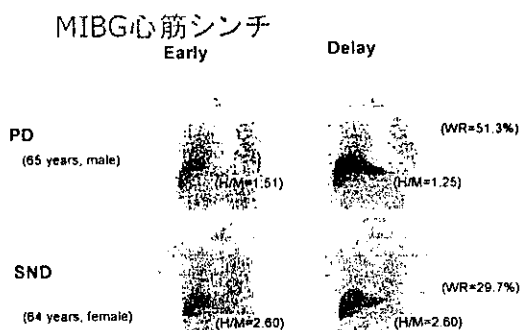


図 3



小脳萎縮に関連していたが、筋固縮は被核にのみ関連していた。起立性低血圧と中間質の細胞変性とは関連していた。

7. MSA の治療

MSA の治療としてまずパーキンソニズムに対しては L-Dopa + DCI と抗コリンを処方する。起立性低血圧には①OH を生じる可能性のある薬剤を中止し②水分・塩分摂取を増やす。③弾性筋縛帯、夜間頸部挙上④薬物治療（アメニウム、ミトドリン、ドロキシドパ、フロリネフ）と 4 つある。次に小脳症状には TRH 又はセレジストの処方。また運動療法もある。

排尿障害の治療としては原因が無緊張性膀胱の場合にはコリン作動薬であるベザコリン。無抑制膀胱には抗コリン薬であるプロバンサインを処方する。また利尿筋括約筋強調不全に関してはジアゼパムやモキシシリトを使う。残尿が 100ml 以上である場合は間欠導尿をする。睡眠時無呼吸症候群には気管切開をする。

9. MSA の病理

主な病理所見では神経細胞の脱落とグリオース（被殻・尾状核・淡蒼球外節・黒質・青斑核・下オリーブ核・橋核・小脳プルキンエ細胞・橋髄中間質外側核）が認められる。さらに特徴的な所見としてグリアと神経細胞の胞体内封入体が特徴的で全症例に認められる。無動症は黒質と被核の神経細胞脱落に関連していたが筋固縮は被核にのみ関連していた。また、小脳失調症はオリーブ核橋

PSP, CBDの臨床像と診断基準

森松光紀¹⁾

1) 山口大学医学部脳神経病態学 (神経内科)

要旨：2003年10月改定の特定疾患医療においてパーキンソン病関連疾患として進行性核上性麻痺 (PSP)，大脳皮質基底核変性症 (CBD) が承認された。世界およびわが国においてPSPの診断基準は概ね確立され、その正確度が判定されている。一方、CBDは臨床像の多様性から世界共通の診断基準は作成されていない。わが国では本研究班 (2001年度) においてCBD暫定診断基準を作成したのち班員施設で患者数を調査し、わが国の有病率を推定した。今後は、病態像をより明瞭にして、CBDの包括的な診断基準を確立すること、ならびにわが国のPSPとCBDについて信頼できる疫学調査を行うことが必要である。

はじめに

1999年度の本研究班 (田代邦雄班長) において、従来のPSPに加えて、パーキンソン病関連としてCBDが研究課題に取り入れられた。2000年度の班会議では、CBDに関して症候学的、生化学的、遺伝子的研究成績が報告されたが、それとともに患者数調査の必要性が指摘された。このためわれわれは、2001年度にCBD暫定診断基準を作成したのち班員施設における患者数 (過去の経験数) を調査した¹⁾。その後、同時期のPSP患者数を調査し、PSPとCBDの患者数比を推定した²⁾。わが国のPSP有病率は不明であるが、鳥取県におけるPSP疫学調査に基づきCBDの有病率を推定した³⁾。これらの実績に基づき2003年10月実施の厚生労働省特定疾患改定に際し、パーキンソン病関連疾患としてPSPとCBDが承認された。一方、PSPの診断基準については世界およびわが国においてほぼ完成している⁴⁾。2003年10月実施の厚生労働省特定疾患個人票では、CBD、PSPともに学術的な診断基準と比較して条件が緩和されているが、これは可能性のある患者をより多く抽出するためである。今回は、両疾患の症候と診断基準を解説するとともに、CBDの臨床的マーカーとして有用性が予想されるいくつかの検査成績について述べる。

1. 主要症候と診断基準

A. PSP

PSPは40歳以上で発症する緩徐進行性の神経変性疾患で、神経症候的に①核上性垂直性注視麻痺、②早期からの姿勢不安定 (易転倒性)、③パーキンソニズム (特に無動・筋強剛)、④痴呆、⑤偽性球麻痺 (構音・嚥下障害)、⑥錐体路徴候 (腱反射亢進、Babinski徴候)、⑦頸部後屈性ジストニー、⑧前頭葉徴候 (把握反射など)

がみられる。MRI所見では中脳被蓋萎縮、脳幹部萎縮、第3脳室拡大を認めるが、初期には明らかでないこともある。

本症の診断基準としては、米国 National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) および Society for PSP (法人; SPSP) の合同委員会で作成したものの (NINDS-SPSP基準) が世界的に用いられている⁵⁾。一方、わが国でもNINDS-SPSP基準を参考に、厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「神経疾患の予防・診断・治療に関する臨床研究班」 (湯浅龍彦班長) が全国患者調査のために新しい診断基準を作成し (表1)⁶⁾、国立療養所を対象として患者調査を行った。わが国の基準は、より広く患者を発見するためにNINDS-SPSP基準よりも条件が緩和されている。両診断基準について病理学的所見との対比からその正当性が検討された。NINDS-SPSP基準については、初診時 (発症後平均4年) の感度 (sensitivity) は “probable PSP” 50%、 “possible PSP” 83%であった。一方、特異度 (specificity) は “probable PSP” 100%、 “possible PSP” 93%であった⁷⁾。従って、本基準の “probable PSP” はほぼ確実に病理学的PSPであるが、排除されるPSP例も約半数あることになる。一方、湯浅班の診断基準についてPSP一次登録基準 (表1の判定 (1) (2) のいずれかに該当するもの) の感度89%、特異度87%であった。一方、同班の改訂基準 (表1の判定 (1) のみ) では感度83%、特異度97%であった。この結果から、改訂基準を満たすものを “probable PSP”、一次登録基準を満たすものを “possible PSP” とすることが提唱された⁸⁾。

2003年10月改定のパーキンソン病関連3特定疾患では上記の理由により、湯浅班 “possible PSP” 診断基準をほぼ認定基準として採用している (表2)。

表1 PSP 疫学調査のための診断基準案(湯浅班)⁴⁾

- ・大前提: 40歳以降の発症で、緩徐進行性であること
- (I) 主要症候:
- a. 垂直性核上性眼球運動障害
 - b. 発症早期(概ね1~2年)からの姿勢の不安定さや易転倒性
 - c. 体幹部や頸部に強い対称性の無動・強剛
- (II) 副症候, 検査所見:
- d. 進行性の構音障害や嚥下障害
 - e. 前頭葉性の徴候*を有する進行性の認知機能障害
(* 思考の緩慢, 抽象化や概念化の障害, 人格の変化, 把握反射, 探索反応, 模倣行動, 使用行動, 語彙の流暢性低下など)
 - f. 画像診断(CTあるいはMRI): 中脳被蓋部の萎縮, 脳幹部の萎縮, 第3脳室の拡大, のうちの1項目以上
- (III) 除外項目:
1. 著しく, かつ初期からの自律神経障害
 2. 著明な多発ニューロパチー
 3. 皮質性感覚障害やalien hand徴候
 4. 著しい非対称性
- (IV) 「特殊経過観察例」(診断未定あるいは非定型例であっても主治医がPSPを強く疑う症例):
- a. 純粋無動症に属するもの
 - b. ほぼ純粋に易転倒性を呈するもの
 - c. レボドパが著効するもPSPが疑われる例
 - d. 小脳症状で発症し, その後PSPが疑われる例
 - e. その他非典型的な徴候を伴うが, 主治医がPSPと判断する例
- ・判定: 除外項目に抵触せず, 大前提を満たすもので,
- (1) 上記a, b, cのうち3項目を満たすもの
 - (2) 上記a, b, cのうち2項目と, d, e, fのうちの1項目以上を有するもの
 - (3) 以上の(1)(2)に該当しないものの, 「特殊経過観察例」に属する症例はPSP同等として登録し, 経過観察する。
- (付) 重症度分類(下記の項目数で判定. 0:なし, 1:軽度, 2:中等度, 3:重度)
- a. 歩行障害・姿勢の不安定さ
 - b. 眼球運動障害
 - c. 無動・強剛(体軸部)
 - d. 嚥下障害・構音障害

B. CBD

CBDは40歳以上で発症する緩徐進行性の神経変性疾患で, 神経症候的に①基底核症状としてパーキンソニズム(特に無動・筋強剛), ②前頭・頭頂葉症候として肢節運動失行, 観念運動失行, 皮質性感覚障害, 把握反応, 他人の手徴候など(①と②の症状は一側優位性が顕著), ③そのほかPSPと同様の姿勢不安定(易転倒性), 偽性球麻痺(構音・嚥下障害), 錐体路徴候(腱反射亢進, Babinski徴候), ④痴呆は遅れて出現すること, が特徴である。MRIでは神経症候に対応して左右差のある前頭・頭頂葉の萎縮を示すが, ときに慢性脳萎縮例もある。

表2 進行性核上性麻痺の認定基準
(特定疾患治療研究事業, 2003)

- (1) 40歳以降で発症することが多く, また緩徐進行性である。
- (2) 主要症候
- ①垂直性核上性眼球運動障害(初期には垂直性眼球運動の緩徐化であるが, 進行するにつれて上下方向への注視麻痺が顕著になってくる)。
 - ②発症早期(概ね1~2年以内)から姿勢の不安定さや易転倒性(すくみ足, 立直り反射障害, 突進現象)が目立つ。
 - ③ほぼ対称性の無動あるいは筋強剛があり, 四肢末梢よりは体幹部や頸部に目立つ。
- (3) その他の症候
- ①進行性の構音障害や嚥下障害
 - ②前頭葉性の進行性認知障害(思考の緩慢化, 想起障害, 意欲低下などを特徴とする)
- (4) 画像所見(CTあるいはMRI)
進行例では, 中脳被蓋部の萎縮, 脳幹部の萎縮, 第三脳室の拡大などを認めることが多い。
- (5) 除外項目
- ①L-ドーパが著効
 - ②初期から高度の自律神経障害の存在(多系統萎縮症の除外)
 - ③顕著な多発ニューロパチー(末梢神経障害による運動障害や眼球運動障害の除外)
 - ④肢節運動失行, 皮質性感覚障害, 他人の手徴候, 神経症状の著しい左右差の存在(大脳皮質基底核変性症の除外)
 - ⑤脳血管障害, 脳炎, 外傷など明らかな原因による疾患
- (6) 判定: 次の3条件を満たすものを進行性核上性麻痺と診断する。
- ①(1)を満たす。
 - ②(2)の2項目以上がある, あるいは(2)の1項目および(3)の1項目以上がある。
 - ③他の疾患を除外できる。

これらに基づき本症の診断基準として従来, ①初老期・老年期に発病する緩徐進行性神経疾患(画像的に他疾患を除外), ②大脳皮質症状として, 肢節運動失行を代表とする前頭・頭頂葉症状(観念運動失行, 皮質性感覚障害, 把握反応, 他人の手徴候, 反射性ミオクローヌスを含む), ③無動・筋強剛を中心とする基底核症状(ジストニーを含む), ④上記神経症状の顕著な一側優位性, ⑤痴呆は遅れて出現する, の5項目が用いられてきた⁶⁾。なお, 筆者らは特異度を高めるために, 大脳皮質症状では肢節運動失行を必須症状として症例を蓄積したが, 2003年度までのCBD自験例23例(臨床例)をRinneら⁷⁾の64例(臨床例のほか, 剖検例も含む)と比較して表3に示す。なお, このような古典的診断基準の正当性について, Litvanらの調査では最終診察時(発症後平均6年)の感度48%, 特異度100%であった。すなわち, 上記基準に合致する例はほぼ確実にCBDであるが, 合致しない例も約半数存在した⁸⁾。これとともに

表3 自験例23例と文献例 (Finneら⁷⁾) の臨床症候の比較

	自験例 (n=23; ~2003)	Rinneら (n=64; ~1994)
1. 運動徴候	%	%
1) 無動・筋強剛	23 (100)	100
2) 平衡障害 (不安定歩行)	21 (91)	73
3) 振戦	12 (52)	48
4) 肢節ジストニー	17 (74)	67
5) 反射性ミオクローヌス	7 (30)	67
2. 皮質徴候		
1) 皮質性感覚障害	10 (43)	45
2) 運動失行	23 (100)	84
3) 他人の手徴候	10 (43)	47
4) 把握反射	16 (70)	48
5) 痲呆	10 (43)	31
6) 失語	3 (13)	16
3. その他		
1) 腱反射亢進	20 (87)	70
2) Babinski徴候	13 (56)	48
3) 核上性注視麻痺	17 (74)	59
4) 眼瞼挙縮	1 (4)	20
5) 構音障害	21 (93)	53

古典的病型とは異なる臨床病型が知られるようになった。すなわち、注意・記憶障害、失語、痲呆、行動異常、または偽性球麻痺などで始まり、やがて四肢運動障害が加わるが、しばしば一側優位を示さない患者群であり、“非典型例”と呼ばれた⁹⁾。この病型の責任病巣は前頭葉、側頭葉または前頭・側頭葉である。“古典型 (典型例)”と“非典型例”を包括した診断基準は作成されていない。

厚生科学研究事業「神経変性疾患に関する研究班」(田代邦雄班長)において筆者らは2001年度に班員施設での患者数を調査した¹⁾。この際、暫定診断基準として表4を用いた。ここではCBDの臨床例 (probable CBD) を“古典型”“準古典型”“非古典型”の3型に分類した。“古典型”と“準古典型”は伝統的な診断基準に含まれるものであり、“非古典型”はLitvanら⁹⁾の“非典型例”に含まれるが、パーキンソニズムと前頭・頭頂葉症状に一側優位性が明瞭な症例である。“probable CBD”の班員施設での経験数は151例 (男65例、女86例)であった。一方、剖検で証明された“definite CBD”例は13例あり、生存中にCBDと診断されたのは8例 (62%)であった¹⁾。この臨床診断基準の正当性 (感度、特異度など) は今後検討されなければならないが、上記“definite CBD”例の成績、および日本剖検報 (1990~1999) 検索で得られた病理学的CBD例の臨床正診率 (生存中CBDと診断された例) 61%²⁾から推測すると感度は60%程度、特異度は100%に近いと思われる。

2003年10月開始のパーキンソン病関連3特定疾患におけるCBD認定基準を表5に示す。

2. 診断のための画像検査および生物学的マーカー

表4 CBDの臨床診断基準 (暫定)

“probable CBD” : 以下の (A) (B) (C) のいずれかに該当するもの

(A) 古典型 : (1) ~ (3) の総てを満たす。

(1) 緩徐進行性の神経変性疾患 (画像的に他疾患を除外する)

(2) 以下のaおよびbが一側優位性に出現する。

a. 大脳皮質徴候として肢節運動失行

b. 錐体外路徴候として無動・筋強剛

(3) 痲呆は遅れて出現する。

(注) CT, MRI, SPECTを含む画像検査で一側優位性の障害 (大脳半球の萎縮または血流・代謝障害) は診断上、重要な支持的所見であるが、び漫性の萎縮または血流・代謝障害の例もあるので、診断上必須所見とはしない。

(B) 準古典型 : ほぼ古典型に似るが、一部条件を満たさないもの。ただし (1) ~ (3) の総てを満たす。

(1) 緩徐進行性の神経変性疾患 (画像的に他疾患を除外する)

(2) 以下のaまたは (および) bが一側優位性に出現する。

a. 大脳皮質徴候として肢節運動失行が明瞭でなくとも、皮質性感覚障害、把握反応、他人の手徴候、反射性ミオクローヌスのいずれかを示す。ただし、肢節運動失行よりも観念運動失行が顕著な場合は通常、両上肢に出現する。

b. 錐体外路徴候として無動・筋強剛がなくてもジストニー、振戦を示す。

(3) 痲呆は遅れて出現する。

(C) 非古典型 : (1) (2) を満たす。

(1) 緩徐進行性の神経変性疾患 (画像的に他疾患を除外する)

(2) 早期には失語、注意障害、異常行動、痲呆、尿失禁、偽性球麻痺などの皮質徴候または運動徴候が目立つが、やがて (A) (B) に示した大脳皮質徴候および錐体外路徴候の両者が一側優位性に出現する。

“definite CBD” : 病理学的にCBDに該当するもの。臨床徴候は問わない。

“possible CBD” : 資料不足により現状では設けない。

A. 画像検査

脳の形態学的検査 (CT, MRI), 血流代謝検査 (SPECT, PET, MRS), 神経機能検査 (機能的MRI : fMRI) などが広く行われており、診断に有用な成績が得られている。しかし、これらは診断基準における“probable PSP”, “probable CBD”の患者を対象として、両疾患を比較したものである。即ち、PSPおよびCBDの非典型例の検出には役立っていない。

われわれは“probable PSP”, “probable CBD”を対象として各種画像成績を報告してきた。¹⁾H-MRSによって基底核領域と前頭葉皮質についてNAA/ choline比およびNAA/ creatine比を調査した成績では、基底核領域においてはPSP, CBDともに両パラメータは健常対照より有意に低下していた。一方、前頭葉皮質ではPSPは健

表5 大脳皮質基底核変性症の認定基準
(特定疾患治療研究事業, 2003)

- (1) 中年期以降に発症し緩徐に進行する。
 - (2) 失行あるいはその他の大脳皮質徴候
 - ① 肢節運動失行があり、左右差が目立つ。
 - ② 肢節運動失行が明瞭でなくても、皮質性感覚障害、把握反応、他人の手徴候、反射性ミオクローヌスのいずれかがあり、左右差が目立つ。
 - ③ 観念運動失行が肢節運動失行よりも顕著な場合は、左右差が目立たないことが多い。
 - ④ その他の認知機能障害
まれに痴呆、異常行動、注意障害、失語などが早期から目立つ例がある。
 - (3) 錐体外路徴候
 - ① パーキンソニズム(無動、筋強剛、振戦): 障害は下肢よりも上肢に目立つことが多い。
 - ② ジストニー
 - (4) その他の神経症状
 - ① 偽性球麻痺(構音障害、嚥下障害)
 - ② 尿失禁
 - (5) 画像所見
CT, MRI, SPECTで一側優位性の障害(大脳半球の萎縮または血流低下)は診断において重要な支持的所見である。しかし、両側性あるいはび漫性に異常所見が出現する例もあるので、診断上必須所見とはしない。
 - (6) 除外すべき疾患
 - ① パーキンソン病
 - ② 進行性核上性麻痺
 - ③ 多系統萎縮症(特に線条体黒質変性症)
 - ④ 薬剤、脳炎、脳血管障害、外傷など
 - ⑤ 類似症状を呈するその他の疾患
 - (7) 判定: 次の3条件を満たすものを大脳皮質基底核変性症と診断する。
 - ① (1) を満たす。
 - ② (2) の1項目以上、および(3) の1項目以上がある。
 - ③ 他の疾患を除外できる。
- (注) なお、必須ではないが、脳画像所見によって他の疾患を除外し、本症でしばしば見られる一側優位性病変を確認することが望ましい。

常対照と差がないが、CBDはPSPおよび健常対照よりも有意に低下していた。即ち、前頭葉神経細胞数の減少に関してPSPとCBDには差異があることが示された¹⁰⁾。次に、患者の手に一定のパラダイムに基づき触覚刺激を与え、頭頂葉感覚皮質の賦活度をfMRIによって調査したところ、健常対照、PSP、CBD患者の間に差がみられなかった。即ち、CBDにおいても触覚刺激に対して感覚皮質は正常に賦活されていることが示された¹¹⁾。

B. 生物学的マーカー

浦上らにより、“probable PSP”と“probable CBD”の症例の間で髄液リン酸化タウ値が比較された。その結果、PSPでは健常対象者と差がないが、CBD例では総タウ値、特にリン酸化タウ値が有意に上昇することが認められた¹²⁾。

CBD非典型例についても髄液タウ値異常が証明されれば臨床診断の精度上昇が期待できる。

C. 遺伝子検索

PSPとCBDの剖検脳に関して、タウ蛋白のアイソフォームが調べられたが、PSP、CBDともに3リピートタウに対する4リピートタウの比が対照者よりも有意に高いことが知られた。また、タウ蛋白の遺伝子多型の研究でPSP、CBDともにハプロタイプH1/H1の遺伝子型を示す頻度が対照者よりも有意に高いと報告されている¹³⁾。即ち、遺伝子レベルでは未だPSPとCBDの差異は明らかでない。

結論

PSPとCBDの典型例では症候が互いに明瞭に異なるが、非典型例では症候が近似することがあり、生存中に誤診されることがある。また、CBDは症候の多様性から包括的な診断基準が作成されていない。これらの問題の解決のためには、遺伝子検索を含む両疾患の病因解明が必要である。研究面では感度は低いが、特異度の高い臨床診断基準によって、診断確実例を検出し本態解明をめざす必要がある。一方、医療の立場からは特異度を犠牲にしても診断の感度を高め、患者を救済する立場が求められる。PSPとCBDの特定疾患承認によって今後、両疾患の研究が一層進捗すると思われる。

文献

- 1) 森松光紀ほか: 厚生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」2001年度研究報告書, 2002, pp 22-24.
- 2) 森松光紀ほか: 臨床神経 42: 1150-1153, 2002.
- 3) Litvan I et al.: Neurology, 47: 1-9, 1996.
- 4) 舟川 格ほか: 神経内科 56: 125-130, 2002.
- 5) 湯浅龍彦ほか: 厚生労働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調査研究班」2002年度研究報告書, 2003, pp. 119-121.
- 6) Litvan I et al.: Mov. Disord. 18: 467-486, 2003.
- 7) Rinne JO et al.: Brain 117: 1183-1196, 1994.
- 8) Litvan I et al.: Neurology 48: 119-125, 1997.
- 9) Litvan I et al.: Corticobasal Degeneration (Advance in Neurology, vol 82)(ed by Litvan I et al.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, pp 183-196.
- 10) 根来 清ほか: 厚生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」2000年度研究報告書, 2001, pp 149-151.
- 11) 小笠原淳一ほか: 厚生労働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調査研究班」2002年度研究報告書, 2003, pp 113-115.
- 12) 浦上克哉ほか: 臨床神経 42: 1162-1164, 2002.
- 13) 森 秀生ほか: 臨床神経 42: 1165, 2002.

SND と OPCA、PSP と CBD：病理学的にみた共通点と相違点

高橋 均¹⁾、若林孝一²⁾

1) 新潟大学脳研究所病理学分野

2) 弘前大学医学部脳神経血管病態研究施設分子病態部門

要旨 線条体黒質変性症(SND)およびオリブ橋小脳萎縮症(OPCA)は、それぞれ多系統萎縮症の1表現型である。前者は、発病早期におけるパーキンソン病との鑑別が必ずしも容易ではないという臨床的な問題をはらんでいないが、臨床経過が長ずるにつれて、橋・小脳の萎縮が明らかになる例がほとんどであると考えられる。また、進行性核上性麻痺(PSP)と皮質基底核変性症(CBD)はときに生前の確定診断が困難で、相互に誤診し合う場合がある。しかし、その剖検による病理組織学的診断は比較的容易である。つまり、その皮質および皮質下の変性病変の程度と分布に加え、それぞれに特徴的な astrocytic tau pathology の出現で鑑別可能である。

はじめに

多系統萎縮症(multiple system atrophy: MSA)は、成人発症、孤発性、原因不明の神経変性疾患である。臨床的には、自律神経障害、パーキンソニズム、小脳失調、錐体路徴候が種々の組み合わせで認められ、これまで、オリブ橋小脳萎縮症(olivopontocerebellar atrophy: OPCA)、Shy-Drager syndrome(SDS)、線条体黒質変性症(striatonigral degeneration: SND)という病型が知られてきた。今日では、パーキンソニズム優勢の例を MSA-P、小脳失調が主要な運動症状の例は MSA-C と呼ばれるようであり、SDS は必ずしも適切な名ではないとされ、避けられる傾向にあるようである。¹⁾ MSA-P は、病理学的にはまさに SND を背景に持つものであるが、その早期診断では孤発性パーキンソン病との鑑別が問題となる。

進行性核上性麻痺(progressive supranuclear palsy: PSP)は、1964年、Steel らによってその臨床病理がほぼ確立された孤発性の神経変性疾患である。その後の研究から CNS をより広範に侵す疾患として認識されるようになってきているが、その本質は不動のものと考えてよい。一方、皮質基底核変性症(corticobasal degeneration: CBD)は、1968年、Rebeiz らによって corticodentatonigral degeneration with neuronal achromasia としてはじめて報告され、以後20年余、類似例の報告がみられなかつ

たもので、1989年、Gibb らの症例報告と CBD という名称の提示以後、急速にその臨床病理学的報告が増加した孤発性の神経変性疾患である。

さて、臨床的には、MSA-P (SND)、および PSP、はパーキンソニズムを呈する疾患群(非定型的パーキンソニズム)としてまとめることが可能なようであり、これらに CBD を加えて、今回、厚生労働省・特定疾患指定を受けたとお聞きした。

本ワークショップでは、SND と OPCA、PSP と CBD の病理学的にみた共通点と相違点について整理して欲しいとの依頼を受けたが、ここに至った背景には、SND は、あくまでもパーキンソン病との早期鑑別が問題となる、あるいはパーキンソニズムとしての疾患であるということを重要視する臨床サイドの考え方(MSA の1型であることに異議はないが、そのように位置づけたほうが診療的には実際的である)があるようであり、一方、PSP と CBD については、その臨床診断が困難な例が少なくなく、とくに後者においては臨床診断基準の作成の上からも PSP との病理学的相違点の有無とその程度を知ることが重要であるとの見方があるようである。

MSA の1表現型としての SND あるいは OPCA

今日でもそうであるかもしれないが、臨床的にパーキンソニズムまたはその類縁疾患と

されながらも、生前の臨床診断の困難な例はまれではない。1964年、AdamsらによるSNDの臨床病理学的報告は、その後、パーキンソニズムのひとつの病型として認識されるようになった。しかし、変性部位が真に線条体と黒質に限局しているのかという疑問は当初からあったし、実際、Adamsらの報告例においてすら、小脳皮質、橋核、下オリーブ核の変性(OPCA病変)が記載されている症例がある。この臨床病理学は、まもなく、Graham & Oppenheimer (1969)のMSAという疾患概念へと移行、今日、臨床病理学的に広く受け入れられるようになった。²⁾

現在、MSAという疾患概念は新たな病理学的知見によってさらに確固たるものとなっている。すなわち、SND、OPCA、SDSのいずれの臨床的病態においても、特徴的な α -synuclein陽性のグリア(オリゴデンドロサイト)封入体はその病態発症に関与していることが明らかにされた。³⁾このグリア封入体は病変の進行とともに増加し、やがて減少、消失すると考えられている(高度に粗鬆化した組織が残る)。

SNDという病態では、このグリア封入体出現とそれに伴う神経細胞の脱落・グリオシスは線条体で最も早期に出現、進行し、一方、OPCAという病態では、これらの変化がおそらく橋核および小脳白質に原発し、プルキンエ細胞の高度脱落をみると考えられる。つまり、臨床経過の短いSNDの剖検例(自検例では2年余)では、これらの変化はほぼ線条体と黒質に限局しており、まさにSNDと呼ぶに相応しい。⁴⁾しかし、長期経過例(自検例では11年余)では、線条体・黒質および下オリーブ核・橋・小脳は高度に変性しており、強いていうと線条体の変化が最も古く、かつ高度かとの印象を受けるのみである(まさに、MSAである)。OPCA剖検例についても同様で、経過とともにSND病変がより明瞭となってくる。

従って、MSAにおける今日の問題は、個々の症例において、何故このような臨床的病態に関与する病理像の発生部位に時期的相違が起こるのか、という点にある。さらに付け加えるならば、グリア封入体形成とそれに伴う神経細胞脱落との関係が未だ完全には解明されたとはいえない点にある。

今後の臨床病理学的解析のためには、病理サイドとしては、MSAの診断名のもと、SND及びOPCA病変の関係、例えば、SND>OPCA

のような記録を残しておくことは重要かもしれない。ちなみに、SDSであるが、病理学的にみても、この診断名はやはり的確とは言えない。この自律神経異常を説明する病変、例えば、脊髄中間質外側核はMSAのみならずパーキンソン病でも侵されることが多く、その病変の程度の評価は通常の検索では極めて困難である。⁵⁾

CBDとPSPの病理診断

ここで述べる事項は、本ワークショップに適ったものであるが、以前、我々が既に発表した内容^{6,7)}との重複をお許し願いたい。

今日、もちろん一部に非定型的な症例は存在するものの、PSPの臨床病理像はほぼ確立しているといえる。一方、CBDはこの10年の間に剖検例がづつづつと報告され、その特徴が知られるようになったが、いくつかの重要な問題も生じてきた。また、臨床的にCBD、病理組織学的にPSP、あるいはその逆もある。さらに、臨床的にfrontotemporal dementia(FTD)、病理組織学的にはCBD(あるいはPSP)というようにFTD、CBD、PSPの間には移行あるいはオーバーラップが存在するのかという疑問である。

1. CBDの病理学的特徴

臨床的にCBDの典型例と考えられる症例の病理学的特徴をまとめると、1) CBDは大脳皮質と皮質下神経核(とくに黒質と淡蒼球)が侵される疾患であり、2) 大脳皮質にballooned neuronが出現し、3) 神経細胞とグリア細胞の両者にタウの蓄積がみられ、4) 大脳皮質にastrocytic plaqueが出現する。これらの所見に則ってCBDを規定した場合、病変の質は全く同一でありながら、大脳皮質病変が中心溝周囲に最も強い例、前頭葉に強い例、さらにシルビウス裂周囲に強い例の3型が存在する。当然ながら、その主要な臨床症状が異なる(肢節運動失行、痴呆・認知障害、失語等)。前述のMSAにおけるSND、OPCA、SDSのようなものである。文献的には、前頭葉に強い例が3~4割、中心溝周囲に最も強い例が5~6割、そしてシルビウス裂周囲に強い例が少数(5%程度)となる。また、施設で扱う疾患のバイアスの影響かとも思われるが、CBDに最も多い症状は痴呆である、との報告もある。

2. CBDの診断上の問題点

症例が蓄積されるにしたがい次のような問

題もクローズアップされてきている。つまり、*ballooned neuron* の数は症例によってばらつきがあり、多数認められるものから、少数しか認められない例、あるいは欠く例の存在である。さらに、CBD と PSP の異同を考えた場合、大脳皮質病変や皮質下病変の程度と分布など鑑別のポイントはいくつか考えられるが、果たして、これだけで確定診断に至れるか。現時点で、このふたつを分けるのは、グリアのタウ蓄積の病変とされている。すなわち、*astrocytic plaque* は CBD に特異的であり、一方、*tufted astrocyte* は PSP では皮質下を主体に多数認められ、この両者が 1 例で共存することはない。⁸⁾

PSP の病理学的診断に際しては、Steel らの原著に示された神経細胞脱落と神経原線維変化に加え、上記の *tufted astrocyte* の確認でまず問題はない。ただし、PSP の前頭葉（中心前回）の変性はごく軽度のものから高度のものまで様々である。ときに、高度の前頭葉萎縮を示す症例がみられる。

3. CBD の病理学的診断基準

2000 年 7 月、米国で「Neuropathology Meeting for the diagnosis of CBD」が開催された。この会は、CBD の病理学的診断基準の作成のため組織されたもので、各国の neuropathologists が集まった（本邦からは都精神研の池田研二と弘前大の若林孝一が参加）。最近、そこでまとまった案が示された。⁹⁾ 1) CBD では皮質と皮質下に神経細胞脱落をみとめる。2) 神経細胞とグリア細胞の双方におよぶ tauopathy であり、*astrocytic plaque* は診断的価値を有する構造物である。3) *ballooned neuron* は出現していることが大事で、たとえ少数でも CBD から除外しない；ただし、*cerebral convexity* での出現が重要。

さて、この病理診断基準で、CBD の剖検診断ができるとしても、PSP と CBD は、真に独立した疾患単位なのであろうか（臨床的にも、病理学的にも相互に似ている疾患に違いはない）。これまでの報告例をみるとそのように考えて差し支えなさそうであるが、つい最近、CBD の臨床診断例において、*astrocytic*

plaque と *tufted astrocyte* が共存していたとの報告がなされた（1 例報告ではあるが、'実'に示唆に富むものである）。¹⁰⁾ FTD をも含む本領域の今後は、さらに複雑なものになるであろうし、また興味あるところでもある。

おわりに

SND あるいは OPCA については、病理学的には α -synuclein 陽性のグリア封入体の出現を特徴とする MSA の 1 表現型と考えて間違いない。ただし、臨床的には、経過が長ずるにつれて画像的にも MSA として捉えられるようになる例がほとんどであろうが、初発・主要症状という点での相違は早期診断（鑑別）とその後の治療という場において、いまだ重要な問題を残しているのかもしれない。

PSP と CBD については、とくに後者において、その臨床症状は多彩である可能性が高く、その臨床診断基準の作成においては、定型例、非定型例の設定、剖検による確定診断等々、かなりの困難さが予想される。また、病理学的にも FTD、PSP、CBD の病態メカニズムやグリアの tau pathology の生成機序を考える上で、その移行型がないのか、さらなる症例の蓄積・検討が必要である。

文献

- 1) Gilman S et al.: J Neurol Sci 163: 94-98, 1999
- 2) Quinn N: J Neurol Neurosurg Psychiatry (suppl): 78-79, 1989
- 3) Wakabayashi K et al.: Acta Neuropathol 96: 445-452, 1998
- 4) Wenning GK et al.: J Neural Transm 109: 307-320, 2002
- 5) Wakabayashi K et al.: Acta Neuropathol 94: 287-289, 1997
- 6) Wakabayashi K, Takahashi H: Rinsho Shinkeigaku 42: 1155-1157, 2002
- 7) Wakabayashi K, Takahashi H: Neuropathology (in press)
- 8) Komori T et al.: Acta Neuropathol 96: 401-408, 1998
- 9) Dickson DW et al.: J Neuropathol Exp Neurol 61: 935-946, 2002
- 10) Katsuse O et al.: Acta Neuropathol 106: 251-260, 2003

神経変性疾患の発症機構：蛋白質分解の破綻

田中 啓二

東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 分子腫瘍学研究部門

はじめに

細胞内の蛋白質分解機構は、選択的蛋白質分解を担うユビキチン・プロテアソームシステム (UPS) と非選択的蛋白質分解を担うリソソーム/液胞システム (LVS) に大別することができる。UPSは、生物の様々な高次機能の制御 (細胞周期・DNA修復・アポトーシス・代謝調節・シグナル伝達・転写制御・免疫応答など) や環境ストレスに応答した恒常性の維持 (ストレス応答・蛋白質の品質管理など) に必須な役割を担っている。またLVSは、外来性の物質を食食して消化する役割のほか、オートファジー (自食作用) を動員して栄養飢餓に応答した生存戦略としての自己成分の分解やオルガネラ量の調節・組織の再編成などに関与している。最近、これらUPSとLVSによる蛋白質分解の破綻が様々な神経変性疾患の発症に関わる可能性が示唆されている。

方法

本研究は、生化学的手法、細胞生物学的手法及び発生工学的手法を駆使して包括的に行った。

結果と考察

1) 蛋白質の品質管理：蛋白質を生命に準えると、その一生には様々な出来事が存在する。蛋白質の新生は、いうまでもなく遺伝子に刻印された情報に従ってアミノ酸が順序よく連結してゆくことである。蛋白質が機能を発揮するためには、合成された蛋白質が分子シャペロンなどの助けを借りて高次構造を形成し、さらに必要に応じて化学修飾や分子集合などの翻訳後変換を受けねばならない。このように平坦でない道程を経て誕生した蛋白質もそれぞれに寿命という宿命を背負っていて、一定の期間の後に必ず破壊される。即ち、細胞内に存在する全ての蛋白質は固有の寿命をもってターンオーバーしているのである。

しかし、遺伝子産物が辿る一生には、まだ多くの謎が隠されている。典型的には、新しく合成された蛋白質の 30%以上

が実はミスフォールディングの結果、不良品として数分内に廃棄される。また正常に高次構造を形成した蛋白質であっても他のパートナー分子と巧み分子集合できなかった場合 (ミスアセンブリ) には、不要品として識別され迅速に分解される。他方、今日生物を取り巻く外環境の劣悪化は、不漸にわれわれの軀を蝕み、細胞内の蛋白質は日々様々なストレスによって損傷を受け続けている。例えば、酸化ストレスや重金属汚染、高温に依存した細胞内外のストレスは拡大の一途を辿っており、日常的に生物を襲っているのである。この状況を踏まえると、細胞内は不良品に溢れたゴミの山のように見えるかも知れないが、実際にはそのような不良品 (損傷蛋白質) が、通常、細胞内で検出されることはない。それは細胞内には蛋白質の異常性を監視してその蓄積を回避するために働く特殊な装置が備わっているからである。この細胞内に生じた不良蛋白質を速やかにモニターしてその蓄積を回避する生体応答は、便宜的に「蛋白質の品質管理」と呼ばれている。今日、この蛋白質の品質管理の破綻が非分裂細胞であるニューロンの死を誘発し、最終的に神経変性疾患の発症原因とであると考える方が国内外で大きな流れになってきつつある。

2) シャペロン依存性ユビキチンリガーゼ「CHIP」：前述したように UPS は、構造的に傷害を受けた変性蛋白質を速やかに除去するが、どのようにして標的基質が異常性を獲得していることを認識するのかということは長い間謎であった。われわれは、5~6年前から蛋白質の種類、即ち標的基質の一次構造とは無関係に異常蛋白質を類別して選択的にユビキチン化するユビキチンリガーゼが存在することを推定し、これを「品質管理リガーゼ」と仮想的に名付けていた。また蛋白質の異常性とは、いわば部分的なアンフォールディングした疎水性領域を識別する必要があり、おそらくこの品質管理リガーゼは分子シャペロンと提携していることを予見していた。ごく最近、この概念に完全に合致するユビキチンリガーゼCHIPが発見された。

CHIP は N 端側に Hsp70 と相互作用する TPR (tetratricopeptide repeat) という繰り返し構造を、そして C 端側には U-box という特殊な構造を有している。U-box 構造は RING-finger 構造と類似のモジュールであるが、RING-finger 構造とは異なり亜鉛を結合しない。興味深いことに CHIP は Hsp70 のみならず Hsp90 と結合し、Hsp70 と結合した CFTR (嚢胞性線維症の原因遺伝子産物) や Hsp90 と結合したステロイドレセプターをユビキチン化する酵素であることが判明した。われわれもごく最近、インビトロで CHIP が Hsp90 や Hsp70 によって捕捉された熱変性蛋白質を選択的にユビキチン化する活性を有することを見出した。この結果 CHIP は、分子シャペロンと提携して再生できなくなった変性蛋白質を迅速に分解すると考えられる。この意味では、分子シャペロンは再生と分解の配分を決定しており、過度の傷害によって再生することができなくなった蛋白質に対しては、CHIP のような品質管理リガーゼを積極的に動員してユビキチン化分解に誘導する新しい役割を担っていると考えられる。

3) ERAD と SCF^{Fbl} : 分泌蛋白質や膜蛋白質などの分泌系蛋白質は粗面小胞体上のリボソームで合成される。これらは翻訳と共役して小胞体膜上の膜透過装置 (トランスロコン) のチャンネルを通じて内腔側へ送り込まれる。小胞体内腔もしくは小胞体膜に組み込まれた新生蛋白質は小胞体内の分子シャペロンと呼ばれる蛋白質群の助けを借りて、フォールディングやアセンブリーなどの高次構造形成が行われる。そこで正しい高次構造を獲得した蛋白質だけが、輸送小胞によりゴルジ体以降のコンパートメントに輸送される。細胞内に異常蛋白質が蓄積したり分泌されたりすると生体にとって有害になるので、分泌経路の入り口である小胞体には、高次構造形成に失敗した蛋白質を選別し、再生・破壊するための様々な機構が兼ね備えられている。このような異常蛋白質を送り出さない仕組みは「小胞体の品質管理」と呼ばれている。小胞体には高濃度に分子シャペロンが存在し高次構造形成に最適な条件を作り出しているにも関わらず、新生蛋白質の約 30% 以上は高次構造形成がうまくいかず、細胞内で分解を受けていると推定されており、ERAD (小胞体関連蛋白質分解) 機構の解明は品質管理を理解する上で必須なことである。

ERAD の基本経路は、小胞体内で ERAD の基質となる蛋白質の識別、小胞体から細胞質への逆行輸送、細胞質におけるユビキチン化とプロテアソームによる分解の 3 つのステップよりなる。最近の研究で、それぞれのステップに登場する分子の多様性がばかりでなく、例えば ERAD 基質が一度ゴルジ体に送られた後に小胞体・細胞質へ逆行輸送されるなどの経路の多様性も報告され、まだ未解明な点も多い。その中で、分泌系蛋白質の多くは糖鎖修飾

を受けた糖蛋白質であるが、糖鎖が異常蛋白質の識別・ERAD へのターゲティング・分解の一連のタグとして機能していることが明確となってきている。最近われわれは、糖鎖を識別するユビキチンリガーゼとして“SCF^{Fbl}”を発見し、この酵素が ERAD に関与していることを突き止めた。

Skp1-Cullin1-F box 蛋白質-Roc1 から構成される SCF 複合体は、最も大きなファミリーを形成する RING 型 E3 である。筆者らは SCF 複合体の唯一の変異因子 F-box 蛋白質の一つ Fbs1/Fbx2 は N 結合型糖鎖、中でも高マンノース型糖鎖を認識するものであることを見出した。細胞中で Fbs1 と結合する蛋白質の一つを同定したところインテグリン β 1 であり、それも Fbs1 は小胞体内で高マンノース型糖鎖付加された前駆体型とのみ結合し、細胞表層の複合型糖鎖修飾を受けたものとは結合しない。細胞接着分子インテグリンは $\alpha\beta$ 二量体となって細胞膜に存在する。 β 1 は 10 種類の α 鎖と二量体を形成するため過剰に作られ小胞体内にプールされている。TCR α の場合と同様に前駆体 β 1 は余剰サブユニットとして ERAD による分解を恒常的に受けていると考えられる。実際、両者の結合は細胞質認められ、しかもプロテアソーム阻害剤を添加したときのみ結合が検出できた。このことは、Fbs1 と結合した β 1 はすみやかにプロテアソーム依存的に分解されることを意味する。これらの結果は、SCF^{Fbl} 複合体が分泌系蛋白質の大部分を占める糖蛋白質の ERAD において糖鎖を識別するユビキチンリガーゼとして機能している可能性を強く示唆するものである。実際、Fbs1 のドミナントネガティブ変異体が ERAD 基質の CFTRAF508 や TCR α の分解を阻害することからも SCF^{Fbl} が ERAD に作用するユビキチンリガーゼであることが裏付けられている。

Fbs1 の発現は成体脳、それもニューロン特異的である。ERAD はすべての細胞・臓器で普遍的に見られる現象であることから、SCF^{Fbl} は神経細胞における品質管理に特化して進化してきたと推定される。また前項で述べた CHIP も脳における発現が非常に高いことが判明している。いっかえれば、ニューロンのような非分裂細胞では、蛋白質の品質管理機構を厳格に維持することが細胞の生存戦略として極めて重要であることを示唆している。

4) オートファジーと疾病: 最初に述べたようにリソソーム/液胞システム (LVS) は外来性の異物や膜蛋白質をエンドサイトーシスして処理する際にも用いられている。特に前者はヘテロファジー (食食作用) と呼ばれており、細胞内成分を処理するオートファジー (自食作用) とは区別されている。オートファジーはオートファゴソーム (自食泡: 細胞成分を取り込んだ二重膜小胞) による標的成分の取り囲みの形成機構であり、その後リソソーム

/液胞と融合して内容物を分解する。すなわち“自分を食べる”分解経路である。

最近、オートファジーの研究が飛躍的に進展している。それは、酵母の遺伝学的研究によりオートファジー欠損変異株 *apg* (autophagy-defective mutant) が多数分離されたことに起因する。注目すべきは、15 の *apg* 遺伝子群のなかで、*Apg8* と *Apg12* はユビキチンシステムと類似の翻訳後修飾反応で標的分子に共有結合するモディファイヤー分子として作用することである (*Apg8*- or *Apg12*-conjugating system)。但し、*Apg8* および *Apg12* ともユビキチンと一次構造における類似性はほとんど認められないが、ユビキチンと同様に E1 によって活性化され E2 の作用で標的基質に共有結合する。即ち、*Apg12* は *Apg7* (E1) と *Apg10* (E2) を経由して標的分子である *Apg5* に結合する。一方、*Apg8* は同じ *Apg7* で活性化された後、*Apg3* (E2) を経由してリン脂質 (PE : phosphatidylethanolamine) に共有結合する (lipidation 機構)。この結果、オートファゴソームすなわち 2 重膜小胞の形成機構が分子レベルで解明されようとしている。

一般に動物細胞ではリソソームそして出芽酵母では液胞と呼ばれているオルガネラは、概念的に同一と思われるが、詳細な機能は必ずしも同じではない。事実、酵母の場合、液胞は細胞質領域の可成りの容積を占めているのに反して動物細胞でリソソームの含量は、組織によっても異なるものの大きな容積を占めることはない。例えば酵母におけるオートファジーは空素や炭素などの栄養飢餓によってのみ激しく誘導されるために、生存により必要な素材を供給するための生存戦略応答として位置づけられてきた。実際、動物細胞では栄養が十分に行き届いた状態では、オートファゴソームを検出することは困難である。しかし、一日絶食したマウスの肝臓では、多くのオートファゴソームを観察することができる。そこで *Apg8/12* システムを条件的に破壊 (即ち、両モディファイヤーの活性化酵素である *Apg7* 遺伝子を欠損) でき

るマウスを作製してオートファジー系の発動を阻止すると、肝細胞における蛋白質分解が大きく損なわれて肝臓に大きな障害が生じることが判明した。このことは、栄養飢餓に応答した生存戦略が唯一の役割と考えられていたオートファジーが高等生物では、栄養状態が十分に供給された状況にあっても不断に活動していることを示している。さらにこのオートファジー欠損を欠損させた肝細胞の解析から、オートファジーを介した LVS と UPS が連携していること、即ち UPS で分解できなかった異常蛋白質凝集体がオートファジー・リソソーム系で処理されるという両分解システムの協同作用機構の存在することが判明した。興味深いことに、オートファゴソームが過剰形成する疾病として神経疾患や筋疾患等が増加の一途を辿ってきている。このこともオートファジー・LVS系が、高等生物では飢餓応答とは異なった恒常的な役割を果たしていることが予想されている。

文献

- 1) Unno, M. et al.: Structure 10, 609-618, 2002.
- 2) Asai, A.: J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 22, 705-710, 2002.
- 3) Yoshida, Y. et al.: Nature 418, 438-442, 2002.
- 4) Park, K. C. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 9733-9738, 2002.
- 5) Niwa, J. et al.: J. Biol. Chem. 277, 36793-36798, 2002.
- 6) Sakata, E. et al.: EMBO Rep. 4, 301-306, 2003.
- 7) Tanahashi-Hori, T. et al. J. Biol. Chem., 278, 16237-16243, 2003.
- 8) Araki, K. et al.: J. Neurochem. 86, 749-762, 2003.
- 9) Imai, J. et al.: EMBO J. 22 3557-3567, 2003.
- 10) Matsuzaki, H. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100, 11285-11290, 2003.
- 11) Kim, S.J. et al.: J. Biol. Chem. 278, 41890-41899, 2003.
- 12) Yoshida, Y. et al.: J. Biol. Chem. 278, 43877-43884, 2003.
- 13) Mizushima, T. et al. Nature Struct. Molecular Biol. in press.

研究発表

ALS 脊髄運動ニューロンの AMPA 受容体サブユニット RNA 編集異常と病因との関連

郭 伸¹⁾, 河原 行郎¹⁾, 伊藤 杏子¹⁾, 孫 慧¹⁾, 相澤 仁志²⁾, 金澤 一郎^{1,3)}

1) 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

2) 旭川医科大学第一内科

3) 国立精神・神経センター

研究要旨 孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンの選択的神経細胞死には、イオンチャネル型グルタミン酸受容体サブタイプの AMPA 受容体を介した、細胞内の Ca^{2+} イオン濃度上昇が深く関わっていることがこれまで多数報告されている。我々は、AMPA 受容体の Ca^{2+} イオン透過性が亢進するような分子変化が ALS 脊髄運動ニューロンで生じているか調べ、ALS 脊髄運動ニューロンで、疾患特異的・細胞選択的に AMPA 受容体 GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集率が有意に低下していることを明らかにした。一方、mRNA レベルでは、サブユニット発現量に変化を認めなかった。動物実験からは、RNA 編集異常が神経細胞死の直接原因となることが示されており、GluR2 の RNA 編集率低下は、ALS 脊髄運動ニューロンの神経細胞死の直接原因であることを裏付けていると考察される。

はじめに

孤発性 ALS の病因として、グルタミン酸受容体である AMPA 受容体を介する遅発性神経細胞死が有力な仮説である。この神経細胞死には、 Ca^{2+} 流入増加に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が重要な役割を持つ。AMPA 受容体サブユニットは GluR1-GluR4 からなるヘテロメリックな 4 量体からなり、 Ca^{2+} 透過性は、Q/R 部位が RNA 編集された編集型 GluR2(R) を含むか否かにより規定されている。すなわち編集型 GluR2(R) 以外のサブユニットのみから構成される AMPA 受容体は Ca^{2+} 透過性が高いが、編集型 GluR2(R) を 1 個でも含む AMPA 受容体は Ca^{2+} 透過性が低い。

したがって、もし ALS 脊髄運動ニューロンで、GluR2(R) の発現量が選択的に減少したり、Q/R 部位の編集率が低下し、未編集型 GluR2(Q) の発現量が増加すれば、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性が亢進し、細胞死が

加速と考えられる。実際、このような AMPA 受容体を介した Ca^{2+} 透過性の変化が、細胞死と深く結びついていることを示す多数の証拠が報告されている。GluR2 サブユニットの発現を抑制すると、*in vitro* では神経細胞死が生じる（ただし *in vivo* では、海馬 LTP 異常、協調運動障害などが生じるが神経細胞死は生じない¹⁾）。また GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を阻止したマウスは、生後 20 日後にけいれん重積発作により死に至る²⁾。

GluR2 発現量については、これまで主に *in situ* hybridization 法によって解析されてきたが、運動ニューロンにおける発現量については一定した見解が得られていなかった。一方、我々のグループでは、ALS 脊髄前角で、疾患特異的・部位特異的に GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が低下していることを報告した³⁾が、これが個々の運動ニューロンにおける RNA 編集異常を反映したものであるかどうかは分からなかった。

本研究では、ALS の脊髄運動ニューロンで、AMPA 受容体に Ca^{2+} 透過性に関与する分子変化が生じているかどうかを検討することを目的とし、単一神経細胞レベルで、1) AMPA 受容体各サブユニット mRNA の定量、2) GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集率の定量を行った。

方法

凍結保存ヒト剖検脳脊髄 (ALS, 正常対照, 疾患対照) よりレーザーマイクロディセクターで切り出した単一ニューロン組織 (100 個または 1 個単位) (図 1) より、total RNA を抽出した⁴⁾。cDNA 作成後、AMPA 受容体サブユニット GluR1-GluR4 に対する定量的 RT-PCR (LightCycler System (Roche Diagnostics)) を行い、各 mRNA の発現量を定量、内部標準として β -actin mRNA 発現量も定量した⁴⁾。

一方、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は、Q/R 部位を含む PCR 産物を作成し、編集された配列は認識するが、未編集の配列は切断できない制限酵素 *BbvI* による消化パターンの違いを利用し、各消化断片の濃度を 2100Bioanalyser (Agilent Technology) で定量することによって、算定した (図 2)^{3,9)}。

(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下書類によるインフォームド consent が得られた資料を用いた。匿名性に留意し、病的に確定診断のついた症例のみ用いた。



図1 レーザーマイクロディセクターによる単一神経

細胞の切り出し

0.1% トリイジンブルー染色された脊髄運動ニューロン (a) の輪郭に沿って、焦点レーザー光で切る (b)。その後、スライドの向きを下にして、その直下に 200 μ l の TRIZOL Reagent (Invitrogen) が入った 0.2ml チューブをセットする。ここに弱いレーザー光を当てることによって、細胞をチューブ内に落とし、回収した (c)。スケールバー、20mm

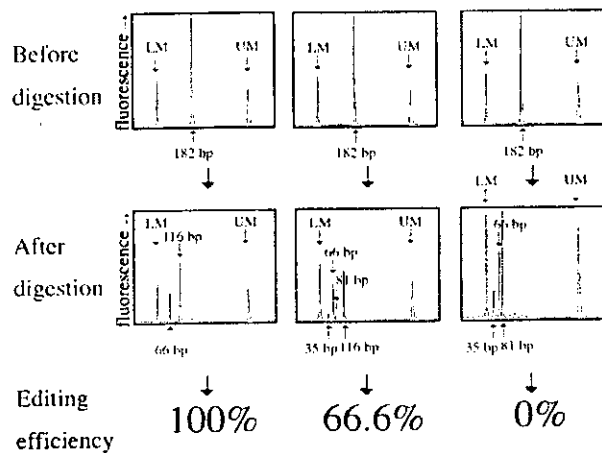


図2 単一ニューロンにおけるGluR2 Q/R部位RNA編集率の定量例

ALS 単一脊髄運動ニューロン 3 例の GluR2 Q/R 部位を含んだ PCR 産物 (182 bp) を制限酵素 *BbvI* で消化し、2100 Bioanalyser にかけた。完全に編集された mRNA 由来の PCR 産物は 116 bp と 66 bp の 2 つのバンドに切断される (左パネル) が、全く編集されていない mRNA 由来の PCR 産物では、116bp のバンドがさらに 35 bp と 81 bp の 2 つのバンドに切断される (右パネル)。したがって、66 bp のバンドは編集の有無に関わらず生じ、116 bp のバンドは編集された場合のみ生じる。このため、各細胞の編集率は、各バンドの濃度と長さからモル数を算定し、116 bp のバンドのモル数と 66 bp のバンドのモル数の比から定量した (中間パネル)。LM, lower marker (15 bp); UM, upper marker (600 bp)。

結果

まず100個単位で、ALS脊髄運動ニューロンにおけるGluR2 mRNA発現量について、正常対照群と比較したが、有意差は認められなかった (ALS群, $81.6 \pm 12.8 \times 10^3$ (mean \pm SEM, n = 8); 対照群, $52.9 \pm 7.9 \times 10^3$ (n = 8)) (Mann-Whitney U test, p > 0.05)。次に、すべてのGluRサブユニットに占めるGluR2 mRNAの発現比率についても、両群で比較したが、やはり有意差は認められなかった (ALS群, $80.7 \pm 1.8\%$ (mean \pm SEM, n = 8); コントロール群, $77.8 \pm 2.0\%$ (n = 8)) (Mann-Whitney U test, p > 0.05)。

単一細胞レベルでもGluR2 mRNAの発現量を定量した。ALS群 (n = 3)の44個の運動ニューロンと、正常対照群 (n = 3)の36個の運動ニューロンで定量比較したが、ALS群 ($126.9 \pm 12.0 \times 10^3$ (mean \pm SEM); range, $280.8 \times 10^3 - 10.1 \times 10^3$ (n = 44))と正常対照群 ($110.1 \pm 13.4 \times 10^3$; range, $259.3 \times 10^3 - 13.3 \times 10^3$ (n = 36))で有意差を認めなかった (Mann-Whitney U test, p > 0.05; 図3)。

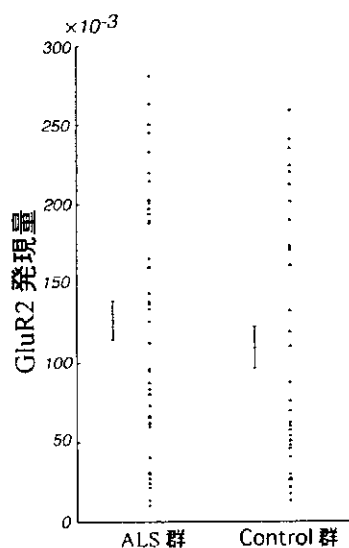


図3 ALS群と正常対照群間での、単一脊髄運動ニューロンにおけるGluR2 mRNA発現量の比較
GluR2 mRNA 発現量を、内部標準 b-actin mRNA 発現量との比で示した。mean \pm SEM も示した。ALS

群3例の44個の運動ニューロンと、正常対照群3例の36個の運動ニューロンで定量。両群で発現量に有意差は認めなかった (Mann-Whitney U test, p > 0.05)。

一方、GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率は、ALS 脊髄運動ニューロンでは5例とも0-100%にばらつき、その平均値は、例外なく100%編集されていた正常対照群と比較し、有意に低下していた (Mann-Whitney U test, p < 0.001; 図4)。疾患対照として、多系統萎縮症 (MSA)、dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) のプルキンエ細胞における RNA 編集率を正常対照群と比較したが、有意差なくほぼ完全に編集されていた (Mann-Whitney U test, p > 0.05; 図4)。さらに細胞選択性を調べるため、ALS 小脳プルキンエ細胞でも編集率を定量したが、やはり非常に高い編集率を保っていた (図4)。

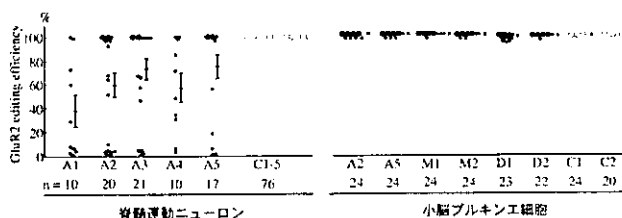


図4 単一ニューロンにおけるGluR2 Q/R部位RNA編集率

ALS 群 5 例 (A1-A5)、コントロール群 5 例 (C1-C5)の単一脊髄運動ニューロンにおける GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率と、ALS 群 2 例 (A2, A5)、多系統萎縮症 (MSA) 群 2 例 (M1, M2)、dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) 群 2 例 (D1, D2)、コントロール群 2 例 (C1, C2)の単一小脳プルキンエ細胞の編集率を疾患対照として示した。mean \pm SEM と解析した細胞数 (n) も示した。運動ニューロンでは、正常コントロール群のすべての細胞において、例外なく編集率は 100%であった。これに対して、ALS 群では、解析した 5 ケースすべてにおいて、編集率は 0% から 100% まで大きくばら

つき、正常コントロール群と比較し、有意に低下していた (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$)。一方、小脳プルキンエ細胞における編集率については、ALS 群、MSA 群、DRPLA 群とコントロール群の間には有意差はない (Mann-Whitney U test, $p > 0.05$)。

考察

ALS 脊髄運動ニューロンでは、これまで考えられてきたような GluR2 サブユニット mRNA の発現量には変化は生じておらず、一方 RNA 編集に異常が生じていることが明らかとなった。この異常は、疾患特異性・細胞選択性があり (図 4)、細胞死に伴う非特異的变化ではないことを示している。GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率を 2/3 程度に落としたマウスは、生下時正常も、一年後に運動ニューロン病を発症することが知られており⁷⁾、動物実験からも、運動ニューロンが RNA 編集率低下に特に脆弱であることが示されている。

脊髄運動ニューロンに発現する GluR2 を含んだ AMPA 受容体密度は、他の神経細胞と比較して優位に低い⁴⁾。また最近の報告によると、未編集型 GluR2 の方が、編集型よりも効率的に機能的 AMPA 受容体に会合し⁸⁾、細胞膜表面へと輸送される⁹⁾ことが明らかになった。これらの事実から、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率がわずかでも低下すると、膜表面に発現する Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の密度がより高くなり、結果細胞死が加速するものと考察される。

結論

ALS 脊髄運動ニューロンでは、AMPA 受容体サブユニット mRNA の発現パターンは、正常対照群と変化はないが、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が有意に低下していることをはじめて明らかにした。この分子変化は ALS 脊髄運動ニューロンの選択的神経細胞死

と深く関連していると考えられる。

文献

- 1) Jia Z, et al: *Neuron* 17; 945-956, 1996.
- 2) Brusa R, et al: *Science* 270; 1677-1670, 1995.
- 3) Takuma H, et al: *Ann. Neurol.* 46; 806-815, 1999.
- 4) Kawahara Y, et al: *J Neurochem* 85; 680-689, 2003.
- 5) Kawahara Y, et al: *Eur J Neurosci* 18; 23-33, 2003.
- 6) Kawahara Y, et al: *Nature*, *in press*.
- 7) Feldmeyer D, et al: *Nat Neurosci* 2; 57-64, 1999.
- 8) Greger IH, et al: *Neuron* 40; 763-774, 2003.
- 9) Greger IH, et al: *Neuron* 34; 759-772, 2002.

ALS モデル動物の AMPA 受容体サブユニット分子変化と病因との関連

郭 伸¹⁾, 孫 慧¹⁾, 河原 行郎¹⁾, 伊藤 杏子¹⁾, 青木 正志²⁾, 金澤 一郎^{1,3)}

- 1) 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
- 2) 東北大学医学部神経内科
- 3) 国立精神・神経センター

研究要旨: ALS の病因解明、治療法の開発にとり、適切な動物モデルの開発は必須である。我々は、ALS 脊髄運動ニューロンで、疾患特異的・細胞選択的に AMPA 受容体 GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集率が有意に低下していることを明らかにしたので、カイニン酸の髄注による脊髄運動ニューロンに特異的な変性を生ずるラットモデルと、ヒト変異 SOD1 トランスジェニックラットにおける神経細胞死を、ALS に特異的な分子変化の観点から検討した。カイニン酸髄注モデルラットは、行動変化、神経病理変化からは、脊髄運動ニューロンに選択的な病変を生じ、ALS の病態を検討するには適したものである可能性が示された。しかしながら、ALS に見られる分子変化の観点からは、両モデルの脊髄運動ニューロンとも GluR2 の RNA 編集に変化が見られず、神経細胞死のメカニズムが異なる可能性が高く、病因としては適切な孤発性 ALS のモデルとは言い難いことを明らかにした。

[はじめに]

孤発性 ALS の病因には AMPA 受容体を介する遅発性興奮性神経細胞死が最も有力であるが、適切なモデル動物は得られていない。我々は、AMPA 受容体サブユニットである GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率低下が孤発性 ALS の病因と密接に関連していることを見いだしたので^{2,7,12}、この分子変化の観点から、カイニン酸の髄注によるモデルラットと、変異ヒト SOD1 トランスジェニック(Tg)ラットにこの分子変化が生じているかどうかを調べ、病因的な異同を検討することを目的とした。また、カイニン酸髄注モデルラットについて、表現型、神経細胞死の選択性の面から、脊髄運動ニューロン死の病態モデルとしての妥当性を検討した。

[方法]

カイニン酸髄注モデルラットは、Nakamura & Kwak

の方法^{5,8,9}により、微小浸透圧ポンプ (Alzet 2004) に充填した 1 mM カイニン酸を脊髄クモ膜下腔に 2、4、8 週間持続的に投与して作成した (各群 n=5)。対照として人工髄液を同期間投与した。

このモデルラットを、表現型、神経病理変化の上から運動機能障害の選択性の有無を検討した。表現型の変化は、rotarod (16rpm, 7 min)の持続時間により運動機能を定量し、感覚障害は後肢の痛覚刺激に対する逃避反射により、膀胱直腸障害は陰部の汚染の有無により判定した。脊髄の病理変化は、10 μ m 厚の凍結切片の Nissl 染色標本により光顕的に観察し、大径ニューロン数 (直径 20 μ m 以上で核小体を持つ前角ニューロン) を算定した。一部、3.5%パラフォルムアルデヒド + 0.5%グルタルアルデヒド (in 0.1 M PBS) 溶液により灌流固定した脊髄を、段階的に 5%-30%蔗糖 PBS 溶液に浸潤させ、凍結下に切片を作成した。

AMPA受容体サブユニットの分子変化の検討のために、このラットおよびヒト変異 SOD1^{Tg} ラット (G93A, H46R; 未発症例、発症例、非Tg 同週齢同胞 各群 n=3) より脊髄運動ニューロンをレーザーマイクロディセクターにより切り出した組織から、定量的 RT-PCR (LightCycler System (Roche Diagnostics)) を行い、AMPA 受容体各サブユニット mRNA を定量、内部標準として β -actin mRNA 発現量も定量した⁴。GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率は、Q/R 部位を含む PCR 産物を作成し、PCR 産物を制限酵素 Bbv1 で消化しその断片を 2100Bioanalyser (Agilent Technology) で定量することにより算出した³。

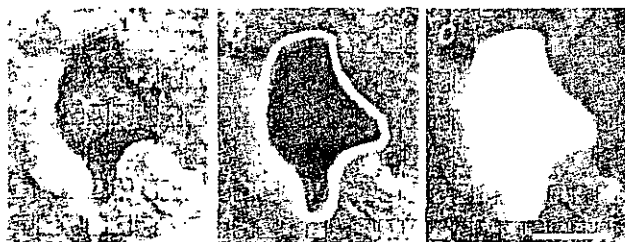


図1 レーザーマイクロディセクターによる単一神経細胞の切り出し

0.1% トルイジンブルー染色された脊髄運動ニューロン (a) の輪郭に沿って、焦点レーザー光で切る (b)。その後、スライドの向きを下にして、その直下に 200 μ l の TRIZOL Reagent (Invitrogen) が入った 0.2ml チューブをセットする。ここに弱いレーザー光を当てることによって、細胞をチューブ内に落とし、回収した (c)。スケールバー、20 mm

[結果]

カイニン酸髄注モデルラットは、時間と共に rotarod 持続時間が短縮した (0週、420 sec; 2週、237.3 \pm 40.4 sec; 4週、205.4 \pm 45.9 sec; 8週: 67.2 \pm 19.0 sec)。8週後においても痛覚刺激に対する逃避反射は保たれており、膀胱直腸障害は見られなかった。

脊髄前角の大径運動ニューロン数は、カイニン酸8週投与ラットと人工髄液投与ラットとの間に有意な差は認

めなかった (それぞれ 3.5 \pm 0.4、3.9 \pm 0.3、Mann-Whitney U test)。カイニン酸8週投与ラットでは、一部の前角大径運動ニューロンに変性像が認められた (図2)。

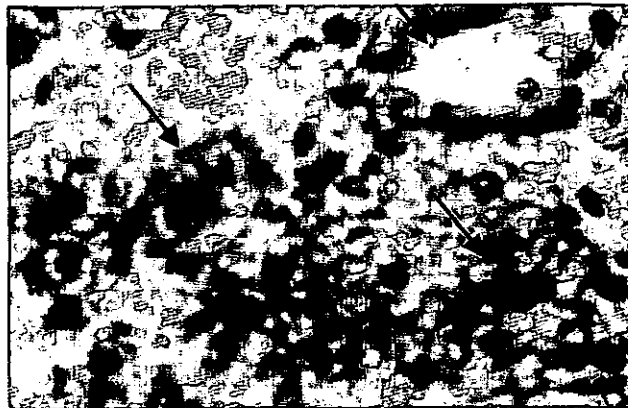


図2 カイニン酸8週間髄注ラット前角運動ニューロンの変性像。

核は偏在し、細胞質のニッスル顆粒が不明瞭になり、一部で空泡が見られる (矢印のニューロン)。特に二本矢で示すニューロンでは、細胞質の染色性は消失している。変性したニューロンをグリア細胞が取り巻いている。

カイニン酸髄注モデルラット脊髄運動ニューロンの AMPA 受容体は、GluR3 の発現量が有意に増加していた (aCSF、24.1 \pm 2.9; 2週 39.6 \pm 8.5; 4週、41.8 \pm 10.4; 8週 44.8 \pm 8.5; 以上 $\times 10^3$ 対 β -actin mRNA 比が、後角ニューロンでは対照との間に有意差がなかった。運動ニューロンの GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率はすべて 100%であった。

Tg ラット (G93A, H46R) 脊髄運動ニューロンの AMPA 受容体発現量には未発症例、発症例とも非Tg 同週齢同胞との間に有意な変化が見られず、また、発症例においても GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率も全て 100%に保たれていた (各個体 20 運動ニューロン以上)。

[考察]

カイニン酸髄注モデルラットは、運動機能選択的な障害、脊髄運動ニューロン選択的な変性、AMPA 受容体分子変化が生じており、脊髄運動ニューロンに選択的な病変を引き起こす疾患モデルと考えられる。しかし、孤発性 ALS に見いだされている、GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率の変化^{2, 7, 12}は認められず、運動ニューロンの変性メカニズムが孤発性 ALS とは異なっていること、すなわち、孤発性 ALS の運動ニューロン死はカイニン酸によるグルタミン酸受容体の持続的な興奮のメカニズムにはよらないことを示唆している。

グルタミン酸受容体アゴニストの脊髄クモ膜下腔への持続投与は、慢性実験では、後角ニューロンの選択的な変性^{1, 5, 8, 9}、短時間投与では、介在ニューロンないし前角運動ニューロン^{5, 6}を傷害することが知られている。カイニン酸の脊髄初代培養系による検討では、後角ニューロンに比し、AMPA 受容体を介する神経細胞死により脆弱であることが示されている¹³。今回初めて、カイニン酸の持続髄注により脊髄運動ニューロンの変性に伴う運動機能選択的な障害を引き起こしうることを示した。この変性は、運動ニューロンに選択的に生じた、GluR3 サブユニットの発現上昇と関連している可能性がある。すなわち、GluR3 サブユニットの発現上昇が GluR2 サブユニットの AMPA 受容体に占める割合を低下させ(aCSF, 41.5% ± 4.1%; 8週, 29.0% ± 3.6%)、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体の割合を増加させることになり、細胞内 Ca²⁺濃度上昇に伴う神経細胞死を引き起こしやすい状態していることが想定される。GluR3 サブユニットは定常的な AMPA 受容体回転により、細胞膜と細胞内小器官との間を輸送されていると考えられており、活動依存性に輸送効率の変わる GluR1 サブユニットとは挙動が異なる^{10, 11}。従って、GluR3 の増加は、AMPA 受容体密度の上昇につながり、AMPA 受容体を介する Ca²⁺の流入はさらに増加すること

が想定される。

カイニン酸髄注モデルラットの運動機能障害、変異ヒト SOD1Tg ラットにおける脊髄運動ニューロン死は、GluR2 RNA 編集低下を伴わず、孤発性 ALS の病因とは異なるといえる。Tg ラットの AMPA 受容体サブユニットには変化が見られず、変異 SOD1 による家族性 ALS の病因には、興奮性神経細胞死のメカニズムは働いていない可能性が高い。

[結論]

カイニン酸髄注モデルラットラットは脊髄運動ニューロンに選択的な変性の病態モデルといえるが、ヒト変異 SOD1 トランスジェニックラットとともに、病的には孤発性 ALS の細胞死とは異なる可能性が高い。

[文献]

- 1 Hirata A, et al. *Brain Res* **771**, 37-44 (1997)
- 2 Kawahara Y, et al. *Nature* in press (2004)
- 3 Kawahara Y, et al. *Eur J Neurosci* **18**, 23-33 (2003)
- 4 Kawahara Y, et al. *J Neurochem* **85**, 680-689 (2003)
- 5 Kwak S, et al. *J Neurol Sci* **129 (Suppl)**, 99-103 (1995)
- 6 Kwak S, et al. *Brain Res* **702**, 61-71 (1995)
- 7 Kwak S, et al. In *Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ed. K Abe) 197-202 (Elsevier Science BV, Amsterdam, 2001)
- 8 Nakamura R, et al. *Brain Res Protocol* **1**, 385-390. (1997)
- 9 Nakamura R, et al. *Brain Res* **654**, 279-285 (1994)
- 10 Passafaro M, et al. *Nat Neurosci* **4**, 917-26 (2001)
- 11 Shi S, et al. *Cell* **105**, 331-43 (2001)
- 12 Takuma H, et al. *Ann Neurol* **46**, 806-815 (1999)
- 13 Vandenberghe W, et al. *J Neurosci* **20**, 123-32 (2000)

「ALS 治療薬リルゾールは、培養アストロサイトの神経栄養因子産生を亢進する」に関する研究

久野貞子¹⁾ 水田依久子¹⁾ 太田潔江¹⁾ 西村公孝¹⁾ 水田英二¹⁾ 太田光熙^{1,2)}

1) 国立宇多野病院臨床研究部 2) 神戸薬科大学臨床化学

研究要旨 成熟ニューロンに対する神経細胞保護作用は、神経変性疾患の治療との関連で重要である。我々は、神経細胞死を抑制し、その保護治療に最適とされる神経栄養因子の産生を亢進する薬物の探索を行っている。本研究では、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療薬であるリルゾールをグリア細胞培養系に添加して検討したところ、リルゾールが神経栄養因子 (NGF, BDNF, GDNF) の産生を強く亢進させる事を明らかにし、本剤の持つ神経保護作用の少なくとも一部はこの神経栄養因子賦活作用に由来すると考えられた。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療薬リルゾール (リルテック) は、運動神経と線条体神経の細胞死を軽減すること、MPTP で惹起されるパーキンソン病マウスに対してドパミン神経細胞への神経保護効果を示すこと、脳内特定部位の神経栄養因子の低下が神経変性に関与している可能性があること、神経栄養因子によって神経細胞死を免れることなどが報告されている。そこで本研究では、培養アストログリア細胞を用いて、リルゾールが神経栄養因子の合成促進作用を有するか否かを mRNA および蛋白レベルで検討した。

方法

培養マウスアストロサイトは 1 日齢 ICR マウス全脳由来のものを用いた。細胞を 10% 血清 DMEM 培養液にてデッシュに $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度でまき、底面一杯に広がれば無血清 DMEM 培養液に交換し、さらに約 1 週間以上培養し、細胞を静止期に導いた。その後、リルゾールを添加し、1-24 時間培養した。その間経時的に細胞および培養液を採取した。

培養上清中の神経栄養因子 (NGF: Nerve growth factor, BDNF: Brain-derived neurotrophic factor, GDNF: Glial cell line-derived neurotrophic factor) の蛋白濃度は、我々が最近確立した ELISA 系を用いて定量した。

神経栄養因子遺伝子発現の解析は、細胞から総 RNA をフェノール/イソチオシアネート法で抽出した後、RT-PCR 法で行った。すなわち、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、バンドの濃さを NIHImage でデジタル解析し、対コントロール (GAPDH) 比を計算して半定量した¹⁾。

結果

培養上清中の神経栄養因子量は、リルゾールの添加量に依存して分泌刺激がみられ、NGF, BDNF, GDNF とともに $426 \mu\text{M}$ で最大であった。そこでこの濃度のリルゾールを添加し、6、15、24 時間目の培養上清を採取し、各神経栄養因子の蛋白濃度を定量したところ、添加 24 時間後の培養上清中に分泌された神経栄養因子は、薬剤無添加コントロールに比べ NGF で 109 倍、BDNF で 2 倍、GDNF では 3.1 倍に上昇