

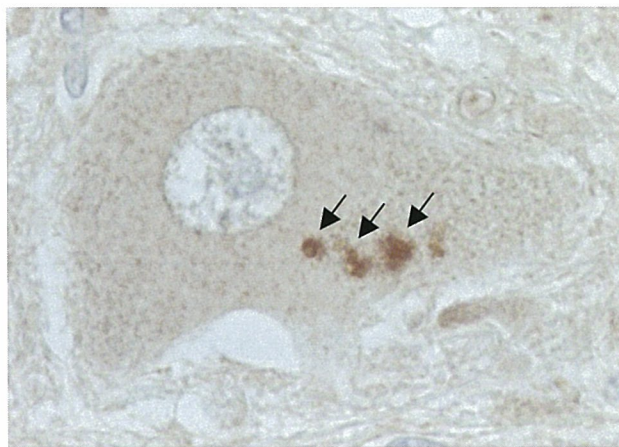
対する抗体を用いて検討した。

### C. 研究結果<sup>2)</sup>

ALS、非 ALS 例の脊髄前角細胞の胞体と突起はほぼ均一に transferrin 陽性反応を示した。また oligodendrocytes と思われる細胞では、核周囲の小さな細胞質が transferrin の抗体で陽性に染色された。

それぞれの異常構造物の抗 transferrin 抗体に対する反応性は以下のものであった。

- 1) Bunina bodies は transferrin 陽性であった(下図)。なお、transferrin の一次抗体を事前に transferrin (Sigma) と反応させた後に免疫染色すると、Bunina bodies と細胞質の染色は消失したので、抗体特異性は確認できた。



矢印は脊髄前角細胞内にある transferrin 陽性の Bunina bodies を示す。Transferrin 免疫染色

- 2) basophilic inclusions は transferrin 陽性、部分陽性、陰性に分けることができた。陽性が 5/15 個、部分陽性が 5/15 個、陰性が 5/15 個とほぼ同じ割合であった。

- 3) Lewy body-like inclusions/round inclusions は軽度 transferrin 陽性であった。コアに相当する部位が細胞質よりわずかに強く染色された。

- 4) skein-like inclusions は transferrin 陰性であった。

なお、albumin, prealbumin, orosomucoid の抗体では、上記の構造物はいずれも陰性であった。

### D. 考 察

- 1) Bunina bodies や basophilic inclusions に存在する transferrin はどこから来たのか？

脊髄前角細胞は transferrin を生成していない代わりに、transferrin receptor が存在し、endocytosis によって transferrin が細胞内に入ってくる。ALS、対照群ともほぼ均一に細胞質が染色されたが、Bunina bodies や basophilic inclusions の染色性が、明らかに細胞質よりも高くなっていった。もともと細胞質に存在する transferrin が Bunina bodies などに移動することが最も可能性が高いと推測した。

また、神経変性疾患では血液脳関門や髄液脳関門の機構が破綻し、正常よりも transferrin が中枢神経系に移入しやすくなっている可能性も否定できない。たとえば Alzheimer 病では血中の transferrin が 5 倍上昇していると記載した文献がある<sup>3)</sup>。また Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) の髄液中では 14-3-3 タンパク質が上昇している<sup>3)</sup>。CJD では cystatin C が診断マーカーの一つになり得るという報告もある<sup>3)</sup>。ALS における血中や髄液中の transferrin の値については検索していないが、正常よりも上昇している可能性は否定できない。

また、神経筋接合部から逆行性に神経細胞胞体内に運ばれた可能性も考慮しなければならない。

- 2) なぜ transferrin が ALS に特異的な異常構造物のうち、Bunina bodies と basophilic inclusions に優位に存在し、skein-like inclusions には存在しないのか？

Bunina bodies や basophilic inclusions の構成成分と transferrin の間には親和性があるのではないかと推測した。既知もしくは未知なるタンパク質と transferrin との直接結合や、あるタンパク質を介して間接結合しているのかもしれない。一つの可能性として Bunina bodies に存在する cystatin C を挙げることができるが<sup>4)</sup>、cystatin C が存在しない basophilic inclusions

では transferrin 陽性の説明は不可能であり、未だ結論は出せない。

異常構造物の構成タンパク質が詳細に判明し、これら封入体の形成メカニズムが明らかにされることが、ALS の病態解明に近づく道であると考ええる。

## E. 結 論

1) Bunina bodies と basophilic inclusions の封入体形成に transferrin が関与していることが示唆されたが、そのメカニズムについては不明である。

2) 今まで Bunina bodies は cystatin C が唯一の陽性タンパク質であったが、今回の検討で transferrin が第 2 の陽性タンパク質であることが判明した。

## F. 文 献

- 1) Bloch B et al.,  
Proc Natl Acad Sci (USA) 82:6706-6710, 1985.
- 2) Mizuno Y et al.,  
Acta Neuropathol., 112: 597-603, 2006.
- 3) Piubelli C et al.,  
Proteomics 6:S256-S261
- 4) Okamoto K et al.,  
Neurosci Lett 162:125-128, 1993.

## G. 健康危険情報

なし

## H. 学会発表

なし

## I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 孤発性 ALS の脊髄前角における RNA 編集異常と病型

郭 伸<sup>1)</sup>，日出山 拓人<sup>1)</sup>，西本 祥仁<sup>1,2)</sup>，伊藤 杏子<sup>1)</sup>，山下 雄也<sup>1)</sup>，辻 省次<sup>1)</sup>，  
柿田 明美<sup>3)</sup>，高橋 均<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻 神経内科学

<sup>2)</sup> 慶応大学 神経内科 <sup>3)</sup> 新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学分野

### [研究趣旨]

我々はグルタミン酸受容体サブタイプである GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集が孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の脊髄運動ニューロンで選択的に低下していることを報告してきた。本報告では、この分子変化と孤発性 ALS の臨床像との関連性を検討し、孤発性 ALS では病型、発症年齢、経過期間を問わず、脊髄前角における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が低下していることを明らかにした。このことは、GluR2 の Q/R 部位 RNA 編集は病型の如何に関わらず孤発性 ALS に疾患特異的に生じている神経細胞死を引き起こす分子変化であることを示すと同時に、病因メカニズムによる孤発性 ALS の分類に有用であることを示唆する。また、複数の ADAR2 基質の RNA 編集率は同一組織での相関性に乏しく、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常を引き起こす分子機構を解明する必要がある。

### [はじめに]

我々は、孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンに発現する AMPA 受容体サブユニット GluR2 には Q/R 部位の RNA 編集を受けない未編集型 GluR2 (Q) が増加していることを明らかにした (1)。この分子変化は、AMPA 受容体の Ca<sup>2+</sup> 透過性を亢進させることにより神経細胞死を引き起こす一次的な原因になることから、ALS の病因と密接に関連している可能性が高い (2)。しかも、SOD1 関連性家族性 ALS (ALS1) の運動ニューロンには見られない分子変化である (3) ことから、孤発性 ALS に特異的な神経細胞死関連分子変化であると考えられる。孤発性 ALS には様々な病型があり、それぞれに異なった病因が働いているとする見方があるが、我々の見出したこの分子変化が孤発性 ALS のどの病型に見られる変化なのかを検討し、病因からくられる孤発性 ALS の範囲を限るツールになるかどうかを検討した。また、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は RNA 編集

酵素 ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA type 2) により特異的に触媒されるため、ADAR2 の酵素活性低下による可能性が示唆される。ADAR2 活性低下の有無を明らかにするために GluR2 mRNA Q/R 部位以外の ADAR2 基質の RNA 編集率を正常対照と比較検討した。

### [方法]

凍結保存した孤発性 ALS 26 例 (四肢型 16 例 (経過 13 年の臨床的 SPMA 1 例を含む)、球麻痺型 8 例、ALS 痴呆 (ALS-D) 1 例、basophilic inclusion body が出現する若年発症例 1 例) 及び正常対照 12 例の剖検脊髄前角組織を対象とした。GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は既報の方法に従い、RT-PCR 産物の制限酵素 BbvI 消化断片の定量により行った (1, 4)。GluR2 及び ADAR2 mRNA の定量は孤発性 ALS 18 例及び正常対照 12 例の剖検脊髄前角組織を対象とし、real-time PCR 法 (Roche Lightcycler 480)

により行い、GluR2 Q/R 部位以外の ADAR2 基質である GluR2 R/G 部位, GluR6 Q/R 部位, kv1.1 I/V 部位の RNA 編集率は RT-PCR 産物の制限酵素 (それぞれ MseI, BbvI, MfeI) 消化断片を Bioanalyzer 2100 (Agilent) により定量することにより算出した). ALS 群対正常対照群の比較を行うと共に, ALS 病型と編集率の関連を検討した.

### [結果及び考察]

ヒト脊髄前角組織における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は, 正常対照群では 100% に保たれていたが, 孤発性 ALS では病型を問わず全例で有意に低下していた (四肢型 ( $63.2 \pm 22.9\%$ ), 球麻痺型 ( $58.3 \pm 11.7\%$ ), ALS 痴呆 (0%), 経過 13 年の SPMA ( $94.8\%$ ), basophilic inclusion body を認めた若年発症例 ( $90.1\%$ )). この部位の RNA 編集率は ADAR2 mRNA/ GluR2 mRNA 比と相関する傾向が見られ, GluR2 Q/R 部位の RNA 編集低下をもたらす因子として我々が報告した ADAR2 mRNA 発現量の低下 (4) が孤発性 ALS 運動ニューロンにも生じていると考えられる. また, 発症年齢による影響の有無についての検討では, 発症年齢が 60 歳以下 6 例 ( $61.3 \pm 24.8\%$ ), 61-70 歳 6 例 ( $48.9\% \pm 14.0\%$ ), 71 歳以上 14 例 ( $62.2\% \pm 19.3\%$ ) の群間比較では有意差は認められなかった. 罹病期間については, 2 年未満 7 例 ( $49.7 \pm 23.9\%$ ) と 2 年以上 19 例 ( $61.5\% \pm 18.2\%$ ) の群間比較では有意差は認められなかった. この検討により, 孤発性 ALS では, 臨床病型にかかわらず GluR2 Q/R 部位の RNA 編集に異常があることが示され, 孤発性 ALS は共通の分子異常により運動ニューロン死を引き起こしていると考えられる.

このように孤発性 ALS には病型を問わず見出される GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は, SOD1 関連家族性 ALS (ALS1) には見られないことから疾患特異性の高い神経細胞死関連分子異常であることが支持される. すなわち, 我々の検討では, ALS1 のモデルラット 2 系統の発症した個体で, 単一運動ニューロンにおけるこの部位の編集率を測定したところ全ての運動ニューロンで編集率が 100%

に保たれていた (2).

他方, GluR2 Q/R 部位以外の ADAR2 基質の編集率は正常コントロール群において GluR6 Q/R 部位, kv1.1 I/V 部位, GluR2 R/G 部位では一定の傾向が無く, kv1.1 I/V 及び GluR6 Q/R 部位の編集率は運動ニューロン毎によってさえばらついていた. 同様にこれらの ADAR2 基質の編集率は ALS 症例毎に様々であり, GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率, ADAR2 発現量と必ずしも相関していなかった. このことは, ADAR2 の基質には, それぞれに特異的な修飾因子が存在し, その基質における ADAR2 の RNA 編集活性を調節していると考えられる.

### [結論]

GluR2 Q/R 部位編集率低下は神経細胞死を引き起こす分子変化であり, 病型を問わず孤発性 ALS 運動ニューロンに特異的に生じている. ADAR2 mRNA 発現量低下がその原因の一つであるが, 他の ADAR2 基質の RNA 編集率とは相関せず, GluR2 Q/R 部位の RNA 編集機構を特異的に解明していく必要がある.

### [文献]

1. Kawahara Y, et al. Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427: 801. 2004
2. Kawahara Y, et al. Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci Res* 54: 11-14. 2005.
3. Kwak S, Weiss JH. Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol.* 16: 281-7. 2006
4. Kawahara et al. Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. *Eur J Neurosci.* 18: 23-33. 2003

## 新しい SOD1 遺伝子変異を認めた家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の症例： 剖検結果をふまえて

1) 自治医科大学神経内科 2) 東京女子医科大学病理学第一講座  
河又 千鶴<sup>1)</sup> 森田 光哉<sup>1)</sup> 柴田 亮行<sup>2)</sup> 中野 今治<sup>1)</sup>

### 研究要旨

SOD1 遺伝子のエクソン 5 中の G が CGTTTA に変異し、144 番目のロイシン以下がフェニールアラニン、バリン、終止コドンへと変化する新たな遺伝子変異を認めた家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の剖検例を経験した。症例は 39 歳女性で、発症 7 ヶ月後に呼吸筋麻痺にて非侵襲的陽圧換気療法導入となるも発症 10 ヶ月で死亡した。病理像は脊髄前角の大型神経細胞の高度脱落を認めるものの、後索や脊髄小脳路には変性を認めなかった。レビー小体様硝子様封入体やプリオン小体は認められなかったが、部分的にユビキチンと SOD1 に陽性を示す軸索の cord-like swelling が観察された。

### A. 研究目的

ALS 患者の 5~10%は遺伝性 (familial ALS; FALS) を示すとされ、その多くが優性遺伝を示す。優性遺伝性 FALS の約 20%に第 21 番染色体長腕上の Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子異常が見いだされている<sup>1)</sup>。今回我々は、急速に筋脱力が進行し、SOD1 遺伝子の新たな変異を認めた症例を経験したので、臨床所見および剖検結果を踏まえて、過去の SOD1 遺伝子変異を伴った症例と比較検討した結果を報告する。

### B. 研究方法

SOD1 遺伝子の DNA 解析は患者本人に同意を得た上で行った。SOD1 の遺伝子解析は、5 つのエクソンについてそれぞれプライム部位を含む翻訳領域を増幅するようにプライマーを設計し、PCR 法にて増幅、精製後、automated sequence analyzer (ABI PRISM310) を使用し、増幅領域内に設計したシーケンス用のプライマーにより両方向から塩基配列を決定した<sup>2)</sup>。

剖検は、死後 8 時間で行なわれた。中心前回を含めた大脳の主要部位、中脳、橋、延髄、小脳、脊髄の代表部分を切り出してパラフィン包埋し、Hematoxylin-Eosin (HE)、Klver-Barrera (KB) 染色および抗 SOD1 抗体および抗ユビキチン抗体を用いて免疫染色を施した。免疫染色は、まず HE 染色標本を作製していくつかのレビー小体様硝子様封入体を顕微鏡撮影した後、1%塩酸添加 70%エタノール溶液で脱色し、抗 Cu/Zn SOD 抗体と抗ユビキチン抗体 (共に Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) を反応させて、可視化した免疫反応物の局在を前述のレビー小体様硝子様封入体の写真と照合しつつ撮影した<sup>3)</sup>。

### C. 研究結果 (症例)

患者：39 歳、女性。

主訴：両手の筋力低下。

既往歴：特記事項なし。

家族歴：父と父方の伯父と祖母に同症を認めた。父は ALS と診断され、急速な呼吸筋麻痺に対して侵襲的人工呼吸器を使用するも 31 歳で死亡。伯父と祖母も ALS と診断され 40 歳台に死亡 (詳細不明)。

現病歴：39 歳 10 ヶ月頃より右手指の筋力低下を自覚。筋力低下は徐々に進行拡大して発症 3 ヶ月頃には右上

肢挙上が困難となり、呂律緩慢となった。発症 5 ヶ月頃には左手の脱力もみられ、当科第 1 回目入院となった。

入院時所見は BMI15.8 とやせを認めた。神経学的所見では頸部および右に強い上肢筋力低下、構音障害、飲水時の嚥下困難を認め、両側母指球筋、上腕三頭筋の萎縮および線維束性収縮を認めた。腱反射は下肢で亢進していたが、病的反射は認められなかった。針筋電図では、上腕二頭筋で陽性鋭波、線維自発電位を認め、前脛骨筋、胸鎖乳突筋でも活動性の神経原性変化を認めた。神経伝導検査、頭頸部 MRI では、明らかな異常所見は認められなかった。臨床所見および筋電図検査および家族歴より常染色体優性遺伝を示す FALS と診断した。SOD1 遺伝子の DNA 解析の結果、エクソン 5 中 435 番目の G が CGTTTA に変異したことにより、144 番のロイシン以下がフェニールアラニン、バリン、終止コドンへと変化する新しい遺伝子異常が確認された (Fig. 1)。

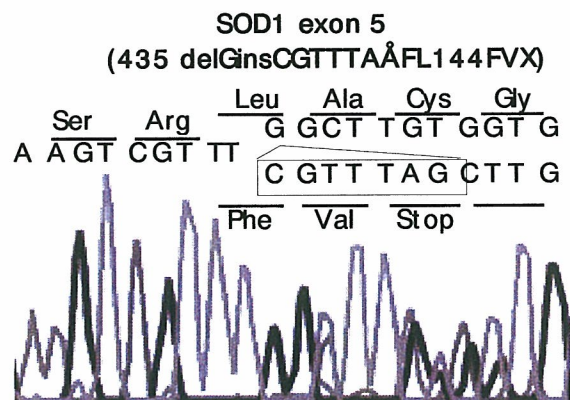


Fig. 1 Direct sequence analysis of SOD1 revealing new mutation in exon5, a G to CGTTTA transition.

肢挙上 7 ヶ月頃には呼吸機能が悪化し、PaO<sub>2</sub> 95mm Hg, PaCO<sub>2</sub> 45mmHg と二酸化炭素の貯留を認め、呼吸苦にて当科第 2 回目入院となった。歩行は困難で、立位保持がようやく出来る程度であり、右手指の機能は廃絶していた。また発声も片言を話すのが限度であり、かろうじて摂食可能であったが、時に誤嚥が認められた。入院数日後、PaCO<sub>2</sub> が 66mmHg と上昇し、非侵襲的

陽圧人工呼吸 (NIPPV) を装着した。発症 9 ヶ月頃には口腔内に唾液貯留を認めるようになり、嚥下・発声も困難となった。徐々に PaCO<sub>2</sub> が漸増したが侵襲的な呼吸管理は希望されず、40 歳 8 ヶ月で死亡した。全経過 10 ヶ月であった。

### 研究結果(病理)

脳重量は 1190g。肉眼的には、大脳は全体的にやや萎縮傾向を認めるが、運動野の萎縮は認められなかった。脊髄の扁平化は目立たず、肉眼的には前角の萎縮は明らかではなかった。

組織学的には、脊髄前角大型神経細胞は頸髄から仙髄に至るまで広汎かつ高度に脱落しており、前根の変性は高度であった。残存する前角細胞にプニナ小体やレビー小体様硝子様封入体は認められなかったが、cord-like swelling を呈した軸索を脊髄前角に多数認めた (Fig. 2)。

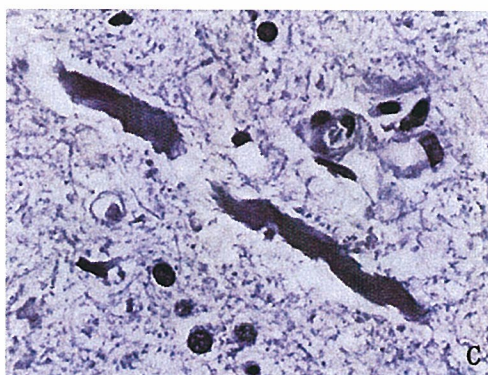
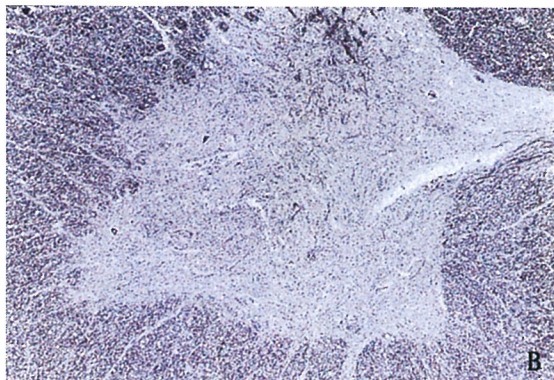
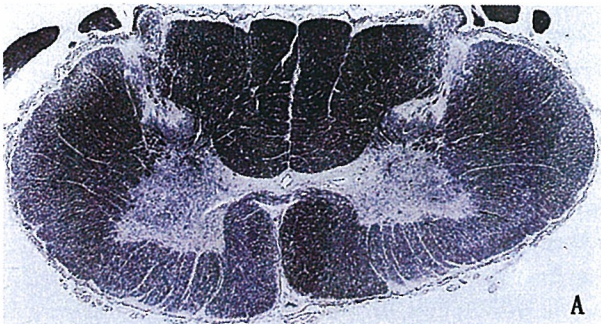


Fig. 2 Histopathological findings.

- A. Section of the spinal cord (C8).  $\times 2.5$ .  
 B. Severe neuron loss in the anterior horns.  $\times 10$ .  
 C. Cord-like swelling axon in the anterior horns.  $\times 200$ .

A and B : Klüver-Barrera  
 C : Hematoxylin-eosin

仙髄 Onufrowicz 核とクラーク柱は保たれていた。前索および側索の淡明化が目立った。特に胸髄から仙髄にかけて、後索にアミロイド小体が目立ったが、後索中間根帯には明らかな変性はみられず、脊髄小脳路は保たれていた。延髄では舌下神経核が高度に脱落しており、錐体路は軽度淡明化していた。橋核、青斑核、小脳歯状核、動眼神経核に著変を認めなかった。大脳皮質運動野では Betz 細胞の軽度脱落を認めた。抗ユビキチン抗体免疫染色と抗 SOD1 抗体免疫染色では、脊髄前角の cord-like swelling を呈した軸索が部分的にいずれにも陽性に染まった (Fig. 3)。

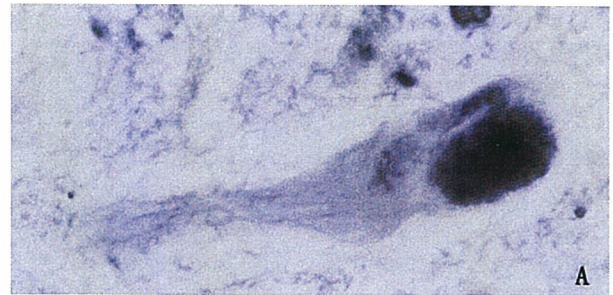


Fig. 3. Immunohistochemical findings of axons showing cord-like swelling (L5). They are partially immunoreactive.

- A : Anti-ubiquitin antibody.  $\times 200$ .  
 B : Anti-SOD1 antibody.  $\times 200$ .

全身臓器では、横隔膜は高度に菲薄化しており、組織学的にも舌、横隔膜、腸腰筋に grouped atrophy, small angulated fiber を認めた。

### D. 考察

本症例は SOD1 遺伝子エクソン 5 中の G が CGTTA に変異し、144 番目のロイシン以下がフェニールアラニン、バリン、終止コドンへと変化する新しい遺伝子異常を認めた症例であった。発症から呼吸機能障害出現までの期間が 7 ヶ月、全経過 10 ヶ月であり急速進行型と思われた。

FALS は、古典的 ALS と同一病理像を示す群と、運動ニューロン系病変に加えて後索中間根帯、Clarke 柱、脊髄小脳路の変性を示す群との二亜型に分けられ、SOD1 遺伝子異常を持つ FALS の多くは後者の臨床像を示す<sup>4)</sup>が、中には後索変性の明らかでない家系の報告もある。本症例は、上位運動ニューロンの変性が軽度で、下位運動ニューロンの変性を認めたが、Clarke 柱、脊髄小脳路の変性は認められず、病変分布は Takahashi らの症例<sup>5)</sup>に似ていた。

SOD1 遺伝子異常を伴う FALS でブニナ小体を認める症例は無く、本症例でもブニナ小体は認められなかった。レビー小体様硝子様封入体は、SOD1 遺伝子異常を持つ FALS に特異的に認められる細胞内封入体と報告されているが、本症例では確認できなかった。cord-like swelling は下位運動ニューロンの軸索全体が cord 様に腫大し、一部がさらに瘤状に膨隆した構造であり、この瘤状の部分が抗 SOD1 抗体で陽性に染まる<sup>6)</sup>。これは SOD1 変異を有する FALS でのみ報告されている構造であり、本症例でも認められた。

本症例のように、遺伝子変異の結果、フレームシフトやナンセンス変異となってしまう FALS 例は既に報告があり、Watanabe らは自験例の Leu126 2bp del を含めた 8 種類の変異とその臨床経過を検討している<sup>7)</sup>。このような症例では変異部位はエクソン 4 か 5、イントロン 4 のいずれかにあり、truncated protein を生じる変異では急速な進行を示す症例が多い (Table1)。Watanabe らはフレームシフトやナンセンス変異によりアミノ酸が 121 から 132 と短くなり高度の構造変化をきたすことが急速な臨床経過と関連すると推測し、また本症の病態を考える上で変異 SOD1 の不安定性が重要であることを指摘している<sup>8)</sup>。今回、我々が新たに見出した変異ではアミノ酸長が 145 と、Watanabe らが解析したものよりやや長い。この変異蛋白がどのような構造変化をきたすのかは解析ができていないが、我々の症例は急速な進行を示していることから、今までの報告に照らせば変異蛋白は不安定性が強いと推測される。

### E. 結論

新しい SOD1 遺伝子変異を認めた家族性筋萎縮性側索硬化症の症例をその剖検結果をふまえて報告した。臨床経過と病理所見、SOD1 変異を考察するためにはさ

らなる解析が必要と思われた。

### F. 引用文献

- 1) Rowland LP, et al : Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 2001;344:1688-1700
- 2) Morita M, et al : A novel mutation Asp90Val in the SOD1 gene associated with Japanese familial ALS. Eur J Neurol 1998; 5:389-392
- 3) Shibata N, et al : Presence of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) immunoreactivity in neuronal hyaline inclusions in spinal cords from mice carrying a transgene for Gly93Ala mutant human Cu/Zn SOD. Acta Neuropathol 1998; 95:136-142
- 4) 加藤信介, ほか : ALS 運動ニューロンの細胞病理. 神経進歩 2004;48:357-368
- 5) Takahashi K, et al : Hereditary Amyotrophic Lateral Sclerosis, Histochemical and Electron Microscopic Study of Hyaline Inclusion in Motor Neurons. Arch Neurol 1972;27:292-299
- 6) Hirano A, et al : Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 1984;43(5):471-480
- 7) Watanabe Y, et al : Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis family with a two-base deletion in the superoxide dismutase-1 gene. Neuropathology 2001;21:61-66
- 8) Sato T, et al : Rapid disease progression correlates with instability of mutant SOD1 in familial ALS. Neurology 2005;65:1954-1957

### G. 学会発表

第 47 回日本神経学会総会にて発表した。

Table 1. フレームシフトおよびナンセンス変異を認めた SOD1 遺伝子変異

コドン	変異	アミノ酸配列	アミノ酸数	ALS型	臨床経過
エクソン4 Val 118	GTG→AAAACGTG (substitution)	V(118)-V-H-E-K→ K(118)-T-G-P-Stop	121	SALS	16months
エクソン5 Leu126	TTG→**G (2-bp deletion)	L(126)-G-K-G-G-N→ G(126)-E-R-W-K-Stop	130	FALS	2years
Lue126	TTG→TAG (substitution)	D(125)-L(126)→ D(125)-Stop	125	FALS	4years
Gly127	GGC→GGTGGGC (4-bp insertion)	G(127)-K-G-G-N-E→ G-E-R-W-K-Stop	132	FALS	2.8years
Glu132	GAA→GATTA (2-bp insertion)	E(132)-E→D(132)-Stop	132	FALS	<2years
Glu133	GAA→*** (3-bp deletion)	E(132)-E(133)-S(134)-E→ E(132)-S(134)-E	152	SALS	>2years
イントロン4	A→G(substitution, 11-bp before exon5) T→G(substitution, 10-bp before exon5)	V(118)-F-F-T-G-P-Stop (all exon5 deleted) V(118)-F-L-Q-V(119)- (additional 3 amino acid)	123 156	FALS FALS	 2.8years

## 筋萎縮性側索硬化症と前頭側頭葉変性症のユビキチンと TDP-43 による再評価

[班 員] 橋詰良夫

[共同研究者] 吉田眞理、三室マヤ、市橋亮一  
愛知医科大学加齢医科学研究所神経病理

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、湯浅・三山型認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症 (ALS-D)、原発性側索硬化症 (PLS) および前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) では、タウやシヌクレインに陰性でユビキチンにのみ陽性を示す封入体 (UI) が脊髄前角細胞や大脳皮質神経細胞に出現することから共通した病態があることが推測されていたが、本年 TDP-43 がユビキチン化蛋白の本体であると解明された。ALS/ALS-D、PLS、FTLD-U、広範型 ALS を含む 40 例の UI の再検討と TDP-43 免疫染色を施行した。ALS の skein like inclusions、hyaline inclusions、PLS、FTLD-U、広範型 ALS の UI はすべて TDP-43 に染色され、TDP-43 タンパクの蓄積する同一疾患のサブタイプと考えられた。ALS/ALS-D は Sampathu ら、Neumann らの分類による FTLD Type3、PLS は Type2、FTLD-U は Type1 に相当すると考えられた。今後 TDP-43 の生理的役割や封入体形成過程の解明により、ALS の病因解明や治療戦略に大きく貢献できる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、湯浅・三山型認知症を伴う筋萎縮性側索硬化症 (ALS-D)<sup>1) 2)</sup>、原発性側索硬化症 (PLS) および前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) では、タウやシヌクレインに陰性でユビキチンにのみ陽性を示す封入体 (UI)<sup>3)</sup> が脊髄前角細胞内や大脳皮質神経細胞内に出現することから、共通した病態があることが推測されてきた。ユビキチン化された蛋白の本体は長年の間不明であったが、本年その蛋白が TDP-43 であると同定された<sup>4) 5)</sup>。われわれは ALS-D や FTLD-U の臨床病理学的解析から、UI には少なくとも神経細胞内封入体、神経突起の 2 つの subtype があり、核内封入体を伴う例があることを指摘したが、今回は新たに症例を追加集積して、UI の再評価と TDP-43 の免疫組織化学を検討した<sup>6) 7)</sup>。

### B. 研究方法

愛知医科大学加齢医科学研究所の剖検例 3212 例中、タウ陰性シヌクレイン陰性でユビキチンにのみ陽性を示す封入体を認めた ALS/ALS-D 26 例 (認知障害の確認されていない ALS 7 例と認知障害の確認されている ALS-D 19 例)、上位運動ニューロン障害優位の ALS1 例と PLS 2 例 (PLS 群)、FTLD-U 5 例、広範型 ALS (人工呼吸器装着後に運動ニューロン系を越えて広範な変性を示す) を呈した 6 例を含む計 40 例を検討した。死亡時平均年齢 65 歳 (46-85 歳)、男女比 0.82、平均罹病期間 39.9 ヶ月 (人工呼吸器装着まで)。ホルマリン固定パラフィン包埋した脊髄、脳幹部、大脳皮質の各切片にユビキチン免疫染色 (polyclonal, Dako)、TDP-43 免疫染色 (polyclonal, Protein Tech, dilution 1:3000) を施行し、UI の形態、分布、出現量を定性的に評価し、疾患の表現形と封入体との関連性を検討した。



### C.研究結果

下位運動ニューロンのUIは、skein like inclusions、hyaline inclusions(U-LMN)の形態を示し、ALS/ALS-Dでは26例中26例(100%)、PLS群では3例中3例(100%)、FTLD-Uでも5例中5例(100%)に確認された。ALS-DとPLS群では、多数のUIを認めたが、FTLD-Uではきわめて少数のUIしか確認できなかった。

大脳のUIは、胞体内と、neuropilの神経突起に出現する杆状、線維状、球状の封入体、神経細胞の核内封入体の3つの形態を示す。ALS/ALS-Dでは、海馬歯状回顆粒細胞、側頭前頭葉、島葉、扁桃核などに主として辺縁系に胞体内UIを認め、大脳皮質II~III層の小型神経細胞核周囲を取り囲む形態が特徴である。ALS-Dの中に、変性突起に多数のUIを示し、胞体内封入体に乏しい症例が1例存在した。本例では被殻や尾状核に多数のUIを認め、少数の核内UIも存在した。PLS群では、胞体内UIが大脳皮質表層と深層、尾状核や被殻に多数みられ、神経突起のUIも観察された。中心前回にもUIが多数みられた。FTLD-Uの5例中3例では、前頭側頭葉に神経突起のUIが出現し胞体内UIは少数であった。FTLD-Uの1例では主としてレンズ状ないし類円形の核内UIを示し、他の1例ではPLS群と同様の皮質表層と深層に胞体内UIを示した。広範型ALSでは6例中6例に胞体内UIを認め、4例にレンズ状ないし類円形の核内UIが観察された。UIの形態と分布から、ALS/ALS-Dのグループ、PLS群、FTLD-U群の大きく3つのグループに分類され、核内封入体を主体とする症例が1例存在した。また広範型ALSは、ALS/ALS-DのグループとUIからは類似性があるものの、基本的な臨床病理像が異なり、核内封入体の出現がみられることなどから、これらの3群とは異なるグループとして分類する方が現時点では適切と考えられた。

TDP-43の免疫染色では、正常な神経細胞の核は微細顆粒状ないし網状に陽性に染色される。

ALS/ALS-Dの下位運動ニューロンでは核の染色性

が低下ないし消失したものが目立ち、skein like inclusions、hyaline inclusionsはTDP-43に陽性を示した(図1)。

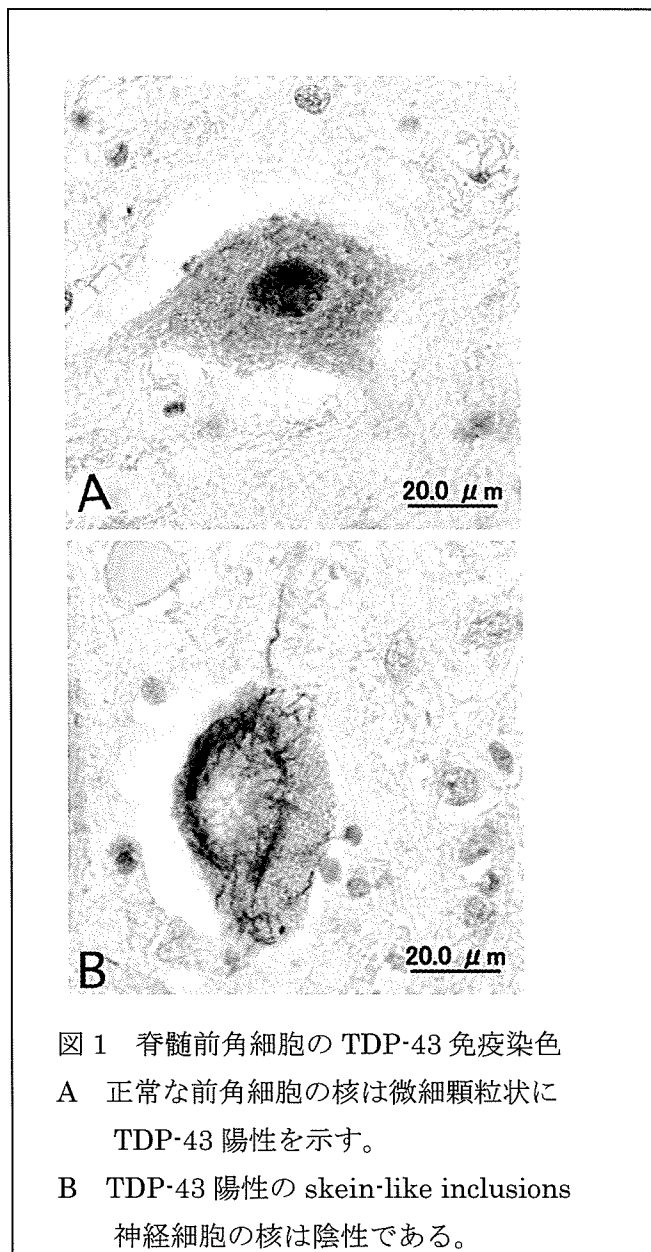


図1 脊髓前角細胞のTDP-43免疫染色  
A 正常な前角細胞の核は微細顆粒状にTDP-43陽性を示す。  
B TDP-43陽性のskein-like inclusions神経細胞の核は陰性である。

大脳皮質では、胞体内、神経突起、核内のUIはTDP-43陽性を示した。封入体のない神経細胞の核はTDP-43に微細顆粒状ないし網状に陽性に染色されるのに対して、TDP-43陽性の胞体内封入体を示す細胞では核の染色性は消失していた。また核内封入体はTDP-43にレンズ状、類円形に濃染し、核の微細顆粒状ないし網状の染色性は消失していた(図2)。

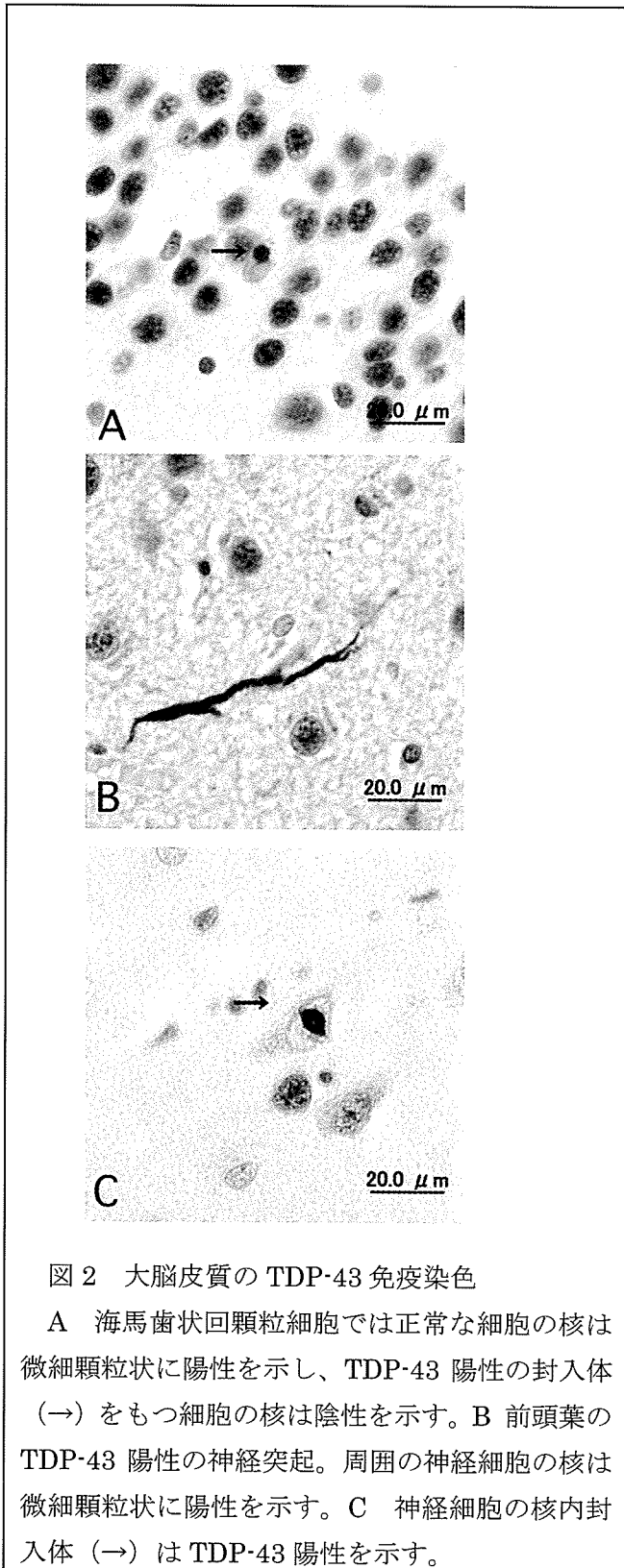


図2 大脳皮質の TDP-43 免疫染色

A 海馬歯状回顆粒細胞では正常な細胞の核は微細顆粒状に陽性を示し、TDP-43 陽性の封入体(→)をもつ細胞の核は陰性を示す。B 前頭葉の TDP-43 陽性の神経突起。周囲の神経細胞の核は微細顆粒状に陽性を示す。C 神経細胞の核内封入体(→)は TDP-43 陽性を示す。

#### D. 考察

ALS/ALS-D、PLS、FTLD-U は、40 例の UI の再検

討から大きく 3 つのグループに分類された。

ALS/ALS-D では皮質表層の核周囲に胞体内 UI がみられ、PLS 群では皮質表層と深層、基底核の胞体内 UI、FTLD-U では神経突起の UI が形成されていた。また広範型 ALS にも胞体内と核内 UI を認めた。Sampathu らは大脳皮質の UI の形態と分布から、FTLD を 3 つの subtype に分類している<sup>8)</sup>。Type1 の UI は神経突起にみられ、Type2 では胞体内 UI が皮質表層と深層にみられ、Type3 では皮質表層に輪状の胞体内 UI を認め、Type1 と Type2 はモノクローナル抗体 mAb182、mAb402 にそれぞれ特異的に染色された。さらにその後発表された Neumann らの TDP-43 の同定<sup>4)</sup>では、ALS の下位運動ニューロンの UI である skein like inclusions、hyaline inclusions、FTLD の Type1、Type2、Type3 のすべての封入体と核内封入体はすべて TDP-43 に染色され、これらの subtype の違いは同一蛋白のリン酸化や truncation などの修飾の違いによる可能性を考察している。われわれの症例を Sampathu ら<sup>8)</sup>、Neumann ら<sup>4)</sup>の subtype と対比すると、ALS/ALS-D は FTLD Type3、PLS 群は Type2、FTLD-U は Type1 に相当すると考えられた。われわれの症例は大部分が孤発性であり、運動ニューロン障害や錐体路変性を示す症例が多く集積され、前頭側頭葉型認知症の症例は少数である。かれらの症例は家族歴を示すものが多く、運動ニューロン障害の合併は Type3 においても半数以下である。このような臨床像の違いは、本邦では湯浅、三山らの報告以来、運動ニューロン疾患やピック嗜銀球のないピック病との異同に力点がおかれて症例が集積されてきたのに対して、欧米では前頭側頭葉変性症の解析の中で症例が蓄積されてきた背景を考慮する必要があると思われる<sup>1) 2) 9-12)</sup>。本邦で ALS-D と診断している症例は欧米では ALS の中に包含されている可能性も示唆される。

今後本邦では、認知症の視点からの前頭側頭葉変性症の臨床病理像の蓄積と解析が重要課題である。

## E. 結論

ALS/ALS-D、PLS、FTLD-U、広範型 ALS40 例の UI の再検討から、ALS/ALS-D は Sampathu ら<sup>8)</sup>、Neumann ら<sup>4)</sup> の FTLD Type3、PLS 群は Type2、FTLD-U は Type1 に相当すると考えられた。ALS の skein like inclusions、hyaline inclusions、FTLD の Type1、Type2、Type3 の UI と核内封入体はすべて TDP-43 に染色され、Neumann ら、Arai らの示すように TDP-43 蛋白の蓄積する同一疾患のサブタイプと考えられた<sup>4、5)</sup>。ALS、ALS-D、PLS、FTLD-U、広範型 ALS、広義の運動ニューロン疾患や他の変性疾患を TDP-43 免疫染色で再検討することが今後の課題である。

さらに TDP-43 の生理的役割や封入体形成過程の解明により、ALS の病因解明や治療戦略に大きく貢献できる可能性が示唆される。

## F. 文献

- 1) 湯浅亮一：臨床神経 4：529-534、1963
- 2) Mitsuyama Y et al：Arch Neurol 36：592-593
- 3) Okamoto K et al：Neurosci Lett 129:233-236, 1991
- 4) Neumann M et al：Science 314:130-133, 2006
- 5) Arai T et al：BBRC 351: 602-611, 2006
- 6) 吉田眞理 ほか：臨床神経 32：1193-1202、1992
- 7) Yoshida M：Neuropathology, 24:87-102,2004
- 8) Sampathu DM et al：Am J Pathol 169: 1343-1352, 2006
- 9) Nakano I et al：Neuropathology 12:69-77, 1992
- 10) Iseki E et al：J Neurol Sci 159:194-201,1998
- 11) Ikeda K et al：Acta Neuropathol (Berl) 104:21-28,2002
- 12) Neary D et al：J Neurol Neurosurg Psychiatry 53:23-32, 1990

## 非 SOD1 家族性筋萎縮性側索硬化症：古典型の病理像を示し、下位運動ニューロンに Bunina 小体とユビキチン陽性封入体を認めた 1 家系

田川朝子<sup>1)</sup>、譚 春鳳<sup>2)</sup>、菊川公紀<sup>1)</sup>、深瀬真之<sup>1)</sup>  
中野亮一<sup>3)</sup>、小野寺 理<sup>4)</sup>、西澤正豊<sup>3)</sup>、高橋 均<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 荘内病院神経内科・病理、<sup>2)</sup> 新潟大学脳研究所病理学分野、  
<sup>3)</sup> 同 神経内科学分野、<sup>4)</sup> 同 生命科学リソース研究センター

**研究要旨** 新しい非 SOD1 家族性筋萎縮性側索硬化症(familial amyotrophic lateral sclerosis; FALS)の 1 家系 (2 世代 4 名に発症) を報告する。臨床的には、成人発症、比較的急速な進行を示す球型 ALS を呈した。1 剖検例では、上位・下位運動ニューロン系に限局した変性を認め、後索、クラーク柱、脊髄小脳路などには明らかな変化は指摘できなかつた。残存下位運動ニューロンの胞体内に、Bunina 小体およびユビキチン陽性封入体が観察された。この全体像は、まさに孤発性 ALS のそれであった。今後の類似症例の蓄積と併せ、その原因遺伝子解明への展開が望まれる。

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、家族性(AD あるいは AR) 発症することがある (FALS)。SOD1 変異で発症する優性遺伝性 FALS は、その全患者の約 20%を占めるとされている<sup>1, 2)</sup>。

従来、FALS には、病理学的に少なくとも 2 型の存在が知られてきた。つまり、上位・下位運動ニューロン系に変性の限局する「古典型」、およびそれらの運動ニューロン系の変性に加え、後索、クラーク柱、さらに小脳脊髄路にも変性をみる「後索型」である。<sup>3)</sup> SOD1 FALS の剖検例の多くは後索変性を伴い、残存下位運動ニューロンに Lewy 小体様封入体の出現を示す後索型を示すことが知られている。<sup>4)</sup>

今回、我々は、古典型の病理像を示し、下位運動ニューロンに Bunina 小体とユビキチン陽性封入体を認めた非 SOD1 FALS の 1 家系 1 剖検例を経験したので報告する。

### 症例

症例(発端者)は、死亡時 77 歳、男性。兄弟 2 人及び息子に同様疾患(球型の ALS)あり。しかし、父(77 歳、膵臓癌で死亡)、母(91 歳、老衰にて死亡)にはなし。75 歳頃、構音障害、嚥下障害にて発症。8 ヶ月後、

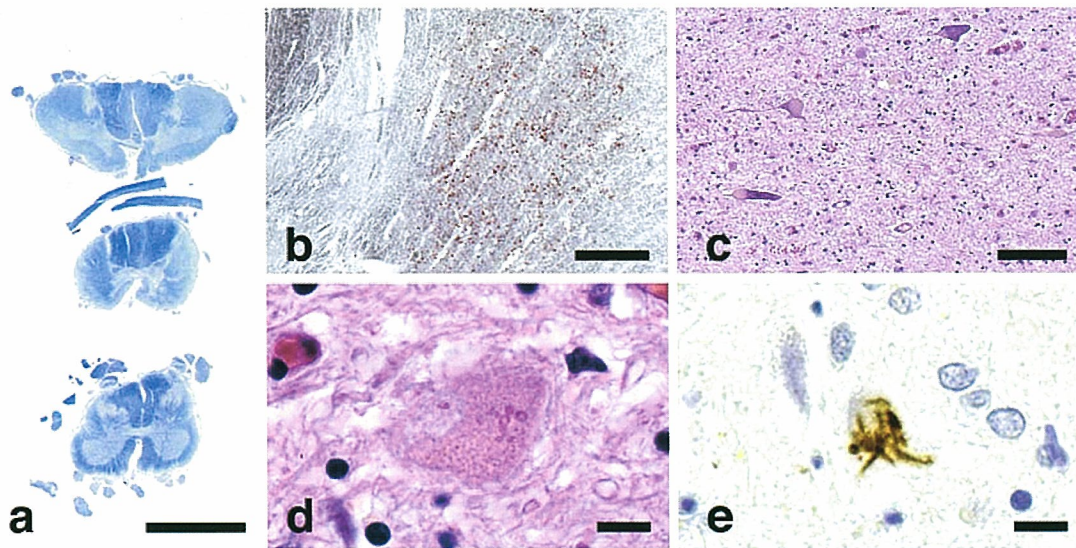
受診。神経学的に舌の萎縮もあり。上肢末端に軽度の筋萎縮が認められたが、全体の筋力にはよく保たれていた。筋電図では、舌、上肢筋に筋原性変化。発症 18 ヶ月後、発声不能。その 6 ヶ月後、嚥下性肺炎を併発入院。経口摂取不能なるも、自力歩行が可能。肺炎による呼吸不全で死亡。全経過は約 2 年半。

発端者の弟で SOD1 遺伝子の検索がなされており、異常なし。

### 剖検所見

脳重は 1,130 g、肉眼的に著変なし。1) 脊髄前側索の淡明化とズダン顆粒の出現、下位運動核における神経細胞脱落とグリオース(舌下神経核でもっとも強く、脊髄では頸髄前角で高度)。2) 中心前回の Betz 細胞を含む錐体神経細胞の脱落とグリオース。3) 残存下位運動ニューロン胞体内に Bunina 小体(免疫組織化学的に cystatin C および transferrin 陽性)およびユビキチン陽性 skeins の出現。4) 少数の線条体小型神経細胞内にユビキチン陽性封入体の出現。海馬歯状回顆粒細胞には類似の封入体なし。以上の所見を Fig. 1, 2 に示す。

なお、下位運動ニューロン胞体内の Bunina 小体および skein-like inclusions の存在を戻し電顕にて確認した。



**Fig. 2** a The cervical (C7), thoracic (T8) and lumbar (L4) spinal cord segments, showing myelin pallor in the anterolateral columns. b The spinal cord at the T8 level, showing many sudanophilic droplets in the lateral corticospinal tract. c The anterior horn at the C7 level, showing moderate neuronal loss and gliosis. d A lumbar lipofuscin-rich anterior horn cell, showing intracytoplasmic beaded Bunina bodies. Note also a Bunina body in a pale cytoplasmic area. e A thoracic atrophic anterior horn cell, showing ubiquitin-positive intracytoplasmic skeins. a Klüver-Barrera; b Sudan III; c, d hematoxylin-eosin; e ubiquitin immunostaining. Bars a 5 mm; b 500  $\mu$ m; c 100  $\mu$ m; d, e 10  $\mu$ m

### 考察

非 SOD1 FALS の新たな家系を報告した。

その臨床的特徴は、典型的な球型の孤発性 ALS に類似するものであった。その遺伝形式であるが、2 世代に発症しているが、発端者の両親には類症はない。その地域性を考慮すると劣性遺伝 (pseudo-dominant) の可能性が否定できなかった。また、その全体的な病理像は、孤発性 ALS のそれと全く区別ができなかった。

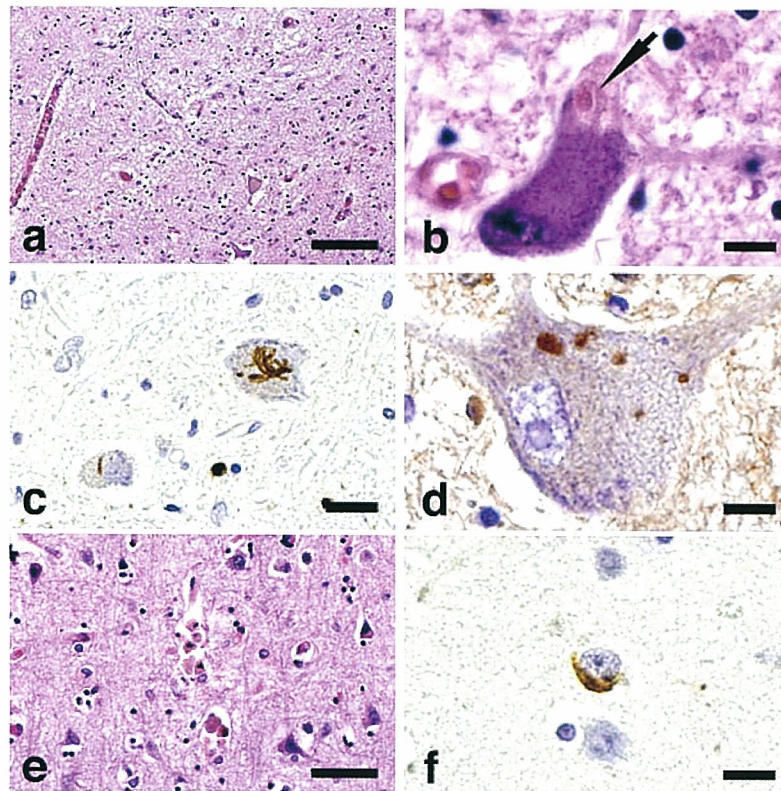
Bunina 小体は、1962 年、Bunina が家族性 ALS の 2 剖検例 (異なる 2 家系) において、残存下位運動ニューロン (VII および XII) の胞体内封入体としてはじめて記載した構造物である。これらの 2 剖検例の臨床病理であるが、Bunina の所見の記載から判断して、それは優性遺伝を示す古典型と考えられる。<sup>5)</sup> その後、FALS における Bunina 小体の出現が確認されてきたのだろうか。SOD1 変異を有する FALS においては、その多くの例が後索型を示すが、少数例の古典型の報告も知られている。しかし、これまで Bunina 小体の出現の報告はない。

古典型 FALS ではどうだろうか。これまで

本邦からの報告を含む比較的多数の家系の報告がある (多くは優性遺伝と考えられる) が、Bunina 小体がみられたとの記載はごく少数である。<sup>4)</sup> このことは、Bunina 小体の出現が本当にまれなのか、あるいは Bunina 小体の当時の認知度の低さからきた単なる見落としなのか、問題の残るところである。

近年、優性遺伝、成人発症の非 SOD1 FALS の 1 家系 1 剖検例の詳細が報告された。<sup>6)</sup> 臨床的側面に多少の違いはあるが、病理学的所見は本例に極めて類似するものであり、下位運動ニューロンには多数の Bunina 小体が認められている。しかし、ユビキチン陽性封入体は認められなかったという。<sup>6)</sup>

今日、孤発性 ALS では、残存する下位運動ニューロンにおけるユビキチン陽性封入体の出現は 100%とまでいわれている。<sup>7)</sup> また、線条体の小型神経細胞内ユビキチン陽性封入体の出現も ALS に特徴的な所見と見なされている。<sup>8)</sup> ごく最近、ALS に認められるユビキチン陽性封入体が TDP-43 陽性との知見が報告された。<sup>8)</sup> この分子は、これまで未知のままであった ALS (およびその疾患スペクトル) における疾患標的蛋白である可能性



**Fig. 3** **a** The hypoglossal nucleus, showing severe neuronal loss and gliosis, with rarefaction of the neuropil. **b** A hypoglossal nucleus motor neuron, showing a relatively large Bunina body (*arrow*) in the peripheral pale area of the cytoplasm. **c** Two facial nucleus motor neurons, showing ubiquitin-positive intracytoplasmic skeins. **d** A facial nucleus motor neuron, showing transferrin-positive intracytoplasmic Bunina bodies. **e** In the precentral cortex layer V, loss of Betz cells is evident. Here, two holes containing lipofuscin-laden macrophages are seen in the center. Such a hole, which is usually as large as a single Betz cell, can be designated as a Betz cell “shadow”. **f** A putaminal small neuron, showing a ubiquitin-positive intracytoplasmic crescent inclusion. **a, b, e** hematoxylin-eosin; **c, f** ubiquitin immunostaining; **d** transferrin immunostaining. *Bars* **a** 100 $\mu$ m; **b, d, f** 10  $\mu$ m; **c** 20  $\mu$ m; **e** 50  $\mu$ m

が高い。本例でも、早速、その存在を免疫組織化学的に検討したが、認められたユビキチン陽性封入体は TDP-43 陽性であった。これらの点を考慮すると、本剖検例で示された病理像は、まさに孤発性 ALS のそれといえる。<sup>7, 9)</sup>

本邦に限らず、本例で示された臨床病理学に類似する家系は存在するのか、その数は、今後の原因遺伝子解明に向けた重要な問題である。

#### 結論

非 SOD1 FALS の 1 家系 1 剖検例を報告した。その病理像は、まさに孤発性 ALS のそれであり、このような病理像を呈する FALS 家系における原因遺伝子の同定は、今後の ALS 研究において極めて重要な課題と考え

られる。

#### 文献

- 1) Deng H-X et al.: Science 261: 1045-1051, 1993
- 2) Rosen DR et al.: Nature 362: 59-62, 1993
- 3) Horton WA et al.: Neurology 26: 460-465, 1976
- 4) Hirano A et al.: Arch Neurol 16: 232-243, 1967
- 5) Bunina TL: Korsakow J Neuropathol Psychiatr 62: 1293-1299, 1962
- 6) Tsuchiya K et al.: Acta Neuropathol 100: 603-607, 2000
- 7) Piao Y-S et al.: Brain Pathol 13: 10-22, 2003
- 8) Wakabayashi K et al.: Clin Neuropathol 20: 47-52, 2001
- 9) Neumann M et al.: Science 314: 130-133, 200

## 変異 SOD1 の神経細胞毒性の発現機序—ジスルフィド結合の重要性

分担研究者 祖父江 元<sup>1)</sup>

研究協力者 丹羽 淳一<sup>1)</sup>, 山田 新一<sup>1)</sup>, 曾根 淳<sup>1)</sup>

高橋 美穂<sup>1)</sup>, 田中 章景<sup>1)</sup>, 道勇 学<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

**研究要旨** SOD1 変異に伴う家族性 ALS や ALS マウスモデルにおいては、病変選択的に変異 SOD1 凝集体が蓄積しており、変異 SOD1 が病変特異的に凝集体形成能を獲得する機序が ALS の病態に密接に関わっていると推定される。SOD1 分子ではシステイン残基で分子内ジスルフィド結合を形成することにより分子を安定化させているが、分子間で誤ったジスルフィド結合が形成されることが、変異 SOD1 の凝集体形成および細胞毒性に強く関与していることが明らかとなった。異常なジスルフィド結合形成は ALS 病変選択的に生じており、SOD1 のジスルフィド結合形成に病変特異的に関与する因子の存在が示唆された。異常ジスルフィド結合形成の抑制を指標にした薬剤スクリーニングが、SOD1 変異に伴う家族性 ALS の治療薬の創薬に結びつく可能性がある。

### A. 研究目的

SOD1 変異に伴う家族性 ALS や変異 SOD1 トランスジェニック(Tg)マウス ALS モデル 動物においては、病変選択的に変異 SOD1 凝集体が蓄積している。変異 SOD1 の病変特異的な凝集体形成能獲得が、ALS の病態に密接に関わっていると推定されるが、その分子機序の詳細は明らかではない。システイン残基が酸化されて形成される分子内ジスルフィド結合が SOD1 分子の安定化に関わっていることは知られているが、我々は野生型および変異 SOD1 を発現させた培養細胞モデルにおいて、ユビキチン-プロテアソーム系阻害に伴い界面活性剤抵抗性の異常なジスルフィド結合を形成した SOD1 高分子凝集体が変異 SOD1 特異的に生じることを見出した (図 1)。そこで、本研究においては、SOD1 分子のシステイン残基が変異 SOD1 の凝集体形成および細胞毒性発揮に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

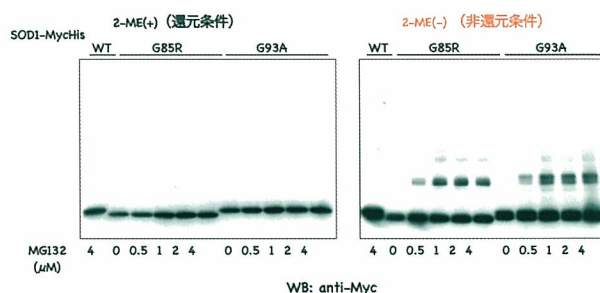


図 1 ユビキチン-プロテアソーム系阻害に伴う変異 SOD1 特異的異常ジスルフィド結合による高分子凝集体の形成

### B. 研究方法

#### (1) SOD1 C→S 変異体の作製

SOD1 分子は、アミノ酸残基 6 番, 57 番, 111 番, 146 番に 4 か所のシステイン残基を有し、このうち 57 番と 146 番のシステイン残基間で分子内ジスルフィド結合を形成することが知られている。野生型および G85R, G93A 変異 SOD1 分子内の 4 か所のシステイン残基を、site-directed mutagenesis 法により種々の組み合わせでセリン残基に置換した C→

S 変異体を発現するベクターを作製した。

### (2) 変異 SOD1 凝集体形成能および細胞毒性の解析

C→S 変異体を発現させた培養細胞 (HEK293, Neuro2a) よりタンパク質を抽出し、界面活性剤の溶解性により可溶性画分と難溶性画分に分画した。可溶性画分については、還元条件 (2-ME(+)) および非還元条件 (2-ME(-)) で Western 解析を行い、SOD1 の凝集体形成を評価した。不溶性画分についてはフィルタートラップアッセイを用いて、SOD1 高分子凝集体形成の程度を検討した。また、GFP タグを付加した C→S 変異体を用いて、神経分化させた Neuro2a において蛍光顕微鏡下で SOD1 封入体の出現頻度を評価した。細胞毒性については、神経分化させた Neuro2a において MTS アッセイによる細胞 viability の測定を行った。

### (3) 変異 SOD1-Tg マウスにおける変異 SOD1 異常ジスルフィド結合形成の解析

ALS 症状を発症した 17 週齢の変異 SOD1-Tg マウス (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J) の大脳、脳幹、小脳、脊髄および肝臓より抽出したタンパク質について、還元条件 (2-ME(+)) および非還元条件 (2-ME(-)) で Western 解析を行い、変異 SOD1 のジスルフィド結合による凝集体形成の組織選択性を解析した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験においては、名古屋大学大学院医学系研究科附属動物実験施設の指針に従い実験動物に苦痛のないよう十分配慮した。

## C. 研究結果

変異 SOD1 特異的な界面活性剤抵抗性の異常ジスルフィド結合による高分子凝集体形成は、SOD1 分子の 6 番および 111 番のシステイン残基を同時に置換することにより著明に抑制され、4 か所全てのシステイン残基をセリン残基に置換することで完全に抑制された (図 2)。タンパク質非吸着性フィルターにトラップされる難溶性画分に含まれる高分子複合体も同様に、6 番および 111 番のシステイン残基を同時に置換することにより減少した。GFP を付加した変異 SOD1 を発現させた Neuro2a を血清除去やレチノイン酸により神経分化させる

と核近傍に封入体を形成するが、変異 SOD1 による封入体形成も 6 番および 111 番のシステイン残基の同時置換により著明に抑制された。

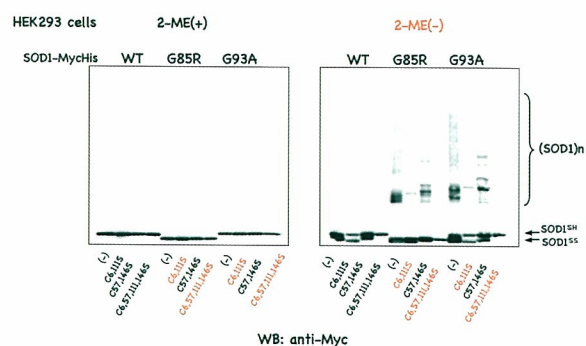


図 2 システイン残基の置換による変異 SOD1 高分子凝集体形成の変化

また、システイン残基置換に伴う変異 SOD1 の細胞毒性に及ぼす影響を、C→S 変異体を発現させ神経分化させた Neuro2a において検討したが、6 番および 111 番のシステイン残基の同時置換により有意に変異 SOD1 の神経細胞毒性が減弱した (図 3)。

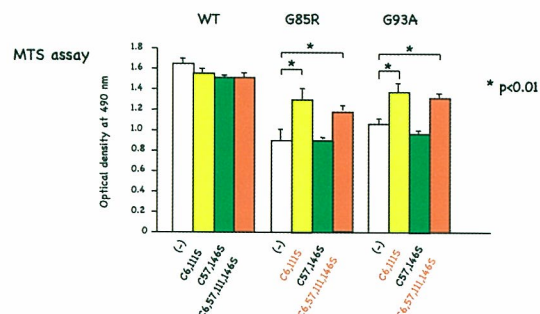


図 3 システイン残基の置換による変異 SOD1 神経細胞毒性への影響

培養細胞モデルにおいて SOD1 のシステイン残基が変異 SOD1 の凝集体形成および細胞毒性に強く関与することが示されたが、さらに、変異 SOD1-Tg マウスを用いて、実際に *in vivo* でも変異 SOD1 が病変に関連した異常なジスルフィド結合を形成しているかどうかを検討したところ、病変の存在する脳幹および脊髄において界面活性剤抵抗性の異常なジスルフィド結合による変異 SOD1 の高分子凝集体形成が生じていた (図 4)。



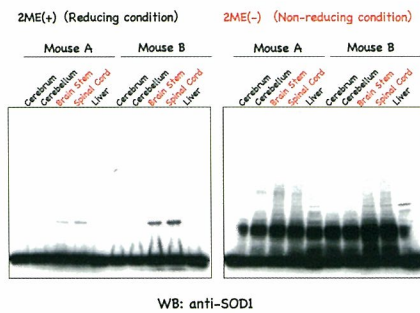


図 4 変異 SOD1-Tg マウスにおけるジスルフィド結合を介した変異 SOD1 高分子凝集体形成

#### D. 考察

SOD1 タンパク質は分子内ジスルフィド結合を形成することにより分子を安定化させているが、システイン残基が分子内ではなく分子間で誤ったジスルフィド結合を形成することが、変異 SOD1 の凝集体形成および細胞毒性に強く関与していると考えられた。この異常なジスルフィド結合形成は病変選択的に生じており、SOD1 のジスルフィド結合形成に病変特異的に関与する因子の存在が示唆される。今後このような因子を同定してゆくことにより、変異 SOD1 による ALS 病態の分子機序がさらに詳細に明らかになるものと思われる。

変異 SOD1 の毒性発揮には異常な分子間ジスルフィド結合の形成が重要であることから、異常ジスルフィド結合の形成を抑制することができれば、SOD1 遺伝子変異に伴う家族性 ALS を治療しうると考えられる。変異 SOD1 の異常ジスルフィド結合を標的とした新規 ALS 治療薬の創薬のために、変異 SOD1 の異常ジスルフィド結合形成を簡便に評価することができる我々の開発した培養細胞モデルは非常に有用であると考えられた。

#### E. 結論

変異 SOD1 の病変選択的な毒性発揮には、変異 SOD1 特異的に生ずる異常な分子間ジスルフィド結合の形成が重要である。変異 SOD1 の病変選択的な異常ジスルフィド結合形成に関与する因子を今後同定することが、ALS 病態の分子機序解明に重要である。SOD1 遺伝子変異に伴う ALS の治療薬開発にも、異常ジスルフィド結合の抑制を指標と

した薬剤スクリーニングが有用であろう。

#### F. 文献

- (1) Tanaka F et al. *Ann N Y Acad Sci.* 1086:1-10, 2006.
- (2) Ishigaki S et al. *Neurobiol Dis.* Dec 5, 2006 [Epub ahead of print].
- (3) Yamada S et al. *J Biol Chem.* 281:23842-51, 2006.
- (4) Huang Y et al. *J Biol Chem.* 281:11610-7, 2006.
- (5) Niwa et al. *蛋白質 核酸 酵素.* 51:1423-7,2006.

#### G. 健康危険情報

特記事項なし。

#### H. 学会発表

- (1) 丹羽淳一, 変異 SOD1 におけるジスルフィド結合の凝集体形成および神経変性への関与. 第 47 回日本神経学会総会 東京, 2006.
- (2) 田中章景, 孤発性 ALS 運動ニューロン特異的病態関連分子の発現動態:神経変性過程との関連. 第 47 回日本神経学会総会 東京, 2006.
- (3) 山田新一, 古細菌プロテアソームによる家族性筋萎縮性側索硬化症治療の可能性. 第 47 回日本神経学会総会 東京, 2006.
- (4) 曾根淳, Dorfin による G93A 変異 SOD1-Tg マウス治療効果の検討. 第 47 回日本神経学会総会 東京, 2006.

#### I. 知的所有権の取得状況

凝集体形成性タンパク質分解用の発現コントロール、及び凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法 (特許出願中 2006-076789)

## ALS モデルラット脊髄における細胞外環境の変化

青木 正志, 水野 秀紀, 割田 仁, 糸山 泰人  
東北大学大学院医学系研究科 神経・感覚器病態学講座神経内科学分野

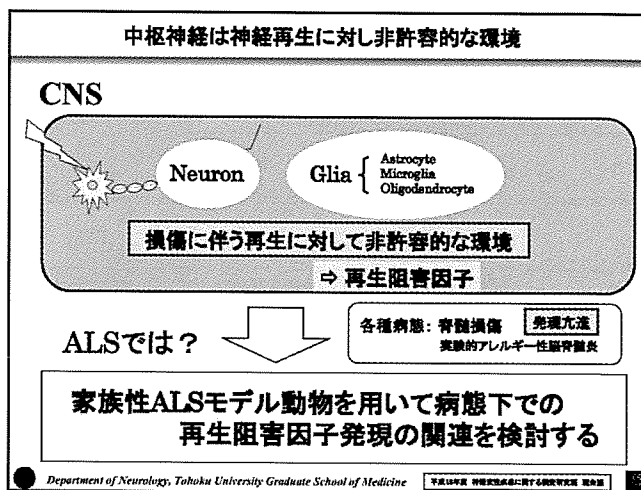
### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病変の主座である脊髄は再生がおこりにくい環境であることが知られている。本研究では、運動ニューロン変性とその細胞外環境の関わりに着目、特に軸索再生阻害因子に焦点をあててモデルラットで検討した。発症前、発症後早期、発症後後期の3期についてコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPGs）の発現を、蛍光免疫組織化学的に解析した。ALSモデルラット腰髄では、コントロールに比してCSPGsの免疫反応が有意に亢進しており、中でも前角および前索において顕著であった。このことから、本モデル病態下の運動ニューロン外環境は、軸索再生については非許容的である可能性が示唆された。

### 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS）は系統的な運動ニューロンの細胞死から全身的な筋萎縮および脱力が進行する極めて予後不良な致死性疾患の一つであり、病因・病態の解明および新規治療法の開発が強く求められている。近年では治療法の候補として再生医療が注目されるようになってきたが<sup>1)</sup>、ALSにおいて病変の主座である脊髄は損傷に伴う神経再生に非常に不利な環境であるという問題点がある。その原因としていくつかの再生阻害因子の存在があげられるが、脊髄損傷などのモデル病態下ではこうした再生阻害因子の発現が亢進してくることが明らかにされている<sup>2)</sup>。そこで、本研究では今後の再生療法をより効果的にすることを念頭におき、これまでに我々が確立した家族性ALSモデル動物である変異

Cu/Zn SOD-Tg ラット (Tg ラット) を用いて病態下での再生阻害因子発現の関連を検討した。



## 対象および方法

東北大学神経内科で永井らが確立、系統維持している His46Arg 変異 *Cu/Zn SOD*-トランスジェニック (以下 Tg) ラット<sup>3)</sup> と正常同腹仔ラットを対象とした。ラットは注意深く観察して四肢のいずれかに筋力低下が明らかになった時点を発症とした。発症前の Tg ラット (24 週齢)、発症後早期の Tg ラット (26 週齢)、発症後後期の Tg ラット (28 週齢) のそれぞれについて腰髄灌流固定凍結切片を作成、また週齢一致正常同腹仔ラットをコントロールとした (各群 n=3~4)。代表的な再生阻害因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (Chondroitin Sulfate Proteoglycans, CSPGs) の発現を、蛍光免疫組織化学的手法を用いて共焦点レーザー顕微鏡下に半定量的解析を行った (関心領域を前角・前索・後角・後索に設定、各  $1.24 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ )。また、各種細胞選択的マーカーとの二重染色を行い CSPGs との関連を検討した。

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

## 結果

総じて Tg ラット腰髄では、コントロールに比してとりわけ前角および前索に CSPGs の有意な発現亢進を認めた。種々の CSPGs のうち Neurocan はその変化が特に顕著で、前角 (図 1A) および前索 (図 1B) における発現亢進がすでに発症前から認められた。Versican についても同様の傾向が確認された (図 2A・B)。また二重染色では、Neurocan と GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) の共発現が観察された。

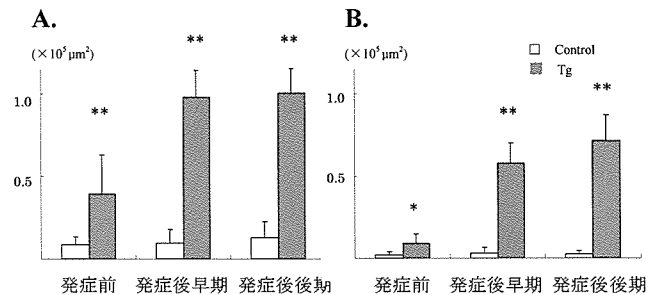


図 1. Neurocan の免疫反応陽性面積 (A; 前角, B; 前索) Tg ラット腰髄では前角、前索において発症前から Neurocan の発現が亢進し、進行性であった。

(One way ANOVA, Tukey-Kramer post hoc test, \*p < 0.05; \*\*p < 0.01)

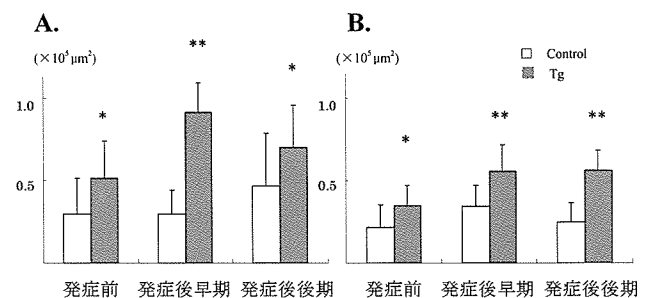
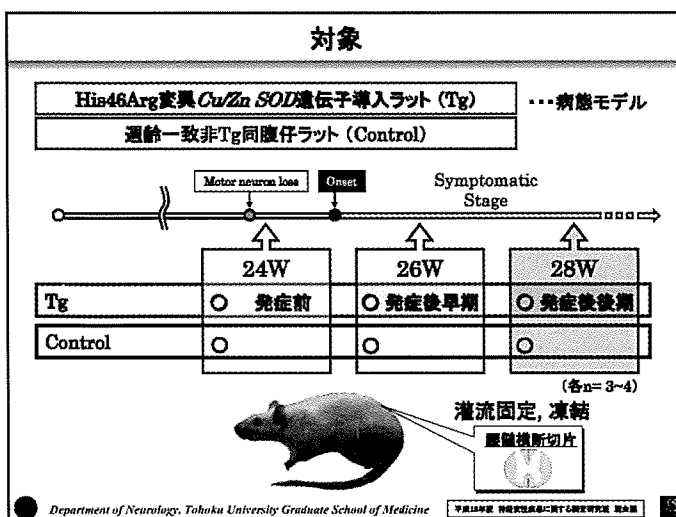


図 2. Versican の免疫反応陽性発現 (A; 前角, B; 前索) Tg ラット腰髄では前角、前索において発症前から Versican の発現亢進を認めた。

(One way ANOVA, Tukey-Kramer post hoc test, \*p < 0.05; \*\*p < 0.01)

## 考 察

本 ALS モデルラットにおいて CSPGs の発現が病変の主座である脊髄前角とその周囲白質で有意に亢進していたことは、変性運動ニューロンの周囲の細胞外環境が神経軸索再生に対して非許容的である可能性を示唆する。また二重染色から得られた結果から CSPGs の発現亢進と反応性アストログリアの関連が想定される。

さらに、発症前から CSPGs 発現亢進が認められ、発症後にそれが増強していることは、本病態における進行性運動ニューロン変性とも何らかの関わりがあるかもしれない。

今後、より詳細な解析を行い、再生阻害因子発現調節メカニズムを解明する必要がある。これらの知見は、変性脊髄の細胞外環境をより神経再生許容的に変化させる新しい再生誘導療法開発に寄与するものと考えられる。

## 文 献

1. Picadr-Riera, N., et al.: *J. Neurosci. Res.*, 223-31, 2004.
2. Morgenstern D.A., et al.: *Prog. Brain Res.*, 313-332, 2002.
3. Nagai M., et al.: *J Neurosci.*, 9246-9256, 2001.