

**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 25 年度 総括・分担研究報告書

平成 26 年(2014 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 25 年度 総括・分担研究報告書

2013 ANNUAL REPORT OF THE RESEARCH COMMITTEE
ON KII AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS/PARKINSONISM-DEMENTIA COMPLEX
THE MINISTRY OF HEALTH, LABOUR AND WELFARE, JAPAN

2014 年 3 月

March, 2014

研究代表者 小久保康昌

三重大学大学院地域イノベーション学研究科

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

Mie University, Graduate School of Regional Innovation Studies

Kii ALS/PDC Research Center

目次

ごあいさつ -----

班構成員名簿 -----

平成 25 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 26 年 1 月 11 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. 大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析
長谷川成人 東京都精神医学総合研究所 -----
2. Kii ALS/PDC (牟婁病) における tauopathy としての神経病理学的特徴
村山繁雄 東京都健康長寿医療センター
3. 紀伊半島 H 地区出身 5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較
小柳清光 信州大学 -----
4. 多発地 ALS と住民の毛髪中元素分析と生活習慣との関連に関する検討
紀平為子 関西医療大学 -----
5. ALS 多発と干物摂取との因果関係解明に関する検討
岡本和士 愛知県立大学 -----
6. 本邦での紀伊半島以外における ALS/PDC が疑われた症例について
富山弘幸 順天堂大学 -----

7. 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
辻 省次 東京大学 -----
8. 牟婁病剖検脳での神経細胞特異的 DNA メチル化解析
岩田 淳 東京大学 -----
9. 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 -----
10. Kii ALS/PDC（牟婁病）における病態解析および創薬を目的とした疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成
広川佳史 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 25 年度研究班カレンダー（敬称略）

平成 25 年

- 3 月 25 日 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金採択通知
(評価点数 : 6.1、全研究班平均 : 6.8)
- 5 月 16 日 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金交付基準額通知 (5/20 受け取り)
648 万円 (間接経費 149.5 万円)
- 5 月 31 日 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金申請書提出
- 7 月 11 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 (埼玉 : 国立保健医療科学院)
- 7 月 22 日 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金交付決定通知
648 万円
- 7 月 31 日 研究班名簿及び疾患概要作成提出
- 8 月 2 日 厚労省より平成 25 年度研究費入金 総額 648 万円 (間接経費 149.5 万円)

平成 26 年

- 1 月 11 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 1108)
- 15 日 難治性疾患克服研究事業の事後評価等の作成・WEB 登録
- 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」2014 年度研究報告書 発行

平成25年度 年中行事

- | | | | |
|--------|-------|---------------------------------|----|
| 平成 25年 | 5月28日 | 昭和薬科大学 紀伊ALS/PDC セミナー (小久保) | 東京 |
| | 5月30日 | パプア調査会議 | 東京 |
| | 5月31日 | 第1回 環境要因会議 | 東京 |
| | 6月27日 | 酸化ストレス Meeting (米田、馬、小久保) | 津 |
| | 7月10日 | 放射線医学総合研究所 紀伊ALS/PDC セミナー (小久保) | 千葉 |
| | 7月11日 | 健康長寿医療センター 研究打ち合わせ | 東京 |
| | 7月27日 | 第2回 環境要因会議 | 愛知 |

8月16日～17日 Guam島 Dr. Chen 訪問
8月25日 神経病理ワークショップ (健康長寿医療センター)
9月3日 小柳清光先生 分担研究者 加入
10月2日 新ホームページ 開設 (<http://kii-als-pdc-project.com>)
10月13日 南伊勢町公開講座 (南伊勢町町民文化会館、聴衆 315名)
10月17日 中日新聞 こどもウイークリー取材 (11月16日 掲載)
12月2日 診断基準、重症度分類 策定完了
12月22日 第1回 臨床神経病理検討会

平成 26 年

1月11日 班会議 (名古屋、ウインク愛知)
1月24日 日本神経学会において、診断基準および重症度分類 承認
1月28日～2月1日 カリフォルニア州立サンディエゴ校訪問
International Joint meeting of Kii and Guam ALS/PDC
(Drs. Galasko, Schellenberg, Salmon, Litvan, Friedman,
Masliah, Ravits)
2月23日 第2回 臨床神経病理検討会
3月16日～27日 西ニューギニア パプア州 現地調査、国際シンポジウム
3月27日 Tokyo Cognitive Seminar 紀伊ALS/PDC 講演 (小久保) 東京

平成 25 年度 班会議 プログラム

日程：平成 26 年 1 月 11 日（土）10：00～15：45

会場：愛知県産業労働センター 11 階 1108

（敬称略）

10：00～10：05

開会挨拶

葛原茂樹

10：05～10：50

座長 葛原茂樹

ミニレビュー

1. 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合（紀伊 ALS/PDC） - 5 年間のまとめと今後の展望 -

小久保康昌（三重大学大学院地域イノベーション学研究所）

10：50～12：10

Proteinopathy

座長 村山繁雄

2. 紀伊半島の ALS/parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) 家系の臨床病理学的所見からみた病因

葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

三室マヤ（愛知医科大学加齢医科学研究所）

小久保康昌（三重大学大学院地域イノベーション学研究所）

3. 大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析

長谷川成人（公益財団法人 東京都医学総合研究所）

小久保康昌（三重大学大学院地域イノベーション学研究所）

葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

4. Kii ALS/PDC（牟婁病）における tauopathy としての神経病理学的特徴

村山繁雄、森本 悟（東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク）

小久保康昌（三重大学大学院地域イノベーション学研究所）

長谷川成人（公益財団法人 東京都医学総合研究所）

葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

5. 紀伊半島 H 地区出身 5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較

小柳清光、山崎峰雄、橋本智代（信州大学医学部）

森本 悟（三重大学大学院腫瘍病理学、慶應義塾大学医学部生理学教室）
初田裕幸、村山繁雄（東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク）
小久保康昌（三重大学大学院地域イノベーション学研究所）
葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

12:10～13:00 < 昼 食 > 事務連絡

13:00～14:00

臨床、環境要因

座長 吉田宗平

6. 多発地 ALS と住民の毛髪中元素分析と生活習慣との関連に関する検討

紀平為子、櫻井威織、吉田宗平、若山育郎（関西医療大学保健医療学部）
高宮幸一、中野幸廣、奥村良、飯沼勇人（京都大学原子炉実験所）
和田幸子、岩井恵子（関西医療大学保健看護学部）
岡本和士（愛知県立大学看護学部）
小久保康昌（三重大学大学院地域イノベーション学研究所）
葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

7. ALS 多発と干物摂取との因果関係解明に関する検討

岡本和士（愛知県立大学看護学部）
吉田宗平、紀平為子（関西医療大学保健医療学部）
小久保康昌（三重大学大学院地域イノベーション学研究所）
葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

8. 本邦での紀伊半島以外における ALS/PDC が疑われた症例について

富山弘幸（順天堂大学脳神経内科/神経変性疾患病態治療探索講座）
中根俊成（国立病院機構長崎川棚医療センター臨床研究部・神経内科）
服部信孝（順天堂大学 脳神経内科/老人性疾患・病態治療研究センター
/神経変性疾患病態治療探索講座）

14:00～14:40

疾患関連遺伝子

座長 辻 省次

9. 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

辻 省次、石浦浩之、三井純、Budrul Ahsan、福田陽子、後藤順
（東京大学 神経内科）
小久保康昌（三重大学大学院地域イノベーション学研究所）
葛原茂樹（鈴鹿医療科学大学保健衛生学部）

日笠幸一郎、吉村淳、土井晃一郎、森下真一(東京大学新領域創成科学研究科)
原賢寿、西澤正豊 (新潟大学 神経内科)
豊田敦、藤山秋佐夫 (国立遺伝学研究所)

10. 牟婁病剖検脳での神経細胞特異的 DNA メチル化解析

岩田 淳 (東京大学大学院医学系研究科分子脳病態科学)
間野達雄 (東京大学 神経内科)

14:40~15:00 < コーヒーブレイク >

15:00~15:40

iPS 細胞

座長 小久保康昌

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・発生医学研究所・幹細胞誘導分野)
濱崎 誠(熊本大学・発生医学研究所・幹細胞誘導分野)

12. Kii ALS/PDC (牟婁病)における病態解析および創薬を目的とした疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成

広川佳史、白石泰三(三重大学大学院腫瘍病理学)
小久保康昌(三重大学大学院地域イノベーション学研究科)
葛原茂樹 (鈴鹿医療科学大学保健衛生学部)
森本 悟 (三重大学大学院腫瘍病理学、慶應義塾大学医学部生理学教室)
石川 充、赤松和土、駒野 肇、岡野栄之(慶應義塾大学医学部生理学教室)

15:40~15:45 閉会挨拶

研究代表者 小久保康昌

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
三重大学大学院地域イノベーション学研究科 紀伊神経難病研究センター
〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 TEL & FAX: 059-231-5117
E-mail:kii-project@clin.medic.mie-u.ac.jp

三重県南部に多発する家族性認知症

-パーキンソン症候群

発症因子の探索と治療介入研究

研究代表者：小久保康昌 三重大学大学院地域イノベーション学研究所

研究要旨

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群(紀伊 ALS/PDC(Amyotrophic Lateral Sclerosis /Parkinsonism-dementia complex)) について、今年度の研究成果をまとめた。1)環境要因と臨床例では、毛髪中におけるバナジウムとマンガンの蓄積、ALS 多発と干物摂取との因果関係、佐賀県の ALS/PDC 類似症例、2) 遺伝的要因では、疾患遺伝子の探索として全ゲノム配列解析と Homozygosity haplotype 解析、エピゲノム研究では剖検脳での神経細胞特異的 DNA メチル化解析、3) Multiple Proteinopathy では、大家系の複数患者剖検脳に蓄積する tau, α -synuclein, TDP-43 の生化学解析、tauopathy としての神経病理学的特徴、リン酸化タウ陽性所見に関するグアム ALS/PDC との比較、4) iPS 細胞研究では、iPS 細胞の樹立と神経細胞への誘導、疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成、の各テーマについて新たな知見が報告された。引き続き、病態解明や発症原因究明を継続するとともに実地臨床への成果還元を目指す必要がある。

研究分担者

岩田 淳 東京大学大学院医学系研究科
分子脳態科学
江良 択実 熊本大学発生医学研究所
岡本 和士 愛知県立大学 看護学部
小柳 清光 信州大学 医学部
紀平 為子 関西医療大学 保健医療学部
辻 省次 東京大学医学部附属病院
神経内科
富山 弘幸 順天堂大学医学部 脳神経内科
神経変性疾患病態治療探索講座
長谷川成人 (助)東京都医学総合研究所
広川 佳史 三重大学医学系研究科 腫瘍病
理学
村山 繁雄 東京都健康長寿医療センター
高齢者ブレインバンク

- パーキンソン症候群 (紀伊 ALS/PDC(Amyotrophic Lateral Sclerosis /Parkinsonism-dementia complex) の発症因子探索と治療介入にむけて、本年度は、1) 環境要因と臨床例：毛髪中元素分析と生活習慣との関連 (紀平)、ALS 多発と干物摂取との因果関係解明に関する検討(岡本)、紀伊半島以外において ALS/PDC が疑われた症例 (富山)、2) 遺伝的要因：疾患遺伝子の探索(辻)、剖検脳での神経細胞特異的 DNA メチル化解析(岩田)、3) Multiple Proteinopathy: 大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析 (長谷川)、tauopathy としての神経病理学的特徴 (村山)、5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較 (小柳)、4) iPS 細胞研究：iPS 細胞の樹立 (江良)、疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成 (広川)の各項目について検討した。

B. 研究方法

1) 環境要因：紀伊半島では、この50年間にALSが減少し、発症年齢が高齢化している。このような変化には、環境要因が大きな影響を与えたと推定される。このような環境要因を明らかにすることは、神経変性疾患全般の発症要因解明や予防法につながる可能性がある。

ALS多発と干物摂取との因果関係；対象は2004年に多発地と非多発地の15歳以上の住民を対象に行った横断調査の参加者と、2004年に行った症例対照研究の1183名の症例と407名の対照を用いた。食事内容および食生活習慣に関する情報は97項目からなる自記式の食品頻度摂取調査から得た。干物の摂取頻度に関しては「毎日1回以上摂取」を高頻度摂取とし、それ以外の食品に関しては低頻度「めったに食べない～週1回以下」を低頻度摂取、「週に4-5回あるいは毎日」を高頻度の2群に分類した。肉類の摂取においては3つの異なる種類のうち1つでも頻回に摂取する者を「頻回摂取」とした。食品の摂取頻度は低頻度（めったに食べない/週1回以下）と高頻度（週に4-5回あるいは毎日）の2群に分類した。肉類の摂取においては3つの異なる種類のうち1つでも頻回に摂取する者を「高頻度摂取」とした。

因果関係の有無の判定には、疫学研究で用いられている判断基準である「関連の時間性」「関連の一致性」「関連の強固性」「関連の特異性」「関連の整合性」の5つの条件を用いた。

毛髪中元素分析と生活習慣との関連；対象は、我々が2010年-2012年に実施した地域住民の健康診断と訪問診療・療養相談において本研究の趣旨に同意した住民とALS患者とした。

1. 頭髪の元素分析

側頭部2か所、後頭部1か所から頭髪約200mgを採取し、アセトン(50ml)、蒸留水(各々50ml、3回)、アセトン(50ml)で各々10分間強振、風乾後30mgを秤量、硝酸洗浄済みポリエチレン袋に封入し照射試料とした。試料作成と分析方法は既に報告

した¹が、京都大学原子炉実験所の研究用原子炉気送管Pn-1で中性子を照射し放射化分析を実施した。

標準試料として、頭髪標準試料(国立環境研究所環境標準試料 NIES CRM No. 13)、各元素の標準としてCa(1000 ppm、以下同様)、Mg(200)、Cu(50)、Al(20)、Mn(5)、V(1)、さらにZn(200)の混合標準液(XSTC-Multi-element Standard, SPEX, USA)から100μl採取し濾紙に滴下した。Sは(NH₄)₂SO₄(w) GR(8.241g)を蒸留水で溶解し1000μgを濾紙に滴下し使用した。

2. 生活・食習慣に関する自記式アンケート

2012年にK地域と対照住民に実施した食品摂取頻度、嗜好、仕事の内容、身体疲労および飲用水の種類などを含めた63項目のアンケート調査の結果から、食生活と仕事に関する項目を抽出し検討した。

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

3. K地域の食品の元素分析

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

紀伊半島以外においてALS/PDCが疑われた症例：順天堂大学脳神経内科遺伝子バンク約3300症例の中から、ALS/PDCが疑われる症例がないか、臨床像を確認した。

2) 遺伝要因：疾患遺伝子の探索；三重県の紀伊ALS/PDCの大家系に属する2例の末梢血からDNAを抽出。Illumina HiSeq2000を用い、ペアエンド法で全ゲノム配列解析を行った。一例については、150塩基のペアエンド法を用いた。全ゲノム配列データのある剖検例8例に共通する変異の抽出を試みた。対照として、disease control 24例の全ゲノム配列解析のデータを用いた。

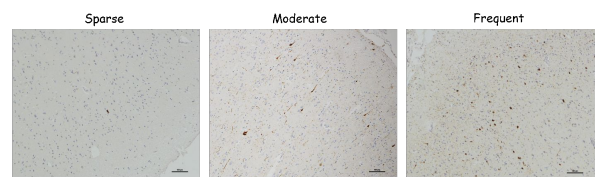
Homozygosity haplotype 解析については、全ゲノム配列解析を行っていない 10 例の剖検例については Genome-wide SNP 6.0 (Affymetrix) でタイピングを行った。全ゲノム配列解析を行った 5 例の剖検例については、全ゲノム配列解析より当該 SNP のデータを抽出し、合計 15 例の剖検例の SNP データを得た。Homozygosity haplotype 法 (HH analysis) を用いて 2cM 以上にわたる共通領域を抽出した。

エピゲノム解析：年齢を適合させた牟婁病患者 10 名、健常者コントロール群 10 名の剖検脳を用いた。側頭葉から抗 NeuN 抗体を用いたフローサイトメトリーを行い、神経細胞核のみを選択的に抽出、そこから DNA 抽出を行った。抽出した DNA は Bisulfite 変換を行い、Illumina 社製 HumanMethylation450 BeadChip を用いてゲノム上の各 CpG についてメチル化の定量を行った。

3) Multiple Proteinopathy: 大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析；症例番号、臨床診断、及び解析部位(括弧内)は以下の通りである。1998-1 (ALS with D) (前頭葉)、2001-1 (ALS with A) (海馬) 2012-2 (PDC) (海馬傍回) 2013-3 (PDC) (海馬傍回)。それぞれ、0.5g の凍結組織から通常の方法に従ってサルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、各種抗体によるイムノプロット解析を行った。用いた抗体は、抗タウ抗体 (HT7, AT8, RD3, RD4, anti-4R, pS396, T46)、抗リン酸化 α Syn 抗体 (mAb PS129)、抗 TDP-43 抗体 (poly pS409/410) である。

tauopathy としての神経病理学的特徴：対象は臨床的に牟婁病と診断された、牟婁病 (Kii ALS/PDC) 患者連続開頭剖検例 9 例。免疫プロットについては、凍結側頭葉皮質を使用した。組織学的検索について、反対固定側海馬・側頭葉 (免疫プロットに対応する部位) のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6 μ m 厚連続切片を作成した。免疫プロットで 4R ほぼ単独を示した 1 例については、保存全ブロックを使用した。H.E. K.B.

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



グリア病理 (Patchy astrocytic structure) ; 0, \pm : 1 - 5, 1+ : 6 - 9, 2+ : 10 - ($\times 100$)、嗜銀顆粒 ; 0, \pm : 1 - 19, 1+ : 20 - 49, 2+ : 50 - 99, 3+ : 100 - ($\times 400$)。

5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較；紀伊半島 H 出身の 5 剖検例 (全例女性、死亡時年齢：60 歳～73 歳、臨床診断は ALS3 名、PDC+ALS2 名)、およびグアム島で生まれ育って死亡した 6 剖

検例 (男性 3 名、女性 3 名、死亡時年齢：51 歳～64 歳、臨床病理診断は全例 PDC) を用いた。大脳、脳幹、小脳をホルマリン固定パラフィン包埋した後、各箇所 6 μ m 厚切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色、クリューバー-バレラ染色、リン酸化タウ (AT8) 免疫染色、リン酸化 TDP-43 免疫染色、グリア膠線維酸性蛋白 (GFAP) 免疫染色、p62 免疫染色等を施行して光学顕微鏡で観察した。

4) iPS 細胞研究：iPS 細胞樹立；1. iPS 細胞樹立のための皮膚線維芽細胞の樹立。三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病患者の皮膚生検から、皮膚由来初代線維芽細胞を樹立する。

2. SeV ベクターを使った iPS 細胞の確立

SeV ベクターによって患者由来線維芽細胞へ初期因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を一過性に発現さ

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

3. 樹立した iPS 細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞マーカー (Nestin 等) の発現を調べ、神経細胞であることを確認する。

疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成 ; (Fig.1)

平成 25 年度に三重大学において承認された「牟婁病(Kii ALS/PDC)患者からのヒト iPSC の樹立とそれを用いた疾患解析および創薬に関する研究」計画書に基づいて、十分なインフォームドコンセントを得た上で、Kii ALS/PDC 患者の協力のもと、(現在)5名の患者において採血を試行。

慶應義塾大学にて、末梢血単核球又は T 細胞を調製。続けてエピソーマルベクターを用いて、SOX2, OCT3/4, KLF4, L-MYC, ドミナントネガティブ p53, LIN28, EBNA1 といった初期化因子を導入し、STO フィーダー細胞上で 3~5 週間培養を行った。具体的には、京都大学 iPS 研究所 (CiRA)より公開されている、「エピソーマルベクターを用いた末梢血からの iPS 細胞樹立 Ver.1」プロトコールに準じた。iPSC コロニーの単離後は拡大培養を行い、未分化性を維持した状態で継代と凍結保存を行う。

各々の患者由来 iPSC について、解析に用いることの可能なクローンの選抜を試行 (エピソーマルベクターの残存およびゲノム挿入が起きていないこと、未分化マーカー発現、テラトーマ形成能の確認、神経系分化能の確認)。(Fig.2)

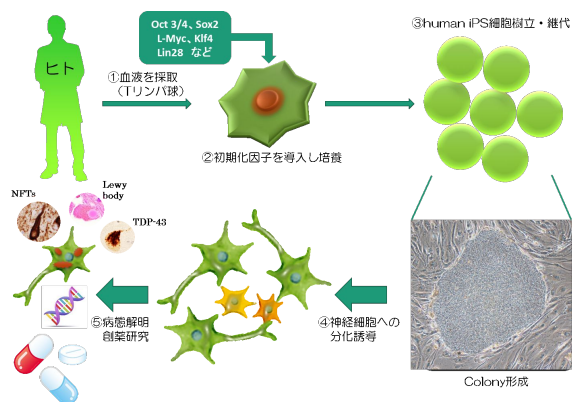


Figure 1. Overview of iPSC

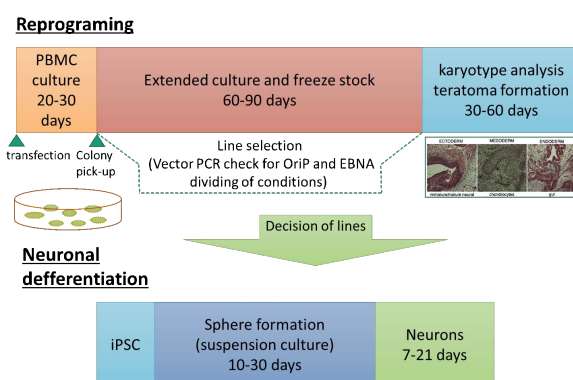


Figure 2. Time course of human iPSC establishment

(倫理面への配慮を含む)

本研究は、三重大学、東京大学、順天堂大学、熊本大学、東京都健康長寿医療センター、東京都医学総合研究所、愛知県立看護大学、関西医療大学、慶應大学の各倫理委員会の承認に基づき行った。

C.研究結果

1) 環境要因 ALS 多発と干物摂取との因果関係 ; 1. 関連の時間性

愛知県で行った症例対照研究において、要因の調整後も干物を週 1 回以上摂取する者のオッズ比に変化が認められず、かつ有意であったことから干物の高頻度摂取は独立した危険因子であることが認められた。この結果は「要因が結果に対し、時間的に先行していること」の条件を満たしているため、関連の時間性が確認された。

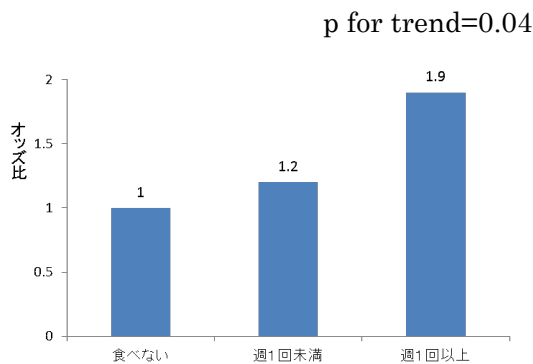
表 1. 愛知県における 症例対照研究の結果

要因	粗オッズ比	調整オッズ比
干物の高頻度摂取 (週 1 回以上)	1.8(1.1-2.8)	1.8 (1.1-2.8)
A 型行動パターン yes)		2.3 (1.5-3.5)
緑黄色野菜 (Less frequent)		2.5 (1.6-4.0)
性		

2. 関連の強固性

摂取頻度の増加に伴い、ALS のリスクは有意な上昇 (p for trend=0.04) を認めた。この結果は、「要因と結果の間に密接な関係が認められること、相対危険比あるいはオッズ比が高いこと、統計的検定において有意であること、量-反応関係が認められること」の条件を満たしているため、関連の強固性が確認された。

図 1. 干物の摂取頻度別オッズ比



3. 関連の一致性

干物を週 3 回以上摂取する者の ALS に対するリスクは K 町では H 村に比べて 4 倍高く、かつ有意であった。したがって、愛知県の症例対照研究の結果と同様の結果を示したことから、「異なった研究方法、研究者、研究対象者でおこなわれた疫学研究で、全て同じような結果が認められること」の条件を満たしているため、関連の一致性が確認された。

表 2. K 町と H 村との比較

要因	オッズ比
干物の高頻度摂取 (週 3 回以上)	4.0 (2.4-6.6)

4. 関連の特異性

多発地である K 町と O 町における高頻度摂取者 (週 1 回以上) の割合は、H 村および愛知対照群に比べ高かった (図 1)。15 歳までの食品別摂取頻度の比較において、大島町に居住していた者のうち干物を毎日 1 回以上摂取する者の割合は、15 歳まで町外にいた者のそれに比べ高かった。これらの結果と、干物の高頻度摂取が ALS 発症リスクと有意な関連を有することを認めたことを考え合わせると、「要因と結果の間に特異的な関係が認められること。仮説としての要因と結果が必要かつ十分条件であること」の条件を満たしているため、関連の特異性が確認された。

図 2. 地域別干物摂取頻度者(週 3 回以上)割合の比較

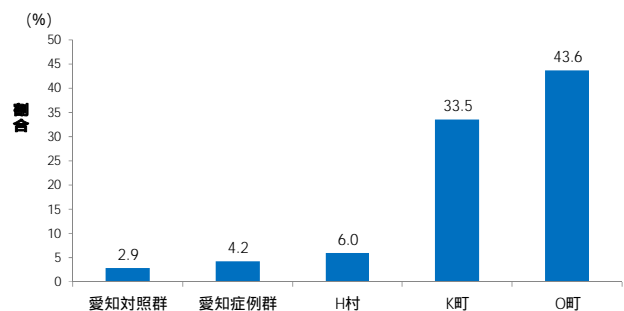
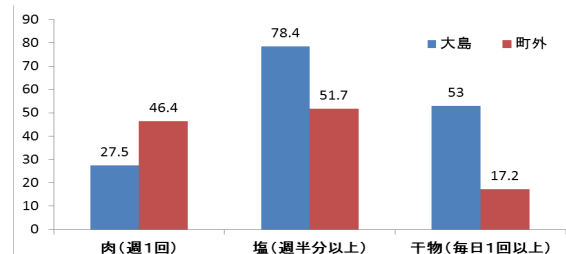


図 3 15 歳までの食品頻度摂取の比較



5, 関連の整合性

多発地である O 町はおよび K-ALS での酸化ストレスの指標である 8-OHDG が、対照地域に比べて高値であった。さらに、H 町にて行った 3 日間の陰膳法の調査にて参加した 4 名はいずれも 1 日 1 食以上過酸化物を多く含む干物を摂取していた。

毛髪中元素分析と生活習慣との関連;

1. 頭髪の元素分析. K 地域 ALS 7 例, 穂原地域 (H-PDC) 5 例, 弧発性 ALS (SALS) 10 例, MND 3 例, K 地域住民 132 名, 対照地域住民 29 名から頭髪試料の提供を得た. 本研究ではこれらの内, パーマや毛染めをしていない頭髪, K-ALS 7, H-PDC 4, SALS 10, MND 3, K 地域住民 87, 対照住民 20 試料について検討した. 我々の放射化分析法で測定した標準頭髪試料(NIES CRM No. 13)の Al, Ca, Mg, Mn, V, Cu, S 含量はその保証値/参考値と良く合致した.

K-ALS では, 頭髪中 V と Mn 含量が対照に比し有意に高値を示した ($p < 0.05$, 図 1). H-PDC でも同様に頭髪中 V 含量が高い傾向が認められた. K 地域住民では, 頭髪中 V や Mn 含量が高値を示す者が多く認められたが, 平均値は対照住民と有意差を認めなかった. 頭髪中の V 含量は頭髪中 Mn 含量および Al 含量と正の相関を示した (各々 $p < 0.01$).

2. 生活・食習慣アンケート調査との関連. 頭髪中の元素含量と生活・食習慣の関連について, アンケート調査を実施し分析した. 漬け物を「よく食べる」と回答した住民では「あまり食べない」と回答した住民に比較して頭髪中 V 含量が高値を示した ($p < 0.05$, 図 2). 畑仕事を「よくする」と回答した住民では「あまりしない」と回答した住民に比し, 頭髪中 Mn ($p < 0.01$)と Al ($p < 0.05$)含量の高値を認めた. 頭髪中 V 含量は尿中 8-OHDG/creatinine 値と正相関する傾向がみられた(Pearson's $r = 0.358$).

3. K 地域の食品の元素分析

K 地域の上記食品 11 品目の内, ひじきや天草中の V 含量が高い値を示した (図 3).

紀伊半島以外において ALS/PDC が疑われた症例:

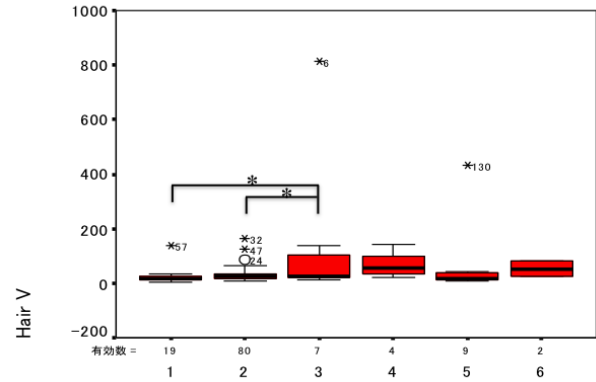


図 1 . 頭髪中のバナジウム(V)含量の比較

K-ALS では対照および K 住民に比し有意な高値を示した (単位: ppb). 1: 対照, 2: K 住民, 3: K-ALS, 4: H-PDC, 5: SALS, 6: MND, *: $p < 0.05$.

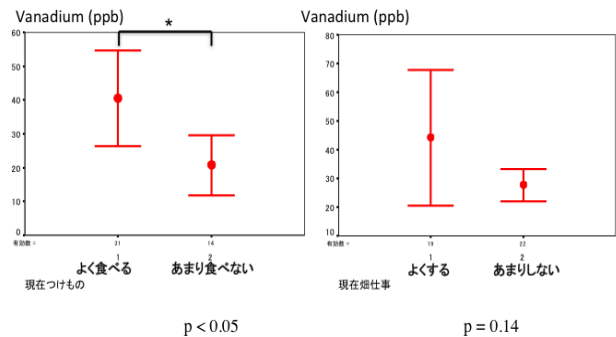


図 2 . 生活習慣と頭髪中 V 含量との比較

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

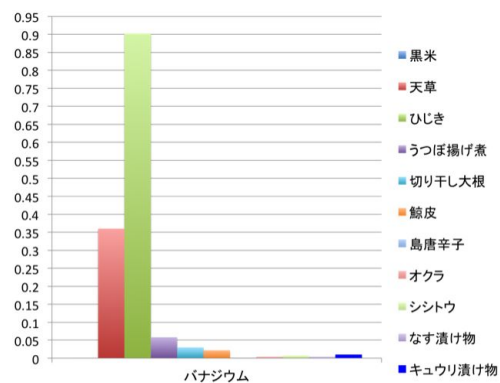


図 3 . 食品中の V 含量

K 地域で生産/加工された食物/食品に含まれる V 含量を測定した. 海産物に高い値を認めた.

紀伊半島以外において ALS/PDC が疑われた症例: 1 例 68 歳女性, 佐賀県出身 (紀伊半島での出生・居住歴なし) の症例で孤発性 ALS/PDC を疑

う症例があった。本症例は、2011年2月頃から前傾姿勢、歩行障害を生じ、四肢腱反射亢進もあり近医で頸髄症を疑われた。11月にC3-6椎弓形成術を施行され、右手箸が使いやすくなった。物忘れも生じ、12月にリハビリテーション継続を目的に療養型病院に転院となったが、歩行障害は増悪し車椅子を使用するようになり、表情が乏しく、声が小さくなった。下肢筋萎縮があり、四肢筋力は2/5前後で、感覚障害は認めなかった。固縮、拘縮があったがレボドパの反応は乏しかった。2012年4月5日に運動ニューロン疾患及びパーキンソン病の精査加療目的で近院神経内科へ転院となった。転院時疎通の悪さ、記憶力低下を認め、やや無為であり、仮面様顔貌、小声、嚥下障害、舌萎縮、四肢筋萎縮、深部腱反射亢進を認めた。感覚障害や失調症状はなかった。針筋電図では上下肢に神経原性変化を認めた。頭部MRIでは軽度の脳萎縮を認め、海馬の萎縮が目立っていた。MIBG心筋シンチは正常であった。5月中旬より嚥下障害、低酸素血症を認め、経管栄養・人工呼吸管理を開始した。6月19日に気管切開施行し、7月下旬頃からは表情もなく、意思表示もほとんどない状態となり経過している。

本症例の遺伝的背景を明らかにすべく候補遺伝子解析を行っているが、今のところ、

C9orf72 (intron 1 GGGGCC repeat expansion)

TDP-43

MAPT (exon 1,2,9-13)

DCTN1 (exon2)

PARK2

SNCA (multiplication)

LRRK2 (exon 11,31,41,48)

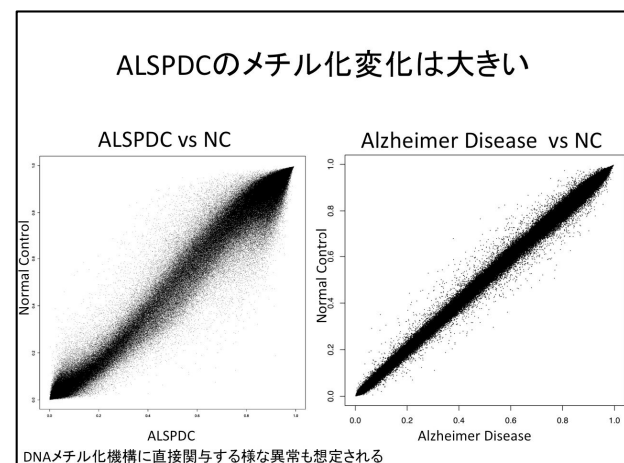
に明らかな責任遺伝子変異は見つかっていない。そのため、エクソーム解析を開始した。

3) 遺伝要因：疾患遺伝子の探索：全ゲノム配列解析からは、剖検例8例に共通し、disease control 24例に存在しない variant は、非翻訳領域に広げても認められなかった。剖検例7例、6

例に認められ、disease control に認められない variant はそれぞれ10個、55個見出された。逆に、24名のdisease controlで1、2、3アレル認められ、剖検例8例で共通する変異はそれぞれ1つずつ存在した。しかしながらこれら3つの変異は既にdbSNPへの登録がなされており、頻度情報の存在する2つのSNPではアレル頻度が12.5%、15.8%と非常に高いことから、ALS/PDCのように集積地以外では極めて稀な疾患を説明するものとは考えられなかった。

Homozygosity haplotype法を用いて解析したところ、全剖検例15例で高率(12名以上)で共通する領域を3ヶ所認めたが、コントロールサンプル14検体のhomozygosity haplotype法による解析でも観察される領域であり、疾患特異的とは考えられなかった。A家系の剖検例3名で共有される領域、A家系の発症者5名(うち3名は上述の剖検例3例)で共有される領域は見出されたものの、A家系以外

の剖検12例中少なくとも8例で共通する染色体領域とはオーバーラップしなかった。



エピゲノム解析：牟婁病患者10名の平均年齢は70.9歳であった。臨床病型としては、ALS型5名、PDC型5名であり各平均年齢は68.6歳(63-73歳)、73.2歳(70-79歳)であった。健常者コントロール群について平均年齢は71.5歳であった。Student t検定p値<0.01, β 値の牟婁病と正常コントロール群間差0.1以上をカットオフとし、25922プローブが検出された。個々のデータのばらつきが大きいこと考慮するとともに、メチ

ル化による遺伝子発現制御のためには連続した一定領域のメチル化変化が起きているということ仮定して、抽出したプローブ群のなかで3カ所以上連続しているプローブを選択し、1380プローブまでの絞り込みを行った。これらのプローブのうちで、遺伝子に関連したプローブは909カ所で471遺伝子と関連しており、特に発現調整に最も重要と考えられるTSS200またはTSS1500に含まれたプローブは254カ所、これらは123遺伝子に関連しているものであった。これらの遺伝子群の機能的内訳としては、シナプス伝達、細胞骨格、転写抑制などに関与する物が多く見られ、牟婁病の特異的病態を表しているものと考えられた。一方で、臨床病型によって分け、同様の基準(p値<0.01, ALS/PDC群間差0.10, 連続3プローブ以上)でプローブを選定したところ、29プローブが選定され、*ZIC1*, *ZIC4*, *LOC145845*の3遺伝子が残った。*ZIC1,4*は双方とも3q24に存在し、Dandy Walker syndrome(先天性小脳形成異常)の原因遺伝子の一つである。正常コントロールとの比較で抽出された遺伝子の数はアルツハイマー病/正常で抽出された遺伝子(下図)の数よりも遙かに多く、その原因としては1.牟婁病に特異的な現象、もしくは2.サンプル数が少ないためのアーチファクト、が考えられた。しかしながら牟婁病内での比較では抽出された遺伝子の数は3つであり、サンプル数の少ない事が原因とは考えにくいと結論した。

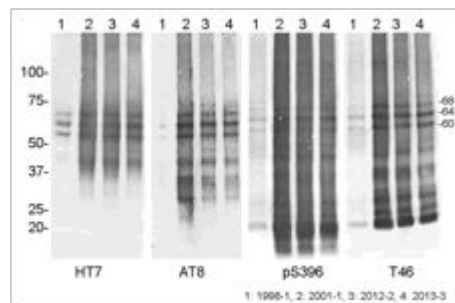
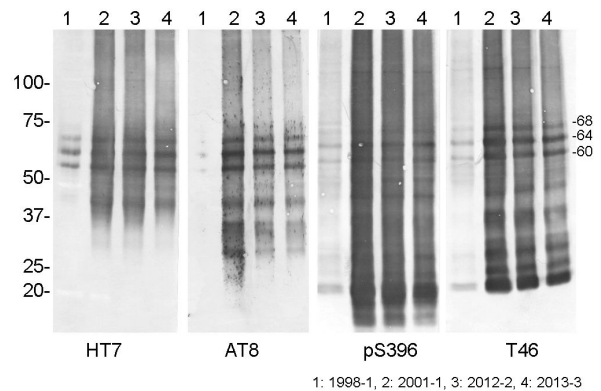
4) Multiple Proteinopathy: 大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析;

1. タウのイムノプロット解析

症例 1998-1 は他の 3 例に比べてタウ蓄積が少ないものの、いずれの症例においても、アルツハイマー病とよく似た、60, 64, 68kDa の全長リン酸化タウのバンド、レーン全体がスメア状に染ま

る反応、複数の C 末端断片が検出された。

アルツハイマー病患者 3 例から調製した不溶性タウのバンドパターンとの比較も行ったが、紀伊の大家系 4 例に検出されたタウの病変は、RD3、anti-4R、T46 いずれの抗体においても検出されるバンドパターンもアルツハイマー病のそれらと区別がつかなかった。



2. TDP-43, シヌクレインの生化学解析

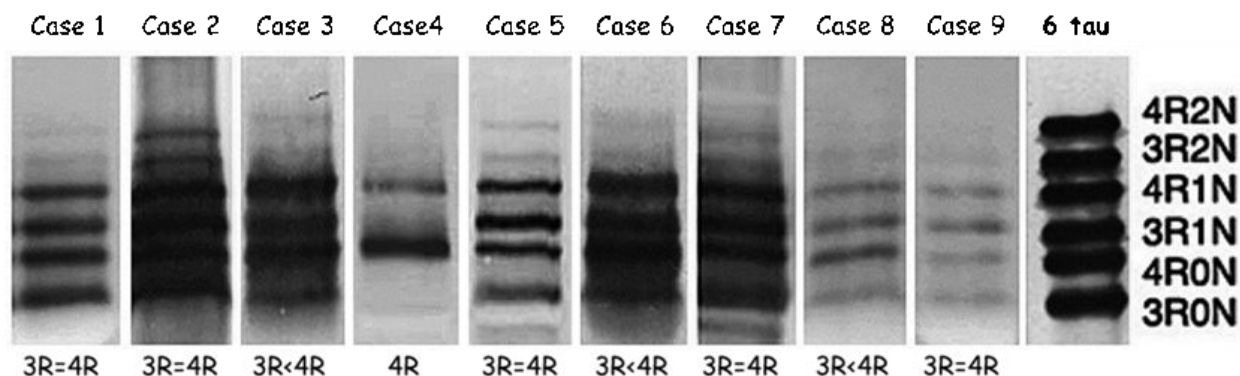
TDP-43 については、解析した 4 例全てにおいて、45kDa の全長リン酸化 TDP-43、18~26kDa の C 末端断片、およびスメア状の反応が検出された。また C 末端断片のバンドパターンは type A-FTLD-TDP のバンドパターンに類似していた。また、シヌクレインについても、1998-1 は軽微であったが、4 例全てにおいてリン酸化シヌクレイン陽性のバンドが検出された。またそのバンドパターンはレビー小体型認知症やパーキンソン病のそれと類似していると思われた。

tauopathy としての神経病理学的特徴：タウ免疫プロットと臨床型分類との対比では、4R dominant 1 例：PDC (Parkinson dementia complex) with ALS (amyotrophic lateral sclerosis)；3<4R 3 例：PDC with ALS 1 例、ALS 1 例、ALS with D (Dementia) 1 例、3+4R (AD 型) 5 例：PDC with ALS 1 例、PDC 2 例、ALS 2 例であった(Fig.1)。プロット陽性 9 例の海馬において、多数の ghost tangle (GT)、神経原線維変化 (NFT)、pretangle (PT)、嗜銀顆

より広範であった。NFT 及び特徴的なグリア病理を半定量的に評価した結果、NFT を AD 型でより豊富に認めた。また、嗜銀顆粒やグリア病変が、免疫プロットで 4R タウが AD に比べ多い群が存在する根拠をなす可能性があることを確認した。

5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較；出現頻度と局在の差はあれ、紀伊症例、グアム症例の全例で、リン酸化タウ陽性の神経原線維変化 (NFT)、プレタングル、スレッド等が認められた。紀伊症例の NFT は、皮質全層に出現する症例

Figure 1. The tau isoform patterns of western blotting in nine Kii ALS/PDC cases. The right end ladder is examples of six tau isoforms



と、皮質浅層に出現する症例が見られた。紀伊症例のリン酸化タウ陽性のアストロサイトは、脳表などでは thorn shaped astrocytes が多く、大脳皮質などの

Case	Age/ Gender	Duration of illness, y	Clinical symptoms			ALS pathology	Middle temporal cortex (MT)					Blotting type
			P	D	A		AG	Subpial thorn	Patchy astrocytic structure	NFT score	AT-8 NFT score	
1	75 M	7	+	+	-	-	±	±	±	Frequent	Frequent	3R=4R
2	70 F	11	+	+	-	-	1+	+	±	Frequent	Frequent	3R=4R
3	60 F	8	+	+	+	+	±	+	2+	Moderate	Moderate	3R<4R
4	70 F	12	+	+	+	+	2+	+	±*	Moderate	Frequent	3R<<4R

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

8	70 F	13	-	-	+	+	±	+	-	None	Sparse	3R<4R
9	70 F	10	-	-	+	+	-	+	±	Moderate	Frequent	3R=4R

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

粒 (AG)を認めた。更に、Gallyas 陰性 AT8 陽性の星状膠細胞の斑状構造を認めた(Fig.2,3)。免疫プロットにて AD 型を示した群は、GT の出現が

灰白質では granular hazy astrocytic inclusions (GHAI; Oyanagi K, et al., 1997)³⁾であった(図 1、2)。主として灰白質で、リン酸化タウ陽性の、神経突起と思われるものと、細く、うねうねと屈曲し枝分かれます

るアストロサイトの突起と思われるものが見られた。紀伊症例の白質では、灰白質にリン酸化タウ陽性所見が多い症例で、オリゴデンドログリアの tau-positive fine granules (TFG; Yamazaki M, et al., 2005)⁴⁾(図 3、4) スレッド、GHAI が認められた。TFG の大きさは、グアム島 PDC 症例より紀伊 PDC-ALS 症例がやや大きかった。紀伊症例とグアム症例の比較では、リン酸化タウ陽性のアストロサイト、および GFAP 陽性のアストロサイトは、紀伊 PDC-ALS 症例がグアム PDC 症例より多かった。

5) iPS 細胞研究: iPS 細胞の樹立 ; 1. 皮膚由来線維芽細胞の樹立

患者からの同意が得られた 5 例の症例において皮膚生検を行い、うち 4 例から iPS 細胞作成に必要な皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。残り 1 例は培養中に汚染があり破棄した。

2. iPS 細胞の樹立

症例から樹立した皮膚由来線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を行った。線維芽細胞に初期化因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を持つセンダイ・ウイルスを感染させ、感染後 1 週間目にマイトマイシンで処理したマウス胎仔初代線維芽細胞(MEF)上へまきなおした。

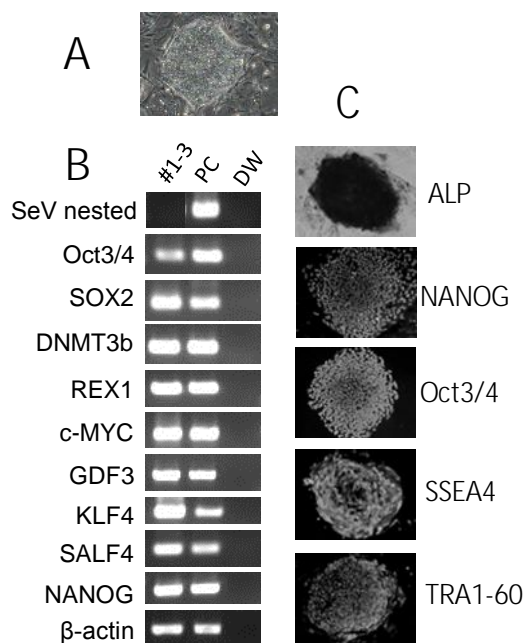
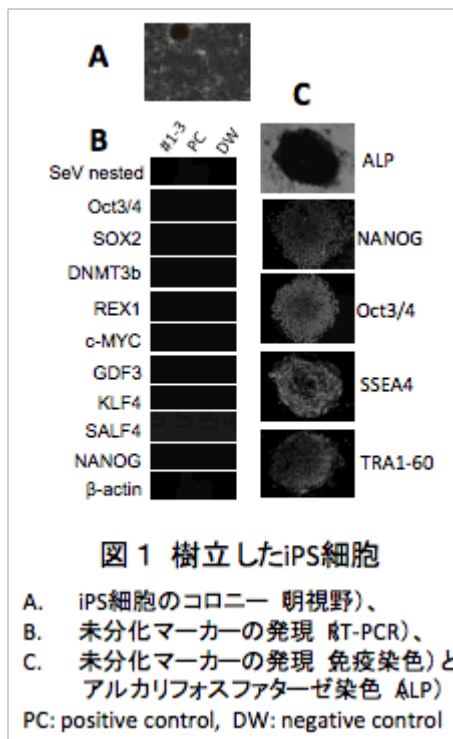


図 1 樹立したiPS細胞

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

感染から 14 日後ぐらいからコロニーが出現した。

感染から 25 日目にコロニーを顕微鏡下にてピックアップしそれぞれのクローンを培養、増幅した。その後、ウイルス除去のために培養の温度を 38 度へシフトさせた。用いたセンダイウイルスベクターは温度感受性株のために 38 度では増殖が停止し、結果としてウイルスベクターフリーの iPS 細胞を得ることができる。PCR にてウイルス除去を確認した後、未分化マーカーの発現を免疫染色と RT-PCR にて調べ、iPS 細胞であることを確認した。H25 年度は、1 症例から 10 数株のウイルスベクターフリーの iPS 細胞株を樹立した(図 1)。

3. 樹立した iPS 細胞からの神経細胞への誘導

これまでに樹立した iPS 細胞のうち症例 1 から樹立した iPS 細胞を神経細胞へと誘導した(図 2)。約 2 週間あまりで形態学的にも神経細胞へと誘導することに成功した。神経細胞特異的マーカーである Nestin の免疫染色を行い、陽性であることから神経細胞であることを確認した。

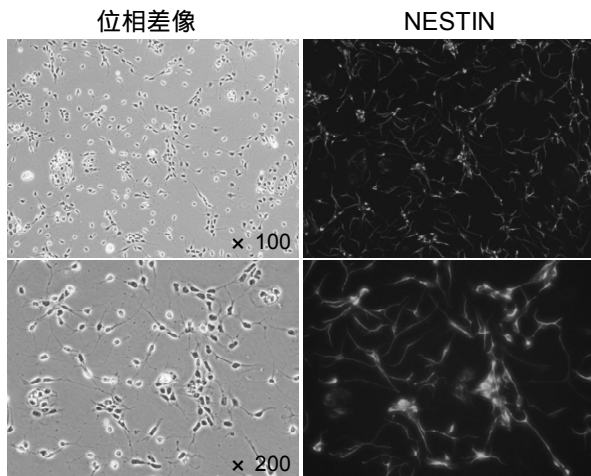


図2 疾患由来iPS細胞から神経細胞への誘導
iPS細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞特異的マーカーであるNESTINの抗体にて免疫染色を行った。

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

細胞や iPS 細胞の樹立効率・増殖速度は異なっていた。単離した iPS 細胞クローンに関して、PCR を用いたエピソーマルベクターの残存確認を行った。(Fig.4)

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

Table 1. Characteristics of five patients.

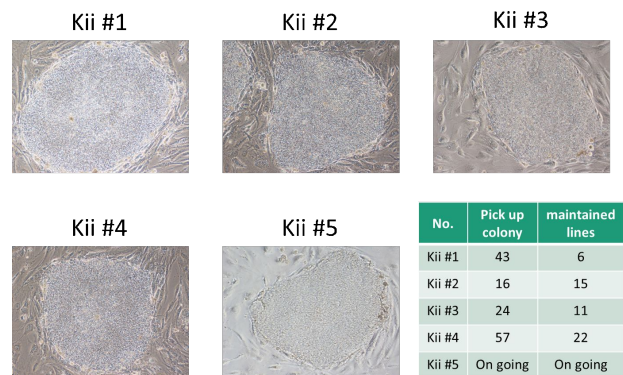


Figure 3. Colonies picked up in Kii #1-Kii #5.

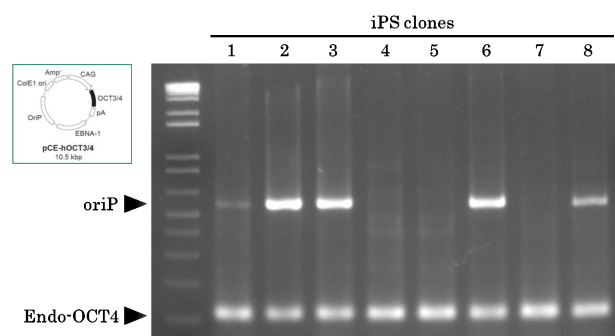


Figure 4. Check for residual plasmid vectors.

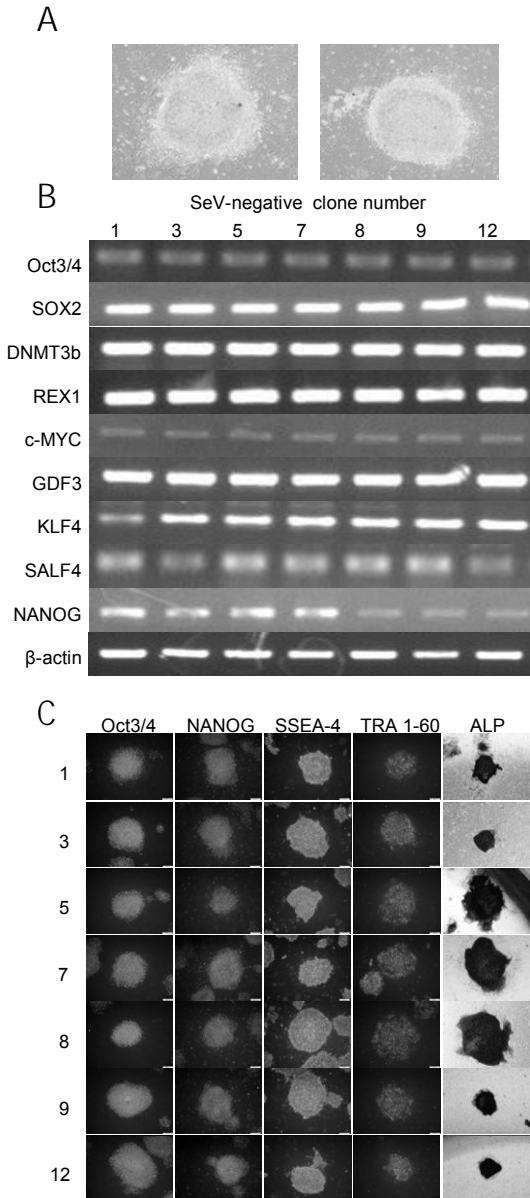


図1 樹立したiPS細胞

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

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

D. 考察

環境要因: 原は活性酸素種(ROS)および活性窒素種(RNS)などの産生で引き起こされる酸化ス

トレスが神経細胞の脆弱性を高めることを報告している。したがって、多発地における今回の干物摂取に関する結果は原の報告を裏付けるものと考えられた。

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

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

頭髪中VやMn高値の一つの要因として、K地域住民の生活習慣との関連が示唆された。生活習慣のアンケート調査から、当地域では畑仕事の頻度が高く、海産物の摂取が多いことが示された。頭髪中のVはAlやMn含量と正の相関を示し、さらに頭髪中のAl、Mnは畑仕事の頻度の高い住民に高値を示した。当地域では飲用水中のCa含量が極めて低い

ことが確認されているが、低 Ca 状態下で、土壌中あるいは海産物中の V や Mn が Al とともに吸収され頭髮など組織に蓄積した可能性が考えられた。漬け物の摂取頻度の高い住民に頭髮中 V 高値を認めたことの意義は不明で、どのような生活習慣と関連するのか今後の課題である。

V は生体への毒性を有する遷移金属であり、マウスでの肺腫瘍³、H₂O₂ 産生による p53 活性化とアポトーシス誘導⁴、ドパミン含有細胞への毒性⁵などが報告されている。Roos らは ALS 患者脊髄液中に Mn, Al, V など金属元素の有意な高値を認め金属による神経毒性の関与を推察している⁶。これら遷移金属元素が運動神経細胞の変性にどのように関与するか今後さらに検討が必要である。

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

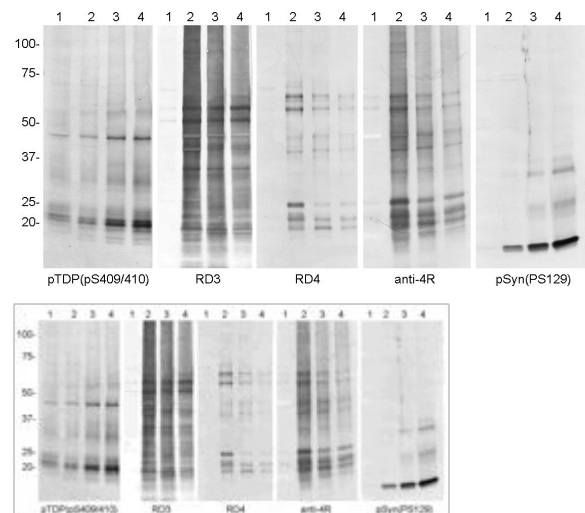
遺伝要因： 疾患遺伝子の探索；8名の剖検例の全ゲノム配列解析のデータより、イントロンや遺伝子間領域も含めて、共通する変異を探索したが、明らかに疾患と関連する共通変異は見出されなかった。

さらに、共有される染色体領域を見出すため、homozygosity haplotype 法を用いて、本疾患に関連する創始者ハプロタイプを探索したが、疾患と関連する創始者ハプロタイプを検出することはできなかった。原理的に、世代が離れていくと homozygosity haplotype 法による創始者ハプロタイプの検出力は下がるため、false positive の可能性は否定できないが、条件を緩めても創始者ハプロタイプは見いだせなかったことから、むし

ろ疾患の病原性変異が存在するとしても複数の遺伝子が関与している可能性(genetic heterogeneity)や、単一遺伝子疾患ではなく複数の疾患感受性遺伝子が関与している complex trait の可能性なども考慮に含める必要があると考えられた。

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

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



それぞれの異常タンパク質の蓄積の程度は、

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

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

5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見：グアム島症例との比較；今回検索した、紀伊半島 H 出身 5 剖検例のリン酸化タウ免疫染色を主とする神経病理学的検討結果では、グアム PDC 症例との顕著な類似性が認められた。すなわちグアム島症例に特異的な所見である、として報告した granular hazy astrocytic inclusions (GHAI; Oyanagi K, et al. 1997)³⁾、tau-positive fine granules (TFG; Yamazaki M, et al. 2005)⁴⁾ が紀伊半島 PDC-ALS 症例にも認められたことである。また、リン酸化タウ陽性所見が ALS では少なく、PDC あるいは PDC-ALS では多いこともあげられる (Oyanagi K, et al., 1994)⁵⁾。紀伊症例とグアム島症例の所見に明らかな相違点は認められなかったが、紀伊症例で、NFT が大脳皮質の浅層優位に出現しない症例が存在すること、リン酸化タウ陽性アストロサイトが多数認められること、tau-positive fine granules の大きさがやや大きいこと、などはグアム症例とは程度が異なるように思われた。

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

易に行える。

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

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

な治療薬を探索)を行っていく予定である。

1st plan

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

遺伝子未確定であり、表現型の再現が困難な可能性あり。

孤発性疾患や遺伝学的背景が不明確な疾患において協力的なツールとなる。

慶應拠点技術

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

2nd plan

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

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

E.結論

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

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

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

今回の解析では、全ゲノム配列で剖検例に共通する変異は検出されなかった。また、homozygosity haplotype 法による創始者ハプロタイプ探索でも、一つの創始者ハプロタイプに絞

り込むことはできなかった。

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

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

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

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

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

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

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y and Era T. Analysis of iPSC cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressive. Oral presentation. The 11th Stem Cell

- Research Symposium. Tokyo, 17th May 2013.
2. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y and Era T. Analysis of iPS cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressive. Poster presentation. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Boston, 14th June, 2013.
 3. 江良 択実 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 130 回 熊本小児科学会総会 特別講演 熊本 2013 年 6 月 16 日
 4. 江良 択実 iPS 細胞と再生医療 第 14 回 医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 招待講演 東京 2013 年 9 月 28 日
 5. Era T, Soga M, Fusaki N, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo S, Irie T, and Endo F. Model of Niemann-Pick disease type C using iPS cells. Oral presentation. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases and The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, 28th November, 2013.
 6. T Kihira , Kazushi Okamoto , Sohei Yoshida , et al. Environmental Characteristics and Oxidative Stress of Inhabitants and Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in a High-incidence Area on the Kii Peninsula , Japan. 2013 Internal Medicine 2013 , 52: 1479-1486.
 7. Tomiyama H. C9orf72 in Japanese amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Rinsho Shinkeigaku. 2013;53:1074-6.
 8. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. Cell Rep. 4:124-34.
 9. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. Brain 136:1128-38.
 10. Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Grubman A, Liddell JR, Crouch PJ, White AR. (2013) Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. PLoS One 8:e67433.
 11. Mann DMA, Rollinson S, Robinson AC, Callister J, Snowden JS, Gendron T, Petrucelli L, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Davidson YS and Pickering-Brown S. (2013) Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neuron Disease associated with expansions in C9ORF72. Acta Neuropathol Comm 1: 68.
 12. Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathol Comm 1: 54.
 13. Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Ishobe T, Hasegawa M, Hisanaga SI (2013) Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. J Biol Chem 288: 7968-77.
 14. Yui Nakayama, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Shigeki Kuzuhara, and Yasumasa

Kokubo. Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Kii Amyotrophic Lateral Sclerosis /Parkinsonism-Dementia Complex. Journal of Neurodegenerative Diseases. Article ID 679089, 4 pages 2013.

15. Kotaro Ogaki , Yuanzhe Li , Masashi Takanashi ,Kei-Ichi Ishikawa , Tomonori Kobayashi, Takashi Nonaka , Masato Hasegawa , Masahiko Kishi , Hiroyo Yoshino , Manabu Funayama , Tetsuro Tsukamoto , Keiichi Shioya , Masayuki Yokochi , Hisamasa Imai , Ryogen Sasaki , Yasumasa Kokubo , Shigeki Kuzuhara , Hiroyuki Tomiyama , , Nobutaka Hattori. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. Parkinsonism Relat Disord. 2013 Jan;19(1):15-20.
16. Ken-ichiro Kobayashi, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Takeshi Nishiguchi, Kenichi Isoda, Yasumasa Kokubo, Katsuhiko Ando, Masaki Katurahara, Yasuhito Sako, Tetsuya Yanagida, Akira Ito, Sentaro Iwabuchi, and Kenji Ohnishi. Rare case of disseminated cysticercosis and taeniasis in a Japanese traveller after returning from India. Am J Trop Med Hyg. 2013 Jul;89(1):58-62.

2.学会発表

1. Yasumasa Kokubo. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parkinsonism-dementia complex (PDC) of the Kii peninsula of Japan (Muro disease). - Recent Advances of Reserch -. 9th international congress on mental disorders & other non-motor features in Parkinson's diseaseand related disorders. MDPD 2013.
2. Satoru Morimoto, Yasumasa Kokubo , Hiroyuki Hatsuta, Shigeki Kuzuhara, Shigeo Murayama. Immunohistochemical study of the cerebellum in amyotrophic lateral screlosis (ALS)/ parkinson-dementia complex (PDC) in Kii peninsula (ALS/PDC- Kii, Muro disease). Alzheimer's Association International Conference, 2013.
3. Y. Kokubo, S. Morimoto, T. Nakagawa, K. Miyazaki, S. Kuzuhara. Clinical trial of Edaravone in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan. 24th International Symposium on ALS/MND.
4. 岡本和土, 紀平為子, 小久保康昌, 葛原茂樹. 日本における判別分析による ALS の予後進展状況の予測に関する研究. 日本疫学会 (大阪), 2013 . 1 月.
5. 岡本和土, 紀平為子, 小久保康昌, 葛原茂樹. 判別分析による ALS の予後進展状況の予測に関する研究. 日本神経学会 (東京). 2013、6 月
6. 紀平 為子, 岡本和土, 吉田宗平, 他. 紀伊半島南部 ALS 多発地域における生活・食習慣の変化に関する検討. 日本神経学会総会, 東京, 2013 年 5 月 29 日~6 月 1 日 .
7. .Tameko Kihira , Iori Sakurai , Sohei Yoshida , et al. Transitional metal in scalp hair and lifestyle of ALS patients and residents in the Kii Peninsula , Japan – the second report-. 24rd International symposium on ALS/MND , Milan , Italy , 6 - 8 December , December 2013.
8. 富山弘幸 . 運動ニューロン疾患の遺伝学 : Update わが国の ALS における C9ORF72 . 第 54 回日本神経学会学術大会 . 2013 年 5 月 30 日、東京

9. Ishiura et al. A molecular genetic study of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) in Kii peninsula of Japan. The 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, 2013 Oct, Boston, USA
10. Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 4th Korea Japan Symposium, Seoul [2013. 2. 26]
11. Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Symposium 3S05a, Yokohama [2013. 9. 13]
12. 長谷川成人 神経変性疾患の細胞病理を形成する蛋白質のプリオン様特性 第8回臨床ストレス応答学会, 松本 [2013. 11. 16]
13. 長谷川成人 神経変性疾患の分子基盤と進行機序 —患者脳の解析から導かれた新しい考え方とその検証— 平成25年度 文部科学省 新学術領域研究 生命科学系3分野が ん・ゲノム・脳 支援活動合同シンポジウム [2013. 8. 6]
14. 長谷川成人 神経変性疾患の原因となるタンパク質の構造異常とその伝播 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会, 岡崎 [2013. 11. 20]
15. 森本悟, 小久保康昌, 齊藤祐子, 長谷川成人, 葛原茂樹, 村山 繁雄: 牟婁病におけるタウオパチーの、免疫化学的・免疫組織化学的研究. 第53回日本神経病理学会学術研究会
16. Morimoto S, Kokubo Y, Hasegawa M, Shigeki K, Murayama S: Immunohistochemical study and western blotting of tauopathy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ parkinson dementia complex (PDC), Kii, Japan. [Annual Meeting 2012 of the American Association of Neuropathologists, Cicagol]
17. Murayama S, Morimoto S, Kokubo Y, Kihira T, Yoshida Y, Yoshida M, Takahashi H, Kuzuhara S: Establishment of pathology center for amyotrophic lateral sclerosis/ parkinson disease complex in Kii Peninsula. [Alzheimer's Association International Conference 12th, Vancouver].
- 18.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

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

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

大家系の患者剖検脳に蓄積する異常蛋白の生化学解析

研究分担者：長谷川成人¹⁾

研究協力者：小久保康昌²⁾、葛原茂樹³⁾

¹⁾ 公益財団法人 東京都医学総合研究所 認知症高次脳機能研究分野

²⁾ 三重大学大学院地域イノベーション学研究科 ³⁾ 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部

研究要旨

三重県南部の家族性認知症-パーキンソン症候群の発症、進行機序解明を探るため、大家系の患者剖検脳4例について、タウ、シヌクレイン、TDP-43の生化学解析を行った。その結果、抗タウ抗体を用いた解析からは、4症例のいずれにおいても、アルツハイマー型タウのバンドパターン(60, 64, 68kDのトリプレット、C末端断片)が検出された。シヌクレイン、TDP-43についても、症例によって程度の違いがあるが、抗リン酸化シヌクレイン抗体、抗リン酸化TDP-43抗体に陽性を示す反応が検出された。TDP-43とシヌクレインの蓄積には比例関係が認められた一方、タウと、TDP-43あるいはシヌクレインの蓄積量には逆相関が認められた。

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ことを目的とし、これまで剖検となった大家系(A家系)の4症例について、保存されている凍結から不溶性画分を調製し、タウ、シヌクレイン、TDP-43の異常病変の生化学解析を行う。

B. 研究方法

症例番号、臨床診断、及び解析部位(括弧内)は以下の通りである。1998-1(ALS with D)(前頭葉)、2001-1(ALS with A)(海馬)、2012-2(PDC)(海馬傍回)、2013-3(PDC)(海馬傍回)。それぞれ、0.5gの凍結組織から通常の方法に従ってサルコシル不溶性画分を調製し、電気泳動後、各種抗体によるイムノプロット解析を行った。用いた抗体は、抗タウ抗体(HT7, AT8, RD3, RD4, anti-4R, pS396, T46)、抗リン酸化 α Syn抗体(mAb PS129)、抗TDP-43抗体(poly pS409/410)である。

(倫理面への配慮)

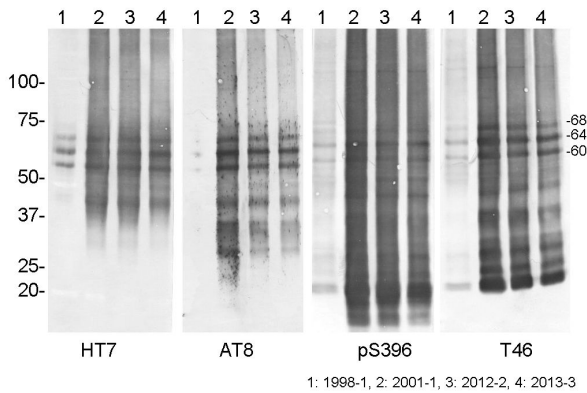
剖検脳の免疫組織、生化学解析については東京都医学総合研究所の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C. 研究結果

1. タウのイムノプロット解析

症例1998-1は他の3例に比べてタウ蓄積が少ないものの、いずれの症例においても、アルツハイマー病とよく似た、60, 64, 68kDaの全長リン酸化タウのバンド、レーン全体がスメア状に染まる反応、複数のC末端断片が検出された。

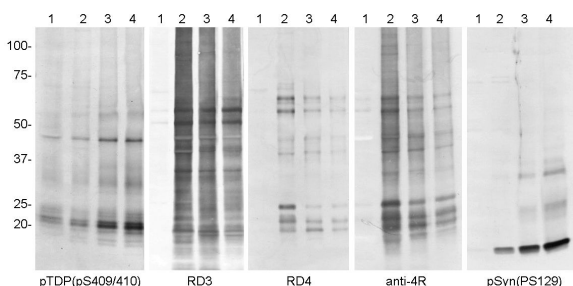
アルツハイマー病患者3例から調製した不溶性タウのバンドパターンとの比較も行ったが、紀伊の大家系4例に検出されたタウの病変は、RD3, anti-4R, T46いずれの抗体においても検出されるバンドパターンもアルツハイマー病のそれらと区別がつかなかった。



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

2. TDP-43, シヌクレインの生化学解析

TDP-43 については、解析した 4 例全てにおいて、45kDa の全長リン酸化 TDP-43、18~26kDa の C 末端断片、およびスミア状の反応が検出された。また C 末端断片のバンドパターンは type A-FTLD-TDP のバンドパターンに類似していた。また、シヌクレインについても、1998-1 は軽微であったが、4 例全てにおいてリン酸化シヌクレイン陽性のバンドが検出された。またそのバンドパターンはレビー小体型認知症やパーキンソン病のそれと類似していると思われた。



それぞれの異常タンパク質の蓄積の程度は、TDP-43 と シヌクレインに比例関係が認められ、逆にタウと TDP、あるいはタウと シヌクレインは逆相関するよう見えた。

D. 考察

今回解析した大家系の 4 例は蓄積量の程度の違いはあれ、いずれもリン酸化タウ、リン酸化 syn、リン酸化 TDP-43 の 3 種類の異常タンパク質の蓄積が認められた。また、タウのバンドパターンはアルツハイマー病のそれと、TDP-43 は type A-FTLD のそれ、シヌクレインは DLB/PD

のそれと区別がつかないバンドパターンであり、ある程度均質な生化学的特徴を示しているように思われた。同じ家系の患者において、基本的には同じ生化学的特徴を有した蛋白質の異常病変が起こっていることが示唆された。

E. 結論

大家系の症例 4 例全てにおいて、タウ、TDP-43、Syn の異常蓄積が確認された。今回解析した部位については、タウの蓄積病変はどの症例も、アルツハイマー病のそれと区別できない生化学的特徴を有し、3R、4R タウの蓄積が認められた。TDP-43 は生化学的に type A 型バンドパターン、Syn は DLB と同じ神経細胞型バンドパターンと思われた。TDP と Syn の病変の程度が相関し、タウ病変の程度は他の病変と逆相関を示した。

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

Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. (2013) Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep.* 4:124-34.

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M (2013) Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* 136:1128-38.

Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Grubman A, Liddell JR, Crouch PJ, White AR. (2013) Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase

Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. PLoS One 8:e67433.

Mann DMA, Rollinson S, Robinson AC, Callister J, Snowden JS, Gendron T, Petrucelli L, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Davidson YS and Pickering-Brown S. (2013) Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neuron Disease associated with expansions in C9ORF72. Acta Neuropathol Comm 1: 68.

Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann DMA, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M (2013) Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathol Comm 1: 54.

Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Ishobe T, Hasegawa M, Hisanaga SI (2013) Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. J Biol Chem 288: 7968-77.

2 : 学会発表

Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 4th Korea Japan Symposium, Seoul [2013. 2. 26]

Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological alpha-synuclein. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Symposium 3S05a, Yokohama [2013. 9. 13]

長谷川成人 神経変性疾患の細胞病理を形成する蛋白質のプリオン様特性 第8回臨床ストレス応答学会, 松本 [2013. 11. 16]

長谷川成人 神経変性疾患の分子基盤と進行機序—患者脳の解析から導かれた新しい考え方とその検証—平成25年度 文部科学省 新学術領域研究 生命科学系3分野 がん・ゲノム・脳 支援活動合同シンポジウム [2013. 8. 6]

長谷川成人 神経変性疾患の原因となるタンパク質の構造異常とその伝播 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会, 岡崎 [2013. 11. 20]

H : 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1 : 特許取得

なし

2 : 実用新案登録

なし

3 : その他

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

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

Kii ALS/PDC（牟婁病）における tauopathy としての神経病理学的特徴

もりもと さとる こくぼ やすまさ はせがわ まさと くずはら しげき むらやま しげお
森本 悟¹⁾，小久保 康昌²⁾，長谷川 成人³⁾，葛原 茂樹⁴⁾，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) 三重大学大学院地域イノベーション学研究所
- 3) 東京都医学総合研究所認知症・高次脳機能研究分野
- 4) 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療福祉学科

研究要旨

Kii ALS/PDC（牟婁病）の主要な特徴であるタウオパチーについて、タウ免疫プロットと組織病理学的所見を対応させることで、アルツハイマー病（AD）老年性変化との類似と相違を明らかにすることを目的とし、牟婁病患者9例の剖検脳を用いて解析を行った。その結果、Kii ALS/PDCにおいて、NFTの多発に加え、嗜銀顆粒と、特徴的なグリア病理の存在を明らかにした。特徴的なグリア病理が、タウ免疫プロットにおける4R tauの蓄積に影響を与えていると考えられた。

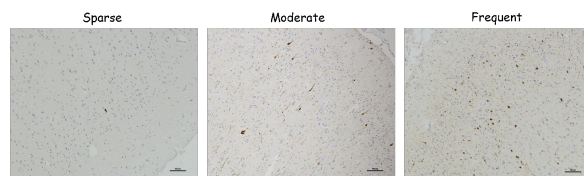
A. 研究目的

Kii ALS/PDC（牟婁病）の免疫プロットによる過去の検討では、tau isoform がアルツハイマー病（AD）パターン（3 repeat (3R)= 4 repeat (4R)）を示すと報告されている。(Itoh N et al. 2003.) 今回新たに最近例9例について免疫プロットを施行したところ、ほぼ4Rパターン1例、3R<4Rパターン3例、3R=4R (ADパターン) 5例と、結果に多様性が見出された。牟婁病のタウオパチーについて、免疫プロットと、組織病理学的所見を対応させることで、AD老年性変化との類似と相違を明らかにする。

B. 研究方法

対象は臨床的に牟婁病と診断された、牟婁病（Kii ALS/PDC）患者連続開頭剖検例9例。免疫プロットについては、凍結側頭葉皮質を使用した。組織学的検索について、反対固定側海馬・側頭葉（免疫プロットに対応する部位）のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、6μm厚連続切片を作成した。免疫プロットで4Rほぼ単独を示した1例については、保存全ブロックを使用した。H.E.

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



グリア病理（Patchy astrocytic structure）；0, ± : 1 - 5, 1+ : 6 - 9, 2+ : 10 - (×100)、嗜銀顆粒；0, ± : 1 - 19, 1+ : 20 - 49, 2+ : 50 - 99, 3+ : 100 - (×400)。本研究は、三重大学及び東京都健康長寿医療センターにおける倫理委員会にて承認を得ている。個人情報に関しては、連結可能匿名化を行い、厳重に管理を行っている。また、患者または家族へのインフォームドコンセントを

行い、同意を取得している。

C. 研究結果

タウ免疫プロットと臨床型分類との対比では、4R dominant 1 例：PDC (Parkinson dementia complex) with ALS (amyotrophic lateral sclerosis)； 3<4R 3 例：PDC with ALS 1 例、ALS 1 例、ALS with D (Dementia) 1 例、 3+4R (AD 型) 5 例：PDC with ALS 1 例、PDC 2 例、ALS 2 例であった(Fig.1)。プロット陽性 9 例の海馬において、多数の ghost tangle (GT)、神経原線維変化 (NFT)、pretangle (PT)、嗜銀顆粒

の星状膠細胞の斑状構造を認めた(Fig.2,3)。免疫プロットにて AD 型を示した群は、GT の出現がより広範であった。NFT 及び特徴的なグリア病理を半定量的に評価した結果、NFT を AD 型でより豊富に認めた。また、嗜銀顆粒やグリア病変が、免疫プロットで 4R タウが AD に比べ多い群が存在する根拠をなす可能性があることを確認した。

D. 考察

Kii ALS/ PDC において、NFT の多発に加え、嗜銀顆粒及び特徴的なグリア病理の存在を明らかにし、それらが免疫プロットにおける 4R tau の

Figure 1. The tau isoform patterns of western blotting in nine Kii ALS/PDC cases. The right end ladder is examples of six tau isoforms

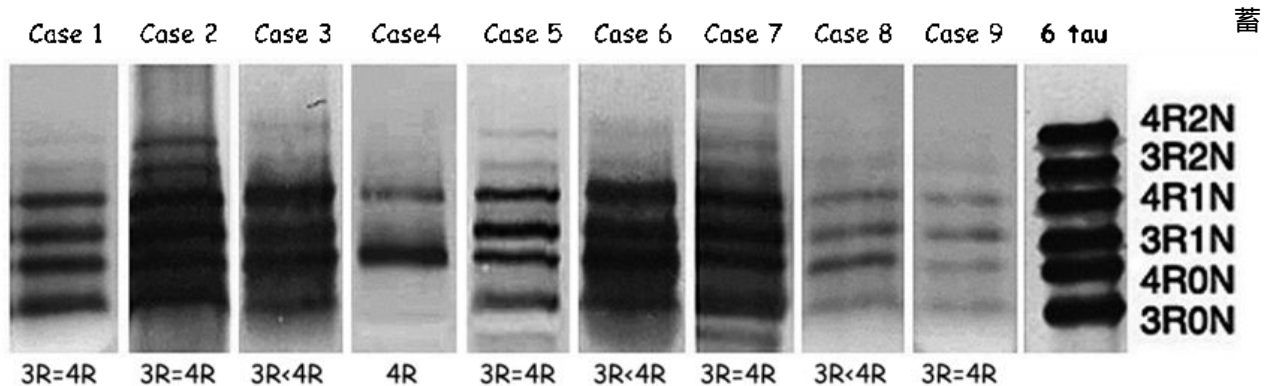


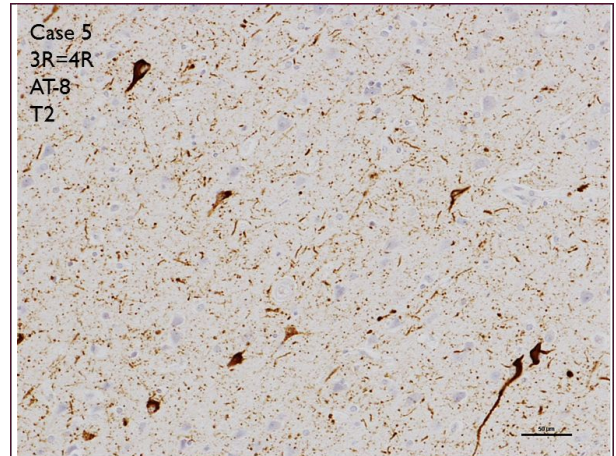
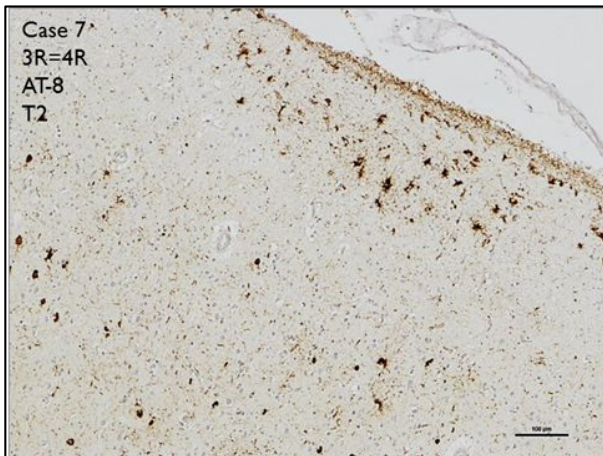
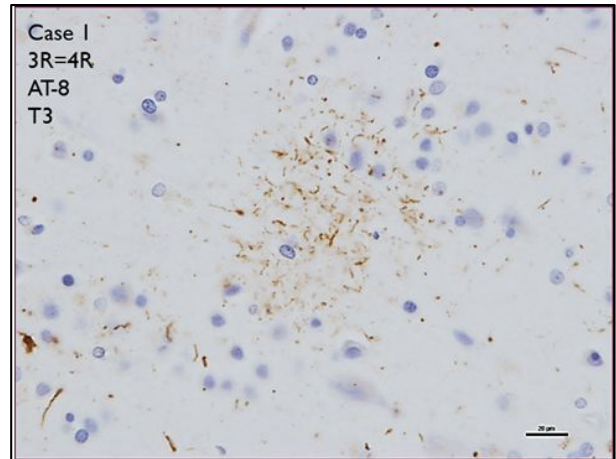
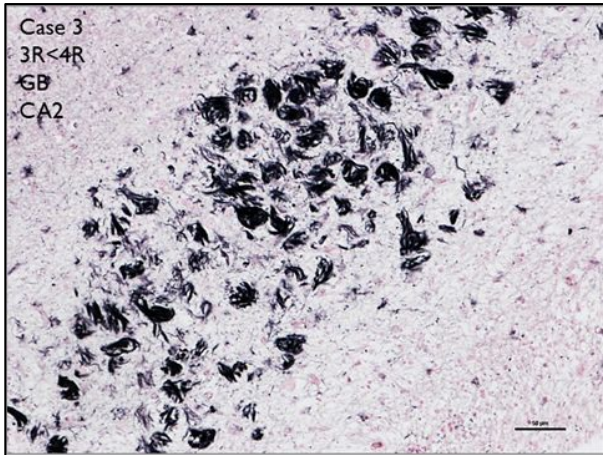
Figure 2. The summary of clinical characteristics and neuropathological findings in nine Kii ALS/PDC cases.

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

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

粒 (AG)を認めた。更に、Gallyas 陰性 AT8 陽性

Figure 3. Typical histopathological findings of Kii ALS/PDC hippocampus of case 3, AT-8 positive subpial thorn shaped GB negative patchy astrocytes in white matter of case 1 a



E. 結論

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

F. 健康危険情報

特記事項なし

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

投稿準備中

2. 学会発表

1. 森本悟, 小久保康昌, 齊藤祐子, 長谷川成人, 葛原茂樹, 村山 繁雄: 牟婁病におけるタウオパチーの、免疫化学的・免疫組織化学的研究. 第 53 回日本神経病理学会学術研究会.

2. Morimoto S, Kokubo Y, Hasegawa M, Shigeki K, Murayama S: Immunohistochemical study and western blotting of tauopathy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/ parkinson dementia complex (PDC), Kii, Japan. [Annual Meeting 2012 of the American Association of Neuropathologists, Cicago]

3. Murayama S, Morimoto S, Kokubo Y, Kihira T, Yoshida Y, Yoshida M, Takahashi H, Kuzuhara S: Establishment of pathology center for amyotrophic lateral sclerosis/ parkinson disease complex in Kii Peninsula. [Alzheimer's Association International Conference 12th, Vancouver].

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

特記事項なし

紀伊半島 H 出身 5 剖検例のリン酸化タウ陽性所見： グアム島症例との比較

小柳 清光¹⁾山崎峰雄²⁾、橋本智代^{1,3)}、森本悟⁴⁾、初田裕幸⁵⁾、村山繁雄⁶⁾、
葛原茂樹⁷⁾、小久保康昌⁸⁾

信州大学医学部神経難病学講座¹⁾、日本医科大学神経内科²⁾、産業医科大学神経内科³⁾、東京都健康長寿医療センター神経内科⁴⁾、慶應義塾大学医学部生理学教室⁴⁾、三重大学医学部医学系研究科腫瘍病理学講座⁴⁾、東京都健康長寿医療センター病理診断科⁵⁾、高齢者ブレインバンク⁵⁾、東京都健康長寿医療センター神経内科⁶⁾、高齢者バイオリソースセンター⁶⁾、鈴鹿医療科学大学保健衛生学部医療福祉学科⁷⁾、三重大学大学院地域イノベーション学研究科⁸⁾

研究要旨

臨床的および神経病理学的に類似性が指摘されて来た紀伊半島とグアム島のパーキンソン認知症（PDC）例と筋萎縮性側索硬化症（ALS）例の脳内タウ陽性構造物の異同を検討した。紀伊半島 H 出身の 5 剖検例（ALS3 名、PDC-ALS2 名）、およびグアム島で生まれ育って死亡した 6 剖検例（全例 PDC）を用いた。大脳、脳幹、小脳にヘマトキシリン-エオジン染色、クリューバー-バレラ染色、リン酸化タウ（AT8）免疫染色、リン酸化 TDP-43 免疫染色、グリア膠線維酸性蛋白（GFAP）免疫染色等を施行し光学顕微鏡観察した。紀伊半島剖検例とくに PDC-ALS のリン酸化タウ免疫染色所見には、グアム PDC 症例との顕著な類似性が認められた。それらは、granular hazy astorcytic inclusions、tau-positive fine granules という、グアム島症例に特異的、として報告されて来た所見（Oyanagi K, et al. 1997, Yamazaki M, et al. 2005）が紀伊半島症例にも認められたことである。また、紀伊半島症例で、リン酸化タウ陽性所見が、ALS では少なく、PDC-ALS では多い傾向も、グアム島症例（Oyanagi K, et al., 1994）と類似していた。一方、大脳白質や皮質でリン酸化タウ陽性アストロサイトは、紀伊半島 PDC-ALS 症例がグアム PDC 症例より多く出現していた。

A. 研究目的

紀伊半島とグアム島ではパーキンソン・認知症（PDC）と筋萎縮性側索硬化症（ALS）が多発し、双方の PDC も ALS も、タウオパチーと TDP-43 オパチーの神経病理学的所見を示すことが報告され、それらの類似性 / 共通性が指摘されて来た^{1,2)}。今回は、とくにグリアのリン酸化タウ陽性所見を中心に紀伊半島とグアム島の症例を神経病理学的に比較検討する。

B. 研究方法

紀伊半島 H 出身の 5 剖検例（全例女性、死亡時年齢：60 歳～73 歳、臨床診断は ALS3 名、PDC+ALS2 名）、およびグアム島で生まれ育って死亡した 6 剖

検例（男性 3 名、女性 3 名、死亡時年齢：51 歳～64 歳、臨床病理診断は全例 PDC）を用いた。大脳、脳幹、小脳をホルマリン固定パラフィン包埋した後、各箇所 6 μ m 厚切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色、クリューバー-バレラ染色、リン酸化タウ（AT8）免疫染色、リン酸化 TDP-43 免疫染色、グリア膠線維酸性蛋白（GFAP）免疫染色、p62 免疫染色等を施行して光学顕微鏡で観察した。

（倫理面への配慮）

全ての症例で、本人へ生前、または本人の死後ご家族へのインフォームドコンセントがそれぞれの医療施設、研究機関でなされている。今回の検索では遺伝子の解析はせず、病理学的検索では、個人が

特定出来ないように配慮して行う。全体としてヘルシンキ宣言に則って実施する。

C. 研究結果

出現頻度と局在の差はあれ、紀伊症例、グアム症例の全例で、リン酸化タウ陽性の神経原線維変化 (NFT)、プレタンゲル、スレッド等が認められた。紀伊症例の NFT は、皮質全層に出現する症例と、皮質浅層に出現する症例が見られた。紀伊症例のリン酸化タウ陽性のアストロサイトは、脳表などでは thorn shaped astrocytes が多く、大脳皮質などの灰白質では granular hazy astrocytic inclusions (GHAI; Oyanagi K, et al., 1997)³⁾であった(図 1、2)。主として灰白質で、リン酸化タウ陽性の、神経突起と思われるものと、細く、うねうねと屈曲し枝分かれするアストロサイトの突起と思われるものが見られた。紀伊症例の白質では、灰白質にリン酸化タウ陽性所見が多い症例で、オリゴデンドログリアの tau-positive fine granules (TFG; Yamazaki M, et al., 2005)⁴⁾(図 3、4)、スレッド、GHAI が認められた。TFG の大きさは、グアム島 PDC 症例より紀伊 PDC-ALS 症例がやや大きかった。紀伊症例とグアム症例の比較では、リン酸化タウ陽性のアストロサイト、および GFAP 陽性のアストロサイトは、紀伊 PDC-ALS 症例がグアム PDC 症例より多かった。

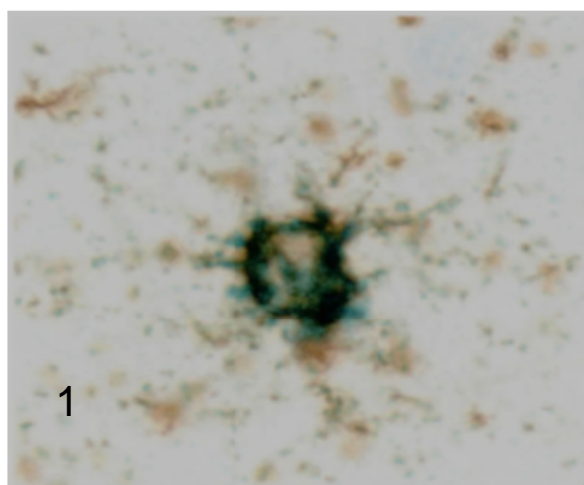


図 1. グアム島 PDC 大脳皮質の Granular hazy astrocytic inclusion (brown; phosphorylated tau, green; glial fibrillary acidic protein)

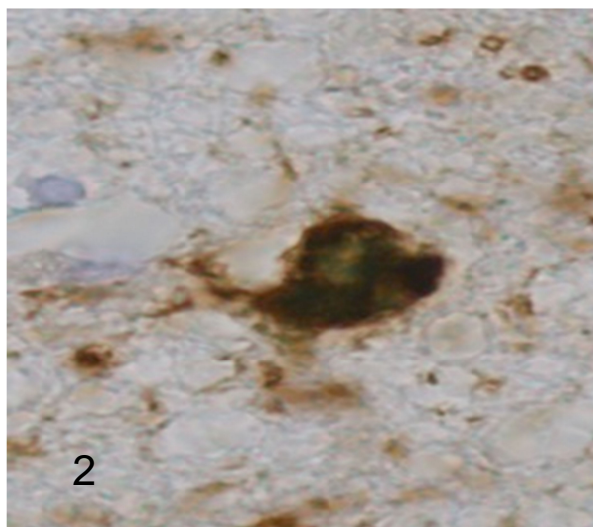


図 2. 紀伊 PDC-ALS 大脳皮質の Granular hazy astrocytic inclusion (brown; phosphorylated tau, green; glial fibrillary acidic protein)

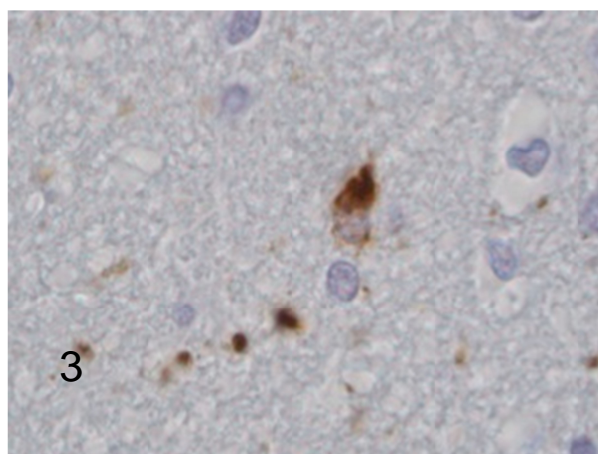


図 3. グアム島 PDC 大脳白質の Tau-positive fine granules (brown; phosphorylated tau)

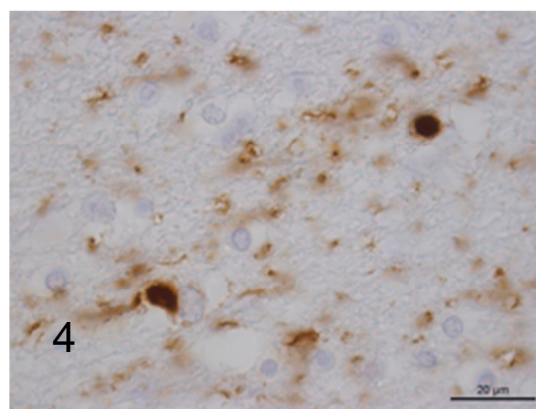


図 4. 紀伊 PDC-ALS 大脳白質の Tau-positive fine granules (brown; phosphorylated tau)

D. 考察

今回検索した、紀伊半島 H 出身 5 剖検例のリン酸化タウ免疫染色を主とする神経病理学的検討結果では、グアム PDC 症例との顕著な類似性が認められた。すなわちグアム島症例に特異的な所見である、として報告した granular hazy astrocytic inclusions (GHAI; Oyanagi K, et al. 1997)³⁾、tau-positive fine granules (TFG; Yamazaki M, et al. 2005)⁴⁾が紀伊半島 PDC-ALS 症例にも認められたことである。また、リン酸化タウ陽性所見が ALS では少なく、PDC あるいは PDC-ALS では多いこともあげられる (Oyanagi K, et al., 1994)⁵⁾。紀伊症例とグアム島症例の所見に明らかな相違点は認められなかったが、紀伊症例で、NFT が大脳皮質の浅層優位に出現しない症例が存在すること、リン酸化タウ陽性アストロサイトが多数認められること、tau-positive fine granules の大きさがやや大きいこと、などはグアム症例とは程度が異なるように思われた。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

I. 文献

1. Shiraki H, Yase Y, Amyotrophic lateral sclerosis and

parkinsonism-dementia in the Kii Peninsula:

comparison with the same disorders in Guam and with Alzheimer's disease. In: Handbook of Clinical Neurology, Vol 15(59): Disorders of the Motor System. Ed. JMBV de Jong, Elsevier, Amsterdam, Chapter 16, p273-300, 1991

2. Kuzuhara S, Kokubo Y, Sasaki R, Narita Y, Yabana T, Hasegawa M, Iwatsubo T, Familial amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii Peninsula of Japan: Clinical and neuropathological study and tau analysis. Ann Neurol 49: 501-511, 2001
3. Oyanagi K, Makifuchi T, Ohtoh T, Chen K-M, Gajdusek DC, Chase TN, Distinct pathological features of the Gallyas- and Tau-positive glia in the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. J Neuropathol Exp Neurol 56:308-316, 1997
4. Yamazaki M, Hasegawa M, Mori O, Murayama S, Tsuchiya K, Ikeda K, Chen K-W, Katayama Y, Oyanagi K, Tau-positive fine granules in the cerebral white matter: a novel finding among the tauopathies exclusive to parkinsonism-dementia complex of Guam. J Neuropathol Exp Neurol 64:839-846, 2005
5. Oyanagi K, Makifuchi T, Ohtoh T, Chen K-W, van der Schaaf T, Gajdusek DC, Chase TN, Ikuta F, Amyotrophic lateral sclerosis of Guam: the nature of the neuropathological findings. Acta Neuropathol 88:405-412, 1994

多発地 ALS 患者と住民における毛髪中元素と生活習慣の関連に関する検討

紀平 為子¹⁾，櫻井威織¹⁾，吉田宗平¹⁾，若山育郎¹⁾，高宮幸一²⁾，中野幸廣²⁾，
奥村良²⁾，飯沼勇人²⁾，和田幸子³⁾，岩井恵子³⁾，岡本和士⁴⁾，小久保康昌⁵⁾，葛原茂樹⁶⁾

1: 関西医療大学保健医療学部，2: 京都大学原子炉実験所，3: 関西医療大学保健看護学部，

4: 愛知県立大学看護学部，5: 三重大学大学院地域イノベーション学研究科，

6: 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部

研究要旨 紀伊半島串本(K)地域での ALS 多発の要因として酸化的ストレスの関与が推察される。本研究では、毛髪中の金属含量と生活・食習慣の関連を検討した。対照 20 名，K 地域住民 87 名，K-ALS 7 名，穂原 PDC 4 名，孤発性 ALS 10 名から化学処理のない頭髪が得られ放射化分析を実施した。K 住民と対照住民には生活習慣のアンケート調査を実施した。K-ALS 患者の頭髪中に V と Mn の高値を認めた(各 $p < 0.05$)。頭髪中 V や Mn 値は Al 値と正相関し、漬け物摂取や畑仕事の頻度と関連が認められた($p < 0.05$)。本地域 ALS 患者ではこれら遷移金属による酸化的ストレス増大の関与が推察された。

A. 研究目的

紀伊半島串本(K)地域の筋萎縮性側索硬化症(ALS)において有害金属による酸化的ストレスの関与を検討するため、毛髪中金属元素含量の測定と酸化的ストレスマーカーおよび生活・食習慣調査を実施し、その関連を検討した。

B. 研究方法

対象は、我々が 2010 年-2012 年に実施した地域住民の健康診断と訪問診療・療養相談において本研究の趣旨に同意した住民と ALS 患者とした。

1. 頭髪の元素分析

側頭部 2 か所，後頭部 1 か所から頭髪約 200mg を採取し、アセトン(50ml)，蒸留水(各々 50ml，3 回)，アセトン(50ml)で各々 10 分間強振，風乾後 30mg を秤量，硝酸洗浄済みポリエチレン袋に封入し照射試料とした。試料作成と分析方法は既に報告した¹⁾が、京都大学原子炉実験所の研究用原子炉気送管 Pn-1 で中性子を照射し放射化分析を実施した。

標準試料として、頭髪標準試料(国立環境研究所環境標準試料 NIES CRM No. 13)，各元素の標準として Ca(1000 ppm，以下同様)，Mg (200)，Cu (50)，

Al (20)，Mn (5)，V (1)，さらに Zn(200)の混合標準液(XSTC-Multi-element Standard，SPEX，USA)から 100 μ l 採取し濾紙に滴下した。S は(NH₄)₂SO₄(w) GR (8.241g)を蒸留水で溶解し 1000 μ g を濾紙に滴下し使用した。

2. 生活・食習慣に関する自記式アンケート

2012 年に K 地域と対照住民に実施した食品摂取頻度，嗜好，仕事の内容，身体疲労および飲用水の種類などを含めた 63 項目のアンケート調査の結果から、食生活と仕事に関する項目を抽出し検討した。

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

3. K 地域の食品の元素分析

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

を実施した。

(倫理面への配慮)

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

1. 頭髪の元素分析

K 地域 ALS 7 例, 穂原地域 (H-PDC) 5 例, 弧発性 ALS (SALS) 10 例, MND 3 例, K 地域住民 132 名, 対照地域住民 29 名から頭髪試料の提供を得た。本研究ではこれらの内, パーマや毛染めをしていない頭髪, K-ALS 7, H-PDC 4, SALS 10, MND 3, K 地域住民 87, 対照住民 20 試料について検討した。

我々の放射化分析法で測定した標準頭髪試料 (NIES CRM No. 13) の Al, Ca, Mg, Mn, V, Cu, S 含量はその保証値/参考値と良く合致した。

K-ALS では, 頭髪中 V と Mn 含量が対照に比し有意に高値を示した ($p < 0.05$, 図 1)。H-PDC でも同様に頭髪中 V 含量が高い傾向が認められた。K 地域住民では, 頭髪中 V や Mn 含量が高値を示す者が多く認められたが, 平均値は対照住民と有意差を認めなかった。頭髪中の V 含量は頭髪中 Mn 含量および Al 含量と正の相関を示した (各々 $p < 0.01$)。

2. 生活・食習慣アンケート調査との関連

頭髪中の元素含量と生活・食習慣の関連について, アンケート調査を実施し分析した。漬け物を「よく食べる」と回答した住民では「あまり食べない」と回答した住民に比較して頭髪中 V 含量が高値を示した ($p < 0.05$, 図 2)。畑仕事を「よくする」と回答した住民では「あまりしない」と回答した住民に比し, 頭髪中 Mn ($p < 0.01$) と Al ($p < 0.05$) 含量の高値を認めた。頭髪中 V 含量は尿中 8-OHdG/creatinine 値と正相関する傾向がみられた (Pearson's $r = 0.358$)。

3. K 地域の食品の元素分析

K 地域の上記食品 11 品目の内, ひじきや天草中の V 含量が高い値を示した (図 3)。

D. 考察

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

頭髪中 V や Mn 高値の一つの要因として, K 地域住民の生活習慣との関連が示唆された。生活習慣のアンケート調査から, 当地域では畑仕事の頻度が高く, 海産物の摂取が多いことが示された。頭髪中の V は Al や Mn 含量と正の相関を示し, さらに頭髪中の Al, Mn は畑仕事の頻度の高い住民に高値を示した。当地域では飲用水中の Ca 含量が極めて低いことが確認されているが, 低 Ca 状態下で, 土壌中あるいは海産物中の V や Mn が Al とともに吸収され頭髪など組織に蓄積した可能性が考えられた。漬け物の摂取頻度の高い住民に頭髪中 V 高値を認めたことの意義は不明で, どのような生活習慣と関連するのか今後の課題である。

V は生体への毒性を有する遷移金属であり, マウスでの肺腫瘍³, H₂O₂ 産生による p53 活性化とアポトーシス誘導⁴, ドパミン含有細胞への毒性⁵などが報告されている。Roos らは ALS 患者脊髄液中に Mn, Al, V など金属元素の有意な高値を認め金属による神経毒性の関与を推察している⁶。これら遷移金属元素が運動神経細胞の変性にどのように関与するか今後さらに検討が必要である。

E. 結論

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

本研究の一部は、科学研究費助成事業(科学研究費補助金)から助成を受け、当該報告書に報告した(課題番号 22590967)。

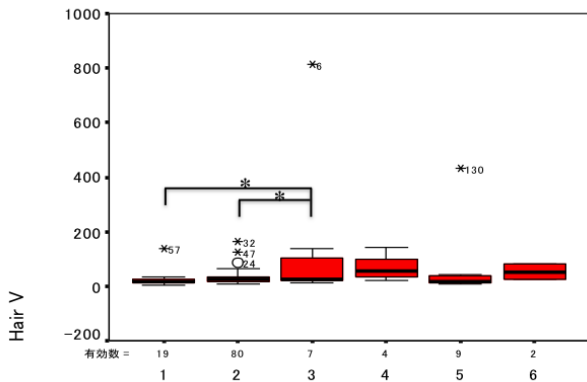


図1．頭髪中のバナジウム(V)含量の比較

K-ALS では対照および K 住民に比し有意な高値を示した(単位: ppb)． 1: 対照, 2: K 住民, 3: K-ALS, 4: H-PDC, 5: SALS, 6: MND, * : $p < 0.05$.

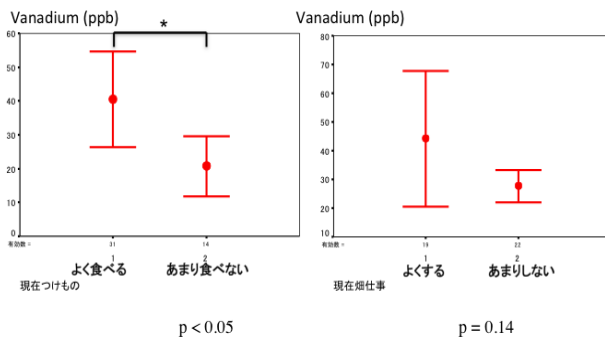


図2．生活習慣と頭髪中 V 含量との比較

現在漬け物をよく食べると回答した住民では頭髪中 V 含量が有意に高い値を示した．畑仕事をよくすると回答した住民では V 含量が高い傾向を認めた。

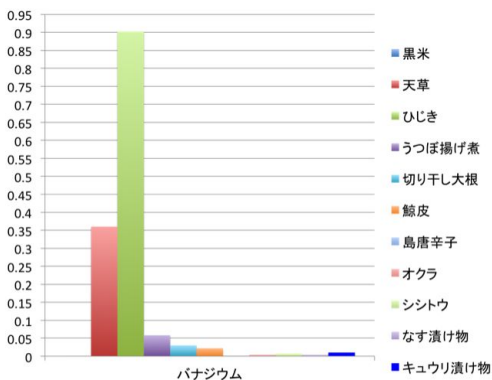


図3．食品中の V 含量

K 地域で生産/加工された食物/食品に含まれる V 含量を測定した．海産物に高い値を認めた．

文献

1. 紀平為子他, 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業牟婁病の実態の把握と治療指針作成平成 23 年度総括・分担研究報告書, p. 24-27.
2. Garruto RM et al. In: Chen KM, Yase Y, ed, ALS in Asia and Oceania, 1984, p. 265-330.
3. Assem FL and Levy LS. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2009; 12: 289-306.
4. Huang C et al. J. Biol. Chem. 2000; 275: 32516-32522.
5. Ngwa HA et al. Toxicol Appl Pharmacol. 2009; 240: 273-285.
6. Roos PM et al. Biol Trace Elem Res. 2013; 151: 159-70.

F.健康危険情報：なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. T Kihira, Kazushi Okamoto, Sohei Yoshida, et al. Environmental Characteristics and Oxidative Stress of Inhabitants and Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in a High-incidence Area on the Kii Peninsula, Japan. 2013 Internal Medicine 2013, 52: 1479-1486.

2. 学会発表

1. 紀平 為子, 岡本和士, 吉田宗平, 他. 紀伊半島南部 ALS 多発地域における生活・食習慣の変化に関する検討. 日本神経学会総会, 東京, 2013 年 5 月 29 日~6 月 1 日.
2. Tameko Kihira, Iori Sakurai, Sohei Yoshida, et al. Transitional metal in scalp hair and lifestyle of ALS patients and residents in the Kii Peninsula, Japan - the second report-. 24rd International symposium on ALS/MND, Milan, Italy, 6-8 December, December 2013.

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

ALS 多発と干物摂取との因果関係解明に関する検討

岡本和士¹⁾

江上いすず²⁾ 紀平為子³⁾ 葛原茂樹⁴⁾ 小久保康昌⁵⁾

1) 愛知県立大学看護学部・疫学

2) 名古屋文理大学³⁾ 関西医療大学⁴⁾ 鈴鹿医療科学大学

5) 三重大学大学院地域イノベーション学研究科

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、本研究では物が ALS 多発の容疑要因としての可能性を探ることを目的に、ALS の多発地である紀伊半島と非多発地域の栄養要因を比較検討に加え、愛知県で行われた症例対照研究の結果も踏まえ、因果関係を判定する 5 条件を用いて、干物と ALS の多発の因果関係に関する検討を行った。[方法] 対象は 2004 年に多発地と非多発地の 15 歳以上の住民を対象に行った横断調査の参加者と、2004 年に行った症例対照研究の 1183 名の症例と 407 名の対照を用いた。食事内容および食生活習慣に関する情報は 97 項目からなる自記式の食品頻度摂取調査から得た。因果関係の有無の判定には、疫学研究で用いられている判断基準である「関連の時間性」「関連の一致性」「関連の強固性」「関連の特異性」「関連の整合性」の 5 つの条件を用いた。

[結果] 症例対照研究から干物を多く摂取するものの ALS のリスクは有意に高いとする結果から、「関連の時間性」が、さらに干物の摂取頻度の増加とともにそのリスクも有意に上昇していたことから「関連の強固性」が確認された。また多発地の K 町と対照の H 村の比較でも、干物を多く摂取することによるリスクは 4 倍高く、しかも有意であった。このことから「関連の一致性」が確認された。症例対照研究で干物の高頻度摂取が ALS 発症リスクと有意な関連を有することを認め、さらに多発地である K 町と O 町で干物の高頻度者の割合が愛知対照群に比べ顕著に高かったことから、「関連の特異性」が確認された。多発地における「過酸化物が多く含まれている干物の摂取頻度が高かったこと」「酸化の進んでいた干物であったこと」の特徴は、諸家の報告により支持されるものであったことから、「関連の整合性」が確認された。[結論] 干物の摂取と ALS 発症の因果関係を「判定基準」に基づき検討した結果、判定基準の 5 条件をいずれも満たしていたため、干物の摂取と ALS 発症の間に因果関係が成り立つ、干物が ALS 多発の危険因子であった可能性が認められた。特に本研究から、酸化の進んだ干物を頻回に摂取していたことが、ALS のリスクを増幅させた可能性が示唆された

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、その解明に関する検討は、私の知る限り皆無である。23 年度の班会議で、因果関係は明らかでないが ALS

の多発地域の住民の食事内容から油脂の酸化の指標である過酸化脂質を多く含む干物とその容疑要因である可能性を報告した。そこで本研究では干物がALS 多発の容疑要因としての可能性を探ることを目的に、ALS の多発地である紀伊半島と非多発地域の栄養要因を比較検討に加え、愛知県で行われた症例対照研究の結果も踏まえ、因果関係を判定する5条件を用いて、干物とALS の多発の因果関係に関する検討を行った。

B. 研究方法

対象は2004年に多発地と非多発地の15歳以上の住民を対象に行った横断調査の参加者と、2004年に行った症例対照研究の1183名の症例と407名の対照を用いた。食事内容および食生活習慣に関する情報は97項目からなる自記式の食品頻度摂取調査から得た。干物の摂取頻度に関しては「毎日1回以上摂取」を高頻度摂取とし、それ以外の食品に関しては低頻度「めったに食べない～週1回以下」を低頻度摂取、「週に4-5回あるいは毎日」を高頻度の2群に分類した。肉類の摂取においては3つの異なる種類のうち1つでも頻回に摂取する者を「頻回摂取」とした。食品の摂取頻度は低頻度(めったに食べない/週1回以下)と高頻度(週に4-5回あるいは毎日)の2群に分類した。肉類の摂取においては3つの異なる種類のうち1つでも頻回に摂取する者を「高頻度摂取」とした。

因果関係の有無の判定には、疫学研究で用いられている判断基準である「関連の時間性」「関連の一致性」「関連の強固性」「関連の特異性」「関連の整合性」の5つの条件を用いた。

C. 研究結果及び考察

1. 関連の時間性

愛知県で行った症例対照研究において、要因の調整後も干物を週1回以上摂取する者のオッズ比に変化が認められず、かつ有意であったことから干物の高頻度摂取は独立した危険因子であることが認められた。この結果は「要因が結果に対

し、時間的に先行していること」の条件を満たしているため、関連の時間性が確認された。時間の先行性が認められた。

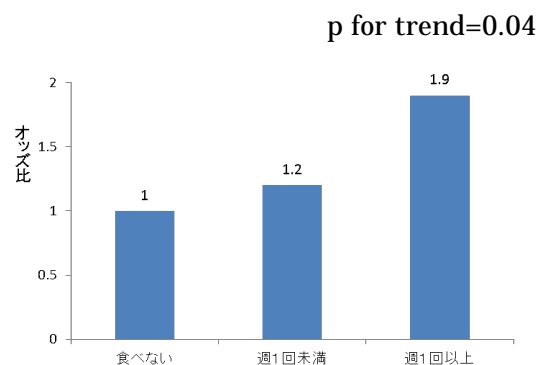
表1. 愛知県における症例対照研究の結果

要因	粗オッズ比	調整オッズ比
干物の高頻度摂取 (週1回以上)	1.8(1.1-2.8)	1.8 (1.1-2.8)
A型行動パターン yes)		2.3 (1.5-3.5)
緑黄色野菜 (Less frequent)		2.5 (1.6-4.0)
性		

2. 関連の強固性

摂取頻度の増加に伴い、ALS のリスクは有意な上昇 (p for trend=0.04) を認めた。この結果は、「要因と結果の間に密接な関係が認められること、相対危険比あるいはオッズ比が高いこと、統計的検定において有意であること、量-反応関係が認められること」の条件を満たしているため、関連の強固性が確認された。

図1. 干物の摂取頻度別オッズ比



3. 関連の一致性

干物を週3回以上摂取する者のALS に対するリスクはK 町ではH 村に比べて4倍高く、かつ有意であった。したがって、愛知県の症例対照研究の結果と同様の結果を示したことから、「異なった研究方法、研究者、研究対象者でおこなわれた疫学研究で、全て同じような結果が認められること」の条件を満たしているため、関連の

一貫性が確認された。

表 2. K 町と H 村との比較

要因	オッズ比
干物の高頻度摂取 (週 3 回以上)	4.0 (2.4-6.6)

4. 関連の特異性

多発地である K 町と O 町における高頻度摂取者 (週 1 回以上) の割合は、H 村および愛知対照群に比べ高かった (図 1)。15 歳までの食品別摂取頻度の比較において、大島町に居住していた者のうち干物を毎日 1 回以上摂取する者の割合は、15 歳まで町外にいた者のそれに比べ高かった。これらの結果と、干物の高頻度摂取が ALS 発症リスクと有意な関連を有することを認めたことを考え合わせると、「要因と結果の間に特異的な関係が認められること。仮説としての要因と結果が必要かつ十分条件であること」の条件を満たしているため、関連の特異性が確認された。

図 2. 地域別干物摂取頻度者 (週 3 回以上) 割合の比較

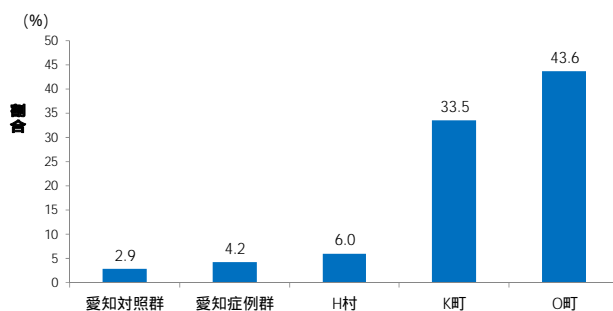
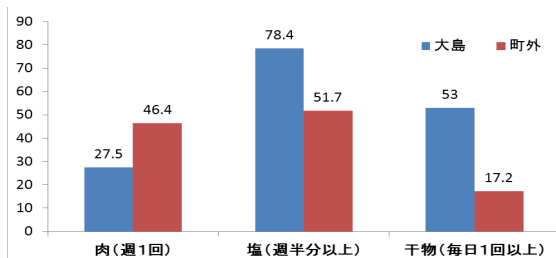


図 3 15 歳までの食品頻度摂取の比較



5. 関連の整合性

多発地である O 町はおよび K-ALS での酸化ストレスの指標である 8-OHdG が、対照地域に比べ

て高値であった。さらに、H 町にて行った 3 日間の陰膳法の調査にて、酸化して 4 名はいずれも 1 日 1 食以上過酸化物を多く含む干物を摂取していた。原は活性酸素種 (ROS) および活性窒素種 (RNS) などの産生で引き起こされる酸化ストレスが神経細胞の脆弱性を高めることを報告している。したがって、多発地におけるこれらの事実は原の報告を裏付けるものと考えられた。

さらに、また、K 町では昔より巡回販売が行われ、奥地では干物を数日かかって手に入れており、また O 町の住民が 15 歳の頃、干物は最短 1 日、最長 1 週間、常温下で保管されていた。干物は、天日乾燥時間が長くなるほど過酸化脂質が増加し、また加熱することにより、さらに過酸化が進行する」との報告がある。報告者は購入時と購入 7 日後のアジの干物の過酸化物質を測定した結果、購入 7 日後では 104 と購入時 (50) の約 2 倍であった。これらの事実を考え合わせると、酸化の進んだ干物を多く摂取していたことが ALS 多発の一因と考えられた。

多発地における「過酸化物質が多く含まれている干物の摂取頻度が高かったこと」「酸化の進んでいた干物であったこと」の特徴は、諸家の報告により支持されるものであった。従って、「従来の理論や経験と矛盾しないこと」の条件を満たしているため、関連の整合性が確認された。

E. 結論

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

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

2.学会発表

1. 岡本和土，紀平為子，小久保康昌，葛原茂樹.日本における判別分析による ALS の予後進展状況の予測に関する研究. 日本疫学会(大阪),2013 . 1月.

2. 岡本和土，紀平為子，小久保康昌，葛原茂樹.判別分析による ALS の予後進展状況の予測に関する研究.

日本神経学会(東京). 2013、6月.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

なし

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班
(分担)研究報告書

本邦での紀伊半島以外における ALS/PDC が疑われた症例について

研究分担者

とみやまひろゆき
富山弘幸¹⁾

共同報告者

なかねしゅんや はつとりのぶたか
中根 俊成²⁾、服部 信孝¹⁾

1) 順天堂大学脳神経内科/神経変性疾患病態治療探索講座

2) 国立病院機構長崎川棚医療センター臨床研究部・神経内科

研究要旨

[目的] ALS/PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis / Parkinsonism-Dementia Complex)は本邦で紀伊半島だけに存在する風土病なのか、について検討する。その上で、ある特定の遺伝的背景と環境因子が存在しないか、についても検討する。

[方法] 順天堂大学脳神経内科遺伝子バンク約 3300 症例の中から、ALS/PDC が疑われる症例がないか、臨床像を確認した。

[結果及び考察] 1 例 68 歳女性、佐賀県出身の症例で孤発性 ALS/PDC を疑う症例があった。本症例は、2011 年 2 月頃から前傾姿勢、歩行障害で発症した。その後四肢腱反射亢進、物忘れ、無為、表情の乏しさ、小声を生じ、嚥下障害、呼吸不全から経管栄養・人工呼吸管理を開始された。本症例は比較的急速にパーキンソニズム、認知症及び運動ニューロン徴候を合併し進行してきており、臨床像からは ALS/PDC の範疇に入る症例と考えられた。候補遺伝子解析を行っているが、今のところ明らかな責任遺伝子変異は見つかっていない。また、特徴的な環境因子については指摘が困難と考えられた。

[結論] 本邦において紀伊半島以外にも ALS/PDC 患者が存在する可能性がある。本症例の臨床的、遺伝学的評価が進むとともに、疾患の解明に向け、今後もさらなる疫学調査、環境因子の調査、遺伝子解析の進展が期待される

A.研究目的

ALS/PDC (Amyotrophic Lateral Sclerosis /

Parkinsonism-Dementia Complex)は本邦で紀伊半島だけに存在する風土病なのか、について検討する。

その上で、ある特定の遺伝的背景と環境因子が存在しないか、についても検討する。

B.研究方法

順天堂大学脳神経内科遺伝子バンク約 3300 症例の中から、ALS/PDC が疑われる症例がないか、臨床像を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究では個人の遺伝情報を取り扱うため、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

1 例 68 歳女性、佐賀県出身(紀伊半島での出生・居住歴なし)の症例で孤発性 ALS/PDC を疑う症例があった。本症例は、2011 年 2 月頃から前傾姿勢、歩行障害を生じ、四肢腱反射亢進もあり近医で頸髄症を疑われた。11 月に C3-6 椎弓形成術を施行され、右手箸が使いやすくなった。物忘れも生じ、12 月にリハビリテーション継続を目的に療養型病院に転院となったが、歩行障害は増悪し車椅子を使用するようになり、表情が乏しく、声が小さくなった。下肢筋萎縮があり、四肢筋力は 2/5 前後で、感覚障害は認めなかった。固縮、拘縮があったがレボドパの反応は乏しかった。2012 年 4 月 5 日に運動ニューロン疾患及びパーキンソニズムの精査加療目的で近院神経内科へ転院となった。転院時疎通の悪さ、記憶力低下を認め、やや無為であり、仮面様顔貌、小声、嚥下障害、舌萎縮、四肢筋萎縮、深部腱反射亢進を認めた。感覚障害や失調症状はなかった。針筋電図では上下肢に神経原性変化を認めた。頭部 MRI では軽度の脳

萎縮を認め、海馬の萎縮が目立っていた。MIBG 心筋シンチは正常であった。5 月中旬より嚥下障害、低酸素血症を認め、経管栄養・人工呼吸管理を開始した。6 月 19 日に気管切開施行し、7 月下旬頃からは表情もなく、意思表示もほとんどない状態となり経過している。

本症例の遺伝的背景を明らかにすべく候補遺伝子解析を行っているが、今のところ、

C9orf72 (intron 1 GGGGCC repeat expansion)

TDP-43

MAPT (exon 1,2,9-13)

DCTN1 (exon2)

PARK2

SNCA (multiplication)

LRRK2 (exon 11,31,41,48)

に明らかな責任遺伝子変異は見つかっていない。そのため、エクソーム解析を開始した。

D.考察

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

E.結論

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

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

Tomiyama H. C9orf72 in Japanese amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Rinsho Shinkeigaku. 2013;53:1074-6.

2.学会発表

富山弘幸 運動ニューロン疾患の遺伝学:Update わが国の ALS における C9ORF72 .第 54 回日本神経学会学術大会 . 2013 年 5 月 30 日、東京 .

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

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

辻 省次¹⁾、石浦浩之¹⁾、三井純¹⁾、Budrul Ahsan¹⁾、福田陽子¹⁾、後藤順¹⁾
小久保康昌²⁾、葛原茂樹³⁾
日笠幸一郎⁴⁾、吉村淳⁴⁾、土井晃一郎⁴⁾、森下真一⁴⁾
原賢寿⁵⁾、西澤正豊⁵⁾
豊田敦⁶⁾、藤山秋佐夫⁶⁾

- 1) 東京大学神経内科
- 2) 三重大学大学院地域イノベーション学研究所
- 3) 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部
- 4) 東京大学新領域創成科学研究科
- 5) 新潟大学神経内科
- 6) 国立遺伝学研究所

研究要旨

紀伊 ALS/PDC には強い家族集積性が存在するため、遺伝素因の存在が考えられている。疾患遺伝子を探索するにあたり、紀伊 ALS/PDC の地域集積性に着目し、共通する変異・創始者ハプロタイプの探索を全ゲノム配列解析と高密度一塩基多型を用いた homozygosity haplotype 法を用いて行ったが、明らかに疾患に関与する共通変異・創始者ハプロタイプを見出すことはできなかった。両手法の限界点はあるものの、病原遺伝子が単一でない可能性（genetic heterogeneity）や、疾患感受性遺伝子が関与する complex trait の可能性も考慮する必要があると考えられた。

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。これまで、1つの大家系について、パラメトリック、ノンパラメトリック連鎖解析を行ってきたが、特定の領域に連鎖領域を絞り込むまでには至っていない。これは、inbred の要素も存在すると考えられること、診断の確実性や、高齢発症であることから浸透率の要

素も考慮に入れないといけない可能性など、さまざまな可能性を考慮する必要があると思われる。もう一つのアプローチとして、病理学的診断が確認されている剖検例について全ゲノム配列解析を行い、エクソン領域において症例間で共有されている変異の検索を行ったが、病原性変異を特定できていない。このような背景から、大家系（A 家系）に属するさらに2名（うち1名が剖検例）の全ゲノム配列解析を追加し、非翻訳領域・遺伝子間領域を含めて発症者に共通する変異の解析を行った。また、創始者ハプロタイプの存在を仮

定し、剖検例 15 例について homozygosity haploype 法を用いて創始者ハプロタイプの検出を試みた。

B.研究方法

三重県の紀伊 ALS/PDC の大家系に属する 2 例の末梢血から DNA を抽出。Illumina HiSeq2000 を用い、ペアエンド法で全ゲノム配列解析を行った。一例については、150 塩基のペアエンド法を用いた。全ゲノム配列データのある剖検例 8 例に共通する変異の抽出を試みた。対照として、disease control 24 例の全ゲノム配列解析のデータを用いた。

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

(倫理面への配慮)

本研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会からの承認を受けて実施した。

C.研究結果

全ゲノム配列解析からは、剖検例 8 例に共通し、disease control 24 例に存在しない variant は、非翻訳領域に広げても認められなかった。剖検例 7 例、6 例に認められ、disease control に認められない variant はそれぞれ 10 個、55 個見出された。逆に、24 名の disease control で 1、2、3 アレル認められ、剖検例 8 例で共通する変異はそれぞれ 1 つずつ存在した。しかしながらこれら 3 つの変

異は既に dbSNP への登録がなされており、頻度情報の存在する 2 つの SNP ではアレル頻度が 12.5%、15.8% と非常に高いことから、ALS/PDC のように集積地以外では極めて稀な疾患を説明するものとは考えられなかった。

Homozygosity haplotype 法を用いて解析したところ、全剖検例 15 例で高率 (12 名以上) で共通する領域を 3 ヶ所認めたが、コントロールサンプル 14 検体の homozygosity haplotype 法による解析でも観察される領域であり、疾患特異的とは考えられなかった。A 家系の剖検例 3 名で共有される領域、A 家系の発症者 5 名 (うち 3 名は上述の剖検例 3 例) で共有される領域は見出されたものの、A 家系以外の剖検 12 例中少なくとも 8 例で共通する染色体領域とはオーバーラップしなかった。

D.考察

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

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

E.結論

今回の解析では、全ゲノム配列で剖検例に共通する変異は検出されなかった。また、homozygosity haplotype 法による創始者ハプロタイプ探索でも、一つの創始者ハプロタイプに絞り込むことはできなかった。

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

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

なし

2.学会発表

Ishiura et al. A molecular genetic study of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) in Kii peninsula of Japan. The 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, 2013 Oct, Boston, USA

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

牟婁病剖検脳での神経細胞特異的 DNA メチル化解析

岩田 淳 1)東京大学大学院医学系研究科 分子脳病態科学
間野 達雄 2)東京大学大学院医学系研究科 神経内科

研究要旨

牟婁病の分子病態を明らかにするためには脳内、それも神経細胞内でどのような遺伝子発現変化が生じているかを検討する必要がある。このためには神経細胞特異的な遺伝子発現変化を捉える技術が必要となるが、我々は神経細胞核を特異的に分離する事で特異的なエピゲノム変化を捉える方法を採用し、特にゲノムメチル化に注目して検討を行った。これにより 471 と非常に多数の遺伝子のメチル化が正常対照と比べて変化していることを明らかにした。また、ALS、PDC の病型間で比較したところ、3つの遺伝子のメチル化が有意に変化している事を明らかにした。

A.研究目的

牟婁病はその地域集積性から家族性もしくは風土病であることが想定されながら現在まで明らかな原因は特定されていない。また、近年臨床病型はALSに比してPDCが多くなっており、何らかの環境要因の関与も考えられる。本研究では、病因、環境因双方を反映する因子として、1. エピゲノムのうちゲノム CpG メチル化の変化を測定する事で牟婁病特異的な変化を同定すること、及び 2.臨床病型の違いがDNAのメチル化変化によって切り分けることができるかを明らかにすることにより、これら病態の分子基盤を解明することを目的とする。

B.研究方法

年齢を適合させた牟婁病患者 10 名、健常者コントロール群 10 名の剖検脳を用いた。側頭葉から抗 NeuN 抗体を用いたフローサイトメトリーを行い、神経細胞核のみを選択的に抽出、そこから DNA 抽出を行った。抽出した DNA

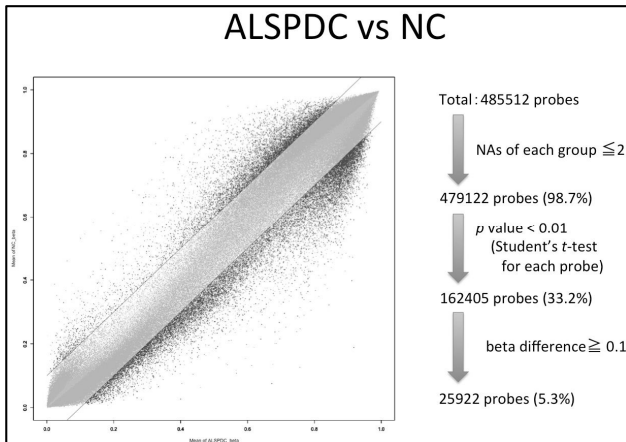
は Bisulfite 変換を行い、Illumina 社製 HumanMethylation450 BeadChip を用いてゲノム上の各 CpG についてメチル化の定量を行った。

(倫理面への配慮)

検体はすべて文書による同意取得済みであり、匿名化されている。当該課題は東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて審査の上承認されている(2186-(7))。

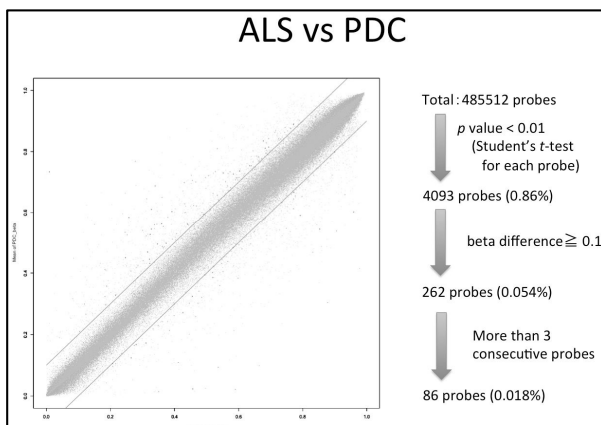
C.研究結果

牟婁病患者10名の平均年齢は70.9歳であった。臨床病型としては、ALS型5名、PDC型5名であり各平均年齢は68.6歳(63-73歳)、73.2歳(70-79歳)であった。健常者コントロール群について平均年齢は71.5歳であった。Student t検定p値<0.01、β値の牟婁病と正常コントロール群間差0.1以上をカットオフとし、25922プローブが検出された。個々のデータのばらつきが大きいこ



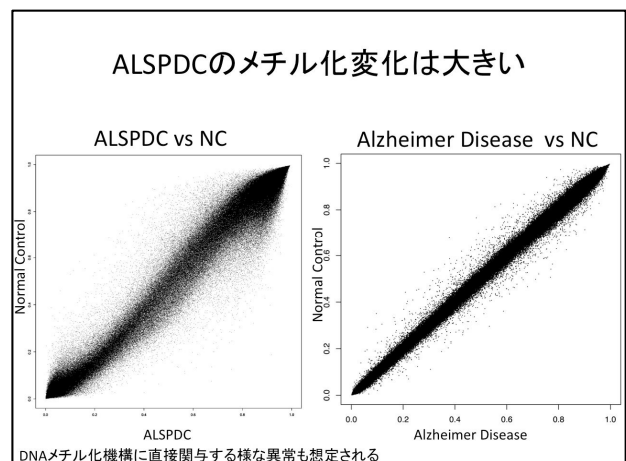
と考慮するとともに、メチル化による遺伝子発現制御のためには連続した一定領域のメチル化変化が起きているということ仮定して、抽出したプローブ群のなかで3カ所以上連続しているプローブを選択し、1380プローブまでの絞り込みを行った。これらのプローブのうち、遺伝子に関連したプローブは909カ所で471遺伝子と関連しており、特に発現調整に最も重要と考えられるTSS200またはTSS1500に含まれたプローブは254カ所、これらは123遺伝子に関連しているものであった。これらの遺伝子群の機能的内訳としては、シナプス伝達、細胞骨格、転写抑制などに関与する物が多く見られ、牟婁病の特異的病態を表しているものと考えられた。

一方で、臨床病型によって分け、同様の基準(p



値<0.01, ALS/PDC群間差0.10, 連続3プローブ以上)でプローブを選定したところ,29プローブが選定され, ZIC1, ZIC4, LOC145845の3遺伝子が残った。ZIC1,4は双方とも3q24に存在し, Dandy Walker syndrome(先天性小脳形成異常)の原因遺伝子の一つである。

正常コントロールとの比較で抽出された遺伝子の数はアルツハイマー病/正常で抽出された遺伝子(下図)の数よりも遙かに多く,その原因としては1.牟婁病に特異的な現象,もしくは2.サンプル数が少ないためのアーチファクト,が考えられた。しかしながら牟婁病内での比較では抽出された遺伝子の数は3つであり,サンプル数の少ない事が原因とは考えにくいと結論した。



D. 考察

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

E. 結論

今回の結果は疾患発症, および臨床病型の病

態機序解明に重要な端緒となる可能性がある。
今後さらに発展させ、特異的な遺伝子調節系の
解析を行いたい。

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、神経細胞を誘導し作り出すことができるので、神経疾患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。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）を用いた。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 5 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 4 例から皮膚由来線維芽細胞を樹立した。H24 年度までに、このうちの 2 症例から iPS 細胞を樹立した。H25 年度は、さらに 1 例からの iPS 細胞の樹立した。さらに樹立した iPS 細胞が神経細胞へ誘導可能であること確認した。

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、様々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。神経疾患においても、通常患者から得ることが困難な神経細胞を誘導し得ることで、疾患解析や治療薬開発に貢献できると期待されている。本研究では、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 細胞を樹立することを目的とする。

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。

3. 樹立した iPS 細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞マーカー (Nestin 等) の発現を調べ、神経細胞であることを確認する。

(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5例の症例において皮膚生検を行い、うち4例からiPS細胞作成に必要な皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。残り1例は培養中に汚染があり破棄した。

2. iPS細胞の樹立

症例から樹立した皮膚由来線維芽細胞を用いてiPS細胞の作製を行った。線維芽細胞に初期化因子(Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc)を持つセンダイ・ウイルスを感染させ、感染後1週間目にマイトマイシンで処理したマウス胎仔初代線維芽細胞(MEF)上へまきなおした。

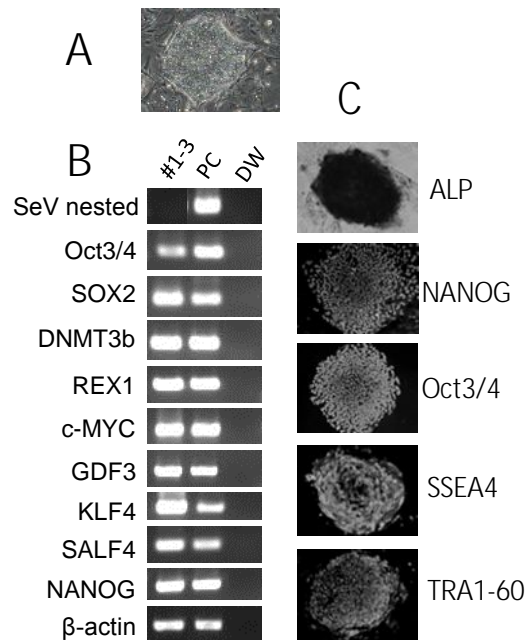


図1 樹立したiPS細胞

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

感染から14日後ぐらいからコロニーが出現した。感染から25日目にコロニーを顕微鏡下にてピックアップしそれぞれのクローンを培養、増幅した。その後、ウイルス除去のために培養の温度を38度へシフトさせた。用いたセンダイウイルスベクターは

温度感受性株のために 38 度では増殖が停止し、結果としてウイルスベクターフリーの iPS 細胞を得ることができる。PCR にてウイルス除去を確認した後、未分化マーカーの発現を免疫染色と RT-PCR にて調べ、iPS 細胞であることを確認した。H25 年度は、1 症例から 10 数株のウイルスベクターフリーの iPS 細胞株を樹立した(図 1)。

3. 樹立した iPS 細胞からの神経細胞への誘導

これまでに樹立した iPS 細胞のうち症例 1 から樹立した iPS 細胞を神経細胞へと誘導した(図 2)。約 2 週間あまりで形態学的にも神経細胞へと誘導することに成功した。神経細胞特異的マーカーである Nestin の免疫染色を行い、陽性であることから神経細胞であることを確認した。

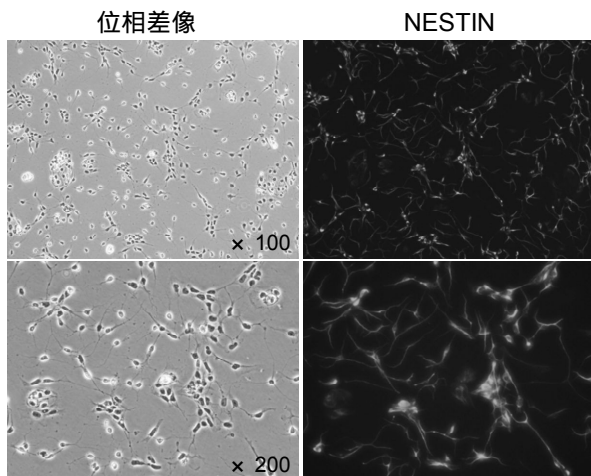


図2 疾患由来iPS細胞から神経細胞への誘導
iPS細胞から神経細胞への分化を誘導し、神経細胞特異的マーカーであるNESTINの抗体にて免疫染色を行った。

D. 考察

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

を iPS 細胞作製のソースとすることで、生検を行わずに末梢血の採血で iPS 細胞作製が可能となるために安全かつ容易に行える。

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

E. 結論

患者 4 例の皮膚生検より皮膚由来線維芽細胞を樹立した。これまでの 2 例に加えて H25 年度は、新たに 1 例より 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く、iPS 細胞が樹立されたと言える。さらに神経細胞を樹立した iPS 細胞から誘導することに成功した。以上より、樹立した iPS 細胞は今後、三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病を研究する解析ツールとして有用である。

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. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y and Era T. Analysis of iPS cells derived from Fibrodysplasia ossificans progressive. Oral presentation. The 11th Stem Cell Research Symposium. Tokyo, 17th May 2013.
2. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hojoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y and Era T. Analysis of iPS cells derived

from Fibrodysplasia ossificans progressive. Poster presentation. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Boston, 14th June, 2013.

3. 江良 択実 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 130 回 熊本小児科学会総会 特別講演 熊本 2013 年 6 月 16 日
4. 江良 択実 iPS 細胞と再生医療 第 14 回 医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 招待講演 東京 2013 年 9 月 28 日
5. Era T, Soga M, Fusaki N, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo S, Irie T, and Endo F. Model of Niemann-Pick disease type C using iPS cells. Oral presentation. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases and The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, 28th November, 2013.

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。

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
Yui Nakayama, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Shigeki Kuzuhara, and Yasumasa Kokubo	Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Kii Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex	Journal of Neurodegenerative Diseases	Volume 2013	Article ID 679089, 4 pages	2013	無
Kotaro Ogaki, Yuanzhe Li, Masashi Takanashi, Kei-Ichi Ishikawa, Tomonori Kobayashi, Takashi Nonaka, Masato Hasegawa, Masahiko Kishi, Hiroyo Yoshino, Manabu Funayama, Tetsuro Tsukamoto, Keiichi Shioya, Masayuki Yokochi, Hisamasa Imai, Ryogen Sasaki, Yasumasa Kokubo, Shigeki Kuzuhara, Hiroyuki Tomiyama, Nobutaka Hattori	Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS	Parkinsonism Relat Disord.	Jan;19(1)	15-20.	2013	無
Tameko Kihira, Kazushi Okamoto, Sohei Yoshida, Tetuya Kondo, Keiko Iwai, Sachiko Wada, Yoshinori Kajimoto, Tomoyoshi Kondo, Yasumasa Kokubo, Shigeki Kuzuhara	Environmental Characteristics and oxidative stress of inhabitants and patients with amyotrophic lateral sclerosis in a high-incidence area on the Kii peninsula, Japan	Internal Medicine	52	1479-1486	2013	無
Ken-ichiro Kobayashi, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Takeshi Nishiguchi, Kenichi Isoda, Yasumasa Kokubo, Katsuhiko Ando, Masaki Katurahara, Yasuhiro Sako, Tetsuya Yanagida, Akira Ito, Sentaro Iwabuchi, and Kenji Ohnishi	Rare case of disseminated cysticercosis and taeniasis in a Japanese traveller after returning from India	American journal of tropical medicine and hygiene Am J Trop Med Hyg	Jul;89(1)	58-62	2013	無
Atsushi Iwata, Kenichi Nagata, Hiroyuki Hatsuta, Hiroshi Takuma, Miki Bundo, Kazuya Iwamoto, Akira Tamaoka, Shigeo Murayama, Takaomi Saido, Shoji Tsuji	Altered CpG methylation in Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation.	Human Molecular Genetics	23(3)	648-656	2014	無
Tameko Kihira, Kazushi Okamoto, Sohei Yoshida, Tetuya Kondo, Keiko Iwai, Sachiko Wada, Yoshinori Kajimoto, Tomoyoshi Kondo, Yasumasa Kokubo, Shigeki Kuzuhara.	Environmental Characteristics and Oxidative Stress of Inhabitants and Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in a High-incidence Area on the Kii Peninsula, Japan.	Internal Medicine	52	1479-1486	2013	有
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	有

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	27	7	2012	無
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 FTLD, PSP, and CBS.	Parkinsonism Relat Disord	19	15-20	2013	有
Yamashita C, Tomiyama H, Funayama M, Inamizu S, Ando M, Li Y, Yoshino H, Araki T, Ichikawa T, Ehara Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Hattori N.	The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease.	Neurobiol Aging	(in press)	(in press)	(in press)	無
Nonaka T, et al.	Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains.	Cell Rep.	4	124-34.	2013	
Masuda-Suzukake M, et al.	Prion-like spreading of pathological alpha- synuclein in brain.	Brain	136:00:00	1128-38.	2013	
Moujalled D, et al.	Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress.	PLoS One	8	e67433.	2013	
Mann DMA, et al.	Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neuron Disease associated with expansions in C9ORF72.	Acta Neuropathol Comm	1	68	2013	
Dan A, et al	Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain.	Acta Neuropathol Comm	1	54	2013	
Kimura T., et al.	Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau at Cdk5-Dependent Alzheimer Phosphorylation Sites.	J Biol Chem	288:00:00	7968-77.	2013	
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	69	1154-1158	2012	あり

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 FTLD/FTLD/ALS; ITALSGEN Consortium, Hernandez DG, Arepalli S, Sabatelli M, Mora G, Corbo M, Giannini F, Calvo A, Englund E, Borghero G, Floris GL, Remes AM, Laaksovirta H, McCluskey L, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Schellenberg GD, Nalls MA, Drory VE, Lu CS, Yeh TH, Ishiura H, Takahashi Y, Tsuji S, Le Ber I, Brice A, Drepper C, Williams N, Kirby J, Shaw P, Hardy J, Tienari PJ, Heutink P, Morris HR, Pickering-Brown S, Traynor BJ.	Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study.	Lancet Neurol	11	323-330	2012	なし
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	あり
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	33	47-58	2013	有
Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, <u>Murayama S</u> , Mann D. M, Akiyama H and Hasegawa M.	Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains.	Cell Rep	4	124-134	2013	有
Tsuiji H, Iguchi Y, Furuya A, Kataoka A, Hatsuta H, Atsuta N, Tanaka F, Hashizume Y, Akatsu H, <u>Murayama S</u> , Sobue G and Yamanaka K.	Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA.	EMBO Mol Med	5	221-234	2013	有

Kakuda N, Akazawa K, Hatsuta H, <u>Murayama S</u> , Ihara Y. The Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.	Suspected limited efficacy of γ -secretase modulators.	Neurobiol Aging	34	1101-1104	2013	有
Fujita K, 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

英文総説

著者名	論文題名	雑誌名	巻	頁	出版西暦年
—				初め頁-終り頁	

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
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		初め頁 - 終り頁
富山弘幸 .	運動ニューロン疾患の遺伝学 : update 『わが国の ALS における C9ORF72』	臨床神経学	53	1074-6 .	2013		

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

小久保康昌	線条体黒質変性症の治療と その具体的臨床事例	脊髄小脳変性症 マニュアル決定 版！（監：西澤正 豊／編：月刊難病 と在宅ケア）		初め頁-終 り頁	2013	無