

めた。脊髄では頸膨大、腰膨大で前根および後根の萎縮を認めた。

(組織学的所見) 舌下神経核の神経細胞は軽度に減少。脊髄横断面で前角萎縮、後索・側索・脊髄小脳路の変性(図1)。頸髄・腰髄とも脊髄前角では神経細胞の高度脱落、残存細胞の萎縮、グリオシスを認めた。HE染色でBunina小体や明瞭な封入体は指摘できなかった。Clarke柱においても神経細胞の萎縮・脱落あり。後索変性は腰髄レベルから認め、腰髄レベルの後根神経節で神経細胞数は減少。骨格筋では高度群集萎縮、脂肪組織置換あり。腓腹神経グルタル固定では、大径有髄線維:約500/mm<sup>2</sup>、小径有髄線維:約1000/mm<sup>2</sup>と大径、小径線維ともに高度な脱落あり、onion bulbの形成はみられず。

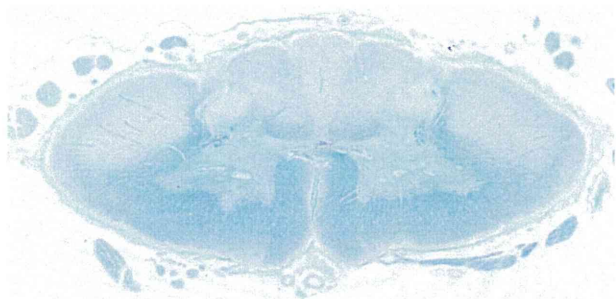


図1 頸髄 前角、後索、側索、脊髄小脳路の変性

(免疫組織化学所見) Ubiquitin陽性封入体を顔面神経核、胸髄前角、腰髄前角などの運動神経細胞質内に認めた。OPTN陽性封入体を舌下神経核、腰髄前角、後根神経節等の神経細胞質内に認めた。外転神経核の運動ニューロンの蛍光染色ではUbiquitin沈着の多くがOPTN沈着と共局在していた(図2)。

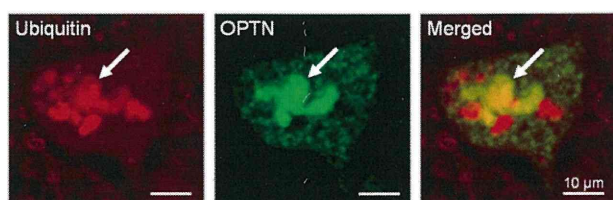


図2 外転神経核運動神経の二重蛍光染色

TDP-43染色では腰髄前角や外転神経核などにskein-like inclusionを認め、リン酸化TDP-43抗体でも頸髄前角、Clarke柱、後根神経節などで神経細胞

胞質内封入体を確認した。

TDP-43



pS409/410



図3 TDP-43陽性封入体

(病理所見まとめ)

A. 下位運動ニューロン障害、B. 感覚神経系障害

(sensory neuronopathy; A、B両者でOPTN、TDP-43陽性封入体)、C. 骨格筋障害、D. 多発脳梗塞、E. 上位運動ニューロン障害・錐体路変性(ただしDの影響を除外できない)

#### D. 考察

HMSN-P剖検例の脳幹・脊髄において下位運動ニューロン障害を認めたことから、本疾患はHMSNすなわち末梢神経障害とは異なる病態と考えられ、むしろALSを含む運動ニューロン病との共通点を認めた。まず、下位優位の運動ニューロン障害および後索障害を有する点は、SOD1変異を有する家族性ALSの病理像と類似していた。

さらに本例では運動神経および感覚神経においてOPTN陽性の封入体を認めた。OPTN陽性の細胞内沈着物は孤発性ALS、OPTN変異、SOD1変異あるいはFUS変異を有する家族性ALSにおいて広く認めるがコントロールでは認めないとされ、ALS病理の指標となる可能性が指摘されている。本例では加

えて TDP-43 陽性封入体も認めた。従って HMSN-P の病理所見は ALS 全般の病理所見とも共通項を有している。

## E. 結論

HMSN-P は sensory neuropathy を伴う家族性運動ニューロン病と捉えることができる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Okita T, Nodera H, Shibuta Y, Nodera A, Asanuma K, Shimatani Y, Sato K, Izumi Y, Kaji R: Can Awaji ALS criteria provide earlier diagnosis than the revised El Escorial criteria? J Neurol Sci 302: 29-32, 2011.
2. 織田雅也, 和泉唯信, 梶龍児: 家族性 ALS の原因遺伝子. Brain Nerve 63: 165-170, 2011.
3. Snapinn KW, Larson EB, Kawakami H, Ujike H, Borenstein AR, Izumi Y, Kaji R, Maruyama H, Mata IF, Morino H, Oda M, Tsuang DW, Yearout D, Edwards KL, Zabetian CP: The UCHL1 S18Y polymorphism and Parkinson's disease in a Japanese population. Parkinsonism Relat Disord 17: 473-475, 2011.
4. 和泉唯信, 鎌田正紀, 梶龍児: 家族性 ALS ALS-OPTN の臨床と病理. Clinical Neuroscience 29: 136-137, 2011.
5. Fujita K, Yoshida M, Sako W, Maeda K, Hashizume Y, Goto S, Sobue G, Izumi Y, Kaji R: Brainstem and spinal cord motor neuron involvement with optineurin inclusions in proximal-dominant hereditary motor and sensory neuropathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry 82: 1402-1403, 2011.
6. 有井敬治, 乾俊夫, 浅沼光太郎, 和泉唯信, 梶龍児, 三ツ井貴夫: Parkinson 病に対する新し

いリハビリテーション. Brain Nerve 63: 878-883, 2011.

7. Kuroda Y, Sako W, Goto S, Sawada T, Uchida D, Izumi Y, Takahashi T, Kagawa N, Matsumoto M, Matsumoto M, Takahashi R, Kaji R, Mitsui T: Parkin interacts with Klokin1 for mitochondrial import and maintenance of membrane potential. Hum Mol Genet 2011, in press

### 2. 学会発表

1. 鎌田正紀, 和泉唯信, 伊東秀文, 香川聖子, 工藤英治, 丸山博文, 川上秀史, 梶龍児: 常染色体劣性 optineurin 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011 年 5 月.
2. 渋谷佳子, 野寺裕之, 沖田任弘, 浅沼光太郎, 島谷佳光, 三ツ井貴夫, 和泉唯信, 梶龍児: 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の診断における Awaji 基準の有用性の検討. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011 年 5 月.
3. 松岡孝至, 鎌田正紀, 藤田浩司, 和泉唯信, 梶龍児: 当院の JaCALS 登録 ALS 患者の検討. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011 年 5 月.
4. 高松直子, 寺澤由佳, 宮城愛, 島谷佳光, 酒井和香, 和泉唯信, 梶龍児: ALS の神経および筋の超音波所見. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011 年 5 月.

## 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

## SCA2 と Motor Neuronopathy

研究分担者 野元正弘

研究協力者 西川典子, 辻井智明, 岩城寛尚, 永井将弘  
愛媛大学 薬物療法・神経内科

### 研究要旨

近年、Spinocerebellar ataxia type 2(SCA2)の中で motor neuron disease(MND)の表現型をとるものがあることが指摘されている。当科で診療中の SCA2 の家系にも、緩徐進行性の Motor Neuronopathy を呈した症例があるため報告した。本例は、緩徐な経過で 2 次運動ニューロンが変性脱落している病態と予測される。上位運動ニューロン徴候がない、脳幹部領域の症状がない点からは ALS とは異なる。しかし、motoneuron に限局した motor neuronopathy を来した原因として ATXN2 の存在が強く関連するものと考えられる。ATXN2 は Motor Neuronopathy を発症させるリスクファクターとなる。

### A. 研究目的

Spinocerebellar ataxia type 2(SCA2)は、ataxin-2(ATXN2)に基づく CAG の 3 塩基リピートの異常増幅による疾患である。SCA2 は通常 olivopontocerebellar atrophy タイプの症候をとることが多いが、2000 年頃から parkinsonian phenotype の SCA2 が報告されてきた。以前に私達も parkinsonism が前景となった SCA2 家系を報告した。この家系は L-dopa responsive parkinsonism を示す点と、同胞内の phenotype が其々異なる点特徴的であった。中でも、ごく緩徐進行性の慢性二次運動ニューロン障害をきたすのみであった症例は世界的にも類似例が殆どなく SCA2 による症状と捉えるべきか疑問が残った。しかし 2010-2011 年になって欧米やアジアより ATXN2 が ALS に関連するという新しい報告が出されてきた。そのため、今回改めて SCA2 と motor neuronopathy の関連について検討したい。

### B. 研究方法

それぞれの患者に対してインフォームドコンセントを行い、書面で同意を得た後に SCA2 の遺

伝子診断を施行した。遺伝子診断は鹿児島大学第三内科の協力を得て行った。  
(倫理面への配慮) 遺伝子診断の際には文書で説明同意を得た。

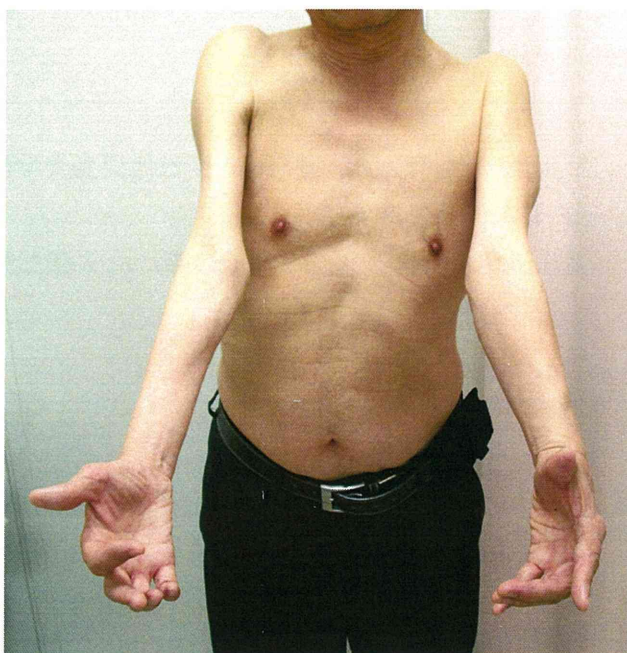
### C. 研究結果

#### 症例

症例は 69 歳男性。14 歳から右上腕の筋萎縮・筋力低下が出現。緩徐に進行し、右上肢拳上不能となった。近医で精査され、筋ジストロフィーやポリオが疑われたが、診断がつかなかった。45 歳頃から左下肢の筋萎縮・筋力低下 58 歳頃から左上肢の筋萎縮・筋力低下が出現。ごく緩徐に進行した。同胞二人が OPCA タイプ、L-dopa responsive parkinsonism の SCA2 と診断されたため、当科紹介受診した。  
神経学的所見 ; Nystagmus あり, slow saccades なし, dysarthria・dysphagia はなく、舌萎縮・繊維束攣縮も認めなかった。頸部右へ傾く dystonia を認める。両上肢には近位部優位な筋萎縮を著明に認め、左下肢筋萎縮あり凹足変形あり (図 1)。筋萎縮部位に線維束攣縮なし。MMT は、Delt 2/2, Triceps 2/2, Biceps 3/2, WF 3/4, WE 3/4, Ilio 5/4,

Quad 5/4, Ham 5/4, TA 4/3, GS 4/4, 握力 11/25kg, 腱反射 消失, 病的反射 陰性 失調なし, 感覚障害なし, 自律神経障害なし 検査; 血液検査では異常なし。針筋電図では慢性 脱神経所見を認めた。MIBG 心筋シンチグラフィ ーでは H/M 比 早期相 2.08, 後期相 1.64 と正 常であった。脊髄性筋萎縮症 SMA 遺伝子エクソ ン 1 欠失はみられなかった。頭部 MRI 検査では、 小脳・脳幹部の萎縮ははっきりしないが、上部小 脳で軽度の萎縮がみられる (図 2)。

図 1 : 上肢の筋萎縮

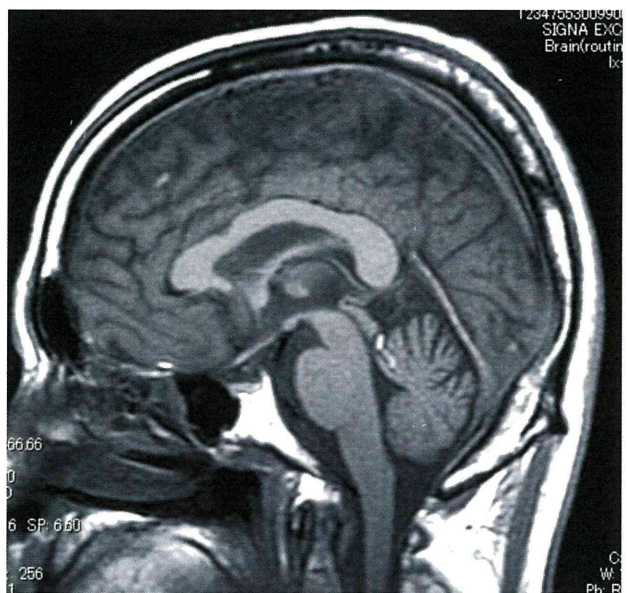


#### D. 考察

本例は、14 歳という若年で発症した緩徐進行性 の motor neuronopathy を呈し、ATXN2 CAG repeats の伸長を有している。小脳失調やパーキンソンニズムは認められない。

SCA と motor neuron disease (MND) の関係 については 2009 年までに症例報告が 3 例あるに すぎず、いずれも小脳失調症状を発症後に、 rapidly progressive and fatal form of MND に至 っている 1-2)。

図 2 : 頭部 MRI 検査



一方、孤発性 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) 患者における ATXN2 の CAG repeats 数を検討したものでは、32 以上に伸長しているものは、コントロール群では 0% であるのに対して、孤発性 ALS では 0.5%、familial ALS では 2.2% であった 3)。また、ALS 患者での ATXN3 の CAG repeats 数を検討したものでは、ALS 患者もコントロールと ATXN3 のサイズ分布は差がないとの結果が得られ、SCA3 と ALS の関連はないと分かった 4)。

本例は、緩徐な経過で 2 次運動ニューロンが変性脱落している病態と予測される。上位運動ニューロン徴候がない、脳幹部領域の症状がない点、また経過が非常に緩徐で fatal ではない点において ALS の範疇には入らない。しかし、motoneuron に限局した motor neuronopathy を来した原因として ATXN2 の存在が強く関連するものと考えられる。

#### E. 結論

Motor Neuronopathy を呈した SCA2 の 1 例を報告した。

ATXN2 は Motor Neuronopathy を発症させるリスクファクターとなる。

#### <参考文献>

- 1) Furtado S, et al. Mov Disord. 2004; 19 :

622-9.

- 2) Infante J, et al. Mov Disord. 2004 ; 19 :  
848-52.
- 3) Van Damme P,et al. Neurology. 2011 ; 76 :  
2066-72.
- 4) Gispert S, et al. Neurobiol Dis. 2012 ; 45 :  
356-61.

## F.健康危険情報

特になし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Tanabe N, Takashima H, Nomoto M. : Three spinocerebellar ataxia type 2 siblings with ataxia, parkinsonism, and motor neuronopathy. Intern Med. 2011 ; 50 :  
1429-32.

### 2.学会発表

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1.特許取得

なし

### 2.実用新案登録

なし

### 3.その他

なし

## 成人型脊髄性筋萎縮症と考えられる当科症例の

### 臨床像と遺伝学的背景の検討

研究分担者 中野今治<sup>1)</sup>

研究協力者 益子貴史<sup>1)</sup>，手塚修一<sup>1)</sup>，秋本千鶴<sup>1)</sup>，森田光哉<sup>1)</sup>，相楽有規子<sup>2)</sup>，斎藤加代子<sup>2)</sup>

1)自治医科大学内科学講座 神経内科学部門，2)東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

#### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）または運動ニューロン疾患と診断された症例について、5年以上の間、下位運動ニューロン症候のみで緩徐に経過した症例を成人型脊髄性筋萎縮症（SMA）として抽出し、その臨床像及び遺伝学的背景について検討した。当院で過去15年間にALSまたは運動ニューロン疾患と診断された症例302例について後方視的に調査・検討したところ、入院当初、下位運動ニューロン症候のみを呈した症例は108例（36%）であった。その中で65名（61%）はその後の経過中に上位運動ニューロン症候の出現、嚥下機能の増悪、呼吸筋麻痺、死亡に至るなど臨床的にALSと診断し得る症例と判断した。5年以上の間、下位運動ニューロン症候のみで極軽微な進行で推移しSMAと考えられたのは11例（10%）であった。その臨床像は、男性4例、女性7例で平均年齢は52.9歳。家族歴は2症例2家系に認めた。初発症状は1例が対称性下肢近位筋優位の筋力低下、他の10例が一側上肢または一側下肢の遠位筋優位の筋力低下であった。小児SMAの大多数で認められるSMN及びNAIP変異について同意が得られた9症例について検索を行ったが、何れの遺伝子にも変異を認めなかった。SMN変異を有するSMA成人発症報告例の大多数は下肢近位筋対称性の発症であり、自験例のSMAと考えられた症例群は遺伝学的にも、症候学的にも異質な疾患群を包括している可能性が示された。

#### A. 研究目的

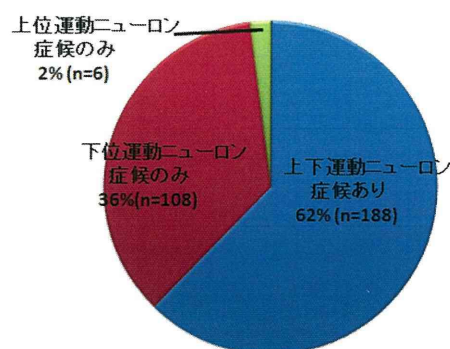
成人型脊髄性筋萎縮症（SMA）は臨床的に下位運動ニューロン症候のみを呈し経過が緩徐で予後が良好な疾患とされる。当科で経験したSMAと考えられる症例の臨床像と遺伝学的背景を解析しその疾患相同性について検討する。

#### B. 研究方法（倫理面への配慮も含む）

当院において、過去15年間に運動ニューロン疾患と診断された302例の中で、下位運動ニューロン症候のみ呈して、かつ5年以上の極軽微な進行で推移しSMAと考えられた11例を後方視的に抽出し、臨床像をまとめた。そのうち遺伝子解析の同意が得られた9例について、小児SMAの大多数で原因遺伝子とされるSMN及びNAIP遺伝子の解析を行った。

#### C. 研究結果

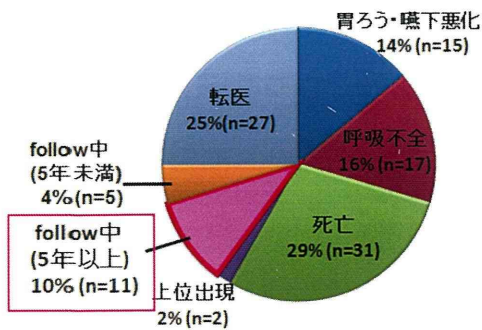
図1 自験302例（当科入院時の臨床所見）



当院入院時より上位運動ニューロン症候および下位運動ニューロン症候を同時に満たす、すなわち筋萎縮性側索硬化症と確定診断できたのは302例中188例（62%）、下位運動ニューロン症候のみを呈した症例は108例（36%）であった（図1）。上位運動ニューロン症候のみを呈した症例も6例存在した。下位運動ニューロン症候

のみを呈した 108 例についてその後の転帰を図

図2 下位運動ニューロン症候のみ108例の転帰



2 に示す. 108 例の中で、嚥下機能が増悪し胃瘻造設を余儀なくされた 15 例、呼吸筋麻痺を認められた 17 例、死亡に至った 31 例、上位運動ニューロン症候が出現した 2 例の合計 65 例 (61%) は臨床的に ALS と診断し得る症例と判断した. 追跡が可能で下位運動ニューロン症候のみを呈した症例は 16 例 (14%) であり、その中で 5 年以上の間、極軽微な進行で推移した 11 例を SMA と臨床診断し、その臨床像をまとめた。

11 例の臨床像は男性 4 例、女性 7 例、家族歴を有したのは 2 症例 2 家系 (両家系とも常染色体優性遺伝形式) であった. 初発症状では 1 例が対称性両側下肢近位筋優位の筋力低下、7 例が一側上肢遠位筋優位筋力低下、3 例が一側下肢遠位筋優位筋力低下を呈した. 発症年齢は平均 52.9 歳で、男女で大きな差はなく 20 代から 70 代まで広く分布していた. 罹病期間は 5-9 年が 3 例、10-14 年が 3 例、15-19 年が 2 例、20 年以上経過した例が 3 例であった. 男女で大きな分布の差はなかった. 現在の ADL については 7 例が歩行可能、4 例が不可能であった. また 4 例が自立生活、7 例が部分介助生活であり、2 例で軽度の嚥下障害を認めた. 寝たきりの症例はなかった.

以上のような自験例 11 例の内、遺伝子解析の同意が得られた 9 例について SMN 遺伝子、NAIP 遺伝子の解析を行ったが、何れの遺伝子にも変異を認めなかった.

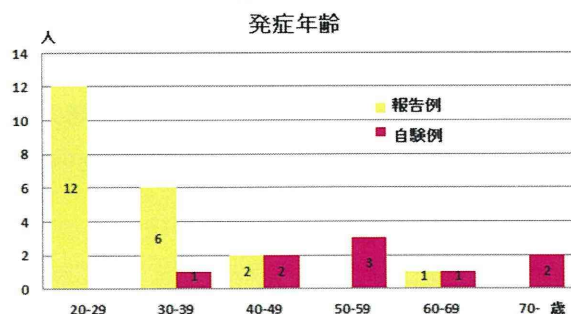
#### D. 考察

筋力低下や筋萎縮、腱反射の減弱・消失といった下位運動ニューロン症候のみで発症した症例でも比較的急性の経過をとり、臨床的には ALS と診断し得る症例が多い. 今回の自験例での後方視的検討でも下位運動ニューロン症候のみで発症した症例の内 61% は ALS と臨床的に診断できる症例であった. 一方、2~5 年で呼吸筋麻痺を来して死亡する ALS と比べると、進行が非常に緩徐で生命予後の良好な症例群が存在する. これらの症例は従来、脊髄性進行性筋萎縮症 (SPMA) や進行性筋萎縮症 (PMA) などと呼ばれてきたが、ALS との同源性やその他の遺伝性運動ニューロパチーとの鑑別は常に議論されてきたところである.

我々は今回、成人発症で下位運動ニューロン症候のみを呈したまま、5 年以上経過しても極めて進行が緩徐な症例を SMA と定義した. この暫定的な定義の基で自験例より抽出した症例群の特徴を明確にするため、小児 SMA 症例の大多数で認められるとされる原因遺伝子 *SMN*、*NAIP* の変異をまず検索したが何れの遺伝子にも異常は認められなかった. そこで *SMN* 変異を有する成人発症 SMA 報告例 21 例と自験例の臨床像を比較した.

文献上検索できた報告例は男性 13 例、女性 8 例であり、家族歴は 9 例と半数で認められた. その発症年齢は平均 31.5 歳で 20-64 歳であるが、18 例が 35 歳以下で自験例と比べると若年発症の傾向があった (図 3). しかし 64 歳と高齢発症も 1 例あり、SMA の診断には高齢発症であっても遺伝子検索が望まれる. 初発症状は報告例 21 例中 19 例が対称性下肢近位筋優位の筋力低下お

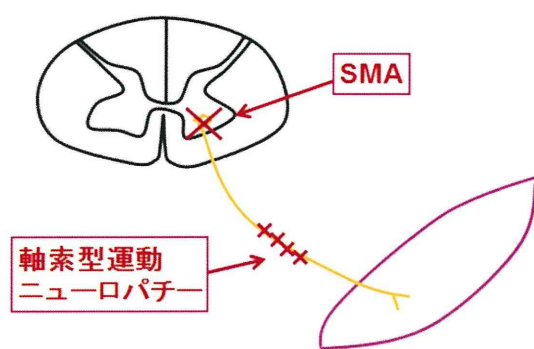
図3 自験例とSMN遺伝子変異を有するSMA報告例との対比



よび筋萎縮であり、2例が非対称性遠位筋優位の筋力低下であるものの症候学的には均質な症例群といえる。自験例で1例が対称性下肢近位筋優位の筋力低下で、その他の症例が遠位筋優位と様々な分布で発症していたことは、症候学的な多様性を示している。両群の罹病期間の分布に差は見られなかった。21例中14例でADLについて記載が有り、6例が自立歩行生活可能、6例が平地歩行のみ可能、2例が歩行不可能で、自験例と類似していた。

前述したように SMA はその障害部位の解剖学的要因から臨床所見、電気生理学的に軸索型運動ニューロパチーとの鑑別は困難である(図4)。そこで、今回9例中6例で遺伝性運動ニューロパチーの原因遺伝子についても網羅的解析を行った。

図4 ニューロパチーとの鑑別



解析は途中であるが、50歳時に一側上肢遠位筋優位の筋力低下で発症した家族歴のない56歳女性1例において、軸索型 Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT2) の原因遺伝子の一つである *MFN2* の P456L 変異を認めた。P456L 変異は新規変異であり、その病因としての意義について現在検討しているところである。

#### E. 結論

脊髄性筋萎縮症として自験例より抽出した症例群は多様な臨床像を呈し、また遺伝学的にも、*SMN* 変異を認める均一な疾患群とは異なることがわかった。また、運動ニューロパチーと考えられる症例も含まれた疾患群である可能性が示された。

謝辞；遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子解析を行っていただいている鹿児島大学医学部第3内科高嶋博先生、橋口昭大先生に深謝いたします。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

第53回 日本神経学会総会にて発表予定

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし



## 脊髄性筋萎縮症の分子遺伝学的検討

研究分担者 斎藤加代子<sup>1)</sup>

研究協力者 久保祐二<sup>1),2)</sup>, 相楽有規子<sup>1)</sup>, 荒川玲子<sup>1)</sup>, 青木亮子<sup>1)</sup>, 近藤恵里<sup>1)</sup>

1) 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

2) 東京女子医科大学先端生命医科学専攻遺伝子医学分野

### 研究要旨

臨床症状から脊髄性筋萎縮症（SMA）と診断されたが、遺伝子診断の指標である survival motor neuron（SMN）遺伝子の欠失を示さない症例に注目し、これらの患者の遺伝子について、次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を行い、SMAを引き起こす新規原因遺伝子の探索を行った。IV型1家系2例に着目したところ、共通するアミノ酸置換を伴うヘテロの新規遺伝子変異を54個同定することができた。なかでもSMN蛋白質と関連する蛋白質、また脊髄で発現する新規SNPを6つ同定し、候補遺伝子とした。また、発症年齢が早かった1例において、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因遺伝子であるSTEX遺伝子の新規SNPを同定した。このような新規SNPが発症の若年化に関与している可能性が考えられた。

### A. 研究目的

小児期発症の脊髄性筋萎縮症（SMA I型、II型、III型）はほぼ単一の病因で、原因遺伝子は第5染色体長腕5q13に存在している survival motor neuron（SMN）遺伝子であり、SMN遺伝子に欠失または突然変異が見られるホモ接合体において発症する。一方、成人発症のIV型では、SMN遺伝子の欠失が見られないことが多く、臨床的にも遺伝子的にも heterogeneous であると言われている。本研究では、臨床症状からSMAと診断されたが、遺伝子診断の指標であるSMN遺伝子の欠失を示さない症例に注目し、これらの患者の遺伝子を次世代シーケンサーを利用して全エクソーム解析をすることでSMAを引き起こす新規原因遺伝子を同定する。

### B. 研究方法

SMA遺伝子診断の指標であるSMN遺伝子の欠失を示さない症例（IV型3例、うち2人は親子関係）に対し、次世代シーケンサーSOLiD4システム

（ABI社）による全エクソーム解析を施行した。ゲノムDNAからのエクソームのキャプチャには、Agilent SureSelect Human All Exon Kit（Agilent社）を使用した。データ解析には、MappingにBioscope 1.3.1、Referenceにはhg19を使用した。得られた解析結果に対し、これらの症例で共通の新規遺伝子変異が存在するかを調査した。

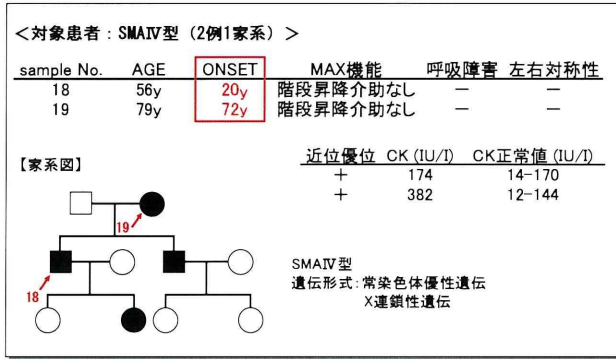
（倫理面への配慮）

本研究の脊髄性筋萎縮症の遺伝子解析について、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

これらの3症例については、PCR-電気泳動法による検査、MLPA法による検査によって、SMN遺伝子の欠失がないことを確認した。次世代シーケンサーの結果より、3例に共通するアミノ酸置換を伴うヘテロの新規遺伝子変異を14個同定した。

図1 親子関係にある2例について



また、図1に示すような親子関係にある2例に着目したところ、共通するアミノ酸置換を伴うヘテロの新規遺伝子変異を54個同定することができた。

この親子関係にある2例について、さらに「SMA機能関連遺伝子の解析」を行い候補遺伝子の絞込みを行った。また、「筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 原因遺伝子の解析」についても検討した。

#### 1. SMA機能関連遺伝子の解析

*SMN*遺伝子は脊髄の神経細胞の核内・細胞質でRNAの代謝に関与する遺伝子である。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤との関わりについての報告もある。そこで *SMN*遺伝子に似た機能をもつ遺伝子や脊髄で発現する遺伝子に注目して候補遺伝子の絞込みを行った。

表1 SMA機能関連遺伝子の解析

※以下の結果はnovel SNP、nonsynonymous、hetero mutationである。

GENE	POINT	chr
1 AAAS	achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia (triple-A syndrome) function: normal development of the peripheral and central nervous system	12
2 HDAC5	histone deacetylase 5 function: transcriptional regulation, etc..	17
3 XAB2	pre-mRNA-splicing factor SYF1	19
4 MAST1	microtubule associated serine/threonine kinase 1 high expression: adult brain, spinal cord and testis	19
5 CASK	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase expression: synapses in the brain, other: FG syndrome 4, mental retardation, microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia	X
6 MAOB	monoamine oxidase B function: metabolism of neuroactive and vasoactive amines in the central nervous system and peripheral tissues	X

その結果、histone deacetylaseである *HDAC5* 遺伝子やRNA splicing factorである *XAB2* 遺伝子など *SMN* proteinの近傍で作用している可能性がある遺伝子が含まれていた (表1)。

#### 2. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 原因遺伝子の解析

近年、ALSの中に下位運動ニューロン症候のみを示す症例が報告されている (ALS8型、原因遺伝子VAPB)。このような症例の可能性も考えられるため、現在報告されているALS1~10型の原因遺伝子に変異があるかを確認した (表2)。

表2 優性遺伝形式ALSの原因遺伝子について

Molecular Genetics of Autosomal Dominant ALS

Gene Reviewより

% of Individuals with FALS	Locus Name (Gene Symbol <sup>1</sup> )	Disease Name	Protein Name	Molecular Genetic Test Availability
20%	ALS1 ( <i>SOD1</i> )	FALS	Superoxide dismutase (Cu-Zn)	Clinical
Rare	ALS3 ( <i>18q21</i> )	FALS		Research only
Rare	ALS4 ( <i>SETX</i> )	Motor neuropathy with pyramidal features	Probable helicase senataxin	Clinical
~4%	ALS6 ( <i>FUS/TLS</i> )	FALS	Fused in sarcoma/translated in liposarcoma	Clinical
Rare	ALS7 ( <i>20p13</i> )	FALS		Research only
Rare	ALS8 ( <i>VAPB</i> )	Finkel type SMA or SMA IV	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	Clinical
Rare	ALS9 ( <i>ANG</i> )		Angiogenin	Clinical
1%-4%	ALS10 ( <i>TARDBP</i> )	TARDBP-related amyotrophic lateral sclerosis	TAR DNA-binding protein 43	Clinical
Unknown	ALS/FTD ( <i>9p21-q22</i> )			Research only
Rare	ALS/FTD ( <i>17q</i> )			Research only

しかしながら下位運動ニューロン症候のみを示すALS8型の原因遺伝子VAPBのSNPは検出されず、ALS4型 (球麻痺症状を伴わない優性遺伝の若年発症型運動ニューロン疾患)の原因遺伝子 *SETX* のSNPが検出された (表3、4)。

表3 ALS4型の原因遺伝子 (*SETX*) について

% of Individuals with FALS	Locus Name (Gene Symbol <sup>1</sup> )	Disease Name	Protein Name	Molecular Genetic Test Availability
Rare	ALS4 <sup>2</sup> ( <i>SETX</i> )	Motor neuropathy with pyramidal features	Probable helicase senataxin	Clinical

表4 検出された *SETX* 遺伝子の SNP

rs No.	coverage	Counts	Percoverage	novelAlleleQV	mutation	
					sample 18	sample 19
1 rs1056899	20	0.95	27	-	hetero	
2 rs1183768	69	0.83	23	-	hetero	
3 rs1185193	20	0.65	27	-	hetero	
4 rs3739922	12	0.92	26	hetero	-	
5 -	12	0.833	17	hetero	-	

≥5                      ≥0.8                      ≥15

今回5個の *SETX* 遺伝子のSNPが検出されたが、共通のSNPはなかった。そのうちの4個のSNPは、ある程度の頻度で見られる既知のSNPで疾患には関与しないものであった。また、症例18 (sample18)のみにデータベース登録されていない新規SNPが1個見つかった (表4)。

#### D. 考察

図1の家系図より、疾患の遺伝形式は優性遺伝もしくはX連鎖性遺伝形式が考えられる。そこで

SMA 機能関連遺伝子の解析では、常染色体上にある 4 個の遺伝子と X 染色体上にある 2 個の遺伝子、計 6 個の新規 SNP を候補遺伝子とした (表 1)。症例 18 と 19 について注目すべき点は、発症年齢に差がある点である。発症年齢は、症例 18 (長男) は 20 歳で、症例 19 (母親) は 72 歳であり、症例 18 において疾患発症の若年化が見られた。このことから、この家系が優性遺伝形式の場合、共通する原因遺伝子変異の他に症例 18 特有の遺伝子の影響が考えられる。

ALS 原因遺伝子の解析より、症例 18 にのみデータベース登録されていない *SETX* 遺伝子の新規 SNP が 1 個見つかった (表 4)。ALS4 型はセナタキシンをコードする *SETX* 遺伝子の変異が原因である優性遺伝の若年発症型運動ニューロン疾患である。セナタキシンは DNA と RNA のヘリカーゼドメインを構成しており、RNA プロセッシングに関わっていると考えられている。これらのことより、この *SETX* 遺伝子の新規 SNP は疾患発症の若年化に関与していることも考えられる。

今後はこれらの新規 SNP が存在するかをキャピラリーシーケンサーにより、リシーケンスして確認する予定である。また、症例 18、19 以外の罹患・非罹患の家族構成員にも協力頂き、DNA を収集し、新規 SNP の有無を確認する予定である。

## E. 結論

1. SMA 機能関連遺伝子の解析より、SMN 蛋白質と関連する蛋白質、もしくは脊髄で発現する新規 SNP を 6 個同定し、候補遺伝子とした。
2. ALS 原因遺伝子の解析より、共通 SNP は検出されなかったが、1 例において、*SETX* 遺伝子の新規 SNP を同定した。この *SETX* 遺伝子の SNP が発症の若年化に関与している可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

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

なし

### 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

## 加齢が孤発性 ALS の危険因子である分子病態の考察

研究分担者 郭 伸<sup>1)</sup>

研究協力者 日出山拓人<sup>1) 2)</sup>, 寺本さやか<sup>1)</sup>, 八賀康介<sup>1)</sup>, 山下雄也<sup>1)</sup>

1) 東京大学 神経内科, 2) 現 同保健・健康推進本部

### 研究要旨

孤発性 ALS の運動ニューロンでは、正常では認められない Q/R 部位未編集型 GluA2 (AMPA 受容体サブユニット) が発現しており、この分子異常は RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の発現低下による。マウスによる検討で、ADAR2 を欠失した運動ニューロンは Ca<sup>2+</sup>透過型 AMPA 受容体を介するメカニズムにより神経細胞死に至ることから、この分子異常が ALS の病因に密接に関与していることが想定される。興味深いことに、孤発性 ALS の病理学的指標である TDP-43 タンパクの局在異常と ADAR2 発現の著減との間には密接な分子連関がある。一方、加齢が ALS の主な危険因子であることはよく知られているが、そのメカニズムは不明である。TDP-43 病理が加齢と共に頻度を増すことは知られているが、ADAR2 発現の加齢による変化は知られていない。本研究では、野生型マウス脊髄における経時的検討から、正常マウス脊髄運動ニューロンにおいて、ADAR2 の発現が加齢により低下することを明らかにし、とくに前角外側に位置する fast fatigable motor neuron に属する大径運動ニューロンでは低下が著しく、未編集型 GluA2 の発現と同時に TDP-43 の局在異常を伴っていた。マウスでは未編集型 GluA2 の発現が運動ニューロン死を引き起こすことから、この加齢性変化は孤発性 ALS の加齢による発症頻度増加、発症後の進行速度の加速化に関与している可能性がある。

### A. 研究目的

孤発性 ALS の運動ニューロンでは、正常では認められない Q/R 部位未編集型 GluA2 (AMPA 受容体サブユニット) が発現しており (1, 2), この分子異常は RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の発現低下による (3). ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス (以下 AR2 マウス) の検討では、ADAR2 を欠失した運動ニューロンは未編集型 GluA2 をサブユニットに持つ Ca<sup>2+</sup>透過型 AMPA 受容体が増加することで神経細胞死に至る (4). また、ADAR2 発現があるレベルを超えて低下することで未編集型 GluA2 が発現することが明らかになっている (5). さらに、30 例を超える孤発性 ALS 患者剖検脊髄運動ニューロンの検討により、未編集型 GluA2 の発現は大多数の孤発性 ALS に生じている分子変化であること (3) から、この分子異常が ALS の病因に密接

に関与していることが想定される (6). ADAR2 発現低下が孤発性 ALS の病因に関連することは、病理学的指標である TDP-43 タンパクの局在異常が例外なく ADAR2 発現の著減した運動ニューロンに出現することからも支持される (7).

加齢が ALS の主な危険因子であることはよく知られている。とくに高齢になると ALS の発症が増えることと、高齢の ALS 患者では進行が速く、気管切開までの期間が短いこと (8) から加齢と発症のメカニズムの間には何らかの関連があると推測されるが、どのような関連かは不明であった。

加齢は TDP-43 の局在にも関与し、アルツハイマー病と正常対照の高齢群と弱年群との比較において、高齢者群で TDP-43 の核から細胞質への局在異常の頻度は高く、かつ相関があり (9, 10), 80 歳以上の正常対照群で約 3% に海馬、扁桃体に TDP-43 病理が

認められたことが報告されている(10, 11). そして、前述したように孤発性 ALS では、ADAR2 の発現のない運動ニューロンでは、例外なく、リン酸化 TDP-43 陽性の封入体が細胞質に認められ、両者の間には密接な分子連関が想定される (7).

以上から、加齢が ALS の危険因子である分子メカニズムに、孤発性 ALS の病因に深く関連する ADAR2 の発現低下が Subclinical に存在することが働いているのではないかと、という仮説を立て、マウス運動ニューロンにおける ADAR2 活性及び TDP-43 病理の加齢性変化を検討した。

## B. 研究方法

様々な週齢(生後 1 日齢から 100 週超齢)の野生型マウス (C57BL/6J) (各 n=3) を用いて、脊髄における ADAR2 の活性を ADAR2 mRNA 発現量(4, 5), 及び特異的基質における RNA 編集率の変化で測定した. ADAR2 および GluA2 mRNA を real time PCR, GluA2 Q/R 部位 (4), CYFIP2 K/E 部位 (12) の RNA 編集率を既報の方法で測定した. さらに ADAR2 (RED1 抗体) および TDP-43 の局在を免疫組織化学的に検討した (4, 7).

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言, 学内倫理委員会, 東京大学動物実験指針に則り, 施行した.

## C. 研究結果

免疫組織化学的検討により, 12 ヶ月齢までの成獣マウスでは, TDP-43 は核内に正常に存在するが, それ以降, 加齢依存性に細胞質への局在異常が認められるようになった. さらに, 免疫組織学的に各週齢のマウスについて TDP-43 と ADAR2 の抗体である RED-1 の共局在について検討した. その結果, 12 ヶ月未満のマウスにおいては, 核の ADAR2 染色性は明瞭で TDP-43 も核に共染するが, 12 ヶ月齢を越えると少数であるが, 脊髄前角外側の大径運動ニューロンに ADAR2 の染色性の低下, TDP-43 の局在異常がみられ始め, 100 週齢前後になると, 例外なくこのような大径運動ニューロンが観察された. ADAR2 の染

色性低下と TDP-43 の局在異常は同一の運動ニューロンに見られ, その数は, 100 週超齢の高齢マウスで, 12 ヶ月齢に比し有意に増加していた

(Mann-Whitney U 検定,  $p < 0.01$ ). ADAR2 の染色性が欠如し, 核の TDP-43 染色性を失った運動ニューロンも見られた. 100 週超高齢マウス (n=3) で異常な染色性を示す運動ニューロンをプロットすると, 前角外側の大径運動ニューロンに偏在することが分かった.

さらに脊髄前角における ADAR2 活性を発達段階とともに調べた結果, ADAR2 mRNA は 20 週まで年齢とともに増加し, 74 週まで有意差はなく, プラトーであったが, 104 週齢では優位に低下していた (ANOVA,  $p < 0.01$ ). しかし, GluA2 Q/R 部位の RNA 編集は生後 1 日目から 104 週齢まで 100% に保たれており, ADAR2 の特異的な基質である CYFIP2 K/E 部位の編集率も発達期には上昇するが, 成長後 104 週齢まで優位に低下していなかった.

これは脊髄全体での検討であるため, 異常な免疫染色性を示した前角外側の運動ニューロンの異常を検出できなかった可能性がある. そのため, レーザダイセクターを用いて前角外側の大径運動ニューロンを切り出し, GluA2 Q/R 部位の編集率を検討した. 驚くべきことに, 正常哺乳類の運動ニューロンは例外なく編集型 GluA2 のみを発現するが, 100 週超齢マウス前角外側の大径運動ニューロンは 5% 前後の未編集型 GluA2 (編集率  $95.3\% \pm 2.6\%$ , Mann-Whitney U 検定,  $p < 0.001$ ) を発現していた.

## D. 考察

マウス脊髄における, ADAR2 mRNA 発現量の発達に伴う増加, 加齢に伴う低下を初めて報告した. 加齢に伴う ADAR2 発現量の低下は脊髄前角外側の大径運動ニューロンで最も顕著であり, 高齢マウスでは未編集型 GluA2 の発現に伴う進行性の ADAR2 低下, TDP-43 の局在異常がみられた. 未編集型 GluA2 の発現は孤発性 ALS の運動ニューロンに極めて疾患特異性, 部位選択性の高い分子異常である (1, 6). しかも, ヘテロ接合体 AR2H マウスの解析から, 未編

集型の GluA2 の発現自体が、その量的な多寡を問わず運動ニューロン死の原因になることが明らかになっている(5)。したがって、高齢マウスの前角外側運動ニューロンの発現する未編集型 GluA2 の割合は5%前後に過ぎないとはいえ、いずれ細胞死に至る運命にあると予想され、その分子メカニズムは孤発性 ALS に相同である。未編集型 GluA2 を発現するニューロンは孤発性 ALS の運動ニューロン以外にはラット一過性脳虚血における海馬 CA1 錐体細胞が知られるのみである(13)。しかし、この分子変化は、ADAR2 タンパクの分解よりもたらされる一過性の変化であることが報告されている(14)点で、ALS、高齢マウスの運動ニューロンに見られる ADAR2 mRNA の発現低下のメカニズムとは異なると考えられる。加齢と共に、ALS に相同の分子変化が脊髄運動ニューロンに生じることは驚きであり、ALS の病因に加齢に伴う分子変化の加速が関与していることを伺わせる。

前角外側の運動ニューロンは fast-fatigable (FF) motor units とされる運動ニューロン群(15)で、大きな細胞体と電気生理学的に早期に疲労しやすい fast conducting axons により特徴付けられる。しかも、ALS(16)と Aging(17, 18, 19)で細胞脱落、変性が起こりやすいことが知られており、本研究の結果からは、ヒトの脊髄運動ニューロン脱落にも ADAR2 発現低下が働いていることを強く示唆する。

本研究からは、加齢による Subclinical な ADAR2 発現低下が、未編集型 GluA2 の発現までの期間を短縮し、加齢による ALS の発症率増加、発症後の進行速度の加速化の分子的基盤になっていると予想させる。実際、孤発性 ALS では編集型 GluA2 のみを発現する運動ニューロンでも ADAR2 の発現が低下している(3)。また、ADAR2 低下と TDP-43 病理の共存が、ALS 運動ニューロンのみならず正常な加齢においてもみられたことは、両者の密接な分子連関を更に支持する結果である。

## E. 結論

高齢で ADAR2 活性が低下することは、GluA2 Q/R 部位の編集は保たれているものの未編集型 GluA2 を発現する確率を高めるため、孤発性 ALS の加齢による発症頻度増加、発症後の進行速度の加速に、加齢による ADAR2 活性低下が関与している可能性がある。

## <引用文献>

1. Kawahara, et al. *Nature*, 427, 801, 2004.
2. Takuma, et al. *Ann Neurol*, 46, 806-15, 1999.
3. Hideyama, et al. *Neurobiol Dis*, in Press, 2011.
4. Hideyama, et al. *J Neurosci*, 30, 11917-25, 2010.
5. Hideyama, Kwak. *Front Mol Neurosci*, 4, 33, 2011.
6. Kwak, Kawahara. *J Mol Med*, 83, 110-20, 2005.
7. Aizawa, et al. *Acta Neuropathol*, 120, 75-84, 2010
8. Atsuta et al. *J Neurol Sci*, 276, 163-9 2008
9. Robinson, et al. *Brain*, 134, 3705-12, 2011
10. Wilson, et al. *Int J Clin Exp Pathol*, 4, 147-55, 2011
11. Nakashima-Yasuda, et al. *Acta Neuropathol*, 114, 221-9, 2007
12. Nishimoto, et al. *Neurosci Res*, 61, 201-6, 2008
13. Peng, et al. *Neuron*, 49, 719-33, 2006
14. Mahajan, et al. *Neuroscience*, 189, 305-15, 2011
15. Cotel et al. *J Neurosci*, 29, 2748-53, 2009
16. Dengler et al. *Muscle Nerve*, 13, 545-50, 1990
17. Saxena et al. *Nat Neurosci*, 12, 627-36, 2009
18. Hashizume et al. *J Comp Neurol*, 269, 425-30, 1988
19. Hirofuji et al. *NeuroReport*, 11, 823-8, 2000

## F.健康危険情報

特記事項無し

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1. Hideyama T, et al. Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol Dis*. 2011; in

press

2. Hideyama T, Kwak S. When Does ALS Start? ADAR2-GluA2 Hypothesis for the Etiology of Sporadic ALS. *Front Mol Neurosci*. 2011; 4(33) 1-11.

他 6編

## 2. 学会発表

- 1) 日出山拓人ら：孤発性筋萎縮性側索硬化症における RNA 編集異常のメカニズムと運動ニューロン死, **第52回神経学会総会**, 名古屋 May 18, 2011.
- 2) 郭 伸 : Failure of RNA editing and the pathogenesis of ALS. *AAN-JSN Joint Symposium (ALS セッション) 第52回日本神経学会総会* 名古屋 May 18-20, 2011.
- 3) Kwak S: Failure of RNA editing and ALS pathogenesis. *ALS Conference*. Tarry Town NY, September 7-9, 2011.
- 4) 山下雄也ら : Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons, **第34回日本神経科学大会** 横浜 September 14-17, 2011.
- 5) Yamashita T et al: Abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 pathology in ALS motor neurons, *Neuroscience2011*, Washington DC, Nov 13, 2011
- 6) Hideyama T, et al: Downregulation of RNA editing enzyme ADAR2 and sporadic ALS. *The 22<sup>nd</sup> International Symposium on MND/ALS* Sydney 30 Nov - 2 Dec, 2011

他 6編

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

無し

## 流れる ALS ～MRI を用いた ALS 患者髄液流の検討～

研究分担者 阿部康二<sup>1)</sup>

研究協力者 佐藤恒太<sup>1)</sup>，森本展年<sup>1)</sup>，田 豊豊<sup>1)</sup>，宮崎一徳<sup>1)</sup>，  
池田佳生<sup>1)</sup>，松浦 徹<sup>1)</sup>

1) 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

これまで交通性水頭症においては、くも膜下腔の髄液流の変化が毛細血管や静脈流に影響を与え、水頭症の原因となる可能性が示されている。一方筋萎縮性側索硬化症(ALS)ではモデルマウスの実験で脊髄血管の Neurovascular Unit の障害など微小循環の障害が報告されているが、ALS の病因として、これまで髄液流に関する研究はほとんどなされていない。我々は ALS における髄液流と病態との関連を検討するために、今回 ALS 患者の髄液流を測定した。対象となったのは、31 名の ALS 患者を含む 40 名の運動ニューロン疾患群(MND)と頸椎症およびコントロール群で、すべての患者に頸髄の MRI 撮影を行い、C5 頸椎レベルでの髄液流の定量的解析を行った。その結果、MND 群では頸椎症群や若年コントロールに比較して有意に収縮期ピークの流速が速い一方で、コントロール群に比較して収縮期ピークまでの時間の有意な延長を認めた。これらの結果から、ALS 患者においては頸髄の圧迫病変だけでは説明のできない髄液流の障害が示唆され、髄液流の異常は ALS の病態と深く関わっている可能性があると考えられた。

### A. 研究目的

これまで交通性水頭症においては、くも膜下腔の髄液流の変化が毛細血管や静脈流に影響を与え、水頭症の原因となる可能性が示されている。一方、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病因として、これまで髄液流に関する研究はほとんどなされていない。我々は ALS における髄液流と病態との関連を検討するために、今回 ALS 患者の髄液流を測定した。

### B. 研究方法

対象は 31 名の ALS 患者を含む 40 名の運動ニューロン疾患(MND)患者、およびコントロール群として年齢調整した 14 名の変形性頸椎症患者、10 名の非頸椎症患者と、若年コントロールである非頸椎症患者 4 名である。MND 群 40 名は四肢発症型 ALS(ALS-limb) 20 名、球麻痺発症型 ALS(ALS-PBP)11 名、上位運動ニューロン徴候のみ(UMN)3 名、下位運動ニューロン徴候のみ

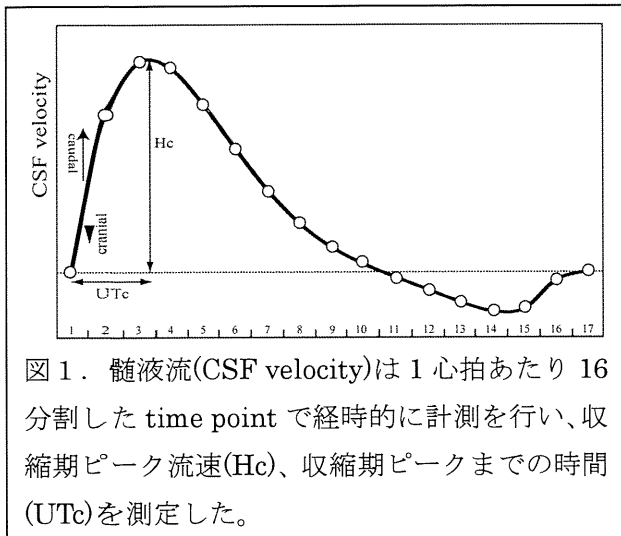
(LMN)6 名で構成されている。

これらすべての患者で 1.5T MRI にて頸髄の MRI 撮影を行った(EXCELART/Vantage; Toshiba, Tokyo, Japan)。頸髄の髄液流は、まず脊髄矢状断画像で Time-SLIP 法によるイメージング解析を行った。また、C5 頸椎の脊髄腹側において脊髄に垂直に円形の ROI を設定し、同部位での髄液流の流速を位相コントラスト法を用いて測定した。髄液流は定量的に解析するために、心電図との同期を行うことで、1 心拍あたり 16 分割した time point で経時的に計測を行った。また髄液の経時変化を特徴づけるため、収縮期ピーク流速(Hc)、収縮期ピークまでの時間(UTc)を測定した(図 1)。

(倫理面への配慮)

本研究は岡山大学医学部倫理審査委員会の審査承認を受けた。



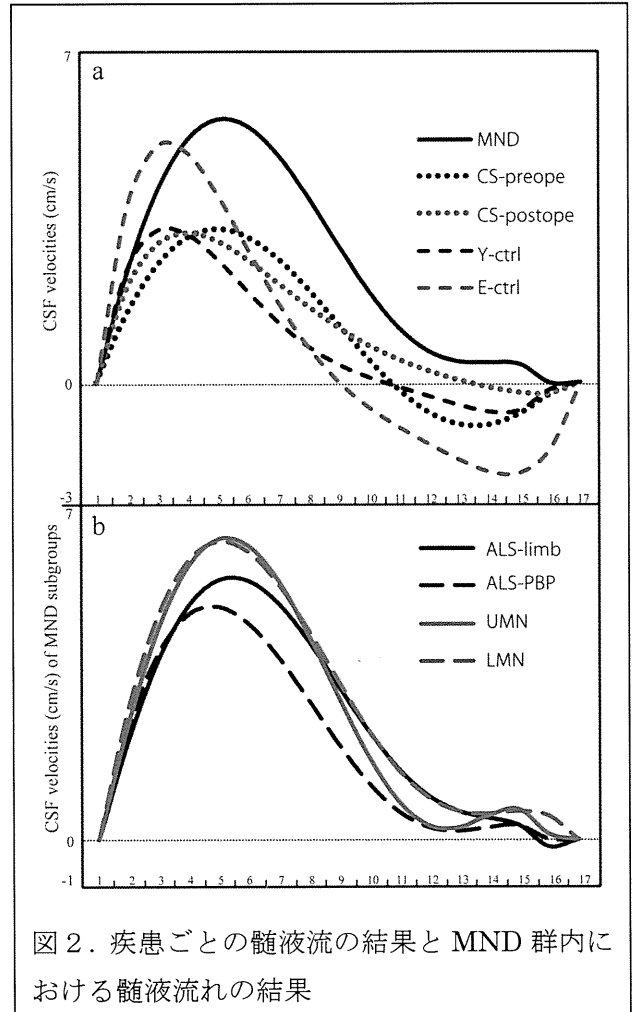


### C. 研究結果

すべての患者の頸髄の髄液流は、Time-SLIP 法によるイメージング解析では、収縮期においては尾側に、拡張期においては頭側に流れるという二相性の変化を認めた。

位相コントラスト法による髄液流の流速の経時的な解析を図2に示す。若年(Y-ctrl)およびALSとの年齢調整コントロール(E-ctrl)の2群間では高齢群では、若年群に比較して、有意に収縮期ピーク流速(Hc)が速かった。次に頸椎症群では、手術群では、手術未施行群と比較して、ピークまでの時間(UTc)の短縮を認めた。MND 群全体をこれらと比較すると、頸椎症群や若年コントロールに比較して有意に Hc が速い一方で、コントロール2群に比較して UTc の有意な延長を認めた。

MND 群内での流速解析では ALS-PBP 群が他群に比較して Hc が遅い傾向を認めたが、有意差はなかった。



### D. 考察

ALS 患者における脊髄の髄液流の解析の結果、MND 群では収縮期ピークまでの時間(UTc)がコントロール群に対して有意に延長していた。また手術未施行の変形性頸椎症群でも UTc の延長が認められたが手術群では MND 群と有意差は見られなかった。また Hc が MND 群およびコントロール群に比較して有意に低い傾向が見られた。言い換えれば、頸椎症群では手術的に頸髄の圧迫病変を除去することで髄液流の UTc の改善が得られていたが、Hc は ALS 群に比べて低値のままであった。これらの結果から、ALS 患者においては頸髄の圧迫病変だけでは説明のできない髄液流の障害が示唆された。

これまで交通性水頭症においては、くも膜下腔の髄液流の変化が毛細血管や静脈流に影響を与

え、水頭症の原因となる可能性が示されている。一方 ALS ではモデルマウスの実験で脊髄血管の Neurovascular Unit の障害や毛細血管の血流低下など微小循環の障害が報告されているが、これらが今回 ALS 患者で観察されたような髄液流の異常と関連している可能性が疑われた。

#### **E.結論**

ALS 患者では頸髄の髄液流の特徴的な障害が認められた。髄液流の異常は ALS の病態と深く関わっている可能性があり、変形性頸椎症との鑑別にも有用であることが示された。

#### **F.健康危険情報**

MRI 撮影は体内・体外金属がないことを確認の上通常操作モードで行われており、安全性に問題はない。

#### **G.研究発表**

##### **1.論文発表**

なし

##### **2.学会発表**

なし

#### **H.知的所有権の取得状況（予定を含む）**

なし

## 光る ALS～ALS モデルマウスにおける autophagy *in vivo* イメージング～

研究分担者 阿部康二<sup>1)</sup>

研究協力者 田 豊豊<sup>1)</sup>, 森本展年<sup>1)</sup>, 佐藤恒太<sup>1)</sup>

1)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

〔目的〕筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンが選択的に障害され、四肢麻痺・呼吸筋麻痺をきたし死にいたる重篤な神経変性疾患である。2008年に我々は ALS モデルマウス脊髄運動ニューロンにおいて autophagosome が細胞内に増加していることを報告し、ALS の運動ニューロン死における autophagy に注目してきた。今回我々は、autophagy の有用なマーカーである LC3 に GFP を結合した蛋白を発現する GFP-LC3 Tg マウスと ALS モデルである G93ASOD1 Tg マウスを掛け合わせた double Tg マウスを作製し、ALS モデルマウスの脊髄における autophagy を *in vivo* で観察することを試みた。

〔方法〕GFP-LC3 Tg マウスと G93ASOD1 Tg マウスを掛け合わせた GFP-LC3/G93ASOD1 double Tg マウス、および正常コントロールとして GFP-LC3 single Tg マウスを用いた。発症前を 10 週齢、発症後早期を 17 週齢、発症後晩期を 19 週齢として *in vivo*、*ex vivo* での観察、および脊髄組織を用いた免疫染色、Western blotting などの検討を行った。

〔結果および考察〕*In vivo* イメージングの結果では double Tg マウス脊髄の GFP 発光シグナルは 10 週から 19 週まで週齢にしたがって増加した。*Ex vivo* イメージングでは脊髄腹側により強い発光が認められ、二重染色では GFP シグナルは LC3、p62 など autophagosome のマーカーとよく一致していることが確認された。Double Tg マウス脊髄前角では 10 週から 19 週まで週齢にしたがって本来は速やかに消化されるべき autophagosome の構成成分が増加していた。また、19 週齢にかけて TUNEL 陽性細胞は増加し、運動ニューロン数は減少していた。

〔結論〕*In vivo* イメージングでの GFP 発光シグナルの傾向と筆者らのこれまでの組織学的検討の結果は一致しており、本実験は ALS モデルマウス脊髄での autophagy を *in vivo* で観察できたと考えた。また、ALS モデルマウスにおいて、autophagy プロセスの進行が何らかの原因で遅延し、さらに運動ニューロン死の過程とも関連している可能性が示唆された。

### A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンが選択的に障害され、四肢麻痺・呼吸筋麻痺をきたし死にいたる重篤な神経変性疾患である。2008年に我々は ALS モデルマウス脊髄運動ニューロンにおいて autophagosome が細胞内に増加していることを報告し、ALS の運動ニューロン死における autophagy に注目してきた。2010年我々は、autophagy の有用なマーカーである LC3 に GFP を結合した蛋白を発現する GFP-LC3 Tg マウスを用いマウス大脳中動脈一過性 60 分虚血モデル作成し、生きたまま虚血脳に誘導された autophagy を *in vivo* で観察した。そこで、我々は ALS モデルである G93ASOD1 Tg マウスと

GFP-LC3 Tg マウスを掛け合わせた double Tg マウスを作製し、ALS モデルマウスの脊髄における autophagy を *in vivo* で観察することを試みた。

### B.研究方法

〔実験動物の作成〕

G93ASOD1 Tg マウス♂8 週齢と GFP-LC3 Tg マウス♀8 週齢を掛け合わせ、生まれたマウスの尻尾の先端を 2 週目で切断し、G93A SOD1 の発現を PCR を用いて確認した。さらに LEDB ライトで GFP-LC3 の発現を確認した。

〔*In vivo* と *ex vivo* イメージング〕

G93ASOD1/GFP-LC3 double Tg (DTg)マウス、および

び正常コントロールとして GFP-LC3 single Tg (STg) マウスそれぞれ 5 匹ずつ用いた。運動麻痺の発症前を 10 週齢、発症後早期を 17 週齢、発症後晩期を 19 週齢とした。それぞれのタイムポイントで、麻酔下にて、腰髄を露出し、生きたまま MVX10 イメージングシステムで *in vivo* イメージングを行った。その後脊髄を速やかに取り出し切片作成を行い、*ex vivo* イメージングを行った。

[免疫組織染色]

*In vivo* イメージングを行った後、1X PBS を左心室から灌流し、その後腰髄を取り出した。取り出した脊髄は 20 $\mu$ m の薄片切片にし、LC3、p62、NeuN、GFAP、Iba1 に特異的な抗体を用い免疫組織染色を行い、さらに HE 染色も行った。

[Western blotting]

10、17、19 週の double Tg マウスを麻酔下に、1X PBS を左心室から灌流し、腰髄前角を取り出した。得られた脊髄はホモジナイズし 12,000rpm で 10 分遠心後上清を取り、サンプル調整を行った。LC3 と  $\beta$ -tubulin に特異的な抗体を用い Western blotting を行った。

[RT-PCR]

19週double Tgマウスを麻酔下に、1X PBSを左心室から灌流し、腰髄前角を取り出した。そこから全 RNAを抽出し、LC3のmRNAに対応したプライマー (5'-AAG TTC ATC TGC ACC ACCG-3' と 5'-TGC TCA GGT AGT GGT TGT CG-3') を用いRT-PCRを行い、LC3の発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え動物実験には、遺伝子組換え実験に関する法令を遵守し、学内の動物実験委員会の許可を受けた。

### C. 研究結果

[*In vivo* と *ex vivo* イメージング]

図 1 に示したように GFP-LC3 STg 群には腰髄において有意なシグナルが観察されなかったが、DTg 群では 10 週齢から GFP の蛍光シグナルが脊髄背側から観察された。また週齢依存的にシグナル増強を認め、19 週の終末期にはピークになった。図 1 下部

に示す *ex vivo* イメージングでも同様に週齢依的にシグナルの増強が見られた。さらに GFP シグナルの強度は背側と比べ運動神経の多い腹側に強い傾向が見られた。

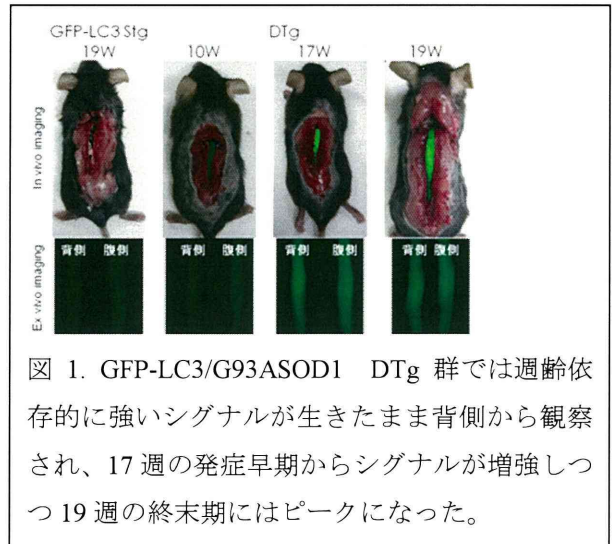


図 1. GFP-LC3/G93ASOD1 DTg 群では週齢依存的に強いシグナルが生きたまま背側から観察され、17 週の発症早期からシグナルが増強しつつ 19 週の終末期にはピークになった。

[免疫組織染色]

HE 染色ではマウス腰髄前角において野生型及び GFP-LC3 STg マウスと比べ G93ASOD1 STg および GFP-LC3/G93ASOD1 DTg マウスの腰髄の前角では運動ニューロン数が週齢依的な減少が見られ、17 週、19 週では 10 週に比べて有意に減少していた。しかし、GFP の蛍光シグナルは、GFP-LC3/G93ASOD1 DTg および G93ASOD1 STg マウス腰髄の前角において特に強く発現し、*In vivo* イメージングと同様に週齢依的に増強が強くなり、17 週、19 週では 10 週に比べて有意に増加していた。

[Autophagy マーカーとの関連]

抗 LC3 抗体と抗 p62 抗体を使い免疫染色を行った結果、抗 LC3 抗体による赤色の蛍光シグナルと内因性 GFP-LC3 の緑色の蛍光シグナルとは完全にマージした。さらに因性 GFP-LC3 は抗 p62 抗体とも完全にマージすることから GFP シグナルは autophagosome であることが確認できた。

[Western blotting]

図 2 左側に示すように抗 LC3 抗体を用いた Western blotting の結果、GFP-LC3 STg 群には GFP-LC3I と GFP-LC3III の蛋白量には週齢依的な変化が見られなかった。しかし DTg マウスの腰髄