

## 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。

#### 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	東京大学医学部付属病院 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

#### 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

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。

ALS 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。

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、酸化的ストレスマーカーである尿中 8-OHdG 値(2010 年から 2012 年の間に測定)と頭髪中元素含量について関連を検討した。

### 3. K 地域の食品の元素分析

2013 年秋に収集した K 地域の米、天草、ひじき、ウツボ揚げ煮、切り干し大根、鯨皮、唐辛子、オクラ、シシトウ、なす漬物、キュウリ漬物の 11 品目について V、Al、Ca、Mg、Fe および Zn 含量を測定した。分析は三重県環境保全事業団に依頼し、食品衛生検査指針(理化学編 厚生労働省監修 2005)に基づきマイクロ波加熱分解-ICP 発光分析法を実施した。

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：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。

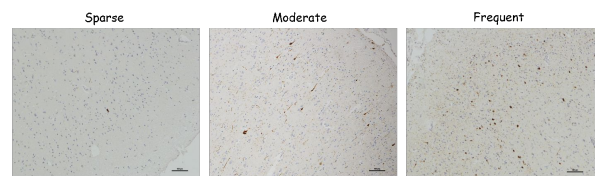
Homozygosity haplotype 解析については、全ゲノム配列解析を行っていない10例の剖検例については Genome-wide SNP 6.0 (Affymetrix)でタイピングを行った。全ゲノム配列解析を行った5例の剖検例については、全ゲノム配列解析より当該 SNP のデータを抽出し、合計15例の剖検例の SNP データを得た。Homozygosity haplotype 法 (HH analysis) を用いて 2cM 以上にわたる共通領域を抽出した。

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: 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プ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。

tauopathy 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。免疫プロットについては、凍結側頭葉皮質を使用した。組織学的検

索について、反対固定側海馬・側頭葉(免疫プロットに対応する部位)のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6 $\mu$ 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。H.E. K.B. 染色、Gallyas-Braak 鍍銀染色(GB)に加え、抗リン酸化タウ(AT-8)抗体を用いて、Ventana NX20 自動免疫染色により検討を行った。コントロールとして、高齢者ブレインバンク凍結半脳保存連続登録892例を使用した。また、免疫プロットに対応する固定側中側頭回にてタウ病変について以下の半定量的な評価を行った。神経原線維変化；GB and AT-8 NFT score: none : 0, Sparse : 1 - 5, Moderate : 6 - 15, Frequent : 16 - ( $\times 100$ )、



グリア病理 (Pachy 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 - ( $\times 400$ )。

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；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：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。

疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成 ; ( Fig.1 )

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。

慶應義塾大学にて、末梢血単核球又は T 細胞を調製。続けてエピソードベクターを用いて、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、「エピソード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。

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 ( エピソード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 )

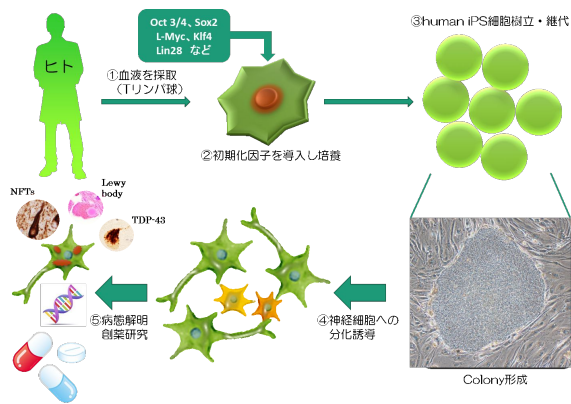


Figure 1. Overview of iPSC

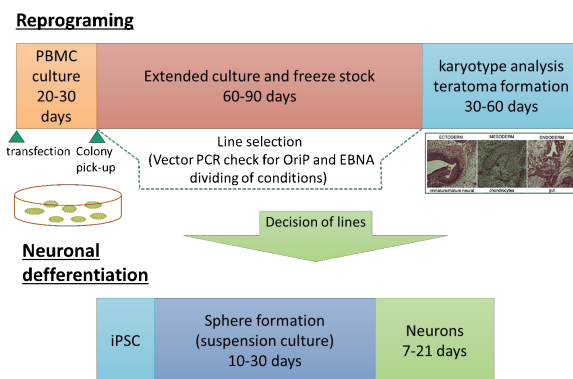


Figure 2. Time course of human iPSC establishment

( 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 ALS 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。

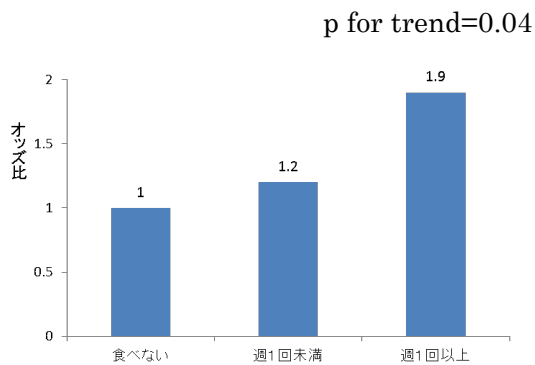
表 1. 愛知県における 症例対照研究の結果

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)	<b>1.8(1.1-2.8)</b>	<b>1.8 (1.1-2.8)</b>
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(た)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

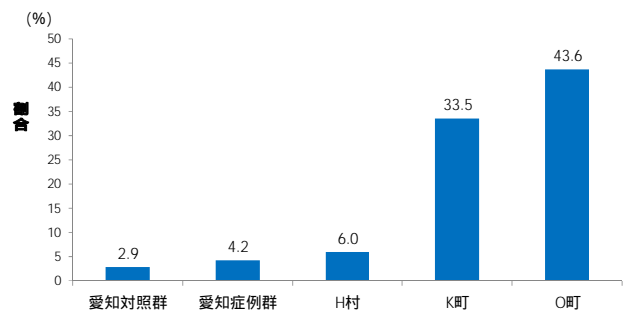
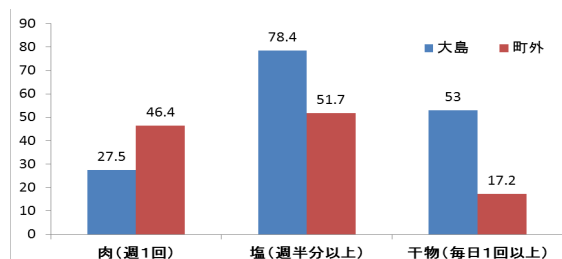


図 3. 15 歳までの食品頻度摂取の比較



## 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。

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).

紀伊半島以外において ALS/PDC が疑われた症例 :

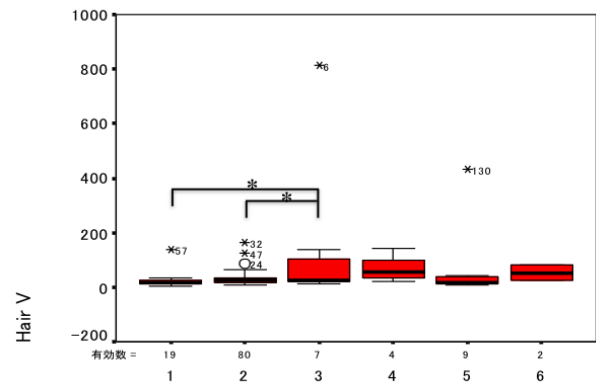


図 1 . 頭髪中のバナジウム(V)含量の比較

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, \* :  $p < 0.05$ .

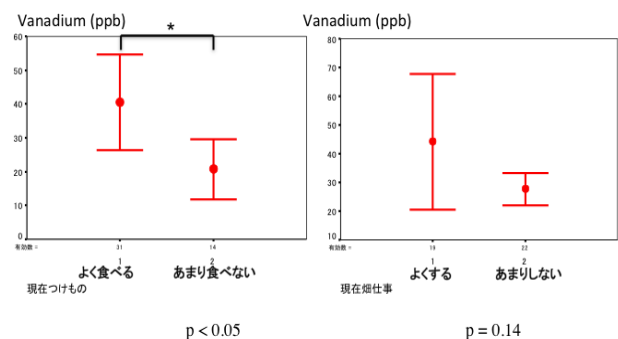


図 2 . 生活習慣と頭髪中 V 含量との比較  
現在漬け物をよく食べると回答した住民では頭髪中 V 含量が有意に高い値を示した . 畑仕事をよくすると回答した住民では V 含量が高い傾向を認めた.

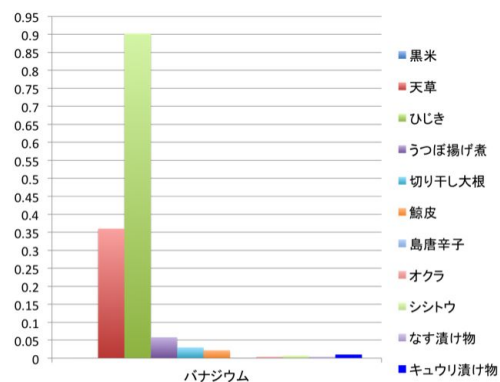


図 3 . 食品中の V 含量

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 .

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)

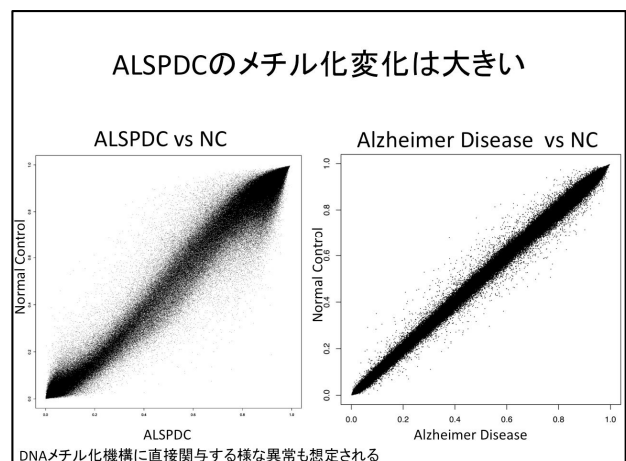
LRRK2 (exon 11,31,41,48)

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： 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。



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

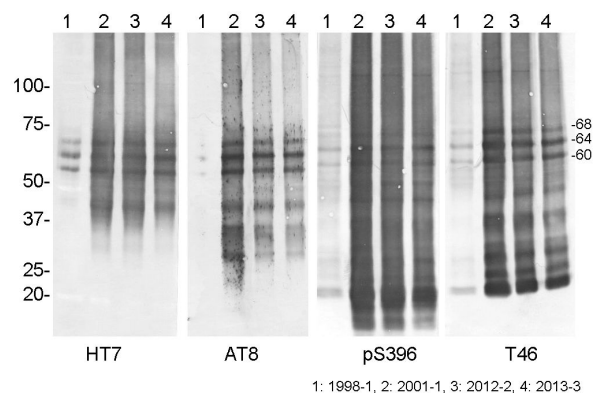
について平均年齢は71.5歳であった。 Student t検定 $p$ 値 $<0.01$ ,  $\beta$ 値の牟婁病と正常コントロール群間差0.1以上をカットオフとし, 25922プローブが検出された。個々のデータのばらつきが大きいこと考慮するとともに, メチル化による遺伝子発現制御のためには連続した一定領域のメチル化変化が起きているということ仮定して, 抽出したプローブ群のなかで3カ所以上連続しているプローブを選択し, 1380プローブまでの絞り込みを行った。これらのプローブのうちで, 遺伝子に関連したプローブは909カ所で471遺伝子と関連しており, 特に発現調整に最も重要と考えられる 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: 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. タウのイムノプロット解析

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、レーン全体がスミア状に染まる反応、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, シヌクレインの生化学解析

TDP-43 については、解析した 4 例全てにおいて、45kDa の全長リン酸化 TDP-43、18~26kDa の C 末端断片、およびスミア状の反応が検出された。また C 末端断片のバンドパターンは type A-FTLD-TDP のバンドパターンに類似していた。また、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 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。



tauopathy としての神経病理学的特徴：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 (Parkinson dementia complex) with ALS (amyotrophic lateral sclerosis)；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(Fig.1)。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

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。

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；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

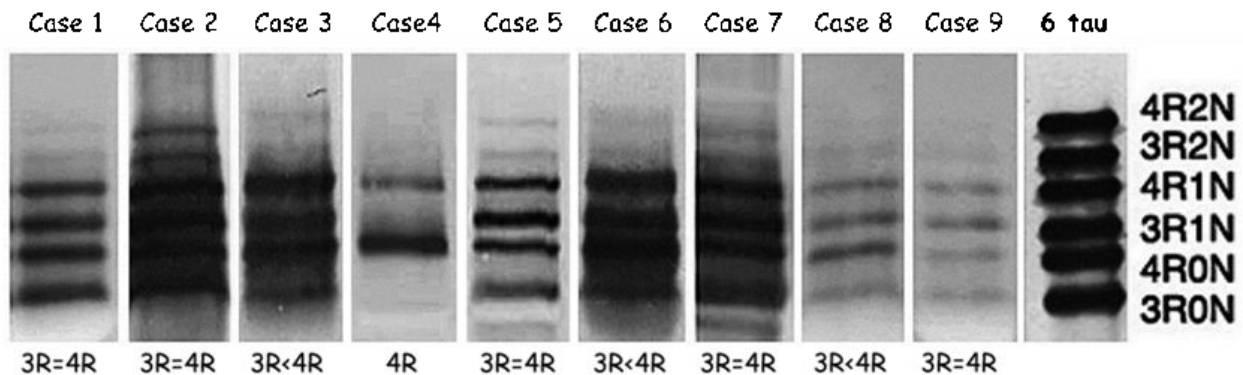


Figure 2. The summary of clinical characteristics and neuropathological findings in nine Kii ALS/PDC cases.

Case	Age/ Gender	Duration of illness, y	Clinical symptoms			ALS pathology	Middle temporal cortex (MT)					Blotting type
			P	D	A		AG	Subpial thorn	Patchy astrocytic structure	NFT score	AT-8 NFT score	
1	75 M	7	+	+	-	-	±	±	±	Frequent	Frequent	3R=4R
2	70 F	11	+	+	-	-	1+	+	±	Frequent	Frequent	3R=4R
3	60 F	8	+	+	+	+	±	+	2+	Moderate	Moderate	3R<4R
4	70 F	12	+	+	+	+	2+	+	±*	Moderate	Frequent	3R<<4R
5	76 F	6	+	+	+	+	1+	-	±	Moderate	Frequent	3R=4R
6	77 M	7	-	+	+	+	±	+	1+	Sparse	Moderate	3R<4R
7	63 F	4	-	-	+	+	1+	+	1+	Frequent	Frequent	3R=4R
8	70 F	13	-	-	+	+	±	+	-	None	Sparse	3R<4R
9	70 F	10	-	-	+	+	-	+	±	Moderate	Frequent	3R=4R

\* Many astrocytic plaque like structures were detected in case 4.

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

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)<sup>4)</sup>(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: iPS 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。

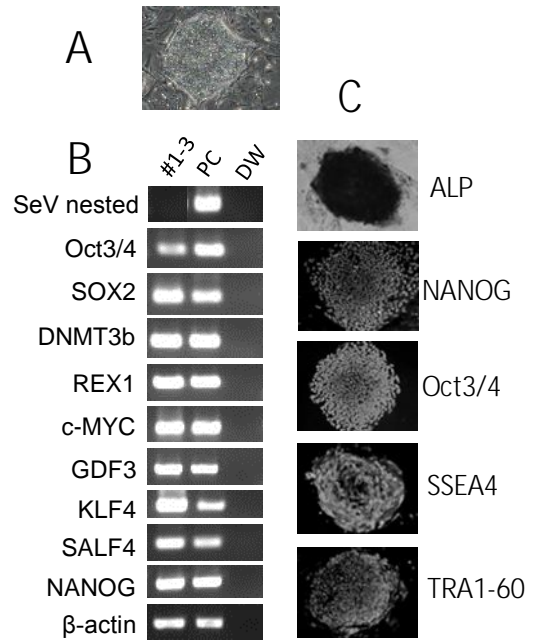


図1 樹立したiPS細胞

- 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

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。H25 年度は、1 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 1)。

### 3. 樹立した iPS 細胞からの神経細胞への誘導

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 2)。約 2 週間あまりで形態学的にも神経細胞へと誘導するに成功した。神経細胞特異的マーカーである 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。

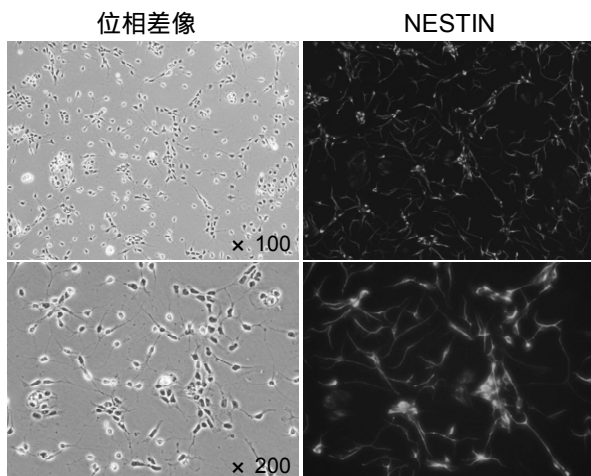


図2 疾患由来iPS細胞から神経細胞への誘導  
iPS細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞特異的マーカーであるNESTINの抗体にて免疫染色を行った。

疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成；現在、Kii ALS/PDC 患者 5 名 (Table.1) の血液検体を用いて、疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、解析に適したクローンの選抜中である (Fig.3)。各症例間で T 細胞や iPSC の樹立効率・増殖速度は異なってい

た。単離した iPSC クローンに関して、PCR を用いたエピソーマルベクターの残存確認を行った。(Fig.4)

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

Table 1. Characteristics of five patients.

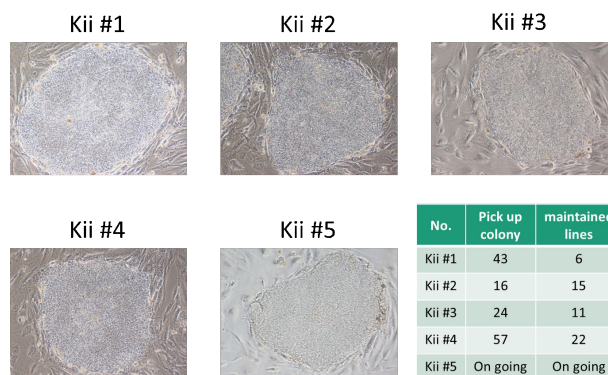


Figure 3. Colonies picked up in Kii #1-Kii #5.

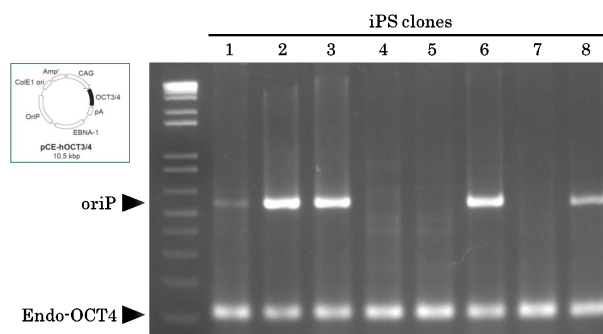


Figure 4. Check for residual plasmid vectors.

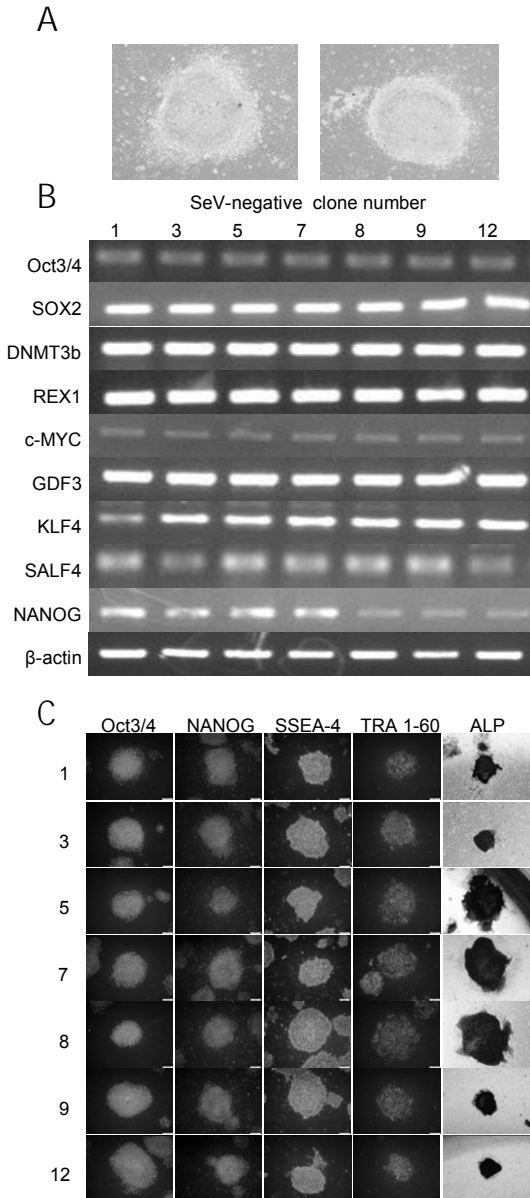


図1 樹立したiPS細胞

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

附則(資料): 紀伊 ALS/PDC 診断基準、重症度分類 (日本神経学会)

#### D. 考察

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

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

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

頭髪中 V や Mn 高値の一つの要因として、K 地域住民の生活習慣との関連が示唆された。生活習慣のアンケート調査から、当地域では畑仕事の頻

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

V は生体への毒性を有する遷移金属であり、マウスでの肺腫瘍<sup>3</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生による p53 活性化とアポトーシス誘導<sup>4</sup>、ドパミン含有細胞への毒性<sup>5</sup>などが報告されている。RoosらはALS患者脊髄液中に Mn, Al, V など金属元素の有意な高値を認め金属による神経毒性の関与を推察している<sup>6</sup>。これら遷移金属元素が運動神経細胞の変性にどのように関与するか今後さらに検討が必要である。

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

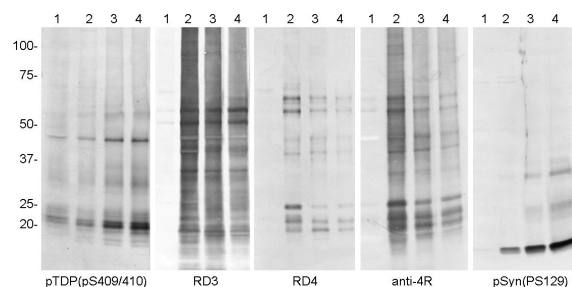
**遺伝要因：** 疾患遺伝子の探索；8名の剖検例の全ゲノム配列解析のデータより、イントロンや遺伝子間領域も含めて、共通する変異を探索したが、明らかに疾患と関連する共通変異は見出されなかった。

さらに、共有される染色体領域を見出すため、homozygosity haplotype 法を用いて、本疾患に関連する創始者ハプロタイプを探索したが、疾患と

関連する創始者ハプロタイプを検出することはできなかった。原理的に、世代が離れていくと homozygosity haplotype 法による創始者ハプロタイプの検出力は下がるため、false positive の可能性は否定できないが、条件を緩めても創始者ハプロタイプは見いだせなかったことから、むしろ疾患の病原性変異が存在するとしても複数の遺伝子が関与している可能性 (genetic heterogeneity) や、単一遺伝子疾患ではなく複数の疾患感受性遺伝子が関与している complex trait の可能性なども考慮に含める必要があると考えられた。

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

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



それぞれの異常タンパク質の蓄積の程度は、

TDP-43 と シヌクレインに比例関係が認められ、逆にタウと TDP、あるいはタウと シヌクレインは逆相関するよう見えた。

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

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

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

を行わずに末梢血の採血で iPS 細胞作製が可能となるために安全かつ容易に行える。

H25 年度は、作製した iPS 細胞から神経細胞を誘導し神経細胞を得ることができた。神経細胞の誘導効率では、健常者由来の iPS 細胞の場合と比較して特に差はなかった。したがって、この疾患の異常が神経細胞の分化に与える影響は、少ないと考えられる。

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

神経保護作用や異常凝集物除去能を有する新たな治療薬を探索)を行っていく予定である。

### 1st plan

数例の半婁病患者検体を用いてiPSCから神経細胞を誘導し、報告が蓄積された遺伝性疾患(ALS,PD)iPSCの状況を参考に解析を行う。

遺伝子未確定であり、表現型の再現が困難な可能性あり。

孤発性疾患や遺伝学的背景が不明確な疾患において協力的なツールとなる。

#### 慶應拠点技術

- 1.末梢血液からの樹立→より簡便に多くの患者さんの協力を得られる。
- 2.神経分化プロトコルを改良したことで、期間を大幅に短縮(3ヶ月→2週間)。
- 3.少数細胞からの簡便なiPS細胞の樹立と神経分化誘導を用いて多検体を一気に解析できるシステム。

### 2nd plan

当研究室におけるハイスループット樹立法を用いて、多数検体同樹立(~数十症例)を行い、多検体の一括解析を行う。

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

## E.結論

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

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

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

今回の解析では、全ゲノム配列で剖検例に共通する変異は検出されなかった。また、homozygosity haplotype 法による創始者ハプロ

タイプ探索でも、一つの創始者ハプロタイプに絞り込むことはできなかった。

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

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

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

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

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

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

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y and Era T. Analysis of iPSC 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.
- 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 sclerosi (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 ン・ゲノム・脳 支援活動合同シンポジウム [2013. 8. 6]
  14. 長谷川成人 神経変性疾患の原因となるタンパク質の構造異常とその伝播 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会, 岡崎 [2013. 11. 20]
  15. 森本悟, 小久保康昌, 齊藤祐子, 長谷川成人, 葛原茂樹, 村山 繁雄: 牟婁病におけるタウオパチーの、免疫化学的・免疫組織化学的研究. 第53回日本神経病理学会学術研究会
  16. Morimoto S, Kokubo Y, Hasegawa M, Shigeki K, Murayama S: Immunohistochemical study and western blotting of tauopathy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ parkinson dementia complex (PDC), Kii, Japan. [Annual Meeting 2012 of the American Association of Neuropathologists, Cicago]
  17. Murayama S, Morimoto S, Kokubo Y, Kihira T, Yoshida Y, Yoshida M, Takahashi H, Kuzuhara S: Establishment of pathology center for amyotrophic lateral sclerosis/ parkinson disease complex in Kii Peninsula. [Alzheimer's Association International Conference 12th, Vancouver].

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1.特許取得

なし

### 2.実用新案登録

なし

### 3.その他

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

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