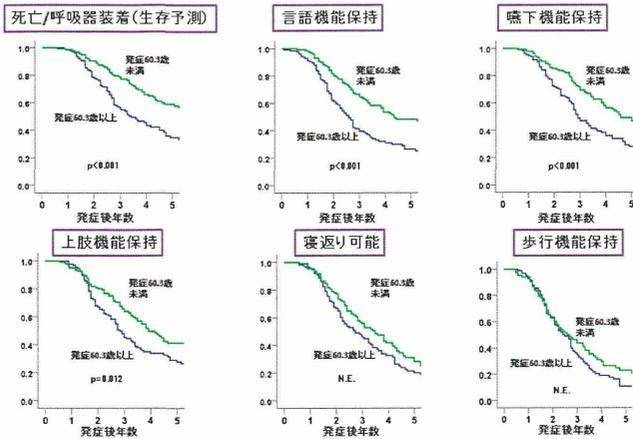


発症年齢による予後予測



発症年齢は生命予後のみでなく多彩な機能予後の予測が可能

発症から死亡/呼吸器装着に至るまでの期間、言語機能廃絶、嚥下機能廃絶、上肢機能廃絶、寝返り不能および歩行機能廃絶に至るまでの期間を発症 60.3 歳以上群と未満群に分け、Kaplan-Meier 曲線で示したものである。発症年齢は生命予後のみでなく、多彩な機能予後に影響していることが示される。前向きに臨床経過を調査している JaCALS では、生存のみでなく多彩な日常生活活動度の予後を把握することが可能である。

D. 考察

ALS に対して、効率の良い長期縦断自然歴把握システムを構築できている。CRC からの電話による予後把握システムにより、臨床現場の負担を増やすことなく経時的な情報収集が可能となり、聞き取り調査を主治医にフィードバックすることで日常臨床の充実も図るという双方向性の診療・研究体制を確立した。また転医による脱落例を最小限にして長期予後を把握できる点でも、有用なシステムであると考えられる。

前向き臨床情報をベースに予後予測因子、運動機能・非運動機能に関与する因子の抽出ができており、多彩な解析が実施可能である。臨床現場への直接の貢献のみならず、治験デザイン策定などの貴重な基礎情報を発信できる。

今回我々が構築したシステムは、多くの神経変性疾患に応用可能である。多様な前向きの臨床情報とリンクした大規模遺伝子リソースは、神経変性疾患分野では我が国で十分に整備されたことが無く、重要なモデルとなりうる。

E. 結論

ALS に対して優れた長期縦断自然歴把握システムを構築した。この情報を元に多彩な解析が可能であり、診療、福祉、介護、行政の現場、施策策定、治験など臨床研究のデザイン構築に活用できる貴重な情報発信が行える。

前向き臨床像に匿名化された遺伝子リソースを結びつけており、疾病の発症のみならず、進行、臨床病型、予後など従来とは異なる視点から遺伝子多型との相関を調べることの出来る基盤が整備された。今後長きにわたり、我が国発の研究を支える資源となりうる。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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]

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。

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

研究分担者 熱田 直樹

名古屋大学医学部附属病院 神経内科 助教

研究要旨

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、神経変性疾患に関する調査研究班をベースに構築され、ALS 患者の登録、遺伝子検体蓄積を行ってきた。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、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。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。

A.研究目的・背景

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、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班（神経変性班）をベースに構築され、ALS 患者の登録、遺伝子検体蓄積を行ってきた。全国 28 施設が参加し、2013 年 3 月現在で 760 例の遺伝子検体が保存され、前向きの臨床情報が収集、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、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。このような検討は既に癌で大きな成果を挙げており、特定の遺伝子多型が個々の癌の予後推定や治療にきわめて重要になってきている。またこれらを通して病態解明の糸口にもなっている。ALS をはじめとする神経変性疾患でも癌と同様に予後や病像に影響する遺伝子多型が存在することが予想される。

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。

B.研究方法

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、保存した。臨床調査票および血液検体はすべて登録施設内で連結可能匿名化を行い、名古屋大学内

に設置した臨床データベースおよびゲノム遺伝子保存センターに保管する体制とした。医師による臨床評価は、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、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。登録した施設での診療が継続されている患者については、医師による臨床評価を一年に一回実施するものとした。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。

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実施した。

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

<縦断的臨床像の解析>

JaCALS に登録後 3 年以上経過した 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 導入までの期間には発症年齢が高齢であることが有意なリスク（ $p < 0.001$ ）（図 1）となり、発症から発語不能まで（ $p < 0.001$ ）（図 2）、発症から嚥下不能まで（ $p < 0.001$ ）（図 3）、発症から上肢機能廃絶まで（ $p = 0.019$ ）（図 4）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 1

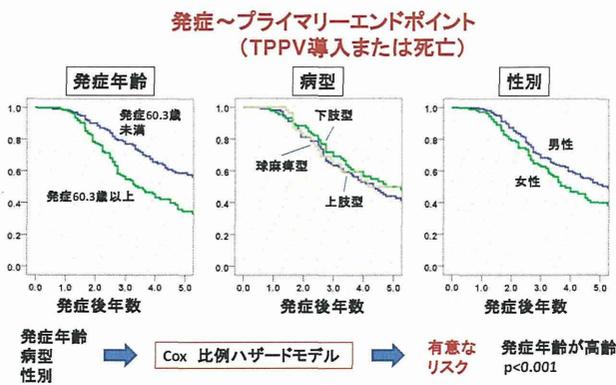


図 2

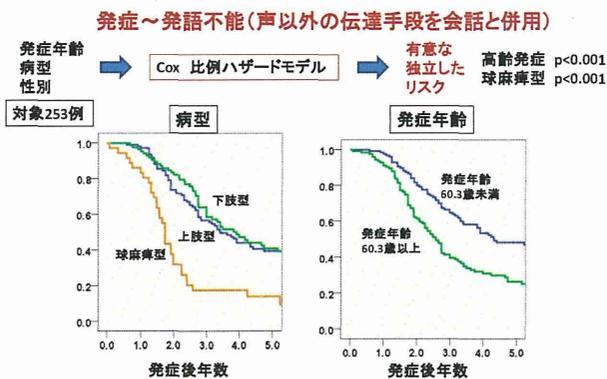


図 3

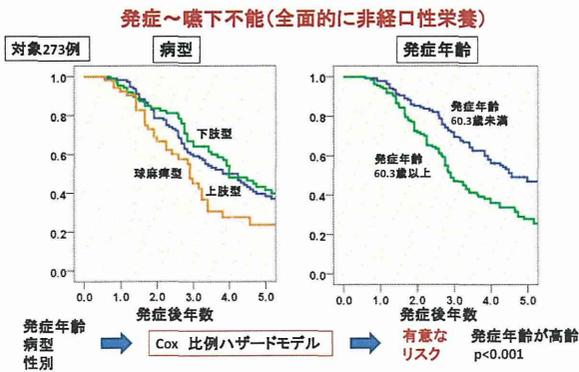
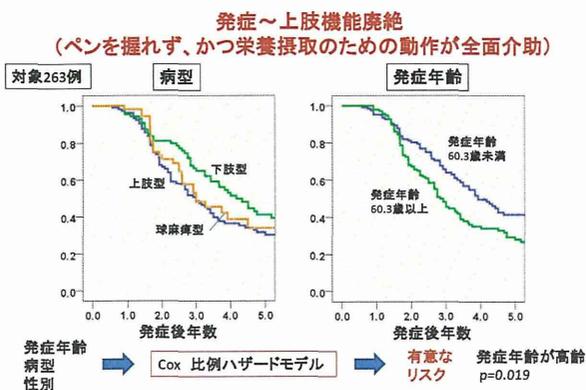


図 4



<遺伝子多型解析>

ALS×コントロールのゲノムワイド関連解析のためにタイピングされた 216 例の 59 万 SNPs データを用いて、発症から死亡もしくは気管切開を伴う人工換気導入までの期間との関連を Cox 回帰を用いて解析した。マイナーアレル頻度 1%未満、call rate が 99%未満、ハーディーワインバーグ平衡 p 値が 1.0×10^{-10} 未満の SNP を除外し、480,477 SNPs を用いた解析を行った。p 値が 10^{-6} 位の関連を示す SNP を 3 つ見出した。

D.考察

孤発性 ALS の病態関連分子探索において、これまで剖検病理検体を用いた脊髄前角細胞での網羅的遺伝子発現解析、諸外国での 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孤発性 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、オッズ比の高い、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。

E.結論

ALS の病像・予後に関連する臨床的因子を明らかにすることができた。さらに 216 例の解析で関連遺伝子多型候補を抽出することができた。JaCALS リソースを用いた 600 例規模の遺伝子多型タイピングが平成 24 年度中にできる見込みであり、病像・予後に関連する有意な遺伝子多型を示すことができる可能性がある。

F.健康危険情報

特記なし。

G.研究発表

1.論文発表

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.

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.

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.

Rabkin J, Ogino M, Goetz R, McElhiney M,

Marziliano A, Imai T, Atsuta N, Morita M, Tateishi T, Matsumura T, Mitsumoto H. Tracheostomy with invasive ventilation for ALS patients: neurologists' roles in the US and Japan. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2013 ;14:116-23.

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。

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

研究分担者 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

研究要旨

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の根治的治療法開発のために、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である。ALS 患者の大規模前向きコホート（JaCALS）では、既に孤発性 ALS 患者 760 例の前向き臨床情報およびゲノム DNA が蓄積されている。この遺伝子検体を用いて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）解析を実施しており、コントロール検体との比較および遺伝子多型と病像・予後との関連解析を進めている。

A.研究目的

ALS はその 90%が孤発性であり、平均 3 年で死に至る代表的な神経難病である。孤発性 ALS の病態関連遺伝子・分子を同定し、病態解析を進める道筋は未確立である。厚労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、ゲノム DNA を既に蓄積しており、1000 例規模を目指してさらに拡大中である。本研究はゲノムワイド一塩基多型（SNPs）解析により ALS の病態関連遺伝子の同定を目指すものである。これまで世界的にも行われてきた疾患群（ALS）×コントロールの関連解析のみでなく、大規模前向き臨床像情報を生かした病像・経過・予後との関連解析により、病態解明や治療法開発の手がかりとなる遺伝子・分子の同定を試みる。

B.研究方法

JaCALS に登録された ALS 患者 650 例の遺伝子検体について全ゲノム網羅的な遺伝子多型タイピングを行った。SNP アレイは、70 万 SNPs+25 万 exome chip を搭載した Illumina 社製 OmniExpress BeadChip を使用した。全例について SNP タイピングし、データの品質管理を行った（Hardy-Weinberg 平衡検定値、call rate 等）。さらに identity-by-state 法により隠れた近親者を検定し、一方を除外した。同時に QQ プロット（quantile-quantile plot）を作製し、 λ 値（inflation factor）により集団構造化の可能性が低いことを確認した。また、HapMap データに基づく主成分分析により、解析した集団の集団階層化がないことを確認した。

C.研究結果

JaCALS 検体 650 例の 70 万 SNPs および 25

万 exome タイピングは平成 25 年 3 月末に完了する見込みである。タイピングできしだい、JaCALS において蓄積されている大規模縦断像データ等、臨床情報との関連解析を実施できる見通しである。

D. 考察

我々はこれまでに JaCALS および 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)。諸外国でも ALS 患者群と正常コントロール群を比較した大規模ゲノムワイド関連解析が複数行われており、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孤発性 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。本研究においては、多彩な前向きに蓄積された ALS 臨床像との関連解析も行う点が特徴であり、よりオッズ比の高い、病態寄与度の高い因子を抽出できる可能性がある。

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）に関わる遺伝子多型および病態（経過、予後、病型など）に関わる遺伝子多型の探索が可能である。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tetsuka S, Morita M, Iida A, Uehara R, Ikegawa S, and Nakano I. ZNF512B gene is a prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 324:163-166 (2013).

Iida A, Hosono N, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Nakajima M, Kubo M, Nakamura Y, and Ikegawa S. Novel deletion mutations of OPTN in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Neurobiol Aging*. 33:1843.e19-24 (2012) .

Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Kubo M, Nakamura Y, and Ikegawa S. Optineurin mutations in Japanese amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 83:233-235 (2012).

Iida A, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Nakamura Y, and Ikegawa S. Large-scale screening of TARDBP mutation in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Neurobiol Aging*. 33:786-790 (2012).

2. 学会発表

飯田有俊、細野直哉、佐野元規、亀井徹正、大嶋秀一、徳田虎雄、中島正宏、久保充明、中村祐輔、池川志郎 筋萎縮性側索硬化症における optineurin 遺伝子の欠失、日本人類遺伝学会、第 57 回大会新宿、日本、2012 年 10 月

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 患者コホートのゲノム遺伝子検体を用いた

遺伝子多型解析

研究分担者 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

研究要旨

孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の根治的治療法開発のために、治療標的となり得る病態関連遺伝子、分子を同定する必要がある。JaCALS では、ALS 患者 760 例の前向き臨床情報に結び付けられた患者ゲノム DNA が蓄積されている。この遺伝子検体を用いて理研ゲノム医科学研究センターにおいて大規模一塩基多型（SNPs）解析を実施しており、コントロール検体との比較および遺伝子多型と病像・予後との関連解析を進めている。平成 24 年度新たに HumanOmniExpressExome BeadChip を用いた SNP タイピングを実施しており、平成 24 年 3 月末までにタイピングを終了できる見通しである。

A.研究目的

ALS は 5～10%が家族性であり、メンデル型遺伝を示すが、90%以上は孤発性である。孤発性 ALS の病因は不明であり、病態関連遺伝子・分子を同定し、病態解析を進める道筋は未確立である。厚労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、ゲノム DNA を既に蓄積している。本研究はこの研究リソースを基に、ゲノムワイド一塩基多型（SNPs）解析により ALS の病態関連遺伝子の同定を目指すものである。これまで世界的にも行われてきた疾患群（ALS）×コントロールの関連解析のみでなく、大規模前向き臨床像情報を生かした病像・経過・予後との関連解析により、病態解明や治療法開発の手がかりとなる遺伝子・分子の同定を試みる。

B.研究方法

JaCALS に登録された ALS 患者 650 例の遺伝子検体について全ゲノム網羅的な遺伝子多型タイピングを行った。SNP アレイは、70 万 SNPs+25 万 exome chip を搭載した Illumina 社製 HumanOmniExpressExome BeadChip を使用した。全例について SNP タイピングし、データの品質管理を行った（Hardy-Weinberg 平衡検定値、call rate 等）。さらに identity-by-state 法により隠れた近親者を検定し、一方を除外した。同時に QQ プロット（quantile-quantile plot）を作製し、 λ 値（inflation factor）により集団構造化の可能性が低いことを確認した。また、HapMap データに基づく主成分分析により、解析した集団の集団階層化がないことを確認した。

C.研究結果

JaCALS 検体 650 例の 70 万 SNPs および 25

万 exome タイピングは平成 25 年 3 月末に完了する見込みである。タイピングできしだい、JaCALS において蓄積されている大規模縦断像データ等、臨床情報との関連解析に進む予定である。

D. 考察

我々はこれまでに JaCALS および 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)。諸外国でも ALS 患者群と正常コントロール群を比較した大規模ゲノムワイド関連解析が複数行われており、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孤発性 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。本研究においては、多彩な前向きに蓄積された ALS 臨床像との関連解析も行う点が特徴であり、よりオッズ比の高い、病態寄与度の高い因子を抽出できる可能性がある。

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）に関わる遺伝子多型および病態（経過、予後、病型など）に関わる遺伝子多型の探索が可能である。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tetsuka S, Morita M, Iida A, Uehara R, Ikegawa S, and Nakano I. ZNF512B gene is a prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 324:163-166 (2013).

Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Nakajima M, Kubo M, Nakamura Y, and Ikegawa S. Novel deletion mutations of OPTN in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Neurobiol Aging.* 33:1843.e19-24 (2012) .

Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Kubo M, Nakamura Y, and Ikegawa S. Optineurin mutations in Japanese amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 83:233-235 (2012).

Iida A, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Nakamura Y, and Ikegawa S. Large-scale screening of TARDBP mutation in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Neurobiol Aging.* 33:786-790 (2012).

2. 学会発表

飯田有俊、細野直哉、佐野元規、亀井徹正、大嶋秀一、徳田虎雄、中島正宏、久保充明、中村祐輔、池川志郎 筋萎縮性側索硬化症における optineurin 遺伝子の欠失、日本人類遺伝学会、第 57 回大会新宿、日本、2012 年 10 月

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。

多施設共同 ALS 患者コホートの構築

研究分担者 中野 今治

自治医科大学医学部 神経内科学 教授

研究要旨

神経変性疾患の医療・福祉・介護体制確立には、疾患の縦断像を多数例で把握することが必須である。また根本治療法を含む新規治療法開発研究を促進し、質の高い治験を効率的に推進出来る基盤整備も重要である。本研究は筋萎縮性側索硬化症(ALS)に代表される神経変性疾患に対して、多施設共同長期縦断自然歴把握システムを構築し、遺伝子検体を合わせて蓄積することで、我が国におけるこれらの疾患の横断的、縦断的臨床像および発症、進行、予後に関する臨床的、遺伝子的因子を明らかにすることを目的としている。前向き経時的臨床情報収集を実施するために、臨床研究コーディネーター(CRC)による電話調査を導入した点が特色である。転医例を含め、脱落例を最小限にして縦断像を把握できるシステムは広く応用可能な画期的モデルを提示する。

A.研究目的

1. 我が国における ALS の横断的、縦断的な臨床像を明らかにする。
2. 遺伝子検体を併せて蓄積し、病態解明研究のための研究リソースを構築する。
3. 多施設共同長期縦断自然歴把握システム、匿名化システム、データセンター、遺伝子保存・管理センターシステムの構築、運営を行う。
4. 発症、進行、予後に関する臨床的、遺伝子的因子を明らかにする。

B.研究方法

研究の対象患者は神経内科医が ALS と診断し本人に告知した患者とし、新規に診断された例、過去に診断された例をともに対象とした。イベントの起こった時期(エンドポイント)として、死亡、永続的な人工換気導入、経管栄養導入、胃瘻造設、非侵襲的陽圧換気導入、気管切開、発語不能、嚥下不能、上肢機能廃絶、独立

歩行不能、独力で寝返り不能になった時期を設定した。

各エンドポイントおよび標準的な ALS 重症度スケールである ALSFRS-R について、患者もしくは主介護者に対して3ヶ月に一度、CRCからの電話インタビューによる調査を実施した。研究に参加する CRC には、本研究の概要、関連する倫理指針、研究実施の具体的な手順、ALS に関する既知の臨床像、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。

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。処理された検体は名古屋大学内のゲノム 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検体とした。正常

対照検体は連結不可能匿名化の状態、DNA抽出および B-cell line 化を行い保存した。

研究実施施設は神経変性班所属施設、および国立病院機構関連病院とし、適宜、研究体制の立ち上げを行った。研究実施体制を Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS) とし、事務局を名古屋大学においた。

D.倫理面への配慮

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守した。研究参加者には十分な説明を行い文書での同意を取り、臨床情報、遺伝子検体について、参加施設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。研究計画はすべての研究実施施設で倫理委員会申請を行い、承認を得て実施した。

C.研究結果

平成 24 年度中に東邦大学大森病院、千葉大学、九州大学での JaCALS 立ち上げを行い、参加施設が計 28 施設となった。

平成 25 年 3 月の時点で ALS 患者 760 例、コントロール 226 例の登録を行い、同数のゲノム DNA および B-cell line を保管した。

D.考察

JaCALS のシステムは、病気の進行に伴い診療担当施設がしばしば移動する多くの神経変性疾患に応用可能である。多様な前向き臨床情報とリンクした遺伝子の大規模リソースは、神経変性疾患分野において我が国で十分な整備がされたことが無く、重要なモデルを提供しうると考えられる。

E.結論

ALS について長期縦断自然歴把握システムを構築した。CRC からの電話による予後把握シ

ステムを取り入れたことにより、臨床現場の負担を増やさず、転医症例についても長期予後把握することができる。ここから得られる前向きの臨床像に匿名化された遺伝子リソースを結びつけており、発症のみならず、進行、臨床病型、予後など従来とは異なる視点から遺伝子多型との相関を調べることの出来る基盤が整備された。今後長きにわたり、我が国発の神経変性疾患研究を支える資源となると考えられる。

F.健康危険情報

特記なし。

G.研究発表

1.論文発表

Tetsuka S, Morita M, Ikeguchi K, Nakano I: Creatinine/cystatin C ratio as a surrogate maker of residual muscle mass in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin Neurosci* 1: 32-37, 2013

Tetsuka S, Morita M, Iida A, Uehara R, Ikegawa S, and Nakano I. ZNF512B gene is a prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 324:163-166, 2013

Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I; Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC): A homozygous mutation of C12 of f65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J Med Genet* 49: 777-784, 2012

Kenji I, Shigeo A, Nami I, Yoshio S, Jun-ichi S, Nobutaka A, Imaharu N, Mitsuru Kawamura: Pseudobulbar Dysarthria in the Initial Stage of Motor Neuron Disease with Disease with Dementia: A Clinicopathological Report of Two Autopsied Cases. *European Neurology* 69: 270-274, 2013

2.学会発表

嶋崎晴雄、石浦浩之、福田陽子、本多純子、迫江公己、直井為任、滑川道人、高橋祐二、後藤順、辻省次、後藤雄一、瀧山嘉久、中野今治. 視神経萎縮、末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺家系の原因遺伝子同定. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月 23 日. 東京

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、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 24 日. 東京

鈴木啓介、勝野雅央、坂野晴彦、須賀徳明、橋詰 淳、矢部一郎、青木正志、中野今治、金井数明、水澤英洋、山本知孝、長谷川一子、西澤正豊、宮嶋裕明、荻田典生、中島健二、辻野 彰、内野 誠、田中章景、祖父江元. リュープロレリン酢酸塩の球脊髄性筋萎縮症患者に対する第 3 相長期継続投与試験 (JASMITT_07OP 試験). 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月 24 日. 東京

中野今治. FTLD (Frontotemporal Lobar Degeneration) - 概念の変遷および蓄積蛋白に基づく分類について-. 第 53 回日本神経学会学

術大会. 2012 年 5 月 25 日. 東京

手塚修一、森田光哉、飯田有俊、池川志郎、中村祐輔、中野今治. 当院における ZNF512B 遺伝子を持つ ALS 患者についての検討. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月 25 日. 東京

益子貴史、手塚修一、秋本千鶴、森田光哉、相楽有規子、斎藤加代子、中野今治. 成人発症脊髄性筋萎縮症の臨床像と遺伝学的背景の解析. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月 25 日. 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 譲、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 25 日. 東京

安藤喜仁、森田光哉、中野今治. Motion Capture System (MCS) を用いた痙性対麻痺に対するボツリヌス毒素局注療法の効果判定. 第 53 回日本神経学会学術大会. 2012 年 5 月 25 日. 東京

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。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

祖父江 元 (名古屋大学大学院医学系研究科)
 田中 章景 (名古屋大学大学院医学系研究科)
 勝野 雅央 (名古屋大学医学部附属病院)
 渡辺 宏久 (名古屋大学医学部附属病院)
 熱田 直樹 (名古屋大学医学部附属病院)
 池川 志郎 (理化学研究所ゲノム医科学研究センター)
 飯田 有俊 (理化学研究所ゲノム医科学研究センター)
 中野 今治 (自治医科大学医学部)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	18	1531-8	2012
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.	18	1136-41	2012
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	7	e46185	2012
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.	91	320-9	2012

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	46	692-7	2012
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	135	2838-48	2012
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.	45	862-70	2012
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.	33	2527.e11-6	2012
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		Epub ahead of print	2013
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	8	e54511	2013

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	4	1405	2013
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.	5	221-34	2013
Rabkin J, Ogino M, Goetz R, McElhiney M, Marziliano A, Imai T, Atsuta N, Morita M, Tateishi T, Matsumura T, Mitsumoto H.	Tracheostomy with invasive ventilation for ALS patients: neurologists' roles in the US and Japan.	Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.	14	116-23	2013
Tetsuka S, Morita M, Iida A, Uehara R, Ikegawa S, and Nakano I.	ZNF512B gene is a prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurol Sci.	324	163-166	2013
Iida A, Hosono N, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Nakajima M, Kubo M, Nakamura Y, and Ikegawa S.	Novel deletion mutations of OPTN in amyotrophic lateral sclerosis in Japanese.	Neurobiol Aging.	33	1843.e19-24	2012
Tetsuka S, Morita M, Ikeguchi K, Nakano I	Creatinine/cystatin C ratio as a surrogate maker of residual muscle mass in amyotrophic lateral sclerosis.	Neurol Clinic Neuroscience	1	32-37	2013
Kenji I, Shigeo A, Nami I, Yoshio S, Jun-ichi S, Nobutaka A, Imaharu N, Mitsuru Kawamura	Pseudobulbar Dysarthria in the Initial Stage of Motor Neuron Disease with Disease with Dementia: A Clinicopathological Report of Two Autopsied Cases.	European Neurology	69	270-274	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract

Makoto Minamiyama^{1,3}, Masahisa Katsuno^{1,3}, Hiroaki Adachi¹, Hideki Doi¹, Naohide Kondo¹, Madoka Iida¹, Shinsuke Ishigaki¹, Yusuke Fujioka¹, Shinjiro Matsumoto¹, Yu Miyazaki¹, Fumiaki Tanaka¹, Hiroki Kurihara² & Gen Sobue¹

Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is a motor neuron disease caused by the expansion of the CAG triplet repeat within the androgen receptor (*AR*) gene. Here, we demonstrated that pathogenic *AR* upregulates the gene encoding calcitonin gene-related peptide α (CGRP1). In neuronal cells, overexpression of CGRP1 induced cellular damage via the activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway, whereas pharmacological suppression of CGRP1 or JNK attenuated the neurotoxic effects of pathogenic *AR*. The depletion of CGRP1 inactivated JNK and suppressed neurodegeneration in a mouse model of SBMA. Naratriptan, a serotonin 1B/1D (5-hydroxytryptamine 1B/1D, or 5-HT1B/1D) receptor agonist, decreased CGRP1 expression via the induction of dual-specificity protein phosphatase 1 (DUSP1), attenuated JNK activity and mitigated pathogenic *AR*-mediated neuronal damage in cellular and mouse SBMA models. These observations suggest that pharmacological activation of the 5-HT1B/1D receptor may be used therapeutically to treat SBMA and other polyglutamine-related neurodegenerative diseases.

The expansion of a genomic trinucleotide CAG repeat causes hereditary neurodegenerative disorders such as Huntington's disease, SBMA, dentatorubral-pallidolucylian atrophy and six forms of spinocerebellar ataxia^{1,2}. SBMA, or Kennedy's disease, is a late-onset motor neuron disease characterized by progressive weakness and atrophy of bulbar, facial and limb muscles, which is attributable to the degeneration of lower motor neurons in the spinal cord and brainstem^{3,4}. This disease is caused by an abnormal expansion of CAG repeats encoding the amino acid glutamine within the gene encoding *AR*, and it exclusively affects males carrying this type of mutation^{5,6}. The pathogenic *AR* protein accumulates in the nucleus of motor neurons and causes several molecular changes, including transcriptional dysregulation, axonal transport defects, mitochondrial dysfunction and disruption of the transforming growth factor- β signaling pathway^{7–17}.

Dysregulation of the transcriptional machinery associated with histone hypoacetylation has been reported in cellular and animal models of polyglutamine diseases^{18,19}. In addition to downregulation of genes that are necessary for the maintenance of normal cellular function, upregulation of certain molecules has also been observed in affected tissues in polyglutamine diseases^{20,21}. These alterations of the normal gene expression profile seem to mediate polyglutamine toxicity in neuronal and non-neuronal cells and are partially reversed by histone acetylation^{14,22,23}. However, it is unknown which genes are dysregulated and directly contribute to neurodegeneration.

Here, we performed a microarray analysis of the spinal cord of a mouse model of SBMA to identify the changes in gene expression that play a crucial part in polyglutamine-mediated neurodegeneration. We also examined whether genetic and pharmacological modulation of the expression of the identified genes could mitigate the histopathological and symptomatic effects of motor neuron degeneration.

RESULTS

Calcitonin gene-related peptide is upregulated in SBMA

To identify the gene expression changes that are specific to SBMA, we prepared total mRNA samples from the spinal cords of transgenic mice carrying a full-length human *AR* with 97 CAGs (*AR*-97Q), transgenic mice bearing a wild-type allele of *AR* with 24 CAGs (*AR*-24Q) and the wild-type littermates of the *AR*-97Q mice. Using microarray analysis, we identified genes with significantly altered expression among the three types of mice ($P < 0.005$). The expression of 124 genes were increased (>150%) or decreased (<67%) in male *AR*-97Q mice compared with their *AR*-24Q counterparts at the before-onset stage (7–9 weeks old). The expression of 12 of the 124 genes also showed a considerable difference between the *AR*-97Q and wild-type littermates but not between the *AR*-24Q and wild-type littermates (Fig. 1a and Supplementary Table 1). Among these candidates, we focused on the gene encoding calcitonin gene-related peptide 1 (*Cgrp1*) for the following reasons: (i) this gene, *Calca*, was

¹Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan. ²Department of Physiological Chemistry and Metabolism, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan. ³These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to M.K. (ka2no@med.nagoya-u.ac.jp) or G.S. (sobueg@med.nagoya-u.ac.jp).

Received 28 December 2011; accepted 13 August 2012; published online 30 September 2012; doi:10.1038/nm.2932

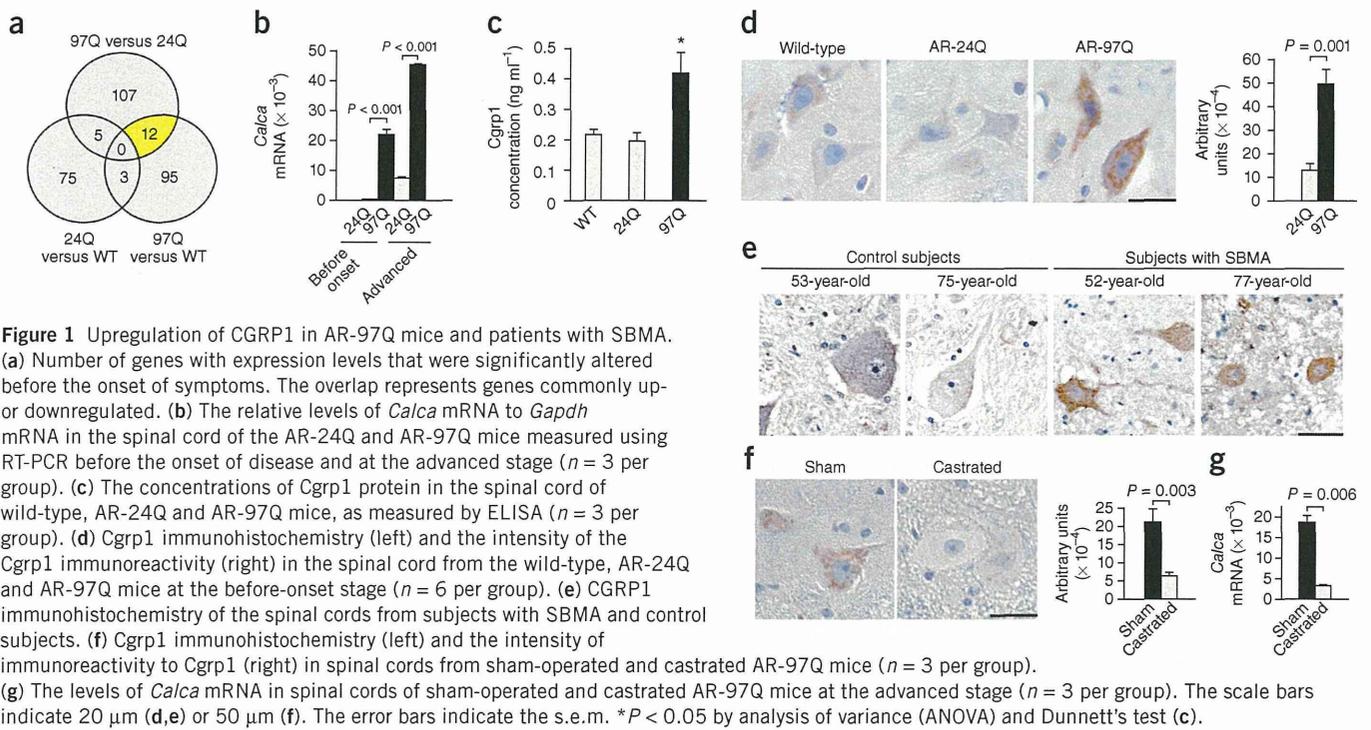


Figure 1 Upregulation of CGRP1 in AR-97Q mice and patients with SBMA. (a) Number of genes with expression levels that were significantly altered before the onset of symptoms. The overlap represents genes commonly up- or downregulated. (b) The relative levels of *Calca* mRNA to *Gapdh* mRNA in the spinal cord of the AR-24Q and AR-97Q mice measured using RT-PCR before the onset of disease and at the advanced stage ($n = 3$ per group). (c) The concentrations of *Cgrp1* protein in the spinal cord of wild-type, AR-24Q and AR-97Q mice, as measured by ELISA ($n = 3$ per group). (d) *Cgrp1* immunohistochemistry (left) and the intensity of the *Cgrp1* immunoreactivity (right) in the spinal cord from the wild-type, AR-24Q and AR-97Q mice at the before-onset stage ($n = 6$ per group). (e) CGRP1 immunohistochemistry of the spinal cords from subjects with SBMA and control subjects. (f) *Cgrp1* immunohistochemistry (left) and the intensity of immunoreactivity to *Cgrp1* (right) in spinal cords from sham-operated and castrated AR-97Q mice ($n = 3$ per group). (g) The levels of *Calca* mRNA in spinal cords of sham-operated and castrated AR-97Q mice at the advanced stage ($n = 3$ per group). The scale bars indicate 20 μm (d,e) or 50 μm (f). The error bars indicate the s.e.m. * $P < 0.05$ by analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test (c).

significantly upregulated in the AR-97Q mice compared with the other types of mice; (ii) the expression of this gene showed a further increase at the advanced stage (13–15 weeks old) (Supplementary Table 1); and (iii) this gene is expressed chiefly in lower motor neurons and dorsal root ganglion sensory neurons, not in glial or vascular endothelial cells²⁴. We confirmed the results of the microarray

using RT-PCR, which also showed strain- and stage-dependent upregulation of *Calca* mRNA (Fig. 1b).

The concentration of *Cgrp1* in spinal cord tissue measured by ELISA was significantly higher in AR-97Q mice compared with AR-24Q or wild-type counterparts (Fig. 1c). Immunohistochemistry with *Cgrp1*-specific antibodies showed that *Cgrp1* immunoreactivity

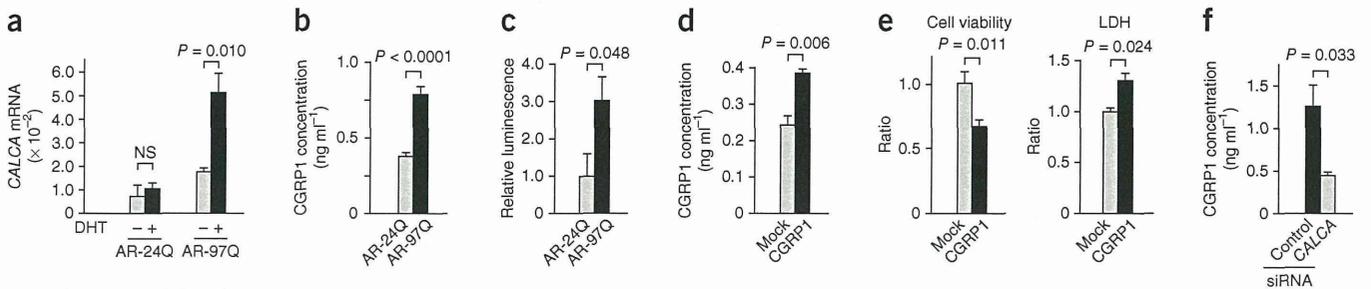


Figure 2 Neurotoxicity of CGRP1 in a cellular model of SBMA. (a) The relative levels of *CALCA* mRNA to *GAPDH* mRNA in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells stably expressing AR-24Q or AR-97Q that were treated with or without DHT ($n = 6$ per group). (b) The concentrations of CGRP1 protein in SH-SY5Y cells stably expressing AR-24Q or AR-97Q. (c) Luciferase activity transcriptionally regulated by the *CALCA* promoter in SH-SY5Y cells stably expressing AR-24Q or AR-97Q ($n = 6$ per group). (d) The concentrations of CGRP1 protein in SH-SY5Y cells transfected with a mock or CGRP1 vector ($n = 3$). (e) The viability as measured by cell viability WST-1 assay (left) and LDH release (right) of SH-SY5Y cells transfected with mock or CGRP1 vector ($n = 6$ per group). (f) The levels of CGRP1 protein in SH-SY5Y cells stably expressing AR-97Q transfected with control or *CALCA* siRNA ($n = 3$ per group). (g) The viability, LDH release and cell death (measured by Trypan blue dye exclusion) of SH-SY5Y cells stably expressing AR-97Q that were transfected with control or *CALCA* siRNA and treated with or without DHT ($n = 6$ per group). (h) The viability of SH-SY5Y cells treated with or without synthetic CGRP1 ($n = 6$ per group). (i) The viability of SH-SY5Y cells stably expressing AR-97Q treated with or without CGRP8-37, a CGRP1 receptor antagonist ($n = 6$ per group). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ by ANOVA with Dunnett's test (h,i). The error bars indicate the s.e.m. NS, not significant.