

## 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、ALSFRS-R の減少に影響する因子の探索、ALSFRS-R の経時変化の類型化と類型関連 SNP の同定、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、通常の変数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なう人

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ALSFRS-R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ALSFRS-Rが有意に低いことが示された。

表：ALSFRS-Rの経時変化への影響

因子	ALSFRS-R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、ALSFRS-R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
ALSFRS-R: 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、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 つのタイプ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，ALSFRS-R に影響する予後因子探索，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，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**, 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.
  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