

201128085A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

牟婁病の実態の把握と治療指針作成

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年(2012年)3月

研究代表者 小久保康昌

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

牟婁病の実態の把握と治療指針作成
2011年度研究報告書

ANNUAL REPORT 2011 OF THE RESEARCH COMMITTEE
ON THE MURO DISEASE (KII AMYOTROPHIC LATERAL
SCLEROSIS/PARKINSONISM-DEMENTIA COMPLEX)
OF
THE MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, JAPAN

2012年3月

March 2012

研究代表者 小久保康昌

三重大学大学院医学系研究科 神経病態内科学講座

Chairman: YASUMASA KOKUBO, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Mie University School of Medicine

ごあいさつ

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 牟婁病の実態の把握と治療指針作成班の 3 年目の研究活動をご報告いたします。研究分担や研究協力の先生方ならびに関係の方々によるご理解とご協力のお陰で、疫学、環境、遺伝子、蛋白、病理、iPS、臨床研究の各分野におきまして着実な研究の進展がありました。また今年度は、初めてワークショップを開催しました。疫学分野では、1950 年以来の古座・古座川・串本地域での臨床像の変遷とまとめ、環境分野では、多発地区での陰膳調査の報告と毛髪元素分析、遺伝子分野では、候補遺伝子解析と全ゲノムシーケンスへの取り組み、蛋白分野では、タウ、TDP-43、 α -synuclein 蛋白のウエスタンブロット解析、病理分野では、4R 主体症例の病理解析および tau isoform と病理変化との関連、iPS 細胞樹立と運動神経分化への取り組み、そしてエダラボンを用いた臨床研究について報告がありました。詳細につきましては、本文をご覧くださいましたら幸いです。また、班会議の席で追加報告された古座川 ALS 症例における C9ORF72 遺伝子変異の存在は、特記すべき新しい発見です。

牟婁病の本体がなんであるかは、長年の謎です。この研究班の 3 年間でこの謎の解明に多少なりとも寄与できていれば、望外の喜びです。ただし、まだまだ残された疑問点、問題点は多く、症状の緩和療法や根治療法のめどは立っていません。引き続き息の長い研究継続が必要です。紀伊半島の難病に苦しむ患者さんに光明をもたらし、さらには、その他の関連する神経変性疾患解決の一助となることを目指して、皆様の引き続きのご指導、ご協力をよろしくお願い申し上げます。

平成 24 年 2 月
厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
牟婁病の実態の把握と治療指針作成班

研究代表者 小久保康昌

班 員 名 簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	小久保 康昌	三重大学大学院医学系研究科 神経病態内科学講座	講 師
研究分担者	岡本 和士	愛知県立大学 看護学部	教 授
	紀平 為子	関西医療大学 保健医療学部	教 授
	辻 省次	東京大学大学院医学系研究科 神経内科	教 授
	富山 弘幸	順天堂大学医学部 脳神経内科	准 教 授
	長谷川 成人	(財)東京都医学研究機構 東京都医学総合研究所	参事研究員
	広川 佳史	三重大学大学院医学系研究科 腫瘍病理学講座	講 師
	村山 繁雄	東京都健康長寿医療センター研究所 老年病理学研究チーム	研 究 部 長
研究協力者	葛原 茂樹	鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 医療福祉学科	特 任 教 授
	後藤 雄一	国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第2部	部 長
	服部 信孝	順天堂大学医学部 脳神経内科	教 授
	江上 いすず	名古屋文理大学 健康生活学部	教 授
	江良 択実	熊本大学 発生医学研究所	教 授
	奥宮 清人	総合地球環境学研究所	准 教 授
	桑野 良三	新潟大学脳研究所 生命科学リソース研究センター	教 授
	武田 伸一	国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター	センター長
	吉田 宗平	関西医療大学 保健医療学部	教 授
	石浦 浩之	東京大学大学院医学系研究科 神経内科	大 学 院 生
	小柳 清光	信州大学医学部 神経難病学講座	特 任 教 授
	森本 悟	東京都健康長寿医療センター	医 師

平成23年度 研究班カレンダー（敬称略）

平成 23 年

- 3月 25日 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金継続採択通知
（中間総合評価：7.5、全研究班平均：6.9）
- 4月 1日 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金交付基準額通知（4/5 受け取り）
1300 万円（間接経費 300 万円）
- 4月 18日 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金申請書提出
- 6月 8日 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金交付決定通知
1300 万円（間接経費 300 万円）
- 6月 13日 研究班名簿及び疾患概要作成提出
- 7月 11日 難治性疾患克服研究事業説明会に研究代表者出席
（東京：国立保健医療科学院 別館 5 階 講堂）
- 21日 厚労省より平成 23 年度研究費入金 総額 1300 万円（間接経費 300 万円）
- 9月 11日 ワークショップ開催
（名古屋：タイムオフィス タイム D）
- 12月 16日 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金研究計画書（新規申請）提出
- 22日 難治性疾患克服研究事業の事後評価資料提出

平成 24 年

- 1月 8日 牟婁病の実態の把握と治療指針作成班 H23 年度班会議開催
（名古屋：愛知県産業労働センター 1104）
- 3月 「牟婁病の実態の把握と治療指針作成」2011 年度研究報告書 発行

《 平成 23 年度 年中行事 》

- 平成 23 年 4月 9日 第 1 回環境因子会議(名古屋)
- 24日 患者データベース作成会議
- 6月 7日 牟婁病研究の患者訪問調査
- 7月 29日-31日 大島地区住民健診
- 8月 28日 患者データベース作成会議
- 9月 11日 ワークショップ(名古屋)
- 10月 16日 穂原地区 地域住民講演会
- 平成 24 年 1月 8日 牟婁病班 班会議 (名古屋)

目 次

ごあいさつ	i
班構成員名簿	iii
平成 23 年度研究班カレンダー	iv
I. 総括研究報告	
小久保康昌 三重大学	1
II. 分担研究報告	
ワークショップ 平成 23 年 9 月 11 日 於：タイムオフィス（名古屋）	
・ワークショップ プログラム	11
・ワークショップ議事録	12
1. 古座・古座川・串本地区の ALS・ALS/PD 症例の臨床的研究	
紀平為子 関西医療大学	13
2. Guam ALS/PD mixed case の疫学像の変遷と疾病学的意義の再評価	
吉田宗平 関西医療大学	14
3. 穂原地区症例について	
葛原茂樹 鈴鹿医療科学大学	
4. これまでの剖検例の解析 ―和歌山、三重症例を統合して―	
森本 悟 東京都健康長寿医療センター	15
5. ALS/PDC の再定義 ―Consensus Criteria の策定―	
小久保康昌 三重大学	16
・研究報告	
班会議 平成 24 年 1 月 8 日 於：愛知県産業労働センター	
・班会議 プログラム	17
・班会議 議事録	18

1. ALS 多発地における栄養摂取状況の解明に関する疫学的研究 岡本和士 愛知県立大学	19
2. 古座・古座川・串本地域出身 ALS・PDC 症例における臨床像の特徴と 毛髪中元素濃度の検討 紀平為子 関西医療大学	24
3. 牟婁病 (紀伊半島 amyotrophic lateral sclerosis / parkinsonism-dementia complex) の候補遺伝子解析 富山弘幸 順天堂大学	28
4. 紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン認知症複合 (ALS/PDC) の 疾患遺伝子の探索 辻 省次 東京大学	31
5. 牟婁病における神経病理学的再検討 村山繁雄 東京都健康長寿医療センター	34
6. 紀伊 ALS/PDC 患者脳に蓄積するタウ, α シヌクレイン, TDP-43 の解析 長谷川成人 東京都精神医学総合研究所	39
7. 牟婁病患者由来 iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導 広川佳史 三重大学	43
8. 牟婁病の運動障害と認知機能障害に対するエダラボンを用いた臨床研究 小久保康昌 三重大学	45
III. 研究成果に関する一覧表	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷	53

I. 総括研究報告

牟婁病の実態の把握と治療指針作成

研究代表者：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）について今年度の新たな研究成果についてまとめた。今年度は、1)疫学：1950 年以來の古座・古座川・串本地域における臨床像の変遷、2)環境要因：飲料水、血清、毛髪微量元素分析と陰膳調査、過去の食物摂取聞き取り調査、3)遺伝子：候補遺伝子解析と全ゲノム遺伝子解析、4)Multiple Proteinopathy：tau, TDP-43、 α -synuclein の異常凝集蛋白質解析と神経病理学的検討、5) iPS 細胞：作成に向けての取り組み、6) エダラボンによる臨床研究について、新たな研究成果を得ることができた。ALS の激減、PDC の持続といった疫学調査、穂原症例と古座川症例での臨床像の相違、最新の遺伝子解析結果や異常凝集蛋白質の解析結果などから、牟婁病はいくつかの疾患からなる症候群である可能性がある。

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。今年度は、牟婁病の実態の把握と治療指針の作成にむけて、1)疫学：1950 年以來の古座・古座川・串本地域における臨床像の変遷、2)環境要因：血清および毛髪元素分析調査と陰膳調査、食事内容の聞き取り調査、3)遺伝子：候補遺伝子解析と全ゲノム遺伝子解析にむけての取り組み、4) Multiple Proteinopathy：tau, TDP-43 の異常凝集蛋白質解析と神経病理学的検討、5) iPS 細胞：作成に向けての取り組み、および 6) エダラボンによる臨床研究の経過報告について検討した。

B.研究方法

①牟婁病研究の現状 -過去から現在、そして将来-
これまでの牟婁病研究を振り返りながら大局

的見地から原因仮説を検証した。

② 古座・古座川・串本地域疫学調査：紀伊半島 ALS の臨床的特徴と多発の要因を検討するため、1950 年～2011 年間の ALS 患者を抽出し、臨床像を再検討した。

③血清および毛髪元素分析調査 (ALS 患者と地域住民の血清および中性子放射化分析法による毛髪元素分析)：対象は、大島住民(27 名)、古座・古座川・串本出身 ALS 患者(6 例)、穂原 PDC 患者(4 例)。対照地域として和歌山県北部花園住民から住民健康診断時に血液、尿、毛髪試料を採取した。毛髪元素分析は、中性子放射化分析法による定量を行った。放射化分析は京都大学原子炉実験所の研究用原子炉気送管 Pn-1 で熱中性子束を照射した。短寿命核種では 2 分間照射後直ちに測定、長寿命核種は 120 分照射、約 1 ヶ月の冷却後測定した。ゲルマニウム検出器と波高分析器を用いて計測された γ 線スペクトルからピーク面積を Covell 法で算出、標準試料との比較法で定量した。

④穂原地区における陰膳調査、大島地区での聞き取り調査：穂原地区に居住する健康な男女 2 名ずつの計 4 名を対象に 2011 年 1 月 14 日から 16 日の 3 日間の秤量調査と陰膳調査を合わせて行っ

た。大島地区では、60歳以上の高齢者を対象に実施された健康診断の受診者に、子供のころ（15歳頃）および現在の干物に関する食事状況の聞き取り調査を行った。

⑤遺伝子解析：1) 候補遺伝子解析：最近、家族性パーキンソン病やALSの危険因子として報告された*SCA2*のCAGリピートの中間伸長について検討した。病理学的に確定診断された12例の紀伊半島ALS/PDC患者において、PCR産物をフラグメント解析し、*SCA2*のCAGリピートの伸長の長さを解析した。

2) 全ゲノムシーケンス：三重県の紀伊ALS/PDCの大家系に属する剖検例2例と明らかな血縁関係のない5剖検例（すべて家族歴あり）からDNAを抽出。Illumina HiSeq2000を用い、ペアエンド法で100塩基長の配列を取得し全ゲノム配列解析を行った。BWAを用いて標準配列（hg19）へのアラインメントを行い、一塩基置換と小欠失・挿入変化を同定した。最近ALS/FTDの原因として同定された*C9orf72*内の6塩基リピート伸長についてもあわせて解析を行った。

⑥ Multiple proteinopathy: 1) 4R 優位症例：通常染色に加え、特殊染色（Gallyas-Braak: GB染色）、及び抗リン酸化タウ（AT-8）抗体、抗アミロイドβ蛋白（11-28）抗体、抗リン酸化αシヌクレイン（pSyn#64）抗体、抗リン酸化TDP43

（PSer409/410m）抗体を用いた免疫組織化学的検索を行った。2) tau: 凍結脳を用いたタウ免疫プロットでタイピングが可能であった8例（ALS 2例、ALS with D 1例、PDC 2例、PDC with ALS 3例）の海馬と側頭葉について検討した。通常染色に加え、特殊染色（Gallyas-Braak: GB染色）、及び抗リン酸化タウ（AT-8）抗体を用いた免疫組織化学的検索を行った。3) TDP-43, α-synuclein: 牟婁病患者4例の脳脊髄に蓄積するタウ、αシヌクレイン、TDP-43について生化学解析を行った。

⑦牟婁病患者由来iPS細胞作製と運動神経細胞誘導：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をセンダイウイルスを用いて遺伝子導入して作製する。iPS細胞からsonic hedgehog signal pathwayのagonistとretinoic acidを用いてembryoid bodyを作成し、これが運動神経細胞の特徴を有することを確認する。得られた運動神経細胞を用いて、現在まで提唱されている以下のALS発症機序について検討する。1) 疫学的環境因子の影響 2) 小胞体ストレスのメカニズム、3) 酸化ストレスのメカニズム、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。

⑧エダラボンによる臨床研究の経過報告：牟婁病では、病態に酸化ストレスが関与している可能性がある。フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンの臨床研究を開始したので、進捗状況を報告する。対象は、紀伊ALS/PDC 5例（男性4名、女性1名、平均年齢68.4歳、全例PDC、平均罹病期間9.4年）に対するオープンラベル試験。方法は、エダラボン（1A, 30mg/回）を適当量の生食液等で用時希釈し、30分かけて1日1回点滴静注する。週2日間点滴投与を1クールとし、16クールを連続して行う。（併用薬）ビタミンE（酢酸トコフェロール）300mg/日とビタミンC（アスコルビン酸）2000mg/日を連日内服併用する。開始時と終了時にMMSE、ALSFRS-R、UPDRS、FAB、やる気スコア、CASを評価し効果を検討する。

（倫理面への配慮を含む）

本研究は、三重大学、東京大学、順天堂大学、理化学研究所、東京都健康長寿医療センター、東京都医学総合研究所、愛知県立看護大学、関西医療大学、独立行政法人国立精神・神経医療研究センター、町立南伊勢病院の各倫理委員会の承認に基づき行った。

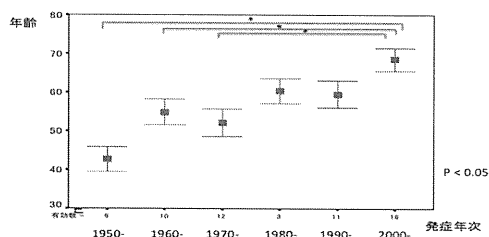
C.研究結果

①牟婁病研究の現状 -過去から現在、そして将来-

牟婁病発見から 60 年間の歴史を振り返りながら、特に臨床像の劇的な変遷という希有な事象から疾患概念について考察した。

②古座・古座川・串本地域疫学調査：1950 年～2011 年に当地域出身 ALS 患者 58 例(男性 33、女性 25、男女比 1.32) を認めた。平均発症年齢の年次推移をみると、1950 年代の発症例では 43 歳、1960 年代では 54.9 歳、2000 年以降は 68.5 歳であり、近年、平均発症年齢の著明な高齢化が認められた (図 1)。

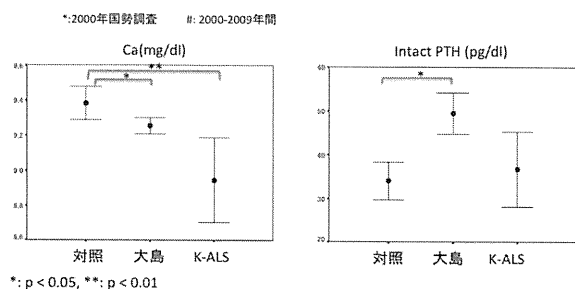
図 1. 発症年次による平均発症年齢の推移



孤発例が 75.9%，家系にパーキンソン病を含む家族歴を有する例は 24.1%であった。臨床症状は、ALS 症状のみを呈する症例が約 74%、ALS 症状に認知症や精神症状、パーキンソン症状などを合併する例が約 26%認められた。

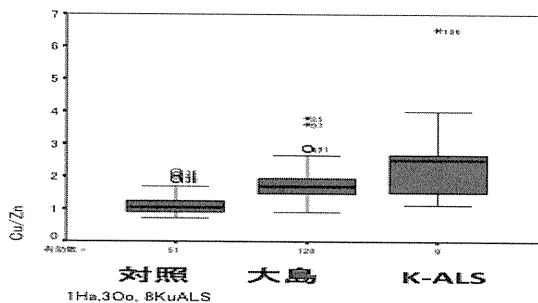
③血清および毛髪中の元素分析調査：古座・古座川・串本地域の住民、患者に共通して血清 Ca の低値を認めた。さらに住民では intact PTH 値の増加を認めたが、ALS 患者では対照と有意差を認めなかった。

図 2 血清 Ca, intact PTH 定量



酸化ストレス指標として Cu/Zn 比を測定した。当地域住民、ALS 患者で対象に比し有意な高値 ($p < 0.05$) を認め、ALS 患者はさらに当地域住民より有意な高値 ($p < 0.05$) を示した。

図 3. 血清 Cu/Zn 比の比較



放射化分析による毛髪中元素定量：大島住民、古座・古座川・串本出身 ALS 患者、穂原 PDC 患者では共通して、対照に比し有意な Mg 高値を認めた。さらに当地域 ALS 患者では当地域住民に比しても、有意な Mg 高値を示した ($p < 0.05$)。また、当地域住民では Hg 含量が対照に比較して有意な高値 ($p < 0.05$) を、Mn 含量が高値傾向を認めた。ALS 患者では、Mn, Al, Hg 含量は症例毎のばらつきが大きかった。血清中の Ca, Cu, Zn 含量と毛髪中の元素含量との間に有意な相関関係は認められなかった。

④穂原地区における陰膳調査、大島地区での食物摂取聞き取り調査：調査対象の 12 食中 7 食において高いアルミニウムの摂取量が認められ、特に 4 例中 3 名については昼食、夕食に摂取量が高かった。食事内容との関連では、魚、特に干物の摂取と高アルミニウムの関係が認められた。大島地区での食物摂取聞き取り調査では、15 歳(昭和 30 年代)と比較して、自家製の干物やイワシの丸干し、アジの丸干しを摂取する居住者の割合が高かった。

⑤遺伝子解析：SCA2 の CAG リピートについては、12 例全例で正常であった。p62/SQSTM1 に

についても、正常であった。

全ゲノム解析では、各々平均被覆度 35X-73X となる全ゲノム配列データを得た。一名あたり 358 万-370 万個の一塩基置換と 54 万-59 万個の短い挿入・欠失が検出された。ALS、パーキンソン病、認知症の原因となる既知遺伝子の明らかな変異は認めなかった。*C9orf72* のリピート伸長は認めなかった。データベースに登録がない新規非同義置換と挿入・欠失は各々 308-347 個、46-78 個であり、全症例に共通する新規 variant は認めなかった。

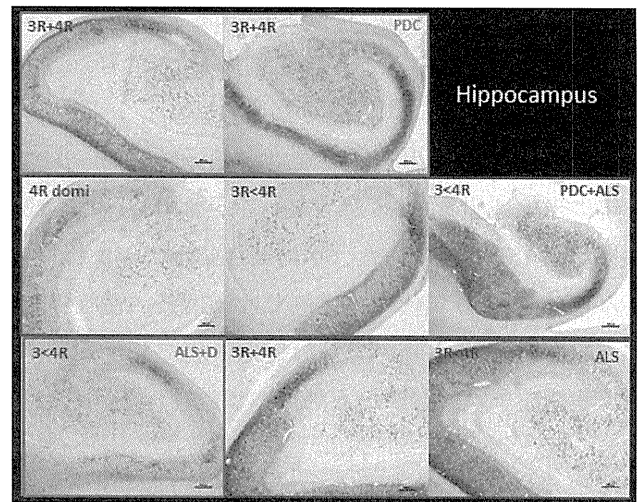
大家系を用いたパラメトリック二点連鎖解析では、LOD スコア>3 となる 1 遺伝子座を見出したが、近傍に存在するマイクロサテライトのタイピングを施行したが、同遺伝子座への明らかな連鎖は見出されなかった

⑥ Multiple proteinopathy:

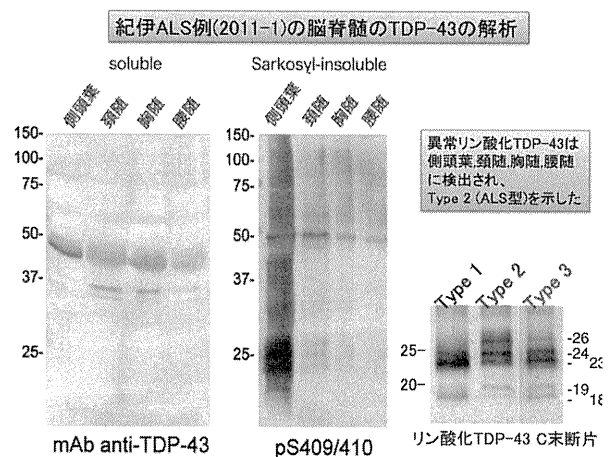
1) 4R 優位症例：筋萎縮性側索硬化症 (ALS) - TDP43 病理と ghost tangle を主体としたパーキンソン病認知症複合 (PDC) の病理に加えて、皮質基底核変性症の病理 (pretangle と thread, astrocytic plaque) を伴っていた。

2) tau: 海馬・側頭葉病理の結果からは、臨床病型に関係なく、3+4R 型は GT が側頭葉部にまで広がっており、3<4R 型は、GT が海馬に限局しており、側頭葉部では嗜銀顆粒と、斑状のグリアの陽性所見が目立つ結果であった。

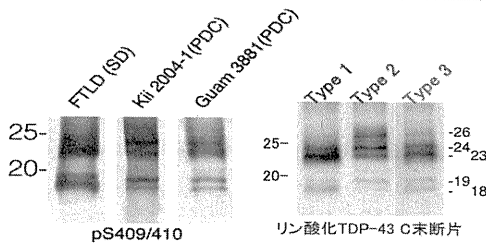
症例番号	年齢	性別	臨床診断	タウの生化学	タウの蓄積量	
1	1998-1	77歳	男性	ALS with D	3R<4R	Level 1~4
2	2001-1	60歳	女性	PDC with A	3R<4R	Level 2~4
3	2004-3	63歳	女性	ALS	3R>=4R	Level 4
4	2004-1	70歳	女性	PDC with ALS	3R<4R	Level 3~4
5	2000-2	76歳	女性	PDC	3R>=4R	Level 3
6	2009-4	70歳	女性	ALS	?	Level 1
7	2005-3	70歳	女性	ALS	3R<4R ?	Level 2
8	2007-1	70歳	女性	PDC	3R>=4R	Level 4
9	2009-1	75歳	男性	PDC	3R>=4R	Level 3



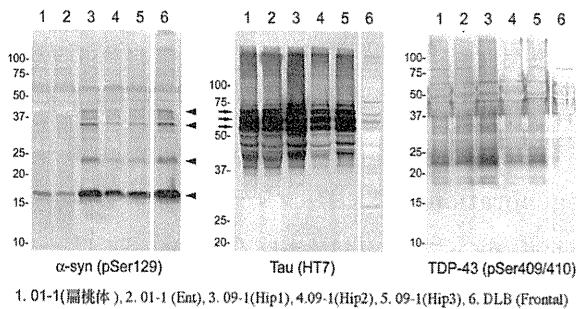
3) TDP-43, α -synuclein: <2011-1, ALS-D> tau は AD type, TDP-43 は、Type B (ALS 型). この症例では、はじめて脊髄のウエスタンブロットを行った。脊髄の tau、TDP-43 ともに脳のタイピングに一致する結果であった。<2004-1, PDC, CBD 病理を伴う> tau は 4R 主体, TDP-43 は、Type B (ALS 型). <2001-1, PDC-A> tau は、4R>3R, TDP-43 は、Type A (FTD 型). <2009-1, PDC> tau は、AD type, TDP-43 は、Type A (FTD 型)、 α -synuclein は、DLB 型.



紀伊PDC2004-1(4R tau蓄積例)とGuam PDC例のTDP-43



紀伊ALS/PDC(2001-1, 2009-1)に蓄積するαSyn, tau, TDP-43



2001-1(3R<4R), 2009-1(3R>=4R)の扁桃体, 海馬, 海馬傍回にDLBと類似のバンドパターンを示すαSynが検出。2001-1, 2009-1に蓄積するTDP-43はType 3?

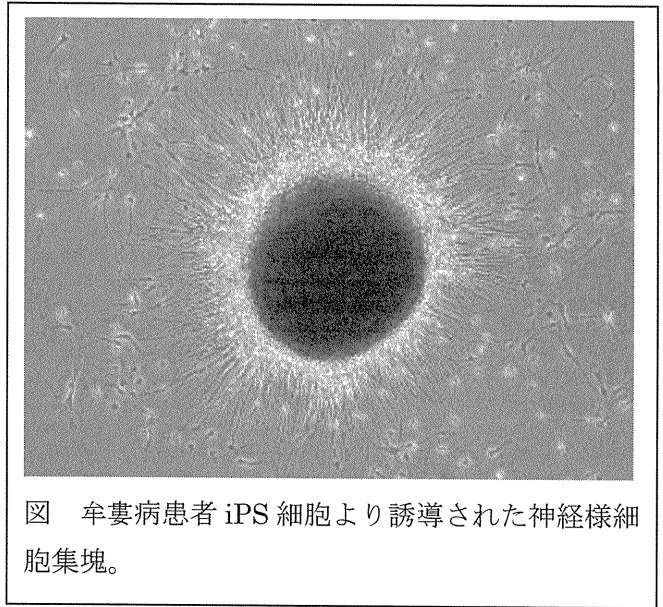


図 牟婁病患者 iPS 細胞より誘導された神経様細胞集塊。

⑦iPS 細胞作成：3例の患者線維芽細胞から iPS 細胞が樹立された。iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導は、理化学研究所より譲渡された正常ヒト iPS 細胞を用いて、*Nat Protoc.* 2009 ; 4(9): 1295-1304.にあるプロトコールに沿って行い、形態的および分化マーカーの発現から運動ニューロンへの分化が確認された。しかし患者由来の iPS 細胞からは神経細胞様の形態を持つものが誘導されたが、運動ニューロンの分化マーカー発現は認められなかった。

⑧エダラボンによる臨床研究の経過報告：2011年11月から順次、投与開始し、経過観察中である。2012年4月に終了予定。途中経過ではあるが、臨床研究開始3ヵ月の時点で、1例で歩行や動作などパーキンソン症状の改善を認めた。また、他の3例で発語量の増加や受け答えの際の反応時間の改善と言った反応が見られた。残りの1例では、易怒性、暴力、性的逸脱があり、投与約2ヵ月で中止した。

附則（再掲）：牟婁病の診断基準 2010
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、臨床的にはほぼ確実
(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
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、臨床介入による効果判定のための評価基準の作成が必要である。

D. 考察

疫学調査と環境要因について：古座・古座川・串本地区において、臨床病型は ALS が主体であるが、他の地域に比べて認知症やパーキンソン症状、精神症状を合併する症例や家系内にパーキンソン病または ALS を有するものが多かった。古座・古座川・串本地区の ALS 症例は、幅広いスペクトラムの臨床表現型を示す不均一な疾患群である可能性が推察された。古座・古座川・串本地区では家系内発症が少なく、大部分が ALS の臨床型をとるのに対して、穂原地区では家族内発症が多くを占め、ALS よりも PDC が主体であるといった大きな違いがある。昨年度までの検討から、有病率の減少、ALS の減少と認知症の増加といった臨床表現型の変化、男性優位から女性優位への性差の変化、発症年齢の高齢化といった特徴があきらかとなっており、このような劇的な変化が変性疾患において数十年間に認められているのは驚くべきことである。牟婁病は、環境因を強く受ける ALS タイプと遺伝素因の影響が大きい PDC タイプといった、いくつかの疾患単位に分類できるのかもしれない。

今回の研究から、多発地区患者での血清 Ca 低値、毛髪中 Mg 高値が明らかとなった。これまでの検討から多発地の河川や井戸などの飲料水中の低 Ca、低 Mg が認められており、個体側の代謝異常を含めたミネラル要因は病態になんらかの影響を及ぼしている可能性はある。数十年以上におよぶ長期間の飲料水中のミネラル異常などが ALS/PDC 発症や病態に及ぼす影響は重要な検討課題である。

陰膳調査から現在の食事内容においてアルミニウム摂取量が多いことがわかった。この原因として干物や丸干しの摂取が疑われた。この確認のために行った食物摂取聞き取り調査からは、幼少時期の干物の摂取が多かったことがわかった。干物や丸干しは過酸化物質価が高いことがわかっており、高 Al とともに酸化ストレスが牟婁病の病態に影響している可能性がある。今後は、多発地山間部での過去の食事聞き取り調査や紀伊半島以外での比較調査が必要と考えられた。

原因遺伝子探索について：これまでの候補遺伝子解析結果をまとめると、計 26 個の遺伝子解析で、主要な ALS, frontotemporal lobar degeneration (FTLD), パーキンソニズム, シヌクレイノパチー, TDP-43 プロテノパチー, タウオパチーの原因および感受性遺伝子の異常を特定できていない。しかしながら、牟婁病は家系図上メンデル遺伝にきれいに従わないものの、家族例が多く発症者の家系内集積が強いこと、環境因子として確立したものはないことから、未知の遺伝的因子が強く発症に関わっている可能性が考えられた。また、環境や栄養の劇的な変化とほぼ時期を同じくして ALS が激減し、高齢化の中で ALS/PDC の臨床病型もやや変遷してきていることより、遺伝的因子と環境因子、加齢因子の相互作用について今後も検討していく必要がある。それらの相互作用に関し epigenetics の evidence も増えつつあるため、その一つのアプローチとして、紀伊半島 ALS/PDC 症例においても Tau などの主要分子、主要遺伝子におけるメチル化、栄養障害特に葉酸欠乏によるメチル化の変化、加齢によるメチル化の変化などの検討が有用である可能性がある。グアム島やパプアニューギニアにみられる ALS/PDC ともあわせ、診断基準に基づく疫学調査から、民族や地域特異性、人類遺伝学も考慮した今後のより大規模な解析の成果が期待される。

今回、単一遺伝子疾患を仮定したパラメトリック連鎖解析をおこなったが、今後は phenocopy

の存在などを考慮し、ノンパラメトリック連鎖解析、多点連鎖解析を行っていく必要があると考えられた。候補領域を見出すことができれば、原因遺伝子の同定に大変有用であると考えられた。また、全ゲノム解析については、構造変異やリピート伸長変異など次世代シーケンサーでは検出困難な変異を見逃している可能性がある。また、genetic heterogeneity が存在する場合この方法では感度が落ちる可能性があり、同一家系に属する多数例についての解析を加えるなど、ある程度連鎖の情報をいながらの解析が必要になるのかもしれない。その意味で ALS/PDC が均質な疾患群ではない可能性を念頭に置きながらのリソース収集も必要になるかもしれない。全ゲノム再解析、連鎖解析を総合的に進めることにより紀伊 ALS/PDC の発症に関与する遺伝的背景の解明を今後も進めていく。

Multiple proteinopathy: これまで ALS/PDC では、NFT の多発と AD 様の 3R=4R タウの出現が主要なタウ病理と考えられてきたが、4R 優位例の存在や嗜銀顆粒や特徴的なグリア病理の発現、CBD 病理合併例などかなり heterogeneity が存在することが明らかとなった。これらの変化が、tau 遺伝子の mRNA のスプライシングの違いに起因するののかといった、今後の機序解明が病態解明に重要と考えられる。

- 1) 紀伊 ALS+D 2011-1 例の側頭葉、頸髄、胸髄、腰髄に異常リン酸化 TDP-43 の蓄積が検出された。そのバンドパターンは Type 2 (type B, ALS 型) と考えられた。
- 2) 紀伊 PDC 2004-1 例(4R タウ蓄積型)脳の TDP-43 のバンドパターンも Type 2 (type B, ALS 型) と考えられた。
- 3) 紀伊 PDC2001-1 (3Rtau < 4Rtau), 2009-1 (3Rtau >= 4Rtau)例の TDP-43 のバンドパターンは Type 3 (type A) と判断された。
- 4) 紀伊 PDC 2009-1 例に蓄積する α Syn のバンドパターンは DLB に類似しており、ユビキチン化が検出された。今後、プロテアーゼ耐性バンドの

パターンを調べ、さらにバンドタイプを検討する必要がある。

このように、牟婁病では、tau、TDP-43 とともに症例毎に発現パターンが異なっている。両蛋白を同時に解析できた症例が限られているため解釈は controversial だが、牟婁病はいくつかの疾患から成る症候群であるのかもしれない。

iPS 細胞作成: 現在の所、牟婁病患者由来の神経細胞は得られていない。牟婁病患者 iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の過程では正常 iPS 細胞とは異なる培養条件設定が必要と考える。また、誘導がより容易なドーパミン産生ニューロンの作成を優先させる。

エダラボンによる臨床研究: これまでの栄養、水質、血清 Cu/Zn、尿中 OHdG 等の検討から牟婁病の発症や病態進展に酸化ストレスの関与が疑われている。臨床研究の第一歩として酸化ストレス軽減を目的としたエダラボンの治療介入を開始した。エダラボンは当初予想していた以上に、大脳機能に対する刺激作用が認められた。認知機能障害の軽度の患者では、有効な治療法となる可能性がある。

また、班会議の席上で、辻 班員から、複数の古座川 ALS 症例において、C90RF72 遺伝子変異を認めたとの報告があった。牟婁病の heterogeneity を示唆する重要な発見であった。

E. 結論

多発地区での疫学調査と環境因子、遺伝子解析、蛋白解析、iPS 細胞作成、新規薬による臨床研究の進展状況について報告した。今後、さらに環境因子、遺伝素因を含めた病態解明が急がれるとともに、これまでの知見をもとにした新規治療介入研究が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Tsuji H, et al (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 116–121.
2. Foulds PG, et al (2011) Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 25: 4127-37.
3. Foulds PG, et al (2012) Post mortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 45:188-95.
4. Hasegawa M, et al (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 45:480-485
5. Nonaka T and *Hasegawa M (2011) In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases, New cellular models of neurodegenerative diseases. *Commun & Integ Biol* 4, 501-502.
6. Meyerowitz J, et al (2011) C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol Neurodegener* 6:57.
7. Habuchi C, et al (2011) Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification. With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy. *J Neurol Sci* 301, 77-85.
8. 紀平為子、岡本和士、吉田宗平、若山育郎、吉備登. 神経難病患者・介護者における補完代替医療利用の実態調査. *日本補完代替医療学会誌* 2011; 8; 11-16.
9. Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. *Neurogenetics* 2011;12:117-21.
10. Montenegro G, Rebelo AP, Connell J, Allison R, Babalini C, D'Aloia M, Montieri P, Schule R, Ishiura H, Price J, Strickland A, Gonzalez MA, Baumbach-Reardon L, Deconinck T, Huang J, Bernardi G, Vance JM, Rogers MT, Tsuji S, De Jonghe P, Pericak-Vanec MA, Schols L, Orlicchio A, Reid E, Zuchner S. Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12. *J Clin Invest* in press
11. Kokubo Y, Hirokawa Y. et al. Cardiac ^{123}I -meta-iodobenzylguanidine scintigraphy and lewy body pathology in a patient with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Kii, Japan. *Mov Disord.* 2011 \cdot 26(2300-2301)
12. Kokubo, Y., Morimoto, S., Shindo, A., Hirokawa, Y., Shiraishi, T., Saito, Y., Murayama, S., & Kuzuhara, S: Cardiac (1)(2)(3)I-meta-iodobenzylguanidine scintigraphy and lewy body pathology in a patient with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Kii, Japan. *Mov Disord*, 2011; 26(12): 2300-2301
13. Seki, N., Takahashi, Y., Tomiyama, H., Rogaeva, E., Murayama, S., Mizuno, Y., Hattori, N., Marras, C., Lang, A. E., George-Hyslop, P. S., Goto, J., & Tsuji, S. Comprehensive mutational analysis of LRRK2 reveals variants supporting association with autosomal dominant

- Parkinson's disease. *Journal of human genetics*, 2011; 56(9): 671-675.
14. Takamura, A., Kawarabayashi, T., Yokoseki, T., Shibata, M., Morishima-Kawashima, M., Saito, Y., Murayama, S., Ihara, Y., Abe, K., Shoji, M., Michikawa, M., & Matsubara, E. 2011. Dissociation of beta-amyloid from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates beta-amyloid-42 assembly. *J Neurosci Res*, 2011; 89(6): 815-821.
 15. Murakami, K., Murata, N., Noda, Y., Tahara, S., Kaneko, T., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Barnham, K. J., Irie, K., Shirasawa, T., & Shimizu, T. 2011. SOD1 deficiency drives amyloid beta oligomerization and memory loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem in press*
 16. Fujita K,¹ Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H: Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt Jakob disease: *BMJ Open Journal* (in press)
 17. Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y and the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Altered g-secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine* (in press)
 18. Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima M, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama S. Mori O, Eishi Y, Mizusawa H: Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology* (in press)
 19. Takao M, Aoyama M, Ishikawa K, Sakiyama Y, Yomono H, Saito Y, Kurisaki H, Mihara B, Murayama S. Spinocerebellar ataxia type 2 is associated with Parkinsonism and Lewy body pathology. *BMJ Case Reports* 2011;10.1136/bcr.01.2011.3685, date of publication
 20. Takao M, Murayama S, Yoshida Y, Mihara B. Superficial siderosis associated with abundant tau and α -synuclein accumulation. *BMJ Case Reports* published online 1 December 2011, doi:10.1136/bcr.10.2011.4925
 21. Cardiac (123)I-meta-iodobenzylguanidine scintigraphy in patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. Kokubo Y, Nomura Y, Morimoto S, Kuzuhara S. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011 In press
 22. Cardiac 123I-Meta- Iodobenzylguanidine Scintigraphy and Lewy Body Pathology in a Patient with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinsonism–Dementia Complex of Kii, Japan Yasumasa Kokubo, Satoru Morimoto, Akihiro Shindo, Yoshihumi Hirokawa, Taizo Shiraishi, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Shigeeki Kuzuhara, *Mov Disord.* 2011 Oct;26(12):2300-1.
 23. PLA2G6 variant in Parkinson's disease Hiroyuki Tomiyama, Hiroyo Yoshino, Kotaro Ogaki¹, Lin Li¹, Chikara Yamashita, Yuanzhe Li, Manabu Funayama, Ryogen Sasaki, Yasumasa

- Kokubo, Shigeki Kuzuhara, and Nobutaka Hattori J Hum Genet. 2011 May;56(5):401-3.
2. 学会発表
 1. Shindo,S.Kuzuhara,Y.Kokubo,Neuropsychological Study of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis, 22th International Symposium on ALS/MND, Sydney,Australia 30November-2December 2011
 2. Y. Kokubo,S.Murayama, H. Tomiyama,Y.Hirokawa,M.Hasegawa,K.Okamoto,T.Kihira,A.Takashima,S.Tsuji,S.Kuzuhara, Research Consortium of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex of the Kii Peninsula of Japan, ICAD 2011, Paris,France July16-21,2011
 3. 紀平為子、吉田宗平、近藤哲哉、森永聡美、和田幸子、岩井恵子、岡本和士、梶本賀義、近藤智善、小久保康昌、葛原茂樹。大島地区での ALS 疫学調査-第 1 報-。第 52 回日本神経学会総会。2011 年、名古屋。
 4. 紀平為子、廣西昌也、小林喜和、吉田宗平、近藤智善、森一郎、村山繁雄。和歌山県内多発地 ALS における神経原線維変化と老人斑。第 52 回日本神経病理学会、2011 年、京都。
 5. Kihira T, Hironishi M, Kobayashi K, Yoshida S, Kondo T, Mori I, Morimoto S, Murayama S. Chronological shift in neuropathological findings of patients with ALS in Wakayama Prefecture on the Kii Peninsula. 22nd International Symposium on ALS/MND. Sydney Australia 30 November - 2 December 2011
 6. Okamoto K, Kihira T, Kuzuhara S, Kokubo Y. Predictors of increase in severity among japanese amyotrophic lateral sclerosis patients by discriminant analysis. 22nd International Symposium on ALS/MND. Sydney Australia 30 November - 2 December 2011
 7. H. Tomiyama, H. Yoshino, K. Ogaki, L. Li, C. Yamashita, Y. Li, M. Funayama, R. Sasaki, Y. Kokubo, S. Kuzuhara, and N. Hattori. PLA2G6 in patients with Parkinson's disease / frontotemporal type of dementia. (The 12th International Congress of Human Genetics, ICHG and the American Society of Human Genetics, ASHG 61st Annual Meeting. 2011, Montreal, Canada.)
 8. Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S. Massively parallel sequence analysis reveals the causative gene of posterior column ataxia with retinitis pigmentosa. American Society of Human Genetics. 2011 Oct, Montreal, Canada.
 9. 石浦浩之、辻省次。次世代シーケンサーによる神経疾患の解明 遺伝性神経疾患の研究 - posterior column ataxia with retinitis pigmentosa- 日本神経学会学術大会 (シンポジウム) 2011 年 5 月、名古屋。
 10. 森本悟、初田裕幸、小久保康昌、葛原茂樹、村山繁雄：高度な白質病変を伴った紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン認知症複合の一剖検例
 11. Hasegawa M: Molecular pathology of TDP-43 proteinopathies. 3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, Melbourne [2011. 8. 2]
- 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

Ⅱ. 分担研究報告

平成 23 年度 Workshop プログラム

○日程：平成 23 年 9 月 11 日（日）13：30～16：00

○会場：Time Office Time D

（敬称略）

テーマ：牟婁病（紀伊 ALS/PDC）の再定義

13：30～13：35

開会挨拶

研究代表者 小久保康昌

I これまでの知見

座長 鈴鹿医療科学大学 葛原茂樹

① 臨床面から

13：35～13：50

古座川地区症例について

紀平為子

関西医療大学

13：50～14：05

ALS/PD mixed case の疾病学的意義と疫学像の変遷

-Guam の経験から牟婁病の臨床疫学像の変化をどう考えるか？

吉田宗平

関西医療大学

14：05～14：20

穂原地区症例について

葛原茂樹

鈴鹿医療科学大学

② 病理面から

14：20～14：40

これまでの剖検例の解析 -和歌山、三重症例を統合して-

森本 悟、村山繁雄

東京都健康長寿医療センター

14：40～14：50 < コーヒーブレイク >

14：50～15：55

II 牟婁病の再定義 -Consensus Criteria のとりまとめ-

座長 三重大学 小久保康昌

1. 臨床面から
2. 病理面から
3. 症例登録システムについて
4. そのほか

15：55～16：00 閉会挨拶

葛原茂樹

牟婁病の実態の把握と治療指針作成班 研究代表者 小久保康昌
三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻神経感覚医学講座神経病態内科学分野
〒514-8507 三重県津市江戸橋 2-174 TEL：059-231-5107 FAX：059-231-5082
E-mail: kii-project@clin.medic.mie-u.ac.jp