

201324050A

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 25 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 26 (2014) 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. ALS 疾患関連遺伝子解析	
勝野 雅央	11
2. 大規模 ALS 患者前向きコホートの構築	
渡辺 宏久	14
3. 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	18
4. ALS Functional Rating Scale-revised に基づく ALS 病勢進行の類型化と類型を規定する SNP・エクソンの同定に関する統計的検討	
平川 晃弘	22
5. SNP アレイを活用した ALS の遺伝統計学的詳細解析	
中枋 昌弘	26
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	
池川 志郎	31
7. 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	33
8. 日本人 ALS における TFG 遺伝子変異の解析	
中野 今治	35
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

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ALS患者905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。前向き臨床情報で示される孤発性ALS患者の重症度スケール変化パターンおよび生存期間は患者ごとに極めて多彩である。我々は臨床的解析から、予後予測指標として頸部筋力低下の程度が有用であることを示した。またゲノムワイド塩基多型（SNPs）タイピング結果と臨床経過との関連解析から、急速な重症度スケール悪化もしくは生存期間と、p値 10^{-9} ～ 10^{-8} 台で関連するSNPsを複数個見出した。その他に国内の複数の研究者にJaCALSゲノム遺伝子リソースを提供することにより、ALSおよび他の神経変性疾患関連遺伝子の解析検証を行い、多くの実績を得ている。

連携する慶応義塾大学岡野研では、B cell lineを用いてiPS細胞を樹立する技術が確立された。今回同定された個別の遺伝子多型を持つ孤発性ALS患者からiPS細胞ライブラリーを作製し、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る基盤が整った。大規模疾患コホートによる発症・進行に関わる遺伝子多型の探索同定、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

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 名古屋大学脳とこころの研究センター 特任教授
熱田直樹 名古屋大学医学部附属病院神経内科 助教
平川晃弘 名古屋大学医学部附属病院・先端医療・臨床研究支援センター・生物統計学 講師
中柘昌弘 名古屋大学医学部附属病院・先端医療・臨床研究支援センター・バイオ

インフォーマティクス 病院助教
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 東京都立神経病院 院長

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は90%が孤発性

であり、平均3年で死に至る神経難病である。本研究は一塩基多型 (SNPs)、rare variants 解析により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。

遺伝性神経変性疾患は、遺伝子異常を用いたモデル動物により病態解明研究が飛躍的に進んだ。しかし孤発性ALSについての方法論は未確立である。従来報告されてきた孤発性ALS関連遺伝子多型はオッズ比1.5以下であり、ここからモデル動物を作製し、病態解析研究を進めることは難しい。より病態寄与度の高い遺伝子を見出し、病態的意義の検証解析を行う系を確立する必要がある。

孤発性ALSについて、前向き臨床情報、DNA、B-cell lineの組み合わせは世界的に類例がない。臨床情報、遺伝子の関連解析から病態関連遺伝子を抽出し、B-cell lineを用いて特定の遺伝子型、臨床型を有する患者のiPS細胞ライブラリーを作製し、病態を解析することは、孤発性ALSの分子病態解明、治療薬スクリーニング系の開発につながりうる。

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行った。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カ月おきに実施し、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

外に出る際には匿名化され、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。JaCALS 参加施設は 30 施設に拡大した。

孤発性 ALS 病態関連遺伝子の探索

平成 24 年度に 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ていたが、平成 25 年度にはバリデーションのために、JaCALS 登録の ALS 患者追加検体および、自治医科大学神経内科および共同研究施設の北海道大学神経内科において蓄積された ALS 患者 遺伝子 検体 の計 349 例について、OmniExpressExomeBeadChip を用いた SNP タイピングを実施した。

得られた SNP タイピング結果を用いて、縦断的臨床像との関連を網羅的に解析した。解析方法とそれぞれの結果は研究結果欄に示す。

SOD1、TDP-43、FUS などを含む 28 の既知の ALS 関連遺伝子について、孤発例においても遺伝子異常が見いだされる場合がある。その検証システム構築のために、Ion AmpliSeq™ Custom Panel を用いてプライマーペアのセットを作成した。これを用いて multiplex PCR を行い、アダプターのライゲーションを行い、ライブラリーを作成した。作成したライブラリーは Ion One Touch™システムを用いてエマルジョン PCR を行い、テンプレートを精製した。精製したテンプレートを Ion PGM™シークエンサーを用いて配列解析を行った。

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た。ライブラリー作成に関しては、Covaris 社の超音波破砕システム 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 Data 解析に関しては、CLCbio 社の CLC GenomicWorkbench 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 SNV を抽出できるシステムを構築した。

(倫理面への配慮)

研究に参加するすべての施設で研究計画の倫理委員会承認を得た。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、文書同意を得た場合にのみ研究に参加いただいている。対象者が書字不能、認知機能障害などにより、文書による同意表明が困難な場合には、代諾者に文書同意を得た。代諾者は親権者、提供者本人の配偶者、成人した子、父母、成人の兄弟姉妹もしくは孫、祖父母、同居の親族の中から選定した。研究にあたっては研究参加者に不利益が生じないように個人情報の保護、プライバシーの尊重に努力し最大限の注意を払った。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

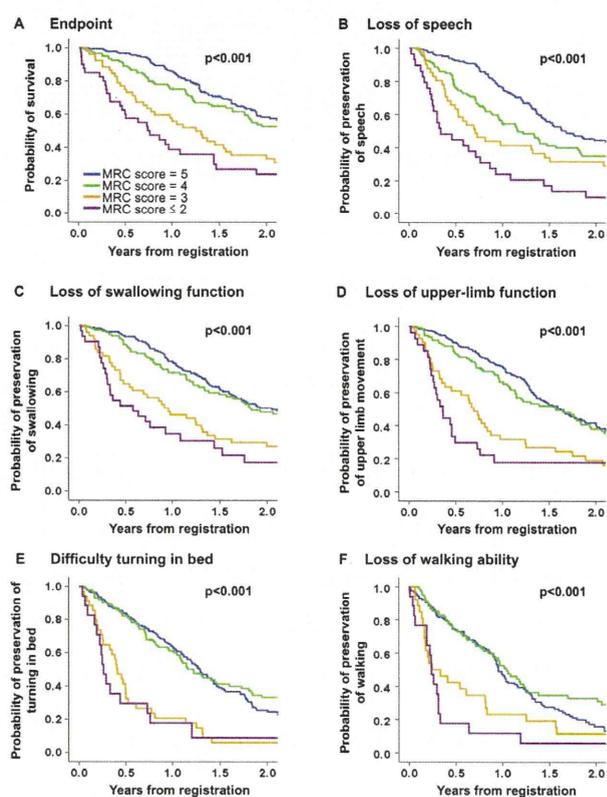
JaCALS 研究リソースの維持・拡大、臨床的解析

JaCALS における ALS 患者登録数は平成 26

年 1 月末時点で 905 例、コントロール検体数は 277 例になった。縦断的な予後情報取得は順調にできており、90%以上の follow up 率を維持している。

2011 年までに登録された 520 例の縦断像の解析により、頸部筋力低下の有無が ALS 患者の生存や嚥下機能、上肢機能の維持など多彩な予後予測に有用であることを示した (J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2013)。

図 1. 頸部筋力低下と予後



(図 1 解説)

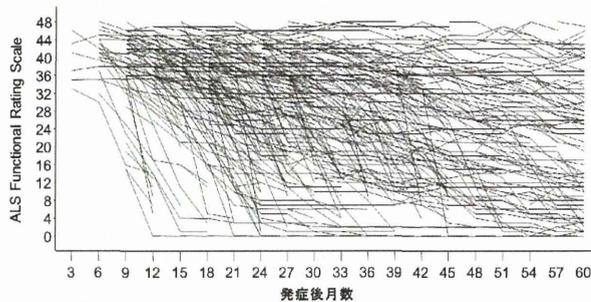
徒手筋力検査 (MRC score:0~5) の値により、登録時からの生存期間および言語機能、嚥下機能、上肢機能、寝返り、下肢機能が廃絶するまでの期間が分かる。

孤発性 ALS 病態関連遺伝子の探索

①ALSFRS-R（重症度スケール）の経時的推移と関連する因子

ALSFRS-R は、ALS 患者に対する臨床研究や治験において世界標準として用いられる重症度スケールである。JaCALS に登録された孤発性 ALS 患者の、発症からの ALSFRS-R 経時的変化を図 2 に示す。

図 2. 孤発性 ALS 発症後の ALSFRS-R 経過



(図 2 解説)

孤発性 ALS 患者の進行は極めて多様である。

このような多彩な進行パターンについて、混合分布モデルを用いて類型化を行った。2006 年 2 月から 2012 年 10 月までに JaCALS に登録され、孤発性で、改訂 El Escorial 診断基準で possible 以上、登録時呼吸器未装着であり、発症から 5 年までの ALSFRS-R 推移データが得られている ALS 患者 465 例を対象とした。

$$\text{仮定するモデル } Y_{ij} \sim \sum_{i=1}^K p_i N(\mu_i, \sigma^2), \text{ただし } \sum_{i=1}^K p_i = 1$$

$$\text{Four-parameter logistic model: } \mu_t = 48 - \frac{48 \times \text{時間}^{\beta_t}}{\{\text{時間}^{\beta_t} + \delta_t^{\beta_t}\}}$$

その結果、ALSFRS-R の経時的変化は急速進行型、シグモイド型、単調減少型、緩徐型の 4 型に分類された。

これら 4 つの類型と関連する臨床的因子として発症年齢、性別、発症部位（上肢、下肢、頸部、球麻痺）、リルゾールの有無について解析を行ったが、表 1 に示すように有意なものは認めなかった。

図 3. 孤発性 ALS 患者経過・進行の類型化

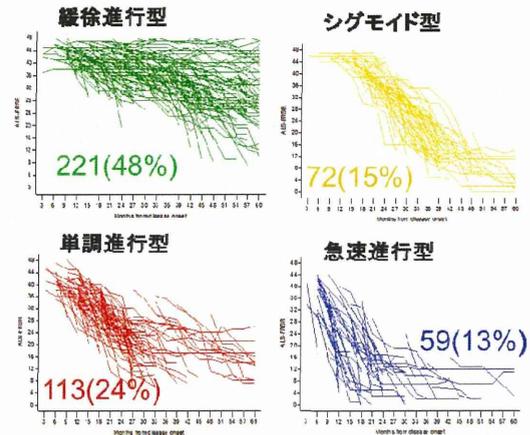


表 1. 類型と臨床的因子との比較

	急速進行型		単調進行型		シグモイド型		緩徐進行型		
変数	N	%	N	%	N	%	N	%	P
発症65歳以上	28	47.5	54	47.8	23	31.9	82	37.1	0.075
男性(vs女性)	26	44.1	69	61.1	45	62.5	129	58.4	0.125
上肢発症	27	45.8	48	42.5	29	40.3	109	49.3	0.477
下肢発症	20	33.9	41	36.3	25	34.7	53	24	0.068
頸部発症	1	1.7	3	2.7	1	1.4	7	3.2	0.826
球麻痺発症	14	23.7	26	23	19	26.4	53	24	0.963
リルゾールあり	37	62.7	66	58.4	50	69.4	120	54.3	0.133

この類型と遺伝子多型（70 万 SNPs+25 万 exome chip）との関連解析を行った。遺伝子多型関与のモデルとして、Dominant model: メジャーアレルホモの例に対するマイナーアレル保有例のオッズ比、Recessive model: メジャーアレル保有例に対するマイナーアレルホモ例のオッズ比、Additive model: マイナーアレルが一つ増えることに対するオッズ比、以上の 3 パターンを用いた。

その結果、急速進行型と関連する SNPs が Recessive model において見出され、そのうち 7 つが p 値 10^{-8} 台であった。その Manhattan plot を以下に示す。

図 4. Manhattan plot(急速進行型と関連)

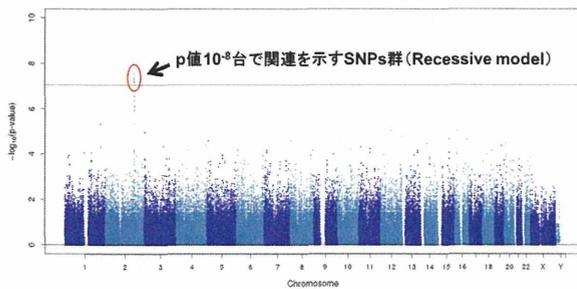
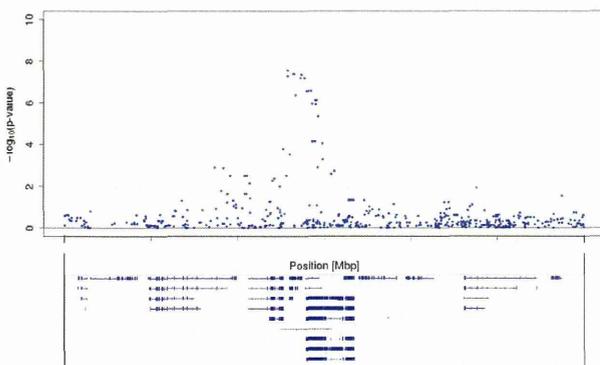
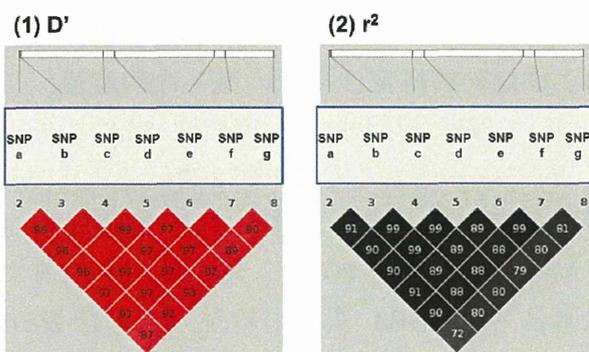


図 5. Positional p values (有意な部分の拡大)



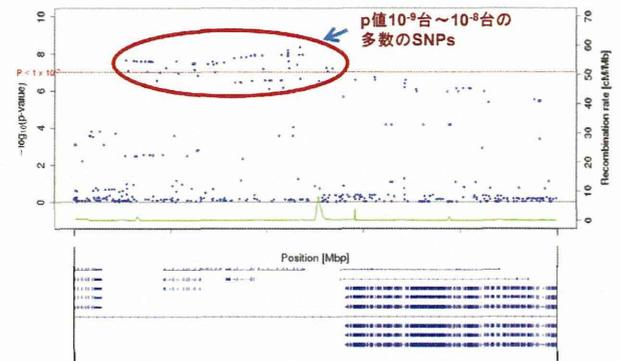
Haploview4.2 ソフトウェアを用いてハプロタイプ解析を行ったところ、これらの SNPs は強い連鎖不平衡状態にあることが示された。

図 6. Haplotype 解析



さらに、1000genomes Phase I version3 アジア人(286 例)を reference として genotype imputation を実施した。ソフトウェアは mach ver1.018 (pre-phase)、minimac- 2013.07.17 (imputation) を用いた。

図 7. imputation 後 positional p values (有意な部分の強拡大)



Imputation の結果により、p 値 10^{-9} 台の SNPs を 3 個、 10^{-8} 台の SNPs を 41 個認めた。

京都大学をはじめ、我が国の 5 拠点が構築した The Human Genetic Variation Database (HGVD)における expression QTL (eQTL)データベースを用いた検索において、タイピングデータで p 値 10^{-8} 台での関連を示した 7SNPs のうち 6SNPs はマイナーアレルホモの場合に、遺伝子 X の発現が低下していることが示された。

②ALS 患者生存期間と関連する因子

ALS 患者の生存期間と関連する遺伝子多型についての検討も実施した。

Exploration 群として JaCALS に登録された孤発性 ALS 患者 514 例、Validation 群として JaCALS の追加検体および、自治医科大学神経内科、北海道大学神経内科の孤発性 ALS 患者検体計 292 例を対象とした。これらについて発症から死亡または人工呼吸器装着（気管切開を伴う）までの期間と 70 万 SNPs+25 万 exome variants との関連を解析した。解析方法は Multivariate Cox を使い、発症年齢とリルゾールの有無を調整した。Exploration 群で p 値が 10^{-5} 台以下となった SNP を Validation 群で検証した。

その結果、Exploration 群と Validation 群のメタ解析で p 値が 10^{-9} 台を示す SNP を一つ、 10^{-8} 台を示す SNP を一つ見出した。

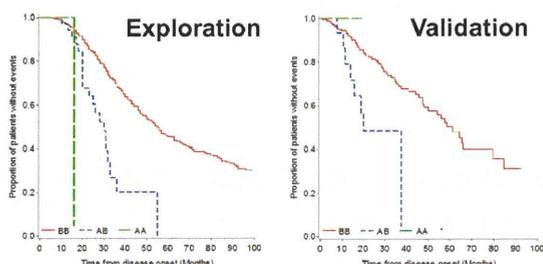
表 2. ALS 患者の生存期間と関連する SNPs

Additive	SNP X (Minor allele = A)					
	Exploration (N = 514)			Validation (N = 292)		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB
Number of patients	1	36	477	1	16	275
MAF	0.037			0.031		
Median (Months)	16	30	54.9	Not reached	20	61.2
HR (95%CI)	3.27 (2.13, 5.02)			2.42 (1.24, 4.72)		
P-value	6.20E-08			9.56E-03		
Meta-analysis HR (95%CI)	3.00 (2.09, 4.30)					
Meta-analysis P-value	2.59E-09					
Test of Heterogeneity	0.4589					

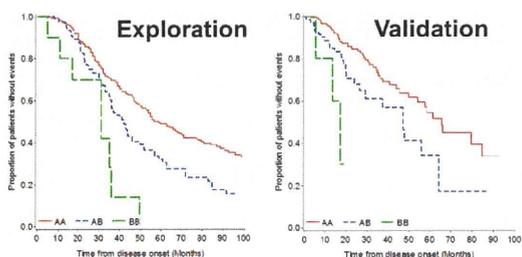
Additive	SNP Y (Minor allele = B)					
	Exploration (N = 514)			Validation (N = 292)		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB
Number of patients	374	130	10	217	72	5
MAF	0.146			0.14		
Median (Months)	56.7	41.9	31.1	65.4	47.3	17.3
HR (95%CI)	1.68 (1.33, 2.12)			2.17 (1.42, 3.31)		
P-value	1.41E-05			3.10E-04		
Meta-analysis HR (95%CI)	1.78 (1.45, 2.18)					
Meta-analysis P-value	2.93E-08					
Test of Heterogeneity	0.2927					

図 9. ALS 患者の生存期間と関連する SNPs と生存曲線

SNP X



SNP Y



(図 9 解説)

SNPX も SNPY もマイナーアレルホモ、ヘテロ、メジャーアレルホモの順で発症からの生存期間が短くなっている。

③既知の ALS 関連遺伝子異常スクリーニングおよび次世代シーケンサーによるエクソーム解析

自治医科大学における High-Resolution Melting 解析による遺伝子異常スクリーニングおよび、Ion PGM シーケンサーを用いた配列解析による ALS 関連遺伝子異常スクリーニングにおいて、JaCALS 登録例のうち家族歴のあるものも含めて計 592 検体の解析を実施したところ、SOD 1 変異例 24 例、TDP43 変異例 3 例、angiogenin 変異例 4 例、FUS 変異例 6 例を認めた。

次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析については、現在孤発性 ALS 391 例のエクソームシーケンスを行い、データ解析を進めている。

「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）拠点施設である東京大学神経内科にコントロール検体 202 例を送付し、日本人のエクソームコントロールデータ構築に供している。

JaCALS 研究リソースを用いた ALS および他の神経変性疾患関連遺伝子の検証

JaCALS において蓄積されたゲノム遺伝子等のリソースを用いて、本研究期間内に ALS および他の神経変性疾患の様々な関連遺伝子について解析が行われた。家族性 ALS の原因遺伝子の一つである C9ORF72 遺伝子変異の我が国の孤発性 ALS 患者における頻度検証 (*Neurobiol Aging* 2012)、新規家族性 ALS 原因遺伝子 ERBB4 変異の検証 (*Am J Hum Genet* 2013)、多系統萎縮症関連遺伝子の検証 (*N Engl J Med* 2013)、Idiopathic basal ganglia calcification 原因遺伝子検証 (*Neurology* 2014)、TFG 遺伝子変異のスクリーニング (in preparation) の実績がある。

D. 考察

ALS 患者の有病率は人口 10 万人あたり 6-7 人程度、発症率は人口 10 万人あたり 2 人程度である。糖尿病や高血圧症などの common disease と異なり、数百例以上の疾患コホート構築や検体の蓄積は容易ではない。

JaCALS においては 900 例以上の ALS 患者登録とゲノム遺伝子および不死化細胞の蓄積に成功しており、加えて前向き縦断的な臨床経過の情報を高率に蓄積できている点で、世界でも有数の研究リソースが構築できていると考えられる。

本研究において、ALS 患者の進行・予後を左右する遺伝子多型を見出すことができている。これは病態抑止治療の分子標的同定に直接つながりうる成果である。すなわち、ALS 患者の重症度が急速に悪化する、あるいは生存期間が短くなることに関連する遺伝子、タンパクを同定できれば、それらを標的にした薬剤をスクリーニングすることで病態抑止治療のための創薬に結びつけることができる。

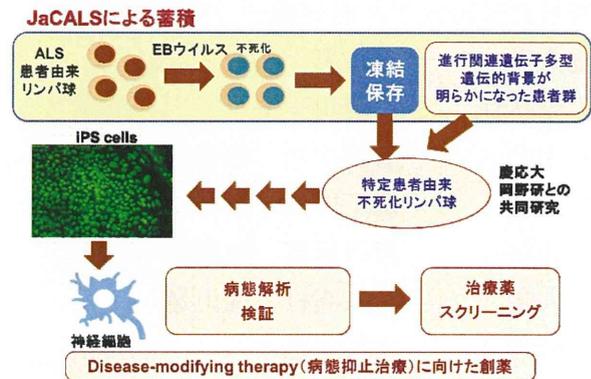
この遺伝子多型と関連する遺伝子・タンパクの検証と病態解析から、薬剤スクリーニングにつなげるモデルとしては、該当する遺伝子多型を持つ ALS 患者由来の iPS 細胞が最も適切であろう。iPS 細胞技術を持つ慶応大学岡野研とは一貫して共同研究体制にあり、岡野研では不死化リンパ球から iPS 細胞を作製する技術確立している。

現在、ALS の進行・予後に関連する遺伝子多型を見出しつつある段階であり、これから図 10 の戦略を強力に推進することにより、悲願である ALS の病態抑止治療開発が実現できる可能性が開かれると考えられる。

ALS 患者の進行・予後を左右する遺伝子多型の同定は、治験デザインにも寄与しうる。ALS 患者に対する治験では治療効果評価のために ALSFRS-R の変化値を用いることが多い。しかしながら図 2 で示したように ALS 患者の重症度変化は極めて多彩である。従って病態抑止治

療の効果を治験で検出するためには、あらかじめ同じような進行が予想される群を定め、適切に割付けるなど、デザインが重要である。進行を規定する因子は割付け因子に用いるなど、治験デザインの改善に有用である可能性がある。

図 10. ALS 患者不死化リンパ球から iPS 細胞作製、神経細胞誘導と創薬



E. 結論

- ・ 900 例規模の ALS 患者前向きコホートの構築に成功しており、合わせてゲノム遺伝子、不死化リンパ球の蓄積がなされている。これらは世界的にも有数の研究リソースである。
- ・ ALS 患者の進行を左右する遺伝子多型および生存期間を左右する遺伝子多型を見出しており、これらを手がかりに ALS 病態抑止治療開発に向けた戦略を推進できる。

< JaCALS 参加施設 >

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	
東京都立神経病院	川田明広	中野今治
静岡てんかん神経医療センター	小尾智一	
東名古屋病院	饗場郁子	
名古屋大学	祖父江元	
ビハール花の里病院	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 藤田行雄 池田佳生
 静岡富士病院 溝口功一
 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 能登祐一 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 石浦浩之 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 中村美恵
 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
 千葉大学 澁谷和幹 桑原聡
 九州大学 林信太郎 吉良潤一
 東京医科大学 相澤仁志

F.健康危険情報

特記なし。

G.研究発表

1.論文発表

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

Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, Tatsumi S, Mimuro M, Iwasaki Y, Katsuno M, Iguchi Y, Masuda M, Senda J, Ishigaki S, Udagawa T, Sobue G. Lower motor neurons are commonly involved in TDP-43-related

frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurology*. 2014;71:172-9.

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba I, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84: 1365-71.

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*. 2013;93:900-5.

Iguchi Y, Katsuno M, Ikenaka K, Ishigaki S, Sobue G. Amyotrophic lateral sclerosis: an update on recent genetic insights. *J Neurol*. 2013;260:2917-27.

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, 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;136:1371-82.

Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system

atrophy. *N Engl J Med*. 2013;369: 233-44.

Takagi S, Iguchi Y, Katsuno M, Ishigaki S, Ikenaka K, Fujioka Y, Honda D, Niwa J, Tanaka F, Watanabe H, Adachi H, Sobue G. RNP2 of RNA recognition motif 1 plays a central role in the aberrant modification of TDP-43. *PLoS One*. 2013;8:e66966.

Honda D, Ishigaki S, Iguchi Y, Fujioka Y, Udagawa T, Masuda A, Ohno K, Katsuno M, Sobue G. The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons. *FEBS Open Bio*. 2013;4:1-10.

Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. *Sci Rep*. 2013;3:2388.

Doi H, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Qiang Q, Tanaka F, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Sobue G. p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar muscular atrophy mouse model. *J Neurosci*. 2013;33:7710-27.

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.

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.

2.学会発表

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H et al. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. 24th International Symposium on ALS/MND, December, 2013, Milan, Italy

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許出願 ALS 疾患関連遺伝子配列解析用の補足 PCR プライマーセット、ALS 疾患関連遺伝子配列の解析方法、及び ALS 疾患の検査方法 特願 2013-234055

2.実用新案登録 特記なし。

Ⅱ. 分担研究報告

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

研究協力者 曾根 淳、中村亮一
名古屋大学医学部附属病院 神経内科

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、5～10%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。次世代シーケンサーを用いた既知の ALS 原因遺伝子スクリーニングシステムの構築を行った。

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%程度に家族歴がある。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。

ALS 患者大規模疾患コホート JaCALS を用いたこれまでの解析にて、日本人の孤発性 ALS の 1.6%で SOD1 遺伝子変異が認められること（Neurol Res Int. 2011;2011:165415.）や、C9ORF72 遺伝子変異が 0.4%で認められる（Neurobiology of Aging. 2012;33 2527.e11-2527.e16）ことが示されている。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。家族性 ALS に関連する遺伝子が孤発例にどのように関わっているのか検証する必要がある。

B.研究方法

SOD1、TDP-43、FUS などを含む 28 の既知の ALS 関連遺伝子について、検証システム構



築のために、Ion AmpliSeq™ Custom Panel を用いてプライマーペアのセットを作成した。これを用いて multiplex PCR を行い、アダプターのライゲーションを行い、ライブラリを作成した。作成したライブラリは Ion One Touch™ システムを用いてエマルジョン PCR を行い、テンプレートを精製した。精製したテンプレートを Ion PGM™ シークエンサーを用いて配列解析を行った。

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

JaCALS に登録された孤発性 ALS 症例のうち、自治医科大学における HRM 法で、既知の遺伝子異常スクリーニングで既知の家族性 ALS 原因遺伝子変異を認めなかった例のうち、213 例の解析を実施した。

28 遺伝子エクソン領域の網羅的シーケンスにて、アミノ酸変化を伴う variant は大部分の例で存在し、1 例あたり平均 10.2 個認められた。これらのうち、米国 the National Center for Biotechnology Information (NCBI) が提供する遺伝子多型データベース dbSNP および、我が国の大規模遺伝子多型データベースである Human Genetic Variation Database (HGVD) のいずれにも登録の無い variant を認めた例は 36 例 (16.9%) あった。

D. 考察

臨床的に孤発性 ALS と判断される例で、家

族性 ALS 原因遺伝子の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。一部の例は浸透率の低さなどの理由により、孤発性に見えている可能性もある。十分大きな家系調査により segregation study ができない遺伝子 variant についても、発症への寄与がある可能性がある。iPS 細胞モデル、動物モデル、遺伝子発現解析などによる検証が求められる。

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

Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, Tatsumi S, Mimuro M, Iwasaki Y, Katsuno M, Iguchi Y, Masuda M, Senda J, Ishigaki S, Udagawa T, Sobue G. Lower motor neurons are commonly involved in TDP-43-related frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurology*. 2014;71:172-9.

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba I, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84: 1365-71.

Iguchi Y, Katsuno M, Ikenaka K, Ishigaki S, Sobue G. Amyotrophic lateral sclerosis: an update on recent genetic insights. *J Neurol*. 2013;260:2917-27.

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, 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;136:1371-82.

Takagi S, Iguchi Y, Katsuno M, Ishigaki S, Ikenaka K, Fujioka Y, Honda D, Niwa J, Tanaka F, Watanabe H, Adachi H, Sobue G. RNP2 of RNA recognition motif 1 plays a central role in the aberrant modification of TDP-43. *PLoS One*. 2013;8:e66966.

Honda D, Ishigaki S, Iguchi Y, Fujioka Y, Udagawa T, Masuda A, Ohno K, Katsuno M, Sobue G. The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons. *FEBS Open Bio*. 2013;4:1-10.

Fujioka Y, Ishigaki S, Masuda A, Iguchi Y, Udagawa T, Watanabe H, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. *Sci Rep*. 2013;3:2388.

Doi H, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Qiang Q, Tanaka F, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Sobue G. p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar

muscular atrophy mouse model. *J Neurosci*. 2013;33:7710-27.

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/dynaactin 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.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1.特許出願 ALS 疾患関連遺伝子配列解析用の補足 PCR プライマーセット、ALS 疾患関連遺伝子配列の解析方法、及び ALS 疾患の検査方法 特願 2013-234055
- 2.実用新案登録 特記なし。

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

名古屋大学脳とこころの研究センター 特任教授

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 30 施設が参加し、既に孤発性 ALS 患者 905 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。この研究リソースを用いて、ALS の進行、予後に関連する臨床的因子、遺伝子多型の解析が行われ、新規の家族性 ALS 原因遺伝子の孤発例における検証や、他の神経変性疾患関連遺伝子の検証が行われるなど、多彩な活用がなされている。

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。

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 30 施設で患者登録システムの構築を行い、症例登録を進めた。2014 年 1 月末の時点で、ALS 患者 905 例の登録ができており、前向き臨床像の調査を行った。また、合わせてゲノム DNA、B-cell line の保存がなされている。正常対照は 277 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
東京都立神経病院 川田明広 中野今治
静岡てんかん神経医療センター 小尾智一
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 藤田行雄 池田佳生
静岡富士病院 溝口功一
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 能登祐一 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 石浦浩之 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 中村美恵
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
千葉大学 澁谷和幹 桑原聡
九州大学 林信太郎 吉良潤一
東京医科大学 相澤仁志

登録した ALS 患者について、現在のところ 90%以上で予後の観察ができています。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。

JaCALS において蓄積されたゲノム遺伝子等のリソースを用いて、本研究期間内に ALS および他の神経変性疾患の様々な関連遺伝子

について解析が行われた。新規家族性 ALS 原因遺伝子 ERBB4 変異の検証 (*Am J Hum Genet* 2013)、多系統萎縮症関連遺伝子の検証 (*N Engl J Med* 2013)、Idiopathic basal ganglia calcification 原因遺伝子検証 (*Neurology* 2014)、TFG 遺伝子変異のスクリーニング (in preparation) の実績がある。

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。

また、大規模に蓄積された患者遺伝子リソースは、新規に見いだされた疾患関連遺伝子変異の検証など多彩な研究に貢献できる。

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

Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, Tatsumi S, Mimuro M, Iwasaki Y, Katsuno M, Iguchi Y, Masuda M, Senda J, Ishigaki S, Udagawa T, Sobue G. Lower motor neurons are commonly involved in TDP-43-related frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurology*. 2014;71:172-9.

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba I, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84: 1365-71.

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, 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;136:1371-82.

Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system

atrophy. *N Engl J Med*. 2013;369: 233-44.

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。