

- 3). Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 117: 151-158, 2009.
- 4). Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 405-9, 2009.
- 5). Nonaka T, Hasegawa M. A Cellular Model To Monitor Proteasome Dysfunction by alpha-Synuclein. *Biochemistry* 48: 8014-22, 2009.
- 6). Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Lett* 583: 2419-24, 2009.
- 7). Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* 18: 3353-3364, 2009.
- 8). Davidson Y, Amin H, Kelley T, Shi J, Tian J, Kumaran R, Lashley T, Lees AJ, Duplessis D, Neary D, Snowden J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Bandopadhyay R, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. TDP-43 in ubiquitinated inclusions in the inferior olives in frontotemporal lobar degeneration and in other neurodegenerative diseases: a degenerative process distinct from normal ageing. *Acta Neuropathol* 118: 359-69, 2009.
- 9). Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga SI, Hasegawa M. Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem* 284: 7940-7950, 2009.
- 10). Masuda M, Hasegawa M, Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M. (# corresponding author) Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies. *FEBS Lett* 583:787-791, 2009.
- 11). 長谷川成人. 企画/編集, 概論-因子から解明される神経変性疾患の分子基盤. *実験医学* 27: 1318-1323, 2009.
- 12). 新井哲明, 長谷川成人, 野中隆, 藤城弘樹, 内門大丈, 秋山治彦. 神経変性疾患の新規原因分子: TDP-43. *実験医学* 27: 1324-1332, 2009.
- 13). 野中隆, 新井哲明, 長谷川成人. 神経変性疾患の細胞病理学. *細胞工学* 28: 437-442, 2009.
- 2.学会発表
- 1). 長谷川成人 (2009) TDP-43 蓄積症の概念と病態解明への展望. 第 50 回日本神経学会総会, 教育講演, 仙台 [2009/05/22]
- 2). Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease 2009, Vienna, Austria [2009/07/12]
- 3). Arai T, Mackenzie IRA, Hasegawa M, Fujishiro H, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Iritani S, Onaya M, Akiyama H (2009) Phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease 2009, Vienna, Austria [2009/07/15]
- H.知的所有権の取得状況 (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

紀伊 ALS/PDC におけるタウ凝集体の解析

報告者氏名 高島 明彦¹⁾

研究要旨（10 ポイント程度）

タウ凝集体である神経原線維変化形成の過程ではリン酸化タウ、タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体、タウ線維が形成され、リン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することが明らかになっている。牟婁病における認知機能障害についてはアルツハイマー病同様、タウが関与すると考え、牟婁病におけるタウ凝集体状態を明らかにすることを目的に生化学的に異なる大きさのタウ凝集体、また他の病理学的特徴である TDP43、シヌクレインについても同時に解析する方法を確立した。

A.研究目的

紀伊 ALS/PDC ではタウ、TDP-43、シヌクレインの凝集体が形成される。タウ凝集体である神経原線維変化形成の過程ではリン酸化タウ、タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体、タウ線維が形成され、リン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することを見いだしている。紀伊 ALS/PDC における病態発症の原因としてタウ、TDP-43、シヌクレイン凝集による可能性が考えられる。ここでは紀伊 ALS/PDC もアルツハイマー病と同様タウオパチーとして捉えられるかどうかを、アルツハイマー病脳由来のタウ凝集体と比較することで明らかにしたいと考えている。更に、TDP-43、シヌクレインの凝集とタウ凝集との関係も同時に検討することを目的とする。

B.研究方法

脳サンプルを 10 mM Tris (pH 7.4), 800 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% sucrose を含む TBS 中でホモゲナイズし 27,000 × g 遠心後、その上清を 50, 40, 30, and 20% の蔗糖密度勾配遠心法で分離する。その各フラクションを SDS-PAGE で分離後タウ、TDP 43、シヌクレインの抗体を用いてそれぞれのフラクションにあるタウ、TDP 43、シヌクレインの分布を調べる。顆粒状タウはフラ

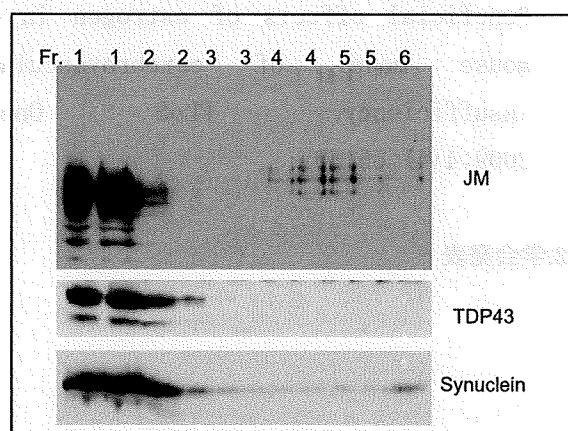
クション 3 に回収されることは AFM 観察で確認されている。

(倫理面への配慮)

理化学研究所倫理規定だい 16 条に基づき実施

C.研究結果

今回は試験的に正常ヒト脳を用いてタウ、TDP 43、シヌクレインの凝集体を蔗糖密度勾配遠心法によって分離した。タウ、TDP 43、シヌクレインは主に可溶性画分であるフラクション 1 に回収されていた。線維状タウが回収されるフラクション 4、5 画分に弱いタウシグナルを見いだしたが TDP43 のシグナルは見いだせなかった。シヌクレインは弱いシグナルがフラクション 2-6 で見いだされた。



D.考察

この方法を用いることでタウ、TDP 43、シヌクレインの凝集状態を同時に見いだすことが可能であることが明らかになった。倫理委員会等の手続きで紀伊 ALS/PDC 患者の脳を使用した結果を出すに至っていないが、方法論は漸く確立したので早い時期に結果を出す予定である。

E.結論

この方法で紀伊 ALS/PDC におけるタウ、TDP 43、シヌクレインの凝集の関係を調べることが可能であると考えられる。

F.健康危険情報

G.研究発表

論文発表

1. Takashima, A. Tauopathy and tau oligomer. *Acta Neuropath.* (in press)
2. Takashima, A. Tauopathy and brain aging. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology* (Springer, NY) (in press)
3. Takashima A. Amyloid-beta, Tau, and Dementia. *J Alzheimers Dis.* 2009 (in press)
4. Kitamura N, Araya R, Kudoh M, Kishida H, Kimura T, Murayama M, Takashima A, Sakamaki Y, Hashikawa T, Ito S, Ohtsuki S, Terasaki T, Wess J, Yamada M. Beneficial effects of estrogen in a mouse model of cerebrovascular insufficiency. *PLoS One.* 2009;4(4):e5159

2.学会発表

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

牟婁病患者由来 iPS 細胞作製

広川佳史¹⁾

¹⁾ 三重大学医学研究科腫瘍病態解明学講座

研究要旨

牟婁病患者由来 iPS の作製、樹立を京都大学 iPS 研究センターの方法に沿って行う。iPS 細胞が樹立された後、神経系の細胞に分化・誘導し、患者と同じ遺伝情報を持った神経系細胞を得る。それらの細胞を用いて、病態の機序解明のため *in vitro* での実験を行う。

A.研究目的

牟婁病患者由来の iPS 細胞を分化誘導することで、運動神経やグリア細胞、ドパミン産生細胞を得ることができる。これらの分化誘導された細胞を用いれば、疾患モデルとして環境因子への脆弱性の検討や薬物の効果判定などが可能となる。本研究は病態解明の為の有効な材料を得ることが目的である。

B.研究方法

患者皮膚より線維芽細胞を採取、培養し、Yamanaka factor である 4 因子、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc をレトロウイルスを用いて遺伝子導入して作製する。詳細なプロトコールは京都大学 iPS 細胞センターより開示されたものを参照する。

iPS細胞からsonic hedgehog signal pathwayのagonistとretinoic acidを用いてembryoid bodyを作成し、これが神経細胞の特徴を有することを確認する。

得られた神経細胞を用いて、現在まで提唱されているALS発症機序が再現できるか検討する。

1) 疫学的環境因子の影響

グアムの類縁疾患の発症機序に、マグネシウムやカルシウム摂取の不足による異常タンパクの蓄積が指摘されている。患者由来と正常人由来のiPSより誘導された神経細胞を低マグネシウム、低カルシウムの条件で長期培養し、タウ蛋白、 α -synuclein、TDP-43蛋白の産生に差があるか検討する。

2) 小胞体ストレスのメカニズム

小胞体ストレスは、異常たんぱく質蓄積などにより、小胞体の機能に付加が生じ、神経変性疾患を引き起こすモデルと考えられている。

a) 小胞体ストレスを誘導する

N-glycosylationの阻害剤である、tunicamycinは古典的な小胞体ストレス誘導薬である。患者由来と正常人由来のiPSより誘導された神経細胞に、tunicamycin処理を加えて小胞体ストレス関連因子である、Grp78やXBP1などの遺伝子発現に差があるか検討する。

小胞体のカルシウム恒常性の障害が、神経変性の病態として提唱されている。グルタミン酸受容体の過度の興奮が小胞体からのカルシウム放出を過剰にし、神経毒性を引き起こす。細胞をグルタミン酸で処理し、小胞体ストレス関連因子の発現差の有無を検討する。

3) 酸化ストレスのメカニズム

家族性ALSには酸化ストレスの原因であるスーパーオキシドを消去する酵素、SOD1遺伝子変異のあるものが報告されている。スーパーオキシドによる神経細胞死がALS発症の機序として提唱されている。患者由来と正常人由来の神経細胞を過酸化水素で処理し、アポトーシスなどの細胞死に差があるか検討する。また低濃度の過酸化水素で細胞を長期間培養し、タウ蛋白、 α -synuclein、TDP-43蛋白の産生に差があるか検討する。

4) さらに、運動神経、グリア細胞、ドパミン産生細胞のマーカーを用いて、embryoid bodyから、それぞれの分化細胞を得る。

最近では、ALS発症機序に神経細胞単独ではなく、グリア細胞を含めた微小環境の関与が提唱されている。この仮説の検証のため、グリア細胞と神経細胞を共培養し、上記であげた項目について検討を行う。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者からの試料の提供を受けるにあたって十分な informed consent を得る。研究計画は、事前に三重大学医学研究科の倫理委員会の承認を得る。得られた個人情報については、法令等を遵守のうえ厳重に管理し、漏洩等のないように十分注意して研究を遂行する。

C.研究結果

患者線維芽細胞を用いた iPS 作製はまだ行っていない。

D.考察

準備段階として、ES 細胞培養など基礎的な手技の確立が必要であり、ウイルスの感染効率のあげるなど至適条件の検討が必要である。

E.結論

準備段階として市販されているヒト線維芽細胞（前立腺組織由来）などを用いて iPS 細胞作製を試みることにする。

F.健康危険情報

特になし。

G.研究発表

1. 論文発表

本年度はなし。

2. 学会発表

本年度はなし。

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

本年度はなし。

2.実用新案登録

本年度はなし。

3.その他

特許取得状況に関する詳細な説明が記載されている。内容は非常に小さく、読み取りが困難である。

左側の欄には、特許の取得状況に関する追加的な情報が記載されている。内容は非常に小さく、読み取りが困難である。

右側の欄には、特許の取得状況に関する追加的な情報が記載されている。内容は非常に小さく、読み取りが困難である。

海馬、脳幹に多数の ghost tangle を伴った牟婁病の 1 例

小久保康昌¹⁾、富本秀和¹⁾、葛原茂樹²⁾
三重大学神経内科¹⁾、国立精神・神経センター²⁾

研究要旨

〔症例〕死亡時 74 歳 男性〔主訴〕歩行障害と発動性低下〔家族歴〕類症なし〔既往歴〕高血圧〔現病歴〕牟婁病多発地区で出生、生育。68 歳時、右手のふるえで発症。動作緩慢、発動性低下、前傾姿勢、小歩症が進行。71 歳、動作緩慢の悪化と物忘れが出現。L-dopa への反応は不良。72 歳時、次第に歩行不能となり、無気力で尿失禁状態。73 歳時の神経学的所見は、MMSE 13/30, FAB 2 点、仮面様顔貌、Myerson 徴候あり、舌萎縮なし、下肢筋力低下あり、筋萎縮なし、動作緩慢、頸部と四肢に固縮あり、両上肢に安静時振戦、腱反射右上肢で亢進。Babinski 徴候陰性、立位は要介助で歩行は不能。頭部 MRI では、両側前頭葉側頭葉萎縮。脳血流シンチでは、前頭葉側頭葉の血流低下。四肢拘縮が進行、呼びかけにも応答不良。74 歳、誤嚥性肺炎で死亡。全経過は、約 7 年。人工呼吸器の使用なし。〔神経病理学的所見〕脳重：1255 g。死後 2 時間 30 分で剖検。① ALS を示唆する神経病理学的所見：前角細胞軽度脱落あり、ブニナ小体と TDP-43 は陰性 ② tau：海馬、扁桃核、マイネルト基底核、レンズ核、側頭葉皮質 II, III 層、黒質、中脳水道周囲灰白質、青斑核、網様体、迷走神経背側核、脊髄前角に陽性。Ghost tangle が多い ③ α -synuclein：黒質、中脳水道周囲灰白質、網様体、迷走神経背側核、青斑核、扁桃核、レンズ核、マイネルト基底核、海馬、脊髄中間質外側核 ④ A β ：なし ⑤ TDP-43：歯状回 陰性 ⑥ 頸髄前角に LBHI 様封入体。Braak: plaque stage 0, NFT stage V, Lewy limbic stage〔考察〕脳幹諸核や脊髄の α -synuclein 病理は、MIBG 心筋シンチの低下と関連するものと思われた。

A. 研究目的

海馬、脳幹に多数の ghost tangle を伴い、脳幹諸核や脊髄に α -synuclein 病理が目立った牟婁病の 1 例を報告する。

B. 研究方法

牟婁病の 1 例について、臨床神経学的所見および神経病理所見を明らかにした。本研究は、三重大学倫理委員会の承認に基づき行った。

C. 研究結果

症例：死亡時年齢 74 歳 男性

主訴：歩行障害、発動性低下。既往歴：高血圧。

家族歴：なし。現病歴：牟婁病多発地区で生育した。

68 歳 右手のふるえで発症。動作緩慢、発動性低下、前傾姿勢、小歩症が進行。71 歳、動作緩慢の悪化と物忘れが出現。

L-dopa への反応不良。73 歳 MMSE 13/30, FAB 2 点、仮面様顔貌、Myerson 徴候あり、舌萎縮なし、下肢筋力低下あり、筋萎縮なし、動作緩慢、頸部と四肢に固縮あり、両上肢に安静時振戦、腱反射 右上肢で亢進。Babinski 徴候陰性、立位は要介助で歩行は不能。74 歳 誤嚥性肺炎で死亡。全経過 約 7 年。呼吸器使用なし。頭部 MRI (図 1)、SPECT (図 2)、MIBG 心筋シンチ (図 3)。

図 1

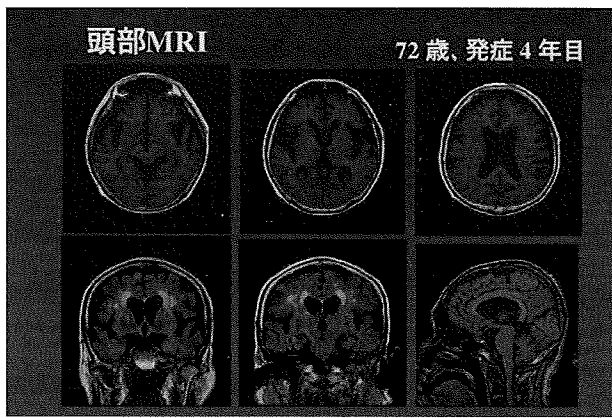


図 2

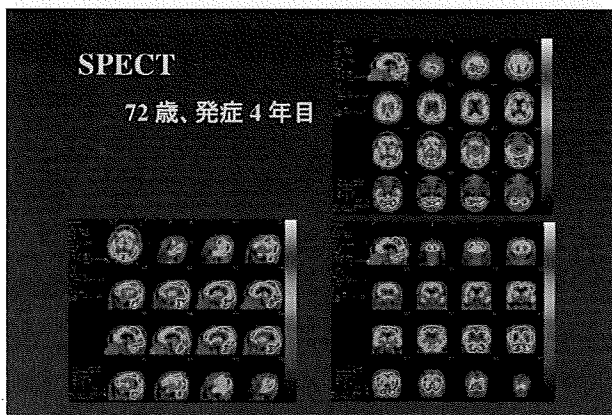
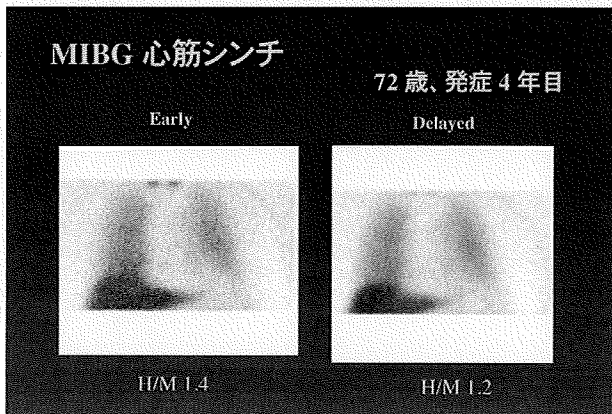
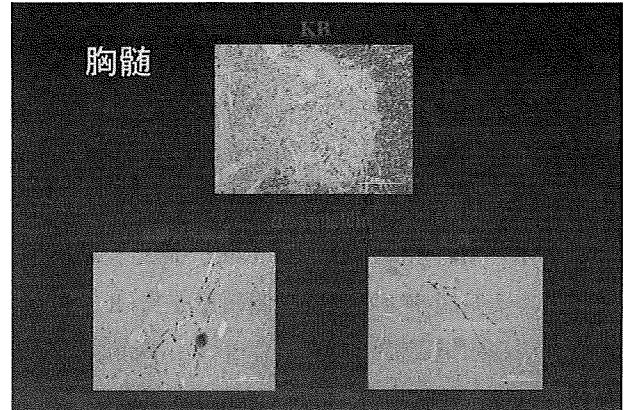


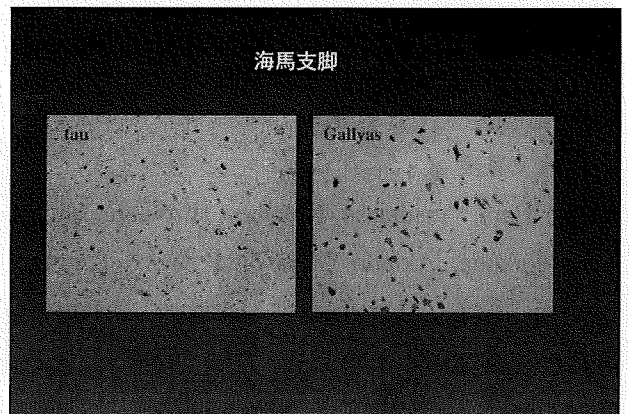
図 3



【神経病理学的所見】脳重：1255g。死後2時間30分で剖検。肉眼所見：前頭葉と側頭葉に中等度萎縮。海馬と線条体に軽度萎縮。黒質と青斑核に高度色素脱失。 脊髄：頸胸髄前角細胞数中等度減少と central chromatolysis。前角細胞の萎縮。Goll 束の変性。側索正常。Bunina 小体なし。腰髄 前角、後角、中間質外側核に NFT。中間質外側核、前角、後角に α -synuclein 陽性構造物。図 4



TDP-43 陰性。頸髄前角細胞内に Lewy body like hyaline inclusion 様封入体。中脳：黒質神経細胞消失、G-NFT +++、 α -syn +。中心灰白質 G-NFT +++、 α -syn +++。網様体 tau +++、 α -syn +++。大脳脚正常。橋：青斑核神経細胞数著減、G-NFT +++、 α -syn ++。縫線核 G-NFT +++、 α -syn ++。一部縦走線維淡明化。延髄：迷走神経背側核神経細胞数減少、NFT+、 α -syn +。舌下神経細胞 正常。錐体路正常。海馬 -海馬傍回：CA2 から内嗅領皮質高度神経細胞数脱落、G-NFT +++、 α -syn ++、顆粒空泡変性、平野小体。SPなし。TDP-43 陰性。図 5



側頭葉：後頭側頭回まで NFT++、 α -syn +。島回 NFT++。白質に glial inclusion。NFT は、●●層に分布。 α -syn+、SP-。前頭葉、頭頂葉、後頭葉：NFT +、 α -syn -、SP-。扁桃核：NFT+++。マイネルト基底核：NFT++。基底核（尾状核、被殻、淡蒼球、視床下核）：NFT +~++、 α -syn +。小脳：歯状核に NFT 散見。Tuft shaped astrocyte, astrocytic plaque, GCI なし。

D. 考察

本例の特徴は、

①多発地区出身、家族歴なし②臨床的には、認知機能障害とパーキンソニズム、MIBG低下③ ALSを示唆する神経病理学的所見：前角細胞軽度脱落あり、ブニナ小体と TDP-43 は陰性 ④ tau：海馬、扁桃体、マイネルト基底核、基底核、側頭葉皮質 II, III層、黒質、中脳水道周囲灰白質、青斑核、網様体、迷走神経背側核、脊髄前角、Ghost tangle が多い ⑤ α -synuclein：黒質、中脳水道周囲灰白質、網様体、迷走神経背側核、青斑核、扁桃体、基底核、マイネルト基底核、海馬、脊髄中間質外側核 ⑥ A β ：なし ⑦ TDP-43：歯状回 陰性 ⑧ 頸髄前角に LBHI 様封入体 Braak: plaque stage 0, NFT stage V, Lewy limbic stage であった。

脳幹諸核や脊髄に α -synuclein 病理は、MIBG 心筋シンチの低下と関連するものと思われた。

E. 結論

ghost tangle と α -synuclein 病理をともなった牟婁病剖検例を報告した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kenju Hara, Yasumasa Kokubo, Hiroyuki Ishiura, Yuko Fukuda, Akinori Miyashita, Ryoza Kuwano, Ryogen Sasaki, Jun Goto, Masatoyo Nishizawa, Shigeki Kuzuhara, and Shoji Tsuji. TRPM7 is not associated with amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in the Kii peninsula of Japan. Am J Med Genet Part B. 2009, in press.

2. 学会発表

Y, Kokubo, S. Kuzuhara. FDG-PET study in amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in the Kii peninsula of Japan. 20th International Symposium on ALS/MND. Berlin, Germany, 8-10 December.

H. 知的所有権の取得状況（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

牟婁病の診断基準と治療指針の作成

小久保康昌
三重大学神経内科

研究要旨

牟婁病（紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合:紀伊 ALS/PDC）についてこれまでの臨床神経学、神経放射線、神経病理学的所見を総括し、現時点での診断基準を作成した。その上で、現時点で行う治療の方針と今後の根治療法にむけての研究の方向性について検討した。診断基準：必須項目 1.地域性：三重、和歌山両県の南部地域出身もしくは同地域に居住歴を有する。2. 臨床症状：ALS、パーキンソニズム、認知症のいずれかで発症し、ひとつもしくは複数の症状を呈する。3. 神経病理学的所見：古典的な ALS 病理かつ NFTs の広範な出現（脳幹諸核と内側側頭葉は必発、抗タウ抗体陽性）。老人斑は、伴わないか伴っても軽度。支持項目 A. 牟婁病の家族歴。B. 画像検査で前頭葉 and/or 側頭葉の萎縮または脳血流および糖代謝の低下。C. 特異な網膜症。確実 (definite): 1+2+3、臨床的にはほぼ確実 (probable): 1+2 と A,B,C のうちひとつ、可能性がある (possible): 1+2 or 2+3。治療指針：1. 既存の ALS、パーキンソン病、認知症に対する治療法の緩用、2. 環境要因の改善、3. 新規治療薬の開発に向けての今後の取り組み。

A.研究目的

牟婁病（紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合:紀伊 ALS/PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis /Parkinsonism-dementia complex :ALS/PDC)）は、紀伊半島南部に多発する神経変性疾患で、グアム島とインドネシア国パプア州に類似疾患が存在する。本研究では、牟婁病の診断基準作成と現時点での治療指針について検討する。

B.研究方法

これまでの臨床神経学、神経放射線、神経病理学的所見を総括し、牟婁病の診断基準について検討する。その上で、現時点で行う治療の方針と今後の根治療法にむけての研究の方向性について論じる。

本研究は、三重大学倫理委員会の承認に基づき行った。

C.研究結果

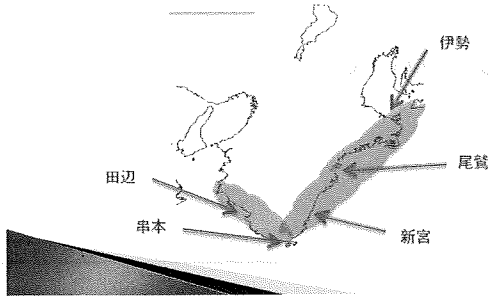
I 診断基準の作成

1) 地域性(図 1)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)が紀伊半島南部に多発することは、1960年代の木村、八瀬らによる疫学調査によって明らかにされた。Kokuboらは、三重県内のALS剖検例を検索し、神経原線維変化(NFT)をともなう紀伊型ALSが、三重県南部に集積していることを明らかにした。一方、パーキンソン認知症複合(PDC)については、1990年代のKuzuharaらによる臨床データの蓄積と初剖検例の報告によって、紀伊半島にもグアム島同様PDCが実在することが明らかになった。紀伊半島のALSとPDCはあわせて牟婁病と呼称される。

図1

牟婁病 (紀伊ALS/PDC) の特徴

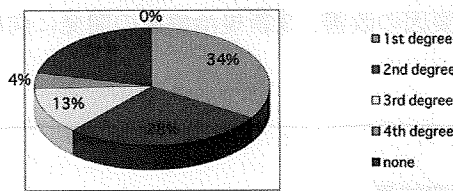
1. 地域性: 三重、和歌山両県の南部出身もしくは居住歴 (多発地は、穂原地区と古座川地区)



2) 家族歴 (表 1): 牟婁病では、約 80%の症例に 4 親等以内の家族歴を有する。遺伝様式は複雑で、常染色体優性遺伝または劣性遺伝のいずれとも判断しがたい。

表 1

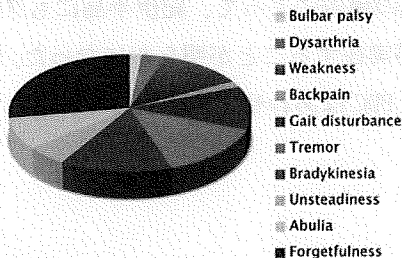
Family history



A relative within the fourth degree of relationship 78.7%

3) 臨床像: 発症年齢は平均 64.8 歳 (52 歳~78 歳) で、男女比は、1:1.61 と女性にやや多い。初発症状は、精神症状、パーキンソン症状、運動ニューロン症状のいずれかで発病する。(表 2)

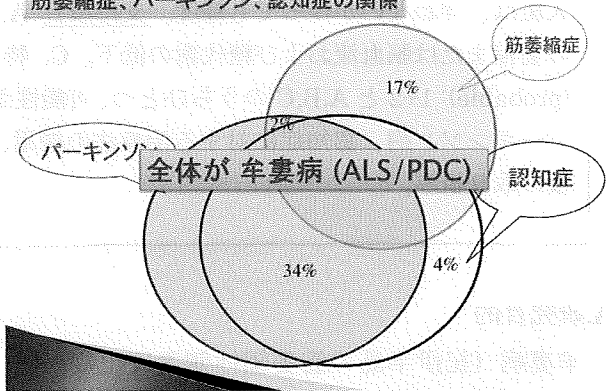
The first symptoms



その後は、パーキンソン症状、認知症、ALS 症状が

複合することもある。病期の進行にともなって、それぞれの症状が顕在化し進行する。パーキンソン症状としては、筋強剛、姿勢反射障害、無動を高頻度に認める。一部の症例では、振戦も認めるが、姿勢時振戦のこともあればパーキンソン病に特徴的な安静時振戦のこともある。精神症状としては、記憶障害、見当識障害、意欲低下は必発で、抑うつ、多幸性、嗜眠傾向、幻覚を示す症例もある。特に、意欲低下や発動性の低下が最も特徴的で、おとなしく、じっとして動きの少ない、いわゆる皮質下性認知症を呈する。運動ニューロン徴候としては、四肢筋萎縮と筋力低下、球麻痺、腱反射の亢進やバビンスキー徴候といった錐体路徴候、呼吸筋麻痺である。(図 2)

筋萎縮症、パーキンソン、認知症の関係



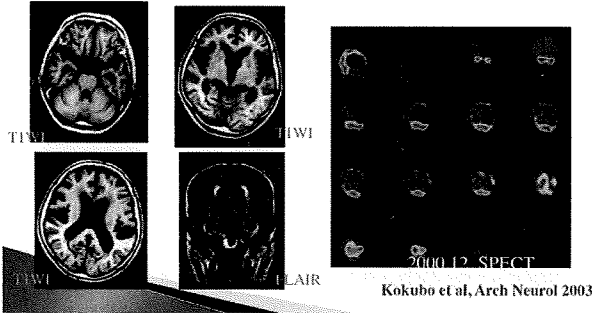
グアム島の ALS/PDC に認められる特異な網膜症が、紀伊半島の症例にも高率に合併する。高齢発症の症例で、Guam dementia のように認知症のみを示す症例が存在するが、PDC であるかどうかは剖検例がなく不明である。

4) 神経放射線学的所見: 頭部 CT および MRI (図 3) では、ほぼ正常例から高度の前頭葉と側頭葉の萎縮を認める例まである。脳血流シンチでは、前頭葉または側頭葉に血流低下を認める。したがって画像所見は、前頭側頭型認知症に分類される。

図 3

Kii PDC with ALS

A 73 years old female. She developed gait disturbance at age 66. She showed Dementia, parkinsonism and amyotrophy.



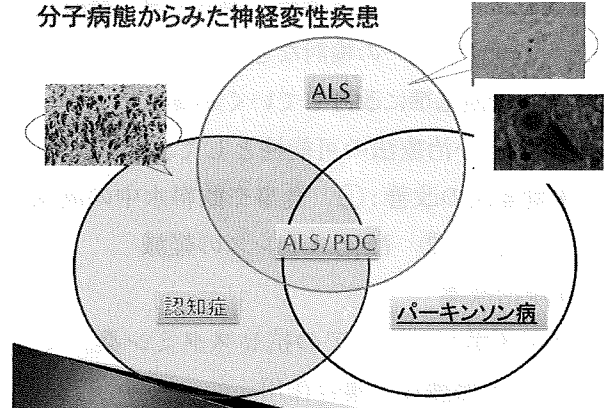
画像統計解析ソフトを用いたより詳細な検討では、血流低下部位は、前頭葉と側頭葉にとどまらず、頭頂葉、後頭葉、帯状回、尾状核、脳幹に及ぶ。MIBG心筋シンチグラフィは、中等度以上のパーキンソニズムを伴う症例では低下するので、心臓交感神経病変が存在するものと考えられる。

5) 神経病理像：肉眼的には、萎縮が目立たない例もあるが、基本的には前頭葉と側頭葉の萎縮がある。脳室拡大は著明で、海馬は萎縮し、黒質と青斑核の脱色素を認める。組織学的所見の特徴は、神経細胞脱落を伴った神経原線維変化 (NFT) の出現と ALS 病変である。NFT は、海馬を含む側頭葉内側に顕著で、前頭葉や脳幹諸核にも多発する。ALS 病変としては、脳幹と脊髄の錐体路変性、脊髄運動神経細胞の脱落、大脳運動領の Betz 巨細胞の脱落を認める。脊髄にも、NFT や tau 陽性病理を認める。α-synuclein は、扁桃体を中心に脳幹や小脳に出現する。TDP-43 は、グアム ALS/PDC 同様、牟婁病の脊髄や海馬歯状回細胞を中心に出現する。

6) 生化学所見：タウ蛋白は、過剰にリン酸化されており、isoform は、3 repeat と 4 repeat からなる。TDP-43 は、過剰リン酸化、断片化されており、牟婁病の病因に関与する新しいタンパク質として注目されている。

図 4

分子病態からみた神経変性疾患



II 治療方針の策定にむけて

治療の現状：① ALS 症状に対して：薬物：リルゾール、非薬物：リハビリテーション、NIV (noninvasive ventilation), PEG, 人工呼吸器
② パーキンソン 症状に対して：薬物：L-dopa をはじめとした抗パ薬、非薬物：リハビリテーション、PEG
③ 認知症症状に対して：薬物：塩酸ドネペジル、抑肝散、抗精神病薬 非薬物：リハビリテーション
④ 介護保険、特定疾患申請、身体障害者手帳交付

D. 考察

今回の検討から、牟婁病の診断基準として、必須項目

1. 地域性：三重、和歌山両県の南部地域出身もしくは同地域に居住歴を有する。
2. 臨床症状：ALS、パーキンソニズム、認知症のいずれかで発症し、ひとつもしくは複数の症状を呈する。
3. 神経病理学、生化学的所見：古典的な ALS 病理かつ NFTs の広範な出現 (脳幹諸核と内側側頭葉は必発、3+4 repeat tau)。

支持項目 A. 牟婁病の家族歴。B. 画像検査で前頭葉 and/or 側頭葉の萎縮または脳血流および糖代謝の低下。C. 特異な網膜症。

注意点：MIBG 心筋シンチは低下する例があり、除外検査にはならない。

確実 (definite)：1+2+3、臨床的にほぼ確実 (probable)：1+2 に支持項目 A, B, C の 1 つを満たす。可能性がある (possible)：1+2 or 2+3

を提案した。今後、高次機能や神経生理、髄液を用いたバイオマーカーの検討などをおこない、より精度の高い診断基準に改訂していく必要がある。

また、新しい治療法の可能性として、

1) 環境要因の改善: ① 食事や飲料水中の高 Mn, 低 Ca の是正 ② 酸化ストレスの軽減

2) 新規治療薬

1. ディメボン: ロシアの抗ヒスタミン薬。ミトコンドリア保護など複合作用。

2. メチレンブルー: ミトコンドリア保護?

3. Rember: タウ凝集抑制

今後これらの新規治療薬の臨床治験に取り組む必要がある。

E. 結論

2010年版の牟婁病診断基準を提案した。また、今後の新しい治療法の開発に向けての方向性についてまとめた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kenju Hara, Yasumasa Kokubo, Hiroyuki Ishiura, Yuko Fukuda, Akinori Miyashita, Ryoza Kuwano, Ryogen Sasaki, Jun Goto, Masatoyo Nishizawa, Shigeki Kuzuhara, and Shoji Tsuji. TRPM7 is not associated with amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in the Kii peninsula of Japan. Am J Med Genet Part B. 2009, in press.

2. 学会発表

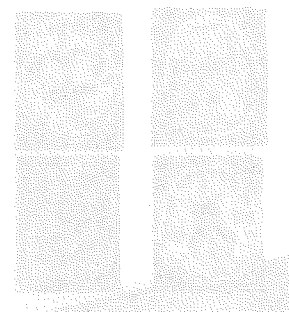
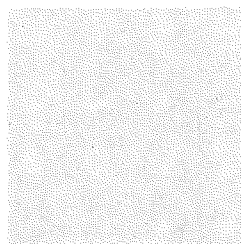
Y, Kokubo, S. Kuzuhara. FDG-PET study in amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in the Kii peninsula of Japan. 20th International Symposium on ALS/MND. Berlin, Germany, 8-10 December.

H. 知的所有権の取得状況 (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



Ⅲ. 研究成果に関する一覧表

英文原著・症例報告

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版 西暦年
<u>Kihira</u> T, Suzuki A, Kondo T., et al.	Immunohistochemical expression of IGF-I and GSK in the spinal cord of Kii and Guamanian ALS patients.	Neuropathology,	29	548-558	2009
Okamoto K, <u>Kihira</u> T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, and Nagai M.	Lifestyle factors and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study in Japan.	Ann Epidemiol	19	359-364.	2009
Okamoto K, <u>Kihira</u> T, Kobashi G, et al.	Fruit and vegetable intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan.	Neuroepidemiology	32	251-256.	2009
Miyake, Y, Sasaki S, Tanaka K, et al Collaborators, <u>Kihira</u> T	Dietary fat intake and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan.	J NeurolSci	288	117-122	2010
Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M	Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan,	Amyotroph Lateral Scler	8	300-304	2007
Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, v Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M	Fruit and Vegetable Intake and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Japan,	Neuroepidemiology	32	251-256	2009
Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M	Lifestyle Factors and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case-Control Study in Japan	Annals of Epidemiology	19	359-364	2009
Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M.	Characterization of inhibitor-bound alpha-synucleindimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding.	J Mol Biol	in pres s.		
Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga SI, Hasegawa M.	Conversion of wild-type alpha -synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant.	J BiolChem	284	7940 -7950	2009
Masuda M, Hasegawa M. Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M.	Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies.	FEBS Let	583	787-791	2009
Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M.	Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models.	FEBS Lett	583	2419-24	2009
Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M.	Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43.	Hum Mol Gene	18	3353-3364.	2009
Nonaka T, Hasegawa M.	A Cellular Model To Monitor Proteasome Dysfunction by alpha-Synuclein.	Biochemistry	48	8014-22.	2009
Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M.	Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D-U are recapitulated in SH-SY5Y cells.	FEBS Lett	583	394-400	2009
Tomiyama H, Kokubo Y, Sasaki R, Li Y, Imamichi Y, Funayama M, Mizuno Y, Hattori N, Kuzuhara S.	Mutation analyses in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan.	Movement Disorders	23	2344-2348	2008

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版 西暦年
Kenju Hara, YasumasaKokubo, Hiroyuki Ishiura, Yuko Fukuda, Akinori Miyashita, RyozoKuwanano, Ryogen Sasaki, Jun Goto, MasatoyoNishizawa, Shigeki Kuzuhara, and Shoji Tsuji.	TRPM7 is not associated with amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex in the Kii peninsula of Japan	Am J Med Genet Part B Neuropsychiatric Genetics	153 B	310-313	2010
Akihiro Shindo, MD1), YasumasaKokubo, MD, PhD1), Ken Kagawa, MD1), Yuichiro Ii, MD1), Ryogen Sasaki, MD, PhD1), JosepDalmou, MD, PhD2), Shigeki Kuzuhara, MD, PhD 1)	Anti-N-methyl-D-aspartate receptor-related grave but reversible encephalitis with ovarian teratoma in two Japanese women presenting with excellent recovery	EurNeurol	61	50-51	2009
Kihira T, Yoshida S, Murata K, Ishiguti H, Kondo T, Kohmoto J, Okamoto K,Kokubo Y, Kuzuhara S.	Changes in the incidence and clinical features of ALS in the Koza,Kozagawa, and Kushimoto area of the Kii Peninsula--from the 1960s to the2000s follow-up study	Brain Nerve.	62	72-80	2010
Fukuda M, Kanou F, Shimada N, Sawabe M, Saito Y, Murayama S, Hashimoto M, Maruyama N, Ishigami A	Elevated levels of 4-hydroxynonenal-histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease	Biomed Res	30	227-233	2009
Tokumar A, Saito Y, Murayama S, Kanemaru K, Sakiyama Y, Toyoda M, Yamakawa H, Terada H	Imaging-Pathologic Correlation in Corticobasal Degeneration	Am J Neuroradiol	30	1884-1892	2009
Sato N, Amino T, Kobayashi K,Asakawa S,Ishiguro T, Tsunemi T, Takahashi M, Matsuura T, Flanigan KM,Iwasaki S, Ishino F, Saito Y, Murayama S, Yoshida M,Hashizume Y, Takahashi Y, Tsuji S, Shimizu N, Toda	Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA) _n .	Am J Hum Gen	85	544-557	2009
Akasaka-Manyu K, Manyu H, Sakurai Y, Wojczyk B, Kozutsumi, Y, Saito Y, Taniguchi N, Murayama S, Spitalnik S, Endo T	Protective effect of N-glycan bisecting GlcNAc residues on β -amyloid production in Alzheimer's disease.	Glycosilation	20	99-106	2010
Ishibashi K, Saito Y, Murayama S, Kanemaru K, Oda M, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K	Validation of cardiac 123I-MIBG scintigraphy in patients with Parkinson's disease who were diagnosed with dopamine PET.	Eur J Nucl Med Mol Imaging			2009
Terada T, Tsuboi Y, Obi T, Doh-ura K, Murayama S, Kitamoto T, Yamada T, Mizoguchi K	Less protease-resistant PrP in a patient with sporadic CJD treated with intraventricularpentosanpolysulphate	ActaNeurol Scand			2009
Ishibashi K, Kanemaru K, Saito Y, Murayama S, Oda K, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K	Cerebrospinal fluid metabolite and nigrostrialdopaminergic function in Parkinson's disease	ActaNeurol Scand			(in press)

邦文単行本

著者名	論文題名	書名	(編集者名)	出版社名	(出版地)	出版西暦年	頁
小久保康昌	パーキンソン認知症複合 (グアム島、紀伊半島)	パーキンソン病 基礎・ 臨床研究のアップデート	葛原茂樹	日本臨床	東京	2009	259- 263
葛原茂樹	Vol.6 血液・造血器疾患 神経疾患 神経変性疾患	内科学書 改訂第7版		中山書店		2009	293- 295
村山繁雄 監訳		エスクロール基本病理学		西村書店			1-374

邦文原著・症例報告

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年
長谷川成人.	概論-因子から解明される神経変性 疾患の分子基盤.	実験医学	27	1318-1323	2009
野中隆, 新井哲明, 長谷川成人.	神経変性疾患の細胞病理学.	細胞工学	28	437-442	2009

邦文総説

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年
葛原茂樹	紀伊半島・グアム・ニューギニアの ALS/ パーキンソン・認知症複合	神経心理学	25	182-191	2009
葛原茂樹	ALS 研究の最近の進歩: ALS と TDP-43	臨床神経学	48	625-633	2009
葛原茂樹	パーキンソン病をめぐる最近の話題と 治療の進歩	日本内科学会雑誌	98	57-66	2009
葛原茂樹	目で見るパーキンソン病 診療の進歩	日本医事新報	4460	65-68	2009
葛原茂樹	紀伊半島グアム・ニューギニアの ALS S・パーキンソン・認知症候群	神経心理学(学会セ ミナー2)	25	182-191	2009
葛原茂樹	パーキンソン病の病態生理	老年精神医学雑誌	19	1171-1177	2009
葛原茂樹	ALS 患者の脳と脊髄への TDP-43 蛋白の 異常蓄積と TDP-43 遺伝子変異の発見	難病と在宅ケア	14	31-33	2008
葛原茂樹	TDP-43 と神経変性疾患 紀伊半島 ALS/PDC と TDP-43	臨床神経	48	625-633	2008

IV. 研究成果の刊行物・別刷

TRPM7 Is Not Associated With Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula of Japan

Kenju Hara,¹ Yasumasa Kokubo,² Hiroyuki Ishiura,³ Yuko Fukuda,³ Akinori Miyashita,⁴ Ryozo Kuwano,⁴ Ryogen Sasaki,² Jun Goto,³ Masatoyo Nishizawa,¹ Shigeki Kuzuhara,² and Shoji Tsuji^{3*}

¹Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University, Niigata, Japan

²Department of Neurology, Mie University School of Medicine, Mie, Japan

³Division of Neuroscience, Department of Neurology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

⁴Genome Science Branch, Center for Bioresource-Based Researches, Brain Research Institute, Niigata University, Niigata, Japan

Received 13 October 2008; Accepted 11 March 2009

Amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex (ALS/PDC) is a distinct neurodegenerative disorder characterized by ALS pathology with neurofibrillary tangles (NFTs) in the spinal cord and brain. Recent clinical studies have revealed a high incidence and a high familial occurrence of ALS/PDC in both Guam and the Kii peninsula of Japan, suggesting a strong genetic predisposition to this disorder. The T1482I variant (rs8042919) of *TRPM7* gene which is suggested to play roles in regulating the cellular homeostasis of Ca²⁺, Mg²⁺, and trace metals, has recently been reported to be associated with Guamanian patients with ALS/PDC. To investigate whether *TRPM7* is associated with Kii ALS/PDC, we conducted parametric linkage analyses of the *TRPM7* locus in a large extended family with ALS/PDC. Linkage analysis did not reveal any evidence supporting the linkage to the *TRPM7* locus. Resequencing of the entire coding region of *TRPM7* did not reveal any pathogenic mutations in an affected individual in this family. The allele frequencies of the T1482I in affected individuals in this family or in those from other families are not significantly different from those in regional controls or those in HapMap-JPT samples. These results indicate that *TRPM7* is not associated with ALS/PDC in the Kii peninsula of Japan. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: ALS/PDC; extended family; *TRPM7* gene; linkage analysis; resequencing

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) is a unique form of ALS highly prevalent in the island of Guam, southern West New Guinea, and the Kii peninsula of Japan [Kimura, 1961; Elizan et al., 1966; Gajdusek and Salazar, 1982]. Both Guamanian and Japanese patients with ALS/PDC are pathologically characterized by neurofibrillary tangles (NFTs) in the brain and spinal cord in addition to the ALS pathology affecting the upper and lower motor neurons [Hirano et al., 1961]. High incidences of ALS in Guam and the Kii peninsula

How to Cite this Article:

Hara K, Kokubo Y, Ishiura H, Fukuda Y, Miyashita A, Kuwano R, Sasaki R, Goto J, Nishizawa M, Kuzuhara S, Tsuji S. 2010. *TRPM7* Is Not Associated With Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula of Japan. *Am J Med Genet Part B* 153B:310–313.

of Japan have been reported since the 1950s [Kurland and Mulder, 1954] and 1960s [Kimura, 1961], respectively. Recent studies have indicated that the PDC type is still common, but also that the incidence of the ALS type is decreasing in both Guam and the Kii peninsula of Japan [Plato et al., 1969; Kuzuhara, 2007]. Because the disease focus occurs in a restricted area among three genetically different populations, genetic and/or environmental factors have been proposed as the etiologies of this disorder. A recent epidemiological study of Kii ALS/PDC has revealed that approximately 70% of patients have a family history of ALS/PDC [Kuzuhara et al., 2001;

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: KAKENHI (Grant-in-Aid for Scientific Research); Grant sponsor: 21st Century COE Program; Grant sponsor: Center for Integrated Brain Medical Science, and Scientific Research (A); Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; Grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

*Correspondence to:

Dr. Shoji Tsuji, Division of Neuroscience, Department of Neurology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. E-mail: tsuji@m.u-tokyo.ac.jp

Published online 29 April 2009 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com)

DOI 10.1002/ajmg.b.30966

Kuzuhara, 2007]. Furthermore, families with multiple cases of ALS/PDC are common in Guam [Kurland and Mulder, 1955; Morris et al., 2004]. These observations made in both Guam and the Kii peninsula of Japan strongly suggest the involvement of genetic factors in ALS/PDC.

A comprehensive mutational analysis of 19 candidate genes including ALS/FTLD-related genes (*SOD2*, *SOD3*, *ALS2/alsin*, *SMN1*, *PGRN*, *ANG*, *VEGF*, *VCP*, *VAPB*, *DCTN1*, *CHMP2B*, and *TARDBP/TDP-43*), the tauopathy-related gene (*GSK3 β*), and parkinsonism-related genes (*α -synuclein*, *LRRK2*, *parkin*, *DJ-1*, *PINK1*, and *ATP13A2*) did not reveal any mutations in these genes in the patients with ALS/PDC [Tomiyama et al., 2008]. The T1482I variant of transient receptor potential melastatin 7 gene (*TRPM7*) has recently been reported to be associated with five Guamanian ALS/PDC patients [Hermosura et al., 2005]. *TRPM7* is a member of the TRP superfamily of ion channels that has been suggested to play roles in the homeostatic regulation of Ca²⁺ and Mg²⁺. The association of the *TRPM7* variant with ALS/PDC may support the environmental factor hypothesis that prolonged exposure to low level of Ca²⁺ and Mg²⁺ contributes to the high incidence of development of ALS/PDC [Garruto, 1991]. To explore the implication of *TRPM7* in Kii ALS/PDC, we have conducted parametric linkage analyses of the *TRPM7* locus, and resequenced the entire coding region of *TRPM7* of an affected individual using a large extended family with ALS/PDC in the Kii peninsula of Japan. We further compared the frequencies of T1482I in the affected individuals in this family or in those from other families with those in regional controls or HapMap-JPT samples to investigate the potential association of T1482I with ALS/PDC in the Kii peninsula.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes according to standard protocol after obtaining informed written consent from patients. The clinical and pathological evaluations of the family members are described elsewhere [Tomiyama et al., 2008]. The research project was approved by the ethics committee of Niigata University, Mie University School of Medicine, and the University of Tokyo.

Linkage Analysis of the *TRPM7* Locus on Chromosome 15q21.2

Parametric pair-wise linkage analysis of the *TRPM7* locus was performed using the Superlink program ([\[n.ac.il/superlink/\]\(http://n.ac.il/superlink/\)\) \[Fishelson and Geiger, 2002\] with the 23 family members including the 8 affected individuals \(Supplementary Figure, A family\). The pedigree information was updated based on information obtained after publication of our previous study \[Tomiyama et al., 2008\]. Pair-wise lod scores at D15S978 and D15S1016 flanking the *TRPM7* locus at 1.6 Mb upstream and 2.6 Mb downstream, respectively, were obtained using autosomal dominant \(AD\) and autosomal recessive \(AR\) models. A disease gene frequency of 0.01 and penetrance rates of 0.9 and 1.0 were used.](http://bioinfo.cs.technio-</p>
</div>
<div data-bbox=)

Resequencing of Entire Coding Regions of *TRPM7*

Coding regions of *TRPM7* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using TaKaRa LA Taq (TaKaRa, Tokyo, Japan) for one patient (V-10) clinically diagnosed with ALS/PDC. The primers were designed using ExonPrimer (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>; see Supplementary Data). The PCR products were purified using ExoSAP-IT (USB), and subjected to direct nucleotide sequence analysis using a BigDye terminator Cycle Sequencing kit v3.1 and an ABI3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The obtained sequence data were analyzed by Variant Reporter™ Software v1.0 (Applied Biosystems).

Association Analysis of T1482I

The allele frequencies of T1482I was investigated in other 7 patients with ALS/PDC included in the linkage study (VI-2, VI-7, VI-9, VI-17, VI-18, VI-21, and VII-4) and another 1 recently diagnosed patient (VI-20) in the A family (Supplementary Figure), 16 Kii-ALS/PDC index patients from other families (6 multiplex families and 10 apparently sporadic patients), and 27 control subjects living in the same region by resequencing exon 28 in *TRPM7* using a primer pair of 5'-TGGTGTCCAGGTAGAATAAAG-3' and 5'-TTCCTGCTCATGTGTTTAC-3', or that described in the Supplementary Table (Exon28F and Exon28R).

Association analysis of T1482I variant was conducted with χ^2 analysis of the allele frequencies of 9 patients in family A, or of 16 index patients in other families, and those in 27 regional controls, or HapMap-JPT samples.

RESULTS

Pair-wise LOD scores were $-\infty$ at both D15S978 and D15S1016 for AD and AR models with complete penetrance. We obtained LOD scores of 0.64/ $-\infty$ and 0.51/ $-\infty$ for AD and AR

TABLE I. Pair-Wise LOD Scores at D15S978 and D15S1016

Mode of inheritance	AD model		AR model	
	0.9	1.0	0.9	1.0
Penetrance				
D15S978	0.64	$-\infty$	0.51	$-\infty$
D15S1016	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$	$-\infty$