

孤発性筋萎縮性側索硬化症の全ゲノム領域を 対象とした関連解析

福島 隆 男

新潟大学大学院医学研究科神経内科学専攻

(主任：辻 省次教授)

A Genome - Wide Association Study of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis

Takao FUKUSHIMA

Neurology, Graduate Student,

School of Medicine, Niigata, University,

(Director: Prof. Shoji TSUJI)

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease characterized by a selective loss of upper and lower motor neurons in the brain and spinal cord. Approximately 10 % of ALS cases are familial, and 15 – 20 % of these familial cases involve mutations in the copper - zinc superoxide dismutase gene (SOD1). The gene causing the autosomal recessive form of juvenile ALS (ALS2) has also recently been identified. On the other hand, the genetic background of SALS, which may be a multifactorial disease, remains unknown. To find susceptibility loci of the SALS, we investigated a total of 109 unrelated Japanese patients with SALS and 110 controls. A genome - wide set of 811 microsatellite markers was used for genotyping. The average distance between microsatellite markers is 4.6cM. The genotyping data of the SALS and control groups were analyzed by the χ^2 test. For the loci showing low p values, we conducted detailed association studies using additional densely distributed microsatellite loci. Among the 811 markers analyzed, we identified two loci with p values <0.001 on chromosomes 13 (p=0.00071) and 18 (p=0.00036), and seven loci with $0.001 < p \text{ values} < 0.01$. From the detailed association studies, we identified three loci located within a 100 - kbp region on the X chromosome with $0.001 < p \text{ values} < 0.05$. The present study revealed possible SALS susceptibility loci. To further characterize these loci, analyses of independent data sets using much more densely distributed microsatellite markers are required.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, association study, genome - wide, susceptibility gene, microsatellite marker

Reprint requests to: Takao FUKUSHIMA
Department of Neurology
Brain Research Institute Niigata University
1 - 757 Asahimachi - dori,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先： 〒951 - 8585 新潟市旭町通り 1 - 757
新潟大学脳研究所神経内科 福島 隆 男

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は、運動ニューロンが選択的かつ系統的に障害され、進行性の筋萎縮、筋力低下を呈する原因不明の神経変性疾患である。大部分は孤発例であるが、約10%は遺伝性に発症し、家族性ALS (familial ALS; FALS) と呼ばれている。FALSの多くは常染色体優性遺伝形式をとり、約20%の症例はCu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子変異を原因としている¹⁾。最近、チュニジアなどの常染色体劣性遺伝形式をとる家系の解析から、若年性FALSの原因遺伝子として2q33に存在するALS2が同定されたが²⁾³⁾、FALS家系の連鎖解析からFALSの原因遺伝子は少なくともさらに5つは存在することが考えられ^{4)–8)}、運動ニューロンの変性に関わる分子は多様であることが示唆されている。分子遺伝学の進歩によりFALSの原因解析が徐々に進んできている一方で、ALSの大部分を占める孤発性ALS (SALS) の病因はいまだに不明である。これまでに興奮性アミノ酸の神経毒性⁹⁾¹⁰⁾、プロテインキナーゼC活性の上昇¹¹⁾¹²⁾、カルシウムホメオスターシスの異常¹³⁾、ニューロフィラメントの異常^{15)–17)}、酸化ストレス障害^{18)–20)}、自己免疫学的異常²¹⁾などの関与が提唱されているものの、決定的なものはなく、SALSの発症には遺伝要因を含めた多様な因子が関与している可能性が指摘されている²²⁾。

アルツハイマー病はALSと同様に家族性発症例と孤発性発症例が存在する神経変性疾患であるが、家族性アルツハイマー病の一部はアミロイド前駆体蛋白遺伝子²³⁾やプレセニリン遺伝子^{24)–26)}が原因遺伝子として同定されており、また孤発性の例ではアポリポ蛋白Eの遺伝子多型のうちAPOE4が発症年齢を若年化させ、アルツハイマー病の発症を促進する疾患感受性遺伝子として同定されている^{27)–30)}。これらの遺伝子はいずれもアミロイド β 蛋白の凝集、沈着に関わり、アルツハイマー病の発症を促進することが最近の研究で明らかにされてきているが、そのような因子は他にも存在すると考えられている。FALSの原因

遺伝子が多数存在することからも、SALSの場合にも運動ニューロンの変性メカニズムに關与する疾患感受性遺伝子が複数存在することが予想される。そのような疾患感受性遺伝子を発見する方法として、一つにはまだ同定されていないFALSの原因遺伝子を通常のパラメトリック連鎖解析とポジショナルクローニングによって同定することが考えられるが、FALS家系はSOD1遺伝子変異を有する家系を除くと発症者の少ない小家系がほとんどで、パラメトリック連鎖解析に適さない場合が多い。また、疾患感受性遺伝子を同定する基本的な方法である罹患同胞対法 (sib-pair analysis) はALSの同胞対がごく少数であるために、十分なサンプルを収集するのは極めて困難である。このような背景からSALSの疾患感受性遺伝子同定のため、全ゲノム領域における疾患・対照関連解析を計画した。

対象と解析方法

1. 対象

新潟県またはその近県在住のSALS患者群109人 (男性66人、女性43人、平均年齢 59.5 ± 11.1 歳)、対照群110人 (男性58人、女性52人、平均年齢 72.5 ± 6.4 歳) から十分なインフォームド・コンセントを行い採血した。SALS患者の病型は上肢型、下肢型、球麻痺型を含む。対照群は、神経内科の外来に通院中で60歳以上の運動神経疾患を持たない方 (脳梗塞、頭痛、めまい、高血圧、糖尿病性末梢神経障害などで通院中の患者あるいは家族で、神経変性疾患は除外している) にご協力いただいた。なお、本研究は新潟大学遺伝子倫理委員会の承認を得て行った。

2. 遺伝子型解析

末梢血白血球より抽出した高分子DNAをテンプレートとして、全ゲノム領域に約4.6cM間隔で分布するマイクロサテライトマーカー (ABI PRISM Linkage Mapping Set HD-5) を用いてPCRを行った。PCRは384 well plateにDNA $2.5 \mu\text{l}$ (1ng/ μl)、solution mix $5 \mu\text{l}$ (AmpliTaq Gold 0.3U, 10 \times PCR Gold Buffer $0.75 \mu\text{l}$, 25mM MgCl_2 0.75

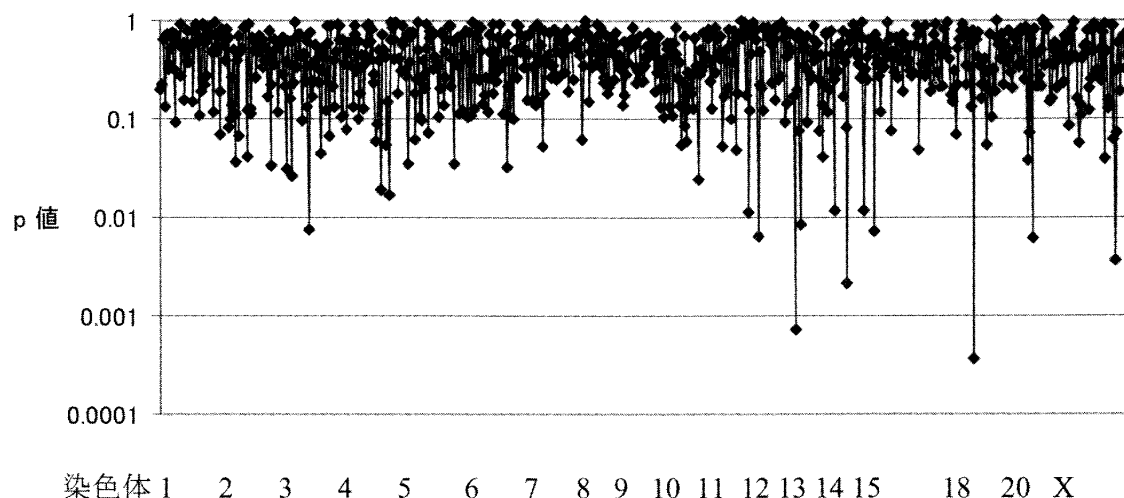


図 811 マーカーの p 値

左側に第 1 染色体の短腕から右側に X 染色体の長腕がくるように
811 マーカーを順に並べ、その p 値を示した。

表 1 低い p 値を示したマーカー

Marker	position(cM)	p value
D3S3706	12.8	0.0076
D12S364	32.8	0.0064
D13S1243	11.5	0.00071
D13S219	30.7	0.0085
D14S1050	98.8	0.0022
D15S153	62.1	0.0071
D18S1129	82.3	0.00036
D20S178	66.0	0.0061
DXS1047	150.3	0.0037

p値が0.01より低い値をとったマーカーを示した。
positionはGenethonのデータベース^{41)~43)}を参考にした。
Bonferroniの補正 (0.000062) を行うと統計学的には有意とは言えない。

μ l, 各 dNTP 250 μ M 含む溶液 0.75 μ l, 各 primer 5 μ M 含む溶液 0.5 μ l) を分注し, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) で行った。試薬等の分注にはロボット (Biomek 2000, FX) を用い省力化を図った。PCR の条件は 95 $^{\circ}$ C 12 分, 94 $^{\circ}$ C 15 秒— 55 $^{\circ}$ C 15 秒— 72 $^{\circ}$ C 30 秒 \times 10, 89 度 15 秒— 55 $^{\circ}$ C 15 秒— 72 $^{\circ}$ C 30 秒 \times 20, 72 $^{\circ}$ C 30 分。PCR 産物を各個人ごとで蛍光色素の色とサイズの違いを利用して, 3 から 20 マーカー分を混和し, ABI PRISM

3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) に泳動した。そのデータを GeneMapper software (Applied Biosystems) を用い解析し, Oracle database にストックした。

3. 統計解析

Oracle database よりデータを取り出し, SALS 患者群とコントロール群でマーカーごとに遺伝子型頻度の違いを χ^2 test ($2 \times n$ Table) を用い比較した。811 マーカーを用いた多重検定を行っているため, Bonferroni の補正を用い評価した。低い p 値を示したマーカーに関しては, SALS とコントロール群で特に差異のあったアレルの関与を検定するためオッズ比と χ^2 test (2×2 Table) を行った。X 染色体に関しては, 男性は 1 アレル, 女性は 2 アレルとして計算した。

結 果

ハイスループットのマイクロサテライトマーカー解析システムを構築し, 約 17 万回の PCR を行い, 遺伝子型の解析をした。約 4.6cM 間隔でゲノムワイドに分布する 811 のマーカーについて解析したが, 12 マーカーについては解析不能であった。そのうち PCR がうまくかからなかったものが 6 マーカー, 多数のピークが出現したためアレ

表2 ALS群と対照群で特に頻度に差のあるアレル

Marker	No. of alleles	significant alleles (bp)	No. (%) of		OR(95%CI)	χ^2	p value
			ALS	control			
D13S1243	7	2(251)	35(17)	17(8)	2.50(1.35-4.63)	8.98	0.0027
		3(253)	60(30)	90(41)	0.61(0.41-0.91)	5.77	0.016
		5(257)	28(14)	47(21)	0.59(0.35-0.99)	4.06	0.044
D18S1129	10	2(240)	19(9)	7(3)	3.16(1.30-7.68)	7.06	0.0079
		8(252)	14(7)	34(15)	0.41(0.21-0.78)	7.59	0.0059
		10(256)	8(4)	0		6.88	0.0087
DXS1047	13	5(157)	24(17)	10(6)	3.13(1.44-6.79)	8.97	0.0027
		10(167)	9(6)	24(15)	0.39(0.18-0.88)	5.45	0.02
X1047-1*	7	1(176)	0	6(4)		3.57	0.06
		6(188)	12(8)	30(18)	0.41(0.20-0.84)	6.23	0.012
X1047-2*	35	9(207)	0	6(4)		3.51	0.061
		11(209)	16(13)	5(3)	4.15(1.48-11.68)	8.33	0.0039
		17(217)	2(2)	13(9)	0.17(0.04-0.76)	5.50	0.019

* 本研究のために新たに設定したマーカー

低いp値を呈したマーカーで、特に差のあるアレルを選びそのアレルの影響を解析するためオッズ比 (OR) と2×2 Tableで χ^2 検定を行いp値を計算した。

ルサイズが決定できなかったものが6マーカーあった。

関連解析の結果、p値が0.001以下を示したのは第13番染色体上のD13S1243 ($p = 0.00071$)と第18番染色体上のD18S1129 ($p = 0.00036$)の2マーカーであり、その他7マーカー (D3S3706, D12S364, D13S219, D14S1050, D15S153, D20S178, DXS1047)でも $0.001 < p < 0.01$ を示した (表1, 図)。これらの低いp値をとったマーカーの近傍に多型性に富むマイクロサテライトマーカーを新たに複数設定し、関連解析を行った。その結果、DXS1047 ($p = 0.0037$)の89kbp上流のマーカー (X1047-1, $p = 0.022$)と11kbp下流のマーカー (X1047-2, $p = 0.042$)でそれぞれ0.05を下回るp値を得た。

また、0.01よりも低いp値を示した上記の9マーカーに関して、特にp値を低くすることに影響のあったアレル、つまり両群間で出現頻度に差のあったアレルを抽出し、そのアレルと残りのアレルをまとめたもので2×2 Tableをつくり χ^2 testを行った (表2)。6個のアレルが $p < 0.01$ を示

し、そのうちD18S1129のアレル8の頻度だけはSALSにおいて少なかった。

考 察

今回、SALSの全ゲノムを対象として疾患・対照関連解析を行い、 $p < 0.001$ を示す2マーカーと、 $0.001 < p < 0.01$ を示す7マーカーを同定した。また、これら9マーカーの近傍に高密度に分布する新たな多型マーカーを設定して追加解析を行い、X染色体上に3つのマーカーが連続して0.05を下回るp値を示す100kbpに渡る興味深い領域も同定した。

最近、Handらはヨーロッパで第18染色体に連鎖するFALS家系を報告した⁵⁾。18q21のD18S846からD18S1109間の8Mbpが候補領域と考えられ、D18S39で最大LOD score 4.5を得たと報告している。興味深いことに、我々のSALSの解析で低いp値を示したD18S1129はD18S846からD18S1109の間に位置しているため、Handらを使用したマーカー (D18S846, D18S39, D18S35,

D18S858, D18S1103, D18S64, D18S1109)でも解析を試みたが、他にp値が低くなるマーカーは認めなかった。

ALSの有病率は人口10万人当たり4～6で、男女比は1.2～2:1と男性に多い^{31)～34)}。新潟大学医学部附属病院神経内科に1989年から1998年に入院したALS患者122人の内訳は、男性75人、女性47人と男女比1.6:1であり、やはり男性が多かった。我々の解析で、X染色体上に連続して低いp値を示すマーカーのある領域が存在するという結果は、このような有病率の男女差、つまり男性のほうがALSに罹患しやすいという事実と照らし合わせても興味深い結果だと思われ、X染色体上に疾患感受性遺伝子が存在する可能性が示唆される。

SALS群と対照群間で出現頻度に差のあったアレルについて検討した結果から(表2)、ALS群と対照群で特に頻度の異なるアレルが存在しており、5つのアレルはALS群で頻度が高いが、1つのアレルはALS群で頻度が低くなっている。ALSで頻度の低いアレルは、ALS抵抗性の遺伝子と関連している可能性もあると考えられる。

本研究では、全ゲノム領域に分布する811マーカーの解析をしていることから、多重検定という問題が生じてしまうため、結果の解釈は慎重に行う必要がある。偽陽性を避けるためには、一般的にBonferroniの補正を行うのが良いといわれているが、この補正を用いると、 $0.05/811 = 0.000062$ が有意水準となり、今回低いp値を示したマーカー全てがまだ有意な値ではないということになってしまい、この結果は慎重に扱う必要がある。そのため、十分に検体数を大きくした場合のp値が有意水準に達するか検討することも不可欠であるが、検体数を単に増やすだけでなく、別の遺伝的背景を持った人種など、全く異なった集合で新たなサンプルセットを収集して関連解析を行い、同じマーカーで有意な結論が導き出せるか検討することも必要である。一方で、Bonferroniの補正は非常に厳しい補正であり、ファーストスクリーニングとしてこのような厳しい補正をせず、広く候補領域を拾い上げることも大切であると考えられる。

また、全ゲノム領域を対象とした解析では解析するマーカー数が重要で、可能な限り多く解析できればもれなく全ゲノムをカバーしたこととなるが、実際には解析できるマーカー数にも限度があり、できるだけ少ないマーカーで効率的な解析を行うことが必要である。そのためには一般的に連鎖不平衡がどれくらいの距離で保たれているかを知る必要がある。尋常性乾癬のHLAクラスI領域のマイクロサテライトマーカーを用いた研究では、連鎖不平衡は少なくとも100kbpは保たれているとしている³⁵⁾。また、アルデヒドデヒドロゲナーゼ2(ALDH2)に関する研究では、400kbp保たれていると報告している³⁶⁾。今回の研究では、マーカー間の距離は約4.6cMと広く、ゲノム上の連鎖不平衡部位をもれなく検出するには不十分であり、今後は解析するマーカーを増やす必要がある。

関連解析においても一つ重要なことは、適切な対照群の収集である。全く遺伝的背景の異なる人種などを対照にすると偽陽性、偽陰性が起こる可能性があり、疾患群と可能な限り遺伝的背景の同じグループを対照群とするべきである。本解析では疾患群、対照群とも新潟県もしくはその周辺の県出身者であり、対照群は我々の神経内科外来を受診した患者の中から60歳以上で運動神経症状を有さないものとした。理想的には、患者の配偶者などを対照群とすべきであるが、日本は元々民族移動のほとんどない島国であるため、今回の解析でも遺伝的均一性は十分保たれていると考えられる。

関連解析には上記のような多くの弱点もあり、その弱点を補う目的で今後は別の解析法も行う必要がある。その1つとして、伝達不平衡テスト(transmission disequilibrium test, TDT)が挙げられる^{37)～39)}。TDTは発症者とその両親をサンプルとするため、遺伝的異質性などの影響は全く受けない。しかし、ALSのような神経変性疾患の解析では、発症年齢が高齢であるため両親のサンプルを得るのは困難であり、両親の代わりに発症者の兄弟の中で非発症者をサンプルとする同胞伝達不平衡テスト(sib TDT)の方がより有効と思

われ⁴⁰⁾、今後、同胞の検体を収集することが重要と考えている。

関連解析のマーカーとしてマイクロサテライトマーカーに続いて最近注目されているのが一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) である。SNPs はマイクロサテライトマーカーより高密度に分布し、数百塩基に1カ所の割合で存在すると推測されているが、多型性は乏しく、通常遺伝子型は2つしかない。関連解析にどちらのマーカーが適しているか判断は困難であるが、高密度に存在する SNPs は領域の絞り込みなど多数のマーカーが必要な場合には有用なマーカーと思われる。

本解析で SALS の疾患感受性遺伝子が存在する可能性のある9領域を示した。このような関連解析にはまだ多くの問題点が存在するが、ALSをはじめとした孤発性神経変性疾患、その他の common disease といわれる多因子性疾患の疾患感受性遺伝子同定においても、重要な研究手法であると考えられる。

謝 辞

本研究は、公益信託「生命の彩」ALS 研究助成基金の助成をうけた。稿を終えるにあたり、本研究に関して御指導、御校閲をいただきました東京大学医学部神経内科辻省次教授に心から感謝申し上げます。また本研究に御協力いただきました新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野 中野亮一先生、同附属生命科学リソース研究センター脳疾患リソース解析部門分子神経疾患資源解析学分野 五十嵐修一先生、同附属生命科学リソース研究センター遺伝子実験部門遺伝子機能解析学分野 宮下哲典先生、桑野良三先生、実験助手の方々、国立療養所西新潟中央病院神経内科 菊川公紀先生に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Royleau GA, Gusella JS, Horvitz HR and Brown Jr RH: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62 1993.
- 2) Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH, Jr Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR and Ikeda JE: A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29: 166-173 2001.
- 3) Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F and Siddique T: The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 29: 160-165 2001.
- 4) Chance PF, Rabin BA, Ryan SG, Ding Y, Scavina M, Crain B, Griffin JW and Cornblath DR: Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet* 62: 633-640 1998.
- 5) Hand CK, Khoris J, Salachas F, Gros-Louis F, Lopes AAS, Mayeux-Portas V, Brown Jr RH, Meininger V, Camu W and Rouleau GA: A novel locus for familial amyotrophic lateral sclerosis on chromosome 18q. *Am J Hum Genet* 70: 251-256 2002.
- 6) Hosler BA, Siddique T, Sapp PC, Sailor W, Huang MC, Hossain A, Daube JR, Nance M, Fan C, Kaplan J, Hung WY, McKenna-Yasek D, Haines JL, Pericak-Vance MA, Horvitz HR and Brown RH Jr: Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA* 284: 1664-
- 1) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B,

- 1669 2000.
- 7) Hentati A, Ouahchi K, Pericak - Vance MA, Nijhawan D, Ahmad A, Yang Y, Rimmler J, Hung W, Schlotter B, Ahmed A, Ben Hamida M, Hentati F and Siddique T: Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15 - q22 markers. *Neurogenetics* 2: 55 - 60 1998.
- 8) Siddique T, Hong S - T, Brooks BR, Hung WY, Siddique NA, Rimmler J, Kaplan JP, Haines JL, Brown RH Jr and Pericak - Vance MA: X - linked dominant locus for late - onset familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 63: A308 (1785) 1998.
- 9) Leigh PN and Meldrum BS: Excitotoxicity in ALS. *Neurology* 47: S221 - 227 1996.
- 10) Rothstein JD: Excitotoxicity hypothesis. *Neurology* 47: S19 - 25; discussion S26 1996.
- 11) Krieger C, Lanius RA, Pelech SL and Shaw CA: Amyotrophic lateral sclerosis: the involvement of intracellular Ca²⁺ and protein kinase C. *Trends Pharmacol Sci* 17: 114 - 120 1996.
- 12) Lanius RA, Paddon HB, Mezei M, Wagey R, Krieger C, Pelech SL and Shaw CA: A role for amplified protein kinase C activity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 65: 927 - 930 1995.
- 13) Krieger C, Jones K, Kim SU and Eisen AA: The role of intracellular free calcium in motor neuron disease. *J Neurol Sci* 124 Suppl: 27 - 32 1994.
- 14) Carpenter S: Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurology* 18: 841 - 851 1968.
- 15) Hirano A, Donnenfeld H, Sasaki S and Nakano I: Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43: 461 - 470 1984.
- 16) Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA and Julien JP: Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 3: 1757 - 1761 1994.
- 17) Schmidt ML, Carden MJ, Lee VM and Trojanowski JQ: Phosphate dependent and independent neurofilament epitopes in the axonal swellings of patients with motor neuron disease and controls. *Lab Invest* 56: 282 - 294 1987.
- 18) de Belleruche J, Orrell RW and Virgo L: Amyotrophic lateral sclerosis: Recent advances in understanding disease mechanisms. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 747 - 757 1996.
- 19) Rothstein JD: Therapeutic horizons for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurobiol* 6: 679 - 687 1996.
- 20) Tu PH, Gurney ME, Julien JP, Lee VM and Trojanowski JQ: Oxidative stress, mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease. *Lab Invest* 76: 441 - 456 1997.
- 21) Smith RG, Siklos L, Alexianu ME, Engelhardt JI, Mosier DR, Colom L, Habib Mohamed A and Appel SH: Autoimmunity and ALS. *Neurology* 47: S40 - 45; discussion S45 - 46 1996.
- 22) Eisen A: Amyotrophic lateral sclerosis is a multifactorial disease. *Muscle Nerve* 18: 741 - 752 1995.
- 23) Goate A, Chartier - Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak - Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M and Hardy J: Segregation of missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704 - 706 1991.
- 24) Shrrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumacov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak - Vance M, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM and St. George - Hyslop PH: Cloning of a gene bearing missense mutations in early - onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754 - 760 1995.
- 25) Levey - Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano

- DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Ying-Hui Fu, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD and Tanzi RE: Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-977 1995.
- 26) Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM and St. George-Hyslop PH: Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376: 775-778 1995.
- 27) van Duijn CM, de Knijff P, Cruts M, Wehnert A, Havekes LM, Hofman A, and Van Broeckhoven C: Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 7: 74-78 1994.
- 28) Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Perez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P and Gourlet V: Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* 3: 569-574 1994.
- 29) Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St. George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D and Roses AD: Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472 1993.
- 30) Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL and Pericak-Vance MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923 1993.
- 31) Nelson LM: Epidemiology of ALS. *Clin Neurosci* 3: 327-331 1995.
- 32) Tysnes OB, Vollset SE and Aarli JA: Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Hordaland county, western Norway. *Acta Neurol Scand* 83: 280-285 1991.
- 33) Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E and Hardiman O: Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997: a population-based study. *Neurology* 52: 504-509 1999.
- 34) Piemonte and Valle D'Aosta Register for Amyotrophic Lateral Sclerosis (PARALS): Incidence of ALS in Italy: evidence for a uniform frequency in Western countries. *Neurology* 56: 239-244 2001.
- 35) Oka A, Tamiya G, Tomizawa M, Ota M, Katsuyama Y, Makino S, Shiina T, Yoshitome M, Iizuka M, Sasao Y, Iwashita K, Kawakubo Y, Sugai J, Ozawa A, Ohkido M, Kimura M, Bahram S and Inoko H: Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the HLA-C gene. *Hum Mol Genet* 8: 2165-2170 1999.
- 36) Koch HG, McClay J, Loh EW, Higuchi S, Zhao JH, Sham P, Ball D and Craig IW: Allele association studies with SSR and SNP markers at known physical distances within a 1 Mb region embracing the ALDH2 locus in the Japanese, demonstrates linkage disequilibrium extending up to 400 kb. *Hum Mol Genet* 9: 2993-2999 2000.
- 37) Spielman RS, McGinnis RE and Ewens WJ: Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52: 506-516 1993.
- 38) Lander ES and Kruglyak L: Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11: 241-247 1995.
- 39) Risch N and Merikangas K: The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517 1996.
- 40) Spielman RS and Ewens WJ: A Sibship Test for Linkage in the Presence of Association: The Sib

- Transmission/Disequilibrium Test. *Am J Hum Genet* 62: 450 - 458 1998.
- 41) Bernardi G, Lathrop M and Weissenbach J: The 1993 - 1994 Genethon humangenetic linkage map. *Nature Genet* 7: 246 - 339 1994.
- 42) Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G and Lathrop M: A second - generation linkage map of the human genome. *Nature* 359: 794 - 801 1992.
- 43) Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J and Weissenbach J: A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: 152 - 154 1996.

(平成 15 年 1 月 27 日受付)