

cerebrospinal fluid, joint fluid, tissues and various diseases. 日本臨床, in press.

2.学会発表

島田(大谷)若菜、船越 洋、加藤 信介、加藤 雅子、中村 敏一、HGFのエンドクリン性供給は、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスでおこる肝臓病理学的変化からの回復に寄与する。第82回日本生化学会大会(神戸)(日本生化学会大会優秀プレゼンテーション賞受賞)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた新規免疫療法開発研究（第2報）

研究分担者：漆谷 真 滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教
研究協力者：竹内成子¹⁾、太田康之²⁾、館野美成子³⁾、阿部康二²⁾、遠山育夫¹⁾
1)滋賀医科大学・分子神経科学研究センター
2)岡山大学 神経内科
3)国立精神神経センター・神経研究所

研究要旨

（目的）筋萎縮性側索硬化症（ALS）の免疫療法の開発を目的として、変異 SOD1 トランスジェニックマウスに対する変異型、野生型アポワクチン効果の作用機序を明らかにするため、血清と脾臓サイトカイン発現解析、脊髄組織の免疫組織化学的検討を行った。さらに本年度は我々が作製した変異 SOD1 特異認識モノクローナル抗体を、発症時期を迎えた同トランスジェニックマウスに髄腔内投与し、他動免疫療法の効果を確認した。

（結果）ワクチン接種個体血清中の変異型 G93A SOD1 に対する抗体価は変異型 SOD1 の報が高かったが、野生型ワクチンは変異型ワクチン同等の発症遅延効果を認め、寿命延長効果は変異型よりもむしろ高かった。脾臓組織のサイトカイン発現量は発症前の生後 120 日齢では両ワクチン投与群で interferon (IFN) γ 、tumor necrosis factor (TNF) α の低下と Interleukin (IL)4 の増加傾向が認められたが、発症時期においてはワクチンの有無にかかわらず IFN γ 、TNF α とも発現は上昇した。一方野生型ワクチン接種個体の IL4 は高値を維持したが、変異型ワクチンでは IL4 の低下が見られた。興味深いことに野生型ワクチンの治療効果と IgG2b は有意に正相関し、IgG2b 抗体価は Transforming growth factor(TGF) β と正相関していた。一方、変異 SOD1 特異認識抗体は発症時期の髄腔内持続投与（6 週間）によって、進行を 21 日間遅延させ、この効果は Fab 断片化抗体よりも Fc を含む全長抗体の方が明らかであった。

（考察）以上の結果より、野生型アポワクチンは変異型によらない有望な治療法となる可能性がある。さらに、ワクチンの投与経路やアジュバントの調整によりさらに有効性が高まる可能性がある。今回変異 SOD1 特異認識抗体の他動免疫の有効性を確認したが、発症時期の投与で進行を抑制する効果が認められた意義は大きい。今後作用機序について検討すると共に、適応病態の拡大を目指し、さらに有効な疾患特異抗体を開発する。

A.研究目的

近年、ミスフォールドタンパク病である神経変性疾患に対する免疫療法が注目されている。免疫療法の汎用性と作用機序解明による実効性の向上をめざし、昨年度に引き続き家族性 ALS モデルマウスに野生型アポ、変異型アポ SOD1 タンパクによるワクチン療法を行い、作用機序を獲得免疫系に着目して解析した。さらに本年

を用いた他動免疫療法についても投与実験を行い、効果を検討した。

B.研究方法

（自動免疫）低発現型 G93A SOD1 トランスジェニックマウス (G93AGur^{dl}) に対し、アポ型野生型(WT-apo) SOD1 と G93A SOD1 ワクチン

ンを免疫し、発症時期を体重減少と rotarod、寿命に対する効果を調べた。さらに生後 120 日、210 日における血清、脾臓、脊髄組織を採取し、抗 G93A SOD1 抗体 IgG サブクラスの解析と real-time PCR による脾臓、脊髄組織の Tumor necrosis factor alpha (TNF α), Interferon-gamma (IFN γ)(以上 Th1), transforming growth factor beta1 (TGF β 1; Th3), Interleukin-4 (IL4; Th2), FoxP3 (Treg), ROR γ t (Th17)発現解析、さらに脊髄の免疫組織化学的解析を行った。

(他動免疫) G93A SOD1 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 (C4F6) とヒト野生型も認識する同抗体 (D3H5) を用いて、微量浸透圧ポンプ (Alzet pump 2006) に 1.5 mg/ml で 200 μ l 充填し、岡山大学神経内科より技術供与を受けたマウス髄腔内カニューレーション法を用い、L4 椎弓より 6 週間持続注入を行った。コントロールとして生理食塩水を注入した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、プロトコルを滋賀医科大学・動物実験委員会の審査をうけ承認された物である。ヒト変異遺伝子を用いているが、特定の個人を同定できる物ではなく、また遺伝子組換え実験のプロトコルは倫理委員会の審査を受け承認されている。

C. 研究結果

(自動免疫) WT-*apo*、G93A ワクチンとも G93A^{Gur^{dl}} マウスの発症を有意に遅延したが、生存延長効果は両者とも延長傾向を認めたが、統計学的には WT-*apo* のみ有意であり、WT-*apo* の抗体価は生存延長効果と正の相関を示した。120 日齢マウスの解析では血清 IgG1/IgG2c 比が WT-*apo* ワクチンは G93A ワクチンより高値であった。さらに 120 日齢では Th2 サイトカインである IL4 の上昇と Th1 サイトカインである TNF α と IFN γ の抑制現象が WT-*apo* と

G93A ワクチンにて見られたが、210 日齢ではワクチンの有無にかかわらず Th1 系サイトカインの著明な上昇を認め、特に G93A ワクチンでは高度であった。さらに IL-4 は WT-*apo* に比し G93A ワクチンでは減少傾向が見られた。さらに IgG サブクラスと Th1/2 系のサイトカインの発現量の相関を調べたところ、WT-*apo* では IFN γ /IgG2c, IL4/IgG1, TGF β 1/IgG2b とも正相関を認めたが、G93A では IL4/IgG1 はむしろ負の相関傾向を示した。また、WT-*apo* ワクチンの治療効果と IgG2b さらに TGF β /IgG2b は正相関を示した。210 日齢の脊髄の解析では残存運動ニューロン数の増加と活性化ミクログリアの減少を認めた。一方で IFN γ の転写因子である STAT4 は活性化ミクログリアに高発現しており、ミクログリアが IFN γ の発生源となることが判明した。

(他動免疫) 発症後の 210 日齢に抗体を髄腔内投与したところ C4F6 投与群は約 3 週間の進行抑制効果が認められたが、Fab 断片は無効であった。一方他のエピトープを有する D3H5 抗体は C4F6 ほどの有効性を認めなかった。

D. 考察

今回の研究により、ワクチンの効果発現には獲得免疫系に大きく修飾され、特に発症後期の Th1 系免疫反応は進行に積極的に関与する可能性が示された。ワクチンの配列による抗原性の違いは細胞性免疫の過剰な惹起によりワクチンの効果を相殺する可能性がある。また IL-4 と TGF β の重要性が示されたことから、ワクチンの投与経路として鼻粘膜ワクチンを中心とする粘膜ワクチンが有効である可能性があり今後の治療開発上留意するべきと考えられる。

また、他動免疫実験の結果から抗体髄腔内投与の効果はミクログリアやリンパ球等の免疫系細胞の Fc 受容体に依存した経路を経る可能性が高い。ミクログリアによる変異タンパクの

貪食や他の免疫細胞活性化によるサイトカインの影響等明らかにする必要がある。

E. 結論

変異 SOD1 トランスジェニックマウスに対する、ワクチン療法はさらに Th2 系を指向した免疫調整療法を組み合わせることによって有効性を高められる可能性がある。変異 SOD1 特異的モノクローナル抗体は投与方法を工夫することによりさらに高い有効性が確認された。治療標的を効果的に設定することにより抗体療法の実用性拡大が期待される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

1. Gros-Louis F, Andersen PM, Dupre N, Urushitani M, Dion P, Souchon F, D'Amour M, Camu W, Meininger V, Bouchard JP, Rouleau GA, Julien JP. Chromogranin B P413L variant as risk factor and modifier of disease onset for amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2009, in press.
2. Sato T, Takeuchi S, Saito A, Ding W, Matsuura H, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal ligation induces transient nuclear exclusion of TDP-43 in brainstem motor neurons. Neuroscience 2009, 164, 1565-1578.
3. Urushitani M, Sato T, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I. Synergistic effect between proteasome and autophagosome in the clearance of poly-ubiquitinated TDP-43. J Neurosci Res 2009, in press
4. Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel SH. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. Glia 2009, in press
5. Amatsubo T, Morikawa S, Matsuda K, Inubushi T, Urushitani M, Taguchi H, Shirai N, Hirao K, Kato M, Morino K, Kimura H, Nakano I, Yoshida C, Okada T, Sano M, Tooyama I. Interaction of the brain tissues with trifluoromethoxy-benzylated ligands for amyloid detection using ^{19}F magnetic resonance imaging. Neurosci Res 2009 63, 76-81, 2009
6. 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症に対するワクチン・抗体療法の展望. 難病とケア 2009, 15: 35-39

2. 学会発表

1. Abou Ezzi S, Urushitani M, Larivière R, Julien JP. Neuronal overexpression of chromogranin A accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of ALS. 20th International Symposium on ALS/MND, 8-10 December 2009, Berlin
2. Abou Ezzi S, Urushitani M, Larivière R, Julien JP. Neuronal overexpression of chromogranin A accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. 5e symposium de la Fondation André-Delambre sur la sclérose latérale amyotrophique, 25 & 26 September 2009, Québec
3. Yanagisawa D, Shirai N, Amatsubo T, Taguchi H, Hirao K, Urushitani M, Morikawa S, Inubushi T, Kato M, Morino K, Kimura H, Nakano I, Yoshida C, Okada T, Sano M, Tooyama I. Binding form of curcumin derivatives to β -amyloid aggregates. International Conference on Alzheimer's Disease, ICAD2009. July, Wien
4. 漆谷 真. 「神経変性疾患克服に向けた多面的アプローチの現状」立命館大学 難治性疾患・統合創薬プロジェクト 第1回セミナー

ナー 2009年9月 草津

5. 漆谷 真。「免疫療法によるALSの治療戦略」

第50回 日本神経学会総会 シンポジウム
2009年5月 s 仙台

6. 漆谷 真。「異常タンパク病としての筋萎縮

性側索硬化症～治療を志向した研究動向
～」

第10回 大阪神経治療研究会 教育講演
2009年4月 大阪

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

「ケト・エノール互変異性を利用した診断薬」
遠山育夫、漆谷 真、田口弘康、白井伸明、平尾
浩一、加藤雅也、柳沢大治郎。2009/2/27 特願
2009-45531

2.実用新案登録

3.その他

細胞内 TDP-43 凝集体形成モデルの構築とその応用

研究分担者：長谷川成人（東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム副参事研究員）
研究協力者：野中 隆¹⁾，山下万貴子¹⁾，亀谷富由樹¹⁾，新井哲明²⁾，秋山治彦²⁾

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム

²⁾ 東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム

研究要旨

TDP-43 は、前頭側頭葉変性症（FTLD）および筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脳に認められる、ユビキチン陽性細胞内封入体の主要構成タンパク質である。TDP-43 の部分欠損変異体を SH-SY5Y 細胞に発現することにより、抗リン酸化 TDP-43 特異抗体および抗ユビキチン抗体に陽性の細胞内凝集体の形成する細胞モデルを構築した。本モデルを用いて、TDP-43 を標的とした ALS の治療薬の探索などの応用を検討した。

A. 研究目的

孤発性および家族性 ALS 患者の遺伝子解析により、TDP-43 遺伝子にミスセンス変異が同定され、TDP-43 の異常が、FTLD や ALS の発症と密接に関連することが示されている。したがって TDP-43 の細胞内蓄積機構や封入体による神経変性機構などを解明することが、ALS の画期的治療法を考える上できわめて重要である。昨年まで TDP-43 の核移行シグナル(78-84 残基) およびその類似配列の欠損変異体を培養細胞に発現させ、さらにプロテアソーム阻害剤処理を行うと、核内あるいは細胞質凝集体が出現すること、TDP-43 の C 末端断片を GFP 融合タンパク質として発現することにより、リン酸化陽性、ユビキチン陽性凝集体が観察されることを報告した。本年度は FTLD 患者脳に蓄積する TDP-43 断片の N 末端切断部位の解析と細胞モデルを用いたいくつかの低分子化合物の凝集抑制効果の検討を行った。

B. 研究方法

FTLD 患者脳に蓄積するリン酸化 TDP-43 の主要な C 末断片をゲル内トリプシン消化し、質量

分析を用いて N 末端部位の解析を行った。同定された切断部位により生じる C 末断片を細胞に発現し、凝集体形成について観察した。

また、TDP-43 の核移行配列および類似配列の欠損変異体を発現する細胞モデル、TDP-43C 末断片—GFP 融合タンパク質を発現する細胞モデルを用いていくつかの低分子化合物の評価を行った。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は当研究所の専門委員会に遺伝子組換え生物等の使用等に関わる申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C. 研究結果

FTLD 患者脳に蓄積する TDP-43 断片のトリプシン消化、LC/MS/MS 解析をおこなった結果、219 からはじまる C 末断片と 247 からはじまる C 末切断を同定した。219-414 の C 末断片は、細胞内凝集体形成が顕著に認められた 218-414 の断片とほぼ同一であったが、219-414、247-414 断片についても同様の凝集体が形成されるか

検討した。その結果、いずれの断片もリン酸化、ユビキチン化された凝集体を形成することが観察された。以上のことから、凝集性の高いC末断片が実際のFTLD患者脳に蓄積していることが確認された。

TDP-43凝集を起こす細胞モデルは異常TDP-43を標的とするALS治療薬の探索に有用である。そこで、2種類のTDP-43蓄積細胞モデルを用いて、治療薬候補化合物の評価を行った。ALSという病気を考え、化合物の早期の認可・適用が望まれることから、現在治療薬として認可されている薬剤や臨床試験中の化合物にターゲットを絞り試験した。今年度はアルツハイマー病の第2相臨床試験において病状を改善する効果が報告されている2剤(メチレンブルーとディメボン)の評価を行った。メチレンブルーは*in vitro*においてA β やタウの凝集を抑制するフェノチアジン系化合物であり、ディメボンは過去にロシアでアレルギーなどの治療に使われていた薬剤である。その結果、二つの化合物はそれぞれ単独でTDP-43の凝集抑制作用を示すと共に、併用した場合には低濃度で強い効果を示すことが観察された。

D. 考察

今年度はFTLDの患者脳の解析ではあるが、実際に凝集性の高いC末断片が脳に存在することを確認した。ALS患者の脳、脊髄に蓄積するTDP-43のC末端断片はそのバンドパターンがFTLDと少し異なることが判明しているが、今後、ALS患者に蓄積するC末断片についても同様の解析を行う予定である。

TDP-43蓄積細胞モデルを用いて、メチレンブルーとディメボンの二つの薬剤がTDP-43の凝集抑制効果を有することを明らかにした。また両者を併用するとより高い効果が期待できることも明らかにした。凝集を抑制するメカニズムについてはまだ不明な点も多いが、メチレン

ブルーはタウやA β の凝集抑制と同じように構造が変化した異常分子に直接作用するものと考えられる。一方、ディメボンについては直接的な作用はみられないことから、間接的に作用することが示唆される。ディメボンはアセチルコリンエステラーゼ、ヒスタミンH1, H2受容体、セロトニン受容体などを阻害することが報告されているが、その効果については不明な点が多い。今回、TDP-43の細胞内蓄積を抑制する全く新しい作用がディメボンにあることを示すもので、ADでも細胞内に蓄積するタウに作用して効果を示している可能性がでてきた。今後、動物モデルを用いたさらなる解析が必要と思われる。

E. 結論

私たちが構築した細胞内TDP-43蓄積モデルは、形態的にも構造的にも患者脳に認められるものを再現したモデルであることを確認した。細胞モデルを用いて、メチレンブルーとディメボンに細胞内TDP-43凝集体形成を抑制効果があること、両薬剤を併用するとさらに高い効果が観察されることを見いだした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

- 1). Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. FEBS Lett 583: 394-400, 2009.
- 2). Arai T Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Iritani S, Onaya M, Akiyama H, Phosphorylated TDP-43

in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies *Acta Neuropathol.* Online Jan 13, 2009.

3). Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 117: 151-158, 2009.

4). Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 405-9, 2009.

5). Nonaka T, Hasegawa M. A Cellular Model To Monitor Proteasome Dysfunction by alpha-Synuclein. *Biochemistry* 48: 8014-22, 2009.

6). Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Lett* 583: 2419-24, 2009.

7). Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* 18: 3353-3364, 2009.

8). Davidson Y, Amin H, Kelley T, Shi J, Tian J, Kumaran R, Lashley T, Lees AJ, Duplessis D, Neary D, Snowden J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Bandopadhyay R, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM TDP-43 in ubiquitinated inclusions in the inferior olives in frontotemporal lobar degeneration and in other neurodegenerative diseases: a degenerative process distinct from normal ageing. *Acta Neuropathol* 118: 359-69, 2009.

9). Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga SI, Hasegawa M. Conversion of wild-type alpha -synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem* 284: 7940 -7950, 2009.

10). Masuda M, Hasegawa M#, Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M. (# corresponding author) Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies. *FEBS Lett* 583:787-791, 2009.

11). 長谷川成人. 企画/編集, 概論-因子から解明される神経変性疾患の分子基盤. *実験医学* 27: 1318-1323, 2009.

12). 新井哲明, 長谷川成人, 野中隆, 藤城弘樹, 内門大丈, 秋山治彦. 神経変性疾患の新規原因分子: TDP-43. *実験医学* 27: 1324-1332, 2009.

13). 野中隆, 新井哲明, 長谷川成人. 神経変性疾患の細胞病理学. *細胞工学* 28: 437-442, 2009.

2.学会発表

1). 長谷川成人 (2009) TDP-43 蓄積症の概念と病態解明への展望. 第 50 回日本神経学会総会, 教育講演, 仙台 [2009/05/22]

2). Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease 2009, Vienna, Austria [2009/07/12]

3). Arai T, Mackenzie IRA, Hasegawa M, Fujishiro H, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Iritani S, Onaya M, Akiyama H (2009) Phosphorylated TDP-43 in

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 特になし
- 2.実用新案登録 特になし
- 3.その他 特になし

ALS モデルマウスのグリア細胞における分子病態の解明

研究分担者：山中 宏二（理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー）

研究協力者：山下 博史，渡辺 祥司，藤森 典子

理化学研究所脳科学総合研究センター・運動ニューロン変性研究チーム

研究要旨：ALS モデルマウスのグリア細胞における分子病態解明の一環として、昨年度に引き続きミクログリアが関与する自然免疫経路の検討を行った。まず、変異 SOD1 マウスの疾患進行期の脊髄病巣における mRNA 発現プロファイルの網羅的解析により、自然免疫系の受容体の発現亢進を確認した。さらに、自然免疫経路のシグナル伝達に必須の分子である MyD88, Trif ノックアウトマウスと SOD1^{G93A} マウスとの交配実験を行い、Trif 依存性のシグナル経路抑制により疾患進行が加速し、マウスの生存期間が著しく短縮した。ALS モデルにおいて自然免疫経路の破綻はその疾患進行を加速すると考えられる。

A.研究目的

ALS モデルマウスにおいてミクログリア由来のサイトカイン産生の異常亢進がみられる原因の一つとして自然免疫経路の活性化が考えられる。自然免疫は病原体の侵入などに対して初期に発動される生体応答であり、マクロファージや樹状細胞に発現する Toll-like 受容体 (TLR) を介して病原体の構成成分を認識し、炎症反応や免疫反応が応答される。神経系ではおもにミクログリアに TLR の発現がみられ、感染防御機構に重要な役割を果たしている。変異 SOD1 マウスの病巣では、感染とは関係なく疾患の進行に伴って TLR2 の発現亢進が報告され、ALS 病態における自然免疫経路の関与が示唆されている。そこで、本研究では ALS モデルマウスにおける自然免疫経路を抑制することにより疾患進行速度への影響を検討する。

B.研究方法

まず、疾患進行期の ALS モデルマウス SOD1^{G85R}, SOD1^{G37R} の脊髄病巣の DNA マイクロアレイによる解析から自然免疫関連分子の発現異常を

検討した。さらに ALS モデルである SOD1^{G93A} マウスと Toll-like 受容体を介したシグナル伝達に必須の分子である MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88), Trif (TIR domain-containing adaptor inducing IFN β) ノックアウトマウスとの 3 重交配実験を行い、疾患の進行速度や生存期間延長の効果を検討した。MyD88, Trif のノックアウトマウスとの交配により、すべての TLR シグナル伝達を特異的に抑制することが可能である。
(倫理面への配慮) ヒト由来試料の使用はないため該当せず。

C.研究結果

変異 SOD1 マウスの脊髄病巣からの、mRNA の網羅的解析を行った。これらは、すべての細胞群における遺伝子発現の総和であるため、細胞群特異的な遺伝子発現の変化を解析するため、細胞群特異的なトランスクリプトームを樹立した。ALS マウスで変動している 225 個の遺伝子についてマーカーと同様に細胞群別発現量を算出し、その値をもとに主に発現している

細胞群別に分類した。その結果、約70%の遺伝子がミクログリア由来と考えられ、発現上昇遺伝子にはリストには Mac2, CD68 等のミクログリアマーカーに加えて、自然免疫に関与する Toll-like 受容体 TLR1, 2, 4, 7, CD14 や補体 C1q, C3 などの上昇がみられ、自然免疫経路の関与が認められた。

さらに、昨年度に行った MyD88^{-/-}, Trif^{-/-} と SOD1^{G93A} マウスとの3重交配実験の追試を行ったが、SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}, SOD1^{G93A}/Trif^{-/-} のに加えて、SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}/Trif^{-/-} の個体を得ることができた。SOD1^{G93A} マウスと比較して、SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}/Trif^{-/-} および SOD1^{G93A}/Trif^{-/-} において有意な生存期間の短縮が見られたが(平均生存期間, SOD1^{G93A}: 162 日; SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}: 151 日; SOD1^{G93A}/Trif^{-/-}: 137 日; SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}/Trif^{-/-}: 137 日) が、発症時期の変化は認めないことから、疾患進行が加速していると考えられた。

D. 考察

MyD88 は 10 種類以上ある TLR のうち TLR3 以外のシグナル伝達に関与するが、Trif は TLR3, 4 を介したシグナル伝達に関与する。MyD88 よりむしろ Trif 依存性経路が ALS モデルの疾患進行の制御因子の一つである可能性が示唆された。今後は、Trif 欠損により疾患進行が加速する分子メカニズムの検討を要する。

E. 結論

ALS モデルにおいて自然免疫経路の破綻はその疾患進行を加速すると考えられる。今後、これらのマウスの脊髄病巣におけるグリア細胞の活性化の検討や、ミクログリアにおいて、どのような炎症性サイトカインや他の分子の発現プロファイルが疾患進行の加速に関与しているのかを検討することを通じて、その分子病態を明らかにする。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

1) Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, & Cleveland DW. Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 106:4465-70, 2009.

2) 山中宏二, 筋萎縮性側索硬化症とグリア細胞 *Medical Science Digest* 35:262-263, 2009.

3) 山中宏二. ALS の今後の研究方向と可能性は *Medical Rehabilitation* 113:13-18, 2009.

2. 学会発表

1) Yamanaka, K. Glial cells as central contributors to non-cell autonomous neurodegeneration in ALS. *The 3rd Korea-Japan Neuroscience Symposium*, Busan, Korea (2009.8)

2) Yamanaka, K. Controlling neuroinflammation through glial cells are viable target for the therapy to slow neurodegeneration in ALS. 第32回日本神経科学学会大会, 名古屋 (2009.9)

3) Watanabe, S., Yamanaka, K. 20th international meeting for MND/ALS, Berlin (2009.12).

4) 渡辺祥司ら 第82回日本生化学会大会, 神戸 2009.10.

5) 山下博史ら 第50回日本神経学会総会, 仙台 2009.5.

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

III. 研究報告(研究協力者)

TAT-FNK 蛋白髄腔内投与による ALS モデルマウスへの蛋白治療

研究協力者：阿部 康二 岡山大学医学部神経内科 教授

研究要旨 前回の研究で、細胞膜透過性を有する TAT 蛋白は、持続髄腔内投与にてマウスの脊髄運動ニューロンに良好に取り込まれ、TAT-FNK の持続髄腔内投与にて、ALS モデルマウスである SOD1 (G93A) Tg マウスの発症、生存期間が延長し、clinical score が改善したことを確認した。今回、TAT-FNK の治療効果につき、さらに組織学的に検討し、腰髄の運動ニューロン数減少の抑制、cleaved caspase 9, 3 および TUNEL 陽性細胞数の減少を確認した。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症は運動ニューロンが選択的に変性し、このため筋萎縮・脱力を来し数年の経過で死に至る神経変性疾患である。しかし病態の解明は十分でなく、いまだ有効な治療法はなく、新規治療法の開発が強く求められる。

近年、HIV1 の転写活性化蛋白質である transcriptional activator protein (TAT) 由来の protein transduction domain (PTD) に結合した蛋白質が、細胞膜や血液脳関門を通過し、神経を含む、さまざまな組織、細胞に取り込まれることが判明した。昨年われわれは、TAT 蛋白が osmotic minipump を用いた持続髄腔内投与にてマウス脊髄運動ニューロンに良好に取り込まれることを確認し、抗アポトーシス作用をもつ Bcl-X_L 蛋白の 3 つのアミノ酸を置換した FNK 蛋白に TAT を結合した TAT-FNK を ALS モデルマウスである、SOD1 (G93A) Tg マウスに、持続髄腔内投与し、発症、生存期間が延長し、clinical score が改善したことを確認した。

そこで本研究では、TAT-FNK の SOD1 (G93A) Tg マウスに対する治療効果につき、さらに組織学的に検討した。

B.研究方法

91 日齢の SOD1 (G93A) Tg マウスに、28 日間、osmotic minipump を用いて人工髄液または TAT-GFP (1.4nmol)、TAT-FNK (1.4nmol) の持続髄腔内投与を行い、133 日齢で各群 6 匹ずつ L4 腰髄を灌流固定し、切片にした。まず Nissl 染色にて L4 腰髄前角の運動ニューロン数を計測した。そして cleaved caspase 9, 3 抗体による免疫染色および terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色を行い、cleaved caspase 9, 3 抗体とニューロンに対する neuron-specific nuclear protein (NeuN) 抗体、またはアストロサイトに対する glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体との二重免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は本学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で、動物愛護面に配慮し、利用動物数を極力減らすように努めた。

C.研究結果

L4 腰髄の運動ニューロン数は人工髄液、TAT-GFP 投与群に比べ、TAT-FNK 投与群で優位に増加していた。また、L4 腰髄において、アポトーシス促進作用のある cleaved caspase 9, 3 が陽性である細胞数、またアポトーシスのマ

ーカーである TUNEL 陽性細胞数は、人工髄液、TAT-GFP 投与群に比べ、TAT-FNK 投与群で優位に減少していた。cleaved caspase 9, 3 と NeuN、GFAP との二重免疫染色では、cleaved caspase 9, 3 と NeuN と merge し、GFAP とは merge しなかった。

D. 考察

人工髄液、TAT-GFP 投与群に比べ、TAT-FNK 投与群で L4 腰髄運動ニューロン数が優位に増加していたことから、28 日間の TAT-FNK 持続髄腔内投与が、ALS による運動ニューロン減少を抑制したことが判明した。また、L4 腰髄の cleaved caspase 9, 3、TUNEL 陽性細胞数は人工髄液、TAT-GFP 投与群に比べ、TAT-FNK 投与群で優位に減少していたことから、TAT-FNK の抗アポトーシス効果が ALS 脊髄で十分に発揮されたことが判明した。cleaved caspase 9, 3 が NeuN と merge したことより、ニューロンが cleaved caspase 9, 3 を発現しており、そのニューロンに TAT-FNK が作用したことが示唆された。

以上より、TAT-FNK 持続髄腔内投与による ALS モデルマウスへの治療効果は組織学的にも証明された。TAT-FNK による蛋白治療は ALS に対する有効な治療法になりえると考えられ、また将来的に、他の治療効果を持つ蛋白質も TAT を結合させることで、ALS 治療に応用することが期待できると考えられた。

E. 結論

TAT-FNK 持続髄腔内投与による、ALS モデルマウスへの著明な治療効果は、組織学的検討においても確認できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究報告

1. 論文発表

Ohta Y, Kamiya T, Nagai M, Nagata T, Morimoto N, Miyazaki K, Murakami T, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Asoh S, Ohta S, Abe K: Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 86: 3028-3037, 2008

2. 学会発表

太田康之、永井真貴子、永田哲也、森本展年、宮崎一徳、武久康、倉田智子、池田佳生、麻生貞光、太田成男、阿部康二. TAT 蛋白髄腔内投与による ALS モデルマウスへの蛋白治療. 第 50 回日本神経学会総会、5 月 20-22 日、2009、仙台、日本

Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Miyazaki K, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asoh S, Ohta S, Abe K. Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. 134th Annual Meeting of the American Neurological Association, Oct 11-14, 2009, Baltimore, USA.

Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Miyazaki K, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asoh S, Ohta S, Abe K. Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 2009, Oct 17-21, 2009, Chicago, USA.

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ALS モデルマウス肝臓における一過性組織障害からの回復過程 には、HGF のエンドクリン性供給が寄与している

研究協力者：加藤 信介 鳥取大学医学部脳神経医科学講座脳病態医科学分野・准教授
共同研究者：加藤 雅子 鳥取大学医学部基盤病態医学講座分子病理学分野
島田(大谷) 若菜 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
中村 敏一 大阪大学先端科学イノベーションセンター

研究要旨：ヒト G93A-SOD1 を高発現(25 コピー数導入)する ALS モデルトランスジェニックマウス(G1H-G93A マウス)は、脊髄および脳幹部の運動ニューロンが持続的・進行性に変性・脱落するのに対し、神経外組織である肝臓・腎臓・心臓においては組織学的障害が一過性に現れるものの最終的には回復していく。本研究では、肝臓に焦点をあてて、肝細胞回復の過程における HGF-c-Met system の活性化について解析した。その結果、肝細胞では血中の全身性 HGF のエンドクリン性の一過性供給が病態の比較的早期におこる。一方、肝臓の回復過程で抗 HGF 抗体を全身投与すると、肝臓の回復が遅延した。以上から、肝臓は、HGF の一過性の供給により組織学的障害から回復していくが、脊髄前角細胞では血液脳関門の存在により早期からの血中 HGF の供給が受けられないために回復ができず、細胞死に至る可能性が考えられた。肝臓と同様に、腎臓・心臓においても組織学的障害像から正常組織像へと回復過程で HGF のエンドクリン性供給が寄与するものと考えられる。

A.研究目的

家族性 ALS (FALS) の発症機序の 1 つに SOD1 の遺伝子変異があげられる。このモデル動物の 1 つとして、ヒトで認められる SOD1 の変異遺伝子(G93A-SOD1)を過剰発現するトランスジェニックマウス(G1H-G93A マウス)が知られる。この動物はヒト ALS 患者と同様に脊髄および脳幹部の運動ニューロンの持続的・進行性的変性・脱落がおこり、運動機能不全による呼吸筋障害により最終的に死亡する。これまで中枢神経系の変化について詳細な検討がなされてきたが、中枢神経以外についても G1H-G93A マウスのみならず、ヒト G93A-SOD1 低発現(18 コピー数導入)する G93A-SOD1 マウスでも肝臓で一過性の組織学的障害がおこること、その組織学的障害は中枢神経系と異なり一過性で、その後肝臓は組織学的障害から回復する事を

報告した(Kato et al., *Histol Histopathol* 2006)。しかし、なぜ肝臓の組織学的障害が一過性でそこから回復可能で、なぜ中枢神経系では組織学的障害が持続・進行性かは不明である。前者の分子機構を明らかにし、その分子機構を運動神経系に適用できれば有用と期待できる。本研究では、肝臓の細胞保護、再生の本体として日本で同定された肝細胞増殖因子(HGF; Nakamura T et al., *BBRC* 1984; *Nature* 1989)とその受容体 c-Met に着目し、肝臓に加えて腎臓および心臓における c-Met の活性化について検討した。

B.研究方法

(1) ALS モデル動物としてヒト G93A-SOD1 を高発現(25 コピー数導入)するトランスジェニックマウス(G1H-G93A マウス) (60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 日齢)を用い、そのコントロールとして

同一年齢の野生型 Littermate を用いた。

(2) 病理組織学的解析：動物を深麻酔後、大動脈から 4%パラフォルムアルデヒド/カコジル酸溶液で還流固定後、同液で後固定し、パラフィン切片を作製した。病理組織染色は、HE 染色および免疫染色を施行した。免疫染色には、一次抗体として抗チロシンリン酸化 c-Met/HGF 受容体 (phospho-c-Met^{1230, 1234, 1235}:c-Met の 1230, 1234, 1235 番目のチロシン残基のリン酸化を特異的に検出し、c-Met の活性化を反映する) 抗体、抗 MIB-1(Ki-67)抗体を用い、ABC 法との組合せで DAB にて可視化した。

(3) 定量的 Real-time RT-PCR 法を用いて HGF mRNA 量を定量した。

(4) HGF タンパク質量を ELISA 法にて定量した。

(5) ALT(GPT)の定量：WAKO トランスアミナーゼ CII Kit を用いて定量した。

(6) 抗 HGF 抗体投与：Alzet mini pump を用いて抗 HGF 機能阻害抗体を肝臓の組織学的障害が顕著になる 98 日齢から 112 日齢まで持続的に皮下投与し、HGF-c-Met system の一過性組織学的障害からの回復過程での寄与を評価した。

C. 研究結果

(1) 脊髄における c-Met の活性化(リン酸化)は動物個体が死亡するまで持続する：4%パラフォルムアルデヒド/カコジル酸溶液で還流固定後の病理組織学的解析の結果、G1H-G93A マウスの脊髄運動ニューロンは、経時的に死細胞数が増え、回復することはなかった。それにともなって、運動ニューロンの phospho-c-Met の免疫染色性が強くなり、その状態が基本的には個体死亡まで持続した。

(2) 肝臓の一過性組織学的障害に伴う肝臓における一過性の c-Met の活性化：G1H-G93A マウスは、HE 染色で一過性の肝細胞組織学的障害を示したものの、120 日齢までにその障害から回復した。すなわち脊髄では進行性に運動ニューロンの変性脱落が進行するのに対して肝細胞での組織学的障害は一過性であった。肝細胞に

おける一過性組織学的障害の特徴は、肝細胞における vacuolation を伴う hydropic change と dark eosinophilic change であった。しかし、MIB-1 免疫染色の結果、肝細胞は細胞分裂・増殖をすることなく、これらの組織学的障害から回復していた。生化学的には血中 ALT(GPT)値の上昇を伴わなかった。脊髄と肝臓における c-Met の活性化を反映する phospho-c-Met について解析したところ、脊髄前角細胞では神経症状発症時期の 100 日齢で、phospho-c-Met が発現していたのに対して、肝細胞ではより早期の 90 日齢から phospho-c-Met の発現を認め、肝細胞組織像が正常化する時期から phospho-c-Met の発現が消失していることが明らかとなった。即ち、脊髄前角細胞と異なり、肝細胞ではより早期から HGF が機能するため、肝細胞は組織学的障害から回復している可能性を示唆した。

(3) 腎臓および心臓における一過性組織学的障害と回復およびそれに伴う一過性の c-Met の活性化：HE 染色において、腎臓や心臓においても肝臓と同様の一過性組織学的障害を認めた。これに伴って、phospho-c-Met の免疫染色性が一過性に強くなり、組織学的障害像からの回復に伴って phospho-c-Met の免疫染色性は低下した。

(4) 組織および血中の HGF mRNA もしくは HGF タンパク質量の定量：肝臓における HGF mRNA の産生量を定量すると、病理組織学的障害を示す前後において、HGF mRNA の誘導が認められなかった。同様に、腎臓、肺、脾臓においても HGF mRNA は病理組織学的障害を示す前後において変化はなかった。一方、血中 HGF 蛋白量に関しては、病理組織障害像からの回復過程で一過性に HGF 蛋白量が血中で高値を示し、回復時期には正常を示していた。

(5) 抗 HGF 抗体投与：抗 HGF 抗体を 2 週間持続的に皮下投与し、血中 HGF をブロックした結果、肝細胞における組織学的障害像からの回復が遅延した。

D. 考察

脊髄や脳幹部運動ニューロンが進行性、持続的

に変性・脱落していくのに対して、中枢神経系以外の組織である肝臓については組織学的障害が一過性であり、その際 ALT の変動を伴わず、かつ MIB-1 発現も認めなかったことから、肝細胞は肝細胞死を伴わず、細胞分裂・増殖をすることもなく、組織学的障害像より回復していることが判明した。同様に腎臓や心臓においても組織学的障害が一過性であった。なぜ中枢神経系の運動ニューロンでは病理組織学的障害が進行性であり、中枢神経系以外の組織が一過性の病理組織学的障害の後、組織像が回復していくかの詳細な分子機構は、現時点では不明である。しかし、この分子機構の完全なる解明は、神経変性の進行過程抑制だけでなく、変性神経細胞の回復機構を駆動できる可能性をもつ重要課題である。HGF は ALS の運動神経細胞変性に対して神経細胞保護作用を示すことに加えて、肝臓、腎臓、心臓の細胞保護、再生因子として機能することが明らかとなっている。以上から、肝細胞では血中の全身性 HGF の一過性供給が病態の比較的早期におこり、その供給により組織学的障害から回復していくが、脊髄前角細胞では血液脳関門の存在により、早期からの血中 HGF の供給が受けられないために回復ができず、細胞死に至る可能性が考えられた。肝臓と同様に、腎臓・心臓においても組織学的障害像から正常組織像へ回復過程に HGF のエンドクリン性供給が寄与するものと考えられる。

E. 結論

ヒト G93A-SOD1 を高発現(25 コピー数導入)する ALS モデルトランスジェニックマウス (G1H-G93A マウス)の肝臓における一過性組織学的障害からの回復には、HGF のエンドクリン性供給が寄与していた。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sumi H, Kato S, Mochimaru Y, Fujimura H, Etoh M, Sakoda S. Nuclear TAR DNA binding protein 43 expression in spinal cord neurons correlates with the clinical course in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 68 (1): 37-47, 2009
- 2) Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T. Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Hum Mol Genet* 18(5): 942-955, 2009
- 3) Yoshihara I, Fujiwara N, Ookawara T, Kato S, Sakiyama H, Yokoe S, Eguchi H, Suzuki K. Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice. *Free Radical Biology & Medicine* 47(5): 559-567, 2009

2. 学会発表

- 1) 別宮豪一, 隅 寿恵, 加藤信介, 山寺みさき, 佐古田三郎: ALS1 モデルの神経細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5 月 20-22 日, 2009
- 2) 隅 寿恵, 加藤信介, 持丸祐子, 藤村晴俊, 衛藤昌樹, 佐古田三郎: 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に関与する. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5 月 20-22 日, 2009
- 3) 加藤信介, 加藤雅子, 平野朝雄, 青木正志, 糸山泰人, 大谷若菜, 船越 洋, 中村敏一: ALS マウスにおける肝・腎・心における一過性組織障害からの回復機構: HGF/活性型リン酸化 c-Met (phosphor-c-Met) システムの関与. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会,

高松, 6月4-6日, 2009

- 4) 隅 寿恵, 加藤信介, 持丸祐子, 藤村晴俊, 衛藤昌樹, 佐古田三郎: 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に関与する. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6月4-6日, 2009
- 5) 別宮豪一, 隅 寿恵, 加藤信介, 山寺みさき, 深田 慶, 佐古田三郎: ALS1 モデルの神経細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6月4-6日, 2009
- 6) 山寺みさき, 隅 寿恵, 別宮豪一, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎: 弧発性筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 陽性グリア封入体. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6月4-6日, 2009
- 7) 島田(大谷)若菜, 船越 洋, 加藤信介, 加藤雅子, 中村敏一: HGF のエンドクリン性供給は, 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスでおこる肝臓病理学的変化からの回復に寄与する. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 10月21-24日, 2009 (日本生化学会大会優秀プレゼンテーション賞受賞)
- 8) 松田一己, 加藤信介: 難治前頭葉てんかん手術例の摘出標本の病理学的検索からリポフスチン封入体を有する神経細胞が確認された皮質形成異常例の臨床・病理学的検討. 第 37 回臨床神経病理懇話会, 姫路, 11月7-8日, 2009

H.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

孤発性筋萎縮性側索硬化症患者ゲノムの CNV(copy number variation)解析（第 3 報）： 疾患感受性蛋白質の免疫組織化学染色および Western blot 法による検討

（第 3 報）

研究協力者：加藤丈夫 山形大学第三内科

共同研究者：清野智美¹⁾、後藤 薫²⁾、荒若繁樹¹⁾、佐藤秀則^{1,3)}、江見 充^{1,3)}、
川並 透¹⁾、栗田啓司¹⁾、豊島 至⁴⁾、祖父江 元⁵⁾

所属：(1)山形大学第三内科、(2)山形大学第二解剖、(3)DNA チップ研究所、
(4)秋田大学医学教育センター、(5)名古屋大学神経内科

研究要旨

これまでの私達の研究により、孤発性 ALS 患者では対照例に比べて、「遺伝子 X」領域のコピー数が有意に増加していることが明らかとなった。そこで本研究では、SH-SY5Y 細胞およびヒト剖検脳・脊髄を用いて、遺伝子 X がコードする蛋白質（蛋白質 X）の発現・局在について免疫細胞（組織）化学的および Western blot による検討を行った。その結果、SH-SY5Y 細胞では蛋白質 X は核に局在していた。ヒト脳・脊髄組織の検討でも、蛋白質 X は主に神経細胞、一部グリア細胞、の核に局在にしていた。以上の結果より、この蛋白質の神経細胞核での量的異常が孤発性 ALS の発症リスクとなる可能性が示唆された。

A.研究目的

私達はこれまでの研究により、孤発性 ALS 患者では対照例に比べて、「遺伝子 X」領域のコピー数が有意に増加していることを明らかにした。しかし、遺伝子 X にコードされる蛋白質（蛋白質 X）のヒト中枢神経系での発現・局在については、これまでに報告がない。そこで本研究では、培養細胞およびヒト剖検脳・脊髄を用いて、中枢神経系での蛋白質 X の発現・局在について検討した。

B.研究方法

培養細胞はヒト神経芽細胞腫由来の細胞株 SH-SY5Y 細胞を用い、免疫細胞化学染色と Western blot を行った。また、ホルマリン固定・パラフィン包埋したヒト剖検脳の各部位およ

さらに新鮮凍結ヒト脳組織（大脳皮質、大脳白質、尾状核、視床、扁桃核、海馬、小脳、橋）を用いて Western blot を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は山形大学医学部倫理委員会の承認を得てから実施し、研究対象者からは文書で同意を得た。

C.研究結果

蛋白質 X に対する抗体を用いて SH-SY5Y 細胞の免疫細胞化学染色を行うと、核が顆粒状に免疫染色された。SH-SY5Y 細胞を細胞分画法により核画分と細胞質画分に分画し Western blot を行うと、抗体に反応するバンドは核画分に認め

られた。

ヒト脳および脊髄の免疫組織化学染色では、SH-SY5Y 細胞と同様に、神経細胞の核が強く免疫染色された。神経細胞より弱い、グリア細胞の核も免疫染色された。新鮮凍結ヒト脳組織の Western blot では、脳のいずれの部位でも予想された分子量の位置に一本の陽性バンドが認められた。ただし、脳の部位により量的な差はあった。

D. 考察

本研究により、蛋白質 X は中枢神経では主に神経細胞の核に多く存在することが明らかとなった。したがって、蛋白質 X は核で機能する蛋白質であると思われる。これまでの私どもの CNV 研究の結果より、この蛋白質の量的異常が孤発性 ALS の発症リスクとなることが示唆された。このことは、運動ニューロンの核での蛋白質 X の量的異常が、運動ニューロンの生存にとって重要な役割を演じている可能性が考えられる。今後、この蛋白質の発現量、特に運動ニューロンでの発現量に、孤発性 ALS と対照例で違いがあるか否か検討が必要である。

E. 結論

孤発性 ALS の発症に関与すると考えられる蛋白質 X は、ヒト中枢神経系に存在し、主に神経細胞、一部グリア細胞、の核に局在していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

加藤丈夫、佐藤秀則、江見 充、川並 透、

栗田啓司、豊島 至、祖父江 元：孤発性 ALS の疾患感受性 CNV (copy number variation) の探索 (演題番号 01 - 211) . 第 50 回日本神経学会総会, 2009 年 5 月、仙台.

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし