

ALS 前向きコホート研究 (JaCALS): 臨床情報・ゲノム生体試料収集と解析

祖父江 元¹⁾

熱田直樹¹⁾、横井大知¹⁾、渡辺はづき¹⁾、中村亮一¹⁾、渡辺宏久¹⁾、伊藤瑞規¹⁾

JaCALS

1) 名古屋大学神経内科

研究要旨

ALS 患者の前向き臨床情報、ゲノム遺伝子、不死化細胞、生体試料を蓄積する多施設共同コホート JaCALS は 30 施設が参加し、1007 例の ALS 患者登録を行った。今年度、重症度スケール ALSFRS-R の低下と生存期間のそれぞれに影響する因子を Joint modelling を用いて解析し、両因子は発症年齢のみが共通し他は異なることを示した。また孤発性 ALS において、発症年齢が高いほど球麻痺発症の割合が多く、生存期間および球筋の機能廃絶までの期間が短いことを示した。難治性疾患実用化研究班との連携により、孤発性 ALS 患者のうち急速に進行する群と関連する遺伝子多型を見出した。生体試料と結び付けられた疾患コホートは病像、病態に関わる臨床因子、遺伝子を明らかにすることにより、診療の向上、病態解明・治療開発研究に大きく寄与する。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は平均 3-4 年で死亡もしくは永続的な人工呼吸器装着が必要となる代表的な神経難病であるが、根治的治療法は未だに開発されていない。その診療、ケアの向上、病態解明・治療法開発研究の推進は喫緊の課題であり、多面的なアプローチが必要である。ALS 克服の研究推進のために多施設共同 ALS 疾患コホート JaCALS を以下の目的で構築した。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の前向き縦断的自然歴を把握する。

ALS 患者の臨床像、進行、予後の多様性に関する臨床的因子を探索する。

前向き自然歴情報とリンクした ALS 患者大規模遺伝子リソースを構築する。

ALS 患者の発症、臨床像、進行、予後の多様性に関する遺伝的因子を探索する。

診断、予後、進行の指標となりうるバイオマーカーを明らかにする。

病態解析や治療薬探索に資するための患者由来細胞を用いた研究を推進する。

B. 研究方法

神経変性疾患に関する調査研究班をベースに ALS 前向きコホート JaCALS を立ち上げ、2006 年から登録を進めてきた。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。今年度新たに血漿、血清、髄液保存体制整備、モニタリングへの対応、臨床試験エントリーサポート体制構築、神経病理との連携体制構築、幹細胞研究への細胞提供推進を行っている。

(倫理面への配慮)

研究参加全施設で倫理委員会の承認を受け、患者および正常コントロール登録にあたっては文書での同意を取得した。

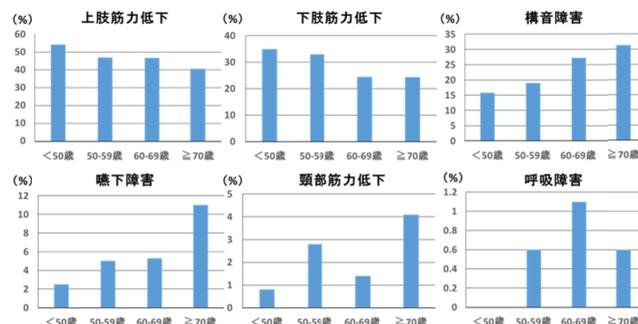
C.研究結果

2014 年 12 月末現在で、ALS 患者 1007 例、コントロール 306 例を登録した。

2012 年 12 月までに JaCALS に登録された孤発性 ALS 患者 539 例のうち、遺伝子異常を認められた例、登録時に発症から 5 年以上経過している例、データが不十分な例を除外し、451 例を解析対象として、経時的な ALSFRS-R 低下に影響する因子と生存期間（発症から死亡もしくは永続的人工呼吸器装着までの期間）に影響する因子を Joint Modelling を用いて解析した。ALSFRS-R 低下へ影響する因子に、高齢発症、女性、初発症状に上肢筋力低下、下肢筋力低下、球麻痺を有することが抽出された($p < 0.0001$ 、 $p = 0.019$ 、 $p = 0.010$ 、 $p = 0.0008$ 、 $p = 0.005$)。生存期間へ影響する因子には、高齢発症、初発症状に頸部筋力低下を有すること、上肢の近位筋優位の筋力低下、リルゾール内服無しが抽出された($p < 0.0001$ 、 $p = 0.018$ 、 $p = 0.010$ 、 $p = 0.030$)。

2014 年 5 月までに JaCALS に登録された孤発性で既知の遺伝子異常がなく、改訂 El Escorial 診断基準で possible 以上を満たす 753 例について、発症年齢が病像に与える影響を解析した。

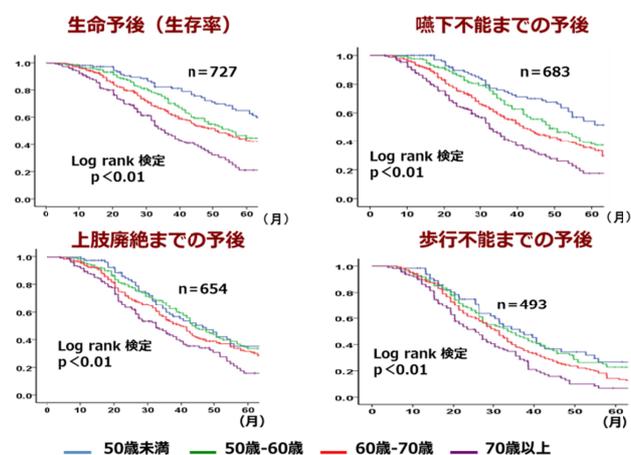
図 1 発症時の症状と発症年齢



発症年齢が高齢になるほど、初発時に四肢筋力低下がある割合が下がり、球麻痺症状、頸部筋力低下がある割合が上がる。

図 1 に示すように高齢であるほど球麻痺発症の割合が高いことが示された。また、発症年齢ごとの生命予後、機能予後の違いを以下に示す。

図 2 発症年齢ごとの生命予後、機能予後



発症年齢が高齢になるほど、生命予後や嚥下機能など球筋の機能予後が不良である。四肢機能も高齢発症のほうが機能予後が悪い傾向があるが、年代ごとの差が小さい。

難治性疾患実用化研究孤発性 ALS 患者大規模前向きコホートの臨床バイオリソース・ゲノム遺伝子・不死化細胞を用いた病態解明、治療法開発研究班との連携により、極めて多彩な孤発性 ALS 患者の機能スケール低下パターンを群分けし、ゲノムワイド遺伝子多型データとの関連解析により、急速に進行する群と強く相関する遺伝子多型、遺伝子を見出した。JaCALS における不死化細胞の

蓄積をもとに特定の遺伝子多型をもつ患者由来の iPS 細胞を作成し、病態解析、治療薬スクリーニングにつなげるプロジェクトを進めている。

D. 考察

ALSFRS-R の低下と生存期間のそれぞれに影響する因子を Joint modelling を用いて初めて報告した。両因子は発症年齢のみが共通し。他は異なっていた。この違いはこれまで十分に認識されておらず、診療や臨床試験のデザインにおいて重要な情報であると考えられた。

孤発性 ALS において、発症年齢が高いほど球麻痺発症の割合が多く、生存期間および球筋の機能廃絶までの期間が短いことが示された。一方で四肢機能廃絶までの期間は発症年齢ごとの違いが小さいことが示された。発症年齢は孤発性 ALS の病像、経過に影響を与える重要な因子であり、その背景をさらに検討する必要がある。

JaCALS において蓄積されたゲノム遺伝子検体を用いて、これまでに孤発性 ALS 関連遺伝子多型同定 (*Hum Mol Genet* 2011) 家族性 ALS 原因遺伝子の孤発例での頻度 (*Neurobiol Aging* 2012, *Neurol Res Int* 2011)、家族性 ALS 新規遺伝子検証 (*Am J Hum Genet* 2013, 2012)、ALS 予後因子同定 (*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013)、他の変性疾患関連遺伝子検証 (*N Engl J Med* 2013, *Neurology* 2014) の実績がある。引き続き、難治性疾患実用化研究班など病態解析を担当する研究班との連携により、ALS の治療法開発につながる研究を支える貴重なリソースとなる。蓄積されている不死化細胞から iPS 細胞を作成する技術が連携する慶應大学生理学岡野研究室にて開発されており、特定の臨床像や遺伝子多型を持つ患者由来の幹細胞を用いることにより、病態解析研究が推進されることが期待される。

E. 結論

登録症例数は順調に伸びており、JaCALS の研究リソースは世界的な規模に育ちつつある。生体

試料と結び付けられた前向き疾患コホートは病像、病態に関わる臨床因子、遺伝子を明らかにすることにより、診療の向上、病態解明・治療開発研究に大きく寄与する。治験のシーズ探索、治験デザイン、治験リクルートサポートを通じて創薬に寄与する。生体試料、細胞提供を通じて、多彩なゲノム解析、幹細胞研究を支える基盤となる。

< 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	
ビハーク花の里病院	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
	金井数明	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 小早川優子 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

Watanabe H, Atsuta N, Nakamura R, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Tomiyama H, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Aoki M, Tsuji S, Nakano I, Kaji R, Sobue G. Factors affecting longitudinal functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis patients. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2014 [Epub ahead of print]

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 Neuron Involvement in TAR DNA-Binding Protein of 43 kDa-Related Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis.

JAMA Neurol. 2014;71:172-9.

Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Nakamura R, Koike H, Sobue G. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. BMJ Open. 2014; 4:e005213

Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K,

Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. Hum Mol Genet. 2014 [Epub ahead of print]

Araki A, Katsuno M, Suzuki K, Banno H, Suga N, Hashizume A, Mano T, Hijikata Y, Nakatsuji H, Watanabe H, Yamamoto M, Makiyama T, Ohno S, Fukuyama M, Morimoto S, Horie M, Sobue G. Brugada syndrome in spinal and bulbar muscular atrophy. Neurology. 2014; 82:1813-21

Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Qiang Q, Ding Y, Watanabe H, Yamamoto M, Ohtsuka K, Sobue G. Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. Hum Mol Genet. 2014; 23:3552-65

2.学会発表

Watanabe H, Atsuta N, Nakamura R, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Tomiyama H, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Aoki M, Tsuji S, Nakano I, Kaji R, Sobue G. Factors affecting longitudinal functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis patients The 25th international symposium on ALS/MND Brussels, Belgium, 2014.12

H.知的所有権の取得状況

特記なし。