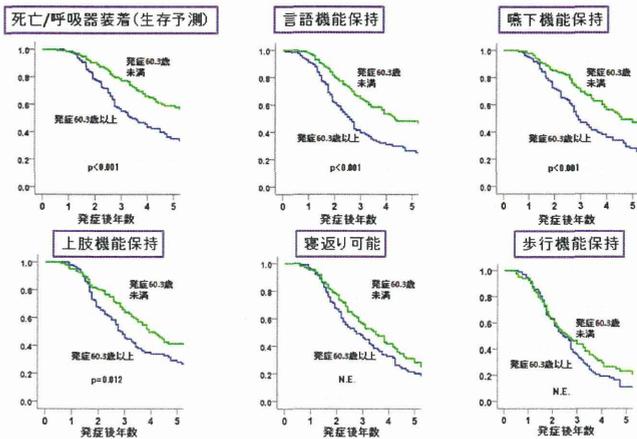


発症年齢による予後予測



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。

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 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.

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.

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)** に蓄積された前向き臨床情報を用いて、ALS の進行や予後を予測する臨床的因子の探索、同定を行った。2006 年 2 月から 2011 年 6 月までに登録された 520 人の ALS 患者のうち、孤発性で改訂版 **El Escorial** 診断基準で **clinically probable laboratory-supported ALS** 以上を満たす 401 人を解析対象とした。その結果、ALS 患者における頸部屈筋の筋力は、生存期間及び発語不能、嚥下不能、上肢機能廃絶、寝返り不能までの期間といった機能予後を予測するための、独立した有用な指標の一つであることが示された。診療、介護体制整備のための状態予測や、臨床試験におけるデザイン策定に寄与できる。

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。2006 年 2 月から症例登録を開始し、徐々に参加施設を拡大した。現在は全国 30 施設が参加し、2014 年 1 月末現在で 905 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。

個別の ALS 患者の臨床経過は多彩であり、数か月の経過で死亡する患者から 10 年以上生存する患者も存在する。また、生存期間だけでなく、球症状、上肢機能、歩行機能など日常生活活動度（**activities of daily living: ADL**）に関わる機能が廃絶されるまでの期間も多彩である。経管栄養、非侵襲的陽圧換気療法、人工呼吸器導入などといった適切な医療、福祉、介護

の対応をとるためには、嚥下障害や呼吸機能障害などの出現を個別に予測する必要がある。また、臨床試験にあたっては、進行抑制効果を適切にとらえるデザインを構築するために、生存期間や運動機能が廃絶されるまでの期間を予測する因子を把握することが重要である。既報告では、生存期間に関する予後不良因子として、高齢発症、球症状で発症、診断時の呼吸機能低値、発症後短期間で診断、診断時の機能スコア低値などが示されているが、ADL の低下を予測する因子に関しては十分に検討されていない。また、筋力低下出現部位と予後との関連に関してもこれまで十分に検討されていない。

JaCALS の前向き臨床情報を用いて、筋力低下出現部位と生存期間および球症状、上肢機能、歩行機能などそれぞれの運動機能が廃絶されるまでの期間との関連を解析した。

B.研究方法

2006 年 2 月から 2011 年 6 月までに登録された 520 人の ALS 患者のうち、孤発性で改訂版

El Escorial 診断基準で clinically probable laboratory-supported ALS 以上を満たす 401 人を解析対象とした。JaCALS 登録後 3 ヶ月おきに臨床研究コーディネーターによる電話調査または医師による診察を行い、ALSFRS-R および換気補助などの導入の有無、導入時期について調査した。プライマリーエンドポイントを死亡または気管切開を伴う人工呼吸器導入、ADL の指標として発語不能、嚥下不能、上肢機能廃絶、寝返り不能、独立歩行不能になった時期と定義し、前向きにその時期を特定した。登録時に頸部前屈筋、両側の肩関節外転、手関節背屈、股関節屈曲、足関節背屈の 9 か所の筋力を徒手筋力検査で 6 段階の MRC スコアを用いて評価した。頸部前屈筋の筋力は臥位で評価した。解析方法は最初に Cox 比例ハザードモデルを用いて登録時の筋力とエンドポイントおよび各 ADL 指標への到達時期との関連を解析した。さらに有意であった部位の筋力について、%VC、罹病期間、ALSFRS-R、年齢など既知の予後予測因子とともに Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行い、独立した予後予測因子であるか検討した。

倫理面への配慮

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。

C. 研究結果

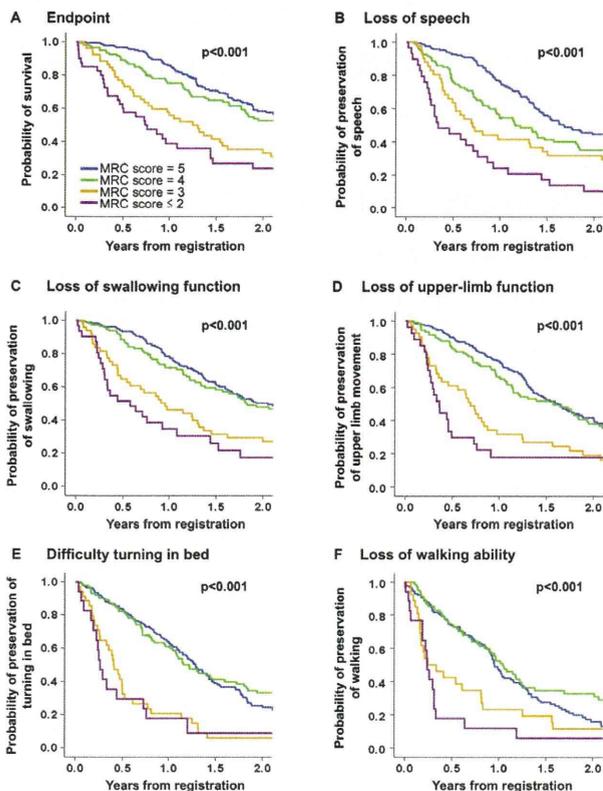
患者背景は男性 244 人、女性 157 人で、平均

発症年齢は 62.2 歳、平均観察期間は 2.1 年であった。初発病変別の頻度は、上肢 47.4% (190 人)、下肢 31.4% (126 人)、構音障害 22.9% (92 人)、嚥下障害 5.5% (22 人)、頸部筋力低下 2.0% (8 人) であった。

頸部前屈筋の筋力低下は登録時からプライマリーエンドポイント (HR0.74, $p<0.001$)、発語不能 (HR0.66, $p<0.001$)、嚥下不能 (HR0.73, $p<0.001$) までの期間を最も短くする因子であった。上肢機能廃絶 (HR0.77, $p=0.001$)、寝返り不能 (HR0.77, $p=0.002$)、独立歩行不能 (HR0.80, $p=0.008$) までの期間に関しても頸部前屈筋の筋力低下は有意な因子のひとつであった。さらに頸部前屈の筋力低下は年齢、性別、罹病期間、%VC、ALSFRS-R、El Escorial 診断基準、リルゾール内服の有無、球症状の有無などといった既知の予後予測因子を共変量として Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を施行してもプライマリーエンドポイント (HR0.72, $p<0.001$) および発語不能 (HR0.78, $p=0.001$)、嚥下不能 (HR0.80, $p=0.003$)、上肢機能廃絶 (HR0.76, $p<0.001$)、寝返り不能 (HR0.83, $p=0.027$) に関して独立した予後予測因子であった。

患者を頸部前屈筋の MRC スコアで 4 群 (5、4、3、2 以下) にわけ、Kaplan-Meier 法を用いてプライマリーエンドポイントおよび各 ADL 指標に対する生存曲線を作成し log-rank test を用いて検定した。すべてのエンドポイントにおいて $p<0.001$ と有意であった。(図 1)

図 1



D. 考察

頸部前屈筋群は、主には第 2~4 頸髄によって支配される。一方で、呼吸筋は主に第 3~5 頸髄支配である横隔膜と第 1 から第 12 胸髄支配である内側肋間筋、外側肋間筋からなる。このように頸部前屈筋と呼吸筋は脊髄運動ニューロンの支配髄節が一部共通している。さらに ALS 患者において胸鎖乳突筋と横隔膜の複合活動電位が相関しているという報告があり、頸部前屈筋と横隔膜の筋力低下は関連があることを示唆している。ALS 患者の主な死因は呼吸不全であることから、頸部前屈筋の筋力低下と生存期間が関連することは妥当であると考えられる。

発語不能、嚥下不能といった球症状は延髄に存在する舌咽神経、迷走神経、副神経、舌下神経の運動ニューロンの機能不全により起きる。また、上肢の筋力は主に第 5 頸髄から第 1 胸髄の運動ニューロン支配を受ける。これらは頸部前屈筋群の支配髄節に隣接しており、障害の波及が起こりやすいと想定される。寝返りに関しては上肢機能、頸部筋力をはじめとする体幹の

筋力など様々な筋力を必要とする。寝返り不能は頸髄から腰髄支配の様々な筋力低下を反映するため、頸部筋力低下とも関連すると思われる。

E. 結論

ALS 患者における頸部屈筋の筋力は、生存期間及び発語不能、嚥下不能、上肢機能廃絶、寝返り不能といった機能予後を予測するための独立した有用な指標の一つであり、診療現場の判断や臨床試験のデザイン作成に寄与することができる。

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.

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.

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.

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.

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

ALS 病勢進行プロファイルとゲノム情報との関連に関する統計的分析

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、減少に影響する因子やその類型については十分に研究されていない。そこで、本研究では、①ALSFRS-R の減少に影響する因子の探索、②ALSFRS-R の経時変化の類型化と類型関連 SNP の同定、③死亡又は人工換気までの期間に影響する SNP の同定と検証をそれぞれ実施した。その結果、ALSFRS-R の減少に影響するいくつかの因子を同定した。また、ALSFRS-R の経時変化を 4 つの類型に分類し、病勢進行が速い類型と関連する SNP を 7 つ同定した。さらに、死亡又は人工換気までの期間に影響する 2SNP を 2 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、その減少に影響している因子については十分に研究されていない。このような背景を踏まえ、本研究では、まず ALSFRS-R の経時変化に影響している予後因子の探索を実施した（目的 1）。なお、死亡又は気管切開をともなう人工換気が施行された症例においては、その後の ALSFRS-R が測定できないため、通常の変量解析では適切に予後因子を探索できない。本研究では、死亡又は人工換気までの期間を調整した上で、ALSFRS-R の経時変化を評価できる Joint Modeling Approach（JMA）を用いて解析を行った。

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（目的 2）。

最後に、本前向きコホートでは、死亡又は気管切開をともなう人工換気までの期間を主要評価項目としている。本研究では、死亡又は人工換気までの期間に影響している SNP の同定と検証も併せて実施した（目的 3）。

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。

【目的1】

研究目的1は、ALSFRS-Rの経時変化に影響している予後因子をJMAを用いて探索することである。JMAは、ALSFRS-Rの経時変化に影響する因子を評価する線形混合モデルと死亡又は人工換気までの期間に影響する因子を評価するCoxモデルを併せた統計解析手法であり、それぞれのモデルに探索したい因子を取り込むことができる。これにより、ALSFRS-Rの経時変化に影響する因子と死亡又は人工換気までの期間に影響する因子を同時に評価できる。本研究では、線形混合モデルに、以下の11因子を含めた。

1. 年齢 (65歳未満 vs 65歳以上)
2. 性別 (女性 vs 男性)
3. リルゾールの使用 (あり vs なし),

4. 発症からの月数
5. 初期症状としての上肢筋力低下 (なし vs あり)
6. 初期症状としての下肢筋力低下 (なし vs あり)
7. 初期症状としての構音又は嚥下障害 (なし vs あり),
8. 初期症状としての頸部筋力低下 (なし vs あり)
9. 登録時筋力の左右優位性 (右スコア-左スコア)
10. 登録時筋力の上肢遠位優位性 (遠位スコア-近位スコア)
11. 登録時筋力の下肢遠位優位性 (遠位スコア-近位スコア)

他方で、Coxモデルには当該11因子から時間を除き、代わりにALSFRS-Rを入れた11因子を含めることとした。なお、本解析は、JaCALSに登録された451例を対象に実施した。

【目的2】

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。

【目的3】

研究目的3は、死亡又は気管切開をとまう人

工換気までの期間に影響しているSNP又はエクソンを同定することである。JaCALSに登録され、SNPが測定された522例のデータ（以下、GWASデータという）を用いることとした。SNP又はエクソンごとに単変量Cox回帰分析を用いてハザード比に対する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、同定したSNP又はエクソンについて更なる検討を実施した。

さらに、本解析にはおいては、292例のValidationデータを用いて、GWASデータで同定されたSNP又はエクソンの再現性を確認した。また、GWASデータとValidationデータの解析結果をメタ解析し、SNP又はエクソンの有意性をより精度高く評価した。

C. 研究結果

【目的1の結果】

JMAによる解析の結果、各因子のALSFRRへの影響の程度とその有意性は、下表のとおりであった。65歳以上、男性、上肢筋力低下あり、下肢筋力低下あり、構音又は嚥下障害ありの症例においては、それぞれ相対するカテゴリーに属する症例と比べて、時間経過をとおして平均的にALSFRRが有意に低いことが示された。

表：ALSFRRの経時変化への影響

因子	ALSFRRの差 (95% CI)	P値
年齢: 65歳以上	-3.0 (-4.6, -1.3)	0.001
男性	1.8 (0.3, 3.4)	0.019
リルゾール: なし	-1.1 (-2.6, 0.5)	0.181
時間	-0.9 (-0.9, -0.9)	<0.0001
上肢筋力低下: あり	-4.0 (-7.1, -1.0)	0.010
下肢筋力低下: あり	-4.0 (-7.0, -1.0)	0.008
構音又は嚥下障害: あり	-4.4 (-7.5, -1.3)	0.005
頸部筋力低下: あり	-2.0 (-7.8, 3.9)	0.504
左右優位性: 右1点上昇	0.2 (-0.1, 0.5)	0.236
上肢遠位優位性: 遠位1点上昇	-0.1 (-0.6, 0.3)	0.635
下肢遠位優位性: 遠位1点上昇	0.4 (-0.1, 0.9)	0.139

次に、各因子の生存又は人工換気までの期間への影響の程度とその有意性は、下表のとおりであった。65歳以上、リルゾールなし、頸部筋力低下あり、上肢遠位優位性、ALSFRRが、それぞれ相対するカテゴリーに属する症例と比べて、死亡又は人工換気のリスクを高めていることが示された。

表：死亡又は人工換気までの期間への影響

因子	ハザード比 (95% CI)	P値
年齢: 65歳以上	2.0 (1.5, 2.8)	<0.0001
男性	0.9 (0.7, 1.2)	0.574
リルゾール: なし	1.4 (1.0, 1.9)	0.030
上肢筋力低下: あり	1.2 (0.7, 2.1)	0.471
下肢筋力低下: あり	0.9 (0.6, 1.6)	0.829
構音又は嚥下障害: あり	1.1 (0.6, 2.0)	0.683
頸部筋力低下: あり	2.3 (1.2, 4.8)	0.018
左右優位性: 右1点上昇	1.0 (0.9, 1.1)	0.771
上肢遠位優位性: 遠位1点上昇	1.1 (1.0, 1.2)	0.010
下肢遠位優位性: 遠位1点上昇	1.1 (1.0, 1.2)	0.244
ALSFRR: 1点減少	1.1 (1.1, 1.1)	<0.0001

【目的2の結果】

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、ALSFRRの経時変化を以下の4つの類型に分類した。

- ① 緩徐型：時間経過に伴う減少の程度が緩やかである類型
- ② 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
- ③ 単調減少型：発症から一定の割合で減少していく類型
- ④ 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、各症例がそれぞれど

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 ($p = 2.7 \times 10^{-8} \sim 6.4 \times 10^{-8}$)。

【目的 3 の結果】

死亡又は人工換気までの期間に影響する SNP 又はエクソンを同定するために、約 70 万 SNP と約 25 万エクソンについて、当該期間とアレル頻度の関連を **dominant model**, **recessive model**, **additive model** を用いてそれぞれ評価した。その結果、GWAS データに対する **additive model** において、2 つの SNP が同定された (SNP A, ハザード比 = 1.7, $P = 1.4 \times 10^{-5}$; SNP B, ハザード比 = 3.3, $P = 6.2 \times 10^{-8}$)。当該 SNP の優位性を **Validation** データで確認したところ、SNP A と SNP B のハザード比と p 値はそれぞれ、ハザード比 = 2.2, $P = 3.1 \times 10^{-3}$, ハザード比 = 2.4, $P = 9.6 \times 10^{-3}$ であった。さらに、これらの結果をメタ解析したところ、SNP A と SNP B の統合ハザード比と統合 p 値はそれぞれ、ハザード

ド比 = 1.8, $P = 2.9 \times 10^{-8}$, ハザード比 = 3.0, $P = 2.6 \times 10^{-9}$ であり、高度に有意であった。

D. 考察

目的 1 について、ALSFRS-R の経時変化と死亡又は人工換気までの期間に共通に影響していた因子は、年齢のみであった。残りの有意な因子は、それぞれ ALSFRS-R の経時変化と死亡又は人工換気までの期間のいずれか一方に独立に影響していることが示された。

目的 2 について、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。

目的 3 について、本解析については GWAS データと **Validation** データを用意できたため、GWAS データで同定された SNP の再現性を **Validation** データで確認することができた。また、両解析結果をメタ解析することもでき、頑健性の高い結果が得られたと言える。現在は、死亡又は人工換気までの期間のデータを追跡調査し、より精度を高めた解析を実施中である。

E. 結論

本研究では、①ALSFRS-R に影響する予後因子探索、②その経時変化の類型化と類型規定 SNP 又はエクソンの同定、③生存又は人工換気までの期間に影響する SNP 又はエクソンの同定と検証をそれぞれ実施した。いずれの解析においても、頻用されている一般的な統計手法ではなく、ALSFRS-R の特性を考慮した統計手法を適用していることから、本解析で得られた結果の妥当性は高いと言える。ただし、(疾患の特性上やむを得ないものの) ALSFRS-R を発症時から測定できないことが統計解析上は問題

となる。今後は、このような欠測データを考慮した統計手法を用いて、より精度高く ALSFRS-R の経時変化を評価していく必要がある。他方で、可能な範囲で、JaCALS 登録時に ALSFRS-R の回顧調査を実施する、又は登録時のアンケート調査から発症から登録までの ALSFRS-R の経時変化を推察するなど、当該欠測問題をデータ収集・研究デザインの観点から解決していくことも重要である。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1. Kojima Y, Hashimoto K, Ando M, **Hirakawa A**, Yonemori K, Kodaira M, Yunokawa M, Shimizu C, Tamura K, Katsumata N, Hosono A, Makimoto A, Fujiwara Y. Clinical outcomes of adult and childhood rhabdomyosarcoma treated with vincristine, d-actinomycin, and cyclophosphamide chemotherapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2012; 138: 1249-1257.
2. Azuma Y, Hata K, Sai K, Udagawa R, **Hirakawa A**, Tohkin M, Ryushima Y, Makino Y, Yokote N, Fujiwara Y, Saito Y, Yamamoto H. Significant association between hand-foot syndrome and efficacy of capecitabine in patients with metastatic breast cancer. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2012; 35: 717-724.
3. Yonemori K, **Hirakawa A**, Ryushima Y, Saito M, Yamamoto H, Hirata T, Ando M, Kodaira M, Yunokawa M, Shimizu C, Tamura K, Yamamoto H, Fujiwara. An analysis of guidance for proper usage documents for oncology drugs in Japan. *Pharmaceutical Medicine*, 2012; 26: 165-170.
4. Yonemori K, **Hirakawa A**, Ando M, Hirata T, Yunokawa M, Shimizu C, Katsumata N, Tamura K, Yasuhiro F. Content analysis of oncology-related pharmaceutical advertising in a peer-reviewed medical journal. *PLoS One*, 2012; 7: e44393.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. **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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. 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 .
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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 .
1. **Hirakawa A**, Kaneko S, Hamada C. Gene selection using a high-dimensional Cox model in microarray data analysis. Pacific Symposium on Biocomputing, Big Island of Hawaii, January 3-7, 2012.
 2. **Hirakawa A**, Hamada C. An adaptive dose-finding approach for correlated bivariate binary and continuous outcomes in phase I oncology trials. 3rd East Asia Regional Biometric Conference, Seoul, Korea, February 2-3, 2012.
 3. Kaneko S, Yamada K, **Hirakawa A**, Hamada C. Estimating the false positive rate in a high-dimensional regression model in cancer prognostic studies with microarrays. 3rd East Asia Regional Biometric Conference, Seoul, Korea, February 2-3, 2012.
 4. Asano J, **Hirakawa A**, Hamada C. A stepwise variable selection for a cure model. 3rd East Asia Regional Biometric Conference, Seoul, Korea, February 2-3, 2012.
 5. **Hirakawa A**, Hamada C. A dose-finding approach based on shrunken predictive probability for combinations of two agents in phase I trials. XXVIth International Biometrics Conference, Kobe, Japan, August 26-31, 2012.
 6. **Hirakawa A**, Hamada C. An adaptive dose-finding approach for correlated bivariate binary and continuous outcomes in phase I oncology trials. XXVIth International Biometrics Conference, Kobe, Japan, August 26-31, 2012.
 7. Asano J, **Hirakawa A**, Hamada C. A stepwise variable selection for a Cox proportional hazards cure model. XXVIth International Biometrics Conference, Kobe, Japan, August 26-31, 2012.
 8. Asakawa T, **Hirakawa A**, Hamada C. A dose-finding method using bayesian model averaging for bivariate binary efficacy and toxicity outcomes in phase I oncology trials. XXVIth International Biometrics Conference, Kobe, Japan, August 26-31, 2012.
 9. Atsumi J, **Hirakawa A**, Hamada C. A new allocation method for balancing prognostic

2.学会発表

1. **Hirakawa A**, Kaneko S, Hamada C. Gene selection

continuous and categorical variables in clinical trials. XXVIth International Biometrics Conference, Kobe, Japan, August 26-31, 2012.

10. Mano H, **Hirakawa A**, Hamada C. Improvement of Trim and Fill method to adjust publication bias in meta-analysis using the clinical trial registration system. XXVIth International Biometrics Conference, Kobe, Japan, August 26-31, 2012.
11. Kaneko S, **Hirakawa A**, Hamada C. Gene selection using a high-dimensional Cox model in microarray data analysis. XXVIth International Biometrics Conference, Kobe, Japan, August 26-31, 2012.
12. Yamada K, **Hirakawa A**, Hamada C. Operating characteristics of the penalized Cox regression analysis in high-dimensional microarray data. XXVIth International Biometrics Conference, Kobe, Japan, August 26-31, 2012.

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

SNP アレイを活用した ALS の遺伝統計学的詳細解析

研究分担者 氏名 中柄 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

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）はその 90～95%が孤発性であるが、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。本研究では、SNP アレイデータを活用し、①ALS 発症に関わるエクソン SNP の探索、②ALS の病勢進行を評価する指標である ALS Functional Rating Scale-revised（ALSFRS-R）の経時変化に関連する SNP 及び③ALS の発症から生存又は人工換気までの期間と関連する SNP 近傍領域の連鎖不平衡解析と Imputation 法による高密度探索をそれぞれ実施した。その結果、①については、Quality control が完了した。②、③については、ALSFRS-R および生存期間のそれぞれと関連する SNP について、近傍領域の LD ブロックを同定し、更に Imputation 法によりその領域内で複数の関連 SNP を同定した。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）はその 90～95%が孤発性であり、平均 3～4 年で死に至る代表的な神経難病である。治療法開発は喫緊の課題であり、病態解明、治療法開発のためには疾患関連遺伝子、分子の同定が必須である。しかし孤発性 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。本研究は SNP アレイデータ解析により孤発性 ALS の病態関連遺伝子を同定することを目的とする。ALS の発症に関わる遺伝子を探索するために、ケース（ALS）ーコントロールの関連解析を実施する。さらに大規模前向き臨床像情報を生かして、病像・経過・予後と関連する遺伝子多型を探索同定することにより、病態解明や治療法開発の手がかりとなる遺伝子・分子の同定を行う。

B.研究方法

本研究では、Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS) と呼ばれる ALS の前向きコホートを用いる。本コホートは、2006 年 2 月に症例登録が開始され、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行ったうえで、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書面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。登録症例の内、745例に対し、SNPアレイ(Illumina HumanOmniExpressExome)が測定されており、約70万のコモンSNPと約25万のエクソンSNPのジェノタイプが決定されている。

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。また各症例では、ALSの病勢進行を評価

する指標としてALS Functional Rating Scale-revised (ALSFRS-R) が測定された。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。この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。

【目的1】

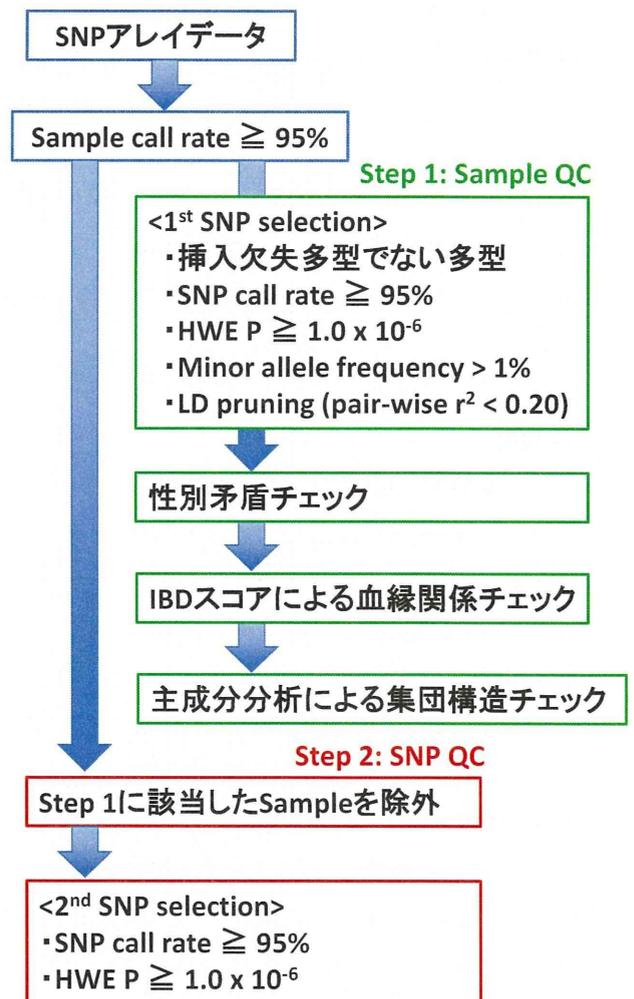
研究目的 1 は、ALS の発症に関わる遺伝子やエクソン SNP をケース (ALS) —コントロールの関連解析を用いて同定する事である。

ケース群には、JaCALS に登録され、SNP アレイが測定された 563 例を対象とした。また、コントロール群には、東京都健康長寿医療センター研究所 (Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, TMIG) の協力の元、TMIG の保有する 2,360 例を使用した。これらのサンプルは、全てエクソン SNP アレイ (Illumina HumanExome) が測定されており、約 25 万のエクソン SNP のジェノタイプが決定されている。この内、ALS が未発症であると確認された 2,082 例を以降の対象とした。本研究では、これらケース・コントロール両群の SNP アレイで共通して測定されている約 25 万種類のエクソン SNP を用いて、ALS と関連するエクソン SNP を探索する事を目的とする。

本解析では、上記 SNP アレイデータの Quality Control (QC) を実施した。本 QC は右図の通り 2 段階のステップで実施した。最初のステップ 1 では、サンプルの QC を実施した。具体的には、サンプル call rate (ジェノタイプが決定された割合) が低い者を除外した後、SNP アレイデータに基づいた、SNP の性別情報と登録時の性別情報の一致性チェック、IBD スコアによる血縁関係個体のチェック、主成分分析による集団構造のチェックを実施した。ステップ 2 では、ステップ 1 のチェックで該当したサンプルを除外して、SNP 単位の QC を実施した。具体的

には、call rate が低い SNP と Hardy Weinberg 平衡(HWE)の逸脱が疑われる SNP を除外した。ケース、コントロールで、測定している SNP アレイのプラットフォームが異なっている事から、それぞれの群で QC を行った。

ソフトウェアとして、主成分分析以外の処理を PLINK v1.07、主成分分析を EIGENSOFT version 4.2 で使用した。



図：SNP アレイデータの QC の流れ

【目的2】

研究目的 2 は、ALSFRS-R の経時変化の類型を規定しているコモン SNP やエクソン SNP を同定することである。同研究分担者である平川が、JaCALS に登録され、ALSFRS-R と SNP アレイが測定された 459 例を用いて、類型と SNP の関連をロジステ

ック回帰分析で確認した結果、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)と有意な関連を示すSNPが7つ同定された。更にこれらのSNPは同一座位に存在していた(以上、平川担当分)。本解析では、これら7つのSNP間の連鎖不平衡関係と、ハプロタイプを明らかにするため、連鎖不平衡解析とハプロタイプ解析を実施した。更に、急降下型の類型と関連するSNPをより高密度に探索するため、同定されたSNPを中心とした前後約1.5Mbpの領域に対してImputation法を実施した。Imputation法のreferenceとして、1000人ゲノムプロジェクト フェーズIIIのアジア人286名の情報を用いた。

連鎖不平衡解析とハプロタイプ解析にはHaploview 4.2を使用した。Imputationソフトウェアには、mach 1.0.18、minimac-2013.07.17を使用した。

【目的3】

研究目的3は、死亡又は気管切開をとまなう人工換気までの期間に関連しているコモンSNPやエクソンSNPを同定することである。同研究分担者である平川が、JaCALSに登録され、SNPが測定された522例のデータ(以下、GWASデータと呼ぶ)を用いてCox回帰分析を実施した結果、有意な関連を示す座位が同定された。また、本解析にはおいては、独立した292例のALS症例(以下、Validationデータと呼ぶ)でも同系列のSNPアレイが測定済みである事から、Validationデータを用いて、GWASデータで同定された座位を検証した所、Validationデータにおいても有意な関連が2座位確認された(以上平川担当分)。本解析では、これらの座位におけるSNP間の連鎖不平衡関係を明らかにするため、連鎖不平衡解析を実施した。またSNP Imputation法を実施する事で、これらの座位の中にある関連SNPをより高密度に探索した。

連鎖不平衡解析、Imputation法は【目的2】と同様の条件で実施した。

C.研究結果

目的1について、ケース群・コントロール群それぞれでQC作業を完了した。マイナーアレル頻度1%未満のエクソンSNPが15万種類以上確認された。現在は、両群のQCで残ったエクソンSNPについて、ケース・コントロール間の関連解析を進めている。

目的2について、ALSFRS-Rの急降下型を規定しているSNPについて、連鎖不平衡解析を実施した結果、7つのSNPが存在する周辺領域全体で連鎖不平衡ブロックを形成している事が確認できた。更にハプロタイプ解析の結果、観測された全ハプロタイプの内、これら7つのSNP全てがマイナーアレル(急降下型へ寄与するアレル)であるハプロタイプが約30%、全てメジャーアレル(急降下型へ寄与しないアレル)であるハプロタイプが約60%と全体の90%以上を占めている事が確認できた。また、Imputation法により推定したジェノタイプと急降下型と関連するSNPを探索した所、recessive modelで 10^{-8} オーダーのP値を持つSNPが更に37種類確認された。現在は、Imputation法のreferenceとして1000人ゲノムプロジェクトの最新データ(SHAPEITによるタイピングデータ)を使用する事で、よりImputation精度を高めた関連解析を実施中である。

目的3について、連鎖不平衡解析を実施した結果、2座位それぞれのSNPを中心としたLDブロックを特定できた。2種類のSNPアレイデータに対してImputation法により推定した結果、片方の座位において、強い連鎖不平衡にあるSNPを更に同定した。現在は、目的2と同様の方法で、よりImputation精度を高めた関連解析を実施中である。

D.考察

目的1について、エクソンSNPアレイを使用した、ALSの関連解析研究は、世界的にも初の試みである。今後、関連解析を進める事で、これまで報告されていないALS関連SNP又は遺伝子が同定されることが期待される。ケース・コントロール両群において、マイナーアレル頻度(MAF)が1%未満のエ

クソン SNP が非常に多く存在した。アミノ酸変異を伴う SNP の頻度は、他の領域の SNP と比べて低頻度である事、同様の傾向がエクソンアレイを使用した他の表現型に注目した研究でも報告されている事(Atherosclerosis 2013; 229(1): 155-160)から、本データの信頼性を裏付けている。

目的 2 について、ALSFRS-R の急降下型と関連している 7 種類の SNP について、これらが同一の連鎖不平衡ブロックに存在している事が確認された。また、これら 7 つの SNP のハプロタイプは、7 つの SNP 全てがマイナーアレル(急降下型へ寄与するアレル)であるハプロタイプと全てメジャーアレル(急降下型へ寄与しないアレル)であるハプロタイプが全ハプロタイプの 90%以上を占めていた。更に、Imputation 法により推定した SNP の関連解析を進めた所、同一 LD ブロック内で更に多くの SNP が同定された。これらの結果は、これら全ての SNP が急降下型へ寄与しているのではなく、この LD ブロック内に急降下型の原因となる SNP が少数存在していると考えられる。

目的 3 について、生存又は人工換気までの期間と関連している 2 か所の座位について、連鎖不平衡関係を明らかにできた。今後より最新の reference データを使用する事でより高精度な関係が明らかになると期待される。

E. 結論

本研究では、①ALS 発症関連エクソン SNP の探索のための Quality control(QC)、②ALSFRS-R の経時変化の中で発症から 2 年以内にスコアが急激に減少する類型と関連するコモン又はエクソン SNP 及び、③生存又は人工換気までの期間に影響するコモン SNP 又はエクソン SNP の連鎖不平衡解析と Imputation 法による高密度探索をそれぞれ実施した。いずれの解析においても、最新のゲノムワイド関連解析研究で使用されている遺伝統計学的解析手法を適用している事から、本解析で得られた結果の妥当性は高いと言える。今後、①については、関連解析を進めていく事で、有用なエクソン SNP が得

られることが期待される。②、③については、近年のゲノム研究の目覚ましい発展により、新しい情報が日々公開されている事を鑑み、最近公開された 1000 人ゲノムプロジェクトの最新データ(SHAPEITによるタイピングデータ)をreferenceとした Imputation 法の実施により、より高精度な結果が得られると期待される。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1. Wu Y*, Gao H*, Li H*, Tabara Y*, Nakatochi M*, Chiu YF*, Park EJ*, Wen W*, Adair LS, Borja JB, Cai Q, Chang YC, Chen P, Croteau-Chonka DC, Fogarty MP, Gan W, He CT, Hsiung CA, Hwu CM, Ichihara S, Igase M, Jo J, Kato N, Kawamoto R, Kuzawa CW, Lee JJ, Liu J, Lu L, McDade TW, Osawa H, Sheu WH, Teo Y, Vadlamudi S, Van Dam RM, Wang Y, Xiang YB, Yamamoto K, Ye X, Young TL, Zheng W, Zhu J, Shu XO, Shin C, Jee SH, Chuang LM, Miki T, Yokota M, Lin X, Mohlke KL, Tai ES. A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin level in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2. Human Molecular Genetics 2014; 23(4): 1108-1119. (*equal contributors)
2. Ichihara S, Yamamoto K, Asano H, Nakatochi M, Sukegawa M, Ichihara G, Izawa H, Hirashiki A, Takatsu F, Umeda H, Iwase M, Inagaki H, Hirayama H, Sone T, Nishigaki K, Minatoguchi S, Cho MC, Jang Y, Kim HS, Park JE, Tada-Oikawa S, Kitajima H, Matsubara T, Sunagawa K, Shimokawa H, Kimura A, Lee JY, Murohara T, Inoue I, Yokota M. Identification of a glutamic acid repeat polymorphism of ALMS1 as a novel genetic risk marker for early-onset

myocardial infarction by genome-wide linkage analysis. *Circulation Cardiovascular Genetics* 2013; 6(6): 569-578.

3. Lee JY, Lee BS, Shin DJ, Park KW, Shin YA, Kim KJ, Heo L, Lee JY, Kim YK, Kim YJ, Hong CB, Lee SH, Yoon D, Jung HK, Oh IY, Kim BJ, Lee J, Park SJ, Kim J, Kawk HK, Lee JE, Park HK, Lee JE, Nam HY, Park HY, Shin C, Yokota M, Asano H, **Nakatochi M**, Matsubara T, Kitajima H, Yamamoto K, Kim HL, Han BG, Cho MC, Jang Y, Kim HS, Park JE, Lee JY. A genome-wide association study of a coronary artery disease risk variant. *Journal of Human Genetics* 2013; 58(3): 120-126.
4. **Nakatochi M**, Katayama M, Kato R, Okochi M, Takase T, Yoshida Y, Kawase M, Honda H. Comprehensive combination analysis for screening of significant peptide epitopes using slide glass type-exclusive peptide array from milk protein. *Kagaku Kougaku Ronbunshu* 2013; 39(1): 40-45. Japanese.

2.学会発表

1. Wu Y, Gao H, Li H, Tabara Y, **Nakatochi M**, Chiu YF, Park EJ, Vadlamudi S, Fogarty M, Wen W, Shu XO, Shin C, Jee SH, Chuang LM, Miki T, Yokota M, Lin X, Mohlke KL, Tai ES, Asian Genetic Epidemiology Network (AGEN) Adiponectin Working Group: A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin level in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2, American Society of Human Genetics 2013, Boston, America, October 22-26, 2013.

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

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 氏名 池川 志郎
所属 理化学研究所 統合生命医科学研究センター
骨関節疾患研究チーム チームリーダー

研究要旨 本分担研究は、孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の発症に関わる易罹患性遺伝子の単離を目的とする。JaCALS (Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research) では、ALS 患者 700 症例以上の（前向き）臨床情報に結び付けられた患者ゲノム DNA が保存・管理されている。また、理化学研究所ゲノム統合生命医科学研究センターでは、これらの検体を用いてゲノム解析を実施し、本邦 ALS における遺伝的要因の解明を行っている。我々は、昨年度来、643 例の ALS 検体について SNP タイピングを行い、病態・予後との関連を解析してきた。本年度は、追加日本人 ALS 検体 340 例、対照 7,784 例についてゲノムワイド関連解析（GWAS）を行った。その結果、孤発性 ALS と有意な相関を示す 33 SNPs を同定した。その中の数種の SNP は、過去に報告された ALS 関連遺伝子の領域にマップされた。ただし、それらは、欧米人 ALS 症例の GWAS で見出された遺伝子領域とは異なるものであった。現在、以前に解析した 610K SNPs の関連解析データとのメタ解析を進めている。

A.研究目的

ALS は遺伝学的に 5~10%が家族性であり、90%以上が孤発性である。孤発性 ALS は、遺伝因子と環境因子の相互作用によって発症する多因子遺伝性疾患である。現在まで、欧米人 ALS 症例を用いた GWAS が、10 報ほど報告されているが、明らかな関連が認められる遺伝子は、*C9ORF72* だけである。ただし、東洋人における関連は殆どない。

一方、本邦では厚労省神経変性班を基に全国 28 施設が参加する JaCALS において、孤発性 ALS 患者 700 症例以上の DNA が（前向き）臨床情報とともに収集・管理されている。

我々は、先に日本人 ALS 症例を用いて大規模ゲノム関連解析を行い、新規の孤発性 ALS 易罹患性遺伝子 *ZNF512B* を同定した。また、610K SNP アレイを用いて GWAS を行ってきた。昨年度来、ALS 患者 643 例の ALS 検体について SNP タイピングを行い、病態・予後との関連解析を行っている。本研究では、さらに追加検体について GWAS を行い、新規孤発性 ALS 易罹患性遺伝子

の探索を行った。

B.研究方法

今年度は、追加日本人 ALS 検体 340 例について解析した。対照には、日本人一般集団 7,784 例を用いた。GWAS 実施に先立って、家族性 ALS の原因遺伝子 (*SOD1*, *OPTN*等)の変異が無いことを確認してから、SNP タイピングを行った。SNP アレイは、Illumina 社製 Human OmniExpressExome BeadChip を使用した。先ず、Hardy-Weinberg 平衡検定値、call rate 値などからデータの品質管理を行った。さらに identity-by-state 法により近親者がいないことを確認した。QQ プロット(quantile-quantile plot)を作製し、主成分分析により、集団階層化を分析した。遺伝統計学的解析の際には、imputation 解析を行った。最終的に関連値 (P 値) を用いて SNP をランキングし、多重検定値による有意水準を満たす SNP を候補とした。

(倫理面への配慮を含む) 文部科学省、厚生労働省及び経済産業省合同「ヒトゲノム・遺伝子解

析研究に関する倫理指針」に従い、検体収集と研究計画は、名古屋大学、理化学研究所、その他関連機関における倫理委員会の承認のもと実施した。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得したのち、収集した。

C.研究結果

本年度は、孤発性 ALS と有意な相関を認める 33 SNPs を同定した。それらの SNP は、全てマイナーアレル頻度の低いものであった。その中の数種の SNP は、以前に報告されていた ALS 関連遺伝子の遺伝子領域にマップされた。また、欧米人の GWAS において相関のあった SNP と本邦 ALS との間に関連は認められなかった。

D.考察

JaCALS が保有する 700 症例以上の ALS 検体と臨床情報を最大限に利用して、前向きコホート研究を行っている。孤発性 ALS の体系的・網羅的解析によって、易罹患性のみならず、経過、予後、病型に関わる遺伝子の単離を目指している。本年度は、日本人孤発性 ALS の追加検体を用いて GWAS を行った。孤発性 ALS と強い関連を認める新規の SNP を見出した。さらに、現在、610K SNP を用いた関連解析のデータと本研究におけるデータを統合したメタ解析を行っている。

E.結論

前向きコホート研究によって、孤発性 ALS の易罹患性に関わる新規の候補遺伝子領域を同定した。欧米人で認められた既報の SNP と孤発性 ALS の関連は認められなかった。

F.健康危険情報

なし。

G.研究発表

1.論文発表

(1) 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*, 2013, 324:163-166.

(2) 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*, 2012, 33:1843.e19-24.

(3) 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*, 2012, 83:233-235.

(4) 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*, 2012, 33:786-790.

2.学会発表

(1) 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

(2) 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、東京、日本、2012 年 5 月

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
なし。