

神経変性疾患の RNA 干渉による治療法の開発

—脳血管内皮細胞を標的として—

研究分担者 水澤 英洋

研究協力者 桑原 宏哉，仁科 一隆，吉田 規恵，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、配列特異的な遺伝子発現抑制法として強力なツールであり、将来の臨床応用が期待されている。しかし、生体内での効果的な short interfering RNA (siRNA) のデリバリー法は確立されていない。脳血管内皮細胞が病態形成の場として重要な役割を果たしているアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症といった神経変性疾患の治療への応用を念頭に、静脈内投与にてすでに肝臓へのデリバリーが確認されている cholesterol (Chol) 結合 siRNA を用いて、脳血管内皮細胞へのデリバリー法の開発を行った。脳の中で血管内皮細胞に特異的に発現する organic anion transporter 3 (OAT3) をターゲットとした Chol 結合 siRNA をデザインし、マウス血清より超遠心法で採取した high density lipoprotein (HDL) 分画と混合してマウス尾静脈より 12 時間おきに 3 回投与したところ、マウス全脳より得られた RNA からの定量的 RT-PCR 解析により、約 50% の OAT3 発現抑制が得られた。Chol 結合 siRNA は、HDL に取り込まれることにより脳血管内皮細胞にデリバリーされ、遺伝子発現を抑制できると考えられた。

A. 研究目的

RNA 干渉は、標的遺伝子の mRNA を配列特異的に切断することでその遺伝子発現を抑制するという多くの生物種に見られる生命現象で、遺伝子発現抑制法の強力なツールとして臨床応用が期待されている。しかし生体内における short interfering RNA (siRNA) の効果的なデリバリー法は確立されていない。今までに、ウイルスベクターやハイドロダイナミクス導入法、カチオニックリポソーム、ナノパーティクルといったデリバリー法が開発されているが、効果的かつ安全な治療法として応用されるまでには至っていない。

脳血管内皮細胞は、多発性硬化症をはじめとした免疫性神経疾患や脳血管障害以外にも、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症といった神経変性疾患において、病態形成に重要な役割を果たしていることが知られている。脳血管内皮細胞への siRNA のデリバリーが可能になれば、これらの疾患の治療法

として応用が期待されるが、今までに報告されているデリバリー法は、現実的には応用困難なハイドロダイナミクス導入法のみである。

全身投与による肝臓へのデリバリー法としては、cholesterol (Chol) あるいは α -tocopherol といった脂質を結合した方法が報告されており、特に Chol 結合 siRNA では、high density lipoprotein (HDL) を介する機序が示唆されている。

我々は、Chol 結合 siRNA の静脈内投与によるマウス脳血管内皮細胞へのデリバリーの可否につき、リポ蛋白の寄与も含めて検討を行った。

B. 研究方法

脳内では血管内皮細胞に特異的に発現する organic anion transporter 3 (OAT3) の mRNA をターゲットとした 21-23 塩基の化学修飾 siRNA を設計し、センス鎖の 3'末端に Chol を共有結合した Chol-siRNA、および non-Chol-siRNA を合成した。

まず、静脈内に投与した siRNA の脳内での分布を検討するため、蛍光色素である Cy3 を標識させた Chol-Cy3-siRNA および non-Chol-Cy3-siRNA を単独で、またはマウス血清から超遠心法で採取した HDL 分画や LDL 分画と混合した上で、マウス尾静脈から 24mg/kg で静注した。1 時間後に脳を摘出し、固定後に凍結切片を作成し、血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand 因子 (vWF) の抗体を用いた免疫染色および Hoechst 核染色を指標として、共焦点顕微鏡にて観察した。

次に、siRNA に Chol を結合することによるターゲット mRNA の切断活性への影響につき、*in vitro* における検討を行った。OAT3 の発現していない Neuro2A 細胞に ① *Renilla luciferase* 融合 OAT3 RNA 発現プラスミド ② *Firefly luciferase* 発現プラスミド ③ Chol-siRNA または non-Chol-siRNA を同時に transfection し、24 時間後に各 luciferase 活性を測定して *Firefly luciferase* 活性に対する *Renilla luciferase* 活性の比率を算出することで、OAT3 発現量の変化を評価した (n=3)。

その上で、Chol-siRNA を静脈内投与した場合の *in vivo* における効果を検討した。マウスに Chol-siRNA 10mg/kg を単独で、あるいは HDL 分画・LDL 分画と混合した上で、12 時間おきに 3 回尾静脈から投与し、最終投与から 6 時間後に脳を採取した (n=4)。1 回に投与する siRNA と各リポ蛋白分画の混合比率は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による評価で全ての Chol-siRNA がリポ蛋白に取り込まれたと考えられた「siRNA 1nmol に対してリポ蛋白分画 10 μ l」の割合とした。脳より RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法により OAT3 mRNA 発現量の変化を評価し、得られた結果を Student's *t*-test により統計学的に解析した。

(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

まず、Cy3 標識 siRNA を静脈内投与した場合の脳組織標本では、non-Chol-Cy3-siRNA を投与した場合には、脳のいずれの部位にも Cy3 シグナルが見られなかったのに対し、Chol-Cy3-siRNA を単独で投与した場合および Chol-Cy3-siRNA を HDL 分画と混合して投与した場合には、脳の全ての部位で血管に沿った Cy3 シグナルが観察された (図 1)。強拡大での観察において、Cy3 シグナルは vWF 抗体で染色された部位と共局在していた (図 2)。

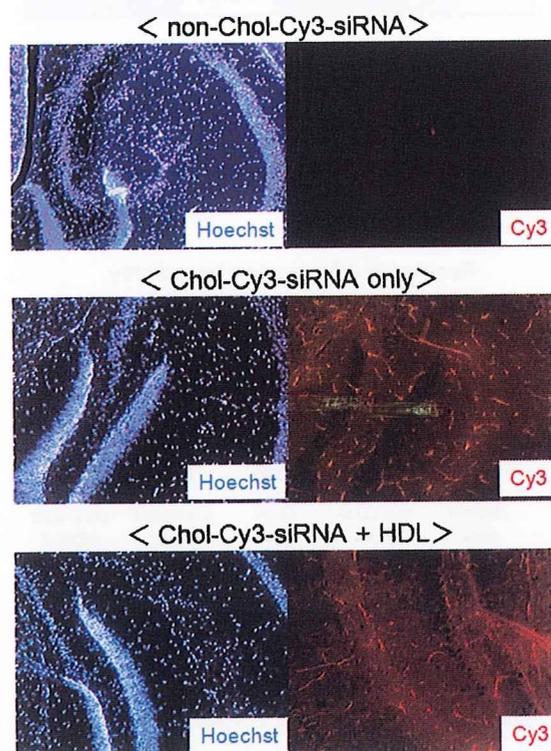


図 1 海馬組織所見 (×100)

Chol-Cy3-siRNA を単独で投与した場合と HDL 分画と混合して投与した場合には脳血管に沿った Cy3 シグナルが観察された

次に、*in vitro* における siRNA の OAT3 mRNA 切断活性の評価では、plasmid only の群 (siRNA は transfection せず) を基準として、non-Chol-siRNA では約 90%、Chol-siRNA では約 86%の発現抑制が観察された。異なるターゲットに対する 2 種類の unrelated siRNA では、遺伝子発現抑制は見られなかった (図 3)。

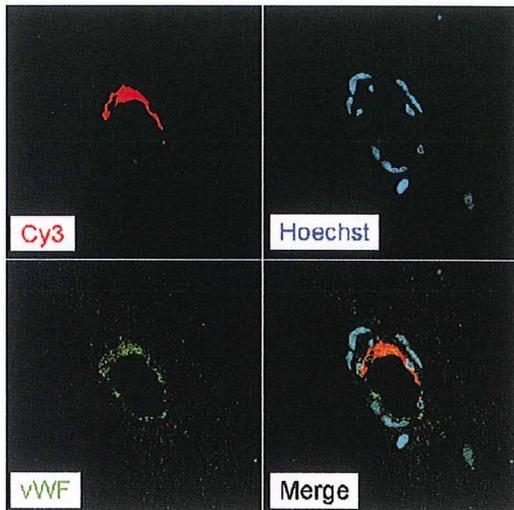


図2 Chol-Cy3-siRNA 投与マウスの線条体組織所見 (×1000)

Cy3 シグナルは vWF の染色部位と共局在した

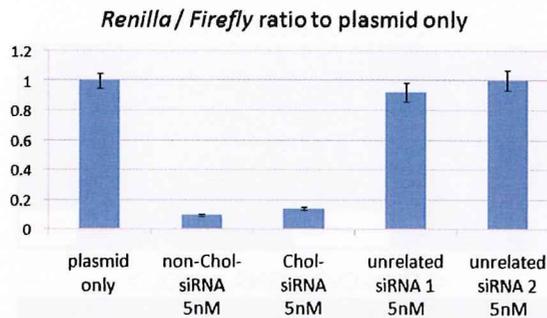


図3 OAT3 mRNA 切断活性

non-Chol-siRNA よりはわずかに劣るものの Chol-siRNA は高い遺伝子発現抑制を示した

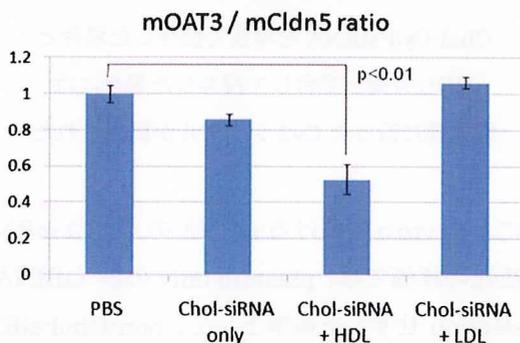


図4 マウス全脳からの RT-PCR

Chol-siRNA を HDL 分画と混合した場合のみ有意な OAT3 mRNA 発現抑制を認めた

そして、Chol-siRNA を静脈内に投与したときの *in vivo* の評価では、Chol-siRNA を単独で投与した場合、および LDL 分画と混合して投与した場合には OAT3 の発現にほとんど変化は見られなかったのに対し、HDL 分画と混合して投与した場合には約 50% の OAT3 mRNA 発現抑制が観察され、他の群と比較して統計学的に有意差を認めた (図 4)。

D.考察

今回、Chol-siRNA の遺伝子発現抑制効果を検証するために、OAT3 をターゲット遺伝子として設定した。OAT3 は、脳の中では血管内皮細胞に特異的に発現していると考えられており、血液脳関門においてドパミン代謝物や一部の薬剤などの排出輸送に寄与するトランスポーターである。従って、脳血管内皮細胞において OAT3 の発現を制御することは、中枢作動薬の薬理効果の発現や中枢神経疾患の病因の解明に貢献すると思われる。

まず、Cy3 標識 siRNA を静脈内投与してマウス脳組織標本を観察した結果から、siRNA は Chol と結合することにより脳血管内皮細胞の細胞質に到達できるということが推察された。

Chol-siRNA のターゲット mRNA 切断活性を *in vitro* で評価した結果からは、non-Chol-siRNA よりはわずかに劣るものの、Chol-siRNA が高い遺伝子発現抑制を示し、さらに unrelated siRNA においては発現抑制が見られなかったことから、今回用いた siRNA の配列特異性が確認できた。

Chol-siRNA をリポ蛋白分画と混合してマウスに静脈内投与した結果からは、HDL 分画と混合した場合にのみ OAT3 発現抑制が観察されたことから、HDL に取り込まれた Chol-siRNA が細胞膜の HDL 受容体を介して脳血管内皮細胞にデリバリーされた (receptor-mediated uptake) 可能性が示唆された。それに対して、Chol-siRNA を単独で静脈内投与した場合には、血液中の HDL に一部が取り込まれて細胞内にデリバリーされる可能性も考えられるが、macropinocytosis などの受容体を介さない機序により細胞内に入ることも想定される。HDL 分画との

混合の有無による *in vivo* での発現抑制の差異については、細胞内への uptake の機序の違いが関与しているかもしれない。つまり、受容体を介する機序の方が効率的に細胞内にデリバリーされやすい、といった可能性が考えられる。

本研究で用いたデリバリー法の大きな特徴は、通常の静脈内投与でよいということと、生体内におけるリポ蛋白の内在性経路を利用した生理的な方法と考えられることにある。デリバリーの機序の解明や生体内での効果の最適化は今後の課題であるが、現実的に臨床応用が可能な脳血管内皮細胞への siRNA のデリバリー法として、将来的に神経変性疾患の新たな治療法としての応用が期待される。

E. 結論

siRNA に Chol を結合させ、リポ蛋白の内在性経路を利用することにより、通常の静脈内投与で脳血管内皮細胞への siRNA のデリバリーができ、遺伝子発現抑制を誘導することができると考えられた。将来的に、脳血管内皮細胞をターゲットとした神経変性疾患に対する新たな治療法として応用できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishida Y, et al. *J Biol Chem* 284: 33400-33408, 2009

Sasaguri H, et al. *FEBS lett* 583: 213-218, 2009

西田陽一郎, 他. *Clin Neurosci* 26: 1111-1113, 2008

2. 学会発表

桑原 宏哉, 他. 第 50 回日本神経学会総会, 2009

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

脊髄前角におけるニューロン再生環境の検討

研究分担者 阿部康二

研究協力者 宮崎一徳，永井真貴子，森本展年，倉田智子，太田康之，武久康，池田佳生，松浦徹

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)における再生医療を行ううえで、ニューロン周囲の再生環境を考慮する必要があるが、ALS 脊髄においてはこれまで十分に検討されていない。そこで、ニューロンを取り囲む細胞外マトリックスの中で、再生促進や阻害に関与する蛋白質の発現パターンを ALS モデルマウスの脊髄で経時的に観察し、ニューロン周囲の再生環境を評価した。また、シナプス部位で実際に再生が行われているかを検討した。ALS モデルマウスの脊髄前角では病態の進行と共に再生促進因子 γ 1Laminin の増加と再生阻害因子 Sema3A の減少がみられ、ニューロン周囲の環境は必ずしも再生にとって不利ではないことが示唆された。一方、シナプス部位では再生部位に発現する蛋白である GAP43 は上昇したが、実際のシナプスを反映する synaptotagmin1 は減少し、効果的なシナプス再生には至っていないことが示唆された。

A. 研究目的

ALS における再生医療の一つとして神経栄養因子等の補充により内因性神経幹細胞を賦活化させる研究が進んでいる。内在性の神経幹細胞は増殖、分化した後、運動ニューロンとして機能を果たすためには軸索伸長し、さらに周囲のニューロンとシナプス形成を行い接続が行われなければならない。

一方、成体の中枢神経系では数々の再生を阻害する物質が存在しており、再生が起りにくいことが報告されており、再生医療を考える上でニューロン周囲の環境を再生の適した状態に整えることは非常に重要であると考えられる。しかし、ALS 脊髄ニューロン周囲の再生環境についてこれまで十分に検討されていない。

そこで、我々はニューロンを取り囲む細胞外マトリックスの中で、軸索伸展促進に働く γ 1Laminin、軸索伸展阻害に働く Sema3A の発現量や空間的な分布を ALS モデルマウスの脊髄で経時的に観察し、軸索再生環境を評価した。また、軸索、シナプスの再生部位に発現する GAP43 と実際のシナプス部位に発現する Synaptotagmin1 の発現パターンを調べるこ

とで、シナプス再生が行われているかを調べた。

B. 研究方法

実験には ALS のモデル動物である G93A トランスジェニック (Tg) マウスおよびコントロールとして同週同腹子のワイルドタイプ (WT) を用いた。Tg マウスは 14 週齢頃から運動機能の低下が見られ、19 週齢頃に死亡する。そのため、10 週を ALS 発症前モデル、15 週を発症初期モデル、18 週を ALS 末期モデルとした。

各個体から採取した脊髄を中心管に沿って腹側部と背側部に切り分け、ウェスタンブロット解析を行い、軸索伸展促進、ニューロン保護などの機能を有し、再生促進に働くと考えられる γ 1Laminin と、軸索再生阻害や成長円錐崩壊などの機能を有し、再生阻害に働くと考えられる Sema3A の経時的な発現量の変化と詳細な分布を調べた。また、脊髄切片を作製し、免疫染色を行い、空間的な分布を調べた。

次に、再生部位に発現する GAP43 と実際のシナプス数を反映する Synaptotagmin1 の蛍光免疫染色を行い、発現パターンの変化を調べた。

C. 研究結果

初めに再生促進に働くと考えられている γ 1Laminin の蛋白量と分布の変化を調べた。ウェスタンブロット解析を行い再生促進因子である γ 1Laminin の蛋白量の経時的な変化を調べたところ、Tg のマウスの腹側部では病態の進行に伴い有意な増加が認められた。一方、Tg マウス脊髄背側部において18週でのみ有意な上昇が見られた。

また、免疫染色を行い γ 1Laminin の空間的分布を調べたところ、Tg マウスでは15週から18週にかけて前角のニューロピルで γ 1Laminin の染色性が上昇していき、 γ 1Laminin 陽性の小さな細胞が認められるようになった。そこで蛍光多重染色を行い、 γ 1Laminin 陽性の細胞種を調べたところ GFAP 陽性のアストロサイトとマージしたため、アストロサイトが γ 1Laminin を発現していることが確かめられた。次に再生阻害因子と考えられている Sema3A の蛋白量と分布の変化を調べた。ウェスタンブロット解析を行い Sema3A の蛋白量を定量したところ Tg マウ

スの腹側部において15週から18週にかけて有意な減少が見られた。一方脊髄背側部においては有意な変化は認められなかった。また、免疫染色を行い Sema3A の空間的分布を調べたところ、Tg マウスでは15週から18週にかけて脊髄前角のニューロピルで Sema3A の減少が認められた。一方、同時期に Sema3A 陽性のリアクティブアストロサイト様細胞が見られるようになった。そこで GFAP 抗体を用いて多重染色を行ったところ、Sema3A 陽性細胞と GFAP 陽性細胞が一致したため、アストロサイトが Sema3A を発現していることが確認できた。

再生促進因子 γ 1Laminin の上昇と再生阻害因子 Sema3A の減少という結果を受け、次に軸索、シナプスの再生部位に発現する GAP43 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、実際に再生が起こっているかを調べた。GAP43 は WT マウスでは灰白質に均一に分布しており、週齢による変化は見られなかった。Tg マウスでは10週で WT マウスと同様の発現パターンが見られたが、15週、18週にかけて GAP43 の著しい上昇が二

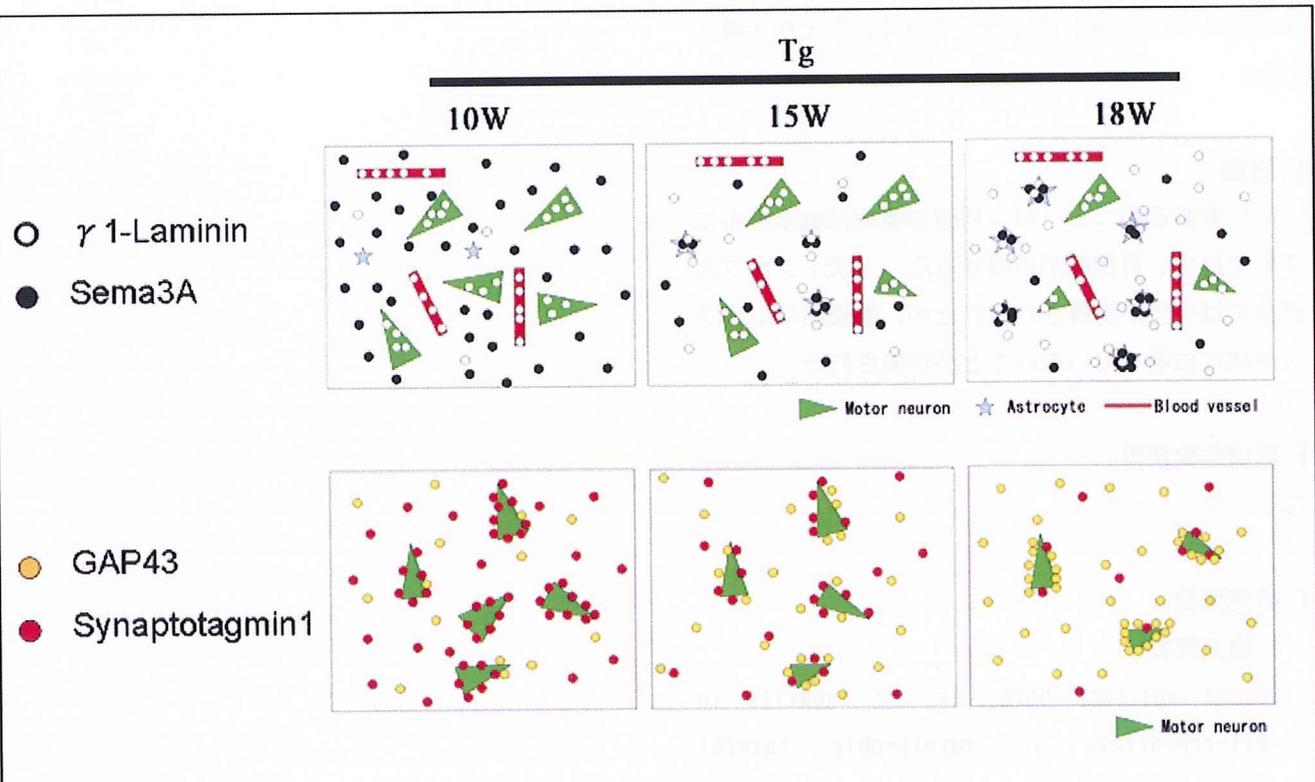


図 結果のまとめ

脊髄前角のニューロピルで γ 1ラミニンの上昇と γ 1Laminin の減少が見られた(上段)。脊髄前角のニューロン周囲では GAP43 の上昇と、Synaptotagmin1 の減少が見られた(下段)。

ニューロピルの特に運動ニューロン周囲で見られた。

GAP43の結果からはシナプス部位で再生が行われていることが示唆されたため、次にシナプス再生が起こっているかを確認するため、シナプス部位に発現する Synaptotagmin1 抗体を用いて、実際のシナプス数を確かめた。WT マウスで Synaptotagmin1 の発現は主に大型 MN の周囲で見られた。Tg マウスでは 10 週では WT マウスの発現パターンとほぼ同じであったが、15 週、18 週にかけてニューロピルの特に運動ニューロン周囲で減少していった。

D. 考察

Tg マウスでは 15、18 週にかけて脊髄前角のニューロピルで再生促進因子の γ 1Laminin の上昇と Sema3A の減少が確認できたため、ニューロン周囲の環境は必ずしも再生にとって不利ではないことが示唆された。また、軸索、シナプス再生部に発現する GAP43 は病態の進行に伴い主に運動ニューロン周囲で発現増加が認められたが、実際のシナプス数を反映する Synaptotagmin1 は同部位で減少したため、効果的なシナプス再生には至っていないことが示唆された。

E. 結論

ALS 脊髄運動ニューロン周囲の環境は軸索再生に不利ではない可能性が示唆された。また、シナプス部位では再生が誘導されていたが、効果的なシナプス形成には至っていないことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Spinal anterior horn has the capacity to self-regenerate in amyotrophic lateral sclerosis model mice.

J Neurosci Res. 87(16):3639-48. 2009

2. 学会発表

第 32 回日本神経科学大会

H. 知的財産権の出願・登録状況（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と解析

研究分担者 高橋良輔^{1),2)}

研究協力者 田代善崇^{1),2)}, 井上治久^{2),3)}, 山崎真弥⁴⁾, 阿部学⁴⁾,
伊東秀文¹⁾, 三澤日出巳⁵⁾, 崎村建司⁴⁾

- 1) 京都大学医学研究科臨床神経学, 2) JST-CREST,
3) 京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター,
4) 新潟大学脳研究所基礎神経科学部門, 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おり、これらの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遺伝子改変マウスを樹立した。この系を用いて運動ニューロン特異的に UPS 機能障害を起こすマウスを作製し解析を行ったところ、8 週齢以降に振戦様の症状を認め、行動解析では、ロタロッドで運動機能低下、及び握力低下が認められた。また、神経病理学所見では、ChAT 陽性細胞にて、Rpt3 発現レベルの低下と Ubiquitin 発現の上昇を認められた。これにより、運動ニューロン特異的 UPS 機能障害によって引き起こされる細胞内機能障害は、運動ニューロン変性を伴う運動機能障害を引き起こすことが判明した。今後、このマウスの解析をさらに進め、ヒト ALS の病態との関連を明らかにする。

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には異常タンパク質の蓄積・分解系に関わる異常タンパク質の発現など、病因がタンパク質分解に関わることが示唆される疾患が多く存在する。今回の研究で、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)に着目し、運動ニューロン特異的に UPS を欠損させたマウスを作製することで、ALS モデルの確立と解析を行うこととした。

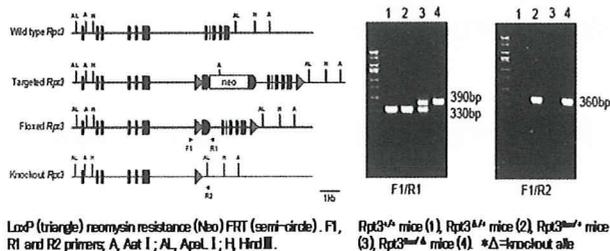
B. 研究方法

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、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)系を確立した。運動ニューロン特異的に Cre を発現する VACHT-Cre マウスと交配

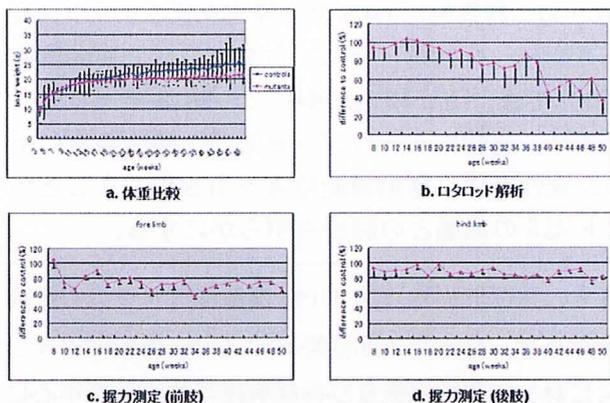
させ、目標部位特異的 UPS 機能障害マウスの作製を行った。得られた部位特異的 UPS 機能障害マウスに対して運動機能及び神経病理学的所見を中心に表現型の解析を行った。動物の取り扱いについては、京都大学医学部動物実験ガイドラインを遵守し、動物委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

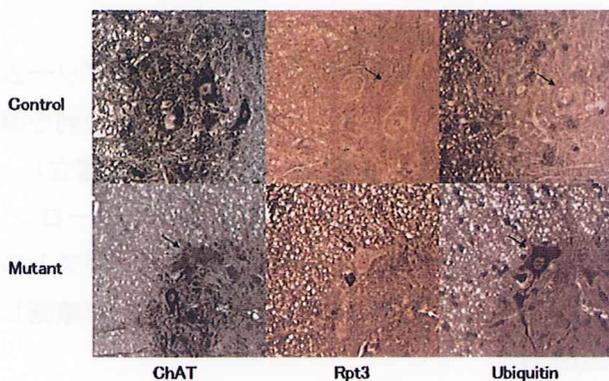
Cre-loxP システムを用いて、26S プロテアソーム構成ユニットの一つである Rpt3 に loxP 配列を導入したマウス(floxed Rpt3 マウス)の系を確立した。floxed Rpt3 マウスに対し、運動ニューロン特異的に Cre を発現する VACHT-Cre マウスとの交配を行い、産仔が正常に出生することを確認した(図 1)。



今回獲得した運動ニューロン特異的 UPS 機能障害マウスに対して運動機能解析・病理解析を行った。8 週齢において、振戦様の症状が認められた。運動機能解析として、体重比較を行ったところ、コントロールと比較して減少傾向にはあったが、有意差は認められなかった。ロタロッド装置を用いた解析では 20 週齢以降に運動機能の低下が認められ、握力測定を行ったところ、20 週齢以降から前肢・後肢ともに握力低下が認められ 80%程度に低下していた (図 2)。



病理解析を行ったところ、6 週齢のマウス脊髄にて、運動ニューロンの相当する ChAT 陽性細胞において、同じ細胞で Rpt3 の発現減少と Ubiquitin の蓄積が認められた (図 3)。



D. 考察

運動ニューロン特異的に Cre を発現する VACHT-Cre と floxed Rpt3 マウスの交配によって部位特異的 Rpt3 欠損マウスを作製した。このマウスは 8 週齢以降に振戦様症状を示した。行動解析ではロタロッド測定による運動機能低下、握力低下が観察された。また、病理解析として、ChAT 陽性細胞にて、Rpt3 発現レベルの低下と Ubiquitin 発現の上昇を確認した。これらの現象は、Cre による Rpt3 遺伝子の欠失によって、細胞内に残存する Rpt3 タンパク質の減少が起こり、UPS 機能障害が引き起こされた結果であると考えられる。この UPS 機能障害を生じた細胞において UPS シグナルである Ubiquitin の蓄積の確認や、神経機能障害からの運動機能異常が認められたものと考えられる。

E. 結論

Cre-loxP システムを用いて、UPS の 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 マウス系の確立を行った。このマウスを用いて、下位運動ニューロン特異的に Cre を発現する VACHT-Cre マウスとの交配を行ったマウスを作製したところ、表現型、運動機能異常、病理解析変化を確認した。本運動ニューロン特異的 Rpt3 欠損マウスの呈した振戦様症状及び運動機能障害は、運動ニューロン内の Rpt3 減少に伴う神経変性、神経細胞機能障害によるものであると示唆され、これによりタンパク分解経路の一つである UPS の機能障害は神経変性疾患、特に ALS にも深く関わっている可能性がある。今後、更にヒト ALS 病理所見との比較検討を行い、UPS 障害と ALS との関連を明らかにする。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K,

Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S.(2009) Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J Neurosci Res.* 87:576-85.

Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, Takahashi R, Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A.(2009) N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio. *J Neurochem.* 108(2):350-60.

Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R.(2009) Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach. *Auton Neurosci.* 146:33-5.

Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R, Kawamura T.(2009) Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease. *Eur J Neurol.* 16, 174-82.

Ikeda A, Hirasawa K, Kinoshita M, Hitomi T, Matsumoto R, Mitsueda T, Taki JY, Inouch M, Mikuni N, Hori T, Fukuyama H, Hashimoto N, Shibasaki H, Takahashi R. Negative motor seizure arising from the negative motor area: is it ictal apraxia? *Epilepsia.* 50, 2072-84.

Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R, Tomimoto H.(2009) Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. *Neuroreport.* 20, 990-6.

Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T.(2009) Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer.* 125, 2029-35.

Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, Takahashi R.(2009) Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice. *Brain Res.* 1294:202-10.

Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara

M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R. (2009) Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). *Intern Med.* 48, 1307-9.

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, Takahashi R.(2009) A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. *Neurosci Res.* 65, 263-71.

Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, Takahashi R.(2009) Mutations in LGII gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: The first report from Asian families. *Epilepsia.* 2009 Sep 22. [Epub ahead of print]

Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsubashi M, Takahashi R, Fukuyama H.(2009) Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Clin Neurophysiol.* 120, 1923-6.

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, Takahashi R.(2009) Loss of PINK1 in medaka fish (*Oryzias latipes*) causes late-onset decrease in spontaneous movement. *Neurosci Res.* in press.

Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S, Sawada H.(2009) Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Nov 11. [Epub ahead of print]

Takahashi R. (2009) Edaravone in ALS. (commentary) *Exp Neurol.* 217:235-6

Inoue H, Kondo T, Lin L, Mi S, Isacson O, Takahashi R.(2009) Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative Diseases, In **Protein folding and misfolding: neurodegenerative diseases**, ed. Ovadi, J.

高橋良輔 (2009) : パーキンソン病の神経細胞移植治療、日本医事新報、4445、79-80

村上 学、井上治久、高橋良輔 (2009) : 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略、ファルマシア、45、1009-1112

2.学会発表

高橋良輔：孤発性パーキンソン病の病因：環境要因とリスク遺伝子。第50回日本神経学会総会、仙台（2009.5.22）

高橋良輔：パーキンソン病の最新の治療と展望。平成21年度日本内科学会生涯教育講演会、仙台（2009.9.6）

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子メカニズムー神経保護治療に向けてーシンポジウム「神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」、第32回日本神経科学学会、名古屋（2009.9.18）

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

Derlin-1 は変異 SOD1 の小胞体内蓄積と小胞体ストレスを軽減する

研究分担者 内野 誠

研究協力者 森 麗, 山下 賢, 木村 円, 前田 寧, 平野 照之

熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野

研究要旨

変異 SOD1 マウスでは変異 SOD1 が運動神経の小胞体 (ER) に蓄積し、ER ストレスによってアポトーシスをきたす。この ER 内への変異 SOD1 の選択的蓄積が、運動神経変性のトリガーである可能性に着目し、小胞体関連分解に関わる Derlin-1 が変異 SOD1 に及ぼす影響として、変異 SOD1 の小胞体内蓄積の軽減および毒性軽減効果について検討した。培養神経細胞において Derlin-1 は野生型および変異型 SOD1 と共局在した。Derlin-1 は、野生型および変異型 SOD1 の一過性および安定発現細胞において細胞内 SOD1 蛋白量の低下をもたらしたが、SOD1 mRNA レベルに影響しなかった。さらに Derlin-1 は変異 SOD1 の毒性を軽減し、これらのマイクロソーム分画で SOD1 含量が低下し、ER ストレスマーカーの軽減がみられた。Derlin-1 は細胞質への逆行性輸送を促進することで変異蛋白の小胞体蓄積を軽減し、ER ストレスを緩和する可能性が示された。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

C. 研究結果

1) 野生型および変異型 SOD1 は Derlin-1 と共局在する。

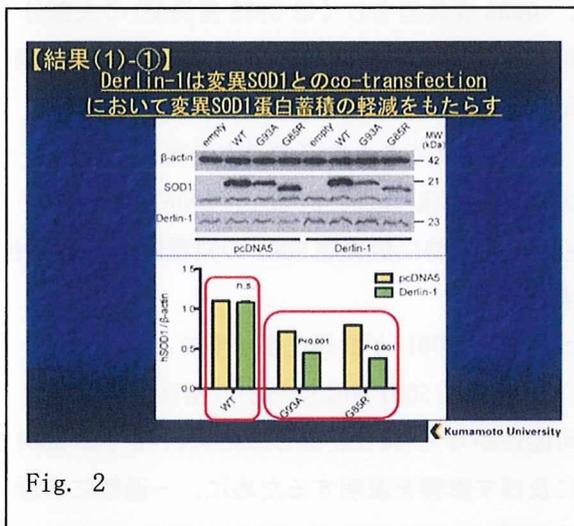
NB2a 細胞に、Derlin-1 および各種 SOD1 (野生型、G93A 変異型もしくは G85R 変異型) 発現ベクターを Lipofectamine 2000 を用いて一過性発現した。Derlin-1 と SOD1 の細胞内局在を明らかにするために、抗 SOD1 および抗 Derlin-1 抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡下に観察したところ、Derlin-1 は網状の構造を呈し、ER を示唆する染色パターンと考えられた (Fig. 1)。一方、各種 SOD1 (野生型、G93A 変異型もしくは G85R 変異型) の大部分は細胞質に局在するものの、一部は Derlin-1 と共局在を示した (Fig. 1)。これらの所見は、変異 SOD1 が ER 内に局在することを示す過去の報告に一致するものであった (Kikuchi et al., 2006)。

2) Derlin-1 は特に変異型 SOD1 の発現量の低下をもたらす。

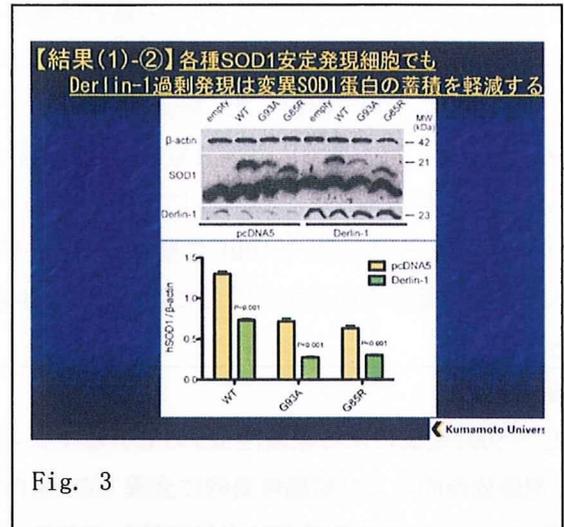
Derlin-1 と SOD1 が共局在を示すことから、Derlin-1 と各種 SOD1 間に何らかの相互作用が存在する可能性が考えられた。はじめに Derlin-1 の SOD1 発現に及ぼす影響を証明するために、一過性に各種 SOD1 と同時に Derlin-1 もしくは pcDNA5 コントロー



ルベクターを発現する NB2a 細胞において、SOD1 の細胞内含量を Western blot を用いて定量した (Fig. 2)。Derlin-1 発現下における変異 SOD1 細胞内含量は、コントロールベクターと比較して、G93A SOD1 において 37.0%、また G85R SOD1 において 52.7%の有意な減少がみられた (Fig. 2)。一方、野生型 SOD1 は Derlin-1 発現およびコントロールベクター発現下において変化しなかった。次にこの Derlin-1 の SOD1 発現に及ぼす抑制効果を確認するために各種 SOD1 を安定発現する NB2a 細胞を用いて、SOD1 の細胞内含量を Western blot を用いて定量した。各種 SOD1 安定発現 NB2a 細胞の樹立を確認するために SDS-PAGE を行ったところ、ヒト SOD1 発現レベルは内在性マウス SOD1 レベルの約 10-20%と推測された。各種 SOD1 安定発現 NB2a 細胞を用いた実験 (Fig. 3) では、Derlin-1 発現下における変異 SOD1 細胞内含量



は、コントロールベクターと比較して、G93A SOD1 において 61.9%、また G85R SOD1 において 52.2%の有意な減少がみられた (Fig. 3)。一過性発現系と異なり、Derlin-1 発現下における野生型 SOD1 細胞内含量は、コントロールベクターと比較して、43.6%の有意な減少がみられた。この原因として一過性発現系と安定発現系における Derlin-1 発現量の差異による可能性が疑われた。



3) Derlin-1 は SOD1 mRNA レベルに影響しない

次に Derlin-1 発現による変異 SOD1 細胞内含量の減少が、変異 SOD1 蛋白の分解亢進によるのか、あるいは変異 SOD1 mRNA の転写の減少によるのかを解明することを試みた。各種 SOD1 の mRNA レベルを定量するために、fluorescence-based real-time reverse transcription PCR 法を用いた。Derlin-1 とコントロールベクター発現細胞の間に、変異 SOD1 の mRNA レベルの有意な変化は見られなかった。したがって Derlin-1 の過剰発現による変異 SOD1 の減少は、変異 SOD1 蛋白の分解亢進による可能性が推察された。

4) Derlin-1 は変異型 SOD1 の細胞毒性を軽減する。

PI/FACS を用いて各種 SOD1 安定発現細胞における細胞死を評価した。過去の報告に一致して (Rizzardini et al., 2005)、両変異 SOD1 発現細胞は、空ベクターあるいは野生型 SOD1 発現細胞に比して、相当数のアポトーシスに陥っている細胞を検出した。さらに Annexin V を用いた細胞死の評価でも、

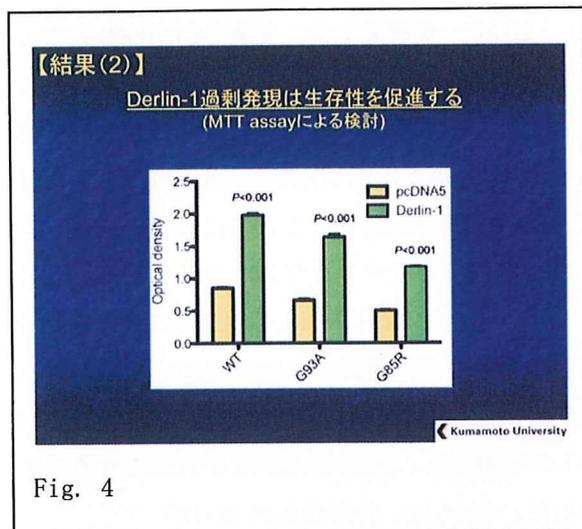


Fig. 4

同様の結果が得られた (data not shown)。次に Derlin-1 は SOD1 の細胞内含量を減少させることにより、変異 SOD1 による細胞毒性を軽減させるのかどうか評価した。Derlin-1 もしくはコントロールベクターをトランスフェクション後 48 時間において、MTT アッセイにより細胞の生存性を観察した。コントロールベクター発現時には変異 SOD1 (G93A, G85R) 安定発現細胞は、野生型 SOD1 発現細胞に比較して低い生存性を呈した。一方 Derlin-1 発現時には、変異 SOD1 (G93A, G85R) のみならず野生型 SOD1 発現細胞においても生存性の改善がみられた (Fig. 4)。それ故に、Derlin-1 は変異 SOD1 による細胞毒性の軽減をもたらすと考えられた。

5) Derlin-1 は変異型 SOD1 による ER ストレスマーカーの活性化を軽減する。

Derlin-1 は ER を含むマイクロゾーム分画において変異 SOD1 含量を低下させるのか調査した。既報 (Kikuchi et al., 2006) に従って、Derlin-1 もしくはコントロールベクターを発現する各種 SOD1 安定発現細胞からマイクロゾーム分画および細胞質分画を抽出した。Derlin-1 およびコントロールベクター発現細胞のマイクロゾーム分画において SOD1 蛋白含量を比較した (Fig. 5)。Fig. 5 に示すように、Derlin-1 を過剰発現したところ、野生型および変異型 SOD1 発現細胞のマイクロゾーム分画において、有意に SOD1 含量の低下がみられた。

さらに Derlin-1 は、ER ストレス経路の活性化を抑

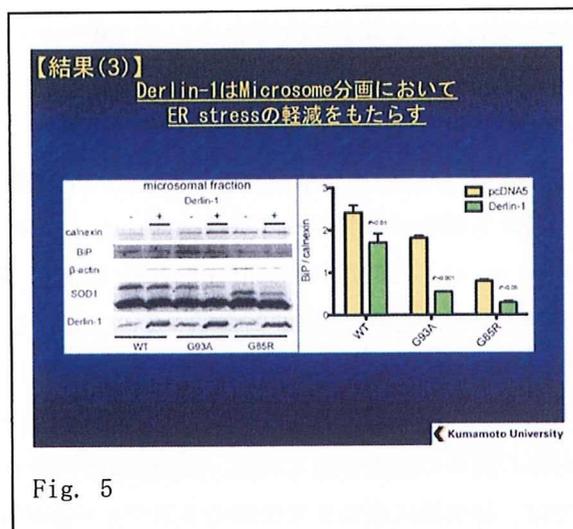


Fig. 5

制することによって、変異 SOD1 毒性の低下をもたらすのかどうか調査した。BiP は ER ストレス下に誘導される ER シャペロンである (Tobisawa et al., 2003)。それ故に Derlin-1 およびコントロールベクター発現細胞のマイクロゾーム分画において、calnexin および BiP, and Derlin-1 の発現を比較した。BiP は Derlin-1 発現時に野生型および変異型 SOD1 発現細胞のマイクロゾーム分画において有意に減少していた (Fig. 5)。次に、Derlin-1 およびコントロールベクター発現細胞の細胞質分画において、ATF6 p50 フラグメントおよび CHOP、human SOD1 の発現を比較した (Fig. 6)。ATF6 p50 フラグメントと CHOP は、Derlin-1 発現時に変異型 SOD1 発現細胞において有意に減少していた (Fig. 6)。さらに Derlin-1 が細胞質分画の SOD1 含量の低下をもたらすかどうか検討したところ、Derlin-1 発現時に変異型 SOD1^{G93A} は有意に減少し、ま

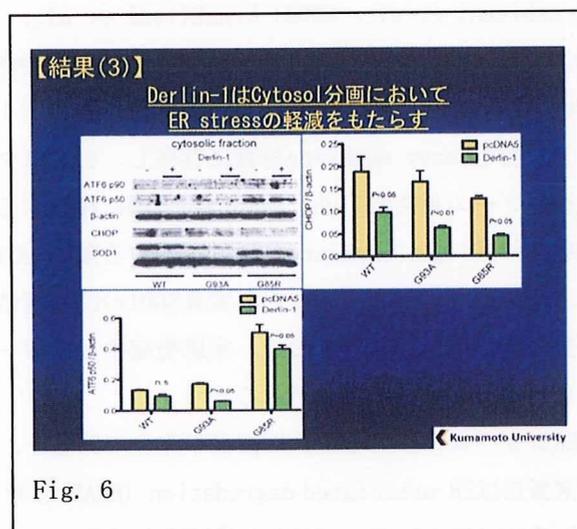


Fig. 6

た野生型および変異型SOD1^{G85R}については減少する傾向が見出された (Fig. 6)。

D. 考察

近年家族性ALSの病態において、ERストレスの関与を示唆する報告が散見される (Atkin et al., 2008; Ilieva et al., 2007; Kikuchi et al., 2006)。変異SOD1を発現する家族性ALS齧歯類モデルでは、完全なunfolded protein response (UPR)、すなわちストレスセンサーキナーゼやシャペロン、アポトーシス実行系の関与が報告されている。変異SOD1^{G93A} マウスでは、終末期に至るまでにERのミスフォールディング認識機構の鍵であるBiPの発現が上昇していると報告されている (Atkin et al., 2006)。同じく哺乳類のUPRにおける転写因子であるATF6も発症時には上昇していると報告されており、すなわち発症期にはすでにUPR経路が進行中にあることが示唆されている。Itoらは変異SOD1マウス脊髄において、症候期にも終末期にもCHOPの発現が亢進しており、さらにCHOPの局在は運動神経のみならず オリゴデンドロサイトやアストロサイト、マイクログリアなどのグリア細胞系にみられたと報告している (Ito et al., 2009)。

週齢依存のおよび組織特異的に、変異SOD1はER内に蓄積し、不溶性高分子種を形成していることが報告されている (Kikuchi et al., 2006)。さらに他の研究でも、野生型および変異型SOD1ともERおよびゴルジ器官に局在することが示されている (Urushitani et al., 2008; Urushitani et al., 2006)。6ヶ月齢の変異SOD1マウス脊髄由来の細胞内分画の解析によると、変異SOD1の23.6%はミトコンドリアを含むheavy membrane分画に存在し、4.2%はマイクロゾームを含むlight membrane分画に存在する。発症後にはlight membrane分画に存在する変異SOD1は、6.46%に増加する。すなわち変異SOD1のER内蓄積は発症前から確認されており、疾患発症のトリガーとして重要である可能性がある。

ERシャペロンによる蛋白修復が不完全であると、異常蛋白はER-associated degradation (ERAD)と呼ばれるシステムによってERから排除される (Travers

et al., 2000)。本研究では、変異SOD1がERADの中心的役割を担うDerlin-1と共局在することが示された。Nishitohらも、変異SOD1は特異的にDerlin-1の細胞質内C端領域と相互作用し、ERADの構成成分である基質の逆行性輸送を阻害することによって、ERストレスを誘導することを示した (Nishitoh et al., 2008)。本研究では変異SOD1がDerlin-1のERADに関わる機能を障害するか否かは確認していないが、変異SOD1によるERAD機能障害を上回って、外来性Derlin-1がERストレスを軽減し、細胞の生存性を向上させることを示した。Sunらは、外来性Derlin-1がubiquitin-proteasome系の基質である cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 蛋白とER内に局在し、効率よく疾患関連折り畳み不良CFTR蛋白を分解したと報告した。我々の結果は、Derlin-1が変異SOD1蛋白の細胞質内への逆行性輸送を通じてERADを促進する可能性を示唆した。

当初の予想と異なり、Derlin-1は野生型および変異型SOD1発現細胞の細胞室分画中のSOD1含量の低下ももたらした。Urushitaniらによると変異SOD1はプロテアゾームの機能障害をもたらすと報告している (Urushitani et al., 2002)。Derlin-1によるERストレスの軽減は、細胞の生存性を改善し、その結果二次的にプロテアゾームの機能障害を回復させていることが予想された。

E. 結論

Derlin-1はSOD1蛋白のERADを促進することによってSOD1を制御しており、変異SOD1の制御という観点からのDerlin-1への洞察は、ALSにおける運動ニューロン変性の治療法開発に有用と考えられる。

F. 健康危険情報 特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表：現在投稿中。
2. 学会発表：森 麗ほか「Derlin-1による変異SOD1の小胞体内蓄積軽減効果の検討」、「第50回日本神経学会総会」、仙台、2009年5月

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

Kartagener 症候群を合併した筋萎縮性側索硬化症の一例

研究分担者 内野 誠

研究協力者 右田明恵, 山下 賢, 林 建祐, 平原智雄, 木村 円, 前田 寧, 平野照之
熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野

研究要旨

Primary ciliary dyskinesia は、反復する上気道感染、男性不妊、左右非対称性のランダム化を特徴とし、とくに内蔵逆位との合併例は Kartagener 症候群と定義される。我々は Kartagener 症候群を罹患する患者において、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を合併した一例を経験した。約7ヶ月の経過で球麻痺と左上肢遠位優位の筋力低下・筋萎縮が進行し、腸瘻造設さらに喉頭気管分離術を施行した。Kartagener 症候群の責任遺伝子の大部分は軸系ダイニンサブユニットをコードしている。近年 ALS の病因の一つとして報告されている細胞質ダイニンの heavy chain と、軸系ダイニンの outer arm における分子間相互作用が報告されている。ALS と Kartagener 症候群の合併報告例はなく因果関係は推測の域を出ないが、Kartagener 症候群における軸系ダイニン機能の破綻と、運動神経死の関連性について今後検討の必要性がある。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）が選択的運動ニューロン変性をきたすメカニズムは未だ明らかではないが、酸化ストレスや、細胞質内凝集、ミトコンドリア機能障害、グリア細胞機能障害、興奮性アミノ酸毒性、軸索輸送障害などの関与が示唆されている。一方 Primary ciliary dyskinesia (PCD) は、反復する上気道感染、男性不妊、左右非対称性のランダム化を特徴とする不均一な疾患群であり、とくに PCD と内蔵逆位の合併例は Kartagener 症候群と定義されている。

B. 研究方法

1) 平成19年4月1日～平成21年12月1日に当科に入院された ALS 患者（改訂 El escorial 基準にて clinically possible 以上の 82 名について、性別比、年齢分布、重症度分布 (ALSFRS-R)、呼吸筋麻痺の有無、球麻痺の有無について評価した。

2) Kartagener 症候群と clinically probable ALS を合併した一例（64 歳、女性）について臨床症状を評価した。

C. 研究結果

1) 性別比は、男性 58.2%、女性 41.8%と男性が多く、また当院受診時の年齢分布は 60 歳代が 35.4%と最も

多く、次いで 70 代(30.5%)、50 代(22.0%)の順であった (Fig. 1)。ALSFRS-R による重症度分布は、37 点以上の軽症の患者が 60%以上を占めていた (Fig. 2)。しかし呼吸筋麻痺を有していた患者は 24.4%、また球麻痺を呈していた患者は 54.9%であった (Fig. 2)。診断時、約 4 分の 1 の症例で呼吸筋麻痺があり、半数以上の症例において球麻痺を認める結果であり、すなわち診断時すでに、呼吸障害、球麻痺を考慮し、積極的に治療介入が必要である症例が多いと考えられた。当院では球麻痺を呈し、誤嚥性肺炎などのリスクの高い症例について、誤嚥防止術を検討しており、肺炎のリスク軽減、喀痰量の減少、吸引回数の減少を含めて、患者および医療者での満足度は高い傾向が見られた。

Fig. 1

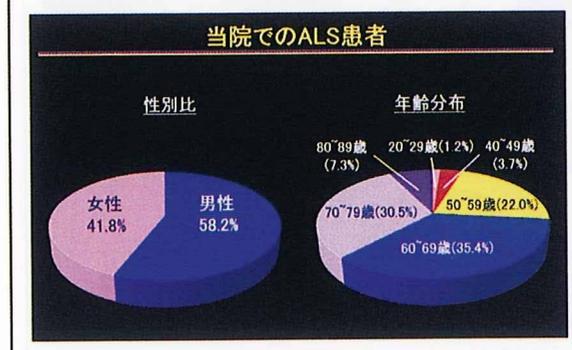
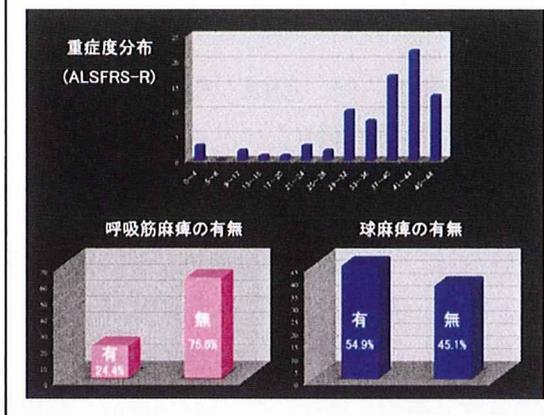
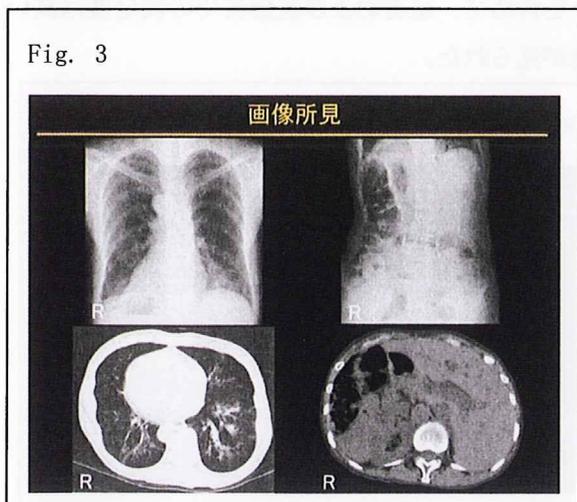


Fig. 2



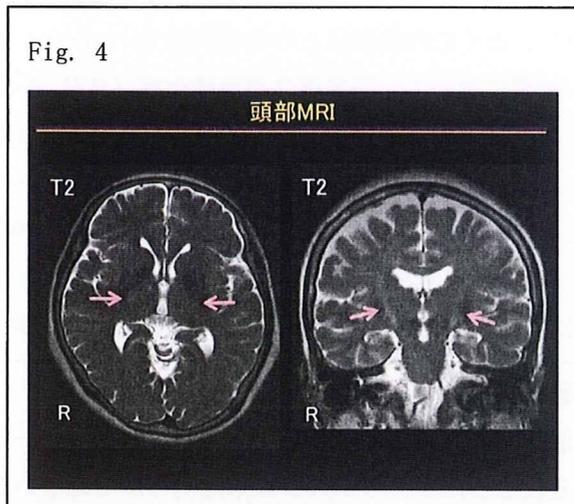
2) 症例は64歳、女性。両親は血族結婚であり、生下時より反復する上気道炎と副鼻腔炎の既往があり、右胸心を含む内蔵逆位症を呈していた。入院7ヶ月前より嚥下困難、構音障害、左手の不自由を自覚していた。入院時神経内科学的所見として、嚥下障害、構音障害、舌萎縮および線維束性攣縮、左側遠位優位の両上肢筋萎縮および筋力低下を認めた。膝蓋腱反射は両側亢進し、両側の Hoffmann および Tromner 反射が陽性であった。感覚系および自律神経系に異常はみられなかった。神経伝導検査では compound muscle action potential amplitude の低下を認め、針筋電図では脳神経、頸髄領域、胸髄領域、腰仙髄領域すべてにおいて進行性および慢性脱神経所見がみられた。心電図検査では右胸心、胸部 X 線では心尖部、大動脈弓、胃泡を右側に認めた (Fig. 3)。高分解能 CT では内蔵逆位とともに気管支拡張所見が

Fig. 3



みられた (Fig. 3)。頭部 MRI では T2 強調像において、両側錐体路が高信号を呈する傾向が見られた (Fig. 4)。Videofluorography では喉頭の閉鎖不全と重度の梨状窩への造影剤貯留を認めた。約7ヶ月の経過で球麻痺と左上肢遠位優位の筋力低下・筋萎縮が進行し、嚥下障害に対して腸瘻造設さらに喉頭気管分離術を施行した。特に難治性の誤嚥性肺炎に対して喉頭気管分離術が有用であった。

Fig. 4



D. 考察

患者は脳神経領域、頸髄領域および腰仙髄領域に下位運動ニューロン徴候と、頸髄領域および腰仙髄領域に上位運動ニューロン徴候を認めることから El Escorial 基準により clinically probable ALS と診断された。また本患者は Kartagener 症候群と診断され、慢性副鼻腔炎、気管支炎および内蔵逆位の trias を認めた。

細胞質ダイニンは細胞内逆行性輸送に関わる主要な分子モーターであり、複合体を形成し、微小管に沿って細胞体に向かって運動する。少なくとも4つのサブユニット (heavy, intermediate, light intermediate, および light chains) から構成され、核やゴルジの機能、軸索輸送に関する小胞や蛋白複合体の細胞内輸送に関わる。エンドソームや伝達複合体、分解産物、ニューロフィラメントなどのカーゴの逆行性輸送にダイニン/ダイナクチン複合体が関与しているという事実から、ダイニン/ダイナクチンの機能障害は運動ニューロンにおける種々の器官

において重大な影響を及ぼすことが予想される。

近年連鎖解析や遺伝子変異解析により、PCD の責任遺伝子が7つ同定された。そのうちの5つ、すなわち DNAH5、DNAI1、DNAI2、TXNDC3 および DNAH11 は軸系ダイニンの outer arm をコードしており、繊毛運動におけるダイニンの重要性を示唆している DNAH5 変異は近位および遠位側の外腕 (ODA) 複合体の集合を障害し、一方 DNAI1 変異は主に近位側 ODA の集合を阻害すると報告されている。

近年細胞質ダイニンによる逆行性軸索輸送の障害が ALS の病因の一つとして注目されている。ダイナクチンサブユニット p150^{Glued} の G59S 変異は、北米の緩徐進行性運動ニューロン疾患患者にリンクすることが報告されており、さらに G59S ヘテロ変異を有するノックインマウスは運動ニューロン変性を来すことが明らかにされた。

細胞質ダイニンの heavy chain をコードする遺伝子は、軸系ダイニンの外腕をコードする遺伝子と、中心領域および 3' 端領域に共通配列を有することが報告されている。さらに軸系ダイニン Dnali1 は、細胞質ダイニンの heavy chain 1 と相互作用を示すことも報告されている。すなわち細胞質ダイニンと軸系ダイニンの間は何らかの分子生物学的な相互作用が存在する可能性が示唆されている (Fig. 5)。

E. 結論

これまでに ALS と Kartagener 症候群の合併報告例はなく、その因果関係は推測の域を出ない。しかし Kartagener 症候群における軸系ダイニン機能の破綻と、運動ニューロン死の詳細な関連性について今後検討の必要性があると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2010 (in press).

2. 学会発表：なし

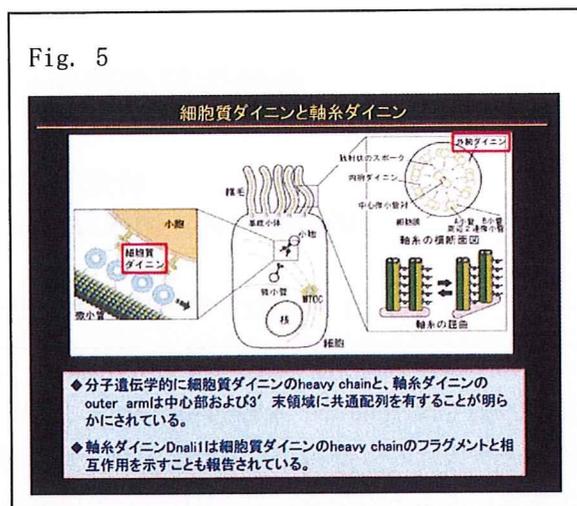
H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

Fig. 5



脊髄性筋萎縮症の臨床の分析と遺伝子解析

研究分担者 斎藤加代子¹⁾

研究協力者 伊藤万由里^{1),2)}, 浦野真理¹⁾, 相楽有規子¹⁾

1) 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター, 2) 同 小児科

研究要旨

我が国では2009年、脊髄性筋萎縮症（SMA; spinal muscular atrophy）が、特定疾患治療研究事業の対象疾患として認定され、認定基準と臨床個人調査票が作成された。SMAは、I、II型はSMN遺伝子変異によるものが多いが、III、IV型は遺伝子的にも臨床的にもheterogeneousである。正確な診断のもと、SMAの病因病態の解明と治療研究をすすめていくことが重要で、臨床個人調査票に基づいた臨床情報のデータベース化も今後の検討課題である。

A.研究目的

脊髄性筋萎縮症（SMA）は、脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と筋力低下を特徴とする下位運動ニューロン病である。我が国では2009年、特定疾患治療研究事業の対象疾患として認定され、認定基準と臨床個人調査票が作成された。今回我々は、治療研究につなげるための足がかりとして、臨床症状と遺伝子検査結果など、現時点で蓄積されている臨床情報の分析を行った。

B.研究方法

1998年から2003年にかけて我々の研究室でSMN(survival motor neuron)遺伝子検査を実施した際に、各主治医に郵送によるアンケート調査を施行した。その対象患者258名について得られた臨床症状と遺伝子解析結果などを分析した。質問項目は、臨床型、性別、年齢、診断方法、遺伝子診断結果、発症年齢、最高到達運動機能、現在の運動機能、筋力低下の状態、中枢神経障害、感覚障害、関節拘縮、他臓器障害、各種検査所見などである。

SMAの原因遺伝子はSMN遺伝子と呼ばれ、第5番染色体上にあり、1995年に同定された。遺伝子診断は、このSMN遺伝子の欠失の有無を確認することにより行い、現在は保険診療に収載

されている。臨床情報の収集に関しては、疫学調査実施時に本学倫理委員会の了承を得ている。

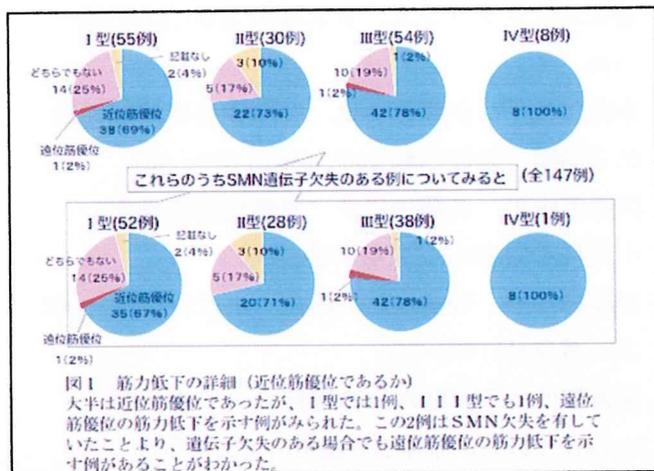
C.研究結果

対象患者258名の臨床型の内訳は、I型87例（34%）、II型65例（25%）、III型84例（33%）、IV型22例（9%）であった。これらのうち、アンケートの回答を得られたのは147例、全体の57%であった。本研究班2009年夏のワークショップでは、このうちSMN遺伝子欠失のあるpureな例についての臨床情報の分析結果を報告した。今回はSMN遺伝子欠失のない例も含めた全147例についての分析を行った。

臨床型別の遺伝子欠失の割合については、I型、II型は90%以上の高い頻度で欠失を認めたが、III型は約60%、IV型は10%程度にのみ欠失を認めた。これより成人発症の型ほど、遺伝的には多様であるといえる。

アンケートの返答が得られた147例についての分析結果は次記の通りであった。発症年齢は、I型は0~5ヶ月（平均42.1日）、II型は1ヶ月~4歳（平均9.4ヶ月）、III型は5ヶ月~15歳（平均4.1歳）、IV型は20~72歳（平均36.5歳）であった。I型では平均死亡年齢は0歳4ヶ月、平均レスピレーター導入年齢は0歳5ヶ月であっ

た。II型については、人工呼吸管理を施行したのは7例、NIPPV導入は8例であった。筋力低下が近位筋優位であるかについてみると、大半は近位筋優位であったが、I型では1例、III型でも1例、遠位筋優位の筋力低下を示す例があった。この2例は、SMN欠失のある例であったことより、遺伝子欠失があっても遠位筋優位の筋力低下を示す例があることがわかった(図1)。

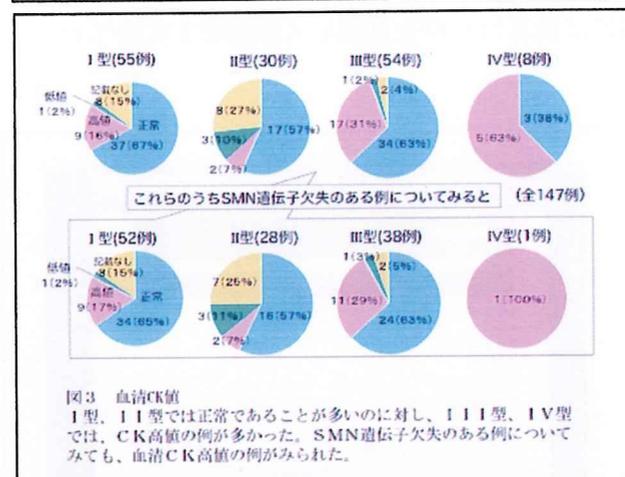
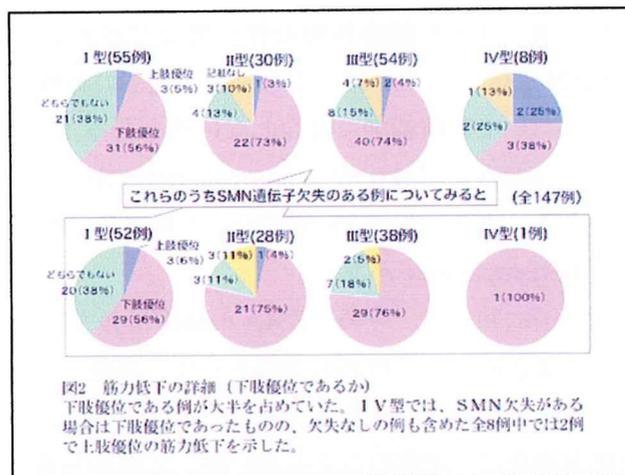


筋力低下が下肢優位であるかについても検討した。下肢優位である例が大半を占めていた。しかし、IV型では、SMN欠失がある場合は下肢優位であったものの、欠失なしの例も含めた全8例中では2例で上肢優位の筋力低下を示していた(図2)。

中枢神経障害の有無について検討した結果、本来SMAの診断基準では中枢神経障害はないことが前提となっているが、SMN遺伝子欠失を認めても中枢神経障害のある例が存在することがわかった。

血清CK値についても検討した(図3)。I型、II型では正常であることが多いのにくらべ、III型、IV型では、CK高値の例の割合が多いことがわかった。SMN遺伝子欠失のある例についても、血清CK高値の例があった。

先天性の関節拘縮は、147例中、I型で2例、II型で1例みられた。小児期発症の型のみで認められており、以前からいわれている、先天性多発



性関節拘縮症 (arthrogryposis multiplex congenita) と SMA との疾患の共通性の存在も示唆しているともいえる。

D. 考察

臨床的にSMAのI、II型と診断された例は、SMN遺伝子欠失の割合が高く遺伝子的にも確定診断が可能である。I型で遺伝子欠失のない例については、SMA周縁疾患を含めた別の疾患の可能性も考慮する必要がある。

III、IV型では、SMN遺伝子エクソン7、8欠失の割合は低い。この欠失のないIII、IV型においては、エクソン7、8欠失以外のSMN遺伝子変異、または、それ以外の遺伝子変異が原因であるといえる。そのため、家族歴や臨床経過も含めた臨床情報の分析が診断に不可欠となる。

SMA関連疾患で遺伝子の分かっているものには、横隔膜麻痺を伴う型、オリブ橋小脳低形成