

201128085B

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

2010年度～2011年度 総合研究報告書

(平成22年度～平成23年度)

研究代表者 小久保康昌

平成24年(2012年)3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

2010年度～2011年度 総合研究報告書

(平成 22 年度～平成 23 年度)

2YEARS' ANNUAL REPORT 2010～2011 OF THE RESEARCH COMMITTEE
ON THE MURO DISEASE (KII AMYOTROPHIC LATERAL
SCLEROSIS/PARKINSONISM-DEMENTIA COMPLEX)
OF
THE MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, JAPAN

研究代表者 小久保康昌

三重大学 医学系研究科 神経病態内科学

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

Department of Neurology, Mie University School of Medicine

2012 年 3 月

March 2012

目 次

牟婁病研究班へのご挨拶

厚生労働省難治性疾患克服研究事業 推進事業評価委員会委員長
鈴鹿医療科学大学 葛原茂樹

I. 総合研究報告	1
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	
資料 平成 22 年度 総括研究報告	23
平成 23 年度 総括研究報告	37
II. 研究分担者ごとの研究総括	47
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	67
IV. 班構成員名簿	81

牟婁病研究班へのご挨拶

厚生労働省難治性疾患克服研究事業 推進事業評価委員会委員長
鈴鹿医療科学大学教授 葛原 茂 樹

厚生労働省科学研究費補助金の奨励研究として、平成 21 年度から始まった牟婁病研究班が、大きな成果を上げて 3 年間の研究機関を終了しました。主任研究者の小久保康昌先生をはじめとして、分担研究者、研究協力者の皆さん方の真摯な取り組みと着実な実績にお祝いを申し上げます。

4 年前に、当時の樹添厚生労働大臣の肝いりで難病関係研究費が 25 億円から一挙に 4 倍の 100 億円に増額され、難病研究は新しい時代を迎えました。厚労省には、これまでの治療研究事業 56 疾患（いわゆる特定疾患）、調査研究事業の 130 疾患（①の 56 疾患を含む）の事業継続に加えて、新しい研究事業が立ち上がりました。主なものは、重点研究として、実験室の研究成果をヒトの治療や診断につなげる新規治療法と診断法の開発研究（4 - 5 億円規模）を 5 件、遺伝子などの難病患者さんの生体試料の保存と供給を目的としたバイオリソース確立事業（数億円規模）2 件、および、従来は厚労省の研究対象として取り上げられなかった希少難治性疾患を対象とした奨励研究事業（数千万円規模）214 疾患です。奨励研究事業によって、今まで日の目を見なかった難病にも研究の光が当たるようになり、患者さんや研究者からは、たくさんの喜びの声が寄せられました。

牟婁病の名付け親は、和歌山県立医大精神神経科教授であった木村潔先生です。元々は紀伊半島南部（牟婁地方）に多発する筋萎縮性側索硬化症（ALS）を指す言葉ですが、私が三重大学在職中に、ALS 多発地に重複してパーキンソン認知症複合（parkinsonism-dementia complex: PDC）も多発することを見出して、両者を統合した名称（Kii ALS/PDC）として使用したもので、グアムのグアム病（ALS/PDC）に倣ったものです。

三重大学の約 20 年にわたる研究と、和歌山県立医大の約 50 年にわたる研究により、この地区の ALS と PDC の疫学、臨床像、病理、脳生化学などの研究は大きく進展しました。この牟婁病研究班は、紀伊 ALS 研究の主力を担ってきた三重と和歌山の研究者を核に、環境医学、栄養学、分子生物学、遺伝子解析、病理学、細胞生物学の全国の研究者を網羅して組織されました。それによって、この病気の分子生物学、病理像、疫学像、環境因子の影響（特に食物や飲用水）、さらには iPS 細胞樹立の試みなど、大きな成果が上がっています。しかし、多発の原因、そして近年の臨床像の変化（古典的 ALS 像を示す患者発生が激減と PDC 病型優位への変化）に関しては、未解決です。

「病気が集積しているところには、原因も集積している筈である」というのは、私の信念です。本研究班は ALS 原因解明の本流を担っているという気概で、研究を推進していただきたいと思います。今後の発展に期待しています。（平成 24 年 4 月）

I. 総合研究報告

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 三重大学神経内科講師

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）についての研究成果について、1)疫学、2)環境要因、3)原因遺伝子解析、4)Multiple Proteinopathy (tau, TDP-43、 α -synuclein, OPTN)、5)iPS 細胞作成、6) エダラボンによる臨床研究、7) 診断基準と治療指針の作成、の各項目に分けてまとめた。各研究分担者、研究協力者のご尽力で牟婁病とは何か、という長年の謎の解明にせまりつつある。迷宮の出口をもとめて、今後も地道で息の長い研究継続が望まれる。

研究分担者（順不同）

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 東京大学附属病院 神経内科 教授

富山弘幸 順天堂大学医学部 脳神経内科・
神経変性疾患病態治療探索講座
准教授

長谷川成人 (財)東京都医学総合研究所 認知症
高次脳機能分野 病態細胞生物学
研究室 参事研究員

広川佳史 三重大学医学部 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

高島明彦 理化学研究所 アルツハイマー病
研究チーム チームリーダー
(平成 22 年度)

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
する神経難病で過去 60 年あまりにわたって原

因究明がなされてきた。牟婁病は遺伝的脆弱性
をもった個体に何らかの環境要因が加わるこ
とで発症する遺伝-環境関連性疾患と考えられ
る。本研究班では、牟婁病の 2 大多発地域であ
る和歌山県古座・古座川・串本地域と三重県穂
原地域に焦点をあてて発症要因探索から臨床
研究に至るまでのさまざまな観点から牟婁病
の本態に迫るべく研究を行ってきた。まだまだ
正体すらつかみきれていない部分もあるが、こ
の 2 年間+当初の 1 年間で明らかになった点も
多い。それらを振り返りながら、今後の研究の
方向性について考えてみたい。

具体的には、牟婁病の実態の把握と治療指針
の作成にむけて、1)疫学調査：古座・古座川・
串本地域における 1960 年代からの疫学調査と
臨床像の変遷のまとめ(紀平)、穂原地区での最
新の疫学調査(小久保)、2)環境要因調査：2 大多
発地区における生活習慣、飲用水の水質、血清
および毛髪元素分析調査、陰膳調査と食事栄
養調査(岡本、紀平、小久保、葛原)、3)原因遺
伝子の探索：候補遺伝子解析(富山、辻)と全ゲ
ノム遺伝子解析(辻)、ミトコンドリア DNA 解
析(後藤)、4) Multiple Proteinopathy としての
牟婁病：tau, TDP-43、 α -synuclein, OPTN の
異常凝集蛋白質解析と神経病理学的検討(長谷

川、高島、村山)、5)iPS細胞作成：作成に向けての取り組み(広川、江良)、6)エダラボンによる臨床研究(小久保)、および7)牟婁病の診断基準作成(小久保、葛原)について研究を行った。

B.研究方法

1)疫学調査：①古座・古座川・串本地域：ALS発症率の変化について、1967-1971年間(I期)、1989-1999年間(II期)、2000-2008年間(III期)の年齢性調整発症率を検討した。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。地域内の医療機関に郵送法と聴き取り法でALS発症率を明らかにし1967年以降の調査と比較した。

②穂原地域：区長、民生委員からの聞き取り調査を下に、認知症、ALS、パーキンソン症状を有する住民の一次スクリーニングを行った。疑い例について神経学的診察を行いALS/PDCを抽出し、2010年時点での有病率を明らかにした。また、臨床診断例におけるphenotypeを明らかにし、過去の報告と比較した。

③大島地区における認知症スクリーニング調査：住民検診対象者632名のうち、参加者131名(20.7%、男性28名、女性103名)で平均年齢75.3歳(S.D.7.6)であった。改訂長谷川式簡易知能評価スケール(HDS-R)と前頭葉機能評価としてFABを実施した。

2)環境要因調査：①食習慣アンケート調査、聞き取り調査：古座・古座川・串本地域、穂原地域および対照地区に居住する20歳以上の全住民を対象に郵送法によるアンケート調査を行い、食習慣および栄養摂取状況を調査した。近年新規ALS患者を認めた和歌山県串本町大島地区における60歳以上の高齢者を対象に、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い発症への食事の関与の程度を検討する。

②血清生化学検査：古座・古座川地区住民と、

対照地区住民を対象に住民検診に際し文書による同意を得て血清生化学検査を実施した。大島地区では、患者と住民の血清元素含量と尿中OHdGの検討をあわせて行った。

③河川、水道水、井戸水の微量元素解析：古座川地区と穂原地区における河川、水道水、井戸水のCa、Mgなどの元素をICP発光分析とICP質量分析で測定した。

④毛髪の元素分析調査(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の元素分析)：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。毛髪の元素分析は、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ヵ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。

⑤陰膳調査：穂原地区において陰膳による食事調査を実施し、多発地域の微量元素の摂取状況に関する特徴を明らかにする。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。

3)遺伝子解析：①候補遺伝子解析：病理学的に確定診断された3例の紀伊半島牟婁病患者において、関連が推定される候補遺伝子につき変異解析を行った。直接塩基配列決定法で、以前解析したMAPTやSOD1の他に、amyotrophic lateral sclerosis(ALS)/frontotemporal lobar degeneration(FTLD)関連遺伝子(SOD2, SOD3, ALS2/alsin, SMN1, PGRN, ANG, VEGF, VCP, VAPB, DCTN1, CHMP2B,

TARDBP/TDP-43), タウオパチー関連遺伝子 (GSK3 β), パーキンソニズム関連遺伝子 (alpha-synuclein, LRRK2, parkin, DJ-1, PINK1, ATP13A2, PLA2G6)のさらに計 20 の候補遺伝子解析を行った. Gene dosage study として, MAPT, APP, alpha-synuclein, TDP-43/TARDBP, GSK3 β , parkin の欠損や重複の有無についても TaqMan 法, SYBR Green 法を用いて解析した. コントロールも合わせて 144 名のゲノムリソースを収集した. またその中から, グラム ALS/PDC で報告された TRPM7 遺伝子の関与を調べた. また, 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, 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. また, 最近 ALS や前頭側頭型認知症 (Frontotemporal dementia: FTD) で報告された optineurin と C9ORF72 について解析を行った.

②ミトコンドリア DNA 解析: 酸化ストレスの関連などから牟婁病にミトコンドリア異常が関わっている可能性があるため多発地区住民のミトコンドリア DNA 解析を行った.

③次世代シーケンサーによる解析: 日本人ゲノムの全ゲノム配列再解析を行い, 解析アルゴリズムなどの整備を進めた. 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.

4) Multiple Proteinopathy としての牟婁病:

① Tau

i)海馬、脳幹に多数の ghost tangle を伴った牟婁病の 1 例: 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。

ii)Multiple phosphorylated proteinopathy としての牟婁病の神経病理: 牟婁病は、タウ、 α シヌクレイン、TDP43 の三種の蛋白が蓄積するが、いずれもリン酸化を受けている。前二者が蓄積する疾患として、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病 (DNFC) との比較を行った。

iii) tauopathy としての神経病理学的検索と生化学解析: tauopathy を中心に牟婁病と他の高齢者タウオパチーの神経病理像を比較検討した。また、4R 優位症例と AD type 症例における病理像を明らかにした。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、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。凍結脳を用いたタウ免疫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。

iv)牟婁病におけるタウ凝集体の解析: タウオパチーとしての観点から牟婁病を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する。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。まず、正常ヒト脳を用いてタウ、TDP43、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。次に、tau のオリゴマー解析として牟婁病におけるタウ凝集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を行った。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 \times 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。

v) tau の western blot 解析：不溶性タウの生化学解析と免疫組織化学解析を行い、紀伊 ALS/PDC 患者脳に蓄積するタウを再検討することを目的とする。

②TDP-43

前頭側頭葉変性症 (FTLD) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者脳に出現するユビキチン陽性の細胞内凝集体の主要構成成分として TDP-43 が同定され、運動神経変性病態への関与が注目されている。そこで牟婁病患者脳に蓄積する TDP-43 の免疫組織化学、生化学解析を行った。

③αシヌクレイン

牟婁病患者 4 例の脳脊髄に蓄積する αシヌクレインの生化学解析を行った。

④ OPTN

紀伊 ALS/PDC 症例 10 例 (紀伊 ALS 5 例, 紀伊 PDC 5 例: 年齢 60~77 歳 平均 69.1 歳) におけるホルマリン固定, パラフィン包埋後脊髄を対象とした。抗体は, OPTN-C (Rabbit polyclonal, 1:100 or 1:50) or OPTN-I (rabbit polyclonal, Cayman Chemical, 1:100 or 1:50) を用いた。また, 遺伝子検索については本疾患の大家系に属する 1 症例を抽出し, PCR 法を用いて全 exon 塩基配列解析を行った。

5) iPS細胞作成：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) を導入したセンダイウイルスを用いて作製する。得られた 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。

6) エダラボンによる臨床研究：対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例 (男性 4 名, 女性 1 名, 平均年齢 68.4 歳, 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。

7) 牟婁病の診断基準と治療指針の作成：これまでの研究成果に今年度の研究結果を加え、診断基準と治療指針について検討する。

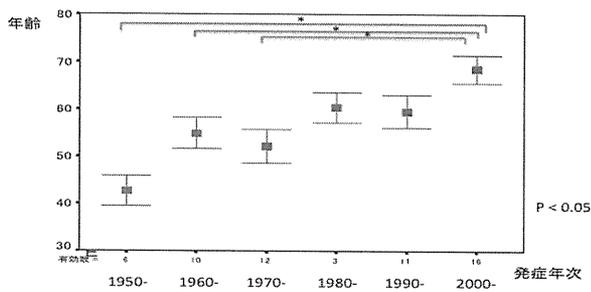
(倫理面への配慮を含む)

本研究は、三重大学、東京大学、順天堂大学、理化学研究所、健康長寿医療センター、東京都医学総合研究所、愛知県立大学、関西医療大学、国立精神・神経医療研究センター、南伊勢町立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) 疫学調査：①古座・古座川・串本地域: 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。2000 年代には 1960 年代に比し ALS 発症率が約 1/3 に減少した。しかし、女性では 2000 年代に逆に年齢性調整発症率が高値となった。また従来発症がなかった串本地域内の大島地区で 2000 年代に新規に複数の ALS 例を認めた。第 III 期の年齢性調整発症率は、3.5/10 万人、O 地区に限ると 8.1/10 万人であった。O 地区では III 期に高発症率が確認された（第 I 期：1967 年～1971 年、第 II 期：1989 年～1999 年、第 III 期：2000 年～2009 年）

②穂原地域：2010 年 4 月時点で 12 名の ALS/PDC 症例が確認された。粗有病率は、1041.7/10 万人であった。ALS/PDC 12 名の内訳は、PDC6 例、認知症主体例が 5 例、パーキンソン症状に錐体路徴候が overlap した症例が 1 例で、純粋な ALS はなかった。

表 1.K 地域と O 地区の ALS 発症率の推移

期間	地域(人口)	粗発症率	年齢性調整発症率
I	K (33,219)	6.0	4.7 (5.7, 2.8) [-2.7, 12.0]
II	K (26,405)	3.8	2.9 (4.8, 1.3) [-3.1, 14.8]
III	K (23,357)	6.4	3.5 (2.6, 3.3) [-4.1, 11.1]
I	O (2,798)		0
II	O (1,667)		0
III	O (1,069)		8.1 (10.4, 6.7) [-45.8, 62.0]

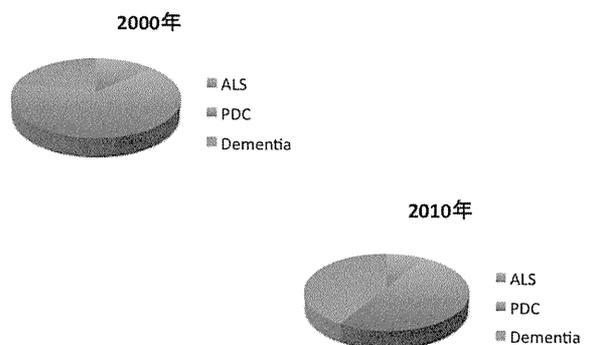
臨床像の変化

In 2010

	臨床像	年齢	発症年齢	罹病期間
1	D with A	86	72	14
2	D	93	82	11
3	D	86	74	12
4	PDC	71	58	13
5	D with A	82	75	7
6	PDC	82	71	11
7	PDC	71	61	10
8	PDC	80	72	8
9	PDC	73	60	13
10	D	85	84	1
11	PDC	71	56	15
12	A with P	63	60	3
	平均 (Max-Min)	78.6 (63-93)	68.8 (56-84)	9.8 (1-15)

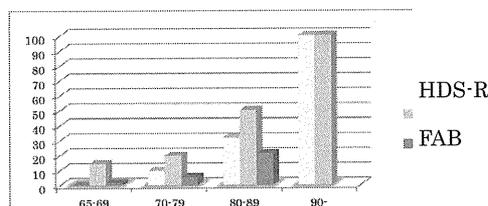
2000 年時点と今回調査での phenotype の変化を示す。

Clinical Subtype の変化



③大島地区における認知症スクリーニング調査：HDS-R 20点未満者とFAB12点未満者の割合を図1に示した。HDS-R 20点未満者は、70歳代で9.6%、80歳代で31.8%であり、1985年大塚らの推定値(年齢階級を著者により編集)に比して高値であった。FABでの12点未満者の割合は80歳代で50%であった。

図1. O地区住民検診におけるHDS-R 20点未満者とFAB 12点未満者の年代別分布

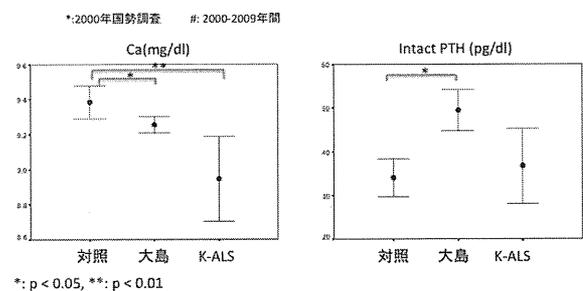


2) 環境要因調査：①食習慣アンケート調査、聞き取り調査：栄養摂取量では古座・古座川・串本地域および穂原地域に顕著な差は認められなかった。しかし全国に比べ、糖質摂取割合は高く、脂質及びタンパク質摂取割合、抗酸化に関連するミネラル(亜鉛、マンガンなど)やビタミン諸量の摂取量は少なかった。食品摂取量に関して、魚類及び砂糖類の摂取量以外全国に比べその摂取量は少なかった。栄養摂取量では、対照地区と比べて、多発地古座川地区と穂原地区では、糖質、イモ類、野菜類の摂取割合は高く、油脂や肉類などの脂質割合が低かった。大島地区での食物摂取聞き取り調査では、15歳(昭和30年代)と比較して、自家製の干物やイワシの丸干し、アジの丸干しを摂取する居住者の割合が高かった。

	多発地区 vs. 対照地区	K地区内高率地区 vs. 低率地区
生活状況		
子どもの頃の飲水方法 (水道水以外)	高	高
現在における井戸水の利用割合	高	高
地元食材の利用割合	高	高
栄養摂取状況		
糖質摂取割合	高	高
脂質摂取割合	低	低
主食イモ摂取割合	高	高
肉類摂取割合	低	低

②血清生化学検査：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。

③河川、水道水、井戸水の微量元素解析：古座川地区では、飲用水中Ca含量は1960年代と同様に低値を示し、大島地区でも水道水のCa低値が明らかになった。和歌山県大島地区の水

道水中 Ca 含量は平均 3ppm で、対照地区と比較し著明な低値を示した。古座川水道水、古座川河川水、古座川井戸水の Ca 含量も同様にきわめて低値を示した。一方大島地区の井戸水、大島地区内の河川水（大川）、山からの採り水（天水）の Ca 含量は対照地区と差がなかった。血清 Ca 含量は、大島住民で有意な低下、古座川地域 ALS で著明低下を示した。大島地区住民では、無機リン高値、intact PTH 高値を認めた。血清 Zn 値は、大島住民古座川地域 ALS ともに低値を示したが、血清 Cu 値に差を認めず、従って Cu/Zn 比が高値を示した。尿中 8-OHdG は古座川地域 ALS で有意な高値大島住民でも高値を認めた。

表 2. 血清Ca, 無機リン、intact PTH値の比較

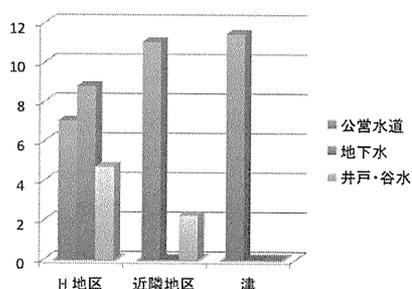
	Ca (mg/dl)	無機リン (mg/dl)	iPTH (pg/ml)
対照	9.38 (0.34)	3.28(0.48)	34.1(15.4)
O 住民	9.25 (0.36)*	3.60(0.43) #	49.2(19.2) #
K-ALS	8.94 (0.32)#	3.38 (0.73)	36.7(9.3)

K-ALS: K 地域 ALS, iPTH: intact PTH

*: $p < 0.05$, #: $p < 0.01$, Mean (S.D)

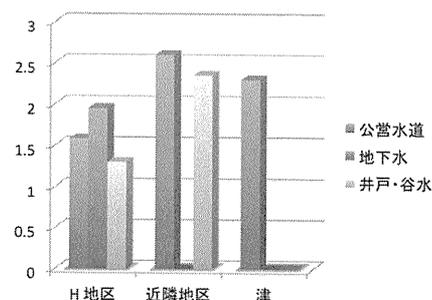
三重県穂原地区では、かつての飲料水である井戸水、谷水での低 Ca、低 Mg を認めた。

カルシウム



H 地区: 公営水道 (13カ所)、地下水 (2カ所)、井戸・谷水 (9カ所)

マグネシウム



H 地区: 公営水道 (13カ所)、地下水 (2カ所)、井戸・谷水 (9カ所)

Ca, Mg 値とも、現在の下水道では上昇していた。

④ 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。

⑤ 穂原地区における陰膳調査：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。

3) 遺伝子解析:①候補遺伝子解析:計 20 を超える候補遺伝子解析を行ったが、病的変異は特定できなかった。牟婁病検体を用いて塩基配列解析、二点連鎖解析を行った結果、牟婁病においては TRPM7 が関与していないことを示すことができた。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 についても、正常であった。C9orf72 のリピート伸

長については、古座川地区の複数の ALS 症例で変異を認めた。

②ミトコンドリア DNA 解析：今回解析した 23 名のミトコンドリアハプログループの構成は以下の通り。MITOMAP に掲載されている East Asia におけるハプログループの頻度（表中の既報告）とほぼ同じ結果であった。また、病因的とされている変異、新たな SNP は見いだされなかった。

種類	A	B	C	D	F	G	H	J	M	N	R	Y	Z
既報告	7	16	5	26	11	4	1	1	15	3	2	1	2
本実験	13	9	0	26	17	0	0	0	9	9	0	0	4

(%)

③次世代シーケンサーによる解析：次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列再解析のパイプラインの整備を進めた。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。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。

4) Multiple Proteinopathy としての牟婁病：

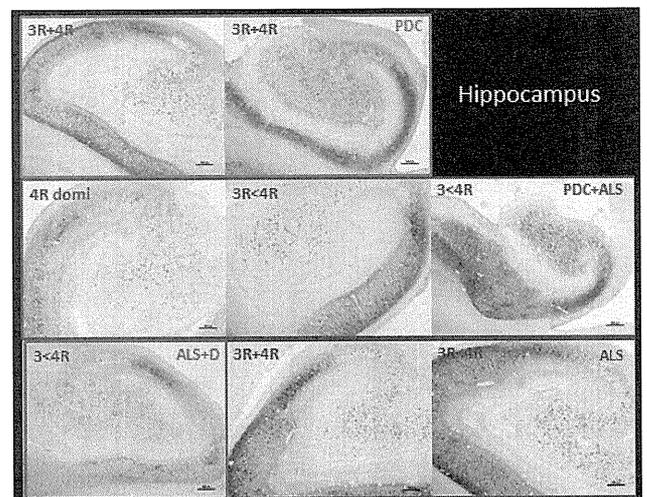
① Tau

i)海馬、脳幹に多数の ghost tangle を伴った牟婁病の 1 例：ghost tangle と α -synuclein 病

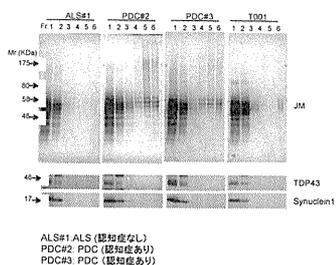
理が顕著であった牟婁病剖検例を報告した。

ii)Multiple phosphorylated proteinopathy としての牟婁病の神経病理：DNTC でも、免疫組織化学的に、TDP43 神経細胞内沈着を側頭葉・海馬に確認できたが脊髄に陽性所見は認めなかった。

iii)tauopathy としての神経病理学的検索と生化学解析：4R 優位型症例では、Ghost tangle, astrocyte 病変 (thorn-shaped astrocyte, astrocytic plaque like glia)、Purkinje 細胞内 tau 蓄積、白質内に多量 threds、Betz 細胞内 tau、小脳 Golgi 細胞、Bergman glia に tau 蓄積、樹状突起内 tau 病理、granular hazy astrocytes。扁桃体や海馬支脚の変性。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 が海馬に局限しており、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。4R 単独症例では、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。



iv) 牟婁病におけるタウ凝集体の解析: 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を試みたその結果、凝集体の大きさに従ってそれぞれの蛋白質を分離できる事がわかった。さらに、正常ヒト脳、牟婁病 ALS 発症 (認知症なし) 1 例、PDC 2 例 (高度の認知症) について検討を行った。牟婁病 ALS#1 ではタウ、TDP43, Synuclein はフラクション 1、2 に回収されており、凝集体は出来ていないと考えられた。PDC # 2、3 は顆粒状凝集体 (フラクション 3)、線維 (フラクション 5、6) のフラクションにタウのシグナルが観察された。(図 1)。



更に、リン酸化タウ抗体を用いて可溶性画分 (フラクション 1)、不溶性画分 (フラクション 6) を比較検討した。PDC#2, PDC#3 から分離した線維画分にあるタウは AT8, PHF1 というリン酸化タウ抗体に反応し凝集物特有のスミアを呈した。リン酸化タウが凝集に関与することが考えられた。可溶性画分でも、ALS#1 に比較して AT8, PHF1 サイトのリン酸化亢進が観察された。AD 脳由来の可溶性画分サンプルと比較すると、トータルタウ量には変化がないが、PDC#2, PDC#3 サンプルに於ける、リン酸化程度は遥かに低かった。このことは、PDC に於けるタウ凝集はリン酸化以外の要因が関与することを示唆している。

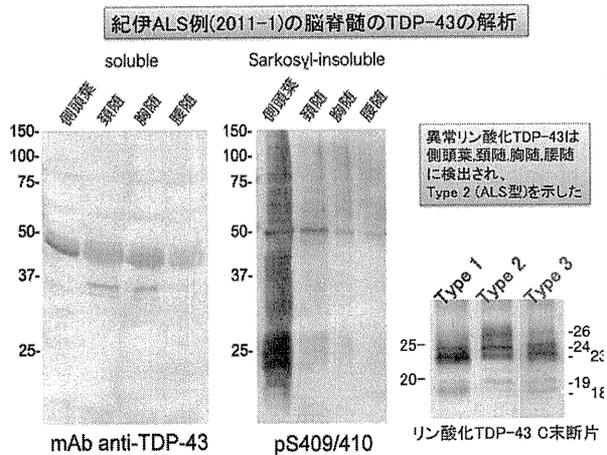
v) tau の western blot 解析: 今回解析した 9 症例のうち AD のタウに似た蓄積を示した症例が 4 例、4R タウアイソフォームの蓄積が認められた 2004-1 を含め、4R タウが 3R タウより

も多く蓄積している症例が 4 例、1 例が不明という結果となった。臨床診断と蓄積タウのアイソフォームに関連はないように思われた。

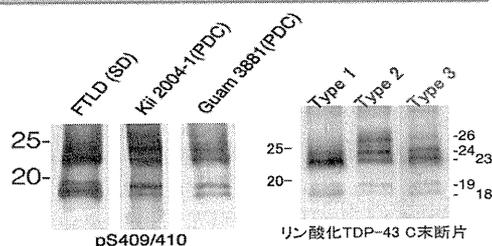
症例番号	年齢	性別	臨床診断	タウの生化学	タウの蓄積量
1	1998-1	77歳	男性	ALS with D	3R<4R Level 1~4
2	2001-1	60歳	女性	PDC with A	3R<4R Level 2~4
3	2004-3	63歳	女性	ALS	3R>=4R Level 4
4	2004-1	70歳	女性	PDC with ALS	3R<4R Level 3~4
5	2000-2	76歳	女性	PDC	3R>=4R Level 3
6	2009-4	70歳	女性	ALS	? Level 1
7	2005-3	70歳	女性	ALS	3R<4R? Level 2
8	2007-1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

②TDP-43, ③αシヌクレイン

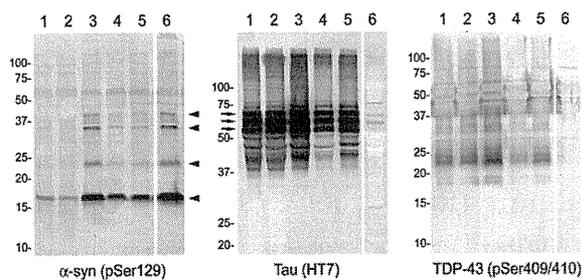
i) TDP-43, α-synuclein: 1) 紀伊 ALS+D 2011-1 例の側頭葉、頸髄、胸髄、腰髄に異常リン酸化 TDP-43 の蓄積が検出された。そのバンドパターンは Type 2 (type B, ALS 型) と考えられた。tau は AD type で、この症例では、はじめて脊髄のウエスタンブロットを行った。脊髄の tau、TDP-43 とともに脳のタイピングに一致する結果であった。2) 紀伊 PDC 2004-1 例(4R タウ蓄積型)脳の TDP-43 のバンドパターンも Type 2 (type B, ALS 型) と考えられた。CBD 病理を伴っていた。3) 紀伊 PDC-ALS 2001-1 (3Rtau < 4Rtau), 2009-1 (3Rtau >= 4Rtau) 例の TDP-43 のバンドパターンは Type 3 (type A, FTD 型) と判断された。4) 紀伊 PDC 2009-1 例 tau は、AD type、TDP-43 は、Type A (FTD 型) に蓄積する αSyn 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。western blot で認められたように牟婁病では、タウの isoform に 2 パターンあり、4R 優位型では、Ghost tangle と astrocyte 病変、白質の threds、樹状突起内にタウ病変を認めた。一方、AD 型では 主として pretangle や NFT を認めた。



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



1. 01-1(扁桃体), 2. 01-1 (Ent), 3. 09-1(Hip1), 4. 09-1(Hip2), 5. 09-1(Hip3), 6. DLB (Frontal)

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?

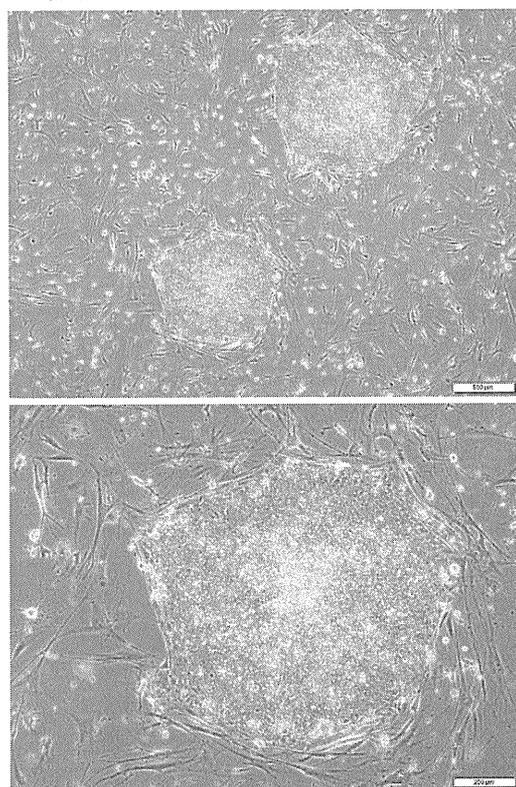
④ OPTN

i) 前角細胞の大型ニューロンに陽性構造物を認めたのは半数程度 (C末抗体がほとんど) であり, 多くは skein like inclusions の形であった。また小～中型ニューロンの胞体には, 大型ニューロンより高頻度で陽性構造物を認め, 一部には突起にも陽性所見を認めた (int 抗体が主)。また, 全 exon 配列における病的な遺伝子

変異は認められなかった。

5) iPS 細胞作成: 患者からの同意が得られた 4 例の症例において皮膚生検を行い, うち 3 例から iPS 細胞作成に必要な皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。残り 1 例は培養中に真菌の汚染があり破棄した。症例から樹立した線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を行った。線維芽細胞に初期化因子(Oct3/4, Sox2, KLF4,c-Myc)を持つセンダイ・ウイルスを感染させ、感染後 1 週間目にマイトマイシンで処理したマウス胎仔初代線維芽細胞(MEF)上へまきなおした。感染から 14 日後ぐらいからコロニーが出現した。現在クローニングしてコロニーを増幅中である(図)。

図 増幅中の iPS 細胞のコロニー



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っており、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。一方、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

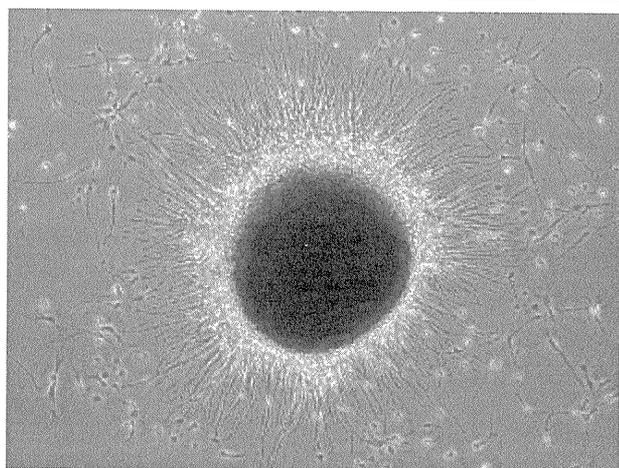


図 牟婁病患者 iPS 細胞より誘導された神経様細胞集塊。

発現は認められなかった。

6) エダラボンによる臨床研究: 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カ月の時点で、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。他の1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。1例は、著変無し。残りの2例では、易怒性、暴力、性的逸脱があり投与約2カ月から3カ月中止した。

7) 牟婁病の診断基準と治療指針の作成: 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、臨床的にほぼ確実 (probable): 1+2 に支持項目 A,B,C の1つを満たす。

を提案した。

D.考察

疫学調査と環境要因について: 古座・古座川・串本地区および穂原地区の疫学調査から、有病率の減少傾向、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、こういった傾向は、グアム ALS/PDC においても報告されている。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り、牟婁病発症には、遺伝素因のほかに環境要因が大きく関わっていることは疑いようがない。さらにこれまで牟婁病としてひとくくりにされてきた病像にいくつかの subtype が存在する可能性が明らかにされつつある。すなわち、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大部分を占め ALS よりも PDC が主体であるといった大きな違いがある。環境因を強く受けるタイプと遺伝素因の影響が大きいタイプといった、いくつかの疾患単位に分類できるのかもしれない。こういった不均一な表現型を示す牟婁病は、一つの疾患として統合できるのか、もしくはいくつかの疾患が重なり合って牟婁病を構成しているのか、今後の大きな課題である。

牟婁病自体は遺伝素因の関与が大きいかもしれないが、加齢や環境変化によって病像が大きく変わるものである可能性がある。従って、環境の変化と牟婁病発症および病型変化との

関連を検討する必要がある。環境要因に関しては、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がある。飲用水中の Ca 低値が牟婁病多発地での特徴であり、同じ水源を飲用水とする大島地区でも牟婁病の新規発症がみられたことから、今後さらに環境因子に関する調査を継続する必要がある。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。

多発地住民の食事調査の結果から、神経細胞に対する攻撃因子（ストレス）である高糖質摂取と防御因子（抗酸化力）であるミネラルやビタミン諸量の低摂取が明らかになった。攻撃因子が優位な状態が示唆されたことから、多発地に対する発症予防を目的とした栄養学的な介入の必要性が考えられた。また、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、多発地山間部での食事聞き取り調査や紀伊半島以外の海岸部地域との比較調査が必要と考えられた。栄養学的調査から、多発地では①糖質摂取割合が高く、摂取割合が低い②主食いも摂取割合は高く、肉類摂取割合は低い③地元食材の利用頻度が高い、といった傾向が認められた。こういった傾向は、通常の ALS でも報告されており、高糖質摂取ではフリーラジカルの生成や superoxide や nitric oxide (NO⁻) の過剰産生

を介し細胞のアポトーシスを誘発し、一方、脂質は神経保護作用を有することから、多発地では、神経細胞に対する攻撃因子（ストレス）と防御因子（抗酸化力）のバランスがより崩れているのかもしれない。

古座川地区での患者と一般住民では尿中 OHdG 値の高値を認めた。飲料水中の Ca 欠乏により毒性金属元素の相対的増加による酸化的ストレス増大を介した神経細胞障害が一つの危険因子であるかもしれない。我々は、以前穂原地区の ALS/PDC 患者の尿中 OHdG 高値について報告しており (Morimoto et al. 2009)、今後、酸化ストレスやニトロ化ストレスの病態への関与に関するさらなる検討が必要と考えられる。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。

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 個の候補遺伝子解析で、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, タウオパチーの主要な原因および感受性遺伝子の検索をおこなった。その結果、古座川地区の ALS 症例の一部において C9ORF72 遺伝子変異を伴う症例が認められたことは、画期的な新発見であった。ただし、穂原地区の PDC 症例や ALS with dementia 症例には変異を認めず、古座川においても一部の症例に限られることから、牟婁病がいくつかの疾患からなる複合疾患群であることが示唆された。我々は、これまでに 100 名弱の患者および家族から DNA の提供を受けている。これらの検体を用いてこれまでに、候補遺伝子解析や連鎖解析を行ってきたが、候補領域の絞り込みは必ずしも十分でない。この理由として、発症年齢が高いために採血時に発症していない個人の扱いが難しいこと、近親婚の割合が高いこと、他の家系からの

発症者の混入などがあり、発症者/非発症者の同定が困難なことが大きな要因である。剖検確定例における全ゲノム解析では、現在のところ各症例に共通する遺伝子変異は見つかっていない。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用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。さらに、DNA から mRNA への transcription や mRNA からの translation 等での異常、あるいは mRNA に転写されない epigenome の異常といった観点からの検討も必要かもしれない。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法として、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。

ミトコンドリア遺伝子解析では、23 例という少数の解析に止まっているために、牟婁病発生地区の住人と一般的な東アジア人との間の人類学的な差異を明確にすることはできていな

い。さらに母数を増やして見る必要がある。今後、牟婁病患者群や可能であればグアム島、パプアニューギニアの患者群のミトコンドリア DNA ハプログループの解析を行うことで新たな変異やミトコンドリア DNA 量の減少などの共通所見が得られれば、病因解明の一助になる可能性がある。

Multiple proteinopathy: 牟婁病は、過剰リン酸化されたタウと TDP-43 が蓄積する multiple phosphorylated proteinopathy と考えられる。tau と TDP-43 の神経病理学的検討と western blot 解析結果から、牟婁病は均一な病態ではないことが強く示唆された。すなわち、Tau については $3R \geq 4R$ の AD type、 $3R < 4R$ タイプ、4R 優位タイプに分類され、TDP-43 については、Type A (FTD 型)と Type B (ALS 型)に分けられる。Tau の 4R 優位例ではグリア病変が強く $3R \geq 4R$ タイプでは神経細胞における病変が主体であると考えられた。これまで牟婁病では、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かもしれない。今後の機序解明が病態解明に重要と考えられる。

リン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失に、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することがわかっている。タウ、TDP-43、 α -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、神経細胞毒性を有するオリゴマーの性状を解析したところ、ALS では凝集体形成がなく、PDC では顆粒状凝集体と線維形成が認められた。シヌクレイン、TDP43 の凝集体形成は見出されていない。タウ凝集が紀伊 ALS/PDC における認知症に関連する可能

性が考えられた。PDCにおける凝集体形成にはリン酸化以外の機序が重要かもわからない。

牟婁病では、tau、TDP-43ともに症例毎あるいは部位によっても発現パターンが異なっていると考えられる。このメカニズムは不明だが、牟婁病では2種類のtau蛋白がシードとして形成される可能性がある。これまでに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。今後のデータ蓄積が重要と考えられる。

OPTNについては、全 exon 配列における病的な遺伝子変異は認められず、細胞脱落の程度を考慮しても、大型ニューロンへの集積が少ないことから、本疾患におけるOPTNの意義については、causativeというよりも、二次的に集積している可能性がある。

iPS細胞作成: 現在の所、牟婁病患者皮膚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られる。今後は、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予定である。分化誘導された細胞が得られれば、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。1) 環境因子の影響: 牟婁病の発症機序に、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、小胞体の機能に負荷が生じ、神経変性疾患を引き起こすモデルと考えられている。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、ドー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、グリア細胞と運動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。

エダラボンによる臨床研究: 今回の栄養、水質、血清Cu/Zn、尿中OHdG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た。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。認知機能障害が高度の患者では興奮作用が優性であったが、軽度の患者では有効な治療法となる

可能性がある。

診断基準の改定について： 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。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) ミトコンドリア保護やタウ凝集抑制作用のあるメチレンブルーなどの新規治療薬について臨床治験に取り組む必要がある。

22 年度には、牟婁病のホームページを開設した。研究班の活動報告などを不定期に更新している。

E. 結論

多発地区での疫学調査と環境因子調査、遺伝子解析、蛋白・病理解析、iPS 細胞作成、臨床研究の進展状況と牟婁病診断基準について報告した。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治療介入研究が望まれる。

F. 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. Tameko Kihira¹, Kazusi Okamoto², Sohei Yoshida¹, Tetuya Kondo¹, Keiko Iwai³, Sachiko Wada³, Satomi Morinaga³, Yoshinori Kazimoto⁴, Tomoyoshi Kondo⁴, Yasumasa Kokubo⁵, Shigeki Kuzuhara. An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960–2009: A possible link to change in drinking water source
Amyotrophic lateral sclerosis in press
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. 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.
5. Hasegawa M, et al (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 45:480-485
6. 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.
7. 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.
8. 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