

## 家族性 ALS の臨床像と遺伝学的背景の解析

研究分担者：青木 正志

東北大学大学院医学系研究科 神経内科学分野

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 ( amyotrophic lateral sclerosis, ALS ) は運動ニューロンが選択的変性・脱落をきたす神経変性疾患であり、国内外で増加中ながら根本的治療が未確立ゆえに、その調査研究は厚生労働行政において重要である。ALS 全体の 5 ~ 10% を占める家族性 ALS は人種差が知られ、本邦における頻度、臨床像、遺伝学的背景を明らかにする必要がある。家族性 ALS の臨床情報と生体試料を継続的に収集し、自験 134 家系を対象に臨床像と網羅的な遺伝子の解析をおこない、45% において病原遺伝子変異を同定し、1 家系に新規 VCP 変異を見出した。さらに、ALS 関連遺伝子において複数の候補変異を検出しており、引き続き機能解析を行っていく。一方、ALS 同様の難治性神経変性疾患であるタウオパチーの生体脳内病変を  $^{18}\text{F}$ -THK5351 PET を用いて可視化し、タウオパチー鑑別診断における有用性を検討したところ、CBS と PSP の鑑別では中心前回、CBS と AD、PSP と AD の鑑別には下側頭回が有用であった。 $^{18}\text{F}$ -THK5351 PET は CBS のサロゲートマーカー、タウオパチー鑑別診断のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

研究 1：筋萎縮性側索硬化症 ( ALS ) は運動ニューロンが選択的変性・脱落をきたす成人発症の神経変性疾患であり、その 5~10% は家族性に発症し家族性 ALS とよばれる。家族性 ALS では現在まで 30 近くの関連遺伝子が同定されているが、本邦における頻度、臨床像、遺伝学的背景は十分解明されていない。本研究では日本人家族性 ALS の遺伝学的背景を解明し、その臨床像を明らかにして両者の関連を探索する。

研究 2：ALS と同様に難治性神経変性疾患であるタウオパチーには、大脳皮質基底核症候群 ( CBS )、進行性核上性麻痺 ( PSP )、Alzheimer 病 ( AD ) といった疾患群が含まれ、タウオパチー内で鑑別が難しいことがある。これらの進行を客観的かつ非侵襲的に評価できるサロゲートマーカーが必要である。CBS における病理学的特徴はアストロサイト斑な

どにみられるタウ凝集体の蓄積とモノアミン酸化酵素 B ( MAO-B ) 増加を伴うグリオーシスである。我々はタウ凝集体ならびに MAO-B に結合するトレーサー  $^{18}\text{F}$ -THK5351 を用いて、CBS 患者の生体脳内のタウ凝集体と MAO-B の経時的变化を評価した。また、タウオパチーの鑑別診断における有用性についても検討した。

### B. 研究方法

研究 1：これまで集積した日本人家族性 ALS 家系に新たな 23 家系を加えた 134 家系を対象とした。まず臨床情報から臨床像 ( 表現型 ) の抽出をおこなった後、解析対象遺伝子を従来の 35 遺伝子から、新規 23 家系では 63 遺伝子へと拡大しターゲットリシーケンス解析を実施した。同定された変異はサンガー法で再現性を確認した。続いて病的変異が同定されていない試料

はエクソーム解析を実施した。なお、欧米で頻度の高い *C9ORF72* リピート異常伸長の有無は repeat-primed PCR 法で確認した。

研究 2-1：CBS 5 名と年齢を一致させた正常健常者 (NC) 4 名に約 1 年の間隔において、<sup>18</sup>F-THK5351 PET を 2 回施行した。PMOD ver. 3.6 (PNEURO) を用いて両側中心前回、中心後回、上前頭回、上頭頂回、淡蒼球、被殻、小脳皮質に関心領域 (VOI) をおき、各領域の SUV 値を算出した。各領域と小脳皮質との比 (SUV<sub>R</sub>) を用いて CBS 患者群と NC 群の集積の経時的変化について比較検討した。

研究 2-2：CBS 12 名、PSP 14 名 (全て PSP-RS)、AD 10 名、NC 10 名に <sup>18</sup>F-THK5351 PET を施行した。同様に PMOD ver. 3.6 (PNEURO) を用いて、51 カ所の VOI を設定し、各領域の SUV 値を算出した。各領域と小脳皮質の比 (SUV<sub>R</sub>) を用いて <sup>18</sup>F-THK5351 集積を評価した。各疾患の鑑別に Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を用いて、area under the curve (AUC) 値を算出し検討した。

研究 2-3：PSP 19 名 (PSP-RS 14 名、PSP-P 5 名)、PD 7 名に <sup>18</sup>F-THK5351 PET を施行した。研究 2-2 と同様の方法で解析検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針、およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って実施された。また、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会にて承認されている。

### C. 研究結果

研究 1：分担研究者らの施設で集積してきた日本人家族性 ALS 134 家系の臨床像と遺伝学的背景を解明した。111 家系において全 35 遺伝子を解析対象としたターゲットリシーケンス解析を行った後、新たに集積した 23 家系においては全 63 遺伝子を対象として解析

を行い、病原遺伝子変異未同定例に対してエクソーム解析を実施した。遺伝子型と臨床的表現型の比較解析を継続して行った。

25 の *SOD1* 変異を 41 家系 (31%) に同定した。*SOD1* 変異例は平均発症年齢 48.4 歳、平均罹病期間は 4.9 年で孤発例に比べやや若年、下肢発症、長期経過例が多くみられた。8 家系に同定した H46R 変異が最多であり、下位運動ニューロン障害主体、下肢発症型という特徴を認めた。続いて、ホモ接合性は急速進行、ヘテロ接合性は比較的長期経過を示すという特徴を有する L126S 変異を 5 家系に認めた。家系内でも表現型が多様で低浸透率を呈する N86S 変異を 4 家系に認めた。変異によって地域的集積を認めた。

12 家系 (9%) に同定した *FUS* 変異は、若年発症・上肢近位筋もしくは頸筋発症で進行が速いという特徴があった。さらに、3 家系 (2%) に *TARDBP* 変異を同定し、急速進行例 (p.G376D 変異) に関して臨床的特徴と表現型解析に関する論文報告を行った。また、p.N345K 変異例について病理学的検知を得た。加えて 1 家系に *OPTN* の p.E478G 変異を同定した。

沖縄出身の 1 家系においては、近位筋優位運動感覚ニューロパチーの病的変異である *TFG* 変異を同定した。また、遺伝性痙攣性対麻痺に関連する *ALDH18A1* 変異を見出した。

総じて 45% の日本人家族性 ALS 家系において病原遺伝子変異を同定し、1 家系には家系内で疾患に連動して伝搬される新規 *VCP* 変異を見出した。新規の病因変異を同定すべく絞り込みを実施し、*TBKI*、*ANXA11*、*KIF5A* といった ALS 関連遺伝子において複数の候補変異を検出しており、引続き機能解析により病原性を解明していく。

研究 2-1：CBS 患者群において、約 1 年後に上頭頂回 (6.53%)、中心前回 (4.34%)、中心後回 (4.33%) で有意に <sup>18</sup>F-THK5351 の集

積増加を認めた ( $p < 0.05$ )。一方、NC 群では  $^{18}\text{F}$ -THK5351 の有意な集積増加領域はなかった ( $p > 0.05$ )。

研究 2-2: NC 群と比較して、CBS 群では中心前回、中心後回、淡蒼球、中脳で、PSP 群では中脳、淡蒼球で、AD 群では下側頭回、紡錘状回で  $^{18}\text{F}$ -THK5351 集積亢進を認めた。いずれの疾患群もタウ関連病理に一致して、 $^{18}\text{F}$ -THK5351 の高集積を認めていた。CBS と PSP の鑑別では中心前回 ( $\text{AUC} = 0.917$ )、CBS と AD、PSP と AD の鑑別には下側頭回 ( $\text{AUC} = 0.992, 0.993$ ) が有用であった。

研究 2-3: PD 群と比較して、PSP (全体) 群では補足運動野、淡蒼球、中脳、小脳白質、大脳白質などで、PSP-RS 群では補足運動野、淡蒼球、視床、中脳、小脳白質、大脳白質で、PSP-P 群では小脳白質、大脳白質で  $^{18}\text{F}$ -THK5351 集積亢進を認めた。PSP と PD の鑑別では小脳白質 ( $\text{AUC} = 0.917$ )、大脳白質 ( $\text{AUC} = 0.835$ )、中脳 ( $\text{AUC} = 0.827$ ) が有用であり、PSP-RS と PD の鑑別には小脳白質 ( $\text{AUC} = 0.939$ )、中脳 ( $\text{AUC} = 0.878$ )、淡蒼球 ( $\text{AUC} = 0.827$ )、PSP-P と PD の鑑別には大脳白質 ( $\text{AUC} = 0.886$ )、小脳白質 ( $\text{AUC} = 0.857$ ) が有用であった。

#### D. 考察

研究 1: 日本人家族性 ALS 新規家系を加えた自験 134 家系の臨床像 (表現型) とその約半数の遺伝学的背景を明らかにすることができた。あらためて本邦家族性 ALS の遺伝学的背景は欧米のそれと異なることが明らかとなり、遺伝子変異の頻度における人種差と、分子病態の多様性が示唆された。続く機能解析にて複数の候補遺伝子変異の病原性解明が期待される。

研究 2: CBS における  $^{18}\text{F}$ -THK5351 の増加率は AD の増加率とほぼ一致していた。経時的に集積亢進を示した領域は、CBS の病理でタウ凝

集体の蓄積が多くみられる領域と一致していた。CBS の生体脳内病変の経時的变化を可視化できたと考えられる。

CBS、PSP、AD の各患者群で  $^{18}\text{F}$ -THK5351 の集積パターンは異なり、中心前回や下側頭回が鑑別に有用であった。 $^{18}\text{F}$ -THK5351 はタウオパチーの疾患鑑別に有用なトレーサーであることが示唆された。

PSP 群と PD 群では  $^{18}\text{F}$ -THK5351 の集積パターンが異なり、小脳白質や大脳白質の VOI が PSP と PD の疾患鑑別に有用であることが示唆された。

#### E. 結論

本研究調査により、日本人家族性 ALS の臨床症状 (表現型) と遺伝学的背景の解明がさらに進んだ。このような多様性が解明されることで、ALS 診断基準の改訂にもつながると期待される。ALS 同様の難治性神経変性疾患であるタウオパチーにおいて、CBS におけるタウ関連皮質病変の進行をモニターするサロゲートマーカーとなる可能性が示唆された。また、PSP と PD の鑑別に  $^{18}\text{F}$ -THK5351 が有用である可能性を示した。これらの研究成果は ALS やタウオパチーに限らず、広く難治性希少疾患を対象とした厚生労働行政・難病施策への貢献につながると期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hayashi N, Atsuta N, Yokoi D, Nakamura R, Nakatochi M, Katsuno M, Izumi Y, Kanai K, Hattori N, Taniguchi A, Morita M, Kano O, Shibuya K, Kuwabara S, Suzuki N, **Aoki M**, Aiba I, Mizoguchi K, Oda M, Kaji R, Sobue G. Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis patients undergoing tracheostomy invasive

ventilation therapy in Japan. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2020; 91: 285-290.

Yu Y, Nakagawa T, Morohoshi A, Nakagawa M, Ishida N, Suzuki N, **Aoki M**, Nakayama K, Pathogenic mutations in the ALS gene C9orf72 cause cytoplasmic mislocalization of Cyclin F and elevated VCP ATPase activity, **Hum Mol Genet** 2019; 28: 3486-3497.

Takeda T, Iijima M, Shimizu Y, Miyashiro M, Onizuka H, Yamamoto T, Nishiyama A, Suzuki N, **Aoki M**, Shibata N, Kitagawa K. **Neuropathology** 2019; 39: 286-293.

Warita H, Kato M, Asada R, Yamashita A, Hayata D, Adachi K, **Aoki M**. Safety, Tolerability, and Pharmacodynamics of Intrathecal Injection of Recombinant Human HGF (KP-100) in Subjects With Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Phase I Trial. **J Clin Pharmacol** 2019; 59: 677-687.

Inoue-Shibui A, Kato M, Suzuki N, Kobayashi J, Takai Y, Izumi R, Kawachi Y, Kuroda H, Warita H, **Aoki M**. Interstitial pneumonia and other adverse events in riluzole-administered amyotrophic lateral sclerosis patients: a retrospective observational study. **BMC Neurol** 2019; 19: 72.

Akiyama T, Suzuki N, Ishikawa M, Fujimori K, Sone T, Kawada J, Funayama R, Fujishima F, Mitsuzawa S, Ikeda K, Ono H, Shijo T, Osana S, Shiota M, Nakagawa T, Kitajima Y, Nishiyama A, Izumi R, Morimoto S, Okada Y, Kamei T, Nishida M, Nogami M, Kaneda S, Ikeuchi Y, Mitsuhashi H, Nakayama K, Fujii T, Warita H, Okano H, **Aoki M**. Aberrant axon branching via Fos-B dysregulation in FUS-ALS motor neurons. **EBioMedicine** 2019; 45: 362-378.

Eura N, Sugie K, Suzuki N, Kiriyama T, Izumi T, Shimakura N, Kato M, **Aoki M**. A juvenile sporadic amyotrophic lateral sclerosis case with P525L mutation in the FUS gene: A rare

co-occurrence of autism spectrum disorder and tremor. **J Neurol Sci** 2019; 398: 67-68.

Miyabayashi T, Ochiai T, Suzuki N, **Aoki M**, Inui T, Okubo Y, Sato R, Togashi N, Takashima H, Ishiura H, Tsuji S, Koh K, Takiyama Y, Haginoya K. A novel homozygous mutation of the *TFG* gene in a patient with early onset spastic paraplegia and later onset sensorimotor polyneuropathy. **J Hum Genet** 2019; 64(2):171-176.

Ezura M, Kikuchi A, Ishiki A, Okamura N, Hasegawa T, Harada R, Watanuki S, Funaki Y, Hiraoka K, Baba T, Sugeno N, Oshima R, Yoshida S, Kobayashi J, Kobayashi M, Tano O, Nakashima I, Mugikura S, Iwata R, Taki Y, Furukawa K, Arai H, Furumoto S, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y, Takeda A, **Aoki M**. Longitudinal changes in <sup>18</sup>F-THK5351 PET in corticobasal syndrome. **Eur J Neurol** 2019; 26: 1205-1211.

Fujimori K, Ishikawa M, Otomo A, Atsuta N, Nakamura R, Akiyama T, Hadano S, **Aoki M**, Saya H, Sobue G, Okano H. Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. **Nat Med** 2018; 24(10): 1579-1589.

Shijo T, Warita H, Suzuki N, Ikeda K, Mitsuzawa S, Akiyama T, Ono H, Nishiyama A, Izumi R, Kitajima Y, **Aoki M**. Antagonizing bone morphogenetic protein 4 attenuates disease progression in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. **Exp Neurol** 2018; 307: 164-179.

Mitsuzawa S, Akiyama T, Nishiyama A, Suzuki N, Kato M, Warita H, Izumi R, Osana S, Koyama S, Kato T, Suzuki Y, **Aoki M**. *TARDBP* p.G376D mutation, found in rapid progressive familial ALS, induces mislocalization of TDP-43. **eNeurologicalSci** 2018; 11: 20-22.

Mitsui S, Otomo A, Nozaki M, Ono S, Sato K,

Shirakawa R, Adachi H, Aoki M, Sobue G, Shang HF, Hadano S. Systemic overexpression of SQSTM1/p62 accelerates disease onset in a *SOD1*<sup>H46R</sup>-expressing ALS mouse model. **Mol Brain** 2018; 11(1): 30.

Imaizumi K, Fujimori K, Ishii S, Otomo A, Hosoi Y, Miyajima H, Warita H, Aoki M, Hadano S, Akamatsu W, Okano H. Rostrocaudal Areal Patterning of Human PSC-Derived Cortical Neurons by FGF8 Signaling. **eNeuro** 2018; 5(2).

Tohna G, Nakamura R, Sone J, Nakatochi M, Yokoi D, Katsuno M, Watanabe H, Watanabe H, Ito M, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Onodera O, Naruse H, Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Ishiura H, Morishita S, Yoshimura J, Doi K, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Atsuta N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALs). Frequency and characteristics of the TBK1 gene variants in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiol Aging** 2018; 64: 158.e15-158.e19.

Shijo T, Warita H, Suzuki N, Kitajima Y, Ikeda K, Akiyama T, Ono H, Mitsuzawa S, Nishiyama A, Izumi R, Aoki M. Aberrant astrocytic expression of chondroitin sulfate proteoglycan receptors in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurosci Res** 2018; 96: 222-233.

Yoshida S, Hasegawa T, Suzuki M, Sugeno N, Kobayashi J, Ueyama M, Fukuda M, Ido-Fujibayashi A, Sekiguchi K, Ezura M, Kikuchi A, Baba T, Takeda A, Mochizuki H, Nagai Y, Aoki M. Parkinson's disease-linked *DNAJC13* mutation aggravates alpha-synuclein-induced neurotoxicity through perturbation of endosomal trafficking. **Hum Mol Genet** 2018; 27: 823-836.

Nishiyama A, Niihori T, Warita H, Izumi R, Akiyama T, Kato M, Suzuki N, Aoki Y, Aoki M. Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiol Aging** 2017; 53: 194.e1-194.e8.

Baba T, Hosokai Y, Nishio Y, Kikuchi A, Hirayama K, Suzuki K, Hasegawa T, Aoki M, Takeda A, Mori E. Longitudinal study of cognitive and cerebral metabolic changes in Parkinson's disease. **J Neurol Sci** 2017; 372: 288-293.

Hasegawa T, Sugeno N, Kikuchi A, Baba T, Aoki M. Membrane trafficking illuminates a path to Parkinson's disease. **Tohoku J Exp Med** 2017; 242: 63-76.

## 2. 学会発表

秋山徹也, 鈴木直輝, 石川 充, 川田治良, 藤井輝夫, 藤島史喜, 舟山 亮, 中山啓子, 三橋弘明, 割田 仁, 岡野栄之, 青木正志. Elucidating axonal pathophysiology under fused in sarcoma (*FUS*)-mutant ALS motor neurons. 第 60 回日本神経学会学術大会 (大阪) 2019 年 5 月 22 ~ 25 日.

鈴木直輝, 川田治良, 秋山徹也, 光澤志緒, 加藤昌昭, 割田 仁, 藤井輝夫, Kevin Eggan, 岡野栄之, 青木正志. Motor nerve organoid to analyze axonal degeneration as the early event in ALS. 同上.

割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 秋山徹也, 光澤志緒, 中村尚子, 小野洋也, 西山 亜由美, 鈴木直輝, 青木正志. Microvasculature as a pro-inflammatory component in a rat model of ALS. 同上.

四條友望, 割田 仁, 鈴木直輝, 池田謙輔, 光澤志緒, 秋山徹也, 小野洋也, 西山 亜由美, 井泉瑠美子, 青木正志. BMP4, a bone morphogenetic protein, accelerates disease progression of amyotrophic lateral sclerosis.

同上.

林 直毅, 熱田直樹, 横井大知, 中村亮一, 勝野雅央, 和泉唯信, 金井数明, 服部信孝, 谷口 彰, 森田光哉, 狩野 修, 澁谷和幹, 桑原 聡, 鈴木直輝, **青木正志**, 餐場育子, 溝口功一, 梶 龍兒, 祖父江 元, JaCALS. 多施設共同前向きコホートでみた ALS 患者の背景と予後因子の検討. 同上.

菊池昭夫, 江面道典, 岡村信行, 長谷川隆文, 石木愛子, 原田龍一, 菅野直人, 吉田隼, 小林潤平, 荒井啓行, 谷内一彦, 古本祥三, 田代 学, 工藤幸司, 武田 篤, **青木正志**.  $^{18}\text{F}$ -THK5351 PET による進行性核上性麻痺とパーキンソン病の鑑別の検討. 同上.

渡辺靖章, 中川 直, 鈴木直輝, 割田 仁, 中山啓子, **青木正志**. ALS-associated *C21ORF2* mutation enhances the autoregulation mechanism of NEK1. 第 59 回日本神経学会学術大会 (札幌) 2018 年 5 月 23 ~ 26 日.

西山亜由美, 鈴木直輝, 割田 仁, 井泉瑠美子, 島倉奈緒子, 秋山徹也, 長名シオン, 加藤昌昭, 新堀哲也, 青木洋子, **青木正志**. Genotype-phenotype analysis of Japanese familial ALS pedigrees with *SOD1* mutations. 同上.

鈴木直輝, 秋山徹也, 川田治良, Feng Tian, 石川 充, 曾根岳史, 藤盛康希, 光澤志緒, 小野洋也, 長名シオン, 池田謙輔, 四條友望, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 加藤昌昭, 割田 仁, 岡野栄之, 藤井輝夫, Kevin Eggan, **青木正志**. Substantial axonal degeneration has occurred before motor neuron loss in ALS models. 同上.

割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 秋山徹也, 小野洋也, 光澤志緒, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 鈴木直輝, **青木正志**. Cytoplasmic aggregation involving RNA-binding proteins in spinal cord of ALS model rats. 同上.

澁井 彩, 加藤昌昭, 鈴木直輝, 井泉瑠美子, 川内裕子, 割田 仁, **青木正志**. リルゾール投与中止に至った筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 複数例の検討. 同上.

Nishiyama A, Niihori T, Warita H, Izumi R, Akiyama T, Kato M, Suzuki N, Aoki Y, **Aoki M**. Targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis reveals differences in the genetic variations across populations. XXIII World Congress of Neurology (Kyoto: September 19, 2017)

Shijo T, Warita H, Suzuki N, Ikeda K, Akiyama T, Ono H, Mitsuzawa S, Nishiyama A, Izumi R, **Aoki M**. Bone morphogenetic protein 4 is up-regulated in a Rat model of amyotrophic lateral sclerosis. Same as above.

Kikuchi A, Okamura N, Hasegawa T, Ezura M, Baba T, Sugeno N, Yoshida S, Kobayashi J, Arai H, Furumoto S, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y, Takeda A, **Aoki M**.  $^{18}\text{F}$ -THK5351 PET in corticobasal syndrome. Same as above.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む.)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし