

# 神経細胞死に応答するミクログリア遺伝子の機能

小池 達郎

## はじめに

哺乳類の神経系では、個体発生初期につくられた神経細胞の約半数が細胞死を起し脱落する。神経細胞の生存はシナプス形成による標的細胞からの神経栄養因子によって支持されており、神経栄養因子の限定的供給のために、多くの神経細胞が発生の過程で死んでいくと考えられている(1)。この神経細胞死は積極的な過程からなるプログラムされた細胞死であり、アポトーシスとしての特徴を持つ。神経繊維切断による神経細胞死・変性、更に、種々の神経疾患においても、この細胞死プログラムが発現されることが示されている。アポトーシスは、形態的には核の断片化と凝集が先行する細胞死であり、その後細胞体の凝集が起こる。更に、凝集した細胞体がマクロファージ等の食細胞により除去されることで完結する。神経系においては、虚血や神経繊維切断による神経細胞の変性にともない、その変性部位での脳型マクロファージ/ミクログリアが増殖し、その保護作用や変性した細胞体及び神経突起の補食作用を行う。ミクログリアは休止型(resting)からアメーバ型(ameboid/phagocytotic)または活性化型(activated/rod-shaped)に変化し増殖するが、その増殖誘導にはインターロイキン-1などが関与すると考えられている。虚血などによる神経損傷後の非常に早い時期から長期にわたるミクログリアの活性化は舌下神経や座骨神経繊維切断によるその神経核や脊髄での神経変性部位でも報告されている。しかしながら、神経細胞死とミクログリアの細胞間相互作用は充分解明されているとは言えない。この為、小脳細胞培養系を用いて、神経細胞死または変性に応答するミクログリア遺伝子を探索・同定し、その機能を探っている(2, 3)。

## 方法

### 1. 神経細胞培養法

生後7日のラット小脳をジスパーゼ処理によって分散し、ポリリジン塗布したプレートにまき、10%牛胎児血清(非働化)を含むMEM培地で3-7日培養して実験

に供した(4)。非神経細胞を完全に除去するにはアフィニティコリンを用いたが、通常場合はFUdR処理をした。この条件下ではミクログリアは優先的に生き残る為、神経細胞-ミクログリア混合培養系とみなし得る(5)。ミクログリアの純粋培養は生後1, 2日の大脳の培養から常法に従って得た(純度95%)。神経細胞は固定後、Neurofilament(160KD)又はMAP2抗体染色により確認した。ミクログリアはMRF-1, OX42により、アストロサイトはGFAP染色により確認した。

### 2. 細胞死及び染色体凝縮のアッセイ法

トリパンブルー染色またはニッスル染色を行い、生細胞数を数えた。細胞を4%PFA溶液で固定後、ヘキスト3258(1 $\mu$ g/ml)で15分染色、PBS(-)で洗浄後、染色体の凝縮及び断片化の有無を蛍光顕微鏡(UV)で観察した。又、TUNEL染色を行った。

### 3. ノーザンプロット及びライブラリー作成など

全RNAはグアニジンチオシアネート法により抽出し、20 $\mu$ gをアガロースゲルにのせた。膜に転写後、32Pで標識したプローブとハイブリダイズした。ライブラリーは5 DIV(days in vitro)の細胞からmRNAを精製後、ファージベクターを用いて作成した。差プローブは標識5 DIVmRNAに3 DIVmRNAをハイブリさせで作成し、ライブラリーから5 DIVで発現増加する遺伝子を拾い、ヌクレオチド配列を調べた。又、常法に従い、ポリクローナル抗体を作成した。

## 結果

小脳の細胞を通常のカリウム濃度(5.4mM)下で培養すると、小脳顆粒細胞は3~4日間の突起伸長・細胞肥大等の分化の後、変性を始め、培養8~9日までには8割以上が死滅する(4)。神経細胞がアポトーシスを起こすこの系で神経細胞とミクログリア細胞がどのように相互作用するかを遺伝子レベルで調べることができる。この培養系で顆粒細胞の細胞死の時期に発現が増加する遺伝子を探索した。培養3日、および5日の培養細胞から抽出したmRNAを用いてcDNAライブラリーを作成し、differential hybridization法により神経細胞変性時(培養5日のライブラリー)に特異的に発現す

る遺伝子を単離した(6)。それらのうちのひとつ

(mrf-1)の発現は、ノーザンブロットでは0.7Kbpの転写産物に相当し、神経細胞の変性が始まる前(培養3日)でも見られるが、培養4日以降急激に活性化される。その後培養5日でピークに達し、神経細胞の変性が最も進行する時期(培養7日)には減少した。塩基配列の決定を行い、全配列についての相同性を検索した結果、aif-1(allograft inflammatory factor-1)(7)と5'上流の塩基配列はことなるが、コーディング領域のアミノ酸配列は同一であった(17KDa)。この遺伝子は異種心臓移植における拒絶反応の際にマクロファージで活性化される遺伝子として同定されたもので、その役割の類似性を予想させる。ミクログリアから別のストラテジーで取られたiba-1(ionized calcium binding adapter-1)(8)ともN-末のアミノ酸配列に違いはあるものの相同性が見られた。これらの遺伝子産物の特徴はカルシウム結合部位であるEFハンドモチーフや多数のリン酸化部位を持つことである。mrf-1遺伝子の活性化はプログラム細胞死として知られる小脳顆粒細胞死に応答するのみならず、グルタミン酸毒性で死につつある顆粒細胞死にも応答した。又、顔面神経核の変性にも応答しており、アポトーシスであるかネクローシスであるかを問わず細胞死に、且つ細胞及び繊維の変性に広く応答するものと考えられる。また、in vivoでは、ラット

小脳におけるmrf-1 mRNAの発現レベルをノーザンブロット法で調べると、生後0から1週間後で高く、以降徐々に減少していった。免疫組織染色からも、幼若期ではミクログリアは良く染色され、成熟するとラミファイド型ミクログリアの細胞体及び突起全体に弱い染色性が認められた(9)。アメーバ型ミクログリアでは発現レベルは高い。これは小脳の発達過程と良くあい、プログラム細胞死が終了すると染色性が低下する傾向にある。更に、舌下神経や座骨神経などの神経突起切断

(axotomy)による神経細胞変性に応答して転写活性や免疫染色性が顕著に増加することが証明された。これらの観察およびミクログリアのマーカーとして用いられるOX42による染色性の比較などから、mrf-1遺伝子の発現増加が神経細胞死と変性のマーカーとなると思われる(9)が、いったいその機能は何であろうか?現在、予測の域をでないが、蛍光標識した酵母を食食のマーカーとして用いた実験から、mrf-1遺伝子の活性化は食食過程そのものに関与している可能性は低い(6)。また、この遺伝子の活性化はインターフェロンガンマで弱く誘導されるものの、リボポリサッカライド(LPS)では誘導されず、LPSによるミクログリアの活性化とは別のカスケードをなしていると考えられる(10)。これに対応するようにNOの生産を促進しても、活性化は起こらず、またNOの阻害剤によっても活性化は抑制されない。小

MRF-1	1:	M-SQSKDLQGG-KAF-G---LL---K---AQQE---E---RL---D---G---I---	27
AIF-1	1:	M-SQSKDLQGG-KAF-G---LL---K---AQQE---E---RL---D---G---I---	27
Iba-1	1:	M--KPEEISRG-KAF-G---LL---K---AQQE---E---RL---D---G---I---	26
BART-1	1:	MKSFWTAE SPAWREVAGINKHFLDDSKYNSDEDLQSKLESSRVRLGGGGSWSLGAQIVA	60
MRF-1	28:	-----NKH---E-----I-----D---D---PK---YSSDEDL-Q--	44
AIF-1	28:	-----NKH---E-----I-----D---D---PK---YSSDEDL-Q--	44
Iba-1	27:	-----NKH---E-----I-----D---D---PK---YSSDEDL-Q--	43
BART-1	61:	RLAAVLGKEGGAFKLLLPVVLCALPIELASPPPGSLTSSLPMSFCIFYPGIACLSHTA	120
MRF-1	45:	--S-KI-E--AF-KTKYMEFDLNGNGDIDIMSLKRMLEKLGVPKTHLELKKLIREVSSGS	97
AIF-1	45:	--S-KI-E--AF-KTKYMEFDLNGNGDIDIMSLKRMLEKLGVPKTHLELKKLIREVSSGS	97
Iba-1	44:	--S-KI-E--AF-KTKYMEFDLNGNGDIDIMSLKRMLEKLGVPKTHLELKKLIREVSSGS	96
BART-1	121:	NPTMCIYSLLSFYPAKYMEFDLNGNGDIDIMSLKRMLEKLGVPKTHLELKKLIREVSSGS	180
<b>EF-HAND LIKE MOTIF</b>			
MRF-1	98:	EETFSYSDFLRMMLGKRSAILRMILMYEERKNKEHQKPTGPPAKKAISEL-----	147
AIF-1	98:	EETFSYSDFLRMMLGKRSAILRMILMYEERKNKEHQKPTGPPAKKAISEL-----	147
Iba-1	97:	EETFSYSDFLRMMLGKRSAILRMILMYEERKNKEHQKPTGPPAKKAISEL-----	146
BART-1	181:	EETFSYSDFLRMMLGKRSAILRMILMYEERKNKNTRSQVLVQPRKLFSLSCNWRWI	235

Figure Comparison of the amino acid sequences among MRF-1, AIF-1, Iba-1, and BART-1. Amino acid numbering is indicated on both sides. Amino acids that are fully conserved are indicated by shadowed boxes. Dashes denote gaps. The EF-hand-like motif is indicated by an open box.

脳混合培養系においてはmrf-1の活性化は必ずしも顆粒細胞死を速めることも遅らせることもない。しかしながら、神経細胞死に応答したmrf-1の活性化はサンドウィッチ培養法でも証明できる。即ち、ニューロンとミクログリアを別々に培養したのち、両者を合わせて培養するのである。この手法から健康な顆粒細胞と合わせたときは活性化は起こらないが、変性しつつある顆粒細胞と合わせると顕著に染色性が増加する。即ち、変性細胞のシグナル（接触又不安定な分泌物）を認識して活性化することが明らかである（6）。

#### 考察

ミクログリア/マクロファージは変性したニューロンなどの細胞体や突起の除去を行うことが知られている。線虫ではこの死細胞の取り込み過程には7つの遺伝子が関与し、最終的にはヌクレアーゼをコードするnuc-1遺伝子によって分解処理される。取り込み過程に関与する7つの遺伝子は二重変異株の遺伝学的解析から2つのグループに分けられる（ced-1, ced-6, ced-7, ced-8 及び ced-2, ced-5, ced-10）（11）。2つのグループにまたがる二重変異株は、どちらか一方内での二重変異よりも死細胞が処理されず、非常に多く残っていた。これは死細胞の認識・貪食過程に2つの独立した（一部の過程は重複した）過程があり、一方に変異が起きても認識・貪食過程が進行する可能性を示唆している。前者のセットの遺伝子は、特に発生におけるプログラム細胞死過程で顕著に働き、第2のセットの遺伝子はこのような特異的な死細胞マーカーの認識によらず、より一般的に死細胞を認識し、補食する過程に関与する遺伝子群と推定されている。このことは、神経細胞の死に方（アポトーシスであれネクローシスであれ）に依らないで、死細胞を処理することができることを意味する。mrf-1の活性化は細胞死のタイプに依らず起こることから、これらの共通のカスケードの段階にカップルしている可能性がある。

活性化したミクログリアには3つの生物機能があることが知られている。それはニューロン死の促進効果、ニューロン変性及び細胞死の抑制保護効果、及び自己防御機能である。ミクログリアから放出される細胞毒性をもつ因子としては、活性酸素及びその媒介物、酸化窒素（NO）、蛋白質分解酵素、脂質分解酵素、興奮性アミノ酸、炎症性サイトカインなどが挙げられる。このような毒性因子が回復不能な損傷を受けた神経細胞の効果的な排除に関与しているのであろう。この制御が崩壊した場合、アルツハイマー病などの神経疾患をより進行させている。一方、ダメージを受けた神経細胞に対し保護的に働くミクログリア因子としては、プラスミノゲン等の細胞の接着因子があり、神経繊維の伸長をたすける以

外に神経細胞の生存を促す。小脳混合培養系においてはmrf-1の活性化は必ずしも顆粒細胞死を速めることも遅らせることもないことから、これらの可能性は低いと考えられる。

1つの可能性として自己防御に関与している可能性がある。酸化ストレスや神経細胞死を促進する環境下でミクログリア自身が自己防御をしている証拠がある。NO生産下ではミクログリアにはSOD活性が上昇する。また、ミクログリアでは細胞死抑制遺伝子であるbcl-2ファミリーの1つであるbcl-xLが活性化する。さらにミクログリアの生存はPI3 kinaseが重要な役割を果たしている（12）。mrf-1がこのカスケードの1部であるかもしれない。

第2の可能性としてミクログリアが活性化するときリソゾーム系の酵素活性が上昇することや膜系のトランスポートが活性化することが考えられる。ミクログリア活性化の初期の段階に関与する可能性である。実際、我々は、mrf-1以外にもこのような可能性を示唆する遺伝子を2、3単離している（Origasa, Mら、未発表）。いずれにしてもMRF-1タンパク質はミクログリアの活性化に伴い働くシグナル伝達系をになっている。従って、神経変性のセンサーとして働いているのではないかと考えられる。

これらの考えをもとに、ラットsubstantia nigraにおけるTH-positiveニューロンの生存と細胞死にミクログリア及びMRF-1関連ペプチドがどのような効果をおよぼすのかを現在検討中である。

#### 文献

- (1) 小池達郎ら：「アポトーシスと疾患」（井川洋二編）、71-82、医薬ジャーナル、1998
- (2) 田中秀逸ら：生化学 69: 1199-1203, 1997
- (3) 小池達郎：分子医学 35: 644-652, 1998
- (4) Suzuki, K. et al. : Mol. Chemical. Neuropathol. 30 : 101-124, 1997
- (5) Sakai, K. et al. : submitted
- (6) Tanaka, S. et al. : J. Neurosci. 18: 6358-6369, 1998
- (7) Utans, U., et al. : J. Clin. Invest. 95: 2954-2962, 1995
- (8) Imai, Y. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 224: 855-862, 1996
- (9) Tanaka, S. et al. : submitted
- (10) Yagi, R. et al. : submitted
- (11) Ellis, R.E. et al. : Genetics 129: 79-91, 1991
- (12) Koike, T. et al. : submitted

# パーキンソン病における神経細胞死

水野美邦<sup>1</sup>, 杉田之宏<sup>1</sup>, 望月秀樹<sup>1</sup>, 後藤啓五<sup>1</sup>, 服部信孝<sup>1</sup>, 頼高朝子<sup>1</sup>, 志村秀樹<sup>1</sup>,  
太田成男<sup>2</sup>, 内田浩二<sup>3</sup>, 田中雅嗣<sup>4</sup>, 中別府雄作<sup>5</sup>, 康 東天<sup>6</sup>

## 目 的

パーキンソン病(PD)における神経細胞死の機序はかなり解明されてはきたが、最初におきる異常や神経細胞の死に方など詳細な分子機構は依然として不明な部分が多い。本ワークショップにおいて、PDにおける神経細胞死とのテーマをいただいたが、田代班長は、アポトーシスを中心としたワークショップを考えられておられたようにうかがっている。PDにおける神経細胞の死に方については、アポトーシスであるか否か、大変ホットな議論が行われてきた領域であるので、できるだけこのテーマにそった報告を行いたいと考えている。また、本年度は田代班3年目であり、3年間の成果のまとめを行う義務も負っている。教室のPDに関する研究テーマは、弧発型PDにおける黒質の変性機序と家族性PDの分子遺伝学的研究が主であるが、後者については本報告書の中で服部信孝らが報告しているので、ここでは、主に弧発型PDにおける黒質の神経細胞死の機序についてアポトーシスであるかどうかを念頭におきつつ報告する。

## 方 法

ヒト剖検脳黒質パラフィン包埋切片にて次の項目を免疫組織化学的方法を中心に検討した。即ちアポトーシスの指標としてTUNEL陽性細胞数、アポトーシス誘導シグナルの一つである酸化的ストレスの指標としてhydroxynonenal (HNE)-modified protein 陽性細胞数、8-oxodihydrodeoxyguanosine-triphosphatase (8-oxo-dGTPase)及び8-oxo-dihydroguanine (8-oxo-dG)陽性細胞数、アポトーシス関連蛋白としてBcl-2, Bcl-xL, Bax発現細胞数を検討した。これらのうちTUNEL陽性細胞数(1), HNE陽性細胞数(2)については既に論文に報告済である。

順天堂大学医学部脳神経内科<sup>1</sup>, 日本医科大学老人病研究所生化学部門<sup>2</sup>, 名古屋大学大学院生命農学研究科食品機能化学研究室<sup>3</sup>, 応用生化学研究所遺伝子治療研究部<sup>4</sup>, 九州大学生体防御医学研究所生化学部門<sup>5</sup>, 九州大学医学部臨床検査部<sup>6</sup>

症例数は項目により多少異なるので、その都度説明する。

TUNEL陽性細胞は、DNAの3'断端に酵素的にビオチンを結合したdUTPを結合させ、それをstreptavidin-peroxidase complex及びdiaminobenzidineで発色させる通常の方法をとった。その他の免疫組織化学に用いた抗体は次の通りである。HNEに対する抗体は、HNE-modified histidyl peptide (Gly3-His-Gly3)に対するポリクローナル抗体、8-oxo-dGTPaseに対する抗体はウサギより得たポリクローナル抗体、8-oxo-dGに対する抗体は、日本油脂より得たモノクローナル抗体を使用した。Bcl-2に対する抗体はヒトBcl-2に対するモノクローナル抗体、Bcl-xLに対する抗体はラットBcl-xLに対するモノクローナル抗体、Baxに対する抗体はヒトBaxに対するポリクローナル抗体、免疫組織は通常diaminobenzidineで発色させる方法をとったが、Bcl-xL, Bcl-2, Baxについては、ニューロメラニンとの相異を解りやすくするため、更にnickel ammonium sulfateで処理する変法を用いた。

## 結果および考察

TUNEL陽性細胞は、非神経疾患対照6例、若年発症PD4例、高齢発症弧発型PD7例の黒質について検討した。対照患者及び若年発症PD患者にはTUNEL陽性細胞は全くみられず、高齢発症PD7例中4例に見られ、TUNEL陽性細胞の残存メラニン含有神経細胞に対する陽性率は、それぞれ4.2, 2.1, 1.2, 0.6%であった。

HNEに対する免疫染色では陽性細胞は細胞質がほぼ一様に染色されがた、その強度には細胞により濃淡の差が見られた。HNE陽性細胞の残存メラニン含有細胞数に対する陽性率を検討すると、平均値で、PD(7例)58.1%, 対照(7例)8.0%とPDで著明に増加していた。

8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGに対する免疫染色では、PD(6例)で大部分の黒質メラニン含有神経細胞が陽性であったのに対し、対照(4例)では10%以下の細胞しか陽性でなかった。8-oxo-dGに対し核は染色されず、主にミトコンドリアDNAが酸化的障害を被っていることを示す。

多系統萎縮症剖検脳(3例)ではPDと異なり、8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGの増加は認められなかった。この結果は、Western blottingでも確認することができた。

Bcl-2に対する免疫染色では、細胞質が陽性に染まり、陽性細胞の平均値は、PD(7例)59.7%、対照(6例)61.7%と有意差はなかった。Bcl-xLに対する免疫染色では、細胞質がやはり陽性に染まり、陽性細胞は、PD22.5%、対照46.0%とPDで有意に低かった。Baxに対する免疫染色では、やはり細胞質が陽性に染まり、陽性細胞はPD92.5%、対照90.5%と有意差はなかった。Bcl-xLとBaxは一部の神経細胞では、核膜にも発現が見られた。一方進行性核上性麻痺剖検例(3例)について同様の検索を行ったが、ここでは対照と全く有意差はなく、PDとの相異が観察された。

### 考 察

TUNEL法はアポトーシス検出のために広く使用されている方法である、即ちアポトーシスが起きているときは、DNAをlinker部分で切断するendonucleaseが活性化されており、DNAの3'断端が多数存在する。それを組織化学的に検出する方法である。鋭敏なよい方法であるが、ネクローシスにより、ランダムにDNAが切れている場合にも陽性になることがあると云われ、その特異性がよく問題にされるが、ネクローシスよりはアポトーシスに特異性が高いとされている(3)。死亡直前には、多くの患者が低血圧や低酸素血症などに曝されるが、このような病態ではTUNELは陽性にならないことは、我々の成績からも明らかである。endonucleaseによりDNAが切断された細胞は、急速にバラバラとなりマクロファージなどに貪食されてしまうので、TUNELが陽性になるのは、その細胞の一生の中で数時間程度といわれ、もとより高い陽性率が期待できるものではない。弧発型PD 7例中4例にのみ低頻度でTUNEL陽性細胞が検出されたことは、パーキンソン病における神経細胞死がアポトーシスによることを支持する所見であろうと我々は考えている。

アポトーシスは、虚血による肝細胞死の形態に2種類(ネクローシスとアポトーシス)あることを発見したKerrら(4)により始めて紹介された言葉で、ギリシャ語のapo = away fromとptosis = fallingが語源とされる。ネクローシスのアポトーシスの形態的違いは、ネクローシスでは、細胞膜が損傷され、細胞体は腫大し、細胞の内容が放出されて周囲に炎症反応を起こすのに対し、アポトーシスでは、細胞膜は保たれ、細胞体は縮小し、細胞周囲に多数のくびれができて、これが細胞から剥がれるように落ちてアポトーシス小体となる。DNAは、アポトーシスで

はヒストンを被っていないlinker部分でendonucleaseにより切断されるのに対し、ネクローシスでランダムに崩壊がおきる。またネクローシスは、ネクローシスを惹起する有害刺激にさらされた細胞集団におきるが、アポトーシスでは個々の細胞が別々に障害される。このような形態的特徴をPDの病理変化に照らして考察すると、黒質の細胞は萎縮はするが、腫大はせず、グリオシスはあるものの、炎症や虚血に見るような炎症反応は存在しない。即ち形態的にネクローシスを示す所見はない。このこともPDの神経細胞死がアポトーシスによることを示す所見ではないかと考える。一方生化学的には、アポトーシスでもネクローシスでも、細胞内カルシウムイオンの増加、各種分解酵素の活性化など共通の異常が多く、有害侵襲の程度や起きる速さにより、どちらになるかが規定され、両者を峻別することへの問題点も提起されている(5)。即ちアポトーシスにおいては、有害刺激のあとcaspaseなどアポトーシスの執行役である蛋白分解酵素が誘導される時間的余裕があるのに対し、ネクローシスではそれが無いという考え方である。

アポトーシス誘導のシグナルは、内因性のものとしてFasligand, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , Glucocorticoid, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO, Bax, Bcl-xS, Bak, Bik, Bad, Bcl-x $\beta$ , caspase, 外因性のものとして放射線, 毒素, ウイルス, 細菌など多数のものが現在知られている。PDについて、アポトーシスを起こしやすい環境があるかどうかを検討してみる。PDについて、ミトコンドリア電子伝達系複合体Iの低下があり、ミトコンドリア呼吸が障害されていることはかなり前より知られている(文献6参照)が、ミトコンドリア呼吸障害は、アポトーシス誘導の最も重要なシグナルの1つとして近年注目されている(7)。即ち、ミトコンドリアにてATP合成が行われるためには、ミトコンドリアの内膜側が外側に対し負に荷電している必要があり、それはミトコンドリアが酸素呼吸を行うことにより、内側のプロトンがミトコンドリア内外膜の間に排出されて膜電位が保たれている。ミトコンドリア呼吸が障害されて、ミトコンドリアの膜電位が低下するとATPの生成障害を起こすのみでなく、ミトコンドリア内膜にあり、透過性をコントロールしているpermeability transition poreが開き(8)、ミトコンドリアからcytochrome cが放出され、これがアポトーシス誘導のシグナルとなり、アポトーシスのプロセスが開始されるといわれる。PDでは、このミトコンドリア呼吸障害がアポトーシス誘導のシグナルになっている可能性が考えられる。

ミトコンドリア呼吸障害と並んで重要なアポトーシス誘導シグナルに酸化ストレスがある。即ち、一酸化窒

素や(9), スーパーオキシドアニオンは(10), アポトーシス誘導の重要なシグナルである。ミトコンドリアにおける活性酸素の増大は, ミトコンドリアの permeability transition poreの開大を招く(8)。PDにおいては, 酸化ストレスのあることが知られており, 鉄の沈着, 脂質過酸化の亢進, SODの活性上昇などが報告されてきた(文献6参照)。今回我々は, HNE修飾蛋白がPDの黒質で著明に増加していることを示した。HNEは, 不飽和アルデヒドの一種で, 細胞の膜系に多く含まれており, 膜の過酸化により遊離してくる。反応性に富んだ物質で, 蛋白の中のシステイン, リジン, ヒスチジンなどフリーのアミノ基またはSH基に結合して環状構造をとり, その蛋白の二次構造の収縮, 架橋形成などにより蛋白の機能を障害する作用を有している。今回の免疫組織は, 蛋白に結合したHNEを認識するものであり, 酸化ストレスによる蛋白の変化がPDでは起きている可能性を示している。更に今回, DNAの酸化障害の指標の一つである8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGを解析した。8-oxo-dGは, deoxyguanineの8位の炭素がhydroxyl radical( $\cdot$ OH)の攻撃を受けて生じるもので, DNAに対する酸化障害の指標として測定されている(12)。8-oxo-dGは, DNAの複製の際, adenineと読まれ, guanine-cytosineのペアからadenine-thymineのペアに突然変異を起こす可能性を有している(13)。8-oxo-dGの起源はDNA strand上のものとdNTPプールにある8-oxo-dGTPがある。8-oxo-dGTPaseは, 8-oxo-dGTPを取り除く作用をしている(14)。本酵素発現の上昇は, 8-oxo-dGTP生成が亢進し, それに対する反応性上昇と解釈される。今回PDでは全例大部分の黒質細胞で8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGの免疫染色が亢進しており, DNAに対する酸化障害が亢進していることが示された。更に興味ある点は, 8-oxo-dGは核内には免疫染色は確認されず, 細胞質に認められた。このことはミトコンドリアDNAにおいて酸化障害が亢進していることを示し, PDにおけるミトコンドリア障害とよく一致する所見ではないかと思われる。即ちPDにおいては, ミトコンドリア呼吸障害と共に, ミトコンドリアにおける酸化ストレスがアポトーシス誘導の強力なシグナルになっていることが推定される。

しかし, 黒質のような小さな剖検材料でアポトーシスの存在を直接証明することは容易ではない。アポトーシスの最もよい指標とされるDNAの電気泳動によるladderingを証明するには, 組織量が充分でない。そこで, 今回更に, 間接的ではあるが, アポトーシスの制御をミトコンドリアにて行っている重要な蛋白であるBcl-2, Bcl-xL, Baxの発現を検討した。Bcl-2, Bcl-xLは, ミト

コンドリア膜, 核膜, 網内系に発現していてアポトーシスを抑制する蛋白である(15)。一方Baxはアポトーシスを誘導する。今回の検討で, PDにおけるBcl-2, Baxの発現量には対照に比較して有意差はなかったが, Bcl-xLについては, PDで発現量の低下を認めた。Bcl-xLは, Bcl-2に似た作用を持つBclファミリーの蛋白であるが, 中枢神経系ではBcl-2よりも重要であると云われる(16)。Bcl-xLの発現量低下の機序は, 今後つめねばならない問題であるが, 単なる変性に二次的変化でないことは, Bcl-2, Baxの発現量に差がないことを見れば明らかである。Bcl-xLの低発現は, PDにおける黒質神経細胞がアポトーシスに陥りやすいことを支持する所見と考えられる。アポトーシス同時に検索したPSPにはこのような変化は見られず, PDにおける神経細胞死の機序には, やはり特有のものがあると思われる。海外からはアポトーシスを阻止する転写因子の一つNF $\kappa$ Bの黒質神経細胞核内での発現がPDで上昇しているとの報告があり(17), アポトーシス関連蛋白の発現が多数動いていることは, PDにおけるアポトーシスの存在を支持する所見と思われる。

#### 文 献

- 1) Mochizuki H, et al: J Neurol Sci 137: 120-123, 1996
- 2) Yoritaka A, et al: Proc Natl Acad Sci USA 93: 2696-2701, 1996
- 3) Gold R, et al. Lab Invest 71: 219-225, 1994
- 4) Kerr JFR, et al: Br J Cancer 26: 239-257, 1972
- 5) Tatton WG, et al. J Neural Transm (Suppl) 49: 245-268, 1997
- 6) Mizuno Y, et al. J Neurochem: 71: 893-902, 1998
- 7) Shimizu S, et al. Oncogene 13: 21-29, 1996
- 8) Marchetti P, et al. J Immunol 157: 4830-4836, 1996
- 9) Kitajima I, et al. Biochem Biophys Res Commun 204: 244-251, 1994
- 10) Yoneda M, et al. Biochem Biophys Res Commun 209: 723-729, 1995
- 11) Uchida K, et al. Proc Natl Acad Sci USA 89: 4544-4548, 1992
- 12) Cheng KC, et al. J Biol Chem 267: 166-172, 1992
- 13) Shibutani S, et al. Nature 349: 431-434, 1991
- 14) Oda H, et al. J Biol Chem 272:17843-17850, 1997
- 15) Vaux DL, et al. Nature 335: 440-442, 1988
- 16) Blomer U, et al. Proc Natl Acad Sci USA 95: 2603-2608, 1998
- 17) Hunot et al. Proc Natl Acad Sci USA 94: 7531-7536, 1997

# パーキンソン病とサイトカイン・神経栄養因子 —MPTP パーキンソニズムマウスの線条体における IL-1 $\beta$ の増加と NGF の減少—

永津 俊治<sup>1)</sup> 一瀬 宏<sup>1)</sup> 茂木 真希雄<sup>2)</sup> 戸荊 彰史<sup>2)</sup> 小川 松夫<sup>3)</sup> 中野 今治<sup>3)</sup>

## はじめに

パーキンソン病は、他の神経変性疾患と共通して、特定の神経細胞（黒質線条体ドーパミンニューロン）が死に至り、線条体で神経伝達物質ドーパミンが減少して発病する。パーキンソン病における黒質線条体ドーパミンニューロンの神経細胞死は、素因遺伝子と神経毒のような環境因子との相互作用によっておこると推定されている。

従来、脳は免疫寛容であり、免疫反応のサイトカイン類は神経細胞死に関与しないと推定されてきた。しかし、脳のグリア細胞がサイトカイン類を産生し、サイトカイン受容体が脳のニューロンやグリアに存在しており、神経変性疾患の神経細胞死においてもサイトカイン類や神経成長因子（ニューロトロフィン）類が関与するのではないかと推定される。ドーパミンニューロンの培養細胞系でニューロンの生存維持と神経細胞死に関連するサイトカイン類や神経栄養因子類が検索されている。サイトカイン類は神経細胞死をおこすと共に、神経栄養因子としても働くことが明らかとなっている。我々は、パーキンソン病におけるサイトカイン類・神経栄養因子類の変化を追求してきた。我々はパーキンソン病剖検脳（線条体）、脳室脳脊髄液（ventricular cerebrospinal fluid, VCSF）、脊椎脳脊髄液（lumbar CSF, LCSF）について、我々が確立した高感度エンザイムイムノアッセイ（EIA）<sup>1)</sup>によって、サイトカイン類、神経栄養因子類を測定した。

平成8年度の報告で、パーキンソン病死後脳（線条体）でTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、EGF、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1が対照脳と比べて有意に増加していること、VCSFとLCSFで、TNF- $\alpha$ の濃度がパーキンソン病で、非パーキンソン症候群、正常対照群と比べて有意に増加していることを報告した<sup>2-7)</sup>。

サイトカイン類や神経栄養因子類の増加は、パーキンソン病における神経細胞死を代償する二次反応と推定されるが、サイトカイン類はProgrammed Cell Death (apoptosis) を誘導するので、神経細胞死の原因である可能性もある。

パーキンソン病における神経細胞死がProgrammed Cell Death (apoptosis) か否かは未定であるが、我々は平成9年度の研究で、パーキンソン病死後脳（線条体）、VCSF、LCSFについて、apoptosis 関連タンパク質のbcl-2、soluble Fas (sFas) をEIAによって検索して、bcl-2もsFasもパーキンソン病死後脳線条体で増加することを報告した<sup>8-10)</sup>。bcl-2はapoptosisを抑制し、Fasはapoptosisを誘導する。sFasはFas分子の膜貫通部分を欠くタンパク質であり、生理的役割は完全には解明されていないが、apoptosisに関連すると推定されている<sup>11,12)</sup>。

平成11年度の研究で、パーキンソン病死後脳、VCSF、LCSFにおけるサイトカイン類の変化と同じ変化が、パーキンソン病モデル動物の脳でもおこるかどうかを検討した<sup>13)</sup>。

## 方法

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)を連続投与してパーキンソン病モデルマウスを作製した。マウスで黒質線条体ドーパミンニューロンを完全に破壊す

- 1) 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所  
分子遺伝学  
2) 愛知学院大学 歯学部 薬理学  
3) 自治医科大学 神経内科

ることは困難である。我々は Fukuda ら<sup>14)</sup>のマウスにおける MPTP の連続投与方法を用いた。マウス (C57BL/6J) に MPTP を 30mg/kg/day、13 日間連続して腹腔内注射した。対照マウスには生理的食塩水を注射した。MPTP 投与マウス脳を最後の MPTP 注射の 5 日後に採取した。脳は迅速に採取氷冷して、線条体 (尾状核/被殻) と前頭葉を切り出した。0.32 M sucrose / 100  $\mu$ M phenylmethylsulfonyl fluoride / 50  $\mu$ g per ml leupeptine / 50  $\mu$ g per ml pepstatin / 50  $\mu$ g per ml antipain でホモジネートとした。15000  $\times$ g、10 分間遠心分離し、上清を分析した。サイトカインとして IL-1 $\beta$  を、神経栄養因子として NGF を、EIA 法で測定した。IL-1 $\beta$  の抗体は R & D (Minneapolis, U.S.A.)、NGF の抗体は Boehringer (Manheim, Germany) を使用した。タンパク質量は Bradford 法<sup>15)</sup>により測定した。

## 結 果

MPTP 投与マウスは、Fukuda et al<sup>14)</sup>の報告したように組織学的にパーキンソン病と類似していた。

IL-1 $\beta$  濃度は表 1 に示すように対照マウスで前頭葉で濃度が高く、線条体では低かった。MPTP マウスの線条体で約 23 倍と著明に増加した ( $p < 0.005$ )。これに対して MPTP マウス前頭葉では IL-1 $\beta$  濃度は変化がなかった。

NGF 濃度も表 2 に示すように対照マウスで前頭葉で濃度が高く、線条体では低かった。MPTP マウスの線条体で NGF は約 50%減少した ( $p < 0.05$ )。前頭葉では有意な変化がみられなかった。

## 考 察

我々は前報で、パーキンソン病脳線条体で各種のサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1)、apoptosis 関連タンパク質 (bcl-2、sFas) が増加することを報告した<sup>1-10)</sup>。パーキンソン病の患者はいずれも L-DOPA を投与されていたので、サイトカイン類の変化は、L-DOPA の二次的影響である可能性も考えられた。本研究で MPTP マウスの線条体で IL-1 $\beta$  が著明に増加することが立証された。この MPTP マウスでの IL-1 $\beta$  の増加はパーキンソン病死後脳の成績とよく一致しており、死後脳での IL-1 $\beta$  の増

加は L-DOPA 投与の二次的反応ではないことを示唆する。

本研究で MPTP マウスの線条体で NGF の有意な減少が初めて立証された。MPTP マウスでの IL-1 $\beta$  の増加と、NGF の減少は線条体に部位特異的であった。

パーキンソン病脳線条体での IL-1 $\beta$  の増加、NGF の減少は、MPTP マウスにおける黒質線条体ドーパミンニューロンの神経細胞死に密接に関連していることが推定される。MPTP による IL-1 $\beta$  の増加は inducible NO synthase (iNOS) を誘導、活性化させて、NO を放出して酸化ストレスによって reactive oxygen species (ROS) を生成し、ミトコンドリアの complex 1 を抑制して apoptosis による神経細胞死をおこすであろう。また NGF の減少も apoptosis による神経細胞死をおこすと推定される。

サイトカインによりおこる apoptosis がパーキンソン病の神経細胞死の原因とすれば、免疫抑制剤による新しい神経細胞保護療法の可能性が考えられる。

## 文 献

- 1) Mogi M et al : Anal Biochem 138 : 125-132, 1984
- 2) Mogi M et al : Neurosci Lett 165 : 208-210, 1994
- 3) Mogi M et al : J Neural Transm [P-D Sect] 9 : 87-92, 1995
- 4) Mogi M et al : Neurosci Lett 180 : 147-150, 1994
- 5) Mogi M et al : Neurosci Lett 211 : 13-16, 1996
- 6) Mogi M et al : J Neural Transm 103 : 1077-1081, 1996
- 7) Mogi M et al : J Neural Transm 103 : 129-132, 1995
- 8) Mogi M et al : Neurosci Lett 215 : 137-139, 1996
- 9) Mogi M et al : Neurosci Lett 220 : 195-198, 1996
- 10) Nagatsu T & Mogi M : Adv Behav Biol 49 : Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases (Fisher A, Hanin I, Yoshida M, Eds), Plenum, New York, pp.407-412, 1998
- 11) Cheng J et al : Science 263 : 1759-1762, 1994
- 12) Nagata S & Goldstein P : Science 267 : 1449-1456, 1995
- 13) Mogi M et al : Neurosci Lett 250 : 25-28, 1998
- 14) Fukuda T et al : Brain Res 728 : 274-276, 1996
- 15) Bradford MM : Anal Biochem 72 : 248-254, 1976



表1 IL-1 $\beta$  content in the brain from control and MPTP-treated mice

Brain region	Control mice (pg / mg protein)	MPTP mice
caudate + putamen (8)	0.055 $\pm$ 0.055 (100%)	1.277 $\pm$ 0.233* (2322%)
frontal cortex (8)	0.492 $\pm$ 0.187 (100%)	0.560 $\pm$ 0.131 (114%)

\*p<0.005

表2 NGF content in the brain from control and MPTP-treated mice

Brain region	Control mice (pg / mg protein)	MPTP mice
caudate + putamen (8)	16.8 $\pm$ 3.7 (100%)	9.1 $\pm$ 1.4* (54%)
frontal cortex (8)	114.0 $\pm$ 23.8 (100%)	147.3 $\pm$ 36.1 (129%)

\*p<0.05

# パーキンソン病： $\alpha$ -synuclein/NACP の蓄積と細胞死

高橋 均<sup>1)</sup> 若林 孝一<sup>2)</sup>

## はじめに

近年、神経変性疾患における遺伝子異常の発見が相次いで報告されている。このような神経変性疾患においては、それぞれに特徴的な神経細胞内封入体、insoluble aggregates の認められることが重要な病理形態学的所見である。<sup>1)</sup> 1997年、一部の家族性パーキンソン病においてはその責任遺伝子の異常として $\alpha$ -synuclein の変異が同定された。<sup>1)</sup> 本ワークショップでは、パーキンソン病における $\alpha$ -synuclein/NACP の蓄積と細胞死について、これまでのわれわれの研究と併せ、論じてみたい。

## パーキンソン病と Lewy 小体

パーキンソン病は、1817年、英国医師 James Parkinson によってはじめて記載された疾患とされている。それから100年近く過ぎ、1912年、Lewy は無名質と迷走神経背側核の神経細胞内に、その後、彼の名をとって Lewy 小体と呼ばれるようになる特徴的な封入体を報告した。彼が報告した神経細胞内封入体であるが、その形態、神経細胞内での存在様式、また、一部は軸索と思われる神経突起内にも同じ性状の構造物 (Lewy neurites) が出現していることなど、当時既に極めて詳細な観察がなされている。Lewy 小体は、電顕的には、中心部は vesicular な構造物が密に詰まっており、その周囲はニューロフィラメントよりやや太い、しばしば顆粒状にみえる線維性構造物が放射状に認められる。

さて、このような Lewy 小体は、実際、どのような分布を示すのか、黒質、青斑核、さらには大脳皮質、末梢交感神経節と、それは広範に認められる。最近では、消化管神経節を含め、各臓器に分布する末梢神経系にも Lewy 小体として良い構造物が出現していることが分かった。<sup>2)</sup>

ところで、Lewy 小体がパーキンソン病においてなぜ重要な構造物に成り得るのか。それは、1919年、Tretiakoff の黒質の病理にはじまるが、Lewy 小体の

出現と同時に、これらの部位には必ず神経細胞の脱落、つまり、今日的に言えば、神経細胞死という現象が引き起こされているということに他ならない。例えば、黒質では、メラニン含有のドパミン神経細胞が高度に消失、それは、腹外側部で最も強いという決まったパターンを示す。そして、Lewy 小体もこの部で早期から出現することが分かっている。と言うことで、パーキンソン病は、神経病理学的には以下のような疾患として定義される；Parkinson's disease is defined by nerve cell loss in the substantia nigra and various other regions of the nervous system, and by the presence of Lewy bodies and Lewy neurites.<sup>3)</sup> このような病理像を示さないパーキンソン病はないと言えるし、臨床的側面からは黒質の変化がかなり重要かも知れないが、黒質だけ侵されるなどというパーキンソン病は存在しないとも言える。また、Lewy 小体を認めない、などというパーキンソン病もない。

従って、神経細胞死を含めたパーキンソン病の病態の解明ということになると、病理形態学的見地に立てば、Lewy 小体の形成機序の解明が最も大きなテーマのひとつであると言える。

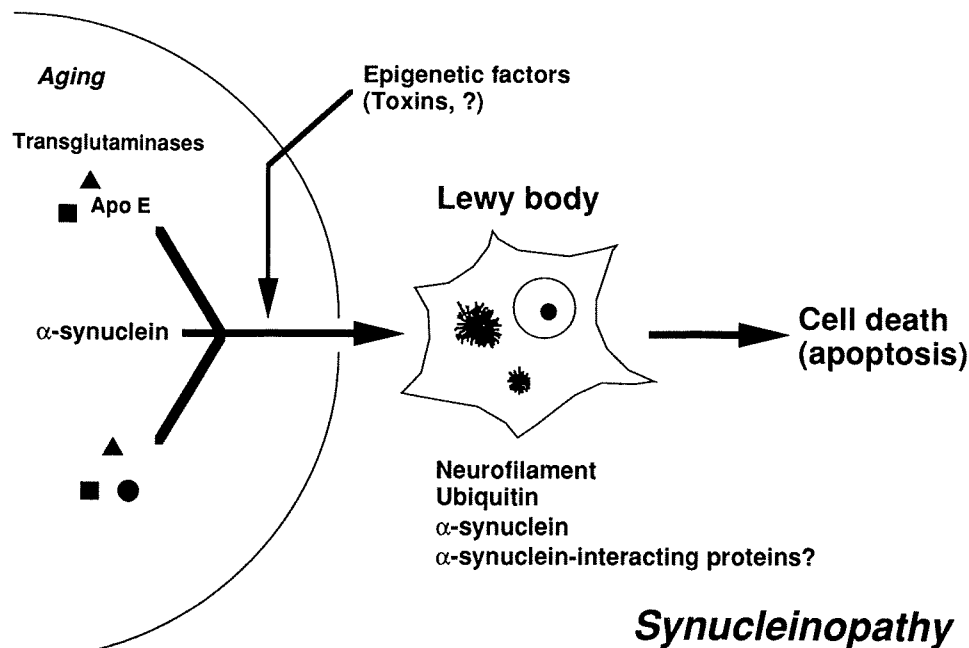
## Lewy 小体と $\alpha$ -synuclein/NACP

Lewy 小体は上述したように電顕的には主にニューロフィラメントよりやや太い、しばしば顆粒状にみえる線維性構造物であるが、これまで種々試みられてきた免疫組織化学的検索では、ほぼコンスタントに見出されるものは、ニューロフィラメントとユビキチンである。<sup>4)</sup> 従って、Lewy 小体の形成には、何らかのニューロフィラメントの異常、そしてそのユビキチン化という過程の存在が考慮されてきた。

1997年、一部のパーキンソン病の家系に $\alpha$ -synuclein 遺伝子に変異が存在し、それがその家系のパーキンソン病の責任遺伝子異常である、との報告がなされた。<sup>1)</sup> この発見そのものも画期的なものであったが、その後、この $\alpha$ -synuclein なるタンパクに対する抗体を用いた免疫組織化学は、家族性を示さない、最も頻度の高い神経変性疾患のひとつとされる孤発性のパーキンソン病の Lewy 小体や Lewy neurites を染

<sup>1)</sup>新潟大学脳研究所病理学分野

<sup>2)</sup>同 脳疾患解析センター



め出すということになった。<sup>5,6)</sup> つまり、 $\alpha$ -synuclein 遺伝子に異常がないいわゆるパーキンソン病においても、このタンパクが Lewy 小体形成に強く関わっていることが示された。

$\alpha$ -synuclein は正常ではシナプス末端に局在する可溶性のタンパクとされているが、<sup>7)</sup> その免疫組織化学では、シナプス末端を認識していると考えられるニューロピルの顆粒状陽性染色に加え、線維性構造物としての Lewy 小体が強陽性に染色された。詳細に観察すると、単に Lewy 小体が染め出されているにとどまらず、通常の染色では、一見全く正常に映る神経細胞の胞体が染色されたり、さらに胞体の一部により強い染色を示し、そこには異常な線維性構造物が凝集しはじめたのかとも見えるようなもの (pale body あるいはその前段階の構造物) まで様々である。つまり、ニューロフィラメントやユビキチンの免疫染色では認識されなかった異常、Lewy 小体形成以前の異常、そしてそれは Lewy 小体形成へと発展する一連の異常が、この  $\alpha$ -synuclein の免疫染色によって捉えられたことになる。<sup>6)</sup>

Lewy 小体のどのような構造物が  $\alpha$ -synuclein に陽性なのか。免疫電顕的に観察すると、正に Lewy 小体を構成しているニューロフィラメントよりやや太い、顆粒状にみえる線維性構造物に陽性反応が認められ

た。<sup>6)</sup> ニューロフィラメントとみられる構造物は全く陰性であった。つまり、Lewy 小体を構成する異常なフィラメントそのものが  $\alpha$ -synuclein でできている、さらに言及すれば、本来シナプス末端に存在する可溶性のタンパクである  $\alpha$ -synuclein が、何らかの原因で不溶性の線維性構造物として胞体あるいは突起内に蓄積、ユビキチン化されているのが Lewy 小体や Lewy neurites である、ということを示唆される結果となった。

既に似たような報告があるが、<sup>8,9)</sup> われわれもリコンビナントの  $\alpha$ -synuclein を 37℃、1 週間、無菌の条件下で試験管内で放置したものを電顕で観察したが、そこには径 12~25 nm の線維性構造物が認められた。このタンパクは本来凝集して線維性構造を造り得るタンパクである可能性が考えられている。

#### Lewy 小体の形成と細胞死

ところで、このような Lewy 小体を持った神経細胞は最終的にはどうなるのか。われわれは、この辺については検討していないが、DRPLA の *in vitro* の実験は興味深い。<sup>10)</sup> つまり、DRPLA cDNA を操作し、様々な欠失変異体を作製し、培養細胞で発現させた実験である。伸長したポリグルタミンを含む部分蛋白は核周囲および核内に線維性凝集体を形成、最終的には、

アポトーシスの形をとって死んでいく、ということが示された。この線維性凝集体形成→アポトーシスは transglutaminase inhibitors によって抑制されるという。もちろん、DRPLA は変性疾患とはいえ、パーキンソン病とは全く異なる疾患であるが、線維性構造物の凝集を伴う神経変性、<sup>11)</sup> そして最終的にはアポトーシスによる細胞死という現象は恐らくパーキンソン病にも当てはまるように思われる。事実、最近、パーキンソン病におけるアポトーシスの存在を示唆する報告が散見される。<sup>12-14)</sup> アポトーシスに陥る神経細胞のどれくらい(全て?)が Lewy 小体形成という過程を経るのか、<sup>15)</sup> 今後病理形態学的に詳細にする必要がある。

パーキンソン病における細胞死の過程について、これまでの知見を基にその可能性を図に示した。パーキンソン病では、epigenetic factors のひとつとしてよく環境因子が問題にされてきた。1817年、産業革命以後になってはじめて記載された疾患ということで、それもあるほどと言えなくもないが、実際、どれほど関与しているものか。レオナルド・ダ・ビンチがすでにパーキンソン病なるものを記載していたとの話もある。<sup>16,17)</sup> パーキンソン病は加齢(これも何らかの内因する遺伝子的要素が強く反映している現象と思われるが)を含め、多くの遺伝子の関与する複合遺伝子病とも呼べるような疾患ということはないのだろうか。

#### おわりに

パーキンソン病は以前から加齢とともに増加する疾患との見方があるが、われわれの教室のこれまでの剖検例におけるその割合をみてもその傾向が容易に見て取れる。また、臨床的にはパーキンソン病との診断がなくても、黒質などに Lewy 小体と神経細胞脱落を認めたいわゆる incidental あるいは presymptomatic なパーキンソン病の症例も加齢とともに増加してきている。<sup>18)</sup> 今後、高齢者が増すにつれてパーキンソン病もどんどん増えていくものと予想される。細胞死の問題を含む病態の解明が急がれるが、その一方で治療に向けた種々の試行もまた重要な時期にきているような気がする。

#### 文 献

- 1) Hardy J, Gwinn-Hardy K: Science 282: 1075-1079, 1998
- 2) Iwanaga K, et al: Neurology (in press)
- 3) Forno LS: J Neuropathol Exp Neurol 55: 259-272, 1996
- 4) Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C: J Neuropathol Exp Neurol 52: 183-191, 1993
- 5) Wakabayashi K, et al: Neurosci Lett 239: 45-48, 1997
- 6) Wakabayashi K, et al: Acta Neuropathol 96: 445-452, 1998
- 7) Clayton DF, George JM: Trends Neurosci 21: 249-254, 1998
- 8) Hashimoto M, et al: Brain Res 799: 301-306, 1998
- 9) Conway AK, Happer JD, Lansbury PT: Nat Med 4: 1318-1320, 1998
- 10) Igarashi S, et al: Nat Genet 18: 111-117, 1998
- 11) Goedert M, Spillantini MG, Davies SW: Curr Opin Neurobiol 8: 619-632, 1998
- 12) Mochizuki H, et al: J Neurol Sci 137: 120-123, 1996
- 13) Tompkins MM, et al: Am J Pathol 150: 119-131, 1997
- 14) Anglade A, et al: Histochem J 12: 25-31, 1997
- 15) Tompkins MM, Hill WD: Brain Res 775: 24-29, 1997
- 16) 平山恵造, 高橋 昭, 東儀英夫, 今井壽正: 治療学 22: 317-331, 1989
- 17) Calne DB, Dubini A, Stern G: N Engl J Med 320: 594, 1989
- 18) 若林孝一, 高橋 均, 小柳清光, 生田房弘: 脳神経 45: 1033-1038, 1994

## ワークショップ(2)

# パーキンソン病の遺伝子治療

## ---その基礎研究について---

中野今治

遺伝子治療とは、疾病の治療を目的として人の体内に遺伝子あるいは遺伝子を導入した細胞を投与することである。本稿ではその概略に触れるとともに、われわれが行っているパーキンソン病の遺伝子治療の基礎実験のデータを示す。

### 【1】アデノ随伴ウイルスベクター

遺伝子導入法には大きく分けて物理化学的遺伝子導入法、生物学的遺伝子導入法、ハイブリッドベクター法がある。本稿で言及するのは生物学的遺伝子導入法で、これにはウイルスベクターを使う。ベクターウイルスとしてはレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV) などが知られているが、それぞれ利点と欠点を持っている。

われわれはAAVベクターを使用しているが、その利点としては、まず病原性や抗原性がなく安全であること、宿主域が広いこと、宿主の染色体DNAへの組み込みが可能であること、ニューロンや筋肉細胞などの非分裂細胞にも導入が可能であること<sup>1) - 3)</sup>が挙げられる。欠点としては、パッケージできるDNAサイズに制限があること、製造法がまだ確立していないこと、ウイルスベクターにするとAAVS1領域に特異的に組み込まれる性質が失われるという点があげられる。野生のAAVは人の特定の染色体領域 (AAVS1領域) に組み込まれる性質を有しているが、ベクターになるとこの特性を失う。つまり、AAVに組み込まれた遺伝子は染色体には入るけれどもどこに入るかわからなくなり、導入された細胞に突然変異を誘発する可能性が生じる。

ここで、AAVと他の代表的ベクターウイルスの特性を比較しておく。レトロウイルスでは非分裂細胞への導入はできないのに対し、アデノウイルスと

AAVではそれが可能である。アデノウイルスは病原性や抗原性を有し<sup>4)</sup>て細胞毒性や免疫反応を示し、レトロウイルスも病原性を有する可能性がある。これに対し、上述のようにAAVにはこのような性質はなく安全である。一方、レトロウイルスではベクターの作製法は確立されており、アデノウイルスでもほぼ確立しているのに対し、AAVではまだ開発段階である。

AAVベクターの作製にはAAVの増殖のためにアデノウイルス粒子が必要であったが、今はアデノウイルスDNAの一部があれば増殖可能な方法が開発されている。導入したい遺伝子 (治療遺伝子) をAAVのDNAのITR (inverted terminal repeat) で挟み、プラスミドに組みこんでベクタープラスミドとする。一方、AAVの増殖に必要な遺伝子であるRepとCapを別のプラスミドに組み込みヘルパープラスミドとする。この3者、アデノウイルスDNAの一部、ベクタープラスミド、そしてヘルパープラスミドを293細胞にtransfectすると、293細胞の中で治療遺伝子が増殖し、また、AAVの形成に必要な蛋白が合成されて、治療遺伝子を組み込んだAAVが産生される。

### 【2】パーキンソン病の遺伝子治療

#### 1. Dopamine合成<sup>5)</sup>

Dopamineはtyrosineからl-dopaを経て合成される。Tyrosineからl-dopaへの段階ではtyrosine hydroxylase (TH)が働き、l-dopaからdopamineが合成される段階ではaromatic l-amino acid decarboxylase (AADC)が作用する。われわれは、パーキンソン病の遺伝子治療実験の最初の試みとして、AAVベクターを使ってこの2酵素の遺伝子の導入実験を行った<sup>5)</sup>。

まず、in vitroで、293細胞にTHとAADCの遺伝子を別々に導入し、これらの酵素の合成とカテコ-

-----  
自治医科大学神経内科

ルアミン産成を調べた。遺伝子導入された293細胞がTHとAADCを産生していることがwestern blottingでまず確認された。カテコールアミンの産生に関しては、次のようなことがわかった。TH遺伝子のみを導入したときにはl-dopaは産生されるがdopamineは産生されない。これにAADC遺伝子を重複して導入すると、dopamineが産生され、TH:AADCが1:1になるまでAADC遺伝子量を増やすにつれてdopamine産生量が増え、これに応じてl-dopaが減少した(図1)。

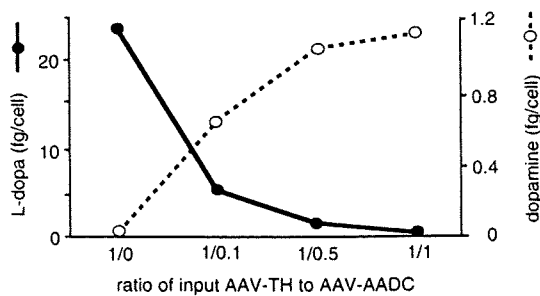


図1. AAV-THとAAV-AADCの量比を変えて293細胞に導入したときのl-dopaとdopamineの産生量<sup>5)</sup>。

次に培養したラット線条体細胞にTHとAADC遺伝子をtransfectすると、THとAADCの両者を合成している細胞の存在が免疫組織学的に確認された。また、遺伝子導入した培養線条体細胞によるl-dopaとdopamine産生量を測定すると、dopamineはTH遺伝子単独導入では0.20 fentgram未満(測定限界未満)だがAADC遺伝子を重複導入すると0.91 fentgramと上昇した。逆に、l-dopaはTH遺伝子単独では3.14 fentgramだが、AADCの遺伝子を重複発現させるとdopamine合成に使用されて0.91 fentgramに減った。つまり、重複導入によってdopamineがより効率的に産生されたことがわかる。

次いで大腸菌の $\beta$ -galactosidaseをコードするLacZ遺伝子を組み込んだAAVベクターをステレオ装置を使ってラットの線条体に導入し、LacZ遺伝子の発現をX-gal染色でみたところ良く発現していた。AAVベクターに組み込んだ遺伝子が線条体で発現することがわかったで、TH遺伝子とAADC遺伝子を別々に組み込んだAAVベクターを、パーキンソン病のモデルラットの線条体にステレオ装置を使って導入した。

パーキンソン病モデルラットの作成は次のように行う。ラットの黒質線条体系路が走るmedial fore-brain bundleに側だけ6-OHDAを注入し、これを破壊する。そうすると線条体のドパミンが枯渇して、パーキンソン病と生化学的に似た状態が作られるが、このラットに低濃度のapomorphineを投与すると健常側に向かって回転運動を始める。手術側の線条体でdopamineが産生されるとこの回転運動が軽減する。手術側の線条体にTHとAADCの遺伝子を導入することによりapomorphineによる回転運動数が少なくなれば、そこでdopamineが産生されたこと、すなわちTHとAADCの遺伝子が発現したことが推測される。実際、TH遺伝子を導入するとこの回転数が減り、THとAADCの両方の遺伝子を導入すると回転数がさらに減少した(図2)。これらのラットに

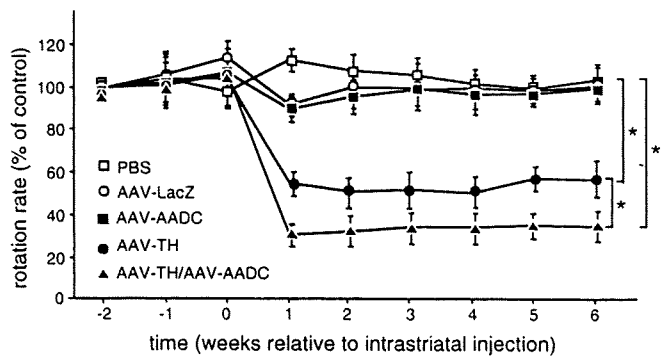


図2. パーキンソン病モデルラットのAPOモルフィンによる回転に及ぼすAAV-AADC、AAV-TH、AAV-TH/AAV-AADC感染の効果。AAV-AADC感染では効果はないが、AAV-TH感染で回転数が有意に減り、AAV-TH/AAV-AADCの重複感染でさらに減少する<sup>5)</sup>。

において、遺伝子導入した側の線条体を免疫組織学的に検索すると、THを産生している細胞とAADCを産生している細胞とが同定され、しかも、その多くはこの両者を産生していた。これらの細胞は形態から神経細胞と推測された。

これまでではdopamine産生に関してTHとAADCに注目してきたが、THの補酵素であるtetrahydrobiopterinの多寡もそれに影響する。したがって、その合成系路の酵素であるGTP cyclohydrolase I (GCH)もdopamine産生に関与することが予想される。そこで、予備的実験として293細胞にAADCの遺伝子に加えてGCH遺伝子も導入してみたところ、3者を重複感染させた細胞ではTH、AADC、GCHが産生されていることがwestern blottingで確認された。

## 2. 神経細胞保護<sup>5)</sup>

パーキンソン病の遺伝子治療の戦略として、dopamine産生の増加のほかにdopamine産生ニューロンを保護する方法がある。それには、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)やbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)などの神経栄養因子の遺伝子を中脳に導入し、その産生を高めて黒質ニューロンを守ることが考えられる。

GDNF遺伝子を組み込んだAAVベクターを293細胞にtransfectするとGDNFが産生されることがWestern blockで確認された。次に、導入したGDNF遺伝子の発現を神経保護作用の面からみてみた；胎生14日めのWistar ratの中脳腹側を無血清で培養し、GDNF遺伝子を組み込んだAAVベクター(AAV-GDNF)を加えて培養1週めと2週めに固定して抗TH抗体による免疫染色を行った。対照としてMock、AAV-LacZ, recombinant human GDNFを加えたものを用いた。AAV-GDNFを加えた培地では対照に比べて1週目も2週目も生き残った細胞数が有意に多くなっており、recombinant human GDNFを加えた場合と同等の神経保護効果とともに神経突起伸張作用を示した。

### 【3】今後の課題

パーキンソン病遺伝子治療のために、今後なすべきことは以下の点である。(1) 遺伝子導入用ベクターシステムの改良；現在のベクターでは十分な濃度が得られず、発現効率があまりよくないので、効

率をあげることが必要である。(2) 導入する遺伝子の決定；とくに神経保護作用を期待するときに、どの神経栄養因子にするのか、またその組み合わせはどうするのかを決めて行かねばならない。(3) ベクターの脳内投与法の確立；一度に注入するのが良いのか、あるいはポンプを使って持続的に注入した方がよいのかなどを決めなければならない。(4) 治療効果を持続維持する方法の開発；一旦、遺伝子を導入しても現在ではその発現期間は限られているために効果が減弱する。長期にわたって遺伝子を発現させる方法を開発しなければならない。(5) パーキンソン病モデル動物のレベルアップ；われわれはこれまでのラットでの実験を行ってきたが、MPTP投与によるパーキンソン病サルへの遺伝子導入実験を計画している。

この研究は以下の人々との共同研究である。小川松夫<sup>1)</sup>、樊東昇<sup>1)</sup>、沈揚<sup>1)</sup>、藤本健一<sup>1)</sup>、池口邦彦<sup>1)</sup>、村松慎一<sup>1)</sup>、長塚八重子<sup>1)</sup>、佐藤美江<sup>1)</sup>、永津俊治<sup>2)</sup>、卜部匡司<sup>3)</sup>、小澤敬也<sup>3)</sup> [1) 自治医科大学神経内科、2) 藤田保健衛生大学総合医学研究所、3) 自治医科大学分子生物学]

### 文献

- 1) Kaplitt MG et al: Nature Genet 8:148-154, 1994
- 2) Flotte TR et al: Gene Ther 2:357-362, 1995
- 3) Du B et al: Gene Ther 3: 254-261, 1996
- 4) Le Gal La Salle G et al: Science 259:988-990, 1993
- 5) Fan D-S et al: Human Gene Ther 9:2527-2535, 1998



# 運動ニューロン損傷モデルに対するグリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) 組換えアデノウイルス・ベクターの治療効果

渡部和彦<sup>1)</sup> 坂本 剛<sup>1,2)</sup> 大橋十也<sup>3)</sup> 竹島多賀夫<sup>4)</sup>  
 小柳清光<sup>1)</sup> 井上聖啓<sup>2)</sup> 衛藤義勝<sup>3)</sup>

## はじめに

グリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF)は、中脳ドパミン・ニューロン<sup>1)</sup>に加え、運動ニューロン<sup>2)</sup>に対しても強力な神経栄養活性を有することから、運動神経損傷や運動ニューロン疾患に対する治療効果が期待されている<sup>3)</sup>。動物実験では、運動神経の切断モデルにおいてGDNF蛋白の大量投与により治療効果を認めたとする報告が相次いでいる<sup>3)</sup>。しかし蛋白投与による治療効果は2週間程度と一過性であり、より持続的な投与方法として、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入が検討されつつある。これまでのところ、新生仔ラットの末梢神経切除による顔面神経核、脊髄前角の運動ニューロンの変性脱落に対して、GDNF組換えアデノウイルス 投与が有効であったとの報告がある<sup>4-7)</sup>。一方、成熟動物の運動ニューロン脱落モデル<sup>8)</sup>では、マウスの頸髄根引き抜き損傷に対するGDNF蛋白大量投与の有効性が示されている<sup>9)</sup>が、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入の効果に関しては検討されていない。本研究では、GDNF組換えアデノウイルスを作成し、成熟ラットの頸髄根引き抜き損傷モデルに対する組換えウイルスの治療効果について検討した。

## 方 法

(1) 組換えウイルス： ヒト培養アストロサイトよりクローニングしたGDNF cDNAを、アデノウイルス・ゲノムからE1A, E1B, E3遺伝子を欠損したウイルスDNAをもつ発現コスミドカセットpAxCAwt (東京大学医科研・斉藤泉先生より供与)<sup>10,11)</sup>に組込んだ。このコスミドカセットDNAと親ウイルスDNAを293細胞に co-transfectし、得られたウイルス液を 293細胞で継代し精製ウイルスAxCAhGDNFを得た<sup>12)</sup>。対照実験として、AxCALacZ ( $\beta$ -galactosidase発現組換えウイルス)<sup>13)</sup>を用いた。培養細胞に対するAxCAhGDNFの生物活性は、ラット胎仔ドパミン・ニューロン培養系<sup>14)</sup>及び、PC12細胞にGDNF

受容体(GFR $\alpha$ 1)をトランスフェクトして得られたPC12 $\alpha$ 9細胞を用いて確認した。

(2) 運動ニューロン損傷モデル：成熟Fisher 344 雄ラット (3カ月齢、体重220-280 g)の右第7頸髄神経節を前・後根を含め引き抜き除去したのち、局所の椎間孔にPBS、あるいはAxCAhGDNF (1 x 10<sup>8</sup> pfu)を浸したgelfoamを留置した。脊髄組織におけるGDNF およびGDNF受容体(GFR $\alpha$ 1, Ret)mRNAの発現はreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法により検討した。またウイルス感染の対照実験として、AxCALacZを同様に接種した。

(3) 組換えウイルスによる保護効果の判定：PBS接種群、AxCAhGDNF接種群ともに、1, 2, 4, 6, 8週後、4% paraformaldehydeで灌流固定した。第7頸髄の15 $\mu$ m厚凍結連続切片を作成、5枚毎の切片計25枚のNissl染色標本につき、灰白質IX層 (Rexed's lamina IX)において明瞭な核小体とNissl物質を有する大型神経細胞 (核径15 $\mu$ m以上)を運動ニューロンとし、その数を算定した。また、AxCALacZ接種群では、 $\beta$ -galactosidase組織染色を施行した。さらに、損傷後の運動ニューロンにおけるcholine acetyltransferase (ChAT) 抗原性の保持に対する組換えウイルスの影響をみる目的で、ChATに対する免疫染色(ABC法)を行った。

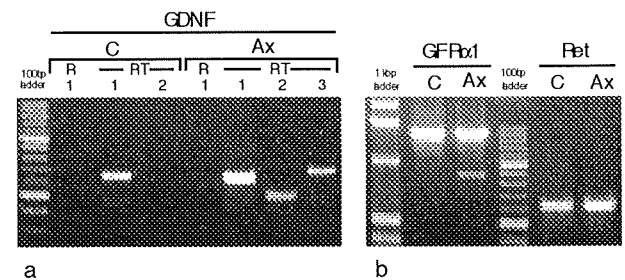


図1. 成熟ラット第7頸髄神経根引き抜き損傷1週間後の第7頸髄のRT-PCRによる解析。C: PBS接種, Ax: AxCAhGDNF接種。a) GDNF mRNAの発現。R: RNA-PCR, RT: RT-PCR。ラット, ヒトに共通 (1), ヒト特異的 (2), AxCAhGDNF特異的 (3) なprimer pairを使用。b) GFR $\alpha$ 1, Ret mRNAの発現。

1) 東京都神経科学総合研究所神経病理学研究部門  
 2) 東京慈恵会医科大学神経内科  
 3) 東京慈恵会医科大学小児科/DNA医学研究所遺伝子治療研究部門  
 4) 鳥取大学医学部付属脳幹性疾患研究施設脳神経内科

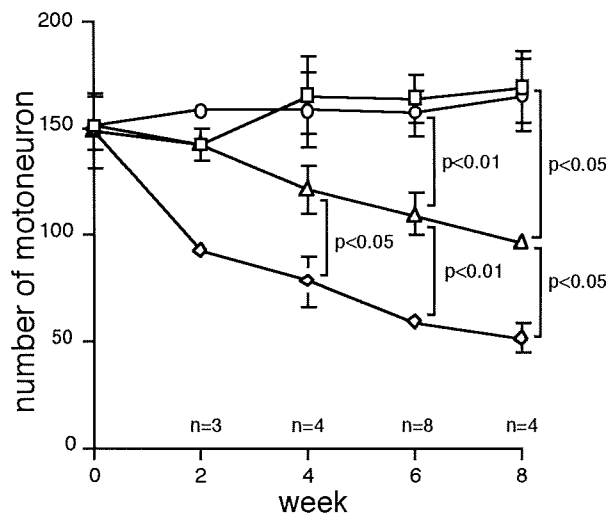


図2. 成熟ラット第7頸髄神経根引き抜き損傷後の第7頸髄前角運動ニューロン数を算定。

PBS接種群: 健常側(□), 傷害側(◇)。

Ax:AxCAhGDNF接種群: 健常側(○), 傷害側(△)。

p: Mann-Whitney's U test.

### 結果と考察

第7頸髄神経根引き抜き除去・AxCALacZ接種群では、傷害側前角運動ニューロンが $\beta$ -galactosidaseで明瞭にラベルされ、組換えアデノウイルスによって成熟運動ニューロンに外来遺伝子を導入し得ることが示された。

一方、RT-PCRでは、引き抜き損傷後のAxCAhGDNF接種により、脊髄組織に組換えウイルスによって導入されたヒトGDNF mRNAの発現を認めた。また、神経根引き抜きやウイルス接種の有無にかかわらず、脊髄組織では常にGDNF 受容体(GFR $\alpha$ 1, Ret)mRNAが陽性であった(図1)。成熟ラット脊髄前角の運動ニューロンはGFR $\alpha$ 1, Ret mRNAを強く発現していることが知られている<sup>15)</sup>。すなわち上記の結果から、引き抜き損傷モデルではAxCAhGDNFの局所接種が前角運動ニューロンでの外来性ヒトGDNFの産生を誘導し、autocrineあるいはparacrineな形で運動ニューロンに対する神経栄養効果が発現されると考えた。

引き抜き損傷後2-8週のPBS接種群では、障害側の前角は萎縮し、前角運動ニューロンの明瞭な脱落を認め(6週後 35.7 $\pm$ 3.1%, n=8)、グリオーシスを伴っていたが、AxCAhGDNF接種群では運動ニューロンの脱落が有意に抑制された(6週後 69.8 $\pm$ 5.0%, n=8)(図2)。なお、組換えウイルス接種に伴う脊髄組織の傷害反応や炎症反応は認められなかった。また、AxCAhGDNFの投与により、傷害側前角運動ニューロンにおけるChAT免疫反応性の低下が抑制された。

本研究から、成熟ラット頸髄運動ニューロン損傷において、GDNF組換えアデノウイルス接種により運動ニューロンの変性・脱落を抑制しうることが示された。

このことは、成人における運動神経損傷や運動ニューロン疾患に対するGDNF組換えアデノウイルスを用いた遺伝子治療の有効性を示唆している。一方、本研究ではその所見を認めなかったが、組換えアデノウイルスの問題点として、免疫源性、炎症惹起性が挙げられており、今後、より改良を加えた組換えウイルスを用いての実験的検討が必要と考えられる<sup>16)</sup>。また、脳由来神経栄養因子(BDNF)や毛様体神経栄養因子(CNTF)など他の神経栄養因子の組換えウイルスを併用することで、神経栄養効果の増強が期待される。さらに、組換えウイルスの傷害局所への接種の他に、運動ニューロンの支配筋への接種など、投与方法によっては効果がさらに改善される可能性がある。以上の点について、今後検討を重ねてゆきたいと考えている。

アデノウイルスベクターを供与下さいました東京大学医科学研究所・斎藤先生に深謝致します。

### 文 献

- 1) Lin L-FH, et al: Science 260:1130-1132, 1993.
- 2) Henderson CE, et al: Science 266:1062-1064, 1994.
- 3) Lapchak PA, et al: Cell Tissue Res 286:179-189, 1996.
- 4) Gimenez y Ribotta M, et al: J Neurosci Res 48:281-285, 1997.
- 5) Baumgartner BJ, et al: J Neurosci 17:6504-6511, 1997.
- 6) Baumgartner BJ, et al: J Neurosci Res 54:766-777, 1998.
- 7) Baumgartner BJ, et al: Exp Neurol 153:102-112, 1998.
- 8) Wu W: Exp Neurol 120:153-159, 1993
- 9) Li L, et al: Proc Natl Acad Sci USA 92:9771-9775, 1995
- 10) Kanegae Y, et al: Nucleic Acids Res 23:3816-3821, 1995.
- 11) Miyake S, et al: Proc Natl Acad Sci USA 93:1320-1324, 1996.
- 12) Watabe K, et al: J Neurochem 69(suppl):S200, 1997.
- 13) Ohashi T, et al: Gene Therapy 2:443-449, 1995.
- 14) Takeshima T, et al: J Neurosci Methods 67: 27-41, 1996.
- 15) Granzer GW, et al: J Comp Neurol 391:42-49, 1998.
- 16) Hermens WTJMC, et al: Prog Neurobiol 55:399-432, 1998.

# 複合剤によるALS治療：動物実験の成績を中心に

岩崎泰雄 池田 憲

## はじめに

癌や結核などを中心とする感染症においては多剤併用による治療が行われている。筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンが選択的に障害される代表的疾患であり、現時点においてはriuzoleが唯一effectiveな薬剤として認められている。これまでALSの治療においては種々の神経栄養因子(NTF)がトライアルされてきているが、明らかな効果を見出したものは存在しない。一方、NTFは単剤だけでは全ての運動ニューロンを保護できないという考えも存在し、運動ニューロンを死滅させないためには複数のNTFが必要だとする考え方の存在している<sup>1)</sup>。そこで、これまでに複数のNTFを用いて行われた動物実験について述べると共にその問題点、ならびに今後のdirectionについて考えてみたい。

## In vitroにおける成績

Arakawaら<sup>2)</sup>は運動ニューロン培養にて、IGF-I単独のみではあまり生存効果は長くないが、他のNTFと併用した場合、その生存効果が増したと報告している。また、bFGF+CNTFの組み合わせではほぼ100%ある一定期間、運動ニューロンが生存したと報告した。Martinouら<sup>3)</sup>は、同じ組み合わせのNTFを用い(FGF+CNTF, FGF+CDF/LIF)検討し、生存効果に何ら影響を与えなかったがChAT活性値を、それぞれ単独投与より増したと報告している。Wongら<sup>4)</sup>も、ChAT活性値を検討し、BDNF+NT-3では相乗効果が得られたが、BDNF+NT-4/5の組み合わせでは相乗効果は得られず、相乗効果の組み合わせを考える上で、それぞれ異なる作用を有した者同志を用いる必要があると述べている。Hughesら<sup>5)</sup>はArakawaら<sup>2)</sup>と同様にIGF-Iそのものの単独だけでは小さな効果しか得られないが、他のNTFを組み合わせで用いた場合、相乗効果が得られると報告している。

Hendersonら<sup>6)</sup>はGDNF, BDNF, CNTF, LIFいずれにおいても運動ニューロンに対してその生存効果を増すが、4者すべてを加えても、相乗効果が得られなかったと報告している。Zumら<sup>7)</sup>はChAT活性において検討を加え、GDNF+BDNF, GDNF+CNTF, BDNF+CNTF, GDNF+CNTF+BDNFの全ての組み合わせにおいて相乗効果が得られたと報告している。Arceら<sup>8)</sup>は生存効果について検討を加え、GDNF+CT-1, GDNF+CNTFにおいて相乗効果を認めたが、GDNF+LIFにおいては何ら相乗効果を認めなかったと報告している。

## In vivoにおける成績

In vivoにおける検討はfacialあるいはsciatic nerveのaxotomy modelにて行われている。Koliatsosら<sup>9)</sup>はfacial axot-

omy modelを用いてBDNF+NT-4/5の組み合わせにて実験を行ったが相乗効果は得られなかったと報告している。BDNF, NT-4/5ともにneurotrophin familyに属しているため、それぞれ別々のNTFを投与しても同じ受容体にその効果を発揮するため相乗効果が得られなかったと推測している。したがって相乗効果の実験においてはそれぞれ異なった種類のもの投与すべきであると考察している。Vejsadaら<sup>10)</sup>はsciatic nerve axotomy modelを用いてCNTF+BDNFにて実験を行ったが、何ら相乗効果は見られなかったと報告している。また彼らはsciatic nerve axotomy modelでは相乗効果がでにくく、相乗効果の実験には適していないのではないかと追言している。彼らはさらに、投与方法として皮下注射を行ったが、皮下注射では投与されたNTFが運動ニューロンに至る前にその効果を失ってしまうのではないかと述べている。G ravelら<sup>11)</sup>はfacial axotomy modelを用いてCNTF+BDNFの相乗効果について検討したが、ネガティブであったと報告している。Baumgartnerら<sup>12)</sup>はsciatic nerve axotomy modelを用いてadenovirusを用いてCNTF+BDNFの相乗効果について検討したが、それぞれ単独で用いた結果よりも、その効果が少なかったと報告しCNTF+BDNFでは保護効果がむしろ抑制されるのではないかと考察している。Vejsadaら<sup>13)</sup>はsciatic nerve axotomy modelを用いて実験を行いBDNF+GDNFをそれぞれ投与経路を変えることにより相乗効果が得られたと報告し、投与方法の重要性を指摘している。この様にin vivoの実験においてはin vitroに比べて期待すべき効果が出ていないのが現状である。また、CNTF+BDNFの組み合わせはむしろ抑制的に働くのではないかと指摘も一致していると考えられる。

## モデル動物での成績

Mitsumotoら<sup>14)</sup>はwobbler miceを用いて実験を行いCNTF+BDNFを投与することにより、進行を停止したと述べている。Haaseら<sup>15)</sup>はpmn miceを用いて実験を行いCNTF+NT-3の組み合わせでその生存効果を延長したと述べている。池田らはwobbler miceを用いてPC-SOD+L-NAMEの相乗効果を検討したが、ネガティブであったと報告している(未発表)。

## まとめ

動物実験においてNTFの相乗効果についての検討ではin vivoよりはin vitroの実験系の方が満足すべき結果が得られている様に思われた。Neurotrophin同志などほぼ同じ作用を有する者同志の併用は相乗効果が得にくく、それぞれ作用の異なった者同志の組み合わせの方が、より良い相乗効果が得られる期待がもたれた。In vivoにおいては投与方法をそれぞれ変えることにより相乗効果を発揮するものもあった。CNTF+B

DNFの組み合わせはaxotomy modelの系においては何ら相乗効果を得ていないが、wobbler miceを使った実験においては、進行を阻止しており、今後のALS治療を考える上で極めて興味深い結果と思われた。また、ALS患者においてヨーロッパではすでに併用療法がtrialされ、その結果もpreliminaryではあるが出始めている。どの種類の薬剤をどの経路で投与した時に一番効果が発揮できるかを確認することが極めて重要であり、かつ急務を要する。

#### 文献

- 1) Nishi R: Science 265: 1052-1053, 1994.
- 2) Arakawa Y et al: J Neurosci 10: 3507-3515, 1990.
- 3) Martinou J-C et al: Neuron 8: 737-744, 1992.
- 4) Wong V et al: Eur J Neurosci 5: 466-474, 1993.
- 5) Hughes RA et al: J Neurosci Res 36: 663-671, 1993.
- 6) Henderson CE et al: Science 266: 1062-1064, 1994.
- 7) Zum AD et al: J Neurosci Res 44: 133-141, 1996.
- 8) Arce V et al: J Neurosci 18: 1440-1448, 1998.
- 9) Koliatsos E et al: Proc Natl Acad Sci 91: 3304-3308, 1994.
- 10) Vejsada R et al: Eur J Neurosci 7: 108-115, 1995.
- 11) Gravel C et al: Nature Med 3: 765-769, 1997.
- 12) Baumgartner BJ et al: Exp Neurol 153: 102-112, 1998.
- 13) Vejsada R et al: Neuroscience 84: 129-139, 1998.
- 14) Mitsumoto H et al: Science 265: 1107-1100, 1994.
- 15) Haase G et al: Nature Med 3: 429-436, 1997.