

めた ($r = 0.70, p < 0.0001$)。重回帰分析では左室駆出率とも相関していた。

③日中の予期せぬ眠気は、全く無かった40%、たまにあった33%、時々あった13%、よくあった9%、いつもあった5%であった。年齢と罹病期間の検討では、高齢、長期例において予期せぬ眠気の頻度が増加していた。日中の予期せぬ眠気の無い症例は若年長期で26%、高齢長期で19%であった。

また、日中の予期せぬ眠気が時々以上ある群はそうでは無い群に比べてADL、重症度、認知機能、睡眠、各種自律神経不全などが広範に不良で、特に非運動機能異常では夜間頻尿や幻覚のスコアで差を認めた。ドパミンアゴニストの投与量も有意に多かった。

④ESS3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

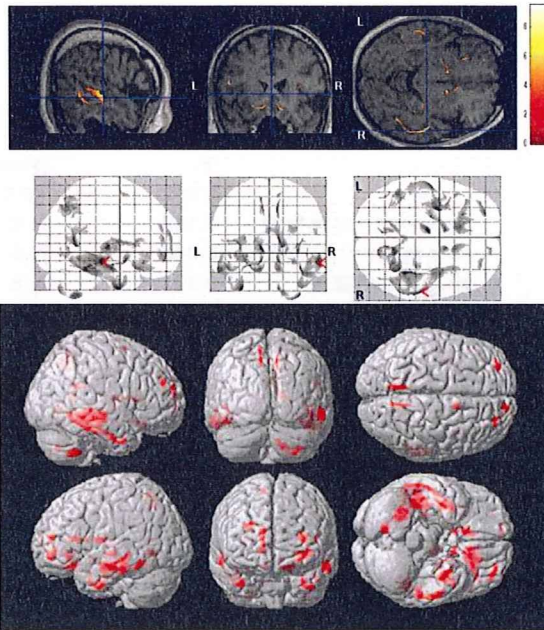
■ 眠気ありPD群の臨床特徴

	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

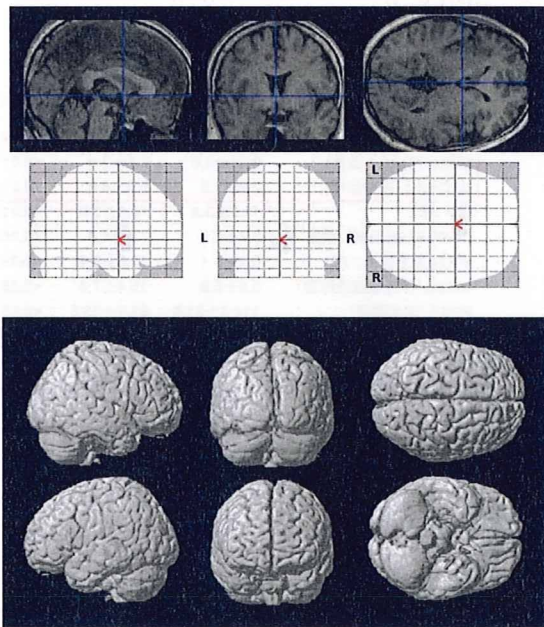
VBMによる解析では、眠気ありPD群16例とcontrol 28例と比較すると前頭葉下面や側頭葉、帯状回、辺縁系に統計学的に有意な萎縮を認めた ($p < 0.05$, FDR, Fig. 1)。

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)。

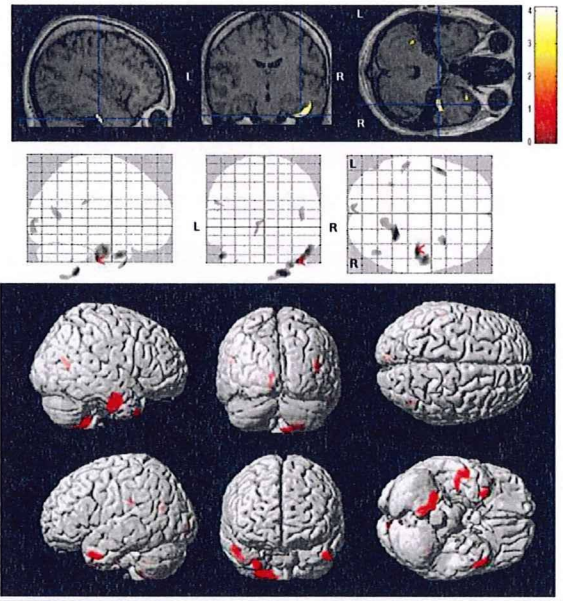
Fig. 2



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

前年度の検討で、PD では、多彩な非運動機能異常を認め、非運動機能異常を多数有するほど QOL は低下し、平均 1 年間の間隔でも QOL の変化は鬱の変化と強い相関を示すことを明らかにしてきた。本年度は、非運動機能異常をクラスター解析することで、同一の罹病期間であっても、ADL が早期に低下し、多彩な非運動機能異常を示す群と ADL は比較的保たれ、非運動機能異常を示さない群に分かれることを見いだした。このことは、広範な病変が早期に進展する群とそうではない群が存在し、その臨床・遺伝因子を見いだすことが、PD の進行とそれを抑制する治療法を見いだす上で重要であると考えられた。

平均 2 年の間隔における縦断的变化の検討でも、非運動機能の変化、中でも鬱の変化

は QOL スコアの変化と密接な関係を示した。鬱スコアの変化はパーキンソニズムが影響する可能性のある疲労感や行動開始困難よりも、自身への失望や魅力の喪失をはじめとする運動機能と関連しない項目の変化を大きいことが判明し、主治医を含めた周囲からの精神面のサポート、病状理解の推進、環境整備など、薬物以外の総合的な対策が鬱の改善、ひいては QOL の改善に結びつく可能性があり、今後の検討課題であると思われた。

薬剤の副作用対策も PD の長期治療において重要である。ドパミンアゴニストは、運動合併症の出現率がレボドパに比べて低いため、特に非高齢者においては第一選択薬となっている。しかし、高容量投与症例を中心に、近年麦角系薬剤における心臓弁膜症、非麦角系薬剤における日中の予期せぬ睡眠が大きな問題となっている。一方で、いずれも発症しない症例の多いことが知られている。また副作用発現の臨床的危険因子や遺伝因子も十分解明されていない。今回の検討では、既報告のように、麦角系アゴニスト投与群では非投与群に比べて、中等度以上の逆流を伴う弁膜症を認める症例や、軽度以上の逆流を 2 弁以上に認める症例の割合が有意に増加していた。しかし、このような弁膜症の頻度は 24%程度であり、麦角系アゴニストの蓄積量は弁の硬化の指標である tenting area や tenting distance とは関連したもの、弁膜症の重症度や composite regurgitation とは相関関係を認めなかった。高容量を長期間投与していても弁膜症を認めない症例も多数認めたことから副作用の発現を鋭敏かつ簡便にチェック出来る指標の開発が望まれる。BNP は、

心室筋で合成され、心室の負荷の増大に合わせて鋭敏に上昇することが知られているナトリウム利尿ペプチドファミリーであり、少量の採血により、商業ベースで広く解析が可能である。今回の検討では BNP は弁膜症の重症群ほど上昇し、composite regurgitation score とも高い相関関係を認めた。BNP は左室駆出率とも相関していた。近年、動物実験において、麦角系ドパミンアゴニストは弁のみならず心筋にも変性を生じることが指摘されているが、BNP は、心臓超音波検査と組み合わせることで弁膜症のみならず、心筋病変の進行を評価する良いマーカーになりうることを期待出来る。

非麦角系ドパミンアゴニストを中心とした日中の予期せぬ睡眠も交通事故や高所作業の危険性増大等との関連から重要な問題である。今回の調査でも、約 4 分の 1 の症例で時々以上の頻度で日中の予期せぬ睡眠があると答えていた。予期せぬ睡眠の危険因子として、これまでアゴニストの投与量、種類、年齢、罹病期間、重症度などの関与が指摘されてきた。我々は、これらに加え、多彩な非運動機能異常も関与することを新たに示した。特に夜間頻尿や睡眠の質の低下などの関与は大きく、薬剤以外の全身的な管理が日中の予期せぬ眠気を予防する重要であると考えられた。

今後、非運動機能異常への対策により、どの程度 QOL の改善を得ることが出来るのかを明らかにすること、非運動機能異常の広がり、鬱の発現、薬剤の副作用発現などに関連する臨床・遺伝子因子の探索が急務であると考えられる。

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。

以上から、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

①PD では進行とともに多彩な非運動機能異常を認め、鬱を中心に QOL とも密接な関連がある。

②麦角系ドパミンアゴニストの副作用である心臓弁膜症を評価する上で BNP は有用である。

③日中の予期せぬ睡眠を予防するためには非運動機能異常の改善を目指すことも重要である。

④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。

F. 研究発表

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.

Kawai Y, et al. Cognitive impairment in spinocerebellar degeneration. *Eur Neurol* 2009; 61: 257.

Watanabe H, et al. B-type natriuretic peptide and cardiovalvulopathy in Parkinson disease with dopamine agonist. *Neurology* 2009; 72: 621.

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
- Takeuchi Y, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve* 2008;38:964-71
- Kawai Y, Suenaga M, Watanabe H, Ito M, Kato K, Kato T, Ito K, Tanaka F, Sobue G. Prefrontal hypoperfusion and cognitive dysfunction correlates in spinocerebellar ataxia type 6. *J Neurol Sci* 2008;271:68-74
- Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Senda J, Kawai Y, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Fractional anisotropy values detect pyramidal tract involvement in multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 2008;271:40-6
- Kawai Y, Suenaga M, Takeda A, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Kato K, Fukatsu H, Naganawa S, Kato T, Ito K, Sobue G. Cognitive impairments in multiple system atrophy: MSA-C vs MSA-P. *Neurology*. 2008;70:1390-6
- Hori N, Takamori M, Hirayama M, Watanabe H, Nakamura T, Yamashita F, Ito H, Mabuchi N, Sobue G. Pupillary supersensitivity and visual disturbance in Parkinson's disease. *Clin Auton Res*. 2008;18:20-7.
- Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain*. 2008;131:229-39.
- Hirayama M, Nakamura T, Hori N, Koike Y, Sobue G. The video images of sleep attacks in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008;23:288-90.
- Suenaga M, Kawai Y, Watanabe H, Atsuta N, Ito M, Tanaka F, Katsuno M, Fukatsu H, Naganawa S, Sobue G. Cognitive impairment in spinocerebellar ataxia type 6. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:496-9.
- Nakamura T, Hirayama M, Ito H, Takamori M, Hamada K, Takeuchi S, Watanabe H, Koike Y, Sobue G. Dobutamine stress test unmasks cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2007;263:133-8.
- Ito M, Watanabe H, Kawai Y, Atsuta N, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Usefulness of combined

fractional anisotropy and apparent diffusion coefficient values for detection of involvement in multiple system atrophy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2007;78:722-8.

Takamori M, Hirayama M, Kobayashi R, Ito H, Mabuchi N, Nakamura T, Hori N, Koike Y, Sobue G. Altered venous capacitance as a cause of postprandial hypotension in multiple system atrophy. Clin Auton Res. 2007;17:20-5.

G. 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 1 年後予後予測指標の探索と
予後予測モデルの作成**

**研究分担者 熱田 直樹
（服部 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・予後の多様性に関与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

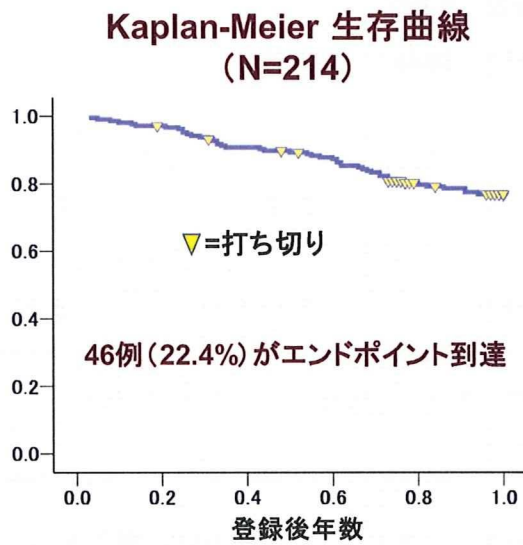
除外し、死亡もしくは TPPV 導入をエンドポイントとして 214 例の Kaplan-Meier 生存曲線を描いた。登録時に分かる情報から 1 年後のエンドポイント到達の有無を予測できるかどうかについて検討した。

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。

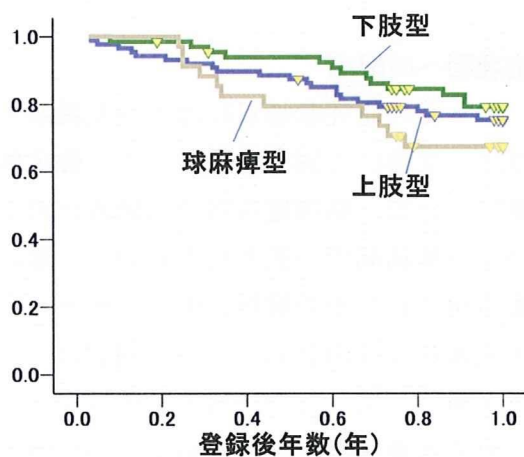
C. 研究結果

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。

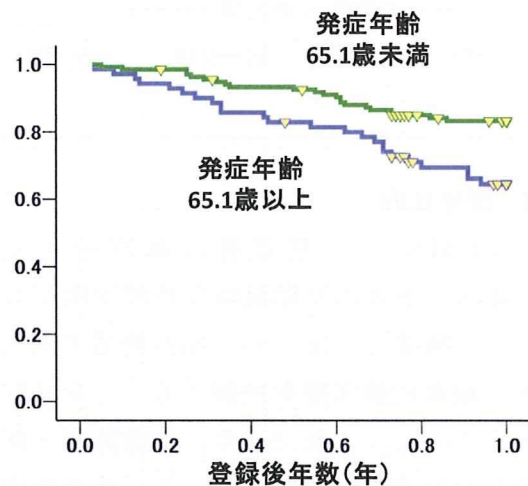
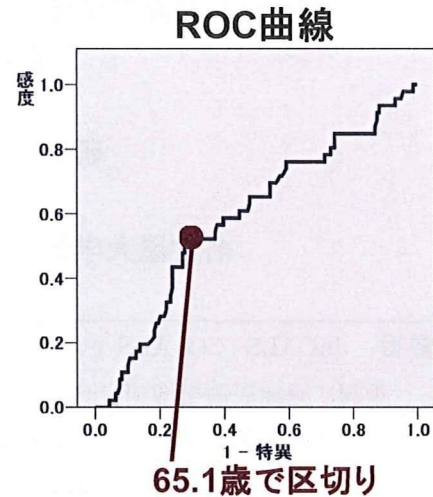
病型による進行の違いを示す。



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。



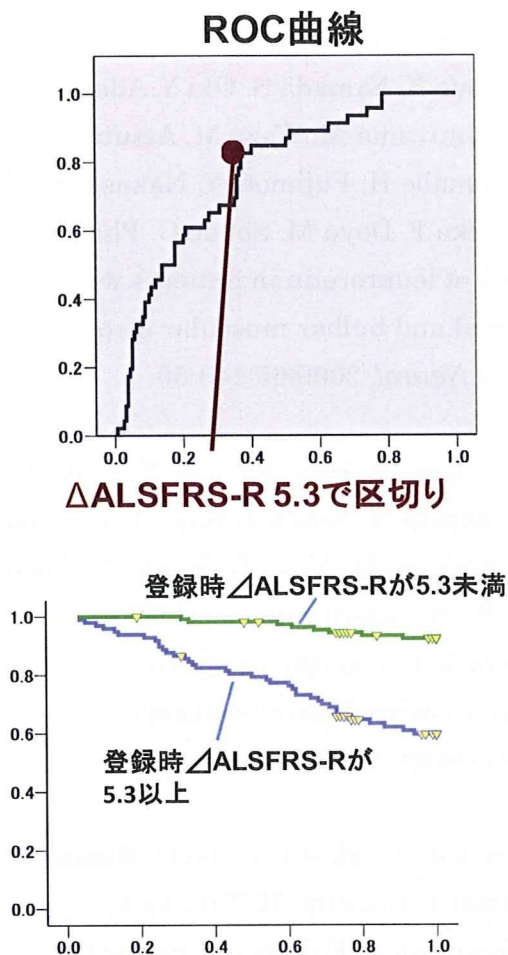
より高齢発症で進行が速い傾向が示された。

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、登録時までには年あたりどの程度 ALSFRS-R が下がったかを示すものとなる。

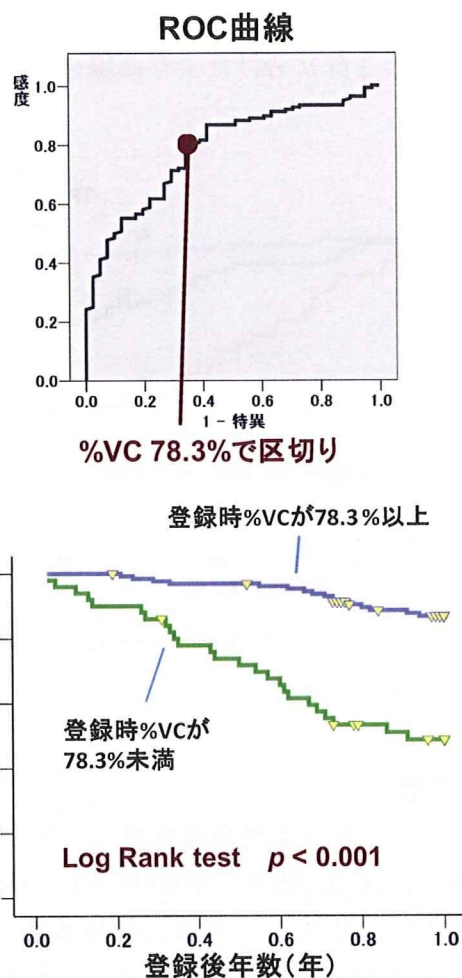
$$\Delta \text{ALSFRS-R} = \frac{48 - \text{登録時 ALSFRS-R}}{\text{発症} \sim \text{登録までの期間(年)}}$$

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一年後予後予測できることが示された。

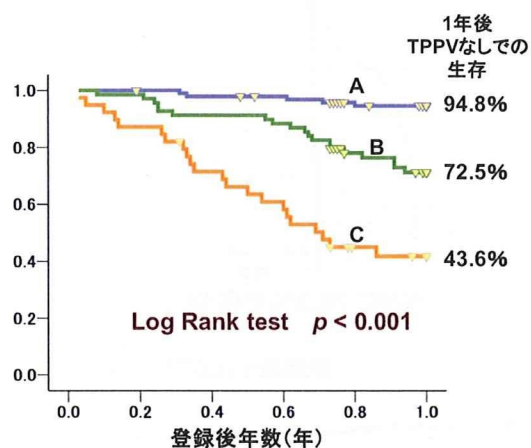


次に Cox 比例ハザードモデルを用いて 1 年後予後に影響を与える因子を解析した。性別、病型、喫煙歴、登録時%VC、登録時 ALSFRS-R、登録時 Δ ALSFRS-R の各因子からステップワイズ法を用いて有意に影響している因子を抽出した。その結果、登録時%VC ($p < 0.001$)、登録時 Δ ALSFRS-R ($p = 0.003$)、発症年齢 ($p = 0.027$) の 3 つが抽出された。前 2 者を用いて予後予測モデルを作成した。

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

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;65:140-50.

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;72:621-6.

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: 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
Takeuchi Y, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G	Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy.	Muscle Nerve	38	964-71	2008
Kawai Y, Suenaga M, Watanabe H, Ito M, Kato K, Kato T, Ito K, Tanaka F, Sobue G	Prefrontal hypoperfusion and cognitive dysfunction correlates in spinocerebellar ataxia type 6	J Neurol Sci	271	68-74	2008
Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Senda J, Kawai Y, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G	Fractional anisotropy values detect pyramidal tract involvement in multiple system atrophy	J Neurol Sci	271	40-6	2008
Kawai Y, Suenaga M, Takeda A, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Kato K, Fukatsu H, Naganawa S, Kato T, Ito K, Sobue G	Cognitive impairments in multiple system atrophy: MSA-C vs MSA-P.	Neurology	70	1390-6	2008
Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G	CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA.	Brain	131	229-39	2008
Hori N, Takamori M, Hirayama M, Watanabe H, Nakamura T, Yamashita F, Ito H, Mabuchi N, Sobue G	Pupillary supersensitivity and visual disturbance in Parkinson's disease.	Clin Auton Res	18	20-27	2008
Hirayama M, Nakamura T, Hori N, Koike Y, Sobue G	The video images of sleep attacks in Parkinson's disease.	Mov Disord	23	288-290	2008

Iwasaki Y, Yoshida M, Hashizume Y, Hattori M, Aiba I, Sobue G	Widespread spinal cord involvement in progressive supranuclear palsy. Neuropathology.	Neuropathology	27	331-340	2007
Nakamura T, Hirayama M, Ito H, Takamori M, Hamada K, Takeuchi S, Watanabe H, Koike Y, Sobue G	Dobutamine stress test unmasks cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease.	J Neurol Sci	263	133-138	2007
Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1.	J Biol Chem	282	28087-28095	2007
Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G	Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	J Neuropathol Exp Neurol	66	617-627	2007
Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model.	J Neurosci	27	5115-5126	2007
Adachi H, Waza M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy.	Neuropathol Appl Neurobiol	33	135-151	2007
Ito M, Watanabe H, Kawai Y, Atsuta N, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G.	Usefulness of combined fractional anisotropy and apparent diffusion coefficient values for detection of involvement in multiple system atrophy.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	78	722-728	2007

Yang Z, Chang YJ, Yu IC, Yeh S, Wu CC, Miyamoto H, Merry DE, Sobue G, Chen LM, Chang SS, Chang C	ASC-J9 ameliorates spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via degradation of androgen receptor.	Nat Med	13	348-353	2007
Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G	Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity.	Neurobiol Dis	25	331-341	2007
Takamori M, Hirayama M, Kobayashi R, Ito H, Mabuchi N, Nakamura T, Hori N, Koike Y, Sobue G	Altered venous capacitance as a cause of postprandial hypotension in multiple system atrophy.	Clin Auton Res	17	20-25	2007

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-

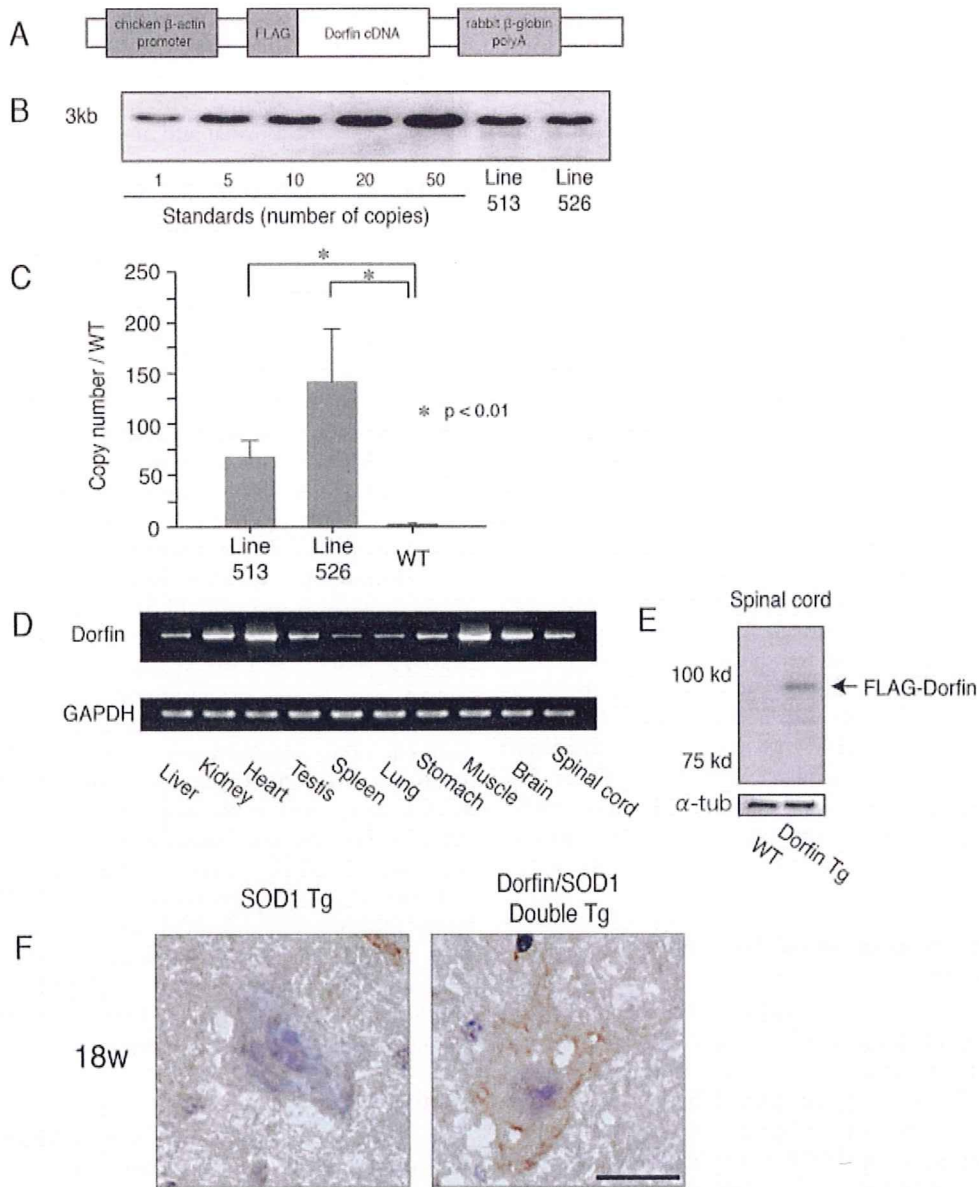


Fig. 1. Dorfin transgenic mouse. **A:** Schematic view of the transgene constructs. The microinjected fragment was composed of a chicken β -actin promoter, a FLAG-tagged Dorfin, and a rabbit β -globin polyadenylation signal sequence (poly-A). **B:** Southern blot analysis of Dorfin transgenic mouse tail 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°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