

E. 結論

Kii ALS/PDC の病的タウの生化学的性質は、AD の PHF
タウと同様である。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

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

分担研究者 中野 今治 自治医科大学神経内科教授

研究要旨

受容体型チロシンキナーゼの1つである EphA4 は運動ニューロンの軸索伸長重要な役割を果たすと考えられている。今回我々は ALS 5例、対照2例脊髄において EphA4 の発現を検討した。80℃で凍結保存した頸髄(C8)および腰髄(L5)より 10μm 厚の凍結切片を作成し、抗 EphA4 抗体で染色した。頸髄では、対照の運動ニューロンの細胞質はほとんど染まっていなかったものの、ALS ニューロンでは細胞質、突起に顆粒状に染まっていたり、細胞体の一部に限局して染まっている所見がみられた。腰髄では ALS では対照と比較して、ニューロンおよびニューロピルに強い染色がみられた。また ALS では一部のアストロサイトも強く染まっていた。ALS の脊髄における EphA4 の発現増強は、運動ニューロン死に対して防衛的に作用している可能性が考えられる。

A 研究目的

CNTF, BDNF, NT-3, NT-4/5, FGF, IGF-1 等運動ニューロンに対して生存維持活性のある神経栄養因子のレセプターの多くはチロシンカイネースレセプターであり、レセプターとそのリガンドは運動ニューロンの機能維持に関して重要な役割を果たしている。

Eph は最初に erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma から新規の受容体型チロシンキナーゼとして見いだされ、その後次々とファミリーメンバーがクローニングされた。1997年ヒト、マウス、ラット、ニワトリについて名称が統一された。受容体は大きく2つのグループに分けられ、受容体 EphA グループは、主にリガンド Ephrin-A グループ (GPI アンカー型) と反応し、受容体 EphB グループは主にリガンド Ephrin-B グループ (1 回膜貫通型) と反応する。それぞれのグループ内ではクロストークが著しく、グループ内の受容体はほとんどのリガンドメンバーと反応する。

受容体 EphA グループの1つであるヒト EphA4 は、1995年 Fox らによりヒト胎児脳ライブラリーからクローニングされ(Hek 8)、また 1996年 Ohta らによりニワトリ胚において運動ニューロンのアポトーシスの時期(胚 5~10 日目)に一致して運動ニューロンに特異的に発現する物質としてクローニングされた(Cek 8)。構造は細胞外に球状領域、システインリッチ領域、フィ

ブロネクチン III 領域を、細胞内にチロシンキナーゼ領域をもち、ラットにおける免疫組織化学的検討では、大脳皮質、線条体、視床、海馬、小脳 Purkinje 細胞で発現していることがわかった。

脊髄では四肢を支配する運動ニューロンの軸索伸長過に一致して発生後期に広範に発現しており、成体になるとその発現は運動ニューロンに限局するといわれている⁷⁾が、成体での機能は解明されていない。1998年 Dottori らによって EphA4 ノックアウトマウスが作成された⁸⁾。EphA4 ノックアウトマウスは生存可能であるが、延髄より末梢の錐体路の著明な軸索の減少が認められ、EphA4 が錐体路の発生に重要な役割を果たすことが示された⁸⁾。今回我々は運動ニューロンで特異的に発現する EphA4 を筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄において検討することにより、EphA4 の成体での役割を推測し、ひいてはそのリガンドの投与等治療に関与することを目的として研究を計画した。昨年我々は ALS 剖検脊髄において RT-PCR 法により EphA4 の発現解析を行い、ALS の脊髄で他部位および対照例の脊髄と比べ明らかに EphA4 mRNA の発現が増強していることを報告した。そこで本年は抗 EphA4 抗体を用いて、EphA4 の発現を免疫組織化学的に検討した。

B 研究対象および方法

1998~99年に自治医大で剖検を行った症例のうち、ALS 5例、非神経疾患対照2例(心筋梗塞、副腎癌)を対象とした。

剖検後脊髄を速やかに取り出し、-80℃で凍結保存した後、頸髄(C8)および腰髄(L5)より10μm厚の凍結切片を作成した。一次抗体に抗EphA4抗体(Dr Pasquale EBより供与)を用いて、HISTOSTAIN SP-KIT(ZYMED社)によりEphA4の発現を検討した。

C 結果

1. 頸髄では対照とALSでは、全体的にはその染まり方に明瞭な差はみられなかった。しかし対照では細胞質にはほとんど染まっていなかったものの、ALSでは細胞質、突起に顆粒状に染まっていたり、細胞体の一部に限局して染まっている所見が一部のニューロンでみられた。
2. 腰髄ではALSでは対照と比較して、ニューロンおよびニューロピルに強い染色がみられた。またALSでは一部のアストロサイトにも強く染まっていた。

D 考察

Martoneら⁷⁾はラットでは成体になるとEphA4の発現が運動ニューロンに限局すると報告している。ヒトにおいてEphA4の発現を免疫組織化学的に検討した報告は未だなく、我々の結果からEphA4はニューロンのみではなく、グリア、突起、ニューロピル等広範に発現していることがわかった。さらにALSにおいては特に腰髄において対照と比較して発現の増強がみられた。全体では対照と発現レベルに差はほとんどみられなかった頸髄ということがわかった。さらにALSにおいては特に腰髄において対照と比較して発現の増強がみられた。全体では対照と発現レベルに差はほとんどみられなかった頸髄においても、一部のニューロンにおいて顆粒状に強く発現していた。ALSでのEphA4の発現が頸髄より腰髄で高かったのは、頸髄でより多くのニューロンが死滅していたためと考えられる。ニューロンが死滅していく過程は剖検脊髄では検討できないため、今後動物モデル、細胞レベルでの検討が必要と思われる。

ALSの脊髄においてEphA4の発現が増強している機序として以下の2つの可能性が考えられる。1)ALSの発症過程において運動ニューロンの死滅を防御しようとしてその発現が増強している 2)ALSにおける運動ニューロンの細胞死をEphA4が直接促している。ニューロンガイダンス因子であるEphA4の発生過程における果たす役割から考察すると1)の機序と考えるのが妥当である。ALSでは前角細胞細胞数の減少に伴い、運動ニューロンの軸索末端が新たに発芽する(sprouting)ことが電気生理学および神経筋接合部におけるAch受容

髄においても、一部のニューロンにおいて顆粒状に強く発現していた。ALSでのEphA4の発現が頸髄より腰髄で高かったのは、頸髄でより多くのニューロンが死滅していたためと考えられる。ニューロンが死滅していく過程は剖検脊髄では検討できないため、今後動物モデル、細胞レベルでの検討が必要と思われる。

ALSの脊髄においてEphA4の発現が増強している機序として以下の2つの可能性が考えられる。1)ALSの発症過程において運動ニューロンの死滅を防御しようとしてその発現が増強している 2)ALSにおける運動ニューロンの細胞死をEphA4が直接促している。ニューロンガイダンス因子であるEphA4の発生過程における果たす役割から考察すると1)の機序と考えるのが妥当である。ALSでは前角細胞細胞数の減少に伴い、運動ニューロンの軸索末端が新たに発芽する(sprouting)ことが電気生理学および神経筋接合部におけるAch受容体の免疫組織化学的検討から報告されており、この現象にEphA4の発現増強が関与している可能性が考えられる。またALSにおいては、我々の症例も含めグリオーシスを認めることは少ないといわれているが、EphA4はアストロサイト等のグリア細胞でも強く発現しており、運動ニューロン防御のために作用している可能性が考えられる。2)の可能性については、培養細胞レベルでもEphA4が細胞死を促進するという報告はなく、現時点では仮説にすぎない。しかしながらEphA4が成体では発生過程と異なる機能をしている可能性も否定できない。

今後EphA4の発現と細胞病理の関連について検討したい。

体の免疫組織化学的検討から報告されており、この現象にEphA4の発現増強が関与している可能性が考えられる。またALSにおいては、我々の症例も含めグリオーシスを認めることは少ないといわれているが、EphA4はアストロサイト等のグリア細胞でも強く発現しており、運動ニューロン防御のために作用している可能性が考えられる。2)の可能性については、培養細胞レベルでもEphA4が細胞死を促進するという報告はなく、現時点では仮説にすぎない。しかしながらEphA4が成体では発生過程と異なる機能をしている可能性も否定できない。

今後EphA4の発現と細胞病理の関連について検討したい。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

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

分担研究者 中野今治 自治医科大学神経内科教授

研究要旨

CAG repeat の伸長が遺伝性神経疾患の原因として注目され、運動ニューロン疾患の一つである球脊髄性筋萎縮症においても androgen receptor 遺伝子中の CAG expansion がその遺伝子異常として明らかとなった。今回我々は ALS 症例において、triplet repeat の伸長の有無を検討した。56 例の家族性 ALS (FALS), 51 例の孤発 ALS 症例 (SALS), および 51 例の正常対照例の末梢血より DNA を抽出し、repeat expansion detection (RED) 法を用いて、CAG/CTG expansion の有無を解析した。伸長したバンドは家族性 56 例中 16 例 (28.6%)、孤発例 51 例中 17 例 (33.3%)、正常対照 51 例中 11 例 (21.6%) に認められた。しかし、CAG/CTG expansion が認められる頻度は 3 群間で有意さはなく、伸長の大多数が ERDA1/Dir1、CTG18.1 に由来すると考えられ、CAG/CTG expansion が ALS の遺伝学的背景に関与している可能性は低い。

A 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の約 10-20% において遺伝歴が認められ、chromosome 21q22 をはじめいくつかの遺伝子座が同定されてきている。しかし、これらの遺伝子座の中で ALS を引き起こす疾患遺伝子として唯一同定されたのは、21q22 における Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase (SOD1) のみである。SOD1 の変異は家族性 ALS の約 25% において認められているが、残りの家族性 ALS の疾患遺伝子および ALS の大多数を占める孤発症例における遺伝学的背景については未だ明らかとはなっていない。

一方遺伝子における CAG リピートの伸長が遺伝性神経疾患の原因として注目され、運動ニューロン疾患の一つである伴性劣性遺伝を示す球脊髄性筋萎縮症においてもアンドロゲン受容体遺伝子中の CAG expansion がその遺伝子異常として明らかとなった。今回我々は、ALS の病因へのトリプレットリピートの伸長の関与を調べることを目的とし、家族性および孤発性 ALS における CAG/CTG expansion の有無を解析した。

B 研究対象および方法

56 例の家族性 ALS (FALS), 51 例の孤発 ALS 症例 (SALS), および 51 例の正常対照例の末梢血より DNA

を抽出し、repeat expansion detection (RED) 法を用いて、CAG/CTG expansion の有無を解析した。原法の RED 法は、耐熱性ライゲースを用いて繰り返しライゲーション反応を行うことでテンプレートに相補的なオリゴヌクレオチドのマルチマーを合成し、電気泳動後にサンプロット法を行い可視化するという方法であるが、今回我々は、プライマーとして 12 リピートの CTG を使用し、ライゲーション反応の前にあらかじめプライマーの 5' 末端を ³²P でラベルすることにより最後のハイブリダイゼーションのステップを省略する変法を用いて解析を行った。RED 法の条件として、5 μg の genomic DNA をテンプレートとし、プライマーとして 5' 末端がラベルされた (CTG)₁₂ を 20-40 pmol を用いて、4U の Pfu DNA ligase を加え、70 度 30 秒、94 度 10 秒のサイクルを 500 回繰り返すという条件で反応を行い、産物を 6% リアクリアミドゲル中で電気泳動し、乾燥後オートラジオグラフィを 2-3 日行った。解析は同一検体につき最低 2 回行った。

C 結果および考察

この変法 RED 法を検証するために、CAG 繰り返し配列をそれぞれ 76、57、23、14 回含んだプラスミド DNA をテンプレートとして用いた結果では、(CAG)₇₆ においては、(CTG)₁₂ のプライマーが 6 つ結合した 216bp のバンドが検出され、同様に CAG の繰り返し数に応じたバンドが認

められた。

テンプレートとして genomic DNA を用いた場合、108bp のバンドは正常対照を含むすべてにおいて検出され、また今までに報告されている CAG リピートの異常を勘案して、48 リピートに対応する 144bp 以上のバンドを異常と定義すると、伸長したバンドは家族性 56 例中 16 例(28.6%)、孤発例 51 例中 17 例(33.3%)、正常対照 51 例中 11 例(21.6%)に認められた。

しかし、RED 法において検出された CAG/CTG expansion のうち約 94% は、ERDA1/Dir1、および CTG18.1 の 2 つの遺伝子座に由来するという報告もあり、我々の解析において CAG/CTG expansion が認められた症例において 2 つの遺伝子座における CAG/CTG expansion の有無を調べたところ、RED 法で 144bp の伸長が検出された孤発症例 1 例 (S3)を除いたすべての症例において ERDA1/Dir1、CTG18.1 のいずれか、あるいは一部の症例では両者において CAG/CTG expansion が認められた。

今回我々が解析した結果では、CAG/CTG expansion

が認められる頻度は 3 群間で有意さはなく、またこれら RED 法により検出された CAG/CTG expansion が、孤発症例 1 例を除いて、ERDA1/Dir1、CTG18.1 に由来すると考えられることから、著明な CAG/CTG expansion が ALS の疾患遺伝子あるいは遺伝学的背景に關与している可能性は低いものと思われる。

E. 結論

家族性および孤発性 ALS の遺伝子異常において、CAG/CTG expansion が關与しているという結果は得られなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

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 ー前臨床研究ー

分担研究者 中野今治 自治医科大学神経内科教授

研究要旨

アデノ随伴ウイルスを用いてドーパミン合成に関わる3種類の酵素（チロシン水酸（TH:tyrosine hydroxylase）、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素（AADC:aromatic l-amino acid decarboxylase）およびTHの補酵素テトラヒドロピオプテリン(BH4: tetrahydrobiopterin)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））を遺伝子の遺伝子導入をパーキンソン病モデルサルに行った。遺伝子治療を行った脳部位で、治療遺伝子が効率よく発現し、治療した脳部位での著明なドーパミンの合成量の増加を認め、かつ著明なパーキンソン病症状の改善があることが確認され、本遺伝子治療は、サルにおいては著効を示すことが判明した。

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は重複感染が可能なため複数の遺伝子を同一神経細胞に導入することが出来る。これまでドーパミン合成系酵素の律速酵素である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）およびTHの補酵素テトラヒドロピオプテリン(BH4: tetrahydrobiopterin)の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)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（ラッ

ト）で検討してきた。以上の3つのドーパミン合成系の酵素遺伝子の導入によってパーキンソン病モデルラットの線条体でドーパミンを合成させることが可能となり、また運動症状の改善が長期間継続することを前年度までに報告したが、本年度はさらにヒトへの臨床応用に向けた前臨床研究として MPTP 投与によるサルのパキンソン病モデルに対してこれらの遺伝子治療の効果を検討した。

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、それぞれを搭載したAAVベクター（AAV-TH、AAV-AADC、及びAAV-GCH）を作製した。対照用としてはAAV-LacZを作成した。発現プロモーターにはcytomegarovirus(CMV)を用いた。パーキンソンモデル動物としては、MPTP慢性投与

(0.25mg/kg/week、6ヶ月間)し、その後2ヶ月間パーキンソン病症状が安定していることを確認した4匹のカニクイザルを用いた。症状評価は、UPDRSの primate 版である PPRS(primate parkinsonism rating scale)を用いた。PPRSは6項目 (spatial hypokinesoa, bradykinesia, manual dexterity of right arm and left arm, balance, freezing ; 各々最小が0、最大が4ポイント) からなり最大スコアが24である。上記のパーキンソン病のモデルサルに、ステレオ装置を用いた定位脳手術下に前記3種類のベクター (1×10^{13} /ml, total 45ul) を片側の被殻に注入した。反対側の被殻には対照用としてAAV-LacZを注入した。遺伝子治療の効果は、免疫組織学的なそれぞれの治療遺伝子蛋白 (TH,AADC,GCH) の発現の確認、PPRSによる症状の変化、ドーパミン作動薬apomorphineに対する片側のドーパミン受容体過敏性の改善によるturning tendencyの検討を行い、遺伝子導入を行った被殻でのドーパミン放出量は脳内微量透析法により検討した。脳内微量透析法の灌流液には人工髄液を用い、透析膜長は10mm、灌流速度は2.0ul/minとした。更に、治療遺伝子の一つであるAADCの機能発現をin vivoで検討するために、AADCの基質であるL-DOPA (およびL-DOPAの末梢代謝を抑制するcarbidopa) を静脈投与し灌流液中のドーパミン濃度の変化も検討した。

倫理面への配慮としては、上記の実験内容の生命倫理的問題については、生命倫理委員会の承諾のもとに行った。

C 結果

AAV ベクターを用いて遺伝子治療として片側の被殻に注入 TH,AADC 及び GCH 遺伝子を同時導

入したパーキンソンモデルサルでは PPRS のスコアの改善が 4 匹全てで認められた。また、apomorphine を投与すると体幹の振り向き運動 (turning) が認められ、ベクター注入側におけるドーパミン受容体過敏性の改善 (抑制) 効果と考えられた。また、No.3 のサル (M-3) で行われた被殻に透析プローブを挿入した脳内微量透析法では、3種類の AAV ベクター注入した治療側では非治療側に比べ灌流液中のドーパミン濃度が高値であることが確認された。さらにドーパミン前駆体の L-DOPA を投与するとドーパミン放出量が更に増加することが確認された。免疫組織学的には治療遺伝子蛋白はベクターを注入した被殻で効率よく発現していることが確認された。

D 考察

本年度のパーキンソン病モデルサルを用いた AAVによる TH, AADCおよびGCHの3種類の治療遺伝子の同時導入研究では、ドーパミンの枯渇で誘導されたドーパミン受容体過敏性を是正するにたりだけの量のドーパミンが遺伝子治療を施した被殻で合成され、実用レベルの著明なパーキンソン病症状改善が得られることが示された。また、脳内微量透析法にて、治療遺伝子注入部位で有意なドーパミン放出が認められてことから上記の改善はこのドーパミン放出量の増加と考えられる。

また、AADCの基質であるL-DOPAを静脈投与することにより、治療側の脳内微量灌流液中のドーパミンが増加したは、今回の治療遺伝子の一つであるAADCの酵素活性がin vivoで実用レベルに達していることを示している。この結果は同時にAADC遺伝子導入による遺伝子治療と経口L-DOPA療法の併用の有用性を示すものである。

すなわち、薬物療法の調節性と定位脳手術を利用した遺伝子治療の脳部位限局作用の両者の長所を併せ持つ治療法の可能性も示唆する。

以上の結果から、AAVベクターを用いた遺伝子導入法を応用し、線条体内でドーパミンを直接合成させる遺伝子治療は、パーキンソン病の新しい

治療法として有用性が期待できるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

運動ニューロン発現プロファイル

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学神経内科教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)をはじめとする運動ニューロン疾患の運動ニューロン死の機序を解明するため、レーザービームを用いて運動ニューロンを単離して、その発現遺伝子プロファイルを解析する研究とゲノムレベルでの遺伝子多型を解析研究を組み合わせることで ALS を始めとする運動ニューロン疾患の新しい病態解明・新規治療法開発戦略が描けることを明らかにした。

A 研究目的

運動ニューロン疾患には筋萎縮性側索硬化症(ALS)をはじめとするいくつかの疾患が含まれるが、選択的運動ニューロン死が共通の最終の common pathway である。しかしこの運動ニューロン死の機序は現在のところ不明である。その病態形成には多くの因子が関与していると考えられ、現在のところ病態解明の糸口さえ見出されていない。ヒトゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムの塩基配列および発現遺伝子についての情報が解明されようとしている。この成果をもとに疾病の病態解明および新規治療法を開発を志すものが「ゲノム創薬」である。我々はこの考えに基づき ALS を始めとする運動ニューロン疾患の病態解明・新規治療法開発戦略を以下のように考えている。一つは近年、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、single cell の状態で細胞を集め、RNA増幅法により発現遺伝子プロファイルを作成することが可能となってきた。さらにマイクロアレイ又はDNAチップを用いることにより、多数の遺伝子の発現を定量的に測定することが可能となってきた。神経組織は神経細胞、グリア細胞、上皮細胞など、lineageの異なる細胞群が混在する組織であり、疾患の病態もおそらくこれらの lineage によって大きく異なっているこ

とが考えられる。特に運動ニューロン疾患のように脊髄前角運動ニューロンが選択的に変性死に陥るような疾患では、脊髄を構成する細胞群に占める脊髄前角運動ニューロンの割合は極めて小さいために運動ニューロンを単離してその発現遺伝子プロファイルを解析することが病態解明に有効であると考えている。もう一つはゲノムにおける単一塩基多型(SNPs)を始めとする遺伝子多型解析からの運動ニューロン疾患の病態解明・新規治療法開発である。この両者を有機的に組み合わせてシステムを構築することにより運動ニューロン疾患の病態解明・新規治療法開発しようと考えている。今回の報告ではこのシステムの概要と試行についてまとめた。

B 方法

1) 運動ニューロンの発現遺伝子プロファイル解析

名古屋大学医学部倫理委員会承認後、十分なインフォームド・コンセントを施行し剖検を行った ALS 6 例、対照 8 例の腰髄膨大部凍結組織を用いた。各々の凍結切片作成後、レーザーマイクロダイセクション法にて脊髄前角運動ニューロンを切り出した。50 個の脊髄前角運動ニューロンを 1 サンプルとし、RNA 抽出後 cDNA を作成し T7 RNA polymerase により増幅した。増幅後サンプルを

蛍光標識後 cDNA マイクロアレー (Clontech 社:Atlas Glass Human 1.0 Microarray) にメーカープロトコールに従いハイブリダイズ・洗浄後 GenePix 4000 (Axon Instruments 社) でスキャニングし定量化し遺伝子発現量の変化を検討した。cDNA の機能別分類は Clontech 社の分類に従った。

2) 遺伝子多型解析

名古屋大学医学部倫理委員会承認後、十分なインフォームド・コンセントを施行し DNA を採取できた ALS 86 例、正常対照例 125 例を用いた。パフィーコートよりゲノム DNA を抽出し、PCR-SSCP 法及び直接塩基配列解読法にて leukemia inhibitory factor (LIF) の変異検出を試みた。

C 結果

1) 運動ニューロンの発現遺伝子プロファイル解析

T7 RNA polymerase による増幅について肝組織を用いて増幅前と 3 回増幅後の RNA を cDNA マイクロアレーで比較検討したところ、その signal intensity は多くの遺伝子について良く対応した。このことはこの T7 RNA polymerase による増幅システムは発現遺伝子の相対比率を大きく変化させないで増幅することが出来るシステムであると考えられた。cDNA マイクロアレーによる発現遺伝子プロファイル解析において cDNA の機能別にアポトーシス関連遺伝子群・カルシウム濃度制御関連遺伝子群・サイトカイン・成長因子関連遺伝子群・転写因子関連遺伝子群の 4 つに分けて各々の群について ALS 運動ニューロンと対照例の発現遺伝子を比較した。アポトーシス関連遺伝子群・カルシウム濃度制御関連遺伝子群においては ALS 運動ニューロンは対照例比し全体的に発現量が多くなっているパターンを示した。サイトカイン・成長因子関連遺伝子群・転写因子関連遺伝子群では両者の発現パターンには大きな差がなかった。cDNA マイクロアレーにて ALS 運動ニューロンと対照例との間で発現量の大きな差が見られたアポトーシス関連遺伝子 No.1 とあ

まり差が見られなかったアポトーシス関連遺伝子 No.9 について定量 RT-PCR および免疫染色でその mRNA および蛋白レベルでの発現量の検証をしたところ、いずれも cDNA マイクロアレーでのデータと矛盾を見なかった。

2) LIF の遺伝子多型解析

LIF は当初サイトカインとして発見されたが、その後の研究で強力な運動ニューロン生存促進作用を持つことがわかった³⁾。そこで我々はこの LIF のゲノムレベルでの遺伝子多型と ALS の間に関連がないかを探った。ドイツで行われた結果では 104 例の ALS の内 4 例において転写開始点より 3400 番目のグアニンがアデニンに置換する変異を認めた⁴⁾。124 例の正常対照例ではこの変異は認めなかった。LIF の 3400 番目のグアニンがアデニンに置換することにより 64 番目のコドンのアミノ酸がバリンからメチオニンに変わる。この部位は LIF の AB ループと呼ばれる部位にあたり、受容体に結合する部位である。そのためこの変異により LIF の作用に何らかの変化を来すことが予想される。我々が検討した東海地区の 86 例の ALS および 125 例の正常対照例ではこの変異を認める例はなかった。この結果からただには LIF と ALS の関連性がないと言えない。なぜならば ALS そのものがかなり不均一な疾患群である可能性が極めて高いということや、このような孤発性の疾患では一個の遺伝子だけではなく多くの遺伝子の変化により疾患感受性が高まっていることが予想されるためである。また日本人と欧米人との間の遺伝的バックグラウンドの違いもあって考えられる。

D 考察

レーザービームを用いて運動ニューロンを単離してその発現遺伝子プロファイルを解析する研究とゲノムレベルでの遺伝子多型を解析研究を組み合わせることで ALS を始めとする運動ニューロン疾患の新しい病態解明・新規治療法開発戦略が描けることを今回報告した。これをさらに発展させることでいわゆる「ゲノム創薬」に繋が

っていくと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

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

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学神経内科教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(FALS)における神経細胞死の機序解明を目的で、変異 SOD 培養神経細胞モデルの構築および解析を行い、さらに heat shock protein (Hsp) による変異 SOD1 凝集体抑制効果および細胞死抑制効果を検討した。Hsp は大きな凝集体の形成抑制効果は有するものの oligomer レベルの重合は抑制ないと推測され、有意な神経突起伸長の改善効果がみられたことから、Hsp には細胞の機能不全をより改善する効果を有すると考えられた。Hsp は FALS の治療で有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）のうち約 10~20% が Cu / Zn SOD の点変異に起因する。しかしながら、変異 SOD の酵素活性度と重症度との間には相関関係がみられず、その神経細胞死の機序としては gain of function が想定されているが、その実態は未だ不明である。

我々は、変異 SOD 培養神経細胞モデルの構築および解析を行い、さらに heat shock protein (Hsp) による変異 SOD1 凝集体抑制効果および細胞死抑制効果を検討する事を通じて、FALS における神経細胞死の機序解明を試みたのでここに報告する。

B. 方法

(1) 変異 SOD 培養神経細胞モデルの作製：human SOD1 cDNA wild type および mutant Gly93Ala(G93A)を pEGFP ? N1 (Clontech 社)へ subcloning した。これを mouse neuroblastoma cell line である Neuro2a 細胞へ transfect する事で SOD1 ? EGFP 融合蛋白の一過性発現系を作製した。

(2) Heat shock protein (Hsp)の contransfection の系の

作製：先に作製してある pCMV Hsp70p および pCMV Hsp40 を、上述の construct とともに以下の量比で cotransfect する事で、SOD1 ? EGFP 融合蛋白と Hsp との一過性共発現系を作製した。Mock DNA としては pCMV β Gal を用いた。

Wild type SOD1 ? EGFP: mock DNA=1:1

G93A SOD1 ? EGFP: mock DNA=1:1

G93A SOD1 ? EGFP: pCMV Hsp70=1:1

G93A SOD1 ? EGFP: pCMV Hsp40=1:1

G93A SOD1 ? EGFP: pCMV Hsp70: pCMV Hsp40
=1:0.5:0.5

(3)細胞内凝集体形成および神経突起伸長の経時的解析：変異 SOD 培養神経細胞モデルの系および Hsp の cotransfection の系での細胞内凝集体形成の解析を、transfection 後 12、24、48、72 時間の時点で経時的に施行した。細胞を氷冷メタノールで固定後、propidium iodide にて核染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡（MRC1024、Bio ? Rad 社）にて観察した。細胞内凝集体形成頻度は、全 EGFP 陽性細胞中の細胞内凝集体陽性細胞の割合として計算した。また、神経突起伸長につい

ては、1 胞体径以上の長さの神経突起を有する細胞数の全 EGFP 陽性細胞中での割合として計算した。

(4) Luciferase assay:細胞死について経時的に解析するために luciferase assay(Promega 社)を行った。Heat shock protein(Hsp)の cotransfection の系において、全体の transfection DNA 量の 10 分の 1 の pGL3 luciferase reporter vector を cotransfect し、luciferase assay を transfection 後 12、24、48、72 時間の時点で経時的に施行した。数値は蛋白量で補正した。

(5)Western blots: SOD1 ? EGFP 融合蛋白の発現量を経時的に解析するため、抗 SOD1 抗体による Western blots を transfection 後 12、24、48、72 時間の時点で経時的に施行した。Sample 量は各 well あたり 20 μ g とした。信号強度は densitometry にて解析した。

C. 結果

(1) 細胞内凝集体形成の頻度 : mutant G93A SOD1 ? EGFP を transfect した細胞では、SOD1 ? EGFP 融合蛋白によると思われる高い頻度の細胞内凝集体形成を認めた。凝集体形成の頻度は transfect 後 48 時間をピークとして経時的に増加した。

一方、wild type SOD1 ? EGFP を transfect した細胞では、細胞質全体が淡い輝度を呈し、SOD1 ? EGFP 融合蛋白が細胞質内にびまん性に分布すると考えられた。細胞内凝集体形成はほとんど認められなかった。

(2)wild type および G93A SOD1 ? EGFP 融合蛋白の経時的発現の解析 : Western blots により、wild type および G93A SOD1 ? EGFP 融合蛋白の発現は、Neuro2a 細胞の内因性 SOD1 発現量の数十倍を示した。wild type SOD1 ? EGFP 融合蛋白は経時的に発現量の増加を呈したのに対し、G93A SOD1 ? EGFP 融合蛋白では経時的な発現量の漸減を認めた。また、G93A SOD1 ? EGFP 融合蛋白を泳動した running gel 上におおよそ SOD1 ? EGFP 融合蛋白の倍数にあたると思われる ladder 状の smear を認め、G93A SOD1 ? EGFP 融合蛋白の oligomer ではないかと推察した。

(3)Hsp による細胞内凝集体形成の抑制効果 : Hsp70 および Hsp70 + Hsp40 を cotransfect した系では有意な凝集体形成抑制効果が認められた。Hsp40 のみの系では抑制効果は認められなかった。

(4)Hsp による G93A SOD1 ? EGFP 融合蛋白の発現量の変化の解析 : Hsp70 および Hsp70 + Hsp40 の系では、若干の G93A SOD1 ? EGFP 融合蛋白発現量の増加が見られたが有意差はなかった。また、ladder 状の smear についても有意な変化は認められなかった。

(5)Luciferase assay : Transfection 後 48 時間で、Hsp70 および Hsp70 + Hsp40 の系では、有意な細胞死抑制効果が認められた。

(6)神経突起伸長の改善効果 : Transfection 後 48 時間で、Hsp70 および Hsp70 + Hsp40 の系では、有意な神経突起伸長の改善効果が認められた。

D. 考察

Hsp70 は Hsp40 の補助下で生体内で蛋白の folding や異常蛋白の refolding、renaturation および ubiquitin ? proteasome 系による蛋白分解の補助などに関わっているとされる。今回の我々の実験系でも、Hsp70 単独よりも Hsp70 + Hsp40 の系においてより改善効果がみとめられた。また、細胞内凝集体抑制効果および神経突起伸長改善効果に比して細胞死抑制効果が少なかった点、さらには Western blot での ladder 状の smear に対して変化を与えなかった点から、Hsp は大きな凝集体の形成抑制効果は有するものの oligomer レベルの重合は抑制できず、それによる細胞死を回避することができなかったのではないかと推測した。また、神経突起伸長の改善効果がより有意だったことから、Hsp は細胞死よりも細胞の機能不全をより改善する効果を有すると考えられた。以上より、Hsp は FALS の治療において有効である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 : 別紙記載

2. 学会発表：別紙記載

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 －運動ニューロン死との関連について－

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学神経内科教授

研究要旨

培養細胞を用いて、Dorfin 蛋白質の機能を解析した。Dorfin 蛋白質は中心体に存在するユビキチン付加酵素活性を持つ蛋白質であると考えられた。Dorfin は進化的によく保存された蛋白質であり、中心体が重要な役割を果たす細胞周期や突起伸展などの基本的な細胞機能に関係していると推測される。また、Dorfin と変異 Cu/Zn-SOD の aggregation との関係を G93A 変異を持つ mtSOD1-GFP 融合蛋白質を COS7 細胞に発現させることにより検討し、内在性 Dorfin は変異 SOD1 による aggregation と共存し、Dorfin の運動ニューロンにおける封入体形成への関与が示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでに筋萎縮性側索硬化症（ALS）の運動ニューロン変性の病態機序の解明のために、ALS の病変の主座である脊髄前角組織における遺伝子発現の変化を遺伝子プロファイリングにより探索してきた。病変が特定の神経システムのみに限局した神経変性疾患の微量なサンプルからでも遺伝子発現を高感度に描出できる遺伝子プロファイリング法である分子インデックス法を用いて、ALS の脊髄前角ホモジネートにおいて発現変化の見られた遺伝子について検討し、これまでに脊髄運動ニューロンに発現している新規遺伝子の全 cDNA 配列を 2 つ決定した。そのうちの 1 つは核移行シグナルを有する蛋白質をコードしており、neugrin (neurite outgrowth associated protein) と名付けた。Neugrin は神経突起の伸長に伴い発現が増加する分子であった。もう 1 つは N 末側に RING-finger を 2 つ持つ蛋白質をコードする遺伝子であり Dorfin と名付けた。今回我々は、培養細胞を用いて、Dorfin 蛋白質の機能を解析し、ALS との関わりについて検討した。

B 対象および方法

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発現遺伝子プロファイルを作成した。分子インデックス法により、3 種類のクラス IIS 制限酵素 (FokI, BsmAI, BsmFI)、64 種類のアダプタープライマー、3 種類のアンカーオリゴ dT プライマーを用いることにより、発現遺伝子の 3'側断片を 3x64x3=576 グループにインデックス化できる。その各々について、ポリアクリルアミドゲル上で 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、切り出してクローニングし、遺伝子配列を決定した。このうち ALS において発現が増加していた 812bp の遺伝子 3'側断片をもとに、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーの PCR によるスクリーニングおよび 5'RACE 法により完全長 cDNA の塩基配列を決定し、組織での mRNA の発現をノーザン解析および in situ hybridization (ISH) において検討した。His タグや GEP を

付けた融合蛋白として培養細胞(HEK293、COS7)へ強制発現させ、ユビキチン-プロテアソーム系との関わりを免疫沈降法、ウエスタン解析を用いて検討した。また細胞内局在を、免疫組織化学的手法を用いて検討した。

C 結果

ヒト脊髄よりクローニングされた新規遺伝子 Dorfin cDNA は全長約 4.4kb で、838 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしていた。N 末側に C3HC4 タイプの RING-finger を 2 つ持つ蛋白質をコードすることから、この遺伝子を Dorfin (double Ring-finger protein)と名付けた。2 つの RING-finger の間には、IBR(inbetween RING)モチーフ 3) と呼ばれる C6HC のコンセンサス配列を持つ Cys/His-rich な領域が存在した。さらに、3 つの核移行シグナル様配列と C 末側に 2 つの疎水性領域を有していた。Dorfin 蛋白質は、データベース検索によりこれまで機能不明のマウス Xybp、Aedes aegypti blood-meal induced protein MRRG、C. Elegans putative protein C17H11.6 と高い類似性があり、進化的には良く保存された蛋白質であった。Dorfin mRNA はノーザン解析では心筋にやや多いものの各臓器に広く発現し、中枢神経系内においては脊髄のみならず、大脳皮質、小脳、基底核にも同様に発現していたが、いずれも発現量は少なかった。ISH では、mRNA の発現は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。

Dorfin 蛋白質の機能を、His タグ付き Dorfin を HEK293 細胞に発現させ検討した。強制発現させた Dorfin 蛋白質はプロテアソーム阻害剤 MG132 非存在下では検出されず、Dorfin 蛋白質は非常に代謝回転の速い蛋白質であると考えられた。Myc タグ付きユビキチンを共発現させ、Dorfin の His タグに対する抗体で免疫沈降することにより、Dorfin または Dorfin に結合している蛋白質がユビキチン化されていることが示された。次に、Dorfin が特異的な E2 と結合するかどうかを、His タグ付き Dorfin と FLAG タグ付き各種 E2 を HEK293 細胞に共発現させ免疫沈降法を用いて検討したが、E2 のうち UbcH7 と UbcH8 が特異的に Dorfin と結合した。Dorfin の N 末あるいは

C 末の deletion mutant を作成して E2 との結合部位を検索したところ、UbcH7 との結合には RING-finger/IBR ドメインが必須であった。さらに、これらの deletion mutant の細胞蛋白質のユビキチン化活性を調べたが、ユビキチン化には RING-finger/IBR ドメインに加え、Dorfin の C 末側を必要とした。すなわち、Dorfin はユビキチン付加酵素活性を有し Dorfin 自体あるいは Dorfin が形成する複合体が E3 として働くと考えられたが、その活性には RING-finger/IBR ドメインを介した特異的 E2 の結合および C 末側を介した基質との結合が必要であると推測された。

Dorfin-GFP 融合蛋白質を MG132 存在下に COS7 細胞に発現させたところ、Dorfin は中心体のマーカーである γ -tubulin と共存し、中心体に局在すると考えられた。この局在が GFP タグ、過剰発現、MG132 などの影響によるものではないことを確認するために我々は Dorfin に対する抗体を作成し、MG132 非存在下に COS7 細胞の蛍光免疫染色を行ったが、内在性 Dorfin も GFP 融合蛋白質と同様の局在を示した。さらに、内在性 Dorfin は中間径フィラメントである vimentin と中心体において共存していた。

家族性 ALS の原因遺伝子である変異 Cu/Zn-SOD を発現させると細胞内に aggregation を形成することが知られているが、Dorfin と変異 Cu/Zn-SOD の aggregation との関係を G93A 変異を持つ mtSOD1-GFP 融合蛋白質を COS7 細胞に発現させることにより検討した。内在性 Dorfin は変異 SOD1 による aggregation と共存し、Dorfin の運動ニューロンにおける封入体形成への関与が示唆された。

D 考察

Dorfin 蛋白質は中心体に存在するユビキチン付加酵素活性を持つ蛋白質であると考えられた。Dorfin は進化的によく保存された蛋白質であり、中心体が重要な役割を果たす細胞周期や突起伸展などの基本的な細胞機能に関係していると推測される。また、中心体は変異蛋白質や

適切に折り畳まれなかった蛋白質が細胞骨格により能動的に集積する部位でもあり、中間径フィラメントにより囲まれた aggresome という構造体を形成する。異常な蛋白質が適切に分解されずに細胞内に蓄積して細胞機能を障害し、様々な疾患を生じることが知られており、さらに筋萎縮性側索硬化症やパーキンソン病を初めとする神経変性疾患においては、病変部位の神経細胞内に中間径フィラメントに囲まれたユビキチン化した異常蛋白の集

積からなる封入体が出現することが極めて重要な病理学上の特徴である。Dorfin が、神経変性の病態、特にユビキチン化された封入体の形成といかに関わるかは今後の非常に興味深い課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記

パーキンソン病における大脳高次機能障害

分担研究者 川井 充 国立精神・神経センター武蔵病院部長

研究要旨

パーキンソン病患者 44 名に対して ECT-SPECT による脳血流検査を行い、statistical parametric mapping により脳血流が WAIS-R 言語性 IQ と相関する部位を求めた。右の側坐核、ブロードマン 10 野、8 野の吻側部、左の 46 野と正の相関を示した。これらの領域はいずれも本症において変性のおこる中脳腹側被蓋野ドーパミン神経の投射を受けている。本症では中脳腹側被蓋野の変性により前頭前野背外側部、側坐核の機能低下を介して、dorsolateral prefrontal circuit, anterior cingulate circuit の機能低下をもたらす、言語性 IQ の低下につながっている可能性がある。

A 研究目的

昨年度我々は、WAIS-R が十分に標準化され、IQ が一般集団で正規分布をとるように設定されている知能検査であることに着目し、PD においてその下位項目の成績が特徴的なプロフィールを取るか否かを検討し、下位項目「算数」の成績が一般集団よりも低いことを報告した。一般的に脳血流は脳代謝と相関しており、これまでアルツハイマー病をはじめとした痴呆で局所的な血流の低下が検討されている。今年度は病期の進行とともに低下する WAIS-R 成績低下の神経基盤を検討する目的で、PD において脳血流が WAIS-R の IQ と相関を示す部位を検討した。

B 対象

1997 年 4 月から 1999 年 10 月までに当科を受診した PD のうち、WAIS-R と脳血流 SPECT を 3 ヶ月以内に施行しえた 44 名（男 21 名、女 23 名）。PD の診断は振戦、筋強剛、暴動のうち 2 つ以上の症状を認め、抗パーキンソン病薬の効果が明らかなものとした。全

例で頭部 MRI を撮影し、脳血管障害、水頭症など他の器質的脳疾患を合併した症例は除外した。平均年齢 66 ± 8.4 歳、平均発症年齢 57 ± 9.1 歳、平均罹病期間 9.2 ± 7.4 年。症状の優位側は右 19 名、左 19 名で、検査時点で優位側を判定できない症例は 6 名であった。全例右利きであった。Hoehn-Yahr のステージは I: 8 名、II: 10 名、III: 17 名、IV: 9 名、V: 0 名であった。全例に WAIS-R を施行したが、PD に伴う運動障害のため 3 名が動作性下位検査「符号」を実施できず、動作性 IQ (PIQ) を測定し得なかった。そこで運動障害による成績低下の影響を受けにくい言語性 IQ (VIQ) を今回の研究対象とした。VIQ は平均 90 ± 15 (65~119) であった。

C 方法

脳血流 SPECT : 99mTc-L-ethyl cysteinate dimer (ECD) を経静脈投与し、Patlak 法で定量化した SPECT 画像を得た。Statistical parametric mapping (SPM) を用いて、脳血流が VIQ と相関 ($p < 0.05$) を示す部位を求めた。この際、全脳血流は各症例とも 50 ml/100g/min

となるように補正した。年齢による脳血流分布の変化は、患者年齢を covariate of confound として設定し SPM による統計処理で除外した。

D 結果

局所脳血流と Z score

Structure	coordinates			Z score
	x	y	z	
右 10 野	18	62	-4	4.24
右側坐核	12	18	-8	4.02
左 46 野	-40	36	14	3.84
右 8 野	14	44	50	未計算

座標は Talairach and Tournoux の脳図譜による。

単位は mm。Z score は SPM で計算された値で、相関が強いほど高い値を示す。

上記表に示す。WAIS-R の VIQ は右の側坐核、ブロードマン 10 野、8 野の吻側部、左の 46 野と正の相関を示した。負の相関を示す部位は存在しなかった。

E 考察

前頭葉皮質や大脳基底核は基底核-視床-大脳皮質サーキットの構成要素として、認知機能に重要な役割を果たしていると考えられている。これらのサーキットは数種類の、互いに交叉しない独立した並列回路を形成しており、それぞれに異なった役割を担っているとされる。前頭前野皮質と結びつくサーキットとして前頭前野背外側部を含む dorsolateral prefrontal circuit、前帯状回を含む anterior cingulate circuit が知られている。脳損傷患者の研究から、前者が傷害された場合は実行機能障害、言語流暢性低下、複雑図形の模写困難などの高次機能障害や、抑うつ傾向が出現することが知られており、また後者の障害では自発性低下をきたすことが知られている。これらのサーキットの中で前頭前野背外側部、前帯状回、側坐核には中脳腹側被蓋

野からドーパミン神経が投射しており、中脳皮質辺縁系路を形成している。

これは dorsolateral prefrontal circuit, anterior cingulate circuit に対し調節的な役割を担っていると考えられている。PD では、前述の中脳腹側被蓋野ドーパミン神経の変性をきたすことが知られている。

今回の研究で脳血流が VIQ と相関を示した前頭前野背外側部 (10 野, 8 野の吻側部, 46 野) や側坐核はいずれも中脳腹側被蓋野から投射を受ける部位であることから、PD では同部位の変性が前頭前野背外側部、側坐核の機能低下を、ひいては dorsolateral prefrontal circuit, anterior cingulate circuit の機能低下をもたらし、VIQ の低下につながっている可能性があると考えられた。

これらのサーキットに障害のある脳損傷患者に認める高次機能障害は、実行機能障害、抑うつ傾向など PD で認める高次機能障害と共通点が多く、本研究の結果と矛盾しない。また、中脳腹側被蓋野に病変のないタイプの若年性パーキンソンニズムでは認知機能低下を伴わないことも、この結果を支持すると考えられた。

一般的に WAIS-R の IQ は後部脳機能を反映する心理検査と考えられている。ゆえに、ある心理検査が前頭葉機能を反映するという際には、前頭葉損傷のある患者でその心理検査の成績が悪いが IQ は保たれていることを証明する必要があるとされる。一方今回の PD 患者での検討で VIQ と相関を示した領域は脳後部ではなく主に前頭葉であった。よってこの相関が PD における中脳腹側被蓋野ドーパミン神経変性の影響を受けている可能性を支持すると考えられた。しかし他疾患や正常例で本研究と同様の検討を行い、この相関が真に PD に特異的であるかどうかを検証する必要がある。また脳血管障害における検討では、VIQ は PIQ よりも左大脳半球病変の影響を受けやすいと報告されている。しかし本研究では左右とも相関領域が存在し、左右差を

認めた。これは大脳の機能局在を反映している可能性があり、さらに検討が必要と考えられた。