにし、それが筋の構造と機能に重要な役割を果たすタンパクであるTitinの発現低下と関連することを示した。

研究成果の概要(英文)：From analyses of a multicenter prospective amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cohort data, we showed that age at onset was a common prognostic factor for both functional decline and survival in ALS patients. We also showed that age of onset had a significant influence on survival time and the progression of bulbar symptoms, but had no influence on upper limb function in sporadic ALS. We classified the patterns of functional decline in sporadic ALS patients and conducted an association study between the pattern and genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs). We identified the following 4 clusters of longitudinal functional decline in the cases: a rapid decline cluster, an intermediate decline cluster, a sigmoidal decline cluster and a moderate decline cluster. We detected a linkage disequilibrium (LD) block associated with a rapid functional decline in patients with sporadic ALS, which is linked to decreased expression of TTN.

研究分野：神経内科学 運動ニューロン疾患

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 疾患コホート 予後因子 重症度スケール 一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は代表的な神経難病であり、根治的治療法は存在しない。その病態解明と治療法開発は喫緊の課題である。孤発性 ALS 患者に対する治療法開発のためには、孤発性 ALS における病態関連分子の同定が重要である。その試みの一つとして、多数の ALS 患者ゲノム遺伝子を収集し、一塩基多型 (SNPs) 等を用いて正常コントロール群との間でゲノムワイド関連解析が行われている。

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、遺伝子多型情報と多施設共同 ALS 患者前向きコホートである 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ることができる。

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と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同定しようとするものである。進行予後と関連する臨床的因子の解明、病理剖検検体の解析も進める。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

(1) 2006年2月から2012年10月までに JaCALS に登録され、孤発性で、改訂 El Escorial 診断基準で possible 以上、登録時呼吸器未装着であり、発症から5年までの ALSFRS-R 推移データが得られている ALS 患者 465 例を対象とした。70 万 SNPs + 25 万 exome chip を用いて全ゲノム遺伝子多型タイピングを行った。混合分布モデルを用いた解析により、ALSFRS-R の経時的変化パターンの分類を行い、得られた分類と発症年齢、性別、発症部位および遺伝子多型との関連解析を行った。

(2) 神経病理解析拠点である愛知医科大学加齢医学研究所との連携により、臨床的に上位運動ニューロン症候を捉えられなかった改訂 El Escorial 診断基準で suspected に相当する例 13 例と上位運動ニューロン症候が捉えられた possible 以上に相当する 29 例の病理所見を検討した。

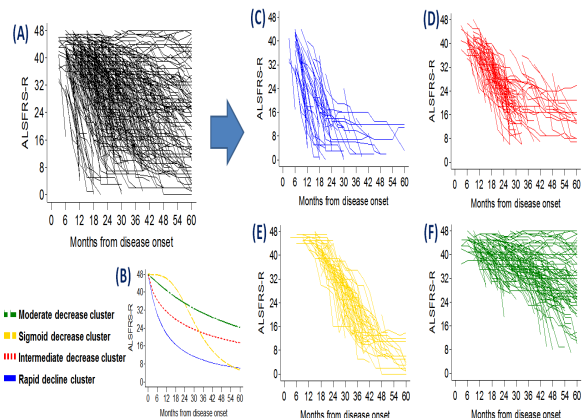
(3) 多施設共同 ALS 疾患コホート JaCALS に登録された孤発性 ALS 患者縦断像の解析により、生存期間に影響する臨床的因子と重症度スケール (ALSFRS-R) の低下に影響する因子を統合的に解析した。

JaCALS における孤発性 ALS 患者 648 例の縦断像解析により、発症年齢が臨床像に与える影響を解析した。

4. 研究成果

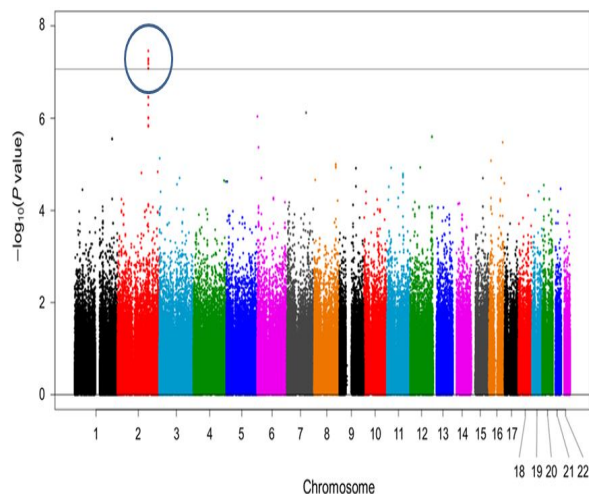
(1) 代表的な ALS 重症度スケールである ALSFRS-R の経時的変化パターンについて、孤発性 ALS 患者 465 例の経過を、非線形混合分布モデルを用いて 4 パターンに分類した。

図 1 . ALS の多様な進行パターンを 4 パターンに分類



その中で急速進行型に関連する遺伝子多型を 70 万 SNPs (一塩基多型) + 25 万 exome variants タイピング結果を用いて探索した。その結果、p 値が 10^{-8} 乗台で関連を示す SNPs を 7 個見出した。

図 2 . 急速進行型と関連する SNPs を示す Manhattan plot
有意な関連を示す SNPs を丸で示す。



それらは大部分の例で連鎖不平衡状態にあり、日本人の大規模ゲノム情報データベースである HGVD にて、マイナーアレルホモの場合に遺伝子 TTN の発現低下と結びついていることが示された。JaCALS において保存されているそれぞれの遺伝子型を持つ患者由来の株化細胞で、これらの SNPs のマイナーアレルホモ例での TTN 遺伝子発現低下を確認した。TTN 遺伝子は筋の構造と機能に重要な働きをするタンパク Titin を発現する。Titin は ALS 患者における治療ターゲットになりうるということが想定される。

(2) 剖検病理所見の解析において、suspected 例であっても 85% には錐体路変性の病理所見が認められた。また suspected 例の 85% で、抗 TDP-43 抗体で染まる細胞質内封入体を残存脊髄前角細胞内に認めた。残る 15% には FUS 陽性の好塩基性封入体を認めた。一方で possible 以上であった例は全例で TDP-43 陽性封入体を認めた。臨床的に上位運動ニューロン症候を認めない suspected 例であっても病理所見では上位運動ニューロン所見を認め例が多いこと、ただし、一部に TDP-43 pathology を認めない非典型例が含まれることを示した。

(3) JaCALS に蓄積された孤発性 ALS 患者縦断像に対して、重症度スケールの低下 (機能低下の進行) に影響する因子と、生存期間に影響する因子を、joint modelling approach を用いて解析を行った。その結果、生存期間に影響する臨床的因子と重症度スケール (ALSFRS-R) の低下に影響する因子は一部異なるが、発症年齢が共通して強く影響する因子であることを示した。

JaCALS における孤発性 ALS 患者 648 例の縦断像解析により、発症年齢が臨床像に与える影響を解析した。その結果、構音障害や嚥下障害が初発症状である割合は高齢群で有意に大きく、上肢筋力低下で発症する割合は若年群で有意に大きかった。また、構音障害などの球麻痺症状の進行は高齢群でより速かったが、上肢筋力低下症状の進行に対して年齢は影響していなかった。発症年齢の影響は部位により異なることが明らかとなり、高齢で発症する孤発性 ALS と若年で発症する孤発性 ALS の背景因子が異なる可能性が示された。

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 9 件)

Yokoi D, Atsuta N, Watanabe H, Nakamura R, Hirakawa A, Ito M, Watanabe H, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Oda M, Abe K, Mizoguchi K, Kano O, Kuwabara S, Kaji R, Sobue G; JaCALS. Age of onset differentially influences the progression of regional dysfunction in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2016 [Epub ahead of print] 査読有

Watanabe H, Atsuta N, Hirakawa A, Nakamura R, Nakatochi M, Ishigaki S, Iida A, Ikegawa S, Kubo M, Yokoi D, Watanabe H, Ito M, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Kanai K, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Kawata A, Aoki M, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G. A rapid functional decline type of amyotrophic lateral sclerosis is linked to low expression of TTN. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 [Epub ahead of print] doi: 10.1136/jnnp-2015-311541. 査読有

Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging*. 2016 39:219.e1-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.030. 査読有

Watanabe H, Atsuta N, Nakamura R, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Tomiyama H, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Aoki M, Tsuji S, Nakano I, Kaji R, Sobue G. Factors affecting longitudinal functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2015;16:230-6. doi:10.3109/21678421.2014.990036. 査読有

Doi Y, Atsuta N, Sobue G, Morita M, Nakano I. Prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *J Epidemiol*. 2014;24:494-9. 査読有

Atsuta N, Nakamura R, Watanabe H, Sobue G. Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). *Brain Nerve*. 2014;66:1090-6. 査読無

Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Nakamura R, Koike H, Sobue G. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open*. 2014;4:e005213. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005213. 査読有

Rabkin J, Ogino M, Goetz R, McElhiney M, Hupf J, Heitzman D, Heiman-Patterson T, Miller R, Katz J, Lomen-Hoerth C, Imai T, Atsuta N, Morita M, Tateishi T, Matsumura T, Mitsumoto H. Japanese and American ALS patient preferences regarding TIV (tracheostomy with invasive ventilation): a cross-national survey.

Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2014;15:185-91. doi: 10.3109/21678421.2014.896928. 査読有

Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Atsuta N, Sobue G, Shimozawa N, Inuzuka T, Tsuji S, Hozumi I. Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology*. 2014;82:705-12. doi: 10.1212/WNL.000000000000143. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

Naoki Atsuta, Hazuki Watanabe, Akihiro Hirakawa, Ryoichi Nakamura, Masahiro Nakatochi, Shinsuke Ishigaki, Aritoshi Iida, Shiro Ikegawa, Masahisa Katsuno, Yuishin Izumi, Mitsuya Morita, Akira Taniguchi, Koji Abe, Kouichi Mizoguchi, Osamu Kano, Takashi Imai, Masashi Aoki, Kenji Nakashima, Ryuji Kaji, Gen Sobue. A rapid functional decline type of sporadic ALS is linked to low expression of TTN
26th International Symposium on ALS/MND
Orlando, USA Dec.11,2015

熱田直樹, 渡辺はづき, 中村亮一, 横井大知, 渡辺宏久, 伊藤瑞規, 勝野雅央, 和泉唯信, 森田光哉, 谷口 彰, 織田雅也, 狩野 修, 溝口功一, 阿部康二, 桑原 聡, 梶龍兒, 祖父江元
我が国のALS患者に対する非侵襲的換気補助療法(NPPV)の転帰と予後
第33回日本神経治療学会総会、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市、2015年11月27日

熱田直樹、祖父江元
「一歩進んだALS診療」いかに予後予測を行うか
第56回日本神経学会学術大会、新潟コンベンションセンター、新潟県新潟市、2015年5月21日

熱田直樹、渡辺はづき, 中村亮一, 平川晃弘, 中朽昌弘, 渡辺宏久, 伊藤瑞規, 千田 譲, 和泉唯信, 梶 龍兒, 森田光哉, 富山弘幸, 谷口 彰, 溝口功一, 狩野 修, 阿部康二, 中野今治, 池川志郎, 飯田有俊, 祖父江元
ALSの進行を規定する因子の探索同定
第55回日本神経学会学術大会、福岡国際会議場、福岡県福岡市、2014年5月21日

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: 急速進行型孤発性ALSの検査方法、

検査キット、及び医薬のスクリーニング方法
発明者：祖父江元、熱田直樹、渡邊はづき、
平川晃弘、中枋昌弘
権利者：国立大学法人名古屋大学
種類：特許
番号：2015-051093
出願年月日：平成 27 年 3 月 13 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熱田 直樹 (ATSUTA, Naoki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：90547457

(2) 研究分担者

渡辺 宏久 (WATANABE, Hirohisa)
名古屋大学・脳とこころの研究センター・
特任教授
研究者番号：10378177

伊藤 瑞規 (ITO, Mizuki)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50437042

平川 晃弘 (HIRAKAWA, Akihiro)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90609330

(3) 連携研究者

祖父江 元 (SOBUE, Gen)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号：20148315

飯田 有俊 (IIDA, Aritoshi)
理化学研究所・統合生命医科学研究センター・
上級研究員
研究者番号：10277585