

201116001A

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

アルツハイマー病の危険因子の解明と予防に関する
大規模ゲノム疫学研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清原 裕

平成24（2012）年3月

目 次

はじめに-----	1
I. 総括研究報告	
アルツハイマー病の危険因子の解明と予防に関する大規模ゲノム疫学研究-----	2
清原 裕 (九州大学大学院医学研究院環境医学分野・教授)	
II. 分担研究報告	
1. 認知症が地域社会に及ぼす影響：久山町研究-----	7
清原 裕 (九州大学大学院医学研究院環境医学分野・教授)	
2. アルツハイマー病の遺伝的危険因子の解明-----	10
神庭 重信 (九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野・教授)	
3. 連続剖検症例の脳病理所見と脂質代謝異常との関連-----	13
岩城 徹 (九州大学大学院医学研究院神経病理学分野・教授)	
4. アルツハイマー病の遺伝的危険因子の解明に関する研究-----	16
中別府 雄作 (九州大学生体防御医学研究所脳機能制御学分野・教授)	
5. アルツハイマー病発症におけるミトコンドリアゲノムとミトコンドリア機能 の関連についての探索-----	18
康 東天 (九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野・教授)	
6. 日本人におけるアルツハイマー病関連遺伝子の探索-----	21
久保 充明 (理化学研究所ゲノム医科学研究センター・センター長)	
7. 地域在宅高齢者の認知機能と栄養素等摂取との関連について：久山町研究---	26
内田 和宏 (中村学園大学短期大学部食物栄養学科・講師)	
8. 地域住民における運動習慣と認知症発症との関係：久山町研究-----	28
熊谷 秋三 (九州大学健康科学センター・教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	36

はじめに

わが国では、高齢化社会を迎えて、高齢人口の伸びに比例して認知症患者が急速に増加している。厚生労働省の推計では、その数は西暦 2010 年に約 200 万人となり、2025 年頃には約 310 万人に達するとされる。このように増え続ける老年期認知症の予防、治療、介護を含めた総合的な対策を講じるには、基礎的研究によって認知症の成因を解明するとともに、疫学研究によって一般住民中の認知症の実態を把握し、その危険因子を明らかにすることが必要不可欠である。しかし、現在のところ、主な認知症病型であるアルツハイマー病 (AD) の危険因子として確立されたものは年齢とアポリポ蛋白 E ϵ 4 遺伝子多型 (ApoE ϵ 4) のみである。また、脳血管性認知症 (VaD) の危険因子の検討もほとんど行われていない。一方、福岡県久山町では、1985 年から 65 歳以上の高齢住民を対象に、世界で最も精度の高い認知症の疫学調査が進行中である。また、この町では 2002 年より生活習慣病のゲノム疫学研究が開始され、その基盤が整備されている。本研究の目的は、久山町における老年期認知症の疫学調査において、AD をはじめ認知症の有病率・発症率の時代的变化を明らかにし、危険因子・防御因子を包括的な健診成績の中より明らかにすることにある。そしてゲノムワイド研究およびマイクロアレイ解析によって、AD の遺伝的危険因子を特定することを目指している。さらに、以上の成果を踏まえ、食事・運動の面からの介入試験を行い、その予防手段の確立を図ることも大きな目標である。

本年度の研究成果により、高齢者の 2 人に 1 人が死亡するまでに認知症を発症すると推定され、認知症が高齢者の ADL 障害に及ぼす影響が極めて大きいことが明らかとなった。改めて高齢化社会における認知症の重要性を再認識させる知見といえよう。また病理学的検討において、脂質代謝異常が老人斑の形成に関与する知見を得た。今後、疫学調査においてこの問題を検証する必要がある。ゲノム研究およびマイクロアレイ解析において、APOE 遺伝子および PICALM 遺伝子多型が AD 発症に密接に関連することを確認し、脳内インスリン不応答性に関与する遺伝子が AD 発症に関与する可能性を見出した。また運動疫学において、継続的な運動習慣が AD 発症を予防することが明らかとなった。今後、研究をさらに推し進め、運動、食事性因子、高血圧・糖尿病などの症候因子を含む包括的な健診を基盤とした追跡調査とわが国のトップレベルのゲノム解析によって、認知症の危険因子・防御因子を解明していく所存である。その成果によって認知症の予防手段が確立され、引いては国民の保健・医療・福祉の向上や高齢者医療費の削減につながることを期待したい。

研究代表者 清原 裕

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
アルツハイマー病の危険因子の解明と予防に関する大規模ゲノム疫学研究
総括研究報告

研究代表者 清原 裕
(九州大学大学院医学研究院環境医学分野・教授)

研究要旨 2005年に福岡県久山町で行われた高齢者調査に参加した65歳以上の住民1,550人（受診率90%）において、認知症が日常生活動作（ADL）障害に及ぼす影響を検討した。ADL障害はBarthel Indexを用いて評価した。久山町の高齢者におけるADL障害者の頻度は20.1%であった。ADL障害の原因疾患として認知症が32%と最も多かった。また、1988年の久山町循環器病健診に参加した60歳以上の認知症のない住民1,193人を17年間前向きに追跡し、地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率を検討した。その結果、全認知症発症の生涯リスクは54.8%であった。病型別にみた生涯リスクは、アルツハイマー病（AD）33.2%、脳血管性認知症（VaD）16.9%だった。

1998年から2003年の期間に死亡した久山町住民の連続剖検例211例のうち、1988年の久山町健診で空腹時採血を行った147例を対象とし、脂質異常症とADの病理学的変化との関連を検討した。その結果、血清総コレステロールとLDLコレステロールは老人斑の出現と有意な関連を認めた。

本研究では、ADの遺伝的要因を検討することを目的としたマイクロアレイ解析およびゲノムワイド研究を行った。マイクロアレイ解析のために、2008年12月より剖検時に前頭葉、側頭葉、海馬、後頭葉から検体を採取し、凍結保存した。このうち、88症例の脳組織を解析に用いた。AD患者の剖検脳およびモデルマウスの海馬から調製したRNAを用いたマイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイリングから、ADの病理変化が脳におけるインスリン不応答を引き起こす可能性が示された。ゲノムワイド研究では、九州大学およびバイオバンクジャパンで収集された2つの患者・対照集団を用いて、AD関連遺伝子のゲノムワイド関連解析を実施した。73万SNPを測定した結果、日本人においてもAPOE遺伝子は強力なAD関連遺伝子であることが確認されたが、APOE遺伝子以外のAD関連遺伝子を同定することはできなかった。今後は、今回用いた検体のAPOEの遺伝子型のタイピングを行って、APOEの遺伝子型で多変量調整または層別した解析を行う予定である。さらに、九州大学で収集した825名のAD患者と認知症のない久山町住民2,934名のDNAサンプルを用いて、これまでに欧米人を対象としたゲノムワイド研究で同定されたAD関連遺伝子の再現性研究を行った。その結果、APOEε4陽性者におけるADを有するリスクは陰性者に比べ4.54倍（年齢調整）高かった。APOE以外の遺伝子では、PICALMがADと有意な関連を示した（オッズ比:1.23）。ミトコンドリアゲノムとADとの関連を検討するために、2005年の久山町高齢者調査に参加した65歳以上の住民のうちDNAサンプルが得られた1,309人においてミトコンドリアDNA配列を決定した。対象者中にAD患者66人を認めた。その結果np16227の変異がAD患者群で有意に高頻度であった。さらに、本研究では線虫を用いた機能的スクリーニングにより、マイトファーゼ遺伝子のスクリーニングにKeimaが有用であることを確認した。

食習慣に関する検討では、食事パターンを用いた介入研究に関する文献の系統的レビューを行った。検索された論文201編のうち、関連のない文献を除外した39編を選択した。そのうち、DASH食による介入が9編、地中海食による介入が8編であった。運動習慣に関する検討では、1988年から65歳以上の認知症のない731人を17年間前向きに追跡し、運動習慣の継続状態と認知症発症の関係を検討した。1983年および1988年の運動習慣に基づき、対象者を運動なし、運動開始、運動中止、運動継続の4群に分類すると、運動なし群に対する全認知症発症の相対危険は、運動開始群0.80、運動中止群0.77、運動継続群0.66で、運動継続群において有意に低かった。

研究分担者：

神庭 重信	(九州大学大学院医学研究院精神病理学分野・教授)
岩城 徹	(九州大学大学院医学研究院 神経病理学分野・教授)
中別府 雄作	(九州大学生体防御医学研究所脳機能制御学分野・教授)
康 東天	(九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野・教授)
久保 充明	(理化学研究所ゲノム医科学研究センター・副センター長)
内田 和宏	(中村学園大学・講師)
熊谷 秋三	(九州大学健康科学センター・教授)

A. 研究目的

わが国では、高齢人口が急速に増加し、高齢者の精神疾患として最も頻度の高い認知症が大きな医療・社会問題となっている。このように増え続ける認知症の予防対策を講じるには、地域住民における認知症の現状および認知症発症の危険因子・防御因子を明らかにすることが重要である。本研究では、老年期認知症の疫学調査において、認知症が地域社会に及ぼす影響を明らかにする。また、脂質代謝異常症とアルツハイマー病 (AD) の病理学的変化との関連を剖検組織の病理学的検討を用いて検証する。そしてゲノムワイド研究およびマイクロアレイ解析によってアルツハイマー病の遺伝的危険因子を特定する。さらに、食事・運動の面からの介入試験を行う準備を行う。

B. 研究方法

2005 年に福岡県久山町で行われた高齢者調査に参加した 65 歳以上の住民 1,550 人 (受診率 90%) を対象に認知症が ADL 障害に及ぼす影響を検討した。Barthel Index、長谷川式簡易知能評価スケール、Mini-Mental State Examination、既往歴などについて質問紙を用いた面接調査を行った。評価項目は ADL 障害であり、Barthel Index の合計得点が 95 点以下のものを ADL 障害ありと定義した。ADL 障害の原因疾患の評価は、質問紙の成績、久山町循環器病健診の成績、臨床カルテ、画像所見を用いて行った。ADL 障害の原因疾患は、脳血管疾患、認知症、整形外科的疾患、その他の疾患に分けて分類し、最終的な ADL 障害の程度に寄与した疾患を原因疾患とした (清原)。

さらに、1988 年の久山町循環器病健診に参加した 60 歳以上の認知症のない久山町住 1,193 人 (受診率 90%) を 17 年間前向きに追跡し、地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率を検討した。認知症の臨床診断は、米国精神医学会による精神疾患の診断と統計のためのマニュアル改訂第 3 版 (DSM-III-R) に基づいて行った。対象者が死亡した

場合は九州大学病理学教室で剖検を行い、詳細な神経病理学的評価を行った (清原、神庭、岩城)。追跡期間中に、350 例の全認知症の発症を認めた。そのうち、AD は 191 例、脳血管性認知症 (VaD) は 117 例であった。この追跡調査の成績からワイブル比例ハザードモデルを用いて推定生存関数と認知症の推定発症関数は作成した。対象者全員が死亡すると推定されるまでの期間の認知症の累積発症率 (生涯リスク) の算出には、競合リスクモデルを用いた (清原)。

1998 年 10 月 1 日から 2003 年 3 月 31 日の期間に死亡した久山町住民 290 名のうち、九州大学で解剖した連続剖検は 211 例であった (剖検率: 73%)。そのうち、1988 年の健診を受診し、空腹時採血を行った 147 例を対象とし、脂質異常症と AD の病理学的変化との関連を検討した。剖検脳データベースよりパラフィン切片を用いて、平野銀染色およびタウ蛋白免疫染色を行った。AD の病理学的変化について、老人斑の評価は CERAD criteria、神経原線維変化は Braak and Braak stage 分類に基づいて行った。脂質関連因子として、総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪とアルツハイマー病の病理との関連を統計学的に解析した。(岩城)。

AD の遺伝的要因を検討することを目的としたマイクロアレイ解析およびゲノムワイド研究を行った。2008 年 12 月より剖検時に前頭葉、側頭葉、海馬、後頭葉から検体を採取し、これまでに 100 症例分を凍結保存した。このうち、88 症例の脳組織を解析に用いた (岩城・中別府)。また、AD モデル動物 (3 x Tg-AD ホモ接合マウス) とミトコンドリア転写因子 TFAM-Tg マウスの導入を行った (中別府)。これらの剖検脳およびモデルマウスの海馬から高品質の RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、両者の比較検討に基づき AD 脳特異的に発現変化する遺伝子を同定した (中別府)。

AD 関連遺伝子の同定を目的としたゲノムワイド研究を行うために、2008 年度より九州大学病院精神科および 21 の関連施設・病院の連携を構築し、AD の血液サンプル収集を開始した (神庭)。60 歳以上の認知症患者のうち、病歴・画像検査・神経心理検査により AD と診断された患者で、研究への同意が得られた 827 例を AD 群とした。理化学研究所ゲノム医科学研究センターが保有する DNA サンプル 8,238 例を対照群とした。SNP のタイピングには、73 万 SNP を搭載したイルミナ社の OmniExpress ビーズチップを用いた。種々の品質管理フィルターをパスした AD 群 816 例および対照群 7,992 例を用いて、ゲノムワイド関連解析を実施した (久保)。

さらに、九州大学で収集した 825 名の AD 患者と認知症のない久山町住民 2,934 名の DNA サンプルを用いて、これまでに欧米人を対象とした GWAS

研究で同定された AD 関連遺伝子の再現性研究を行った。遺伝子解析には multiplex PCR-based Invader assay を用いた。白人を対象とした GWAS で報告された 8 つの AD 関連遺伝子の SNPs うち、Y 遺伝子と相同性 (99.3%) が高く解析できなかった PCDH11X 上の SNPs を除いた 7 つの SNPs に、APOE の遺伝子多型を同定するための 2 つの一塩基多型 (SNP) を加えた 9 つの SNPs を遺伝子解析した。ロジスティック回帰分析を用いて、元研究における非リスクアレルに対するリスクアレルのオッズ比を算出した (神庭)。

AD 発症におけるミトコンドリアゲノムとミトコンドリア機能の関連について検討するために、2005 年の久山町高齢者調査に参加した 65 歳以上の住民のうち DNA サンプルの得られた 1,309 人においてミトコンドリア DNA 配列を決定した。対象者中に AD 患者 66 人を認めた (康、神庭、清原)。さらに、本研究では、オートファジーによる異常ミトコンドリアの除去機構 (マイトファジー) が認知症発症に及ぼす影響に注目し、まず RNAi (85% の遺伝子をカバーするライブラリーが存在) でノックダウンした線虫を用いて、マイトファジー関連遺伝子の機能的スクリーニング法の確立に努めた。pH 感受性蛍光タンパク質 Keima を線虫で発現させ、リソソームと融合したミトコンドリアを検出することにより一次スクリーニングを行った。二次スクリーニングは、pH 依存的に自己切断を行う cathepsinD をウェスタンブロットで検出して定量的に行った。この方法により同定した遺伝子のヒトホモログを見つけ、その遺伝子がミトコンドリアの分解に関わっているかを培養細胞で確かめた (康)。

食習慣に関する検討では、食事パターンと認知症の関係を検討した文献および、食事パターンを用いた介入研究に関する文献の系統的レビューを行った。2001 年から 2012 年 2 月までの原著論文を PubMed (MEDLINE) を用いて収集した。食事パターンと認知症とに関する論文の検索式には、「(dementia OR Alzheimer) AND "dietary pattern"」を用いた。さらに、食事パターンを用いた介入研究に関する論文の検索式には、「"dietary pattern" AND (intervention OR trial)」を用いた。食事パターンは、Gu らの分類に基づいて 1) 地中海式食事パターン (MedDiet)、2) Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) 食、3) Healthy Diet Indicator (HDI)、4) Healthy Eating Index (HEI)、5) Recommended Food Score (RFS)、6) Dietary Behavior Score (DBS)、7) その他に分類した (内田)。運動習慣に関する検討では、1988 年から 65 歳以上の認知症のない 731 名を 17 年間前向きに追跡し、運動習慣の継続と認知症発症の関係を検討した。1983 年および 1988 年の運動習慣に基づき、対象者を

運動なし、運動開始、運動中止、運動継続の 4 群に分類し、運動なし群に対する全認知症発症の相対危険を算出した (熊谷)。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき研究計画書を作成し、九州大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。研究者は、対象者の個人情報の漏洩を防ぐうえで細心の注意を払い、その管理に責任を負っている。

C. 研究結果

久山町の高齢者住民における ADL 障害に関する疫学研究では、ADL 障害者の頻度は 20.1% で、男性に比べ女性の方が高かった (男性 14.1%、女性 23.9%)。ADL 障害の原因疾患として、認知症が 32% と最も多かった。さらに、ADL 障害の重症度別に原因疾患をみると、ほぼ寝たきりに相当する重度の ADL 障害者 (Barthel Index 20 点未満) では、約 65% が認知症により ADL 障害を生じていた (清原)。

地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率に関する研究では、追跡期間中に、350 例の全認知症の発症を認めた。そのうち、AD は 191 例、VaD は 117 例であった。追跡調査の成績から、生存関数と認知症の発症関数を作成し、各追跡時点における認知症発症数を推定した。さらに、これらの関数を用いて生涯リスクを算出した結果、全認知症の生涯リスクは 54.8% (95% 信頼区間 [CI] 49.4-60.1%) であった。また、病型別にみた生涯リスクは、AD 33.2% (95% CI 26.2-40.3%)、VaD 16.9% (95% CI 13.4-20.4%) であった (清原)。

久山町の連続剖検例において脂質代謝異常症と老人斑の形成の関係を検討した結果、老人斑形成の頻度はそれぞれ総コレステロール ≤ 224 mg/dl 62.2%、総コレステロール > 224 mg/dl 86.1%、LDLC ≤ 155 mg/dl 62.7%、LDLC > 155 mg/d 85.7%、HDL ≥ 40 mg/dl 62.7%、HDL < 40 mg/dl 83.8%、TG ≤ 139 mg/d 65.2%、TG > 139 mg/dl 77.1% であった。総コレステロール高値、特に LDL コレステロール高値で HDL コレステロール低値の場合、老人斑形成のリスクが高まることが確認された (岩城)。

AD の遺伝要因を検討することを目的としたマイクロアレイ解析では、新鮮脳凍結検体 88 例において RIN6.9 以上の High quality の RNA の抽出し、前頭葉、側頭葉、海馬について全遺伝子の発現プロファイリングを得た。AD 脳における発現プロファイルをマウス AD モデルの海馬における発現プロファイルと比較したところ、精神疾患や AD に関連する遺伝子群の発現変化に加えて、両者共にインスリン不応答性を示す遺伝子発現プロフ

ファイルを示すことが明らかになった。

患者対照研究を用いたゲノムワイド研究を行うために、2010年6月までに計843例のAD患者の血液サンプルを収集した(神庭)。これらのサンプルからゲノムDNAが抽出され、2010年7月より理化学研究所横浜研究所ゲノム医科学研究センターでゲノムワイド関連解析を開始した。種々の品質管理フィルターをパスした約60.3万SNPについて、関連解析を実施した結果、APOE遺伝子領域に $p=9.0 \times 10^{-22}$ (オッズ比4.0)の非常に強い関連を認めたAPOE遺伝子領域以外には、ゲノムワイドレベルの有意水準を満たすSNPは認められなかった。なお、解析集団における集団の階層化を検討したところ、すべてのサンプルはアジア人のクラスターに存在しており、QQプロットにおけるラムダ値は1.087であることから、解析集団における集団階層化の影響は少ないと考えられた。次に、ゲノムワイド関連解析にて $p < 10^{-3}$ を示した541SNPを選択し、既報のAD関連遺伝子領域を除外した後、SNP間の連鎖不平衡を考慮して、再現性研究の候補SNP346SNPを選択した。これらのSNPについて、協力研究機関において収集された独立したAD症例を用いて再現性を検討した。再現性研究にて25SNPが $p < 0.05$ を示したが、Bonferroni補正後の有意水準である $P < 1.4 \times 10^{-4}$ を満たすものはみられず、ゲノムワイド関連解析との統合でもゲノムワイドレベルの有意水準を満たすSNPは認められなかった(久保)。さらに、九州大学で収集したAD患者と認知症のない久山町住民のDNAサンプルを用いて、これまでに欧米人を対象としたゲノムワイド研究で同定されたAD関連遺伝子の再現性を調べた。その結果、APOE- ϵ 4陰性者と比べてAPOE- ϵ 4陽性者におけるADのオッズ比(性・年齢調整)は、4.54倍高かった($P = 4.6 \times 10^{-27}$)。APOE以外の遺伝子では、性・年齢調整したADのオッズ比は、PICALM(rs3851179)でのみ有意に高かった(オッズ比1.23、95%CI 1.03-1.47)(神庭)。

2005年の久山町高齢者調査に参加した65歳以上の住民におけるADとミトコンドリアゲノムの関連について検討では、np16227のAからGへの変異の頻度がAD患者群で優位に高かった(オッズ比5.55、95%CI 2.20-13.97)。また、ミトファジー関連遺伝子の網羅的スクリーニング法の確立を行った。pHが中性領域では赤、酸性領域では緑の蛍光を発する蛍光蛋白質KEIMAを線虫の筋肉に発現させた。飢餓環境下でオートファジーにより酸性環境であるリソソームに取り込まれ、点状580 nmで発光しているのが観察された(康)。

食習慣に関する検討では、食事パターンと認知症の関係を検討した文献および、食事パターンを用いた介入研究に関する文献の系統的レビューを行った。食事パターンと認知症とに関する論文の

検索式を用いて検索された論文は951編であった。その中から認知症以外のものや原著論文でない934編を除外した17編をレビューした。横断研究が6編、追跡研究が10編、介入研究が1編であった。食事パターンの分類では、MedDietが6編と最も多かった。このうち、4編はMedDietが認知症に対し予防的に働くことが示されていた。

食事パターンを用いた介入研究に関する論文の検索式を用いて検索された論文は201編であった。その中から介入研究以外のものや原著論文でない162編を除外した39編をレビューした。食事パターン別では、DASH食が9編、MedDietが8編で、その他の単独または複数の栄養素・食品群について介入したものが22編であった(内田)。

運動習慣に関しては、運動習慣の継続状態と認知症発症の関係を検討した。その結果、全認知症発症の相対危険(多変量調整)は、運動開始群0.80(95%CI 0.42-1.52)、運動中止群0.77(95%CI 0.55-1.09)、運動継続群0.66(95%CI 0.46-0.96)であり、運動継続群においてのみ発症リスクが有意に低かった。AD発症に対する多変量調整後の相対危険は、運動開始群0.38(95%CI 0.12-1.26)、運動中止群0.78(95%CI 0.50-1.23)、運動継続群0.60(95%CI 0.36-0.99)と、AD発症においても運動継続群においてのみ有意な発症リスクの低下が認められた。一方、運動習慣の継続状態とVD発症の間に有意な関係は認めなかった(熊谷)。

D. 考察

今回の久山町における断面調査の成績ではADL障害の原因として認知症が最も多かった。中でも寝たきりに相当する重度ADL障害の原因疾患として認知症の占める割合が高かったことから、ADL障害の対策において認知症予防は極めて重要であるといえよう。また、本研究では、地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率を推定した。その結果、高齢者の2人に1人が死亡するまでに認知症を発症すると推定され、AD発症の生涯リスクは33%とVaDの17%に比べ高かった。この値は過去に欧米諸国から報告された値(20-40%)とほぼ同様であった。我々は以前に糖尿病がAD発症の危険因子である事を報告した。生活習慣の欧米化に伴う糖尿病の増加が、AD発症の生涯リスクの上昇に関与している可能性がある。

久山町における連続剖検例を用いた検討では、脂質異常症が老人斑の形成に関与することを明らかにした。脳内のコレステロール代謝に関わるAPOEの遺伝子多型は、ADの強力な危険因子であることが知られている。血液中と脳内のコレステロール代謝は、血液脳関門により隔絶されているため、脳内コレステロールは血清コレステロールとは別の代謝・輸送系を有するといわれている。今回得られた血清脂質異常症と老人斑との関連

に関する知見を分子レベルで解明するためには、脂質代謝異常が脳内の脂質代謝に及ぼす影響を検討する必要がある。

マイクロアレイ解析では、AD 患者の脳においてインスリン不応答を引き起こす遺伝子発現変化が明らかになった。我々は、昨年までに、久山町の追跡研究において糖代謝異常が AD 発症の危険因子となること、久山町の剖検例の検討において、糖代謝異常やインスリン抵抗性が老人斑形成に関与することを明らかにしてきたことから、今回の結果は極めて興味深い所見であると思われる。

ゲノムワイド研究では、日本人においても APOE 遺伝子は強力な AD 関連遺伝子であることが確認されたが、APOE 遺伝子以外の AD 関連遺伝子を同定することはできなかった。今後は、今回用いた検体の APOE の遺伝子型のタイピングを行って、性、年齢および APOE の遺伝子型を調整した関連解析、また APOE の遺伝子型で層別した関連解析を行い、日本人の新たな AD 関連遺伝子の同定を目指す予定である。さらに、既知の AD 関連遺伝子の日本人サンプルを用いた再現性の検討では、APOE 遺伝子に加えて、PICALM が日本人を含む多人種間で共通した AD の遺伝的危険因子であった。PICALM が AD 発症に関与する機序は未だ明らかではないが、PICALM 遺伝子産物はあらゆる神経細胞に出現し、神経伝達や記憶形成に重要な役割を果たす vesicle-associated membrane protein 2 の輸送に関係すると考えられている。また、PICALM 遺伝子産物はアミロイド前駆蛋白のエンドサイトーシスにも関係するとの考えもある。つまり、PICALM の機能的変異は、シナプスの機能やアミロイド前駆蛋白のエンドサイトーシスに影響を及ぼし、AD 発症に関与するのかもしれない。

ミトコンドリア遺伝子と AD の関係の検討では、np16227 の遺伝子多型が AD の有無と有意な関係を示した。np16227 遺伝子の機能は未だ十分に検討されていないため、この遺伝子が AD 発症に関与する機序の解明が必要である。しかし、本サンプル中の AD 患者数が少ないため、今後機能解析に進む前に、他の集団においても同様の関係が得られることを確認する必要があると思われる。

マイトファージによるミトコンドリアの分解機構の研究は酵母などの単細胞生物での研究が先行しており、多細胞生物では殆ど行われていない。これは、多細胞生物におけるマイトファージの検出の困難さによるものである。これまでマイトファージを検出するには、電子顕微鏡で観察するか、ウェスタンブロットの結果から推定するしかなかった。今回用いた Keima タンパク質を使った方法は非常に簡便で再現性も高く、今後マイトファージの研究をするうえで有用なツールとなることが期待される。

本研究では、これまでに食事パターンと認知症

に関する疫学研究で主に用いられている食事パターンについて検証した。その結果、各研究で用いられた食事パターンに共通する栄養素として「低脂肪」が、食品群として「野菜」「果物」の高摂取と「食塩」の低摂取が挙げられた。脂肪に関しては、特に飽和脂肪酸と認知症との関連が指摘されている。また、野菜や果物、食塩については、カリウム、マグネシウム等による血圧上昇抑制作用や、食物繊維による血中コレステロール低下作用によって動脈硬化や脳梗塞を予防することで認知症予防につながると考えられている。今後、これらの点について十分に考慮して介入計画をたてる必要があると思われる。

運動習慣の継続と認知症発症の検討では、運動習慣継続群の全認知症および AD 発症の相対危険度は、運動習慣なし群に比較し有意に低かった。これは、運動習慣が AD 発症の予防因子となりうる可能性を支持する結果であり、興味深い。今後は、定量化された身体活動・運動量および体力の変化を暴露指標として、認知症に関する前向き研究を実施するとともに、運動介入による認知機能改善に最も適した運動プログラムの検討を行う予定である。

E. 結論

本研究では、脂質代謝異常が老人斑の形成に関与することや、APOE 遺伝子、PICALM 遺伝子、脳内インスリン不応答性に関与する遺伝子が AD 発症に関与すること、運動習慣の継続が AD 発症のリスクを低下させることが示された。今後、脂質代謝異常などの AD の危険因子を遺伝的側面からの検討も加え、介入試験による予防の可能性を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

- 認知症が高齢者の ADL 障害に及ぼす影響は大きい（清原）
- 高齢者の 2 人に 1 人が死亡するまでに認知症を発症すると推定される（清原）
- 病理学的に、脂質代謝異常が老人斑の形成に関与する。（岩城）
- APOE 遺伝子および PICALM 遺伝子多型が AD 発症に関与する可能性がある（神庭・久保）。
- 脳内インスリン不応答性に関与する遺伝子が AD 発症に関与する可能性がある（岩城・中別府）。
- 運動習慣の継続が AD 発症を予防する可能性がある。（熊谷）

H. 知的財産権の出願・登録状況

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（認知症対策総合研究事業）
アルツハイマー病の危険因子の解明と予防に関する大規模ゲノム疫学研究
分担研究報告

認知症が地域社会に及ぼす影響：久山町研究

研究代表者 清原 裕
(九州大学大学院医学研究院環境医学分野・教授)

研究要旨 2005年に福岡県久山町で行われた高齢者調査に参加した65歳以上の高齢住民1,550人（受診率90%）において、認知症がADL障害に及ぼす影響を検討した。ADL障害はBarthel Indexを用いて評価した。久山町の高齢者におけるADL障害者の頻度は20.1%であった。ADL障害の原因疾患として、認知症が32%と最も多かった。

さらに、1988年の久山町循環器病健診に参加した60歳以上の認知症のない久山町住民1,193人（受診率90%）を17年間前向きに追跡し、地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率を検討した。対象者全員が死亡すると推定されるまでの期間の認知症の生涯リスクの算出には、競合リスクモデルを用いた。その結果、全認知症の生涯リスクは54.8%(95%信頼区間[CI] 49.4-60.1%)であった。また、病型別にみた生涯リスクは、アルツハイマー病33.2%(95%CI 26.2-40.3%)、脳血管性認知症16.9%(95%CI 13.4-20.4%)であった。

本研究の成績から、認知症が地域社会に及ぼす影響は極めて大きく、健全な高齢化社会を迎えるために、認知症対策と効率的な介護行政の確立が急務であると考えられる。

A. 研究目的

わが国では、超高齢化社会を迎えて、高齢人口の伸びに比例して認知症患者が急速に増加している。このように増え続ける認知症の予防対策を講じるには、疫学研究によって、認知症が地域社会に及ぼす影響を把握することは必要である。そこで、福岡県久山町で行われた認知症の断面調査の成績から、認知症がADL障害に及ぼす影響を検討した。さらに追跡調査の成績から、高齢者が生涯に認知症を発症する確率を算出した。

B. 研究方法

a) 認知症がADL障害に及ぼす影響

2005年に福岡県久山町で行われた高齢者調査に参加した65歳以上の高齢住民1,550人（受診率90%）において、Barthel Index, 長谷川式簡易知能評価スケール, Mini-Mental State Examination, 既往歴などについて質問紙を用いた面接調査を行った。調査期間は、2005年10月から2006年6月であった。調査場所は、自宅、公民館でおこない、入所している対象者には施設、病院に訪問調査を行った。評価項目は、ADL障害であり、Barthel Indexの合計得点が95点以下のものをADL障害ありと定義した。ADL障害の原因疾患の評価は、質問紙の成績に加えて久山町循環器病健診や、臨床カルテ、画像所見を用いて行った。ADL障害の原因疾患は、脳血管疾患、認知症、

整形外科的疾患、その他の疾患に分けて分類し、最終的なADL障害の程度に寄与した疾患を原因疾患とした。

b) 地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率

1988年の久山町循環器病健診に参加した60歳以上の認知症のない久山町住1,193人（受診率90%）を1988年11月から2005年10月まで17年間前向きに追跡し、地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率を検討した。

対象者が死亡した場合は九州大学病理学教室で剖検を行い、詳細な神経病理学的評価を行った。なお、認知症の臨床診は、米国精神医学会による精神疾患の診断と統計のためのマニュアル改訂第3版(DSM-III-R)に基づいて行った。この追跡調査の成績からワイブル比例ハザードモデルを用いて推定生存関数と認知症の推定発症関数は作成した。対象者全員が死亡すると推定されるまでの期間の認知症の累積発症率(生涯リスク)の算出には、競合リスクモデルを用いた。

(倫理面の配慮)

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」に基づき研究計画書を作成し、九州大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。本研究は、すべての対象者からインフォームドコンセントを取得したうえで実施した。研究者は、対象者の個人情報

の漏洩を防ぐうえで細心の注意を払い、その管理に責任を負っている。

C. 研究結果

a) 認知症がADL障害に及ぼす影響

久山町の高齢者におけるADL障害者の頻度は20.1%で、男性に比べ女性の方が高かった(男性14.1%、女性23.9%)。ADL障害の原因疾患として、全体では認知症が32%と最も多かった(図1)。男女別に検討すると、男性では脳血管疾患と認知症が、女性では認知症と整形外科的疾患が多かった。さらに、ADL障害の重症度別に原因疾患をみると、ほぼ寝たきりに相当する重度のADL障害者(Barthel Index 20点未満)では、約65%が認知症によりADL障害を生じていた。

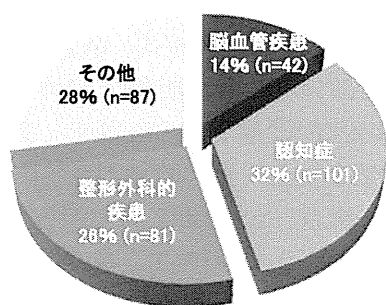


図1. ADL障害の原因疾患

久山町ADL障害者男女311人、65歳以上、2005年

b) 地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率

追跡期間中に、350例の全認知症の発症を認めた。そのうち、アルツハイマー病(AD)は191例、脳血管性認知症(VaD)は117例であった。追跡調査の成績から、生存関数と認知症の発症関数を作成し、各追跡時点における認知症発症数を推定した。さらに、これらの関数を用いて生涯リスクを算出した結果、全認知症の生涯リスクは54.8%(95%信頼区間[CI] 49.4-60.1%)であった(図2)。また、病型別にみた生涯リスクは、AD 33.2%(95%CI 26.2-40.3%)、VaD 16.9%(95%CI 13.4-20.4%)であった。

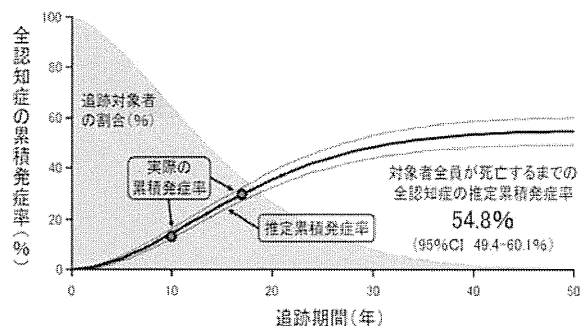


図2. 地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率

久山町男女1,193人、60歳以上、1988-2005年

D. 考察

今回の久山町における断面調査の成績ではADL障害の原因として認知症が最も多かった。中でも寝たきりに相当する重度ADL障害の原因疾患として認知症の占める割合が高かったことから、ADL障害の対策において認知症予防は極めて重要であるといえよう。さらに、臨床記録を用いてADL障害の原因を詳細に検討すると、認知症によりADL障害を生じた人のうち、22%は脳血管障害後に認知症を発症していた。したがって、脳血管障害の予防も将来の認知症と重度ADL障害を予防する上で不可欠である。

本研究では、地域高齢者が生涯に認知症を発症する確率を推定した。その結果、高齢者の2人に1人が死亡するまでに認知症を発症すると推定され、中でもAD発症の生涯リスクは33%とVaDの17%に比べ高かった。この値は過去に欧米諸国から報告された値(20-40%)とほぼ同様であった。我々は以前に糖尿病がAD発症の危険因子である事を報告した(Neurology 77:1126-1134, 2011)。生活習慣の欧米化に伴う糖尿病の増加が、AD発症の生涯リスクの上昇に関与しているのかもしれない。

これらの成績は、認知症が地域社会に及ぼす影響は極めて大きいことを示唆しており、健全な高齢化社会を迎えるために、認知症対策と効率的な介護行政の確立が急務である。

E. 結論

本研究の成績から、認知症が地域社会に及ぼす影響は大きく、より健全な高齢化社会を迎えるために、認知症対策と効率的な介護行政の確立が重要な課題になったと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: The Hisayama Study. Neurology 77:1126-1134, 2011
- Doi Y, Ninomiya T, Hata J, Hirakawa Y, Mukai N, Ikeda F, Fukuhara M, Iwase M, Kiyohara Y. N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide and Risk of Cardiovascular Events in a Japanese Community: The Hisayama Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31: 2997-3003, 2011
- Matsuzaki T, Sasaki K, Hata J, Hirakawa

- Y, Fujimi K, Ninomiya T, Suzuki SO, Kanba S, Kiyohara Y, Iwaki T. Association of Alzheimer disease pathology with abnormal lipid metabolism: The Hisayama Study. *Neurology* 77:1068-1075, 2011
4. Ohara T, Ninomiya T, Kubo M, Hirakawa Y, Doi Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y. Apolipoprotein Genotype for Prediction of Alzheimer's Disease in Older Japanese: The Hisayama Study. *J Am Geriatr Soc* 59:1074-1079, 2011
 5. Ninomiya T, Ohara T, Hirakawa Y, Yoshida D, Doi Y, Hata J, Kanba S, Iwaki T, Kiyohara Y. Midlife and late-life blood pressure and dementia in Japanese elderly: the Hisayama Study. *Hypertension* 58:22-28, 2011
 6. Usui T, Ninomiya T, Nagata M, Doi Y, Hata J, Fukuhara M, Kiyohara Y. Albuminuria as a Risk Factor for Peripheral Arterial Disease in a General Population. *J Atheroscler Thromb* 18:705-712, 2011
 7. Hata J, Doi Y, Ninomiya T, Fukuhara M, Ikeda F, Mukai N, Hirakawa Y, Kitazono T, Kiyohara Y. Combined Effects of Smoking and Hypercholesterolemia on the Risk of Stroke and Coronary Heart Disease in Japanese: The Hisayama Study. *Cerebrovasc Dis* 31:477-484, 2011
 8. Yonemoto K, Doi Y, Hata J, Ninomiya T, Fukuhara M, Ikeda F, Mukai N, Iida M, Kiyohara Y. Body mass index and stroke incidence in a Japanese community: the Hisayama study. *Hypertens Res* 34:274-279, 2011
2. 学会発表
 1. 清原 裕. 認知症の実態とその予防: 久山町研究. 第12回日本健康支援学会年次学術集会教育講演、福岡市、2011.2
 2. 清原 裕. 認知症のコホート研究: 久山町研究<シンポジウム>神経内科領域における前方向的コホート研究から見てきたもの. 第52回日本神経学会学術大会、名古屋市、2011.5
 3. 小原知之、二宮利治、神庭重信、清原 裕. 地域高齢者における認知症の実態: 久山町研究<シンポジウム6>生物学的精神医学におけるコホート研究の重要性. 東京、2011.5
 4. 清原 裕. 変貌する心血管病の現状と課題: 久山町研究<シンポジウム2>我が国の大規模コホート研究のこれまでとこれから. 第47回日本循環器病予防学会・日本循環器管理研究協議会総会、福岡市、2011.6
 5. 清原 裕. 1. 高齢者における脳血管疾患を考慮した脂質管理. 1) 脂質異常症と脳卒中の疫学. 第53回日本老年医学会学術集会イブニングセミナー、東京、2011.6
 6. 吉田大悟、二宮利治、福原正代、清原 裕. 地域高齢者における日常生活動作 (ADL) 障害の頻度の時代的推移: 久山町研究. 第27回日本老年学会総会・第53回日本老年医学会学術集会、東京、2011.6
 7. 小澤未央、二宮利治、小原知之、内田和宏、福原正代、清原 裕. 地域一般住民におけるカルシウム、マグネシウム、カリウムの摂取量と認知症発症の関連: 久山町研究. 第27回日本老年学会総会・第53回日本老年医学会学術集会、東京、2011.6
 8. 清原 裕. 日本人におけるエビデンス構築の意義: Hisayama Study を通して. 第54回日本歯周病学会秋季学術大会基調講演、下関市、2011.9
 9. 清原 裕. 変貌する日本人の生活習慣病の現状と課題: 久山町研究. 第61回日本体質医学会総会特別講演、東京都、2011.10
 10. 清原 裕. 糖尿病と認知症の疫学: 久山町研究<シンポジウム5>生活習慣病と認知症「糖尿病と認知症」. 第30回日本認知症学会学術集会、東京都、2011.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

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（認知症対策総合研究事業）
アルツハイマー病の危険因子の解明と予防に関する大規模ゲノム疫学研究
分担研究報告

アルツハイマー病の遺伝的危険因子の解明

研究分担者 神庭 重信
(九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野・教授)

研究要旨 九州大学病院精神科および 21 の関連施設・病院との連携で収集した 825 名のアルツハイマー病 (AD) 患者と認知症のない福岡県久山町住民 2,934 名のゲノム DNA を比較して、白人を対象としたゲノムワイド関連解析で同定された AD 関連遺伝子の再現性研究を行った。その結果、アポリポ蛋白 E ϵ 4 (APOE- ϵ 4) 陰性者と比べて、APOE- ϵ 4 陽性者における性・年齢調整した AD のオッズ比は 4.54 倍高かった ($P = 4.6 \times 10^{-27}$)。APOE 以外の遺伝子では、性・年齢調整した AD のオッズ比は、PICALM (rs3851179) でのみ有意に高かった (オッズ比:1.23, 95% 信頼区間:1.03-1.47)。さらに、rs3851179 のリスクアレルと APOE- ϵ 4 の有無で 6 群に分けて両者のない群を基準とすると、APOE- ϵ 4 陽性者における AD のオッズ比は rs3851179 のリスクアレル数にかかわらず、いずれも有意に高かった。APOE- ϵ 4 陰性者では、rs3851179 のリスクアレルが増えると、AD のオッズ比が上昇する傾向があったが (傾向性 p 値:0.053)、APOE- ϵ 4 陽性者では、その様な傾向は認めなかった (傾向性 p 値:0.38)。以上の成績より、PICALM は日本人においても AD の有意な遺伝的危険因子であることを示した。

A. 研究目的

認知症の中で最も多い病型であるアルツハイマー病 (AD) の遺伝的危険因子としてアポリポ蛋白 E ϵ 4 対立遺伝子 (APOE- ϵ 4) が広く知られている。近年、白人を対象としたゲノムワイド関連解析 (GWAS) において、新たな AD 関連遺伝子として 8 つの遺伝子が報告された。しかしこれらの AD 関連遺伝子は白人を対象とした結果であり、遺伝的背景の違う他人種において再現されるかは定かではない。そこで本研究では、日本人の AD 患者群と認知症のない対照群を比較して、白人を対象とした GWAS で同定された AD 関連遺伝子が日本人でも再現できるか検討した。

B. 研究方法

AD 群は九州大学病院精神科および 21 の関連施設・病院との連携により収集された AD 患者 825 名とした。対照群は 2002 年に遺伝子研究の同意を得た 40 歳以上の福岡県久山町住民 3,196 名のうち、2007 年までに認知症を発症した 262 名を除いた 2,934 名とした。遺伝子解析には multiplex PCR-based Invader assay を用いた。白人を対象とした GWAS で報告された 8 つの AD 関連遺伝子のうち、X 染色体上にある PCDH11X は、Y 遺伝子と相同性が高かった (99.3%) ため、遺伝子解析できなかった。残った 7 つの遺伝子に、APOE の遺伝子多型を同定するための 2 つの一塩基多型 (SNP) を加えた 9SNPs を遺伝子解析した。本遺伝子解析

における全 call 率は 99.6% だった。統計解析は、ロジスティック回帰分析を用いて、元研究における非リスクアレルに対するリスクアレルのオッズ比を算出した。

(倫理面の配慮)

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき研究計画書を作成し、九州大学医学部および理化学研究所横浜研究所ゲノム医科学研究センター倫理委員会の承認を得て行われた。全ての対象者からインフォームド・コンセントを取得した。AD 群については、対象者のみならず代諾者からもインフォームド・コンセントを取得した。研究者は、対象者の個人情報の漏洩を防ぐうえで細心の注意を払い、その管理に責任を負っている。

C. 研究結果

APOE- ϵ 4 陰性者と比べて性・年齢調整した APOE- ϵ 4 陽性者における AD のオッズ比は、4.54 倍高かった ($P = 4.6 \times 10^{-27}$)。APOE 以外の遺伝子では、性・年齢調整した AD のオッズ比は、PICALM (rs3851179) でのみ有意に高かった (オッズ比:1.23, 95% 信頼区間:1.03-1.47, 表 1)。この関係は、性、年齢、APOE- ϵ 4 の有無で多変量調整しても変わらなかった。さらに、PICALM (rs3851179) のリスクアレルの有無と APOE- ϵ 4 の有無で 6 群に分けて、両者のない群を基準にし

て他の群におけるADのオッズ比を求めた(図1)。その結果、APOE-ε4陽性者におけるADのオッズ比はrs3851179のリスクアレル数にかかわらず、いずれも有意に高かった。APOE-ε4陰性者ではrs3851179のリスクアレルが増えると、ADのオッズ比が上昇する傾向があったが(傾向性p値:0.053)、APOE-ε4陽性者では、その様な傾向は認めなかった(傾向性p値:0.38)。また、APOE-ε4とrs3851179との間に交互作用は認めなかった(交互作用p値=0.68)。

D. 考察

本研究はPICALMが日本人を含む多人種間で共通したADの遺伝的危険因子であることを示した報告である。

PICALMがAD発症に関与する機序は未だ明らかではない。PICALM遺伝子産物はあらゆる神経細胞に出現し、神経伝達や記憶形成に重要な役割を果たすvesicle-associated membrane protein 2の輸送に関係すると考えられている。また、PICALM遺伝子産物はアミロイド前駆蛋白のエンドサイトーシスにも関係するとの考えもある。つまり、PICALMの機能的変異は、シナプスの機能やアミロイド前駆蛋白のエンドサイトーシスに影響を及ぼし、AD発症に関与するのかも知れない。

本研究によって、ADの関連遺伝子が解明されると考えられる。その成果は、ADをはじめとする認知症の病態解明と治療法の飛躍的進歩とともに、認知症の予防手段の確立をもたらし、高齢者医療費の削減につながると期待される。

E. 結論

日本人においてPICALMは、APOE-ε4以外のAD関連遺伝子であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ohara T, Ninomiya T, Kubo M, Hirakawa Y, Doi Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y: Apolipoprotein genotype for prediction of Alzheimer's disease in older Japanese: the Hisayama Study. *J Am Geriatr Soc.* 59: 1074-79, 2011
- Ninomiya T, Ohara T, Hirakawa Y, Yoshida D, Doi Y, Hata J, Kanba S, Iwaki T, Kiyohara Y: Midlife and late-life blood pressure and dementia in Japanese elderly: the Hisayama Study. *Hypertension.* 58: 22-28, 2011
- Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y: Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama

- Study. *Neurology.* 77: 1126-1134, 2011
- Matsuzaki T, Sasaki K, Hata J, Hirakawa Y, Fujimi K, Ninomiya T, Suzuki SO, Kanba S, Kiyohara Y, Iwaki T: Association of Alzheimer disease pathology with abnormal lipid metabolism: the Hisayama Study. *Neurology,* 77(11):1068-75, 2011
- Kato TA, Shinfuku N, Sartorius N, Kanba S: Are Japan's hikikomori and depression in young people spreading abroad? *The Lancet.* 378: 1070, 2011
- Kato TA, Monji A, Yasukawa K, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Hashioka S, Han YH, Kasai M, Sonoda N, Hirata E, Maeda Y, Inouchi T, Utsumi H, Kanba S: Aripiprazole inhibits superoxide generation from phorbol-myristate-acetate (PMA)-stimulated microglia in vitro: implication for antioxidative psychotropic actions via microglia. *Schizophrenia Research.* 129:172-182, 2011
- Nakao T, Sanematsu H, Yoshiura T, Togao O, Murayama K, Tomita M, Masuda Y, Kanba S: fMRI of patients with social anxiety disorder during a social situation task. *Neuroscience Research.* 69:67-72, 2011

2. 学会発表

- 小原知之, 二宮利治, 神庭重信, 清原裕: 地域高齢者における認知症の実態: 久山町研究. <シンポジウム 6>生物学的精神医学におけるコホート研究の重要性, 第33回日本生物学的精神医学会, 東京都, 2011.5
- 神庭重信: <シンポジウム 5>進化論と生物学的精神医学の融合. 座長, シンポジスト, 第33回日本生物学的精神医学会, 東京都, 2011.5
- 神庭重信: うつ病臨床のゆくえ-求められるしなやかな病態把握. 座長, 第8回日本うつ病学会, 大阪, 2011.7
- Kanba S: Depression in Asia. WPA regional meeting in Kaohsiung, symposium speaker, Taiwan, 2011.11
- 神庭重信: 心のなかの身体, 身体の中の心. 会長講演, 第24回日本総合病院精神医学会総会, 福岡, 2011.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得 なし
- 実用新案登録 なし
- その他 なし

表 1. 日本人におけるアルツハイマー病とその関連遺伝子との関係

SNP	遺伝子	染色体	Position	アレル*	MAF		性・年齢調整	
					AD 群	対照群	オッズ比 (95% CI)	P
rs6656401	CR1	1	205758672	[G/A]	0.04	0.04	1.21 (0.78-1.89)	0.39
rs744373	BIN1	2	127611085	[A/G]	0.34	0.31	1.20 (0.99-1.44)	0.06
rs11136000	CLU	8	27520436	[T/C]	0.25	0.28	1.06 (0.88-1.29)	0.54
rs3851179	PICALM	11	85546288	[T/C]	0.39	0.42	1.23 (1.03-1.47)	0.02
rs2373115	GAB2	11	77768798	[T/G]	0.45	0.42	0.85 (0.72-1.01)	0.06
rs11610206	FAM113B	12	45925793	[C/T]	0.09	0.10	1.33 (0.99-1.77)	0.053
rs597668	EXOC3L2	19	50400728	[T/C]	0.43	0.43	0.93 (0.78-1.11)	0.44

SNP: 一塩基多型; MAF: minor allele frequency; CI: 信頼区間.

*アレル 2 は元研究におけるリスクアレルを示す.

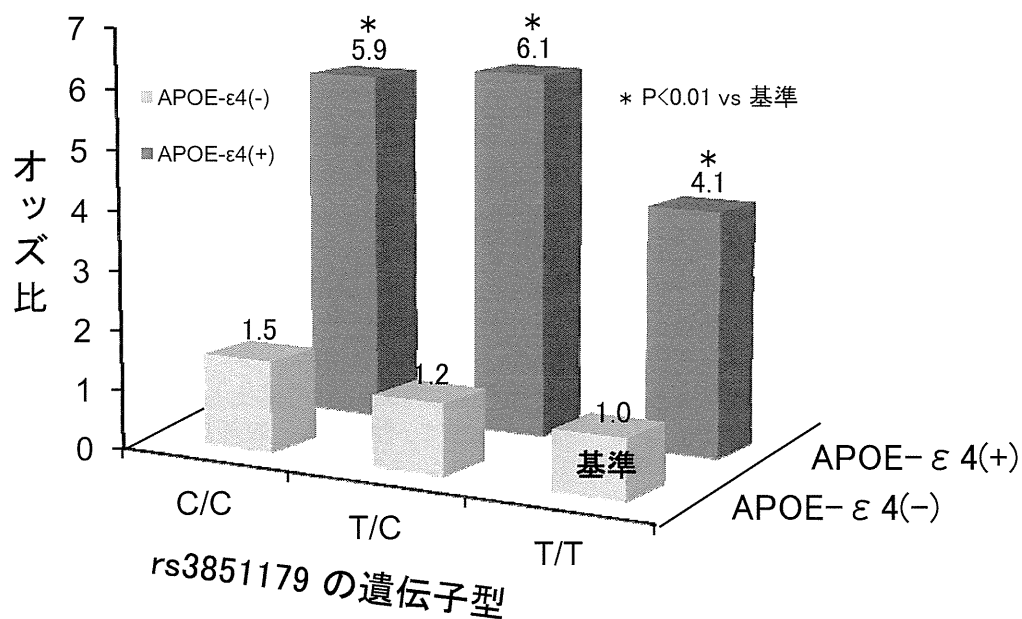


図1. rs3851179遺伝子型がアルツハイマー病にあたる影響
アルツハイマー病群825名、久山町男女2,934名、性・年齢調整

厚生労働科学研究（認知症対策総合研究事業）
アルツハイマー病の危険因子の解明と予防に関する大規模ゲノム疫学研究
分担研究報告

連続剖検症例の脳病理所見と脂質代謝異常との関連

研究分担者：岩城 徹
(九州大学大学院医学研究院神経病理学分野・教授)

研究要旨 2008年12月より剖検時に前頭葉、側頭葉、海馬、後頭葉よりサンプリングし、100症例分を凍結保存した。このうち88症例分をマイクロアレイ解析に供与した。脳の病理組織所見を検討するために平野銀染色及びタウ蛋白免疫染色を行った。剖検脳の病理学的変化は、老人斑の評価を CERAD criteria に基づいて、神経原線維変化は Braak ステージ分類に基づいて行い、マイクロアレイ解析による発現プロファイルとの関連解析にデータを供与した。一方、これまで進めて来た連続剖検症例の脳病理データベースを用いて、老人斑などの病理変化と脂質代謝異常との関連について検討した。その結果、血清総コレステロールと LDL コレステロールは老人斑の出現と有意な関連を認め、総コレステロール値が一定の値を超えた時に老人斑形成のリスクが急上昇する傾向を認めた。

A. 研究目的

本研究の目的は剖検脳の病理診断によって認知症の分類の精度を高めること、剖検時に前頭葉、側頭葉、海馬、後頭葉よりサンプリングし、凍結保存することによって分子レベルでの検討を可能にすることである。さらに久山町疫学研究では様々な住民検診データが整理保存されており、これと病理所見との関連を統計学的に検討することによって、リスクの評価を行うことができる。我々は生活習慣病とアルツハイマー病との関連を大きな研究テーマとして掲げ、老人斑 (neurofibrillary tangle) の蓄積と糖尿病関連因子との関連を統計学的に解析し、耐糖能異常、特にインスリン抵抗性が老人斑の形成に関与することを明らかにし、その成果を学術誌に発表した (Neurology, 2010)。引き続き脂質代謝異常とアルツハイマー病の病理所見、特に老人斑の蓄積に焦点を当てた研究を推進し、その結果をまとめて学術誌に発表することを目標とした。これまでコレステロールとアルツハイマー病の病理所見の関連について報告した研究はほとんどない。

B. 研究方法

1) 剖検脳の病理診断と凍結サンプルの採取

2008年12月より剖検時に前頭葉、側頭葉、海馬、後頭葉よりサンプリングし、これまでに100症例分を凍結保存した。このうちマイクロアレイ解析に88症例分を供与した。病理診断には HE 染色と Klüver-Barrera 染色に加えて、平野銀染色及びタウ蛋白免疫染色を行った。アルツハイマー病の病理学的変化は、老人斑の評価は CERAD criteria、神経原線維変化については、Braak and

Braak ステージ分類に基づいて行った。

2) 脂質代謝異常とアルツハイマー病の病理所見との関連

1998年10月1日から2003年3月31日の期間に死亡した久山町住民290例のうち、他院剖検例、検討不能例を除いて連続剖検例が211例あり、解剖率は約73%であった。そのうち、1988年の久山町住民健診を受診し、かつ中性脂肪に対する食事の影響を除外するため空腹時採血を受診した147例を対象とした (Table 1)。脂質関連因子として、総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪とアルツハイマー病の病理との関連を統計学的に解析した。LDL コレステロールの値は Friedewald の式 (LDL コレステロール = 総コレステロール - HDL コレステロール - 中性脂肪/5) にて算出した。解析の際の調整因子として、性、年齢、収縮期血圧、空腹時血糖、空腹時インスリン、BMI、喫煙、運動、脳血管障害を用いた。全ての症例において遺伝子解析のための informed consent が得られており、アルツハイマー病の重要な危険因子であるアポリポ蛋白 E の遺伝子多型を直接シーケンシング法にて決定し、APOE ε 4 の有無も調整因子として加えて解析した。

C. 研究結果

昨年度、総コレステロールと LDL コレステロール平均値は老人斑なし (none) に比べると老人斑が出現すると上昇しており、一方 HDL コレステロールの平均値は、老人斑なし (none) と比較して、老人斑が出現すると低下していたことを報告した。

本年度はそれに追加して老人斑の出現頻度を CERAD のスコアごとに細分して検討した (Table 2)。この結果から老人斑が高頻度に出現し、病理学的にアルツハイマー病の病変に相当する群でもオッズ比が有意に上昇していた。

老人斑形成の頻度はそれぞれ総コレステロール $\leq 224\text{mg/dl}$ の時 62.2%、総コレステロール $> 224\text{mg/dl}$ の時 86.1%、LDLC $\leq 155\text{mg/dl}$ の時 62.7%、LDLC $> 155\text{mg/dl}$ の時 85.7%、HDL $\geq 40\text{mg/dl}$ の時 62.7%、HDL $< 40\text{mg/dl}$ の時 83.8%、TG $\leq 139\text{mg/dl}$ の時 65.2%、TG $> 139\text{mg/dl}$ の時 77.1%であった。総コレステロール高値、特に LDL コレステロール高値で HDL コレステロール低値の場合、老人斑形成のリスクが高まることが確認された。

D. 考察

昨年度から継続して脂質代謝異常が主に老人斑の形成に関与することを明らかにし、その成果を学術誌に発表した (Neurology、2011、論文発表 No. 1)。糖代謝異常との関連では昨年度、アルツハイマー病の病理所見、特に老人斑の蓄積に焦点を当て、危険因子としての評価を行い、耐糖能異常、特にインスリン抵抗性との関連について成果を発表した。本年度はアルツハイマー病の“発症”との関連で同様に食後 2 時間の血糖値上昇が危険因子として有意である事を清原教授らのグループが確認し、共同研究として学術誌に発表した (Neurology、2011、論文発表 No. 2)。以上、我々のアルツハイマー病の脳病変に重点を置いた研究の成果として、生活習慣病関連因子である耐糖能異常と脂質代謝異常の両方が老人斑の形成を通して、アルツハイマー病の病態に関与している可能性を示せた。これは本研究班における疫学と病理学の融合によるユニークな取組みによる成果であるといえる。さらに病理疫学の有用性を展開するため、老人斑や神経原線維変化などの病理所見をより定量的に評価するために病理組織標本のデジタル画像から病変を自動的に抽出し、定量化するコンピュータープログラムを開発中である。

E. 結論

2008 年 12 月より剖検時に前頭葉、側頭葉、海馬、後頭葉よりサンプリングし、100 症例分を凍

結保存した。このうち 88 症例分をマイクロアレイ解析に供与した。老人斑と脂質代謝異常との関連について検討し、血清総コレステロールと LDL コレステロールが一定の値を超えた時に老人斑形成のリスクが急上昇した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuzaki T, Sasaki K, Hata J, Hirakawa Y, Fujimi K, Ninomiya T, Suzuki SO, Kanba S, Kiyohara Y, Iwaki T. Association of Alzheimer's disease pathology with abnormal lipid metabolism: the Hisayama Study. Neurology 77: 1068-1075, 2011
2. Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama Study. Neurology 77: 1126-1134, 2011
3. Ninomiya T, Ohara T, Hirakawa Y, Yoshida D, Doi Y, Hata J, Kanba S, Iwaki T, Kiyohara Y. Midlife and late-life blood pressure and dementia in Japanese elderly: the Hisayama study. Hypertension 58: 22-28, 2011
4. Ohara T, Ninomiya T, Kubo M, Hirakawa Y, Doi Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y. APOE genotype for prediction of Alzheimer's disease in Japanese elderly: the Hisayama Study. J. Am. Geriatr. Soc. 59: 1074-1079, 2011

2. 学会発表

1. 岩城徹. 認知症の病理疫学: 久山町研究. 第 41 回新潟神経学夏期セミナー、新潟、2011.7
2. 鈴木諭、岩城徹. 6 カ月の経過で進行性の行動異常と運動障害を示した 23 歳男性. 第 52 回日本神経病理学会、京都、2011.6

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Table 1. Demographic characteristics of 147 subjects according to the presence of neuritic plaques (NPs). Values are percentage, mean \pm SE, or geometric mean (95% prediction interval). Geometric mean of fasting insulin and triglycerides are shown due to the skewed distribution. TC: total cholesterol, LDLC: low-density lipoprotein cholesterol, HDLC: high-density lipoprotein cholesterol, TG: triglycerides. Values are adjusted for age and sex except for sex and age at medical examination. *P<0.05. Male sex is adjusted for age. Age at medical examination is adjusted for sex.

Variables	Without NPs (CERAD = 0) (n = 47)	With NPs (CERAD = 1 to 3) (n = 100)	
Male sex	41.9%	46.5%	
Age at medical examination (y)	63 \pm 1	71 \pm 1	*
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.7 \pm 0.2	6.0 \pm 0.1	
Fasting insulin (μ U/ml)	4.5 (4.0, 5.2)	5.5 (5.0, 6.0)	*
Systolic blood pressure (mmHg)	143.3 \pm 3.6	137.5 \pm 2.4	
Diastolic blood pressure (mmHg)	78.1 \pm 1.9	76.0 \pm 1.3	
TC (mmol/L)	4.9 \pm 0.2	5.4 \pm 0.1	*
LDLC (mmol/L)	3.0 \pm 0.2	3.6 \pm 0.1	*
HDLC (mmol/L)	1.4 \pm 0.1	1.3 \pm 0.03	
TG (mmol/L)	1.0 (0.9, 1.2)	1.2 (1.1, 1.3)	
TC/HDLC	3.7 \pm 0.2	4.6 \pm 0.1	*
LDLC/HDLC	2.4 \pm 0.2	3.0 \pm 0.1	*
non-HDLC (mmol/L)	3.5 \pm 0.2	4.2 \pm 0.1	*
Body mass index (kg/m ²)	21.8 \pm 0.5	21.9 \pm 0.3	
Current smoking	49.5%	43.6%	
Regular exercise	6.6%	5.2%	
APOE ϵ 4 carrier	0.03%	21.8%	*

Table 2. Multivariate-adjusted odd ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for neuritic plaques according to lipid profile level. Model 1 was adjusted for age and sex. Model 2: Model 1 + systolic blood pressure, fasting blood glucose, fasting insulin, body mass index, current smoking, regular exercise and cerebrovascular disease. Model 3: Model 2 + APOE ϵ 4 carrier. CERAD score: 0 (none), 1 (sparse), 2 (moderate), 3 (frequent)

TC (>5.80 vs. \leq 5.80 mmol/L)	Model 1			Model 2			Model 3		
	OR	(95%CI)	P value	OR	(95%CI)	P value	OR	(95%CI)	P value
CERAD score 1–3 vs 0	6.6	(2.1, 20.5)	0.001	9.6	(2.7, 34.1)	0.0005	24.8	(4.7, 130.5)	0.0002
CERAD score 2–3 vs 0	5.1	(1.6, 16.4)	0.006	7.7	(2.1, 28.4)	0.002	25.6	(3.8, 174.1)	0.0009
CERAD score 3 vs 0	4.3	(1.2, 15.0)	0.02	6.6	(1.5, 28.9)	0.01	84.4	(5.3, >999.9)	0.002

厚生労働科学研究（認知症対策総合研究事業）
アルツハイマー病の危険因子の解明と予防に関する大規模ゲノム疫学研究
分担研究報告

アルツハイマー病の遺伝的危険因子の解明に関する研究

研究分担者：中別府 雄作
(九州大学生体防御医学研究所脳機能制御学分野・教授)

研究要旨 アルツハイマー病患者の剖検脳（前頭葉、側頭葉、海馬）およびモデルマウスの海馬から調製した RNA を用いたマイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイリングから、アルツハイマー病の病理変化が脳におけるインスリン不応答を引き起こす可能性が示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) をはじめとする認知症の発症・進展に関連する遺伝子群をマイクロアレイ解析により同定することを目的とする。

B. 研究方法

(1)久山町の剖検脳 (non-AD 群と AD 群) と AD モデルマウス (3xTg-AD ホモ接合マウスと non-Tg コントロールマウス) から高品質の RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、両者の比較検討に基づき AD 脳特異的に発現変化する遺伝子を同定する。
(2)AD 病モデル動物 (3xTg-AD ホモ接合マウス) における遺伝子発現変化の検証。(3)ミトコンドリア転写因子 TFAM-transgene をもつ 3xTgAD-ヘミ接合体マウスを樹立する。

(倫理面への配慮)

九州大学ヒトゲノム遺伝子解析倫理審査専門委員会に承認された研究計画に従っている。動物実験及び組換え DNA 実験は九州大学動物実験委員会及び遺伝子組換え実験安全委員会 (に承認された研究計画に従い、行っている。

C. 研究結果

新鮮脳凍結検体 88 例について RNA の抽出を行い、RIN6.9 以上の High quality の RNA を用いてマイクロアレイ解析をおこなった結果、前頭葉 (non-AD18 例, AD15 例), 側頭葉 (non-AD 19 例, AD 10 例), 海馬 (non-AD 10 例, AD 7 例) について全遺伝子の発現プロファイリングを得た。3-way ANOVA により、性別, VD (脳血管性認知症), AD の中で AD による発現プロファイルの変化が大きく、さらに前頭葉<側頭葉<海馬の順に顕著な変化を認めた。AD 脳における発現プロファイルをマウス AD モデルの海馬における発現プロファイルと比較したところ、精神疾患や AD に関連する遺伝子群の発現変化に加えて、両者共にインスリン不

応答性を示す遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになった。

E. 結論

耐糖能異常とインスリン抵抗性が AD 発症の危険因子となる分子基盤の 1 つとして、AD 患者の脳においてインスリン不応答を引き起こす遺伝子発現変化が明らかになった。

G. 研究発表

- 論文発表
 - Ohnishi, Y.N. et al., FosB is essential for the enhancement of stress tolerance and antagonizes locomotor sensitization by FosB. *Biol Psychiatry*, 70: 487-495, 2011.
 - Iwama, E., et al., Cancer-related PRUNE2 protein is associated with nucleotides and is highly expressed in mature nerve tissues. *J Mol Neurosci*, 44: 103-114, 2011.
 - Fujita, K., Nakabeppu, Y. and Noda, M. Therapeutic effects of hydrogen in animal models of Parkinson's disease. *Parkinson's disease*, 2011: 307875, 2011.
- 学会発表
 - 外間政朗, 岩城徹, 清原裕, 佐々木富男, 中別府雄作, 剖検脳マイクロアレイ解析による脳疾患遺伝子発現プロファイリング, 脳神経外科学会第 70 回学術総会, 2011/10/10/13, 横浜
 - Hokama, M., T. Iwaki, K. Sasaki, Y. Kiyohara, T. Sasaki, Y. Nakabeppu, Gene expression profiling of postmortem brains of patients with Alzheimer's disease pathology: The Hisayama Study, 41st Annual meeting of Society for

Neuroscience, Washington, DC, USA,
2011/11/12-11/16 (11/16)

3. 中別府雄作, アルツハイマー病の分子機構
～遺伝子発現機構からのアプローチ,
Hisayama Study Conference 2011,
2011/12/3, 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

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（認知症対策総合研究事業）
アルツハイマー病の危険因子の解明と予防に関する大規模ゲノム疫学研究
分担研究報告

アルツハイマー病発症におけるミトコンドリアゲノムと
ミトコンドリア機能の関連についての探索

研究分担者：康 東天
（九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野・教授）

研究要旨 アルツハイマー病の一因として、機能低下したミトコンドリアの蓄積による神経細胞の脱落が示唆されている。我々は異常ミトコンドリアを積極的に除く事が、アルツハイマー病の予防や緩和に繋がると考えている。しかしながら、その機構は不明な点が多く、ヒトの関連遺伝子は同定されていない。本研究では線虫を用いた機能的スクリーニングにより、ミトコンドリア分解機構の関連遺伝子を同定し、その結果からヒト遺伝子を見つけ、アルツハイマー病の病態解明、治療に応用していく。

A. 研究目的

アルツハイマー病の発症と進展においてミトコンドリア機能異常が関与している可能性が報告されているが、その分子レベルでのメカニズムはほとんど解明されていない。本研究ではアルツハイマー病の発症と進展におけるミトコンドリア機能異常の関与の可能性を分子レベルで明らかにするために異なった角度からのアプローチを取る計画である。第1は一次的にミトコンドリアゲノム (mtDNA) に異常があり、その結果としてのミトコンドリア機能異常からアルツハイマー病の発症に至る可能性についての解析であり、アルツハイマー病患者と対照群で mtDNA 配列を直接比較する。第2はモデル動物の作製であり、ミトコンドリアゲノムそのものには異常がないが、ミトコンドリアの品質管理機構に異常があり、結果として機能異常ミトコンドリアの蓄積がアルツハイマー病の発症に至る可能性についての解析である。ミトコンドリアの品質管理機構としてミトコンドリアのオートファジー（ミトファジー）に注目し、ミトファジーに関与する遺伝子の網羅的解析を行う。

B. 研究方法

(1) ミトコンドリアゲノム解析

久山町住民健診受診者約 3000 人で、mtDNA 複製転写御領域である D-loop および呼吸鎖複合体 I の ND6 サブユニットの DNA 配列を決定する。

(2) ミトファジー関連遺伝子の網羅的スクリーニング

ミトコンドリア品質管理には様々な機構があり、その中でオートファジーによる異常ミトコンドリアの除去機構（ミトファジー）に注目して

研究を行う。マイトファジーの遺伝子は酵母で同定されているが、高等真核生物においては、その分子機構は不明である。まず、線虫を用いてスクリーニングを行い、マイトファジー関連因子を同定するとともにその分子機能解析を目指す。さらに、その遺伝子情報をヒト遺伝子へ利用し、マイトファジーによるミトコンドリア品質管理と認知症との関連を明らかにする。

①簡便な観法の確立：ミトコンドリアがオートファジー（マイトファジー）で分解される際には、リソソームに運ばれ酸性状態 (pH4~5) に置かれる。pH 感受性蛍光タンパク質 Keima を線虫で発現させ、リソソームと融合したミトコンドリアを検出することにより一次スクリーニングを行う。二次スクリーニングは、pH 依存的に自己切断を行う cathepsinD をウエスタンブロットで検出して定量的に行う。

②線虫でのスクリーニング：①で作製した検出系を用い、線虫を RNAi (85%の遺伝子をカバーするライブラリーが存在) でノックダウンし、通常と異なる表現形をしめず遺伝子を見つける。

③同定した遺伝子の解析：②で同定した遺伝子のヒトホモログを見つけ、その遺伝子がミトコンドリアの分解に関わっているかを培養細胞で確かめる。分解に関わっている遺伝子はアルツハイマー病との連鎖解析を行う。

(倫理面への配慮)

研究方法、試料提供協力者に対する説明同意等、九州大学を含む各大学倫理委員会で承認された計画のもとで行われている。