

200/0824

厚生科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

神経変性疾患に関する研究

(課題番号 H11-特疾-15)

平成13年度 総括・分担研究報告書

平成14 (2002) 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 多系統萎縮症における glial cytoplasmic inclusions の免疫組織化学 および magnetization transfer imaging を用いた臨床病理学的検討	11
広島大学医学部第三内科 中村 重信	
3 紀伊 ALS/パーキンソン痴呆複合 - 臨床と病理の対比-	13
三重大学医学部神経内科 葛原 茂樹	
4 筋萎縮性側索硬化症(ALS)における アポトーシス関連蛋白 Apaf-1 の発現解析	14
自治医科大学神経内科 中野 今治	
5 ALS病態関連分子の探索から -2~3の新規分子について-	16
名古屋大学大学院医学研究科神経内科学 祖父江 元	
6 カベルゴリンのパーキンソン病の夜間運動緩慢への効果 ---wrist activity monitor による検討---	19
国立精神・神経センター武蔵病院 川井 充	
12 研究成果の刊行に関する一覧表	21

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	33,000 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、大八木保政、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、渡部和彦、湯浅龍彦）24名、計31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13年度研究班のワークショップ・班会議・研究報告会を平成14年1月11日～12日に全共連ビルで開催した。本年度は合同ワークショップ、招待講演1題、特別報告2題、ミニシンポジウム3題と各個研究の研究報告会を行った。

合同ワークショップは本研究班と特定疾患患者の生活の質（QOL）の判定手法の開発に関する研究班と合同で開催し、「特定疾患臨床調査個人票の問題点と利用のしかた」、「神経疾患と QOL 評価」、「神経難病の介護負担測定について」、の発表があり、特定疾患に関する臨床研究および事業の評価にあたっては、横断班と臨床班の密な連帯が必須であるということが理解された。

招待講演は「ALS の新しい遺伝子」として、25 歳未満で発症する常染色体劣性遺伝形式の若年性 ALS（チニジュア、サウジアラビア）の遺伝子が染色体 2q33. に東海大学池田讓衛教授により同定され、この遺伝子についての解析は、若年発症 ALS のみならず成人発症の孤発性 ALS 解析への発展が急務であり、臨床的バックグラウンドを有する当班構成員による全国レベルでの共同研究として取り組むことにより世界的レベルの成果が期待されると思われた。

特別報告として「パーキンソン病の定位脳手術の適応と手技の確立に関する多施設共同研究－3年間のまとめのとその後の経過」と「班員施設における大脳皮質基底核変性症の症例数調査」が発表された。

ミニシンポジウムは ALS 関連1題とパーキンソン病関連2題で、「パーキンソン病をめぐって」のテーマで、「パーキンソン病における神経細胞死」、「パーキンソン病の分子遺伝学」、「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探索」、「パーキンソン病モデルサルでの遺伝子治療実験」が発表され、当研究班でのパーキンソン病の病因・病態の解明、治療法の開発への向けての神経病理、"Parkin"と今回、新しく同定された遺

伝子座 (12p11.23-q13.11) の分子遺伝学、遺伝子治療を含めた総括的なシンポジウムであった。

パーキンソン病関連のもう一つのミニシンポジウムは「本邦における疫学調査」をテーマに「米子市の疫学調査」、「北海道岩見沢市での疫学調査」、「鹿児島県における疫学調査—1980年調査との比較検討」、「京都府における疫学調査」が発表され、本邦北海道から九州までの4地区におけるパーキンソン病の有病率が100~120人/10万人であることが明らかにした。

一方、「筋萎縮性側索硬化症をめぐって」をテーマとするミニシンポジウムでは、「ALSにおける神経細胞死」、「SOD1変異家族性ALSにおける遺伝子変異と臨床」、「ALS病態関連遺伝子の探索」、「紀伊ALS/PDCの再発掘」が発表され、家族性ALSの病因・病態解明の状況、紀伊半島におけるALS/パーキンソニズム痴呆複合(PDC)の疫学・病態及び遺伝子解析を行い、PDCの発掘とタウ蛋白異常を明らかにした。

研究報告会では29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、遺伝子関連ではSOD1変異マウスにおけるVEGF導入の異常、ALSにおけるアポトーシス関連蛋白Apaf-1の発現、臨床的に特徴のあるCu/Zn SOD遺伝子変異(L84VおよびH46R)を導入したトランスジェニックマウスの作製、孤発性ALSの全ゲノム領域を対象とした関連解析がなされた。

Spinal cord derived growth factor-Bの発現、ALS病態関連分子が病理学的に検討され、紀伊ALS/PDCの臨床と病理の対比およびCu/Zn SOD遺伝子のHis46R変異を認めた家族性ALSの剖検例が検討された。

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multiplepoint stimulationによる変化、培養脊髄腹側神経細胞に対するグルタミン酸毒性に対する神経保護の検討、神経栄養因子組換えアデノウイルス・ベクターおよびT-588の作用、ALSに対する超大量メチルコバラミン治療が発表された。

パーキンソン病(PD)の発症機序に関する研究では、パーキンソン病モデルでのドパミントランスパーターの発現、パーキン蛋白の神経変性への関与、パーキンソン病と多系統萎縮症、ジストニアでの遺伝子多型の解析、パーキンソン病患者における高ホモシステイン血症、若年性パーキンソニズムのドパミン合成能が検討された。

PDの治療面では、日本脳炎ウイルス性パーキンソン病モデルラットでのデプレニール投与、カベルゴリンのパーキンソン病の夜間運動緩慢への効果、primary autonomic failureの起立性低血圧への治療が発表された。

パーキンソン病および大脳皮質基底核変性症の脳機能画像、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症の生化学、病理学的検討がなされた。

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の解析により、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ほか、相模原地区の家族性パーキンソン病の遺伝子座が同定され、その病態解明が期待される。

PD の疫学調査では、本邦の北海道から九州までの 4 ヶ所で調査が行われ、人口 10 万対 100~120 人であることが明らかにされた。

当研究班の対象疾患の臨床研究のみならず、難病情報センターの医学講座を担当し、社会的ニードへ対応した。

本研究班は ALS、PD を初めとする神経変性疾患を対象とする臨床に基づいた研究班であり、全国レベルの研究班員の協力体制を組んできたが、現研究班の研究課題をさらに継続発展させる必要がある。そのうち、「ALS 治療法の開発」、「Parkin 遺伝子の解明とパーキンソン病治療法への応用」、「大脳皮質基底核変性症の病態解明と治療法の開発」の研究は特に重点的、かつ継続的に取り組むべき課題といえる。

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 24 名、計 31 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

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、大八木保政、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、渡部和彦、湯浅龍彦）24 名、計 31 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た。

C. 研究成果

平成 13 年度研究班のワークショップ・班会議・研究報告会を平成 14 年 1 月 11 日～12 日に全共連ビルで開催した。本年度は合同ワークショップ、招待講演 1 題、特別報告 2 題、ミニシンポジウム 3 題と各個研究の研究報告会を行った。

合同ワークショップは本研究班と特定疾患患者の生活の質（QOL）の判定手法の開発に関する研究班と合同で開催し、「特定疾患臨床調査個人票の問題点と利用のしかた」、「神経疾患と QOL 評価」、「神経難病の介護負担測定について」、の発表があり、特定疾患に関する臨床研究および事業の評価にあたっては、横断班と臨床班の密な連帯が必須であるということが理解された。

招待講演は「ALS の新しい遺伝子」として、25 歳未満で発症する常染色体劣性遺伝形式の若年性 ALS（チニジュア、サウジアラビア）の遺伝子が染

染色体 2q33. に東海大学池田譲衛教授により同定され、この遺伝子についての解析は、若年発症 ALS のみならず成人発症の孤発性 ALS 解析への発展が急務であり、臨床的バックグラウンドを有する当班構成員による全国レベルでの共同研究として取り組むことにより世界的レベルの成果が期待されると思われる。

特別報告として「パーキンソン病の定位脳手術の適応と手技の確立に関する多施設共同研究—3年間のまとめとその後の経過」と「班員施設における大脳皮質基底核変性症の症例数調査」が発表された。

ミニシンポジウムは ALS 関連 1 題、パーキンソン病関連 2 題で開催し、「パーキンソン病をめぐって」のテーマで、「パーキンソン病における神経細胞死」、「パーキンソン病の分子遺伝学」、「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探索」、「パーキンソン病モデルサルでの遺伝子治療実験」が発表され、当研究班でのパーキンソン病の病因・病態の解明、治療法の開発への向けての神経病理、「Parkin」と今回新しく同定された遺伝子座（12p11.23-q13.11）の分子遺伝学、遺伝子治療を含めた総括的なシンポジウムであった。

パーキンソン病関連のもう一つのミニシンポジウムは「本邦における疫学調査」をテーマに「米子市の疫学調査」、「北海道岩見沢市での疫学調査」、「鹿児島県における疫学調査—1980 年調査との比較検討」、「京都府における疫学調査」が発表され、本邦北海道から九州までの 4 地区におけるパーキンソン病の有病率が 100~120 人/10 万人であることが明らかにした。

一方、「筋萎縮性側索硬化症をめぐって」をテーマとするミニシンポジウムでは、「ALS における神経細胞死」、「SOD1 変異家族性 ALS における遺伝子変異と臨床」、「ALS 病態関連遺伝子の探索」、「紀伊 ALS/PDC の再発掘」が発表され、家族性

ALS の病因・病態解明の状況、紀伊半島における ALS/パーキンソニズム痴呆複合 (PDC) の疫学・病態及び遺伝子解析を行い、PDC の発掘とタウ蛋白異常を明らかにした。

研究報告会では 29 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、遺伝子関連では SOD1 変異マウスにおける VEGF 導入の異常、ALS におけるアポトーシス関連蛋白 Apaf-1 の発現、臨床的に特徴のある Cu/Zn SOD 遺伝子変異 (L84V および H46R) を導入したトランスジェニックマウスの作製、孤発性 ALS の全ゲノム領域を対象とした関連解析がなされた。

Spinal cord derived growth factor-B の発現、ALS 病態関連分子が病理学的に検討され、紀伊 ALS/PDC の臨床と病理の対比および Cu/Zn SOD 遺伝子の His46R 変異を認めた家族性 ALS の剖検例が検討された。

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 multiplepoint stimulation による変化、培養脊髄腹側神経細胞に対するグルタミン酸毒性に対する神経保護の検討、神経栄養因子組換えアデノウイルス・ベクターおよび T-588 の作用、ALS に対する超大量メチルコパラミン治療が発表された。

パーキンソン病 (PD) の発症機序に関する研究では、パーキンソン病モデルでのドパミントランスパーターの発現、パーキン蛋白の神経変性への関与、パーキンソン病と多系統萎縮症、ジストニアでの遺伝子多型の解析、パーキンソン病患者における高ホモシステイン血症、若年性パーキンソニズムのドパミン合成能が検討された。

PD の治療面では、日本脳炎ウイルス性パーキンソン病モデルラットでのデプレニール投与、カベルゴリンのパーキンソン病の夜間運動緩慢への効果、primary autonomic failure の起立性低血圧への治療が発表された。

パーキンソン病および大脳皮質基底核変性症の脳機能画像、多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症の生化学、病理学的検討がなされた。

D. 考察

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の解析により、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ほか、相模原地区の家族性パーキンソン病の遺伝子座が同定され、その病態解明が期待される。

PD の疫学調査では、本邦の北海道から九州までの4ヵ所で調査が行われ、人口 10 万対 100~120 人であることが明らかにされた。

当研究班の対象疾患の臨床研究のみならず、難病情報センターの医学講座を担当し、社会的ニードへ対応した。

本研究班は ALS、PD を初めとする神経変性疾患を対象とする臨床に基づいた研究班であり、全国レベルの研究班員の協力体制を組んできたが、現研究

班の研究課題をさらに継続発展させる必要がある。そのうち、「ALS 治療法の開発」、「Parkin 遺伝子の解明とパーキンソン病治療法への応用」、「大脳皮質基底核変性症の病態解明と治療法の開発」の研究は特に重点的、かつ継続的に取り組むべき課題といえる。

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 24 名、計 31 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

論文発表：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 順天堂大学脳神経内科教授

研究要旨

劣性遺伝形式をとる AR-JP では loss-of-function 型変異により E3 活性の消失または細胞内局在の変化によりパーキン蛋白の基質が分解されずに蓄積することで神経細胞死が起こると推定される。現在基質候補として糖化修飾アルファ-シヌクレイン、パエル受容体、シンフィリン-1、そして CDCrel-1 がある。本研究では酵母 two-hybrid スクリーニングで単離された CDCrel-1 に注目して解析を行った。CDCrel-1 は確かに mammalian cell 内でもパーキンと結合することが確認できたが、*n vivo* ubiquitination や患者剖検脳を用いた半定量方法では蓄積しているとす結果は得られなかった。CDCrel-1 は主要なパーキン蛋白の基質とは考えにくいと思われた。

A. 研究目的

近年単一遺伝子異常で起こる家族性パーキンソン病が相次いで報告されている。この単一遺伝子異常で起こる選択的神経変性のメカニズムを明らかにすることにより孤発型パーキンソン病の病態解明に繋がる可能性がある。現在 Park1-8 の 8 遺伝子座が同定されえており、うち park1, Park2 については原因遺伝子が明らかにされている。Park1 はアルファシヌクレインが原因遺伝子として、パーキンは Park2 の原因遺伝子として単離された。特に Park2 は我が国で臨床病理学的検討がされたものである。常染色体劣性若年性パーキンソン病（AR-JP: Park2）は一般にレビー小体を認めず、選択的に黒質神経変性を来す。パーキン遺伝子は常染色体 6 番長腕に位置し全長 1.4 Mb の巨大遺伝子である。変異は世界各国から報告されており最もポピュラーな遺伝性パーキンソン病と認識されている。その機能については我々の研究グループにより ubiquitin ligase (E3) であることが明らかにされた。劣性遺伝形式をとる AR-JP では loss-of-function 型変異により E3 活性の消失または細胞内局在の変化によりパーキン蛋白の基質が分解されずに蓄積することで

神経細胞死が起こると推定される。従ってその病態解明にはパーキン蛋白の基質同定が最重要課題であると言える。現在基質候補として糖化修飾アルファ-シヌクレイン、パエル受容体、シンフィリン-1、そして CDCrel-1 がある。本研究では酵母 two-hybrid スクリーニングで単離された CDCrel-1 に注目して解析を行った。

B. 方法

酵母 two hybrid スクリーニング: parkin 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 cloning した。スクリーニングは 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行った。パーキンの ubl-linker を transfection した酵母 (PJ69-4A (MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ)) に Brain cDNA library、SH-SY5Y cDNA library をそれぞれ transfection した。その yeast を SD/-Trp/-Leu/-His plate で選択し、SD/-

Trp/-Leu/-His/-Ade plate で確認した。結合を確認するために pGAD-C1 cDNA clone を酵母より回収し pGBD-C1 パーキン、pGBD-C1 ubl-linker とともにそれぞれ co-transformation を行い 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(+) (Invitrogen) 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 parkin 全長、parkin の ubl domain、ubl-linker、delta-ubl、RING box、および CDCrel-1 を cloning した。SH-SY5Y および HEK293 を 10% fetal bovine serum を加えた DMEM で培養した。プロテアソーム阻害は MG132 (50 μ M; Peptide Institute) を加えて 6 時間反応させた。パーキン遺伝子の point mutant は pcDNA3.1 Flag-parkin に対して、site directed mutagenesis kit (Stratagene) を使用しそれぞれの point mutant を作成した(T415N)。

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 (A-14; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-Myc antibody (9E10; Santa Cruz Biotechnology) を使用し、Western blot の抗体は monoclonal anti-Myc antibody, mouse monoclonal anti-FLAG(M2) antibody (Sigma), mouse monoclonal anti-HA antibody (HA.11; Berkeley Antibody company) を使用した。

exocytosis の解析: ヒト Growth hormone (GH) を tracer にシナプスに関与する SNAP25, mutant SNAP25, CDCrel-1, dominant negative 効果を持つ mutant CDCrel-1, wild type パーキン, T415N mutant パーキンをハムスター insulinoma 由来 HIT-T15 細胞株に double transfection し、ELISA にて GH を測定した。

Western blotting による CDCrel-1 の蓄積の検討: 前頭葉より蛋白を抽出し、CDCrel-1 のペプチド抗体を用いてコントロール群と比較した。尚剖検脳の

扱いについてはインフォームドコンセントを得ている。また順天堂大倫理委員会の承認を得ている。

In vivo ubiquitination: パーキンに myc を、ubiquitin に FLAG を tag 蛋白として HIT-T15 cell に double transfection して myc で免疫沈降し FLAG で immunoblot を行った。

C. 結果

酵母 two hybrid スクリーニング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 つは CDCrel-1 があった。CDCrel-1 は synaptic vesicle に存在することが報告されており、細胞内局在は Parkin と一致している可能性が考えられた。酵母内ではパーキンの 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 にクローニングし、培養細胞内にパーキン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。exocytosis では CDCrel-1 の過剰発現状態でも脱分極後の exocytosis の抑制は認められなかった。一方、C 末が欠損している amino acid number 1-197 の SNAP25 では、exocytosis の抑制が認められた。少なくとも我々の系では報告通り変異型 SNAP25 では exocytosis の抑制が起こり CDCrel-1 については dominant negative form も含めて exocytosis の抑制や enhancement は認められなかった。また Western blotting による CDCrel-1 の蓄積の有無については対照群と大差なかった。また in vivo ubiquitination については CDCrel-1 が ubiquitination されている結果は得られなかった。このことは少なくとも CDCrel-1 はパーキンの主要な基質ではないことを示している。一方、変異パーキン蛋白については T415N の変異型が exocytosis を濃度依存性に抑制した。

D. 考察

酵母 two-hybrid スクリーニングで CDCrel-1 が単離された。この分子は syntaxin と結合することで exocytosis を抑制している蛋白の可能性が指摘されていたが、我々の系では exocytosis を抑制するとする結果は得られなかった。また患者剖検脳での解析でもその蓄積は認められず、また in vivo ubiquitination の実験系でも polyubiquitination は認めなかった。細胞内局在ではパーキン同様 CDCrel-1 は synaptic vesicle に存在することより、その細胞内局在からは parkin とは一致している。しかも exocytosis のメカニズムを考えれば、それが抑制されてドパミンが遊離されないことが考えられる。その結果としてドパミンが生理的部位に存在せず病的な所に存在するようなことが起こることで酸化的ストレスを介した神経細胞死が誘導される可能性が考えられた。しかし今回の研究成果では CDCrel-1 が主要な基質とは考えにくくパーキン蛋白とは結合するが、別の機序に関わっている可能性が考えられた。一方、T415N の変異パーキンが濃度依存性に exocytosis を抑制することよりパーキン蛋白は CDCrel-1 とはシナプス上で結合するが別の因子により exocytosis を抑制していると考えられた。HIT-T15 細胞は内在性パーキン蛋白を持つことは確認できているので、T415N の変異パーキンは dominant negative 効果で exocytosis を抑制していると考えられる。酵母 two-hybrid スクリーニングでは CDCrel-1 以外にも複数の結合分子が単

離できている。シナプス関連分子を中心に解析することで AR-JP の病態解明に結びつけることが可能と考えている。

E. 結論

CDCrel-1 は確かに mammalian cell 内でもパーキンと結合することが確認できたが、*n vivo* ubiquitination や患者剖検脳を用いた半定量方法では蓄積しているとする結果は得られなかった。このことは CDCrel-1 は主要なパーキン蛋白の基質とは考えにくいと思われた。但し、CDCrel-1 がシナプス小胞に存在することやパーキンも同様な局在を示すことは CDCrel-1 を介してシナプスに関連した機能を示していると考えられた。

パーキン蛋白の基質については我々の研究グループをはじめ数種の基質候補が報告されている。家族性アルツハイマー病が beta-amyloid 系代謝系に関わりのある分子がその原因として単離されている。同じようなことがやはり家族性パーキンソン病についても当然予想されると考えており原因遺伝子の単離またその機能解明は common form である孤発型パーキンソン病の病態解明に繋がると考えている。

F. 研究発表

論文発表：別紙記載

多系統萎縮症における glial cytoplasmic inclusions の免疫組織化学
および magnetization transfer imaging を用いた臨床病理学的検討

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) 患者脳脊髄に特異的に出現する glial cytoplasmic inclusion(GCI) の形成機序に脂肪酸が関与しているかどうかを明らかにする目的で剖検脳を用いて脂肪酸合成酵素の有無を免疫組織化学法を用いて検討した。また、臨床的に病態を把握する目的で、従来の撮像法では得られなかった微細な分子構造的変化を検出する目的で magnetization transfer image を用いて magnetization transfer ratio(MTR) を算出し、正常脳と比較検討した。MSA 患者脳に出現する GCI のほとんどが α -synuclein 陽性であり、異常線維構造を呈し、ミトコンドリアストレス応答蛋白質である bcl-2 が一部陽性で、脂肪酸合成酵素も多くが陽性であった。GCI の形成に α -synuclein の異常凝集が中心となっており、その凝集にミトコンドリア負荷によるエネルギー源として脂肪酸合成酵素が沈着し、 α -synuclein 凝集と深く関与しているものと思われた。MTR は関心領域のうち橋底部、大脳後脚、被殻、中心前回白質の 4 ヲ所で正常より有意に低下し、脳萎縮と共に中小脳脚、大脳脚の MTR が低下していることが明らかとなった。MTR の測定は MSA 患者脳の変化をとらえるのに有用と考えた。

A. 研究目的

多系統萎縮症 (MSA) は原因不明の進行性の神経変性疾患の 1 つである。病態、病因を明らかにし、臨床的多角的にも病態を把握できることが望まれる。MSA 脳脊髄に特異的に出現する glial cytoplasmic inclusions(GCI) の形成機序をより明らかにするために、MSA 剖検脳を用いて脂肪酸合成酵素の関与を検討し、臨床的に脳の変性を把握する目的で、従来の撮像法では得られない微細な分子構造的変化の検出に優れている magnetization transfer imaging(MTI) を作成し、正常対照と比較検討した。また、MSA 患者脳の萎縮との関連性を検討した。

B. 研究方法

1) 剖検脳を用いた検討は、MSA と臨床病理診断された 3 症例 (OPCA1 例、SND2 例)。剖検時摘出した脳ホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックより厚さ 7 μ m 切片を作成し、免疫組織化学法を用いて、被殻、橋、延髄で検討した。一次抗体に抗脂肪酸合成酵素 (FAS) 抗体 (rabbit, 5 μ m/ml, IBL)、抗 bcl-2 抗体 (mouse, x15, DAKO)、抗 α -synuclein(C-8) 抗体 (goat, x500, Santa Cruz)、抗 α -B-crystallin 抗体 (mouse, x1000, Stress Gen)、抗 ubiquitin 抗体 (mouse, x20000, Chemicon) を用いた。抗原賦活法は抗 bcl-2 抗体を用いるときは antigen retrieval buffer (DAKO) で、121 $^{\circ}$ C 15 分間 autoclave した。その他は、蒸留水で 10 分間 microwave 処理を行った。免疫染色法は、mouse

抗体は、ENVISION+法を、その他は ABC 法を用い、発色基質に DAB を使用した。

2) MTI の検討は、MSA11 例 (58.3 \pm 6.7 歳、平均罹病期間 3.7 年)、正常対照 11 例 (56.4 \pm 6.6 歳) を対象とした。1.5T の MRI を用いて MTI をスピンエコー法 (TR/TE=500/8ms) で、off-resonance RF pulse 3.4x10 $^{-6}$ T で、自由水共鳴周波数より 1.0kHz 遠隔に 250Hz 帯域幅で 7.8ms 照射し検出し、MTR (magnetization transfer ratio) = [(Mo-Ms)/Mo] x100(%) (Mo=照射前の信号強度、Ms=照射後の信号強度) を大脳白質等の関心領域 15 ヲ所で算出した³⁾。各部位において、Student-t 検定を用いて正常対照と比較検討した。更に、各部位の MTR の変化と脳萎縮との関連を明らかにするために、各 MSA 患者の各部位における MTR 値と正常者の各部位の MTR 平均値との差を求め、 Δ MTR とし、MRIT1 強調画像を用いて脳各部位の長さを測定し、同様に、各 MSA 患者の各部位における長さとして算出した。各部位における Δ MTR と Δ length との関連性を Pearson 検定を用いて検討した。

C. 研究結果

1) MSA3 症例に観察された GCI の一部が抗 FAS 抗体陽性であった。橋、延髄に認められる GCI の方が FAS 陽性 GCI の割合が多い。キャップ型、三角烏帽子型など様々な形態を示す GCI が陽性であった。細胞質内には、異常繊維形成と関係なく均質に染

色されるものがほとんどだが、異常繊維形成に一致して染色されるものが少数存在した。橋連続切片を用いてミトコンドリアストレス応答蛋白質でもある bcl-2 も一部の GCI に陽性であった。その割合は、 α -synuclein 陽性 GCI に対し、bcl-2 陽性 GCI が約 25%、FAS 陽性 GCI が約 60% であった。

2) MT法を用いて、15カ所の関心領域(橋底部、中小脳脚、大脳脚、視床、被殻、淡蒼球、尾状核頭部、中心前回白質、前頭葉白質、側頭葉白質、頭頂葉白質、後頭葉白質、脳梁膝部、脳梁膨大部、内包後脚)でMTRの計測を行ったところ、正常者と比べて有意に低下を橋底部、大脳後脚、被殻、中心前回白質の4カ所で認めた。

更に、脳各部位の長さ各部位のMTRに関して、正常者11名の平均を求め、各MSA患者各部位の長さの差とMTRの差を求め、各々が相関するかどうかを求めたところ、P値が0.01未満の高い正の相関関係を認めた部位は、橋前後及び横径の差と中小脳脚、大脳脚のMTRの差、中小脳脚径の差と中小脳脚、大脳脚のMTRの差、淡蒼球短軸の差と尾状核頭部、側頭葉白質、後頭葉白質のMTRの差であった。

D. 考察

1) MSAの脳脊髄に出現するGCIは現在のところ疾患特異性が極めて高い。私たちは、GCIと臨床病理像は極めて密接な関係にあると脊髄を用いて指摘した。GCIの主な構成蛋白質は α -synucleinの異常線維構造と考えられている。 α -synucleinが何故oligo-dendrogliaの中で異常線維構造を形成するのかは明らかでない。Probst-Cousin SらはGCIの中にapoptosis関連蛋白質の沈着を報告した。我々も、mitochondrial stress 応答によるapoptosis抑制蛋白質であるbcl-2が沈着していることを証明した。培養細胞を用いて、 α -synucleinの過剰発現によりapoptosisが生じること、 α -synucleinはmitochondrial stress 引き起こし細胞死が誘導されることが報告されている。MSAにおけるmitochondria エネルギー代謝に関する研究は今のところまだ無い。mitochondria エネルギーである脂肪酸を確認することは形態的には困難である。そこで、脂肪酸合成酵素の存在を確認したところ、GCIに確認された。最近、 α -synucleinが脂肪酸と強い親和性を持つことが報告され、また、 α -synucleinは試験管内で極長鎖脂肪酸によって凝集しやすいことが解った。これらのことより、GCIの形成に脂肪酸合成酵素が関与している可能性が考えられた。

2) MTRが神経細胞脱落と深く関係している部位で正常と比べて低下しており、これらは、形態的萎縮と密接に関連していた。MTRの低下は高分子プロトンの減少を意味し、高分子プロトンは髄鞘、神経細胞に多く含まれる。従って、これらの所見は、髄鞘

の変化、軸索の消失などと深く関係していると思われる。また、淡蒼球短軸の低下と尾状核頭部、側頭葉白質、後頭葉白質のMTRの低下に正の相関を認めたことは、淡蒼球の萎縮と側頭、後頭葉白質の変性とが同じように進行しているとも考えられる。MSAにおける変性を解析するのに有用と思われた。

E. 結論

MSAにおけるgliaの異常は病態と深く関係している。その形成には α -synucleinの異常線維形成を中心とし、脂肪酸合成酵素が関与していると思われた。また、臨床的に病態を把握する方法としてMTIは極めて有用と考えた。

F. 研究発表

論文発表：別紙記載

紀伊 ALS/パーキンソン痴呆複合 - 臨床と病理の対比-

分担研究者 葛原茂樹 三重大学神経内科教授

研究要旨

紀伊半島多発地域の筋萎縮性側索硬化症 (Kii ALS)とパーキンソン痴呆複合 (Kii PDC)について臨床像と病理像を対比した。Kii ALS の臨床像は通常のALSと変わらず、神経病理学的には、ALSの所見に加えて、脳幹諸核と大脳皮質に神経細胞脱落とNFT を認めたが、軽度であった。Kii PDC の臨床像は、意欲や発動性低下、物忘れといった精神症状とパーキンソン症状が主体で、神経病理学的には、ALS の所見の他に側頭葉を中心とした大脳皮質、脳幹諸核、小脳歯状核、脊髄灰白質に神経細胞脱落と多数のNFTを認め、さらに様々な程度の ALS 症状を伴っていた。

1. 研究目的

紀伊半島多発地域の筋萎縮性側索硬化症 (Kii ALS)とパーキンソン痴呆複合 (Kii PDC)において臨床像と病理像を対比する。

2. 研究方法

生前に臨床像を観察し得た、三重県徳原地区の Kii ALS 1例 (女性、死亡年齢 66歳)と Kii PDC 4例 (男性 1例、女性 3例、平均死亡年齢 70.8歳)について、臨床像を経時的に観察し、H&E染色とKB染色および Bielschowsky または Gallyas 染色を施行した脳脊髄標本から所見を得た。

3. 結果と考察

Kii ALS の臨床像は、通常のALSと変わらず、痴呆やパーキンソン症状は認めなかった。神経病理学的には、ALSの所見に加えて、脳幹諸核と大脳皮質に神経細胞脱落とNFT を認めたが、軽度であった。

Kii PDC の臨床像は、意欲や発動性低下、物忘れといった精神症状とパーキンソン症状が主体で、

様々な程度の ALS 症状を伴った。

神経病理学的には、側頭葉を中心とした大脳皮質、脳幹諸核、小脳歯状核、脊髄灰白質に神経細胞脱落と多数の NFT を認め、ALS の所見を伴っていた。

ALS 病変と NFT 病変の程度は、症例によって強弱があり、それぞれの臨床症状と対応していると推定した。NFT や ALS 病変には、罹病期間の影響も否定できない。

4. 結論

Kii ALS と Kii PDC は、臨床像は異なるが、同質の神経病理学的変化を共有する。ただし、病変の程度は症例によって強弱があり、それがそれぞれの臨床症状に反映して異なった臨床像を呈するものと思われる。

E. 研究発表

論文発表：別紙記載

筋萎縮性側索硬化症(ALS)における
アポトーシス関連蛋白Apaf-1の発現解析

分担研究者	中野今治	自治医科大学神経内科教授
研究協力者	江隅英作	国家公務員共済組合連合会 三宿病院神経内科医長
	池口邦彦	自治医科大学神経内科

研究要旨

ALSにおける脊髄運動ニューロン死がアポトーシスであるか否かについての結論は未だ出ていない。この問題を解明する手がかりとして、剖検組織において、アポトーシス実行蛋白の1つであるApaf-1の発現を検討した。ALS 3例、神経疾患対照1例(OPLL)、非神経疾患対照2例(心筋梗塞、副腎癌)を対象とし、頸髄(C8)および腰髄(L5)より凍結切片を作成。抗Apaf-1抗体(R&D systems; MAB868)を用いて免疫組織化学的に検討した。頸髄、腰髄共に、前角運動ニューロンにおいてリポフスチンを除く細胞質で弱い染色性を示した。しかし、対照とALSの間に明瞭な差はみられなかった。ALSにおける神経細胞死にApaf-1を介したアポトーシスが関与している可能性は否定的であった。

A 研究目的

ALSにおける脊髄運動ニューロン死がアポトーシスであるか否かについての結論は未だ出ていない。

山崎ら¹⁾、Kihiraら²⁾は、ALSの脊髄においてTUNEL陽性の運動ニューロンを認めたものの、アポトーシス小体はみられず、アポトーシス以外の死の機序が存在する可能性を指摘している。

しかし、Muら³⁾はALSの剖検腰髄を用いてIn situ hybridizationを行い、アポトーシス抑制遺伝子である*bcl-2*の発現低下と、アポトーシス促進遺伝子である*bax*の発現増強を報告している。

アポトーシスシグナルの伝達経路のうち、カスパーゼカスケードの上流ではアポトーシス刺激の種類によりその伝達経路が異なっている。Fasを介するアポトーシスでは、リガンドであるFasLが対応する受容体に結合する。一方増殖因子の枯渇や放射線等の刺激により誘発されるアポトーシスは、ミトコンドリアを経由してカスパーゼカスケードの活性化を引き起こす。

Apaf-1はapoptotic protease activating factor-1の略称であり、線虫(*C.elegans*)のアポ

トーシス実行遺伝子*Ced-4*のhuman homologueとしてクローニングされた⁴⁾。Apaf-1は細胞質蛋白であり、ヒトでのmRNAの発現はubiquitousと言われている。その機能として、1) mitochondriaから放出されたcytochrome Cと結合することにより、2) dATPの存在下でApaf-1とpro caspase-9がCARD(caspase recruitment domain)を介して複合体を形成し、3) caspase-9(Apaf-3)はprocessingを受け活性型となりcaspase-3を活性化して細胞死を引き起こすと言われている。

そこでALSの運動ニューロン死がアポトーシスによるか否かを解明する手がかりとして、剖検組織におけるアポトーシス促進蛋白Apaf-1の発現を抗Apaf-1抗体を用いて、免疫組織化学的に検討した。

B 研究対象および方法

1998~2001年に自治医大で剖検を行った症例のうち、ALS 3例、神経疾患対照1例(OPLL)、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°C で凍結保存した後、頸髄(C8)および腰髄(L5)より $10\ \mu\text{m}$ 厚の凍結切片を作成した。一次抗体に mouse monoclonal 抗Apaf-1抗体 (R&D systems: MAB868) を用いて、HISTOSTAIN SP-KIT (ZYMED 社)により Apaf-1の発現を検討した。

C 結 果

1. 頸髄では対照とALS共に、前角運動ニューロンにおいてリボフスチンを除く細胞質で弱い染色性を示した。しかし、対照とALSの染まり方に明瞭な差はみられなかった。(図1~2)
2. 腰髄でも頸髄と同様に前角運動ニューロンにおいてリボフスチンを除く細胞質で弱い発現を認めた。しかし、対照と ALS 間で明瞭な差はみられなかった。

D 考 察

ALS における神経細胞死に Apaf-1 を介したアポトーシスの実行が関与している可能性を考慮し実験を計画したが、抗 Apaf-1 抗体を用いた免疫組織化学的検討では、ALS の脊髄では一部の運動ニューロンに Apaf-1 が発現していたが、対照と比べ両者に明らかな差異はみられなかった。

しかしながら、アポトーシスのシグナルは Fas を介して伝達される経路もあり、今回の結果のみで ALS における運動ニューロンの細胞死がアポトーシスであるか否かについての結論は出せない。今後アポトーシス伝達経路のさらに下流に存在する Caspase についての検討を進めたい。

E 研究発表

論文発表：別紙記載

ALS 病態関連分子の探索から —2~3 の新規分子について—

分担研究者 祖父江 元 名古屋大学神経内科教授

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロンが選択的に変性死に陥る神経変性疾患である。ALS の一部には遺伝性のものが知られており、*SOD1*、*ALS2* 遺伝子の異常が原因であることが明らかにされている。しかし遺伝性、孤発性を含めて運動ニューロン変性死の分子機構は不明である。我々は変性運動ニューロンに特異的に発現している機能分子を探索することで病態に関連する分子群の同定を行った。この中に多くの新規分子が含まれていたが、*neugrin* と *Dorfin* について機能解析の結果、特に *Dorfin* は E₃ ユビキチンリガーゼ活性を有し、ALS のユビキチン化封入体と共存しており、ALS の病態と深く関わることができた。

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、ALS の病変の主座である脊髄前角における遺伝子発現の変化を、発現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する神経変性疾患由来の微量サンプルからでも、遺伝子発現を高感度に描出できる発現遺伝子プロファイリング法である分子インデックス法¹⁾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タンパク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²⁾。もう 1 つは N 末側に RING-finger を 2 つ持つユビキチンリガーゼと推定されるタンパク質をコードする遺伝子であり *Dorfin* と名付けた³⁾。今回我々は、特に *Dorfin* タンパク質について特異抗体を作成し、免疫組織化学的手法を用いた ALS 脊髄の病理学的検討および、培養細胞を用いた *Dorfin* の機能解析を行い、ALS との関わりについて検討した。

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。3 種類のクラス II 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 3×64×3=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た。*Dorfin* の C 末側に対する特異抗体を作成し、孤発性および家族性 ALS 脊髄内における *Dorfin* の局在を病理学的に検討した。また、Xpress タグを付けた融合蛋白として培養細胞 (HEK293、Neuro2a) へ強制発現させ、特にユビキチン-プロテアソーム系との関わりを免疫沈降法、ウエスタン解析などを用いて検討した。