

## カイニン酸持続髄注による ALS 病態モデル動物の開発

郭 伸<sup>1)</sup>, 孫 慧<sup>1)</sup>, 河原 行郎<sup>1)</sup>, 伊藤 杏子<sup>1)</sup>, 金澤 一郎<sup>1,2)</sup>, 辻 省次<sup>1)</sup>

1) 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学

2) 国立精神・神経センター

研究要旨: ALS の病因解明、治療法の開発にとり、適切な動物モデルの開発は必須である。我々は、ラット脊髄クモ膜下腔にカイニン酸を持続的に髄注することにより脊髄運動ニューロンに選択的な変性を生ずることを示した。このモデルラットは、行動変化の発症様式・運動機能への選択性、神経病理変化の選択性からは、ALS の病態モデルといえる。その分子メカニズムを検討し、AMPA 受容体を介したものであることが明らかになり、脊髄運動ニューロンが AMPA 受容体を介した遅発性の神経細胞死に特異的に脆弱であることが示され、孤発性 ALS で明らかにされている AMPA 受容体の分子変化と共に、ALS では長期にわたる AMPA 受容体の興奮が生じ、神経細胞死を引き起こしている可能性が高いことが示された。

### [はじめに]

孤発性 ALS の病因には RNA editing の異常に伴う 1-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)受容体を介する遅発性興奮性神経細胞死が最も有力な仮説であるが<sup>4,7,10</sup>、適切なモデル動物は得られていない。我々は、ラット脊髄クモ膜下腔にカイニン酸を持続的に髄注することにより脊髄運動ニューロンに選択的な変性を生ずることを示した<sup>3</sup>。外来性の因子により脊髄運動ニューロンに選択的、且つ緩徐進行性の神経変性を *in vivo* で引き起こしたモデル動物はこれまでになく、運動ニューロンの細胞死を生じさせる機序を研究する上に有用なツールになると考える。さらに、ALS の病因を考える上にも、有用な知見をもたらすものとする。このモデルにおける神経細胞死の分子メカニズムを検討した。

### [方法]

カイニン酸髄注モデルラットは、Nakamura & Kwak の方法<sup>5,6,9</sup>により、米国 National Institute of Health によ

る Guideline for Animal Care and Use、東京大学動物実験マニュアル (2001) に則り作成した。微小浸透圧ポンプ (Alzet 2004) に充填した 3 mM カイニン酸を雄 Fisher ラット脊髄クモ膜下腔に 4 週間持続的に投与して作成した (各群 n=5)。対照として人工髄液を同期間投与した。細胞死のメカニズムの検討のため、1) 3 mM カイニン酸 + 3 mM 6-nitro-7-sulfamobenzo(f)quinoxaline-2,3-dione (NBQX) (非 NMDA 受容体アンタゴニスト)、2) 3 mM カイニン酸 + 3 mM D(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) (NMDA 受容体アンタゴニスト)、3) 1.5mM カイニン酸 + 1.5mM cyclothiazide (CTZ) (AMPA 受容体脱感作阻害剤)、4) 1.5mM CTZ を同様の方法により 4 週間連続投与した (各群 n=5)。

このモデルラットを、表現型、神経病理変化の上から運動機能障害の選択性の有無を検討した。表現型の変化は、rotarod (16rpm, 7 min)の持続時間により運動機能を定量し、感覚障害は後肢の痛覚刺激に対する逃避反射により、膀胱直腸障害は陰部の汚染の有無により判定し

た。脊髄の病理変化は、10  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片の Nissl 染色標本により光顕的に観察し、大径ニューロン数（直径 20  $\mu\text{m}$  以上で核小体を持つ前角ニューロン）を算定した。一部、3.5%パラフォルムアルデヒド + 0.5%グルタルアルデヒド（in 0.1 M PBS）溶液により灌流固定した脊髄を、段階的に 5%-30%蔗糖 PBS 溶液に浸潤させ、凍結下に切片を作成した。

### [結果]

カイニン酸髄注モデルラットは、時間と共に rotarod 持続時間が短縮した（0週、420 sec；2週、179.7  $\pm$  48.4 sec；4週、176.2  $\pm$  40.1 sec）。4週後においても痛覚刺激に対する逃避反射は保たれており、膀胱直腸障害は見られなかった。対照群では4週後も rotarod 持続時間の低下はみられなかった。3 mM カイニン酸 + 3 mM NBQX 群では3週以降有意に改善し、4週後 302.2  $\pm$  44.7 sec であった（Mann-Whitney U test、 $p < 0.05$ ）。これに対し、3 mM カイニン酸 + 3 mM APV 群では4週後 177.0  $\pm$  54.7 sec と有意差をみなかった（Mann-Whitney U test、 $p > 0.1$ ）。また、1.5 mM CTZ 単独投与によつては、4週後 415.0  $\pm$  3.5 sec と rotarod 持続時間の悪化はみられなかったのに対し、より少量のカイニン酸を同時投与した群（1.5 mM カイニン酸 + 1.5 mM CTZ）では4週後 151.1  $\pm$  24.3 sec と著明な悪化がみられた。

脊髄前角の大径運動ニューロン数は、カイニン酸2週投与では人工髄液投与群との間に有意差をみなかったが4週投与ラットでは有意な低下がみられた（カイニン酸4週投与群 4.8  $\pm$  0.2、人工髄液4週投与群 6.2  $\pm$  0.2、Mann-Whitney U test、 $p < 0.001$ ）。カイニン酸4週投与ラットでは、一部の前角大径運動ニューロンに変性像が認められた。3 mM カイニン酸 + 3 mM NBQX 群では4週後 5.6  $\pm$  0.1 であり、前角細胞数はカイニン酸投与群に比し有意に多かった（Mann-Whitney U test、 $p < 0.001$ ）。

また、rotarod スコアの悪かった 1.5 mM カイニン酸 + 1.5 mM CTZ ではカイニン酸投与群と同程度ないしより高度の前角細胞数の低下（4.5  $\pm$  0.2）がみられたが、同スコアのよい CTZ 単独投与群では保たれていた（5.9  $\pm$  0.1）。3 mM カイニン酸 + 3 mM APV 群、1.5 mM カイニン酸 + 1.5 mM CTZ 群ともに前角細胞の変性像がみられた。神経細胞の変性像は空泡変性と神経細胞を取り巻くグリア細胞の増勢が主体であり、ALS 患者剖検組織にみられる増とは必ずしも一致しなかった。

上記の結果は、rotarod スコアと前角細胞の変性との間に相関があることを示し、rotarod スコアが後肢の運動機能を反映していることを意味している。

### [考察]

昨年度、Wistar ラットで示した<sup>3</sup>ものと同様の変化が Fisher ラットにおいても示され、更に前者では8週の投与が必要であったにもかかわらず、後者では4週で同様の変化がもたらされた、という種差がみられた。また、昨年度は明らかにできなかった、前角細胞の脱落が定量的計測により明らかになり、カイニン酸髄注モデルラットは、運動機能選択的な障害、脊髄運動ニューロン選択的な変性が生じており、脊髄運動ニューロンに選択的な病変を引き起こす疾患モデルと結論づけることができる。

グルタミン酸受容体アゴニストの脊髄クモ膜下腔への持続投与は、慢性実験では、後角ニューロンの選択的変性<sup>1,5,8,9</sup>、短時間投与では、介在ニューロンないし前角運動ニューロン<sup>5,6</sup>を傷害することが知られている。しかしながら、カイニン酸による遅発性の神経毒性の in vivo における検討は行われてこなかった。脊髄初代培養系におけるカイニン酸毒性の検討では、後角ニューロンに比し、AMPA 受容体を介する神経細胞死により脆弱であることが示されている<sup>11</sup>。従つて、カイニン酸への持続暴露などによる遅発性の神経毒性が、ALS にみられる緩徐進

行性の運動ニューロン死に通ずるメカニズムによることが想定されていた。

今回の研究により、カイニン酸の持続髄注によりもたらされる選択的運動ニューロン死は、AMPA 受容体を介するものであることが明らかになった。すなわち、非 NMDA 受容体アンタゴニストにより神経細胞死が阻止されるが、NMDA 受容体アンタゴニストによっては阻止されないことである。ただし、NBQX には AMPA 受容体への選択性は余り強いものではないので、AMPA 受容体の脱感作を選択的に阻害する CTZ での検討を加えた。CTZ は AMPA 受容体の脱感作を阻害し、チャネル開口時間を延長する。しかし、単独投与では全く細胞死への影響はなく、脱感作時間の変化のみでは細胞の生存に大きな影響を与えないことが示唆される。カイニン酸の同時投与により強い運動ニューロン死がみられ、これがカイニン酸単独より強い作用であったのは、カイニン酸毒性が AMPA 受容体を介するものであることを意味している。

AMPA 受容体の持続的興奮が運動ニューロン死につながる分子メカニズムの詳細は明らかではないが、孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンに特異的に生じている AMPA 受容体の  $Ca^{2+}$  透過性を増強する分子変化 (GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA editing 率の低下) が ALS の病因と密接に関連していること<sup>2,4,7,10</sup>からは、脊髄運動ニューロンが AMPA 受容体の興奮による神経細胞死に特異的に脆弱であることを示し、この分子メカニズムを解明することが、ALS の特異的治療の開発につながるものと考えられる。

#### [結論]

カイニン酸髄注モデルラットは脊髄運動ニューロンに選択的な変性の病態モデルであり、AMPA 受容体の持続的興奮により引き起こされる。ALS の運動ニューロン死には AMPA 受容体を介する遅発性神経細胞死のメカニズムが働いている。

#### [文献]

- 1 Hirata, A., et al. *Brain Res.* 771, 37-44. (1997).
- 2 Kawahara, Y., et al. *Nature* 427, 801 (2004).
- 3 郭 伸、ら. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する研究班2003年度研究報告書、pp43-45, 2004
- 4 Kwak, S. & Kawahara Y. *J Mol Med* DOI,10.1007/s00109-004-0599-z (2004).
- 5 Kwak, S. & Nakamura R. *J. Neurol. Sci.* 129 (Suppl), 99-103 (1995).
- 6 Kwak, S. & Nakamura R. *Brain Res.* 702, 61-71 (1995).
- 7 Kwak, S., et al. In *Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ed. K. Abe) 197-202 (Elsevier ScienceB.V., Amsterdam, 2001).
- 8 Nakamura, R., et al. *Brain Res Protocol* 1, 385-390. (1997).
- 9 Nakamura, R., et al. *Brain Res* 654, 279-285 (1994).
- 10 Takuma, H., et al. *Ann Neurol* 46, 806-815 (1999).
- 11 Vandenberghe, W., et al. *J Neurosci* 20, 123-132 (2000).

## 筋萎縮性側索硬化症における 運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイル

山本正彦、蔣月梅、小林靖、吉原剛、石垣診祐、  
田中章景、丹羽淳一、道勇学、祖父江元

名古屋大学神経内科

孤発性 ALS の運動ニューロンにおいて、包括的な遺伝子発現プロファイル解析を行い、運動ニューロン特異的な遺伝子発現を検出した。Bunina 小体を有する孤発性 ALS14 例、対照 13 例の剖検脊髄凍結組織よりレーザーマイクロダイセクションにて運動ニューロンを切り出し、RNA を抽出後増幅、マイクロアレイを用い遺伝子発現プロファイルを作成しクラスター解析を行った。さらに TaqMan RT-PCR、ISH、IHC により発現変化を確認した。運動ニューロンでは遺伝子の 1%が増加・3%が減少を示し、特徴的に変動する遺伝子群を抽出した。転写因子・細胞骨格の関連遺伝子群が減少し、神経栄養因子・細胞周期の関連遺伝子群が増加した。神経変性性と神経保護的、細胞死の促進と抑制という相反する発現変動が観察された。以上より、孤発性 ALS 運動ニューロン特異的に発現が変動する遺伝子群の病態発現機構への関与が示唆された。

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症（ALS）において単離した運動ニューロンの包括的な遺伝子発現プロファイル解析を行い、脊髄前角の遺伝子発現プロファイルと比較検討することによって、ALS 運動ニューロン特異的な遺伝子発現を検出しその分子病態を解析する。家族性 ALS では約 20%に SOD1 変異が認められる。SOD1 変異をげっ歯類や培養細胞に導入してその分子病態を解析することは可能であるが<sup>2) 6)</sup>、孤発性 ALS ではこのアプローチによる研究は不可能である。今回用いた方法は孤発性 ALS に対する重要で有用な解析手段である<sup>3)</sup>。

### 方法

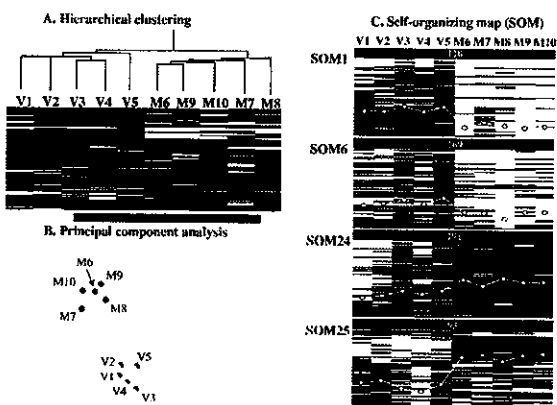
ALS14 例(平均年齢 62.1 歳)、対照 13 例(平均年齢 66.7 歳)の剖検脊髄凍結組織よりレーザーマイクロダイセクション法にて運動ニューロンを切り出し、RNA を抽出後 T7 RNA ポ

リメラーゼ法により増幅した。増幅によっても遺伝子発現比が変化しないことを確認した。同様に脊髄前角より RNA を抽出し、各々を蛍光標識後、DNA マイクロアレイを用い遺伝子発現プロファイルを作成しクラスター解析を行った。さらに、TaqMan RT-PCR、in situ hybridization、immunohistochemistry により発現変化を確認した。組織採取に関して名大倫理委員会より承認を得た。

### 結果

運動ニューロンレベルでは遺伝子の 1%が増加と 3%が減少、脊髄前角レベルでは 0.7%が増加と 0.2%が減少を示した。階層（樹状図、主成分解析）および非階層（SOM）クラスタリングによって、ALS 運動ニューロンにおいて特徴的に変動する遺伝子群を抽出することができた (Fig.1)。運動ニューロンでは転写因子(CRABP1, EGR3 etc)、細胞骨格(DCTN1,

MAPs etc) の関連遺伝子群の発現が減少し、神経栄養因子(GDNF, HGF etc)、細胞周期(CCNC, CCNA etc) の関連遺伝子群の発現が増加した。機能が既知または未知の遺伝子 (KIAA0231, ACAT etc) について、Taqman RT-PCR、in situ hybridization、immunohistochemistry により発現変化を確認した。一方、前角では運動ニューロンとは明らかに異なるクラスターを形成するものの、炎症関連遺伝子群を含め特徴的な変動を検出できなかった。



**Fig. 1 Clustering of gene expression in spinal motor neurons and spinal ventral horns.**

(A) Hierarchical clustering of gene expression in spinal motor neurons and ventral horns. The dendrogram was produced by hierarchical clustering of relative expression levels of 4,845 genes (rows) in 5 spinal homogenate and 5 motor neuron samples (columns) in making a total of 48,450 data points. Visual representation is shown with green representing down-regulated ( $<0.44$ ), black representing intermediate, and red representing up-regulated ( $>2.28$ ). The hierarchical clustering successfully detects two large clusters of ALS, discriminating between spinal homogenates of ventral horns (samples V1, V2, V3, V4 and V5) and motor neurons (samples M6, M7, M8, M9 and M10, with a correlation coefficient of 0.446 at

the branching point. (B) Principal component analysis of spinal motor neurons and ventral horns. Principal component analysis by 6 components for the 4,845 genes reveals 2 main clusters consisting of spinal motor neurons (M6-10) and homogenates (V1-5). The number of patients corresponds to those in the dendrogram. (C) SOM (Self-organizing map) analysis of spinal motor neurons and ventral horns. The 4,845 genes are grouped into 25 clusters, the optimal size of which is calculated from gap statistics analysis. In SOM1 and SOM6 majority of genes are down-regulated and in SOM24 and SOM25 majority of genes are up-regulated commonly in isolated motor neurons of 5 cases (M6-10). The numbers of genes are given at the top.

### 考察

ALS では包括的な遺伝子発現プロファイル解析は脊髄組織のホモジネートを用いて報告されている<sup>1) 4)</sup>。しかし、この方法では ALS において惹起されるグリア反応も検出され、運動ニューロン減少の影響もある。実際、運動ニューロンと脊髄前角の遺伝子発現プロファイルを比較してみると、脊髄前角において増加した遺伝子群には、運動ニューロン由来と考えられるものがある程度反映されるが、減少群には運動ニューロン由来の発現はほとんどみられない。したがって、切り出した運動ニューロンの発現解析はきわめて有効で世界において初めての試みである。ビタミン A を介する転写因子などの転写関連因子や逆行性軸索輸送に関わる DCTN の減少などが ALS 運動ニューロン特異的な発現変化である。一方、我々が以前に報告したように<sup>5)</sup>、GDNF, HGF, CNTF などの神経栄養因子が増加した。しかし、それらの受容体を含め細胞膜の受容

体や表面抗原は ALS 運動ニューロンにおいて減少傾向にあった。細胞死関連遺伝子では、細胞周期関連遺伝子が興味深い変化を示した。CCNC, CCNA, CCNE の変動は G1/S 期停止を促進する働きをした。Caspase, TNFR, Bak などの直接細胞死を惹起すると考えられる遺伝子発現もみられたが、変化率は比較的少なく、残存運動ニューロンの中で細胞死が進行している割合が少ないものと考えられた。症例ごと、あるいは運動ニューロンごとに、詳細に病態関連遺伝子群の発現変化を検出することによって、我々が提唱した ALS における運動ニューロンの脱落過程が実証されるものと思われる<sup>7)</sup>。

#### まとめ

Bunina 小体を有する孤発性 ALS14 例、対照 13 例の剖検脊髄凍結組織よりレーザーマイクロダイセクションにて運動ニューロンを切り出し、RNA を抽出後増幅、マイクロアレイを用い遺伝子発現プロファイルを作成しクラスター解析を行った。孤発性 ALS 運動ニューロンでは、神経変性性とともに神経保護的な遺伝子発現の変化がみられ、同時に細胞死の促進と抑制という相反する発現変動が観察され、細胞変性過程に対応する特徴的な遺伝子発現が検出された。細胞変性の初期から後期の細胞死にいたる遺伝子発現の変動シーケンスが想定され、分子標的治療の候補を探索できると考えられる。ALS 運動ニューロン特異的に発現が変動する遺伝子群の病態発現機構への関与が示唆された。

#### 文献

- 1) Dangond F et al. The molecular signature of late-stage human ALS revealed by expression profiling of post-mortem spinal cord gray matter. *Physiol Genomics* 16: 229-239, 2004
- 2) Ishigaki S et al. X-Linked inhibitor of apoptosis protein is involved in mutant SOD1-mediated neuronal degeneration. *J Neurochem* 82: 576-584, 2002
- 3) Jiang Y et al. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* in press
- 4) Malaspina A et al. Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *J Neurochem* 77: 132-145, 2001
- 5) Yamamoto M et al. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA in the spinal cord and muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 204: 117-120, 1996
- 6) Yoshihara T et al. Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 80: 158-167, 2002
- 7) Sobue G et al. Degenerating compartment and functioning compartment of motor neurons in ALS: possible process of motor neuron loss. *Neurology* 1983; 33: 654-657, 1983

## プロテアソーム障害による運動ニューロン変性

辻 幸子<sup>1)</sup>, 田代 淳<sup>1)</sup>, 新保和賢<sup>1)</sup>, 菊地誠志<sup>1)</sup>, 佐々木秀直<sup>1)</sup>, 森若文雄<sup>2)</sup>, 田代邦雄<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>北海道大学大学院医学研究科神経内科学

<sup>2)</sup>北海道医療大学心理科学科

### 研究趣旨

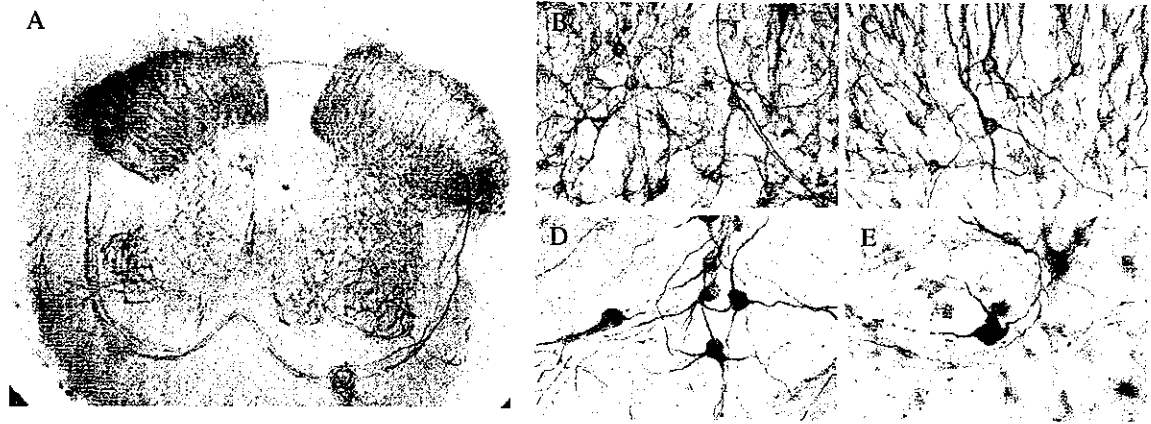
ラット脊髄スライス培養を用いて、プロテアソーム障害が運動ニューロンに及ぼす毒性について検討した。プロテアソーム特異的阻害剤であるラクタシスチンに曝露しプロテアソーム活性を正常の 30%程度まで障害させると、運動ニューロンは神経突起の断片化やリン酸化ニューロフィラメントの増加が見られるようになり、72 時間後には有意に脱落するが、後角ニューロンでは特に変化は見られなかった。免疫染色では運動ニューロンはカルレチニン、カルビンディンなどのカルシウム結合蛋白は陰性で、細胞内カルシウムキレーターBAPTA-AM の添加で運動ニューロン死は有意に減少したことから、カルシウム動態が運動ニューロンの脆弱性に関与していると考えられた。ラクタシスチン曝露後、脊髄全体としては活性型カスパー 3 が出現するが運動ニューロンに一致した発現ではなく、汎カスパー阻害剤  $\alpha$ -VAD-fmk では運動ニューロン保護効果は見られなかったことから、この運動ニューロン死はカスパーに依存性しない細胞死である可能性が示唆された。

### はじめに

近年、神経変性疾患の病態形性においてユビキチン・プロテアソーム系障害が関与している可能性が指摘されている。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) においても、我々を含めた複数のグループから分散培養系での検討でプロテアソーム障害に対する運動ニューロンの特異的脆弱性の報告がある<sup>iii</sup>。また、後肢初発 ALS モデルである SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックマウスで発症直前に腰

髄のプロテアソーム活性が局所的に低下するという報告もある<sup>iii</sup>。しかし、プロテアソーム障害から運動ニューロン死に至る経路の詳細は明らかでなく、スライス培養で運動ニューロンの特異的脆弱性に否定的な報告もでてきている<sup>iv</sup>。このような背景から、我々はラット脊髄スライス培養を用いて、プロテアソーム障害から運動ニューロン死に至る過程において (1) 他のニューロンに比べた脆弱性の有無、(2) 細胞死の機序

図1



(A) 培養14日目コントロールのSMI-32染色全体像。前角に運動ニューロンが集簇している。  
(B) (D) コントロールの強拡大像。(C) (E) ラクタシスチン(5 $\mu$ M)曝露72時間後。前角(E)では運動ニューロンが著明に変性、脱落しているが、後角ニューロン(C)には変化は見られない。

について検討をおこなった。

#### 方法

生後6日目のSDラットから取り出した脊髄腰膨大を400 $\mu$ mにスライスし、2週間培養した。10~11日目にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンに曝露し免疫組織染色などで評価した。

#### 結果

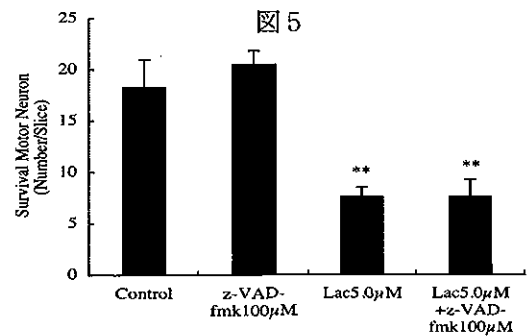
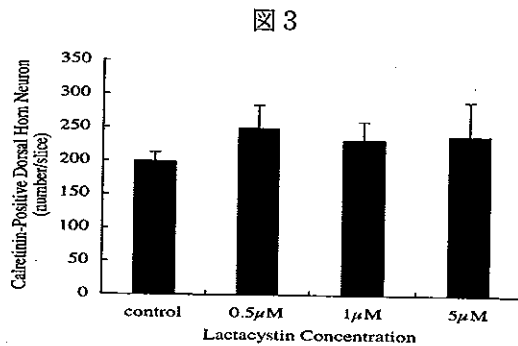
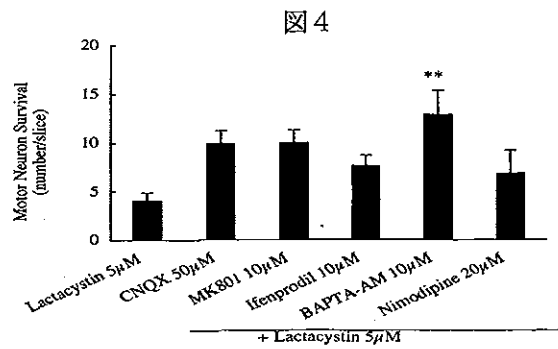
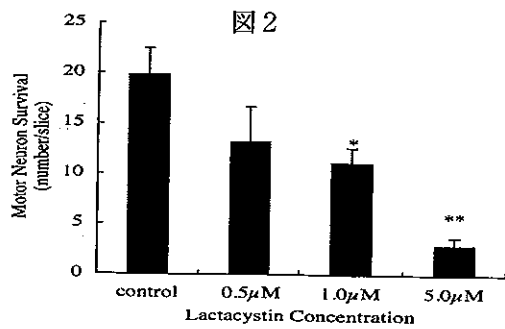
ラクタシスチン5 $\mu$ Mに曝露するとスライス全体のプロテアソーム活性はコントロールの30~40%に低下した。非リン酸化ニューロフィラメント抗体(SMI-32)で免疫染色すると曝露後約36時間から前角運動ニューロンで突起の断片化が見られるようになり、72時間では運動ニューロンの脱落が見られたが、後角ニューロンではこのような変化は見られなかった(図1, 2)。ALSではリン酸化ニューロフィラメントの増加が出現することから、SMI-32と抗リン酸化ニューロフィラメント抗体(SMI-31,

-34)との二重染色を行ったところ、時間とともに二重陽性運動ニューロンが増加した。

ALSで傷害されやすい運動ニューロンはカルシウム結合蛋白の発現が少なくカルシウム緩衝能が低いことが報告されている<sup>9)</sup>。我々の系でも緩衝能の高いカルシウム結合蛋白であるカルビンディン、カルレチニン<sup>10)</sup>は運動ニューロンでは免疫染色で陰性だった。カルレチニン陽性後角細胞はラクタシスチン5 $\mu$ Mに曝露しても有意な変化はなかった(図3,  $p>0.05$ )。更に、細胞内カルシウムキレーターBAPTA-AMをラクタシスチンと同時に添加すると運動ニューロンは有意に保護された(図4,  $p<0.01$ )。

次に、アポトーシスの関与を調べるため、活性化型カスパー3で免疫染色を行うと、コントロールでは陰性に対し曝露群では脊髄全体に陽性細胞を認め、ウエスタンブロットでも活性化型に相当する17KDに曝露





後 72 時間でバンドが出現した。しかし、SMI-32 との二重染色では活性化型カスパー 3 陽性細胞は運動ニューロンとは一致せず、運動ニューロンではアポトーシス様の核変化も見られなかった。更に、汎カスパー 3 阻害剤 z-VAD-fmk (100 μM) を添加しても保護効果は見られなかった (図 5) ことから、運動ニューロン死はカスパー 3 依存性アポトーシスとは異なる機序であることが推察された。

### 考察

運動ニューロンは特にプロテアソーム障害に脆弱であること、初期には神経突起の変性とニューロフィラメントのリン酸化を伴うこと、カルシウム動態が重要であることを示した。神経変性の過程において様々なカスケードがクロストークしていると思われるが、今回の我々の結果はプロテアソーム障害が運動ニューロンの特異的脆弱性を決め

る重要な要素である可能性を示している。実際の ALS 患者では cytosolic protease 活性の変化はないとの報告が 1 件ある<sup>i)</sup>のみでプロテアソーム活性について詳細に検討した報告はなく、今後の検討が待たれる。今後、プロテアソーム障害の下流の経路について詳細を明らかにできれば ALS の病態解明と進行抑制に有用であろうと考えている。

<sup>i)</sup> Kikuchi S, et al. J Neurosci Res 69; 373-381 (2002)

<sup>ii)</sup> Urushitani M, et al. J Neurochem 83; 1030-1042 (2002)

<sup>iii)</sup> Kabashi E, et al. J Neurochem 89; 1325-1335 (2004)

<sup>iv)</sup> Vlug AS, et al.: ALS other motor neuron disorders; 16-21 (2004)

<sup>v)</sup> Vanselow BK, et al. J Physiol 525; 433-445 (2000)

<sup>vi)</sup> Shaw PJ, et al. J Neurol Sci 139 Suppl; 71-75 (1996)

# 運動ニューロン疾患患者髄液サイトカイン/ケモカインの fluorescent bead - based immunoassay 法を用いた多項目同時測定による解析

吉良潤一<sup>1)</sup>, 田中正人<sup>1)</sup>, 石津尚明<sup>1)</sup>, 小副川学<sup>1)</sup>, 三野原元澄<sup>2)</sup>, 谷脇考恭<sup>1)</sup>, 菊池仁志<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>所属：九州大学大学院医学研究院神経内科

<sup>2)</sup>所属：九州大学病院神経内科

## 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの運動ニューロン疾患 (Motor neuron disease, MND) の病因仮説の一つとして近年、免疫・炎症機転の関与が注目されている。本研究で我々は、fluorescent bead-based immunoassay 法を用い、MND 患者髄液における多項目サイトカインの同時解析を行い、MND における免疫・炎症機転の関与を検討した。MND 患者群では Th2 系サイトカイン/ケモカインの活性化に関与する髄液中 IL-5、MCP-1、G-CSF の有意な上昇が認められた。また、IL-8 と MCP-1 の正相関、両ケモカインと髄液蛋白との正相関、MCP-1 と ALSFRS-R との逆相関がそれぞれ認められ、MND における中枢神経系での免疫・炎症機転が運動ニューロン傷害過程の一因子として関与している事が示唆された。

## はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を代表とする運動ニューロン疾患 (Motor neuron disease, MND) は現段階で有効な治療法に乏しい。MND は原因不明であるが、病因仮説の一つとして、免疫・炎症機転の関与が挙げられている。これまで MND における免疫・炎症機転の解析に関してさまざまな報告がなされている。中でもサイトカイン/ケモカインの発現解析に関しては、MND 患者髄液中の interleukin(IL)-6<sup>1)</sup> および monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の上昇<sup>2)</sup>、血清中 MCP-1 の上昇<sup>3)</sup>などが報告されている。本研究で我々は、fluorescent bead-based immunoassay 法を用いることで MND 患者髄液における多項目サイトカインの同時解析を行い、MND にお

ける免疫・炎症機転の関与を検討した。

## 方法

孤発性MND患者 37名 (年齢：37~77、平均 61.2歳、罹病期間：20.1±20.5 (SD)ヶ月)、遺伝性MND患者 5名、孤発性脊髄小脳変性症 (SCD) 患者 15名 (年齢：47~80、平均 61.9歳、罹病期間：41.5±39.0 (SD)ヶ月)、非炎症性神経疾患 (OND) 患者 18名 (年齢：20~73、平均 51.0歳) 髄液の 16種類サイトカイン/ケモカイン (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), MCP-1, macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ ) を fluorescent

bead-based immunoassay 法により同時測定し、*Mann-Whitney U-test*を用いて比較検討した。MND 患者においては機能評価として revised ALS functional rating scale (ALSFRS-R) を用い、一般髄液検査所見を含め臨床所見との相関を、*Spearman* 順位相関係数を用いて比較検討した。

### 結果

MND 患者群の髄液では、OND 患者群と比較し G-CSF ( $19.3 \pm 17.6$  vs  $10.3 \pm 6.5$  pg/ml,  $p=0.0173$ )、MCP-1 ( $251.4 \pm 79.4$  vs  $173.2 \pm 45.2$  pg/ml,  $p=0.0003$ )、IL-5 ( $1.2 \pm 0.29$  vs  $0.91 \pm 0.17$  pg/ml,  $p<0.0001$ ) の有意な上昇を認めた。SCD 患者においては、MCP-1 ( $265.1 \pm 90.9$  vs  $173.2 \pm 45.2$  pg/ml,  $p=0.0015$ ) のみで OND 患者と比較し有意な上昇を認めた (図 1)。

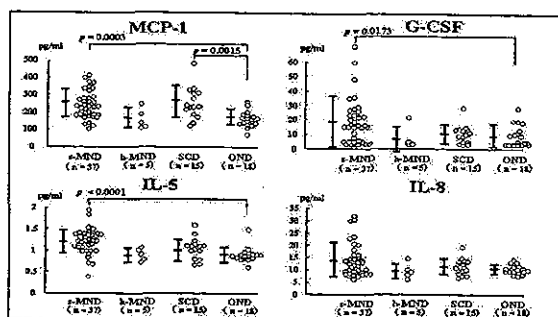


図 1. 孤発性 MND (s-MND)、遺伝性 MND (h-MND)、SCD、OND における髄液サイトカイン/ケモカインの比較。

OND 患者髄液の mean + 2SD 以上の値を示すものを異常高値症例とし、各群の総数における割合を異常率と定義した。MND と OND で比較検討すると、MCP-1 ( $p=0.0114$ )、IL-5 ( $p=0.0074$ )、IL-8 ( $p=0.0181$ ) において有意な上昇を認めた (図 2)。

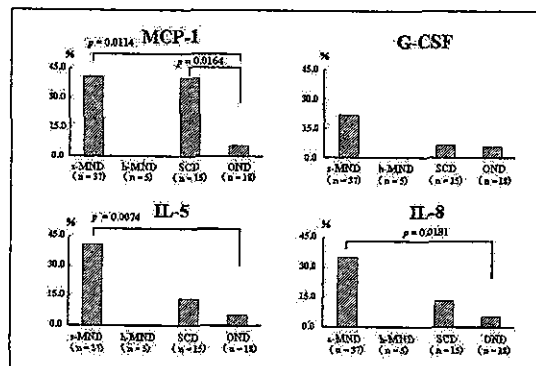


図 2. s-MND、h-MND、SCD、OND における髄液サイトカイン/ケモカイン異常率の比較。

各種サイトカイン/ケモカイン同士では MCP-1 と IL-8 で相関が認められ ( $r=0.432$ ,  $p=0.0095$ )、両者のみで髄液蛋白との相関が認められた (MCP-1 ( $r=0.359$ ,  $p=0.0425$ )、IL-8 ( $r=0.407$ ,  $p=0.0212$ ))。ALSFRS-R とは MCP-1 のみで逆相関が認められ ( $r=-0.538$ ,  $p=0.0013$ )、重症例ほど髄液 MCP-1 値が高値であった (図 3)。

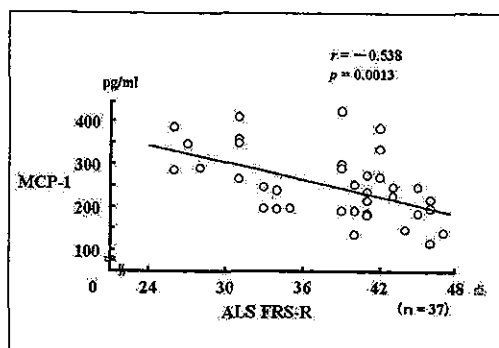


図 3. 髄液 MCP-1 値と ALSFRS-R との相関。

### 考察

本研究では、MND における髄液サイトカイン/ケモカインの変動が示された。中でも髄液 IL-5、MCP-1、G-CSF の有意な上昇が認められ、これらは Th2 系サイトカイン/ケモカインの活性化に関与している。また、

IL-8 と MCP-1 の相関、両ケモカインと髄液蛋白との相関、MCP-1 と ALSFRS-R との相関がそれぞれ認められ、MND における中枢神経系での炎症細胞誘導が運動ニューロン傷害過程の一因子として作用している事が示唆された。

Ford<sup>4)</sup> らは、孤発性 ALS 患者髄液における Th1 サイトカインである IL-12 と IFN- $\gamma$  の発現低下を報告し、Th1 サイトカインの関与を否定している。また、近年 Appel らのグループ<sup>2,3)</sup> により ALS での免疫機序の解析が多くなされており、我々の結果と同様に髄液 MCP-1 が有意に高いと報告している。さらに彼らの報告では、ALS 患者血清においては MCP-1 が Appel score と有意に逆相関 (ALS 重症例ほど MCP-1 が低値) し、MCP-1 の中枢神経系での活性化を示唆している。MCP-1 はアストロサイトや血管内皮細胞から放出され、ミクログリアの誘導に関与すると報告されており<sup>5,6)</sup>、また、IL-5 によるミクログリアの活性化も報告されている<sup>7)</sup>。以上の事より、MCP-1 や IL-5 によるミクログリアの活性化は MND における運動ニューロン傷害に寄与している可能性が考えられる。

一方、G-CSF は EAE モデル動物の実験結果より神経細胞に対する防御的な作用が報告されている<sup>8)</sup>。MND における G-CSF に関する報告はなく、今後さらに解析を進めていく必要がある。

#### 結論

髄液中の多項目サイトカイン/ケモカインの同時測定による解析で、MND では、Th2 系サイトカインの活性化が示唆された。なかでも MCP-1 は MND の重症度と相関し MND の傷害過程においてミクログリアな

どの炎症細胞誘導に関与している事が示唆された。

#### 文献

- 1 Sekizawa T et al. :  
J Neurol Sci 194-199, 1998.
- 2 Henkel JS et al. :  
Ann Neurol 221-235, 2004.
- 3 Simpson EP et al. :  
Neurology 1758-1765, 2004.
- 4 Lara SF et al. : ALS and other motor neuron disorders 118-120, 2004.
- 5 Panenka W et al. :  
J Neurosci 7135-7142, 2001.
- 6 Sung FL et al. :  
Mol Cell Biochem 121-128, 2001.
- 7 Liva SM et al. :  
Neurochem Res 629-637, 2001.
- 8 Zavala F et al. :  
J Immunol 2011-2019, 2002.

筋萎縮性側索硬化症における nestin の発現に関する  
免疫組織学的検討  
—Creutzfeldt-Jakob 病との対比—

水野裕司<sup>1)</sup>、竹内利行<sup>2)</sup>、高玉真光<sup>3)</sup>、  
大浜栄作<sup>4)</sup>、中里洋一<sup>5)</sup>、高橋 均<sup>6)</sup>、岡本幸市<sup>1)</sup>

- 1) 群馬大学大学院医学系研究科脳神経内科学
- 2) 群馬大学医学部生体調節研究所
- 3) 老年病研究所附属病院
- 4) 鳥取大学医学部脳幹性疾患研究所
- 5) 群馬大学大学院医学系研究科病態病理学
- 6) 新潟大学医学部脳研究所

研究要旨 我々は最近 Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) の小脳 Purkinje 細胞では神経幹細胞や神経前駆細胞のマーカーである nestin の発現が増加し、さらに小脳皮質の変性が強いほど nestin の発現が強くなることを報告した。この結果は CJD の Purkinje 細胞が何らかの機序を介して再活性化されている可能性を示唆していると考えた。今回計 19 例の CJD を再検討したところ、Purkinje 細胞の染色性には種々のパターンのあることがわかった。また、小脳・側頭葉の白質には nestin 陽性の小さな神経細胞が存在することも判明した。一方、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では最も強い変性所見がみられる脊髄前角細胞が CJD の Purkinje 細胞と同様に nestin 陽性になるか否かを検討するために、CJD、非 CJD・非 ALS を含む脊髄パラフィン切片を抗 nestin 抗体で染色した。ALS 例、非 ALS 例の脊髄前角細胞では、CJD の Purkinje 細胞のように nestin の発現増加を示す例はみられなかった。しかし、ALS に特徴的な構造物である Bunina 小体の一部、Lewy body-like hyaline inclusion の外周、axonal swelling に相当する部位が nestin 陽性反応を示した。これらの nestin 陽性所見の意味づけは不明であった。

はじめに

Nestin は神経幹細胞、神経前駆細胞のマーカーとして広く利用されている中間径フィラメントであるが、今までのところ神経変性疾患における nestin の発現に関する報告は少

ない。我々は最近 Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) の小脳 Purkinje 細胞の樹状突起、胞体、torpedo が抗 nestin 抗体で微細顆粒状に染色されることを報告した<sup>1)</sup>。一方、多系統萎縮症 (MSA) と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の

Purkinje細胞には同様の所見は認められなかった。CJDにおけるPurkinje細胞は比較的変性を受けずに残存するといわれており、これらの現象はPurkinje細胞が再活性化され、本来存在していないnestinを発現することによって死滅せずに残存しているのではないかという可能性を考えた。また、CJDの側頭葉にみられるballooned neuronsにもnestinの発現増加があり、Purkinje細胞と同様の機序が存在しているのではないかと推定している<sup>2)</sup>。

我々は今まで3例のCJDの免疫組織染色の結果をもとに報告してきたが<sup>1) 2)</sup>、今回は16例のCJD剖検例を追加し、計19例について、小脳と側頭葉を検討した。さらにALSの脊髄パラフィン切片を抗nestin抗体で免疫染色し、ALSでは最も強い変性所見がみられる脊髄前角細胞にnestinの発現増加がみられるか否かを検討した。

## 対象および方法

### 1. 対象

19 CJD剖検例の小脳および側頭葉のパラフィン切片、3例のCJD脊髄、35例のALS脊髄、20例の非CJD・非ALS脊髄のパラフィン切片を用いた。なお、19例のCJD小脳および側頭葉は共同研究者の所属する4施設の剖検例を使用した。脊髄は主として老年病研究所で剖検された症例を用いた。さらに主として小脳皮質の顆粒細胞層の変性状態により小脳病変を軽度、中等度、重度の3段階に分け、それぞれにおいてnestinの発現状況が異なるか否かを検討した。

### 2. 抗体

抗nestin抗体は共同研究者である竹内らが作製した抗体で、ヒトnestinアミノ酸配列

のC末端17個のアミノ酸を抗原として作製したウサギポリクローナル抗体である<sup>3)</sup>。

抗human  $\beta$ -tubulin III抗体はCymbus Biotechnology LTDより、抗microtubule-associated protein 2 (MAP2)抗体はSanta Cruz Biotechnology, Inc.より購入した。

### 3. 染色

4% paraformaldehydeで固定後、パラフィンに包埋した。5  $\mu$ mの厚さで切片を作製し、Histofine SAB-PO kit (Nichirei)を用い、ブロッキングを室温で30分、1次抗体を4°Cで15~18時間、PBSでの洗浄を30分、2次抗体を室温で30分、PBSでの洗浄を30分した後、avidin-biotin-peroxidase法で発色した。なお、抗human  $\beta$ -tubulin III抗体の使用に際しては前処置として、オートクレーブでの10分間処置を行った。

## 結果

我々は2003年に3例のCJDを検索した結果、Purkinje細胞の染色性は小脳皮質の変性が強いほどnestinの発現が強くなると報告した<sup>1)</sup>。そこで今回は症例を追加し計19例(軽度が3例、中等度が2例、重度が14例)を検討したところ、変性の程度とnestinの発現との間には明らかな相関はなく、いずれの場合もPurkinje細胞は良く染色されることがわかった。さらにPurkinje細胞のnestin染色性には数種類のパターンが存在していた。多くは胞体、樹状突起、torpedoを含むPurkinje細胞は微細顆粒状に染色されたが、その他に胞体内や胞体の周囲が粗大顆粒状に染色されたり、Purkinje細胞が脱落しているにもかかわらず、その跡に点状の陽性構造を認めたりするものがみられた。

また、小脳及び側頭葉白質に少数の nestin 陽性の小型細胞を認めたが、この細胞はさらに神経細胞のマーカーである MAP2 にも陽性反応を示したので、白質に存在したこれらの小型細胞は神経細胞であると解釈した。数的には非常に少なく、1 つも認められない切片もあった。Ballooned neurons は nestin のみならず、 $\beta$ -tubulin III、MAP2 の 3 種類の抗体で陽性であり、異常共存であると思われた。

脊髄に関しては CJD、ALS、非 CJD・非 ALS の前角細胞はいずれも nestin の抗体では染色されなかった。また、リポフスチン顆粒が染色される切片と染色されない切片が存在したが、その理由は不明であった。しかし、ALS に特徴的な構造物である Bunina 小体の一部はその周囲を取り囲むように nestin で染色された (図)。これは nestin 染色後にエオジン染色を追加するとエオジンで強く染色されることより確認した。

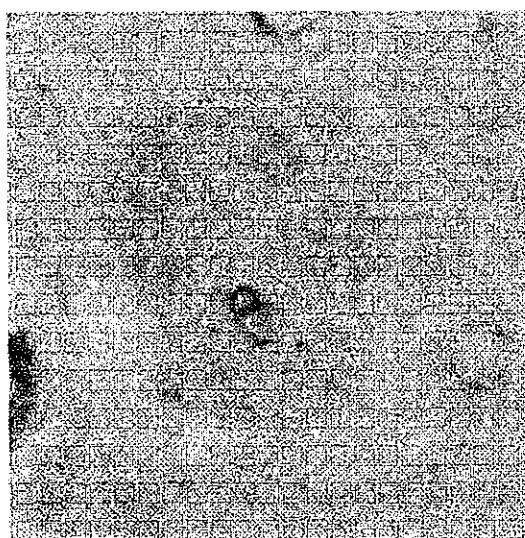


図 ALS 脊髄前角細胞内に辺縁が nestin で陽性の 2 つの円形構造物がみられる。エオジンによる後染色を行うとこれらの内部は赤染し Bunina 小体と判断した。Nestin 免疫染色、400 倍

さらに Lewy body-like hyaline inclusion の外周 (nestin 染色後にエオジン染色を追加して確認)、axonal swelling に相当する部位が同じく nestin 陽性であった。前角細胞がほとんど消失している変性の強い切片においても、astrocyte が特に nestin を強く発現しているという所見もみられなかった。

## 考察

神経幹細胞は発生中の脳だけではなく、成体の脳にも存在し、その部位は側脳室周囲と海馬の歯状回であるといわれている。従って、nestin が小脳の Purkinje 細胞<sup>1)</sup>や ballooned neurons<sup>2)</sup> に強く発現しているという所見や、小脳・側頭葉白質に数は非常に少ないものの nestin 陽性の小型の神経細胞が存在するということは興味深い事実である。

CJD においては、Purkinje 細胞は比較的変性を免れていると思われているが、そこに nestin が発現している意義は、Purkinje 細胞が何らかの機序を介して再活性化され、一時的にも死滅を免れているのではないかと我々は考えている。そこで今回、ALS において強い変性を受けながらも残存している脊髄前角細胞にも、Purkinje 細胞や ballooned neurons と同様な現象が起こっていないかどうかを検索したが、残存する脊髄前角細胞では nestin の発現増加がみられなかった。これらの所見は、CJD の Purkinje 細胞や ballooned neurons と ALS の前角細胞、あるいは nestin 陰性であった MSA の Purkinje 細胞の変性機序が少なくとも同じではないことを示唆していると考えられる。

## 文献

- 1) Mizuno Y et al: Neurosci. Lett. 352,

109-112, 2003

2) Mizuno Y et al: Neurosci. Lett. 366,  
144-147, 2004

3) Sugawara K et al: Lab. Invest, 82,  
345-351, 2002.



## ALS モデルマウスへの IGF-1 治療における IGF-1R $\beta$ および IRS-1 の変化

永野 功<sup>1)</sup>、奈良井恒<sup>1)</sup>、Hritelina Ilieva<sup>1)</sup>、太田康之<sup>1)</sup>、永田哲也<sup>1)</sup>、東海林幹夫<sup>1)</sup>、  
阿部康二<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

### 研究要旨

ALS に対する IGF-1 髄注療法の確立を目指して、G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウス(Tg マウス)に IGF-1 の持続的髄注を行い、腰髄組織での IGF-1 受容体(IGF-1R)と IRS-1 の発現を調べた。Tg マウスでは、腰髄組織での IGF-1R と IRS-1 の発現が対照に比べて増加していた。IGF-1 投与群の腰髄組織において、IGF-1R と IRS-1 の発現は著明に低下した。IGF-1 は IGF-1R と IRS-1 を介して、PI3-K/Akt および MEK/ERK を活性化し、運動ニューロン死を抑制する可能性が示唆された。

### はじめに

Insulin-like growth factor-1(IGF-1)はインスリン類似の神経栄養因子で、運動ニューロン保護作用を持つことが報告されている。しかし、ALS 患者への皮下注による治験では明らかな有効性を示さなかった。我々は、脊髄組織への移行を改善させるために、IGF-1 を直接腰部脊髄腔内へ注入し、これにより G93A 変異型ヒト SOD1 トランスジェニックマウス(Tg マウス)の生存期間が延長することを観察した。IGF-1 の効果の機序を見るために、その受容体 IGF-1R と細胞内関連タンパク質 IRS-1 の発現を、各群で比較した。

### 方法

動物は変異型ヒト SOD1(G93A) トランスジェニックマウス(Tg マウス)は、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)より購入し、C57B/L の background で維持した。対照としては non-transgenic littermates を用いた。ヒトリコンビナント IGF-1 は人工髄液に溶解して浸透圧ポンプ(#2004、Alzet)を用いて、高用量(1 mg/kg/day)、低用量(0.1 mg/kg/day)および vehicle の 3 群で持続的注入を施行した。140 日齢より腰部くも膜下腔へ注入を開始。定期的に運動機能を調べ、240 日齢で腰髄を取り出して凍結切片を作成した。L4 髄節からの連続切片を Nissl 染色および ChAT 免疫染色(anti-ChAT, Chemicon International, Temecula, CA, USA)して運動ニュー

ロン数をカウント。IGF-1R は $\beta$  chain を(sc-713, Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA) 免疫組織化学的に ABC 法で検出。また IRS-1 は、Upstate Biotech. の抗体を使用して検出した (#06-248, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)。

### 結果

IGF-1 髄注によって用量依存的に運動機能の低下が遅延することが見出された。240 日齢での L4 髄節の運動ニューロン数を比較すると、vehicle 治療群で non-Tg littermate に比べて 77.6%減少していたのに対して、低用量群で 40.7%、高用量群で 20.9%の減少に留まった(Fig. 1)。

IGF-1R $\beta$ または IRS-1 陽性運動ニューロン数は、Figs. 2A, 2B に示すように、non-transgenic littermates に比べて、vehicle を投与した Tg マウスで上昇していた。これに対して IGF-1 髄注群では、IGF-1R $\beta$ または IRS-1 陽性運動ニューロン数が著明に減少していることが見出された。

### 考察

今回得られた結果から、IGF-1 の運動ニューロン保護作用は変異型 SOD1 発現マウスにおいても発揮されていると考えられた。Kaspar らは AAV を用いて IGF-1 遺伝子を G93A Tg マウスに導入することで、症状進行の抑制を観察しており、IGF-1 は in vivo でも運動ニューロン保護

作用を示すことが考えられる。この作用は、IGF-1R から IRS-1 を介して、PI3-K/Akt および MEK/ERK の pathway を通じて発揮されることが推測される。興味深いことに、Tg マウス脊髄組織での、IGF-1R と IRS-1 の発現は著明に亢進していた。Wilczak らは、ALS 患者脊髄組織で free IGF-1 が 53%程度に低下しており、IGF-1R と IRS-1 の発現が上昇している

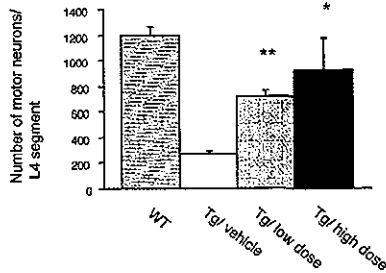


Figure 1. Motor neurons of G93A mice treated with IGF-1 significantly outnumber those treated with vehicle. The number of motor neurons per millimeter in the middle of the L4 segment is shown. The values are means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus vehicle treatment.

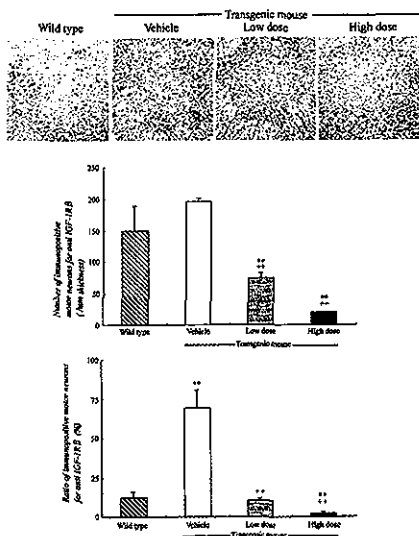


Figure 2A. Immunohistochemistry for IGF-1R  $\beta$  in the anterior horn of wild type and SOD1<sup>G93A</sup> mice (upper panel), numbers of immunopositive motor neurons (middle panel), and ratios (bottom panel). Note the similar numbers of immunopositive motor neurons between wild type and Tg mice with vehicle treatment, and the dose dependent decrease with IGF-1 treatment (upper and middle panels). Scale bar in a = 100  $\mu$  m (also applies to all other panels).

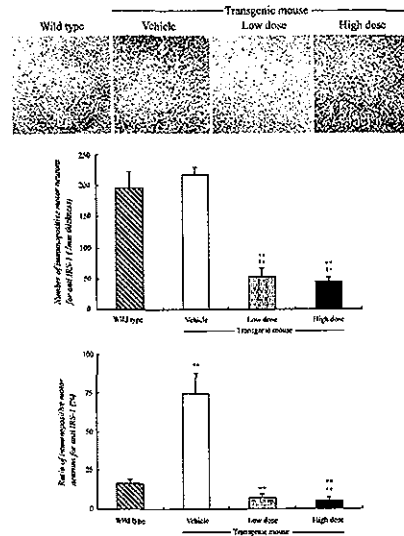


Figure 2B. Immunohistochemistry for IRS-1 in the anterior horn of wild type and SOD1<sup>G93A</sup> mice (upper panel), numbers of immunopositive motor neurons (middle panel), and ratios (bottom panel). Note the similar numbers of immunopositive motor neurons between wild type and Tg mice with vehicle treatment, and the dose dependent decrease with IGF-1 treatment (upper and middle panels). Also note the increase of the ratio in Tg mice with vehicle treatment, and the dose dependent decrease with IGF-1 treatment (bottom panel). Scale bar in a = 100  $\mu$  m (also applies to all other panels).

ことを報告しており、これは IGF binding proteins (IGFBP) 2, 5 and 6 の増加によるものと推定している。これに対して、IGF-1 髄注により脊髄の free IGF-1 上昇によって、IGF-1R と IRS-1 は低下した。これは過剰の IGF-1 によって downregulation が惹起されたものと推定される。これらの結果から、Tg マウス脊髄ではおそらく free IGF-1 が減少しており、その結果 IGF-1R と IRS-1 が増加していること、また IGF-1 投与によって IGF-1R を介して IRS-1 以下の活性化が惹起され、生存因子を上昇させることによって運動ニューロンを保護することが推測された。

#### まとめ

IGF-1 髄注療法により、Tg マウス脊髄において IGF-1 受容体以下の活性化がおり、最終的には PI3-K/Akt と MEK/ERK の活性化によって、運動ニューロン死が抑制される。IGF-1 髄注療法は、ALS 患者への応用が期待される。

## 文献

1. Gurney ME, et al. *Science* 264: 1772-1775, 1994.
2. Adem A, et al. *J Neural Trans Gen Sect* 97: 73-84, 1994.
3. Braunstein GD, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50: 792-794, 1987.
4. Wilczak N, et al. *Lancet* 361: 1007-1011, 2003.
5. Kaspar BK, et al. *Science* 301: 839-842, 2003.

## siRNA 過剰発現による SOD1 ノックダウンマウスを用いた

### 筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療

水澤英洋<sup>1)</sup>、齋藤友紀<sup>1)</sup>、伊藤 薫<sup>1)</sup>、安齋政幸<sup>2)</sup>、三谷 匡<sup>2)</sup>、横田隆徳<sup>1)</sup>

1) 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

2) 近畿大学 先端技術総合研究所

#### 研究趣旨

Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) に対する small interfering RNA (siRNA) トランスジェニックマウスを作製し、ES 細胞レベルでマウスに導入したところ、siRNA を過剰に発現したトランスジェニックマウス (TgM) が作製できた。このマウスでは全身性に SOD1 タンパクの発現が抑制されていた。

SOD1-siRNA TgM と G93A SOD1 TgM の掛け合わせにより、SOD1-siRNA トランスジェニックマウスと G93A SOD1 トランスジェニックマウスの両方を有するダブル TgM が作製できた。このマウスにおいて G93A SOD1 タンパクの発現抑制が認められた。マウスにおける ALS の発症の予防ないし進行の抑制が期待され、ヒトにおいても siRNA がうまくデリバリーできれば強力な治療法になるものと思われる。

#### はじめに

RNA interference は二本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) によって配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。細胞内に導入された dsRNA が約 21 塩基の短い断片に分解され (siRNA)、これが RNA-ヌクレアーゼ複合体である RISC (RNA induced silencing complex) の形成を誘導し、siRNA 配列に相補的な配列をもつ mRNA を分解すると考えられている。

ALS の原因の一つとして SOD1 遺伝子変異があげられ、疾患の発症に変異タンパクの gain of toxic function が関与していることが想定されている。この変異タンパクの発現を抑制することで疾患の発症や進行を防げる可能性があり、本研究では siRNA を用いて変異遺伝子の発現抑制を試みた。

#### 方法

##### 1) SOD1-siRNA TgM の作製

SOD1 mRNA に対する siRNA 発現断片を作製し、受精卵へのマイクロインジェクション法と ES 細胞を用いた方法の二つの方法でマウスに導入した。

ES 細胞を用いた方法では、まずマウス ES 細胞に SOD1-siRNA 発現断片を導入し、クローンを選択した。高率に SOD1 タンパクの発現を抑制したクローンからキメラマウスを作製し F1 マウスを得た。

##### 2) TgM の解析

尾から抽出したゲノム DNA から PCR 法でトランスジェニックマウスを確認した。また、尾からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティング法で SOD1 タンパクを検出した。

作製された TgM およびコントロールとな