

ALS では subclinical に sympathetic hyperactivity になっていることを指摘したい⁽²⁰⁾。また、長期呼吸療養で、時に、血中ルビノリ高値でその末梢受容体低反応で、著明な血圧変動を示して循環不全や突然死⁽²¹⁾が生じたり、SOD1 変異例の TLS で、臨床的に多系統変性症と類似の autonomic failure が生じ病理的にも確認された症例⁽²⁰⁾も報告されている。AMS は個体運動発達のにも古く、ALS では障害されにくい運動系ではあるが、これらの報告から、古い系も核上性障害だけでなく、稀には核下性の障害も加わりうる事が示唆された。

(IV) ALS は個体運動発達の古い運動機能系が機能を維持する

ALS の呼吸筋麻痺を越えた長期の臨床的な観察から、ALS では VMS、EMS、AMS の全ての遠心性運動系が障害され、その障害特徴として、「個体運動発達の新しい運動系から障害され、古い運動機能系は維持される傾向」を報告してきた。このことは、TLS を初めて報告した 1987 年に、それまでに連続して呼吸器を装着した TLS 例を含む長期呼吸療養患者 18 例の頸から上の脳運動神経系の障害を個体運動発達指標⁽²²⁾⁽²³⁾にあわせて、Swallowing (嚥下運動)、Neck movements (頸運動)、Tongue movements (舌運動)、Lip pursing (口すぼめ)、Mouth closing (閉口)、Mouth opening (開口)、Forehead wrinkling (前頭部しわ寄せ)、Eye lid closing (閉眼)、Full ocular movement (眼球運動) と、顔面の下部から顔面上部の諸筋群の麻痺を経過を追って観察した結果からえられた⁽⁵⁾。その結果、ALS の特徴は『個体運動発達の新しい運動機能系から障害され、古い運動機能系は障害が遅れ、古い運動機能系が障害される時は核上性の障害から始まり、最終的には核下性の障害も加わる可能性がある』と纏められた。この障害特徴は、JH Jackson⁽²⁴⁾が、神経疾患での障害論に述べている「Dissolution being the reverse of the process of Evolution」の考えが、ALS の運動障害にも適応されることを示していると考えられた。

(V) おわりに

発症から呼吸筋麻痺までの臨床病理像で作られてきた「今までの ALS 観」が、ALS の全体像ではなく、その一部であり、TLS を含めた ALS の臨床病理像が ALS の全体像であることが明瞭になった現在、呼吸筋麻痺を越え

て長期療養している患者・家族に対して、「今までの ALS 観」では対応できない。しかし、今でも教科書に書かれている「今までの ALS 観」の臨床病理像を考える ALS の枠のまま、実際の臨床においても、現実の患者と家族に対応している医療者が少なくない。そこで、実際に長期呼吸療養生活をおくっている患者が欧米に比して多い日本では、関わっている医療者は、臨床症状を「今までの ALS 観」に囚われずに患者を率直にみる機会を多く持って、臨床的に ALS 患者の示す現実の症状を確かめていくことが重要である。また、障害をもって厳しい医療療養環境下で生きている ALS 患者と家族の実態を現場から理解して、その改善への取組みに加わっていくことも大切である。

呼吸筋麻痺後を含めた ALS の全体像を把握するためには、ALS の臨床的観察は、これからますます重要になっている。ALS を纏め上げる時の Charcot の気持ち「The minute examination of all these symptoms is certainly most interesting and instructive」(1869 年)を、1 世紀たった 1968 年に Goldblatt⁽²⁵⁾は「It is additionally "interesting and instructive" to examine the process by which facts concerning that syndrome, and others closely related to it, were first pieced together」と述べているが、このことは、依然として、ALS の臨床像には深められる事実が多く残されていることを示している。また、この感触は、私自身が観察された ALS の症候や症状が、「The preserved motor functions are ontogenetically old」で解釈できた時の「想い」とも一致している。

最後に、脳神経学の領域では、常に、臨床的観察が大切であることを強調する Lord Brain⁽²⁵⁾の言葉を記す。

"It is sometimes said that clinical observation has little more to offer neurology, yet clinical observation continues to discover new syndromes and to reinterpret old symptoms, and I foresee great scope for it still." (1963)

文献

(1) Oliver D: Ventilation in motor neuron disease: Difficult

- decisions in difficult circumstances. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders* 5:6-8, 2004.
- (2) Hayashi H and EA Oppenheimer: ALS patients on TPPV. Totally locked-in state, neurologic findings and ethical implications. *Neurology* 61:135-137, 2003.
- (3) Goetz CG :Charcot's disease : Amyotrophic lateral sclerosis :A case of glossolabial laryngeal paralysis February 28, 1888. In: Charcot The Clinician The Tuesday Lessons. New York:Raven Press, 164-186, 1987.
- (4) 林 秀明 : 筋萎縮性側索硬化症晩期患者の管理とケア *臨床神経* 24:1274-1276, 1984.
- (5) Hayashi H et al: Amyotrophic lateral sclerosis: Oculomotor functions in patients in respirators. *Neurology* 37:1431-1432, 1987.
- (6) Hayashi H et al: Amyotrophic lateral sclerosis patients living beyond respiratory failure. *J Neurol Sci* 105:73-78, 1991.
- (7) Hayashi H and S Kato: Total manifestations of amyotrophic lateral sclerosis: ALS in totally locked-in state. *J Neurol Sci* 93:19-35, 1989.
- (8) Hayashi H: Japanese experience. In: Oliver D, Boracio GD, Walsh D. eds. Palliative care in amyotrophic lateral sclerosis. Oxford: Oxford university press pp 152-154, 2000.
- (9) 林 秀明 : ALS の呼吸筋麻痺と呼吸器装着—最近の考え方—「今までの ALS 観」から「新しい ALS 観」への進展— *理学療法ジャーナル* 34 : 46—48, 2000.
- (10) Holstege G: Descending motor pathway and the spinal motor system: Limbic and non-limbic components. *Progr Brain Research* 87:307-421, 1991.
- (11) 林 秀明、他 : ALS の全運動筋麻痺までの経過からみた ALS の臨床分類—呼吸運動系先行麻痺型の提唱とその意義— *脳神経* 49:435-441, 1997.
- (12) 林 秀明、他 : ALS の呼吸運動系先行麻痺型の臨床病理学的検討 *脳神経* 51:771-778, 1999.
- (13) Hayashi H : Longterm in-hospital ventilatory care for patients with ALS. In: Mitsumoto H, Norris FH, eds. *Amyotrophic lateral sclerosis : a comprehensive guide to management*. New York: Demo Publications, 127-138, 1994.
- (14) Mogenson GJ et al: From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology* 193-236:69-97, 1980.
- (15) Ironside R: Disorders of laughter due to brain lesions. *Brain* 79:589-609, 1956.
- (16) Brown JW: Physiology and phylogenesis of emotional expression. *Brain Research* 1967,9:181-189.
- (17) Wilson SAK: Some problems in neurology. II. Pathological laughing and crying. *J Neurol Psychopath* 1924,4:299-333.
- (18) 林 秀明: ALS の臨床神経症状の全経過と療養上の問題の検討. 「運動ニューロンの変性疾患、ことに筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態に関する分子生物学的、神経病理学および臨床医学的研究」(財) 東京都神経科学総合研究所 1994 年 3 月 pp 43-51.
- (19) Goldstein K: Human nature in the light of psychopathology. New York: Schocken Books, 1963.
- (20) Shimizu T et al: Autonomic failure in ALS with a novel SOD1 gene mutation. *Neurology* 2000; 54: 1534-1537.
- (21) Shimizu T et al: Circulatory collapse and sudden death in respirator-dependent amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1994; 124: 45-55.
- (22) Humphrey T: The trigeminal nerve in relation to early human fetal activity. *Res Pub Assoc Nerv Ment Dis* 33:127-154, 1954.
- (23) Saint-Anne Dargassies S: Neurological development in the full term and premature neonate. Amsterdam: Excerpta Medica 1977.
- (24) Jackson JH: Evolution and dissolution of the nervous system (Croonian lectures delivered at Royal College of Physicians, March 1884). In: ed. by Taylor J. *Selected Writings of John Hughlings Jackson*. V II, London: Hodder and Stoughton, pp 45-91, 1932.
- (25) Goldblatt D: Motor neuron disease: Historical Introduction. In: Norris FH and Kurland LT eds. *Motor neuron disease. Contemporary neurology symposium 2*, New York & London: Grun & Stratton, pp 3-11, 1969.

ALS長期人工呼吸器生存例の病理

中野今治
自治医科大学神経内科

【はじめに】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、臨床的には選択的な下位運動ニューロン障害と上位運動ニューロン障害の症候が前面にでる神経変性疾患である。このことは、ALSの病理変化は、この二つの運動ニューロンに限局していることを意味している。ALSにおいてこの運動ニューロン症候と裏腹の関係にあるのが、豊倉の陰性四徴候—感覚障害が無い、眼球運動障害が無い、括約筋障害が無い、褥瘡ができない—である。この臨床的陰性四徴候は、病理学的にはそれぞれ脳脊髄の感覚路に病変が無いこと、外眼筋核のニューロン脱落が無いこと、Onuf核ニューロンの消失が無いこと、自律神経系が保たれることを意味している。

ところが、ALS患者を人工呼吸器で長期延命するとこの原則が当てはまらないことを示す症例が、もっぱら本邦から報告されている。そのような例では、臨床的には人工呼吸器を使用し始めてから、眼球運動障害や括約筋障害などの陰性症候が出現すると言われている¹⁾。

【広範病変型】

人工呼吸器で長期延命したした症例の剖検例を調べると、神経病理学的病変は運動系を超えて広範な領域に広がっている。脊髄では、ALSで侵される錐体路や前角運動ニューロンは高度に変性しているのに加えて、その他の前索・側索にも強い変性が認められる（図1）。さらには、ALSではほとんど侵されない後索にも高度の変性が認められる。特に、腰髄ではいわゆる後索型家族性ALSで見られる後索中間根帯に変性が強調されているのは特記すべき所見である（図2）。このほかに、仙髄ではOnuf核のニューロンが変性しており、胸髄ではClarke柱のニューロンが高度に脱落している。後者の変性のために頸髄での後脊髄小脳路の二次変性が生じていることが考えられる。

上位運動ニューロンの脱落も高度であり、Betz巨細胞はほとんど認められない（図3）。さらに、Betz巨細胞脱落跡に出現するリポフスチン含有マクロファージの集簇もほとんど見られず、中心前回の変性は相当古いことが推測される。

脳幹でも運動ニューロン系以外にも変性は広がっており、延髄や橋の被蓋の変性も高度である（図4、5）。これに対し、外眼筋支配の神経核には明らかな変性は無いが有っても軽度であった（図6）。また、歯状核赤核淡蒼球レイ体系の変性も明らかであった（図4、7）。

人工呼吸器を使用しなくても、変性の強い症例では上位・下位の運動系を超えて病変が広がっていることは以前から知られていた。たとえば、古典的ALSの脊髄白質は単に錐体側索路と錐体前索路のみでなく、それ以外の前側索の淡明化が見られることは多くの神経病理医が指摘している²⁾。さらには、脊髄灰白質においても、ALSで脱落するのは前角大型ニューロン（いわゆる下位運動ニューロン）のみでなく、それより小型のニューロンも脱落することが詳細な計測により示されている³⁾。

【限局病変型】

一方、人工呼吸器により9年余にわたって人工的に延命を図っても病変の広がりには上位・下位運動ニューロンの範囲を本質的には超えない症例の報告も本邦からなされている⁴⁾。これらの症例は、下位運動ニューロンこそ高度に脱落しているものの、脊髄の変性は人工呼吸器非使用例とほとんど変わりなく、後索は正常に保たれ、錐体側索路の中等度の淡明化を除けば驚くほど良く保たれている（図8）。但し、中心前回ではBetz巨細胞は高度に脱落しており、その突起であると考えられる大径有髄線維も延髄錐体ではほとんど見られない。すなわち、限局型であっても、いわゆる

る上位運動ニューロンと下位運動ニューロン中、大型(Betz巨細胞と α 運動ニューロン)は高度に脱落している。ちなみに、KB染色における染色の濃さは、大径有髄線維よりも中・小径の有髄線維に依存している。この様な例の錐体側索路の淡明化が軽いのは、中等径～小径有髄線維が多く残存していることによると考えられる。

頸髄レベルで後脊髄小脳路を構成する有髄線維は大多数が大径であることから、正常例でもKB染色で淡明に見えることがある。この例の後脊髄小脳路(図8)が淡明に見えるのはその影響と思われる。

これらの例では、脊髄ではClarke柱ニューロンや中間質外側角のニューロンは保たれており(図9)、脳幹の被蓋や外眼筋核(図10)、さらには広範型で侵されやすい歯状核赤核淡蒼球ルイ体系にも明らかな変性は認められない(図11)

【まとめ】

ALS患者を人工呼吸器によって人為的に長期延命可能となり、それまでには見られなかった運動ニューロンを超えた広範な病理像が見られるようになった。一方、ほぼ同じ長さを人工呼吸器で生き延びた症例であっても、運動ニューロン系の病変こそ高度であるものの、本質的な病変は上位運動ニューロンと下位運動ニューロンに局限している症例も存在している。

この両者はどのような関係にあるのであろうか。もちろん現時点では結論を出すことはできない。ただ、可能性としては以下のようなことが考えられる。1) 広範型と限局型は異なる疾患である。病変が運動ニューロンに局限する自然経過のALSでも、1年前後で死亡する症例から10年余も延命する症例まであり、本症が単一疾患であるとの確たる根拠はない。ALSの原因が全く分からない現在、ALSは独立疾患ではなく、症候群であるとの考えは我々をして首肯させるだけのものを持っている。

2) 広範型と限局型は同一疾患であり、進行の速度が異なるにすぎない。すなわち、限局型であってもさらに人工呼吸器で延命すれば病変は広範型になる。Oyanagiら、生田

らの観察から分かるように、自然経過のALS症例であっても、病変は α 運動ニューロンだけでなく、中等径ニューロンや小径ニューロンの脱落があり、錐体路以外にも索変性が見られる。これらの所見は、いずれの症例も人為的に十分な長さ延命させれば病変は広範になることを推測させる。

繰り返しになるが、現時点では1)、2)のいずれとも決めがたい。今後、個々の症例がどちらのグループに入るのかを予測できるようになれば、人工呼吸器装着の有無の決定の際、重要なファクターになるものと思われる。というのは、電子装置を用いた意思伝達装置が今後ますます発達することが予想され、いずれのタイプに属するかでその駆使能力が異なってくる事が考えられるからである。

謝意：今回の発表に当たり、症例の検索・発表を快諾下さった以下の方々に深謝いたします。

都神経科学総合研究所 新井信隆先生、都立神経病院 林秀明先生、加藤修一先生、愛知医大加齢医学研究所 吉田眞理先生、橋詰良夫先生

文献

1. Hayashi H, Kato S: Total manifestations of amyotrophic lateral sclerosis. ALS in the totally locked-in state. J Neurol Sci 93: 19-35, 1989
2. 生田房弘、巻沢隆夫、大浜栄作ほか：ヒト脊髄の索変性：ALS索変性の観察と疑問から。神経進歩 26:710-736, 1982
3. Oyanagi K, Ikuta F, Horikawa Y: Evidence for sequential degeneration of the neurons in the intermediate zone of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis: a topographic and quantitative investigation. Acta Neuropathol 77: 343-349, 1989
4. 吉田眞理、村上文之、橋詰良夫ほか：人工呼吸器装着により長期生存した筋萎縮性側索硬化症2例の臨床病理学的検討。臨床神経 32: 259-265, 1992



図1. 長期間人工呼吸器で延命したALSの頸髄。白質では錐体路を含む前側索全体の高度の淡明化が見られる。それに加えて後索にも変性が明らかである。KB染色、約3倍

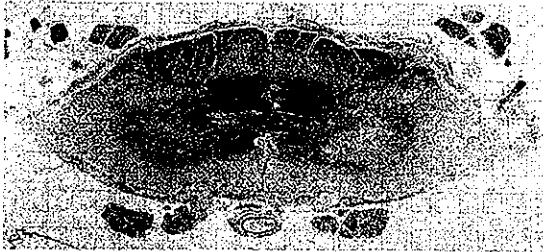


図2. 長期間人工呼吸器で延命したALSの腰髄。後索中間根帯に相当する部位に変性が目立っている。KB染色、約3倍



図3: 長期間人工呼吸器で延命したALSの中心前回。Betz巨細胞はほぼ完全に消失している。KB染色、5倍

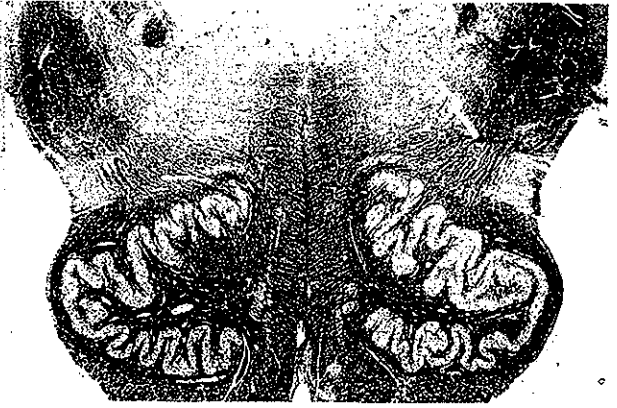


図4. 長期間人工呼吸器で延命したALSの延髄。延髄網様体の淡明化が見られる。KB.



図5. 長期間人工呼吸器で延命したALSの橋被蓋；中心被蓋路を主体に淡明化と萎縮が認められる。上小脳脚の淡明化も明らかである。KB.

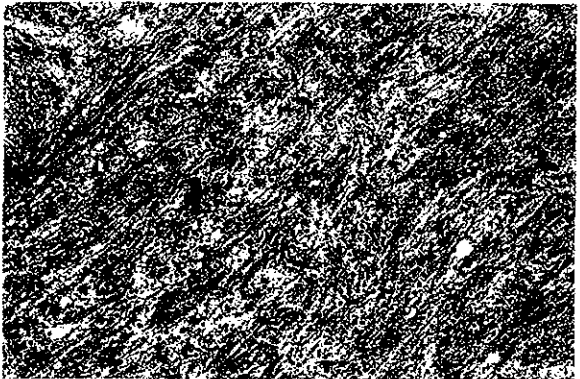


図6. 長期間人工呼吸器で延命したALSの淡蒼球。ニューロン脱落とグリオシスが著明である。HE、100倍。

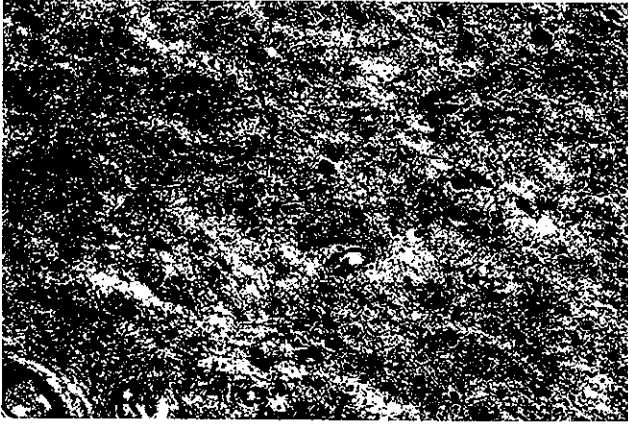


図7. 長期間人工呼吸器で延命したALSの視床下核. ニューロン脱落とグリオシスが著明である. HE, 100倍.

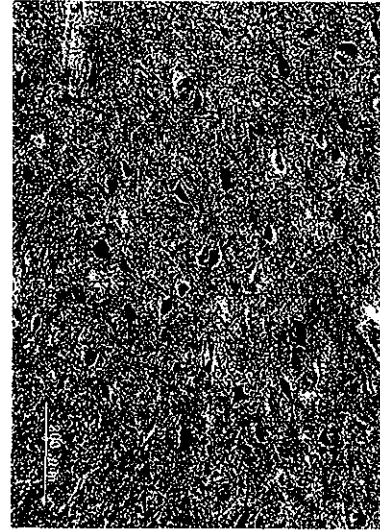


図10. 図8と同一例の動眼神経核. ニューロンは良く保たれている. HE, 100倍.



図8. 人工呼吸器使用9年余の限局病変型ALSの頸髄. 索変性は通常経過のALS例と変わらない. KB染色.



図11. 図8と同一例の視床下核 (右). ニューロンは良く保たれている. HE, 200倍.



図9. 図8と同一症例の下部胸髄. クラーク柱と中間質外側核のニューロンは良く保たれている. KB, 10倍.

ラット ALS モデルを用いた新しい治療法の開発

青木正志、割田 仁、石垣あや、加藤昌昭、永井真貴子、糸山泰人

東北大学大学院医学系研究科神経内科

家族性 ALS の原因遺伝子 SOD1 が発見されてから約 10 年が経過して、これまでに多くの遺伝子変異が報告された。しかしながらわが国における SOD1 遺伝子変異による家族性 ALS の頻度は未だに不明である。変異 SOD1 による家族性 ALS の発症メカニズムも未だ十分には解明されていない。東北大学神経内科では ALS に対する新しい治療法の開発のために、世界に先駆けてトランスジェニック (Tg) ラットによる ALS モデルの開発に成功した。さらにこの ALS ラットモデルに対して肝細胞増殖因子 (HGF) 蛋白の髄腔内持続投与を行い、その治療効果を臨床的にかつ病理学的にも確認した。さらにはこの HGF 髄腔内の持続投与を ALS 発症期からおこなっても、Tg ラットの罹病期間の延長が可能であることを確認した。HGF の ALS に対する臨床応用が期待される。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は現在までに有効な治療薬や治療法がほとんどないため、神経疾患のなかで最も過酷な疾患とされ、早期に病因の解明と有効な治療法の確立が求められている。遺伝学的解析法の進歩により、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 (SOD1) であることが明らかになり^{1,3)}、さらにはこの SOD1 遺伝子の突然変異をマウスに導入することにより、ヒト ALS の病態を非常に良く再現することに成功した⁴⁻⁷⁾。SOD1 遺伝子変異による家族性 ALS の発症メカニズムはまだ十分には解明されていないが、変異による SOD 活性の低下が直接の原因ではなく、変異 SOD1 が新たに獲得した“gain of toxic function”によるものと考えられている⁸⁾。最近では変異 SOD1 を特異的に認識するユビキチンライゲースが報告され、その病態における役割が注目されている⁹⁻¹⁰⁾。

SOD1 変異にともなう家族性 ALS

我々はこれまでに、日本人 15 家系の家族性 ALS において 12 種類の SOD1 遺伝子変異を報告してきたが、SOD1 変異の種類により ALS の進行は全く異なることが明らかになった。例えば 46 番 His が Arg への変異 (H46R) は点突然変異が SOD1 の活性中心にあるにもかかわらず、非常に緩徐な進行を示し、平均罹病期間は約 17 年であった^{3,11)}。またすべての患者において左下肢からの発症がみられている。その一方、84 番 Leu

が Val への変異 (L84V) では例外なく急速な進行で上肢からの発症であった¹²⁾。これまでの症例による臨床型の検討により、各点突然変異によりおよその罹病期間が決まることが明らかになった。

前述のように家族性 SOD1 の原因遺伝子 SOD1 が発見されてから約 10 年経過し、わが国からも本研究班の班員を中心に多くの遺伝子変異が報告された。このことにより SOD1 遺伝子変異を伴う ALS の特徴としては、1) 下肢からの発症が多い、2) 必ずしも上位ニューロン徴候を伴わないこともある、3) 遺伝子変異により罹病期間がある程度規定されることが確認された。その一方で、1) 日本における家族性 ALS の頻度、2) その中で SOD1 変異を伴うものの割合は依然として不明であり、本研究班が中心となり、data を集積する必要がある。例えば家族性 ALS における SOD1 変異によるものの頻度は、各施設からのこれまでの報告によれば東北大学では家族性 ALS 27 家系中 15 家系に、名古屋大学では 21 家系中 11 家系¹³⁾、新潟大学では 20 家系中 8 家系¹⁴⁾であり、わが国においては米国で約 20% と云われる頻度より高い可能性がある。またこのような臨床情報の集積が、SOD1 以外の新たな家族性 ALS の原因遺伝子の発見に結びつくと考えられる。

トランスジェニック (Tg) ラットによる新しい ALS モデル

ALS のモデル動物としては従来マウスが用いられてきたが、特に病態の首座である脊髓の解析には、そ

の個体の大きさによる研究上の様々な制約があった。東北大学の永井真貴子らは動物モデルにおける脊髄や脊髄腔に対する治療的なアプローチを可能とするために、世界にさきがけて変異 SOD1 導入 Tg ラットによる ALS モデルの作製に成功した (図 1) ¹⁵⁾。

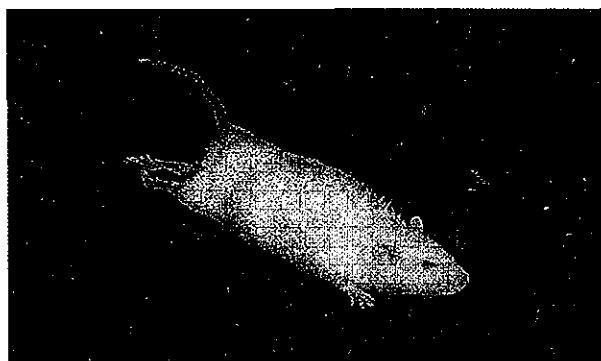


図 1. 両後肢に痙性麻痺の出現が認められたトランスジェニックラット。尾のトーヌスも亢進している。

H46R 変異および G93A 変異を持つ Tg ラットは共に導入された変異ヒト SOD1 蛋白が多く発現した系統 (H46R-4 および G93A-39) において運動ニューロン病の症状の発現が認められている。発症は、二つの変異を導入した Tg ラットとも後肢の筋力低下で始まり、対麻痺、四肢麻痺へと進行し死に至った。H46R-4 は 144.7 日で発症し、24.2 日の経過で死亡した。G93A-39 は 118.6 日で発症し、8.3 日の経過で死亡した。変異 SOD1 蛋白の発現量は G93A-39 の方が H46R-4 に比較して少ないにもかかわらず、G93A-39 はより早期に発症し、かつ非常に急速な進行を示している。これはわれわれが作製している変異 SOD1 導入 Tg マウス ¹⁶⁾ と同様にラットにおいても導入した変異が G93A 変異の家系は速い経過を示し、H46R 変異が緩徐な経過を取ることを良く再現していた ¹⁵⁾。Tg ラットは従来のマウスに比較して約 20 倍の大きさを持つために、脳脊髄液 (髄液) の採取および解析ならびに薬剤や遺伝子治療用のベクターの髄腔内投与が極めて容易である。将来的な遺伝子治療を含めた新しい治療法開発のために非常に有用なモデルとなることが期待される。

ALS ラットにおける神経前駆細胞の解析

新しいラットによる ALS モデルはプロモデオキシウリジン (BrdU) を投与して脊髄の増殖性細胞を標識することが可能であり、再生医療の開発を念頭に内在性神経前駆細胞の解析を開始した。これまでの解析では ALS ラットでは運動ニューロン脱落前より有意に脊髄神経前駆細胞が増殖していたが (図 2)、その多く

はグリア系細胞に分化していることが示された。その一方で nestin 陽性細胞が中心管上衣層と白質に認められ、BrdU/nestin 二重陽性かつ GFAP 陰性細胞も確認され、より未分化な段階の細胞の存在が示唆された。このような未分化な細胞をうまく分化誘導し、組織修復に役立てる方法を探っていくことが新規治療法につながる可能性があると考えて研究を進めている。

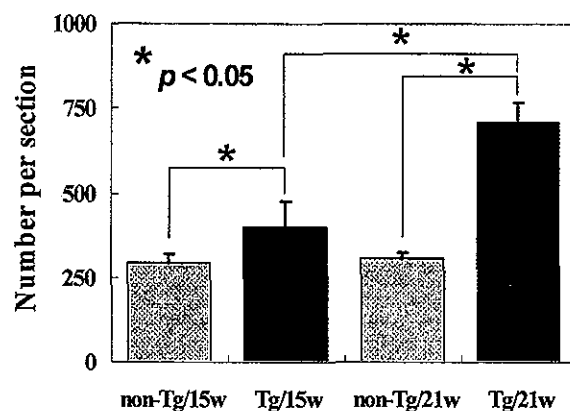


図 2. BrdU 陽性細胞数

H46R Tg ラット腰髄では運動ニューロン脱落前の 15 週齢より有意に BrdU 陽性細胞が増加し (Tg/15w)、発症後の 21 週齢ではさらに増加していた (Tg/21w)。non-Tg: 非 Tg ラット, Tg: Tg ラット, *: $p < 0.05$

肝細胞増殖因子 (HGF) の髄腔内持続投与による新しい治療法の開発

ALS の病態の首座である脊髄の運動ニューロンに対して効率良くしかも全身に対する副作用を回避できる薬物の投与ルートとして髄腔内投与が注目されている。Tg ラットによる ALS モデルはこのルートによる薬剤供給が可能である。肝細胞増殖因子 (HGF) は、運動ニューロンに対する強力な栄養作用が明らかになったが ^{17,18)}、これまでに東北大学では ALS ラットに対して浸透圧ポンプを用いて髄腔内にリコンビナント HGF 蛋白の持続投与を行った。vehicle (PBS) および 40 μg 、200 μg (総量) の 3 群の ALS ラットにそれぞれ HGF を発症前の 100 日齢から 1 ヶ月間にわたり投与したところ、HGF 投与群においては vehicle 投与群に比較して有意に腰髄運動ニューロン数が保たれており、このことは HGF 投与量に依存的であった。さらにはヒトへの臨床応用のために ALS 発症後の病態進展に対する HGF の効果を検討した。ALS ラットの髄腔内に臨床的に発症時期の直前である 115 日齢から HGF

蛋白 200 μg の 4 週間持続投与を行っても vehicle と比較して 63% の著明な罹病期間の延長効果を認めた ($p = 0.023$) (図 3)。発症期の投与により罹病期間の延長効果を確認したことは、現在治療法のない ALS にとって希望のある発見であり、早期の臨床試験の開始が期待される。

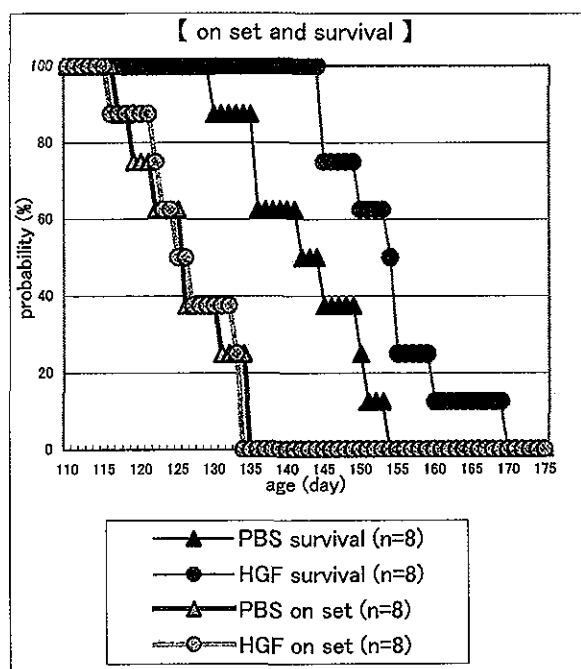


図 3. 115 日令投与による発症および生存曲線
Vehicle を投与した G93A Tg ラット (PBS) と、HGF 200 μg を投与した G93A Tg ラット間では発症に差はないが、発症から死亡までの罹病期間が有意に延長した。

おわりに

変異 SOD1 による細胞死の機序は未だ不明な点も多く、今後の研究のさらなる発展が期待させる。同時に我々神経内科医には新規治療法の開発も求められるが、今後の「神経再生医療」の展開にも、神経再生に必要な場を作り出すための神経栄養因子の効率的な利用が必須であると思われる。私たちはベクターなどによる遺伝子導入を含め、脊髄の運動ニューロンに対する薬剤の効率的な供給法を Tg ラットによる ALS モデルを通じて検討していきたいと考えている。

文献

1) Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al: Nature 1993; 362:59-62

2) Deng HX, Hentati A, Tainer JA et al: Science 1993; 261:1047-1051
 3) Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y et al: Nature Genet 1993; 5:323-324
 4) Gurney ME, Pu H, Chiu AY et al: Science 1994; 264: 1772-1775
 5) Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR et al: Neuron 1995; 14:1105-1116
 6) Bruijn LI, Becher MW, Lee MK et al: Neuron 1997; 18:327-338
 7) Nagai M, Aoki M, Miyoshi I et al: Ecerpta Medica Internatinal congress series 1221 Neurology, Molecular mechanism and therapeutics of amyotrophic lateral sclerosis, ed by Koji Abe, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp273-279
 8) Julien JP: Cell 2001; 104:581-91
 9) Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, et al: J Biol Chem 2002; 277:36793-36798
 10) Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, et al: J Biol Chem 2004; 279:11327-11335
 11) Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y et al: J Neurol Sci 1994; 126:77-83
 12) Aoki M, Abe K, Houi K et al: Ann Neurol 1995; 37:676-9
 13) 祖父江元、熱田直樹、渡邊宏久ほか：厚生労働科学研究費補助金 神経変性疾患に関する調査研究班 2003 年度研究報告書 pp59-62
 14) 中野亮一、菊川公紀、福島隆男ほか：厚生科学研究費補助金 神経変性疾患に関する研究班 2000 年度研究報告書 pp43-45
 15) Nagai M, Aoki M, Miyoshi I et al: J Neurosci 2001; 21:9246-9254
 16) 青木正志、加藤昌昭、永井真貴子ほか：厚生科学研究費補助金 神経変性疾患に関する研究班 2001 年度研究報告書 pp111-113
 17) Sun W, Funakoshi H, Nakamura T: J Neurosci 2002; 22:6537-6
 18) 船越 洋、中村敏一：神経治療 2003; 20: 533-540

Tg マウスを用いたハンチントン病の治療戦略

貫名 信行

独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム

1. はじめに

ハンチントン病や遺伝性の脊髄小脳変性症の多くは、その病気の原因遺伝子の CAG 塩基配列の繰り返し異常に伸長することにより、異常に伸長したグルタミン鎖を含む原因遺伝子産物が神経細胞に異常蓄積し、神経細胞死や機能異常を引き起こす疾患である。異常に伸びたグルタミン鎖がその病気の発症に強く関わっていることからポリグルタミン病とまとめて呼ばれている。ポリグルタミン鎖の長さが長いと若年で発症することからポリグルタミンの長さに依存した神経細胞への毒性がどのようにして生じているかが、その病態を考える上で重要である。近年そのような病態を再現するモデルマウスの解析からポリグルタミン病の神経細胞の核にポリグルタミンを含む蛋白凝集体:核内封入体が形成されることがわかり、これらの病気において凝集体形成が重要な役割を果たしていることが示唆された。このようにポリグルタミン病はその病態が少しずつわかってはきたが、治療法が確立しておらず、遺伝子診断が直接患者さんの治療に結びつかないといった矛盾があり、治療法、発症予防法の確立が急がれていた。

2. 分子構造病態に基づく治療戦略

われわれはポリグルタミンを発現する細胞モデルを用いて、伸長するポリグルタミンを発現すると異常な凝集体を形成し、シャペロン系がその凝集を抑制しようとするにもかかわらず、凝集抑

制がうまくいかないと、細胞の蛋白分解系プロテアソームを阻害して細胞死を引き起こすという機序を明らかにしてきた。これらの病態の中核にあるのは凝集体形成であり、その凝集体に様々な分子がリクルートされることである。

このような病態の解析から、凝集抑制がこの病態を抑えるために必要と考え、最も上流のポリグルタミンを含む蛋白の構造異常の解析を行った。ポリグルタミン鎖を安定性の極めて高い蛋白質で構造も明らかにされている蛋白質の一つであるミオグロビンへ挿入し、ポリグルタミン鎖の構造およびポリグルタミン挿入に伴う(ホスト)蛋白質の構造変化を検討した。その結果変異型ミオグロビンに挿入された伸長したポリグルタミン鎖は分子内ベータシート構造をとっていることが判明した。また、35, 50 のリピート数をもつミオグロビンは凝集体を形成し始めると分子間ベータシート構造を含んでいることがわかり、またポリグルタミンの伸長に伴いミオグロビンが不安定化することが示された(図1)。そこでこの研究で用いた変異ミオグロビンの系を用いて病態の最も上流である凝集体形成を抑える化合物を検索した。

Mb-Q35 (35 ポリグルタミンを含むミオグロビン)を用いて200あまりの化合物を *in vitro* で検討したところ、二糖に凝集抑制効果が認められ、その中でもトレハロースが最も強力であった。そこでトレハロースの効果をポリグルタミンが発現した細胞においてみたところ、凝集抑制効果が

認められ、トレハロース合成酵素 OtsA, B を発現したところ凝集抑制効果、細胞死抑制効果はシャペロンの HDJ1 と同程度に認められた。さらにトレハロースの Mb-Q35 の不安定性に対する影響を評価したところ、トレハロース存在下で Mb-Q35 は正常域の Q12 (12 グルタミンを持つもの) と同程度になることが示され、これらの結果はトレハロースが分子を安定化し、凝集抑制効果があり、その結果細胞死抑制効果が認められたと考えられた (図 2)。さらにハンチントン病モデルマウス R6/2 マウスの飲料水に 2% の濃度で投与したところ生存日数の増加 (10% 程度)、ロタロッドテストなどの機能低下の遅延、病理学的な凝集体形成減少を認めた (図 3, 4)。以上の結果トレハロースは伸長したポリグルタミンによるホスト蛋白の不安定化を抑え、凝集体形成を抑えることにより発症を遅延させたと考えられた。

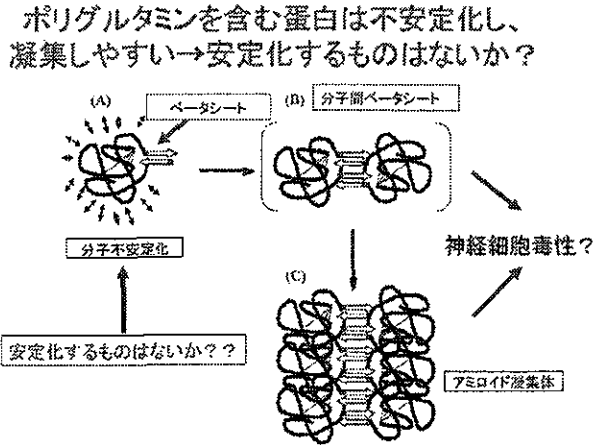
3. 今後の展望

本研究によって凝集体形成が病態の最も上流にあり、これを抑えることにより、病態の進行を抑えることが可能であることを示された。この抑制効果が完全なものでないことは、より強力な抑制効果のある化合物の探索や、あるいは凝集体分解の促進などが今後の治療法開発にとって必要であることを示唆している。アルツハイマー病、パーキンソン病あるいは筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の病態において蛋白のミスフォールディングが注目されている。これらの疾患においても分子安定化による治療の可能性が示唆されたと考える。

4. 参考文献

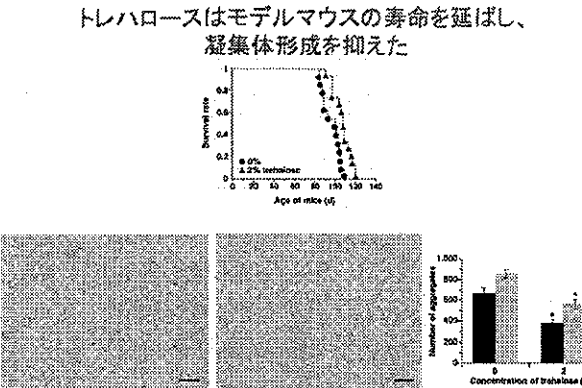
- 1) Wang, G. H., Mitsui, K., Kotliarova, S., Yamashita, A., Nagao, Y., Tokuhira, S., Iwatsubo, T., Kanazawa, I., and Nukina, N. (1999). Caspase activation during apoptotic cell death induced by expanded polyglutamine in N2a cells. *Neuroreport* 10, 2435-2438.
- 2) Jana, N. R., Tanaka, M., Wang, G., and Nukina, N. (2000). Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum Mol Genet* 9, 2009-2018.
- 3) Jana, N. R., Zemskov, E. A., Wang, G., and Nukina, N. (2001). Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 10, 1049-1059.
- 4) Mitsui, K., Nakayama, H., Akagi, T., Nekooki, M., Ohtawa, K., Takio, K., Hashikawa, T., and Nukina, N. (2002). Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1 α and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *J Neurosci* 22, 9267-9277.
- 5) Zemskov, E. A., and Nukina, N. (2003). Impaired degradation of PKC α by proteasome in a cellular model of Huntington's disease. *Neuroreport* 14, 1435-1438.
- 6) Tanaka, M., Morishima, I., Akagi, T., Hashikawa, T., and Nukina, N. (2001). Intra- and intermolecular β -pleated sheet formation in glutamine-repeat inserted myoglobin as a model for polyglutamine diseases. *J Biol Chem* 276, 45470-45475.
- 7) Tanaka, M., Machida, Y., Nishikawa, Y., Akagi, T., Hashikawa, T., Fujisawa, T., and Nukina, N. (2003). Expansion of polyglutamine induces the formation of quasi-aggregate in the early stage of protein fibrillization. *J Biol Chem* 278, 34717-34724.
- 8) Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, Kurosawa M, Nekooki M, Nukina N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med.* 2004 10:148-54.

図1 ポリグルタミン病の病態に関与する凝集体



(A) ポリグルタミンは伸長するとペータシートを形成する。
 (B) (C) このペータシートはペータシート間の結合を生じ、繊維を形成する。このような凝集体が神経毒性を持っている。分子不安定化を抑えることによって凝集体形成を抑えられるか。

図3 トレハロースの寿命と病理に対する効果

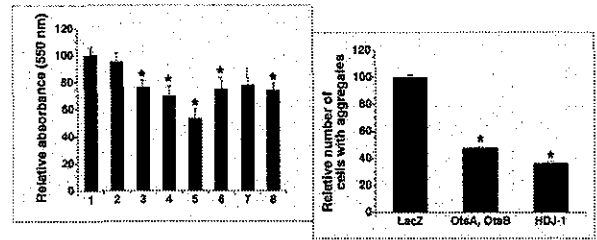


(図上) 生存曲線：2%トレハロースを自発的に飲ませたマウスは約10%の寿命の延長を見た。
 (図下左) 核内封入体の減少(左：コントロール(比較対照群)、右：トレハロース服用)
 (図下右) 核内封入体の定量(黒：8週令、灰：12週令)

図2 凝集抑制化合物の探索

トレハロースは分子を安定化し、凝集体形成を抑制する

Cm value of	Trehalose 0μM	10μM	100μM
Mb-wt	1.66	1.66	1.61
Mb-Q12	1.04	1.04	1.13
Mb-Q35	0.85	1.02	1.06



(1) PBS (2) glucose (3-5) trehalose (50, 100, 1000 μM) (6) N-acetylgalactosamine tetrazine (7) N-acetylneuraminic acid (8) QBPI

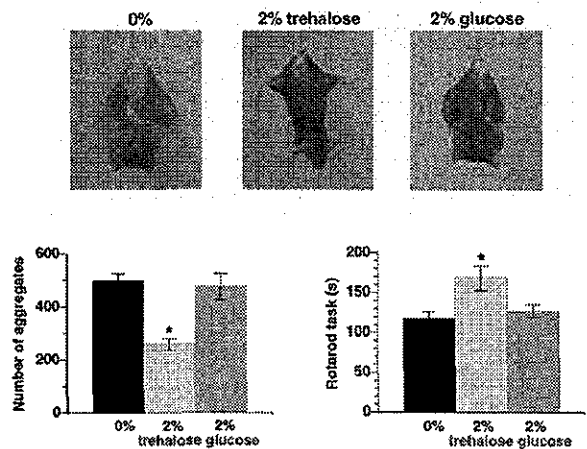
(図上) Mb-Q12, Q35 を変性剤で変性させる実験を行い、50%変性させるのに必要な濃度(Cm value)から分子の不安定さを測定した。トレハロース存在下ではQ35は非存在下のQ12と同程度になる。このことはトレハロースは分子を安定化していることを示している。

(図下左) Mb-Q35 を様々な化合物の存在下で凝集体形成の度合いを調べた。トレハロース(3-5)を含む二糖に抑制効果が認められた。

(図下右) ポリグルタミンを発現した細胞における凝集体形成はトレハロース合成酵素(OtsA, B)を発現するとシャペロンのHDJ1を発現した時と同程度の効果が認められる。

図4 トレハロースによる症状の改善

トレハロースは症状の悪化を遅らせた



(図上) クラスピングという手足を広げられない現象がトレハロース飲用で減少。

(図下左) トレハロースの分解産物のグルコースと比べても凝集体抑制効果がある。

(図下右) ロタロッドテストで回転棒に乗っていられる時間も延びた。

球脊髄性筋萎縮症の病態に基づく治療法の開発

名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科 祖父江 元

研究要旨 球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、緩徐進行性の筋力低下・筋萎縮を主徴とする成人発症の遺伝性運動ニューロン疾患である。男性にのみに発症し、女性は通常無症状である。原因はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子における CAG 繰り返し塩基配列の異常延長であり、ポリグルタミン鎖の延長した変異 AR タンパクが核内に蓄積することで神経細胞障害が生じる。トランスジェニックマウスを用いた解析により、変異 AR の核内蓄積がリガンドであるテストステロンに依存していることが解明され、LHRH アナログによる治療効果が明らかとなった。SBMA が男性のみで発症することは、テストステロン分泌量の著しい性差で説明可能と考えられる。現在、本疾患に対する LHRH アナログの臨床試験が進行中である。

はじめに

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、成人期に発症する緩徐進行性の下位運動ニューロン疾患であり、男性のみが罹患する。主症状は四肢近位部の筋力低下・筋萎縮と球麻痺であるが、深部感覚障害を主体とする感覚神経障害も認められる。随伴症状として、女性化乳房を高率に認めるほか、肝機能障害、耐糖能異常、高脂血症、高血圧症などがしばしばみられる。女性様皮膚、睾丸萎縮、不妊、陰萎を認めることもある。女性保因者は通常無症状だが、手指の振戦や、有痛性筋痙攣、軽度の血清 CK 値上昇などを認めることもある。根本的治療は存在せず、対症療法としてテストステロンが使用されることがあるが、効果は乏しく長期間の有効性は認められていない。

SBMA の病態は脊髄前角細胞や顔面神経核、舌下神経核の変性、脱落であり、その原因はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の第 1 エクソン内の CAG リピートの異常延長である。AR の CAG リピート数は、正常では 12~34 程度であるが患者では 40~62 程度に延長している。このため SBMA は、ハンチントン病や脊髄小脳変性症などと並んで、ポリグルタミン病と呼ばれ、これらの疾患においては表現促進現象 (anticipation) や CAG リピート数のばらつき (体細胞モザイク)、主に神経組織が選択的に障害されるという、共通の病態が観察される。また、他のポリグルタミン病

と同様 SBMA においても、CAG リピート数は筋力低下の発症年齢と負の相関を示し、年齢補正した重症度とは正の相関を示す。病理学的には、脊髄前角細胞や下位脳神経運動核、腎、精巣、皮膚などで変異 AR 蛋白の核内集積を認める。変異蛋白の核内蓄積はポリグルタミン病ほぼ全体に通じる病理学的特徴でもあり、病態形成において中心的役割を果たしていると考えられている。核内に集積した変異 AR は CBP などの転写関連因子の機能を阻害して転写障害をもたらすことが知られており、神経細胞の機能障害ひいては細胞死に繋がると考えられている。CBP などの核内タンパクはヒストンアセチル化 (HAT) 活性を有しており、CBP の機能阻害によりヒストンのアセチル化が低下することが転写障害の主因と考えられている。すなわち、変異蛋白の核内集積およびそれに引き続く転写障害が、ポリグルタミン病の中心的病態であり、同時に治療のターゲットとも考えられる。

我々は、SBMA のモデル動物として、CAG リピートが 97 に延長した全長のヒト AR 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (Tg) を作成し、病態の解明及び病態機序に基づく治療開発を行った。

方法

チキン B-プロモーター 調節下に 24CAG ないし 97CAG を有するヒト AR を pCAGGS ベクタ

ーにサブクローニングし、microinjectionにて Tg を作成した。運動解析にあたっては rotarod task および cage activity を解析した。去勢および sham operation は、4 週齢の雄マウスに対し、ケタミン-キシラジン麻酔下で、経腹腔的アプローチで行った。雌マウスには、20 μ g のエン酸テストステロンを週 1 回皮下投与した。Leuprorelin は 100 μ g を皮下投与した。酪酸ナトリウムは 2、4、8、16g/l の濃度で SB 水溶液を調整し、給水瓶によりマウスに ad libitum で経口投与した。

結果

表現型における性差：Tg はいずれも体格の縮小、寿命短縮、進行性筋萎縮、筋力低下および活動低下を示し、これらすべての症状は雄の AR-97Q マウスにおいて重篤かつ急速に進行したが、雌では症状が認められないか、あっても雄より遥かに軽症であった。ウエスタンブロットでは、変異 AR の高発現が認められ、変異 AR のモノマーのバンドに加え、スタッキングゲルに留まるものと切断された変異 AR の断片も認められた。スタッキングゲルに留まる変異蛋白の発現は雄で大量に認められたが、雌では少量であった。Tg においては、異常延長したポリグルタミンに対する特異的抗体 (1C2) による免疫染色で、核のびまん性染色や核内封入体が脊髄、大脳、小脳、脳幹や後根神経節の神経細胞および心や筋、膵などの非神経組織に認められた。核のびまん性染色や核内封入体は 4 週齢から認められ、加齢とともに増加したが、雄では雌より高頻度に認められ、症状やウエスタンブロットの性差に一致する結果が得られた。筋病理では、雄マウスにおいて著明な群集萎縮と小角化繊維といった神経原性変化が認められた。脊髄運動ニューロンの数には明らかな減少は見られなかったが、脊髄前根の大径繊維の軸索径は雄 Tg において有意に縮小していた。

内分泌学的介入：症状や病理所見の性差が、男性ホルモンであるテストステロン分泌の性差によるものと仮説をたて、まず雄 Tg に去勢を施行した。去勢された雄マウスでは筋萎縮、体重、rotarod や cage activity による

運動機能評価において劇的な改善が認められ、寿命も 3 倍以上に延長した。ウエスタンブロットでは、スタッキングゲルに留まる変異 AR 蛋白は、対照群に比べ去勢マウスにおいて著明に減少し、核分画における変異 AR もまた、去勢マウスにおいて著明に減少した。1C2 免疫染色における核のびまん性染色や核内封入体も、去勢により劇的に改善した。これらの結果は、去勢によるテストステロン減少が変異 AR の核内移行を抑えることで SBMA の病態を著明に改善することを示唆している。逆に、症状の軽微なメス Tg にテストステロン投与を行うと、症状や病理所見は著明に増悪し、ウエスタンブロットや 1C2 免疫染色では、核内に局在する変異 AR がテストステロン投与によって著明に増加することが確認された。SBMA マウスに対する抗アンドロゲン療法：去勢による症状の軽減に基づき、次に薬剤による SBMA の治療について検討した。AR を標的とするホルモン療法はすでに前立腺癌において方法が確立しており、使用される薬剤には黄体形成ホルモン刺激ホルモン (luteinizing hormone-releasing hormone: LHRH) アナログとアンドロゲン拮抗薬とがある。LHRH アナログは下垂体に作用しゴナドトロピンの分泌を低下させ結果としてテストステロンなどアンドロゲンの分泌を抑制する薬剤であり、一方のアンドロゲン拮抗薬は AR のリガンド結合部位をアンドロゲンと競合することで AR の機能を阻害するものである。LHRH アナログであるリュープロレリンを投与したトランスジェニックマウスでは、去勢した時と同様に症状や病理所見が劇的に改善した。リュープロレリンを投与により、マウスの寿命は 3 倍以上に延長し、病理学的にも脊髄前根の軸索萎縮や筋における神経原性変化が著明に改善した。ウエスタンブロットや延長ポリグルタミン鎖に対する抗体で免疫組織染色を行うと、核内に集積する変異 AR の量が著減しており、リュープロレリンの投与によりテストステロン分泌が抑制されたことで変異 AR の核内移行が阻害され、去勢の際と同様に病態の進展が抑止されたと考えられる。リュープロレリンは前立腺癌などの治療薬として効果や副作用の評価が詳細に行われているものであり、臨床応用は比較的容易と

考えられ、SBMA の治療薬として極めて有望と考えられる。一方、アンドロゲン拮抗薬であるフルタミドを投与したところ、マウスの運動機能や寿命には改善が認められず、変異 AR の核内集積にも変化は認められなかった。フルタミドがテストステロンと同様に神経変性を促進することは、ポリグルタミン鎖の延長した AR を発現するショウジョウバエのモデルでも明らかにされている。フルタミドなどのアンドロゲン拮抗薬は核内において AR の機能を阻害するが、AR の核内移行に対する阻害効果は乏しく、むしろ促進するとの結果も報告されている。従って、SBMA マウスにフルタミドを投与しても変異 AR の核内集積が阻害されないため、病態を改善することができなかつたと考えられる。

病態の可逆性：神経変性疾患の治療を考える上で重要な問題点の一つは、一旦発症した病気が改善しうるか否か、言い換えれば病態における可逆性の有無である。リュープロレリン投与の際に興味深いことは、マウスの病態の可逆性が示唆されることである。LHRH アナログは投与初期には下垂体刺激作用を介してテストステロンの分泌を促進するが、その後持続作用により下垂体の LHRH に対する感度を低下させることで、結果的に去勢と同レベルまでテストステロン分泌を抑制する。リュープロレリンを投与した SBMA マウスでも、ヒトと同様に投与 2 週後に一過性の血清テストステロン値の上昇が認められ、同時期に症状の一過性増悪がみられた。しかし投与 4 週後にはテストステロンは去勢レベルまで低下し、それに伴って運動機能も正常化し、以後その効果は持続した。さらに、同一マウスの筋を経時的に観察すると、リュープロレリン投与初期に核内の変異 AR が増加したが、投与の継続により減少することが観察された。こうした病理学的変化は症状の変動に一致するものであり、一過性のテストステロン増加により亢進した変異 AR の核内集積が、その後のテストステロン減少により可逆的に改善したことを示唆している。すなわち、SBMA の病態は不可逆なものではなく、いったん形成された病態も病初期であれば治療されうることを示している。

Hsp70 による治療：熱ショック蛋白質 (heat

shock protein: Hsp) はストレスによって発現誘導される蛋白質であり、構造変化した蛋白質を正常な構造に戻す (refolding) 作用を有することが知られている。こうした作用はシャペロン効果と呼ばれ、異常蛋白質の凝集抑制や分解促進、および異常蛋白質と他の正常蛋白質との相互作用の抑制をもたらすものと考えられている。SBMA などのポリグルタミン病でみられる核内封入体には Hsp が共存しており、Hsp がポリグルタミン鎖の延長した変異蛋白質の凝集を抑制し細胞障害を軽減することが培養細胞を用いた研究などで報告されている。我々は Hsp70 を高発現させたマウスと SBMA のトランスジェニックマウスとを交配し、Hsp70 高発現による治療効果を検討した。二重免疫染色では Hsp70 と変異 AR の共存が認められ、免疫沈降においても両者の相互作用が確認された。高発現した Hsp70 により変異 AR の核内での凝集は抑制され、マウスの運動機能は有意に改善した。ウェスタンブロットやフィルタートラップでは、凝集した AR のみならず、変異 AR のモノマーの蛋白質量も減少した。これは、変異 AR の凝集が抑制されたのみならず、その分解が Hsp70 により促進されたためと考えられた。

転写障害に対する治療：SBMA などのポリグルタミン病では、核内に集積した変異蛋白質により c-AMP response element binding protein-binding protein (CBP) などの転写調節因子の機能が障害されることが知られており、これがポリグルタミン病における神経細胞障害の主因と考えられている。延長ポリグルタミン鎖による転写障害を改善する薬剤として、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が注目されている。CBP などの転写調節因子にはヒストンをアセチル化して転写活性を高める作用があるが、こうした作用がポリグルタミン鎖の延長した変異蛋白質により阻害されることが知られている。HDAC 阻害剤がヒストンをアセチル化し転写活性を改善することが、SBMA の培養細胞モデルで明らかにされており、この結果はハンチントン病のショウジョウバエやマウスモデルでも確認されている。SBMA のトランスジェニックマウスにおいても、HDAC 阻害剤である酪酸ナトリウム (sodium butyrate) の経口投与に

より運動機能改善や寿命の延長が認められ、神経原性筋萎縮など病理所見にも改善がみられた。治療により変異 AR の核内集積には変化がなかったが、ヒストン H3 のアセチル化が改善していたことから、転写改善に基づく治療効果と考えられた。しかしその効果は狭い用量範囲でのみ認められ、高用量では毒性により逆に神経症状を悪化させる結果となった。

考察

モデルマウスを用いた解析により、テストステロン依存性の変異 AR の核内集積が、SBMA の病態形成にとって必須のステップと考えられる。去勢やあるいは LHRH アナログによる治療は、テストステロンの分泌を抑制することで変異 AR の核内凝集を阻害し、著明な神経症状の改善に帰結した。Hsp70 は変異 AR no refolding によりその凝集を阻害する一方分解を促進した。HDAC 阻害剤である酪酸ナトリウムは、Tg において低下しているヒストンのアセチル化を促進し、表現型を改善したと考えられる。

結論

抗アンドロゲン療法はすでに前立腺癌の治療として安全性の確立しているものであり、SBMA の有望な治療薬と考えられる。現在我々は、SBMA 患者に対する leuprorelin の二重盲検試験を実施中である。今後は、抗アンドロゲン療法に加え、Hsp70 の発現ないし機能を増強する治療法や、HDAC 阻害剤などによる転写改善なども併用して治療戦略を立てていくべきであると考えられる。

文献

1. Adachi H, Kume A, Li M, et al. Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by the human AR promoter show polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1039-1048.
2. Katsuno M, Adachi H, Kume A, et al. Testosterone reduction prevents

phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* 2002; 35: 843-854.

3. Katsuno M, Adachi H, Doyu M, et al. Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Med* 2003; 9: 768-773.
4. Katsuno M, Adachi H, Inukai A, Sobue G. Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Cytogenet Genome Res* 2003; 100: 243-251.
5. Katsuno M, Adachi H, Inukai A, et al. Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Mol Med* 2004; 82: 298-307.
6. Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, et al. Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J Neurosci* 2003; 23: 2203-2211.
7. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, et al. Sodium Butyrate Ameliorates Phenotypic Expression in a Transgenic Mouse Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1183-1192.
8. Katsuno M, Adachi H, Sobue G. Sweet relief for Huntington disease. *Nat Med* 2004; 10: 123-124.
9. Katsuno M, Sobue G. Polyglutamine diminishes VEGF; passage to motor neuron death? *Neuron* 2004; 41: 677-6779.

JaCALS

(Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research)

Protocol (案)

Study Code: JaCALS

Version: 1.1

1. 研究の目的

1. 1. 背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は全身の運動ニューロンが特異的かつ進行性に脱落をきたす神経変性疾患であり、四肢筋、呼吸筋、球筋などヒトの生命、ADL に直結する部位に重篤な症状をきたす。患者の苦痛は極めて大きく、平均 3 年半の経過で死亡するか長期人工呼吸器装着が必要となる。40 歳台から 50 歳台の働き盛りに好発するため、患者やその家族のみならず社会的にも重大な損失を与える。

近年、各種神経成長因子、ビタミン B12 大量療法、フリーラジカルスカベンジャーをはじめとして、各種治療介入研究が行われている。今後、治療研究を推進する上で、本邦の ALS の自然歴および進行速度、予後に影響する因子の解析が極めて重要である。これまでに我が国では、2 度の全国調査(1982 年、1996 年)が神経変性疾患に関する調査研究班により行われたが、いずれも後ろ向きの検討である。また、リルゾール、間欠的陽圧呼吸、胃瘻など、自然歴を修飾しうる治療法が普及しており、前向きの自然歴調査を全国規模で行う必要がある。さらに、本邦では、諸外国に比べ人工呼吸器管理下の症例の比率が多いことが特徴とされており、平成 13、14 年度の特定疾患申請書類からの類推では全症例の 30% に及ぶと推定される。人工呼吸器装着症例の臨床像の変化と予後を知ることは、患者とその家族に十分な情報を提供する上で、また適切な政策医療を行う上できわめて重要であるが、人工呼吸器装着例の自然歴に関する全国調査は行われていない。

これまで行われた本邦の後ろ向きの調査では、ALS の臨床病型を通常型、下肢型、球麻痺型の 3 型に分類した場合、球麻痺型の予後が不良であることが指摘されている。しかし、この 3 型に分類されない ALS も少なくない。また、大脳病変や自律神経病変など、多系統に病変を認める症例の存在することも明らかにされており、病初期より ALS の病像を拡大して、病型を前向きに把握する必要がある。また進行速度や予後に影響を与える因子について、病型以外にも探索する必要がある。

一方、予後や疾患の進行を変えうる新規治療法を開発するためには、自然歴を修飾しうる病態関連遺伝子を見付け、その働きを調べていくアプローチもきわめて重要である。その実施のためには、1000 例単位の遺伝子と臨床情報が組み合わされたサンプルが必要である。日本全国で ALS の新規発症は 1000～1500 人程度、患者数は 5000～6000 人程度であるため、必然的に全国規模のサンプル収集を行わなくては必要な数を収集できない。収集したサンプルは今後の ALS 研究進展のための、極めて貴重な財産となる。

以上の背景をもとに、神経変性疾患に関する調査研究班（班長 葛原茂樹）および厚生労働省精神・神経疾患研究委託費による研究班（班長 湯浅龍彦）関連施設において症例の収集を行い、遺伝子解析研究を神経変性班施設および東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターにおいて進めるプロジェクトを計画した。

所定の研究期間が終了したのち、検体を臨床情報とともに連結不可能匿名化したうえで

神経変性班が創設する ALS バンクにて保存し、さらなる研究進展のための資源とする予定である。

1. 2. 目的

- ① ALS の自然歴を前向きに明らかにする。永続的な人工呼吸器装着後の症例の予後と実態についても検討する。
- ② 予後と進行に影響を及ぼす臨床的な因子を明らかにする。
- ③ 予後と進行に影響を及ぼす遺伝的な因子を明らかにする。
- ④ 発症に関与する因子を明らかにする。
- ⑤ ALS の臨床・遺伝情報を統合したバンクをつくる。

2. 対象患者選択基準

患者登録期間内に、研究参加施設において神経内科医が ALS と診断し、本人に告知した患者。患者が痴呆を伴う場合、本人および代諾者に告知した患者。現在存命であれば、新規に診断された例、過去に診断された例ともに対象とする。

3. 研究デザイン

多施設共同で遺伝子と臨床情報を収集するコホート研究。選択基準を満たし、文書によるインフォームド・コンセントが得られた患者を対象に、最長5年間の観察と検査を実施する。

4. 倫理的配慮

4. 1. 本研究の実施に際しての倫理的配慮

4. 1. 1. ヘルシンキ宣言及び倫理指針の遵守と倫理委員会における審査

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、ヘルシンキ宣言（資料1参照）に基づく倫理原則を遵守して実施する。

患者を組み入れる前に、同意説明文書を含む研究計画書について、各施設の倫理審査委員会から文書による承認を得る。

4. 1. 2. 参加者のプライバシー保護

患者への同意説明文書には、患者情報は連結可能匿名化され、研究者により厳重に保護されること、研究実施者または各研究施設の倫理審査委員会の承認した者が、データの検証の為に、既往歴を含んだ本研究に関連するカルテ等の一部を直接閲覧することがある旨説明される。患者の特定には、症例番号のみが用いられ、患者情報の機密は保持される。