

神経変性疾患に関する研究

(課題番号 H11-特疾-15)

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
平成12年度研究報告書

平成13年3月

主任研究者 田代邦雄

(北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻神経病態学講座神経内科学分野)

目次

研究組織	1
研究成果の概要	2
総括研究報告書	5
分担研究報告書	
1 パーキンソン病の発症機序に関する分子生物学的研究	8
順天堂大学医学部脳神経科	水野 美邦
2 多系統萎縮症とそのサブタイプとの異同に関する検討	12
広島大学医学部第三内科	中村 重信
3 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン痴呆複合の タウ蛋白の生化学的分析	15
三重大学医学部神経内科	葛原 茂樹
4 正常およびALS 剖検脊髄における 受容体型チロシンキナーゼ EphA4 の発現	17
自治医科大学神経内科	中野 今治
5 孤発性および家族性筋萎縮性側索硬化症における CAG/CTG expansion の検討	19
自治医科大学神経内科	中野 今治
6 アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる MPTP パーキンソン病 モデルサルの遺伝子治療 一前臨床研究一	21
自治医科大学神経内科	中野 今治
7 運動ニューロン発現プロファイル	24
名古屋大学大学院医学研究科神経内科学	祖父江 元

8	家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) 培養神経細胞モデルに おけるシャペロンによる変移 SOD1 凝集体抑制効果の検討	27
	名古屋大学大学院医学研究科神経内科学 祖父江 元	
9	ヒト脊髄よりクローニングした新規遺伝子 Dorfin の機能解析 ー運動ニューロン死との関連についてー	30
	名古屋大学大学院医学研究科神経内科学 祖父江 元	
10	パーキンソン病における大脳高次機能障害	33
	国立精神・神経センター武蔵病院 川井 充	
11	臨床調査個人票改訂版 筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病	36
12	研究成果の刊行に関する一覧表	39

研究組織

主任研究者	田代 邦雄（北海道大学大学院医学研究科神経内科学教授）
分担研究者	水野 美邦（順天堂大学医学部脳神経科教授） 中村 重信（広島大学医学部第三内科教授） 葛原 茂樹（三重大学医学部神経内科教授） 中野 今治（自治医科大学医学部神経内科教授） 祖父江 元（名古屋大学大学院医学研究科神経内科学教授） 川井 充（国立精神・神経センター武蔵病院第2病棟部部长）
研究補助金	44,000 千円

研究結果の概要

本研究班は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症 (Kennedy-Alter-Sung 病)、脊髄空洞症、パーキンソン病 (PD)、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、ペルオキシソーム病、ライソゾーム病の 10 疾患を対象疾患とし、それらの基礎的ならびに臨床的研究を進展させ、これら難病の治療法の開発も視野に入れた調査研究を行うことを目的としている。

主任研究者 (田代邦雄) 1 名、分担研究者 (水野美邦、中村重信、葛原茂樹、中野今治、祖父江 元、川井 充) 6 名に研究協力者 (青木正志、阿部康二、荒崎圭介、岩崎泰雄、岡本幸市、小川紀雄、郭 伸、梶 龍児、加知輝彦、久野貞子、近藤智善、高橋 均、田中順一、中島健二、中田 力、中野亮一、中川正法、長谷川一子、水澤英洋、森松光紀、森若文雄、山田 猛、渡部和彦) 23 名、計 30 名の研究体制で、ALS、PD およびそれらの関連疾患に重点をおき、分子遺伝学、神経病理、神経薬理、神経化学、神経生理、神経疫学、神経治療などの多方面から各個研究、プロジェクト研究を展開している。

平成 12 年度研究班のワークショップ・班会議・研究報告会を平成 13 年 1 月 12 日～13 日に全共連ビルで開催した。

ワークショップは「大脳皮質基底核変性症をめぐって」のテーマで、「欧米およびわが国におけるこれまでの経過」、「Corticobasal degeneration の病理診断基準剖検例ならびに剖検例からみた臨床」、「大脳基底核変性症 (CBD) における失行 — その特徴と診断上の重要性」、「画像診断 MRI、PET 所見からみた診断基準」、「生化学的診断マーカー」についての発表があり、本症には典型的な臨床症候、経過を呈する症例群のほか、非典型的な症候、経過を呈する症例群があり、今後、班構成員共同での実態調査を行い、診断基準の確定、さらには特定疾患申請への提言を進めていくことにした。

研究報告会では 55 題の各個研究が発表された。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の基礎研究として、多発地 ALS における環境要因の検討として低 CaMg 食投与マウスの皮膚病変の検討、ALS 脊髄におけるグルタミン酸受容体サブユニットの分子変化の単一運動ニューロンを用いた解析、フリーラジカルによるラット腰髄培養神経細胞死、ALS における macrophage migration inhibitory factor の解析がなされた。遺伝子関連では変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおける運動ニューロン死、Cu/Zn SOD 活性中心に遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスの作製、家族性 ALS 26 家系の Cu/Zn SOD 遺伝子解析と臨床および病理学的特徴の検討、Cu/Zn SOD 遺伝子にホモ接合性変異を認めた家族性 ALS が発表され、家族性 ALS における変異 SOD1 遺伝子異状と臨床経過、予後との関連を明らかにした。また、沖縄県にみられる近位筋優位の筋萎縮を呈する遺伝性神経原性筋萎縮症の遺伝子座が数個の BAC 領域まで絞り込み、類似の家系が滋賀県にも存在していることを明らかにした。その他、ALS 遺伝子関連で正常および ALS 剖検脊髄における受容体型チロシンキナーゼ EphA4 の発

現、家族性 ALS 培養神経細胞モデルにおけるシャペロンによる変異 SOD-1 凝集体形成抑制効果の検討、運動ニューロンの発現遺伝子プロファイルの検討やヒト脊髄よりクローニングした新規遺伝子 *Dorfin* の機能解析がなされた。また、孤発性および家族性 ALS における CAG/CTG expansion の検討、ALS の前角細胞におけるカテプシン群の発現解析、導入遺伝子コピー数の異なる Gly93Ala トランスジェニックマウスの免疫組織学的検討、球脊髄性筋萎縮症の脊髄前角細胞における Golgi 装置の免疫組織学的検討が分子生物学的、免疫組織学的、神経病理学的手法を用いて検討された。

ALS に対する治療法の開発に関連して、ALS の治療効果をみる評価法としての運動単位推定数の変化、培養脊髄腹側神経細胞に対する T-588 の trophic 効果、神経栄養因子組換えアデノウイルス・ベクターおよびリボザイムを用いた遺伝子治療の開発、超大量メチルコバラミン治療の長期経過で、超大量メチルコバラミン治療の追跡調査で治療群の予後が良好であることが明らかにされた。

パーキンソン病 (PD) の発症機序に関する研究では、放射光マイクロビームを用いたパーキンソン病中脳黒質内鉄分布と化学状態分析がなされた。パーキン蛋白関連では、ユビキチンリガーゼとしてのパーキン蛋白の細胞内局在の検討と yeast two hybrid system を用いたパーキン蛋白の基質探索が行われ、その細胞内局在を明らかにするとともに、蛋白の候補基質の一部を解明した。

培養ラット中脳ドパミン神経の MPP⁺ 誘発性アポトーシスにおける GAPDH の核内蓄積、パーキンソン病患者における高ホモシステイン血症の臨床及び培養実験における検討がなされ、ニューロメラニン合成酵素チロシナーゼの機能異常によるドパミン神経障害、パーキンソン病治療薬セレギニン (L-デプレニール) が培養アストロサイトの神経栄養因子 (NGF、BDNF、GDNF) 産生を刺激するが明らかにした。

PD の治療面では、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる MPTP パーキンソン病モデルサルスの遺伝子治療を進めた。また、相模原地区における家族性パーキンソニズムの原因遺伝子の連鎖解析では Lod Score が 3 以上の染色体領域が 3 ヶ所に絞り込まれた。

パーキンソン病における脳機能画像と臨床症候、パーキンソン病患者の WAIS-R 言語 IQ と脳血流の相関、各種ストレスによる細胞死に対するイムノフィリンリガンドの保護効果とその生化学的基盤、パーキンソン病モデルラットの黒質神経細胞脱落に対する IGF-1 の効果が検討された。パーキンソン病の実態調査は北海道の岩見沢市のみならず、鹿児島県、京都府で調査を開始した。

パーキンソン病関連疾患では、びまん性レビー小体病における α -synuclein/NACP 陽性神経細胞内およびグリア細胞内封入体の広範な出現や 3 世代にわたり発症したびまん性レビー小体病家系の臨床及び病理学的検討がなされ、パーキンソン病における視床封入体の分布と大脳高次機能障害が検討された。

紀伊半島の ALS/パーキンソン痴呆複合 (PDC) は、三重県穂原地区での臨床、病理、タウ蛋白の生化学的分析が行われたが、同じ紀伊半島の和歌山県古座川地区でも ALS/

PDC の発症が認められ、ALS/PDC は紀伊半島全体としてもまだ消滅しているわけではないことが明かとなった。

また、本研究班の対象疾患のうち、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病の臨床調査個人票の改訂を行った。

研究により得られた成果の今後の活用・提供

家族性 ALS における変異 SOD-1 遺伝子、臨床および病理学的特徴を解析することで、遺伝子異常と臨床経過・予後との関連が解明され、ALS の病態解明へ貢献すると考えられる。また、ALS に対する遺伝子治療を含めた治療法の開発が期待される。家族性パーキンソン病 (PD) の発症機序に関する分子生物学的研究ではパーキン蛋白の細胞内局在が明らかにされ、パーキン蛋白の候補基質の一部が解明され、その病態解明が期待される。

PD の疫学調査は、1978 年、1979 年の厚生省研究班の京都府、鹿児島県からの報告により、わが国では人口 10 万対 50 で、欧米に比し有病率が低いとされていた。近年、鳥取県、北海道での調査で人口 10 万対 100 と欧米と大きな差がないことが明らかになったが、先の京都府、鹿児島県での再調査が必要であり、それが開始された。また、パーキンソン病関連疾患である大脳皮質基底核変性症に関するワークショップを開催し、その臨床像、画像所見、生化学的所見を解析し、今後のプロジェクト研究の基盤が作られ、本邦での診断基準 [臨床的基準及び病理学的に確定した症例の基準] の作成に貢献すると思われる。

当研究班の対象疾患 10 疾患の臨床研究のみならず、「難病の診断と治療指針」(六法出版社)の改訂、臨床調査個人票の改訂、難病情報センターの医学講座の改訂を行い、社会的ニードへ対応した。

今後、ALS、PD の分子生物学的研究と、これらの疾患に対する遺伝子治療法の開発推進、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、線条体黒質変性症の診断基準の確定と公費負担特定疾患認定への提言のための臨床調査個人票の作成、日本特有の優性遺伝性筋萎縮症、常染色体劣性若年性パーキンソニズムおよび紀伊半島の ALS/PDC の病態解明を目指し、最終年度までの 3 年間に研究の継続、充実、進展を図り、研究成果の普及に努める。

總 括 研 究 報 告

神経変性疾患に関する研究

主任研究者 田代 邦雄 北海道大学大学院医学研究科教授

研究要旨

本研究班は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症（Kennedy-Alter-Sung 病）、脊髄空洞症、パーキンソン病（PD）、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、ペルオキシソーム病、ライソソーム病の 10 疾患を対象疾患とし、それらの基礎的ならびに臨床的研究を進展させ、これら難病の治療法の開発も視野に入れた調査研究を行うことを目的としている。主任研究者 1 名、分担研究者 6 名に、研究協力者は新たに 1 名を追加した 23 名、計 30 名の研究体制で、ALS、PD、それらの関連疾患に重点をおき、プロジェクト研究、各個研究を分子遺伝学、神経病理、神経薬理、神経化学、神経生理、神経疫学、神経治療などの多方面から展開した。

A. 研究目的

本研究班は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症（Kennedy-Alter-Sung 病）、脊髄空洞症、パーキンソン病（PD）、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、ペルオキシソーム病、ライソソーム病の 10 疾患を対象疾患とし、それらの基礎的ならびに臨床的研究を進展させ、これら難病の治療法の開発も視野に入れた調査研究を行うことを目的としている。

B. 研究方法

平成 12 年度は、主任研究者 1 名、分担研究者 6 名に、研究協力者は新たに 1 名を追加した 23 名、計 30 名の研究体制で研究を行った。

ALS、PD およびそれらの関連疾患に重点をおき、プロジェクト研究、各個研究を分子遺伝学、神経病理、神経薬理、神経化学、神経生理、神経疫学、神経治療などの多方面から展開した。平成 11 年度はプロジェクトリーダーを決め、研究体制の構築と研究の着手に重点を置いたが、平成 12 年度は研究の継続と充実を図り、研究

成果の普及に努めた。

C. 研究成果

平成 13 年 1 月 12 日～13 日に平成 12 年度研究班のワークショップ・班会議・研究報告会を全共連ビルで開催した。

ワークショップは「大脳皮質基底核変性症をめぐって」のテーマで、「欧米およびわが国におけるこれまでの経過」、「Corticobasal degeneration の病理診断基準剖検例ならびに剖検例からみた臨床」、「大脳基底核変性症（CBD）における失行 — その特徴と診断上の重要性」、「画像診断 MRI、PET 所見からみた診断基準」、「生化学的診断マーカー」についての発表があり、本症には典型的な臨床症候、経過を呈する症例群のほか、非典型的な症候、経過を呈する症例群の存在が明らかにされた。今後、班構成員共同での実態調査を行い、診断基準の確定、さらには特定疾患申請への提言を進めていくことにした。

研究報告会では 55 題の各個研究が発表された。

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の基礎研究として、多発地 ALS における環境要因の検討として低 CaMg 食投与

マウスの皮膚病変の検討、ALS 脊髄におけるグルタミン酸受容体サブユニットの分子変化の単一運動ニューロンを用いた解析、フリーラジカルによるラット腰髄培養神経細胞死、ALS における macrophage migration inhibitory factor の解析がなされた。遺伝子関連では変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおける運動ニューロン死、Cu/Zn SOD 活性中心に遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスの作製、家族性 ALS 26 家系の Cu/Zn SOD 遺伝子解析と臨床および病理学的特徴の検討、Cu/Zn SOD 遺伝子にホモ接合性変異を認めた家族性 ALS が発表され、家族性 ALS における変異 SOD1 遺伝子異状と臨床経過、予後との関連を明らかにした。また、沖縄県にみられる近位筋優位の筋萎縮を呈する遺伝性神経原性筋萎縮症の遺伝子座が数個の BAC 領域まで絞り込み、類似の家系が滋賀県にも存在していることを明らかにした。その他、ALS 遺伝子関連で正常および ALS 剖検脊髄における受容体型チロシンキナーゼ EphA4 の発現、家族性 ALS 培養神経細胞モデルにおけるシャペロンによる変異 SOD-1 凝集体形成抑制効果の検討、運動ニューロンの発現遺伝子プロファイルの検討やヒト脊髄よりクローニングした新規遺伝子 *Dorfin* の機能解析がなされた。また、孤発性および家族性 ALS における CAG/CTG expansion の検討、ALS の前角細胞におけるカテプシン群の発現解析、導入遺伝子コピー数の異なる Gly93Ala トランスジェニックマウスの免疫組織学的検討、球脊髄性筋萎縮症の脊髄前角細胞における Golgi 装置の免疫組織学的検討が分子生物学的、免疫組織学的、神経病理学的手法を用いて検討された。

ALS に対する治療法の開発に関連して、ALS の治療効果をみる評価法としての運動単位推定数の変化、培養脊髄腹側神経細胞に対する T-588 の trophic 効果、神経栄養因子組換えアデノウイルス・ベクターおよびリポザイムを用いた遺伝子治療の開発、超大量メチルコバラミン治療の長期経過で、超大量メチルコバラミン治療の追跡調査で治療群の予後が良好であることが明らかにされた。

パーキンソン病 (PD) の発症機序に関する研究では、放射光マイクロビームを用いたパーキンソン病中脳黒質内鉄分布と化学状態分析がなされた。パーキン蛋白関連では、ユビキチンリガーゼとしてのパーキン蛋白の細胞内局在の検討と yeast two hybrid system を用いたパーキン蛋白の基質探索が行われ、パーキン蛋白の細胞内局在を明らかにし、パーキン蛋白の候補基質の一部を解明した。

培養ラット中脳ドパミン神経の MPP⁺ 誘発性アポトーシスにおける GAPDH の核内蓄積、パーキンソン病患者における高ホモシステイン血症の臨床及び培養実験における検討がなされ、ニューロメラニン合成酵素チロシナーゼの機能異常によるドパミン神経障害、パーキンソン病治療薬セレギニン (L-デプレニール) が培養アストロサイトの神経栄養因子 (NGF、BDNF、GDNF) 産生を刺激するが明らかにした。

PD の治療面では、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる MPTP パーキンソン病モデルサルでの遺伝子治療を進めた。また、相模原地区における家族性パーキンソニズムの原因遺伝子の連鎖解析では Lod Score が 3 以上の染色体領域が 3 ヶ所に絞り込まれた。

パーキンソン病における脳機能画像と臨床症候、パーキンソン病患者の WAIS-R 言語 IQ と脳血流の相関、各種ストレスによる細胞死に対するイムノフィリンリガンドの保護効果とその生化学的基盤、パーキンソン病モデルラットの黒質神経細胞脱落に対する IGF-1 の効果が検討された。パーキンソン病の実態調査は北海道の岩見沢市のみならず、鹿児島県、京都府で調査を開始した。

パーキンソン病関連疾患では、びまん性レビー小体病における α -synuclein/NACP 陽性神経細胞内およびグリア細胞内封入体の広範な出現や 3 世代にわたり発症したびまん性レビー小体病家系の臨床及び病理学的検討がなされ、パーキンソン病における視床封入体の分布と脳高次機能障害が検討された。

紀伊半島の ALS/パーキンソン病痴呆複合 (PDC) は、三重県穂原地区での臨床、病理、タウ蛋白の生化学的分

析が行われたが、同じ紀伊半島の和歌山県古座川地区でも ALS/PDC の発症を認められ、ALS/PDC は紀伊半島全体としてもまだ消滅しているわけではないことが明らかとなった。

また、本研究班の対象疾患の筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病の臨床調査個人票の電子媒体化とこれらの臨床調査個人票の改訂を行った。当研究班の対象疾患 10 疾患の臨床研究のみならず、「難病の診断と治療指針」(六法出版社)の改訂、臨床調査個人票の改訂、難病情報センターの医学講座の改訂を行い、社会的ニードへ対応した。

D. 考察

本研究班の対象疾患は、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病などの 10 疾患であり、これらおよび関連疾患に重点をおいて、プロジェクト研究、各個研究を多方面から進め、家族性 ALS における変異 SOD-1 遺伝子異常と臨床経過・予後との関連が解明され、ALS の病態解明への貢献、また、ALS に対する遺伝子治療を含めた治療法の開発が期待される。家族性パーキンソン病の発症機序に関する分子生物学的研究ではパーキン蛋白の細胞内局在が明らかにされ、パーキン蛋白の候補基質の一部が解明され、その病態解明が期待される。

パーキンソン病の疫学調査は、1978 年、1979 年の厚生省研究班の京都府、鹿児島県からの報告により、わが国では人口 10 万対 50 で、欧米に比し有病率が低いとされていた。近年、鳥取県、北海道での調査で人口 10 万対 100 と欧米と大きな差がないことが明らかになったが、先の京都府、鹿児島県での再調査が必要であり、それが開始された。また、パーキンソン病関連疾患である大脳皮質基底核変性症に関するワークショップを開催し、その臨床像、画像所見、生化学的所見を解析し、今後のプロジェクト研究の基盤が作られ、本邦での診断基準 [臨

床的基準及び病理学的に確定した症例の基準] の作成に貢献すると思われる。

当研究班の対象疾患 10 疾患の臨床研究のみならず、「難病の診断と治療指針」(六法出版社)の改訂、臨床調査個人票の改訂、難病情報センターの医学講座の改訂を行い、社会的ニードへ対応した。

今後、ALS、PD の分子生物学的研究と、これらの疾患に対する遺伝子治療法の開発推進、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、線条体黒質変性症の診断基準の確定と公費負担特定疾患認定への提言のための臨床調査個人票の作成、日本特有の優性遺伝性筋萎縮症、常染色体劣性若年性パーキンソニズムおよび紀伊半島の ALS/PDC の病態解明を目指し、最終年度までの 3 年間に研究の継続、充実、進展を図り、研究成果の普及に努める。

E. 結語

筋萎縮性側索硬化症、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症 (Kennedy-Alter-Sung 病)、脊髄空洞症、パーキンソン病、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、ペルオキシソーム病、ライソソーム病の 10 疾患を対象疾患とした本研究班は、これらの疾患の基礎的ならびに臨床的研究を推進させ、治療法の開発も視野に入れた調査研究を行うことを目的としている。主任研究者 1 名、分担研究者 6 名、研究協力者 23 名、計 30 名の研究体制で、プロジェクト研究、各個研究を進めた。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

分 担 研 究 報 告

パーキンソン病の発症機序に関する分子生物学的研究

分担研究者 水野 美邦 順天堂大学医学部教授

研究要旨

パーキンソン病の発症機序に関し、我々のグループで遺伝子クローニングに成功した常染色体性劣性遺伝の若年性パーキンソン病（ARJP）の原因であるパーキン遺伝子の遺伝子産物であるパーキン蛋白の機能解析を中心に研究を行った。パーキン蛋白の機能については、田中啓二らとの共同研究にて、これがユビキチンリガーゼの一種であることを明らかにしているが、本研究においては、パーキン蛋白の細胞内局在を詳細に検討し、これがGolgi装置とシナプス小胞に存在することを明らかにした。即ち輸送小胞に結合して軸索輸送を受ける蛋白である。次にパーキン蛋白の基質探索をyeast two hybrid methodで行い、シナプス蛋白の一種であるCDC-rel1がその候補の1つであることを明らかにした。CDC-rel1は、シナプスにおいてexocytosisを抑制する蛋白であり、パーキンの欠損によりCDC-rel1の分解が障害されると、神経終末部にこれが蓄積し、ドーパミンの放出を障害し、パーキンソニズムの発現、酸化的ストレスによる細胞障害を惹起する可能性がある。これらの結果は、孤発型パーキンソン病の発症機序にも示唆を与える結果であり、ユビキチンシステムや酸化的障害の研究が孤発型パーキンソン病においても重要であることを示している。

A. 研究目的

パーキンソン病は黒質、青斑核の選択的神経細胞死により特徴づけられる原因不明の神経変性疾患で、その原因解明は焦眉の急である。大部分が孤発性であるが、一部家族性を示し、それらにおいては黒質変性機序を分子レベルで解明できる可能性が高い。本研究において、我々は我々のグループにより原因遺伝子の単離と、遺伝子産物の機能解析に成功したパーキン遺伝子に関する分子レベルでの研究を推進することを目的とした。

パーキン蛋白質はN末端にユビキチン様ドメイン（Ubl）を、C末端には二つのRING-finger motifsとそれらをつなぐin-between-RINGからなるRING boxを持つ。我々はパーキン蛋白の細胞内局在をまず解析した。次にパーキン蛋白の基質を明らかにする目的でyeast two hybrid systemを用いてパーキン蛋白に結合する蛋白を解析した。

一方パーキンソン病類似の臨床症状を呈する進行性核上性麻痺（PSP）や大脳皮質基底核変性症（CBD）では、神経細胞内にタウ蛋白の蓄積があり、その研究も神経変性の機序を解明するために重要である。本研究で我々はPSPとCBDにおける異常リン

酸化タウ4 Rアイソフォームの蓄積にmRNAレベルでの各アイソフォームの発現がどのように関わっているかを検討した。

B. 研究方法

1) パーキン蛋白の細胞内局在

プラスミドの構築：ヒト脳メッセンジャーRNAからRT-PCRで増幅したパーキン遺伝子断片をpcDNA3.1(+), pQBI25ベクター各々のBamHI, NheI siteにサブクローニングし、MycまたはGFP (green fluorescent protein)との融合蛋白質の発現ベクターを構築した。パーキン変異体はsite-directed mutagenesisにより作製した。すべてのプラスミドの塩基配列はDNAシーケンサーで確認し、以下の実験に使用した。

培養細胞への形質導入：HEK293, SH-SY5Y, U373 MG, COS-1細胞を5% CO₂, 37度でDMEM (10% FBS)培養液中で培養し、70~80% confluentの状態で行ポフェクション法にて形質導入した。これらの細胞は形質導入36~48時間後に解析に用いた。免疫沈降で使用する際は細胞回収12時間前に50 mM MG132を加えた。

定した。病理学的検討は、各症例の前頭葉皮質、一部PSP症例の淡蒼球のパラフィン包埋切片を抗リン酸化タウ抗体であるAT8にて免疫染色して評価した。

C. 研究結果

1) パーキン蛋白の細胞内局在

HEK293細胞にMycタグパーキンおよびFLAGタグUbcH7を共発現させ抗Myc抗体で免疫沈降を行うと、パーキンはUbcH7と共沈した。この結合はパーキンがRING box構造を有する時のみ認められた。またSH-SY5Y細胞にMycタグパーキンとFLAGタグユビキチンを共発現させると、プロテアソーム阻害剤MG132の存在下でパーキンは高分子ユビキチン化蛋白と共沈した。さらにSH-SY5Y細胞で発現させたMycタグパーキンをを用いたin vitro ubiquitination assayにてパーキンのユビキチンリガーゼ活性を確認した。次に細胞内局在を検討するため、U373 MGおよびSH-SY5Y細胞を用いて免疫染色を行った。U373 MG細胞内のパーキンは核周囲に集積して認められた。この細胞をさらにゴルジ体のトランスゴルジ網に存在する γ -アダプチンに対する抗体を用い二重染色したところパーキンと γ -アダプチンは共染され、パーキンはU373MG細胞においてトランスゴルジ網に存在していることが明らかとなった。

次にカテコールアミンを含有するヒト神経芽細胞種由来のSH-SY5Y細胞を用いたところ、レチノイン酸により神経様分化させたSH-SY5Y細胞においてパーキンの免疫染色性はゴルジ体に認められ、さらに分化誘導により伸長した神経様突起内に顆粒状に存在した。これらはシナプトタグミンと共存し、パーキンがシナプス小胞に存在する可能性を考えた。そこでラット脳より遠心分画法にてシナプス小胞を精製し、ショ糖密度勾配法によりパーキン、シナプトフィジン、およびシナプトタグミンの分布を比較検討した。パーキンはシナプス小胞分画で最も濃縮され、ショ糖密度勾配法では二峰性のピークを示した。同時に行ったシナプス小胞蛋白(シナプトフィジン、

シナプトタグミン)のimmunoblotも同様の分布を示した。これらの結果からパーキンがシナプス小胞に局在する可能性がさらに強く示唆された。これを直接的に証明するため、シナプトソーム粗分画を用いて抗パーキン抗体による免疫電顕を行うと、シナプス小胞の膜上にパーキンの免疫染色性を認め、パーキンがシナプス小胞に局在することを明らかにした。

しかしパーキンのアミノ酸配列にはいかなるsignal

sequenceも膜貫通領域も認めないことから、パーキンがどのような機序で膜に局在するのかを検討した。ラット精製シナプス小胞を様々な濃度の塩で処理し、パーキンの可溶性を調べると、パーキンは塩濃度依存性に膜から可溶化され、静電的に膜に結合していると考えられた。次にパーキンの膜局在に関するドメインを検索する目的で行った各種パーキン欠失変異体とGFPの融合蛋白の強制発現系の実験では、Ublのみが細胞質に均一に認められ、他の変異体は核周囲に集積した。これらの細胞を界面活性剤非存在下で破碎し超遠心すると、Ublのみが可溶性分画に回収され、他の変異体は膜分画に沈殿し、生化学的にも同様の結果を得た。

2) パーキン蛋白の基質解析

患者から得られたパーキン mutantとUbcH7との結合を調べた。RING boxに変異を持つパーキン mutantとUbcH7との結合が消失していた。そしてパーキン mutantのリガーゼ活性を調べたが、すべてのパーキン mutantでリガーゼ活性が消失していた。

次に細胞の種類によりパーキンのリガーゼ活性に違いがあるかどうかを確認するためにいくつかの培養細胞を用いてパーキンのリガーゼ活性の有無を調べた。SH-SY5Y, PC12, NT2などの神経系の培養細胞内にパーキンをtransfectionさせたところパーキンのリガーゼ活性が確認された。正確な定量は行っていないがNT2よりSH-SY5Y, PC12でpoly-ubiquitination鎖の量が多くカテコラミンをNeurotransmitterとするNeuronへ分化可能なcell lineにおいて基質が存在しているとわかった。しかし、HEK293, HeLaなどの神経系以外の培養細胞内ではパーキンのリガーゼ活性は消失していた。よりhomogeneousな材料を用いた方がbinding proteinを単離できると考えSH-SY5YのcDNA libraryを用いた。1 \times 10⁷Screeningによりパーキン蛋白と結合する異なる14のclonesが得られた。その1つにCDCrel-1が含まれていた。

CDCrel-1蛋白はsynaptic vesicleに存在することが報告されており、細胞内局在はパーキン蛋白と一致している可能性が考えられた。Yeast内ではパーキンのubl domainおよびubl-linkerのみ発現させるとCDCrel-1との結合が強く見られた。このCDCrel-1をmammalian expression vectorにsubcloningし、培養細胞内にパーキン蛋白とともに過剰発現させ、免疫沈降法を用いて結合を確認した。また、パーキン蛋

免疫沈降：10 cm dishより回収した形質導入細胞沈殿に1 ml lysis buffer を加え、4度30分間攪拌し、10,000 xg 10分間の上清を得た。この上清に2 mgの抗Mycポリクローナルを加え4度で1時間反応させ、10 ml protein A sepharoseビーズにて免疫沈降を行った。ビーズを洗浄し30mlサンプルバッファーで溶解後、SDS-PAGE, immunoblotを行った。

in vitro ubiquitination assay：SH-SY5Y細胞で発現させたMycタグパーキンを抗Myc抗体で免疫沈降したものに¹²⁵Iで標識したユビキチン、ユビキチン活性化酵素、UbcH7, ATPを加え30度1時間反応させたものをオートラジオグラフィーで検出した。

培養細胞の免疫染色：U373 MGおよび100mMレチノイン酸にて3週間処理し神経細胞様に分化したSH-SY5Y細胞を4%パラホルムアルデヒドにて室温で10分間固定、M74抗パーキンポリクローナル抗体¹³⁾と抗g-アダプチンまたは抗シナプトタグミンモノクローナル抗体を加え、それぞれFITC, TRITCにて発色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

ラットシナプス小胞の精製：20匹のWhisterラット (adult) 脳を180 mlのhomogenization buffer (0.32M ショ糖, 4mM HEPES)中、ガラステフロンhomogenizerで破碎 (900 rpm, 9 strokes) し、ショ糖密度勾配法で各分画を得、SDS-PAGE, immunoblotのサンプルとした。

ラットシナプトソームの免疫電顕：ラットシナプトソームの5 mm凍結切片を4%パラホルムアルデヒドにて4度で30分間固定後、2%ウシ血清アルブミンで4度30分間のブロッキングを行った。その後、M74抗パーキンポリクローナル抗体で4度一晩反応後、HRP標識二次抗体を加え室温で2時間反応させた。0.5%グルタルアルデヒドで結合抗体を固定し、0.55 mM DABで発色後、2% OsO₄ で後固定し電子顕微鏡 (80 kV) により観察した。

パーキンの可溶化：ラットシナプス小胞分画を様々な濃度のNaCl, KCl, MgCl₂にて氷上30分間処理後、超遠心 (100,000 xg 1時間) で分離し、各々の分画を等量ずつSDA-PAGE, immunoblotに用いた。

蛍光顕微鏡観察と細胞遠心分画：パーキン蛋白の種々の欠失変異を作成し、それぞれのC末端にGFPを付加した欠失変異体をCOS-1細胞に一過性に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内局在を観察した。さらに細胞を回収し0.25Mショ糖緩衝液中でsonication (10秒x3) を行い、100,000 xg, 1時間でfractionationを行った後、沈殿を上清と等量に合わ

せSDA-PAGE, immunoblotに用いた。

2) パーキン蛋白の基質探索

Yeast two hybrid system: パーキン遺伝子のubiquitin like domainからlinker部(ubl-linker)をGAL4 DNA binding domainを含むyeast two hybrid vector (pGBD-C1)にsubcloningした。ScreeningはBrain cDNA libraryおよびSH-SY5YからのcDNA libraryをGAL4 活性ドメインと結合させを行った。パーキンubl-linker をtransfectionしたyeast にBrain cDNA library, SH-SY5Y cDNA libraryをそれぞれtransfectionした。結合を確認するためpGAD-C1 cDNA cloneをyeastより回収しpGBD-C1 パーキン, pGBD-C1 ubl-linkerとco-transformationをおこないβ-galactosidase assayを行った。

発現プラスミドおよび培養細胞へのtransfection: まず、pcDNA3.1(+) のKpnI/BamHI siteにMycとFlagをcodeするoligo DNAを結合させた。このプラスミドにPCRにより増幅したパーキン全長、パーキンのubl domain, ubl-linker, delta-ubl, RING box, およびCDCrel-1をcloningした。SH-SY5Y細胞, PC12細胞, NT2およびHEK293細胞を10% fetal bovine serumを加えたDMEMで培養した。

パーキン point mutantはpcDNA3.1 Flag-に対して、site directed mutagenesis kit を使用しそれぞれのpoint mutantを作成した。

免疫学的検索: Transfection後36時間の培養細胞を使用し、lysis bufferで細胞を破壊し、15000g, 15分遠心した上清を使用した。免疫沈降法の抗体はそれぞれrabbit polyclonal anti-Myc antibody, mouse monoclonal anti-Myc antibody を使用し、Western blotの抗体はmonoclonal anti-Myc antibody, mouse monoclonal anti-FLAG(M2) antibody, mouse monoclonal anti-HA antibody を使用した。

3) タウ蛋白の解析

対象は当院剖検例のうちPSP 6例, CBD 4例, Alzheimer病 (AD) 1例, 正常対照 5例。

定量的RT-PCR法: 凍結保存した剖検脳より前頭葉皮質を、また一部PSP症例からは淡蒼球を切り出しRNAを抽出。これをTaqman probeを用いたrealtime PCR法にてmRNAを定量した。この際4R mRNAを特異的に定量するためExon 10にprobeを設定、また3R特異的なprobe設定が困難であったため3Rと4Rを両方認識するようにExon 9にprobeを設

白の結合部位を確認するためにパーキン欠損mutant (ubl, ubl-linker, delta-ubl, RINGbox)を作成しそれぞれとCDCrel-1との結合を調べた。パーキン全長, ubl-domain, ubl-linker, RING boxとCDCrel-1との結合が確認された。Delta-ublとCDCrel-1との結合は消失していた。

3) タウ蛋白の解析

AT8免疫染色：CBD症例の皮質は4例中3例はastrocytic plaqueやneuropil threadsなどが多数認められ++と評価した。1例は皮質にballooned neuronが中等度と少数astrocytic plaqueが認められたが、タウ陽性病変は非常に乏しく±と評価した。PSP前頭葉皮質では6例中5例はタウ陽性病変に乏しく-から±であった。1例のみ多数のtufted astrocyteとneuropil threadsを認め++と判定した。淡蒼球は2例（いずれも皮質病変の乏しい症例）で評価したが2例ともtufted astrocyteやneuropil threadsが多数認められた（++）。AD皮質には多数の神経原線維変化（NFT）やneuropil threadsを認めた（++）。正常対照例ではタウ陽性病変は認めなかった。

mRNA定量：正常対照例；いずれも今まで言われているように、3Rの方が4Rに比べて2倍から3倍多かった。ADでは正常例と同様3Rの発現量が4Rに比し約1.5倍多かった。CBDでは皮質病変が++の症例では4Rが3Rに比し約1.5から2倍多く発現していた。皮質病変が±の症例では3Rの方が4Rに比べて発現量は多かった。PSPでは皮質病変が-から±の症例では症例によりことなり3Rが多いもの3例と4Rが多いもの2例に分かれた。一方皮質病変が++の症例では3Rが4Rより発現量が多かった。淡蒼球に関しては++の2例はいずれも4Rの発現量が多かった。

D. 考察

パーキン蛋白の細胞内局在に関しては、Golgi装置、輸送小胞、シナプス小胞に存在することを明らかにし、パーキンがUblより下流の広範な部位を介して、静電的にこれらに結合する蛋白であることを明らかにした。パーキンが膜輸送機構により運ばれシナプス小胞に局在するという事実は、パーキンの基質がシナプス終末に存在することを示唆する。

パーキン蛋白の基質に関しては、パーキン蛋白との結合蛋白として異なる14のclonesが得られた。単離されたclonesのうちCDCrel-1蛋白はsyntaxinと結合することでexocytosisを抑制している蛋白である。

したがって、細胞内局在ではCDCrel-1同様synaptic vesicleに存在するパーキンと一致している。さらにパーキンの基質とすればUbiquitin-protein ligase活性がないAR-JP患者脳では蓄積し、シナプスにおいてexocytosisが抑制されることが推測される。正常に行われるべきexocytosisが抑制されれば結果として神経細胞死が生ずることが予想される。

Yeast two hybridおよび免疫沈降の結果からCDCrel-1はパーキンのubl-linker部位と結合していると考えられる。従ってCDCrel-1は基質の1つとして十分詳細な検討すべきものと考えmammalian cell内におけるin vitro binding assayを行った。結果としてRING-box, ubl-linkerと2カ所で結合しているような結果が得られたがdelta-ublでは結合が見られなかったことよりRING boxでも非特異的と考えている。

タウの分析に関しては、CBDの前頭葉皮質およびPSPの淡蒼球ではタウ陽性病変の出現量に相関し4RタウのmRNA発現量が多かった。PSPやCBDで蓄積する異常リン酸化タウは4Rが主であるといわれており、本研究の結果からmRNAレベルでの4R過剰発現が4R優位の異常リン酸化タウ発現、病理学的タウ陽性病変の出現に関与している可能性が考えられた。PSPの皮質病変はタウ陽性病変の有無に関わらず症例により3Rと4Rの出現比率は異なった。これに関してはPSPの皮質病変は皮質下基底核病変に比し必発ではないため症例間で一定した比率をとらないと考えられる。また異常リン酸化タウ病変との関わりに関してはタウのリン酸化の過程でmRNAの発現量以外に何らかの要素が影響しconstantな相関関係が見られないのではないかと推測した。ADは異常リン酸化タウの蓄積が3Rと4Rで同程度であり、mRNAの発現量も正常対照例と変わらない³⁾と言われているが、本研究でも1例だけではあるが正常対照と変わらない発現比率を認めた。

E. 結論

常染色体劣性家族性パーキンソン病の原因蛋白パーキンはシナプス小胞に局在するユビキチンリガーゼである。パーキン蛋白の基質候補の1つがCDCrel-1であることを明らかにした。タウに関しては、PSP、CBDではタウ陽性病変がconstantに出現する部位ではmRNAレベルで4Rが3Rの発現量を上回りこの発現量の差が異常リン酸化タウの4R優位の蓄積に影響していると考えられる。

F. 研究発表：別紙記載

多系統萎縮症とそのサブタイプとの異同に関する検討

分担研究者 中村 重信 広島大学医学部教授

研究要旨

多系統萎縮症(MSA)とそのサブタイプとの異同に関して、次の3点について検討した。1) MSAにおける頭部MRIの異常を検討し、臨床的に分類されたMSAのサブタイプ間では、頭部MRI所見の一部に差異を認めるものの、オーバーラップが大きく、共通する所見を多く認めた。2) MSAにおける心血管系自律神経機能を解析した。その結果、MSAおよびパーキンソン病においては心血管系自律神経機能障害がみられ、MSAではより高度であることが示された。しかし、MSAの臨床的サブタイプ間における心血管系自律神経機能障害には質的相違はみられないことが示唆された。3) 臨床的にShy-Drager症候群、線条体黒質変性症と診断された2症例の延髄弓状核神経細胞密度、脊髄glial cytoplasmic inclusion密度に差は認めなかった。以上の結果から、MSAを敢えてサブタイプの神経変性疾患として分ける必要があるかどうか検討する必要があると思われる。

A. 研究目的

厚生省が難病対策として取り上げる疾患の中に、Shy-Drager症候群(SDS)、脊髄小脳変性症のうちオリブ・橋・小脳萎縮症(OPCA)、線条体黒質変性症(SND)が含まれている。しかし、SDS、OPCA、SNDの3疾患にはオーバーラップがあり、多系統萎縮症(MSA)としてその中でサブタイプを分ける試みがなされている。特定疾患の治療や対策を考える上で、MSAをサブタイプに分ける必要があるかどうかを、画像診断、自律神経機能障害、神経病理学的研究の3方向から検討した。

B. 研究方法

1) 初発症状によりMSA29例をSDS、OPCA、SNDのサブタイプに分類した。頭部MRIを用いて被殻・淡蒼球・中脳・赤核・橋・上小脳脚・中小脳脚・第4脳室・歯状核の計測、小脳虫部・小脳半球・前頭葉・頭頂葉・側頭葉・後頭葉の萎縮

の程度および橋底部・中小脳脚・被殻背外側部・中心前灰白質の異常信号の有無を判定し、正常対照群21例と比較した。また、MSA5例においてdiffusion-weighted imaging: DWIを施行し、大脳白質のapparent diffusion coefficient (ADC)値を算出し、正常群5例と比較した。

2) MSA、パーキンソン病(PD)、同年代の健常対照群について、長時間心電図解析装置を使用して心拍変動のパワースペクトル解析を24時間にわたって行った。高速フーリエ変換を用いて低周波成分(LF)や高周波成分(HF)のパワー値およびそのLF/HFを求め、その日内リズムについても3群間で比較した。さらに、MSA症例サブタイプ間での異同について検討した。

3) 症例1は臨床的にSDSと診断された70歳男性である。起立性低血圧症と排尿障害を主徴とし、全経過7年で死亡した。症例2は臨床的にSNDと診断された60歳女性である。パーキンソンニズ

ムを主徴に全経過 3 年で死亡した。剖検時採取された延髄と脊髄をホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を用いて、HE、KB および GB 染色を行った。延髄弓状核神経細胞密度および脊髄切片を 13-15 に分け、各部位における glial cytoplasmic inclusion (GCI) の密度を顕微鏡下で測定した。

C. 研究結果

1) 正常対照群と比較し、MSA では中脳・橋・上小脳脚・小脳・前頭葉・頭頂葉の萎縮を認めた。サブタイプ間の比較では OPCA で有意に中小脳脚・小脳の萎縮を認めたが、その他の部位では 3 群間で有意差は認めなかった。被殻背外側部 T2 高信号の出現率は SND で有意に高かったが、橋底部・中小脳脚の T2 高信号・被殻背外側部の T2 低信号の出現率には有意差を認めなかった。また、DWI における MSA の大脳白質の ADC 値は、正常対照群と比較して中心前回白質でのみ有意に高値であった。この結果は同部位での拡散状態の亢進を示唆しており、病理変化を反映している可能性がある。

2) PD 群や MSA 群では検状群に比べ 24 時間にわたる LF、HF のパワー値や LF/HF 比は低下し、その日内変動パターンも障害されていた。とくに、MSA 群ではその障害の程度は PD 群よりさらに強い傾向であった。MSA の間では臨床的サブタイプである SND、SDS、OPCA の症例間において LFHF のパワー値、LF/HF 比やその日内変動パターンの相違は認められなかった。

3) 延髄弓状核神経細胞密度は正常 87.1 ± 13.7 個/mm² と較べると症例 1 は 19.2 個、症例 2 は 12.5 個と明らかに減少していたが、症例 1 と 2 の間に差は認めなかった。脊髄における GCI の分布は症

例 1、2 ともに側索、灰白質、赤核脊髄路に高く、後索、胸髄核にはほとんど認めないという特徴があった。最も高い側索では 230 個/mm² と高密度であったが、症例 1 と 2 の間に明らかな差は認められなかった。

D. 考察

1) MSA 症例における大脳白質—中心前回白質の ADC 高値についてはその神経病理学的背景や知的機能障害との関連性をさらに検討する必要がある。

2) MSA 症例における LF や HF 値の異常が他の自律神経系のパラメーターとどのように関連するかを検討する必要がある。また、治療によっていかに変化するかを明にすることが大切である。

3) 延髄弓状核の生理的意義や GCI の病的意義をさらに多くの症例について検討することが必要であろう。

SDS、OPCA、SND は本研究で明らかにされたように、オーバーラップが多い。また、同一症例でも病期によって OPCA→SND→SDS と診断が変化することもある。Gilman ら 1) はこれらを multiple system atrophy とし、SDS、OPCA、SND をそれぞれ MSA-P、MSA-C、MSA-A とすることを提唱している。また、わが国を含めて、多くの国において SDS、OPCA、SND という病名に変わって、MSA という病名がより頻繁に使用されるようになってきている。

わが国の難病対策事業においては SDS、OPCA、SND を別々のカテゴリーとして登録し、適応のある治療薬も SDS、OPCA、SND の個々の疾患で異なっている。しかし、現場の医療ではオーバーラップが多いため、適当な病名をつけて治療し

ていることが少なくない。そのため、疾患頻度などの難病患者の実態把握には支障をきたしている。さらに、SDS 患者で小脳症状を示すもの、SND 患者で小脳症状や自律神経症状を示す者に対する治療には保健診療上の問題点がある。たしかに、病因や disease entity としての議論は大切であるが、神経難病の治療や対策を考える上では、研究班構成の問題も含めて MSA について再検討することが望まれる。

E. 結論

特定疾患の治療や対策を考える上で、MSA をサブタイプに分ける必要があるかどうかを、画像診断、自律神経機能障害、神経病理学的研究の3方向から検討した。その結果、MSA を敢えてサブタイプの神経変性疾患として分ける必要があるかどうかさらに検討する必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン痴呆複合 のタウ蛋白の生化学的分析

分担研究者 葛原 茂樹 三重大学神経内科教授

研究要旨

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン痴呆複合 (Kii ALS/PDC) 剖検脳を用いてタウ蛋白の生化学的分析を行った。Kii ALS/PDC の NFT を構成しているタウ蛋白は AD と同様に過剰にリン酸化されてウエスタンブロットでは triplet band を示し、含まれるタウ isoform, リン酸化部位にも相違点はなかった。電顕で AD の PHF タウと同様の twisted filament が観察された。Kii ALS/PDC のタウ蛋白の生化学的性質は AD と同様であった。

A. 研究目的

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン痴呆複合 (Kii ALS/PDC) の病態の解明を目的に、本疾患の脳組織のタウ蛋白の生化学的性質を分析した。

B. 研究方法

4 例の Kii ALS/PDC 患者の剖検凍結脳を用いて、8 種類のリン酸化依存性抗タウ抗体、2 種類の非依存性抗タウ抗体を用いて、凍結脳より調整した Sarkosyl 不溶性画分のウエスタンブロット、免疫組織染色を行いタウ蛋白のリン酸化部位を検討した。また、脱リン酸化処理不溶性・可溶性タウのウエスタンブロットにより、含まれるタウ isoform を検討した。不溶性タウのネガティブ染色電顕像も観察した。

C. 結果

Kii ALS/PDC の Sarkosyl 不溶性タウは ウエスタンブロットで AD と同様の triplet band を示し、各リン酸化依存性抗体に対して AD と同様の反応性を示した。免疫

組織染色では全てのリン酸化依存性・非依存性抗体によって神経原線維変化が染色された。不溶性・可溶性タウともに AD と同様に 6 つの isoform が含まれていた。超微形態は 80nm 周期でくびれをもつ twisted filament であった。

D. 考察

Kii ALS/PDC は、 β アミロイドの沈着とは独立して NFT が出現する点から、NFT の主たる構成蛋白である病的タウが、AD とは異なる機序で神経細胞変性に関与している可能性が考えられる。近年、いくつかの taupathy において、蓄積する病的タウ、もしくは発現しているタウが疾患特異的な生化学的性質を有することが、病態との関係で注目されている。今回、我々の行った Kii ALS/PDC の病的タウの分析では、AD の PHF タウとの間に生化学的相違は確認されなかったが、この独特の疾患において AD と同質の病的タウと神経細胞変性との関連を解明することは、AD における神経細胞変性機序の解明にも大きく貢献するものと思われる。