

験により検証を行う必要がある。

また本剤がラジカルスカベンジ作用を有することから、不可逆性に細胞死に陥っていない神経細胞をレスキューすることが可能かもしれない。もしそうであれば投与期間中の短期効果が得られるかもしれない。現在呼吸障害、嚥下障害をきたしていない症例を対象に、倫理委員会の承認を受けた、プラセボ対象二重盲検比較試験を進行中であり、平成15年1月時点で5例が二重盲検を終了した。1群20例、合計40例の患者を対象にするが、平成15年夏には全例の投与が終了する予定であり、本剤のALSに対する作用がさらに詳細に解明されることが期待できる。

今までのところ本剤が効果があったと思われる症例、あるいは効果がみられなかった症例が存在するように思われるが、このような Responder, Non-Responder をあらかじめ予想するサロゲート・マーカーの確立が望ましい。現在 ALSFRS-R の低下と髄液中3NT、脂質過酸化のマーカーといわれるマロンジアルデヒドとの関係を検討中である。

E. 結論

ALS患者にエダラボンを投与したところ、多くの症例は投与後も症状の進展が見られたが、一部に症状の進行が抑制されたと考えられる症例も認められた。今後このような Responder を対象にし、プラセボ対象無作為化比較試験により本剤によるALS進行抑制効果を検証することが重要である。

F. 健康危険情報

本剤は急性期脳梗塞対象患者使用において、まれに急性腎不全、急性心不全がPMSにおいて報告されている。今後も本剤投与を受けた患者には注

意深く安全性については慎重に検査データをフォローする予定である。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Harukawa H, Utsumi H, Asano A, Yoshino H: Anti-LM1 antibodies in the sera of patients with Guillain-Barre syndrome, Miller Fisher syndrome, and motor neuron disease. *J Peripheral Nervous System.* 7:54-58, 2002.
- 2) Koga M, Yoshino H, Morimatsu M, Yuki N. Anti-GT1a IgG in Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 72:767-771, 2002.
- 3) Oshima Y, Mitsui T, Yoshino H, et al. Central motor conduction in patients with anti-ganglioside antibody associated neuropathy syndromes and hyperreflexia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73:568-573, 2002.

学会発表

古野 英、木村 暁夫、浅野 敦子。ALSに対するフリーラジカル・スカベンジャーを用いた臨床試験。第43回日本神経学会総会（2002年5月札幌）

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許願（平成14年1月31日申請）

発明者：吉野 英

特許出願人：三菱ウエルファーマ株式会社、国立精神・神経センター総長

発明の名称：神経変性疾患の予防又は治療薬

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

研究協力者 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：我々が開発した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を用いて、脊髄において運動ニューロンにはほぼ特異的に *GluR2* 遺伝子（AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット2）を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスと変異 *SOD1-Tg* とのダブルトランスジェニックマウスにおいては、ALS の発症及び運動ニューロン変性が大幅に遅延されることがわかった。従って、AMPA 型受容体を介した Ca^{2+} 流入は、変異 *SOD1* 毒性を助長させる大きな要因であることが示された。

A. 研究目的

運動ニューロン特異的な遺伝子過剰発現及びノックアウトシステムを開発し、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。本年度は、脊髄運動ニューロンが特異的に Ca^{2+} 透過性の AMPA 型グルタミン酸受容体を発現していることに注目し、受容体の Ca^{2+} 透過性を減少させるサブユニット (*GluR2*)を導入することで、ALS における運動ニューロンの脆弱性が軽減されるかどうか検討した。

B. 研究方法

変異 *SOD1-Tg* において障害される脊髄運動ニューロンは、コリンアセチル転移酵素 (*ChAT*) を特異的に発現する代表的なコリン作動性ニューロンである。我々は、*ChAT* プロモータ領域 6.4kb と Internal Ribosomal Entry Site (IRES) - Enhanced Green Fluorescent Protein (*EGFP*) cDNA を用いることにより、外来遺伝子（とレポーター遺伝子 *EGFP*）を運動ニューロンを含む少数のコリン作動性ニューロン特異的に発現させるシステムを開発した。そして外来遺伝子としてラット *GluR2* cDNA が挿入されたトランスジェニックマウス (*ChAT-GluR2-Tg*)を作成し、*G93A SOD1-Tg* とのダブルトランスジェニックマウスについて ALS 発症時期・生存日数などを解析した。なお、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-Tg* マウスとして3ラ

インが得られ、最も発現量の高いラインの脊髄運動ニューロンでは、*GluR2* mRNA 量は野生型マウスの約5倍に増加し、その結果 Ca^{2+} 透過性の AMPA 型受容体の割合が約半分に減少した。また、*G93A SOD1-Tg* とのダブルトランスジェニックマウスでは、発症時期（19.3%）、生存日数（14.3%）の大幅な遅延が認められ、発症に先立って起こる変異 *SOD1* タンパクの misfolding / aggregation や発症に伴うミトコンドリアからの cytochrome c 放出 (apoptosis 経路の活性化)、発症後に起こる gliosis 等も同様に遅れていた。従って、脊髄運動ニューロンにおける *GluR2* の発現量を増加させることで、発症までの変化が緩やかになり、発症までの期間が大幅に（19.3%）延びることが示された。

E. 結論

運動ニューロンにおける AMPA 型受容体の Ca^{2+} 透過性を下げることで、変異 *SOD1* による運動ニューロン変性が大幅に遅延することが示された。即ち、 Ca^{2+} 透過性の AMPA 型受容体を発現していることが、変異 *SOD1* により運動ニューロンが選択的に障害される要因の一つである、いわゆるリスクファクターであることが示された。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Araya, R., et al: Cell Death Differ. 9, 322-328 (2002)

Imai, Y., et al; Mol. Cell 10, 55-67 (2002)

Kobayashi, S., et al: J. Biol. Chem. 277,
33968-77 (2002)

Urushitani M, et al: J. Neurochem. 83, 1030-
1042 (2002)

2. 学会発表

館野美成子, 定方久子, 田中三佳, 濱裕, 宮脇敦,
辛龍文, 三浦正巳, 増田正雄, 青崎俊彦, 三澤日
出巳, 糸原重義, 高橋良輔: ALS発症における、
Ca²⁺透過性AMPA型グルタミン酸受容体の関与。
第25回日本分子生物学会年会、(2002)、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

とくに予定はない。

厚生労働科学研究費補助金
(筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究班)
研究報告書

筋萎縮性側索硬化症における AMPA 受容体を介する神経細胞死のメカニズムに関する研究
ーサブユニット mRNA 分子変化からの解析ー

研究協力者 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助教授

研究要旨：AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性変化を引き起こす分子異常が ALS の病因に強く関連することを示してきたが、昨年度、脊髄運動ニューロンの AMPA 受容体 mRNA 発現量及び GluR2 サブユニット比率は ALS と正常対照で有意差を認めないことを報告し、GluR2 RNA 編集異常が特異的に関与していることを考察した。本研究では、GluR2 RNA 編集異常が選択的に運動ニューロンの細胞死を引き起こすメカニズム、および GluR2 RNA 編集率が低下するメカニズム解明を目的とした。単一ニューロン組織を用いた AMPA 受容体各サブユニット (GluR1～GluR4) の定量 RT-PCR では、脊髄運動ニューロンにおける AMPA 受容体発現量レベルおよび GluR2 の占める割合は他のニューロン種に比し有意に低く、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率低下が脊髄運動ニューロンをより選択的に障害することを考察した。編集酵素 (ADAR1～ADAR3) の発現レベル定量ではそれぞれが脳内で不均一な分布を示すこと、GluR2、GluR5、GluR6 の Q/R 部位の編集率測定の結果からは、ヒト白質では GluR2 の Q/R 部位編集が落ちていること、それが ADAR2 mRNA レベルに相関することが明らかになり、ADAR2 の発現量の変化が GluR2 の RNA 編集異常を引き起こすことを示した。

A. 研究目的

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 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 GluR2 が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、さらに GluR2 は転写後編集を受け初めて AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性が変化する。すなわち、AMPA 受容体は 4 量体のサブユニット構造をとるが、構成サブユニットに RNA 編集を受けた GluR2 を含む場合には Ca^{2+} 非透過性であるが、編集された GluR2 を含まない場合には Ca^{2+} 透過性が高くなる。

我々は、ALS では GluR2 サブユニットの RNA 編集異常があることを報告し、この分子変化がノックアウト動物で神経細胞死を引き起こすこと^{2,6}などから神経細胞死の一時的な原因であり、ALS の病因と深く関わる可能性が高いことを示したが⁸、GluR2 サブユ

ット mRNA 発現レベルは十分な検討がなく、AMPA 受容体サブユニット構成の変化が病因とどう関わっているかは必ずしも明らかではない。

本報告では、ヒト単一ニューロンから切り出した組織における AMPA 受容体サブユニット GluR1～GluR4 の mRNA 発現レベルを定量 RT-PCR により測定し、AMPA 受容体サブユニット構成比から AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性の高低を各種神経サブセットごとに推定し、脊髄運動ニューロンの特異性考察すること、ALS 運動ニューロンにおける変化の有無を単一運動ニューロンレベルで検討すること、GluR2 RNA 編集率と編集酵素の発現レベルの関係を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

剖検時凍結保存した ALS および正常剖検脳脊髄より、昨年報告したと同様、laser microdissector (浜松フォトニクス) を用いて単一ニューロンを切り出し (小脳プルキンエ細胞、大脳皮質錐体細胞、脊髄運動ニューロン、後角ニューロン)、total RNA を抽出した。蛍光プローブを用いたプライマーにより LightCycler (Roche Diagnostics) を用

いて定量 RT-PCR を GluR1~GluR4 につき行った。量比はアクチンに対するコピー数で表した。

正常対照大脳皮質、白質（脳梁）、小脳、小脳白質、脊髄灰白質、前索、後索の組織から同様の方法で total RNA を抽出し、Q/R 部位を持つ GluR2、GluR5、GluR6 について定量 RT-PCR をおこなった。RNA 編集酵素である adenosine deaminases that act on RNA (ADARs) についても特異的プライマーペアを用い、同様の方法で定量 RT-PCR を行い、組織における発現レベルを検討した。また、Q/R 部位の RNA 編集率を、編集部位を特異的に認識する制限酵素 Bbv-1 での消化の有無で検討した。

（倫理面への配慮）

剖検組織の使用にあたっては、原則研究倫理委員会の承認の下文書によるインフォームドコンセントを得られた試料を用いた。匿名性に留意し、病的に確定診断のついた症例のみを用いた。

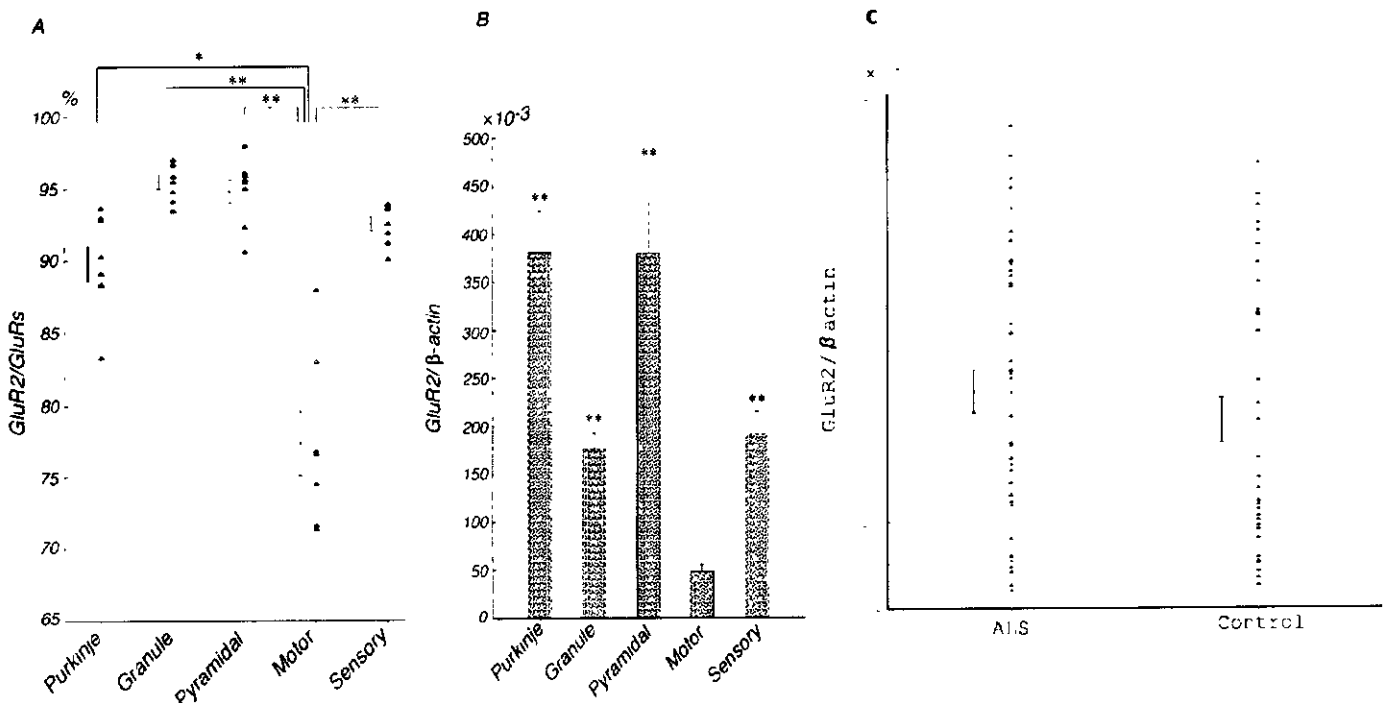
C. 研究結果

正常対照の単一ニューロン組織を用いた検討では、脊髄運動ニューロンは、小脳プルキンエ細胞、大脳錐体細胞、脊髄後角細胞のいずれに比べても、AMPA 受容体サブユニット

ト mRNA 発現レベル、GluR2 の割合とも有意に低かった（図 A,B）。脊髄運動ニューロンは、10 個の細胞を同一切片から集めた組織により検討したが、発現量、GluR2 比とも ALS と正常対照で差はなかった（図 C）。GluR2 は脊髄運動ニューロンでも全サブユニットの70%以上、その他の神経種では80%以上を占めていた。

組織における ADAR 発現パターンは、ADAR1 はやや灰白質の方が白質より発現レベルが高い傾向があるが瀰漫性に発現していたのに対し、ADAR2 では灰白質有意の発現、ADAR3 では白質有意の発現であった。対 β -アクチンレベルで発現レベルを比較すると、灰白質では ADAR1, 2 の 1/10 のレベルであった。

Q/R 部位をもつ GluR2、GluR5、GluR6 の発現レベルは対 β -アクチンで 100:1:10 の割合であり、脳組織では GluR2 が大多数を占めていた。GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は、灰白質ではほぼ 100% に保たれていたのに対し、検索したいずれの白質組織でも 100% に達しなかった（81-94%）。ADAR2/GluR2 比と GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の相関をとると、RNA 編集率が 100% 未満の組織では ADAR2/GluR2 比が 20×10^{-3} 以下であることが分かった。



D. 考察

単一ニューロンにおける AMPA 受容体サブユニット構成を定量的に測定した報告はヒト脳では初めてのものである。動物における報告 (2.1-63%)^{1,3,5,7,9}と比較して GluR2 mRNA の占める割合が高いのは、動物種による違い、細胞種の違い (培養細胞と凍結組織)、測定方法 (共通プライマーによる RT-PCR と Real time 定量 PCR) などの可能性があるが、類似した方法による結果は我々の結果により近い値を出している³、方法の違いによる影響の可能性が高いと考えられる。脊髄運動ニューロンで AMPA 受容体サブユニット mRNA 発現レベルおよび GluR2 の AMPA 受容体サブユニットに占める割合とも他のニューロン種より有意に低いことは、最近の知見からは GluR2 RNA 編集低下による障害を受けやすくより脆弱であると考えられる。すなわち、GluR2 Q/R 部位の編集の有無により細胞内小胞体からシナプス後膜への trafficking が異なり、非編集の GluR2 はより速やかに膜に integrate されるといふ⁴。このメカニズムが働いているとすると、僅かではあっても非編集 GluR2 は機能的 AMPA 受容体を構成し、神経細胞死を引き起こす⁴と考えられる。

ALS の運動ニューロンには AMPA 受容体構成サブユニット上の変化はみられないことを初めて明らかにした。単一ニューロン組織を用いての定量 RT-PCR であり、PCR 産物の陽性率も ALS と正常対照で異ならなかったことから、残存する運動ニューロンでは有意差がないといえる。

以上のことは、GluR2 mRNA の Q/R サイトでの RNA 編集低下⁸により病変の選択性も説明し得、この分子変化が ALS の病因に深く関わっていることを示唆し、その分子メカニズムを解明する必要がある。

GluR2 Q/R 部位の編集がヒト脳白質では必ずしも 100% でなかったことは、灰白質、白質とも 100% に保たれる動物脳での知見と異なり、動物種差を表しているのかもしれない。また、編集酵素の発現レベルとの関連では、GluR2 の RNA 編集が ADAR2 mRNA 発現レベルと相関していることが明らかになり、3種の二重鎖 RNA 編集酵素の中 ADAR2 が特異的に関与していることが示唆される。今後、ALS にみられる編集低下が ADAR2 の発現レベルとどう関連するかを検討していく必要がある。

文献

1. Brorson, J. R., Zhang, Z. & Vandenberghe, W. *J Neurosci* **19**, 9149-59 (1999).
2. Brusa, R., Zimmermann, F., Koh, D. et al. *Science* **270**, 1677-1680 (1995).
3. Dai, W. M., Egebjerg, J. & Lambert, J. D. *Br J Pharmacol* **132**, 1859-75 (2001).
4. Greger, I. H., Khatri, L. & Ziff, E. B. *Neuron* **34**, 759-72 (2002).
5. Greig, A., Donevan, S. D., Mujtaba, T. J. et al. *J Neurochem* **74**, 179-91 (2000).
6. Higuchi, M., Maas, S., Single, F. et al. *Nature* **406**, 78-81 (2000).
7. Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P. et al. *Neuron* **9**, 247-58 (1992).
8. Takuma, H., Kwak, S., Yoshizawa, T. et al. *Ann Neurol* **46**, 806-815 (1999).
9. Vandenberghe, W., Robberecht, W. & Brorson, J. *J Neurosci* **20**, 123-132 (2000).

E. 結論

ヒト中枢神経でニューロンにおける AMPA 受容体サブユニットの発現比率を初めて定量的に示した。特に単一脊髄運動ニューロンは他のニューロン種に比べ AMPA 受容体発現レベル、GluR2 比率とも有意に低いことが明らかになり、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常により脊髄運動ニューロンが特異的に脆弱になるメカニズムと考えられた。GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は ADAR2 の発現レベルが関与していることが明らかになった。ALS の病因には、GluR2 の RNA 編集の変化が深く関わっている可能性が高まった。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kawahara Y, Kwak S, Sun H, Ito K, Hashida H, Aizawa H, Jeong S-Y, Kanazawa I: Human spinal motoneurons express low relative abundance of GluR2 mRNA: An implication for excitotoxicity in ALS. *J Neurochem*, in press, 2003

- (2) 郭 伸：筋萎縮性側索硬化症、657 頁-662 頁（総編集：亀山正邦、高久史麿、今日の診断指針 第5版、医学書院、東京）2002
- (3) 郭 伸：筋萎縮性側索硬化症・運動ニューロン疾患、臨床医学の展望「神経病学—血管系を除く」、金澤一郎、日本医事新報、4068：6-8、2002
- (4) 河原行郎、郭 伸：筋萎縮性側索硬化症における AMPA 型受容体異常、Brain Medical、14:55-62、2002.

2. 学会発表

- (1) 河原行郎、他：筋萎縮性側索硬化症脊髄運動ニューロンの AMPA 受容体発現パターン、第 43 回日本神経学会総会、2002. 5.31. 札幌
- (2) Kwak S, Kawahara Y, et al: Deficient GluR2 mRNA editing causes AMPA receptor-mediated neurotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis, 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Kanagawa, 5 October 2002
- (3) Kawahara Y, Kwak S, et al : AMPA receptor subunit expression profile in

spinal motoneurons of normal humans and ALS patients, 15th Naito Conference on Molecular Biological Approaches for Intractable Diseases [III], Kanagawa, 5 October 2002

- (4) Kawahara Y, Kwak S, et al : AMPA receptor subunit expression profile in spinal motoneurons of normal humans and ALS patients. The 13th International Symposium on MND/ ALS, Melbourne, 17-19. November 2002
- (5) Kawahara Y, Kwak S, et al : Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain, the Gordon Research Conference on RNA EDITING, Ventura, California, 19-24 January 2003

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

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

ミトコンドリア膜保護剤による筋萎縮性側索硬化症の予防治療に関する研究

吉良幸美 佐藤英介 井上正康

大阪市立大学大学院医学研究科 分子病態学講座

研究要旨 FALS 変異 SOD は活性酸素産生の主座であるミトコンドリア及びペルオキシソーム膜への親和性が低下し、これによりミトコンドリア局所での酸化障害が引き起こされる可能性を見いだした。この可能性を検証するために、FALS モデルマウス(G93A-SOD1 トランスジェニックマウス)を用いてミトコンドリア病態を解析した。また、ミトコンドリア膜保護作用を有するカルニチンが本病態マウスの神経・筋機能を保護し、筋細胞のアポトーシスを抑制し、寿命延長効果があることを明らかにした。

A. 研究目的

FALS の発症に Cu,Zn-SOD (SOD1)の点突然変異が関与することが判明したが、その病態発症の分子機構及びその治療法は確立されていない。我々はこれまで SOD1 の細胞内局在と酸化障害の関係に注目し正常 Cu,Zn-SOD がミトコンドリアやペルオキシゾームなどに濃縮局在していること、および変異 SOD では両膜への結合性が低下していることを明らかにした。本疾患は他の臓器に比較してミトコンドリア依存性の高い神経や骨格筋が特異的なターゲットとなることから、FALS ではミトコンドリア局所での活性酸素病態が増強し、アポトーシスを誘起する可能性を示唆した。さらに、ミトコンドリア依存性アポトーシスでは、長鎖脂肪酸が重要であることを解明し、FALS にも長鎖脂肪酸毒性が関与している可能性が示唆された。本研究では、FALS におけるミトコンドリア障害の関与、及び長鎖脂肪酸をエネルギーに変換するカルニチンによる治療効果を検討した。

B. 研究方法

1. G93A FALS-Tg の肝より分離したミトコンドリアの活性酸素産生について検討した。また脊椎および筋の酸化障害について脂質過酸化物質(4-HNE)及び8OH-dGを経時的に解析した。
- 2.カルニチン(400 mg/kg/day)を含む飲水を Tg に与え、運動能力、発症時期、進行速度、及び寿命に対するカルニチンの作用を検討した。
3. カルニチン投与群及び非投与群(8.5ヶ月齢)の酸化障害の程度及び細胞死の状態を生化学的に解析した。
(倫理面への配慮)
動物の扱いに関しては、本学動物実験規定に従った。

C. 研究結果

- (1) FALS Tg の活性酸素産生及び酸化障害の解析
Normal 及び発症後の Tg の肝より分離し

たミトコンドリアからの O_2^- の産生を化学発光法により比較したところ、Tg は Normal に比較し優位に O_2^- 産生が上昇していた。また発症後の脊椎と腓腹筋の脂質過酸化を検討した結果、進行に伴い過酸化レベルが上昇していた。また、DNA の酸化障害マーカーである 8OH-dG レベルも上昇していた。

(2) カルニチンによる治療効果

Tg にカルニチン (400 mg/kg/day) を飲水摂取させ、ロタロッドによる運動能力の評価、発症時期、進行速度、寿命に対する影響を検討した。カルニチン投与群では運動能力の低下時期はコントロールに比較して約 1 ヶ月半も遅延し、寿命も約 1 ヶ月延長した。

(3) カルニチン治療効果の生化学的解析

カルニチン投与群及び非投与群の Tg 8.5 ヶ月齢の筋・脊椎を解析した結果、カルニチン治療群では脂質過酸化の抑制、筋細胞のアポトーシス抑制効果が見られた。

D, E. 考察及び結論

現在までに FALS 患者で見られた変異部位は SOD 分子の立体構造に影響する特性が強く、変異 SOD1 の多くは分子構造特性が変化していることが示唆される。SOD による O_2^- の細胞内消去反応は拡散律速で起こらなければならない。したがって、本研究で見いだしたごとく、SOD1 が活性酸素産生の主座であるミトコンドリアやペルオキシゾーム膜表面に結合局在化していることは極めて重要である。これにより、両オルガネラから細胞質側にリークしてくる O_2^- をその膜表面で効率良く消去していると考えられる。FALS の変異 SOD1 のオルガネラへの結合能が低下していることより、変異 SOD1 の局在性変

化が細胞内 O_2^- の消去不全を誘起し、活性酸素傷害が蓄積しうる可能性が示唆された。実際、FALS モデルマウスのミトコンドリアからはコントロールに比較し多量の O_2^- が産生されておりその時期の骨格筋や脊椎では酸化障害マーカーが優位に上昇していた。

また本研究では、神経細胞のミトコンドリア依存性アポトーシスを抑制するカルニチンをモデルマウスに経口投与する予防治療実験でその臨床病態が著明に軽減することも判明した。この所見は、FALS 患者でもカルニチンの保護作用をテストしてみる意義があることを示唆する。今後、この点に注目し、病態動物モデルおよび FALS 患者におけるさらなる病態軽減法を開発したい。

F. 健康危機情報：特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kira Y, Sato E et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 399 : 96-102, 2002.
2. Chang B J, Nishikawa M et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 405 : 55-64, 2002.
3. Nishikawa M, Nshiguchi S et al., *Cancer Research.* 61: 1843-1845, 2001.
4. Inoue M, Sato E et al., *Free Rad. Res.* 33: 757-770, 2001.
5. Nishikimi A, Kira Yet al, *Biochem J.* 356: 621-626, 2001.

2. 学会発表

1. 吉良幸美. 筋萎縮性側索硬化症におけるミトコンドリア障害の解析及びカルニチンによる治療効果の検討. 第 24 回日本フリーラジカル学会 (2002 年 5 月, 大阪) 他

・厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）研究報告書
「筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関する新規治療法の開発に関する研究」

ALS 遺伝子治療の基礎実験—AAV ベクターによる骨格筋への遺伝子導入の血清型による相違

研究協力者 中野 今治 自治医科大学

【研究要旨】

これまでに、筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する遺伝子治療として、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用して骨格筋に神経栄養因子 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の遺伝子を導入し、軸索を通して運ばれた GDNF により脊髄の運動神経細胞の脱落を抑制する方法を開発してきた。霊長類の AAV のうちヒトを自然宿主とするものは、2、3、5 型(AAV2、AAV3、AAV5)があるが、遺伝子導入用のベクターとして通常使用されている AAV2 では、heparan sulfate proteoglycan (HPS)との親和性が強いために、HPS の発現の多い slow fiberの方が fast fiber よりも遺伝子導入しやすいと報告されている。本研究では AAV2 とは capsid 蛋白の異なる AAV3 および AAV5 に由来するベクターが、骨格筋への遺伝子導入において AAV2 ベクターより優れた特性を示すかどうか検討する。

共同研究者：

吉村まどか¹⁾、永田三保子¹⁾、村松慎一¹⁾

水上浩明²⁾、小澤敬也²⁾

所属：1) 自治医科大学神経内科、

2) 自治医科大学遺伝子治療研究部

【材料と方法】

AAV2、AAV3、AAV5 のそれぞれについてマーカーとして LacZ 遺伝子を組み込んだ組み替え AAV ベクターを作製した。dot blot で力価を計測し、同時に 293 細胞で生物学力価を測定した。この方法で得られた AAV2、AAV3、AAV5 各 1.0×10^{12} genome copies/ml を各 $50 \mu\text{l}$ 、3 週、5 週、8 週齢の ICR マウス右後脚に筋注した。2 週間後に屠殺し、LacZ 染色と抗 slow 抗体による免疫染色を行った。slow fiber と遺伝子導入された筋線維との関連を連続切片で検討し、AAV2 と比較した。また、GDNF の遺伝子を搭載した AAV2 および AAV3 ベクターを作製し、マウス骨格筋での GDNF 発現量を ELISA 法により定量し比較した。

【結果】

腓腹筋では AAV2、AAV3、AAV5 の 3 者ともほぼ同様に効率よく LacZ の発現が認められた。辺縁の相対的にベクター濃度が低いと予想される部位では染色性が低下し、LacZ 陽性細胞は散在して認められた。そのような部位を詳細に検討すると、3 週令のマウスにおいて、AAV2 と AAV3 では LacZ 染色陽性線維は slow fiber に多かった (図 1)。5 週及び 8 週齢のマウスは、AAV2 では slow

fiber に比較的入りやすい傾向があったが、AAV3、AAV5 では、同様の部位でも LacZ 陽性細胞はどちらのタイプにも認められ、slow fiber と fast fiber で明らかな差は認められなかった (図 2)。AAV2 と AAV3 の GDNF の発現量には有意差はなかった (図 3)。

【考察】

AAV ベクターは、骨格筋への遺伝子導入用ベクターとして現在最も有力と考えられている。その理由としては、野生型の AAV は非病原性のため安全性において優れていること、骨格筋基底膜の約 40nm の pore より小さく、高い遺伝子導入効率が示すこと、炎症反応がほとんどなく長期間の発現が得られることが挙げられる。

AAV3 と AAV2 では、capsid 蛋白の塩基配列の 87% が一致しているが、プロモーター領域の塩基配列の相違もあり、AAV2 では遺伝子導入されない巨核球・赤芽球系細胞にも AAV3 は遺伝子導入可能である。AAV5 は、AAV2 との相同性が capsid については 57% しかなく、AAV2 で親和性を指摘されている HPS との結合が見られないなど異なった tropism を示す。骨格筋では、HSP が slow fiber において fast fiber よりも多く発現しているため、AAV2 ベクターでは slow fiber の方が fast fiber よりも遺伝子導入効率が高いことが報告されている。この傾向は今回の我々の結果でも確認された。AAV2 に比べて HSP の影響の少ない AAV3 および AAV5 を使用した遺

伝子導入では、AAV3 では成獣で、AAV5 では週令に関係なく、slow fiber および fast fiber で効率の相違は認められなかった。このことから、成熟筋細胞に対する遺伝子治療で AAV3 や AAV5 をベクターとして使用する場合、slow fiber の多少や疾患による筋線維の特定のタイプの変化によらず遺伝子導入をはかれる利点があると考えられ、臨床応用の際により実際的である事が期待される。ALS では、slow fiber より fast fiber の障害が目立つ場合が多いとの報告があり、初期に fast fiber への GDNF の遺伝子導入を行う治療が望ましいと考えられるが、その際には、AAV2 ベクターよりも

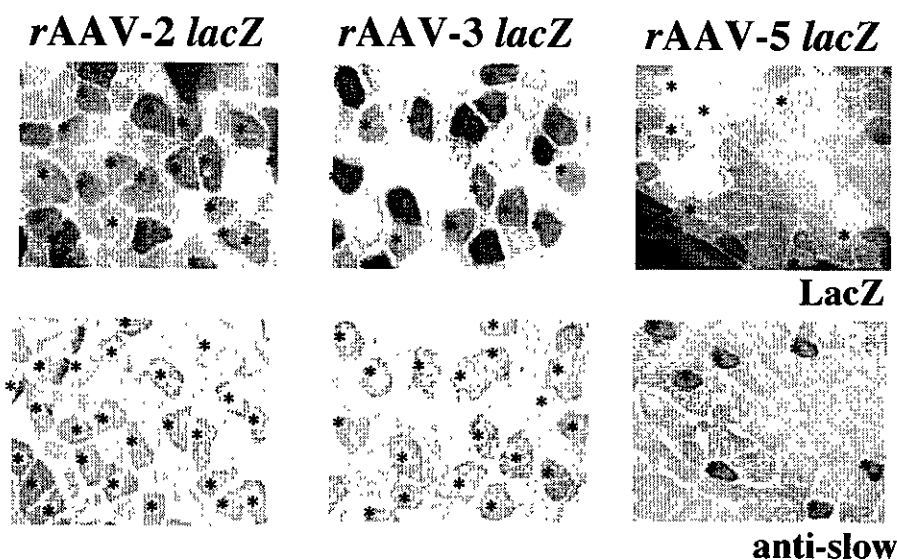
AAV3 ベクターや AAV5 ベクターの方が有用である可能性がある。

【結論】

ALS の遺伝子治療用ベクターとして従来使用されている AAV2 ベクターと異なる血清型の AAV3 および AAV5 に由来するベクターについて、マウス骨格筋への遺伝子導入効率を筋線維型別に比較検討した。成獣においては、AAV3 および AAV5 ベクターによる遺伝子導入は、slow fiber および fast fiber で差がなく、slow fiber に入りやすい AAV2 よりも有用であると考えられる。

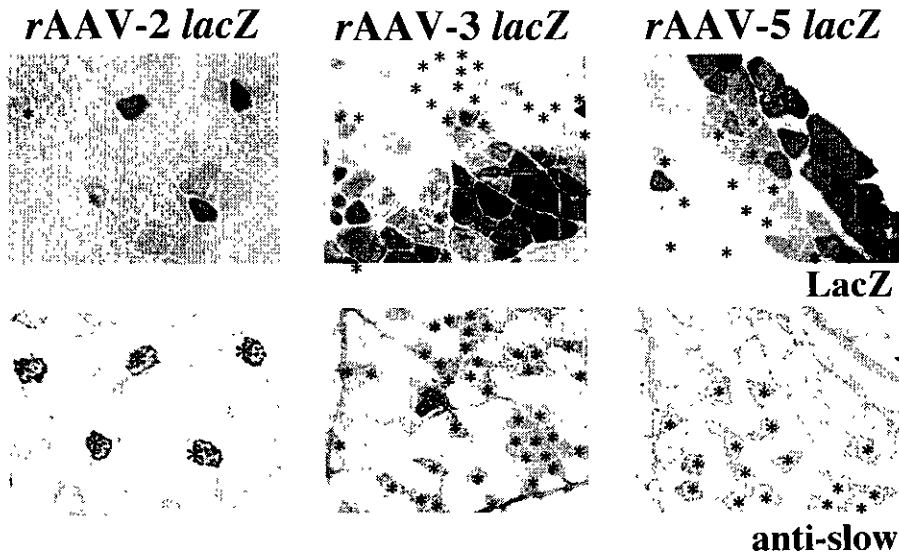
図 1

3 week-old mice



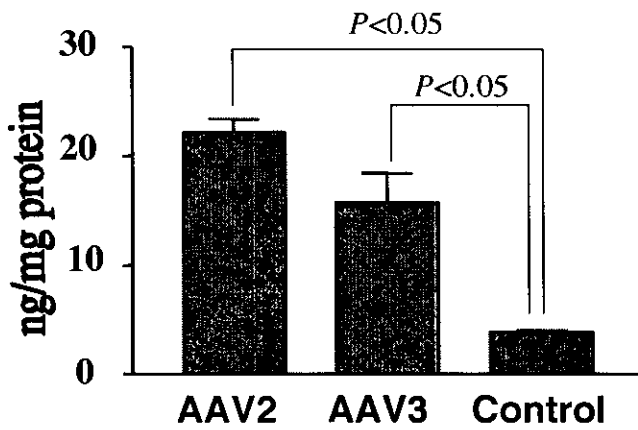
☒ 2

5 week-old mice



☒ 3

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)



変異SOD1の安定性とLBI形成—ヒトFALSとモデルマウスでの検討

研究協力者 佐古田三郎 大阪大神経内科教授
藤村晴俊、隅 寿恵、山本洋一、深田 慶 大阪大神経内科
加藤信介 鳥取大神経病理

研究要旨

SOD1関連家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)における変異SOD1の安定性とLewy body-like hyaline inclusion (LBI) の出現頻度との関連に注目して、ヒトFALS剖検例とマウスモデルの両者において、生化学的、病理学的比較検討を行った。3例のFALS 剖検例の赤血球/脊髄では、変異SOD1と正常SOD1がG37R例では1 : 2、C111Y例では1 : 1の比率で認められたのに対し、L126*例では変異SOD1は認められなかった。G37RとC111Yは安定型変異、L126*は不安定型変異と考えられた。病理学的にはLBIは、G37R例(経過9年)ではほとんど認められず、C111Y例(経過6年)では脳幹運動核に少数のみ認めた。一方、L126*例(経過2年)では脊髄、脳幹の下位運動ニューロンに多数認められた。LBIは臨床的経過年数とは無関係に、不安定型に特徴的に出現する構造物であると考えられた。次にG93A SOD1マウスと、G93Aとヒト正常SOD1の重複ミュータント(G93A/WT)を有するマウスとの比較検討では、G93A/WTの方がG93Aよりも脊髄における変異SOD1量が著明に増加しており、臨床的に発症の早期化、罹病期間の短縮、といった症状の重篤化を示した。病理学的にはLBIの出現頻度は、G93A/WTではG93Aの約半数に減少していた。この結果は、本来安定型のG93Aが、導入した正常SOD1により安定化されることで、マウス脊髄における神経毒性作用を増強する一方、LBIの形成を抑制したと考えられる。すなわち、マウスにおいてもLBIの形成は、変異SOD1の安定性によって規定されると考えられた。

目的

SOD1遺伝子に関連する家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)に特異的な病理学的指標の1つとして、残存下位運動ニューロンにおけるLewy body-like hyaline inclusion (LBI)の出現が知られている。LBIがいかなる形成機序で生じるのか、また変異SOD1のいかなる神経毒性に関連した構造物であるのかは明らかでない。さらにLBIの出現頻度と種々の変異SOD1との関係は全く不明である。著者らはこれまで変異SOD1の安定性と病理像の関連をヒトFALSおよびモデルマウスで検討してきたが、今回これらのまとめを行い報告する。

ヒトFALS症例

症例1はG37R変異を有する42歳男性で、上肢筋力低下で発症、6年で人工呼吸管理を要し、全経過9年で肺炎のため死亡した。症例2はC111Y変異を有する65歳男性で、下肢筋力低下で発症、2年で人工呼吸管理を要し、全経過6年で十二指腸癌による出血、多臓器不全のため死亡した。症例3はコドン126における2塩基対欠失(L126*)を

有する44歳女性で、下肢筋力低下で発症、1年半で人工呼吸管理を要し、全経過2年で肺炎のため死亡した。

マウスモデル

G93A SOD1とヒト正常SOD1の重複transgenic (Tg) マウス(G93A/WT)を用い(昨年の本学会議で報告、n=3)、G93Aマウス(n=3)を対照に比較検討した。

方法

1. 変異SOD1の質量分析

HPLC/ESIMS (electron spray ionization mass spectroscopy)法により、ヒト例の末梢赤血球および、ヒトおよびマウスの凍結脊髄組織を用い、変異SOD1と正常SOD1の相対的質量比を計測した。

2. 病理学的検索

ヒトFALS

1)の各症例で大脳皮質1次運動野(傍矢状部)、中脳(黒質、III、IV核)、脳幹(青斑核、V運動核、橋核、VI核、VII核、疑核、XII核)、小脳(皮質、歯状核)、脊髄4レ

ベル (C8、Th8、L5、S2での前角、クラーク柱、中間質外側核、Onuf核) を対象に、これらの構造物を含む4 μm厚パラフィン切片を作成、HE染色およびユビキチン、SOD1に対する抗体を用いて、SAB法にて免疫組織染色を行った。

2) 各構造物におけるLBIの出現頻度を、半定量的に - (なし)、+ (数切片に1つ)、++ (毎切片に少数)、+++ (毎切片に多数) の4グレードに評価した。

マウスモデル

1) G93AおよびG93A/WTマウスのそれぞれにおいて、ALS様症状発症後末期に経心的に4% PFAで灌流固定し、摘出した脊髄組織を一晩浸漬固定した後パラフィン包埋し、腰髄膨大部の4 μm厚切片を作成した。

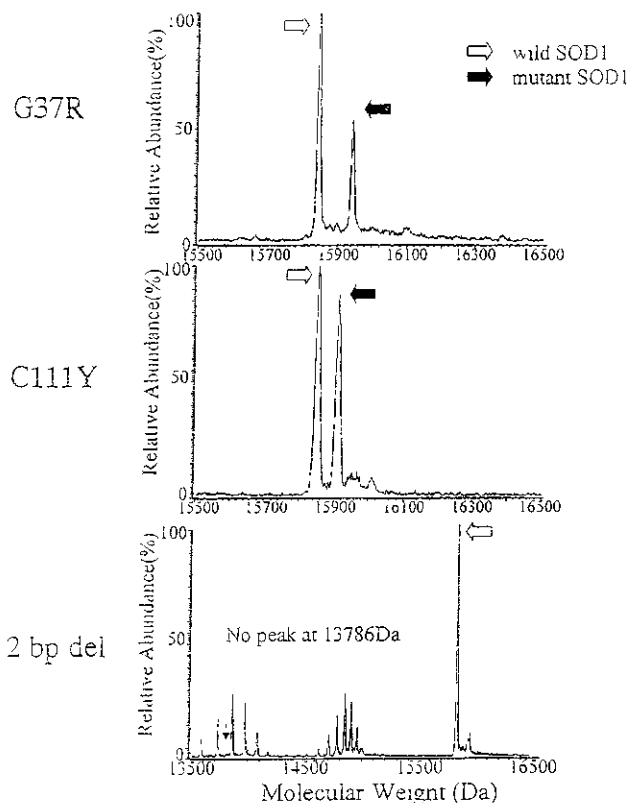
2) 各個体で50~100 μm間隔、7組の切片にHE染色を施し、それぞれ隣接切片にユビキチン、およびSOD1に対する抗体を用いての免疫組織染色を行った。

3) これらを用い一切片あたりの平均残存前角ニューロン (短径20 μm以上) 数、LBIの個数、前角の空胞 (直径10 μm以上) 数を算定した。

結果

変異SOD1の質量分析

ヒトFALS例の結果を示す。



G37R例では赤血球のみを分析し、変異SOD1が正常SOD1に対し1:2の比率で認められた。C111Y例では凍結脊髄のみを分析し、変異SOD1と正常SOD1が1:1の比率で認められた。L126*例では赤血球、脊髄ともに変異SOD1は全く同定できなかった。以上より、G37RとC111Yの変異SOD1は安定型、2塩基対欠失は不安定型と考えられる結果を得た。

マウス脊髄における分析では、G93Aマウスでは脊髄の変異SOD1濃度は1.66±0.89であったのに対し、G93A/WTマウスでは7.05±1.87と著明に増加しており、正常ヒトSOD1の導入による変異SOD1の安定化の効果が推測された。これは臨床的にG93A/WTマウスの方がG93Aマウスよりも発症時期が早く、罹病期間が短い経過に対応するものと考えられた。

ヒトFALS例の病理学的検索結果 (表)

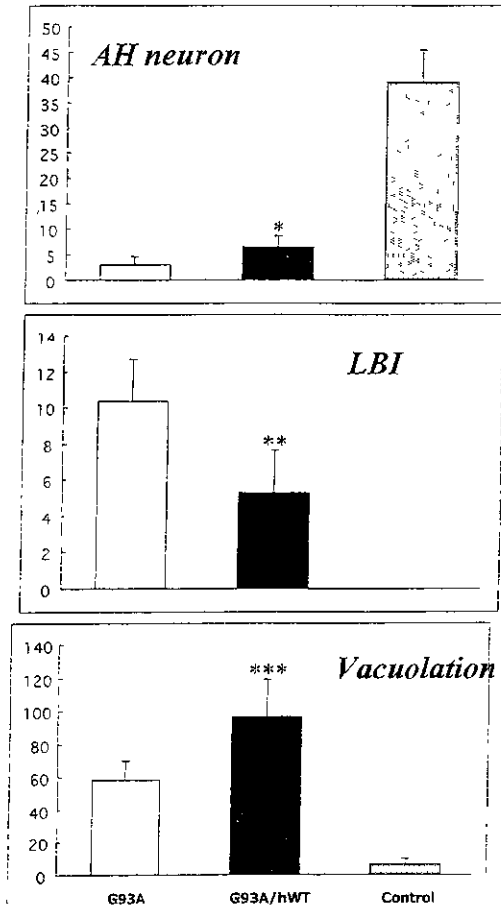
G37R例 (経過9年) では、LBIは脊髄前角のみに極めて少数のみ見られ、他の部位には全く見られなかった。C111Y例 (経過6年) では、LBIは脊髄には少数のみ見られ、脳幹の運動核に少数見られた。L126*例 (経過2年) では、LBIは脊髄および脳幹の下位運動ニューロンに極めて多数認められた。

表 LBIの出現頻度

	Patient 1 (G37R)	Patient 2 (C111Y)	Patient 3 (L126*)
precentral gyrus	-	-	nd
substantia nigra	-	-	-
III nucleus	-	+	+
IV nucleus	-	++	-
locus ceruleus	-	-	-
V motor nucleus	-	+	-
VI nucleus	-	++	-
VII nucleus	-	-	-
pontine nucleus	-	-	-
ambiguous nucleus	-	-	-
dorsal vagal nucleus	-	-	-
XII nucleus	-	+	+++
cerebellar cortex	-	-	nd
dentate nucleus	-	-	nd
spinal AHC	+	+	+++
Clarke's column	-	-	+++
IML column	-	-	+
Onuf's nucleus	-	-	+

Lewy body-like hyaline inclusionの頻度 - (なし)、+ (数切片に1つ)、++ (毎切片に少数)、+++ (毎切片に多数)、nd (検査せず)

マウスモデルでの病理学的検索結果
平均残存前角ニューロン（短径20 μ m以上）
数は、G93A/WTマウス、G93Aマウスとも
に激減していたが、G93A/WTマウスの方が
G93Aマウスよりも有意に多かった。LBIの
一切片あたりの平均出現個数は、G93A/WT
マウスはG93Aマウスの約半数に減少してい
た。前角の空胞の一切片あたりの平均出現
個数は、G93A/WTマウスの方がG93Aマウ
スよりも約2倍に増加していた。



考 察

従来、ヒトFALSに特異的な病理学的指標の
1つとして、残存下位運動ニューロンにお
けるLBIの出現が知られている。FALSでは
これ以外に、細胞体内のニューロフィラメ
ント封入体(neurofilamentous coglomerate; NC)
が見られる例があるが、LBIとNCはそれぞ
れいかなる形成機序で生じるのか、また変
異SOD1のいかなる神経毒性に関連した構
造物であるのかは明らかでない。さらにこ
れら封入体の出現頻度と種々の変異SOD1
との関係は全く不明である。本研究では、
異なったSOD1変異を有するFALSの3剖
検例において、赤血球および/または脊髄
における

変異SOD1をHPLC/質量分析により同定
することで、C111Y例とG37R例は安定型、
L126*は不安定型と考えられる結果を得た。
病理学的にはLBIは、G37R例（経過9年）
ではほとんど認められず、C111Y例（経過
6年）では脳幹運動核に少数のみ認めた。
一方、L126*例（経過2年）では脊髄、脳
幹の下位運動ニューロンに多数認められた。
これらの結果から、LBIは臨床的経過年数
とは無関係に、不安定型に特徴的に出現す
る構造物であると考えられた。次にG93A
SOD1マウスと、G93Aとヒト正常SOD1の
重複Tg (G93A/WT) マウスとの比較検討では、
G93A/WTの方がG93Aよりも脊髄における
変異SOD1量が著明に増加しており、臨床的
に発症の早期化、罹病期間の短縮、といっ
た症状の重篤化を示した。病理学的には
LBIの出現頻度は、G93A/WTではG93Aの約
半数に減少していた。この結果は、本来安
定型のG93Aが、導入した正常SOD1により
安定化されることで、マウス脊髄における
神経毒性作用を増強する一方、LBIの形成
を抑制したと考えられる。すなわち、マウ
スにおいてもLBIの形成は、変異SOD1の安
定性によって規定されると考えられた。今
後できる限り小コピー数の変異SOD1と正常
SOD1を重複して導入するマウスモデルでの
解析が、よりヒト生体内に近い環境での病
態解析に有用であると考えられた。

結 論

変異SOD1には安定型と不安定型があり、
LBIは不安定型に特徴的に出現する構造物
であると考えられた。またマウスモデルに
おいてもLBIの形成は、変異SOD1の安定性
により規定されると考えられた。

論文発表

Fukada K, Nagano S, Satoh M, Thoyama C, Nakanishi
T, Shimizu A, Yanagihara T, Sakoda S. Stabilization of
mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by
coexpressed wild SOD1 protein accelerates the disease
progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice.
Eur J Neurochem 14: 2032-2036, 2001

Inoue K, Fujimura H, Ogawa Y, Satoh T, Shimada K,
Sakoda S. Familial amyotrophic lateral sclerosis with a
point mutation (G37R) of the superoxide dismutase 1
gene: a clinicopathological study. *Amyotrophic
lateral sclerosis and other motor neuron
disorders* 3: 244-247. 2002

筋萎縮性側索硬化症の皮膚病変と galectin-1

山形大学医学部第三内科 和田 学 加藤 丈夫

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)において、褥瘡ができにくいなどの皮膚変化が生じることが知られている。私達は神経再生因子の galectin-1 が脊髄前角の腫大軸索に蓄積してくることを示し、ALS の病態に関与していることを報告した。一方、galectin-1 が ALS の皮膚変化と関係するかは不明であるため、今回、galectin-1 に対するポリクローナル抗体を用い、ALS(n=12)および疾患コントロール(n=10)の皮膚組織を免疫組織化学的に検討した。疾患コントロール群と比較し、ALS 皮膚において、galectin-1 の免疫反応陽性部位の面積は有意に低下していた($p=0.0016$)。ALS の皮膚において、膠原線維の形成過程における障害と Galectin-1 の低下が何らかの関係を有するものと考えられた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄前角に認められる腫大軸索は初期病変として重要と考えられる。私達は、ALS の腫大軸索に galectin-1 が蓄積し、電顕的に neurofilament と近接して存在していることを見出し報告した。また、ALS の特徴として皮膚の変化が挙げられるが、皮膚変化と galectin-1 との関係は不明である。今回私達は、galectin-1 に対するポリクローナル抗体を用い、ALS の皮膚を免疫組織化学的に検討し、皮膚の変化との関係について検討した。

B. 研究方法

●B-1. 対象

孤発性 ALS 12例(男性8例、女性4例、生検時の平均年齢 58.3 ± 5.2 才)及び疾患 コントロール 10例(男性5例、女性5例、生検時の平均年齢 60.1 ± 5.6 才)より、インフォームドコンセントを得た後に皮膚生検を行った。全例に

おいて左上腕より生検を行い、4%ホルムアルデヒド固定後、6 μm 厚のパラフィン切片を作成した。

(標本は帝京大学市原病院 神経内科 尾野精一先生より提供)

●B-2. 方法

a) 抗体

Recombinant human galectin-1 に対するポリクローナル抗体 (Gal-1; Horie H, *et al. J Neurosci.* 1999)を用い、以下の研究を行った。

b) Western blot

疾患コントロール 1例の生検皮膚は1% SDS/TBSで可溶化し、これにより得られた上清を15%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。その後、ニトロセルロース膜に転写後、Gal-1(0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)と反応させた。二次抗体を反応させた後、アルカリフォスファターゼ法により発色させた。

c) 免疫組織化学

皮膚組織は、脱パラフィン後、Gal-1(3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を用い、ABC法により、免疫染色した。

d) 免疫反応陽性部位の面積計測
 一切片において20ヶ所(350×240μm)を撮影後、免疫反応陽性部位面積をNIH-imageにより計測し、ALSおよび疾患コントロールの2群において比較検討した。

e) 2群間における免疫反応陽性部位面積の比較

Unpaired Mann-Whitney's U-testにより2群を検定し、 $p < 0.01$ を有意とした。

C. 研究結果

1. Gal-1の免疫反応の低下はALSの真皮乳頭層において著しかった。

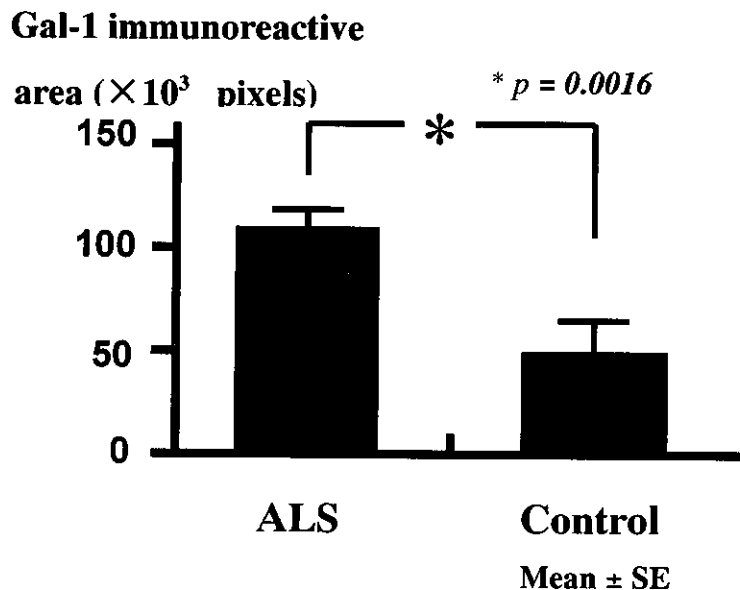
2. 皮膚真皮におけるgalectin-1の免疫反応陽性部位の面積は12例中10例においてコントロール群に比較し低下していた。

図. 2群間におけるGal-1免疫反応陽性部位の比較

3. 2群間における皮膚Gal-1陽性部位面積の比較検討から、ALSのGal-1陽性部位面積はコントロールに比較し有意に低下していた($p=0.0016$)(図)。

D. 考察

ALSにおける皮膚の変化は a) 膠原原線維 (collagen fibrils) の小径化 (Ono S, et al. *Neurology* 1986)、b) 真皮コラーゲンの量的減少 (Ono S, et al. *J Neurol Sci.* 1990)、c) コラーゲン間の架橋の変化 (架橋に関するhistidino-hydroxylysinoxonoleucineの減少) (Ono S, et al. *Ann Neurol.* 1992)、d) コラーゲンの可溶性が増加 (Ono S, et al. *Neurology* 1992)などが報告されており、皮膚変化と膠原原線維の異常が示唆されている。一方、皮膚におけるgalectin-1の局在については免疫組織化学、免疫電顕、In situ hybridizationから主にfibroblastに局在しているものが多いと考えられる(Akimoto Y, et



al. Cell Tissue Res. 1995)ことから、fibroblastでのgalectin-1の減少が皮膚変化の病態に関与しているものと考えられた。

E. 結 論

ALSの皮膚においてgalectin-1の免疫反応は低下していた。

Galectin-1は主に真皮のfibroblastに局在することから、コラーゲン及び膠原線維の小径化に関与しているものと推測された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Wada M, *et al.* Decreased galectin-1 immunoreactivity of the skin in amyotrophic lateral sclerosis.

J Neurol Sci. in press

2. 学会発表

和田 学、他5名

筋萎縮性側索硬化症皮膚病変におけるgalectin-1の免疫組織化学的研究
第43回 日本神経学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

脊髄運動ニューロンに対するニコチンの神経保護効果に関する研究

研究協力者 下濱 俊

京都大学医学研究科臨床神経学助教授

中溝知樹、神吉理枝、山下博史

京都大学医学研究科臨床神経学

川又 純

滋賀県立成人病センター研究所

研究要旨 ラット脊髄初代培養系に慢性的にグルタミン酸を曝露した際に認められる選択的運動ニューロン死がニコチンの投与により抑制された。ニコチン性アセチルコリン受容体作動薬の ALS 治療薬としての可能性が示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する有効な治療法が切望されている。本研究では、ラット脊髄初代培養系を用いてニコチンの運動ニューロン保護効果を解析し、ALS に対する新たな治療法の可能性について検討する。

B. 研究方法

胎生 16 日目のラット胎児より脊髄腹側を取り出し、トリプシン処理したあと、ピペッティングにて細胞を分散し、ポリエチレンイミンでコートしたカバースリップの上に撒いた。培養開始後 1, 4, 6, 8 日目に培地を交換し、11 日目にグルタミン酸+グルタミン酸トランスポーター阻害薬を含む培地に 24 時間曝露した。14 日目に固定し免疫染色に供した。SMI32 抗体を用いることにより、運動ニューロンを同定した。顕微鏡下で生存細胞数を計数し、無処置対照群に対する百分率としてその生存を評価した。

(倫理面への配慮)

動物は NIH の実験動物の使用に関するガイドラインを遵守して扱われた。

C. 研究結果

培養脊髄ニューロンを低濃度(10 μ M)のグルタミン酸とグルタミン酸トランスポーター阻害薬に 24

時間曝露すると、選択的運動ニューロン死が認められた。このとき培地中にニコチンを加えておくと、濃度依存性に、この運動ニューロン死が抑制された。この保護効果は $\alpha 4$ および $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬によって抑制された。脊髄切片の免疫組織化学的検討により、脊髄運動ニューロンには両受容体が分布していることが明らかとなった。

D 考察

我々はすでにニコチンが β アミロイド毒性や興奮性毒性から大脳皮質ニューロンを保護することを見出している。今回、脊髄運動神経においても、ニコチンが慢性グルタミン酸毒性から運動ニューロンを保護することができた。ニコチン性アセチルコリン受容体は 5 つのサブユニットからなる 5 量体で、 $\alpha 1 \sim 7$ 、 $\alpha 9, 10$ 、 $\beta 1 \sim 4$ 、 δ 、 ϵ 、 γ の計 16 のサブユニットが同定されている。中枢神経系においては $\alpha 7$ 、および $\alpha 4 \beta 2$ が主要な受容体である。このどちらもが神経保護効果に関与するという報告があるが、今回われわれの検討では、脊髄運動神経に関しては $\alpha 7$ 、および $\alpha 4 \beta 2$ の両方の受容体を解していることが示された。

ニコチンの *in vitro* での神経細胞保護効果の報告は数多くあり、*in vivo* においても、虚血モデルやパーキンソン病モデルでの保護効果の報告がある。臨床的にはパーキンソン病での喫煙と発症率との負の相関関係は明らかであり、アルツハイマー病にかん

しても少量の喫煙が発症を抑制することを示唆する報告がある。ALSに関しては、喫煙はリスクファクターであるとする報告が2つほどあるのみであるがタバコの成分がニコチンのみでないことを考えると、この結果は必ずしもALSに対するニコチン性アセチルコリン受容体刺激薬の有効性を否定するものではない。ALS患者の脊髄で早期よりコリン作動性シナプスが減少しているとの報告もあり、ALSとニコチン性アセチルコリン受容体との関連が示唆される。本研究の発展により今後、ニコチン性アセチルコリン受容体を解した保護効果を利用したALSに対する新しい治療法につながることを期待される。

E. 結論

ニコチンには運動ニューロン保護効果があり、ALS治療薬としての可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomoki Nakamizo, Jun Kawamata, Kohei Yoshida, Yuko Kawai, Rie Kanki, Hideyuki Sawada, Takeshi Kihara, Hirofumi Yamashita, Hiroshi Shibasaki, Akinori Akaike, Shun Shimohama Phosphodiesterase inhibitors are neuroprotective to cultured spinal motor neurons. *J Neurosci Res.* 2003 in press
- 2) Kume T, Asai N, Nishikawa H, Mano N, Terauchi T, Taguchi R, Shirakawa H, Osakada F, Mori H, Asakawa N, Yonaga M, Nishizawa Y, Sugimoto H, Shimohama S, Katsuki H, Kaneko S, Akaike A. Isolation of a diterpenoid substance with potent neuroprotective activity from fetal calf serum. *Proc Nat Acad Sci USA* 2002;99:3288-93.
- 3) Kawamata J, Shimohama S. Association of novel and established polymorphisms in neuronal nicotinic acetylcholine receptors with sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 2002;4:71-6.
- 4) Shimohama S, Kihara T. Nicotinic

receptor-mediated protection against beta amyloid neurotoxicity. *Biol Psychiatry* 2001;49:233-9

- 5) Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, Akaike A alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Biol Chem* 2001 ;276:13541-6

2. 学会発表

- 1) Nakamizo T, Shimohama S, Kawamata J, Kanki R, Sawada H, Kihara T, Yamashita H, Yoshida K, Kawai Y, Shibasaki H, Akaike A. Neuroprotective effects of phosphodiesterase inhibitors on cultured spinal motor neurons Society for Neuroscience, 32nd. Annual Meeting. Orlando, Nov. 2002
- 2) 中溝知樹, 下濱 俊, 神吉理枝, 山下博史, 本田和弘, 木原武士, 澤田秀幸, 柴崎 浩, 吉田耕平, 河合裕子, 赤池昭紀. ホスホジエステラーゼ阻害薬の培養脊髄運動ニューロンに対する保護効果. 第43回日本神経学会総会 札幌, 2002年5月
- 3) 神吉理枝, 中溝知樹, 山下博史, 澤田秀幸, 本田和弘, 木原武士, 下濱 俊, 柴崎 浩, 赤池昭紀 ミトコンドリア電子伝達複合体阻害剤による運動ニューロン障害の検討 第43回日本神経学会総会 札幌, 2002年5月
- 4) 川又 純, 中溝知樹, 下濱 俊, 柴崎 浩. アルツハイマー病における $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体の関与の検討 第43回日本神経学会総会 札幌, 2002年5月
- 5) 木原武士, 下濱 俊, 本田和弘, 澤田秀幸, 柴崎 浩, 赤池昭紀 β アミロイドによるPI3キナーゼの変化 第43回日本神経学会総会 札幌, 2002年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

いまのところ予定なし。