

201231113A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

大規模孤発性 ALS 患者前向きコホートの
遺伝子・不死化細胞リソースを用いた
病態解明、治療法開発研究
(H24-難治等(難)-一般-012)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 祖父江 元

(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成 25 (2013) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

大規模孤発性 ALS 患者前向きコホートの遺伝子・不死化細胞リソース
を用いた病態解明、治療法開発研究

祖父江 元 1

II. 分担研究報告

1. 次世代シーケンサーを用いた ALS 疾患関連遺伝子探索

田中 章景 7

2. ALS 疾患関連遺伝子解析

勝野 雅央 11

3. 大規模 ALS 患者前向きコホートの構築

渡辺 宏久 15

4. 筋萎縮性側索硬化症の病像・予後に関連する因子の探索・同定

熱田 直樹 19

5. 大規模 ALS 患者コホートのゲノム遺伝子検体を用いた遺伝子多型
解析

池川 志郎 23

6. 大規模 ALS 患者コホートのゲノム遺伝子検体を用いた遺伝子多型
解析

飯田 有俊 25

7. 多施設共同 ALS 患者コホートの構築

中野 今治 27

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 35

I . 総括研究報告

大規模孤発性 ALS 患者前向きコホートの遺伝子・不死化細胞リソースを用いた 病態解明、治療法開発研究

研究代表者 祖父江 元

名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、その90%が孤発性であり、平均3年で死に至る神経難病である。根治的治療法開発のために、孤発性ALSの治療標的となり得る病態関連遺伝子、分子を同定することが重要だが、その同定から病態意義の検証へ進める道筋はできていない。

我々は神経変性疾患に関する調査研究班（神経変性班）を基にALS患者の大規模前向きコホート（JaCALS）を立ち上げ、既に孤発性ALS患者760例の前向き臨床情報、DNA、B cell lineを蓄積した。この3点が結び付けられた大規模リソースは世界的にも類を見ない。この研究資源を拡大して1000例規模とし、理研ゲノム医科学研究センターにおける大規模一塩基多型（SNPs）解析、「次世代シーケンサーを用いた孤発性の神経難病の発症機構の解明に関する研究」班（代表：戸田達史）、「パーソナルゲノム情報に基づく脳疾患メカニズムの解明」班（代表：辻省次）と連携した次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析を行い、孤発性ALS関連遺伝子多型、rare variantsを抽出する。

さらにB cell lineを用いて、同定された遺伝子多型、rare variantsを持つ孤発性ALS患者からのiPS細胞を確立し、孤発性ALS危険因子の有無によるiPS細胞ライブラリーを慶応大学岡野研との連携で作製し、効率的に病態関連分子の検証、疾患モデル系の作製、病態解析研究を進め、薬剤スクリーニング系を確立してトランスレーショナルリサーチを推進する。大規模コホートによる発症・進行に関わる遺伝子多型の検索、それに基づくiPS細胞ライブラリー樹立と病態解明は、今後の孤発性神経疾患の病因・病態解明へのパラダイムを形成する可能性がある。

研究分担者

田中章景 横浜市立大学大学院医学系研究科
神経内科学・脳卒中医学 教授

勝野雅央 名古屋大学大学院医学系研究科・神
経内科学 准教授

渡辺宏久 名古屋大学医学部附属病院神経内
科 講師

熱田直樹 名古屋大学医学部附属病院神経内
科 助教

池川志郎 理化学研究所ゲノム医科学研究セ
ンター・ゲノム医科学 チームリー
ダー

飯田有俊 理化学研究所ゲノム医科学研究セ
ンター 骨関節疾患研究チーム・ゲ
ノム医科学、疾患遺伝子研究 上級
研究員

中野今治 自治医科大学医学部・神経内科学
教授

A.研究目的

ALSは90%が孤発性で、平均3年で死に至る神経難病である。孤発性ALSの病態関連分子を同定し、病態解析を進める道筋は未確立である。厚生省神経変性班を基に全国28施設が参加す

るJaCALS (Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research) では、孤発性ALS患者760例の前向き臨床情報、DNA、B cell lineを既に蓄積しており、1000例規模を目指してさらに拡大する。本研究はSNPs、rare variants解析によりALSの病態関連遺伝子を同定し、その遺伝子型を持つ患者由来のiPS細胞ライブラリーを構築して、病態的意義の検証、治療薬スクリーニング体制の整備を行うことを目的とする。

B.研究方法

JaCALS 研究リソースの維持・拡大

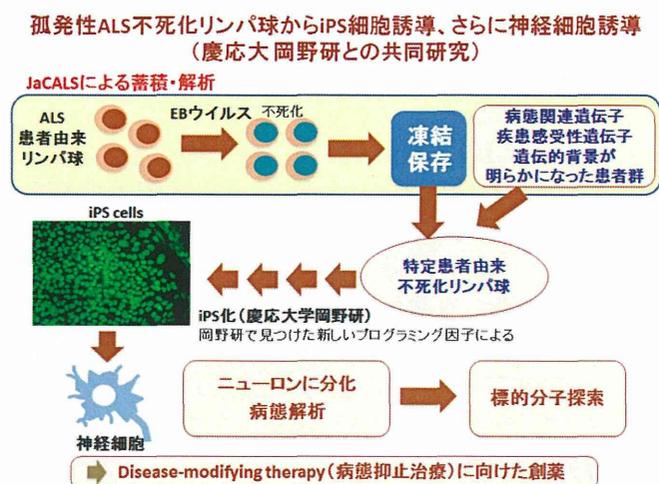
JaCALS 参加施設において ALS と診断された例について、文書によるインフォームドコンセントを得て登録を行った。登録時および1年おきに神経内科医師による臨床評価を実施した。また、信頼性検証済み(BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 2011)のシステムにより、臨床研究コーディネーター (CRC) による電話調査を3か月おきに実施し、代表的な ALS 重症度スケールである ALSFRS-R 日本版スコアおよび侵襲的処置の有無などの予後情報を調査した。登録時に静脈採血を行い、血液検体からDNA抽出およびEBウイルスを用いた B-cell line 作製を行った。臨床情報および血液検体は参加施設外に出る際に匿名化のうえ、研究統括施設 (名古屋大学) に送付された。参加施設をベースに JaCALS 運営委員会を組織し、検体は運営委員会の管理のもとで解析研究に供する形とした。患者の配偶者など患者と血縁が無く、文書でのインフォームドコンセントが得られた人からも静脈採血を行い、DNA抽出および B-cell line 作製を行いコントロール検体とした。コントロールは連結不可能匿名化した。運営事務局は名古屋大学に設置した。

孤発性 ALS 病態関連遺伝子の探索

孤発性 ALS 患者ゲノムを用いて 60 万 SNPs

を用いたゲノムワイド多型解析を行った。この多型データについて、孤発性 ALS 対コントロールの関連解析に加え、進行速度など ALS 患者の臨床像に影響を与えている可能性のある多型も探索した。平成 24 年夏に使用可能となった Human Exome Beadchips を用いて、エクソン内 25 万ヶ所の variants タイピング解析も実施した。SNPs 解析によって ALS に関連する可能性がある遺伝子および、これまでの病態解析研究の中で ALS との関連が示唆される遺伝子すべてについて、次世代シーケンサーを用いて網羅的シーケンスを行い、ALS 関連遺伝子変異の検索を行った。さらに、孤発性 ALS 患者ゲノムを全エクソームシーケンズ解析して、ALS 発症リスクおよび臨床像に影響する rare variants を探索した。

B-cell line を用いた iPS 細胞ライブラリー



探索された ALS 関連遺伝子多型、遺伝子異常を持つ患者由来の iPS 細胞作製を行う。患者が御存命の場合には文書によるインフォームドコンセントを得て、患者の皮膚等から組織の採取を行う。御存命でない場合は御遺族の同意を得て、保存されている B-cell line からの iPS 細胞作製を行う。iPS 細胞ライブラリーは JaCALS 運営委員会の管理、審査のもと、解析担当施設倫理委員会の承認を前提に研究資材としての提供を行える体制を構築する。得られ

た iPS 細胞から運動ニューロン、グリアへの分化誘導を行い、特定の遺伝子多型を有する群と有さない群、孤発性 ALS 患者由来群とコントロール群等を比較検討することで、病態関連遺伝子・分子の検証、病態解析を推進する。薬剤スクリーニングに活用可能なモデル系を作製する。得られた iPS 細胞を十分な審査のもと広く研究者に提供するシステムの構築を進める。

iPS 細胞ライブラリー構築は主に平成 25 年度に推進を予定している。

倫理面への配慮

ALS 患者コホートの構築、網羅的ゲノム解析については、研究に参加するすべての施設で倫理委員会承認を得た。研究対象者には倫理委員会にて承認された説明書・同意書を用いて十分な説明を行い、文書同意を得て参加いただいた。検体・資料を分析する際には、氏名・住所・生年月日などの個人情報を取り除き、匿名符号をつけ、連結可能匿名化して厳重に管理した。

C.研究結果

全国 28 施設が参加する ALS 患者の大規模前向きコホート (JaCALS) 登録数は、平成 25 年 3 月の時点で 760 例にまで至っている。

JaCALS参加施設(28施設)

東北大学	加藤昌昭 青木正志	宮城病院	今井尚志
新潟大学	石原 智彦 西澤正豊	岡山大学	山下徹 阿部康二
自治医科大学	森田光哉 中野今治	国立精神神経センター	村田美穂
東京都立神経病院	川田明広 林秀明	京都府立医科大学	滋賀健介 中川正法
静岡てんかん神経医療センター	溝口 功一	三重大学	谷口彰
東名古屋病院	豊嶋郁子	相模原病院	長谷川一子
名古屋大学	祖父江元	東京大学	高橋祐二 辻省次
ピハール花の里病院	日地正典 織田雅也	京都大学	山下博史 高橋良輔
	和泉唯信	鳥取大学	渡辺保裕 中島健二
	富山弘幸 大垣光太郎	山梨大学	長坂高村 澁山嘉久
順天堂大学	服部信孝	東京病院	相澤仁志
徳島大学	和泉唯信 梶能兒	北海道大学	加納崇裕 佐々木秀直
鈴鹿病院	酒井素子 小長谷正明	東邦大学大森病院	狩野修 岩崎泰雄
拓海会神経内科クリニック	藤田拓司	千葉大学	滋谷和幹 桑原聡
群馬大学	池田裕樹 岡本幸市	九州大学	林信太郎 吉良潤一

また、正常対照 (コントロール) は 226 例分が連結不可能匿名化の状態では保存されている。このリソースでは、前向き臨床情報、DNA、B cell line を蓄積しており、この 3 点が結び付けられた大規模リソースは世界的にも類を見ない。孤

発性 ALS の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析については、アジレント社の SureSelect Human All Exon V4+UTRs キットを用いて、ライブラリを作成し、名古屋大学遺伝子実験施設の SOLiD5500xl を用いて、エクソームシーケンス解析を行うシステムを確立、着手している。平成 25 年 1 月末の時点で、92 例のエクソームシーケンスが完了しており、平成 24 年度中には、220 例のシーケンスを完了する見込みである。得られたシーケンスリードを標準配列にマッピングし、多型・変異の検出を進めている。また、家族性 ALS の病因遺伝子や、孤発性 ALS の病態に関与することが報告されている既知の病態関連遺伝子について、アジレント社 HaloPlex システムを用いて、目的とする ALS 疾患関連遺伝子のエクソン部分をヒトゲノムから抽出、増幅してライブラリを作成し、ライフテクノロジー社 Ion PGM™システムを用いて網羅的に解析するシステムを構築した。ゲノムワイド大規模 SNPs 情報と臨床像との相関について、220 例 60 万 SNPs を用いた解析により、ALS 患者生存期間との関連を示す SNPs を p 値 10^{-7} 台を一つと 10^{-6} 台を 15 個見出し、追加検体による検証を進めている。連携する岡野研では B cell からの iPS 細胞作製に成功した。

D.考察

かつて極めて予後不良とされた慢性骨髄性白血病が、分子標的薬の開発により劇的に生存率が向上した例に示されるように、ALS に代表される神経難病も病態関連分子を定めることにより、劇的に予後を改善する治療薬を開発できる可能性がある。大規模な臨床情報、遺伝子検体リソースの組み合わせと大規模 SNPs、次世代シーケンサーを用いた解析により、病態関連遺伝子、分子の同定が可能である。

明確な原因遺伝子の存在する遺伝性疾患と異なり、孤発性疾患では疾患モデルの作製、病

態解析にはこれまで困難が大きかった。本研究では、孤発性 ALS 患者の臨床像、遺伝子多型ごとに iPS 細胞ライブラリーを作製することにより、病態関連分子の検証、病態解析研究が飛躍的に進むことが期待される。

iPS 細胞ライブラリーを基に病態モデルを構築することにより、病態関連分子に影響を与える薬剤のスクリーニングが劇的に進むことが期待される。我が国発の画期的治療薬開発につながるトランスレーショナルリサーチを進展させることができる。

我々はこれまでに JaCALS の設立、運営を進め、BioBank Japan と合わせた大規模検体による関連解析から、ZNF512B 遺伝子多型と孤発性 ALS との関連を明らかにした (Hum Mol Genet. 2011)。また、研究代表者は運動ニューロン疾患である球脊髄性筋萎縮症の病態解析から医師主導型治験まで展開 (Nature Med.2003, 2005, 2007, Lancet Neurol 2010) した実績を有する。本研究は平成 24 年 4 月着手の研究計画であり、臨床現場への具体的な成果の活用はこれからであるが、トランスレーショナルリサーチの推進により、孤発性 ALS 治療薬開発につながる成果が期待される。

孤発性 ALS の病態関連分子のいくつかは他の神経変性疾患にも関連すると想定され、病態関連分子の同定から創薬にいたる研究開発は、他分野にわたる研究の進展につながりうる裾野の広いものになることが強く期待される。

E. 結論

大規模 ALS 患者前向きコホートと蓄積された遺伝子を基に、病因 (発症) に関わる遺伝子および病態 (経過、予後、病型など) に関わる遺伝子の探索が可能である。また株化細胞からそれぞれの遺伝子型を持つ iPS 細胞ライブラリーの作成が可能である。これらは孤発性 ALS 病態解明の重要な戦略になりえると同時に、創薬に向けた分子標的の同定とその検証を行う

新しい枠組みになりえる。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. *Nat Med.* 2012;18:1531-8.

Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med.* 2012;18:1136-41.

Katsumata R, Ishigaki S, Katsuno M, Kawai K, Sone J, Huang Z, Adachi H, Tanaka F, Urano F, Sobue G. c-Abl Inhibition Delays Motor Neuron Degeneration in the G93A Mouse, an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One.*2012;7:e46185.

Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S. The TRK-fused gene is mutated in hereditary

motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet.* 2012;91:320-9.

Mano T, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Hashizume A, Tanaka F, Sobue G. Cross-sectional and longitudinal analysis of an oxidative stress biomarker for spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 2012;46:692-7.

Hashizume A, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Mano T, Atsuta N, Oe H, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Longitudinal changes of outcome measures in spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain.* 2012;135:2838-48.

Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13:1225-38.

Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa J, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis.* 2012;45:862-70.

Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R, Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Fujita K, Izumi Y, Kaji R, Hattori N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with

amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2012;33:2527.e11-6.

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain.* 2013 Feb 28. [Epub ahead of print]

Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Iguchi Y, Kobayashi K, Kimata T, Waza M, Tanaka F, Mori I, Sobue G. dnc-1/dynactin 1 Knockdown Disrupts Transport of Autophagosomes and Induces Motor Neuron Degeneration. *PLoS One.* 2013;8:e54511.

Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, Nakai A, Sobue G. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun.* 2013;4:1405.

Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med.* 2013;5:221-34.

2.学会発表

熱田直樹、中村亮一、渡辺はづき、渡辺宏久、伊藤瑞規、千田 讓、田中章景、梶 龍兒、森

田光哉、和泉唯信、青木正志、溝口功一、谷口彰、岡本幸市、饗場郁子、川田明広、長谷川一子、大垣光太郎、中野今治、祖父江元. 多施設共同 ALS 患者コホートにおける上位運動ニューロン症候を呈さない例の臨床像. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月. 東京

渡辺はづき、熱田直樹、中村亮一、渡辺宏久、伊藤瑞規、千田 讓、田中章景、梶 龍兒、和泉唯信、森田光哉、青木正志、溝口功一、谷口彰、岡本幸市、饗場郁子、川田明広、長谷川一子、大垣光太郎、中野今治、祖父江元. 我が国の ALS 患者に対する換気補助療法の現状と予後 : JaCALS の解析から. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月. 東京

中村亮一、熱田直樹、渡辺はづき、千田讓、伊藤瑞規、渡辺宏久、田中章景、梶龍兒、森田光哉、和泉唯信、青木正志、溝口功一、谷口彰、岡本幸市、饗場郁子、川田明広、長谷川一子、阿部康二、中野今治、祖父江元. ALS 患者の縦断像 (JaCALS からの解析) 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特記なし。
2. 実用新案登録 特記なし。

II. 分担研究報告

次世代シーケンサーを用いた ALS 疾患関連遺伝子探索

研究分担者 田中 章景

名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 准教授
(現) 横浜市立大学大学院医学系研究科 神経内科学 教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は代表的な神経難病で根治的治療法はなく、その開発は喫緊の課題である。ALS の 90%以上は孤発性であり、病態に関連する遺伝子・分子の同定から病態解明に至る道筋は未確立である。本研究では、次世代シーケンサーを応用して精度の高い ALS 関連遺伝子の同定を行い、ALS の発症・病態機構の解明と治療法開発を推進する。孤発性 ALS の疾患関連遺伝子の探索について、SOLiD5500xl での解析を進め、得られた variant 情報から ALS 発症あるいは臨床経過に影響を及ぼす遺伝子の同定を目指す。

A.研究目的・背景

ALS は、運動ニューロンが選択的に変性脱落する成人発症の神経変性疾患であり、発症から平均 3-4 年で死亡または永続的な人工呼吸器装着が必要となる。現在のところ根治的治療法はなく、その開発は喫緊の課題である。

ALS 患者の 90%以上は孤発性であり、5~10%は家族性である。家族性 ALS は SOD1、TDP-43、FUS など複数の病因遺伝子が同定されており、これらの遺伝子を手掛かりに疾患モデルを構築するなど病態解明研究が進められている。一方、大多数を占める孤発性 ALS については、複数の疾患感受性遺伝子や環境要因が複合的に関与して発症すると想定され、病態に関連する遺伝子・分子の同定から病態解明研究に至る道筋は、はるかに困難で未確立である。

我々はこれまで、孤発性 ALS の病態関連遺伝子に対して、患者剖検組織からの網羅的遺伝子発現解析(Ann Neurol 2005)を行い、神経変性過程初期より発現低下をきたしている遺伝

子を同定(J Neuropathol Exp Neurol 2007)して、これら遺伝子の 1 つである dynactin1 の遺伝子発現変化を培養細胞、線虫に展開し、孤発性 ALS のモデル開発を行ってきた。

本研究では、我々が推進してきたこのような ALS 病態関連遺伝子の同定と、それらを病態解析と治療法開発へ展開するという実績を進展させ、新世代のゲノム医学を応用したより精度の高い疾患感受性遺伝子の同定に基づき、ALS の発症・病態機構の解明と治療法開発を推進する。

疾患の病態に強く関与する遺伝子 variants は、アレル頻度が低く、多種類のものが存在するという仮説(multiple rare variants 仮説)が提唱されているが、頻度の高い一塩基多型 (SNPs) を用いたゲノムワイド関連解析では、これらの rare variants を検出することはできない。我々が有する日本を代表する ALS リソースを使って、研究期間内に ALS と関連した variants の同定とその検証を進める。

B.研究方法

既知の遺伝子変異が認められなかった孤発性 ALS 症例に関して、名古屋大学理学部遺伝子実験施設の次世代シーケンサー SOLiD5500xl を利用し、Agilent 社の Sureselect ターゲットエンリッチシステムを用いて、全エクソンの解析を行うシステムを構築し、現在運用、解析に入っている。ライブラリー作成に関しては、Covaris 社の超音波破碎システム Covaris S220 および LifeTechnology 社の Librarybuilder を導入し、高品質なライブラリーをハイスループットで作成出来る体制を整えた。得られた遺伝子データ解析に関しては、CLCbio 社の CLC Genomic Workbench ソフトウェアを導入し、SOLiD 5500xl で得られた遺伝子リード配列をヒト標準配列 (hg19) にマッピングし、その後に Variant 情報を収集、さらに dbSNP を始めとするデータベースとの比較検討を行う事によって、新規の SNVs (single nucleotide variants) を抽出できるシステムを構築した。

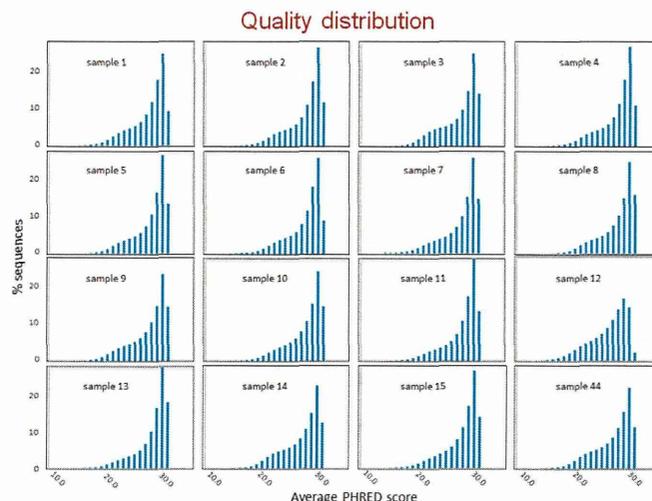
倫理面への配慮

研究はヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針および臨床研究に関する倫理指針を遵守して実施した。研究計画は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得ており、研究対象患者に対しては文書でのインフォームドコンセントを得ることを必須とした。患者臨床情報および遺伝子検体はすべて連結可能匿名化して保存、解析された。

C.研究結果

平成 25 年 2 月の時点で、ALS 患者 92 検体で全エクソンシーケンスが完了しており、順次データ解析が進行中である。平成 24 年度内に 220 検体で全エクソンシーケンスが完了する見込みである。

シーケンスが完了したもののうち、44 検体の Quality distribution を以下に示す。



Phred クオリティスコアは 20 以上が大半を占めており、問題ないと考えられる。

以下の表に示すように、10×以上のリードが得られた variants はトータルで平均 35,000 個あり、それらのうちアミノ酸置換を伴う rare variants は平均約 700 個認められた。

Sample	Total read counts	Total variants (>10x)	Rare variants	Rare variants	
				Amino acid change	Splice site effect
sample 1	210,497,279	37,059	4500	724	28
sample 2	168,163,493	39,877	5111	954	40
sample 3	167,914,713	36,078	2,877	736	24
sample 4	150,131,295	22,291	2,999	517	12
sample 5	134,999,546	34,202	2,449	603	22
sample 6	131,615,140	33,085	2,449	578	22
sample 7	113,216,389	32,638	2,726	547	29
sample 8	166,527,524	35,757	2,097	639	26
sample 9	123,533,608	25,894	3,137	819	38
sample 10	182,857,172	25,843	3,267	741	23
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
sample 44	155,697,448	24,129	4,215	740	23
Average	155,013,964.3	35,376.7	4,198	709.2	30.6

D.考察

ALS ゲノムの multiple rare variants を同定するための次世代シーケンサー利用と、莫大なデータを扱うゲノム情報処理を、有機的連携を計りつつ推進する体制が構築され、順調に進行中である。我々は、国内随一の ALS のゲノムリソースと前向き臨床情報を有し、疾患関連遺伝子の発現を動物モデルへ展開し、病態解析、

治療法開発へとつなげてきた数々の実績がある。この体制により ALS 克服へ向けての新たな戦略を開拓することができると考えられる。

E. 結論

次世代シーケンサーの急速な発展は、個人の莫大なゲノム情報を短時間に取得可能なレベルに至っている。この最先端技術を難病である ALS に応用するのみでなく、大規模患者コホートによる前向き臨床情報と結び付けて解析を行う点が特色である。ゲノム情報と臨床情報が両輪となることで、真に患者に根差した次世代医療への展望が開けるものと思われる。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. *Nat Med*. 2012;18:1531-8.

Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med*. 2012;18:1136-41.

Katsumata R, Ishigaki S, Katsuno M, Kawai K, Sone J, Huang Z, Adachi H, Tanaka F, Urano F, Sobue G. c-Abl Inhibition Delays

Motor Neuron Degeneration in the G93A Mouse, an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One*. 2012;7:e46185.

Mano T, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Hashizume A, Tanaka F, Sobue G. Cross-sectional and longitudinal analysis of an oxidative stress biomarker for spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 2012;46:692-7.

Hashizume A, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Mano T, Atsuta N, Oe H, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Longitudinal changes of outcome measures in spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain*. 2012;135:2838-48.

Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci*. 2012;13:1225-38.

Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa J, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis*. 2012;45:862-70.

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain*. 2013 Feb 28. [Epub ahead of print]

Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Iguchi Y, Kobayashi K, Kimata T, Waza M, Tanaka F, Mori I, Sobue G. dnc-1/dynactin 1 Knockdown Disrupts Transport of Autophagosomes and Induces Motor Neuron Degeneration. *PLoS One*. 2013;8(2):e54511.

Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, Nakai A, Sobue G. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun*. 2013;4:1405.

Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med*. 2013;5(2):221-34.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1.特許取得 特記なし。
- 2.実用新案登録 特記なし。
- 3.その他 特記なし。

ALS 疾患関連遺伝子解析

研究分担者 勝野 雅央

名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 准教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の 90%以上は孤発性であり、5 から 10%は家族性である。家族性 ALS の多くは単一遺伝子の変異により引き起こされると考えられ、原因遺伝子は複数同定されている。臨床的には孤発性 ALS と判断される例でも家族性 ALS の原因遺伝子異常が見いだされる例があり、それらの網羅的なスクリーニングが必要である。Ion Torrent を用いた既知の ALS 原因遺伝子スクリーニングシステムを構築し、それらの確認を行う。

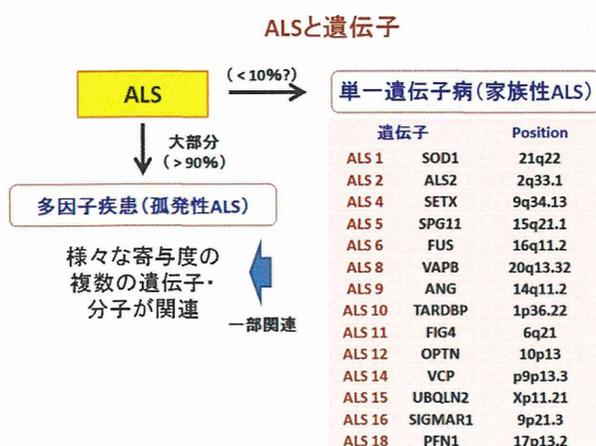
A.研究目的・背景

ALS は、代表的な神経難病であり、運動ニューロンの選択的な変性脱落により、発症から平均 3-4 年で死亡または永続的な人工呼吸器装着が必要となる。その病態解明と治療法開発は喫緊の課題である。

ALS 患者の 90%以上は孤発性であり、5～10%は家族性である。家族性 ALS は SOD1、TDP-43、FUS など複数の病因遺伝子が同定されており、これらの遺伝子を手掛かりに疾患モデルを構築するなど病態解明研究が進められている。

一方、大部分を占める孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子は十分に解明されておらず、病態解明から治療法開発に至る道筋は未確立である。孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子を同定することが、本研究の主目的の一つである。

実際には日本人の孤発性 ALS の 1.6%で SOD1 遺伝子変異が認められる（Neurol Res Int. 2011;2011:165415.）など、家族歴が明らかでなく、臨床的には孤発性 ALS と判断される例でも家族性 ALS の原因となる遺伝子異常が認められる例が存在する。孤発性 ALS 関連遺伝子の探索にあたっては、あらかじめ既知の家族性 ALS 原因遺伝子異常のスクリーニングを行う必要がある。



B.研究方法

次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行うにあたって、名古屋大学で既知の ALS 関連遺伝子解析を網羅的に行うシステムを構築した。現在、既知の家族性 ALS 原因遺伝子として、20 を超える遺伝子が同定されている。次世代シーケンサー技術が登場する以前は、これ

らの遺伝子を網羅的に解析する事は事実上困難であったが、Life Technology 社の次世代型シーケンサー Ion Torrent システムを導入する事により、既知の ALS 遺伝子に変異が存在するか否かを迅速に検討出来るシステムを構築し、運用を開始している。

次世代シーケンサーでの解析を行うためには、まず抽出したヒトゲノムから、ALS 関連遺伝子の領域のみが抽出されたゲノムライブラリを作成する必要がある。我々は、Agilent Technology 社の Haloplex システムを採用し、SOD1, TARDBP, FUS などを含む、合計 22 の既知の ALS 関連遺伝子の全エクソン領域を含む 90kbp に亘る広範囲な遺伝子領域を、カスタムデザインを設計する事によって、ゲノム DNA から抽出、精製した。

既知の遺伝子変異が認められないものの、明らかに家族内発症が疑われる症例については、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、家系内での比較検討、原因遺伝子の絞り込みを行う事によって、新たな ALS 原因遺伝子の同定を目指す。

倫理面への配慮

研究はヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針および臨床研究に関する倫理指針を遵守して実施した。研究計画は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得ており、研究対象患者に対しては文書でのインフォームドコンセントを得ることを必須とした。患者臨床情報および遺伝子検体はすべて連結可能匿名化して保存、解析された。

C.研究結果

ゲノムライブラリを作成、Ion Torrent でのシーケンスを行うといった一連のシステムを構築し、現在解析を始め、データを蓄積している。既知の遺伝子変異が明らかになった場合には、前向き臨床情報と合わせた解析を行う事で、

変異の違いによる臨床症状、予後の違いなどの解析を行う。

家族内発症が認められるが、既存の遺伝子変異が認められない6家系については、全エクソン解析およびデータ解析を行っているが、現時点では新規原因遺伝子の同定には至っていない。

D.考察

臨床的に孤発性 ALS と判断される例で、SOD1 遺伝子に加え、家族性 ALS 原因遺伝子である TDP43 等で異常が認められる例があり、その原因としては de novo 変異、家族歴が存在するが認知されていないなど複数の要因が考えられる。これらの単一遺伝子病として発症する ALS と多因子疾患と想定される孤発性 ALS との間には、病態を共有している部分と異なる部分があると想定される。孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子を探索するにあたり、できるだけ純粋な孤発性 ALS をまとめて解析を行う必要があり、遺伝子異常のスクリーニングは重要である。

一方で、家族性 ALS 原因遺伝子は同様の病理変化を引き起こすという点で、孤発性 ALS の病態とも深く関わっている可能性がある。より多くの家族性 ALS 原因遺伝子を同定することは、孤発性 ALS の病態解明、治療方開発にもつながる可能性がある。家族歴が明確で、既知の原因遺伝子異常を認めない例については、十分な説明と同意をいただいたうえで、家系内の検体採取を進め、原因遺伝子同定を目指すことは重要である。

E.結論

孤発性 ALS 病態関連遺伝子・分子の探索を進めるにあたり、既知の家族性 ALS 原因遺伝子のスクリーニングは重要である。引き続き、次世代シーケンサーを用いたスクリーニングシステムによる解析を推進する。

F.健康危険情報

特記なし。

G.研究発表

1.論文発表

Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. *Nat Med.* 2012;18:1531-8.

Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Jiang YM, Huang Z, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Iida M, Tohnai G, Tanaka F, Muramatsu S, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med.* 2012;18:1136-41.

Katsumata R, Ishigaki S, Katsuno M, Kawai K, Sone J, Huang Z, Adachi H, Tanaka F, Urano F, Sobue G. c-Abl Inhibition Delays Motor Neuron Degeneration in the G93A Mouse, an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One.* 2012;7:e46185.

Mano T, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Hashizume A, Tanaka F, Sobue G. Cross-sectional and longitudinal analysis of an oxidative stress biomarker for spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 2012;46:692-7.

Hashizume A, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Mano T, Atsuta N, Oe H,

Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Longitudinal changes of outcome measures in spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain.* 2012;135:2838-48.

Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13:1225-38.

Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa J, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis.* 2012;45:862-70.

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain.* 2013 Feb 28. [Epub ahead of print]

Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Iguchi Y, Kobayashi K, Kimata T, Waza M, Tanaka F, Mori I, Sobue G. dnc-1/dynactin 1 Knockdown Disrupts Transport of Autophagosomes and Induces Motor Neuron Degeneration. *PLoS One.* 2013;8(2):e54511.

Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, Nakai A, Sobue G. Heat shock factor-1

influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun.* 2013;4:1405.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1.特許取得 特記なし。
- 2.実用新案登録 特記なし。
- 3.その他 特記なし。

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
（分担）研究報告書
大規模孤発性 ALS 患者前向きコホートの遺伝子・不死化細胞リソースを用いた
病態解明、治療法開発研究

大規模 ALS 患者前向きコホートの構築

研究分担者 渡辺 宏久

名古屋大学医学部附属病院 神経内科 講師

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、平均 3 年で死に至る代表的な神経難病である。我々は ALS 患者の大規模前向きコホート（JaCALS : Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research）を立ち上げ、全国 28 施設が参加し、既に孤発性 ALS 患者 760 例の前向き臨床情報、DNA、B cell line を蓄積している。この 3 点が結び付けられた大規模リソースは世界的にも類を見ない。この研究資源を拡大して 1000 例規模とする予定である。

A.研究目的

ALS は成人発症の神経変性疾患であり、進行性に全身の骨格筋萎縮をきたし、発症から平均 3-4 年で死亡または永続的な人工呼吸器装着に至る。根治的治療法は存在しない。

標準的医療・介護福祉体制を確立し、治療介入研究を推進するためには、ALS の縦断像・横断像を明らかにし、患者の予後等に関与する因子を解明する体制づくりが必須である。また新規治療法開発研究促進のためには、良質の自然歴情報と結びついた遺伝子情報の蓄積が必要である。得られる臨床情報は臨床現場での患者への説明や診療方針決定のための貴重な基礎資料となり、診療の質向上に寄与できる。また治験計画策定・推進、医療・福祉行政の施策策定にあたって必須の情報となる。千例規模の患者ゲノム遺伝子解析は難病とされる神経変性疾患の病態解明に寄与し得る。

本研究は神経変性疾患に関する調査研究班（神経変性班）をベースに多施設共同 ALS 患者コホート（JaCALS）を構築し、前向き縦断的臨床情報、DNA、B cell line を蓄積し、これ

らを基に病態関連遺伝子を同定し、その遺伝子型を持つ患者由来の iPS 細胞ライブラリーを構築して、病態的意義の検証、治療薬スクリーニング体制の整備を行うことを目的とする。JaCALS コホートはさらなる拡大と縦断的臨床情報の継続収集を進め、1000 例規模にする。

B.研究方法

研究の対象は神経内科医が ALS と診断し本人に告知した患者とした。医師による臨床評価は、病型、初発症状、肺活量、神経所見、各処置の導入時期などにつき行い、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（エンドポイント）および ALSFRS-R について、3 ヶ月に一度、臨床研究コーディネーター（CRC）から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。CRC には、研究の概要、関連する倫理指針、研究実施手順、既知の ALS 臨床像、患者および介護者に対して行うべき配慮等に関する研修を実施した。電話調査は信頼性検証済み（BRAIN

and NERVE: 神経研究の進歩 2011) のシステムを用いて行った。各実施医療機関において文書による同意の得られた患者から採血を行い、連結可能匿名化を行った後、外部委託施設に送付し、DNA 抽出および B-cell line 化を行った。処理された検体はゲノム DNA 保存センターにて保管した。ALS に罹患しておらず、患者と血縁関係ではなく、文書での同意が得られた人について採血を行い正常対照 (コントロール) 検体とし、連結不可能匿名化の状態 で DNA および B-cell line の形で保存した。

神経変性班および国立病院機構に属する施設の中から研究委員会を組織し、委員会の管理の下で研究プロジェクトを審査し、広く活用できる体制を整えた。

倫理面への配慮

すべての研究参加者には十分な説明を行い、文書にて同意を取った。臨床情報、遺伝子検体について、参加施設内での匿名化および中央事務局での匿名化を行い、二重に匿名化された形で解析に供する形とした。研究参加は自由意志であり、同意はいつでも撤回可能とした。研究計画は、症例登録を行っている全施設で施設倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

全国 28 施設で患者登録システムの構築を行い、症例登録を進めている。2013 年 3 月の時点で、ALS 患者 760 例の登録ができており、前向き臨床像の調査が継続中である。また、同数のゲノム DNA、B-cell line の保存がなされている。正常対照は 226 例の登録を行い、連結不可能匿名化された状態でゲノム DNA、B-cell line の保存がなされている。

JaCALS 参加施設を以下に示す。

東北大学 加藤昌昭 青木正志
新潟大学 石原智彦 西澤正豊

自治医科大学 森田光哉 中野今治
東京都立神経病院 川田明広 林秀明
静岡てんかん神経医療センター 溝口功一
東名古屋病院 饗場郁子
名古屋大学 祖父江元
ビハーラ花の里病院 日地正典 織田雅也
和泉唯信
順天堂大学 富山弘幸 大垣光太郎
服部信孝
徳島大学 和泉唯信 梶龍兒
鈴鹿病院 酒井素子 小長谷正明
拓海会神経内科クリニック 藤田拓司
群馬大学 池田将樹 岡本幸市
宮城病院 今井尚志
岡山大学 山下徹、阿部康二
国立精神神経センター 村田美穂
京都府立医科大学 滋賀健介 中川正法
三重大学 谷口彰
相模原病院 長谷川一子
東京大学 高橋祐二 辻省次
京都大学 山下博史 高橋良輔
鳥取大学 渡辺保裕 中島健二
山梨大学 長坂高村 瀧山嘉久
東京病院 相澤仁志
北海道大学 加納崇裕 佐々木秀直
東邦大学大森病院 狩野修 岩崎泰雄
千葉大学 澁谷和幹 桑原聡
九州大学 林信太郎 吉良潤一

登録した ALS 患者について、現在のところ 92% で予後の観察ができています。

年齢で分けた予後の違いを示す。