

図5 生化学的検索

A: α TTPの局在. Western blottingでは α TTPは少量ながら中枢神経系広汎に発現する一方, 心臓には発現していない(Cx: 大脳, Cll: 小脳, SP: 脊髄).

B: α TTPノックアウトマウスの α -tocopherol組織内濃度(本文参照).

定していると考えられる. これらの詳細については別の総説を参照されたい¹⁴⁾.

神経変性と α -Toc欠損の因果関係

α TTPが少量ながら中枢神経にも発現していることから(図5-A), α TTPの中枢神経内での機能が注目されていた. α TTPの中枢神経内の局在についてはバグマンガリア⁹⁾, プルキンエ細胞¹⁵⁾などの報告があるが決着はついていない. そこで α TTPノックアウトマウスの中枢神経内の α -tocopherol濃度について検討した. α TTPノックアウトマウスでは末梢血, 中枢神経内には α -tocopherolは検出感度以下であった. α -tocopherol過剰食の群では血中の α -tocopherolは正常近くまで上昇するが, 中枢神経内の α -Toc濃度は正常の5~10%程度までしか上昇しなかった(図5-B). すなわち, 中枢神経内に α TTPが欠損すると血中の α -tocopherolを中枢神経内に効率よく輸送できない, あるいは保持できないと解釈できる. しかし, 重要な点は血中の α -tocopherol濃度を上昇させてやると少量ではあるが中枢神経内に α -tocopherolが移行する点である. すなわち, α TTPの中枢神経内への移行は α TTP以外にも別のルー

トがマイナーながら存在することを示している. 今回作製した α -tocopherol欠乏食の野生型の群では中枢神経内に α -Toc濃度ある程度保たれた. これは, 妊娠に α -tocopherolが必要であるために欠乏食にできずに胎生期に中枢神経内に入った α -tocopherolがなかなか抜けないことによるのかも知れない. この α -Toc欠乏食の野生型マウスは神経症状を発症しなかったが, その中枢神経内の α -tocopherol濃度は α -tocopherol過剰食の α TTPノックアウトマウスの中枢神経内の α -Toc濃度より低いことに注目したい. このことは, 中枢神経内の α -Toc濃度は正常の5~10%程度あれば神経変性を防ぐには十分であることを示唆している.

α TTP遺伝子異常症例やノックアウトマウスの神経症状や神経病理所見が従来報告されている欠乏食による α -tocopherol欠乏動物のそれらによく似ていることから α TTP遺伝子異常による神経変性は血中の α -tocopherol欠乏が考えられていた. しかし, 今回の実験から α TTPは血中の保持のみならず, 中枢神経系への移行にも中核的な働きをしており, α TTP欠損は中枢神経にさらに高度の α -tocopherol欠乏状態が生じさせていることが

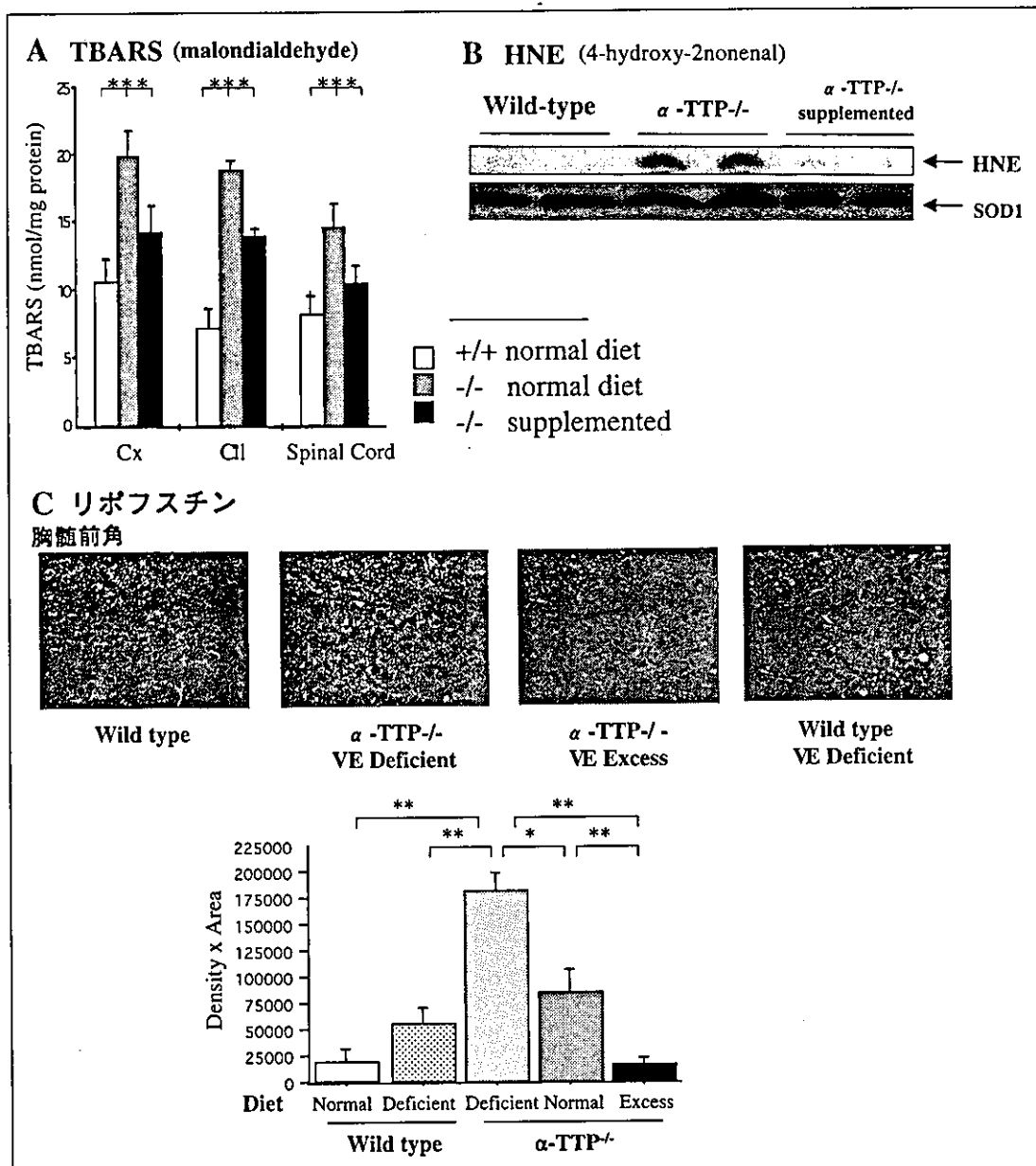


図6 酸化ストレスの評価

- A: TBARS法による中枢神経組織内酸化ストレス定量。
- B: 抗HNE抗体を用いた小脳のWestern blotting。
- C: 脊髄前角細胞に沈着するリポフスチン(白矢印, Fontana-Masson染色)。

判明した。そして、組織内の α -tocopherol補充で神経変性がほぼ完全に防止ができたことは、神経変性の主たる原因が組織内の α -tocopherol欠乏にあり、中枢神経内 α TTPの α -tocopherol輸送以外の未知の機能の障害ではなさそうであることが示された。

酸化ストレスと神経変性

α TTPノックアウトマウスの中枢神経系において α -tocopherol欠乏による酸化ストレスの影響の

評価をmalondialdehyde(MDA)の生化学的定量と4-hydroxy-2-nonenal(HNE)のWestern blottingで行った。MDAとHNEともに α TTPノックアウトマウスの中枢神経で上昇し、 α -tocopherolの投与により有意に減少した(図6-A)。HNEは脂質過酸化の代謝産物であるだけでなく、酸化ストレスの際に強力に細胞障害性に働くこともわかっている。さらに興味深いことに、HNE修飾をうけている物質が代表的なradical scavengerの一つであるCu/Zn SOD1であり、この修飾によりSOD1

機能が障害されている可能性があり、さらに酸化ストレスが強まる機序が想定された(図6-B)。

また、MDAを含むcarbonyl複合物の凝集体であるリポフスチンは α TTPノックアウトマウスの中樞神経系において、神経変性を起こしている部位、すなわち後根神経節や網膜色素上皮、脊髄前角細胞に特に顕著に沈着していた。この事実は酸化ストレスによる神経変性の部位特異性との相関を示す重要な所見と考えている。そして、それを定量すると食餌中の α -tocopherol含有量の程度に応じてリポフスチン量が増減していることが明らかとなった(図6-C)。これらの事実から、脂質酸化の抗酸化物質である α -tocopherolが長期間、ほぼ完全に欠損することにより、神経細胞に慢性のストレスが加わって神経変性をきたしたと考えられた。後根神経節細胞などある一部の神経系に特異的に酸化ストレスがかかりやすい機序は依然不明であるが、この病変分布が老化の障害部位と一致している点は興味深い。

従来、神経系は中樞神経系は脂質の含有量が多くもっとも酸化の受けやすい組織といわれている。Alzheimer病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の病態生理に酸化ストレスが関与しているという知見は多く報告されている。しかし、動物モデルで、酸化ストレスによる神経細胞死をきたすのはいずれも急性のモデルである。フリーラジカルを産生するパラコートやMPTPの投与による神経変性は数日以内に、また、ラジカルスカベンジャーの一つであるMnSOD1のノックアウトマウスは生後数日で死亡する。一方、 α TTPノックアウトマウスは生後1年で発症し、月の単位で緩徐に進行する。この点で α TTPノックアウトマウスは慢性の酸化ストレスによる初めての神経変性のモデルといえる。このモデルマウスの神経細胞死や、部位特異性の検討は神経変性疾患に共通の機序の解明に役立つかも知れない。また、このマウスとAlzheimer病などの神経変性疾患のモデルマウスとの掛け合わせは、それぞれの神経細胞死の機序における酸化ストレスの関与を検索する有用な方法になると期待している。

AVED患者の治療法

上記の α TTPノックアウトマウスからの知見より、AVED患者にビタミンE投与が神経変性進行の防止に意義をもつという理論的裏づけができたと考えている。 α TTPが α -tocopherolの中樞神経内への移行をも行っているという事実からAVED患者のビタミンE投与は血中の α -tocopherol値が正常範囲内になったというだけでは十分であるとは限らないことを示しており、現在適切な投与量について検討している。

本研究は東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室・五十嵐啓二先生、新井洋由先生、中外製薬創薬資源研究所・寺社下浩一先生、鈴木宏志先生、東京都神経科学総合研究所神経病理・内原俊記先生、東北大学医学部眼科・富田浩史先生などとの共同研究であり、各先生に深謝する。

文 献

- 1) Harding AE, Matthews D, Jones S, et al. Spinocerebellar degeneration associated with selective defect of vitamin E absorption. *N Engl J Med* 1985; 313:32-5.
- 2) Yokota T, Wada Y, Furukawa T, et al. Adult-onset spinocerebellar syndrome with idiopathic vitamin E deficiency. *Ann Neurol* 1987; 22:84-7.
- 3) Arita M, Sato Y, Miyata A, et al. Human α -tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. *Biochem J* 1995; 306:437-43.
- 4) Ouahchi K, Arita M, Kayden HJ, et al. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein. *Nature Genet* 1995; 9:141-5.
- 5) Gotoda T, Arita M, Arai H, et al. Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the α -tocopherol-transfer protein. *N Engl J Med* 1995; 333:1313-18.
- 6) Yokota T, Shiojiri T, Arai H, et al. Retinitis pigmentosa and ataxia caused by mutation in the α -tocopherol transfer protein gene. *N Engl J Med* 1996; 335:1770-1.

- 7) 横田隆徳. α -tocopherol転移タンパク遺伝子変異によるFreidreich型運動失調症. 神経内科 1998 ; 48 : 229-36.
- 8) Cavalier L, Ouahchi K, Keyden HJ, et al. Ataxiawith isolated vitamin E deficiency : heterogeneity of mutations and phenotypic variability in a large number of families. Am J Hum Genet 1998 ; 62 : 301-10.
- 9) Hosomi A, Goto K, Kondo H, et al. Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat. Neurosci Lett 1998 ; 256 : 159-62.
- 10) Yokota T, Shiojiri T, Gotoda T, et al. Freidreich-like ataxia and retinitis pigmentosa caused by His101Gln mutation of the α -tocopherol-transfer protein gene. Ann Neurol 1997 ; 41 : 826-32.
- 11) Yokota T, Igarashi K, Uchihara T, et al. Delayed onset ataxia in mice lacking alpha-tocopherol transfer protein : Model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. Proc Natl Acad USA 2001 ; 98 : 15185-90.
- 12) Larnaout A, Belal S, Zouari M, et al. Friedreich ataxia with isolated vitamin E deficiency : a neuropathological study of a Tunisian patient. Acta Neuropathol 1997 ; 93 : 633-7.
- 13) Yokota T, Kumagai J, Uchihara T, et al. Autopsy of ataxia with retinitis pigmentosa caused by the His101Gln mutation of the α -tocopherol transfer protein. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2000 ; 68 : 521-2.
- 14) 新井洋由. 体内ビタミンE輸送の分子機構. 日本臨牀 1999 ; 10 : 2276-83.
- 15) Copp RP, Wisniewski T, Hentati F, et al. Localization of alpha-tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders. Brain Res 1999 ; 822 : 80-7.

* * *

α -tocopherol 転移タンパク遺伝子欠損マウス における遅発性運動失調症

横田 隆徳 水澤 英洋

□ はじめに

慢性の脂肪吸収障害が、運動失調や視覚障害などの進行性の症状をきたすことは知られていたが、1980年代に、常染色体劣性遺伝形式で脂肪吸収障害を伴わない特発性のビタミンE単独欠乏性のFriedreich失調症型の脊髄小脳変性症の報告がされた¹⁾。1995年に α -tocopherol転移タンパク(α TTP)遺伝子がクローニングされ²⁾、ビタミンE欠乏性脊髄小脳変性症の原因遺伝子として同定された³⁾。現在ではfamilial isolated vitamin E deficiency (FIVE)、またはataxia with isolated vitamin E deficiency (AVED)の名称で疾病概念として確立した。近年、我々は α TTPノックアウトマウスを作製して、運動失調の発生機序とビタミンE欠乏との因果関係を明らかにし、この疾患がビタミンE投与で治療可能であることを証明した⁴⁾ので紹介する。

□ α TTP ノックアウトマウスの神経症状

ノックアウトマウスは、マウス α TTPゲノムDNAのexon 1をネオマイシン耐性遺伝子に置換することにより α TTP遺伝子をノックアウトして作製した。ノックアウトマウスでは肝臓の α TTP mRNAやタンパクは欠損し、血清の α -tocopherol濃度は著明に低下した。ヘテロ接合体マウスでは肝臓の α TTP mRNA、血清の α -tocopherol濃度ともに半減した。作製されたノックアウトは α -tocopherolの欠乏した餌を与えた群、正常の餌(36 mg/kg)を与えた群、過剰の餌(600 mg/kg)を与えた群の3群を飼育した。過剰の餌によって α TTPノックアウトマウスの血清の α -tocopherol濃度は正常レベル程度まで回復した。 α TTPノックアウトマウスは生後1年までは明らかな神経症状は示さなかったが、1年3ヵ月頃より運動失調・筋力低下・振戦を示すようになった。進行すると歩行時に両下肢をひきずるようになった。振戦は安静時には明らかではないが、歩行時やストレスが加わるとより明らかとなった。

よこた たかのり 東京医科歯科大学講師/神経内科
みずさわ ひでひろ 同 教授

歩行障害は小股歩行になることがフットプリント解析で明らかになり(図1A)、加速度式回転車テストにより、野生型に比較してノックアウトマウスの運動障害は明らかであった。これらの振戦や運動障害は α -tocopherol欠乏食群ではより障害が顕著で、 α -tocopherolの過剰投与により著明に改善し、過剰食の群では野生型と有意差はほとんどなかった。

さらに電気生理学的に検討したところ、体性感覚誘発電位で前肢・後肢いずれの電気刺激でも末梢神経伝導は正常だが、大脳誘発電位はその振幅がノックアウトマウスでは著明に低下し、 α -tocopherolの過剰投与により著明に改善した(図1B)。

□ α TTP ノックアウトマウスの神経病理所見

中枢神経系の病変の主座は脊髄後索で、顕著な神経線維の脱落とスフェロイドを、後索核で線維性グリオーシスを認めた(図1C)。この変化はBurdach束よりGoll束に高度で、腰髄より頸髄、頸髄より延髄後索核でより顕著である一方、後根神経節では変化はわずかで、dying backタイプの後索変性であった。網膜は外顆粒層、視細胞内節、外節の厚さの減少を認めた。また、自己蛍光を発する大量のリポフスチンを後根神経節・脊髄前角細胞・網膜色素上皮に認めた。これらの神経変性の所見は、 α -tocopherol欠乏食群ではより障害が顕著で、 α -tocopherolの過剰投与により著明に改善した。

□ ビタミンE欠乏の機序と α TTP

自然界のビタミンEは主に α 、 β 、 γ 、 δ -tocopherolの同族体からなる。 α TTPは肝細胞に豊富に存在する細胞質タンパクとして同定され、その働きは空腸で吸収され、カイロミクロンに取り込まれた α -tocopherolを肝臓で選択的に摂取し、肝臓で合成されたVLDLに転送することでリサイクルして、血中濃度を維持することと考えられている。

AVED患者の血中ビタミンE欠乏の機序は、肝臓の α TTPの機能異常でよく説明できる。 α -tocopherolを

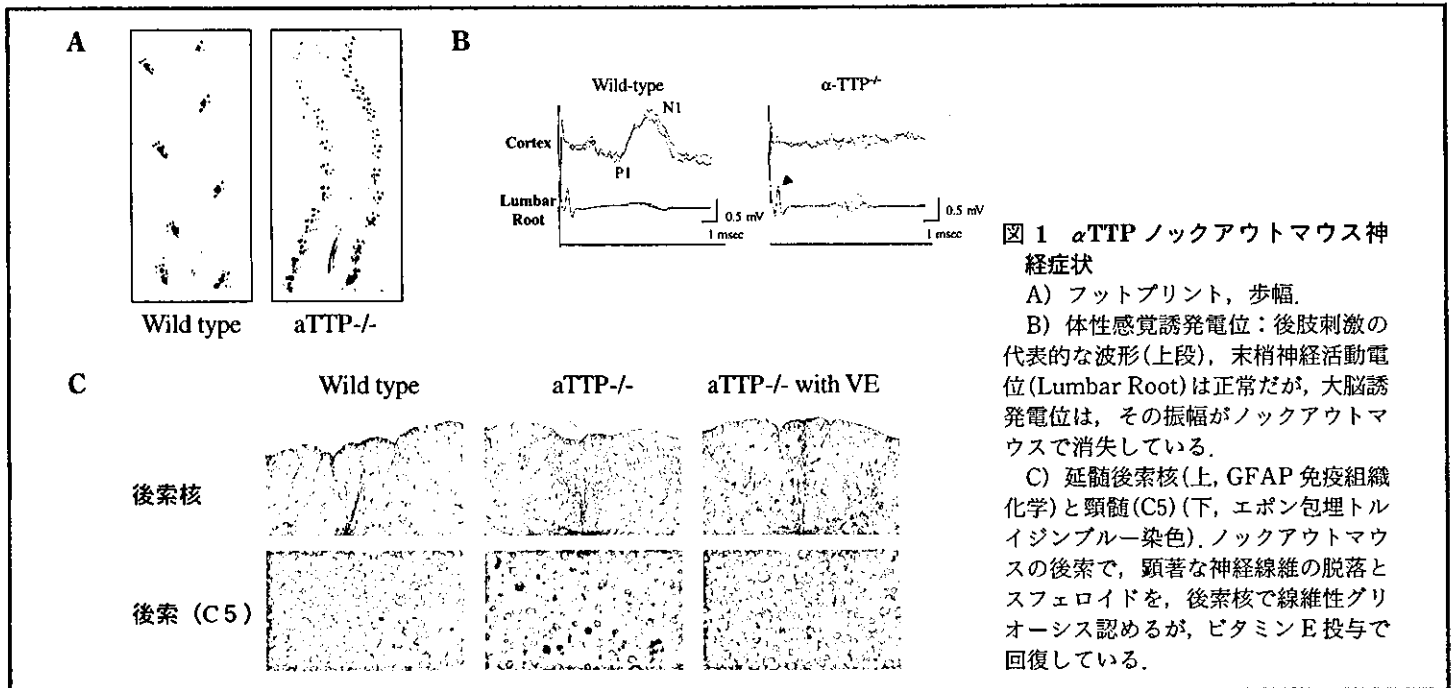


図1 α TTP ノックアウトマウス神経症状

A) フットプリント, 歩幅.

B) 体性感覚誘発電位: 後肢刺激の代表的な波形(上段), 末梢神経活動電位(Lumbar Root)は正常だが, 大脳誘発電位は, その振幅がノックアウトマウスで消失している.

C) 延髄後索核(上, GFAP 免疫組織化学)と頸髄(C5)(下, エボン包埋トルイジンブルー染色). ノックアウトマウスの後索で, 顕著な神経線維の脱落とスフェロイドを, 後索核で線維性グリオシス認めるが, ビタミンE投与で回復している.

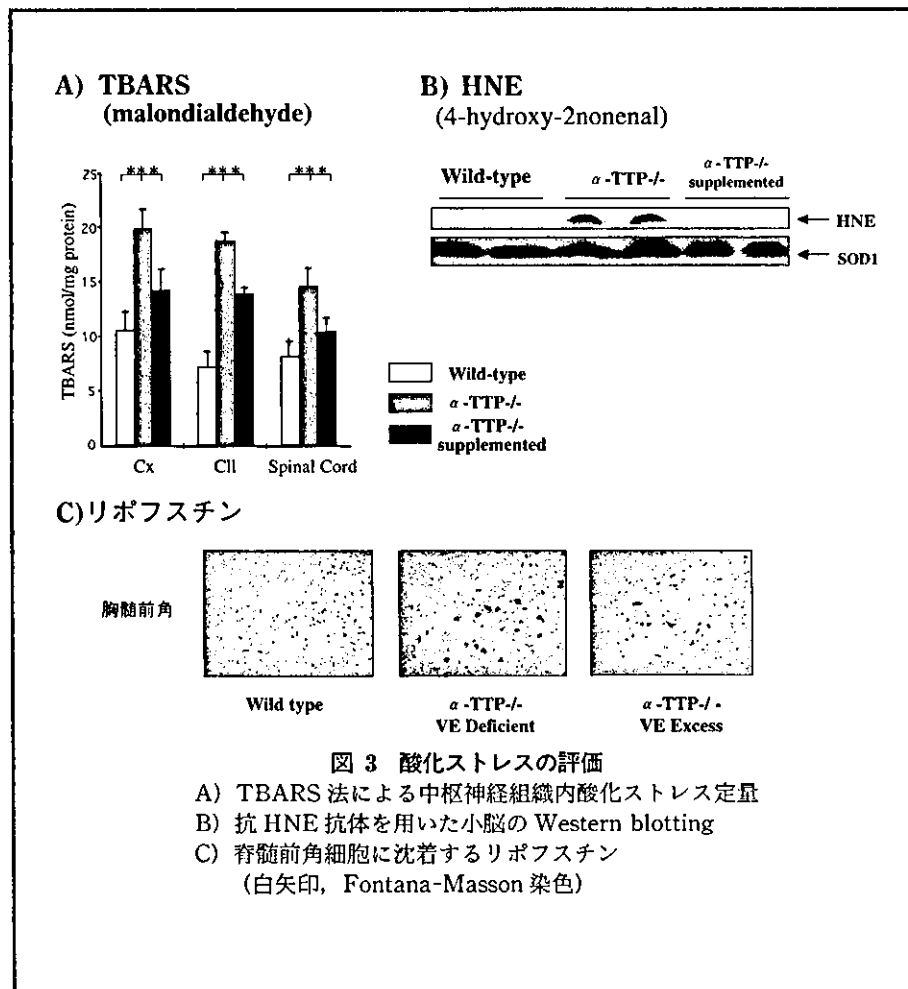


図3 酸化ストレスの評価

- A) TBARS 法による中枢神経組織内酸化ストレス定量
 B) 抗 HNE 抗体を用いた小脳の Western blotting
 C) 脊髄前角細胞に沈着するリポフスチン (白矢印, Fontana-Masson 染色)

口摂取させると小腸で吸収され, 血中の α -tocopherol 濃度は AVED 患者では正常上昇する. しかし, AVED 患者では α -tocopherol 濃度は正常に比して急速に低下する. すなわち, AVED 患者では肝臓で α TTP が十分に働かないため, 血中に α -tocopherol を保持しておくことができず, α -tocopherol 濃度が低下するという機序が考えられる.

■ 神経変性と α -tocopherol 欠損の因果関係

α TTP が少量ながら中枢神経にも発現していることから(図2A), α TTP の中枢神経内での機能が注目されていた. α TTP ノックアウトマウスでは末梢血, 中枢神経内には α -tocopherol は検出感度以下であった. α -tocopherol 過剰食の群では, 血中の α -tocopherol は正常近くまで上昇するが, 中枢神経内の α -tocopherol 濃度は正常の5~10%程度までしか上昇しなかった(図2B). すなわち, α TTP は血中の保持のみならず, 中枢神経系への移行にも中核的な働きをしており, α TTP の欠損は中枢神経にさらに高度の α -tocopherol 欠乏状態を生じさせていることが判明した. しかし, 重

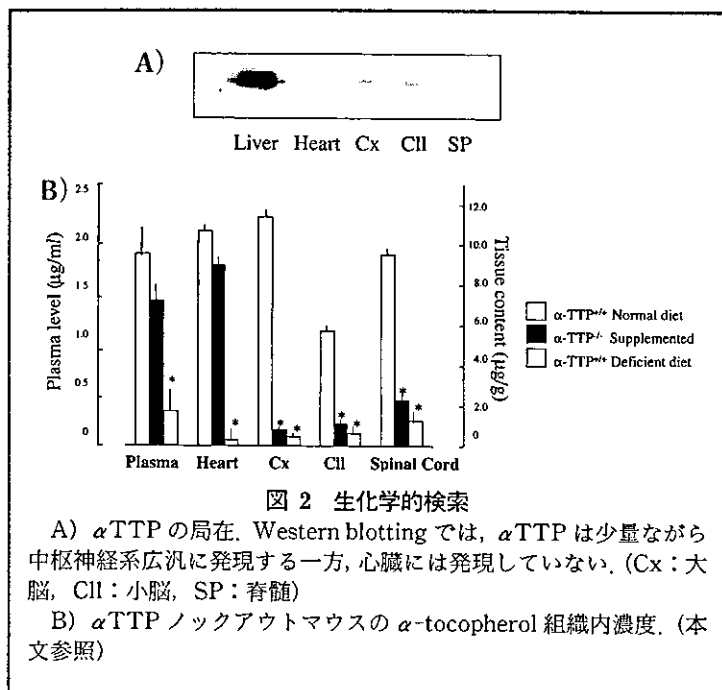


図2 生化学的検索

A) α TTP の局在. Western blotting では, α TTP は少量ながら中枢神経系広汎に発現する一方, 心臓には発現していない. (Cx: 大脳, Cll: 小脳, SP: 脊髄)

B) α TTP ノックアウトマウスの α -tocopherol 組織内濃度. (本文参照)

要な点は α TTP ノックアウトマウスでも, 血中の α -tocopherol 濃度を上昇させてやると, 少量ではあるが中枢神経内に α -tocopherol が移行する点である. これは, α TTP の中枢神経内への移行は α TTP 以外にも別のルートがマイナーながら存在することを示している. このことは, 中枢神経内の α -tocopherol 濃度は正常の 5~10% 程度であれば, 神経変性を防ぐには十分であることを示している. そして, この事実は神経変性の主たる原因が組織内の α -tocopherol 欠乏にあり, 中枢神経内 α TTP の α -tocopherol 輸送以外の未知の機能の障害ではなさそうであることが示された.

■ 酸化ストレスと神経変性

ビタミン E は脂質の抗酸化作用をもつ代表的な radical scavenger の 1 つとして知られている. α TTP ノックアウトマウスの中枢神経系において, α -tocopherol 欠乏による酸化ストレスの影響の評価を, malondialdehyde (MDA) の生化学的定量と 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) の Western blotting で行った. MDA と HNE とともに α TTP ノックアウトマウスの中枢神経内で上昇し, α -tocopherol の投与により有意に減少した (図 3 A). HNE は脂質過酸化の代謝産物であるだけでなく, 酸化ストレスの際に強力に細胞障害性に働くこともわかっている. さらに興味深いことに HNE 修飾をうけている物質が代表的な radical scavenger の 1 つである Cu/Zn SOD 1 であり, この修飾により SOD 1 機能が障害されている可能性があり, さらに酸化ストレスが強まる機序が想定された (図 3 B).

また, MDA を含む carbonyl 複合物の凝集体であるリポフスチンは α TTP ノックアウトマウスの中枢神経系において, 神経変性をおこしている部位, すなわち後根神経節や網膜色素上皮・脊髄前角細胞に特に顕著に沈着していた. この事実は, 酸化ストレスによる神経変性の部位特異性との相関を示す重要な所見と考えている (図 3 C). これらの事実から, 脂質酸化の抗酸化物質である α -tocopherol が長期間, ほぼ完全に欠損することにより, 神経細胞に慢性のストレスが加わって神経変性をきたしたと考えられた.

従来, 中枢神経系は脂質の含有量が多く最も酸化の受けやすい組織といわれている. アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の病態生理に, 酸化ストレスが関与しているという知見は多く報告されている. しかし, 動物モデルで, 酸化ストレスによる神経細胞死をきたすのは, いずれも急性のモデルである. フリーラジカルを産生するパラコートや MPTP の投与による神経変性は数日以内に, また radical scavenger の 1 つである MnSOD 1 のノックアウトマウスは生後数日で死亡する. 一方, α TTP ノックアウトマウスは生後 1 年で発症し, 月の単位で緩徐に進行する. この点で α TTP ノックアウトマウスは, 慢性の酸化ストレスによる初めての神経変性のモデルといえる. このモデルマウスの神経細胞死や, 部位特異性の検討は神経変性疾患に共通の機序の解明に役立つかも知れない. また, このマウスとアルツハイマー病などの神経変性疾患のモデルマウスとの掛け合わせは, それぞれの神経細胞死の機序における酸化ストレスの関与を検索する有用な方法になると期待している.

謝辞 本研究は東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室, 五十嵐啓二先生, 新井洋由先生, 中外製薬創薬資源研究所, 寺社下浩一先生, 鈴木宏志先生, 東京都神経科学総合研究所神経病理, 内原俊記先生, 東北大学医学部眼科, 富田浩史先生などとの共同研究であり, 各先生に深謝する.

文献

- 1) Yokota T, et al. Adult-onset spinocerebellar syndrome with idiopathic vitamin E deficiency. *Ann Neurol* 1987; 22: 84-7.
- 2) Arita M, et al. Human α -tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. *Biochem J* 1995; 306: 437-43.
- 3) Ouahchi K, et al. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 1995; 9: 141-5.
- 4) Yokota T, et al. Delayed onset ataxia in mice lacking alpha-tocopherol transfer protein: Model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. *Proc Natl Acad USA* 2001; 98: 15185-90.

《内科疾患に伴う神経症状》 ビタミン欠乏症

横田 隆徳*

ビタミン B₁(サイアミン)欠乏症●

サイアミンはケト酸代謝の補酵素で、その欠乏は神経系のブドウ糖利用障害、ミトコンドリア障害をきたし、神経伝達物質や有髄神経の伝導に直接の影響があると考えられている。サイアミンは小腸で吸収され、肉体労働によって消費されるため、その両者のバランスによって血中濃度は規定される。昭和初期や第二次世界大戦中、戦直後には結核とともに二大国民病であったが、栄養状態の改善とともに、その頻度は激減していた。1960年代になり、インスタントラーメンなどのビタミン B₁無添加のインスタント食品の偏食などにより増加した時期があった。現在ではその多くはアルコール多飲者の栄養不良に伴うものが多い。このような食事摂取の問題に加えて、消化管切除などの吸収の障害、下痢、利尿薬の使用などの喪失量の増加、高度の肉体労働、発熱、甲状腺機能亢進などの需要の増加が原因となりうる。近年、高カロリー輸液内へのビタミン剤の入れ忘れによる Wernicke 脳症の報告が相次いでいるので注意されたい。

1. 脚気(beriberi)

長期間のサイアミン欠乏の後、発症する。心血管系に障害があるもので、浮腫、心拍出量増加による心不全を伴う浮腫型脚気(wet beriberi)と、伴わない末梢神経障害型脚気(dry beriberi)がある。浮腫型では倦怠感、食欲不振、動悸、顔面下肢の浮腫などの症状があり、心肥大を示す。末梢

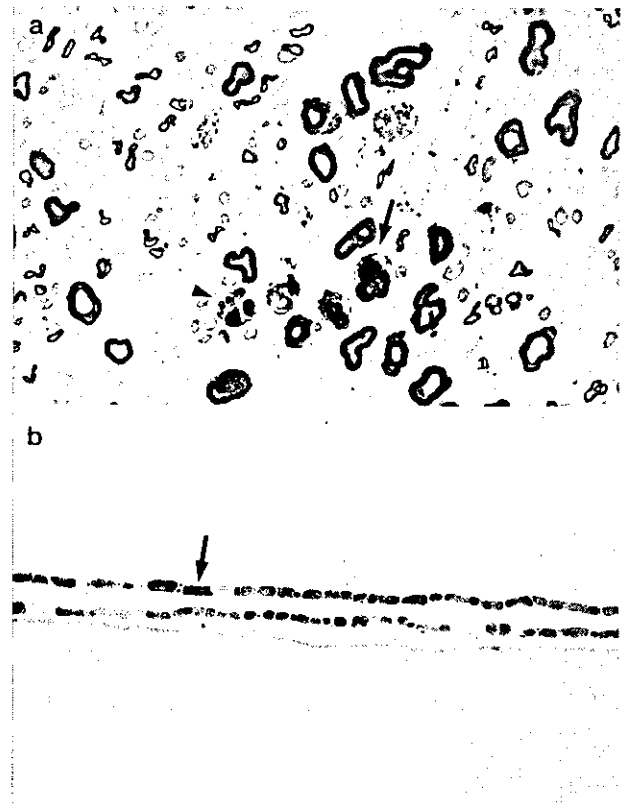


Fig. 1. ビタミン B₁欠乏性末梢神経障害の腓腹神経病理所見(神田 隆 博士より)

- a : エポソ包埋トルイジンブルー染色(×200). 有髄線維の脱落, ミエリン球(矢印), 貪食したマクロファージ(矢頭)を認める.
b : ときほぐし標本. 数珠状に連なったミエリン球(矢印)を認める.

神経障害型では四肢とくに下肢末梢に強いピリピリとした異常感覚が特徴である。進行すると感覚鈍麻、筋力低下が生ずる。血中ビタミン B₁値が 40 mg/ml で発症するといわれている。末梢神経伝導検査や神経生検(Fig. 1)で軸索障害型の障害が認められる。

* T. Yokota(講師) : 東京医科歯科大学神経内科.

2. Wernicke 脳症

慢性のアルコール多飲者が何らかの理由で摂取不良、需要亢進するエピソードの後に発症しやすい。発症は比較的急速で、眼球運動障害、運動失調、意識障害を三主徴とする。しかし、この3つが揃うことは全症例の1/3以下で、意識障害だけのこともある。意識障害は傾眠から昏睡までさまざまだが、見当識障害、無欲無関心、集中力低下など global confusional state と呼ばれる比較的軽度なものであることが多く、アルコール離断症状の振戦せん妄と鑑別が困難なことがある。眼球運動障害の多くは外転神経障害だが、核上性麻痺のこともある。しばしば注視方向性眼振を伴う。眼瞼下垂や内眼筋の麻痺はまれである。運動失調のほとんどは体幹失調による歩行障害が主体で、四肢の運動失調は通常軽い。多発性末梢神経障害、自律神経障害(低体温、低血圧)を伴うこともまれではない。

検査所見ではビタミン B₁ 値低値、ビタミン B₁ を補酵素とするトランスケトラーゼ活性値の低下、これにビタミン B₁ を添加して、その活性値の上昇をみるサイアミンピロリン酸塩効果(thiamine pyrophosphate effect: TPPE)がある。MRI 上 T₂ 強調画像で高信号で、急性期には enhance される視床内側、中脳水道近傍、乳頭体の病変が特徴で診断的価値がある。

治療上重要なことは、臨床上疑われたら検査結果を待たずに早急に 100~200 mg のサイアミンを静注することである。以降は 50~200 mg を経口または筋注で継続投与する。未治療では致死的になる場合がある。動物実験では中枢神経系の症状が出現してから病理所見が認められるまでには約1日必要であり、そのあいだにビタミン B₁ を補えば完全に回復するという。しかし、約半数の例は見当識障害・健忘・作話を三主徴とする Korsakoff 症候群に移行するといわれる。

ビタミン B₆ 欠乏症●

ビタミン B₆ (pyridoxine, pyridoxal, pyrido-

xamine) はアミノ酸代謝の補酵素として GABA, セロトニン, ドパミンなどの神経伝達物質の合成、分解に関与している。症状は慢性欠乏で生じ、感覚優位の軸索変性型の末梢神経障害を示す。単独の欠乏症はまれだが、pyridoxine 排泄促進薬である抗結核薬の isoniazid (INH) や penicillamine を内服している場合に欠乏症になる場合があるので、これらの薬剤を投与する際はビタミン B₆ (50~100 mg/day) を併用する。

ビタミン B₁₂ 欠乏症●

ビタミン B₁₂ (cobalamin) は、まず R-protein (電気泳動で rapid の意味) に結合し、次いで胃壁細胞でつくられた内因子に結合することが吸収に必要である。十二指腸で消化され、回腸で特異受容体を介して吸収される。腸管から吸収された cobalamin は transcobalamin-II に結合して輸送される。cobalamin は methylcobalamin と adenosylcobalamin に変換され、前者は homocystein から methionine への変換に関する補酵素であり、この障害で葉酸代謝異常が生じ、後者は methylmalonyl CoA mutase の補酵素で、この障害で神経脂質代謝の異常をきたす。

ビタミン B₁₂ 欠乏は吸収障害の場合、貯蔵分のため数年間は臨床症状を示さないことが多い。臨床的特徴として、貧血は大球性で緩徐に進行してしばしば高度で、全身倦怠感を示す。ビタミン B₁₂ 欠乏症の 40% の患者が神経症状を示す。一方、神経所見を示す例の 20% しか貧血を示さない。発症は高齢で 80% 以上は 50 歳以上である。症状は、四肢とくに下肢に強いピリピリとした針で刺されるようなしびれ感、運動失調、記憶障害、味覚障害、視力低下、起立性低血圧、陰萎、膀胱直腸障害が出現する。神経学的所見では手袋靴下型の表在覚障害に加え、ほとんどの例で下肢に強い深部感覚障害を示す。Romberg 徴候が陽性で、運動失調、歩行障害をきたす。膝蓋腱反射は亢進してアキレス腱反射は低下消失し、Babinski 徴候が陽性となることが多い。進行例では腱反射は全身で消失す

る。25%で Lhermitte 徴候がみられる。中枢神経症状として、意識障害、夜間せん妄、無欲うつ状態などがある。悪性貧血では比較的高率に胃癌を合併するので定期的な検査が必要である。

欠乏原因の80%は慢性胃炎に伴う内因子の欠損により、多くの場合、悪性貧血を伴う。この疾患は自己免疫疾患の一つで、約90%に胃壁細胞抗体が、約70%に内因子抗体が認められる。そのほか、胃切除後、回腸切除後、熱帯スプルー、高齢者の萎縮性胃炎、colchicine の投与でも吸収不全が起こる。高度の慢性膵炎では cobalamin-R-protein 複合体の消化不全が起こり、内因子への結合が障害されて吸収不全が起こる。blind-loop 症候群では細菌の異常繁殖や広節裂頭条虫でも吸収不全が起こる。また、先天性の R-protein 欠乏症、transcobalamin-II 欠乏症も報告されている。病理では脊髄側索、後索に左右対称性に変性を認め、これを亜急性連合性脊髄変性症と呼ぶ。

診断は血中 200 mg/ml 以下によってつけられるが、正常下限でも治療に反応する場合がある。脊髄の MRI で脊髄側索、後索に T₂強調画像で高信号となり、体性感覚誘発脳電位で後索の伝導障害が、末梢神経伝導検査で軸索変性、脱髄の所見が示されれば診断の助けとなるが、治療に反応することがもっとも診断の根拠である場合がある。

治療は最初の2週間はビタミン B₁₂ 1 mg 筋注を連日行い、その後、月1回の筋注を継続する。通常2日で貧血の改善が、2週間以内に感覚障害の改善がみられる。

ビタミン E 欠乏症●

活性型ビタミン E, alpha-tocopherol は脂溶性ビタミンで、細胞膜に存在して脂質の過酸化を抑制するラジカルスカベンジャーの一つである。空腸から吸収され、カイロミクロンに入って肝臓に運ばれ、肝細胞で alpha-tocopherol 転移タンパクより VLDL に輸送され血中濃度が維持される。慢性の欠乏によって神経障害をきたし、原因の多くは脂肪吸収障害で、慢性膵炎、胆管閉塞症、原発

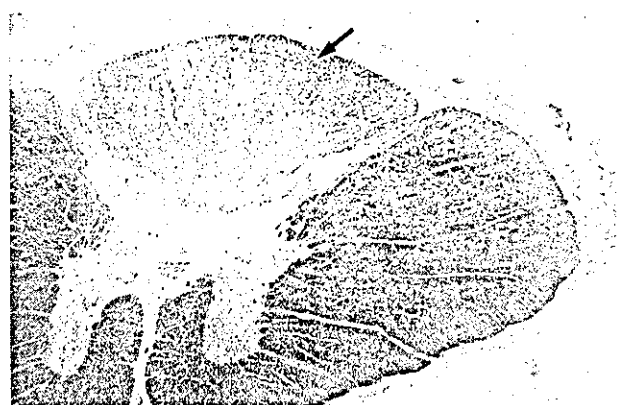


Fig. 2. Alpha-tocopherol 転移タンパク遺伝子異常による先天性ビタミン E 欠乏性脊髄小脳変性症例の剖検脊髄 (LB 染色)。後索の変性を認める (矢印)。

性胆汁性肝硬変、胃切除、小腸切除などが基礎疾患となる。まれに無βリポタンパク血症や alpha-tocopherol 転移タンパクの遺伝子異常により先天性にビタミン E 欠乏症になる例が報告されている。

神経症状は後索性 (Fig. 2) の運動失調で、腱反射低下、深部感覚低下、歩行時ふらつきを認める。先天性の例では、網膜色素変性症、心筋症、振戦を認める例がある。診断は血清ビタミン E 値の測定でなされるが、欠乏が正常下限の 1/5 以下になって 10 年以上持続すると、神経症状が生じる。

治療は吸収不全の場合はビタミン E の筋注 (100 mg)、先天性の例では経口大量投与 (800 mg) で神経症状の軽度の改善、進行の停止が期待できる。

ビタミン A 欠乏症●

ビタミン A は脂溶性の retinol のことで、網膜での rhodopsin の再生に必要であることに加え、変換された retinoic acid は受容体を介して上皮組織などの維持、分化調整遺伝子の発現に関与している。ビタミン A 欠乏の原因は慢性膵炎、胆管炎がある。治療は栄養障害の場合は 3~20 万単位/day 経口で 1 週間、吸収障害は同量を筋注する。

ペラグラ●

ニコチン酸, ニコチンアミドの総称であるナイアシンの欠乏で生ずる。ナイアシンは pyridoxine により tryptophan から合成され, ミトコンドリアの酸化還元反応や DNA 損傷修復に関与する。アルコール多飲, 偏食, ビタミン B₆ 欠乏症などが原因となる。症状は痴呆(dementia), 下痢(diarrhea), 皮膚炎(dermatitis)で 3D と呼ばれる。精神症状は痴呆以外に幻覚, せん妄, 抑うつなど多彩である。皮膚症状は日光露出部の皮膚炎(hyper-

keratinosis), 口角炎, 舌炎などがある。神経症状として末梢神経障害, 痙攣発作, パーキンソン症状がある。診断は血中ニコチン酸値の低下だが, 正常下限でも治療にて反応することで診断できることがある。

治療はニコチンアミド(300~1,000 mg/day)を急性症状が消失するまで経口投与する。通常精神, 消化器症状は数日で改善するが, 末梢神経障害はあまり回復しない。治療が遅れると致死的になる場合がある。

 総 合 論 文

家族性特発性ビタミン E 欠乏症の発見と発症機序の解明 および治療法の確立*

東京医科歯科大学 神経内科**

横田 隆徳

Vitamins (Japan), 78 (2), 87-92 (2004)

Pathophysiology and Therapy for Familial Idiopathic Vitamin E Deficiency

Takanori YOKOTA

Department of Neurology, Tokyo Medical and Dental University

I found the new disease 'familial ataxia with idiopathic vitamin E deficiency (AVED)' without fat malabsorption. I identified the causative gene: α -tocopherol transfer protein (α TTP). By impairing α TTP function in the liver, α -tocopherol cannot be transferred to VLDL, resulting in low concentration of serum vitamin E. I establish the disease entity and made clear the clinical picture of posterior column ataxia and retinitis pigmentosa. Furthermore, by investigating α TTP knockout mouse, I clarify the mechanism of vitamin E deficiency and neuronal degeneration. In this disease, almost symptoms can be prevented to progress by vitamin E supplementation.

Key words: vitamin E, α -tocopherol transfer protein, ataxia, retinitis pigmentosa

(Received October 6, 2003)

1. 原因遺伝子発見までの背景

慢性の脂肪吸収障害が運動失調や視覚障害などの進行性の症状をきたすことは知られていた。1981年 Burck ら¹⁾, 1985年 Harding ら²⁾により特発性のビタミン E (E) 単独欠乏による重篤な Friedreich 失調症型の脊髄小脳変性症の小児例の報告がされたのに引き続いて、1987年に我々³⁾初めて中年以降の成人発症の比較的軽度の家系を報告し、さらに E 欠乏の機序が E の吸収不全ではなく、血清からの E の消退速度の亢進であること明らかにした。現在では familial isolated vitamin E deficiency (FIVE), または ataxia with isolated vitamin E deficiency (AVED) の名称で報告されている。

1995年に症状の均一なチュニジアの家系で連鎖解析が進められ、第 8 染色体長腕に原因遺伝子が連鎖することが明らかとなり、同年に Arita ら⁴⁾によってよりクローニングされたヒト α -tocopherol 転移タンパク (α -TTP) 遺伝子が同じく第 8 染色体長腕に存在することが判明し、フランスの Koenig, 日本の Arai, アメリカの Kayden らによる共同研究により北アフリカ, イタリアの例の家系において α -TTP 遺伝子 frame-shift 変異が発見された⁵⁾。我々も Gotoda, Arai らと共同で我々の成人発症例の検索を進め、同年に同遺伝子に missense 変異があり、これが α -TTP の機能障害の原因であることを証明した⁶⁾。

我々はこの成人発症の E 欠乏症の症例を集積してい

*本論文は日本ビタミン学会第55回大会(平成15.5.29~30, 出雲市)における奨励賞講演をまとめたものである。

**〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45

くうちに、しばしば重度の網膜色素変性症を伴う例が稀でないことに気付いた。これらより、 α -TTP が網膜色素変性症の新しい原因遺伝子であり、また網膜色素変性症を伴う Friedreich 型失調症という新しい症候群と考えている⁷⁾⁸⁾。

さらに我々は α -TTP ノックアウトマウスを作製して、神経変性の発生機序と E 欠乏との因果関係を明らかとし、この疾患が E 投与で治療可能であることを証明し⁹⁾、神経変性疾患の中で最初の原因治療の確立となった。

2. 遺伝子異常と臨床症状⁹⁾¹⁰⁾

基本的な神経症状は著明な運動失調と深部感覚障害、Romberg 徴候、四肢腱反射消失でほぼ全例に認められる。症状は下肢に強い。多くの例に構音障害を、約半数の例に Babinski 徴候、頭部振戦を認める。一部の例に四肢末端の表在感覚障害、網膜色素変性症、側湾症、凹足、四肢筋力低下、筋萎縮を認める。知能障害、眼振、fasciculation、自律神経症状は認めない。

一般検査所見では、他の脂溶性ビタミンであるビタミン A、D は正常で E の単独欠損である。劣性遺伝で E の運搬タンパクの一つである β -リポプロテインの先天欠損が原因の無 β -リポプロテイン症は類似の症状を示すが、 β -リポプロテインが低値であり脂溶性ビタミンが正常であることから鑑別できる。肝臓の α -TTP の機能評価として α -Toc の経口負荷試験で上述のように α -Toc の吸収は正常だが、その消退速度が亢進していることが示される。画像診断では頭部 MRI では小脳、脳幹の萎縮、輝度異常は認めず、SPECT も正常である。脊髄 MRI で脊髄に萎縮を認めることがある。

電気生理学的所見では、正中神経性感覚誘発電位で N13 と皮質電位の消失を認める一方、Erb の電位は認められ、末梢神経伝導検査では運動神経は正常、感覚神経では伝導速度正常、振幅低下もごく軽度に留まることが特徴的である。その他の詳細な検討は我々の検索した H101Q 変異のみであるが、経頭蓋的磁気刺激による運動誘発電位で中枢運動時間の延長、網膜電図の振幅低値、視覚誘発電位で P100 の延長を認める⁸⁾。これらの神経症状、検査所見から神経系の運動失調の主な責任病巣は脊髄後索と網膜で、加えて、視覚伝導路、錐体路、末梢感覚神経の障害が考えられた。構音障害がある例で小脳症状の有無については深部感覚障害が著明であるためその評価が困難だが、MRI、SPECT や神経耳科的な検索では小脳障害は明らかでは

なかった(自検例)。

遺伝子異常は現在まですべての exon にて変異が知られている¹⁰⁾。北アフリカ、イタリアからの報告は最も頻度の高い 744delA をはじめ 486delA、530AG→GTAAGT、513insTT はいずれも frame-shift 変異のホモ接合体である。最近西日本で発見された G552A は exon 3 の 3'端の変異で exon 3 の skipping をおこし 57% の truncation でタンパクの機能はほとんどないと考えられる¹¹⁾。これらの症例の発症は 20 歳以下で 30 歳までに自力歩行不能となるなど症状は重く、血清 E の濃度は著しく低い(<1.0 mg/L)。744delA はタンパクの C 末端の 11% のみが欠損するのみだが、その例の症状や血清 E の濃度低下は重度であり、この事実はタンパクの C 末端に重要な働きが存在することを示唆する⁵⁾¹²⁾。

一方、我々の報告した 4 家系(H101Q)は missense 変異であり発症も 30~50 歳台遅く、症状も軽くて血清 E の濃度低下も比較的軽度である(>1.0 mg/L)。事実、剖検肝には正常対象と同じ分子量の α -TTP が発現しており³⁰⁾、変異 cDNA による recombinant タンパクの α -Toc の *in vitro* での転送機能は正常タンパクの 11% ではあるが残存していた⁶⁾。513insTT と 574G→A の frame-shift 変異と missense 変異の複合ヘテロ接合体である例¹⁰⁾の症状や血清 E の濃度低下は軽度で、劣性遺伝である本症の遺伝形式から肝臓 α -TTP の機能は missense 変異のアリルに依存すると考えるとよく説明できる。ただし、H101Q のヘテロ接合体は無症状だが、血清 E 濃度は正常範囲内だが平均値は正常より約 25% 低下しており、肝臓で変異タンパクが正常タンパクの機能を阻害したり、変異タンパクと正常タンパクがダイマーを作る可能性も考えられている⁶⁾。

GAA repeat の伸長を伴う Friedreich 失調症と α -TTP 遺伝子の non-conservative 変異による本症の基本症状、経過はよく似ているが、神経症状では本症の約半数の例に見られる頭部振戦や一部の例でみられる網膜色素変性症は Friedreich 失調症では認められない点と、検査所見では感覚神経の末梢神経伝導検査で Friedreich 失調症ではほとんど導出不能になるのに対して本症では振幅が正常下限ながら導出される点が異なる⁸⁾。また、本症では画像診断上小脳脳幹の萎縮が明らかでなく、四肢末梢部に高度の感覚障害を示し腱反射が消失することから、特に我々の報告したような症状の軽い conservative な missense 変異では電気生理学的検査の解釈が不十分であると感覚性多発ニューロパチーと考えてしまうこともあるので注意が必要である¹³⁾。

3. 神経病理学的所見

剖検例は744delAの例¹⁴⁾とH101Qの例¹⁵⁾の報告がある。両者の基本的な病理像は共通しており、主たる病理所見としてはspheriodとcorpora amylaceaを伴う後索変性と、主に神経細胞へのceroid-lipofuscin沈着であった。後索変性は吻側ほど変化が強く、Goll束、Burdach束両者に認められるが、Goll束により高度な変化であった。一方、後根神経節細胞の減少はごく軽度でNageotte結節も稀であった。さらに後根神経節の末梢軸索側である感覚神経線維は軽度の大径有髄線維の減少は認めるものの有髄線維全体の線維密度は正常範囲内でその変化は後索変性に比して極めて軽度であった。これらの病変パターンは後根神経節の中樞軸索のdying-back型変性といえる。Ceroid-lipofuscinの異常沈着は特に後根神経節細胞、脊髄前角細胞に著明だが、744delA例では大脳皮質第3相、脳神経核、小脳歯状核、視床、線状体、外側膝状体などH101Q例に比してより広範に沈着を認めている。

程度は軽度であるが重要な所見として2例ともに軽度ながら小脳Purkinje細胞の脱落を認めている。744delA例では小脳歯状核の神経細胞も軽度低下していた。また、H101Q例では網膜に局所的に光受容体細胞の変性と網膜色素細胞の多量のceroid-lipofuscin沈着を認め視野、視力障害の責任病巣と考えられた。また、H101Q例では外側膝状体の髄鞘は淡明化しており視覚誘発電位のP100潜時延長を説明する病変かもしれない。皮質脊髄路は744delAでは中等度淡明化していた。これらの病理所見はE欠乏動物¹⁶⁾⁻¹⁸⁾やヒトの慢性脂肪吸収不全¹⁹⁾の所見と非常によく一致しているが、本症では小脳Purkinje細胞の脱落が明らかな点異なる。

4. α -tocopherol 転移タンパク(α -TTP)

α -TTPは肝細胞に豊富に存在する細胞質タンパクとして同定され、その分子量は約3万でクロマトフォーカシング上等電点5.1および5.0のふたつのアイソフォームを有する。 α -TTPは1モル当たり1モルの α -Tocと結合し、メチル基の1つ少ないだけの γ -Tocは親和性は極端に低下することから本タンパクは α -Tocに特異的に結合し²⁰⁾²¹⁾、肝細胞から α -Tocをゴルジを介さない経路で細胞外に分泌する働きを担っていると考えられる²²⁾。

ヒト α -TTP遺伝子cDNAは全長4.5kbで5つのエキソンからなる278のアミノ酸をコードするopen reading

frameを持ち、C末端側に疎水性アミノ酸が比較的多くあることからこの部分に基質結合部位が存在することが推定されている²⁰⁾。 α -TTPのアミノ酸配列は網膜細胞に局在するcellular retinaldehyde binding protein (CRALBP)と高いホモロジーを示し、その機能が網膜色素細胞内において様々なレチノイドの中から11-cis-レチナールを識別して視細胞に供給する働きであることから、これらはファミリーを形成し、脂溶性生体物質の中から生体に必要なもののみを識別して輸送する機能に関与することが推定されている。

5. α -TTP ノックアウトマウスの神経症状⁹⁾

ノックアウトマウスの作製はマウス α -TTPゲノムDNAにexon1をネオマイシン耐性遺伝子に置換することにより α -TTP遺伝子をノックアウトした。ノックアウトマウスでは肝臓の α -TTP mRNAやタンパクは欠損し、血清の α -tocopherol濃度は著明に低下した。ヘテロ接合体マウスでは肝臓の α -TTP mRNA、血清の α -tocopherol濃度ともに半減した。作製されたノックアウトマウスでは α -tocopherolの欠乏した餌を与えた群、正常の餌(36 mg/kg)を与えた群、過剰の餌(600 mg/kg)を与えた群を作成すると、過剰の餌によって α -TTPノックアウトマウスの血清の α -tocopherol濃度は正常レベル程度まで回復した。 α -TTPノックアウトマウスは生後1年までは明らかな神経症状は示さなかったが、1年3か月頃より運動失調、筋力低下、振戦を示すようになった。進行すると歩行時に両下肢をひきずるようになった。振戦は安静時には明らかではないが、歩行時やストレスが加わるとより明らかとなった。歩行障害は加速度式回転車テストにより野生型に比較してノックアウトマウスの運動障害は明らかであった。これらの振戦や運動障害は α -tocopherol欠乏食群ではより障害が顕著で、 α -tocopherolの過剰投与により著明に改善し、過剰食の群では野生型と有意差はほとんどなかった。

さらに電気生理学的に検討したところ、体性感覚誘発電位で前肢、後肢いずれの電気刺激でも末梢神経伝導は正常だが、大脳誘発電位はその振幅がノックアウトマウスでは著明に低下し、 α -tocopherolの過剰投与により著明に改善した。網膜電図でもノックアウトマウスではMuller細胞や内神経層の機能を反映すると考えられるa波、光受容体細胞の機能を反映すると考えられるb波ともに低下していた。

中枢神経系の病変の主座は脊髄後索で顕著な神経線維の脱落とスフェロイドを、後索核で線維性グリオー

シス認めた。この変化は Burdach 東より Goll 東に高度で、腰髄より頸髄、頸髄より延髄後索核でより顕著である一方、後根神経節では変化はわずかで、dying back タイプの後索変性であった。網膜は外顆粒層、視細胞内節、外節の厚さの減少を認めた。また、自己蛍光を発する大量のリポフスチンを後根神経節、脊髄前角細胞、網膜色素上皮に認めた。これらの病理所見は例の 744delA と H101Q の剖検所見にはほぼ合致したしていたが、剖検例で認められた軽度の小脳 Purkinje 細胞の脱落が α -TTP ノックアウトマウスでは明らかではなかった。

これらの神経変性の所見は α -tocopherol 欠乏食群ではより障害が顕著で、 α -tocopherol の過剰投与により著明に改善した。

6. ビタミン E 欠乏の機序

自然界の E は α , β , γ , δ -tocopherol (Toc) が主な同族体である。一般に食物には α -Toc よりも γ -Toc のほうが多く含まれているが、生理的に活性をもつのは α -Toc で、実際は乳類の血漿中には α -Toc 濃度は γ -Toc の 5~20 倍も高い。上述のように α -TTP は肝細胞の細胞質タンパクで α -Toc を選択的に摂取し、リサイクルして血中濃度を維持する働きを果たしていると考えられている。すなわち、 α -Toc と γ -Toc は小腸で同程度の効率で吸収され、カイロミクロンの成分として肝臓に取り込まれる。肝細胞において γ -Toc は胆汁から腸管内に排泄される一方、 α -Toc は選択的に肝臓で合成される超低比重リポタンパク (VLDL) に取り込まれて再び血中に戻る。血中で VLDL は低比重リポタンパク (LDL) に変化し、LDL 受容体を介して各組織の細胞内に取り込まれる²³⁾⁻²⁵⁾。

AVED 患者の E 欠乏の機序は肝臓の α -TTP の機能異常でよく説明できる。正常人に α -Toc 経口摂取させると小腸で吸収され血清中の α -Toc 濃度は上昇し 6~8 時間後にピークとなるが、AVED 患者ではこの α -Toc の吸収は正常かむしろ亢進している³⁾²⁶⁾²⁷⁾。しかし、その後の α -Toc 濃度は AVED 患者では正常に比して急速に低下する。ラジオリラベルした α -Toc を経口摂取させ、その脂質代謝を詳細に検討すると、カイロミクロン内の α -Toc の動態は正常と同じだが、VLDL, LDL, HDL 内では α -Toc は急速に低下する²⁵⁾。また、ラジオリラベルした α -Toc (d_6 -RRR- α -Toc) と γ -Toc (d_6 -SRR- α -Toc) を用いて両者の識別能を検討すると、E 欠乏が高度で後に α -TTP 遺伝子の frame-shift 変異を持つことが判明した AVED 患者では正常で認められる d_6 -RRR- と

d_6 -SRR- α -Toc の識別能は全く消失している一方、E 欠乏の比較的軽度な missense 変異を持った AVED 患者は正常と高度の E 欠乏患者との中間的な比較的軽度の識別能の低下を示した²⁸⁾。

7. 神経変性と α -Toc 欠損の因果関係

α -TTP が少量ながら中枢神経にも発現していることから、 α -TTP の中枢神経内での機能が注目されていた。 α -TTP の中枢神経内の局在についてはバグマンガリア²⁹⁾、プルキンエ細胞³⁰⁾などの報告があるが決着はついていない。そこで α -TTP ノックアウトマウスの中枢神経内の α -tocopherol 濃度について検討した。 α -TTP ノックアウトマウスでは末梢血、中枢神経内には α -tocopherol は検出感度以下であった。 α -tocopherol 過剰食の群では血中の α -tocopherol は正常近くまで上昇するが、中枢神経内の α -Toc 濃度は正常の 5~10% 程度までしか上昇しなかった⁹⁾。すなわち、中枢神経内に α -TTP が欠損すると血中の α -tocopherol を中枢神経内に効率良く輸送できない、あるいは保持できないと解釈できる。しかし、重要な点は血中の α -tocopherol 濃度を上昇させてやると少量ではあるが中枢神経内に α -tocopherol が移行する点である。すなわち、 α -TTP の中枢神経内への移行は α -TTP 以外にも別のルートがマイナーながら存在することを示している。今回作製した α -tocopherol 欠乏食の野生型の群では中枢神経内に α -Toc 濃度ある程度保たれた。これは、妊娠に α -tocopherol が必要であるために欠乏食にできずに胎生期に中枢神経内に入った α -tocopherol がなかなか抜けないことによるのかも知れない。この α -Toc 欠乏食の野生型マウスは神経症状を発症しなかったが、その中枢神経内の α -tocopherol 濃度は α -tocopherol 過剰食の α -TTP ノックアウトマウスの中枢神経内の α -Toc 濃度より低いことに注目したい。このことは、中枢神経内の α -Toc 濃度は正常の 5~10% 程度であれば神経変性を防ぐには十分であることを示唆している。

α -TTP 遺伝子異常症例やノックアウトマウスの神経症状や神経病理所見が従来報告されている欠乏食による α -tocopherol 欠乏動物のそれらによく似ていることから α -TTP 遺伝子異常による神経変性は血中の α -tocopherol 欠乏が考えられていた。しかし、今回の実験から α -TTP は血中の保持のみならず、中枢神経系への移行にも中核的な働きをしており、欠損は中枢神経にさらに高度の α -tocopherol 欠乏状態が生じさせていることが判明した。そして組織内の α -tocopherol 補充で神経変性

がほぼ完全に防止ができたことは、神経変性の主たる原因が組織内の α -tocopherol欠乏にあり、中枢神経内 α -TTPの α -tocopherol輸送以外の未知の機能の障害ではなさそうであることが示された。

8. AVED患者の治療法

上記の α -TTPノックアウトマウスからの知見より、AVED患者にE投与が神経変性進行の防止に意義をもつという理論的裏付けができたと考えている。 α -TTPが α -tocopherolの中枢神経内への移行も行っているという事実から、AVED患者のE投与は血中の α -tocopherol値が正常範囲内になったというだけでは不十分で、正常の2~3倍のレベルに保つことにより神経症状の進行を停止させることに成功している。

9. 今後の展望

中枢神経系は脂質の含有量が多く最も酸化の受けやすい組織と言われている。老化やアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の病態生理に酸化ストレスが関与しているという知見は多く報告されている。しかし、動物モデルで、酸化ストレスによる神経細胞死をきたすのはいずれも急性のモデルで、 α -TTPノックアウトマウスは慢性の酸化ストレスによる初めての神経変性のモデルといえる。現在、このマウスとアルツハイマー病などの神経変性疾患のモデルマウスとの掛け合わせ実験を進行中で、それぞれの神経細胞死の機序における酸化ストレスの関与を検索する有用な方法になると期待している。

謝 辞

本研究は東京大学大学院薬学部衛生化学、新井洋由先生、東京大学大学院第3内科、後藤田貴成先生、中外製薬創薬資源研究所、鈴木宏志先生、東京都神経科学総合研究所神経病理、内原俊記先生などとの共同研究であり各先生に深謝する。

(平成 15. 10. 6 受付)

文 献

- Burck U, Goebel HH, Kuhlendahl HD, Meier C, Goebel KM (1981) Neuromyopathy and vitamin E deficiency. *Neuroperiatrics* **12**, 267-278
- Harding AE, Matthews S, Jones S, Ellis CJ, Booth IW, Muller DP (1985) Spinocerebellar degeneration associated with selective defect of vitamin E absorption. *N Engl J Med* **313**, 32-35
- Yokota T, Wada Y, Furukawa T, Tsukagoshi H, Uchihara T, Watabiki S (1987) Adult-onset spinocerebellar syndrome with idiopathic vitamin E deficiency. *Ann Neurol* **22**, 84-87
- Arita M, Sato Y, Miyata A, Miyata A, Tanabe T, Takahashi E, Kayden HJ, Arai H, Inoue K (1995) Human α -tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. *Biochem J* **306**, 437-443
- Ouahchi K, Arita M, Kayden HJ, Hentani F, Ben Hamida M, Sokol R, Arai H, Inoue K, Mandel J-L, Koenig M (1995) Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein. *Nat Genet* **9**, 141-145
- Gotoda T, Arita M, Arai H, Inoue K, Yokota T, Fukuo Y, Yazaki Y, Yamada N (1995) Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the α -tocopherol-transfer protein. *N Engl J Med* **333**, 1313-1318
- Yokota T, Shiojiri T, Gotoda T, Arai H (1996) Retinitis pigmentosa and ataxia caused by mutation in the α -tocopherol transfer protein gene. *N Engl J Med* **335**, 1770-1771
- Yokota T, Shiojiri T, Gotoda T, Arita M, Arai H, Ohga T, Kanda T, Suzuki J, Imai T, Matsumoto H, Harino S, Kiyosawa M, Mizusawa H, Inoue K (1997) Freidreich-like ataxia and retinitis pigmentosa caused by His101Gln mutation of the α -tocopherol-transfer protein gene. *Ann Neurol* **41**, 826-832
- Yokota T, Igarashi K, Uchihara T, Jishage K, Inaba A, Tomita H, YiLi, Arita M, Suzuki H, Mizusawa H, Arai H (2001) Delayed onset ataxia in mice lacking α -tocopherol transfer protein: Model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. *Proc Natl Acad USA* **98**, 15185-15190
- Cavalier L, Ouahchi K, Keyden HJ, Di Donato S, Reutenauer L, Mandel JL, Koenig M (1998) Ataxia with isolated vitamin E deficiency: heterogeneity of mutations and phenotypic variability in a large number of families. *Am J Hum Genet* **62**, 301-310
- Tamaru Y, Hirano M, Kusaka H, Ito H, Imai T, Ueno S (1997) α -tocopherol-transfer protein gene: exon skipping of all transcripts causes ataxia. *Neurology* **49**, 584-588
- Hentani A, Deng HX, Hung WY, Nayer M, Ahmed MS, He X, Tim R, Stumpf DA, Siddique T (1996) Human α -tocopherol-transfer protein: gene structure and mutations in familial vitamin E deficiency. *Ann Neurol* **39**, 295-300
- 松谷 学, 松本博之, 千葉 進, 柏木 基, 笠原理子 (1994) 網膜色素変性症と伴い感覚性多発ニューロパチーを主徴とした特発性ビタミンE欠乏症の1例. *脳神経* **46**, 989-994
- Lamaout A, Belal S, Zouari M, Fki M, Ben Hamida C, Goebel HH, Ben Hamida M, Hentati F (1997) Friedreich ataxia with isolated vitamin E deficiency: a neuropathological study of a Tunisian patient. *Acta Neuropathol* **93**, 633-637
- Yokota T, Kumagai J, Uchihara T, Shiojiri T, Seko , Pang, Mizusawa H, Inoue K (2000) Autopsy of ataxia with retinitis pigmentosa caused by the His101Gln mutation of the α -tocopherol transfer protein. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **68**, 521-522
- Nelson JS, Fitch CD, Fische VW, Broun GD, Chou AC (1981) Progressive neuropathologic lesions in vitamin E deficient rhesus monkey. *J Neuropathol Exp Neurol* **40**, 166-186
- Southam E, Thomas PK, King RHM, Goss-Sampson MA, Muller DP (1991) Experimental vitamin E deficiency in rats. *Brain* **114**, 915-936

- 18) Robinson WG, Kuwabara T, Bier JG (1980) Vitamin E deficiency and the retina: photoreceptor and pigment epithelial changes. *Invest Ophthalmol Visual Sci* **18**, 683-690
- 19) Muller DPR, Lloyd JK, Wolff OH (1983) Vitamin E and neurological function. *Lancet* **1**, 225-227
- 20) Sato Y, Hagiwara K, Arai H, Inoue K (1991) Purification and characterization of the α -tocopherol transfer protein from rat liver. *FEBS Lett* **288**, 41-45
- 21) Yoshida H, Yusin M, Ren I, Kuhlenkamp J, Hirano T, Stolz A, Kaplowitz N (1991) Identification, purification and immunochemical characterization of α -tocopherol-binding protein from rat liver cytosol. *J Lipid Res* **33**, 343-350
- 22) Arita M, Nomura K, Arai H, Inoue K (1997) α -tocopherol-transfer protein stimulates the secretion of α -tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 12437-12441
- 23) Kayden HJ, Traber MG (1993) Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res* **34**, 343-358
- 24) Traber W, Ramakrishnan, Kayden HJ (1994) Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR- α -tocopherol. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10005-10008
- 25) Traber MG, Sokol RJ, Burton GW, Ingold KU, Papas AM, Huffaker JE, Kayden HJ (1990) Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate α -tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. *J Clin Invest* **85**, 397-407
- 26) Stampf DA, Sokol R, Bettis D, Neville H, Ringel S, Angelini C, Bell R (1987) Freidreich disease: V. Variant form with vitamin E deficiency and normal fat absorption. *Neurology* **37**, 68-74
- 27) Sokol RJ, Kayden HJ, Bettis DB, Traber MG, Neville H, Ringel S, Wilson B, Stampf DA (1988) Isolated vitamin E deficiency in the absence of fat malabsorption—familial and sporadic cases: characterization and investigation of causes. *J Lab Clin Med* **111**, 548-559
- 28) Traber M, Sokol RJ, Kohlschutter A, Yokota T, Muller DPR, Dufour R, Kayden HJ (1993) Impaired discrimination between stereoisomers of α -tocopherol in patients with familial isolated vitamin E deficiency. *J Lipid Res* **34**, 201-210
- 29) Hosomi A, Goto K, Kondo H, Iwatsubo T, Yokota T, Ogawa M, Arita M, Aoki J, Arai H, Inoue K (1998) Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat. *Neurosci Lett* **1256**, 159-162
- 30) Copp RP, Wisniewski T, Hentati F, Larnaout A, Ben Hamida M, Kayden HJ (1999) Localization of alpha-tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders. *Brain Res* **822**, 80-87

α -Tocopherol Transfer Protein Is Specifically Localized at the Implantation Site of Pregnant Mouse Uterus

D.E. Kaempf-Rotzoll,^{3,4} K. Igarashi,³ J. Aoki,³ K. Jishage,⁵ H. Suzuki,⁵ H. Tamai,⁶ O. Linderkamp,⁴ and H. Arai^{2,3}

Graduate School of Pharmaceutical Sciences,³ Department of Health Chemistry, University of Tokyo, Bunkyo-ku, 113-0033 Tokyo, Japan

Division of Neonatology,⁴ Department of Pediatrics, University of Heidelberg, D-69120 Heidelberg, Germany
Pharmaceutical Technology Laboratory,⁵ Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Gotemba, 412-8513 Shizuoka, Japan
Department of Pediatrics,⁶ Osaka Medical College, 569-8686 Takatsuki-shi, Japan

ABSTRACT

α -Tocopherol transfer protein (α -TTP) was first described to play a major role in maintaining α -tocopherol levels in plasma, while α -tocopherol was primarily reported to be a factor relevant for reproduction. Expression of α -TTP is not only seen in the liver, from where it was first isolated, but also in mouse uterus, depending on its state of pregnancy, stressing the importance of α -TTP for embryogenesis and fetal development. The cellular localization of α -TTP in mouse uterus is reported here. By immunohistochemistry, α -TTP could be localized in the secretory columnar epithelial cells of the pregnant uterus on Days 4.5 and 6.5 postcoitum as well as in the glandular epithelial cells and the inner decidual reaction zone surrounding the implantation site. On Days 8.5 and 10.5 postcoitum (midterm of mouse pregnancy), α -TTP could still be detected in the uterine secretory columnar epithelial cells, while in α -TTP knockout mice, no immunostaining was visible. It is suggested that α -TTP plays a major role in supplying the placenta and consecutively the fetus with α -tocopherol throughout pregnancy. We conclude that α -tocopherol plays a role in the process of implantation and that α -TTP may be necessary for adequate α -tocopherol status of the fetus.

female reproductive tract, implantation, pregnancy, uterus

INTRODUCTION

Vitamin E (α -tocopherol) was first discovered and recognized as a factor essential for reproduction by Evans and Bishop 80 years ago in 1922 [1]. Meanwhile, α -tocopherol is recognized as a major lipid-soluble chain-breaking antioxidant found in cellular membranes and is known as an important factor in the protection of polyunsaturated fatty acids against peroxidative damage. Peroxidative damage is well known to take place in the placenta itself, the placental brush border being most vulnerable to oxidative stress [2]. Free radicals also play a role in the induction of fetal anomalies, such as impaired embryogenesis in diabetic pregnancy [3], suggesting that α -tocopherol is of great importance

¹The first author thanks the Novartis Foundation (Japan) for the Promotion of Science for the grant of Japan-Europe Scientists Exchange Program 2001.

²Correspondence: Hiroyuki Arai, University of Tokyo, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Department of Health Chemistry, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, 113-0033 Tokyo, Japan. FAX: 81 3 3818 3173; e-mail: harai@mol.f.u-tokyo.ac.jp

Received: 19 December 2001.

First decision: 15 January 2002.

Accepted: 18 March 2002.

© 2002 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.
ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

in its function as the main naturally occurring antioxidant. α -Tocopherol transfer protein (α -TTP), with its high affinity for α -tocopherol, plays a major role in maintaining adequate plasma α -tocopherol levels by excreting α -tocopherol from the hepatocyte into plasma [4]. The regulation of α -tocopherol levels in the fetomaternal unit is little studied so far and the role of tocopherol-binding proteins is of great interest to elucidate how α -tocopherol is transported from the maternal circulation to the uterus and placenta before uptake in fetal tissues can occur. α -TTP, which has been cloned and chromosomally localized [5], is a 30-kDa protein identified as a product of the causative gene for ataxia with isolated vitamin E deficiency (AVED) [6]. Patients with AVED have practically undetectable serum vitamin E levels and show severe neurological symptoms and muscular weakness. While α -TTP was primarily described as a cytosolic liver protein [6, 7], it has meanwhile been localized in many other tissues, namely in rat brain [8] and most recently in pregnant mouse uterus [9]. α -TTP could be detected by northern blot analysis throughout mouse pregnancy (20 days of gestation) with a peak around 4.5 days postcoitum (dpc). This day coincides with the period of implantation in the mouse, suggesting a possible role of α -tocopherol, the major ligand of α -TTP, in this process. We therefore attempted to obtain more precise information on the localization of α -TTP by immunohistochemistry in mouse uterus on the day of implantation (4.5 dpc), 6.5 and 8.5 dpc, as well as around midterm at 10.5 dpc and compared these results with nonpregnant, wild-type adult female mice as well as with α -TTP knockout mice.

MATERIALS AND METHODS

Animal Breeding and Tissue Preparation

Ten C57BL/6Cr wild-type female mice (SLC, Hamamatsu, Japan) and eight α -TTP knockout female mice, of which the generation is described elsewhere [9], were included in the study. Two nonpregnant wild-type and two nonpregnant α -TTP knockout mice were killed at 8 wk of age. Two mice each at the following stages of 4.5, 6.5, and 8.5 dpc gestation, wild-type vs. knockout, were included, as were two wild-type mice at 10.5 dpc. α -TTP knockout mice at 10.5 dpc were not included in the study due to expected morphological changes in placenta and fetus as well as the fact that no additional information was expected from these animals. The tissues were immediately dissected free from surrounding tissues. Dissected tissues were rinsed in buffer (250 mM sucrose/1 mM EDTA/10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4°C followed by subsequent dehydration and paraffin embedding. Sections (5 μ m) were cut on a Microm HM 400R microtome and adhered to polylysine-coated microscope slides (Matsunami, Tokyo, Japan).

Preparation of Mouse α -TTP-Specific Rat Monoclonal Antibodies

The coding region of mouse α -TTP cDNA was inserted into the *SalI*/*EcoRI* sites of the pET21a vector (pET system, Novagen, Madison, WI).

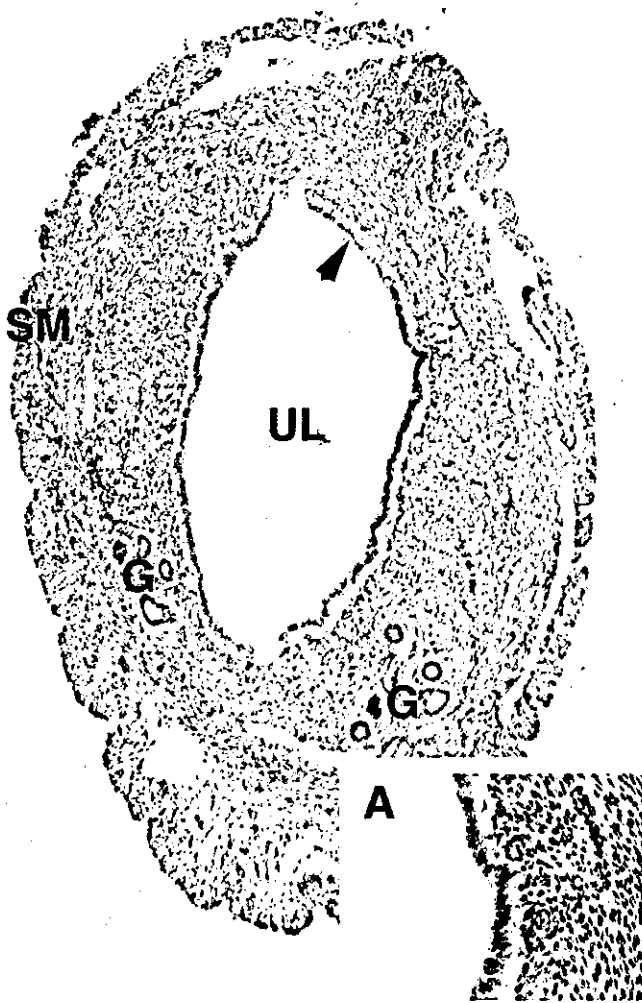


FIG. 1. Transverse section (5 μm) through nonpregnant mouse uterus (magnification $\times 4$). No staining with α -TTP-specific monoclonal antibody can be seen. Arrowhead marks secretory endometrial columnar epithelium, of which magnification $\times 60$ is shown in inset A. SM, Two layers of smooth muscle cells; G, glandular epithelium; UL, uterine lumen.

After the plasmid was introduced into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) (Novagen), the protein was expressed as a His-tagged protein by induction with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. The protein was purified using nickel column chromatography (Novagen) according to the manufacturer's protocol. Rats (WKY strains, female, 6-wk; SLC) were immunized by injecting the protein into the hind foot pads using Freund complex adjuvant. At 3-wk intervals after the initial injection, the rats were injected twice with the purified protein mixed with Freund complex adjuvant. Three weeks after the second booster injection, the enlarged medial iliac lymph nodes from the rats were used for cell fusion with mouse myeloma cells, line PA1. Several monoclonal antibody-producing hybridoma cell lines were established. From the various antibodies isolated, controls were not only performed by Western blotting but also by testing the immunohistochemical usefulness of these by checking mouse liver sections for α -TTP localization in cytoplasm of hepatocytes. Only the clones positive in Western blotting and immunohistochemistry were selected. In this study, the monoclonal antibody from clone A8-F1 (rat IgG2a) was used for immunohistochemistry.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed based on avidin-biotin amplification and oxidation with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride [10]. Tissue sections adhered to polylysine-coated slides (Matsunami) were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded series of ethanol. The endogenous, tissue-specific peroxidase was blocked with 3% H_2O_2 in methanol for 20 min followed by washing in 0.05 M Tris-HCl/0.15 M

NaCl, pH 7.6 (TBS). Antigen retrieval was performed using a microwave oven: samples were microwaved at 750 W and boiled five times consecutively for 5 min in 0.01 M citrate buffer, pH 6.0, followed by brief washing in tap water and TBS prior to blocking with 10% rabbit serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA) in TBS for 30 min at room temperature. Excess fluid was allowed to drain from the sections, which were then covered with 50 μl of a 1:20 dilution of the mouse α -TTP-specific rat monoclonal antibodies. Control sections were left at the blocking stage and not covered with the primary antibodies. Incubation of all slides was carried out overnight at room temperature in humidified air-tight chambers. After three 5-min washes in TBS, the sections were covered with a 1:1000 dilution of rabbit biotinylated anti-rat IgG (Vector Laboratories) for 60 min at room temperature. After three 5-min washes in TBS, the slides were covered with avidin-biotin-complex elite (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) for 30 min and washed again three times for 5 min in TBS. After oxidation with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride for 5 min and brief washing in tap water, light counterstaining was performed with Mayers hematoxylin. The slides were then cleared and mounted with 60% HSR solution (Kokusai Shiyaku, Kobe, Japan). Each staining procedure was repeated three times, consisting of 20 consecutive sections. The investigations were conducted in accordance with the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

RESULTS

Controls

Control histological sections incubated with solely 10% rabbit serum followed by anti-rat biotinylated antiserum showed no staining whatsoever. A number of representative controls are displayed in Figures 2B, 3A, 4A, 5A, 6B, and 7B (insets), showing various stages of early and midpregnancy. To verify the specificity of α -TTP staining in pregnancy, mouse uteri of nonpregnant mice (8 wk old) were stained identically as the sections above, showing no α -TTP reaction (Fig. 1 with inset A) when treated with α -TTP monoclonal antibodies. Negative controls hereof (identical immunohistochemical procedure except that α -TTP monoclonal antibodies were not used) also showed no staining (data not shown).

Early Pregnancy (4.5 and 6.5 dpc)

During this pregnancy stage, immunoreactive α -TTP was detected in three specific localizations of mouse uterus. Firstly, marked binding of the monoclonal antibody specifically to the secretory endometrial columnar epithelium was noted (Figs. 2 with inset A, 3, and 4). Second, the glandular epithelial cells partly showed immunoreactivity, namely when they were located near the implantation site in the inner decidual reaction zone. It should be noted that the endometrium forms the mucosal lining of the uterine cavity and consists of columnar secretory epithelial cells that are bipolar with respect to their histologic orientation within this tissue. Their nucleus is displaced toward the basal side of the cell, and at the opposite side, the luminal surface forms the place of secretion. The epithelial cell population is comprised of the secretory luminal columnar epithelium and of glandular epithelial cells [11], which are found in the inner and outer decidual reaction zone. In Figure 2, the section farthest away from two neighboring implantation sites was chosen, and in this section, the glandular epithelium was not stained. In Figure 3, the embryonic cavity is seen, and directly around this site, the glandular epithelium showed immunoreactivity. This phenomenon was documented again at 6.5 dpc, where, in Figure 4, the upper arrow marks glandular epithelium in the outer decidual reaction zone showing no immunostaining, while the lower arrow marks glandular epithelium in direct vicinity to the embryonic cavity in the inner decidual reaction zone, showing immunoreactivity. Third, the inner decidual reaction

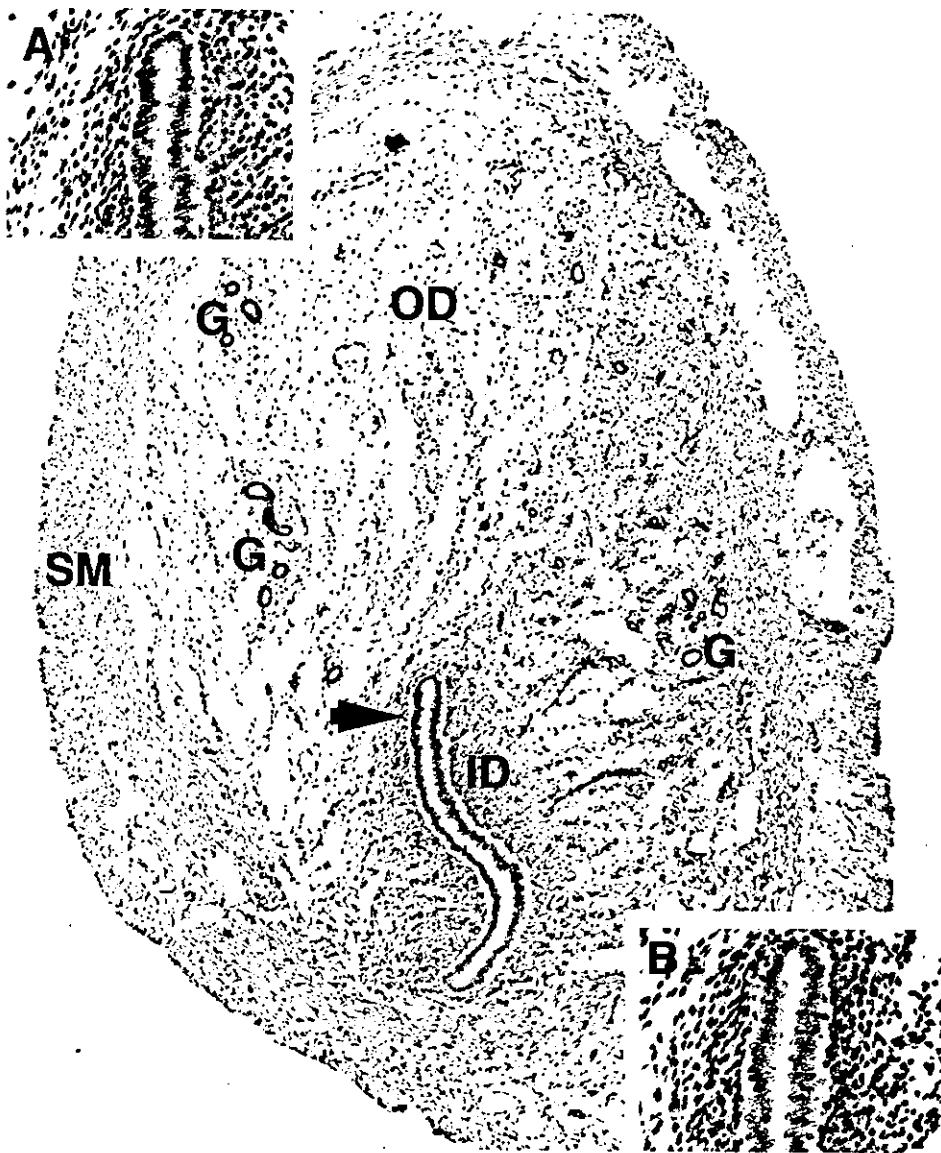


FIG. 2. Transverse section (5 μ m) through gravid mouse uterus, 4.5 dpc (magnification $\times 4$). Immunohistochemical binding of α -TTP-specific monoclonal antibody to secretory endometrial columnar epithelium (arrowhead) is evident. Magnification $\times 60$ hereof is shown in inset A; inset B shows negative control. SM, Two layers of smooth muscle cells; G, glandular epithelium; OD, outer decidual reaction zone; ID, inner decidual reaction zone.

zone itself, as shown in Figure 3 (arrowhead) and Figure 4 (lower arrowhead), consisting of reticular connective tissue filled abundantly with lymphocytes and granulocytes and surrounding the implantation site, showed staining as well.

Midpregnancy (8.5 and 10.5 dpc)

The staining pattern during this period of pregnancy now focused mainly on the secretory luminal endometrial epithelium. Reactivity of glandular epithelium could hardly be verified anymore due to the enlarging embryo and the concomitant thinning of uterine lumen. The decidual reaction in the inner and outer zones became more and more striking, and maternal vessel dilation with developing maturation of the placenta was seen (Figs. 5 and 6). It could be noted that the α -TTP immunoreactive staining of the luminal epithelium seemed to decrease compared with prior pregnancy stages. There was, however, one striking change at 10.5 dpc concerning the localization of α -TTP in the luminal epithelium: The staining was mainly located in the apical, supranuclear region of these cells.

α -TTP Knockout Mice

As stated elsewhere [9], the availability of α -TTP knockout mice made it possible to verify the specificity of the

antibodies used in this study to show α -TTP immunoreactivity. Here we give one example, in Figure 7, showing no α -TTP staining of the luminal epithelium of α -TTP knockout mice at 8.5 dpc (data of nonpregnant knockout mice and mice from 4.5 and 6.5 dpc are not shown).

DISCUSSION

Vitamin E was initially identified as a factor required for animals to have offspring and to prevent miscarriage [1, 12]. In this study, the secretory epithelium of the pregnant uterus, consisting of both the secretory luminal and glandular epithelium as well as the inner decidual reaction zone directly surrounding the embryonal implantation area, could be identified as localization sites of α -TTP, the major transporter for α -tocopherol, by monoclonal antibody studies. These findings are consistent with the Northern blot analysis results published earlier [9], showing α -TTP gene expression in the uterus throughout pregnancy with a transient increase at implantation (4.5 dpc) followed by a gradual decrease until parturition on Day 20 of pregnancy. It has been shown that the secretory epithelial cells of the pregnant uterus are involved in transport of ions, sugars, free amino acids, and other substances into the uterine lumen [13]. The endometrium-derived secretions have been