

ALS ラットモデル脊髄における軸索再生阻害因子の発現変動

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

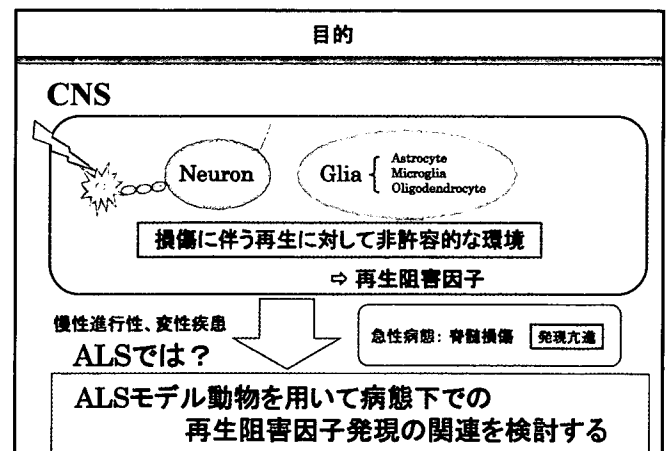
筋萎縮性側索硬化症（ALS）における神経再生療法開発を念頭に、細胞外基質の主要構成成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）の発現を ALS ラットモデルで検討した。コントロールに比し ALS ラットモデル脊髄では、病変の主座である前角とその周囲白質を中心に CSPG が発症前から有意に沈着亢進していた。CSPG の分子種によって発現変動には相違がみられた中で neurocan は進行性かつ著しい発現亢進を示し、成体脊髄では通常検出し得ない全長型アイソフォーム発現も確認された。また、多重免疫組織化学では反応性アストロサイトと CSPG の一部共局在が認められ、その関与が示唆された。CSPG は軸索再生や細胞遊走を阻害する活性が知られており、本病態における変性運動ニューロンをとりまく細胞外微小環境は神経再生に対して非許容的な可能性が示唆される。

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死から全身的な筋萎縮および筋力低下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、変異 Cu/Zn SOD-トランスジェニック動物が開発されるやいなや ALS 研究は大きな進展を遂げ、なかでも変性する運動ニューロンのみならず、グリア細胞や運動ニューロンをとりまく細胞外微小環境の異常が明らかになりつつある。また ALS 治療法の候補として神経再生療法が注目されるようになってきたが¹⁾、病変の主座である脊髄は損傷に伴う神経再生に対してもともと非許容的な環境であるといわれる。その原因として細胞外基質に存在する再生阻害因子が知られており、脊髄損傷などの急性病態モデルではその発現が亢進することが明らかにされている²⁾。しかし、ALS のような緩徐進行性の神経変性病態下での再生阻害因子発現は十分明らかにな

っていない。

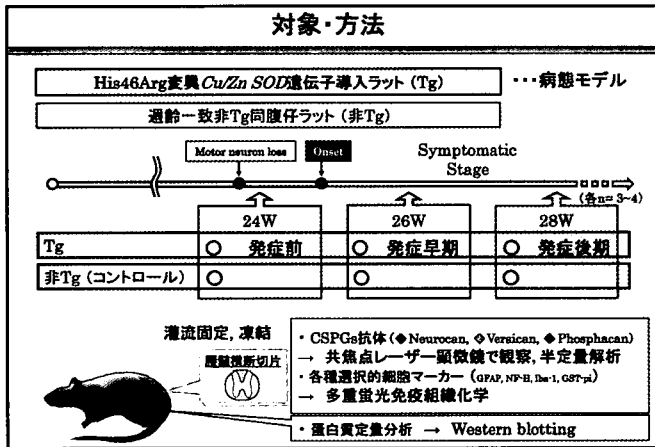
本研究では神経再生療法開発を念頭に、細胞外基質の主要構成成分であり軸索再生阻害活性や細胞遊走阻害活性をもつコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）の発現が、選択的運動ニューロン変性にともなるとどのように変化するかを解析し、病態進行との関連を検討した。



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³⁾を対象とし、週齢一致正常同腹仔ラット (非 Tg 正常ラット) をコントロールとして用いた。一側の後肢に筋力低下が明らかになった時点を発症とし、発症前 (24 週齢)、発症早期 26 週齢)、発症後期 (28 週齢) の各病期において腰髄灌流固定凍結切片を作成、中枢神経系の主要 CSPG である neurocan、versican、phosphacan の発現を蛍光免疫組織化学的に検出、共焦点レーザー顕微鏡下に半定量的解析を行った (各群 n=3~4)。また、各種細胞選択的マーカーとの多重染色を行い細胞種と CSPG の関連を検討した。さらに、免疫ブロッティング法による定量的解析も行った (各群 n=3)。

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

非 Tg 正常ラットに比し Tg ラットの主病変部位 (前角とその周囲白質) では、いずれの CSPG についても有意な沈着亢進が明らかとなったが、分子種ごとに異なる変動が認められた。なかでも neurocan は発症前から進行性かつ顕著な沈着を示し、本病態とのより強い関連が示唆された。一方で versican も neurocan 同様に

発症早期より有意な沈着亢進をみせたが、そのピークは発症早期にあって発症後期ではやや沈着の程度を減じていた。さらに、phosphacan は発症早期に沈着亢進を示した (図 1, 2)。免疫ブロッティングでは、発症後期 Tg ラットに発現する neurocan が成体脊髄では生理的にほとんど検出されない全長型アイソフォームを含むことが示された (図 3)。また、細胞選択的マーカーとの二重蛍光染色組織により neurocan、phosphacan と反応性アストロサイトとの共局在が Tg ラット前角に認められ (data not shown)、同細胞の CSPG 沈着亢進への関与が示唆された。

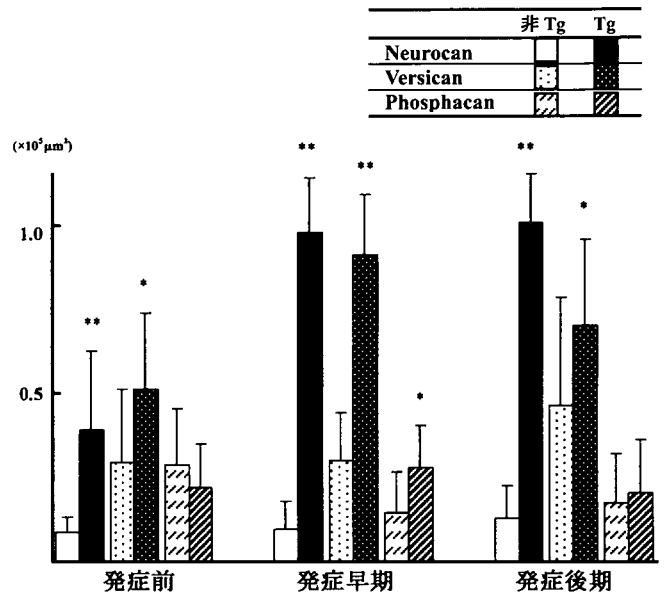


図 1. 各 CSPG の免疫反応陽性面積 (前角)

Tg は neurocan の発現が発症前から顕著に亢進し、進行性であった。他 CSPG でも発症早期において亢進していた。
(One way ANOVA, Tukey-Kramer post hoc test, *p < 0.05; **p < 0.01)

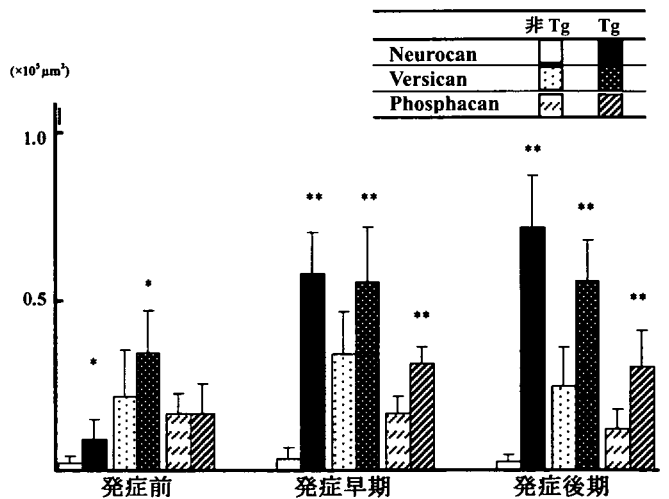


図 2. 各 CSPG の免疫反応陽性面積 (前索)

Tg はいずれの CSPG 発現も発症前期で亢進し、進行性であった。
(One way ANOVA, Tukey-Kramer post hoc test, *p < 0.05; **p < 0.01)

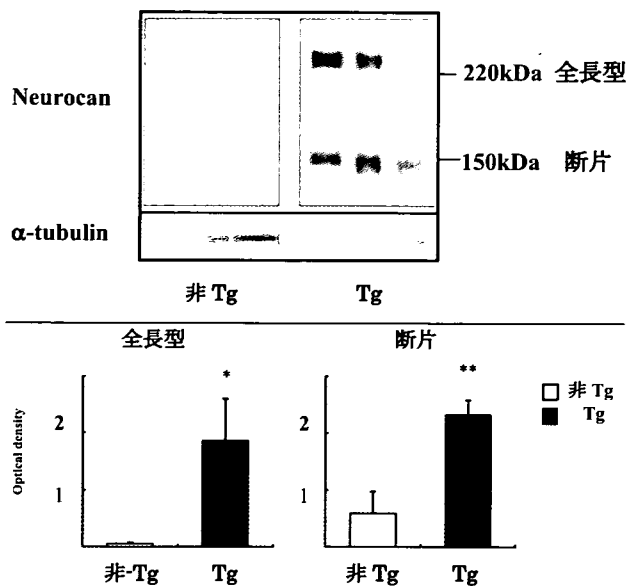


図 3. Neurocan の免疫プロットング (上段) およびその定量化 (下段)

Tg では成体脊髄で生理的にほとんど検出されない全長型アイソフォームが認められた。(Student's t-test, *p < 0.05; **p < 0.01)

考察

選択的かつ進行性の運動ニューロン変性を示す ALS ラットモデルにおいて、CSPG が病変の主座である脊髄前角とその周囲白質で発症前から有意に沈着亢進していることが初めて明らかとなり、病態進行との強い関連が示唆された。なかでも ALS ラットモデルにおける neurocan の著しい沈着亢進と、通常は発生期にみられる全長型 neurocan アイソフォームの発現、そして反応性アストロサイトの CSPG 沈着への関与は重要な知見と考えられる。

成体中枢神経における CSPG は細胞外基質の構成成分としてシグナル伝達やシナプス可塑性への関与が生理的な役割として想定されている。また病変形成時にはグリア細胞増生とともに、病変拡大抑制や神経炎症を最小限に抑止するといった、神経保護的な役割も議論されている⁴⁾。したがって、本モデル病態においても CSPG 沈着亢進が少なくとも病初期においては神経保護的にはたらいている可能性がある。

その一方で神経再生という観点からは、今回明ら

かとなったような過度の CSPG 沈着亢進が反応性アストロサイト増生とともに軸索再生や細胞遊走を阻害する細胞外微小環境を形成していると考えられる。したがって、ALS において神経再生療法を開発する場合には細胞外微小環境の変化を十分考慮し、細胞補充と同時に細胞外微小環境を神経再生に対して許容的なものへと変化させる戦略が重要であると考えられる。今後 CSPG 沈着亢進機構の解明、さらには CSPG 分解や発現抑制をもたらす介入研究によって、変性脊髄における細胞外微小環境を標的とした新しい治療法開発に寄与することが期待される。

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.
4. Rhodes K.E., et al.: *J Anat.*, 33-48, 2004.

ALS における G-CSF の発現と治療へのアプローチ

報告者氏名：田中正人¹⁾，菊池仁志¹⁾，山崎亮¹⁾，立石貴久¹⁾，吉良潤一¹⁾

所属：¹⁾九州大学大学院医学研究院神経内科

研究趣旨

我々は、これまでにALS患者髄液において顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が有意に増加していること、培養細胞を用いた実験から G-CSF は神経細胞保護効果を有することを報告した。今回、ALS モデルマウスに対してG-CSFを皮下投与し、その治療効果を検討した。G-CSF 投与により有意に延命効果を認め、生化学的評価から、G-CSF 投与群での有意な bcl-2 蛋白の発現亢進を認めた。G-CSF 投与によって、bcl-2 蛋白の発現亢進などの抗アポトーシス効果誘導が、G-CSF による延命効果機序の一つとして考えられた。ただし、G-CSF の全身投与による肝・脾腫などの副作用の軽減が、臨床応用のためには必要と考えられた。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)を代表とする運動ニューロン疾患(MND)は現段階で有効な治療法に乏しい。MND は原因不明であるが、病因仮説の一つとして、免疫・炎症機転の関与が挙げられている。我々のグループでは、ALS 患者群では非炎症性神経疾患患者群に比べ、髄液中の顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が有意に上昇していることを見出した。さらに、運動ニューロン培養細胞系(NSC34細胞)を用いた実験より、G-CSF は、神経細胞障害ストレスに対し防御的な作用があることを証明してきた。ALS 患者髄液でのG-CSFの上昇は、生体内での運動ニューロン変性に対する防御反応の一つと考えられる。そして、G-CSF が ALS に対する治療薬の一つとなる可能性が期待される。そこで、本研究では、ALS モデルマウスに対しG-CSFを皮下投与し、その神経保護効果を解析した。

B.研究方法

①ALSのモデルマウスである変異SOD1^{G93A}遺伝子導入マウスを用い、これに対し、ヒトG-CSF(100μg/kg)を、対照群として生理食塩水を、生後10週目より死亡するまで5日連日皮下投与(2日休薬)し、両群

で生存期間を比較した。

②両群より、各臨床ステージにおけるマウスのL5前根を摘出し、2%osmium溶液で固定・Epon包埋した後、トルイジンブルー染色し、L5前根の正常大径有髄線維数を両群で比較した。

③同様に、両群から、脊髄の可溶性タンパク分画を抽出した後にウェスタンブロットを行い、bcl-2蛋白発現量を比較した。

動物実験に関しては、九州大学医学研究院動物実験委員会の承認を得て、適切な方法で操作・解剖を行った。

C.研究結果

①臨床評価：G-CSF投与群では平均141.3日±7.1日と、生理食塩水投与群133.7±8.1日に対し、生存期間の延長を認めた。(p<0.05)(図1)

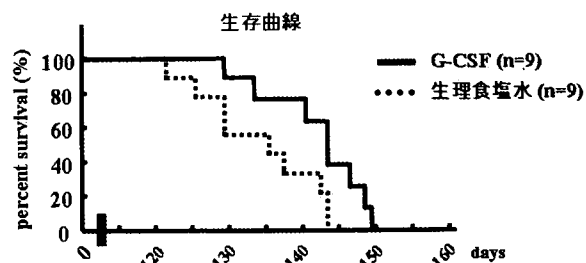


図1 変異SOD1^{G93A}遺伝子導入マウスの生存曲線
G-CSF投与群で有意に生存期間の延長を認めた(p<0.05)

②病理学的評価：無症状期でも少数の神経線維の変性を認めるが、両群で有意差はなかった。両群で継続的に正常大径有髄数の減少を認めた。しかし、麻痺症状出現早期では、両群でさらに線維数の減少を認めたが、G-CSF 投与群で有意に残存数が多かった。(p<0.05) (図2)

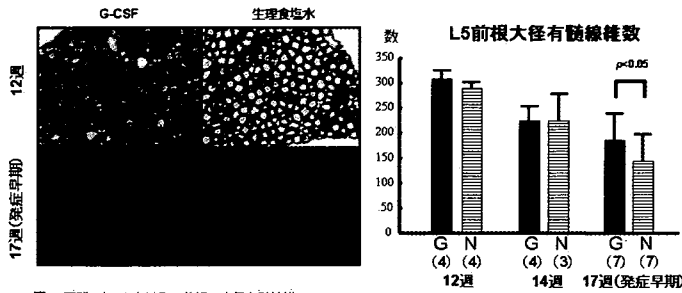


図2 両群マウスにおけるL5前根の大径有髄線維
両群で12週より正常大径有髄線維の減少が認められるが、17週(発症早期)の時点では、G-CSF 投与群で残存する正常大径有髄線維数が多い。(p<0.05)
G: G-CSF投与群、N: 生理食塩水投与群

③生化学的評価：脊髄より抽出した bcl-2 蛋白発現量は、麻痺症状出現早期、死亡期いずれにおいても G-CSF 投与群で高かった。死亡期では有意に高値であった。(p<0.05) (図3)

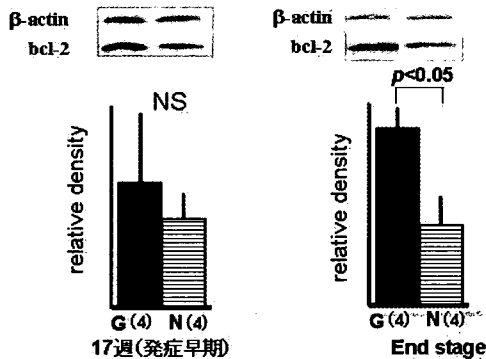


図3 両群マウスの脊髄におけるbcl-2タンパクの発現
G-CSF群でbcl-2タンパクの発現亢進を認め、特にEnd stageでは、有意に高値であった。(p<0.05) G: G-CSF投与群、N: 生理食塩水投与群

④G-CSFの細胞新生効果: G-CSF 投与群のマウスでは、一部において、新生神経細胞のマーカーである nestin 陽性細胞の増加を認めた。(図4)



図4 nestin染色
G-CSF投与マウスの一部では、新生細胞のマーカーであるnestin陽性細胞が増加している。

⑤副作用: G-CSF 投与群のマウスでは、G-CSF 投与が原因

と考えられる死亡例はなかった。しかし、G-CSF 投与マウスの全例において、肝脾腫を認めた。(図5)

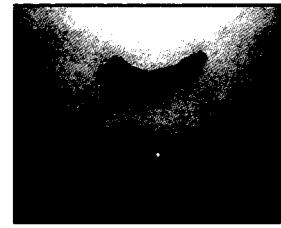


図5 G-CSF皮下投与による腫腫
G-CSF皮下投与マウスでは(図上段)、脾臓の腫大を認めた。

D. 考察

我々の G-CSF 皮下投与実験で、変異 SOD1^{G93A} 遺伝子導入マウスでは、無症状時期である生後 12 から 14 週の時点で、大径有髄線維数の減少が始まっていることが示された。そして、G-CSF 投与により、その減少速度が抑制されていることが示唆された。つまり、変異 SOD1^{G93A} 遺伝子導入マウスでは、おそらく多因子によって、早期より神経細胞死の誘導が開始されており、G-CSF はその進行を抑制していることが考えられる。そして、その作用機序の一つとして、抗アポトーシス因子である bcl-2 蛋白の発現亢進が関与していることが考えられた。

G-CSF には、抗アポトーシス効果¹⁾、抗炎症効果²⁾、血管新生効果³⁾ などがあると報告されている。これまでの我々の実験結果では、G-CSF は変異 SOD1^{G93A} 遺伝子導入マウスに対して、bcl-2 発現亢進を介した抗アポトーシス効果を有することが示唆された。bcl-2 と変異 SOD1^{G93A} 遺伝子を導入したマウスの報告⁴⁾ では、変異 SOD1^{G93A} 遺伝子導入マウスの麻痺発症と死亡時期を延長させている。さらに、近年、変異 SOD1 は bcl-2 蛋白と結合し、その抗アポトーシス作用を働かなくすると報告されており⁵⁾、bcl-2 蛋白の発現亢進は非常に重要な役割をはたすと考えられる。

しかし、G-CSF を全身投与(皮下注射)することによる副作用が、臨床応用する場合には問題となる。G-CSF 製剤は、腫瘍疾患の抗がん剤治療の白血球減少に対する短期間使用での安全性は確立されているものの、長期間投与に関する安全性は確立されていない。上述の結果では、G-CSF 投与マウスでは、G-CSF 投与が原因となる死亡や、白血病化したマウスはなかったが、全例で肝・脾腫を認めた。そのため、投与方法を改善し、

中枢神経系への局所投与が、安全性、有効性を高めるためには必要と考えられた。

E. 結論

G-CSF は ALS のモデルマウスである変異 SOD1^{G93A} 遺伝子導入マウスの生存期間を有意に延長させることがわかった。さらにその機序としては、抗アポトーシス因子である bcl-2 蛋白の上昇が関与していることがわかった。今回使用した G-CSF は、ALS 患者髄液中で実際に上昇しているものであり、それを治療法として用いたことは、非常に有用であると考えられる。また、G-CSF 製剤の短期皮下投与に関しては、すでに安全に使用されている。しかし、ALS に対して用いた場合の長期投与による副作用の問題点を改善できれば ALS の有用な治療法の一つとなる可能性がある。

F. 文献

1. Harada M et al, Nat Med. 11:305-11, 2005
2. Zavala F et al, J Immunol.168:2011-9, 2002
3. Ohki Y et al, FASEB.19:2005-7, 2005
4. Kostic V et al, 277:559-62, 1997
5. Pasinelli P et al, Neuron 43:19-30, 2005

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka M et al, J Neuropathol Exp Neurol. 65(8):816-25, 2006

2. 学会発表

Tanaka M et al, 国際 ALS/MND 会議. 2006, 横浜

I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

G-CSF による変異 SOD1-Tg マウス単球系細胞機能回復と 神経細胞死の関与

班員：吉良 潤一

研究協力者：山崎 亮、田中 正人、立石 貴久、菊池 仁志、大八木保政

所属：九州大学大学院医学研究院神経内科

研究要旨

我々はこれまで、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、また変異 SOD1(G93A)トランスジェニック(mSOD1-Tg)マウスの神経細胞脆弱性とミクログリアの機能低下、および G-CSF によるミクログリアの機能回復を見いだした。今回は G-CSF のミクログリアを介した神経細胞保護機序を検討した。免疫組織学的検討では神経細胞障害急性期におけるミクログリアの GDNF 発現を介した神経細胞保護作用を見だし、mSOD1-Tg マウス由来の初代培養ミクログリアを用いた実験では、mSOD1-Tg マウスミクログリアの機能低下と G-CSF 投与による機能回復を認めた。これらの結果より、G-CSF の神経細胞保護作用は、抗アポトーシス作用に加え、ミクログリアの機能回復を介した間接的な経路の関与が考えられた。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患では、従来からミクログリアが神経障害性に働くと考えられている。しかし近年の報告ではミクログリアの神経保護作用も指摘され(Beers et al, 2006)、本邦でも中枢神経におけるミクログリアの機能解析が行われつつある。

我々はこれまで、変異 SOD1(G93A)トランスジェニックマウス(以後 mSOD1-Tg マウス)の舌下神経切断モデルにおける神経細胞脆弱性を確認した。また我々は mSOD1-Tg マウス神経細胞周囲を取り囲むミクログリアの反応性低下に着目し、mSOD1-Tg マウスミクログリアの機能低下を見いだした。さらに、G-CSF 皮下投与による神経細胞保護に成功した

が、その機序は従来から指摘されている抗アポトーシス作用(Tanaka, 2006)の他にミクログリアを介した間接的な作用が関与している可能性が考えられた。今回我々は、ミクログリアの神経細胞保護作用および G-CSF のミクログリアに与える影響を検討した。

方法

① 生後 12 週 of mSOD1-Tg マウス、および同腹仔の非トランスジェニックマウス(以下 NTG マウス)の左舌下神経を切断し、以後の組織学的変化を経時的に観察した。すなわち切断 5 日後、10 日後、20 日後および 40 日後の舌下神経核を Nissle 染色や免疫染色により観察した。また、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、適当な時期に還流固定し G-CSF の神経保護作用を免疫組織学的に検討した。

② 生後 5 日の mSOD1-Tg マウスおよび同腹仔の NTG マウス初代培養ミクログリアをインベージョンチャンバーに播種(1×10⁵/well)、22 時間後にチャンバー下面に遊走してきた細胞数を比較した。化学誘因物質には MCP-1 (50 ng/ml)および ATP (100 μg/ml)を用いた。さらにこの系に G-CSF(2 μg/ml)を投与し、遊走能の変化を観察した。さらに初代培養ミクログリア/腹腔マクロファージの機能解析を、ウエスタンブロット等の手法を用いて行った。

結果

① マウスの舌下神経切断後、切断側舌下神経核の神経細胞数を非切断側と比較したところ、脱落の程度は mSOD1-Tg マウスでより顕著であった。また、G-CSF 投与群では、NTG マウス、mSOD1-Tg マウスともに 40 日後の神経細胞死を抑制した(Fig.1)。

切断 5 日後の舌下神経核ではミクログリアによる神経細胞の取り囲み反応が見られるが、これらのミクログリアは免疫染色にて GDNF と一致した

(Fig.2)。このミクログリアによる GDNF 発現は、初代培養ミクログリアを用いたウエスタンブロットでも確認された。

② インベージョンチャンバーを用いた実験では、NTG と比較し mSOD1-Tg マウス由来の初代培養ミクログリアおよびマクロファージの遊走能低下が見られた。この遊走能の低下は、G-CSF 投与により著

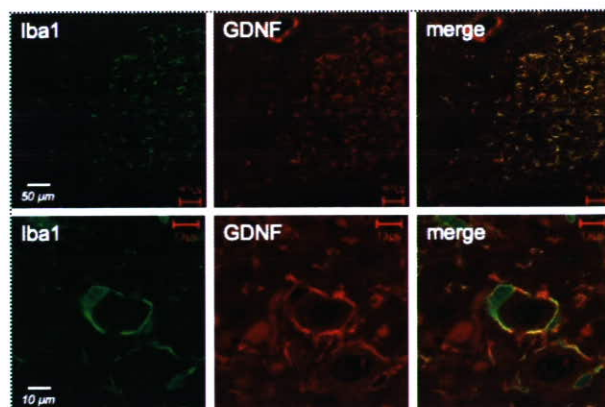


Fig.2 ミクログリアのGDNF発現

明に改善した(Fig.3)。マウス腹腔マクロファージのウエスタンブロットでは、細胞の遊走に必要な MMP-9 の mSOD1-Tg 由来細胞における活性低下、発現低下を認め、さらに p-p38MAPK、p-NF-κB p65 の発現低下を認めた。MMP-9 の mSOD1-Tg における発現低下は初代培養ミクログリアにおいても見られた。

初代培養ミクログリアに G-CSF を投与すると、ウエスタンブロットにて野生型では GDNF の発現亢進傾向を認めたが mSOD1-Tg マウスでは明らかな変化を認めなかった。

考察

今回の結果より、①障害神経細胞を取り囲むミクログリアは神経保護的に作用しており、② mSOD1-Tg マウスではその神経保護作用が低下している、③G-CSF はミクログリアの機能回復を介して間接的に神経保護作用を発現している可能性が示唆された(Fig.4)。

軸索切断モデルにおけるミクログリアの神経保護作用は、シナプスのストリッピング、

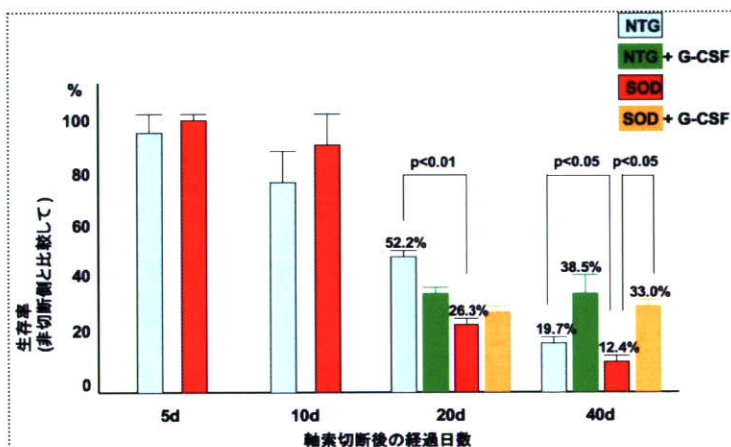


Fig.1 舌下神経細胞脱落の経時的変化

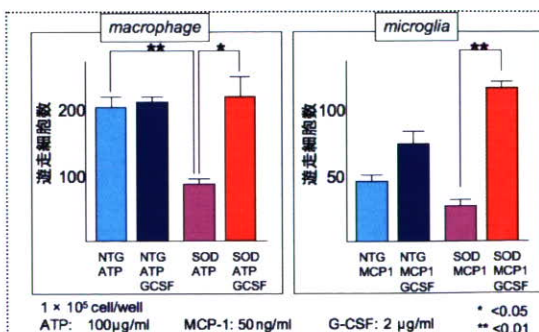
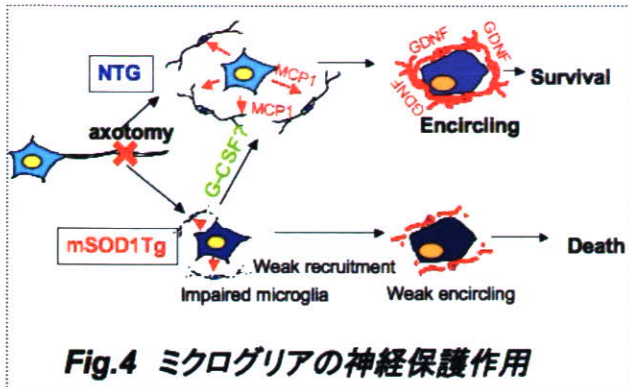


Fig.3 mSOD1 マウス単球系細胞の浸潤能低下と G-CSF による回復



GLT-1 を介したグルタミン酸除去、BDNF を介した作用などが報告されている。これらの神経保護作用の発現にもミクログリアの活性化が必要であるが、活性化経路の違いにより神経保護的活性化状態、神経保護／神経障害的活性化状態の二つがあると考えられている(中島ら、2003)。本モデルでは、障害ニューロンを取り囲むミクログリアにおける GDNF 発現を認め、培養系でも同様の所見を得た。GDNF は TGF β スーパーファミリーに属し、あらゆる有核細胞において発現が見られる。神経細胞に対しては特に強力な神経栄養因子として働くことが知られている(Li, 2007)。GDNF の発現誘導には NF- κ B よりも JNK-MAPK 経路が関与するという報告もある(T Tanaka, 2007)。今回の実験では mSOD1-Tg マウスにおいて NF- κ B とともに p38MAPK の活性低下が見られたため、単球系細胞機能の全体的な低下に伴う GDNF 発現低下を考えている。mSOD1-Tg マウスにおける GDNF 発現状態の解析は今後の課題である。

mSOD1-Tg マウスではミクログリアの神経細胞取り囲み反応の低下を認めたが、この現象と神経細胞の脆弱性との関連性は明らかでない。しかし G-CSF による神経細胞脱落抑制とミクログリアの神経細胞取り囲み反応回復、遊走能回復、GDNF 発現促進を考慮すると、G-CSF の作用はニューロンのみならずミクログリアにも及んでいると考えられる。今後は G-CSF のミクログリアを介した神経保護機能の解明を行うとともに、実際の患者血液中の単球系細胞を分離し、機能低下の有無を検討していき

いと考えている。

結論

mSOD1-Tg マウスの神経細胞脆弱性にはミクログリアの機能低下が関与している可能性がある。G-CSF は神経細胞のみならずミクログリアの機能を回復させ、相乗的に神経細胞保護作用を発揮している可能性が示唆された。

文献

1. Tanaka et al. J Neuropathol Exp Neurol, 2006
2. 中島和之, 高坂新一. 脳 21, 2003
3. T Tanaka et al. Neuroscience letters, 2007
4. Li et al. Experimental Neurology, 2007
5. Beers et al, PNAS 2006

健康危険情報

特記事項なし

学会発表

第 19 回日本神経免疫学会総会 (金沢)

変異 SOD1-Tg マウスにおける神経細胞の脆弱性と単球系細胞機能障害

第 48 回日本神経学会総会 (名古屋)

筋萎縮性側索硬化症(ALS)における単球系細胞の組織浸潤能低下

第 12 回グリア研究会 (名古屋)

変異 SOD1-Tg マウスにおける単球系細胞機能障害

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 |

RNA 編集異常と孤発性 ALS モデルマウスの開発

郭 伸¹⁾

日出山 拓人¹⁾, 山下 雄也¹⁾, 辻 省次¹⁾, 高橋 良輔²⁾,
三澤 日出巳³⁾, 鈴木 岳之⁴⁾,

1) 東京大学 神経内科, 2) 京都大学 神経内科,

3) 共立薬科大学 薬理学, 4) 共立薬科大学 基礎生物学

研究要旨

我々はグルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 受容体サブユニット 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。この 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、孤発性 ALS では、ADAR2 活性低下により GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が低下することで神経細胞死が生じる、という仮説を立てた。この仮説を証明するために、Cre-loxP システムを利用した ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、ADAR2 活性のない運動ニューロンが緩徐進行性の細胞死を引き起こすことを明らかにした。このマウスは、進行性の運動ニューロン死を伴う運動機能低下を示し、生存期間も正常対照マウスより短く、孤発性 ALS の病因を模したモデル動物として有用なツールとなることが期待できる。

A. 研究目的

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 Ca²⁺ 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こと (3)、昨年度報告したように孤発性 ALS と診断された四肢型、球麻痺型、ALS-D, basophilic inclusion body が出現する若年発症例のいずれにおいても共通して認められた分子変化であることから、孤発性 ALS に疾患特異的な神経細胞死関連分子変化であると考えられる。そして、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。Higuchi らの全身的 ADAR2 ノックアウトマウスは、GluR2 Q/R 部位の編集が 10% に低下し、痙攣重積で幼弱死する (4) ため、ADAR2 活性低下が神経細胞死を引き起こすかどうかは明らかではない。そこで非特異的痙攣死を避けるために、ADAR2 を背随運動ニューロン選択的にノックアウトする変異マウスを作製し、ADAR2 活性を落とすことにより GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が低下し、孤発性 ALS に見られる緩徐進行性運動ニューロン死が生じるかどうかを検討した。

B. 研究方法

脊髄運動ニューロンをコンディショナルにノックアウトするため、Cre/LoxP 系により ADAR2 活性基

を2個のLoxPで挟んだ変異マウス (ADAR2^{Flox/Flox}) を作成し、運動ニューロン選択的に小胞性アセチルコリントランスポーターのプロモータにより Cre recombinase を発現する2系統の変異マウス (VChT-Cre.Fast および-Cre.Slow) (5) との交配により、ADAR2^{Flox/Flox}/VChT-Cre.Fast と-Cre.Slow を作製した。本研究ではADAR2^{Flox/Flox}/VChT-Cre.Fast (以下, Fast系, n=25), ADAR2^{Flox/Flox}/VChT-Cre.Slow (以下, Slow系, n=33) を用いた。対照として、VChT-Cre およびADAR2^{Flox/Flox} マウス (各 n=10) を野生型マウスとともに用いた。

ADAR2 遺伝子の発現の有無を in situ hybridization 法, PCR 法を用いて検討し、運動機能をロータロッド (10rpm), 上肢牽引力により判定した。抗リン酸化ニューロフィラメント抗体 (SMI32), 抗ADAR2抗体を用いた免疫組織化学により運動ニューロン数の経時的変化を計測した。対照として、VChT-Cre およびADAR2^{Flox/Flox} マウスを用いた。

実験方法については東京大学医学部研究倫理委員会の承認を得、動物実験倫理規範に基づいて行った。

C. 研究結果

約1/3の運動ニューロンでは、ADAR2 遺伝子に Cre 発現依存性に組み替えが起こり、不完全朝ADAR2 mRNA を発現していることをISH, PCR 法にて確認した。これらの運動ニューロンではADAR2 タンパクが発現していないことを免疫組織化学で確認し、更にGluR2 Q/R 部位のRNA編集が全く起こらず、未編集型のGluR2 mRNA のみが発現していた。上記により、このコンディショナルノックアウトマウスでは、予想通り Cre 依存性にADAR2 遺伝子のノックアウトが起こりGluR2 Q/R 部位のRNA編集が欠如することを確認した。

ロータロッドは、コントロール群は1年以上180秒可能であったが、Fast系は5週目から、Slow系は8週目から低下が認められ、週齢と共に低下していった。上肢握力は、Fast系は10週目から、Slow系は28週目から進行性の低下が認められた。上肢の牽引

力喪同様の時間経過で低下した。このように緩徐進行性に運動機能の低下が認められ、生存期間もコントロール群に比べ有意に短縮し (median survival \pm SEM: 81.5 \pm 16.4 weeks versus control mice 105.1 \pm 13.5 weeks; P=0.0262, Log-rank analysis) した。SMI32 陽性前角細胞のうち、ADAR2 抗体陽性細胞のみが、2か月以降12か月にかけて緩徐に減少した。このノックアウトマウスは、進行性の運動ニューロン死を伴う運動機能低下を示し、原因はADAR2 活性低下によるGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常であると考えられる。このように Cre-loxP システムを利用したコンディショナルノックアウトマウスにより、ADAR2 活性低下が緩徐進行性の運動ニューロン死を引き起こすことを初めて示した。経過中、痙攣や感覚障害、知的機能低下、膀胱直腸障害は示さず、緩徐進行性の経過はALSの臨床経過に酷似する。

D. 考察

これらのノックアウトマウスは、緩徐進行性に運動機能の低下が認められ、生存期間もコントロール群に比べ有意に短縮し、運動ニューロン変性及びニューロン数の減少が緩徐進行性に認められた。つまり、このノックアウトマウスは、進行性の運動ニューロン死を伴う運動機能低下を示し、原因はADAR2 活性低下によるGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常であると考えられる。したがって、孤発性ALS運動ニューロンに生じているGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常は神経細胞死の直接原因であり、この分子異常はADAR2 活性の低下によると考えられる。

E. 結論

緩徐進行性の運動ニューロン死を引き起こすADAR2 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、GluR2 Q/R 部位のRNA編集異常が孤発性ALSにおける運動ニューロン死の直接原因であることを示した。このコンディショナルノックアウトマウスは孤発性ALSのモデル動物として、今後の病因解明、治療薬開発研究に供することができる。

F. 文献

1. Kawahara Y, et al. : Nature 427: 801. 2004
2. Kawahara Y, et al. : Neurosci Res 54: 11-14. 2005
3. Kwak S, Weiss JH. : Curr Opin Neurobiol. 16: 281-7. 2006
4. Higuchi, M. et al. : Nature 406, 78-81, 2000
5. Misawa, H. et al. : Genesis 37, 44-50, 2003

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

山下雄也, 郭 伸 : グルタミン酸受容体と神経細胞死, 神経変性疾患のサイエンス, 高橋良輔編, 南山堂, 91-102, 2007

日出山拓人, 郭 伸 : 孤発性 ALS の病因, 難病と在宅ケア 2007年6月号, 7-10, 2007

日出山拓人, 郭 伸 : 孤発性 ALS と興奮性アミノ酸, Clinical Neuroscience 26 巻 3 号, 印刷中

日出山拓人, 郭 伸 : 筋萎縮性側索硬化症の AMPA 受容体仮説, Annual Review 2008 神経, 印刷中

2. 学会発表

日出山拓人ら, 第 48 回神経学会総会, 2007 年 5 月 16 日, 名古屋

日出山 拓人ら, 神経科学大会 (Neuro2007), 横浜, 2007年9月10日

Hideyama T, et al, 18th ALS/MND International Symposium, Toronto, 2007 年 12 月 2 日

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

変異遺伝子特異的な RNA 干渉法の in vivo への応用

水澤英洋¹⁾，久保寺隆行¹⁾，山田宏美¹⁾，横田隆徳¹⁾，安斎政幸²⁾，三谷匡²⁾

1) 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

2) 近畿大学 先端技術研究所

研究要旨

遺伝性疾患，ウイルス性疾患においてその変異遺伝子，病原遺伝子自体を small interfering RNA (siRNA) で治療するという究極の遺伝子治療を目指した基礎研究が進行している。我々はこれまでに，変異 superoxide dismutase 1 (SOD1) を原因遺伝子にもつ筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスである G93A SOD1 トランスジェニックマウス (TgM) に抗 SOD1 siRNA TgM を掛け合わせるにより発症と疾病の進行を著明に遅らせられることを報告した。しかし，siRNA のデザインが変異 SOD1 特異的ではないために，抗 SOD1 siRNA を導入したマウスは内因性 SOD1 も抑制され，副作用として肝障害が認められた。この副作用に対し，我々が考案した「変異遺伝子特異的な RNAi 法」を適用した。siRNA で抑制された内因性野生型 SOD1 の発現を，アミノ酸配列を変えずに塩基配列を置換させて siRNA が効かないようデザインした siRNA 抵抗性野生型 SOD1 で補うことによって機能的・組織学的に肝障害を回避することに初めて成功した。この手法を活用することにより，siRNA を用いた遺伝子発現抑制による遺伝子治療の適応が拡大することが期待される。

A. 研究目的

我々はこれまでに，変異 SOD1 遺伝子を原因とする筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のモデルマウスである G93A SOD1 トランスジェニックマウス (TgM) に，SOD1 に対する small interfering RNA (siRNA) を発現させた抗 SOD1 siRNA TgM を掛け合わせるにより変異 SOD1 の発現を抑制し，ALS の発症と進行を遅延させることに成功した (J Biol Chem. 2005, Arch Neurol. 2007)。しかし，使用した siRNA のデザインが変異 SOD1 特異的ではないために，治療したマウスでは内因性の野生型 SOD1 の発現も抑制されてしまった。このため，抗 SOD1 siRNA TgM では内因性 SOD1 の発現抑制による肝臓への脂肪沈着とそれに因る軽度の肝

機能障害が認められた。この副作用に対し，我々が考案した変異遺伝子特異的な RNAi 法 (Oligonucleotides. 2005) を適用し解決を試みた。

B. 研究方法

1) siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 トランスジーン の作製

ヒト野生型 SOD1 トランスジーン の塩基配列の中で，抗 SOD1 siRNA の標的となる塩基配列をアミノ酸配列は変えないように変更できる塩基を site-directed mutagenesis により置換させ，siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 トランスジーン を作製した (図 1)。

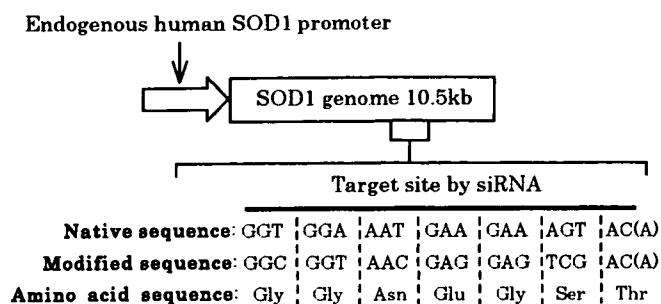


図 1. siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 トランスジーン
siRNA の標的塩基配列の中で、そのコドンよりコードされるアミノ酸配列は変えずに変換できる塩基を置換させることで作製した。

2) siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 TgM の作製

siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 トランスジーンを受精卵へマイクロインジェクションすることにより、siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 を過剰に発現する TgM を作製した。

3) ダブル TgM の作製

抗 SOD1 siRNA TgM と siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 TgM とを体外受精させることにより SOD1 に対する siRNA と siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 の両方のトランスジーンを有するダブル TgM を作製した。

4) ダブル TgM の解析

各種臓器から蛋白質を抽出し、抗 SOD1 抗体を用いたウエスタンブロッティング (WB) を行った。肝臓の SOD1 酵素活性はショ糖緩衝液中でホモジナイズし、SDS で SOD2 を不活性化した後測定した。組織検査は中性緩衝ホルマリンで固定後の肝臓をパラフィンに包埋し薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、肝臓の凍結切片のズダンⅢ染色を行った。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は東京医科歯科大学の動物実験委員会の規定に基づいて、動物愛護に留意して行った。

C. 研究結果

1) siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 TgM の作製

siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 トランスジーンを構築し、受精卵へのマイクロインジェクションにより siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 を過剰に発現する TgM を作製した。ここで、トランスジーンが発現量が異なる高発現型、低発現型の 2 系統のマウスが作製できた。WB で内因性マウス SOD1 に加え、それよりも若干分子量の大きい siRNA 抵抗性ヒト SOD1 の発現を確認した。

2) ダブル TgM の作製

抗 SOD1 siRNA TgM にて抑制された内因性野生型 SOD1 を補うために、siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 TgM を抗 SOD1 siRNA TgM と掛け合わせダブル TgM を作製した。この際、低発現型の siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 TgM では補う SOD1 蛋白の発現量が十分でないため、掛け合わせでは高発現型の siRNA 抵抗性 SOD1 TgM を用いた。作製したダブル TgM の肝臓・脳・脊髄から抽出した蛋白の WB において、siRNA によって内因性のマウス SOD1 の発現は抑制されたまま、ヒト野生型 SOD1 の発現が補われていることを確認した (図 2)。

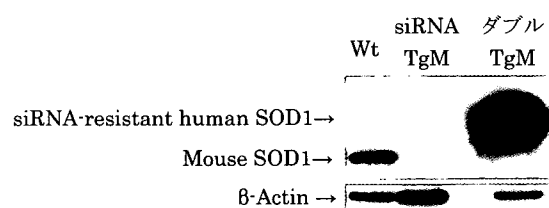


図 2. 肝臓の WB

抗 SOD1 siRNA TgM に高発現型 siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 TgM を掛け合わせることによって (ダブル TgM)、内因性のマウス SOD1 の発現は抑制したまま、ヒト SOD1 の発現を補うことに成功した。

3) ダブル TgM の解析

a) SOD1 酵素活性測定

SOD1 の発現を補ったことによるタンパク機能の改善を評価するために肝臓における SOD1 酵素活性を測定した。抗 SOD1 siRNA TgM において抑制された

SOD1 酵素活性がダブル TgM で回復していることを確認した。

b) 血液生化学検査

血清 ALT 値の測定にて、抗 SOD1 siRNA TgM で上昇のみられた ALT 値がダブル TgM で野生型とほぼ同等の値まで改善した。

c) 組織学的解析

肝臓の組織切片のズダン III 染色を行い、抗 SOD1 siRNA TgM で認められた肝臓の脂肪沈着がダブル TgM では認められず、血液生化学検査に加え組織学的にも肝障害を改善させることに成功した(図 3)。

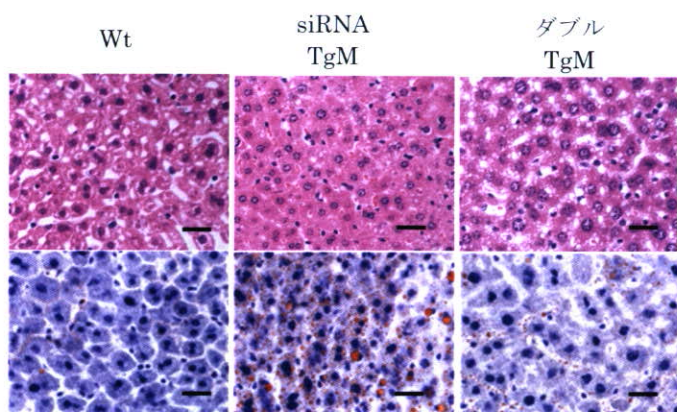


図 3. 肝臓の組織学的検査

ヘマトキシリン・エオジン染色(上段)及びズダン III 染色(下段)を行った。siRNA TgM で認められた肝臓の脂肪沈着がダブル TgM では認められない。

(bar=20 μ m)

D. 考察

今回、ALS に対する siRNA を用いた遺伝子治療において認められた内因性野生型 SOD1 の発現抑制による副作用に対して、我々が考案した「変異遺伝子特異的な RNAi 法」を適用することでその副作用を回避させることに成功した。

この「変異遺伝子特異的な RNAi 法」とは、野生型・変異型アレルの発現を効率の良い siRNA で抑制すると同時に、その siRNA で切断されないようにエンジニアした siRNA 抵抗性野生型遺伝子で野生型タンパクを補うことで変異遺伝子特異的な発現抑制効果が得られる。本方法を実際の遺伝子治療へ応用するこ

とを考える際、補充した野生型タンパクが果たして本来の内因性タンパクと同等の機能を果たすのかという点が問題点として最も懸念された。その点に関して、本研究において siRNA 抵抗性野生型遺伝子によって発現させた SOD1 タンパクが、siRNA で抑制された SOD1 タンパクを機能の面でも補うことが可能であることを in vivo において初めて証明することができた。

E. 結論

- 1) 抗 SOD1 siRNA TgM において、副作用として内因性 SOD1 の発現抑制による肝障害が認められた。
- 2) これに対し、「変異遺伝子特異的な RNAi 法」を適用し、in vivo レベルで抑制された野生型 SOD1 タンパクを補い、副作用を回避させることに成功した。

F. 文献

- 1) Saito Y. et al. : J Biol Chem. 280, 42826-30, 2005.
- 2) Kubodera T. et al. : Oligonucleotides. 15, 298-302, 2005.
- 3) Uchiyama S. et al. : J Biol Chem. 281, 31713-19, 2006.
- 4) Yokota T. et al. : Arch Neurol. 64, 145-6, 2007.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y, Yamada H, Unno T, Yamamoto Y, Kubodera T, Anzai M, Mitani T, Mizusawa H: Increase of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA. Arch Neurol 64: 145-146, 2007

2. 学会発表

1. 山田宏美, 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋 :
ALS モデルマウスの siRNA を用いた遺伝子治療の副作用の回避, 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5 月 16 日-18 日、2007
2. 山田宏美, 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋 : A
new RNA strategy for selective suppression of a
mutant allele to any mutation. 第 13 回日本遺伝
子治療学会, 名古屋, 6 月 28-30 日, 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

小児発症ハンチントン病の問題点

（分担）研究者氏名 長谷川一子¹⁾
研究協力者氏名 齋藤加代子²⁾，松尾真理²⁾，武藤香織³⁾

- 1) 所属 国立病院機構相模原病院神経内科
2) 所属 東京女子医大小児科，遺伝子医療センター
3) 所属 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター公共政策研究分野

研究要旨

特定疾患交付申請書からは，若年性ハンチントン病（以下HD）患者数は30人に満たないが，このなかには，小児期（幼児期）発症のHD症例が数例含まれている．小児期発症HDの病態については，明らかでないため，ここでは主として患者会からの聞き取り調査を基に，臨床上的問題点を明らかとした．その結果，小児期発症HDは成人発症例に比較して，運動，精神症状増悪のスピードが速く，痙攣発作の頻度が高いことが明らかとなった．介護面では薬物投与により意識レベルが低下し，介護者である親が戸惑うことも少なくない．小児が発症後，両親のいずれが発症することもあり，意図しないままに親世代の発症前診断となってしまう事例も散見する．病状や病名の告知については，対象が幼児であること，病状の進行によっては段階的告知が困難である場合もある．これらをふまえ，HD作業グループを組織し，HD療養の手引きを作成することとした．

A.研究目的

特定疾患交付申請書からは，若年性ハンチントン病（以下HD）患者数は20人に満たない．このなかには，小児期（幼児期）発症のHD症例が数例含まれている．小児期発症HDの病態については，症例数が非常に少ないことから，明らかとされていない事が多い．HD患者会では，小児期発症HDに関する問題点が明らかとするべき論点として話題となっているため，ここでは従来，明らかとされていなかった小児期発症のHDについて予備調査を行った．

B.研究方法

主として日本ハンチントン病ネットワークによ

せられた相談内容をもとに，小児期発症HDの実態について予備調査を行った．

（倫理面への配慮）

個人情報保護法に則って調査を行った．特に小児期発症HDは症例数が少ないため，個人が特定できないように配慮した．

C.研究結果

患者会に寄せられている相談内容から得られた，小児期発症HDと成人期発症のHDとの大きな差異は以下のとおりである．

1. 臨床上的の問題

非常に稀な病態であるため、HDであるとの診断に至るまで時間がかかる事が少なくない。また、親の世代より先に発症することもあり、これが診断困難の一因となる。

患者会に寄せられている小児期発症HDの症状としては、1) 発症年齢が15歳以上の場合には、成人発症のHDに比較して、若干経過が早い傾向があるに留まる。パーキンソニズムを伴う症例、あるいは薬物療法により容易にパーキンソニズムが惹起される症例が多い。2) 幼児期発症のHDでは病状の進行が成人期発症HDに比較して早い。すなわち、成人発症HDでは、臥床状態に至るまで10年以上経過するケースが多いが、小児期では5年程度でも臥床状態となる事が多い。このため、運動能力の低下、知的能力の低下などの、病態の悪化スピードに本人、両親ともに適応する事が困難であることも少なくない。3) 不随意運動についても典型的舞踏運動のみである症例は少なく、筋緊張が高い症例が多いと患者会では把握している。4) この筋緊張は精神的緊張でさらに増悪し、著明な発汗を伴うことも知られている。実際に高体温になるか、また、悪性高熱のようにCK値の上昇を伴うかについては明らかとされていない。5) 運動症状としては巧緻障害が目立ち、早期から鉛筆がもてないなどの症状が主訴となることもある。6) おそらく失調症状によるもの、またはジストニアその他の不随意運動によるものと考えられるが、転倒の頻度が高い。7) 痙攣発作の頻度が高く、発症時から痙攣発作を認める症例も見られる。また、痙攣発作による外傷も少なくない。8) 精神症状としては成人発症HDに比較して、自傷行為、衝動行為(噛み付く、物を投げる)などの問題行動の頻度が高い。これらは心理的緊張状態により強度となる傾向がある。9) 思春期になると、特に男児で著しいが自慰行為をTPOに無関係で行い、かつ、執拗に行う事もあり、介護者である親が困惑する事例もある。10) 8)、9)の一因の一つともいえるが衝動行為、強迫行動異常の頻度も高い。

2. 介護に関する問題

臨床症状でみられる痙攣発作、舞踏運動、精神症

状を薬物療法によりコントロールを試みた場合、意識レベルの低下がもたらされることが相談事項としてある。これは介護者である親にとってのジレンマとなりやすく、心理的負担(治療により悪くしているのではないかとの負い目)となりやすい。自傷行為、衝動行為、強迫行動が目立つ場合には、介護者である親の心理的ストレスを生じやすい。

また、小児が発症後、両親のいずれが発症すること、同時に発症することなどもあり、健常者の親が小児、成人発症HDである配偶者の両者を介護することもある。その場合、成人発症HDの家庭内暴力DVなどが見られることもあり、介護者の心理的負担が大となりやすい。

3. 病状告知に関する問題

患者が幼児であることに基づく告知の問題もある。患児の病態への理解のみならず、両親の疾病受容が困難な場合もある。さらに、病状の増悪が比較的早いことから、病状の進行に合わせた段階的告知も困難となる場合がある。

また、患児の診断ができた時点で両親が未発症者である場合もある。この場合は患者の確定診断が両親のいずれかの発症前診断、すなわちat riskであることが示されてしまう事例もある。

D. 考察

若年性HDに対する一般の神経内科医の印象の多くは10代後半に発症し、パーキンソニズムを伴い、多くは父親由来の遺伝である、というのが通常と思われる。tableにRuokkoら¹⁾によりまとめられた小児期および成人期発症HDの臨床像を示す。文献によって若干の頻度の差異はあるものの、これはほぼ平均的な運動障害の頻度であるが、小児期発症HDではジストニア、ミオクローヌス、パーキンソニズムを伴う頻度が高く、舞踏運動が前景にみられる症例はむしろ少数である。また、失調症状を合併する症例の頻度も成人発症HDに比較して高い。また、Ribaiらの文献²⁾からは精神症状で発症する小児期発症HDの頻度も高いことが示されている。結果で述べたように両親の世代が未発症であること、

臨床像で舞踏運動が必ずしも前景にみられないことから診断困難例が少なくない事が推定される。臨床症状では巧緻性が早期に障害されるのは成人例と同様であるが、小児発症HDではより障害が早期より強度であることが多い。このため、精神症状とあいまって学業の継続が困難となる症例が多い。

Table. Summary of clinical findings for Huntington's disease (HD) patients.

Clinical findings	Group HD	
	Juvenile and childhood onset (n=4)	Adult and late onset (n=46)
Rigidity	100%	86%
Bradykinesia	100%	33.5%
Ataxia	100%	67%
Dystonia	75%	48%
Chorea	75%	86%
Dysarthria	100%	76%
Pyramidal signs	100%	76%
Dysmetria	50%	38%

文献的には家族会から得られているような、高体温、発汗過多などの記載は少ないが、今後症例を実際に調査する場合には、病態生理を解明していく必要があると思われる。また、精神症状についてもさらに詳細な分析が必要である。

若年発症HDの多くは父親由来でCAGリピート数が多いとされているが、Ribaiらによれば、必ずしも正しくないとされる。患者会から得られている小児期発症HDの多くは父親由来とされているが、実態調査は不十分と思われ、調査研究が望まれる。

今後は臨床像に関する実態調査と共に、小児期発症HDに対する薬物療法のあり方、介護に関する問題解決、遺伝子診断におけるインフォームドコンセントのあり方、両親に対する発症前診断になる事例もあることなどを考慮した遺伝子診断の運用のあり方などを盛り込んだ「療養の手引き」の作成が必要であると思われた。

E. 結論

従来注目されていなかった、小児期発症HDについて、患者会から得られた情報を基に予備調査を行った。今後、小児期発症HDの実態を調査していく必要がある。同時に小児期発症HDを含めた療養手帳の作成が臨まれる。

F. 文献

1. Roucco HH et al. Arq Neuropsiquiatr 64:5-9, 2006.
2. Ribai P et al: Arch Neurol 64:813-819,2007.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 長谷川一子:ハンチントン病. 112-116. 精神・神経疾患画像アトラス 葛原茂樹監修 メディカルビュー社 2007.
2. 学会発表
 - 1) 横山照夫(箱根病院), 小浜るり子, 長谷川一子, 土谷一郎, 石原傳幸:ハンチントン病の経管栄養の長期予後. 第48回日本神経学会総会 05-16-2007 名古屋

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

ナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニットプロモーター制御下で蛍光タンパク質を 発現するトランスジェニックマウスの作製とその解析

貫名信行¹⁾

小山文隆¹⁾、宮崎晴子¹⁾²⁾、黒沢大¹⁾、山田みず樹¹⁾、玉岡晃²⁾、金子武嗣³⁾

¹⁾独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム、²⁾筑波大学大学院医学系研究科神経内科学、³⁾京都大学大学院医学研究科高次脳形態学研究領域

ハンチントン病(HD)はハンチンチンの N 末端領域に存在するポリグルタミン(poly Q)の伸長が原因である。我々はHDモデルマウスおよび患者の線条体で発現が顕著に低下する分子としてナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニット($\beta 4$)を同定した。伸長 polyQ による $\beta 4$ の遺伝子発現抑制メカニズムを *in vivo* で明らかにするため、 $\beta 4$ プロモーター制御下で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウス(TG)の作製を行い、線条体で蛍光タンパク質である Venus を強く発現する TG を確立した。この TG を HD モデルマウスと交配し double TG を作製した。このマウスの線条体では Venus の発現が強く抑制された。Double TG での Venus の発現抑制は、伸長 polyQ による発現抑制が β プロモーターに依存している、ことを示す。

A.研究目的

ハンチントン病(HD)は舞踏運動、精神および知能障害を特徴とする常染色体優性遺伝の神経変性疾患で、ハンチンチン遺伝子に存在する CAG トリプレットリピートの伸長[翻訳産物は伸長ポリグルタミン(poly Q)]が原因で発症する¹⁾。その神経病理学的特徴は線条体での神経細胞死である。我々HDモデルマウスを DNA マイクロアレイで解析し、モデルマウスおよび HD 患者の線条体で発現が顕著に低下する分子としてナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニット($\beta 4$)を同定した(図 1)^{2,3)}。伸長 polyQ による $\beta 4$ の遺伝子発現抑制メカニズムを *in vivo* で明らかにするため、 $\beta 4$ プロモーター制御下で蛍光タンパク質を発現する TG の作製を行った。

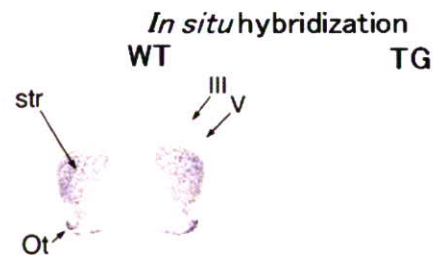


図1. ナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニット($\beta 4$)は線条体で強く発現し、ハンチントン病トランスジェニックマウス(TG)では発現が抑制される。

B.研究方法

マウス β プロモーターの下流 Venus cDNA、イントロンおよびポリ A 付加シグナルを挿入したトランスジーンを構築した。約 400 個のマウス受精卵にトランスジーンを注入し TG を作製した。尻尾からゲノム DNA を調製し、PCR でファウンダーマウスを同定した。得られたファウンダーマウスから F1 マウスを作製した。各ラインから凍結切片を作製し、蛍光顕微