

ALS と FTLD レジストリの構築と解析

研究分担者： 祖父江 元
学校法人愛知医科大学

研究要旨

2006 年から登録を継続している ALS 患者大規模レジストリ (JaCALS) は参加施設を 41 施設に拡大し、合計 2235 例の ALS 患者を登録している。登録患者の縦断的臨床情報に加えて遺伝子検体、不死化リンパ球および不死化リンパ球からの患者由来 iPS 細胞パネルを蓄積している。この研究リソースを活用し、孤発性 ALS の多様な表現型に関連するゲノム因子を明らかにし、患者 iPS 細胞由来運動ニューロンの表現型評価から創薬に向けた薬剤検証を試みている。これらは孤発性 ALS の heterogeneity を克服し、画期的な病態解析、創薬を推進する重要基盤になりうると考えられる。神経内科施設と精神科施設から構成された前頭側頭型認知症の前方向的コホート研究体制 (FTLD-J) は、大阪大学精神医学教室が事務局を務める体制を構築し、212 例の登録が行われた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療法開発は悲願であるが、近年 ALS の病態に関連する遺伝子が多数同定され、中枢神経に介入する技術の進歩もあり、治療開発のチャンスが広がっている。孤発例においても発症に関わる遺伝子に加えて、個別の患者で異なる多様な疾患修飾遺伝子(modifier gene)・分子の存在が想定され、これらを同定したうえで、標的遺伝子、分子に介入する治療開発を行う必要がある。しかし神経変性疾患に対する治療開発は、未だ方法論が確立していない。

我が国の多施設共同 ALS 患者レジストリ JaCALS では ALS 患者の縦断的な臨床情報、ゲノム DNA、不死化細胞を蓄積している。これらを統合した解析により、ALS に対する革新的な治療開発を目指す。

前頭側頭葉変性症 (FTLD) は精神症状、言語症状、運動症状など多彩な症状を呈する

一方で、特徴的な物忘れを呈しない例も多く、診断が困難な例や認知症と診断されていない例も存在する。本邦を含む東アジア圏と欧米にて家族歴の頻度や背景となる遺伝子変異が大きく異なることが報告されており、治療に向けた研究を開始するに当たり、本邦における FTLD の特徴を明らかにすることが重要である。神経内科施設と精神科施設から構成された前頭側頭型認知症の前方向的コホート研究体制 (FTLD-J) を構築し症例の蓄積を進めた。

B. 研究方法

多施設共同 ALS 患者レジストリ JaCALS について、登録にあたっては、全例で文書によるインフォームドコンセントを取得し、臨床調査票や血液検体はすべて登録施設内で符号化を行った。通常の静脈採血で得られた血液を外部委託施設 (SRL) において DNA

抽出および B-cell line 作成を行い、検体保存センターに送付し、保存している。医師による臨床評価は、病型、初発症状、肺活量、各種神経所見、重症度、各処置の導入時期などにつき行い、日常生活活動度 (ADL) の評価は日本版 ALSFRS-R を用いている。ALSFRS-R は代表的な ALS 疾患特異的重症度スケールであり、多くの臨床試験で評価項目として用いられている。臨床調査票の回収は訪問 CRC が行い、訪問時に調査票の不備について確認し、必要に応じて担当医に確認、修正している。規約に基づき運営委員会を組織し、蓄積された検体の研究活用について、管理する体制としている。

経管栄養導入や呼吸器装着などの病気の進行を示す重要なイベントおよび ALSFRS-R について、3 ヶ月に一度、臨床研究コーディネーター (CRC) 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る調査を実施している。ALS 患者の多くは、大学病院などの基幹病院で診断された後、自宅近くの病院に通院したり、ADL 低下のために往診のみになるなど、通院先を変えていくことが多い。そのため、全体の経過を最初に登録した施設のみで追跡・把握することは難しいことから、問診型のプロトコルを作成し、これを用いて CRC が一定の手順で電話調査を行うシステム (BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 63:491-496, 2011) を確立した。登録した施設での診療が継続されている患者については、医師による臨床評価を一年に一回実施するものとした。CRC には、研究の概要、関連する倫理指針、研究実施手順、既知の ALS 臨床像、患者および介護者に対して行うべき配慮等に関する研修を実施している。

FTLD-J について、behavioral variant FTD (bvFTD) および semantic dementia (SD) を対象

として、文書でのインフォームドコンセントのもと臨床情報と生体試料の収集を行った。臨床情報としては、患者背景/症状/重症度：FTLD-J 臨床情報調査シート、精神神経徴候/ADL 評価：Cambridge Behavioral Inventory、介護者負担：Zarit 介護者負担尺度・介護状況調査シート、高次脳機能検査：ACE-R (施行が困難な例は MMSE・語想起)、FAB、WAB について収集した。生体試料は血漿/ゲノム DNA および脳脊髄液の収集を行った。

(倫理面への配慮)

人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に従い、倫理審査承認と参加施設の長による実施許可を得て、参加者の文書によるインフォームドコンセントを取得して実施した。

C. 研究結果

孤発性 ALS 患者と正常コントロールとのゲノムワイド関連解析 (GWAS) により得られたリスク遺伝子多型情報を用いて、遺伝子多型と遺伝子発現との関連データベース、化合物ライブラリーと遺伝子発現との関連データベースを使った統合解析により、孤発性 ALS における遺伝子発現変化を逆転、正常化させうる化合物候補を抽出した。これらの治療候補化合物を ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンの経時的神経突起長の変化パターンを用いて、有効性の検証を行ったところ、5 種類の薬剤で表現型の改善が得られた。

長期のフォローアップが得られている孤発性 ALS 患者 1076 例の生存期間と関連する遺伝子多型を GWAS にて同定し、それが患者 iPS 細胞由来運動ニューロンで再現されることを示した。さらに ALS 患者の発症年齢と関わるゲノム因子を探索する GWAS を実施した。JaCALS の 1807 例で、線形回

帰分析を用いて SNP と発症年齢の関連を検討し、ゲノムワイド有意($P < 5 \times 10^{-8}$)な関連を示す SNP を同定した。得られた回帰係数から、この SNP の T アレルを一つ持つ場合、持たない場合と比べて 4.1 歳早く発症することが示された。この SNP について、独立したサンプル(ALS 患者) 203 例で再現性を確認することができた。

FTLD-J は大阪大学精神医学教室が事務局を務める体制を構築し、212 例の登録が行われた。登録例の症例検討会を進めている。FTLD をきたす疾患に含まれる 4 リピートタウオパチーと ALS における TDP-43 病理を介した共通病態を解明し、バイオマーカー、治療標的分子を探索する解析を行った。進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD)、ALS、FTLD の患者剖検組織をもちいて、これらに共通した病態関連タンパクの異常がないかを探索した。特に、ALS の重要病変である運動ニューロンに注力して解析を行った。脊髄運動ニューロンの TDP-43 病理 (核外移行と細胞質内凝集) は PSP の約 40%、CBD の約 60% でみられた。凝集体の形態的・電顕的特徴は ALS のそれと類似していた。ミクログリアの反応は TDP-43 の凝集量と相関した。

さらに、近年 ALS・FTLD の疾患制御タンパクとして同定された SFPQ (Splicing Factor Proline/Glutamine Rich) の核内発現を、脊髄運動ニューロンで検討した。正常ならばみられるはずの SFPQ と FUS (fused-in-sarcoma) との会合が、PSP・CBD・ALS 患者の脊髄運動ニューロンでは障害されていた。また 4 リピートタウもしくは TDP-43 凝集のあるニューロンでは SFPQ の発現が低下ないし消失していた。

D. 考察

孤発性 ALS の発症に加えて、発症年齢や発症後の予後など多様な表現型に対してゲノム因子が関連していることが示された。

孤発性 ALS においても患者 iPS 細胞由来運動ニューロンの表現型評価により、薬剤の検証に活用できる可能性が示された。

運動ニューロン TDP-43 病理は、PSP・CBD と ALS との共通した所見であり、SFPQ/FUS の会合不全はこれに相関すると考えられた。

E. 結論

孤発性 ALS の発症、phenotype、予後に関わる遺伝子、分子の同定、検証から創薬に結び付ける研究コンセプトが大きく進展した。大規模疾患レジストリは、孤発性 ALS の heterogeneity を克服し、画期的な病態解析、創薬を推進する重要基盤であると考えられる。

運動ニューロン TDP-43 病理は、PSP・CBD と ALS との共通した病態を示唆する。その共通病態に、SFPQ の機能不全が関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表 (2020/4/1~2023/3/31 発表)

1. 論文発表

Riku Y, Iwasaki Y, Ishigaki S, Akagi A, Hasegawa M, Nishioka K, Li Y, Riku M, Ikeuchi T, Fujioka Y, Miyahara H, Sone J, Hattori N, Yoshida M, Katsuno M, Sobue G. Motor neuron TDP-43 proteinopathy in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain* 145(8) 2769-2784. 2022

Yokoi S, Ito T, Sahashi K, Nakatochi M,

Nakamura R, Tohnai G, Fujioka Y, Ishigaki S, Udagawa T, Izumi Y, Morita M, Kano O, Oda M, Sone T, Okano H, Atsuta N, Katsuno M, Okada Y, Sobue G. The SYNGAP1 3'UTR Variant in ALS Patients Causes Aberrant SYNGAP1 Splicing and Dendritic Spine Loss by Recruiting HNRNPK. *J Neurosci*. 42(47) 8881-8896. 2022

Ohdake R, Watanabe H, Kawabata K, Ogura A, Sato M, Tanaka Y, Imai K, Masuda M, Kato T, Yokoi T, Hara K, Nakamura R, Atsuta N, Nakagawa M, Katsuno M, Sobue G. Convenient Auditory-Based Language and Executive Function Test for Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Pilot Study. *Arch Clin Neuropsychol*. 38(1) 57-71. 2023

Serum asymmetric dimethylarginine level correlates with the progression and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. Ikenaka K, Maeda Y, Hotta Y, Nagano S, Yamada S, Ito D, Torii R, Kakuda K, Tatebe H, Atsuta N, Aguirre C, Kimura Y, Baba K, Tokuda T, Katsuno M, Kimura K, Sobue G, Mochizuki H. *Eur J Neurol*. 2022 Jan 19.

Mutation screening of the DNAJC7 gene in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Tohnai G, Nakamura R, Atsuta N, Nakatochi M, Hayashi N, Ito D, Watanabe H, Watanabe H, Katsuno M, Izumi Y, Taniguchi A, Kanai K, Morita M, Kano O, Kuwabara S, Oda M, Abe K, Aoki M, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Ishihara T, Kawata A, Yokota T, Hasegawa K, Nagano I, Yabe I, Tanaka F, Kuru S, Hattori N, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for

Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS).

Neurobiol Aging. 2021 Dec 11:S0197-4580(21)00358-4.

Fiber-specific white matter analysis reflects upper motor neuron impairment in amyotrophic lateral sclerosis. Ogura A, Kawabata K, Watanabe H, Choy SW, Bagarinao E, Kato T, Imai K, Masuda M, Ohdake R, Hara K, Nakamura R, Atsuta N, Nakamura T, Katsuno M, Sobue G. *Eur J Neurol*. 2022 Feb;29(2):432-440.

2. 学会発表

特別講演「神経変性疾患の治療法開発の時代へ」、祖父江元、次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム 2022、2022/8/27

ALSに対する precision medicine に向けて、熱田直樹、中村亮一、藤内玄規、祖父江元、第 63 回日本神経学会学術大会シンポジウム、2022/5/21

ムーンショット型研究開発：疾患の予測・予防を目指す革新的イノベーション創出、祖父江元、第 62 回日本神経学会学術大会シンポジウム、2021 年 5 月 21 日

A multi-ethnic meta-analysis identifies novel genes, including ACSL5, associated with ALS、中村亮一、熱田直樹、藤内玄規、中柝昌弘、林直毅、渡辺宏久、勝野雅央、和泉唯信、服部信孝、森田光哉、谷口彰、狩野修、織田雅也、桑原聡、梶龍兒、桃沢幸秀、三澤計治、長崎正朗、祖父江元、JaCALS、

第 62 回日本神経学会学術大会、2021 年 5 月 21 日

ALS のゲノム研究、熱田直樹、中村亮一、藤内玄規、祖父江元、第 62 回日本神経学会学術大会シンポジウム、2021 年 5 月 22 日

An ALS patient SynGAP 3' UTR variant at the FUS binding site causes aberrant SynGAP splicing and spine abnormalities by recruiting hnRNPK. Satoshi Yokoi, Takuji Ito, Kentaro Sahashi, Ryoichi Nakamura, Shinsuke Ishigaki, Naoki Atsuta, Katsuno Masahisa, Yohei Okada, Gen Sobue. PACTALS 2021 NAGOYA 2021 年 9 月 17 日～18 日 web 開催

Genome-wide meta-analysis identifies novel genes, including ACSL5, associated with amyotrophic lateral sclerosis. Ryoichi Nakamura, Kazuharu Misawa, Genki Tohnai, Masahiro Nakatochi, Naoki Atsuta, Naoki Hayashi, Masahisa Katsuno, Yuishin Izumi, Nobutaka Hattori, Mitsuya Morita, Akira Taniguchi, Osamu Kano, Masaya Oda, Satoshi Kuwabara, Ryuji Kaji, Jun-ichi Niwa, Manabu Doyu, Masao Nagasaki, Gen Sobue, the Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research : JaCALs. PACTALS 2021 NAGOYA 2021 年 9 月 17 日～18 日 web 開催

Genetic analysis of KIF5A gene in Japanese patients with sporadic ALS. Ryoichi Nakamura, Naoki Atsuta, Genki Tohnai, Masahiro Nakatochi, Naoki

Hayashi, Masahisa Katsuno, Yuishin Izumi, Akira Taniguchi, Nobutaka Hattori, Mitsuya Morita, Osamu Kano, Satoshi Kuwabara, Masaya Oda, Koji Abe, Kouichi Mizoguchi, Ryuji Kaji, Jun-ichi Niwa, Manabu Doyu, Gen Sobue, the Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research : JaCALs. PACTALS 2021 NAGOYA 2021 年 9 月 17 日～18 日 web 開催

Mutation screening of the DNAJC7 gene in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Genki Tohnai, Ryoichi Nakamura, Naoki Atsuta, Masahiro Nakatochi, Naoki Hayashi, Masahisa Katsuno, Yuishin Izumi, Akira Taniguchi, Nobutaka Hattori, Mitsuya Morita, Osamu Kano, Satoshi Kuwabara, Masaya Oda, Koji Abe, Kouichi Mizoguchi, Ryuji Kaji, Gen Sobue. PACTALS 2021 NAGOYA 2021 年 9 月 17 日～18 日 web 開催

Motor neuron TDP-43 proteinopathy in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. Riku Y, et al. 日本神経学会学術総会 2021 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記なし。