

筋萎縮性側索硬化症の進行を示すバイオマーカー

三本 博^{1)*} 齋藤 豊和²⁾

要旨：現在、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) の治療には 2 種類の薬剤が使用されているが、さらに効果的な治療が必要である。そのためには、臨床的な治療効果判定を補助する信頼性の高いバイオマーカー (biomarker; BM) の開発が必須である。神経生理学的 BM と神経画像法 BM は ALS の疾患を理解する上で重要で、興味を引くものの、BM としては高価であり、さらに充分なる研究が要求される。一方、体液を使用する BM にはクレアチニン (creatinine; Crn)、尿酸 (uric acid; UA)、2 種のニューロフラメント (pNF-H と NFL) があり、共に ALS の進行を示唆する可能性が報告されている。Crn と UA は安価であり、また NF は多くの研究室でも研究可能なので、今後、臨床治療試験などあらゆる機会においてこれらの更なる信頼性が研究されるべきである。(臨床神経 2018;58:729-736)

Key words：筋萎縮性側索硬化症、バイオマーカー、クレアチニン、尿酸、ニューロフラメント

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) のバイオマーカー (biomarker; BM) という概念は比較的新しく^{1)~3)}、ALS の進行を示す BM の重要性・必要性が臨床治療試験 (臨床治験) の発展と共に確認されてきた⁴⁾⁵⁾。

Mildvan ら⁶⁾ は臨床の代替マーカー (surrogate marker) を開発するには、まず第一に疾患の自然経過を確立し、BM がその臨床経過を忠実に再現することが必須であるとした。ALS はいまだ原因不明の疾患であり、しかもその臨床像は多様であるため、ALS の進行を示す BM の開発はことのほか難しいとされている。それでも明らかな進歩が見えてきている⁷⁾⁸⁾。このレビューでは客観的な検査法である神経生理学的、神経画像法や体液を基にした BM の現状 (Table 1) をレビューしつつ、できれば将来への示唆を加えてみたい。

神経生理学的バイオマーカー

(1) 運動単位数推定 (motor unit number estimation; MUNE)
運動単位 (motor unit) の数を推定する方法は McComb ら⁹⁾ と Brown ら¹⁰⁾ が始めたが、運動単位数推定 (motor unit number estimation; MUNE) を ALS の臨床に応用したのは Shefner ら¹¹⁾ であり、経時的变化を示すことをクレアチニン (creatinine; Crn) の臨床治験で示した¹²⁾。MUNE 法には統計法と多数点

Table 1 Biomarkers that predict disease progression in ALS (currently under investigation).

Electrophysiological Biomarkers

Motor unit number estimate (MUNE)
Electrical impedance myography (EIM)
Transcranial magnetic stimulation (TMS)

Brain Imaging

Magnetic resonance imaging (MRI)
Magnetic resonance spectroscopy (MRS)
Positron emission tomography (PET) scan

Biochemical Biomarkers

Plasma creatinine (Crn)
Plasma uric acid-urate (UA)
Plasma lipid profile
Oxidative stress chemicals

Newly Reported Biomarkers

Neurofilaments (NF)
Urinary p75
Biological biomarker

での刺激法 (multipoint stimulation; MPS) とがあるが¹¹⁾¹³⁾、MUNE は統計的仮説に基づいており、テクニックを均一にするのが難しく、特定の筋しか検索できず、しかも下位運動ニューロンの異常しか調べることができないなど、幾つかの

*Corresponding author: Eleanor and Lou Gehrig ALS Center, Department of Neurology, Columbia University Medical Center [710 West 168th Street, New York, NY, 10032 USA]

¹⁾ Eleanor and Lou Gehrig ALS Center, Department of Neurology, Columbia University Medical Center

²⁾ 北里大学名誉教授 (現：医療法人興生会 相模台病院)

(Received August 28, 2018; Accepted October 2, 2018; Published online in J-STAGE on November 29, 2018)

doi: 10.5692/clinicalneurolog.cn-001220

問題点がある¹¹⁾¹³⁾。以前、我々 (Hiroshi Mitsumoto; HM) の研究チーム (以下 HM チーム) は幾つかの BM の信憑性を ALS 患者で検討し、MPS による MUNE 法は臨床的 BM (ALSFRS-R と FVC) の次に ALS の進行度を正確に示したため、BM として使用し得る可能性を示した⁴⁾¹³⁾。

(2) 電気抵抗ミオグラフィ (electrical impedance myography; EIM)

EIM は筋肉内の局在する組織の電気抵抗を測定し、筋肉の健康度を電氣的に示す非侵襲的テストである¹⁴⁾。EIM は ALS の臨床的評価法と相関を示し、しかも疾患の進行を示すことが報告されているが¹⁵⁾¹⁶⁾、今後 EIM が実際に臨床治験に使用され、その有用性がテストされるか否かが大きな問題となっている。

(3) 経頭蓋磁気刺激法 (transcranial magnetic stimulation; TMS)

TMS は 1998 年に欧米の三つの研究グループが ALS 患者に起こる中枢性運動伝導速度 (cortical motor conduction time; CMCT) の変化と上位運動ニューロンの異常興奮性を研究する方法を報告した^{17)~19)}。HM チームも ALS の客観的 BM の検索で CMCT がどのように ALS の進行とともに変化するかを調べ、CMCT は MUNE よりも劣るものの ALS の進行速度と相関した⁴⁾²⁰⁾。Weber ら²¹⁾は、運動神経細胞の興奮に引き続いて起る postsynapse の反応を報告し、その反応はピークの遅れ、興奮時間の遷延、反応の非同調性がみられ、この変化は ALS の進行に沿って著明な変化を示した。その後も TMS はオーストラリアの研究グループで続けられ、BM として使用できる可能性を示唆した²²⁾。大脳運動皮質の興奮過剰性は孤発性 ALS の初期に既にみられ、家族性 ALS では臨床症状の出現以前に表れているとの指摘もある²²⁾。Short interval intracortical inhibition (SICI) と CMCT の延長は共に ALSFRS-R の減少と良い相関を示しており、これらの TMS による検査は疾患進行を示す BM であり得る可能性がある²³⁾²⁴⁾。

脳イメージングによるバイオマーカー

(1) 磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging; MRI)

ALS の脳画像法で最も良く知られている変化は、内包後脚の 2/3 に丸くみられる異常像で、大脳皮質脊髄路の構造的異常を反映している²⁵⁾。最近報告された MRI のフレア画像を使用すると皮質脊髄路の異常を量的に示すことができる。この報告によれば、フレア画像の異常は ALS 機能と相関し、BM になる可能性を示した²⁶⁾。現在の脳画像法の研究は複数の画像法を組み合わせ、脳機能を含めた検索がなされるようになり、大脳皮質の細線化、脳局部の萎縮と神経線維の異方向性 (anisotropy) の異常と ALSFRS-R の減少との相関性を探索している^{27)~29)}。脳画像が ALS 進行を忠実に表わしているかどうかは今後の研究に委ねられる。

(2) 磁気共鳴スペクトロスコピー (magnetic resonance spectroscopy; MRS)

MRS により脳細胞とその突起に存在する N-アセチル・アスパラギン酸塩 (NAA) を頭蓋外から計測することができる²⁵⁾。この方法では ALS の前頭葉で NAA が著明に減少していることが示されている³⁰⁾。HM チームは工学的にさらに進んだ方法を用い、運動皮質のみの MRS を計測できる方法 (MRS Imaging) を用いて NAA を計測すると、予想通り正常よりも著明に減少していることを見出した⁴⁾。NAA の減少を経時的に調べると、その変化は臨床的 BM や生理学的 BM に比べて極めて少なく、我々が研究した時点では MRS を BM として使うことは MR 機器そのものの進歩がない限り困難と結論した⁴⁾。数多くの MRS 研究があるが、BM として用いることのできる研究はない。一方、全脳の MRS を計測する方法が開発されたが、これによると NAA の減少のみが ALS の機能障害と相関を示した³¹⁾。最近、7 テスラーなる強力な MR 機器で ALS の MRS を調べたところ、ベースラインの検索で全 NAA (NAA と NAAG の合計) は努力肺活量 (FVC) と、NAA はクレアチンとの比率で ALSFRS-R と良く相関することが報告されている³²⁾が、MRS が ALS の進行を示す BM となり得るかは将来の研究にかかっていると云えよう。

(3) PET スキャン (positron emission tomographic scan; PET scan)

初めて陽電子放射形コンピュータ断層撮影法 (PET スキャン) を使用して、放射性 [18F] を標的にしたグルコースの脳内糖代謝を ALS 患者で検索したのは 1980 年代であり³³⁾、ALS 患者では糖代謝の減少が前頭葉の運動領野のみでなく、広範に脳代謝の異常が起こっていることが認められた。30 年を経過した現在、GABA 系の神経細胞やグリア細胞などを標的にした PET スキャンの検索が行われており、ALS での診断的価値も示されている。しかしながら PET スキャンの研究方法にもいろいろ問題があることも指摘されており³⁴⁾、Alshikho ら²⁸⁾は [11C]-PBR28 を使用して ALS 患者のグリア細胞の増加の有無を経時的に調べたが 6 か月間では変化がみられなかったと報告している。PET スキャンが ALS の進行を示す BM として使用される可能性は MRS 同様将来に待たなければならない。

体液におけるバイオマーカー

(1) 血中クレアチニン (creatinine; Crn)

血中 Crn の検査は腎不全との関連で 1950 年代から使用されてきている。体内のクレアチン (creatinine; Cr) は 94% 前後が筋肉にあり、Crn は高エネルギー磷酸 Cr の最終代謝物質である³⁵⁾。1980 年代から ALS 患者では尿中 Crn が増加していることは知られていた³⁶⁾。最近になり血中 Crn レベルにより ALS の生存期間を予測できることが報告され³⁷⁾、さらにこれに続いてデキシプラミベキソールの効果が陰性であった臨床治療データを再解析したところ、この薬剤に効果のあったグループは血中 Crn レベルが高く、生存期間と強い相関を示し、

Table 2 Creatinine (Crn) as a biomarker.

Investigators	Research Design	Number of Patients	Correlations with Crn	Additional Comments
Paillisse et al. 2005 ³⁷⁾	Prospective observational	2,069	Positive correlation with survival period	Leukocytes and other 12 variables showed positive correlations
Ikeda et al. 2012 ³⁸⁾	Cross-sectional study	92	Negative correlations with ALSFRS-R and FVC	TC, LDL-C, urate, and ferritin showed similar correlations
Chiò et al. 2014 ³⁹⁾	Study through ALS Registry	Discovery group, 712 patients and confirmation groups, 122 patients	Positive correlation with survival	Albumin showed a similar correlation
Bozik et al. 2014 ⁴⁰⁾	EMPOWER clinical trial and post-hoc analyses	943 patients	Positive correlation between Crn decline and ALSFRS-R decline. Significantly less decline in Dex-treated group	Crn seems to be a reliable biomarker for ALS
Atassi et al. 2014 ⁴¹⁾	PRO-ACT database	>8,600	Positive correlations with ALSFRS-R, FVC, and survival period	Uric acid showed similar correlations
Patin et al. 2015 ⁴²⁾	Retrospective study	216	Correlation with disease progression	Similar findings with ferritin
van Eijk et al. 2018 ⁴³⁾	Meta-analysis	1,241	Positive correlations with ALSFRS-R and survival period ($P = 0.001$)	22% of patient enrollment can be reduced if the study period is prolonged to 18 month
Mitsumoto et al. 2018 (under preparation)	ALS COSMOS, prospective observational study	346	Positive correlations at baseline with ALSFRS-R, FVC, and survival period	Lower Crn levels were associated with shorter survival

ALSFRS-R: ALS functional rating scale-revised, FVC: forced vital capacity, Dex: dexpropamprone, PRO-ACT: Pooled Resource Open-Access ALS Clinical Trials database, ALS COSMOS: ALS cohort study of multicenter oxidative stress.

血中 Crn レベルが臨床治験の BM である可能性を示唆した。Table 2 にこれまで検索された血中 Crn の BM としての可能性を示した^{37)~44)}。さらに現在論文準備中であるが⁴⁵⁾ (Table 2), HM チームが施行している多施設による研究⁴⁴⁾でも血中 Crn が疾患の進行を示す BM になる可能性を見出している。すなわち、血中 Crn レベルは生存期間を予測し、ALS の機能障害 (ALSFRS-R と FVC) と強い相関があり、さらに疾患の進行と血中 Crn の経時的変化にも相関がみられた。Crn は過去数十年、通常の血液検査の一項目であり、新鮮さに欠け、何ら魅力的なものではないが、Karitzky ら⁴⁵⁾の指摘の如く、「格好な生化学的 BM が必要である」という点から言えば、これ以上安上がりな BM はない。ALS 患者では腎不全に陥ることは極めて稀で、ALS としての診断的特異性はないが、ALS 患者群の中では筋萎縮の過程を忠実にあらわすマーカーとして、臨床治験を含めてすべての臨床研究で血中 Crn レベルを幅広くテストされるべきである。

(2) 血中尿酸・尿酸塩 (uric acid・uric acid salt; UA)

様々な神経変性疾患 (特にパーキンソン病や多発性硬化症など) や中枢神経系の炎症性疾患で UA が減少していることが指摘されてきた⁴⁶⁾。2009 年、ALS 患者でも UA の減少が報告され、その減少度は ALSFRS-R の進行と相関することが示され⁴⁷⁾、さらに ALS 患者では血中 UA レベルが正常人よりも低いという報告⁴⁸⁾⁴⁹⁾、UA レベルは男性のみに生存期間を予測できることが指摘された⁵⁰⁾⁵¹⁾。PROACT なる ALS 臨床治験の集積データとデキシプラミペキソールの臨床治験データ

の分析からも、血中 UA レベルは生存期間を予測できることが示されている⁵²⁾⁵³⁾。ALS の疾患重症度を統計的調節に加えて統計分析してみると、血中 UA レベルと ALS の生存期間とに明らかな相関が得られ⁵²⁾、さらに血中 UA レベルは ALS の疾患進行速度と負の相関を示し⁴⁹⁾、疾患進行の予知が可能としている³⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁴⁾。

血中 UA レベルが ALS の BM として考えられることは非常に興味深い。UA は DNA/RNA の構成物質であるプリン最終代謝物質であるが、この UA は血中でフェントン反応を起こす移行性金属 (transitional metal) をキレートし、さらに過酸化物質・水酸化遊離物の酸化作用を抑制する抗酸化機能を有している^{55)~58)}。興味あることにエダラポンを投与された患者では血中 UA レベルが対照群に比して有意に高く、UA がペリオキシ亜硝酸塩 (酸化ストレス物質) に対する効果的な抗酸化・清掃作用を有している結果を示している⁵⁹⁾。血中 UA レベルは ALS の進行を示す BM として、血中 Crn と同様に今後 ALS の臨床治験などあらゆる機会に血中 UA と同時検索を行い、BM としての有用性をさらに研究すべきである。

(3) 血中脂質

ALS 患者では血中脂質が増加していることは以前に報告されていたが⁶⁰⁾、新たに 2008 年 Dupuis らは脂質異常と生存期間延長の相関を示し、血中コレステロール値と high density lipoprotein (HDL)/low density lipoprotein (LDL) の比が高い ALS 患者は平均で 12 か月生存期間が延長するという報告であった⁶¹⁾。この驚くべき報告に続き数多くの検討が行われた。報

告の半数はDupuisらの結果を再現したが、残りの半数は生存期間の延長を見出せなかった。しかしながらALS患者で見られる脂質異常は興味深い。その理由として中枢神経組織の構造は脂質に大きく左右されるからであり、その幾つかについての文献を示すのみとするが^{62)~64)}、ALSには脂質の質的・量的異常があると考えられ、今後体液中の脂質がBMとなる可能性は高い。

(4) 酸化ストレス化合物

酸化ストレスはALSの病態に深く関与していることが知られている⁶⁵⁾。ALS患者では尿中の酸化ストレスマーカー(アイソプロテイン・8-オキシデオキグアノシン)が明らかに増加しており⁶⁶⁾、最近の報告では種々の酸化ストレスマーカーが異常に増加していることが報告されている⁶⁷⁾。エダラボンを用いた初期の臨床試験では、6か月間エダラボンを投与されたALS患者の髄液中の3-ニトロタイロシン(蛋白酸化ストレスマーカーの一つ)が有意に減少していた⁶⁸⁾。酸化ストレスのBMもまた今後の研究課題である。

最近新しく開発されたバイオマーカー

(1) ニューロフィラメント (neurofilament; NF)

ALSの下位および上位運動ニューロンとその軸索に起こるNFの異常は脳病理学的検索で報告されてきた^{69)~71)}。1987年、BrownらはALSの血清中にneurofilament light chain (NFL) (後述)と思われる抗体の増加を報告した⁷²⁾。その後20年を経てNFの重要性が再び注目された。NFには三つのsubunitが存在するが、分子量の大きいNF-heavy (NF-H)がリン酸化されたNF (phosphorylated neurofilament-heavy; pNF-H)の血中レベルがALS患者で増加していることがBoylanらにより報告された⁷³⁾⁷⁴⁾。血中pNF-Hレベルは生存期間の短縮と相関し⁷⁴⁾、髄液中pNF-HレベルはC9orf72に変異を有する患者にも見出され、その高値は疾患進行速度と生存期間の短縮と相関を示した⁷⁵⁾。髄液中のpNF-HレベルはALS診断にとって88%の特異性と91%の感受性を示した⁷⁶⁾。さらにpNF-Hを髄液中と血中濃度で同時に測定した報告では、髄液、血中で共に著明な増加がみられ、疾患の進行と相関した⁷⁷⁾。難点はpNF-Hの測定がかなり困難なことにある⁷⁸⁾。

NFの小さいsubunit light chainはNFLと呼ばれ、これに対する髄液・血中濃度を測定すると、髄液のNFLはALS診断にとり最も高い特異性と感度を示したが、NFLレベルは疾患の進行中には変化がなかったものの、NFLの血中量は死亡率と相関を示した⁷⁹⁾⁸⁰⁾。またNFL量の高いグループはdiffusion tensor imaging (DTI)の分割アニソトロピー (fractional anisotropy)が低下しており、MR画像法で放射状拡散率の亢進しているグループに属していることから、この結果は皮質脊髄路の神経線維の破壊の結果であると考えられた⁸¹⁾。Gilleら⁸²⁾は血中NFL量の増加は下位運動ニューロンの疾患からではなく、上位運動ニューロン障害によるものであるとしてMenke⁸¹⁾の結論を支持している。

Xuら⁸³⁾は2016年までのALSのNFのデータをレビューし、他の疾患と比較したところ、ALSの生存期間を予測するBMとして価値あることを示した。Poesenら⁷⁶⁾は、ALSの診断的信憑性を検索する目的で、ALS(220名)の髄液中のpNF-HとNFLレベルを他の神経疾患(316名)、ALS類似疾患(50名)と比較し、pNF-HはALSの診断的特異性が高いことを示したが、ALSの進行を示すBMとして使用されるためには更なる検討が必要であると結論している。Rossiら⁸⁴⁾は髄液のpNF-HとNFLのレベルを非炎症性神経疾患と比較してALSの診断に特異性がみられたことを指摘した。

発症時からのALS疾患の進行度を示す指標として Δ FSが提唱されている⁸⁵⁾。これは健康時の全スコア48から検査時の患者のALSFRS-Rのスコアの差を症候発症から検査までの期間(月数)で割った数であるが、pNF-HとNFLレベルともにこの疾患進行度と良い相関関係がみられたという⁸⁵⁾。

ALSの経過中、どの時点でNFが増加するかについては不明である。家族性ALSの家族で非発病者と発症者で髄液のpNF-H、血中・髄液中のNFLレベルを見ると、発症者のみにNFの増加がみられ、NFの増加はALSの症候に伴って起こっていることが指摘された⁸⁶⁾。ドイツの多施設による研究グループは、髄液中のNFL、pNF-Hと血中NFLレベルをALS初期と後期で、さらに他神経疾患とALS類似疾患で測定し、診断に関してはALSで感度、特異性共に90%以上で、ALSにおけるNFの有用性を示した⁸⁷⁾。pNF-HやNFLはこれまで短期間に数多く研究されてきた。ALS研究者がいかにNFに関して期待しているかが伺える。NFがALS疾患の進行を示すBMとして確固たる位置を得るにはさらに多方面からの研究が必要であるが、今後の新しい臨床試験には血中NFLを測定することを強く勧めたい。

(2) 炎症反応を示すBM

信頼性のBMを探るために髄液のプロテオミクス解析を行い、3種のチトテリオリナーゼ(CHIT1, CHIL1, CHI3L2)を同定した⁸⁸⁾。これら3種の酵素は貪食細胞の活性を示す酵素と考えられている。これらの酵素のうち、CHI3L1はALSと原発性側索硬化症(PLS)で測定開始時には既に正常より高値であり、3種の酵素は疾患の進行と共に上昇し、さらに髄液のpNF-Hレベルと良い相関を示した⁸⁸⁾。

他のBMとしてC反応性蛋白(CRP)が挙げられる。血中CRP値をALS患者(394名)で測定したところベースラインのALSFRS-Rの全スコアと相関を示し、さらに生存期間を予測することが可能であった。ALS患者でのCRP値の上昇はNP001の臨床試験から見出されたもので、現在NP001の臨床試験の患者選択とALSの進行を示すBMとして用いられている⁸⁹⁾。

(3) 低親和性神経成長因子受容体 (p75)

p75は、神経成長とは反対の細胞死と関係が深い。細胞外に突出しているこの受容体の断片は尿中へ無変化で排泄されるため、これを同定することで細胞死の程度が分かると考えられている⁹⁰⁾。Shepherdら⁹¹⁾によるとALSではこのp75が

Table 3 Key ALS biomarkers: advantages and shortcomings.

Biomarker	Correlation with survival	Correlation with ALS function	Accessibility	Portability	Simplicity	Cost	RCT experience
NUNE	unknown	yes	training needed	easy	complex	relatively cheap	yes
EIM	unknown	yes	training needed	easy	complex	relatively cheap	no
TMS	unknown	yes	training needed	hard	complex	expensive	no
MRI	unknown	uncertain	hard	hard	complex	expensive	no
MRS	unknown	yes	hard	hard	complex	expensive	no
PET	unknown	unknown	hard	hard	complex	highly expensive	no
Crn	yes	yes	easy	easy	simple	cheap	yes
UA	yes	yes	easy	easy	simple	cheap	no
NF	yes	yes/no	training needed	easy	simple	relatively cheap	no

Crn: creatinine, UA: uric acid, NF: neurofilaments, RCT: randomized control trials.

著明に尿中に増加しており、症状発症から p75 測定までの期間と生存期間に強い相関を示した。問題点は p75 レベルを尿中 Crn を基準にしたことである。ALS では血中 Crn が疾患の進行とともに減少し、これに伴い尿中 Crn も減少する。従って尿中 p75 の経時的な増加は人工的に誇張される危険性があり、尿の比重を用いるべきである。

おわりに

現在までに研究された ALS の BM を示し、著者の個人的な判定を加えたものを Table 3 に示した。現在までに ALS の進行を明らかに示す BM はないものの、BM を開発しようとする活発な動きがある。筋萎縮を示す血中 Crn、抗酸化現象を示すと考えられている血中 UA は BM として最も広く研究され、臨床治験等のあらゆる ALS 研究の機会に使用されるべきである。進歩しつつある BM のうち、血中 NF はさらに検索を加える価値がある。神経生理学的検査法はさらに広く研究者に認識される必要がある。脳画像法は ALS 診断に価値がありそうであるが、検査法のテクノロジー自体の進歩が要求される。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体として、

研究費・助成金：三本 博：CDC, MDA Wings Over Wall Street, Tsumura, Cytokinetics

文 献

- Bradley WG. Biological markers in amyotrophic lateral sclerosis: help or hindrance? *J Neurol* 1999;246 Suppl 3:III13-15.
- Simpson EP, Henry YK, Henkel JS, et al. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: a potential biomarker of disease burden. *Neurology* 2004;62:1758-1765.
- Pasinetti GM, Ungar LH, Lange DJ, et al. Identification of potential CSF biomarkers in ALS. *Neurology* 2006;66:1218-1222.
- Mitsumoto H, Ulug AM, Pullman SL, et al. Quantitative objective markers for upper and lower motor neuron dysfunction in ALS. *Neurology* 2007;68:1402-1410.
- Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V, et al. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol* 2014;13:1127-1138.
- Mildvan D, Landay A, De Gruttola V, et al. An approach to the validation of markers for use in AIDS clinical trials. *Clin Infect Dis* 1997;24:764-774.
- Vu LT, Bowser R. Fluid-based biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotherapeutics* 2017;14:119-134.
- Benatar M, Boylan K, Jerome A, et al. ALS biomarkers for therapy development: State of the field and future directions. *Muscle Nerve* 2016;53:169-182.
- Galea V, de Bruin H, Cavasin R, et al. The numbers and relative sizes of motor units estimated by computer. *Muscle Nerve* 1991;11:1123-1130.
- Doherty TJ, Brown WF. The estimated numbers and relative sizes of thenar motor units as selected by multiple point stimulation in young and older adults. *Muscle Nerve* 1993; 16:355-366.
- Shefner JM, Cudkovicz ME, Zhang H, et al. The use of statistical MUNE in a multicenter clinical trial. *Muscle Nerve* 2004;30:463-469.
- Shefner JM, Cudkovicz M, Schoenfeld D, et al. A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology* 2004;63:1656-1661.
- Gooch CL, Pullman SL, Shungu DC, et al. Motor unit number estimation (MUNE) in diseases of the motor neuron: utility and comparative analysis in a multimodal biomarker study. *Suppl Clin Neurophysiol* 2009;60:153-162.
- Rutkove SB, Zhang H, Schoenfeld DA, et al. Electrical impedance myography to assess outcome in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *Clin Neurophysiol* 200;118:2413-2418.
- Rutkove SB, Caress JB, Cartwright MS, et al. Electrical impedance myography as a biomarker to assess ALS progression. *Amyotroph Lateral Scler* 2012;13:439-445.
- Rutkove SB, Caress JB, Cartwright MS, et al. Electrical impedance myography correlates with standard measures of ALS severity. *Muscle Nerve* 2014;49:441-443.
- Mills KR, Nithi KA. Peripheral and central motor conduction

- in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998;159:82-87.
- 18) Urban PP, Vogt T, Hopf HC. Corticobulbar tract involvement in amyotrophic lateral sclerosis. A transcranial magnetic stimulation study. *Brain* 1998;121:1099-1108.
 - 19) Eisen A, Nakajima M, Weber M. Corticomotorneuronal hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998; 160 Suppl 1:S64-S68.
 - 20) Floyd AG, Yu QP, Piboolnurak P, et al. Transcranial magnetic stimulation in ALS: Utility of central motor conduction tests. *Neurology* 2009;72:498-504.
 - 21) Weber M, Eisen A. Peristimulus time histograms (PSTHs)- a marker for upper motor neuron involvement in ALS? *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1 Suppl 2:S51-S56.
 - 22) Vucic S, Ziemann U, Wisen A, et al. Transcranial magnetic stimulation and amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiological insights. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:1161-1170.
 - 23) Shibuya K, Park SB, Geevasinga N, et al. Motor cortical function determines prognosis in sporadic ALS. *Neurology* 2016;87:513-520.
 - 24) Shibuya K, Simon NG, Geevasinga N, et al. The evolution of motor cortical dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol* 2017;128:1075-1082.
 - 25) Chan S, Kaufmann P, Shungu DC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and primary lateral sclerosis: evidence-based diagnostic evaluation of the upper motor neuron. *Neuroimaging Clin N Am* 2003;13:307-326.
 - 26) Fabes J, Matthews L, Filippini N, et al. Quantitative FLAIR MRI in amyotrophic lateral sclerosis. *Acade Radiol* 2017;24:1187-1194.
 - 27) Menke RAL, Proudfoot M, Talbot K, et al. The two-year progression of structural and functional cerebral MRI in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroimage Clin* 2017;17:953-961.
 - 28) Alshikho MJ, Zurcher NR, Loggia ML, et al. Integrated MRI and [¹¹C]-PBR28 PET imaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2018;83:1186-1197.
 - 29) Geevasinga N, Korgaonkar MS, Menon P, et al. Brain functional connectome abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis are associated with disability and cortical hyperexcitability. *Eur J Neurol* 2017;24:1507-1517.
 - 30) Chan S, Shungu DC, Douglas-Akinwande, et al. Motor neuron diseases: comparison of single-voxel proton MR spectroscopy of the motor cortex with MR imaging of the brain. *Radiology* 1999;212:763-769.
 - 31) Stagg CJ, Knight S, Talbot K, et al. Whole-brain magnetic resonance spectroscopic imaging measures are related to disability in ALS. *Neurology* 2013;80:610-615.
 - 32) Atassi N, Xu M, Triantafyllou C, et al. Ultra high-field (7tesla) magnetic resonance spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2017;12:e0177680.
 - 33) Dalakas MC, Hatazawa J, Brooks RA. Lowered cerebral glucose utilization in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1987;22: 580-586.
 - 34) Chiò A, Pagani M, Agosta F, et al. Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *Lancet Neurol* 2014;13:1228-1240.
 - 35) Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 2000;80:1107-1213.
 - 36) Corbett AJ, Griggs RC, Moxley RT. Skeletal muscle catabolism in amyotrophic lateral sclerosis and chronic spinal muscular atrophy. *Neurology* 1982;32:550-552.
 - 37) Paillisse C, Lacomblez L, Bensimon G, et al. Prognostic factors for survival in amyotrophic lateral sclerosis patients treated with riluzole. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2005;6:37-44.
 - 38) Ikeda K, Hirayama T, Takazawa T, et al. Relationship between disease progression and serum levels of lipid, urate, creatinine and ferritin in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis: a cross-section study. *Intern Med* 2012;51:1501-1508.
 - 39) Chiò A, Calvo A, Bovio G, et al. Amyotrophic lateral sclerosis outcome measures and the role of albumin and creatinine: a population-based study. *JAMA Neurol* 2014;71:1134-1142.
 - 40) Bozik ME, Mitsumoto H, Brooks BR, et al. A post hoc analysis of subgroup outcomes and creatinine in the phase III clinical trial (EMPOWER) of dexamipexole in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2014;15:406-413.
 - 41) Atassi N, Berry J, Shui A, et al. The PRO-ACT database: design, initial analyses and predictive features. *Neurology* 2014; 83:1719-1725.
 - 42) Patin F, Corcia P, Madji Hounoum B, et al. Biological follow-up in amyotrophic lateral sclerosis: decrease in creatine levels and increase in ferritin levels predict poor prognosis. *Eur J Neurol* 2015;22:1385-1390.
 - 43) van Eijk RPA, Eijikemans MJC, Ferguson TA, et al. Monitoring disease progression with plasma creatinine in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018;89:156-161.
 - 44) Mitsumoto H, Facto-Litvak P, Andrews H, et al. ALS Multi-center Cohort Study of Oxidative Stress (ALSCOSMOS): study methodology. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2014;15:192-203.
 - 45) Karitzky J, Ludolph AC. Imaging and neurochemical markers for diagnosis progression in ALS. *J Neurol Sci* 2001;25:35-41.
 - 46) Ilull L, Amaro S, Chamorro A. Administration of uric acid in the emergency treatment of acute ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2016;16:4.
 - 47) Keizman D, Ish-Shalom M, Berliner S, et al. Low uric acid levels in serum of patients with ALS: further evidence for oxidative stress. *J Neurol Sci* 2009;285:95-99.
 - 48) Abram A, Drory VE. Influence of serum uric acid levels on prognosis and survival in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol* 2014;261:1133-1138.
 - 49) Oh S, Baek S, Park JS, et al. Prognostic role serum levels of uric acid in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Neurol* 2015;11: 376-382.
 - 50) Zoccollella S, Simone IL, Capozzo R, et al. An exploratory study of serum urate levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2011;258:238-243.
 - 51) Paganoni S, Zhang M, Quiroz Zárate A, et al. Uric acid levels predict survival in men with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2012;259:1923-1938.
 - 52) Paganoni S, Nicholson K, Chan J, et al. Urate levels predict survival in amyotrophic lateral sclerosis: Analysis of the expanded Pooled Resource Open-Access ALS clinical trials

- database. *Muscle Nerve* 2018;57:430-434.
- 53) O'Reilly ÉJ, Liu D, Johns DR, et al. Serum urate at trial entry and ALS progression in EMPOWER. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 2016;28:1-6.
- 54) Kuffner R, Zach N, Norel R, et al. Crowdsourced analysis of clinical trial data to predict amyotrophic lateral sclerosis progression. *Nat Biotechnol* 2015;33:51-57.
- 55) Cutler RG, Camandola S, Malott KF, et al. The role of uric acid and methyl derivatives in the prevention of age-related neurodegenerative disorders. *Curr Top Med Chem* 2015;15:2233-2238.
- 56) Squadriti GL, Cueto R, Splenser AE, et al. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biophys* 2000;376:333-337.
- 57) Du Y, Chen CP, Tseng CY, et al. Astroglia-mediated effects of uric acid to protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Glia* 2007;55:463-472.
- 58) Fabbrini E, Serafini M, Colic Baric I, et al. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. *Diabetes* 2014;63:976-981.
- 59) Nagase M, Yamamoto Y, Miyazaki Y, et al. Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration. *Redox Rep* 2016;21:104-112.
- 60) Gustafson A, Stortebecker P. Vascular and metabolic studies of amyotrophic lateral sclerosis. II. Lipid and carbohydrate metabolism. *Neurology* 1972;22:528-538.
- 61) Dupuis L, Corcia P, Fertgani A, et al. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2008;70:1004-1009.
- 62) Mariosa D, Hammar N, Malmström H, et al. Blood biomarkers of carbohydrate, lipid, and apolipoprotein metabolisms and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A more than 20-year follow-up of the Swedish AMORIS cohort. *Ann Neurol* 2017;81:718-728.
- 63) Blasco H, Veyrat-Durebex C, Bocca C, et al. Lipidomics reveals cerebrospinal-fluid signatures of ALS. *Sci Rep* 2017;7:17652.
- 64) Abdel-Khalik J, Yutuc E, Crick PJ, et al. Defective cholesterol metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *J Lipid Res* 2017;58:267-278.
- 65) D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, et al. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Bio Med* 2013;65:509-528.
- 66) Mitsumoto H, Santella RM, Liu X, et al. Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2008;9:177-183.
- 67) Blasco H, Garcon G, Patin F, et al. Panel of oxidative stress and inflammatory biomarkers in ALS: a pilot study. *Can J Neurol Sci* 2016;24:1-6.
- 68) Yoshino H, Kimura A. Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study). *Amyotroph Lateral Scler* 2006;7:241-245.
- 69) Delisle MB, Carpenter S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1984;63:241-250.
- 70) Hirano A, Nakano I, Kurland LT, et al. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984;43:471-480.
- 71) Munoz DG, Greene C, Perl DE, et al. Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 1988;47:9-18.
- 72) Brown RH Jr, Johnson D, Oganowski M, et al. Antineural antibodies in the serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1987;37:152-155.
- 73) Boylan K, Yang C, Crook J, et al. Immunoreactivity of the phosphorylated axonal neurofilament H subunit (pNF-H) in blood of ALS model rodents and ALS patients: evaluation of blood pNF-H as a potential ALS biomarker. *J Neurochem* 2009;111:1182-1191.
- 74) Boylan KB, Glass JD, Crook JE, et al. Phosphorylated neurofilament heavy subunit (pNF-H) in peripheral blood and CSF as a potential prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:467-472.
- 75) Gendron TF, C9orf72 Neurofilament Study Group, Daugherty LM, et al. Phosphorylated neurofilament heavy chain: A biomarker of survival for C9orf72-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2017;82:139-146.
- 76) Poesen K, De Schaepdryver M, Stubendorff B, et al. Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease. *Neurology* 2017;88:2302-2309.
- 77) De Schaepdryver M, Jeromin A, Gille B, et al. Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018;89:367-373.
- 78) Lu CH, Petzold A, Topping J, et al. Plasma neurofilament heavy chain levels and disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: insights from a longitudinal study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;86:565-573.
- 79) Lu CH, Macdonald-Wallis C, Gray E, et al. Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2015;84:2247-2257.
- 80) Gong ZY, Lv GP, Gao LN, et al. Neurofilament subunit L levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Trans Neurol* 2015;2:748-755.
- 81) Menke RA, Gray E, Lu CH, et al. CSF neurofilament light chain reflects corticospinal tract degeneration in ALS. *Ann Clin Trans Neurol* 2015;2:748-755.
- 82) Gille B, De Schaepdryver M, Goossens J, et al. Serum neurofilament light chain levels as a marker of upper motor neuron degeneration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2018; Jun 16. doi:10.1111/han.12511 [Epub ahead of print].
- 83) Xu Z, Henderson RD, David M, et al. Neurofilaments as biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016;11:e0164625.
- 84) Rossi D, Volanti P, Brambilla L, et al. CSF neurofilament proteins as diagnostic and prognostic biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 2018;265:510-521.
- 85) Kimura F, Fujimura C, Ishida S, et al. Progression rate of ALSFRS-R at the time of diagnosis predicts survival time in ALS. *Neurology* 2006;66:265-267.
- 86) Weydt P, Oeckl P, Huss A, et al. Neurofilament levels as biomarkers in asymptomatic familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2016;79:152-158.

- 87) Feneberg E, Oeckl P, Steinacker P, et al. Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2018;90:e22-e30.
- 88) Thompson AG, Gray E, Thzenas ML, et al. Cerebrospinal fluid macrophage biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2018;83:258-268.
- 89) Lunetta C, Lizio A, Maestri E, et al. Serum C-reactive protein as a prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol* 2017;74:660-667.
- 90) Seeburger J, Tarras S, Natter H, et al. Spinal cord motoneurons express p75NGFR and p145trkB mRNA in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 1993;621:111-115.
- 91) Shephard SR, Wu J, Cardoso M, et al. Urinary p75ECXD: A prognostic, disease progression, and pharmacodynamic biomarker in ALS. *Neurology* 2017;88:1137-1143.

Abstract

A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis

Hiroshi Mitsumoto, M.D., D.Sc.¹⁾ and Toyokazu Saito, M.D.²⁾

¹⁾Wesley J Howe Professor of Neurology (at CUMC), Eleanor and Lou Gehrig ALS Center, Department of Neurology, Columbia University Medical Center (CUMC)

²⁾Emeritus professor, Kitasato University

Although we currently have two, approved, disease-modifying drugs for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), we are in desperate need for more efficacious treatment. To aggressively test for newer therapies, we must develop reliable objective biomarkers to supplement clinical outcome measures. Many biomarker candidates have been actively and vigorously investigated. Among neurophysiological biomarkers, transcranial magnetic stimulation (TMS)-based biomarkers show potential in exploring disease mechanisms. Neuroimaging biomarkers have high specificity in diagnosing ALS but are an expensive endeavor and are not sensitive enough to detect changes over time of the disease. Among fluid-based biochemical biomarkers, creatinine (Crn) and uric acids (UA), which have been known for decades, may prove to be highly promising biomarkers that can predict disease progression. They can be easily tested in any clinical trials because the costs are minimal. Although known for some time, neurofilaments (NF), either phosphorylated-NF heavy subunit (pNFH) or NF light subunit (NFL), have emerged as “new” biomarkers using specific antibodies. They appear to be highly specific and sensitive in diagnosing ALS, yet they may be insensitive to assess changes in disease over time. These two NF biomarkers along with Crn and UA should be explored extensively in future clinical trials and any other clinical studies in ALS. Yet, we still need newer, more innovative, and reliable biomarkers for future ALS research. Fortunately, aggressive investigations appear to be currently underway.

(*Rinsho Shinkeigaku (Clin Neurol)* 2018;58:729-736)

Key words: ALS, prognostic biomarker, creatinine, uric acid, neurofilament