

201231159A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

三重県南部に多発する家族性認知症
ーパーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

平成25年(2013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

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

三重県南部に多発する家族性認知症
ーパーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

ANNUAL REPORT 2012 OF THE RESEARCH COMMITTEE
ON THE MURO DISEASE (KII AMYOTROPHIC LATERAL
SCLEROSIS/PARKINSONISM-DEMENTIA COMPLEX)
OF
THE MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, JAPAN

2013年3月

March 2013

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 難治性疾患等克服研究事業 三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究班の1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、環境、遺伝子、蛋白、病理、iPS細胞、臨床研究の各分野におきまして新たな研究の進展がありました。環境分野では、過去と現在の生活環境や食習慣の変化を明らかにし、遺伝子分野では、大家系を対象とした全ゲノムシーケンスの取り組みおよび表現型とエピゲノムの関係の解析、蛋白分野では、2012年の新たな2剖検例の異常蛋白解析、病理分野では、小脳でのタウ病理の拡がり、iPS研究では、iPS細胞樹立と運動神経分化への取り組み、そして臨床研究では、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。また、ミニシンポジウムとして一昨年にヨーロッパで報告されました新たなALS/FTD原因遺伝子であるC9orf72遺伝子と牟婁病との関係を取り上げました。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。

牟婁病は、これまでの研究によって、heterogeneityのある症候群である可能性が強まっていました。C9orf72遺伝子変異例の集積は、それを証明した画期的な発見でした。ただし、coreであるPDC typeについては、いまだに環境や遺伝子の影響がどこまでなのか、謎に包まれています。過去50年間の歴史ある研究の中で、本疾患の臨床像が大きく変化したことは紛れもない事実であり、この意味するところの解明が牟婁病本体に迫る鍵となるのではないかと考えています。残された多くの疑問点や問題点の解明と症状の緩和法や根治療法の確立に向けて、新たな研究手法であるiPS細胞研究を含めた地道な研究継続が必要です。紀伊半島の稀少難病に苦しむ患者さんにご家族に希望の光をもたらし、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25年2月

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群
発症因子の探索と治療介入研究班

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	三重大学医学系研究科神経病態内科学	講 師
研究分担者	岩田 淳	東京大学医学部附属病院 分子脳病態科学	特任准教授
	江良 択実	熊本大学発生医学研究所	教 授
	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	東京大学医学部附属病院 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	参事研究員
	広川 佳史	三重大学医学系研究科腫瘍病理学	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
	石浦 浩之	東京大学医学部附属病院 神経内科	助 教
	江上 いすず	名古屋文理大学健康生活学部	教 授
	奥宮 清人	総合地球環境学研究所	准 教 授
	小柳 清光	信州大学医学部 神経難病学講座	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
	斉藤 祐子	国立精神・神経医療研究センター病院 臨床検査部	医 長
	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
	馬 寧	鈴鹿医療科学大学保健衛生学部	教 授
	宮崎 光一	町立南伊勢病院	院 長
	吉田 宗平	関西医療大学保健医療学部/神経病研究センター	教 授
	米田 操	鈴鹿医療科学大学保健衛生学部	准 教 授

平成24年度研究班カレンダー（敬称略）

平成 24 年

- 3月28日 平成24年度厚生労働科学研究費補助金採択通知
（事前評価：6.8、全研究班平均：6.0）
- 4月6日 平成24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）
585万円（間接経費135万円）
- 4月23日 平成24年度厚生労働科学研究費補助金申請書提出
- 5月31日 難治性疾患等克服研究事業（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）
- 6月15日 平成24年度厚生労働科学研究費補助金交付決定通知
585万円（間接経費135万円）
- 28日 厚労省より平成24年度研究費入金 総額585万円（間接経費135万円）
- 7月31日 研究班名簿及び疾患概要作成提出
- 12月11日 平成25年度厚生労働科学研究費補助金研究計画書（継続申請）e-Rad申請

平成 25 年

- 1月5日 三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と
治療介入研究班 H24 年度班会議開催
（名古屋：愛知県産業労働センター 907号室）
- 10日 難治性疾患克服研究事業の研究成果報告書（継続）概要版の作成・登録
- 3月 「三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と
治療介入研究」2012年度研究報告書 発行

《 平成 24 年度年中行事 》

- 平成 24 年 6月16日 第3回環境因子会議(名古屋)
- 7月28日-29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
- 11月25日 穂原地区 地域住民講演会
- 平成 25 年 1月5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 24 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	
・研究報告	
班会議 平成 25 年 1 月 5 日 於：愛知県産業労働センター	
・班会議 プログラム	21
・班会議 議事録	23
1. C9ORF72 遺伝子の異常伸長を有する紀伊 ALS 2 症例の臨床的特徴	
について	
紀平為子 関西医療大学	24
2. C9orf72 repeat expansion を伴った紀伊 ALS の一自験例の	
臨床的特徴について	
吉田宗平 関西医療大学	27
3. 三重県 ALS/FTD 患者における C9orf72 遺伝子変異	
富山弘幸 順天堂大学	30
4. 紀伊半島南部 ALS 多発地域における生活・食習慣の変化に関する検討	
紀平為子 関西医療大学	33
5. 紀伊半島南部 ALS 多発地域における栄養摂取量の継時的変化に	
関する検討	
岡本和士 愛知県立大学	37

6. 紀伊半島の家族性認知症・パーキンソン症候群における 脳内 BMAA の解析 小久保康昌 三重大学	41
7. 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	45
8. エピゲノム解析を通じた三重県南部に多発する家族性認知症 ーパーキンソン症候群の病態解析 岩田 淳 東京大学	48
9. 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 (Kii ALS/PDC、牟婁病) における小脳の免疫組織化学的検討 村山繁雄 東京都健康長寿医療センター	51
10. 患者脳に蓄積する異常蛋白質の組織病理、生化学解析 長谷川成人 東京都精神医学総合研究所	55
11. 三重県南部に多発する家族性認知症・パーキンソン症候群からの iPS 細胞の樹立 江良択実 熊本大学	59
12. 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	62
13. 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における エダラボンを用いた臨床研究 小久保康昌 三重大学	64
III. 研究成果に関する一覧表	69
IV. 研究成果の刊行物・別刷	73

I. 総括研究報告

紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群の 発症因子の探索と治療介入に関する研究

研究代表者：小久保康昌 三重大学神経内科

研究要旨

紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群（紀伊 ALS/PDC, 牟婁病）に関する今年度の新たな研究成果についてまとめた。1) 牟婁病の中の C9orf72 遺伝子変異：紀伊半島における C9 症例集積の発見と臨床像の解明、2) 環境要因：ALS 減少に影響を与えた生活と食習慣の変化に関する検討、脳内 BMAA 解析、3) 遺伝要因：多発大家系に焦点をあてた発症遺伝子の探索と表現型の変化に関連するエピゲノム解析、4) Multiple Proteinopathy:小脳における tau 病理の広がり、2012年に新たに剖検された2症例の異常蛋白質解析、5) iPS 細胞研究:iPS 細胞の樹立と運動ニューロンへの分化の試み、6) 臨床研究:エダラボンの臨床研究結果、について新たな研究成果を得ることができた。数十年の間に臨床像が大きく変化した原因を明らかにすることが、本疾患の謎を解く鍵になると思われる。

研究分担者

岩田 淳 東京大学医学部附属病院
分子脳病態科学
江良 択実 熊本大学 発生医学研究所
岡本 和士 愛知県立大学 看護学部
紀平 為子 関西医療大学 保健医療学部
辻 省次 東京大学医学部附属病院 神経内科
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
長谷川 成人 財東京大学医学総合研究所
広川 佳史 三重大学医学系研究科 腫瘍病理学
村山 繁雄 東京都健康長寿医療センター研究所

A.研究目的

紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群（紀伊 ALS/PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis / Parkinsonism-dementia complex :ALS/PDC)), 牟婁病) の発症因子探索と治療介入にむけて、

本年度は、1) 牟婁病の中の C9orf72 変異例：紀伊半島における集積の発見と臨床像の解明（石浦、辻、紀平、吉田、富山）2) 環境要因：ALS 減少に影響を与えた生活と食習慣の変化に関する検討、脳内 BMAA 研究（紀平、岡本、小久保）、3) 遺伝要因（石浦、岩田、辻）、4) Multiple Proteinopathy（森本、村山、長谷川）、5) iPS 細胞研究（広川、江良）、6) 臨床研究（小久保）の各項目について検討した。

B.研究方法

1) 牟婁病の中の C9orf72 変異例：2011年に北欧を中心としたヨーロッパの ALS と前頭側頭型認知症 (FTD) において新規原因遺伝子 C9orf72 が発見された。本遺伝子異常と紀伊 ALS/PDC との関連を検討した。①紀伊半島における ALS, ALS/PDC 症例について、C9ORF72 内のリピート伸長変異の頻度や地域分布、ハプロタイプ解析による創始者効果についての検討を行った。②C9orf72 遺伝子変異

を認めた串本 3 症例の臨床像について検討した。

③9orf72 遺伝子変異を認めた三重県亀山症例の臨床像について検討した。

2) 環境要因：紀伊半島では、この 50 年間に ALS が減少し、発症年齢が高齢化している。このような変化をもたらした環境要因を明らかにすることは、神経変性疾患全般の発症要因解明や予防法につながる可能性がある。①1960 年代と現在とで生活・食習慣に生じた変化を明らかにする：紀伊半島南部の大島地区住民と穂原地区住民、及び対照地区住民(紀伊半島北部山間部など)を対象とし、生活・食習慣の変化に関する自記式アンケートを実施した。食品摂取頻度、嗜好、仕事の内容、身体疲労、飲み水等に関する 63 項目の質問について、若い頃 (20-30 歳代、1960 年代を想定)と現在での違いを、「よく食べた」(毎日~隔日程度)、「滅多に食べなかった」(週に 1 回以下)、或いは、「多かった」、「あまり多くなかった」の 2 項選択で回答を求めた。また、住民健診では、身体測定、認知症の検査として HDS-R, MMSE, FAB, においの検査 (カード型嗅覚同定検査)、血清元素測定、DNA の酸化的ストレスの指標とされる尿中 8-OHdG 測定を実施した。② 栄養摂取量の経時的変化：2003 年と 2011 年に多発地の住民を対象に行った栄養調査結果を比較し、栄養摂取状況の変化と ALS 発症頻度の低下との関連を明らかにする。2003 年と 2010 年に紀伊半島南部の古座川町(多発地)と花園地区(対象地区)の 20 歳以上の居住者を対象に、生活状況調査と自記式 (一部聞き取り) による食品摂取頻度調査を行った。③ 脳内 BMAA の解析：Guam ALS/PDC では、ソテツの根茎に寄生するシアノバクテリアが産生する神経毒である BMAA (β -methylamino-L-alanine) を発症要因とする仮説がある。牟婁病 (Kii ALS/PDC) 脳における BMAA の存在の有無を明らかにすることで、BMAA が紀伊 ALS/PDC の病態に及ぼす影響について検討する。対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例 (男性 1 名、女性 4 名、平均年齢 69.0 歳、ALS 2 例 PDC 3 例、平均罹病期間 7.4 年) と age-matched の非神

経疾患 3 例、common ALS 2 例。方法は、患者脳由来蛋白質の加水分解産物を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、質量分析計 (LC/MS/MS)、アミノ酸分析器 (AAA) によって BMAA の有無について解析した。

3) 遺伝的要因：①疾患遺伝子の探索：多発大家系に着目し、連鎖解析の進め方についての再検討を行うとともに、本家系に属する 2 名の発症者についてさらに全ゲノム配列解析を追加した。大家系 (発症者 9 名、非発症者 25 名) については以前の研究でマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型が決定されている。パラメトリック二点解析 (浸透率 90% の不完全浸透優性遺伝モデル、disease allele frequency 1%、phenocopy 3%) を行った。さらに、本疾患の遺伝子座の絞り込みを進める上で最適と考えられる連鎖解析のアプローチについて検討をした。また、本家系に属する 2 名の末梢血由来の genomic DNA について、HiSeq2000 (Illumina) を用いて全ゲノム配列解析を行った。②エピゲノム解析：ゲノム DNA の CpG メチル化は当該遺伝子の発現に影響を及ぼす事が知られている。本疾患が家系内においてパーキンソニズム (PDC)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) といった表現形が異なる事が知られている。特に、時代の変遷によって ALS の表現形が減少し、PDC の表現形が残るようになっており、その原因としてエピゲノム情報の変化を想定した。ゲノム DNA の CpG アイランドのメチル化について特定の遺伝子について検討した。対象は 16 例でそのうち PDC は 8 例、ALS は 8 例。脳の部位としては側頭葉 14、頭頂葉 3、小脳 1 であった。我々が所有する側頭葉 88、頭頂葉 90、小脳 78 例を正常対照として使用した。選定した遺伝子としては MAPT, GSK3B, APP, SNCA であり、三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群と病理学的に類似性のある神経変性疾患の関連遺伝子とした。それぞれの遺伝子で解析する CpG アイランドについてはアルツハイマー病、パーキンソン病などで我々が異常を同定した部位に設定した。メチ

ル化率は bisulfite 変換後の PCR を使用した pyrosequencing 法によって測定した。

4) Multiple Proteinopathy: ①小脳の免疫組織化学的検討: Kii ALS/PDC における tauopathy の広がり、並びに小脳病変を詳細に検討した。また、ubiquitin, p62 及び ubiquilin 2 蛋白についても併せて検討を行った。穂原地区の Kii ALS/PDC 10 連続剖検例の小脳を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6 μ m/9 μ m 厚の切片を作成し、通常染色 (H.E. K.B.染色)、特殊染色 (Gallyas-Braak 鍍銀染色) に加え、以下の各種抗体を用いて自動免疫染色装置 Ventana を用いて免疫染色を施行した。一部は Pser242 と calbindin との蛍光二重染色を施行した。<使用抗体> リン酸化(p)-tau(AT-8, Pser242)、ubiquitin、p62、ubiquilin 2、calbindin。

②異常蛋白質の組織病理、生化学解析: 2012 年に剖検となった 2 例の患者脳、脊髄の細胞内異常タンパク質の病変を免疫組織、生化学解析に解析する。免疫組織染色は、凍結脳の一部をホルマリン固定後、ビブラトーム切片を作製し、免疫組織染色を行った。生化学解析は、凍結脳からサルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、イムノブロット解析した。タウの関しては、不溶性画分の一部を 6M グアニジン塩酸に可溶化、透析後にアルカリホスファターゼ処理による脱リン酸化を行い、蓄積タウのアイソフォーム構成を調べた。用いた抗体は、リン酸化タウを検出する AT8 と pS396、非リン酸化タウを検出する HT7 と T46、リン酸化 α シヌクレインに対する抗体 mAb PS129、リン酸化 TDP-43 を検出する抗体 mAb pS409/410 である。

5) iPS 細胞研究 ① iPS 細胞の樹立: 三重県南部に多発する家族性認知症・パーキンソン病患者の皮膚生検から、皮膚由来初代線維芽細胞を樹立する。センダイウイルスベクター (SeV ベクター) によって患者由来線維芽細胞へ初期因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を一過性に発現させ iPS 細胞の樹立を

行う。樹立した iPS 細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60 の免疫染色による iPS 細胞の確認を行う。さらに、未分化マーカーの発現を PCR にて確認する。

②iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導:

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 発症機序が再現できるか検討する。i) 疫学的環境因子の影響、ii) 小胞体ストレスのメカニズム、iii) 酸化ストレスのメカニズム。

6) 臨床研究: 紀伊半島の家族性認知症・パーキンソン症候群 (ALS/PDC) では、尿中 OHdG が高値であることを報告しており (Morimoto et al. Mov. Disord. 2008)、病態に酸化ストレスの関与が想定されている。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、24 クールを連続して行う。併用薬として 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。期間は、2011 年 11 月から 2012 年 6 月まで。

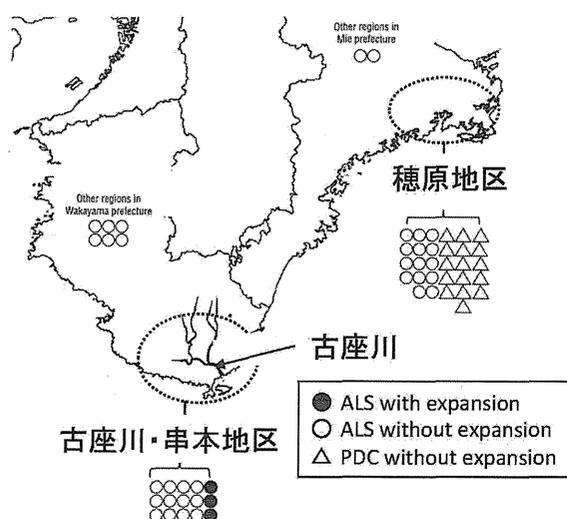
(倫理面への配慮を含む)

本研究は、三重大学、東京大学、順天堂大学、熊本大学、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) 牟婁病の中の C9orf72 変異例: ① *C9ORF72* 内の 6 塩基 (GGGGCC) の異常伸長は、穂原地区症例 30 名については、本リピート伸長を認めなかった。一方で紀南 (串本・古座川地区) 症例 15 名 (家族例 1 名、孤発例 14 名) については、3 名 (20%) で本変異を認めた。このうち、1 例のみで家系内の類症の発症者を認めた。紀南の 3 症例に関しては、3.3Mb~63Mb と非常に長い領域にわたって共通ハプロタイプを認め、創始者効果の存在が考えられた。

図 1. 牟婁地方における C9orf72 変異症例



② 串本地区症例 i) 死亡時 72 歳女性。臨床像は、69 歳左下肢症状で発症し、その後球麻痺、上肢へと進行した例で、上位下位運動ニューロン徴候を呈し、経過中パーキンソン症状や不随意運動、小脳症状、認知症を認めなかった。全経過: 2 年 6 ヶ月。この同胞で死亡時 78 歳男性は、75 歳時右手の脱力で発症し、76 歳舌萎縮と fasciculation を認め、また四肢に脱力と筋萎縮、fasciculation、さらに DTR 亢進を示し、78 歳呼吸困難で死亡した。認知症状や行動異常、パーキンソン症状、不随意運動、小脳症状は認めなかった。全経過: 約 3 年。ii) 死亡時 49 歳女性。家族歴なし。41 歳時左下垂足で発症、42 歳時

右下垂足が出現した。47 歳呼吸障害による意識消失発作があり、気切による人工呼吸器装着となった。頭部その後左手の脱力、次いで右手脱力が進行した。CT 特変なし。49 歳時大腸癌の肝転移にて死亡した。本例は、左下垂足で発症し、両下垂足、その後呼吸障害が急速に進行した症例で、経過中に認知症、パーキンソン症状を認めなかった。全経過: 8 年 9 ヶ月。iii) 死亡時 74 歳女性。家族歴なし。26 歳まで牟婁地方の多発地に在住歴あり、和歌山市へ移住の 46 年後に 72 歳で球麻痺にて発症した emigrant ALS であった。球麻痺が進行し、胃瘻造設。73 歳言語命令に対してやや了解が悪く、頭部 CT にて軽度大脳皮質の萎縮を認めた。74 歳呼吸不全悪化し死亡 (全経過 2 年 4 か月)。臨床的には孤発性の球麻痺型 ALS と異ならなかった。血清抗 HTLV-1 抗体 (+)。皮膚生検所見: 光顕的には膠原繊維束の断裂、離解と酸性ムコ多糖類の増加を、電顕的には膠原繊維の小径化と無定形物質の蓄積を認めた。他地域のいわゆる孤発性 ALS と同様の所見を示した。

③ 亀山地区症例: 発端者は、65 歳発症の下位運動ニューロン徴候を主体とする ALS で、その同胞が 57 歳発症の PPA 患者であった。ALS 患者は軽度の認知機能障害と前頭葉機能の低下を認めたものの PPA の合併はなく、また PPA 患者に上位下位運動ニューロン徴候などの ALS の臨床所見は全く認めなかった。

2) 環境要因 ① 食品摂取頻度では、1960 年代に「よく食べた」が現在では摂取頻度が減少した食品として、ごはん (1960 年代 88.7% から現在 59.2% に、以下同様)、漬け物 (85% から 65%)、味噌汁 (82% から 41%)、海藻 (76% から 62%) が認められた。一方、1960 年代に比し現在摂取頻度が増加した食品として、食パン (40.8% から 76.1%)、野菜サラダ (48% から 69%)、卵料理 (45% から 65%)、乳製品 (19% から 44%) といった欧米化食品が認められた。食品の入手方法は、スーパーマーケット利用が約 30% 増加した

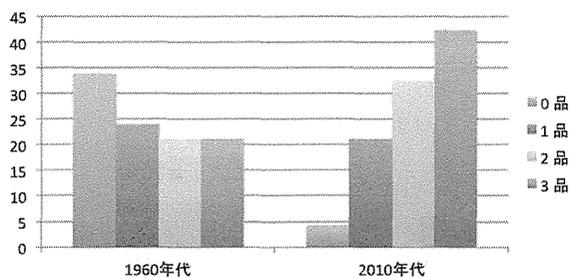


図 2. 欧米化食品を「よく食べた」と回答した住民の割合. 欧米化食品として、乳製品、卵料理、野菜サラダとした. 副食に欧米化食品を多く摂る住民では主食に「食パン」を摂るものが有意に多かった ($p < 0.01$).

飲用水として井戸水利用は、1960年代 43.7%、現在 1.4%と著しく減少したのに対し、水道水利用は、1960年代 32.4%、現在 87.3%と著明に増加した(図 4). 大島地区では水源の変更で串本地区同様の水質となった.

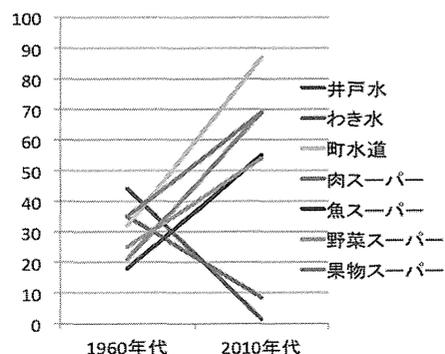


図 3. 生活習慣の変化

「よく利用した」「減多に利用しなかった」の 2 項選択で回答を求めた. 井戸水とわき水の利用は減少し、各種食品購入のスーパー利用が増加した.

仕事の内容の頻度は、力仕事 (1960年代 56.3%、現在 9.9%) や漁業 (1960年代 32.2%、現在 7%)、林業、水田は激減した

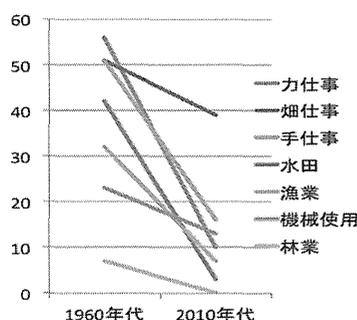


図 4. 仕事の変化. 「よくした」「減多にしなかった」の 2 項選択で回答を求めた. 力仕事や漁業の頻度は著減した.

②栄養摂取量の経時的変化: i. 栄養摂取量に関して兩年のエネルギー摂取量に有意差は認められなかった. 栄養摂取割合に関しては、糖質摂取割合は有意でないが低下傾向を示し、脂質摂取割合は有意な増加を、飽和及び不飽和脂肪酸は有意でないが増加傾向を認めた. ii. ビタミン・ミネラル摂取に関して、鉄、ビタミンD、βカロテンは有意な増加を、亜鉛、カルシウム、マグネシウム、ビタミンCおよびビタミンDは有意でないが増加傾向を認めた. 食事中的コレステロールは有意に増加していた. iii. 食品頻度摂取に関して、2010年では総食品摂取量は有意差はないが、穀類の摂取頻度は有意な低下を認め、野菜類、肉類、卵類および大豆製品の摂取頻度は有意な増加を認め、牛乳を含む乳製品は有意でないが増加傾向を認めた. 同様な検討を、対照地区にて行った結果、糖質摂取割合と脂質摂取割合は増加傾向を認めた. 一方、鉄、亜鉛は減少し、肉類および卵類の摂取割合には有意差が認められず、牛乳を含む乳製品の摂取割合は有意でないが減少傾向を認めた.

図5 年度別三大栄養摂取割合の比較

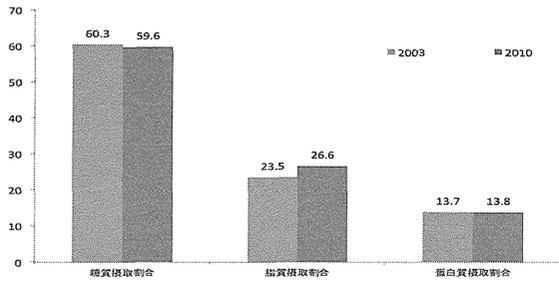


図6 脂肪酸摂取量の年度別比較

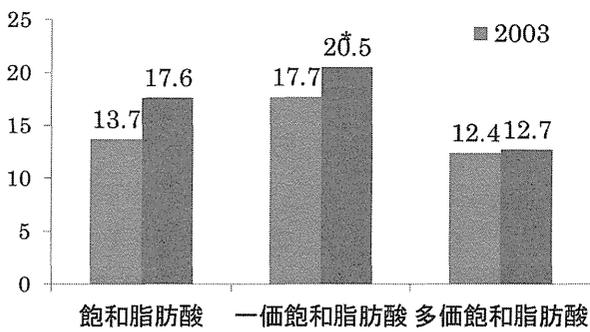


図7 カルシウム、マグネシウム及びコレステロール摂取量の年度別比較

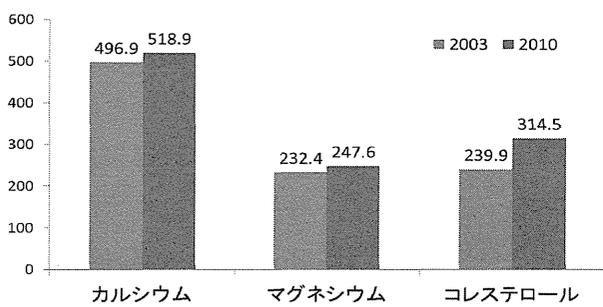


図8 ミネラルおよびビタミン摂取量の年度別比較

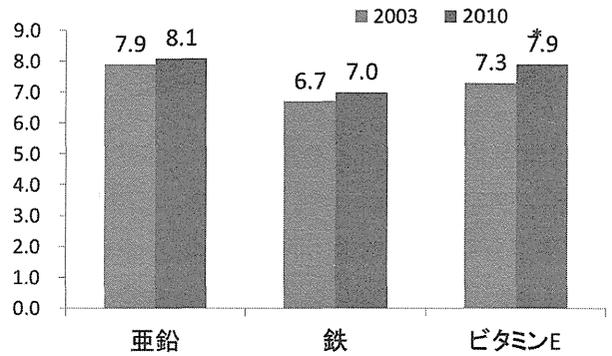
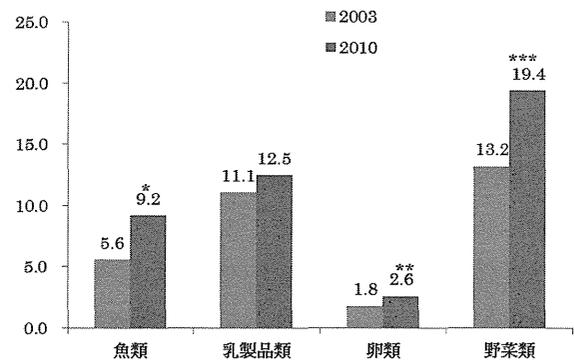
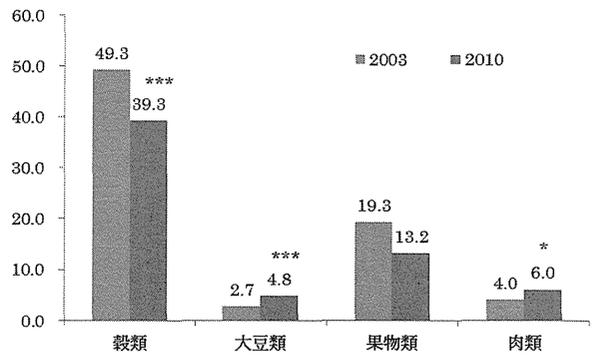


図9 食品摂取頻度割合の年度別比較



③ 脳内 BMAA の解析 : 図 10

結果

・ BMAA	1回目		2回目	
	LC/MS/MS	HPLC	LC/MS/MS	HPLC
1 (MH)	+	+	ND	+
2 (TK)	+	+	ND	+
3 (NO)	+	+	ND	ND
4 (MH)	+	ND	ND	ND
5 (IW)	ND	ND	ND	ND

ND: not detected.

3種類の検索方法で一定の検出結果を示した症例はなかった。

3) 遺伝要因 : ①疾患遺伝子の探索 : 大家系に属する2名の married-in の発症者に関して姉妹であるという知見が得られ、連鎖解析を計算しなおし、いくつか LOD スコアが上昇したり下降したりするマーカーを見出した。また、affected-persons-only method を用いた解析では、新たに LOD スコアが 2.8 となるマーカーを認め、さらなる確認を行う必要があると考えられた。

追加で施行された2名の全ゲノム配列解析については、シーケンスは終了し、現在情報解析を行っている。②エピゲノム解析 : 異常を認める CpG の位置としては MAPT が非翻訳領域 exon1 の 5'側, GSK が exon-1 の上流であった。

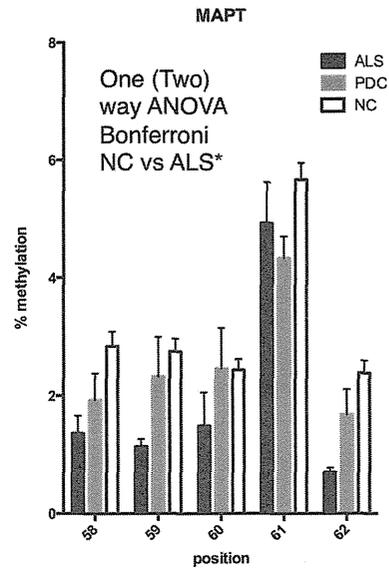
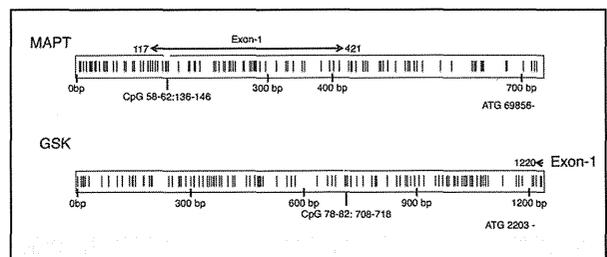


図 11 MAPT 遺伝子 CpG アイランドにおいて ALS の表現形に比較的特異的な異常を見いだした。

図 12



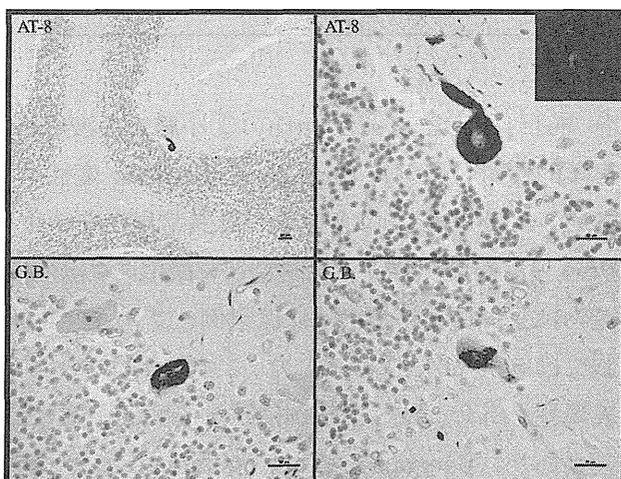
4) Multiple Proteinopathy: ①小脳の免疫組織化学的検討 : 全例に torpedo と grumose 変性を認め、8例(80%)には多核或いは異常局在を示す Purkinje cells を見いだした。リン酸化タウ陽性構造物は、白質及び歯状核には全例、プルキンエ細胞には5例(50%)に存在した。この5例は PDC の表現型を有し、ALS 単独例に比して病変が強い傾向があり、Bergmann glia や golgi cell にリン酸化タウの蓄積を認め、分布の多様性を示した。小脳症状は認めなかった。ubiquitin, p62, ubiquilin 2 に対する免疫染色は全例で陰性であった。

Case/P	Age	Sex	DfG1 (%)	Phenotype			Types of degeneration				Park pathology					
				A	P	D	Distortion ofPCs	Multinuclei ofPCs	Torpedo	Grumose degeneration	Cortex			WM		DN
											PCs	ML	GL	L	D	
Case 1	63	F	4	+	-	-	+	-	-	+	-	+	±	-	+	+
Case 2	70	F	13	+	-	-	+	-	+	+	-	-	±	-	±	±
Case 3	70	F	10	+	-	-	-	-	+	+	±	±	-	-	±	+
Case 4	77	M	7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Case 5	65	M	3	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Case 6	76	F	6	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Case 7	70	F	12	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Case 8	60	F	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Case 9	75	M	7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	±	+
Case 10	70	F	11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Positive rate							80%	60%	100%	100%	50%	90%	80%	90%	100%	100%

表 1. 染色結果のまとめ

torpedo、grumose 変性を全例に認め、プルキンエの位置異常は 80%、多核形成は 60%に認める。また、リン酸化タウについては、プルキンエ細胞に 50%、分子層に 90%、顆粒層に 80%、小葉間白質には 90%、深部白質には 100%、並びに歯状核に陽性構造物を認めた。

図 13. プルキンエ細胞内に銀染色、AT-8 陽性の顆粒状、線維状ないしはそれらが凝集した構造物を認め、突起にまで及んでいる。Calbindin と Pser242 との蛍光 2 重染色にてプルキンエ細胞内のリン酸化タウの蓄積が確認された。



②異常蛋白質の組織病理、生化学解析：2012-2 例 (PDC) (60 歳にパーキンソニズムで発症され、72 歳で亡くなられた女性、大家系の 1 員)について、側頭葉、胸髄の免疫組織染色を行った。側頭様、胸髄とも一部の血管周囲のグリア細胞が AT8 強陽性を示し、加えて白質に astrocytic plaque 様の病変が観察された。また灰白質には神経細胞内のタウ病変(NFT)も観察された。また、多数のリン酸化αシヌクレイン陽性の皮質型レビー小体やレビー突起と思われる病変が皮質及び胸髄の灰白質に認められた。一方、TDP-43 の異常病変は今回調べた組織においては検出できなかった。

図 14

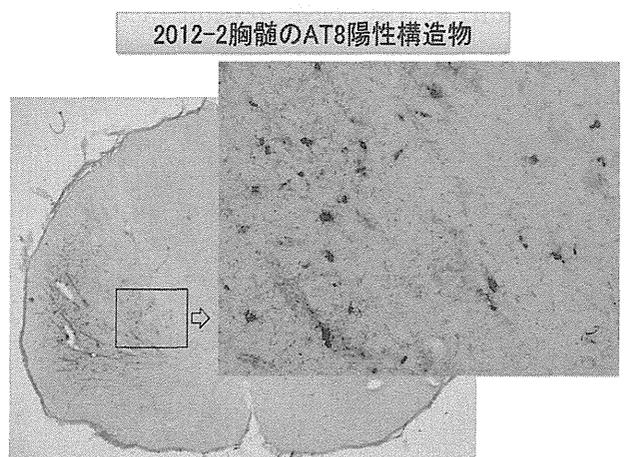


図 15

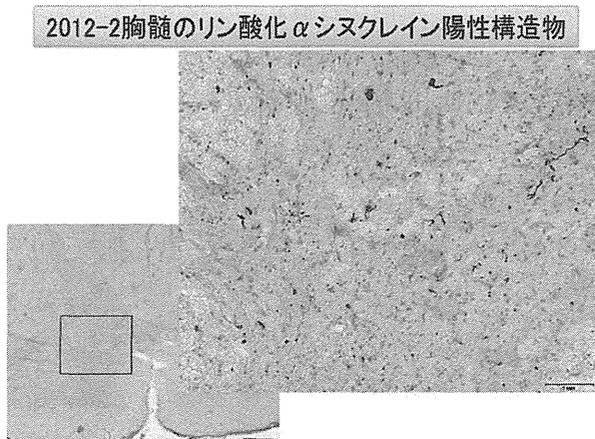
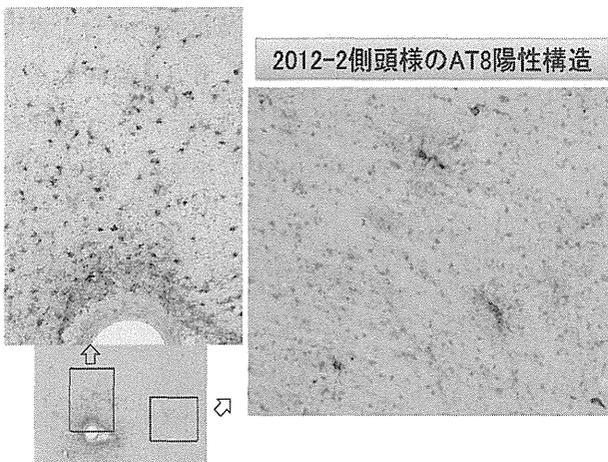


図 16



2012-3 例 (PDC) (60 歳にパーキンソニズムで発症され、75 歳で亡くなられた男性)について、同様に側頭葉、胸髄の免疫組織染色を行った。2012-2 例のような血管周囲のグリアのタウ病変は明らかではないが、側頭様の白質に astrocytic plaque 様のタウ陽性構造物が多数認められ、また神経細胞にも多数の NFT が観察された。胸髄のタウ病変はごく少数の神経細胞に認められるのみであった。一方、リン酸化 α シヌクレインの病変は側頭様だけでなく、胸髄の神経細胞においても強く認められた。TDP-43 の異常所見は側頭様、胸髄のいずれにおいても検出できなかった。

図 17

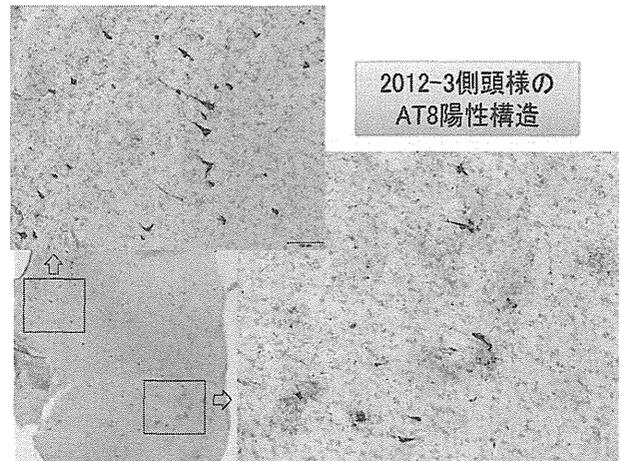
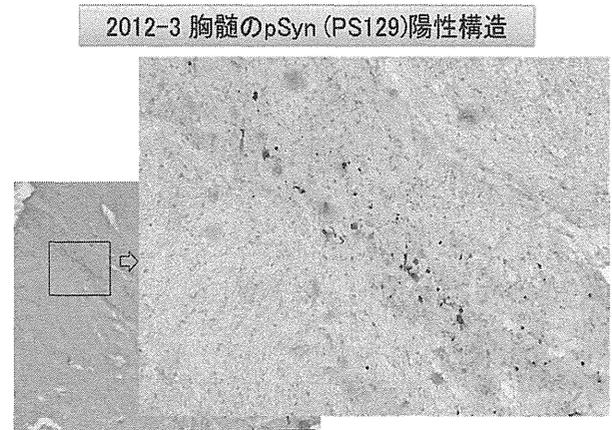


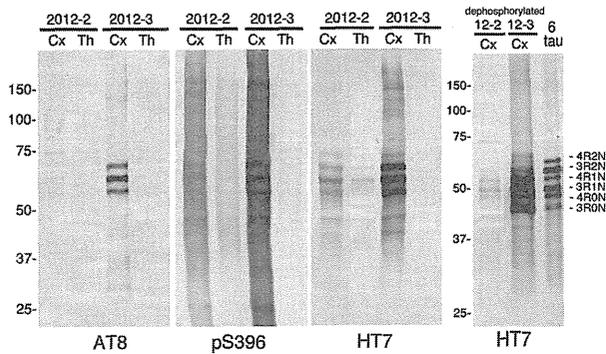
図 18



2012-2, 3 の凍結組織より、サルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、抗タウ抗体、あるいは抗リン酸化 α シヌクレイン、抗 TDP-43 抗体にてイムノブロット解析を行った。その結果、2012-3 の側頭葉に AT8, HT7 で強い AD-type のリン酸化タウバンド(60, 64, 68kD のトリプレット)が観察され、2012-2 の側頭様でも HT7 で類似のバンドが検出された。また 2012-2 胸髄にも弱いながら pS396, HT7 で陽性所見が観察された。2012-2, 3 の側頭様のタウに関してはアルカリホスファターゼ処理による脱リン酸化を行ったところ、HT7 にて 3 リピートタウ及び 4 リ

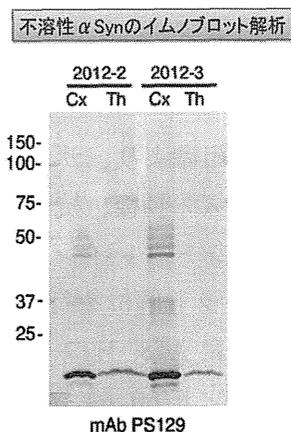
ピートタウと同じ移動度のタウバンドが検出された。

図 19



一方、リン酸化 α シヌクレイン抗体によるイムノブロットでは、2012-2, 2012-3 のいずれの症例においても皮質に強い陽性バンドが検出され、胸髄にも弱いながら同様の陽性所見が検出された。高分子側にユビキチン化 α シヌクレインと思われるバンドも検出され、そのバンドパターンはDLBのそれと似ていると思われた

図 20



一方、リン酸化TDP-43のバンドは検出されなかった。

5) iPS 細胞研究 ①iPS 細胞樹立：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例は培養中に汚染があり破棄した。症例から樹立した皮膚由来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。感染から25日目にコロニーを顕微鏡下にてピックアップしそれぞれのクローンを培養、増幅した。その後、ウイルス除去のために培養の温度を38度へシフトさせた。用いたセンダイウイルスベクターは温度感受性株のために38度では増殖が停止し、結果としてウイルスベクターフリーのiPS細胞を得ることができる。PCRにてウイルス除去を確認した後、未分化マーカーの発現を免疫染色とRT-PCRにて調べ、iPS細胞であることを確認した。この研究で計2症例から10数株のウイルスベクターフリーのiPS細胞株を樹立した(図21)。

図 21

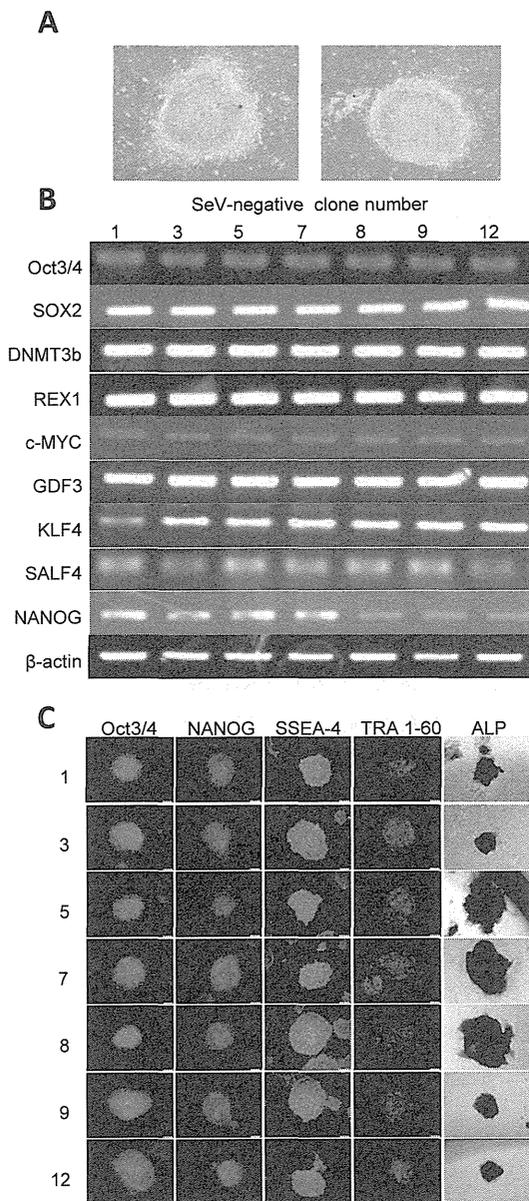


図1 樹立したiPS細胞

- A. iPS細胞のコロニー(明視野)、
- B. 未分化マーカーの発現(RT-PCR)、
- C. 未分化マーカーの発現(免疫染色)と
- D. アルカリフォスファターゼ染色(ALP)

② 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: 4 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、形態の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。

6) 臨床研究: 5 例中病状が軽度の 2 例で意欲や活動性に改善が見られた。特に最も病状の軽かった 1 例では、UPDRS, CAS やる気スコアであきらかな改善がみられた。他の 1 例では著変なく、高度認知症の残り 2 例では易怒性、暴力行為が出現し投与 3 ヶ月で中止した。

表 2 やる気スコア: 自由時間観察

		Yahr
1	IV	目つきがしっかりした、自分で食事を食べる、立ち上がろうとする、掃除をしようとする、会話が聞きやすい、ほとんどmute だが、ありがたいという発語あり、昼夜のメリハリ
2	II	犬の散歩が長くなった、家の補修を2時間した、歩くのが速くなった、意欲が出た、動きやすい、走れるような気がする
3	IV	不変
4	V	易怒性、暴力、昼夜逆転
5	V	自分で食事をしなくなった、易怒性、暴力、性的逸脱

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

D. 考察

牟婁病の中の C9orf72 変異例：本邦における

C9ORF72 変異の頻度は低いが、紀南地方には集積が見られ、ハプロタイプ解析からは、広大な共通ハプロタイプが観察されることから強い創始者効果の存在が考えられた。紀南地方の ALS 多発の一因であると考えられた。串本地区で見いだされた *C9ORF72* 変異 3 例は、いずれも典型的な ALS 症状を呈し、精神症状や認知症あるいはパーキンソン症状は示さず、頭部 MRI 画像上も脳萎縮を認めなかった。牟婁病として包含されてきた症例の一部に *C9ORF72* 変異を認めたことで同地域の多発要因の一因を解明できたことは大きな成果である。紀伊半島において単なる認知症症例や失語症、パーキンソニズムなどを呈する神経変性疾患においても、疫学調査とともに本遺伝子変異についての検討とともに孤発性も含む神経変性疾患の発症機序との関与の解明が望まれる。

環境要因：1960 年代に比較して近年は、摂取食品として食パンを主食とする頻度が増加し、さらに副

食として乳製品や卵料理、野菜サラダの摂取頻度が増加するなど食生活の欧米化が認められた。これらにより、蛋白、脂質、ミネラル、抗酸化物質（レチノールやトコフェロール類）、ビタミン類の摂取量の増加が推察され、住民の身長・体重の維持や認知機能検査での高得点に寄与した可能性が推察された。さらに食品調達にスーパーマーケット利用が進み、他地域からの食品の購入が進んでいることが確認された。また、労働内容では畑仕事は継続しているが、漁業などの力仕事の頻度が減少していることが確認された。食生活の欧米化や激しい身体負荷の軽減が ALS の危険因子とされる酸化的ストレスや外傷の頻度を軽減する要因として作用した可能性が考えられた。一方、飲用水は、従来多発地とされた地域の河を水源とした水道水が広く利用されていることが確認された。食生活や身体負荷の軽減は対照地域でも同様に認められたが、河川や飲用水は当該地域に特異的であり、Ca など必須元素の極めて低い水質であった。河川や飲用水の Ca 低値による影響が、住民の食生活の欧米化や食品調達の広域化で改善されている可能性が考えられた。

多発地では 2003 年と 2010 年で総エネルギー摂取量に差がないにもかかわらず、栄養摂取状況に差が認められたこと、特に糖質摂取割合および穀類摂取割合の有意な減少、一方脂肪摂取割合、肉類、卵類、乳製品それぞれの摂取割合が有意に増加していた。さらに、β-カロテンは有意な、ビタミン E は有意ではないが増加傾向を認めた。糖質摂取割合・穀類摂取頻度の減少は高糖質摂取によるフリーラジカルの生成や superoxide や nitric oxide (NO-) の過剰産生の抑制につながることで、脂質摂取割合・卵や乳製品摂取頻度の増加は神経髄鞘の保護作用の増強および神経成長因子の効果を高め、神経障害の修復と再生の促進につながることで報告されている。さらに、亜鉛摂取量や野菜類摂取量の増加は酸化ストレスに対する防御機能の向上と関連するとの報告もある。これらの報告から栄養状態の改善が神経障害の促進を抑制する可能性が推測される。

Cox らは、蘇鉄の根茎に含まれるシアノバクテリアが産生する神経毒 BMAA が蘇鉄の実、さらには実を食するオオコウモリの体内に蓄積し、オオコウモリを食べるグアム島チャモロ人に