

動が減少し、63歳で無動無言状態になった。ドーパは無効であった。当時の神経症状は、硬い仮面様顔貌で口を固く結び、自発語は全くなく、コミュニケーションは不可能であったが、人の顔はよく追視した。四肢は高度の筋強剛と屈曲拘縮を示し、筋線維性収縮はなく萎縮は廃用性と考えられた。下顎反射、四肢伸反射は正常であったが、バビンスキー徴候は陽性であった。脳CTは発症時は年齢相応の萎縮のみであったが、死亡1年前には前頭葉側頭葉優位の高度の萎縮を示した。70歳時(1999年)に肺炎で死亡した。臨床診断はPDCであった。[弟例]45歳時(1979年)に構音障害と嚥下障害に気づき医師を受診した。球麻痺症状、舌萎縮、全身の筋萎縮と錐体路徴候が認められ、ALSと診断された。46歳時に呼吸筋麻痺でレスピレーターを装着された。レスピレーター管理下でも意志疎通は保たれ、痴呆やパーキンソニズムの存在には気付かなかった。49歳時に心停止状態で発見され、蘇生術を受けて心拍動は回復したが意識は回復せず、23日後に死亡した(1983年)。臨床診断はALSであった。

### 1. 神経病理学的検討

ホルマリン固定・パラフィン包埋切片について、通常の組織学的染色に加え、タウ、A $\beta$ の免疫組織化学検討を行った。

### 2. 電子顕微鏡学的検討

姉例についてのみ、剖検脳組織を2.5%グルタルアルデヒド、4%パラホルムルデヒドを含む0.1 Mカゴジレートバッファー液で固定し、通常の方法で観察した。

### 3. タウ蛋白解析

姉例についてのみ行った。新鮮脳について、既に報告されている方法で、不溶性タウ、および脱リン酸化タウについて、ウェスタン

ブロットを実施し、タウのアイソフォームを検討した。

## C. 研究結果

### 1. 神経病理学的所見

[姉例] 肉眼的所見。脳重は935gで前頭葉・側頭葉に高度の萎縮を認めた。黒質と青斑核の脱色素を認めた。組織学的所見。高度の神経細胞脱落と多数のアルツハイマー神経原線維変化塊(NFT)を、海馬と下側頭回、扁桃核、マイネルト核、黒質、青斑核、脳幹被蓋に認め、中等量のNFTを前頭葉と側頭葉の皮質に、少数を小脳歯状核や脊髄灰白質にも認めた。老人斑やLewy小体はなかった。この他に、前中心回のBetz細胞に変性とタウ陽性封入体を認め、脊髄側索の変性・萎縮、前角細胞の中等度の脱落、Bunina小体など、ALSに合致する病変を認めた。

[弟例] 肉眼所見は記録が失われており確認できなかった。組織学的に、脳は高度の萎縮と神経細胞消失、高度のグリオシスを呈し、心停止による無酸素性脳症の慢性期と考えられた。海馬と下側頭回にはNFTが散見された。黒質、青斑核、脳幹被蓋の神経細胞脱落は高度で、中等量-軽度のNFTを認めた。ALS病変として、舌下神経核と脊髄前角の高度の細胞脱落と脊髄錐体路の変性を認めた。

### 2. NFTの電顕所見

細胞質内NFTは、直径約20nmで、周期80nmの捻れを持つtwisted tubuleであった。

### 3. 脳に蓄積した異常タウ蛋白解析

脳内に蓄積した異常不溶性タウは、60、64、68kDの3バンドパターンで、脱リン酸化後の電気泳動では3 repeat tauと4 repeat tauがほぼ等量出現していた。

#### D. 考察

弟例は、紀伊半島 ALS 多発H地区の最初の ALS 剖検例として、かつて報告したものである。その特徴は無酸素症脳症の影響を強く受けてはいたが、ALS 病変に加えて大脳皮質と脳幹の神経核に相当数の NFT が認められ、従来報告されていた紀伊半島多発地区特有の ALS5)、あるいはグアム ALS1)と同じ所見であった。一方、姉例は、臨床的に PDC の症状が確認されていて剖検所見が得られた紀伊 PDC の第 1 例である。臨床的には PDC 症状のみで、一次的にバビンスキー徴候が認められた以外には、はっきりした運動ニューロン症状を認めなかったにもかかわらず、病理学的には PDC 病変に加えて明らかな ALS 所見を認めた。すなわち、臨床症状から見る限り、姉は PDC、弟は ALS であったが、神経病理学的には両例ともほぼ同じで、PDC と ALS 両者の所見が認められた。これは、既にグアムの ALS/PDC で指摘されているのと同じく、紀伊半島多発地区の ALS と PDC も疾病学的には単一疾患であって、異なる臨床像を示していることを示唆する所見である。

紀伊 ALS/PDC の NFT の電顕所見は、グアムの ALS/PDC やアルツハイマー病と基本的には同一であり、twisted tubule (PHF) で構成されていることが示された。脳内に蓄積

する異常タウ蛋白は、タウ蛋白解析では正常脳のタウと分子種は同じであり、3 repeat あるいは 4 repeat に偏ったアイソフォームの異常増加は認められなかった。同様の所見はグアム ALS/PDC でも最近報告された。

紀伊 ALS/PDC の分子遺伝学的解析では、われわれは従来知られている遺伝子異常である家族性 ALS の SOD1 遺伝子、frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP17)のタウ遺伝子について検討したが、異常変異は確認されなかった。これらの所見は、グアムの ALS/PDC でも同様の成績が得られている。

#### E. 結論

紀伊 ALS/PDC は、臨床的には ALS、PDC、PDC+ALS という 3 種類の臨床像をとることがあるが、病理学的にはほとんど同じ所見を示す単一疾患の可能性が高い。今後は更に多くの症例で検討するとともに、家族性発症が多いので、遺伝性神経変性疾患としてとらえて分子遺伝学的な原因遺伝子解析を行う必要がある。

#### F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)  
分担研究報告書

紀伊半島多発地域の筋萎縮性側索硬化症とパーキンソン痴呆複合の  
臨床像に関する研究

分担研究者 葛原茂樹 三重大学医学部教授

研究要旨

三重県南部には、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)とパーキンソン痴呆複合(PDC)の世界的多発地域がある。集積地 A 地区の ALS/PDC の臨床像について、多数例について検討した。A 地区および近隣地区出身で、1996 年から 1999 年の間に確認された有病者 30 例 (筋萎縮性側索硬化症 8 例、パーキンソン痴呆複合 22 例)の臨床像について臨床神経学的に検討した。紀伊半島の ALS の多くは、通常の ALS と変わらない臨床症状を示したが、病初期からパーキンソニズムを合併した 1 例があり、PDC との中間型と考えられた。紀伊半島の PDC の臨床像は Guam 島の PDC の臨床像と類似しており、ALS を合併する頻度が高く、パーキンソン病やその他のパーキンソン症候群とは異なっていた。

A. 研究目的

紀伊半島南部に多発する筋萎縮性側索硬化症 (ALS)とパーキンソン痴呆複合(PDC)の研究は、ALS やパーキンソン病、アルツハイマー病といった神経変性疾患の原因究明に貢献することのできる課題である。三重県南部 A 地区に多発する ALS/PDC の臨床像について、多数例について検討した。

B. 研究方法

A 地区および近隣地区出身で、1996 年から 1999 年の間に罹患が確認された有病者 30 例 (筋萎縮性側索硬化症 8 例、パーキンソン痴呆複合 22 例)の臨床像について臨床神経学的に検討した。本研究においては、研究対象者に対して不利益とならないようプライバシーに十分配慮した。

C. 研究結果

1. 患者背景と疫学的事項

診察時の平均年齢は、ALS 例では 68.3 歳で、年齢分布は 62 歳から 77 歳、PDC 例では 72.0 歳で、年齢分布は 58 歳から 82 歳であった。男女比は、ALS 例では 1:3、PDC 例では 1:1.8 と女性優位であった。ALS/PDC の家族歴は、ALS 例では 25%、PDC 例では 82%、全体では 67%に認めた。平均発症年齢は、ALS 例では 65.0 歳で、年齢分布は 57 歳から 75 歳、PDC 例では 67.5 歳で、年齢分布は 53 歳から 79 歳であった。診察時までの平均罹病期間は、ALS 例では 3 年 3 ヶ月、PDC 例では 4 年 8 ヶ月であった。1999 年 11 月 1 日現在の A 地区人口は 1459 名で、10 万人あたりの粗有病率は、ALS は 137.1、PDC は 1370.8 で、年次別発症例数では、毎年 1 例から 6 例の新規発

生が見られた。

## 2. 臨床症状

① 初発症状；ALSの初発症状では、8例中、四肢の筋力低下または構音障害で発症した症例がそれぞれ4例ずつであった。PDCの初発症状では、22例中、物忘れ、意欲低下、抑うつ症状といった精神症状で発症した症例が13例、動作緩慢、歩行障害、振戦といったパーキンソニズムで発症した症例が8例、構音障害が1例であった。② 筋萎縮の分布；ALSでは、8例全例に四肢の筋萎縮を認めた。そのうち、4例では四肢全体の筋萎縮、3例では上肢遠位部の筋萎縮、1例では上肢近位部の筋萎縮であった。8例中、6例に球麻痺、2例に呼吸筋麻痺を認めた。PDC22例中、18例に四肢の筋萎縮を伴い、4例では筋萎縮はなかった。筋萎縮合併例のうち15例では上肢遠位部に限局していた。7例には球麻痺が出現した。③ 錐体路徴候；ALSでは、8例中7例(88%)に錐体路徴候を認めた(腱反射亢進7例、Babinski徴候3例)。PDCでは、22例中14例(68%)に錐体路徴候を認めた(腱反射亢進12例、Babinski徴候5例)。④ パーキンソニズム；ALSの1例で、発症早期から歯車様固縮と姿勢反射障害を認めた。PDCでは、22例中18例で筋強剛があり、そのうちの5例では屈曲拘縮を示した。姿勢反射障害と無動を14例に認めた。7例に振戦を認め、そのうち4例では、安静時優位、3例では、姿勢時優位であった。⑤ 精神症状；ALSでは認めなかった。PDCでは22例中20例に精神症状を認めた。内訳は、20例で記憶・記銘力障害、17例で見当識障害、17例で意欲低下、4例で抑うつ、1例で多幸性、7例で嗜眠傾向、5例で幻覚、5例で無言無動状態であった。⑥ その他；自律神経症状では、PDC22例中3例に

起立性または食事性低血圧を認めた。PDCの1例で、声帯麻痺のため気管切開術を施行した。糖尿病は、ALS例ではなく、PDC例では22例中5例に合併していた。L-dopaを投与したPDC11例中5例に、病初期に軽度の臨床症状の改善を認めた。⑦ 死亡原因と平均罹病期間；ALSでは、死亡した3例のうち、直接死因は2例が呼吸筋麻痺、1例が喀痰による気道閉塞であった。平均罹病期間は、2年11ヵ月であった。PDCでは、死亡した4例のうち、直接死因は2例が誤嚥性肺炎、1例が喀痰による気道閉塞、1例が合併疾患のCOPD悪化による呼吸不全であった。平均罹病期間は、6年6ヵ月で、1例で人工呼吸器を6週間使用した。

## D. 考察

ALSは、発症年齢の平均は65.0歳で、初発症状は四肢筋力低下または構音障害で、四肢筋力低下、球麻痺、呼吸筋麻痺が進行した。88%に、錐体路徴候を認めた。罹病期間は平均2年11ヵ月で、死亡例の直接死因は喀痰による気道閉塞または呼吸筋麻痺であった。早期からパーキンソニズムを合併した症例があった。

PDCでは、発症年齢の平均は67.5歳で、初発症状は精神症状またはパーキンソニズムで、筋強剛、無動、姿勢反射障害、記憶・記銘力障害、見当識障害、意欲低下が徐々に進行した。上肢遠位部の筋萎縮と錐体路徴候をそれぞれ68%に認めた。末期には、屈曲拘縮で無言無動状態となった。L-dopaを投与した11例中5例で、病初期には多少効果があった。死亡例の平均罹病期間は6年6ヵ月で、直接死因は誤嚥性肺炎または喀痰による窒息であった。

#### E. 結論

紀伊半島の ALS の多くは、通常の ALS と変わらない臨床症状を示したが、病初期からパーキンソニズムを合併した 1 例があり、PDC との中間型と考えられた。紀伊半島の PDC の臨床像は Guam 島の PDC の臨床像と類似し

ており、パーキンソン病やその他のパーキンソン症候群とは異なっていた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

厚生科学研究費補助金（特定疾患研究事業）  
分担研究報告書

アデノ随伴ウイルスベクターを用いたパーキンソン病の遺伝子治療の研究

分担研究者 中野今治 自治医科大学医学部神経内科教授

研究要旨

293細胞へ AAV-TH, AAV-AADC および AAV-GCH の重複感染させると 293細胞の GCH 活性, BH4 合成およびドーパミン合成は AAV-GCH によるウイルス感染量に応じた増加を示した。また、片側パーキンソン病モデルに apomorphine を投与して生じる異常回転運動は、AAV-TH と AAV-AADC の二者併用よりも AAV-GCH を追加した三者併用の方でより強く抑制された。モデル動物の異常回転運動に対する治療効果は7カ月以上持続しており、導入遺伝子の発現は7カ月目でも免疫染色で確認された。

A. 研究目的

我々は黒質ドーパミンニューロンの変性によって線条体のドーパミン含量が低下するパーキンソン病の遺伝子治療法として、神経組織へ安全かつ効率良く遺伝子導入できるアデノ随伴ウイルス（AAV: adeno-associated virus）ベクターを用いて線条体のドーパミン含量を高める治療法を研究している。AAV は重複感染が可能のため複数の遺伝子を同一神経細胞に導入することも出来る。これまでドーパミン合成系酵素のチロシン水酸化酵素（TH:tyrosine hydroxylase）、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC:aromatic l-amino acid decarboxylase）を発現する AAV ベクターを用いて遺伝子導入による治療効果をモデル動物で検討してきた。

以上の2つの酵素遺伝子の導入によって線条体でドーパミン合成が可能となるが、さらにドーパミン合成を促進するにはその律速酵素である TH の酵素活性を高めることが重要

である。TH の酵素活性はその補酵素テトラヒドロピオプテリン（BH4: tetrahydrobiopterin）のよって制御されている。そこで今回は BH4 の細胞内濃度を高めることが有用と考え BH4 合成の律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I（GCH: GTP cyclohydrolase I）の遺伝子を AAV ベクターを用いて、既に報告した TH, AADC の遺伝子と同時に導入することを試みた。GCH によって BH4 合成が増加し、BH4 の補酵素作用により TH の活性が高まることによりドーパミン合成量が増加し遺伝子治療の効率が改善することが期待される。

パーキンソン病の治療は現在、ドーパミンの補充療法が主体であるが、長期に服用すると、効果の減弱し、また、wearing-off 現象や on-off 現象、ジスキネシア、幻覚・妄想などの副作用が出現する。ドーパミン合成系の遺伝子を線条体に導入し、そこでコンスタントにドーパミン合成が行われるようになれば、これらの

好ましくない症候は著明に減らすことができる。

#### B. 研究方法

治療用遺伝子としてはドーパミン合成関連酵素の TH, AADC, 及び GCH の各遺伝子を用い、それぞれを発現する AAV ベクター (AAV-TH, AAV-AADC, 及び AAV-GCH) を作製した。発現プロモーターには cytomegaravirus(CMV)を用いた。まず, *in vitro* 系として, 293 細胞に AAV-TH, AAV-AADC および AAV-GCH を重複感染させそれぞれのタンパクの発現を免疫プロットで確認した。また, GCH 活性, BH4 合成量およびドーパミン合成量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。*in vivo* としてはパーキンソン病モデルラット (黒質線条体路に 6-hydroxydopamine を注入しドーパミンニューロンを破壊することにより作製) の線条体に AAV-TH, AAV-AADC, 及び AAV-GCH の三種類のベクターを定位脳手術にて注入しその併用効果を評価した。対照群には AAV-LacZ を投与した。その効果は, apomorphine による異常回転運動の抑制効果, ドーパミンの含有量および蛍光二重免疫染色法 2 よって確認した。

#### C. 研究結果

293 細胞へ AAV-TH, AAV-AADC および AAV-GCH の重複感染させた場合, それぞれのタンパクが発現することが免疫プロットによって確認された。遺伝子導入後の 293 細胞の GCH 活性, BH4 合成量およびドーパミン合成量は AAV-GCH によるウイルス感染量に応じた発現増加を示した。また, *in vivo* では, 片側パーキンソン病モデルに apomorphine

を投与した場合に起きる異常回転運動は対照群 (AAV-LacZ 投与群) では改善されないのに対して, AAV-TH と AAV-AADC の二者併用によりこの異常回転運動は抑制され, さらに AAV-GCH を追加した三者併用の方ではより強く抑制され効果的であった。形態学的には, 蛍光二重免疫染色法を組み合わせることによって 3 種類の AAV ベクターの注入部位の大部分の同一の神経細胞に全ての導入遺伝子が発現していることが確認された。重複感染が効率よく起きていることが明らかとなり, 化学的には AAV-GCH 併用によって遺伝子導入後の線条体における BH4 が増加し, ドーパミン含有量も増加することが確認された。長期的には遺伝子導入後, モデル動物の異常回転運動に対する治療効果は 7 カ月以上持続しており, 形態学的にも導入遺伝子の発現は 7 カ月の時点で免疫染色で明瞭に確認された。

(倫理面への配慮)

本研究は病原性のない AAV を利用した遺伝子導入実験であり, 安全性の点からは倫理的に問題になることはないと思われる。また, 実験実験は動物倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めて自治医大動物実験指針規定に従い, 各種処置時には麻酔をかける等して動物虐待にならないように十分な配慮をした。

#### D. 考察

(1) 3 種類の AAV ベクターの同時投与により神経細胞に重複感染が高い割合で起きていることから, 別々のベクターを用いて複数の遺伝子を同一神経細胞に効率よく導入できることが確認された。(2) AAV-GCH によって, GCH 活性の上昇, BH4 合成量の増加が確認された。(3) AAV-TH と AAV-AADC の二者併用よりも, AAV-GCH を追加した三者

併用の方が、機能的（異常回転運動の抑制）にも、生化学的（ドーパミン合成量の増加）にもより有用であることが示された。（4）遺伝子導入後の長期効果については、7ヶ月後の時点で、異常回転運動に対する治療効果は持続しており、その時点での導入遺伝子の発現も免疫組織化学的に明瞭に確認された。以上より、人への応用の場合でも、ドーパミン合性系の各段階の酵素遺伝子を重複して導入することが効率上望ましいと思われる。また、今回は導入遺伝子の発現は7ヶ月までしか見えていない。しかし、導入遺伝子が染色体に組み込まれないとしても、ニューロンは非分裂細胞であるので導入遺伝子が希釈される可能性は低く、さらに長期の発現が十分に期待で

きる。

#### E. 結論

以上のことから、AAVベクターの重複感染が効率よく起きること、GCH-AAVベクターの有用性、AAV-TH、AAV-AADC、及びAAV-GCHの各遺伝子の三者併用の有効性、および導入した治療遺伝子の長期間の発現がラットモデル実験により明らかとなった。

#### F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

筋萎縮性側索硬化症の運動ニューロンの遺伝子発現プロファイリング  
- レーザーマイクロダイセクションと cDNA マイクロアレイによる検索

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学研究科教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症の原因・病態に関連する遺伝子を解明することを目的とし、運動ニューロンをレーザーマイクロダイセクションにより単離し、cDNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子プロファイルを作製した。この方法により、ALSの運動ニューロンにおいて特異的に発現が変化する遺伝子群を同定した。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)の病因遺伝子としてSOD1 遺伝子が同定されているが、遺伝子変異が検出率は低く、他の遺伝子変異は明らかにされていない。また、孤発例での遺伝子変化はほとんど解明されていない状況にある。

今回、我々は多くの神経変性の病変の主座をなす組織において遺伝子発現パターン（プロファイル）が大きく変化している分子群を捉えることにより、代表的神経変性疾患の一つである孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロン変性に関与する分子を探索することを目的とした。我々は、cDNA マイクロアレイを用いて、ALSの脊髄前角組織において発現変化見られる遺伝子について検討した。

B. 研究方法

孤発性ALSおよび非神経疾患患者の剖検脊髄腰髄組織よりレーザーマイクロダイセクション法を用いて運動ニューロンのみを切り出し、RNAを抽出した。このRNAをもとにT7 promoter-oligo dTをプライマーとして二本

鎖cDNAを合成した。T7 RNA polymeraseによるRNA増幅を行い、再度、二本鎖cDNAを合成した。このRNA増幅操作を繰り返し、3回増幅RNAをCy5-dUTPで標識した。2000クローンを貼り付けたマイクロアレイを用いて、ハイブリダイゼーションを行い、共焦点スキャナーで測定した。

今回用いたサンプルは家族に了解を得て行った剖検のサンプルを使用した。

C. 結果

ALSとコントロールでの脊髄運動ニューロンにおける発現遺伝子プロファイルの比較を行った。コントロールとALSのシグナルはほぼ45度の直線上にあり、シグナル比が3倍以上異なる遺伝子が約30個得られた。

D. 考察

レーザーマイクロダイセクションとcDNAマイクロアレイを組み合わせて用いることにより、単一細胞のみを集めて、極微量のRNAサンプルからでも発現遺伝子プロファイルを検索することが可能であった。この方法では、

運動ニューロンにおける変化を直接的に検出することが可能であり、神経細胞変性死の機序の解明に重要であると考えられる。

今後はALS群とコントロール群の数を増加することとマイクロアレイ上のクローン数を増やして解析することにより、ALSにおける神経変性に関連する遺伝子を検索していく予定である。

#### E. 結論

今回、運動ニューロンのみを選択的に集め、その発現遺伝子プロファイルをALSとコントロールで比較することが可能であった。ALSにおいて特異的に発現が変化している遺伝子群を同定した。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

筋萎縮性側索硬化症の遺伝子発現プロファイリングによる病態関連分子の探索

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学研究科教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄前角組織において、正常対照と比較し発現に著変のある遺伝子群を包括的に捉えるために遺伝子発現プロファイルを分子インデックス法により作成した。ALSで発現が著変していた遺伝子3'側断片を84クローン得たが、そのうち新規遺伝子FI39A、FI58Gについて完全長cDNAをクローニングした。

A. 研究目的

系統選択的な神経細胞死により発症する神経変性疾患の多くを占める孤発性のものの原因・関与する遺伝子群・病態機序などは未だに不明なままである。神経変性の病変の主座をなす組織において遺伝子発現パターン（プロファイル）が著変している分子群を捉えることにより、代表的神経変性疾患の一つである孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロン変性に関与する分子を探索することを目的とした。

B. 研究方法

孤発性ALSおよび非神経疾患患者の剖検脊髄腰髄前角組織より抽出したtotal RNAをもとにcDNAを合成し、分子インデックス法により遺伝子発現プロファイルを作成した。サンプル組織における全発現遺伝子由来cDNAを576グループにインデックス化し、その各々について、ALSと正常対照を比較することにより疾患で発現に明らかな差のある遺伝子断片を同定し、切り出しクローニングした。得られた遺伝子断片の塩基配列をもとにデー

タベース検索、ノーザンプロット解析、RT-PCR、in situ hybridization(ISH)を行った。未知遺伝子の一部については完全長cDNAの塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

名古屋大学医学部附属病院および関連病院において文書により同意を得た剖検組織を用いて研究を行った。

C. 研究結果

孤発性ALSにおいて、分子インデックス法により発現が大きく変化していた遺伝子の3'側断片の塩基配列を、既知・未知を合わせ84クローン得た。ノーザンプロット解析、RT-PCRにて腰髄前角組織での発現定量を行った14クローンの正常対照組織に対する発現比は、0.1 - 10の範囲にあった。このうち2つの未知遺伝子FI39AおよびFI58Gについて全cDNA配列を決定した。

FI39AcDNAは全長約4.4kbで、ORFより予測される838残基のアミノ酸配列のN末側にRing finger / IBR motifを有していた。ノーザンプロット解析では各臓器にubiquitous

に発現し、ISHでは、mRNAの発現はALS脊髄前角運動ニューロンを始めとする神経細胞およびグリアに見られた。FI39Aの過剰発現による培養細胞に対する影響について検討したが、これまでのところ明らかな細胞形態の変化やアポトーシス誘導は見られなかった。FI58G cDNAは全長約1.8kbで、219アミノ酸残基からなるORFを有していた。既知の蛋白にhomologyは持たないが、内部に核移行シグナル(NLS)が存在し、培養細胞内では核内に局在した。ノーザンブロット解析では中枢神経、心筋・骨格筋に多く発現していた。

#### D. 考察

ALSで発現変化がみられた遺伝子群のうち、

新規遺伝子FI39AおよびFI58Gの全長cDNAをクローニングした。FI58Gは既知の蛋白にhomologyを持たない新規の核蛋白であった。FI39Aは、Ubc(ubiquitin conjugating enzyme) / E2と結合するRing finger / IBR motifを有し、ユビキチン系に関与することが推定された。

#### E. 結論

神経変性疾患の多くに、その病変部位において神経細胞内にユビキチン化された封入体が出現することが知られているが、これらの新規遺伝子/蛋白がALSの病態形成メカニズムにいかに関与するかについて更なる検討が必要である。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

球脊髄性筋萎縮症の transgenic mouse model の作成と臨床病理学的検索

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学研究科教授

研究要旨

ヒトアンドロゲン受容体プロモーター調節下に 239 リPEATのポリグルタミン鎖を発現させる transgenic mouse を作成した。核内封入体の発現分布がより広範であることや神経細胞の脱落が必ずしも明らかではない点など、ヒトの球脊髄性筋萎縮症（SBMA）との差異はみられるが、このトランスジェニックマウスは SBMA の動物モデルと考えられる。

A.研究目的

ヒトのアンドロゲン受容体遺伝子プロモーターの調節下で、異常延長ポリグルタミン鎖を発現するトランスジェニックマウスを作成し、SBMA のモデル動物を作成し、治療法の開発等、医療に貢献すること。

B.研究方法

ヒトゲノム DNA より PCR 法にて得た 3.4Kb からなる AR 遺伝子のプロモーター領域を含む DNA 断片と 239CAG リPEATを、pFLAG vector に組み込み cloning した。Sal I と Pin A1 により transgene を切り出し、マイクロインジェクション法にてトランスジェニックマウスを作成した。マウスに対し苦痛を与えぬよう配慮した。

C.研究結果

4 系統のトランスジェニックマウスを得た。トランスジェニックマウスでは体格が縮小し、累積生存率が徐々に低下した。さらに、発症すると動作が遅くなり、運動量が減り、歩行時や立ち上がったときに転倒した。Rotarod

による運動機能の評価では、一系統で第 8 週より有意な運動能力低下を示した。核内封入体の出現は臨床症状よりも先行していた。FLAG の免疫染色標本で、核内封入体が脊髄前角細胞をはじめとして大脳・小脳顆粒細胞層の神経細胞にみられ、このほかにグリア細胞にも認めた。一般臓器では皮膚に認められたが、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、精巣、胸腺、骨格筋、心筋などにはみられなかった。FLAG と GFAP の二重染色で、核内封入体は GFAP 陽性細胞と共存しており、アストログリア内に核内封入体が存在することを確認した。SBMA における核内封入体の臓器別の分布に比し、神経組織にグリア細胞も含めて、広範に核内封入体を認めた。

D.考察

臨床的には筋力低下に加え、運動失調、体格の縮小、寿命短縮が観察され、病理学的にも核内封入体が SBMA よりも広範にみられたが、その病変分布には選択性がみられ、また神経機能の低下がみられたことは、非常に重要と考えられる。病変分布の決定因子は未だ不明

であるが、Huntington 病の全長遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスではヒトと似通った病変分布を示し、coding region に決定因子が存在することを示唆させる。今回作成したモデルでは、AR 遺伝子のプロモーター領域を挿入したこと、ポリグルタミン鎖が非常に延長していること、種の相違などが病変の選択性に関与したと推察される。

#### E. 結論

ヒトの AR 遺伝子プロモーターの調節下で、異常延長ポリグルタミン鎖を発現するトランスジェニックマウスを作成した。このトランスジェニックマウスは SBMA のモデル動物となりうると考えられるが、さらに病態について詳細な検索が必要である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
- 2 学会発表：別紙記載

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

パーキンソン病の高次神経機能に関する研究

分担研究者 川井 充 国立精神・神経センター武蔵病院第2病棟部長

研究要旨 パーキンソン病患者（PD）69名を対象とし、WAIS-R言語性下位項目プロフィール分析を行った。各下位項目の評価点間に有意な差が生じるかを検討した結果、全例及び言語性IQが79以下の19例では有意差は生じなかったが、言語性IQが80以上ある50例では、算数の評価点のみが有意に低下していた。さらにSPECTで脳血流を測定し得た44名を対象とし、SPMで画像および統計処理を行い、脳血流が算数の評価点と相関を示す部位を求めた結果、1. 右ブロードマン47, 40, 6, 44野, 島皮質および2. 左ブロードマン44, 45野の脳血流と算数の評価点には有意な正の相関（ $p < 0.05$ ）を示した。1. は健常人のPETを用いた賦活試験で視空間的作働記憶のタスクによって賦活される部位であり、PDではこの部位の機能低下が視空間的作働記憶の障害をもたらし、算数の評価点の低下をもたらしている可能性が考えられた。

A. 研究目的

パーキンソン病患者では病初期から遂行機能障害や記憶障害を中心とする多彩な認知機能障害を呈することが知られている。WAIS-Rは11種類の下位検査の素点を9つの年齢群ごとに評価点に換算し、評価点のプロフィールで知能を評価する検査であり、日本版では1402人の階層化モデルを用いてどの年齢群においても各下位検査の評価点の平均が10、標準偏差が3前後となるように調整されている。パーキンソン病患者においてWAIS-Rの下位検査のプロフィールを検討した報告は少なく、少数例の報告（アメリカ版WAIS-R）で言語性IQが動作性IQを上回ることが報告されているのみである。またWAIS-Rの成績と局所脳血流との相関はアルツハイマー病患者において頭頂葉の局所脳血流が報告されているが、パーキンソン病での報告はない。そこで我々は、WAIS-Rを用いて、パーキンソ

ン病患者を対象に認知機能の特徴を分析し、さらに局所脳血流とWAIS-Rの結果の相関について検討した。

B. 研究方法

1991年1月から1999年10月までに当科を受診したパーキンソン病患者で、WAIS-Rを施行した69名（男36名、女33名、平均年齢 $66 \pm 8.7$ 歳、平均発症年齢 $57 \pm 10$ 年、平均罹病期間 $8.9 \pm 7.0$ 年）のWAIS-Rの成績を対象とした。痴呆の有無は問わなかったが、脳血管障害を含む他の器質的脳疾患を合併する症例は除外した。modified Hoehn-Yahrのステージは1; 7名、1.5; 3名、2; 12名、2.5; 2名、3; 32名、4; 12名、5; 1名であった。運動障害のため動作性下位検査が実行不可能であったものが10名いたため、言語性下位検査の評価点のみを調査対象とした。WAIS-Rの言語性下位検査（「知識」、「数唱」、「単

語」、「算数」、「理解」、「類似」)の評価点の間に有意な差が生じるかをANOVA (post hocはScheffe-F test)で検討した。危険率は5%とした。検討は全例(69名)と、言語性IQが80以上の例(50名、平均年齢66±9.1歳、平均発症年齢59±10年、平均罹病期間7.9±6.2年、modified Hoehn-Yahrのステージは1; 6名、1.5; 3名、2; 10名、2.5; 2名、3; 22名、4; 6名、5; 1名)言語性IQが79以下の例(19名、平均年齢66±7.8歳、平均発症年齢54±11年、平均罹病期間12±8.4年、modified Hoehn-Yahrのステージは1; 1名、1.5; 0名、2; 2名、2.5; 0名、3; 10名、4; 6名、5; 0名)に分けて行った。また言語性IQおよび言語性下位検査評価点と、検査時点でのtrihexyphenidyl、L-DOPA/DCI合剤内服量(L-DOPA量)との相関( $p<0.05$ )を検討した。

上記患者のうち右利き患者44名(言語性IQ>80:35名、言語性IQ<79:9名)を対象としてWAIS-R施行前後3ヶ月以内にECD-SPECT (Patlak法)で脳血流を定量した。局所脳血流と、言語性IQの影響を除外した「算数」評価点との相関を検討するため言語性IQが79以下の症例も対象とした。statistical parametric mapping (SPM)で画像及び統計処理を行い、脳血流が「算数」の評価点と相関( $p<0.05$ )を示す部位を求めた。全脳血流は各症例とも50ml/min/100gとなるように補正した。言語性IQによる影響はcovariate of confoundとしてSPMによる統計処理で除外した。

### C. 研究結果

対象全69例(言語性IQの平均±標準偏差: 89±15、範囲: 51~121)では、WAIS-R下位

項目の平均評価点間に有意な差は生じなかった。一方、言語性IQが80以上の50例(言語性IQの平均±標準偏差: 96±11、範囲: 80~121)のみで検討すると「知識」、「単語」、「理解」と比較し「算数」のみが有意に低下していた( $p<0.05$ )。言語性IQが79以下の19例(言語性IQの平均±標準偏差: 71±7.8、範囲: 51~79)では各下位項目間に有意差を生じず、評価点の全般的な低下傾向を示した。検査時点でのtrihexyphenidyl、L-DOPAの内服量は言語性IQおよび言語性下位検査評価点と有意な相関を示さなかった。「算数」の評価点は、右ブロードマン6, 40, 44, 47島皮質および左ブロードマン44, 45野の相対的脳血流と有意に正相関した。

### D. 考察

本研究では言語性IQが80以上の症例で「算数」評価点の低下を認めた。言語性下位検査のなかで「算数」のみが時間制限のある検査であることから、中期以降のパーキンソン病患者に見られる精神緩慢の影響を受けているとも考えられる。しかし対象は発症早期の症例も含んでおり、選択的な算数評価点の低下を精神緩慢だけでは説明できない。また抗コリン薬は認知機能障害を引き起こすことが知られており、L-DOPAも認知機能障害を引き起こすという報告がある。本研究ではtrihexyphenidyl、L-DOPAの検査時点での内服量は言語性下位検査のいずれの評価点とも相関しなかったが、「算数」評価点との相関を否定するには至らなかった。

WAIS-Rの「算数」は、読み上げられた文章題を聞きとり、理解し、心理的操作によって式を組み立て、暗算を行い、言語で回答を表出する作業である。紙に書き取って計算を



行うことは禁じられており、問題は式及び計算が単純なものから順に、後半になるほど複雑になるように配列されている。一方、一般的に算数問題の解決には多くの高次神経機能が関与しており、そのいずれが障害されても能力低下が生じると考えられている。その要因には(1)注意力障害、(2)即時記憶障害、(3)数字の認知障害、(4)数字の表出障害、(5)演算記号の認知障害、(6)演算記号の表出障害、(7)空間認知の障害：数の空間的配列の認知障害で、筆算の障害が著明、(8)構成能力障害、(9)痴呆、(10)演算の障害：上記(1)~(9)のいずれの要因にもよらず、計算の基本的な約束が失われたもの、などが挙げられる。本研究において、言語性IQが80以上の症例では「数唱」の評価点は他の下位検査と比較し優位な低下を認めないことから(3)、(4)は否定的であるが、「算数」評価点との間に有意差を認めなかったことから軽度の注意力障害あるいは即時記憶障害は否定しきれない。またこれらの症例では「算数」の易しい問題の解答は可能であり、演算記号の認知、表出は可能と考えられ(5)、(6)は否定的である。計算は暗算であり、口頭で答える問題形式であるが、筆算の情景を思い浮かべて計算する場合を考えると(7)、(8)は否定しきれない。言語性IQが保たれていることは必ずしも痴呆でないことを意味しないが、言語性IQの低い症例では「算数」のみならず下位検査評価点の全般的低下を示すことから、(9)は考えにくい。計算能力は学習により後天的に獲得されるため、教育歴も考慮に入れる必要があるが、同様に教育による影響の大きい「知識」、「単語」の評価点が保たれていることから教育歴の影響も考えにくい。したがって本研究で見られた「算数」評価点の低下は、上記(1)~(10)の

要因の中では軽度の注意力障害、即時記憶障害、空間認知障害、構成能力障害および演算障害が原因である可能性が考えられる。

演算の心理操作の一部に作働記憶が関与しているとする報告が多数ある。作働記憶とは、人が思考する際に必要な情報を一時的に記憶しながら、それを過去の情報をもとに操作するという心理機構を指し、聴覚情報を記憶する音響ループ、視覚情報を記憶する視空間スケッチパッド、及びこれら2つの下位記憶システムを操作する中枢実行部に分けられると考えられている。パーキンソン病患者では病初期の、痴呆のない症例でも視空間的作働記憶（視空間スケッチパッド及び中枢実行部）の障害が認められることが知られており、本研究で見られた「算数」評価点の低下は視空間的作働記憶の障害による演算の障害である可能性がある。空間認知障害および構成能力障害も視空間スケッチパッドの障害として存在する可能性があり、注意力障害は中枢実行部の障害として存在する可能性がある。

相対的脳血流が「算数」の評価点と正相関した領域のうち右ブロードマン6, 40, 47（右弁蓋に相当する）は、健常人のPETを用いた賦活試験で視空間的作働記憶のタスクで賦活される部位である。パーキンソン病患者ではこの部位の機能低下が視空間的作働記憶の障害をもたらし、算数の評価点低下をもたらしている可能性がある。ただしこの結果はあくまでも「算数」評価点と相対的な右弁蓋脳血流の相関を示しているにすぎず、パーキンソン病患者で右弁蓋の脳血流が低下する、ということは意味しない。

## E. 結論

言語性IQが80以上の50例では「知識」、

「単語」、「理解」と比較し「算数」のみが有意に低下していた。「算数」の評価点は、右ブロードマン6, 40, 44, 47 島皮質および左ブロードマン44, 45野の相対的脳血流と有意に正相関した。「算数」評価点の低下は視空間的作働記憶の障害による演算の障害である

可能性がある。

#### F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
- 2 学会発表：別紙記載

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Shinpo, K., Kikuchi, S., Moriwaka, F., Tashiro, K. : Protective effects of the TNF-ceramide pathway against glutamate neurotoxicity on cultured mesencephalic neurons, *Brain Res.* 819, 170-173, 1999
- Suzuki T, Ogata A, Tashiro K. Nagashima K, Tamura M, Nishihira J  
Augmented expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the telencephalon of the developing rat brain, *Brain Res* 816:457-462, 1999
- Kikuchi S, Shinpo K, Moriwaka F, Makita Z, Miyata T, Tashiro K. :  
Neurotoxicity of methylglyoxal and 3-deoxyglucosone on cultured cortical neurons: synergism between glycation and oxidative stress, possibly involved in neurodegenerative diseases *J. Neurosci. Res.* 57:280-289, 1999
- Sudo, K., Fujiki, N., Tsuji, S., Ajiki, M., Higashi, T., Niino, M., Kikuchi, S., Moriwaka, F., Tashiro, K. : Focal (segmental) dyshidrosis in syringomyelia, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 67, 106-108, 1999
- Kikuchi S, Ogata A, Shinpo K, Moriwaka F, Fujii J, Taniguchi N, Tashiro K. :  
Detection of an Amadori product, 1-hexitol-lysine, in the anterior horn of the amyotrophic lateral sclerosis and spinobulbar muscular atrophy spinal cord: evidence for early involvement of glycation in motoneuron diseases *Acta Neuropathol (Berl)* 99: 63-66, 2000
- Suzuki T, Ogata A, Tashiro K. nagashima K, Tamura M, Yasui K, Nishihira J.: A method for detection of a cytokine and its mRNA in the central nervous system of the developing rat, *Brain Res Protocols* 4:271-279, 1999
- 須藤和昌、田代邦雄 : 脊髄空洞症の発汗過多・発汗低下、*脊椎脊髄* 12 :845-849, 1999
- 菊地誠志、蔭山博司、田代邦雄 : パーキンソン病の鑑別診断、*総合臨床* 48:2796-2803, 1999
- 蔭山博司、菊地誠志、森若文雄、田代邦雄 : パーキンソン病の検査所見、*診断治療* 87:591-595, 1999
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y. :  
Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin: †Absence of protein in AR-JP Patients. *Ann Neurol* 45:655-658, 1999
- Wang M, Hattori N, Matsumine H, Kobayashi T, Yoshino H, Morioka A, Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y. : Polymorphism in the parkin gene among sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 45:668-672, 1999
- Nisipeanu P, Inzelberg R, Blumen SC, Carasso RL, Hattori N, Matsumine H,