

筋萎縮性側索硬化症(ALS)におけるアポトーシス関連蛋白 Caspase-3 の発現解析

江隅 英作¹⁾²⁾, 池口 邦彦²⁾, 森田 光哉²⁾, 中野 今治²⁾

- 1) 国家公務員共済組合連合会三宿病院神経内科
- 2) 自治医科大学医学部神経内科

研究要旨 ALSにおける運動ニューロン死のメカニズムが、アポトーシスか否かについての結論は未だ出ていない。以前我々はアポトーシスの実行に関与しているといわれている Apaf-1 の発現を解析したが、ALS患者の脊髄においては明らかな増強がみられなかったことを報告した。そこでアポトーシスカスケードの最終実行蛋白である Caspase-3 の発現を免疫組織化学的に検討した。ALS患者の脊髄では Caspase-3 の発現増強は認められず、この結果から ALSにおける神経細胞死が古典的アポトーシス伝達経路を介している可能性は否定的であった。

はじめに

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古典的伝達経路のうち、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。

昨年我々はミトコンドリアを介したアポトーシスの重要な促進蛋白である Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) の脊髄での発現を免疫組織化学的に検討した。頸髄・腰髄共に、対照およびALSで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の間で明瞭な差はみられなかった。

そこで本年はアポトーシスカスケードの最

終実行蛋白である Caspase-3 (CPP32) の発現を免疫組織化学的に検討した。

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、対照 3例 (OPLL, 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。一次抗体には rabbit polyclonal clonal 抗 CPP32 抗体⁴⁾ および mouse monoclonal 抗 Caspase-3 抗体 (SantaCruzBiotechnology: sc-7272) を用い、HISTOSTAIN SP-KIT (ZYMED社) により Caspase-3 の発現を検討した。

結果

1. rabbit polyclonal clonal 抗 CPP32 抗体による検討

頸髄・腰髄共に ALS および対照で CPP32 の明らかな発現は認められなかった。対照と ALS の染色性にも明瞭な差はみられなかった。

2. mouse monoclonal 抗 Caspase-3 抗体による検討

頸髄・腰髄共に ALS および対照で Caspase-3 の明らかな発現は認められなかった。対照と ALS の染色性にも明瞭な差はみられなかった。

考察

ALSにおける神経細胞死に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進めたが、2種類の抗 Caspase-3 抗体を用いた免疫組織化学的検討で ALS の脊髄では対照

と比べ明らかな差異はみられなかった。今回の結果から、ALS の運動ニューロン死が古典的アポトーシス伝達経路を介している可能性は否定的であった。

Martin は ALS の脊髄におけるアポトーシス関連蛋白の発現を免疫組織化学的に検討している⁵⁾。この報告によれば、アポトーシス促進蛋白の Bax および Bak の発現は上昇しており、アポトーシス抑制蛋白である Bcl-2 の発現は低下している。また Caspase-3 の発現についても検討しており、ALS では発現が増強しているという結果を示している。しかしながらこの報告では Caspase-3 の発現解析は生化学的手法を用いたものであり、免疫組織化学的に ALS の脊髄での発現を詳細に検討したものではないため、その判断は慎重にしなければならない。

Nakai ら⁶⁾はインフルエンザ脳症のニューロンおよび少数のグリア細胞において Caspase-3 の発現が認められたことを免疫組織化学的に検討し報告している。このように中枢神経が障害される疾患の中には、その細胞死にアポトーシスが関与しているものがあることは事実である。

しかしながら、ALS の剖検脊髄におけるアポトーシス実行蛋白である Caspase-3 の発現を免疫組織化学的に検討した報告は未だ見当たらず、今回の我々の検討は意義深いものと考えられる。

ALS の脊髄において Caspase-3 の発現が認められなかったという今回の結果から、ALS の運動ニューロン死にアポトーシスが関与していないと断定するのは早計であろう。しかしながらもう一度 ALS の臨床像を振り返ると、ALS の運動ニューロン死を全てアポトーシスで説明するのは困難と言わざるを得ない。もし死滅した運動ニューロンの全てがアポトーシスに起因するならば、ALS は「急性」の臨床経過をとらなければ合致しないと考えられるからである。

近年アポトーシス研究は目覚ましい展開を見せており、特に重要な知見は小胞体ストレス応答であろう。虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異などのストレスは小胞体内に異常な折り畳み構造を持つタンパク質 (unfolded protein) を上昇させ、小胞体ストレスとして作用する。このような小胞体ストレスに対し、細胞は unfolded protein response (UPR) や endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) と呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって異常タンパク質による小胞体の破綻を回避しよう

とする⁵⁾。しかしながらさらに強いストレスが加わった場合、小胞体は抗しきれなくなり、最終的に個体の危機管理機構としてのアポトーシスを誘導する。ロックアウトマウスによる解析から、このような局面でのアポトーシスの実行が小胞体に局在する Caspase-12 の活性化により引き起こされることが報告されている。今後は未だヒトでクローニングされていない Caspase-12 の発現も検討する必要があるだろう。

また Caspase-2 が関与しているといわれているゴルジ体におけるアポトーシスにも注目しなければならず、いわゆる「オルガネラ特異的アポトーシス」という概念でアポトーシスの全体像に迫っていく必要があるだろう。

難治性神経変性疾患の代表ともいえる ALS の運動ニューロン死のメカニズムに迫る一つの鍵が「アポトーシス」である。しかしながら、アポトーシスのメカニズムは death signal やミトコンドリアを介した古典的な経路に加え、様々な器官が関わっていることが解明されつつある。運動ニューロンが特異的に死滅するという病態を呈する ALS において、アポトーシスという一つの切り口からアプローチしても、さらに様々なネットワークの関与を考慮しなければならない。

結論

ALS における運動ニューロン死のメカニズムがアポトーシスか否かについて検討するため、古典的アポトーシスカスケードの最終実行蛋白である Caspase-3 の発現を免疫組織化学的に検討した。ALS 患者の脊髄では Caspase-3 の発現増強は認められず、この結果から ALS における神経細胞死が古典的アポトーシス伝達経路を介している可能性は否定的であった。今後は小胞体ストレス応答を始めとする「オルガネラ特異的アポトーシス機構」にも注目する必要がある。

文献

- 1) Yamazaki M, et al: Clin Neurosci 18: 443-445, 2000
- 2) Kihira T, et al: Neuropathology 18: 301-308, 1998
- 3) Mu X, et al: Ann Neurol 40: 379-386, 1996
- 4) Krajewska M, et al: Cancer Res 57: 1605-1613, 1997
- 5) Martin L: J Neuropath and Exp Neurol 58: 459-471, 1999
- 6) Nakai Y, et al: Acta Neuropathol 105: 233-239, 2003
- 7) Mori K: Cell 101: 451-454, 2000

孤発性 ALS の疾患感受性遺伝子同定のための全ゲノム領域を対象とした関連解析

中野亮一¹⁾、福島隆男¹⁾、菊川公紀²⁾、犬塚貴³⁾、宮下哲典⁴⁾、桑野良三⁴⁾、辻省次⁵⁾

- 1) 新潟大学脳研究所神経内科
- 2) 国立療養所西新潟中央病院神経内科
- 3) 岐阜大学医学部神経・老年学分野
- 4) 新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター遺伝子実験部門
遺伝子機能解析学分野
- 5) 東京大学医学部神経内科

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障害されかつ進行性の経過をとる原因不明の神経変性疾患である。約 10% を占める遺伝性の ALS の原因に関しては、その一部で遺伝子が同定され始めているが、ほとんどを占める孤発性 ALS に関しての原因は未だ不明であり、全ゲノム領域を対象として関連解析を行い、疾患感受性遺伝子が存在する可能性のある領域を見いだした。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の大部分は孤発例であるが、約 10% は遺伝性に発症し、家族性 ALS (FALS) と呼ばれている。FALS の多くは常染色体優性遺伝形式をとり、約 20% の症例は Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子変異を原因としている¹⁾。最近、常染色体劣性遺伝形式をとる若年性 FALS の原因遺伝子として ALS2 が同定されたが²⁾、連鎖解析から FALS の原因遺伝子は少なくともさらに 5 つは存在することが考えられ³⁻⁵⁾、運動ニューロンの変性に関わる分子は多様であることが示唆されている。分子遺伝学の進歩により FALS の原因解析が徐々に進んできている一方で、ALS の大部分を占める孤発性 ALS (SALS) の病因はいまだに不明である。

アルツハイマー病は ALS と同様に家族性発症例と孤発性発症例が存在する神経変性疾患であるが、家族性アルツハイマー病の一部はアミロイド前駆体蛋白遺伝子⁶⁾やプレセニリン遺伝子¹⁰⁾が原因遺伝子として同定されており、また孤発性の例ではアポリポ蛋白 E の遺伝子多型のうち APOE4 が

発症年齢を若年化させ、アルツハイマー病の発症を促進する疾患感受性遺伝子として同定されている¹¹⁾。SALS の場合にも運動ニューロンの変性メカニズムに関与する疾患感受性遺伝子が存在する可能性があることから、その同定を目指して全ゲノム領域における疾患・対照関連解析を行った。

対象および方法

(1) 対象 新潟県またはその近県在住の SALS 患者群 109 人 (男性 66 人、女性 43 人、平均年齢 59.5 ± 11.1 歳)、対照群 110 人 (男性 58 人、女性 52 人、平均年齢 72.5 ± 6.4 歳) から十分なインフォームド・コンセントを行い採血した。SALS 患者の病型は上肢型、下肢型、球麻痺型を含む。対照群は、神経内科の外来に通院中で 60 歳以上の運動神経疾患を持たない方にご協力いただいた。なお、本研究は新潟大学遺伝子倫理委員会の承認を得て行った。

(2) 遺伝子型解析 末梢血白血球より抽出した高分子 DNA をテンプレートとして、全ゲノム領域に約 4.6cM 間隔で分布するマイクロサテライトマー

カー (ABI PRISM Linkage Mapping Set HD-5) を用いて PCR を行った。384 well plate に分注ロボット (Biomek2000, FX) を用い DNA サンプルや試薬類を分注し、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) で PCR を行い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) に泳動した。そのデータを GeneMapper software (Applied Biosystems) を用い解析し、Oracle database にストックした。

(3)統計解析 Oracle database よりデータを取り出し、SALS 患者群とコントロール群でマーカーごとに遺伝子型頻度の違いを χ^2 test (2×n Table) を用い比較した。低い p 値を示したマーカーに関しては、SALS とコントロール群で特に差異のあったアレルの関与を検定するためオッズ比と χ^2 test (2×2 Table) を行った。X 染色体に関しては、男性は 1 アレル、女性は 2 アレルとして計算した。

結果

関連解析の結果、p 値が 0.001 以下を示したのは第 13 番染色体上の D13S1243 (p=0.00071) と第 18 番染色体上の D18S1129 (p=0.00036) の 2 マーカーであり、その他 7 マーカー (D3S3706, D12S364, D13S219, D14S1050, D15S153, D20S178, DXS1047) でも 0.001< p< 0.01 を示した (表 1, 図 1)。これらの低い p 値をとったマーカーの近傍に多型性に富むマイクロサテライトマーカーを新たに複数設定し、関連解析を行った。その結果、DXS1047 (p=0.0037) の 89kbp 上流のマーカー (X1047-1, p=0.022) と 11kbp 下流のマーカー (X1047-2, p=0.042) でそれぞれ 0.05 を下回る p 値を得た。

また、0.01 よりも小さな p 値を示した上記の 9 マーカーに関して、特に p 値を小さくすることに影響のあったアレル、つまり両群間で出現頻度に差のあったアレルを抽出し、そのアレルと残りのアレルをまとめたもので 2×2 Table をつくり χ^2 test を行った (表 2)。6 個のアレルが p< 0.01 を示し、そのうち D18S1129 のアレル 8 の頻度だけは SALS において少なかった。

考察

今回、SALS の全ゲノムを対象として疾患・対照関連解析を行い、p< 0.001 を示す 2 マーカーと、0.001< p< 0.01 を示す 7 マーカーを同定した。また、これら 9 マーカーの近傍に高密度に分布する新たな多型マーカーを設定して追加解析を行い、X 染色体上に 3 つのマーカーが連続して 0.05 より小さな p 値を示す 100kbp に渡る興味深い領域も同定した。

ALS の有病率は人口 10 万人当たり 4~6 で、男女比は 1.2~2.1 と男性に多い¹²⁾。我々の解析で、X 染色体上に連続して低い p 値を示すマーカーのある領域が存在するという結果は、このような有病率の男女差、つまり男性のほうが ALS に罹患しやすいという事実と照らし合わせても興味深い結果だと思われ、X 染色体上に疾患感受性遺伝子が存在する可能性が示唆される。

SALS 群と対照群間で出現頻度に差のあったアレルについて検討した結果から (表 2)、ALS 群と対照群で特に頻度の異なるアレルが存在しており、5 つのアレルは ALS 群で頻度が高いが、1 つのアレルは ALS 群で頻度が低くなっている。ALS で頻度の低いアレルは、ALS 抵抗性の遺伝子と関連している可能性もあると考えられる。

本研究では、全ゲノム領域に分布する 811 マーカーの解析をしていることから、多重検定という問題が生じてしまうため、結果の解釈は慎重に行う必要がある。偽陽性を避けるためには、一般的に Bonferroni の補正を行うのが良いといわれているが、この補正を用いると、0.05/811=0.000062 が有意水準となり、今回小さな p 値を示したマーカー全てがまだ有意ではないということになってしまい、この結果は慎重に扱う必要がある。そのため、十分に検体数を大きくした場合の p 値が有意水準に達するか検討することも不可欠であるが、検体数を単に増やすだけでなく、別の遺伝的背景を持った人種など、全く異なった集合で新たなサンプルセットを収集して関連解析を行い、同じマーカーで有意な結論が導き出せるか検討することも必要である。一方で、Bonferroni の補

正は非常に厳しい補正であり、ファーストスクリーニングとしてこのような厳しい補正をせず、広く候補領域を拾い上げることも大切であると考ええる。

また、全ゲノム領域を対象とした解析では解析するマーカー数が重要で、可能な限り多く解析できればもれなく全ゲノムをカバーしたこととなるが、実際には解析できるマーカー数にも限度があり、できるだけ少ないマーカーで効率的な解析を行うことが必要である。そのためには一般的に連鎖不平衡がどれくらいの距離で保たれているかを知る必要がある。尋常性乾癬のHLAクラスI領域のマイクロサテライトマーカーを用いた研究では、連鎖不平衡は少なくとも100kbpは保たれているとしている¹³⁾。また、アルデヒドデヒドロゲナーゼ2に関する研究では、400kbp保たれていると報告している¹⁴⁾。今回の研究では、マーカー間の距離は約4.6cMと広く、ゲノム上の連鎖不平衡部位をもれなく検出するには不十分であり、今後は解析するマーカーを増やす必要がある。

結論

SALSに関する全ゲノム領域に渡る関連解析を行い、疾患感受性遺伝子が存在する可能性のある9領域を示した。

文献

- 1) Rosen DR, et al. Nature 362: 59-62 1993.
- 2) Hadano S, et al. Nat Genet. 29: 166-173 2001.
- 3) Yang Y, et al. Nat Genet 29: 160-165 2001.
- 4) Chance PF, et al. Am J Hum Genet 62:633-640 1998.
- 5) Hand CK, et al. Am J Hum Genet 70: 251-256 2002.
- 6) Hosler BA, et al. JAMA 284:1664-1669 2000.
- 7) Hentati A, et al. Neurogenetics 2:55-60 1998.
- 8) Siddique T, et al. Am J Hum Genet 63: A308 (1785) 1998.
- 9) Goate A, et al. Nature 349: 704-706 1991.
- 10) Shrrington R, et al. Nature 375: 754-760 1995.
- 11) van Duijn CM, et al. Nat Genet 7: 74-78 1994.
- 12) Nelson LM Clin Neurosci 3: 327-331 1995.
- 13) Oka A, et al. Hum Mol Genet 8: 2165-2170 1999.
- 14) Koch HG, et al. Hum Mol Genet 9: 2993-2999 2000.

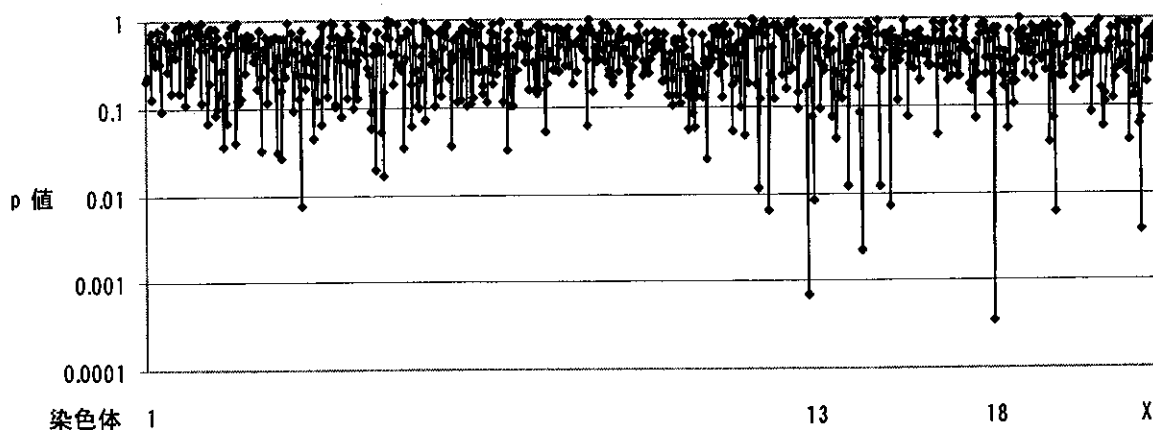


図1 811マーカーのp値

左側に第1染色体の短腕から右側にX染色体の長腕がくるように811マーカーを順に並べ、そのp値を示した。

Marker	Position(cM)	p value
D3S3706	12.8	0.0076
D12S364	32.8	0.0064
D13S1243	11.5	0.00071
D13S219	30.7	0.0085
D14S1050	98.8	0.0022
D15S153	62.1	0.0071
D18S1129	82.3	0.00036
D20S178	66.0	0.0061
DXS1047	150.3	0.0037

表1 低い p 値を示したマーカー

p 値が 0.01 より低い値をとったマーカーを示した。position は Genethon のデータベースを参考にした。Bonferroni の補正 (0.000062) を行うと統計学的には有意とは言えない。

	No. of alleles	Significant alleles	No. (%) of		OR(95%CI)	χ^2	p value
			ALS	control			
D13S3706	7	2	35(17)	17(8)	2.50(1.35-4.63)	8.98	0.0027
		3	60(30)	90(41)	0.61(0.41-0.91)	5.77	0.016
		5	28(14)	47(21)	0.59(0.35-0.99)	4.06	0.044
D18S1129	10	2	19(9)	7(3)	3.16(1.30-7.68)	7.06	0.0079
		8	14(7)	34(15)	0.41(0.21-0.78)	7.59	0.0059
		10	8(4)	0		6.88	0.0087
DXS1047	13	5	24(17)	10(6)	3.13(1.44-6.79)	8.97	0.0027
		10	9(6)	24(15)	0.39(0.18-0.88)	5.45	0.02
X1047-1*	7	1	0	6(4)		3.57	0.06
		6	12(8)	30(18)	0.41(0.20-0.84)	6.23	0.012
X1047-2*	35	9	0	6(4)		3.51	0.061
		11	16(13)	5(3)	4.15(1.48-11.68)	8.33	0.0039
		17	2(2)	13(9)	0.17(0.04-0.76)	5.50	0.019

表2 ALS 群と対照群で特に頻度に差のあるアレル

低い p 値を呈したマーカーで、特に差のあるアレルを選びそのアレルの影響を解析するためオッズ比 (OR) と 2×2 Table で χ^2 検定を行い p 値を計算した。

臨床的特徴のある 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病態解析

青木 正志¹⁾

1) 東北大学大学院医学系研究科神経内科

研究要旨 家族性 ALS において臨床型の異なる 2 種類の 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を作製し、その病態を比較した。これらのマウスはヒト家系における変異による経過の違いおよび病型をよく再現していた。またこのマウスにおいて GRP78, Caspase-12 の発現上昇が認められ、神経細胞変性に小胞体ストレスが関与している可能性が示唆された。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症（以下 ALS）は主として中年以降に上肢または下肢の脱力、あるいは球麻痺症状で発症し、数年の経過で四肢の脱力、筋萎縮が進行し、呼吸筋の麻痺により死に至る神経変性疾患である。ALS 発症者の大半は孤発性だが、5-10%が家族性を示し、家族性 ALS の多くは常染色体優性遺伝形式をとることが知られている。1991 年に一部の家族性 ALS 家系の病因遺伝子が第 21 染色体上に連鎖することが明らかとなり、さらに 1993 年にその原因遺伝子が Cu/Zn SOD 遺伝子であることが明らかになった。

現在までに家族性 ALS の約 20%で Cu/Zn SOD 遺伝子の変異が認められ、70 種類以上の変異が報告されている。変異の大部分は点突然変異であり、変異の種類によって臨床経過が異なることが報告されている。

目的

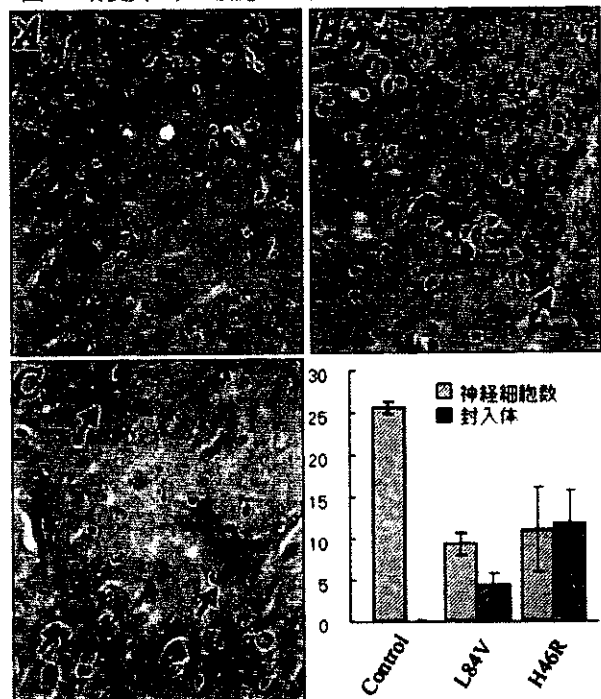
Cu/Zn SOD 遺伝子変異を伴う家族性 ALS として、臨床経過が著しく早く上肢から発症を認める L84V 変異と、経過が数十年と長く下肢より発症する H46R 変異それぞれを導入したトランスジェニックマウスの病態解析をする。

方法

ヒト Cu/Zn SOD 遺伝子全長とプロモーター領域を含む 11.5 kb の領域をベクターに組み込み、L84V、H46R 二種類の変異を導入、マウス受精卵に Injection してトランスジェニックマウスを得た。その中で、L84V が 3 系統、H46R が 1 系統で ALS 様の四肢脱力、筋萎縮の症状発現が確認された。これらのマウスの臨

床症状、経過、Cu/Zn SOD 活性と、終末期腰髄膨大部の病理像を比較検討した。また、神経細胞の変性への小胞体ストレスの関与を検討するために L84V 変異トランスジェニックマウス 6 ヶ月齢（終末期）脊髄において GRP78 抗体を用いた Western-blotting、免疫染色と、Caspase-12 および Caspase-3 抗体を用いた免疫染色を行った。

図 1. 各変異マウス腰髄膨大部の神経細胞数と封入体の数



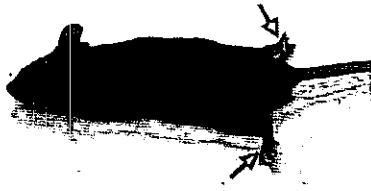
A : コントロールマウス B : L84V マウス C : H46R マウス

図2. L84V、H46R 変異トランスジェニックマウスの比較

L84V



H46R



変異	Cu/Zn SOD 発現量	経過(日)	生存期間(日)
L84V	7.8	8.6±6.5	189±29
H46R	20.1	27.5±8.2	184±12

(発現量はヒト/マウス Cu/Zn SOD比)

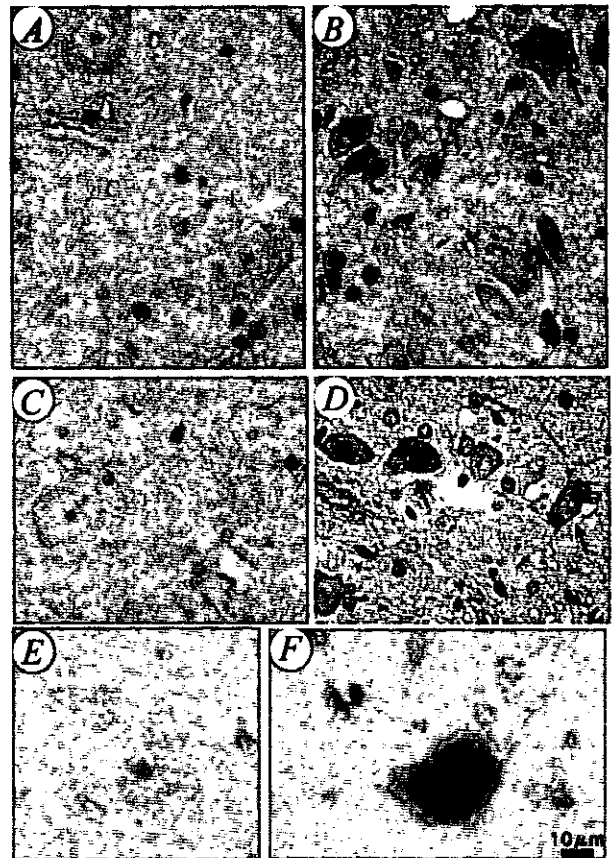
結果

L84V 変異、H46R 変異トランスジェニックマウスにおいて全経過が約 185 日のラインで比較すると、変異蛋白の発現量はそれぞれ 7.8 倍、20 倍と H46R 変異マウスの変異蛋白発現量のほうが約 2.5 倍多かった。しかしながら、発症から死亡までの臨床経過はそれぞれ平均 8.6 日、27.5 日と L84V 変異マウスのほうが明らかに早かった(図2)。SOD 活性は H46R 変異マウスで正常マウス 20% と低下を認め、L84V 変異マウスでは 103% とほぼ正常マウスと同等の活性を示した。

脊髄前角の神経細胞脱落、グリオシスは両変異ともに認められた。既存のマウスにて報告されている空胞変性の出現は今回作製した 2 種類の変異マウスともにほとんど認められなかった。神経細胞、グリア細胞内に認められる Lewy-body like inclusion は 2 つの変異マウスでも認められたが、H46R 変異マウスにおいて一切片あたり平均 11.6 個と著明に認められるのに対して、L84V 変異マウスでは平均 4.3 個とその頻度は低かった。(図1)

L84V 変異トランスジェニックマウスの終末期において Western-blotting により GRP78 蛋白の上昇を認めた(図4)。同一の抗体を用いた免疫染色では残存神経細胞内に抗体の反応性を認めた。また、Caspase-12 および Caspase-3 の免疫染色で残存神経細胞の中に抗体陽性の細胞が認められた。(図3)

図3. GRP78, Caspase-12, Caspase3 抗体による免疫染色



A, B 抗 GRP78 抗体 A: コントロール、B: L84V マウス
C, D 抗 Caspase12 抗体 C: コントロール、D: L84V マウス
E, F 抗 Caspase3 抗体 E: コントロール、F: L84V マウス

考察

L84V 変異が H46R 変異よりも発症に必要とされる蛋白量が少なく、なおかつ発症から死亡までの経過が急速であり、これは L84V 変異蛋白のほうが H46R 変異蛋白よりも細胞毒性が高いことを示しており、急速な経過を示す L84V 変異、緩徐な経過を示す H46R 変異というヒト家系での臨床形を再現していると思われた。

これまでに作製されている変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックマウスと比較すると、今回作製した L84V、H46R どちらの変異トランスジェニックマウスも Cu/Zn SOD 活性の上昇はなく、病理像としてヒト ALS 患者では認められない変化である空胞変性の少ないヒトの ALS より近いモデルと考えられた。(表 1)

神経細胞、グリア細胞内に認められる Lewy-body like inclusion が症状進行の遅い H46R 変異マウスにおいて進行の早い L84V 変異マウスよりも著明に認められたことは、この封入体の形成が直接神経細胞死に関与するものではない可能性が示唆された。

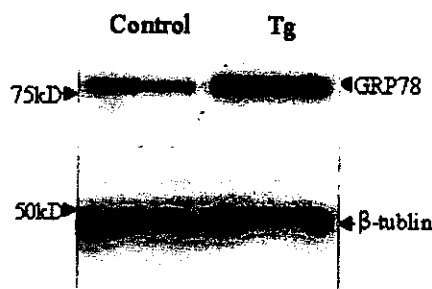
このトランスジェニックマウスでは終末期において GRP78 の発現上昇を認め、また免疫染色において Caspase-12 および 3 陽性の残存神経細胞が認められたことより、変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックマウスにおいて何らかの小胞体ストレスが神経細胞死に関与している可能性が示唆された。

表 1. 既存の Cu/Zn SOD トランスジェニックマウスとの比較

	Cu/Zn SOD 発現量	Cu/Zn SOD 酵素活性 *2	空胞変性	発症 *3	生存期間 *4
G93A G1H G37R(42)	12.3	6.8 ↓	++	3-3.5 Mo 3.5-4 Mo	133±11.8
G85R(148)	1.0	1 →	±	7.5 Mo	8Mo(240 day)
H46R #70	20.1	0.2 ↓	±	5Mo	184±12
L84V #13	5.4	0.9 →	±	8.5-9Mo	290±23
#51	7.8	1.0 →	±	5.5 Mo	189±29
#191	9.0	0.9 →	±	6 Mo	202±22

*1. ヒトマウス Cu/Zn SOD 発現量比
*2. 正常コントロールマウスに対する酵素活性の比(単位:倍)
*3. 発症までの期間(単位:日または月)
*4. 生存期間(単位:日). G85R(148)は月齢が異なるためその日数

図 4. 抗 GRP78 抗体を用いたウェスタンブロット



結論

変異の異なる 2 種類のトランスジェニックマウスを比較すると、Cu/Zn SOD 遺伝子変異を伴う家族性 ALS における臨床像を再現していた。神経細胞およびグリア細胞に見られる inclusion body は神経細胞死に直接関与するものではない可能性がある。神経細胞死には小胞体ストレスが関与している可能性がある

文献

- 1) Aoki M, et al: Nat Genet 5: 323-324, 1993
- 2) Aoki M, et al: Ann Neurol 37: 676-679 1995
- 3) Rosen DR, et al: Nature 362: 59-62 1993
- 4) Gurney ME, et al: Science 264: 1772-1775 1994
- 5) Wong PC, et al: Neuron 14: 1105-1116 1995
- 6) Jaarsma D, et al: Neurobiol Dis 7: 623-643 200

変異型 SOD1 トランスジェニックマウスにおける VEGF 発現の特異的障害

阿部康二¹⁾、永野 功¹⁾、村上哲郎¹⁾、塩手美冬¹⁾、Hristelina Ilieva¹⁾、東海林幹夫¹⁾

1) 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

研究要旨：Vascular endothelial growth factor (VEGF)と運動ニューロン死との関連性について調べるために、G93A 変異型 SOD1 マウスに低酸素刺激を与えて VEGF の誘導を検出した。VEGF は正酸素下では脊髄運動ニューロンに軽度発現しており、G93A マウスでその発現は少し亢進していた。低酸素刺激にて VEGF は non-transgenic littermates では約 10 倍に上昇したが、G93A マウスでは各週齢でほとんど誘導されなかった。VEGF の誘導障害は、変異型 SOD1 マウスにおいて、運動ニューロン死を助長する可能性がある。

はじめに

VEGF は血管内皮細胞の増殖因子であり、発生期、腫瘍増殖や糖尿病網膜症における血管形成に重要な役割を果たしている。VEGF はニューロン保護作用をグルタミン酸毒性に対して、および虚血に対して発揮することが示されている。さらに、VEGF プロモーター領域にある HRE (hypoxia-response element)を欠失させたマウスでは、慢性的な運動ニューロン変性が生じることが報告されている¹⁾。変異型ヒト SOD1 マウスは ALS のモデル動物とみなされているが、運動ニューロン死の機序については明らかではない。我々は、G93A SOD1 変異マウスにおける運動ニューロン死に VEGF が関与している可能性を探るために、低酸素環境にマウスを曝露して脊髄における VEGF 誘導を調べた。

方法

変異型 human SOD1(G93A) transgenic mice

(Tg)は、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)より購入し、C57B/L の background で維持した。このマウスは 22 週齢以降で病理学的変化が始まるが、両下肢の脱力症状は 32-34 週齢ごろに発症し、36-38 週齢で死亡する。そこで、G93A マウスは、12 週齢 (asymptomatic)、24 週齢(early symptomatic)、36 週齢(late symptomatic)の各週齢を用い、対照群は non-transgenic littermate(Wt)を用いた。

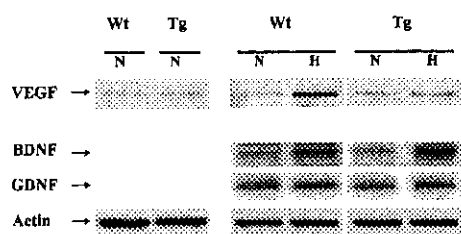
動物は、密閉容器に入れて O₂ 8% (92% nitrogen)に 2 時間曝露し、その 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間後に sacrifice して腰部脊髄を取り出して、4% paraformaldehyde 固定したのち凍結薄切標本を作製した。また、低酸素曝露を与えない動物群を Tg と Wt で用意し、同様に標本を作った。

切片は 1:500 の濃度の rabbit anti-VEGF antibody (sc-152, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)に反応させ、ピオチン化 2 次抗体続いて ABC reagent (Vector Laboratories,

Burlingame, CA, USA)をかけたのち、DAB にて発色した。

さらに、発現量の定量のために Western blotting を施行した。マウス腰髄組織を homogenize したのち遠心上清をとってタンパク濃度を測定。サンプルは 12 % SDS-PAGE にて分離した後に PVDF membrane に transfer した。Membrane をブロックしたのちに、anti-VEGF (1:1000; sc-152, Santa Cruz), anti-BDNF (1:2000; sc-546, Santa Cruz)または anti-GDNF (1:1000; sc-328, Santa Cruz)にて反応させ、ECL 法 (Pierce, Rockford, IL, USA) で X-ray film(X-OMAT, Kodak)に発光した。Blot は scanner で読み込んで、NIH image 1.62 を用いて定量化した。

Figure 1



結果

免疫組織化学法による VEGF の検索では、正酸素環境の Wt マウス腰髄では VEGF 発現はほとんど見られなかったのに対し、Tg マウスにおいては腰髄運動ニューロンの細胞質に VEGF の発現がみられた。低酸素曝露によって Wt マウスでは運動ニューロンを中心に著明な VEGF の発現誘導が認められた。時間経過では hypoxia 後 6 時間で最も発現が強かった。対照的に、Tg マウスの腰髄においては低酸素曝露によって VEGF はほとんど変化がなかった。これらの結果は調べた全ての週齢で

同様に観察された。

Western blotting による定量的分析では、hypoxia 後 6 時間に VEGF は Wt マウス脊髄にてピークに達した (normoxia の約 9 倍)。しかしながら、Tg マウスでは全ての週齢において有意な増加は認められなかった。BDNF および GDNF は、hypoxia で発現が増加したが、Tg と Wt マウスの間で違いはなかった(Fig. 1)。

考察

VEGF は血管新生のみならずニューロン保護作用を示すことが *in vitro*² および *in vitro*³ で報告されている。また、HRE 欠損マウスにおいて運動ニューロン変性が惹起されることから¹、VEGF は運動ニューロンの生存維持に必要であると推定される。今回の実験結果において、12 週から 36 週齢の G93A Tg マウス脊髄の運動ニューロンでは、正酸素下で VEGF がやや上昇しているのに対して、hypoxia 曝露で VEGF が誘導されなかった。神経組織は microcirculation の変化によって hypoxia に曝される可能性があり、VEGF 誘導によるニューロン保護作用が重要と考えられる。さらに、グルタミン酸毒性によるニューロン死は VEGF によって防がれることから、ALS における運動ニューロン死の機序として想定されているグルタミン酸毒性に発揮にも VEGF の調節障害が関与する可能性が示唆される。正酸素下の Tg マウスで VEGF がやや上昇していたことは、組織の循環障害に対する代償作用、SOD1 変異マウス神経組織で産生が亢進している炎症性サイトカインによる誘導、または proteasome の機能障害によって HIF-1 や VEGF 自身の breakdown が遅延していることなどが推定される。いずれにせよ病理変化がみられない 12 週齢の若年 Tg マウスにおいて

も VEGF 誘導障害が観察されたことは、この現象が運動ニューロン死に先行して起こることが示唆され、SOD1 変異マウスにおける運動ニューロン死の一因となる可能性が考えられる。VEGF の誘導障害を補正することで運動ニューロン死を防ぐことができるかを、今後検討する予定である。

文献

1. Oosthuysen B, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001; 28: 107-108.
2. Matsuzaki H, et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity. *FASEB J* 2001; 15: 1218-122-.
3. Hayashi T, et al. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 887-895.

「SOD1 遺伝子変異を認めない若年性家族性筋萎縮性側索硬化症の一家系」に関する研究

分担研究者
研究協力者

吉良 潤一¹⁾
三浦 史郎¹⁾, 菊池 仁志¹⁾, 立石 貴久¹⁾, 大八木 保政¹⁾,
古谷 博和¹⁾, 田代 博史²⁾, 岩城 徹²⁾柴田 弘紀³⁾, 服
巻 保幸³⁾

- 1) 九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科
- 2) 九州大学脳研病理部門
- 3) 九州大学生体防御医学研究所遺伝実験情報センターゲノム機能学分野

研究要旨 常染色体優性遺伝 (AD) の遺伝形式をとる家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の 1 家系を経験した。本家系は臨床的には ALS であるが、病理学的には多系統変性症の像を示し、さらに動眼神経核およびマイネルト基底核にユビキチン陽性の好塩基性嗜銀性細胞質内封入体を多数認めた。また、SOD1 遺伝子には異常を認めず、新たな FALS であると考えられた。さらに、本家系では表現促進現象をとっている可能性が考えられた。現在、4 名の家系内 ALS 患者を中心に連鎖解析を行っている。

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侵され、その結果、進行性の筋力低下、筋萎縮をきたす。ALS のほとんどは孤発性であるが、5-10%は遺伝性である¹⁾³⁾。現在まで遺伝子座が判明している家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) は 5 つあり、責任遺伝子まで判明しているものは 2 つある。ALS1 は常染色体優性遺伝 (AD) の遺伝形式を示し、染色体 21q22.1 上の SOD1 遺伝子に変異があり⁴⁾⁶⁾、日本の FALS 家系の 50-71%を占める⁷⁾。

今回われわれは、SOD1 遺伝子に変異を認めない AD の遺伝形式を示す ALS の一家系を経験したので、その臨床症状、検査所見、病理所見、連鎖解析について報告する。

方法

臨床所見：発端者、発端者の父親とその大叔父および家系内の発症者 1 名についてその病歴、神経学的所見を検討した。それ以外の家系内死亡例に関しては聞き取り調査を行った。

病理所見：発端者の父親の剖検標本の検討を行った。

連鎖解析：家系内 ALS 患者 4 名とその家族 33 名について、文書で承諾をとった上で、末梢血リンパ球よりゲノム DNA を抽出し、常染色体について約 10cM きざみで 382 のマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイドに連鎖解析を行っ

た。2 点 LOD 値については FASTLINK software package (version 4.1P)の MLINK program、多点 LOD 値については GENEHUNTER program (version 2.1)にて解析した。

結果

家系図：本家系の家系図を図 1 に示す。遺伝形式は AD であると考えられた。

世代別の死亡年齢もしくは人工呼吸器を装着した年齢は第 II 世代で 60 歳、第 III 世代で 42 歳、第 IV 世代で 38.5 歳、第 V 世代で 32 歳であった。

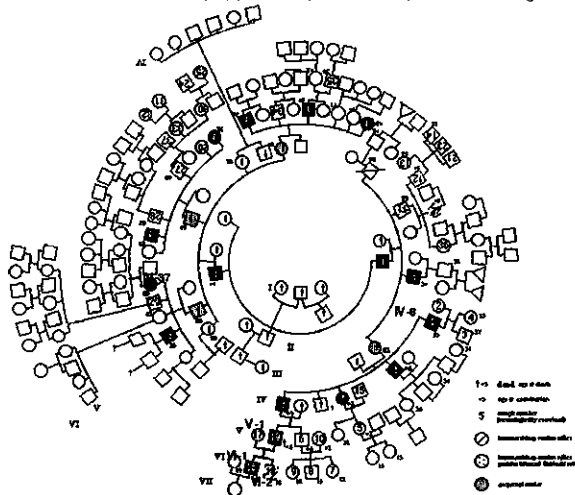


図 1 本家系の家系図：家系内で ALS と考えられた症例を黒で塗りつぶしてある

臨床所見：発端者（VI-1）は当科受診時 20 歳の男性。頸筋と上肢近位筋の筋力低下と筋萎縮で発症。発症後 2 ヶ月で上肢の挙上、駆け足ができなくなった。症状は徐々に進行し、半年後には嚥下障害、呼吸筋麻痺が出現し車椅子生活。1 年後には寝たきりとなり、1 年半後には気管切開をし、人工呼吸器管理となっている。発症 4 ヶ月後の神経学的所見では脳神経系に異常なく、上肢近位筋に中等度の筋萎縮と筋力低下、下肢近位筋に中等度の筋力低下を認め、Gowers 徴候陽性。感覚系に異常なく、深部腱反射は下肢で亢進。病的反射は認められなかった。血清生化学検査では CK 値の軽度上昇を認めた。髄液検査では蛋白の軽度上昇がみられた。SOD1 遺伝子には異常なし。頭部 MRI には異常所見を認めなかった。末梢神経伝導速度検査で運動神経伝導速度はほぼ正常だが、左腓骨神経での F 波の出現率は低下し、潜時も延長。感覚神経は正常。針筋電図検査で神経原性の変化を認めた。MEP は上肢末梢刺激で延長、SEP は正常であった。なお入院 1 ヶ月後に、MEP の中枢伝導速度の低下および両側バビンスキー反射の出現が見られた。

発端者の父親（V-1）は 31 歳時に右上肢筋力低下で発症。発症 9 ヶ月で人工呼吸器管理となり、14 年後に死亡している。

発端者の父親の大叔父（IV-8）は 52 歳時に下肢の痙性と頸筋の筋力低下で発症。両側バビンスキー反射陽性。発症 2 年で車椅子生活になっている。

家系内発症者の女性（IV-37）は 58 歳時に下肢脱力にて発症。2 年後に人工呼吸器管理となっている。

病理所見（V-1）：肉眼的には前頭葉・脳幹・小脳・脊髄の萎縮と淡蒼球の粗鬆化を認めた。組織学的に脊髄は、前角細胞の脱落、錐体路、後索、脊髄視床路、脊髄小脳路に高度の変性を認め、後角侵入部だけが保たれている状態であった。また、中心前回の Betz 巨細胞の脱落も見られ、その他、オリブ橋小脳路・歯状核赤核路・黒質線条体路・淡蒼球ルイ体路・自律神経系など多系統にわたり高度の変性所見が見られた。さらに動眼神経核、マイネルト基底核に好塩基性の細胞質内封入体（図 2）を多数認め、その全てが嗜銀性を示した。免疫組織化学的にはポリグルタミン染色、SOD1 染色、 α -シヌクレイン染色、ニューロフィラメント染色、tau 染色は陰性でユビキチン染色のみ陽性であった。

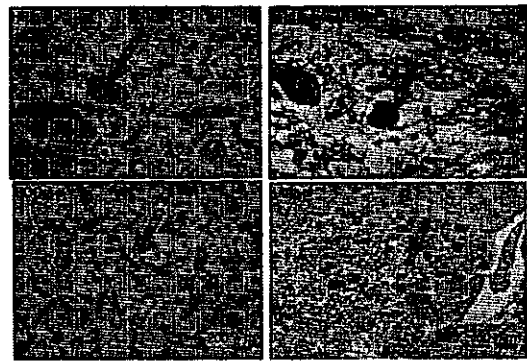


図 2 病理所見（V-1）：動眼神経核にユビキチン陽性の好塩基性嗜銀性細胞質内封入体を認める。この封入体は SOD1 染色は陰性である。左上：HE 染色、右上：鍍銀染色、左下：SOD1 染色、右下：ユビキチン染色

連鎖解析（表 1）：1 番、5 番、7 番、8 番、17 番染色体上に 2 点 LOD 値、多点 LOD 値ともに 1 以上の領域を認めた。しかし、3 以上となる領域はなかった。

染色体	VI-2が罹患者である場合		VI-2が健常者である場合	
	GENEHUNTER	MLINK	GENEHUNTER	MLINK
1	0.788	0.608	1.081	1.189
2	<0	0.326	<0	0.220
3	0.598	1.180	0.619	0.570
4	<0	0.410	0.151	1.051
5	0.181	0.957	1.162	2.167
6	<0	0.613	<0	0.589
7	1.185	1.097	1.676	2.134
8	1.886	1.124	0.907	0.650
9	0.594	0.836	<0	1.389
10	<0	0.203	0.639	0.742
11	0.190	0.788	0.980	0.451
12	0.911	1.259	<0	0.262
13	0.002	0.160	0.612	0.719
14	<0	0.281	<0	0.873
15	<0	0.200	<0	0.425
16	1.128	0.822	0.705	0.613
17	<0	0.649	1.436	1.279
18	0.373	1.649	<0	0.874
19	<0	0.294	<0	0.345
20	<0	0.677	<0	0.165
21	1.726	<0	0.685	<0
22	0.478	0.880	0.911	0.140

表 1：連鎖解析の結果

考察

既知の FALS と本家系の特徴を比較してみる（表 2）。ALS2 は若年性の FALS で常染色体劣性遺伝（AR）の遺伝形式を示し、染色体 2q33 上の Alsin をコードする遺伝子に欠失変異が認められ、経過は緩徐進行性である⁸⁾⁻¹²⁾。ALS3 は下肢発症の成人発症の FALS で進行は早く、AD の遺伝形式を示し、染色体 18q に連鎖している¹³⁾。ALS4 は球症状を欠き、非常に緩徐な経過を示す若年性の FALS で AD の遺伝形式を示し、染色体 9q34 に連鎖している¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。ALS5 は AR の遺伝形式をとる FALS の中で最も多く、上肢で発症し緩徐に進行する若年性 FALS であり染色体 15q15-q22 に連鎖している⁸⁾¹⁷⁾。

本家系は AD の遺伝形式をとり、症状は四肢近位筋優位で、比較的早く進行する。また、FALS

における表現促進現象の報告はほとんどないが¹⁸⁾¹⁹⁾、死亡年齢を見てみると本家系では表現促進現象の可能性が伺えた。

本家系の剖検例では多系統にわたり高度に変性しており、動眼神経核およびマイネルト基底核に好塩基性嗜銀性の特徴的な細胞質内封入体を多数認めた。ALS における好塩基性封入体の報告は散見される²⁰⁾⁻²⁴⁾がいずれも嗜銀性はないかわずかに認めたという程度であり、本家系が病理学的に新たに独立した疾患群である可能性が示唆された。

連鎖解析についてであるが、献体を採取させて頂いた方は全員神経学的所見を取り、罹患者群と非罹患者群に分類した。非罹患者群の中には自覚症状はないものの神経学的に下肢深部腱反射の亢進を認める者が3名、その中で下顎反射陽性である者が2名、バビンスキー反射が陽性であるものが1名含まれている。また、家系内で発症年齢に達していないと考えられる者もあり、今後新たに発症者が出現する可能性は高く、今後再解析を迫られるかもしれない。今回は、発端者の弟(VI-2)はまだ発症年齢に達していないものと考え、罹患者であると仮定した場合とそうでない場合の2通りについて解析した。現段階では LOD 値が1以上であった1番、5番、7番、8番、17番を中心に更にマーカーを密にとって解析していく方針である。

結論

AD の遺伝形式をとる新規の FALS を発見した。その特徴としては以下の点が挙げられた。

- ① 四肢近位筋優位の筋力低下・筋萎縮で発症。
- ② SOD1 遺伝子に異常を認めない。
- ③ 臨床的には ALS、病理学的には多系統変性症を呈している。
- ④ 残存神経細胞内にユビキチン陽性嗜銀性好塩基性細胞質内封入体を多数認める。
- ⑤ 表現促進現象の可能性がある。

最後に、SOD1 遺伝子検査をして頂いた東北大学神経内科助手の青木正志先生に感謝します。

	ALS1	ALS2	ALS3	ALS4	ALS5	本家系
発症	青年~初老期	青年	成人	青年	青年	青年~初老期
遺伝形式	AD	AR	AD	AD	AR	AD
遺伝子座	21q22.1	2q35	18q	9q34	15q15-q22	?
原因遺伝子	Cu/Zn SOD1	ALSH	?	?	?	?
四肢近位筋優位・筋萎縮	稀々	時に四肢筋萎縮	下肢発症	四肢近位筋優位	四肢近位筋優位	四肢近位筋優位
経過	3-6年	10-15年	6年	20年以上	10年以上	比較的早い
自覚的徴候所見	+	?	?	+	-	+
表現促進現象	一部+の報告あり	-	-	-	-	+?
封入体	Lewy小体(神経細胞質内ユビキチン陽性封入体)	?	?	-	?	好塩基性ユビキチン陽性細胞質内封入体

表2: FALS の既報告例と本家系の比較

文献

1. Mulder DW et al. Neurology 36:511-517, 1986.
2. Camu W et al. J Neurol Sci 165Suppl:21-26,1999.
3. Strong MJ et al. Can J Neurol Sci 18:45-58, 1991.
4. Siddique T et al. N Engl J Med 324:1381-1384, 1991.
5. Rosen DR et al. Nature 362:59-62, 1993.
6. Deng HX et al. Science 261:1047-1051,1993.
7. Abe K et al. J Neurol Sci 136:108-116,1996.
8. Hamida MB et al. Brain 113:347-363, 1990.
9. Hentati A et al. Nat Genet 7:425-428,1994.
10. Hosler BA et al. Neurogenetics 2:34-42,1998.
11. Yang Y et al. Nat Genet 29:160-165,2001.
12. Hadano S et al. Nat Genet 29:166-173,2001.
13. Hand CK et al. Am J Hum Genet 70:251-256,2002.
14. Chance PF et al. Am J Hum Genet 62:633-640, 1998.
15. Rabin BA et al. Brain 122:1539-1550,1999.
16. Blair IP et al. Neurogenetics 3:1-6,2000.
17. Hentati a et al. Neurogenetics 2:55-60, 1998.
18. Ceroni M et al. Neurology 53:1064-1071, 1999.
19. Iwai K et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 72:819-820, 2002.
20. Oda M et al. Acta Neuropathol 44:211-216, 1978.
21. Kusaka H et al. Acta Neuropathol 80:660-665, 1990.
22. Matsumoto S et al. Acta Neuropathol 83:579-583, 1992.
23. Mizutani T et al. Acta Neuropathol 84:372-377, 1992.
24. Tsuchiya K et al. Clin Neuropathol 20:53-59, 2001.

パーキンソン病モデルにおける黒質神経細胞死メカニズムの検討

水野 美邦¹⁾
望月 秀樹¹⁾, 古谷 剛¹⁾,
早川 英規¹⁾, 山田 正典¹⁾, 三浦 正幸²⁾

- 1) 順天堂大学医学部脳神経内科
2) 理化学研究所 細胞修復

研究要旨

AAV-Apaf-1-ドミナント・ネガティブのウィルスベクターを用いた制御実験により、慢性 MPTP 投与による黒質ドパミン神経細胞死には、ミトコンドリアを介するアポトーシスの系も関与していることをすでに報告した。一方、パーキンソン病やそのモデルマウスにおいて、IL-1 β などの炎症性サイトカインの上昇も報告されている。今回我々は、IL-1 β -converting enzyme すなわちカスパーゼ 1 を活性化するため、その上流にあると考えられているカスパーゼ 11 の発現を、MPTP によるパーキンソン病モデルにおいて検討したところ、MPTP 急性投与後早期にカスパーゼ 11 発現上昇を黒質のドパミン神経細胞およびミクログリアで確認した。さらに、カスパーゼ 11 のノックアウトマウスを用いて、MPTP を急性投与したところ黒質神経細胞死の黒質ドパミン神経細胞死が抑制された。MPTP 急性投与モデルの黒質神経細胞死にはカスパーゼ 11 を介した炎症の関与が示唆された。

はじめに

パーキンソン病は黒質、青斑核の選択的神経細胞死により特徴づけられる原因不明の神経変性疾患である。しかし、その神経細胞死の正確なメカニズムは解明されておらず、炎症やアポトーシスの関与が注目されている。

我々はすでに、AAV-Apaf-1-ドミナント・ネガティブのウィルスベクターを用いた制御実験により、慢性 MPTP 投与による黒質ドパミン神経細胞死には、ミトコンドリアを介するアポトーシスの系も関与していることをすでに報告した。

しかし炎症とパーキンソン病に関しても多くの報告がある。IL-1 β は、パーキンソン病の線条体や脳脊髄液にて上昇していること、IL-1 β -converting enzyme すなわちカスパーゼ 1 のドミナント・ネガティブマウスが MPTP 投与により細胞死が制御されることなどがすでに報告されている。同マウスは、ハンチントン病モデルマウスや、ALSモデルマウス(7)においてはカスパーゼ 1 の上昇が報告されており、カスパーゼ-1が、神経変性疾患に共通した系で関与している可能性もある。

今回我々は、IL-1 β -converting enzyme すなわちカスパーゼ 1 を活性化するため、その上

流にあると考えられているカスパーゼ 11 に注目した。まず、MPTP を用いたパーキンソン病モデルマウスにおいて、その発現について免疫組織化学および western blotting で継続的に検討した。さらに、カスパーゼ-11 ノックアウト(KO)マウスを用いて、MPTP を投与することにより黒質ドパミン神経細胞死の制御が可能かどうかにつき免疫組織化学及びドパミン含量の測定につき検討した。また、MPTP の投与方法を検討することにより細胞死機序の異なる可能性につき言及した。

方 法

・ C57Black/6 とカスパーゼ-11 ノックアウト(KO)マウス

C57Black/6 とカスパーゼ-11-KO マウス 8-12 週齢を使用した。カスパーゼ-11-KO マウスは Harvard Medical School の Prof. J. Yuan より御供与頂いた。

・ MPTP 投与方法

マウスを MPTP 急性投与群と慢性投与群に分け、急性投与として 1 回 20mg/kg を 2 時間おきに 1 日 4 回腹腔投与、慢性投与として 1 日 1 回 30mg/kg を 5 日間腹腔投与してパーキン

ソン病モデルを作成した。コントロールとして、同方法にて生理食塩水を投与した。

・免疫組織化学染色

マウスを、ペントバルビタールにて十分麻酔し、PBS と 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、脳を取り出した。2 日間後固定し、その後クリオスタットにて 25 μ m にて薄切した。0.5% H_2O_2 /PBS にて、室温、30 分間脱ペルオキシダーゼをし、各種動物血清にてブロッキング後、4°C にて一次抗体と反応させた。一次抗体として rabbit polyconal anti-TH (永津氏より御供与)、rabbit polyconal anti-Iba-1 for microglia(高坂氏より御供与)、rat monoclonal anti-Ich-3 for caspase-11, mouse monoclonal anti-iNOS, を使用した。各種ビオチン標識した二次抗体で室温、2 時間反応後、ABC で室温、2 時間反応し DAB で発色した。蛍光二重染色として、一次抗体で反応後、FITC-, Rhodamine-標識した二次抗体にて反応させ、confocal microscopy にて観察した。

・ Western Blotting 法

マウスより中脳腹側を取り出し、Lysis Buffer にて溶解した。SDS-PAGE にて分離し、PVDF 膜に transfer し、blotting を行った。一次抗体として、rabbit polyconal anti-TH, rabbit polyconal anti-Iba-1 for microglia, rat monoclonal anti-Ich-3 for caspase-11 にて incubate し、HRP 化した二次抗体にて incubate し、ECL にて発色した。

・ ドパミン含量の測定

電気化学的法による High-performance liquid chromatography (HPLC)法にて、線条体のドパミン含量を測定した。

・ RT-PCR

マウスより中脳腹側を取り出し、RNeasy kit (Qiagen)にて RNA を抽出し、First strand cDNA synthesis kit (Amersham)にて cDNA を作成した。Ex-Tag (TAKARA) にて PCR を施行した。プライマーとして以下のものを使用した。IL-1 β forward; CTG TGT CTT TCC CGT GGA CC, IL-1 β reverse; CAG CTC ATA TGG GTC CGA CA, iNOS forward; TCA CTG GGA CAG CAC AGA AT, iNOS reverse; TGT GTC TGC AGA TGT GCT GA), β -actin forward; ATC CTG AAA GAC CTC TAT GC β -actin reverse; AAC GCA GCT CAG TAA CAG TC.

結 果

C57black/6 マウスの MPTP を投与し、ドパミン神経細胞の抗体である TH と、ミクログリアの抗体である Iba-1 で黒質の免疫染色をした。MPTP 急性投与、慢性投与どちらも黒質 TH 陽性細胞死を認めた。しかし急性投与では、黒質、線条体にミクログリアの活性化を認めたが、慢性投与ではミクログリアの活性化を確認できなかった。急性投与では、中脳腹側の Western blotting にて TH の減少は MPTP 投与 48 時間後に認められたが、ミクログリアの活性化は、投与後早期の 12 時間後から認められた。すなわち、カスパーゼ-11 は TH の減少する時期の前、またミクログリアの活性化と同じ投与後 1 2 時間後にその発現を認めた。カスパーゼ-11 の免疫染色では黒質緻密部で、神経細胞とグリア細胞にその発現を確認し、蛍光二重染色にて、その発現は TH 陽性神経細胞とミクログリアに特異的に発現していること確認した。

次にカスパーゼ-11 を制御することによって MPTP による神経細胞死が抑制できるかを検討するため、カスパーゼ-11 ノックアウトマウスを使用した。同様の方法で MPTP を投与したところ、急性投与では TH 陽性細胞死の抑制を認めた。しかし、慢性投与では神経細胞死の十分な抑制効果を認めなかった。急性投与における線条体ドパミン含量を測定したところ C57Black/6 マウスでは有意な減少を認められたが、カスパーゼ-11 ノックアウトマウスではドパミン含量の減少の改善を認めた。

カスパーゼ-11 ノックアウトマウスの MPTP 急性投与に対する神経細胞死防御効果のメカニズムを検討した。カスパーゼ-11 ノックアウトマウスを Iba-1 で染色したところミクログリアの活性化の抑制を認めた。さらに、中脳腹側の RT-PCR を施行したところ C57Black/6 マウスでは IL-1 β の発現上昇を認められたが、カスパーゼ-11 ノックアウトマウスでは IL-1 β の発現の抑制を確認できた。さらにパーキンソン病や、MPTP パーキンソン病モデルにおいて iNOS の発現上昇が確認されているため我々も iNOS の発現について同モデルで検討した。B6 マウスでは、MPTP 投与 48 時間後に iNOS の発現を免疫染色にて黒質緻密部に確認し、ミクログリアとの二重染色にてその発現が共局在することを確認した。ところが、カスパーゼ-11 ノックアウトマウスでは iNOS の発現を認めず、中脳腹側

の RT-PCR にても iNOS の発現上昇を認めなかった。

考 察

MPTP は、マウスに投与するとドパミン神経細胞死を生じるため孤発性パーキンソン病の良いモデルになる。今回我々が施行した急性、慢性投与の様にその投与方法にてグリア（ミクログリア）の活性化が全く異なり、その神経細胞死のメカニズムの差異を示していることが考えられた。急性投与では、MPTP 投与後早期に黒質の TH 陽性細胞とミクログリアにカスパーゼ-11 が発現することより、その神経細胞死にカスパーゼ-11 が関与している事が示唆され、カスパーゼ-11 ノックアウトマウスにおいても MPTP 急性投与にてその抑制効果を認めた事より、MPTP の神経細胞死メカニズムにカスパーゼ-11 が関与していることが考えられた。さらにカスパーゼ-11 ノックアウトマウスでは、IL-1 β や iNOS の発現の抑制を認めており、これらの neurotoxic mediator がカスパーゼ-11 によって制御されており、その神経細胞死に関与していることが考えられた。

以上のように、MPTP 急性投与による細胞死は、ミクログリアの活性化とカスパーゼ-11 の上昇が引き金と考えられた。今後は、パーキンソン病の細胞死の検討には、ミクログリアの解析が重要と思われる。一方 MPTP 慢性投与によるモデルはミトコンドリアを介した細胞死を主体としており、急性投与モデルと経路が異なる。孤発性のパーキンソン病においても、その細胞死刺激の強さや持続の差異により、細胞死の機序が異なる可能性があり、治療法を選択する上でも検討が重要である。

結 論

MPTP は一般的にはミトコンドリア complex1 を抑制することによって、神経細胞死を起こすことはすでに知られているが、今回我々が報告したように急性投与ではカスパーゼ-11 を介したカスパーゼ-1、カスパーゼ-3 の活性化による神経細胞死も関与することが示唆された。実際パーキンソン病においても、ミクログリアの活性化や、カスパーゼ-1 の下流にある IL-1 β や、iNOS の発現上昇も報告されており、パーキンソン病の神経細胞死の機序の一部にはカスパーゼ-11 の活性化が関与している事が示唆される。

研究成果

[英文原著]

- 1) Agid Y, Olanow CW, Mizuno Y. Levodopa: why the controversy? *Lancet* 2002 Aug 17;360(9332):575
- 2) Goetz CG, Koller W, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Brin MF, Lees AJ, LeWitt P, Lozano A, Mizuno Y, Nutt J, Oertel W, Olanow E, Tolosa E. Management of Parkinson's Disease; an evidence-based review. *Mov Disord* 2002;17 (Suppl 4):S1-S166
- 3) Hyun DH, Lee M, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Halliwell B, Jenner P. Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem* 277(32): 28572-28577, 2002
- 4) Kobayashi H, Krüger R, Markopoulou K, Wszolek Z, Chase B, Taka H, Mineki R, Murayama K, Riess O, Mizuno Y, Hattori N. Haploinsufficiency at the α -synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease. *Brain* 2002 (in press)
- 5) Kobayashi K, Mori H, Okuma Y, Dickson D W, Cookson N, Tsuboi Y, Motoi Y, Tanaka R, Miyashita N, Anno M, Narabayashi H, Mizuno Y. Contrasting genotypes of the tau gene in two phenotypically distinct patients with P301L mutation of frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17. *J Neurol* 249:669-675, 2002
- 6) Kobayashi T, Ota S, Tanaka K, Ito Y, Hasegawa M, Umeda Y, Motoi Y, Takanashi M, Yasuhara M, Anno M, Mizuno Y, Mori H. A novel L266V mutation of the tau gene causes frontotemporal dementia with a unique tau pathology *Ann Neurol* 53: 2003(in press)
- 7) Miwa H, Mizuno Y. Enlargements of somatosensory-evoked potentials in progressive supranuclear palsy. *Acta Neurol Scand* 2002;106:209-212
- 8) Miwa H, Kondo T, Mizuno Y. Bell's palsy-induced blepharospasm. *J Neurol* 249 (2002):452-454
- 9) Miwa H, Mizuno Y, Kondo T. Familial hemifacial spasm: report and cases and review of literature. *Journal of the Neurological Sciences*193(2002):97-102
- 10) Mori H, Oda M, Komori T, Arai N, Takanashi M, Mizutani T, Hirai S, Mizuno Y. Lewy bodies in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 104: 273-278, 2002
- 11) Mori H, Hattori N, Mizuno Y. Genotype-Phenotype Correlation: Familial Parkinson Disease. *Neuropathology* 2003 (in press)
- 12) Ohizumi H, Okuma Y, Fuake J, Fujishima K, Goto K, Mizuno Y. Head tremor in dentatorubral-pallidolusian atrophy. *Acta Neurol Scand* 106: 319-321, 2002
- 13) Okuma Y, Mizuno Y, Lee RG. Reciprocal Ia inhibition in patients with asymmetric spinal spasticity. *Clin Neurophysiol* 113: 292-297, 2002
- 14) Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina

- M, Sharma N, Forno L, Ochiishi T, Shimura H, Sharon R, Hattori N, Langston JW, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS. Parkin localizes to the lewy bodies of Parkinson disease and dementia with lewy bodies. *Am J Pathol* 160: 1655-1667, 2002
- 15) Suzuki A, Obi K, Urabe T, Hayakawa H, Yamada M, Kaneko S, Onodera, Mizuno Y, Mochizuki H. Feasibility of ex vivo gene therapy for neurological disorders using the new retroviral GCDNsap packaged in the vesicular stomatitis virus G protein. *Journal of Neurochemistry* 82: 953-960, 2002
 - 16) Takanashi M, Mori H, Arima K, Mizuno Y, Hattori N. Expression patterns of tau mRNA isoforms correlate with susceptible lesions in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Molecular Brain Research* 2002 (in press)
 - 17) Takanashi M, Ohta S, Matsuoka S, Mori H, Mizuno Y. Mixed multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy: a clinical and pathological report of one case. *Acta Neuropathol* 103: 82-87, 2002
 - 18) Tanaka R, Mochizuki H, Suzuki A, Katsube N, Ishitani R, Mizuno Y, Urabe T. Induction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 280-288, 2002
 - 19) Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Urabe T. Migration of EGFP expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mice brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* (in press).
 - 20) The Global Parkinson's Disease Survey (GPDS) Steering Committee. Factors Impacting on Quality of Life in Parkinson's Disease. Results from an International Survey. *Mov Disord.* 2002;17:60-67
 - 21) Urabe T, Tanaka R, Noda H, Mizuno Y. Anticoagulant Therapy with a Selective Thrombin Inhibitor for Acute Cerebral Infarction: Usefulness of Coagulation Markers for Evaluation of Efficacy. *Journal of Thrombosis* 13(3), 155-160, 2002
- Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N. Etiology, pathogenesis, and genetics of Parkinson's disease. In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 239-244
- 2) Elibol B, Kobayashi T, Ataç FB, Hattori N, Sahin G, Güter G, Mizuno Y. Familial Parkinsonism with apathy, depression and central hypoventilation (Perry's syndrome). In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 285-290
 - 3) Hattori N, Asakawa S, Shimura H, Kubo S, Sato K, Kitami T, Chikaoka-Kawamura Y, Imai Y, Takahashi R, Suzuki T, Tanaka K, Shimizu N, Mizuno Y. Ubiquitin-proteasome pathway is a key to understanding of nigral degeneration in autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 291-296
 - 4) Schlossmacher MG, Prosch MP, Gai WP, Sharma N, Medina M, Ochiishi T, Shimura H, Hattori N, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS. Colocalization of parkin with α -synuclein in the Lewy bodies of Parkinson's disease. In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 297-300
 - 5) Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Prosch MP, Tockenbacher A, Shneider R, Mizuno Y, Kosik K, Selkoe DJ. Ubiquitination of a novel form of α -synuclein by parkin. In *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, eds, Mizuno Y, Fisher A, Hanin I, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2002, pp 301-304
 - 6) Mizuno Y, Asakawa S, Suzuki T, Hattori N, Minoshima S, Chiba T, Yoshino H, Shimizu N, Tanaka K. 28. Parkin Mutations (Park2). In *Genetics of Movement Disorders*, ed, Pulst SM, Academic Press, San Diego, 2002, pp 297-301
- [和文原著]
- 1) 飯島真喜子, 大熊泰之, 大泉英樹, 藤島健次, 後藤啓五, 水野美邦. 睡眠後に発症し胸郭出口における圧迫伸展機序の関与が考えられた腕神経叢障害の1例. *脳神経* 54 巻9号, 医学書院, 東京, 2002, pp819-822
 - 2) 色井淳子, 大熊泰之, 深江治郎, 藤島健次, 後藤啓吾, 水野美邦. 漢字の失読と語義失語を伴った筋萎縮側索硬化症の1例. *脳神経* 54 巻10号, 医学書院, 東京, 2002, pp903-907.
- [英文著書]
- 1) Mizuno Y, Hattori N, Shimura H, Kitada T, Kubo S, Wang M, Satpl K, Suzuki T, Chiba T, Tanaka K,

[英文総説]

- 1) Agid Y, Olanow CW, Mizuno Y. Levodopa: why the controversy? *Lancet* 2002;360(9332):575
- 2) Goetz CG, Koller W, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Brin MF, Lees AJ, LeWitt P, Lozano A, Mizuno Y, Nutt J, Oertel W, Olanow E, Tolosa E. Management of Parkinson's Disease; an evidence-based review. *Mov Disord* 2002;17 (Suppl 4):S1-S166
- 3) The Global Parkinson's Disease Survey (GPDS) Steering Committee. Factors Impacting on Quality of Life in Parkinson's Disease. Results from an International Survey. *Mov Disord.* 2002;17:60-

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患事業）
 神経変性疾患に関する研究班
 （分担）研究報告書

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

分担研究者 長谷川一子 （国立相模原病院神経内科）
 研究協力者 船山 学¹⁾，古和久幸²⁾，辻 省次³⁾，小幡文弥⁴⁾
 1) 北里大学医療系大学院
 2) 北里学園
 3) 東京大学医学部神経内科
 北里大学医療衛生学部

研究要旨 神奈川県相模原市在住の常染色体優性遺伝様式をとるパーキンソニズムの原因遺伝子の探索を行っている。本家系は臨床的には孤発性パーキンソン病ときわめて類似するが、病理学的には Lewy 小体を認めないなどの特徴を有する。現在までに、他の家族性パーキンソニズムの原因遺伝子として報告された遺伝子は自験家系の原因遺伝子ではないことを示し、ゲノムワイドの探索を開始した。前年度までには自験家系の原因遺伝子が 12p11.2-q13.1 に存在することを示し、原因遺伝子座を PARK 8 として登録した。ヒトゲノムプロジェクトにより 12p11.2-q13.1 には、機能や局在が既知、あるいは未知の遺伝子が約 60 個マップされており、さらにこの領域内のいずれかの場所と相同配列を持つ Expressed Sequence Tag (EST) が無数報告されている。Park 8 の遺伝子本体を特定するために、これらの遺伝子や EST について、家系内患者／健常者のゲノム塩基配列を比較し、疾患と関連する変異を網羅的に探索する作業を現在行っているところである。

はじめに

相模原地区のパーキンソニズム家系は常染色体優性遺伝様式をとる。発症年齢は 38～74 歳（平均 51±6 歳）で、臨床的には片側発症でパーキンソン病の主要 4 症候を示し、L-ドーパへの反応は良好で、臨床経過に於いても通常のパーキンソン病と明らかな差異は認めない。しかし、神経病理学的にはパーキンソン病の診断根拠とされる Lewy 小体を認めず、神経細胞脱落が黒質に限局性であり、青斑核は著変を認めないなど、孤発性パーキンソン病とは病理学的には異なっている。

この家系について原因遺伝子を探索することを目的として、検討を開始している。

これまでに α -Synuclein, Parkin, Tau, UCH-L1 について、相模原家系における遺伝子変異の有無を調べた結果、報告されている変異は検出されなかった。さらに、これら 4 遺伝子の近傍に位置する microsatellite marker を用いた連鎖解析を行ったが、相模原家系における発症とこれらの遺伝子の近傍遺伝子についても連鎖が否定され、4 遺伝子における未知の変異による発症の可能性も排除されている。

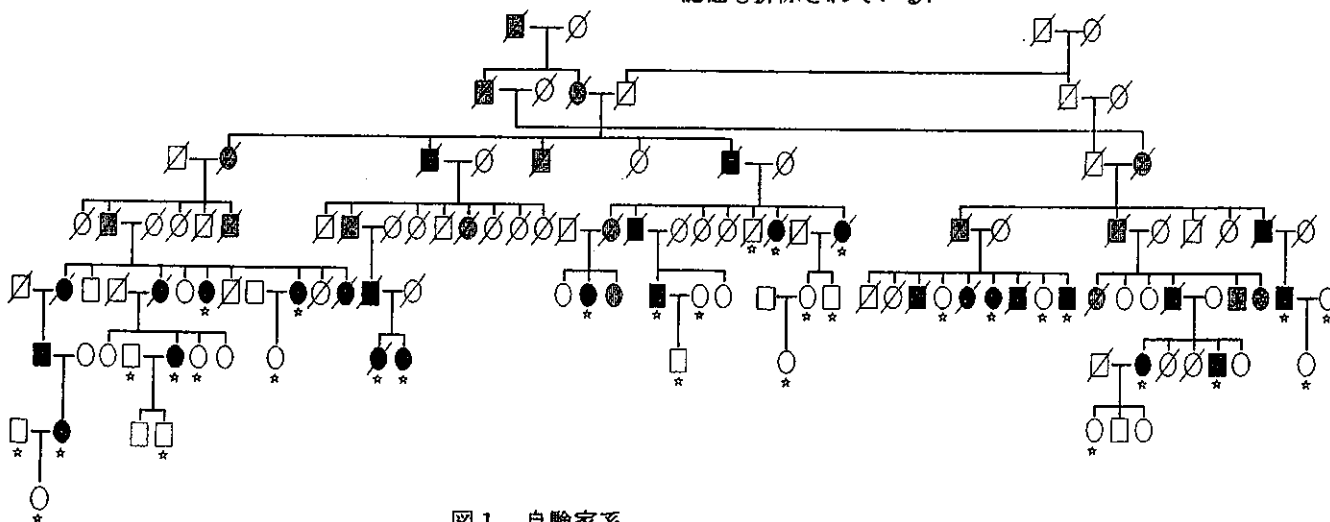


図 1. 自験家系

■ 発症者 ◐ 発症が推定される症例