

GFP-Dorfin and VCP-myc were overexpressed in HEK293 cells. Cells were treated with MG132 of 1μM for 16 hours.

図2 HEK293細胞におけるDorfinとVCPの局在
HEK293細胞にDorfinとVCPを発現させるとaggresomeに共局在する。

VCP/p97のDorfinの機能に対する影響を調べるためにDorfinが変異SOD1をユビキチン化する条件にドミナントネガティブ型のVCPを加えて、変異SOD1のユビキチン化の程度を調べたところ、コントロールに比べてユビキチン化の程度が減少することが分かった。(図3)

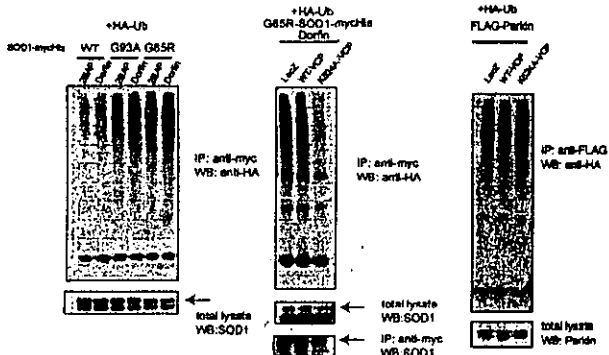


図3 VCP/p97のドミナントネガティブ型はDorfinの変異SOD1に対するユビキチン化能を阻害する

Dorfinは変異SOD1特異的にユビキチン化能を有する。(左)

VCP/p97のドミナントネガティブ型(K524A)はDorfinによる変異SOD1(G85R)のユビキチン化を阻害する。(中)

VCP/p97のドミナントネガティブ型(K524A)はParkinの自己ユビキチン化は阻害しない。(右)

考察

我々は今までにDorfinが変異SOD1や

Synphilin-1を基質とするユビキチンリガーゼでありALSやPD、DLBなどの疾患部位におけるユビキチン陽性封入体に局在する事を示してきた。

今回、我々はDorfinがVCP/p97とin vitro、in vivoで結合しており培養細胞内でaggresomeに共局在することを見出した。VCP/p97がDorfinと同様に培養細胞のみならずLewy小体やALS-Dといった病理組織で見出されるユビキチン陽性封入体に局在するという報告もあり、ALSをはじめとする神経変性疾患において両者の機能は封入体を通じて密接に関係しているものと思われる。

また内在性のDorfinが400-600kDと比較的大きな複合体を形成していることはVCP/p97のような結合因子がDorfinの機能に必須もしくは極めて大きな役割を担っていることを示唆する。実際、我々はVCP/p97のドミナントネガティブ体によりDorfinのユビキチンリガーゼ活性を阻害されることを見出し、VCP/p97がDorfinのユビキチンリガーゼ活性に大きく寄与している事を示した。

VCP/p97はAAA+ファミリーに属するATPaseであるが膜融合や転写、細胞周期など多岐に渡る細胞機能に関与するといわれている。その中でも最近PDやポリグルタミン病などに強い関与を示唆されているERAD(小胞体関連輸送)において小胞体の内側からポリユビキチン化されたタンパクを細胞質側に引きずり出してプロテアソームへ移送する働きを担っていると考えられている。またVCP/p97のドミナントネガティブ体を培養神経細胞に導入するとALSなど神経変性疾患の障害を受けた神経細胞に認められるのと同様の空胞を生じることが報告されている。

DorfinがVCP/p97を通じてERADに寄与するのか、ERADがALSの病態と関連するのかは今のところ不明であるが非常に興味深い。今後はDorfinのドミナントネガティブ体やRNAi法などによる機能喪失モデルを作製、解析することでそうした疑問を解決し、ALSや他神経変性疾患の病態解明につなげていきたい。

結論

DorfinはVCP/p97と結合し、VCP/p97はDorfin

のユビキチンリガーゼ活性に重要である。

文献

- (1) Niwa J et al. *J Biol Chem.* **277**, 36793-8. (2002)
- (2) Ishigaki S et al. *FEBS Lett.* **531**, 354-8. (2002)
- (3) Ishigaki S et al. *J Neurochem.* **82**, 576-84. (2002)
- (4) Yoshihara T et al. *J Neurochem.* **80**, 158-67. (2002)
- (5) Ito T et al. *J Biol Chem.* **278**, 29106-14. (2003)
- (6) Hishikawa N et al. *Am J Pathol.* **163**, 609-19. (2003)

SOD1トランスジェニックラットに対するメチルコバラミン大量投与の効果

梶 龍児¹⁾, 和泉唯信¹⁾, 野寺裕之¹⁾,
石垣あや²⁾, 青木正志²⁾, 糸山泰人²⁾

1) 徳島大学医学部神経内科

2) 東北大学医学部神経内科

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の動物モデルである変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックラット(G93A)にメチルコバラミン大量投与を行いその効果を検討した。メチルコバラミン大量投与群(n=11)には 30mg/kg/day, 週 5 回腹腔内投与を生後 45 日目から行った。同様にプラセボ投与群(n=7)には等容量の生理食塩水を生後 45 日目から週 5 回腹腔内に投与した。発症前期間はメチルコバラミン大量投与群が 145±12 日, プラセボ群が 150±4 日で両者に差を認めなかった。(Kaplan-Meyer, Logrank $\chi^2 = 0.043$, $p = 0.84$)。生存期間はメチルコバラミン大量投与群が 19±4 日, プラセボ群が 15±5 日 (Kaplan-Meyer, Logrank $\chi^2 = 3.19$, $p = 0.074$)。有意差を認めなかったがメチルコバラミン大量投与群で生存期間が長い傾向があった。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は上位運動ニューロンと下位運動ニューロンが選択的に障害され全身の筋萎縮が進行する。常時進行性の経過をとり、発症から死亡までの平均経過は 3-4 年である。治療薬としては riluzole が世界的に認可されているのみであるが、その効果もごく軽微であり、新しい治療薬の開発が切に望まれている。病因のひとつとしてグルタミン酸異常仮説が提唱されている¹⁾。ビタミン B₁₂ の類縁体であるメチルコバラミンはグルタミン酸の細胞毒性に対して防御効果をもつことが報告されている²⁾。また、メチルコバラミン大量投与(500 μ g/kg)は実験的アクリルアミドニューロパチーの運動神経再生も促す³⁾。我々はすでに ALS に対してメチルコバラミン大量療法を施行し、短期的には CMAP(compound muscle action potential)や MRC (Medical Research Council) scores を改善させることを報告した⁴⁾⁵⁾。1993 年に家族性 ALS においてその一部の原因遺伝子が Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) であることが明らかになった⁶⁾⁷⁾。永井らは変異 Cu/Zn SOD 導入トランスジェニックラットの作製に世界

にさがけて成功した⁸⁾。今回われわれはその変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックラット(G93A)に対してメチルコバラミン大量投与を行いその効果を検討した。

対象および方法

東北大学神経内科から提供していただいた変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックラット(G93A)を用いた。メチルコバラミン大量投与群(n=11)にはメチルコバラミン 30mg/kg/day, プラセボ投与群(n=7)には等容量の生理食塩水を、各々生後 45 日目から週 5 回腹腔内に投与した。体重および肉眼的変化から発症時期を決定し、発症前期間と発症からの生存期間を両群で比較した。

結果: 発症前期間はメチルコバラミン大量投与群 145±12 日, プラセボ群が 150±4 日で両者に差を認めなかった。(Kaplan-Meyer, Logrank $\chi^2 = 0.043$, $p = 0.84$)。生存期間はメチルコバラミン大量投与群が 19±4 日, プラセボ群が 15±5 日 (Kaplan-Meyer, Logrank $\chi^2 = 3.19$, $p = 0.074$, 図)。有意差を認めなかったがメチルコバラミン大量投与群で生存期間が長い傾向があった。

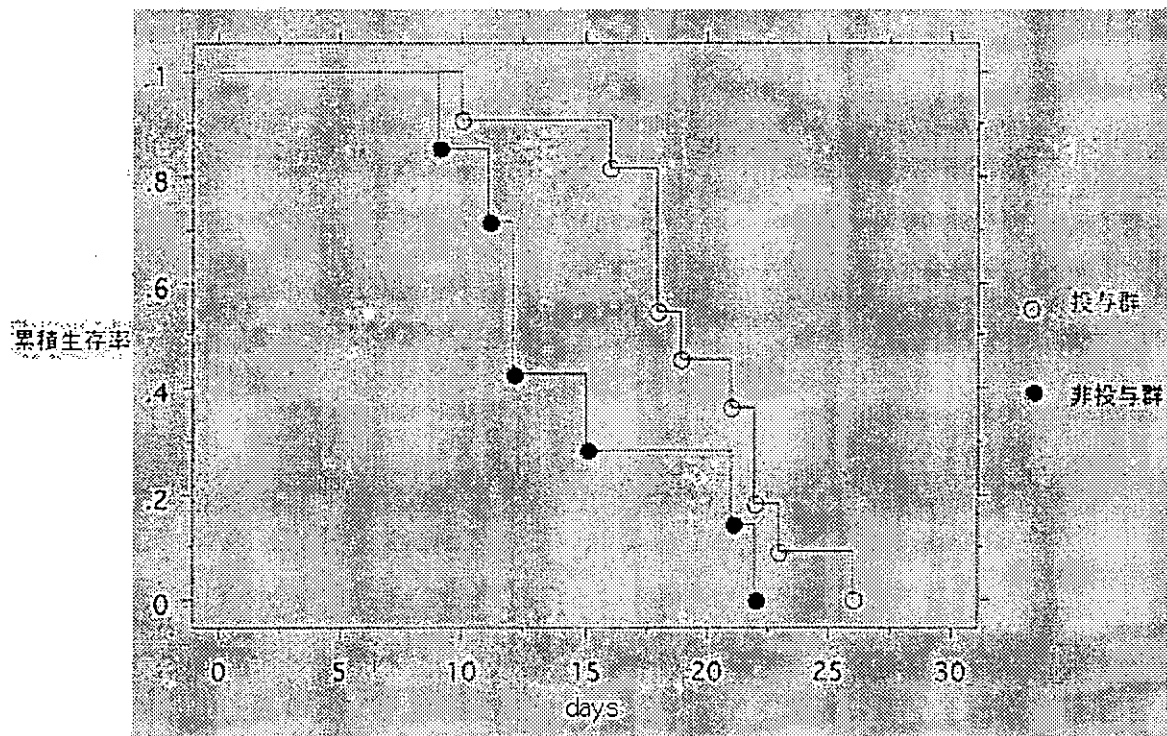


図 生存曲線

考察

ALS に対する治療薬としては riluzole が世界的に唯一認可されているのみである。神経栄養因子などの治験が海外を中心に行われているが満足いく結果はまだ得られていない。我々の検討では ALS 患者に対するメチルコバラミン大量投与は短期的には CMAP や MRC scores を改善する⁴⁾⁵⁾。メチルコバラミンはグルタミン酸の細胞毒性に対して防御効果をもつ²⁾。そのため、病因としてグルタミン酸異常仮説が提唱されている ALS に対してメチルコバラミンが有効である可能性があると考えられる。今回の検討では、メチルコバラミン大量投与により変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックラット (G93A) の発症前期間は変化しないが発症後の生存期間が延長する傾向にあった。より多くの例数で検討し病理学的な検討も加えた効果判定をする必要がある。また、ラットはマウスに比べて大きいいため MUNE (motor unit number estimate) 法も施行可能であるためそれを加えた検討も行う必要がある。

結論

メチルコバラミン大量投与により変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックラット (G93A) の発症前期間は変化しないが発症後の生存期間が延長する傾向にあった。

文献

- 1) Albin, R.L. et al. Neurology 42: 733-738, 1992
- 2) Akaike, A. et al. Eur J Pharmacol 241: 1-6, 1993
- 3) Watanabe, T. et al. J Neurol Sci 122: 140-143, 1994
- 4) Kaji, R. et al. Muscle Nerve 21: 1775-1778, 1998
- 5) Kodama, M. et al. Neurology 54 (Suppl3): 255-256, 2000
- 6) Aoki, M. et al. Nature Genet 5: 323-324, 1993
- 7) Rosen, DR. et al. Nature 362: 59-62, 1993
- 8) Deng, HX. Et al. Science 261: 1047-1051, 1993
- 9) Nagai, M. et al. J Neurosci 21: 9246-9254, 2001

成体ラット運動ニューロン損傷に対する minocycline 療法の検討

岩崎泰雄¹⁾，池田 憲^{1),2)}，青柳 丞¹⁾，市川靖充³⁾，五十嵐修¹⁾

- 1) 東邦大学大森病院 神経内科
- 2) PL 東京健康管理センター神経内科
- 3) NTT 東日本関東病院 神経内科

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する治療開発を目的に、顔面神経引き抜き損傷後に生じる成体ラットの運動ニューロン変性モデルに対する minocycline の神経保護効果の有無を検討した。方法は 12-14 週齢 Fisher 344 系ラットの右顔面神経（茎乳突孔部）を引き抜き除去した直後から 0.1 % minocycline の混餌食と通常食を 1～4 週間、連日、自由投与した。Minocycline 投与群において、運動ニューロン死が有意に抑制された。本実験で、minocycline は外傷後の成体運動ニューロンに対する保護作用を有することが確認された。

はじめに

これまでに、われわれは筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の新薬開発を目的に、運動神経細胞の培養、坐骨神経や顔面神経の外傷モデルを用いた各種薬剤の治療効果を検討してきた^{1),2)}。今回は、いくつかの神経疾患モデル動物において保護作用が報告されている minocycline が、成体ラット運動ニューロン損傷モデルに対して神経保護効果を有するか検討した。

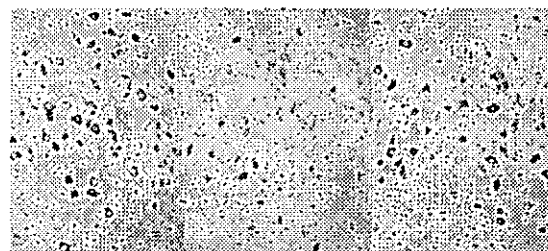
方法

Fisher 344 系ラット（生後 12-14 週齢雄）の右顔面神経を引き抜き除去した。外傷直後から 0.1 % minocycline 混餌食(n=7)と通常食(n=7)を 1～4 週間、連日、自由投与した。治療効果の判定は、外傷から 4 週間後に Nissl 染色を作製し、運動ニューロンの生存率(損傷側/非損傷側 X 100 %)を算出した。統計は Mann-Whitney's U test を用いた。また、microtubule-associated protein-2 (MAP-2)、GFAP、phospho-p44/p42 matogen-activated protein kinase (MAPK)の免疫染色を作製し、両群を比較検討した。

結果

Minocycline 混餌投与群において、運動ニューロン死が有意に抑制された(図 1, 2)。免疫染色での検討では、MAP-2 染色は運動ニューロンの生存と比例して minocycline 投与群で染色性が保たれていた。GFAP 染色は両群間で明らかな差はなかった。P44/p42 MAPK 染色は、非外傷側の正常運動ニューロンは染色されなかった。一方、損傷運動ニューロンにおいては、一部の運動ニューロンで染色が認められた(図 3)。P44/p42 MAPK 染色に関しては、今後の検討が必要と考えられた。

図1 顔面神経核のNissl 染色



非外傷側

通常食

Minocycline

図2 運動ニューロン生存率

Minocycline 混餌投与により，運動ニューロン死が軽減されている ($p < 0.01$).

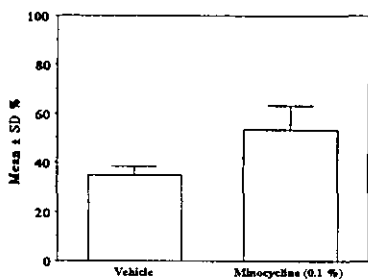
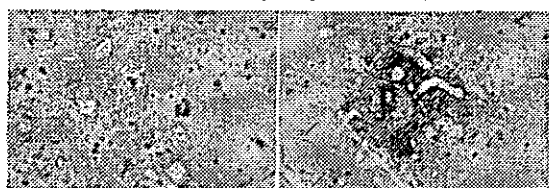


図3 顔面神経核の p44/p42 MAPK 染色



非外傷側

外傷側

考察

Minocycline は血液脳関門を通過する tetracycline から誘導された半合成化合物である。これまでに，mutant SOD(G93A)マウス^{3,4)}や mutant SOD(G37R)マウス^{5,6)}において本薬剤の有効性が報告されている。これらの運動ニューロン疾患動物モデルに対する minocycline の神経保護作用の共通機序としては p38 MAPK, caspase-1, iNOS, COX-2 の誘導を抑制する結果，ミクログリア増殖や炎症反応を抑えることが提唱されている。しかし，他の運動ニューロン障害モデルでの治療効果や作用機序は不明な点が多い。今回，引き抜き損傷により誘発される顔面運動ニューロン死に対する minocycline 療法の有用性が示唆された。本剤における保護作用の機序を解明するには，今後は NOS 染色の変化，isolectin B4 染色や p38 MAPK 染色を用いた microglia を介する作用を経時的に検討する必要があると考えられた。

結論

顔面神経引き抜き損傷により誘発される成体運動ニューロン死に対する minocycline の神経保護効果が確認された。

文献

- 1) Iwasaki Y, et al. Neurochem Res 27: 225-228, 2002
- 2) Iwasaki Y, et al. Ann Neurol 52 (Suppl 1): 55, 2002
- 3) Zhu S, et al. Nature 417: 74-78, 2002
- 4) Van Den Bosch L et al. Neuroreport 13: 1067-1070, 2002
- 5) Kriz J, et al. Neurobiol Dis 10: 268-278, 2002
- 6) Kriz J, et al. Ann Neurol 53: 429-436, 2002

IGF-1 髄腔内投与による SOD1 変異マウスにおける治療効果の検討

阿部康二¹⁾、永田哲也¹⁾、永野 功¹⁾、Hristelina Ilieva¹⁾、塩手美冬¹⁾
村上哲郎¹⁾、奈良井恒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 インシュリン様成長因子(以下 IGF)-1 は、in vitro 及び in vivo で運動ニューロンに対する保護作用を持つことが知られている。しかし筋萎縮性側索硬化症 (以下 ALS)の患者に対する経皮的な投与方法では効果が認められなかった。今回、我々は ALS モデル SOD1 変異マウス(G93A)を使用し、IGF-1 髄腔内投与による治療効果を検討した結果、ALS モデル SOD1 変異マウスにおいて治療的效果を持つことが示された。

はじめに

インシュリン様成長因子(以下 IGF)-1 は、in vitro 及び in vivo で運動ニューロンに対する保護作用を持つことが知られている。しかし ALS の患者に対する経皮的な投与方法では効果が認められなかった。今回、我々は ALS モデル SOD1 変異マウス(G93A)を使用し、IGF-1 髄腔内投与による治療効果を検討した。

方法

ALS モデル SOD1 変異マウス(G93A)を使用した。IGF-1 を low dose 群(0.1mg/kg/day)及び high dose (1 mg/kg/day)群に分け、生後 140 日目(発症 80 日前)より腰部より髄腔内持続投与施行した。臨床的な評価としては、body weight、rotarod testing wheel-running activity、life span で行い、病理学的な評価は Nissl 染色により脊髄前角の運動ニューロンの数及び p-Akt、p-ERK、bcl-2 等の生存因子を免疫組織化学染色で対照群と比較検討した。

結果

IGF-1 髄腔内投与は SOD1 変異マウスにおいて、対

照群と比べて発症の遅延、生存期間の延長をもたらした。(Fig.1A, B) さらに IGF-1 髄腔内投与は体重減少の抑制、運動機能の低下の抑制をもたらした。(Fig.2A, B, C) 一方、病理学的には、運動ニューロン死の抑制を認め(Fig.3) 運動ニューロンにおける各種生存因子の発現の増加も認めた。(Fig.4)

考察

IGF-1 の脊髄腔内持続注入は、G93A mutant SOD1 マウスの運動障害の発症を遅延させ、生存期間を延長した。更に治療群において、脊髄運動ニューロン死の抑制と生存因子の減少の抑制が認められた。またこれらの結果は Gage らの IGF-1 遺伝子治療の結果とも compatible と思われた

文献

M.M. Bilak et al.: NeuroReport 12, 2531-2535, 2001
I. Eustache et al.: Dev. Brain Res. 81, 284-292, 1994
A. Gorio et al.: J. Neurochem. 81, 194-202, 2002
G.D. Borasio et al.: Neurology 51, 583-586, 1998
E.C. Lai et al.: Neurology 49, 1621-1630, 1997

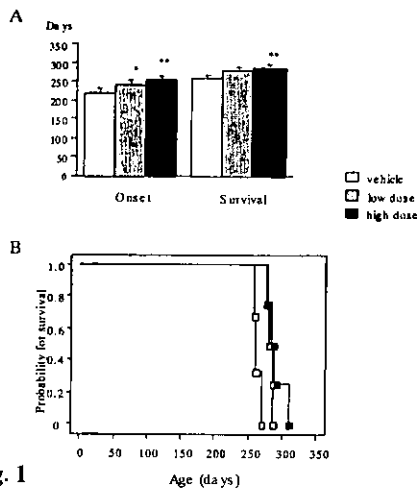


Fig. 1
Effects of IGF-1 administration on disease onset and survival of the G93A mice. (A) The mean onset of disease (lower bars) and mean survival (upper bars). Both the high-dose and low-dose treatments significantly delay the onset of clinical disease and prolong survival. The values shown are means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, versus vehicle treatment. (B) Cumulative probability of survival. Open triangles, control (vehicle); shaded squares.

low dose = 100 μ g/kg/day; filled circles, high dose = 1 mg/kg/day.

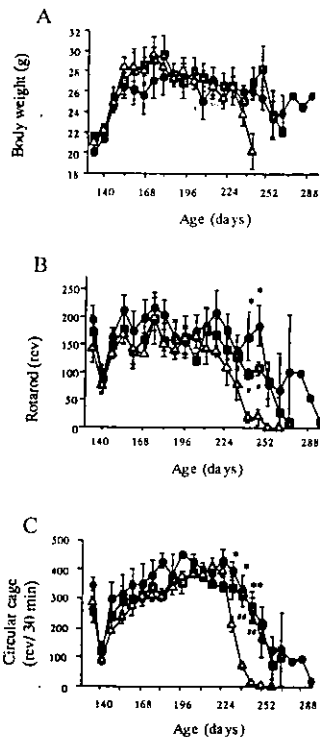


Fig. 2
Effects of IGF-1 treatment on the body weight and motor performance of G93A mice. (A) The change in body weight of mice treated with IGF-1 (open triangles, vehicle; shaded squares, 100 μ g/kg/day; filled circles, 1 mg/kg/day). (B) Effects of intrathecal administration of IGF-1 on rotarod performance. There is improved performance with IGF-1 treatment (shaded squares, 100 μ g/kg/day; filled circles, 1 mg/kg/day) compared with the control mice (open triangles) at 238 and 245 days of age. (C) Effects of intrathecal administration of IGF-1 on wheel running activity. Animals treated with IGF-1 (shaded squares, 100 μ g/kg/day; filled circles, 1 mg/kg/day) show greater wheel activity than the control mice (open triangles).

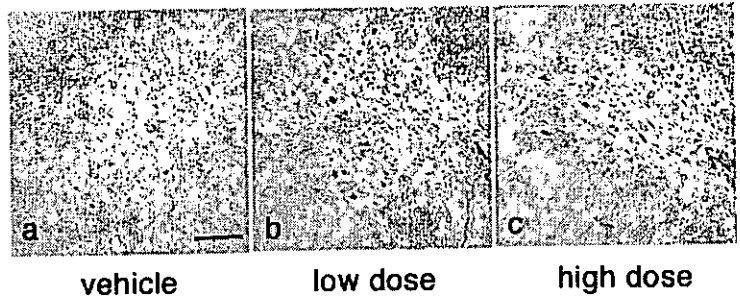


Fig. 3
Representative photomicrographs in the ventral horns of the lumbar spinal cord of G93A mice at 240 days of age. There is a profound loss of motor neurons in the ventral horn of the vehicle-treated G93A mice (a), and preserved numbers of motor neurons of the IGF-1-treated mice (b and c). Nissl stain. Scale bar in a = 100 μ m (also applies to b and c).

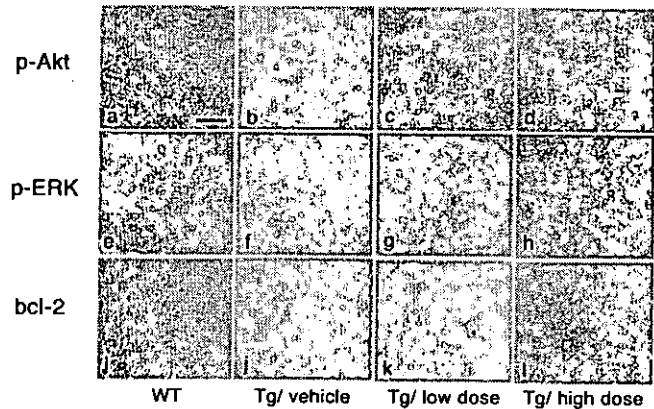


Fig. 4
Immunohistochemistry for phosphorylated Akt (p-Akt), phosphorylated ERK (p-ERK) and bcl-2 in the ventral horns of G93A mice. Immunohistochemistry demonstrates the apparent expression of p-Akt, p-ERK and bcl-2 in the cells in the ventral horns of G93A mice treated with IGF-1, whereas immunoreactivities for these proteins are virtually absent in the vehicle-treated mice. Scale bar in a = 100 μ m (also applies to all other panels).

「siRNA を用いた変異 SOD1 による家族性 ALS の 遺伝子治療」に関する研究

分担研究者 水澤英洋¹⁾

研究協力者 日野太郎¹⁾、横田隆徳¹⁾、李一¹⁾、多比良和誠²⁾

1) 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態

2) 東京大学大学院工学部化学生命工学

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症機序は変異 SOD1 が何らかの毒性を獲得する (gain of toxic function) と考えられている。変異 SOD1 遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA (small interference RNA) および発現型 siRNA を作製し、さらに in vivo 特に神経系へのデリバリーを解決するために、siRNA 発現アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターを作製した。培養細胞系で、変異 SOD1 の発現抑制効果を認め、さらにラット脊髄や脳に直接投与することでニューロンの内因性 SOD1 の発現を抑制した。SiRNA を用いることで変異 SOD1 による家族性 ALS の遺伝子治療ができる可能性がある。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は原因不明の難病であり、家族性 ALS の一部は、superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異が原因であることが 1995 年に明らかとなった。その発症機序は変異 SOD1 が何らかの毒性を獲得する (gain of toxic function) ことと考えられている。その神経細胞死の機序はいまだ不明であるが、変異 SOD1 の発現そのものを抑制できれば、発症を防ぐことが期待できる。従来、特定遺伝子の発現を抑制する方法として、antisense、ribozyme、DNA enzyme が用いられてきた。いずれも mRNA レベルでターゲット遺伝子の翻訳を抑制する方法だが、その抑制効果は不十分であった。近年、合成した 21-22 塩基の 2 本鎖 RNA である siRNA (small

interference RNA) の導入によって哺乳動物細胞でも遺伝子の強力な発現抑制が起こることが発見された¹⁾。今回、この siRNA を用いて SOD1 遺伝子変異による ALS の遺伝子治療を行うために、点変異特異的な siRNA 配列を検討すること、siRNA を in vivo で用いるために siRNA 発現ウイルスベクターを作製することが、本研究の目的である。

方法

G93A 変異 SOD1 mRNA に対する siRNA を複数デザインした。HEK293T および N2a 培養細胞に siRNA と SOD1 発現ベクターと共発現させて、有効な siRNA 配列をスクリーニングした

次に点変異を特異的に認識するために、siRNA 配列のミスマッチ部位を変えることで複数設計し、最も野生型と特異性の高いものを選択した。さらに、こうして得られた siRNA 配列を tRNA promotor, U6 promotor, 独自のデザインした tandem 型²⁾, stem 型³⁾の発現型 DNA ベクターで構築し、その有効性を比較検討した。

最も有効な構造の発現型ベクターをカセットとして、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスに組み込み、siRNA 発現ウイルスベクターを作製した。それらを、培養細胞およびラット脊髄・脳へ直接投与し、SOD1 の抑制効果を確かめた。

結果

作製した siRNA は、培養細胞において野生型 mRNA にはほとんど抑制せずに、変異 mRNA を特異的に認識し変異タンパクの発現を抑制した。

点変異特異的な siRNA 配列は、5'側より 10-13 塩基にミスマッチをおいたものが最も有効であった。

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

こうして、作製した発現型ベクターによっても、siRNA と同様に野生型をほとんど抑制せず、変異 SOD1 を選択的に抑制するものが得られた (図 1)。

この発現型 siRNA カセットを組み込むことでアデノウイルスベクターおよびアデノ随伴

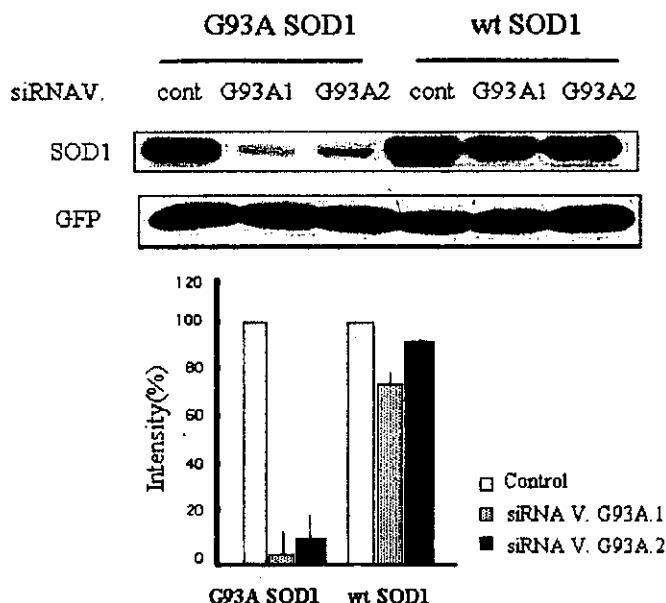


図 1 G93A1 siRNA は G93ASOD1 を特異的に認識して、タンパクの発現を 90%以上抑制した。(HEK293T 培養細胞を用いた Western blotting)

ウイルスベクターが作製できた。

siRNA 発現アデノウイルスベクターにより、N2a 細胞において変異 SOD1 発現細胞ライン (G93A 変異、G85R 変異) および内因性 SOD1 蛋白の発現を抑制した (図 2)。さらにこの

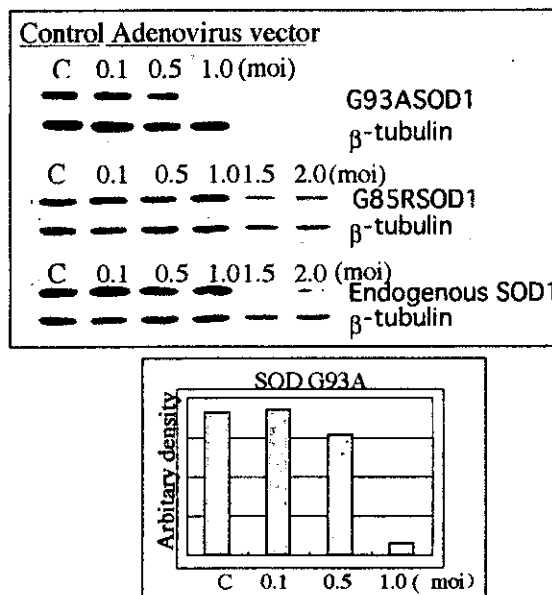


図 2 siRNA 発現アデノウイルスベクターは G93A・G85R 変異 SOD1 発現細胞でその発現を抑制した。(N2a 培養細胞を用いた Western blotting)

アデノウイルスベクターをラット脊髄に直接微量投与したところ、脊髄前角の複数のニューロンで SOD1 発現が抑制されていた。

siRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターによっても、HeLa 細胞を用いた培養細胞系で、内因性 SOD1 蛋白の発現を有意に抑制した (図 3)。ラット脳に直接微量投与したところ、内因性 SOD1 発現が抑制されたニューロンが確認された。

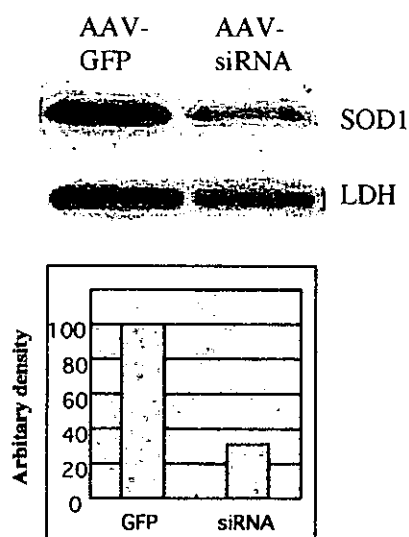


図 3 siRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターは内因性 SOD1 タンパクの発現を抑制した。

(HeLa 培養細胞を用いた Western blotting)

考察

今回、変異 SOD1 配列に特異的な siRNA を作製しえたが、これらを遺伝子治療に用いるには siRNA の神経細胞へのデリバリーの問題と、その持続時間の問題がある。持続時間については、U6 promotor, stem 型の siRNA 発現 DNA ベクターにより細胞内で siRNA を作ることが可能となり、神経細胞へのデリバリーを解決する方法の 1 つとしてウイルスベク

ターに組み込むことが可能となった。

発現型ウイルスベクターにおいても培養細胞系で siRNA の抑制効果は確認されたが、in vivo での効果は一部のニューロンに限られており、未だ十分な効果ではないため、今後投与方法の検討、導入効率を高めることが必要である。

結論

変異 SOD1 mRNA を配列特異的に切断できる siRNA および発現型 siRNA を作製し、正常アリルは抑制せずに変異アリルのみの発現を抑制することができた。siRNA 発現アデノウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターによっても同様な抑制効果を in vitro, in vivo で確認することができた。

文献

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

紀伊半島の ALS/パーキンソン痴呆複合に出現するタウ蛋白の 各種抗リン酸化タウ抗体による免疫組織化学的検討

小久保康昌¹⁾、石黒幸一²⁾、村山繁雄³⁾、葛原茂樹¹⁾

三重大学神経内科¹⁾、三菱化学生命科学研究所²⁾、東京都老人総合研究所³⁾

研究要旨 紀伊半島多発地域の ALS とパーキンソン痴呆複合(PDC)に出現するタウ蛋白のリン酸化部位について検討した。紀伊 ALS/PDC 5 例 (ALS 1 例、PDC 4 例)の海馬を含むホルマリン固定側頭葉内側部パラフィン包埋切片について、リン酸化部位別の抗タウ抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。PHF tau でリン酸化が確認されている 28 ヲ所のうち、14 ヲ所のリン酸化部位を認識する抗体を使用した。対照は、Braak stage 3 以上のアルツハイマー病、および健常者の各 5 例である。紀伊 ALS/PDC に出現するタウ蛋白では、14 ヲ所のリン酸化部位の全て (Ser199, Ser202, Thr205, Ser208, Thr212, Ser214, Thr231/235, Ser262, Ser396, Ser404, Ser409, Ser413, Ser422) においてリン酸化を確認した。死後変化の影響を受けず、PHF-tau 特異的なリン酸化部位とされる Thr 212 と Ser 214 の 2 ヲ所でのリン酸化を初めて確認した。今回検討した 14 ヲ所のリン酸化は、アルツハイマー病のタウ蛋白に認められる部位であることから、アルツハイマー病と Kii ALS/PDC におけるタウ蛋白の異常凝集には共通のメカニズムが存在する可能性が考えられた。

はじめに

紀伊半島南部に多発する筋萎縮性側索硬化症 (Kii ALS) とパーキンソン痴呆複合 (Kii PDC) では、グアムの ALS/PDC と同様に中枢神経系に大量のタウ蛋白が蓄積しており、タウオパチーの一型と考えられている。¹⁾ 今回、Kii ALS/PDC に出現するタウ蛋白のリン酸化部位について免疫組織化学的に検討した。

対象および方法

対象は、神経病理学的に確定診断した Kii

ALS 1例 (女性、死亡年齢66歳)とKii PDC 4例 (男性1例、女性3例、平均死亡年齢70.3歳)である。対照として、Braak stage 3以上のアルツハイマー病5例 (男性3例、女性2例、平均死亡年齢82.4歳)と健常者5例 (男性2例、女性3例、平均死亡年齢68.2歳)を用いた。健常者のうち1例 (男性、99歳)では神経原線維変化が多発していたが、アルツハイマー病の診断基準を満たさず、年齢の範囲内であった。方法は、各症例の側頭葉内側部を含むホルマリン固定パラフィン包埋切片について

Vectastain kit を用いた ABC法によって免疫組織化学的に検討した。抗体は、以下に示すリン酸化部位を特異的に認識する17種類の抗タウ抗体を用いた。AT8 (Ser202, Ser205を認識、1/100), AT100 (Thr212, Ser214を認識、1/100) (Innogenetics), Tau5 (1/100) (Neo Markers), Tau (Dr. Iharaより提供、1/2000), anti-PS199 (1/2500), PS202 (1/200), PT205 (1/100), PS208 (1/100), PT231/235 (1/500), PS262 (1/100), PS396 (1/1000), PS404 (1/500), PS409 (1/300), PS413 (1/100), PS422 (1/200), tau-C (1/2500), tau-N (1/500) (Dr. Ishiguroより提供)。また、全例にGallyas染色を施行した。

結果

Kii ALS/PDC 脳に出現するタウ蛋白は、全ての抗タウ抗体で陽性に染色された。アルツハイマー病脳に出現するタウ蛋白は、PS199, PS404, N末、C末に対する抗体では染色されなかった。健常者脳では、99歳例に出現した神経原線維変化が、AT8, AT100, PS199, PT205, PS208, PS262, PS409, PS413, PS422の各抗タウ抗体で染色された。その他の2例に認めたとく少数の神経原線維変化が一部の抗タウ抗体で染色された。(表1)

考察

アルツハイマー病脳に出現するタウ蛋白で確認されている28カ所のリン酸化部位²⁾のうち、今回用いた17種類の抗タウ抗体が認識するのは、14カ所 (Ser199, Ser202, Thr205, Ser208, Thr212, Ser214,

Thr231/235, Ser262, Ser396, Ser404, Ser409, Ser413, Ser422)であった。紀伊 ALS/PDC に出現するタウ蛋白は、全ての抗タウ抗体によって染色されたので14カ所のリン酸化部位全てでリン酸化されていることが確認できた。この中には死後変化の影響を受けず、アルツハイマー病の tau に特異的なリン酸化部位とされる Thr 212 と Ser 214 の2カ所³⁾が含まれていた。Kii ALS/PDC 脳とアルツハイマー病脳に出現するタウ蛋白が同一部位でリン酸化されていたことから、アルツハイマー病と Kii ALS/PDC におけるタウ蛋白の異常凝集には共通のメカニズムが存在する可能性が考えられた。今後、今回確認した部位以外のリン酸化部位について検討し、両疾患のタウ蛋白の異同について検索するとともに、リン酸化に関わるキナーゼの同定について検討を進める必要がある。

文献

- 1) Kuzuhara S, et al: Ann Neurol 49:501-511,2001
- 2) 宮坂知宏他: 脳神経 54:753-766,2002
- 3) Ksiezak-Reding H, et al: Neurobiol Aging 19:535-43, 1998

表の説明

表1. Kii ALS/PDC、アルツハイマー病、健常者の脳の側頭葉内側部標本における、Gallyas 染色と各種抗タウ抗体による染色結果。

ALS/PDC

Antibodies age	ALS/PDC				
	1 (H.Y.) 70	2 (H.M.) 58	3(W.A.) 76	4 (O.N.) 77	5 (H.M.) 66
GB	+	+	+	+	+
AT8	+	+	+	+	+
AT100	+	+	+	+	+
Tau 5	+	+	+	+	+
Tau	+	+	+	+	+
anti-PS199	+	+	-	-	-
anti-PS202	+	+	-	-	-
anti-PT205	+	+	-	-	-
anti-PS208	+	nd	+	nd	+
anti-PT231/PS23	+	+	-	-	+
anti-PS262	+	+	+	+	+
anti-PS396	+	-	+	+	+
anti-PS404	+	-	-	-	-
anti-PS409	-	nd	+	nd	-
anti-PS413	+	-	-	-	+
anti-PS422	+	+	-	-	-
anti-tau-C	+	+	+	-	-
anti-tau-N	+	+	-	-	-

GB: Gallyas-Braak staining

+ : positive, - : negative, nd: not done

AD

Antibodies age	AD				
	8116 76	8162 84	8251 79	8523 87	8603 86
GB	-	-	-	-	+
AT8	-	-	-	+	+
AT100	-	-	-	-	+
Tau 5	nd	nd	-	nd	nd
Tau	nd	nd	-	nd	nd
anti-PS199	-	-	-	-	+
anti-PS202	-	-	-	-	-
anti-PT205	-	-	-	-	+
anti-PS208	-	-	-	-	+
anti-PT231/PS23	-	-	-	-	-
anti-PS262	+	-	-	-	+
anti-PS396	+	-	-	-	-
anti-PS404	-	-	-	-	-
anti-PS409	-	-	-	-	+
anti-PS413	-	-	-	-	+
anti-PS422	-	-	-	-	+
anti-tau-C	-	-	-	-	-
anti-tau-N	-	-	-	-	-

Normal control

Antibodies	Control				
	8133	8172	8184	8198	8552
age	52	56	69	65	99
GB	-	-	-	-	+
AT8	-	-	-	+	+
AT100	-	-	-	-	+
Tau 5	nd	nd	-	nd	nd
Tau	nd	nd	-	nd	nd
anti-PS199	-	-	-	-	+
anti-PS202	-	-	-	-	-
anti-PT205	-	-	-	-	+
anti-PS208	-	-	-	-	+
anti-PT231/PS23	-	-	-	-	-
anti-PS262	+	-	-	-	+
anti-PS396	+	-	-	-	-
anti-PS404	-	-	-	-	-
anti-PS409	-	-	-	-	+
anti-PS413	-	-	-	-	+
anti-PS422	-	-	-	-	+
anti-tau-C	-	-	-	-	-
anti-tau-N	-	-	-	-	-

Ballooned neuron の見られる神経疾患

南 正之¹⁾, 水谷 智彦¹⁾, 河西 竜太¹⁾, 鈴木 良夫²⁾, 森 啓³⁾

- 1) 日本大学医学部内科学講座神経内科部門
- 2) 旭中央病院病理科
- 3) 大阪市立大学医学部老年医学研究部門脳神経科学

研究要旨 各種神経変性疾患において ballooned neuron (BN)がしばしば観察される事は知られている。一方、脳梗塞は最も一般的な神経疾患の1つであり、神経変性疾患例でもしばしば共に見られる病態であるが、脳梗塞についてBNに関するまとまった検討は殆どなされていない。今回、各種神経変性疾患におけるBNの発現の有無を改めて検討すると共に、脳梗塞について多数例を用いてBNの発現を検索した結果、神経変性疾患例では従来の知見と合致する結果が得られ、また、脳梗塞例でもBNの存在がしばしば認められた。本研究の結果より、神経変性疾患においてBNが認められても、脳梗塞の存在により修飾されている可能性に留意する必要があると思われた。

はじめに

Ballooned neuron (BN) は腫大し、クロマチンの消失した淡明な細胞質と偏在した核を持つ細胞で、大脳皮質基底核変性症・進行性核上性麻痺・Pick 病・Alzheimer 病・argyrophilic grain disease 等の各種神経変性疾患や Creutzfeldt-Jakob 病などでしばしば発現が見られ、免疫組織化学的には眼球水晶体の主要構成成分である α B crystallin (α BC) に対する抗体によって明瞭に染色される。

一方、脳梗塞は日常的に見られる代表的な脳血管障害であり、神経変性疾患患者においてもしばしば両者の併存が見られるが、脳梗塞に関しては BN

についてこれまで殆ど検討されておらず、この2つの病態が同時に存在した場合、BNの発現がどちらに起因するものかは明らかではなかった。本研究では各種神経変性疾患におけるBNの発現の有無を改めて検討すると共に、脳梗塞について多数例を用いてBNの発現を検索した。

対象と方法

病歴、理学的所見、画像診断によって臨床的に診断され、病理解剖によって確定診断された各種神経変性疾患45剖検例、脳梗塞48剖検例、合計93剖検例を対象とした。

神経変性疾患例の内訳は筋萎縮性側索硬化症

23 例, 多系統萎縮症 5 例, Alzheimer 病 2 例, Parkinson 病及びその関連疾患 6 例, Pick 病 3 例, 大脳皮質基底核変性症 4 例, 進行性核上性麻痺 2 例である。

脳梗塞例は発症から死亡までの期間を 1-5 日, 6-10 日, 11-20 日, 21-30 日, 30 日以上の 5 群に分けて検討を行った。

剖検により得られた脳・脊髄は 10% 磷酸緩衝ホルマリン液で固定し, パラフィンに包埋した後に薄切切片を作成し, 一般染色を施行した。免疫染色は抗 α BC 抗体を一次抗体とし, Vectastain kit (Vector, USA) を用いた avidin-biotin complex 法により行った。

結果

神経変性疾患では大脳皮質基底核変性症 4 例, Pick 病 3 例, 家族性 Parkinson 病 1 例で BN がしばしば見られ, α BC 陽性であった。また, α BC は皮質型 Lewy 小体でも陽性であったが, central chromatolysis を呈した脊髄前角細胞では陰性であった。

脳梗塞では症例ごとに陽性例と陰性例があり, 時期別に α BC 陽性神経細胞を検討したところ, 48 例中 30 例に non-BN, 21 例に BN が見られ, 特に発症後 11 日以降の例で有意に陽性例が多かった(表 1)。

表 1: Frequency of α BC-positive neurons in each group

Group	Interval from onset of CI to death (day)	Frequency of α BC-positive neurons	
		non-BN	BN
Group 1 (n=7)	1-5	3 / 7 (42.9%)	1 / 7 (14.3%)
Group 2 (n=8)	6-10	3 / 8 (37.5%)	1 / 8 (12.5%)
Group 3 (n=9)	11-20	7 / 9 (77.8%)	5 / 9 (55.6%)
Group 4 (n=7)	21-30	7 / 7 (100.0%)	4 / 7 (57.1%)
Group 5 (n=17)	after 30	10 / 17 (58.8%)	10 / 17 (58.8%)

α BC, α B crystallin; CI, cerebral infarction; BN, ballooned neuron; non-BN, non-ballooned neuron; n, number of brain. §, $p < 0.05$; ¶, $p < 0.01$

考察

BN の存在はある種の神経変性疾患においてはよく認識され, 神経病理学的診断をつける上でその存在が重要な指標となる疾患も多い。大脳皮質基底核変性症と Pick 病は BN が高頻度に見られる疾患として知られており, 本研究でも検討した全例でその発現が見られた。一方, 形態学的に BN と同様に腫大した神経細胞が筋萎縮性側索硬化症の脊髄前角細胞でしばしば観察されたが, 免疫組織化学的には α BC 陰性で

あり, BN とは異なる変化と考えた。

脳梗塞例に関する系統的な研究は我々が検索した限りでは Lowe らのものがあるのみであり, しかも脳梗塞のどの時期にどの程度発現するのかはこれまで不明であった。本研究は脳梗塞の時期別に検討を行った最初の研究であり, 脳梗塞でも高頻度に BN が発現すること, 脳梗塞では急性期で発現する頻度は低く, 亜急性期以降に発現頻度が増加することを初めて明らかにした。

過去の様々な報告によると α B β はストレス状態の下で発現が誘導されるストレス蛋白の 1 種であり、ストレス下で保護的に働いていると考えられていることから、神経変性疾患・脳梗塞例でも細胞保護的に作用していることが推測された。

神経変性疾患において脳梗塞を併発することは稀ではなく、BN が見られた場合には脳梗塞によって組織像が修飾されている可能性に留意する必要がある。

結 論

BN の存在は神経変性疾患においてはよく認識されているが、脳梗塞ではそれが認識されているとは言い難い。本研究では脳梗塞例でも BN が高頻度に発現することを初めて明らかにした。神経変性疾患でも脳梗塞を併発する事は稀ではなく、神経変性疾患例でも脳梗塞により修飾されている可能性に留意する必要がある。

文 献

- 1) Minami M, Mizutani T, Kawanishi R, et al: Neuronal expression of α B crystallin in cerebral infarction. *Acta Neuropathol* 105: 549-554, 2003.
- 2) Lowe J, Errington DR, Lennox G, et al: Ballooned neuron in several neurodegenerative diseases and stroke contain α B-crystallin. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18: 341-350, 1992.
- 3) Iwaki T, Wisniewski T, Iwaki A, et al. Accumulation of α B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic condition. *Am J Pathol* 140: 345-356, 1992.
- 4) Klemenz R, Fröhli E, Steiger RH, et al. α B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3652-3656, 1991.

CTG リピートの延長からみた神経細胞における tauopathy の発症メカニズム：筋強直性ジストロフィーモデル細胞を用いた解析

分担研究者
研究協力者

吉良 潤一¹⁾
古谷 博和¹⁾、新納 信江¹⁾、大八木 保政¹⁾、林 利光²⁾
1) 九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科
2) 富山医科薬科大学薬学部

研究要旨 筋強直性ジストロフィー(DM1) は、DMPK 遺伝子の 3'非翻訳領域に存在する CTG リピートの延長によって起こるが、中枢神経系には tauopathy が生じる。この発症機序を明らかにし、治療薬をスクリーニングするシステムを作成するために、ルシフェラーゼ遺伝子の 3'非翻訳領域に 250 回の CTG リピートを組み込んだ mRNA を恒常的に発現する培養神経細胞(PC12 細胞)を作製した。この細胞は分化誘導後、酸化ストレスをかけると、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を抑制し(cis-効果)、細胞死を起こし、DM1 の中枢神経系に認められるのと同じような tau 遺伝子の alternative splicing の起こる事が確認された。また、ある種のフラボノイドが cis-効果と細胞死を抑制する事が確認され、今後このシステムが DM1 治療薬のスクリーニングシステムとしても有効であると考えられた。

A. 研究目的

筋強直性ジストロフィー(DM1) は、DMPK 遺伝子の 3'非翻訳領域に存在する CTG リピートの延長によって起こるが、筋病変のみならず全身に合併症が起こり、特に中枢神経系では異常リン酸化 tau 蛋白が沈着する tauopathy の起こる事が知られている。そこで、レポーター(ルシフェラーゼ(*luc*))遺伝子の 3'下流に、CTG リピートを挿入した mRNA を恒常的に発現する神経系細胞を PC12 細胞で作成し、リピート延長が自分自身の遺伝子の発現を抑制する cis-効果や tauopathy、細胞死を起こす機序を解析するとともに、これらの効果を軽減させる bioflavonoid のスクリーニングを行った。

B. 研究方法

250 繰り返しの CTG リピートをルシフェラーゼ(*luc*)遺伝子の下流に挿入し、それを pCAGGSneo ベクターに組み込み、PC12 細胞の stable 細胞を作成した(CTG-250)。この細胞を nerve growth factor (NGF)存在下で分化誘導を行った後、fetal calf serum (FCS) を抜いた培地で培養し、酸化ストレスをかけた。このようにして分化誘導した CTG-250 の *luc* 遺伝子転写量を、Northern blotting で測定し、次に RT-PCR 法で、tau 遺伝子の発現と alternative splicing の違いを検出した。また、*luc* 活性と LDH活性を測定することで、リピートが *luc*

の活性を抑制する効果(cis-効果)と、リピートが起こす神経細胞死を調べた。さらにこの細胞を用いて、神経細胞毒性を軽減する 235 種類の bioflavonoid のスクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

今回の研究は、モデル細胞として実験的に作成された培養細胞が中心となっており、特に倫理面への配慮は必要ないと考えられる。

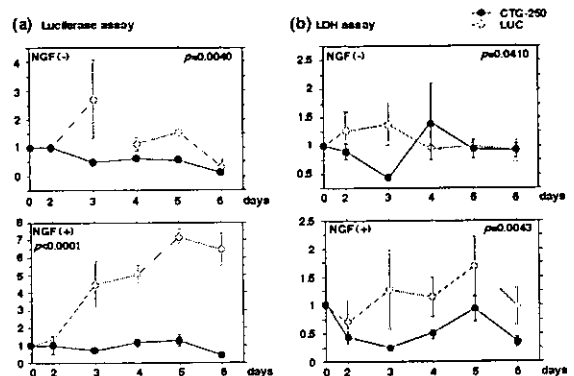


図1 CTG-250 で分化誘導後に認められた cis-効果(左、下段)と細胞死(右、下段)

C. 研究結果

最初からNGF(-)で培養した場合は、コントロー

ルと比較してCTG-250に有意なcis-効果と細胞死は起こらなかったが、いったんNGF(+)でCTG-250を分化誘導した後は、CTG-250に有意な細胞死が起こり、*luc*の活性も減少した(cis-効果の出現)(図1)。しかし、コントロールとCTG-250で*luc* mRNAの発現量に差は認められなかった(図2)。このことから、CTG-250でも患者筋芽細胞や線維芽細胞同様に、延長したCTG(CUG)を含むmRNAは、転写は正常に行われるものの翻訳量が減少していること、つまり核・細胞質輸送の障害が起きていることが確認された。

図2 CUGリピートを含むmRNAの発現

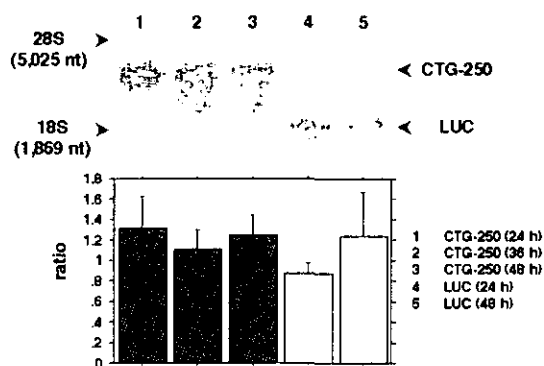
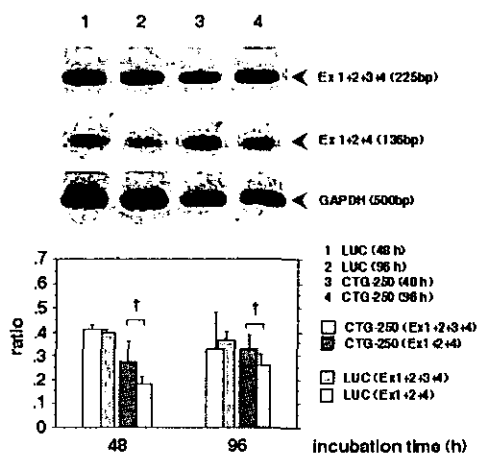


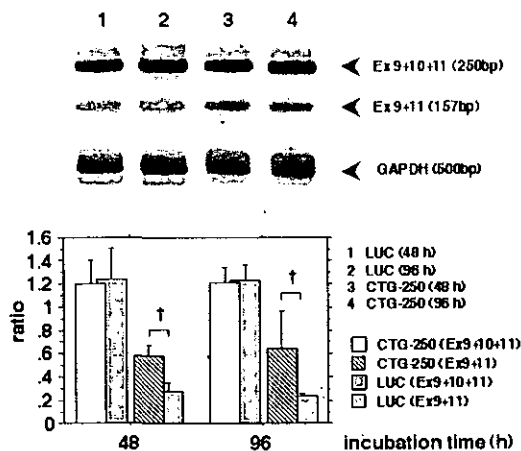
図3. RT-PCRによるtau isoformの発現の違い(exon 3のsplice outを示す)



次にtau遺伝子の発現をRT-PCR法で調べてみると、CTG-250ではtau遺伝子のexon3とexon10のsplice-outされたisoformの発現が増えており、DM1患者脳やモデルマウスの脳に認められるtauopathyの所見や遺伝性前頭側頭痴癡の所見に類似していた(図3, 4)。ただ、現時点では、DM1と同じようtau蛋白の異常リン酸化が起こっているかどうかは確認されなかった。CTG-250で認められたcis-効果や細胞死は、flavone (toringin), isoflavone (ononin)とformononetin, flavanone (isosakuranetin), xanthylatinおよびDHEA-S (dehydroepiandrosterone sulfate)など

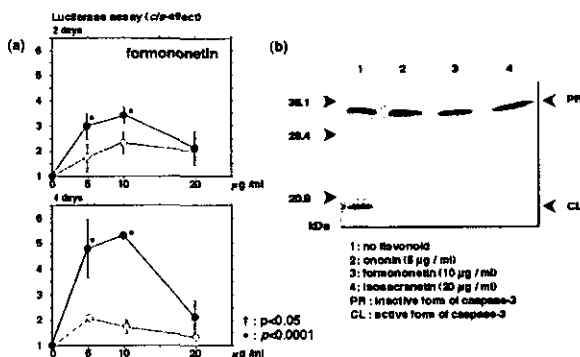
で有意に抑制された(図5)。

図4. RT-PCRによるtau isoformの発現の違い(exon 10



のsplice outを示す)

図5. isoflavone(formononetin)によるCTGリピートのcis-効果(a)および細胞死の抑制(b)。培地にformononetinを加える事で、ルシフェラーゼ活性は上昇し、CTGリピートのcis-効果がCTG-250 (●)でコントロール(○)に比べ軽減している(a)。またコントロールで認められた活性型caspase-3のバンドが、これらのbioflavonoidを加えることで消失していることがわかる(b)。



D. 考察

PC12細胞はNGFが培地に加えられまでは分裂を繰り返し、核膜が一定の周期で消失するが、NGFが加えられると細胞分裂を停止し、核膜は維持され、軸索や樹状突起の形成を開始する。

CTG-250では、(1)リピートを含むmRNAはコントロールと同様に発現しているにもかかわらず、(2)リポーター遺伝子の活性には差が認められること、(3)これまでにリピートを含むmRNAが核内に多くとどまることがRNA FISH法で確認されていること、(4)アフリカツメガエル卵にリピートを含むルシフェラーゼの発現プラスミドを打ち込んだところ、cis-効果は細胞分裂をしない卵母細胞の方が、細胞分裂する受精卵より強く認められた