

研究発表

拡散テンソル MRI と磁気刺激を用いた ALS 患者の錐体路機能評価

岩田信恵¹⁾，青木茂樹²⁾，宇川義一¹⁾，郭 伸¹⁾，阿部修²⁾，
寺尾安生¹⁾，岡部慎吾¹⁾，新井憲俊¹⁾，金澤一郎^{1), 3)}

- 1) 東京大学大学院医学系研究科神経内科学
- 2) 同放射線科
- 3) 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨 拡散異方性を画像化した MRI の拡散テンソル画像 (Diffusion Tensor Image; DTI) により ALS 患者の錐体路変性の評価を行い、臨床症状および生理学的機能評価と一致するか検討した。El Escorial 診断基準で Definite、Probable、Possible ALS と診断された患者 19 人および健常成人 15 人に対して、経頭蓋磁気刺激 (TMS) を用いて中枢運動伝導時間 (CMCT) 等を計測、また DTI における fractional anisotropy (FA) map 上に設定した関心領域において FA 値を計測し、比較検討した。ALS 患者において、錐体路上にある関心領域 (大脳白質皮質脊髄路、内包後脚、大脳脚、橋腹側錐体路、延髄錐体) での FA 値が健常者に比し有意に低値であったが、それ以外の部位では有意差はなかった。CMCT と FA 値との相関解析では、錐体路上の関心領域において有意の負の相関ないし相関の傾向を認めたが、それ以外の部位では相関を認めなかった。ALS 患者の錐体路における拡散異方性の変化は、臨床症状や生理学的機能評価と相関した。DTI は ALS 患者における上位運動ニューロンの異常を検出するのに役立つ可能性がある。

はじめに

ALS の早期診断は、治療的研究を行うために重要である。このため、診断確実性にグレードをつける試みが世界的に工夫されており、El Escorial 診断基準などが作られた¹⁾。この基準は、さらに診断感度を上げるために改訂され (El Escorial 98)、下位ニューロン変性所見として特定部位の筋力低下・筋萎縮という臨床所見を、筋電図学的所見 (急性除神経所見) で代用することが認められた (clinically-probable-laboratory-supported ALS)²⁾。ALS の臨床診断のためには、上位および下位運動ニューロンの変性所見の確認が必要だが、下位ニューロンの変性が強い場合、上位運動ニューロン所見は臨床的にはマスクされてしまうことがあり、診断を困難にする。上位運動ニューロン所見の診断を補助する検査法としては、磁気刺激による中枢運動伝導時間 (CMCT) が知られているが、いまだ不十分である^{3,4,5,6,7,8,9)}。

拡散強調 MRI は中枢神経系の水分子の拡散を画像化したものであり、脳梗塞急性期の診断に広く臨床応用されるようになった¹⁰⁾。急性期脳梗塞の診断では白質の走行による信号の変化は診断の妨げになるため、その影響を取り除く等方性拡散強調像を用いる。さらに echo planar imaging (EPI) の導入により、この白質走行の方向性による拡散の違い (拡散異方性) を利用して、白質線維の評価に応用する試みがなされるようになり (Diffusion Tensor Image; DTI)^{11,12,13,14)}、脱髄性疾患、脳血管障害、脳腫瘍などの白質病巣について応用されるようになった¹⁵⁾。ALS においても錐体路の拡散異方性の低下が報告されている¹⁶⁾。

本研究ではこの DTI により、ALS の各病期において上位運動ニューロンの変性を定量化して表し、患者の神経症状、磁気刺激による中枢運動伝導時間との対応を解析し、本方法の ALS 診断における有用性について検討することを目的とする。

方法

El Escorial 診断基準で Definite、Probable、Possible ALS と診断された患者 19 人 (56.3 ± 13.9 歳) および健常成人 15 人 (50.5 ± 13.6 歳) を対象とした。本研究は、東京大学大学院医学系研究科、倫理委員会により承認され、患者および健常被検者より書面による同意を得て行った。経頭蓋磁気刺激 (TMS) を用いて片側または両側の第一背側骨間筋における中枢運動伝導時間 (CMCT) および一次運動野-脳幹潜時を計測した。DTI の撮像は 1.5-T の臨床機 Signa ver 9.0 (GE, USA) により、7 種の MPG 印加軸を用いて行った。DTI における fractional anisotropy (FA) map 上に関心領域を設定して各部位の FA 値を計測し、患者群、健常者群で比較し、臨床症状および CMCT との相関について検討した。

結果

ALS 患者において、錐体路上にある関心領域 (大脳白質皮質脊髄路、内包後脚、大脳脚、橋腹側錐体路、延髄錐体) での FA 値が健常者に比し有意に低値であったが、それ以外の部位では有意差はなかった (図 1)。

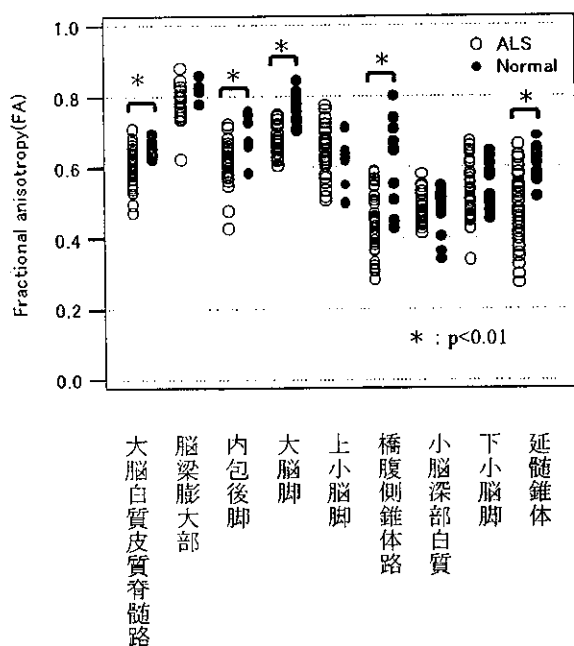
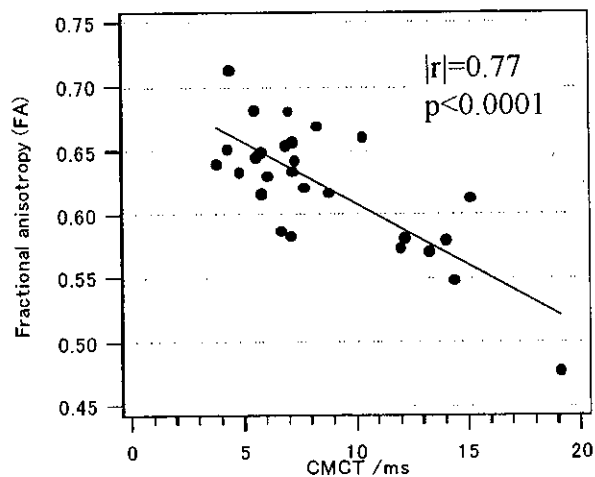


図 1 各部位における FA 値

ALS 患者と正常者の比較では、錐体路上の関心領域においてのみ有意差を認めた。

(a) 内包後脚



(b) 脳梁膨大部

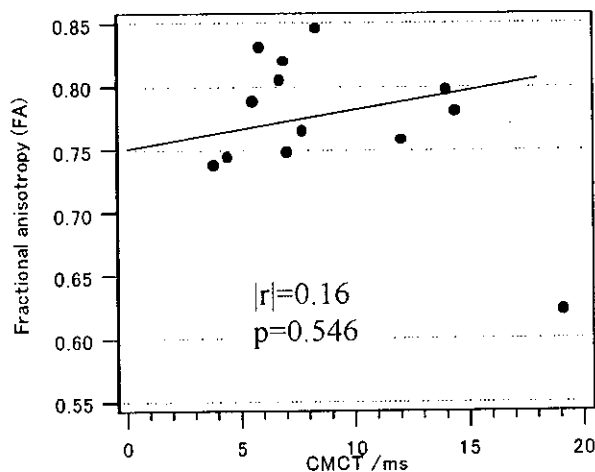


図 2 CMCT と FA 値の相関

錐体路上の代表的な ROI (内包後脚) においては有意な負の相関を認めた。

CMCT と FA 値との相関解析では、錐体路上の関心領域において有意の負の相関ないし相関の傾向を認めたが、それ以外の部位では相関を認めなかった (代表的な部位について、図 2 に示す)。ALS functional disability scale¹⁷ と内包後脚における FA 値は正に相関した (図 3)。

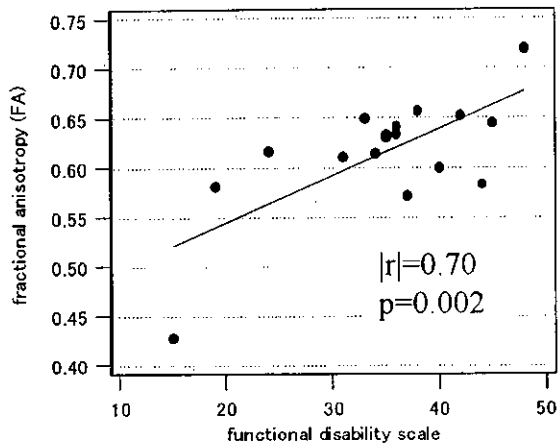


図3 内包後脚における FA 値と臨床症状の相関

考察

ALS 患者の錐体路における拡散異方性の変化 (DTI における FA 値の低下) は、臨床症状や生理学的機能評価と相関した。

結論

DTI は ALS 患者における上位運動ニューロンの異常を検出するのに役立つ可能性がある。

文献

1. Brooks BR et al. J Neurol Sci., 124(suppl): S96-107, 1994.
2. World Federation of Neurology Research

Group on Motor Neuron Diseases. <http://wfnals.org/oldsite/Articles/elescorial1998.htm>.

3. Ugawa Y et al. Acta Neurol Scand. 78: 297-306, 1988.
4. Ugawa Y et al. Brain. 115 (Pt 6):1947-61 (1992).
5. Claus D et al. J Neurol Sci. 129 Suppl:30, 1995.
6. Misra UK et al. Electromyogr Clin Neurophysiol. 35: 485-90, 1995.
7. Mills KR et al. J Neurol Sci. 159: 82-7, 1998.
8. Cruz Martinez A et al. Electromyogr Clin Neurophysiol. 39: 285-8, 1999.
9. Rosler KM et al. Clin Neurophysiol. 111: 2208-18, 2000.
10. Moseley ME et al. Magn. Reson. Med. 14: 330-346, 1990.
11. Basser PJ et al. J Comput Assist Tomogr. 14: 856-873, 1994.
12. Basser PJ et al. J. Magn. Reason. B 111: 209-219, 1996.
13. Pierpaoli C et al. Magn. Reson. Med. 36: 893-906, 1996.
14. Hazlewood CF et al. Magn. Reson. Med. 19: 214-6, 1991.
15. Horsfield MA et al. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 63(suppl):S80-84, 1998.
16. Ellis CM et al. Neurology. 53: 1051-8, 1999.
17. Cedarbaum JM et al. J Neurol Sci. 169: 13-21, 1999.

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患研究事業）

神経変性疾患に関する研究班

（分担）研究報告書

siRNA を用いた変異 SOD1 による筋萎縮性側索硬化症 の遺伝子治療

水澤英洋¹⁾、横田隆徳¹⁾、日野太郎¹⁾、斉藤友紀¹⁾、多比良和誠²⁾

1) 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態

2) 東京大学大学院工学部化学生命工学

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症機序は変異 SOD1 が何らかの毒性を獲得する (gain of toxic function) と考えられている。変異 SOD1 遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA (small interference RNA) および発現型 siRNA を作製した。さらに siRNA が ribozyme や DNA enzyme より細胞内で有効であることを示した。siRNA は SOD1 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の遺伝子治療へ有効である可能性がある。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は原因不明の難病であり、家族性 ALS の 1 部の原因が superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異であることが 1995 年に明らかとなった。その発症機序は変異 SOD1 が何らかの毒性を獲得する (gain of toxic function) ことと考えられている。その神経細胞死の機序はいまだ不明であるが、変異 SOD1 の発現そのものを抑制できれば、発症を防ぐことが期待できる。従来、特定遺伝子の発現を抑制する方法として、antisense、ribozyme、DNA enzyme が用いられてきた。いずれも mRNA レベルでターゲット遺伝子の翻訳を抑制する方法だが、その抑制効果は不十分であった。近年、合成した 21-22 塩基の 2 本鎖 RNA である siRNA (small interference RNA) の導入によって哺乳動物

細胞でも遺伝子の強力な発現抑制が起こることが発見された¹⁾。今回、この RNAi を用いて SOD1 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の遺伝子治療をすることが本研究の目的である。

方法

野生型および G93A SOD1 mRNA の 2 次構造の解析から数カ所に 19mer RNA と TT の 3'overhang からなる siRNA をデザインした。HEK293T および N2a 培養細胞に siRNA と SOD1 発現ベクターと共発現させて、有効な siRNA 配列をスクリーニングした。SOD1 mRNA の 2 次構造上もっとも大きな 1 本鎖のループ構造をとる部分に NUX 配列をターゲットとする複

数の ribozyme, プリン-ピリミジン接合部をターゲットとする複数の DNA enzyme もデザインした。T7 promoter を用い in vitro 転写し in vitro でのそれぞれの切断効率を検討した。次に最も有効なものを培養細胞に発現させて siRNA との効果と比較検討した。さらに、有効な siRNA 配列を tRNA promoter, U6 promoter, 独自の tandem 型²⁾, stem 型³⁾の各種デザインした発現型 DNA ベクターで構築し、その有効性を比較検討した。これらの研究は培養細胞レベルの実験で、遺伝子変異 cDNA は mutagenesis によって作製し、患者さんの材料は使っておらず動物愛護、人権擁護上問題ない。

結果

作製した siRNA は培養細胞の内因性 SOD1 タンパクを配列特異的に認識して、有効にタンパクの発現を抑制した。ALS に関連する SOD1 の遺伝子変異はそのほとんどが点変異であるが、siRNA はその 1 塩基の違いを認識して、野生型 mRNA にはほとんど影響せずに、変異 mRNA を特異的に発現抑制した(図1)。

同一の SOD1 mRNA の基質部位に対する ribozyme や DNA enzyme は in vitro 転写による in vitro での切断実験で切断効率は90%以上の有効なものを作製し得た。これらを用いて培養細胞系でその効率効率を同部位にデザインした siRNA と比較検討すると特に内因性の SOD1 の発現抑制において siRNA は ribozyme や DNA enzyme よりはるかに有効であった(図2)。

さらに、同様に有効な siRNA を DNA ベクタ

ーに組み込んで最も有効な DNA ベクターの構造を検討したところ、U6 promoter 下の stem 型の発現型 siRNA ベクターが最も有効であった。

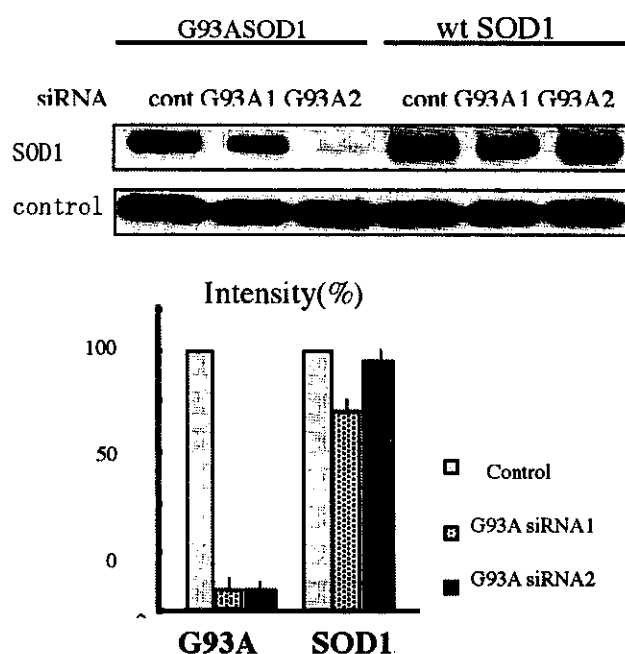


図1 G93A1 siRNA は G93ASOD1 を特異的に認識して、有効にタンパクの発現を抑制した。(293T 培養細胞を用いた Western blotting)

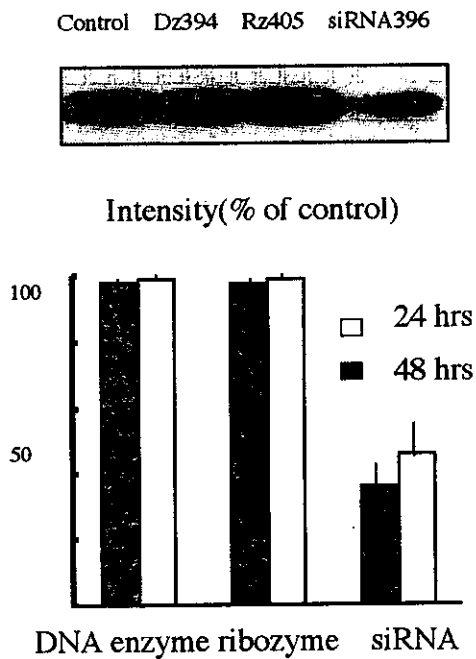


図2 siRNA は ribozyme (Rz405) や DNA enzyme (Dz394) より有効に内因性 SOD1 の発現を抑制する。(293T 培養細胞を用いた Western blotting)

考察

細胞内で siRNA が ribozyme や DNA enzyme より有効であったのは、siRNA がターゲットの mRNA へのアクセスが helicase をその複合タンパク (RISC) 内に持っているため mRNA の 2 次構造にあまり依存しない点、mRNA は 2 本鎖が 1 本鎖より細胞内で安定である点などが理由と考えた。

今回、変異 SOD1 配列特異的な siRNA を作製しえたが、これらを遺伝子治療に用いるには siRNA の神経細胞へのデリバリーの問題とその持続時間の問題がある。これらを解決する方法の 1 つとしてウイルスベクターを用いる必要があるが、そのためには細胞内で siRNA が発現する発現型 siRNA が必要である。そこで、U6 promotor, stem 型の siRNA 発現

ベクターを開発して、有効に SOD1 mRNA を切断できたことから、現在このコンストラクトを用いて細胞内で siRNA を発現するアデノウイルス、アデノ随伴ウイルスを作製している。

結論

変異 SOD1 mRNA を配列特異的に切断できる siRNA および発現型 siRNA を作製し、これが ribozyme や DNA enzyme より細胞内で有効であることを示した。

文献

- 1) Elbashir SM, et al. Nature 2000; 411:494-498. 2002; 19:497-500
- 2) Miyagishi, M, et al. Nat Biotechnol 19, 497-500.
- 3) Brummelkamp TR, et al. Science, 296, 550-553.

血漿中抗酸化物質による 筋萎縮性側索硬化症患者の酸化ストレスの評価

宗宮 真¹⁾，田中 真¹⁾，鈴木葉子¹⁾，谷野 豊²⁾，山本順寛²⁾，岡本幸市¹⁾

1) 群馬大学医学部神経内科

2) 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学科

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病態への酸化ストレスの関与を血漿中抗酸化物質の変化から検討した。ALS 群では正常対照群と比較し，総コエンザイム Q-10（Coenzyme Q-10：以下 CoQ-10）中に占める酸化型の割合の上昇を認めた。ALS 患者の全身の酸化ストレスの評価に血漿中 CoQ-10 の酸化還元状態の測定が有用である可能性を示した。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態への酸化ストレスの関与が様々な報告から示されている¹⁾。酸化ストレスの関与を示す生体内での証拠のひとつとして，ALS患者血液中での過酸化脂質²⁾や核酸の酸化生成物³⁾の上昇が報告されている。しかし，その前段階として起こりうる防御側の抗酸化物質の変化については十分に理解されていない。

今回われわれは血漿中での抗酸化物質の変化に着目し，次の2点について検討した。

1. ALS患者の血漿中抗酸化物質に健常人と比較して違いがあるか。
2. 血漿中にALSの病態への酸化ストレスの関与を示す指標となるものが存在するか。

これらを調べるため，血漿中の主な抗酸化物質のうち，水溶性抗酸化物質：尿酸，ピタ

ミン C，非抱合型ビリルビン，脂溶性抗酸化物質：ビタミン E，コエンザイムQ-10（Coenzyme Q-10：以下CoQ-10）の測定を行なった。

特にCoQ-10については，血漿中の酸化型，還元型についてそれぞれ定量し，その酸化還元状態について検討した。総CoQ-10に占める酸化型の割合を%CoQ-10とした。

対象および方法

1. 対象（表1）

ALS患者28例，健診の際に協力の得られた同年代の正常対照者18例を対象とした。書面による説明と同意の後，問診・診察を行い，以下の項目について調査した。

年齢，性別，臨床症状，初発部位，罹病期間，診断基準への合致（El Escorial criteria），

重症度 (ALS health state scale : 以下 AHSS), 内服薬 (特に抗酸化作用を持つ内服薬について)

正常対照者のうち抗酸化作用を持つ内服薬を服用している者は除外した。

表 1. 対象

	正常対照群	ALS群
年齢*	61.7 ± 12.2	63.2 ± 10.8
性別(男性/女性)	13 / 5	20 / 8
初発部位 (球症状/上肢/下肢)		7 / 17 / 4
罹病期間(年) *		4.1 ± 4.0
AHSS: 1/2/3/4		2/17/6/3

*平均値 ± 標準偏差

2. 採取・保存・抽出

採取：ヘパリン採血管を用いて、静脈より採血した。

保存：ただちに遠心分離 (1,500g, 10分) した後、血漿を測定まで-80℃で保存した。

抽出：メタノール, 2-propanol により抽出を行った。

3. 測定

水溶性抗酸化物質測定高速液体クロマトグラフィー：UV条件 260 nm, 480 nm, column LC-NH₂, 40 mM NaH₂PO₄水溶液 /methanol =10/90, 1.0 ml/min

脂溶性抗酸化物質測定高速液体クロマトグラフィー⁴⁾：UV条件 210 nm, ECD 600 mV, column LC-8, 50 mM NaClO₄ methanol /2-propanol=10/90, 0.8 ml/min

結果

1. 水溶性抗酸化物質

ALS 群では正常対照群と比較し、尿酸、ビタミン C、非抱合型ビリルビンのいずれも有意な差を認めなかった。

2. 脂溶性抗酸化物質

ALS 群では酸化型 CoQ-10 の上昇を認めた。ビタミン E は有意差を認めなかった。

3. 脂溶性抗酸化物質/総コレステロール

CoQ-10 はコレステロールとの比についても検討した。その結果、やはり酸化型 CoQ-10 で上昇を認めた。総 CoQ-10 でも上昇がみられた。

4. %CoQ-10

総 CoQ-10 に占める酸化型の割合を示す%CoQ-10 の上昇がみられた (図 1)。

%CoQ-10 について罹病期間との相関、重症度・初発部位による違い、同一患者での経時変化についてまとめた。

a. 罹病期間

罹病期間との明らかな相関はみられなかった。罹病期間の短い症例では、正常対照群の範囲に含まれる症例がみられた。1-4年の症状の増悪が見られる時期に上昇する傾向がみられた。

b. 重症度や初発部位

重症度 (AHSS) や初発部位の異なる群間での有意差は認められなかった。

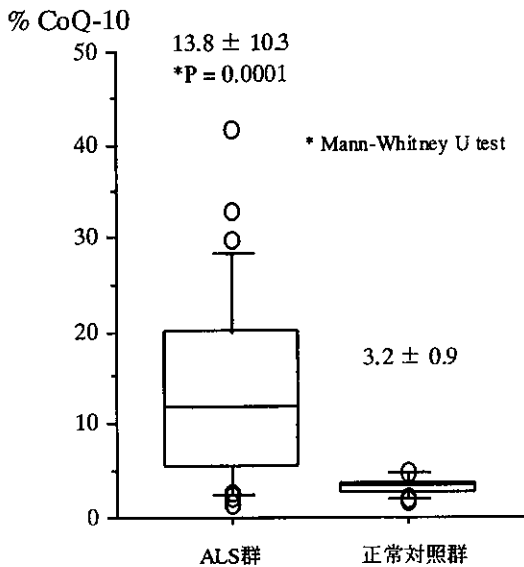


図1
%CoQ-10 : ALS群と正常対照群との比較

c. 同一患者での経時変化

同一患者 8 症例について 3-9 ヶ月後に再び検討した。症例により増減に差はあるが、いずれも高値を示した。初回検討時に正常対照群の範囲にあった 2 症例も 2 回目の検討では高値を示した。

考察

1. ALSにおける酸化ストレスの関与を示す所見として、血漿中CoQ-10の酸化還元比率の測定が有用である可能性が考えられた。
2. 酸化型CoQ-10, %CoQ-10の上昇の原因については今回の検討からのみでは明らかではないが、1) ミトコンドリア機能障害等に由来する酸化ストレスの亢進, 2) 神経・筋などの組織障害の反映(酸化型の上昇)等が考えられる。
3. 血漿中の酸化還元状態の測定の意義は次のようにまとめられる。

1) 酸化還元状態のImbalanceの後、酸化生成物が生じることから、酸化生成物による評価と比較し、酸化ストレスに対して鋭敏と考えられる。

2) 血漿による評価は簡便な採取が可能であることや全身の酸化ストレスを反映していると考えられることなどの特徴がある。

3) 不足した抗酸化物質 (CoQ-10など) を含めた抗酸化能を有する薬剤の投与の適応や投与時期の検討に有用である可能性が考えられる。

4. 今後、他の神経筋疾患や髄液での測定を行い、CoQ-10の酸化還元状態をはじめとする抗酸化物質の疾患ごとの特徴について検討していく予定である。

結論

今回の検討から、ALS 患者の全身の酸化ストレスの評価に血漿中 CoQ-10 の酸化還元状態の測定が有用である可能性を示した。

文献

- ¹ Robberecht W et al.: J Neurol 247 (Suppl 1): 1-6, 2000
- ² Oteiza PI et al.: Neurochem Res 22: 535-9, 1997
- ³ Bogdanov M et al.: Free Radic Biol Med 29: 652-8, 2000
- ⁴ Yamashita S et al.: Anal Biochem 250: 66-73, 1997

筋萎縮性側索硬化症大脳皮質ユビキチン化蛋白複合体の同定

福田隆浩¹、藤ヶ崎純子¹、高田耕司²、田中順一¹

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症の一部、特に性格異常などの痴呆を伴う症例には海馬傍回、歯状回、扁桃体の神経細胞に桿状或いは三日月形のユビキチン陽性封入体が認められることが知られている。しかし、このユビキチン陽性封入体の構成成分は知られておらず、病態との関連も不明である。海馬傍回、歯状回、扁桃体、短島回にユビキチン陽性封入体を多数認める筋萎縮性側索硬化症において、抗ユビキチン抗体等を用いた精製分画法にて得られた非水溶性尿素可溶性のユビキチン化蛋白複合体由来ペプチド断片を逆相HPLCにて検討した結果、ユビキチン陽性封入体の存在領域と非存在領域にペプチド断片の量的差異を認めた。今後、各ペプチド断片のアミノ酸配列の同定を行うと共に水溶性や非尿素溶性の蛋白質成分の解析も進め、ユビキチン陽性封入体を含む脳組織ユビキチン化蛋白複合体群の全容を明らかにしていく。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症の一部、特に性格異常などの痴呆を伴う症例には海馬傍回、歯状回、扁桃体の神経細胞に桿状或いは三日月形のユビキチン陽性封入体が認められることが知られている(図1)。しかし、このユビキチン陽性封入体の構成成分は知られておらず、病態との関連も不明である。今回、共同演者の高田が開発した抗ユビキチン抗体等を用いた精製分画法にて脳組織中の非水溶性尿素可溶性ユビキチン化蛋白複合体の純化・同定を試み、ユビキチン陽性封入体との関連を分析した。

方法

A. ユビキチン陽性封入体の分布:

ユビキチン陽性封入体の分布を検索するため筋萎縮性側索硬化症剖検例23症例と、明らかな病変を中枢神経系に認めないコントロール(Control)5例を対象とした。各症例の剖検脳からホルマリン固定パラフィン包埋標本作製し、ダコ社ポリクローナル抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織化学法にて封入体の分布を検索した。

B. ユビキチン化蛋白複合体の分析:

ユビキチン陽性封入体の存在する筋萎縮性側索硬化症(ALS UBQ(+))2症例とユビキチン陽性封入体の存在しない筋萎縮性側索硬化症(ALS UBQ(-))1症例、Control 1症例の凍結脳組織(海馬+海馬傍回+扁桃体)、さらにALS UBQ(+)2症例のUBQ陽性封入体が存在しない

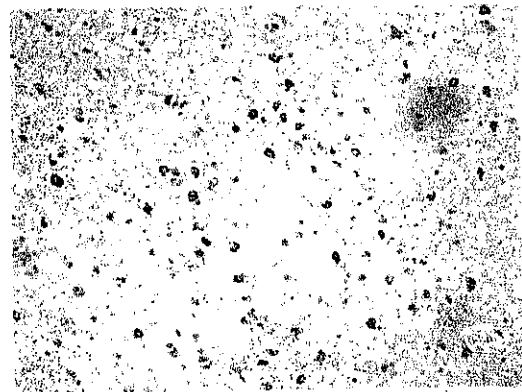


図1 ユビキチン陽性封入体(海馬傍回)

凍結脳組織(後頭葉)を試料に用いた。解凍した組織にトリス緩衝液を加えた後ホモジナイズ、遠心し、上清(水溶性画分)を除いた沈殿に8M尿素含有緩衝液を加え超音波処理により可溶化した。これを4M尿素に対して透析して得た尿素可溶化画分を抗ユビキチン抗体(FK2)-Sepharoseカラムにのせ、吸着したユビキチン化蛋白複合体を3.5M MgCl₂で溶出した。この精製画分をゲルろ過でさらに分画し、高分子量のユビキチン化蛋白複合体を得た。解析の対象をユビキチンが共有結合する領域に絞るため、精製標品をendoproteinase Asp-Nで消化後、ユビキチンC末端領域断片と結合するペプチド成分を抗ユビキチンC末端領域断片抗体(UC1)を用いた免疫沈降で分離し、逆相HPLCを用いて分離・分析した。

結果および考察

A. ユビキチン陽性封入体の分布：

ALS UBQ(+) は、5 例あり、そのいずれも、側頭極内側から脳梁膨大部近傍までの海馬傍回、歯状回、扁桃体、短島回に高密度に、そして、長島回、帯状回、下前頭回、上側頭回に少数のユビキチン陽性封入体を認めた (図 2)。ALS UBQ(-) 18 症例および Control 群では、辺縁系にユビキチン陽性の神経原線維性変化や老人斑を、年齢相応に認める症例が存在するも、今回検索したユビキチン陽性封入体は認められなかった。



図 2 ユビキチン陽性封入体の分布

側頭極内側から脳梁膨大部近傍までの海馬傍回、歯状回、扁桃体、短島回に高密度、長島回、帯状回、下前頭回、上側頭回に少数のユビキチン陽性封入体を認めた。

B. ユビキチン化蛋白複合体の精製初期過程における蛋白量と multiubiquitin complex 量の推移：

対象症例の海馬傍回、海馬、扁桃体を含む凍結脳組織を抽出・精製した過程、すなわち、水溶性画分、8M 尿素可溶画分、透析後の 4M 尿素可溶画分、FK2-Sepharose カラムクロマトグラフィー時の非吸着画分と MgCl₂ 溶出画分のそれぞれについて含有する蛋白量と multiubiquitin complex 量を図 3 にまとめた。4M 尿素可溶画分までは蛋白量と multiubiquitin complex 量の損失は少なく、クロマトグラフィーによって夾雑蛋白質は非吸着画分に除かれ、multiubiquitin complex のほとんどが MgCl₂ 溶出画分に回収された。このことから十分な精製がなされたと判断される。

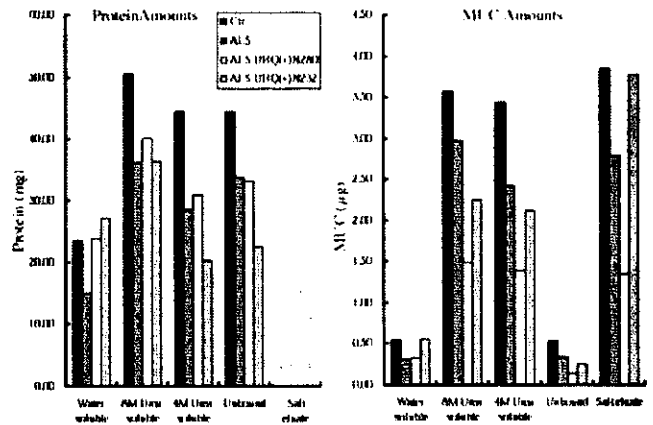


図 3 ユビキチン化蛋白複合体の分析過程における、総蛋白量と multiubiquitin complex (MUC) 量の推移

C. ユビキチン C 末端領域断片結合性ペプチド断片の逆相 HPLC：

Control 1 症例、ALS UBQ(-) 1 症例、ALS UBQ(+) 2 症例の海馬傍回、海馬、扁桃体を含む凍結脳組織より得られたユビキチン C 末端領域断片結合性ペプチド断片の逆相 HPLC 結果を凍結脳組織重量で補正し分析した (図 4a)。逆相 HPLC 分画パターンは 4 症例とも類似していたが、各ペプチド量を反映するピークの高さは症例により異なっていた。ALS UBQ(+) 2 症例において、ピークが必ずしも高いわけではなく、ユビキチン陽性封入体の有無だけではこの差異を説明することはできない。マウスの虚血実験では multiubiquitin complex が脳内に増加することが知られている。死亡前の虚血などの条件が異なることにより、非封入体性のユビキチン化蛋白複合体の代謝に差が生じ、ペプチド断片量の差異が生じた可能性もある。

筋萎縮性側索硬化症でユビキチン陽性封入体の存在する海馬傍回、海馬、扁桃体を含む凍結脳組織と、ユビキチン封入体の存在しない後頭葉の凍結脳組織を重量で補正し比較したところ (図 4b, 4c)、ペプチド断片の出現パターンは両者一致していたが、個々のピーク高を比較するとユビキチン陽性封入体存在領域でより高値を示すものが複数見出された (arrow head)。ユビキチ

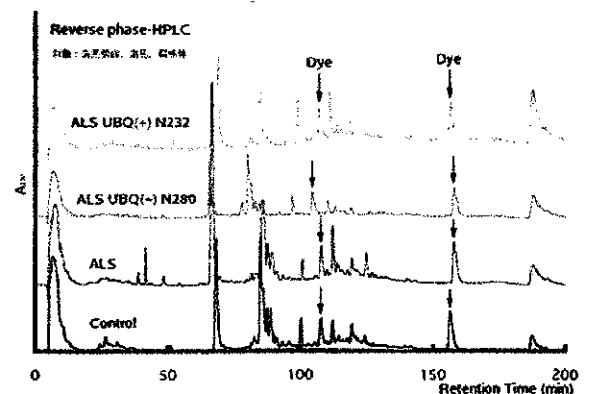


図 4a UCP 結合性ペプチド断片の逆相 HPLC

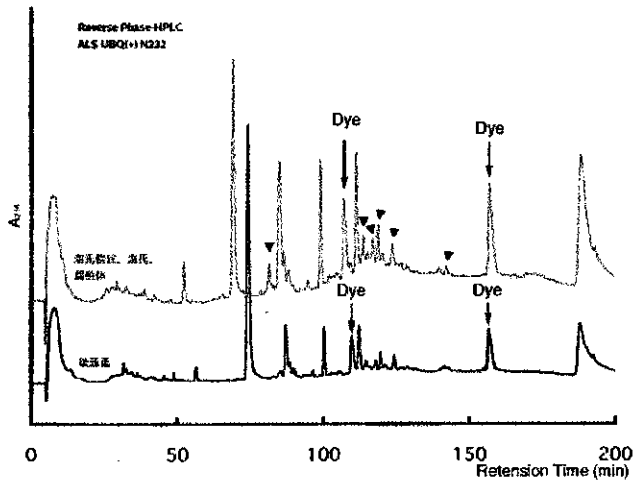


図 4b UCP 結合性ペプチド断片の逆相 HPLC

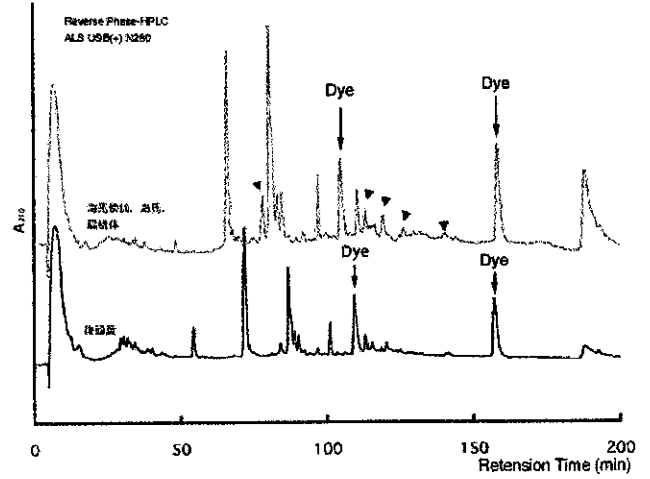


図 4c UCP 結合性ペプチド断片の逆相 HPLC

ン化蛋白複合体の代謝に影響する虚血などへの反応が部分的に差のある可能性も否定できないが、ユビキチン陽性封入体由来のペプチド断片も含まれていると推定される。

結論

海馬傍回、歯状回、扁桃核、短島回にユビキチン陽性封入体を多数認める筋萎縮性側索硬化症において、抗ユビキチン抗体等を用いた精製分画法にて得られた非水溶性尿素可溶性のユビキチン化蛋白複合体由来ペプチド断片を逆相 HPLC にて検討した結果、ユビキチン陽性封入体

の存在領域と非存在領域にペプチド断片の量的差異を認めた。今後、各ペプチド断片のアミノ酸配列の同定を行うと共に水溶性や非尿素溶性の蛋白質成分の解析も進め、ユビキチン陽性封入体を含む脳組織ユビキチン化蛋白複合体群の全容を明らかにしていく。

文献

- 1) Okamoto K, et al. *Neurosci. Lett.* 1991;129:233-6
- 2) Takada K, et al. *Biochem. J.* 2001;356:199-206
- 3) Usuba T, et al. *Int. J. Cancer* 2001;94:662-8

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄運動ニューロンの細胞死の経路：Smac/DIABLOの関与について

長尾雅裕¹⁾ 加藤修一¹⁾ 宮崎之男¹⁾ 林秀明¹⁾

はじめに

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、一次二次運動ニューロンが障害される進行性の変性疾患である。その原因は今だ不明であるが、家族例でのCu/Zn SOD1遺伝子異常とその変異遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでの運動ニューロン疾患の発症から、Cu/Zn SOD1が発症に関与することが強く疑われている。Cu/Zn SOD1の運動ニューロン死を起こす機序は不明な点が多いが、マウスの研究からはミトコンドリアが関与するアポトーシスである可能性が示唆されている。一方、ヒトのALSでは、いまだにアポトーシスの起きている証拠が乏しい。チトクロームCがヒトのALSの運動ニューロンで増加している報告¹⁾は、少なくともミトコンドリアが関与する可能性を示唆する。ミトコンドリアには、チトクロームCの他にもアポトーシスの誘導物質としてSmac/DIABLO(second activator of caspase)/(direct IAP binding protein with low pI)²⁾が知られている³⁾。

Smac/DIABLOは、inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)と結合することで、IAPsがカスパーゼと結合するのをブロックし、結果としてカスパーゼの活性によりアポトーシスを引き起こす。その作用にはチトクロームCのような細胞質でのアダプター蛋白との結合を必要としない。今回、我々は、ALSの運動ニューロン死とミトコンドリアとの関係について、Smac/DIABLOについて検討した。

方法

剖検より得た腰髄について検討した。ALS10例(男:女

= 5 : 5、平均年齢69.8±3.8、対照7例(男:女= 2 : 7、平均年齢73.42±12.0)を15%ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、5ミクロン切片を作成。免疫組織化学により、抗Smac/DIABLO(OSI; 1:2000)、抗チトクロームC(Chemicon; 1:500)、抗Apaf-1(apoptotic protease activating factor-1)(Santa Cruz;1:200)、抗ユビキチン(DAKO; 1:600)、SMI-31(Sternberger; 1:3000)について検討した。発色はニッケル増感をしたABC法によった。

結果

Smac/DIABLO染色性(-IR)は正常運動ニューロンでは、痕跡程度にしか存在しなかった。ALSでは、運動ニューロンで増加を認め、一部の運動ニューロンおよび大多数のスフェロイドでは強く染色された(図1、2)。一方、チトクロームC、Apaf-1-IRではスフェロイドは染色されなかった(図2)。運動神経の細胞体の染色は、Smac/DIABLOとチトクロームCは一致しなかった(図2)。ユビキチン陽性の細胞内封入体はSmac/DIABLO陰性だった。SMI-31陽性のスフェロイドはSmac/DIABLOも陽性だった(図3)。

考察

今回の研究で、ALSの運動ニューロン、特にスフェロイドでSmac/DIABLOが増加していることが分かった。今回用いた抗Smac/DIABLO抗体は前駆体ではなく成熟したSmac/DIABLOを認識するものなので、Smac/DIABLOの増加は、合成の増加ではなくミトコンドリアからの放出である

¹⁾都立神経病院神経内科

と考えられた。Smac/DIABLOに関しては、先に述べたように、IAPsの働きを抑制することでカスパーゼによるアポトーシスを促進するのが唯一の分かっている機能である。そのため、Smac/DIABLOがスフェロイドに強い親和性があることがアポトーシスとどう関わるのかが一番の問題となる。大きく二つの場合が考えられる。第一はSmac/DIABLOがIAPsと結合した状態で細胞体からスフェロイドに輸送された可能性である。その場合、細胞体のIAPsが低下するため、細胞体ではアポトーシスが起りやすくなっていると考えられる。第二の場合は、IAPsと結合しないままスフェロイドに輸送された場合である。その場合、Smac/DIABLOがスフェロイドに移動したことは、細胞体にとってはむしろアポトーシスから保護的な状態になったと言える。即ち、この場合、Smac/DIABLOは細胞内の防御機構としてスフェロイドに追いやられたと考えられる。いずれの状態かを確かめるためにはIAPs側の変化を調べる必要がある。

Smac/DIABLOはIAPsによってユビキチン化され不活性化される代謝経路をもつ⁹⁾。スフェロイドはユビキチン陰性で、その点からSmac/DIABLOはユビキチン化されていない状態のままスフェロイドにあると考えられる。しかし、そのことが、ただちにSmac/DIABLOがIAPsと結合しない状態で存在するとは言いえない。両者のバランスにユビキチン化は影響を受けると思われるからである。上記以外に、細胞体でSmac/DIABLOはすでにアポトーシスに関わる働きをし、その後スフェロイドに輸送されている可能性もある。スフェロイドはニューロフィラメントの豊富な構造を持つが⁹⁾、なぜ、Smac/DIABLOがスフェロイドに親和性があるのかは今のところ不明である。しかし、軸索輸送される全ての物質がスフェロイドに存在するという訳ではないので、親和性には理由があるはずである。その理由によっては、Smac/DIABLOが未だ知られていない機能を持って、ALSの病態に関わっている可能性もある。いずれにせよ、ミトコンドリアから放出されるSmac/DIABLOは、スフェロイドの形成または運動ニューロン死に関わる可能性が考えられた。

文献

- 1) Guegan et al: J Neurosci 21: 6569-6576, 2001
- 2) Du C et al: Cell 102: 33-42, 2000
- 3) Verhagen AM et al: Cell 102: 43-53, 2000
- 4) Hu S et al: J Biol Chem : (in press), 2003
- 5) Hirano A: Advances in Neurology 36: 75-88, 1982



図1 連続切片で、Smac/DIABLOが強陽性の運動ニューロン(白矢印)、スフェロイド(黒矢印)を示している。同じスフェロイドはチトクロームC、Apaf-1で陰性。一方、同じ運動ニューロンはチトクロームCでも強陽性である。

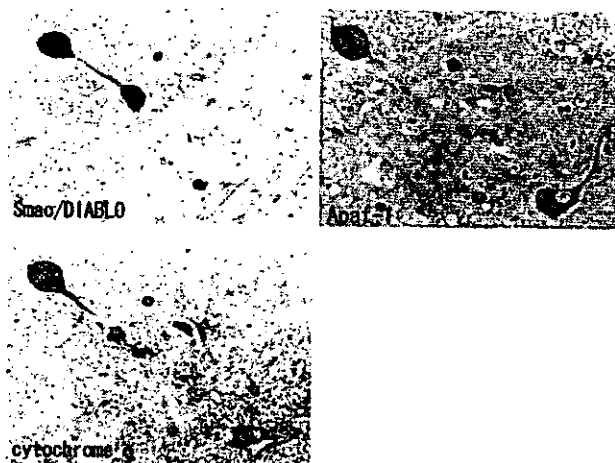


図2 連続切片で運動ニューロンからスフェロイドまで、Smac/DIABLOは強陽性を示している。チトクロームCは正常レベル。Apaf-1は陰性。

	control neuron	ALS neuron spheroid	
Smac	-	+	++
cyto-c	+	+~++	-
Apaf-1	-	+	-
ubiquitin	-	skeln +	-
SMI-31	-	+	++

図3 染色性の比較。++強陽性。+陽性。-陰性。スフェロイドはSmac/DIABLOとSMI-31でのみ強陽性を示す。

原発性側索硬化症とは？：上位運動ニューロン優位の変性と前頭側頭葉萎縮を示した一例検例

譚 春鳳¹⁾、柿田明美^{1,2)}、朴 月善¹⁾
菊川公紀³⁾、田中正美³⁾、岡本幸市⁴⁾、高橋 均¹⁾

- 1) 新潟大学脳研究所病理学分野、 2) 同 脳疾患標本解析学分野
3) 国療西新潟中央病院神経内科、 4) 群馬大学医学部神経内科

研究要旨 上位運動ニューロン徴候と前頭側頭葉萎縮を示した一例検例（病理組織診断：原発性側索硬化症、PLS）について、その臨床病理像の詳細を示すとともに、既報の類似例を文献考察し、PLS とはいかなる疾患かを検討した。その結果、本症はまれな神経変性疾患であり、上位運動ニューロン優位の筋萎縮性側索硬化症とみなされること、さらに、しばしばユビキチン陽性神経細胞内封入体の出現を伴う前頭側頭葉変性を続発する疾患と考えられた。

はじめに

原発性側索硬化症 (PLS) は、上位運動ニューロンが選択的、かつ進行性に侵される神経疾患と考えられている。しかし、本症の独立したひとつの疾患単位としての存在にはいまだ議論の残るところである。現在、本症はまれな臨床症候群であり¹⁾、剖検によってのみ診断が確立する疾患²⁾と捉えられている。

神経病理学的に真の PLS は存在するか？我々はこれまでそのような病理診断を付すに値する症例を経験したことがなかったが³⁾、最近、緩徐進行性の上位運動ニューロン徴候、それに引き続いて進行性の前頭側頭葉萎縮を示した一例検例に遭遇した。その神経病理学的検索は、本例に筋萎縮性側索硬化症 (ALS)³⁾ ならびに前頭側頭葉型痴呆の特殊な 1 型⁴⁾ に強く関連する組織像の存在を明らかにした。

症例

死亡時 82 歳、女性。75 歳時、高い声が出なくなり、徐々にしゃべりにくさが進行。77 歳初診時、高度の構音障害（筆談可、痴呆なし）、顔面と頸部屈筋の軽度の筋力低下、軟口蓋の動き不良。Fasciculation なし。深部腱反射（下顎反射を含め）亢進、Babinski 徴候陽性、下肢の spasticity を認めた。針筋電図では異常なし。この時の頭部 MRI では脳に著変を認めず。79 歳、筋力低下が進行し、嚥下障害が出現、次いで歩行不能となった。

四肢筋の萎縮は最期まで著明ではなかった。精神状態については、81 歳まで構音障害は非常に高度であったが OK サインを出すなどしてコミュニケーションは可能。以後、問いかけに対し反応が鈍くなり、やがて意志疎通は全く不可となった。頭部 MRI では、脳室の拡大を伴った高度の前頭側頭葉の萎縮を認めた。82 歳、急性の呼吸停止にて死亡。全経過 7 年 4 ヶ月。経過中、下位運動ニューロン徴候ははっきりしなかった。



図 1. 死亡約 1 ヶ月前の T1 強調 MRI。脳室の拡大、前頭葉および側頭葉の萎縮が明らかである。

剖検所見

脳重 883 g。前頭側頭葉の萎縮が明らかで、中心前回でもっとも高度であった。大脳剖面では側脳室の拡大を伴い、白質のボリュームが高度に減じて認められた。脊髄はやや細いが前根および後根は尋常。組織学的には、大脳皮質、とくに前頭側頭葉の皮質において細胞密度の増加とニューロピルの減少が明らかで、ときに2層の microvacuolation を認めた。中心前回（腹側部でより高度）では、全層にわたって高度の神経細胞の脱落とグリオーシスが見られ、Betz cell は完全に消失。白質では、そのボリュームの減少と細胞密度の増加及び線維性グリオーシスを認めたが、全体的に髄鞘の淡明化は余り目立たない (dissociate

gliomyelinique)。錐体路には高度、かつほぼ進行しきった変性を認めた。脳幹および脊髄の運動ニューロンは保たれて見えたが、ごく少数にプニナ小体が出現していた。脊髄前根の大径有髄線維は良く保たれており、筋にも著変を認めず。ユビキチン免疫染色では、円形あるいは半月状の神経細胞内封入体および陽性突起が、前頭側頭葉皮質（特に中心前回皮質第2層）および線条体（特に被殻尾側）に認められた。ごく少数の下位運動ニューロンに skein-like inclusion を認めた。Trans-Golgi network を認識する特異抗体 (TGN46)³⁾を用いた免疫染色では、下位運動ニューロン内ゴルジ装置の数、形態に著変を認めず。

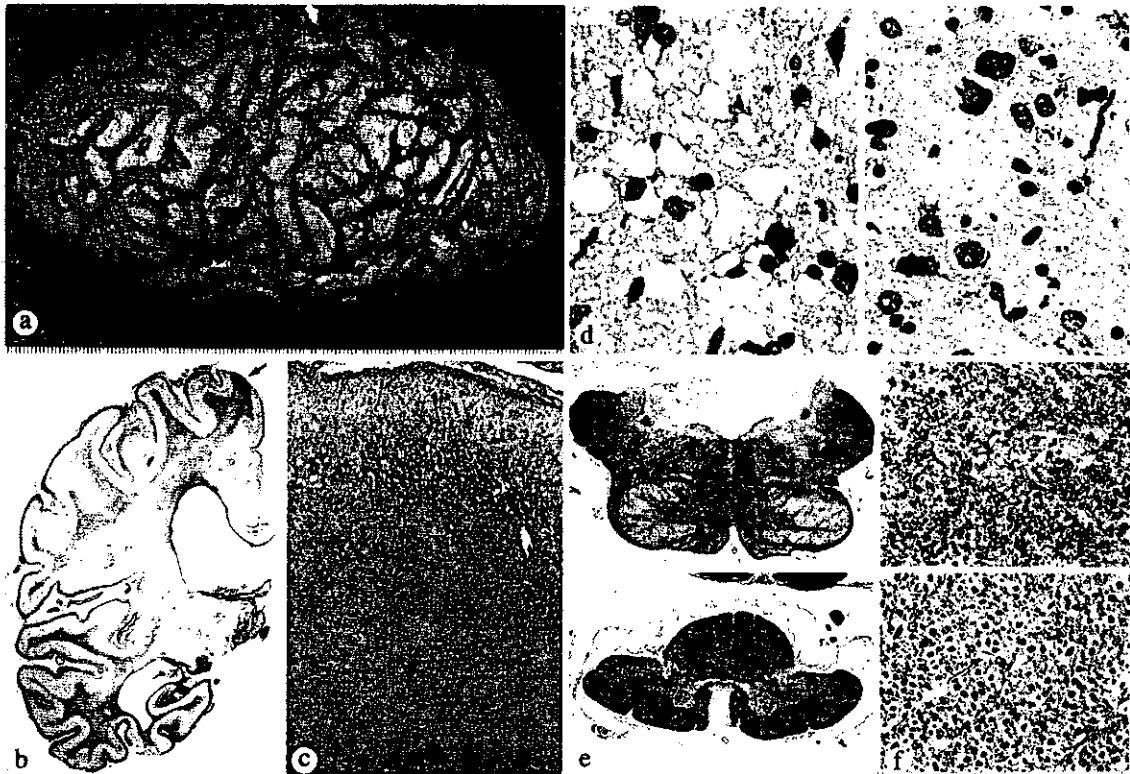


図 2. a 前頭葉および側頭葉の萎縮。中心前回では腹側部で萎縮が強い (矢印)。b 前頭側頭葉の葉性萎縮と白質の線維性グリオーシス (運動野皮質下白質でもっとも高度、矢印) (Holzer)。c 中心前回腹側部：高度の神経細胞脱落とグリオーシス。2層では顕著な microvacuolation。d ユビキチン陽性の神経細胞内封入体と dystrophic neurites：中心前回2層 (左) と被殻 (右)。e 錐体路および皮質脊髄路の高度の変性。f 本例 (上) と対照例 (下)：錐体路における大径有髄線維の脱落が著明 (SMI-31)。

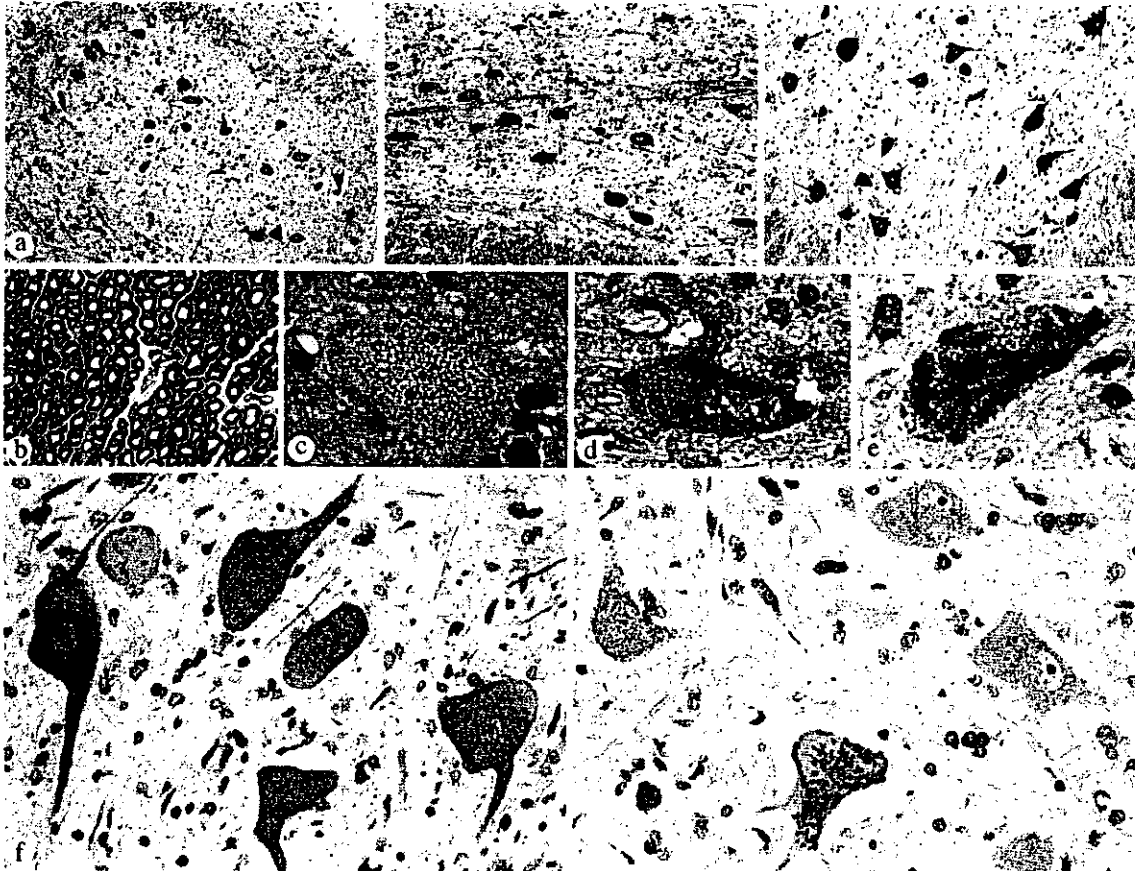


図 3. a 下位運動ニューロンはよく保たれている (左: 舌下神経核、中: 頸髄、右: 腰髄) (K-B)。b 腰髄前根に著変なし (toluidine blue)。c Bunina 小体 (頸髄前角細胞、HE)。d Cystatin-C 陽性構造物 (頸髄前角細胞、矢印)。e ユビキチン陽性 skein-like inclusion (顔面神経核)。f 本例の脊髄前角細胞のゴルジ装置に著変なし (左)。対照の ALS 例では著明な fragmentation を認める (右) (TGN46)。

考察

これまで報告のある PLS あるいはその類似例のうち、ユビキチン免疫染色を施行してある 7 例⁶⁻¹²⁾を検討すると、男性 4 例、女性 3 例、死亡時年齢は 55-78 歳 (平均 65.0 歳)、罹病期間は 2-17 年 (平均 6.5 年) である。そのうちの 3 例および 5 例の下位運動ニューロンには、それぞれ Bunina 小体および skein-like inclusion の出現が認められている。また、4 例に前頭側頭葉の萎縮 (脳重: 850-1230 g, 平均 1000 g) を、4 例に前頭側頭葉皮質にユビキチン陽性の封入体が観察されている。本

例を含め、PLS は臨床的にまれな疾患で、病理組織学的には上位運動ニューロン変性優位の ALS として捉えることが可能であり、それはしばしば ユビキチン陽性の神経細胞内封入体を伴う前頭側頭葉変性 (前頭側頭葉型痴呆) を続発する疾患と考えられた。

また、PLS は、frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease-type inclusions but without motor neuron disease、あるいは motor neuron disease-inclusion dementia (臨床的には進行性の前頭側頭葉型痴呆を呈し、剖検によってユビキチン陽性の神経細胞内封入

体の出現を伴う前頭側頭葉変性に加え、上位運動ニューロン優位の変性像や、ときに下位運動ニューロンにユビキチン陽性の胞体内封入体の認められることのある病態^{13,14)}と病理組織学的に強くリンクしていることが示された。

結論

PLS は上位運動ニューロン変性優位のALS (ALS の1亜型)であり、しばしば前頭側頭葉変性(前頭側頭葉型痴呆)を続発する疾患である。

文献

- 1) Swash M et al.: J Neurol Sci 170: 5-10, 1999
- 2) Rowland NP: J Neurol Sci 170: 1-4, 1999
- 3) Piao Y-S et al.: Brain Pathol 12: 10-22, 2003
- 4) McKhann GM et al.: Arch Neurol 58: 1803-1809, 2001
- 5) Sakurai A et al.: Acta Neuropathol 100: 270-274, 2000
- 6) Imai H et al.: No To Shinkei 47: 399-410, 1995
- 7) Watanabe R et al.: Neuropathology 17: 220-224, 1997
- 8) Koyanaga M et al.: Acta Neuropathol 96: 532-536, 1998
- 9) Tsuchiya K et al.: Neuropathology 19: 71-76, 1999
- 10) Sugihara H et al.: Neuropathology 19: 77-84, 1999
- 11) Yamazaki M et al.: Neuropathology 20 (Suppl): 1D-4, 2000
- 12) Mochizuki A et al.: Neuropathology 22 (Suppl): 1C-4, 2002
- 13) Holton JL et al.: Acta Neuropathol 103: 221-227, 2002
- 14) Ikeda K et al.: Acta Neuropathol 104: 21-28, 2002

筋萎縮性側索硬化症に対する大量メチルコバラミン療法の長期効果

梶 龍児¹⁾, 和泉唯信¹⁾, 西村公孝¹⁾,
坂本 崇¹⁾, 野寺裕之¹⁾, 松本真一¹⁾
1) 徳島大学医学部高次脳神経診療部

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対するメチルコバラミン大量療法の長期的効果を検討した。対象は呼吸不全をきたしていない ALS 患者 41 名。22 名にはメチルコバラミン大量投与（50mg/day, 週 2 回筋注）を行い、19 名には無投与で経過を追跡した。経過観察中に症状が進行しないもの、処方を変更したもの、大量投与を中断したもの、重篤な副作用が出現したものは除外した。7 名（投与群 4 名, 非投与群 3 名）が除外され、34 名を解析した（投与群 18 名, 非投与群 16 名）。生存期間または呼吸器使用にいたるまでの期間は、投与群が 18.5 ± 13.6 月であるのに対し非投与群は 17.7 ± 9.0 月であった。また、非投与群は全員すでに死亡しているのに対し投与群は 11 名が呼吸器を使用することなく生存中であり、Kaplan-Meier の生存曲線でも投与群の方が予後良好であった（2002 年 10 月末時点, Logrank $\chi^2 = 6.05$, $p = 0.014$ ）。重篤な副作用は全く認めず安全に施行できるため、より多数例で検討する必要がある。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は上位運動ニューロンと下位運動ニューロンが選択的に障害され全身の筋萎縮が進行する。常時進行性の経過をとり、発症から死亡までの平均経過は 3~4 年である。治療薬としては riluzole が世界的に認可されているのみであるが、その効果もごく軽微であり、新しい治療薬の開発が切に望まれている。病因のひとつとしてグルタミン酸異常仮説が提唱されている¹⁾。ビタミン B₁₂ の類縁体であるメチルコバラミンはグルタミン酸の細胞毒性に対して防御効果をもつことが報告されている²⁾。また、メチルコバラミン大量投与（500 μ g/kg）は実験的アクリルアミドニューロパチーの運動神経再生も促す³⁾。我々はすでに ALS に対してメチルコバラミン大量療法を

施行し、短期的には CMAP（compound muscle action potential）や MRC（Medical Research Council）scores を改善させることを報告した^{4) 5)}。今回、さらにその長期的効果を検討した。

対象および方法

対象は呼吸不全をきたしていない ALS 患者 41 名。オープン非ランダム化対照試験。患者をメチルコバラミン大量投与と無投与の二群に振り分けた。大量投与群にはメチルコバラミン 50mg/day を週 2 回筋肉注射する。大量投与群および非投与群で生存期間または呼吸器使用に至るまでの期間を比較する。経過観察中に症状が進行しないもの、処方を変更したもの、大量投与を中断したもの、重篤な副作用が出現したものは除外した。