

行い、同意を取得している。

C. 研究結果

タウ免疫ブロットと臨床型分類との対比では、① 4R dominant 1例：PDC (Parkinson dementia complex) with ALS (amyotrophic lateral sclerosis)；② 3<4R 3例：PDC with ALS 1例、ALS 1例、ALS with D (Dementia) 1例、③ 3+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 (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理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。

D. 考察

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、それらが免疫ブロットにおける4R tauの蓄積に影響を与えていると考えられた。

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

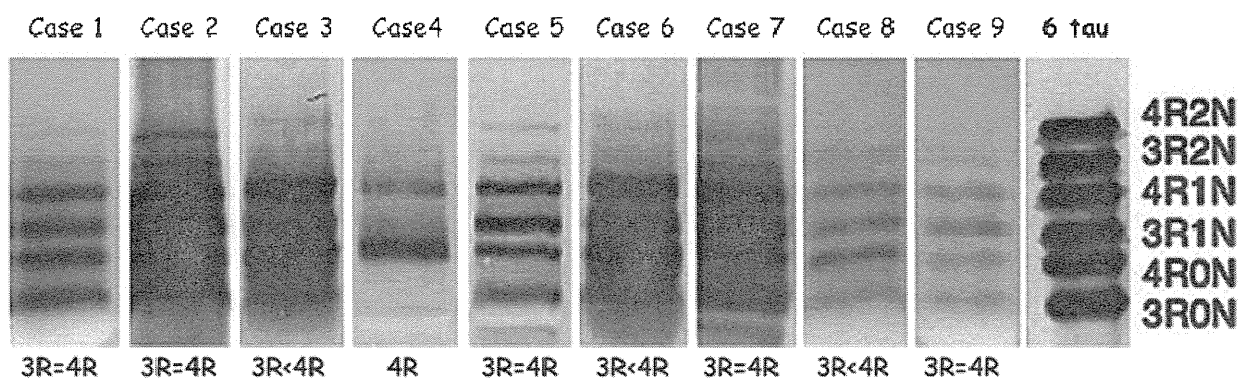
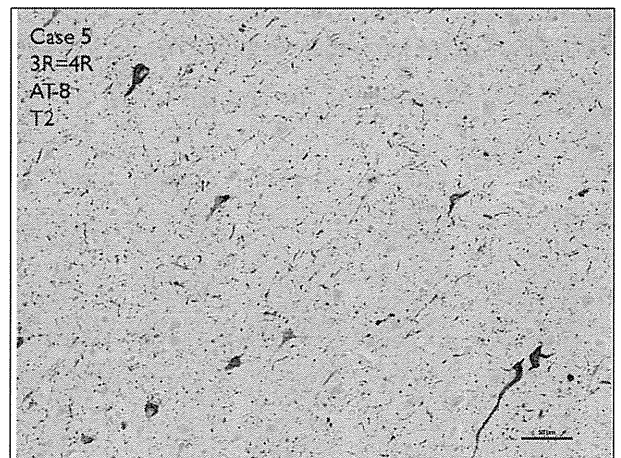
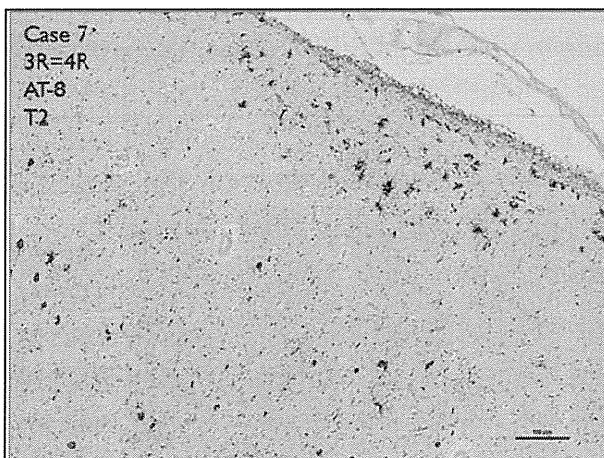
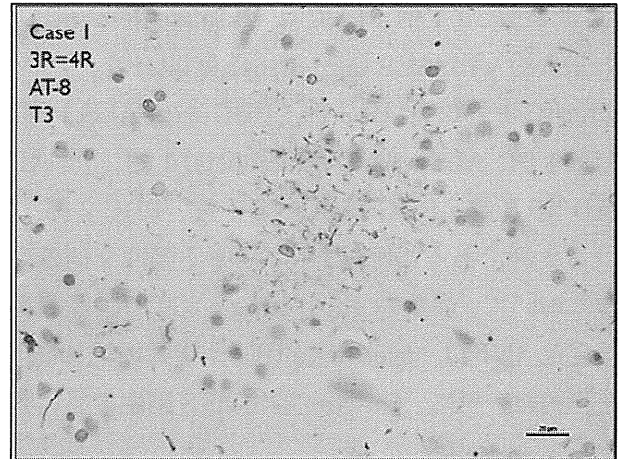
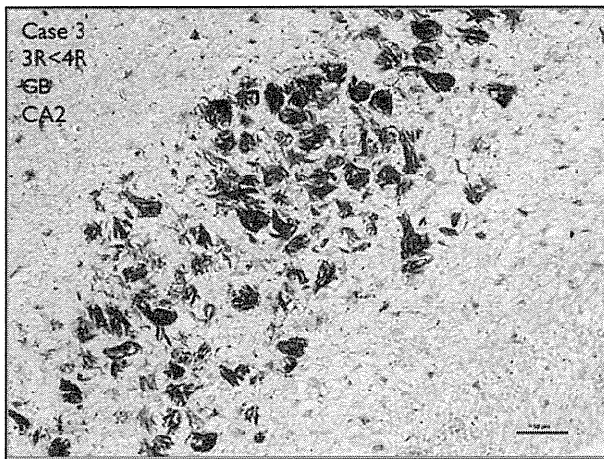


Figure 2. The summary of clinical characteristics and neuropathological findings in nine Kii ALS/PDC cases.

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.

Figure 3. Typical histopathological findings of Kii ALS/PDC in this study. Numerous tangles in hippocampus of case 3, AT-8 positive subpial thorn shaped astrocyte in case 7, AT-8 positive but GB negative patchy astrocytes in white matter of case 1 and many argyrophilic grains in case 5.



E. 結論

Kii ALS/ PDC のタウオパチーは、アルツハイマー一型老年性変化との共通点並びに相違点を有する。

F. 健康危険情報

特記事項なし

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

投稿準備中

2. 学会発表

1. 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.

2. 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]

3. 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)

特記事項なし

紀伊半島 H 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¹⁾山崎峰雄²⁾、橋本智代^{1,3)}、森本悟⁴⁾、初田裕幸⁵⁾、村山繁雄⁶⁾、
葛原茂樹⁷⁾、小久保康昌⁸⁾

信州大学医学部神経難病学講座¹⁾、日本医科大学神経内科²⁾、産業医科大学神経内科³⁾、東京都健康長寿医療センター神経内科⁴⁾、慶應義塾大学医学部生理学教室⁴⁾、三重大学医学部医学系研究科腫瘍病理学講座⁴⁾、東京都健康長寿医療センター病理診断科⁵⁾、高齢者ブレインバンク⁵⁾、東京都健康長寿医療センター神経内科⁶⁾、高齢者バイオリソースセンター⁶⁾、鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療福祉学科⁷⁾、三重大学大学院地域イノベーション学研究所⁸⁾

研究要旨

臨床的および神経病理学的に類似性が指摘されて来た紀伊半島とグアム島のパーキンソン認知症 (PDC) 例と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 例の脳内タウ陽性構造物の異同を検討した。紀伊半島 H 出身の 5 剖検例 (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 (全例 PDC) を用いた。大脳、脳幹、小脳にヘマトキシリン-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) 免疫染色等を施行し光学顕微鏡観察した。紀伊半島剖検例とくに PDC-ALS のリン酸化タウ免疫染色所見には、グアム PDC 症例との顕著な類似性が認められた。それらは、granular hazy astorcytic inclusions、tau-positive fine granules という、グアム島症例に特異的、として報告されて来た所見 (Oyanagi K, et al. 1997, Yamazaki M, et al. 2005) が紀伊半島症例にも認められたことである。また、紀伊半島症例で、リン酸化タウ陽性所見が、ALS では少なく、PDC-ALS では多い傾向も、グアム島症例 (Oyanagi K, et al., 1994) と類似していた。一方、大脳白質や皮質でリン酸化タウ陽性アストロサイトは、紀伊半島 PDC-ALS 症例がグアム PDC 症例より多く出現していた。

A. 研究目的

紀伊半島とグアム島ではパーキンソン・認知症 (PDC) と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) が多発し、双方の PDC も ALS も、タウオパチーと TDP-43 オパチーの神経病理学的所見を示すことが報告され、それらの類似性/共通性が指摘されて来た^{1,2)}。今回は、とくにグリアのリン酸化タウ陽性所見を中心に紀伊半島とグアム島の症例を神経病理学的に比較検討する。

B. 研究方法

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 μ 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。

(倫理面への配慮)

全ての症例で、本人へ生前、または本人の死後ご家族へのインフォームドコンセントがそれぞれの医療施設、研究機関でなされている。今回の検索では遺伝子の解析はせず、病理学的検索では、個人が

特定出来ないように配慮して行う。全体としてヘルシンキ宣言に則って実施する。

C.研究結果

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)、プレタングル、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)³⁾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)⁴⁾(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。

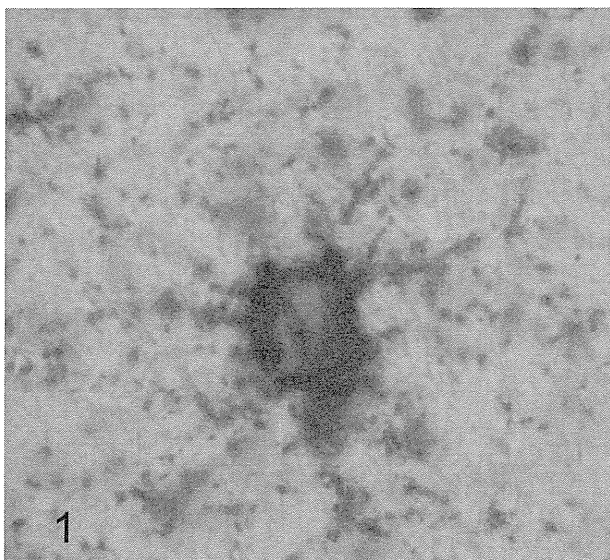


図1. グアム島PDC大脳皮質の Granular hazy astrocytic inclusion (brown; phosphorylated tau, green; glial fibrillary acidic protein)

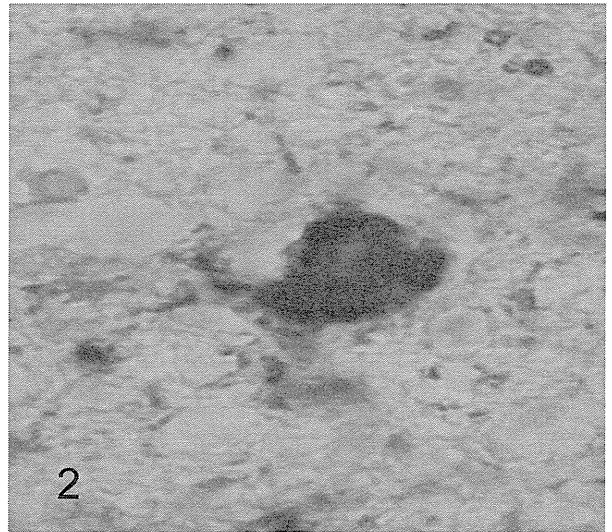


図2. 紀伊PDC-ALS大脳皮質の Granular hazy astrocytic inclusion (brown; phosphorylated tau, green; glial fibrillary acidic protein)

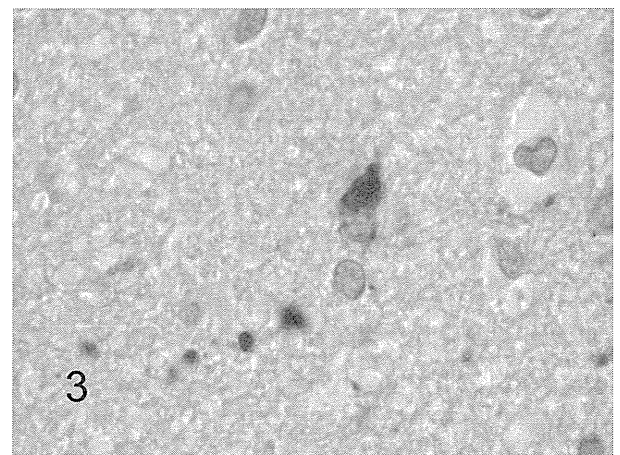


図3. グアム島PDC大脳白質の Tau-positive fine granules (brown; phosphorylated tau)

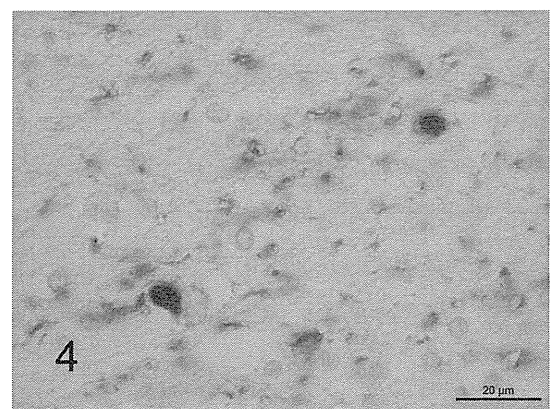


図4. 紀伊PDC-ALS大脳白質の Tau-positive fine granules (brown; phosphorylated tau)

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

I. 文献

1. Shiraki H, Yase Y, Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the Kii Peninsula: comparison with the same disorders in Guam and with Alzheimer's disease. In: Handbook of Clinical Neurology, Vol 15(59): Disorders of the Motor

System. Ed. JMBV de Jong, Elsevier, Amsterdam, Chapter 16, p273-300, 1991

2. Kuzuhara S, Kokubo Y, Sasaki R, Narita Y, Yabana T, Hasegawa M, Iwatsubo T, Familial amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii Peninsula of Japan: Clinical and neuropathological study and tau analysis. *Ann Neurol* 49: 501-511, 2001
3. Oyanagi K, Makifuchi T, Ohtoh T, Chen K-M, Gajdusek DC, Chase TN, Distinct pathological features of the Gallyas- and Tau-positive glia in the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:308-316, 1997
4. Yamazaki M, Hasegawa M, Mori O, Murayama S, Tsuchiya K, Ikeda K, Chen K-W, Katayama Y, Oyanagi K, Tau-positive fine granules in the cerebral white matter: a novel finding among the tauopathies exclusive to parkinsonism-dementia complex of Guam. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:839-846, 2005
5. Oyanagi K, Makifuchi T, Ohtoh T, Chen K-W, van der Schaaf T, Gajdusek DC, Chase TN, Ikuta F, Amyotrophic lateral sclerosis of Guam: the nature of the neuropathological findings. *Acta Neuropathol* 88:405-412, 1994

多発地 ALS 患者と住民における毛髪中元素と生活習慣の関連に関する検討

紀平 為子¹⁾, 櫻井威織¹⁾, 吉田宗平¹⁾, 若山育郎¹⁾, 高宮幸一²⁾, 中野幸廣²⁾,
奥村良²⁾, 飯沼勇人²⁾, 和田幸子³⁾, 岩井恵子³⁾, 岡本和士⁴⁾, 小久保康昌⁵⁾, 葛原茂樹⁶⁾

1: 関西医療大学保健医療学部, 2: 京都大学原子炉実験所, 3: 関西医療大学保健看護学部,

4: 愛知県立大学看護学部, 5: 三重大学大学院地域イノベーション学研究科,

6: 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部

研究要旨 紀伊半島串本 (K) 地域での ALS 多発の要因として酸化ストレスの関与が推察される。本研究では、毛髪中の金属含量と生活・食習慣の関連を検討した。対照 20 名, K 地域住民 87 名, K-ALS 7 名, 穂原 PDC 4 名, 孤発性 ALS 10 名から化学処理のない頭髪が得られ放射化分析を実施した。K 住民と対照住民には生活習慣のアンケート調査を実施した。K-ALS 患者の頭髪中に V と Mn の高値を認めた (各 $p < 0.05$)。頭髪中 V や Mn 値は Al 値と正相関し、漬け物摂取や畑仕事の頻度と関連が認められた ($p < 0.05$)。本地域 ALS 患者ではこれら遷移金属による酸化ストレス増大の関与が推察された。

A. 研究目的

紀伊半島串本 (K) 地域の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において有害金属による酸化ストレスの関与を検討するため、毛髪中金属元素含量の測定と酸化ストレスマーカーおよび生活・食習慣調査を実施し、その関連を検討した。

B. 研究方法

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¹⁾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 μ l 採取し濾紙に滴下した。S は (NH₄)₂SO₄(w) GR (8.241g)を蒸留水で溶解し 1000 μ 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。

(倫理面への配慮)

生体試料採取や臨床・個人情報収集に際して倫理的側面に充分配慮し、文書を用いた説明と本人の自由意志による同意を得てから実施した。本研究は関西医療大学倫理審査委員会で承認を得た(10-03)。

C. 研究結果

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)。

D. 考察

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 状態下で、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。漬け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, H_2O_2 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。

E. 結論

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。

本研究の一部は、科学研究費助成事業(科学研究費補助金)から助成を受け、当該報告書に報告した(課題番号 22590967)。

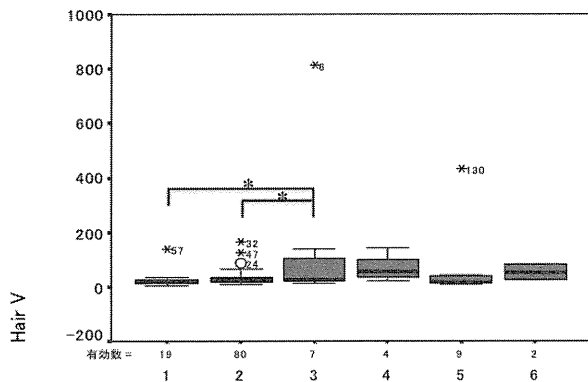


図 1. 頭髪中のバナジウム(V)含量の比較

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, *: $p < 0.05$.

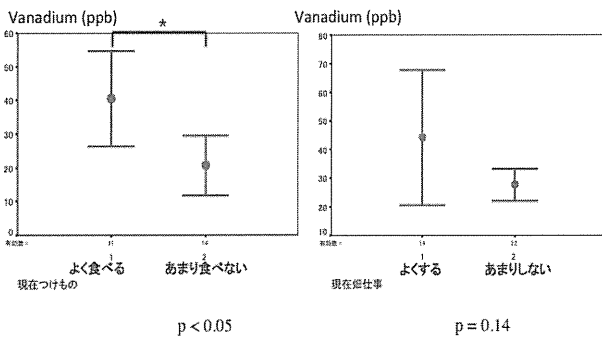


図 2. 生活習慣と頭髪中 V 含量との比較

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。

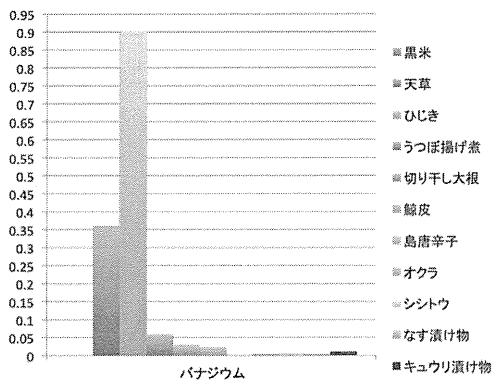


図 3. 食品中の V 含量

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。

文献

1. 紀平為子他, 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業卒婁病の実態の把握と治療指針作成平成 23 年度総括・分担研究報告書, p. 24-27.
2. Garruto RM et al. In: Chen KM, Yase Y, ed, ALS in Asia and Oseania, 1984, p. 265-330.
3. Assem FL and Levy LS. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2009; 12: 289-306.
4. Huang C et al. J. Biol. Chem. 2000; 275: 32516-32522.
5. Ngwa HA et al. Toxicol Appl Pharmacol. 2009; 240: 273-285.
6. Roos PM et al. Biol Trace Elem Res. 2013; 151: 159-70.

F.健康危険情報：なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 学会発表

1. 紀平 為子, 岡本和士, 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.
2. 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.

H.知的所有権の取得状況(予定を含む)

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし
- 3.その他：なし

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¹⁾

江上いすず²⁾ 紀平為子³⁾ 葛原茂樹⁴⁾ 小久保康昌⁵⁾

¹⁾ 愛知県立大学看護学部・疫学

²⁾ 名古屋文理大学³⁾ 関西医療大学⁴⁾ 鈴鹿医療科学大学

⁵⁾ 三重大学大学院地域イノベーション学研究科

研究要旨

〔目的〕紀伊半島南部ではかつて ALS の多発が認められていたが、近年では発症率の低下が認められてきた。これまで、この変化に影響を与えた要因、特に環境及び生活関連要因の解明に関する検討は私の知る限り皆無である。かつて発表者は ALS の発症に栄養要因が関連することを報告した。そこで、本研究では物が ALS 多発の容疑要因としての可能性を探ることを目的に、ALS の多発地である紀伊半島と非多発地域の栄養要因を比較検討に加え、愛知県で行われた症例対照研究の結果も踏まえ、因果関係を判定する 5 条件を用いて、干物と ALS の多発の因果関係に関する検討を行った。〔方法〕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。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。

〔結果〕症例対照研究から干物を多く摂取するものの ALS のリスクは有意に高いとする結果から、「関連の時間性」が、さらに干物の摂取頻度の増加とともにそのリスクも有意に上昇していたことから「関連の強固性」が確認された。また多発地の K 町と対照の H 村の比較でも、干物を多く摂取することによるリスクは 4 倍高く、しかも有意であった。このことから「関連の一致性」が確認された。症例対照研究で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、さらに多発地である K 町と O 町で干物の高頻度者の割合が愛知対照群に比べ顕著に高かったことから、「関連の特異性」が確認された。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ことから、「関連の整合性」が確認された。〔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つ、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

A. 研究目的

紀伊半島南部は、神経難病である筋萎縮性側索硬化症と認知症を伴うパーキンソン症候群の多発地帯であることが、以前から知られている。さらに、本地域にはパーキンソン病に似た運動障害と認知症を特徴とするパーキンソン認知症複合と呼ばれる疾患も多く見られる。これまでこれまでに飲み水や食べ

物などの環境要因に関する調査研究は行われてきたが、未だその原因は不明である。さらに、近年は発症率の低下が報告されてきた。この変化には主に生活関連要因の影響が大きいと推測されるも、その解明に関する検討は、私の知る限り皆無である。23 年度の班会議で、因果関係は明らかでないが ALS の多発地域の住民の食事内容から油脂の酸化の指標であ

る過酸化物質を多く含む干物はその容疑要因である可能性を報告した。そこで本研究では干物が ALS 多発の容疑要因としての可能性を探ることを目的に、ALS の多発地である紀伊半島と非多発地域の栄養要因を比較検討に加え、愛知県で行われた症例対照研究の結果も踏まえ、因果関係を判定する 5 条件を用いて、干物と ALS の多発の因果関係に関する検討を行った。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果及び考察

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。時間の先行性が認められた。

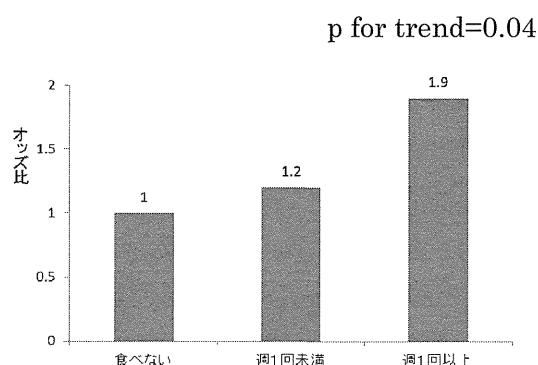
表 1. 愛知県における 症例対照研究の結果

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		

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 1)。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

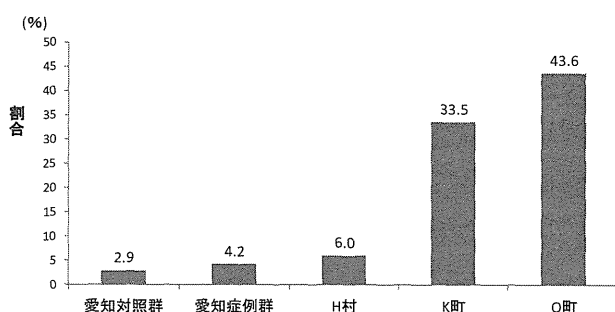
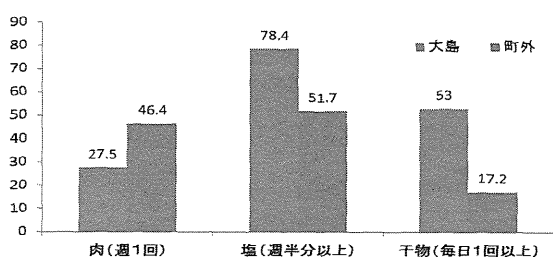


図 3 15 歳までの食品頻度摂取の比較



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、酸化して 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。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、多発地におけるこれらの事実は原の報告を裏付けるものと考えられた。

さらに、また、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物価を測定した結果、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。

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

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

2.学会発表

1. 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.
2. 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.

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし

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班
(分担)研究報告書

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

研究分担者
とみやまひろゆき
富山弘幸¹⁾

共同報告者
なかねしゅんや はつ通りのぶたか
中根 俊成²⁾、服部信孝¹⁾

- 1) 順天堂大学脳神経内科/神経変性疾患病態治療探索講座
- 2) 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

研究要旨

〔目的〕ALS/PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis / Parkinsonism-Dementia Complex)は本邦で紀伊半島だけに存在する風土病なのか、について検討する。その上で、ある特定の遺伝的背景と環境因子が存在しないか、についても検討する。

〔方法〕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。

〔結果及び考察〕1 例 68 歳女性、佐賀県出身の症例で孤発性 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、歩行障害で発症した。その後四肢腱反射亢進、物忘れ、無為、表情の乏しさ、小声を生じ、嚥下障害、呼吸不全から経管栄養・人工呼吸管理を開始された。本症例は比較的急速にパーキンソニズム、認知症及び運動ニューロン徴候を合併し進行してきており、臨床像からは ALS/PDC の範疇に入る症例と考えられた。候補遺伝子解析を行っているが、今のところ明らかな責任遺伝子変異は見つかっていない。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。

〔結論〕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る。本症例の臨床的、遺伝学的評価が進むとともに、疾患の解明に向け、今後さらなる疫学調査、環境因子の調査、遺伝子解析の進展が期待される

A.研究目的

ALS/PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis /

Parkinsonism-Dementia Complex)は本邦で紀伊半島

だけに存在する風土病なのか、について検討する。

その上で、ある特定の遺伝的背景と環境因子が存在しないか、についても検討する。

B.研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究では個人の遺伝情報を取り扱うため、DNA, RNA 検体採取にあたっては研究対象者、研究協力者の不利益・危険性が排除されるよう説明と同意を得た。研究者は個々人の特定ができないように配慮するとともに、得られた個人情報については人権擁護のため法令等を遵守のうえ厳重に管理し、漏洩等のないように十分注意して遺伝子解析、研究を遂行した。これらは倫理委員会の承認に基づいた。

C.研究結果

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ン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。

D.考察

以上の所見、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。

E.結論

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。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

Tomiyama H. C9orf72 in Japanese amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Rinsho Shinkeigaku. 2013;53:1074-6.

2.学会発表

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.

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：特になし

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¹⁾、石浦浩之¹⁾、三井純¹⁾、Budrul Ahsan¹⁾、福田陽子¹⁾、後藤順¹⁾
小久保康昌²⁾、葛原茂樹³⁾
日笠幸一郎⁴⁾、吉村淳⁴⁾、土井晃一郎⁴⁾、森下真一⁴⁾
原賢寿⁵⁾、西澤正豊⁵⁾
豊田敦⁶⁾、藤山秋佐夫⁶⁾

- 1) 東京大学神経内科
- 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
- 4) 東京大学新領域創成科学研究科
- 5) 新潟大学神経内科
- 6) 国立遺伝学研究所

研究要旨

紀伊 ALS/PDC には強い家族集積性が存在するため、遺伝素因の存在が考えられている。疾患遺伝子を探索するにあたり、紀伊 ALS/PDC の地域集積性に着目し、共通する変異・創始者ハプロタイプの探索を全ゲノム配列解析と高密度一塩基多型を用いた homozygosity haplotype 法を用いて行ったが、明らかに疾患に関与する共通変異・創始者ハプロタイプを見出すことはできなかった。両手法の限界点はあるものの、病原遺伝子が単一でない可能性（genetic heterogeneity）や、疾患感受性遺伝子が関与する complex trait の可能性も考慮する必要があると考えられた。

A.研究目的

紀伊 ALS/PDC は、運動ニューロン症状に加えパーキンソニズム、認知症を伴い、病理学的に広範な tau の沈着を認める特徴的な疾患である。家族集積性が認められ、遺伝学的素因が強く発症に関わると推定される。これまで、1つの大家系について、パラメトリック、ノンパラメトリック連鎖解析を行ってきたが、特定の領域に連鎖領域を絞り込むまでには至っていない。これは、inbred の要素も存在すると考えられること、診断

の確実性や、高齢発症であることから浸透率の要素も考慮に入れられない可能性など、さまざまな可能性を考慮する必要があると思われる。もう一つのアプローチとして、病理学的診断が確認されている剖検例について全ゲノム配列解析を行い、エクソン領域において症例間で共有されている変異の検索を行ったが、病原性変異を特定できていない。このような背景から、大家系（A 家系）に属するさらに2名（うち1名が剖検例）の全ゲノム配列解析を追加し、非翻訳領域・遺伝

子間領域を含めて発症者に共通する変異の解析を行った。また、創始者ハプロタイプの存在を仮定し、剖検例 15 例について homozygosity haploype 法を用いて創始者ハプロタイプの検出を試みた。

B.研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会からの承認を受けて実施した。

C.研究結果

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。

D.考察

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。

E. 結論

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り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。

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

なし

2. 学会発表

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

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 1)東京大学大学院医学系研究科 分子脳病態科学

間野 達雄 2)東京大学大学院医学系研究科 神経内科

研究要旨

牟婁病の分子病態を明らかにするためには脳内、それも神経細胞内でどのような遺伝子発現変化が生じているかを検討する必要がある。このためには神経細胞特異的な遺伝子発現変化を捉える技術が必要となるが、我々は神経細胞核を特異的に分離する事で特異的なエピゲノム変化を捉える方法を採用し、特にゲノムメチル化に注目して検討を行った。これにより 471 と非常に多数の遺伝子のメチル化が正常対照と比べて変化していることを明らかにした。また、ALS, PDC の病型間で比較したところ、3つの遺伝子のメチル化が有意に変化している事を明らかにした。

A.研究目的

牟婁病はその地域集積性から家族性もしくは風土病であることが想定されながら現在まで明らかな原因は特定されていない。また、近年臨床病型は ALS に比して PDC が多くなっており、何らかの環境要因の関与も考えられる。本研究では、病因、環境因双方を反映する因子として、1. エピゲノムのうちゲノム CpG メチル化の変化を測定する事で牟婁病特異的な変化を同定すること、及び 2.臨床病型の違いが DNA のメチル化変化によって切り分けることができるかを明らかにすることにより、これら病態の分子基盤を解明することを目的とする。

B.研究方法

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

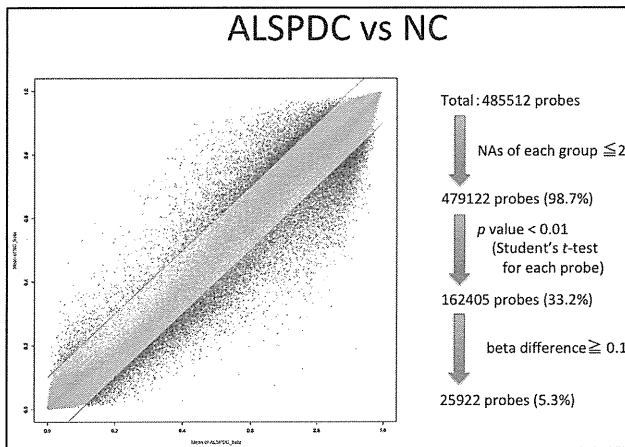
した DNA は Bisulfite 変換を行い、Illumina 社製 HumanMethylation450 BeadChip を用いてゲノム上の各 CpG についてメチル化の定量を行った。

(倫理面への配慮)

検体はすべて文書による同意取得済みであり、匿名化されている。当該課題は東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて審査の上承認されている(2186-(7))。

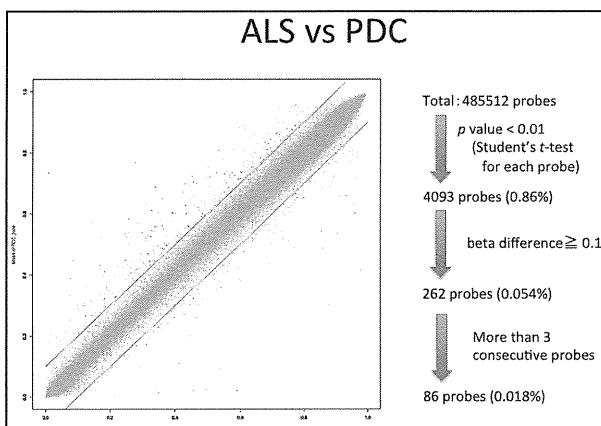
C.研究結果

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、β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を仮定して、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プローブまでの絞り込みを行った。これらのプローブのうち、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、

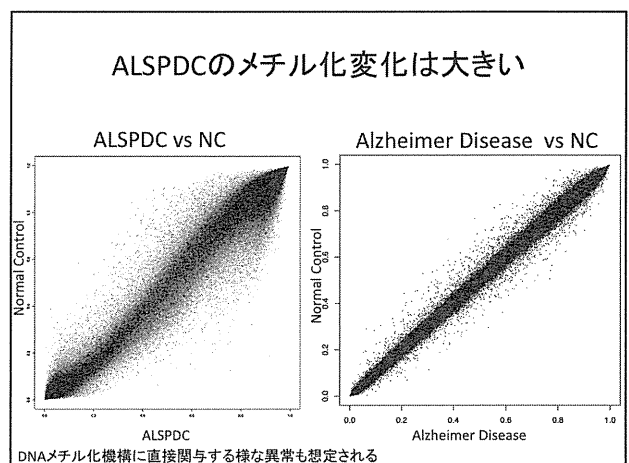


Dandy Walker syndrome(先天性小脳形成異常)の原因遺伝子の一つである。

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。

D.考察

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。

E.結論

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。

F.健康危険情報

なし