

## 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 招聘教授

#### 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 (紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合:紀伊 ALS/PDC) についての研究成果について、1)環境要因、2)原因遺伝子解析、3)エピゲノミクス、4) Multiple Proteinopathy (tau, TDP-43、 $\alpha$ -synuclein、グアム ALS/PDC との比較)、5) iPSC 細胞作成、6) エダラボンによる臨床研究、7) 診断基準と重症度分類の作成、の各項目に分けてまとめた。本研究班の成果によっていわゆる牟婁病と呼称されてきた疾患は少なくとも、孤発性 ALS、C9orf72 変異例、OPTN 変異例および tauopathy を基調とする ALS/PDC-tau の 4 型に分類されることが明らかとなった。この中で ALS/PDC-tau は紀伊半島とグアム島に特異的である。今後は、病態解明とともに患者への還元を目指した治療法の開発に力を注ぐ必要がある。なお、診断基準と重症度分類は、日本神経学会において承認された。

#### 研究分担者 (順不同)

岡本和士 愛知県立大学看護学部 教授  
紀平為子 関西医療大学 保健医療学部 教授  
辻 省次 東京大学附属病院 神経内科 教授  
富山弘幸 順天堂大学医学部 脳神経内科・  
神経変性疾患病態治療探索講座  
准教授  
長谷川成人 (財)東京都医学総合研究所 認知症  
高次脳機能分野 病態細胞生物学  
研究室 参事研究員  
広川佳史 三重大学医学部 腫瘍病理学講座  
講師  
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、神経内科  
研究部長  
岩田 淳 東京大学大学院医学系研究科  
分子脳病態科学 准教授

江良拓実 熊本大学 発生医学研究所 教授  
小柳 清光 信州大学医学部神経難病学講座  
教授

#### 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 (紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合:紀伊 ALS/PDC) について、この 2 年間の班研究の進捗を報告する。本研究班では、紀伊 ALS/PDC の発症因子の探索と治療介入にむけて、1)環境要因調査：多発地の栄養摂取状況に関する調査結果に基づき、栄養摂取状況の変化に加え、多発に関連する要因を解明する。(岡本)、紀伊半島南部(K)地域の紀伊 ALS 多発に関連する環境要因と生活習慣に関する検討 (紀平)、三重県内の C9orf72 変異例と佐賀県で見いだされた

ALS/PDC 類似例(富山)、2)原因遺伝子の探索：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い、特定の領域に連鎖領域を絞り込むことを目指す。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、病原性変異の特定を目指す。(辻) 3) エピゲノム：特定遺伝子の CpG メチル化解析および神経細胞核特異的なエピゲノム変化の解析により、ゲノム CpG メチル化の変化を測定する事で紀伊 ALS/PDC に特異的な変化を同定することと臨床病型の違いが 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 4) Multiple Proteinopathy としての紀伊 ALS/PDC : tauopathy に関する神経病理学的検討(村山) 2012 年の 2 剖検例と大家系内 4 例の中樞神経系内に蓄積する蛋白解析(長谷川) 紀伊とグアム ALS/PDC の神経病理学的比較検討(小柳)、5)iPS 細胞研究：患者リンパ球由来 iPS 細胞樹立と神経細胞への分化誘導(広川)、患者皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞の樹立と神経細胞への分化誘導(江良)、6) エダラボンによる臨床研究(小久保)、および 7) 牟婁病の診断基準と重症度分類作成(小久保、葛原)について研究を行った。

## B.研究方法

1) 環境要因調査：栄養摂取状況の変化と危険要因の検討：栄養摂取状況の変化の検討には紀伊半島の K 地域と H 地域にて 2003 年と 2010 年に行った栄養調査結果を用いた。さらに多発に関する危険要因の検討には 2010 年に行った栄養調査結果と同年に愛知県で行った症例対照研究結果を用いた。食習慣の変化と毛髪中微量元素解析：対象は、紀伊半島南部の大島地区住民(K 住民)と対照住民とし、生活・食習慣に関する自記式アンケート調査を実施した。若い頃(1960 年代を想定)と現在について、「よく食べた・多かった」(毎日~隔日程度),「減多に食

べなかった・あまり多くなかった」(週に 1 回以下)の 2 項選択で回答を求めた。対象は、平成 22~24 年間に実施した住民健診と訪問診察で、本研究に同意が得られた住民と ALS 患者とした。頭髮試料の収集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で放射化分析を実施した。三重県内 C9orf72 変異例と佐賀県での ALS/PDC 類似例：Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS)の ALS 563 例の解析で見つかった 2 家系中 1 家系につき、発端者である三重県北部亀山市出身の ALS 患者 1 名、そしてその同胞で Primary Progressive Aphasia (PPA)患者 1 名からなる C9orf72 遺伝子変異(イントロン 1 の GGGGCC 繰り返し配列の伸長)の患者の臨床的、遺伝学的意義を検討した。また、他地域の ALS/FTD 患者および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患者との比較検討を行った。

さらに、全国各地の parkinsonism、運動障害を中心とし、dementia も含む神経疾患例からなる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) 原因遺伝子解析: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。三重県の紀伊 ALS/PDC の大家系に属する 4 例とその他の家系 5 例(うち剖検例が合わせて 8 例)について 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。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 解析にあたり、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。

3) エピゲノム：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。一方で、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。

#### 4) Multiple Proteinopathy としての紀伊

ALS/PDC：Tauopathy に関する神経病理学的検討：対象は、Kii ALS/PDC 連続開頭剖検例 10 例 (平均年齢 69.6 歳：60-77 歳、女性 7 人)。タウ免疫プロットについては、凍結側頭葉皮質を使用し、Hasegawa M, et al, Brain 2007 のプロトコールに準じて施行した。組織学的検索

について、反対固定側海馬・側頭葉 (免疫プロットに対応する部位) 及び小脳のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6 $\mu$ m/9 $\mu$ m 厚連続切片を作成した。免疫プロットで 4R ほぼ単独を示した 1 例については、保存全ブロックを使用した。通常染色 (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 Pser242)、抗コピキチン抗体、抗 p62 抗体、抗コピキリン 2 抗体、抗カルバインディン抗体を用いて、Ventana NX20 自動免疫染色により検討を行った。コントロールとして、高齢者ブレインバンク凍結半脳保存連続登録 892 例を使用した。また、免疫プロットに対応する固定側中側頭回にてタウ病変について半定量的な評価を行った (Fig.1)。2012 年に剖検となった 2 例 (2012-2, -3) の大脳皮質及び胸髄、凍結組織が保管されている大家系の家族例 4 例 (1998-1, 2001-1, 2012-2, 2013-3) の前頭葉あるいは海馬 (傍回) から、Sarkosyl 不溶性画分を調製し、蓄積するタウ、S、TDP-43 を各種抗体により検出、解析した。用いた抗体は、抗タウ抗体 (HT7、AT8、RD3、RD4, anti-4R、pS396、T46)、抗リン酸化 S 抗体 (mAb PS129)、抗 TDP-43 抗体 (poly pS409/410) である。

2012 年の 2 例については、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、免疫組織染色を行うことで、細胞病理の観察も行った。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。

5) iPS 細胞研究 : Kii ALS/PDC 患者の協力のもと患者から採血を行い、末梢血単核球又は T 細胞を調製する。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血液細胞に導入し、フィーダー細胞上で 3~5 週間培養を行う。各々の患者由来 iPS 細胞で解析に用いることの可能なクローンの選抜を試行する。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。

6) エダラボンによる臨床研究: 対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例 (男性 4 名, 女性 1 名, 平均年齢 68.4 歳、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、16 クールを連続して行う。(併用薬) 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。

7) 牟婁病の診断基準と治療指針の作成: これまでの研究成果に本研究班の研究結果を加え、診断基準と重症度分類を策定する。

(倫理面への配慮を含む)

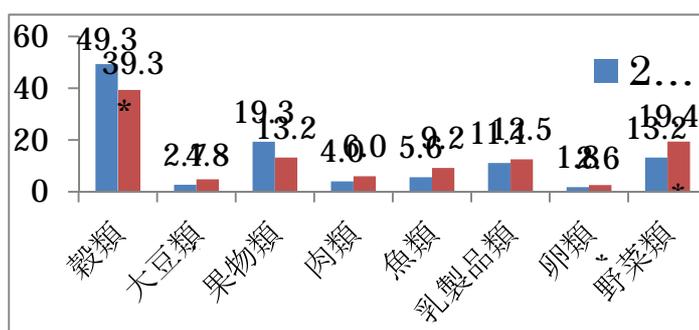
本研究は、三重大学、東京大学、順天堂大学、健康長寿医療センター、東京都医学総合研究所、

愛知県立看護大学、関西医療大学、熊本大学、信州大学、南伊勢町立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) 環境要因調査 : 栄養摂取状況の変化と危険要因の検討 : 2010 年は 2003 年に比べ、大豆類、肉類、卵類、および野菜類の摂取頻度は有意な増加を、穀類のみ有意な減少を認めた (図 1)。

図 1 . 食品別摂取頻度の年度別比較



干物を多く摂取する者の割合は多発地域である K 地域および O 町では愛知の対照群に比べ顕著に高く、さらに K 地域は対照地域の H 村と比較して 4 倍高かった (表 1)。

表 1 . 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)

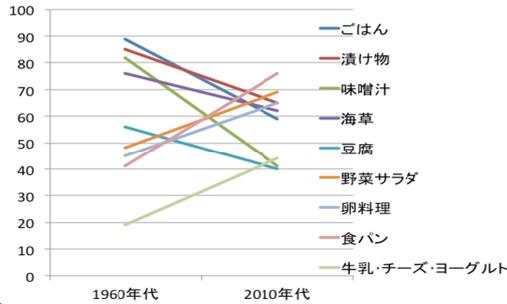
### 1. 生活習慣とその変化

#### 1-1. 食品摂取の頻度調査と時代変化

本研究への参加者は K 住民 71 名 (平均年齢 76.2 ± 8.2 歳), 対照住民 10 名であった。各食品について「1960 年代によく食べた」と回答した住民の割合が「現在よく食べる」と回答した住民の割合と比較して 20% 以上減少したものは、ごはん、漬け物、味噌汁で、一方、20% 以上増加した食品は、食パン、野菜サラダ、卵料理、乳製品であった (図 2) . 魚介類・干物や煮野菜の摂取頻度は、1960 年代も現在も共に

「よく食べる」と回答した者の割合が80%以上、肉料理は1960年代も現在も同様に25-30%であり、時代による変化はみられなかった。

図 2



1-2. 仕事の内容と

飲用水

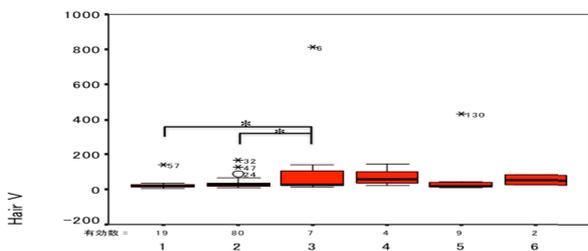
1960年代は力仕事や漁業、林業、水田での労働が多かったが、現在は激減した。一方、畑仕事は緩やかな減少にとどまった。

飲用に井戸水を利用する住民の割合は、1960年代 43.7%、現在 1.4%と著しく減少し、水道水利用は、1960年代 32.4%、現在 87.3%と著明に増加した。水源は1960年代と同様であった。

2. 頭髪中の金属元素測定

K-ALS 7例, 穂原(H)-PDC 4例, 孤発性(S)ALS 10例, K住民 87名, 対照 20名からパーマや毛染めの無い頭髪を採取した。K-ALSで頭髪中VとMnの高値を認めた ( $p < 0.05$ , 図3)。H-PDCとK住民でも頭髪中VやMnが高値を示す者が認められた。頭髪中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  $p < 0.01$ )。

図3. 頭髪中のバナジウム(V)含量の比較。



1: 対照, 2: K住民, 3: K-ALS, 4: H-PDC, 5: SALS, 6: その他の運動ニューロン疾患 (単位: ppb). \*:  $p < 0.05$ . 頭髪中元素含量と生活・食習慣との関連では、漬け物を「よく食べる」と回答した住民で頭髪中Vが高値 ( $p < 0.05$ ), 畑仕事を「よくする」と回答した住民

で頭髪中MnとAlの高値を認めた (各  $p < 0.05$ ).

三重県内のC9orf72変異例と佐賀県でのALS/PDC類似例: 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、当初家族歴のない孤発性ALSと考えられていたが、C9orf72遺伝子変異が同定されたことをきっかけに同胞が57歳発症のPPA患者であることが判明し、遺伝子検査を行ったところ同変異を認めた。その同胞間で臨床像は全く異なっており、本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、また本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。なお、欧米のC9orf72遺伝子変異例でパーキンソニズムを合併する症例があることも報告されているが、本家系の2例についてはパーキンソニズムの合併はなかった。よって、これらC9orf72遺伝子変異症例の臨床所見としては、認知機能障害、運動ニューロン徴候などALS/PDCとoverlapした症候も認めたが、ALS/PDCと全てで共通しているわけではなかった。

一方、parkinsonism、運動障害症例を中心とする順天堂大学脳神経内科遺伝子バンク症例の臨床像の確認では、約3300症例中1例で孤発性ALS/PDCを疑う症例を見出した。本症例は佐賀県出身(紀伊半島での出生・居住歴なし)の68歳女性例であった。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。

2) 遺伝子解析: 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。

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、翻訳領域のみならず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。

3) エピゲノム: 1. *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。

2. 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  $< 0.01$ ,  $F$  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

図 4

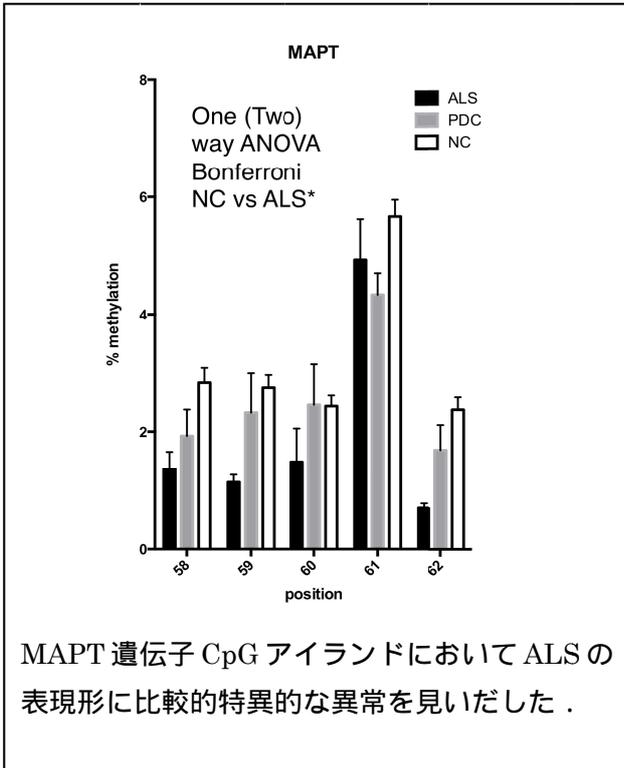
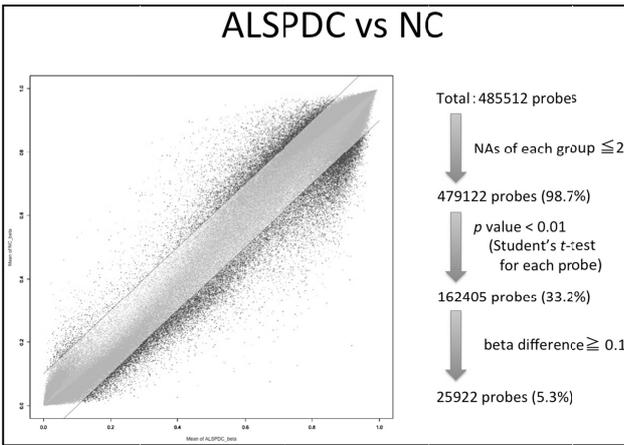


図 5



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、特に発現調整にもっと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ものが多く見られ、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。

4) Multiple Proteinopathy としての紀伊 ALS/PDC :

Tauopathy に関する神経病理学的検討：タウ免疫プロットと臨床型分類との対比では、4R dominant 1例：PDC with ALS； 3<4R 3例：PDC with ALS 1例、ALS 1例、ALS with D (Dementia) 1例、 3+4R (AD型) 5例：PDC with ALS 1例、PDC 2例、ALS 2例であった(表.2)。プロット陽性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 AT-8 陽性の星状膠細胞の斑状構造を認めた(表 2)。免疫プロットにて 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プロットで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。更に、小脳における検討については全例にトルペド及びグルモース変性を認め、8例(80%)には多核或いは異常局在を示すブルキンエ細胞を見いだした。リン酸化タウ陽性構造物は、白質及び歯状核には全例、ブルキンエ細胞には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、バーグマンガリアやゴルジ細胞にリン酸化タウの蓄積を認め、分布の多様性を示した(表 3)。全例小脳症状は認めなかった。ユビキチン関連蛋白に対する免疫染色は全例で陰性であった。

表 2

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.

2012-2胸髄のAT8陽性構造物

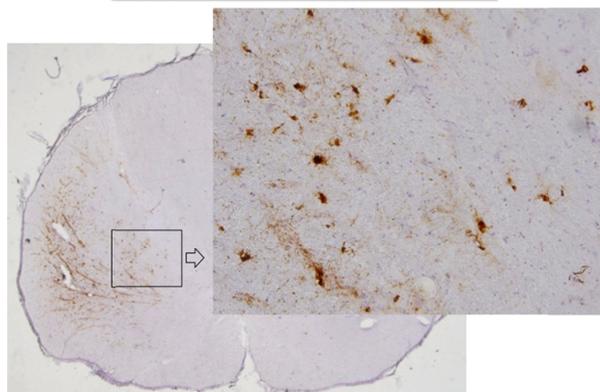
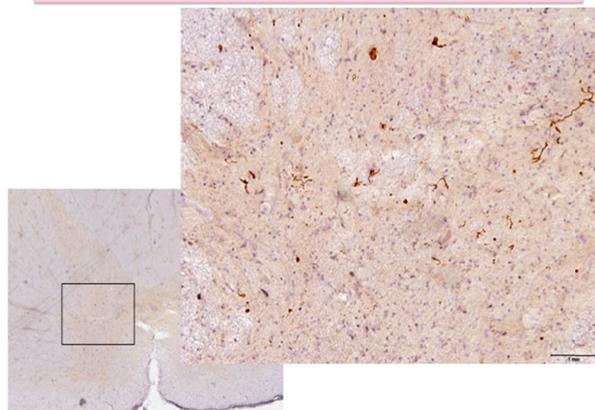


図 6

図 7

2012-2胸髄のリン酸化αシヌクレイン陽性構造物



Case	Age	Sex	DOI (year)	Phenotype			Types of degeneration				Tau pathology					
				A	P	D	Dislocation of PCs	Multinucleus of PCs	Torpedo	Gumose 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	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

DOI: Duration of the illness

A: amyotrophy, P: parkinsonism, D: dementia

PCs: parkinje cells, ML: molecular layer, GL: granular layer, WM: white matter (L:lobe, D:deep), DN:dentate nucleus

±: quite a few neuropil threads without inclusions

\*: severe white matter pathology

表 3

### 1. 2012-2 (PDC)の組織、生化学解析

60歳でパーキンソニズムを発症、72歳で亡くなられた女性(2012-2: 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ところ、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も観察された。また、多数のリン酸化αS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大脳皮質及び胸髄の灰白質に認められた。

### 2. 2012-3 (PDC)の組織、生化学解析

60歳でパーキンソニズムを発症、75歳で亡くなられた男性(2012-3)は、側頭葉白質にastrocytic plaque様タウ陽性構造が多数認められ、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。リン酸化αS病変は側頭葉だけでなく、胸髄の神経細胞においても強く認められた。TDP-43の異常所見は側頭葉、胸髄のいずれにおいても検出できなかった。

2012-2, -3例の大脳皮質、胸髄におけるタウ、αSの生化学解析では、大脳皮質において、AD型のリン酸化タウバンドパターンとリン酸化αSの蓄積が確認された。胸髄のタウについては検出が困難であった。

3. 大家系の剖検例(1998-1, 2001-1, 2012-2, 2013-3)のタウ、TDP-43、 $\alpha$ Sの解析(図8,9)

1998-1は解析部位が前頭葉のためか、他の3例に比べてタウ蓄積量が少なかった。しかしながら、いずれの症例においても、ADとよく似た、60, 64, 68kDaの全長リン酸化タウのバンド、レーン全体がスマア状に染まる反応、複数のC末端断片が検出された。AD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、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ADのそれらと区別がつかなかった。

また、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、およびスマ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、S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S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。

図8

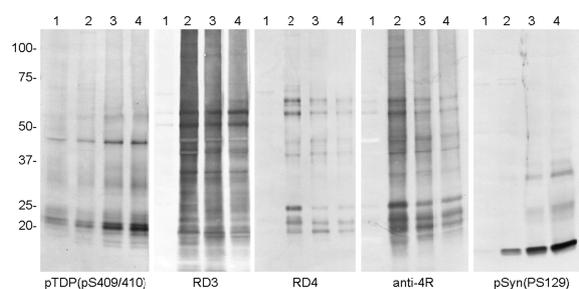
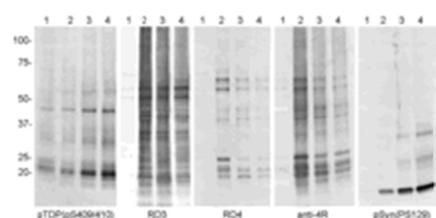


図9



(1: 1998-1, 2: 2001-1, 3: 2012-2, 4: 2013-3)

それぞれの異常タンパク質の蓄積の程度は、TDP-43と $\alpha$ Sに比例関係が認められ、逆にタウとTDP、あるいはタウと $\alpha$ Sは逆相関するように見えた。

紀伊症例のリン酸化タウ陽性のアストロサイトは、脳表などではthorn shaped astrocytesが多く、大脳皮質などの灰白質ではgranular hazy astrocytic inclusions (GHAI; Oyanagi K, et al., 1997)<sup>3)</sup>であった(図10,11)。紀伊症例の白質では、灰白質にリン酸化タウ陽性所見が多い症例で、オリゴデンドログリアのtau-positive fine granules (TFG; Yamazaki M, et al., 2005)<sup>4)</sup>(図12, 13)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。

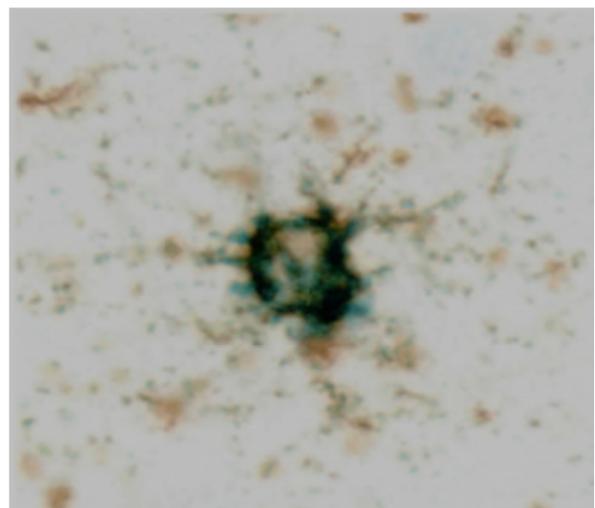


図10. グアム島PDC大脳皮質のGranular hazy astrocytic inclusion (brown; phosphorylated tau, green; glial fibrillary acidic protein)

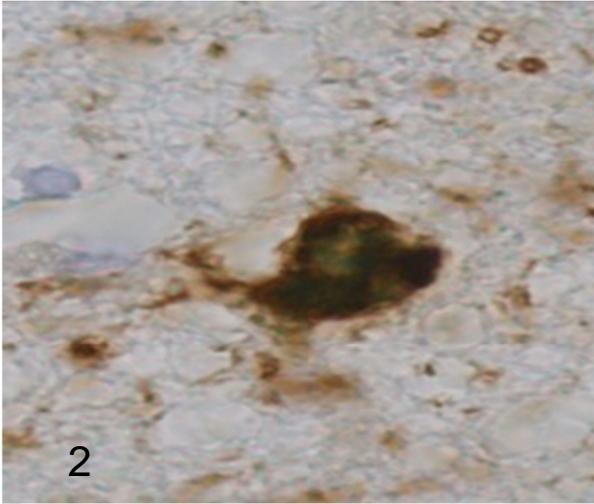


図 11. 紀伊 PDC-ALS 大脳皮質の Granular hazy astrocytic inclusion (brown; phosphorylated tau, green; glial fibrillary acidic protein)

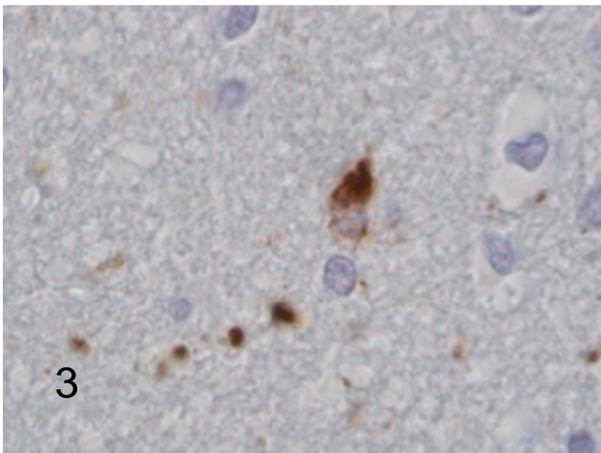


図 12. グアム島 PDC 大脳白質の Tau-positive fine granules (brown; phosphorylated tau)

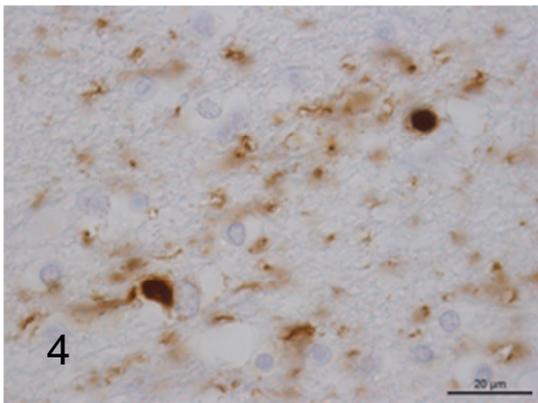


図 13. 紀伊 PDC-ALS 大脳白質の Tau-positive fine granules (brown; phosphorylated tau)

5) iPS 細胞研究： Kii ALS/PDC 患者 5 名の血液検体を用いて、疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、解析に適したクローンの選抜中である。(表 4、図 14) 5 例中 4 例の皮膚線維芽細胞のうち、3 症例 (1 症例あたり 10 数株) からウイルスベクターフリーの iPS 細胞株を樹立した(図 15)。これまでに樹立した iPS 細胞のうち症例 1 から樹立した iPS 細胞を神経細胞へと誘導した(図 16)。約 2 週間あまりで形態学的にも神経細胞へと誘導することに成功した。神経細胞特異的のマーカである Nestin の免疫染色を行い、陽性であることから神経細胞であることを確認した。

表 4 . Characteristics of five patients.

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

図 14. Colonies picked up in Kii #1-Kii #5.

Kii #1

Kii #2

Kii #3

Kii #4

Kii #5

No.	Pick up colony	maintained lines
Kii #1	43	6
Kii #2	16	15
Kii #3	24	11
Kii #4	57	22
Kii #5	On going	On going

図 15

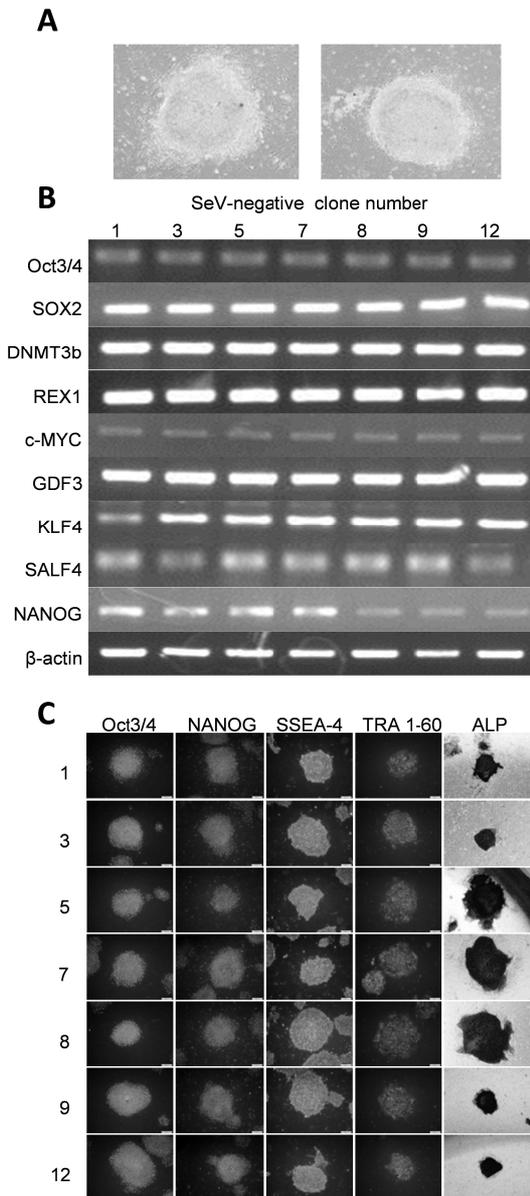


図1 樹立したiPS細胞

- 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)

図 16

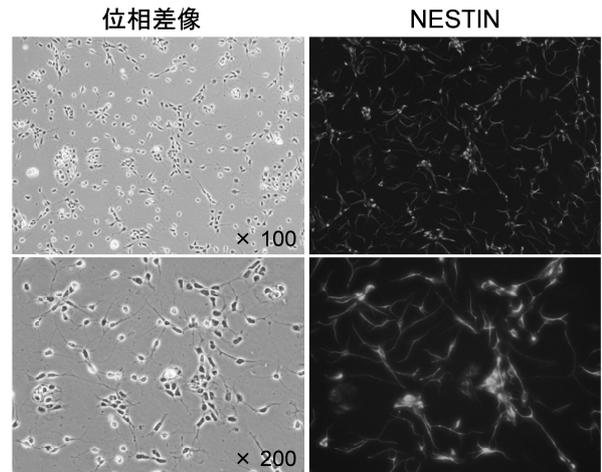


図2 疾患由来iPS細胞から神経細胞への誘導  
iPS細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞特異的マーカーであるNESTINの抗体にて免疫染色を行った。

6) エダラボンによる臨床研究: 2011年11月から2012年4月に終了。臨床研究開始3カ月の時点で、1例で歩行や動作などパーキンソン症状の改善を認めた。他の1例で発語量の増加や受け答えの際の反応時間の改善と言った反応が見られた。1例は、著変無し。残りの2例では、易怒性、暴力、性的逸脱があり投与約2ヵ月から3ヵ月で中止した。

7) 牟婁病の診断基準と重症度分類の作成 :

2014年1月に日本神経学会にて承認された。

附則1 .

D.考察

疫学調査と環境要因について : K地域におけるALSの発症率の減少の要因として、食事内容の西洋化(穀類の減少、大豆類、肉類、卵類など、および野菜類の摂取頻度増加)が寄与した可能性がある。穀類の減少が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、肉類、卵類の増加が神経髄鞘の保護作用の増強、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、野菜類の増加が酸化ストレスに対する防御機能の向上がALSの発症頻度の

減少に寄与した可能性が推測された。以前行ったH町の陰膳調査から発症の被疑物としてあげられた干物の高頻度摂取とALS多発の間に有意な関連が認められ、しかも頻度が増加するほどそのリスクは有意に上昇していた。干物に含まれる過酸化物が酸化ストレスとなり、神経障害を促進させた可能性がある。

本地域では、1960年代に比し近年、主食にパンをとる頻度が増し、乳製品や卵料理、野菜サラダの摂取頻度が増加していた。労働内容では、畑仕事は継続され、漁業、林業などの力仕事は著減した。一方、飲用水の水源はALS多発を認めた地域の河川と同じであった。食生活の変化や身体負荷の軽減は対照地域でも同様に認められたが、河川や飲用水のCa含量の低い水質は当該地域に特異的であった。

毛髪中の元素測定は有害元素の体内蓄積の指標として利用されるが、多発地ALS患者頭髪中にVやMnの高値が認められたことから、これらの体内蓄積が推察された。AlやMnは土壤中に多く含まれ、Vは海産物や土壤に分布するとされる。頭髪中VやMn高値の一つの要因として、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習慣と関連して、体内への吸収が増加し蓄積した可能性が考えられた。Vは生体への毒性を有する遷移金属であり、発癌性やDNA損傷<sup>2</sup>、ドパミン含有細胞への毒性<sup>3</sup>などが報告され、神経変性への関与が推察される。

今回のALS/FTD症例の解析結果から、一見孤発例とみられる症例や、異なる疾患の偶然の合併にみえる家系においても*C9orf72*遺伝子変異が認められることがある、という教訓が得られた。

*C9orf72*遺伝子変異症例はALS/PDCとoverlapした症候も多いものの、これまで報告されている臨床像、病理像を考えると、少なくとも穂原地区のALS/PDCとは異なる疾患群ではないかと考えられた。今回見出された佐賀県出身の孤発性ALS/PDCを疑う症例については、その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。

原因遺伝子探索について：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。

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ことや、現在の次世代シーケンサーによって得られるshort readを用いた解析では、全ゲノム配列解析においても、rearrangementやrepeat expansionの検出力は弱く、今回の解析で真の病因変異を検出できなかった可能性は残る。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り、連鎖解析についても、遺伝モデルを設定しないノンパラメトリック連鎖解析を重視した解析も検討する必要があると考えられた。

エピゲノム解析：牟婁病では特定遺伝子のメチル化に異常を来している事が判明した。異常は病理学的に類似するアルツハイマー病と同様の変化に加えて、牟婁病に特異的なものも観察された。さらに、ALS/PDCの表現型間でメチル化の異なる遺伝子も同定され、それぞれの病型の違いを説明しうる可能性が示唆された。

Multiple proteinopathy: 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。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。

大家系の 4 例は蓄積量の程度の違いはあれ、いずれもリン酸化タウ、リン酸化  $\alpha$ S、リン酸化 TDP-43 の 3 種類の異常タンパク質の蓄積が認められた。また、タウのバンドパターンは AD のそれと、TDP-43 は type A-FTLD のそれと、 $\alpha$ S は DLB/PD のそれと区別がつかないバンドパターンであり、ある程度均質な生化学的特徴を示しているように思われた。

複数の種類の異常蛋白質病変が同時に起こっている状況を見ると、患者脳において、タウ、S、TDP-43 など、もともと線維化しやすい蛋白質が異常を起こしやすい、あるいは異常化したものが分解、除去されにくいような、何らかの遺伝的背景、あるいは環境的背景が存在するのかもしれない。

紀伊とグアムの ALS/PDC では、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 (GHA1; Oyanagi K, et al. 1997) tau-positive fine granules (TFG; Yamazaki M, et al. 2005)<sup>4)</sup>が紀伊半島 PDC-ALS 症例にも認められた。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)。

iPS 細胞研究: 一般的に iPS 細胞は染色体異常が起こりやすい。核型解析を行って異常の認められないクローンを解析用として最終的に選

別する必要がある。同時に多分化能を有した状態の確認が必要である。iPS 細胞から運動神経、ドパミン作動性神経、興奮性神経、抑制性神経、グリア細胞へと分化誘導を行い、研究方法で上げたような各種の生化学的研究を行って病態解明を進める。創薬研究においても患者 iPS 細胞から分化誘導した各細胞を用いて、既存の薬剤や神経保護作用や異常凝集物除去能を有する新たな治療薬を探索する。

iPS 細胞樹立の効率には特に健常者と変わりはなかった。この結果より、紀伊 ALS/PDC では、細胞のリプログラミングや iPS 細胞の増殖には影響を与えないことが示唆された。また、神経細胞の誘導効率では、健常者由来の iPS 細胞の場合と比較して特に差はなかった。したがって、この疾患の異常が神経細胞の分化に与える影響は、少ないと考えられる。

エダラボンによる臨床研究: これまでの様々な環境要因の検討から牟婁病の病態機序に酸化ストレスの関与が疑われている。本研究班では、酸化ストレス軽減を目的としたエダラボンの治療介入を行い、認知機能障害が重度の患者では興奮作用が優性であったが、軽症の患者では有効な治療法となる可能性が認められた。エダラボンは当初予想していた以上に、大脳機能に対する刺激作用があった。今後、酸化ストレス軽減を目的とした様々な新規薬剤の治療研究の推進が望まれる。

診断基準と重症度分類の策定について: 本研究班における研究成果を元に、診断基準と重症度分類を策定し、日本神経学会において承認された。今後、診療ガイドラインの作成と臨床介入による効果判定のための評価基準の作成が必要である。25 年度には、紀伊 ALS/PDC のホームページをリニューアルした。

(<http://kii-als-pdc-project.com>) 研究班の活動報告などを随時更新し、情報発信に努めている。

E. 結論

本研究班の研究成果として、環境因子（食生活

の西洋化、肉体労働の減少、古い干物のような過酸化物質の高い食品摂取の発症リスク、毛髪中 V, Mn 高値)、遺伝子解析 (パラメトリック連鎖解析、全ゲノム配列解析、homozygosity haplotype 法による創始者ハプロタイプの検討)、エピゲノム解析 (特定遺伝子のメチル化異常、表現型間でのメチル化の差異)、蛋白・病理解析 (tau、 $\alpha$ -synuclein、TDP-43 の病理、生化学解析)、iPS 細胞研究 (iPS 細胞の樹立と神経細胞分化)、臨床研究 (エダラボン) と紀伊 ALS/PDC 診断基準策定について報告した。古くから牟婁病と呼称されてきた疾患が、孤発性 ALS、C9orf72 変異例、OPTN 変異例、tauopathy を主病変とする紀伊 ALS/PDC-tau の少なくとも 4 病型からなるという、疾患概念が明らかになったことは、本研究班の重要な成果と考えられる。今後は、さらに環境因子、遺伝素因を含めた病態解明が急がれるとともに、これまでの知見をもとにした新規治療薬による治療介入研究が望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y and Era T. Analysis of iPS cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressive. Oral presentation. The 11<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium. Tokyo, 17<sup>th</sup> May 2013.
2. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y and Era T. Analysis of iPS cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressive. Poster presentation. 11<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Boston, 14<sup>th</sup> June, 2013.
3. 江良 択実 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 130 回 熊本小児科学会総会 特別講演 熊本 2013 年 6 月 16

日

4. 江良 択実 iPS 細胞と再生医療 第 14 回 医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 招待講演 東京 2013 年 9 月 28 日
5. Era T, Soga M, Fusaki N, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo S, Irie T, and Endo F. Model of Niemann-Pick disease type C using iPS cells. Oral presentation. The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases and The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, 28<sup>th</sup> November, 2013.
6. T Kihira, Kazushi Okamoto, Sohei Yoshida, et al. Environmental Characteristics and Oxidative Stress of Inhabitants and Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in a High-incidence Area on the Kii Peninsula, Japan. 2013 Internal Medicine 2013, 52: 1479-1486.
7. Tomiyama H. C9orf72 in Japanese amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Rinsho Shinkeigaku. 2013;53:1074-6.
8. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. Cell Rep. 4:124-34.
9. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. Brain 136:1128-38.
10. Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Grubman A, Liddell JR, Crouch PJ, White AR. (2013) Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as

- Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. *PLoS One* 8:e67433.
11. Mann DMA, Rollinson S, Robinson AC, Callister J, Snowden JS, Gendron T, Petrucelli L, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Davidson YS and Pickering-Brown S. (2013) Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neuron Disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Comm* 1: 68.
  12. Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Comm* 1: 54.
  13. Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Ishobe T, Hasegawa M, Hisanaga SI (2013) Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. *J Biol Chem* 288: 7968-77.
  14. Yui Nakayama, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Shigeki Kuzuhara, and Yasumasa Kokubo. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Kii Amyotrophic Lateral Sclerosis /Parkinsonism-Dementia Complex. *Journal of Neurodegenerative Diseases*. Article ID 679089, 4 pages 2013.
  15. Kotaro Ogaki , Yuanzhe Li , Masashi Takanashi ,Kei-Ichi Ishikawa , Tomonori Kobayashi, Takashi Nonaka , Masato Hasegawa , Masahiko Kishi , Hiroyo Yoshino , Manabu Funayama , Tetsuro Tsukamoto , Keiichi Shioya , Masayuki Yokochi , Hisamasa Imai , Ryogen Sasaki , Yasumasa Kokubo , Shigeki Kuzuhara , Hiroyuki Tomiyama , , Nobutaka Hattori. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013 Jan;19(1):15-20.
  16. Ken-ichiro Kobayashi, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Takeshi Nishiguchi, Kenichi Isoda, Yasumasa Kokubo, Katsuhiko Ando, Masaki Katurahara, Yasuhito Sako, Tetsuya Yanagida, Akira Ito, Sentaro Iwabuchi, and Kenji Ohnishi. Rare case of disseminated cysticercosis and taeniasis in a Japanese traveller after returning from India. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 Jul;89(1):58-62.
  17. 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
  18. 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.
  19. 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.

20. 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.
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.  $\alpha$ -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  $\beta$  immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid  $\beta$  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 $\beta$  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  $\gamma$ -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 <sup>123</sup>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.
41. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M,

Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S. -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. Tsujii 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. -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.

## 2.学会発表

1. Yasumasa Kokubo. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parkinsonism-dementia complex (PDC) of the Kii peninsula of Japan (Muro disease). - Recent Advances of Reserch -. 9th

international congress on mental disorders & other non-motor features in Parkinson's 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-. 24<sup>rd</sup> International symposium on ALS/MND, Milan, Italy, 6-8 December, December 2013.
8. 富山弘幸. 運動ニューロン疾患の遺伝学:

- Update わが国の ALS における C9ORF72 .  
第 54 回日本神経学会学術大会 . 2013 年 5 月  
30 日、東京
9. Ishiura et al. A molecular genetic study of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) in Kii peninsula of Japan. The 63<sup>rd</sup> 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. 23<sup>rd</sup> 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、鷲尾 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 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.
  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, Cicago]
  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 8<sup>th</sup> 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 8<sup>th</sup> 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 8<sup>th</sup> 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

#### 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

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>