

201324096A

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

－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25年度 総括・分担研究報告書

平成26年(2014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

－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25年度 総括・分担研究報告書

2013 ANNUAL REPORT OF THE RESEARCH COMMITTEE  
ON KII AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS/PARKINSONISM-DEMENTIA COMPLEX  
THE MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, JAPAN

2014年3月

March 2014

研究代表者 小久保康昌

三重大学大学院地域イノベーション学研究科

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

Mie University, Graduate School of Regional Innovation Studies  
Kii ALS/PDC Research Center

## 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 2 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、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、毛髪中のバナジウムとマンガン高値および酸化の進んだ干物の摂取と ALS 多発との因果関係、遺伝子分野では、大家系内剖検例を対象とした全ゲノムシーケンスと創始者ハプロタイプの検出、および本疾患に特異的な CpG メチル化変化と表現型とエピゲノムの関係の解析、蛋白分野では、大家系 4 剖検例における異常凝集蛋白質解析、病理分野では、tauopathy としての特徴と Guam ALS/PDC の tau 病変との比較、iPS 研究では、疾患特異的 iPS 細胞の樹立と神経細胞への分化誘導、について興味深い報告がありました。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。

本年度は、日本神経学会のご協力の下、紀伊 ALS/PDC の診断基準と重症度分類を策定することができました。本文は、総括報告書に資料として添付しております。8 月には、Guam ALS/PDC の世界的権威である Kwang-Ming Chen 先生を Guam 島に訪問、今年 1 月には、UCSD の Dr. Galasko を訪問し、国際共同研究の足がかりを得ました。10 月には、ホームページをリニューアルし、研究成果などを素早く公開できる体制を整えることが出来ました。また、同月には初めての公開講座を開催し多くの聴衆にご参加頂きました。

これまでの各分野における精力的な研究にもかかわらず、紀伊 ALS/PDC の原因はいまだ不明で、有効な治療法も見つかっていません。紀伊半島の稀少難病に苦しむ患者さんにご家族に研究成果を還元できる日をめざして、地道な研究継続が必要です。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 26 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	三重大学大学院 地域イノベーション学研究科	招聘教授
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
	小柳 清光	信州大学医学部 神経難病学講座	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
	石井 賢二	東京都健康長寿医療センター研究所 PET 画像診断研究	研 究 部 長
	石浦 浩之	東京大学医学部附属病院 神経内科	助 教
	石神 昭人	東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御チーム分子老化制御	研究副部長
	江上いすず	名古屋文理大学 健康生活学部	教 授
	大和 俊信	志摩市民病院	院 長
	岡野 栄之	慶應義塾大学, 医学部生理学教室	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
	小林 一成	三重大学大学院地域イノベーション学研究科	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

島田 齊	放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター分子神経イメージング研究プログラム	研 究 員
白石 泰三	三重大学大学院医学系研究科 腫瘍病理学	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
初田 浩幸	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	協力研究員
樋口 真人	放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター 脳分子動態チーム	チームリーダー
広川 佳史	三重大学大学院医学系研究科 腫瘍病理学	講 師
馬 寧	鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部	教 授
丸山 直記	東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御チーム	チームリーダー
水谷 颯洋	昭和薬科大学 薬物治療学教室	教 授
三室 マヤ	愛知医科大学 加齢医科学研究所	助 教
宮崎 光一	町立南伊勢病院	院 長
森本 悟	三重大学大学院医学系研究科 腫瘍病理学	大 学 院 生
山中 宏二	名古屋大学環境医学研究所 病態神経科学分野	教 授
吉田 宗平	関西医療大学	副 学 長
吉田 眞理	愛知医科大学 加齢医科学研究所	教 授
米田 操	鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 医療栄養学科	准 教 授
渡辺 泰男	昭和薬科大学 薬理学研究室	教 授

## 平成 25 年度 研究班カレンダー (敬称略)

### 平成 25 年

- 3 月 25 日 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金採択通知  
(評価点数 : 6.1、全研究班平均 : 6.8)
- 5 月 16 日 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金交付基準額通知 (5/20 受け取り)  
648 万円 (間接経費 149.5 万円)
- 5 月 31 日 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金申請書提出
- 7 月 11 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 (埼玉 : 国立保健医療科学院)
- 7 月 22 日 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金交付決定通知  
648 万円
- 7 月 31 日 研究班名簿及び疾患概要作成提出
- 8 月 2 日 厚労省より平成 25 年度研究費入金 総額 648 万円 (間接経費 149.5 万円)

### 平成 26 年

- 1 月 11 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1108)
- 15 日 難治性疾患克服研究事業の事後評価等の作成・WEB 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」2014 年度研究報告書 発行

---

## 平成25年度 年中行事

---

### 平成 25 年

- 5 月 28 日 昭和薬科大学 紀伊 ALS/PDC セミナー (小久保) 東京
- 5 月 30 日 パプア調査会議 東京
- 5 月 31 日 第 1 回環境要因会議 東京
- 6 月 27 日 酸化ストレス Meeting (米田、馬、小久保)津
- 7 月 10 日 放射線医学総合研究所 紀伊 ALS/PDC セミナー (小久保) 千葉
- 7 月 11 日 健康長寿医療センター 研究打ち合わせ 東京

7月27日 第2回環境要因会議 愛知  
 8月16日～17日 Guam島 Dr. Chen 訪問  
 8月25日 神経病理ワークショップ（健康長寿医療センター）  
 9月3日 小柳清光先生 分担研究者加入  
 10月2日 新ホームページ 開設 (<http://kii-als-pdc-project.com>)  
 10月13日 南伊勢町公開講座（南伊勢町町民文化会館、聴衆 315名）  
 10月17日 中日新聞 こどもウイークリー取材（11月16日掲載）  
 12月2日 診断基準、重症度分類 策定完了  
 12月22日 第1回 臨床神経病理検討会

平成26年

1月11日 班会議（名古屋、ウインク愛知）  
 1月24日 日本神経学会において、診断基準および重症度分類 承認  
 1月28日～2月1日 カリフォルニア州立サンディエゴ校訪問  
 International Joint meeting of Kii and Guam ALS/PDC  
 (Drs. Galasko, Schellenberg, Salmon, Litvan, Friedman,  
 Masliah, Ravits)  
 2月23日 第2回 臨床神経病理検討会  
 3月16日～27日 西ニューギニアパプア州現地調査、国際シンポジウム  
 3月27日 Tokyo Cognitive Seminar 紀伊 ALS/PDC 講演（小久保）東京

# 目 次

ごあいさつ .....	i
班構成員名簿 .....	iii
平成 25 年度研究班カレンダー .....	v
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 26 年 1 月 11 日 於：愛知県産業労働センター	
・班会議 プログラム .....	23
・班会議 議事録 .....	26
1. 大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析	
長谷川成人 東京都精神医学総合研究所 .....	27
2. Kii ALS/PDC (牟婁病) における tauopathy としての神経病理学的特徴	
村山繁雄 東京都健康長寿医療センター .....	30
3. 紀伊半島 H 地区出身 5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較	
小柳清光 信州大学 .....	33
4. 多発地 ALS と住民の毛髪中元素分析と生活習慣との関連に関する検討	
紀平為子 関西医療大学 .....	36
5. ALS 多発と干物摂取との因果関係解明に関する検討	
岡本和士 愛知県立大学 .....	39
6. 本邦での紀伊半島以外における ALS/PDC が疑われた症例について	
富山弘幸 順天堂大学 .....	43

7. 紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソニズム認知症複合 (ALS/PDC) の疾患遺伝子の探索	
辻 省次 東京大学 .....	46
8. 牟婁病剖検脳での神経細胞特異的 DNA メチル化解析	
岩田 淳 東京大学 .....	49
9. 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からの iPS 細胞の樹立	
江良択実 熊本大学 .....	52
10. Kii ALS/PDC (牟婁病) における病態解析および創薬を目的とした疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成	
広川佳史 三重大学 .....	56
III.研究成果に関する一覧表 .....	59
IV.研究成果の刊行物・別刷 .....	61

# I . 総括研究報告

## 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

研究代表者：小久保康昌 三重大学大学院地域イノベーション学研究所

### 研究要旨

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（紀伊 ALS/PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis / Parkinsonism-dementia complex)）について、今年度の研究成果をまとめた。1) 環境要因と臨床例では、毛髪中におけるバナジウムとマンガンの蓄積、ALS 多発と干物摂取との因果関係、佐賀県の ALS/PDC 類似症例、2) 遺伝的要因では、疾患遺伝子の探索として全ゲノム配列解析と Homozygosity haplotype 解析、エピゲノム研究では剖検脳での神経細胞特異的 DNA メチル化解析、3) Multiple Proteinopathy では、大家系の複数患者剖検脳に蓄積する tau,  $\alpha$ -synuclein, TDP-43 の生化学解析、tauopathy としての神経病理学的特徴、リン酸化タウ陽性所見に関するグアム ALS/PDC との比較、4) iPS 細胞研究では、iPS 細胞の樹立と神経細胞への誘導、疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成、の各テーマについて新たな知見が報告された。引き続き、病態解明や発症原因究明を継続するとともに実地臨床への成果還元を目指す必要がある。

### 研究分担者

岩田 淳 東京大学大学院医学系研究科  
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  
小柳 清光 信州大学 医学部  
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 財団法人京都医学総合研究所  
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  
高齢者ブレインバンク

ーパーキンソン症候群（紀伊 ALS/PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis / Parkinsonism-dementia complex) の発症因子探索と治療介入にむけて、本年度は、1) 環境要因と臨床例：毛髪中元素分析と生活習慣との関連（紀平）、ALS 多発と干物摂取との因果関係解明に関する検討（岡本）、紀伊半島以外において ALS/PDC が疑われた症例（富山）、2) 遺伝的要因：疾患遺伝子の探索（辻）、剖検脳での神経細胞特異的 DNA メチル化解析（岩田）、3) Multiple Proteinopathy: 大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析（長谷川）、tauopathy としての神経病理学的特徴（村山）、5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較（小柳）、4) iPS 細胞研究：iPS 細胞の樹立（江良）、疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成（広川）の各項目について検討した。

## B. 研究方法

1) 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。このような変化には、環境要因が大きな影響を与えたと推定される。このような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。

①ALS多発と干物摂取との因果関係；対象は2004年に多発地と非多発地の15歳以上の住民を対象に行った横断調査の参加者と、2004年に行った症例対照研究の1183名の症例と407名の対照を用いた。食事内容および食生活習慣に関する情報は97項目からなる自記式の食品頻度摂取調査から得た。干物の摂取頻度に関しては「毎日1回以上摂取」を高頻度摂取とし、それ以外の食品に関しては低頻度「めったに食べない～週1回以下」を低頻度摂取、「週に4-5回あるいは毎日」を高頻度の2群に分類した。肉類の摂取においては3つの異なる種類のうち1つでも頻回に摂取する者を「頻回摂取」とした。食品の摂取頻度は低頻度（めったに食べない/週1回以下）と高頻度（週に4-5回あるいは毎日）の2群に分類した。肉類の摂取においては3つの異なる種類のうち1つでも頻回に摂取する者を「高頻度摂取」とした。

因果関係の有無の判定には、疫学研究で用いられている判断基準である「関連の時間性」「関連の一致性」「関連の強固性」「関連の特異性」「関連の整合性」の5つの条件を用いた。

②毛髪中元素分析と生活習慣との関連；対象は、我々が2010年-2012年に実施した地域住民の健康診断と訪問診療・療養相談において本研究の趣旨に同意した住民とALS患者とした。

### 1. 頭髪の元素分析.

側頭部2か所、後頭部1か所から頭髪約200mgを採取し、アセトン(50ml)、蒸留水(各々50ml、3回)、アセトン(50ml)で各々10分間強振、風乾後30mgを秤量、硝酸洗浄済みポリエチレン袋に封入し照射試料とした。試料作成と分析方法は既に報告した<sup>1)</sup>が、京都大学原子炉実験所の研究用原子炉気

送管Pn-1で中性子を照射し放射化分析を実施した。

標準試料として、頭髪標準試料(国立環境研究所環境標準試料 NIES CRM No. 13)、各元素の標準としてCa(1000 ppm, 以下同様)、Mg(200)、Cu(50)、Al(20)、Mn(5)、V(1)、さらにZn(200)の混合標準液(XSTC-Multi-element Standard, SPEX, USA)から100 $\mu$ l採取し濾紙に滴下した。Sは(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(w) GR(8.241g)を蒸留水で溶解し1000 $\mu$ gを濾紙に滴下し使用した。

### 2. 生活・食習慣に関する自記式アンケート.

2012年にK地域と対照住民に実施した食品摂取頻度、嗜好、仕事の内容、身体疲労および飲用水の種類などを含めた63項目のアンケート調査の結果から、食生活と仕事に関する項目を抽出し検討した。

食生活と仕事の特徴、酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdG値(2010年から2012年の間に測定)と頭髪中元素含量について関連を検討した。

### 3. K地域の食品の元素分析

2013年秋に収集したK地域の米、天草、ひじき、ウツボ揚げ煮、切り干し大根、鯨皮、唐辛子、オクラ、シシトウ、なす漬物、キュウリ漬物の11品目についてV、Al、Ca、Mg、FeおよびZn含量を測定した。分析は三重県環境保全事業団に依頼し、食品衛生検査指針(理化学編 厚生労働省監修2005)に基づきマイクロウェーブ加熱分解-ICP発光分析法を実施した。

③紀伊半島以外においてALS/PDCが疑われた症例:順天堂大学脳神経内科遺伝子バンク約3300症例の中から、ALS/PDCが疑われる症例がないか、臨床像を確認した。

2) 遺伝要因：①疾患遺伝子の探索；三重県の紀伊ALS/PDCの大家系に属する2例の末梢血からDNAを抽出。Illumina HiSeq2000を用い、ペアエンド法で全ゲノム配列解析を行った。一例については、150塩基のペアエンド法を用いた。全ゲノム配列データのある剖検例8例に共通する変異の抽出を試みた。対照として、disease control 24例の全ゲノム配列解析のデータを用いた。

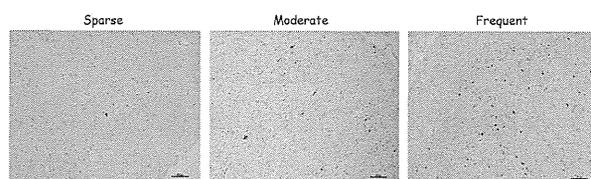
Homozygosity haplotype 解析については、全ゲノム配列解析を行っていない 10 例の剖検例については Genome-wide SNP 6.0 (Affymetrix) でタイピングを行った。全ゲノム配列解析を行った 5 例の剖検例については、全ゲノム配列解析より当該 SNP のデータを抽出し、合計 15 例の剖検例の SNP データを得た。Homozygosity haplotype 法 (HH analysis) を用いて 2cM 以上にわたる共通領域を抽出した。

②エピゲノム解析：年齢を適合させた牟婁病患者 10 名、健常者コントロール群 10 名の剖検脳を用いた。側頭葉から抗 NeuN 抗体を用いたフローサイトメトリーを行い、神経細胞核のみを選択的に抽出、そこから DNA 抽出を行った。抽出した DNA は Bisulfite 変換を行い、Illumina 社製 HumanMethylation450 BeadChip を用いてゲノム上の各 CpG についてメチル化の定量を行った。

3) Multiple Proteinopathy: ①大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析；症例番号、臨床診断、及び解析部位(括弧内)は以下の通りである。1998-1 (ALS with D) (前頭葉)、2001-1 (ALS with A) (海馬)、2012-2 (PDC) (海馬傍回)、2013-3 (PDC) (海馬傍回)。それぞれ、0.5g の凍結組織から通常の方法に従ってサルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、各種抗体によるイムノプロット解析を行った。用いた抗体は、抗タウ抗体 (HT7, AT8, RD3, RD4, anti-4R, pS396, T46)、抗リン酸化  $\alpha$ Syn 抗体 (mAb PS129)、抗 TDP-43 抗体 (poly pS409/410) である。

②tauopathy としての神経病理学的特徴：対象は臨床的に牟婁病と診断された、牟婁病 (Kii ALS/PDC) 患者連続開頭剖検例 9 例。免疫プロットについては、凍結側頭葉皮質を使用した。組織学的検索について、反対固定側海馬・側頭葉 (免疫プロットに対応する部位) のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6  $\mu$ m 厚連続切片を作成した。免疫プロットで 4R ほぼ単独を示した 1 例については、保存全ブロックを使用した。H.E. K.B. 染色、Gallyas-

Braak 鍍銀染色 (GB) に加え、抗リン酸化タウ (AT-8) 抗体を用いて、Ventana NX20 自動免疫染色により検討を行った。コントロールとして、高齢者ブレインバンク凍結半脳保存連続登録 892 例を使用した。また、免疫プロットに対応する固定側中側頭回にてタウ病変について以下の半定量的な評価を行った。神経原線維変化；GB and AT-8 NFT score: none : 0, Sparse : 1-5, Moderate : 6-15, Frequent : 16-( $\times 100$ )、グリア病理 (Patchy astrocytic structure) ; 0,  $\pm$  : 1-5, 1+ : 6-9, 2+ : 10-( $\times 100$ )、嗜銀顆粒 ; 0,  $\pm$  : 1-19, 1+ : 20-49, 2+ : 50-99, 3+ : 100-( $\times 400$ )。



③5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較；紀伊半島 H 出身の 5 剖検例 (全例女性、死亡時年齢：60 歳～73 歳、臨床診断は ALS3 名、PDC+ALS2 名)、およびグアム島で生まれ育って死亡した 6 剖検例 (男性 3 名、女性 3 名、死亡時年齢：51 歳～64 歳、臨床病理診断は全例 PDC) を用いた。大脳、脳幹、小脳をホルマリン固定パラフィン包埋した後、各箇所 6  $\mu$ m 厚切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色、クリューバー-バレラ染色、リン酸化タウ (AT8) 免疫染色、リン酸化 TDP-43 免疫染色、グリア膠線維酸性蛋白 (GFAP) 免疫染色、p62 免疫染色等を施行して光学顕微鏡で観察した。

4) iPS 細胞研究: ① iPS 細胞樹立 ; 1. iPS 細胞樹立のための皮膚線維芽細胞の樹立. 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。

2. SeV ベクターを使った iPS 細胞の確立

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

では、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。

3. 樹立した iPS 細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞マーカー (Nestin 等) の発現を調べ、神経細胞であることを確認する。

②疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成 ; (Fig.1)

i) 平成 25 年度に三重大学において承認された「牟婁病(Kii ALS/PDC)患者からのヒト iPSC の樹立とそれを用いた疾患解析および創薬に関する研究」計画書に基づいて、十分なインフォームドコンセントを得た上で、Kii ALS/PDC 患者の協力のもと、(現在) 5名の患者において採血を試行。

ii) 慶應義塾大学にて、末梢血単核球又は T 細胞を調製。続けてエピソーマルベクターを用いて、SOX2, OCT3/4, KLF4, L-MYC, ドミナントネガティブ p53, LIN28, EBNA1 といった初期化因子を導入し、STO フィーダー細胞上で 3~5 週間培養を行った。具体的には、京都大学 iPS 研究所 (CiRA)より公開されている、「エピソーマルベクターを用いた末梢血からの iPS 細胞樹立 Ver.1」プロトコールに準じた。iPSC コロニーの単離後は拡大培養を行い、未分化性を維持した状態で継代と凍結保存を行う。

iii) 各々の患者由来 iPSC について、解析に用いることの可能なクローンの選抜を試行 (エピソーマルベクターの残存およびゲノム挿入が起きていないこと、未分化マーカー発現、テラトーマ形成能の確認、神経系分化能の確認)。(Fig.2)

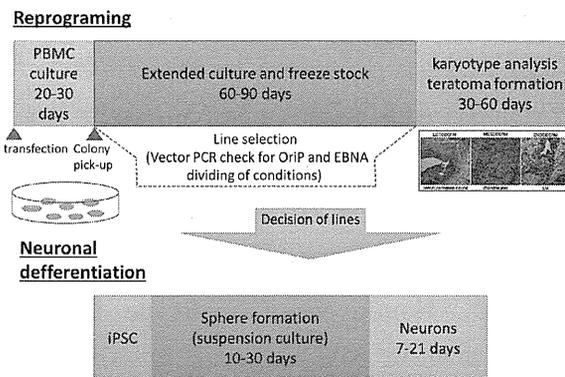


Figure 2. Time course of human iPSC establishment

(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、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、慶應大学の各倫理委員会の承認に基づき行った。

C. 研究結果

1) 環境要因 ①ALS 多発と干物摂取との因果関係 ;

1. 関連の時間性

愛知県で行った症例対照研究において、要因の調整後も干物を週 1 回以上摂取する者のオッズ比に変化が認められず、かつ有意であったことから干物の高頻度摂取は独立した危険因子であることが認められた。この結果は「要因が結果に対し、時間的に先行していること」の条件を満たしているため、関連の時間性が確認された。

表 1. 愛知県における 症例対照研究の結果

要因	粗オッズ比	調整オッズ比
干物の高頻度摂取 (週 1 回以上)	1.8(1.1-2.8)	1.8 (1.1-2.8)
A 型行動パターン yes)		2.3 (1.5-3.5)
緑黄色野菜 (Less frequent)		2.5 (1.6-4.0)
性		

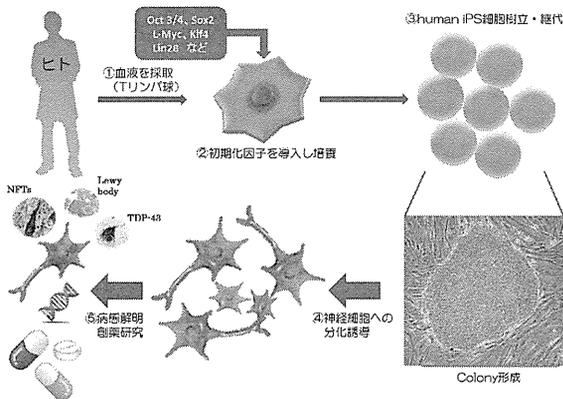
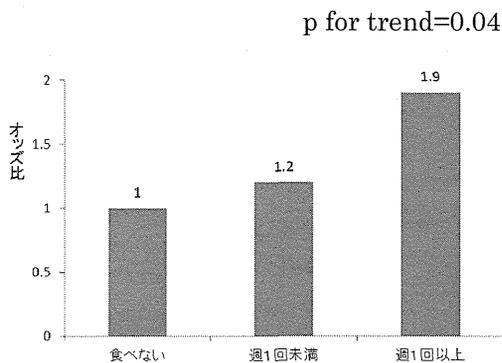


Figure 1. Overview of iPSC

## 2. 関連の強固性

摂取頻度の増加に伴い、ALS のリスクは有意な上昇 (p for trend=0.04) を認めた。この結果は、「要因と結果の間に密接な関係が認められること、相対危険比あるいはオッズ比が高いこと、統計的検定において有意であること、量-反応関係が認められること」の条件を満たしているため、関連の強固性が確認された。

図 1. 干物の摂取頻度別オッズ比



## 3. 関連の一致性

干物を週3回以上摂取する者のALSに対するリスクはK町ではH村に比べて4倍高く、かつ有意であった。したがって、愛知県の症例対照研究の結果と同様の結果を示したことから、「異なった研究方法、研究者、研究対象者でおこなわれた疫学研究で、全て同じような結果が認められること」の条件を満たしているため、関連の一致性が確認された。

表 2. K町とH村との比較

要因	オッズ比
干物の高頻度摂取 (週3回以上)	4.0 (2.4-6.6)

## 4. 関連の特異性

多発地であるK町とO町における高頻度摂取者(週1回以上)の割合は、H村および愛知対照群に比べ高かった(図2)。15歳までの食品別摂取頻度の比較において、大島町に居住していた者のうち干物を毎日1回以上摂取する者の割合は、15歳まで町

外にいた者のそれに比べ高かった。これらの結果と、干物の高頻度摂取がALS発症リスクと有意な関連を有することを認めたことを考え合わせると、「要因と結果の間に特異的な関係が認められること。仮説としての要因と結果が必要かつ十分条件であること」の条件を満たしているため、関連の特異性が確認された。

図 2. 地域別干物摂取頻度者(週3回以上)割合の比較

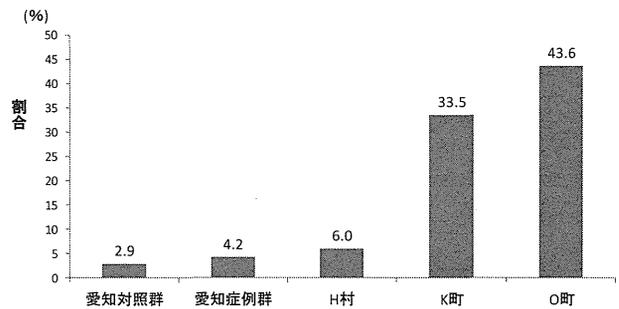
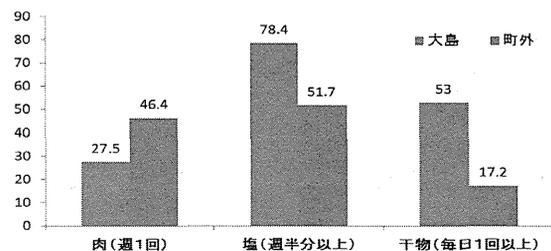


図 3. 15歳までの食品頻度摂取の比較



## 5. 関連の整合性

多発地であるO町はおよびK-ALSでの酸化ストレスの指標である8-OHdGが、対照地域に比べて高値であった。さらに、H町にて行った3日間の陰膳法の調査にて参加した4名はいずれも1日1食以上過酸化物を多く含む干物を摂取していた。

②毛髪中元素分析と生活習慣との関連;

1. 頭髪の元素分析. K地域 ALS 7例, 穂原地域 (H-PDC) 5例, 弧発性ALS (SALS) 10例, MND 3例, K地域住民 132名, 対照地域住民 29名から頭髪試料の提供を得た. 本研究ではこれらの内, パーマや毛染めをしていない頭髪, K-ALS 7, H-PDC 4,

SALS 10, MND 3, K 地域住民 87, 対照住民 20 試料について検討した。我々の放射化分析法で測定した標準頭髪試料(NIES CRM No. 13)の Al, Ca, Mg, Mn, V, Cu, S 含量はその保証値/参考値と良く合致した。

K-ALS では、頭髪中 V と Mn 含量が対照に比し有意に高値を示した ( $p < 0.05$ , 図 1)。H-PDC でも同様に頭髪中 V 含量が高い傾向が認められた。K 地域住民では、頭髪中 V や Mn 含量が高値を示す者が多く認められたが、平均値は対照住民と有意差を認めなかった。頭髪中の V 含量は頭髪中 Mn 含量および Al 含量と正の相関を示した (各々  $p < 0.01$ )。

2. 生活・食習慣アンケート調査との関連. 頭髪中の元素含量と生活・食習慣の関連について、アンケート調査を実施し分析した。漬け物を「よく食べる」と回答した住民では「あまり食べない」と回答した住民に比較して頭髪中 V 含量が高値を示した ( $p < 0.05$ , 図 2)。畑仕事を「よくする」と回答した住民では「あまりしない」と回答した住民に比し、頭髪中 Mn ( $p < 0.01$ )と Al ( $p < 0.05$ )含量の高値を認めた。頭髪中 V 含量は尿中 8-OHdG/creatinine 値と正相関する傾向がみられた(Pearson's  $r = 0.358$ )。

### 3. K 地域の食品の元素分析

K 地域の上記食品 11 品目の内、ひじきや天草中の V 含量が高い値を示した (図 3)。

③紀伊半島以外において ALS/PDC が疑われた症例：

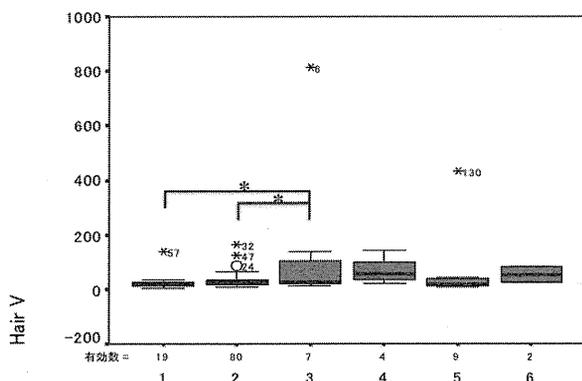


図 1. 頭髪中のバナジウム(V)含量の比較

K-ALS では対照および K 住民に比し有意な高値を示した (単位: ppb)。1: 対照, 2: K 住民, 3: K-ALS, 4: H-PDC, 5: SALS, 6: MND, \*:  $p < 0.05$ 。

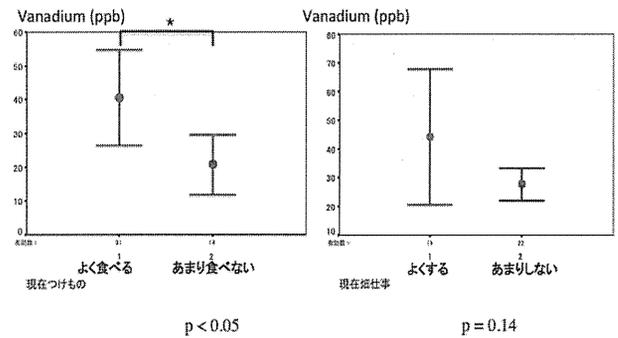


図 2. 生活習慣と頭髪中 V 含量との比較

現在漬け物をよく食べると回答した住民では頭髪中 V 含量が有意に高い値を示した。畑仕事をよくすると回答した住民では V 含量が高い傾向を認めた。

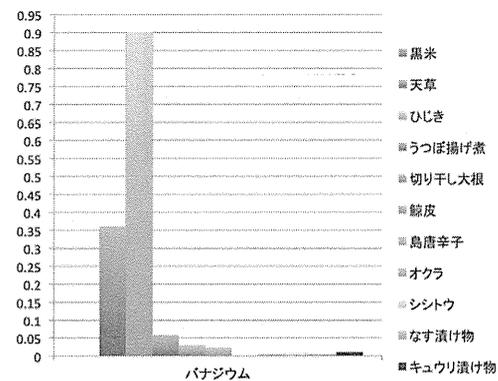


図 3. 食品中の V 含量

K 地域で生産/加工された食物/食品に含まれる V 含量を測定した。海産物に高い値を認めた。

③紀伊半島以外において ALS/PDC が疑われた症例：

K-ALS では対照および K 住民に比し有意な高値を示した (単位: ppb)。1: 対照, 2: K 住民, 3: K-ALS, 4: H-PDC, 5: SALS, 6: MND, \*:  $p < 0.05$ 。

現在漬け物をよく食べると回答した住民では頭髪中 V 含量が有意に高い値を示した。畑仕事をよくすると回答した住民では V 含量が高い傾向を認めた。

K 地域で生産/加工された食物/食品に含まれる V 含量を測定した。海産物に高い値を認めた。

③紀伊半島以外において ALS/PDC が疑われた症例: 1 例 68 歳女性、佐賀県出身 (紀伊半島での出生・居住歴なし) の症例で孤発性 ALS/PDC を疑う症例があった。本症例は、2011 年 2 月頃から前傾姿勢、

歩行障害を生じ、四肢腱反射亢進もあり近医で頸髄症を疑われた。11月にC3-6椎弓形成術を施行され、右手箸が使いやすくなった。物忘れも生じ、12月にリハビリテーション継続を目的に療養型病院に転院となったが、歩行障害は増悪し車椅子を使用するようになり、表情が乏しく、声が小さくなった。下肢筋萎縮があり、四肢筋力は2/5前後で、感覚障害は認めなかった。固縮、拘縮があったがレボドパの反応は乏しかった。2012年4月5日に運動ニューロン疾患及びパーキンソニズムの精査加療目的で近院神経内科へ転院となった。転院時疎通の悪さ、記憶力低下を認め、やや無為であり、仮面様顔貌、小声、嚥下障害、舌萎縮、四肢筋萎縮、深部腱反射亢進を認めた。感覚障害や失調症状はなかった。針筋電図では上下肢に神経原性変化を認めた。頭部MRIでは軽度の脳萎縮を認め、海馬の萎縮が目立っていた。MIBG心筋シンチは正常であった。5月中旬より嚥下障害、低酸素血症を認め、経管栄養・人工呼吸管理を開始した。6月19日に気管切開施行し、7月下旬頃からは表情もなく、意思表示もほとんどない状態となり経過している。

本症例の遺伝的背景を明らかにすべく候補遺伝子解析を行っているが、今のところ、

C9orf72 (intron 1 GGGGCC repeat expansion)

TDP-43

MAPT (exon 1,2,9-13)

DCTN1 (exon2)

PARK2

SNCA (multiplication)

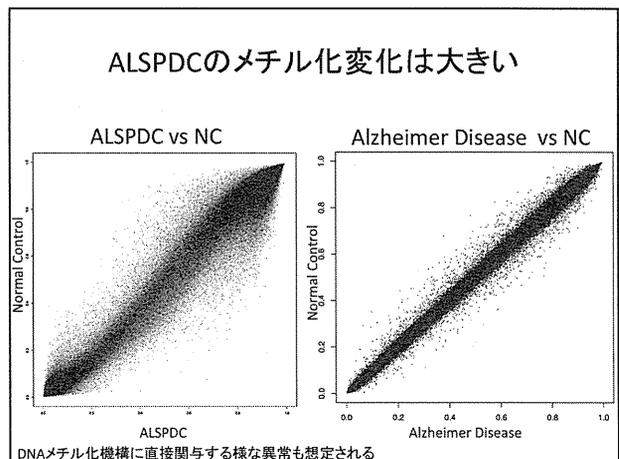
LRRK2 (exon 11,31,41,48)

に明らかな責任遺伝子変異は見つかっていない。そのため、エクソーム解析を開始した。

3) 遺伝要因: ①疾患遺伝子の探索: 全ゲノム配列解析からは、剖検例8例に共通し、disease control 24例に存在しない variant は、非翻訳領域に広げても認められなかった。剖検例7例、6例に認められ、disease control に認められない variant はそれぞれ10個、55個見出された。逆に、24名の disease

control で1、2、3アレル認められ、剖検例8例で共通する変異はそれぞれ1つずつ存在した。しかしながらこれら3つの変異は既に dbSNP への登録がなされており、頻度情報の存在する2つの SNP ではアレル頻度が12.5%、15.8%と非常に高いことから、ALS/PDC のように集積地以外では極めて稀な疾患を説明するものとは考えられなかった。

Homozygosity haplotype法を用いて解析したところ、全剖検例15例で高率(12名以上)で共通する領域を3ヶ所認めたが、コントロールサンプル14検体のhomozygosity haplotype法による解析でも観察される領域であり、疾患特異的とは考えられなかった。A家系の剖検例3名で共有される領域、A家系の発症者5名(うち3名は上述の剖検例3例)で共有される領域は見出されたものの、A家系以外の剖検12例中少なくとも8例で共通する染色体領域とはオーバーラップしなかった。



②エピゲノム解析: 牟婁病患者10名の平均年齢は70.9歳であった。臨床病型としては、ALS型5名、PDC型5名であり各平均年齢は68.6歳(63-73歳)、73.2歳(70-79歳)であった。健常者コントロール群について平均年齢は71.5歳であった。Student t検定p値<0.01,  $\beta$ 値の牟婁病と正常コントロール群間差0.1以上をカットオフとし、25922プローブが検出された。個々のデータのばらつきが大きいこと考慮するとともに、メチル化による遺伝子発現制御のためには連続した一定領域のメチル化変化が起きているということ仮定して、抽出したプローブ群のなかで3カ所以上連続しているプローブを選択し、1380プローブ

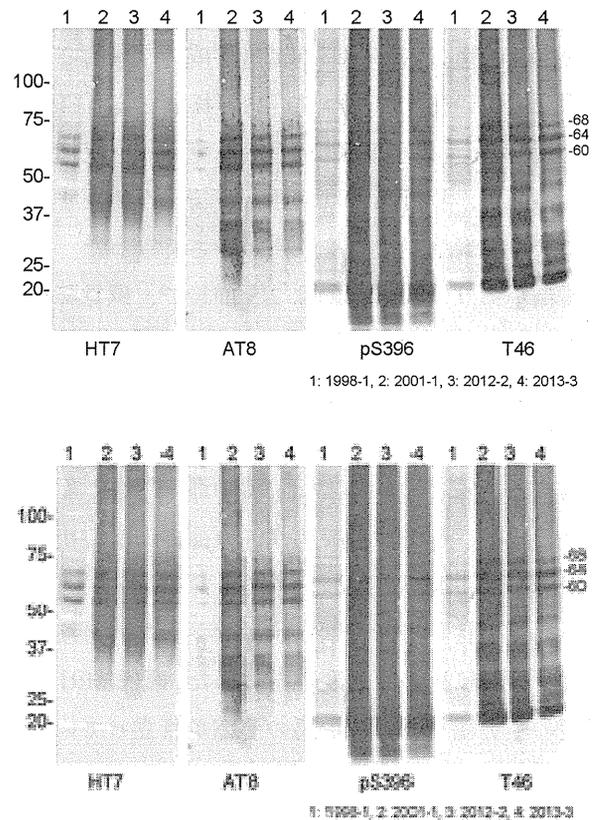
ブまでの絞り込みを行った。これらのプローブのうちで、遺伝子に関連したプローブは909カ所で471遺伝子と関連しており、特に発現調整に最も重要と考えられるTSS200またはTSS1500に含まれたプローブは254カ所、これらは123遺伝子に関連しているものであった。これらの遺伝子群の機能的内訳としては、シナプス伝達、細胞骨格、転写抑制などに関与する物が多く見られ、牟婁病の特異的病態を表しているものと考えられた。一方で、臨床病型によって分け、同様の基準(p値<0.01, ALS/PDC群間差0.10, 連続3プローブ以上)でプローブを選定したところ、29プローブが選定され、*ZIC1*, *ZIC4*, *LOC145845*の3遺伝子が残った。*ZIC1,4*は双方とも3q24に存在し、Dandy Walker syndrome(先天性小脳形成異常)の原因遺伝子の一つである。正常コントロールとの比較で抽出された遺伝子の数はアルツハイマー病/正常で抽出された遺伝子(下図)の数よりも遙かに多く、その原因としては1.牟婁病に特異的な現象、もしくは2.サンプル数が少ないためのアーチファクト、が考えられた。しかしながら牟婁病内での比較では抽出された遺伝子の数は3つであり、サンプル数の少ない事が原因とは考えにくいと結論した。

4) Multiple Proteinopathy: ①大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析;

#### 1. タウのイムノプロット解析

症例 1998-1 は他の 3 例に比べてタウ蓄積が少ないものの、いずれの症例においても、アルツハイマー病とよく似た、60, 64, 68kDa の全長リン酸化タウのバンド、レーン全体がスメア状に染まる反応、複数の C 末端断片が検出された。

アルツハイマー病患者 3 例から調製した不溶性タウのバンドパターンとの比較も行ったが、紀伊の大家系 4 例に検出されたタウの病変は、RD3、anti-4R、T46 いずれの抗体においても検出されるバンドパターンもアルツハイマー病のそれらと区別がつかなかった。



#### 2. TDP-43, αシヌクレインの生化学解析

TDP-43 については、解析した 4 例全てにおいて、45kDa の全長リン酸化 TDP-43、18~26kDa の C 末端断片、およびスメア状の反応が検出された。また C 末端断片のバンドパターンは type A-FTLD-TDP のバンドパターンに類似していた。また、αシヌクレインについても、1998-1 は軽微であったが、4 例全てにおいてリン酸化αシヌクレイン陽性のバンドが検出された。またそのバンドパターンはレビー小体型認知症やパーキンソン病のそれと類似していると思われた。

②tauopathy としての神経病理学的特徴: タウ免疫ブロットと臨床型分類との対比では、①4R dominant 1 例: PDC (Parkinson dementia complex) with ALS (amyotrophic lateral sclerosis); ②3<4R 3 例: PDC with ALS 1 例、ALS 1 例、ALS with D (Dementia) 1 例、③3+4R (AD 型) 5 例: PDC with ALS 1 例、PDC 2 例、ALS 2 例であった(Fig.1)。ブロット陽性 9 例の海馬において、多数の ghost tangle (GT)、神経原線維変化

Figure 1. The tau isoform patterns of western blotting in nine Kii ALS/PDC cases. The right end ladder is examples of six tau isoforms

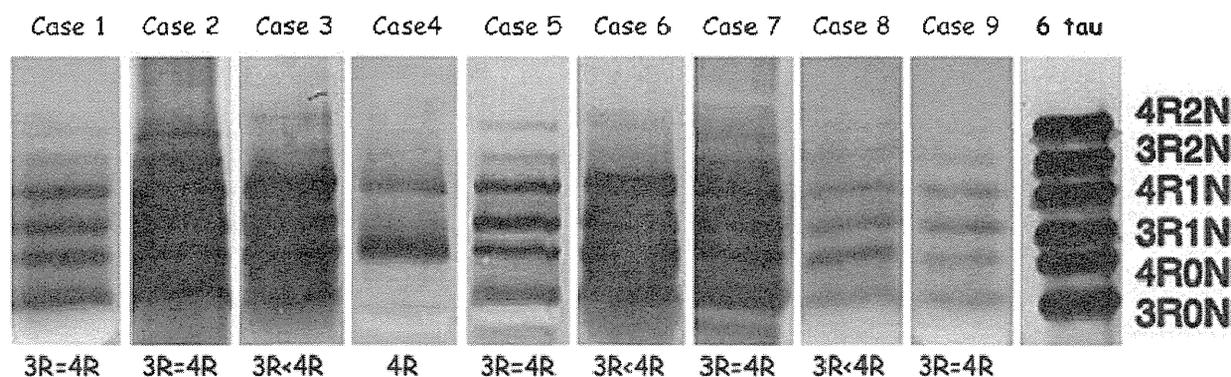


Figure 2. The summary of clinical characteristics and neuropathological findings in nine Kii ALS/PDC cases.

Case	Age/ Gender	Duration of illness, y	Clinical symptoms			ALS pathology	Middle temporal cortex (MT)					Blotting type
			P	D	A		AG	Subpial thorn	Patchy astrocytic structure	NFT score	AT-8 NFT score	
1	75 M	7	+	+	-	-	±	±	±	Frequent	Frequent	3R=4R
2	70 F	11	+	+	-	-	1+	+	±	Frequent	Frequent	3R=4R
3	60 F	8	+	+	+	+	±	+	2+	Moderate	Moderate	3R<4R
4	70 F	12	+	+	+	+	2+	+	±*	Moderate	Frequent	3R<4R
5	76 F	6	+	+	+	+	1+	-	±	Moderate	Frequent	3R=4R
6	77 M	7	-	+	+	+	±	+	1+	Sparse	Moderate	3R<4R
7	63 F	4	-	-	+	+	1+	+	1+	Frequent	Frequent	3R=4R
8	70 F	13	-	-	+	+	±	+	-	None	Sparse	3R<4R
9	70 F	10	-	-	+	+	-	+	±	Moderate	Frequent	3R=4R

\* Many astrocytic plaque like structures were detected in case 4.

(NFT)、pretangle (PT)、嗜銀顆粒 (AG)を認めた。更に、Gallyas 陰性 AT8 陽性の星状膠細胞の斑状構造を認めた(Fig.2,3)。免疫ブロットにて AD 型を示した群は、GT の出現がより広範であった。NFT 及び特徴的なグリア病変を半定量的に評価した結果、NFT を AD 型でより豊富に認めた。また、嗜銀顆粒やグリア病変が、免疫ブロットで 4R タウが AD に比べ多い群が存在する根拠をなす可能性があることを確認した。

③5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較；出現頻度と局在の差はあれ、紀伊症例、グアム症例の全例で、リン酸化タウ陽性の神経原線維変化 (NFT)、プレタンブル、スレッド等が認められた。紀伊症例の NFT は、皮質全層に出現する症例

と、皮質浅層に出現する症例が見られた。紀伊症例のリン酸化タウ陽性のアストロサイトは、脳表などでは thorn shaped astrocytes が多く、大脳皮質などの灰白質では granular hazy astrocytic inclusions (GHAI; Oyanagi K, et al., 1997) <sup>3)</sup>であった (図 1、2)。主として灰白質で、リン酸化タウ陽性の、神経突起と思われるものと、細く、うねうねと屈曲し枝分かれするアストロサイトの突起と思われるものが見られた。紀伊症例の白質では、灰白質にリン酸化タウ陽性所見が多い症例で、オリゴデンドログリアの tau-positive fine granules (TFG; Yamazaki M, et al., 2005) <sup>4)</sup> (図 3、4)、スレッド、GHAI が認められた。TFG の大きさは、グアム島 PDC 症例より紀伊 PDC-ALS 症例がやや大きかった。紀伊症例とグアム

症例の比較では、リン酸化タウ陽性のアストロサイト、および GFAP 陽性のアストロサイトは、紀伊 PDC-ALS 症例がグアム PDC 症例より多かった。

## 5) iPS 細胞研究: ①iPS 細胞の樹立; 1. 皮膚由来線維芽細胞の樹立

患者からの同意が得られた 5 例の症例において皮膚生検を行い、うち 4 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。

### 2. iPS 細胞の樹立

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。

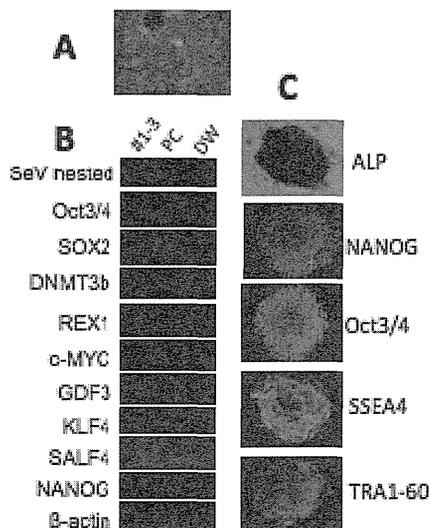


図 1 樹立した iPS 細胞

- 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) とアルカリフォスファターゼ染色 (ALP)  
 PC: positive control, DW: negative control

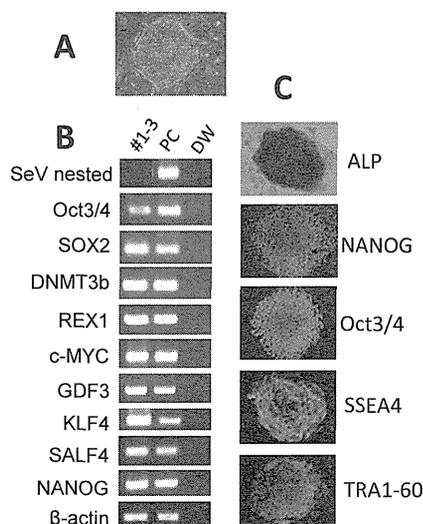


図 1 樹立した iPS 細胞

- 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) とアルカリフォスファターゼ染色 (ALP)  
 PC: positive control, DW: negative control

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。H25 年度は、1 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 1)。

### 3. 樹立した iPS 細胞からの神経細胞への誘導

これまでに樹立した iPS 細胞のうち症例 1 から樹立した iPS 細胞を神経細胞へと誘導した (図 2)。約 2 週間あまりで形態学的にも神経細胞へと誘導することに成功した。神経細胞特異的マーカーである Nestin の免疫染色を行い、陽性であることから神経細胞であることを確認した。