

図2A 健康人のドパミン合成細胞と線条体。黒質のドパミン合成細胞は、線条体に投射し、軸索終末でドパミンを合成して線条体に放出する。

である。また、細胞移植は、黒質のドパミン合成細胞と類似の働きを持つ交感神経節の神経細胞を線条体に移植する治療法である。この場合、患者自身の交感神経節細胞を用いるので拒絶反応は生じない。

これらの治療法はそれぞれ利点と共に、問題も有している。パーキンソン病治療薬の長期間服用により、①効果の減弱、②運動症状の変動、③不随意運動、④立ち直り反射の障害やすくみ足など、抗パーキンソン病薬が奏効しにくい症状、⑤幻覚妄想などの精神症状、が出現する。また、手術療法や細胞移植療法の効果も限られており、適応も限られてくる。このように、進行したパーキンソン病においては現在の治療法では満足すべき効果は得られていない状況であり、新しい治療法の開発が望まれている。遺伝子治療はそのような治療方法として期待される。

パーキンソン病では黒質のドパミン黒質の細胞は変性するが、線条体固有のニューロンは保持されている。我々の行っているパーキンソン病遺伝子治療では、この線条体ニューロンに遺伝子を導入するのである。我々の遺伝子治療の理解にはこのことの認識が必要である。

### パーキンソン病の一般的な遺伝子治療戦略

パーキンソン病発症の主なメカニズムは、①黒質のドパミン合成細胞が脱落して、②線条体でドパミンが足りなくなり、③その結果、視床下核が異常に興奮した状態になることによると考えられる。従って、その遺伝子治療の戦略としては、それぞれのステップを阻止することを目指した3つの方法が考えられる。すなわち、黒質ド

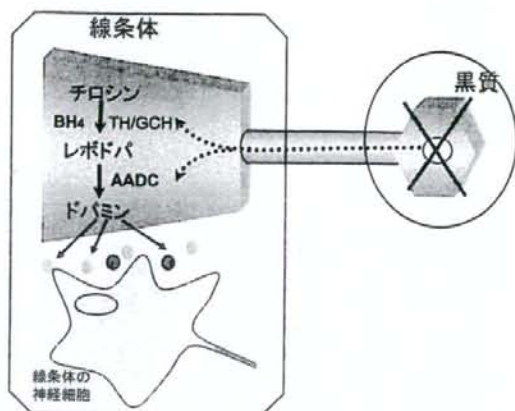


図2B パーキンソン病のドパミン合成細胞と線条体。パーキンソン病では黒質のドパミン合成細胞の変性のために線条体でドパミンが不足する。線条体の神経細胞は保全されている。TH:チロシン水酸化酵素、AADC:芳香族アミノ酸脱炭酸酵素、GCH:GTPシクロヒドラーゼI、BH4:テトラヒドロピオブテリン

パミン合成細胞の保護、線条体でのドパミン合成、そして視床下核の興奮抑制である(図3)。ドパミン合成細胞の保護のためには、神経栄養因子の遺伝子を搭載したベクターを線条体に注入して発現させる<sup>29)</sup>。発現した神経栄養因子は、黒質からそこに投射しているドパミン合成細胞の軸索を逆行輸送されて細胞体に達し、神経保護作用を発揮することが期待される。第2の戦略は、線条体でのドパミン合成に関わっている3つの酵素(TH、AADC、GCH)の遺伝子を導入することである<sup>4)</sup>。3つめの方法は、視床下核の異常興奮の抑制である。これには、抑制性伝達物質であるガンマアミノ酪酸(GABA)を合成する酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(glutamic acid decarboxylase:GAD)の遺伝子を視床下核に注入してGABAを合成させる。いずれの手法ともベクターとしてAAVを用い、定位脳手術により目的とする場所に注入する(図3)。

### アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV)をベクターとして使用

ベクターとは、治療用遺伝子の運び屋の意味であり、いくつか種類がある。ウイルスベクターはこの運び屋としてウイルスを使った場合の名称である(図4)。

AAVは自然界に存在するウイルスのひとつで、それのみでは増殖できず、人に対しては病原性がなく、成人の多くは不顕性感染の状態にある<sup>30)</sup>。ウイルス由来のタンパク質の遺伝子を取り除き、空いた部分に治療用の遺

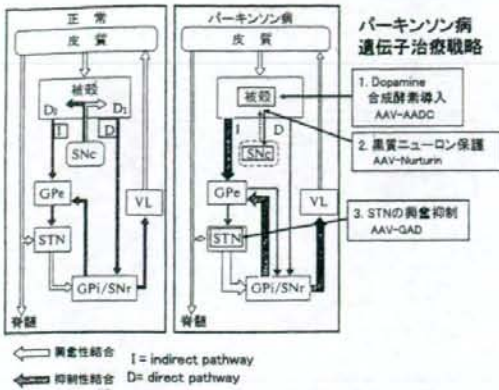


図3 健常人とパーキンソン病における大脳基底核運動系路の機能連関と遺伝子治療戦略

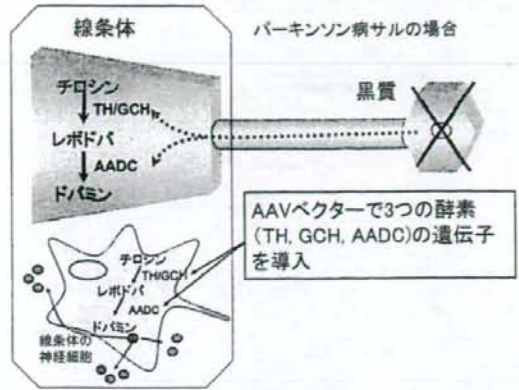


図5 パーキンソン病モデルサルでの遺伝子治療実験。サルの場合には3つの酵素（TH：チロシン水酸化酵素、GCH：GTPシクロヒドラーゼI、AADC：芳香族アミノ酸脱炭酸酵素）の遺伝子を同時注入しても安全で奏効することが確認できた。

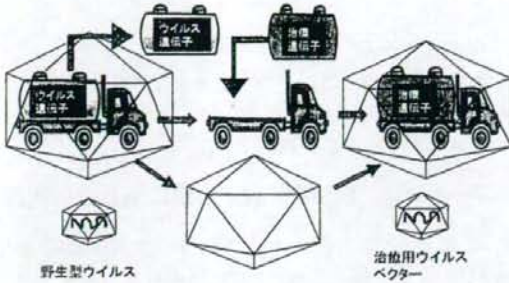


図4 ウイルスベクターの概念図。野生型ウイルスの増殖や蛋白合成に必要な遺伝子（荷台の積み荷）を治療用遺伝子に積み換え、再びウイルス粒子を作成する。遺伝子導入はこのウイルスベクターの感染によって行われる。

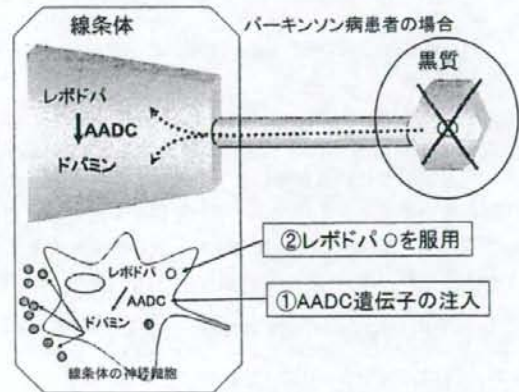


図6 パーキンソン病患者の遺伝子治療。AADCの遺伝子のみを線条体に注入し、レボドパを服用してドパミンを合成させる。AADC：芳香族アミノ酸脱炭酸酵素

伝子を搭載したものが治療用ベクターである。我々の遺伝子治療では、この空いた部分に AADC の遺伝子を搭載している (図4)。

パーキンソン病に対する我々の遺伝子治療戦略

我々は、パーキンソン病のモデルサルで遺伝子治療実験を行って、安全で効果が有ることを確認した後に臨床研究を立案した。

サルの研究では、ドパミン合成に関わる3つの酵素 (TH, GCH, AADC) の遺伝子を別々の AAV ベクターに搭載して線条体に注入し、治療効果を挙げた<sup>5)</sup> (図5)。しかし、臨床研究においては、最初から3種類の遺伝子を同時に注入するのは安全性の点で不安が有ることから、まず AADC の遺伝子のみを注入して AADC を合

成させ、L-DOPA を服用することでドパミンを合成する戦略を採用した (図6)。

線条体に注入された AADC の遺伝子は、線条体固有細胞に入って発現し、AADC を産生する。次に服用した、レボドパがその細胞の中に入って、AADC によってドパミンに変換され、線条体に放出される。この方法であれば、仮に AADC が過剰に発現したとしても、服用するレボドパを減らせば産生されるドパミンの量も減るために副作用の心配もなくなる。

この計画に基づいて、パーキンソン病のモデルサルで

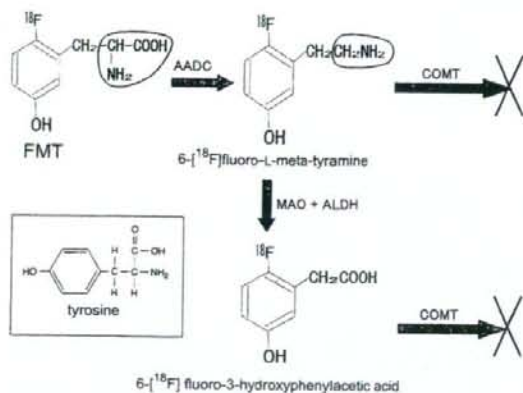


図7 6-[<sup>18</sup>F]fluoro-L-meta-tyrosine (FMT) の代謝。F-dopamine は COMT で代謝されるが、F-meta-tyramine は代謝されないため、FMT の方が代謝的に安定である。AADC: 芳香族 L アミノ酸脱炭酸酵素、MAO: モノアミンオキシダーゼ、ALDH: アルデヒドデヒドロゲナーゼ、COMT: カテコールアミン-O-メチルトランスフェラーゼ 比較のために tyrosine を示した。

(Applied Radiation and Isotopes 1990: 41 (5) pp.433-437 より引用)

も人で行うのと同じ方法を試みた結果、AADC の遺伝子だけの注入では効果が無いこと、不随意運動などの副作用もないこと、そして、レボドパを投与することで初めてドパミンが作られて効果が現れ、症状が改善することが確認された。

### 6-[<sup>18</sup>F] fluoro-L-meta-tyrosine (FMT)-PET

我々は、特発性パーキンソン病の診断をより確実にし、かつ線条体での AADC 遺伝子発現を視覚的・経時的に追跡するために、FMT-PET システムを開発した (宇都宮セントラルクリニックで実施)。FMT は AADC により代謝されて 6-[<sup>18</sup>F] fluoro-L-meta-tyramine になる。これは、F-dopamine と異なり、catecholamine-O-methyltransferase (COMT) により分解されないために、代謝的に安定である (図 7, 8)。即ち、黒質ドパミン合成細胞の軸索終末であれ、AADC 遺伝子を導入した被殻ニューロンであれ、AADC が存在する部位では、FMT が 6-[<sup>18</sup>F] fluoro-L-meta-tyramine に代謝されて貯留する。そして、そこで陽電子崩壊が生じて光子を放出して、その部位は高信号域として描出される。

パーキンソン病患者では、黒質ドパミン合成細胞の軸索終末が脱落しているために、FMT-PET では被殻での信号が低下する。一方、AADC 遺伝子を導入した患者

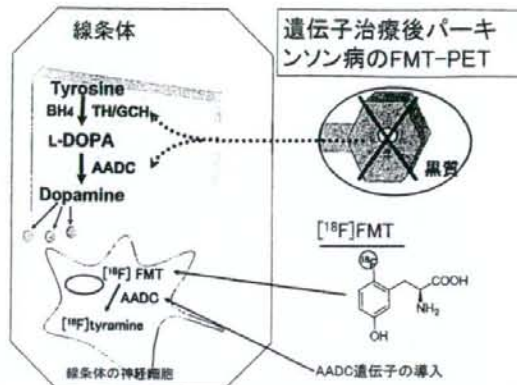


図8 AADC 遺伝子導入後の FMT-PET の原理。線条体ニューロンに導入された AADC 遺伝子により、AADC が産生され、FMT が tyramine に代謝されて貯留し、<sup>18</sup>F の陽電子崩壊が起こって光子が生じる。

では、注入部位の被殻ニューロンで AADC が発現するために、術前に減弱していた信号が増加する。PET は繰り返して検査できるために、AADC の発現を経時的に追跡できる利点を有する。

### パーキンソン病患者に対する遺伝子治療の実施

我々は、上のような考え方に立って、「AADC 発現 AAV ベクター線条体内投与による進行期パーキンソン病遺伝子治療の臨床研究」という研究課題名で研究計画を策定した。AADC 遺伝子を組み込んだ 2 型 AAV ベクターを進行したパーキンソン病患者の線条体 (被殻) に定位脳手術的に注入し、その安全性を検証するとともに、経口投与する L-dopa によってドパミン産生を促し、パーキンソン症状を改善すること、およびドパミンの過剰合成に伴って生じ得るジスキネジアは L-dopa の投与量を減らすことにより予防することを狙った研究である。同時に、上述のように、導入した AADC 遺伝子の発現を FMT-PET を用いて経時的に観察することも主要な課題とした。

この研究計画は、自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会に提出されて審議・承認され、ついで、厚生労働省の厚生科学審議会科学技術部に申請された。そこでの審議を経た後に、「パーキンソン病遺伝子治療臨床研究作業委員会」で専門的な審議が行われ、2006 年 10 月 31 日、厚生労働大臣から実施許可証が出た。

その後、様々の準備をし、本治療法の希望者を募集して、50 歳代のパーキンソン病男性患者に対して、国内で初めての遺伝子治療を実施した (図 9)。

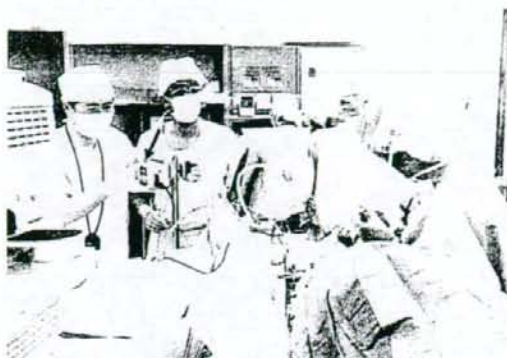


図9 2007年5月7日に実施された遺伝子治療手術。注入ポンプ(→)によりAAV-AADCのベクター液を注入する。

### パーキンソン病の遺伝子治療法に関する世界の現状 (表1)

上述したように、パーキンソン病に対する遺伝子治療の基本的戦略には大きく3つ有る。米国では、そのそれぞれに従ったパーキンソン病の遺伝子治療が実際に行われている。3つの遺伝子治療ともベクターとしてAAVが用いられており、注入はいずれも定位脳手術で行われている。

我々と同じ方法で行っているのは、カリフォルニア大学サンフランシスコ医療センターで、ここでは既に9例で実施されている。

視床下核の異常興奮を抑える臨床研究では、一側の視床下核にのみGADの遺伝子を注入する。この方法は、2003年にコーネル大学で開始され、現在最初の12例が終了して2007年に論文が発表された<sup>7)</sup>。治療側の手足(注射と反対側の手足)で1年後でも症状の改善が認められ、PETを使って遺伝子の働きが確認された。

3番目の臨床研究は、神経栄養因子の一つであるニューロトリン (NTN) の遺伝子を両側の線条体に注入する方法である。これまで12例が治療を受け、1年後の評価では症状が改善していたと報告されている。

### おわりに

進行したパーキンソン病に対しては十分な治療法が無く、新規の治療法の開発が望まれている。遺伝子治療は緒に就いたばかりであるが、さらに改良され、期待に答える治療法となるものと思われる。

表1 パーキンソン病で現在行われている遺伝子治療 (いずれも AAV を使用)

1) 線条体でのドパミン合成 AADC (aromatic L-amino acid decarboxylase) UCSF, 自治医科大学
2) 黒質ドパミンニューロンの保護 Nurturin (CERE-120) UCSF
3) 視床下核ニューロンの抑制 <sup>7)</sup> GAD-65, GAD-67 (glutamic acid decarboxylase) Cornell University

今回の遺伝子治療臨床研究は、自治医科大学神経内科、遺伝子治療研究部、脳神経外科、宇都宮セントラルクリニックの共同研究として実施された。

また、実施に当たっては、自治医科大学附属病院看護部、中央手術部、麻酔科、治験推進室および関係事務部門から多大の支援を賜ったことに謝意を表する次第である。

### 文 献

- 1) Nagatsu T: Molecular biology of dopamine systems. In: Controversies in the Treatment of Parkinson's disease. Rinne UK, Yanagisawa N (eds), PMSI, Tokyo, 1992, p15-26.
- 2) Leu-Fen HL, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F: GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science 1993; 260: 1130-1132.
- 3) Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ: Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. J Neurosci 1995; 15: 7810-7820.
- 4) Shen Y, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Fan D-S, Ogawa M, et al: Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase I for gene therapy of Parkinson's disease. Human gene therapy 2000; 11: 1509-1519.
- 5) Ozawa K, Fan D-S, Shen Y, Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, et al: Gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. J Neural Transm 2000; [Suppl] 58: 181-191.
- 6) Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F, et al: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. Hum Gene Ther 2002; 13: 345-354.
- 7) Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, et al: Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. Lancet 2007; 369: 2097-2105.



## 放射線照射による脊髄障害と神経叢障害

## Radiation Myelopathy and Plexopathy

嶋崎 晴雄\* 中野 今治\*

Haruo Shimazaki, Imaharu Nakano

## Abstract

Radiation myelopathy (RM) is a relatively rare disorder characterized by white matter lesions of the spinal cord resulting from irradiation. It is divided into two forms by the latent periods: transient RM and delayed RM. The delayed RM develops usually non-transverse myelopathy symptoms such as dissociated sensory disturbance, unilateral leg weakness, and gait disturbance with asymmetric steps. Spinal MRI shows initially cord swelling and long T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub> intramedullary lesion with enhancement, then exhibits cord atrophy. Histopathological findings of delayed RM are white matter necrosis, demyelination, venous wall thickening and hyalinization. Glial theory and vascular hypothesis have been proposed to explain its pathophysiology. Several therapies such as adrenocorticosteroid, anticoagulation and hyperbaric oxygen have been tried to this disease with variable benefits.

Radiation plexopathy is classified into two major types by the location: radiation-induced brachial plexopathy (BP) and radiation-induced lumbosacral plexopathy (LSP). The BP initially emerges as arm and shoulder pain, whereas LSP as leg weakness. Myokymia and fasciculations are observed in both types. Electrophysiological study reveals findings of peripheral neuropathy. It is often difficult to distinguish the radiation plexopathy from cancer invasion to the plexus, but MRI is useful to differentiate between these diseases. Pathological findings are small vessel obstruction, thick fibrosis, axonal degeneration and demyelination. Its pathomechanism is presumed that radiation-induced fibrous tissue compresses the nerve root as well as microvascular obstruction of the nerve. Adrenocorticosteroid and anticoagulation are considered as the strategy for symptomatic relief.

**Key words :** delayed radiation myelopathy, chronic progressive radiation myelopathy, radiation-induced brachial plexopathy (BP), radiation-induced lumbosacral plexopathy (LSP)

## I. 放射線神経障害

がん治療のため放射線照射を行った場合、それが原因で神経系に障害をきたすことがある。神経系の放射線障害は、その神経障害部位から放射線脳障害、放射線脊髄症、放射線末梢神経障害に大きく分けられる。また、障害の経過からは、放射線照射後数日から数カ月して起こり、一過性で1~9カ月(平均3カ月)で自然寛解する急性一過性放射線障害と、照射後6カ月以降に生じる難治性の慢性進行性放射線神経障害に分類される<sup>1)</sup>。本稿

では、主として遅発性放射線脊髄障害と、末梢神経障害について概説する。

## II. 遅発性放射線脊髄症 (delayed radiation myelopathy: DRM)

DRMは慢性進行性放射線脊髄症(chronic progressive radiation myelopathy)とも呼ばれ、放射線照射終了後、1年前後が最も多いが、数カ月から数年後に脊髄症状が現れ、一般に予後不良である。

DRMは、放射線照射を受けた患者の数パーセントに

\* 自治医科大学内科学講座神経内科学部門〔〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1〕Division of Neurology, Department of Internal Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan



Fig. 1 遅発性放射線ミエロパチー

脊髄全体が高度に障害され、壊死(星印)の部分が認められる。第3頸髄(上:KB染色,下:HE染色,×5)。



Fig. 2 Fig. 1の壊死部の拡大

壊死部にはコレステリン結晶が沈着し、周囲にはマクロファージが浸潤している(HE染色,×100)。

発症すると推測されている。その発症には、総線量のみでなく、1回照射量、照射される脊髄の長さ、照射期間、照射感覚とも関連している。総線量の安全限界は35~40 Gyとみなされている<sup>2)</sup>。57~61 Gyでは5%、68~73 Gyでは50%の率でradiation myelopathyを発症したとの報告がある<sup>3)</sup>。

### 1. 臨床症状

異常感覚で発症することが多く、手足のしびれ感やビリビリ感を訴える。多くの場合、その初期には下肢から始まる解離性感覚障害(温痛覚が侵され、触覚は保たれる)、ならびに下肢の脱力や歩行障害が現れる。Lhermitte徴候を伴うことも少なくない。初めから左右対称性に障害されることもあるが、通常一側性である。しかし進行すると両側性となることが多い。

症状は徐々に進行する。病変が進行すれば他の他覚的神経所見も認められるようになる。痙性対麻痺を呈し、下肢の腱反射亢進、病的反射陽性となる。また障害部以下の全感覚の低下、消失がみられる。中でも深部感覚障害が目立つことが多く、そのため感覚性運動失調が認められる。

### 2. 検査所見

脳脊髄液検査では一般的に正常だが、蛋白とリンパ球、ミエリン塩基性蛋白の軽度増加を認めることがある。

通常、画像診断では単純X線写真、骨シンチ、脊椎CTは異常はみられないが、他疾患との鑑別に役立つ。ミエログラフィーも異常を呈さないことが多いが、時として脊髄の腫大がみられることがある<sup>4)</sup>。MRIは最も診断に寄与すると考えられる。Wangらの10症例の検討<sup>5)</sup>では、発症から8カ月以内の場合、T<sub>1</sub>強調で低信号、T<sub>2</sub>強調で高信号の長い脊髄病変がみられ、約半数でgadoliniumにenhanceされた。この時期では脊髄腫大は稀ではない。一方、発症から3年以上経った症例では、信号異常はなく、萎縮した脊髄が描出されたという<sup>6)</sup>。照射を受けて8年後に発症し、その11カ月後に胸髄に空洞形成がみられた例の報告もある<sup>5)</sup>。また、放射線により赤色髄が脂肪に置換されるために、照射野の椎体はT<sub>1</sub>強調像で高信号に、T<sub>2</sub>強調像で中間信号になることも参考になるという<sup>6)</sup>。一方、発症後8年で、FDP-PETで頸髄病変のグルコース代謝の亢進を捉えた報告もある<sup>7)</sup>。その原因は、炎症ではなく、病変部位で神経活動電位を起こすためのエネルギー需要が増加しているためと推定されている。

電気生理学的検査は、診断には有用でないといわれている<sup>8)</sup>。

### 3. 病理

病変は照射範囲内の脊髄節に限られ、照射中央部の変化が最も強い。病変は通常左右非対称で、灰白質より白質が、前索よりも側索や後索が侵されやすく、壊死部がみられる(Fig. 1)。壊死部にはコレステリン結晶が沈着し、周囲にはマクロファージが浸潤している(Fig. 2)。毛細血管内皮細胞の障害に基づく血行障害性壊死が主体と考えられている。主病変は静脈で、静脈壁は肥厚し著しいヒアリン化を認め(Fig. 3)、線維素血栓がみられ、白質神経線維の消失、小動脈の閉塞もみられる。

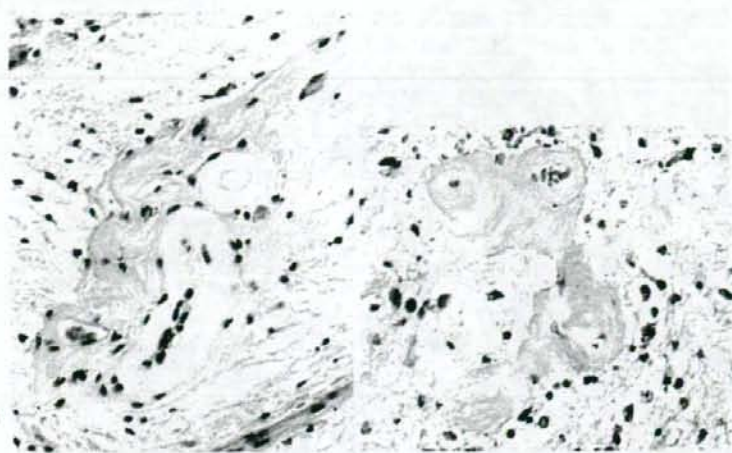


Fig. 3 壁が肥厚してヒアリン化した血管 (HE染色,  $\times 200$ )。

#### 4. 病態機序

種々の仮説があるが、古典的には glial theory と vascular hypothesis が提唱されている<sup>9)</sup>。

グリア説は、グリア、特にオリゴデンドロサイトの DNA が放射線により障害され、有糸分裂の際に細胞死に陥り、白質が破壊される原因となっているとするものである。しかし、オリゴデンドロサイトはゆっくりとしか分裂しないので、それだけで大きな脱髄巣や白質病変はきたしにくいのではないかという反論もある。さらに、オリゴデンドロサイトは白質に均一に分布しているが、放射線脊髄障害の白質病変は、ある部位に局限しており、その周囲に障害のない白質で取り囲まれているという事実も説明できない。

一方、血管説は、放射線による血管障害により循環障害が生じ、二次的に白質病変を生じるとするものである。血管運動神経の刺激や、血管内皮の炎症による閉塞もメカニズムとして推定されているが、血管透過性の亢進が重要であるとする報告が多い。中枢神経にのみ病変が生じることも、その血管が選択的に中性子を捕獲する特徴をもつことで説明できるという<sup>10)</sup>。しかし、白質病変部位の血管に形態学的な異常がみられない例も存在するという反証もある<sup>11)</sup>。形態の異常がみられない血管においても、照射後血管内皮に作用する、いくつかのサイトカインの濃度に変化がみられたとの報告もある<sup>11)</sup>。現在では、2つの機序が両者とも放射線脊髄症の病変形成に関与しているという見方が一般的になっている。

#### 5. 診断、鑑別診断

放射線脊髄症の診断基準として、以下の3点を満たす

ことが必要である<sup>12)</sup>。

- 1) 脊髄が放射線照射野に含まれている。
  - 2) 神経学的障害が放射線照射を受けた脊髄節に対応している。
  - 3) 転移あるいは他の原発性脊髄病変が除外される。
- 鑑別診断としては、原疾患の脊髄転移や、壊死性が慢性脊髄症が最も重要であるが、その他の進行性の脊髄症(髄内腫瘍、傍腫瘍性症候群、運動ニューロン疾患)などが鑑別の対象となる。

#### 6. 治療、予後

根治療法は現在のところないが、浮腫や炎症の存在と関連して、短期間のステロイド投与が有効であった患者も存在する。ステロイド漸減で症状が急速に悪化した症例<sup>13)</sup>もあるが、再燃を示さず治癒したと考えられる例もある<sup>14,15)</sup>。ステロイドが一定期間有効であっても、その後症状が進行した報告もある<sup>16)</sup>。

ステロイドが無効で、ヘパリン・ワーファリンによる抗凝固療法後に症状の進行停止や<sup>17)</sup>、軽快がみられたとの報告がある<sup>18)</sup>。有効であった機序としては、小血管内皮の損傷進行を停止し、回復させたと推測している。

高圧酸素療法を行った9例中6例で、症状が進行停止あるいは改善したとの報告がある<sup>19)</sup>。また、放射線脊髄症の発症が予測されるケースでは、予防的に高圧酸素療法を勧める意見もある<sup>20)</sup>。高圧酸素療法は、照射を受けた組織の血管新生を促し、遅発性放射線障害を軽減すると考えられている。

上記のような治療有効例もあるが、一般的には神経症状は数週から数カ月間にわたり緩徐に進行し、不可逆的

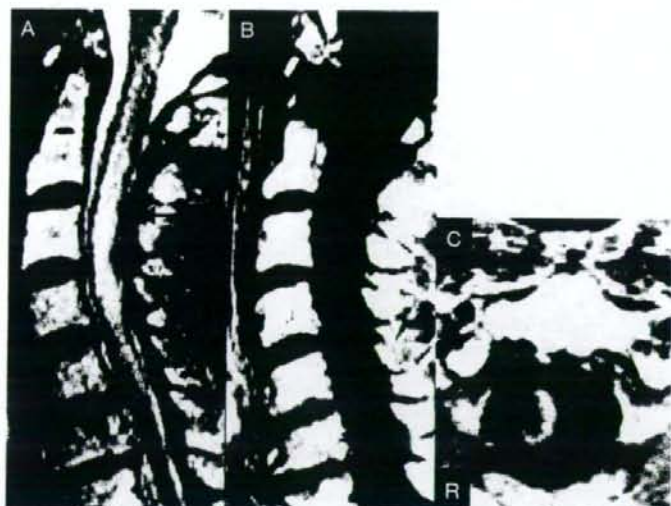


Fig. 4 遅発性放射線脊髄症の頸髄 MRI

(自験例, 文献 21 と同例)

A: T<sub>2</sub>強調像矢状断: C1-4 椎体後方の頸髄内に高信号域(矢印)を認め、頸髄は腫脹していた。B, C: Gd造影 T<sub>1</sub> 強調像: C1-2 椎体後方の頸髄右側にリング状の増強効果(矢頭)を認めた。C 2, 3 の椎体の信号は T<sub>1</sub> 強調で高信号(B), T<sub>2</sub> 強調で中間から高信号(A)となっており(A, B 細矢印), 放射線照射による脂肪髄化が示唆される。

とされる<sup>12)</sup>。

### 7. 自験例<sup>21)</sup>

〈症 例〉56 歳, 女性

1991 年 5 月, 上咽頭腫瘍にて化学療法および放射線療法(60 Gy)を施行した。1996 年 2 月中旬より左大腿の異常感覚が出現し, 翌日には左下肢の温度覚が消失した。2 月末頃から右上肢の筋力低下を自覚し, 3 月上旬には右下肢の筋力低下, 翌日に排尿困難が出現し, 5 日後に当科入院となった。

入院時の神経学的所見では, 右上下肢不全麻痺と深部腱反射亢進, 左 C 5 以下の温痛覚低下, 排尿障害が認められ, Brown-Séquard 症候群を呈していた。頸髄 MRI T<sub>2</sub> 強調像矢状断 (Fig. 4 A) では, C1-4 椎体後方の頸髄内に高信号域を認め, 頸髄は腫脹していた。Gd 造影 T<sub>1</sub> 強調像 (Fig. 4 B, C) では, C1-2 椎体後方の頸髄右側にリング状の増強効果を認めた。減圧目的で C1-2 laminectomy を施行した。術中のエコーでは腫瘍を示唆する所見はみられなかった。ステロイドや抗凝固療法を行ったが, 症状は徐々に進行した。

## III. 放射線神経叢障害

末梢神経は生体組織の中で極めて放射線感受性が低く, 放射線障害は生じにくいとされている。総線量と末梢神経障害発症率の関連については, 58 Gy 照射された患者の 15%, 63 Gy 照射を受けた患者の 75% に発症したと報告されている<sup>22)</sup>。放射線照射から症状発症までの期

間は平均 4 年間で, 3 カ月から 26 年間と幅がある。60 Gy 以上照射を受けた場合, 照射後 1 年以内に発症するのに対し, 60 Gy 以下の場合, 1 年以上経ってから症状が出現するとされている<sup>23)</sup>。長い潜伏期間は末梢神経の放射線抵抗性の強いことを示している。放射線末梢神経障害は主として, 乳がんなどの治療後に生じる radiation-induced brachial plexopathy と, 骨盤腔腫瘍に対する治療に伴い生じる, radiation-induced lumbosacral plexopathy に分類されている。

### 1. 臨床症状

Radiation-induced brachial plexopathy での初発症状は, 一側性の腕や肩の痛みが多く, 照射部位の神経領域に一致した異常感覚や感覚低下, 深部腱反射の低下を認め, 数カ月後に脱力が明らかになることが多い。また fasciculation, myokymia が特徴的とされる<sup>1)</sup>。Radiation-induced lumbosacral plexopathy は, 照射部位から 3 つのタイプに分類される<sup>24)</sup>。①子宮や膀胱, 直腸がんに対する骨盤腔, 後壁照射による仙骨神経叢障害, ②鼠径リンパ節の照射による大腿神経障害, ③傍大動脈リンパ節照射による腰神経叢障害, である。最も多いのは仙骨神経叢と大腿神経が障害されるタイプである。症状は下肢の脱力が主で, 感覚障害は比較的軽度である。そのため, post-irradiation lower motor syndrome と呼ばれることもある<sup>25)</sup>。Brachial plexopathy とは対称的に, 痛みは伴わないことが多く, 下肢に痛みが放散する患者をみた場合は, まず, がんの再発や浸潤を考えたほうがよいとされる。その他, 持続性の fasciculation や



myokymia, 腱反射低下などを呈するが、膀胱直腸障害はみられない<sup>24)</sup>。

## 2. 検査所見

髄液検査では軽度の蛋白上昇を認めることがある。末梢神経伝導検査では、運動神経はCMAP (componud muscle action potentials) の低下, MCV (motor nerve conduction velocity), F波潜時の遅延または消失, plexusの近位と遠位間でのconduction block, SNAP (sensory nerve action potentials) 低下が多くみられる<sup>24)</sup>。針筋電図では障害部位に一致して限局性、慢性の部分的脱神経と再支配を示す所見、傍脊筋のfibrillationや、myokymic dischargeが認められる<sup>26,27)</sup>。

Lumbosacral plexopathy例での腓腹神経生検では、軸索変性による著明な有髄線維変性、大径および小径線維の減少がみられたとの報告がある<sup>28,29)</sup>。

MRIでは、radiation-induced brachial plexopathy例での放射線による線維化を描出できるが、T<sub>2</sub>強調像では低信号または高信号であり、造影されることもある<sup>30)</sup>。Radiation-induced lumbosacral plexopathyのMRI所見として、馬尾前面の線状の増強効果<sup>25,31,32)</sup>や粒状の増強効果<sup>33)</sup>を認めた報告がなされている。

## 3. 病理

形態学的変化は、壊死、小動脈の中膜ヒアリン化、神経線維の線維性組織への置換、脱髄、神経周囲膜の肥厚などである<sup>34)</sup>。Radiation-induced lumbosacral plexopathyをきたした剖検例では、神経根周囲の細血管障害、血管内皮障害や馬尾神経根の軸索変性、脱髄、神経鞘の菲薄化などがみられ、前角細胞にcentral chromatolysisが認められた<sup>35)</sup>。

## 4. 病態機序

遅発性放射線末梢神経障害の発症機序としては、以下のものが考えられている。まず、神経周囲の組織の線維化による機械的圧迫によるもの<sup>32)</sup>、また、放射線照射によりサイトカインやフリーラジカルが活性化され凝固能が亢進し、血管内皮障害が生じ、末梢神経の細血管障害や脱髄を起しているとする可能性が考えられている<sup>36)</sup>。さらに、Schwann cellまたはaxon自体への直接影響<sup>37)</sup>、schwannoma, neurinoma, sarcomaなどの発生によるものとする報告<sup>38,39)</sup>がある。

## 5. 診断、鑑別診断

診断に際しては、放射線照射歴、照射部位、発症まで

の期間などが参考になるが、腫瘍の浸潤によるplexopathyが主な鑑別疾患であり、実地臨床上鑑別困難なことがある。Radiation-induced brachial plexopathyを考えさせる所見としては、①腕神経叢のupper trunk (C5-6)の障害(lower trunkは鎖骨で照射より保護されるため<sup>40)</sup>、②痛みでなく異常感覚で発症する、③リンパ浮腫がある、④皮膚に放射線照射による変化がある、⑤線量が60 Gy以上であることである<sup>23)</sup>。また、radiation-induced lumbosacral plexopathyを支持する所見としては、両下肢の脱力が多く、痛みや感覚障害がないことが挙げられる<sup>41)</sup>。両者に共通する鑑別点として、筋電図での障害部位のmyokymic dischargeはがん転移ではみられにくいとの報告がある<sup>27)</sup>。病変部のCTまたはMRIを撮影すれば腫瘍再発の確認に役立つ<sup>42)</sup>。さらに、brachial plexus周囲の生検により、病理組織学的に検討し、1本の神経束を取り囲む緻密な線維性結合組織がみられた報告がある<sup>43)</sup>。その他の鑑別疾患として、radiation-induced brachial plexopathyでは、外傷、局所の感染、SLE、PNなどの膠原病による神経血管障害による局所の血栓などがあり、radiation-induced lumbosacral plexopathyでは、大動脈瘤、腸腰筋膿瘍などの圧迫、diabetic amyotrophy、産科的処置による障害などがある<sup>1)</sup>。

## 6. 治療、予後

ステロイド大量療法が有効であった例<sup>44)</sup>、デポ型ステロイド局所注射が一過性に有効であった例<sup>45)</sup>、放射線神経叢障害で副腎皮質ステロイドが無効であった例に、抗凝固療法を行い、症状改善に有効であった症例<sup>46)</sup>や、conduction blockも改善した症例<sup>46)</sup>、副腎皮質ステロイドとワファリンの併用療法を行い、著効した例<sup>31,32)</sup>の報告もあるが、副腎皮質ステロイドの漸減中に増悪した例や、無効の例<sup>41,48)</sup>も存在する。また、疼痛に対して内服が無効な8例のbrachial plexopathy例に対し、頸髄後根のentry zoneを電気凝固することで疼痛を緩和できたとの報告もある<sup>47)</sup>。

治療奏効例の報告もあるが、一般に本症の予後は不良で、lumbosacral plexopathyでは、発症後6カ月～7年の経過で、17例中12例が悪化、4例が不変、改善1例と報告されている<sup>41)</sup>。

## 7. 自験例

〈症例〉49歳、男性

1979年7月中旬に他院にて右精巣seminomaを摘出し、その後両側鼠径部、腸骨動脈および傍大動脈(L1の

レベルまで)を照射野として、合計 120 Gy の放射線照射を受けた。1982 年 1 月頃より、右足が段差につまずいたり、階段から下りるとき右足で体重を支えられなくなった。8 月に当科外来を受診した。両大腿部の知覚低下を指摘された。その後も右足の筋力低下は少しずつ増悪し、階段は手すりを使わないと上り下りができなくなったため、1984 年 10 月上旬、当科に第 1 回目の入院となった。

入院時の所見では、下腹部両側腸骨動脈部から鼠径部にかけて、逆 V 字型に褐色の放射線皮膚炎の癬痕が認められた。神経学的には右に強い両側腸腰筋と大腿四頭筋の筋力低下と、両側膝蓋腱反射の消失を認めた。下肢の病的反射や膀胱直腸障害はなく、右大腿内側の痛覚と触覚の軽度低下を認めた。大腿神経の MCV は、右が 34.0 m/s、左が 42.2 m/s と低下していた。針筋電図では左大腿四頭筋に高振幅の unit が認められた。腰椎ミエログラフィーは異常なく、radiation neuropathy と診断した。退院後、通院を自己中断していたが、下肢の筋力低下が進行したため 1999 年 8 月に再受診し、10 月下旬に当科に第 2 回目の入院となった。入院時には、両側大腿前面の筋萎縮が著明で、両側腸腰筋、大腿四頭筋、縫工筋、大腿内転筋、中小殿筋、右腓骨筋の筋力低下を認めた。両側膝蓋腱とアキレス腱反射は消失していた。痛覚は右大腿内側で低下していた。今回は右の総腓骨神経の MCV も 34.7 m/s と低下していた。針筋電図では右前脛骨筋にも神経原性変化が認められた。Radiation-induced lumbosacral plexopathy と診断し、プレドニソロン 40 mg/day の内服を開始し、軽度の筋力回復がみられた。

#### 文 献

- 1) 佐竹真理恵, 橋口良也, 法化陽關一, 永松啓爾: 放射性神経障害. 日本臨牀 別冊 神経症候群 V, その他の神経疾患, 東京, 2000, pp563-568
- 2) 中野今治: ミエロパシー. 神経内科学書, 第 1 版, 豊倉康夫(編), 朝倉書店, 東京, 1987, pp844-851
- 3) Wang PY, Shen WC, Jan JS: MR imaging in radiation myelopathy. AJNR Am J Neuroradiol 13: 1049-1055, 1992
- 4) Worthington BS: Diffuse cord enlargement in radiation myelopathy. Clin Radiol 30: 117-119, 1979
- 5) 新藤和雅, 新田清明, 網野章由, 長坂高村, 塩澤全司: 胸髄に空洞形成のみられた慢性進行性放射線脊髄症の 1 例. 臨床神経 35: 1012-1015, 1995
- 6) 柳下 章: 放射線脊髄症. 脊椎脊髄疾患の MRI, 柳下 章(編), 三輪書店, 東京, 2004, pp257-258
- 7) Esik O, Emri M, Csornai M, Kasler M, Godeny M, et al: Radiation myelopathy with partial functional recovery: PET evidence of long-term increased meta-

- bolic activity of the spinal cord. J Neurol Sci 163: 39-43, 1999
- 8) Rampling R, Symonds P: Radiation myelopathy. Curr Opin Neurol 11: 627-632, 1998
- 9) Okada S, Okada R: Pathology of radiation myelopathy. Neuropathology 21: 247-265, 2001
- 10) Morris GM, Coderre JA, Bywaters A, Whitehouse E, Hopewell JW: Boron neutron capture irradiation of the rat spinal cord: histopathological evidence of a vascular-mediated pathogenesis. Radiat Res 146: 313-320, 1996
- 11) Tsao MN, Li YQ, Lu G, Xu Y, Wong CS: Upregulation of vascular endothelial growth factor is associated with radiation-induced blood-spinal cord barrier breakdown. J Neuropathol Exp Neurol 58: 1051-1060, 1999
- 12) Goldwein JW: Radiation myelopathy: a review. Med Pediatr Oncol 15: 89-95, 1987
- 13) Godwin-Austen RB, Howell DA, Worthington B: Observations on radiation myelopathy. Brain 98: 557-568, 1975
- 14) 宇高不可思, 辻 輝之, 重松一生: 副腎皮質ステロイド薬が著効を示した chronic progressive radiation myelopathy の 1 例. 臨床神経 30: 439-443, 1990
- 15) Berendes K, Dorstelmann D: Radiation myelopathy-two cases with unusual development. J Neurol 216: 73-76, 1977
- 16) 広田佐栄子, 副島俊典, 東野貴徳, 大林加代子, 高田佳木, 他: 副腎皮質ステロイド薬の長期投与を行った放射線脊髄症の 1 例. 臨床 43: 649-652, 1998
- 17) 結城奈津子, 滋賀健介, 山口達之, 中川正法: 抗凝固療法を施行した delayed radiation myelopathy の 1 例. 神経内科 64: 538-542, 2006
- 18) Glantz MJ, Burger PC, Friedman AH, Radtke RA, Massey EW, et al: Treatment of radiation-induced nervous system injury with heparin and warfarin. Neurology 44: 2020-2027, 1994
- 19) Angibaud G, Ducasse JL, Baille G, Clanet M: Potential value of hyperbaric oxygenation in the treatment of post-radiation myelopathies. Rev Neurol 151: 661-666, 1995
- 20) Sminia P, van der Kleij AJ, Carl UM, Feldmeier JJ, Hartmann KA: Prophylactic hyperbaric oxygen treatment and rat spinal cord re-irradiation. Cancer Lett 191: 59-65, 2003
- 21) 佐山節子, 中野今治: がんの治療と関連しておこる神経障害—放射線治療と神経障害. Clin Neurosci 15: 885-887, 1997
- 22) Stoll B, Andrews J: Radiation-induced peripheral neuropathy. Br Med J 1: 834-837, 1966
- 23) Kori SH, Foley KM, Posner JB: Brachial plexus lesions in patients with cancer: 100 cases. Neurology

- 31: 45-50, 1981
- 24) Thomas P, Kbernd H: Pheripheral Neuropathy due to physical agent. *Peripheral Neuropathy*, Dyck PJ, et al (eds), 3rd ed., WB Saunders, Philadelphia, 1993, pp1000-1008
- 25) Bowen J, Gregory R, Squier M, Donaghy M: The post-irradiation lower motor neuron syndrome neuropathy or radiculopathy? *Brain* **119**: 1429-1439, 1996
- 26) Lederman RJ, Wilbourn AJ: Brachial plexopathy: recurrent cancer or radiation? *Neurology* **34**: 1331-1335, 1984
- 27) Harper CM Jr, Thomas JE, Cascino TL, Litchy WJ: Distinction between neoplastic and radiation-induced brachial plexopathy, with emphasis on the role of EMG. *Neurology* **39**: 502-506, 1989
- 28) 沼田久美子, 伊藤道子, 内山真一郎, 小林逸郎, 竹宮敏子: 晩発性放射線腰部神経叢障害の1例. *No to Shinkei* **42**: 629-633, 1990
- 29) 丸山芳一, 法化図陽一, 金久禎秀, 永松啓爾, 大西晃生: 子宮癌に対する骨盤腔内X線照射後にみられた lumbosacral radiation neuropathy の3例. *神経内科* **22**: 52-60, 1985
- 30) Wouter van Es H, Engelen AM, Witkamp TD, Ramos LM, Feldberg MA: Radiation-induced brachial plexopathy: MR imaging. *Skeletal Radiol* **26**: 284-288, 1997
- 31) 姉崎利治, 原田 隆, 河内 泉, 三瓶一弘, 相馬芳明, 他: 副腎皮質ホルモン・ワファリン併用療法が著効した post-irradiation lumbosacral radiculopathy の1例. *臨床神経* **39**: 825-829, 1999
- 32) 梅田麻衣子, 成瀬 聡, 伊藤晶子, 藤田信也: 腰髄 MRI で馬尾前面の増強効果をもとめた post-irradiation lumbosacral radiculopathy の1例. *臨床神経* **45**: 758-761, 2005
- 33) Hsia AW, Katz JS, Hancock SL, Peterson K: Post-irradiation polyradiculopathy mimics leptomeningeal tumor on MRI. *Neurology* **60**: 1694-1696, 2003
- 34) Gillette EL, Mahler PA, Powers BE, Gillette SM, Vujaskovic Z: Late radiation injury to muscle and peripheral nerves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **31**: 1309-1318, 1995
- 35) Berlit P, Schweddeheimer K: Neuropathological findings in radiation myelopathy of the lumbosacral cord. *Eur Neurol* **27**: 29-34, 1987
- 36) Baker DG, Krochak RJ: The response of the microvascular system to radiation: a review. *Cancer Invest* **7**: 287-294, 1989
- 37) Lundborg G, Schildt B: Microvascular permeability in irradiated rabbits. *Acta Radiol Ther Phys Biol* **10**: 311-320, 1971
- 38) Foley KM, Woodruff JM, Ellis FT, Posner JB: Radiation-induced malignant and atypical peripheral nerve sheath tumors. *Ann Neurol* **7**: 311-318, 1980
- 39) Hussussian CJ, Mackinnon SE: Postirradiation neural sheath sarcoma of the brachial plexus: a case report. *Ann Plast Surg* **43**: 313-317, 1999
- 40) Brennan MJ: Breast cancer recurrence in a patient with a previous history of radiation injury of the brachial plexus: a case report. *Arch Phys Med Rehabil* **76**: 974-976, 1995
- 41) Thomas JE, Cascino TL, Earle JD: Differential diagnosis between radiation and tumor plexopathy of the pelvis. *Neurology* **35**: 1-7, 1985
- 42) Thyagarajan D, Cascino T, Harms G: Magnetic resonance imaging in brachial plexopathy of cancer. *Neurology* **45**: 421-427, 1995
- 43) Gosk J, Rutowski R, Reichert P, Rabczynski J: Radiation-induced brachial plexus neuropathy - aetiopathogenesis, risk factors, differential diagnostics, symptoms and treatment. *Folia Neuropathol* **45**: 26-30, 2007
- 44) 法化図陽一, 渡邊 修, 森 敏雄, 永松啓爾, 中村泰也: 乳癌転移巣への放射線治療により radiation neuropathy を発症した1例. *臨床神経* **35**: 211-214, 1995
- 45) 熊巳真澄, 馬目太三, 山本梯司: Radiation plexopathy に対する methylprednisolone 局注の試み. *神経治療* **15**: 87-89, 1998
- 46) Soto O: Radiation-induced conduction block: resolution following anticoagulant therapy. *Muscle Nerve* **31**: 642-645, 2005
- 47) Teixeira MJ, Fonoff ET, Montenegro MC: Dorsal root entry zone lesions for treatment of pain-related to radiation-induced plexopathy. *Spine* **32**: E316-319, 2007

## お知らせ

本誌は「脳と神経」誌, 「神経研究の進歩」誌の統合誌です。雑誌略称は、和文欧文とも「Brain Nerve」になります。  
「BRAIN and NERVE」編集部

# 病 理

中野 今治

筋萎縮性側索硬化症(ALS)には古典型 ALS のほかに家族性 ALS, 若年性 ALS, 痴呆をともなう ALS など, いくつかのサブタイプがある。本稿のテーマは古典型 ALS (Charcot 病)の病理であり, 以降特に断らない限り ALS という術語は古典型 ALS を指すものとする。

ALS では上位運動ニューロン(upper motor neuron: UMN)と下位運動ニューロン(lower motor neuron: LMN)が選択的に侵され, それに対応する症候が出現する。実際の病理所見はこの範囲を超えている場合が希でないが, 本稿では典型的 ALS の UMN と LMN に絞って述べることにする。

## 肉眼所見

通常の ALS では, 大脳の萎縮はなく, 中心前回の萎縮もみられず, 大脳の前額断面でも中心溝の内側に位置する中心前回皮質にも萎縮や変色はみられない(図 1)。筆者の経験では, 通常は頸髄前根の変色と萎縮が唯一の肉眼所見である。ただし, 中心前回の変性が高度の場合にはその萎縮と, 前額断面での中心前回皮質の萎縮と変色が認められる(図 2)。

## 組織所見

### 1. 下位運動ニューロン病変

脊髄では前角が前後方向に萎縮して, その前縁が扁平になり, 外側の角が先鋭になる(図 3)。前角の萎縮は, 主として前角大型ニューロン(LMN)の脱落(図 4)につれてその樹状突起が消失することによる。

#### A. LMN 消失への過程

前角の残存ニューロンには正常に見える神経細胞のほか, 種々の細胞病理が観察される。消失に至る過程と考えられる像には, ニッセル小体中心崩壊, 細胞体と樹状突起の萎縮, 核の偏在化, 萎縮した細胞質の赤染化(HE 染色), リポフスチンによる細胞体占拠(他の細胞質成分が消失した結果)(図 5), 核萎縮と濃縮, 神経食作用(neuronophagia)(図 5)があげられる。

また Golgi 装置に特異的な蛋白(MG-160)に対する抗体を用いて免疫染色を行うと, 残存ニューロンの多くが Golgi 装置の断片化を呈している<sup>1)</sup>。

ALS における運動ニューロン死はアポトーシスによる

なかの いまはる 自治医科大学教授/神経内科  
0289-0585/08/¥500/論文/JCLS

との考えが提唱された<sup>2)</sup>が, 異論もある<sup>3)</sup>。Yamazaki ら<sup>4)</sup>は, TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL)法で ALS 剖検例の脊髄前角細胞を染め, TUNEL法陽性(DNA の断片化が生じていることを示している)あるいは陰性の LMN を写真に撮り, 次に HE 染色を施して, 撮影しておいたニューロンの HE 染色像を観察した。そうすると TUNEL 法陽性ニューロンは全て高度に萎縮していかつ核が濃縮しているのに対し, 萎縮していないニューロンは TUNEL 法陰性であり, 萎縮していても核が明るいニューロンも陰性であった(図 6)。アポトーシス小体は観察されなかった。この所見は, ALS の LMN では DNA の断片化は神経細胞変性の最末期に生じ, アポトーシスとは異なるメカニズムの細胞死が生じている可能性を示している<sup>4)</sup>。

### B. LMN の異常構造物

#### 1) 封入体

残存ニューロンには Bunina 小体(図 7)とユビキチン化した封入体が出現する。

Bunina 小体は好酸性を示す微小な細胞質内封入体(図 7 左)で, ALS に特異的な封入体であるという点で重要である。その構成蛋白や由来は不明であるが, cystatin C, あるいは transferrin に対する抗体で陽性に染まる<sup>5)</sup>。電子顕微鏡的には, 限界膜を持たず, 電子密度の高い顆粒が密集した構造である(図 7 右)。周辺には壊れた膜構造が付着している。内部にしばしば空隙(封入体外の細胞質が陥入したものである可能性がある)を有し, 神経細糸や壊れた膜を含んでいるように見える。

ユビキチン陽性封入体には, 円形をしたもの(円形封入体)(図 8 左)と, 線条に見える封入体(糸束様封入体)(図 8 右)とがある。円形封入体は HE 染色では文字通り丸く見えるが, 多くは内部が不規則に網目状に見えて周辺は空隙で囲まれている(図 9 左)。電子顕微鏡的には, 神経細糸様の細い線維と異常な太い線維とが混在している構造である(図 9 右 上, 下)。糸束様封入体の超微形態は, 円形封入体内にみられる異常に太い線維のみが束になった構造であり, 限界膜はない。糸束様封入体が集簇して円形封入体に移行している像が時に認められる。糸束様封入体はしばしば二重膜を有する小胞で囲繞されており<sup>6)</sup>, ユビキチン化の後にリソゾーム系で処理されることが推測される。円形封入体でも同様である。



図1 ALSの中心前回  
通常例では中心溝(矢印)の内側に位置する中心前回には萎縮も変色もみられない。



図3 典型的な ALS 頭髄の横断面  
前角が前後方向に萎縮して、その前縁が扁平になり、外側の角が先鋭になる。  
KB染色、約6倍



図4 ALS(上)頭髄前角の大型ニューロンは対照(下)に比して明らかに脱落している。  
KB染色、40倍



図5 ALSの腰髄前角  
左に萎縮したニューロン、右に神経食細胞像が認められる。  
HE染色

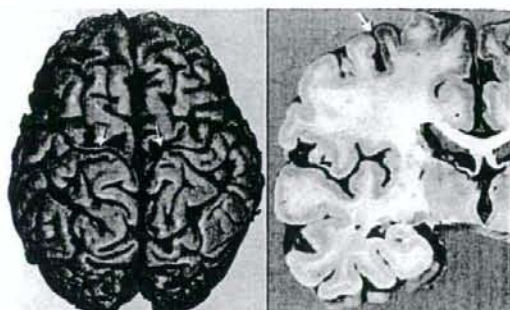


図2 中心前回の高度萎縮(矢印)を呈する ALS の大脳前額断面では中心前回に萎縮と変色が認められる。

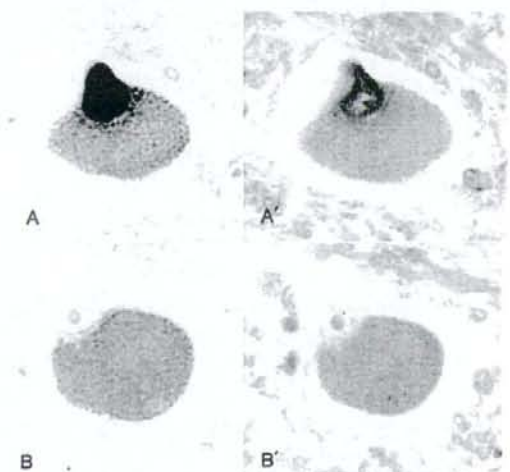
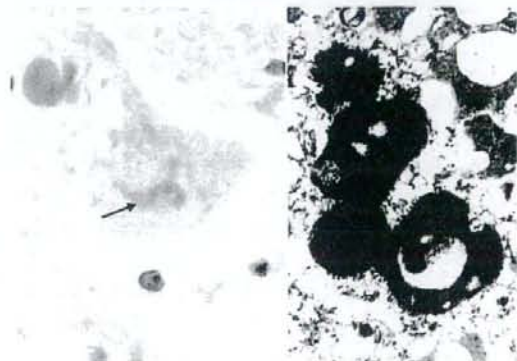


図6 ALS前角細胞の TUNEL 法  
A と A'、B と B' はそれぞれ同一の細胞である。A、B の細胞とも細胞質は萎縮してリポフスチンで充満しているが、TUNEL 法陽性のニューロン(A)では核が濃縮している(A')のに対して、陰性のニューロン(B)は明るい核と明瞭な核小体を有している。A、B: TUNEL 法、A'、B': HE 染色、400倍

図7 ALS前角細胞の Bunina 小体(左: 矢印)。HE 染色、200倍。Bunina 小体の電子顕微鏡写真(右)、5,000倍



2006年にこのユビキチン化封入体の構成蛋白が TDP-43 であることが報告され<sup>7,8)</sup>、大きな注目を集めている。TDP-43 に対する抗体で免疫染色を行うと確かに両者とも陽性に染まる(図10)。

## 2) スフェロイド

スフェロイドは LMN 軸索近位部に神経細糸が貯留して類球形に腫大した構造である(図11)。早期に死亡した症例で多くみられる。神経細糸は遅い軸索流に関連していることから、ALS の運動ニューロン死には軸索流の障害が



図 8 脊髄前角細胞の円形封入体(左)と糸束様封入体(右). ユビキチン免疫染色, 200 倍

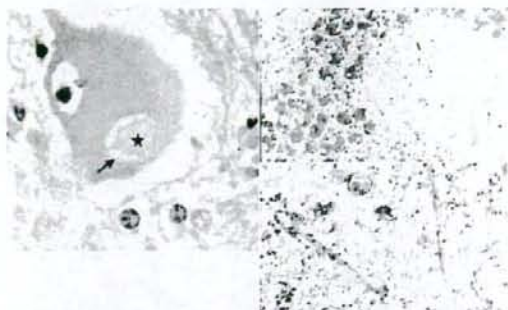


図 9 左)ALS 前角細胞の円形封入体(round inclusion)(星印). HE 染色, 200 倍. 右)円形封入体の電子顕微鏡像. 神経細糸様の細い線維と異常な太い線維とが混在している. 右上: 2,000 倍, 右下: 10,000 倍

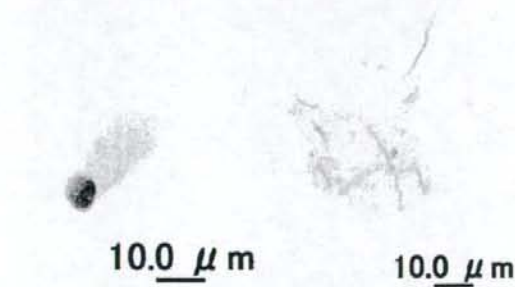


図 10 前角大型ニューロンの円形封入体(左)と糸束様封入体(右). 抗 TDP-43 抗体染色(愛知医科大学加齢医学研究所の橋詰良夫教授, 吉田眞理准教授のご好意による)



図 11 脊髄前角のスフェロイド(星印)  
HE 染色, 200 倍



図 12 ALS の細胞の変化  
細胞質が均質に染まって萎縮した Betz 細胞(左, 右, 矢印)や Betz 細胞の消失跡に集簇したマクロファージの像(右, 二重矢印)がみられる. KB 染色, 200 倍

関係しているとの説もある。

## 2. 上位運動ニューロン病変

上位運動ニューロンの病理像は, LMN ほど精緻には観察されていない。錐体路の淡明化(軸索脱落)(図 3)がしばしば認められる。軸索脱落が軽微な場合は淡明化が捉えにくいので, 鍍銀軸索染色で確認する必要がある。

中心前回では, Betz 細胞の変性・萎縮とその消失跡へのマクロファージの集簇(図 12)が認められる。

謝辞: 今回の執筆にあたり, 愛知医科大学加齢医学研究所の橋詰良夫教授, 吉田眞理准教授より貴重な TDP-43 の免疫染色標本の観察使用を許可いただいた。深い謝意を表する次第である。

## 文 献

- 1) Gonatas NK, Stieber A, Mourtelatos Z, et al. Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 1992; 140: 731-7.
- 2) Troost D, Aten J, Morsink F, et al. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis is not restricted to motor neurons. Bcl-2 expression is increased in unaffected post-central gyrus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995; 21: 498-504.
- 3) Migheli A, Cavalla P, Marino S, et al. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53: 606-16.
- 4) Yamazaki M, Esumi E, Nakano I. Is motoneuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis? *Neuropathology* 2005; 25: 381-7.
- 5) Mizuno Y, Amari M, Takatama M, et al. Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2006; 112: 597-603.
- 6) Nakano I, Shibata T, Uesaka Y. On the possibility of autolysosomal processing of skein-like inclusions—electronmicroscopic observation in a case of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1993; 120: 54-9.
- 7) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LD, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130-3.
- 8) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 35: 602-11.

# Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats

Mutsuko Nonaka-Sarukawa<sup>1,2</sup>

Takashi Okada<sup>1</sup>

Takayuki Ito<sup>1,2\*</sup>

Keiji Yamamoto<sup>2</sup>

Toru Yoshioka<sup>3</sup>

Tatsuya Nomoto<sup>1</sup>

Yukihiro Hojo<sup>2</sup>

Masahisa Shimpo<sup>2</sup>

Masashi Urabe<sup>1</sup>

Hiroaki Mizukami<sup>1</sup>

Akihiro Kume<sup>1</sup>

Uichi Ikeda<sup>3</sup>

Kazuyuki Shimada<sup>2</sup>

Keiya Ozawa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Genetic Therapeutics,  
Jichi Medical University, Japan

<sup>2</sup>Division of Cardiovascular Medicine,  
Jichi Medical University, Japan

<sup>3</sup>Department of Organ Regeneration,  
Shinshu University Graduate School  
of Medicine, Japan

\*Correspondence to: Takayuki Ito  
and Keiya Ozawa, Division of  
Genetic Therapeutics, Centre for  
Molecular Medicine, Jichi Medical  
University, 3311-1 Yakushiji,  
Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0498,  
Japan.

E-mail: titou@jichi.ac.jp and  
kozawa@jichi.ac.jp

Received: 5 October 2007

Revised: 26 November 2007

Accepted: 11 December 2007

## Abstract

**Background** Inflammation plays an important role in the pathogenesis of hypertension and hypertensive organ damage. Interleukin (IL)-10, a pleiotropic anti-inflammatory cytokine, exerts vasculoprotective effects in many animal models. In the present study, we examined the preventive effects of adeno-associated virus (AAV) vector-mediated sustained IL-10 expression against hypertensive heart disease and renal dysfunction in Dahl salt-sensitive rats.

**Methods** We injected the rats intramuscularly with an AAV type 1-based vector encoding rat IL-10 or enhanced green fluorescent protein (EGFP) at 5 weeks of age; subsequently, the rats were fed a high-sodium diet from 6 weeks of age.

**Results** Sustained IL-10 expression significantly improved survival rate of Dahl salt-sensitive rats compared with EGFP expression (62.5% versus 0%,  $p < 0.001$ ); it also caused 26.0% reduction in systolic blood pressure at 15 weeks ( $p < 0.0001$ ). Echocardiography exhibited a 22.0% reduction in hypertrophy ( $p < 0.0001$ ) and a 26.3% improvement in fractional shortening ( $p < 0.0001$ ) of the rat left ventricle in the IL-10 group compared to the EGFP group. IL-10 expression also caused a 21.7% decrease in the heart weight/body weight index and cardiac atrial natriuretic peptide levels. Histopathological studies revealed that IL-10 decreased inflammatory cell infiltration, fibrosis, and transforming growth factor- $\beta_1$  levels in the failing heart. Furthermore, IL-10 expression significantly reduced urine protein excretion with increased glomerular filtration rates.

**Conclusions** This is the first study to demonstrate that the anti-inflammatory cytokine IL-10 has a significant anti-hypertensive effect. AAV vector-mediated IL-10 expression potentially prevents the progression of refractory hypertension and hypertensive organ damage in humans. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords** AAV vector; gene therapy; hypertension; inflammation; interleukin-10

## Introduction

Inflammation plays an important role in the pathogenesis of hypertension and hypertensive organ damage. Congestive heart failure (CHF) is a crucial life-threatening sequelae of hypertensive organ damage, and

its severity is closely related with the serum tumor necrosis factor (TNF) levels [1,2]. Recent studies have demonstrated the marked anti-hypertensive and renoprotective effects of an immunosuppressant *in vivo* [3,4]. Although these observations suggest a therapeutic potential of anti-inflammatory molecules, anti-TNF antibody treatments (e.g. infliximab and etanercept) have failed to improve the survival of CHF patients partly because of their cytokine-inducing effects and cytotoxicity [5,6].

Interleukin (IL)-10 is a pleiotropic cytokine produced by monocytes/macrophages and type 2 helper T cells. It regulates inflammatory and immune reactions by inhibiting macrophage activation, T-cell proliferation, and the production of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  [7]. IL-10 also enhances endothelial nitric oxide synthase expression [8] and inhibits vascular smooth muscle cell proliferation [9,10]. Previous studies have demonstrated the therapeutic effects of IL-10 on CHF models resulting from acute viral or autoimmune myocarditis [11,12]. However, no studies have examined the effects of IL-10 on chronic CHF resulting from hypertensive heart disease that occurs far more frequently than acute myocarditis. In the present study, we examined the effects of IL-10 using Dahl salt-sensitive (DS) rats that present with severe hypertension and chronic CHF when fed a salt-rich diet [13].

We employed an adeno-associated virus (AAV) type 1-based vector in order to sustain serum levels of IL-10 because it has a short biological half-life. AAV vectors permit long-term transgene expression with minimal inflammatory and immune responses [14]. If the intramuscular injection of the AAV serotype 1 vector carrying the IL-10 gene (AAV1-IL-10) produces sufficient amount of IL-10 in skeletal myocytes, then IL-10 should be secreted into the systemic circulation [10]. We examined the preventive effects of IL-10 on chronic CHF progression in DS rats, focusing on its effects on survival, hypertension, pathological cardiac remodelling and renal function.

## Materials and methods

### AAV vector production

Rat IL-10 was cloned from rat splenocyte cDNA by the polymerase chain reaction (PCR) using the primers: 5'-GCACGAGAGCCACAACGCA-3' (upstream) and 5'-GATTTGAGTACGATCCATTTATTCAAACGAGGAT-3' (downstream) [10]. To achieve efficient transduction of the skeletal muscles, we developed a recombinant AAV type 1-based vector encoding rat IL-10 (AAV1-IL-10) or enhanced green fluorescence protein (EGFP, AAV1-EGFP) controlled by the modified chicken  $\beta$ -actin promoter with the cytomegalovirus immediate-early enhancer and by the woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element [pBS II SK (+) WPRE-B11, provided by Dr Thomas Hope, University of Illinois, Chicago, IL, USA]. The AAV vectors were prepared by the previously described three-plasmid transfection adenovirus-free protocol modified by the use of the active gassing system [15,16]. Briefly, 60% confluent human embryonic kidney 293 cells were co-transfected with the proviral transgene plasmid, the AAV-1 chimeric helper plasmid p1RepCap (provided by Dr James M. Wilson, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA), and the adenoviral helper plasmid pAdeno (provided by Avigen, Inc., Alamada, CA, USA). The crude viral lysate was purified by two rounds of two-tier CsCl centrifugation [14]. The viral stock titer was determined by dot blot hybridization with plasmid standards.

### Animal experiment protocols

All animal studies were performed in accordance with the guidelines issued by the committee on animal research and approved by the ethics committee of Jichi Medical University. For histopathological and physiological studies (Protocol 1; Figure 1), we divided the male DS rats (Japan SLC, Shizuoka, Japan) into the following three groups:

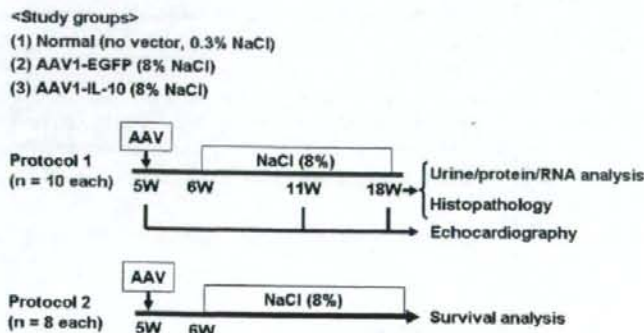


Figure 1. Study protocols. The male DS rats were divided into the three groups: (1) normal group, (2) EGFP group, and (3) IL-10 group. The rats without normal group were injected with AAV1 vectors at 5 weeks of age. The rats in the normal group were fed a low-sodium diet (containing 0.3% NaCl), whereas those in the EGFP or IL-10 group were fed a high-sodium diet (containing 8% NaCl) from 6 weeks of age



IL-10, EGFP and normal ( $n = 10$ , respectively). AAV1-IL-10 or AAV1-EGFP [ $1 \times 10^{12}$  genome copies (g.c./body)] was injected bilaterally into the anterior tibial muscles of the 5-week-old rats in the IL-10 or EGFP groups, respectively. From 6 weeks onwards, these rats were fed a high-sodium diet (containing 8% NaCl). DS rats in the normal group were fed a low-sodium diet (containing 0.3% NaCl). Systolic blood pressure (SBP) was measured every 2 weeks by the tail-cuff method using a manometer tachometer (MK-1030; Muromachi Kikai Co., Ltd, Tokyo, Japan). During the acclimatization period (3–5 weeks), training for blood pressure measurements was performed three times a week. The mean of the three measurements following a 10-min rest at 37°C was used in the calculations. Blood was collected from the tail vein at 5, 11 and 18 weeks; the sera and plasma were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . At 18 weeks, the rats were sacrificed by administering an overdose of isoflurane, and their hearts and lungs were harvested and weighed. The tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to obtain proteins and RNA for the subsequent analysis. For survival analysis (Protocol 2; Figure 1), the rats were randomly divided into three groups ( $n = 8$  each). Those in the IL-10 or EGFP group were injected at 5 weeks of age with the AAV1-IL-10 or AAV1-EGFP ( $1 \times 10^{11}$  g.c./body), respectively, and this was followed by a high-sodium diet from 6 weeks of age. By contrast, those in the normal group were fed a low-sodium diet.

## Echocardiography

Transthoracic two-dimensional echocardiography was performed at 5, 11 and 18 weeks of age using a 13-MHz transducer (ProSound SSD- $\alpha$ 5; Aloka Co., Ltd, Tokyo, Japan). The internal diameter in end-diastole or end-systole of the left ventricle (LVDD or LVDS, respectively) or the posterior wall thickness (PWT) of the left ventricle (LV) in end-diastole was measured by M-mode tracing at the papillary muscle level. The relative wall thickness (RWT) or the percentage fractional shortening (%FS) of LV was calculated according to the formula:  $\text{RWT} = 2 \times \text{PWT}/\text{LVDD}$ ,  $\text{\%FS} = (\text{LVDD} - \text{LVDS})/\text{LVDD} \times 100$  (%).

## Cytokine measurements

At 18 weeks, protein samples were prepared by homogenizing the frozen heart tissues in a lysis buffer [10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.2% NP40, 1 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid] containing the protease inhibitor cocktail Complete Mini (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After centrifugation of the homogenates or serum samples, the supernatants were used for measurement. The serum IL-10 and the tissue transforming growth factor (TGF)- $\beta_1$  concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Amersham PharmaciaBiotech, Bucks, UK; BioSource International, Inc., Camarillo, CA, USA; R&D Systems Inc., Minneapolis,

MN, USA). The tissue cytokine levels were standardized using the total protein concentrations estimated by the BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

## Quantitative reverse transcriptase (RT)-PCR

At 18 weeks, total RNA was extracted from the heart by using RNAzol B (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA) and reverse-transcribed into double-stranded cDNA by using the Superscript Preamplification System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with the T7-dT primer (5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCCTATAGGGA-GGCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'). To estimate the atrial natriuretic protein (ANP) mRNA levels, quantitative PCR analysis was conducted using the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The GAPDH mRNA was quantified for normalization. The oligonucleotide primers used were: for GAPDH, 5'-CAGCAATGCAT CCTGCAC-3' (upstream) and 5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCACAGG-3' (downstream) [17]; for ANP, 5'-GGTAGGATTGACAGGATTGGAGCC-3' (upstream) and 5'-ACATCGATCGTGATAGATGAAGAC-3' (downstream) [18]. Quantitative values were obtained from the threshold cycle ( $C_t$ ) number that indicates exponential amplification of a PCR product.

## Histopathology

At 18 weeks of age, the anesthetized rats were perfused with 50 ml of saline, followed by 100 ml of cold 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4). The hearts were fixed in the same fixative and finally embedded in paraffin. For evaluation of light microscopic findings, we stained sections (3  $\mu\text{m}$  thick) with hematoxylin and eosin (H&E) or the Azan-Mallory stain using the standard methods.

## Statistical analysis

The data were assessed using the StatView, version 5.0 (Statview, Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Differences in the values at specific stages between the groups were assessed by one-way analysis of variance combined with Fisher's test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Survival curves were analysed by the Kaplan-Meier method and compared using log-rank tests.

## Results

### Pro-survival effect of systemic IL-10 in DS rats

Compared to the control EGFP transduction, IL-10 transduction significantly improved survival rates in DS

rats fed a high-sodium diet ( $p < 0.001$ , Figure 2). After 13 weeks of the gene delivery, serum IL-10 concentrations significantly increased in the IL-10-transduced rats compared to the normal untreated rats or control EGFP-transduced rats ( $986.6 \pm 278.5$  pg/ml versus  $<3$  or  $20.8 \pm 18.1$  pg/ml,  $p < 0.001$ , respectively; Figure 3). At this time point, the EGFP transduction generated a slight but significant increase of endogenous IL-10 levels compared to control ( $p < 0.01$ ).

### Anti-hypertensive effects of IL-10

SBP gradually increased in the EGFP group, resulting in levels of  $184 \pm 7$  mmHg at 15 weeks of age (Figure 4). At 9 weeks (i.e. after 4 weeks of the vector injection), SBP in the IL-10 group ( $151 \pm 7$  mmHg) was significantly lower

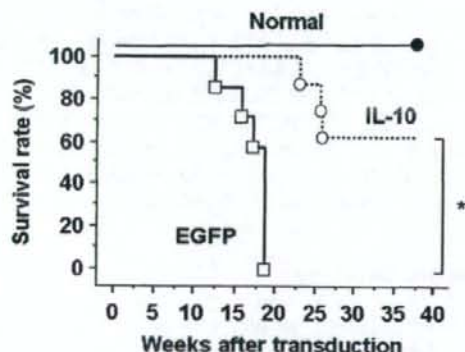


Figure 2. The pro-survival effects of IL-10 in DS rats. The 5-week-old rats were intramuscularly injected with AAV1-IL-10 or AAV1-EGFP at  $1 \times 10^{11}$  g.c./body. Kaplan-Meier survival analysis was performed. Closed circle, normal group; open circles, IL-10 group; open squares, EGFP group ( $n = 8$  each). \* $p < 0.001$  versus EGFP group

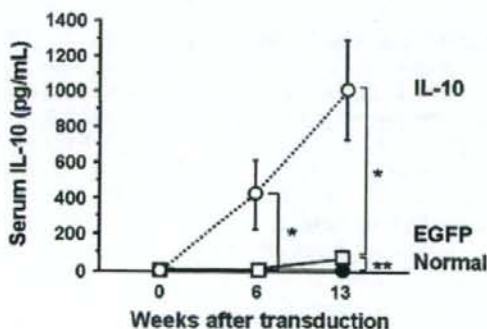


Figure 3. AAV vector-mediated systemic IL-10 expression in DS rats. AAV1-EGFP or AAV1-IL-10, at  $1 \times 10^{12}$  g.c./body, respectively, was injected bilaterally into the anterior tibial muscles of the 5-week-old rats. Serum IL-10 levels were determined periodically by ELISA. The normal group includes DS rats fed a low-sodium diet and not administered the vector injection. The results are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 10$  each). \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$

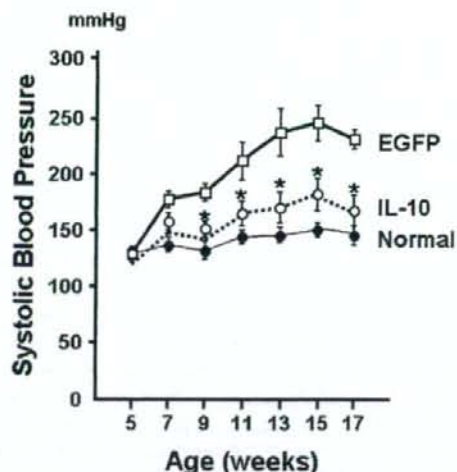


Figure 4. The anti-hypertensive effect of IL-10. Longitudinal tracing of systolic blood pressure evaluated by the tail-cuff method after injecting the AAV vectors in 5-week-old DS rats. Open squares, EGFP group; open circles, IL-10 group; closed circles, normal group ( $n = 10$  each). The results are presented as means  $\pm$  SD. \* $p < 0.001$  versus EGFP group

Table 1. Effects of IL-10 on left ventricular hypertrophy and function

Age (weeks)	RWT (mm)		%FS (%)	
	5	11	5	18
Normal	$0.46 \pm 0.03$	$0.48 \pm 0.02$	$58.7 \pm 3.7$	$57.2 \pm 3.9$
EGFP	$0.45 \pm 0.03$	$0.63 \pm 0.04^*$	$59.8 \pm 1.9$	$32.9 \pm 4.4^*$
IL-10	$0.45 \pm 0.04$	$0.49 \pm 0.02^{**}$	$59.4 \pm 2.6$	$59.2 \pm 4.6^{**}$

M-mode echocardiograms of the LV at the papillary muscle level were traced for analysis. RWT of the LV as an index of LV hypertrophy and %FS as an index of systolic LV function were calculated as described in the Materials and methods. The results are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 10$  each). \* $p < 0.0001$  versus Normal group, \*\* $p < 0.0001$  versus EGFP group at the same time-point, respectively.

than that in the EGFP group ( $p < 0.0001$ ). The anti-hypertensive effect of IL-10 persisted until the animals were sacrificed at 18 weeks of age.

### Effects of IL-10 on left ventricular hypertrophy, function and CHF

Echocardiography exhibited a 22.0% reduction in the RWT of the LV posterior wall at 11 weeks of age ( $p < 0.0001$ ) and a 26.3% improvement in %FS of the LV wall at 18 weeks of age ( $p < 0.0001$ ) in the IL-10 group compared to the EGFP group (Table 1). As compared to EGFP expression, IL-10 expression caused a 21.7% or 52.7% decrease in the heart or lung weight/body weight index, respectively (all  $p < 0.05$ ; Figures 5a and 5b). Similarly, the cardiac ANP mRNA level significantly increased in the EGFP group compared to the control ( $46.5 \pm 23.8$ -fold); whereas, IL-10 transduction significantly suppressed this increase ( $9.28 \pm 5.2$ -fold) compared to control (Figure 5c).

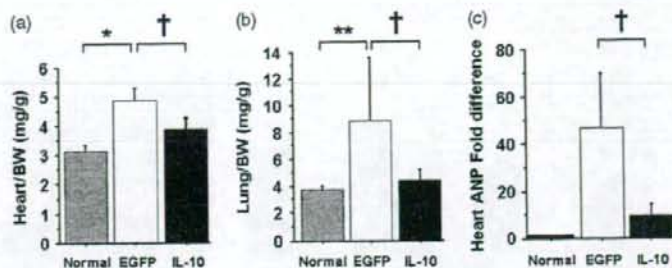


Figure 5. Effects of IL-10 on congestive heart failure. The hearts (a) and lungs (b) of DS rats were harvested and weighed at 18 weeks of age. Data were expressed after normalization using body weight. The cardiac ANP mRNA levels determined by real-time RT-PCR (c). The total RNA was extracted from the heart at 18 weeks of age. The mRNA levels were corrected by using the GAPDH mRNA level of each animal and then normalized to the mean value of the normal group. The results are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 10$  each). \* $p < 0.01$  versus Normal group, \*\* $p < 0.05$  versus Normal group, † $p < 0.05$  versus EGFP

### Effects of IL-10 on pathological cardiac remodelling

H&E staining demonstrated increased interstitial and perivascular cell infiltration in the failing heart of the EGFP-transduced rats (Figure 6a). Azan-Mallory staining demonstrated that interstitial and perivascular fibrosis increased in the EGFP group (Figure 6b). IL-10 transduction inhibited fibrosis and significantly decreased the cardiac TGF- $\beta_1$  levels in DS rats compared to the EGFP transduction ( $64.5 \pm 45.3$  pg/mg protein versus  $197.1 \pm 91.9$  pg/mg protein,  $p < 0.05$ ; Figure 6c).

### Effects of IL-10 on renal function

Compared to control rats, DS rats fed a high-sodium diet exhibited a 68.0% increase in serum creatinine, a 243.0%

increase in urine protein levels, and a 49.9% decrease in glomerular filtration rate (all  $p < 0.05$ ; Figure 7). Sustained IL-10 expression reduced these changes by 88.2%, 100% and 45.8%, respectively (all  $p < 0.05$ ).

### Discussion

The present study demonstrates that systemic IL-10 expression via the AAV serotype 1 vector prevented the progression of hypertension, CHF and renal dysfunction in DS rats. A single intramuscular injection of AAV1-IL-10 achieved long-term systemic IL-10 expression, leading to the prolonged survival of the rats. The IL-10 transduction not only preserved systolic LV function, but also reduced fibrosis of the LV at the heart failure phase. The anti-hypertensive effect of IL-10 occurred prior to the

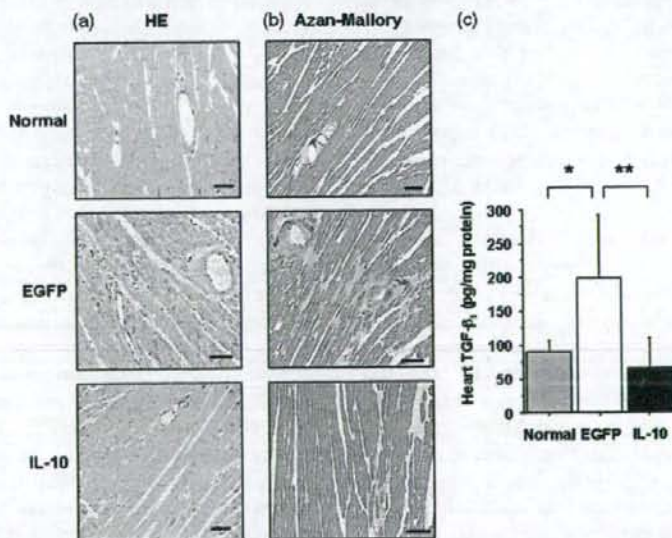


Figure 6. Histopathology and cardiac TGF- $\beta_1$  levels of the 18-week-old DS rats. (a) Representative micrographs of the H&E staining. (b) Representative micrographs of Azan-Mallory staining. Magnification,  $\times 200$ ; scale bar = 100  $\mu$ m. (c) TGF- $\beta_1$  concentrations in the heart homogenates determined by ELISA. The results are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 10$  each). \* $p < 0.05$  versus Normal group, \*\* $p < 0.05$  versus EGFP group

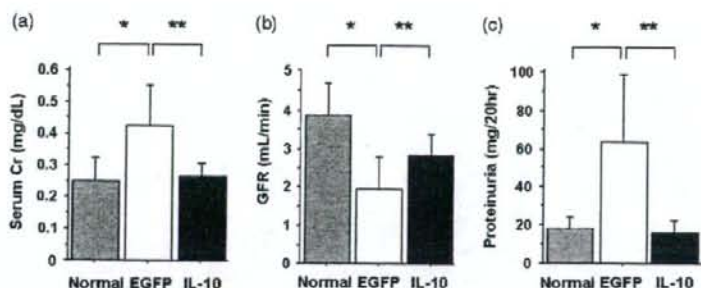


Figure 7. Effects of IL-10 on renal function in DS rats. (a) Serum creatinine (Cr), (b) glomerular filtration rate (GFR) and (c) urine protein levels were determined at 18 weeks of age. The results are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 10$  each). \* $p < 0.001$  versus Normal group, \*\* $p < 0.05$  versus EGFP group

development of CHF and LVH, suggesting that this effect may largely contribute to amelioration of sodium-induced hypertensive organ damage.

Many studies have suggested the therapeutic potentials of IL-10 for CHF. Serum IL-10 levels decrease in CHF patients [19], and exogenous IL-10 administration retards progression of the disease in many cardiovascular disease models [20]. However, these studies used CHF models in which CHF was a result of acute viral or autoimmune myocarditis, and they examined the short-term IL-10 effects against initial inflammatory responses [11,12]. In the present study, we demonstrated the effects of long-term IL-10 expression against chronic CHF progression, hypertension and inflammatory changes of the cardiac tissue.

We detected a slight but significant increase of endogenous IL-10 levels in the heart failure phase in control DS rats. However, this increase was insufficient to cause beneficial effects. On the other hand, conventional IL-10 therapies based on recombinant drugs or plasmids require frequent administration for sufficient and sustained IL-10 expression. Thus, we used AAV vectors that permit long-term transgene expression *in vivo* [14]. Previously, we demonstrated that a single intramuscular injection of the AAV5-based vector caused systemic IL-10 expression for 1 year [21]. Since AAV1 is more efficient for muscle transduction than AAV2 or AAV5 [22], we used AAV1 as the vector in the present study [23].

A clinical trial using infliximab, a chimeric monoclonal antibody to TNF- $\alpha$ , failed to prolong the survival of CHF patients over the long term [5]. We speculate that the failure might be in part based on an insufficient regulation of the cytokine network, which may be involved in the progression of CHF and other related diseases such as hypertension and renal failure. Recent studies have shown the marked anti-hypertensive effects of an immunosuppressant mycophenolate mofetil (MMF) in DS rats [3,4]. MMF administration also ameliorates renal dysfunction via anti-inflammatory effects. Interestingly, an intramuscular injection of AAV1-IL-10 successfully ameliorated renal function in a rat model after nephrectomy [24]. We also observed that systemic IL-10 expression significantly attenuated hypertension and renal dysfunction, along with a decrease

of inflammatory cell infiltration, in the kidney of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (T. Nomoto *et al.*, unpublished data). In the present study, we demonstrate that IL-10 gene therapy successfully ameliorated heart failure and renal dysfunction along with a suppression of severe hypertension in DS rats. These observations suggest that anti-inflammatory action of IL-10 may attenuate the target organ damage related to high blood pressure. However, precise mechanism underlying the anti-hypertensive effect of IL-10 require further investigation.

The synthesis of ANP, a cardioprotective hormone predominantly produced by the ventricle, as well as its circulating levels, increases in accordance with the severity of CHF [25,26]. Administration of exogenous ANP ameliorates CHF in clinical settings via its diuretic and vasodilatory effects. In the present study, the cardiac ANP mRNA level significantly decreased in the IL-10 group. These observations suggest that IL-10 ameliorated CHF independently of direct ANP production but inhibited the adaptive increase in ANP levels.

The present study demonstrates that IL-10 expression attenuated pathological cardiac remodelling with reduced expression of TGF- $\beta_1$ , a hallmark of cardiac fibrosis in DS rats [27]. Expression of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 in the endothelium of intramyocardial arterioles triggers perivascular macrophage accumulation [28]. Macrophage infiltration induces TGF- $\beta_1$  production, leading to fibroblast proliferation and extracellular matrix production [29]. Interestingly, a neutralizing antibody against TGF- $\beta$  inhibits fibroblast activation, resulting in reduced collagen production and subsequent myocardial fibrosis [30]. Previously, we reported that systemic IL-10 expression significantly decreased serum MCP-1 levels, perivascular macrophage infiltration, and pulmonary tissue TGF- $\beta_1$  levels *in vivo* [10,21]. These observations suggest that the reduced macrophage-derived TGF- $\beta_1$  expression following MCP-1 suppression might be responsible for the anti-remodelling effects of IL-10. However, the direct effects of IL-10 on TGF- $\beta_1$  in the pathogenesis of CHF remain unclear.

Epidemiological studies have demonstrated that the increased pro-inflammatory cytokine expression is related to the incidence of pre-hypertension [31]. These results