

**厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）**

**三重県南部に多発する家族性認知症**

**-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究**

**平成 24 年度 総括・分担研究報告書**

**平成 25 年(2013 年)3 月**

**研究代表者 小久保康昌**

**厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）**

**三重県南部に多発する家族性認知症**

**-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究**

**平成 24 年度 総括・分担研究報告書**

ANNUAL REPORT 2012 OF THE RESEARCH COMMITTEE  
ON THE MURO DISEASE (KII AMYOTROPHIC LATERAL  
SCLEROSIS/PARKINSONISM-DEMENTIA COMPLEX)  
OF  
THE MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, JAPAN

**2013 年 3 月**

**March 2013**

**研究代表者 小久保康昌**

**三重大学大学院医学系研究科 神経病態内科学講座**

Chairman: YASUMASA KOKUBO, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Mie University School of Medicine

## ごあいさつ

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業 三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究班の1年目の研究活動をご報告いたします。研究分担や研究協力の先生方ならびに関係の方々によるご理解とご協力のお陰で、環境、遺伝子、蛋白、病理、iPS細胞、臨床研究の各分野におきまして新たな研究の進展がありました。環境分野では、過去と現在の生活環境や食習慣の変化を明らかにし、遺伝子分野では、大家系を対象とした全ゲノムシーケンスの取り組みおよび表現型とエピゲノムの関係の解析、蛋白分野では、2012年の新たな2割検例の異常蛋白解析、病理分野では、小脳でのタウ病理の拡がり、iPS研究では、iPS細胞樹立と運動神経分化への取り組み、そして臨床研究では、エダラボンを用いた臨床研究について報告がありました。また、ミニシンポジウムとして一昨年にヨーロッパで報告されました新たなALS/FTD原因遺伝子であるC9orf72遺伝子と牟婁病との関係を取り上げました。詳細につきましては、本文をご覧くださいただけましたら幸いです。

牟婁病は、これまでの研究によって、heterogeneityのある症候群である可能性が強まっていました。C9orf72遺伝子変異例の集積は、それを証明した画期的な発見でした。ただし、coreであるPDC typeについては、いまだに環境や遺伝子の影響がどこまでなのか、謎に包まれています。過去50年間の歴史ある研究の中で、本疾患の臨床像が大きく変化したことは紛れもない事実であり、この意味するところの解明が牟婁病本体に迫る鍵となるのではないかと考えています。残された多くの疑問点や問題点の解明と症状の緩和法や根治療法の確立に向けて、新たな研究手法であるiPS細胞研究を含めた地道な研究継続が必要です。紀伊半島の稀少難病に苦しむ患者さんにご家族に希望の光をもたらし、その他の関連する神経変性疾患解決の一助となることを目指して、皆様の引き続きのご指導、ご協力をよろしくお願い申し上げます。

平成 25 年 2 月  
厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業  
三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群  
発症因子の探索と治療介入研究班  
研究代表者 小久保康昌

# 目次

ごあいさつ -----

班構成員名簿 -----

平成 24 年度研究班カレンダー -----

## .総括研究報告

小久保康昌 三重大学 ----- 1

## .分担研究報告

### ・研究報告

班会議 平成 25 年 1 月 5 日 於：愛知県産業労働センター

・班会議 プログラム -----

・班会議 議事録 -----

1. C9ORF72 遺伝子の異常伸長を有する紀伊 ALS 2 症例の臨床的特徴について  
紀平為子 関西医療大学 -----
2. C9orf72 repeat expansion を伴った紀伊 ALS の一自験例の臨床的特徴について  
吉田宗平 関西医療大学保健医療学部
3. 三重県 ALS/FTD 患者における C9orf72 遺伝子変異  
富山弘幸 順天堂大学 -----
4. 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  
紀平為子 関西医療大学 -----
5. 紀伊半島南部 ALS 多発地域における栄養摂取量の継時的変化に関する検討  
岡本和士 愛知県立大学 -----
6. 紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群における脳内 BMAA の解析  
小久保康昌 三重大学 -----

7. 紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン認知症複合（ALS/PDC）の疾患遺伝子の探索  
辻 省次 東京大学 -----
  8. エピゲノム解析を通じた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の病態解析  
岩田 淳 東京大学 -----
  9. 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（Kii ALS/PDC、牟婁病）における小脳の免疫組織化学的検討  
村山繁雄 東京都健康長寿医療センター -----
  10. 患者脳に蓄積する異常蛋白質の組織病理、生化学解析  
長谷川成人 東京都精神医学総合研究所 -----
  11. 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からの iPS 細胞の樹立  
江良択実 熊本大学 -----
  12. 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  
広川佳史 三重大学 -----
  13. 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におけるエダラポンを用いた臨床研究  
小久保康昌 三重大学 -----
- .研究成果に関する一覧表 -----
- .研究成果の刊行物・別刷 -----

## 平成 24 年度研究班カレンダー（敬称略）

### 平成 24 年

- 3月28日 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金採択通知  
(事前評価：6.8、全研究班平均：6.0)
- 4月 6日 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金交付基準額通知（4/5 受け取り）  
585 万円（間接経費 135 万円）
- 4月23日 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金申請書提出
- 5月31日 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）説明会に研究代表  
者出席（東京：国立保健医療科学院 別館 5 階 講堂）
- 6月15日 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金交付決定通知  
585 万円（間接経費 135 万円）
- 28日 厚労省より平成 24 年度研究費入金 総額 585 万円（間接経費 135 万円）
- 7月31日 研究班名簿及び疾患概要作成提出
- 12月11日 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金研究計画書（継続申請）e-Rad 申請

### 平成 25 年

- 1月 5日 三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索  
と治療介入研究班 H24 年度班会議開催  
(名古屋：愛知県産業労働センター 907)
- 10日 難治性疾患克服研究事業の研究成果報告書（継続）概要版の作成・登録
- 2月13日 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金追加交付決定通知  
135 万円
- 3月 「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」2012 年度研究報告書 発行

### 平成24年度 年中行事

- 平成 24年 6月16日 第3回環境因子会議(名古屋)
- 7月28日-29日 大島地区住民健診
- 8月28日 患者データベース作成会議
- 11月25日 穂原地区 地域住民講演会
- 平成 25年 1月5日 牟婁病班 班会議（名古屋）

平成 24 年度 班会議 プログラム

日程：平成 25 年 1 月 5 日（土）10：00～15：40

会場：愛知県産業労働センター 9 階 907

（敬称略）

10：00～10：05

開会挨拶

研究代表者 小久保康昌

10：05～11：05

ミニシンポジウム 牟婁病の中の C9orf72 変異

座長 小久保康昌

1. 紀伊半島の 9p-linked ALS/FTD

石浦浩之、辻 省次 東京大学

2. C9ORF72 遺伝子の異常伸張を有する紀伊 ALS2 症例の臨床的特徴について

紀平為子 関西医療大学

3. C9orf72 repeat expansion を伴った紀伊 ALS の一自験例の臨床的特徴について

吉田宗平 関西医療大学

4. 三重県 ALS/FTD 患者における C9orf72 遺伝子変異

富山弘幸 順天堂大学

11：05～12：05

環境要因

座長 葛原茂樹

5. 紀伊半島南部 ALS 多発地域における栄養摂取量の継時的変化に関する検討

岡本和士 愛知県立大学

6. 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

紀平為子 関西医療大学

7. 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（牟婁病：Kii ALS/PDC）

における脳内 BMAA の解析 小久保康昌 三重大学

12:05～13:00

< 昼 食 > 事務連絡

13:00～13:40

疾患関連遺伝子

座長 辻 省次

8. 紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソニズム認知症複合（ALS/PDC）の疾患遺伝子の探索

石浦浩之、辻 省次 東京大学

9. エピゲノム解析を通じた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の病態解析

岩田 淳 東京大学

13：40～14：20

Proteinopathy

座長 村山繁雄

10. 紀伊半島における筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合（Kii ALS/PDC、牟婁病）における小脳の免疫組織化学的検討

森本 悟、村山繁雄 東京都健康長寿医療センター

11. 患者脳に蓄積する異常蛋白質の組織病理、生化学解析

長谷川成人 東京都医学総合研究所



14 : 20~14 : 40 < コーヒーブレイク >

14 : 40~15 : 20

iPS 細胞、治療研究

座長 葛原茂樹

12. 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からの iPS 細胞の樹立

江良択実 熊本大学

13. 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におけるエダラボンを用いた臨床研究

小久保康昌 三重大学

15 : 20~15 : 35

14. 今後の研究の展望 フリーディスカッション 小久保康昌

15 : 35~15 : 40 閉会挨拶

葛原茂樹

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群  
発症因子の探索と治療介入研究班 研究代表者 小久保康昌  
三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻臨床医学系講座神経病態内科学分野  
〒514-8507 三重県津市江戸橋 2-174 TEL : 059-231-5107 FAX : 059-231-5082  
E-mail: kii-project@clin.medic.mie-u.ac.jp

## 紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群の 発症因子の探索と治療介入に関する研究

研究代表者：小久保康昌 三重大学神経内科

### 研究要旨

紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群（紀伊 ALS/PDC, 牟婁病）について今年度の新たな研究成果についてまとめた。1) 牟婁病の中の C9orf72 遺伝子変異：紀伊半島における C9 症例集積の発見と臨床像の解明、2) 環境要因：ALS 減少に影響を与えた生活と食習慣の変化に関する検討、脳内 BMAA 解析、3) 遺伝要因：多発大家系に焦点をあてた発症遺伝子の探索と表現型の変化に関連するエピゲノム解析、4) Multiple Proteinopathy:小脳における tau 病理の広がり、2012 年に新たに剖検された 2 症例の異常蛋白質解析、5) iPS 細胞研究：iPS 細胞の樹立と運動ニューロンへの分化の試み、6) 臨床研究：エダラボンの臨床研究結果、について新たな研究成果を得ることができた。数十年の間に臨床像が大きく変化した原因を明らかにすることが、本疾患の謎を解く鍵になると思われる。

#### 研究分担者

岩田 淳 東京大学医学部附属病院  
分子脳病態科学  
江良 択実 熊本大学 発生医学研究所  
岡本 和士 愛知県立大学 看護学部  
紀平 為子 関西医療大学 保健医療学部  
辻 省次 東京大学医学部附属病院 神経内科  
富山 弘幸 順天堂大学医学部 脳神経内科/  
神経変性疾患病態治療探索講座  
長谷川 成人 (財)東京都医学総合研究所  
広川 佳史 三重大学医学系研究科 腫瘍病理学  
村山 繁雄 東京都健康長寿医療センター研究所

#### A. 研究目的

紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群（紀伊 ALS/PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis / Parkinsonism-dementia complex :ALS/PDC), 牟婁病）の発症因子探索と治療介入にむけて、

本年度は、1) 牟婁病の中の C9orf72 変異例：紀伊半島における集積の発見と臨床像の解明（石浦、辻、紀平、吉田、富山）2) 環境要因：ALS 減少に影響を与えた生活と食習慣の変化に関する検討、脳内 BMAA 研究（紀平、岡本、小久保）、3) 遺伝要因（石浦、岩田、辻）、4) Multiple Proteinopathy（森本、村山、長谷川）、5) iPS 細胞研究（広川、江良）、6) 臨床研究（小久保）の各項目について検討した。

#### B. 研究方法

1) 牟婁病の中の C9orf72 変異例：2011 年に北欧を中心としたヨーロッパの ALS と前頭側頭型認知症 (FTD) において新規原因遺伝子 C9orf72 が発見された。本遺伝子異常と紀伊 ALS/PDC との関連を検討した。紀伊半島における ALS, ALS/PDC 症例について、C9ORF72 内のリピート伸長変異の頻度や地域分布、ハプロタイプ解析による創始者効果についての検討を行った。C9orf72 遺伝子変異

を認めた串本 3 症例の臨床像について検討した。

9orf72 遺伝子変異を認めた三重県亀山症例の臨床像について検討した。

2) 環境要因：紀伊半島では、この 50 年間に ALS が減少し、発症年齢が高齢化している。このような変化をもたらした環境要因を明らかにすることは、神経変性疾患全般の発症要因解明や予防法につながる可能性がある。1960 年代と現在とで生活・食習慣に生じた変化を明らかにする：紀伊半島南部の大島地区住民と穂原地区住民、及び対照地区住民(紀伊半島北部山間部など)を対象とし、生活・食習慣の変化に関する自記式アンケートを実施した。食品摂取頻度、嗜好、仕事の内容、身体疲労、飲み水等に関する 63 項目の質問について、若い頃 (20-30 歳代、1960 年代を想定)と現在との違いを、「よく食べた」(毎日~隔日程度)、「滅多に食べなかった」(週に 1 回以下)、或いは、「多かった」、「あまり多くなかった」の 2 項選択で回答を求めた。また、住民健診では、身体測定、認知症の検査として HDS-R, MMSE, FAB, においの検査 (カード型嗅覚同定検査)、血清元素測定、DNA の酸化的ストレスの指標とされる尿中 8-OHDG 測定を実施した。栄養摂取量の経時的変化：2003 年と 2011 年に多発地の住民を対象に行った栄養調査結果を比較し、栄養摂取状況の変化と ALS 発症頻度の低下との関連を明らかにする。2003 年と 2010 年に紀伊半島南部の古座川町(多発地)と花園地区(対象地区)の 20 歳以上の居住者を対象に、生活状況調査と自記式 (一部聞き取り) による食品摂取頻度調査を行った。脳内 BMAA の解析：Guam ALS/PDC では、ソテツの根茎に寄生するシアノバクテリアが産生する神経毒である BMAA (β-methylamino-L-alanine) を発症要因とする仮説がある。牟婁病 (Kii ALS/PDC) 脳における BMAA の存在の有無を明らかにすることで、BMAA が紀伊 ALS/PDC の病態に及ぼす影響について検討する。対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例 (男性 1 名、女性 4 名、平均年齢 69.0 歳、ALS 2 例 PDC 3 例、平均罹病期間 7.4 年) と age-matched の非神

経疾患 3 例、common ALS 2 例。方法は、患者脳由来蛋白質の加水分解産物を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、質量分析計 (LC/MS/MS)、アミノ酸分析器 (AAA) によって BMAA の有無について解析した。

3) 遺伝要因：疾患遺伝子の探索：多発大家系に着目し、連鎖解析の進め方についての再検討を行うとともに、本家系に属する 2 名の発症者についてさらに全ゲノム配列解析を追加した。大家系 (発症者 9 名、非発症者 25 名) については以前の研究でマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型が決定されている。パラメトリック二点解析 (浸透率 90% の不完全浸透優性遺伝モデル、disease allele frequency 1%、phenocopy 3%) を行った。さらに、本疾患の遺伝子座の絞り込みを進める上で最適と考えられる連鎖解析のアプローチについて検討をした。また、本家系に属する 2 名の末梢血由来の genomic DNA について、HiSeq2000 (Illumina) を用いて全ゲノム配列解析を行った。エピゲノム解析：ゲノム DNA の CpG メチル化は当該遺伝子の発現に影響を及ぼす事が知られている。本疾患が家系内においてパーキンソニズム (PDC)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) といった表現形が異なる事が知られている。特に、時代の変遷によって ALS の表現形が減少し、PDC の表現形が残るようになっており、その原因としてエピゲノム情報の変化を想定した。ゲノム DNA の CpG アイランドのメチル化について特定の遺伝子について検討した。対象は 16 例でそのうち PDC は 8 例、ALS は 8 例。脳の部位としては側頭葉 14、頭頂葉 3、小脳 1 であった。我々が所有する側頭葉 88、頭頂葉 90、小脳 78 例を正常対照として使用した。選定した遺伝子としては MAPT, GSK3B, APP, SNCA であり、三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群と病理学的に類似性のある神経変性疾患の関連遺伝子とした。それぞれの遺伝子で解析する CpG アイランドについてはアルツハイマー病、パーキンソン病などで我々が異常を同定した部位に設定した。メチ

ル化率は bisulfite 変換後の PCR を使用した pyrosequencing 法によって測定した。

4) Multiple Proteinopathy: 小脳の免疫組織化学的検討: Kii ALS/PDC における tauopathy の広がり、並びに小脳病変を詳細に検討した。また、ubiquitin, p62 及び ubiquilin 2 蛋白についても併せて検討を行った。穂原地区の Kii ALS/PDC 10 連続剖検例の小脳を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6  $\mu$ m/9  $\mu$ m 厚の切片を作成し、通常染色 (H.E. K.B. 染色) 特殊染色 (Gallyas- Braak 鍍銀染色) に加え、以下の各種抗体を用いて自動免疫染色装置 Ventana を用いて免疫染色を施行した。一部は Pser242 と calbindin との蛍光二重染色を施行した。 < 使用抗体 > リン酸化(p-)tau(AT-8, Pser242)、ubiquitin、p62、ubiquilin 2、calbindin。

異常蛋白質の組織病理、生化学解析: 2012 年に剖検となった 2 例の患者脳、脊髄の細胞内異常タンパク質の病変を免疫組織、生化学解析に解析する。免疫組織染色は、凍結脳の一部をホルマリン固定後、ピラトーム切片を作製し、免疫組織染色を行った。生化学解析は、凍結脳からサルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、イムノプロット解析した。タウの関しては、不溶性画分の一部を 6M グアニジン塩酸に可溶化、透析後にアルカリホスファターゼ処理による脱リン酸化を行い、蓄積タウのアイソフォーム構成を調べた。用いた抗体は、リン酸化タウを検出する AT8 と pS396、非リン酸化タウを検出する HT7 と T46、リン酸化  $\alpha$  シヌクレインに対する抗体 mAb PS129、リン酸化 TDP-43 を検出する抗体 mAb pS409/410 である。

5) iPS 細胞研究 iPS 細胞の樹立: 三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病患者の皮膚生検から、皮膚由来初代線維芽細胞を樹立する。センダイウイルスベクター (SeV ベクター) によって患者由来線維芽細胞へ初期因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を一過性に発現させ iPS 細胞の樹立を

行う。樹立した iPS 細胞については、1)アルカリホスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60 の免疫染色による iPS 細胞の確認を行う。さらに、未分化マーカーの発現を PCR にて確認する。

iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導: iPS 細胞から sonic hedgehog signal pathway の agonist と retinoic acid を用いて embryoid body を作成し、これが運動神経細胞の特徴を有することを確認する。得られた運動神経細胞を用いて、現在まで提唱されている以下の ALS 発症機序が再現できるか検討する。 ) 疫学的環境因子の影響、 ) 小胞体ストレスのメカニズム、 ) 酸化ストレスのメカニズム。

6) 臨床研究: 紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群 (ALS/PDC) では、尿中 OHdG が高値であることを報告しており (Morimoto et al. Mov. Disord. 2008)、病態に酸化ストレスの関与が想定されている。対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例 (男性 4 名、女性 1 名、平均年齢 68.4 歳、全例 PDC、平均罹病期間 9.4 年) に対するオープンラベル試験。方法は、エダラボン (1A, 30mg/回) を適当量の生食液等で用時希釈し、30 分かけて 1 日 1 回点滴静注する。週 2 日間点滴投与を 1 クールとし、24 クールを連続して行う。併用薬として ビタミン E (酢酸トコフェロール) 300mg/日と ビタミン C (アスコルビン酸) 2000mg/日を連日内服併用する。開始時と終了時に MMSE、ALSFRS-R、UPDRS、FAB、やる気スコア、CAS を評価し効果を検討する。期間は、2011 年 11 月から 2012 年 6 月まで。

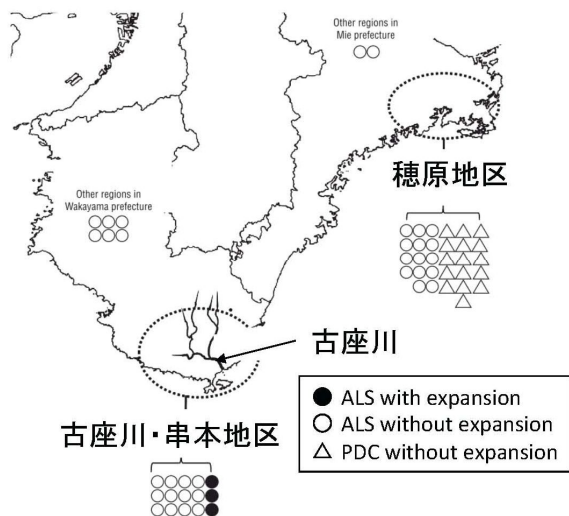
(倫理面への配慮を含む)

本研究は、三重大学、東京大学、順天堂大学、熊本大学、理化学研究所、東京都健康長寿医療センター、東京都医学総合研究所、愛知県立看護大学、関西医療大学、独立行政法人国立精神・神経医療研究センター、町立南伊勢病院の各倫理委員会の承認に基づき行った。

## C. 研究結果

1) 牟婁病の中の C9orf72 変異例: C9ORF72 内の 6 塩基 (GGGGCC) の異常伸長は、穂原地区症例 30 名については、本リピート伸長を認めなかった。一方で紀南 (串本・古座川地区) 症例 15 名 (家族例 1 名、孤発例 14 名) については、3 名 (20%) で本変異を認めた。このうち、1 例のみで家系内の類症の発症者を認めた。紀南の 3 症例に関しては、3.3Mb ~ 63Mb と非常に長い領域にわたって共通ハプロタイプを認め、創始者効果の存在が考えられた。

図 1. 牟婁地方における C9orf72 変異症例



串本地区症例 ) 死亡時 72 歳女性。臨床像は、69 歳左下肢症状で発症し、その後球麻痺、上肢へと進行した例で、上位下位運動ニューロン徴候を呈し、経過中パーキンソン症状や不随意運動、小脳症状、認知症を認めなかった。全経過: 2 年 6 ヶ月。この同胞で死亡時 78 歳男性は、75 歳時右手の脱力で発症し、76 歳舌萎縮と fasciculation を認め、また四肢に脱力と筋萎縮、fasciculation、さらに DTR 亢進を示し、78 歳呼吸困難で死亡した。認知症状や行動異常、パーキンソン症状、不随意運動、小脳症状は認めなかった。全経過: 約 3 年。 ) 死亡時 49 歳女性。家族歴なし。41 歳時左下垂足で発症、42 歳時右下垂足が出現した。47 歳呼吸障害による意識消失

発作があり、気切による人工呼吸器装着となった。頭部その後左手の脱力、次いで右手脱力が進行した。CT 特変なし。49 歳時大腸癌の肝転移にて死亡した。本例は、左下垂足で発症し、両下垂足、その後呼吸障害が急速に進行した症例で、経過中に認知症、パーキンソン症状を認めなかった。全経過: 8 年 9 ヶ月。 ) 死亡時 74 歳女性。家族歴なし。26 歳まで牟婁地方の多発地に在住歴あり、和歌山市へ移住の 46 年後に 72 歳で球麻痺にて発症した emigrant ALS であった。球麻痺が進行し、胃瘻造設。73 歳言語命令に対してやや了解が悪く、頭部 CT にて軽度大脳皮質の萎縮を認めた。74 歳呼吸不全悪化し死亡 (全経過 2 年 4 ヶ月)。臨床的には孤発性の球麻痺型 ALS と異ならなかった。血清抗 HTLV-1 抗体 (+)。皮膚生検所見: 光顕的には膠原繊維束の断裂、離解と酸性ムコ多糖類の増加を、電顕的には膠原繊維の小径化と無定形物質の蓄積を認めた。他地域のいわゆる孤発性 ALS と同様の所見を示した。

亀山地区症例: 発端者は、65 歳発症の下位運動ニューロン徴候を主体とする ALS で、その同胞が 57 歳発症の PPA 患者であった。ALS 患者は軽度の認知機能障害と前頭葉機能の低下を認めたものの PPA の合併はなく、また PPA 患者に上位下位運動ニューロン徴候などの ALS の臨床所見は全く認めなかった。

2) 環境要因 食品摂取頻度では、1960 年代に「よく食べた」が現在では摂取頻度が減少した食品として、ごはん (1960 年代 88.7% から現在 59.2% に、以下同様) 漬物 (85% から 65%)、味噌汁 (82% から 41%)、海藻 (76% から 62%) が認められた。一方、1960 年代に比し現在摂取頻度が増加した食品として、食パン (40.8% から 76.1%)、野菜サラダ (48% から 69%)、卵料理 (45% から 65%)、乳製品 (19% から 44%) といった欧米化食品が認められた。食品の入手方法は、スーパーマーケット利用が約 30% 増加した

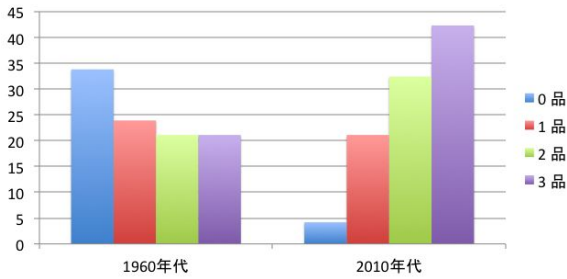


図 2. 欧米化食品を「よく食べた」と回答した住民の割合。欧米化食品として、乳製品、卵料理、野菜サラダとした。副食に欧米化食品を多く摂る住民では主食に「食パン」を摂るものが有意に多かった ( $p < 0.01$ )。

飲用水として井戸水利用は、1960年代 43.7%、現在 1.4%と著しく減少したのに対し、水道水利用は、1960年代 32.4%、現在 87.3%と著明に増加した(図 4)。大島地区では水源の変更で串本地区同様の水質となった。

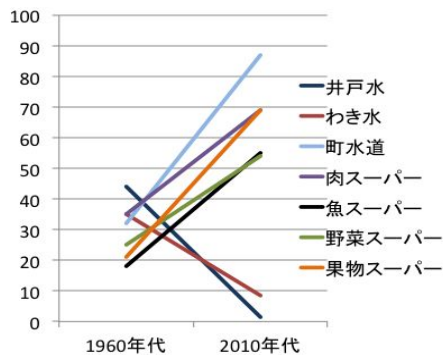


図 3. 生活習慣の変化

「よく利用した」「減多に利用しなかった」の 2 項選択で回答を求めた。井戸水とわき水の利用は減少し、各種食品購入のスーパー利用が増加した。

仕事の内容の頻度は、力仕事(1960年代 56.3%、現在 9.9%)や漁業(1960年代 32.2%、現在 7%)、林業、水田は激減した

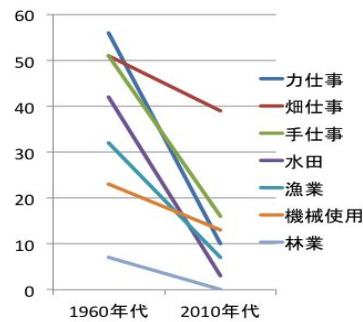


図 4. 仕事の変化。「よくした」「減多にしなかった」の 2 項選択で回答を求めた。力仕事や漁業の頻度は著減した。

栄養摂取量の経時的変化： 栄養摂取量に関して兩年のエネルギー摂取量に有意差は認められなかった。栄養摂取割合に関しては、糖質摂取割合は有意でないが低下傾向を示し、脂質摂取割合は有意な増加を、飽和及び不飽和脂肪酸は有意でないが増加傾向を認めた。ビタミン・ミネラル摂取に関して、鉄、ビタミンD、カロテンは有意な増加を、亜鉛、カルシウム、マグネシウム、ビタミンCおよびビタミンDは有意でないが増加傾向を認めた。食事のコレステロールは有意に増加していた。食品頻度摂取に関して、2010年では総食品摂取量は有意差はないが、穀類の摂取頻度は有意な低下を認め、野菜類、肉類、卵類および大豆製品の摂取頻度は有意な増加を認め、牛乳を含む乳製品は有意でないが増加傾向を認めた。同様な検討を、対照地区にて行った結果、糖質摂取割合と脂質摂取割合は増加傾向を認めた。一方、鉄、亜鉛は減少し、肉類および卵類の摂取割合には有意差が認められず、牛乳を含む乳製品の摂取割合は有意でないが減少傾向を認めた。

図 5 年度別三大栄養摂取割合の比較

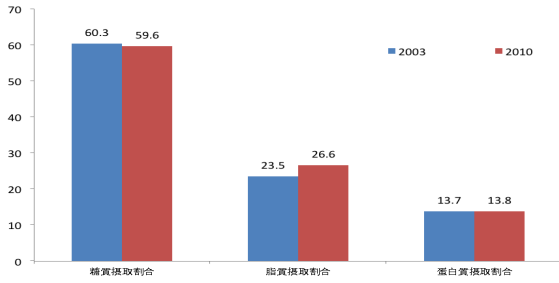


図6 脂肪酸摂取量の年度別比較

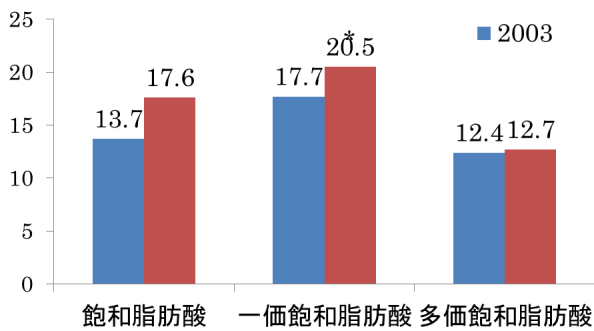


図7 カルシウム、マグネシウム及びコレステロール摂取量の年度別比較

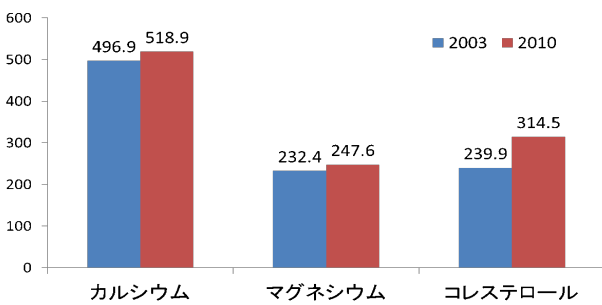


図8 ミネラルおよびビタミン摂取量の年度別比較

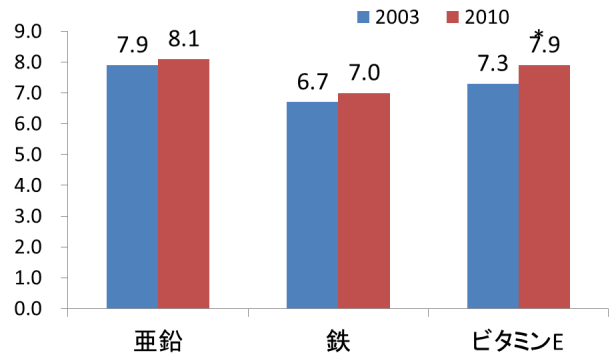
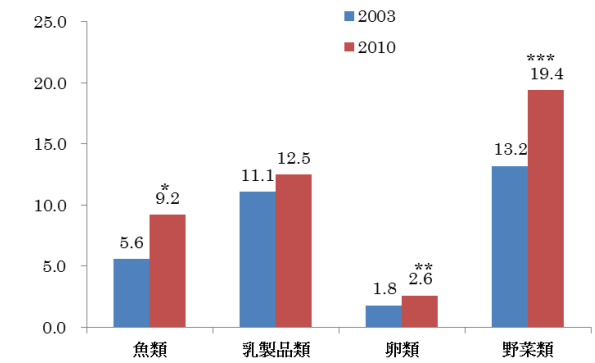
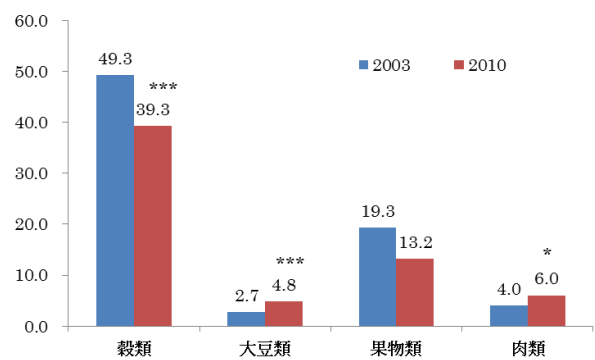


図9 食品摂取頻度割合の年度別比較



脳内 BMAA の解析：図10

## 結果

・ BMAA

	1回目		2回目	
	LC/MS/MS	HPLC	LC/MS/MS	HPLC
1 (MH)	+	+	ND	+
2 (TK)	+	+	ND	+
3 (NO)	+	+	ND	ND
4 (MH)	+	ND	ND	ND
5 (IW)	ND	ND	ND	ND

ND: not detected.

3種類の検索方法で一定の検出結果を示した症例はなかった。

3) 遺伝要因： 疾患遺伝子の探索：大家系に属する2名の married-in の発症者に関して姉妹であるという知見が得られ、連鎖解析を計算しなおし、いくつか LOD スコアが上昇したり下降したりするマーカーを見出した。また、affected-persons-only method を用いた解析では、新たに LOD スコアが 2.8 となるマーカーを認め、さらなる確認を行う必要があると考えられた。

追加で施行された2名の全ゲノム配列解析については、シーケンスは終了し、現在情報解析を行っている。 エピゲノム解析：異常を認める CpG の位置としては MAPT が非翻訳領域 exon1 の 5'側 ,GSK が exon-1 の上流であった。

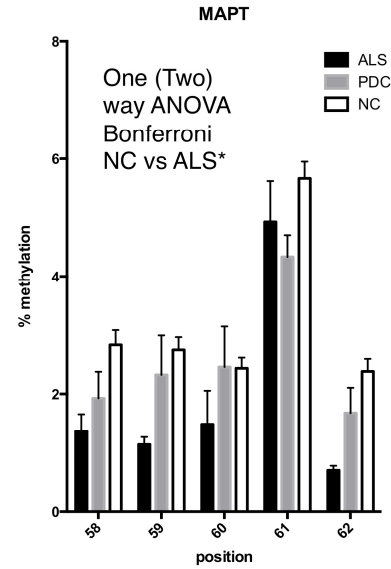
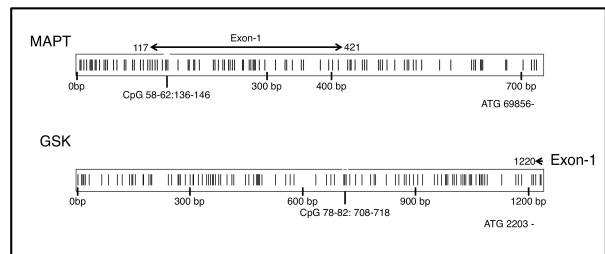


図 11 MAPT 遺伝子 CpG アイランドにおいて ALS の表現形に比較的特異的な異常を見いだした。

図 12



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



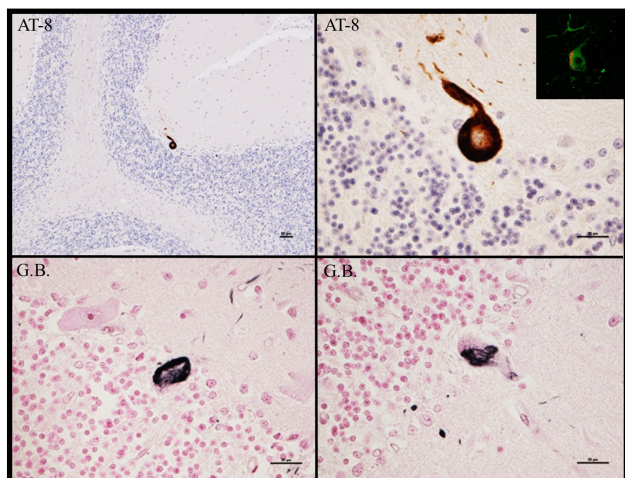
2 に対する免疫染色は全例で陰性であった。

Case/P	Age	Sex	DOI (year)	Phenotype			Types of degeneration				P-tau pathology					
				A	P	D	Dislocation of PCs	Multinuclei of PCs	Torpedo	Grumose degeneration	Cortex			WM		DN
											PCs	ML	GL	L	D	
Case 1	63	F	4	+	-	-	+	-	+	+	-	+	±	+	+	+
Case 2	70	F	13	+	-	-	+	-	+	+	-	-	±	-	±	±
Case 3	70	F	10	+	-	-	-	-	+	+	-	±	-	+	±	+
Case 4	77	M	7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 5	65	M	3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 6	76	F	6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Case 7	70	F	12	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 8	60	F	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 9	75	M	7	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	±	+
Case 10	70	F	11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Positive rate							80%	60%	100%	100%	50%	90%	80%	90%	100%	100%

表 1 . 染色結果のまとめ

torpedo、grumose 変性を全例に認め、ブルキンエの位置異常は 80%、多核形成は 60%に認める。また、リン酸化タウについては、ブルキンエ細胞に 50%、分子層に 90%、顆粒層に 80%、小葉間白質には 90%、深部白質には 100%、並びに歯状核に陽性構造物を認めた。

図 13 . ブルキンエ細胞内に銀染色、AT-8 陽性の顆粒状、線維状ないしはそれらが凝集した構造物を認め、突起にまで及んでいる。Calbindin と Pser242 との蛍光 2 重染色にてブルキンエ細胞内のリン酸化タウの蓄積が確認された。



異常蛋白質の組織病理、生化学解析 : 2012-2 例 (PDC) (60 歳にパーキンソニズムで発症され、72 歳で亡くなられた女性、大家系の 1 員)について、側頭葉、胸髄の免疫組織染色を行った。側頭様、胸髄とも一部の血管周囲のグリア細胞が AT8 強陽性を示し、加えて白質に astrocytic plaque 様の病変が観察された。また灰白質には神経細胞内のタウ病変(NFT)も観察された。また、多数のリン酸化 シヌクレイン陽性の皮質型レビー小体やレビー突起と思われる病変が皮質及び胸髄の灰白質に認められた。一方、TDP-43 の異常病変は今回調べた組織においては検出できなかった。

図 14

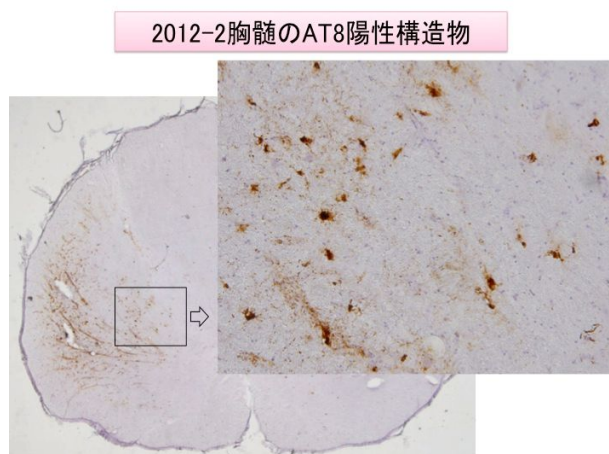


図 15

2012-2胸髄のリン酸化 $\alpha$ シヌクレイン陽性構造物

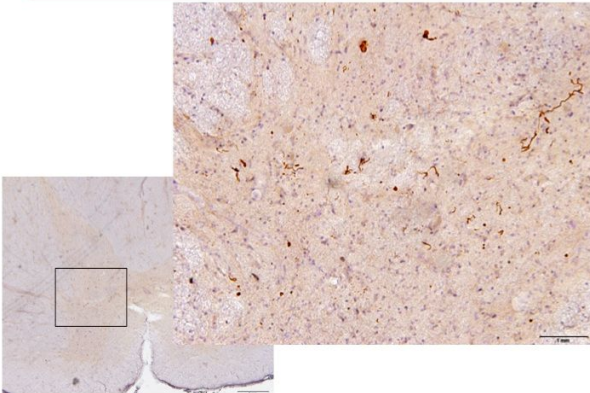
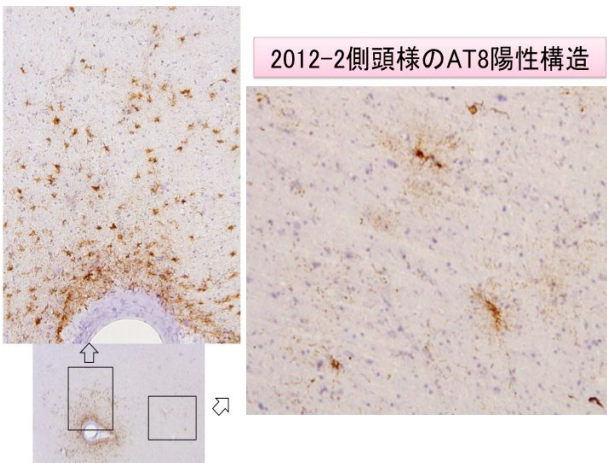


図 16

2012-2側頭様のAT8陽性構造



2012-3 例 (PDC) (60歳にパーキンソニズムで発症され、75歳で亡くなられた男性)について、同様に側頭葉、胸髄の免疫組織染色を行った。2012-2 例のような血管周囲のグリアのタウ病変は明らかではないが、側頭様の白質に astrocytic plaque 様のタウ陽性構造が多数認められ、また神経細胞にも多数の NFT が観察された。胸髄のタウ病変はごく少数の神経細胞に認められるのみであった。一方、リン酸化シヌクレインの病変は側頭様だけでなく、胸髄の神経細胞においても強く認められた。TDP-43 の異

常所見は側頭様、胸髄のいずれにおいても検出できなかった。

図 17

2012-3側頭様のAT8陽性構造

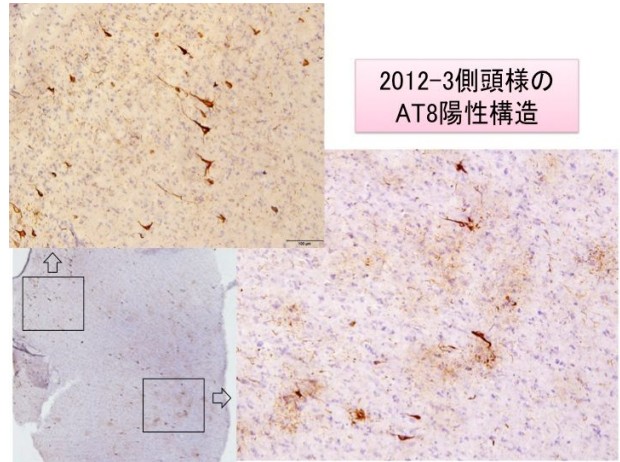
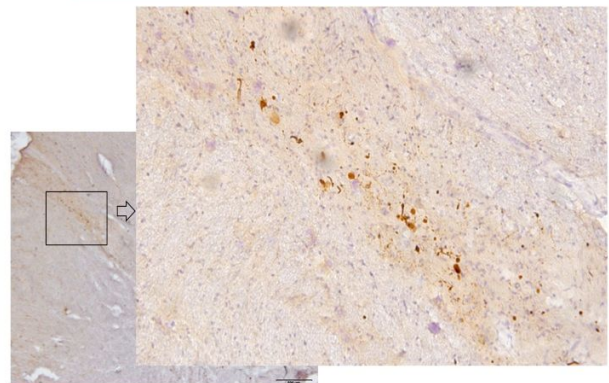


図 18

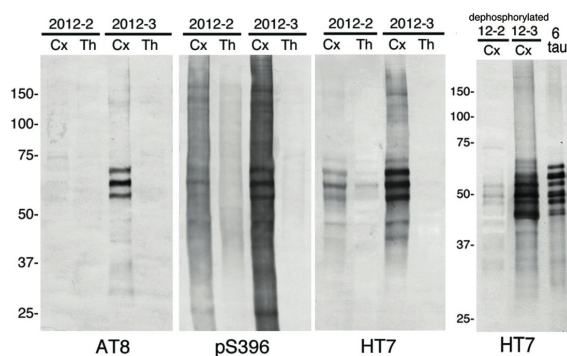
2012-3 胸髄のpSyn (PS129)陽性構造



012-2, 3 の凍結組織より、サルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、抗タウ抗体、あるいは抗リン酸化シヌクレイン、抗 TDP-43 抗体にてイムノプロット解析を行った。その結果、2012-3 の側頭葉に AT8, HT7 で強い AD-type のリン酸化タウバンド(60, 64, 68kD のトリプレット)が観察され、2012-2 の側頭様でも HT7 で類似のバンドが検出された。また 2012-2 胸髄にも

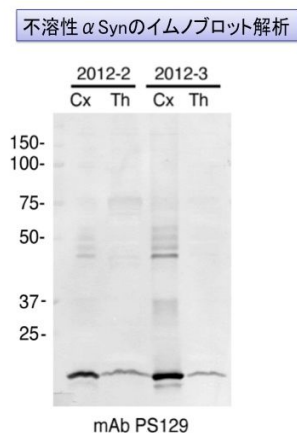
弱いながら pS396, HT7 で陽性所見が観察された。2012-2, 3 の側頭様のタウに関してはアルカリホスファターゼ処理による脱リン酸化を行ったところ、HT7 にて 3 リピートタウ及び 4 リピートタウと同じ移動度のタウバンドが検出された。

図 19



一方、リン酸化 シヌクレイン抗体によるイムノプロットでは、2012-2, 2012-3 のいずれの症例においても皮質に強い陽性バンドが検出され、胸髄にも弱いながら同様の陽性所見が検出された。高分子側にユビキチン化 シヌクレインと思われるバンドも検出され、そのバンドパターンは DLB のそれと似ていると思われた

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 iPS 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コロニーを培養、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)。

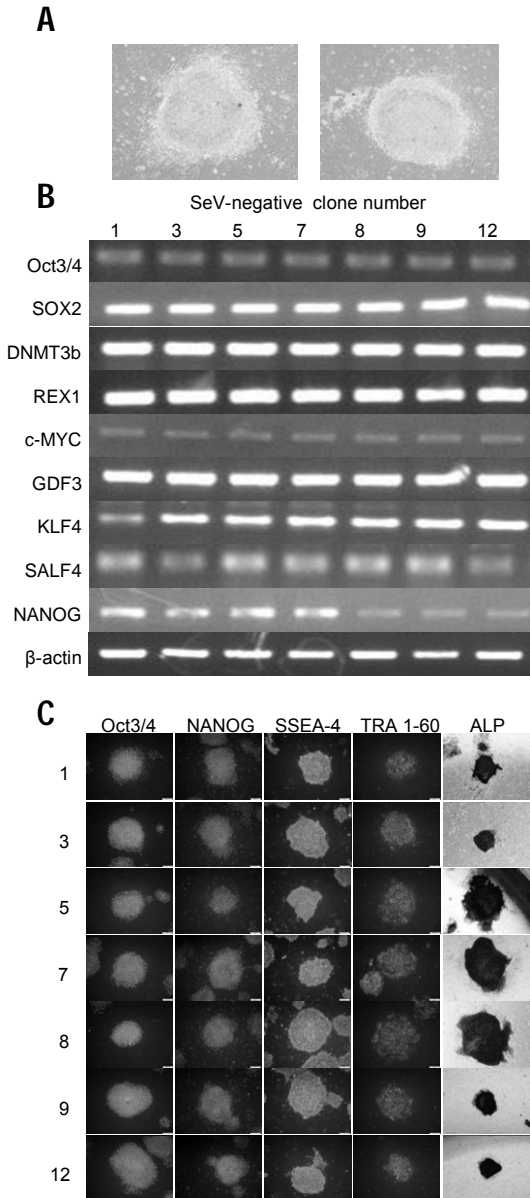


図1 樹立したiPS細胞

- 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)

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。

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ヵ月で中止した。

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

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

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、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ことで、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で報告されている。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す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。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 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、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 Syn 病変が側頭頭皮

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Synの異常病変が臨床症状と関係していて、特にリン酸化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的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、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、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, Pamphelett 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 FTLN/FTLN/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, Shiraishi 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. *ほか J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Jul;71(7):625-30.
- 31. 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、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 .
  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・パーキンソンニズム認知症複合 ( 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, Cicagol]
  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. 5. 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

1) 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>

## C9ORF72 遺伝子の異常伸長を有する紀伊 ALS 2 症例の臨床的特徴について

きひらためこ よしだそうへい かじもとよしのり いしくちひろし ひろにしまさや さかもとしげる こくぼやすまさ くずはらしげき  
紀平為子<sup>1</sup>、吉田宗平<sup>1</sup>、梶本賀義<sup>2</sup>、石口宏<sup>3</sup>、廣西昌也<sup>4</sup>、坂本繁<sup>5</sup>、小久保康昌<sup>6</sup>、葛原茂樹<sup>7</sup>、  
いしうらひろゆき つじしょうじ  
石浦浩之<sup>8</sup>、辻省次<sup>8</sup>

1:関西医療大学保健医療学部、2: 新宮市立医療センター、3: 和歌山県立医大附属病院紀北分院内科、4: 和歌山県立医大神経内科、5: くしもと町立病院、6: 三重大学大学院医学系研究科神経病態内科学、7: 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部、8: 東京大学大学院医学研究科神経内科学

**研究要旨:** 北欧の ALS-FTD 家系から新たな原因遺伝子 C9ORF72 が発見された。ALS 多発地である紀伊半島串本出身者からも本遺伝子 GGGGCT repeat の異常伸長を呈する 3 例が発見された。その内の 2 例の臨床症状を報告した。症例は下垂足で発症、上位下位運動ニューロン徴候を呈し、認知症やパーキンソン症状、小脳症状は認めなかった。EMG で neurogenic pattern、頭部 MRI で明らかな萎縮を認めず、典型的な ALS の臨床経過を呈した。紀伊 ALS は heterogenous な症例を包含すると推察されるが、C9ORF72 遺伝子異常は当地多発の一つの原因と考えられた。

### A. 研究目的

ALS-FTD (frontotemporal dementia) 家系から発見された原因遺伝子 C9ORF72 は、北欧を中心とした家族性 ALS の主要な原因であることが明らかになり、さらに孤発性 ALS においても高頻度に認められることが示された<sup>1</sup>。ALS 多発地である串本地域の出身者から本遺伝子 GGGGCT repeat の異常伸長を呈する 3 例が発見された<sup>2</sup>。その内の 2 例の臨床症状を報告する。

### B. 症例報告

**症例 1:** 死亡時 72 歳女性。

家族歴: 同胞に同病あり。

既往歴: 2002 年、S 状結腸癌摘出術、2004 年、甲状腺機能低下症。

現病歴: 2002 年 3 月、「階段や坂道でカクツとなる」ことを主訴に整形外科通院中のところ、2008 年 8 月頃、69 歳時、左下垂足が出現した。EMG で左下肢 neurogenic pattern と上肢に軽度 fasciculation が認められたため MND が疑われた。徐々に下肢の脱力が進行し、構音障害が出現した。2010 年、嚥下障害が出現した。

**2010 年 6 月**の神経学的所見 (発症 1 年 10 ヶ月後) 舌萎縮、構音障害、嚥下障害を認めたが、呼吸障害なし。運動系: 筋萎縮を上下肢に認める。MMT: Neck F (5, 5), Neck E (5, 5), 上肢 (5,5), Iliopsoas (4, 4), TA (4,2)。DTR は上下肢で亢進。錐体外路症状なし、Parkinsonism なし。

**2010 年 11 月**の所見: 自宅で手すり歩行可能。会話は困難だが、書字可能で筆談による意志疎通を行う。

**Mental Status:** alert, consciousness clear.

**HCF:** aphasia (-), apraxia (-), agnosia (-)

**CNs:** 嗅覚: 著変なし。Vision/Field 著変なし。Pupils, prompt. EOM, smooth, full. Facial sensation, 著変なし。Facial muscles 4/5 レベル。Soft palate, movement, weak. palatal reflex (+)。SCM (3-, 3-), Tz (3-, 3-) Tongue, 萎縮著明で fasciculation (+), 挺舌は歯列まで可能。

**Motor system:** 両上下肢と両手の骨間筋に筋萎縮 (+)。MMT: Neck F (5-, 5-), Deltoid (2, 4), Biceps (4, 4), Triceps (3+, 3), 左下垂足で装具使用 TA (4, 1), その他の下肢筋は 4+レベルでつたい歩き可能。

**Reflexes:** DTRs: jaw jerk (3), Biceps (2, 3), Triceps

(2, 2), Brachioradialis (2, 3), PTR (3, 2), ATR (2, 1), Babinski sign (-, +-), Chaddock (-, +-)

**Extrapyramidal sign:** Parkinsonism (-), Involuntary movement (-). Cerebellar sign (-).

**Sensory system:** 著変なし.

ANS: 著変なし.

筋電図: neurogenic pattern, NCV: 著変なし.

MRI Brain: 著変なし.

MRI Neck: 著変なし.

MRI Lumbar: L4/5 stenosis,

Th12/L1-5/S1 osteophyte

頭部 CT: 脳内に著変なし (図 1)

その後症状が進行し、2011 年 1 月には胃瘻造設、同年 2 月に死亡した。

本例は、左下肢症状で発症し、その後球麻痺、上肢へと進行した例で、上位下位運動ニューロン徴候を呈し、経過中パーキンソン症状や不随意運動、小脳症状、認知症を認めなかった。全経過: 2 年 6 ヶ月。症例 1 の同胞: 78 歳男性。

現病歴: 2009 年夏、75 歳時、「ビンのふたが開けられない」など右手の脱力が出現した。さらに「手のこわばり」で箸も使いにくくなった。同年の頸椎 MRI 検査で軽度の脊柱管狭窄所見を認めたが、感覚障害がないため経過観察となった。2010 年 11 月、舌萎縮と fasciculation を認め、また四肢に脱力と筋萎縮、fasciculation、さらに DTR 亢進を認めた。2011 年 8 月、PEG 造設したが、2012 年春、呼吸困難で死亡した。全経過: 約 3 年。

**症例 2:** 49 歳女性。

家族歴: なし。

既往歴: 特記なし。

現病歴: 2002 年 4 月、41 歳時、左下垂足、翌年 12 月右下垂足が出現した。2007 年 6 月、S 医療センターを初診し、電気生理検査などから Charcot Marie Tooth 病が疑われ経過観察中であった。2008 年 2 月、呼吸障害による意識消失発作があり、気切による人工呼吸器装着となった。

MRI 腰椎(2005 年 12 月): 著変なし

CT 頭部(2006 年): 著変なし (図 2)

筋電図: 2005 年 12 月の検査では、peroneal N. 左側導出不能、右側、遠位潜時 4.6 msec. NCV 53 m/sec. (50.1 ± 7.2), CMAP 1.0 mV と低振幅を認め axonopathy と判断された。2007 年 4 月の検査では上肢下肢に neurogenic pattern を認めた。

頭部 CT: 著変なし (図 2)。

その後左手の脱力、次いで右手脱力が進行した。2010 年 5 月、S 状結腸癌が発見され、摘出術が施行された。2011 年 1 月、大腸癌の肝転移にて死亡した。本例は、左下垂足で発症し、両下垂足、その後呼吸障害が急速に進行した症例で、経過中に認知症、パーキンソン症状を認めなかった。全経過: 8 年 9 ヶ月。

倫理面への配慮について、臨床・個人情報収集と研究のための利用、研究報告等に際して倫理的側面に充分配慮し、文書を用いた説明と本人の自由意志による同意を得てから実施した。

## C. 研究結果

本地域出身の 2 例とその同胞の臨床症状をまとめると、下肢または上肢発症で、上位下位運動ニューロン徴候を呈し典型的な ALS の臨床経過であった。明らかな認知症状や行動異常、パーキンソン症状、不随意運動、小脳症状は認めなかった。

## D. 考察

*C9ORF72* 遺伝子の GGGGCT 異常伸長は家族性 FTD と家族性 ALS の主要な原因であること、さらに孤発性 ALS でも認められることが示された。その臨床症状は多岐にわたり同一家系内でも発症年齢や罹病期間が異なり、臨床表現型においても FTD 症状を呈する例や、ALS 症状のみを呈する例が報告されている。ALS 症状としては球麻痺、球麻痺と四肢症状、或いは四肢症状のみなどを呈し、*C9ORF72* 遺伝子異常を示す ALS では、本遺伝子異常のない ALS 症例に比し発症年齢が若く、認知あるいは行動異常などの合併が多く、FTD の家族歴をもつものが多い、生存期間が短い<sup>3</sup>。FTD/ALS の神経画像では、dorsolateral frontal/insular atrophy, parietal cortex atrophy が特徴としてあげられている<sup>4</sup>。

*C9ORF72* 遺伝子異常を認めた串本出身の ALS 2

症例は、下垂足で発症、弧発性 ALS と同様の臨床症状を呈し、認知症状やパーキンソン症状を認めず、頭部 MRI 画像上も明らかな萎縮を認めなかった。紀伊半島南部に位置する古座・古座川・串本出身の ALS 症例では、その約 30%に何らかの精神症状や認知症あるいはパーキンソン症状を呈し、70%では弧発性 ALS と同様の症状を呈することをこれまで報告してきた<sup>5</sup>。今回、*C9ORF72* 遺伝子の異常伸長を呈する串本出身 ALS 症例は、いわゆる紀伊 ALS の一つの特徴とされてきた、家族歴を有し精神症状や認知症状、パーキンソン症状を呈する症例群とは異なる症例群であると考えられた。古座・古座川・串本出身の ALS では、*C9ORF72* 遺伝子異常<sup>2</sup>、*optineurin* 遺伝子変異<sup>6</sup>、家族歴を有し ALS 症状にパーキンソン症状や認知症を呈する症例<sup>5</sup>、弧発性 ALS と臨床的に区別できない例などが含まれ、heterogeneity が示唆された。このような様々な ALS 症状を呈する疾患がこの地域に集積した原因・要因を今後さらに検索する必要がある。

#### E. 結論

*C9ORF72* 遺伝子異常を認めた串本出身の ALS 2 症例は、下垂足で発症し弧発性 ALS と同様の臨床症状を示した。認知症状やパーキンソン症状を認めず、頭部 MRI 画像上も明らかな萎縮を認めなかった。*C9ORF72* 遺伝子の異常伸長は、紀伊地域における ALS 多発の一つの原因と考えられた。

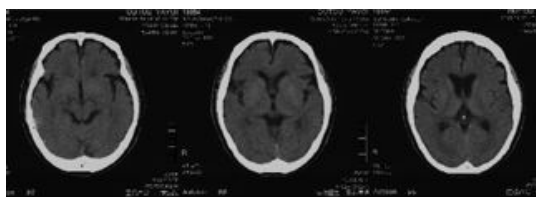


図 1 . 症例 1 の頭部 CT

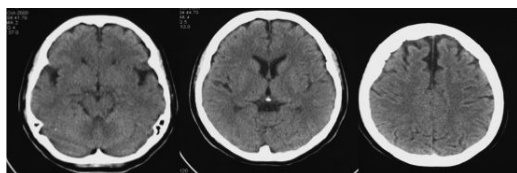


図 2. 症例 2 の頭部 CT

#### 文献

1. DeJesus-Hernandez et al., *Neuron* 2011; 72: 245-56.
2. Ishiura H, et al., *Arch Neurol.* 2012;69: 1154-8.
3. Byrne S, et al., *Lancet Neurol.* 2012; 11: 232-240.
4. Boeve B.F. et al., *Brain* 2012; 135: 765-783.
5. Kihira T. et al, *Brain and Nerve* 2010;62: 72-80.
6. Naruse H. et al., *Amyotroph Lateral Scler.* 2012; 13: 562-6.

#### F.健康危険情報 なし

#### 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.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

#### H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

## C9orf72 repeat expansion を伴った紀伊 ALS の一自験例の

### 臨床・疫学的特徴について

吉田宗平<sup>1)</sup>、紀平為子<sup>1)</sup>、尾野精一<sup>2)</sup>、小久保康昌<sup>3)</sup>、葛原茂樹<sup>4)</sup>、石浦浩之<sup>5)</sup>、辻省次<sup>5)</sup>  
関西医療大学 保健医療学部/神経病研究センター<sup>1)</sup>、帝京大学市原病院神経内科<sup>2)</sup>、  
三重大学大学院医学系研究科神経病態内科学<sup>3)</sup>、鈴鹿医療科学大学保健衛生学部<sup>4)</sup>、  
東京大学大学院医学部研究科神経内科学<sup>5)</sup>

ALS-FTD 家系から発見された原因遺伝子 C9orf72 は、北欧を中心とした FALS や SALS において高頻度の遺伝子異常であることが指摘されている。本邦では稀とされていたが、ALS 多発地の紀伊半島多発地出身者から本遺伝子 GGGGCT repeat の異常伸張を呈する 3 例が発見された。そのうちの一自験例の臨床・疫学的特徴を報告した。本例は、26 歳まで牟婁地方の多発地に在住歴あり、和歌山市へ移住の 46 年後に 72 歳で球麻痺にて発症した emigrant ALS であった。家族歴なく、経過中に軽度の認知症状を示したが、明瞭な FTD 様症状は認めず、呼吸不全で死亡。全経過は 2 年 4 か月。皮膚生検所見は、孤発性 ALS や同多発地の孤発性 ALS や家族性 ALS/PDC と同一所見で、その他、抗 HTLV-I 抗体が陽性あった。

#### A. 研究目的

ALS-FTD 家系から発見された原因遺伝子 C9orf72 は、北欧を中心とした FALS や SALS において高頻度の遺伝子異常であることが指摘されている<sup>1,2)</sup>。本邦では稀とされていたが、ALS 多発地の紀伊半島南部出身の 15 名の ALS 患者から本遺伝子 GGGGCT repeat の異常伸張を呈するものが 3 例発見された<sup>3)</sup>。そのうちの一例を経験したので、その臨床・疫学像の特徴を報告する。

#### B. 研究方法

臨床・疫学像を中心とした自験例の追跡記録に基づいた症例報告と考察。なお、個人を特定できる事項の記載は避けた。

#### C. 研究結果

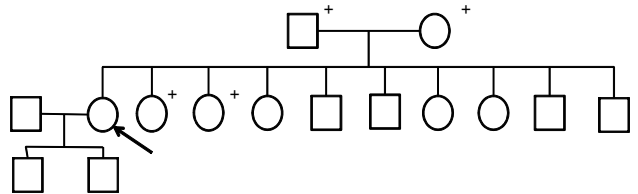
**[症例]** 72 歳女性、主婦（大正 10 年 7 月 7 日生）。

**居住歴：**和歌山市在住。出身地は、東牟婁郡串本町高富（父・母ともに高富出身）。発症までの居住歴は、24 歳で結婚し、26 歳で和歌山市へ移住。

**現病歴：**平成 6 年当初よりしゃべり難くなる。次第

にむせたり、食事ごとに気管へ引き込む、流涎あり、舌が動かなくなったとの主訴で、平成 6 年 4 月 S 病院を受診し、平成 5 月 31 日 W 医大神経病外来を紹介された。

**家族歴：**なし。



本例（ ）は、10 人兄弟の長女。妹 5 人うち 2 死亡（+）しており、死因は不明。弟 4 人は当時健在。

父：老衰 90 歳で死亡、母：胃がんで死亡。

**血族結婚：**なし。

**既往歴：**42 歳時肝障害

**現症：**舌萎縮と fasciculation あり、挺舌困難で発語不能。下顎反射亢進、両上肢のび慢性筋萎縮と腱反射の減弱。両膝蓋腱反射は亢進するが、アキレス反射は正常。Babinski 徴候両側陰性。感覚障害、膀胱直腸障害は認めず。球麻痺型 ALS と診断。

**経過：**S 病院にて平成 6 年 12 月胃瘻造設。平成 7



年当初より言語命令に対してやや了解が悪く、頭部 CT にて軽度大脳皮質の萎縮を認めた。その他、人格変化など特異な周辺症状はなかった。5月より自宅療養。9月8日呼吸不全悪化にてS病院へ再入院するも、9月25日死亡（全経過2年4か月）。

**検査所見:** EEG は 20 ~ 30  $\mu$ V, 7 ~ 8Hz の diffuse slow pattern を示した。四肢 EMG は neurogenic pattern で diffuse lower motor neuron lesions の所見。神経伝導速度は、Ulnar N ( TL/ rt: 3.4, lt:4.1 sec; MCV/rt:50, lt:57 m/sec ) Tibial N ( TL/ rt:4.8, lt:3.5; MCV/ rt:46.1, lt :41.5 m/s ) で、temporal dispersion ( - )、血清 CK 128、その他正常だが、血清抗 HTLV-1 抗体 (+)であった。

**皮膚生検所見:** 光顕的には膠原繊維束の断裂、離解と酸性ムコ多糖類の増加を、電顕的には膠原繊維の小径化と無定形物質の蓄積を認めた。

#### D. 考察

本例は、26歳まで紀伊半島南部の ALS/PDC 多発地に在住し、他地域へ移住して46年後に72歳で発症した emigrant ALS<sup>4)</sup>である。両親とも同地区の出身者で、10人兄弟の長女で、家族歴はなかった。臨床的には、球麻痺にて発症し、両上肢中心の上・下位運動ニューロン徴候を伴い構音・嚥下障害を来して呼吸不全にて全経過2年4か月で死亡した。最近、本例に *C9orf72 repeat expansion* が発見されたが<sup>3)</sup>、前頭側頭型認知症・筋萎縮性側索硬化症 (FTD/ALS) の臨床特徴は認められず、臨床的には孤発性の球麻痺型 ALS と異ならなかった。これまでの欧米からの *C9orf72 repeat expansion* を伴った FTD/ALS の報告例<sup>1,2)</sup>からすると、高齢発症にあたる。経過中、本例は軽度の認知障害を認めたが、頭部 CT 上も加齢の範囲を超えない軽度の脳萎縮で、臨床症状としても脱抑制 ( disinhibition )、無欲 ( apathy )、常同 ( stereotype ) もなく<sup>5)</sup>、前頭側頭型認知症 ( frontotemporal dementia : FTD ) の臨床診断基準<sup>6)</sup>を満たす特徴は伴っていなかった。

一方、孤発性 ALS には、長期臥褥の経過にかかわ

らず、褥瘡が生じにくいとされている。これは、ALS における陰性4徴候の一つで、臨床的には”皮膚つまみ現象” ( delayed return phenomenon )<sup>7)</sup>といわれる。本例においても、光顕的には膠原繊維束の断裂、離解と酸性ムコ多糖類の増加を、電顕的には膠原繊維の小径化と無定形物質の蓄積がみとめられ<sup>8)</sup>、他地域のいわゆる孤発性 ALS と同様の所見を示した。また、本多発地で発症した孤発性 ALS<sup>2</sup>例、家族性 ALS/PDC<sup>1</sup>例にも同様の皮膚所見が確認された。すなわち、神経系と同様に外肺葉から発生する皮膚の病理所見は、表現型 ( phenotype )としての ALS/PDC に共通した臨床的特徴と思われた。

最後に、本例は血清抗 HTLV-1 抗体陽性例で紀伊半島南部は adult T-cell leukemia ( ATL ) や T-cell leukemia-lymphoma ( ATLL ) の好発地で、HTLV-I associated myelopathy の家族集積発症が報告されている<sup>9,10)</sup>。また一方で、ALS 類似例の報告<sup>11)</sup>や human endogenous retrovirus ( HERV-K ) の発現が ALS 剖検脳で指摘されており<sup>12)</sup>、今後検討すべき課題の一つと思われた。

#### E. 結論

本例は、26歳まで牟婁地方に在住歴あり、和歌山市へ移住の46年後、72歳で球麻痺症状にて発症した emigrant ALS であった。経過中に軽度の認知症状を示したが、明瞭な FTD 様症状は認めなかった。家族歴なく、全経過は2年4か月。皮膚生検所見は、他地域の孤発性 ALS や同多発地の孤発性 ALS や家族性 ALS/PDC と同一所見を示した。また、血清抗 HTLV-I 抗体陽性のキャリアーであった。

#### 文献

1. Bradley FB, Kevin BB, Neill RG-R, et al: Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. Brain. 2012;135: 765-783.
2. Byrne S, Elamin M, Bede P, et al.: Cognitive

- and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study. *Lancet Neurol.* 2012;11:232-240.
3. Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, et al.: C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol.* 2012;69:1154-1158.
  4. 吉田宗平、紀平為子、河本純子ら：紀伊半島筋委縮性側索硬化症（ALS）の最近の疫学像 Migration study を中心として－. *神経内科.* 1994;41:369-376.
  5. Snowden JS, Neary D, Mann DMA, et al.: Fronto-Temporal Lobar Degeneration: Fronto-temporal dementia, progressive aphasia, semantic dementia. *Clinical Neurology and Neurosurgery Monographs,* Churchill Livingstone, New York, 1996.
  6. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, et al.: Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology.* 1998;51:1546-1554.
  7. Ono S, Toyokura Y, Mannen T, et al.: “Delayed return phenomenon” in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 1988;77:102-107.
  8. Ono S, Nagao K and Yamauchi M: Amorphous material of the skin in amyotrophic lateral sclerosis: A morphologic and biochemical study. *NEUROLOGY.* 1994;44:537-540.
  9. Karitani Y, Kobayashi T, Koh T, et al.: Adult T-cell leukemia on the east coast of Kii Peninsula – presentation of an anti-ATLA-negative case. *Jpn J Clin Oncol.* 1983;13 Suppl2:269-280.
  10. Miyai I, Fujita M, Kitahara Y, et al.: Familial cases of HTLV-I-associated myelopathy. *Ann Neurol.* 1987;22:601-605.
  11. Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, et al.:

- HTLV-I-associated myelopathy (HAM)/tropical spastic paraparesis (TSP) with amyotrophic lateral sclerosis-like manifestations. *J neurovirol.* 2000;6:544-548.
12. Douville R, Liu J, Rothstein J, et al.: Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *ANN NEUROL* 2011;69:141-151.

#### **F.健康危険情報**

なし

#### **G.研究発表**

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1. 論文発表  
なし
- 2.学会発表  
なし

#### **H.知的所有権の取得状況（予定を含む）**

- 1.特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 三重県 ALS/FTD 患者における *C9orf72* 遺伝子変異

分担者：

とみやまひろゆき  
富山弘幸<sup>1),2)</sup>

順天堂大学脳神経内科<sup>1)</sup>，順天堂大学神経変性疾患病態治療探索講座<sup>2)</sup>

共同報告者：

ないとうゆたか おおがきこうたろう  
内藤 寛<sup>3),4)</sup>，大垣光太郎<sup>1)</sup>，  
りげんてつ ふなやままなぶ たむらあさこ たにくちあきら ささきりょうげん  
李元哲<sup>5)</sup>，船山学<sup>1),5)</sup>，田村麻子<sup>4)</sup>，谷口彰<sup>4)</sup>，佐々木良元<sup>4)</sup>，  
はつりのぶたか くずはらしげき こくぼやすまさ  
服部信孝<sup>1),2),5)</sup>，葛原茂樹<sup>6)</sup>，小久保康昌<sup>4)</sup>

伊勢赤十字病院神経内科<sup>3)</sup>，三重大学神経内科<sup>4)</sup>，  
順天堂大学老人性疾患・病態治療研究センター<sup>5)</sup>，  
鈴鹿医療科学大学保健衛生学部<sup>6)</sup>

### 研究要旨

三重県 ALS/FTD (Amyotrophic Lateral Sclerosis / Frontotemporal Dementia)における *C9orf72* 遺伝子変異の意義を明らかにすることを目指し、*C9orf72* 遺伝子変異（イントロン 1 の GGGGCC 繰り返し配列の伸長）の 1 家系の患者の臨床的、遺伝学的意義を、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比較しつつ検討した。

本家系は、三重県北部亀山市出身の ALS 患者 1 名を発端者とし、その同胞に Primary Progressive Aphasia (PPA) を合併していることが後にわかり、同じ遺伝子変異によることが判明した家系であった。その同胞間で臨床像は全く異なり、本 ALS 患者に PPA の合併はなく、また本 PPA 患者に ALS の臨床所見は全く認めなかった。今回の結果から、一見孤発例とみられる症例や、異なる疾患の偶然的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、ということが示された。*C9orf72* 変異による ALS/FTD は ALS/PDC (Parkinsonism-Dementia Complex) と overlap した症候も認めるが、これまでに既報告の臨床像、病理像を考えると異なる疾患群ではないかと考えられた。

*C9orf72* 遺伝子変異は白人の創始者効果によって広がったりスクアレルによることがわかっており、ALS、認知症、パーキンソニズムの原因や遺伝的背景となり得ると考えられてきている。三重県南部においては、ALS、FTD、パーキンソニズム症例が地域特異性ももちつつ集積しており、事実古座川地域の ALS 症例において *C9orf72* 遺伝子変異が複数例で同定されている。さらにその広がり、遺伝的背景を明らかにするため、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が望まれる。

## A. 研究目的

三重県 ALS/FTD (Amyotrophic Lateral Sclerosis / Frontotemporal Dementia)における *C9orf72* 遺伝子変異の意義を明らかにし、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の臨床的、遺伝的関連について検討する。

## B. 研究方法

我々は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 1 家系を経験した。その患者の臨床的、遺伝学的意義を検討するとともに、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。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

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。

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 (parkinsonism-dementia complex) と overlap した症候も認めしたが、ALS/PDC と全てで共通しているわけではなかった。

## D. 考察

今回の結果から、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 (parkinsonism-dementia complex) 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。

*C9orf72* 遺伝子変異は白人 (フィンランド人) の創始者効果によって広がったリスクアレルによることがわかっており、ALS、認知症、パーキンソニズムの原因や遺伝的背景となり得ると考えられてきている。実際、本家系の発症者 2 名もフィンランド人からの共通リスクハプロタイプを持っていたと考えられた。三重県南部においては、ALS、FTD、パーキンソニズム症例が地域特異性ももちつつ集積しており、事実古座川地域の ALS 症例において *C9orf72* 遺伝子変異が複数例で同定されている。さらにその広がり、遺伝的背景を明らかにするため、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が望まれる。

## E. 結論

*C9orf72* 遺伝子変異をもつ三重県 ALS/FTD 患者において、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との臨床的、遺伝的関連について検討した。

*C9orf72* 遺伝子変異は ALS の原因遺伝子として欧米で頻度が高いことが報告されているが、ALS のみならず認知症や失語症などを呈する神経変性疾患においても病態解明から治療法の開発に繋がる可能性のある重要な遺伝子であるといえる。本邦、特に本研究班においても、*C9orf72* 遺伝子変異がどのように孤発性も含む神経変性疾患の発症機序に関与しているのか、さらなる疫学的、分子遺伝学的、病理学的検討が期待される。

## F.健康危険情報

特になし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.

### 2.学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし
- 3.その他：特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究班  
(分担)研究報告書

## 表題 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

報告者氏名: きひら ためこ おかもと かずし よしだ そうへい えがみ いわい けいこ わださちこ  
紀平 為子<sup>1</sup>、岡本和士<sup>2</sup>、吉田宗平<sup>1</sup>、江上いすず<sup>3</sup>、岩井恵子<sup>4</sup>、和田幸子<sup>4</sup>、  
こくぼ やすまさ くずはらしげき  
小久保康昌<sup>5</sup>、葛原茂樹<sup>5,6</sup>

所属：1:関西医療大学保健医療学部、2: 愛知県立大学看護学部、3: 名古屋文理大学健康生活学部 4: 関西医療大学保健看護学部、5: 三重大学大学院医学系研究科神経病態内科学、6: 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部

**目的**：紀伊半島南部地域の ALS 発症頻度の低下に関する要因を究明するため、1960 年代と現在を比較し当地域の生活・食習慣の変化を明らかにする。**方法**：紀伊半島南部地区、対照地区住民に、食品摂取頻度、仕事、身体疲労、飲み水などに関して 1960 年代と現在の変化を尋ねる自記式アンケートを実施した。**結果**：当地域では近年、食パン、乳製品、野菜サラダの摂取頻度の増加など食習慣の欧米化、食品調達の広域化、農・漁業就労の頻度減少による力仕事の著減、町水道の利用増加で飲用水の水質の均一化が認められた。**考察**：これらにより、抗酸化物質等の摂取増加、激しい身体負荷の軽減がもたらされ、ALS の危険因子とされる酸化的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た。

### A.研究目的

紀伊半島南部では 1950-1960 年代に ALS の多発が認められたが、最近では、発症率の低下や発症年齢の高齢化など疫学的変化が認められている。これらの変化に環境・生活習慣など外的要因の関与が推察されるが、その具体的な内容は必ずしも明らかではない。当地域の ALS 減少に関連する外的要因を究明することは、ALS の発症要因の解明や発症予防を検討する上で重要と考えられる。本研究では紀伊半島南部多発地において ALS 発症頻度の低下と関連して 1960 年代と現在とで生活・食習慣にどのような変化が認められたかを明らかにする。

### B.研究方法

紀伊半島南部の大島地区住民と穂原地区住民、及び対照地区住民(紀伊半島北部山間部など)を対象とし、生活・食習慣の変化に関する自記式アンケートを実施した。食品摂取頻度、嗜好、仕事の内容、身体疲労、飲み水等に関する 63 項目の質問について、若い頃 (20-30 歳代、1960 年代を想定)と現在での違いを、「よく食べた」(毎日~隔日程度)、「滅多に食べなかった」(週に 1 回以下) 或いは、「多かった」

「あまり多くなかった」の 2 項選択で回答を求めた。大島地区では本アンケートを住民健診時(平成 24 年 7 月 28-29 日)、穂原地区では穂原講演会(同年 11 月 25 日)、対照地区は地区集會時(同年 10 月 22 日)に実施した。

これらのアンケート調査結果と、住民健診での検査結果を比較し、生活習慣が健康に及ぼす影響につき検討した。住民健診では、身体測定、認知症の検査として HDS-R, MMSE, FAB, においの検査(カード型嗅覚同定検査)、血清元素測定、DNA の酸化的ストレスの指標とされる尿中 8-OHdG 測定を実施した。

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

### C.研究結果

本研究への参加者は大島地区 71 名(男性 15 名、女性 56 名、平均年齢  $76.2 \pm 8.2$  歳)、穂原地区 16 名、対照地区 10 名でアンケートの回収率は 100%であった。

1. 食品摂取頻度で、1960年代に「よく食べた」が現在では摂取頻度が減少した食品として、ごはん(1960年代 88.7%から現在 59.2%に、以下同様)、漬物(85%から 65%)、味噌汁(82%から 41%)、海藻(76%から 62%)が認められた。一方、1960年代に比し現在摂取頻度が増加した食品として、食パン(40.8%から 76.1%)、野菜サラダ(48%から 69%)、卵料理(45%から 65%)、乳製品(19%から 44%)が認められた。一方、魚介類・干物や煮野菜の摂取頻度は、1960年代も現在もともに「よく食べる」が80%以上であり、肉料理も摂取頻度は多くないが1960年代も現在も同様に25-30%であり、年代による変化はなかった。副食の欧米化を検討するため、乳製品(牛乳、チーズ、ヨーグルト)、卵料理、野菜サラダの3品のうち、全く摂らない、1品、2品、3品摂取する者の頻度を1960年代と現在(2010年代)で比較した。1960年代にこれら欧米化食品を全く摂らなかった者が33.8%から4.2%に著減し、逆に3品摂る者が21.1%から42.3%へと2倍に増加した(図1)。副食に欧米化食品を多くとる住民では主食に「食パン」を摂る者が有意に多かった( $p<0.05$ )。

現在「食パンをよく食べる」と回答した住民では、血清無機リンが高く( $p<0.05$ )、収縮期血圧が低値( $p<0.05$ )を示したが、骨密度は低値( $p<0.05$ )であった。現在「野菜サラダをよく食べる」と回答した住民では、体重、身長、握力が高値(各々 $p<0.05$ )で、さらにカード型嗅覚同定検査、MMSE、およびFABで高得点(各々 $p<0.05$ )を示した(図2)。一方、現在「干物をよく食べる」と回答した住民では、血清無機リン、血清Mgが低く(各々 $p<0.05$ )、血清Feと尿中8-OHDGが高値(各々 $p<0.05$ )であった(図3)。

このような食生活の欧米化傾向は、穂原地域住民でも認められ、欧米化食品3品を摂取する者の割合は、14.3%から60%へと増加した。対照地区住民でも同様に22.2%から50%へと増加した。

食品の入手方法は、スーパーマーケット利用が約30%増加した(図4)。

2. 仕事の内容の頻度は、力仕事(1960年代 56.3%、現在 9.9%)や漁業(1960年代 32.2%、現在 7%)、林業、水田は激減したが、畑仕事は(1960年代 50.7%、現在 39.4%)緩やかな減少であった(図5)。1960年代に「漁業や力仕事をよくした」と回答した住民

では、骨密度若年比と血清Fe値が高値(各々 $p<0.05$ )を示したが、血清アルブミン値は低値( $p<0.05$ )を示し、尿中8-OHDG値が高値を示す傾向がみられた( $P=0.197$ )。

3. 飲用水として井戸水利用は、1960年代 43.7%、現在 1.4%と著しく減少したのに対し、水道水利用は、1960年代 32.4%、現在 87.3%と著明に増加した(図4)。大島地区では水源の変更で串本地区同様の水質となった。

#### D. 考察

当地域では、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<sup>1</sup>。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<sup>2</sup>。

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。

#### E. 結論

本研究では、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的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。

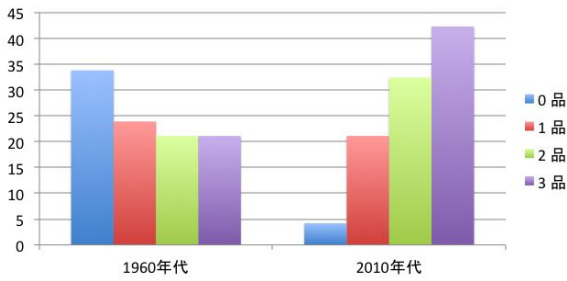


図1．欧米化食品を「よく食べた」と回答した住民の割合．欧米化食品として，乳製品，卵料理，野菜サラダとした．副食に欧米化食品を多く摂る住民では主食に「食パン」を摂るものが有意に多かった ( $p < 0.01$ ).

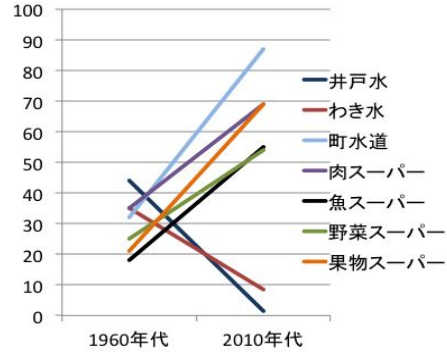


図4．生活習慣の変化

「よく利用した」「滅多に利用しなかった」の2項選択で回答を求めた．井戸水とわき水の利用は減少し、各種食品購入のスーパー利用が増加した．

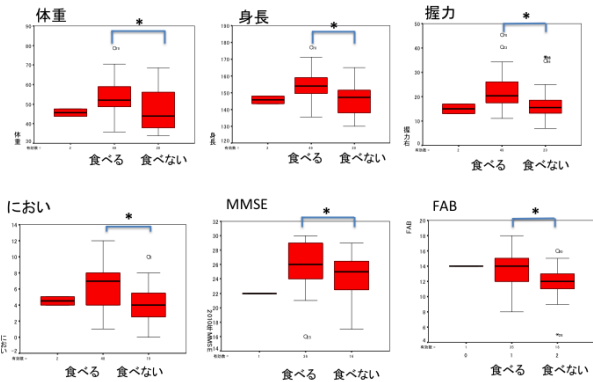


図2．「現在野菜サラダをよく食べる」と回答した住民の特徴．野菜サラダをよく食べる者では、身体計測、認知症検査で高得点を示した．

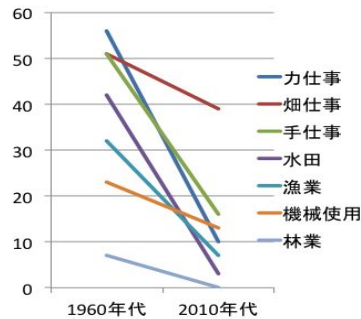


図5．仕事の変化．「よくした」「滅多にしなかった」の2項選択で回答を求めた．力仕事や漁業の頻度は著減した．

文献

- Halliwel B. Am J Clin Nutr 2000; 72: 1082-7.
- Schmidt S. et al., J Neurol Sci. 2010; 291: 22-29.

## F.健康危険情報 なし

## 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. 学会発表

1. T Kihira, I Sakurai, S Yoshida, et al. Neutron

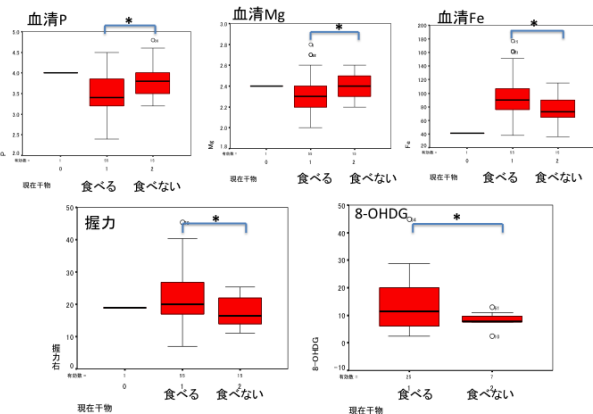


図3．「現在干物をよく食べる」と回答した住民の特徴．干物をよく食べると回答した者は、尿中8-OHDG 値が有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ).



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

#### **H.知的所有権の取得状況（予定を含む）**

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

## 紀伊半島南部 ALS 多発地域における栄養摂取量の継時的変化に関する検討

岡本 和士<sup>1)</sup>

紀平 為子<sup>2)</sup>、江上いすず<sup>3)</sup>、小久保 康昌<sup>4)</sup>、葛原茂樹<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>愛知県立大学看護学部・疫学

<sup>2)</sup>関西医療大学、<sup>3)</sup>名古屋文理大学、<sup>4)</sup>三重大学医学部・神経内科

<sup>5)</sup>鈴鹿医療科学大学

### 研究要旨

[目的] 紀伊半島南部ではかつて ALS の多発が認められていたが、近年では発症率の低下が認められてきた。これまで、この変化に影響を与えた要因、特に環境及び生活関連要因の解明に関する検討は私の知る限り皆無である。かつて発表者は ALS の発症に栄養要因が関連することを報告した。そこで、本研究では 2003 年と 2011 年に多発地の住民を対象に行った栄養調査結果を比較し、栄養摂取状況の変化と ALS 発症頻度の低下との関連を明らかにすることにある。[方法] 2003 年と 2010 年に紀伊半島南部の古座川町(多発地)と花園地区(対象地区)に 20 歳以上の居住者を対象に、生活状況調査と自記式(一部聞き取り)による食品摂取頻度調査を行った。[結果] 1. 栄養摂取量に関して兩年のエネルギー摂取量に有意差は認められなかった。栄養摂取割合に関しては、糖質摂取割合は有意でないが低下傾向を示し、脂質摂取割合は有意な増加を、飽和及び不飽和脂肪酸は有意でないが増加傾向を認めた。2. ビタミン・ミネラル摂取に関して、鉄、ビタミン D、カロテンは有意な増加を、亜鉛、カルシウム、マグネシウム、ビタミン C およびビタミン D は有意でないが増加傾向を認めた。食事中的コレステロールは有意に増加していた。3. 食品頻度摂取に関して、2010 年では総食品摂取量は有意差はないが減少していたが、穀類の摂取頻度は有意な低下を認め、野菜類、肉類、卵類および大豆製品の摂取頻度は有意な増加を認め、牛乳を含む乳製品は有意でないが増加傾向を認めた。同様な検討を、対照地区にて行った結果、糖質摂取割合と脂質摂取割合は増加傾向を認めた。一方、鉄、亜鉛は減少し、肉類および卵類の摂取割合には有意差が認められず、牛乳を含む乳製品の摂取割合は有意でないが減少傾向を認めた。本検討で、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、さらに一部の栄養素及び食品にて対照地区と異なる変化を認めたことは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を示唆する知見と考えられた

### A. 研究目的

紀伊半島南部は、神経難病である筋萎縮性側索硬化症と認知症を伴うパーキンソン症候群の多発地帯であることが、以前から知られている。さらに、本地域にはパーキンソン病に似た運動障害と認知症を特徴とするパーキンソン認知症複合と呼ばれる疾患も多く見られる。これまでこれまでに飲み水や食べ物などの環境要因に関する調査研究は行われてきたが、未だその原因は不明である。さらに、近年

は発症率の低下が報告されてきた。この変化には主に生活関連要因の影響が大きいと推測されるも、この解明に関する検討は、私の知る限り皆無である。そこで、本研究では 2003 年と 2011 年に多発地の住民を対象に行った栄養調査結果を比較し、栄養摂取状況の変化と ALS 発症頻度の低下との関連を明らかにすることにある。

## B. 研究方法

### 1. 調査対象および調査方法

本研究は2003年と2010年に紀伊半島南部の古座川町(多発地)と花園地区(対象地区)に20歳以上の居住者を対象に、生活状況調査と自記式(一部聞き取り)による食品摂取頻度調査を行った。

対象者のうち、アンケートに回答した2003年144名(平均年齢 $62.5 \pm 13.3$ 歳)と2010年477名(平均年齢 $67.4 \pm 14.8$ 歳)であった。多発地および対象地区とも2010年の回答者は2003年に比べ有意に高齢であったため、そこで、本検討の解析対象者として両地区とも30-59歳(2003年51名、2010年120名)を用いた。

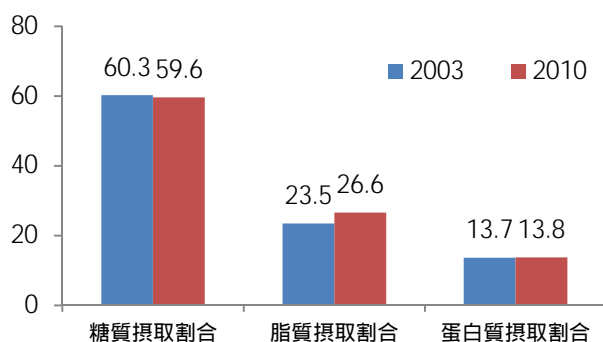
統計学的有意差の検定には、平均値の差の検定にはt-検定を、割合の差の検定には $\chi^2$ 検定を行った。

## C. 研究結果

### 1. 三大栄養素の摂取量及び摂取割合の比較

栄養摂取量に関して両年のエネルギー摂取量に有意差(2003: 1942kcal; 2010: 1996kcal)は認められなかった。栄養摂取割合に関しては、糖質摂取割合は有意でないが低下傾向を示し、脂質摂取割合は有意な増加を認めた(図1)。

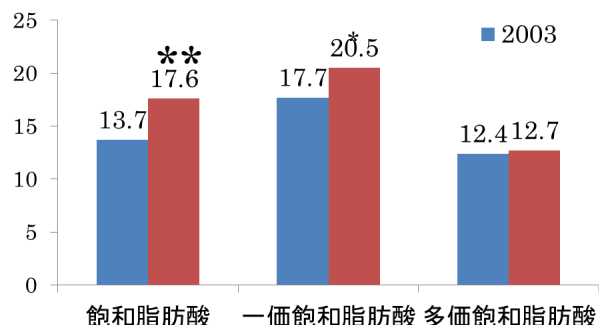
図1 年度別三大栄養摂取割合の比較



### 2. 年度別脂肪酸摂取量の比較

脂肪摂取のうち、2003年に比べて2010年に飽和及び一価不飽和脂肪酸は有意な増加を認めた。一方、2010年における多価不飽和脂肪酸は有意でないが、2003年に比べ増加傾向を示した(図2)。

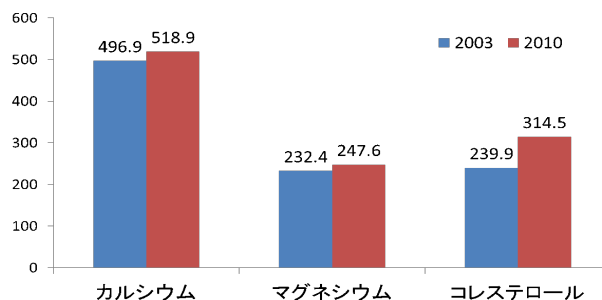
図2 脂肪酸摂取量の年度別比較



### 3. ミネラル及びコレステロール摂取量の比較

カルシウム、マグネシウムおよびコレステロールの摂取量は、いずれも2003年に比べ2010年には有意ではないが増加傾向を認めた。一方、対象地区では、多発地と同様コレステロール摂取量は増加していたが、カルシウム及びマグネシウム摂取量は有意ではないが減少していた(図3)。

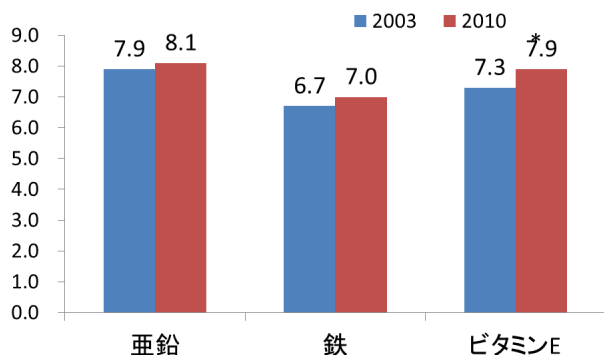
図3 カルシウム、マグネシウム及びコレステロール摂取量の年度別比較



### 4. ミネラルおよびビタミン摂取量の比較

カロテン摂取量は、2003年(1684 $\mu$ g)に比べて2010年には3130 $\mu$ gと有意な増加を認めた。カルシウム、マグネシウムおよびコレステロール摂取量は有意でないが、2003年に比べ増加傾向を示した。一方対象地区では、カロテン摂取量は多発地同様増加を認めたが、カルシウム、マグネシウムおよびコレステロール摂取量はいずれも減少していた(図4)。

図4 ミネラルおよびビタミン摂取量の年度別比較

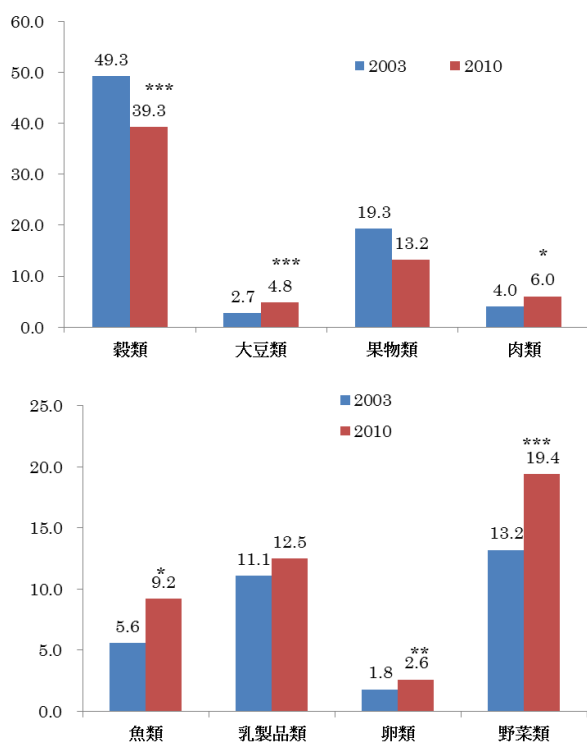


### 5. 食品摂取頻度別比較

2003年に比べ、2010年では穀類と果物類の摂取割合は有意な減少を、肉類、魚類、卵類および野菜類の摂取割合は有意な増加を認めた。

対照地区でも、多発地と同様に穀類摂取割合は有意な減少、肉類、魚類、野菜類の摂取割合は有意な減少を認めた。しかし、乳製品類および卵類の摂取割合は、多発地と異なり有意な減少を認めなかった(図5)。

図5 食品摂取頻度割合の年度別比較



### D. 考察

本研究にて、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、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ことで、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につながることで報告されている。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。本研究にて、およそ7年ではあるも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えた。

### E. 結論

本検討で、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、さらに一部の栄養素及び食品にて対照地区と異なる変化を認めたことは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。

### F. 健康危険情報

特になし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
- 2 .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.

### 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

### 2.学会発表

1. 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
- 2 . 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 .
- 2 . 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 .

## 紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群における

### 脳内 BMAA の解析

主任研究者 小久保康昌<sup>1)</sup>

研究協力者 Sandra Banack<sup>2)</sup>、森本 悟<sup>3)</sup>、村山繁雄<sup>3)</sup>、富樫辰也<sup>4)</sup>、Walter G. Bradley<sup>5)</sup> Paul Alan Cox<sup>2)</sup>、葛原茂樹<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup>三重大学神経内科、<sup>2)</sup> The Institute for Ethnomedicine、<sup>3)</sup> 健康長寿医療センター、<sup>4)</sup> 千葉大学海洋バイオシステム研究センター、<sup>5)</sup>University of Miami School of Medicine  
<sup>6)</sup> 鈴鹿医療科学大学

#### 研究要旨

〔目的〕グアム島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (Guam ALS/PDC)で病因との関連が示唆されている神経毒 BMAA (β-methylamino-L-alanine) について、牟婁病 (Kii ALS/PDC)脳における存在の有無を検討する。

〔対象と方法〕対象は、5例の牟婁病患者凍結脳。(ALS 2例、PDC 3例。男性1名、女性4名。死亡時年齢60歳から77歳、平均69.8歳。罹病期間3年から13年、平均7.4年)、age-matchedの非神経疾患3例、Common ALS 2例。方法は、患者脳由来蛋白質の加水分解産物を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、質量分析計 (LC/MS/MS)、アミノ酸分析器 (AAA)によってBMAAの有無について解析した。なお、本研究は、三重大学医学部倫理委員会で承認を得ている。

〔結果および考察〕3種類の解析結果からは、牟婁病5例のBMAAについて一貫した検出結果は得られなかった。

〔結論〕グアム島のALS/PDCでは、シアノバクテリアが産生する神経毒であるBMAAの持続摂取が発症に関与するという仮説があり、脳内にBMAAの蓄積が報告されている。今回、5例の牟婁病 (Kii ALS/PDC)患者脳内でBMAAが検出されなかったことから、少なくとも牟婁病ではBMAAが発症に関与は否定的である。

#### A.研究目的

グアム島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (Guam ALS/PDC)では、ソテツの根茎に寄生するシアノバクテリアが産生する神経毒であるBMAA(β-methylamino-L-alanine)を発症要因とする仮説がある。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

性を及ぼすとされ、長期に亘るBMAAの摂取がALS/PDC発症を引き起こすと想定されている。牟婁病 (Kii ALS/PDC)脳におけるBMAAの存在の有無を明らかにすることで、BMAAが紀伊ALS/PDCの病態に及ぼす影響について検討する。

## B. 研究方法

対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例（男性 1 名、女性 4 名、平均年齢 69.0 歳、ALS 2 例 PDC3 例、平均罹病期間 7.4 年）と age-matched の非神経疾患 3 例、common ALS 2 例。方法は、患者脳由来蛋白質の加水分解産物を用いて高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、質量分析計（LC/MS/MS）、アミノ酸分析器（AAA）によって BMAA の有無について解析した。

（倫理面への配慮）本研究は、三重大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

表 1 対象患者

	Phenotype	Age	Sex	Duration of illness (years)
1 (MH)	ALS	66	F	3
2 (TK)	ALS	70	F	13
3 (NO)	ALS with dementia	77	M	8
4 (MH)	PDC with ALS	60	F	7
5 (IW)	PDC with ALS	72	F	6

## C. 研究結果

5 例について、2 回ずつ解析を行った。

表 2 BMAA 結果

	結果			
	1回目		2回目	
BMAA	LC/MS/MS	HPLC	LC/MS/MS	HPLC
1 (MH)	+	+	ND	+
2 (TK)	+	+	ND	+
3 (NO)	+	+	ND	ND
4 (MH)	+	ND	ND	ND
5 (IW)	ND	ND	ND	ND

ND: not detected.

3 種類の検索方法で一定の検出結果を示した症例はなかった。

## D. 考察

Spencer らはグアム島住民が蘇鉄の実を継続的に摂取することで、含有される神経毒が ALS/PDC の発症を引き起こすという仮説を報告した。

表 3 グアム島の蘇鉄と実の調理法



彼らは、紀伊半島においても奄美大島からもたらされた蘇鉄を食することが、ALS/PDC の原因であると報告しているが、実際には、蘇鉄を食用として用いることはない。また、グアム島での蘇鉄の実の摂取量は、神経毒として想定された摂取量より大幅に少なかったことから、この仮説は一旦下火となった。

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。

表 4 蘇鉄の根茎にあるシアノバクテリア

### 蘇鉄に存在するBMAAの起源は何か？



Cox らは、Guam ALS/PDC の凍結脳を用いた解析で protein-binded BMAA 濃度の高値を報告しており、食物連鎖の中で bio-magnification された cyanobacteria 由来の BMAA が神経細胞死を誘発しているとする説を提唱している。

表5 BMAA の bio-magnification



BMAA は、AMPA/kainite レセプターを介して運動ニューロンに興奮毒性を生ずることで神経細胞死を引き起こすという。

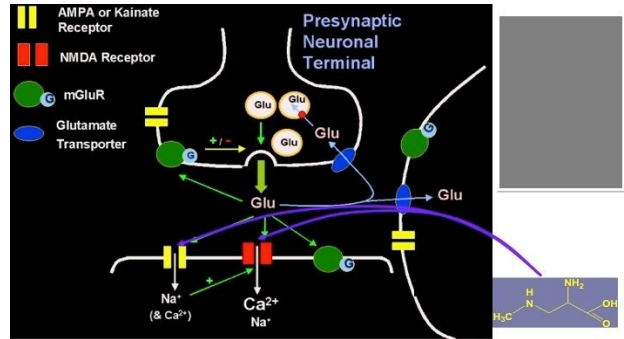
表6 Guam ALS/PDC 患者における BMAA 解析結果

**BMAA in Human Neuroproteins**

Diagnosis	Protein BMAA	Diagnosis	Protein BMAA	Diagnosis	Protein BMAA
ALS/PDC	1190	Control	ND	AD	220
ALS/PDC	644	Control	ND	AD	264
ALS/PDC	610	Control	ND	AD	26
ALS/PDC	736	Control	ND	AD	38
ALS/PDC	149	Control	ND	AD	53
ALS/PDC	433	Control	ND	AD	ND
Asympt.	82	Control	ND	AD	128
Asympt.	ND	Control	ND	AD	34
		Control	ND	AD	38
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		
		Control	ND		

mean = 439  $\mu\text{g/g}$       mean = 89  $\mu\text{g/g}$   
Acta Neurologica 110: 267-269

表7 BMAA の神経細胞興奮作用



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。

### E. 結論

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。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表



1. 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.

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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.

## 2.学会発表

1. 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

2. 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

3. 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.

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得：なし

2.実用新案登録：なし

3.その他：なし

## 紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン認知症複合（ALS/PDC）の 疾患遺伝子の探索

石浦浩之<sup>1)</sup>、三井純<sup>1)</sup>、Budrul Ahsan<sup>1)</sup>、福田陽子<sup>1)</sup>、後藤順<sup>1)</sup>、辻省次<sup>1)</sup>  
小久保康昌<sup>2)</sup>、葛原茂樹<sup>3)</sup>  
日笠幸一郎<sup>4)</sup>、吉村淳<sup>4)</sup>、土井晃一郎<sup>4)</sup>、森下真一<sup>4)</sup>  
原賢寿<sup>5)</sup>、西澤正豊<sup>5)</sup>、桑野良三<sup>5)</sup>  
豊田敦<sup>6)</sup>、藤山秋佐夫<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学神経内科、<sup>2)</sup> 三重大学神経内科、<sup>3)</sup> 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部、  
<sup>4)</sup> 東京大学新領域創成科学研究科、<sup>5)</sup> 新潟大学脳研究所、<sup>6)</sup> 国立遺伝学研究所

### 研究要旨

新たな家系に関する情報をもとに、連鎖解析を update した。また、大家系に属する 2 名の全ゲノム配列解析を追加で施行した。本疾患の遺伝学的な特性を考慮に入れた連鎖解析と、全ゲノム配列解析の結果から、ALS/PDC の発症にかかわる遺伝子の同定を引き続き試みていく。

### A. 研究目的

紀伊 ALS/PDC は、運動ニューロン症状に加えパーキンソニズム、認知症を伴い、病理学的に広範な tau の沈着を認める特徴的な疾患である。家族集積性が認められ、遺伝学的素因が強く発症に関わると推定される。現在まで多数の発症者を認める大家系の存在が知られているが、遺伝形式の点からは常染色体優性遺伝が示唆されるものの不完全浸透の可能性があること、さらには、近親婚が多く含まれていることから、常染色体劣性遺伝の可能性も排除できないことなど、遺伝形式が必ずしも明確でない。さらに、高齢発症であり、他の原因による類似疾患の混入 (phenocopy) の存在を完全には除外できず、単一遺伝子疾患にもとづくパラメトリック連鎖解析で結論を得ることが困難であった。また、大家系に属する剖検例 2 例に加えて、大家系には属していないが、病理

学的に診断が確定した症例 5 例の合計 7 例について全ゲノム配列解析を行ったものの、全例に共通する新規非同義置換は認めていない。

本年は、多発大家系に着目し、連鎖解析の進め方についての再検討を行うとともに、本家系に属する 2 名の発症者についてさらに全ゲノム配列解析を追加した。

### B. 研究方法

大家系（発症者 9 名、非発症者 25 名）については以前の研究でマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型が決定されている。パラメトリック二点解析（浸透率 90% の不完全浸透優性遺伝モデル、disease allele frequency 1%、phenocopy 3%）を行った。さらに、本疾患の遺伝子座の絞り込みを進める上で最適と考えられる連鎖解析のアプローチについて検討をした。

また、本家系に属する 2 名の末梢血由来の

genomic DNA について、HiSeq2000 (Illumina) を用いて全ゲノム配列解析を行った。

(倫理面への配慮)

東京大学、三重大学において倫理申請を行い承認された研究である。

## C. 研究結果

大家系に属する2名の married-in の発症者に関して姉妹であるという知見が得られ、連鎖解析を計算しなおし、いくつか LOD スコアが上昇したり下降したりするマーカーを見出した。また、affected-persons-only method を用いた解析では、新たに LOD スコアが 2.8 となるマーカーを認め、さらなる確認を行う必要があると考えられた。

追加で施行された2名の全ゲノム配列解析については、シーケンスは終了し、現在情報解析を行っている。

## D. 考察

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と考えられる。

## E. 結論

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

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

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, Pampillet 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/FTL/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.

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.

## **2.学会発表**

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。

## **H.知的所有権の取得状況（予定を含む）**

### 1.特許取得

特になし

### 2.実用新案登録

特になし

### 3.その他

特になし

## エピゲノム解析を通じた三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン 症候群の病態解析

岩田 淳<sup>1)</sup>

1) 東京大学医学部附属病院 分子脳病態科学

### 研究要旨

Kii-ALS-PDC の表現形のバリエーションとして筋萎縮性側索硬化症(ALS), パーキンソン・認知症複合(PDC)に大別される。同一化系内は時代の変遷と共に ALS の表現形が減少し, PDC の表現形が残存する傾向にある。その原因は食生活や就労形態などの生活スタイルの変化などにあると想定されているが, 未だ不明である。我々は, その分子病態的バックグラウンドにエピゲノム変化があると考え, 死後脳を使用して解析を行い, 特異的な変化を同定した。

### 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の病態解明を目的とし, エピゲノム解析からのアプローチにより表現形の違いとエピゲノム情報との関連の有無について検討する。ゲノム DNA の CpG メチル化は当該遺伝子の発現に影響を及ぼす事が知られている。本疾患が家系内においてパーキンソニズム(PDC), 筋萎縮性側索硬化症(ALS)といった表現形が異なる事が知られている。特に, 時代の変遷によって ALS の表現形が減少し, PDC の表現形が残るようになっており, その原因としてエピゲノム情報の変化を想定した。

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。

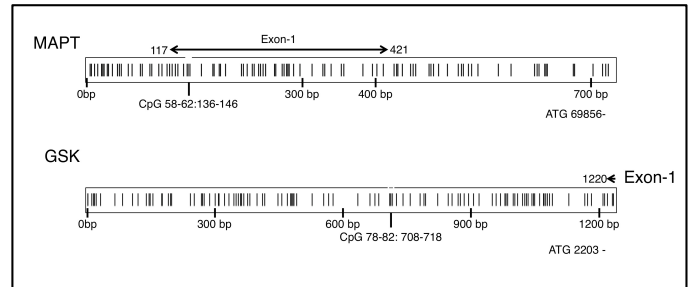
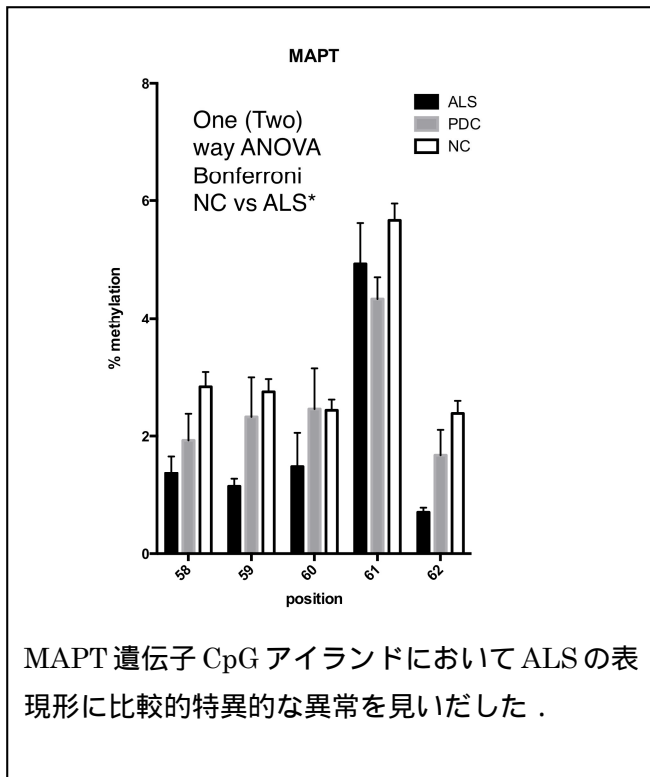
(倫理面への配慮)

東京大学大学院医学系研究科での倫理委員会許可を受けた上で解析を行った。

### B. 研究方法

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

### C. 研究結果



異常を認める CpG の位置としては MAPT が非翻訳領域 exon1 の 5'側 ,GSK が exon-1 の上流であった。

### D. 考察

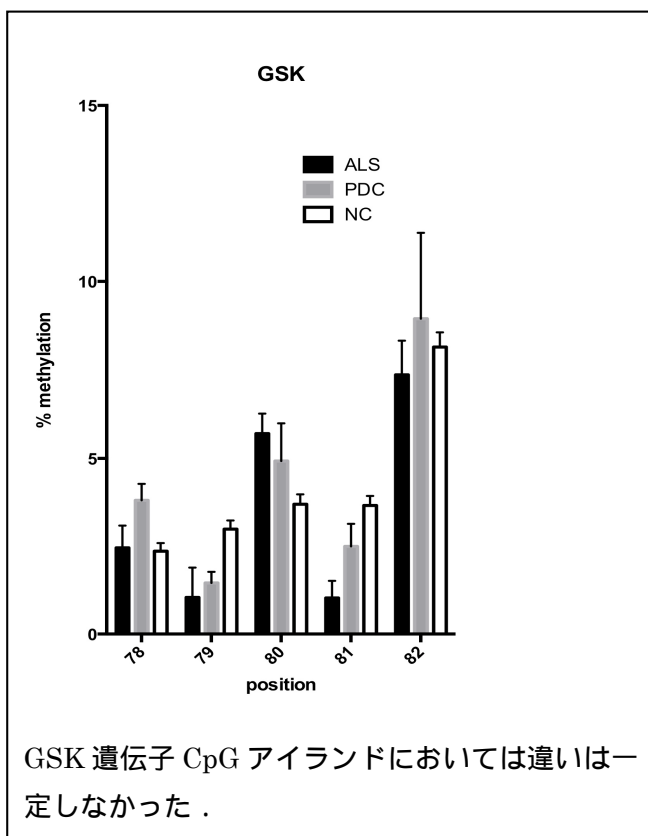
MAPT , GSK 遺伝子においてそれぞれ 1 箇所ずつ正常対照と比べて ALS もしくは PDC の表現形間で有意差の見られる CpG を同定した。

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。

### E. 結論

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。



### F. 健康危険情報

なし

## **G.研究発表**

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

### **1. 論文発表**

なし

### **2. 学会発表**

なし

## **H.知的所有権の取得状況(予定を含む)**

### **1.特許取得**

なし

### **3. 実用新案登録**

なし

### **3.その他**

## 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

### ( Kii ALS/PDC、牟婁病 ) における小脳の免疫組織化学的検討

森本 悟 1)、初田 裕幸 1)、小久保 康昌 2)、葛原 茂樹 3)、村山 繁雄 1)

- 1) 東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク
- 2) 三重大学医学部神経内科
- 3) 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部

#### 研究要旨

2012年、石浦らによって古座川流域のALS例の一部にC9orf72遺伝子変異が報告され、小脳病変が注目されている。したがって今回、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(Kii ALS/PDC、牟婁病)におけるtauopathyの広がり、並びに小脳病変を詳細に検討し、ubiquitin, p62及びubiquilin 2蛋白についても併せて検討を行った。結果、全例にtorpedoとgrumose変性を認め、8例(80%)には多核或いは異常局在を示すPurkinje cellsを見いだした。リン酸化タウ陽性構造物は、白質及び歯状核には全例、プルキンエ細胞には5例(50%)に存在した。また、この5例はPDCの表現型を有し、ALS単独例に比して病変が強い傾向があり、Bergmann gliaやgolgi cellにリン酸化タウの蓄積を認め、分布の多様性を示した。小脳症状は認めなかった。ubiquitin, p62, ubiquilin 2に対する免疫染色は全例で陰性であった。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Purkinje cells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。

#### A.研究目的

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(Kii ALS/PDC、牟婁病)は、中枢神経系へのリン酸化タウの集積を特徴とする疾患である。また、2012年に古座川流域のALS例の一部にC9ORF72遺伝子変異が見つかり、小脳病変が注目されている。三室らによる小脳のリン酸化タウ病変の報告はあるものの、詳細な検討はなされていない。したがって、Kii ALS/PDCにおけるtauopathyの広がり、並びに小脳病変を詳細に検討した。また、ubiquitin, p62及びubiquilin 2蛋白についても併せて検討を行った。

#### B.研究方法

穂原地区のKii ALS/PDC 10連続剖検例の小脳を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6µm/9µm厚の切片を作成し、通常染色(H.E. K.B.染色)、特殊染色(Gallyas- Braak 鍍銀染色)に加え、以下の各種抗体を用いて自動免疫染色装置Ventanaを用いて免疫染色を施行し

た。一部はPser242とcalbindinとの蛍光二重染色を施行した。〈使用抗体〉リン酸化(p)-tau(AT-8, Pser242)、ubiquitin, p62、ubiquilin 2、calbindin

(倫理面への配慮)

ご遺族の剖検同意に基づき、高齢者ブレインバンク倫理規定に沿って研究を施行した。

#### C.研究結果

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



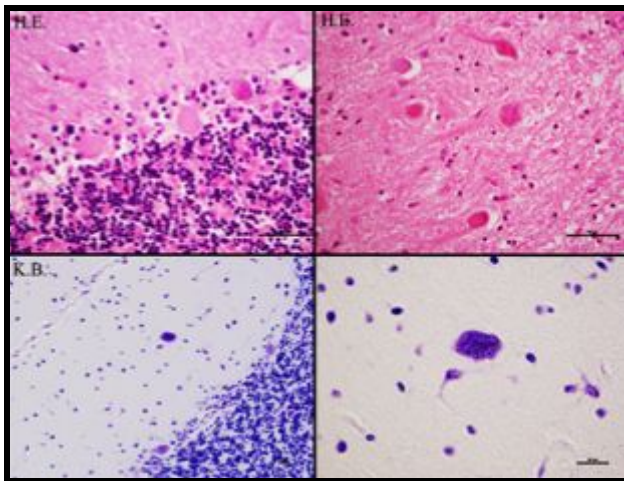


図 1 . プルキンエ細胞層における torpedo、歯状核におけるグルモース変性、及び分子層における多核かつ異所性のプルキンエ細胞を認める。

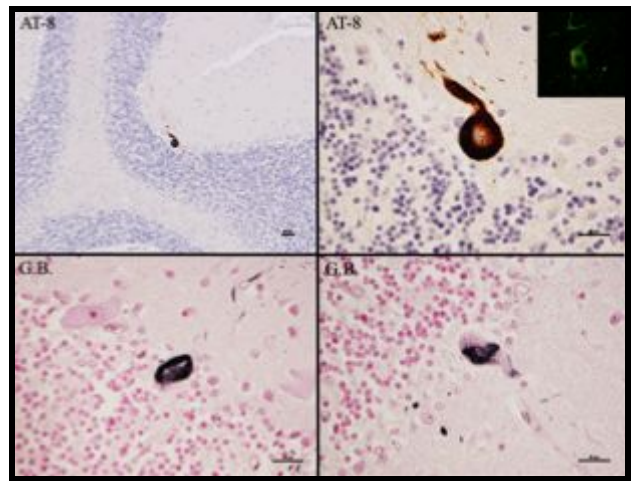


図 3 . プルキンエ細胞内に銀染色、AT-8 陽性の顆粒状、線維状ないしはそれらが凝集した構造物を認め、突起にまで及んでいる。Calbindin と Pser242 との蛍光 2 重染色にてプルキンエ細胞内のリン酸化タウの蓄積が確認された。

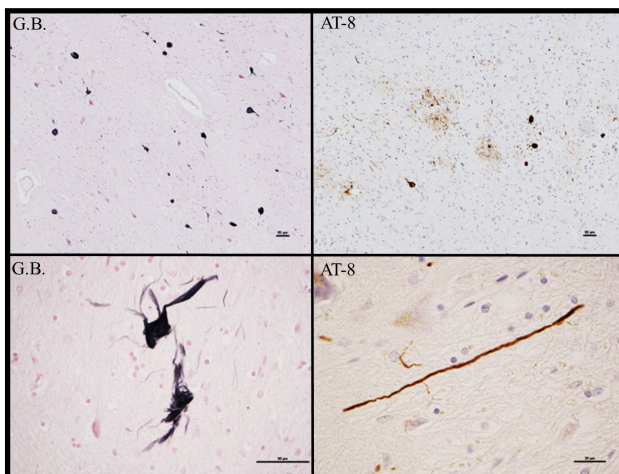


図 2 . 歯状核において、多数の NFT ( 或いは pre-tangle ) coild body を認め、AT-8 では neuropil threads, long neurite を散見する。

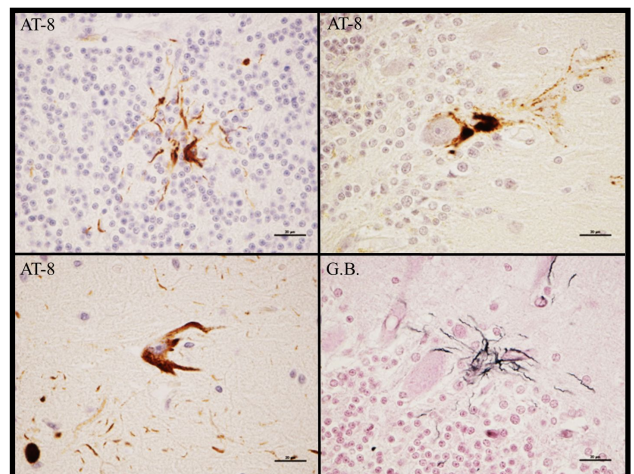


図 4 . AT-8 による染色では、顆粒層に astrocyte の突起と思われる構造物、プルキンエ細胞を取り囲む glia、あるいは bergmann glia、更には golgi 細胞にも陽性所見を認める。

Case/P	Age	Sex	DOI (year)	Phenotype			Types of degeneration				P-tau pathology					
				A	P	D	Dislocation of PCs	Multinucleus of PCs	Torpedo	Grumose degeneration	Cortex		WM		DN	
											PCs	ML	GL	L	D	
Case 1	63	F	4	+	-	-	+	-	+	+	-	+	±	+	+	+
Case 2	70	F	13	+	-	-	+	-	+	+	-	-	±	-	±	±
Case 3	70	F	10	+	-	-	-	-	+	+	-	±	-	+	±	+
Case 4	77	M	7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 5	65	M	3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 6	76	F	6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Case 7	70	F	12	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 8	60	F	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Case 9	75	M	7	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	±	+
Case 10	70	F	11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Positive rate							80%	60%	100%	100%	50%	90%	80%	90%	100%	100%

表 1 . 染色結果のまとめ

torpedo、grumose 変性を全例に認め、プルキンエの位置異常は 80%、多核形成は 60%に認める。また、リン酸化タウについては、プルキンエ細胞に 50%、分子層に 90%、顆粒層に 80%、小葉間白質には 90%、深部白質には 100%、並びに歯状核に陽性構造物を認めた。

## D. 考察

白木、八瀬らは、Guamanian 及び Kii ALS/PDC において、多核かつ異常局在を示すプルキンエ細胞が存在すると報告した。三室らは、Kii ALS/PDC では主として歯状核に NFT が出現すると報告している。今回の検討では、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。

## E. 結論

Kii ALS/PDC における特異な小脳病変を報告した。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. Murayama S, Saito Y. [Prognosis of amyotrophic lateral sclerosis in relation with pathological pattern of propagation]. *Rinsho Shinkeigaku.* 2012;52(11):1066-7.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. 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.

## **2.学会発表**

1. 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]
2. 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 International Conference 12th, Vancouver].

## **H.知的所有権の取得状況（予定を含む）**

特記事項なし

## 患者脳に蓄積する異常蛋白質の組織病理、生化学解析

研究分担者：長谷川成人<sup>1)</sup>

研究協力者：村山繁雄<sup>2)</sup>、小久保康昌<sup>3)</sup>、葛原茂樹<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人 東京都医学総合研究所 <sup>2)</sup> 東京都健康長寿医療センター 高齢者ブレインバンク

<sup>3)</sup> 三重大学 医学部 神経内科 <sup>4)</sup> 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部

### 研究要旨（10ポイント程度）

2012年に剖検となった Kii-PDC 患者 2 例の凍結脳 から胸髄と大脳皮質の細胞内異常タンパク質の病変について免疫組織、生化学解析を行った。2012-2, 2012-3 のいずれの症例においても、大脳皮質および胸髄の神経細胞にリン酸化 シヌクレインの蓄積が認められ、イムノプロット解析においても確認された。タウについては神経細胞やグリア細胞に陽性所見が認められたが、2012-2 例では血管周囲のグリア病変が目立っていたが、生化学解析から 6 種類のタウの蓄積の可能性が示唆された。一方、いずれの症例においても今回解析した組織においては TDP-43 の異常は検出できなかった。二例の症例については シヌクレインとタウの病変が臨床症状に関係している可能性が考えられる。

以下すべて 10 ポイント程度

#### A. 研究目的

三重県南部に多発する認知症-パーキンソン症候群の発症、病態形成機構を解明するため、2012年に剖検となった 2 例の患者脳、脊髄の細胞内異常タンパク質の病変を免疫組織、生化学解析に解析する。

#### B. 研究方法

免疫組織染色は、凍結脳の一部をホルマリン固定後、ビブラトーム切片を作製し、免疫組織染色を行った。生化学解析は、凍結脳からサルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、イムノプロット解析した。タウに関しては、不溶性画分の一部を 6M グアニジン塩酸に可溶化、透析後にアルカリホスファターゼ処理による脱リン酸化を行い、蓄積タウのアイソフォーム構成を調べた。用いた抗体は、リン酸化タウを検出する AT8 と pS396、非リン酸化タウを検出する HT7 と T46、リン酸化  $\alpha$  シヌクレインに対する抗体 mAb PS129、リ

ン酸化 TDP-43 を検出する抗体 mAb pS409/410 である。

(倫理面への配慮)

剖検脳の免疫組織、生化学解析については東京都医学総合研究所の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

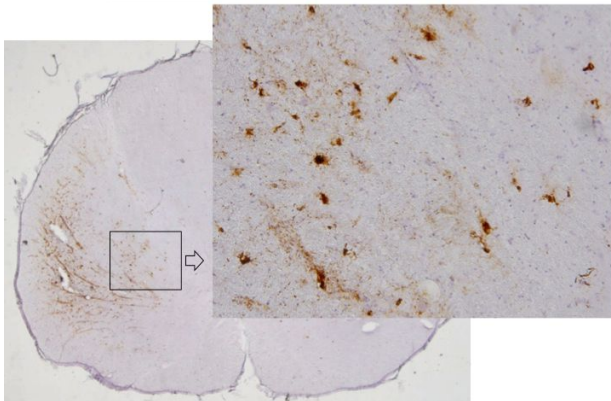
#### C. 研究結果

##### 1. 症例番号 2012-2 (PDC)の免疫組織染色

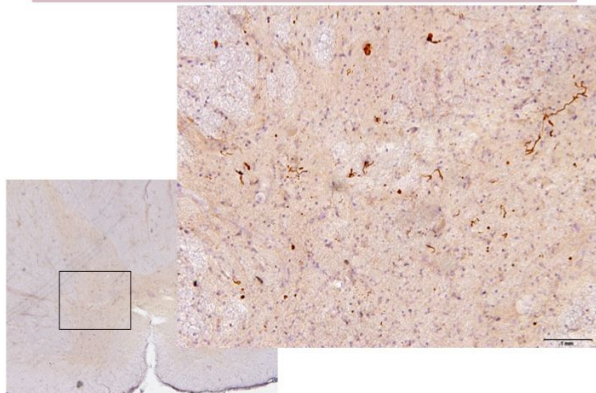
2012-2 例 (60 歳にパーキンソニズムで発症され、72 歳で亡くなられた女性、大家系の 1 員) について、側頭葉、胸髄の免疫組織染色を行った。側頭様、胸髄とも一部の血管周囲のグリア細胞が AT8 強陽性を示し、加えて白質に astrocytic plaque 様の病変が観察された。また灰白質には神経細胞内のタウ病変(NFT)も観察された。また、多数のリン酸化 シヌクレイン陽性の皮質型レビー小体やレビー突起と思われる病変が皮質及び胸髄の灰白質に認められた。

一方、TDP-43 の異常病変は今回調べた組織においては検出できなかった。

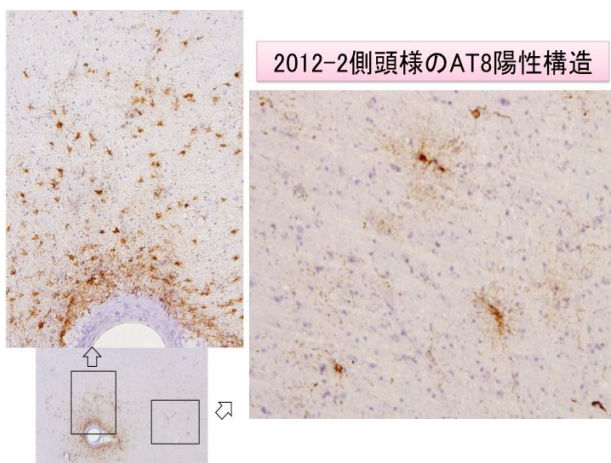
2012-2胸髄のAT8陽性構造物



2012-2胸髄のリン酸化 $\alpha$ シヌクレイン陽性構造物

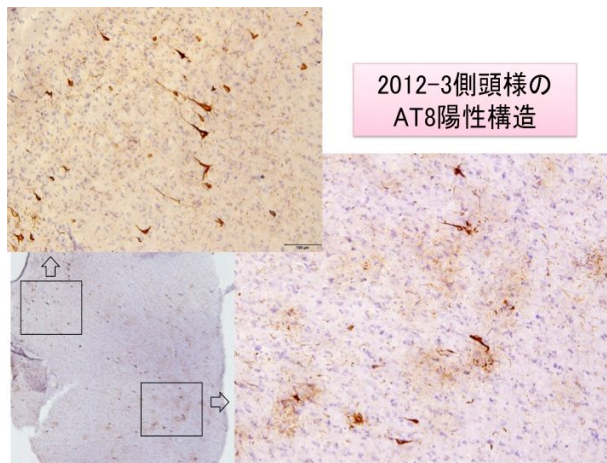


2012-2側頭様のAT8陽性構造

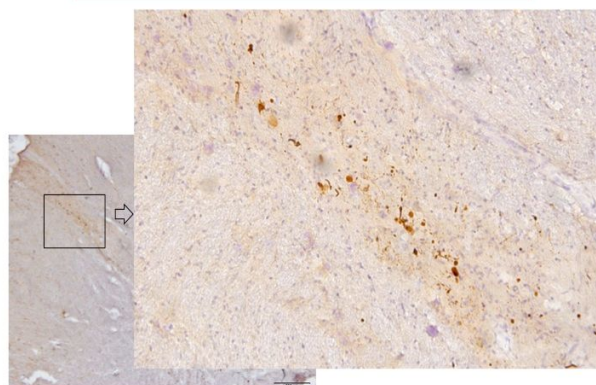


2012-2 例のような血管周囲のグリアのタウ病変は明らかではないが、側頭様の白質に astrocytic plaque 様のタウ陽性構造物が多数認められ、また神経細胞にも多数の NFT が観察された。胸髄のタウ病変はごく少数の神経細胞に認められるのみであった。一方、リン酸化 シヌクレインの病変は側頭様だけでなく、胸髄の神経細胞においても強く認められた。TDP-43 の異常所見は側頭様、胸髄のいずれにおいても検出できなかった。

2012-3側頭様のAT8陽性構造



2012-3 胸髄のpSyn (PS129)陽性構造物



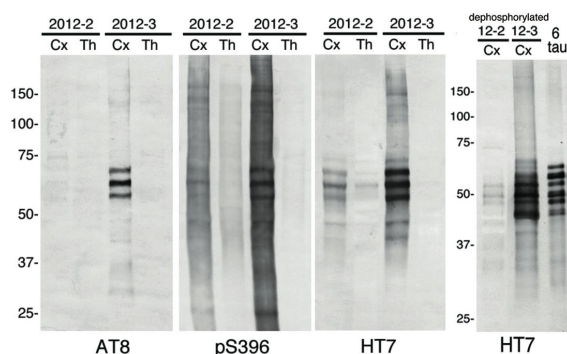
## 2. 症例番号 2012-3 (PDC)の免疫組織染色

2012-3 例 (60歳にパーキンソンニズムで発症され、75歳で亡くなられた男性)について、同様に側頭葉、胸髄の免疫組織染色を行った。

## 3. 蓄積タンパク質の生化学解析

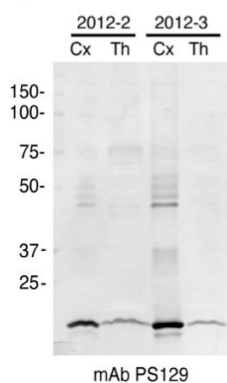
2012-2, 3 の凍結組織より、サルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、抗タウ抗体、あるいは抗リン酸化 シヌクレイン、抗 TDP-43 抗体にてイムノプロット解析を行った。その結果、2012-3 の側頭葉に AT8, HT7 で強い AD-type のリン酸化タウバンド(60, 64, 68kD のトリプレッ

ト)が観察され、2012-2 の側頭様でも HT7 で類似のバンドが検出された。また 2012-2 胸髄にも弱いながら pS396, HT7 で陽性所見が観察された。2012-2, 3 の側頭様のタウに関してはアルカリホスファターゼ処理による脱リン酸化を行ったところ、HT7 にて 3 リピータウ及び 4 リピータウと同じ移動度のタウバンドが検出された。



一方、リン酸化 シヌクレイン抗体によるイムノプロットでは、2012-2, 2012-3 のいずれの症例においても皮質に強い陽性バンドが検出され、胸髄にも弱いながら同様の陽性所見が検出された。高分子側にユビキチン化 シヌクレインと思われるバンドも検出され、そのバンドパターンは DLB のそれと似ていると思われた

不溶性  $\alpha$  Syn のイムノプロット解析



一方、リン酸化 TDP-43 のバンドは検出されなかった。

#### D. 考察

今回解析した 2 例の PDC 症例(2012-2、2012-3)

には、タウと 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、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 リピータウと 4 リピー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 リピータウの蓄積が予想されたが、むしろ 3 リピー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 リピータウ特異抗体(RD3), 4 リピータウ特異抗体(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 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 Syn の異常病変が臨床症状と関係していて、特にリン酸化 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。

#### E. 結論

今回解析した二例の PDC 患者(2012-2、2012-3)の 大脳皮質、胸髄にタウ、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 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、SynのバンドパターンはDLBのそれと同様と思われた。

**F：健康危険情報**  
**特になし**

**G：研究発表**

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

**1：論文発表**

1). 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.

**2：学会発表**

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

**H：知的所有権の取得状況（予定を含む）**

**1：特許取得**

1) 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>

## 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 からの iPS 細胞の樹立

研究分担者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授

### 研究要旨

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、皮膚由来の線維芽細胞に4つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させ作製する。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。そこで解析に必要な細胞を作り出し研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。皮膚生検サンプルから作製できるので、多くの疾患から作製可能である。iPS細胞樹立には、国内で開発されたセンダイウイルスベクター(SeVベクター)を用いる。この方法では、iPS細胞作製に用いる初期化因子が染色体に組み込まれないために、疾患研究により有用なiPS細胞を作製できる。本研究班の協力のもと、三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病4症例の皮膚生検サンプルを現在までに提供していただき、そのうちの3例から皮膚由来線維芽細胞を樹立した。このうちの2症例からiPS細胞を樹立した。

### A.研究目的

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、皮膚由来の線維芽細胞や末梢血液細胞に4つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させ作製した多能性幹細胞である。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。そこで患者由来のiPS細胞を樹立し、その細胞から病気の標的細胞を作り出して研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。今回、難治性疾患の1つである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からiPS細胞の樹立を行った。

### B.研究方法

#### 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。

(倫理面への配慮)

#### 1) 倫理審査

疾患由来のiPS細胞作製とその解析については倫理委員会ですでに承認済みである。また患者サンプルの提供については、提供機関の倫理審査委員会の承認があることを確認した後、研究を行う。



## 2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノムそのものの情報を得るわけではない。作製した iPS 細胞等を用いた病因解析・治療薬開発研究は本研究では行わない。また、研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報は公表されることはない。本研究のために特別に用意した番号によって管理し、人種・性別・年齢・診断名以外の患者情報はサンプル提供を行う臨床機関にて管理を行う。作製した iPS 細胞は所属機関において施錠できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

## 3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

皮膚由来線維芽細胞を得るための皮膚生検は通常の医学診療の範囲で行われている方法に準じて行う。痛みは、局所麻酔注射の時のみである。瘢痕は普通のけがの場合と同じである。以上より、危険性はほとんどない。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

## C. 研究結果

### 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 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。

## 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。

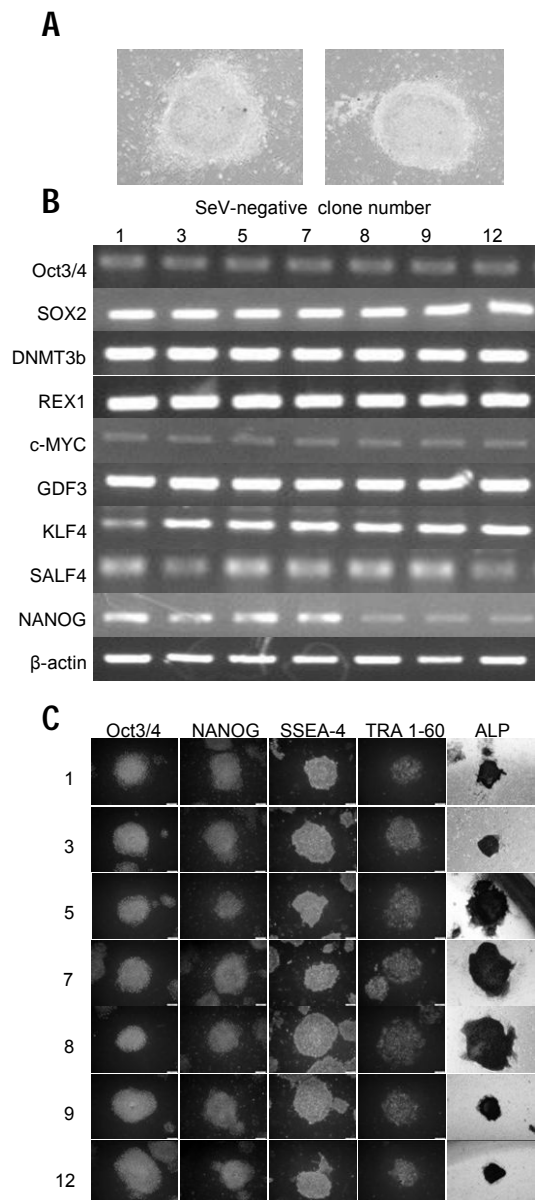


図1 樹立したiPS細胞

- 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
- D. アルカリフォスファターゼ染色(ALP)

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 1)。

#### D. 考察

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 細胞樹立の効率には特に健常者と変わりはなかった。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。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。

今後、作製した iPS 細胞から神経細胞、特に運動神経を分化誘導し疾患の病態解析を行うで進めている。

#### E. 結論

患者 3 例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、そのうち 2 例から iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は形態的にも、また、未分化マーカーの発現でも iPS 細胞に矛盾することがなかった。したがって、iPS 細胞が樹立されたと言える。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

##### 1. 論文発表

特になし。

##### 2. 学会発表

1. 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
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
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
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
5. 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

特になし。

##### 2. 実用新案登録

特になし。

##### 3. その他

特になし。

## 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

広川佳史<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 三重大学医学研究科腫瘍病理学講座

### 研究要旨

牟婁病患者由来 iPS から神経系の細胞に分化・誘導し、患者と同じ遺伝情報を持った神経系細胞を得る。iPS 細胞樹立は熊本大学発生医学研究所、江良拓実先生との共同研究により行う。それらの細胞を用いて病態の機序解明のため、現在までに神経変性疾患で提唱されている異常の検証を in vitro での実験により行う。

### A. 研究目的

牟婁病患者由来の iPS 細胞を分化誘導することで、運動神経やグリア細胞、ドパミン産生細胞を得ることができる。これらの分化誘導された細胞を用いれば、疾患モデルとして環境因子への脆弱性の検討や薬物の効果判定などが可能となる。本研究は病態解明の為の有効な材料を得ることが目的である。

### B. 研究方法

患者皮膚より線維芽細胞を採取、培養し、Yamanaka factor である 4 因子、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc をセンダイウイルスを用いて遺伝子導入して作製する。実際の作製作業は熊本大学発生医学研究所にて行う。

iPS 細胞から sonic hedgehog signal pathway の agonist と retinoic acid を用いて embryoid body を作成し、これが運動神経細胞の特徴を有することを確認する。得られた運動神経細胞を用いて、現在まで提唱されている ALS 発症機序が再現できるか検討する。

#### 1) 疫学的環境因子の影響

グアムの類縁疾患の発症機序に、マグネシウムやカルシウム摂取の不足による異常タンパクの蓄積が指摘されている。患者由来と正常人由来の iPS より誘導された運動神経細胞を低マグネシウム、低カル

シウムの条件で長期培養し、タウ蛋白、-synuclein、TDP-43 蛋白の産生に差があるか検討する。

#### 2) 小胞体ストレスのメカニズム

小胞体ストレスは、異常たんぱく質蓄積などにより、小胞体の機能に付加が生じ、神経変性疾患を引き起こすモデルと考えられている。

##### a) 小胞体ストレスを誘導する

N-glycosylation の阻害剤である、tunicamycin は古典的な小胞体ストレス誘導薬である。患者由来と正常人由来の iPS より誘導された運動神経細胞に、tunicamycin 処理を加えて小胞体ストレス関連因子である、Grp78 や XBP1 などの遺伝子発現に差があるか検討する。

小胞体のカルシウム恒常性の障害が、神経変性の病態として提唱されている。グルタミン酸受容体の過度の興奮が小胞体からのカルシウム放出を過剰にし、神経毒性を引き起こす。細胞をグルタミン酸で処理し、小胞体ストレス関連因子の発現差の有無を検討する。

#### 3) 酸化ストレスのメカニズム

家族性 ALS には酸化ストレスの原因であるスーパーオキシドを消去する酵素、SOD1 遺伝子変異のあるものが報告されている。スーパーオキシドによる神経細胞死が ALS 発症の機序として提唱されている。

患者由来と正常人由来の運動神経細胞を過酸化水素で処理し、アポトーシスなどの細胞死に差があるか検討する。また低濃度の過酸化水素で細胞を長期間培養し、タウ蛋白、 $\alpha$ -synuclein、TDP-43蛋白の産生に差があるか検討する。

4) さらに、運動神経、グリア細胞、ドパミン産生細胞のマーカーを用いて、embryoid bodyから、それぞれの分化細胞を得る。

最近では、ALS 発症機序に神経細胞単独ではなく、グリア細胞を含めた微小環境の関与が提唱されている。この仮説の検証のため、グリア細胞と運動神経細胞を共培養し、上記であげた項目について検討を行う。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、患者からの試料の提供を受けるにあたって十分な informed consent を得る。研究計画は、事前に三重大学医学研究科の倫理委員会の承認を得ている。得られた個人情報については、法令等を遵守のうえ厳重に管理し、漏洩等のないように十分注意して研究を遂行する。

### C. 研究結果

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。

### D. 考察

牟婁病患者 iPS 細胞から運動ニューロンへの分化誘導の過程では正常 iPS 細胞とは異なる培養条件設定が必要と考える。

また別の方法による神経細胞分化について考察

する。皮膚組織にも存在する幹細胞である Muse 細胞は iPS 細胞ほどではないが多分化能を有している。牟婁病患者患者の皮膚生検組織内にも少ないながらこの Muse 細胞は存在しているはずである。論文報告に従って患者皮膚線維芽細胞培養より Muse 細胞を単離し、神経細胞への分化誘導を試みることも検討する。

### E. 結論

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。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

-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

本年度はなし。

### H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得 本年度はなし。

2. 実用新案登録 本年度はなし。

3. その他 特になし。

## 紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群における

### エダラボンを用いた臨床研究

主任研究者 小久保康昌<sup>1)</sup>

研究協力者 森本 悟<sup>2)</sup>、中川十夢<sup>3)</sup>、宮崎光一<sup>3)</sup>、葛原茂樹<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>三重大学神経内科、<sup>2)</sup>健康長寿医療センター、<sup>3)</sup>町立南伊勢病院、

<sup>4)</sup>鈴鹿医療科学大学

#### 研究要旨

〔目的〕紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群 (ALS/PDC) では、病態に酸化ストレスの関与が想定されている。フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンの臨床効果について報告する。

〔対象と方法〕対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例 (男性 4 名、女性 1 名、平均年齢 68.4 歳、全例 PDC、平均罹病期間 9.4 年) に対するオープンラベル試験。方法は、エダラボン (1A, 30mg/回) を適当量の生食液等で用時希釈し、30 分かけて 1 日 1 回点滴静注する。週 2 日間点滴投与を 1 クールとし、24 クールを連続して行う。(併用薬) 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。なお、本研究は、町立南伊勢病院倫理委員会で承認を得ている。

〔結果および考察〕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。

〔結論〕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投与研究を行った。病状が軽度の症例ではエダラボンが有効であったが、一方、重症例では興奮性などの陽性症状が出現した。病期による薬剤の使い分けが必要である。

#### A. 研究目的

我々は、紀伊半島の家族性認知症-パーキンソン症候群 (ALS/PDC) では、尿中 OHdG が高値であることを報告しており (Morimoto et al. Mov. Disord. 2008)、病態に酸化ストレスの関与が想定されている。現在、common ALS において、エダラボンの臨床治験第 Ⅲ 相が行われており、診断確実で軽症例ではプラセボとの群間差をもってピンチ力が改善することが報告されている。紀伊 ALS/PDC におけるフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンの臨床効果

について報告する。

#### B. 研究方法

対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例 (男性 4 名、女性 1 名、平均年齢 68.4 歳、全例 PDC、平均罹病期間 9.4 年) に対するオープンラベル試験。方法は、エダラボン (1A, 30mg/回) を適当量の生食液等で用時希釈し、30 分かけて 1 日 1 回点滴静注する。週 2 日間点滴投与を 1 クールとし、24 クールを連続して行う。併用薬として ビタミン E (酢酸トコフェロール) 300mg/日とビタミン C (アスコルビン酸) 2000mg/日を連日内服併

用する。開始時と終了時に MMSE、ALSFRS-R、UPDRS、FAB、やる気スコア、CAS を評価し効果を検討する。期間は、2011年11月から2012年月まで。

(倫理面への配慮) 本研究は、町立南伊勢病院倫理委員会で承認を得ている。

表 1 対象患者

	Pheno type	Age	Sex	Duration of illness (years)	MMSE	Yahr
1	PDC	72	F	11	5/8 (mute)	IV
2	PDC	69	M	2	27/30	II
3	PDC	56	M	10	8/30	IV
4	PDC	73	M	8	12/30	V
5	PDC	72	M	16	0/30	V

### C.研究結果

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ヵ月で中止した。

表 2 MMSE

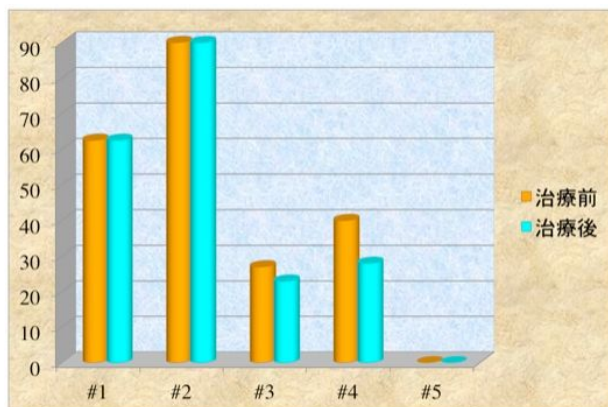


表 3 FAB

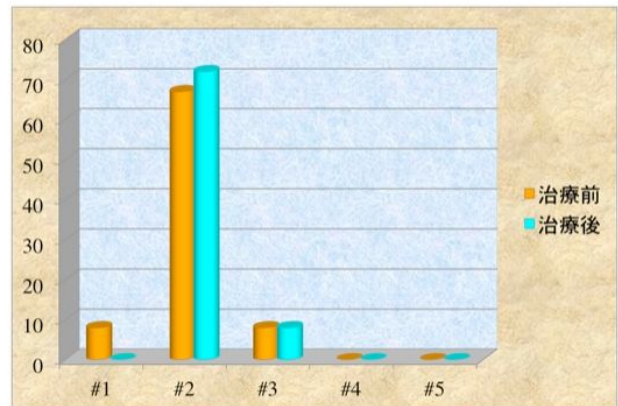


表 4 やる気スコア

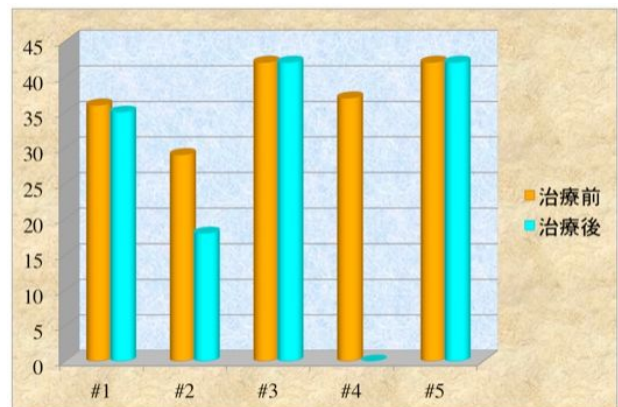


表 5 CAS:面接

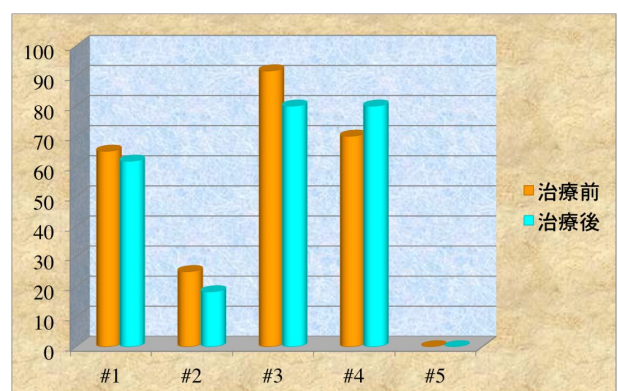


表6 CAS: 質問紙

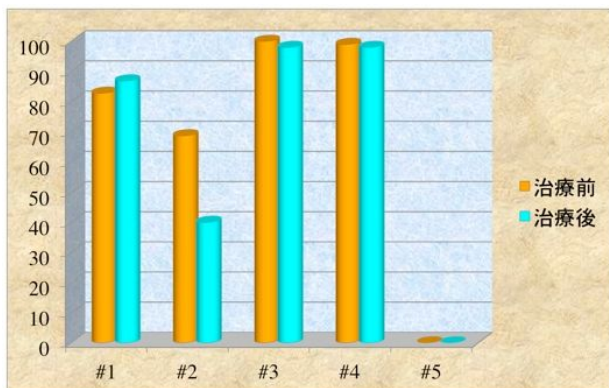


表7 CAS: 日常生活行動

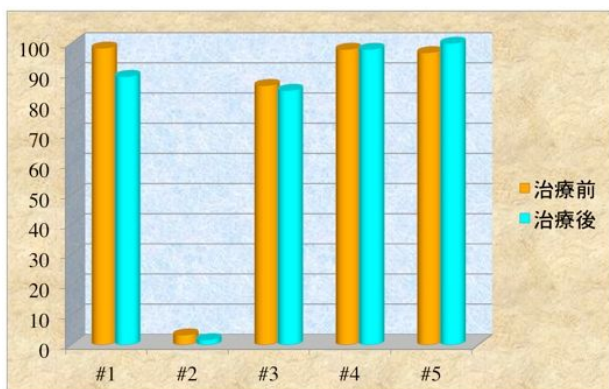
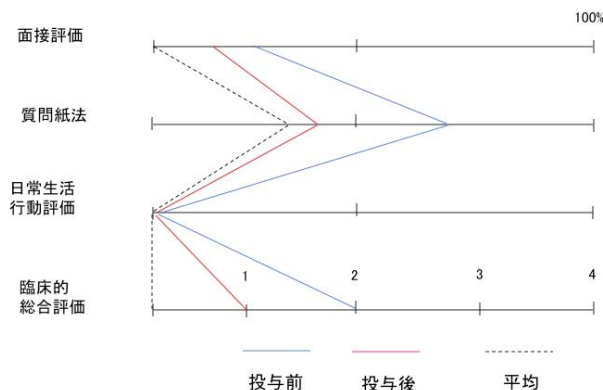


表8 やる気スコア：自由時間観察

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

表9 症例2 有効例: CAS



### D. 考察

エダラボンは、神経疾患に対しては脳梗塞とALSのほかには投与されたデータはない。今回、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。今後、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。

### F. 健康危険情報

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. 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.

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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.

### 2. 学会発表

1. 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

2. 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

3. 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.

## H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし



研究業績録について

英文単行本

著者名	論文題名	書名	(編集者名)	出版社名	(出版地)	出版西暦年	頁
Shigeki Kuzuhara, Yasumasa Kokubo	Amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex in the Kii peninsula of Japan(Muro disease):a review on recent research and new concept	Amyotrophic Lateral Sclerosis and the Frontotemporal Dementias	Michael J. Strong	Oxford University Press		2012	39-54

英文原著・症例報告

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年	GRANTへの謝辞の有無
Tameko Kihira, SYoshida, 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	13	347-350	2012	有
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.	<i>Arch Neurol</i>	69	1154-8	2012	有り
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 FTLT/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,	Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study.	<i>Lancet Neurol</i>	11	323-30	2012	無し

Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ.						
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.	<i>Amyotroph Lateral Scler</i>	13	562-6	2012	有り
Ogaki K, et al.	Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTLD, PSP, and CBS.	Parkinsonism & Related Disorders	19	15-20	2013	
Tsuji H, et al.	Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy.	Brain	135	3380-3391	2012	
Egawa N, Kitaoka S, et al.	Drug-Screening Platform for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells.	Sci Transl Med	4	145ra104.	2012	
Parker SJ, et al.	Inhibition of TDP-43 accumulation by bis(thiosemicarbazonato)-copper complexes.	PLoS One	7	e42277.	2012	
Wang Y, et al.	Phosphorylated a-Synuclein in Parkinson's Disease.	Sci Transl Med.	4	121ra20	2012	
Shahpasand K, et al	Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by Tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease.	J Neurosci	32	2430-2441	2012	
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	33	2527.e11-6.	2012	無
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,	VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson disease.	Mov Disord	27	1413-7.	2012	有

Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N.						
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 FTLN, PSP, and CBS.	Parkinsonism Relat Disord	19	15-20.	2013	有
Saito Y, Inoue T, Zhu G, Kimura N, Okada M, Nishimura M, Kimura N, <u>Murayama S</u> , Kaneko S, Shigemoto R, Imoto K, Suzuki T.	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and Abeta generation in Alzheimer's disease.	Mol Neurodegener.	7	50	2012	有
Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, <u>Murayama S</u> , Tsuji S, Goto J	Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population.	Amyotroph Laterl Scler	13 (6)	562-6	2012	有
Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, <u>Murayama S</u> , Kuzuhara S	- Synuclein Pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/ Parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan.	J Neuropath Exp Neurol	71 (7)	625-30	2012	有
Kai H, Shin RW, Ogino K, Hatsuta H, <u>Murayama S</u> , Kitamoto T	Enhanced antigen retrieval of amyloid immunohistochemistry: re-evaluation of amyloid pathology in Alzheimer disease and its mouse model.	J Histochem Cytochem	60 (10)	761-9.	2012	有
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, <u>Murayama S</u> , 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.	91(2)	320-9	2012	有
Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, <u>Murayama S</u> , Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R,	Altered -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.	EMBO Molecular Medicine	4 (4)	344-352	2012	有

Nagaike K, Ihara Y and the Japanese Alzheimer 's Disease Neuroimaging Initiative						
Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, <u>Murayama S</u> , Akiyama H, Hasegawa M, David M. A. Mann, Tamaoka A	Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy	Brain	135 (11)	3380- 91	2012	有
Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima M, Takahashi H, Kato T, Takao M, <u>Murayama S</u> , Mori O, Eishi Y, Mizusawa H	Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum.	Neuropathology	32 (6)	593- 603	2012	有
Kakuda N, Akazawa K, Hatsuta H, Murayama S, Ihara Y	Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Suspected limited efficacy of -secretase modulators.	Neurobiol Aging	34	1101-1104	2013	有
Funabe S, Takao M, Saito Y, Hatsuta H, Sugiyama M, Ito S, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Hattori N, <u>Murayama S</u>	Neuropathologic analysis of Lewy- related alpha-synucleinopathy in olfactory mucosa.	Neuropathology	in press		2013	有
Fujita K,1 Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, <u>Murayama S</u> , Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H:	Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt Jakob disease	BMJ Open Journal	in press		2013	有
<u>Kokubo Y</u> , 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	306-308	2012	有または無
<u>Kokubo Y</u> , 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.	71(7)	625-630	2012	

TAMEKO KIHIRA , SOHEI YOSHIDA , TETSUYA KONDO , KEIKO Iwai , SACHIKO WADA , SATOMI MORINAGA , YOSHINORI KAZIMOTO , TOMOYOSHI KONDO , KAZUSI OKAMOTO , <u>YASUMASA KOKUBO &amp; SHIGEKI KUZUHARA</u>	An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960 - 2009: A possible link to change in drinking water source	Amyotrophic Lateral Sclerosis		In Press		
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 , <u>Yasumasa Kokubo</u> , Shigeki Kuzuhara , Hiroyuki Tomiyama , , Nobutaka Hattori	Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTLN, PSP, and CBS	Parkinsonism and Related Disorders		In Press		
Maya Ando, Manabu Funayama, Yuanzhe Li, Kenichi Kashihara, Yoshitake Murakami, Nobutaka Ishizu, Chizuko Toyoda, Katsuhiko Noguchi, Takashi Hashimoto, Naoki Nakano, Ryogen Sasaki, <u>Yasumasa Kokubo</u> , Shigeki Kuzuhara, Kotaro Ogaki, Chikara Yamashita, Hiroyo Yoshino, Taku Hatano, Hiroyuki Tomiyama, and Nobutaka Hattori,	VPS35 Mutation in Japanese Patients with Typical Parkinson ' s Disease	Movement Disorders Journal		In Press		

## 英文総説

著 者 名	論 文 題 名	雑 誌 名	巻	頁	出版西暦年
なし					

## 邦文単行本

著 者 名	論 文 題 名	書 名	(編集者名)	出版社名	(出版地)	出版西暦年	頁
なし							

邦文原著・症例報告

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年	GRANTへの謝辞の有無
Kokubo Y, Hirokawa Y ほか	-Synuclein pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex in the Kii Peninsula, Japan.	J Neuropathol Exp Neurol	71	625-30	2012	有
白井慎一, 高橋育子, 加納崇裕, 佐藤和則, 久保田佳奈子, 矢部一郎, 村山繁雄, 佐々木秀直	長大な脊髄病変を伴い multiple biopsies にて組織診断された血管内リンパ腫の1例	臨床神経	52(5)	336-343	2012	有
小久保康昌	The 22nd International Symposium on ALS/MND 報告	神経治療学	29	174		無

邦文総説

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年
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	23	17-24.	2012
村山繁雄, Seung-Jae Lee, 武田篤, 鈴木則宏	パーキンソン病はプリオン病か? - シヌクレイノパチーの細胞間移行 - (座談会)	Frontiers in Parkinson Disease.	5(1)	5-13	2012
村山繁雄, 齊藤祐子	【アルツハイマー病-先制医療に向けての展開】アルツハイマー病と脳老化の病理学	カレントセラピー	30(4)	320-325	2012
村山繁雄, 齊藤祐子	アルツハイマー病と脳老化の病理学 - 特集 今, 認知症にどう向き合うか.	内科	109(5)	840-845	2012
村山繁雄, 高尾昌樹, 初田裕幸, 斎藤祐子	6.ブレインバンク 第1部 病理解剖の進め方, 切り出し方法など c.特殊な部位, 手技, 検体保存	病理と臨床【臨時増刊号】	30	103-109	2012
村山繁雄, 齊藤祐子	第1部:基礎編 パーキンソン病の神経病理 up to date	Progress in Medicine	32(6)	1161-1165	2012
村山繁雄, 齊藤祐子	タウ蛋白と免疫染色	検査と技術	40(8)	749-751	2012
村山繁雄, 齊藤祐子, 丹羽真一	第1部4章新しい臨床研究の技術とプロジェクト展開 2.精神・神経疾患研究のためのブレインバンク	実験医学	30(13)	146-155	2012

高尾昌樹, 村山繁雄, 美原盤, 吉田洋二	バイオバンク構築における病理の役割【共同研究の機転として機能する我が国のバイオバンクの実例】ブレインバンクの現状, 高齢者ブレインバンク, 美原記念病院ブレインバンクの経験から	病理と臨床	30(6)	635-645	2012
高橋英気, 望月英明, 井藤英喜, 筑井恵美子, 加藤貴行, 鄭仁熙, 徳丸阿耶, 山川通隆, 安藝良一, 沢辺元司, 高尾昌樹, 新井富生, 村山繁雄	膿瘍との鑑別が困難であった肺腫瘍・転移性脳腫瘍の1例	内科	110(3)	469-480	2012
沢辺元司, 新井富生, 村山繁雄, 清水孝彦, 戸田行総, 古田耕, 増井徹	バイオバンク構築における病理の役割【共同研究の起点として機能する我が国のバイオバンク】東京都健康長寿医療センターの病理由来組織バンクおよび日本における組織バンクの課題	病理と臨床	30(6)	624-628	2012
砂川昌子, 増田義重, 沢辺元司, 足立正, 徳丸阿耶, 井藤英喜, 川田真幹, 稲松孝思, 村山繁雄, 初田裕幸	- CPC - 4年間, 経管栄養をした高度認知症の1例	Geriatric Medicine	50(5)	653-662	2012
神谷久雄, 村山繁雄, 舟邊さやか, 齊藤祐子, 福田隆浩	薬剤性パーキンソン症状との鑑別が問題となった軽度認知障害の87歳男性	BRAIN and NERVE	64 (12)	1435-1442	2012