

- 関与はあるのか? : あなたも名医!パーキンソン病 Q&A version 2. 日本医事新報 jmed mook 第 23 号 2012;23:17-24.
21. Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M, Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan, *Amyotroph Lateral Scler.*2007; 8 : 300-304.
 22. Kihira T Kanno S, Miwa H, Okamoto K, Kondo T, The role of exogenous risk factors in amyotrophic lateral sclerosis in Wakayama, Japan, *Amyotroph Lateral Scler.* 2007; 8 : 150-156.
 23. Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, v Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M, Fruit and Vegetable Intake and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Japan, *Neuroepi.* 2009; 32 : 251-256.
 24. Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y, Nagai M, Lifestyle Factors and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case-Control Study in Japan, *Ann Epidemiol.*2009; 19 : 359-364.
 25. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S. α -Synuclein Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71:625-30.
 26. Kokubo Y, Nomura Y, Morimoto S, Kuzuhara S. Cardiac (123)I-meta-iodobenzylguanidine scintigraphy in patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. *Parkinsonism and Related Disorders* 18 (2012) 306–308
 27. Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S, Goto J. Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population. *Amyotroph Lateral Scler.* 13:562-566, 2012
 28. Tameko Kihira, S Yoshida, T Kondo, K Iwai, S Wada, S Morinaga, Y Kazimoto, T Kondo, K Okamoto, Y Kokubo, S Kuzuhara. An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960-2009: A possible link to change in drinking water source. *Amyotrophic Lateral Sclerosis,* 2012; 13: 347-350
 29. Kuzuhara S, Kokubo Y. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula of Japan (Muro disease): a review w on recent research and new concept. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and the frontotemporal dementias.* Oxford University Press, Ed. By Michael J. Strong 2012, pp39-54.
 30. Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ranum LP, Tamaoki T, Ichikawa Y, Date H, Goto J, Tsuji S. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol* 2012;69:1154-8.
 31. Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, Chiò A, Restagno G, Nicolaou N, Simon-Sanchez J, van Swieten JC, Abramzon Y, Johnson JO, Sendtner M, Pamphlett R, Orrell RW, Mead S, Sidle KC, Houlden H, Rohrer JD, Morrison KE, Pall H, Talbot K, Ansorge O; Chromosome 9-ALS/FTD Consortium; French research network on FTLD/FTLD/ALS; ITALSGEN Consortium, Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M,

- Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012;11:323-30.
32. Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S, Goto J. Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population. *Amyotroph Lateral Scler* 2012;13:562-6.
33. Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, Murayama S, Kitamoto T. Enhanced antigen retrieval of amyloid β immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid β pathology in Alzheimer disease and its mouse model. *J Histochem Cytochem*. 2012 Oct;60(10):761-9.
34. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet*. 2012 Aug 10;91(2):320-9.
35. Saito Y, Inoue T, Zhu G, Kimura N, Okada M, Nishimura M, Kimura N, Murayama S, Kaneko S, Shigemoto R, Imoto K, Suzuki T. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and A β generation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2012 Oct 3;7:50.
36. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain*. 2012 Nov;135(Pt 11):3380-91.
37. Kakuda N, Akazawa K, Hatsuta H, Murayama S, Ihara Y; The Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Suspected limited efficacy of γ -secretase modulators. *Neurobiol Aging*. 2013 Apr;34(4):1101-1104.
38. Murayama S, Saito Y. [Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis in relation with pathological pattern of propagation]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2012;52(11):1066-7.
39. Hasegawa M, Nonaka T, Suzukake M, Tsuji H, Tamaoka A, Yoshida M, Murayama S, Arai T, Akiyama H. [Prion-like protein propagation in neurodegenerative diseases]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2012;52(11):1325-6.
40. Kokubo Y, Nomura Y, Morimoto S, Kuzuhara S. Cardiac ¹²³I-meta-iodobenzylguanidine scintigraphy in patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18:306-8.
41. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M,

- Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S. α -Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Jul;71(7):625-30.
42. Kamiya H, Murayama S, Funabe S, Saito Y, Fukuda T. [An 87-year-old Man with Mild Cognitive Impairment, Accompanying Possible Drug-induced Parkinsonism]. *Brain Nerve*. 2012 Dec;64(12):1435-42.
43. Tuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, Murayama S, Sobue G, Yamanaka K. Spliceosome Integrity is Defective in the Motor Neuron Diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med*. 2012 Dec 19.
44. Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama M, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DMA, Tamaoka A (2012). Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135: 3380–3391.
45. α -Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. Kokubo Y, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kuzuhara S. *ほか* *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Jul;71(7):625-30.
- international congress on mental disorders & other non-motor features in Parkinson's disease and related disorders. MDPD 2013.
2. Satoru Morimoto, Yasumasa Kokubo, Hiroyuki Hatsuta, Shigeki Kuzuhara, Shigeo Murayama. Immunohistochemical study of the cerebellum in amyotrophic lateral sclerosis (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. 岡本和士, 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. 岡本和士, 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.
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 :

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

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].
18. T Kihira, I Sakurai, S Yoshida, et al. Neutron activation analysis for trace elements in scalp hair from ALS patients and residents of the Kii Peninsula, Japan. 23rd International symposium on ALS/MND, Chicago, USA, 5 December-7 December 2012.
19. 紀平為子、櫻井威織、吉田宗平、他. 多発地 ALS・PDC の環境要因の検討—放射化分析による毛髪中元素濃度定量—. 第 53 回神経学会総会、東京、2012 年 5 月
20. H. Tomiyama, H. Yoshino, K. Ogaki, L. Li, C. Yamashita, Y. Li, M. Funayama, R. Sasaki, Y. Kokubo, S. Kuzuhara, and N. Hattori. Mutation analysis for *PLA2G6* in patients with Parkinson's disease / frontotemporal type of dementia. (17 Jun, 2012. Movement Disorders, Dublin, Ireland)
21. H. Tomiyama, C. Yamashita, R. Sasaki, Y. Li, M. Funayama, N. Hattori, S. Kuzuhara, and Y. Kokubo. No association between *ATXN2* (*SCA2*) CAG repeat expansion and amyotrophic lateral sclerosis /parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. (7 Nov, 2012. The American Society of Human Genetics, ASHG 62nd Annual Meeting. San Francisco, USA)
22. 石井英子、藤原奈佳子、岡本和士: ALS 機能評

- 価スケールと骨量計を用いた在宅療養 ALS 患者評価. 日本公衆衛生学会.2012. 山口
23. 石井英子、藤原奈佳子、岡本和士. 在宅療養におけるALS患者の嚥下状況とALS機能評価スケールとの関連、日本疫学会. 2013、大阪.
 24. 岡本 和士、紀平為子、小久保康昌、阪本 尚正、小橋 元、鷺尾 昌一、三宅 吉博、横山 徹爾、佐々木 敏、稲葉 裕、永井正規. 筋萎縮性側索硬化症発症関連要因解明に関する疫学的研究. 日本疫学会. 2013、大阪.
 25. Okamoto K , Kihira T, Was dried fish a trigger of high-incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Kii peninsula, Japan?. 第 23 回 ALS /MND 国際シンポジウム. 2013. Chicago.
 26. Shigeki Kuzuhara、 Yasumasa Kokubo. Changing patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parkinsonism-dementia complex (PDC) of the Kii peninsula in Japan. 13th Asian Oceanian Congress of Neurology.2012.6.4-8. Melbourne, Australia
 27. Satoru Morimoto,Yasumasa Kokubo, Masato Hasegawa, Shigeki Kuzuhara,Shigeo Murayama. Immunochemical Study Western blotting of tauopathy in ALS/ Parkinson Dementia Complex (PDC), Kii ,Japan. AANP.2012.6.21-24.Chicago, USA
 28. Yasumasa Kokubo, Akira Taniguchi, Masato Hasegawa, Yuma Hayakawa, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Yoshihumi Hirokawa, Taizo Shiraiishi, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Shigeki Kuzuhara. Alfa-Synuclein pathology of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. The 8th International Conference on Frontotemporal dementias, Manchester, UK, 2012.
 29. 石浦浩之、小久保康昌、三井純、福田陽子、日笠幸一郎、吉村淳、斉藤太郎、森下真一、豊田敦、原賢寿、西澤正豊、葛原茂樹、後藤順、辻省次. 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) の全ゲノム配列解析による疾患遺伝子の探索。日本神経学会学術大会、2012年5月、東京。
 30. 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. JNEN 2012 [Annual Meeting of the American Association for Neuropathologists, Cicagol]
 31. 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. The Journal of the Alzheimer's Association, 2012 [Alzheimer's Association Internatinal Confernce 12th, Vanccouver].
 32. Hasegawa M, et al (2012) Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester 2012/09/05.
 33. Nonaka T, et al (2012) Intracellular seeding model reproduces characteristic feature of affected neurons in TDP-43 proteinopathy. The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester 2012/09/05.
 34. Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Nonaka T, Hasegawa M (2012) Inoculation of recombinant alpha-synuclein fibrils can induce alpha-synuclein pathology in wild-type mice. The 8th International

Conference on Frontotemporal Dementias,
Manchester 2012/09/05.

35. 江良 択実 ES/iPS 細胞の分化と臨床への応用 第 115 回 日本小児科学会学術集会 総合シンポジウム 2 iPS 細胞を利用した研究の展開 福岡 2012 年 4 月 20 日
36. 江良 択実 iPS 細胞研究の進展 第 28 回 日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会 特別講演 福岡 2012 年 4 月 21 日
37. 江良 択実 初心者でも簡単。センダイウイルスベクターを使った外来因子フリー疾患由来 iPS 細胞の樹立とその応用 第 11 回 日本再生医療学会総会 ランチョンセミナー 横浜 2012 年 6 月 13 日
38. Era, T. Study for iPS cells derived from intractable diseases 第 18 回日本遺伝子治療学会、Corporate Seminer II、熊本、2012 年 6 月 28 日
39. Era, T. Studying the intractable diseases using pluripotent stem cells 第 18 回日本遺伝子治療学会、Symposium III、熊本、2012 年 6 月 29 日

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/2012/0908.html>

H.知的所有権の取得状況

1.特許取得

神経変性疾患関連タンパク質の不溶性凝集体の増幅方法, 野中隆, 増田雅美, 山下万喜子, 秋山治彦, 長谷川成人,

国際出願番号 PCT/JP2012/062794

国際出願日 2012/05/18

2.実用新案登録 なし

3.その他

1. 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>

2. 2012 年 9 月、英国科学雑誌「Brain (ブレイン)」での論文発表について、東京都広報部よ

資料. 紀伊 ALS/PDC

疾患概念・診断基準・重症度分類

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。

資料. 平成 24 年度総括研究報告

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）について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 財団法人東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)と現在との違いを、「よく食べた」(毎日~隔日程度)、「減多に食べなかった」(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 PDC3 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)アルカリホスファターゼ染色 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) を適当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。

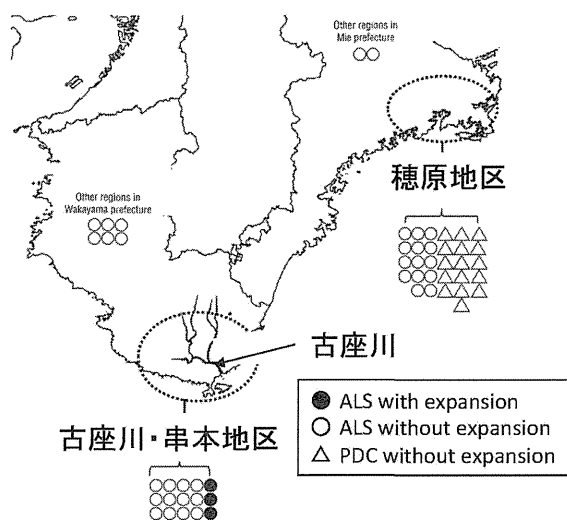
(倫理面への配慮を含む)

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 ヶ月)。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: 顕微鏡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

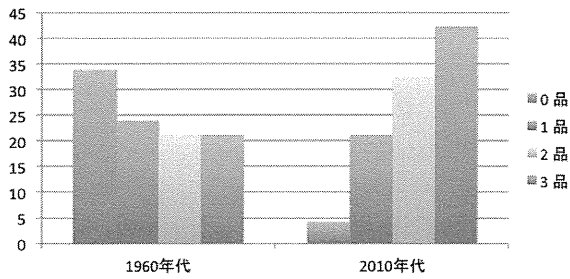


図 2. 欧米化食品を「よく食べた」と回答した住民の割合。欧米化食品として、乳製品、卵料理、野菜サラダとした。副食に欧米化食品を多く摂る住民では主食に「食パン」を摂るものが有意に多かった ($p < 0.01$)。

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。

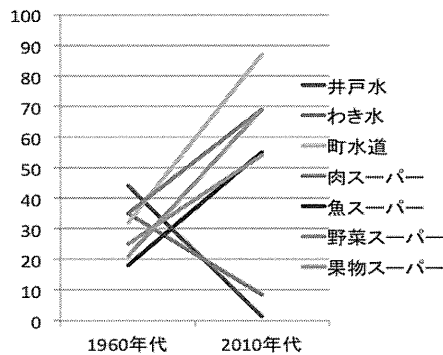


図 3. 生活習慣の変化

「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

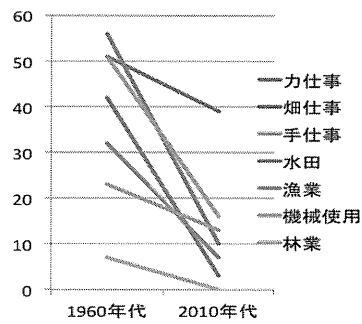


図 4. 仕事の変化。「よくした」「減多にしなかった」の 2 項選択で回答を求めた。力仕事や漁業の頻度は著減した。

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

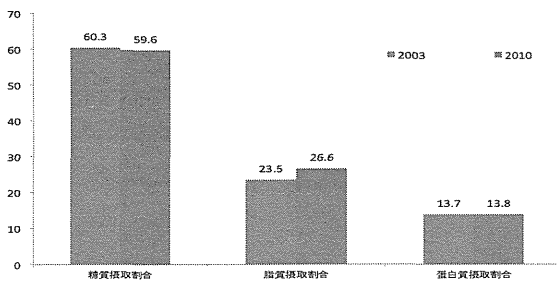


図6 脂肪酸摂取量の年度別比較

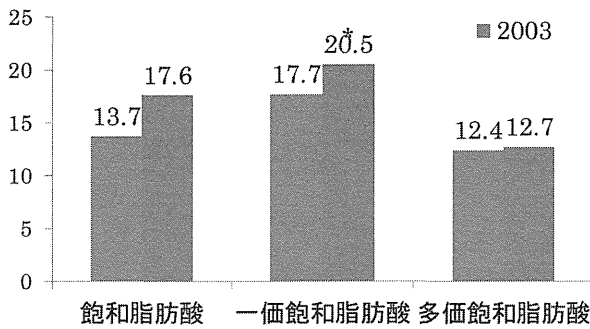


図7 カルシウム、マグネシウム及びコレステロール摂取量の年度別比較

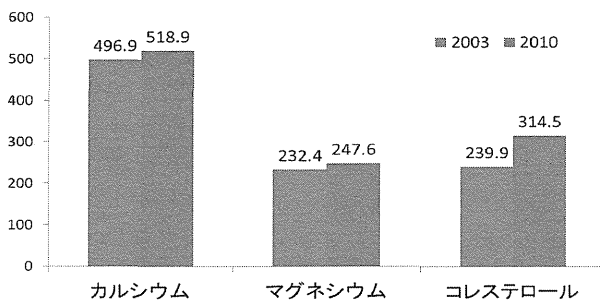


図8 ミネラルおよびビタミン摂取量の年度別比較

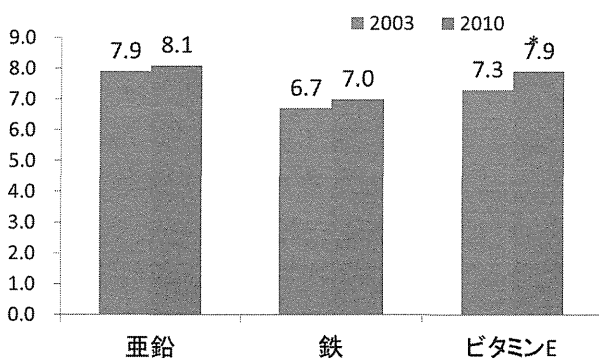
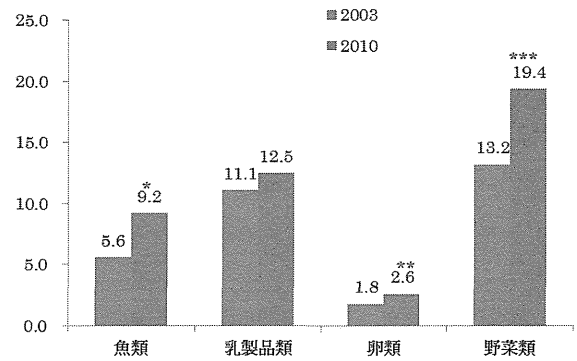
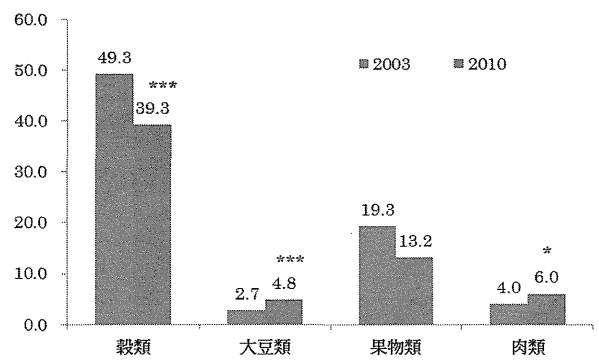


図9 食品摂取頻度割合の年度別比較



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出した。

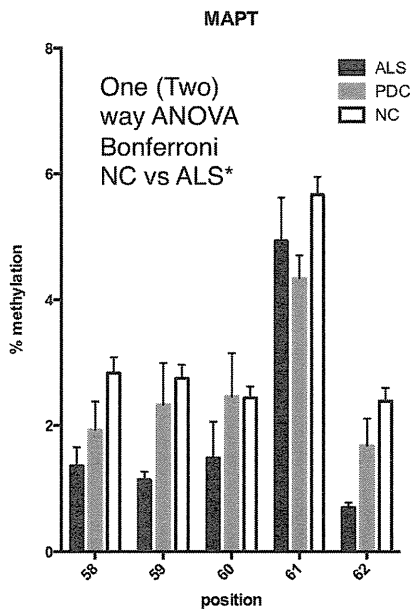
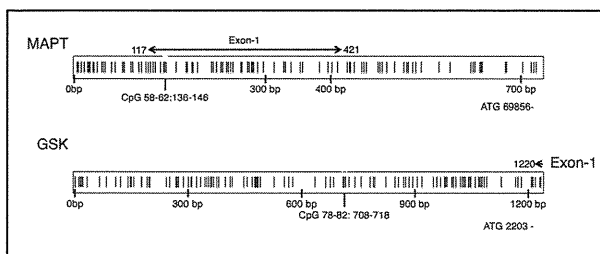


図 12



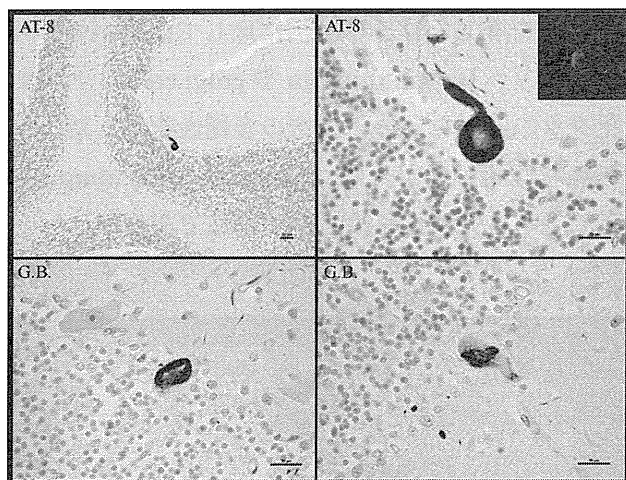
4) Multiple Proteinopathy: ①小脳の免疫組織化学的検討：全例に torpedo と grumose 変性を認め、8例(80%)には多核或いは異常局在を示す Purkinje cells を見いだした。リン酸化タウ陽性構造物は、白質及び歯状核には全例、プルキンエ細胞には5例(50%)に存在した。この5例はPDCの表現型を有し、ALS 単独例に比して病変が強い傾向があり、Bergmann glia や golgi cell にリン酸化タウの蓄積を認め、分布の多様性を示した。小脳症状は認めなかった。ubiquitin, p62, ubiquilin 2 に対する免疫染色は全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

Case#P	Age	Sex	BOI (year)	Phenotype			Types of Aggregation				P-tau pathology						
				A	P	D	Dilatation of PCs	Multinucleated PCs	Torpedos	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	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proportionate							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

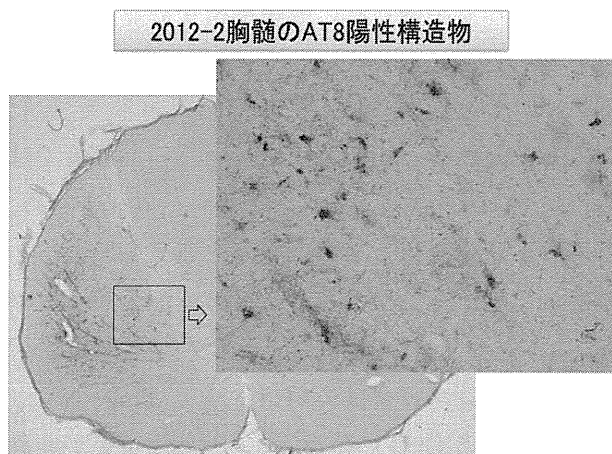


図 15

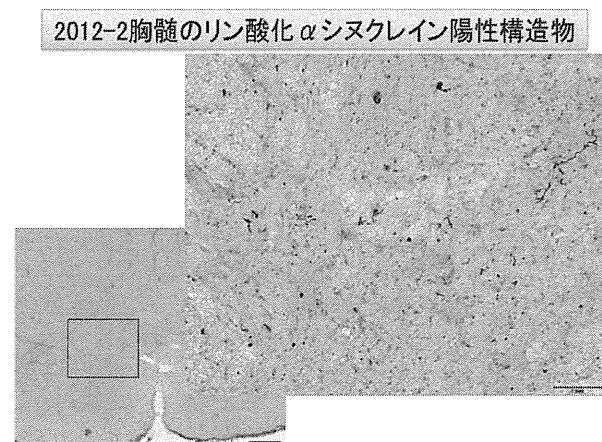
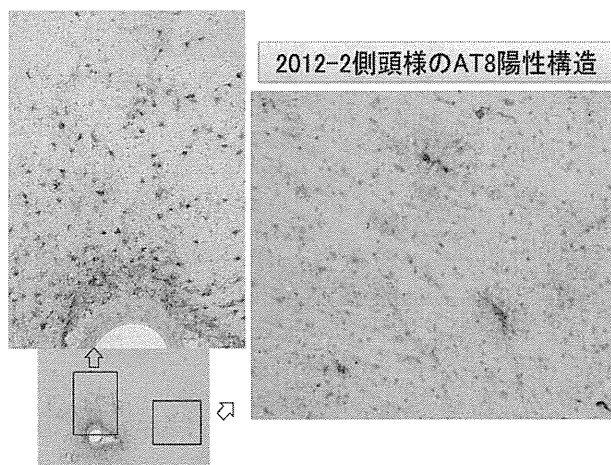


図 16



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

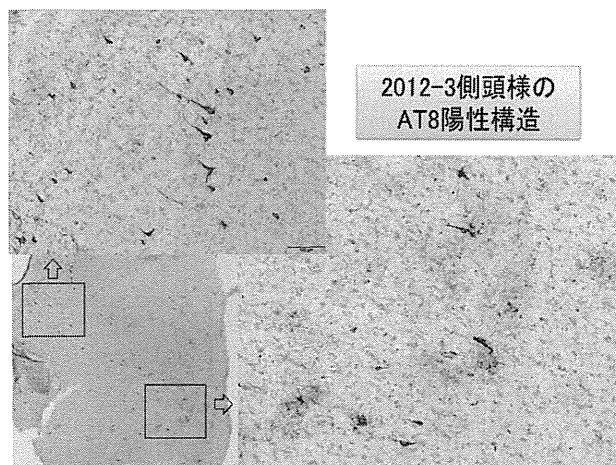
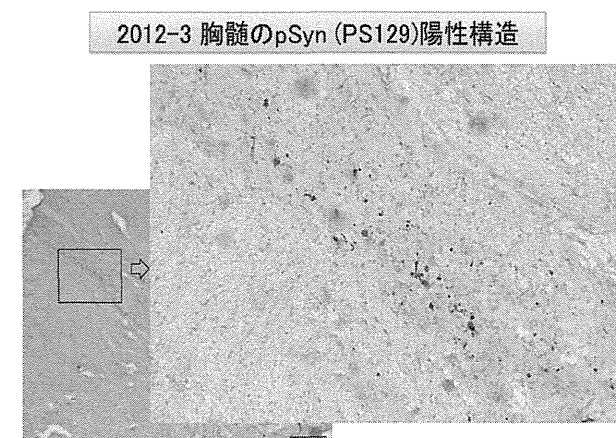
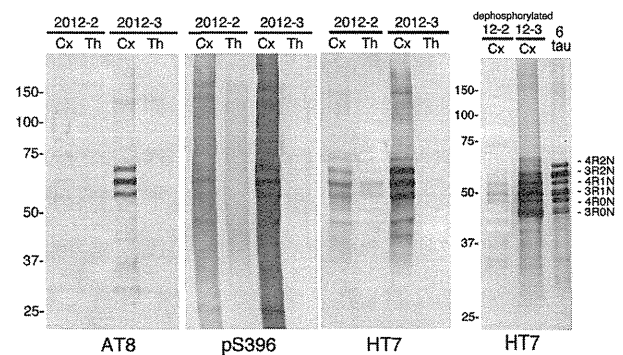


図 18



012-2, 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