

ALS の死因に関する 2004 年アンケート調査結果
- 湯浅班 ALS の死因に関する調査研究グループからの報告 -

田中正美¹⁾, 土井静樹²⁾, 亀谷 剛³⁾, 溝口功一⁴⁾,
饗場郁子⁵⁾, 舟川 格⁶⁾, 石田 玄⁷⁾, 乾俊夫⁸⁾,
信國圭吾⁹⁾, 松尾秀徳¹⁰⁾, 塩屋敬一¹¹⁾, 湯浅龍彦¹²⁾

- 1) 国立病院機構 (NHO) 西新潟中央, 2) 同 札幌南病院, 3) 同 山形病院,
4) 同 静岡神経医療センター, 5) 同 東名古屋病院, 6) 同 兵庫中央病院,
7) 同 松江病院, 8) 同 徳島病院, 9) 同 南岡山医療センター,
10) 同 長崎神経医療センター, 11) 同 宮崎東病院,
12) 国立精神・神経センター国府台病院神経内科

研究主旨: 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) で気管切開を伴う侵襲的人工換気 (TPPV) を施行した場合でも天寿を全うできないことはすでに報告されているが、死因については解ってはいない。そこで、TPPV、非侵襲的人工換気 (NPPV)、全く人工換気を行わなかった患者で調査し、気管食道分離術が未だに十分に普及していない状況下での死因について明らかにする。さらに、自律神経機能異常によると思われる突然死が稀に起こりうる事が判っているので、その頻度を明らかにすることを目的に、国立病院機構内 11 施設が参加して調査を行った。

はじめに

人工呼吸器を装着する筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者が次第に増加しているが、人工呼吸器装着後の ALS 患者の死因がどうなっているかについてはまとまった検討がなされていない。田中らは 8 年間に亡くなった自験 19 名の ALS 患者の死因を調べ、呼吸不全が 13 名、肺炎が 4 名、肺塞栓と突然の心停止が各 1 名いたことを報告した¹⁾。そこで、気管食道分離術が十分に普及していない現状での死因について、全国調査をすることとなった。より多くの患者を対象として、呼吸器装着の有無による死因の相違について明らかにすること、自律神経障害が関与したと考えられる突然死例はすでに報告があるが、田中らの調査でも判明したため、その頻度を調査する目的で、国立病院機構内 11 施設の共同研究として、2000 年から 2004 年までに死亡した 144 例の

死因調査を実施したのでその結果を報告する。

対象と方法

全国の国立病院機構 (NHO) 11 施設の参加を得た。プライバシーに配慮し、代表施設である国立西新潟中央病院で倫理委員会の了承を得、更に可能な場合は参加施設毎にも倫理委員会の了承を得た。調査用紙はインターネットで配布し、回収は郵便で国立西新潟中央病院に集めて解析した。死因は主治医の判断によることとし、あくまでも臨床的な推測である。平均値の差の検定は、Welch's t-test で行った。

結果

2000 年から 2003 年の間に死亡した ALS 患者 144 名を対象とした。これらの患者は全て病院内での死亡患者で、自宅で死亡した患者はいなかった。また、気管食道分離術施行例はいなかった。回路漏れや機械のトラブルなど人工呼吸器が直接死亡に関

与したと考えられる患者は、この期間、これらの施設にはいなかった。

ALS患者全体では40から83歳(66.6±9.7歳)で発病から死亡までの経過は57.3±42.8ヶ月で、男性は82名(66.0±9.3; 40-80歳)、女性は61名(67.7±10.3; 40-83歳)で(性別不詳が1名)、経過はそれぞれ65.2±47.8; 6-229ヶ月と45.8±31.9; 8-148ヶ月と罹病期間に性差が認められた(p<0.005)。

呼吸器装着(侵襲的人工換気: TPPV)の有無による罹病期間についても検討を行った。非装着例(85例)では(41.5±26.7; 6-135ヶ月)で、気管切開を伴う人工呼吸器装着例(48例)では(88.0±51.7; 12-229ヶ月)であった。TPPV装着して年齢や装着後の生存期間を検討できたのが男性34例、女性11例で、装着時の年齢はそれぞれ64.1±8.1と66.3±10.2歳であった。装着時の年齢でその後の生存期間に差がないかどうかについて男女を含めて検討した。59歳以下(13例)の装着後の生存期間は67.2±55.8ヶ月(2週間から189ヶ月)、60から69歳(17例)では59.2±45.5(1から180ヶ月)、70歳以上(14例)では32.6±24.5(18日から72ヶ月)であった。59歳以下と60-69歳群とでは有意差はないが(p>0.67)、59歳以下と70歳以上群とでは高齢者の方が短い傾向があり(p<0.057)、60-69歳と70歳以上群とでは高齢者群でより短い傾向が認められた(p<0.049)。

NPPV(非侵襲的人工換気)を装着(装着期間は7.81±12.1; 3日-38ヶ月)して死亡したのは11例(男7例、女4例)に留まり、生存期間は40.6±26.5; 9-96ヶ月で人工呼吸器非装着例と変わりがなかった。

死因の中で最も多いのはALSによる呼吸不全によるもので、77例あってNPPV装着を含む呼吸器非装着例であった(非装着例のうちの80.2%)。これに次いで多かったのが肺炎(22例)であった。呼吸器非装着例の死因の第2位は肺炎の7例、次いで敗血症、悪性腫瘍、突然の心停止の各2例であった。呼吸器装着例では肺炎(VAP)が多く15例(31.3%)、次いで多臓器不全の7例、腎不全4例、肺以外の感染症3名、敗血症3名、悪性腫瘍2名、心筋梗塞2名、脳血管障害2名などであった。NPPV例での死因は、呼吸不全が8例、肺炎が3例であった。

突然死が21例(14.6%)で認められた。原因としては、痰詰まり9例、原因不明の心停止9例、肺梗塞の疑い2例、気管内出血1例であった。突然の心停止をきたした9例(6.3%)の罹病期間は(68.4±

39.5; 13-121ヶ月)で、うち5例は人工呼吸器装着例で、やや呼吸器装着例に目立った。突然の心停止に自律神経が関与している可能性についても検討し、突然死した患者の中の5例に以下が認められた。1例で160から170の頻脈が出現し、薬剤や頸動脈洞刺激に反応しなかった。2例で脈拍数の変動、2例で血圧変動があり、うち1例では低血圧、意識消失発作が認められた。他に、直接死因には直結しなかったが、死亡3ヶ月前に、200/分の上室性頻脈があって、薬剤や除細動で効果がなく、半日後に自然に改善したエピソードもあった。

考 察

発病から死亡までの罹病期間に性差が認められたが、これは呼吸器装着例が男性34名、女性14名と差があることによるものと考えられる。また、この性差は、ALS患者数自体の差(約4:3)より大きいことから、家庭内で誰が介護を担っているか、あるいは介護負担への遠慮などの要因が存在することを示唆しているように思われ、TPPV施行時に現行の介護福祉制度上の問題があることを示唆している。

死亡例のみを対象とした今回の調査で、TPPVをすることにより4年間生存期間が延長することが判明し、呼吸器を装着すると5年間生存期間が延長する、という従来の結果²⁾と類似している。また、神経変性疾患調査研究班の540例を対象とした、呼吸器管理を行わなかった342例の生存期間は35.8±31.1ヶ月で、呼吸器管理を行った198例では49.1±37.2ヶ月という結果³⁾に比して、はるかに良好であった。この相違は不明である。

呼吸困難時のALS患者への対策として、欧米で主流であるNPPV装着患者の罹病期間は、今回の結果では呼吸器非装着患者と変わらなかった。TPPVを装着しない限り生存期間の延長の可能性が低い現実を物語っている。NPPVはALSの自然経過に影響しないという報告がある一方で、NPPVと機械的排痰介助を併用することで、気管切開を回避して1年以上生存期間を延長できるという報告があり、排痰を介助する機械が広範に導入されれば、NPPVでも生存期間の延長を計れる可能性はある。NPPVは気管切開をしないので、導入する際には気楽に装着できるが、本シリーズのように球症状出現時にむしろTPPVへ移行しないことが多く、球症状出現時にさまざまな問題を提起する可能性がある。球症状が出現すると唾液を押し込み、呼吸困難期間をいたずらに長くする危険性もあるので、NPPVはTPPVを前提として考えるべきものであろう。TPPV例では認められなかった呼吸不全での死亡が

NPPVでは8割を占めたことは、この辺りの状況を物語っていると考えられる。

ALSの自律神経障害、特に血漿エピネフリン値や血行力学的検査などから sympathetic hyperactivityが古くから認められており、病理学的には脊髄中間質外側核の細胞数の減少を認めたという報告もあるが、脊髄病変を否定し、扁桃核や基底核外側核、外側視床下部病変との可能性を示唆している報告もあって、sympathetic hyperactivityの責任病変は同定されていない。本症の突然死に自律神経障害が関与している可能性についてはすでに指摘されていて、清水らは人工呼吸器を装着した23例のうち原因不明の突然の心停止で6例が死亡したことを報告した。私たちのシリーズと同様に、清水らの患者でも著明な血圧と脈拍の変動が8例で認められ、うち2例が突然死しており、塩酸タムスロンシンが本症の sympathetic hyperactivity、特に血漿ノルエピネフリン値を低下させ、血圧の昼夜の格差を改善する効果があることを報告している。また、浅井らは人工呼吸器非装着の20剖検例のうち、2例で原因不明の突然死があり、この2例を含む6例で終末期に心電図のQTc時間の延長が認められ、これは交感神経低下状態を意味しているので突然死との関連が示唆される、と報告した。このことは、突然死をきたすALS患者では一般の sympathetic hyperactivityを伴う病態とは異なり、脊髄中間質外側核の細胞数の減少やMIBGでの取り込み低下(評価には慎重を要する検査ではあるけれども)と関連した交感神経機能低下を呈しうようになる病態が存在するのかもしれない。

まとめ

ALSでは人工呼吸器を装着しない場合、肺炎で死亡する前に呼吸不全でほとんどが亡くなること、人工呼吸器を装着しても4-5年しか生存期間を延長できないこと、食道と気管を離断する手術をしない限り肺炎(VAP)が死因に直結すること、多臓器不全の詳細は不明であるが、肝・腎不全の5例を含めると12例(25%)もが内臓器機能不全で死亡していることは長期間の医療で限界まで頑張っている姿が想像されること、NPPVを装着しても生存期間の延長には寄与せず、むしろ7割が呼吸不全で死亡すること、痰詰まりも含めて21例(14.6%)で突然死があり得ること、6.3%では突然に心停止が起こりうること、この心停止に自律神経が関与しているかもしれないこと、が明らかとなり、患者や家族に疾患を説明する上で参考となる資料になると考えられる。また、今後、ALS医療を考える上でも貴重な

資料であると考えられた。

文献

- 1) 田中正美ら：神経内科, 61:311-2, 2004.
- 2) 佐藤 猛ら：Clinical Neurosci, 16:935-8, 1998.
- 3) 桃井浩樹ら：神経進歩, 48:133-44, 2004.

筋萎縮性側索硬化症の発症関連要因に関する疫学的検討—第1報—

分担研究者：近藤 智善（和歌山医科大学神経内科学教授）

研究協力者： 紀平為子¹、浜喜和¹、三輪英人¹、岡本和士²

所属：1 和歌山県立医科大学神経内科 2 愛知県立看護大学疫学

研究趣旨 我々は昨年度本班会議で和歌山県南部において、女性の ALS 調整発症率の減少、男性での高値持続、および発症年齢の高齢化を認め報告した。これらの結果から ALS 発症への生活環境要因の関与が示唆されたため、本年度は ALS 発症関連要因の解明を目的として、職業と既往歴に関する疫学的検索を行った。和歌山県内 ALS 患者 121 例と和歌山県立医科大学神経内科の 40 歳以上の入院患者 197 例を対照とし、特に脊椎疾患の既往・手術歴、発症時職業を調査した。頸腰椎症を有する ALS 患者は 40 例 (33.1%)、脊椎疾患に対する手術既往を有する ALS 患者は 14 例 (11.6%) であった。これは、それぞれ対照の 43 例 (21.8%)、対照 8 例 (4.1%) に比し有意に多かった ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。発症時職業の調査では ALS の男性では鉄鋼、自動車・運送、建設・土木・造園関係などの第二次産業への就業者が対照に比べ有意に多かった ($p < 0.01$)。本研究で、化学物質の暴露や過剰で継続的な筋活動と関連する職種および頸腰椎疾患の既往が ALS 発症に関連する可能性が推察された。これら要因と ALS 発症との関連は今後さらに症例を集積して検討する必要がある。

はじめに

和歌山県では 1960 年代以来 ALS の高発症率が示されてきた。特に本県南部地域では世界の発症率の 100-150 倍の高値が示された。その後 1980 年代の調査では、Guam 島での ALS 減少と同様に和歌山県でも発症率の低下が示された。しかし 1993 年以降、本県南部において新たな ALS 症例が診断されたことから、年齢調整した発症率の検討が必要と考えられた。我々は 1998 年以降の和歌山県の ALS 調査を行い、和歌山県南部において女性の ALS 調整発症率の減少、男性での高値持続、および発症年齢の高齢化を認め平成 15 年度本班会議で報告した。これらの結果は ALS 発症に何らかの生活環境要因の関与を示唆するものと考えた。本年度は ALS 発症関連要因の解明を目的として、職業と既往歴に関する疫学的検索を行った。

対象および方法

ALS 患者に関する郵送法によるアンケート調査を県内全医療機関に 2002 年から 2004 年までに 4 回、県内全訪問看護ステーションに 2004 年に 1 回実施した。回答を得た機関にはさらに主治医への聴き取り調査、カルテ参照、訪問看護師へ聴き取り調査を実施した。ALS 患者情報として特に脊椎疾患の既往・手術歴、骨折・外傷、発症時職業を調査した。対照は、和歌山県立医科大学神経内科に 1999 年度と 2000 年度に入院した 40 歳以上の全患者 197 例とした。

結果

アンケート調査による MND 回答数は 252 例、このうち聴き取り調査あるいはカルテ参照可能であった ALS 例は 206 例 (男女比 1.42 : 1) であった (表 1)。対照例は、パーキンソン病およびパーキンソン病関

連疾患が 32.5%と最も多く、次いで脳血管障害 17.8%、筋疾患 8.1%、末梢神経障害 7.6%、感染性・炎症性疾患 7.6%、脊髄疾患 6.6%、脊髄小脳変性症・多系統萎縮症その他の変性疾患 5.6%、内科疾患に伴う神経障害などその他 13.7%であった。

既往歴の調査は、カルテ参照あるいは主治医や看護師からの聞き取り調査により既往歴が確認された ALS 121 例、対照 197 例で検討した。頸腰椎症の既往を有する患者は ALS で 40 例 (33.1%)、神経疾患対照では 43 例 (21.8%) であり、ALS において有意に高値を認めた ($p < 0.02$, odds ratio 1.70, 95% CI 1.07-3.03)。脊椎疾患に対して手術治療を施行された患者は ALS 14 例 (11.6%)、対照 8 例 (4.1%) と ALS において有意に多かった ($p < 0.01$, odds ratio 3.09, 95% CI 1.2-7.5)。骨折の既往歴では有意差を認めなかった (表 2)。臨床症状や画像所見から典型的な頸椎症性脊髄症あるいは脊椎管狭窄症と診断され手術治療を勧められたが、後に ALS の診断がなされ手術未施行例が 8 例 (脊椎疾患を有する ALS の 20%) 認められた。

次に、発症時の職業の分類は便宜上 1: 農・林・漁業関係、2: 鉄鋼・機械・化学関係、3: 自動車・運送・鉄道関係、4: 建設・土木・造園関係、5: 公務員・会社員・商業などの事務関係、6: 主婦・無職・その他とした。

発症時の職業について ALS 206 例、神経疾患対照 197 例において検討した。ALS 男性では農・林・漁業従事者が 14.9%、鉄鋼・化学・機械関係が 11.6%、自動車・運送・鉄道関係が 10.7%で、これらをあわせると対照に比べ有意に多かった ($p < 0.0001$, Odds

ration 3.95, 95% CI 2.00-7.87). 女性においても対照に比べ上記第二次産業従事者が ALS で多かった (表 3). ALS 患者の発症時職業を和歌山県 15 歳以上の全就業者 (2000 年の県就業者総数 499,157、男性 291,858 人、女性 207,299 人) の職業と比較すると、ALS において第一次および二次産業従事者が有意に多く認められた (図 1).

考察

ALS と頸椎症性髄症などの脊椎疾患の合併は従来から指摘されているが、ALS の発症関連要因かどうかは尚明らかではない。脊椎疾患と ALS の初期症状の鑑別についても手術適応を含め重要な問題となっている。本研究では ALS の発症と予後に関連する要因を検索する目的で既往歴と発症時職業を検索したが、脊椎症の既往歴が ALS で有意に高く、また職業では第二次産業従事者が有意に多かった。Yamada ら¹は 63 例の ALS 患者につき頸椎症などの脊髄疾患の合併及び手術施行歴を調査し、30 例 (48%) に cervical spondylosis (CS)、7 例 (13%) に lumbar spondylosis (LS) を認め、7.9% の ALS 例が初期に脊椎疾患に対し手術施行されたと報告した。Rowland LP ら²によると初期に椎弓切除術を施行された ALS 例は 5% であった。これに比べ本研究では頸腰椎症の合併率は 33.1% とやや少ないが、手術施行例は 11.6% と高い値であった。Marija Sostarko ら³は disc protrusion/prolapse を合併し手術治療が施行された 7 例の ALS を提示し、5 例は手術後 12-15 ヶ月で死亡し、予後は一般の ALS より短い可能性を指摘した。本研究では脊椎疾患につき手術治療を勧められたが未施行のまま ALS の診断がなされた例が 8 例認められ、今後その予後につき手術施行例と比較し検討する必要がある。脊椎疾患が ALS の発症あるいは予後にどのように関連するか今後さらに検討を要するが、感覚障害を呈し典型的な脊椎疾患が考えられる場合でも初期には慎重に ALS の鑑別が必要と考えられた。

次に身体の過重労働や運動が ALS 発症の関連要因かどうかについても論議されている。本研究では発症時に鉄鋼関係や自動車・運送関係、造園建設関係の職業に就いている割合が ALS で有意に高く、また和歌山県での全就業者の職業との比較でも ALS で第一次および第二次産業従事者が有意に多く認められた。職業や生活習慣と ALS の関連についての報告では、ALS ではスポーツなど身体の激しい運動を日常的に行う習慣が有意に高いとの報告⁴、農業従事者に多いなどの報告⁵がなされた。しかし過剰な身体運動が ALS 発症に関連するかは明らかではない。過剰で継続的な運動神経への興奮刺激が興奮性アミノ酸グルタミン酸過剰分泌に関連する可能性やフリーラジカル産生増加の可能性も考えられ、今後さらに身体の激しい運動や職業と ALS の関連につき前向きにも調査する必要がある。

まとめ

本研究では、頸腰椎疾患の既往および手術歴、さらに化学物質への暴露や過剰で継続的な筋活動に関連する職種への就業が ALS 発症に関連する可能性が推察された。これら要因と ALS 発症との関連は今後

さらに症例を集積して検討する必要があると考えた。
表 1 対照

アンケート調査によるMND回答数:	252例
聴取り/カルテ参照可能であったALS:	206例
発症時の既往歴調査可能であったALS:	121例
疾患対照:	197例
(H11・12年に当科に入院した40歳以上の全患者)	

表 2 対照症例の基本的属性

	ALS	Neurological control
Sex Male	121 (58.7%)	104 (52.8%)
Female	85 (41.3%)	93 (47.2%)
Age at onset	63.4±11.0	62.5±10.4
Family history	24 (11.6%)	
Past history		
CS/LS/CSM (+)	40/121 (33.1%)	43/197 (21.8%)
Operation for CS	14/121 (11.6%)	8/197 (4.1%)
Fracture	21/121 (19.6%)	24/197 (12.2%)

表 3 ALS と神経疾患対照における発症時の職業

	Odds ratio (性・年齢調整後)	95% CI	p
職種(2,3,4)	3.95	2.00-7.87	0.0001
脊椎疾患	1.80	1.07-3.03	0.03
脊椎疾患手術	3.00	1.20-7.50	0.02
骨折	1.32	0.69-2.55	0.41

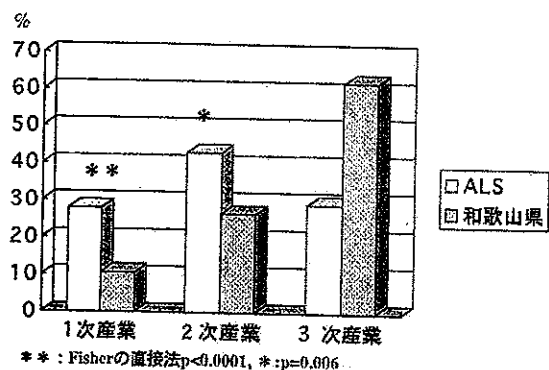


図 1 ALS 発症時職業と和歌山県全就労者の職業の比較

文献

- 1: Yamada M, et al.: J Orthop Sci 8:878-881, 2003
- 2: Rowland LP: J Neurol Sci 160: S6-S24, 1998
- 3: Sostarko M, et al.: J Neurol Sci 106: S42-S46, 1998
- 4: Scarmeas N, et al.: Neurology 59: 773-775, 2002
- 5: Mandrioli J, et al.: Neurology 60: 683-689, 2003

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン痴呆複合 に出現する Pigmentary retinopathy

小久保康昌¹⁾、伊藤邦生²⁾、葛原茂樹¹⁾
三重大学神経内科¹⁾、三重大学眼科²⁾

研究要旨 我々は、紀伊半島多発地域の Kii ALS とパーキンソン痴呆複合 (Kii PDC) に、特異な網膜症である pigmentary retinopathy が出現することを、2003 年に報告した。今回 Kii ALS/PDC 患者および多発地区在住の非罹患者における pigmentary retinopathy の頻度について調査した。対象は、Kii ALS 5 例と Kii PDC 7 例 (男性 7 例、女性 5 例、平均年齢 64.3 歳) および、多発地区在住の非罹患者 115 名 (男性 51 例、女性 64 例、平均年齢 64.7 歳)。方法は、眼底鏡と眼底写真を用いて retinopathy の有無について検討した。眼底所見の判定は眼科医がおこなった。Kii ALS/PDC では、ALS 5 例中 2 例と PDC 7 例中 2 例の合計 12 例中 4 例 (33.3%) に、非罹患者では 115 名中 1 例 (0.9%) に pigmentary retinopathy を認めた。pigmentary retinopathy は紀伊半島の多発地区一般住民にはほとんどみられなかったことから、ALS/PDC の病因に深く関わっていることが推察された。

はじめに

我々は紀伊半島多発地域の Kii ALS とパーキンソン痴呆複合 (Kii PDC) には、特異な網膜症である pigmentary retinopathy が出現することを、2003 年に報告した。¹⁾ 今回、Kii ALS/PDC 患者および多発地区在住の非罹患者における pigmentary retinopathy の頻度について調査した。

対象および方法

対象は、Kii ALS 5 例と Kii PDC 7 例 (男性 7 例、女性 5 例、平均年齢 64.3 歳) と、多発地区在住で住民検診を受診した非罹患者 115 名 (男性 51 例、女性 64 例、平均年齢 64.7 歳) である。年代別の内訳は、20 歳台 2 人、30 歳

台 2 人、40 歳台 4 人、50 歳台 22 人、60 歳台 42 人、70 歳台 35 人、80 歳台 8 人であった。

方法は、眼底鏡と眼底写真を用いて retinopathy の有無について検討した。眼底所見の判定は眼科医がおこなった。115 名の非罹患者については、神経学的診察を行い、異常がないことを確認した。

結果 (表 1) (図 1)

Kii ALS 5 例中 2 例と Kii PDC 7 例中 2 例、合計 12 例中 4 例、33.3% に、pigmentary retinopathy を認めた。また、非罹患者 115 名中 1 例 (0.9%) に pigmentary retinopathy

を認めた。この1例は、65歳の女性で、近隣地区からの移住者で、ALS/PDC の家族歴はなかった。

考察

pigmentary retinopathy は、グアム島の ALS/PDC 患者にのみ出現する特異な網膜症である。²⁾³⁾ pigmentary retinopathy は、当初その眼底所見の特徴からハエ幼虫感染症である ophthalmomyiasis と考えられたが、網膜の病理学的検索の結果ハエ幼虫は確認されず、ophthalmomyiasis とは異なる原因不明の網膜症とされている。⁴⁾ Guam 島では、ALS/PDC 患者の 53.1%、非罹患 Chamorro 人の 16.2% に pigmentary retinopathy が認められている²⁾⁵⁾。

我々は、2003 年に紀伊半島の ALS/PDC 患者に、pigmentary retinopathy と考えられる網膜症を認め、報告した。¹⁾

今回、紀伊半島の ALS/PDC 患者における pigmentary retinopathy の頻度と非罹患一般住民における出現率を明らかにするために調査を行った。今回の結果から、紀伊半島では、pigmentary retinopathy は、ALS/PDC 患者の 1/3 に認められるのに対し、一般住民にはほとんどみられないことがわかった。pigmentary retinopathy は、

ALS/PDC の病因に深く関わっていることが推察された。

文献

- 1) Kokubo Y, et al: Neurology 60:1725-1726, 2003
- 2) Cox, et al: Ophthalmology 96:1731-1735, 1989
- 3) Hira, et al: JAOA 68:452-458, 1997
- 4) Campbell, et al: Ophthalmology 100:37-42, 1993
- 5) Hanlon, et al: Optometry & vision science 70:854-859, 1993

図の説明

図 1. Kii ALS/PDC に認められた pigmentary retinopathy。

表 1. Kii ALS/PDC 12 例の臨床像。

図 1

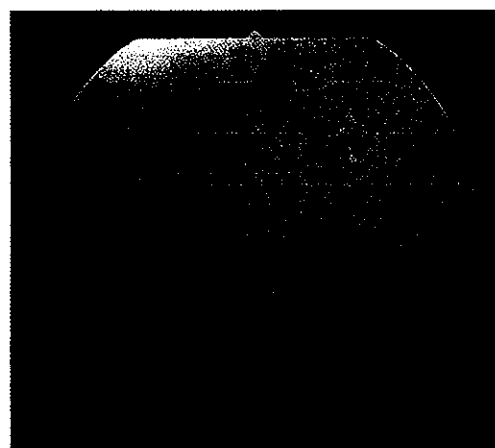


表 1

	Age	Sex	Duration of the illness	Motor neuron signs	Dementia	Parkinsonism
Kii ALS #1	66 y	Female	5y5m	MA (limbs), PTS	None	None
Kii ALS #2	64 y	Male	2y	BP, MA (upper limbs), PTS	None	None
Kii ALS #3	63 y	Female	4 y	BP, MA, PTS	None	None
Kii ALS #4	62 y	Male	2 y	BP, MA (limbs&respiratory muscle), PTS	MD, DO	None
Kii ALS #5	52 y	Male	1 y	MA (limbs), PTS	None	None
Kii PDC #1	63 y	Female	2y7m	MA (small hand muscles)	MD, DO	Rgt, BK, GD
Kii PDC #2	72 y	Female	13 y	MA (limbs), PTS	MD, DO, Hypb	Rgt, BK, GD
Kii PDC #3	64 y	Female	7 y	MA (limbs), PTS	MD, DO, Hypb	Rgt, BK
Kii PDC #4	64 y	Male	4y6m	MA (small hand muscles), PTS	MD	Rgt, BK, GD
Kii PDC #5	72 y	Male	7 y6m	MA (upper limbs), PTS	MD, DO, Hypb	Rgt, BK
Kii PDC #6	52 y	Male	unknown	None	MD, DO, Psy	Rgt, BK
Kii PDC #7	76 y	Male	7 y6m	MA (limbs)	MD, DO, Hypb	Rgt, BK

BP; bulbar palsy, MA; muscle atrophy, PTS; pyramidal tract signs, MD; memory disturbance, DO; disorientation, Hypb; hypobulia, AM; akinetic mutism, Psy; psychiatric symptom, Rgt; rigidity, BK; bradykinesia, GD; gait disturbance
y; year(s), m; months

Familial frontotemporal dementia with motor neuron disease の 1 家系

伊藤伸朗¹⁾、松浦慶太¹⁾、成田有吾¹⁾、葛原茂樹¹⁾

1)三重大学医学部神経内科

研究趣旨：若年発症の家族性の運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型痴呆(FTD)の 1 家系の 3 例を報告した。父親は 39 歳時(1973 年)に手の筋力低下で発症した古典的 ALS で 42 歳時に他病で死亡。長女(45 歳)は 27 歳時に無頓着さなど精神症状から発症した、非常に緩徐な進行の FTD を伴う ALS。長男(42 歳)は 30 歳時発症の、姉よりも高度の FTD 症状と、上位運動ニューロン障害優位の軽度の ALS 症状を示す。遺伝子異常は現時点で不明。本家系の研究は、ALS、FTD、また近年注目されるユビキチン陽性封入体関連疾患の病態研究に新しい示唆を与える可能性がある。

はじめに

近年、前頭側頭型痴呆(FTD)の臨床症状を呈する遺伝子変異、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を来す遺伝子変異が複数みだされ、これらの疾患の病態解明と治療への展開が期待されている。また、FTD と ALS には臨床所見および病理学的にオーバーラップした症例および疾患?痴呆をともなう筋萎縮性側索硬化症(ALS with dementia)を prototype とする motor neuron disease inclusion dementia と呼ばれる疾患群、frontotemporal dementia with motor neuron disease linked to chromosome 17(FTDP-17)などが知られており、また、第 9 染色体短腕に link する ALS with dementia 家系も報告されている。しかし、現時点では ALS、FTD、また、それらの類縁疾患の原因および病態については、孤発性、家族性ともに未知のものが多い。

今回、我々は特異な臨床的特徴をもつ家族性の運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型痴呆の 1 家系の 3 例を報告した。

症例

家系図を図 1 に示す。症例 1 の親世代業時に不自由を感じるようになった。

42 歳時、上肢筋力低下の進行と下肢のつっぱり感のために当院内科に精査入院した。入院時神経所見は、遠位優位の四肢筋力低下(徒手筋力検査(MMT)で上下肢の近位筋 4+、遠位筋 4-程度)と筋萎縮、舌の萎縮、構音障害、四肢深部腱反射亢進があり、針筋電図検査で四肢筋、舌筋に脱神経所見を認め ALS と診断された。知能および精神症状については精査されていないが、社会生活上の問題はなかった。退院 1 ヶ月後に上部消化管出血により急死した。剖検は行われなかった。

症例 2:症例 1 の長女。生来健康で商業高校卒。23 歳で結婚、24 歳で女兒を出産。27 歳頃から物忘れが目立つようになり、30 歳頃から身だしなみの無頓着さがみられていた。33

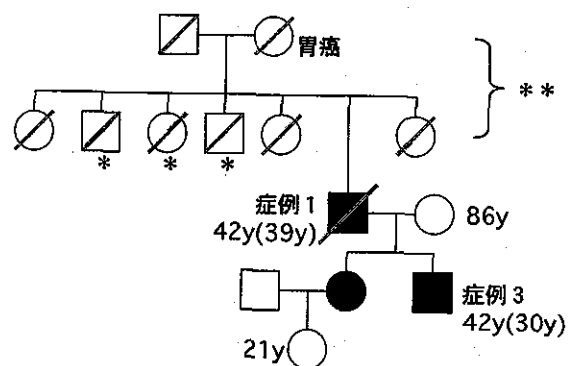


図 1.家系図

*:戦争で死亡 **:神経疾患について不明

歳頃から歩行時の息切れがあり、また、尿便失禁がときどきみられていた。35 歳時に突然の意識障害で当科に緊急入院。高度の呼吸筋力低下による CO₂ ナルコーシスであった。四肢の遠位優位の筋力低下、筋萎縮と深部腱反射亢進の ALS 症状に加え、病識の少なさ、軽度の脱抑制性などの精神症状も認められた。気管切開で呼吸状態が改善し自発呼吸で退院。以後 10 年間、独歩で生活し、買い物や料理などの際に部分的に介助が必要であったが排泄、食事摂取は独力で可能であった。2004 年、45 歳時に四肢筋力低下が進行し、つたい歩き不可能となったため再入院した。2004 年の入院時所見は、胸腹部に聴診、触診上の異常所見なし。全身のやせが高度にみられた。気管切開孔を指で押えて発声。内容は単調で同じ単語、フレーズの繰り返しが多かった。病識はやや乏しかったが、問題行動はみられなかった。顔面筋力は軽度低下。舌萎縮、線維束攣縮を高度に認めたが、嚥下障害は軽度で、きざみ食をむせることなく摂取可能であった。遠位優位の筋力低下(MMT で上下肢の近位筋

4、遠位筋 3 程度、頸筋 3)、萎縮がみられた。両手指は鷲手様に変形拘縮、アキレス腱は両側で軽度短縮していた。四肢の深部腱反射亢進を認め、ankle clonus を認めた。Babinski 徴候、Chaddock 反射は両側陰性。筋トーンスは正常範囲。独歩、つたい歩きは不可能だが、上体を支えて介助すればなんとか歩行できた。画像検査は、MRI で軽度の前頭葉、側頭葉萎縮を認め、脳血流シンチでも同部の血流低下がみられた。その他の検査では、髄液 tau 蛋白濃度は 220pg/ml (正常範囲)。動脈血液ガスでは PO₂ 86.5%、PCO₂ 60.5%と換気低下がみられた。体性感覚誘発電位は正常。高次機能検査は発語困難、書字不可能のため一部しか行えなかったが、軽度の記銘力低下、保続がある軽度の痴呆であり、10 年前と比較して精神症状は軽度に進行していた。apoE 遺伝子多型は E3/3 であった。

症例 3：症例 2 の弟。生来健康で商業高校卒。30 歳時に工業機械の塗装の仕事についてゆけなくなり退社。周囲には怠け癖がひどくなったとみられていた。他の単純作業に就くも、内容がわからないため仕事にならず続けれなかった。以後、自宅で生活し、日中はテレビを見るなどで無為に過ごしていた。幼児程度の理解、判断能力であり、簡単な家事手伝いくらいしかできず、留守番も出来なかった。おとなしく問題行動はみられていない。結婚歴なし。2004 年、42 歳時に当科に精査入院した。

2004 年の入院時の一般身体所見は問題なし。脱抑制的で落ち着きなく、軽度の常同行為があった。多幸的で病識は極めて乏しかった。脳神経系では軽度の注視方向性眼振を認めた。構音障害は軽度で、嚥下障害なし。舌辺縁部にわずかな萎縮と筋線維束攣縮を認めた。四肢筋力は正常であったが、両側の前腕-手に軽度の筋萎縮を認めた。筋線維束攣縮なし。下肢優位の四肢深部腱反射亢進を認め、ankle clonus を認めた。Babinski 徴候、Chaddock 反射は両側陽性。上下肢でわずかな小脳性失調所見を認めた。歩行は軽度の痙性歩行で、継ぎ足歩行はやや不安定であった。

MRI 検査では症例 2 よりも明らかな前頭葉、側頭葉萎縮、脳血流シンチでも高度の大脳前半部の血流低下を認めた (図 2)。髄液 tau 蛋白濃度は 460pg/ml (軽度高値)。針筋電図検査で舌、前腕筋で神経原性変化を認めた。MMSE は 23/30 点。WAIS-R は performance IQ 51、verbal IQ 53、Total IQ が 63。記銘力低下、保続を認め、前頭葉機能低下が主体の、症例 2 と同質ながらより高度の知能低下を認めた。ApoE 遺伝子多型は E3/3。

考察

本家系の臨床的特徴は、1) 優性遺伝性が考えられること、2) 27-37 歳と若年発症であるこ

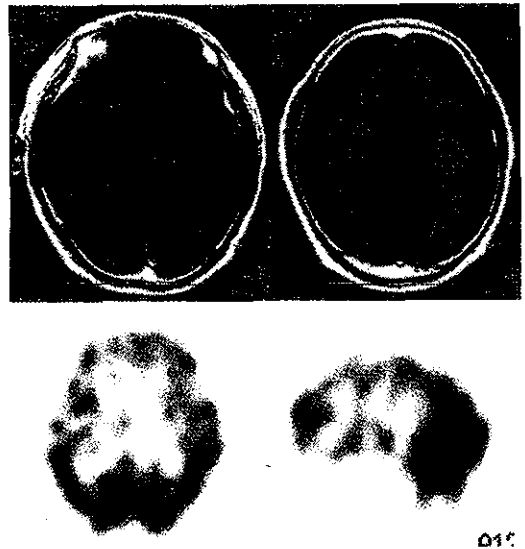


図 2. 症例 3 の MRI T1 強調画像 (上段) と脳血流シンチ画像 (下段)

前頭葉、側頭葉に目立つ大脳萎縮、脳室拡大と、前頭葉、側頭葉、頭頂葉に高度の血流低下を認める

と、3) FTD 症状、MND 症状とも比較的軽症できわめて進行が遅いこと、4) 前景に立つ症状が各例で異なることであった。症例 1 は古典的 ALS 症状を示しており、症状が進行する以前に他疾患で死亡しているが痴呆症状はみられなかったようである。症例 2 は FTD 症状が先行したがごく軽症で経過しており、最近の 10 年間では四肢体幹の下位運動ニューロン (LMN) 症状が中心症状となっている。気管切開後、10 年以上にわたって自分で気管切開孔からの吸痰や経口食事摂取が可能で、ほぼ自活できているという特異な経過をとっている。症例 3 は姉 (症例 2) より強い FTD 症状があるが、30 歳頃の発症から 10 年以上の経過でわずかな進行しか認めていない。本例には、発症時期不明の上位運動ニューロン (UMN) と LMN (UMN >> LMN) の障害があるが、現時点で運動障害は自覚していない。本例では軽微な小脳症状が認められた。また、3 例ともにパーキンソン症状は認めなかった。

ALS with dementia もしくは運動ニューロン障害を伴う FTD (FTD with MND) は一般に孤発性であるが、稀ながら家族性発症例も報告されている (1-7)。若年発症、経過の長い痴呆を伴う ALS の家系は Campanella G ら (1959) が報告しているが、近年の報告で臨床的に類似した家系はない。また、FTDP-17 の各家系、家族性 ALS? 特に若年性の ALS2、ALS6 などとも臨床的に異なっている。なお、本家系でみられる家系内での症状 (表現型) の相違は、これまでに報告された ALS with dementia 家系でも、また、FTDP-17 や ALS/PDC でもみられる現象である。

本家系においては、その特異な臨床所見の背景となる病理学的変化と、遺伝子異常に関する点に興味をもたれる。ALS with dementia では海馬歯状核を中心にユビキチン陽性封入体 (Ubi) が出現することが知られているが、Pick 小体をもたない葉性萎縮で UMN 障害を伴う症例、また臨床的には古典的 ALS である症例の一部にも同様の病理所見がみられる。近年、これらを motor neuron disease inclusion dementia(MNDID)と呼び、ALS から FTD にまたがる臨床像を呈するひとつの疾患群とする考え方があり注目されている。ここにおいて、本家系の3症例はそれぞれが MNDID の3病型に類似していること、また、Ubiを伴う ALS with dementia の家族発症例も報告されており(6,7)、本家系にも Ubi が存在する可能性は高いよう思われる。遺伝子異常に関しては、近年、9q21-22 に連鎖した北米の5家系が報告されている(8)。この報告ではユビキチン陽性封入体の記載はない。一方、この連鎖が否定された家系も報告されており(9)、複数の遺伝子異常が家族性 ALS with dementia もしくは FTD with MND の原因になっていると思われる。また、17q21 に連鎖して tau gene mutation のない Ubi 陽性の FTD 家系 (MND 症状なし) も報告されている(10)。本家系では現時点で連鎖解析は不可能であるため、今後、既知の遺伝子異常を検索してゆく予定だが、ALS with dementia, motor neuron disease-inclusion dementia の病態について示唆を与える新しい遺伝子異常をもつ可能性もあると思われる。

文献

1. Finlayson MH, et al : Acta Neuropathol 26;237-246:1973
2. Pinski L, et al : Clin Genet 7;186-191:1975
3. Robertson E, et al : Arch Neurol 69;197-207:1953
4. 吉田真理 ほか : 臨床神経 32;1193-1202:1992
5. 村上信之 ほか : 厚生省特定疾患神経変性疾患調査研究班 1988年度研究報告書,1989,p76-9
6. Bigio H, et al: J Neuropathol Exp Neurol 63;801-811:2004
7. Mackenzie IRA, et al: Acta Neuropathol 105;543-8:2003
8. Hosler BA, et al : JAMA 284;1664-9:2000
9. Ostojic J, et al : Neurosci Lett 340;245-7:2003
10. Rosso SM, et al: Brain 124;1948-1957:2001

家族性筋萎縮性側索硬化症 (Leu126delTT) モデルマウスの解析

中島健二、渡辺保裕、中野俊也、北山通朗、安井建一、深田育代、土井浩二

鳥取大学医学部脳神経内科

研究趣旨

当施設では Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子コドン 126 に 2 塩基欠失 (Leu126delTT) を有する家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) 家系を長期間フォローアップしている。今回同様の変異を導入したトランスジェニックマウス (TgM) に対して検討を行った。4 種類のヒト型 SOD1 (W: 野生型、WF: 野生型に FLAG epitope を付加、D: 2 塩基欠失および DF: FLAG 付加の 2 塩基欠失) を発現する TgM において臨床症状・経過を観察し、生化学的、病理学的に検討した。D および DF のヘテロ接合体において ALS の表現型が得られた。D および DF マウスのホモ接合体では発症日齢、死亡日齢の著明な短縮化が認められ、同一ライン内では均一な臨床経過を呈した。ウェスタンブロット解析では D および DF 蛋白の発現量は極めて少ないことが示された。発症した TgM において病理学的に前角細胞の減少と反応性 gliosis を認めた。残存神経細胞胞体内に eosinophilic cytoplasmic inclusion が観察され、抗 SOD1 抗体 (D および DF) および抗 FLAG 抗体 (DF のみ) に陽性であった。本 TgM はヒト FALS の臨床、生化学、病理像をよく反映していた。

はじめに

一部の家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の原因遺伝子として Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) の遺伝子異常が報告され、約 100 種類近くが確認されている (<http://www.alsod.org>)。当施設が報告した FALS の大家系¹においても SOD1 遺伝子の exon 5 において 2 塩基の欠失が確認された^{2,3}。大多数の FALS にみられる 1 塩基置換 (point mutation) とは異なり、本変異は 2 塩基欠失によりフレームシフトを生じる変異であった⁴。本家系患者は後索型の ALS に分類され、残存運動神経細胞に Lewy body like hyaline inclusion (LBHI) を認める^{1,5}。Truncated protein を生じる本遺伝子異常を持つトランスジェニックマウス (TgM) を作製することは本疾患の病態解明に極めて有用な情報をもたらすと考えられる。そこで TgM の解析により変異 SOD1 の細胞障害の機序を解明すること、TgM を用いて ALS の治療法を開発することを目的として本研究を開始した。

対象と方法

モデルマウスの作製

Genomic DNA を導入した TgM を作製するため、Prof. Y. Groner (Department of Molecular Genetics, the Weizmann Institute of Science, Israel) よりヒト SOD1 ゲノムの全長を含むプラスミド (p-GSOD-SVneo) の供与をうけた。図 1 に示すように、ヒト野生型 SOD1 (W) をもとに PCR mutagenesis をおこない 2 塩基欠失 SOD1 ゲノムを含むコンストラクトを得た (D)。同様の方法により、野生型および 2 塩基欠失の SOD1 蛋白の C 末端に FLAG タグ (DYKDDDDK) を付加したコンストラクトを作製した (それぞれ WF、DF)。

以上の 4 つのコンストラクトをマウス胚に導入し、各 SOD1 ゲノムを有する TgM を作製した。ヒト SOD1 遺伝子の導入はマウス尾から抽出した DNA をもとに PCR にて確認をおこなった。

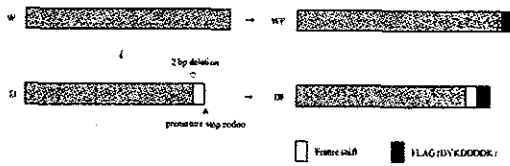


図1 各SOD1分子のシエーマ

Wをテンプレートとして2 bpの欠失を追加することによって、Dを作製した。それぞれWとDをテンプレートとしてFLAG配列を付加することによって、WFとDFを作製した。

ウエスタンブロット

F2マウスの脊髄より、complete mini (Roche diagnostics) を含む 25 mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) をもちい、氷上で 5 sec. × 3 回超音波処理することにより蛋白を抽出した。タンパク質濃度を決定後に、これらのサンプルを SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し PVDF 膜に転写した。

各 SOD1 は抗ヒト SOD1 モノクローナル抗体 (MBL)、抗 FLAG 抗体 (Stratagene)、抗 SOD1 ポリクローナル抗体 (Stressgen Biotechnologies) を一次抗体として、ECL システム (Amersham) によって検出した。

神経病理学的分析

すべての検討は鳥取大学医学部動物実験のためにガイドラインに則っておこなった。ペントバルビタール麻酔下に、生理食塩水に続き後 4% paraformaldehyde を含む 0.1 M リン酸緩衝液で経心臓灌流固定をおこない、脊髄をパラフィン固定した。

組織は H&E 染色、Klüver-Barrera 染色、抗 GFAP ポリクローナル抗体 (Chemicon) およびウエスタンブロットで使用したものと同様の抗 SOD1 ポリクローナル抗体および抗 FLAG 抗体による免疫染色にて検出をおこなった。

結果

TgM の作製において、W で 13 ライン、D で 2 ライン、WF で 5 ライン、DF で 8 ラインの F0 マウスを得た。サザンブロット、ウエスタンブロット後、最終的に W、D、WF および DF それぞれ 2 ラインの TgM を確立した。

確立した TgM のうち D および DF の各 1 ライン (D2 および DF7) のヘテロ接合体において ALS の表現型が得られた。D および DF のホモ接合体では発症日齢、死亡日齢の著明な短縮化が認められ、発症時期、死亡時期において同一ライン内では均一な臨床経過を呈した (図 2)。

W、WF、D、DF および non-transgenic (NTG) マウス脳 homogenate より総タンパク質の 10 μg をもちい、ウエスタンブロットを行った。抗ヒト SOD1 モノクローナル抗体は、マウスの SOD1 とは反応を認めず、W、WF、DF と反応した (図 3 A)。抗 FLAG 抗体は FLAG を付加した WF および DF との反応が確認された (図 3 B)。抗 SOD1 ポリクローナル抗体はマウスおよびヒト W、WF、DF の各 SOD1 に反応したが、D 型 SOD1 は検出感度以下と考えられた (図 3 C)。

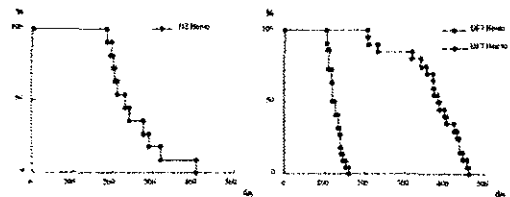


図2 D2 (左) および DF7 (右) マウスの生存曲線
平均の発症日齢および死亡日齢はそれぞれ D2 ホモ接合体: 239.0 日および 250.7 日、DF7 ホモ接合体マウスは 120.8 日および 126.7 日、DF7 ヘテロ接合体マウスで 340.9 日および 372.4 日であった。

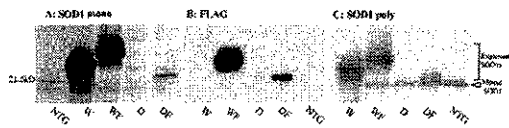


図3 ウェスタンブロット解析

W、WF、D、DFおよびnon-transgenic (NTG) マウスの脳にてウェスタンブロットをおこなった。抗ヒトSOD1モノクローナル抗体W、WF、DFを認識した(A)。抗FLAG抗体はWFおよびDFのみに反応した(B)。抗SOD1ポリクローナル抗体はマウスおよびヒトW、WF、DFの各SOD1に反応した(C)。

低位脊髄の解析において、NTG マウスと発症したDF7 マウス(日齢239日)を比較した。

Klüver-Barrera 染色においてNTG マウス(図4A)に比してDF7 マウス(図4B)において前角細胞の減少を認めた。さらにGFAP免疫染色においてDF7では反応性 gliosis(図4D)が観察された。

H&E 染色強拡大(図4E)にて残存前角細胞に周辺部に halo を伴う eosinophilic cytoplasmic inclusion を認めた。凝集体は抗SOD1ポリクローナル抗体(図4F)と抗FLAG抗体(図4G)によって顆粒状に染色された。

考察

本研究において、マウス本来の内因性SOD1を保持しながらFALSに関連するヒトSOD1を過剰発現させたマウスでALS症状が認められた。このことは変異SOD1が何らかの新しい運動神経細胞にとって有害な機能を獲得したという“gain of function”説⁶を支持するものと考えられた。

今回我々が作製したマウスの大きな特徴は、生体内での変異SOD1蛋白の量が極めて少ないことであった。この結果は、先に我々がヒトFALS患者剖検組織⁷や蛋白発現系⁸で得た結果と同様のものであった。生体内で極少量しか存在しないSOD1蛋白がいかなる機序で運動細胞に障害を与えるかは、FALSの病態の解明に重要な意義をもつと考えられる。一つの説明として、本変異は他の変異SOD1蛋白と比較して単位分子あたりの細胞毒性が強い可能性が考えられる。あるいは、変異SOD1の分解に関してproteasomeの積極的な関与も重要な役割を果たしているかも知れない。すなわち、1) 運動神経では本来SOD1の発現が多い⁹、2) 変異

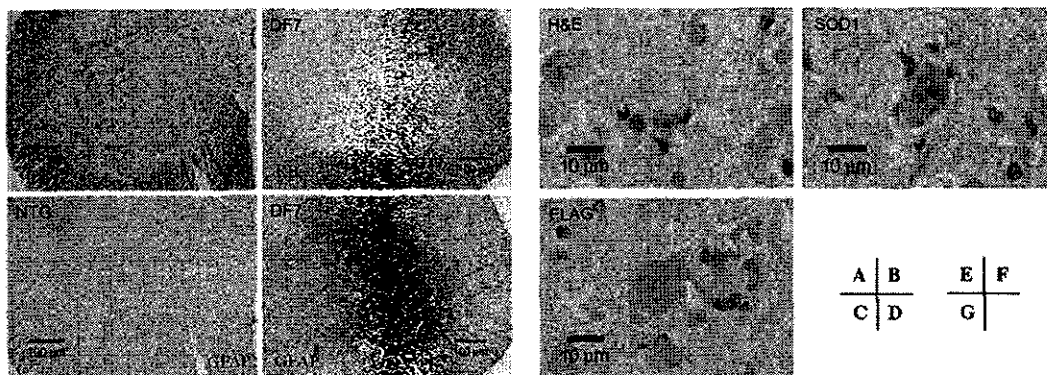


図4 DF7マウスの病理学的検索

NTG マウスおよびDF7マウスの下部脊髄のKlüver-Barrera染色(A、B)およびGFAP免疫染色(C、D)。NTGマウス(A、C)に比してDF7マウスにおいて前角細胞の減少(B)と反応性 gliosis(D)が観察された。

H&E染色強拡大(E)にて残存前角細胞に周辺部に halo を伴う eosinophilic cytoplasmic inclusion を認めた。凝集体は抗SOD1ポリクローナル抗体(F)と抗FLAG抗体(G)によって顆粒状に染色された。

SOD1蛋白のみがproteasomeで代謝される¹⁰、3) 変異SOD1の存在はproteasome活性を抑制する¹¹、4) 脊髄ではproteasome活性は年齢とともに低下する¹²、などの事実は、変異SOD1による運動神経選択的な障害を説明しうる可能性があると考えられる。

本TgMは、残存する脊髄前角細胞にLBHIが認められた。LBHIはFALSの重要な病理学的指標と考えられている。FALSの発症仮説として凝集体が何らかの細胞毒性を持つとする“凝集毒性”説は一つの有力な仮説である。しかしながらLBHIは病期が進行する程数が増える傾向がマウスおよびヒトFALS患者でも認められ、必ずしも病勢と一致しない点が指摘されうる。ハンチントン舞踏病や遺伝性脊髄失調症などのポリグルタミン病¹³やアルツハイマー病¹⁴などでは、顕微鏡的に存在を確認できる凝集体 (macroaggregate) よりも、顕微鏡でも

(microaggregate) により強い細胞毒性があることが示唆されている。SOD1の関連するFALSにおいても、このようなmicroaggregateの細胞毒性への関与について今後検討を要すると考えられる。

まとめ

本研究によりヒトALSの臨床、病理像をよく反映したTgMを得ることができた。現在、我々はさらなる病態の解明はもちろんのこと、本TgMを対象とした遺伝子治療と神経幹細胞治療の試みを進めている。このような試みが、FALSのみならずALSの根本的な治療の確立につながると考えている。

文献

1. Takahashi K, et al: *Arch Neurol*, 292-9, 1972
2. Pramatarova A, et al: *Hum Mol Genet*, 2061-2, 1994
3. Nakashima K, et al: *Neurology*, 1019-20, 1995
4. Watanabe Y, et al: *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 251-8, 2000
5. Kato S, et al: *J Neuropathol Exp Neurol*, 1089-101, 1996
6. Brown RH Jr.: *Nat Med*, 1362-4, 1998
7. Watanabe Y, et al: *Acta Neurol Scand*, 167-72, 1997
8. Watanabe Y, et al: *FEBS Lett*, 108-12, 1997
9. Pardo CA, et al: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 954-8, 1995
10. Johnston JA, et al: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 12571-6, 2000
11. Urushitani M, et al: *J Neurochem*, 1030-42, 2002
12. Keller JN, et al: *Neuroscience*, 149-56, 2000
13. Tarlac V, et al: *J Neurosci Res*, 406-16, 2003
14. Dumery L, et al: *Pathol Biol*, 72-85, 2001

変異 SOD1 トランスジェニック(Tg)マウスにおける SOD1 凝集

-特に Dorfin との関連について-

分担研究者 祖父江 元¹⁾

研究協力者 伊藤 隆¹⁾, 丹羽 淳一¹⁾, 菱川 望¹⁾, 山田 新一¹⁾, 曾根 淳¹⁾
石垣 診祐¹⁾, 道勇 学¹⁾

¹⁾ 名古屋大学大学院医学研究科神経内科

研究要旨 SOD1 変異を伴う家族性 ALS において、運動ニューロンが選択的に障害される機序はいまだ不明である。我々が同定した新規ユビキチンリガーゼ Dorfin は、*in vitro* において変異 SOD1 を認識し、神経細胞保護活性を有している。変異 SOD1 トランスジェニック(Tg)マウスを用いた検討により、Dorfin は *in vivo* において病変選択的に変異 SOD1 と結合した。Dorfin は変異 SOD1 の病変選択性に関与する毒性獲得の機序解明に有用なツールとなりうると考えられた。また、Dorfin はユビキチンリガーゼであることから、高発現により病変部位選択的に変異 SOD1 を減少させることが期待でき、治療戦略としても有望である。

A. はじめに

SOD1 変異を伴う家族性 ALS において、運動ニューロンが選択的に障害される機序はいまだ不明である。SOD1 変異を伴う家族性 ALS の発症原因としては当初 SOD1 の活性低下による酸化ストレスが考えられたが、SOD1 ノックアウトマウスは ALS を発症しないため SOD1 の機能低下(loss of function)ではなく、変異 SOD1 が運動ニューロンに対する毒性機能を獲得する(gain of toxic function)ことが原因と考えられるようになってきている。変異 SOD1 トランスジェニック(Tg)マウス脊髄では発症や封入体形成に先立って界面活性剤に耐性の変異 SOD1 数分子からなるオリゴマーの形成が生じ時間とともに増加することが知られている。この変異 SOD1 高分子複合体は病変の生じない部位では観察されず、神経障害と関連性が深い。また変異 SOD1 は培養細胞内で野生型よりも半減期が短

くプロテアソーム阻害剤によって半減期が延長することから不安定化した変異 SOD1 はユビキチン化を受けてプロテアソームで速やかに分解されていると考えられている。Dorfin はヒト脊髄より我々がクローニングした RING-finger / IBR ドメインを有するユビキチンリガーゼであるが、培養細胞を用いた実験では Dorfin は変異 SOD1 を特異的に認識しユビキチン化して、変異 SOD1 による神経細胞死を抑制する。また ALS の剖検脊髄では Dorfin は前角運動ニューロン内のユビキチン化封入体に局在し、SOD1 変異をともなう家族性 ALS においては SOD1 とユビキチン化封入体において共存する。今回、我々は ALS のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 Tg マウスの中枢神経組織や病変のない一般臓器を用いて *in vivo* における変異 SOD1 凝集と Dorfin の関係を検討した。

B. 研究方法

(1)対象 脊髄において変異 SOD1 が進行性に蓄積し、進行性の運動障害を伴う G93A 変異 SOD1 マウス[B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur] (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)を用いた。マウス運動能を Economex Rotarod (Colombus Instruments, Columbus, OH)を用いて評価し病期を発症前(5 週齢) 発症時(10 週齢) 発症早期(14 週齢) 発症末期(20 週齢)に分類した。各病期のマウスおよび non-Tg マウスそれぞれ 4 例について以下の免疫組織化学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は事前に名古屋大学大学院医学研究科実験動物倫理委員会より承認を得ている。

(2)免疫組織化学 ケタミン・キシレンにてマウスを十分に麻酔した後、左心室より 0.1 M phosphate buffer、4% paraformaldehyde を還流して固定し、一般臓器・中枢神経組織についてパラフィン包埋を行った。G93A 変異 SOD1 Tg マウスの中枢神経組織(大脳、小脳、脳幹、脊髄)や一般臓器において抗 SOD1 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 Dorfin 抗体を用いて ABC 法により免疫染色を行い、封入体の数を単位面積あたりでカウントした。抗 Dorfin 抗体(Dorfin-30)は、Dorfin のアミノ酸 678-690 に対応するペプチド抗原をウサギに免疫し、アフィニティー精製することにより作製した。

(3)免疫沈降法 G93A 変異 SOD1 Tg マウス、non-Tg マウスの大脳、小脳、脳幹、脊髄、肝臓を TBS buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS)でホモゲナイズした後、遠心して核分画を除去した上清を用いた。抗 Dorfin 抗体(Dorfin-30)を用いて免疫沈降後、抗 SOD1 抗体で western blot した。

C. 研究結果

SOD1、ユビキチン、Dorfin の凝集体形成は一般臓器にはみられず、中枢神経組織のみに存在した(図 1)。中枢神経組織における凝集体形成を詳細に検討してみると、大脳、小脳、脳幹の順に凝集体形成が増加し、脊髄において最も著明であった。Dorfin は *in vitro* では野生型 SOD1 には結合せず、

変異 SOD1 のみと結合するが、SOD1 Tg マウスの

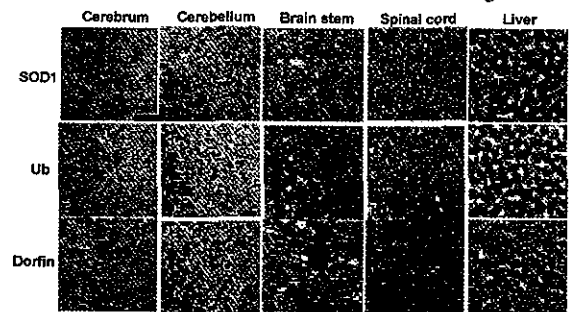


図 1 中枢神経組織(大脳、小脳、脳幹、脊髄)、一般臓器(肝臓)における SOD1 凝集体形成

各組織における Dorfin と変異 SOD1 の結合の程度を免疫沈降法で検討した(図 2A)。Dorfin は肝臓では変異 SOD1 とは結合せず、病変の存在する中

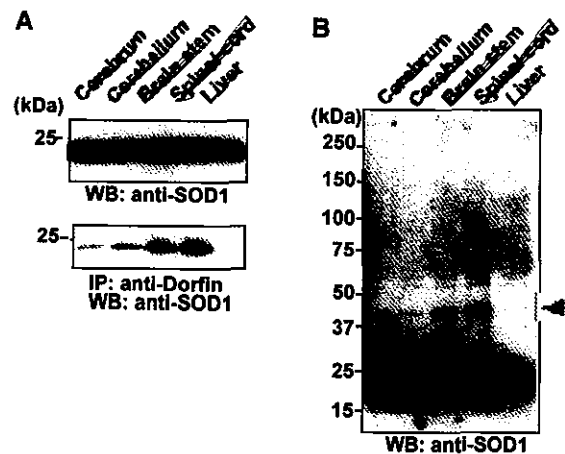


図 2 中枢神経組織(大脳、小脳、脳幹、脊髄)、一般臓器(肝臓)における Dorfin と変異 SOD1 の結合

枢神経組織の変異 SOD1 を特異的に認識していた。さらに中枢神経組織の中で Dorfin の認識する変異 SOD1 の量は、病変の程度とよく相関しており、最も病変の強い脊髄において Dorfin は変異 SOD1 と最も強く結合した。中枢神経組織においては SDS 抵抗性の SOD1 ダイマーが病変の強いところほど多く出現し、Dorfin と変異 SOD1 の結合の程度と SOD1 オリゴマー形成量はよく相関していた(図 2B)。次に G93A 変異 SOD1-Tg マウスの臨床経過を発症前(5 週齢) 発症時(10 週齢) 発症早期(14 週齢) 発症末期(20 週齢)にわけて各病期の SOD1

の凝集体形成と Dorfin の関連を検討した (図 3).
Dorfin およびユビキチン陽性の異常構造物は SOD1

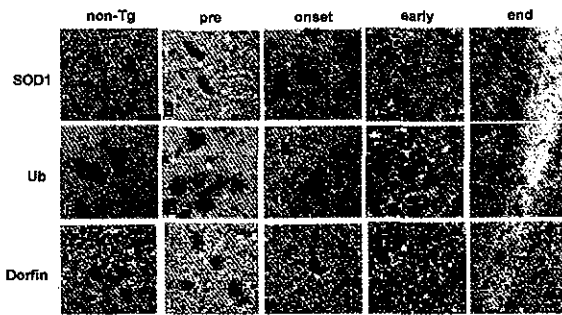


図3 G93A 変異 SOD1 Tg マウス脊髄における SOD1 凝集体形成の経時的な変化

陽性の異常構造物よりやや遅れて出現し、SOD1 の蓄積と併行して増加した (図 3). さらに G93A SOD1 Tg マウス各病期の脊髄を用いて、免疫沈降法により Dorfin と変異 SOD1 の結合の強さを検討した (図 4A). Dorfin が認識する変異 SOD1 の量は、onset の時期から病変の進行とともに急激に増加し、SDS 抵抗性の変異 SOD1 ダイマーも onset の頃より経時的に増加する. ここでも Dorfin と変異 SOD1 との結合の強さは SDS 抵抗性の SOD1 オリゴマーの出現に程度とよく相関していた (図 4B).

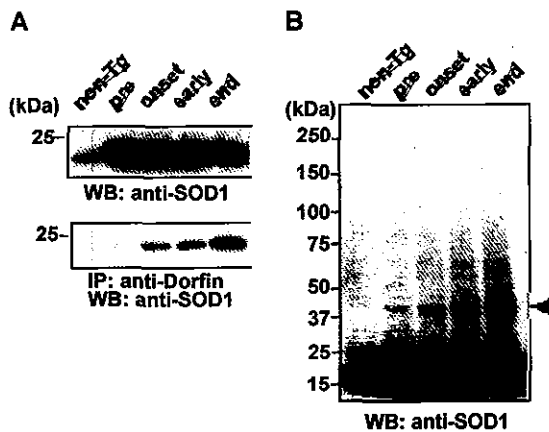


図4 G93A 変異 SOD1 Tg マウス脊髄における Dorfin と変異 SOD1 の結合の経時的変化

D. 考察

SOD1 変異を伴う家族性 ALS の発症原因としては変異 SOD1 が運動ニューロンに対する毒性機能を獲得すること (gain of toxic function) が考

えられている. しかし変異 SOD1 の毒性の機序はいまだ明らかでない. これまでの報告からは変異 SOD1 の毒性獲得・神経変性の発症には、異常タンパク質が oligomer や protofibril を形成して蓄積することによる神経細胞の機能障害が原因であると推定され、剖検組織で見られるような封入体はむしろ神経保護的作用を有するとの報告もみられる. G93A 変異 SOD1 Tg マウスでは中枢神経のみならず一般臓器でも広く変異 SOD1 が発現しているが、変異 SOD1 高分子複合体は病変の生じない部位では観察されず、神経障害と関連性が深いと考えられる. 今回の検討から Dorfin は病変の存在する中枢神経組織の変異 SOD1 のみを特異的に認識することが明らかになった. 病変の存在する中枢神経組織では変異 SOD1 を misfold させやすい状態 (病変特異的に SOD1 を misfold させる因子が存在?) が存在し、そういった状態の変異 SOD1 を Dorfin は特異的に認識していると考えられる. Dorfin は病変の存在する組織の変異 SOD1 のみ認識するため、Dorfin は変異 SOD1 の病変選択性や毒性獲得の機序解明に有用なツールとなりうると考えられる.

E. まとめ

Dorfin は病変部位の変異 SOD1 を特異的に認識するため、変異 SOD1 の病変選択性に関与する毒性獲得の機序解明に有用なツールとなりうると考えられた.

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

- (1) Ishigaki S et al. J Biol Chem. in press. (2004)
- (2) Takeuchi H et al. J Neurochem. 89, 64-72 (2004)
- (3) Hishikawa N et al. Am J Pathol. 163, 609-19. (2003)
- (4) Ito T et al. J Biol Chem. 278, 29106-14. (2003)
- (5) Ando Y et al. Neurochem Res. 28, 839-46. (2003)
- (6) Niwa J et al. J Biol Chem. 277, 36793-8. (2002)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

ALS ラットモデル脊髄におけるグリア系前駆細胞の増殖

青木正志¹⁾，割田 仁²⁾，石垣あや¹⁾，永井真貴子¹⁾，糸山泰人¹⁾

1) 東北大学大学院医学系研究科神経内科，2) 国立病院機構米沢病院神経内科

研究趣旨 筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデル動物、変異 *SOD1* 遺伝子導入ラット成体脊髄におけるグリア系前駆細胞の増殖が病態進行につれてどのように変化するかの検討を行った。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis, 以下 ALS）は系統的な運動ニューロン脱落を特徴とする致死的な神経変性疾患である。我々はこれまでに ALS の新しい動物モデルとしてヒト変異 *SOD1* 遺伝子導入ラット（Tg ラット）を確立した¹⁾。従来のマウスモデルに比べて約 20 倍の大きさをもつラットモデルでは、病態解明のための生化学的・組織学的解析が優れて容易である。

近年、成体脊髄においても脳の一部と同様に内在性の神経前駆細胞（neural progenitor cells, NPCs）が存在することが示されている中²⁾、再生医療が ALS の新規治療戦略として注目されている。今回我々は Tg ラット脊髄におけるグリア系前駆細胞の増殖について検討した。

対象および方法

発症前および発症後の His46Arg ヒト変異 *SOD1*-Tg ラットを対象に、週齢一致非 Tg ラットを対照とした（各群 $n = 4 \sim 5$ ）。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg)を1日1

回7日間連日腹腔内投与して2日後に得た灌流固定後腰髄凍結切片において、BrdUとグリア系前駆細胞の選択的マーカーNG2（nerve/glial antigen 2）、あるいはGFAP（glial fibrillary acidic protein, アストロサイトの選択的マーカー）、Iba-1（ionized Ca-binding adaptor molecule-1, ミクログリア、マクロファージの選択的マーカー）との多重蛍光免疫組織化学を行った。

なお、すべての遺伝子操作はDNA組換え実験指針に従い、また動物実験は動物愛護面に配慮しかつ利用動物数を極力減らすように努めた。倫理面は東北大学医学部動物実験指針に従った。

結果

対照群では BrdU 陽性細胞は主として白質の外周層に散在し、そのほとんどは NG2 陽性細胞と共局在を示した。一方、Tg ラットでは対照に比して発症前より有意に BrdU 陽性細胞の増加が認められ、白質外周層と脊髄灰白質腹側に局在していた。それらの多くは NG2 と共局在し、Iba-1、ついで GFAP と共陽性を示した。この中でグリア系前駆細胞増殖を示す BrdU/NG2 二重陽性細胞を定量す

主に白質の外周層（とくに前索・側索）に局在していた（図1）。

考察

成体脊髄においても NPCs が存在し、生理的条件下ではゆっくりと分裂しながら主にグリア細胞供給に与っているとされる²⁾。このような生理的 NPCs の増殖は白質外周層に優位と報告されており、ラットではその70%までが NG2 と共陽性といわれる^{2,3)}。本研究における対照ラットの BrdU 陽性細胞局在はこれに合致する。

NG2 はグリア系前駆細胞、とくにオリゴデンドロサイトおよびアストロサイト前駆細胞の選択的マーカーとして汎用されており、かねてより *in vivo* で NG2 陽性細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte progenitor cell, OPC) と同義とされてきた。しかし、NG2 陽性細胞は髄鞘化の終了した成体中枢神経系においても白質のみならず灰白質まで広汎かつ豊富に存在することから、成体 NG2 陽性細胞はいわゆる OPC としての意義だけではなく、アストロサイトやミクログリア、成熟オリゴデンドロサイトとも異なる第4の機能を担っている可能性が議論されている⁵⁾。

一方、病態下においては NG2 陽性細胞が反応性に増殖することがすでに脊髄損傷モデルや脱髄モデルで複数報告されている。本研究においても NG2 陽性細胞は病態の進行とともに明らかに増殖しており、それが発症前から病変部位におけるアストロサイト増殖にほぼ一致している点から、この astrocytosis や glia 癭痕形成に参画している可能性が示唆される。

さらに最近になり NG2 陽性細胞が *in vitro*, *in vivo* で多分化能と自己複製能を有しニューロンにも分化するという幹細胞用性格を示す報告もあり⁴⁾、本 Tg ラットで増殖している NG2 陽性細胞

も単なるグリア細胞の供給源としてではなく、再生医療の観点からは分化誘導し得る注目すべき細胞と考えられる。

今後他の選択的マーカーを組み合わせたより詳細な解析と *in vivo* における NG2 陽性細胞分化の追跡といったさらなる検討が重要と考えられる。

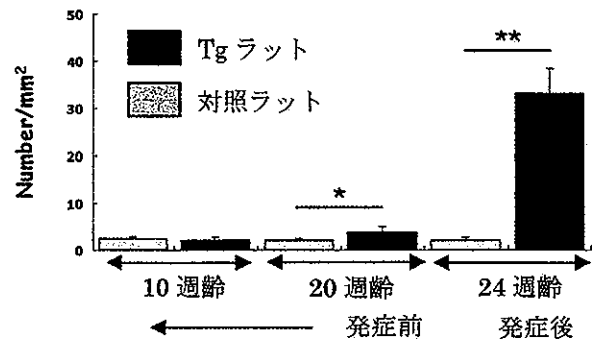


図1. 腰髄における NG2/BrdU 二重陽性細胞数

腰髄横断切片における NG2 と BrdU に対する蛍光二重免疫組織化学を行い、二重陽性細胞を計測した。各群とも5切片以上の多重切片における計測値を平均し単位面積あたりの数を示した。発症前20週齢から Tg ラットでは NG2/BrdU 陽性細胞が対照ラットに比べ有意に増加しており、発症後には一層増加が際だっている (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA with Tukey-Kramer post-hoc test)。

まとめ

本モデルラット脊髄では運動ニューロン脱落変性部位である前角を中心としたアストロサイト増殖に、白質外周層の NG2 陽性グリア系前駆細胞が関与している可能性がある。この細胞群は再生医療の観点から標的となり得る注目すべき細胞である。

文献

1. Nagai M, et al: J Neurosci, 9246-9256, 2001.
2. Horner PJ, et al.: J Neurosci, 2218-2228, 2000.
3. Horner PJ, et al.: J Neurocytol, 469-480, 2002.
4. Aquirre A, et al.: J Neurosci, 10530-10541, 2004.
5. Nishiyama A, et al.: J Neurocytol, 437-455, 2002.