

穿刺は1トラック、STNの初回側（視床手術側と同側の左側）は4トラック、STNの2回目（右側）も同じく4トラックの穿刺を要していた。

D. 考察

STN-DBS手術の術後成績は4～5年の中長期予後も概ね良好であることが報告されている。2005年に報告されたRodriguez-Orozらの多施設共同研究によれば術後のUPDRS総運動スコアはL-dopa薬on/offそれぞれにおいて術前の半分に改善したが、なかでも振戦に関連するスコアは著減し、しかも長期にわたって効果が持続していた。当施設におけるこれまでの実績でも、STN-DBS手術により、若年発症のパ病では術後服薬量がL-dopa換算量で約1/4に、壮年発症の例でも半分程度に内服薬を減らすことができていた。全般的なParkinson病の症状を改善させる目的では、視床下核内の刺激至適部位は視床下核背側が推奨されているが、時にこの部位の限局した刺激では、振戦が十分抑制できないこともあり、最近我々は視床凝固とSTN-DBSの同時手術を行っている。手術目標部位を増やすことで穿刺に伴う合併症の危険も増加することが危惧されるが、個々の穿刺数を減らし効率よく目標点を捕らえることであれば、安全に手術を行い得ると思われる。

パ病の遺伝子治療を開始するにあたっては、AADC遺伝子を組み込んだAAVベクターを安全・確実に脳内の目標とす

る部位に到達させる技術が必要とされるが、今回検討した視床・視床下核の穿刺に比して、被殻を目標とする穿刺はその構造の大きさから容易であることが予想される。視床下核穿刺を行う際のトラック数を検討したが、それぞれのトラックは2mmの間隔でグリッド状に配置されており、最多穿刺を要した8トラックの症例でも、最も離れた位置となる2つのトラック間の距離は10mmに満たなかった。通常の画像誘導手術を行う場合、被殻を対象とすればこの距離は全てその構造内に収まる数値であり、複数回の穿刺を行うことなく、極めて確実な目標構造への到達が予想される。

両側同時手術を行う場合、仰臥位で前頭部に穿頭、硬膜切開を置く事により、脳脊髄液の流出とクモ膜下腔への空気の流入により、大脳組織が沈下する為に前後方向での目標のズレが生じることが報告されている。通常のパ病に対する手術も遺伝子導入の為の手術も共に目標は大脳深部の基底核であることより、脳実質のシフトの影響は大脳皮質に比べ少ないが、STNの場合は約2mmの誤差を生じうる、といわれている。この差は髄液の流出量や頭部固定の高さ等により、症例毎に異なるので、初回穿刺時には前後方向での目標探索が必要となる。しかし、一側で目標部位が確定できれば、対側も同程度の脳沈下が起こっている事が予測されることより、最初から前後方向の目標座標を修正して穿刺することができる。この

判断により、2回目の穿刺（対側穿刺）では、初回穿刺に比して穿刺トラック数を減らすことが可能になっていると思われる。

今回検討した19例では、39個所の目標点を捕らえる為に129トラックの準微小電極による穿刺が行われたが、術直後に撮影した頭部CTスキャンにて頭蓋内出血の合併は皆無であった。

E. 結論

MRI と 定 位 脳 手 術 支 援 ソ フ ト StereoPlan を用いた画像誘導定位脳手術において、目標点は平均 3.3 回の穿刺で安全に捕らえることができ、目標に至るまでに仮穿刺を行った経路も目標トラックから数 mm 未満のところを位置していた。この方法であれば、被殻を対象とした定位脳手術では一回の穿刺で確実に目標部位に到達する事が可能と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 加藤正哉、藤本健一、小泉唯子、渡辺英寿：視床腹中間核凝固を組み合わせた視床下核法、第64回日本脳神経外科学会総会（2005.10.6、横浜）

2) 小泉唯子、加藤正哉、渡辺英寿：近赤外線光トポグラフィーを用いた STN-DBS 中の局所脳血流測定 第45回日本定位・機能神経外科学会（2006.1.21、大宮）

3) 加藤正哉、小泉唯子、藤本健一、渡

辺英寿 振戦に対する視床下核刺激療法と視床凝固術の併用 第45回日本定位・機能神経外科学会（2006.1.21、大宮）

H. 知的財産権の出願・取得状況

該当なし

6-FMT 合成プロセス確立に関する研究

研究者 佐藤俊彦 宇都宮セントラルクリニック院長

研究要旨：パーキンソン病の主要原因である線条体ドーパミン濃度の増減診断が可能な 6-FMT の合成プロセスを確立した。合成プロセスは、① ^{18}O ガスと $\text{Ar}+\text{F}_2$ 混合ガスへの 10 MeV の陽子線を順次照射による ^{18}F ガスの製造、② ^{18}F ガスを酢酸ナトリウムカラムに通じる ^{18}F -acetyl hypo fluorite の製造、③ ^{18}F -acetyl hypo fluorite と 6-FMT 前駆体の N-Trifluoroacetyl-5-acetoxy-2-trimethylstannyl-L-phenylalanine ethyl ester との反応とその後の臭化水素による加水分解、④高速液体クロマトグラフィでの 6-FMT 分取である。このプロセスにより、6-FMT を合成できることを確認した。

A、研究目的

パーキンソン病の遺伝子治療対象患者のスクリーニングが可能な PET 用 RI 検査薬の 6-FMT (6-Fluorometatyrosine) の合成プロセスを確立する。特に、 ^{18}F ガスの製造、この ^{18}F ガスと反応前駆体との標識反応、この反応物からの 6-FMT 分離などの各プロセスの詳細条件を決定する。

B、研究方法

これまでの 6-FMT 合成事例を文献調査し、今回使用する 10 MeV 陽子線加速器で実施可能なプロセスを選定すると同時に、このプロセスの妥当性を実験的に検証する。

① ^{18}F ガスの製造

^{18}O ガスへの陽子線照射により ^{18}F ガスを製造するが、その際の ^{18}O ガスの適正充填圧力と照射電流を決定する。また、 ^{18}F ガスの大部分は ^{18}O ガスを充填した金属ターゲット内壁に吸着されるため、この吸着 ^{18}F の回収方法を検討する。

② ^{18}F -acetyl hypo fluorite の製造

ターゲットより回収した ^{18}F ガスを酢酸ナトリウムと反応させて ^{18}F -acetyl hypo fluorite を製造するが、カラム法により実証する。

③ 6-FMT 標識反応

^{18}F -acetyl hypo fluorite と反応前駆体との反応により ^{18}F をフェニル基の 6 位置に置換する。今回は、反応前駆体として N-Trifluoroacetyl-5-acetoxy-2-trimethylstannyl-L-phenylalanine ethyl ester を使用し、置換反応を確認する。また、その後の加水分解に臭化水素を使用し、加水分解反応も確認する。

④ 高速液体クロマトグラフィーによる 6-FMT の分取

加水分解反応後の反応液から高速液体クロマトグラフィーにより、6-FMT が分取可能であることを確認する。

(倫理面への配慮)

今回の研究では、ヒトへの直接投与は行わない。

C、研究結果

これまでの6-FMT合成に関する文献調査の結果、FDG合成のように ^{18}F マイナスイオンから合成するプロセスはいまだなく、 ^{18}O ガスへの陽子線照射によって製造する ^{18}F ガスから合成するプロセスしかないことがわかった。したがって、本研究ではこのプロセスを順次実験的に検討すると同時に、適切な運転条件を決定した。

① ^{18}F ガスの製造

(第1プロセス)

アルミターゲットに、 $^{18}\text{O}_2$ ガスを充填し、エネルギー10MeVの陽子線を照射10分間照射。

$^{18}\text{O}_2$ ガス充填圧力：13Kg/cm²

照射電流：3.1 μA

(第2プロセス)

第1プロセス終了後に、ターゲットから $^{18}\text{O}_2$ ガスを抜き出し、代わって、Ar+F₂ガス及びArガスを充填し、陽子線を再度15分間照射した。

Ar+F₂ガス充填圧力：4Kg/cm²

Arガス充填圧力：8Kg/cm²

照射終了後に上記ガスを回収し、 ^{18}F 約20mCiを得た。

② ^{18}F -acetyl hypo fluoriteの製造

上記のAr+F₂ガスを酢酸ナトリウム

(ソーダライム)カラムに通じて ^{18}F -acetyl hypo fluoriteを製造した。 ^{18}F 収量に対し、 ^{18}F -acetyl hypo fluoriteの製造収率は93%であった。

③ 6-FMT標識反応

N-Trifluoroacetyl-5-acetoxy-2-trimethylstannyl-L-phenylalanine ethyl esterを酢酸水溶液に溶かし、 ^{18}F -acetyl hypo

fluoriteガスを吹き込み標識反応を実施した。反応液を減圧蒸留により酢酸を除去した後、臭化水素溶液を加え、130℃で加水分解を実施した。

④ 高速液体クロマトグラフィーによる6-FMTの分取

上記加水分解後の反応液を減圧蒸留により臭化水素を除去し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により6-FMTを分離生成した。合成収率は、 ^{18}F ガスを基準に約20%であった。

D、考察

^{18}F ガスの製造に関し、第1プロセスの照射のみでは、生成した ^{18}F ガスがターゲットに吸着し、回収できなかった。第2プロセスにより、吸着 ^{18}F をArガス中に回収できたが、回収効率は理論値に対し約60%であった。臨床応用には支障ないが、今後さらに最適化できる可能性がある。

E、結論

今回の一連のプロセス検討と実験的な検証により、6-FMT合成のプロセス検証と詳細条件を決定できた。パーキンソン病治療のためのスクリーニング検査のための6-FMT薬剤の製造が可能となった。

G、研究発表

1、論文発表

2、学会発表

H、知的財産権の出願・登録状況

なし。

6-FMT 合成プロセス確立に関する研究

研究者 佐藤俊彦 宇都宮セントラルクリニック院長

研究要旨：パーキンソン病の主要原因である線条体ドーパミン濃度の増減診断が可能な 6-FMT の合成プロセスを確立した。合成プロセスは、① ^{18}O ガスと $\text{Ar}+\text{F}_2$ 混合ガスへの 10MeV の陽子線を順次照射による ^{18}F ガスの製造、② ^{18}F ガスを酢酸ナトリウムカラムに通じる ^{18}F -acetyl hypo fluorite の製造、③ ^{18}F -acetyl hypo fluorite と 6-FMT 前駆体の N-Trifluoroacetyl-5-acetoxy-2-trimethylstannyl-L-phenylalanine ethyl ester との反応とその後の臭化水素による加水分解、④高速液体クロマトグラフィでの 6-FMT 分取である。このプロセスにより、6-FMT を合成できることを確認した。

A、研究目的

パーキンソン病の遺伝子治療対象患者のスクリーニングが可能な PET 用 RI 検査薬の 6-FMT (6-Fluorometatyrosine) の合成プロセスを確立する。特に、 ^{18}F ガスの製造、この ^{18}F ガスと反応前駆体との標識反応、この反応物からの 6-FMT 分離などの各プロセスの詳細条件を決定する。

B、研究方法

これまでの 6-FMT 合成事例を文献調査し、今回使用する 10MeV 陽子線加速器で実施可能なプロセスを選定すると同時に、このプロセスの妥当性を実験的に検証する。

① ^{18}F ガスの製造

^{18}O ガスへの陽子線照射により ^{18}F ガスを製造するが、その際の ^{18}O ガスの適正充填圧力と照射電流を決定する。また、 ^{18}F ガスの大部分は ^{18}O ガスを充填した金属ターゲット内壁に吸着されるため、この吸着 ^{18}F の回収方法を検討する。

② ^{18}F -acetyl hypo fluorite の製造

ターゲットより回収した ^{18}F ガスを酢酸ナトリウムと反応させて ^{18}F -acetyl hypo fluorite を製造するが、カラム法により実証する。

③ 6-FMT 標識反応

^{18}F -acetyl hypo fluorite と反応前駆体との反応により ^{18}F をフェニル基の 6 位置に置換する。今回は、反応前駆体として N-Trifluoroacetyl-5-acetoxy-2-trimethylstannyl-L-phenylalanine ethyl ester を使用し、置換反応を確認する。また、その後の加水分解に臭化水素を使用し、加水分解反応も確認する。

④ 高速液体クロマトグラフィーによる 6-FMT の分取

加水分解反応後の反応液から高速液体クロマトグラフィーにより、6-FMT が分取可能であることを確認する。

(倫理面への配慮)

今回の研究では、ヒトへの直接投与は行わない。

C、研究結果

これまでの6-FMT 合成に関する文献調査の結果、FDG 合成のように¹⁸F マイナスイオンから合成するプロセスはいまだなく、¹⁸O ガスへの陽子線照射によって製造する¹⁸F ガスから合成するプロセスしかないことがわかった。したがって、本研究ではこのプロセスを順次実験的に検討すると同時に、適切な運転条件を決定した。

① ¹⁸F ガスの製造

(第1プロセス)

アルミターゲットに、¹⁸O₂ ガスを充填し、エネルギー 10 MeV の陽子線を照射10分間照射。

¹⁸O₂ ガス充填圧力：1.3 Kg/cm²

照射電流：3.1 μA

(第2プロセス)

第1プロセス終了後に、ターゲットから¹⁸O₂ ガスを抜き出し、代わって、Ar+F₂ ガス及び Ar ガスを充填し、陽子線を再度15分間照射した。

Ar+F₂ ガス充填圧力：4 Kg/cm²

Ar ガス充填圧力：8 Kg/cm²

照射終了後に上記ガスを回収し、¹⁸F 約20 mCi を得た。

② ¹⁸F-acetyl hypo fluorite の製造

上記の Ar+F₂ ガスを酢酸ナトリウム(ソーダライム) カラムに通じて¹⁸F-acetyl hypo fluorite を製造した。¹⁸F 収量に対し、¹⁸F-acetyl hypo fluorite の製造収率は9.3%であった。

③ 6-FMT 標識反応

N-Trifluoroacetyl-5-acetoxy-2-trimethylstannyl-L-phenylalanine ethyl ester を酢酸水溶液に溶かし、¹⁸F-acetyl hypo

fluorite ガスを吹き込み標識反応を実施した。反応液を減圧蒸留により酢酸を除去した後、臭化水素溶液を加え、130℃で加水分解を実施した。

④ 高速液体クロマトグラフィーによる6-FMT の分取

上記加水分解後の反応液を減圧蒸留により臭化水素を除去し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により6-FMT を分離生成した。合成収率は、¹⁸F ガスを基準に約20%であった。

D、考察

¹⁸F ガスの製造に関し、第1プロセスの照射のみでは、生成した¹⁸F ガスがターゲットに吸着し、回収できなかった。第2プロセスにより、吸着¹⁸F を Ar ガス中に回収できたが、回収効率は理論値に対し約60%であった。臨床応用には支障ないが、今後さらに最適化できる可能性がある。

E、結論

今回の一連のプロセス検討と実験的な検証により、6-FMT 合成のプロセス検証と詳細条件を決定できた。パーキンソン病治療のためのスクリーニング検査のための6-FMT 薬剤の製造が可能となった。

G、研究発表

- 1、論文発表
- 2、学会発表

H、知的財産権の出願・登録状況
なし。

パーキンソン病に対する遺伝子治療臨床研究

研究協力者 村松 慎一 自治医科大学神経内科 助教授

【研究要旨】 アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを応用したパーキンソン病に対する遺伝子治療の前臨床試験を行った。選択的神経毒 MPTP の慢性投与により作製したパーキンソン病のモデルサルにおいて、線条体への芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の遺伝子導入と L-dopa 経口投与の併用による遺伝子導入実験を行いその効果と安全性を確認した。Positron emission tomography (PET)計測により AADC 遺伝子の発現を *in vivo* で評価した。さらに遺伝子発現を抑制する機構を組み入れたベクターシステムにより *in vivo* でドパミン産生を調整できることを明らかにした。

A. 研究目的

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを応用した進行期のパーキンソン病に対する遺伝子治療の第 III 相臨床研究の実実施計画に沿ったプロトコルにより、カニクイサルのモデルを使用した前臨床試験を行う。

B. 研究方法

1) 臨床プロトコルに沿った方法の有効性と安全性を検証するため、選択的神経毒MPTPの慢性投与により作製したパーキンソン病モデルサル（筑波霊長類センターとの共同研究）を使用し、AAV-AADCを被殻に注入する。導入したAADC遺伝子の発現状況を、各種のリガンドを使用したpositron emission tomography (PET)計測（浜松ホトニクスで実施）により評価する。遺伝子導入を行ったサルの全身臓器・組織におけるベクターゲノムの検出を行う。さらに、安全性をより高めるため、導入遺伝子の発現を調節する技術の開発を行う。

C. 研究結果

1) MPTP モデルサル（3頭）の実験では、遺伝子治療前にはL-dopaの大量（20 mg / kg）を投与しても運動障害の改善が見られなかったのに対し、AAV-AADC注入2週後には、L-dopa 5 mg/kgを投与すると1時間後にはAAV-AADC注入側と対側の上肢の動きが改善し、この効果は約3時間持続した。遺伝子導入側の被殻で、PET計測により [¹¹C] L-dopa

の取り込みの増加が認められ、AADCの発現が *in vivo* で確認できた。12週間後のPET計測でも同様の発現が認められた。ドパミン受容体を反映する [¹¹C]racloprideの結合能は、L-dopa 5 mg投与後に遺伝子導入側において低下した。

3) エストロゲン受容体のリガンドであるタモキシフェンと結合して、誘導的に Cre recombinase 活性を発現する CreER^{T2}を AAVベクターに組み込んだシステムを開発し、ラットのモデル動物において、ドパミンの過剰産生を抑制できることを明らかにした。

D. 考察

パーキンソン病は、黒質緻密部から線条体に投射するドパミン神経細胞が選択的に脱落する変性疾患で、振戦、筋強剛、動作緩慢などの運動障害を呈する。初期にはドパミンの前駆物質である L-dopa の服用が有効であるが、やがてその効果は減弱してしまふ。その理由として L-dopa をドパミンに変換する AADC の活性が線条体で低下することが考えられる。そこで、この AADC の遺伝子を AAVベクターにより線条体の細胞に導入する遺伝子治療が考えられる。この方法では L-dopa の投与量を調節することにより、ドパミンの産生量をコントロールできるため安全性が高く、臨床応用の第一段階として適切であると考えられる。本研究では、ヒトと同様

な運動症状を示す、選択的神経毒 MPTP の慢性投与によるサルモデルにおいて、この方法の有効性と安全性を確認した。PET 計測により、遺伝子導入側の被殻で AADC 遺伝子の長期発現が確認され、L-dopa 投与によるドパミンの産生が^[11C]raclopride の結合能の低下として観察できた。

E. 結論

モデルサルを使用した前臨床実験で臨床研究に沿ったプロトコルの有効性と安全性を確認した。さらに、遺伝子発現の調整機構を組み入れたシステムの有効性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I and Ozawa K: Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. *Exp Opin Biol Ther*, 5(5):663-671,2005.
2. Maruyama M, Higuchi M, Takaki Y, Matsuba Y, Tanji H, Nemoto M, Tomita N, Matsui T, Iwata N, Mizukami H, Muramatsu S, Ozawa K, Saido TC, Arai H and Sasaki H: Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 57(6):832-842,2005.
3. Liu Y, Okada T, Sheykholslami K, Shimazaki K, Nomoto T, Muramatsu S, Kanazawa T, Takeuchi K, Ajalli R, Mizukami H, Kume A, Ichimura K and Ozawa K: Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector. *Mol Ther*,12(4):725-733,2005.
4. Li XG, Okada T, Koder M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*,13(1):160-166,2006.
5. Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K and Hanazono H: Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells*, *in press*.

2. 学会発表

1. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療と細胞移植. 第 46 回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005 年 5 月 26 日.(プログラム P 34)
 2. Liu Y, et al.: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. The American society of gene therapy's 8th annual meeting. Minneapolis, June 3, 2005.
 3. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. 第 23 回日本神経治療学会総会, 鳥羽市, 2005 年 6 月 9 日.(プログラム P 10)
 4. 村松慎一: AAV ベクターによるパーキンソン病の遺伝子治療. (AAV vectors for the treatment of Parkinson's disease) 第 28 回日本神経科学大会, 横浜, 2005 年 7 月 27 日.(プログラム P 57)
 5. Muramatsu S, et al.: *In vivo* assessment of transgene-mediated dopamine synthesis by positron emission tomography in a primate model of Parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 11th annual meeting. Tokyo, July 29, 2005. (abstract p23).
 6. Muramatsu S, et al.: Gene therapy for Parkinson's disease: Strategies for clinical applications. The 2nd Nikko International Symposium 2005. Nikko, September 30, 2005. (abstract p20-21).
 7. Sato T, et al. Activity of 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase, the second enzyme for biosynthesis of tetrahydrobiopterin, in the brain. 第 78 回日本生化学会大会, 神戸, 2005 年 10 月 22 日.
 8. Muramatsu S, et al.: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. Society for Neuroscience's 35th Annual Meeting, Washington, DC, November 14, 2005.
 9. 村松慎一 他: パーキンソン病の遺伝子治療. 第 45 回日本定位・機能神経外科学会, 埼玉, 2006 年 1 月 20 日. (プログラム P 69)
- ### G. 知的財産権
- なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|---|----|-----------|-------|
| Yamazaki M, Esumi E, <u>Nakano I.</u> | Is motoneuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis? | Neuropathology | 25 | 381-387 | 2005 |
| Saito Y, Motoyoshi Y, Kashima T, Izumiya- Shimomura N, Toda T, <u>Nakano I</u> , Hasegawa M, Murayama S | Unique tauopathy in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. | J Neuropathol Exp Neurol | 64 | 1118-1126 | 2005 |
| Ishihara K, Araki S, Ihori N, Shiota J, Kawamura M, Yoshida M, Hashizume Y, <u>Nakano I.</u> | Argyrophilic grain disease presenting with frontotemporal dementia: A neuropsychological and pathological study of an autopsied case with presenile onset. | Neuropathology | 25 | 165-170, | 2005. |
| Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Ando Y, <u>Nakano I.</u> | A phenotype without spasticity in saccinrelated ataxia. | Neurology | 64 | 381-387 | 2005 |
| Muramatsu S, Tsukada H, <u>Nakano I</u> and Ozawa K | Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. | Expert Opinion on Biological Therapy | 5 | 63-671 | 2005 |

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|-----------------|----------|-----------|------|
| Ogura, T., Mizukami, H., Mimuro, J., Madoiwa, S., Okada, T., Matsushita, T., Urabe, M., Kume, A., Hamada, H., Yoshikawa, H., Sakata, Y., <u>Ozawa, K.</u> | Utility of intraperitoneal administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. | J Gene Med | in press | | 2006 |
| Urabe, M., Xin, K.Q., Obara, Y., Nakakura, T., Mizukami, H., Kume, A., Okuda, K., <u>Ozawa, K.</u> | Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. | Mol Ther. | in press | | 2006 |
| Ishiwata, A., Mimuro, J., Kashiwakura, Y., Niimura, M., Takano, K., Ohmori, T., Madoiwa, S., Mizukami, H., Okada, T., Naka, H., Yoshioka, A., <u>Ozawa, K.</u> , Sakata, Y | Phenotype correction of hemophilia A mice with adeno-associated virus vectors carrying the B domain-deleted canine factor VIII gene. | Thromb Res | in press | | 2006 |
| Okada, T., Uchibori, R., Iwata-Okada, M., Takahashi, M., Nomoto, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Liu, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kobayashi, E., and <u>Ozawa, K.</u> | A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. | Mol. Ther. | in press | | 2006 |
| Urabe, M., Nakakura, T., Xin, K.Q., Obara, Y., Mizukami, H., Kume, A., Kotin RM, and <u>Ozawa, K.</u> | Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. | J. Virol. | 80 | 1874-1885 | 2006 |
| Hiraide, A., Yokoo, N., Xin, K.Q., Okuda, K., Mizukami, H., <u>Ozawa, K.</u> , and Saito, T. | Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. | Hum. Gene Ther. | 16 | 1413-1421 | 2005 |
| Okada, T., Nomoto, T., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Ogura, T., Iwata-Okada, M., Uchibori, R., Shimazaki, K., Mizukami, H., Kume, A., and <u>Ozawa, K.</u> | Large-scale production of recombinant viruses by use of a large culture vessel with active gassing. | Hum. Gene Ther. | 16 | 1212-1218 | 2005 |

| | | | | | |
|--|--|---------------------|-----------|----------------|-------------|
| <p>Liu, Y., Okada, T., Sheykholeslami, K., Shimazaki, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Kanazawa, T., Takeuchi, K., Ajalli, R., Mizukami, H., Kume, A., Ichimura, K., and <u>Ozawa, K.</u></p> | <p>Specific and efficient transduction of cochlear inner hair cells with recombinant adeno-associated virus type 3 vector.</p> | <p>Mol. Ther.</p> | <p>12</p> | <p>725-733</p> | <p>2005</p> |
| <p>Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., Mizukami, H., Muramatsu, S., <u>Ozawa, K.</u>, Saido, T.C., Arai, H., and Sasaki, H.</p> | <p>Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease.</p> | <p>Ann. Neurol.</p> | <p>57</p> | <p>832-842</p> | <p>2005</p> |

研究成果の刊行物・別冊

Workshop: Recent Advances in Motor Neuron Disease

Is motoneuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis?

Mineo Yamazaki,^{1,2} Eisaku Esumi³ and Imaharu Nakano⁴

¹Division of Neurology, 2nd Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, ²Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, ³Department of Neurology, Tokyo Tama Hospital, Tokyo and ⁴Department of Neurology, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

To clarify the controversy concerning whether the cell death of motor neurons in ALS is apoptosis, we investigated the expression of Apaf-1 and caspase-9 mRNA in spinal cord tissue obtained at autopsy from patients with ALS and controls using RT-PCR; the presence of *in situ* nuclear DNA fragmentation in motor neurons by the TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method; and immunocytochemical localization of Apaf-1 and caspase-3, which are known as promoters of apoptotic processes. Although Apaf-1 and caspase-9 mRNAs levels were increased in ALS, Apaf-1 immunoreactivity (IR) showed no significant difference between ALS and the control, and caspase-3 IR was not observed in ALS motoneurons, casting doubt on the notion that motor neurons in ALS undergo death by the classic apoptotic pathway. Although TUNEL-positive motor neurons were frequently observed in the anterior horn in ALS, these neurons always showed an atrophic cell body with a shrunken and pyknotic nucleus, indicating that they were at the terminal stage of degeneration. No apoptotic bodies were seen. These findings suggest that the mechanism of motor neuronal cell death in ALS might not be apoptosis, but some other as yet unidentified mechanism.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, Apaf-1, apoptosis, caspase, cell death, DNA fragmentation.

INTRODUCTION

Since the discovery of missense mutations in the chromosome 21 gene which encodes copper/zinc superoxide

dismutase-1 (SOD1) in the dominantly inherited ALS family,^{1–4} ALS research has focused on this SOD1 gene mutation.^{5–9} A number of authors have proposed the possibility of programmed cell death, termed apoptosis, in the motor neurons in SOD1 transgenic mice, and suggested that the same cell death processes also occur in classic ALS in humans.

The definition of apoptosis is so fuzzy, however, as to confound attempts to interpret the results of apoptosis studies over a range of degenerative diseases. This lack of clarity is reflected in inconsistencies in the biochemical and morphological features of motoneuronal cell death observed in SOD1 transgenic mice and in patients with ALS.^{10–16}

Several recent investigations of motor neuronal cell death in ALS have focused on caspases and related proteins in SOD1 transgenic mice.^{17–20} Caspases are generated in the form of pro-enzymes (inactive form), and are activated by proteolysis to form active complexes which kill neurons via the apoptosis process. The caspases examined in the present study are thought to be associated with mitochondria and to be active in the final common pathway of the caspase cascade. Cytochrome C (Apaf-2) and Apaf-1 are discharged together from mitochondria, and form a complex with caspase-9 through caspase recruitment domain in the presence of dATP. As a result, caspase-9 is changed to the activated form, which in turn activates caspase-3, which finally induces cell death.

To clarify whether apoptosis is in fact associated with the cell death of motoneurons in ALS patients, we studied the presence of DNA fragmentation, the definitive sign of apoptosis, in these cells. In addition, we also analyzed Apaf-1 and caspase-9 mRNA, and immunocytochemically investigated Apaf-1 and caspase-3 in spinal motoneurons in ALS patients.

Correspondence: Mineo Yamazaki, MD, PhD, The 2nd Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan. Email: yamazaki@nms.ac.jp

Received 26 May 2005; accepted 30 May 2005.

MATERIALS AND METHODS

Tissue preparation

The brain and cervical and lumbar segments of the spinal cord were rapidly obtained at autopsy of patients with ALS ($n=3$), disease controls ($n=2$, ossification of the posterior longitudinal ligament and MSA) and non-neurological disease controls ($n=2$, acute myocardial infarction and adrenal gland cancer). All ALS patients showed symptoms of upper and lower motor neuron involvement and fulfilled the pathological criteria of ALS. The tissues obtained at autopsy were preserved, frozen at -80°C until analysis. For the TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method, sections were made from formalin-fixed and paraffin-embedded blocks of the appropriate regions.

RT-PCR method

Total mRNA was isolated from the cerebral cortex (area 17), putamen and spinal cord of ALS patients. Poly A+ mRNA was controlled using a Quickprep mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). RT-PCR was performed using the following primers specific to *Apaf-1* and *caspase-9* genes. The sense and antisense primers for *Apaf-1* were 5'-ACATCACGAA TCTTTCCCGC-3', corresponding to APPN, and 5'-AACACTTCACTATCACTTCC-3', corresponding to APPC. The primers used for *caspase-9* were 5'-GCCATG GACGAAGCGGATCGGCGG-3' (sense) and 5'-GGC CTGGATGAAAAGAGCTGGG-3' (antisense). PCR was performed with a synthetic first-strand cDNA template. Amplification was continued for 35 cycles (1 min denaturation at 94°C , 1 min annealing at 55°C , 2 min extension at 72°C).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed using mouse monoclonal anti-Apaf-1 antibody (MAB868; R & D systems, Minneapolis, MN, USA), rabbit polyclonal anti-CPP32 antibody²¹ and mouse monoclonal anticaspase-3 antibody (sc-7272; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Frozen sections were incubated with 3% hydrogen peroxide for 30 min to block endogenous peroxidase activity. The sections were incubated with the antibodies at 4°C overnight and immunoreactivity was visualized with a Histostain SP kit (Zymed, San Francisco, CA, USA).

TUNEL method

Formalin-fixed, paraffin-embedded lumbar cord specimens from six ALS patients were examined in comparison with those from four controls. To facilitate the earliest possible detection of changes in motor neurons, these six cases were selected from among more than 50 ALS cases for their relatively well-preserved anterior horn cells. Mean age of the ALS and control (three with cerebral infarction and one with Marchiafava-Bignami disease) patients was 67 years (range 50–84 years) and 50 years (range 18–70 years), respectively.

DNA fragmentation was detected by the TUNEL method, using an *in situ* cell death detection kit (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, MN, USA). Negative controls were examined using TUNEL reaction solution without TdT or fluorescein dUTP. Feasibility of the nuclear labeling of cells by the TUNEL method was confirmed in intestinal tissue obtained at autopsy of patients with malignant lymphoma. After oligonucleosomal DNA cleavages were labeled, photos of each TUNEL-positive neuron were taken, the same specimens were stained with HE, and TUNEL-positive neurons identified from the

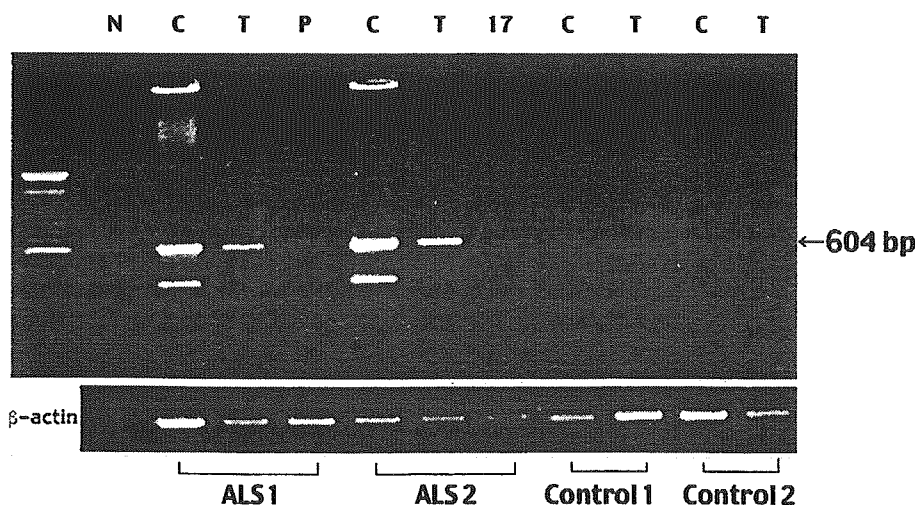


Fig. 1 Detection of Apaf-1 mRNA in the brains of control and ALS patients. β -actin mRNA in the same samples was used as control. The Apaf-1 mRNA band was detected in the cervical and thoracic cord, and was compared with cerebral cortex and putamen in patients with ALS (N: negative control, C: C8, T: Th12, P: putamen, 17: area 17).

photos were cytopathologically observed. TUNEL-positive spinal motor neurons and all anterior motor neurons in all sections were counted, and the frequency of TUNEL-positive spinal motor neurons was measured.

RESULTS

PT-PCR

PCR using primers to amplify *Apaf-1* clearly revealed positive bands of Apaf-1 mRNA in the cervical (C8) and thoracic cord (T12) in patients with ALS, but not in the cerebral cortex and putamen as such. In contrast, Apaf-1 mRNA was scarcely detected in the spinal cord of control cases (Fig. 1). Apaf-1 mRNA was clearly expressed in the putamen and cervical cord of patients with MSA (Fig. 2). The caspase-9 mRNA band was detected in the spinal cord of ALS patients and putamen and cervical cord of MSA patients, but was hardly seen in control cases (Fig. 3).

Immunocytochemistry

To determine whether Apaf-1 and caspase-3 are activated in ALS, control and ALS brains were immunostained with anti-Apaf-1 and anticaspase-3 antibodies. For Apaf-1, anterior horn motoneurons in control and ALS spinal cords showed weak cytoplasmic staining for Apaf-1, whereas ALS brains showed no significant differences to control brains (Fig. 4a,b). Immunolabeling using antibodies specific to caspase-3, rabbit polyclonal anti-CPP32 antibody (Fig. 4c,d) and mouse monoclonal anticaspase-3 antibody (Fig. 4e,f) revealed only scarce caspase-3 immunoreactivity in motor neurons in control and ALS brains.

TUNEL method

TUNEL-positive motor neurons in the anterior horn were observed in three of six ALS cases, whereas in control cases

only two TUNEL-positive neurons were seen, one each in two cases. The TUNEL-positive motor neurons were atrophic and round in both groups, without large cell processes. They were filled with lipofuscin and the nucleus was eccentric, flat and pyknotic (Fig. 5a,b). Although TUNEL-positive motor neurons with Lewy body-like hyaline inclusions were occasionally found (Fig. 5c,d), no TUNEL-positive neurons carrying Bunina bodies were observed.

Not all atrophic anterior horn neurons were TUNEL-positive; some had TUNEL-negative nuclei, which were always a generally round shape with a light nucleoplasm. (Fig. 5e,f). However, most TUNEL-negative neurons were of normal size and had many processes in their cell bodies. TUNEL-positive motor neurons represented 5.3–8.9% of

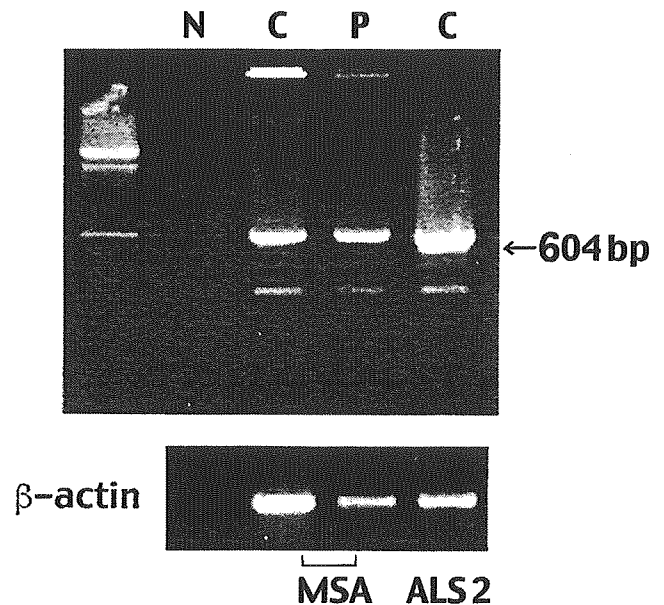


Fig. 2 Detection of Apaf-1 mRNA in the brains of MSA patients. Apaf-1 mRNA was expressed in the putamen and cervical cord of a patient with MSA (N: negative control, C: C8, P: putamen).

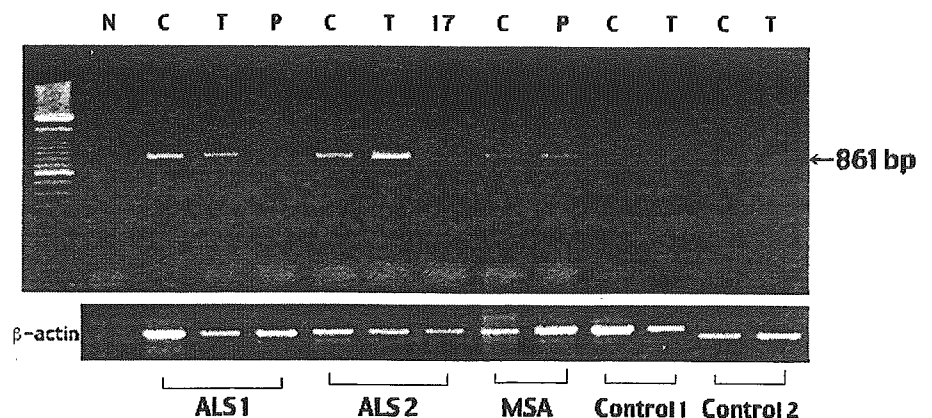


Fig. 3 Expression of caspase-9 mRNA in control, MSA and ALS brains. The caspase-9 mRNA band was detected in the spinal cord of ALS patients and in the putamen and cervical cord of MSA patients, but not in control case tissues (N: negative control, C: C8, T: Th12, P: putamen, 17: area 17).

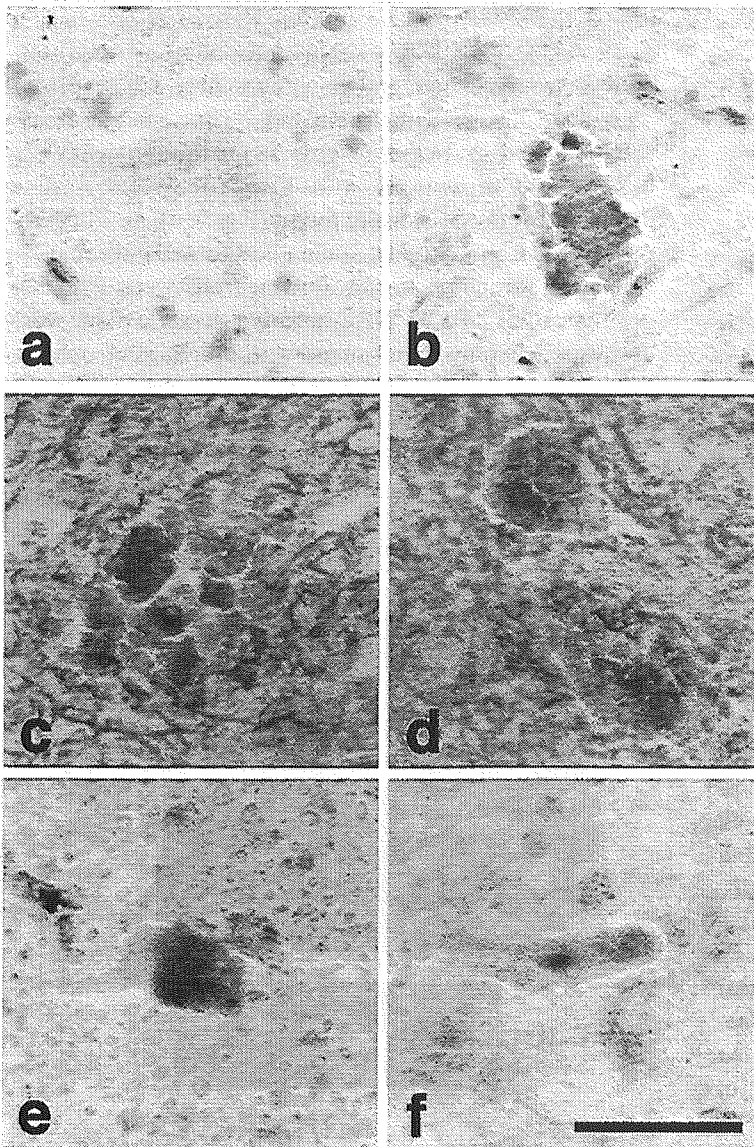


Fig. 4 Immunohistochemical expression of Apaf-1 and caspase-3 in the spinal cord of control and ALS patients. (a,b) No difference in Apaf-1 immunostaining between ALS (a) and control (b) cervical cords (C8). (c,d) Immunolabeling using rabbit polyclonal anti-CPP32 antibody showed no immunoreactivity in anterior horn neurons of control (c) or ALS (d) lumbar cords (L5). (e,f) Mouse monoclonal anticaspase-3 antibody revealed almost no immunoreactivity of caspase-3 in motor neurons in ossification of the posterior longitudinal ligament (e) or ALS (f) cervical cords (C8). Bar, 100 μ m.

all anterior horn neurons (Table 1), and all motor neurons with a normal appearance were TUNEL-negative. No apoptotic bodies were seen in any ALS patient specimen.

DISCUSSION

For several reasons, the findings of this study on whether neurons in ALS undergo apoptosis were inconclusive. Although mRNAs of Apaf-1 and caspase-9 were apparently expressed in ALS brains, indicating that apoptosis through *Apaf-1* and *caspase-9* may be, at least to some extent, involved in this neuronal cell death, expression was not restricted to the ALS brain but was also recognized to some degree in the MSA brain. Further, we could not determine whether Apaf-1 mRNA and caspase-9 mRNA

in the ALS brains were expressed by neurons, glia, or both. Indeed, our immunocytochemical investigation of Apaf-1, caspase-9 and caspase-3 failed to show any substantial increase in the production of these proteins in ALS over control brains. Against these findings, however, it was recently reported that caspase-9 is activated in spinal motor neurons of ALS patients.²² It thus remains unclear whether caspase-9 is activated in motor neurons of ALS brains. In our study, caspase-9 mRNA was expressed in ALS brains and was clearly activated in motor neurons of the ALS spinal cord. However, our data also suggest that caspase-3 was not activated in the spinal motor neuron, and it was unlikely that the apoptotic cascade from caspase-9 to caspase-3 was present.

The phenomenon apoptosis was originally defined as fulfilling the following conditions: (i) DNA fragmentation;

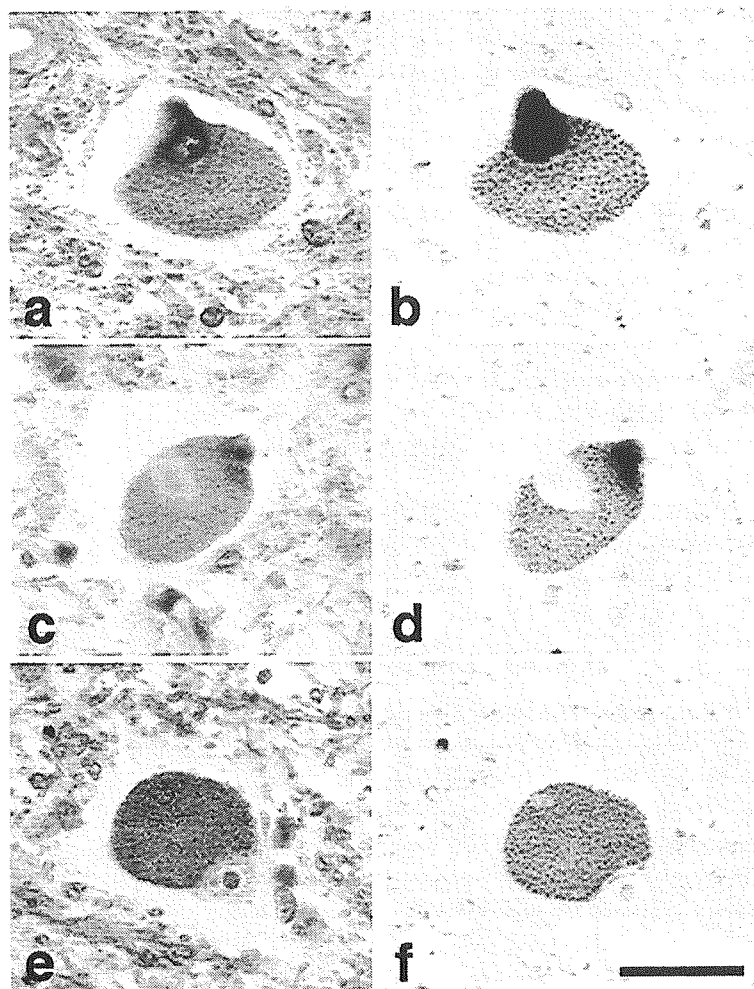


Fig. 5 TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) staining of anterior horn neurons in ALS patients. (a,b) A TUNEL-positive lumbar motor neuron is seen (case 1). The cell body is round and filled with lipofuscin. The same section stained with HE stain (a) and the TUNEL method (b). (c,d) TUNEL staining was occasionally observed in motor neurons with hyaline inclusions. (e,f) Some TUNEL-negative anterior horn neurons were atrophic and filled with lipofuscin. Bar, 50 μ m.

Table 1 Positive TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) of ALS spinal motor neurons

| Case | Age (years), sex | Total no. neurons (no.sections) | TUNEL-positive neurons | Mean % positive per section |
|------|------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 1 | 61, female | 486 (10) | 26 | 5.3 |
| 2 | 81, female | 219 (5) | 13 | 5.9 |
| 3 | 67, male | 202 (10) | 18 | 8.9 |

and (ii) nuclear fragmentation and cellular budding (the presence of apoptotic bodies). Given the inconclusive PCR and immunocytology results here, we also checked whether the morphological changes of motor neurons in ALS were compatible with this definition. Results using the TUNEL method showed the presence of *in situ* DNA fragmentation in 5–9% of spinal motor neurons in ALS patients. If this DNA fragmentation does in fact represent a process of apoptosis, and if apoptotic cell death in motoneurons proceeds over a few hours as seen in other organs, this high proportion of TUNEL-positive cells would result in the total mathematical disappearance of spinal motor neurons in only a few months, with patients of course dying long before. In reality, however, the typical clinical course

of several years before death means that one or both of the above assumptions is wrong. Although the possibility that apoptosis occurs more slowly in *in situ* motor neurons than other organ cells cannot be denied, *in vitro* studies using neuronal cell cultures²³ and our present finding that all TUNEL-positive neurons had shrunken pyknotic nuclei suggest that the mechanism of motor neuronal cell death in ALS represents a different process to apoptosis as defined above.

Moreover, it has been reported that the formation of apoptotic bodies was completed within several minutes in cells of a culture system.²⁴ Further, *in vivo*, apoptotic bodies disappear within only a few hours after formation in organs such as the liver.²⁵ If this is the case for motoneu-

rons also, this rapid time course may explain why apoptotic bodies can hardly be detected in human brain tissue. DNA fragmentation detected by the TUNEL method, however, is considered to represent an early stage of apoptosis, so specimens containing frequent TUNEL-positive neurons undergoing apoptosis should show at least some apoptotic bodies. This was not the case for our ALS specimens, implying again that the DNA fragmentation we observed may not be related to apoptosis. The present study thus fails to corroborate several reports indicating the apoptotic processes of motoneuronal cell death in ALS.²⁶⁻²⁸ ALS is a lethal disease without effective therapy, so the exploration of new drugs and therapies on the basis of immature hypotheses of pathomechanisms is both valid and necessary. At the same time, however, it is necessary to pursue investigations into the cause and mechanism of this difficult disease via a rational and critical observation and analysis of patient tissues.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude to Dr Nobutaka Arai, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, and Dr Masaya Oda, Tokyo Metropolitan Neurological Hospital, for the donation of brain tissues used in this study. We also gratefully acknowledge the helpful support of Dr Kunihiro Ikeguchi and Dr Mitsuya Morita, Department of Neurology, Jichi Medical School.

REFERENCES

- Deng HX, Hentati A, Tainer JA *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* 1993; **261**: 1047-1051.
- Aoki M, Ogasawara M, Matsubara Y *et al.* Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation. *Nat Genet* 1993; **5**: 323-324.
- Elshafey A, Lanyon WG, Connor JM. Identification of a new missense point mutation in exon 4 of the Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) gene in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 363-364.
- Nakano R, Sato S, Inuzuka T *et al.* A novel mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **200**: 695-703.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; **264**: 1772-1775.
- Tsuda T, Munthasser S, Fraser PE *et al.* Analysis of the functional effects of a mutation in SOD1 associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 1994; **13**: 727-736.
- Dal Canto MC, Gurney ME. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 1994; **145**: 1271-1279.
- Durham HD, Roy J, Dong L, Figlewicz DA. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**: 523-530.
- Ghadge GD, Lee JP, Bindokas VP *et al.* Mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis: molecular mechanisms of neuronal death and protection. *J Neurosci* 1997; **17**: 8756-8766.
- Migheli A, Cavalla P, Marino S, Schiffer D. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; **53**: 606-616.
- Rabizadeh S, Gralla EB, Borchelt DR *et al.* Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 3024-3028.
- Troost D, Aten J, Morsink F, de Jong JMBV. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis is not restricted to motor neurons. Bcl-2 expression is increased in unaffected post-central gyrus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995; **21**: 498-504.
- Troy CM, Shelanski ML. Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6384-6387.
- Yoshiyama Y, Yamada T, Asanuma K, Asahi T. Apoptotic related antigen, LeY and nick-end labeling are positive in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 1994; **88**: 207-211.
- Mu X, He J, Anderson DW, Trojanowski JQ, Springer JE. Altered expression of bcl-2 and bax mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord motor neurons. *Ann Neurol* 1996; **40**: 379-386.
- Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; **58**: 459-471.
- Pasinelli P, Borchelt DR, Houseweart MK, Cleveland DW, Brown RH Jr. Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15763-15768.
- Li M, Ona VO, Guegan C *et al.* Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 2000; **288**: 335-339.

19. Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G. Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2002; **277**: 50966–50972.
20. Kang SJ, Sanchez I, Jing N, Yuan J. Dissociation between neurodegeneration and caspase-11-mediated activation of caspase-1 and caspase-3 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2003; **23**: 5455–5460.
21. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S *et al*. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 1997; **57**: 1605–1613.
22. Inoue H, Tsukita K, Iwasato T *et al*. The crucial role of caspase-9 in the disease progression of a transgenic ALS mouse model. *EMBO J* 2003; **22**: 6665–6674.
23. Kaasik A, Vassiljev V, Poldoja E, Kalda A, Zharkovsky A. Do nuclear condensation or fragmentation and DNA fragmentation reflect the mode of neuronal death? *Neuroreport* 1999; **10**: 1937–1942.
24. Matter A. Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 1979; **36**: 179–190.
25. Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 1990; **11**: 847–853.
26. Kihira T, Yoshida S, Hironishi M, Wakayama I, Yase Y. Neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis is mediated by a possible mechanism different from classical apoptosis. *Neuropathology* 1998; **18**: 301–308.
27. Migheli A, Aztori C, Piva R *et al*. Lack of apoptosis in mice with ALS. *Nature Med* 1999; **5**: 966–967.
28. He BP, Strong MJ. Motor neuronal death in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is not apoptotic. A comparative study of ALS and chronic aluminum chloride neurotoxicity in New Zealand white rabbits. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000; **26**: 150–160.

ORIGINAL ARTICLE

Unique Tauopathy in Fukuyama-Type Congenital Muscular Dystrophy

Yuko Saito, MD, PhD, Yasufumi Motoyoshi, MD, PhD, Takeshi Kashima, MD, PhD,
Naotaka Izumiyama-Shimomura, PhD, Tatsushi Toda, MD, PhD, Imaharu Nakano, MD, PhD,
Masato Hasegawa, PhD, and Shigeo Murayama, MD, PhD

Abstract

Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) is characterized by muscular dystrophy and cortical dysgenesis of the cerebrum and cerebellum. We investigated the extent and nature of tauopathy in the brains of 7 postfetal (14–34 years of age) and 2 fetal (18- and 20-week gestational age) FCMD cases. In all postfetal cases, tauopathy was found in the areas of cortical dysgenesis in the cerebrum, in addition to predictable sites such as the hippocampus. In fetal cases, the neuropil of malformed cerebral cortex was diffusely immunostained with anti-aberrantly phosphorylated tau antibodies. By immunoelectron microscopy, the epitope of the antibodies was associated with microtubule-like bundles within cellular processes protruding through disrupted glia limitans. In Western blot analysis, a unique 50-kDa band of tau was detected in a fetal and a postfetal case. In addition, 3 to 4 tau bands of 60 to 68 kD, similar to tau in Alzheimer disease, were also detected in the latter. After dephosphorylation, the insoluble tau from the fetal and the postfetal cases showed highly similar immunoblotting patterns. This anomalous phosphorylation of tau may be related to the development of the cortical dysgenesis in FCMD and may shed light on the biologic function of tau in the development of the central nervous system.

Key Words: Fukutin, Glia limitans-basal lamina complex, Gliomesenchymal tissue, Malformation, Polymicrogyria.

INTRODUCTION

Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD; MIM 2533800) is the second most common muscular dystrophy next to Duchenne muscular dystrophy in Japan. An autosomal-recessive disorder, FCMD is characterized by severe congenital muscular dystrophy associated with brain malformation, principally cerebral and cerebellar cortical dysgenesis (1, 2). Recently, the FCMD gene was identified on chromosome 9q31 and its gene product was named *fukutin* (3). However, the role of *fukutin* in various clinical presentations of FCMD remains to be clarified.

The neuropathology of FCMD is characterized by polymicrogyria of the cerebrum and cerebellum, pachygyria, agyria, and anomalies of the pyramidal tracts (2) and is categorized as type II lissencephaly (4). A migration disorder during the period of brain development is thought to cause these brain abnormalities (2, 5). Microscopically, the surface of the brain in FCMD cases is covered with neurogliomesenchymal tissue (nGMT) containing mixtures of neuronal and glial tissue. We and others have recently reported that there are breaches of the glia limitans–basal lamina complex of the brains and in the skeletal muscles in fetal (6, 7) and postfetal (8, 9) cases.

Neurofibrillary tangles (NFTs) have been reported in FCMD cases in the locus ceruleus, basal nucleus of Meynert (10), and hippocampus (11), and thus FCMD has been classified as a secondary tauopathy along with muscle diseases such as myotonic dystrophy, hamartomatous diseases such as tuberous sclerosis (12), and infections such as subacute sclerosing panencephalitis (13), as well as metabolic diseases such as Niemann-Pick type C disease (14) and Salla disease (15). However, the phosphorylation of tau in these cases has not been fully studied except in a few examples such as Niemann-Pick type C disease (16) and myotonic dystrophy (17).

Here we examined both fetal and postfetal cases of FCMD neuropathologically and biochemically and found accumulation of aberrantly phosphorylated tau in the malformed tissue from both groups. The immunochemical analysis of the insoluble tau from the fetuses and postfetal cases revealed that it included a unique band that was distinct from the insoluble tau from typical Alzheimer disease (AD). Our

From the Department of Neuropathology (YS, SM), Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan; the Department of Pathology (YS), Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo, Japan; the Department of Neurology (YM), National Shimoshizu Hospital, Chiba, Japan; the Department of Human Pathology (TK), Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan; the Human Tissue Research Group (NI-S), Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan; the Division of Clinical Genetics (TT), Department of Medical Genetics, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan; the Department of Neurology (IN), Jichi Medical School, Tochigi, Japan; and the Department of Molecular Neurobiology (MH), Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo, Japan.

Send correspondence and reprint requests to: Shigeo Murayama, MD, PhD, Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan; E-mail: smurayam@tmig.or.jp

Supported by Aid for Scientific Research on Priority Areas—Advanced Brain Science Project—from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (SM, YS); Aid for Degenerative Disease from Ministry of Health, Labor, and Welfare (SM); and Aid for a Long-Term Comprehensive Research on Age-Associated Dementia from Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (SM).