

図2 疾患由来iPS細胞から神経細胞への誘導
iPS細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞特異的マーカーであるNESTINの抗体にて免疫染色を行った。

②疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成；現在、Kii ALS/PDC 患者 5 名 (Table.1) の血液検体を用いて、疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、解析に適したクローンの選抜中である (Fig.3)。各症例間で T 細胞や iPSC の樹立効率・増殖速度は異なっていた。単離した iPSC クローンに関して、PCR を用いたエピソームベクターの残存確認を行った。(Fig.4)

Cases	Gender	Age	Onset	Birth	FH	Clinical phenotype		
						Parkinsonism	Dementia	MND
Kii #1	Male	66	59	Hohara	+	+	-	-
Kii #2	Female	74	60	Hohara	+	+	+	+
Kii #3	Female	83	72	Hohara	+	+	+	+
Kii #4	Female	74	58	Hohara	+	+	+	+
Kii #5	Male	79	74	Hohara	+	-	+	-

Table 1. Characteristics of five patients.

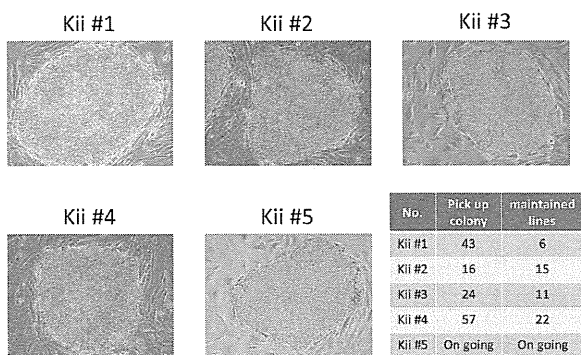


Figure 3. Colonies picked up in Kii #1-Kii #5.

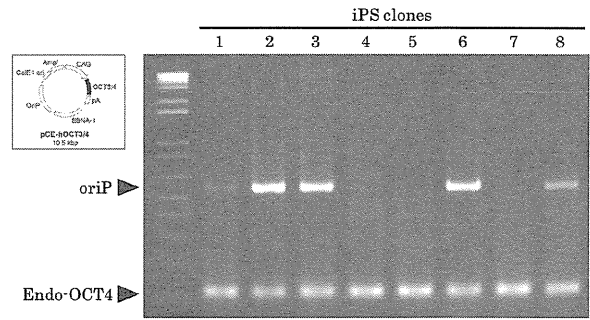


Figure 4. Check for residual plasmid vectors.

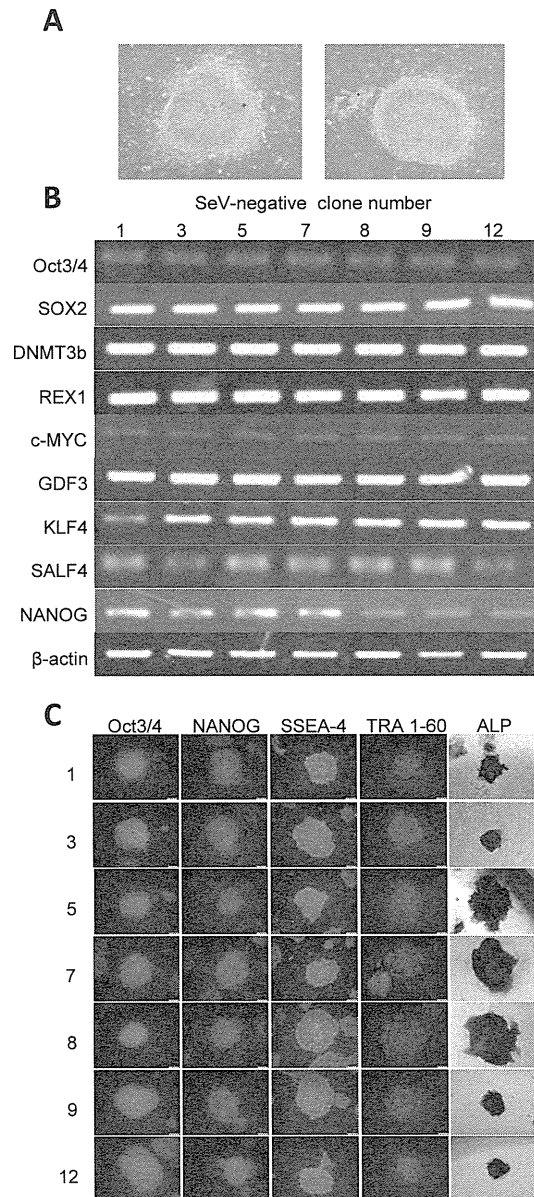


図1 樹立したiPS細胞

- 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)

附則（資料）：紀伊 ALS/PDC 診断基準、重症度分類（日本神経学会）

D. 考察

環境要因：原は活性酸素種（ROS）および活性窒素種（RNS）などの産生で引き起こされる酸化ストレスが神経細胞の脆弱性を高めることを報告している。したがって、多発地における今回の干物摂取に関する結果は原の報告を裏付けるものと考えられた。

K 町では昔より巡回販売が行われ、奥地では干物を数日かかって手に入れており、また O 町の住民が 15 歳の頃、干物は最短 1 日、最長 1 週間、常温下で保管されていた。干物は、天日乾燥時間が長くなるほど過酸化脂質が増加し、また加熱することにより、さらに過酸化が進行する」との報告がある。報告者は購入時と購入 7 日後のアジの干物の過酸化価を測定した結果、購入 7 日後では 104 と購入時（50）の約 2 倍であった。これらの事実を考え合わせると、酸化の進んだ干物を多く摂取していたことが ALS 多発の一因と考えられた。多発地における「過酸化物が多く含まれている干物の摂取頻度が高かったこと」「酸化の進んでいた干物であったこと」の特徴は、諸家の報告により支持されるものであった。従って、「従来の理論や経験と矛盾しないこと」の条件を満たしているため、関連の整合性が確認された。

毛髪中の元素含量測定は、有害元素の体内蓄積の指標としてしばしば用いられている。本研究で多発地 ALS 患者頭髪中に V や Mn の高値が認められ、これらの体内蓄積が推察された。また K 地域住民の中にもこれら金属の高値を示す住民が認められた。Al や Mn は土壌中に多く含まれ、V は環境中に広く分布するが海産物や土壌に多いとされている。当地域の土壌は、Al や Mn 含量が高いと報告されているが²、V 含量は明らかでなく、今後測定する必要がある。K 地域の海産物中の V 含量は日本食品標準成分表の値とほぼ同様であった。

頭髪中 V や Mn 高値の一つの要因として、K 地域住民の生活習慣との関連が示唆された。生活習慣の

アンケート調査から、当地域では畑仕事の頻度が高く、海産物の摂取が多いことが示された。頭髪中の V は Al や Mn 含量と正の相関を示し、さらに頭髪中の Al、Mn は畑仕事の頻度の高い住民に高値を示した。当地域では飲用水中の Ca 含量が極めて低いことが確認されているが、低 Ca 状態で、土壌中あるいは海産物中の V や Mn が Al とともに吸収され頭髪など組織に蓄積した可能性が考えられた。漬物物の摂取頻度の高い住民に頭髪中 V 高値を認めたことの意義は不明で、どのような生活習慣と関連するのか今後の課題である。

V は生体への毒性を有する遷移金属であり、マウスでの肺腫瘍³、H₂O₂ 産生による p53 活性化とアポトーシス誘導⁴、ドパミン含有細胞への毒性⁵などが報告されている。Roos らは ALS 患者脊髄液中に Mn、Al、V など金属元素の有意な高値を認め金属による神経毒性の関与を推察している⁶。これら遷移金属元素が運動神経細胞の変性にどのように関与するか今後さらに検討が必要である。

臨床経過から比較的急速に ALS、parkinsonism、dementia を合併し進行してきており、ALS/PDC の範疇に入る症例と考えた。今後エクソーム解析により遺伝学的背景が明らかになることが期待される。しかしながら本症例は孤発例であり、変異の絞り込みや意義付けが大変であることが予想された。そのため非発症者の家系メンバーからの協力も要請中であるが、今後コントロールのデータベースなどとの検討も必要と考えられる。また、特徴的な環境因子については指摘が困難と考えられた。

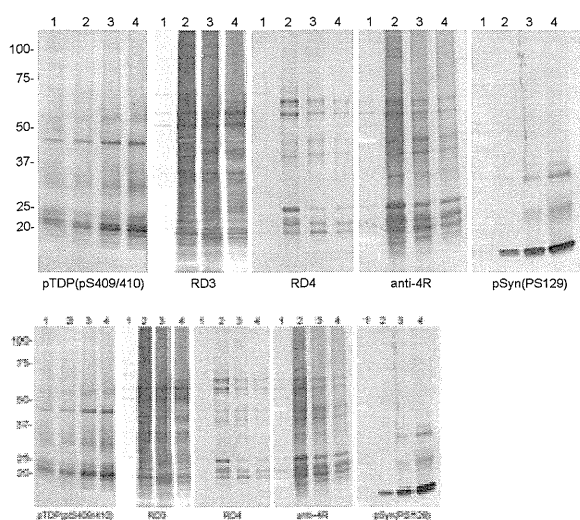
遺伝的要因：①疾患遺伝子の探索；8名の剖検例の全ゲノム配列解析のデータより、イントロンや遺伝子間領域も含めて、共通する変異を探索したが、明らかに疾患と関連する共通変異は見出されなかった。

さらに、共有される染色体領域を見出すため、homozygosity haplotype 法を用いて、本疾患に関連する創始者ハプロタイプを探索したが、疾患と関連する創始者ハプロタイプを検出することはできなかった。原理的に、世代が離れていくと homozygosity haplotype 法による創始者ハプロタイプの検出力は

下がるため、false positive の可能性は否定できないが、条件を緩めても創始者ハプロタイプは見いだせなかったことから、むしろ疾患の病原性変異が存在するとしても複数の遺伝子が関与している可能性 (genetic heterogeneity) や、単一遺伝子疾患ではなく複数の疾患感受性遺伝子が関与している complex trait の可能性なども考慮に含める必要があると考えられた。

② エピゲノム ; ALSPDC と健常者の比較, ALS と PDC の比較により抽出されてきたプローブには全く重複を認めず, 疾患の発症に関する病態の分子基盤とは別に, 臨床病型に関する分子基盤が存在している可能性が示唆された。

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 ; 今回解析した大家系の 4 例は蓄積量の程度の違いはあれ, いずれもリン酸化タウ, リン酸化 α syn, リン酸化 TDP-43 の 3 種類の異常タンパク質の蓄積が認められた。また, タウのバンドパターンはアルツハイマー病のそれと, TDP-43 は type A-FTLD のそれ, α シヌクレインは DLB/PD のそれと区別がつかないバンドパターンであり, ある程度均質な生化学的特徴を示しているように思われた。同じ家系の患者において, 基本的には同じ生化学的特徴を有した蛋白質の異常病変が起こっていることが示唆された。



それぞれの異常タンパク質の蓄積の程度は, TDP-43 と α シヌクレインに比例関係が認められ, 逆にタウと TDP, あるいはタウと α シヌクレインは逆

相関するように見えた。

② tauopathy としての神経病理学的特徴 : Kii ALS/PDC において, NFT の多発に加え, 嗜銀顆粒及び特徴的なグリア病理の存在を明らかにし, それらが免疫プロットにおける 4R tau の蓄積に影響を与えていると考えられた。

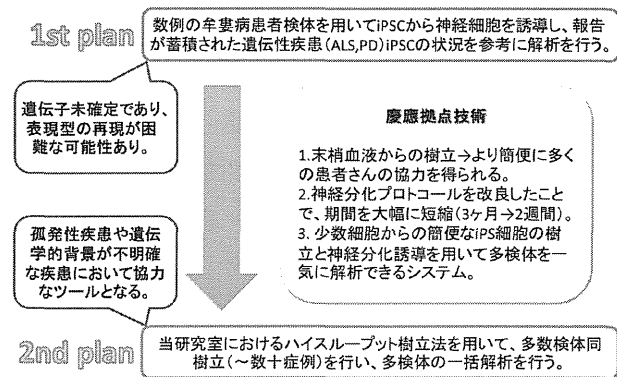
③ 5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見 : グアム島症例との比較 ; 今回検索した, 紀伊半島 H 出身 5 剖検例のリン酸化タウ免疫染色を主とする神経病理学的検討結果では, グアム PDC 症例との顕著な類似性が認められた。すなわちグアム島症例に特異的な所見である, として報告した granular hazy astrocytic inclusions (GHAI; Oyanagi K, et al. 1997)³⁾, tau-positive fine granules (TFG; Yamazaki M, et al. 2005)⁴⁾ が紀伊半島 PDC-ALS 症例にも認められたことである。また, リン酸化タウ陽性所見が ALS では少なく, PDC あるいは PDC-ALS では多いこともあげられる (Oyanagi K, et al., 1994)⁵⁾。紀伊症例とグアム島症例の所見に明らかな相違点は認められなかったが, 紀伊症例で, NFT が大脳皮質の浅層優位に出現しない症例が存在すること, リン酸化タウ陽性アストロサイトが多数認められること, tau-positive fine granules の大きさがやや大きいこと, などはグアム症例とは程度が異なるように思われた。

iPS 細胞研究: ① iPS 細胞の樹立 ; これまでに, 患者 5 例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。H25 年度は, そのうち 1 例から iPS 細胞を樹立した。この症例も加えてこれまで行った 3 例からの iPS 細胞樹立の効率は特に健常者と変わりはなかった。この結果より, 三重県南部に多発する家族性認知症・パーキンソン病では, この疾患の異常は, 細胞のリプログラミングや iPS 細胞の増殖には影響を与えないことが示唆された。線維芽細胞樹立のためには生検が必要であり, 樹立まで 1 ヶ月かかる。そこで, 血液細胞あるいは血液細胞由来の細胞を iPS 細胞作製のソースとすることで, 生検を行わずに末梢血の採血で iPS 細胞作製が可能となるために安全かつ容易に行える。

H25 年度は, 作製した iPS 細胞から神経細胞を誘

導し神経細胞を得ることができた。神経細胞の誘導効率では、健常者由来の iPS 細胞の場合と比較して特に差はなかった。したがって、この疾患の異常が神経細胞の分化に与える影響は、少ないと考えられる。

②疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成;現在疾患特異的PSCの樹立、選別を行っている段階であり、今後、
i) アルカリフォスファターゼ活性の確認、ii) RT-PCR・免疫染色を用いた未分化マーカーの発現確認を行った後に、iii) SCID マウスへの iPSC 移植を用いたテラトマ形成能(多分化能)の確認、iv) 核型解析を行い、異常の認められないクローンを解析用として最終的に選別する。本疾患 iPSC 作成時の問題点としては、疾患の Heterogeneity が挙げられる。Kii ALS/PDC は家族性に発症するものの、遺伝子が同定されておらず、作製した iPSC を扱う上では、依然として孤発性疾患の要素が色濃く残る。→可能であれば autopsy による確認が必要。しかしながら、本疾患における iPSC 作製及び表現型の再現や病態解析が成功すれば、他の孤発性疾患解明の糸口ともなる。また、iPS 細胞作成におけるゲノム変異も問題となるが、東京大学神経内科(辻省次先生)が分担拠点として品質管理を行っている。次年度以降の展望として、疾患特異的ヒト iPSC から各種神経系細胞への分化誘導と病態解析(樹立したヒト iPSC を用いて、運動神経、ドパミン作動性神経、興奮性神経、抑制性神経、グリア細胞へと分化誘導後、生化学的、遺伝学的並びに電気生理学的手法により、異常タンパク質蓄積をはじめとした in vivo で確認されている病態の再現、神経細胞の活動性や代謝能の解析)及び創薬スクリーニング(細胞内活性酸素種の軽減、グルタミン酸による興奮毒性の抑制、異常構造物の抑止などを指標に、リルゾール、フリラジカルスカベンジャー、抗酸化ビタミン群といった既存の薬剤に加え、神経保護作用や異常凝集物除去能を有する新たな治療薬を探索)を行っていく予定である。



採血及びヒト iPSC 細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) の作成;

E. 結論

干物の摂取と ALS 発症の因果関係を「判定基準」に基づき検討した結果、判定基準の 5 条件をいずれも満たしていたため、干物の摂取と ALS 発症の間に因果関係が成り立津ことが確認された。従って、干物が ALS 多発の危険因子であった可能性が認められた。特に本研究から、酸化の進んだ干物を頻回に摂取していたことが、ALS のリスクを増幅させた可能性が示唆された

紀伊半島串本地域の ALS 患者頭髪中に遷移金属である V や Mn の高値を認め、これら金属元素による酸化的ストレスの増大が推察された。飲用水中の Ca 含量が極めて低い環境下で畑仕事や海産物摂取の頻度が高い生活・食習慣と関連して V や Mn が体内に蓄積した可能性が考えられた。

本邦において紀伊半島以外にも ALS/PDC 患者が存在する可能性があり、本症例の臨床的、遺伝学的評価は ALS/PDC の研究に新しい展開をもたらす可能性がある。本症例の臨床的、遺伝学的評価が進むとともに、本疾患の解明に向け、今後もさらなる疫学調査、環境因子の調査、遺伝子解析の進展が期待される。

今回の解析では、全ゲノム配列で剖検例に共通する変異は検出されなかった。また、homozygosity haplotype 法による創始者ハプロタイプ探索でも、一つの創始者ハプロタイプに絞ら込むことはできなかった。

本疾患の遺伝学的な特性を考慮に入れた連鎖解析と全ゲノム配列解析を行うことで、引き続き ALS/PDC の発症にかかわる遺伝因子を探索する。

今回の結果は疾患発症、および臨床病型の病態機序解明に重要な端緒となる可能性がある。今後さらに発展させ、特異的な遺伝子調節系の解析を行いたい。

Kii ALS/ PDC のタウオパチーは、アルツハイマー型老年性変化との共通点並びに相違点を有する。

脳内のリン酸化タウ陽性所見は、紀伊半島症例とグアム島症例で概略類似し、アストロサイトにおけるその所見は紀伊症例で顕著である。

患者 4 例の皮膚生検より皮膚由来線維芽細胞を樹立した。これまでの 2 例に加えて H25 年度は、新たに 1 例より iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は形態的にも、また、未分化マーカーの発現でも iPS 細胞に矛盾することがなく、iPS 細胞が樹立されたと言える。さらに神経細胞を樹立した iPS 細胞から誘導することに成功した。以上より、樹立した iPS 細胞は今後、三重県南部に多発する家族性認知症・パーキンソン病を研究する解析ツールをして有用である。

Kii ALS/PDC 患者 5 例から iPSC 樹立を行った。今後、神経系解析に用いる iPSC クローンを選抜を進め、神経系細胞への分化誘導を行い、病態の解明や新たな治療に迫る検討を行っていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y and Era T. Analysis of iPS cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressive. Oral presentation. The 11th Stem Cell Research Symposium. Tokyo, 17th May 2013.
2. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T,

Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y and Era T. Analysis of iPS cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressive. Poster presentation. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Boston, 14th June, 2013.

3. 江良 択実 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 130 回 熊本小児科学会総会 特別講演 熊本 2013 年 6 月 16 日
4. 江良 択実 iPS 細胞と再生医療 第 14 回 医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 招待講演 東京 2013 年 9 月 28 日
5. Era T, Soga M, Fusaki N, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo S, Irie T, and Endo F. Model of Niemann-Pick disease type C using iPS cells. Oral presentation. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases and The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, 28th November, 2013.
6. T Kihira, Kazushi Okamoto, Sohei Yoshida, et al. Environmental Characteristics and Oxidative Stress of Inhabitants and Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in a High-incidence Area on the Kii Peninsula, Japan. 2013 Internal Medicine 2013, 52: 1479-1486.
7. Tomiyama H. C9orf72 in Japanese amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Rinsho Shinkeigaku. 2013;53:1074-6.
8. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. Cell Rep. 4:124-34.
9. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. Brain 136:1128-38.
10. Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, Hasegawa M,

- Kanninen KM, Grubman A, Liddell JR, Crouch PJ, White AR. (2013) Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. *PLoS One* 8:e67433.
11. Mann DMA, Rollinson S, Robinson AC, Callister J, Snowden JS, Gendron T, Petrucelli L, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Davidson YS and Pickering-Brown S. (2013) Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neuron Disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Comm* 1: 68.
 12. Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Comm* 1: 54.
 13. Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Ishobe T, Hasegawa M, Hisanaga SI (2013) Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. *J Biol Chem* 288: 7968-77.
 14. Yui Nakayama, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Shigeki Kuzuhara, and Yasumasa Kokubo. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Kii Amyotrophic Lateral Sclerosis /Parkinsonism-Dementia Complex. *Journal of Neurodegenerative Diseases*. Article ID 679089, 4 pages 2013.
 15. Kotaro Ogaki , Yuanzhe Li , Masashi Takanashi , Kei-Ichi Ishikawa , Tomonori Kobayashi, Takashi Nonaka , Masato Hasegawa , Masahiko Kishi , Hiroyo Yoshino , Manabu Funayama , Tetsuro Tsukamoto , Keiichi Shioya , Masayuki Yokochi , Hisamasa Imai , Ryogen Sasaki , Yasumasa Kokubo , Shigeki Kuzuhara , Hiroyuki Tomiyama , , Nobutaka Hattori. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTLN, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013 Jan;19(1):15-20.
 16. Ken-ichiro Kobayashi, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Takeshi Nishiguchi, Kenichi Isoda, Yasumasa Kokubo, Katsuhiko Ando, Masaki Katurahara, Yasuhito Sako, Tetsuya Yanagida, Akira Ito, Sentaro Iwabuchi, and Kenji Ohnishi. Rare case of disseminated cysticercosis and taeniasis in a Japanese traveller after returning from India. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 Jul;89(1):58-62.
- ## 2. 学会発表
1. Yasumasa Kokubo. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parkinsonism-dementia complex (PDC) of the Kii peninsula of Japan (Muro disease). - Recent Advances of Reserch -. 9th international congress on mental disorders & other non-motor features in Parkinson's diseaseand related disorders. *MDPD* 2013.
 2. Satoru Morimoto, Yasumasa Kokubo , Hiroyuki Hatsuta, Shigeki Kuzuhara, Shigeo Murayama. Immunohistochemical study of the cerebellum in amyotrophic lateral sclerolosis (ALS)/ parkinson-dementia complex (PDC) in Kii peninsula (ALS/PDC-Kii, Muro disease). *Alzheimer's Association International Conference*, 2013.
 3. Y. Kokubo, S. Morimoto, T. Nakagawa, K. Miyazaki, S. Kuzuhara. Clinical trial of

- Edaravone in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan. 24th International Symposium on ALS/MND.
4. 岡本和土, 紀平為子, 小久保康昌, 葛原茂樹. 日本における判別分析による ALS の予後進展状況の予測に関する研究. 日本疫学会(大阪), 2013. 1月.
 5. 岡本和土, 紀平為子, 小久保康昌, 葛原茂樹. 判別分析による ALS の予後進展状況の予測に関する研究. 日本神経学会(東京). 2013, 6月
 6. 紀平 為子, 岡本和土, 吉田宗平, 他. 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. 日本神経学会総会, 東京, 2013年5月29日~6月1日.
 7. Tameko Kihira, Iori Sakurai, Sohei Yoshida, et al. Transitional metal in scalp hair and lifestyle of ALS patients and residents in the Kii Peninsula, Japan – the second report-. 24rd International symposium on ALS/MND, Milan, Italy, 6-8 December, December 2013.
 8. 富山弘幸. 運動ニューロン疾患の遺伝学: Update わが国の ALS における C9ORF72. 第54回日本神経学会学術大会. 2013年5月30日、東京
 9. Ishiura et al. A molecular genetic study of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) in Kii peninsula of Japan. The 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, 2013 Oct, Boston, USA
 10. Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 4th Korea Japan Symposium, Seoul [2013. 2. 26]
 11. Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Symposium 3S05a, Yokohama [2013. 9. 13]
 12. 長谷川成人 神経変性疾患の細胞病理を形成する蛋白質のプリオン様特性 第8回臨床ストレス応答学会, 松本 [2013. 11. 16]
 13. 長谷川成人 神経変性疾患の分子基盤と進行機序 —患者脳の解析から導かれた新しい考え方とその検証— 平成25年度 文部科学省新学術領域研究 生命科学系3分野 がん・ゲノム・脳 支援活動合同シンポジウム [2013. 8. 6]
 14. 長谷川成人 神経変性疾患の原因となるタンパク質の構造異常とその伝播 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会, 岡崎 [2013. 11. 20]
 15. 森本悟, 小久保康昌, 齊藤祐子, 長谷川成人, 葛原茂樹, 村山 繁雄: 牟婁病におけるタウオパチーの、免疫化学的・免疫組織化学的研究. 第53回日本神経病理学会学術研究会
 16. Morimoto S, Kokubo Y, Hasegawa M, Shigeki K, Murayama S: Immunohistochemical study and western blotting of tauopathy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ parkinson dementia complex (PDC), Kii, Japan. [Annual Meeting 2012 of the American Association of Neuropathologists, Cicago]
 17. Murayama S, Morimoto S, Kokubo Y, Kihira T, Yoshida Y, Yoshida M, Takahashi H, Kuzuhara S: Establishment of pathology center for amyotrophic lateral sclerosis/ parkinson disease complex in Kii Peninsula. [Alzheimer's Association International Conference 12th, Vancouver].
- 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
2013年7月、米国科学誌「Cell Reports (セルリポート)」での論文発表について、東京都広報部よりプレ

スリリースすると共に、東京都医学総合研究所のホームページにて成果の概要を掲載。

<http://www.igakuken.or.jp/research/topics/2013/0704.html>

紀伊半島に多発する筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合
(Kii ALS/PDC; Amyotrophic lateral sclerosis/Parkinsonism-dementia complex of
the Kii Peninsula)

疾患概念

1. 地域性：紀伊半島南部の和歌山県から三重県にまたがる、牟婁郡とその周辺地域(具体的には、和歌山県田辺市から三重県松阪市を結んだライン以南)の居住者、あるいは居住歴のあるもの。
2. 臨床病型と臨床症状：臨床病型には、ALS 型とPDC型がある。
ALS 型は、筋萎縮、線維束性収縮、腱反射亢進、Babinski 徴候などの上位と下位の運動ニューロン障害症状を示し、古典的なALS と異なるところはない。
PDC型は、パーキンソニズム（無動、筋強剛を主徴とし、時に振戦を伴い L-dopa への反応は不良）と認知症（意欲低下を主体とした前頭葉皮質下性認知症症状）を単独、もしくは複合して示す。PDC型にALS症状を合併することがある。
3. 神経病理学的所見： ALS型では典型的 ALS 所見を認める。PDC型では黒質変性、基底核変性を認める。神経原線維変化の出現量は、PDC型では大量であり、ALS 型では少ない。好発部位は、脳幹被蓋の諸核、黒質、マイネルト核、間脳、側頭葉内側部で、分布は加齢性変化を超えて広範囲である。PDC型の中にも、典型的ALS病変を認める症例がある。アミロイド老人斑を伴う症例があるが、主体はタウ蛋白の蓄積である。

紀伊 ALS/PDC 診断基準

1. 紀伊半島南部の和歌山県から三重県にまたがる、牟婁郡とその周辺地域(具体的には、和歌山県田辺市から三重県松阪市を結んだライン以南)の居住者、あるいは居住歴のあるもの。
2. 病型としては、
 - a. ALS type : 古典的 ALS の臨床像を呈する。
 - b. PDC type : 進行性のパーキンソニズム (L-dopa 反応不良)および認知症 (早期から意欲低下が目立つ)、のいずれかあるいは、複合症状を示す。
 - c. ALS/PDC type: a. と b. の合併。
3. ALS/PDC の家族歴がある。(家族歴は、ALSのみの場合、PDC のみの場合あるいは両者の場合を問わない)
4. 神経病理学的には、
 - a. 古典的なALS 病理 + 大脳皮質、脳幹に加齢性変化を超えて広く出現する神経原線維変化。
 - b. 黒質変性、基底核変性 + 大脳皮質、脳幹に加齢性変化を超えて広く出現する多数の神経原線維変化。
 - c. a+b.

Possible

(1+ 2a)、(1+2b)のいずれかを満たす

Probable

(1+2c)、(1+2a+3)、(1+2b+3)のいずれかを満たす

Definite

(Possible or Probable) かつ (4のa、b、cのいずれかに該当)

重症度分類

- I 日常生活は自立しており、発病前の社会生活を維持できている。
- II 日常生活は不自由があるものの自立している。社会生活上、就労や家事等が困難である。
- III 屋外歩行には装具あるは介助者による支えが必要である。日常生活にも部分的に介助を要する。
- IV ベッド上または車椅子生活だが、意思疎通可能で、介助により摂食や排泄ができる。
- V ほぼ寝たきりで全面的介助が必要。

Ⅱ. 分担研究報告

平成25年度 班会議 プログラム

○日程：平成26年1月11日（土）10：00～15：45

○会場：愛知県産業労働センター 11階 1108

（敬称略）

10：00～10：05

開会挨拶

葛原茂樹

10：05～10：50

座長 葛原茂樹

ミニレビュー

1. 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）

—5年間のまとめと今後の展望—

○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）

10：50～12：10

I Proteinopathy

座長 村山繁雄

2. 紀伊半島のALS/parkinsonism-dementia complex（ALS/PDC）家系の
臨床病理学的所見からみた病因

○葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

三室マヤ（愛知医科大学加齢医科学研究所）

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）

3. 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（公益財団法人 東京都医学総合研究所）

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）

葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

4. 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、○森本 悟（東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク）

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）

長谷川成人（公益財団法人 東京都医学総合研究所）

葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

5. 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、山崎峰雄、橋本智代（信州大学医学部）
- 森本 悟（三重大学大学院腫瘍病理学、慶應義塾大学医学部生理学教室）
- 初田裕幸、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）
- 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）
- 葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

12:10～13:00

< 昼 食 > 事務連絡

13:00～14:00

II 臨床、環境要因

座長 吉田宗平

6. 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、櫻井威織、吉田宗平、若山育郎（関西医療大学保健医療学部）
- 高宮幸一、中野幸廣、奥村良、飯沼勇人（京都大学原子炉実験所）
- 和田幸子、岩井恵子（関西医療大学保健看護学部）
- 岡本和士（愛知県立大学看護学部）
- 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）
- 葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

7. 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（愛知県立大学看護学部）
- 吉田宗平、紀平為子（関西医療大学保健医療学部）
- 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）
- 葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

8. 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（順天堂大学脳神経内科/神経変性疾患病態治療探索講座）
- 中根俊成（国立病院機構長崎川棚医療センター臨床研究部・神経内科）
- 服部信孝（順天堂大学 脳神経内科/老人性疾患・病態治療研究センター
/神経変性疾患病態治療探索講座）

14:00～14:40

III 疾患関連遺伝子

座長 辻 省次

9. 紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソンニズム認知症複合（ALS/PDC）の疾患遺伝子の探索

辻 省次、○石浦浩之、三井純、Budrul Ahsan、福田陽子、後藤順
(東京大学 神経内科)
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)
葛原茂樹 (鈴鹿医療科学大学保健衛生学部)
日笠幸一郎、吉村淳、土井晃一郎、森下真一(東京大学新領域創成科学研究科)
原賢寿、西澤正豊 (新潟大学 神経内科)
豊田敦、藤山秋佐夫 (国立遺伝学研究所)

10. 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 (東京大学大学院医学系研究科分子脳病態科学)
○間野達雄 (東京大学 神経内科)

14 : 40 ~ 15 : 00 < コーヒーブレイク >

15 : 00 ~ 15 : 40

IV iPS 細胞 座長 小久保康昌

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

○江良沢実 (熊本大学・発生医学研究所・幹細胞誘導分野)
濱崎 誠 (熊本大学・発生医学研究所・幹細胞誘導分野)

12. 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、白石泰三 (三重大学大学院腫瘍病理学)
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)
葛原茂樹 (鈴鹿医療科学大学保健衛生学部)
○森本 悟 (三重大学大学院腫瘍病理学、慶應義塾大学医学部生理学教室)
石川 充、赤松和土、駒野 肇、岡野栄之 (慶應義塾大学医学部生理学教室)

15 : 40 ~ 15 : 45 閉会挨拶 研究代表者 小久保康昌

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
三重大学大学院地域イノベーション学研究所 紀伊神経難病研究センター
〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 TEL & FAX: 059-231-5117
E-mail:kii-project@clin.medic.mie-u.ac.jp

班会議議事録

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

平成 25 年度班会議 開催報告

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による平成 25 年度班会議を、平成 26 年 1 月 11 日（土曜日）に、愛知県名古屋市中村区の愛知県産業労働センター11 階会議室にて開催した。演題数は、ミニレビュー（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） - 5 年間のまとめと今後の展望 -）1 題、一般演 11 題で、参加者数は 25 名であった。午前 10 時から始まった班会議は、活発な討論が行われプログラム通りに進行し、午後 4 時に閉会した。

平成 26 年 2 月 20 日 研究代表者 小久保康昌 記

大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析

研究分担者：長谷川成人¹⁾

研究協力者：小久保康昌²⁾、葛原茂樹³⁾

¹⁾ 公益財団法人 東京都医学総合研究所 認知症高次脳機能研究分野

²⁾ 三重大学大学院地域イノベーション学研究所 ³⁾ 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部

研究要旨

三重県南部の家族性認知症-パーキンソン症候群の発症、進行機序解明を探るため、大家系の患者剖検脳4例について、タウ、 α シヌクレイン、TDP-43の生化学解析を行った。その結果、抗タウ抗体を用いた解析からは、4症例のいずれにおいても、アルツハイマー型タウのバンドパターン(60, 64, 68kDのトリプレット、C末端断片)が検出された。 α シヌクレイン、TDP-43についても、症例によって程度の違いがあるが、抗リン酸化 α シヌクレイン抗体、抗リン酸化TDP-43抗体に陽性を示す反応が検出された。TDP-43と α シヌクレインの蓄積には比例関係が認められた一方、タウト、TDP-43あるいは α シヌクレインの蓄積量には逆相関が認められた。

A.研究目的

三重県南部に多発する認知症-パーキンソン症候群の発症、病態形成機構を解明することを目的とし、これまで剖検となった大家系(A家系)の4症例について、保存されている凍結から不溶性画分を調製し、タウ、 α シヌクレイン、TDP-43の異常病変の生化学解析を行う。

B.研究方法

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ブ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 α Syn抗体 (mAb PS129)、抗TDP-43抗体 (poly pS409/410)である。

(倫理面への配慮)

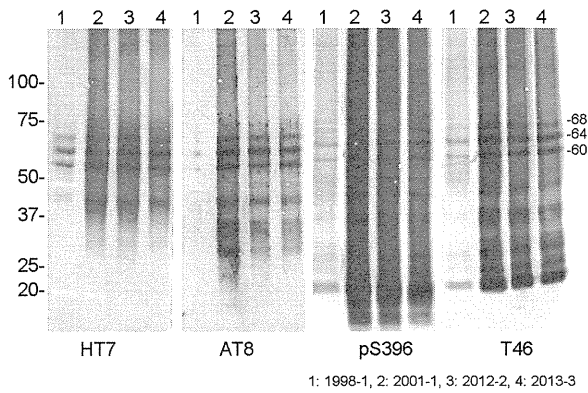
剖検脳の免疫組織、生化学解析については東京都医学総合研究所の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C.研究結果

1. タウのイムノブロット解析

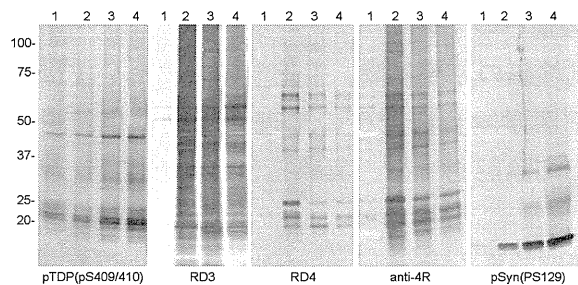
症例1998-1は他の3例に比べてタウ蓄積が少ないものの、いずれの症例においても、アルツハイマー病とよく似た、60, 64, 68kDaの全長リン酸化タウのバンド、レーン全体がスメア状に染まる反応、複数のC末端断片が検出された。

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、およびスミ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。



それぞれの異常タンパク質の蓄積の程度は、TDP-43と α シヌクレインに比例関係が認められ、逆にタウとTDP、あるいはタウと α シヌクレインは逆相関するよう見えた。

D. 考察

今回解析した大家系の4例は蓄積量の程度の違いはあれ、いずれもリン酸化タウ、リン酸化 α syn、リン酸化TDP-43の3種類の異常タンパク質の蓄積が認められた。また、タウのバンドパターンはアルツハイマー病のそれと、TDP-43はtype A-FTLDのそれ、 α シヌクレインはDLB/PD

のそれと区別がつかないバンドパターンであり、ある程度均質な生化学的特徴を示しているように思われた。同じ家系の患者において、基本的には同じ生化学的特徴を有した蛋白質の異常病変が起こっていることが示唆された。

E. 結論

大家系の症例4例全てにおいて、タウ、TDP-43、 α Synの異常蓄積が確認された。今回解析した部位については、タウの蓄積病変はどの症例も、アルツハイマー病のそれと区別できない生化学的特徴を有し、3R、4Rタウの蓄積が認められた。TDP-43は生化学的にtype A型バンドパターン、 α SynはDLBと同じ神経細胞型バンドパターンと思われた。TDPと α Synの病変の程度が相関し、タウ病変の程度は他の病変と逆相関を示した。

F : 健康危険情報

特になし

G : 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

1 : 論文発表

Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep.* 4:124-34.

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 136:1128-38.

Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Grubman A, Liddell JR, Crouch PJ, White AR. (2013) Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase

Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. PLoS One 8:e67433.

Mann DMA, Rollinson S, Robinson AC, Callister J, Snowden JS, Gendron T, Petrucelli L, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Davidson YS and Pickering-Brown S. (2013) Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neuron Disease associated with expansions in C9ORF72. Acta Neuropathol Comm 1: 68.

Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathol Comm 1: 54.

Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Ishobe T, Hasegawa M, Hisanaga SI (2013) Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. J Biol Chem 288: 7968-77.

2 : 学会発表

Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 4th Korea Japan Symposium, Seoul [2013. 2. 26]

Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Symposium 3S05a, Yokohama [2013. 9. 13]

長谷川成人 神経変性疾患の細胞病理を形成する蛋白質のプリオン様特性 第8回臨床ストレス応答学会, 松本 [2013. 11. 16]

長谷川成人 神経変性疾患の分子基盤と進行機序—患者脳の解析から導かれた新しい考え方とその検証—平成25年度 文部科学省 新学術領域研究 生命科学系3分野 がん・ゲノム・脳 支援活動合同シンポジウム [2013. 8. 6]

長谷川成人 神経変性疾患の原因となるタンパク質の構造異常とその伝播 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会, 岡崎 [2013. 11. 20]

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

2013年7月、米国科学誌「Cell Reports (セルリポート)」での論文発表について、東京都広報部よりプレスリリースすると共に、東京都医学総合研究所のホームページにて成果の概要を掲載。

<http://www.igakuken.or.jp/research/topics/2013/0704.html>

Kii ALS/PDC（牟婁病）における tauopathy としての神経病理学的特徴

もりもと さとる こくぼ やすまさ はせがわ まさと くずはら しげき むらやま しげお
森本 悟¹⁾、小久保 康昌²⁾、長谷川 成人³⁾、葛原 茂樹⁴⁾、村山 繁雄¹⁾

- 1) 東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク
- 2) 三重大学大学院地域イノベーション学研究所
- 3) 東京都医学総合研究所認知症・高次脳機能研究分野
- 4) 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療福祉学科

研究要旨

Kii ALS/ PDC（牟婁病）の主要な特徴であるタウオパチーについて、タウ免疫プロットと組織病理学的所見を対応させることで、アルツハイマー病（AD）老年性変化との類似と相違を明らかにすることを目的とし、牟婁病患者 9 例の剖検脳を用いて解析を行った。その結果、Kii ALS/ PDC において、NFT の多発に加え、嗜銀顆粒と、特徴的なグリア病理の存在を明らかにした。特徴的なグリア病理が、タウ免疫プロットにおける 4R tau の蓄積に影響を与えていると考えられた。

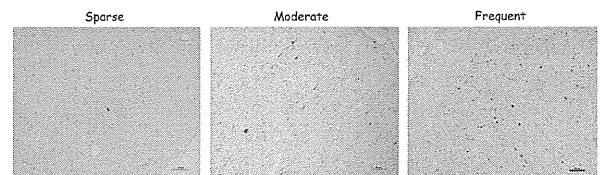
A.研究目的

Kii ALS/ PDC（牟婁病）の免疫プロットによる過去の検討では、tau isoform がアルツハイマー病（AD）パターン（3 repeat (3R)= 4 repeat (4R)）を示すと報告されている。(Itoh N et al. 2003.) 今回新たに最近例 9 例について免疫プロットを施行したところ、ほぼ 4R パターン 1 例、3R<4R パターン 3 例、3R=4R (AD パターン) 5 例と、結果に多様性が見出された。牟婁病のタウオパチーについて、免疫プロットと、組織病理学的所見を対応させることで、AD 老年性変化との類似と相違を明らかにする。

B.研究方法

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 μm 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-(×100)、



グリア病理 (Patchy astrocytic structure) ; 0, ± : 1-5, 1+ : 6-9, 2+ : 10-(×100)、嗜銀顆粒 ; 0, ± : 1-19, 1+ : 20-49, 2+ : 50-99, 3+ : 100-(×400)。本研究は、三重大学及び東京都健康長寿医療センターにおける倫理委員会にて承認を得ている。個人情報に関しては、連結可能匿名化を行い、厳重に管理を行っている。また、患者または家族へのインフォームドコンセントを