

2005061785A

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：
運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

平成17年度 総括研究年度終了報告書

主任研究者 小柳 清光

平成18年（2006年）3月

目次

I. 総括研究年度終了報告

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

小柳 清光 -----3

II. 分担研究年度終了報告

1. 筋萎縮性側索硬化症(ALS)前角細胞リボゾーム RNA 遺伝子
転写活性と細胞変性/ヌクレオリン、分子シャペロンの変化

小柳 清光 -----7

2. ALS 脊髄で増殖する細胞の有無と細胞種の同定

山崎 峰雄 -----13

3. 剖検とリソース、臨床病理学的検索、ALS における痴呆の
責任病巣

水谷 俊雄 -----17

4. 変性モデルラットの解析および治療法の開発

渡部 和彦 -----21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----27

IV. 研究成果の刊行物・別刷り -----31

I. 総括研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：
運動ニューロンにおける蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

主任研究者 小柳清光 東京都神経科学総合研究所
運動・感覚システム研究分野長・参事研究員

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の脊髄・脳幹の運動ニューロンの最早期変化、特にその蛋白合成系に焦点を合わせ、病的メカニズムの解明と新規治療法を開発する目的で研究を進め、17年度下記の成果を得た。

ALS 脊髄運動ニューロンで報告したリボゾーム (r)RNA 遺伝子転写活性の減少がニューロン死の最早期のサインでありニューロン死に直結している事を見出した。これは ALS モデルと考えられる顔面神経「引き抜き損傷」ラットで、一定期間継続する rRNA 遺伝子転写活性の減少が運動ニューロン死に直結していること、一方軸索傷害が生じても rRNA 遺伝子転写活性が保たれていればニューロン死が生じにくいことを見出したことに基づく。

家族性 ALS モデルである SOD1 遺伝子変異 (Tg) ラット（東北大 青木ら）においては、脊髄運動ニューロンの数は減少していたが rRNA 遺伝子転写活性は保たれていた。すなわち SOD1 Tg ラットは孤発性 ALS や「引き抜き損傷」とは異なるメカニズムによって運動ニューロンが死んでいく可能性を指摘した。

ALS 脊髄では主としてミクログリアと血管構成細胞が活発な細胞増殖を行っていることを初めて見出した。

成体ラット顔面神経「引き抜き損傷」における顔面神経核で内在性の神経幹細胞が出現増殖することを見出し、この部位から神経幹細胞を継代培養し得た。運動ニューロン傷害への遺伝子治療を見据え、FGF2、Noggin 組換えアデノウイルスの作製を完了した。また組換えヘルペスウイルスベクター、組換えポリオウイルスベクターについても検討を開始し、ラジカルスカベンジャーMCI-186 の経口投与による保護効果を見出した。

分担研究者

水谷俊雄	東京都立神経病院部長
渡部和彦	東京都神経科学総合研究所副参事研究員
山崎峰雄	日本医科大学第二内科講師

A. 研究目的

ALS 脊髄・脳幹運動ニューロンの蛋白合成系に焦点を合わせ、新たな視点から孤発性および家族性 ALS の病態究明と治療法の開発を目指す。

- I. ALS 運動ニューロンにおける最早期変化、特に運動ニューロンにおける蛋白合成系の異常に着目し細胞脱落との関連を解明する。
- II. ALS 脊髄で増殖する細胞の同定と修復への関与を解析する。
- III. ALS で観察される痴呆症状の形態学的責任病巣の検討。
- IV. 新規の神経栄養因子および組み換えウイルス、移植による細胞治療法の開発。

B. 研究方法

- I. ALS の発症メカニズムの追求：
 - (1) ALS の前角細胞における、蛋白合成系の「最上流」と考えられるリボゾーム(r)RNA 遺伝子の転写活性減少メカニズムを解明する。これと、蛋白合成系の「下流」の rRNA の量、粗面小胞体の変化、Golgi 小体の断片化、ユビキチン化封入体の出現、運動ニューロン脱落などが「一連の」

変性であるか検討する。

- (2) 家族性ALSの運動ニューロン変性メカニズムを解析する。

- II. ALS 脊髄で増殖する細胞種の同定と修復機構への関与の解析。

ヒト ALS 解剖例脊髄のフォルマリン固定、パラフィン包埋材料を用いて増殖中の全細胞を染める分裂細胞マーカーMIB-1 と、各種細胞マーカー、との二重免疫染色を行って増殖する細胞種を同定し修復への関与を検討する。

- III. ALS-痴呆の責任病巣の解析：

大脳側頭葉を免疫組織学的に解析し、痴呆の発症機構を追求する。

- IV. モデル動物を用いた治療法の開発：

成体ラット顔面神経引き抜き損傷モデルと前角細胞軸索損傷モデルを用いて、脱落を阻止する有効な新規組み換えウイルス、栄養因子を見出す。

C. 研究結果と考察

ALS 脊髄運動ニューロンで報告したリボゾーム(r)RNA 遺伝子転写活性の減少が、運動ニューロン死に直結している可能性を見出した。すなわちこれは ALS モデルと考えられている顔面神経「引抜き損傷」ラットで、一定期間継続する rRNA 遺伝子転写活性の減少が、運動ニューロンの死に直結していること、一方軸索傷害が生じても rRNA 遺伝子の転写活性が保たれていればニューロン死が生じにくいことを

見出したことに基づく。

家族性 ALS モデルである SOD1 遺伝子変異 (Tg) ラット (東北大 青木ら) においては、脊髄運動ニューロンの数は減少していたが rRNA 遺伝子転写活性は保たれていた。すなわち SOD1 Tg ラットは孤発性 ALS や「引き抜き損傷」とは異なるメカニズムによって運動ニューロンが死んでいく可能性を指摘した。

ALS 脊髄では主としてミクログリアと血管構成細胞が活発な細胞増殖を行っていることを初めて見出した。

成体ラット顔面神経「引き抜き損傷」における顔面神経核において内在性神経幹細胞が出現増殖することを見出し、この部位から神経幹細胞を継代培養し得た。運動ニューロン傷害への遺伝子治療を見据え、FGF2、Noggin 組換えアデノウイルスの作製を完了した。また組換えヘルペスウイルスベクター、組換えポリオウイルスベクターに関しても検討を開始し、ラジカルスカベンジャー MCI-186 の経口投与による保護効果を見出した。

D. 結論

1. 孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンにおける rRNA 遺伝子転写活性は運動ニューロン死の直接の引き金となっている。
2. SOD1 遺伝子変異 ALS の運動ニューロンは孤発性 ALS とは異なる機序

によって変性していく。

3. 顔面神経「引き抜き損傷」ラット顔面神経核で内在性神経幹細胞が出現増殖することを見出し、この部位から神経幹細胞を継代培養し得た。「引き抜き損傷」に対して、FGF2、Noggin 組換えアデノウイルスの作製を完了した。また組換えヘルペスウイルスベクター、組換えポリオウイルスベクターに関しても検討を開始し、ラジカルスカベンジャー MCI-186 の経口投与による保護効果を見出した。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表 原著論文 計 26 編。

そのうちの主なもの

- 1) Ikeda K, Aoki M, Kawazoe Y, Sakamoto Y, Hayashi Y, Ishigaki A, Nagai M, Kamii R, Kato S, Itoyama Y, Watabe K. Motoneuron degeneration after facial nerve avulsion is exacerbated in pre-symptomatic transgenic rats expressing human mutant Cu/Zn superoxide dismutase. J Neurosci Res 2005;82:63-70.
- 2) Watabe K, Hayashi Y, Kawazoe Y. Peripheral nerve avulsion injuries as experimental models for adult motoneuron degeneration. Neuropathology 2005;25:371-380.
- 3) Kadoya T, Oyanagi K, Kawakami E, Hasegawa M, Inagaki Y, Sohma Y, Horie H. Oxidized Galectin-1 advances

the functional recovery after peripheral nerve injury. *Neurosci. Lett.* 2005;380:284-288.

- 4) Yamazaki M, Esumi E, Nakano I, Is motor neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis?, *Neuropathology*, 2005;25: 381-387.

2. 学会発表

国内 計43編、国外 計4編。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1件：発明者・渡部和彦、権利者・(財)東京都医学研究機構。(出願公開前につき報告を差し控えさせていただきます。)

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

II. 分担研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

1. ALS 前角細胞リボゾーム RNA 遺伝子転写活性と 細胞変性/ヌクレオリン、分子シャペロンの変化

分担研究者 小柳清光 東京都神経科学総合研究所
運動・感覚システム研究分野長・参事研究員

研究要旨

ALS 前角細胞の変性脱落機序を解明するため、蛋白合成系の「最上流」にあると考えられるリボゾーム(r)RNA 遺伝子の転写活性減少のメカニズムを明らかにし、「下流域」の変性所見との関連性を解析する。17 年度の研究で、ALS 脊髄運動ニューロンで報告したリボゾーム(r)RNA 遺伝子転写活性の減少がニューロン死の最早期のサインでありニューロン死に直結している事を見出した。これは ALS モデルと考えられる顔面神経「引き抜き損傷」ラットで、一定期間継続する rRNA 遺伝子転写活性の減少が運動ニューロン死に直結していること、一方軸索傷害が生じても rRNA 遺伝子転写活性が保たれていればニューロン死が生じにくいことを見出したことに基づく。

家族性 ALS モデルである SOD1 遺伝子変異 (Tg) ラット (東北大 青木ら) においては、脊髄運動ニューロンの数は減少していたが rRNA 遺伝子転写活性は保たれていた。すなわち SOD1 Tg ラットは孤発性 ALS や「引き抜き損傷」とは異なるメカニズムによって運動ニューロンが死んでいく可能性を指摘した。

A. 研究目的

ALS 前角細胞の変性脱落機序を
解明するため、蛋白合成系の「最上流」

にあると考えられるリボゾーム
(r)RNA 遺伝子の転写活性減少のメカ
ニズムを明らかにする。この所見を、

蛋白合成系のより「下流」にある、rRNA の量、粗面小胞体の変化、Golgi 装置の断片化などと対比し、ALS 前角細胞におけるこれらの変化が蛋白合成系の「一連の」変性であるか否かを明らかにする。このため(1) ALS モデルと考えられている顔面神経「引き抜き」損傷ラットの所見と「切断」ラットの rRNA 遺伝子転写活性の定量的所見を比較した。(2) 家族性 ALS モデルである SOD1 Tg ラット(東北大 青木ら)における rRNA 遺伝子転写活性を検討した。

B. 研究方法

(1) ALS モデルと考えられる顔面神経「引き抜き」損傷成体ラット、および顔面神経「切断」成体ラットを用い、運動ニューロン数と rRNA 遺伝子転写活性を検討した。12-14 週齢のフィッシャー雄ラットを用いた。右顔面神経「引き抜き」または「切断」後、30 分、2 時間、6 時間、1 日、3 日、7 日、2 週、3 週、4 週に、それぞれ 3 匹、および正常対照 3 匹、計 24 例を使用してエーテル麻酔下に 4%パラフォルムアルデヒド灌流固定し、パラフィン包埋 6 μ m 厚切片 120 μ m おき連続切片 6 枚を作成した。クレシルバイオレット染色標本で運動ニューロンの数を計測した。また AgNOR 染色標本を用いて、核小体を有する顔面神経核の、断面積 70 μ m² 以上の細胞核の断面積と、その細胞核内の、核小体および核内 AgNOR 陽性

領域の面積を画像解析装置によって計測し、経時的推移を検討した。

(2) 家族性 ALS のモデルである SOD1 遺伝子変異ラット(東北大 青木、糸山ら)の脊髄において、運動ニューロンの数と、rRNA 遺伝子転写活性を検討した。

C. 研究結果と考察・結論

(1) 「引き抜き」損傷ラットでは、引き抜き後 2 時間という極めて早期に運動ニューロンの rRNA 遺伝子転写が低下し、2 週間後に運動ニューロンは有意な脱落を示した。一方、顔面神経「切断」ラットでは、rRNA 遺伝子転写の低下も、有意な運動ニューロンの脱落も認められなかった。AgNOR 染色は rRNA 遺伝子転写活性をよく反映し、それは細胞の蛋白合成能を示していると言われている。本研究によって、①引き抜き損傷運動ニューロンにおいては、rRNA 遺伝子転写活性が損傷後 2 時間という極めて早期に減少し、しかも②これが一定期間減少し続けることによって、運動ニューロン死が惹起される可能性を明らかにした。つまり rRNA 遺伝子転写活性の減少は、神経細胞死に先立つ相当、早期の変化であることを見出した。③運動ニューロンにおける rRNA 遺伝子転写の減少は、細胞内蛋白合成系の最上流、最早期に生じる出来事と考えられ、運動ニューロン死に結びつく最早期の指標となり得るものと考えられた。④rRNA 遺伝

子転写の減少を阻止することにより、運動ニューロンの変性プロセスの進行を止めうる可能性が考えられた。

(2) **SOD1 Tg** ラットにおいては、脊髄運動ニューロンの数は減少していたが、**rRNA** 遺伝子転写活性は保たれていた。すなわち **SOD1** 遺伝子変異ラットでは孤発性 **ALS** や顔面神経引き抜き損傷とは異なるメカニズムによって運動ニューロンが死んでいくことを指摘した。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oyanagi K, Kawakami E, Kikuchi-Horie K, Ohara K, Ogata K, Takahama S, Wada M, Kihira T, Yasui M, Magnesium deficiency over generations in rats with special references to the pathogenesis of the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam, *Neuropathol*, in press
- 2) Ito U, Kawakami E, Nagasao J, Kuroiwa T, Nakano I, Oyanagi K, Restitution of ischemic injuries penumbra of cerebral cortex after temporary ischemia, *Acta Neurochir*, in press
- 3) Hoshino M, Qi M-L, Yoshimura N, Miyashita T, Tagawa K, Wada Y, Enokido Y, Marubuchi S, Harjes P, Arai N, Oyanagi K, Blandino G, Sudol M, Rich T, Kanazawa I, Wanker EE, Saitoe M, Okazawa H, Transcriptional repression induces a slowly progressive atypical neuronal death associated with changes of YAP isoforms and p73, *J Cell Biol*, 172, (2006), 589-604
- 4) Oyanagi K, The nature of the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam and magnesium deficiency, *Parkinsonism and Related Disorders*, 11, (2005), S17-23
- 5) Yamazaki M, Hasegawa M, Mori O, Murayama S, Tsuchiya K, Ikeda K, Chen K-M, Katayama Y, Oyanagi K, Tau-positive fine granules in the cerebral white matter: a novel finding among the tauopathies exclusive to parkinsonism-dementia complex of Guam, *J Neuropathol Exp Neurol*, 64, (2005), 839-846
- 6) Kadoya T, Oyanagi K, Kawakami E, Hasegawa M, Inagaki Y, Sohma Y, Horie H, Oxidized galectin-1 advances the functional recovery after peripheral nerve injury, *Neurosci. Lett.*, 380, (2005), 284-288
- 7) Anamizu Y, Kawaguchi H, Seichi A, Yamaguchi S, Kawakami E, Kanda N, Matsubara S, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nakamura K, Oyanagi K, Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells., *Acta Neuropathol*, 109, (2005), 457-466
- 8) Kotliarova SJNR, Sakamoto N, Kurosawa M, Miyazaki H, Nekooki M, Doi H, Machida Y, Wong HK, Suzuki T, Uchikawa C, Kotliarov Y, Uchida K, Nagao Y, Nagaoka U, Tamaoka A, Oyanagi K, Oyama F, Nukina N, Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in Huntington disease transgenic mice with expanded polyglutamine-EGFP fluorescent aggregates, *J Neurochem*, 93, (2005), 641-653

2. 学会発表

- 1) 小柳清光, ラット二世代にまたがるマグネシウム欠乏実験で認められた選択的黑質ドパミン神経細胞脱落. 第24回神経組織培養研究会. 東京都文京区 順天堂大学 (2006. 3. 11 発表)
- 2) Oyanagi, K. , Magnesium and neurotoxicity, Neurodegenerative disorders on Guam & in the Pacific regions symposium, Guam, USA, (2005. 12. 04 発表)
- 3) Oyanagi K, Yamazaki M, Tau-positive fine granules and glanular hazy astrocytes in ALS/PDC, Neurodegenerative disorders on Guam & in the Pacific Regions Symposium, Guam, USA, (2005. 12. 04 発表)
- 4) 小柳清光, 神経病理学からみる基底核疾患: ハンチントン病とグアム島のパーキンソン痴呆症から学ぶこと, 第20回日本大脳基底核研究会, 愛知県豊橋市シーパレスリゾート, (2005. 07. 09 発表)
- 5) 小柳清光, 神経変性疾患を病理診断するために: 最近の知見を含めて, 第29回日本病理学会近畿支部学術集会, 大阪府大阪市天王寺区大阪赤十字病院., (2005. 06. 04 発表)
- 6) 新宅雅幸、小柳清光、金田大太, 黒質の強い変性を伴ったALS-dementiaの1剖検例, 第33回臨床神経病理懇話会, 石川県金沢市宝町 金沢大学医学部, (2005. 11. 27 発表)
- 7) Oyanagi, K, Hashimoto, T. , Kawakami, E, Nagasao, J, Nishi, K, Effect of Mg for MPP+ toxicity on cultured rat nigral neurons, The 8th European Congress of Neuropathology, オランダ、アムステルダム(2005. 6. 26 発表)
- 8) 若山幸示、鈴木仁、清水夏繪、野本順子、原諭吉、小柳清光、尾野清一, SOD-1遺伝子 Cys111tyr 変異を認めた家族性筋萎縮症(FALS)の1剖検例, 第46回日本神経学会総会, 鹿児島県鹿児島市, (2005. 05. 25 発表)
- 9) 吉田宗平、小柳清光、河上江美子、井出亜里, 二世代に亘るMg欠乏ラット中脳黒質におけるFeの定量と化学状態分析, 第46回日本神経学会総会, 鹿児島県鹿児島市, (2005. 05. 26 発表)
- 10) 小柳清光、河上江美子、長竿淳、西克典, MPP+毒性のマグネシウム(Mg)による阻害: 培養黒質神経細胞を用いた検討, 第46回日本神経学会総会, 鹿児島市, (2005. 05. 26 発表)
- 11) 池田尚子、太田篤胤、上原万里子、小柳清光、鈴木和春, マグネシウム血中濃度恒常性維持機構に関する研究, 第59回日本栄養・食糧学会大会, 東京都世田谷区 東京農業大学, (2005. 05. 14 発表)
- 12) 平井健、長竿淳、山崎峰雄、渡部和彦、河上江美子、渋谷誠、森田俊、高橋均、水谷俊雄、林秀明、小柳清光, 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄における細胞増殖: その局在について, 第46回日本神経病理学会, 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター, (2005. 05. 13 発表)
- 13) 小柳清光、河上江美子、長竿淳、西克典, MPP+パーキンソンモデルへのマグネシウム投与効果-, 第46回日本神経病理学会, 宇都宮市, (2005. 05. 12 発表)
- 14) 伊藤梅男、黒岩俊彦、長竿淳、河上江美子、中野今治、小柳清光, 虚血性ペ

ナンブラにおける播種性神経細胞壊死後の neuronal remodeling process-樹状突起の電顕的観察, 第 46 回日本神経病理学会, 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター, (2005. 05. 12 発表)

15) 小柳清光、河上江美子、長竿淳、穴水依人、星地亜都市、渡部和彦, 脊髄損傷の修復機転における Schwann 細胞の役割, 第 46 回日本神経病理学会, 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター, (2005. 05. 12 発表)

16) 長竿淳、林祐一、川添陽子、河上江美子、渡部和彦、小柳清光, 成体ラット顔面神経引き抜き損傷後の運動ニューロンにおけるリボゾーム(r)RNA 遺伝子転写活性, 第 46 回日本神経病理学会, 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター, (2005. 05. 12 発表)

17) 山崎峰雄、斉藤祐子、村山繁雄、片山泰朗、小柳清光, グアム島パーキンソ

ン痴呆症脳の神経突起: alpha シヌクレインも蓄積しにくい, 第 46 回日本神経病理学会, 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター, (2005. 05. 12 発表)

18) 小柳清光、河上江美子、長竿淳、西克典, MPP+パーキンソンモデルへのマグネシウム投与効果, 第 46 回日本神経病理学会, 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター, (2005. 05. 12 発表)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

II. 分担研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

2. ALS 脊髄で増殖する細胞の有無と細胞種の同定

分担研究者 山崎 峰雄 日本医科大学第二内科・講師

研究要旨

ALS 脊髄における修復機転を明らかにし、神経幹細胞による治療法の開発の可能性を探る目的から、ALS 脊髄で分裂する細胞の研究を行った。これまで ALS の脊髄でアストロサイトを含め、どんな細胞がどこで分裂しているのか、という報告は見られない。また ALS に対する幹細胞治療の可能性が説かれているにもかかわらず、ALS 脊髄で幹細胞が増殖して組織修復に関与しているのか、という報告も見られない。本研究は ALS 脊髄における増殖細胞と修復機構を明らかにし幹細胞移植治療の可能性を探る目的から、ALS 脊髄における増殖細胞の存在と局在を免疫組織学的に検討した。その結果、弧発型 ALS 患者脊髄で増殖する細胞が主としてミクログリアと血管構成細胞であることを世界でもはじめて見出した。その一方アストロサイトやシュワン細胞の増殖が顕著でないこと、増殖細胞の局在は、必ずしも病変の強さと一致しないことが分かった。

A. 研究目的

ALS 脊髄における増殖細胞と修復機構を明らかにし幹細胞移植治療の可能性を探る目的から、ALS 脊髄における増殖細胞の存在と局在を免疫組織学的に検討落を惹起するか解析する。

本研究は以下の事柄を背景として推進した。すなわち古典型 ALS の脊髄

では一般に、側索、前索、前側索の変性と前角および中間帯の神経細胞脱落が見られる。一方後索、後角は保たれることが多い。これらの変性および神経細胞脱落部位、特に前角では「グリオオーシス」が見られる、と神経病理学的に記載されてきた。「グリオオーシス」とは一般にアストロサイトの反応性的変化を指し、これはアストロサイトの

分裂後の形態変化であり、組織修復に関与する、と報告されている (Ikuta F, Oyanagi K, et al. 1983)。ところがこれまで ALS の脊髄でアストロサイトを含め、どんな細胞がどこで分裂しているのか、という報告は見られない。また我々も含めて ALS に対する幹細胞治療の可能性を信じているにもかかわらず、ALS 脊髄で幹細胞が増殖して組織修復に関与しているのか、という報告も見られない。このようなことを背景として本研究を推進した。

B. 研究方法

臨床病理学的に古典型 ALS と診断された日本人計 8 剖検例および日本人対照計 5 剖検例を用いた。ホルマリン固定、パラフィン包埋された頸髄および腰髄切片を、細胞増殖マーカーとされる MIB-1 抗体を用いて免疫染色し陽性細胞の局在と頻度を調べた。さらに MIB-1 と、各種細胞マーカー、即ち、GFAP (アストロサイト)、GST-pai (オリゴデンドログリア)、Iba1 (ミクログリア)、LCA (リンパ球)、Schwann/2E (シュワン細胞)、Nestin (幹細胞) とで二重免疫染色を行って増殖している細胞種を検討した。

C. 研究結果と考察・結論

ALS 脊髄では、その病変が軽症例から重症例になるにつれ、MIB-1 陽性増殖細胞の数が多いうように見受けられる所見が得られた。さらに、MIB-1 陽

性細胞は、対照脊髄では白質にごく少数認められ、ALS 症例では対照に比較して側索から前側索、前索などでやや数が多く、後索でも少数認められた。前角を含む灰白質では MIB-1 陽性細胞の数は一般に白質より少なく見えた。しかし前角の運動ニューロンがほとんど消失した症例では前角で MIB-1 陽性細胞は若干多く見えた。一方、幹細胞が存在すると報告がなされている脊髄中心管の上皮細胞とその周囲には全く陽性所見は認められなかった。

以上本研究は、ALS および対照ヒト脊髄で初めて増殖細胞の存在を見出した。ただ、ALS の増殖細胞の増加はこれまで顕著な変性が指摘されてきた部位とは必ずしも一致するものではなかった。

また MIB-1 陽性の増殖細胞の相当数がミクログリア、および血管構成細胞であることを確認し、その一方アストロサイトやシュワン細胞の増殖が顕著でないことが分かった。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suda S, Komaba Y, Kumagai T, Yamazaki M, Katsumata T, Kamiya T, Katayama Y, Progression of the olivopontocerebellar form of adrenoleukodystrophy as shown by MRI, Neurology, 66: 144-145, 2006
- 2) Yamazaki M, Hasegawa M, Mori O, Murayama S, Tsuchiya K, Ikeda K,

Katayama Y, Oyanagi K, Tau-positive fine granules in the cerebral white matter: a novel finding exclusive to parkinsonism-dementia complex of Guam among the tauopathies, *J Neuropathol Exp Neurol*, 64:839-846, 2005

- 3) Yamazaki M, Esumi E, Nakano I, Is motor neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis?, *Neuropathology*, 25: 381-387, 2005
- 4) Miyasaka T, Watanabe A, Saito Y, Murayama S, David M.A. Mann, Yamazaki M, Ravid R, Morishima-Kawashima M, Nagashima K, Ihara Y, Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil threads, *J Neuropathol Exp Neurol*, 64:665-674, 2005
- 5) Hachiya NS, Ohkubo T, Kozuka Y, Yamazaki M, Mori O, Mizusawa H, Sakasegawa Y, Kaneko K, More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser-microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/d-lactate dehydrogenase protein 2, *Anal Biochem*, 347(1):106-111, 2005

2. 学会発表

- 1) 鶴見昌史, 山口 博, 中村秀紀, 加藤健吾, 山崎峰雄, 勝又俊弥, 桂研一郎, 片山泰朗, 内腸骨動脈血管奇形によるうっ血性ミエロパチーの一例, 第 533 回日本内科学会関東地方会 (2006 年 2 月 18 日 発表)
- 2) 原 啓子, 金子朋広, 木嶋祥一郎, 上田佳恵, 山崎峰雄, 勝又俊弥, 飯野靖彦, 片山泰朗, 発症早期に血漿交換が有用であった HELLP 症候群の一例, 第 534 回日本内科学会関東地方会 (2006 年 3 月 11 日 発表)
- 3) 山崎峰雄, 崎山快夫, 齊藤祐子, 文村

優一, 森修, 山崎昌子, 山之内博, 片山泰朗, 村山繁雄, 進行性核上性麻痺では痴呆症状のみを呈するサブグループが存在する, 第 46 回日本神経学会総会 (2005 年 5 月 25-27 日 発表)

- 4) 山崎峰雄, 齊藤祐子, 文村優一, 森修, 山崎昌子, 山之内博, 片山泰朗, 村山繁雄, 進行性核上性麻痺の臨床病理学的検討-痴呆症状のみを呈する PSP 亜群の存在, 第 46 回日本神経病理学会学術研究会総会 (2005 年 5 月 12-14 日 発表)
- 5) 山崎峰雄, 齊藤祐子, 村山繁雄, 片山泰朗, 小柳清光, グアム島パーキンソン痴呆症脳神経突起: α -synuclein も蓄積しにくい, 第 46 回日本神経病理学会学術研究会総会 (2005 年 5 月 12-14 日 発表)
- 6) 平井健, 長竿淳, 山崎峰雄, 渡部和彦, 河上江美子, 渋谷誠, 森田俊, 高橋均, 水谷俊雄, 林秀明, 小柳清光, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脊髄における細胞増殖: その局在について, 第 46 回日本神経病理学会学術研究会総会 (2005 年 5 月 12-14 日 発表)
- 7) 新井裕至, 山崎峰雄, 山崎昌子, 森修, 大秋美治, 内藤善哉, 片山泰朗, 精神行動異常で発症し, 前側頭葉の高度萎縮を呈したがタウ・ユビキチン蓄積を伴わなかった痴呆の一剖検例, 第 46 回日本神経病理学会学術研究会総会 (2005 年 5 月 12-14 日 発表)
- 8) Miyasaka T, Watanabe A, Saito Y, Murayama S, David M. A. Mann, Yamazaki M, Rivka Ravid, Morishima-Kawashima M, Nagashima K, Ihara Y, Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil threads, 第 48 回日本神経化学学会大会 (福岡) (2005 年 9 月 28-30 日 発表)
- 9) 水越元気, 菅野華子, 山崎峰雄, 勝又

俊弥、坂本静樹、片山泰朗、診断に苦慮した脳結核腫の1例、第10回日本神経感染症学会、(2005年10月20日-21日発表)

- 10) 石原 力, 飯塚美穂, 高田大輔, 鎌野千佐子, 金子朋広, 山崎峰雄, 勝又俊弥, 飯野靖彦, 片山泰朗, 経過中にサイトメガロウイルス感染による重篤な消化管出血を伴ったANCA関連腎炎の一例, 第526回日本内科学会関東地方会(2005年5月14日発表)
- 11) 藤田有子, 金子朋広, 町田佳恵, 鎌野千佐子, 高田大輔, 内海甲一, 山崎峰雄, 勝又俊弥, 飯野靖彦, 片山泰朗, 血栓性血管病変を伴う病理組織所見を呈した抗GBM抗体腎炎の一例, 第528回日本内科学会関東地方会(2005年7月9日発表)
- 12) 中嶋信人, 岡村正哉, 新井裕至, 永山寛, 山口 博, 山崎峰雄, 勝又俊弥, 坂本静樹, 片山泰朗, 西野一三, 左縫工筋

に限局してMRI異常所見を呈し、多発筋炎との異同が問題となった糖原病の1例, 第531回日本内科学会関東地方会(2005年11月12日発表)

- 13) 上田佳恵, 木嶋祥一郎, 藤田恵美子, 金子朋広, 内海甲一, 山崎峰雄, 勝又俊弥, 飯野靖彦, 片山泰朗, 心移植後慢性腎機能障害が出現した一例, 第532回日本内科学会関東地方会(2005年12月11日発表)

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

II. 分担研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

3. 剖検とリソース、臨床病理学的検索、 ALS における痴呆の責任病巣

分担研究者 水谷俊雄 東京都立神経病院・部長

研究要旨

平成 17 年度中に孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新規剖検 4 症例および新規対照剖検 3 例のリソース、加えて都立神経病院に登録されたおよそ 70 例の ALS 症例および対照 20 例をリソースして本研究課題を推進した。分担研究課題のうち ALS で観察される痴呆症状の形態学的責任病巣を明らかにする研究では、16 年度、痴呆を伴わない ALS 7 例について海馬支脚を含む左側頭葉 (吻側および尾側) を免疫組織学的に検討し、Alzheimer 型痴呆とは異なり、ALS では内嗅領皮質、歯状回、stratum lacunosum に層状変性や神経細胞脱落が無いにもかかわらず、海馬支脚の Prosubiculum が萎縮する可能性を指摘した。17 年度の新規 ALS4 剖検例の観察で、痴呆を示した 2 症例では Prosubiculum の萎縮とアストログリアの増殖が見られた。しかしこれらの症例でも内嗅領皮質、歯状回、stratum lacunosum に神経細胞脱落は見られなかった。すなわち ALS では Alzheimer 型痴呆とは異なる機序によって Prosubiculum が萎縮し、これによって痴呆症状を来していることが更に明らかとなった。

A. 研究目的

本研究課題の推進のために筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新規剖検症例および既剖検標本のリソースを行う。さらに ALS 患者で観察される痴

呆症状の形態学的責任病巣を検討する。

B. 研究方法

平成 17 年度、都立神経病院で剖検された ALS 4 症例について、フォ

ルマリン固定後、大脳を前額断し、海馬支脚を含む左側頭葉（吻側および尾側）をパラフィン包埋し、薄切後、Hematosylin-Eosin 染色、Kluver-Barrera 染色、Methenamine-Bodian 染色、抗リン酸化 tau 抗体、抗 ubiquitin 抗体による免疫染色を施し、病理学的に検索した。

C. 研究結果と考察・結論

17 年度剖検 ALS4 症例の Prosubiculum の変化を調べた結果、痴呆を示した 2 例では、2 例ともに Prosubiculum の萎縮が見られたが、内嗅領皮質には明らかな病変を見いだすことは出来なかった。痴呆症状を示さなかった 2 例には Prosubiculum にも内嗅領皮質にも著変は認められなかった。

海馬支脚のうち、アンモン角に接する部分をとくに Prosubiculum という。ここは内嗅領皮質から歯状回に入力する貫通線維が通る場所で、Alzheimer 型痴呆ではこの部分が萎縮し、アストログリアの増殖がみられる。我々は Alzheimer 型痴呆では、Prosubiculum の萎縮は内嗅領皮質の層状変性とほぼ比例関係にあり、内嗅領皮質の層状変性による二次的な萎縮であることを報告してきた。一方 ALS における記憶・記銘力障害の形態学的背景としても Prosubiculum は注目されている。

17 年度新規剖検 ALS 症例の所見から、ALS では Alzheimer 型痴呆とは異なる機序によって Prosubiculum が萎縮し、これによって痴呆症状を来していることが更に明らかとなった。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mochizuki Y, Mizutani T, Isozaki E, Ohtake T, Takahashi Y. Acute limbic encephalitis: a new entity? Neuroscience Letters 394: 5-8, 2006
- 2) Uchihara T, Nakamura A, Mochizuki Y, Hayashi M, Orimo S, Isozaki E, Mizutani T. Silver stainings distinguish Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions: comparison between Gallys-Braak and Campbell-Switzer methods. Acta Neuropathol 110: 255-260, 2005
- 3) 山岡由美子、平井 健、川田明広、磯崎英治、板東充秋、望月葉子、小森隆司、内原俊記、小柳清光、水谷俊雄、林 秀明. 著しい中心前回の萎縮と注目すべき組織学的所見を伴う多系統萎縮症. 脳神経 57 (3): 255-265, 2005

2. 学会発表

- 1) 大迫美穂、小出玲爾、望月葉子、水谷俊雄、林 秀明. 単純ヘルペス脳炎と非ヘルペス性辺縁系脳炎の MRI 所見の特徴. 第 10 日本神経感染症学会総会 (2005 年 10 月発表)
- 2) 蕨 陽子、鏡原康裕、林 秀明、望月葉子、水谷俊雄. 脊髄円錐・馬尾障害を呈した intravascular malignant lymphomatosis の 1 剖検例. 第 174 回日本神経学会関東地方会 (2005 年 9 月発表)

- 3) 内原俊記、中村綾子、望月葉子、林雅晴、磯崎英治、水谷俊雄. α -シヌクレイン陽性構造物の嗜銀性の違い Lewy 小体と GCI の比較. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005 年 5 月発表)
- 4) 望月葉子、山岡由美子、川田明広、磯崎英治、水谷俊雄、林 秀明. 中心前回の萎縮と多彩な組織所見を伴った多系統萎縮症. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005 年 5 月発表)
- 5) 上釜和也、長尾雅裕、宮本和人、松原四郎、神田武政、林 秀明、望月葉子、水谷俊雄. 前角・前根に病変を認めた CIDP 一剖検例. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005 年 5 月発表)
- 6) 望月葉子、水谷俊雄、磯崎英治、川田明広、林 秀明. 多系統萎縮症におけ

る中心前回萎縮. 第 46 回日本神経学会総会 (2005 年 5 月発表)

- 7) 内藤清香、宮本和人、林 秀明、井出勝久、水谷俊雄. 失調を呈し、ステロイド単独投与が著効した Langerhans 細胞性組織球症の 78 歳男性例. 第 172 回日本神経学会関東地方会 (2005 年 3 月発表)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

II. 分担研究年度終了報告書

筋萎縮性側索硬化症の最早期病変を求めて：運動ニューロンにおける
蛋白合成系の異常と治療法開発の試み

4. 変性モデルラットの解析および治療法の開発

分担研究者 渡部和彦 東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究要旨

ALS 運動ニューロンの変性メカニズムの解明と、ALS の新規治療法を開発する目的で研究を続けた。1. 成体ラット顔面神経引き抜き損傷における顔面神経核運動ニューロン死に伴って内在性神経幹細胞が出現増殖することを見出した。また、顔面神経核を含む成体ラット腹側脳幹組織から神経幹細胞を継代培養しうることがわかった。2. 成体ラット顔面神経引き抜き損傷に対して、各種の神経栄養因子組換えアデノウイルスベクターを損傷部に局所接種しその保護効果を検討した。また、組換えヘルペスウイルスベクター、組換えポリオウイルスベクターに関しても検討を開始した。3. 成体マウス顔面神経切断後の運動ニューロン死に対し、ラジカルスカベンジャーMCI-186 の経口投与を行いその保護効果を見出した。4. 引き抜き損傷部位にラット株化シュワン細胞を移植し、神経栄養因子産生による傷害運動ニューロンの保護効果を検討した。また、移植のためのラット神経幹細胞を樹立し解析した。

A. 研究目的

ALS モデルとして成体ラット顔面神経の損傷モデルを使用し、損傷神経細胞の病態解析を行い、それに対する神経栄養因子の遺伝子導入治療、低分子薬物投与の効果を分析し、更に有効な新規組み換えウイルスを開発しシュ

ワン細胞・幹細胞の移植治療を試みる。

B. 研究方法

1. 成体運動ニューロン変性のメカニズムに関する検討：成体ラット顔面神経引き抜き損傷後の顔面神経核における nestin 陽性神経幹細胞の出現増殖について検討した。また、成体ラット顔

面神経核の初代培養を行い、神経幹細胞の増殖分化について解析した。

2. 組換えウイルスに関する検討：成体ラット顔面神経引き抜き損傷に対して、我々の作製した各種の神経栄養因子組換えアデノウイルスベクターを損傷部に局所接種しその保護効果を検討した。また、組換えヘルペスウイルスベクター、組換えポリオウイルスベクターに関しても本年度より検討を開始した。

3. 低分子薬剤投与による保護効果の検討：成体マウス顔面神経切断後の運動ニューロン死に対し、ラジカルスカベンジャーMCI-18の経口投与を行ってその効果を検討した。

4. シュワン細胞、神経幹細胞の移植による細胞治療の試み：引き抜き損傷部位にラット株化シュワン細胞を移植し、神経栄養因子産生による傷害運動ニューロンの保護効果を検討した。また、移植のための成体ラット神経幹細胞を樹立し解析した。

C. 研究結果と考察・結論

1. 成体運動ニューロン変性のメカニズムに関する検討：近年の脳室周囲・嗅神経系および海馬歯状回における内在性神経幹細胞の解析により、成熟した脳でも神経再生が起こる可能性が指摘されている。一方、脳病変に伴ってそれ以外の部位、たとえば大脳新皮質や線条体でも神経幹細胞が出現増殖することが知られている。我々は成体ラ

ットに顔面神経引き抜き損傷を加えると、顔面神経核の運動ニューロン死がおり、4-6週間の経過で運動ニューロン数が20%にまで減少することをこれまで報告してきた。今年度は、成体ラット顔面神経引き抜き損傷における顔面神経核運動ニューロン死に伴って内在性神経幹細胞が出現増殖することを見出した。3ヶ月齢雄ラット右顔面神経を引き抜き除去2週間後から運動ニューロン死が明らかとなり、nestin陽性の神経幹細胞が出現増殖した。運動ニューロン死の明らかでない神経切断ではnestin陽性細胞の出現はみられなかった。一方、正常顔面神経核を含む腹側脳幹組織からFGF2、EGF存在下でneurosphereを増殖させ、6ヶ月以上にわたり神経幹細胞を継代培養しうることを見出した。また、顔面神経引き抜き損傷を加えた組織からはより大量の神経幹細胞培養が得られることがわかった。この神経幹細胞はレチノイン酸存在下でニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化した。本実験モデルは成体脳における内因性神経幹細胞増殖分化の解析に有用であり、in vitro、in vivo両面での神経幹細胞の増殖分化を促進する薬剤などのスクリーニングに応用することにより神経変性疾患に対する再生医療の開発に寄与しうると考えられる。

2. 組換えウイルスに関する検討：本研究では、神経細胞選択的に感染する