

ALS 患者より病気や治療の効果、予後や見通しが不確かであり生活への影響が深刻で、主観的 QOL が低いことがうかがえた。

3) 主観的 QOL 尺度・コーピング尺度・不確かさ尺度の関連 (表 10)

3 尺度間の関連を Spearman 順位相関係数で分析した。QOL 合計得点と正の相関にあったのはコーピング尺度の情動焦点型対処であった。したがって「状況の良い面を見ながら、今の経験はためになる」と思い、自分で自分を励ます」積極的・肯定的な対処をしている人は主観的 QOL が良い状態にあると考えられる。特に主観的 QOL の中でも下位尺度の「志気」と正の相関があった。したがって「物事の良い面を見て自分を励まし」積極的・肯定的な対処ができる人は「毎日の生活が楽しく、将来に希望が持て、今の自分をすき」と思い、主観的 QOL が良い状態にある傾向であった。

主観的 QOL 下位尺度の「受容」と不確かさは負の相関関係にあった。したがって、治療や経過に対する不確かさが低い方が、周囲の偏見を感じることなく物事の良い面を見て自分を励まし現在の自分の状況を受容しやすい傾向であった。

表 10 主観的 QOL 尺度・コーピング尺度・

	不確かさ尺度の相関(Spearman 順位相関係数)	
	コーピング 情動焦点型対処	不確かさ
QOL 合計	.436**	-.184
志 気	.444**	-.091
受 容	.147	-.248**

* p < 0.05 ** p < 0.01

考 察

患者の身体的状況の中で主観的 QOL 得点に有意な差があったのは日内変動であった。先行研究では H&Y Stage III, IV 群が I 群より優位に主観的 QOL スコアが低値であった⁷⁾が、本研究では有意差はなかった。ここで考えられる事は運動機能障害の進行程度より不安定な日内変動の方が主観的 QOL への影響が大きいということを意味しており、自分の身体的状況が次の瞬間変わるかもしれないという確実性のなさが生活の楽しさや希望、目標を持ちにくい状況においている。

また、調子がよいと感じる時間と主観的 QOL 得点が正の相関にあったことから、患者自身が安定した身体状況であると実感できることが重要である。

家族以外の人との交流も主観的 QOL 得点と有意な差があり、家族以外の友人や知人との交流が生活の張り合いや生きる希望を持てることにつながる事が明らかになった。社会資源サービスの活用が主観的 QOL の向上につながることで、社会的疎外と社会的接触の現象は慢性疾患のもたらすもっとも有害な影響であること⁸⁾合わせて考えると、社会関係のつながりと広がりを持つような支援が必要であることが示唆された。

周囲のひとが自分をどのように思っているか気になったり、

偏見を感じると自分自身を肯定的に見ることができず受容が難しくなる。このような状況と不確かさには関連性があることが明らかになった。疾患や治療、予後の不確かさが高く疾患に関連して起こる出来事に明確な意味を見出せない時には、自分自身を受け入れる事ができず不安定な状態に置かれる。このように疾患からおこるストレスフルな状況に対して、物事の良い面を見て自分を励まし積極的・肯定的な対処をすることが主観的 QOL を高めることにつながる。つまり、疾患と共に生きている今の自分を認めその意味を見出すことである。不確かさを解消するためには、医療従事者は患者が今の状況やこれからの状況を理解し納得できるように説明するのはもちろんの事、様々な困難を抱えながら生活している患者を認め積極的・肯定的な見方ができるような支援が必要である。患者は病状の進行に伴い身体の自由が失われ、社会的な役割も薄れていくことを体験から感じ、自分自身の存在や生き方にも危うさを感じている⁹⁾。そのような状況におかれている患者の訴えや言葉に耳を傾けることが最も必要であると思われる。

結 論

パーキンソン病患者の主観的 QOL の向上には身体的な安定を実感できること、社会とのつながり、不確かさの軽減、積極的・肯定的な対処が必要である。そのためには薬物療法や生活の調整はもちろんのこと、医療従事者は患者が今の状態を理解し納得できるような説明、患者自身が自分の今の状態をありのままに受け止め意味を見出しにいけるような支援が必要である。

文 献

- 1) 竹内博明他：パーキンソン病患者の主観的 QOL 評価，日本看護研究学会誌，22(4)，17-26，1999。
- 2) 藤井千枝子他：難病患者の Quality of Life の向上についての一考察 パーキンソン病患者の主観的満足感を通して，看護研究，30(4)，11-21，1997。
- 3) Soshana Abudi et al：Parkinson's disease symptoms - patients' perception，Journal of Advanced Nursing，25：54-59，1997。
- 4) 川南勝彦他：難病患者に共通の主観的 QOL 尺度の開発，日本公衆衛生雑誌，47(12)，2000。
- 5) Mishel, M. H：Uncertainty Illness Scales Manual. University of North Carolina at Chapel Hill, 1997。
- 6) Mishel, M. H：Uncertainty Illness. IMAGE；Journal of Nursing Scholarship，20(4)：225-232，1988。
- 7) 堀洋道他：心理測定尺度集Ⅲ，サイエンス社，23-26，2001。
- 8) Strauss, LA, 南裕子(監訳)：慢性疾患を生きる，97-102，1987
- 9) 佐々木栄子：パーキンソン病の特徴が自己概念に与える影響，北海道医療大学看護福祉学部 紀要第 10 号，7-15，2003。

和歌山県における筋萎縮性側索硬化症の疫学的研究

紀平為子¹⁾、廣西昌也¹⁾、河本純子¹⁾ 三輪英人¹⁾ 近藤 智善¹⁾

1) 和歌山県立医科大学神経内科

研究要旨：紀伊半島（和歌山県古座川地域と三重県稲原地域）では ALS の高い発症率が 1980 年代以降減少したとされるが、最近の調査はなされていない。本研究では ALS 多発が継続しているか検討するため、アンケート調査と県内各保健所に特定疾患 ALS 登録患者につき聞き取り調査による疫学調査を実施した。調査ではプライバシーに十分配慮した。1998 年から 2001 年の調整発症率は県全体で年平均 2.26、男性 3.09、女性 1.50、県内の地域別分布は古座保健所管轄地域で男性 6.75 であった。和歌山県では女性において ALS 発症率は他報告とほぼ同様で多発は解消していると考えられた。しかし男性では ALS 発症率は尚高値を認め、特に古座地域では著明な高値を示した。何らかの環境要因と性差が本疾患の発症に関与すると考えられた。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位・下位運動ニューロンを系統的におかす変性疾患で、これまで 40-50 歳代の発症が多いとされ、男性にやや多い（男性：女性 1.1~3.0:1）。大部分は孤発例であるが、5-10%に家族性発症が認められる。平均罹病期間は 3~5 年で予後は一般に不良である。有病率は世界の各地域ともほぼ均一で、人口 10 万人当たり

0.8-6.4/10 万人、年間発症率 1~1.5/10 万人とされる¹⁾²⁾。日本の紀伊半島（和歌山県古座川地域と三重県穂原地域）、Guam 島ではかつて有病率が他地域の 10 数倍~100 倍と極めて高いことが示され多発地域として注目された。最近 Guam 島での発症率が激減し ALS の病因に何らかの環境要因の関与が示唆されている³⁾。しかし三重県原穂地域では、尚 ALS とパーキンソニズム痴呆複合 (PDC) の多発が報告されている⁴⁾。本研究では和歌山県での多発の継続につき検討するため、調査対象期間 1998 年 1 月 1 日から 2001 年 12 月 31 日の和歌山県全域での ALS

疫学調査を実施し、前回の 1989-1993 年での調査と比較し文献的考察を行った。

方法

和歌山県内の全医療機関を対象に以下に示す第一回アンケート調査を実施した。1998 年 1 月 1 日から 2001 年 12 月 31 日の間、外来受診あるいは入院した運動ニューロン疾患患者につき、患者数と臨床症状、家族歴、罹病期間を調査した。第一回調査では県・郡市医師会の協力を得ると共に本教室より 569 医療機関にアンケート用紙を送付した。回答を得た医療機関に EL Escorial 改訂 ALS 診断基準⁵⁾に基づく第二回アンケート調査を送付した。さらに、県内各保健所に ALS の特定疾患医療受給者証交付の登録患者につき聞き取り調査を行った。

調査ではプライバシーに十分配慮し、患者の同定はイニシャルと生年月日・性別・住居地の管轄保健所名により行った。従って個人の特定を行わなかった。データや書類は、本研究責任者が

保管庫に施錠し管理した。パソコンで扱うデータはパソコン本体には保存せず、MOで施錠保管した。MOのコピーはバックアップ用1個のみとした。このMOの使用は本研究の責任者と同教室の協力研究者（共著者）のみとした。

本研究では、和歌山県での年齢・性を調整したALS発症率と臨床的特徴を検討した。さらに、和歌山県内9保健所管轄地域ごとの調整発症率を男女別に検討し、従来の疫学調査、特に1989-1993年の調査との比較を行った。和歌山県の人口は1,087,781人、男性506,882人、女性563,030人（2000年10月1日現在、厚生省人口統計による）であり、本研究期間中の統計計算にはこの値を使用した。

結果

第一回調査では、344医療機関より回答を得、回収率58%、第二回調査では聞き取り調査を含め99%の回答を得た。1998年1月1日から2001年12月31日までのアンケート調査と保健所聴き取り調査によるMND回答例数は179例、このうち期間中の県内出身のMND例114例、ALS例は108例で、男女比は1.84:1、家族歴を有する例は5例（4.6%）であった。El Escorial改訂ALS診断基準に基づく病型分類ではdefinite89例、probable3例、possible7例、その他特定疾患登録個人調査表からALSと判断した例9例であった。

調査期間中の平均発症年齢は64.5±10.2歳（男性63.9±10.3歳、女性65.8±10.2歳）であった（図1）。男性では65-69歳にピークを示し、女性では、55-54歳と70-74歳にピークをもつ二峰性を示した。

調査期間中の和歌山県におけるALSの

粗発症率は年平均2.50（男性3.45、女性1.68）であった（表1）。年齢・男女別人口10万人当のALS発症頻度は、男性では65-69歳と75-79歳の発症頻度が高く、女性でも65-69歳と80-84歳に高くほぼ同様の傾向が認められた。

2000年厚生省人口統計による年齢と性を調整した調整発症率は県全体で年平均2.26、男性3.09、女性1.50であった。地域別では古座保健所管轄地域を除き和歌山県内ほぼ均一に1.34~2.78、男性では1.68~4.86を示した。古座保健所管轄地域では調整発症率3.64、男性6.75、女性1.02と男性で高値を認めた（表2）。和歌山県での2001年12月31日現在の粗有病率は10.39（男性14.60、女性6.93、人口10万人当）であり、調査期間以前に発症した生存症例が27例（男性18例、女性9例）認められた。

初発症状として球麻痺を示した例18.7%、上肢症状を呈した例29.9%、下肢脱力や歩行障害を示した例18.7%、上下肢症状を示した例13.9%、その他、呼吸障害で発症した例3.7%であった。ALSにその他の症状を合併する例が10例認められ、痴呆症状6例、安静時振戦、筋強剛、精神症状、macroglobulinemiaを呈する例各1例であった。

考察

本研究で県内の地域格差は解消されつつあり、これまで高値が示された紀伊半島中南部よりむしろ和歌山市や県北部地域で男性の発症率が高い傾向が認められた。しかし、従来多発地とされた古座地域では現在でも男性で調整発症率6.75/10万人と高値を示したことは注目に値する。本邦でのその他の地域の粗発

症率は 1~1.5 (人/10万人)^{1),2)}、北海道での粗発症率 0.66-0.69⁶⁾、アメリカ、北スウェーデン、フィンランド、カナダなど 8 カ国を含む地域の粗発症率 0.6-2.6⁷⁾と報告されている。和歌山県では特に男性において ALS の多発が継続していると考えられた。

わが国の紀伊半島古座川地区、穂原地区、Guam 島南部は 1960 年代から ALS の多発が報告され、1963 年当時の有病率は古座川地区 73.9/10 万人⁸⁾、穂原地域では 152.7/10 万人⁹⁾と報告された。これら多発地域では 1970 年代から患者の発症が減少し、1980 年代には他地域の数倍程度まで激減した。1990 年代の再調査ではやはり紀伊半島中南部で高い発症率を示し、古座川地区では 1989 年~1993 年間の調整発症率 9.54 であった¹⁰⁾。

次に発症年齢について、本研究では ALS の平均発症年齢は 64.7 歳、男性では 65-69 歳をピークとしたほぼ正規分布を示し、女性では 55-59 歳と 70-74 歳にピークをもつ二峰性を示すと考えられた。また、年齢別発症頻度が男女とも 65-69 歳と 75-80 歳にピークを認めたことが特徴であった。1989-1993 年の和歌山県内での調査¹⁰⁾と比較するとほぼ同様であり、この 10 年間で平均発症年齢には変化がみられないと考えた。1982 年の ALS 全国調査では平均発症年齢は男女 54.2 歳¹¹⁾、1980 年-1989 年の北海道における ALS 疫学調査では 58.2 歳 (男性 57.7 歳、女性 58.9 歳)⁶⁾と本邦の 1980 年代の調査では 60 歳未満の報告が認められる。ALS の発症は加齢に伴い増加する傾向が示されているが、本研究でも発症の高齢化が推察され今後さらに検討する必要がある。

結論

本研究において、和歌山県の ALS 調整発症率は女性に於いて著明な減少を示すが、男性では県内均一に高いことが明らかとなった。これまで高値が示された紀伊半島中南部よりむしろ和歌山市や県北部地域において男性の発症率が高い傾向が認められた。従来多発地とされた古座地域では現在でも尚男性に於いて高値を示したことは注目に値する。何らかの環境要因が特に男性に強く作用していると推察され、今後更に環境要因を含む疫学調査が必要と考えられた。

文献

- 1) 近藤喜代太郎: "Annual Review 神経 1991" 中外医学社, p371-382, 1991.
- 2) 八瀬善郎: 神経進歩 33: 741-751, 1989.
- 3) Plato CC, et al. Am J Epidemiol, 157, 149-157, 2003.
- 4) 葛原茂樹. 神経内科 50,137-145, 1999.
- 5) World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases: A Consensus Conference held at Airlie House, Warrenton, Virginia April 2-4, 1998.
- 6) 田代邦雄, ほか. -厚生省特定疾患神経変性疾患調査研究班, 1990 年度研究報告書 (万年班長), pp. 113-116, 1991.
- 7) Chancellor AM, et al. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 55, 1106-1115, 1992.
- 8) 木村潔, ほか. 精神神経学雑誌, 65, 31-38, 1963.
- 9) 松本宣光. 和歌山医学, 18, 33-45, 1967.
- 10) Yoshida S, et al. J Neurol. Sci 155, 146-155, 1998.
- 11) Uebayashi, U, et al. Neuroepidemiology 2, 243-256, 1983.

図1 発症年齢

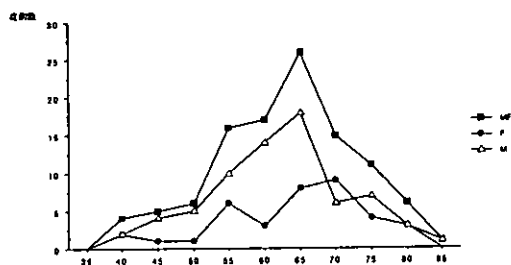


表1 粗発症率

発症年	県内発症例 (人)			粗発症率 (10万人当)		
	総数	男性	女性	総数	男性	女性
2001年	35	22	13	3.22	4.34	2.31
2000年	20	16	4	1.84	3.16	0.71
1999年	27	19	8	2.48	3.75	1.42
1998年	26	13	13	2.48	2.56	2.31
年平均	27	17.5	9.5	2.50	3.45	1.68

表2 地域別調整発症率

	総数	男性	女性
和歌山県	2.26	3.09	1.50
和歌山市	2.18	3.23	1.25
岩出保健所管轄地域	2.08	2.91	1.30
高野口保健所管轄地域	2.78	4.86	1.34
湍南保健所管轄地域	2.54	4.36	2.31
湍渡保健所管轄地域	2.14	1.68	2.58
御坊保健所管轄地域	2.61	3.65	1.67
田辺保健所管轄地域	2.05	2.53	1.63
新宮保健所管轄地域	1.34	2.31	0.46
古座保健所管轄地域	3.64	6.75	1.02

ALS データベース研究 予備調査の成果と今後の方向

（主任）研究者 葛原茂樹¹⁾

研究協力者 大生定義²⁾ 山口拓洋³⁾ 斎藤真梨³⁾ 伊藤陽一³⁾ 大橋靖雄³⁾
森若文雄⁴⁾ 田代邦雄⁴⁾ 鈴嶋よしみ⁵⁾ 福原俊一⁵⁾ 成田有吾¹⁾

1) 三重大学医学部神経内科、 2) 横浜市立市民病院神経内科、 3) 東京大学大学院医学系研究科生物統計学、 4) 北海道医療大学心理科学部、 5) 京都大学大学院医学研究科健康解析学

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症患者・介護者・担当医の各種スケール・診断経緯・治療内容・介護者負担等のデータベースの構築と新知見の探索・所見の定量化をめざし、介入研究・記述研究に有用な項目の選択・比較も行い、併せて参加研究者へデータ活用を常時行える環境の提供を目的とする。方法は、継続的アンケート調査で、期間毎に収集状況・集計結果をフィードバックし、双方向性で参加の全研究者にデータ活用を可能にする。解析は事務局がサポートしていく。すでに予備調査では、50 例以上が参加、ALSAQ-40 日本語版の妥当性が検証された。患者のローカスオブコントロールの低下など、疾患受容の違いが定量的に示された。今後、このプロジェクトが進行する中で、経時的データの集積により、患者・家族の診療満足度が介入や環境とどう関連して動くかなど縦断的な知見も期待でき、研究参加者間の多方向の検討の常設化は研究の進展に資するものと思われる。

はじめに

共同研究者の大生が、属していた QOL 判定手法に関する研究班（主任研究者福原俊一）^{1)・2)} と ALS のガイドライン小委員会（委員長田代邦雄）の協力³⁾ で予備的に行っていた調査を発展的に継続することとなった。

データベース研究は、北米^{4)・5)} などで行なわれ、現実の診療とガイドラインの乖離などの知見も得られている。数年前に北米の項目を田代と米国の三本先生のご好意で入手し、それらと日本独自の項目や測定スケールを入れて大生と山口が中心となり、2001 年から 2002 年にかけて予備調査を行なった。今回はこの内容を若干紹介するとともにこれからの研究計画を発表する。

研究目的

①筋萎縮性側索硬化症患者、介護者、担当医に対しアンケート方式で各種基礎データの収集と ALSFRS-R、SF-36、介護負担度、ALSAQ40^{註1)}、NAS-J^{註2)}等を継続的に調査し、症状や治療状況、介護者の QOL などについてデータベース化する。

②臨床症状や各種介入の推移を把握し、それらの関連性についても検討する。患者のみならず介護者に関する QOL や介護負担感に関する検討も行う。

③介入研究や記述研究に役立つ各種の必要な項目の選択・比較と改訂を行う。

④共同研究者と双方向で解析を進め、仮説の形成を

支援する。

研究方法

対象は入院・通院・在宅療養中の本症患者・介護家族・担当医で、IC:担当医が予めアンケート調査を依頼し、了解の得られた患者に対して調査を行う。調査前に、ヘルシンキ宣言に則って説明、文書で同意を得た後に実施する。

本研究に関心のある本症治療施設の医師は、研究事務局（東京大学大学院医学系研究科生物統計学）宛に参加意向の連絡をする。本研究の趣旨に同意が得られた場合には、研究事務局から登録票が送付され、担当医はそれを記入の上事務局に郵送する。事務局で登録票を確認のうえで、調査票を担当医宛に送付する。担当医が informed consent を得たうえで、2週間以内に最初の調査を行う。その後、3ヶ月毎に同様の調査を継続して行う。記入がすんだ調査票は、直ちに研究事務局に郵送する。

調査表 1：医師記入分の項目 患者基礎情報（年齢・性・身長・体重）・診療形態・痴呆の有無・症状の発現時期・初発部位・診断時期・外科手術の有無・病型・“非定型特徴”の有無・日本版 ALSFRS-R・エルエスコリアル診断基準・薬物治療内容・治療的インターベンション・肺活量（肺活量又は強制肺活量－最大値）・呼吸インターベンションの有無と使用時間・胃瘻や経鼻の経管栄養の施行・合併症・併存症の有無・ガイドラインでいわれている ALS 診療に含まれる

項目のうち、これまでに患者に対して説明したものと行ったもの

調査表 2：介護者記入分の項目 介護者基礎情報（年齢・性・患者との関係・介護の必要性・実際に介護しているか）・SF36・雇用状態・患者との同居・介護者の人数・介護による生活の影響・Zarit介護負担度・介護負担感スコア（三重大）・患者についてのALSFRS評価（介護者による）

調査表 3：患者記入分の項目患者基礎情報（身長・年齢・出生地・性・仕事・学歴・収入）・ALSの初発症状・来院理由・最初の診断名・他医受診の有無・診断結果の聞き方・診断時の情報提供・診断の方法・進め方についての満足度・対症療法の状況・身の回りのサポート状態・リフレックの服用の有無・ビタミン剤や補助薬品などによる代替治療の有無・薬剤等の費用額・SF36・経管栄養の状況・呼吸補助機械の使用状況・説明やケアの満足度・ALSAQ40・家族歴・既往歴・記入の介助の有無・NAS-J（帰属スタイル以外の6項目）

結果の公表とデータベースのデータ使用

原則として、毎年度毎に、データの収集状況や集計結果を含めた報告書を研究事務局が作成し、研究参加者に配布するものとする。

本研究に参加している全ての研究者は、その仮説に基づいて、データを使用する権限があるとする。その場合には研究事務局に連絡し、データ解析のサポートを受ける。結果を公表する場合には、ALSデータベース研究組織のデータを使用している旨を記載する。

結果：予備的（項目は、前述とほぼ同じ）横断調査回収状況

2001年10月から調査は開始され、担当医師／介護者／患者65組にアンケートを配布し、2002年8月末現在、担当医師45人、介護者63人、患者59人からアンケートが回収された。

結果の概要

1、各項目についての単純集計（本調査開始時に参加者に配布予定）。

2、ALSAQ-40日本語版の妥当性の検討⁶⁾の概要
大学病院など15施設における本症患者（男性64%、平均年齢58.5歳、平均罹病期間58.5カ月、古典的ALS44%、呼吸器介入46%）と担当医師のペアの回答が得られた39組が解析対象。

内的整合性

想定した5つのドメイン毎のCronbachの α 係数は、0.95-0.97：オリジナル版とほぼ等しいか大きい。
各項目とその項目が属するドメインの他の項目の合計点との相関係数（item to total correlation）もついては、Emotional Functioningで用いられている項目

EF_3「マナーと違うことをして、はずかしいと思ったことがある」の相関係数が0.54以外は0.7-0.95。

収束妥当性および判別妥当性

ALSAQ-40のPhysical Mobilityドメインスコアは、ALSFRS-Rの全ての項目、SF-36の身体機能(Physical Functioning)と日常役割機能(身体)(Role-Physical)ドメインのみと有意な相関が見られ、SF-36の日常役割機能(Role Emotional)や社会生活機能(Social-Functioning)等とは認められなかった。また、Emotional Functioningドメインスコアは、ALSFRS-Rの言語(Speech)等と、SF-36の心の健康(Mental Health Index)、活力(Vitality)、全体的健康観(General Health Perceptions)等と有意な相関が認められたが、ALSFRS-Rの書字(Handwriting)や階段登り(Climbing stairs)とは認められなかった。その他のドメインスコアについても、関連があると思われる他の変数とは有意な相関を示しており、関連がないと考えられる変数との相関はあまり高くなかった。

3、包括的健康関連QOLスコアの傾向

SF36 8下位尺度全てにおいて、ALS患者のスコアは国民標準値よりも有意に低かった(図1)。

(サンプルの性・年代に該当する日本人国民標準値を基準として標準化した得点を用いた。国民標準値の平均値を50点、標準偏差と10点として計算して表示している。身体機能、日常役割機能(身体、精神とも)、社会生活機能は、標準値の2SD以下という非常に低い得点であった。特に、身体機能、日常役割機能(身体、精神とも)、社会生活機能は、標準値の2SD以下という非常に低い得点であった。ALSは「身体機能」が著しく障害されており、それに伴って、「日常役割機能」や「社会生活機能」も障害の程度が大きくなると考えられる。また、「心の健康」や「活力」も他疾患よりも有意に低い。「体の痛み」は、他疾患とさほど変わらなかった(図2)。

4、心理的適応尺度の傾向(図3)

ALS患者のNAS-J(心理的適応尺度)得点を、他疾患と比較した。性・年齢を調整変数とした共分散分析を行った。7つの下位尺度のうち「受容」は健常者に適用できないため、健常者は残りの6下位尺度のデータを使用した。ALS患者は、「不安・うつ」「自尊感情」「態度」「ローカスオブコントロール」において、健常者よりも有意に低い得点を示した。「不安・うつ」「ローカスオブコントロール」「受容」においては、ALS患者は、パーキンソン病患者や視覚障害者よりも有意に低い得点を示した。「自己効力感」は、群間に有意な差が見られなかった。(ALSは自己効力感があまり低くない)ALS患者においては、特にローカスオブコントロールが低いことが特徴的で、「受容」も、

他の疾患よりも顕著に低いのが特徴的である。

考察と結論

今回紹介した結果は鋳山の中の一部を紹介したに過ぎないが、共通の尺度たとえば、心理的適応の尺度 (NAS-J) では、本症患者のローカスオブコントロールや受容が低いなどが浮き彫りとなった。また ALSAQ40 など疾患特異的尺度の妥当性も予備的調査の段階で明らかにできた。患者のみならず、介護者の QOL スケールも調査している。質的研究方法もとりいれ、広く他の方面との共同研究のフィールドにもなり得ると考える。本予備調査でも、50 例を超える参加があり、解析を待っているデータも横断的調査でも多い。

今後、経時的なデータを得ることにより、患者・家族の診療満足度が介入や環境とどう関連して動くかなどさらなる知見も期待できる。この調査が継続することにより、多くの新しい知見や仮説形成を促し、臨床家の印象への客観的・定量的なサポートを与えるものと思われる。

また、新たに研究参加者との双方向あるいは研究参加者間での検討を常設化することは今後の研究に資するものと考えられる。

参考文献

- (1) 大生定義：神経疾患のQOL評価 2001 年度神経変性疾患に関する研究班研究報告書 神経変性疾患に関する研究班・特定疾患患者の生活の質の判定手法の開発に関する研究班合同ワークショップ (平成14年1月11日 東京) 13-15 2002
- (2) 萱間真美ら：筋萎縮性側索硬化症患者の介護負担に関する質的研究 厚生労働省科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 特定疾患のアウトカム研究：QOL, 介護負担, 経済評価班 平成14年度 総括・分担報告書 7-16 2003
- (3) 日本神経学会治療ガイドライン Ad Hoc 委員会 ALS治療ガイドライン小委員会：ALS治療ガイドライン2002 臨床神経 42 670-719 2003
- (4) ALS C.A.R.E. Study Group : The ALS patient care database: goals, design, and early results. Neurology.54:53-7. 2000
- (5) Bradley WG et al: Current management of ALS: comparison of the ALS CARE Database and the AAN Practice Parameter. The American Academy of Neurology. Neurology. 57:500-4 2001
- (6) 山口拓洋ら：ALS特異的QOL尺度ALSAQ-40 日本語版—その妥当性と臨床応用にむけて—投稿中
- (7) Jenkinson C et al: The amyotrophic lateral sclerosis assessment questionnaire (ALSAQ-40): tests of data quality, score reliability and response

rate in a survey of patients. J Neurol Sci 180: 94-100, 2000

(8) Suzukamo Y et al: Development and Validation of "The Nottingham Adjustment Scale Japanese Version" which Measures Psychological Adjustment to the Visual Impairment. Jpn J Psychosom Med. 41: 610-618 2001

註1)

ALSAQ-40 : ALS 特異的 QOL 尺度⁷⁾
オリジナル版の妥当性、信頼性(再現性)等の計量心理学的な特性は検証されている。Physical Mobility (10項目)、ADL/Independence (10項目)、Eating and Drinking (3項目)、Communication (7項目)、Emotional Functioning (10項目)の5つのドメインから構成され、その簡易版であるALSAQ-5)が米国神経学会ALSデータベースにも用いられている。

註2)

Nottingham Adjustment Scale (NAS)1991年、イギリスのA.Doddsらが作成。視覚障害への心理的適応に関連する7つの心理的変数を測定。

- 1) 不安・うつ 12項目
- 2) 自尊感情(self-esteem) 9項目
- 3) 視覚障害者への態度 7項目
- 4) ローカスオブコントロール 4項目
- 5) 障害の受容 9項目
- 6) 自己効力感(self-efficacy) 8項目
- 7) 帰属スタイル6項目

計55項目からなる。日本語版においては0から100の範囲で表され、高得点ほど適応している状態を示している。NASの日本語版(以下NAS-Jと表記)は、Suzukamoら⁸⁾によって作成され妥当性・信頼性が検証された。本研究では、「視覚障害」という表現を「パーキンソン病」に変更した「NAS-J」パーキンソン病版を使用した。NAS-Jパーキンソン病版は、本研究に先立って、その信頼性・妥当性の検証が終了している。

謝辞

ALSAQ40の妥当性検証に直接協力頂いた先生方をここに掲げ、謝意を表したい。(施設は当時、敬称略)

釧路労災病院 津坂和文
国立療養所道北病院 箭原 修
国立療養所札幌南病院 藤木直人
九州大学附属病院 大八木保政
国立療養所千葉東病院 今井尚志
国立療養所南九州病院 福永秀敏
都立神経病院 加藤修一

長野赤十字病院 矢彦沢裕之
 国立中信松本病院 大原慎司
 東邦大学大橋病院 岩崎泰雄
 福島県立医科大学病院 山本悌司
 国立療養所山形病院 木村 格
 国立療養所南岡山病院 難波玲子
 東北大学医学部附属病院 青木正志
 横浜市立市民病院 渡辺 良

図3 心理適応尺度の比較

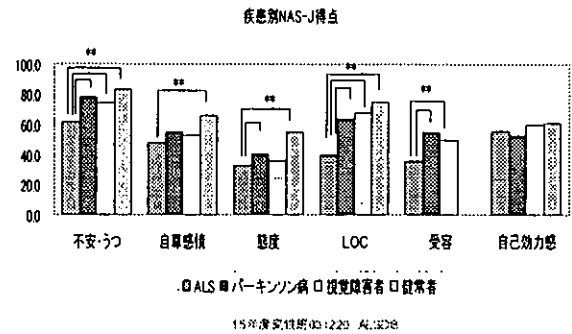


図1 SF36

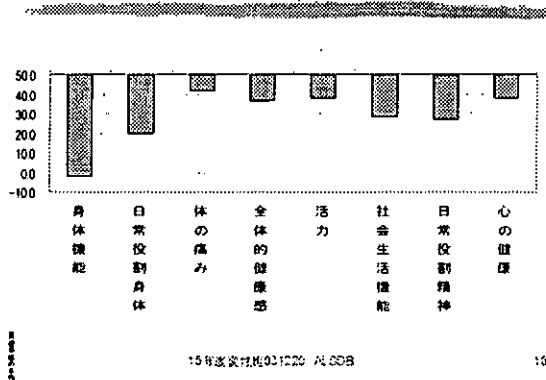
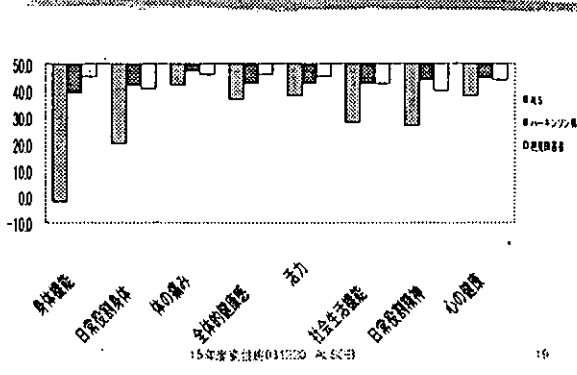


図2 SF36:他疾患との比較



ハンチントン病マウスモデル脳における遺伝子発現変化の検討—II

貫名 信行¹⁾, 小山 文隆¹⁾, 宮崎 晴子¹⁾, 黒沢大¹⁾
Kotliarova S.E.¹⁾, Jana N.R.¹⁾, 坂本 尚昭¹⁾

1) 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター病因遺伝子研究グループ

研究要旨 昨年度確立したハンチントン病トランスジェニックマウス脳における遺伝子発現変化を解析した。トランスジェニックマウス(HD190QG)脳における190Qを含む伸長 polyQ-EGFP 融合タンパク質の GFP の蛍光を直接イメージャーに取り込むことで融合タンパク質の脳内での発現部位を調べることが出来た。12 週から 24 週齢では海馬、線条体および視床下部での 190Q を含む伸長 polyQ-EGFP の強い蛍光を示す凝集物が形成された。その EGFP 陽性の凝集体は主として細胞質に形成されたものであった。これらの分布はトランスジェニックマウスで発現が低下する DARPP-32、oxytocin によって想定される病変部位と対応していた。また、EGFP をプローブに *in situ* ハイブリダイゼーション法でトランスジェニックマウスを解析するとトランスジーンは脳内で広く発現していた。これらのことから細胞質凝集体が核内凝集体と平行して形成され、対応する遺伝子発現異常を引き起こす可能性が考えられる。

はじめに

ハンチントン病(HD)は CAG リピート病の一種で、典型的な常染色体優性遺伝の形質を示す遺伝病である¹⁾。この疾患の原因は病因遺伝子であるハンチンチンの exon 1 領域に存在する CAG トリプレットリピートの伸長であり、翻訳産物のハンチンチンの伸長 polyglutamine (poly Q) が原因となり HD が発症する²⁾。

これまで HD の発症メカニズムに関しさまざまな研究がなされており、伸長 polyQ 断片が核内封入体を作りその過程で転写因子などを取り込むことで遺伝子発現が変化し発症にいたる、などの仮説が提唱されている³⁾。本研究では伸長 polyQ が引き起こす神経細胞変性のメカニズムを明らかにするため、トランスジェニックマウスを作成し DNA チップ法を用いて変化する遺伝子を網羅的に検索している。昨年引き続きトランスジェニックマウスの解析と発現が変化した EST の遺伝子を明らかにする研究をすすめている。

方法

トランスジェニックマウスの作成

ヒトハンチンチンプロモーターの下流に 150 CAG トリプレットリピートを含む exon1

断片と翻訳産物の可視化のために EGFP cDNA を結合した 2.9 k b のトランスジーンを構築した。このトランスジーンからトランスジェニックマウスを作成した。

伸長 polyQ-EGFP 凝集体の共焦点顕微鏡あるいは蛍光イメージャーでの解析

トランスジェニックマウスから経時的に脳を採取し凍結切片を作成した。EGFP の蛍光を共焦点顕微鏡あるいは BIO-RAD の Molecular Imager FX に取り込むことで融合タンパク質の凝集体の分布を経時的に調べた。

In situ ハイブリダイゼーション

定法に従って凍結切片を digoxigenin で標識した cRNA をプローブにハイブリダイゼーションを行った。トランスジェニックマウスおよびその同腹コントロールを比較することでその遺伝子の脳内発現部位およびトランスジェニックマウスでの発現変化を確認した。

結果と考察

トランスジェニックマウスの解析

ヒトハンチンチンプロモーターの下流に 150 CAG リピートの exon1 断片、その翻訳産物の可視化のために EGFP cDNA を結合したト

ランスジーンを作製した。このランスジーンよりランスジェニックマウスを2ライン得た。それぞれマウスゲノムに組み込まれたランスジーンは190、150 CAG リピートであった。マウスのリピート数とEGFPが付加していることで、HD190QG、HD150QGとなづけた。

両ラインとも神経症状を示した。HD190QGラインでは5週くらいから小刻みな震えが始まり8週で顕著になり、週令とともに体重の減少、症状の悪化が認められた。これらのマウスでは生存が短くなり、平均生存値はそれぞれ23週 (HD190QG) 41週 (HD150QG)であった。

伸長 polyQ の凝集物は核と細胞質に形成される

HD150QGより凍結切片を調製し、共焦点顕微鏡によりEGFPの蛍光を観察することでランスジーンの発現、脳内での凝集体の蓄積を調べた。まず伸長 polyQ凝集体の蓄積と週齢の関係を調べた。2週齢では蛍光は認められなかったが、5週齢の線条体では伸長 polyQの蛍光が認められ、細胞質、核内に伸長 polyQ凝集体が認められた。10週では核内凝集体がユビキチン抗体陽性になった。32週ではユビキチン陽性の核内凝集体から蛍光が消失した。他方、細胞質凝集体のEGFPの蛍光は週齢と共に増加した。

ユビキチン陽性の核内凝集体はEGFPの蛍光を失う

32週齢のHD150QGのユビキチン陽性の核内凝集体は週齢と共にEGFPの蛍光を失った。しかし、核を分画しEGFP抗体を用いてウェスタンブロット法で解析したところ核内には伸長 polyQ-EGFP融合タンパク質が存在していることがわかった。また、EGFP抗体で染色すると核内凝集体が染色された。このことから核内凝集体にはEGFPは存在しているが核内プロテアーゼなどにより蛍光が消失したものと考えた。

蛍光イメージャーによる伸長 polyQ-EGFP凝集体の脳内分布

上の結果は、EGFP陽性の凝集体は主として細胞質に形成されたものである、ことをしめす。次にHD190QGマウス脳で発現する伸長 polyQ-EGFP凝集体の脳内分布をEGFPの蛍光をイメージャーに直接取り込むことで調べた。

同腹正常マウスを対照にすると、4週では弱いながらも検出可能なレベルの蛍光が観測できた。12-24週のマウスではさらに強い蛍光が認められ、脳の広範、特に線条体、海馬、視床下部で週齢と共に増加した。このようにランスジェニックマウス(HD190QG)脳における伸長 polyQ-EGFP融合タンパク質のEGFPの蛍光を直接イメージャーに取り込むことで融合タンパク質の脳内での蓄積部位を調べることが出来た。

HD190QGでの遺伝子発現変化

今回作成したランスジェニックマウスをGeneChipで解析することで350遺伝子の変化を明らかにした。神経機能に関係する遺伝子、enkephalin, oxytocin, vasopressinそして対照として用いた主として線条体 spiny neuronで発現することが知られているpreprotachykinin Aの遺伝子発現をTaqMan RT-PCR法でしらべた。前3種の遺伝子はHD190QGで明らかに発現が減少していた。これに対し、PPTA mRNAは発現に変化が認められなかった。

伸長 polyQ-EGFP凝集体の分布はDARPP-32とoxytocinの発現が低下する部位と一致している

24週齢の線条体、視床下部には伸長 polyQ-EGFPの強い蛍光を示す凝集体が存在していた。

DARPP-32とoxytocin mRNAはHD190QGでの発現低下が示されたのでin situ ハイブリダイゼーション法で脳内分布を調べた。コントロールマウス脳ではそれぞれ線条体、視床下部で高い発現が認められた。他方HD190QGマウス脳では明らかに発現が低下していた。つまり、伸長 polyQ-EGFPの凝集体の分布はランスジェニックマウスで発現が低下するDARPP-32、oxytocinによって想定される病変部位と対応していた。

EGFPをプローブにin situ ハイブリダイゼーション法で解析するとランスジーンはHD190QG脳内で広く発現しており、病変部位での過剰発現は認められなかった。

結論

このことから細胞質凝集体が核内凝集体と平行して形成され、病変領域に特異的遺伝子発現異常を引き起こす可能性が考えられる。

文献

1. Harper, P. S. Huntington' s Disease (London: W. B. Saunders) (1991).
2. Huntington' s Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington' s disease chromosomes. The Huntington' s Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72, 971-983 (1993).
3. Mitsui, K., Nakayama, H., Akagi, T., Nekooki, M., Ohtawa, K., Takio, K., Hashikawa, T., Nukina, N. Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1a and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *J. Neurosci.* 22, 9267-9277 (2002).

ALS モデル SOD1 変異(G93A)マウスにおける

SOD1,GRP75 及び PMP70 の細胞内局在の検討

阿部康二¹⁾、Hristelina Ilieva¹⁾、永野 功¹⁾、村上哲郎¹⁾、
塩手美冬¹⁾、奈良井恒¹⁾、永田哲也¹⁾、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 今回、我々は ALS モデル SOD1 変異マウスにおいてミトコンドリア/ペルオキシソームに関連する GRP75 及び PMP70 の細胞内局在とその変化について検討した。その結果、発症前においてペルオキシソームの変化が見られており、これは SOD1 変異マウスの発症に重要な知見と思われる。

はじめに

ALS モデル SOD1 変異マウスにおける運動ニューロン死の正確な機序は未だ不明である。しかし細胞内オルガネラの機能的損傷が深く関与していると考えられている。ミトコンドリア/ペルオキシソームは細胞内において ROS の産生に深く関わっている。今回我々はミトコンドリア/ペルオキシソームに関連する GRP75 及び PMP70 の細胞内局在とその変化について検討した。

方法

ALS モデル SOD1 変異マウスにおける運動ニューロン死の正確な機序は未だ不明である。しかし細胞内オルガネラの機能的損傷が深く関与していると考えられている。ミトコンドリア/ペルオキシソームは細胞内において ROS の産生に深く関わっている。今回我々はミトコンドリア/ペルオキシソームに関連する GRP75 及び PMP70 の細胞内局在とその変化について検討した。

結果及び考察

SOD1 変異マウスでは SOD1 が、前角の neuropil に

おいて点状の沈着物として検出されたが、32 週齢では白質や運動ニューロンにおいてむしろ発現低下が見られた。(Fig. 1) GRP75 と SOD1 の共発現は発症前 SOD1 変異マウスとコントロールの両者に見られたが、発症後は失われた。(Fig. 2, 3) 更に発症前の 20 週齢と発症後の 32 週齢では PMP70 は運動ニューロン細胞質では減少していたが、発症後マウスの前角のグリア細胞では増加していた。(Fig.4) これらは SOD1 の可溶性や輸送の変化によると考えられた。

文献

- Kira, Y. et al.: Arch. Biochem. Biophys., 399, 96-102, 2002
Higgins, C.M.J. et al.: J. Neurosci., 22, 215, 2002
Warita, H. et al.: Brain Res., 819, 120-131, 1999
Jaarsma, D. et al.: Neurobiol. Dis., 7, 623-643, 2000
Borchelt, D.R.: Neurobiol. Dis., 5, 27-35, 1998

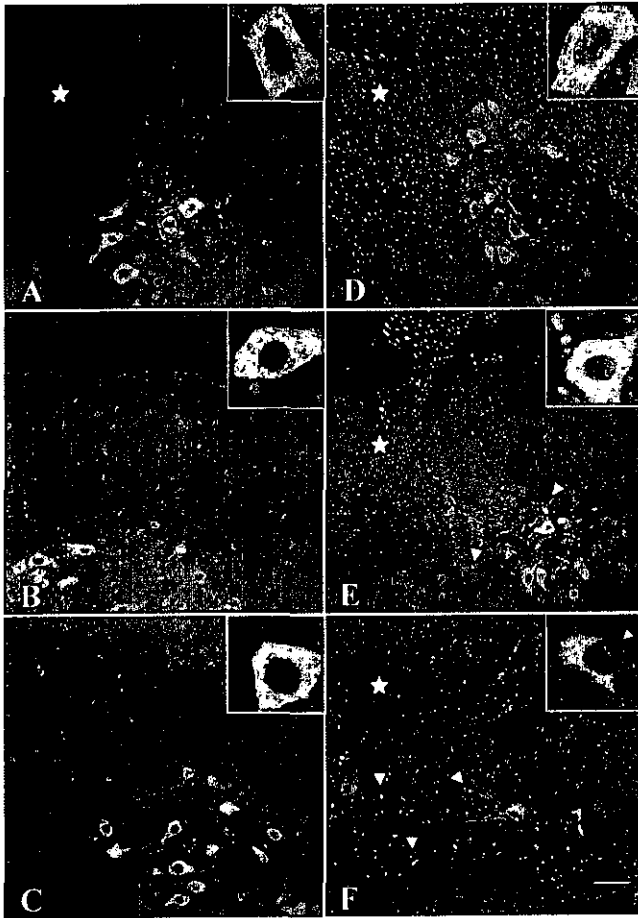


Fig. 1

In Wt mice SOD1 immunoreactivity did not show a change and was essentially the same at ages 8, 20 and 32W (Fig. 1, A, B, C). Compared to Wt mice, pre-symptomatic Tg mice showed an intense SOD1 signal in the white matter (WM) of anterior and lateral column at 8 W, which is absent in Wt animals at 8W (Fig. 1D, asterisk). Unlike Wt, a weak SOD1 signal was detected in the nuclei of large motor neurons at 8 W of Tg mice (Fig. 1D, inset). At 20 W of age in Tg animals, the intense WM signal was preserved (Fig 1E, asterisk) and additionally, the neuropil of anterior horn showed slight and a few dot-like SOD1 immunoreactivities (Fig. 1E, arrowheads). At 32W in Tg animals, the number and intensity of the immunoreactivities in the neuropil of anterior horn increased greatly (Fig 1F, arrowheads).

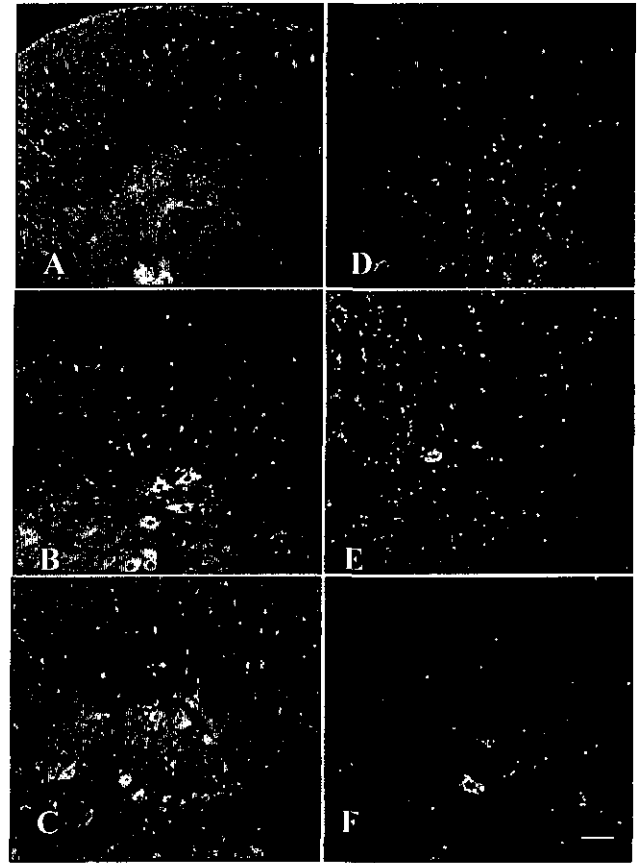


Fig. 2

Immunofluorescent analysis for Grp75 revealed tiny, dot-like signals in the cell bodies and processes of large motor neurons, representing mitochondria (Fig. 2). Similar pattern was found in both Wt and Tg animals with slight increase in signal intensity with age (Fig. 2). The number of Grp75 positive dots was not reduced in the surviving large motor neurons even at 32W of Tg mice (Fig. 2F)

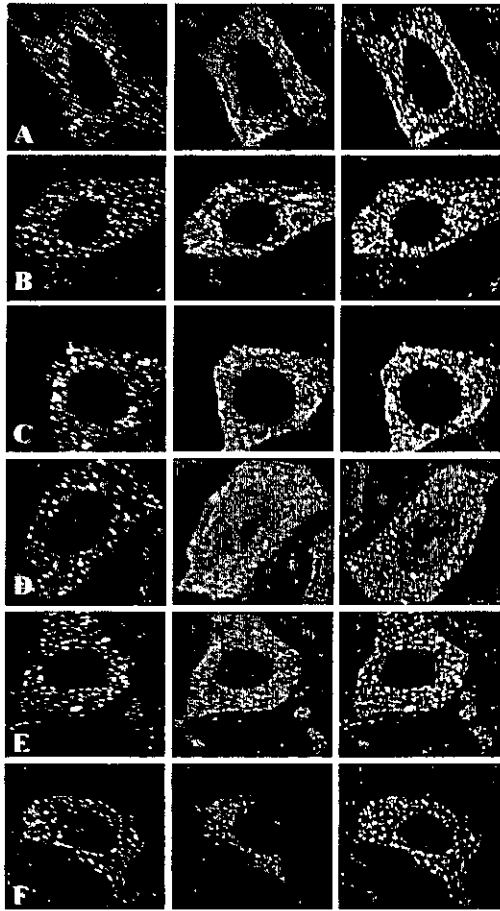


Fig. 3

As for double staining, Wt mice showed the same pattern between 8, 20 and 32 W weeks (Fig. 3A-C), and the red SOD1 and the green Grp75 signals partially colocalized giving yellow signals (Fig. 3A-C). The number of yellow signals was 10-12 in each large motor neuron of Wt mice. Colocalization signal in the cytoplasm was similar at 8 and 20 W of Tg mice to that of Wt mice (Fig. 3 D,B), but was absent in symptomatic Tg mice at 32 W (Fig. 3F).

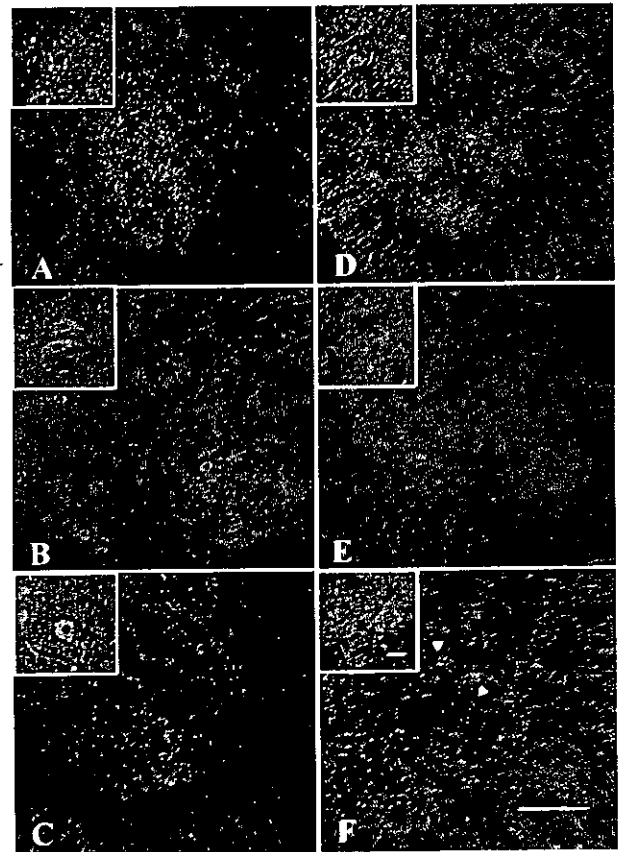


Fig. 4

At 8W, we obtained positive labeling for PMP70 in the alpha motor neurons and interneurons in the anterior horn of Wt and Tg animals (Fig. 4). In Tg animals, motor neurons showed a reduction in the PMP70 immunoreactivity beginning from 20W of age (Fig. 4E). While the perinuclear region remained positively stained, the rest of the cytosolic signal was decreased compared to age-matched Wt animals and 8W Tg animals (Fig 4E, inset). Unlike Wt, PMP 70 immunoreactivity increased in glial cells of Tg animals as star-shaped cells in the neuropil of anterior horn at 32W (Fig. 4F, inset)

変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおける 封入体と小胞体ストレス

青木 正志¹⁾、加藤 昌昭¹⁾、割田 仁¹⁾、石垣 あや¹⁾、神位りえ子¹⁾、糸山 泰人¹⁾

1) 東北大学大学院医学系研究科神経内科

研究要旨 変異 SOD1 蛋白発現量の異なる Tg マウス系統における封入体の頻度と症状経過を比較することにより、封入体が細胞傷害性に働いていないことを示した。また、封入体において活性型 Caspase12 反応性が認められることから、この封入体が小胞体ストレスからの細胞死へのシグナルとも何らかの関連を持ち、これを抑制することで細胞保護性に働い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）は主として中年期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。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、100 種類以上の変異が報告されている。ヒト変異 Cu/Zn SOD 遺伝子導入マウス、ラットが作製されており、脊髄前角の運動神経脱落を伴う ALS 様の症状発現をしめすことが知られている。このモデル動物では脊髄においてヒト ALS 患者病理像にも認められる Lewy-body like hyaline inclusion の出現を認める。

目的

変異 SOD1 トランスジェニック (Tg) マウスにおいて認められる Lewy-body like hyaline inclusion の頻度と変異 Cu/Zn SOD 蛋白の発現量、症状経過との関連を検討すること。小胞体ストレス関連蛋白を免疫組織化学的に検討することにより、封入体と小胞体ストレスの関連について検討する。

方法

L84V 変異 SOD1 導入 Tg マウスにおいて蛋白発現量の異なる 3 系統 (L84V-51, 13, 191) の症状経過と、終末期腰髄膨大部における封入体の病理像を比較検討した。

封入体と小胞体ストレスの関与を検討するために終末期 Tg マウス脊髄において GRP78、活性型 Caspase-12 (国立精神神経センター 桃井隆博士より供与) およびユビキチンの免疫染色、

Western-blotting を行った。

図 1. Tg マウス腰髄膨大部における封入体

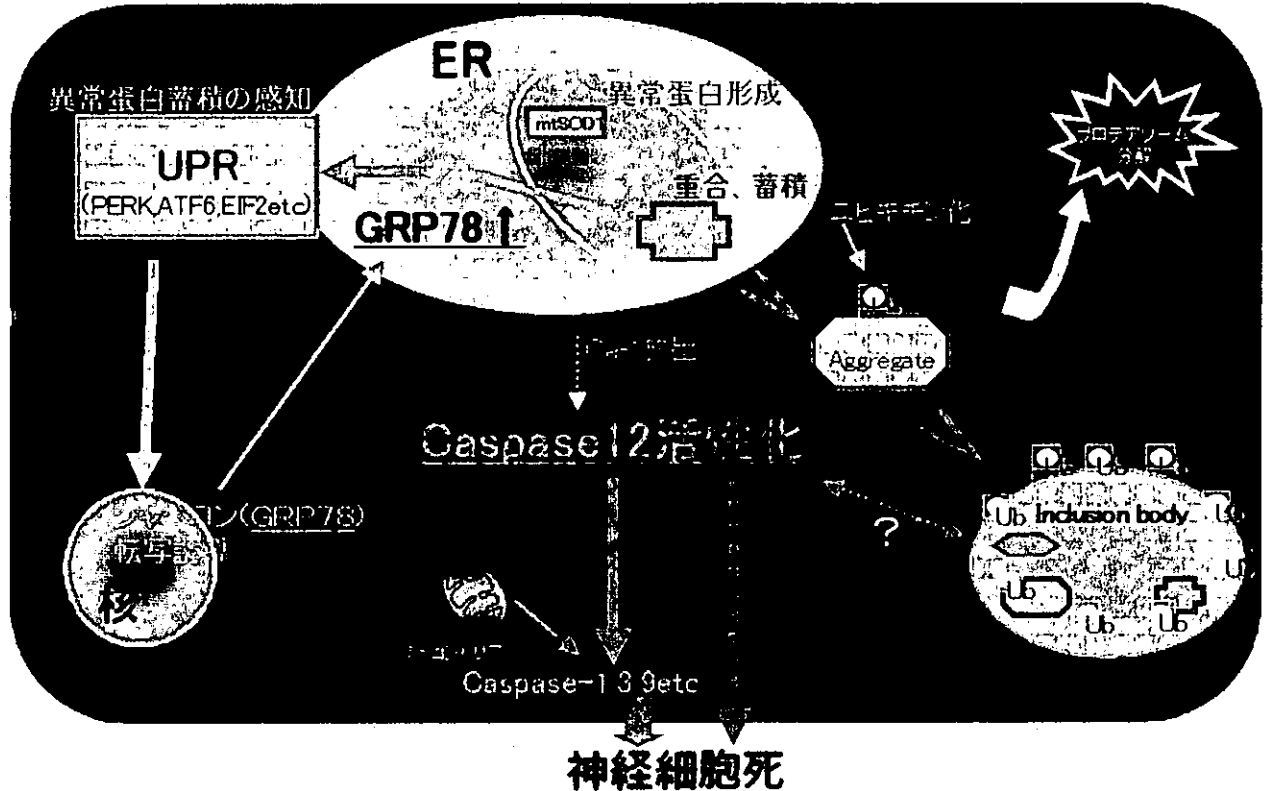


a: HE
b: Cu/Zn SOD
c: Ubiquitin

結果

L84V 変異トランスジェニック (Tg) マウスでは蛋白発現量の異なる 3 系統にて ALS 様の症状発現を認めており、すべての系統においてこれまでに報告されているのと同様に HE 染色にて中心部がエオジン好性で周辺に Halo を伴った封入体の形成が認められている。この封入体は Ubiquitin, SOD 抗体陽性である (図 1)。

図2. 異常蛋白の蓄積、封入体形成と小胞体ストレス



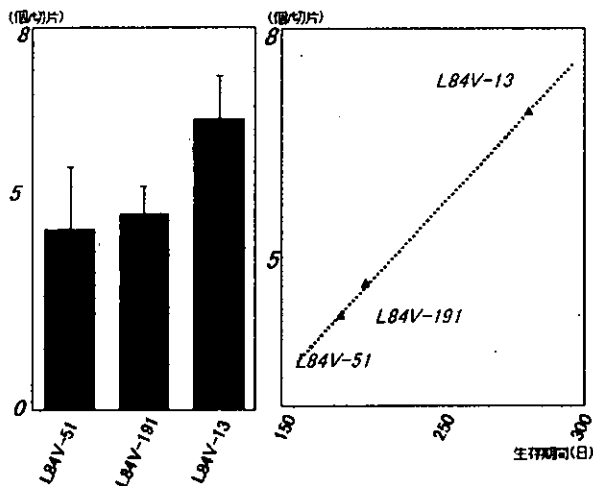
L84V 変異 Tg マウス 3 系統 (L84V-51, 191, 13) における変異 SOD1 蛋白発現量はそれぞれマウス SOD1 蛋白と比較して 7.8 倍、9.0 倍、5.4 倍であり、それぞれの生存期間は 184 ± 29 日、 202 ± 22 日、 290 ± 23 日と発現量の少ない系統のほうが長い経過を示していた。しかしながら、各系統における終末期の腰髄 i 切片辺りの封入体数はそれぞれ 4.3 ± 1.5 個、 4.7 ± 0.6 個、 7.0 ± 1.0 個と

変異蛋白の発現量が少なく、経過の長い系統のほうがむしろ多いという結果であった。(図3)

この Tg マウスにおいては、脊髄の Western-blotting にて GRP78 の高発現が認められ、免疫染色においても抗 GRP78、抗活性型 caspase12 抗体にて神経細胞の染色性が認められたことから、小胞体ストレスを介した細胞死へのシグナルが働いていることが示唆された。(図4, 5, 6)

また、活性型 caspase12 は抗 Ubiquitin 抗体にて反応性を持つ封入体にも存在することが認められた (図4)。

図3. 封入体の頻度と各系統の生存期間



考察

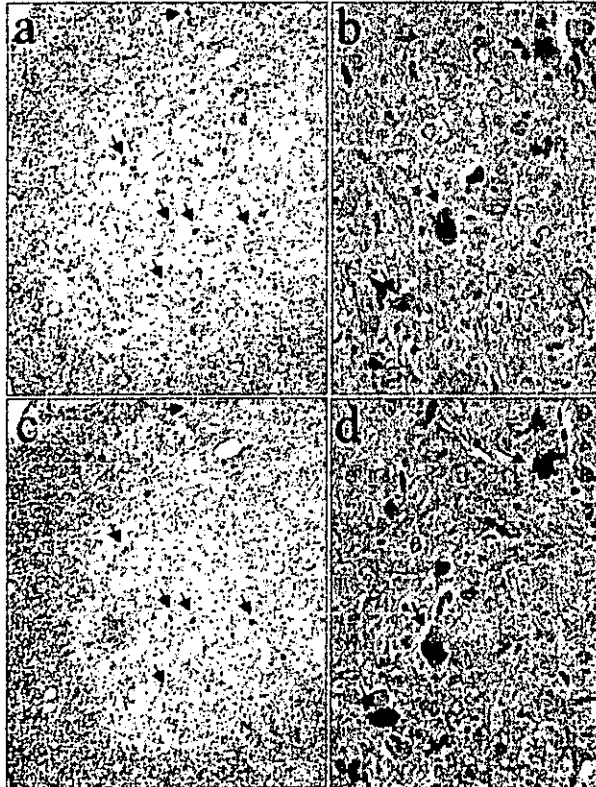
Tg マウスにおける封入体は同一変異 Tg マウス系統の中では生存期間が長い系統でより多く認められた。このことは、封入体が直接神経細胞障害の原因とはなっていないことを示唆していると考えた。

Tg マウスにおいて Western-blotting にて小胞体ストレスに関連するシャペロン蛋白である GRP78 の増加を認め、免疫染色にて抗活性型カスパーゼ 12 抗体の反応性を認めた。このことは、この Tg マウスにおいて小胞体ストレスが生じており、それが神経細胞障害に関与していることを示唆する。

抗活性型カスパーゼ 12 抗体の免疫染色では、神経細胞内だけ

ではなく、封入体内にも反応性が認められた。このことはユビキチン化された封入体内に活性型カスパーゼ12が取り込まれていることを示し、封入体が異常SOD1だけでなく、その他の蛋白も取り込むことによって細胞保護的に働いている可能性が考えられた。

図4. Ubiquitin, Active-caspase12による免疫染色



a, b: 抗活性型 Caspase12 抗体
c, d: Ubiquitin 抗体

図5. 抗GRP78抗体を用いたウェスタンブロット

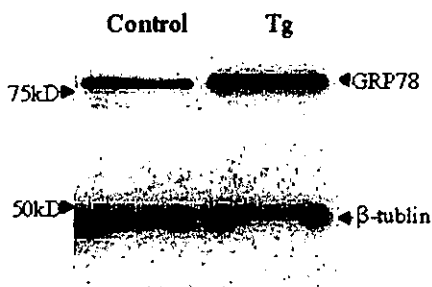
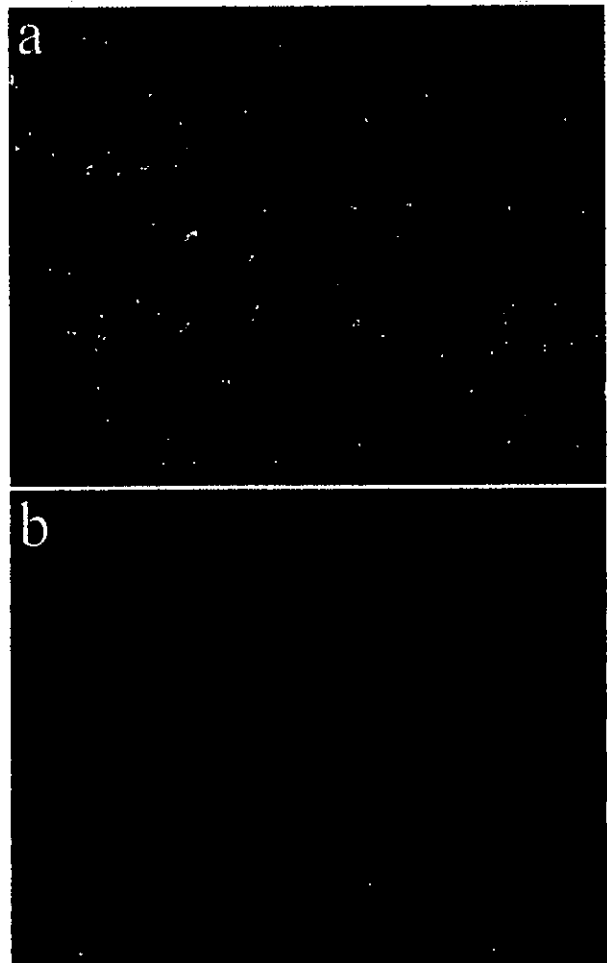


図6. GRP78による免疫染色



a: L84V Tg マウス腰髄 (終末期、6M 齢)
b: control マウス腰髄 (6M 齢)

結論

変異SOD1 Tgマウスでは小胞体ストレスに伴う神経細胞障害として、カスパーゼ12の活性化が脊髄中に認められる。しかし、活性化したカスパーゼ12はユビキチン陽性封入体の中にも多く認められることと、封入体自体が臨床症状の遅い系統のほうが多く認められることから、このTgマウスにて認められる封入体は神経細胞障害に影響を与えておらず、むしろ神経細胞保護的に働いている可能性がある。

文献

- 1) Aoki M, et al: *Ann Neurol* 37: 676-679 1995
- 2) Kato S, et al: *Neuropathol Exp Neurol* 55:1089-1101 1996
- 3) Kourouk Y, et al: *Hum Mol Genet* 11:1505-1515 2002

Dorfin による変異 SOD1 のユビキチン化を制御する Dorfin 結合因子

分担研究者 祖父江 元¹⁾

研究協力者 石垣 診祐^{1, 2)}、丹羽 淳一¹⁾、道勇 学¹⁾、垣塚 彰³⁾、田中 啓二²⁾

¹⁾ 名古屋大学大学院医学研究科神経内科

²⁾ 東京都臨床医学総合研究所分子腫瘍学研究部門

³⁾ 京都大学大学院生命科学研究科高次生体統御学

研究要旨 Dorfin 複合体のマスマスペクトロメトリーによる解析から複数の候補タンパク質を得た。そのうち VCP/p97 は培養細胞内で Dorfin と共局在しており、*in vitro* 及び *in vivo* にて Dorfin と結合していることが判明した。マウス組織及び複数の培養細胞内で Dorfin は 400kD-600kD の複合体を形成しており、複合体内で VCP/p97 と結合していることが示唆された。VCP/p97 のドミナントネガティブ変異体は Dorfin の *in vivo* での E3 活性を阻害した。以上の結果から Dorfin の E3 活性には VCP/p97 が必要であることが判明した。

はじめに

Dorfin は、遺伝子発現プロファイリングを行うことで、孤発性 ALS 脊髄において発現が増加している遺伝子として我々がクローニングした遺伝子である。Dorfin 遺伝子産物は、N 末側に RING-finger/IBR ドメインを有するユビキチンリガーゼをコードしている。培養細胞内では、Dorfin は核近傍の微小管形成中心 (MTOC) と思われる部位に局在しているが、孤発性 ALS および SOD1 遺伝子変異を有する家族性 ALS のいずれにおいても、運動ニューロン内に存在するユビキチン化封入体が Dorfin に対する特異抗体により免疫染色される。Dorfin は培養細胞内において変異 SOD1 に特異的に結合し、変異 SOD1 を特異的にユビキチン化する。培養神経細胞内では変異 SOD1 による細胞死を、Dorfin を発現させる事により抑制することができた。

また、病理組織において ALS ユビキチン化封入体のみならず、パーキンソン病 (PD) や Lewy 小体型痴呆 (DLB) の疾患部位である中脳黒質ニューロンや大脳皮質ニューロンに認められる Lewy 小体にも Dorfin が局在することが特異抗体を用いた免疫染色からわかった。さらに Lewy 小体の構成成分である Synphilin-1 をユビキチン化することも判明した。

ALS や PD、DLB などは中高年以降に主に発症し、進行性の経過をとる神経変性疾患であるが、いずれの疾患においても、病変部位の神経細胞内に凝集した異常タンパク質からなる封入体を有することが共通した病理学的特徴である。これらの封入体はいずれもユビキチン陽性であることが特徴である。細胞内において、通常不要となったタンパク質や変性タンパク質はユビキチン化され、プロテアソームに

よって分解・除去されるが、神経変性疾患においてはユビキチン化封入体として異常なタンパク質が蓄積している。Dorfin が ALS や PD などのユビキチン化封入体に存在し、その構成成分をユビキチン化することは疾患の病態において極めて重要な役割を担っている証拠である。しかしながら Dorfin の生理的な機能はいまだ不明である。これを解明することは ALS や他の神経変性疾患の病態機序解明に大きく貢献するものと思われる。

我々は、Dorfin が、細胞内で結合している因子を培養細胞内にタグを付加した Dorfin を発現させて回収する事により同定し、Dorfin の細胞内での機能をその因子と関連から検討した。

方法

HEK293細胞にFLAGタグで標識したDorfinを強制発現させ、抗FLAG抗体でコーティングしたビーズに結合したタンパク質をマスマスベクトロメトリーにより解析することでDorfin結合タンパクを探索した。

DorfinのN末にMBPタグをつけた融合タンパクを大腸菌を用いて作製し、また-recombinantに作製したC末にHisタグを付加したVCP/p97をbaculovirusを用いて作製した。両者を用いて *in vitro* の binding assay を行った。

マウスの全脳よりタンパクを抽出し、超遠心による glycerol gradient fraction に分画した。Western blotting により Dorfin と VCP/p97 の存在する画分を確認した後に両者が存在する fraction を用いて Dorfin と VCP/p97 の結合の有無を、抗 Dorfin 抗体を用いた免疫沈降法によって調べた。

HEK293細胞にGFP-DorfinとVCP-mycタンパクを同時に発現させ、蛍光顕微鏡下に両者の細胞内局在を観察した。

研究結果

マスマスベクトロメリーの解析の結果 6 つの候補因子が得られた。我々はこのうち小胞体関連輸送 (ERAD) など多くの細胞器官の機能を担っている VCP/p97 に注目した。大腸菌由来の精製 Dorfin とバキュロウイルスを用いて精製した VCP/p97 との

結合を *in vitro* にて確認した。VCP/p97 は Dorfin の C 末を介して Dorfin に結合した。

マウス脳の lysate を用いた glycerol gradient fraction analysis より内在性 Dorfin は VCP/p97 と同様に分子量約 400-600kD の複合体中に存在し、両者が共存する fraction を用いて免疫沈降法を行った結果から内在性の Dorfin は内在性の VCP/p97 と結合していることがわかった。(図 1)

HEK293細胞においてDorfinとVCPを共発現させると両者はプロテアソーム阻害剤下で核近傍の aggresome に一致した部位に共局在した。(図 2)

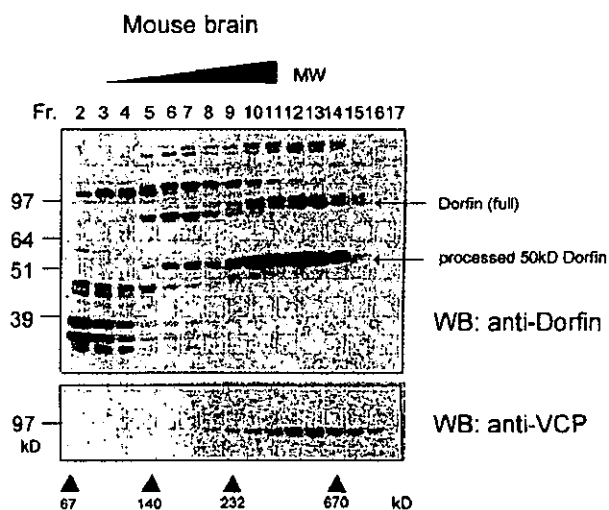


図 1a マウス脳の lysate を用いた glycerol gradient fraction analysis

内在性の Dorfin と VCP は分子量約 400-600kD 付近の fraction に存在する。

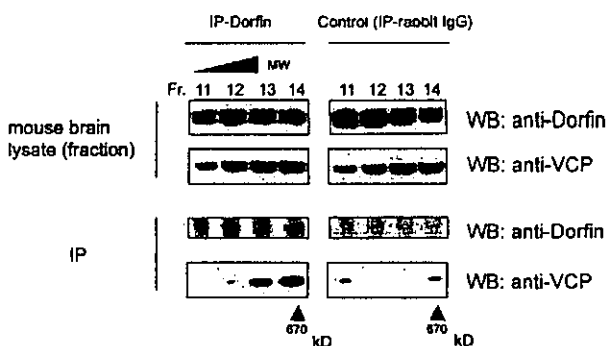


図 1b 図 1a の fraction を用いて抗 Dorfin 抗体で行った免疫沈降

内在性の Dorfin と内在性の VCP/p97 が共沈降する。