

表題

ALS モデルマウスにおける pro-survival factor, YAPdeltaC と p73 について

報告者氏名 森本展年¹⁾、永井真貴子¹⁾、倉田智子¹⁾、宮崎一徳¹⁾、武久康¹⁾、池田佳生¹⁾、
阿部康二¹⁾、岡澤均²⁾

所属 1) 岡山大学神経内科、2) 東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学

【目的】 transcription 阻害により necrosis, apoptosis, autophagy like cell death とは異なる緩徐な細胞死が誘導されることが観察され、TRIAD(transcriptional repression-induced atypical death)として注目され、その中で YAPdeltaC と p73 の働きが重要と考えられている。我々は ALS モデルマウスにおけるこれらの因子の関与について検討した。【方法】 G93A 変異 SOD1 遺伝子導入マウス(Tg)と週齢を一致させた野生型(WT)を12週齢(発症前)、17週齢(発症早期)、19週齢(発症後期)各群 n=5 とした。【結果】 脊髄前角において、FL-YAP 陽性細胞の割合は WT と Tg で差がなかったが、YAPdeltaC 陽性細胞の割合は Tg では発症前から低下していた。【結論】 ALS モデルマウスにおいて、YAPdeltaC の早期からの減少を認めた。

A. 研究目的

細胞死には necrosis, apoptosis, autophagy like cell death の3つの代表的な細胞死が知られている。近年、RNA polymerase II 依存性 transcription の阻害により上記3つの細胞死いずれとも一致しないゆっくりとした細胞死が誘導されることが観察され、TRIAD (transcriptional repression-induced atypical death) として注目されている。TRIAD では pro-survival factor である新規タンパク質 YAPdeltaC と p53 ファミリーである p73 の働きが重要と考えられている。一方、ALS では脊髄前角の運動ニューロンの減少がみられるにも関わらず、これまでの研究ではこれが apoptosis によるものであることを明確に示すデータがなく、どのような細胞死のメカニズムをとるのかについては一定の結論がでていない。我々は、ALS モデルマウスにおいて YAPdeltaC と p73 に注目することにより ALS における細胞死とこれらの因子が関連している可能性について検討した。

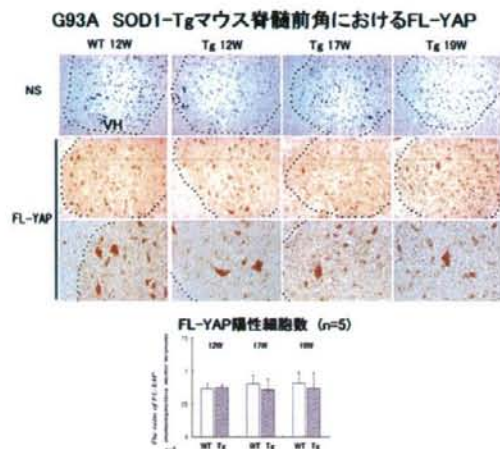
B. 研究方法

G93A 変異 SOD1 遺伝子導入マウス(Tg)と週齢を一致させた野生型マウス(WT)をそれぞれ、12週齢(発症前)、17週齢(発症早期)、19週齢(発症後期)の時点で4%パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定、腰髄を採取、免疫染色に使用した。また、同時点で生理食塩水による脱血処理後に腰髄前半を分離採取し、Western-blotting に使用した。脊髄運動ニューロンについて Nissl 染色及び、抗 FL-YAP 抗体、抗 YAPdeltaC 抗体にて免疫染色を行った。また、抗 p73 抗体と抗リン酸化 p73 抗体、抗 YAPdeltaC 抗体と抗リン酸化 p73 抗体については二重染色を行った。

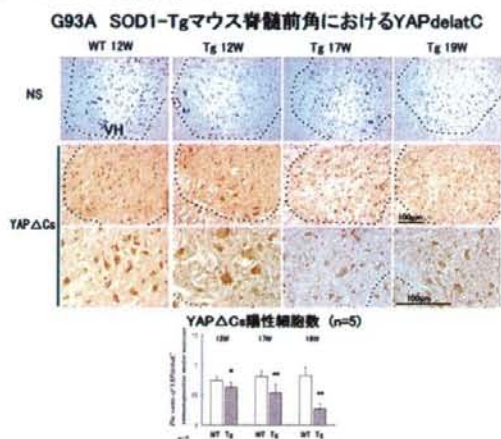
(倫理面への配慮)

岡山大学動物実験規則に準拠して、動物の使用数および苦痛の低減に最大限に配慮した。

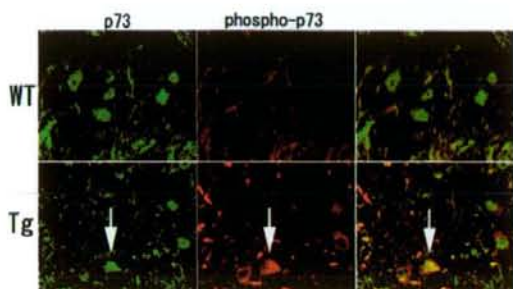
C. 研究結果



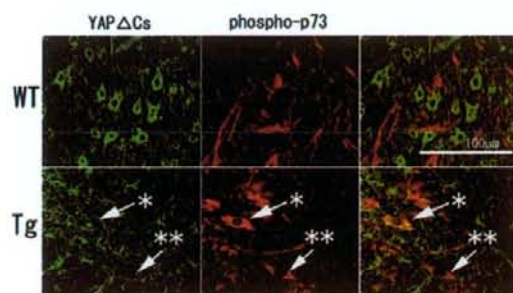
マウス脊髄前角において、運動ニューロン数に対するFL-YAP陽性細胞の割合はWTマウスとTgマウスで差がなかった。また運動ニューロン数に対するFL-YAP陽性細胞の割合はWTマウス、Tgマウスともに週齢間で差がなかった。



YAPdeltaC陽性細胞の割合はTgマウスでは12週齢からWTと比べ有意に減少していた。またYAPdeltaC陽性細胞の割合はWTマウスでは週齢間で差がなかったが、Tgマウスでは週齢が進むにつれて減少を認めた。



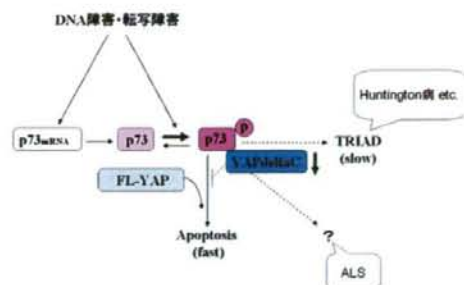
マウス脊髄前角の切片を用いた二重染色ではapoptotic factorであるp73はWTマウス、Tgマウスともに脊髄前角運動ニューロンに発現していたが、Tgマウスでは一部がリン酸化されていることが示された。



また、WTマウス脊髄前角ニューロンではYAPdeltaCとリン酸化p73の共局在は目立たないがTgマウスでは一部共局在を認めた。

D. 考察

G93A SOD1-Tgマウス脊髄におけるTRIAD関連分子の動態



実験結果よりALSモデルマウス脊髄においてYAPdeltaCは早期より減少していることが示された。また、ALSモデルマウス脊髄ではリン酸化p73とYAPdeltaCは共局在を示した。これらの結果を

TRIADの概念にあてはめて考えるとHuntington病などでYAPdeltaCが相対的に多く保たれた状況ではゆっくりとした細胞死が起こるのに対し、ALSでは比較的早期からYAPdeltaCが失われた状態になっており、ALSでは比較的細胞死が起こっている可能性があると考えられた。しかしながら、実際の運動ニューロン死にこれらの分子が直接関与しているかということについては今後、p73の下流に位置する細胞死の実行因子を探っていく必要があると考えられる。

E.結論

ALSモデルマウスの運動ニューロン死において、p73のリン酸化とYAPdeltaCの早期からの減少が関係している可能性が示唆された。TRIADとALSの運動ニューロン死が関連している可能性について今後の検討が必要である。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

Journal of Neuroscience Research : 2008 Oct 24

2.学会発表

なし

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

マウス 26S プロテアソーム欠損による神経変性疾患モデルの確立

高橋良輔^{1,2)}

田代善崇^{1,2)} 井上治久^{1,2)}、山崎真弥³⁾、阿部学³⁾、村松一洋⁴⁾、
原田彰宏⁴⁾、三澤日出巳⁵⁾、崎村建司³⁾

1)京都大学医学研究科臨床神経学、2)JST-CREST、3)新潟大学脳研究所基礎神経科学部門、
4)群馬大学生体調節研究所細胞構造分野、5)慶応大学薬学部薬理学講座、

研究要旨

神経変性疾患は異常タンパク質の蓄積に起因するコンフォメーション病と考えられている。さらに異常タンパク質蓄積の原因として、タンパク質分解障害が示唆されている。今回我々はユビキチンプロテアソームシステム(UPS)で機能する26SプロテアソームのサブユニットであるRpt3を部位特異的に欠損させるマウスを作製し、神経変性疾患モデルとなりうるか検証を行うため、Creマウスと交配させたところ、運動神経特異的にRpt3を欠損させるマウスの取得に成功し、このマウスがいくつかの運動機能測定において、コントロール個体との差を確認した。今後このマウスのサンプル個体を増やし、詳細な検討を行っていく。

A.研究目的

パーキンソン病・アルツハイマー病・ハンチントン病・筋萎縮性側索硬化症など多くの神経変性疾患は異常タンパク質の蓄積に起因するコンフォメーション病と考えられている。さらに異常タンパク質蓄積の原因として、タンパク質分解障害が示唆されている。今回の研究において、我々は主要な異常タンパク質分解経路の一つであるユビキチンプロテアソームシステム(UPS)で、タンパク質分解を担っている26SプロテアソームのサブユニットであるRpt3を部位特異的に欠損させるマウスを作製した。本研究は、神経特異的26Sプロテアソームノックアウトマウスが、神経変性疾患モデルとなりうるかどうか検証することを目的とした。

B.研究方法

部位特異的欠損マウスを作製するために Cre-loxPシステムを用いることとした。26Sプロテアソーム構成ユニットの一つであるRpt3にloxP配列を導入し

たマウス(floxed Rpt3マウス)を作製し、先に作製が報告されているVChT-Creマウス、Nestin-Creマウス、Tau-Creマウスとの交配を行った。得られた部位特異的Rpt3欠損マウスに対して運動機能解析を行った。本研究においては動物実験の実施における各法律・省令・規程に基づき、生命倫理・安全対策に講じて実験を行った。

C.研究結果

Cre-loxPシステムを用いて、26Sプロテアソーム構成ユニットの一つであるRpt3にloxP配列を導入したマウス(floxed Rpt3マウス)を作製した。作製したfloxed Rpt3マウスへ運動神経特異的にCreを発現するVChT-Creマウス、神経幹細胞にCreを発現するNestin-Creマウス、グリア細胞を除く運動神経特異的にCreを発現するTau-Creマウスとの交配を行い、VChT-Creマウスとの交配において、産仔が正常に出生することを確認した(図1)。

Nestin-Cre, Tau-Cre マウスのとの交配においては出生が確認されておらず、胎生致死の可能性も

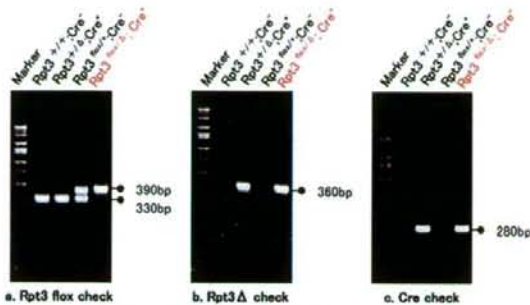


図1. floxed Rpt3とVACHT-Creの交配結果

考えられる。今回取得した VACHT-Cre との交配分について運動機能解析を行った。7 週齢において、Foot print 及び歩幅を測定したがコントロールと比較して差は認められなかった。8 週齢において、前肢・後肢の握力測定、順方向のみのロタロッド測定を行ったが、コントロールと比較して差は認められなかった。逆回転を含むロタロッド測定において、コントロールと比べて差が認められた(図2)。体重変化においてコントロール群と比較して体重は減少傾向を認めた(図3)。8 週齢以降のマウスにおいてコントロール個体と比較して異常な Limb Clasp 反射を示した(図4)。

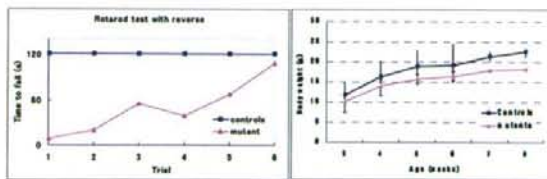


図2. 逆回転を含むロタロッド測定

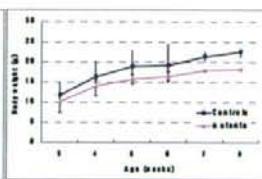


図3. 体重変化

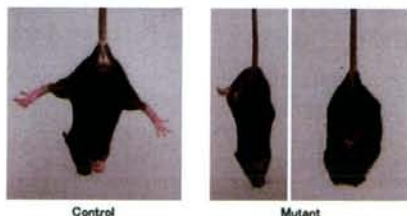


図4. limb clasp反射

D.考察

運動神経特異的に Cre を発現する VACHT-Cre との交配にて部位特異的 Rpt3 欠損マウスを取得し、8 週齢で逆回転を含むロタロッド測定、体重変化、8 週齢以降にて異常な Limb Clasp 反射を示した。今回交配を行った VACHT-Cre マウスの特徴は 5 週齢での Cre の最大発現である。Cre が発現された後に Rpt3 遺伝子の欠失が起き、細胞内に残存する Rpt3 タンパク質の減少が起こると考えられるため、遺伝子の欠失状況・Rpt3 タンパク質の寿命と関連して UPS 障害による神経変性が起こる時期が遅れる事が考えられ、今後週齢を重ねることで運動機能障害が増大することも考えられる。また、今回サンプル個体数が少ないため、今後個体数を増やし解析を進める必要がある。

E.結論

Cre-loxP システムを用いて、26S プロテアソームサブユニットである Rpt3 を目標とした floxed Rpt3 マウスの作製を行った。このマウスを用いて、VACHT-Cre, Nestin-Cre, Tau-Cre マウスとの交配を行い、運動神経特異的に Cre を発現する VACHT-Cre マウスとの交配において正常に出生することを確認した。この VACHT-Cre との交配で得られた部位特異的 Rpt3 欠損マウスにおいて、逆回転を含むロタロッド測定、体重変化において差を認め、さらに異常な Limb Clasp 反射を示したため、今後サンプル個体を増やし解析を行っていく。また運動機能解析だけでなく、病理学的解析も行い、運動神経特異的に起きた UPS 機能障害による神経細胞の変化を追っていき、本研究によって得られた部位特異的 Rpt3 欠損マウスが神経変性疾患モデルとなりうるかどうかを検証していく。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H. and Cleveland, D.W. (2008 Feb 3) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* 11, 251-253

Moriwaki, Y., Kim, Y.J., Ido, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Endo, S. and Takahashi, R. (2008) L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependant manner. *Neurosci. Res.* 61, 43-8

Ogawa, M., Mizuguchi, K., Ishiguro, A., Koyabu, Y., Imai, Y., Takahashi, R., Mikoshina, K. and Aruga, J. (2008) Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase. *Gene Cells*, 13, 397-409

Imai, Y., Gehrke, S., Wang, H.Q., Takahashi, R., Hasegawa, K., Oota, E. and Lu, B. (2008) Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *EMBO J.* 27, 2432-43.

Wang, H.Q., Imai, Y., Inoue, H., Kataoka, A., Iita, S., Nukina, N. and Takahashi, R. (2008) Pael-R transgenic mice crossed with parkin deficient mice displayed progressive and selective catecholaminergic neuronal loss. *J. Neurochem.* 107, 171-85.

Fujiwara, M., Marusawa, H., Wang, H.Q., Iwai, A., Ikeuchi, K., Imai, Y., Kataoka, A., Nukina, N., Takahashi, R. and Chiba, T. (2008) Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 27, 6002-11.

Kawamoto, Y., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Inoue, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Budka, H., Martins, L.M., Downward, J. and Takahashi, R. (2008) Accumulation of HtrA2/Omi in neuronal and glial inclusions in brains with alpha-synucleinopathies. *J. Neuropathol Exp Neurol.* 67, 984-93.

Inoue, H., Kondo, T., Lin, L., Mi, S., Isacson, O. and Takahashi, R. (2008) Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative, "Disease Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases" Ovadi, J. and Orosz, F. Springer, Hungary, 97-109

竹内啓喜, 高橋良輔: パーキンソン病の成因、日本老年医学会雑誌、44、415-421、2008

松井秀彰, 高橋良輔: パーキンソン病、蛋白質 核酸 酵素、53、981-981、2008

山門穂高, 高橋良輔: α シヌクレイン、蛋白質 核酸 酵素、53、1102-1102、2008

小林芳人, 高橋良輔: Pakin 遺伝子、蛋白質 核酸 酵素、53、1076-1076、2008

江川斉宏, 高橋良輔: Pael 受容体、蛋白質 核酸 酵素、53、1075-1075、2008

高橋良輔: 神経変性疾患研究の進歩、日本内科学会雑誌、97、2243-2249、2008

高橋良輔: 神経変性疾患研究の課題、臨床神経学、48、903-905、2008

高橋良輔: 神経変性疾患とゲノム、ゲノム医学、8、88-89、2008

麓 直浩、富本秀和、井上治久、福山秀直、高橋良輔: 下肢単麻痺を呈した延髄内側梗塞の1例、神経内、68、92-94、2008

2. 学会発表

高橋良輔: はじめに一神経変性疾患研究の課題、第49回日本神経学会総会シンポジウム「神経変性疾患研究の焦点-新たな病的因子の登場と臨床への展望」、2008.5.16、横浜

北口浩史、富本秀和、猪原匡史、植村健吾、木原武士、浅田めぐみ、木下彩菜、高橋良輔: 慢性脳虚血は $A\beta$ 沈着を促進する、第49回日本神経学会総会、2008.5.15、横浜

河本恭裕、小林芳人、高橋良輔、秋口一郎: alpha-synuclein 関連疾患脳内の封入体における Omi/HtrA2 の蓄積 第49回日本神経学会総会、

2008.5.15、横浜

井上治久、高橋良輔：パーキンソン病における治療標的としての軸索再生、Neuroscience2008、シンポジウム「中枢神経系疾患に於ける軸索再生/変性のメカニズム」、2008.7.9、東京

高橋良輔：AANとMDSの取り組み、第2回 Movement Disorder Society, Japan 学術集会、オープニングセミナー「パーキンソン病治療ガイドライン update」、2008.10.2、京都

近藤孝之、井上治久、富本秀和、高橋良輔：自律神経障害の新たな疾患概念；Autoimmune Autonomic Ganglionopathy、第61回日本自律神経学会総会、シンポジウム「自律神経学における最近のトピックス」、2008.11.7、横浜

Ryosuke Takahashi：The molecular mechanisms underlying parkin-related parkinsonism, BMB2008、シンポジウム「神経変性疾患関連遺伝子探索と機能解析」、2008.12.11、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

神経変性疾患の RNA 干渉による治療

水澤 英洋、桑原 宏哉、宇野 佳孝、朴 文英、横田 隆徳

東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

研究要旨

RNA 干渉は有用な配列特異的な遺伝子発現抑制方法であり、臨床での応用が期待されている。しかし、生体内における標的臓器への効果的かつ安全な short interfering RNA (siRNA) のデリバリー方法が確立されていない。我々は、siRNA の生体内におけるベクターとして、ビタミン E、中でも最も生体内における分布や肝臓への輸送経路が判明している α -Tocopherol (Toc) を用いた。siRNA のアンチセンス鎖 5'末端に Toc を共有結合させ、マウス肝臓の内在性遺伝子であるアポ B に対する Toc-siRNA を設計してマウスの尾静脈から投与したところ、定量的 RT-PCR にて肝臓におけるアポ B mRNA の発現量を有意に低下させた。なお、siRNA 投与の際に知られるインターフェロン応答などの副作用は Toc-siRNA では見られなかった。また、マウス神経芽細胞腫 (neuro2a) の培養細胞を用いた実験では、Cy3 標識した Toc-siRNA を培養液に加えるのみで培養細胞内に Cy3 シグナルが観察され、神経細胞への Toc-siRNA のデリバリーも可能であると考えられた。RNA 干渉による遺伝子治療は、神経変性疾患の将来の治療法として期待される。

A. 研究目的

Short interfering RNA (siRNA) を用いた遺伝子治療は様々な疾患に対する新規の治療法として期待されているが、生体内でのデリバリーが最も問題となっている。今までにハイドロダイナミクス法やウイルスベクターを用いる方法が検討されてきたが、実際の臨床応用を考えた際には非ウイルスベクターが最も現実性があり、肝臓をはじめとした様々な臓器へのベクターが開発されている。

現在最も研究されている非ウイルスベクターとして、カチオニックリポソームやそれに様々な修飾を加えたものがある。これらのベクターの中には効率よく siRNA をデリバリーさせるものも報告されているが、肝機能障害やインターフェロン応答などの副作用が指摘されている。

我々はベクターとして最適な条件として、対象臓器または細胞において必要不可欠であり、なおかつその組織では合成ができないものを挙げた。ビタミンはそれに最も適合する物質であり、ビタミン E、

中でも α -Tocopherol (Toc) は体内における生理的動態が分かっていることと安全性の点から最もベクターに相応しいものと考えた。そこで我々は、Toc を siRNA に直接結合させることで、生体内での Toc の生理学的輸送動態を用いた siRNA のデリバリーを試みた。siRNA の全身投与によってデリバリーされる臓器として、最も容易とされる肝臓を標的臓器として検索した。この肝臓へのデリバリーによって、家族性アミロイドポリニューロパチーが治療対象疾患になりうる。さらにこの方法を中枢神経系に応用し、中枢神経系の変性疾患の遺伝子治療に利用すべく、マウス神経培養細胞にてその導入を検証する。

B. 研究方法

アンチセンス鎖の 5'側にアミダイトを介して Toc を共有結合させた 27-29mer の化学修飾 siRNA を合成した (Toc-siRNA)。siRNA の配列は、肝臓における内在性遺伝子であるアポリポ蛋白 B (アポ B) に対する siRNA を設計した。

化学修飾による血清中の RNA 分解酵素 (RNase) に対する耐性を評価するため、Toc-siRNA にマウス血清を加え一定時間の温置後に電気泳動を行った。

化学修飾や Toc 結合が siRNA の効果を減弱させるかどうか確認するため、トランスフェクション試薬を用いてアポ B に対する Toc-siRNA をマウス肝細胞の培養細胞に遺伝子導入し、定量的 RT-PCR にて確認した。

生体内での Toc-siRNA の取り込み及びその分布を調べるため、Toc-siRNA に蛍光色素である Cy3 で標識させたものをマウス尾静脈から 8mg/kg で静注し、1 時間後に全身臓器を取り出して固定後切片を共焦点顕微鏡で観察した。また細胞質内への取り込みを確認するため、尾静脈から 32mg/kg の Toc-siRNA を静注した 3 時間後に肝臓を取り出し、肝臓内から短い RNA のみを抽出して、今回用いた Toc-siRNA のアンチセンス鎖を認識するプローブでノザンプロット (NB) を行った。

次に、生体内における Toc-siRNA の効果を調べるため、マウス尾静脈から Toc-siRNA を 2mg/kg で静注し、48 時間後に肝臓を取り出してアポ B の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR にて調べた。その後、この量を投与した時の効果持続時間を静注後 1、2、4 日後の肝臓を用いて同様に定量的 RT-PCR で評価するとともに、0.5mg/kg から 32mg/kg までの投与量で、静注後 2 日後の肝臓で同様に定量的 RT-PCR による評価を行った。

Toc-siRNA 投与により副作用が生じているかどうか確認するために、2mg/kg で Toc-siRNA を投与したマウスから静注 3 時間後に採血を行い、血清中のインターフェロン (IFN) - α を測定した。また、このマウスの肝臓における IFN- β の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR で確認した。さらに、血算及び血清の生化学を検査した。

さらに、神経細胞にも取り込まれるかの評価も行った。マウス神経芽細胞腫 (neuro2a) の培養細胞を用いて Cy3 で標識した Toc-siRNA を様々な濃度で培養液に加え、3 時間後に蛍光顕微鏡で Cy3 シグナルを観察した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

化学修飾を施した Toc-siRNA に血清を加えて温置した後に電気泳動を行ったところ、化学修飾のないものと比較して 24 時間後でも分解されず残存しており、施された化学修飾により血清中の RNase に対する耐性が得られたものと考えられた。

トランスフェクション試薬を用いたマウス肝細胞の培養細胞への遺伝子導入では、化学修飾及び Toc 結合によるアポ B 遺伝子発現抑制に有意差は認められなかった。

Cy3 で標識した Toc-siRNA を静注したところ、肝臓で多くの細胞に Cy3 陽性のシグナルが認められた (図 1)。また、Toc-siRNA 静注後の肝臓における短い RNA 鎖を検出する NB では、投与した長さである 29 塩基と Dicer によって細胞内で切り出された長さである 21 塩基の、計 2 本のアンチセンス鎖をバンドとして検出した。

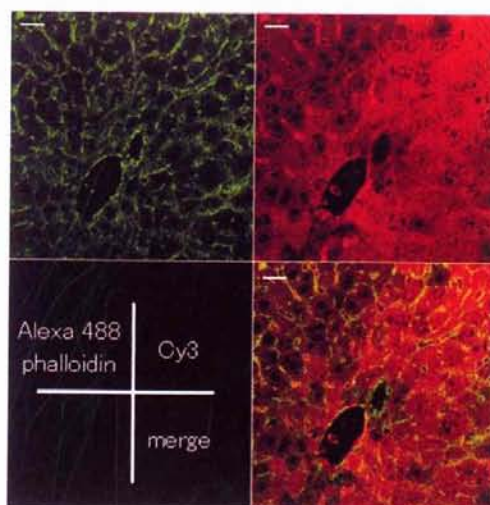


図 1. 肝臓の共焦点顕微鏡画像 (bar=20 μ m)
多くの肝細胞に Cy3 陽性シグナルを認める

生体内における Toc-siRNA の効果については、2mg/kg で投与した場合に肝臓での定量的 RT-PCR で標的遺伝子であるアポ B の mRNA の発現量が 50% 程度抑制されていた。標的遺伝子以外の内在性遺伝子の発現抑制は認められなかった。また、肝臓における Toc-siRNA の遺伝子抑制効果は投与 2 日目まで認められ、4 日目で元の状態に戻った。また投与 2 日目の段階での Toc-siRNA による遺伝子抑制効果は用量依存性に認められた (図 2)。

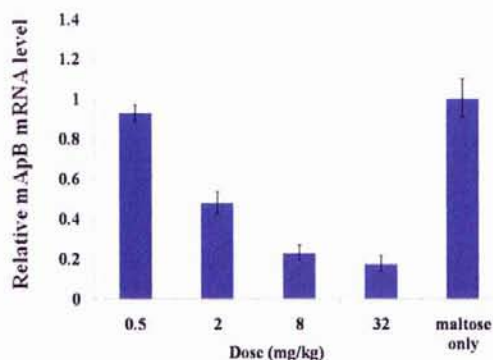


図 2. 肝臓の定量的 RT-PCR

Toc-siRNA による用量依存性の遺伝子抑制効果が見られる

Toc-siRNA 投与から 3 時間後の血清の IFN- α 値は検出感度以下であり、肝臓での IFN- β の mRNA 発現も認められなかった。また血算における白血球数と血小板数の異常値、血清生化学における肝機能・腎機能障害はいずれも認められなかった。

マウス神経芽細胞腫 (neuro2a) の培養細胞を用いた実験では、血清を含まない DMEM 培養液に Cy3 標識した Toc-siRNA を 1 μ M の濃度で加えたとき、3 時間後にはほぼすべての細胞で Cy3 陽性シグナルが観察され (図 3)、トランスフェクション試薬を用いなくても神経細胞にも取り込まれるということが判明した。

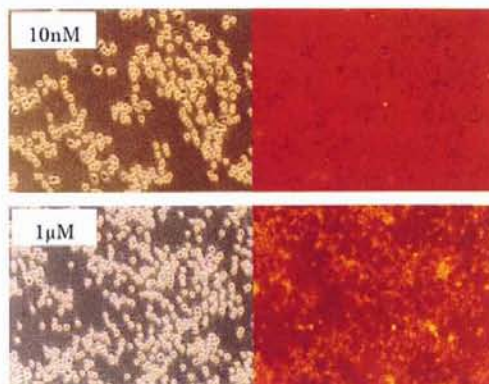


図 3. neuro2a 細胞の蛍光顕微鏡画像

1 μ M の濃度のときほぼすべての神経細胞に Cy3 陽性シグナルを認める

D. 考察

今までに、脂質直接結合型 siRNA として、コレステロール (Chol) を結合した siRNA (Chol-siRNA) が報告されているが、アポ B に対する Chol-siRNA で有効な標的遺伝子発現抑制のために必要な量は 50~100mg/kg であった。今回用いた Toc-siRNA では 2mg/kg で同等の効果が得られており、はるかに優れた効果を有していると考えられる。Chol-siRNA と Toc-siRNA の差については、Chol と Toc の血清中の肝臓への輸送経路の違いや Chol が体内で合成可能である点、それぞれの siRNA と脂質との結合部位及び結合方式の違いや結合している siRNA の長さ及び化学修飾の違いなどが原因として挙げられる。

また、Toc-siRNA による明らかな副作用は認められなかった。Toc-siRNA を 2mg/kg で投与した時のマウスへの Toc 静注量は 46 μ g/kg であり、人間が一日に必要な Toc の摂取量が 125-200 μ g/kg であることを考えると非常に少量である。またビタミン E の作用として抗酸化作用がよく知られているが、この Toc-siRNA では Toc の抗酸化作用を示す唯一の水酸基をアミダイト化しているため、抗酸化作用は失活されている。そして、特にカチオニックリポソームを用いて siRNA を投与した時に問題となる IFN 応答は認められなかった。生体内への siRNA 投与により IFN 応答を生じる原因として、siRNA の Toll 様受容

体の認識などが知られており、多くの場合 RNA に化学修飾を施すことで回避している。Toc-siRNA が IFN 応答を生じなかった原因として、Toc-siRNA 自体に化学修飾を施していることに加え、Toc-siRNA はカチオニックリポソームとは肝臓に取り込まれる経路が異なっていると思われること、などが考えられる。

最後に、neuro2a 細胞に Toc-siRNA が取り込まれたことから、神経細胞の遺伝子発現抑制にも有用となる可能性が示唆された。今後、in vivo における効果の検討および Toc-siRNA が取り込まれる機序の解明に向けてのさらなる研究が必要であるが、将来的に RNA 干渉を用いて神経変性疾患の遺伝子治療が可能となることが十分に期待される。

E. 結論

Toc を用いた in vivo での肝臓への siRNA デリバリーは効果的かつ安全であった。また、Toc-siRNA は神経培養細胞にもデリバリーされることが示された。今後、取り込み経路の同定など更なる検討が必要だが、Toc を用いることは神経変性疾患の遺伝子治療を目標とした siRNA の重要かつ有効な輸送手段として期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T. : Efficient *in vivo* delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol. *Mol Ther* 16 : 734-40, 2008

2) 久保寺隆行、横田隆徳、水澤英洋 : ALS の遺伝子治療. *Clin Neurosci* 26 : 337-339, 2008

2. 学会発表

仁科 一隆ら : ビタミン E 結合 siRNA を用いた家

族性アミロイドポリニューロパチーの治療法の検討.
第 49 回日本神経学会総会、横浜

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

進行性核上性麻痺剖検例における臨床症候の解析

饗場郁子¹⁾，齋藤由扶子¹⁾，伊藤信二¹⁾，後藤敦子¹⁾，横川ゆき¹⁾，見城昌邦¹⁾
片山泰司¹⁾，早川恵理¹⁾，犬飼 晃¹⁾，吉田眞理²⁾，橋詰良夫²⁾
¹⁾国立病院機構東名古屋病院神経内科 ²⁾愛知医科大学加齢医科学研究所

研究要旨

進行性核上性麻痺(PSP)剖検 11 例における臨床症候を解析した。発症年齢 69.9 ± 5.7 歳，死亡時年齢 75.5 ± 4.7 歳，罹病期間 5.7 ± 2.6 年。最終臨床診断：PSP10 例，パーキンソン病(PD)1 例。主要症候の平均出現時期は易転倒性 0.1 年，認知症 1.4 年，核上性注視麻痺 1.8 年，構音障害 2.0 年，嚥下障害 2.6 年，頸部後屈 4.3 年，ADL:車いすまで 2.7 年，臥床状態まで 4.2 年。PSP 診断時期 2.5 年。転倒・外傷と嚥下・呼吸器系合併症が多く，死因は肺炎が 7 例で最も多かった。生存期間は中央値 68.0 ヶ月，平均値 68.9 ヶ月。核上性注視麻痺・嚥下障害・頸部後屈出現までの期間が短い例，移動能力悪化が早い例，合併症出現・医療処置開始が早い例ほど生命予後が不良であった。臨床像は古典的 Richardson's syndrome (RS) に該当する例が多かったが，PSP-Parkinsonism (PSP-P) に準ずる例，小脳失調が目立つ例なども存在した。

A. 研究目的

進行性核上性麻痺(Progressive supranuclear palsy:PSP)は，近年剖検例の詳細な検討により，古典的な Richardson's syndrome (RS) に加え PSP-parkinsonism (PSP-P)，Pure akinesia with gait freezing (PAGF) などの病型分類がなされている。剖検診断した PSP 症例の臨床症候を解析し，臨床上のスペクトラムを明らかにする。

B. 研究方法

国立病院機構東名古屋病院神経内科にて 1996 年～2007 年に剖検診断した PSP11 例(男性 8 例，女性 3 例)について，臨床症候・医療処置・合併症の出現頻度および出現時期，ADL の経過について診療録を後ろ向きに調査し，生命予後との関連を検討した。また病理所見と臨床像の関連を検討した。

(倫理面への配慮) 剖検時に研究利用に関する説明を行い，文書にて同意を取得した上で研究を行った。

C. 研究結果

発症年齢 69.9 ± 5.7 (61～79) 歳。死亡時年齢 75.5 ± 4.7 (67～83) 歳。罹病期間 5.7 ± 2.6 (0.6～11.4) 年。最終臨床診断：10 例は PSP，1 例はパーキンソン病(PD) (正診率 90.9%)。

(1) 発症時の症候および初期の診断名

発症時の症候:易転倒性 80%，歩行障害 60%，動作緩慢 37.5%，振戦 20%，書字障害 20%，異常行動 20%，眼症状，小声，嚥下障害，性格変化，発話量低下が各々 9.1%。

初期の診断名：PSP 3/11，パーキンソン症候群 4/11 (Vascular parkinsonism 2，Drug induced parkinsonism 1，Parkinsonism 1)，PD2/11，脊髓小脳変性症(SCD) 1/11，慢性硬膜下血腫 1/11。PSP と臨床診断された時期は 2.5 ± 1.8 (1.1～7.2) 年。

(2) 臨床症候の出現頻度・発症から出現までの期間

易転倒性 10/11 例・ 0.1 ± 0.3 年。核上性注視麻痺 10/11・ 1.8 ± 2.1 年。構音障害 9/10・ 2.0 ± 1.5 年。嚥下障害 11/11・ 2.6 ± 2.1 年。頸部後屈 10/11・4.3

±2.1年、錐体路徴候 9/9・1.0±0.5年、認知症 10/11・1.4±0.7年、振戦 5/11・1.0±0.8年、小脳失調 2/11・1.0年、ADL:車いすが必要となるまで 2.7±2.1年、臥床状態まで 4.2±2.7年。

(3) 合併症と医療処置

合併症:転倒・転落 10/11、肺炎 11/11・3.8±2.3年、頭部外傷 7/8、骨折 4/10、窒息 3/9・4.0±1.0年、仰臥位での舌根沈下による気道狭窄 2/11、Gerhardt 症候群 1/11、イレウス 1/11。

医療処置:吸引 11/11・3.0±1.9年、経管栄養 11/11・4.0±2.2年、尿道カテーテル 8/11・4.2±1.7年、気管切開 6/11・4.6±0.6年。

転倒・転落は病初期にとどまらず、車椅子、臥床レベルになっても車椅子やベッドからの転落が生じていた。嚥下障害・肺炎は全例にみられ車椅子レベルから出現することが多く、全例で吸引、経管栄養が施行されていた。仰臥位での舌根沈下による気道狭窄や痰による窒息、Gerhardt 症候群など呼吸器系合併症は頻度は少ないが臥床状態となってから出現していた。

(4) 生命予後と関連する要因

表1:罹病期間と関連していた要因

	相関係数	P値
核上性麻痺出現までの期間	0.817	0.0050
嚥下障害出現までの期間	0.832	0.0007
頸部後屈出現までの期間	0.887	0.0002
PSPと診断されるまでの期間	0.781	0.0056
車椅子となるまでの期間	0.879	0.0001
臥床状態となるまでの期間	0.940	<0.0001
肺炎出現までの期間	0.858	0.0007
吸引出現までの期間	0.891	0.0005
経管栄養出現までの期間	0.887	<0.0001

核上性注視麻痺、嚥下障害、頸部後屈出現までの時期が短い例、ADL悪化が早い例、肺炎出現が早期である例、吸引・経管栄養開始が早い例ほど、生命予後が不良であった。年齢、易転倒性・構音障害・認知症出現までの期間は罹病期間と関連していなかつた。

た。

(5) 死因と生存期間

死因:肺炎 7/11、窒息・血気胸・悪液質・胃癌各々 1/11。生存期間は中央値 68.0ヶ月、平均値 68.9ヶ月であった。

(6) 病理所見と臨床症候との関連

臨床像は古典的なRSに該当する例が多かった。基本的な病理所見については脳幹被蓋、淡蒼球・視床下核、黒質、小脳歯状核に神経細胞脱落とグリオーススを認め、PSP-tau pathologyを呈する古典的なPSP病理像を呈する例が多かった。特徴ある所見を示した4例を提示する。

- ① 最も経過の短かった例は、嚥下性肺炎で発症し、呼吸不全を合併し7ヶ月で死亡。核上性注視麻痺、易転倒性、認知症はなく、最終臨床診断はパーキンソン病であった。病理学的にはPSP初期像で、脳幹被蓋、淡蒼球、視床下核に萎縮はみられなかった。
- ② 最も経過の長かった例は易転倒性、異常行動で発症しPDとして7年経過した後PSPと診断され、全経過11年6ヶ月で死亡。臨床像はPSP-Pに準ずる症例と考えられたが、病理学的には古典的なPSPであった。
- ③ 小脳性運動失調が目立ち初期にSCDと診断された例は、末期まで四肢の筋トーンスが低下し、四肢はhyperkineticで口蓋ミオクローヌスも認めた。SCDと診断された初期には小脳萎縮を認めず、経過とともに小脳萎縮が明らかとなり、脳幹被蓋のみでなく橋底部にも萎縮を認めた。病理学的には高度の歯状核病変に加え、オリブ橋小脳系や小脳皮質の障害も高度であった。
- ④ 典型的なRSの経過に加え、MIBGにおけるH/M比が低下、起立性低血圧、糞便イレウスなど自律神経機能不全を合併した例は、病理学的には典型的なPSP病理像に加え、レビー小体の出現、青斑核、迷走神経背側核の神経細胞脱落を認めPDの合併と考えられた。

D. 考察

WilliamsらはPSP103剖検例の臨床経過を検討し、古典的なRSとは異なる経過を示すPSP-Pという臨床亜型を提唱した。PSP全体に占める割合はRSが54%だったのに対し、PSP-Pは全体の32%を占めていた。PSP-Pは病理学的には、PSP-Tau pathologyの分布がより限られ、程度も軽いとされている。PSP-Pの臨床上的特徴は初期に左右差、振戦があり、L-dopaが中等度有効であるため、しばしばパーキンソン病と診断される。パーキンソニズムが長く先行し、RSの特徴である初期の転倒、眼球運動障害、認知機能障害はなく生命予後もよい(罹病期間平均9.1年)と報告されている。

今回の剖検診断した11例の臨床経過は、初期の易転倒性、核上性注視麻痺などを呈し罹病期間は平均5.7年で、RSに合致する例が多かった。全経過11年6ヶ月と最も経過の長かった1例は、PDとして長く経過し、発症7年目にPSPと診断された症例で、8年目で車椅子、10年目に臥床レベルと移動能力の悪化が遅かった。初期の易転倒性はあるもののPSP-Pに準ずる例と考えられたが、病理学的には典型的なPSP病理像であった。今回の少数例の検討ではPSP-Pに準ずる例は11例中わずか1例と欧米の報告(32%)に比べ少なかった。この理由としてPSPと臨床診断されずPDとされている例が存在する可能性もあり、本邦におけるPSPのphenotypeの分布を明らかにするためには、多数例での検討が望まれる。

小脳性運動失調が目立ち、初期にSCDと診断された例が1例存在した。小脳性運動失調はSteeleらの原著にも記載があるが、SCDと診断されるほど小脳失調が目立つ例の報告は少ない。小脳に関連するPSPの病理所見は、遠心系である歯状核病変が主体であるが、通常橋核、下オリブ核など入力系にも病変が存在する。本例では、高度の歯状核病変に加え、オリブ橋小脳系の変化が通常のPSPよりも高度で、ブルキンエ細胞の脱落も認められ、脳幹被蓋のみならず橋底部、小脳にも萎縮を認めた。上記のように高度の歯状核変性に加え、オリブ橋小脳系の病変の合併が、臨床上みられた小脳性運動失調の

責任病巣と推察される。PSPでは、明らかな小脳失調が存在しない場合でも、slurred, explosive speech, 歩行がwide based, 四肢のトーン低下など小脳病変を示唆する臨床徴候が存在する。これらに加え明らかに小脳失調が存在する場合SCDと診断される可能性があるが、通常SCDでは小脳失調が存在する時点ですでに画像上小脳萎縮が存在する場合が多く、小脳失調が存在するのに小脳萎縮がみられない場合には、PSPを念頭に置く必要がある。

E. 結論

古典的なRSに合致する症例が多かったが、パーキンソニズムが長く先行しPSP-Pに準ずる例、小脳失調が目立つ例などが存在した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・饗場郁子. 他の変性性パーキンソニズムの病態, 診断と治療. カレントセラピー, 26・36-41・2008.

2. 学会発表

・早川恵理, 饗場郁子, 齋藤由扶子ほか. 長期人工呼吸器管理の筋萎縮性側索硬化症におけるMRI所見の検討. 第49回日本神経学会総会(2008.5.15).

・伊藤信二, 饗場郁子, 齋藤由扶子ほか. 初診時パーキンソン病と診断された症例の長期経過. 第49回日本神経学会総会(2008.5.15).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

レビー小体病の、嗅球・扁桃核進展型の提唱

○村山繁雄（むらやましげお）¹⁾、齊藤祐子²⁾、仙石鍊平³⁾、初田弘幸⁴⁾、足立正¹⁾⁵⁾、舟辺さやか¹⁾⁶⁾

所属：1. 東京都老人総合研究所高齢者ブレインバンク、2. 東京都老人医療センター剖検病理科、3. 慈恵医大神経内科、4. 大阪市立大学老年病科・神経内科、5. 鳥取大学医学部脳神経内科、6. 順天堂大学医学部脳神経内科

研究要旨

レビー小体病では Braak らにより脳幹上行系進展仮説が提出されているが、嗅球よりはじまる経路、アルツハイマー病に合併するとされる扁桃核型との関係が、明確ではない。高齢者連続開頭剖検例の中枢神経系を、嗅球を含め、網羅的に抗リン酸化 α シヌクレイン抗体免疫染色で評価した結果、嗅球・扁桃核系という進展型路が、脳幹上行系とは独立して存在していることが明らかとなった。

A. 研究目的

レビー小体 (LB) の中枢神経系内出現に関しては、Braak による脳幹上行系進展仮説が提唱されている。一方、パーキンソン病 (PD) では発症早期より嗅覚が犯され、Braak は LB 病理が嗅球に早期より発現することを報告した。しかし、Braak は、脳幹上行系進展経路と嗅球の正確な関係を明らかにしていない。一方 AD において、扁桃核に強調され、脳幹病変が極めて軽微な、扁桃核型が提唱された。さらに、AD において、嗅球と扁桃核の LB 病変の相関が報告された。

以上を総合すると、脳幹上行系とは独立して、LB 病理の出現に、嗅球・扁桃核系が存在すること、それらは AD において強調されることが示唆される。しかし、AD 以外の高齢者における、嗅球における LB 病理については、昨年度我々が報告したものとどまり、扁桃核との関係の正確な報告はまだない。

我々は、AD を含む高齢者連続剖検例において、嗅球・扁桃核系進展経路が、脳幹上行系と独立して存在するのいかを検討した。

B. 研究方法

高齢者ブレインバンクに登録された、東京都老人医療センター連続開頭剖検 320 例（平均年齢 81.5 \pm 8.5 歳）を、高齢者ブレインバンク

プロトコル (www.mci.gr.jp/BrainBank/) に従い、網羅的に検索した。

原則として半脳は凍結保存、同側より 8 箇所を 4%パラフォルム 48 時間固定、反対側脳は 20%ホルマリン固定後、ブレインカッティングで詳細に臨床・画像・病理連関をとり、27 カ所を採取・評価した。通常染色には H.E. と K.B. 染色、特殊染色として、Elastic- Masson、Gallyas- Braak、Methenamine Silver、免疫染色としては Ventana NX20 を用い、抗リン酸化 α シヌクレイン (psyn#64)、抗リン酸化タウ (AT8)、抗 Abeta(11-28)、抗 ubiquitin 抗体を用いた。

嗅球は既報告通り、一側を 4%パラフォルムに 48 時間固定後矢状断を作成、パラフィン包埋し、上記と同様免疫組織学的に評価した。主に二次嗅覚構造よりなる辺縁部と、三次嗅覚構造よりなる前嗅核を分けて評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京都老人医療センター・東京都老人総合研究所倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

中枢神経系に LB 病理を認めたのは 102 例 (31.9%) で、うち 85 例 (26.6%) の嗅球に LB 病理を認めた。85 例中 14 例は辺縁部のみに、2 例の AD 合併例では前嗅核のみに、残り 69 例は両方

の領域に LB 病理を認めた。

5 例は嗅球にのみレビー小体を認めた。これらの例では脳幹病変は thread や dot をわずかに認めるのみであった。

認知症・パーキンソン症状の臨床症状は、辺縁部のみ陽性例には認められず、前嗅核陽性例のみ認められた(表 1)。扁桃核のレビー小体病理は、嗅球のレビー小体病理と強く相関したが、辺縁部より前嗅核のレビー小体病理とより強く相関した(図 1)。

辺縁部における抗 TH 抗体と α シヌクレインの染色部位の一致は極めてまれであった。黒質変性を伴う症例では、嗅球は全て LB 病理陽性であった。

表 1.

前嗅核に細胞内凝集がないと、パーキンソン症状、認知障害は出現しない

嗅球 レビー小体病理 グレード	辺縁				症状陽性症例数 / 全症例数
	0	1	2	3	
0	0/0	0/10	0/2	0/2	
1	0/2	0/4	0/10	0/3	
前嗅核	2	0/0	1/2	3/7	1/8
	3	0/0	2/2	5/11	0/3
	4	0/0	3/3	9/11	2/5

図 1.

扁桃核 LB 病理は特に前嗅核と相関が強く、発症者の扁桃核グレードは全て 4 である

Spearman's 相関係数 辺縁 0.52 < 前嗅核 0.65



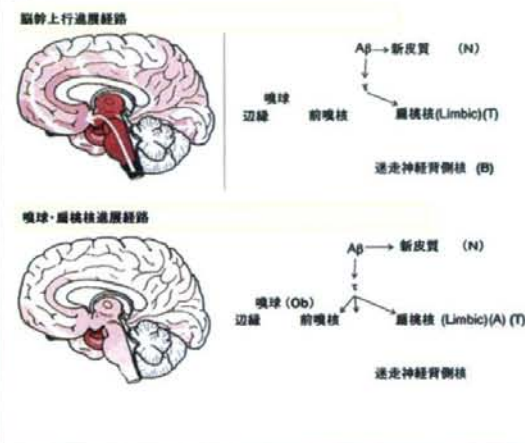
表 2.

扁桃核は、レビー小体病に最も侵されやすい解剖学的構造である

	嗅球	扁桃核	黒質	背側核	迷走神経 背側神経核	前核	交感 神経節	計
0.5B	3	2	3	4	6	1	4/6	8
0.5T	5	8	3	3	1	0	0/6	8
0.5A	7	14	0	0	0	0	0/11	14
0.5計	15	24(80%)	6	7	7	1	4/23	30
1B	13	14	13	16	16	1	5/12	16
1T	13	14	13	12	12	1	5/8	14
1A	7	7	3	3	3	0	0/5	7
	33	35(95%)	29	31	31	3	10/25	1計
0+1計	48	59(88%)	35	38	38	3	14/48	67

*Stage 2 以上では 100%。Stage 0.5 = dots & threads のみ; Stage 1 = 細胞質内凝集あり

図 2.



黒質変性を伴わない偶発 LB 病における LB 病変の部位別頻度では扁桃核が最も頻度が高く、ついで嗅球、迷走神経背側核の順であった(表 2)。

D. 考察

以上より、LB 病理は、嗅球の辺縁部より前嗅核に達し、扁桃核に至って臨床症状に関与する進展経路が推察された。一方扁桃核は、脳幹上行系、嗅球・扁桃核系の両方の交差点であるため、LB 病理の発現頻度が最も高くなる機序が考えられた。

早期例の検討からは、脳幹上行型のパターンは存在するが、その時点でも嗅球には陽性所見が延髄陽性の半数に出現していた。また辺縁系に初期から Lewy 小体病理を認める群では、扁桃核、次いで嗅球の出現頻度が高く、脳幹はそれに比べ、はるかに低かった。すなわち、辺縁型の分布は、嗅球・扁桃核進展経路に依存している可能性が示

唆された。特にこの傾向は、いわゆる扁桃核亜型では極めて顕著であった。さらに扁桃核亜型は高率に、嗅球病変を認めることが明らかとなった。

以上より、扁桃核亜型は、嗅球扁桃核進展型の、扁桃核のみを検索したことによる不十分な表現であること、この伸展型はADの時に強調されるが、一般にも存在すると考える方が、妥当であると解釈された。

E. 結論

嗅球・扁桃核進展経路は、脳幹上行系経路とは独立して存在している。

しかし、Lewy小体病理が本当に進展経路として拡がるかたちを持つのか、他の変性疾患のように、解剖学的にはゲリラ的に発症するが、好発部位が存在するだけであるのかについては、さらに検討が必要である。

我々の検討は、むしろ後者を示唆する所見である可能性が高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Inoue K, Murayama S: The incidence and extent of Lewy- body related alpha- synucleinopathy in human aging olfactory bulb. 2008; 67: 1072-1083

2. Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Ito G, Iwatsubo T, Fukayama M, Murayama S: Lewy body pathology involves cutaneous nerves. J Neuropath Exp Neurol 2008; 67: 945-953

3. Hashimoto M, Kawasaki K, Suzuki M, Mitani K, Murayama S, Mishina M, Oda K, Kimura Y, Ishiwata K, Ishii K, Inoue K: Presynaptic and postsynaptic nigrostriatal dopaminergic functions in multiple system

atrophy. Neuroreport 2008; 19: 145- 150

2. 学会発表

1. Ishibashi K, Murayama S, Ishii K, Mizusawa H: Correlative study of MIBG cardiac scintigraphy and Dopamin pet scan in diagnosis of Parkinson disease. 2008 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008.11.17, Washington D.C., U.S.A.

2. Hatsuta H, Saito Y, Adachi T, Arai T, Sawabe M, Kuwano R, Mori H, Murayama S: Staging for Amyloid Angiopathy in Human Aging. 2008 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008.11.15, Washington D.C., U.S.A.

3. Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Sakiyama Y, Hatsuta H, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Inoue K, Murayama S: The incidence and extent of Lewy- body related alpha- synucleinopathy in human aging olfactory bulb. 2008 Annual Meeting of the American Association for Neuropathologists, 2008.4. 8, San Diego, U.S.A, JNEN 67: 443 (2008 Moore Award for the best clinicopathological presentation)

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

パーキンソン病モデルに対する G-CSF 治療効果の検討

望月秀樹^{1,2}、任勇日¹、安田徹¹、早川英規¹、仁平友子¹、服部信孝²、水野美邦¹

1. 順天堂大学老人性疾患病態・治療研究センター
2. 順天堂大学脳神経内科

研究要旨

パーキンソン病は、黒質線条体ドパミンニューロンの変性脱落による神経変性疾患であり、まだ有効な治療薬がないのが現状である。我々は Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) が MPTP 投与によるパーキンソン病モデルにおいて抗アポトーシス因子制御によるドパミン神経保護作用があることを報告した。Tsai らは G-CSF がアルツハイマー病モデルにおいて血液幹細胞の増殖を促進することにより神経新生を誘発し、機能改善を認めたと報告した (Tsai et al. 2007)。今回我々は 6-OHDA 投与による片側パーキンソン病モデルにおいて G-CSF 全身投与と脳内直接投与の治療効果を比較し、またその機序が神経新生によるものかどうかについて検討した。G-CSF 脳内直接投与群において障害側黒質 TH 陽性細胞数は Vehicle 群に比べて回復傾向が見られた。一方、G-CSF 投与による神経新生は確認されなかった。G-CSF のドパミン神経に対する保護作用は、神経新生の機序よりむしろ抗アポトーシス因子への制御が主体であると考えられた。

A. 研究目的

6-OHDA 投与による片側パーキンソン病モデルマウスにおける G-CSF の全身投与と脳内直接投与の治療効果を比較し、その機序が神経新生によるものかどうか検討した。

B. 研究方法

1. 片側パーキンソン病モデル作製

C57BL/6 マウス (♂、10-16 週齢) を用いて 6-OHDA 2.5 μg (Sigma) を片側黒質に注入し、注入側黒質線条体ドパミンニューロンの変性、脱落を誘発した。

2. G-CSF 投与

片側パーキンソン病モデルに G-CSF (Kirin, Japan) を全身投与または脳内直接投与し、その治療効果を検討した。

全身投与群 A :

6-OHDA 投与 1 日後 G-CSF (200 μg/kg) あるいは Vehicle を 1 日 1 回連続 5 日間腹腔内投与した。
全身投与群 B :

6-OHDA 投与 1 日後 G-CSF (200 μg/kg) あるいは Vehicle を 1 日 1 回連続 5 日間腹腔内投与して、3 ヶ月後にもう 1 度 G-CSF (200 μg/kg) を 1 日 1 回連続 5 日間腹腔内投与した。

脳内直接投与 :

Micro-Osmotic pump (0.25 μl/hr, 14days, model 1002) を用いてマウス障害側線条体に G-CSF (60 μg/kg/day) あるいは Vehicle を 14 日間持続的に注入した。

3. BrdU 投与 :

BrdU (50mg/kg) を各群で G-CSF 投与開始から投与終了まで 1 日 1 回腹腔内投与し増殖細胞をマーキングした。

4. 免疫組織化学的解析

G-CSF 投与終了後マウスを灌流固定し、TH、BrdU、DCX、CD34、GFAP、Iba-1 等の抗体を用いて免疫染色を行った。G-CSF 脳内直接投与群と全身投与群の黒質 TH 陽性細胞数をカウントし、比較した。上記 2 群の脳室下帯 (SVZ) 及び線条体の BrdU、DCX、CD34 陽性細胞数をカウントし比較した。

C. 研究結果

1. 片側パーキンソン病モデルにおける 6-OHDA 注入側黒質線条体 TH 陽性細胞の顕著な脱落を確認した (Fig 1)。

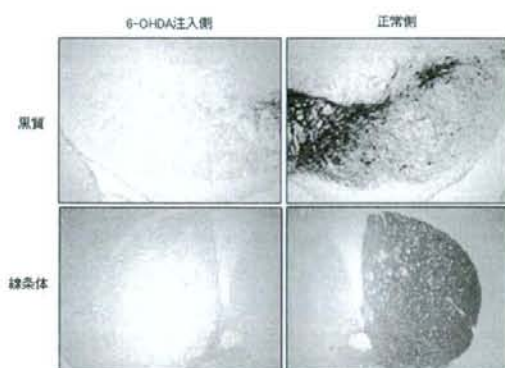


Fig 1. 黒質と線条体の TH 染色像。6-OHDA 注入側黒質線条体の TH 陽性細胞が著しく脱落している。

2. G-CSF 脳内直接投与群の障害側黒質線条体 TH 陽性細胞数は Vehicle 群に比べて回復傾向が見られた (Fig 2)。

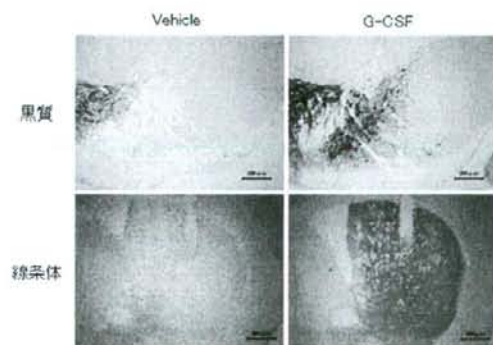


Fig 2A

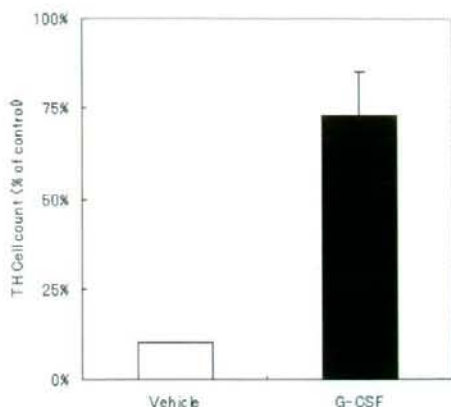


Fig 2B

- A. 黒質と線条体の TH 染色像。G-CSF 脳内直接投与群の黒質線条体 TH 陽性細胞数は対照群に比べ増加傾向が見られた。B. 黒質 TH 陽性細胞数カウント。G-CSF 脳内直接投与群では黒質 TH 陽性細胞数が 70% 近くまで回復している。
3. G-CSF 全身投与の A、B 両群では G-CSF 投与による障害側黒質線条体 TH 陽性細胞数の顕著な回復は見られなかった。
4. BrdU 陽性細胞を含め、DCX、CD34 陽性細胞の G-CSF 投与による変化は認められなかった (Fig 3)。

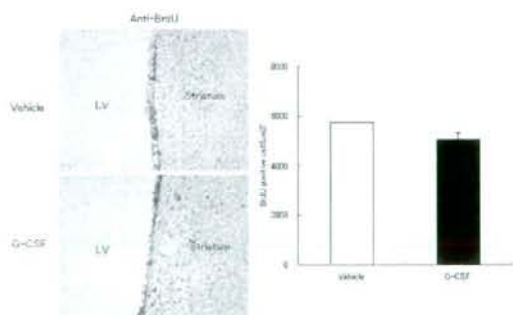


Fig 3A

Fig 3B

- A. 片側パーキンソン病モデルの脳室下帯の BrdU 染色。B. 脳室下帯の BrdU 陽性細胞数
5. G-CSF 脳内直接投与群、全身投与群において、投与後の死亡例、脳梗塞発症例は認められなかった。

D.考察

今回 6-OHDA 投与による片側パーキンソン病モデルでは G-CSF 脳内直接投与の方が G-CSF 全身投与に比較し、顕著な改善が見られた。またその機序について G-CSF リセプターノックアウトマウスを用いてさらに検討する。直接投与で骨髄増殖などの問題がなければウィルスベクターによる G-CSF 治療効果を検討する。

E.結論

G-CSF のドパミン神経に対する保護作用は神経新生の機序よりむしろ、抗アポトーシス因子の制御による保護作用が主体であると考えられた。

F.健康危険情報

G.研究発表

1.論文発表

2.学会発表

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