

変異 SOD1-Tg マウスにおける神経細胞死の解析

報告者氏名：山崎 亮¹⁾、田中正人¹⁾、立石貴久¹⁾、大八木保政¹⁾、吉良潤一¹⁾

所属：¹⁾九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科

研究要旨

我々は、平成 17 年度「神経変性疾患に関する調査研究」班にて、G-CSF の抗アポトーシス作用を介した神経細胞死の抑制を報告した。今回、舌下神経軸索切断モデルを用いて、G93A 変異 SOD1-Tg マウスにおける神経細胞の脆弱性、および G-CSF 投与の神経細胞死およびミクログリアへの影響を検討した。舌下神経軸索切断モデルにより、変異 SOD1-Tg マウスでは、3 日後のミクログリアによる神経細胞の取り囲みが抑制され、40 日後の神経細胞死が促進していた。G-CSF の前投与によりこのミクログリアの神経細胞取り囲み反応は回復した。これらの結果より、変異 SOD1-Tg マウスではミクログリアの反応性低下と神経細胞の脆弱性が存在し、G-CSF は直接的な神経細胞保護効果とともにミクログリアを介した間接的保護効果を有す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)をはじめとする神経変性疾患では、脳内単球系細胞であるミクログリアの活性化が病変部位に見られることが多い。従来、これらのミクログリアは変性した神経細胞を貪食していると考えられていたが、近年、ミクログリアの神経保護作用が注目されつつある。ALS のモデルマウスとして変異 SOD1(G93A)-トランスジェニックマウス(以下 mSOD1Tg)があるが、このマウスは生後 12 週で後肢の筋力低下から発症し、生後 20 日で死亡する。このマウス脊髄でもミクログリアの活性化は見られるが、神経細胞死後の貪食反応なのか、神経細胞変性に対す

る何らかの保護的影響を及ぼしているのかは不明である。また、我々は平成 17 年度「神経変性疾患に関する調査研究班」報告会にて G-CSF の神経細胞保護効果について報告したが(Tanaka et al, 2006)、その詳細な機序は不明である。今回我々は、マウス舌下神経軸索切断モデルを用いて、mSOD1Tg における神経細胞の脆弱性、ミクログリアの反応性の異常、および G-CSF 投与の神経細胞死およびミクログリア反応性への影響を検討した。

B. 研究方法

① 生後 12 週の mSOD1Tg、および同腹仔の非トランスジェニックマウス(以下 NTG)にお

いて、気管前部で胸鎖乳突筋に並走する左舌下神経の近位部と遠位部を眼科用はさみで切断した。切断3日後と40日後に還流固定し、延髄を30 μ mの厚さに薄切して、Nissle染色により切片あたりの神経細胞数を舌下神経切断側および非切断側との間、およびNTGとmSOD1Tgとの間で比較した。また、同様の薄切切片を、神経細胞マーカーの抗neuronal nuclei (NeuN)抗体、およびミクログリアマーカーの抗Iba1抗体を用いて染色し、ニューロンとミクログリアとの関係などを免疫組織化学的に検討した。

② G-CSFの効果を検討するため、舌下神経切断の5日前(day -5)からヒトリコンビナントG-CSF 200 μ g/kgをマウス後肢背側に皮下注射し、舌下神経を切断(day 0)。その3日後(day 3)に還流固定し舌下神経核を観察した。

なお、すべての動物実験は学内の動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

① 舌下神経軸索切断モデルの作成は低侵襲かつ安全に行うことができた。NTGでは、舌下神経切断3日後には切断側でNeuNの反応性が低下し、傷害ニューロンをミクログリア

が取り囲んでいる様子が著明に見られた。切断側の反応性ミクログリアは、非切断側のミクログリアと比較し、数の増加、樹状突起の肥大化、変形が著明であった。一方、mSOD1Tgにおいては、NTGと比較してミクログリアの数も少なく、傷害ニューロンを取り囲む現象もNTGと比較して目立たなかった。NTGで見られたミクログリア樹状突起の肥大も見られなかった(Fig. 1)。

舌下神経切断40日後の生存ニューロン数を切断側と非切断側で比較したところ、NTGでは39.1%が残存していた。一方mSOD1Tgでは、13.4%しか残存していなかった(n=5)(Fig. 2)。従って、mSOD1Tgの舌下神経核ニューロンは発症以前より脆弱であり、またミクログリアの反応性もNTGとmSOD1Tgでは異なることが示唆された。

② 次に、このモデルにおけるG-CSFの作用を検討するため、G-CSFを前投与したのち舌下神経を切断し、3日後のニューロン、ミクログリアを観察した。

NTG群においては、未投与群で見られたミクログリアの反応、すなわち細胞数の増加や樹状突起の肥大、ニューロンを取り囲む現象などはすべて減弱していた。それと対照的に、

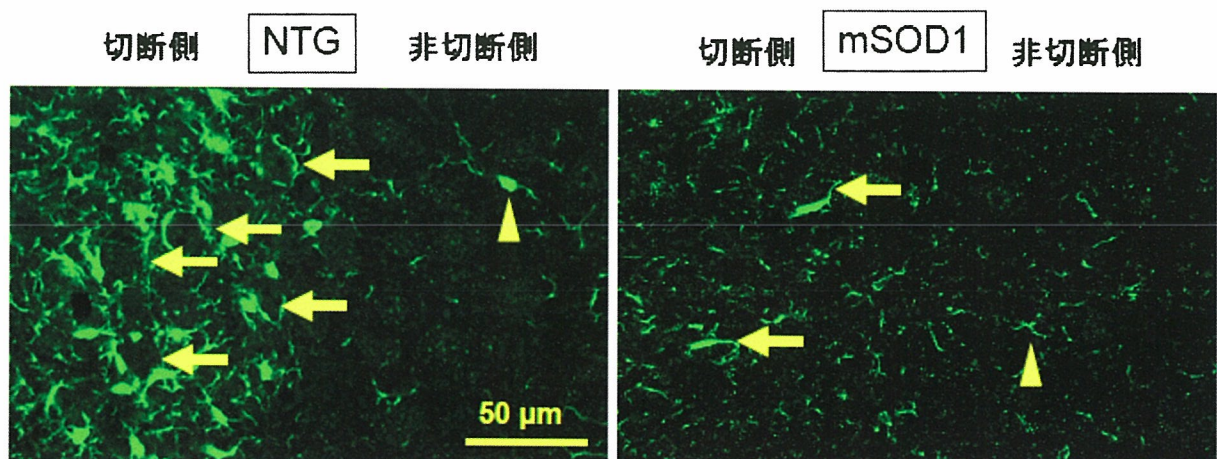


Fig.1 舌下神経軸索切断3日後の舌下神経核(Iba1免疫染色)

矢印: 反応性ミクログリアのニューロン取り囲み像、矢頭: ラミファイドタイプの常在性ミクログリア。

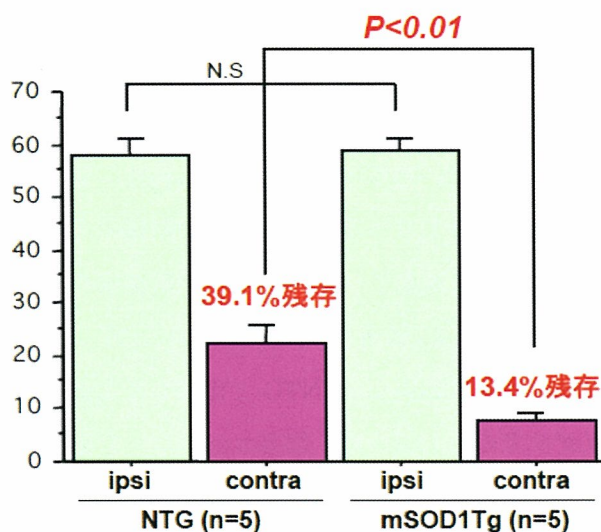


Fig.2 舌下神経軸索切断40日後のNissle陽性細胞数。
Ipsi: 切断側, Contra: 非切断側

mSOD1Tg 群においては、未投与群と比較して上記のような現象の亢進が示唆された。すなわち、ミクログリアのニューロン取り囲み現象も顕著であった(Fig. 3)。長期投与における神経保護効果、すなわちニューロン生存率の変化に関しては現在検討中である。

D. 考察

今回の結果より、舌下神経切断モデルにおいて、mSOD1Tg の神経細胞の脆弱性およびミクログリアの反応性における病的変化が示唆された。軸索切断モデルでは血液脳関門は破壊されないため、末梢血液由来の白血球の浸潤を伴わずに脳脊髄実質の神経細胞を選別的に変性させることができる。そのため、慢

性的な神経細胞死のモデルとして有用とされる(Snyder et al., 1992)。舌下神経は左右の神経核が延髄背側で隣接しており、病理学的比較が容易であるため、今回の実験に用いた。mSOD1Tg の神経細胞脆弱性に関しては、顔面神経軸索切断モデルの実験で既に示され、ATF-3 や c-Jun、HSP27 などの分子の関与が示唆されている(Ikeda et al., 2005)。さらに、今回の我々の検討では、mSOD1Tg 群と NTG 群間におけるニューロン生存率の違いには、ニューロン自身の脆弱性以外に、ミクログリア機能の相違も関与し、mSOD1Tg では、ミクログリアの神経保護作用が低下している可能性が示唆された。

Serpe らは Scid マウス(T、B 細胞欠損マウス)の顔面神経軸索切断モデルにおいて、神経細胞死が有意に亢進することを報告している(Serpe et al, 1999)。このことは、軸索切断モデルにおける神経細胞死には、免疫系を介した神経保護作用が関与していることを示唆している。最近、Beers らは、Pu.1 ノックアウトマウス(マクロファージ、好中球、T、B 細胞、およびミクログリア欠損マウス)を用い、

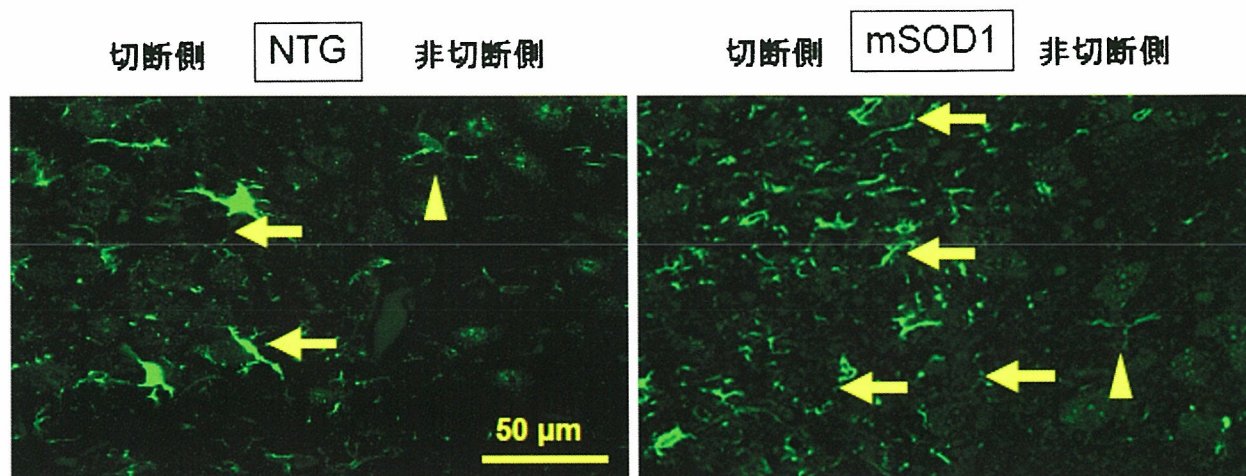


Fig.3 G-CSF前投与後舌下神経軸索切断3日後の舌下神経核(Iba1免疫染色)
矢印: 反応性ミクログリアのニューロン取り囲み像, 矢頭: ラミファイドタイプの常在性ミクログリア。

このマウスと mSOD1Tg を掛け合わせ、野生型の骨髄を移植したところ、その生存率が有意に延長したと報告している(2006)。従って、ニューロンが変異 SOD1 を持っていたとしてもミクログリアが正常であれば神経細胞保護効果が期待でき、近年注目されている分野である。

G-CSF 投与によるミクログリアの反応性の変化に関しては、その機序は現在不明であるが、NTG では G-CSF の神経保護作用によりニューロンから放出される炎症性サイトカインやケモカインが減少し、ミクログリアの活性化や神経細胞の取り囲み現象も軽度になること、mSOD1Tg では逆にニューロンからのサイトカイン放出が促進され、その周囲のミクログリアの神経保護作用が回復している可能性はある。今後、培養神経細胞やミクログリアを用いた検討が必要である。一方、mSOD1Tg では、ニューロンのみならずミクログリアも同様に機能異常を生じている可能性がある。実際我々は、マウスの単球系を用いた実験で、mSOD1Tg と NTG との間で機能的な差を見出している (Yamasaki et al, unpublished data)。今後、G-CSF の長期投与が神経細胞死を抑制する作用、また単球系細胞の神経細胞保護機能を検討するため、初代培養ミクログリアやマクロファージを用いた解析を進めていく予定である。

E. 結論

マウス軸索切断モデルにおける神経細胞死において、所属ミクログリアが重要な役割を担っている。mSOD1Tg における神経細胞の脆弱性促進には、ミクログリアの機能異常が

部分的に関わっている可能性もある。G-CSF は、ニューロン以外に、ミクログリアの動態にも影響している可能性が示唆された。

F. 文献

1. Tanaka et al. J Neuropathol Exp Neurol 65: 816-825, 2006
2. Snider et al. J Neurobiol 23: 1231-1246, 1992
3. Ikeda et al. J Neurosci Res 82: 63-70, 2005
4. Serpe et al. J Neurosci 19: 1-5, 1999
5. Beers et al. PNAS 103: 16021-16026, 2006

G. 健康危険情報

特記事項なし

H. 学会発表

1. 山崎亮ら: カテプシン D 欠損マウスの脳内リソソーム蓄積とミクログリア末梢血管内注入の及ぼす影響. 第 10 回グリア研究会. 2005
2. 山崎亮ら: カテプシン D 欠損マウスにおける運動障害と脳内 GAD 分解亢進による GABA 系の異常-その解析とミクログリア注入による酵素補充療法の試み- 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 2005
3. 山崎亮ら: カテプシン D 欠損マウスのミクログリア活性化機構の解明. 第 11 回グリア研究会. 2006

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

外来性ヒト Bcl-2 による変異 SOD1 マウスの運動ニューロン変性抑制機序

内野 誠¹⁾、山下 賢¹⁾、箕田修治²⁾、前田 寧¹⁾、内田友二¹⁾、山下太郎¹⁾、平野照之¹⁾

¹⁾熊本大学大学院医学薬学研究部 神経内科学分野

²⁾ 国立病院機構 熊本再春荘病院 神経内科

研究要旨

アデノウイルスベクターの逆行性軸索輸送と Cre-loxP 組み換えを用いて、G93A 変異を有するヒト Cu/Zn superoxide dismutase トランスジェニックマウス（G93A マウス）の運動ニューロンにおける、ヒト Bcl-2 の神経保護効果の作用機序について検討した。アデノウイルス注入後 15 週における G93A マウスの舌下神経核運動ニューロンについて、免疫組織学的手法を用いて、cytochrome-c および活性型 caspase-1 の細胞内局在を調べた。ヒト Bcl-2 を発現する G93A マウスの運動ニューロンでは、未注入のマウスに比較して、より淡く、点状の cytochrome-c の染色パターンを呈するニューロンが有意に多く、また活性型 caspase-1 陽性のニューロンは有意に少なかった。これらの結果から、病初期における一過性の外来性ヒト Bcl-2 発現は、ミトコンドリアから細胞質への cytochrome-c の放出を阻止し、caspase-1 の活性化を制御することによって、G93A マウスの運動ニューロン変性を防御す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）は上位及び下位運動ニューロンが選択的に障害される進行性神経変性疾患であるが、その原因は不明であり有効な治療法は開発されていない。変異ヒト SOD1 トランスジェニックマウスは筋力低下、筋萎縮、背髄前角細胞の減少と前根の萎縮などヒト ALS 類似の徴候を呈し、ALS のモデルマウスとして用いられており、本マウスの神経変性機序にはアポトーシスの関与が考えられている。前回我々は、変異ヒト SOD1 (G93A) トランスジェニックマウスの運動ニューロンに、逆行性軸索輸送によるヒト Bcl-2 を過剰発現させ、運動ニューロン変性の抑制効果を確認した。今回は逆行性軸索輸送によるヒト Bcl-2 発現が G93A マウスの運動ニューロン変性を抑制する機序について検討する。

B. 研究方法

1. 10 週齢の G93A マウスと正常対照マウスの舌筋内に、cre-loxP 組み換えを応用した Bcl-2 の発現カセットを有するアデノウイルスベクター（AxCALNLBcl-2）を注入し、その 24 時間

後に cre recombinase を発現するアデノウイルスベクター（AxCANCre）を注入し、逆行性軸索輸送により運動ニューロンに導入された Bcl-2 が、G93A マウスの運動ニューロン変性にもたらす効果について、症候が著明となる 25 週齢時の G93A マウスにおいて病理学的に検討した。運動ニューロンに対する外来性 Bcl-2 の効果を定量的に評価するため、大型運動ニューロン数の測定を行った。

2. 逆行性軸索輸送によるヒト Bcl-2 発現が G93A マウスの運動ニューロン変性を抑制する機序を明らかにするために、10 週齢時にアデノウイルスベクターを注入し、25 週齢時に観察を行った G93A マウス各群について cytochrome c および活性型 caspase-1 の免疫染色を行った。
3. これらの結果を定量的に評価するために、残存神経細胞中において cytochrome c もしくは活性型 caspase-1 が強く染色された神経細胞数の比率を、G93A マウス各群について比較した。

C. 研究結果

1. 10週齢のG93Aマウスの舌筋内にAxCALNLBcl-2に続いてAxCANCreを注入すると、両ベクターを注入したG93Aマウスの舌下神経核では、AxCALNLBcl-2のみを注入したマウスや未注入マウスと比較して、より多くの運動ニューロンが保存されていた。またAxCALNLBcl-2のみを注入したマウスや未注入マウスでは、神経細胞体およびニューロピル周囲に著明な空胞変性が観察されたが、両ベクターを注入したマウスでは、ニューロピル周囲にわずかに空胞を認めるのみであった。運動ニューロン変性に対する外来性Bcl-2の効果を定量的に評価するために、残存する大型運動ニューロンの数を測定したところ、両ベクターを注入したG93Aマウスの運動ニューロンの数は、AxCALNLBcl-2のみを注入したマウスや未注入マウスの運動ニューロンの数に比較して、有意に残存していた (図1)。

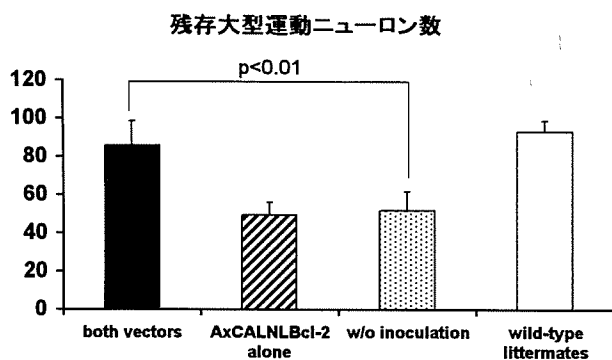


図1. 逆行性軸索輸送により導入されたBcl-2発現の運動ニューロン変性に対する効果
症候が著明となる25週齢時のG93Aマウスに、AxCALNLBcl-2に続いてAxCANCreを注入し、運動ニューロンに対する外来性Bcl-2の効果を定量的に評価するために、大型運動ニューロンの数を測定した。両ベクターを注入したG93Aマウスの運動ニューロンの数は、AxCALNLBcl-2のみを注入したマウスや未注入マウスの運動ニューロンの数に比較して、有意に残存していた。

2. さらに、反応性アストロサイトを検出するためにGFAP染色を行うと、未注入G93Aマウスの脳幹部切片では反応性アストロサイトの著明

な増生を認めたが、両ベクターを注入したマウスでは、明らかに反応性アストロサイトの増生が減弱していた。

3. 10週齢時にアデノウイルスベクターを注入し、25週齢時に観察を行ったG93Aマウス各群についてcytochrome cの免疫染色を行ったところ、Bcl-2を発現しないG93Aマウスの舌下神経核では細胞質を中心にcytochrome cが強く、diffuseに染色されたが、一方両ベクターを注入しBcl-2を発現するG93Aマウスでは、cytochrome cはより淡く、点状に染色された。

4. この結果を定量的に評価するために、残存神経細胞中においてcytochrome cが強く、diffuseに染色された神経細胞数の比率を比較したところ、両ベクターを注入しBcl-2を発現するG93Aマウスでは、Bcl-2を発現しないマウスに比較して、有意に減少していた (図2)。

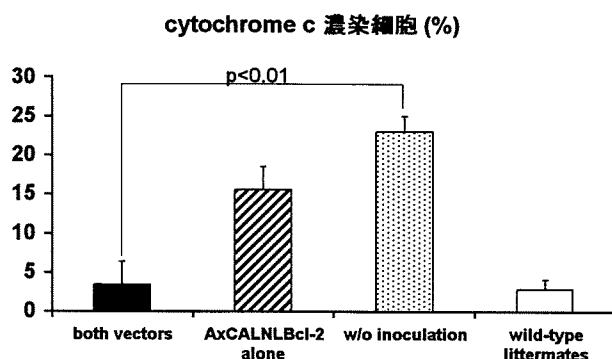


図2. 残存神経細胞中におけるcytochrome c濃染神経細胞の比率

AxCALNLBcl-2およびAxCANCre注入15週後の25週齢時においてcytochrome cの免疫染色を行い、各運動ニューロンにおける染色強度をNIHImage softwareを用いて評価し、残存神経細胞中における濃染細胞の比率を、G93Aマウス各群にて比較した。

5. 次に同様に10週齢時にアデノウイルスベクターを注入し、25週齢時に観察を行ったG93Aマウス各群について活性型caspase-1の免疫染色を行ったところ、Bcl-2を発現しないG93Aマウスの舌下神経核では活性型caspase-1が

強く染色される傾向にあり、特に未注入G93Aマウスでは、活性型caspase-1が強く染色される細胞は形態が小さく、進行したアポトーシスを示唆するものと考えられた。一方両ベクターを注入しBcl-2を発現するG93Aマウスでは、活性型caspase-1が染色される細胞は比較的わずかであった。

6. この結果を定量的に評価するために、残存神経細胞中において活性型caspase-1が強く染色された神経細胞数の比率を比較したところ、両ベクターを注入しBcl-2を発現するG93Aマウスでは、Bcl-2を発現しないマウスに比較して、有意に減少していた (図3)。

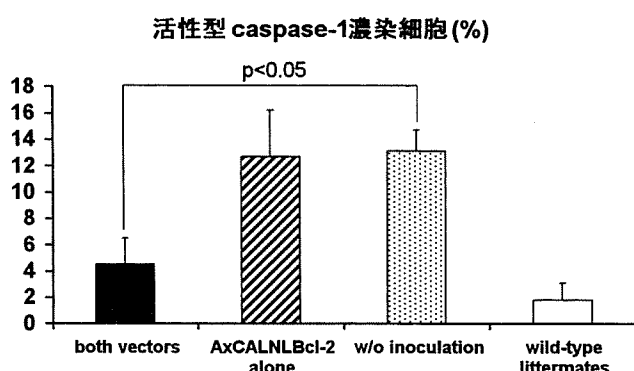


図 3. 残存神経細胞中における活性型 caspase-1 濃染神経細胞の比率

AxCALNLBcl-2 および AxCANCre 注入 15 週後の 25 週齢時において活性型 caspase-1 の免疫染色を行い、各運動ニューロンにおける染色強度を NIHImage software を用いて評価し、残存神経細胞中における濃染細胞の比率を、G93A マウス各群にて比較した

D. 考察

G93A マウスの運動ニューロン変性にはアポトーシスの関与が考えられているが、本システムにより誘導されたヒト Bcl-2 の発現により、その変性が抑制されたものと考えられた。過剰発現された Bcl-2 は cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への放出を抑制し、その下流に位置すると考えられる caspase-1 の活性化を抑制することにより、運動ニューロン変性を防御することが推測された。さらに運動ニューロンにおける選択的な Bcl-2 発現が周囲の反応性アストロサイトの

増生をも抑制した点から、疾患発症において運動ニューロンが一時的な標的であること、またアストロサイトの反応はそれに続く二次的な現象であることが示唆された。

E. 結論

逆行性に導入された外来性ヒト Bcl-2 が cytochrome c の放出を抑制し、ミトコンドリア依存性アポトーシスの制御を通して運動ニューロン変性を防御することが示唆された。Bcl-2 などの抗アポトーシス因子を、導入部位のみならず、逆行性軸索輸送部位において運動ニューロンに発現させること、cre-loxP 発現調節系を組み合わせることによって、ALS などの運動ニューロン疾患の遺伝子治療が可能となる可能性が示された。

F. 文献

1. Yamashita S. et al.:Neuroscience Letters. 350:17-20, 2003
2. Yamashita S. et al.:Neuroscience Letters. 328:289-93, 2002
3. Yamashita S. et al.:Gene Therapy. 8:977-86, 2001

G. 健康危険情報

なし。

H. 学会発表

山下賢ほか. 第 44 回日本神経学会総会. 2003

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

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける細胞移植の検討

中島健二，渡辺保裕，森田恵里，中野俊也，北山通朗，安井建一
鳥取大学医学部脳神経内科

研究趣旨

我々はマウスにおいて，第4脳室を介して外来細胞を広く脳脊髄に分布させる移植手技を確立した．移植片細胞として運動神経の再生・再ミエリン化の促進，運動機能の回復の効果が報告されている嗅神経被覆細胞（olfactory ensheathing cell: OEC）をもちいた．野生型 C57BL/6CR にて移植手技の安全性の確認を行い，一昨年の本会議で報告した ALS モデルマウス（SOD1L126delTT TgM）において細胞移植効果を検討した．評価項目は，体重，hind limb extension score, foot print, 発症日齢，死亡日齢，病期とし，OEC 非移植マウスと比較した．更に，手術後 10, 30 および 100 日の時点で病理学的検索を行った．OEC は移植後 10 日で多数が生存し，漸減傾向を示したが移植後 100 日までの生着が確認され，副作用は認めなかった．SOD1L126delTT TgM に対する移植において，OEC 移植による有意な臨床的な治療効果は確認できなかった．本検討において，マウスにおける OEC 移植法を確立し，脊髄への OEC の生着を確認した．現在，ALS モデルマウスへの治療効果を確認するため，OEC 以外の神経幹細胞あるいは骨髄間葉系幹細胞等を用いた移植，移植細胞への遺伝子改変等を検討している．

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は，運動ニューロン変性により進行性の筋萎縮を主症状とする疾患である．中年以降に発症し，通常 3 から 5 年の経過で死に至る難病であり，未だ有効な治療法が確立されていない．我々は，脊髄の運動ニューロン保護・再生面から ALS の新たな治療法を見出すため，我々は嗅神経被覆細胞（olfactory ensheathing cell: OEC）に注目した．OEC は脊髄損傷モデル動物への移植において，運動神経の再生・再ミエリン化，そして運動機能の回復を促進する事が報告されている^{1,2)}．今回この OEC を用いて，マウスにおける第四脳室への細胞移植法を確立し，移植手技の安全性の確認を行った．さらに山陰の家族性 ALS（familial ALS: FALS）患者から発見された変異 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（SOD1L126delTT TGM）³⁾へ OEC 移植を行い，術前・術後の臨床的評価（体重，hind limb extension score, foot print, 発症日齢，死亡日齢，および病期）と脊髄の病理学的検索を行い，OEC 非移植マウスと比較検討した．

B. 研究方法

マウスを用いた実験は，鳥取大学医学部動物実験ガイドラインに従って行った．

1) OECの採取・精製

緑色蛍光蛋白（GFP）を発現する TGM（C57BL/6CR）計5匹の嗅粘膜より OEC を採取し，Biancoらの方法⁴⁾

により選択培養をおこなった．OEC が 95% 以上の純度となるまで継代を繰り返した．OEC の精製度は p75 neurotrophin receptor（p75NTR）抗体を用いて確認した．

2) OECの移植

移植手術は野生型マウス（C57BL/6CR）および ALS-TGM に対して施行した．マウスへの移植は生後 90 日に行った．野生型マウスにおいて第四脳室より細胞を投与し⁵⁾，細胞が脳脊髄液を介して広く脳・脊髄に分布することを確認した．さらに細胞移植手技の安全性について検討を行った．

3) 評価

臨床評価として発症日齢，死亡日齢，歩行解析，hind limb reflex test, 体重測定を週に一度施行した．病理解析として移植細胞の同定（GFP による移植片細胞の標識）と抗 NeuN 抗体による残存神経細胞数の解析を行った．

C. 研究結果

1) OEC 精製

OEC の同定には GFAP（glial fibrillary acidic protein）, S100 または p75NTR が用いられている．今回は p75NTR 抗体を用いて OEC を同定した．継代により，95% 以上の純度の OEC を得た．

2) 野生型マウスへの OEC 移植

90 日齢の C57BL/6CR マウスへ OEC を移植し，体重，hind limb extension score, foot print で評価を行った．これらの評価により移植移植直後にコントロール群と比し軽度の運動障害を認めたが移

植 2 週間以降は認められず、手術による長期的な運動機能障害はないと考えられた。

3) ALS-TGM での OEC 移植効果

90 日齢の ALS-TGM を OEC 移植群 (n=6) とコントロール (PBS 注入) 群 (n=6) に分け、OEC 移植後に臨床的評価を行った。体重、hind limb extension score と foot print から両群間に有意差はみられなかった。平均発症日齢・平均死亡日齢・平均病期日数に関しても、両群間に有意差は認めなかった。

Table ALS-TGM への OEC 移植による臨床評価

	OEC	Control
Onset (days)	139.5±4.5	141.9±7.3
Death	151.1±6.0	168.6±13.8
Disease duration	11.6±3.4	26.8±8.1

4) 病理学的検索

90 日齢の ALS-TGM へ OEC を移植し、手術後 10 日と 30 日でマウスを灌流固定し、摘出した脊髄表面を蛍光顕微鏡下で直接観察した。コントロールとして PBS のみを注入した ALS-TGM を用いた。

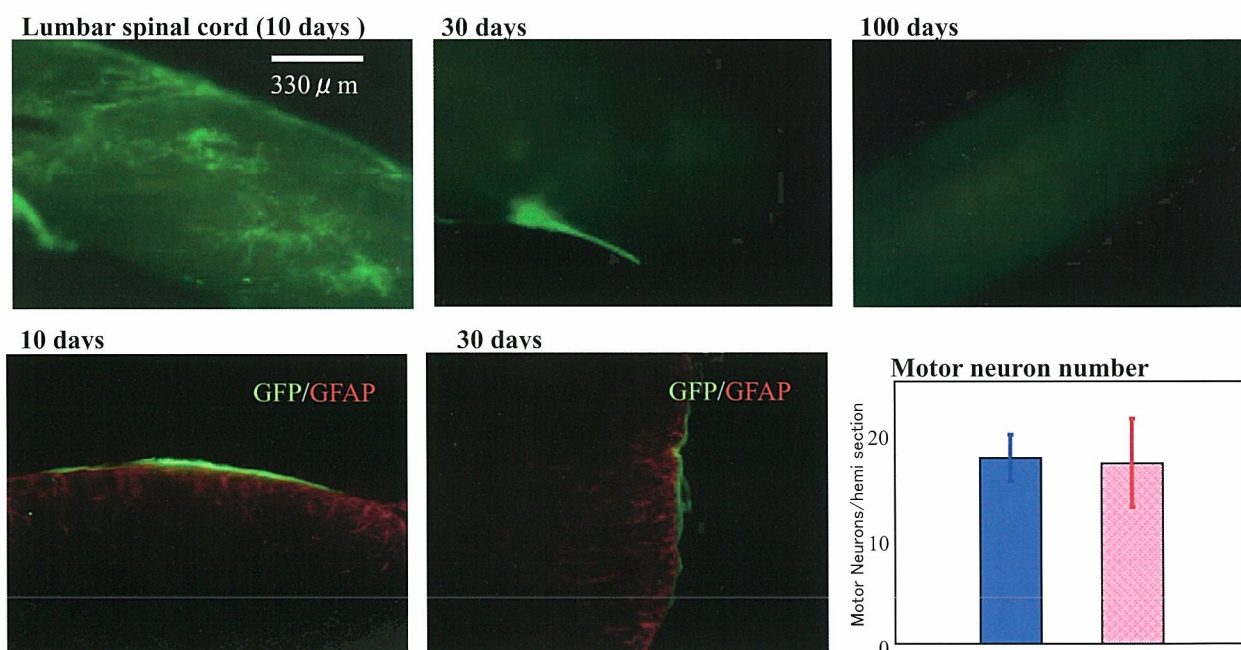
手術 10 日後のマウスでは、OEC は脊髄表面全体に生着しており、特に腰髄付近に多く確認された (図 1)。しかし手術 30 日後のマウスの脊髄では、頸髄の一部のみに OEC が確認されるのみであった (図 1)。これより、移植後約 30 日間まで OEC は生存するものの、その数は経時的に減少した。

せる細胞移植法を確立し、この移植法が安全であるか否かを確認した。そして、ALS モデルマウスに対して本移植法を用いて OEC を移植した。OEC の移植により、運動機能の回復、発症の遅延、又は発症後の症状進行を遅延し生存期間が延長するかを検討した。さらに、移植後の OEC の生着期間についても検証を行った。

本移植によるマウスへの周術期手術侵襲、慢性期の運動機能障害を含めた副作用は認められず、安全性を確認し得た。一方 OEC は脊髄内で少なくとも移植後 100 日間生着することを確認した。しかし、ALS-TGM での検討では治療群とコントロール群の間に有意差は認めなかった。このことより、移植後 OEC が脊髄へ生着している期間に最も効果を発揮するための最適な移植時期を検討する必要があると考えられた。

今後の方向として OEC のみならず神経幹細胞や骨髄間葉系幹細胞等の細胞移植に用いることを検討している。とくに骨髄間葉系幹細胞は、*in vitro* で骨細胞、神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化する⁶⁾ことが確認され「第 2 の万能細胞」として注目を浴びている。この細胞は OEC 同様に患者自身の組織から分離・培養し自家移植することが可能であり、拒絶反応の危険がなく、ヒトの受精卵を使う ES 細胞のような倫理的問題もない。

更に神経栄養因子である GDNF を分泌するよう遺伝子改変した OEC でも同様な移植を行うことを検討している。



を用いた検討も行う。

F. 文献

- 1) Ramon-Cueto A, et al. Exp Neurol 127: 232-244, 1994.
- 2) Li Y, et al. Science 277: 2000-2002, 1997.
- 3) Watanabe Y, et al. Mol Brain Res 135: 1-2: 12-20, 2005.
- 4) Bianco JJ, et al. Glia 45: 111-123, 2004.
- 5) Wu S, et al. Neuroscience letters 318: 81-84, 2002.
- 6) Sanchez-Romas J, et al. Exp Neurol 164: 247-256, 2000.

G. 健康危険情報

なし

H. 学会発表

17th International Symposium on ALS / MND

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
申請中
「エキソン5において2塩基欠失を有する SOD1 遺伝子を導入した、遺伝子導入非ヒト動物」
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ALS 治療薬の開発に向けて

池田 穰衛¹⁾、田中一則²⁾、菅野拓也²⁾、秦野伸二²⁾、平山令明³⁾

¹⁾東海大学大学院医学研究科 脳・神経疾患研究センター

²⁾Neugen Pharma, Inc.

³⁾東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

研究要旨

本研究では、NAIPの酸化ストレス性細胞死を選択的に抑制する機能に着目して、NAIP機能を活性化・昂進する低分子化合物の同定と、この物による神経疾患治療薬開発の可能性について検討した。新たに開発したNAIP-ELISA系を用いて低分子化合物953個をスクリーニングし、NAIP発現レベルを上昇させる30化合物を同定した。これらすべての化合物は酸化ストレス性細胞死を抑制し、化合物L-745, 870は中でも最も強い細胞死抑制活性を示した。さらに、その抑制作用はNAIP発現誘導を介していることがRNA干渉実験で明らかになった。また、該当化合物投与は、砂ネズミでの一過性前脳虚血モデル実験において虚血性の海馬CA1神経細胞死を抑制し、さらにSOD1^{H46R}トランスジェニックALSモデルマウスにおける発症の遅延ならびに延命効果をもたらした。従って、NAIP発現誘導化合物L-745, 870は、脳細胞傷害・神経変性を伴う疾患の治療や予防に有用であることが強く示唆された。

A. 研究目的

神経変性疾患見られる神経細胞死の分子背景として、酸化ストレスや活性酸素種（ROS）、ミトコンドリア機能傷害、カルシウム恒常性異常が関わっていると考えられている。我々は、酸化ストレス・ROSによる神経細胞死・アポトーシスを分子標的としてALS治療薬の開発を試みている。本研究では、NAIPの酸化ストレス性細胞死を選択的に抑制する機能に着目して、NAIP機能を活性化・昂進する低分子化合物の同定と、この物による神経疾患治療薬開発の可能性について検討した。

B. 研究方法

NAIP/BIRC1 遺伝子は脊髄性筋萎縮症の重篤度に

関わる modifier である。NAIP は酸化ストレスや ROS によって誘導される細胞死を選択的に抑制するとともに、内・外因性 NAIP の強制発現は様々な神経変性疾患モデル動物において神経細胞の保護（神経細胞死抑制）に寄与する。これらの NAIP 機能に着目して、独自に開発した NAIP-ELISA と *in vitro* 酸化ストレス性細胞死抑制活性定量系を駆使して、向脳神経低分子化合物を出発材料に用いて、NAIP 機能を昂進・活性化する化合物を選抜した。この化合物の薬理特性と一過性脳虚血モデル動物ならびに ALS (SOD1^{H46R}) モデルマウスでの薬効について解析した。

（倫理面への配慮）

本研究で計画している全ての遺伝子改変実験、動

物実験、及び実験材料の採取については、東海大学における倫理委員会、組換え DNA 実験安全委員会、ならびに動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

先ず、細胞内 NAIP を定量的に解析するために、1 次抗体として 1B9 抗体を、2 次抗体として ME1 抗体を使用した NAIP double-antibody sandwich ELISA (NAIP-ELISA) 法を開発した。NAIP-ELISA 系を用いて脳神経関連の 953 個の低分子化合物をスクリーニングし、NAIP 発現誘導する化合物を 30 個同定した。その 30 化合物すべてにおいて培養細胞での NAIP 発現レベルの有意な上昇活性が認められ、フリーラジカル産生促進剤である menadione による酸化ストレス性細胞死を抑制することが判明した。その中で、もっとも強力な細胞死抑制活性を示したドーパミン D4 受容体拮抗剤 (L-745, 870) の細胞死抑制活性を *in vitro* および *in vivo* 実験で解析した。細胞死抑制活性は、非神経系や神経系などの細胞株のみならず初代培養細胞系においても同等の抑制活性が確認された。さらに、L-745, 870 による NAIP 発現レベルの有意な上昇活性は、L-745, 870 の濃度依存的に誘導され、細胞死も濃度依存的に抑制された。細胞死を誘発する種々のストレスの中で酸化ストレスのみ特異的に抑制活性を示し、酸化ストレス以外のストレスに対しては抑制活性を示さなかった。さらに、NAIP-RNA 干渉実験により、NAIP 発現を減少させると細胞死抑制活性も同様に低下したことから、その抑制作用は NAIP 発現の上昇を介していると考えられた。また、NAIP 以外の細胞死抑制タンパク質の発現増加は示されず、他の細胞死抑制因子の関与も否定された。次に、砂ネズミでの一過性前脳虚血モデル実験を行ったところ、L-745, 870 は海馬 CA1 領域の NAIP 発現を上昇させ、同時に虚血性の神経細胞死に対して保護的に作用することが確認された。さらに、ALS (SOD1^{H46R}) マウスに L-745, 870 を経口投与 (発症前・後) したところ、発症後経過の顕著な遅延が認

められ、平均 30% (最大 50%) 延命効果が認められた。

D. 考察

本研究で同定した30個のNAIP発現誘導化合物の中で、これまでに抗アポトーシス効果が報告されていた化合物はプロモクロプチンのみで、L-745, 870 を含む他の29化合物の抗アポトーシス効果については新規の発見であった。従って、NAIP-ELISAシステムは新規の酸化ストレス性アポトーシスを特異的に抑制する化合物の選抜に極めて有効なシステムの一つであると考えられる。今後、これら新規の化合物に関してはさらに詳細な解析を行う必要がある。

本研究では、ドーパミンD4受容体拮抗剤であるL-745, 870が、*in vitro*実験においてNAIPを特異的に増加させ、その発現増加により酸化ストレス特異的なアポトーシスを抑制したことを示した。また、同化合物は、*in vivo*実験においても砂ネズミ一過性前脳虚血後の遅発性海馬CA1神経細胞死の遅延を示し、さらにALS (SOD1^{H46R}) マウスでの発症遅延ならびに延命効果をもたらした。これらの結果は、NAIPが酸化ストレスやROSに起因する細胞死の選択的な抑制効果を介して脳細胞の傷害・神経変性を軽減していることを示しており、よってNAIPは神経細胞死を伴う疾患の治療や予防に有効であると考えられる。しかし、その分子機序の詳細は今後の解析を待たねばならない。

L-745, 870化合物は、当初抗精神病に対する治療薬として開発され、ヒトでの安全性試験 (Phase I) を終え臨床研究 (Phase IIa) で薬効が認められず開発は中断されている。L-745, 870については、このような開発経過から、ヒトへの生理的影響等について詳細に検討されている。今後、ALSのみならずパーキンソン病などの難治性神経変性疾患モデル動物でのL-745, 870薬効試験を積極的に進めるとともに、臨床試験への展開が期待される。また、併せてL-745, 870をリード化合物としてその類縁化合物に関しても検討し、神経疾患治療薬開発へ向けて研

究を遂行する計画である。

E. 結論

NAIP の選択的な酸化ストレス性細胞死抑制活性を分子標的とする低分子化合物は、ALS 治療薬および新たな神経保護剤の開発に有効と考えられた。また、NAIP 発現誘導化合物 L-745,870 は、脳細胞傷害・神経変性を伴う疾患の治療や予防に有用であることが強く示唆された。

F. 文献

- 1) Okada Y, et al.: J Cereb Blood Flow Metab 25, 794-806, 2005.
- 2) Hadano S, et al.: Hum Mol Genet 15, 233-250, 2006.
- 3) 秦野伸二, ほか: 最新医学 61, 1956-1970, 2006.
- 4) Tanaka K, et al.: DNA Seq, in press, 2006.
- 5) Suzuki-Utsunomiya K, et al.: Biochem Biophys Res Commn, in press, 2007.

G. 健康危険情報

なし

H. 学会発表

- 1) Hadano S, et al.: The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 292 (2P-A-364), Kyoto/Japan, 2006.
- 2) Kunita R, et al.: The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 362 (2P-C-121), Kyoto/Japan, 2006.
- 3) Suzuki-Utsunomiya K, et al.: The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 293 (2P-A-365), Kyoto/Japan, 2006.
- 4) Tanaka K, et al.: The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular

Biology and 11th FAOBMB Congress, 423 (3P-A-228), Kyoto/Japan, 2006.

- 5) Hadano S, et al.: 神経化学 45 (2-3), 452 (P1-N-087), Nagoya/Japan, 2006.
- 6) Otomo A, et al.: 神経化学 45 (2-3), 321 (WS-7-1), Nagoya/Japan, 2006.
- 7) Otomo A, et al.: Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 7 (suppl. 1), 52-53 (C70), Yokohama/Japan, 2006.
- 8) Kunita R, et al.: Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 7 (suppl. 1), 53 (C71), Yokohama/Japan, 2006.
- 9) Kunita R, et al.: The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting, Program p174 (2511/B432), San Diego/USA, 2006.
- 10) Suzuki-Utsunomiya K, et al.: Keystone Symposia, Molecular Mechanisms of Neurodegeneration (A4), Taos/USA, 2007.

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

進行性核上性麻痺とタウ遺伝子

高野弘基¹⁾、西澤正豊¹⁾、高橋均²⁾、柿田明美³⁾、小野寺理³⁾

1) 新潟大学 脳研究所 神経内科、新潟大学医歯学総合病院 神経内科、
2) 新潟大学 脳研究所 病理学、3) 新潟大学 脳研究所 リソース解析センター

研究要旨

進行性核上性麻痺（PSP）と皮質基底核変性症（CBD）は、孤発性の神経変性疾患であり、*タウ* 病理を特徴とすることから近似した疾患と考えられている。欧米人では、両疾患とも *タウ* 遺伝子を含む領域に相関が示されてきており、*タウ* 遺伝子の 5' 領域に遺伝学的危険因子の存在が推定されている。日本人 PSP 32 人、CBD 10 人、正常対照群 60 人からのゲノム DNA を用い、*タウ* 遺伝子上流約 95 kb の CRHR1 遺伝子内の多型 rs7209436 [T/C]、*タウ* 遺伝子の約 30 kb 上流 rs962885 [T/C]、*タウ* 遺伝子イントロン 0 rs242557 [A/G]、イントロン 0 rs242562 [A/G]、エクソン 4A C482T [T/C]、エクソン 6 C139T [T/C]、イントロン 9 C-47A [A/C]、*タウ* 遺伝子下流 150kb の rs2240756 [A/C] について相関解析をした。rs962885 の TT *タウ* 型と rs242562 の AA *タウ* 型は PSP に相関した（それぞれ、 $P=0.043$ オッズ比=2.51 と $P=0.007$ オッズ比=3.53）。PSP と CBD 患者を合わせて解析した場合は、rs242557 の AA *タウ* 型、rs242562 の AA *タウ* 型、エクソン 4A C482T の CC *タウ* 型が相関した（それぞれ、 $P=0.040$ オッズ比=2.46 と $P=0.003$ オッズ比=3.64 と $P=0.018$ オッズ比=0.37）。rs7209436 およびエクソン 6 C139T、イントロン 9 C-47A、rs2240756 は相関を示さなかった。rs7209436 ~ *タウ* 遺伝子エクソン 6 C139T までの約 197 kb に PSP および CBD の遺伝因子が存在する。

A. 研究目的

進行性核上性麻痺（PSP）と皮質基底核変性症（CBD）は、中～高年時に発症する孤発性の神経変性疾患であり、 β -キニンズドと前頭葉性と表現されうる痴呆を特徴とする。両疾患とも病理学的には *タウ* 蛋白の異常な（過リン酸化 4 位 *タウ* 蛋白）凝集物、つまり *タウ* 病理を特徴とすることから近似した疾患と考えられている。

遺伝学的相関研究においても、両疾患とも *タウ* 遺伝子を含むヒト 17 番染色体 17q21.31 領域に相関が示されてきている。相関する領域は、組み換えが生じえない約 900kb の逆位多型のために⁷⁾、強力な連鎖不平衡状態にあり、H1 型と H2 型の 2 つの *タウ*

型に二分される¹⁻⁶⁾。欧米人においては PSP 及び CBD と H1 との相関が示されてきている⁸⁾。最近の H1 特異的多型を利用した解析では *タウ* 遺伝子の 5' 領域に遺伝学的危険因子の存在が推定されている⁹⁾。

本研究では、日本人は基本的に全てが H1 であることを踏まえて¹⁰⁻¹²⁾、*タウ* 遺伝子領域と PSP 及び CBD との相関を解析し、本領域における遺伝学的危険因子の存在を検討する。

B. 研究方法

PSP 32 人、CBD 10 人、非血縁の 65 歳以上の正常対照群 60 人からのゲノム DNA を用いた。PSP は NINDS-SPSP 臨床診断基準¹³⁾、CBD は Gibbs の

診断基準¹⁴⁾に従って臨床診断した。

対象は全て日本人であるが、PSP, CBD 例については、外遺伝子のIクワ 0~4, Iクワ 4A, Iクワ 5~14 について直接塩基配列決定法にて変異がないことと、H1型の一塩基多型の 牀接合であることを確認した。また、全例について、イトクワ 9 の 238bp の挿入欠失多型を PCR 法にて解析し、H1 型に連鎖する挿入型の 牀接合であることを確認した。

多型としては、外遺伝子の上流約 95 kb の CRHR1 遺伝子内の多型 rs7209436 [T/C], 外遺伝子の約 30 kb 上流 rs962885 [T/C], 外遺伝子イトクワ 0 rs242557 [A/G], イトクワ 0 rs242562 [A/G], Iクワ 4A C482T [T/C], Iクワ 6 C139T [T/C], イトクワ 9 C-47A [A/C], 外遺伝子下流 150kb の rs2240756 [A/C] を多クワした。

統計解析は、SNPAlyze (Ver.3.2 Pro)を用いた。本研究は新潟大学医歯学総合病院の遺伝子倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

各多型は疾患群と対照群のいずれにおいても Hardy-Weinberg 平衡からの有意な逸脱はなかった。

rs962885 の TTケクワと rs242562 の AAケクワは PSP に関連した (それぞれ、 $P=0.043$ オッズ比=2.51 95%信頼区間 1.02 - 6.20 と $P=0.007$ オッズ比=3.53 95%信頼区間 1.4 - 9.0)。

PSPとCBD患者を合わせて (PSP+CBD) 解析した場合では、rs242557 の AAケクワ、rs242562 の AAケクワ、Iクワ 4A C482T の CCケクワが関連した (それぞれ、 $P=0.040$ オッズ比=2.46 95%信頼区間 1.03 - 5.87 と $P=0.003$ オッズ比=3.64 95%信頼区間 1.51 - 8.72 と $P=0.018$ オッズ比=0.37 95%信頼区間 0.15 - 0.85)。

rs7209436 およびIクワ 6 C139T、イトクワ 9 C-47A、rs2240756 は関連を示さなかった。

連鎖不平衡解析では、rs242557、rs242562、Iクワ 4A C482T は、PSP または PSP+CBD 群では $D' > 0.7$ を示したが、正常対照群ではみられなかった。

これらの多型による H^2 分析では、 H^2 分析

A-A-T は有意に PSP+CBD 群で多かった (PSP+CBD 群 24.9%、正常対照群 10.3%、 $P=0.014$)。

D. 考察

PSP 群または PSP+CBD 群と関連を示した多型は、外遺伝子上流の rs962885, 外遺伝子イトクワ 0 rs242557, イトクワ 0 rs242562, Iクワ 4A C482T である。したがって、これらの多型が存在する領域を挟む rs7209436 ~ 外遺伝子Iクワ 6 C139T までの約 197 kb に PSP と CBD の遺伝学的因子が存在すると考えられる。

Iクワ 4A C482T 多型では、CCケクワがオッズ比=0.37 で関連しているが、TTケクワでは有意差はなく、Cケクワは防御ケクワと考えられた。

また連鎖不平衡解析では、rs242562 とIクワ 4A C482T 間の D' の絶対値は対照群で 0.44 であつたにも関わらず、PSP+CBD 群では 0.73 であつた。このことは rs242562 付近の危険因子とIクワ 4A C482T 付近の防御因子の欠落が同時にそろつたと発病に関連する可能性を示唆していると考えられる。そのような H^2 分析つまり rs242557 A ケクワ - rs242562 A ケクワ - Iクワ 4A C482T T ケクワは、PSP+CBD 群で 24.9%、正常対照群で 10.3%に推定され有意差があつた ($P=0.014$)。

E. 結論

rs7209436 ~ 外遺伝子Iクワ 6 C139T までの約 197 kb に PSP および CBD の遺伝因子が存在する。外遺伝子のイトクワ 0 ~ Iクワ 4A の H^2 分析 rs242557 A ケクワ - rs242562 A ケクワ - Iクワ 4A C482T T ケクワ が特に危険染色体と考えられる。

F. 文献

- 1) Baker M, et al. Hum Mol Genet. 8:711-715, 1999
- 2) Higgins JJ, et al. Neurology. 55:1364-7, 2000
- 3) Ezquerra M, et al. Neurosci Lett. 275:183-186, 1999
- 4) de Silva R, et al. Neurosci Lett. 311:145-148, 2001
- 5) Pittman AM, et al. Hum Mol Genet. 13: 1267-1274, 2004
- 6) Pastor P, et al. Ann Neurol. 56: 249-258, 2004

- 7) Stefansson H, et al. Nat Genet. 37: 129-137, 2005
- 8) Houlden H, et al. Neurology. 56:1702-1706, 2001
- 9) Pittman AM, et al. J Med Genet. 42:837-846, 2005
- 10) Okuizumi K, et al. Ann Neurol. 44: 707-708, 1998
- 11) Conrad C, et al. Neurosci Lett. 250: 135-137, 1998
- 12) Evans W, et al. Neurosci Lett. 369:183-185, 2004
- 13) Litvan I, et al. Neurology. 47:1-9, 1996
- 14) Gibb WR, et al. Adv Neurol. 53:51-54, 1990

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

なし

皮質下白質に著明なタウの蓄積を認めた皮質基底核変性症の2剖検例

坂井健二¹⁾、朴 月善¹⁾、菊川公紀²⁾、深瀬真之²⁾、大原慎司³⁾、
長谷川成人⁴⁾、高野弘基⁵⁾、西澤正豊⁵⁾、柿田明美⁶⁾、高橋 均¹⁾

¹⁾ 新潟大学脳研究所病理学分野、²⁾ 荘内病院神経内科・病理科
³⁾ 国立病院機構中信松本病院神経内科、⁴⁾ 東京都精神研分子神経生物
⁵⁾ 新潟大学脳研究所神経内科学分野、⁶⁾ 同 生命科学リソース研究センター

研究要旨 非定型的な臨床病理像を呈した皮質基底核変性症(CBD)と考えられた2症例を経験したので報告する。症例1は死亡時86才、男性。81才時に四肢筋力低下と認知症で発症し徐々に増悪。頭部MRIでは対称性の大脳萎縮を認めた。症例2は死亡時74才、男性。71才時に易転倒性で発症。パーキンソニズム、認知症、失語と構成失行が認められ、頭部MRIでは大脳、脳幹、小脳の萎縮を認めた。両例において、大脳皮質グリア内封入体(astrocytic plaque)の存在に加え、皮質下白質のastrocyteの突起内に著明なタウの蓄積が認められた。症例2において、典型的なCBDと同様なタウの生化学とそのタウ遺伝子に変異のないことを確認した。この皮質下白質のastrocyte優位のタウ蓄積が非定型的な臨床経過に関連していると考えられた。

はじめに

皮質基底核変性症(Corticobasal degeneration; CBD)は進行性のパーキンソニズム、大脳皮質症状、認知症を特徴とする弧発性神経変性疾患である¹⁾。神経病理学的には非対称性の前頭頭頂葉萎縮、*ballooned neurons*の出現、皮質下神経核の変性及びタウの蓄積を認め、タウオパチーに分類されている。タウが神経細胞とグリアの両者に蓄積することが特徴的であるとされ、神経細胞ではpretangle、astrocyteではastrocytic plaque、oligodendrocyteではcoiled bodyやargyrophilic threadsが認められるが、CBDではastrocytic plaqueが疾患特異的な構造物であるとされている^{2,3,4)}。今回我々は弧発性タウオパチーで、CBDとして非定型的な臨床像と病理学的所見を呈したが、神経病理学的、生化学的にCBDであると考えられた2剖検例を経験したのでその臨床病理を報告する。

症例

症例1⁵⁾：死亡時86才、男性。81才頃より進行性の四肢筋力低下と筋萎縮、認知症が認められた。83才時にはHDS-R 13/20で、失見当識、呼称障害を認めたが、失行や失認はなかった。頭部MRIでは両側対称性の前頭

側頭葉の萎縮を認めた。認知症と四肢の筋力低下が徐々に進行し、認知症を伴う筋萎縮性側策硬化症と臨床診断された。84才頃より寝たきり状態となり、気管支肺炎にて86才で死亡。全経過約4年。

症例2⁶⁾：死亡時74才、男性。71才頃より後方への転倒傾向を認め、寡動と尿失禁が出現した。74才時には体幹優位のパーキンソニズム、MMSE 14/30の認知症、失語と構成失行が認められた。頭部MRIでは大脳、小脳及び脳幹の萎縮が認められ、多系統萎縮症と臨床診断された。74才時に虚血性腸炎で死亡。全経過は約3年。

剖検所見

脳重は2症例ともに1,040 g。症例1では対称性の前頭葉萎縮を認め(Fig. 1a)、軽度の淡蒼球の萎縮と著明な黒質の脱色素を認めた(Fig. 1b, c)。症例2では脳全体に萎縮を認めたが、小脳と脳幹がより高度だった。剖面では淡蒼球、視床下核、小脳歯状核の色調変化と黒質の脱色素を認めた。組織学的には2症例で非常に類似しており、*ballooned neuron*(Fig. 2f)を伴う大脳皮質の変性と皮質下神経核、黒質の変性を認めた。症例1では頸椎の変形に伴う脊髄の圧迫を認めた。

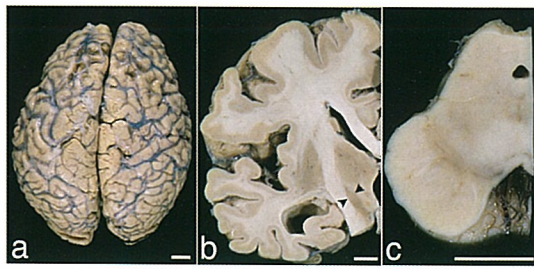


Fig. 1 Gross observation. **a, b** Mild atrophy of the frontal, temporal lobes and the globus pallidus. **c** Marked depigmentation of the substantia nigra. **a, b, c** Case 1. Bars **a-c** 1cm

両例で共通する特徴的な所見は、大脳皮質下白質に巣状に多数のタウ陽性線維状構造物を認めたことである(Fig. 2a)。タウ陽性線維状構造物は argyrophilic threads と比較すると短くて彎曲している点が形態学的に異なっていた (Fig. 2b)。タウ陽性構造物としては、大脳皮質で pretangles や coiled bodies も認めたが非常に少数だった。タウの免疫染色では 4 リピートタウ⁷⁾ にのみ染色された(Fig. 2c,g)。GFAP と AT8 を用いた二重免疫染色ではタウは astrocyte の突起の先端に蓄積していると考えられた(Fig. 2d,e)。

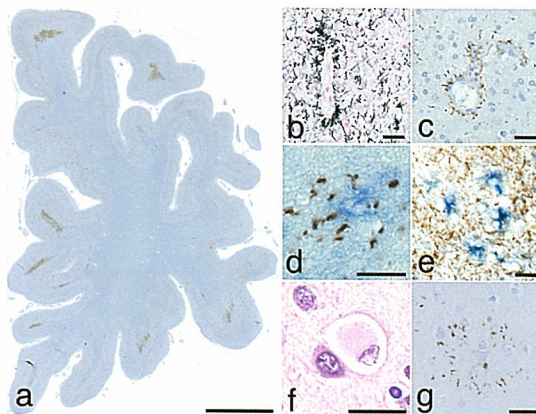


Fig. 2 Histological observation. **a** Focal, massive tau lesions in the subcortical white matter. **b, c** Argyrophilic, tau-positive fibrillary structures in the subcortical white matter. **d** A tau-positive astrocytic plaque-like lesion in the subcortical white matter. **e** Randomly arranged tau-positive structures. **f** A ballooned neuron. **g** An astrocytic plaque. **a, b, d, f, g;** Case 1; **c, e** Case 2; **a** AT8; **b** Gallyas-Braak; **c, g** RD4; **d, e** Double-labeling immunostaining with AT8 (brown) and GFAP (blue); **f** HE. Bars **a** 1cm; **b-g** 20 μm

前頭葉白質を対象として AT8 を用いた免疫電顕と Gallyas 電顕^{8,9)}を行い、タウおよび Gallyas 陽性構造物は axon とは離れた部位に存在していることが示され(Fig. 3a), oligodendrocyte へのタウ蓄積である argyrophilic threads とは異なることが示された。また、免疫電顕では 18-22 nm の直線からくびれを持つ線維にタウが陽性だった(Fig. 3b)。

症例 2 では非リン酸化タウ抗体 T46 およびリン酸化タウ抗体 PS396 を用いウエスタンブロット解析では、sarkosyl 不溶性タウの出現パターンは典型的な CBD 例のそれと一致した¹⁰⁾。また、症例 2 ではタウ遺伝子に異常はなかった。

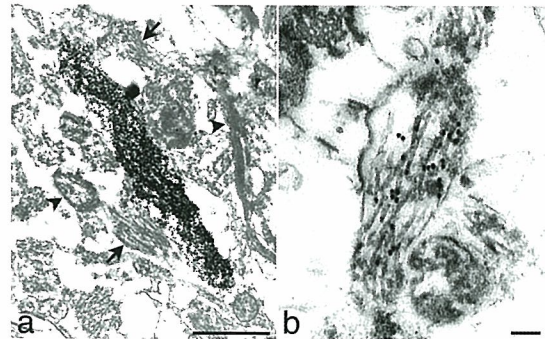


Fig. 3 Ultrastructural observation of the affected subcortical white matter. **a** Gallyas-Braak electron micrograph, showing an argyrophilic cell process. **b** AT8 immunoelectron micrograph, showing a cell processes that contains a number of tau-positive straight and twisted tubules. **a** Case 2; **b** Case 1. Bars **a** 1 μm; **b** 0.1 μm

考察

2 症例ともに進行性の認知症を指摘されていたが、明らかな大脳皮質症状や左右差を伴う大脳の萎縮がなかったことから、臨床的に CBD とは診断されておらず、認知症を伴う筋萎縮性硬化症や多系統萎縮症と臨床診断されていた。しかし、神経病理学的には筋萎縮性硬化症や多系統萎縮症を示す所見は認められず、2 症例ともに大脳皮質と皮質下神経核、黒質の変性が認められたこと、大脳皮質で ballooned neurons が認められたこと、神経細胞とグリア両者へのタウの蓄積、特に astrocytic plaque が多数認められたことから CBD と診断した^{3,11)}。また、症例 2 では不溶性タウの生化学的な分析も典型的 CBD と同一パターンであった。

これら 2 症例における最も特徴的な所見は皮質下白質でのタウの巣状で大量の蓄積であり、これらの所見は CBD として非常に非定型的であった。CBD における argyrophilic threads ではタウは oligodendrocyte 内に蓄積していることが報告されているが^{8,9)}、我々の 2 症例では、皮質下白質に認められたタウ陽性線維状構造物において、タウは二重免疫染色やガリアス電顕、免疫電顕の結果から、astrocyte の突起内に蓄積していると考えられた。しかも、2 症例ではともに pretangles や coiled bodies は比較的少数しか認められず、astrocyte 優位にタウが蓄積している症例の可能性が考えられた。2 症例はともに CBD として非常に非定型的な臨床像を呈しており、これらはこのような astrocyte に大量のタウが蓄積したという、定型的な CBD とは異なったタウ蓄積のパターンを呈したことと大きく関連していると考えられた。

結論

我々は神経病理学的に CBD と診断した非定型的な弧発性タウオパチーの 2 症例を報告した。タウは皮質下 astrocyte 優位に蓄積して

いると考えられ、非定型的な臨床経過に関与していると考えられた。今後は類似例の蓄積により、タウの蓄積と臨床症状や神経病理学的な所見の関連を明らかにすることが必要と考えられる。

文献

- 1) Mahapatra RK et al.: Lancet Neurol 3: 736-743, 2004
- 2) Dickson D et al.: ISN Neuropath Press, Basel, pp 115-123, 2003
- 3) Wakabayashi K et al.: Neuropathology 24: 79-86, 2004
- 4) Komori T et al.: Acta Neuropathol 96:401-408,1998
- 5) Sakai K et al.: Acta Neuropathol 112:341-348,2006
- 6) Ohara S et al.: Neurosci Lett 330: 84-88, 2002
- 7) De Silva R et al.:Neuropathol Appl Neurobiol 29:288-302,2003
- 8) Ikeda K et al.: Neurosci Lett 174:157-159,1994
- 9) Arima K et al.: Neuropathology 16:65-70,1996
- 10) Arai T et al.: Ann Neurol 55:72-79,2004
- 11) Dickson D et al.: J Neuropathol Exp Neurol 61:935-946,2002

ハンチントン病患者と家族からみた医療の課題

報告者氏名 長谷川 一子¹⁾

報告者氏名 武藤 香織²⁾

報告者氏名 中井 伴子³⁾

¹⁾ 国立病院機構相模原病院 ²⁾ 信州大学・東京大学 ³⁾ 日本ハンチントン病ネットワーク

研究要旨

【目的・方法】ハンチントン病（HD）の診療は、患者のみならず家族も包括的にケアの対象にする必要がある。本研究では、当事者が療養生活で支援を要する点を明確にするために、日本ハンチントン病ネットワーク（JHDN）への相談内容分析、JHDN 会員への自記式調査紙調査を実施した。【結果・考察】本人の症状や問題行動が進行しつつも通院拒否が続く人を抱える家族への支援、患者自身のアイデンティティの変化に対する支援が最も急務であることが明らかになった。その他、遺伝カウンセリングへのアクセスの確保、確定診断を受けてから期間の短い家族への支援、介護生活が長期化する介護者への健康に対する支援が挙げられた。時間の流れに応じて問題の所在が変化するため、重要な局面に差し掛かる前後のケアを手厚くする必要がある。【結論】今後、今回の知見をもとに HD のケアマネジメントを向上させるような診療ガイドライン策定を目指したい。

A. 研究目的

ハンチントン病（HD）は、常染色体優性遺伝の神経変性疾患である。遺伝性であり、かつ多くは晩発性であるため、患者本人のみならず、発病リスクを抱えた人やそのきょうだい、子どもなど、家族全体の包括的なケアを要する疾患である。英国や米国、カナダ、オーストラリアなどでは、長期的に複数の多世代を支援するための包括的な取り組みが進んでいるが、わが国ではまだ患者本人の状況を臨床個人質問紙によって把握する試みが始められたばかりである（長谷川一子他 第 47 回日本神経学会総会にて報告済み）。

そこで、HD の包括的なケアの指針を策定することを目的として、臨床個人質問紙による調査と並行しながら、当事者が療養生活で支援を要する点を明確にするための調査を実施した。

B. 研究方法

いくつかの視点から問題を絞り込むために、複数の手法とデータを用いて検討することとした（トライアングレーション）。

1. 当事者団体である日本ハンチントン病ネットワーク（JHDN）に寄せられる相談内容の分析
2. JHDN の会員に対する匿名の自記式質問紙調査

これらのデータを立場ごとに全て逐語化し、KJ 法に則って時間軸に沿ったグループわけを行った。最終的には、場面ごと（告知、受診まで、受診後、遺伝子診断など）の事例としてまとめ分析した。

（倫理面への配慮）すべての調査は本研究の目的を説明し、アンケート調査は匿名でおこなって回答をもって同意とみなした。相談内容は、患者数が少ないことから、より個人が特定されないように年齢などの詳細を省いて提示している。

C. 研究結果

（1）JHDN への相談内容分析

2005 年 4 月から翌年 3 月までの間に、当事者からは 15 件のメール相談が寄せられている（他にケア提供職種から 5 件）。1 回から数回のや