

フリーラジカルによるラット腰髄培養神経細胞死

分担研究者 阿部 康二 岡山大学医学部神経内科教授

研究要旨 ALS 発症者の 5~10% は家族性で、1993 年以来第 21 番染色体長腕上の Cu/ZnSOD 遺伝子に点突然変異が続々と発見され、ALS の原因としてフリーラジカルの役割が注目されている。フリーラジカルの脊髄神経細胞への影響を検討する目的で、ラット腰髄培養神経細胞において、グルタミン酸、フリーラジカル (NOC18, peroxynitrite) を添加し、TUNEL の免疫染色を行い immunoreactivity を検討した。その結果、前角細胞において 24、48 時間後に TUNEL 陽性細胞数の割合はグルタミン酸添加群、フリーラジカル添加群で有意に増加し ($p<0.05$)、染色強度も増加した。また、glutamate receptor (AMPA/kainate) antagonist, NO inhibitor, free radical scavenger の効果が認められた。ラット腰髄培養神経細胞死の 1 つとしてアポトーシスが関与していることが示唆された。そして、グルタミン酸添加、フリーラジカル添加により前角細胞におけるアポトーシスの過程が促進された可能性が示唆された。

共同研究者：真邊泰宏、割田仁（同助手）村上哲郎（同大学院生）

A. 研究目的

ALS 発症者の 5~10% は家族性で、1993 年以来第 21 番染色体長腕上の Cu/ZnSOD 遺伝子に点突然変異が続々と発見され、ALS の原因としてフリーラジカルの役割が一躍注目されることとなった。フリーラジカルの脊髄神経細胞への影響を調べるため、本実験ではラット腰髄培養神経細胞において、グルタミン酸、フリーラジカル (NOC18, peroxynitrite) を添加し、TUNEL の免疫染色を行い immunoreactivity を検討した。

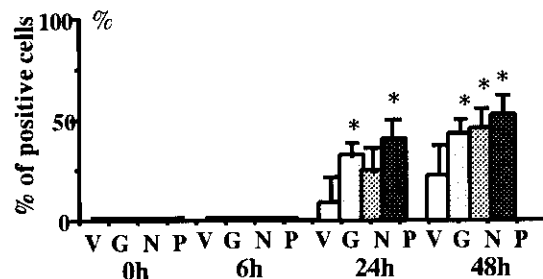
B. 研究方法

生後 11 日目、体重 18~23g の SD ラット ($n=5$) からエーテル麻酔下に腰髄を取り出し、5mm の組織切片を作成した。多孔質膜上で非動化ウマ血清入り MEM で培養した。培養開始 24 時間後に生理食塩水 (20 μ l) 又は glutamate (100 μ M), NOC18 (10 μ M), peroxynitrite (100 μ M) を添加した。また、CNQX (AMPA/kainate receptor antagonist), PTIO (NO inhibitor), Vitamine E (free radical scavenger) を添加 1 時間前に加え効果を調べた。6、24、48 時間培養後に組織切片を取り出し 4% パラホルムアルデヒド緩衝液で固定した。10 μ m の凍結切片を作成、免疫組織化学的に TUNEL の染色を行った。光学顕微鏡で観察した。なお、動物の扱いは岡山大学の動物取り扱い規約に準拠し、可能な限り愛護的に行った。

C. 研究結果

TUNEL について、前角細胞において添加 6 時間後まで生理食塩水添加群、グルタミン酸添加群、フリーラジカル添加群とも TUNEL 陽性細胞は認められなかった。しかし、24、48 時間後に TUNEL 陽性細胞数の割合はグルタミン酸添加群、フリーラジカル添加群で有意に増加し (図 1A, $p<0.05$)、染色強度も増加した。後角では、TUNEL 陽性細胞数の割合の増加を認めたが、各群で有意差はなかった (図 1B)。CNQX + glutamate, PTIO + glutamate, Vitamine E + glutamate 添加各群はグルタミン酸添加群と比較して有意に TUNEL 陽性細胞数の割合が減少した ($p<0.05$)。PTIO + NOC18 添加群は NOC18 添加群と比較して有意差はなかったが TUNEL 陽性細胞数の割合は減少傾向にあった。Vitamine E + peroxynitrite 添加群は peroxynitrite 添加群と比較して有意に TUNEL 陽性細胞数の割合が減少した (図 2, $p<0.05$)。

A large motor neurons in the ventral horn



B small neurons in the dorsal horn

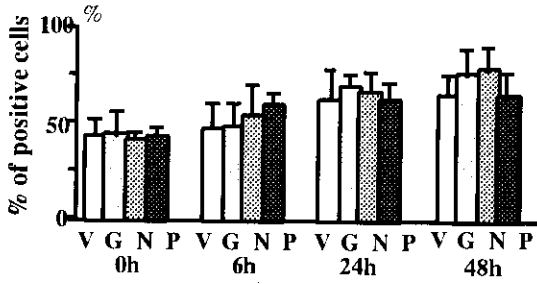


図1. Chronological changes of the proportion of TUNEL positive small neurons (panel A) in the dorsal horn and large motor neurons (B) in the ventral horn of lumbar spinal cord after an addition of vehicle (V), glutamate (G), NOC18 (N), or peroxynitrite (P). Positive cells in each samples were counted in an area (0.50 mm²) of the dorsal or ventral horn, summed. The data was calculated as proportion of positive neurons. *p<0.05 against vehicle-treated group.

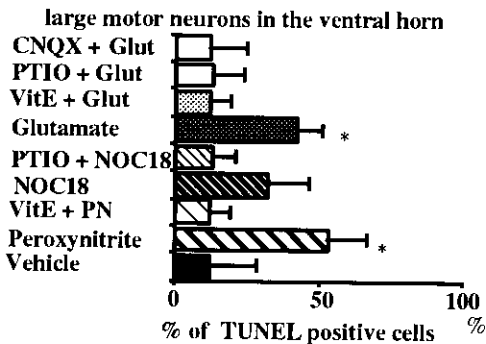


図2. The AMPA/kainate receptor antagonist, antioxidants, and agents that suppress nitric oxide production protect TUNEL immunoreactivity against glutamate toxicity and oxidative stress. Cultures were preincubated for 1 h with 200 μM the AMPA/kainate receptor antagonist CNQX, 100 μM PTIO, and 50 μg/ml vitamin E. Cultures were then exposed for 24 h to vehicle, 100 μM glutamate, 10 μM NOC18, or 100 μM PN. TUNEL positive cells in each samples were counted in an area (0.50 mm²) of the ventral horn and summed. The data was calculated as proportion of positive neurons and represented as mean ± S.D. *p<0.05 compared to each of the other values.

D. 考察

本実験においてコントロール群においても

TUNEL 陽性細胞が認められた。これは腰髄切断による外傷性虚血のために TUNEL の immunoreactivity が亢進したと考えられた。コントロール群と比較してグルタミン酸添加群、フリーラジカル添加群は時間経過と共に TUNEL 陽性細胞数の割合の増加、染色強度の増強を認めた。グルタミン酸添加、フリーラジカル添加により前角細胞における TUNEL の immunoreactivity が亢進したと考えられた。後角においては TUNEL 陽性細胞の割合に有意な変化はなく、前角細胞において有意な変化を認めたことは、前角細胞がグルタミン酸及び酸化的ストレスに影響されやすいと考えられた。また、glutamate receptor (AMPA/kainate) antagonist, NO inhibitor, free radical scavenger の効果が認められた。この事により glutamate-NO-peroxynitrite (PN) - mediated oxidative stress の特異的な効果を確認することが出来た。本実験ではアポトーシス小体の存在を示したものではないため、アポトーシスとは断定できないものの、ラット腰髄培養神経細胞死の1つとしてアポトーシスが関与していることが示唆された。そして、グルタミン酸添加、フリーラジカル添加により前角細胞におけるアポトーシスの過程が促進された可能性が示唆された。

E. 結論

ラット腰髄培養神経細胞の特に前角細胞において、グルタミン酸添加、フリーラジカル添加により、アポトーシスの過程が促進された可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 学会発表

真邊泰宏他、グルタミン酸によるラット腰髄培養神経細胞死、第41回日本神経学会総会、松本、2000年5月

Y.Manabe et al. Motor neuron apoptosis by glutamate. International Symposium on Molecular Mechanism and Therapeutics of ALS, Sep. 22, 2000, Kurashiki, Japan

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病態の解明と治療に関する研究

： HGF の ALS に対する機能解析

分担研究者 船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科バイオメディカル教育研究
センター腫瘍生化学研究部助手

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの特異的細胞死とその軸索変性による運動機能不全を起こす重大な難治性神経変性疾患である。本研究では、運動ニューロンに対する強力な神経栄養作用をもつ HGF による ALS の疾患進行抑制作用について評価した。神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス（HGF-Tg）と ALS モデルトランスジェニックマウス（ALS-Tg）を交配することで、ALS モデルマウスの神経細胞に直接長期間 HGF 遺伝子を発現させ解析した結果、HGF/ALS-Tg マウスは、ALS-Tg マウスに比べ麻痺の発症が遅れ、寿命が延長した。また HGF/ALS-Tg では運動神経細胞死の抑制は頸髄・腰髄両レベルで認め、運動神経軸索変性（脊髄前根）もよく抑制されていた。HGF は ALS に有効と考えられる。

研究目的

HGF は、神経系において特異的な発現パターンを示し、*in vitro* で強力な神経栄養作用を示す新規神経栄養因子である。HGF のもつ神経栄養作用は、ALS の中心病態である運動神経細胞死を阻止すると共に、その軸索変性を阻止し、神経ネットワーク再構築による機能再建に寄与するものと期待される。私達は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）に着目し、ALS 進行抑制に対する HGF の果たす役割を解析すると共に、その成果を基盤とした新しい治療法開発をめざし研究を進めた。本年度は、昨年度までに既に作成した神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス（HGF-Tg）の解析と、これと ALS-Tg との交配によるダブルトランスジェニックマウスの機能解析—HGF による ALS の進行抑制作用の解析を進めた。

研究方法

（1）HGF-Tg と ALS-Tg の交配によるダブルトランスジェニックマウスの作成と解析（Wildtype, HGF, ALS, HGF/ALS の4つのグループについての解析）
① 定量的な競合的 RT-PCR 法による HGF および *c-met* mRNA の定量、② HGF 蛋白質量の ELISA 法による定量、③ 組織染色法（Cresil violet およびトルイジンブルー染色）による運動神経細胞数の計測と脊髄前根の運動神経軸索変性の評価、④免疫染色法、⑤ウエスタンブロット法、⑥ *In situ* hybridization 法、⑦運動機能解析（後肢反射テスト、footprint テストによる歩幅解析および Rotorod テスト）と寿命を解析した。

研究結果

HGF-Tg と ALS-Tg の交配によるダブルトランスジェニックマウスの作成と解析
（Wildtype, HGF, ALS, HGF/ALS の4つの

グループについての解析)。RNase プロテクションアッセイ、ELISA 法、運動神経細胞数と運動機能評価の結果、選別した理想的神経特異的 HGF トランスジェニックマウス (HGF-Tg) と ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) を交配しダブル Tg-マウスを作成した。この解析結果、HGF/ALS (+/-) マウスは ALS (+/-) マウスに比べ麻痺の発症が大幅に遅れさらに寿命が1ヶ月延長した。運動機能も、後肢反射テスト、Rotorod テストおよび foot print による歩幅解析を行った結果、HGF/ALS マウスが ALS マウスに比べ優れていることが明らかとなった。これらの結果は、HGF が ALS の進行を抑制し機能改善に寄与することを意味している。次いで HGF の運動ニューロン死および軸索変性に対する効果を頸髄・腰髄両レベルで評価した。その結果、HGF は頸髄・腰髄両レベル共に運動ニューロン死を良く抑制すること、運動神経軸索変性が抑制されることが明らかとなった。一部の ALS-Tg においては、末期に脊髄後根の感覚神経線維の変性を認めたが、HGF/ALS-Tg においては全例感覚神経線維はよく保たれていたことから、HGF は ALS の終末期に時に認める感覚神経の変性にも有効であることが明らかとなった。

考察

HGF の運動ニューロンに対する神経生存促進活性は、既知の神経栄養因子の中で最も強い分子の1つであることから、HGF は ALS に効果的であると期待されている。ただ、その解析にあたっては (1) ALS は他の神経変性疾患と同様長期間を経て病態が完成するため、長期投与が必要であること。(2) 血液脳関門の存在による全身の運動神経細胞への薬剤供給の難しさがあ

ることの2点の難しさがある。これらに対して、私達は HGF を神経系に高発現するトランスジェニックマウスを作成し、このマウスと ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) を交配することで、ALS-Tg の神経細胞に直接 HGF 遺伝子を長期間発現させた際の効果を評価した。この結果、HGF を効率良く ALS-Tg の神経細胞に特異的に発現させることに成功した。本研究成果で HGF の発現により ALS-Tg の寿命を大幅に延長することに成功したのみならず、その運動機能を比較的維持できることが明らかとなったこと、また HGF/ALS-Tg では運動神経のみならず、ALS 終末期に時に認める感覚神経の変性にも有効であったことから、ALS の治療への応用に期待がもてるといえる。

結語

HGF 遺伝子を神経細胞に直接供給することで、ALS モデルマウスの麻痺の発症を遅延し寿命を大幅に延長することが明らかとなった。

共同研究者

大阪大学大学院医学系研究科バイオメディアカル教育研究センター腫瘍生化学研究部教授 中村 敏一

倫理面への配慮

動物実験に際しては倫理面に十分配慮し、大阪大学医学部動物実験指針に従い実験を施行した。

参考文献

1. Nakamura T et al., *Nature*. 342(6248):440-3, 1989.
2. 船越 洋他. *神経研究の進歩*. 44, 414-422, 2000.

研 究 協 力 者

研 究 報 告

I113T 変異 SOD1 トランスジェニックマウスの作製および解析

中野 亮一 新潟大学医学部附属病院神経内科講師

共同研究者： 菊川公紀²⁾、福島隆男¹⁾、小宅陸郎¹⁾、佐藤俊哉¹⁾、田中恵子¹⁾、
朴 月膳³⁾、林森太郎³⁾、山田光則³⁾、高橋 均³⁾、小出隆司⁴⁾、
犬塚 貴⁵⁾、辻 省次¹⁾

- 1) 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野
- 2) 国立療養所西新潟中央病院神経内科
- 3) 新潟大学脳研究所病態神経科学部門神経病理学分野
- 4) 国立療養所犀潟病院神経内科
- 5) 岐阜大学医学部高齢医学講座

要 旨：変異 SOD1 による運動ニューロン変性のメカニズムを探り、治療法開発に役立てるために I113T 変異を導入した変異 SOD1 トランスジェニック(TG)マウスを作製した。このマウスは表現型では生後 12 ヶ月より両後肢に脱力を生じ徐々に進行する。ROTA-ROD を用いた解析では生後 12 ヶ月齢から non-TG と TG 間で明らかな有意差 ($p<0.005$)が認められ、月齢を経るごとにその差は増大した。病理では前角細胞の変性、脱落、sciatic nerve の変性と筋線維の神経原性萎縮を認めた。本マウスは神経細胞の変性脱落前から運動麻痺と骨格筋の神経原性変化を認め、これは運動ニューロンの dysfunction を示唆する所見と考えた。また、本マウスは導入遺伝子の発現が生理的なレベルに近く、病態の解明および治療研究にも有用であると思われた。

A. 目 的

すでに数種類の変異 SOD1 TG マウスが作成されているが、いずれの変異も実際のヒトの病理所見が報告されておらず、ヒトの病理との対比が十分になされていない。また、いずれの TG マウスも変異タンパクの発現量が極端に多く、それに起因すると思われる病理変化が加わっている可能性があり、生理的レベルの変異

蛋白量で発症する TG マウスを作成し、病態の解明および治療研究に役立てることを目的に研究を行った。

B. 方 法

プロモーター領域を含むヒトゲノム SOD1 に Kunkel 法で遺伝子変異を導入し、EcoRI、BamHI で処理した遺伝子をそれぞれ BDF1 マウスの受精卵雄性前核にマ

イクロインジェクション法により注入し、それらの受精卵を仮親マウスの卵管に移入して TG マウスを作製した。得られたマウスは、genomic Southern blot、RT-PCR、Western blot により解析し、ROTA-ROD を用いて行動解析を行った。病理学的解析にはマウスをエーテル麻酔下で tail cut、灌流固定を行い、蛋白抽出には頸椎脱臼にて苦痛を与えないよう配慮した。

C. 結果

I113T 変異を導入した TG マウスは、3 ライン得られ、その F1 マウスを用いた RT-PCR では脳、肝、腎いずれの臓器でも mRNA が発現していた。さらに Western blot により内在性マウス SOD1 の 1-3 倍の導入遺伝子産物の発現を確認した。表現型では、生後 12 ヶ月目より後肢に軽度の麻痺を生じ、徐々に進行した。ROTA-ROD では、得られたすべてのライン間で同胞の non-TG と TG では、12 ヶ月目から明らかに有意差($p < 0.005$)が認められ、月齢を経るごとにその差は増大した。

病理では、TG は 18 ヶ月齢から骨格筋の神経原性変化を認め、月齢を経るごとに著明となった。脊髄では、前角細胞の変性、脱落を認め、一部空胞変性を認めた。Sciatic nerve では、マクロファージの浸潤を伴った変性と軸索の大小不同が顕著で、これらは一次運動ニューロンおよび二次運動ニューロンの変性を示唆する所見であった。

D. 考察

本マウスは、神経細胞の変性が生じる前から症状および筋病変が認められ、こ

れらのことは運動ニューロンの dysfunction を示唆し、家族性 ALS の初期像を示している可能性を考えた。また、得られた TG マウスは変異蛋白の発現量がこれまでの報告例に比べて生理的なレベルに近く、表現型が得られる時期が 12 ヶ月目と中年期以後の発症であり、症状の進行も緩徐であった。これらのことから、今回作製したマウスは神経細胞の dysfunction の時期から神経細胞死に至るまでを観察することが可能であり、運動ニューロンの変性機構の解析や治療薬の薬効の評価により有用なマウスであると考えた。

(文献)

- 1) Gurney ME, et al: Science 264: 1772-1775, 1994.
- 2) Ripps ME et al: Proc Natl Acad Sci USA 92: 689-693, 1995.
- 3) Wong PC et al: Neuron 14: 1105-1116, 1995.
- 4) Bruijn LI et al: Neuron 18: 327-338, 1997.
- 5) Kikugawa K et al: Neurogenetics 1: 113-115, 1997.

孤発性筋萎縮性側索硬化症の発症に関与する疾患感受性遺伝子の検討

中野 亮一 新潟大学医学部附属病院神経内科講師

共同研究者： 福島隆男¹⁾、菊川公紀²⁾、小林 央¹⁾、斉藤正明²⁾、田中 一³⁾、
犬塚 貴⁴⁾、辻 省次¹⁾

- 1) 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野
- 2) 国立療養所西新潟中央病院神経内科 3) 信楽園病院神経内科
- 4) 岐阜大学医学部高齢医学講座

要 旨：孤発性 ALS の発症メカニズムは未だに不明であるが、高血圧や糖尿病のような common disease と同様に、ALS にも発症に関わる何らかの遺伝的要因、すなわち疾患感受性遺伝子が存在する可能性がある。そこで、孤発性 ALS 患者群とコントロール群で関連解析を行い、疾患感受性遺伝子を同定することを最終目標として研究を開始した。今回は、最近、スコットランド人における関連解析において両群間で多型性に有意差のあるマーカーが存在することが報告されたため、人種の異なる日本人の ALS 群でも同様の傾向があるかどうか検討した。その結果、スコットランド人で最も有意差を認めたマーカーD3S1293 において、日本人でも $p=0.0389$ と有意差を認めたが、検体数の少ないことから、今後検体数を増やして更に検討する必要がある。

A. 目 的

家族性 ALS の一部が SOD1 の遺伝子変異で発症することが解明されているが、一方で孤発性 ALS の発症メカニズムは未だに不明である。孤発性 ALS の発症には多くの因子が関与するという指摘もされてきており、糖尿病やリウマチ性疾患、循環器疾患や精神疾患などの、いわゆる多遺伝子性疾患と同様に、ALS においても疾患感受性遺伝子(susceptibility gene)が存在する可能性がある。そこで、ALS の疾患感受性遺伝子の同定を最終目標とし

て研究を開始したが、今回は、最近、Hayward ら¹⁾がスコットランドの ALS 患者群とコントロール群間で多型性に有意差のあるマーカーを報告したことから、この結果が人種を超えて再現性があるか、日本人症例において検討した。

B. 方 法

孤発性 ALS 患者 55 人、ALS 以外の疾患、正常コントロール群 48 人からインフォームド・コンセントの元に（後述）採血を行い、末梢血白血球より通常の方法

で得られた高分子ゲノム DNA をテンプレートとし、スコットランド人で有意差の報告された第1染色体上の3ヶ所および第3染色体上の6ヶ所、計9ヶ所のマイクロサテライトマーカー(D1S216, D1S431, D1S2848, D3S3680, D3S1263, D3S1286, D3S1300, D3S1293, D3S1282)をPCRにて増幅し、ABI PRISM 377でGene Scan 解析を行った。その allele frequency を患者・対照群間で比較し、 χ^2 検定で有意差を検討した。

インフォームド・コンセントの内容として、サンプルは匿名化した上で管理し、当科における神経疾患研究においてのみ使用するなど、十分なプライバシー保護に務めることを説明した。

C. 結果

解析を行った9ヶ所のマイクロサテライトマーカーすべての χ^2 検定の結果を表に示す。これらのマーカーのうち、第3染色体長腕上のマーカーD3S1293では、ALS群とコントロール群間で多型のパタ

	χ^2 値	p値
D1S216	13.41	0.494
D1S431	7.077	0.718
D1S2848	8.343	0.401
D3S3680	4.829	0.681
D3S1263	20.74	0.0782
D3S1286	11.35	0.727
D3S1300	6.926	0.805
D3S1293	20.50	0.0389
D3S1282	11.82	0.223

表：ALS群とコントロール群間の多型解析結果

ーンに有意差を認めた ($p=0.0389$)。しかし、その1Mbp下流のD3S1282では χ^2 検定で有意差を認めなかった。D3S1263でも $p=0.0782$ と低い傾向はあるが、有意差は出なかった。また、第1染色体上のマーカーでも今回の検討では有意差は認めなかった。

D. 考察

スコットランド人における解析で、 $p=0.00004$ と最も低いp値を示した第3染色体長腕上のD3S1293は、日本人においても $p=0.0389$ と有意差を認め、このマーカーの存在する領域には人種を超えて、ALS群と対照群で多型性に偏りが存在する可能性がある。しかし、このような関連解析においては検体の数が結果に大きく影響を与えるため、今後は検体数を増やし、また、近傍のマイクロサテライトマーカーやSNPsを用いるなどして慎重に検討する必要があると思われる。

E. 結論

スコットランド人のALSにおいて行われた関連解析でコントロール群と多型パターンに偏りが報告されたマイクロサテライトマーカーのひとつ(D3S1293)は、人種の異なる日本人ALSにおいても同様にコントロール群との間に有意差を認め、この領域はALSの疾患感受性遺伝子が存在する候補領域のひとつである可能性が考えられた。

(文献)

1)Hayward C, Torrance HS, Brock DJH et al.: Neurology 54(Suppl 3) A426, 2000.

研究要旨 昨年まで我々は、主に細胞内における glycation と ALS の関連につき注目してきたが、今回は細胞外における蛋白の glycation が脊髄ニューロンに与える影響を検討した。多種類の glycation の最終産物 advanced glycation end-products (AGEs) のうち glyceraldehyde から生成したものを (AGE-2)、methylglyoxal から生成したものの (AGE-4) が培養脊髄ニューロンに対して用量依存性に毒性を示し、この毒性は mitochondria 異常、活性酸素種の発生、apoptosis に関連していた。毒性は部分的に AGE 受容体 (RAGE) を介している可能性が示唆された。SMI-32 陽性ニューロンは AGE-2 の毒性に、より脆弱であった。毒性に抵抗性のある MAP2 陽性ニューロンの約 60% が calretinine 陽性だった。二重染色では、SMI-32 陽性ニューロンは calretinine 陰性であり、脊髄 organotypic culture でも、その傾向が確認できた。現在、髄液中 AGEs の定量を試みている。

A. 研究目的

これまで、脊髄細胞内における glycation につき注目し報告してきたが、今回は細胞外における蛋白の glycation が脊髄ニューロンに与える影響を検討した。

B. 研究方法

Glycation の最終産物である Advanced glycation end-products (AGEs) に様々な種類が存在することが知られている。今回はウシ血清アルブミン (BSA) を AGEs 化して各種作成したもののうち、glucose から生成したものを AGE-1、short chain sugars として glyceraldehyde から生成したものを AGE-2、dicarbonyl compounds として methylglyoxal から生成したものを AGE-4 とし、それぞれ、BSA を D-glucose に 8 週間、glyceraldehyde、methylglyoxal は 7 日間 incubation して、AGE-BSA を作成した。CML-BSA も作成した、コントロールとして修飾されていない BSA を用いた。これら AGE-BSA を 48 時間、培養脊髄ニューロンに暴露した。可能な限りグリアの影響を排除するため、無血清培地で培養し、90% 以上の neuron rich culture とした。

C. 研究結果

mitochondria の還元能を反映する MTS を用いてその毒性を検討した。Glyceraldehyde から作成された AGE-2、methylglyoxal から作成された AGE-4 は用量依存性の神経毒性を認めた。特に AGE-2 に著明な毒性を認めた ($p < 0.01$)。AGE-1

及び CML には毒性を認めなかった。これらの AGE-BSA 48 時間暴露後、Hoechst 33258 にて核の状態を観察した。AGE-2 及び AGE-4 の暴露で分断、凝縮の増加が認められ、apoptosis の機序による細胞死が示唆された。やはり、AGE-2 に、より著明な apoptosis 誘導を認めた。以後は最も強い毒性を示した AGE-2 についての結果を示す。細胞内の caspase 活性を反映する蛍光試験では、AGE-2 の暴露により蛍光強度の著明な上昇を認めた。AGE-2 の 48 時間暴露により、細胞内 peroxides 増加を示す DCF、mitochondria の free radical 上昇を示す dihydrorhodamine の蛍光強度の上昇を認め、oxidative stress の増加が示唆された。mitochondria の膜電位を推測するために利用される、JC-1 を用いた検討では、AGE-2 暴露により mitochondria の膜電位の低下を認めた。

この毒性が、AGE 受容体 (RAGE) を介しているかを見るために、RAGE に対する抗体を用いた。この抗体での免疫組織化学的検討では、ヒト運動ニューロンの細胞体及び神経突起の表面に、凸状に顆粒状の染色を認めた。Neuropile も染色されており、グリアや軸索も染色されて可能性が示唆された。この抗体を 1 時間 preincubation して、その後同様に AGE-2 の毒性を検討したが、部分的にその毒性を阻害していることが示唆された。

運動ニューロンの指標として SMI-32 染色を施行し、全体ニューロンの指標としての MAP2 陽性ニューロンと比較検討では、SMI-32 陽性

ニューロンはAGE-2の毒性に、より脆弱であった。この脆弱性の一因として、昨年までは glutathione などの antioxidants の関与を検討してきたが、今回はカルシウム結合蛋白である、calretinine に注目した。AGE-2 の暴露に抵抗性の MAP2 陽性ニューロンの約 60% が calretinine 陽性であった。

Calretinine 陽性ニューロンはほとんどが小型から中型で、二重染色では、SMI-32陽性ニューロンはcalretinine陰性であった。脊髄のorganotypic culture では、calretinine 陽性細胞は前角部に全く認められなかった。

髄液中のAGEの定量を試みた。すでに、糖尿病患者の血中において前述の様々なAGEsの存在確認に成功している。Gel filtrationと、それぞれのfractionでのcompetitive ELISAによるAGE-1の定量を行った。ALS患者の髄液においてAGE-1の同定が可能だった。

D. 考察

これまでの研究から、ALSにおいては、何かprimaryな原因によるglycationの異常があり、蛋

白のglycationからAGEsの生成が進む可能性を考えており、これには多種類存在することがわかっている。一部はRAGEなどの受容体や結合蛋白を介して、あるいは直接、神経細胞に作用し、free radicalの発生、mitochondriaの異常、そしてアポトーシスなど神経細胞障害に向かうと考える。これに対して、glutathioneなどのantioxidantsや、calretinineなどのcalcium結合蛋白が神経毒性を阻害すると考えられ、運動ニューロンの脆弱性に関与する可能性があると考えている。しかし、ある種のAGEsは細胞毒性を認めず、細胞保護に働く可能性も残った。

細胞外からのglycation修飾された蛋白が、神経細胞やグリア細胞に影響を与える可能性があるため、髄液中のglycationの状態を検討することが必要と考えた。今回はAGE-1の同定が可能であった。今後、コントロールとの比較や、その他のAGEsなど特異的AGEsの検索をすすめていく予定である。

E. 結論

GlycationとALSの病態との関連を主に細胞外からの影響を中心に検討した。

厚生科学研究費補助金（特定疾患研究事業）
研究報告書

筋萎縮性側索硬化症における
運動ニューロン発現遺伝子プロファイル解析に関する研究

道勇 学 名古屋大学医学部神経内科学講座講師
協力研究者 吉原 剛
小林 靖 名古屋大学医学部神経内科学講座
祖父江 元

研究要旨

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病態解明・新規治療法開発システムを構築することを今回検討した。cDNA マイクロアレイにて ALS 運動ニューロンと対照例との間で発現量に数倍程度の差がある遺伝子群を同定した。遺伝子多型解析研究では 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。欧米例では 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と、本邦例の解析ではこの変異は認めなかった。これらのシステムをさらに発展させ有機的に統合させることで、ALS の病態解明に近づく方策になると考える。

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. 研究方法

1) 運動ニューロン発現遺伝子プロファイル解析

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 マイクロアレイ (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

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。

(倫理面への配慮)

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上記の研究を行った。

C. 研究結果

1) 運動ニューロン発現遺伝子プロファイル解析

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 の機能別に分けて 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。

D. 考察

運動ニューロン発現遺伝子プロファイル解析にて ALS 運動ニューロンは対照例比し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で発現量が多くなっている遺伝子を多く見たことは運動神経細胞死の機序を考える上で重要な結果である。今後はさらに多数の遺伝子群について検討を深める必要がある。また今回の LIF の遺伝子多型解析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ると考えられる。

E. 結論

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. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・Q Shanlou, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, Sobue G, Takahashi M: Differential effects of LAR on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant protein. *J Biol Chem*, in press
- ・Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, Sobue G: Chaperones, Hsp70 and Hsp40, suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem*, 275: 8772-8778, 2000
- ・McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH: CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet*, 9: 2197-2202, 2000
- ・Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Riku S, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G: Differential somatic CAG repeat instability in variable brain cell lineage in dentatorubral pallidolucyian atrophy (DRPLA): a laser-captured microdissection (LCM)-based analysis. *Hum Genet*, 107: 452-457, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得
1 件
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ALS 及び免疫性神経疾患における髄液中 nitrotyrosine の検討

吉野 英 国立精神・神経センター国府台病院神経内科

研究要旨：Peroxynitrite による酸化ストレスのマーカである 3-nitrotyrosine を ALS 及び種々の免疫性神経疾患において測定した。ALS の約半数と、ギランバレー症候群（GBS）、感覚障害優位の慢性多発神経炎（CIDP）の一群において高値を示す症例が認められた。これらの難治性神経疾患に対し、あらたな Anti-oxidant、Radical Scavenger 作用を有する新薬が有効となりうることが示唆された。

A. 研究目的

近年 ALS をはじめとする神経変性疾患において、酸化ストレスによる神経障害が大きな役割を果たしていることが知られてきた。NO と superoxide の反応物の peroxynitrite は、チロシン残基に結合し 3-nitrotyrosine (3-NT) を生成するが、ニューロフィラメントの L 鎖に結合しリン酸化を阻害し、ニューロフィラメントの assembly を障害することにより、神経変性をもたらす可能性が考えられている。3-NT は ALS 脊髄ホモジェネートでコントロールに比し高値であり、ALS 運動ニューロンに免疫反応性が認められるという報告がある。本研究では、3-NT の臨床的意義を探索的に評価するために、ALS および免疫性神経疾患における髄液中 3-NT を測定した。

B. 対象及び方法：

対象は ALS 21 例、GBS 15 例、CIDP 16 例、Fisher 症候群 12 例、その他の疾患 13 例である。方法は、Competitive EIA 法を用いた。

本研究において測定する 3-NT は疾患のプロセスで生じる生化学的マーカーと考えられ、個人の遺伝情報を含まず、本研究は倫理面の問題はないと判断した。

C. 結果

ALS では $1.6 \pm 4.2 \text{ ng/ml}$ であったが、上昇群 (N=10) と非上昇群 (N=11) に分かれたため、両者の臨床像を比較したところ、年齢、罹病期間、初発症状において大きな差はみられなかった。GBS では $3.5 \pm 9.3 \text{ ng/ml}$ であったが、上昇群 (N=5) と非上昇群 (N=9) を比較したところ、上昇群では発病後平均 6 ヶ月を経過した時点でも全例において筋力低下の後遺症を有していることがわかった。CIDP では感覚障害優位型は、運動障害優位型よりも有意に 3-NT 値が高かった。フィッシャー症候群での 3-NT 値はほとんどの例で低値であった。その他の疾患の中では少数例であるが、アルツハイマー病で 3-NT が高値であった。

D. 考察

以前の報告では HPLC 法により ALS 全例で正常コントロールに比し 3-NT が高値を示したと報告された (Ann Neurol 46:129, 1999)。今回の研究では ALS で上昇しているのは約半数であったが、この差異の理由は、方法の違い、また対象患者の違いが考えられる。上昇群と非上昇群の間の、髄液採取時における ALS 症状の進み具合程度、また長期予後などを比較する必要がある。

また今回の研究で ALS のみならず、GBS の一部や感覚神経障害優位の CIDP などの免疫性神経疾患や、アルツハイマー病でも 3-NT 高値を示す症例が存在したことがわかった。このことは多くの神経疾患で神経細胞障害過程において peroxinitirite による酸化ストレスが重要な役割を演じていることが示唆される。このことは、これらの難治性神経疾患に対し、Anti-oxidant、Radical Scavenger 作用を有するあらたな薬剤が有用となる期待がなされる。今後さらに症例数を蓄積し、臨床的に詳細な比較検討を行い、長期予後における意義を解明する必要がある。

E. 結論

ALS の約半数の症例、及びギランバレー症候群の一群と感覚障害優位の免疫性神経疾患や、少数例であるがアルツハイマー病

でも 3-NT 高値を示す症例が存在した。このことより多くの神経疾患で神経細胞障害過程において peroxinitirite による酸化ストレスが重要な役割を演じていることが示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1) Yoshino H, Harukawa H, Asano A.: IgG antiganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome with bulbar palsy. J. Neuroimmunol 105:195-201, 2000.

2) Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Nakamura Y, Yanagawa H, Sato T.: Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. Neurology 55:718-721, 2000.

3) Yoshino H, Asano A, Yamada M, Miyatake T.: Localization of GalNAc-GD1a in large spinal motoneurons and peripheral motor neurons. J. Neuroimmunol, in press.

学会発表

1) 吉野英. 正常人および ALS における IgM 抗 GM1、GalNAc-GD1a、SGPG 抗体. 第 41 回日本神経学会総会 (2000 年 5 月, 松本)

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
研究報告書

脳由来神経栄養因子（BDNF）による運動神経軸索輸送促進機序
比留間弘美、川上 倫 北里大学医学部生理学

研究要旨 脳由来神経栄養因子（BDNF）による培養運動神経の軸索輸送促進作用の機序について検討した。BDNFの軸索輸送促進作用は、TrkB-IgGおよびチロシンキナーゼ阻害薬である herbimycin A をそれぞれ前処置すると消失した。TrkB に対する免疫反応が運動神経において細胞体に検出された。これらの結果より、BDNFの運動神経軸索輸送促進作用は、細胞体上の TrkB 受容体に BDNF が結合し、さらにチロシンキナーゼを活性化させて起こることが示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでに、培養運動神経の軸索輸送が脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）によって促進されることを報告してきた。筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病因に関連する事項のひとつとして運動神経の軸索輸送障害が挙げられており、この障害の改善が ALS の病態改善の一助となる可能性がある。本研究では培養運動神経における BDNF の軸索輸送促進作用発現の機序について検索した。

B. 研究方法

ラット胎児（14日齢）の脊髄腹側部から神経細胞を単離し、培養した。ビデオ増感顕微鏡を用いて培養細胞の軸索中を輸送される粒子をリアルタイムで観察した。コントロール観察期間の後、薬物を持続的に投与し、軸索輸送の変化を観察した。観察実験終了後、各々の細胞につき、運動神経のマーカーである SMI32 を用いて蛍光染色を行い運動神経の同定を行った。同定された運動神経について、順行性、逆行性に移動する粒子数の経時的变化を解析した。

本研究における実験は、北里大学医学部動物実験・倫理委員会の承認、指導のもとに行われた。特に、動物を殺す際には、深い麻酔により安楽死させた。

C. 研究結果

<軸索輸送に及ぼす BDNF の効果>

100 ng/ml の BDNF を持続的に投与すると、順行性、逆行性に輸送される粒子数は直ちに増加し、投与開始から 8 分後に最大値に達した。最大値はコントロールの約 140%であった。その後値は徐々に元のレベルへ戻った。

<TrkB-IgG 処置後の BDNF の効果>

1 μ g/ml の TrkB-IgG を投与して 30 分後に 100 ng/ml の BDNF を投与すると、BDNF 誘導性の輸送粒子数増加が認められなかった。

<Herbimycin A 処置後の BDNF の効果>

500 ng/ml の herbimycin A を投与して 30 分後に 100 ng/ml の BDNF を投与すると、BDNF 誘導性の輸送粒子数増加が認められなかった。

<培養運動神経における TrkB 受容体に関する蛍光免疫細胞化学的検討>

SMI32 と TrkB-IgG を用いて蛍光免疫細胞化学的に培養脊髄神経を二重染色したところ、SMI32 陽性の運動神経には TrkB 受容体が発現していることが判明した。TrkB 受容体は細胞体に発現し、神経線維には発現が認められなかった。

D. 考察

BDNF を培養運動神経に投与すると順行性、逆行性の速い軸索輸送が増加したことから、BDNF は速い軸索輸送を促進させる効果

をもつと考えられる。BDNF に選択的に結合し、BDNF が TrkB 受容体に結合することを妨げる TrkB-IgG を培養運動神経に前処置してから BDNF を投与すると、BDNF の軸索輸送促進効果が認められなかったことから、BDNF は、その高親和性受容体である TrkB 受容体に結合して軸索輸送を促進することが示唆された。このことは、運動神経に TrkB 受容体が発現していることを示した免疫細胞化学的実験結果からも支持された。興味深いことに、TrkB 受容体は細胞体に発現し、神経線維には発現が認められなかった。従って、BDNF は細胞体の TrkB 受容体に作用し、軸索輸送を促進すると考えられる。さらに、チロシンキナーゼ阻害薬である herbimycin A を前処置してから BDNF を投与すると、BDNF の軸索輸送促進効果が認められなかったことから、BDNF の軸索輸送に対する作用は、チロシンキナーゼ活性化を介して発現すると考えられる。TrkB 受容体はチロシンキナーゼのドメインをもつことから、BDNF と TrkB 受容体の結合は、直接的にチロシンキナーゼを活性化すると推察される。加えて、本結果より、チロシンキナーゼを活性化する薬物は運動神経の軸索輸送を促進するのに有効であると考えられる。

E. 結論

BDNF は、細胞体にある TrkB 受容体を介してチロシンキナーゼを活性化し、運動神経の速い軸索輸送を促進することが本研究によって示された。本研究結果が、ALS における運動神経軸索輸送障害の改善に貢献できるならば幸いである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
投稿準備中

2. 学会発表

1) Yamamoto M, Hiruma H, Hosokawa R, Nishida S, Takenaka T, Kawakami T: The neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor increase axonal transport in untreated and glutamate-treated cultured rat motor neurons. Society for Neuroscience 30th Annual Meeting Abstracts vol. 26: p.1353, 2000.

2) 山本美絵, 比留間弘美, 西田早苗, 齋藤綾子, 竹中敏文, 川上倫: 脳由来神経栄養因子・肝細胞増殖因子が培養運動神経細胞の軸索輸送に及ぼす影響. 第 77 回日本生理学会大会予稿集: p.89, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究報告書

運動ニューロン特異的遺伝子発現・ノックアウトシステムの確立に関する研究

高橋 良輔 理研脳センター・運動系神経変性研究チーム・チームリーダー

研究要旨: 変異 SOD1 トランスジェニック(TG)マウスにおける運動ニューロン変性のメカニズムを解明するため、コリンアセチル転移酵素 (ChAT) のプロモータを使って、マウスで運動ニューロン特異的に遺伝子発現・ノックアウトが行いうるシステムを開発する。本年度は運動ニューロンを含むコリン作動性ニューロン特異的にグルタミン酸受容体及び Cre recombinase を発現するマウスを作製した。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症 (Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, FALS) の動物モデル、変異 SOD1 トランスジェニック(TG)マウスにおける運動ニューロン変性のメカニズムを解明するため、マウスで運動ニューロン特異的に遺伝子を過剰発現もしくはノックアウトが行いうるシステムを開発する。

B. 研究方法

コリンアセチル転移酵素 (ChAT) は運動ニューロンを代表とするコリン作動性ニューロンの特異的マーカーである。コリン作動性ニューロン特異的発現を決定する 6.4kb の ChAT プロモータ領域²⁾の下流に目的の遺伝子を連結できるようにし、その直後に Internal Ribosomal Entry Site(IRES)、続けて Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) cDNA、SV40 poly(A) signal を配置したコンストラクトを作製した。さらに目的の遺伝子としてラット GluR2 と Cre リコンビナーゼの cDNA を挿入し、それぞれトランスジェニックマウスを作製した (ChAT-GluR2, ChAT-Cre マウス)。動物倫理面では動物の苦痛を軽減するよう、所の「動物実験実施要領」に基づき配慮した。

C. 研究結果: ChAT-GluR2 マウスは3ライン解析し、2 ラインでレポーター遺伝子である GFP の脊髄運動ニューロンでの発現を確認した。また ChAT-Cre マウスも 3 ライン中 1 ラインではほぼコリン作動性神経特異的に、脊髄においては運動ニューロンを含むニューロン群で Cre リコンビナーゼによる遺伝子組み換えが生じるトランスジェニックマウスが得られた。現在詳細な解析を行っている。

E. 結論

コリン作動性ニューロンにはほぼ特異的に遺伝子を発現する TG マウスが得られた。

F. 健康危険情報: なし

G. 研究発表

1. 論文発表

後藤由季子、高橋良輔: 細胞死の分子メカニズムー多様性への理解。モレキュラーメディシン 37:384-390 (2000)

高橋良輔: IAP の作用メカニズムと神経細胞死防御。生体の科学 51:273-278 (2000)

Kawata A., Kato S., Shimizu T., Hayashi H., Hirai S., Misawa H. and Takahashi R.: Aberrant splicing of human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) RNA transcripts. Neuroreport 11, 2649-2653 (2000).

Imai Y., Soda M. and Takahashi R.: Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. J. Biol. Chem. 275, 35661-35664 (2000).

2. 学会発表

高橋良輔: XIAP によるカスパーズ阻害の分子メカニズム、ミニシンポジウム「アポトーシス研究の新展開」、日本癌学会総会 (2000.10.04、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

とくに予定はない。

筋萎縮性側索硬化症に疾患特異的 mRNA 異常の単一運動ニューロンを用いた解析

郭 伸 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学

研究要旨：分担研究者らは、ALS の脊髄前角では AMPA 受容体サブユニットである GluR2 mRNA 発現および編集率が低下しており、AMPA 受容体からの Ca^{2+} 流入の増大により脊髄運動ニューロンに細胞死が生じている可能性を示した (Takuma et al, Ann Neurol 1999)。本研究では、この分子変化が脊髄前角運動ニューロンに生じ、選択的神経細胞死の原因として働いているかどうかを調べることを目的とする。ヒト剖検脊髄より、レーザーマイクロディセクター (浜松フォトジェニク社製) を用いて単一運動ニューロンを切り出し、RT-PCR 法・制限酵素による消化により GluR2 サブユニットの RNA 編集率を測定した。正常対照例においては、運動ニューロンの GluR2 RNA 編集率は、ほぼ 100%であったのに対し、ALS 2例では編集率がばらつき、平均値は 50%以下であった。以上の結果は、ALS の脊髄運動ニューロンでは AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性が亢進しており、脊髄運動ニューロンの細胞死に病因として関与していることを示唆する。

A. 研究目的

孤発例筋萎縮性側索硬化症の病因仮説のうち、グルタミン酸受容体のサブタイプである AMPA 受容体を介する細胞死のメカニズムの関与を示唆する知見が蓄積している。脊髄運動ニューロンは AMPA 受容体を介する神経細胞死に対する脆弱性が高く、細胞死に先立って細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが培養神経細胞により明らかにされている。AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性は転写後編集を受けた GluR2 サブユニットが受容体を構成するサブユニットの中に含まれているかどうかにより決定され、GluR2 を含まないまたは GluR2 を含んでいてもそれが RNA 編集を受けていない場合には Ca^{2+} 透過性になる。我々は、脊髄前角に AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を亢進させる分子変化、すなわち、AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットである GluR2 mRNA の発現量および Q/R サイトでの転写後編集 (editing) 率が ALS 前角で低下していること、特に編集率の低下は他の神経疾患には見られない、ALS に疾患特異的な変化である点、病因に深く関わっている可能性が高いことを示した。これらの AMPA 受容体の分子変化が脊髄運動ニューロンの細胞死を促進することは、モデル動物で示されている。したがって、ALS 脊髄前角で我々が見いだした AMPA 受容体の分子変化は神経細胞の変性脱落の因子である可能性は極めて高い。

本研究では、運動ニューロンの AMPA 受容体にも同様の変化が生じているかどうかを

確かめることを目的とした。

B. 研究方法

剖検時凍結保存した正常 (2例) および ALS (2例) 剖検脊髄より、10 μ m 厚の凍結切片を作製し、水晶製プレパラートに貼り付けた後、凍結乾燥した。この組織を 0.1% toluidine blue 液で染色の後、100 μ m レーザービームにより輪郭の縁取りをし、縁取られた組織を全量 200 μ l チューブに採取した。この組織から TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出し、逆転写酵素で cDNA とした後、特異的プライマーペアを用いて、GluR2 mRNA に対する RT-PCR を行った。GluR2 に対する PCR プライマーペアは Q/R サイトを含むように設計した。GluR2 の PCR 産物を制限酵素 Bbv-1 で消化し、得られた断片を 20% SDS-polyacrylamide gel で分離、銀染色を施したのち、画像解析装置 (Epi-Light 200, アイシンコスモス) で定量した。

(倫理面への配慮)

剖検脊髄の使用にあたっては、匿名性に留意し、病的に確定診断のついた症例を用いたことのみを記した。

研究結果

脊髄運動ニューロン組織は、house keeping enzyme である β -actin の RT-PCR 産物が検出できたものについて検討した。2例の正常対照例においては、10個の

運動ニューロンの GluR2 RNA 編集率は、90%以上のものが大半で、予想された通り多くは 100%であった。対象とした ALS 2 例は、前角組織を用いた GluR2 RNA 編集率はほぼ 0%であり、全ての運動ニューロンで編集率が著減していることが予想されたが、個々の運動ニューロンにおける編集率は 0%~100%近い値のばらつきを示した。ただし、編集率の低下している運動ニューロンの方が多く、10個での平均値は 50%以下であった。

考 察

以上の結果は、筋萎縮性側索硬化症の脊髄運動ニューロンで GluR2 mRNA の Q/R サイトでの RNA 編集が減少していることを示している。

GluR2 の Q/R サイトでの RNA 編集はヒト脳を含め、動物種間で高度に保存されており¹⁰⁻¹⁶、また、発生早期からほぼ 100%であることが知られている。さらに、この部位での RNA 編集の減少により、神経細胞死が生ずることが動物実験より明らかにされている^{7, 8}。本研究の結果は、ALS の脊髄運動ニューロンの GluR2 mRNA は編集されていないものの割合が高まっており、運動ニューロンの細胞死に大きく関与していることを示唆する。すなわち、我々が筋萎縮性側索硬化症剖検脊髄で示した、前角での編集率低下は⁶、運動ニューロン自体に生じていること、したがって、筋萎縮性側索硬化症の運動ニューロンしの原因ないし増悪因子として働いている可能性が高いことを意味している。

また、運動ニューロンにより編集率が異なることも極めて興味深い知見であり、運動ニューロンの障害の病理学的変化が均一でないことを反映している可能性がある。今後は運動ニューロンの病理変化の強さと GluR2 mRNA 編集率の減少との対応を検討することが必要である。

ラット ALS モデルにおける検討では、GluR2 mRNA 発現が、カイニン酸の持続投与で down regulation をうける可能性を示唆している。8 週間での段階では、GluR2 mRNA を発現している運動ニューロンでは、編集率の低下はみられなかったが、神経細胞

死の過程が収束してした段階をみている可能性もあるので、変性脱落した運動ニューロン、GluR2 mRNA 発現の低下しているニューロンでの編集率の低下の有無を検討するために、8 週以前の段階での検討が必要である。

E. 結論

単一細胞を用いた検討で、ALS 脊髄運動ニューロンの GluR2 mRNA 編集が低下していることが明らかになり、AMPA 受容体チャネルの分子変化が ALS の運動ニューロンに選択的な細胞死の病因と極めて関連が高いことが分った。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 郭 伸：Startle 病 (hyperekplexia)、*Clinical Neuroscience* 18:338-340, 2000.
- (2) 郭 伸：急性散在性脳脊髄炎、臨床医、増刊号 (内科治療のグローバルスタンダード)、26:807-8, 2000
- (3) 河原行郎、郭 伸、金澤一郎、百瀬敏光：線条体黒質変性症病変の左右差、*神経内科* 53(Suppl. 2)492-493, 2000.

2. 学会発表

- (1) 郭 伸：ヒト単一運動ニューロンにおけるグルタミン酸受容体関連物質 mRNA 発現の検討、第 41 回日本神経学会総会、2000. 5. 25. 松本
- (2) Kwak S: Aberrant editing of glutamate receptor mRNA in ALS. *International Symposium on Molecular Mechanism and Therapeutics of Myotrophic Lateral Sclerosis*. Sept. 23, 2000. Kurashiki.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし