

211-216, 2007.

学会発表

・奈良優子、村松慎一、李 小剛、古寺美加、滝野直美、池口邦彦、中野今治、岡田尚巳、小澤敬也、浦野扶美、一瀬 宏、Daniel Metzger、Pierre Chambon：発現調節 AAV ベクターによるパーキンソン病の遺伝子治療。第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月 25-27 日

・石川剛久、森田光哉、中野今治：痴呆を伴う筋萎縮性側索硬化症における脳血流 SPECT の検討。第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月 25-27 日。

・河又千鶴、森田光哉、中野今治：SOD 1 遺伝子変異を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の病理所見について。第 47 回日本神経学会総会。東京、2006 年 5 月 11 日-13 日。

・中村優子、森田光哉、中野今治：ALS 患者に対する非観血的持続 CO2・O2 モニタリング。第 48 回日本神経学会総会、名古屋、2007 年 5 月 18 日 (プログラム・詳録集 p. 328)

2) 海外

口頭発表	7 件
原著論文による発表	13 件
それ以外 (レビュー等) の発表	0 件

そのうち主なもの
(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

・ Yamazaki M, Esumi E, Nakano I: Is motoneuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis? *Neuropathology* 25: 381-387, 2005.(December 2005)

・ Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I and Ozawa K: Gene therapy for Parkinson's disease using recombinant adeno-associated viral vectors. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5(5):663-671, 2005.

・ Ishihara K, Araki S, Ihori N, Shiota J, Kawamura M, Yoshida M, Hashizume Y, Nakano I: Argyrophilic grain disease presenting with frontotemporal dementia: A neuropsychological and pathological study of an autopsied case with presenile onset. *Neuropathology* 25: 165-170, 2005.

・ Ouyang Y, Takiyama Y, Sakoe K, Shimazaki H, Ogawa T, Nagano S, Yamamoto Y, Nakano I: Sacsin-related ataxia (ARSACS): Expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology* 66: 1103-1104, 2006.

・ Ishikawa T, Morita M, Nakano I: Constant blood flow reduction in premotor frontal lobe regions in ALS with dementia —a SPECT study with 3D-SSP. *Acta Neurol Scand* 116: 340-344, 2007.

学会発表

・ Nakano I, Ishihara K, Sugie M, Shiota J, Kawamura M, Kitamoto T.: An autopsy case of MV2 Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) with marked and diffuse cortical spongiform changes: A cortical form? 8th European Congress of Neuropathology 2005. Amsterdam, The Netherlands, 25-28 June 2005.

・ Ishikawa T, Morita M, Nakano I: A SPECT study using eZIS and SPM97 in ALS with dementia cases. XVIIIth World Congress of Neurology, Sydney Australia, 5-11 November 2005.

7. 知的所有権の出願・取得状況 (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 | なし |

筋萎縮性側索硬化症における脳血流の解析

難治性疾患克服研究事業
神経変性疾患に関する調査研究班

自治医科大学神経内科
中野今治



ALS-D患者

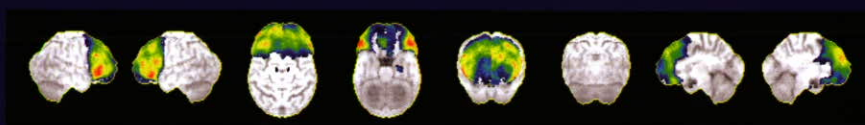
病識に乏しく、球症状、上肢の筋力低下に
比し、下肢の筋力低下は軽い症例が多い。

Z-score (decrease): 3.0

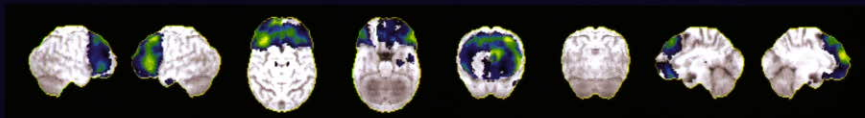


7.0

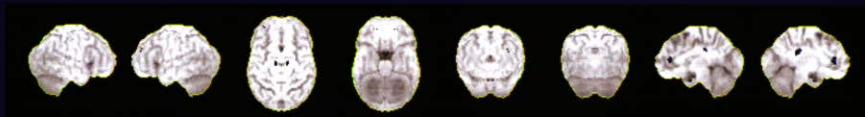
ALS-D
vs.
Normal
controls



ALS-D
vs.
ALS



ALS
vs.
Normal
controls



脳血流の群間比較

ALS-D群は、正常群、ALS群と比較して前頭葉に著
明な血流低下を認める。一方、ALS群では正常対照
群と比較しても有意な血流低下は認められない

・筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の脳血流変化をeZISとSPM97を用いて、客観的に評価し、その診断における有用性を検討した。

・ALS16例と認知症を伴ったALS(ALS-D)5例を対象として、 ^{123}I -IMP-SPECTを施行し、eZISおよびSPM97を用いて、健常者33例と比較検討した。

・ALS-D症例では両側前頭葉の血流低下が顕著に認められ、その診断において有用であることが示された。ALS症例では有意かつ特徴的な脳血流低下パターンを見出し得なかった。

・さらに多くのALSおよびALS-D症例を長期的解析することで、ALSおよびALS-Dの病態の差異について解析を進める予定である。また、この方法は広く普及することが予想され、本症診断の精度が高まるものと期待される。

・ALSの診断においてしばしば見逃されることがある認知症の合併を、SPECTを施行することで客観的に評価、診断することができる。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）総合研究報告書

研究課題：神経変性疾患に関する調査研究

課題番号：H17-難治-一般-015

主任研究者：国立精神・神経センター武蔵病院 葛原茂樹

分担研究者：名古屋大学大学院医学系研究科神経内科 祖父江 元

分担研究者研究課題

ALS 臨床調査個人票の解析

ALS に関する多施設共同前向き臨床データベースおよび遺伝子リソースの構築

Dorfin キメラタンパク質による SOD1 変異に伴う ALS 治療の試み

変異SOD1の神経細胞毒性の発現機序の検討

1. 研究目的

ALS の克服に向けて、臨床面および基礎面からのアプローチを行う。臨床面においては、ALS 臨床調査個人票データから ALS 臨床像を描出するとともに、多施設共同の前向き臨床データベースおよび遺伝子リソースを構築する。

一方、新規ユビキチンリガーゼ(E3) Dorfin による ALS 治療を実現化する目的で Dorfin の変異 SOD1 特異的結合能を保存しつつ、より安定して高発現する人工 E3 の作成を試みる。また、変異 SOD1 の病変特異的な凝集体形成機序解明のためジスルフィド結合の果たす役割を明らかにする。

2. 研究方法

特定疾患治療研究事業における臨床調査個人票の研究目的利用に関する要綱に基づきデータを解析した。神経変性班および旧国立療養所関連施設において、ALS 臨床データベース登録、長期経過観察、遺伝子採血、匿名化管理システムを構築した。また臨床データセンター、遺伝子検体管理センターを構築した。

Dorfin の変異 SOD1 認識部位である C 末と、CHIP の E3 活性部位である U-Box を融合した種々のキメラタンパク質発現コンストラクトを作成し、変異 SOD1 結合能、ユビキチン化活性、神経細胞保護効果等を解析した。一方、分子内の 4 か所のシステイン残基をセリン残基に置換した野生型および変異型 SOD1 を培養細胞に発現させ、凝集体形成や細胞毒性に及ぼすジスルフィド結合の影響を解析した。

(倫理面への配慮)

ALS 臨床調査個人票は文書による研究利用同意のあるデータを厚労省にて連結不可能匿名化された状態で提供を受け解析した。多施設共同前向き臨床データベースおよび遺伝子リソースについて、参加は自由意志で文書同意を必須とし、臨床情報および遺伝子検体を施設内で匿名化した。全参加施設の倫理委員会承認を得た。

3. 研究結果及び考察

ALS 臨床調査個人票の解析から ALS 患者横断像を多数例で明らかにし、発症年齢が大きく臨床像に影響することなど重要な症候学的新知見を得た。ALS データベースおよび遺伝子リソースについて全国 15 施設で体制を構築し、既に 191 例の患者を登録し長期経過観察を行っている。

CHIP-Dorfin キメラタンパク質は野生型 Dorfin に比べ、より強い変異 SOD1 結合性、ユビキチン化活性、変異 SOD1 分解能、神経毒性軽減効果を有していた。このキメラタンパク質を導入することで、変異 SOD1-Tg マウスの治療効果が高まることが期待できる。また、SOD1 のシステイン残基の置換により、変異 SOD1 の高分子凝集体形成が著明に抑制され細胞毒性が減弱した。すなわち、システイン残基が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。

4. 評価

1) 達成度について

ALS データベースおよび遺伝子リソースについては、体制構築、患者登録が順調に進んでおり、電話調査等による経過観察補足率が 95% 以上と、極めて有用な前向き自然歴把握システムとなっている。

培養細胞レベルにおいて Dorfin キメラタンパク質による有望な新規治療法の開発に成功し、SOD1 の病変特異的な凝集体形成機序と毒性発揮機序の一端を明らかにできた意義は大きい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

特定疾患治療研究事業は世界的にユニークな制度であり、多数例の解析による横断像、症候学の提示の意義は大きい。神経変性疾患における質の高い前向き自然歴情報と遺伝子リソースが組み合わせられた研究リソースは我が国初で、世界的にも少なく、貴重な資源となる。

遺伝子工学的手法により、神経変性疾患の原因となる異常タンパク質をより強力に分解する人工タン

パク質を開発したことは神経変性疾患の治療戦略として世界的なインパクトを持つ。また、変異 SOD1 分子間の異常なジスルフィド結合の形成が毒性発揮に重要であることを明らかにし新たな ALS 治療戦略のターゲットを提示できた意義は大きい。

3) 今後の展望について

臨床調査個人票の解析は今後経年的に実施することで、変化する疫学的確に捉え、診療現場に還元できると共に適切な医療政策に反映することができる。ALS データベースおよび遺伝子リソースは臨床像および自然歴の解析を進め、大規模ゲノム遺伝子解析を行うことで、病態解明、治療法開発につながる研究成果を生む可能性がある。

Dorfin キメラタンパク質による治療をマウスレベルに展開することでヒトへの応用に近づけるとともに、異常ジスルフィド結合形成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。

4) 研究内容の効率性について

臨床調査個人票の解析を適切に行うことにより、特定疾患治療研究事業の意義を拡大しうる。ALS のような全国で数千人規模の疾患について臨床・遺伝子の蓄積を行うためには年単位の全国規模での取組みが必要であり、順調なシステム構築ができています。

一方、3年間の事業期間内において、今後の ALS 新規治療の開発に結びつく基礎研究成果を効率よく挙げることができ、当初の目標を達成した。

5. 結論

ALS 臨床調査個人票の解析から我が国の ALS 患者横断像を明らかにし、症候学的解析から新知見を得ることができた。ALS 患者の前向き臨床像把握、遺伝子検体蓄積を行う多施設共同研究実施体制を構築した。

基礎研究では Dorfin キメラタンパク質による新規治療法の開発に成功し、変異 SOD1 の病変選択的な凝集体形成、毒性発揮に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を明らかにした。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 220件
原著論文による発表 4件
それ以外 (レジュメ等) の発表 23件
そのうち主なもの
(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)
論文発表

- 山本正彦, 田中章景, 祖父江元 ALS 脊髄前角の遺伝子発現プロファイル 神経研究の進歩 59巻10号 Page1129-1139 (2007. 10)
- 祖父江元 神経変性疾患の病態抑止療法への展望 治療研究のパラダイムシフト 神経治療学 24 巻 4 号 Page403-405 (2007. 07)

3. 丹羽淳一, 祖父江元 ユビキチン系の生理と病態 ユビキチンと病態生理 ユビキチンと運動ニューロン疾患 蛋白質・核酸・酵素 51巻10号 Page1423-1427 (2006. 08)

4. 渡辺宏久, 伊藤瑞規, 熱田直樹, 長縄慎二, 深津博, 祖父江元 孤発性脊髄小脳変性症 多系統萎縮症の MRI 画像 神経研究の進歩 50 巻 3 号 Page397-407 (2006. 06)

5. 熱田直樹, 渡辺宏久, 祖父江元 疾患別・患者への情報提供の実際 私はこう説明している 神経内科的疾患 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 診療の実際と患者へのインフォームド・コンセント 脊椎脊髄ジャーナル19巻6号 Page702-708 (2006. 06)

6. 伊藤瑞規, 熱田直樹, 渡辺宏久, 平山正昭, 祖父江元 パーキンソン病の妄想に対するolanzapineの有効性 脳と神経 57巻6号 Page491-494 (2005. 06)

学会発表

1. 丹羽淳一, 山田新一, 曾根 淳, 高橋美穂, 道勇学, 祖父江元: 変異SOD1と特異的に結合するタンパク質の探索同定 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 2007. 5

2. 熱田直樹, 伊藤瑞規, 渡辺宏久, 千田譲, 中野今治, 青木正志, 辻省次, 高野弘基, 湯浅龍彦, 林 秀明, 葛原茂樹, 祖父江元: 臨床調査個人票からみた我が国のALS 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 2007. 5

3. 丹羽淳一, 山田新一, 伊藤隆, 高橋美穂, 曾根淳, 石垣診祐, 道勇学, 祖父江元: 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毒性への関与 第47回日本神経学会総会, 東京, 2006. 5

4. 山本正彦, 蔭月梅, 小林靖, 吉原剛, 石垣診祐, 丹羽淳一, 道勇学, 祖父江元: 孤発性 ALS における運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイル 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005. 5

2) 海外

口頭発表 20件
原著論文による発表 21件
それ以外 (レジュメ等) の発表 6件
そのうち主なもの
(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

1. Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J Biol Chem.* 282:28087-28095, 2007

2. CHIP Overexpression Reduces Mutant Androgen Receptor Protein and Ameliorates Phenotypes of the Spinal and Bulbar Muscular Atrophy Transgenic Mouse

Model. Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. *J Neurosci*. 27: 5115-5126, 2007

3. Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis*. 25: 331-341, 2007

4. Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. *J Neurosci*. 26: 12106-12117, 2006

5. Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G. Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. *J Biol Chem*. 281:23842-23851, 2006

6. Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients. Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Banno H, Suzuki K, Katsuno M, Tanaka F, Tamakoshi A, Sobue G. *Brain*. 129: 1446-1455, 2006

7. Mutant androgen receptor accumulation in SBMA scrotal skin: A pathogenic marker. Banno H, Adachi H, Katsuno M, Suzuki K, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. *Ann Neurol*. 59: 520-526, 2006

8. Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 16801-16806, 2005

9. 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Tanaka F, Inukai A, Doyu M, Sobue G. *Nature Med*. 11, 1088-1095, 2005

10. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. *Ann Neurol*. 57: 236-251, 2005

学会発表

1. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, C. Sang, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: Medical induction of heat shock protein alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. Gordon Research Conference on CAG triplet repeat disorders Mount Holyoke, MA, 2005. 7

2. Sobue G: Molecular target therapy for motor neuron disease. The 8th Korean Society for Brain and Neural Science (KBNS) Annual Academic Meeting. Seoul, Korea, 2005. 10

Sobue G: Molecular targeted therapy for polyglutamine disease. French-Japanese Workshop on translational research from genome-based sciences to clinical medicine Paris, France, 2006. 9

3. Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Sobue G. CHIP over-expression reduces the mutant AR protein and ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model. 37th The Society for Neuroscience Annual meeting, San Diego, 2007. 11

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

出願番号：PCT/J P 2 0 0 7 / 0 5 5 4 9 3

発明者：山田 新一、丹羽 淳一、祖父江 元

発明の名称：凝集体形成性タンパク質分解用の発現コンストラクト、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

出願人：国立大学法人名古屋大学

出願日：2006年3月20日

出願番号：特許出願2005-47826

発明者：祖父江 元、足立 弘明、和座 雅浩

発明の名称：抗ポリグルタミン病剤

出願人：国立大学法人名古屋大学

出願日：2005年2月23日

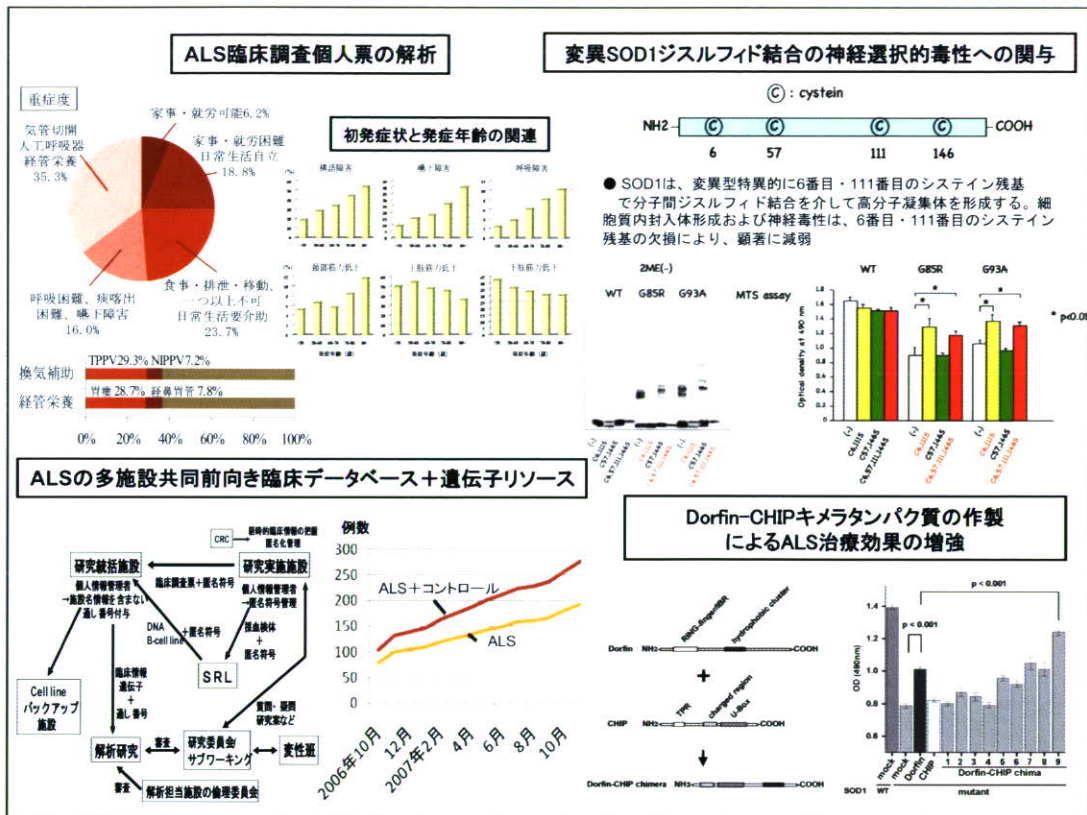
出願番号：特許出願2005-353564

発明者：祖父江 元、勝野 雅央、足立 弘明

発明の名称：球脊髄性筋萎縮症の病態を再現する非ヒト動物、及び球脊髄性筋萎縮症治療剤

出願人：財団法人名古屋産業科学研究所

出願日：2005年12月7日



難治性疾患克服研究事業
 神経変性疾患に関する調査研究班
 名古屋大学 祖父江 元

特定疾患治療研究事業におけるALS臨床調査個人票の解析により、多数例での横断像描出および症候学的解析を行うことができた。2005年度4202例のALS患者重症度および換気補助、経管栄養を実施している患者の割合、2003～2006年度3428例の新規登録ALS患者の初発症状と発症年齢の関係を示す。我が国のALS患者は人工換気や経管栄養を実施している割合が高いこと、発症年齢が若いほど四肢筋力低下で発症する割合が高く、高齢発症ほど球症状で発症する割合が高いことが示された。

ALSの多施設共同前向き臨床データベースと遺伝子リソースを図に示す体制により構築した。平成19年11月の段階で193例のALS患者を登録した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）総合研究報告書

研究課題：神経変性疾患に関する調査研究

課題番号：H17-難治-一般-015

主任研究者：国立精神・神経センター武蔵病院 葛原茂樹

分担研究者：大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学 戸田達史

分担研究者研究課題

パーキンソン病と関連疾患の遺伝子多型と発症リスクの研究

1. 研究目的

パーキンソン病疾患感受性遺伝子を同定するとともに、SNP と各薬剤への反応性、副作用との関連を明らかにしテラーメイド治療法を確立することをめざす。

2. 研究方法

マイクロサテライト・SNP アレイを用いたゲノムワイド関連解析、多数の候補遺伝子内 SNP を用いた関連解析、により PD 感受性遺伝子を同定する、ことを行う。

（倫理面への配慮）

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、大阪大学をはじめ採血施設でも、指針にそった倫理委員会による承認を得ている。

3. 研究結果及び考察

27,158 個の MS と、pooled DNA 法を用いた、ゲノムワイドスクリーニングにより、候補領域 280 ヶ所を抽出した。うち 164 マーカーに関して、個別 DNA 検体を用いたタイピングを行い、 $P < 0.001$ の MS マーカーを 7 箇所同定した。1 個の MS は SNP としても 10^{-8} の有意な領域である。

268 SNPs のスクリーニングから、 α -synuclein (SNCA) が初めての確実な PD 感受性遺伝子であることを報告した。その他 Calbindin など数個の遺伝子の SNPs で、 $P = 10^{-3} - 10^{-4}$ の有意な相関をみいだした。

55 万 SNP chip を用いて患者 800 人のゲノムワイド関連解析の実験を行い解析中である。

4. 評価

1) 達成度について

順調に進んでおり、確実な PD 感受性遺伝子 α -synuclein を見い出した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

2001-2002 年に向け、数施設から罹患同胞対法による連鎖領域の報告がはじめてなされた。また 2005 年、2006 年と 200-300 人程度の SNP chip によるゲノムワイド関連解析が発表された。現在、米国、ドイツ、日本などの数施設が、大規模なスタディを行っている。

3) 今後の展望について

次の 3 年間には疾患感受性遺伝子や薬剤効果に影響する SNP などが、網羅的に同定されると考えられる。

4) 研究内容の効率性について

この分野のテクノロジーの進歩はめざましく、主たる実験計画の変更を余儀なくされた。途中から導入した SNP chip により、飛躍的に効率化している。

5. 結論

パーキンソン病疾患感受性遺伝子同定を目的として 2 通りの大規模な関連解析を行い、今後の有望な成果が期待される。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 48 件

原著論文による発表 0 件

それ以外 (レビュー等) の発表 14 件

そのうち主なもの

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

水田 依久子、戸田 達史 PARK1, PARK4 (α -synuclein) Clin Neurosci 25:72-73, 2007

戸田 達史 パーキンソン病の分子遺伝学 BRAIN NERVE 59:815-823, 2007

学会発表

戸田 達史 日本発、臨床から遺伝子へ福山型筋ジストロフィー 福山型遺伝子フクチン同定のヒント、幸運とそれから 日本神経学会総会 企画講演 名古屋 2007年5月

戸田 達史 ポストゲノム時代の神経疾患の分子遺伝学と治療戦略 日本神経治療学会総会 教育講演 仙台 2007年6月

2) 海外

口頭発表 16 件

原著論文による発表 30 件

それ以外 (レビュー等) の発表 3 件

そのうち主なもの

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Multiple candidate gene analysis identifies *a-synuclein* as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15:1151-1158, 2006

Satake W, Mizuta I, Suzuki S, Nakabayashi Y, Ito C, Watanabe M, Takeda A, Hasegawa K, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Fibroblast growth factor 20 gene and Parkinson's disease in the Japanese population. *Neuroreport* 18:937-940, 2007

Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, Hasegawa K, Urade Y, Goto Y, Naiki H, Toda T. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nature Struct Mol Biol* 14:332-340, 2007

Kano H, Kurahashi H, Toda T. Genetically regulated epigenetic transcriptional

activation of retrotransposon insertion confers mouse dactylaplasia phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* (in press)

学会発表

Toda T, Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M. Multiple candidate gene analysis identifies *a-synuclein* as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, Atlanta, USA, Oct 14-18, 2006

Toda T, Satake W, Mizuta I, Suzuki S, Nakabayashi Y, Ito C, Watanabe M, Takeda A, Hasegawa K, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M. Fibroblast growth factor 20 gene and Parkinson's disease in the Japanese population. Movement Disorder Society, Istanbul, Turkey, Jun 3-Jun 7, 2007

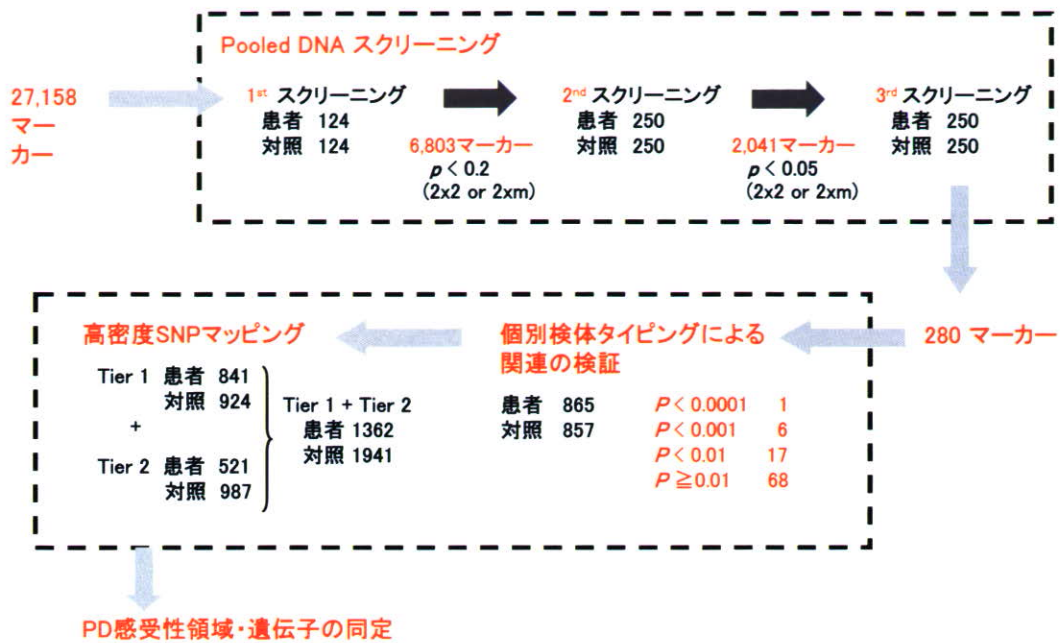
7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

なし

パーキンソン病と関連疾患の遺伝子多型と発症リスクの研究

<pooled DNAによるゲノムワイドマイクロサテライト関連解析 (27,000個)>



難治性疾患克服研究事業
神経変性疾患に関する調査研究班
大阪大学 戸田達史

マイクロサテライトDNA多型を用いたゲノムワイド関連解析では、27,158個のマイクロサテライトと、プールDNA法を用いた、ゲノムワイドの3段階のスクリーニングにより、候補領域280ヶ所を抽出した。うち164マーカーに関して、個別DNA検体を用いたタイピングを行い、 $P < 0.001$ のマイクロサテライトマーカーを7箇所同定した。1個のマイクロサテライトはSNPとしても 10^{-8} の有意な領域である。

パーキンソン病と関連疾患の遺伝子多型と発症リスクの研究

多数候補遺伝子SNPの関連解析

268 SNPs (121 候補遺伝子)

患者190人、対照190人

カイ二乗検定

$P < 0.05$

22 SNPs (16 候補遺伝子)

さらに
患者692人対照748人
タイピング

カイ二乗検定

計: 患者882人対照938人

***α -synuclein (SNCA) の
SNPで $P = 5.0 \times 10^{-10}$***

難治性疾患克服研究事業
神経変性疾患に関する調査研究班
大阪大学 戸田達史

多数の候補遺伝子SNPを用いた関連解析では、268SNPsのスクリーニングから、 α -synuclein (SNCA)が初めての確実なPD感受性遺伝子であることを報告した。その他Calbindinなど数個の遺伝子のSNPsで、 $P=10^{-3}$ - 10^{-4} の有意な相関をみいだした。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）総合研究報告書

研究課題：神経変性疾患に関する調査研究

課題番号：H17-難治一般-015

主任研究者：国立精神・神経センター武蔵病院 葛原茂樹

分担研究者：国立精神・神経センター武蔵病院 久野貞子

分担研究者研究課題：パーキンソン病関連疾患の治療および薬理生化学的研究

1. 研究目的

パーキンソン病（以下 PD）等の神経変性疾患の治療には、適切な薬物・外科・リハビリ治療の継続が重要である。申請者はこの3者を組み合わせた治療および薬理生化学的研究を行い、患者の ADL/QOL に資することを目的とする研究を行う。

2. 研究方法

1)17年度は PD における心臓弁膜異常の検討を宇多野病院神経内科受診中の患者を対象として心臓超音波検査を行い対照と比較した。2)18年度は、患者会と協力して患者の立場からの PD における外科治療の有効性と患者満足度調査を行った。3)19年度は武蔵病院神経内科入院患者を対象に高齢 PD の血中 L-dopa 濃度パターンの検討を行った。

（倫理面への配慮）

1)、3)の研究は、日常臨床で行っている診療行為の結果を纏めた臨床研究であり、研究成果には患者の個人情報が入らないので倫理的に問題とはならない。2)のアンケート調査は主治医から患者に依頼し、回答は患者会宛とし、そこで匿名化した資料を解析しており、いずれも倫理的に問題とはならない。

3. 研究結果及び考察

1)PD群は Non-PD群に比べ有意に心弁膜逆流が多く、特に大動脈弁、僧帽弁で中等度以上の逆流を示す者が有意に多かった。過去3年間の麦角系ドパミンアゴニスト(DA)服薬履歴の検討結果から、いずれかの弁逆流の原因になりうるものが示唆された。しかし、PD そのものがリスクであるのか、麦角系 DA がリスクであるのか明確でなく、今後は前向きな検討が必要である。2)287 通の回答を日本全国の患者から得た。平均年齢 62.8 歳、発症年齢は 48.4 歳、罹病期間は 14.1 年、DBS 術後期間は 1 年未満 23%、1-3 年 43%、3-5 年 21%、5 年以上 9%、手術部位は視床下核 146 名、淡蒼球 22 名、視床 15 名であった。総合的な満足度は約 70%と比較的高い結果であった。問題点は振戦、筋固縮、ジスキネジアへの効果は高いが、発声、書字、易転倒性などの効果が低く今後の検討を要する。また、手術施行側の主治医調査と比較すると満足度は低かったが、今回の調査では 300 名弱の多数例で患者の本音に近い結果が得られたと推察した。3)高齢発症 PD では L-dopa 吸収パターンに個人差が大きく、L-dopa による効果が不十分な患者では L-dopa の増量や食前投与を検討することが必要である。

4. 評価

1) 達成度について

1)に関しては、国内、国外の学会で報告し論文を投稿中である。また、現在前向きな研究を続行中である。2)に関しては、一つの研究として纏まったと考えており、国内、国外の学会で発表し、現在論文作成

中である。3)19年度の成果であり、今後、口演および論文として成果を纏める予定である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

過去3年間の研究のうち、1)と2)に関しては、国内、国外の学会で評価を得ており、論文として成果を纏めつつある。特に患者の立場に立った DBS の有効性と満足度調査は従来なかった視点から纏めたものである。

3) 今後の展望について

臨床研究のため3年間では、纏まった研究成果は不十分であり、後数年の研究期間が必要である。

4) 研究内容の効率性について

1)、3)に関しては、臨床研究であり必ずしも効率が良いとは言えないが、2)に関してはアンケート調査研究でもあり、効率良く出来たと考えている。

5. 結論

パーキンソン病関連疾患の治療および薬理生化学的研究として、過去3年間に行ったことは、ほぼ目的にかなっていた。今後更に関連論文を作成した。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	2 件
原著論文による発表	10 件
それ以外（レビュー等）の発表	24 件

そのうち主なもの

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

論文発表

久野貞子：2.線条体黒質変性症、多系統萎縮症（MSA-P）：パーキンソン病との関連で、パーキンソン病と関連疾患（進行性核上性麻痺・大脳皮質基底核変性症）の療養の手引き、三重大学、2005;57-60

久野貞子：パーキンソンニズムを呈する主な鑑別疾患－神経変性疾患、Modern Physician 2005;25(8) :913-917

久野貞子：パーキンソン病治療の原則、OT ジャーナル 2005;39(2) :106-111

大江田知子、久野貞子：痴呆を伴うパーキンソン病（PDD）、Cognition and Dementia, 2005; 4(1) 15(15)-19(19)

久野貞子：認知症（痴呆）を伴うパーキンソン病と小体型認知症（痴呆）は同じ疾患か 区別するべきであるとの立場から、Cognition and Dementia, 2005; 4(4) :83(347)-85(349)

久野貞子、水田英二、北川尚之、後藤啓五、波多野靖子、望月秀樹：Parkinson 病に対する

talipexole から pramipexole への切り替え方法の検討、神経治療 2006; 23(2) : 157-163

久野貞子、大江田知子：パーキンソン病における認知障害、老年精神医学雑誌 2006; 17(4) : 430-433

久野貞子：発病と進行 パーキンソン病患者の死亡原因. パーキンソン病 臨床の諸問題. 中外医学社 2006;54-58

久野貞子：パーキンソン病とうつ 1. パーキンソン病の精神症状. Depression Frontier 医薬ジャーナル 2006 ; 4(2) : 8-11

久野貞子：ふるえの診断と治療のポイント「パーキンソン病と本態性振戦の鑑別のポイント」ふるえの臨床 Modern Physician 新興医学出版社 2007 ; 27(1) : 30-33.

学会発表

久野貞子：培養グリア細胞による神経栄養因子分泌測定システムを用いた神経保護効果の検討.

第47回日本神経学会総会, 東京, 2006. 5. 13

久野貞子：市販の抗パーキンソン病薬には病気の進展予防効果がある-yes-. 第1回 Movement Disorder Society, Japan, 東京 2007. 10. 5

久野貞子、太田潔江、水田依久子、藤波綾、太田光熙：Ropinirole は神経栄養因子 GDNF の産生を亢進する—培養グリア細胞による神経栄養因子分泌測定システムを用いた検討—. 第48回日本神経学会総会、名古屋、2007. 5. 18

村田美穂、久野貞子：パーキンソン病に対する深部脳刺激術の効果と満足度に関するアンケート調査. 第48回日本神経学会総会、名古屋、2007. 5. 16

青木吉嗣、高見澤格、大矢寧、小川雅文、村田美穂、久野貞子：ドパミンアゴニスト内服中のパーキンソン病患者での、心臓弁逆流と BNP 値の検討. 第48回日本神経学会総会、名古屋、2007. 5. 16

大江田知子、正木元子、水田英二、久野貞子、澤田秀幸：パーキンソン病患者における心臓弁膜症のリスク因子解析. 第48回日本神経学会総会、名古屋、2007. 5. 16

青木吉嗣、高見澤格、村田美穂、久野貞子：パーキンソン病患者の弁逆流と、BNP および下腿浮腫との関係. 第1回 Movement Disorder Society, Japan, 東京 2007. 10. 5

2) 海外

口頭発表 1 件

原著論文による発表 6 件

それ以外 (レギュラー等) の発表 0 件

そのうち主なもの

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

Nishimura M, Kuno S, Kaji R, Kawakami H: Influence of a tumor necrosis factor gene polymorphism in Japanese patients with multiple system atrophy. Neuroscience Letters, 2005;374:218-221

Toyomoto M, Inoue S, Ohta K, Kuno S, Ohta M, Hayashi K, Ikeda K: Production of NGF, BDNF and GDNF in mouse astrocyte cultures is strongly enhanced by a cerebral vasodilator, infenprodil. Neuroscience

Letters 2005;379:185-189

Ogawa T, Seki S, Masuda H, Igawa Y, Nishizawa O, Kuno S, Michael B Chancellor, William C de Groat, Yoshimura N: Dopaminergic mechanisms controlling urethral function in rats. Neurourology and Urodynamics 2006 ; 25 : 480-489

Mizuno Y, Kanazawa I, Kuno S, Yanagisawa N, Yamamoto M, Kondo T, and the Japanese Parkinson-Entacapone, Study Group: Placebo-Controlled, Double-Blind Dose-Finding Study of Entacapone in Fluctuating Parkinsonian Patients. Movement Disorders. 2007; 22 : 75-80

Kuno S: Problems in patients with advancing Parkinson's disease. Parkinsonism & Related Disorders 2006; 12: S48-S51

Mizuno Y, Abe T, Hasegawa K, Kuno S, Kondo T, Yamamoto M, Nakashima M, Kanazawa I, and the STRONG Study Group: Ropinirole is Effective on Motor Function When Used as an Adjunct to Levodopa in Parkinson's Disease : STRONG Study. Movement Disorders : 22(13)1860-1865, 2007

学会発表

Kuno S, Ohta K, Mizuta I, Fujinami A, Ohta M: Screening of neuroprotective drugs by up-regulation of neurotrophic factor synthesis in cultured mouse astrocytes. 18th World Congress of Neurology, Australia, Sydney, 2005. 11. 9

Kuno S, Ohta K, Fujinami A, Ohta M: Enhancement of the synthesis of neurotrophic factors by ropinirole in cultured astrocytes. The Movement Disorder Society's 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders Kyoto, 2006. 11. 1

Kuno S, Murata M, the Deep-Brain Stimulation for Parkinson's Disease Study Group: Evaluation of Effects of Deep Brain Stimulation for advanced Parkinson's Disease. 1st Asian & Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress (AOPMC), Singapore, 2007. 10. 22

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得数 申請中 1 件

発明の名称 「不随意運動治療剤」

発明者 久野貞子、水田英二、花田敬久、上野正孝

出願人 エーザイ株式会社
独立行政法人国立病院機構

国際出願日 2006年4月10日

国際出願番号 PCT/JP2006/307991

国際公開番号 W02006/109876

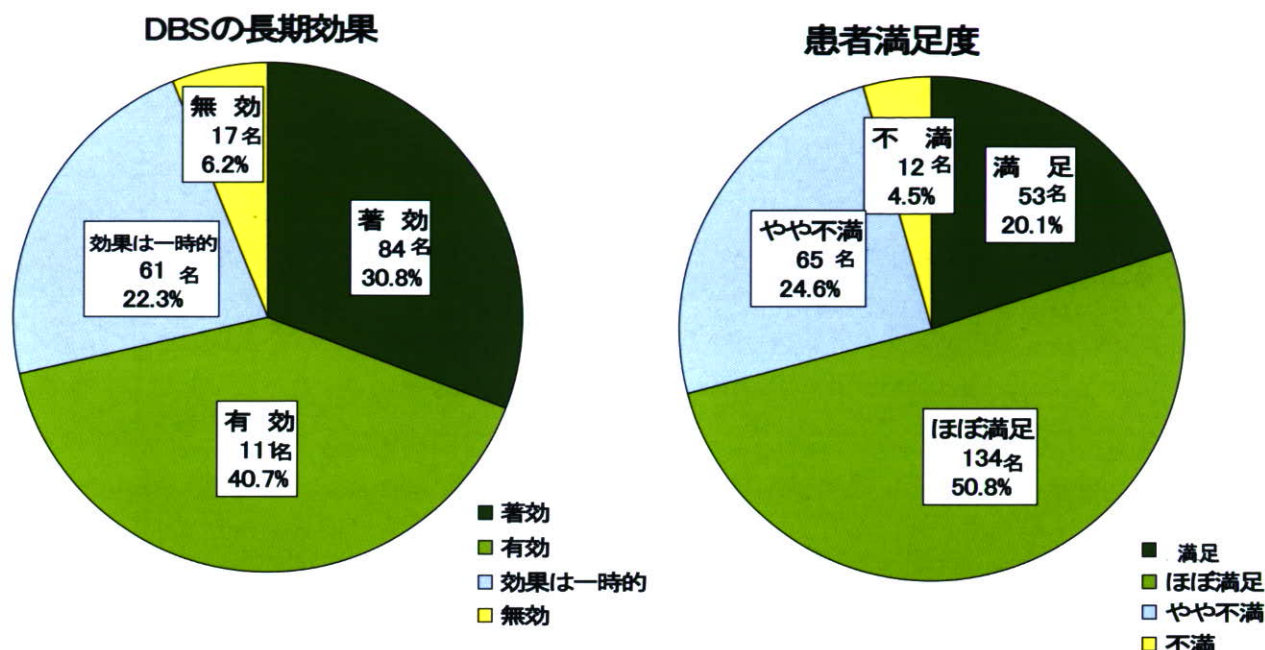
国際公開日 2006年10月19日

2. 実用新案登録 なし

3. その他

パーキンソン病における外科治療の有効性と患者満足度調査

難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班
 国立精神・神経センター武蔵病院 久野 貞子



進行期パーキンソン病の治療として深部脳刺激術(DBS)があるが、わが国ではDBSの有用性、長期効果、問題点等について十分に認知されていない。今回は患者の立場からのDBSの長期効果と満足度について、全国アンケート調査を行った。方法は、患者が気兼ねなく返答出来るよう、主治医が患者に調査票を手渡し、記載後患者会に郵送し、会で匿名処理後研究者が解析した。回答は287名から得られ、平均年齢は62.8歳、男性145名、女性136名、無記載5名であった。患者背景は発症年齢48.4歳、罹病期間14.1年、DBS術後期間は1年未満23.3%、1-3年42.5%、3-5年20.9%、5年以上が8.7%であった。手術部位は視床下核146名、淡蒼球22名、視床15名、残り不明。結果：振戦、筋固縮、ジスキネジアは術後著明改善し、効果も持続したが、書字、易転倒性、発声への効果は低かった。総合的な満足度は約70%であり、患者会のみ調査結果と主治医の結果の間であり、今後更に継続的な調査が必要と考えた。不満足の原因のうち、術前の説明が不十分なためと推定されるものが多く、今後施術者はDBSの説明に一層の工夫が必要と思われた。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）総合研究報告書

研究課題：神経変性疾患に関する調査研究

課題番号：H17-難治-一般-015

主任研究者：国立精神・神経センター武蔵病院 葛原茂樹

分担研究者：独立行政法人国立病院機構相模原病院 長谷川一子

分担研究者研究課題 PARK8 パーキンソニズムの原因遺伝子 LRRK2 の機能解析

1. 研究目的

相模原在住の常染色体優性遺伝様式を示す家族性パーキンソン病家系における連鎖解析を行い、原因遺伝子座を2002年にPARK8として登録した。PARK8パーキンソニズムは、孤発性パーキンソン病と同様の臨床像を示すため、孤発性パーキンソン病の原因解明にもつながることが期待されている。2004年にPARK8の原因遺伝子として、leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)が同定された。LRRK2は280kDaの分子量のタンパク質で、アミノ酸配列上、Ras small Gタンパク質ドメインとMAPKKKドメインを有する特徴的な構造をしており、LRRK2は何らかのシグナル伝達経路を担っていると考えられる。現時点では、LRRK2の機能に関しては未知であり、LRRK2の特異的抗体はLRRK2の機能を解析するための有力なツールとなり、抗体を用いた脳内分布や細胞内局在の解析から、LRRK2の機能に関する情報が得られると考え、LRRK2に対する特異的抗体の作製し、免疫組織化学的解析を行った。

2. 研究方法

LRRK2のキナーゼドメインを構成している1838番から2134番目までの297アミノ酸をグルタチオンSトランスフェラーゼとの融合タンパク質として大腸菌で発現させた。発現タンパク質をグルタチオンセファロースによるアフィニティクロマトグラフィにより均一に精製した。精製したタンパク質を用いて、定法の如くポリクロナル抗体とモノクロナル抗体を作成した。抗体作成後、精製し、ウェスタンブロットにより正しく抗原を認識

していることを確認した。

標的とした抗原を抗体が認識していることを確認後、チキンやラット、ヒト剖検脳に対する免疫組織化学を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト剖検脳の使用に際しては、国立病院機構相模原病院の倫理委員会規定に則り、研究目的での臓器利用に関する同意の得られているものを用いた。

3. 研究結果及び考察

作成したポリクロナル抗体、モノクロナル抗体について、特異性を確認するために、全長LRRK2をCOS細胞にトランスフェクションした細胞抽出液に対してウエスタンブロットングを行った。それぞれの抗体は、全長LRRK2と考えられる280kDaのバンドを強く認識した。LRRK2をトランスフェクトしていないCOS細胞抽出液においてはこのバンドは現れなかった。さらにポリクロナル抗体については、マウス脳抽出液に対してウエスタンブロットングを行ったところ、LRRK2をトランスフェクトしたCOS細胞で検出された280kDa付近のバンドと同じ位置にバンドを検出することができ、この抗体がマウス内在のLRRK2を認識できることを示した。また、280kDaのバンド以外に75kDa付近にも認識されるバンドがあり、LRRK2が脳内で限定分解産物としても存在している可能性が示唆された。

LRRK2の細胞内局在を調べるために、マウス脳を可溶性画分、ミトコンドリア画分、核画分に分画してから、ウエスタンブロッテ

イングにより LRRK2 が検出される場所を調べた。その結果、可溶性画分には LRRK2 は検出されず、核やミトコンドリア画分に主に存在していることが判明した。

ポリクロナル抗体を用いて、マウス脳に対する免疫組織化学的解析を行った。大型の神経細胞が免疫陽性となった。この免疫陽性細胞は脳全体に広く分布しており、ドーパミンニューロンなど特定のニューロンには局在していないことが示された。

脳の部位別に観察した結果、大脳基底核や海馬歯状回付近においては、核や核周囲に比較的強い免疫反応性が認められた。一方、大脳皮質や小脳プルキンエ細胞においては、核より核周囲や細胞質部分に比較的強い免疫反応性が認められ、脳の部位によって LRRK2 の細胞内局在が変化していると考えられた。

ヒト剖検脳においても同様の解析を行った。LRRK2 免疫陽性細胞は脳全体に広く分布した。細胞内局在においても核や核周囲が強く染色される部位と、核が染色されずに核周囲や細胞質が比較的強く染色される部位とが認められた。今回の我々の解析からは、LRRK2 がドーパミンニューロンに特に多く分布しているということは認められず、脳内の幅広いニューロンに広く散在していることが明らかとなった。LRRK2 の遺伝子変異がなぜドーパミンニューロンの変性をもたらすのか不明であるが、今回の結果から LRRK2 タンパク質自体の発現量とは直接関連しないことが示唆された。また、LRRK2 がニューロンの生存にとって重要な細胞内シグナルの伝達に関わっている可能性が高いことから、LRRK2 タンパク質の異常はパーキンソン病ばかりでなく、広く他の神経変性疾患を引き起こす可能性があることを示唆した。

また、LRRK2 の細胞内局在が同一個体においてもニューロン毎に差異があることがわかった。さらに、隣り合っているニューロンでも LRRK2 陽性となる細胞と陽性とならない細胞があることがわかった。このような違いがどのような理由により生じているのか解明していくことが、LRRK2 の機能の解明に繋がっていくと考えている。

4. 評価

1) 達成度について

ポリクロナル、およびモノクロナル抗体を作成し、免疫組織学的解析を開始し、当初の

予定を達成した。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

現在、免疫組織化学を施行中であり、解析結果から神経変性疾患全体に関与する事象が浮かび上がってきている。実証後発表予定である。

3) 今後の展望について

神経変性疾患の発症のメカニズム全般にかかわるブレークスルーを目指している。

4) 研究内容の効率性について

作業内容を分担して行っており、効率性の高い研究が実施できている。

5. 結論

PARK8 の原因遺伝子である LRRK2 に対するポリクロナル、およびモノクロナル抗体を作成した。詳細は現在解析中であるが、中枢神経に広く分布している事、核やミトコンドリア画分に主に存在していることを明らかとした。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	3 件
原著論文による発表	0 件
それ以外 (ビュー等) の発表	0 件

そのうち主なもの

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

学会発表

長谷川一子：第 46, 48 回日本神経学会総会

2) 海外

口頭発表	1 件
原著論文による発表	0 件
それ以外 (ビュー等) の発表	0 件

そのうち主なもの

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

学会発表

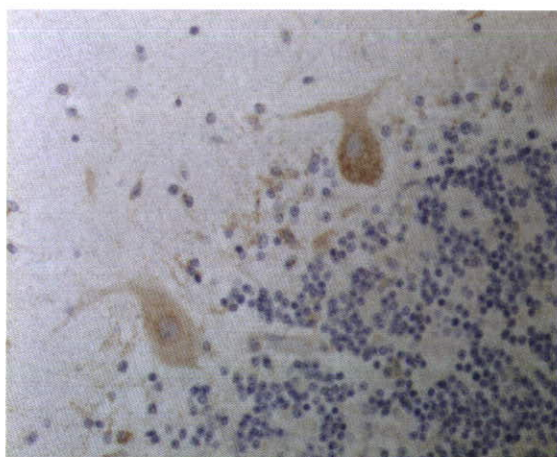
Hasegawa K: 19th international congress of Movement disorders. 2006

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

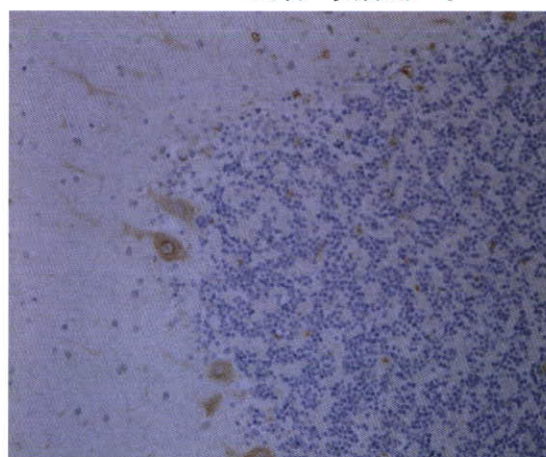
1. 特許取得	なし
2. 実用新案登録	なし
3. その他	なし

PARK8パーキンソニズムの原因遺伝子 LRRK2の機能解析

難治性疾患克服研究事業
神経変性疾患に関する調査研究班
所属 NHO相模原病院神経内科
氏名 長谷川一子



抗LRRK2ポリクロナル抗体



抗LRRK2モノクロナル抗体

- PARK8パーキンソニズムの原因遺伝子LRRK2の機能解析を行うために、ポリクロナルおよびモノクロナル抗体を作成した。
- LRRK2は中枢神経系に広範に発現しているが、部位により細胞内局在に差異が認められた。
- LRRK2は核やミトコンドリア画分に主に存在している。

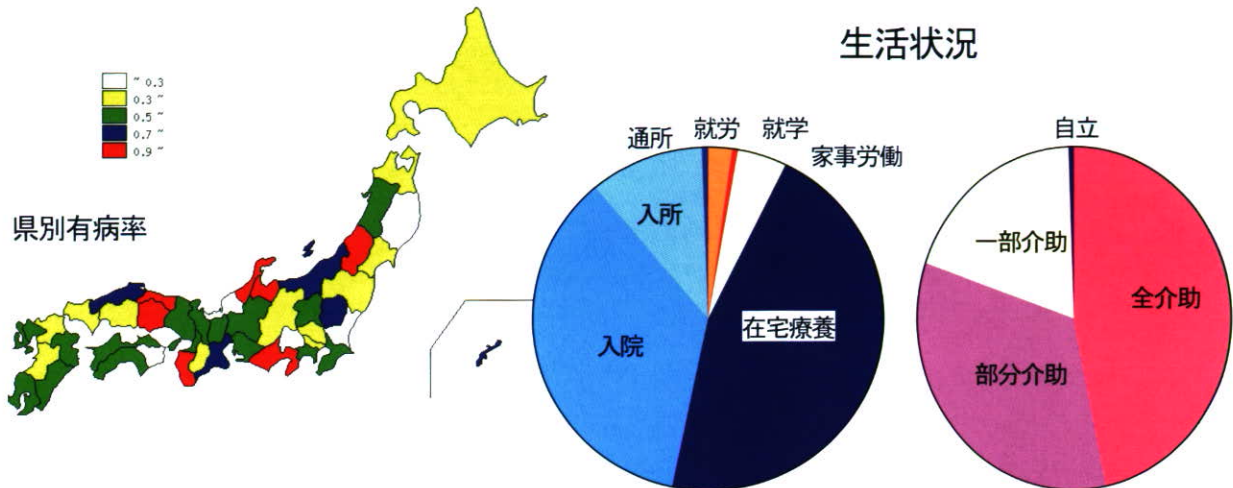
解説

- 相模原市に在住する常染色体優性遺伝様式を示すPARK8パーキンソン病の原因遺伝子LRRK2の機能をポリクロナルおよびモノクロナル抗体を作成し、免疫組織学的に解析した。
- PARK8パーキンソニズムは孤発性パーキンソン病と同様の臨床像を示すため、LRRK2の機能を明らかにすることは、孤発性パーキンソン病の病因を解明するブレークスルーとなる事が期待される。
- ポリクロナル、モノクロナル抗体による免疫組織学的検討の結果、LRRK2は中枢神経系に広範に発現しているが、部位により細胞内局在に差異が認められた。
- LRRK2の細胞内局在を細胞画分により検討すると、可溶性画分にはLRRK2は検出されず、核やミトコンドリア画分に主に存在する事が明らかとなった。

ハンチントン病の現状

難治性疾患克服研究事業
神経変性疾患に関する調査研究班
所属 NHO相模原病院神経内科
氏名 長谷川一子

ハンチントン病の有病率：0.58/10万人



- ・ハンチントン病の現状について特定疾患個人票をもとに調査した。
- ・有病率は人口10万人当たり0.58人で、図のように地域差がある。
- ・機能障害が高度で、在宅療養、入院、入所がほとんどで、自立している症例は少ない。
- ・未受診の症例も散見し、早期の臨床症状のコントロールが必要である。

解説

- ハンチントン病は昭和56年に特定疾患の指定をうけ、調査対象となった疾患である。しかし、有病率の低さも相まって、全国規模の調査は行われてこなかった。今回、特定疾患個人票をもとに実態を調査した。その結果、ハンチントン病の有病率は0.58人/10万人と算出できた。なお、図に示すように、地域差が認められた。
- 临床上は舞踏運動のほかに、様々な不随意運動を示す症例が多い。調査票からは明らかとされないが、巧緻障害を呈することが多く、早期から書字などが不能となり、就労不能となる。精神症状では、従来、認知症、性格変化などが指摘されていたが、衝動性行動や強迫行動がみられ、社会生活を阻害する因子となる傾向がみられる。
- 患者会から得られた情報によれば、医療拒否の症例や家庭内暴力を呈することもまま見受けられ、これらの根底には医療不信も見受けられる。今後、「ハンチントン病療養の手引き」を作成し、患者および介護者を支援していく予定である。

研究課題：神経変性疾患に関する調査研究

課題番号：H17-難治-一般-015

主任研究者：国立精神・神経センター武蔵病院 葛原茂樹

分担研究者：東北大学大学院神経内科学 青木正志

分担研究者研究課題：ALS 運動ニューロン変性における細胞外環境の関与

1. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, 以下 ALS）は系統的かつ進行性の運動ニューロン変性を本態とする致死的神経変性疾患である。現時点で有効な治療法がないため新規治療法の開発が強く求められている。我々は自ら開発したALSの新しい動物モデル、ヒト変異 *Cu/Zn SOD* トランスジェニックラットを用い、運動ニューロンをとりまく細胞外環境に着目してその変性病態における意義を解明する。

2. 研究方法

脊髄における運動ニューロン変性と関連する細胞外環境の変化を明らかにするため、細胞外基質の主要構成成分として知られるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）の沈着を蛍光免疫組織化学および免疫ブロッティング法で解析した。CSPG は中枢神経系に広く発現する分子群で軸索再生阻害活性や細胞遊走阻害能をもつ代表的な再生阻害因子でもあり、神経損傷により発現が亢進することが知られる。

（倫理面への配慮）

すべての遺伝子操作は本学 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。

3. 研究結果及び考察

対照に比し ALS モデルラット脊髄の主病変部位（前角とその周囲白質）では、いずれのCSPGについても蛍光免疫組織化学で有意な沈着亢進が明らかとなった。なかでも *neurocan* は有意な運動ニューロン脱落のない発症前から始まる進行性の沈着を示し、本病態とのより強い関連が示唆された。免疫ブロッティングでは、発症後期の Tg ラットに

沈着する *neurocan* は成体脊髄では生理的にほとんど検出されない全長型を含んでいることが示された。一方、*versican* と *phosphacan* は発症早期までに沈着亢進をみせた後、発症後期にはその沈着が軽度低下した。さらに、細胞選択的マーカーとの二重蛍光免疫組織染色により *neurocan*, *phosphacan* と反応性アストロサイトとの共局在が認められ、同細胞のCSPG沈着への関与が示唆された。以上より、損傷や虚血といった急性病態では複数報告されてきたCSPG沈着亢進が、慢性進行性の変性病態においても生じることが明らかとなった。このようなCSPG沈着亢進は、運動ニューロン脱落に伴って早期より生じるとされるグリオーシスとともに神経再生に対して非許容的な環境を形成している可能性がある。

4. 評価

1) 達成度について

限られた人員および予算にかかわらず、当初の計画は達成されたと考えている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

近年、成体脊髄にも内在性の神経幹（前駆）細胞が存在し潜在的神経再生能があることが報告され、ALSのような変性脊髄に対しても細胞補充療法が新たな治療戦略として注目を集めている。しかし本研究の成果から、細胞外に著しく沈着するCSPGが神経突起伸展・シナプス形成といった補充細胞の機能的組込みを阻害する障壁となり得ることが示唆された。すなわち、ALSにおける再生誘導療法開発においては単に移植等による細胞補充のみならず再生を許容しやすい環境（再生の場）の形成が必要である可能性を示唆している。このような報告は国際的にも未だなされておらず重要な意義がある。

3) 今後の展望について

本研究で明らかになった ALS モデルラット脊髄における CSPG 発現亢進の病態への関与については、CSPG の発現抑制あるいは分解を試みる介入研究を行って明らかにしていく必要がある。今後、細胞補充療法を含め再生誘導療法を開発していく上では、このような細胞外微小環境を標的とした治療戦略が重要な組合せ療法のひとつとなり得ると考えられ、新規治療法開発への寄与が期待される。

4) 研究内容の効率性について

本研究で用いたラットの ALS モデルはヒト ALS の病態をよく再現しており従来のマウスモデルに比して解析・介入研究が容易である。さらに国内外においてもラットの ALS モデルを擁して種々の解析系を確立している施設は限られており、本研究の効率性は高い。

5. 結論

細胞外微小環境を標的とした治療法開発が ALS 新規治療法開発につながる可能性がある。とりわけ、変性脊髄における再生誘導戦略においては、本研究のような再生許容環境の構築を念頭においた治療法開発が細胞補充の組合せ療法として重要であると考えられる。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 12 件
原著論文による発表 0 件
それ以外 (レビュー等) の発表 5 件
そのうち主なもの

学会発表

割田 仁 ほか、発症後の ALS モデルラットにおける再生誘導因子の髄腔内複合投与, 第 47 回日本神経学会総会 2006.5 東京

水野秀紀 ほか、ALS モデルラット脊髄における再生阻害因子の発現, 第 47 回日本神経学会総会 2006.5 東京

水野秀紀 ほか、ALS モデルラット脊髄におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの変化, 第 48 回日本神経学会総会 2007.5 名古屋

2) 海外

口頭発表 11 件

原著論文による発表 9 件
それ以外 (レビュー等) の発表 0 件

そのうち主なもの

論文発表

Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y. Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in ALS transgenic rats, *J Neurosci Res*, in press

Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y. Intrathecal delivery of HGF from the ALS onset suppresses disease progression in a rat ALS model, *J Neuropathol Exp Neurol*, (2007) 66: 1037-1044

Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Sobue G, Aoki M, Itoyama Y, Okano H: Analyzing the disease progression of phenotypically variable SOD1 (G93A) rats, *J Neurosci Res*, (2006) 83: 119-133

学会発表

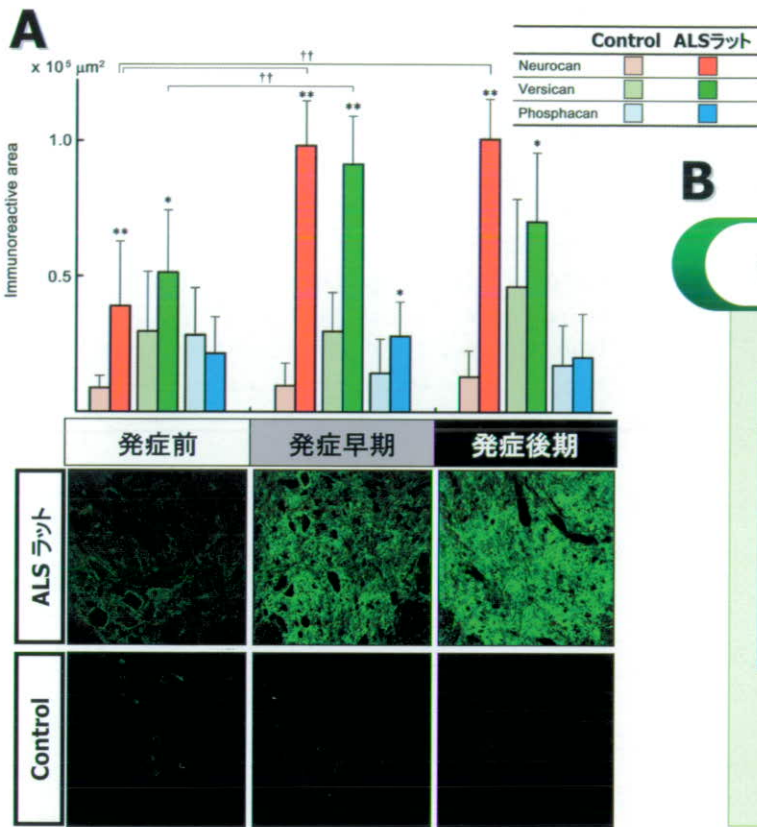
Aoki M, Ishigaki A, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y. Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor at the onset of paralysis slows disease progression in a rat of ALS. 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, Japan, 30 November - 2 December, 2006

Warita H, Aoki M, Nagai M, Ishigaki A, Mizuno H, Funakoshi H, Itoyama Y. Intrathecal infusion of anti-hepatocyte growth factor antibody exacerbates disease progression in a rat model of ALS. 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, Japan, 30 November - 2 December, 2006

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
ラットを用いた ALS モデル (出願済)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ALSモデルラット脊髄におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の沈着亢進と細胞外環境の重要性



難治性疾患克服研究事業
 神経変性疾患に関する調査研究班
 東北大学大学院神経内科学 青木正志



図: ALSモデルラット脊髄におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の沈着亢進と細胞外環境の重要性

A: 脊髄前角における主要なCSPG (neurocan, versican, phosphacan) の免疫組織化学とその陽性面積の半定量解析。上段のグラフに示すように、control (週齢一致正常同腹仔) と比較してALSラットではいずれのCSPGも有意な沈着亢進がみられる (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, †† $p < 0.01$)。なかでもneurocanはもっとも顕著かつ進行性の沈着を示す(中段パネル: ALSラット、下段パネル: control、左から右へ発症前、発症早期、発症後期)。一方でversicanとphosphacanの沈着ピークは発症早期にみられ、発症後期にはその程度を減じることが分かる。

B: ALSにおける変性脊髄では運動ニューロンの選択的・系統的変性が病態の中核をなすが、本研究で明らかになったCSPG沈着のように運動ニューロンをとりまく細胞外環境もまた重要と考えられ、治療の標的となり得る。CSPGは細胞外基質の主要構成成分であるとともに損傷脊髄では発現が亢進して軸索伸展障害や細胞遊走障害にはたらく代表的な再生障害因子(矢印)である。とりわけ細胞補充を含めた再生誘導の観点からは、CSPG沈着亢進はグリオースिसとともに神経再生に対して非許容的な環境形成につながっている可能性がある。したがって、再生障害因子の抑制やグリオースिसのコントロールが将来的な神経再生誘導療法開発に役立つかもしれない。