

超大量メチルコバラミン筋注による ALS 治療の試み

梶 龍児

ALS の陰性徴候の意義

ALS の臨床症状における陰性徴候として、外眼筋や括約筋の麻痺が起りにくいことが知られている。これらの2つの系は、ヒトや高等なサルのみで特異に進化した直接皮質脊髓路の投射を持たない唯一のものである^{#1}。この事実は、本疾患が系統発生的に一番新しい投射路の選択的な変性であることを示している^{#2}。電気生理学的にも、ALS においては皮質脊髓路の中でも最も早く伝導するものが選択的に障害されやすいことが判明している^{#3}。また、この直接皮質脊髓路は、個体発生においても約10歳前後で完成する最も発現が遅い系の1つである。見方を変えれば、ALS は「個体発生で後に発現するものほど、疾病で先に失われやすい」という生物学的原則に従っている。

ALS と遺伝子の発現

ALS の病因については種々の説がある。例えば、一部の家族例に見られる異常 SOD1 遺伝子は、過酸化化合物の代謝の異常を通して DNA の損傷を来し、正常な遺伝子の発現を障害することも考えられている。また、ALS 以外の変性疾患でも、例えば triplet repeat 病における核内封入体は遺伝子の発現に影響を与えることが考えられている。

DNA のメチル化と遺伝子の発現

有核細胞においては、遺伝子の発現はある程度 DNA のサイトシン残基のメチル化の有無により調節されている。即ち、メチル化が進むと発現されにくくなり、メチル化が減少すると発現されやすい^{#4}。このメチル化のパターンは、種々の臓器で異なることが知られており、細胞の分化に関係していると考えられている^{#5}。この DNA のメチル化を行う DNA メチルトランスフェラーゼは、通常 S-アデノシルメチオニンをメチル基の供与体として必要と

する。また、メチルコバラミンも、このメチル基の供与体として働くことが知られているが、高濃度のメチルコバラミンの存在下では、S-アデノシルメチオニンが競合的阻害を受けることにより DNA のメチル化が低下することがわかっている^{#6}。

ALS とコバラミン

これとは別に、亀山らは ALS 患者の脊髓前角においてシアノコバラミンの含量が著明に増加しており、逆にメチルコバラミンの含量が相対的に低下していることを示した^{#7}。従来、ALS に限らず、各種の疾患にビタミンの大量投与が効くという民間療法が信じられているが、科学的に立証されたものはない。ビタミン B12 など欧米の薬店などで大量を含むものが販売されており、その大量投与が明らかな効果を持つということはあるまいことである。しかし、B12 の経口投与では、内因子の問題があるため、大量に用いても充分に血中に移行しない。また、市販の B12 は、ヒドロオキシコバラミンやシアノコバラミンが多く、メチルコバラミンは少ない。後者を含有する場合でも、本成分の分解を防ぐのに必要な完全な遮光をしている製剤はまれである。従って、これらにどれだけのメチルコバラミンが含まれているかは明らかではなく、真の意味で、大量のメチルコバラミンが ALS に試みられたことはないと考えられる。

ALS 治療のストラテジー

現在のところ ALS に対する薬剤として riluzole などが用いられているが、これを含めて客観的な臨床評価項目を改善させる治療法は見つかっていない。riluzole はグルタミン酸の放出抑制作用を持つとされており、ALS において選択的に障害される、直接皮質脊髓路の神経伝達物質であるグルタミン酸の神経毒性は本症で重要な役割を果たしていると考えられている。高濃度のメチルコバラミンは、グルタミン酸による興奮性神経細胞死を抑制

ることが知られている^{#9}。また、超大量メチルコバラミンは実験的アクリルアミドニューロパチーの神経再生を促す作用をもつことが示されている^{#10}。通常量の100倍量に相当するメチルコバラミン50mg投与は、体重当たり相当量の動物実験で安全であることが分かっている^{#11}。

ALSにおける超大量メチルコバラミン投与

我々は、京都大学医学部医の倫理委員会の承認を受けて、超大量メチルコバラミン筋注によるALS治療の試みを行っている。1日25mg筋注の2週間投与によりCMAP振幅が有意に上昇することを評価医と患者に対する二重盲検試験で確認している^{#12}。これは、ALSの臨床徴候の指標を有意に改善、または進行を遅延させた初めての報告となった。また、現在本剤の臨床症状（筋力評価）に対する効果を調べるための無作為割り付けによる二重盲検クロス・オーバー試験が1日50mg筋注（14日間）を用いて進行中であり、その中間集計は児玉らにより本年度報告されている^{#13}。

謝 辞

亀山正邦先生、木村淳先生には貴重なご助言をいただき深謝いたします。

文 献

1. Iwatsubo T, Kuzuhara S, Kanemitsu A, Shimada H, Toyokura Y: Corticofugal projections to the motor nuclei of the brain stem and spinal cord in humans. *Neurology* 1990;40:309-12.
2. Kaji R, Kimura J: Amyotrophic lateral sclerosis: what makes the direct corticospinal tract so vulnerable. *Muscle Nerve* 1993;16:872-4.
3. Kohara N, Kaji R, Kojima Y, Kimura J: An electrophysiological study of the corticospinal projections in amyotrophic lateral sclerosis. *Electroencephalogr cli Neurophysiol (J. clin Neurophysiol)* 1999, in press.
4. Cedar H, Stein R, Gruenbaum Y, Naveh Many T, Sciaky Gallili N, Razin A: Effect of DNA methylation on gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983;2:605-9.
5. Stein R, Gruenbaum Y, Pollack Y, Razin A, Cedar H: Clonal inheritance of the pattern of DNA methylation in mouse cells. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* 1982;79:61-5.
6. Pfohl-Leszkowicz A, et al: Effect of Cobalamin Derivatives on in Vitro Enzymatic DNA Methylation: Methylcobalamin Can Act as a Methyl Donor. *Biochemistry* 1991;30:8045-51.
7. 亀山正邦: 神経系疾患におけるシアン代謝。-とくにALSにおけるシアン代謝障害について- *臨床神経* 1980;12:999-1007.
8. Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, Tamura Y, Kaneda K, Akaike A: Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B12 analog, against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture. *Invest-Ophthalmol -Vis-Sci* 1997;38:848-54.
9. Akaike A, Tamura Y, Sato Y, Yokota T: Protective effects of a vitamin B12 analog, methylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Eur-J-Pharmacol* 1993;241:1-6.
10. Watanabe T, Kaji R, Oka N, Bara W, Kimura J: Ultra-high dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acrylamide neuropathy. *J Neurol Sci* 1994;122:140-3.
11. Kaji R, Kodama M, Imamura A, Hashida T, Kohara N, Ishizu M, Inui K, Kimura J: Effect of ultrahigh-dose methylcobalamin on compound muscle action potentials in amyotrophic lateral sclerosis: a double-blind controlled study. *Muscle Nerve* 1998;21:1775-8.
12. 木村 淳、梶 龍児、児玉光生、幸原伸夫: 筋萎縮性側索硬化症及び運動ニューロン疾患に対して超大量メチルコバラミンを用いた治療的研究。京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会

13. 児玉光生、梶 龍兒、坂本 崇、松本真一、高木恒和、
村瀬永子、小島康祐、幸原伸夫、木村 淳：
超大量メチルコバラミン筋注による ALS 治療の試み. 平
成 1 0 年度厚生省神経変性疾患調査研究報告書.

研究発表

鉄代謝のマスター蛋白、IRP2の神経変性疾患への関与

岩井 一宏 山中 宏二 湊 長博

はじめに

アルツハイマー病等の神経変性疾患においては病巣部での鉄等の金属イオン、ユビキチン化蛋白の沈着、蛋白の酸化変化が認められ、その病態形成との関連が注目されている。しかしながら、鉄イオンの蓄積機序に関する研究は進んでいないのが現状である。我々はこれまで高い相同性を有した2種のRNA結合蛋白、IRP1及びIRP2を中心に哺乳類細胞における鉄イオン代謝の解析を進めてきた。IRPは細胞内鉄イオン濃度が低い場合のみみ鉄代謝に関与する分子をコードするmRNA上にあるstem-loop構造をしたiron responsive element(IRE)と特異的に結合することにより細胞内遊離鉄イオン濃度を一定に保つように制御している鉄代謝のマスター制御因子である(1)。鉄イオンの有無に関わらず安定な蛋白であるIRP1はiron-sulfur clusterがassembly/disassemblyすることによりIRE結合活性が制御されているのに対し(2)、IRP2は鉄イオン存在下で鉄イオンが結合することにより受ける酸化変化がシグナルとなり、ユビキチン依存性にプロテアソームで急速に分解されることによりその活性が制御されている(3-5)。鉄イオン存在下でもIRE結合活性を有するIRP1ミュータントを細胞株に導入することにより細胞質内の鉄イオン濃度が高くなり、preliminaryではあるが細胞死が観察されることから(6)、鉄イオン以外の要因でIRP1またはIRP2のIRE結合活性が増強されることにより細胞内遊離鉄イオン濃度の亢進を介して、フリーラジカル産生が高まることが、神経細胞死に関与していると考えられる。実際、NOやH₂O₂によりIRP1のIRE結合活性は増強されることが報告されている(7,8)。しかしながら、神経系においてはIRP2の発現が高く、アルツハイマー病巣においてIRP2蛋白の蓄積が報告されている(9)。それゆえ、神経変性疾患の病巣における鉄イオンの蓄積、神経細胞死にはIRP2の関与が考えられる。そこで、IRP2の神経変性疾患への関与について検討することを旨とし、IRP2のRNA結合活性増強を介したトランスフェリン受容体(TfR)発現亢進、フェリチン(Ft)発現抑制により細胞内遊離鉄イオン濃度の上昇によるフリーラジカル産生を高める鉄イオン以外の因子の検索、また、発生工学的手法を用いて、IRP2蛋白の神経変性疾患にお

京都大学医学研究科免疫細胞生物学

ける意義を検索を進めた。

方 法

1. 神経芽細胞腫株Neuro2Aを、鉄イオン、鉄イオンキレーター、Al, Zn等の金属イオンの存在下で培養し、IRP2のRNA結合活性をRNA gel shift assayで、また、IRP2より発現が制御されるトランスフェリン受容体(TfR)、フェリチン(Ft)の産生量を免疫沈降法で検索した。
2. バキュロウイルス発現系を用いて精製したIRP2を用い、IRP2の酸化変化をin vitro oxidation assay系を用いて解析した。
3. 常法に従い、IRP1及びIRP2ノックアウトマウスを作製した。

結 果

IRP2のIRE結合活性を増強させる因子の報告はこれまではない。前述のように、IRP2は鉄イオンが結合することにより生じる酸化変化がシグナルとなって分解されることによって制御されていることから、他の金属イオンがIRP2の鉄結合部位に競合的に結合することにより安定化しIRE結合活性が増強することが考えられる。そこで、マウス神経芽細胞腫株Neuro 2Aを各種金属イオン存在下で培養したところ、アルミニウムの添加によりIRP2のRNA結合活性、蛋白量ともに増加することが観察された。加えてアルミニウム添加によるIRP2のIRE結合活性の増強を介する、TfRの産生増強、Ftの産生低下が認められ、アルミニウムにより誘導されるIRP2のIRE結合活性により細胞内遊離鉄イオン濃度が上昇し、フリーラジカル産生を高める可能性が示唆された。また、精製IRP2を用いたin vitro oxidation assayで鉄イオンによるIRP2の酸化修飾がアルミニウムの共存により抑制されたことから、IRP2の鉄結合部位にアルミニウムが競合的に結合することにより、IRP2のユビキチン修飾に抑制的に働き、IRP2を安定化することにより、IRP2のIRE結合活性が増強すると考えられた。

IRP1ノックアウトマウスは、少なくとも15カ月齢まで異常が認められず、IRP1ノックアウトマウスより樹立した胎児線維芽細胞は鉄イオンの有無によるTfR、Ftの発現調節には異常が認められなかった。これに対し、IRP2ノックアウトマウスは樹立されて間もないため今後の検討を

待たねばならないが、加齢により十二指腸上皮での鉄イオンの蓄積が認められるのに加え、歩行異常を来すことから神経系にも異常が生じている可能性を考えられ、現在解析を進めている。

考 察

鉄イオンは各種神経変性疾患の病巣に蓄積しているのみならず、フェロオキシダーゼであるセルロプラスミン欠損患者において神経細胞死が認められることから(10)、鉄代謝異常自体が神経細胞死の引金となると考えられる。それゆえ、鉄代謝のマスター制御因子であるIRPの神経変性疾患における意義の検索は重要であるといえる。今回我々はアルミニウムがIRP2のIRE結合活性増強因子であることを示した。アルミニウムと神経疾患についてはこれまでに種々の報告がある。いわゆる透析痲呆におけるアルミニウムの関与は疑う余地はない。しかしながら、病巣でのIRP2の蓄積が示されているアルツハイマー病とアルミニウムの関連については、現在は否定的であると考えられている。我々はアルミニウムにはとらわれず、IRP2の安定化を来す因子の更なる検索を進め、神経変性疾患における鉄代謝異常へのIRP2の関与に関して神経細胞死との関連との観点から解析を進めていく予定である。また、IRP1ノックアウトマウスは少なくとも15カ月齢までは異常が見られないのに対し、IRP2ノックアウトマウスにおいては十二指腸上皮での鉄の蓄積、歩行異常という症状が認められることから、神経変性疾患におけるIRP2の重要性が示唆される。今後、IRP2ノックアウトマウスのフェノタイプの解析を進め、IRP2の神経系における役割を解析してゆきたい。また、IREに対して同等の親和性、特異性を持った2種のIRPそれぞれの欠損マウスで表現型が異なることから、これらマウスを用いて2種のIRPの生体内における役割、各種疾患における役割を検索し得ると考えている。また、我々の樹立したIRP2に対するモノクローナル抗体を用いて、各種神経変性疾患病巣におけるIRP2量の検討などを進めてゆく予定にしている。

文 献

- (1) Klausner R D, et al. Cell 72: 19-28, 1993
- (2) Haile D J, et al. Proc. Natl Acad. Sci. U S A. 89: 11735-11739, 1992
- (3) Samaniego F, et al. J. Biol. Chem. 269: 30904-30910, 1994
- (4) Iwai K, et al. EMBO J. 14, 5350-5357, 1995
- (5) Iwai K, et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 95: 4924-4928, 1998
- (6) DeRusso P A, et al. J. Biol. Chem. 270: 15451-15454, 1995

- (7) Pantopoulos K, et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 92: 1267-1271, 1995
- (8) Pantopoulos K, et al. EMBO J. 14: 2917-2924, 1995
- (9) Smith M A, et al. Brain Res. 788: 232-236, 1998
- (10) Yoshida K, et al. Nat. Genet. 9:267-272, 1995

神経変性疾患におけるボルナ病ウイルス感染の検索

田代真人¹、西藤岳彦¹、大原義朗²、齋藤 博³、佐光一也⁴

<はじめに>

1985年にRottらのグループ(1)によって精神疾患患者の血清中に抗BDV抗体が検出されて以来、精神疾患と本ウイルス感染症の関連が示唆されているが、血清疫学的解析ではこれまでのところ確定的な情報は得られていない。一方で、1996年de la Torreらのグループによって(2)、剖検で海馬硬化症と診断された患者の剖検脳サンプルからBDVゲノムRNAが検出され、またその組織免疫染色によってもBDV抗原の発現が認められたことから、BDV感染の神経変性疾患への関与が疑われている。

近年RT-PCRによって末梢血単核球(PBMC)から本ウイルスRNAを検出する事が試みられているが(3)、実験室内コンタミネーションが本ウイルスの感染疫学的調査に重大な影響を与えている可能性が指摘されている(4)。我々は、昨年度の本研究班での研究において、RT-PCRにおける実験室内コンタミネーションを低減させるために、新たなプライマーセットの解析を行った。その結果、1)実験室継代ウイルス由来RNA、2) PCR操作に用いる陽性対照からのコンタミネーション、3) リコンビナントBDV蛋白発現ベクターからのコンタミネーション(3)の可能性を低減できることを示してきた。

また、BDVの血清疫学調査においても、使用するアッセイ方法の違いによって非特異反応のレベルが異なっている可能性が指摘されていた。Horimotoらは(4)、新たに大腸菌で発現させたBDV p40蛋白質を用いたReverse type Sandwich enzyme immunosorbent assay (RS-ELISA)を開発し、非特異反応の低減と感度を上昇させることに成功した。そこで本研究では、上記の二種のアッセイ系を用いてパーキンソン病患者におけるBDVウイルス感染症の疫

学調査を行い、パーキンソン病とBDV感染との関連の可能性について検討した。

<材料と方法>

Nested RT-PCR

Reverse transcriptaseによるcDNA合成およびTaq polymeraseをもちいた第一段階PCRにはBDVp40-701, BDVp24-172Rを用い、第二段階PCRにはBDVp40-748, BDVp24-43Rを用いたNested RT-PCRを行った(3)。cDNAの合成は、MuLV Reverse Transcriptase (Perkin-Elmer社)を用いて行い、第一段階PCR及び第二段階PCRは、Sawady Technology社のSuper Taq Premix Kitを用いた。

Reverse type sandwich ELISA (RS-ELISA)

Horimotoらの方法(4)に準じて行い、被検血漿はブロックエース(大日本製薬)で10倍希釈したものをを用いた。

検体

札幌中村記念病院、仙台国立療養所西多賀病院、金沢医科大学病院の外来及び入院患者の末梢血単核球(PBMC)由来全RNA中におけるBDVゲノムおよび血漿中の抗BDV p40抗体の解析を行った。内訳は、パーキンソン病患者48例、筋萎縮性側索硬化症の4例の計52例であった。プロフィールは、パーキンソン病患者については男性23名、女性25名で平均年齢63歳、平均罹病期間は7.8年であった。筋萎縮性側索硬化症の4例に関しては男性1例、女性3例で平均年齢57歳であった。各患者から採血したEDTA-処理血液は、各病院から冷蔵保存で国立感染症研究所に輸送され、国立感染症研究所において、リンフォセパール(IBL)を用いてPBMCと血漿に分離された。分離されたPBMCはRNA分離のため-80℃に保存後、ISOGEN(日本ジーン)を用いて全RNA画分を精製した。

<結論>

材料と方法に記載された札幌、金沢、仙台的各病院から得られた52検体の末梢血由来RNAをもちいての

所属 1) 国立感染症研究所 2) 金沢医科大学
3) 国立療養所西多賀病院 4) 札幌中村記念病院

Nested RT-PCRによる検索では、上述の検体いづれからもBDV RNA特異的なPCR産物の増幅は認められなかった。

一方、患者血清を用いたRS-ELISAの結果、52検体中1検体が、他の検体より明らかに高い吸光度を示した。すなわち、他の53検体の吸光度は0.04以下であり、さらに大部分の検体においてはバックグラウンドの吸光度が認められなかったのに対して、1検体のみが0.12という値を示した(図1)。この患者は61歳のパーキンソン病の患者で、男性、罹病期間は5年であった。しかし、カリフォルニア大学のDr. Lipkinから分与されたBDV実験感染ラットの血清を 3×10^6 倍希釈した陽性対象では吸光度が、0.55を示していたことから、この患者血漿で認められた値が他の検体と比較して有意であると結論づけるのは困難であろう。

<考察>

近年、BDV感染の分子疫学的検索にNested RT-PCRの手法が多用されているが、一方でこのアッセイ系の感度が非常に高いことから、実験室内コンタミネーションがその解析結果に重大な影響を与えている可能性を危惧するむきもある(4)。また、ラット実験感染モデルにおいても、感染時期によっては末梢血中に現れるウイルス量が標的器官である脳でのウイルス量を反映しないなど、疫学調査の対象として末梢血中のウイルスRNAの検出が妥当であるかどうかと言った議論も存在する(6)。本研究では、パーキンソン病患者にお

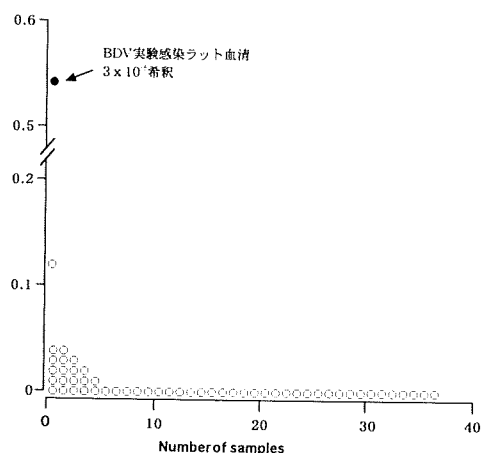
けるBDV感染の可能性を検討するため血清疫学調査と、末梢血中のRNAの検索を行った。

今回の検索では、パーキンソン病の患者末梢血中にはBDVのRNAの存在は証明されなかった。このことは、検索対象とした末梢血RNA中のBDV RNA量が検出限界以下であった可能性も含めて、慎重に評価する必要があるだろう。また今後の方向性としては、そのような可能性を排除するためにBDVの標的器官である脳検体での検索が重要な意義を持つであろう。また、血清中の抗体検索において他の検体より高いELISAでの吸光度を示した例についても、健常者や他の疾患の患者などとのAge-match controlを取るなどが、今後の課題であろう。

<参考文献>

- 1) Rott et al. Science 228. 755-756 1985
- 2) de la Torre et al. Virology 223. 272-282 1996
- 3) 田代真人 平成9年度厚生省特定疾患神経変性疾患調査研究班報告書
- 4) Horimoto et al. J. Clin. Microbiol. 35 : 1661-1666 1997
- 5) Richt et al. J. Neurovirol. 3. 174-178 1997
- 6) Sauder C et al. J Virol Methods 71(2):229-245 1998

図1 パーキンソン病患者における抗BDV p24抗体のRS-ELISAによる検索



パーキンソン病患者剖検脳のボルナ病ウイルス

渡辺真紀子¹、朝長啓造¹、生田和良^{1, 2}、森若文雄³、田代邦雄³、
近藤智善⁴、水野美邦⁴、山崎俊三⁵、久野貞子⁵

はじめに

ボルナ病ウイルス (BDV) はマイナス鎖、1 本鎖の RNA をそのゲノムとして持ち、神経細胞親和性を示すウイルスである。現在までにウマ、ウシ、ネコ、ダチョウをはじめとする多くの動物に自然感染していることが判っているが^{1, 2, 3)}、その病原性はその主たる自然宿主であるウマにおいて最も良く観察されている。急性感染したウマは約 4 週間の潜伏期の後、脳膜脳脊髄炎を原因とする運動失調、抑うつ等の神経症状を呈し、その約 80% が死亡する。しかし一方で、BDV 陽性動物の大部分は不顕性に経過することも明らかにされている。

1985 年、ドイツで行われた BDV の疫学調査の結果、ヒトの BDV 感染と精神分裂病やうつ病等の精神疾患との高い関連性が報告された⁴⁾。以後、同様の研究結果が相次いだ^{5, 6, 7, 8)}、BDV に対する抗体価やウイルス RNA 量が検出限界境界程度の低いことが原因となり、依然、精神疾患と BDV 感染との明瞭な関連性はつかめていない。しかし、これまでの研究、ならびに我々の行った精神分裂病患者の一部より感染性 BDV の分離など、BDV がヒトに感染し、脳内においてその持続感染が存在することは明らかである。我々は、この脳内に持続感染し、動物に病原性を発揮しうる BDV のヒトへの影響、特に神経変性疾患への関与に関する研究を行っている。

本研究では特に、ヒトの運動性疾患の代表であるパーキンソン病と BDV との関連に着目し検討を行った。一般に、黒質から線条体にのびるドーパミンニューロンの一部は線条体内アセチルコリンニューロンとの間にシナプスを形成し、アセチルコリン系に対して抑制的に働いている。パーキンソン病においては、黒質線条体ニューロンに変性・脱落が生じてドーパミンによる抑制が解かれるため、相対的にアセチルコリン系が優位になるとされている。BDV 感染によるドーパミンレセプターやアセチルコリン系の異常は、BDV のモデル動物であるラットにおいても示唆されている^{9, 10)}。今回、パーキンソン病患者由来剖検脳の黒質および前頭葉領域における BDV 感染の可能性を検討した。

対象と方法

順天堂大学・脳神経内科および国立宇多野病院より 9 名のパーキンソン病患者 (P1~P9; 61~81 歳) の剖検脳由来黒質および前頭葉領域 (P1~P4 のみ) を対象とし、BDV

RNA の検出ならびに、その黒質領域のホモジネートを新生スナネズミに脳内接種し、パーキンソン病患者由来 BDV の伝播、増殖能を検討した。

BDV RNA の検出は、p24 および p40 領域の nested RT-PCR、その後のサザンブロット法により行った。また、患者黒質領域 (P1~P4 のみ) を接種した新生スナネズミの脳内の BDV RNA 検出には、p24 および p40 領域プローブを用いた in situ hybridization によって解析した。PCR 増幅遺伝子産物はクローニング後、その塩基配列の決定を行った。

結果

1. パーキンソン病患者剖検脳由来黒質領域の BDV RNA 検出

パーキンソン病患者 9 名 (表 1) の黒質 (P1~P9) および前頭葉領域 (P1~P4 のみ) について、BDV 遺伝子検出を nested RT-PCR 法により行った。その結果、BDV p24 遺伝子領域では P2、P6、P7 および P8 の患者の黒質、P2 と P4 の前頭葉に、一方 BDV p40 遺伝子領域では P1、P4 および P6 の黒質、P2 および P4 の前頭葉にシグナルが検出された (表 2)。

患者	死亡年齢/性	発症年齢	罹病期間	家族性	アマンタジン感受
P1	78M	63	15	(-)	(+)
P2	79M	65	10	(-)	(+)
P3*	67M	34	34	(-)	(-)
P4	81F	<73	>8	(-)	不明
P5	77F	65	13	uk	(+)
P6	66F	49	17	uk	(+)
P7	74M	57	18.6	uk	(+)
P8	61M	47	13.5	uk	(+)
P9	66F	42	23	uk	(+)

* 若年性パーキンソン症候型
uk, unknown

表 1 BDV 検出を行ったパーキンソン病患者の内訳

2. パーキンソン病患者剖検脳由来黒質領域を脳内接種した新生スナネズミの BDV RNA 検出

パーキンソン病患者剖検脳の黒質領域に認められた BDV の感染性を検討するため、患者黒質領域 (P1~P4 のみ) のホモジネートを新生スナネズミに脳内接種した。対象としては PBS 接種を行った。接種後 19 日目にスナネズミの解剖を行い、その大脳と小脳における BDV の存在を nested RT-PCR により検討した。その結果、P2 患者黒質接種スナネズミの小脳、および P4 患者の黒質接種スナネ

1 北海道大学免疫科学研究所血清学部門
2 大阪大学微生物病研究所免疫生体防御研究部門
3 北海道大学医学部神経内科学講座
4 順天堂大学医学部脳神経内科学講座
5 国立宇多野病院臨床検査部

ズミの脳においてBDV p24 遺伝子が nested RT-PCR により検出できた (表3)。これらのスナネズミ脳の病理組織切片に対するBDV p24 領域プローブを用いた in situ hybridization を行ったところ、nested RT-PCR の結果と一致する結果が得られた (表3)。

患者	黒質		前頭葉	
	p24	p40	p24	p40
P1	-	+	-	-
P2	+	-	+	+
P3	-	-	-	-
P4	-	+	+	+
P5	-	-	NE	NE
P6	+	+	NE	NE
P7	+	-	NE	NE
P8	+	-	NE	NE
P9	-	-	NE	NE

表2 パーキンソン病患者剖検脳からのBDV RNA の検出

患者	RT-PCR				in situ hybridization			
	大脳		小脳		大脳		小脳	
	p24	p40	p24	p40	p24	p40	p24	p40
P1	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	-	-	+	-	+	-	+	-
P3	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	+	-	-	-	+	-	-	-
P5	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
P6	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
P7	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
P8	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
P9	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

表3 患者黒質接種スナネズミからのBDV の検出

3. パーキンソン病患者由来BDV と感染スナネズミ由来BDV のp24 遺伝子領域の塩基配列の比較

次に、これらスナネズミに伝播したBDV がパーキンソン病患者由来であるかどうか確かめるために、P2 患者黒質およびP2 患者黒質接種スナネズミより増幅されたBDV のp24 遺伝子領域をクローニングし、その塩基配列の比較を行った。その結果、図1 に示すようにP2 患者より増幅されたBDV の塩基配列は、P2 患者黒質接種スナネズミより得られた塩基配列と同様の塩基配列の変異が数カ所において認められ、スナネズミにおいて検出されたBDV が明らかにパーキンソン病患者由来であることが確かめられた。

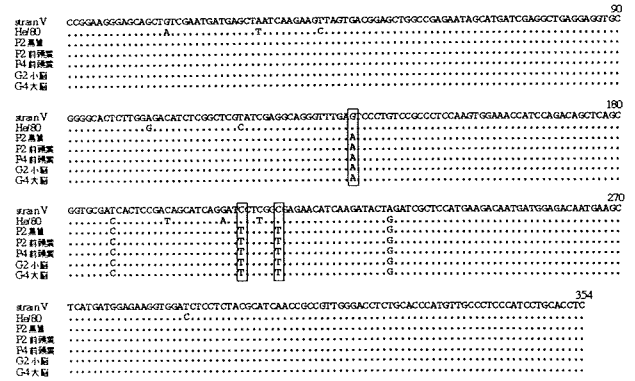


図1 患者および患者黒質接種スナネズミよりのBDV p24 領域の塩基配列

考 察

パーキンソン病患者に特徴的に神経変性病変が認められる黒質領域においてBDV の存在を検索した。その結果、試みた9例の内6例にBDV RNA の存在が確認された。また、BDV RNA 陽性であった3例の黒質を新生スナネズミへの脳内接種を試み、2例においてウイルスの伝播、増殖が認められた。このことは、パーキンソン病患者の黒質内でBDV がその感染性を保ったまま持続感染していたことを示している。また、スナネズミに伝播したBDV 陰性であった症例 (P3) は若年性パーキンソン病患者由来であった。このように、未だ例数は少ないが、これまで検索されてきた精神分裂病 (私達は、4名の剖検脳を試みた結果、1名由来の海馬、橋、小脳にのみ陽性反応が認められた) や大うつ病患者の脳内BDV 検出率^{1, 2)} よりも高いと考えられる。さらに私達はBDV に自然感染したウマに見られる異常として運動器障害が最も高率であることも認めており、このようなウマの脳にはBDV RNA が検出されたことから¹³⁾、今後、さらにパーキンソン病患者剖検脳の例数を増やすと共に、in situ hybridization によるパラホルム固定患者剖検黒質切片からの直接的なBDV 感染の検出を含め、このウイルス感染とパーキンソン病の病態との関連性を明らかにして行く予定である。

文 献

1. Nakamura, Y. et al.: Vaccine 13: 1076-1079, 1995.
2. Hagiwara, K. et al.: Med. Microbiol. Immunol. 185: 145-151, 1996.
3. Hagiwara, K. et al.: Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4: 339-344, 1997.
4. Rott, R. et al.: Science 228: 755-756, 1985.
5. Kishi, K. et al.: FEBS Lett. 364: 293-297, 1995.
6. Iwahashi, K. et al.: Acta Psychiatr. Scand. 96: 412-415, 1997.

7. Nakaya, T. et al.: FEBS Lett. 378: 145-149, 1996.
8. Kishi, M. et al.: Med. Microbiol. Immunol. 184-135-138, 1995.
9. Solbrig, M. V. et al.: Virology 222: 332-338, 1996.
10. Gies, U. et al.: Brain Pathol. 8: 39-48, 1998.
11. Salvatore, M. et al.: Lancet 349: 1813-1814, 1997.
12. Haga, S. et al.: Lancet 350: 592-593, 1997.
13. Hagiwara, K. et al.: Med. Microbiol. Immunol. 186: 19-24, 1997.

TNF- α の神経細胞傷害に対する変異SOD1の影響

山田 猛 朝原 秀昭 吉良 潤一

はじめに

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の研究において、家族性ALS (FALS)の病態研究は孤発性ALSの病態解明にもつながることが期待できる。FALSの病因遺伝子のうち明らかにされているのは、Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1)のみである。SOD1変異が運動ニューロン変性を引き起こす機序として、変異SOD1のperoxidase活性によるNOからのperoxynitrite生成亢進、peroxynitriteによるtyrosine残基のニトロ化による蛋白質の機能障害が考えられている。

ALSの病理所見として、大脳皮質運動野や脊髄前角におけるミクログリアの活性化は良く知られており、ALSの病態との関連が注目されている。痴呆を伴うALSの一例で脳脊髄液中にミクログリアに対する抗体が認められている¹⁾。G93A変異SOD1を発現させたトランスジェニックマウスにおいて、運動ニューロン障害の進行とミクログリアの活性化が密接に関連している可能性が報告されている²⁾。本研究では、SOD1変異がミクログリアの活性化や活性化ミクログリアから放出されるTNF- α による神経細胞傷害に及ぼす影響を明らかにする。

方法

1. 細胞：マウスミクログリアのcell lineとしてN9細胞³⁾を、マウス運動ニューロン様細胞としてNSC-34を用いた。N9細胞はRPMI1640/5% FBS、NSC-34細胞はDMEM/10% FBSにて培養した。
2. SOD1発現ベクター：正常、A4V変異、G93A変異ヒトSOD1 cDNAをpRC/CMVベクターに組み込んで発現ベクターを作成した。N9細胞にはelectroporation法により遺伝子を導入し、一過性に発現させた。NSC-34細胞についてはヒトSOD1を発現するstable transformantsを作成した。
3. ミクログリアの活性化：遺伝子導入24時間後に、N9細胞を96穴プレートに10⁴個/ウエルまいた。24時間後、100 u/mlのマウス組換えインターフェロン γ (IFN- γ , Genzyme)と100 ng/mlのlipopolysaccharide (LPS)を培溶液に添加し、24時間培養した。NO₂⁻の産生量をGriess法により、TNF- α の産生量をELISA法 (Genzyme)により測定した。
4. TNF- α による細胞傷害：各NSC-34細胞を96穴プレートに10⁴個/ウエルまき、培養液中にヒト組換えTNF- α (Bachem)を0~100 ng/ml (30 U/ng)添加し、48時間培養後、MTT assayにより細胞のviabilityを測定した。

九州大学医学部神経内科

結果

1. ミクログリアの活性化

N9細胞はIFN- γ あるいはLPS単独では活性化されなかったが、両者を同時に添加すると活性化された。NO₂⁻の産生量は、SOD1遺伝子導入によりNO₂⁻の産生が有意に抑制された。変異SOD1では正常に比べて抑制効果が有意に減少していた(図1A)。TNF- α の産生も同様に抑制された(図1B)。

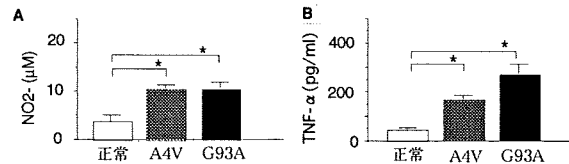


図1 活性化ミクログリアのNO₂⁻とTNF- α 産生に及ぼすSOD1の影響。*p<0.05

2. TNF- α による細胞傷害

元来のNSC-34細胞ではTNF- α による細胞傷害はMTT assay法では認められなかった(図2A)。一方、SOD1発現細胞ではTNF- α による細胞傷害がわずかではあるがみられた(図2B~D)。特にA4V変異SOD1では1 ng/mlの低濃度から細胞傷害が認められた(図2C)。

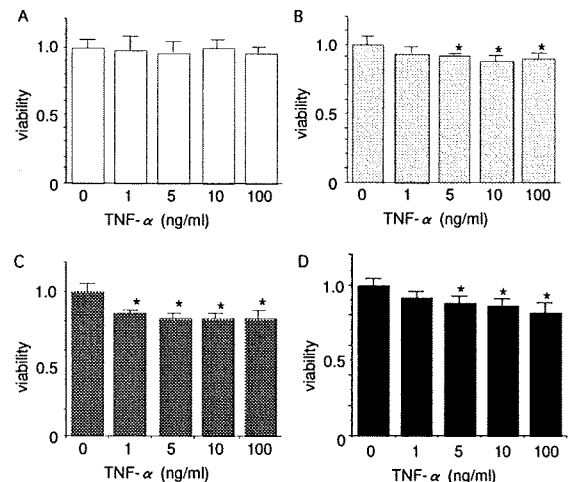


図2 TNF- α の細胞障害に及ぼすSOD1の影響。*p<0.05

考察

ミクログリアのLPSによる活性化機構については、LPSがLPS結合蛋白と結合した複合体がCD14と結合、あるいはLPSが単独で受容体と結合して、tyrosine kinaseが活性化されるシグナル伝達経路が関与している。IFN- γ につ

いては受容体のcross linkによりJanus kinase (JAK)及びsignal transducers and activators of transcription (STAT) が順次活性化され、遺伝子転写が促進される。その結果、TNF- α 、IL-3、IL-6などのサイトカイン、BDNF、bFGF、NT4/5などの栄養因子、iNOSの誘導によるNOの産生などが起こる。機構は不明であるが、正常SOD1はこのシグナル伝達を抑制するものと考えられる。一方、変異SOD1は例えば、シグナル伝達に関与する蛋白のtyrosine残基をニトロ化することでシグナル伝達の異常を引き起こし、抑制効果が阻害されると考えられる。

TNF- α の受容体には、55 kDの分子量でcaspaseを活性化して細胞をapoptosisに導くものと、75 kDの分子量でNF- κ Bを介して細胞傷害に体して防御的に作用するものがある。したがって、TNF- α はどちらの経路が優勢になるかによって細胞傷害性にも保護的にも働くと考えられる。変異SOD1はTNF- α の細胞傷害経路を増強する可能性がある。

SOD1変異はミクログリアの活性化を促進し、TNF- α などのサイトカインによる細胞死を促進することにより運動ニューロン障害に関与していると考えられ、ミクログリアの活性化抑制はALSの進行抑止につながる可能性が考えられる。

文 献

1. Banati RB, et al. Clin Neuropathol 14: 197-200, 1995
2. Hall ED, et al. Glia 23: 249-256, 1998
3. Corradin SB, et al. Glia 7: 255-262, 1993

ALS 脊髄における AMPA 受容体の分子変化

郭 伸¹、詫間 浩²、金澤一郎¹

はじめに

筋萎縮性側索硬化症の病因仮説として、グルタミン酸受容体、特に AMPA/カイニン酸 (KA) 型受容体を介した遅発性の神経細胞死のメカニズムが注目されている (4, 15)。すなわち脊髄運動ニューロンは AMPA/KA 受容体の持続興奮により神経細胞死に陥りやすいことが培養細胞系で示され (3)、そのメカニズムには AMPA/KA 受容体を介する Ca^{2+} の流入の引き起こす持続的細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が主要な役割を果たしていると考えられている (7)。

AMPA/KA 受容体はおそらく 4 個のサブユニットからなるオリゴマーにより形成されている。その Ca^{2+} 透過性の高低は構成サブユニットに GluR2 サブユニットが含まれるかどうかにより決定される (5)。従って、GluR2 を構成サブユニットに持たない AMPA/KA 受容体は Ca^{2+} 透過性が高く、GluR2 を一個でも構成サブユニットとする場合には Ca^{2+} 透過性は低い。また、GluR2 サブユニットは第 2 膜貫通ドメインの一アミノ酸が転写後編集 (posttranscriptional editing) により転換しており (グルタミンからアルギニン)、これにより始めて Ca^{2+} 透過性に影響を与えるので、この部位 (Q/R 部位) で転写後編集を受けない GluR2 が構成サブユニットに含まれていても AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性は低下しない (13, 14)。すなわち、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性は構成サブユニットに転写後

編集を受けた GluR2 を含む場合にのみ低下する。したがって、GluR2 の発現が極端に低下した場合、転写後編集が起こらない場合には AMPA 受容体のカルシウム透過性は高く、細胞内 Ca^{2+} 濃度に影響するようになる。実際、GluR2 の knockout mouse や GluR2 編集を起こさせない mutant mouse では中枢神経に機能的異常や異常な神経細胞死を引き起こすことが示されている (2, 6)。また、虚血後の遅発性神経細胞死に先立って GluR2 mRNA が減少することが、実験動物の海馬で示されている (10)。このように、グルタミン酸受容体のとくに GluR2 サブユニットの分子異常は、神経細胞の機能・生存にとって、重大な意味を持っている。

ALS 脊髄では AMPA 受容体を介する神経細胞死が重要な役割を果たしていると考えられているので、本研究では、AMPA/KA 型受容体を介した Ca^{2+} 流入を促進させる上記の分子的变化がこの受容体に生じているかどうかを検討した。

対象及び方法

剖検時凍結保存した脊髄から、凍結下に白質・灰白質 (前角・後角) を切り出した。対象の疾患は筋萎縮性側索硬化症 (11 例、平均年齢 60.9 歳)、疾患対照 (7 例、平均年齢 62.4 歳) として多系統萎縮症 (3 例)、Machado-Joseph 病 (2 例)、パーキンソン病 (2 例)、神経精神疾患を有しない正常対照 (10 例、平均年齢 44.9 歳) を用いた。

¹ 東京大学医学部神経内科

² 現大阪市立大学第二内科

切り出した標本より Trizol を用いて total RNA を抽出し、SuperScriptII Kit (Stratagene)、を用いて逆転写反応を行った後、AMPA/KA 受容体サブユニット (GluR1~4) それぞれに特異的なプライマーペアを用いて GluR1~4 につき nested-PCR 法を適用した。定量性を得るために、house-keeping enzyme である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) についても RT-PCR を行い、アガロースゲルで分離したバンドを光学的に定量することにより、GluR サブユニットの RT-PCR 産物を G3PDH の RT-PCR 産物に対する比を計算した。

また、GluR2 サブユニットの Q/R 部位に、CAG から CGG への転写後編集が生じているかどうかを調べるために、PCR 産物を制限酵素 (Bbv-I、GCAGC を認識する) により切断した。この酵素は非編集 GluR2 mRNA に由来する PCR 産物(Q/R 部位が CAG)を切断するが、編集された GluR2 mRNA (Q/R 部位が CGG) は切断しないので、切断断片の数の違いから、編集 GluR2 mRNA と非編集 GluR2 mRNA を区別することができる。酵素処理した PCR 産物をアガロースゲルで分離し染色の後、分離後光学的に定量し、編集率を非編集 GluR2 mRNA に由来する PCR 産物の全 GluR2 mRNA に対する比として計算した。また、PCR 産物のシーケンシングにより Q/R 部位の転写後編集による一塩基置換の有無を確認した。

結果

GluR1, GluR3, GluR4 の各 mRNA の発現は、脊髄前角、後角、白質の各部位間、および、ALS、疾患対照、正常対照の各群間で有意な差を認めなかった。これに対して、GluR2 mRNA は前角での発現量が各群で大きく異なり、G3PDH mRNA に対する発現量として比較すると、正常対照群の前角での値に対し、ALS (0.3%)、疾患対象各群 (20%)

の前角で著明に減少していた。

GluR2 mRNA の転写後編集率は、正常対照はいずれの部位でもおよそ 94%であった。疾患対照・ALS 群における後角・白質での編集率は 90.4~99.6%であり、3群間に差を認めなかった。これに対し、前角では、ALS で 67.5%に低下しており、正常対照群、疾患対照群に対し統計的に有意であった ($p < 0.05$, Mann-Whitney)。特に ALS の 2例の前角では、編集率がほぼ 0%であり、発現している GluR2 mRNA のほとんどが非編集であることを示していた。編集率が 0%の症例とほぼ 100%の症例で PCR 産物のシーケンスを行い、前者では Q/R 部位が CAG であり、後者では CGG で、一塩基置換が生じていることを確認した。

考察

ALS 脊髄前角では、GluR2 mRNA の発現および、転写後編集が選択的に落ちていた。

GluR2 mRNA 発現量の低下は、疾患対照群の前角にも見られ、疾患に特異的な変化とは言えない。文献的にも、GluR2 mRNA 発現量の低下は、実験的虚血などのさまざまな脳病変に伴って生ずることが知られており (11)、本研究で見られた変化は、脊髄前角に病変があることを意味はしても、その病変の特異性を反映するものではない可能性が高い。

これに対し、GluR2 mRNA の転写後編集率の低下は ALS 前角のみに見られた変化であり、疾患に特異的な変化であることを示唆している。ハンチントン病の線条体、アルツハイマー病の大脳皮質などでの検討では、有意な編集率の低下が起こっていないことが報告されている (1, 8, 9) ことから、この変化は非特異的な病変を反映するものではなく、ALS の病変と深く関わる変化であることが推定できる。実際、実験系においても、さまざまな条件下で GluR2 mRNA 編集率は保存されることが示さ

れており、非特異的病変は編集率に影響しないことが示されている (11, 12)。

ALS 脊髄前角に於ける GluR2 mRNA 発現量の減少、転写後編集の低下はいずれも AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を亢進させる変化である。生体内では、ほとんどの AMPA 受容体は GluR2 を含み Ca^{2+} 透過性が低いとされているので、これらの変化は、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を大きく変え、細胞内 Ca^{2+} を持続的に上昇させる可能性がある

(5)。実験的には、GluR2 mRNA 発現量の低下よりも、GluR2 編集率の低下の方が、神経細胞死に対する影響がより大きく、GluR2 編集の欠損したミュータントマウスでは、けいれんによる神経細胞死を引き起こすことが示されている (2)。さらに最近の報告では、 Ca^{2+} 透過性の変異 GluR2 遺伝子をトランスフェクトしたマウスでは、遅発性の脊髄運動ニューロン脱落が報告されており (Korhekar R, Seeberg PH 私信)、GluR2 編集率の低下が特に脊髄運動ニューロンの生存にとって不利に働くことを示す知見が得られている。

GluR2 mRNA の編集率の低下が ALS 脊髄でも最も病変の強い前角に見られたこと、編集率の低下を引き起こすような他の疾患や細胞死は従来知られていないこと、GluR2 mRNA の非編集は神経細胞死を引き起こすことが動物実験で示されていること、などからは、GluR2 mRNA の編集率の低下は ALS の病因と深く関わる現象であるといえる。少なくとも、GluR2 mRNA 編集を低下させる原因が他にあったとしても、神経細胞の生存にとって不利な条件であることは間違いなく、脊髄前角運動ニューロンの細胞死を促進させる変化である。

ALS 例での編集率が、0%のものから95%以上のものまで見られたことは、病期の違いのほかに、ALS の脊髄病変が髄節により異なるための影響は否定できない。病変の進行とともに編集率が低下する可能性を示唆している。

文献

1. Akbarian S, et al, Brain Res, 699:297-304, 1995.
2. Brusa R, et al, Science, 270:1677-80, 1995.
3. Carriedo SG, et al, J Neurosci, 16: 4069-79, 1996.
4. Couratier P, et al, Lancet, 341:265-8, 1993.
5. Hollmann M, et al, Science, 252:851-3, 1991.
6. Jia Z, et al, Neuron, 17: 945-56, 1996.
7. Lu YM, et al, J Neurosci, 16:5457-65, 1996.
8. Nutt S, et al, Neuroreport, 5: 1679-83, 1994.
9. Paschen W, et al, J Neurochem, 63: 1596-602, 1994.
10. Paschen W, et al, J Cer Bl Fl Met, 16: 548-56, 1996.
11. Pellegrini-Giampietro D, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 89: 10499-503, 1992.
12. Rump A, et al, J Cer Bl Fl Met, 16: 1362-5, 1996.
13. Sommer B, et al, Cell, 67:11-19, 1991.
14. Verdoorn T, et al, Science, 252:1715-18, 1991.
15. Weiss JH, et al, Adv Neurol, 56: 311-8, 1991.

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症メカニズムにおける *Apaf-1* の発現解析

江隅 英作¹ 西澤 正豊² 池口 邦彦² 中野 今治²

目 的

神経細胞死のメカニズムの1つとしてアポトーシスがあり、活性酸素や細胞毒がアポトーシスを引き起こすことが示されている。家族性筋萎縮性側索硬化症(以下 FALS と略す)では, superoxide dismutase 1 (以下 SOD1 と略す)遺伝子の点変異が報告され, 変異遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは運動ニューロンの細胞死が起こることから, FALS の発症にアポトーシスが関与している可能性が示唆されている。

また筋萎縮性側索硬化症(以下 ALS と略す)の病変主座である脊髄前角細胞で線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下 *C.elegans* と略す)のアポトーシス抑制遺伝子 *Ced-9* の哺乳類ホモログである *bcl-2* の発現低下と *bcl-2* の阻害作用を持つ *bax* の過剰発現を認めたという報告 (Xiaojun Mu BS et al. 1996) がある。

近年 *C.elegans* において *Ced-9* により抑制的制御を受けているといわれている *Ced-3* および *Ced-4* が細胞死の実行過程に働くことが判った (Ellis RE et al. 1991)。このうち *Ced-3* は哺乳類でサイトカインの生成にかかわる interleukin-1 β converting enzyme (以下 ICE と略す)の相同蛋白質であり (Yuan J et al. 1993), 現在ヒト ICE ファミリー遺伝子 (カスパーゼと総称する) は 12 種類見いだされている。ICE を過剰発現するトランスジェニックマウスは未だ作成されていないが, ALS 疾患モデルといわれている SOD1 変異遺伝子を導入したトランスジェニックマウスと ICE 遺伝子の active site に点変異を導入し ICE 蛋白質の発現を dominant negative に抑制するトランスジェニックマウスを掛け合わせたところ, その子孫は SOD1 変異遺伝子を導入したトランスジェニックマウスに比べ死亡までの期間が延長したという報告 (Friedlander RM et al. 1997) がある。これらの結果から ALS の発症メカニズムにアポトーシス関連遺伝子の発現が関与している可能性がある。

最近 *Ced-3* と蛋白質レベルで結合し, アポトーシスの実行に関与していると考えられている *Ced-4* のヒトホモログが cloning され, apoptotic protease activating factor-1

(*Apaf-1*)であることがわかった (Zou H et al. 1997)。*Apaf-1* は *Ced-3* および *Ced-4* に identical な部分と 12 個の WD-40 repeat を持つ細胞質蛋白であり, ヒトでの mRNA の発現は ubiquitous である。その機能としては, mitochondria から放出された cytochrome C (*Apaf-2*) と結合し, dATP の存在下で CARD (caspase recruitment domain) を介して Caspase-9 (ICE-LAP6, *Apaf-3*) と複合体を形成することによって, Caspase-9 は processing を受け活性型となり, Caspase-3 を活性化して細胞死を誘導するといわれている。

本研究はアポトーシスの実行が ALS 発症に関与しているかどうかを解明する手がかりとして, 剖検組織から mRNA を抽出し, RT-PCR 法によりアポトーシス実行遺伝子といわれている *Apaf-1* および *Caspase-9* (ICE-LAP6, *Apaf-3*) の発現解析を行った。

対 象

1998 年に自治医大で剖検を行った症例のうち, ALS 2 例, 神経疾患対照 1 例 (多系統変性症; MSA), 非神経疾患対照 2 例 (心筋梗塞, 副腎癌) を対象とした。

方 法

剖検後脳および脊髄を速やかに取り出し, -80℃で凍結保存した後, Quickprep mRNA purification kit (Pharmacia) を用いて poly A⁺ mRNA を調整し, 合成した first-strand cDNA を template として以下の primer を用い RT-PCR を施行した。

Apaf-1

APPN

5' - ACATCACGAATCTTTCCCGC - 3'

APPC

5' - AACACTTCACTATCACTTCC - 3'

Caspase-9

CA9N

5' - GCCATGGACGAAGCGGATCGGCGG - 3'

CA9C

5' - GGCCTGGATGAAAAAGAGCTTGGG - 3'

1 三宿病院神経内科 2 自治医科大学神経内科

94°C, 1min→55°C, 1min→72°C, 2min
35 cycles

結 果

1. ALS 例の頸髄および胸髄では大脳、被殻と比べ明らかに *Apaf-1* mRNA の発現量が増加していた。非神経疾患例の脊髄では *Apaf-1* mRNA の発現量はわずかであった。(図 1)
2. MSA 例の頸髄および被殻では *Apaf-1* mRNA の発現量が著明に増加していた。(図 2)
3. ALS 例の頸髄、胸髄および MSA 例の頸髄、被殻では *Caspase-9* mRNA の発現量が増加していた。非神経疾患例の脊髄では *Caspase-9* mRNA の発現量はわずかであった。(図 3)

考 察

ALS および MSA における神経細胞死は *Apaf-1* および *Caspase-9* を介したアポトーシスの実行が関与している可能性が示された。しかし *Apaf-1* および *Caspase-9* の発現増強は ALS に特異的現象ではないように思われた。本研究で対象とした脊髄は部位を細分化して検討しておらず、*Apaf-1* および *Caspase-9* の発現がニューロンで増強しているのかあるいはグリアで増強しているのかは現在のところ不明である。ALS における神経細胞死がアポトーシスとどのように関わっているかをより詳細に検討するため、今後は脊髄の部位別での mRNA の発現量の検討、抗体を用いた各組織での免疫組織化学的解析、運動ニューロンで遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作成を行いたい。

文 献

1. Xiaojun Mu BS et al. Ann Neurol 40: 379-386, 1996.
2. Ellis RE et al. Annu Rev Cell Biol 7: 663-698, 1991.
3. Yuan J et al. Cell 75: 641-652, 1993.
4. Friedlander RM et al. Nature 388: 31, 1997.
5. Zou H et al. Cell 90: 405-413, 1997.
6. Li P et al. Cell 91: 479-489, 1997.

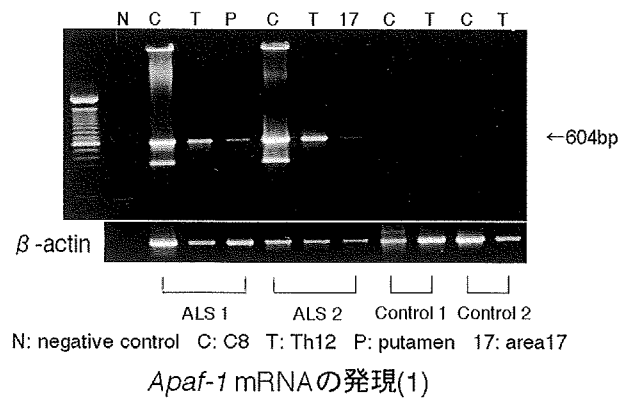


図 1 ALS 例の頸髄および胸髄では大脳、被殻と比べ明らかに *Apaf-1* mRNA の発現量が増加していた。非神経疾患例の脊髄では *Apaf-1* mRNA の発現量はわずかであった。

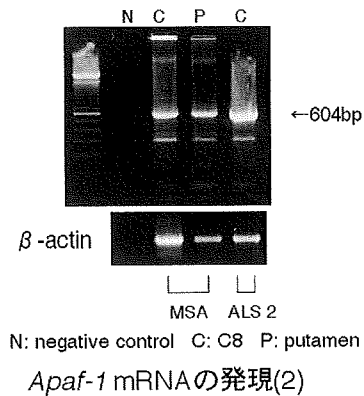


図 2 MSA 例の頸髄および被殻では *Apaf-1* mRNA の発現量が著明に増加していた。

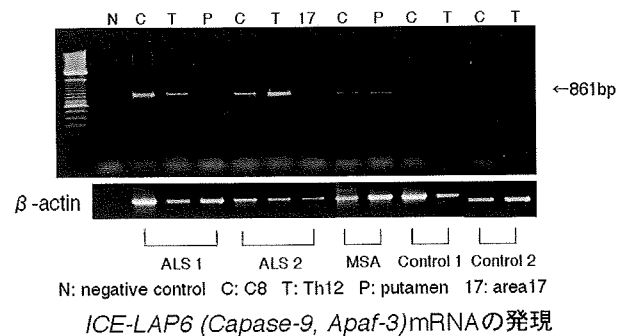


図 3 ALS および MSA 例の頸髄および胸髄では大脳、被殻と比べ明らかに *Caspase-9* mRNA の発現量が増加していた。非神経疾患例の脊髄では *Caspase-9* mRNA の発現量はわずかであった。

変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックマウス 末梢神経における軸索輸送速成分

割田 仁^{1),2)} 城 洋志彦¹⁾ 柏原健一¹⁾ 糸山泰人²⁾ 阿部康二¹⁾

はじめに

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、主として運動ニューロンの選択的細胞死をきたし進行性の筋萎縮・筋力低下をもたらす難治性変性疾患で、その予後が極めて不良にもかかわらず有効な治療法は未だ確立していない。家族性 ALS (familial ALS, FALS) の原因遺伝子として、Cu/Zn SOD 遺伝子の変異が報告されて以来、いくつかの変異 Cu/Zn SOD トランスジェニック(Tg)マウスが確立されている。これらのマウスは進行性かつ致死的な選択的運動ニューロン変性脱落を示し、ヒト ALS の有用な動物モデルである。しかし Cu/Zn SOD の変異がなぜ運動ニューロンの選択的神経細胞死を引き起こすかについてはいまだ不明な点が多い。

これまでにヒト ALS および変異 Cu/Zn SOD Tg マウスにおいて軸索輸送の異常を示唆する報告がある。軸索輸送には主に速成分と遅成分があり、速成分の代表的輸送蛋白として、順行性および逆行性それぞれ kinesin、cytoplasmic dynein が挙げられる。本研究で我々は未発症の本マウスを対象に、発症前の早期変化として末梢神経における軸索輸送・速成分の異常の有無を検討した。

対象および方法

ヒト FALS の一部で認められる Gly⁹³→Ala(G93A)アミノ酸置換を伴うヒト変異 Cu/Zn SOD Tg マウス (B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur^{dl})を対象とした。このマウスは約 32 週前後で一側の後肢から四肢へと進行する痙性四肢麻痺を示し、1~2 週の経過で死に至るものである。これを用い、いずれも無症状である早期(週齢 19 週;n=5)および発症直前期(30 週;n=5)と、週齢を一致させた非 Tg 正常マウス(コントロール;各 n=5)を比較検討した。

臨床的に運動能を反映する各パラメーターを測定後、マウスの左側坐骨神経を外科用細糸で絞扼した ligation model を作製。6時間後に絞扼部を含めた同側および対側坐骨神経を速やかに摘出し凍結した。この新鮮凍結標本の縦断切片において、免疫組織化学染色による絞扼部

近位/遠位双方での kinesin、cytoplasmic dynein の反応陽性産物の蓄積を比較した。さらに支配髄節を含む腰髄、両側坐骨神経、腓腹筋についても病理学的検討を加えた。

結果

コントロールにおいては週齢にかかわらず絞扼部近位端では kinesin の、遠位端では cytoplasmic dynein の免疫反応陽性産物の蓄積を認めた。これに対し、早期 Tg マウスではコントロールにみられる近位端での kinesin の免疫反応陽性産物のみが減少し、発症直前 Tg マウスでは kinesin、cytoplasmic dynein ともに絞扼部の両側端でコントロールに比し明らかな免疫反応陽性産物の減少が認められた。

早期・発症直前群ともに Tg マウスの運動能はコントロールと有意差がなかった。病理学的検討では、早期 Tg マウスで腓腹筋(坐骨神経支配筋の一つ)に軽度の神経原性変化がみられた他は、脊髄前角細胞数および坐骨神経有髄線維密度/ヒストグラムのいずれにもコントロールと有意差は認められなかった。これに対し、発症直前 Tg マウスでは腓腹筋に高度の神経原性変化が既に認められ、坐骨神経有髄線維密度はやや減少傾向、脊髄前角細胞数は軽度ながら有意に減少していた。

考察

発症の 10 週以上早期、臨床的には何ら異常がなく、病理学的には支配筋にのみ軽度の神経原性変化がある段階で、坐骨神経における軸索輸送の順行性速成分がほぼ選択的に障害されている可能性が示唆された。また発症直前までの病期を追った比較から、臨床的に発症に至るかなり前の段階から骨格筋の神経原性変化は始まっており、前角細胞数の減少はみられても発症直前期で軽度なことが判明した。このことから発症前の変化として脊髄前角細胞にまず機能的な異常が主として生じていることを推察させる。今回示唆された軸索輸送速成分の異常は脊髄前角細胞の脱落以前に生じていることから、このモデルマウスにおける運動ニューロン死に機能的異常として軸索輸送速成分の異常が関与している可能性がある。今後、変

¹⁾ 岡山大学医学部神経内科

²⁾ 東北大学医学部神経内科

異 Cu/Zn SOD が軸索輸送成分の異常をもたらす機構について、ALS 前角細胞における蛋白チロシン残基のニトロ化亢進や細胞骨格とくにニューロフィラメントの異常との関連についても検討を要する。

参考文献

- 1) Rosen DR, et al.: Nature 363: 59-62, 1993.
- 2) M.E. Gurney, et al.: Science 264: 1772-1775, 1993
- 3) Collard J-F, et al: Nature 375: 61-64, 1995.
- 4) Zhang B, et al. J Cell Biol 139: 1307-1315, 1997.
- 5) Sasaki S, et al. Neurology 47: 535-540, 1996.
- 6) Hirokawa N, et al. Science 279: 519-526, 1998.
- 7) Beckman JS, et al. Nature 364: 584, 1993.
- 8) Abe K, et al. Neurosci Lett 199: 152-154, 1995.
- 9) Ferrante RJ, et al. Ann Neurol 42: 326-334, 1997.
- 10) Warita H, et al. Brain Res: in Press.