

愛知県医師会難病相談室は専任の医療ソーシャルワーカー（MSW）4人が置かれ、愛知県医師会、愛知県、名古屋市の協力体制で支援、運営されている。

初回の相談を電話等で MSW が受け、必要に応じて MSW による療養生活相談の実施や専門医による医療相談を手配し、対応を進めている。適宜 MSW がフォローアップを行っている。

電話相談を含む全相談件数は、平成 16～20 年度平均で新規相談が 1461 件/年、継続相談が 1680 件/年の合計 3131 件/年だった。疾患群別割合は消化器系が 20%と最も多く、続いて神経系 16%、膠原病 14%、眼科 13%、骨・関節 9%、心身 4%、呼吸器 3%の順であった。電話相談を含めた相談内容は、特定疾患などの難病に完全に限定することはできず、特に近年、慢性肝炎に関連した問い合わせ、相談が多かったことが割合に影響した。

専門医による医療相談の件数は、平成 16～20 年度平均で 295 件/年であり、年間のべ 130 人程度の各分野専門医が関わった。疾患群別割合は神経系 27%と最も大きい割合を占め、次いで膠原病 18%、消化器 9%、耳鼻科 9%、心身 7%、呼吸器 6%、眼科医 6%の順であった。

難病相談・支援センターである難病相談室以外に、名古屋市の外的愛知県内保健所 15 施設のうち 12 施設（80%）で専門医による医療相談が実施されていた。それぞれの施設における医療相談参加専門医数は 2 人/年～19 人/年まで幅があったが、地域の保健所においても専門医による医療相談が幅広く実施されていた。

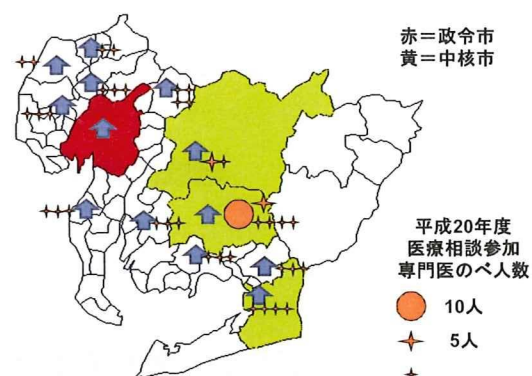


図1 愛知県における医療相談体制

難病相談室への相談の内容は 47%が医療や療養生活の不安・疑問であり、社会復帰への受け入れ・適応が 24%、医療機関についてが 15%、医療・生活の経済面が 6%、職業・住居についてが 3%、家族との関係や家族の生活についてが 1%の順であった。それぞれ、医療や療養生活の不安・疑問に対しては MSW による相談面接、専門医による医療相談、医療機関については施設情報提供、医療・生活の経済面については各種制度情報提供、紹介、家族に関係した相談は MSW による相談面接、必要に応じて医療相談、遺伝カウンセリングの手配で対応された。社会復帰への受け入れ・対応や職業・住居については合わせて相談の 1/4 以上を占め、MSW による各種制度紹介、情報提供がなされたが、就労支援については愛知県労働局、地域のハローワークとの連携がとれておらず、具体的な対応がとれていない実態が指摘された。

神経系疾患群に関する新規医療相談 295 件における患者性別は男性 49.5%、女性 50.5%であり、患者年齢は 50 歳台、60 歳台にピークがあるものの 10 歳台から 80 歳台まで幅広く分布していた。医療相談にあたり患者本人が来室したのは

84.5%であり、15.5%は患者家族のみ来室しての相談であった。

患者家族のみ来室した事例を提示する。

《事例1》

67歳女性

・2年ほど前からふらつき、歩行障害、書字困難、立ちくらみ、排尿障害などが出現した。

・総合病院神経内科で多系統萎縮症と診断された。

・現在の多彩な症状への対処、今後の進展などについて家族の不安が強くあり、娘のみ難病相談室に来室した。

→医療相談内容

・失禁・失便、呼吸器感染、いびきなど現在の症状について説明、解説した。

・今後予想される経過について説明した。

・一般的に遺伝性ではないことなど、疾患一般について説明した。

来室時すでに診断が確定しており、患者、家族も納得しているケースは44.6%にすぎず、診断はつけられているがセカンドオピニオンを希望しているケースが14.9%、診断が未確定であるのが40.5%であった。診断名は多い順にパーキンソン病30件、運動ニューロン疾患29件、多発性硬化症16件、多系統萎縮症12件、脊髄小脳変性症11件、後縦靭帯骨化症11件であった。

診断未確定の状態でも医療相談に来室された事例を提示する。

《事例2》

72歳女性

・3年ほど前に手のふるえが出現し、近くの外科系医院で投薬を受けてきた。

・しだいに歩きにくくなり、歩行時突進するようになった。

・総合病院の整形外科を受診し、レントゲン検査などを受けるが、確定診断に至らなかった。

・保健所で難病相談室を紹介され、来室した。

→医療相談内容

・症状の経過を整理した。

・診察にて全身の固縮、姿勢反射障害、仮面様顔貌、転倒による皮下出血痕があった。

・パーキンソニズムの精査加療目的で某国立療養所(当時)神経内科を紹介した。

医療相談来室の目的(重複有り)は、「各種症状への対応」が86.9%、「診断の明確化」は54.8%で過半を占める。その他に「遺伝歴についての相談」「プリオン病患者との誤針事故への対処」など多岐にわたる。それらに対して専門医として、疾患・症状に関する説明、プロブレムの整理、適切な受診への方向付けなどが行われている。

医療相談の結果、適切な医療施設への紹介が35.9%で、主治医への手紙での連絡が33.6%のケースで行われた。

D. 考察

愛知県難病相談支援センターは4人のMSWと年間のべ130人程度の専門医参加により年間約3000件の相談、約300

件の医療相談に対応している。名古屋市以外の地域保健所でも 8 割の施設で医療相談を実施しており、年間のべ 2~19 人の専門医が対応している。愛知県においては難病相談事業に多くの専門医が関わっていることが特徴であり、地域においても規模の違いはあるが、広く実施されている。

一方で難病相談事業と県労働局、地域ハローワークなどとの連携は構築できておらず、相談者からのニーズが高い就労等の支援を円滑に行う体制は不十分である。

神経系医療相談内容を分析した結果から、来室時に診断が確定し、患者自身が納得しているケースは 44%にすぎず、来室者の約半分は診断をはっきりさせることを主な目的の一つとしている。また医療相談の結果、36%で適切な医療施設への紹介が必要となる。従って、相談・支援を要する難病患者の中には、診断が未確定であったり、適切な専門医に受診していない患者が多く存在する。この場合特に、相談事業における専門医のかかわりが重要である。

E. 結論

愛知県においては、専任 MSW と専門医の参加により幅広く難病相談、医療相談体制を構築し、維持できている。難病患者支援にあたり重要なインフラの一つと言える。

神経難病においては診断が確定していなかったり、患者が診断に納得していないケースがかなりあり、それらは適切な診療や研究の対象になっていない実情が

ある。相談に応じ、適切な診療の流れに結び付ける体制は地域の神経難病医療にとって重要であると考えられる。そのため、医療相談・支援事業においては、MSW と医師との協力により、療養・生活面の相談から医療・医学面の相談まで応じ、必要に応じて適切な専門医紹介や受診指導ができる体制が必要である。

なお、相談件数の多い社会復帰支援をより充実させるために、県労働局、地域ハローワークなどとの連携を構築し、就労等の支援を円滑にできるようにすることが望ましい。

F. 研究発表

Yamashita F, Hirayama M, Nakamura T, Takamori M, Hori N, Uchida K, Hama T, Sobue G. Pupillary autonomic dysfunction in multiple system atrophy and Parkinson's disease: an assessment by eye-drop tests. Clin Auton Res. 2010 Feb 3. [Epub ahead of print]

Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Hashizume A, Hama T, Uchida K, Yamashita F, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. The profile of motor unit number estimation (MUNE) in spinal and bulbar muscular atrophy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2009 Dec 3. [Epub ahead of print]

Koike H, Morozumi S, Kawagashira Y, Iijima M, Yamamoto M, Hattori N, Tanaka F, Nakamura T, Hirayama M,

Ando Y, Ikeda SI, Sobue G. The significance of carpal tunnel syndrome in transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid*. 2009 Jul 15;1-7. [Epub ahead of print]

Watanabe H, Hirayama M, Noda A, Ito M, Atsuta N, Senda J, Kaga T, Yamada

A, Katsuno M, Niwa T, Tanaka F, Sobue G. B-type natriuretic peptide and cardiovalvulopathy in Parkinson disease with dopamine agonist. *Neurology*. 2009;72:621-6.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

パーキンソン病患者における日中の眠気とその背景

分担研究者 渡辺 宏久

名古屋大学医学部附属病院神経内科講師

研究要旨

研究要旨 [目的] 昨年我々は、Nagoya Parkinson's disease study group のデータを用い、日中の予期せぬ睡眠は、薬剤よりもパーキンソン病 (PD) の病変の広がりや密接に関連する可能性を報告した。本年は、MRI voxel based morphometry (VBM) を用いて日中眠気のある PD 群の脳容積を眠気のない PD 群および正常対照群と比較検討することにより、その病態を明らかにする。[方法] probable PD 連続 51 例を対象とし、Epworth Sleepiness Scale (ESS) を用いて ESS 3 点以下を眠気なし PD 群、10 点以上を眠気あり PD 群とした。画像解析は、眠気のある PD 群と正常対照群、眠気のない PD 群と正常対照群、眠気のある PD 群と眠気のない PD 群の群間で SPM5/VBM5 を用いた解析を行った。[結果と考察] 日中の眠気を伴う PD 患者では多彩な非運動機能障害を認め、特に幻覚との関連が強かった。日中の眠気とアゴニスト内服用量とは麦角系、非麦角系ともに関連を認めなかった。ESS で 10 点以上の PD 群は ESS 3 点以下の PD 群やコントロール群に比べて有意な脳萎縮を前頭葉下面や側頭葉、後頭葉を中心に認めた。[結論] PD 患者での日中眠気はドパミンアゴニストの影響による眠気よりも PD 自体の病期進行が危険因子である可能性がある

A. 研究目的

日中眠気のある PD 患者では日中眠気のない PD 患者より広範な脳病変を認め、眠気の原因として、薬剤よりも PD 自体の病気の進行が関与している可能性があることを昨年指摘した。

本年は、名古屋大学神経内科通院中の連続 PD 例を対象として、日中の眠気がある PD 群における薬剤の影響と臨床特徴を確認するとともに、日中の眠気がある PD 群の頭部 MRI での萎縮の有無を Voxel Based Morphometry (VBM) で検討することにより PD 患者における日中の眠気の原因を探索した。

B. 研究方法

英国 Brain bank の診断基準による probable PD 連続 51 例を対象に Epworth Sleepiness Scale (ESS) を用いて ESS 3 点以下を眠気なし PD 群、4 点から 9 点を中間 PD 群、ESS 10 点以上を眠気あり PD 群とした。画像解析は、眠気のある PD 群と正常対照群、眠気のない PD 群と正常対照群、眠気

のある PD 群と眠気のない PD 群の群間で SPM5/VBM5 を用いた解析を行った。灰白質と白質の萎縮の比較には t 検定を用い、年齢、性別、脳容積量を共変量とした。対象 PD 群とコントロール群の比較には $FDR < 0.05$ を、眠気あり PD 群と眠気なし PD 群の比較には uncorrected $p < 0.005$ を統計学的に有意とした。

(倫理面への配慮)

「特定疾患治療研究事業における臨床調査個人票の研究目的利用に関する要綱」に基づいて実施し、疫学研究の倫理指針を遵守した。臨床データはすべて研究利用への同意を得たうえでの提供をうけた。

C. 研究結果

ESS3 点以下の眠気なし PD 群 16 例と、ESS10 点以上の眠気あり PD 群 16 例では性別、年齢、MMSE、発症年齢、罹病期間には有意差を認めなかった。(Mann-Whitney's U test, Table 1)

Table 1

■ 眠気なしPD群と眠気ありPD群の背景

	眠気なしPD群 ESS ≤ 3* 16例	眠気ありPD群 ESS ≥ 10* 16例	p value*
性別 (M : F)	6 : 10	7 : 9	N.S
検査時年齢	64.3 ± 10.8	65.6 ± 8.9	N.S
MMSE	29.1 ± 1.4	27.3 ± 3.7	N.S
教育歴	12.1 ± 2.7	12.0 ± 2.6	N.S
発症年齢	54.6 ± 11.1	55.7 ± 10.5	N.S
罹病期間	9.7 ± 3.9	10.0 ± 2.6	N.S

Mann-Whitney's U test

対象 PD 51 例全体での ESS と薬剤用量の相関は、L-dopa 内服量に弱い相関 ($r = 0.292, p < 0.05$) を認めたが、麦角系アゴニスト、非麦角系アゴニスト、総アゴニスト換算量には相関を認めなかった。(Spearman's rank correlation coefficient、Table 2)。

Table. 2

■ PD51例全体での ESSと薬剤用量の相関

	r	p-value**
L-dopa	0.292	<0.05
麦角系アゴニスト換算量	0.152	N.S
非麦角系アゴニスト換算量	0.044	N.S
総アゴニスト換算量	0.161	N.S

**Spearman's rank correlation coefficient

眠気のない PD 群と眠気のある PD 群での薬剤用量の比較では、L-dopa 内服量に 2 群間で有意差を認めたが ($p < 0.05$)、麦角系、非麦角系、ともに有意差はなく総アゴニスト換算量にも有意差を認めなかった。(Mann-Whitney's U test)。

眠気あり PD 群は眠気なし PD 群に比べ多彩な非運動症状を認め特に幻覚において強い有意差を認めた、昨年の報告と同様であった ($p < 0.01$ 、Mann-Whitney's U test、Table 3)。

Table 3

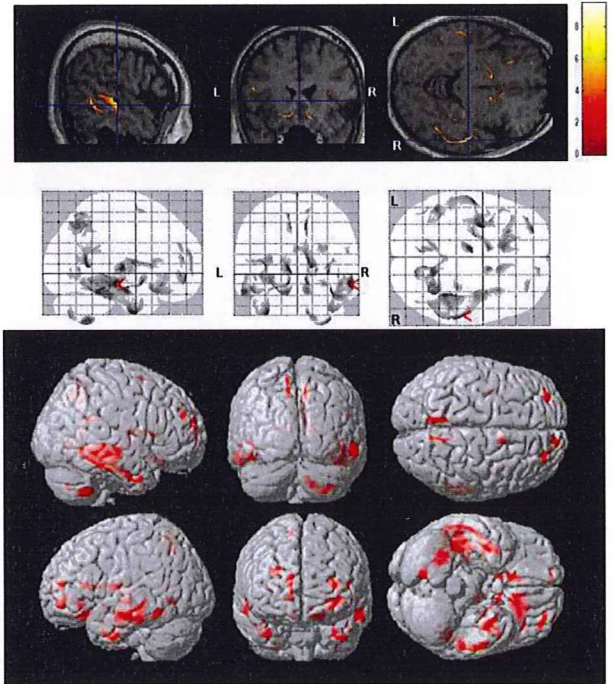
■ 眠気ありPD群の臨床特徴

	眠気なしPD群 16例	眠気ありPD群 16例	p-value*
Hoehn & Yahr	2.4 ± 0.9	3.1 ± 1.1	<0.05
幻覚(UPDRS I 改変)	0.39 ± 1.0	2.7 ± 2.6	<0.01
UPDRS I (精神症状)	2.2 ± 1.9	5.5 ± 3.5	<0.01
BDI (鬱)	11.0 ± 3.4	19.0 ± 9.0	<0.01
OABSS (過活動性膀胱)	3.7 ± 2.8	7.1 ± 4.0	<0.05
IPSS (前立腺スコア)	6.4 ± 6.1	12.5 ± 8.5	<0.05
NMSQ (非運動機能障害)	9.6 ± 5.8	15.4 ± 7.0	<0.05
PDSS (睡眠障害)	114.6 ± 31.6	93.6 ± 35.5	<0.05

* Mann-Whitney's U test

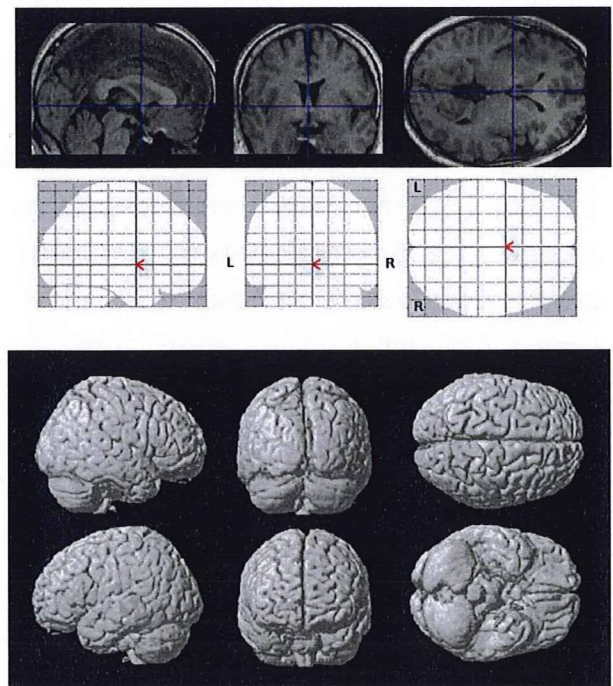
VBM による解析では、眠気あり PD 群 16 例と control 28 例と比較すると前頭葉下面や側頭葉、帯状回、辺縁系に統計学的に有意な萎縮を認めた ($p < 0.05, FDR, Fig. 1$)。

Fig. 1



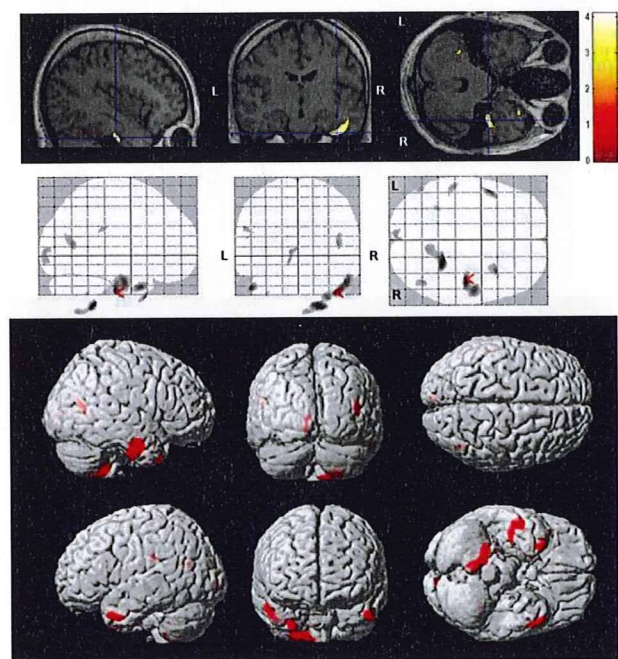
一方、眠気なし PD 群 16 例と Control 28 例と比較したところ統計学的に有意な萎縮部位は検出されなかった ($p < 0.05, FDR, Fig. 2$)。

Fig. 2



さらに眠気あり PD 群 16 例 と眠気なし PD 群 16 例 で直接比較すると前頭葉下面、側頭葉、島皮質、後頭葉で統計学的に有意な萎縮を認めた。(Uncorrected $p < 0.001$) Fig.3

Fig. 3



D. 考察

PD の日中の眠気は薬剤が原因であるのか、疾患の進行が原因であるのかはこれまでいくつかの議論がなされているが、大脳病変の関与につき、VBM で解析した報告は認めない。

本検討では、レボドパのみ ESS 低値群と ESS 高値群で有意差を認めたが、ESS 高値群での平均内服量は $400 \pm 186.4\text{mg}$ と、高用量とは言えない内服量であった。一方、昨年 の報告と同様に ESS 高値群は低値群よりも多彩な非運動機能異常を認め、薬剤も含めた多変量解析の結果では ESS スコアと幻覚スコアのみ有意に相関していた。さらに、VBM による検討では、ESS 高値群は、低値群やコントロールに比べて前頭葉下面、側頭葉から頭頂葉にかけて有意な萎縮を認めた。

以上、眠気のある PD は眠気の無い PD よりも多彩な非運動機能異常を有し、有意な大脳萎縮を認めることから、PD の日中に眠気は薬剤よりも大脳病変の進行が密接に関連していると考えられた。より

多数例を用い、さらに病理学的な検討を加えることで眠気に最もかかわる解剖学的部位と神経伝達物質を見いだすことが今後の検討課題である。

E. 結論

日中の眠気を伴う PD 患者では多彩な非運動機能障害を認め、特に幻覚との関連が強かった。日中の眠気とアゴニスト内服用量とは麦角系、非麦角系ともに関連性を認めなかった。ESS で 10 点以上の PD 群は ESS 3 点以下の PD 群やコントロール群に比べて有意な大脳萎縮を前頭葉下面や側頭葉、後頭葉を中心に認めた。PD 患者での日中の眠気はドパミンアゴニストの影響による眠気よりも PD 自体の病期進行が危険因子である可能性があると考えられた。

G. 研究発表

- 1) Senda J, et al. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10: 288.
- 2) Kawai Y, et al. Cognitive impairment in spinocerebellar degeneration. *Eur Neurol* 2009; 61: 257.
- 3) Watanabe H, et al. B-type natriuretic peptide and cardiovalvulopathy in Parkinson disease with dopamine agonist. *Neurology* 2009; 72: 621.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

JaCALS 登録時情報による一年後予後予測

研究分担者 熱田 直樹

名古屋大学医学部附属病院神経内科 助教

研究要旨 JaCALS では ALS 患者の前向き自然歴を高率に追うことのできる調査システムを構築し、順調に登録症例を増加させている。併せて、ゲノム遺伝子の蓄積も行っており、今後の解析に供する体制を整えている。登録後 1 年以上経過した 214 例のうち 93% で打ち切りなく観察できており、登録時の情報で一年後の予後を高い感度・特異度で予測できることが示された。今後は特定疾患臨床調査個人票解析と合わせて、双方の利点を生かしつつ我が国の ALS の全体像を継続的に把握し、臨床現場、行政施策策定、治験計画などに活用できる情報発信を行っていく。

A. 研究目的

JaCALS では筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者の長期縦断自然歴把握システムを構築し、我が国の ALS 患者の前向き、縦断的臨床像を把握することを目的としている。これにより、治験計画・医療行政施策の基礎資料づくり、臨床現場で活用される基礎資料づくり、臨床像・進行・予後の多様性に関する因子の探索を行う。

JaCALS 登録時に得られる情報のうち、一年後の予後を予測できる指標を探索した。

B. 研究方法

JaCALS 登録後 1 年以上経過した 230 例のうち、登録時に気管切開を介した人工呼吸器装着(TPPV)を導入済みの 16 例を除外し、死亡もしくは TPPV 導入をエン

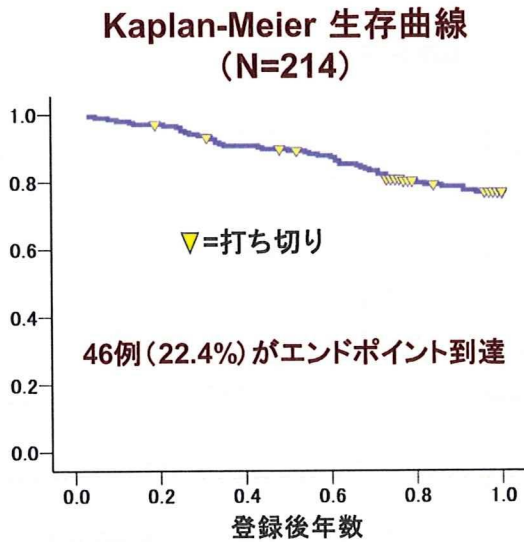
ドポイントとして 214 例の Kaplan-Meier 生存曲線を描いた。登録時に分かる情報から 1 年後のエンドポイント到達の有無を予測できるかどうかについて検討した。

倫理面への配慮

すべての研究参加者には十分な説明を行い、文書にて同意を取得した。臨床情報について、参加施設内での匿名化および中央事務局での匿名化を行い、二重に匿名化された形で解析に供する形とした。研究参加は自由意志であり、同意はいつでも撤回可能とした。研究計画はすべての研究実施施設で倫理委員会への申請を行い、承認を得て実施するものとした。すでに症例登録を開始している全施設で施設倫理委員会の承認を得た。

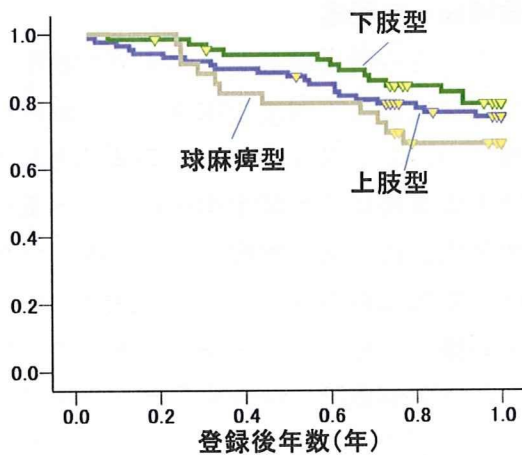
C. 研究結果

JaCALS 登録後一年以上経過した 214 例のうち、94.4%の例で 1 年間の経過観察ができていた。そのうち 46 例(22.4%)がエンドポイント（死亡または TPPV 導入）に到達した。全体の生存曲線を以下に示す。



1 年後の予後予測指標を探索するために、いくつかの指標で分けて生存曲線を描いた。

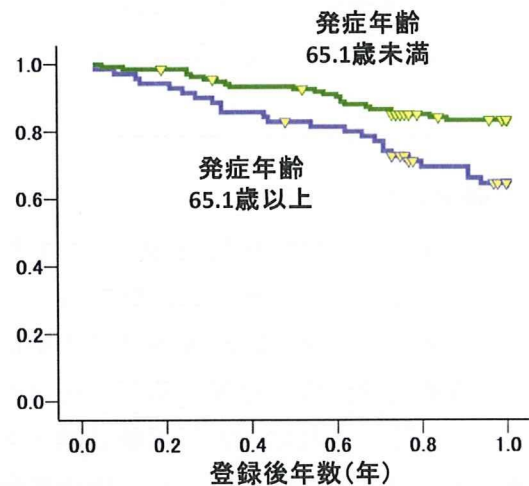
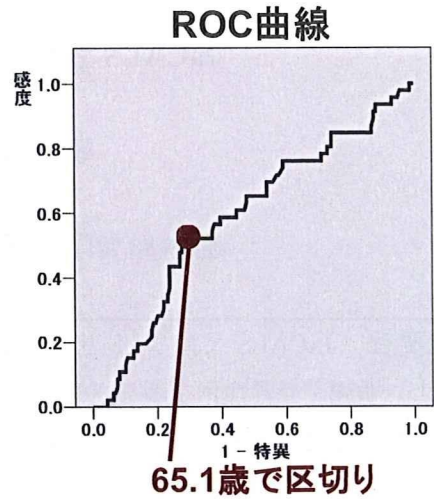
病型による進行の違いを示す。



球麻痺型、上肢型、下肢型の順で進行が速い傾向が示された。

発症年齢について、ROC 解析にて 65.1 歳で区切った時に最もエンドポイント到達

予測の感度と特異度が高くなると考えられた。ROC 曲線と生存曲線を示す。



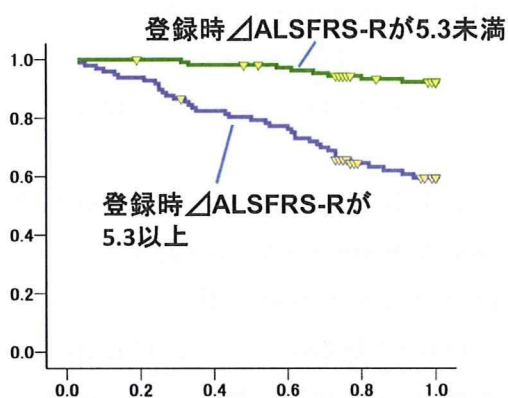
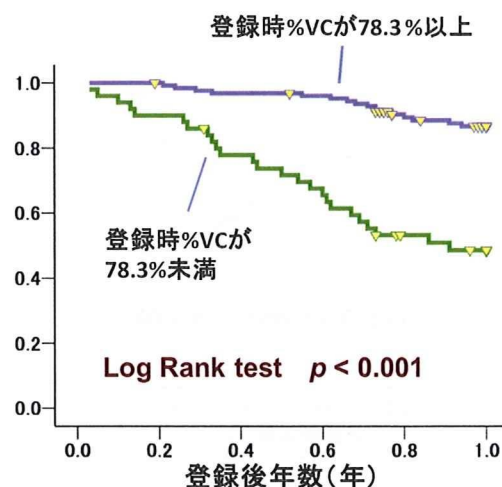
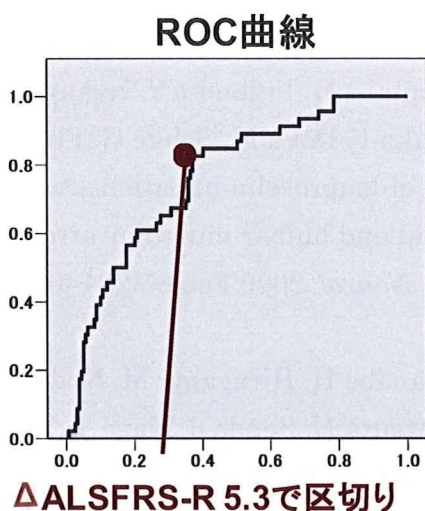
より高齢発症で進行が速い傾向が示された。

登録時 Δ ALSFRS-R を以下のように定義する。発症時は ALSFRS-R が満点 (48 点) と仮定し、登録時まで年あたりどの程度 ALSFRS-R が下がったかを示すものとなる。

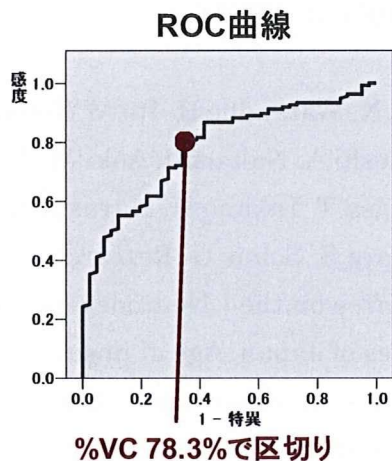
$$\Delta \text{ALSFRS-R} = \frac{48 - \text{登録時 ALSFRS-R}}{\text{発症} \sim \text{登録までの期間(年)}}$$

ROC 解析にて Δ ALSFRS-R 5.3 で区切れば一年以内のエンドポイント到達予測の感度、特異度が最大となることが示さ

れた。ROC 曲線と生存曲線を示す。



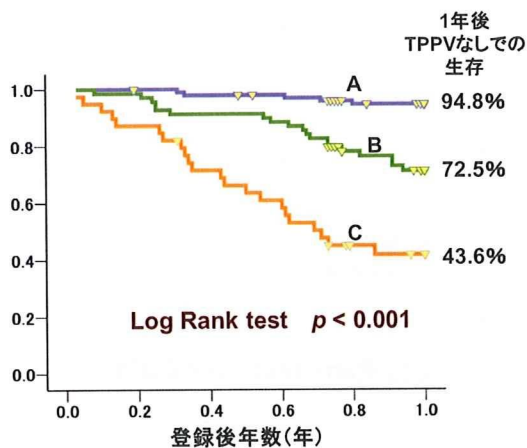
登録時%VCと1年後の予後予測について、ROC 解析から 78.3%で区切ると最も感度と特異度が高く1年後予後予測できることが示された。



次に Cox 比例ハザードモデルを用いて1年後予後に影響を与える因子を解析した。性別、病型、喫煙歴、登録時%VC、登録時 ALSFRS-R、登録時△ALSFRS-Rの各因子からステップワイズ法を用いて有意に影響している因子を抽出した。その結果、登録時%VC ($p < 0.001$)、登録時△ALSFRS-R ($p = 0.003$)、発症年齢 ($p = 0.027$) の3つが抽出された。前2者を用いて予後予測モデルを作成した。

- A:登録時%VC 78.3%以上かつ登録時△ALSFRS-R 5.3 未満
- B:登録時%VC 78.3%未満または登録時△ALSFRS-R 5.3 以上
- C:登録時%VC 78.3%未満かつ登録時△ALSFRS-R 5.3 以上

以上の3群に分けた生存曲線を以下に示す。



以上のように、精度高く一年後の予後予測ができることが示された。

D. 考察

1年間のALS患者経過観察データから、登録時 Δ ALSFRS-R、登録時%VCの組み合わせによって、一年後の呼吸器無しでの生存を精度高く予測できることが示された。このような情報は臨床現場でのインフォームドコンセント、呼吸・栄養補助処置のタイミング決定、侵襲処置方針決定、患者支援のための行政施策の策定、治験計画の作成などの重要な基礎資料になり得る。

E. 結論

JaCALSにおいて、ALS患者の縦断的臨床情報を収集するシステムを構築した。経時的情報収集は現在のところ高率に実施できており、患者の進行予測に寄与できる因子の抽出と予後予測モデルを作成することができる。

F. 研究発表

Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N,

Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, **Atsuta N**, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol*. 2009 Feb;65(2):140-50.

Watanabe H, Hirayama M, Noda A, Ito M, **Atsuta N**, Senda J, Kaga T, Yamada A, Katsuno M, Niwa T, Tanaka F, Sobue G. B-type natriuretic peptide and cardiovalvulopathy in Parkinson disease with dopamine agonist. *Neurology*. 2009 Feb 17;72(7):621-6.

Senda J, Ito M, Watanabe H, **Atsuta N**, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009; 10(5-6): 288-94

Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G; Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral

sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009;276:163-9

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

祖父江 元 (名古屋大学大学院医学系研究科)
 田中 章景 (名古屋大学大学院医学系研究科)
 平山 正昭 (名古屋大学医学部附属病院)
 渡辺 宏久 (名古屋大学医学部附属病院)
 熱田 直樹 (名古屋大学医学部附属病院)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurosci Res.	88	123-35	2010
Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G	TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases.	J Biol Chem.	284	22059-66	2009
Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G	Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurol Sci	276	163-9	2009
Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Hashizume A, Hama T, Uchida K, Yamashita F, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G.	The profile of motor unit number estimation (MUNE) in spinal and bulbar muscular atrophy	J Neurol Neurosurg Psychiatry			2009
Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy.	Ann Neurol	65	140-50	2009
Watanabe H, Hirayama M, Noda A, Ito M, Atsuta N, Senda J, Kaga T, Yamada A, Katsuno M, Niwa T, Tanaka F, Sobue G	B-type natriuretic peptide and cardiovalvulopathy in Parkinson disease with dopamine agonist.	Neurology	72	621-6	2009

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Dorfin Ameliorates Phenotypes in a Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Jun Sone,¹ Jun-ichi Niwa,^{1,2} Kaori Kawai,¹ Shinsuke Ishigaki,¹ Shin-ichi Yamada,¹ Hiroaki Adachi,¹ Masahisa Katsuno,¹ Fumiaki Tanaka,¹ Manabu Doyu,^{1,2} and Gen Sobue^{1*}

¹Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

²Department of Neurology and Stroke Center, Aichi Medical University, Aichi, Japan

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease that is characterized by progressive motor neuron degeneration and leads to death within a few years of diagnosis. One of the pathogenic mechanisms of ALS is proposed to be a dysfunction in the protein quality-control machinery. Dorfin has been identified as a ubiquitin ligase (E3) that recognizes and ubiquitinates mutant SOD1 proteins, thereby accelerating their degradation and reducing their cellular toxicity. We examined the effects of human Dorfin overexpression in G93A mutant SOD1 transgenic mice, a mouse model of familial ALS. In addition to causing a decrease in the amount of mutant SOD1 protein in the spinal cord, Dorfin overexpression ameliorated neurological phenotypes and motor neuron degeneration. Our results indicate that Dorfin overexpression or the activation or induction of E3 may be a therapeutic avenue for mutant SOD1-associated ALS. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Dorfin; ALS; G93A mutant SOD1; ubiquitin ligase; neurodegeneration

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive and fatal neurodegenerative disease characterized by progressive muscle atrophy, paralysis, and death within a few years of diagnosis (Rowland and Shneider, 2001). Several hypotheses for the pathogenesis of ALS have been proposed, including protein quality-control dysfunction, mitochondrial damage, oxidative stress, glutamate receptor abnormality, inflammation, neurotrophic factor deficiency, and activation of apoptosis (Julien, 2001; Boillee et al., 2006; Kabashi and Durham, 2006; Cassina et al., 2008). However, the pathogenic mechanism has not been clarified, and no effective therapy has been developed. Approximately 90% of ALS cases are sporadic (nonhereditary; SALS) and 10% are familial ALS (hereditary; FALS). About 20% of cases of FALS are due to mutations in Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1; Rosen et al., 1993; Hirano, 1996; Martin et al., 2007). Mutant SOD1 protein is thought to induce motor neuron degeneration by a gain of toxic function

rather than a loss of dismutase function (Bruijn et al., 1998; Boillee et al., 2006; Martin et al., 2007).

Sporadic and familial ALS present inclusion bodies composed of aberrant protein aggregates in the cytoplasm of residual motor neurons (Shibata et al., 1996; Ross and Poirier, 2004; Strong et al., 2005). Inclusions containing mutant SOD1 are found in the motor neurons of mutant SOD1-related FALS patients and mutant SOD1 transgenic (Tg) mice (Gurney et al., 1994; Shibata et al., 1996; Watanabe et al., 2001). Aberrant proteins such as mutant SOD1 are ubiquitinated (Alves-Rodrigues et al., 1998; Ardley and Robinson, 2004) and are thought to be degraded by the ubiquitin-proteasome system (Niwa et al., 2002; Urushitani et al., 2002; Goldberg, 2003; Kabuta et al., 2006; Cheroni et al., 2009). However, when the production of aberrant proteins exceeds the cellular degradation capacity, these proteins often form aggregates before they are degraded (Sherman and Goldberg, 2001; Goldberg, 2003).

The ubiquitin-proteasome system mediates post-translational modification and degradation of proteins and is essential for many fundamental cellular functions, including cell cycling, DNA repair, cell signaling, gene transcription, and apoptosis (Ardley and Robinson, 2004; Kabashi and Durham, 2006). Protein ubiquitination is an ATP-dependent process during which ubiquitin is sequentially activated by ubiquitin-activating enzymes (E1), transferred to ubiquitin-conjugating enzymes (E2),

Contract grant sponsor: 21st Century Center of Excellence (COE) grant and global COE grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; Contract grant sponsor: Ministry of Health, Welfare and Labor of Japan; Contract grant sponsor: Core Research for Evolutional Science and Technology.

*Correspondence to: Gen Sobue, MD, Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan. E-mail: sobueg@med.nagoya-u.ac.jp

Received 22 January 2009; Revised 20 May 2009; Accepted 24 May 2009

Published online 16 July 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.22175

and ligated to protein substrates by ubiquitin ligases (E3). Polyubiquitinated proteins are degraded by the 26S proteasome (Goldberg, 2003; Ciechanover, 2005). E3s are of particular importance insofar as they determine the targeting specificity of the ubiquitin-proteasome system (Ardley and Robinson, 2004).

Previously, we identified Dorfin as the product of a gene expressed in the anterior horn of the human spinal cord (Niwa et al., 2001). Dorfin contains a RING-finger/in-between-RING domain and functions as an E3. Dorfin is the first E3 reported to recognize mutant SOD1 proteins and to accelerate their degradation, thereby reducing their cellular toxicity *in vitro* (Niwa et al., 2002; Takeuchi et al., 2004). We have also shown that Dorfin is located in the inclusions found in spinal cord sections from SALS, FALS, and other neurodegenerative disease patients (Niwa et al., 2002; Hishikawa et al., 2003; Ito et al., 2003). These results suggest that Dorfin is involved in the protein quality-control system that addresses abnormal proteins related to neuronal degeneration. In particular, the results suggest that Dorfin acts *in vivo* as an E3, which reduces the level of mutant SOD1 aggregates and toxicity.

In this study, we demonstrate that transgenic overexpression of Dorfin ameliorated phenotypic expression in G93A mutant SOD1 transgenic mice and reduced the accumulation of mutant SOD1 in the spinal cord. These results suggest that Dorfin overexpression may be an effective treatment for mutant SOD1-related FALS.

MATERIALS AND METHODS

Generation and Maintenance of Tg Mice and Genotyping

Full-length human Dorfin cDNA (GenBank accession No. AB029316) tagged with the FLAG epitope was amplified by PCR and inserted into a pCMV-Tag2 vector (Stratagene, La Jolla, CA). FLAG-Dorfin was excised from the vector and inserted downstream of the chicken β -actin promoter in the pCAGGS vector (see Fig. 1A). We generated Dorfin Tg mice by microinjection of pCAGGS carrying FLAG-Dorfin into BDF1 fertilized eggs and obtained 20 founders. These founder mice were back-crossed to C57BL/6 mice. We screened mouse tail DNA by PCR for the presence of the Dorfin transgene using the primers 5-TTGATTTATATTTTGGC GATGC-3 and 5-ACCAGCCACCACCTTCTGATAG-3. The Dorfin transgene copy number in each line was determined by densitometric comparison of the Southern blot hybridization intensity of the DNA with known standards or quantitative real-time RT-PCR using the iCycler system (Bio-Rad, Hercules, CA) as previously described (Ishigaki et al., 2002). Transgenic mice overexpressing human SOD1 carrying a Gly93Ala mutation were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Transgenic progeny were identified by PCR using primers specific for human SOD1 (Gurney et al., 1994). Genotyping of mice was performed by PCR using mouse tail DNA. G93A mutant SOD1 Tg mice were maintained by crossing to F1 of C57BL/6 and SJL. We performed real-time quantitative PCR with mouse tail DNA

to estimate the mutant SOD1 copy number in each mouse. We calculated the ratio of mutant SOD1 relative to apolipoprotein B, an internal reference, and compared these results with those of founder mouse tail DNA known to have 25 copies of mutant SOD1 (Dal Canto et al., 1996) using the primer set 5'-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3' and 5'-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3' for mutant SOD1 and using the primer set 5'-GGCAAACACTTACGGGTCAT-3' and 5'-TTGGCTGTTAGAATGCTGGA-3' for apolipoprotein B. We excluded mice with a low copy number of mutant SOD1. We analyzed the Dorfin transgenic lines 513 and 526 of this mouse model in the present study.

To determine the potential neuroprotective role of Dorfin in ALS, we crossed hemizygous Dorfin Tg mice with hemizygous G93A mutant SOD1 Tg mice. This mating resulted in the generation of four groups of mice: 1) wild type, 2) Dorfin single transgenic mice (Dorfin Tg), 3) G93A single transgenic mice (G93A SOD1 Tg), and 4) Dorfin and G93A SOD1 double transgenic mice (Dorfin/G93A SOD1 double Tg). We compared littermates of G93A SOD1 Tg mice and Dorfin/G93A SOD1 double Tg mice using the following examinations, and we excluded the mice that died of symptoms unrelated to ALS such as injury by fighting each other, difficulty with the water feeding device, and trauma. The mice had *ad libitum* access to food and water on the bottoms of their cages during the light phase of the 12-hr light/12-hr dark cycle, as described previously (Adachi et al., 2001; Katsuno et al., 2003). All animal experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the care and use of laboratory animals* and were approved by the Nagoya University Animal Experiment Committee. All animal experiments were performed with the investigator blinded to genotype.

Assessment of Neurological Phenotype

We assessed the life span of the mice in each group. The end point of survival dates was defined as when an animal could not stand up within 30 sec after it was put on a flat board on both the right and the left sides. Rotarod performance was assessed by using an Economex Rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH). Three trials were performed at 5 rpm, and the longest duration that each mouse remained on the rod was recorded. The timer was stopped when the mouse fell from the rod or after an arbitrary limit of 300 sec.

The footprints of mice were collected as they walked on a straight line. Their front paws were painted with red ink and the hind paws with blue ink. Stride was measured within the area showing regular walking. The longest three strides of both hind paws were measured. Strides of mice that could not walk were measured as zero. Motor activity was analyzed at 10 weeks (presymptomatic stage), 14 weeks (early stage), and 18 weeks (end stage) of age.

Immunohistochemistry

Mice were exsanguinated under ketamine-xylazine anesthesia and transcardially perfused with 20 ml of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). Tissues were post-fixed overnight in 10% phosphate-buffered formalin and proc-

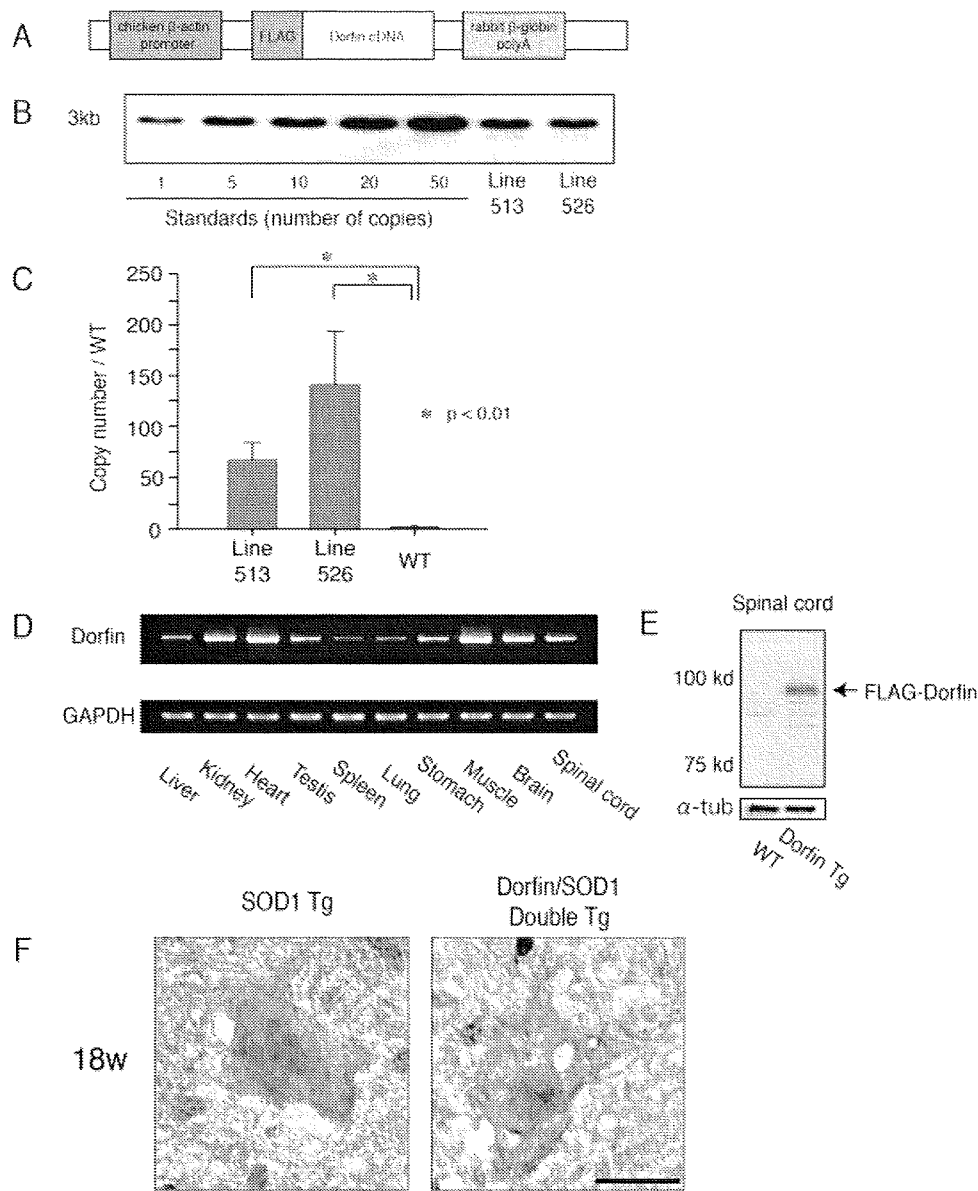


Fig. 1. Dorfin transgenic mouse. **A:** Schematic view of the transgene constructs. The microinjected fragment was composed of a chicken β -actin promoter, a FLAG-tagged Dorfin, and a rabbit β -globin polyadenylation signal sequence (poly-A). **B:** Southern blot analysis of Dorfin transgenic mouse tail DNA. About 20 copies of FLAG-Dorfin transgene are detected in DNA samples from lines 513 and 526. **C:** Quantitative RT-PCR analysis of Dorfin mRNA expression. Total RNA samples were extracted from spinal cord of Dorfin Tg and wt mice ($*P < 0.01$; $n = 3$ each). Dorfin Tg mice from both

lines 513 and 526 express Dorfin mRNA at significantly higher levels than wt mice. Error bars represent SEM. **D:** Transgene expression in Dorfin 526 line Tg mice. RT-PCR analysis of RNA from systemic organs. **E:** Dorfin protein in the spinal cord of 526 Dorfin Tg mouse. Immunoprecipitation using anti-FLAG antibody demonstrates that exogenous FLAG-Dorfin is detected only in Dorfin Tg mice. **F:** Immunohistochemistry of the spinal cord of 526 Dorfin/G93A SOD1 double Tg mice and G93A SOD1 Tg mice with antibodies against Dorfin. Scale bar = 20 μ m.

essed for paraffin embedding, as previously described (Adachi et al., 2001; Katsuno et al., 2002). Transverse sections of spinal cord (4 μ m thick) were deparaffinized, rehydrated, and treated for antigen retrieval. For the mutant SOD1 immunohistochemical study, the paraffin sections were pretreated with formic acid for 5 min at room temperature; processed using the Ventana Discovery system (Ventana, Tucson, AZ) with heating at 100 $^{\circ}$ C for 30 min; and incubated with mouse anti-

SOD1Ab, NCL-SOD1 (1:5,000; Novocastra, Newcastle upon Tyne, United Kingdom), and biotin-SP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) using the Ventana DAB map kit (Ventana, Tucson, AZ). For immunostaining of ubiquitin, sections were similarly processed and incubated with antiubiquitin mouse monoclonal antibody 4PD1 (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and biotin-SP-conjugated goat anti-mouse IgG

(1:500; Jackson ImmunoResearch). The areas of SOD1-positive immunoreactivity or ubiquitin-positive aggregates in the anterior horn of transverse spinal cord sections were assessed with a computer-assisted image analyzer (Win roof; Mitani Corporation, Tokyo, Japan) under the light microscope (Axio Imager M1; Carl Zeiss Japan, Tokyo, Japan). Each spinal cord section was divided into four portions by coronal and sagittal lines passing through the central canal. The immunoreactive areas in the gray matter of the above-mentioned dorsal portions were summed and divided by the area of the entire gray matter of the same portion to calculate the ratio of the immunoreactive area. One hundred consecutive transverse sections of the lumbar spinal cord were prepared for each of five mice, and SOD1- or ubiquitin-positive areas in the anterior horn were assessed on every tenth section, as described previously (Terao et al., 1996). For Dorfin immunohistochemistry, we air dried cryostat sections (6 μm thick) of mice spinal cord (Katsuno et al., 2003) and stained them with antiserum against Dorfin (Dorfin-41, 1:200; Niwa et al., 2001; Hishikawa et al., 2003). For double-immunofluorescence staining of the spinal cord, sections were blocked with 4% goat serum and then sequentially incubated with anti-GFAP antibody (1:1,000; Dako, Glostrup, Denmark) and anti-SOD1 antibody (1:100; NCL-SOD1). Anti-GFAP antibody was visualized by anti-rabbit goat IgG coupled with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR), and anti-SOD1 antibody was visualized with anti-mouse goat IgG coupled with Alexa Fluor 568 (Molecular Probes). Stained sections were observed under an LSM-710 confocal microscope (Carl Zeiss, Gottingen, Germany).

Morphometric Analyses of Spinal Neurons and Ventral Spinal Roots

To assess the neuron populations, 100 serial (4 μm thick) sections from L5 lumbar spinal cords were prepared as described above. Every tenth section was examined by the disector method. The section was stained by the Nissl technique, and neurons in the anterior horn were counted by the disector method using the nucleolus as the leading edge on an Axio vision image analyzer (Carl Zeiss Japan) as described previously (Terao et al., 1996; West, 1999). Data were expressed as the number of neurons per volume of 400 μm thickness of unilateral ventral horn.

The L5 ventral roots were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.125 M cacodylate buffer (pH 7.4) and embedded in epoxy resin for morphometric analysis. Morphological changes and diameters of myelinated fibers with normal shape were assessed in toluidine blue-stained semithin sections. Morphological changes of myelinated fibers were assessed as described previously (Dyck et al., 1993). Abnormal fibers were those with swollen axons or with a myelin ovoid showing the figure of axonal change (Dyck et al., 1993). Normally shaped myelinated fibers were chosen manually, and their diameters were measured using a computer-assisted image analyzer (Axiovision; Carl Zeiss Japan, Tokyo, Japan), as described previously (Katsuno et al., 2002; Minamiyama et al., 2004). The results were expressed as a diameter frequency histogram per whole L5 ventral root using the data from normally shaped

fibers. The ratio of the normally shaped small fibers (<6 μm) and normally shaped large fibers ($\geq 6 \mu\text{m}$) to the number of normally shaped fibers at 10 weeks, 14 weeks, and 18 weeks of age were investigated. The ratio of the number of abnormal fibers against the normal and abnormal fibers was examined.

Immunoprecipitation and Western Blotting Analysis

Spinal cords were snap-frozen with powdered CO_2 in acetone (Katsuno et al., 2003). Frozen tissue was homogenized in ice-cold lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% NP-40), maintained at 4°C for 30 min, and centrifuged at 18,000g for 30 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant (soluble fraction) was determined by using the DC protein assay (Bio-Rad). The pellet fractions were suspended in ice-cold buffer (0.5% SDS, 8 M urea, 1% β -mercaptoethanol, 50 mM phosphate buffer, pH 7.4), homogenized 15 times, and kept at 4°C for 30 min. Samples were then centrifuged at 18,000g for 30 min at 4°C to obtain the supernatant (insoluble fraction).

Immunoprecipitation from the soluble fraction was performed with 8 μg anti-FLAG rabbit antibody (Sigma, St. Louis, MO) and Protein A/G Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology), and the precipitates were washed four times. Spinal cord lysates or immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE (5–20% gradient gel). Western blotting was performed using standard procedures as described previously (Katsuno et al., 2002; Minamiyama et al., 2004). Primary antibodies were used at the following concentrations: anti-FLAG M2, 1:1,000 (Sigma); anti-Cu-Zn SOD1, 1:5,000 (SOD-100; Stressgen, Victoria, British Columbia, Canada); anti-Dorfin, 1:1,000 (Dorfin 30; Hishikawa et al., 2003). Secondary antibody probing and detection were performed using the ECL Plus kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). Chemiluminescence signals were digitalized (LAS-3000 Imaging System; Fujifilm, Tokyo, Japan), and band intensities were quantified in Multi Gauge software version 3.0 (Fujifilm).

Statistical Analyses

Data were analyzed by Kaplan-Meier and log-rank tests for survival rate, unpaired *t*-tests for the results of RT-PCR, two-factor repeated measure ANOVA for the Rotarod and footprint, one-factor factorial ANOVA with Fisher's probability of least significant differences post hoc test for the results of immunohistochemical study with SOD1 and ubiquitin antibody, and two-factor factorial ANOVA for the other analyses (Statview version 5; Hulus, Tokyo, Japan). *P* values of 0.05 or less denoted statistical significance.

RESULTS

Dorfin Transgenic Mice

We established 20 lines of Dorfin transgenic mice and examined 10 different organs for exogenous, FLAG-tagged Dorfin mRNA expression. We assessed the number of copies of Dorfin transgene in each Dorfin Tg mouse line by Southern blotting (Fig. 1B) and quantitative RT-PCR (Fig. 1C) and selected two Dorfin Tg mouse lines for further study (513 and 526). Approximately 20 copies of the FLAG-Dorfin transgene were

TABLE I. Copy Number of Mutant SOD1 Gene*

Genotype	G93A mutant SOD1 copy number
Dorfin/G93A mSOD1 double Tg	25.2 ± 1.6
G93A mSOD1 Tg	25.0 ± 1.1

*Values are the mean ± SD, n = 72 (Dorfin/G93A mSOD1 double Tg), n = 77 (G93A mSOD1 Tg).

detected in DNA samples from each of these lines. Exogenous Dorfin was highly expressed in the spinal cord, brain, muscles, kidney, heart, and testis and was not substantially detected in the stomach, lung, spleen, or liver (Fig. 1D). We were unable to detect the exogenous Dorfin protein by Western blotting, probably because of its short half-life (Ishigaki et al., 2007). Immunoprecipitation using anti-FLAG antibody showed that exogenous Dorfin protein was detected only in the Dorfin Tg mice (Fig. 1E). We also detected Dorfin protein by immunohistochemistry with Dorfin antibody in Dorfin/G93A SOD1 double Tg mouse spinal cord sections (Fig. 1F). We did not find differences in size, body weight, gross morphology, or behavior between the Dorfin Tg mice and their littermates, indicating that Dorfin overexpression does not affect normal mouse development.

Dorfin Ameliorates Clinical Phenotypes in a Transgenic Mouse Model of ALS

To determine the potential neuroprotective role of Dorfin in mutant SOD1-related ALS, progeny of Dorfin transgenic mice (lines 513 and 526) were crossed with G93A mutant SOD1 transgenic mice [B6SJL-TgN (SOD1-G93A)1Gur] (Gurney et al., 1994). The mean copy number of the mutant SOD1 gene in mice used for examinations is shown in Table I. The same copy number was observed in Dorfin/G93A SOD1 double Tg mice and G93A SOD1 Tg mice. We determined the life span and assessed motor impairment in both lines of Dorfin/G93A SOD1 double Tg mice and G93A SOD1 Tg mice. Dorfin/G93A SOD1 double Tg mice survived significantly longer than SOD1 Tg offspring from crossings of either Dorfin Tg line (Fig. 2A). Dorfin improved the mean survival time (513 Dorfin/G93ASOD1 double Tg at 144.9 days vs. G93ASOD1 Tg at 134.4 days, $P < 0.01$; and 526 Dorfin/G93ASOD1 double Tg at 142.2 days vs. G93ASOD1 Tg at 131.7 days, $P < 0.01$) as well as the maximal life span (513 Dorfin/G93ASOD1 Double Tg at 175 days vs. G93A SOD1 Tg at 155 days and 526 Dorfin/G93ASOD1 Double Tg at 167 days vs. G93A SOD1 Tg at 148 days; Fig. 2A). Both Dorfin Tg lines showed a significant increase in the mean life span of approximately 10 days and a significant increase in maximal life span of approximately 20 days. As a measure of motor impairment, we assessed Rotarod performance and foot stride during walking. The onset of motor impairment on the Rotarod task was delayed for 1 week in both lines of Dorfin/G93A SOD1 double Tg mice, and the progression of the motor deficit was

slowed by 1–2 weeks compared with that observed in the G93A SOD1 Tg mice. Both the 513 and the 526 lines of Dorfin/G93A SOD1 double Tg mice performed significantly better than the G93A SOD1 Tg mice ($P < 0.05$, ANOVA; Fig. 2B; 513: Dorfin/G93ASOD1 double Tg 300 ± 0.0 sec vs. G93ASOD1 Tg 300 ± 0.0 sec at 10 weeks of age, 300 ± 0.0 sec vs. 278.8 sec at 14 weeks of age, 160.8 ± 34.2 sec vs. 67.8 ± 25.5 sec at 18 weeks of age; 526: 300 ± 0.0 sec vs. 300 ± 0.0 sec at 10 weeks of age, 300 ± 0.0 sec vs. 300 ± 0.0 sec at 14 weeks of age, 135.8 ± 29.8 sec vs. 86.0 ± 27.0 sec at 18 weeks of age). We analyzed the walking strides at three time points, 10 weeks (presymptomatic stage), 14 weeks (early stage), and 18 weeks of age (end stage). Both lines of Dorfin/G93ASOD1 double Tg mice showed significantly longer foot strides than the G93A SOD1 Tg mice (513: $P < 0.05$; 526: $P < 0.01$, ANOVA; Fig. 2C; 513: Dorfin/G93ASOD1 double Tg 68.0 ± 2.0 mm vs. G93ASOD1 Tg 63.0 ± 0.9 mm at 10 weeks of age, 69.7 ± 2.3 mm vs. 63.6 ± 0.9 mm at 14 weeks of age, 29.9 ± 5.8 mm vs. 20.1 ± 3.0 mm at 18 weeks of age; 526: 67.3 ± 1.8 mm vs. 67.1 ± 0.9 mm at 10 weeks of age, 63.1 ± 1.3 mm vs. 63.3 ± 1.4 mm at 14 weeks of age, 50.1 ± 5.6 mm vs. 26.0 ± 4.5 mm at 18 weeks of age).

Dorfin Ameliorates Histopathological Changes in the Transgenic Mouse Model of ALS

Dorfin ameliorated histopathological impairments in spinal neurons (Fig. 3A) and their axons in the double Tg mice (Fig. 3B). We assessed the size of the neuron population in the lumbar spinal cord and the distribution of ventral root diameters. The number of neurons in the unilateral lumbar spinal anterior horn was significantly larger in the Dorfin 526/G93ASOD1 double Tg mice than in the G93ASOD1 Tg mice examined with ANOVA ($P < 0.05$; $n = 5$). Dorfin overexpression also ameliorated histopathological changes in the ventral roots. Histograms of the diameters of myelinated fibers in the G93ASOD1 Tg mouse lumbar ventral roots showed decreases in the numbers of large myelinated fibers with age, whereas the 526 Dorfin/G93ASOD1 double Tg mice retained these large axons even at 18 weeks of age (Fig. 3B). We investigated the ratio of normally shaped small myelinated fibers ($< 6 \mu\text{m}$) and normally shaped large myelinated fibers ($\geq 6 \mu\text{m}$) to the normally shaped fibers (Fig. 3C), and the ratio of abnormally shaped fibers to the normally shaped and abnormally shaped fibers (Fig. 3D) at 10 weeks, 14 weeks, and 18 weeks of age with ANOVA. Dorfin/G93ASOD1 double Tg mice showed a significantly lower ratio of small myelinated fibers ($P < 0.05$, ANOVA) and a higher ratio of large myelinated fibers ($P < 0.05$, ANOVA) compared with G93A SOD1 Tg mice. The ratio of abnormal fibers in Dorfin/G93ASOD1 double Tg mice was significantly lower than that of G93ASOD1 Tg mice ($P < 0.05$, ANOVA).