

して有意に持続性 Na 電流が増加し、K 電流が低下していることが示唆された。これらの軸索イオン電流の変化パターンは ALS において報告されている所見と一致していた。ALS では生理的に持続性 Na 電流が高く、K 電流が低い軸索を持つ運動ニューロンが優位に侵されると考えられた。

広範な線維束性収縮 (fasciculation) は ALS に特異的に認められ、運動ニューロン死に関わっている可能性は高い。線維束性収縮は軸索興奮性増大による自発発射により生じることから、Na チャネル阻害剤、K チャネル開口剤などのイオンチャネル作動薬は ALS に対する新規治療オプションとなり得るものと考えられる。

#### E. 結論

1. ALS では生理的に興奮性が高い軸索が優位に障害される。
2. ALS では持続性 Na 電流増加と K 電流減少により相乗的に軸索興奮性の増大を来とし、異常自発発射 (fasciculation) が持続的に生じることが推定される。
3. Na、K チャネル作動薬は ALS に対する新規治療オプションとなり得る。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

##### 論文発表

1. Sonoo M, Kuwabara S, Shimizu T, Komori T, Hirashima F, Inaba A, Hatanaka Y, Misawa S, Kugio Y; The Tokyo Metropolitan Neuromuscular Electrodiagnosis Study Group. Utility of trapezius EMG for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2009 Jan;39(1):63-70.

2. Kuwabara S. Physiological differences in excitability among human axons. *Clin Neurophysiol*. 2008 Oct 7.
3. Bae JS, Sawai S, Misawa S, Kanai K, Iose S, Shibuya K, Kuwabara S. Effects of age on excitability properties in human motor axons. *Clin Neurophysiol* 2008 Oct;119(10):2282-6.
4. Kuwabara S. Ionic mechanisms for paresthesias arising from human sensory axons. *Clin Neurophysiol* 2008 Sep;119(9):1945-6.
5. Nakata M, Baba H, Kanai K, Hoshi T, Sawai S, Hattori T, Kuwabara S. Changes in Na(+) channel expression and nodal persistent Na(+) currents associated with peripheral nerve regeneration in mice. *Muscle Nerve*. 2008 Jun;37(6):721-30.
6. Misawa S, Kuwabara S, Matsuda S, Honma K, Ono J, Hattori T. The ipsilateral cortico-spinal tract is activated after hemiparetic stroke. *Eur J Neurol*. 2008 Jul;15(7):706-11.
7. Ning YP, Kanai K, Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Sato S, Asahina M, Kuwabara S, Takeda A, Hattori T, Mizuno Y, Hattori N. PARK9-linked parkinsonism in eastern Asia: mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype. *Neurology* 2008 Apr 15;70(16 Pt 2):1491-3.
8. Sawai S, Kanai K, Nakata M, Hiraga A, Misawa S, Iose S, Hattori T, Kuwabara S. Changes in excitability properties associated with axonal regeneration in human neuropathy and mouse Wallerian degeneration. *Clin Neurophysiol* 2008 May;119(5):1097-105.
9. Kuwabara S, Sonoo M, Komori T, Shimizu T, Hirashima F, Inaba A, Misawa S, Hatanaka Y; Tokyo Metropolitan Neuromuscular Electrodiagnosis Study Group. Dissociated small hand muscle atrophy in amyotrophic lateral

sclerosis: frequency, extent, and specificity.

Muscle Nerve. 2008 Apr;37(4):426-30.

10. Kanai K, Kuwabara S, Sawai S, Nakata M, Misawa S, Iose S, Hirano S, Kawaguchi N, Katayama K, Hattori T. Genetically confirmed Huntington's disease masquerading as motor neuron disease. Mov Disord 2008 Apr 15;23(5):748-51.

## 2.学会発表

1. 三澤園子、金井数明、澤井撰、磯瀬沙希里、  
澁谷和幹、桑原聡. 筋委縮性側索硬化症にお  
ける解離性小手筋委縮:(1)頻度・特異度. 磯  
第38回日本臨床神経生理学会、神戸.
2. 桑原聡、三澤園子、金井数明、澤井撰、磯瀬  
沙希里、澁谷和幹. 筋委縮性側索硬化症にお  
ける解離性小手筋委縮:(2)軸索興奮性の差異.  
磯第38回日本臨床神経生理学会、神戸.

## H.知的所有権の取得状況(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

## ALSにおける舌・胸鎖乳突筋・僧帽筋の針筋電図の有用性の比較：多施設共同前向き研究

園生雅弘<sup>1)</sup>、桑原聡<sup>2)</sup>、清水俊夫<sup>3)</sup>、小森哲夫<sup>4)</sup>、平島富美子<sup>5)</sup>、稲葉彰<sup>6)</sup>、畑中裕己<sup>1)</sup>、  
三澤園子<sup>2)</sup>、釘尾由美子<sup>3)</sup>

1) 帝京大学神経内科, 2) 千葉大学神経内科, 3) 東京都立神経病院神経内科, 4) 埼玉医科大学神経内科,  
5) 埼玉リハビリテーションセンター神経内科, 6) 横須賀共済病院神経内科

### 研究要旨

ALSでの脳神経領域障害の証明には舌のEMGが古くから用いられるが、安静がとりにくいなどの問題がある。近年胸鎖乳突筋（SCM）、僧帽筋（Trap）などの有用性を示唆する報告がある。本研究では、ALSにおける上記3筋のEMGの感受性、頸椎症（CS）との比較における特異性について、多施設共同前向き研究によって検討した。ALSでは上記3筋、CSではSCM、Trapの2筋においてEMGを施行し、得られた安静度、線維自発電位・陽性鋭波、線維自発電位の安静時活動出現有無を主に解析した。結果として、104例のALS患者が得られた。完全な安静は舌、SCM、Trapの順に、6%、43%、85%の症例で実現された。何らかの安静時活動は、順に9%、17%、63%の症例で見られた。32例のCS患者のSCM、Trapでは安静時活動は1例も見られなかった。舌は安静がとり難く異常検出率も低くて、臨床的舌萎縮以上の情報を与えない。僧帽筋の安静時活動はALSでの特異性も高く、ALSの早期診断に有用である。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）での脳神経領域障害の証明には舌のEMGが古くから用いられている。しかし、しかし実際には舌は安静が取りにくいことが難点となる。過去の文献を見ても、ALSでの舌の安静時活動の出現頻度には報告間の差が著明である。また、舌のEMGがsubclinicalな球障害を検出できるかにも議論がある。近年胸鎖乳突筋（SCM）、僧帽筋などの有用性を示唆する報告がある。本研究では、ALS診断、特に早期診断における、舌、SCM、僧帽筋の針筋電図の有用性を、多施設共同研究によって明らかにすることを目的とした。また、特異性評価のために、頸椎症（CS）患者のSCMと僧帽筋の針筋電図も調べた。

### B. 研究方法

首都圏神経筋電気診断フォーラムに属する8施設で、

12ヶ月間に、ALS・CSで筋電図検査を受けた患者をエントリーした。なお、エントリーにあたっては、本研究の目的方法を説明し、informed consentを得た。

ALS患者では、改定El Escorial基準（EEC）での診断カテゴリーを記載した。EECでは、clinically possible、さらには改訂EECでは削除された、下位運動ニューロン障害のみを呈するclinically suspected（＝進行性筋萎縮症；PMA）のカテゴリーの患者もエントリー対象とした。これは本研究では針筋電図の早期診断に果たす役割を明らかにしたいと考えたためである。これらの低いカテゴリーに属する患者においては、可能な限りの追跡情報を得て、カテゴリーの上昇、あるいは呼吸器や胃瘻の導入などに至っていないかを調べた。その他、初発が球症状かそうでないか、球症状としての舌萎縮の有無も記載した。

針筋電図では安静時活動を主に評価した。即ち、線

維自発電位・陽性鋭波 (Fib/PSW)、線維束自発電位 (Fasc) の出現の有無を主たる評価項目とした。Fib/PSWsについては、3秒以上続く規則的活動のみを採用した。筋内10カ所以上を検索し、2カ所以上で出現した場合を異常とした。Fascについては、MUPの形態で、高度に不規則・低頻度で発火するもののみを採用した。随意収縮のいかなる残存もFascの評価を不可能にすると考えた。これらの安静時活動の定義・採用基準について、事前に施設間で十分な申し合わせを行った。

また各筋で実現できた安静度を、Complete relaxation (随意運動単位電位=MUPの残存なし)、Partial relaxation (随意MUPがある程度残存するが、Fib/PSWは規則的な発火パターンによって認識可能)、No relaxation (随意活動が高度に残存し、Fib/PSWも認識不可能) の3段階に分けて、記載した。Fib/PSWはCompleteとPartial relaxationにおいて、FascはComplete relaxationにおいてのみ評価した。

随意収縮時活動の異常についても、減少動員、高振幅・巨大MUP、多相性の不安定MUPなどを異常所見として定性的に評価し記載したが、これらについては検者の主観を逃れ得ないと考え、参考にとどめた。

### C. 研究結果

104例のALS患者が得られた(男:女 56:48、45-83歳、平均66.5歳)。罹病期間は3-52ヶ月(中央値 11ヶ月)、初発部位は40例が球部、64例が非球部、明確な舌萎縮は41例であり、63例でなし。

EECでのDiagnostic categoryの内訳は、Clinically definite 6例、Clinically probable 21例、Clinically probable-laboratory supported 18例、Clinically possible 34例、Clinically suspected (PMA) 25例であった。

Clinically possible以下の59例のうち、3~14ヶ月のフォロー情報が得られた47例中25例で、カテゴリー上昇ないし、補助呼吸・胃瘻の導入となり、ALSの診断が確実になったと考えられた。

CS患者は明確な上肢筋の萎縮を呈する例のみを対象とし、32名(男:女 29:3、33-85歳、平均62.2歳)がエントリーされた。

ALS患者の各筋で実現できた安静度を図1に示す。

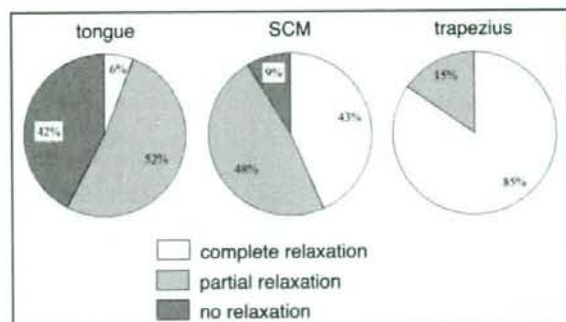


図1 ALS患者の各筋で実現できた安静度

完全な安静は舌では6%の症例でしか実現できなかったのに対し、僧帽筋では85%の症例で実現された。SCMはその中間であった。

ALS患者、CS患者それぞれで、安静時活動、随意収縮時活動異常の認められた患者の割合を図2に示した。

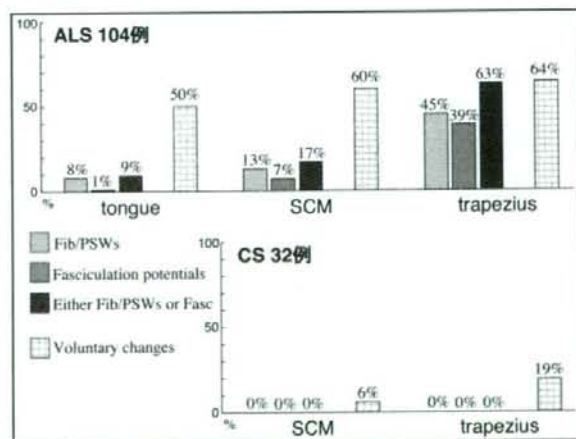


図2 ALS患者・CS患者での、異常安静時活動、随意収縮時活動異常の出現率

ALS患者で、何らかの安静時活動が見られた割合は僧帽筋が63%と最も多く、SCMは17%、舌では9%にとどまった。CS患者のSCM、僧帽筋では、随意収縮時活動異常は少数例でみられたものの、安静時

活動は1例も見られなかった。

ALSのうち、球症状で初発した症例とそれ以外の症例との間では、各筋の安静時活動の出現率に有意差はなかった。舌萎縮の有無でわけると、舌のFib/PSWの出現率にわずかな有意差があったが、舌での何らかの安静時活動の出現は、舌萎縮が明確な患者においても15%にとどまり、舌萎縮が明らかでない患者では5%と極めて稀であった。

EECでpossibleないしsuspected (= PMA)の低いカテゴリーの患者でも、僧帽筋の安静時活動の頻度はより高い診断確度の患者と同様に高く、特にsuspected患者での僧帽筋での安静時活動出現率は72%に達した。

#### D. 考察

##### 1) EMG評価方法に関して

EECでは、ALSを示唆する下位運動ニューロン(LMN)障害を証明するためには、安静時活動の存在(EECでいうところのactive denervation)と随意収縮時活動の異常(EECでいうところのchronic denervation)の両者の異常が必要とされるが、本研究では安静時活動のみを異常判定の主たる評価項目とした。これは、随意収縮時活動を一般に行われているように定性的に評価する方法は、熟練検者によって施行されれば十分信頼性があるものの、主観の影響を完全に排除することはできないと考えたためである。対して安静時活動は存在するか否かの2者択一であり、各活動の定義・採用基準さえ十分に統一しておけば、主観の混入の余地は少ないと考えたためである。

随意収縮時活動について定量評価を行えばよいのではと指摘されるかもしれないが、実際には現存する針筋電図の随意収縮時活動の定量評価の手法には様々な問題点があり、必ずしもその方が信頼性が高いと言い切れるものではなく、また煩雑なために広く用いられていないのが実情である。

ALSであると診断するためには、安静時活動と共に随意収縮時活動での神経原性変化を証明することが必須であることは確かだが、これは今回の症例では、本研究対象以外の四肢筋において通常証明できてい

る。舌・SCM・僧帽筋などに異常が及んでいるかどうかの判断は、安静時活動の証明のみで十分と考えた次第である。

また、Fascについては特異性が低いとの意見もありEECでは参考にとどめられているが、一方ALSでの特異性は高く重要な所見との意見もある。本研究では少なくともCSでのFasc出現はなく特異性が高いことが支持された。針筋電図での線維束自発電位の証明はALS診断に有用と我々は考えており、その意味でFascにFib/PSWと同様の意義を認めた新しいAwaji基準<sup>2)</sup>は歓迎されるものである。

##### 2) 舌の針筋電図の限界

舌では安静がとりにくいという記載は、これまでの論文・綜説などでも見られるが、実際にその程度を調べた報告はほとんどない。本研究では、舌の安静が実際極めてとりやすく、安静時活動の証明が困難であることが示された。これは手技の不良によるものではない。なぜなら、本研究の前に舌の安静の取り方についてExpertであるアイオワ大学木村淳先生からご教授を受け、仰臥位で顎下部から刺入するのはもちろん、その際に舌を調べると言うのではなく「顎の下の筋肉を調べる」と被検者に説明すること、唾液が貯まったら我慢せず嚥下して構わないと指示するなどの多くのtipsを教わり、それを各施設で統一的に用いての結果がこのようであったからである。以上からも臨床的に観察される「舌のfasciculation」と一般に言われるものは、contraction fasciculationであることが明らかである。

舌の安静時活動の頻度についての過去の報告も様々で、18例のALS患者の舌で、10例で線維自発電位、7例で線維束自発電位を認めたとする報告もあれば<sup>2)</sup>、68例のALSの球筋(咬筋、舌、SCM)でFib/PSWは1例も見られなかったとする報告もある<sup>3)</sup>。このように結果に差がある大きな原因は、安静時活動認識の基準にあるのではと推測される。脳神経領域では随意MUPが一般に小さく、線維自発電位などとの区別が難しい場合があることは指摘されている。

本研究では、臨床的に舌萎縮が明らかでない時に舌のEMGで安静時活動が認められる可能性はほとんどなく（5%）、舌萎縮が明らかであっても出現率は低い（15%）ことが示された。このことから、舌のEMGが臨床的舌萎縮の観察に加えるところはほとんどない、即ちsubclinicalな異常検出の意義もなく、有用性は限られることが示された。

### 3) 僧帽筋の針筋電図の有用性

本研究からは、僧帽筋は安静をとることが容易で、ALSでの安静時活動出現率も非常に高いことが示された。またclinically suspectedなどの低い診断カテゴリーでの異常出現率も高く、早期診断に有用であることが示唆された。CSでは僧帽筋に安静時活動が見られた例はなく、特異性も極めて高いことが示された。動物実験からは僧帽筋を支配する下位運動ニューロンはC3-C5レベルに主に存在することが示されており、CSで異常がつかまってもよさそうではあるが、近位型の頸椎症性筋萎縮症には神経根症も多く、脊髄管内を上行するspinal accessory nerveは影響を受けないこと、一般にCSでは神経根症以外では安静時活動の出現率が低いことなどが関係するものと考えられる。

いずれにしても、僧帽筋での安静時活動出現率が極めて高いこと、CSとの比較における特異性も高いことは、ALS診断においてこの筋が非常に有用であることを意味する。前記のように僧帽筋支配ニューロンの細胞体は上中位頸髄にあるので、これを脳神経筋と扱うのは適当ではない。しかし少なくとも頸髄領域の二つ目の筋として活用することは可能であり、例えば背側骨間筋と僧帽筋を調べるという方法などが考えられると思われる。

### E. 結論

1) 舌は安静が取り難く、またALSでの安静時活動の出現率も低い。EMGが臨床的舌萎縮の観察に加える情報はほとんどなく、痛みが強い割に有用性は低いと考えられた。

2) 僧帽筋は安静をとることが容易で、ALSでの安静時活動の出現率も高い。またCSでは安静時活動出現は見られず特異性も高い。早期診断を含むALS

の診断に極めて有用と考えられた。

### 文献

- 1) de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills: Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. Clin Neurophysiol, 119: 497-503, 2008.
- 2) Finsterer J, Fuqslang-Frederiksen A, Mamoli B: Needle EMG of the tongue: motor unit action potential versus peak ratio analysis in limb and bulbar onset amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 63: 175-180, 1997.
- 3) de Carvalho M, Bentes C, Evangelista T, et al: Fibrillation and sharp-waves: do we need them to diagnose ALS?. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1: 29-32, 1999.

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Sonoo M, Kuwabara K, Shimizu T, et al: Utility of trapezius EMG for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 39(1): 63-70, 2009.

#### 2. 学会発表

- 1) Sonoo M, Kuwabara K, Shimizu T, et al: The significance of tongue and trapezius electromyography in the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. 55th annual scientific meeting of American association of neuromuscular and electrodiagnostic medicine, Providence, 9, 2008.
- 2) 園生雅弘, 桑原聡, 清水俊夫他: 筋萎縮性側索硬化症(ALS)診断における、舌、胸鎖乳突筋(SCM)、上部僧帽筋(Trap)の針筋電図(EMG)の有用性の比較: 多施設共同前向き研究. 第38回日本臨床神経生理学会学術大会, 神戸, 11, 2008.

### H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし

## 下肢屈筋群優位の筋萎縮・筋力低下を呈する SOD1His46Arg 変異を

### 有する家族性筋萎縮性側索硬化症の一家系

山下 賢、森 麗、木村 円、前田 寧、平野 照之、内野 誠

熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野

#### 研究要旨

SOD1His46Arg 変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の一家系 3 症例を報告する。3 症例における初発症状はいずれも一側下腿の筋力低下であった。各症例とも発症初期には筋萎縮は下腿屈筋群により顕著であり、一方伸筋群は比較的長期間保たれていた。進行期においても下腿伸筋群の障害は比較的軽度であった。さらに病初期に採取された筋病理組織では壊死・再生・炎症細胞浸潤の所見がみられ、炎症性ミオパチーに類似の所見を呈した。本例の兄は 14 年間の長期に渡り緩徐に進行し、一方、妹は約 3 年の経過で比較的急速に症状が進行しており、同一家系内にも症候にバリエーションがあると考えられた。これらの知見は、SOD1 変異を伴う FALS の表現型のスペクトラムを拡げ、FALS の病態解明に寄与することが期待される。

#### A. 研究目的

Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子の His46Arg 変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) 患者は一側下肢から発症し、緩徐に進行する比較的均一な症候を呈するが、罹患筋やその筋病理所見に関しては明らかではない。我々は SOD1His46Arg 変異を有する FALS 症例を臨床的に詳細に検討することによって、FALS の病態を解明することを目的としている。

#### B. 研究方法

SOD1His46Arg 変異を有する FALS の一家系 3 症例について、神経学的診察に加えて骨格筋 MRI、神経伝導検査、針筋電図、筋病理組織を含む臨床的精査を行った。

#### C. 研究結果

**症例 1** は 58 歳男性(兄)。44 歳頃から左下腿のこむらがえりが出現し、46 歳時に左足の踏ん張りが利かないことに気がついた。第一回入院時は、症状が右下腿に限局しており、筋病理組織 (Fig. 2A) にて壊死・再生・炎症細胞浸潤の所見から炎症性筋炎を疑われステロイド投与を受けた。副作用のため投与を

中止され、以降外来で経過観察された。徐々に筋力低下は進行し、両側下肢に拡がった。第二回入院時両下肢の筋萎縮・筋力低下、上肢の筋力低下を認め、深部腱反射は上肢で減弱、下肢で消失していた。感覚障害、自律神経障害はみられなかった。歩行に杖を要し、つま先をあげ、踵で歩行し、つま先、踵歩行は不能であった。針筋電図では左腓腹筋に加えて左上腕二頭筋でも、進行性および慢性脱神経所見を認め、下腿の骨格筋 MRI (Fig. 1D、E) では、両側腓腹筋、ヒラメ筋の脂肪変性が顕著であるのに対して、下腿伸筋群は比較的保たれていた。前回と同部位から施行した筋生検では殆どの筋線維は萎縮し、pyknotic nuclear clumps を認め、ルーチン ATPase 染色では Type 1 および 2 線維とも顕著な萎縮を認めた (Fig. 2B、C)。

**症例 2** は 56 歳女性(妹)。53 歳時に右下腿のこむらがえりで発症し、同様に腓腹筋、ヒラメ筋の筋萎縮が進んだ。神経内科学的所見では、両上下肢に筋力低下がみられ、特に左が重く、左右差がみられた。普通歩行は可能であったが、踵歩行であり、つま先立ち、片足立ちは不能であった。針筋電図検査で

右上腕二頭筋と右腓腹筋において進行性および慢性脱神経所見を認め、下腿の骨格筋 MRI (Fig. 1F、G) では、腓腹筋、ヒラメ筋の脂肪変性はみられるものの、下腿伸筋群は比較的保たれていた。右腓腹筋の筋病理所見では小径角化線維、group atrophy の所見と、一部に筋の変性、壊死像を認めた。ルーチン ATPase 染色では Type 1 および 2 線維とも萎縮を認めた (Fig. 2D、E)。

症例 3 の 84 歳女性 (母) は 46 歳時、下腿のこむらがえりと進行性の歩行障害が出現。49 歳時近医にて精査を受けた際、右下腿の筋力低下・筋萎縮を指摘されたが、原因は不明であった。その後筋力低下は徐々に対側下腿にも進展した。68 歳時に認知機能障害のため、以降施設入所中である。神経内科学的所見では舌萎縮や線維束攣縮、構音・嚥下障害はなく、両上肢に筋線維束攣縮と四肢に高度筋萎縮、筋力低下を認めた。筋萎縮は特に右下腿屈筋に強い傾向が見られた。深部腱反射は全体的に消失していたが、病的反射はみられなかった。歩行は不能で、ベッド上に寝たきりの状態であったが、呼吸状態に問題なかった。

SOD1 遺伝子検索にて 3 症例とも SOD1His46Arg 変異を検出した (Fig. 3)。

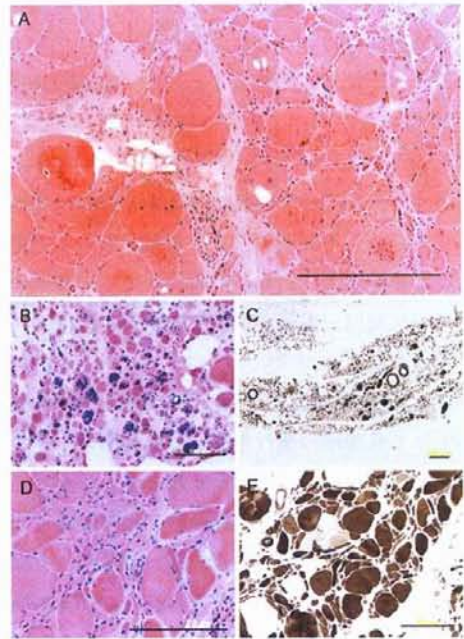


Fig. 2 筋病理所見 (腓腹筋)

症例 1 : 第一回入院時 HE 染色 (A)、第二回入院時 HE 染色 (B)、ルーチン ATP 染色 (C)  
症例 2 : HE 染色 (D)、ルーチン ATP 染色 (E)

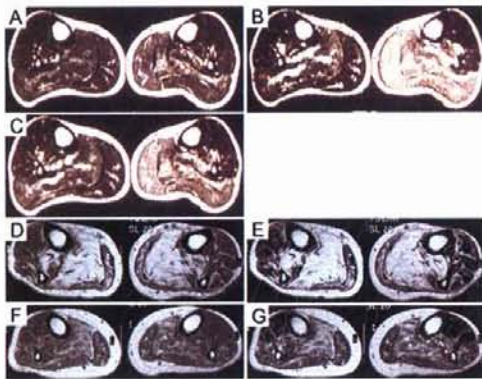


Fig. 1 下腿骨格筋 MRI

症例 1 : 第一回入院時 T1WI (A)、T2WI (B)、Gd 造影 T1WI (C)、第二回入院時 T1WI (D)、T2WI (E)  
症例 2 : T1WI (F)、T2WI (G)

#### D. 考察

3 症例とも El escorial criteria では suspected ALS と診断される。過去の報告と同様、3 症例における初発症状はいずれも一側下腿の筋力低下であった。

病初期に採取された筋病理組織では壊死・再生・炎症細胞浸潤の所見がみられ、炎症性ミオパチーに類似の所見を呈した。遺伝子操作を行ったモデルマウスでの検討ではアストロサイトやマイクログリアは疾患の進展に寄与すると考えられている一方、骨格筋自体の関与は低いと報告されている。しかし G93A マウスでは腓腹筋のような oxidative muscle においてミトコンドリアの機能異常が報告されており、このことが本症例に特徴的な腓腹筋での炎症性ミオパチー様の所見がみられた原因と推測される。



さらに興味深いことに各症例とも発症初期には筋萎縮は下腿屈筋群により顕著であり、一方伸筋群は比較的長期間保たれていた。進行期においても下腿伸筋群の障害は比較的軽度であった。筋萎縮の分布が屈筋群に強かったことは、腰髄の前角細胞の解剖学的分布に関連があるかもしれない。前角の中でも、伸筋支配の運動神経核は腹側、屈筋は背側に分布している。本症例では、左右差をもって下腿の屈筋群から発症しており、前角なかでもの背側の神経細胞から変性・脱落が進行している可能性があると考えられる。

本例の兄は14年間の長期に渡り緩徐に進行し、下肢MRIにて筋萎縮の進行を、また病初期および進行期に筋病理組織像での変化を比較することができた貴重な症例である。一方、妹は約3年の経過で比較的急速に症状が進行しており、同一家系内にも症候にバリエーションがあると考えられる。FALSの発症と進行には環境因子や遺伝的因子(e.g. CNTF)などの他因子が関わっている可能性が示唆された。

#### E. 結論

これらの知見は、SOD1変異を伴うFALSの表現型のスペクトラムを拡げ、FALSの病態解明に寄与することが期待される。グリア細胞の活性化と運動ニューロンの解剖学的脆弱性との関連性、変異SOD1のミトコンドリア障害による筋線維自体への毒性など、さらなるFALSの病態解明への研究が重要と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Neuromuscular Disorders (revised)

##### 2. 学会発表

日本神経学会九州地方会(2008年3月福岡)

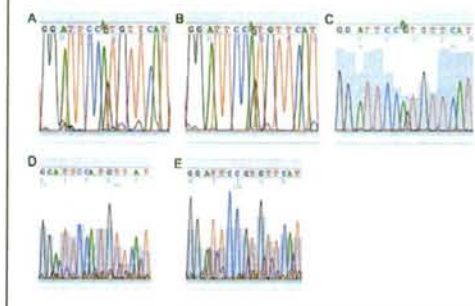
#### H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Fig. 3 SOD1 遺伝子検索

症例1 (A)、症例2 (B)、症例3 (C)

PCR産物のクローニング；正常アレル(D)、変異アレル(E)



## Derlin-1 による変異 SOD1 の小胞体内蓄積軽減を目的とする

### 家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療の開発

山下 賢、森 麗、木村 円、前田 寧、平野 照之、内野 誠

熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野

#### 研究要旨

変異 SOD1 マウスでは変異 SOD1 が運動神経の小胞体(ER)に蓄積し、ER ストレスによってアポトーシスをきたす。Derlin-1 は、近年ミスフォールディング蛋白の細胞質への逆行性輸送の中心的局面を担うことが明らかにされた。Derlin-1 の SOD1 発現に及ぼす影響を解明するために、Derlin-1 を野生型もしくは変異型 SOD1 発現細胞に過剰発現すると、ER への変異 SOD1 蓄積が軽減され、変異 SOD1 蛋白の分解が促進された。Derlin-1 は細胞質への逆行性輸送を促進することにより小胞体関連分解を引き起こし、変異 SOD1 の ER 内蓄積を軽減することが示唆された。

#### A. 研究目的

ヒト SOD1 変異による家族性 ALS のモデルマウスでは、週齢依存的および組織特異的に変異 SOD1 蛋白が運動ニューロン的小胞体(ER)内に蓄積しており、その結果運動ニューロンが ER ストレスによって、アポトーシスをきたすことが明らかとなっている。この ER 内への変異 SOD1 蛋白の選択的蓄積が、運動ニューロン変性のトリガーとなっている可能性に着目し、小胞体関連分解(ERAD)に関連する分子が変異 SOD1 蛋白の発現に及ぼす影響について検討し、それらの遺伝子を家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療の開発へと応用させることを目的としている。

#### B. 研究方法

小胞体膜に局在する Derlin-1 は、近年ミスフォールディング蛋白の細胞質への逆行性輸送の中心的局面を担うことが明らかにされた。野生型および変異型 SOD1 を発現する神経細胞において、Derlin-1 を過剰発現することによって、変異 SOD1 蛋白の発現に及ぼす影響を観察し、変異 SOD1 蛋白の小胞体内蓄積の軽減および毒性軽減効果について検討を行う。

#### C. 研究結果

1) 野生型および変異型 SOD1 は Derlin-1 と共局在する。

Derlin-1 発現ベクターと、各種 SOD1(野生型もしくは G93A、G85R 変異型)発現ベクターをリポフェクション法により Neuro2a 細胞に共発現させた。Derlin-1 および SOD1 ベクターの配合比率について、

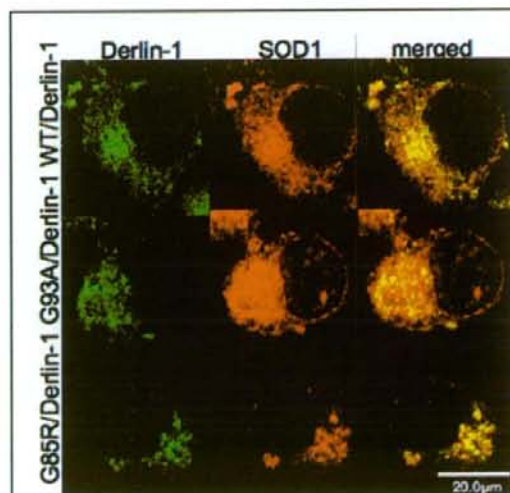


Fig. 1 野生型および変異型 SOD1 は Derlin-1 と共局在する。Scale bar=20 μm

種々の条件で発現量を比較したところ、Derlin-1 : SOD1=1 : 1 の時に両者の十分な発現がみられたことから (Data not shown)、以下の実験ではこの条件にて検討を行った。はじめに Derlin-1 と各種 SOD1 の発現部位を明らかにするために、免疫蛍光染色法により観察を行った。Derlin-1 は過去の報告と同様に、小胞体の染色パターンを示唆する網状構造を示した (Fig. 1)。また Derlin-1 は小胞体マーカーである Calnexin と顕著な共局在を示した (Data not shown)。一方 SOD1 は、野生型および変異 SOD1 (G93A, G85R) ともに細胞質を主とする染色性を示したが、一部は Derlin-1 および Calnexin と共局在を示し (Fig. 1, Data not shown)、過去の報告と同様、小胞体への分布を裏付けた。

## 2) Derlin-1 は特に変異型 SOD1 の発現量の低下をもたらす。

Derlin-1 と各種 SOD1 が共局在を示し、何らかの相互作用する可能性が推測されたことから、次に Derlin-1 が各種 SOD1 発現に及ぼす影響を明らかにするために Western blot 法によりそれぞれのタンパク量を比較した。以下の実験では各種 SOD1 の発現量を一定化するために、各種 SOD1 すなわち野生型および変異 SOD1 (G93A, G85R) 安定発現 Neuro2a 細胞株を確立し、これらを実験に使用した。過去の報告と同様、変異型 SOD1 安定発現細胞はその毒性のためか、内在性 SOD1 に比して 10~20% 程度の発現にとどまるクローンのみ細胞株の確立が可能であった。これらの細胞について、Derlin-1 発現ベクターもしくは empty vector である pcDNA5 をリポフェクション法によりト

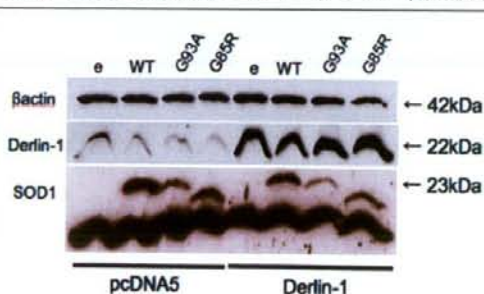


Fig. 2 Derlin-1 は特に変異型 SOD1 の発現量の低下をもたらす。

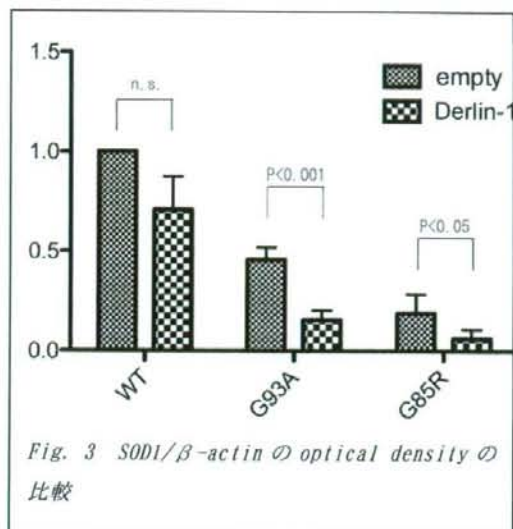


Fig. 3 SOD1/ $\beta$ -actin の optical density の比較

ランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後に、細胞を回収・蛋白抽出し、Derlin-1 (Sigma) および SOD1 (Calbiochem)、 $\beta$ -actin (Sigma) の各種抗体を用いて Western blot 法により各種蛋白を検出した。また得られた各 SOD1 の発現バンドについて Image J software (NIH) により optical density を定量化し、internal marker である  $\beta$ -actin の optical density で補正し、Derlin-1 の有無により比較した。すると Fig. 2 に示すように、pcDNA5 に比して Derlin-1 発現下では、野生型および変異 SOD1 (G93A, G85R) いずれも発現量が低下する傾向が見られた。定量的な比較においては (Fig. 3)、野生型 SOD1 に関しては有意差はみられなかったが、変異 SOD1 (G93A, G85R) に関しては有意な発現量の低下を示した。これらの発現量の低下が各種 SOD1 の産生低下によるものか、あるいは分解亢進に伴うものかを明らかにするために、RT-PCR 法によりそれぞれの条件における mRNA 量を比較したところ、いずれも有意な差は見られなかった (Data not shown)。すなわち Derlin-1 過剰発現に伴う SOD1 含量の低下は、SOD1 の分解亢進による可能性が示唆された。

## 3) Derlin-1 は変異型 SOD1 の細胞毒性を軽減する。

変異 SOD1 含量の低下は SOD1 による細胞毒性軽減に重要な役割を果たすとの仮説の下に、各種 SOD1 (野

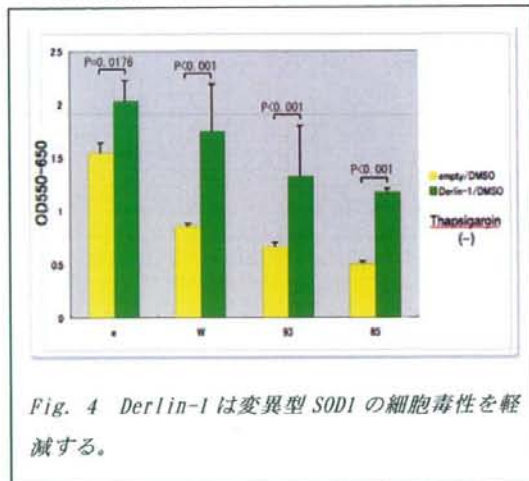


Fig. 4 Derlin-1 は変異型 SOD1 の細胞毒性を軽減する。

生型および G93A, G85R) 安定発現 Neuro2a 細胞株について、Derlin-1 発現ベクターもしくは empty vector をリポフェクション法によりトランスフェクションし、48 時間後に細胞の生存性を MTT assay により評価した。empty vector をトランスフェクションした際には、過去の報告と同様、変異型 SOD1 (G93A, G85R) を発現する細胞は、野生型 SOD1 を発現する細胞と比較して低い生存性を示した。一方 Derlin-1 をトランスフェクションすると、変異型 (G93A, G85R) のみならず野生型 SOD1 を発現する細胞においても、細胞の生存性の改善が見られた (Fig. 4)。すなわち Derlin-1 は変異 SOD1 の毒性を軽減することが明らかとなった。

#### D. 考察

ALS の発症は、多因子によって規定されていると考えられているが、最近の報告では小胞体ストレスが家族性 ALS の発症に関わっている可能性が示唆されてきた。小胞体ストレスとは、種々の特異的なシグナル伝達を含む複合的な反応であるが、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる反応を介して、小胞体における蛋白の折りたたみ容量が破綻しないように機能している。しかしながら小胞体ストレスが遷延すると、ついにはミトコンドリア依存のもしくは非依存的に細胞死に至る。変異 SOD1 蛋白の小胞

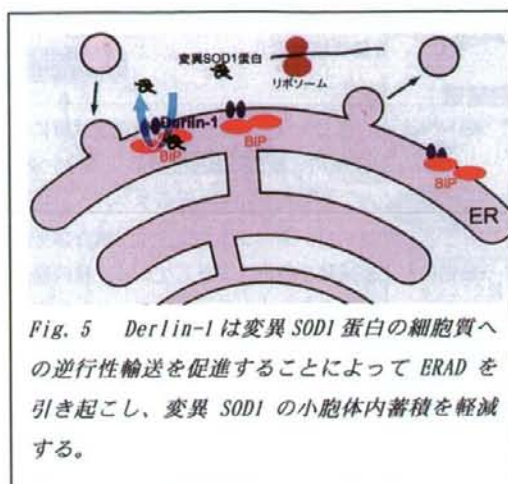


Fig. 5 Derlin-1 は変異 SOD1 蛋白の細胞質への逆行性輸送を促進することによって ERAD を引き起こし、変異 SOD1 の小胞体内蓄積を軽減する。

体内蓄積は、変異 SOD1 による家族性 ALS の発症以前から確認されており、疾患発症のトリガーとして重要であると推測される。今回我々は Derlin-1 が変異 SOD1 蛋白の細胞質への逆行性輸送を促進することによって ERAD を引き起こし、変異 SOD1 の小胞体内蓄積を軽減する可能性を明らかにした (Fig. 5)。変異 SOD1 の小胞体内蓄積を軽減させることは、家族性 ALS における運動ニューロン変性の抑制に寄与するものと考えられる。変異 SOD1 の小胞体内蓄積を軽減させる手段として、この Derlin-1 を運動ニューロン内小胞体に過剰発現させる遺伝子治療の実現を検討している。

#### B. 結論

変異 SOD1 の小胞体内蓄積の軽減効果を有する Derlin-1 は、家族性 ALS の遺伝子治療の重要な候補遺伝子となりうると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

- 論文発表  
なし
- 学会発表  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

- 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マウスを用いた一酸化窒素合成酵素阻害剤による治療法の開発

青木正志<sup>1</sup>、鈴木直輝<sup>1</sup>、割田 仁<sup>1</sup>、水野秀紀<sup>1</sup>、武田伸一<sup>2</sup>、糸山泰人<sup>1</sup>

1. 東北大学大学院医学系研究科 神経内科

2. 国立精神神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

〔目的〕我々は以前に尾部懸垂による神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)の dystrophin 糖蛋白複合体からの局在変化がNOの過剰産生を引き起こし、筋萎縮に繋がる新しい経路の存在を初めて生体内で示した(J.Clin.Invest.117;2468-76,2007)。今回は坐骨神経切除モデルおよび筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスを用いて除神経による筋萎縮における分子機構を解析した。

〔方法および結果・考察〕マウスの坐骨神経切除を行い、後肢各筋を採取・解析した。nNOSの発現は除神経により膜から減少し細胞質に移行した。nNOS欠損マウスやnNOS阻害剤投与群では萎縮耐性が観察された。筋萎縮関連 E3-ubiquitin-ligase である MuRF1, atrogin1 の発現および Foxo3a の活性化は nNOS 欠損マウスで抑制された。ALS モデルでも nNOS の局在変化が示唆された。

〔結論〕除神経や ALS における nNOS の局在変化が NO を介して筋萎縮に繋がる可能性を示せた。NO の産生過多を抑制することで筋萎縮を軽減できる可能性がある。

### A.研究目的

社会の高齢化に伴い、寝たきりや脳卒中罹患後の筋萎縮への対策が重要度を増している。近年、筋萎縮においてユビキチン・プロテアソーム系を介した蛋白質分解経路の活性化が起こることが明らかになったが、筋萎縮の分子機構の詳細、特に筋細胞膜の機械的安定性の維持や細胞内情報伝達に非常に重要な分子であるジストロフィンを中心とした蛋白質複合体の筋萎縮への関与は明らかではなかった。

筋萎縮においてジストロフィン糖蛋白質複合体が筋量の調節に関与するとの第1の仮説を立てた。この仮説を証明するため、不動による筋萎縮の一つである尾部懸垂モデルを用いて、筋萎縮の

分子機構を検討した。さらにこの結果を応用して除神経時の筋萎縮や筋萎縮性側索硬化症（以下ALS）、筋ジストロフィーの治療に応用する目的で検討を行った。

### B.研究方法

尾部懸垂を2週間行うことで、ひらめ筋を中心としたマウス後肢の各筋に顕著な筋萎縮を引き起こすことができる。非懸垂地上対照筋および懸垂筋を採取し、免疫組織学的染色でジストロフィン糖蛋白質複合体の変化を検討した。さらに電子常磁性共鳴測定器(EPR spectrometer)を用いて、懸垂筋における一酸化窒素(NO)合成量が増加していることを ex vivo で検討し、nNOS 欠損マ

ウスを用いての実験も行った。nNOS/NO がどのように筋萎縮のシグナル伝達系に働きかけるかの検討も E3-ユビキチンリガーゼや転写因子 Foxo に関して検討した。

除神経モデルとしてはマウスの坐骨神経切除を行い、その後 2 週間の間の筋萎縮について尾部懸垂と同じ項目を検討した。ALS に関しては H46R-SOD1-Tg マウスを用いて発症前後および終末期の骨格筋に関して免疫染色を行い、nNOS inhibitor の効果についても検討した。さらにヒト ALS の骨格筋についても nNOS の局在変化を免疫染色で検討した。

#### (倫理面への配慮)

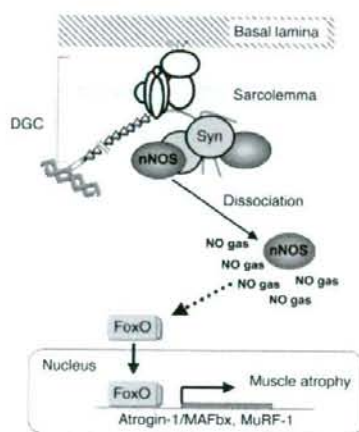
尾部懸垂モデル、除神経モデルおよび H46R-SOD1-Tg マウスに関しては動物実験の倫理審査および遺伝子改変動物に関する審査にて承認を受けており、代替手段が無いため動物の苦痛に配慮して実験を行っている。ヒト骨格筋の検討に関しても東北大学医学部の倫理委員会にて承認を得ている。

#### C. 研究結果

非懸垂地上対照筋および懸垂筋を採取し、免疫組織学的染色を行ったところ、懸垂筋ではジストロフィン糖蛋白質複合体の一員として筋細胞膜に局在し細胞内情報伝達に重要な役割を担う神経型一酸化窒素合成酵素 (neuronal nitric oxide synthase: nNOS) が、細胞質に局在を移すことがわかった。さらに電子常磁性共鳴測定器 (EPR spectrometer) を用いて、懸垂筋における一酸化窒素 (NO) 合成量が増加していることを *ex vivo* で示した。これらの結果から nNOS 由来の NO が筋萎縮を促進する、との第 2 の仮説を立てた。

nNOS 欠損マウスを用いて実験を行った所、実際に尾部懸垂による筋萎縮が軽度になり、萎縮筋における NO 産生量増加も抑制されたことから、nNOS が尾部懸垂における筋萎縮促進分子として働いていることが明らかとなった。次に

nNOS/NO がどのように筋萎縮のシグナル伝達系に働きかけるかの検討を行った。近年、筋萎縮において E3-ユビキチンリガーゼである MuRF-1 や atrogenin-1 の発現上昇および脱リン酸化を介した Foxo-3a の活性化が、それらの E3-ユビキチンリガーゼの発現を制御していることが知られている。nNOS 欠損マウス懸垂筋では、Foxo-3a の脱リン酸化を介した MuRF-1 や atrogenin-1 の発現上昇は認められず、nNOS 下流の NO によって、尾部懸垂による筋萎縮が引き起こされることが明らかになった。さらに nNOS 特異的な阻害剤である 7-nitroindazole を投与することによって筋萎縮が軽減できることも示した (Figure)。



Figure

A model of nNOS involvement in tail suspension-induced muscle atrophy. Under normal conditions nNOS is located at the sarcolemma as a peripheral member of the DGC. During tail suspension, nNOS dissociates from  $\alpha 1$ -syntrophin (syn) and dislocates into the cytoplasm, generating NO, which ultimately regulates Foxo transcription factors, and muscle-specific E3 ubiquitin ligases, MuRF-1, and atrogenin-1/MAFbx, which promote muscle protein degradation by the ubiquitin proteasome system.

さらに除神経筋においても同様の nNOS の細胞質への局在変化、Foxo-3a の核内移行と活性化、

MuRF-1 および atrogen-1 の発現上昇を認めた。除神経による筋萎縮は nNOS 欠損マウスや nNOS inhibitor の投与により軽減した。これらより nNOS /NO が尾部懸垂にとどまらず多様な筋萎縮系で機能していることが明らかになった。

ヒト ALS 筋でも免疫染色を行うと nNOS の局在が特に小角化線維で細胞質に移行していることがわかった。これは SOD1 の遺伝子変異が見られない孤発例で見られた現象である。また病期によって nNOS の局在変化が見られない症例もあり、動物モデルでの検討が必要である。

H46R-SOD1-Tg マウスは進行が比較的緩徐で個体差が少ないことから病態解析や治療実験に有用であることが知られている。このマウスの生後 21 週間後の ALS 病初期の骨格筋において nNOS の局在変化が見られ、終末期までこの変化は継続した。水溶性の nNOS inhibitor を浸透圧ポンプで発症前から 6 週間連続投与した時に前脛骨筋で筋萎縮が軽度押さえられた。今後機能的な解析が必要である。

#### D. 考察

尾部懸垂モデルや除神経モデルでは物理的な不動状態を引き起こし何らかの重力感知機構を介して nNOS の局在変化・筋萎縮シグナル系の活性化が起こるものと考えられる。なぜ nNOS の局在変化が起こるのかについては、nNOS を細胞膜に結び付けている alpha1-syntrophin の翻訳後修飾の可能性を示唆するデータを得ているが今後解明すべき課題である。また ALS モデルにおける nNOS inhibitor の筋萎縮抑制効果が軽度にとどまっているのは SOD1 遺伝子異常の影響が運動神経、筋、脊髄のグリアなど多岐にわたっていることや iNOS など nNOS 以外の NOS が関与している可能性を考えている。

#### E. 結論

尾部懸垂、除神経の骨格筋では筋細胞膜のジストロフィン糖蛋白質複合体に含まれている nNOS

が細胞質内に移行して NO を産生することにより蛋白分解系を促進し、筋萎縮を引き起こすことを明らかにした。ALS の骨格筋でも nNOS の局在変化は観察されており nNOS/NO やそれらと相互作用する分子は ALS 治療の新たなターゲットの候補となる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

nNOS inhibitor は中枢神経機能や筋内血管拡張機能、収縮能などに影響を与える可能性があり、副作用については今後検討する必要がある。

#### G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

##### 1. 論文発表

Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y. Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironmental niche for spinal motor neurons in ALS transgenic rats, *J Neurosci Res* 86: 2512-23, 2008

Dadvajantsana B, Aoki M, Warita H, Suzuki N, Itoyama Y. Expression of insulin-like growth factor II receptor in the spinal cord of ALS transgenic rats, *Tohoku J Exp Med* 214: 303-310, 2008 他

##### 2. 学会発表

鈴木直輝, 青木正志, 鈴木友子, 武田伸一, 糸山泰人: nNOS/NO を介した除神経による筋萎縮の解析 49th 日本神経学会総会 (H20. 5. 15-17: パシフィコ横浜) 他

#### H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

特になし



## 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける細胞移植の検討

中島健二，渡辺保裕，森田恵里，土井浩二，安井建一，北山通朗，中野俊也

鳥取大学医学部脳神経内科

### 研究要旨

第4脳室を介して移植細胞を広く脳脊髄に分布させる手技をもちいて，ALSモデルマウス（SOD1L126delTT）への細胞移植効果を検討した。移植細胞として，ヒトでの生検が可能，病変部への遊走能を有する，ALSモデル動物に対して神経保護効果を有するなどの特徴をもつ mesenchymal stem cell（MSC）を使用した。コントロール（非移植）群に比べMSC移植群では各臨床パラメータに良好な傾向が見られたが，有意差は認めなかった。病期を性別に検討した場合に，雌にのみMSC群はコントロール群に比し有意な改善傾向を示した。病理学的には，移植片細胞は，脊髄前角を含めた脳実質内に移行していることが確認されたが，運動ニューロンのマーカーと移植細胞のマーカーの共存所見は認められなかった。MSC移植による治療効果は，運動神経細胞の再生よりも，残存神経細胞に対するMSCの細胞保護効果と考えられた。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は，大脳皮質から腰部脊髄までの広範な運動ニューロン変性により進行性の筋萎縮を主症状とする疾患である。中年以降に発症し，通常3から5年の経過で死に至る難病であり，未だ有効な治療法が確立されていない。近年，本疾患を含めた神経変性疾患において再生医療が大きな期待を集めている。しかしALSにおける細胞治療を考えた場合，本疾患の広範な病変分布のため細胞の局所注入では現実的な治療となりにくい。ALSモデルマウスを用いたこれまでの細胞移植の検討でも

（Table 1），移植細胞の種類，移植経路，移植時期，結果としての移植効果はさまざまであり，更に多くの検討が必要なことを示唆している。我々のこれまでの検討により，第四脳室に細胞を直接注入することで，脊髄に移植細胞を広範分布させ得ることを報告した（1）。本研究では，ヒトにおいて生検が可能，病変部への遊走能を有する，ALSモデル動物に対する効果も含めて神経保護効果を有するなどの特徴を有する骨髄間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）をトランスジェニックマウス（SOD1L126delTT TGM，以後ALS-TGM）（2）へ移植し，治療効果の検討を行った。

### B. 研究方法

マウスを用いた実験は，鳥取大学医学部動物実験ガイドラインに従って行った。

#### 1) MSCの採取・精製

マウスからの初代MSCの培養が困難であったため，5週齢の緑色蛍光蛋白（GFP）を発現するトランスジ

エニックラット（LEW-GFP rat）の脛骨，大腿骨よりMSCを採取し，定法により初代培養MSCを得た。GFPの蛍光強度が比較的弱く検出が困難であった一部の検討では，MSCを抗GFP抗体を使って検出，もしくは，dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) (Molecular Probes, USA)によりラベルした。

#### 2) MSC移植

移植手術ALS-TGMに対して生後100日齢に移植を行った。対照（非移植）群に対しては，phosphate buffer saline (PBS)の注入を施行した。マウス（ホスト）に対しラット（ドナー）の異種移植となったため免疫抑制剤としてTacrolimus (FK506) (3 mg/kg/day，藤沢製薬より供与)を手術開始一週間前から，評価終了まで飲水中に混入し投与した。

#### 3) 評価

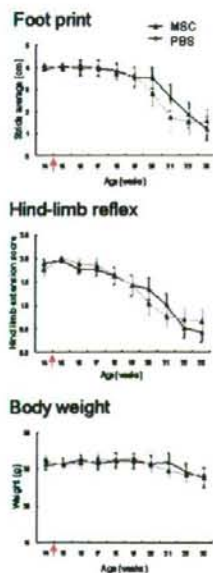
臨床評価として foot print, hind limb reflex test, 体重測定を週に一度施行した。更に発症日齢，死亡日齢，病期の比較検討を行った。

病理解析として移植細胞の同定（GFP および DiI）と抗 NeuN 抗体による残存神経細胞数の解析を行った。一次抗体として mouse anti-GFP monoclonal antibody (1:250, MAB3580, Chemicon, USA), rabbit polyclonal antibody against GFP (1:250, MBL, Japan), rabbit polyclonal antibody against GFAP (prediluted, Dako, USA), mouse anti-NeuN antibody (1:500, MAB377, Chemicon, USA)を用いた。

Table1 Clinical effect of cell therapy in SOD1 ALS model

Report (year)	Cell source (cell number)	Host	transplantation	Operation time (days)	Clinical effect transplantation vs control (days)
Erde N. et al. (2000)	human UBCs ( $5 \times 10^7$ )	G93A mice	IV	56	Lifespan: 148 vs 127 ( $p < 0.001$ )
Willing A.E. et al. (2001)	human NT neurons ( $1.5 \times 10^7$ )	G93A mice	Injection (L4-5)	56	Delayed the onset of motor behavioral symptoms
Garbuzova-Davis S. et al. (2002)	human NT neurons ( $1.5 \times 10^7$ )	G93A mice	Injection (L4-5)	53	Lifespan: 128 vs 106
Garbuzova-Davis S. et al. (2003)	human UBCs ( $1 \times 10^7$ )	G93A mice	IV	66	lifespan: 121.8±8.2 vs 100.1±9.7
Corti S. et al. (2004)	murine MSCs ( $3 \times 10^7$ )	G93A mice	Intraperitoneal	28	Lifespan: 139.5±7.0 vs 127±2 (cf. G93A 129±5)
Hemendinger R. et al. (2005)	mouse Sertoli cells ( $1 \times 10^7$ )	G93A mice	Injection (L4-5)	55-65	-
Garbuzova-Davis S. et al. (2006)	human NT neurons ( $7.5 \times 10^7$ )	G93A mice	L (multiple)	61.1	Lifespan: increased tendency
Corti S. et al. (2007)	mouse NSCs (Lewis X+, CXCR4+) ( $2 \times 10^7$ )	G93A mice	Injection (L4-5)	70	Lifespan: 165.8±9.2 vs 142.8±8.7 ( $p < 0.0001$ )
Habisch H.J. et al. (2007)	human MSCs ( $1 \times 10^7$ )	G93A mice	Intrathecal (magna)	45	-
Zhao C.P. et al. (2007)	human MSCs ( $3 \times 10^7$ )	G93A mice	IV	56	Onset: 170.6±3.8 vs 156.6±3.6 ( $p < 0.05$ ) Lifespan: 206.7±3.8 vs 188.3±3.5 ( $n < 0.01$ )
Suzuki M. et al. (2007)	human NPCs secreting ODNF ( $1.2-1.8 \times 10^7$ )	G93A mice	Injection (L1-4)	70	-
Matin L.J. et al. (2007)	mouse (OB) NPCs ( $1.0-30 \times 10^7$ )	G93A mice	Injection (L)	70	Onset: ~117 vs ~90, Lifespan: ~170 vs ~140
Vercelli A. et al. (2008)	human NSCs ( $1 \times 10^7$ ) (low copy)	G93A mice	Injection (L1-2)	196	Improved motor tests

UBCs: umbilical cord blood cells; NT neurons: neuron-like cells; MSCs: mesenchymal stem cells; NPCs: neural precursor cells; OB: olfactory bulb; G93A mice: SOD1 G93A mice; IV: intravenous; L: lumbar spinal cord; magna: foramen magna



	MSC transplant (n=13)	Control (n=13)
Onset	157.2 ± 10.2	154.8 ± 7.4
Lifespan	173.0 ± 12.2	164.4 ± 8.3
Duration	15.8 ± 3.6	9.6 ± 1.3

Mean ± S.E

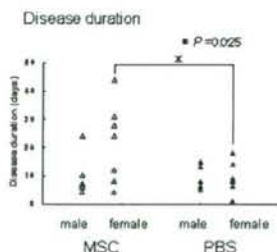


Fig. 1 Effect of MSC transplantation in ALS-TGM.

(Left) There were no significant differences between transplanted and sham-operated transgenic mice in foot print, hind-limb reflex and body weight.

(Right) There were beneficial trends in age of onset, age at death, and disease duration in MSC-transplanted mice compared to control mice, however these did not reach statistical significance. When sex is taken into account, however, disease duration of females treated with MSCs was significantly longer than control females (male; n=6, female; n=7 in each treatment group). \* $P = 0.025$ .

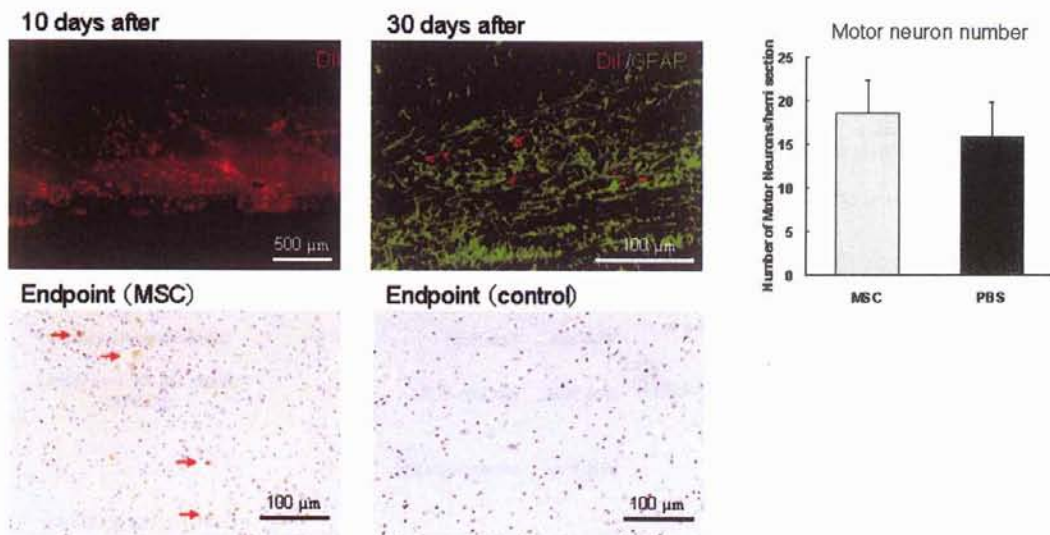


Fig. 2 Histopathological evaluations of the spinal cord and the brain after MSC transplantation.

(A) 10 days after transplantation, many MSCs labeled with DiI survived on the surface of the spinal cord shown here without fixation. (B) Section of the spinal cord 30 days after MSC transplantation. MSCs (DiI labelled, red) entered into spinal cord parenchyma. Astrocytes were labelled with anti-GFAP antibody (green). (C and D) MSCs were detected in sections of lumbar spinal cord after fixation by anti-GFP antibody staining (brown) in MSC-transplanted mice, but not in sham-operated mice. (E) There was no statistical difference between the MSC transplanted and non-transplanted mice in the number of motor neurons in the ventral gray matter (MSC; n=8, PBS; n=7).

### C. 研究結果

#### 1) ALS-TGM での MSC 移植効果

100日齢のALS-TGMをMSC移植群(n=13)とコントロール(PBS注入)群(n=13)に分け、MSC移植後に臨床の評価を行った。体重、hind limb extension scoreとfoot printから両群間に有意差はみられなかった(Fig. 1)。平均発症日齢・平均死亡日齢・平均病期に関しても、両群間に有意差は認めなかった。しかし性別にわけた検討した場合、雌のみ病期において有為な改善傾向が認められ、MSC移植の有用性が示された。

#### 4) 病理学的検索

100日齢のALS-TGMへMSCを移植し、手術後10日と30日および死亡直前のマウスを病理評価をおこなった(Fig. 2)。コントロールとしてPBSのみを注入したALS-TGMを用いた。

病理評価でMSCは脊髄表面から脊髄実質への移行が確認された。運動神経のマーカーと移植細胞のマーカーは一致せず、移植したMSCの神経細胞への分化は確認されなかった。残存運動神経細胞数の評価において、コントロール群に比してMSC移植群で残存運動神経数が多い傾向を示したが、有意差は認めなかった。

### D. 考察

骨髄間葉系幹細胞は、*in vitro*で骨細胞、神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化する(3)ことが確認され「第2の万能細胞」として注目を浴びている。この細胞は、骨髄穿刺により患者自身の組織から分離・培養し自家移植することがきわめて容易であるという特性を有する。

性差による治療効果の差違に関しては、これまでもG93AマウスにおけるMSC移植(4)において、雌のみで自発運動の改善が報告されている。またclenbutol( $\beta_2$ stimulator)の投与にて雌のみで症状の改善(5)が、免疫抑制剤cyclosporine Aの投与において雄のみに強い効果(6)が報告されている。従って、本検討におけるMSC移植の治療効果は、対象マウス数を増やせば雄にも認められるものか、実際に雌のみにしか効果を示さないのかに関しては更なる検討が必要と考えられた。

### E. 結論

マウスにおける細胞移植法を確立し、脊髄へのMSCの生着と臨床の有効性を確認した。MSCの移植効果は、特定の神経系細胞の置換ではなく、神経保護作用によると考えられた。

このようなアプローチで治療効果を発揮させるた

めには、移植時期および移植回数、移植細胞数、移植細胞の種類、遺伝子治療 (GDNF, IGF, HGF) との組合せ、などを今後検討する必要があると考えられた。

#### F. 文献

- 1) Morita E, et al. A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. *Exp Neurol* 213: 431-438, 2008.
- 2) Watanabe Y, et al. Mouse motor neuron disease caused by truncated SOD1 with or without C-terminal modification. *Brain Res Mol Brain Res*. 135, 12-20, 2005.
- 3) Woodbury D, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61, 364-370, 2000.
- 4) Habisch HJ, et al. Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *J. Neural Transm* 114, 1395-1406, 2007.
- 5) Teng YD, et al. Therapeutic effects of clenbuterol in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 397, 155-158, 2006.
- 6) Kirkinetzos IG, et al. An ALS mouse model with a permeable blood-brain barrier benefits from systemic

cyclosporine A treatment. *J Neurochem* 88, 821-826, 2004.

#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 学会発表

19th International Symposium on ALS / MND

#### I. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

申請中

「エキソン5において2塩基欠失を有する SOD1 遺伝子を導入した、遺伝子導入非ヒト動物」

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし