

図4

GBA<sup>-/-</sup>神経細胞の透過型電子顕微鏡像。ライソソームに繊維状構造物の蓄積を認めた。

#### D. 考察

1. OPTN 優性変異例と劣性変異例では、以下の臨床病理学的共通点が見出された。

1. 成人発症、上位・下位運動ニューロン徴候、手指変形、側頭葉萎縮、緩徐な経過
2. 上位・下位運動ニューロン脱落、Golgi 装置断片化、TDP-43 陽性封入体の出現
3. Bunina 小体の欠如
4. 嗜銀顆粒性疾患の合併

一方、優性例と劣性例の相違点として、劣性例では優性例に比して

1. 発症年齢がやや若い
2. Golgi 装置断片化の頻度が高い
3. TDP-43 陽性封入体の分布が広範
4. 上位運動ニューロン変性が強い
5. 黒質・被殻・淡蒼球の細胞脱落が見られる

という点が指摘できる。

Q398X OPTN 劣性変異例は nonsense-mediated mRNA decay により OPTN がまったく産生されず、OPTN の loss-of-function で発症していることは明らかである。一方、E478G OPTN 優性変異例の発症機序は明らかではないが、劣性変異例と類似の臨床神経病理所見を呈していること、劣性変異例より Golgi 装置断片化や TDP-43 凝集体の程度が軽いことから、dominant-negative の機序による loss-of-function で発症している可能性が示唆される。

今回検討した5例のうち、比較的緩徐な進行を呈した3例で認められた手指変形と側頭葉萎縮が OPTN-ALS の臨床的特徴であるかどうかは今後の症例の蓄積が必要である。さらに、Golgi 装置の断片化と TDP-43 の蓄積、嗜銀顆粒性疾患の合併、黒質・被殻・淡蒼球の細胞脱落が OPTN-ALS の病理学的特徴であるか否かについても、さらなる剖検症

例の蓄積が必要である。

2. 我々は SOD1 の転写をターゲットとしたスクリーニングを、アストロサイト由来 H4 細胞株を用いて確立しヒット化合物の同定に成功した。052C9 は濃度依存的に有意に SOD1 蛋白レベルを低下させた。SOD1 発現低下を認める濃度では細胞毒性は検出されず  $\beta$ -actin 発現レベルも低下しないため転写を全般的に抑制しないと考えられる。

既存薬 X は SOD1 の発現を部分的に抑制する。SOD1 発現抑制は部分的であることが望ましい可能性がある。SOD1-KO マウスは ALS 表現型を示さないが軸索切断に対する軽度の脆弱性を認め、病理学的に神経筋接合部及び軸索の変性を認める。

低分子化合物で野生型 SOD1 の発現を低下させることは、SOD1-ALS だけでなく孤発性 ALS にも効果を有し得る。野生型 SOD1 マウスも変異 SOD1 マウス同様の病理変化を認め、野生型と変異型 SOD1 の同時導入マウスで表現型が増悪する。

SOD1 プロモータの変異により SOD1 遺伝子発現レベルが低下し孤発性 ALS 患者の発症遅延との関連が示唆される。活性化プロテイン C を変異 SOD1 マウスに投与すると SOD1 発現を抑制し ALS の表現型を緩和させた。これらの知見に基づくと、変異 SOD1 の毒性とは「新規毒性の獲得」というよりは「野生型 SOD1 の毒性の増強」によるものかもしれない。病原蛋白の転写を直接抑制することは、SOD1 関連家族性 ALS の新規治療戦略のみならず病原蛋白が蓄積する他の神経変性疾患にも応用可能と考えられる。

我々のスクリーニング・システムは SOD1 転写を抑制する既存薬 X を同定した。既存薬 X を変異 SOD1 マウスに経口投与し ALS 症状を改善した。既存薬 X の SOD1 転写抑制効果は *in vitro* 及び *in vivo* で mRNA、蛋白レベルともに効果を認めた。既存薬 X は国内で既に抗癌剤として使用され安全性も受け入れられている。本研究は既存薬 X の新たな薬理的性質を提示し ALS 治療薬として新たに再配置できる可能性を示すものである。

既存薬 X が神経炎症及び NF $\kappa$ B の活性を低下させることが示された。NF $\kappa$ B は神経炎症に関わる主要な転写因子で ALS 患者の脊髄前角で発現が亢進する。NF $\kappa$ B の転写調節領域が、SOD1 の 5' 非翻訳領域にあるプロモータ領域に存在しており、NF $\kappa$ B が SOD1 の転写調節因子の一つという報告もある。既存薬 X の SOD1 発現調節作用機序の少なくとも一部は NF $\kappa$ B を介する可能性が示唆される。

我々ほどの細胞種で既存薬 X が SOD1 発現抑制効果を最

も認めるかは同定できなかったが、変異 SOD1 マウス由来プライマリ・アストロサイトをを用いることで少なくとも SOD1 発現抑制作用を有することが示唆された。実際本研究では既存薬 X の発症後投与により SOD1 マウスの発症進行が延長しているが、ニューロンやミクログリア等他の細胞に対し効果を有する可能性はあると思われる。

既存薬 X の効果は細胞をベースにした実験で見られる SOD1 発現抑制効果に比べると SOD1 マウスの ALS 症状に対する治療効果は限定的である。この差異は、脳血液関門を通過する程度が低いことに起因するのかもしれない。今後既存薬 X をリード化合物として、より有効で脳血液関門を通過しやすい薬剤に改良することが望まれる。

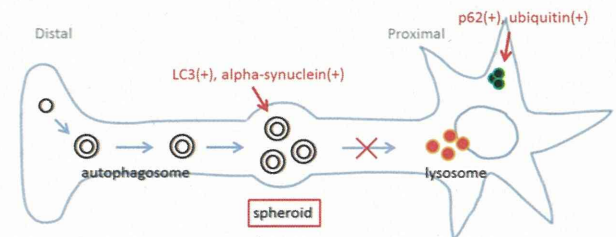
神経変性疾患の特徴は、病原蛋白が蓄積すること、その蛋白が毒性を獲得しその毒性により神経変性が生ずることである。本研究の成果は、SOD1 関連 ALS のような神経変性疾患に対し、マウスモデルと患者 iPS 細胞由来の疾患標的細胞の両者を用いて、病原蛋白の発現を直接薬剤で調節するという新しい治療戦略の可能性を示すものである。

3. 今回我々が作製した GBA ナンセンス変異メダカは GCCase 酵素活性を欠損しているにも関わらず月単位で生存し、病態の進行を観察することが可能であった。GBA ノックアウトマウスは皮膚からの水分漏出などにより出生後間もなく致死的となる。我々は出生直後の同変異マウス脳の病理学的解析を行ったが、 $\alpha$ -syn の蓄積は確認できなかった。GBA<sup>-/-</sup>メダカにおいて $\alpha$ -syn 凝集体形成は受精後 2 か月以降で観察され、変異体の生存期間が影響していると考えている。

前述したパーキンソン病の危険因子としての疫学研究結果は GBA ヘテロ接合型変異のものであり、我々は GBA<sup>+/-</sup>メダカの解析も行ったが、明確な表現型は見出せなかった。しかし、GBA ホモ接合型変異（ゴーシェ病）は GBA ヘテロ接合型変異よりさらにパーキンソン病罹患率が増加するという報告がある。また既報にて、GCCase 酵素活性は $\alpha$ -syn 存在下で低下し、GCCase 酵素活性低下がさらに $\alpha$ -syn の蓄積を促すというポジティブフィードバックの病態機序が提唱されている。GBA ヘテロ接合型変異を持つと、元々 GCCase 酵素活性が低い状態からこのポジティブフィードバックの機序でさらに活性が低下し、GBA ホモ接合型変異の状態に近づくとも考えられる。GBA<sup>-/-</sup>メダカで見出された結果はこれを反映していると考えている。

透過型電子顕微鏡と免疫電顕による解析により、GBA<sup>+/-</sup>メダカの $\alpha$ -syn 凝集体は、オートファゴソームが蓄積し

腫脹した軸索(スフェロイド)に存在することを確認した。また、Cathepsin D 免疫染色と透過型電子顕微鏡による観察でライソソームの異常を認めた。マウス初代培養神経細胞の解析において、神経細胞の軸索におけるオートファジーは遠位側より開始され、近位側に輸送される (retrograde transport) ことが報告されている。さらに、ライソソーム阻害薬の処理により、この過程が阻害され、オートファゴソームが軸索内に蓄積することが報告されている。今回の GBA 変異メダカの解析結果をこれら既報を踏まえて解釈すると、GBA 変異により一次的にライソソーム障害が起こり、その結果として軸索内にオートファゴソームと $\alpha$ -syn の蓄積が起こっている可能性が考えられる (下図)。 $\alpha$ -syn の分解経路に関しては、プロテアソーム系、オートファジー/エンドソーム・ライソソーム系のいずれの系も重要と考えられている。しかし、 $\alpha$ -syn は presynapse に主に存在するとされているが、その軸索輸送を含めた分解経路は明確には分かっていない。今回の結果からは、 $\alpha$ -syn がオートファゴソームにより retrograde transport を受け、ライソソームで分解されている可能性が考えられる。また、p62 陽性凝集体がスフェロイドに認めなかったことから、この系が p62 非依存的に起こっている可能性も考えられる。ただし、これらの可能性は今後の研究によって検証が必要である。PD 患者剖検脳の解析でも Lewy body と Lewy neurite が LC3 陽性となることが示されており、これら $\alpha$ -syn 凝集体の形成にオートファジーが関与している可能性が示されている。今後さらなる病態機序の解明と検証を行い、これらを修飾する治療法の開発を進める必要がある。



## E. 結論

1. OPTN-ALS は、Golgi 装置断片化と TDP-43 凝集体形成を通じて、孤発性 ALS と共通の機序で ALS を発症している可能性が示唆された。

2. ALS モデルマウスにおいて、病原蛋白 SOD1 発現を抑制し、病理学的解析及び表現型解析において治療効果を有する既存薬の分子標的薬を同定した。この薬剤は NF $\kappa$ B 経路を抑制し、孤発性 ALS に対して有効性を発揮する可能性が示された。

3. ホモ接合型 GBA ナンセンスメダカは月単位で生存し、

当研究目的に対するモデル動物として有用であると考えた。同変異体における $\alpha$ -シヌクレイン蓄積の一因としてオートファジー・ライソソーム経路の障害が挙げられ、この病態機序が GBA 変異とパーキンソン病の関連性において重要であると考えた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

・ Ito H, Nakamura M, Komure O, Ayaki T, Wate R, Maruyama H, Nakamura Y, Fujita K, Kaneko S, Okamoto Y, Ihara M, Konishi T, Ogasawara K, Hirano A, Kusaka H, Kaji R, Takahashi R, Kawakami H. Clinicopathologic study on an ALS family with a heterozygous E478G optineurin mutation. *Acta Neuropathol.* 2011 Aug;122(2):223-9.

2. 学会発表

・ Ito H, Nakamura M, Komure O, Maruyama M, Wate R, Nakamura Y, Fujita K, Kaneko S, Ogasawara O, Nakabayashi H, Ayaki T, Okamoto Y, Ihara M, Kaji R, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R, Kawakami H. Clinical and Neuropathologic Investigation of a Family with ALS Associated with Mutated Optineurin. XVIIth International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010.

・ 村上 学、井上治久、月田香代子、伊東秀文、浅井康行、天貝裕地、饗庭一博、下川浩輝、上杉志成、中辻憲夫、高橋良輔：既存薬による SOD1 転写を標的とした筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発。第 53 回日本神経学会学術大会，東京（2012. 5. 25）

・ Murakami G., Inoue H., Tsukita K., Asai Y., Amagai Y., Aiba K., Shimogawa H., Uesugi M., Nakatsuji N., Takahashi R. : Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis. The 13th Asian Oceanian Congress of Neurology, Melbourne, Australia(2012. 6. 4-8)

・ 村上 学、井上治久、月田香代子、伊東秀文、浅井康行、天貝裕地、饗庭一博、下川浩輝、上杉志成、中辻憲夫、高橋良輔：既存薬による SOD1 転写を標的とした筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発。第 21 回日本 Cell Death 学会，名古屋（2012. 7. 28）

・ Murakami G., Inoue H., Tsukita K., Asai Y., Amagai Y.,

Aiba K., Shimogawa H., Uesugi M., Nakatsuji N., Takahashi R. : Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan(2012. 9. 19)

・ 上村紀仁、石川智子、木下政人、小池正人、松井秀彰、山門穂高、植村健吾、内山安男、藤堂剛、武田俊一、高橋良輔：メダカを用いた GBA 変異とパーキンソン病の関連性の解析。第 54 回日本神経学会学術大会、東京（2013. 5. 31）

・ Uemura N, Fujiwara-Ishikawa T, Kinoshita M, Koike M, Matsui H, Yamakado H, Uemura K, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Takahashi R. Viable Gaucher's disease model of medaka fish completely deficient in glucocerebrosidase activity developed alpha-synuclein aggregation in the brain. 17<sup>th</sup> international congress of Parkinson's disease and movement disorders, Sydney, Austraria (2013. 6. 20)

・ Uemura N, Fujiwara-Ishikawa T, Kinoshita M, Koike M, Matsui H, Yamakado H, Uemura K, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Takahashi R. Viable Gaucher's disease model of medaka fish completely deficient in glucocerebrosidase activity developed alpha-synuclein aggregation in the brain. The 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto, Japan (2013. 6. 22)

・ 上村紀仁、石川智子、木下政人、小池正人、松井秀彰、山門穂高、植村健吾、内山安男、藤堂剛、武田俊一、高橋良輔：GBA ノックアウトメダカは脳にアルファシヌクレイン凝集体を形成する。第 22 回日本 Cell death 学会、京都(2013. 7. 19)

・ Uemura N, Fujiwara-Ishikawa T, Kinoshita M, Koike M, Matsui H, Yamakado H, Uemura K, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Takahashi R. Viable Gaucher's disease model of medaka fish completely deficient in glucocerebrosidase activity developed alpha-synuclein aggregation in the brain. Neuroscience 2013, SanDiego, USA (2013. 11. 10)

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

神経変性疾患の分子基盤を明らかにするために、常染色体優性遺伝性を示す、近位筋優位運動感覚ニューロパチー (hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement, HMSN-P)、家族性筋萎縮性側索硬化症、家族性パーキンソニズムの3疾患について、連鎖解析、全ゲノムあるいはエクソーム解析を組み合わせることにより、その病因遺伝子の探索を行った。HMSN-P については、*TRK-fused gene(TFG)* がその病因遺伝子であることを見出した。家族性筋萎縮性側索硬化症については、*ERBB4* が病因遺伝子であることを見出し (ALS19 と命名)、機能解析により、NRG-1 による ErbB4 の自己リン酸化が、変異特異的に低下していることを明らかにした。常染色体優性遺伝形式の家族性パーキンソニズムと診断されていた家系については、発症者3名のエクソーム解析結果から *PRNP* P105L 変異を見だし、さらに、類似した臨床的特徴を有する3家系において、同遺伝子変異が確認された。これまで、同遺伝子変異は痙性対麻痺と認知症を主症状とする遺伝性プリオン病の原因遺伝子として位置づけられてきたが、*PRNP* P105L 変異による遺伝性プリオン病では、パーキンソニズムと認知症を呈する一群があることが明らかとなった。

研究分担者：辻 省次

所属機関名：東京大学医学部附属病院 神経内科学

A.研究目的

本研究では、1. 常染色体優性遺伝の、成人発症で緩徐進行性の近位筋優位の筋力低下・筋萎縮を主徴とする近位筋優位運動感覚ニューロパチー (hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement, HMSN-P)、2. 常染色体優性遺伝の家族性筋萎縮性側索硬化症、3. 常染色体優性遺伝形式を示し、パーキンソニズムを主症状とする疾患、の3つの疾患について、病因遺伝子を同定し、神経変性疾患発症の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

連鎖解析は、Affymetrix SNP6.0 アレイを用いて SNP typing を行い、われわれが開発したパイプラインソフトウェア SNP-HiTLink を用いて行い、候補領域を同定した。

次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム配列解析は、エクソーム配列解析、あるいは、全ゲノム配列解析を行った。エクソーム配列解析については、

Nimblegen Sequence Capture Human Exome 2.1M array、あるいは、Agilent SureSelect (50Mb) を用いてエクソンキャプチャーを行い、Illumina HiSeq2000, GAIIx、ABI SOLiD4 を用いて大規模塩基配列解析を行った。得られた短鎖長配列は、BWA を用いて参照配列にアラインメントし、SAMtools を用いて variants を検出した。検出された variants に関しては RefSeq と dbSNP130 を用いてアノテーションを行った。

ハプロタイプ解析は、家系メンバーの SNP タイピングの結果を用いて、組換えを最小にするようにハプロタイプを再構成した。また、SNP タイピングが実施できた家系メンバーが発症者のみの場合は homozygosity haplotyping 法を用いてハプロタイプの再構成を行った。

変異 *ErbB4* の機能解析は、COS-7 を用いた発現実験により、NRG-1 による ErbB4 の自己リン酸化を解析した。

(倫理面への配慮)

書面によるインフォームドコンセントを得て、ヒ

トゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、所属機関の研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

### C. 研究結果

近位筋優位運動感覚ニューロパチー(HMSN-P)の病因遺伝子の解明:

パラメトリック連鎖解析で、第3番染色体セントロメア周辺に、最大 LOD スコアが5を認める31.4 Mbの領域を見出した。ハプロタイプ解析により、この領域内に3.3 Mbの創始者ハプロタイプを認め、これが最少候補領域と考えられた。エクソーム解析により、201,223個の variants が検出されたが、最少候補領域内の新規のアミノ酸置換を伴う変異として、*TRK-fused gene (TFG)* の c.854C>T (p.Pro285Leu)を見出した。本変異は4家系全てにおいて認められ、共分離が確認された。本変異は日本人対照者482名に存在しなかった。ハプロタイプ解析からは、2つの独立した創始者が想定された。

常染色体優性遺伝性筋萎縮性側索硬化症の病因遺伝子の解明:

連鎖解析及び全ゲノム配列解析により、病原性変異の可能性が高いものとして *ERBB4* c.2780G>A (p.Arg927Gln)を同定した。FALS 364例、SALS 818例の変異スクリーニングにより、カナダ人家系で同一変異を、また日本人孤発例で *de novo* 変異 c.3823C>T (p.Arg1275Trp)を同定した。孤発例においては、本人および両親の SNP genotyping により家族関係を確認した。ハプロタイプ解析により、c.2780G>A 変異は日本人家系とカナダ人家系で独立に生じていることを確認した。変異が認められたアミノ酸は、種を越えて保存されており、PolyPhen-2を用いたアミノ酸置換の影響予測では Probably damaging と判定された。*ErbB4* は受容体チロシンキナーゼであり、Neuregulin (NRG) の結合により二量体化して自己リン酸化され、下流のシグナルを活性化する。COS-7を用いた発現実験により、NRG-1による *ErbB4* の自己リン酸化が、変異特異的に低下していることが判明した。

常染色体優性遺伝形式を示し、パーキンソニズムを主症状とする疾患の病因遺伝子の解明:

エクソーム配列解析で見出された変異について、発端家系の発症者3例が共有し、健常者373例に認められないヘテロ接合性変異が10個抽出され、既知の病原性変異として *PRNPP105L* 変異が認められた。さらに同家系の発症者1例、および類似3家系の発症者5例においても *PRNPP105L* 変異が認められた。ハプロタイプ解析を行った結果、同変異を含む2.9Mbpの領域が全家系間で共有されるハプロタイプが認められ、創始者効果を有すると考えられた。

### D. 考察

近位筋優位運動感覚ニューロパチー(HMSN-P)については、エクソーム解析により、*TFG* が病因遺伝子であることを明らかにした。

家族性筋萎縮性側索硬化症の病因遺伝子として、新たな病因遺伝子 *ERBB4* を発見し、ALS19と命名した。これまでの研究で、*ErbB4* は運動神経細胞の生存に深く関わっていることが明らかになっている。*ErbB4* のホモ接合性ノックアウト(KO)マウスは胎生致死であるが、運動神経の軸索伸長に異常をきたし、ヘテロ接合性 KO マウスは軽度ではあるが運動機能異常を来すことから、*ErbB4* の機能低下が ALS19 における運動神経細胞死を引き起こすと考えられる。これらの結果は、NRG 等による *ErbB4* の刺激が ALS の治療につながる可能性を示唆する。

プリオン遺伝子 (*PRNP*) P105L 変異における既報告は、本邦より6家系11症例なされている。その臨床病型としては瘧性対麻痺(9例)や失調(1例)で、認知症を10例に認め、初期からパーキンソニズムを主体とした症例が1例報告されている。一方、自験例9例のうち5例はパーキンソニズムを主体とし、全例で経過中に認知症を合併した。パーキンソニズムに対してはL-Dopaを始めとした抗パーキンソン病治療薬が使用されていたがいずれの症例においても効果は認められなかった。その他、自験例では、錐体路症候(6例)、失調(2例)、ミオクローヌス(3例)の合併を認めた。*PRNP* P105L 変異による遺伝性プリオン病では、認知症に伴ってあるいは、先だって多様な運動症状が認められ、パーキンソニズムも主要な運動症状のひとつである。遺伝子診断がなされる前の臨床診断は、認知症を伴う遺伝性パーキンソン病、大脳基底核変性症、脊髄小脳変性症、ハンチントン病と様々であった。

## E.結論

HMSN-P の病因遺伝子として、*TFG* を、家族性筋萎縮性側索硬化症の病因遺伝子として、*ERBB4* を発見した。プリオン遺伝子 (*PRNP*) P105L 変異を有するプリオン病の臨床表現型として、非典型的なパーキンソニズム、認知症を伴う症例の存在を明らかにした。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

### 1. 論文発表

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* 91:320-329, 2012.

Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa M, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G, JaCALs, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown RH Jr, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J, Tsuji S: *ERBB4* mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *Am J Hum Genet* 93:900-905, 2013.

### 2. 学会発表

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 (HMSN-P). Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Nov 7 2012, San Francisco, USA

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

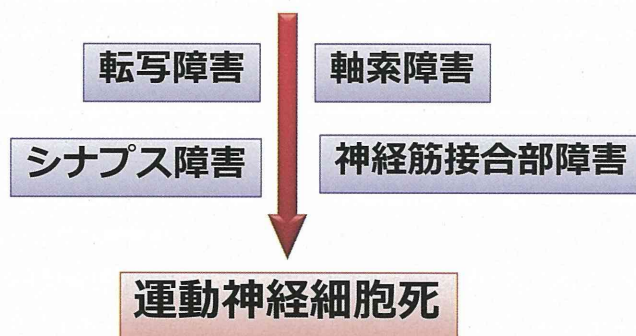
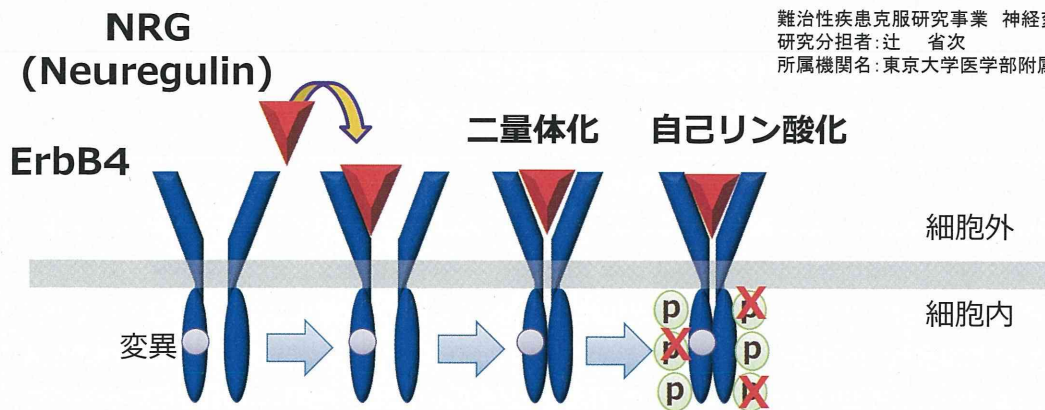
P13-0067 筋萎縮性側索硬化症の新規病因遺伝子

### 2. 実用新案登録 なし

### 3. その他 なし

# NRG-ErbB4パスウェイの障害は運動神経細胞死を引き起こす

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  
研究分担者: 辻 省次  
所属機関名: 東京大学医学部附属病院 神経内科学



神経変性疾患に関する調査研究  
研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

2009年度の筋萎縮性側索硬化症（ALS）の臨床調査個人票のデータを用いALS患者7,461人（新規1,795人、更新5,666人）の栄養呼吸管理に関する横断的分析を行った（入力率72.9%）。栄養呼吸管理の主流は胃瘻腸瘻、気管切開下陽圧換気（約30%（新規は約4%））であった。新規で発症年齢の高齢化、人工呼吸器導入のリスク要因として呼吸障害が示唆された。全国47都道府県の担当課に対し、2009年度のALS特定疾患医療受給者証所持者に係る調査を実施した。[新規+更新]は10,237人、[新規]は2,264人であった（回収率100%）。[新規+更新]および[新規]の所持者数を分子、医療保険制度別加入者人口を分母として、年間の有病率および発病率（対人口10万）を推計すると、それぞれ9.93（男11.77、女8.23）、2.20（男2.62、女1.80）で70歳代にピークが見られた。なお、新規所持者数に地域差が示唆された。

研究分担者：土井 由利子

所属機関名：国立保健医療科学院 疫学調査研究

A.研究の背景と目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動神経細胞の変性を主病変として、全身の筋萎縮と筋力低下を生じ、数年の自然経過で死亡する進行性の予後不良の疾患であり、国が難病として指定する特定疾患治療研究対象疾患の一つである。

平成16年10月に厚生労働省から「特定疾患治療研究事業における臨床調査個人票の研究目的利用に関する要綱」が出され、個票の情報を研究目的で活用するための体制が整備された。熱田らは、平成15～18年度のALS臨床調査個人票のデータを解析し、その有用性と問題点について検討した<sup>1)</sup>。その結果、ALSの横断像の描出や病像の解析には極めて有用である一方<sup>2)</sup>、経時的な情報の把握や入力率の担保などに問題のある点が指摘された<sup>1)</sup>。

本研究の目的は、臨床調査個人票のデータをもとに、ALSに関する記述疫学的分析を行い、国の難病対策に資する科学的知見を提供することである。平成24年度は、初年度として、これまでに指摘されてきた臨床調査個人票の問題点を踏まえつつ、ALS患者の栄養呼吸管理に関する横断的分析を中心に検討を行うこととした。

特定疾患医療受給者証の交付を申請する場合、申請者は必要書類として臨床調査個人票（医師の診断書）を都道府県に提出しなければならないが、この電子媒体データの厚生労働省健康局疾病対策課への提供（入力率）が必ずしも100%に達していない。そこで、平成25年度は、ALS特定疾患医療受給者証所

持者数に係る全国都道府県調査を実施し、これをもとに有病率[新規+更新]および発病率[新規]の推計を行うことを目的とした。特に代表性や地域差に焦点を当てて検討を試みた。

I. ALS患者の栄養呼吸管理に関する横断的研究（平成24年度）

B.研究方法

1. データ

ALS臨床調査個人票（2006～2010年度分（東日本大震災発災（2010年3月11日）前の5年間））の研究目的利用申請を行い、厚生労働省健康局疾病対策課から個人を特定できない形での電子媒体情報として提供を受けた（2012年2月1日付）。

2. 解析

各年度の臨床調査個人票の入力件数が最も多かったのは2009年度で、7,821件（新規1,801件、更新6,020件）であった。特定疾患医療受給証の有効期間は、10月1日から翌年の9月30日までの1年間であるため、10月1日より前に新規の申請をした者は同じ年度内に更新の申請をしなければならない。そこで、重複件数を除外した、7,461人（新規1,795人、更新5,666人）を、本研究の解析に用いた。

経管栄養（経鼻胃管および胃瘻腸瘻）による栄養管理、非侵襲的陽圧換気（NIPPV）および気管切開下陽圧換気（TPPV）による呼吸管理について、1）それぞれの使用頻度と療養している場所の内訳（%）、2）使用期



間および発症から導入までの期間（月）を算出した。さらに、3）新規患者においては、栄養呼吸管理と初発症状、性、発症年齢（55歳未満、55歳以上65歳未満、65歳以上）との関連について、多変量回帰分析を用いて解析を行った。

（倫理面への配慮）

国立保健医療科学院研究倫理審査委員会の承認を得た（NIPH-IBRA#12005）。

### C.研究結果

表1に対象者の性、申請時の年齢、発症年齢を示す。年齢の確認には、満年齢（歳）、生年（YYYY）、発症年月（YYYYMM）を用いた。

表1 対象者の属性

	新規+更新 N=7,461	新規 N=1,795
性（%）		
男	57.7	57.0
女	42.3	43.0
申請時の年齢（歳）		
平均（標準偏差）	66.9 (11.0)	68.1 (10.4)
中央値（4分位範囲）	68.0 (15.0)	69.0 (14.0)
発症年齢（歳）		
平均（標準偏差）	61.3 (12.7)	66.6 (10.6)
中央値（4分位範囲）	63.0 (17.0)	68.0 (14.0)

表2と表3に栄養呼吸管理の使用頻度と療養している場所の内訳を示す。全体（新規+更新）では、経鼻胃管、NIPPVに比べ、胃瘻腸瘻、TPPVの使用頻度が高かった。新規では、経鼻胃管と胃瘻腸瘻の頻度に差はなく、TPPVに比べNIPPVの使用頻度が高かった。新規で、NIPPV使用の144人のうち21人は経鼻胃管、12人は胃瘻腸瘻を使用していた。TPPV使用の72人のうち33人は経鼻胃管、22人は胃瘻腸瘻を使用していた。72人のうち14人がNIPPVを併用していた（以上、表2）。

栄養呼吸管理別に療養の場所を見ると（表3）、経鼻胃管では入院、胃瘻腸瘻ではやや在宅の頻度が高く、NIPPVでは在宅、TPPVではやや入院の頻度が高かった。

表2 栄養呼吸管理の頻度

	新規+更新 N=7,461	新規 N=1,795
--	------------------	---------------

	n	%	n	%
経鼻胃管	389	5.2	76	4.2
胃瘻腸瘻	2,469	33.1	87	4.8
NIPPV	770	10.3	144	8.0
TPPV	2,072	27.8	72	4.0

表3 栄養呼吸管理別にみた療養場所

	経鼻胃管 n=389	胃瘻腸瘻 n=2,469	NIPPV n=770	TPPV n=2,072
在宅	26.7	51.2	61.6	43.8
入院	69.9	44.0	31.8	52.5
入所	1.5	3.1	1.3	2.2
他	1.8	1.7	5.3	1.5

経管栄養（経鼻胃管または胃瘻腸瘻）、NIPPVおよびTPPVの使用期間（使用開始から2009年度末まで）の中央値（4分位範囲）（月）は、それぞれ36.1（51.0）、21.6（30.0）、51.3（60.0）であった。表4には、発症から導入までの期間（月）を更新と新規に分けて示した。

表4 栄養呼吸管理別にみた発症から導入までの期間（月）

	更新 N=5,666	新規 N=1,795
中央値（4分位範囲）		
経管栄養	25.3 (28.1)	11.5 (15.1)
NIPPV	25.3 (26.6)	11.1 (13.1)
TPPV	26.6 (29.2)	5.5 (11.9)

新規ALS患者の初発症状の分布を図1に示す。主な初発症状は四肢の筋力低下（上肢>下肢）と球麻痺であったが、わずかに呼吸障害6.7%（n=121）と頸部筋力低下6.5%（n=117）を認めた。

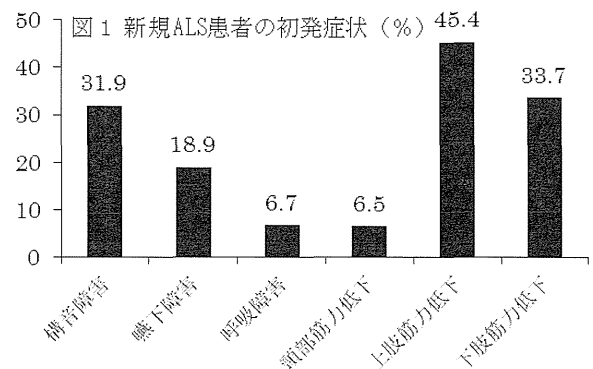


表5に、初発症状と栄養呼吸管理との関連について有意差を示したオッズ比のみを示す。

表5 栄養呼吸管理と初発症状との関連

	経鼻胃管	胃瘻腸瘻	NIPPV	TPPV
障害	n=76	n=87	n=144	n=72
構音		2.09		
嚥下	2.07	3.55		2.30
呼吸	3.49	4.92	8.56	13.39
頸部			2.51	
上肢		0.56		
下肢				

呼吸障害は、性・発症年齢に関係なく、NIPPVとTPPVとの間に極めて強い関連を認めた。加えて、NIPPVでは頸部筋力低下および高齢発症、TPPVでは嚥下障害および高齢発症との間に有意な関連を認めた。さらに、呼吸障害および嚥下障害は、経管栄養との間でも同様の有意な関連を認めた。加えて、胃瘻腸瘻では、構音障害とも同様の有意な関連を認めた一方で、上肢の筋力低下とは負の関連を認めた。なお、いずれにおいても、性別との有意な関連は認められなかった。

#### D. 考察

過去5年間（2006～2010年度）のうちで、臨床調査個人票の入力件数が最も多かった2009年度のデータ（新規1,795人、更新5,666人）を用い、ALS患者の栄養呼吸管理に関する分析を行った。以下に、本研究で示唆された主な分析結果について考察する。

##### 1) 発症年齢の高齢化

これまで教科書的には“ALSの発症年齢は10歳代から80歳代に及ぶが50～60歳代が最も多い”とされてきた。しかし、表1より、2009年度新規ALS患者の75%は61歳以降（50%は61～75歳）に発症していたことがわかった。2003～2006年度の新規ALS患者3,428人の平均発症年齢（標準偏差）65.4（10.7）歳<sup>2)</sup>と2009年度の66.6（10.6）歳を比べてみても1歳以上の上昇があり、ALSの発症年齢の高齢化が進んでいることが示唆された。

“高齢”は唯一の確立された孤発性ALSのリスク要因だと言われている<sup>3)</sup>。加齢を止めることはできないが、ALSと関連する何らかの加齢現象の程度や速度を減少させることで、病気の発症や進行を遅らせることができるかもしれない。

平成24年度版高齢社会白書によれば、65歳以上の高齢者人口は過去最高の2,975万人（総人口の23.3%）を記録した（2011年10月1日現在）。そのうち一人暮らしの高齢者は479万人に上った。このように、高齢化が進む日本社会において、高齢発症のALS患者を如何にしてサポートして行くか、直面する喫緊の課題と思われる。

##### 2) 栄養呼吸管理の実態

ALSの呼吸筋障害による換気不全と球麻痺による嚥下障害は、そのまま放置すると患者の生命にかかわるので、呼吸管理と栄養管理はALS患者の治療上極めて重要である<sup>4)</sup>。

全体としてみると、栄養管理の主流は胃瘻腸瘻、呼吸管理の主流はTPPVであり、いずれもALS患者の約30%に導入されていた（表2）。呼吸管理について、新規ALS患者に絞って見てみると、NIPPVがTPPVを大きく上回っていた。このうち当初よりTPPVによる呼吸補助を必要とした者は58人（3.2%）であった。その理由としては、NIPPVのマスクがあわなかったり、当初よりすでに球麻痺が強くNIPPVができなかった可能性が考えられる。

新規ALS患者では、発症から栄養呼吸管理導入までの期間が、更新に比べ大幅に短くなっていた。その理由として、診断・治療の早期化や急速に進行する呼吸障害の可能性などが考えられる。

##### 3) 初発症状と栄養呼吸管理

ALSでは、稀に初発症状として急速に進行する呼吸障害が出現することがあり、この初期の段階での呼吸障害は頸髄C<sub>3-5</sub>前角細胞の脱落による横隔膜麻痺によるものとされる<sup>5)</sup>。今回の分析で（表5）、新規ALS患者の6.7%に初発症状として呼吸障害が認められ、発症年齢とは関係なく、極めて高い頻度でNIPPVやTPPVが導入されていたことがわかった。また、ALSでは球麻痺と呼吸筋麻痺は時間的に近接して麻痺する傾向があるとされ<sup>4)</sup>、呼吸管理と併せて栄養管理が施行されていることが確認できた。また、球麻痺による気道分泌物の増強や誤嚥物の排出困難があればTPPV、頸部筋力低下（頸髄C<sub>1-6</sub>）に伴う換気不足があればNIPPVで対応されている可能性が示唆された。

なお、新規ALS患者のうち当初よりTPPVによる呼吸補助を必要とした58人の中には、TPPV導入後にALSと診断された者がいた可能性も考えられるが、用いたデータの限界から、病歴や経過に関する情報を入手す

ることができなかった。

#### 4) 今後の展望

臨床調査個人票登録システムの改善により、交付中止（死亡や転出など）情報の把握と連結可能匿名化が可能になれば、NIPPV や TPPV 導入後の予後を明らかにすることができる。

なお、後述する、平成 25 年度の ALS 特定疾患医療受給者証所持者数に係る全国都道府県調査よれば（回収率 100%）、2009 年度（2009 年 4 月 1 日～2010 年 3 月 1 日）の所持者数（全数）が 10,237 であったことから、臨床調査個人票の入力率は 72.9%であることがわかった（50%未満は、奈良、三重、佐賀、大阪、宮崎、神奈川、北海道、鳥取、長野（低い順））。臨床調査個人票登録システムの改善により、入力率 100%が実現されるよう期待したい。

#### E. 結論

本研究で新たに得られた主な知見は、ALS の発症年齢の高齢化が進んでいること、新規の NIPPV や TPPV の導入に初発症状としての呼吸障害が極めて大きく関与していることであった。

#### 参考文献

- 1) 熱田直樹, 渡辺宏久, 伊藤瑞規, 千田譲, 祖父江元. 現行の臨床調査個人票の問題点-筋萎縮性側索硬化症. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 2007 年度神経変性疾患に関する調査研究班ワークショップ報告書 (2008 年 3 月). pp. 3-6.
- 2) Naoki Atsuta et al. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 2009; 276: 163-169.
- 3) Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 2001; 344: 1688-700.
- 4) ALS 治療ガイドライン. [http://www.neurology-jp.org/guidelinem/als\\_index.html](http://www.neurology-jp.org/guidelinem/als_index.html).
- 5) de Carvalho M, et al. Motor neuron disease presenting with respiratory failure. J Neurol Sci 1996 ;139 Suppl:117-22.

#### II. ALS の有病率・発病率の推計および地域差に関する研究（平成 25 年度）

#### B. 研究方法

全国の都道府県担当課に対し、2009 年度（2009 年 4 月 1 日から 2010 年 3 月 31 日までの 1 年間）における ALS 特定疾患医療受給者証所持者数（全数（年度内死亡者を含む）、新規・更新、性・年齢階級）に関する情報提供を依頼した。併せて、都道府県特定疾患医療受給者審査委員会の委員数（うち神経内科医数）も求めた。対象年度は、東日本大震災発災（2010 年 3 月 31 日）以前の直近年度で臨床調査個人票の入力件数が最も多かった年度とした。

特定疾患医療受給者証は医療保険適用者に限定されるため、総務省統計局人口推計（2009 年 10 月 1 日現在）から厚生労働省被保護者全国一斉調査基礎調査被保護人員（2009 年 7 月 1 日現在）を引いた人数（医療保険制度加入者人口）を分母、2009 年度の特定疾患医療受給者証所持者数（[新規+更新]、[新規]）を分子に用い、年間の有病率および発病率を推計した。

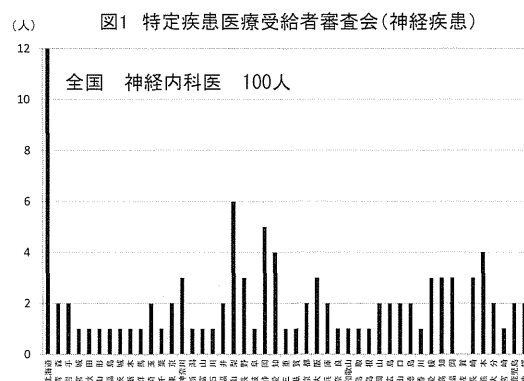
さらに、新規所持者における地域差（47 都道府県）について、医療保険制度加入者人口を用い、間接法にて性・年齢調整を行い、観察数/期待数（95%信頼区間、P 値）を算出した。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立保健医療科学院研究倫理審査委員会の承認を得て実施したものである（NIPH-IBRA#12005）。

#### C. 研究結果

全国 47 都道府県より回答を得た（回収率 100%）。特定疾患医療受給者審査会の神経内科医は全国で 100 人であった（図 1）。



ALS 特定疾患医療受給者証所持者の[新規+更新]は 10,237 (男 5,842、女 4,395) 人、うち[新規]は 2,264 (男 1,302、女 962) 人であった。都道府県別人数、性・年

年齢階級別人数および有病率・発病率（対人口 10 万）を表 1～表 3 に示した。なお、有病率・発病率、地域差の解析に用いたのは、20 歳未満の 6 人を除く 10,231（男 5,840、女 4,391）人である。

表 3 より、有病率 (c/d) は 9.93（男 11.77、女 8.23）、発病率 (d/b) は 2.20（男 2.62、女 1.80）と推計された。いずれも 70 歳代にピークが見られた（有病率 27.08（男 33.41、女 21.90）、発病率 6.54（男 8.30、女 5.09））。参考値として、総人口を分母とした値 (c/a、d/a) を併記した。

新規所持者における地域差（観察数/期待数（95%信頼区間）、P 値）を表 4 に示した。男性では、沖縄（2.02（1.28-3.02）、 $P<0.01$ ）、奈良（1.96（1.31-2.81）、 $P<0.001$ ）、和歌山（1.79（1.10-2.77）、 $P<0.05$ ）、新潟（1.47（1.04-2.01）、 $P<0.05$ ）で高く、東京（0.79（0.64-0.97）、 $P<0.05$ ）、大阪（0.72（0.55-0.93）、 $P<0.05$ ）で低い傾向、女性では熊本（1.57（1.01-2.33）、 $P<0.05$ ）で高く、宮崎（0.31（0.06-0.92）、 $P<0.05$ ）で低い傾向が見られた。

#### D. 考察

全国 47 都道府県特定疾患医療受給者審査会において、2009 年度に提出された臨床調査個人票をもとに、100 人の神経内科医によって、10,237（男 5,842、女 4,395）人が ALS と判断された。特定疾患医療受給者証所持者数については、衛生行政報告例として、毎年度末現在の所持者数が公表されており、ALS の 2009 年度末現在の所持者数は 8,492（男 4,839、女 3,653）人と報告されている。特定疾患医療受給者証は、死亡などで受給資格が無くなった場合、それを都道府県に返納しなければならない。ALS のように年間の死亡者数が多い場合（例：1,797 人（2009 年 1 月 1 日～同年 12 月 31 日））、衛生行政報告例の公表値では、1 年間に ALS と判断された患者数を正確に反映することができない。今回、年間の患者数を把握するために 47 都道府県の担当課宛に調査を行ったが、今後は、臨床調査個人票登録システムを改善することにより、入力率 100%を実現する必要がある。

[新規+更新]および[新規]の所持者数を分子、医療保険制度別加入者人口を分母として、年間の有病率および発病率（対人口 10 万）を推計した。20 歳以上の医療保険制度別加入者人口においては、それぞれ 9.93（男 11.77、女 8.23）、2.20（男 2.62、女 1.80）で、70 歳代にピークが見られた。集団における疾病発生を把握するために

は、有病率や発生率などの基本的疫学情報が必須であり、なおかつ、経年的にモニタリングする必要がある。そのためには、臨床調査個人票登録システムが改善されるよう、繰り返し強調したい。

なお、特定疾患治療研究事業の限界として、医療保険制度非加入者（被保護者や自費診療の者など）、対象者であるが申請を行っていない者、認定基準を満たしていない者については把握することができなかった。

表 4 に示したように、新規所持者数に地域差が見られたが、奈良 ( $P<0.001$ )、沖縄 ( $P<0.01$ ) 以外の和歌山、新潟、東京、大阪（以上、男性）、熊本、宮崎（以上、女性）の有意差は  $P<0.05$  程度であった。

紀伊半島南部は ALS の多発地域として世界的も知られている<sup>1)</sup>。今回、男性の新規所持者で奈良県（29 人）が有意に高かった理由は定かではないが、ALS 多発地域と地理的に近いことも可能性の 1 つとして考えられるかもしれない（例：現在居住県と出身県）。同様に、沖縄県（23 人）で有意に高かった理由も定かではないが、沖縄に特有の「沖縄型神経原性筋萎縮症」<sup>2)</sup> と関連があるかもしれない。

いずれにしても、今回は 2009 年度のみでの解析結果であるので、今後、複数年度のデータを用いた解析が必要である。新規所持者が有意に高い地域については、さらに詳細な調査・検討が必要であると思われる。

#### E. 結論

2009 年度の ALS の年間有病率[新規+更新]および発病率[新規]（対医療保険制度加入者人口 10 万）（20 歳以上）は、それぞれ 9.93（男 11.77、女 8.23）、2.20（男 2.62、女 1.80）で、70 歳代にピークが見られた（27.08（男 33.41、女 21.90）、6.54（男 8.30、女 5.09））。

新規所持者数に地域差が見られたが、奈良 ( $P<0.001$ )、沖縄 ( $P<0.01$ ) 以外の和歌山、新潟、東京、大阪（以上、男性）、熊本、宮崎（以上、女性）の有意差は  $P<0.05$  程度であった。

#### 参考文献

- 1) Kihira T, Yoshida S, Kondo T, Iwai K, Wada S, Morinaga S, Kazimoto Y, Kondo T, Okamoto K, Kokubo Y, Kuzuhara S. An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960-2009: a possible link to change in drinking water source. *Amyotroph Lateral Scler.* 2012; 13(4):

347-50.

- 2) 大城盛夫, 中原啓一, 末原雅人. 沖縄本島に見られる感覚障害を伴う特異な神経原性筋萎縮症 9 例. 厚生省神経疾患研究委託費研究報告書 筋ジストロフィー症の疫学, 病態および治療開発に関する研究. pp. 5-9 (1985.03)

#### F.健康危険情報

なし。

#### G.研究発表

##### 1.論文発表

なし。

##### 2.学会発表

- 1) Doi Y, Nakano I, Atsuta N, Morita M, Sobue  
G. Care management for ALS patients.  
Neuroepidemiology 2012; 39: 241 (2012, 2<sup>nd</sup> Internaional Conference on Neurology & Epidemiology, France, Nice).
- 2) 土井由利子, 中野今治, 祖父江元, 熱田直樹,  
森田光哉. 臨床調査個人票の有用性と問題点.  
第 23 回日本疫学会学術総会; 2013.1.25; 大阪.  
同抄録集. pp.107.

#### H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし。

表1 全国47都道府県別ALS特定疾患医療受給者証所持者数（2009年4月1日～2010年3月31日）

都道府県	新規+更新			新規			更新		
	男	女	男女	男	女	男女	男	女	男女
北海道	223	212	435	67	43	110	156	169	325
青森	82	68	150	16	14	30	66	54	120
岩手	83	62	145	16	14	30	67	48	115
宮城	105	70	175	18	11	29	87	59	146
秋田	75	55	130	12	13	25	63	42	105
山形	88	58	146	13	14	27	75	44	119
福島	116	71	187	26	9	35	90	62	152
茨城	154	79	233	41	21	62	113	58	171
栃木	84	68	152	16	9	25	68	59	127
群馬	119	72	191	22	10	32	97	62	159
埼玉	279	183	462	70	46	116	209	137	346
千葉	265	192	457	61	47	108	204	145	349
東京	463	377	840	97	78	175	366	299	665
神奈川	330	257	587	87	70	157	243	187	430
新潟	173	99	272	39	25	64	134	74	208
富山	54	41	95	13	12	25	41	29	70
石川	63	43	106	13	10	23	50	33	83
福井	41	17	58	10	4	14	31	13	44
山梨	34	27	61	11	4	15	23	23	46
長野	111	81	192	24	20	44	87	61	148
岐阜	89	59	148	32	18	50	57	41	98
静岡	175	124	299	39	30	69	136	94	230
愛知	289	219	508	76	45	121	213	174	387
三重	86	68	154	22	8	30	64	60	124
滋賀	73	46	119	19	8	27	54	38	92
京都	120	95	215	19	14	33	101	81	182
大阪	368	299	667	63	70	133	305	229	534
兵庫	244	204	448	43	47	90	201	157	358
奈良	65	56	121	29	9	38	36	47	83
和歌山	91	49	140	20	9	29	71	40	111
鳥取	44	74	118	7	3	10	37	71	108
島根	62	44	106	14	7	21	48	37	85
岡山	109	58	167	24	14	38	85	44	129
広島	111	86	197	20	18	38	91	68	159
山口	81	60	141	16	15	31	65	45	110
徳島	56	30	86	11	4	15	45	26	71
香川	69	53	122	6	11	17	63	42	105
愛媛	49	54	103	10	15	25	39	39	78
高知	41	33	74	8	7	15	33	26	59
福岡	181	162	343	43	46	89	138	116	254
佐賀	30	31	61	13	11	24	17	20	37
長崎	61	45	106	10	11	21	51	34	85
熊本	95	80	175	21	24	45	74	56	130
大分	89	67	156	11	14	25	78	53	131
宮崎	69	51	120	15	3	18	54	48	102
鹿児島	84	68	152	16	16	32	68	52	120
沖縄	69	48	117	23	11	34	46	37	83
全国	5,842	4,395	10,237	1,302	962	2,264	4,540	3,433	7,973

表2 全国47都道府県性年齢階級別ALS特定疾患医療受給者証所持者数（2009年4月1日～2010年3月31日）

年齢（歳）	新規＋更新			新規			更新		
	男	女	男女	男	女	男女	男	女	男女
0～4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5～9	1	0	1	0	0	0	1	0	1
10～14	0	2	2	0	0	0	0	2	2
15～19	1	2	3	1	0	1	0	2	2
20～24	8	2	10	2	0	2	6	2	8
25～29	14	5	19	1	1	2	13	4	17
30～34	23	27	50	4	4	8	19	23	42
35～39	58	37	95	7	6	13	51	31	82
40～44	120	106	226	17	24	41	103	82	185
45～49	180	139	319	26	29	55	154	110	264
50～54	326	232	558	54	45	99	272	187	459
55～59	663	402	1,065	143	80	223	520	322	842
60～64	955	635	1,590	217	120	337	738	515	1,253
65～69	1,103	693	1,796	234	160	394	869	533	1,402
70～74	1,111	837	1,948	269	181	450	842	656	1,498
75～79	752	656	1,408	194	166	360	558	490	1,048
80～84	407	436	843	96	108	204	311	328	639
85歳以上	120	184	304	37	38	75	83	146	229
計	5,842	4,395	10,237	1,302	962	2,264	4,540	3,433	7,973
再掲									
20歳以上	5,840	4,391	10,231	1,301	962	2,263	4,539	3,429	7,968

表3 全国47都道府県ALS特定疾患医療受給者証所持者数（対人口10万）（2009年4月1日～2010年3月31日）

年齢	人口		新規+更新			新規			更新		
	総人口 (a)	医療保険制度 加入者人口 (b)	所持者数 (c)	c/a (対人 口10万)	c/b (対人 口10万)	所持者数 (d)	d/a (対人 口10万)	d/b (対人 口10万)	所持者数 (e)	e/a (対人 口10万)	e/b (対人 口10万)
男											
20~29	7,382,000	7,366,821	22	0.30	0.30	3	0.04	0.04	19	0.26	0.26
30~39	9,279,000	9,241,101	81	0.87	0.88	11	0.12	0.12	70	0.75	0.76
40~49	8,255,000	8,187,477	300	3.63	3.66	43	0.52	0.53	257	3.11	3.14
50~59	8,380,000	8,235,051	989	11.80	12.01	197	2.35	2.39	792	9.45	9.62
60~69	8,608,000	8,393,464	2,058	23.91	24.52	451	5.24	5.37	1,607	18.67	19.15
70~79	5,726,000	5,576,087	1,863	32.54	33.41	463	8.09	8.30	1,400	24.45	25.11
80歳以上	2,668,000	2,627,371	527	19.75	20.06	133	4.99	5.06	394	14.77	15.00
計	50,298,000	49,627,372	5,840	11.61	11.77	1,301	2.59	2.62	4,539	9.02	9.15
女											
20~29	7,033,000	7,005,115	7	0.10	0.10	1	0.01	0.01	6	0.09	0.09
30~39	9,027,000	8,952,725	64	0.71	0.71	10	0.11	0.11	54	0.60	0.60
40~49	8,152,000	8,066,518	245	3.01	3.04	53	0.65	0.66	192	2.36	2.38
50~59	8,493,000	8,396,326	634	7.46	7.55	125	1.47	1.49	509	5.99	6.06
60~69	9,190,000	9,025,874	1,328	14.45	14.71	280	3.05	3.10	1,048	11.40	11.61
70~79	6,997,000	6,816,596	1,493	21.34	21.90	347	4.96	5.09	1,146	16.38	16.81
80歳以上	5,229,000	5,109,590	620	11.86	12.13	146	2.79	2.86	474	9.06	9.28
計	54,121,000	53,372,744	4,391	8.11	8.23	962	1.78	1.80	3,429	6.34	6.42
男女											
20~29	14,415,000	14,371,936	29	0.20	0.20	4	0.03	0.03	25	0.17	0.17
30~39	18,306,000	18,193,826	145	0.79	0.80	21	0.11	0.12	124	0.68	0.68
40~49	16,407,000	16,253,995	545	3.32	3.35	96	0.59	0.59	449	2.74	2.76
50~59	16,873,000	16,631,377	1,623	9.62	9.76	322	1.91	1.94	1,301	7.71	7.82
60~69	17,798,000	17,419,338	3,386	19.02	19.44	731	4.11	4.20	2,655	14.92	15.24
70~79	12,724,000	12,393,683	3,356	26.38	27.08	810	6.37	6.54	2,546	20.01	20.54
80歳以上	7,897,000	7,736,961	1,147	14.52	14.82	279	3.53	3.61	868	10.99	11.22
計	104,420,000	103,001,116	10,231	9.80	9.93	2,263	2.17	2.20	7,968	7.63	7.74



表4 全国47都道府県新規ALS特定疾患医療受給者証所持者（20歳以上）の地域差（2009年4月1日～2010年3月31日）

都道府県	男 (N=1, 301)				女 (N=962)				男女 (N=2, 263)			
	観察数/ 期待数	95%CI 下限	95%CI 上限	P	観察数/ 期待数	95%CI 下限	95%CI 上限	P	観察数/ 期待数	95%CI 下限	95%CI 上限	P
全国	1.00				1.00				1.00			
北海道	1.17	0.91	1.48		0.97	0.70	1.30		1.07	0.88	1.30	
青森	1.12	0.64	1.82		1.19	0.65	1.99		1.14	0.77	1.62	
岩手	1.07	0.61	1.74		1.19	0.65	1.99		1.11	0.75	1.59	
宮城	0.77	0.46	1.22		0.63	0.31	1.13		0.71	0.48	1.02	
秋田	0.94	0.48	1.64		1.25	0.66	2.13		1.06	0.69	1.57	
山形	0.97	0.52	1.66		1.36	0.74	2.28		1.13	0.75	1.65	
福島	1.18	0.77	1.73		0.54	0.25	1.03		0.91	0.63	1.26	
茨城	1.32	0.95	1.79		0.97	0.60	1.48		1.18	0.91	1.52	
栃木	0.77	0.44	1.26		0.61	0.28	1.16		0.71	0.46	1.05	
群馬	1.03	0.65	1.56		0.65	0.31	1.20		0.88	0.60	1.24	
埼玉	0.97	0.76	1.23		0.95	0.70	1.27		0.97	0.80	1.17	
千葉	0.97	0.74	1.24		1.08	0.80	1.44		1.02	0.84	1.23	
東京	<b>0.79</b>	<b>0.64</b>	<b>0.97</b>	*	0.88	0.70	1.10		<b>0.83</b>	<b>0.71</b>	<b>0.96</b>	*
神奈川	1.01	0.81	1.25		1.17	0.91	1.48		1.08	0.92	1.26	
新潟	<b>1.47</b>	<b>1.04</b>	<b>2.01</b>	*	1.24	0.80	1.83		<b>1.37</b>	<b>1.05</b>	<b>1.75</b>	*
富山	1.07	0.57	1.83		1.28	0.66	2.24		1.15	0.74	1.70	
石川	1.08	0.57	1.84		1.08	0.52	1.99		1.08	0.69	1.62	
福井	1.16	0.55	2.12		0.61	0.17	1.56		0.92	0.50	1.54	
山梨	1.20	0.60	2.14		0.59	0.16	1.51		0.94	0.53	1.56	
長野	0.99	0.64	1.48		1.12	0.68	1.73		1.05	0.76	1.41	
岐阜	1.43	0.98	2.02		1.11	0.66	1.75		1.29	0.96	1.71	
静岡	0.96	0.68	1.31		1.03	0.69	1.46		0.99	0.77	1.25	
愛知	1.07	0.84	1.33		0.91	0.66	1.21		1.00	0.83	1.20	
三重	1.10	0.69	1.67		0.55	0.24	1.08		0.87	0.59	1.25	
滋賀	1.42	0.86	2.22		0.83	0.36	1.63		1.17	0.77	1.71	
京都	0.72	0.43	1.12		0.70	0.39	1.18		0.71	0.49	1.00	
大阪	<b>0.72</b>	<b>0.55</b>	<b>0.93</b>	*	1.10	0.86	1.39		0.88	0.74	1.05	
兵庫	0.76	0.55	1.02		1.11	0.81	1.47		0.91	0.73	1.12	
奈良	<b>1.96</b>	<b>1.31</b>	<b>2.81</b>	***	0.82	0.38	1.56		<b>1.48</b>	<b>1.05</b>	<b>2.03</b>	*
和歌山	<b>1.79</b>	<b>1.10</b>	<b>2.77</b>	*	1.03	0.47	1.96		1.46	0.98	2.10	
鳥取	1.09	0.44	2.25		0.59	0.12	1.74		0.87	0.41	1.59	
島根	1.66	0.91	2.78		1.05	0.42	2.17		1.39	0.86	2.12	
岡山	1.15	0.74	1.72		0.89	0.49	1.49		1.04	0.74	1.43	
広島	0.67	0.41	1.04		0.80	0.48	1.27		0.73	0.52	1.00	
山口	0.97	0.55	1.57		1.14	0.64	1.88		1.04	0.71	1.48	
徳島	1.25	0.62	2.24		0.59	0.16	1.50		0.95	0.53	1.57	
香川	0.54	0.20	1.19		1.32	0.66	2.36		0.88	0.51	1.41	
愛媛	0.64	0.31	1.17		1.21	0.68	2.00		0.88	0.57	1.31	
高知	0.93	0.40	1.84		1.01	0.41	2.09		0.96	0.54	1.59	
福岡	0.90	0.65	1.22		1.21	0.89	1.62		1.03	0.83	1.27	
佐賀	1.50	0.80	2.56		1.57	0.78	2.81		1.52	0.97	2.26	
長崎	0.66	0.32	1.22		0.90	0.45	1.61		0.76	0.47	1.16	
熊本	1.09	0.68	1.67		<b>1.57</b>	<b>1.01</b>	<b>2.33</b>	*	1.30	0.95	1.73	
大分	0.84	0.42	1.50		1.35	0.74	2.27		1.06	0.69	1.57	
宮崎	1.22	0.68	2.02		<b>0.31</b>	<b>0.06</b>	<b>0.92</b>	*	0.82	0.49	1.30	
鹿児島	0.87	0.50	1.42		1.09	0.63	1.78		0.96	0.66	1.36	
沖縄	<b>2.02</b>	<b>1.28</b>	<b>3.04</b>	**	1.32	0.66	2.36		<b>1.74</b>	<b>1.21</b>	<b>2.44</b>	**

# 臨床調査個人票を用いた筋萎縮性側索硬化症(ALS)に関する記述疫学研究

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 研究分担者:土井 由利子 所属機関名:国立保健医療科学院 疫学調査研究分野

## 栄養呼吸管理に関する横断的研究 (平成24年度)

- 2009年度のALSの臨床調査個人票のデータを用い、ALS患者7,461(新規1,795、更新5,666)人について、栄養呼吸管理に関する横断的分析を行った(データ入力率72.9%)。
- 全体では栄養呼吸管理の主流は胃瘻腸瘻、気管切開下陽圧換気TPPVであった(約30%)。新規ではNIPPVの方が高い。
- 新規で発症年齢の高齢化、人工呼吸器導入のリスク要因として呼吸障害が示唆された。

表2 栄養呼吸管理の頻度

	新規+更新		新規	
	N=7,461		N=1,795	
	n	%	n	%
経鼻胃管	389	5.2	76	4.2
胃瘻腸瘻	2,469	33.1	87	4.8
NIPPV	770	10.3	144	8.0
TPPV	2,072	27.8	72	4.0

## 有病率・発病率の推計および地域差に関する研究(平成25年度)

- 全国47都道府県の担当課に対し、2009年度のALS特定疾患医療受給者証所持者に係る調査を実施した。[新規+更新]は10,237人、[新規]は2,264人であった(回収率100%)。
- [新規+更新]および[新規]の所持者数を分子、医療保険制度別加入者人口を分母として、年間の有病率および発病率(対人口10万)を推計すると、それぞれ9.93(男11.77 女8.23)、2.20(男2.62 女1.80)で、70歳代にピークが見られた(27.08(男33.41 女21.90)、6.54(男8.30 女5.09))。
- 新規所持者数に地域差が示唆された。男性では沖縄、奈良、和歌山、新潟で高く、東京、大阪で低い傾向、女性では熊本で高く、宮崎で低い傾向が見られた。なお、沖縄(P<0.001)、奈良(P<0.01)以外はP<0.05程度であった。

神経変性疾患に関する調査研究  
研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

我々は ALS-FUS のモデルショウジョウバエを作成し、その表現型を修飾する因子、すなわち ALS の治療薬開発につながる因子の探索を行っている。平成 23・24 年度は、FUS のショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ系統を樹立し、*Caz* の機能喪失が運動能力の低下および運動ニューロンの形態異常を来すことを示した。平成 25 年度は、その *Caz-KD* ショウジョウバエを用いて、その表現型を修飾する因子を探索した。家族性 ALS の原因遺伝子に変異を有するショウジョウバエ系統との交配では、ヒト *VCP* のショウジョウバエホモログ *ter94* の変異系統は、*Caz-KD* による表現型を増強し、*ter94* 過剰発現系統は *Caz-KD* による表現型を抑圧した。これまでの報告と我々の結果からは *VCP* は FUS の nucleoplasmic shuttling の機能を担っている可能性が考えられ、今後の展開として、*VCP* の shuttling 機能を活性化する低分子化合物などが ALS の根本治療薬となる可能性が考えられた。

研究分担者：徳田 隆彦

所属機関名：京都府立医科大学大学院分子脳病態

解析学（神経内科）

A.研究目的

2006 年に *TDP43*、2009 年に *FUS* が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子として報告された。我々は、平成 23 年度に、まず *FUS* のショウジョウバエホモログである *Caz* を KD したショウジョウバエ系統を樹立し、その運動機能障害の病態解析を行うことを計画した。

ショウジョウバエはヒト神経系を構成する遺伝子の約 75% のホモログを有し、ヒト遺伝子との相同性も高く、多くの遺伝子解析が可能である。また GAL4/UAS 標的発現システムを用いることにより組織特異的に標的遺伝子を過剰発現または KD させることが可能である。従って目的とする神経系標的遺伝子の機能解析や、変異を有する疾患発症原因遺伝子による神経系への影響を短期間で解析できる利点を有している。

我々は、平生年度末までには *Caz* を KD したショウジョウバエ系統を樹立し、*Caz* の機能喪失が運動ニューロン障害を来すことを報告した。この *Caz-KD* ショウジョウバエ (ALS-FUS モデルショウジョウバエ) を用いて、その表現型を修飾する因子、すなわち ALS の根本治療薬の候補となる分子を探索することを最終的な目的とした。

B.研究方法

1) *Caz* ノックダウンショウジョウバエ系統の作成

で pRISE ベクターへクローニングした。Off-target 効果でないことを担保するために、2 つの標的領域を target とする dsRNA を発現する transgene を使用した。target 領域

は、*Caz* の aa.1-aa.167 と aa.363-aa.399 を標的としている。ベクターは自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター発生遺伝学研究部門の影山裕二先生より御供与頂いた pRISE ベクターを使用した。

2) 複眼原基特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエの形態学的解析と、ヒト *VCP* のショウジョウバエホモログ *ter94* との相互作用の解析

組織特異的に標的遺伝子の発現を制御することが可能な GAL4-UAS システムを用いて、複眼原基特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエを作製し、その成虫複眼を走査型電子顕微鏡 (KEYENCE VE7800) で観察した。

さらに、複眼特異的 *Caz-KD* による表現型を指標として、FALS の原因遺伝子に変異を有するショウジョウバエを交配し、次世代の複眼が *Caz-KD* による表現型を増強・抑圧する系統を探索した。

3) 神経特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエの運動能力および *ter94* との相互作用の検討

神経特異的 *Caz-KD* (*elav>UAS-Caz-IR*) と *ter94* 変異系統の交配 (*elav>UAS-Caz-IR/ter94<sup>k15502</sup>*)、神経特異的 *Caz-KD* と *UAS-GFP* 系統の交配 (*elav>UAS-Caz-IR/UAS-GFP*)、および神経特異的 *Caz-KD* と *ter94* 過剰発現系統の交配 (*elav>UAS-Caz-IR/UAS-ter94*) を行った。それぞれのハエを 28°C に置き、新しく生まれた成虫の雄を集め、1 つのガラスチューブに計 20 匹入れ、25°C のインキュベーター内に置いた。Tapping によってすべての成虫を底面に落とし、その後成虫がガラス壁面を登るのを video で記録した。こ

のステップを5回繰り返して、tapping後の30秒間に2cm毎に付けられた目盛りを1匹が1つ超えると climbing score 1点を与え、すべての成虫の score の合計を成虫の総数 x 5(試行数)で除したものをその系統の平均の climbing score とした。Climbing assay は羽化後3日、7日、14日、21日、28日目まで施行した。

#### 4) 神経特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエの神経筋接合部(NMJ)における運動ニューロンの形態と *ter94* の相互作用の検討

3)と同様の交配を行ったショウジョウバエ系統で、それぞれの3齢幼虫をHL3 saline中で解剖を行い筋肉上のNMJを分離して、4%paraformaldehyde/PBSで30分固定し、2%BSA/PBS/0.1% TritonX-100で30分間ブロッキングして、FITC 結合ヤギ抗 HRP 抗体で染色した。画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Zeiss LSM510) を用いて Z 軸方向に1 μm の間隔でスライスして得た各切片をマージさせた。第4筋肉上のNMJにおける branch の長さを Image Jソフトを用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト及びヒト由来の試料を対象としない。

### C.研究結果

#### 1) 神経特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエ(3 齢幼虫)の中樞神経系における *Caz* の発現

*elav3A-GAL4* ドライバー系統を用いて神経特異的に *Caz* 二本鎖 RNA を発現させた系統の中樞神経系由来タンパク

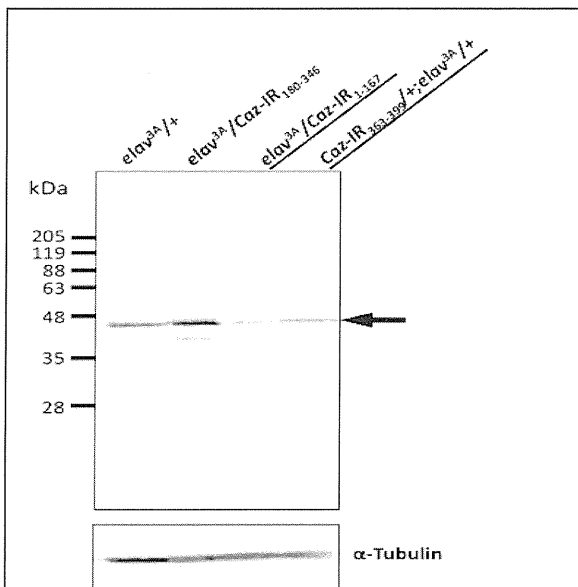


図 1. *Caz* ノックダウンショウジョウバエ(3 齢幼虫)の中樞神経系の western blotting

質粗抽出液を調整し、western blotting により解析を行った。*GAL4* のみを発現するコントロールと比較すると、*elav3A>UAS-Caz-IR180-346* 系統では *Caz* タンパク質レベルの減少が見られなかったが、*elav3A>UAS-Caz-IR1-167* の strain 3 と VDRC から入手した *Caz-IR363-399/+;elav3A/+* で *Caz* タンパク質レベルの顕著な減少が認められた(図 1)。

#### 2) 神経特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエ(成虫)の Climbing assay

Climbing assay により神経特異的な *Caz* ノックダウンショウジョウバエの成虫の運動能力について検討した。神経特異的 *Caz* ノックダウン系統である *elav3A>UAS-Caz-IR1-167*、*Caz-IR363-399/+;elav3A/+* では、コントロール(*elav3A/+*)と比較して運動能力が顕著に低下していた(図 2)。

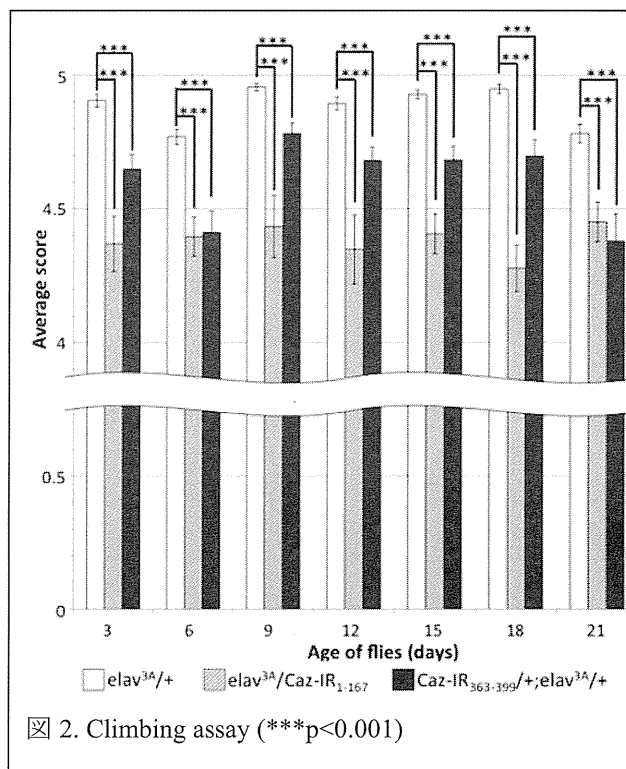


図 2. Climbing assay (\*\*\*) $p < 0.001$

#### 3) 神経特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエの神経筋接合部(NMJ)の形態学的観察

*elav3A>UAS-Caz-IR1-167* 及び *Caz-IR363-399/+;elav3A/+* の 3 齢幼虫のNMJにおける運動ニューロンを検討した。*Caz* ノックダウン系統とコントロールとの間で、運動ニューロンの構造的な違いは観察されなかった。しかしながら、運動ニューロンの synaptic branch の長さを測定し比較すると、*Caz* のノックダウンにより synaptic branch の短縮が観察された。