

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：岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 神経病態内科学 阿部康二

分担研究者研究課題：筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と治療法の開発

1. 研究目的

原因不明で有効な治療法が存在しない筋萎縮性側索硬化症（ALS）の分子病態解明と新規治療法の開発を目的とする。

2. 研究方法

ALS モデル動物である、変異型 SOD1 遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いて、選択的運動神経細胞死の分子病態解析と治療法開発の研究に取り組んでいる。

（倫理面への配慮）

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究」「疫学的研究」「臨床研究」に関する倫理指針を遵守し、研究に用いられる動物も適切な方法で安楽死が行われる。

3. 研究結果及び考察

ALS モデルマウス脊髄において、最近注目されている細胞内タンパク処理システムである autophagy の亢進やミトコンドリア DNA 修復酵素の発現低下といった新たな ALS の分子病態を解明した。また治療法の開発に関連して、神経栄養因子である EGF および FGF2 の脊髄腔内投与が内在性の神経幹細胞の増殖と脊髄前角への移動を誘導すること、また IGF-1 の脊髄腔内投与が ALS モデルマウスおよび ALS 患者の神経症状の進行を抑制しうることなどを

明らかにした。

4. 評価

1) 達成度について

当初に計画していた研究目標はほぼ達成されている。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

神経栄養因子の脊髄腔内投与が ALS 治療の候補となりうる基礎データを明らかにし、特に IGF-1 の脊髄腔内投与療法は ALS 患者を対象としてその有効性が確認された。ALS の治療として今後の臨床応用に希望を与えている。

3) 今後の展望について

今後も ALS の分子病態解析と、それらの知見を基に臨床応用可能な治療法を開発するという両面からの研究を推進していく。

4) 研究内容の効率性について

病態解明に関する基礎的な研究と臨床に即した治療法開発研究がバランスよく効率的に実施されている。

5. 結論

これまで知られていなかった、autophagy やミトコンドリア DNA 修復酵素の ALS 分子病態への関与を明らかにし、神経栄養因子の脊髄腔内投与の実験的および臨床的有効性を明らかにするなど、難病 ALS の克服へ向けて大きな成果を上げている。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	20 件
原著論文による発表	1 件
それ以外 (ビュー等) の発表	9 件

2) 海外

口頭発表	14 件
原著論文による発表	18 件
それ以外 (ビュー等) の発表	1 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

- Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, Miyazaki K, Kurata T, Morimoto M, Murakami T, Takehisa Y, Ikeda Y, Kamiya T, Abe K. Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 2007; 1167: 112-117.
- Murakami T, Nagai M, Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Kurata T, Takehisa Y, Kamiya T, Abe K. Early decrease of mitochondrial DNA repair enzymes in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice carrying a mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 2007; 1150: 182-189.
- Ohta Y, Nagai M, Nagata T, Murakami T, Nagano I, Narai H, Kurata T, Shiote M, Shoji M, Abe K. Intrathecal injection of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes proliferation of neural precursor cells in the spinal cords of mice with mutant human SOD1 gene. *J Neurosci Res.* 2006; 84: 980-992.
- Sasaki S, Warita H, Komori T, Murakami T, Abe K, Iwata M.: Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 2006; 1083: 196-203.
- Narai H, Nagano I, Ilieva H, Shiote M, Nagata T, Hayashi T, Shoji M, Abe K. Prevention of spinal motor neuron death by insulin-like growth factor-1 associating with the signal transduction systems in SODG93A transgenic mice. *J Neurosci Res.* 2005; 82: 452-457.
- Nagano I, Shiote M, Murakami T, Kamada H, Hamakawa Y, Matsubara E, Yokoyama M, Moritaz K, Shoji M, Abe K. Beneficial effects of intrathecal IGF-1 administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res.* 2005; 27: 768-772.
- Nagano I, Ilieva H, Shiote M, Murakami T, Yokoyama M, Shoji M, Abe K. Therapeutic benefit of intrathecal injection of insulin-like growth factor-1 in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci.* 2005; 235: 61-68
- Sasaki S, Warita H, Abe K, Iwata M.: Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol (Berl).* 2005; 110: 48-56.

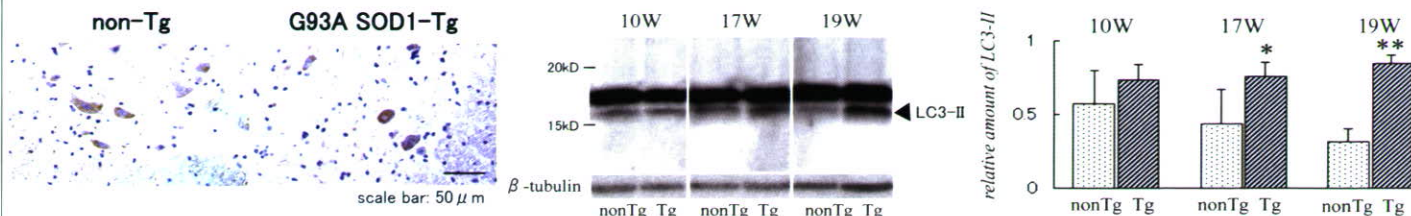
7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

- 特許取得：特になし
- 実用新案登録：特になし
- その他：特になし

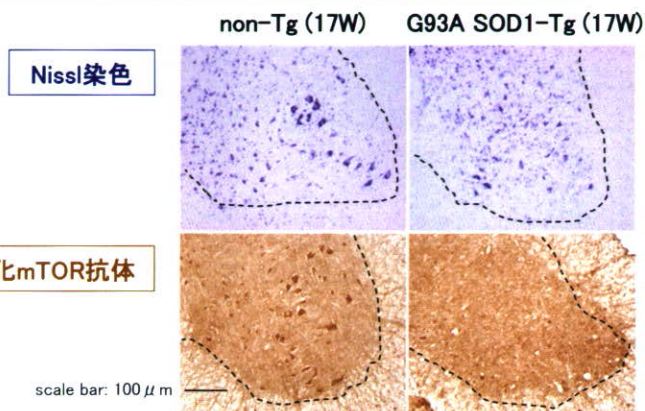
ALSの発症機序におけるautophagyの役割について

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
岡山大学神経内科 阿部康二

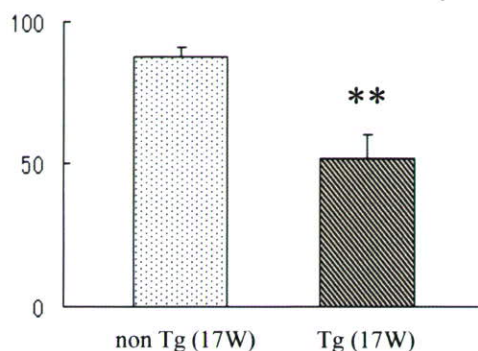
抗LC3抗体を用いた脊髄前角の免疫染色とイムノブロット解析



抗リン酸化mTOR抗体を用いた脊髄前角の免疫染色



Ratio of immunopositive motor neurons for anti phospho-mTOR (%)



【解説】

Autophagyは細胞質内でautophagosomeを形成し、不要なタンパクを自己消化する機構であり、autophagosomeの形成に重要な膜タンパクであるLC3はautophagyのマーカーの1つである。ALSモデル動物である、G93A変異型ヒトSOD1トランスジェニックマウス(Tg)を用いてALSの運動ニューロン変性におけるautophagyの役割について検討した。LC3に対する抗体を用いた脊髄前角の免疫染色では運動ニューロンの細胞質が染色され、イムノブロット解析ではLC3- IIの発現量は発症初期(17週齢)以降のTg群で対照群に比べて有意差をもって増加していることが明らかになった。

またautophagyを抑制する機構に関与するとされている、mTORに対する抗体を用いた脊髄前角の免疫染色による検討では、残存運動ニューロンにおけるリン酸化mTOR陽性細胞の割合を、残存した運動ニューロン(Nissl染色陽性)数に対する比をとって算出した。その結果、Tgマウスでリン酸化mTOR陽性細胞の割合が有意差をもって減少していることが判明した。

以上より、ALSモデルマウス脊髄前角における発症初期でのLC3- II 発現量の増加は、ALS の発症とautophagosome形成増加・autophagy亢進の関連を示唆し、autophagy抑制因子であるリン酸化mTORの減少もALS におけるautophagyの亢進に関与していると考えられ、autophagyがALS の発症に伴って変化していることを明らかにした。

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：信州大学医学部内科（脳神経内科，リウマチ・膠原病内科）池田修一

分担研究者研究課題

パーキンソン病における α -synuclein の生体内動態と診断的利用に関する研究

1. 研究目的

α -synuclein(asy)をバイオマーカーとして、臨床的に鑑別困難なパーキンソンニズムに対する生化学的な鑑別法を確立するとともに、パーキンソン病モデル動物を用いて、asy の動態を評価し、細胞内凝集のメカニズムを解明する

2. 研究方法

- 1) Sandwich-ELISA 系を用いてパーキンソン病患者血漿，脳脊髄液中 asy 濃度を測定
- 2) パーキンソンニズムを呈する患者の脳脊髄液中 asy 濃度と MIBG 心筋シンチグラムの集積率の組み合わせによりパーキンソン病，多系統萎縮症，その他のパーキンソン症候群を鑑別する
- 3) セルロプラスミン欠損マウス(酸化ストレスマウス)に少量のロテノン(ミトコンドリア複合体 I 阻害物質)を投与しパーキンソン病モデルを作成し，asy の経時的動態について評価する

（倫理面への配慮）

当該施設倫理規定に則り研究遂行。
特に患者髄液採取に関しては，十分な説明と同意を得た上で行う。

3. 研究結果及び考察

- 1) パーキンソン病患者では脳脊髄液中 asy 濃度が低下していた。血漿中では対照と変わりなかった。
- 2) 1)の結果を踏まえ，多系統萎縮症，その他のパーキンソン症候群を加えて脳脊髄液中 asy 濃度を測定した。一方，同じ症例に対し MIBG 心筋シンチグラムを施行し，心筋への

集積(H/M 比)を評価した。

脳脊髄液中 asy 濃度はパーキンソン病群，多系統萎縮症群で低下し，その他のパーキンソン症候群群では正常であった。H/M 比はパーキンソン病群で低下し，多系統萎縮症群，その他のパーキンソン症候群群では正常であった。その結果から，2つの検査を組み合わせる事により，90%近い確率で3つの疾患群を鑑別する事が可能であった。

3) パーキンソン病患者の脳脊髄液で asy 濃度が低下するメカニズムを解明するため，先述のモデルマウスを用いて検討したところ，脳内で寡量体とリン酸化 asy の増加が確認された。患者での asy 濃度の低下は，凝集，不溶化による見かけ上の低下である事が示唆された。

4. 評価

1) 達成度について

Asy を用いた診断法については，ほぼ確立されたと考えるが，測定系の精度上昇と病理組織学的に確定診断された症例による評価が必要。

モデル動物を用いた実験に関しては，今後，asy 凝集に関するメカニズムの解明を進める必要がある。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

パーキンソン病において asy がキー蛋白とされていることは周知の事実となっているが，本蛋白の本質的機能については未だ解明されていない。しかし本研究は患者生体内での本蛋白動態を解明し，診断的利用の可能性を見いだしたものであり，社会的意義は大きい。動物実験により本蛋白動態のメカニズムの解明が得られれば，学術的にも大きな意義があらうと考えられる。

3) 今後の展望について

パーキンソニズムを呈する疾患の診断に関しては、蛋白測定精度の上昇と、数的に更に大規模な検討を加える必要が有る。α-synuclein 濃度変化のメカニズム解明のため、更にモデル動物の解析を進める予定。

4) 研究内容の効率性について

5. 結論

パーキンソニズムを呈する患者脳脊髄液中の asy 濃度を測定し、疾患により濃度に一定の傾向が有る事を見いだした。

動物実験の結果から、パーキンソン病患者脳脊髄液中の asy 濃度低下は、本蛋白の凝集に伴う不溶化による可能性があった。

本蛋白濃度と MIBG 心筋シンチグラムと組み合わせる事により、診断的に利用できる可能性が示唆された。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 10 件

原著論文による発表 1 件

それ以外 (ビュー等) の発表 2 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

吉田邦広 他, 長野県在住の筋萎縮性側索硬化症患者の臨床的重症度と療養実態. 信州医誌 vol55:4:181-190,2007

池田修一, 神経型 Wilson 病の臨床像と診断. 医学のあゆみ vol216:11:819-821,2006

学会発表

兼子一真 他, パーキンソン病患者における血漿, 髄液中α-synuclein 定量
第 47 回日本神経学会総会, 2006

日根野晃代 他, 髄液中α-synuclein 定量と [123I]-MIBG 心筋シンチグラムの組み合わせによる Parkinsonism の鑑別
第 48 回日本神経学会総会, 2007

2) 海外

口頭発表 2 件

原著論文による発表 9 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

Yoshida K. et al, Nationwide survey on predictive genetic testing for late-onset, incurable neurological disease in Japan. *J Hum Genet* 52:675-679, 2007

Morita H. et al, Lack of modulation of Ib inhibition during antagonist contraction in spasticity. *Neurology* 67:52-56, 2006

Hashimoto T. et al, Presurgical Factors Affecting Patient Satisfaction with Pallidal Surgery in Parkinson's Disease. *Stereotact Funct Neurosurg* 84:24-27, 2006

学会発表

Morita H. et al. Increase in reflex gain of motoneuron pool in spasticity.

International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders, 2006

Shimajima Y. et al. The safety of transcranial magnetic stimulation in patients treated with deep brain stimulation.

The 28th International Congress of Clinical Neurophysiology, 2006

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

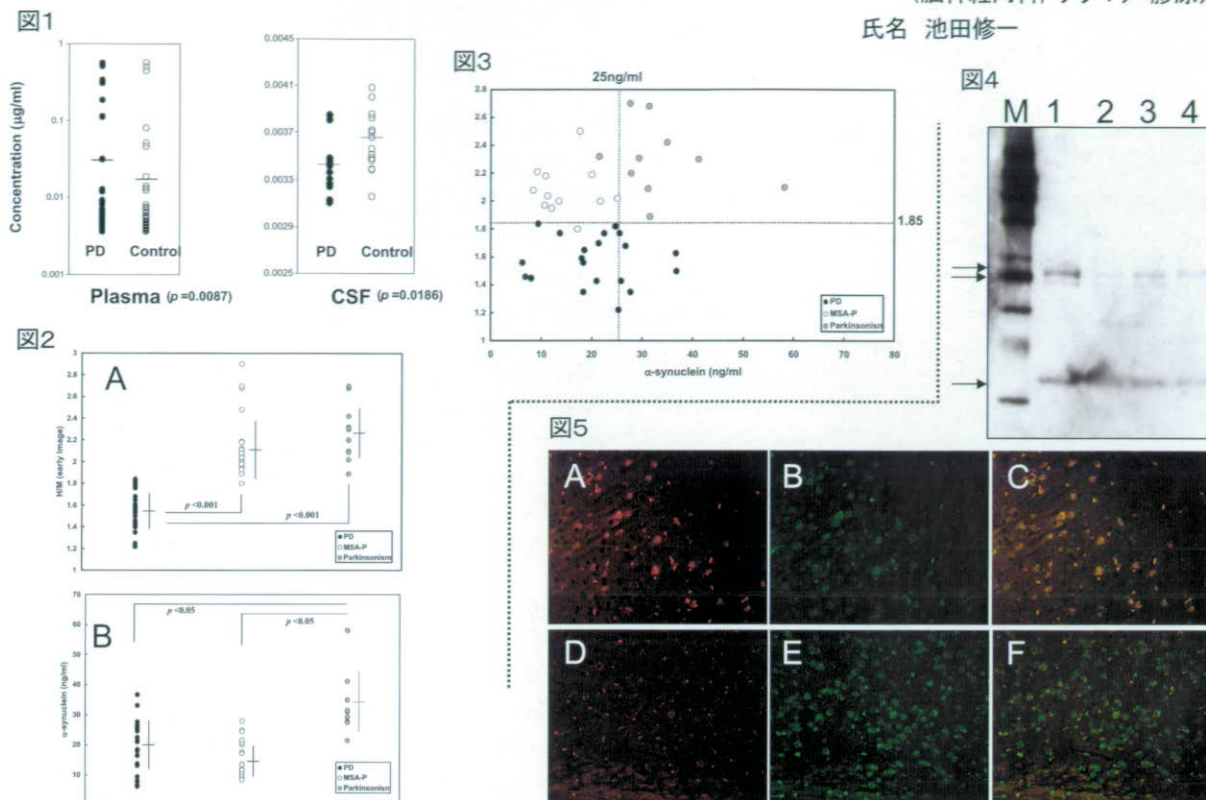
1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

パーキンソン病における α -synucleinの生体内動態と診断的利用に関する研究

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 信州大学医学部内科
 (脳神経内科, リウマチ・膠原病内科)
 氏名 池田修一



解説

図1 パーキンソン病患者 (PD) と対照 (control) で血漿 (plasma) および脳脊髄液 (CSF) 中 α -synuclein 濃度を定量した。血漿中では患者と対照で有意な差は認められなかったが、脳脊髄液中では PD 患者で有意に低下していた。

図2 多系統萎縮症 (MSA) を含め、パーキンソニズムを来した患者脳脊髄液で α -synuclein 濃度を定量し、MIBG 心筋シンチグラムの結果と対比した。A: MIBG の心筋への集積 (H/M 比) は従来の報告と同様、PD 群で低下し、MSA およびその他のパーキンソン症候群 (PS) では低下を認めなかった。B: 脳脊髄液 α -synuclein 濃度は PD および MSA 群は PS 群に対し、有意に低下していた。

図3 PD 群、MSA 群、PS 群を H/M 比、 α -synuclein の 2 つのパラメーターで分類した。H/M 比の cut-off 値を 1.85、 α -synuclein 濃度の cut-off 値を 25 ng/ml とすると、感度、特異度ともに約 90% の確立で、PD、MSA、PS を区別する事が可能であり、診断的利用の可能性が見いだされた。

パーキンソン病における α -synuclein 濃度変化のメカニズムについて、セルロプラスミン欠損 (Cp-/-) マウスを用いた新しいモデルを作成し検討を開始した。セルロプラスミンは強力なフェロキシダーゼ活性を有し、その欠損患者脳では鉄の過剰沈着により酸化ストレスが亢進し、著しい組織障害が起こる事が知られている。Cp-/- マウスは臨床的症状、組織学的変化ともに認めないが、一定の負荷を加える事により、正常マウスに比して強い変化を生じると考えられている。今回、比較的少量のロテノンに Cp-/- マウスに投与し、パーキンソン病モデルを作成した。

図4 ロテノン投与4週後のマウス脳をホモジネイトし、抗 α -synuclein 抗体を用いたイムブロッティングにより評価した。M: molecular weight marker. 1: Cp-/-, ロテノン+. 2: Cp-/-, ロテノン-. 3: Cp+/+, ロテノン+. 4: Cp+/+, ロテノン-. 1-4 すべてに α -synuclein 単量体の明瞭なバンドを認める (1本矢印)。1で2量体の強いバンドを認める (2本矢印) が、2-3では弱い。ロテノン投与された Cp-/- マウスで α -synuclein の凝集傾向が強い事が示唆された。

図5 マウス嗅内野組織免疫組織化学像。A-C: Cp+/+, ロテノン+ マウス。D-F: Cp-/-, ロテノン- マウス。A, D: 抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体による染色。B, E: 抗リン酸化 α -synuclein 抗体による染色。C, F: それぞれ A・B, D・E の融合像。A-F すべて倍率 200 倍。Cp-/- マウスではロテノン負荷により TH 陽性細胞が減少し、リン酸化 α -synuclein の発現が増加している。

以上から PD 患者髄液における α -synuclein 減少のメカニズムとして、本蛋白の凝集変性の関与が示唆された。

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：東邦大学医療センター大森病院神経内科 岩崎泰雄

分担研究者研究課題

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療薬開発に関する研究

1. 研究目的

難治性疾患であるALSの治療法を開発するために運動ニューロン病のモデル動物を用いた実験研究を行った。

2. 研究方法

グルタミン酸を添加した脊髄器官培養、新生児ラットの坐骨神経切断モデル、wobblerマウスの3種類の運動ニューロン病モデルを使用した。これら実験系における、tacrolimus、atorvastatinの神経保護効果を検討した。

（倫理面への配慮）

倫理面に関しては、本研究が non-human animal experimental trial であるため、実験施設の動物倫理委員会ガイドラインに準じて施行した。

3. 研究結果及び考察

1. グルタミン酸を添加した脊髄器官培養、新生児ラットの坐骨神経切断モデルにおいて、tacrolimus は運動ニューロンの生存を有意に促進した。

2. Atorvastatin はグルタミン酸を添加した脊髄器官培養の運動ニューロンに保護的に作用した。また、本薬剤は wobbler マウスの運動徴候を有意に遅延し、脊髄運動ニューロンと脱神経所見を有意に軽減した。

免疫抑制剤の tacrolimus、スタチン製剤の atorvastatin には障害された運動ニューロンに対して、保護的に作用が確認された。ALS 患者の生存を延長する薬剤開発の資料となると考えられた。

4. 評価

1) 達成度について

実験結果は達成できたと考えられたが、薬剤の用量や機序など詳細な点をさらに検討する必要性が生じた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

Tacrolimus や Atorvastatin の研究成果は2005年から2006年にかけて、米国神経学会である American Neurological Association や国内学会で発表した。Atorvastatin の wobbler マウスの研究成果は、来年度に米国と国内の学会で発表する予定である。

3) 今後の展望について

グルタミン酸を添加した脊髄器官培養、新生児ラットの坐骨神経切断モデル、wobbler マウスの3種類の運動ニューロン病モデルを活用して、運動ニューロン変性を抑制できる薬剤を発見していきたい。

4) 研究内容の効率性について

すでに確立された運動ニューロン疾患モデルを使用しているために、再現性に優れている。また、今回用いた3つの動物実験系は in vitro と in vivo の治療効果をそれぞれ判定できる利点があるので、効率的に一つの薬剤の評価ができる。

5. 結論

日常の臨床で使用されている免疫抑制剤の tacrolimus やスタチン製剤の atorvastatin には、多機能作用がある点が注目されてきたが、ALS 治療にも役立つ可能性が示唆された。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	7件
原著論文による発表	0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）

学会発表

1. 池田 憲, 青柳 丞, 市川靖充, 平野貴代子, 渡部和彦, 岩崎泰雄: 成体ラット運動ニューロン損傷に対する minocycline の治療効果. 第46回日本神経学会総会. 鹿児島, 2005. 5
2. 五十嵐 修, 市川靖充, 清塚鉄人, 青柳 丞, 岩本康之介, 平野貴代子, 川辺清一, 井口裕章, 藤岡俊樹, 池田 憲, 岩崎泰雄: グルタミン酸及び脊髄運動ニューロン死に対する IGF-I の神経保護効果. 第45回日本神経学会総会. 鹿児島, 2005. 5
3. 池田 憲, 馬場繁二, 岩崎泰雄: In vitro と in vivo 運動ニューロン障害モデルに対する Tacrolimus の効果. 第47回日本神経学会総会. 東京, 2006. 5
4. 池田 憲, 榎原英俊, 田村政紀, 岩崎泰雄: 人間ドックによるパーキンソン病の早期診断と有病率の調査. 第48回日本神経学会総会. 名古屋, 2007. 5
5. 狩野 修, 池田 憲, 荒崎圭介, 岩崎泰雄: 筋萎縮性側索硬化症の診断に至るまで: 新旧診断基準の比較検討. 第48回日本神経学会総会. 名古屋, 2007. 5
6. 佐藤龍太, 狩野 修, 伊藤裕乃, 岩本康之介, 川瀬祐士, 川辺清一, 井口裕章, 池田 憲, 藤岡俊樹, 岩崎泰雄: Parkinson 病における pramipexole の抗うつ効果の検討: 運動機能との関連性. 第25回日本神経治療学会総会. 仙台. 2007. 6

2) 海外

口頭発表	7件
原著論文による発表	5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

1. Iwasaki Y, Igarashi O, Iwasa Y, Hirano K, Satoh R, Iwamoto K, Kawase Y, Aoyagi J, Ichikawa Y, Kawabe K, Ikeda K: Bilirubin and amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 107: 160, 2005
2. Igarashi O, Ikeda K, Iwasaki Y: The relation between trace elements and amyotrophic lateral

sclerosis. *Biomed Res Trace Elements* 16: 9-11, 2005

3. Iwasaki Y, Ikeda K, Igarashi O, Baba S: Depression is associated with impairment of ADL, not motor function in Parkinson disease. *Neurology* 66: 956, 2006

4. Ikeda K, Kashihara H, Tamura M, Kano O, Iwamoto K, Iwasaki Y: Body mass index and the risk of Parkinson disease. *Neurology* 68: 2156-2157, 2007

5. Kano IO, Arasaki K, Ikeda K, Iwasaki Y: Slower disease progression and prolonged survival in contemporary patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 64: 458-459, 2007

学会発表

1. Iwasaki Y, Ikeda K, Kawabe K, Hirano K: Atorvastatin protects spinal motor neurons from glutamate-mediated neurotoxicity. 130th Annual Meeting of the American Neurological Association, San Diego, 2005. 9
2. Ikeda K, Aoyagi J, Baba S, Iwasaki Y: Neuroprotective effects of tacrolimus on three models of spinal motoneurons damage. 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, 2006. 11
3. Ikeda K, Aoyagi J, Baba S, Iwasaki Y: Therapeutic comparison of tacrolimus in experimental models of damaged spinal motoneurons. 131st Annual Meeting of the American Neurological Association, Chicago, 2006. 10
4. Igarashi O, Ikeda K, Araki Y, Baba S, Iwasaki Y: Antidepressant effects of pramipexole in Parkinson's disease. 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto, 2006. 10
5. Ikeda K, Kano O, Iwamoto K, Iwasaki Y: Green tea-containing food delays progression wobbler mouse neuromuscular disease. 132nd Annual Meeting of the American Neurological Association, Washington DC, 2007. 10
6. Kano O, Ikeda K, Arasaki K, Iwasaki Y: Changes in the progression of diagnostic interval and pathway in amyotrophic lateral sclerosis in Japan. 132nd Annual Meeting of the American Neurological Association, Washington DC, 2007. 10
7. Iwasaki Y, Ikeda K, Kano O, Kawabe K, Murata K: Atorvastatin protects spinal motor neuron death from axotomy induced neuronal death. 132nd Annual Meeting of the American Neurological Association, Washington DC, 2007. 10

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

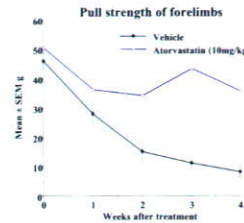
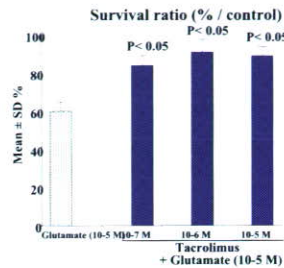
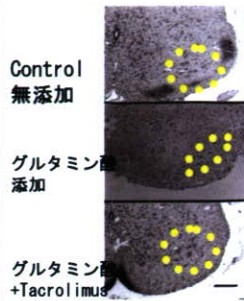
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

グルタミン酸添加の脊髄器官培養, 新生ラット坐骨神経切断モデル, Wobblerマウスを用いた筋萎縮性側索硬化症の治療薬開発

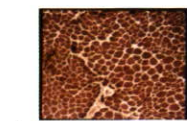
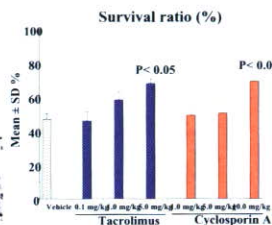
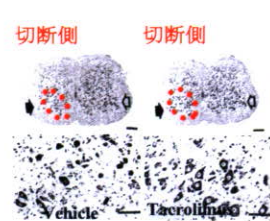
難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する調査研究班
東邦大学医療センター大森病院神経内科 岩崎泰雄

1. グルタミン酸を添加した脊髄器官培養

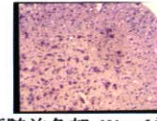
3. Wobblerマウスに対するatorvastatin療法



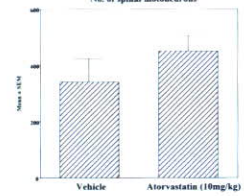
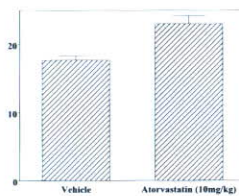
2. 新生児ラットの坐骨神経切断モデル



上腕二頭筋 ATPase染色



頸髄前角部 Nissl染色



本実験の要約: 日常の臨床で使用されている免疫抑制剤のtacrolimusやスタチン製剤のatorvastatinには, 多機能作用を有することが着目されているのが, ALS患者の治療にも役立つ可能性が示唆された。
今後の展望: 3種類の運動ニューロン病モデルを同時に活用して, ALSの運動ニューロン変性を制止できる薬剤を発見し, 開発していきたい。

解説

1. グルタミン酸を添加した脊髄器官培養

グルタミン酸の添加により, 約40%の運動ニューロンが死滅した。一方, tacrolimusを同時に添加すると運動ニューロンの死滅が有意に減少できた。

2. 新生児ラットの坐骨神経切断モデル

生後24時間以内に新生児ラットの坐骨神経を切断すると, 約50%の脊髄運動ニューロンが死滅した。このモデルにneuroimmunophilinであるtacrolimusやcyclosporin Aを投与すると, 脊髄運動ニューロン死が有意に抑制された。

3. Wobblerマウスに対するatorvastatinの治療効果

本薬剤の混餌投与(10mg/日)した2週間後から前肢の筋力低下の進行を有意に遅延した。神経病理学的な検討では, 上腕二頭筋の脱神経所見と頸髄の運動ニューロン変性を有意に軽減した。

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：熊本大学大学院医学薬学研究部 神経内科学分野 内野 誠

分担研究者研究課題

逆行性軸索輸送を用いた Bcl-2 発現による ALS モデルマウスの運動神経変性に対する治療効果

1. 研究目的

我々は、致死的な進行性神経難病である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療を目指している。ALS に対する遺伝子治療法の開発の基礎研究として、今回我々は、変異ヒト SOD1 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りヒト Bcl-2 を過剰発現させ、運動ニューロン変性の抑制効果およびその抑制機序について検討した。

2. 研究方法

変異ヒト Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) トランスジェニックマウス (G93A マウス) 及び正常対照マウスの舌筋内に、マーカー遺伝子である LacZ 遺伝子を有するアデノウイルスベクター (AdLacZ) を注入し、舌下神経核における発現を検討した。COS7 細胞と変異 SOD1 遺伝子を有する初代神経細胞に、cre-loxP 組み換えによる 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) と、cre recombinase を発現するアデノウイルスベクター (AxCANCre) を注入し、遺伝子発現、および staurosporine によるアポトーシスへの影響を検討した。10 週齢の G93A マウスおよび正常対照マウスの舌筋内に、AxCALNLBcl-2 と、AxCANCre を注入することによって、逆行性に舌下神経核に Bcl-2 を発現させ、アデノウイルス注入後 15 週における Cytochrome c および活性型 caspase-1 の発現を免疫染色にて検出した。

（倫理面への配慮）

モデル動物を利用した実験的研究では動物愛護の精神に基づき、制定されている法律・基準（動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼養及び保管等に関する基準、動物の処分方法に関する指針）を遵守し、所属研

究施設で定められた熊本大学動物実験指針等に基づいて動物実験委員会の承認を得て行った。

3. 研究結果及び考察

1) LacZ 遺伝子は G93A マウスと正常対照のマウスの舌下神経核において高度に発現し、両マウスにおいて遺伝子発現の挙動・消長に差異を認めなかった。

2) AxCALNLBcl-2 と AxCANCre を共感染させると、COS7 細胞と変異 SOD1 遺伝子を有する初代培養神経細胞において Bcl-2 の過剰発現がみられ、staurosporine によるアポトーシスから神経細胞が防御された。

3) Bcl-2 は G93A マウスと正常対照マウスにおいて注入部位である舌筋線維とともに脳幹部の舌下神経核にも検出された。

4) 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、Bcl-2 は G93A マウスの舌下神経核に少なくとも注入 8 週間まで検出された。舌下神経核における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のマウスと比較すると、有意に残存し、空胞変性や反応性アストロサイトの増生も明らかに減弱していた。

5) アデノウイルス注入後 15 週におけるヒト Bcl-2 を発現させた G93A マウスの舌下神経核では、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。

(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。逆行性に導入された外来性ヒト Bcl-2 が Cytochrome c の放出を阻害し、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抑制することが示唆された。

4. 評価

1) 達成度について

ALS に対する遺伝子治療法の開発の基礎研究として、アデノウイルスベクターの逆行性軸索輸送が、ALS モデルマウスの運動ニューロンへの遺伝子導入を可能とすること、さらに Bcl-2 遺伝子導入によって神経病理学的に運動ニューロン変性の抑制をもたらしたことを明らかにした。しかし導入遺伝子は長期的には発現が困難であり、また導入された Bcl-2 も運動ニューロン変性を完全には抑制できなかったことから、より長期間の発現が可能となる遺伝子導入法の開発や、より有効な導入遺伝子の探索が必要と考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

アデノウイルスベクターは一過性発現系ではあるものの、ゲノムに統合されることはなく安全性は高い。本研究で ALS モデルマウスの運動ニューロンに比較的短期間 Bcl-2 を発現させることで運動ニューロン変性を抑制することが可能であったことから、アデノウイルスベクターが ALS の遺伝子治療の有用なツールであることを示した点で意義があると考える。

3) 今後の展望について

より長期間に、また広範囲の運動ニューロンへの発現が可能となる遺伝子導入法の開発として、各種アデノ随伴ウイルスベクターの使用を検討している。またより神経変性抑制効果の高い遺伝子を探索するために、小胞体ストレス関連蛋白の神経変性抑制作用を検討している。

4) 研究内容の効率性について

神経病理学的解析は、鳥取大学神経病理学教室加藤信介先生との共同研究で行い、適宜意見交換を行うことによって効率的に研究が進められたものと考えている。

5. 結論

逆行性軸索輸送を用いた本システムによってヒト Bcl-2 を運動ニューロンに誘導することにより、ミトコンドリア依存性アポトーシスの抑制を通して ALS の治療が可能となる可能性が示された。

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 (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: なし

学会発表

山下賢ほか. 第 44 回日本神経学会総会. 2003

箕田修治ほか. 第 43 回日本神経学会総会. 2002

箕田修治ほか. 第 42 回日本神経学会総会. 2001

2) 海外

口頭発表 0 件

原著論文による発表 3 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

Yamashita S. et al. Neuroscience Letters. 350:17-20, 2003,

Yamashita S. et al. Neuroscience Letters. 328:289-93, 2002,

Yamashita S. et al. Gene Therapy. 8:977-86, 2001

学会発表

Mita S, et al. World congress of Neurology, 17-22 June, 2001, London.

Mita S, et al. Annual Meeting of American Neurological Association, 2002, New York.

Mita S, et al. Annual Meeting of American Academy of Neurology, 2004, San Francisco.

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

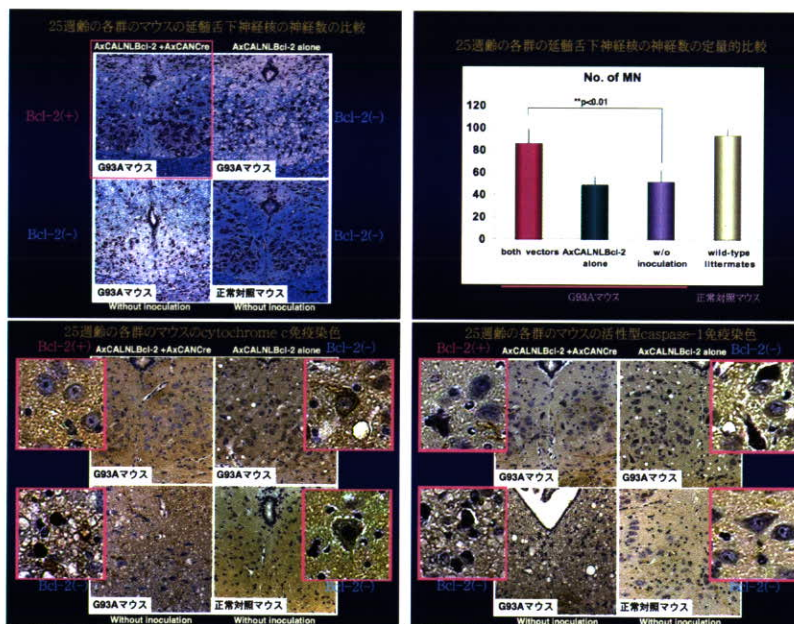
1. 特許取得: なし

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし

逆行性軸索輸送を用いたBcl-2発現によるALSモデルマウスの運動神経変性に対する治療効果

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
 熊本大学 神経内科学分野:内野 誠、山下 賢、箕田修治、
 有馬寿之、内田友二、木村 円、山下太郎、前田 寧、平野照之



本システムにより誘導されたヒト Bcl-2 の発現により、G93 A マウスの運動ニューロン変性が抑制された。逆行性に導入された Bcl-2 が Cytochrome c の放出を阻害し、ミトコンドリア依存性アポトーシスの制御により運動ニューロン変性を抑制することが示唆された。

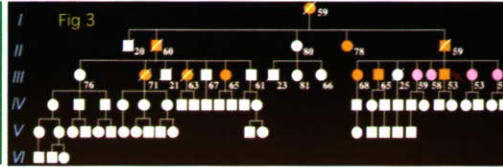
ALSに対する遺伝子治療法の開発の基礎研究として、骨格筋注入後アデノウイルスベクターの逆行性軸索輸送を用いて、運動ニューロンに治療遺伝子を導入する方法(左上段)について検討した。10週齢のG93Aマウスの舌筋内にAxCALNLBcl-2に続いてAxCANCreを注入すると、Cre-loxP組み換えによって発現したBcl-2(左中段)はG93Aマウスと正常対照マウスにおいて注入部位である舌筋線維とともに脳幹部の舌下神経核にも検出された(左下段)。注入15週後の舌下神経核における運動ニューロンの数は、AxCALNLBcl-2のみを注入したマウスや未注入のマウスと比較すると、有意に残存していた(中上段および右上段)。

運動ニューロン変性の抑制機序について、cytochrome-cおよび活性型caspase-1の免疫染色を行ったところ、ヒトBcl-2を発現させたG93Aマウスの舌下神経核では、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(中下段)、また活性型caspase-1陽性のニューロンは有意に少なかった(右下段)。本システムにより誘導されたヒトBcl-2の発現により、G93Aマウスの運動ニューロン変性が抑制された。逆行性に導入されたBcl-2がCytochrome cの放出を阻害し、ミトコンドリア依存性アポトーシスの制御により運動ニューロン変性を抑制することが示唆された。

常染色体優性近位優位成人型 脊髄性筋萎縮症の検討

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
熊本大学 神経内科学分野 内野 誠

患者：62歳 男性
主訴：上下肢脱力
原病歴
小学生の頃 ふくらはぎにこむら返りが頻発
35歳頃 走る際の脚力低下を自覚
41歳時 上肢の筋力低下も加わる
50歳頃 階段昇降困難



■ 発症者
■ 軽度筋力低下
■ 正常
■ 発症者
■ 死亡

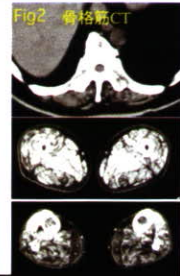


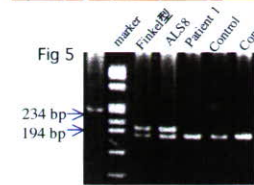
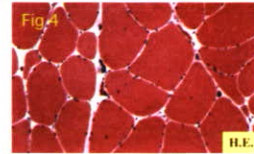
Table 1 NC study

	MCV (ml)	SCV (ml)	CMAP (mV)	SNAP (μV)
正中神経	45.2	53.8	1.34	12.0
尺骨神経	62.6	60.0	10.6	13.0
後脛骨神経	45.3	-	9.5	-
深腓骨神経	50.7	-	9.0	-
腓腹神経	-	48.2	-	21.0

Needle EMG
Long duration & high amplitude
刺入時電位亢進 (-) ⇒ 慢性期の神経原性変化
fasciculation (+)

Table 2 精査した2兄弟例の臨床像

	患者1 (発症者)		患者2	
	62歳	72歳		
年齢	62歳	72歳		
小児期下腿クランプ	++	+		
筋力低下自覚	38-40歳	40-43歳		
球症状	-	-		
姿勢時手指振戦様	+	+		
深部腱反射	消失	消失		
錐体路兆候	-	-		
頻尿	+	+		
血清CK	750-800	720-740		
筋力低下	R L	R L		
三角筋	2- 2-	2- 2-		
上腕二頭筋	3+ 3+	2+ 2+		
手根屈筋	4+ 4+	4- 4-		
大腿屈筋	3+ 3+	3+ 3+		
腓腹筋	4+ 4+	4- 4-		



結論：ブラジルのFinkel型SMAとは異なる日本特有の常染色体優性近位優位成人型脊髄性筋萎縮症の存在が示唆された。

Fig 1.。患者全身像。

Fig 2.CTでは近位筋では大腿四頭筋に筋萎縮と脂肪変性による異常低吸収域が散在。遠位筋では腓腹筋に筋萎縮と異常低吸収域。

Table 1.電気生理検査では慢性期の神経原性変化

Fig 3.家系図。3世代10例の発症者を有し、常染色体優性遺伝形式。

Table 2.臨床像の特徴。40歳以降に近位筋優位の筋力低下、筋萎縮が緩徐に進行。球症状(-)、感覚障害(-)、上肢の姿勢時振線様不随運動、DTR消失、頻尿(+)

Fig 4.筋生検。筋線維の大小不同、角化小径線維散在、中心核増多、type 2 優位性。緩徐進行性神経原性変化が主体で、筋原性変化が混在。

Fig 5.制限酵素HaeIIIを用いたVAPB遺伝子exon2のP56S変異のスクリーニング。ブラジル在住のFinkel型SMAとALS8の患者では、この変異で生じる207bpが検出されるが、正常対照と同様に本家系の患者1では、179bpの正常なバンドのみ認められた。

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：群馬大学大学院医学系研究科 脳神経内科学 岡本幸市

分担研究者研究課題

筋萎縮性側索硬化症とパーキンソン病の病態解明に関する神経病理学的検討

1. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）とパーキンソン病（PD）は代表的な神経変性疾患であるが、その原因や病態はなお不明であり、動物モデルもないので、剖検例を詳細に検討することでこれらの疾患の病態解明を目指す。

2. 研究方法

多数の筋萎縮性側索硬化症（ALS）とパーキンソン病（PD）の剖検例に対して免疫組織学的手法を用いて詳細に検討する。

（倫理面への配慮）

剖検例は、遺族から承諾書を得ており、組織は丁寧に扱う。

3. 研究結果及び考察

1) ALS に特徴的な運動神経細胞内封入体である Bunina 小体が、抗トランスフェリン抗体で陽性であることを見出した。2) ユビキチン結合蛋白である p62 に対する抗体を用いて検討した結果、skein-like 封入体、Lewy 小体様封入体、好塩基性封入体が陽性であり、これらの封入体形成に p62 が関与している可能性が示唆された。3) 18 例の PD と対照 8 例の中脳を α シヌクレインとゴルジ装置(GA)に対する抗体を用いて二重免疫染色を行った結果、対照例においてはメラニン含有細胞では GA の微細化はほとんどみられなかったが、PD 例においては Lewy 小体を有する細胞では 5%に、Lewy 小体の前駆構造物である pale body を有する細胞では 19%に、これらの封入体を有さない細胞では 3%に GA の微細化がみられた。この結果から PD

に特徴的な Lewy 小体が形成されると神経毒性は減少する可能性が示唆された。

4. 評価

1) 達成度について

ALS と PD の病態解明はなお不十分であるが、3年間の目標は達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

ALS に特徴的な Bunina 小体にトランスフェリンが含まれることは新たな知見であり、ALS の病態解明に寄与する。また、Lewy 小体形成とゴルジ装置の関連を検討したのも初めてであり、Lewy 小体の形成の解明に寄与するもので、学術的意義がある。

3) 今後の展望について

孤発性の ALS と PD には適切な動物モデルがなく、剖検例を種々の抗体を用いてさらに免疫組織学的に詳細に検討することは、ALS と PD の病態解明に寄与するものと考えられる。

4) 研究内容の効率性について

すでに多数の ALS と PD の剖検例は手元であり、目的とする抗体の多くも市販されており研究の効率性は高い。

5. 結論

Bunina 小体にトランスフェリンが含まれることと、Lewy 小体形成は神経毒性よりも神経保護的に働いている可能性を示した。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表	54 件
原著論文による発表	6 件
それ以外 (レビュー等) の発表	30 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

岡本幸市：前頭側頭型認知症と ubiquitin 陽性 tau 陰性神経細胞内封入体. *Dementia Japan* 20:10-16, 2006.

池田将樹, 水野裕司, 山崎恒夫, 田中 真, 岡本幸市：Parkinson における腰痛・四肢異常感覚の検討. *神経内科* 64 : 412-416, 2006.

学会発表

林 信太郎, 甘利雅邦, 高玉真光, 岡本幸市：筋萎縮性側索硬化症の脊髄灰白質における小型神経細胞の変性についての病理学的検討. 第 32 回日本神経学会総会, 福岡, 2007.

水野裕司, 甘利雅邦, 高玉真光, 相澤仁志, 美原 盤, 岡本幸市：筋萎縮性側索硬化症の脊髄前角細胞における異常構造物と transferrin の発現に関する検討. 第 48 回日本神経病理学会, 東京, 2007.

2) 海外

口頭発表	15 件
原著論文による発表	23 件
それ以外 (レビュー等) の発表	1 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

Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K: Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 112: 597-603, 2006.

Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K: Immunoreactivities of p62, an ubiquitin-binding protein, in the spinal anterior horn cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuro Sci* 249: 13-18, 2006.

Fujita Y, Ohama E, Takatama M, Al-Sarraj S, Okamoto K: Fragmentation of Golgi apparatus of nigral neurons with alpha-synuclein-positive inclusions in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 112: 261-265, 2006.

学会発表

Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K: P62 immunoreactivities in the spinal anterior horn cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis. XVIth International Congress of Neuropathology, San Francisco, 2006.

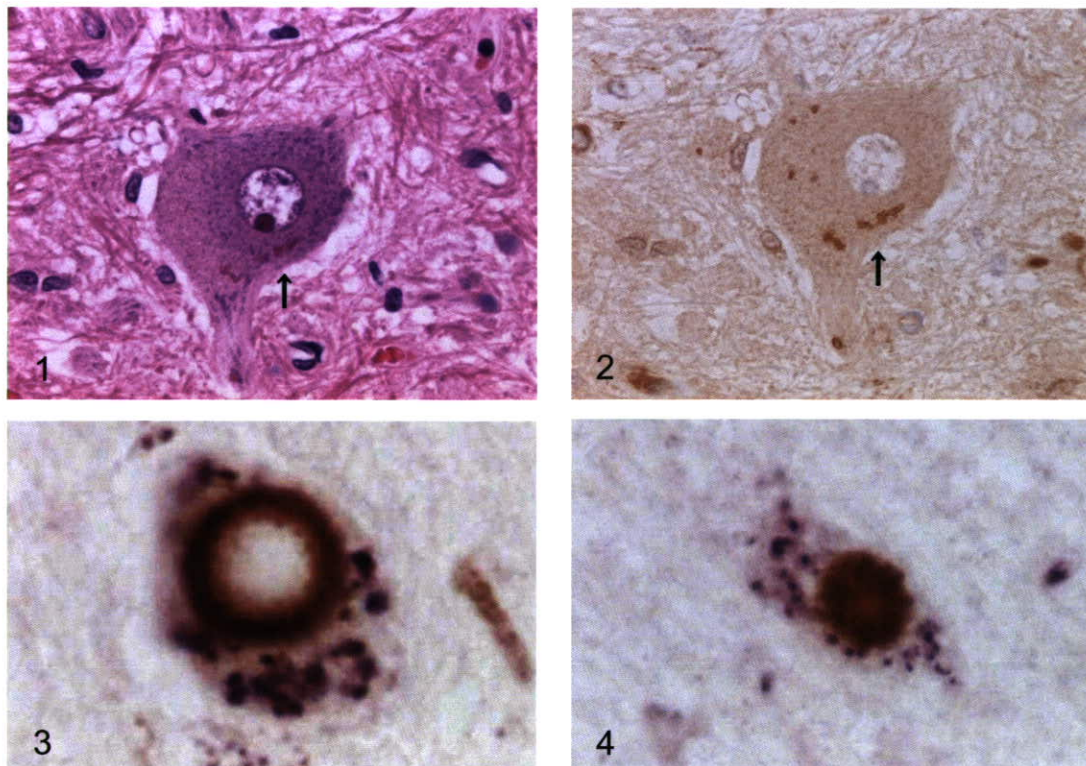
Fujita Y, Ohama E, Takatama M, Al-Sarraj S, Okamoto K: The Golgi apparatus of the nigral neurons with alpha-synuclein-positive inclusions in patients with Parkinson's disease. XVIth International Congress of Neuropathology, San Francisco, 2006.

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

筋萎縮性側索硬化症(ALS)とパーキンソン病(PD)の 病態解明に関する神経病理学的検討

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 群馬大学 岡本 幸市



ALSに特徴的な運動神経細胞内封入体であるBunina小体(図1, 矢印)の構成成分は不明であるが, 抗シスタチンC抗体で陽性であることを以前に報告したが, 今回抗トランスフェリン抗体でも陽性所見を呈することを見出した(図2, 矢印) 図1,2:ALS腰髄前角細胞, 図1はHE染色, 図2は図1を脱色後に行った抗トランスフェリン抗体を用いた免疫染色.

18例のPDと対照8例の中脳を α シヌクレインとゴルジ装置(GA)に対する抗体を用いて二重免疫染色を行った結果, 対照例においてはメラニン含有細胞ではGAの微細化はほとんどみられなかったが, PD例においてはLewy小体(図3)を有する細胞では5%に, Lewy小体の前駆構造物であるpale bodyを有する細胞(図4)では19%に, これらの封入体を有さない細胞では3%にGAの微細化がみられた. この結果からPDに特徴的なLewy小体が形成されると神経毒性は減少する可能性が示唆された. 図3, 4: 茶色が α シヌクレイン陽性構造物, 紫が抗TGN-46抗体で陽性のGA. 図3のGAは正常であるが, 図4のGAは微細化している.

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：東京大学大学院医学系研究科神経内科学 郭 伸

分担研究者研究課題

孤発性 ALS の病因・病態研究

1. 研究目的

グルタミン酸受容体である AMPA 受容体サブユニットの RNA 編集異常が孤発性 ALS に疾患特異性が高いことを更に確実にする。ALS に見られるパーキンソニズムの責任病巣を明らかにする。

2. 研究方法

異なる病型の ALS、運動ニューロン疾患患者剖検脊髄を用いて、前角、運動ニューロンにおける GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率を、RT-PCR 産物の制限酵素処理断片の定量により検討する。

F-DOPA PET を用いて、パーキンソニズムを呈した ALS 患者の黒質の病変を検討する。

（倫理面への配慮）

東京大学医学系研究科の研究倫理委員会で承認されている。一切の個人情報に記載しない。

3. 研究結果及び考察

孤発性 ALS の様々な病型での検討で、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率の低下が全例で見られることを明らかにした。一方、SOD1 関連家族性 ALS、球脊髄性筋萎縮症ではこの分子変化が運動ニューロンに生じていないことを示した。これにより、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が、孤発性 ALS に疾患特異的に生じている分子異常であり、病因と関連することが強く示唆された。

線条体の F-DOPA の取り込みは正常であり、ALS におけるパーキンソニズムがパーキンソン病との合併ではなく、疾患特異的な病変の広がりによることが示された。

4. 評価

1) 達成度について

GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は孤発性

ALS の病因的意義が高いことを示した。

ALS におけるパーキンソニズムは疾患内在的症候であることを明らかにした。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

AMPA 受容体の機能異常に直接結びつく分子異常が病因的意義を持つことから、この機能分子の正常化による治療の可能性が開けた。この分子異常が、ALS の大多数を占める孤発性 ALS の病因に深く関連することは、疾患概念、治療法開発に新たな展開を拓く可能性がある。

パーキンソニズムが皮質病変による可能性を示したことで、ALS を前頭側頭型痴呆症の部分症候として捉える考え方に矛盾せず、ALS の病態理解を進めた。

3) 今後の展望について

GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常を生じさせる分子異常の解明、この分子異常が孤発性 ALS の運動ニューロン死を直接に引き起こす分子異常かどうかの検討、分子異常を正常化し神経細胞死を抑制する方法の開発・臨床応用、などが長期的展望としてみえてきた。前頭側頭型痴呆症と ALS との病因的関連性を解明する必要がある。

4) 研究内容の効率性について

孤発性 ALS の病態解明・治療法開発に着実に歩を進めた。解析に用いる剖検材料の入手が困難である。

5. 結論

孤発性 ALS に共通し、神経細胞死に直接関連する活性分子の異常を同定した。

ALS におけるパーキンソニズムは単なるパーキンソン病との合併ではなく、疾患に内在する症候であることを明らかにした。

6. 研究発表

1) 国内

口頭発表 20 件
原著論文による発表 0 件
それ以外 (レビュー等) の発表 22 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

生体の科学、56 : 424-425, 2005
医学の歩み、215 : 683-687, 2005
難病と在宅ケア 12 : 49-53, 2006
神経進歩 50:902-911, 2006
Brain and Nerve 59:1117-1127, 2007.

Annual Review 2008 神経、印刷中
学会発表

第 46 回日本神経学会総会、シンポジウム SY-11 「神経変性疾患の最新の原因・病態解析」 鹿児島、May 25-27, 2005.

第 28 回神経科学大会、シンポジウム SY1-14 「トランスレーショナルニューロサイエンス難病 ALS への神経科学の挑戦」 横浜、July 26-28, 2005.

大阪大学蛋白研セミナー「脳神経疾患研究の最前線」、大阪、November 24-25, 2005

第 4 1 回脳のシンポジウム、群馬、Feb 18-19, 2006

第 79 回日本薬理学会年会、シンポジウム 「進行性神経疾患の研究の最前線および治療の現状と創薬への展望、横浜、March 8-10, 2006

第 65 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会、シンポジウム II 「神経疾患の電磁気刺激による診断と治療」 東京、November 16-17, 2006

第 1 回日本薬物動態学会ビジョン・シンポジウム「薬効・毒性・動態 個人間変動の新機軸」 東京、July 19-20, 2007

海外

口頭発表 8 件
原著論文による発表 10 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

J Mol Med 83:110-120, 2005
Ann Neurol 58: 175-181, 2005
J Neurochem 98:782-791, 2006.
Arch Neurol 63:1719-1722, 2006.
Mov Disord 22:1308 -1313, 2007.

学会発表

The 16th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Berlin, Jun 6-9, 2005.

The 16th International Symposium on MND/ALS, Dublin, Des 8-10, 2005,

The 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto, Oct 28-Nov 2, 2006

The 17th International Symposium on MND/ALS. Yokohama, 30 Nov-2 Des, 2006

the Gordon Research Conference on RNA Editing, Ventura, California, Jan 15-19, 2007

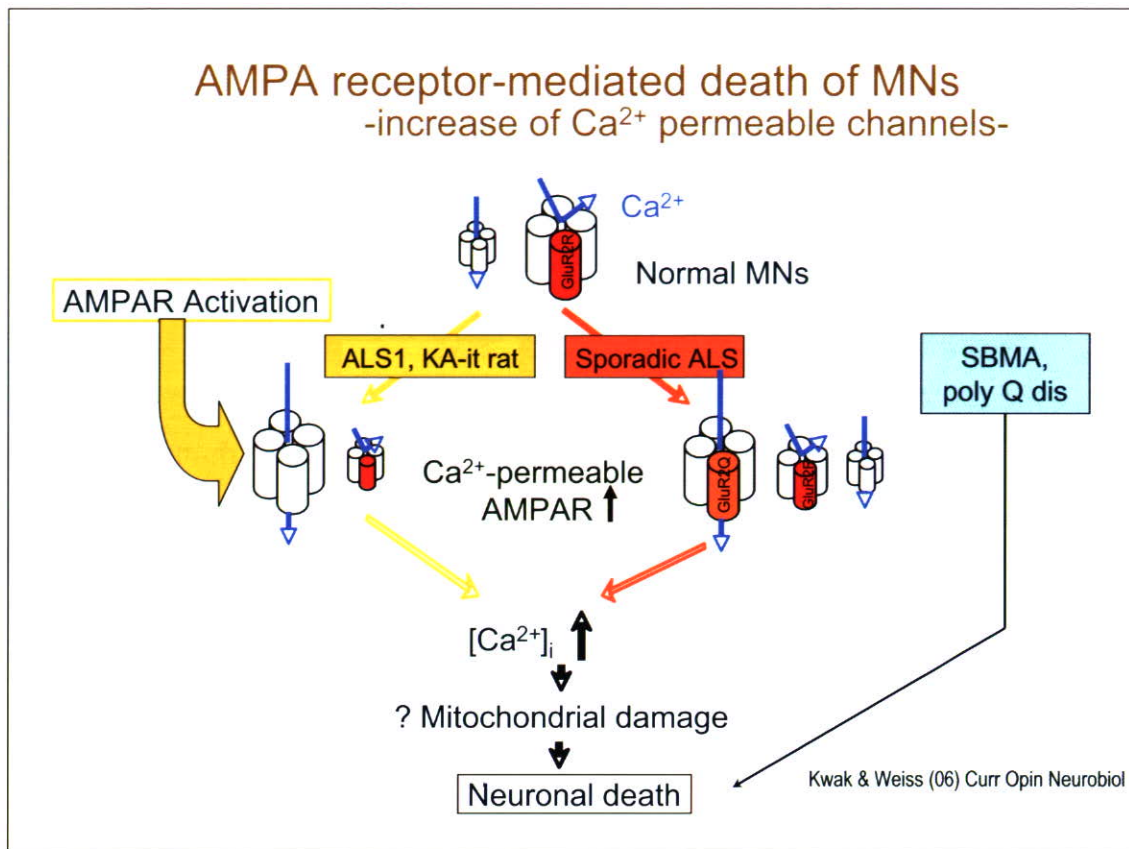
17th Meeting of the European Neurological Society, Rhodes, Greece, Jun 16-20, 2007

37th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, 3-7 Nov 2007

The 18th International Symposium on MND/ALS. 2007, Tronto, 30 Nov-2 Des, 2007

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



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
東京大学 郭 伸

孤発性ALSに特異的な神経細胞死のメカニズム：

正常の神経細胞では殆どのAMPA受容体は編集型GluR2を含みCa²⁺非透過性である。運動ニューロンなどではGluR2 を含まないCa²⁺透過性のAMPA受容体が少数ながら存在していることが示されている。

孤発性ALS、変異SOD1関連家族性ALS (ALS 1) のいずれにもAMPA受容体を介する細胞死のメカニズムが働いている証拠があるが、両者の分子機構は異なり、ALS 1 ではGluR2 の割合の減少により編集型GluR2 を含まないAMPA受容体の割合が増えることにより (左)、孤発性ALS では未編集型GluR2 を含むAMPA受容体が増えることにより (中)、Ca²⁺透過性のAMPA受容体が増加し、細胞内Ca²⁺濃度が上昇することが神経細胞死を引き起こす。但し、後者が単獨で神経細胞死を引き起こしうるのに対し、前者には変異SOD1の細胞毒性などの因子が更に加わる必要がある。

これに対して、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の運動ニューロン死には、AMPA受容体を介するメカニズムは働いていない。

運動ニューロン死には様々なメカニズムが働いているなかで、GluR2 Q/R 部位のRNA編集異常は孤発性ALSに特異的な、神経細胞死の直接原因である。

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：徳島大学 ヘルスバイオサイエンス研究部 感覚情報医学講座
神経情報医学分野（神経内科） 梶 龍児

分担研究者研究課題

伴性劣性ジストニア・パーキンソニズム(*lubag*病)におけるジストニアの病理学的な基盤と疾患遺伝子の解明

1. 研究目的

ジストニアはパーキンソン病の治療薬による副作用としておこるのみならず、疾患としてもパーキンソン病について多い基底核疾患である。フィリピンで多発する伴性劣性ジストニア・パーキンソニズム(XDP, DYT3, *lubag*病)は、疾患遺伝子をもつ母親から生まれる男児の30歳代に発症し、ジストニアからパーキンソニズムへ発展する特異な疾患である。わが国でも発症者がでることが考えられ、本研究は、本症の疾患遺伝子を解明することにより遺伝相談を可能にし、さらにジストニアとパーキンソニズムの病態・発症機序を解明することを目的とする。

2. 研究方法

病理学的検討：フィリピン国立小児病院のLee博士の協力を得て患者剖検脳8検体を得て、病初期のジストニアと後期のパーキンソニズムのそれぞれ病期で特徴的な病理所見を、ホルマリン固定脳と凍結脳で検討した。
遺伝子検索：やはりLee博士の協力を得てフィリピンの多発地域でフィールドワークを行い採取した血液から、Bacクローンによる人工染色体を作成、連鎖解析で候補領域を従来報告されている部位からさらに狭めた上でshotgun法による全塩基配列の決定をおこなった。

(倫理面への配慮)

フィリピン国立小児病院および徳島大学(遺伝子)の倫理審査を受け、答申をえて遺伝子・病理検索をおこなった。採血および剖検脳の検索に当たっては患者(またはその遺言)と家族の文書による同意を十分な説明のもとに

得た。

3. 研究結果及び考察

病理学的検討：基底核線条体は組織学的にドパミン含量の多いstriosomeと少ないmatrixに分かれる。患者剖検脳において線条体を中心としたCalcineurin染色(線条体medium spiny neuron全体を染める)およびCalbindin染色(matrixのみを染める)をおこなったところ、病初期のジストニアのみを呈した患者脳においてはstriosomeの選択的な変性が見られた。Striosomeはドパミンの放出を制御する機能をもつと考えられ、その変性によりドパミンの相対的な過剰が生じることが推察された。

遺伝子検索：本疾患の連鎖解析により狭められた遺伝子領域の全塩基配列を調べたところTAF1(TATA-binding protein associated factor 1)遺伝子のintronにおいてレトロトランスポゾンの疾患特異的な挿入を見出した。またこのTAF1の神経細胞特異的なisoform N-TAF1を見出し、このN-TAF1の発現が患者脳で特異的に減少していることを見出した。N-TAF1は神経可塑性に重要な役割を果たすImmediate early geneなどの発現に重要な役割を果たしていると考えられ、臨床的に、または生理学的に我々が報告してきたジストニアでの神経可塑性の障害を説明できる。

4. 評価

1) 達成度について

遺伝性ジストニア*lubag*病において、疾患の分子的な基盤を解明し、疾患遺伝子を初めて同定できた。ほぼ100%ではないかと自負し