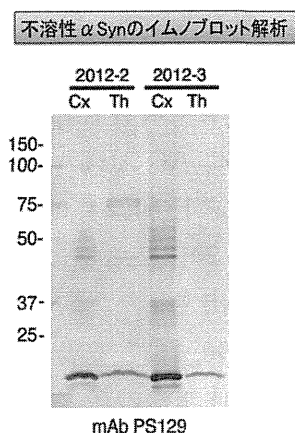


図 20



一方、リン酸化 TDP-43 のバンドは検出されなかった。

5) iPS 細胞研究 ①iPS 細胞樹立：患者からの同意が得られた 4 例の症例において皮膚生検を行い、うち 3 例から iPS 細胞作成に必要な皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。残り 1 例は培養中に汚染があり破棄した。症例から樹立した皮膚由来線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を行った。線維芽細胞に初期化因子(Oct3/4, Sox2, KLF4,c-Myc) を持つセンダイ・ウイルスを感染させ、感染後 1 週間目にマイトマイシンで処理したマウス胎仔初代線維芽細胞(MEF)上へまきなおした。感染から 14 日後ぐらいからコロニーが出現した。感染から 25 日目にコロニーを顕微鏡下にてピックアップしそれぞれのクローンを培養、増幅した。その後、ウイルス除去のために培養の温度を 38 度へシフトさせた。用いたセンダイウイルスベクターは温度感受性株のために 38 度では増殖が停止し、結果としてウイルスベクターフリーの iPS 細胞を得ることができる。PCR にてウイルス除去を確認した後、未分化マーカーの発現を免疫染色と RT-PCR にて調べ、iPS 細胞であることを確認した。この研究で計 2 症例から 10 数株のウイルスベクターフリーの iPS 細胞株を樹立した(図 21)。

図 21

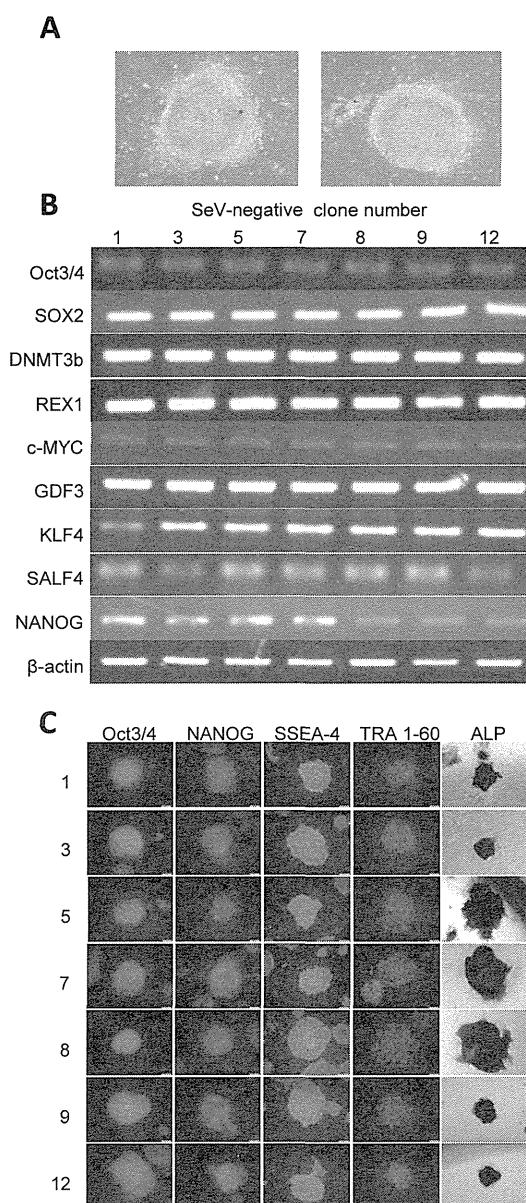


図 1 樹立したiPS細胞

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

② 牟婁病患者由来 iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導：4 例の患者線維芽細胞から iPS 細胞が樹立された。iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導は、理化学研究所より譲渡された正常ヒト iPS 細胞を用いて、*Nat Protoc.* 2009 ; 4(9):

1295–1304.にあるプロトコールに沿って行い、形態のおよび分化マーカーの発現から運動ニューロンへの分化が確認された。しかし患者由来の iPS 細胞からは神経細胞様の形態を持つものが誘導されたが、運動ニューロンの分化マーカー発現は認められなかった。

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

表 2 やる気スコア：自由時間観察

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

附則（再掲）：牟婁病の診断基準 2010

必須項目

1. 地域性：三重、和歌山両県の南部地域出身もしくは同地域に居住歴を有する。
2. 臨床症状：ALS、パーキンソニズム、認知症のいずれかで発症し、ひとつもしくは複数の症状を呈する。
3. 神経病理学、生化学的所見：古典的な ALS 病理かつ NFTs の広範な出現（脳幹諸核と内側側頭葉は必発、3+4 repeat tau）。

支持項目 A. 牟婁病の家族歴。B. 画像検査で前頭葉 and/or 側頭葉の萎縮または脳血流および糖代謝の低下。C. 特異な網膜症。

注意点：MIBG 心筋シンチは低下する例があり、除外検査にはならない。

確実 (definite)：1+2+3、臨床的にほぼ確実

(probable)：1+2 に支持項目 A, B, C の 1 つを満たす。

可能性がある (possible)：1+2 or 2+3

#### D. 考察

牟婁病の中の C9orf72 変異例：本邦における

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

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

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

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

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

ALS/PDC が発症するという、BMAA の bio-magnification 説を提唱した。BMAA は、AMPA/kainite レセプターを介して運動ニューロンに興奮性毒性を生ずることで神経細胞死を引き起こすとされている。今回の紀伊 ALS/PDC における結果から、少なくとも BMAA が紀伊 ALS/PDC 脳内に蓄積しているという証拠はなく、BMAA が神経変性疾患の普遍的な原因であるとする説に反する。

我が国で食生活や、労働、住環境といった生活環境が大きく変化し、欧米化してきたのは、1960年代くらいからだと考えられる。ALS が減少した要因を生活環境に求めるとすると、現在 ALS/PDC の好発年齢である 60 歳代、70 歳代の住民においては、少なくとも成人以降に受けた環境の影響が大きいということになる。さらにこれらの環境変化は全国的に生じた現象であることから、この地域の宿主側の脆弱性に作用する要因が含まれているのかもしれない。いずれにしても、ALS の臨床像が数十年の間に変化しうるものであるという事実は、他地域の通常型 ALS においても同様の変化を起こしうる鍵が隠されている可能性が高い。

**遺伝的要因**：家系構造に関する追加データにより、連鎖解析を update した。しかしながら、パラメトリック連鎖解析では、phenocopy や低浸透、genetic heterogeneity の影響を強く受けるため、結果の解釈については慎重になるべきであり、確認を行っていく必要があると考えられた。同一家系に属する発症者については共通する variant を持つ可能性が高いと考えられるため、大家系の発症者 2 名について全ゲノム配列解析を追加した。これにより、疾患に関連した variant を同定できる可能性があると考えている。通常の一塩基置換などでは結論がつかない可能性もあり、structural variant や repeat expansion など、次世代シーケンサーで検出困難な variant の検出も積極的に検討していく必要がある。

**エピゲノム解析**：MAPT, GSK 遺伝子において

それぞれ1箇所ずつ正常対照と比べてALSもしくはPDCの表現形間で有意差の見られるCpGを同定した。特にMAPT遺伝子での異常は連続するCpGにおいて共通しており、遺伝子発現変化に与える影響が強いことが想定される。別途行っている解析では、同部位のCpGメチル化低下は下流遺伝子の発現を増加させる可能性が示唆されており、ALSの表現形においてMAPTの発現亢進が想定される。

Multiple Proteinopathy: Kii ALS/PDC患者小脳での広範なAT-8陽性所見の分布を確認し、これまでに一部の進行性核上性麻痺症例にのみ報告のあるプルキンエ細胞におけるリン酸化タウの蓄積を認めた。また、多彩なグリア病変も合わせて存在することを確認した。②異常蛋白質の組織病理、生化学解析：今回解析した2例のPDC症例(2012-2、2012-3)には、タウと $\alpha$ Synの病変が確認されたが、TDP-43の病変は検出できなかった。いずれの症例も神経細胞だけでなく、グリア細胞、特にアストロサイト内の蓄積と思われるタウ病変が共通に観察された。一方、 $\alpha$ Synの蓄積は神経細胞内に限られているように見えた。

生化学解析から、蓄積タウのバンドパターンはAD型を示し、3リピートタウと4リピートタウの両方のアソフォームの蓄積が確認された。組織病理からはアストロサイトなどのグリア細胞内のタウ蓄積が目立つことから、4リピートタウの蓄積が予想されたが、むしろ3リピートタウのバンドが強く検出された。グリア細胞内に蓄積するタウが3リピートタウを含むかどうかはアイソフォーム特異抗体などを用いて解析できれば明確になると思われるが、今回、3リピートタウ特異抗体(RD3)、4リピートタウ特異抗体(RD4)は、いずれもどの病変も染色せず、明らかにすることはできなかった。今後組織に様々な処理を施して、抗体のエピトープ露出した後で解析する必要があると思われる。

今回解析した組織にはTDP-43病変が認められなかった。一方、2例とも $\alpha$ Syn病変が側頭様皮

質だけでなく、脊髄の神経細胞にも強く検出された。またタウ病変は2例とも皮質に強く検出されたが、2012-3の脊髄には病変はごくわずかであった。以上のことは、解析部位の問題もあるかもしれないが、本症例に関しては、タウと $\alpha$ Synの異常病変が臨床症状と関係していて、特にリン酸化 $\alpha$ シヌクレインの神経細胞内蓄積が脊髄の主要な病変である可能性が高いと考えられた。

iPS細胞研究: 患者2例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、その細胞を使ってiPS細胞樹立を行った。iPS細胞樹立の効率は特に健常者と変わりはない。この結果より、この疾患の異常はiPS細胞誘導や細胞のリプログラミングには影響を与えないことが示唆された。iPS細胞から運動ニューロンへの分化誘導は、理化学研究所より譲渡された正常ヒトiPS細胞を用いて、*Nat Protoc.* 2009 ; 4(9): 1295–1304.にあるプロトコールに沿って行い、形態的および分化マーカーの発現から運動ニューロンへの分化が確認された。しかし患者由来のiPS細胞からは神経細胞様の形態を持つものが誘導されたが、運動ニューロンの分化マーカー発現は認められなかった。

臨床研究: 紀伊ALS/PDCの、とくに意欲低下を主体とする認知症症状に対する効果について注目した。症例2で歩行や動作、意欲の改善、症例1で発語量の増加や受け答えの改善と言った反応が見られた。症例3は不変、症例4,5は、易怒性、性的逸脱等があり投与、約3ヵ月で中止した。少数例での検討ではあるが、比較的軽症の患者ではある程度の効果が期待できる可能性がある。

## E. 結論

牟婁病として包含されてきたALSの一部にC9orf72変異例が存在することが明らかとなった。牟婁病のheterogeneityを証明する重要な発見であった。1960年代に比較して現在、紀伊半島南部地域において食生活の欧米化、食品調達の広域化、重労働など身体負荷の軽減など食・生活習慣に著明な

変化があることが確認された。これらが ALS の危険因子とされる酸化ストレスや外傷を軽減する要因として作用した可能性が考えられるが、その機序について今後さらに検討が必要である。栄養状況が改善した事実を鑑みると、栄養摂取状況の変化が ALS 発症頻度の低下に寄与した可能性が示唆された。今後、この寄与の蓋然性を検討するためには発症年齢および出生年別の検討を行うことが必要である。紀伊 ALS/PDC (牟婁病) 脳における神経毒 BMAA の解析をおこなった。紀伊 ALS/PDC での BMAA の神経毒説は、否定的である。次世代シーケンサーを用いた大家系の解析では、さらに検出条件を検討して原因遺伝子に迫る予定である。MAPT 遺伝子の CpG アイランドにおいて ALS の表現形と PDC の表現形で正常コントロールとの比較においてメチル化に違いを認める部位を同定した。小脳におけるタウ病理の特徴を明らかにした。2 例の PDC 患者(2012-2、2012-3)の大脳皮質、胸髄にタウ、 $\alpha$  Syn の蓄積が検出されたが、TDP-43 の蓄積は確認できなかった。いずれの症例も神経細胞だけでなく、グリア細胞、特にアストロサイト内の蓄積と思われるタウ病変が共通に観察され、リン酸化  $\alpha$  Syn の蓄積も神経細胞内に共通に観察された。生化学解析から、蓄積タウのバンドパターンは AD 型を示し、6 種類のアソフォームの蓄積が確認された。また、 $\alpha$  Syn のバンドパターンは DLB のそれと同様と思われた。患者 2 例から iPS 細胞を樹立した。運動ニューロンへの分化誘導が困難な場合、誘導がより容易なドーパミン産生ニューロンを用いて実験を行う必要がある。Muse 細胞の培養系の確立が必要である。牟婁病の病態に酸化ストレス、ニトロ化ストレスが関与しているという前提で、フリーラジカルスカベンジャーの臨床研究を行った。病状が軽度の症例では、エダラボンが有効であったが、重症例では、興奮性や性的逸脱といった陽性症状が見られた。軽症例を対象とした多数例での長期的な QOL 改善効果等についての検討が必要である。今後、さらに環境因子、遺伝素因を含めた病態解明とともに、iPS 細胞を用いた新規治療薬開発が望まれる。

## F.健康危険情報

エダラボン臨床研究において、進行例で高度の認知症例では、易怒性や性的逸脱といった興奮症状を認めた。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. T Kihira, S Yoshida, T Kondo, et al. 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
2. Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R, Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Fujita K, Izumi Y, Kaji R, Hattori N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2012;33:2527.e11-6.
3. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N. *VPS35* mutation in Japanese patients with typical Parkinson disease. *Mov Disord* 2012;27:1413-7.
4. Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya K, Yokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Tomiyama H, Hattori N. Analyses of the *MAPT*, *PGRN*, and *C9orf72* mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19:15-20.
5. 富山弘幸. パーキンソン病の発症に遺伝子の関与はあるのか? : 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.

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
- 10.Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S.  $\alpha$ -Synuclein Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71:625-30.
11. 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
12. 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
- 13.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
14. 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.
15. 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.
16. 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 FTL D/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.
17. 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.
  18. Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, Murayama S, Kitamoto T. Enhanced antigen retrieval of amyloid  $\beta$  immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid  $\beta$  pathology in Alzheimer disease and its mouse model. *J Histochem Cytochem*. 2012 Oct;60(10):761-9.
  19. 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.
  20. 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 $\beta$  generation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2012 Oct 3;7:50.
  21. 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.
  22. Kakuda N, Akazawa K, Hatsuta H, Murayama S, Ihara Y; The Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Suspected limited efficacy of  $\gamma$ -secretase modulators. *Neurobiol Aging*. 2013 Apr;34(4):1101-1104.
  23. Murayama S, Saito Y. [Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis in relation with pathological pattern of propagation]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2012;52(11):1066-7.
  24. 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.
  25. Kokubo Y, Nomura Y, Morimoto S, Kuzuhara S. Cardiac  $^{123}\text{I}$ -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.
  26. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraiishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S.  $\alpha$ -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.
  27. 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.
  28. 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.
29. 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.
30.  $\alpha$ -Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. Kokubo Y, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kuzuhara S. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Jul;71(7):625-30.
- 2.学会発表**
1. 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. 23<sup>rd</sup> International symposium on ALS/MND, Chicago, USA, 5 December-7 December 2012.
2. 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
3. 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)
4. 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)
5. 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
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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
- 10.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
11. Yasumasa Kokubo, Akira Taniguchi, Masato Hasegawa, Yuma Hayakawa, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Yoshihumi Hirokawa, Taizo Shiraishi, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Shigeki Kuzuhara. Alfa-Synuclein pathology of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. The 8<sup>th</sup> International Conference on



Frontotemporal dementias, Manchester, UK, 2012.

12. 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。

13. 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, Cicago]

14. 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].

15. Hasegawa M, et al (2012) Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. The 8<sup>th</sup> International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester 2012/09/05.

16. Nonaka T, et al (2012) Intracellular seeding model reproduces characteristic feature of affected neurons in TDP-43 proteinopathy. The 8<sup>th</sup> International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester 2012/09/05.

17. 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 8<sup>th</sup> International Conference on Frontotemporal Dementias, Manchester 2012/09/05.

18. 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

19. 2. 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

20. 3. 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

21. 4. 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

22. 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

#### H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

##### 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

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>

資料. 平成 25 年度総括研究報告

## 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

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。

#### A.研究目的

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) 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

#### 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)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 高齢者ブレインバンク

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、シントウ、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。

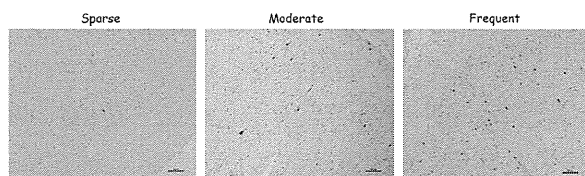
Homozygosity haplotype 解析については、全ゲノム配列解析を行っていない10例の剖検例については Genome-wide SNP 6.0 (Affymetrix) でタイピングを行った。全ゲノム配列解析を行った5例の剖検例については、全ゲノム配列解析より当該 SNP のデータを抽出し、合計15例の剖検例の SNP データを得た。Homozygosity haplotype 法 (HH analysis) を用いて 2cM 以上にわたる共通領域を抽出した。

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

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、テラトーム形成能の確認、神経系分化能の確認)。(Fig.2)

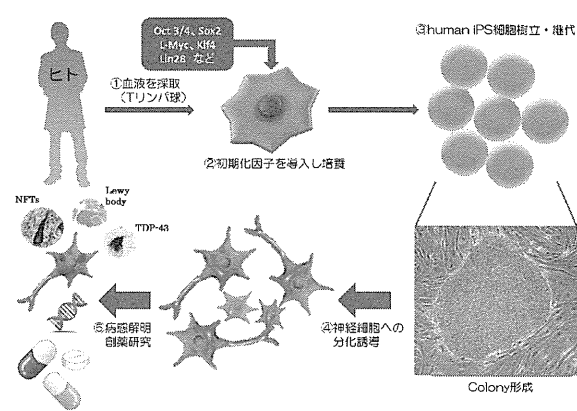


Figure 1. Overview of iPSC

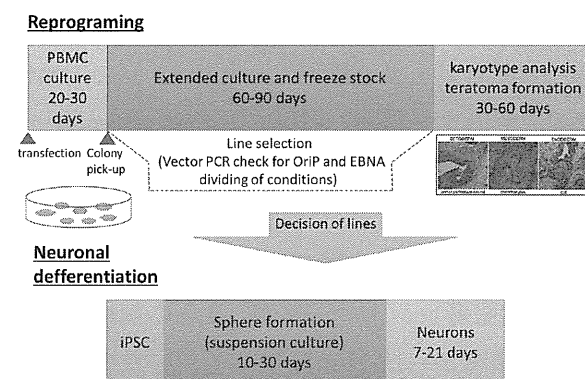


Figure 2. Time course of human iPSC establishment

(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。

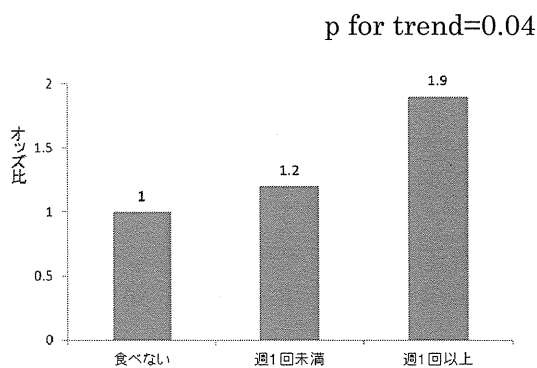
表 1. 愛知県における 症例対照研究の結果

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		0.1 (0.9-2.4)

## 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

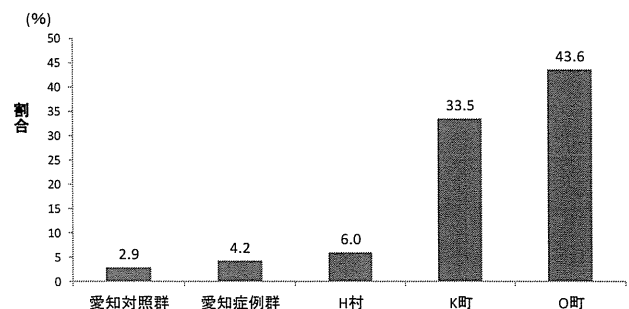
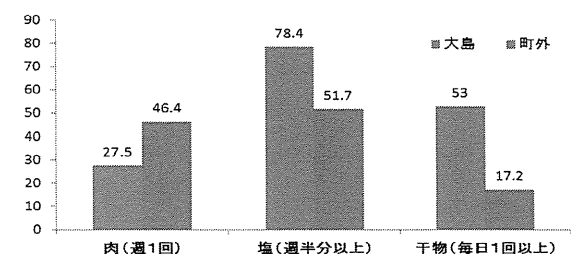


図 3 15 歳までの食品頻度摂取の比較



## 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:

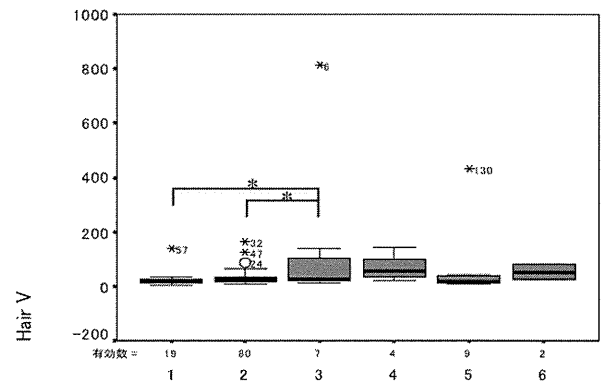


図 1. 頭髪中のバナジウム(V)含量の比較

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, \* :  $p < 0.05$ .

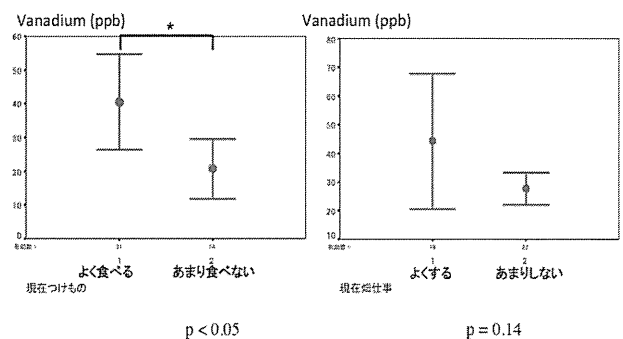


図 2. 生活習慣と頭髪中 V 含量との比較

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。

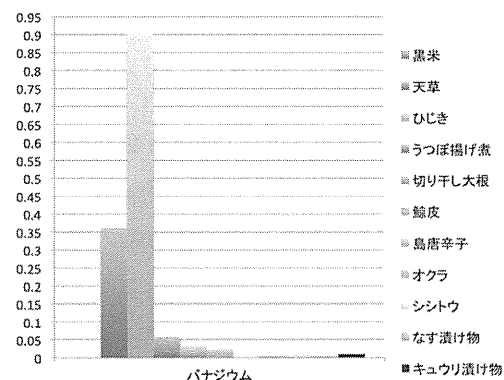


図 3. 食品中の V 含量

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：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

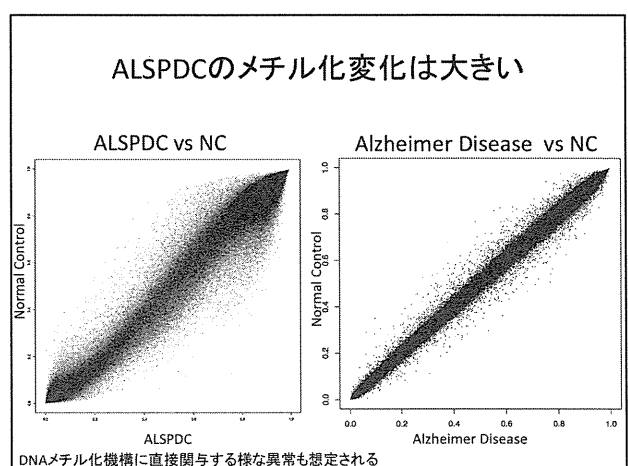
SNCA (multiplication)

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。

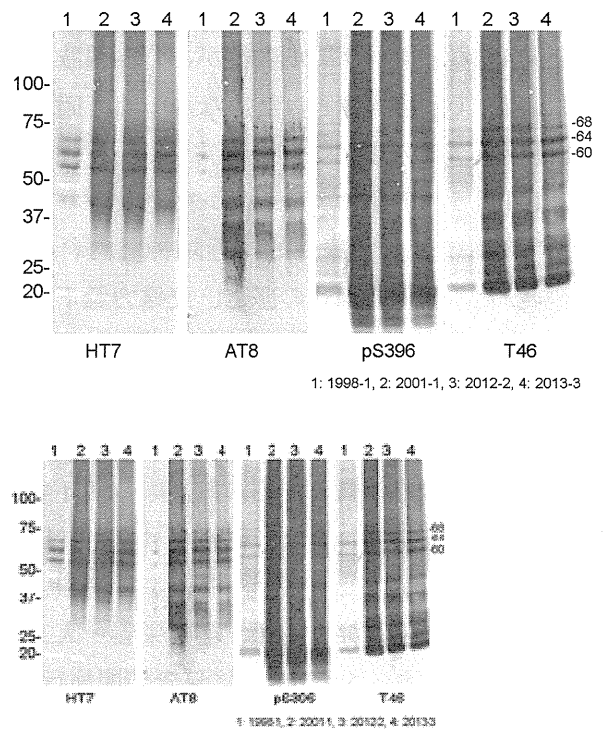
#### 4) Multiple Proteinopathy: ① 大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析;

##### 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。



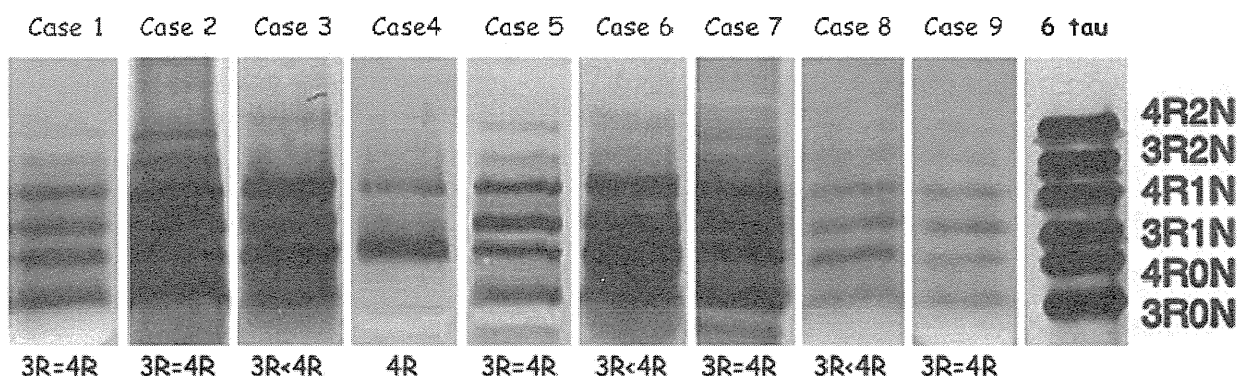
##### 2. TDP-43, $\alpha$ シヌクレインの生化学解析

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、 $\alpha$ 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  $\alpha$ 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 (NFT)、pretangle (PT)、嗜銀顆

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

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



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

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

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

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. 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

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) 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。

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。

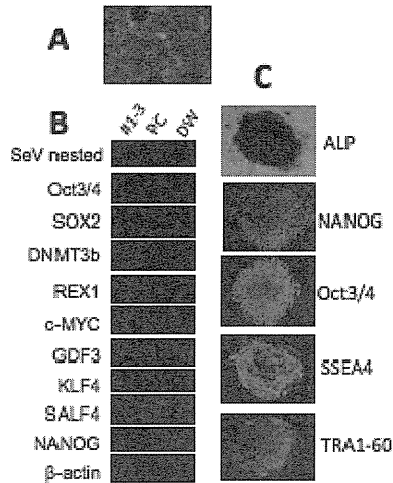


図 1 樹立したiPS細胞

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

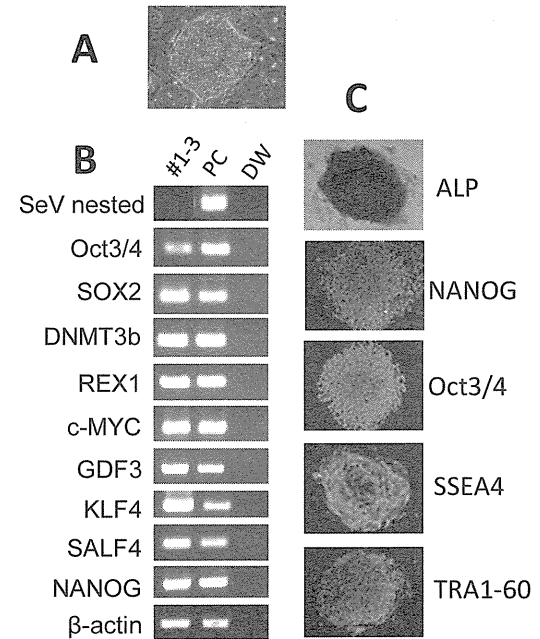


図 1 樹立したiPS細胞

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