

(健康危険情報)

なし

F.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G.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

特になし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

JaCALS 研究リソースの維持・拡大  
神経変性疾患領域における基盤的調査研究班との連携  
筋萎縮性側索硬化症の症例収集・遺伝子解析

担当責任者氏名： 青木正志<sup>1)</sup>  
共同研究者氏名： 鈴木直輝<sup>1)</sup>、加藤昌昭<sup>1)</sup>、割田 仁<sup>1)</sup>、井泉瑠美子<sup>1)</sup>、  
西山亜由美<sup>1)</sup>、島倉奈緒子<sup>1)</sup>、安藤里紗<sup>1)</sup>

所属： <sup>1)</sup> 東北大学大学院 医学系研究科 神経・感覚器病態学講座 神経内科学分野

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS) は上位および下位運動ニューロンを侵す進行性の神経変性疾患であり、その原因の究明が求められている。発症者の約 5%に家族歴があり、家族性 ALS と呼ばれる。これまで当科では継続して家族性 ALS 患者の症例収集および遺伝子解析を行ってきた。また孤発性 ALS を含め患者登録、臨床経過のフォローアップも継続して行ってきた。当科で収集した常染色体優性遺伝の遺伝形式が疑われる家族性 ALS の 122 家系において SOD1, FUS/TLS, TDP43, VCP, C9ORF72, Profilin1 (PFN1) についての解析を行った。その結果 29 家系に SOD1 遺伝子変異 (24%)、11 家系に FUS/TLS 遺伝子変異(9%)、1 家系に TDP-43 変異を認めたが、残る 81 家系では検索した遺伝子には異常を認めなかった。これらの家系において次世代シーケンサーを用いたターゲット・リシーケンスおよびエクソーム解析により新たな原因遺伝子の検索を行っていく。

#### A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS) は上位および下位運動ニューロンを侵す進行性の神経変性疾患であり、その原因の究明が求められている。発症者の約 5%は家族歴を伴う。我々は家族性 ALS を中心として症例の収集および遺伝子解析を行ってきた。また孤発性 ALS を含め患者登録、臨床経過のフォローアップも継続して行ってきた。これまでに収集された DNA 検体および新規患者検体において、既知の ALS 関連遺伝子の検索を行い、遺伝子変異の種類、頻度を検討すること、また遺伝子型と臨床型との関係を明らかにすることを目

的とした。

#### B.研究方法

当科で収集した家族性 ALS と考えられる（常染色体優性遺伝形式が疑われる）122 家系について、SOD1、FUS/TLS、TARDBP(TDP-43)、VCP、C9ORF72、PFN1、C9ORF72 についてサンガー法などで遺伝子解析を行った。

（倫理面への配慮）

すべての遺伝子操作は東北大学 DNA 組換え実

験指針に従い、個人を同定できない形で発表し、個人情報には鍵のかかる戸棚に保管、DNA は連結可能匿名化で保存している。東北大学倫理委員会の承認を受けている。

### C. 研究結果

29 家系 (24%) に SOD1 遺伝子変異を、11 家系 (9%) に FUS/TLS 遺伝子変異、1 家系 (1%) に TDP-43 遺伝子変異を認めた。VCP, C9ORF72, PFN1 遺伝子については 122 家系内では遺伝子変異は認めなかった。

SOD1 遺伝子変異としては、下位運動ニューロン優位、下肢発症が多い H46R、L126S 変異が複数家系に認められ、それ以外にも様々な臨床型を呈する変異が認められた。FUS/TLS 遺伝子変異は若年発症で進行が速く、上肢や頸部からの発症例が多い特徴がある。その一方で、81 家系では検索した遺伝子には異常を認めなかった。

### D. 考察

次世代シーケンサーの登場にて新規 ALS の原因遺伝子の報告が続いている。私たちの解析で、特に欧米で頻度が高い C9ORF72 遺伝子変異を認めなかったことは人種差を示すものと考えられた。

今回の 122 家系の解析のうち 81 家系では遺伝子異常を認めなかった。連鎖解析を行うことができる家系が少ないために、どのような方法で原因遺伝子を同定するかが課題である。

### E. 結論

家族性 ALS の遺伝子解析を行った。今後も継続的な患者情報収集および新たな検体の収集を行う。また次世代シーケンサーを含めた遺伝子解析パイプラインの確立が重要である。また孤発性 ALS を含めた患者登録、臨床経過のフォローアッ

プも継続して行っていく。

### (健康危険情報)

特記事項なし

### F. 研究発表

1. 論文発表  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)  
なし

2. 学会発表  
なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

研究開発課題名：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  
分担研究開発課題名：FTLD コホートの構築、運営

## 分担研究報告書

「熊本大学における FTLD コホート構築、  
および新規治療法の確立（意味性認知症における言語訓練）」

研究分担者 池田 学（熊本大学大学院生命科学研究部神経精神科学分野）  
研究協力者 橋本 衛（熊本大学大学院生命科学研究部神経精神科学分野）  
福原竜治（熊本大学大学院生命科学研究部神経精神科学分野）  
一美奈緒子（熊本大学大学院生命科学研究部神経精神科学分野）

### ○研究要旨

熊本大学神経精神科学分野では、平成 19 年 7 月より認知症疾患患者データベースを運用している。そのうち、前頭側頭葉変性症（frontotemporal lobar degeneration: FTLD）の臨床診断で登録されている患者は平成 26 年 12 月現在 63 名であり、毎年数人ずつの新規登録がなされている。われわれは、認知症疾患別に有効な治療法の開発を継続しているが、今回軽度意味性認知症（semantic dementia: SD）患者に試行された 2 つの語彙訓練について報告する。一つの訓練では、SD において患者本人が日常的に使用している物品のうち、語彙が残存している物を対象に維持訓練を行った。その結果、対象とした非訓練後と比較して訓練後は 4 ヶ月後も呼称能力が維持されることが分かった。次に、呼称能力が維持されていても語の理解障害が生活上の困難になっていることに着目し、物品の音声提示を用い物品をイメージさせるといった訓練も行った。その結果、訓練前は物品名を聞いても物が頭に浮かばなかった単語が、3 ヶ月後には音声提示で理解できるようになり、さらには日常生活場面でも使用できるようになった。

### A. 研究目的

熊本大学附属病院神経精神科では、外来および入院患者を対象とした認知症疾患患者データベースを、平成 17 年 7 月より運用している。このデータベースには、臨床症状、各種心理検査や神経学的所見、画像を含めた包括的評価が行われた上で臨床診断がなされた例が登録される。FTLD 例は平成 26 年 12

月現在で 63 名であり、毎年新規患者は県内外より紹介され、数人ずつの新規登録がなされている。FTLD コホートの構築に当たり、今回我々は患者のプライバシーに配慮したデータベースを新たに構築し、心理検査などの臨床データを管理するとともに、頭部 MRI や SPECT などの脳画像解析システムを立ち上げた。臨床データは、MMSE などの基本的

な認知機能検査のほか、前頭葉機能検査、言語機能検査、日常生活動作評価、精神・行動障害の評価を含んでいる。これらをもとにして、我々は患者の診断および症状評価などの臨床と、症状発現の神経基盤解析や治療困難例に対する新規介入法の開発などの研究をリンクさせた活動を展開しはじめている。ここで我々が開発中である、原発性進行性失語（primary progressive aphasia: PPA）の1型の意味性認知症に対する、言語訓練法の新しい試みについて詳述する。

原発性進行性失語（Mesulam 1987）は、症候学的観点から進行性非流暢性失語（primary progressive aphasia: PNFA）、意味性認知症（Semantic Dementia: SD）、logopenic progressive aphasia（LPA）の3型に分類されている。このうちSDでは、側頭葉前方部から底面にかけて限局した脳萎縮がみられ、病初期から「語義失語」（井村 1943）と称される特徴的な言語障害を呈することが知られている。語義失語の中核は語彙の減少に伴う語想起障害であり（Pijnenburg 2004）、患者は日常生活および検査場面において具体的な物の名前を想起することができなくなる。このような呼称の障害は病初期から際立っているものの、他のPPAでも呼称障害が初発症状であることが多く（Mesulam 2001）、むしろSDに特異的な現象としては語の理解障害があげられる。よって、SD患者では、例えば「歯ブラシ」を呼称できないだけでなく、「歯ブラシ」と聞いても複数の物品から歯ブラシを選び出すことができない。すなわちこの呼称障害は、想起と語理解の二方向性（two way anomia）の障害を示す。さらに、理解できない語に対する既知感も失われ、「歯ブラシって何ですか？」と「歯ブラシ」をあたかも初めて聞くかのような反応がSDではしばしば認められ

る（田辺 1992）。また、ある時点で二方向性呼称障害を示した単語は、別の機会に検査を行っても同様に二方向性の障害を認める傾向がある（Hodges 1995）といった、障害された語に一貫性も認められる。このようなSDの特徴は、通常の失語症患者が呼称検査で浮動性を認めるのとは対照的である。一方、SDでは語のレベルで著しい障害を認めるにもかかわらず、発話は流暢で音韻操作は保たれ、音韻性錯語や文法的な誤りは認められない。以上のような特徴的な病態から、SDの言語障害は語に関する意味記憶の障害がその中核と考えられている。

SD患者に対する語の再獲得訓練に関する先行研究（Grahamら1999、小森ら2004）は散見されるが、その効果については、①訓練終了と同時に訓練効果が急速に失われる（Grahamら1999）、②機械的な丸暗記であり獲得された語が有効に機能していない（Grahamら2001）などの否定的な見解もあり、未だSDに対する言語訓練は確立していない。

## B. 研究方法

SDに対し、目的の異なる2つの訓練を行った。

### <訓練1>

【目的】意味性認知症患者に対する言語訓練の一方法として、残存する語彙を維持することを目的とした「語彙の維持訓練」を実施し、その効果を検討した。

【対象】次の2例を対象とした。（症例1）63歳男性、右利き、右側優位萎縮。MMSE 17点、90単語線画呼称課題：呼称 29/90、指示 69/90。（症例2）61歳男性、両手利き、右側優位萎縮。MMSE 25点、90単語線画呼称課題：呼称 49/90、指示 76/90。いずれの症例も語彙の障害は比較的軽度であった。

【方法】[訓練語の選択]あらかじめ患者の自宅を訪問し、患者が日常生活で使用している物品の呼称能力を評価した。その結果を基に、呼称できた語を任意に 50 語選択し、それらを訓練語 25 語と非訓練語 25 語の 2 群に分けた。[訓練方法]訓練語の物品を写真に撮り、表に写真を、裏に物品名を記した写真カードを作成し、訓練に用いた。患者は写真カードを見て、その物品名の呼称もしくは書称を毎日 1 回、4 ヶ月間実施した。[評価]訓練終了後に患者の自宅を訪問し、訓練語と非訓練語の呼称能力について実物品を用いて評価した。

#### <訓練 2 >

【目的】意味性認知症に対する言語訓練として、我々は文字と写真を用いた訓練方法により一定の効果を得てきた。しかしこの方法では、呼称はできるようになっても、聴覚的理解は改善しにくいという問題があった。そこで本研究では視覚呈示に加えて音声（聴覚）呈示による訓練を行い、その効果を検証した。

【対象】対象は次の 1 例である。63 歳、両手利き男性、右側優位萎縮。MMSE 25 点、90 単語線画呼称課題：呼称 49/90、指示 76/90。語義の障害は比較的軽度。「聞いただけではわからない言葉をなんとかしてほしい」と訴え、言語訓練に積極的であった。

【方法】[訓練語の選択]患者の日常生活に即した物品名を聴覚的に呈示し、それが何であるかがわからなかった単語の中から 50 語を選択し訓練語とした。[訓練方法]訓練の教材として、音声呈示用の CD（筆頭演者である心理士が訓練語を読み上げ、それを録音）と、訓練物品の写真とその名称が記載されたシートを作成した。患者はまず CD に録音された物品名を聞き、その物品の形体を頭に思い浮かべる。頭に思い浮かばない場合は、シー

トの文字と写真を見て、その単語が何であったかを確認する。この一連の訓練を、3 ヶ月間、毎日、自宅で継続した。[評価]訓練終了後、訓練語をランダムに口頭呈示し、その物品について説明させた。また、訓練語が日常会話で使用できているかどうかを妻に確認した。

（倫理面への配慮）

研究は、本人または介護者に本研究への参加について口頭および書面にてインフォームドコンセントをしたうえで行った。患者の匿名性には十分配慮し情報を取り扱った。

#### C. 研究結果

##### <訓練 1 >

【結果】訓練終了後の訓練語と非訓練語の呼称正答率を示す。症例 1 では、訓練語 100% (25/25 語)、非訓練語 40% (10/25 語)、症例 2 では、訓練語 100% (25/25 語)、非訓練語 12% (3/25 語)であった。

##### <訓練 2 >

【結果】訓練終了後の評価では正答率 96% (48/50 語)であった。また、妻の評価では、88% (46/50 語)の語が日常生活で使用できていた。

#### D. 考察

訓練 1 では、2 症例とも訓練語は 4 ヶ月後にもすべて呼称できたが、非訓練語は呼称できる語数が著明に減少した。このことから、意味性認知症では訓練することによって呼称能力が維持される可能性が示唆された。一方で、訓練効果が訓練していない語に汎化しないことも明らかになった。なお、訓練効果が長期的に継続するかどうかの確認およびより効果的な訓練方法の開発などが今後の

課題としてあげられた。訓練2では、訓練前は物品名を聞いただけではその物品が頭に浮かばなかった単語が3ヵ月後には音声呈示でも理解できるようになり、さらに日常生活でも使用できるようになっていた。本アプローチは意味性認知症の言語訓練方法として効果的である可能性が示唆された。

SDの言語訓練にはいくつかの限界が指摘されている。ひとつは、語彙が増加あるいは保持されているように見えても、訓練の方法にそって機械的に丸暗記されているのみであるという指摘である。そこで我々は、語彙の評価に際し、訓練語をランダムに提示し説明を求める方法をとった。この方法を用いても訓練語は非訓練語と比較して高い正答率を得ており、いわゆる丸暗記による正答ではないと考えられる。また、範疇化の障害のため、訓練に用いる語を患者個人の日常生活に即した物品から選ぶことにより、訓練の結果がそのまま日常生活でのコミュニケーションの向上に寄与できるように工夫している。

認知症患者に対するリハビリテーションの目的の一つとして、患者のみならず家族のQOLの改善があげられる。特に訓練2においては、訓練前には聞いても分からなかった単語が、訓練によって頭に浮かぶようになり、さらには日常生活でも使用できるようになるなど、家族との意思疎通に貢献できたと考えている。

一般に、SD症例の中には「言葉がわからない」と訴えるものの、言語訓練に対して全く関心のない症例は少なくない。このような意欲に乏しい症例に訓練を実施すべきかどうかについては意見の分かれるところである。しかし、経過とともに「我が道を行く」行動障害が増加するSD症例において、言語訓練が日課として定着すれば、常同行動などの行動障害の発症を未然に予防することも

期待できる可能性がある(池田ら1995)。訓練への意欲に乏しい症例に対する言語訓練の導入方法としては、我々の行った訓練のように訪問を交える方法が有効かもしれない。訪問訓練には慣れ親しんだ環境で訓練ができ患者がよりリラックスして臨めるといった利点がある。さらに、心理士が訪問することにより、家族への心理ケアや疾患教育も可能となるなど、家族への利点も大きい。そして家庭での訓練が定着すれば、将来的なデイサービスへの導入も容易となるであろう。このように、SDの言語訓練の意義については、言語機能以外の効果も含めて検討すべきであろう。

最後に、今回の研究では対象症例が3症例と少ないことなどの方法論的な限界があり、結果を解釈する上で制限があることを付記する。

## E. 結論

今回、熊本大学附属病院神経精神科の連続例からFTLDコホート構築のため、データベース作成及び臨床データ解析システムを構築した。また、連続例から抽出したSD患者の実物品を用いた語の維持訓練および音声を用いた語理解の訓練についても紹介した。線画を用いた訓練でも必ずしも機械的な丸暗記には留まらないが範疇化の障害があるため、訓練の目的を日常生活での応用とした場合、患者個人の生活場面に即した訓練語を用いることが有用であること、およびSDの特異的な言語症状である語の理解障害に対しても訓練の効果が得られる可能性があることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Fukuhara R, Ghosh A, Fuh JL, Dominguez J, Ong

PA, Dutt A, Liu YC, Tanaka H, Ikeda. Family history of frontotemporal lobar degeneration in Asia - an international multi-center research. *International Psychogeriatrics*, (26)1967-71, 2014

Fujito, Kamimura N, Ikeda M, Koyama A, Shimodera S, Morinobu S, Inoue S. Comparison of driving behaviors between individuals with frontotemporal lobar degeneration and those with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* (in press)

Hashimoto M, Sakamoto S, Ikeda M. Clinical features of delusional jealousy in patients with dementia. *J Clin Psychiatry* (in press)  
品川俊一郎, 矢田部裕介, 繁信和恵, 福原竜治, 橋本 衛, 池田 学, 中山和彦. 本邦におけるFTDに対する off-label 処分の実態について, *Dementia Japan* 29, 78-85, 2015

池田 学. 前頭側頭葉変性症の症候学. 日常臨床に必要な認知症症候学. 新興医学出版社. 東京, 2014, 50-62

池田 学. 前頭側頭葉変性症 (含: 進行性失語症) 井村裕夫 第4版わかりやすい内科学 文光堂. 東京, 2014, 600-601

## 2. 学会発表

Ikeda M. ASAD Joint Symposium on Dementia. Frontotemporal Dementia in Asia. 14th Asian & Oceanian Congress of Neurology, The Venetian Macao, Macao, China, March 2-5, 2014

Ikeda M. Keynote address: Overview on the diagnosis and management of frontotemporal lobar degeneration. 9th Annual Meeting of Taiwanese Society of Geriatric Psychiatry, Chung Shan Medical University, Taichung city, Taiwan, March 16, 2014

Ikeda M. Symposium: Young onset dementia:

need for more research. Care situations for young onset dementia in Asian countries. International Psychiatric Association 2014 International Meeting, Beijing, China, October 23-26, 2014

Ikeda M. Plenary Lecture: Fronto-temporal dementia. 8th Congress of Asian Society Against Dementia, Colombo, Sri Lanka, November 14-16, 2014

Ikeda M. Symposium: Epidemiology & Risk. Epidemiology of early-onset dementia. 8th Congress of Asian Society Against Dementia, Colombo, Sri Lanka, November 14-16, 2014

一美奈緒子, 橋本衛, 田中希, 石川智久, 池田学. 意味性認知症に対する音声を用いた訓練効果の検討. 第38回日本神経心理学学会学術集会. 平成26年9月26、27日. 山形

一美奈緒子, 橋本衛, 池田学. 意味性認知症における「語彙の維持訓練」の効果. 第38回高次脳機能障害学会総会. 平成26年11月28、29日. 仙台

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし



厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

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

進行・予後を規定する遺伝子探索、発症に関わる遺伝子探索

ALS 病勢進行の類型及び生命予後を規定する SNP・エクソンの同定に関する統計的検討

担当責任者 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 講師  
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  
熱田直樹 名古屋大学医学部附属病院神経内科 病院講師

### 研究要旨

平成 26 年度は、ALS の生命予後（死亡又は TPPV）に関連する SNP 又はエクソンを同定した。518 例分の生存時間データに Cox 回帰モデルを適用し、関連 SNP 又はエクソンの関連の強さを評価した。また、348 例の検証用データに同様の解析を実施し、先の解析で選定した SNP 又はエクソンの生命予後への関連の再現性を確認した。さらに、メタアナリシスにより、これらの解析から得られた p 値を統合し、関連の強さを検証した。その結果、14 個の SNP 又はエクソンに生命予後との関連が示唆された。ただし、各ジェノタイプの症例数が不均衡であることに起因して高度に有意になった SNP 又はエクソンもあり、結果解釈には注意が必要であった。

#### A. 研究目的

本年度の目的は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の生命予後に関連する SNP 又はエクソンを同定することであった。具体的には、各 SNP 又はエクソンのジェノタイプが、死亡又は TPPV までの期間に与える影響を評価した。Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS) に登録された 518 例のデータを GWAS データセットとして、Cox 回帰モデルを用いて、関連 SNP 又はエクソンを選定した。次に、JaCALS 登録例を含む 348 例のデータを検証用データセットとして、関連 SNP 又はエクソンの再現性を確認した。さらに、メタアナリシスにより、GWAS 及び検証用データセットの解析から得られた p 値を統合し、関連の強さを検証した。

#### B. 研究方法

本研究で用いる前向きコホート JaCALS は、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。

2015 年 3 月時点で、JaCALS には 1023 例の ALS 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。

本研究は，JaCALSにおいて生命予後データとSNPデータが得られている518例をGWASデータセットとし，GWASデータセットに含まれていないJaCALS症例と他施設のALS症例を併合した348例を検証用データセットとして統計解析を進めた。Cox回帰モデルを用いて各SNP又はエクソンのジェノタイプが死亡又はTPPVまでの期間に与える影響を評価した。ここで，Cox回帰においては，死亡又はTPPVをイベントとし，イベントを起こしていない症例は最終観察日をもって打ち切りとした。GWAS及び検証用データセットに対して，Additiveモデル，Dominantモデル，Recessiveモデルを仮定したCox回帰分析を実施し，各モデルにおいてメタアナリシスよりにp値を統合した。

### C.研究結果

メタアナリシスで  $p < 1.0 \times 10^{-5}$  となった SNP 又はエクソンは，Additive モデルで 6 個，Dominant モデルで 7 個，Recessive モデルで 1 個の合計 14 個あった ( $p = 3.0 \times 10^{-12} \sim 9.5 \times 10^{-6}$ )。これら 14 個について，GWAS データセットにおける p 値は  $p = 1.1 \times 10^{-10} \sim 1.1 \times 10^{-3}$  であり，検証用データセットにおける p 値は  $p = 7.9 \times 10^{-4} \sim 2.5 \times 10^{-1}$  であった。14 個の SNP 又はエクソンの結果は，下表のとおりである。なお，N は症例数、HR はハザード比と 95%信頼区間、Meta はメタアナリシスを表しており，SNP 又はエクソン名はマスキングしている。

| SNP1 (Minor allele =A) |                   |     |     |                   |     |     |
|------------------------|-------------------|-----|-----|-------------------|-----|-----|
| Dominant               | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     |
|                        | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  |
| N                      | 1                 | 35  | 482 | 1                 | 18  | 329 |
| HR                     | 3.35 (2.23 ,5.03) |     |     | 2.87 (1.37 ,6.02) |     |     |
| P                      | 5.9E-09           |     |     | 5.2E-03           |     |     |
| Meta HR                | 3.23 (2.26 ,4.61) |     |     |                   |     |     |
| Meta P                 | 1.2E-10           |     |     |                   |     |     |
| SNP2 (Minor allele =A) |                   |     |     |                   |     |     |
| Dominant               | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     |
|                        | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  |
| N                      | 2                 | 36  | 480 | 0                 | 18  | 330 |
| HR                     | 1.94 (1.32 ,2.86) |     |     | 4.32 (2.03 ,9.20) |     |     |
| P                      | 8.2E-04           |     |     | 1.5E-04           |     |     |
| Meta HR                | 2.29 (1.62 ,3.24) |     |     |                   |     |     |
| Meta P                 | 2.5E-06           |     |     |                   |     |     |
| SNP3 (Minor allele =B) |                   |     |     |                   |     |     |
| Dominant               | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     |
|                        | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  |
| N                      | 227               | 231 | 60  | 142               | 173 | 33  |
| HR                     | 0.59 (0.48 ,0.74) |     |     | 0.78 (0.51 ,1.19) |     |     |
| P                      | 3.7E-06           |     |     | 2.5E-01           |     |     |
| Meta HR                | 0.62 (0.52, 0.76) |     |     |                   |     |     |
| Meta P                 | 3.6E-06           |     |     |                   |     |     |
| SNP4 (Minor allele =B) |                   |     |     |                   |     |     |
| Dominant               | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     |
|                        | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  |
| N                      | 243               | 219 | 56  | 172               | 143 | 33  |
| HR                     | 0.62 (0.50 ,0.77) |     |     | 0.70 (0.46 ,1.07) |     |     |
| P                      | 1.6E-05           |     |     | 9.8E-02           |     |     |
| Meta HR                | 0.63 (0.52, 0.77) |     |     |                   |     |     |
| Meta P                 | 4.3E-06           |     |     |                   |     |     |
| SNP5 (Minor allele =B) |                   |     |     |                   |     |     |
| Dominant               | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     |
|                        | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  |
| N                      | 128               | 261 | 129 | 96                | 160 | 92  |
| HR                     | 0.62 (0.49 ,0.79) |     |     | 0.58 (0.37 ,0.90) |     |     |
| P                      | 1.2E-04           |     |     | 1.5E-02           |     |     |

|                         |                   |     |     |                   |     |     |                         |                       |     |     |                      |     |     |
|-------------------------|-------------------|-----|-----|-------------------|-----|-----|-------------------------|-----------------------|-----|-----|----------------------|-----|-----|
| Meta HR                 | 0.61 (0.50, 0.76) |     |     |                   |     |     | HR                      | 1.76 (1.25 ,2.48)     |     |     | 4.32 (2.03 ,9.20)    |     |     |
| Meta P                  | 5.6E-06           |     |     |                   |     |     | P                       | 1.1E-03               |     |     | 1.5E-04              |     |     |
| SNP6 (Minor allele =A)  |                   |     |     |                   |     |     |                         |                       |     |     |                      |     |     |
| Dominant                | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     | Meta HR                 | 2.05 (1.50 ,2.80)     |     |     |                      |     |     |
|                         | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  | Meta P                  | 6.0E-06               |     |     |                      |     |     |
| N                       | 72                | 256 | 190 | 41                | 149 | 158 | SNP11 (Minor allele =A) |                       |     |     |                      |     |     |
| HR                      | 0.63 (0.51 ,0.79) |     |     | 0.66 (0.43 ,1.00) |     |     | Additive                | GWAS                  |     |     | 検証用                  |     |     |
| P                       | 7.0E-05           |     |     | 5.1E-02           |     |     |                         | AA                    | AB  | BB  | AA                   | AB  | BB  |
| Meta HR                 | 0.64 (0.52 ,0.78) |     |     |                   |     |     | N                       | 52                    | 239 | 227 | 29                   | 161 | 158 |
| Meta P                  | 9.5E-06           |     |     |                   |     |     | HR                      | 1.33 (1.12 ,1.58)     |     |     | 1.77 (1.27 ,2.47)    |     |     |
| SNP7 (Minor allele =A)  |                   |     |     |                   |     |     |                         |                       |     |     |                      |     |     |
| Dominant                | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     | P                       | 1.1E-03               |     |     | 7.9E-04              |     |     |
|                         | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  | Meta HR                 | 1.41 (1.21 ,1.65)     |     |     |                      |     |     |
| N                       | 72                | 256 | 190 | 41                | 149 | 158 | Meta P                  | 8.8E-06               |     |     |                      |     |     |
| HR                      | 0.63 (0.51 ,0.79) |     |     | 0.66 (0.43 ,1.00) |     |     | SNP12 (Minor allele =B) |                       |     |     |                      |     |     |
| P                       | 7.0E-05           |     |     | 5.1E-02           |     |     | Additive                | GWAS                  |     |     | 検証用 (N = 347)        |     |     |
| Meta HR                 | 0.64 (0.52 ,0.78) |     |     |                   |     |     |                         | AA                    | AB  | BB  | AA                   | AB  | BB  |
| Meta P                  | 9.5E-06           |     |     |                   |     |     | N                       | 408                   | 101 | 9   | 277                  | 67  | 3   |
| SNP8 (Minor allele =A)  |                   |     |     |                   |     |     |                         |                       |     |     |                      |     |     |
| Additive                | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     | HR                      | 1.50 (1.20 ,1.88)     |     |     | 1.94 (1.24 ,3.03)    |     |     |
|                         | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  | P                       | 4.6E-04               |     |     | 3.7E-03              |     |     |
| N                       | 1                 | 35  | 482 | 1                 | 18  | 329 | Meta HR                 | 1.59 (1.30, 1.92)     |     |     |                      |     |     |
| HR                      | 3.28 (2.23 ,4.84) |     |     | 2.37 (1.21 ,4.62) |     |     | Meta P                  | 9.0E-06               |     |     |                      |     |     |
| P                       | 1.9E-09           |     |     | 1.2E-02           |     |     | SNP13 (Minor allele =B) |                       |     |     |                      |     |     |
| Meta HR                 | 3.02 (2.16 ,4.23) |     |     |                   |     |     | Additive                | GWAS                  |     |     | 検証用 (N = 347)        |     |     |
| Meta P                  | 1.0E-10           |     |     |                   |     |     |                         | AA                    | AB  | BB  | AA                   | AB  | BB  |
| SNP9 (Minor allele =B)  |                   |     |     |                   |     |     |                         |                       |     |     |                      |     |     |
| Additive                | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     | N                       | 408                   | 101 | 9   | 277                  | 67  | 3   |
|                         | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  | HR                      | 1.50 (1.20 ,1.88)     |     |     | 1.94 (1.24 ,3.03)    |     |     |
| N                       | 377               | 132 | 9   | 250               | 92  | 6   | P                       | 4.6E-04               |     |     | 3.7E-03              |     |     |
| HR                      | 1.45 (1.17 ,1.80) |     |     | 2.00 (1.34 ,2.97) |     |     | Meta HR                 | 1.59 (1.30, 1.92)     |     |     |                      |     |     |
| P                       | 7.0E-04           |     |     | 6.7E-04           |     |     | Meta P                  | 9.0E-06               |     |     |                      |     |     |
| Meta HR                 | 1.56 (1.30, 1.89) |     |     |                   |     |     | SNP14 (Minor allele =A) |                       |     |     |                      |     |     |
| Meta P                  | 4.2E-06           |     |     |                   |     |     | Recessive               | GWAS                  |     |     | 検証用                  |     |     |
| SNP10 (Minor allele =A) |                   |     |     |                   |     |     |                         |                       |     |     |                      |     |     |
| Additive                | GWAS              |     |     | 検証用               |     |     |                         | AA                    | AB  | BB  | AA                   | AB  | BB  |
|                         | AA                | AB  | BB  | AA                | AB  | BB  | N                       | 3                     | 54  | 461 | 1                    | 28  | 319 |
| N                       | 2                 | 36  | 480 | 0                 | 18  | 330 | HR                      | 65.88 (18.44 ,235.31) |     |     | 19.40 (2.53 ,148.75) |     |     |
|                         |                   |     |     |                   |     |     | P                       | 1.1E-10               |     |     | 4.3E-03              |     |     |
|                         |                   |     |     |                   |     |     | Meta HR                 | 46.73 (15.88 ,137.55) |     |     |                      |     |     |
|                         |                   |     |     |                   |     |     | Meta P                  | 3.0E-12               |     |     |                      |     |     |

## D. 考察

ALS の生命予後に影響する SNP 又はエクソンを探索し、いくつかの有望な SNP 又はエクソンを 14 個同定した。しかしながら、これらの中には、生命予後が極端に悪かった少数例のマイナーアレル保有例が原因で統計的に高度に有意になった SNP 又はエクソンも含まれているため、結果解釈には注意が必要である。例えば、SNP No.14 においては、そのマイナーアレル頻度が極めて低く、これらの症例の予後が極めて悪いために、高度に有意となった。このような関連の再現性を確認するためには、症例数を増やすほかない。今後は、各症を観察を継続すると共に、検証用データを増やしていく予定である。

## E. 結論

本研究では、ALS の生命予後と関連する 14 個の SNP 又はエクソンを選定した。その関連の強さは、 $p = 3.0 \times 10^{-12} \sim 9.5 \times 10^{-6}$  であり、真の関連 SNP 又はエクソンの同定を期待させるものであった。ただし、頑健な結論を得るためには更に多くのデータで検証する必要があると判断した。

(健康危険情報)

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 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*, 2014; 45: 687-692.
- 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*, 2014; 21: 294-300.
- 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*, 2014; 61:143-148.
- Yamada S, **Hirakawa A**. Reply to: appropriate statistical descriptions for evaluating the predictive role of epithelial-to-mesenchymal transition in patients with pancreatic cancer. *Surgery*, 2014; 155: 959-960.
- Harano K, **Hirakawa A**, Kato T, Suzuki K, Watanabe S, Katsumata N. Use of colony-stimulating factor in patients with ovarian cancer receiving paclitaxel and carboplatin in Japan. *Journal Gynecologic Oncology*, 2014; 25: 124-129.
- Taniyama TK, Hashimoto K, Katsumata, N, **Hirakawa A**, Yonemori K, Yunokawa M, Shimizu C, Tamura K, Ando M, Fujiwara Y. Can oncologists predict survival for patients with progressive disease after standard chemotherapies? *Current Oncology*, 2014; 21: 84-90.
- Hirakawa A**, Yonemori K, Kuwatsuka Y, Kodaira M, Yamamoto H, Yunokawa M, Hamada A, Shimizu C, Tamura K, Gemma A, Fujiwara Y. A descriptive analysis of post-chemotherapy development of interstitial lung disease using spontaneous reporting data in Japan. *Current Drug Safety*, 2014; 9: 220-226.
- Ozeki N, Iwano S, Taniguchi T, Kawaguchi K,

- Fukui T, Ishiguro F, Fukumoto K, Nakamura S, **Hirakawa A**, Yokoi K. Therapeutic surgery without a definitive diagnosis can be an option in selected patients with suspected lung cancer. *Interactive Cardiovascular Thoracic Surgery*, 2014; 5:830-7.
9. Kataoka Y, Nishida S, **Hirakawa A**, Oiso Y, Arima H. Comparison of incidence of hyponatremia between intranasal and oral desmopressin in patients with central diabetes insipidus. *Endocrine Journal*, 2014; [Epub ahead of print]
  10. 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].
  11. **Hirakawa A**, Matsui S. Response to Letter to the Editor by Drs Wages et al. *Statistics in Medicine*, 2014; 33, 2159-60.
  12. Asano J, **Hirakawa A**, Hamada C. Assessing the prediction accuracy of cure in the Cox proportional hazards cure model: an application to breast cancer data. *Pharmaceutical Statistics*, 2014; 13: 357-363.
  13. Asakawa T, **Hirakawa A**, Hamada C. Bayesian model averaging continual reassessment method for bivariate binary efficacy and toxicity outcomes in phase I oncology trials. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 2014; 23: 310-325.
  14. Kaneko S, **Hirakawa A**, Hamada C. Enhancing the lasso approach for developing a survival prediction model based on gene expression data. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2014; Article ID 259474 .
2. 学会発表
    1. Yoshimi A, Aleksic B, Kunimoto S, Kushima I, Nakamura Y, Kimura H, Takasaki Y, Wang C, Xing J, **Hirakawa A**, Ikeda M, Iwata N, Ozaki N. Transcriptome analysis of lymphoblastoid cell line from schizophrenia and bipolar disorder. XXII World Congress of Psychiatric Genetics, Denmark, October 16-20, 2014.
    2. Yoshimi A, Kunimoto S, Yamada S, Aleksic B, **Hirakawa A**, Nagai T, Ozaki N. Proteomic analysis of the lymphoblastoid cell line derived from Japanese schizophrenic patients. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Canada, June 22-26, 2014.
    3. Nara E, Yunokawa M, Yonemori K, Doutani C, Shimizu K, Mimaki Y, Oomatsu N, Komatsu M, **Hirakawa A**, Shimizu C, Fujiwara Y, Tamura K. Identifying the social support needs of young cancer patients in Japan. European Society of Medical Oncology, Spain, June 25-28, 2014.
    4. Tanaka R, Yonemori K, **Hirakawa A**, Hashimoto J, Kodaira M, Yamamoto H, Yunokawa M, Shimizu C, Fujimoto M, Fujiwara Y, Tamura K. Risk factors for developing skeletal-related events associated with metastatic breast cancer patients receiving bone-modifying agents. European Society of Medical Oncology, Spain, June 25-28, 2014
    5. Okuma H, Koizumi F, **Hirakawa A**, Nakatochi M, Hashimoto J, Kodaira M, Yunokawa M, Yamamoto H, Yonemori K, Shimizu C,

- Fujiwara Y, Tamura K. Integrative analysis of two prospective neoadjuvant studies with breast cancer patients and microarray analysis . European Society of Medical Oncology, Spain, June 25-28, 2014.
6. Kato T, Taniguchi T, Kawaguchi K, Fukui T, Ishiguro F, **Hirakawa A**, Iwano S, Yokoi K. The contact length between the tumor contour and lung on computed tomography is a risk factor for pleural recurrence after complete resection of thymoma. 28th Annual Meeting of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery, Italy, October 11-15, 2014.
  7. Shimada K, Shimada S, Sugimoto K, Hayakawa F, Katayama M, **Hirakawa A**, Takagi Y, Nakamura S, Seto M, Naoe T, Tomita A, Kiyoi H. Development and analysis of novel intravascular large B-cell lymphoma NOD/Shi-*scid* IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mouse xenograft model. The 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.
  8. Sato H, **Hirakawa A**, Hamada C. Dose-finding approach based on efficacy and toxicity outcomes in phase I oncology trials for molecularly targeted agents. The 2015 ENAR Spring Meet, Miami, USA, March 11-15, 2015.
  9. 平川晃弘. 抗がん剤開発における早期臨床試験の現状と課題. 医学統計シンポジウム, 東京, 2014年12月1日.
  10. 平川晃弘. 広い視点を持った開発担当者・審査員を育てるために ～境界を超えた人材育成と人材交流の必要性～医療機関の立場から. 第11回DIA日本年会, 東京, 2014年11月16-18日.
  11. 宮内理世, 久保田誠司, 伊藤善之, 伊藤淳二, 中原理絵, 川村麻里子, 岡田徹, 長縄慎二, 吉川史隆, 平川晃弘. 名大病院における子宮頸癌術後の(化学)放射線療法による治療成績の検討. 日本放射線腫瘍学会第27回学術大会, 横浜, 2014年12月11-13日.
  12. 清水忍, 平川晃弘, 鋤塚八千代, 室谷健太, 木下文恵, 中朽昌弘, 杉下明隆, 飯島祥彦, 加藤勝義, 安藤昌彦, 水野正明. 名古屋大学における臨床研究認定者制度に関する取組み. ARO 協議会第2回学術集会, 京都, 2014年9月23-24日.
  13. 浅野淳一, 平川晃弘, 浜田知久馬. Cox proportional hazards cure modelにより推定した治癒確率の予測精度の評価法. 2014年度統計関連学会連合大会, 東京, 2014年9月13-16日.
  14. 島田和之, 島田聡子, 杉本慶樹, 早川文彦, 片山幸, 平川晃弘, 中村栄男, 瀬戸加大, 直江知樹, 富田章裕, 清井仁. 異種移植モデルを用いた血管内大細胞型B細胞リンパ腫の病態解析. 第76回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014年10月31-11月2日.
  15. 平川晃弘. がん第I相試験における用量探索法の最近の展開. 科研費シンポジウム, 福岡, 2015年2月2-4日.
  16. 平川晃弘, 清水忍, 鋤塚八千代, 室谷健太, 木下文恵, 中朽昌弘, 杉下明隆, 飯島祥彦, 加藤勝義, 安藤昌彦, 水野正明. 名古屋大学における臨床研究認定者制度に関する取組み. 日本臨床試験学会第6回学術集会総会, 東京, 2015年2月20-21日.
  17. 平川晃弘, 木下文恵, 鋤塚八千代, 室谷健太, 森由美子, 中村真由美, 杉下明隆, 清水忍, 水野正明. 中部先端医療開発円環コンソーシアムにおけるWeb登録・割付システムの紹介. 日本臨床試験学会第6回学術集会総会, 東京, 2015年2月20-21日.
  18. 金子周平, 平川晃弘, 浜田知久馬. 遺伝子発現量データに基づくLassoを用いた生存時間予測モデルの構築に関する研究. 日本計量生物学会年会, 京都, 2015年3月12-13日.

#### G. 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

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

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

進行・予後を規定する遺伝子探索、発症に関わる遺伝子探索

### ALS 発症年齢のゲノムワイド関連研究

担当責任者 中枘昌弘 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 病院助教  
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  
熱田直樹 名古屋大学医学部附属病院神経内科 病院講師

#### 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。平成 26 年度は、SNP アレイデータを活用し、ALS の発症年齢にかかわる SNP の探索を実施した。SNP と発症年齢間の関連を評価するため、524 例と 150 例の 2 種類の SNP アレイデータを用いて線形回帰分析を実施し、その結果をメタアナリシスで統合した。その結果、8 種類の SNP について発症年齢との関連が示唆された。今後は、より検出力を高めるため、他の解析方法を適用する必要があると予想される。

#### 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 2 種類の SNP アレイデータを用いたゲノムワイド関連研究及びメタアナリシスにより孤発性 ALS の発症年齢関連遺伝子の探索を行った。

#### 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。

2015年3月時点で、JaCALSには1023例の症例が登録されている。登録症例の内、809例に対し、SNPアレイ (Illumina HumanOmniExpressExome ver 1.0 / 1.2) 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。

本研究は、JaCALSにおいて発症年齢と SNP データが得られている 2 種類の SNP アレイデータ (ver1.1: 524, ver1.2:150 例) を使用して関連解析を進めた。個々の SNP アレイデータに対し、線形回帰分析を実施して、各 SNP と発症年齢の関連を評価した。従属変数には、発症年齢(単位: 年)、独立変数には SNP の遺伝子型、共変量には性別情報を使用した。SNP の遺伝子型は、Additive モデルに順じて数値化した。最終的に 2 種類の SNP アレイにおける解析結果をメタアナリシスにより統合した。

線形回帰分析には PLINK ver 1.07 を使用し、メタアナリシスには、METAL ver 2011-03-25 を使用した。

#### (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た。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。検体は匿名符号をつけ、連結可能匿名化して管理、解析を行った。

### C. 研究結果

メタアナリシスの結果、 $P < 1 \times 10^{-5}$  を示した SNP を 8 種確認した ( $P = 9.86 \times 10^{-6} \sim 9.54 \times 10^{-7}$ )。これらの個々の結果は下表に示す通りである。これらの SNP に対して、2 種類のデータ間での不均質性 (heterogeneity) の評価も行った所、どの SNP においても、有意 ( $P < 0.05$ ) な逸脱を示さなかった。

表. メタアナリシスで  $P < 1 \times 10^{-5}$  を示した 8 SNP

| SNP   | Alleles (a/A) | MAF   | $\beta \pm SE$   | P-value  |
|-------|---------------|-------|------------------|----------|
| SNP-A | T/C           | 0.036 | $8.19 \pm 1.67$  | 9.54E-07 |
| SNP-B | A/G           | 0.421 | $-2.83 \pm 0.60$ | 2.01E-06 |
| SNP-C | G/A           | 0.280 | $-3.07 \pm 0.68$ | 6.08E-06 |
| SNP-D | A/G           | 0.278 | $-3.05 \pm 0.68$ | 7.08E-06 |
| SNP-E | G/A           | 0.200 | $-3.50 \pm 0.79$ | 9.16E-06 |
| SNP-F | T/C           | 0.462 | $2.76 \pm 0.62$  | 9.23E-06 |
| SNP-G | A/G           | 0.200 | $-3.49 \pm 0.79$ | 9.39E-06 |
| SNP-H | A/G           | 0.024 | $-8.97 \pm 2.03$ | 9.86E-06 |

a: minor allele, A: major allele,

MAF: minor allele frequency,

$\beta$ : regression coefficient,

SE: standard error

### D. 考察

ALS の発症年齢についてゲノムワイド関連解析研究は、世界的にみて実施例が少ない。今後、関連解析を進める事で、これまで報告されていない発症年齢関連 SNP 又は遺伝子が同定されることが期待される。

本解析において、2 種類のデータ間で有意な不均質性 (heterogeneity) は観測されなかった。このことから両データ間で発症年齢と SNP の関連が同傾向で観測されていると期待できる。

本結果は  $P < 1 \times 10^{-5}$  を示す SNP を複数提示できたものの、どれもゲノムワイドな有意水準 ( $P < 1 \times 10^{-8}$ ) を示すまでには至らなかった。今後、部分集団構造 (population substructure) 等の共変量で補正することで検出力の向上を目指していく予定である。

### E. 結論

本研究では、ALS の発症年齢と関連する 8 種類の SNP を同定した。今後、頑健な結論を得るために、より検出力の高い解析方法を適用する必要があると考えられる。

(健康危険情報)



なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Arima C, Kajino T, Tamada Y, Imoto S, Shimada Y, **Nakatochi M**, Suzuki M, Isomura H, Yatabe Y, Yamaguchi T, Yanagisawa K, Miyano S, Takahashi T. Lung adenocarcinoma subtypes definable by lung development-related miRNA expression profiles in association with clinicopathologic features. *Carcinogenesis* 2014; 35(10): 2224-2231.
2. **Nakatochi M**, Ushida Y, Yasuda Y, Yoshida Y, Kawai S, Kato R, Nakashima T, Iwata M, Kuwatsuka Y, Ando M, Hamajima N, Kondo T, Oda H, Hayashi M, Kato S, Yamaguchi M, Maruyama S, Matsuo S, Honda H. Identification of an interaction between VWF rs7965413 and platelet count as a novel risk marker for metabolic syndrome: an extensive search of candidate polymorphisms in a case-control study. *PLoS One* 2015; 10(2): e0117591.

### 2. 学会発表

1. Okuma H, Koizumi F, Hirakawa A, **Nakatochi M**, Hashimoto J, Kodaira M, Yunokawa M, Yamamoto H, Yonemori K, Shimizu C, Fujiwara Y, Tamura K. Integrative analysis of two prospective neoadjuvant studies with breast cancer patients and microarray analysis. European Society of Medical Oncology, Spain, June 25-28, 2014.
2. **Nakatochi M**, Shimamura T. Construction of the integrated co-expression network including DNA methylation and gene-expression. Pacific Symposium on Biocomputing, USA, January 4-8, 2015
3. 本多裕之, 中柝昌弘, 片山真, 加藤竜司, 大河内美奈, 吉田安子. 全網羅ミルクペプチドアレイを用いたアレルギー診断ペプチド探索への分布関数解析法の応用. 化学工学会 第46回秋季大会・受賞記念講演, 福岡, 2014年9月17日~19日.
4. 清水忍, 平川晃弘, 鍬塚八千代, 室谷健太, 木下文恵, 中柝昌弘, 杉下明隆, 飯島祥彦, 加藤勝義, 安藤昌彦, 水野正明. 名古屋大学における臨床研究認定者制度に関する取

組み. ARO 協議会第2回学術集会, 京都, 2014年9月23-24日.

5. 肺癌において c-myc の転写活性と機能的に関わるマイクロRNAの同定と解析. タイメイチー, 梶野泰祐, 島田友香子, 有馬千夏, 中柝昌弘, 鈴木元, 三好浩之, 柳澤聖, 高橋隆. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014年9月25日~27日.
6. Hishida A, Zhao N, Wu MC, **Nakatochi M**, Naito M, Sasakabe T, Hattori Y, Suma S, Okada R, Kawai S, Morita E, Hamajima N, Tanaka H, Wakai K. A SNP-set kernel association test detected genetic pathway involved in persistent Helicobacter pylori infection. 第25回日本疫学会学術総会, 愛知, 2015年1月21日~23日.
7. Hattori Y, Hishida A, Morita E, **Nakatochi M**, Zhao N, Wu MC, Sasakabe T, Suma S, Okada R, Kawai S, Naito M, Hamajima N, Tanaka H, Wakai K. SNP-set kernel association test identified biological pathways associated with Japanese cedar and hinoki pollen allergy. 第25回日本疫学会学術総会, 愛知, 2015年1月21日~23日.
8. 平川晃弘, 清水忍, 鍬塚八千代, 室谷健太, 木下文恵, 中柝昌弘, 杉下明隆, 飯島祥彦, 加藤勝義, 安藤昌彦, 水野正明. 名古屋大学における臨床研究認定者制度に関する取組み. 日本臨床試験学会第6回学術集会総会, 東京, 2015年2月20-21日.

## G. 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

進行・予後を規定する遺伝子探索、発症に関わる遺伝子探索  
ゲノムワイド関連解析による孤発性 ALS 発症、進行・予後に関わる遺伝子の探索

担当責任者 池川 志郎

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

担当責任者 飯田 有俊

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 上級研究員

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)全体の90%を占める孤発性ALSは、遺伝的要因と環境的要因の相互作用によって発症するものと考えられている。その病像は極めて多様であり、現在まで孤発性ALSの発症、進行・予後に関与する遺伝子は、殆ど何も明らかになっていない。本研究は、ゲノム解析により、ALS発症、進行・予後に関わる遺伝因子を単離することを目的とした。これまでのALS症例一対照研究を統合してメタ解析を行い、 $10^{-6}$ 台のP値を示す46SNPsを同定した。また、ALS症例における種々の臨床情報と遺伝子型の解析から、ゲノムワイド関連解析の有意水準を満たす複数のSNPを同定した。

#### A. 研究目的

孤発性ALSの発症は、家族性ALSの発症とは異なり、遺伝因子と環境因子の相互作用によるものと考えられている。しかし、孤発性ALSは、極めて多様な臨床像を取り、これまでの様々な仮説に反して、発症機序のみならず進行・予後を規定する因子が何であるか殆ど明らかになっていない。

孤発性ALSに関するゲノム解析は、これまで主に欧米に於いてゲノムワイド関連解析(GWAS)が行われてきた。しかしながら、報告されたALS関連SNPは他集団において再現性が殆どなく、そればかりか、遺伝子多型頻度に明らかな人種差が存在する。

一方、本邦においては、ALSの国内研究共同体であるJaCALSが、孤発性ALS患者800症例以上の前向き臨床情報をデータベース化し、ALSに特化したDNAバンクで検体を収集、管理している。既に我々はALS340例と対照7,782

例を用いてGWASを行い、新規ALS易罹患性SNPを33SNPs同定してきた。

本研究はこれまでの研究リソースを用いてGWASからALSの発症、進行・予後に関わる遺伝因子を単離することを目的とした。

#### B. 研究方法

1) GWASメタ解析 家族ALS原因遺伝子の変異を持つ症例を除いたJaCALS由来のALS検体340例のSNPタイピングデータを評価し、解析した。対照は、日本人一般集団7,782例を用いた。全例についてSNPタイピングを行い、データの品質管理を行った。他方、バイオバンクジャパン由来のALS検体902例と対照2,061例を用いた。種々の統計解析より、これらの結果を統合してメタ解析を行った。さらに情報解析により、SNPの評価を行った。

2) ALS進行・予後に関わるSNPの解析 JaCALSで管理・保存されている465例についてHuman

OmniExpressExome BeadChip を使用して SNP タイピングを行い、個々の臨床情報と SNP の関連を解析した。さらに、追加症例 64 検体のタイピングを行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守した。研究計画は、理化学研究所をはじめ、研究に参加する全ての研究施設の倫理委員会で承認を得てから実施した。プライバシーの保護、人権擁護等の問題に十分配慮して、かつ個人情報の保管体制を十分に整え、文書でインフォームドコンセントの得られた試料を使用した。

### C. 研究結果

1) GWAS メタ解析: ALS1, 242 例、対照 9, 843 例を解析し、6 領域 (15q24、12q23、15q21、2p22、18q21、2q21)由来の 46SNPs が  $10^{-6}$  台の P 値を示した。最も相関が強いものは、15q24 の SNP で P 値は  $1.23 \times 10^{-6}$ 、オッズ比は 1.3 (95%CI 1.2-1.5)であった。この領域には、24 SNPs がマップされた。また、12q23 領域には、9 SNPs がマップされた。これらは、いずれにも新規の領域であった。

2) ALS 進行・予後に関わる SNP の解析: ALS 患者の経時的臨床像 (進行度、重症度等) と遺伝子型の関連を解析し、ゲノムワイド水準 ( $P=5 \times 10^{-8}$ ) を満たす SNP を複数同定した。

### D. 考察

ALS は、極めて多様な臨床像を呈する疾患である。それゆえ、ALS の病態解明には、これまで欧米で行われてきたような症例—対照研究のみならず、大規模な前向き臨床情報を用いて多面的に解析することが重要である。本研究において、ALS 発症に関する候補遺伝子については、まだ解析の途中であるが、興味深い領域も

含まれているので、追加検体を用いた追試が必要である。また、ALS の臨床情報を用いた病態解析より、病像や経過・予後の解明、治療法の開発の手がかりが発見された可能性がある。今後、さらに詳細な検討が必要となる。

### E. 結論

大規模 ALS 患者コホートの臨床情報とゲノム解析により、発症、進行・予後に関わる SNP と新規 ALS 関連遺伝子候補を同定した。

#### (健康危険情報)

なし

### F. 研究発表

1. 論文発表  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)  
なし

2. 学会発表

熱田直樹、渡辺はづき、中村亮一、平川晃弘、中朽昌弘、渡辺宏久、伊藤瑞規、千田譲、和泉唯信、梶龍兒、森田光哉、富山弘幸、谷口彰、溝口功一、狩野修、阿部康二、中野今治、池川志郎、飯田有俊、祖父江元  
ALS の進行を規定する因子の探索同定  
第 55 回日本神経学会、2014 年 5 月、福岡、日本

### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発明者 飯田有俊、池川志郎、中村祐輔、祖父江元

名称 ZNF512B 遺伝子の一塩基多型に基づく筋萎縮性側索硬化症の検査方法

特許番号 5643933

登録日 平成 26 年 11 月 14 日

2. 実用新案登録 なし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

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

進行・予後を規定する遺伝子探索、発症に関わる遺伝子探索  
次世代シーケンサーを基盤としたALSの発症・病態関連遺伝子の探索、解析

担当責任者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科 教授  
熱田 直樹 名古屋大学医学部附属病院 病院講師  
研究協力者 曾根 淳 名古屋大学大学院医学系研究科 寄附講座助教  
中村 亮一 名古屋大学医学部附属病院 医員

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の 5-10% は家族性であり、90%以上は孤発性である。家族性 ALS の原因となる遺伝子異常は多数同定されてきているが、孤発性 ALS の関連遺伝子は十分に解明されていない。本研究では、ALS 患者の大規模前向きコホート（JaCALS）において収集されたゲノム遺伝子を基に次世代シーケンサーを応用した精度の高い ALS 関連遺伝子の解析、エクソーム解析を行い、既知の ALS 関連遺伝子の孤発性 ALS における影響について解析した。

#### A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の根本的治療法開発は喫緊の課題であり、そのためには病態関連遺伝子、分子の同定が必要である。家族性 ALS の原因遺伝子の一部は既に明らかとなっているが、大部分を占める孤発性 ALS 関連遺伝子は十分に分かっていない。孤発性 ALS の病態に関連する遺伝子を見出し、根本的治療法の開発を推進することが求められている。ALS 患者の大規模前向きコホート（JaCALS）のゲノム遺伝子リソースを用いた大規模ゲノム解析により孤発性 ALS の疾患関連遺伝子を探索同定することを目的とする。

#### B.研究方法

SOD1、TDP-43、FUS などを含む 28 種類の既知の ALS 疾患関連遺伝子について、次世代シーケンサーを用いた網羅的なシーケンシングシステムを構築し、解析を行った。ALS 患者 256 例について、Ion AmpliSeq™ Custom Panel を用い、28 遺伝子のエクソン部分を増幅するプライマーペアのセットを作成、multiplex PCR 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 Touch2™システム、Ion PGM™シーケンサーを用いて多サンプルを同時に網羅的なゲノム配列解析を行った。また一方で、Agilent 社の SureSelect ターゲットエンリッチシステムを用いて、全エクソン領域のゲノム解析を行うシステムを構築した。Covaris 社の超音波破碎システム Covaris S220 および LifeTechnology 社の LibraryBuilder を用いて、高品質なライブラリをハイスループットに作成した。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、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、HGVDなどを始めとするデータベース上の variant 情報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。

ALS 患者 252 例について、Agilent SureSelect Human All Exon V5+UTR を用いたエクソンキ