

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）
平成 25 年度（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

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

研究分担者 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

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病勢進行の程度を評価する指標として ALS Functional Rating Scale-revised（ALSFRS-R）が頻用されている。ALS は不可逆的進行性の疾患であるため、ALSFRS-R は時間経過に伴い単調減少していくことになるが、その類型の数や種類については明らかになっていない。そこで、平成 25 年度は、ALSFRS-R の経時変化の類型化と類型規定 SNP 又はエクソンの同定を実施した。その結果、ALSFRS-R の経時変化を 4 つの類型（緩徐型、シグモイド型、単調減少型、急降下型）に分類し、病勢進行が速い急降下型と関連する SNP を 7 つ同定した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病勢進行を評価する指標として ALS Functional Rating Scale-revised（ALSFRS-R）が頻用されている。ALSFRS-R は、言語・嚥下・構音・動作・歩行等の機能を定量化した病勢進行に関する総合的指標であり、最も病勢が進行した状態は 0 点（最小値）、いずれの機能にも症状がない状態であれば 48 点（最大値）となる。ALS は進行性の不可逆的疾患であるため、ALSFRS-R は時間経過に伴い単調減少することになるが、これまでの臨床経験から ALSFRS-R の経時変化（病勢進行の様相）には複数の類型が存在していることが示唆されていた。例えば、ALS の発症から数年が経過しても、ALSFRS-R を 40 点以上維持している症例や数年で 10 点以下になる症例などが確認されている。ALSFRS-R の経時変化を類型化することは、患者集団を病勢進行の様相が異なるサブタイプに分類することを意味し、将来の臨床試験や治療戦略の決定に有用である。本研究では、この複数の類型を統計学的に検出し、さらにその類型を規定している SNP を同定した。

B. 研究方法

本研究で用いる前向きコホートは、Japanese

Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research（JaCALS）と呼ばれ、2006 年 2 月に症例登録が開始された。現在、全国 30 施設において登録体制が整えられており、運営事務局は名古屋大学に設置されている。臨床調査票および血液検体は、すべて各研究参加施設内において連結可能匿名化をおこなったうえで、血液検体は DNA 抽出と細胞株化をおこない、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されている ALS であると本人に診断告知された症例を対象とし、改訂版 El Escorial 診断基準への適合度は臨床調査票にて確認できるようにしている。すべての登録患者から文書でのインフォームドコンセントを取得している。また、すべての参加施設で倫理委員会の承認を得ている。

2014 年 1 月末時点で、JaCALS には 905 例の症例が登録されている。本研究における解析では、当該集団から、家族歴のある症例、遺伝子異常が認められている症例、El Escorial 診断基準が suspected の症例、登録時点で人工呼吸器を導入している症例、データ欠測等により解析に不適合と判断された症例等を除外した上で実施した。また、ALSFRS-R は、3 カ月に一度、臨床研究コーディネーター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り

収集される。つまり、ALSFRS-Rは、登録時から3か月ごとに収集されている計量値の経時観察データとなる。ただし、ALSが発症してからJaCALSに登録されるまでの数か月間は、ALSFRS-Rが不明であり、データ解析上は欠測となる。

研究目的2は、ALSFRS-Rの経時変化を類型化し、類型を規定しているSNPを同定することである。類型化に用いる統計モデルは、様々な類型を検出できるように4パラメータロジスティックモデルに基づく非線形混合分布モデルを用いた。類型の数については、統計的指標だけでなく、臨床的洞察も交えて決定した。類型とSNP又はエクソンの関連については、SNP又はエクソンごとに単変量ロジスティック回帰分析を用いてオッズ比に対するp値を推定し、高度に有意なSNP又はエクソンを探索した。また、SNP imputation を実施し、同定されたSNP又はエクソンについて更なる検討を実施した。なお、類型化の解析対象集団は465例であり、SNP又はエクソンとの関連解析は、これらが測定された459例を対象に実施した。

C. 研究結果

4パラメータロジスティックモデルに基づく非線形混合分布モデルを適用し、ALSFRS-Rの経時変化を以下の4つの類型に分類した。

緩徐型：時間経過に伴う減少の程度が緩やかである類型

シグモイド型：発症から1.5年程度までは殆ど減少しないものの、その後は単調減少していく類型

単調減少型：発症から一定の割合で減少していく類型

急降下型：発症から2年以内にスコアが急激に減少する類型

それぞれの混合割合（推定患者割合）は、緩徐型65%、シグモイド型16%、単調減少型15%、急降下4%と推定された。次に、この4つの類型が混合している混合分布モデルを用いて、各症例がそれぞれの類型に帰属するのか、その確率を計算した（それ

ぞれの類型に帰属する確率を合計すると1になる。）本解析では、帰属確率が最も高かった類型に帰属させることとした。その結果、緩徐型48%（221例）、シグモイド型15%（72例）、単調減少型24%（113例）、急降下13%（59例）となった。

次に、類型を規定しているSNP又はエクソンの同定を試みた。統計学的には、4つの類型のそれぞれを規定しているSNP又はエクソンを探索することは困難であるため、本研究では、緩徐型と急降下型を規定しているSNP又はエクソンをそれぞれ同定した。つまり、前者は、緩徐型と残り3類型のアレル頻度比較で有意になったSNP又はエクソン、後者は、急降下型と残り3類型のアレル頻度の比較で有意になったSNP又はエクソンを同定することになる。具体的には、約70万SNPと約25万エクソンを対象にアレル頻度の分布を dominant model, recessive model, additive model を用いてそれぞれ評価し、p値を算出した。その結果、いずれのモデルにおいても緩徐型を規定する高度に有意なSNP又はエクソンは同定されなかった。しかしながら、急降下型を規定するSNPは recessive model において7つ同定された ($p = 2.7 \times 10^{-8} \sim 6.4 \times 10^{-8}$)。

D. 考察

ALSFRS-Rの経時変化の類型化は世界的にも初の試みであり、類型に数やタイプに関する事前情報もないため、本研究で用いた非線形混合分布モデルはヒューリスティックなアプローチであると言える。しかしながら、検出された4つの類型は臨床的にも合理性が高かった。今後は、類型の再現性を別コホートで検証することが望まれる。また、急降下型を規定しているSNPを同定することができ、現在は、更なる検討を進めている。

E. 結論

本研究では、ALSFRS-Rの経時変化を4つの類型（緩徐型、シグモイド型、単調減少型、急降下型）に分類し、病勢進行が速い急降下型と関連するSNPを7つ同定した。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1. Tanabe Y, Hashimoto K, Shimizu C, **Hirakawa A**, Harano K, Yunokawa M, Yonemori K, Katsumata N, Tamura K, Ando M, Kinoshita T, Fujiwara Y. Paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 2013; 18: 132-138.
2. Sato Y, Kawataki M, **Hirakawa A**, Kato T, Itani T, Hayakawa M. The diameter of the inferior vena cava provides a noninvasive way of calculating central venous pressure in neonates. *Acta Paediatrica*, 2013; e241-246.
3. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, **Hirakawa A**, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death & Disease*, 2013; e525.
4. **Hirakawa A**, Hamada C, Matsui S. A dose-finding approach based on shrunken predictive probability for combinations of two agents in phase I trials. *Statistics in Medicine* 2013; 32: 4515-4525.
5. Hirano K, Ohgomori T, Kobayashi K, Tanaka F, Matsumoto T, Natori T, Matsuyama Y, Uchimura K, Sakamoto K, Takeuchi H, **Hirakawa A**, Suzumura A, Sobue G, Ishiguro N, Imagama S, Kadomatsu K. Ablation of Keratan Sulfate Accelerates Early Phase Pathogenesis of ALS. *PLoS One*, 2013; e66969.
6. Asano J, **Hirakawa A**, Hamada C. A stepwise variable selection for a Cox proportional hazards cure model with Application to Breast Cancer Data. *Japanese Journal of Biometrics*, 2013; 34: 21-34.
7. 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. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 2013; 84: 1365-1371.
8. Ozeki N, Fukui T, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Ito S, Sakao Y, Mitsudomi T, **Hirakawa A**, Yokoi K. Significance of the serum carcinoembryonic antigen level during the follow-up of patients with completely resected non-small cell lung cancer. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Epub ahead of print] doi: 10.1093 .
9. Goto M, Yamamoto T, Kato M, Majima T, Toriyama K, kamei Y, Matsukawa Y, **Hirakawa A**, Funahashi Y. Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 11 patients. *International Journal of Urology*, doi: 10.1111/iju.12266.
10. Nakamura S, Fukui T, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Ishiguro F, **Hirakawa A**, Yokoi K. Prognostic impact of tumor size eliminating the ground glass opacity component: modified clinical T descriptors of the TNM classification of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2013; 12: 1551-1557.
11. Asano J, **Hirakawa A**, Hamada C, Yonemori K, Hirata T, Shimizu C, Tamura K, Fujiwara Y. Use of Cox's cure model to establish clinical determinants of long-term disease-free survival in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Breast Cancer*, 2013; 3545-3579.
12. Arima H, Wakabayashi T, Nagatani T, Fujii M, **Hirakawa A**, Murase T, Yambe Y, Yamada T, Yamakawa F, Yamamori I, Yamaguchi M, Oiso Y. Adipsia increases risk of death in patients with

central diabetes insipidus. Endocrine Journal, Epub
ahead of print] doi 10.1507 .

13.

2.学会発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況（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