

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16～18年度 総合研究報告書

主任研究者 小柳 清光

平成19年（2007年）3月

# 目次

## I. 総合研究報告

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

## 分担研究報告

1. 筋萎縮性側索硬化症(ALS)前角細胞リボソーム 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 -----9

2. 剖検とリソース、臨床病理学的検索、ALS における認知症の  
責任病巣

水谷 俊雄 -----19

3. 変性モデルラットの解析および治療法の開発

渡部 和彦 -----23

4. 異常蛋白から追求する家族性 ALS の発症メカニズム

三澤 日出巳（平成 16 年度参加）、小柳 清光（平成 17-18 年度参加） ---31

5. ALS 脊髄で増殖する細胞の有無と細胞種の同定（平成 17-18 年度参加）

山崎 峰雄 -----35

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----41

III. 研究成果の刊行物・別刷り -----47

## I. 総合研究報告

### 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

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た。

1. 運動ニューロンにおける細胞内蛋白合成系の最上流に位置する、と考えられるリボゾーム(r)RNA 遺伝子転写活性が、ALS 脊髄運動ニューロンで減少している事を見出した。ALS モデルと考えられる顔面神経「引き抜き損傷」ラットの観察で、こ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可能性を指摘した。一方、家族性 ALS モデルである SOD1 遺伝子変異 (Tg) ラット（研究協力者、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おり、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。rRNA 遺伝子転写活性減少は、転写活性化因子の一つと報告されているヌクレオリンの減少に基づく可能性を見出した。
2. 遺伝性脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子産物である運動ニューロン生存蛋白（survival motor neuron (SMN) protein, the product of the spinal muscular atrophy-determining gene）が、孤発性 ALS 症例の脊髄では有意に減少していたことを確認した。
3. 研究期間中、孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の新規剖検 12 症例および新規対照剖検 6 例のリソース、さらに都立神経病院に保管されている剖検 ALS 70 症例、対照 20 症例を提供することによって本研究課題を推進した。分担研究課題では、認知症を呈した ALS 症例の多くが病理学的に三山型であったこと、ALS では Alzheimer 型痴呆とは異なる機序によって Prosubiculum が萎縮し、痴呆症状を来している可能性を指摘した。
4. 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行った。(1) 家族性 ALS モデルである変異ヒト SOD1(G93A, H46R)トランスジェニック・ラットに顔面神経引き抜き損傷

を加えた際、正常ラットに比べて傷害運動ニューロンの変性脱落が有意に促進されるが、傷害運動ニューロンのみに変異 SOD1 を発現させても変性脱落が促進されないことを見出した。(2) 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前駆細胞が出現増殖することを見出し、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF2) 組換えアデノウイルス投与によって内在性神経前駆細胞の増殖を誘導しえた。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前駆細胞を継代培養しうることがわかった。(3) 成体ラット顔面神経引き抜き損傷に対して、肝細胞増殖因子(HGF)組換えウイルスが損傷運動ニューロンの変性脱落を有意に抑制することを確認した。また、組換えヘルペスウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターに関しても検討した。(4) 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。(5) ラット顔面神経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前駆細胞株を樹立し解析した。

5. 家族性 ALS のうち常染色体劣性遺伝で若年発症を特徴とする

ALS2/ALSIN において、原因遺伝子産物である ALS2/ALSIN 蛋白が小脳顆粒細胞軸索の維持に関連していることを見出した。これに関連し、ALS2/ALSIN 蛋白と結合し運動ニューロン変性と係わると考えられる ALS2BP 蛋白の同定を試み、分子量約 120 kDa の特異的バンドを検出した。質量分析 (MS/MS) による解析から、この 120 kDa のタンパク質は微小管 (microtubule) 結合活性を持つ既知のタンパク質であることが判明した。これらの解析から「ALS2 発症において、神経軸索の安定性の低下、およびそれに起因する軸索を介する物質輸送系の障害」が ALS 病態の形成へ関与する可能性を指摘した。

6. 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。またミクログリアは分裂することによって活性化ミクログリアに変化することを見出した。

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

1. 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と細胞脱落との関連の解明。

2. 剖検材料のリソースおよび ALS で観察される認知症状の形態学的責任病巣の検討。

3. 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。

#### 4. 家族性 ALS の新規原因遺伝子

ALS2/ALSIN 欠失による運動ニューロン脱落メカニズムの解析。

#### 5. ALS 脊髄で増殖する細胞の同定と病巣修復への関与の解析。

### B. 研究方法

#### 1. ALS 運動ニューロン蛋白合成系の解析：

ALS 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と原因物質、蛋白合成系への関与を解明する。このため、ALS 剖検例と ALS モデルと言われる顔面神経引き抜きモデルの顔面神経核ニューロン、SOD1 遺伝子変異ラット (研究協力者：東北大 青木ら) の脊髄運動ニューロンにおける所見を解析した。

運動ニューロンの軸索障害に対する酸化型ガレクチン-1 の効果を検討した。

遺伝性脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子産物である survival motor neuron (SMN) protein は、軸索の伸長や神経筋結合の成熟に必要な蛋白である、という。SMN 蛋白を ALS で検索した。

#### 2. リソースと ALS- 認知症の責任病巣：

新規剖検の実施、また分担課題では大脳皮質、基底核を免疫組織学的に解析し、認知症の発症機構を追求した。

#### 3. モデル動物を用いた新規治療法の開発：

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。

#### 4. ALS2/ALSIN 欠失による運動ニュー

#### ロン脱落メカニズムの解析

原因遺伝子産物である ALS2/ALSIN 蛋白の発現と役割を免疫組織化学的に明らかにする。このため若年から老齢までのラット中枢神経系を免疫組織学および生化学的に検索した。

#### 5. 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 解剖例脊髄のホルマリン固定、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、抗 MHC classII 抗体に属する抗 CR3.43 抗体等を用いた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した。

### C. 研究結果と考察

#### 1. ALS 運動ニューロン蛋白合成系の解析：

(1) 運動ニューロンにおけるリボゾーム (r)RNA 遺伝子転写活性と細胞死との関係：転写活性化因子ヌクレオリンの定量的検討

細胞内蛋白合成系の最上流に位置すると考えられる rRNA 遺伝子転写活性が、孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンで減少している事を見出した。また ALS モデルと考えられている顔面神経損傷ラットの顔面神経核運動ニューロンでの解析から、rRNA 遺伝子転写活性の減少はニューロン死に直結した極めて早期の変化である可能性を報告した。ALS 脊髄運動ニューロンの rRNA 遺伝子転写活性の減少がヌクレオリンの減少によって引き起こされている可能性を報告した。

家族性 ALS モデルである SOD1 遺伝子変異 (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 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。

ラット前角細胞軸索障害モデルは、酸化型ガレクチン-1 投与で障害が形態学的にも機能的にも有意に回復した。

## (2) 運動ニューロン生存蛋白 (SMN protein) の孤発性 ALS における検討

対照例の脊髄運動ニューロンでは、その殆どが SMN 蛋白を有していたにも係わらず、孤発性 ALS 症例の脊髄では SMN 蛋白が減少した運動ニューロンの混在を認めた。すなわち ALS 脊髄における SMN 蛋白は有意に減少しており、それは運動ニューロン変性と密接に関連している可能性を指摘した。

## 2. 剖検とリソース、臨床病理学的検索、ALS における認知症の責任病巣

(1) 研究期間中、新規 ALS 剖検 12 症例、対照 6 症例のリソース、さらに過去の剖検 ALS70 症例、対照 20 症例を提供し、研究課題を推進した。

(2) 認知症を呈した ALS 症例の多くが病理学的に三山型であったこと、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指摘した。

## 3. 変性モデルラットの解析および治療法の開発

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前駆細胞が出現増殖することを見出し、FGF2 組換えアデノウイルス投与によって神経前駆細胞の増殖を誘

導しえた。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前駆細胞を継代培養しうるということがわかった。

(2) 成体ラット顔面神経引き抜き損傷に対して、組換えヘルペスウイルスベクター、組換えレンチウイルスベクターに関する検討を加えた。

(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) ラット顔面神経引き抜き損傷部位にラット株化シユワン細胞を移植し、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前駆細胞を樹立し解析した。

## 4. 家族性 ALS の一型とされる ALS2 の原因遺伝子に由来する ALS2/ALSIN 蛋白の解析

(1) ALS2/ALSIN 蛋白が小脳顆粒細胞軸索の伸張と萎縮、すなわち ALS2/ALSIN 蛋白は軸索の維持に密接に関連していることを指摘した。

(2) ALS2/ALSIN 蛋白と結合し運動ニューロン変性と係わる ALS2BP 蛋白の同定を試み、分子量約 120 kDa の特異的バンドを検出した。質量分析 (MS/MS) による解析から、この 120 kDa のタンパク質は微小管結合活性を持つ既知のタンパク質であることが判明した。これらの解析から ALS2 発症において、神経軸索の安定性の低下、およびそれに起因する軸索を介する物質輸送系の障害が ALS 病態の形成へ関与する可能性を指摘した。

## 6. ALS 脊髄で増殖する細胞の有無と細胞腫の同定

ALS 脊髄で初めて、ミクログリアを中心とした細胞分裂を見出した。ミクログリアは分裂することによって活性化ミク

ログリアに変化することを確認した。またその局在は脊髄前角よりも脊髄側索で顕著であることを観察した。

#### D. 結論

##### 1. ALS 運動ニューロンの変性脱落機序、特にその最早期病変の解明：

ALS 運動ニューロンにおけるリボソーム rRNA 遺伝子の転写活性の減少がニューロン脱落の極めて早期の変化すなわち病変の「引き金」である可能性を本研究で指摘した。しかもこの活性減少は、転写活性化因子の一つであるヌクレオリンの減少によって惹起されている可能性を見出した。またニューロン軸索の伸長に関与する、といわれる運動ニューロン生存 (SMN) 蛋白の減少も見出した。

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ことを指摘した。

##### 2. ALS-認知症の発症メカニズムの解析：

認知症を呈した ALS 症例の多くは病理学的に三山型であることを確認した。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指摘した。

##### 3. 運動ニューロン障害モデル動物におけるニューロン変性メカニズムの解明と新規治療法の開発：

運動ニューロン変性阻止に有効な種々の栄養因子組み換えウイルスを得た。これらの臨床応用を隣接する都立神経病院と準備中である。顔面神経「引抜き損傷」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。

##### 4. 家族性 ALS 2 の原因遺伝子に由来する ALS2/ALSIN 蛋白の解析

ALS2 蛋白は微小管結合活性を持つ既知の蛋白と結合し、軸索の維持に重要であることを突き止めた。ALS2 発症において、神経軸索の安定性の低下、およびそれに起因する軸索を介する物質輸送系の障害が ALS 病態の形成へ関与する可能性を指摘した。

##### 5. ALS 脊髄で増殖する細胞の組織修復への関与：

世界でも初めて ALS 脊髄でミクログリア、血管構成細胞を主体とする細胞増殖の存在を明らかにし、活性型ミクログリアはミクログリアの分裂によって生じていることを見出した。これらの増殖細胞が ALS 脊髄の修復メカニズムへどのように関与しているかを解析することにより、内在性細胞による ALS 脊髄病変の修復、という新しい治療戦略を樹立できる。

#### 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 49 編。

そのうちの主なもの

- 1) Oyanagi K, Yamazaki M, Kawakami E, Morita T, Makifuchi T, Takahashi H. On the origin of the degenerated fibers in the white matter of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis: New Research. Ed. Murray CA. Nova Science Publishers. Pp.179-196, 2006

- 2) Ito Y, Wiese S, Funk N, Chittka A, Rossoll W, Boemmel H, Watabe K, Wegner M, Sendtner M. Sox10 regulates ciliary neurotrophic factor (Cntf) gene expression in Schwann cells. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:7871-7876.
- 3) Hayashi Y, Kawazoe Y, Sakamoto T, Ojima M, Wang W, Takazawa T, Miyazawa D, Ohya W, Funakoshi H, Nakamura T, Watabe K. Adenoviral gene transfer of hepatocyte growth factor prevents death of injured adult motoneurons after peripheral nerve avulsion. Brain Res 2006;1111:187-195.
- 4) Marubuchi S, Okuda T, Tagawa K, Enokido Y, Horiuchi D, Shimokawa R, Tamura T, Qi M-L, Eishi Y, Watabe K, Shibata M, Nakagawa M, Okazawa H. Hepatoma-derived growth factor, a new trophic factor for motor neurons, is up-regulated in the spinal cord of PQBP-1 transgenic mice before onset of degeneration. J Neurochem 2006;99:70-83.
- 5) 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.
- 6) 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
- 7) Hashimoto T, Matsubara S, Mochizuki Y, Tsuji S, Mizutani T, Oyanagi K. Forme fruste or incipient form of widespread-type ALS, or MND with PNLA? An autopsy case report. Neuropathology, In press.
- 8) Hasegawa M, Arai T, Akiyama H, Nonaka T, Mori H, Hashimoto T, Yamazaki M, Oyanagi K. TDP-43 is deposited in the Guam parkinsonism-dementia complex brains. Brain, In press.

## 2. 学会発表

国内 計 115 編、国外 計 23 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。



## 分担研究報告

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

### 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することを目標に研究を進めた。

1. ALS 脊髄運動ニューロンで rRNA 遺伝子転写活性の減少を見出し
2. ALS モデルと考えられる顔面神経「引き抜き損傷」ラットにおける観察で、rRNA 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。
3. 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。
4. 早発老化モデルと言われる klotho マウスの脊髄前角細胞における Klotho 蛋白形成不全と、リボゾーム RNA 遺伝子の転写活性の減少、胞体内 RNA および粗面小胞体の減少を見出した。これらの所見が ALS 前角細胞の所見と類似する事を指摘し、ALS における klotho 遺伝子の検索の必要性と、klotho マウスが ALS の研究モデルとして有用であることを報告した。
5. rRNA 遺伝子転写の制御に関し、その活性化因子の一つと報告されているヌクレオリンを脊髄運動ニューロンにおいて定量的に検討し、ALS では有意に減少している事を見出した。
6. 遺伝性脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子産物である運動ニューロン生存蛋白

(survival motor neuron (SMN) protein, the product of the spinal muscular atrophy-determining gene) は、軸索の伸長や神経筋結合の成熟に必要な蛋白である、と報告されている。孤発性 ALS 症例の脊髄では SMN 蛋白が有意に減少していることを確認した。

7. 分子シャペロン KDEL が ALS 脊髄運動ニューロン変性の早期に局在が変化することを見出した。
8. ラットを用いた脊髄前角細胞の軸索障害モデルにおいて、酸化型ガレクチン-1 を軸索障害部位に投与すると、軸索障害の形態学および機能的回復が有意に進むことを見出し報告した。

#### A. 研究目的

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と細胞脱落との関連を解明する。

#### B. 研究方法

##### 1. 運動ニューロンにおけるリボゾーム(r)RNA 遺伝子転写活性と細胞死との関係：転写活性化因子ヌクレオリンの定量的検討

(1) ヒト ALS 及び対照の脊髄運動ニューロンにおける rRNA 遺伝子転写活性を計測する。すなわち、剖検症例のホルマリン固定脊髄をパラフィン包埋し、その 6 ミクロン厚切片を AgNOR 染色して、核内の陽性領域を画像解析装置により計測した。

(2) 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%パラホルムアルデヒド灌流固定し、パラフィン包埋 6 $\mu$ m

厚切片 120 $\mu$ 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 $\mu$ m<sup>2</sup> 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。

(3) 家族性 ALS のモデルである SOD1 遺伝子変異ラット H46R および G93A 各 4 匹およびリターメート各 4 匹(東北大学青木、糸山ら)のホルマリン固定パラフィン包埋脊髄において、運動ニューロンの数と、rRNA 遺伝子転写活性を検討した。

(4) 早発老化モデルと言われる klotho マウスにおいて、脊髄前角細胞における Klotho 蛋白形成不全と、リボゾーム RNA 遺伝子の転写活性の減少、胞体内 RNA および粗面小胞体の検討を行う。すなわち、klotho 変異マウスは 8 週から 10 週で死亡する。本研究では 7 週齢の klotho 変異マウス (KL<sup>-/-</sup>) と、野生型 (WT) マウスを使用した。KL<sup>-/-</sup>マウス 7 匹、WT 5 匹は 4%パラホルムアルデヒドで経心的に灌流固定し第 5 頸髄を切り出しパラフィン包埋した。6 ミクロン厚の切片を作製し光学顕微鏡および免疫組織化学的、レクチン化学的に観察した。電顕観察用には KL<sup>-/-</sup>mouse

と wild type mouse 各 2 匹ずつ 2.5% グルタルで経心的に灌流固定し第 5 頸髄を取り出し標本化した。

脊髄における klotho gene の発現を、RT-PCR 法を用い、検討する。

Hematoxylin-eosin, Klüver-Barrera 染色による光学顕微鏡観察、電子顕微鏡観察に加え免疫組織化学的観察、レクチン化学的観察を行った。また第 5 頸髄前角の核小体をもつ神経細胞の面積を計測した。計測は各症例とも第 5 頸髄部を 4 分割してその間の 3 枚につき行った。

(5) rRNA 遺伝子転写活性減少のメカニズムを解明する目的から、その活性化因子であるヌクレオリンを ALS 脊髄運動ニューロンにおいて定量的に検討した。

(6) ヌクレオリン計測のため、孤発性 ALS のうち、脊髄運動ニューロン脱落が軽度の 4 症例、脱落が高度の 3 症例、および対照 3 例をもちいて、パラフォルムアルデヒド固定パラフィン包埋された脊髄を用い、サンタクルツ社のモノクロナル抗ヌクレオリン抗体によって免疫染色し、陽性領域を画像解析装置を用いて定量的に計測する。

(7) ラットを用いた脊髄前角細胞の軸索障害モデルに対する酸化型ガレクチン-1 投与による、軸索障害の形態学および機能的回復を検討した。すなわち、成熟ラットを用い、座骨神経を切断-縫合後凍結し、その部位に種々の濃度の酸化型ガレクチン-1 を浸透圧ポンプで投与して 100 日後まで観察した。臨床症状は、下肢指の開大の程度で評価し、形態学的評価は、21mm 遠位部における有髄線維を定量的に検討した。

**2. 運動ニューロン生存蛋白 (survival motor neuron (SMN) protein, the product of the spinal muscular atrophy-determining**

**gene) 及び分子シャペロン KDEL の孤発性 ALS における検討**

(1) survival motor neuron (SMN) protein は、脊髄運動ニューロンの変性と脱落を示す脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy) の責任遺伝子産物であり、軸索の伸長や神経筋結合の成熟に必要な蛋白である、と報告されている。ALS 脊髄運動ニューロンにおけるこの蛋白の発現の有無と変化に関する報告は、これまで認められない。今年度、われわれは ALS 運動ニューロン変性と SMN 蛋白との関連を知る目的から、孤発性 ALS 脊髄において SMN 蛋白の発現とその変化を検討した。材料と方法は、日本人孤発性 ALS 6 例、対照日本人 7 例を用いる。ホルマリン固定、パラフィン包埋脊髄を用いて 6 ミクロン厚切片を作成し、サンタクルツ社製ウサギポリクロナル抗体を用いて ABC 法による免疫染色を行い、脊髄の Rexed 第 8 層、9 層に位置し、細胞核を有する短径 25 ミクロン以上のニューロンの総数と、その中で胞体が SMN 免疫染色陽性を示すニューロン数、との比率を求めた。

(2) 孤発性 ALS 脊髄における分子シャペロン KDEL を免疫組織学的に検討した。

### C. 研究結果と考察・結論

**1. 運動ニューロンにおけるリボゾーム (r)RNA 遺伝子転写活性と細胞死との関係 :**

(1) ヒト ALS 脊髄運動ニューロンにおける rRNA 遺伝子転写活性が有意に減少していることを見出した。

(2) 「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 30 分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。

(3) 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。

(4) 早発老化モデルと言われる klotho マウスにおいて、脊髄前角細胞における Klotho 蛋白形成不全と、リボゾーム RNA 遺伝子の転写活性の減少、胞体内 RNA および粗面小胞体の減少を見出した。ALS 前角細胞の所見との類似を指

摘し、ALS における klotho 遺伝子の検索の必要性と、klotho マウスが ALS の研究モデルとして有用であることを報告した。

(5) 活性化因子ヌクレオリンの定量的検討結果で、ALS 脊髄運動ニューロンにおけるヌクレオリンは、脊髄運動ニューロン脱落高度の症例の、残存ニューロンが極めて萎縮したものではありませんに減少していたのみならず、脱落軽度の症例の、大きさがほぼ保たれた運動ニューロンにおいても有意に減少していた。ALS 脊髄運動ニューロンに見られる rRNA 遺伝子転写活性の減少は、ヌクレオリンの減少により惹起されている可能性が考えられた。

(6) ラットを用いた脊髄前角細胞の軸索障害モデルにおいて、酸化型ガレクチン-1 を軸索障害部位に投与すると、軸索障害の形態学のおよび機能的回復が有意に進むことを見出した。

## 2. 運動ニューロン生存蛋白 (survival motor neuron protein, the product of the spinal muscular atrophy-determining gene) および分子シャペロン KDEL の孤発性 ALS における検討

(1) 短径 25 ミクロン以上の脊髄運動ニューロンの内、SMN 蛋白を有するものは、対照 7 例では 81% から 97% であった。一方 ALS 6 例では 42% から 91% であった。すなわち ALS では、SMN 蛋白を有する脊髄運動ニューロンの比率は有意に減少していた。すなわち、対照脊髄運動ニューロンでは、その殆どが SMN 蛋白を有していたが、孤発性 ALS の脊髄では SMN 蛋白が減少した運動ニューロンが混在していた。上記したように SMN 蛋白はニューロン活動の

維持には重要な働きを果たしていることが指摘されている。ALS 脊髄における SMN 蛋白の減少は運動ニューロン変性と密接に関連している可能性がある。

(2) ALS 脊髄運動ニューロンにおける早期変化と言われて来た Golgi 装置の断片化より早く、分子シャペロン KDEL は、細胞内の局在を変化させていた。

#### D. 健康危険情報

特になし。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hasegawa M, Arai T, Akiyama H, Nonaka T, Mori H, Hashimoto T, Yamazaki M, Oyanagi K. TDP-43 is deposited in the Guam parkinsonism-dementia complex brains. Brain, In press.
- 2) Shintaku M, Oyanagi K, Kaneda D. Amyotrophic lateral sclerosis-dementia with severe degeneration of the substantia nigra and clinical parkinsonism. Report of an autopsy case. Neuropathology, In press.
- 3) Hashimoto T, Matsubara S, Mochizuki Y, Tsuji S, Mizutani T, Oyanagi K. Forme fruste or incipient form of widespread-type ALS, or MND with PNLA? An autopsy case report. Neuropathology, In press.
- 4) Ito U, Nagasao J, Kawakami E, Oyanagi K. Fate of disseminated dead neurons in the cortical ischemic penumbra: Ultrastructure indicating novel scavenger mechanisms by microglia and astrocytes, Stroke, In press.
- 5) Sundar PD, Yu C-E, Sieh W, Steinbart E, Garruto RM, Oyanagi K, Craig U-K, Bird T D, Wijsman EM, Galasko DR, Schellenberg GD. Two sites in the MAPT region confer genetic risk for Guam ALS/PDC and dementia, Hum Mol Genet, 16(3), 295-306, 2007
- 6) Ito U, Kuroiwa T, Nagasao J, Kawakami E, Oyanagi K. Temporal profiles of axon terminals, synapses and spines in the ischemic penumbra of the cerebral cortex. Ultrastructure of neuronal remodeling, Stroke, 37, 2134-2139, 2006
- 7) Ito U, Kawakami E, Nagasao J, Kuroiwa T, Nakano I, Oyanagi K. Restitution of ischemic injuries in penumbra of cerebral cortex after temporary ischemia, Acta Neurochir., 96(Suppl), 239-243, 2006
- 8) Oyanagi K, Yamazaki M, Kawakami E, Morita T, Makifuchi T, Takahashi H. On the origin of the degenerated fibers in the white matter of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis: New Research. Ed. Murray CA. Nova Science Publishers. pp.179-196, 2006
- 9) 小柳清光. パーキンソン病・パーキンソン痴呆症とマグネシウム -世代にまたがる長期欠乏実験-, 文月会誌, 0(2), 48-53, 2007
- 10) 小柳清光. ミネラルと神経変性疾患, 日本医事新報, (4316), 93-94, 2007
- 11) 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, Neuropathology, 22; 115-128, 2006
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) Kadota 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) Kikuchi-Horie K, Kawakami E, Kamata M, Wada M, Hu J-G, Nakagawa H, Ohara K, Watabe K, Oyanagi K. Distinctive expression of midkine in the repair period of rat brain during neurogenesis: immunohistochemical and immunoelectron microscopic observations. J Neurosci Res 2004;75:678-87.
- 19) Ito U, Kuroiwa T, Hanyu S, Hakamata Y, Kawakami E, Nakano I, Oyanagi K. Ultrastructural temporal profile of the dying neuron and surrounding astrocytes in the ischemic penumbra: apoptosis or necrosis?, Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia V, Buchan, AM, 2004; 189-196

## 2. 学会発表

- 1) Oyanagi K, Hashimoto T. Magnesium as the candidate of pathogenesis and therapeutics of the parkinsonism in humans. The 9th International Symposium of aromatherapy and medical plants. Grasse, France (2007年3月18日発表)
- 2) 小柳清光、渡部和彦、長竿淳、河上江美子、シュワン細胞の分裂・遊走促進による脊髄損傷新規治療法の開発, 平成18年度東京都医学研究機構「研究交流フォーラム」, 東京都文京区駒込 駒込病院講堂(2007年03月16日発表)
- 3) 橋本智代、長竿淳、西克典、辻貞俊、小柳清光. MPP+毒性に対するマグネシウム(Mg)の「治療」効果, 第47回日本神経学会, 東京都(2006年5月12日発表)
- 4) 山崎峰雄、橋本智代、長竿淳、森修、片山泰朗、小柳清光. 3/4リポートタウ: パーキンソンニズム痴呆症では同一グリア細胞内に共存する, 第47回日本神経学会, 東京都(2006年5月13日発表)
- 5) 小柳清光、橋本智代、河上江美子、緒方謙太郎、高濱祥子、辻貞俊、紀平為子、安井昌之, 世代にまたがる長期アルミニウム(AI)投与ラット脳神経細胞内リン酸化タウの沈着, 第47回日本神経学会, 東京都(2006年5月13日発表)
- 6) 鈴木仁、尾野精一、石田康生、小柳清光. 著明な錐体路変性と前頭側頭葉萎縮を呈し脊髄にブニナ小体を認めた1剖検例: 原発性側索硬化症(PLS)に関する1考察, 第47回日本神経病理学会, 岡山市(2006年5月26日)

- 7) 若山幸示、鈴木仁、石田康生、野本順子、原諭吉、尾野精一、小柳清光。レビー小体様硝子様封入体の広範な出現を認め、SOD1 遺伝子 cys111tyr 変異を伴った家族性筋萎縮性側索硬化症の 1 剖検例, 第 47 回 日本神経病理学会, 岡山市(2006 年 5 月 26 日発表)
- 8) 小柳清光、橋本智代、大藤高志、巻淵隆夫。神経原線維変化の発現ステージング: グラム島パーキンソン痴呆症での検討, 第 47 回 日本神経病理学会, 岡山市(2006 年 5 月 26 日発表)
- 9) 新宅雅幸、小柳清光、金田大太, Parkinsonism を主徴とし黒質の強い変性を伴った ALS-dementia の 1 剖検例, 第 47 回 日本神経病理学会, 岡山市(2006 年 5 月 25 日発表)
- 10) 平井健、長竿淳、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) 脊髄における細胞増殖: ミクログリアの活性化について, 第 47 回 日本神経病理学会, 岡山市(2006 年 5 月 24 日発表)
- 11) 小柳清光、橋本智代、河上江美子、緒方謙太郎、高濱祥子、紀平為子、辻貞俊、安井昌之。世代にまたがる長期アルミニウム(AI) 投与ラットに認められたリン酸化タウの沈着, 第 47 回 日本神経病理学会, 岡山市(2006 年 5 月 24 日発表)
- 12) 橋本智代、長竿淳、西克典、辻貞俊、小柳清光。MPP+ 毒性に対するマグネシウム(Mg) の治療実験: ラット培養黒質神経細胞を用いて, 第 47 回 日本神経病理学会, 岡山市 (2006 年 5 月 24 日発表)
- 13) 入江東吾、鈴木仁、山崎寿洋、尾野精一、石田康生、小柳清光。人工呼吸器による延命後、古典型 ALS の病変に加えて、軽度ながら広範な変性所見を認めた孤発性 ALS の 1 剖検例, 第 47 回 日本神経病理学会, 岡山市 (2006 年 5 月 24 日発表)
- 14) 山崎峰雄、橋本智代、長竿淳、森修、片山泰朗、小柳清光。タウオパチーでは 3/4 リピートタウが同一グリア細胞内に共存する, 第 47 回 日本神経病理学会, 岡山市 (2006 年 5 月 24 日)
- 15) 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リボゾーム(r)RNA 遺伝子転写活性と運動ニューロン脱落の相関: 軸索切断との比較, 第 47 回 日本神経病理学会, 岡山市(2006 年 5 月 24 日発表)
- 16) 橋本智代、小柳清光、松原四郎、望月葉子、水谷俊雄。ブニナ小体と著明な前側索変性を呈し、視床下核グリオーシスと黒質内側部鉄沈着、脊髄神経節変性を伴った筋萎縮性側索硬化症の 1 例, 第 84 回 関東臨床神経病理懇話会, 東京都板橋区 日本大学医学部(2006 年 7 月 22 日発表)
- 17) Oyanagi K, Kawakami E, Nagasao J, Watabe K. Remyelination by Schwann cells in the spinal cord of a newly developed model for transverse myelopathy in rats., 第 16 回 国際神経病理学会, サンフランシスコ(2006 年 9 月 12 日発表)
- 18) Nagasao J, Hayashi Y, Kawazoe Y, Kawakami E, Watabe K, Oyanagi K. Ribosomal RNA gene transcription activity and motoneuron loss: Comparison between facial nerve avulsion and axotomy., 第 16 回国際神経病理学会, 米国サンフランシスコ(2006 年 9 月 12 日発表)
- 19) Oyanagi K, Hashimoto T, Ohto T, Makifuchi T. Staging of neurofibrillary tangle formation in the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam., 第 16 回国際神経病理学会, 米国サンフランシスコ(2006 年 9 月 12 日発表)
- 20) Hashimoto T, Nishi K, Nagasao J, Tsuji S, Oyanagi K. Magnesium (Mg) effect for MPP+ toxicity on cultured rat nigral neurons: Aiming to treat Parkinson disease., 第 16 回国際神経病理学会, 米国サンフランシスコ(2006 年 9 月 12 日発表)

- 21) Yamazaki M, Hashimoto T, Nagasao J, Mori O, Tsuchiya K, Katayama Y, Oyanagi K. Coexistence of both 3- and 4-repeat tau isoforms in glia among tauopathies., 第16回国際神経病理学会, 米国サンフランシスコ (2006年9月12日発表)
- 22) Oyanagi K, Nagasao J, Yamazaki M, Okamoto K, Aoki M, Watabe K, Wada M, Morita T, Takahashi H, Mizutani T, Hayashi H. Protein synthesizing system in the motor neurons in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis: pursuing the beginning of the alterations, 17th International Symposium on ALS/MND, パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県 (2006年12月1日発表)
- 23) 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黒質ドパミン神経細胞脱落, 第24回神経組織培養研究会, 東京都文京区本郷 順天堂大学, (2006年3月11日発表)
- 24) Oyanagi K. Critical periods of the neurodegenerative diseases and malignant tumors, 第29回日本神経科学大会, 京都市 国立京都国際会館 (2006年7月19日発表)
- 25) Oyanagi K, Hashimoto T. Magnesium in the parkinsonism-dementia complex: as the pathogenesis and therapeutics., 第11回国際マグネシウムシンポジウム, 三重県志摩賢島 (2006年10月26日発表)
- 26) 小柳清光, 壮・老年期神経疾患の発症の切っ掛け: 臨界期に関する胎生期からの観察, 第29回神経研シンポジウム「神経変性と癌の統合的戦略」, 東京都新宿区新宿明治安田生命ホール (2006年10月6日発表)
- 27) 小柳清光, ALS:Up-date., 都立神経病院臨床病理カンファレンス, 府中市武蔵台東京都立神経病院 (2006年6月15日発表)
- 28) 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黒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)
- 29) Oyanagi.K , Magnesium and neurotoxicity, Neurodegenerative disorders on Guam & in the Pacific regions symposium, Guam, USA, (2005.12.04 発表)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 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)
- 38) 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)
- 39) 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)
- 40) 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)
- 41) 伊藤梅男、黒岩俊彦、長竿淳、河上江美子、中野今治、小柳清光，虚血性ペナンプ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)
- 42) 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)
- 43) 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)
- 44) 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)
- 45) 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)
- 46) 小柳清光、山崎峰雄、渡部和彦、河上江美子、和田学、森田俊、高橋均、加藤修一、水谷俊雄、林秀明，筋萎縮性側索硬化症：折り畳みに関与する蛋白からみた前角細胞小胞体の変化，第45回日本神経学会(2004, 5.12)
- 47) 山崎峰雄、長谷川成人、森修、片山泰朗、小柳清光，グアム島パーキンソンニズム痴呆症では大脳皮質と白質でタウアイソフォームが異なる，第45回日本神経学会(2004, 5.14)
- 48) 小柳清光、山崎峰雄、渡部和彦、河上江美子、和田学、森田俊、高橋均、加藤修一、水谷俊雄、林秀明，筋萎縮性側索硬化症：小胞体で蛋白の折り畳みに関与すると言われるシャペロンからみた前角細胞の変化，第45回日本神経病理学会(2004, 5.27)
- 49) 山崎峰雄、長谷川成人、森修、片山泰朗、小柳清光，大脳皮質と白質で異なるタウアイソフォーム：グアム島パーキンソン痴呆症における観察，第45回日本神経病理学会(2004, 5.26)
- 50) 伊藤梅男、黒岩俊彦、袴田陽二、河上江美子、中野今治、小柳清光，虚血性ペナンプラにおける播種性神経細胞死後の neuronal remodeling process: 死亡した神経細胞を囲む神経細胞突起，第45回日本神経病理学会(2004, 5.26)
- 51) 小柳清光、河上江美子、穴水依人、星地亜都司、渡部和彦，ヒト脊髄損傷の病態に近似し、病変の強さをコントロールでき、病変の再現性が確保できる新しい脊損モデルの開発，第45回日本神経病理学会(2004,

5. 26

- 52) Horie H, Oyanagi K, Nakajima S, Kawakami E, Sato M, Kadoya T, Yoshioka T, Tetzlaff W. Axonal plasticity in neurite extension, 第 47 回日本神経化学会大会・第 27 回日本神経科学大会・合同大会, (2004, 9. 22)
- 53) Horie H, Oyanagi K, Nakajima S, Kawakami E, Sato M, Kadoya T, Yoshioka T, Tetzlaff W. Pre-axotomy enhances neurite regeneration from axons removed from their cell bodies, 4th Asia Pacific Synposium on Neural

Regeneration, (2004, 12.5)

**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。

## 分担研究報告

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

### 2. 剖検とリソース、臨床病理学的検索、 ALS における認知症の責任病巣

分担研究者 水谷俊雄 東京都立神経病院・部長

#### 研究要旨

1. 研究期間中に孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の新規剖検 12 症例および新規対照剖検 8 例のリソースを行い、過去の剖検例 ALS70 症例、対照 20 症例を提供して本研究課題を推進した。
2. ALS で観察される認知症状の形態学的責任病巣を明らかにする研究では、認知症を呈した ALS 症例の多くは病理学的に三山型であったことを確認した。すなわち ALS における認知症状の発現には、側頭葉のみならず前頭葉の障害が必要と思われた。
3. 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。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

分担課題に関しては、都立神経病院で剖検された ALS 60 症例について、フォルマリン固定後、大脳を前額断し、海馬支脚を含む側頭葉（吻側および尾側）および側頭葉、基底核などをパラフィン包埋し、薄切後、Hematoxylin-Eosin 染色、

Klüver-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、病理学的に検索する。

### C. 研究結果と考察・結論

認知症を呈した ALS 症例の多くは病理学的に三山型であったことを確認した。一方、扁桃体病変を示したにもかかわらず、軽度の性格変化を呈したのみの症例が存在した。すなわち ALS における認知症状の発現には、側頭葉のみならず前頭葉の障害が必要条件と思われた。一方扁桃体のみ障害では、認知症状は満たさないことが考えられた。

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。

Prosubiculum を通過した貫通線維は直接歯状回に入力するとされてきたが、その他にもアンモン角の stratum lacunosum を通る線維系があることも知られており、我々は剖検例でそれを証明している。Alzheimer 型痴呆ではこの stratum lacunosum の萎縮、神経線維の減少、アストログリアの増殖が観察される。しかし、今回検討した ALS 例には同様の変化は認められなかった。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

なし。

- 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) Oyanagi K, Nagasao J, Yamazaki M, Okamoto K, Aoki M, Watabe K, Wada M, Morita T, Takahashi H, Mizutani T, Hayashi H. Protein synthesizing system in the motor neurons in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis: pursuing the beginning of the alterations. 17th International symposium ofn ALS/MND (2006 年 12 月発表)
- 2) 平井 健、長竿 淳、森田 俊、高橋 均、