

前角においては発症初期の17週と終末期の19週においてGFP-LC3IとIIの量が週齢依存的に有意に増加することが確認され、ALSの進行に従って内因性LC3の発現が増加することが示唆された。

〔細胞染色〕

図2右側に示すように、神経細胞のマーカーとして抗NeuN抗体、アストロサイトのマーカーとして抗GFAP抗体、ミクログリアのマーカーとして抗Iba1抗体を用い、二重染色を行ったところ、発症初期の17週ではNeuNとGFP二重陽性細胞が最も多く観察され、終末期の19週では逆にGFAPとGFP二重陽性細胞が最も多く観察された。また19週ではIba1とGFP二重陽性細胞の数も増加した。

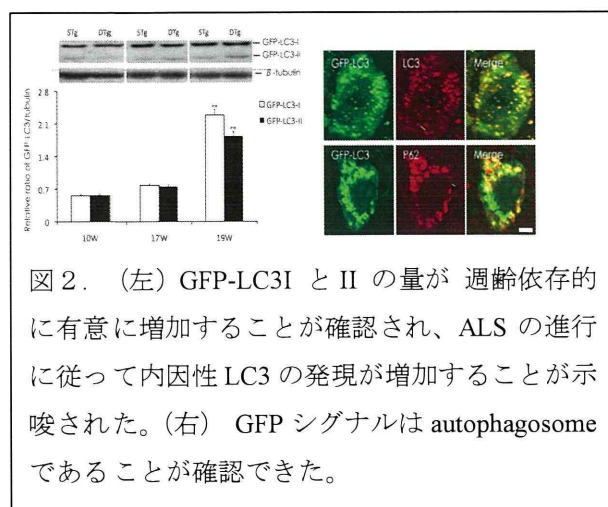


図2. (左) GFP-LC3IとIIの量が週齢依存的に有意に増加することが確認され、ALSの進行に従って内因性LC3の発現が増加することが示唆された。(右) GFPシグナルはautophagosomeであることが確認できた。

〔GFP-LC3 mRNAの発現〕

19週齢のDTgマウスの前角においてGFP-LC3のRT-PCRを検討したところ、STg群に比べてDTgマウスにおいてGFP-LC3のmRNAの発現量が約2倍に増加していることがわかった。

#### D. 考察

本研究ではGFP-LC3/G93ASOD1 DTgマウス脊髄の*in vivo*および*ex vivo*イメージングを初めて報告した。DTgマウスでは*in vivo*および*ex vivo*イメージングで発症早期の10週からGFP-LC3の蛍光シグナルが増強しており、17週から19週にわたり週齢依存的に増強していた。またautophagosomeに特異的なLC3とp62の抗体を用いた免疫染色では、DTgマウスの腰髄前角にautophagosomeの数が週齢依存的

に増加しており、*In vivo* 及び *ex vivo* で観察された蛍光シグナルはautophagyの誘導との関連が示唆された。さらにDTgマウス腰髄前角ではGFP-LC3の蛋白量はDTg週齢依存的に有意に増加し、19週齢のGFP-LC3 mRNAの発現量はGFP-LC3 STgのおよそ2倍に増加していた。

以上よりGFP-LC3/G93ASOD1 DTgマウスでは週齢依存的にautophagyが過剰に誘導されていることが示唆された。また一方で19週齢における著明なautophagosomeの形成はautolysosomeとの融合が阻害されている可能性も考えられた。

#### E. 結論

ALSモデルマウスの脊髄において、Autophagyが生じていることを*in vivo*で観察することに初めて成功した。この研究はALSだけではなく、虚血脳や、Autophagyが関係するその他の神経変性疾患への応用が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

In vivo optical imaging of motor neuron autophagy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Tian F, Morimoto N, Liu W, Ohta Y, Deguchi K, Abe K. *Autophagy*. 2011 Sep;7(9):985-92.

##### 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

## ALS-FUS モデルショウジョウバエの解析

研究分担者 徳田隆彦<sup>1,2)</sup>

研究協力者 笹山博司<sup>2)</sup>，水野敏樹<sup>2)</sup>，中川正法<sup>2)</sup>，島村真依<sup>3)</sup>，山口政光<sup>3)</sup>，永井義隆<sup>4)</sup>

1)京都府立医科大学分子脳病態解析学(神経内科併任)，2)京都府立医科大学神経内科学，  
3)京都工芸繊維大学応用生物学，4)国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第4部

### 研究要旨

*TDP43* および *FUS* が筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子として報告され、これらは転写制御因子であるとされているが、その生体内の役割および ALS の病態発現機序は未だ明らかにされていない。我々は、ALS-FUS の病態発現機序を検討する目的で、そのショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ系統を樹立した。神経特異的に *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエでは、3 齢幼虫の中樞神経系で *Caz* の発現が減少していた。また、神経特異的な *Caz* ノックダウンショウジョウバエは climbing assay で運動機能が低下しており、運動ニューロンの synaptic branch の短縮が認められた。今回作製した *Caz* ノックダウンショウジョウバエは運動ニューロン障害による運動能力の低下というヒトの ALS の病態の一部を再現しており、FUS-ALS のモデルショウジョウバエとして今後の応用が期待される。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は *SOD1* に加えて 2006 年に *TDP43*、2009 年に *FUS* がその原因遺伝子として報告された(1-3)。*TDP43* や *FUS* は転写制御因子の一つとされるが、その生体内の役割はまだ十分明らかにされていない。そこで我々は、*FUS* のショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ系統を樹立し、その運動機能障害の病態の解析を行うことを計画した。

ショウジョウバエはヒト神経系を構成する遺伝子の約 70% のホモログを有し、*C. Elegans* と比較してヒト遺伝子との相同性も高く、多くの遺伝子解析が可能である。また疾患モデルとして頻用されるマウスと比較するとライフサイクルが 10 日間と短く、*GAL4/UAS* 標的発現システムを用いることにより組織特異的に標的遺伝子を過

剰発現またはノックダウンさせることが可能である。従って目的とする神経系標的遺伝子の機能解析や、変異を有する疾患発症原因遺伝子による神経系への影響を短期間で解析できる利点を有している。京都工芸繊維大学山口らは神経変性疾患の病態解析モデルとして有用であることを示してきた(4)。ショウジョウバエには、*FUS* のホモログである *Cabeza* (以下 *Caz*) が存在し、*Caz* は *FUS* と同様に核に存在していて、RNA の代謝制御に重要な役割をしていると考えられている。*FUS* と同様に RNA の代謝制御に関係する *TDP43* では、そのホモログである *TBPH* をノックダウンしたショウジョウバエで運動障害を生じることが報告されており(5)、我々も *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエを作製した。

## B.研究方法

### 1) Caz ノックダウンショウジョウバエ系統の作成

ヒト *FUS* に相同なショウジョウバエの *Caz* を RNAi によりノックダウンするため、*Caz* cDNA 断片を head to head で pRISE ベクターへクローニングした。Off-target 効果でないことを担保するために、2つの標的領域を target とする dsRNA を発現する transgene を作成した。すなわち、*Caz* の aa.1-aa.167 と aa.180-aa. に相当するそれぞれ 500bp の cDNA 断片を head to head で pRISE ベクター(目的遺伝子導入部位の上流に UAS 配列を含む)へクローニングした。このようにして作製した pRISE ベクターを受精卵へ微量注入し、P 因子法とバランス染色体を応用した交配を繰り返して、*Caz* をノックダウンする遺伝子導入ショウジョウバエを作成した。また、w;UAS-Caz-IR;+(Caz-IR<sub>363-399</sub>/+;CG3606)系統は Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC)から入手した。本系統は *Caz* の aa.363 から aa.399 までの領域を標的としている。さらに、これらの *Caz* ノックダウン系統と *elav*<sup>3A</sup>-GAL4 ドライバー系統との交配により、神経特異的な *Caz*-ノックダウンショウジョウバエ系統を作製した。

### 2) Caz ノックダウンショウジョウバエ系統の解析

#### ①3 齢幼虫中枢神経系の western blotting による解析

3 齢幼虫 5 匹を解剖して中枢神経系を取り出し、 $\beta$ -mercaptoethanol 1.4 $\mu$ l を加えた 1X サンプルバッファ 20 $\mu$ l (50 mM Tris-HCl(pH6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 1.2% $\beta$ -mercaptoethanol) に入れ氷上でピペティング、5 分間 100°C で加熱してその上清を回収した。各抽出液を全量 12% SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライして、電気泳動を行った。そして PVDF 膜(Bio-Rad)に転写して、ウサギ抗 *Caz* ペプチド抗体(1:5000 希釈)によって blotting を行った。検出は ECL ウェスタンブロットング検出試薬で行い、その検出結果は、

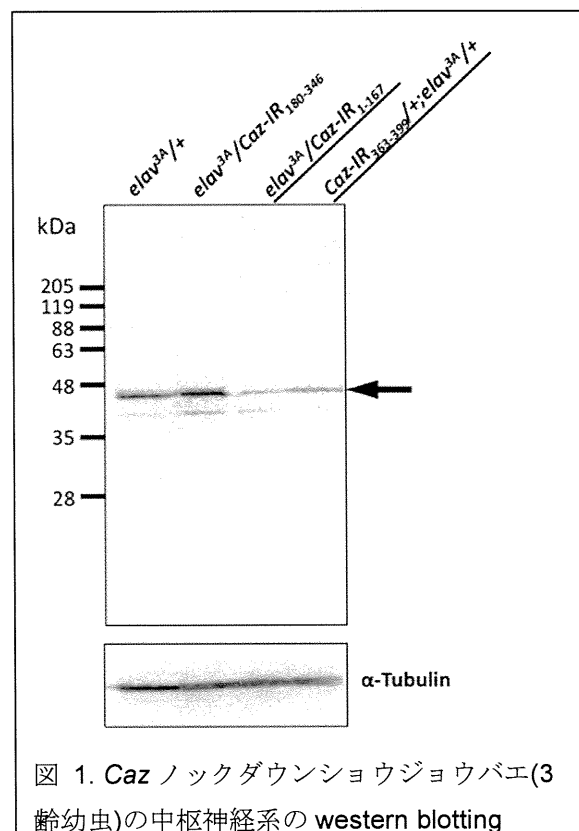
Lumivision Pro HS II image analyzer (Aisin Seiki)で解析を行った。

#### ②Climbing assay

*elav*<sup>3A</sup>-GAL4/+及び *elav*<sup>3A</sup>-GAL4>UAS-Caz-IR を 28°Cに置き、新しく生まれた成虫の雄と雌を集め、1つのガラスチューブに雌雄が同数になるよう計 30 匹入れ、25°Cのインキュベーター内に置いた。Tapping によってすべての成虫を底面に落とした後に成虫がガラス壁面を登るのを video で記録した。このステップを 5 回繰り返し、tapping 後の 30 秒間に 2cm 毎に付けられた目盛りを 1 匹が 1 つ超えると climbing score 1 点を与え、すべての成虫の score を合計したものを成虫の総数 x 5(試行数)で除したものをその系統の平均の climbing score とした。Climbing assay は 3 日おきに行い、羽化後 21 日目まで調べた。

#### ③3 齢幼虫の神経筋接合部(NMJ)の形態学的解析

3 齢幼虫を HL3 saline 中で解剖を行い筋肉上の NMJ を分離して、4%paraformaldehyde/PBS で 30 分固定し、2% BSA/PBS/0.1% TritonX-100 で 30 分間



ブロッキングして、FITC 結合ヤギ抗 HRP 抗体で染色した。画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Zeiss LSM510) を使って Z 軸方向に  $1\mu\text{m}$  の間隔でスライスして得た各切片をマージさせた。NMJ の branch の長さは第 4 筋肉上の NMJ の branch の長さを Image J ソフトを用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト及びヒト由来の試料を対象としない。

### C. 研究結果

#### 1) 神経特異的遺伝子導入ショウジョウバエ(3 齢幼虫)の中枢神経系における *Caz* の発現

*elav3A-GAL4* ドライバー系統を用いて神経特異的に *Caz* 二本鎖 RNA を発現させた系統の中枢神経系由来タンパク質粗抽出液を調整し、western blotting により解析を行った。GAL4 のみを発現するコントロールと比較すると、*elav<sup>3A</sup>>UAS-Caz-IR<sub>180-346</sub>* 系統では *Caz* タンパク質レベルの減少が見られなかった

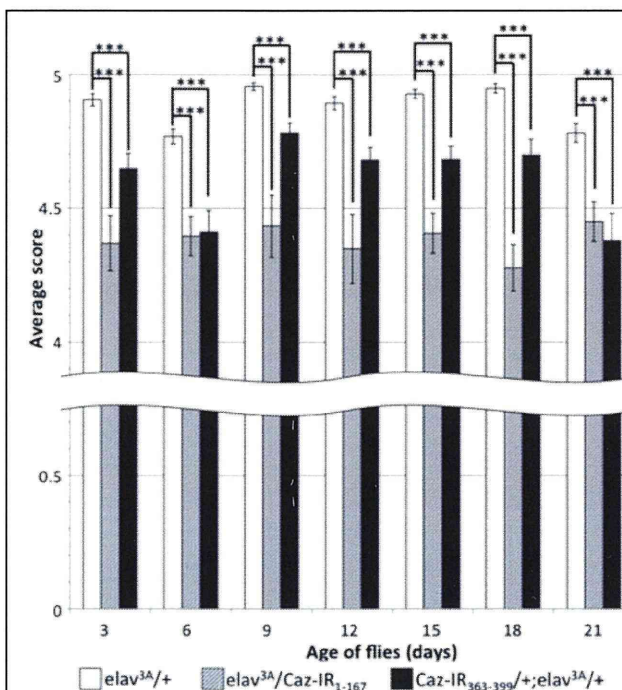


図 2. Climbing assay (\*\*\*) $p < 0.001$

が、*elav<sup>3A</sup>>UAS-Caz-IR<sub>1-167</sub>* の strain 3 と VDRC から入手した *Caz-IR<sub>363-399</sub>/+;elav3A/+* で *Caz* タンパク質レベルの顕著な減少が認められた(図 1)。

#### 2) 神経特異的遺伝子導入ショウジョウバエ(成虫)の Climbing assay

Climbing assay により神経特異的な *Caz* ノックダウンショウジョウバエの成虫の運動能力について検討した。神経特異的 *Caz* ノックダウン系統である *elav<sup>3A</sup>>UAS-Caz-IR<sub>1-167</sub>*、*Caz-IR<sub>363-399</sub>/+;elav3A/+* では、コントロール(*elav<sup>3A</sup>/+*)と比較して運動能力が顕著に低下していた(図 2)。

#### 3) 神経特異的な *Caz* ノックダウンショウジョウバエの神経筋接合部(NMJ)の形態学的観察

*elav<sup>3A</sup>>UAS-Caz-IR<sub>1-167</sub>* 及び *Caz-IR<sub>363-399</sub>/+;elav3A/+* の 3 齢幼虫の NMJ における運動ニューロンを検討した。*Caz* ノックダウン系統とコントロールとの間で、運動ニューロンの構造的な違いは観察されなかった。しかしながら、運動ニューロンの synaptic branch の長さを測定し比較すると、*Caz* のノックダウンにより synaptic branch の短縮が観察された(図 3)。

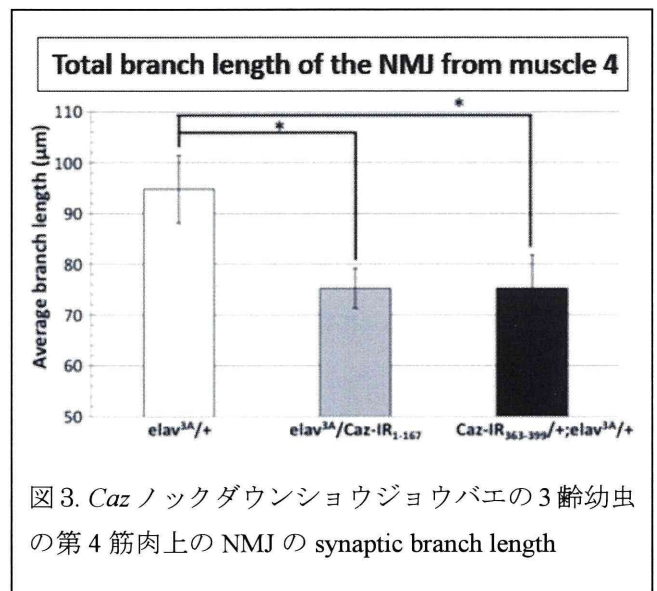


図 3. *Caz* ノックダウンショウジョウバエの 3 齢幼虫の第 4 筋肉上の NMJ の synaptic branch length

### D. 考察

*FUS* の遺伝子異常による ALS 病態発現機序が、変異によって異常凝集蛋白が細胞質への沈着すること

などの gain-of-function 機序であるのか、あるいは正常な FUS 蛋白が細胞質にトラップされることなどによって核内で機能すべき正常な FUS が失われるなどの loss-of-function 機序であるのかは未だ明らかではない。しかし、先行研究で、FUS と同様に RNA の代謝制御に関係する TDP-43 では、そのホモログである *TBPH* をノックダウンしたショウジョウバエで運動障害を生じることが報告されており(6)、今回、我々は家族性 ALS の原因遺伝子である *FUS* の病態発現メカニズムを検討する目的で、*FUS* のショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンさせるショウジョウバエ系統を樹立した。

神経特異的に *Caz* をノックダウンした 3 齢幼虫の中枢神経系の western blotting で、*elav<sup>3A</sup>>UAS-Caz-IR<sub>1-167</sub>*(strain 3)と *Caz-IR<sub>363-399</sub>/+;elav3A/+*で効率良く *Caz* がノックダウンされていることを確認した。これらの神経特異的 *Caz* ノックダウンショウジョウバエ系統では、Climbing assay で検討した運動能力が顕著に低下していた。次にこの運動能力の低下の原因を調べるため、神経筋接合部(NMJ)の観察を行った。ショウジョウバエにおいて成虫の運動システムは大部分が胚起源であること、また成虫の多くの運動ニューロンは幼虫の運動ニューロン由来であることから、3 齢幼虫の NMJ における運動ニューロンを検討した。運動能力の低下していた *Caz* ノックダウンショウジョウバエの *elav<sup>3A</sup>>UAS-Caz-IR<sub>1-167</sub>* 及び *Caz-IR<sub>363-399</sub>/+;elav3A/+*では、運動ニューロンの synaptic branch の短縮が観察された。従って、*Caz* ノックダウンショウジョウバエの運動能力の低下は synaptic branch の短縮が一因であると考えられる。また上記の様に標的配列が異なる *elav<sup>3A</sup>>UAS-Caz-IR<sub>1-167</sub>* と *Caz-IR<sub>363-399</sub>/+;elav3A/+*の両方で synaptic branch の縮小が認められたことから、観察された表現型が off target 効果によるものではないことも分かった。以上の結果から、*FUS* のショウジョウバエホモログである *Caz* を神経特異的にノックダウンしたショウジョウバエは、運動ニューロン障害による運

動能力の低下というヒトの ALS の病態の一部を再現できた。今回このような *FUS*-ALS のモデルショウジョウバエが得られたことで、ショウジョウバエを用いた分子遺伝学研究の最大の利点であるすでに確立された突然変異系ショウジョウバエとの交配による病態修飾分子の大規模なスクリーニングが可能になると考えられる。すなわち、今後の研究では、今回我々が作成した *Caz* ノックダウンショウジョウバエとすでに確立された突然変異系ショウジョウバエとの交配により、*Caz* のノックダウンにより生じた機能異常を回復または悪化させる突然変異体をスクリーニングし、改善または悪化に関わる分子を同定することを予定している。このようにして同定した分子のヒトホモログは疾患の新規診断マーカーや治療薬の新規分子標的となる可能性がある。

## E. 結論

- 1) *FUS* のショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエを作製した。
- 2) 神経特異的にノックダウンすると、3 齢幼虫の中枢神経系で *Caz* の発現が減少していた。
- 3) 神経特異的な *Caz* ノックダウンショウジョウバエは climbing assay で運動機能が低下しており、運動ニューロンの synaptic branch の短縮が認められた。
- 4) 今後は、今回作製した *ALS-FUS* のモデルショウジョウバエを、特異的な変異ショウジョウバエ系統と交配させて、*Caz* ノックダウンによる運動障害の表現型に影響を与える分子を網羅的にスクリーニングする。

## 文献

1. M. Neumann, et al. *Science*, 314: 130-133, 2006.
2. T.J. Kwiatkowski, et al. *Science*, 323: 1205-1208, 2009.
3. C. Vance, et al. *Science*, 323: 1208-1211, 2009.
4. N. Fujikake et al. *J. Biol. Chem.* 283: 26188-26197,



2008

5. F. Feiguin, et al. FEBS Letters, 583: 1586-1592, 2009.

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1.論文発表

1) Fujii C, Tokuda T, Ishigami N, Mizuno T, Nakagawa M: Usefulness of serum S100B as a marker for the acute phase of aquaporin-4 autoimmune syndrome. Neurosci Lett 494: 86-88, 2011.

2) Noto Y, Shibuya K, Sato Y, Kanai K, Misawa S, Sawai S, Mori M, Uchiyama T, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Kasai T, Tokuda T, Nakagawa M, Kuwabara S. Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: specificity, sensitivity, and a possible prognostic value. Amyotroph Lateral Scler 12(2): 140-143, 2011.

3) El-Agnaf OMA, Tokuda T. Correspondence: Detection of elevated levels of  $\alpha$ -synuclein oligomers in CSF from patients with parkinson disease. Neurology 77(5): 510-511, 2011.

4) 徳田隆彦: 特集「脳と神経を測る」8. 筋萎縮性側索硬化症のバイオマーカー —髄液 TDP-43—. BRAIN MEDICAL 23(3): 59-63, 2011.

5) 徳田隆彦: 特集「認知症」診断・治療の実際: 認知症の CSF マーカー診断. 総合臨床 60: 1891-1899, 2011.

### 2.学会発表

1) 徳田隆彦, 笠井高士, 石神紀子, 近藤正樹, 中川正法: ヒト髄液中の A $\beta$  オリゴマーを定量する ELISA 系の開発と臨床応用. 日本神経学会学術大会(第 52 回), 名古屋, 2011. 5. 20.

2) 徳田隆彦: ヒト髄液中の A $\beta$  オリゴマーを定量する ELISA 系の開発と臨床応用. 平成 22 年度松医会賞受賞講演, 松本, 2011.5.21.

3) 徳田隆彦: パーキンソン病と ALS のバイオマーカー: 現状と展望: 1) パーキンソン病. 神経変性疾患に関する調査研究班平成 23 年度ワークショップ,

東京, 2011.7.15.

4) Tokuda T, Kondo M, Kasai T, Oishi Y, Ataka S, Shimada H, Miki T, Mori H, Nakagawa M: Intravenous immunoglobulin improved cognitive functions in patients with Alzheimer's disease without any changes in PIB retention in the brain. The 11th Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2011 (AAICAD), Paris Porte de Versailles Convention and Exhibition Center, Paris, France, 2011.7.20.

5) 徳田隆彦: パーキンソン病 biomarker 最新知見. 第 5 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ), 教育講演, 東京, 2011.10.7.

6) Tokuda T, Noto Y, Shiga K, Tsuchiya A, Yazaki M, Matoba S, Nakagawa M: Cardiomyopathy in a Japanese family with the Glu61Lys transthyretin variant: a new phenotype. The 8th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Kumamoto, Japan, 2011.11.20.

## 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を用いた神経変性疾患モデルの検討

研究分担者 高橋良輔<sup>1),2)</sup>

研究協力者 田代善崇<sup>1),2)</sup>, 伊東秀文<sup>1)</sup>, 井上治久<sup>2),3)</sup>, 山崎真弥<sup>4)</sup>, 阿部 学<sup>4)</sup>,  
三澤日出巳<sup>5)</sup>, 崎村建司<sup>4)</sup>

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タンパク質分解系(UPS)に必須のタンパク質を部位特異的に欠損させる遺伝子改変マウスシステムを樹立した。この系を用いて運動ニューロン特異的UPS機能障害マウスを作製し解析を行ったところ、振戦様の症状と共に、運動機能及び握力の低下が認められた。また、神経病理学所見では、運動ニューロンにALS関連分子の蓄積等の異常が認められた。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、ALSマウスモデルとしての病態解明への応用が期待できる。

### A. 研究目的

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、さらに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)に着目し、部位特異的にUPSの関連タンパク質であるRpt3を欠損させたマウスが、神経変性疾患モデルとなりうるか検証することを目的とした。

### B. 研究方法

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)を作製した。先に作製されているVChT-Creマウスとの交配を行い、運動神経部位特異的Rpt3欠損マウス(Rpt3-CKOマウス)の作製を行った。このマウスを用いて、表現型の変化、神経変性・神経細胞死の検討を行った。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に準じ、動物委員会の承認を得て行った。

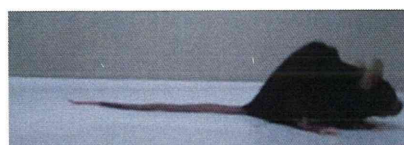
### C. 研究結果

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。運動ニューロン特異的にCreを発現するVChT-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。この運動ニューロン特異的UPS機能障害マウスは、8週齢において振戦様の症状を認めた。



Control (Rpt3<sup>Δ+/+</sup>;Cre<sup>+</sup>)

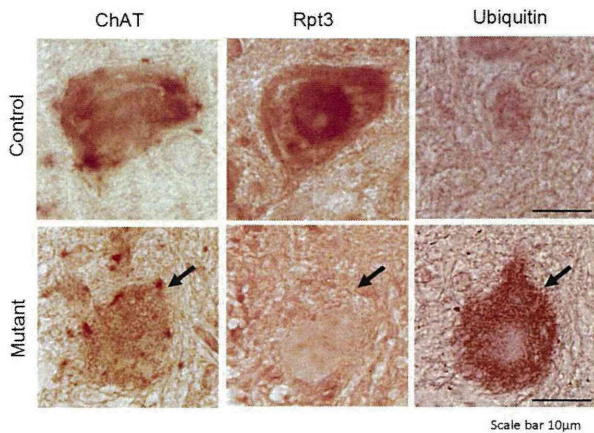


Mutant (Rpt3<sup>Δ/flox</sup>;Cre<sup>+</sup>)

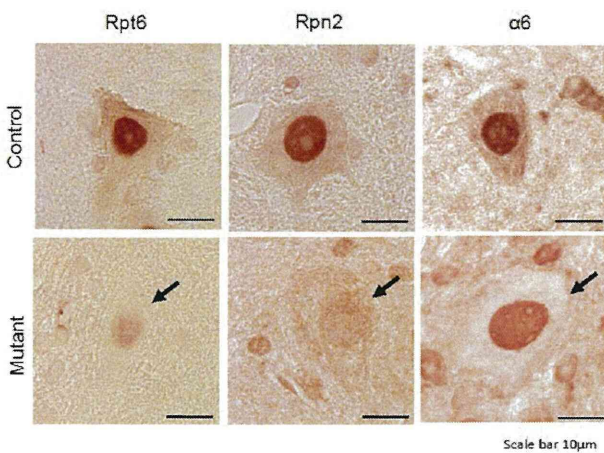
体重比較を行ったところ、35週以降に減少傾向を認めた。ロタロッド測定を行ったところ25週齢以降に運動機能の低下が生じ、握力測定でも、20週齢以降から前肢・後肢ともに握力低下が認められ80%程度に低下していた。

病理学的解析では、6週齢のマウス脊髄にて、運動ニューロンに相当する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。

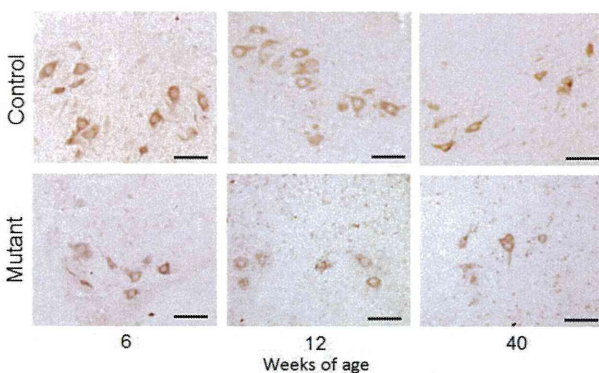




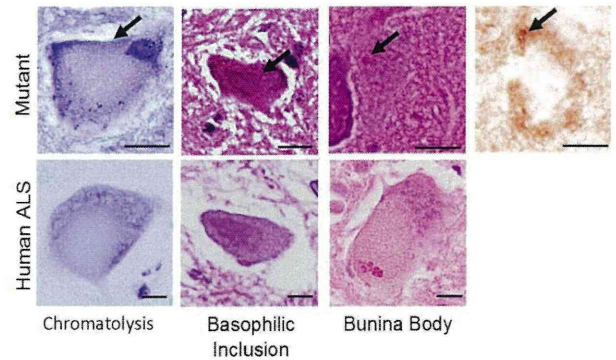
既報告より、Rpt3は26Sプロテアソームの形成・他プロテアソームサブユニットタンパクの発現に大きくかかわっていることが分かっており、今回のRpt3-CKOマウスも Rpt3発現の障害によって他サブユニットの発現障害が起きていた。



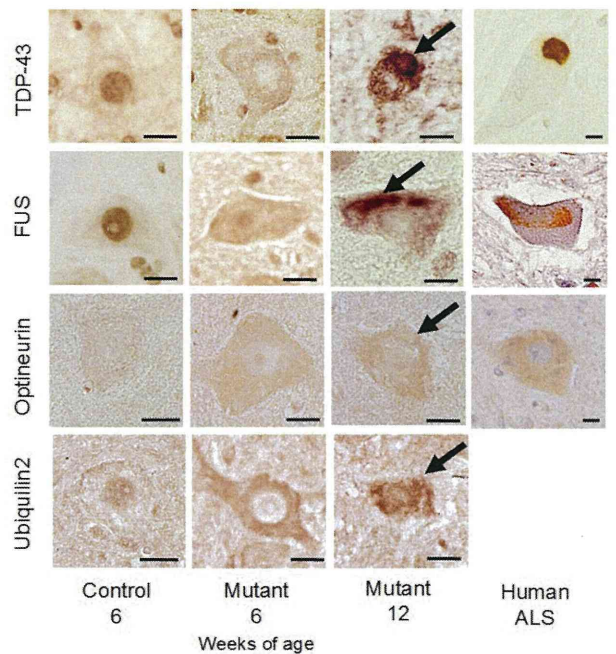
このRpt3-CKOマウスの脊髄運動ニューロン数を6週、12週、40週齢毎に計測したところ、神経細胞死が進行性に減少していた。



また、この神経細胞死の過程として、Rpt3発現障害を受けた細胞に、ALSに特徴的な病理学的所見となるchromatolysis、basophilic inclusion、Bunina bodyが出来ていた。



また孤発性・遺伝性ALSとの類似性を検討するため、近年遺伝性ALS患者より同定され、孤発性ALSとの関連が示唆されている因子である、TDP43、FUS、Optineurin、Ubiquilin2を調べたところ、それぞれにALSで見られる病理学的所見と類似した封入体形成や、凝集、蓄積が認められた。



#### 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運動ニューロン特異的 Rpt3欠損 (Rpt3CKO) マウスを作製した。このマウスは振戦様症状を呈し、行動異常ならびに体重低下を確認した。病理学的所見においても、神経細胞死と共に、ALSに特徴的な病理学的変性や、孤発性 ALSに報告された病因関連因子の蓄積や凝集を認めたこれらの現象は、Rpt3の発現障害によって引き起こされた UPS機能障害が、運動ニューロンの



変性、細胞死へ誘導しており、また、これらの ALS に特徴的な病理学的変性が UPS機能障害によって再現されたことにより、ALSにおける細胞変性過程に UPS機能が大きく関わっていることが分かった。

#### E.結論

- 1.運動ニューロン特異的Rpt3欠損マウス (Rpt3-CKOマウス) を作製した。
2. Rpt3-CKOマウスの脊髄運動ニューロンで Rpt3の欠失、ユビキチンの蓄積、26Sプロテアソーム他サブユニットの欠損が見られた。
3. Rpt3-CKOマウスでは進行性の運動機能障害が認められた。
4. Rpt3-CKOマウスでは進行性の運動ニューロン減少が認められた。
5. Rpt3-CKOマウスの運動ニューロンの細胞病理学的所見はALS患者の所見と酷似していた。以上より、この Rpt3-CKOマウス内で起きている変性機構を調べることでALSで起きている神経変性過程が分かる可能性がある。今後、このマウスで起きている因子発現変化や関係経路を探索する。

#### F.研究発表

- 第52回日本神経学会学術大会、名古屋  
(2011.5.19)  
第34回日本神経科学大会、横浜 (2010.9.17)  
第34回日本分子生物学会年会、横浜  
(2010.12.13)

#### G.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

## 変異 SOD1-Tg マウスの急性神経傷害時のミクログリアと T 細胞の 反応性低下は神経細胞脆弱性と相関する

研究分担者 吉良潤一<sup>1)</sup>

研究協力者 河村真実<sup>1)</sup>, 山崎亮<sup>1)</sup>, 河村信利<sup>1)</sup>, 立石貴久<sup>1)</sup>,  
長柄祐子<sup>1)</sup>, 大八木保政<sup>1)</sup>

1)九州大学大学院医学研究院 神経内科学

### 研究要旨

私たちは、これまで mSOD1-Tg マウスの舌下神経切断モデルにおける運動神経細胞の脆弱性と神経細胞周囲のミクログリアの反応性低下、mSOD1-Tg マウス由来ミクログリアの機能低下および G-CSF 投与によるミクログリアの機能回復を報告してきた。今回私たちは、正常マウスと mSOD1-Tg マウスにおける成熟に伴うミクログリアと T 細胞の急性神経傷害への反応性の変化を検討した。正常マウスでは成熟に伴いミクログリアと T 細胞の神経保護機能が增加していたが、mSOD1-Tg マウスでは神経細胞脆弱性に一致してミクログリアと T 細胞の数が減少しており、mSOD1 はミクログリアと T 細胞に伴う保護機能を低下させることが示唆された。

### A. 研究目的

mSOD1-Tg マウスでは非自律性神経細胞死が存在し、ミクログリアや T 細胞の疾患進行への関与が考えられている。私たちは、これまでに mSOD1-Tg マウスの舌下神経切断モデルにおける運動神経細胞の脆弱性と神経細胞周囲のミクログリアの反応性低下、mSOD1-Tg マウス由来ミクログリアの機能低下および G-CSF 投与によるミクログリアの機能回復を報告してきた。今回私たちは、ALS モデルにおけるミクログリアおよび T 細胞の役割を明らかにすることを目的として、①正常マウスの舌下神経切断モデルにおいて週齢に関連した正常成熟による神経細胞、ミクログリア、T 細胞への影響、②正常マウスと比較したときの mSOD1-Tg マウスの未発症期と疾患進行期における舌下神経切断に対するミクログリア、T 細胞の反応性の違いおよび神経細胞脆弱性との関連、③それぞれの反応性ミクログリアの神経保護および神経毒性マーカーによる染色性の違いからみた表現型の変化の有無を検討した。

### B. 研究方法

①8 週齢、17 週齢の正常 (N-Tg) マウスの左舌下神経切断モデルにて、切断 3 日後のミクログリア数 (抗 Iba1 抗体陽性)、7 日後の T 細胞数 (抗 CD3 抗体陽性)、21 日後の舌下神経細胞残存率 (切断側/非切断側) (Nissl 染色)

を比較し、正常成熟による変化を検討した。②疾患進行に伴う変化を検討するために、発症前 (8 週齢) と進行期 (17 週齢) の mSOD1-Tg (G93A) マウスにおける舌下神経切断後の神経細胞残存率、ミクログリア数、T 細胞数を同週齢の N-Tg マウスと比較した。③ミクログリアにおける神経保護マーカー (GDNF、IGF-1、Arginase1)、神経毒性マーカー (iNOS)、抗原提示細胞マーカー (MHC classII) の発現をミクログリアマーカーの抗 Iba1 抗体との二重免疫組織化学染色により検討した。

動物実験に関しては九州大学医学研究院動物実験委員会の承認を得て、適切な方法で操作・解剖を行った。

### C. 研究結果

①N-Tg マウスでは切断 21 日後の舌下神経細胞残存率は 8 週齢より 17 週齢で有意に増加し、ミクログリアと CD3 陽性 T 細胞は 8 週齢より 17 週齢で増加傾向にあった。(図 1)

②舌下神経細胞残存率の N-Tg マウスと mSOD1-Tg マウスの比較では、切断 21 日後で 8 週齢では有意差はなかったが、17 週齢では (N-Tg:  $53.6 \pm 5.6$ , mSOD1-Tg:  $36.5 \pm 2.6$ ,  $p < 0.05$ ) と mSOD1-Tg マウスで低下を認めた。切断 3 日後では神経細胞の脱落は認めなかった。(図 2)

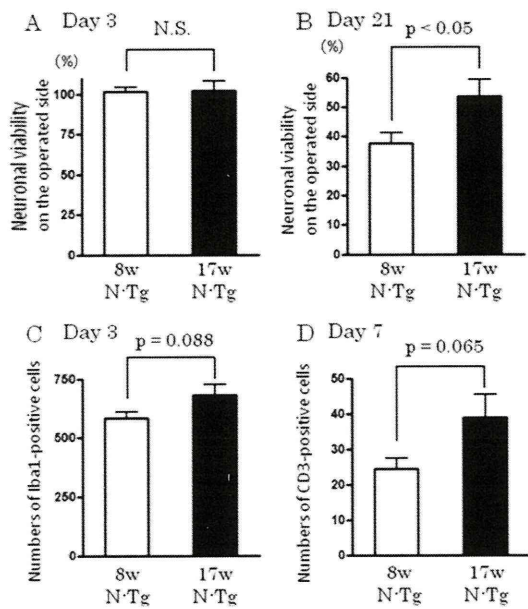


図 1. 正常マウスにおける週齢による成熟関連性の舌下神経切断後の神経細胞残存率およびミクログリア、T細胞反応性の変化 (A) 3日後の神経細胞残存率 (B) 21日後の神経細胞残存率 (C) 3日後のミクログリア数 (D) 7日後のCD3陽性T細胞数

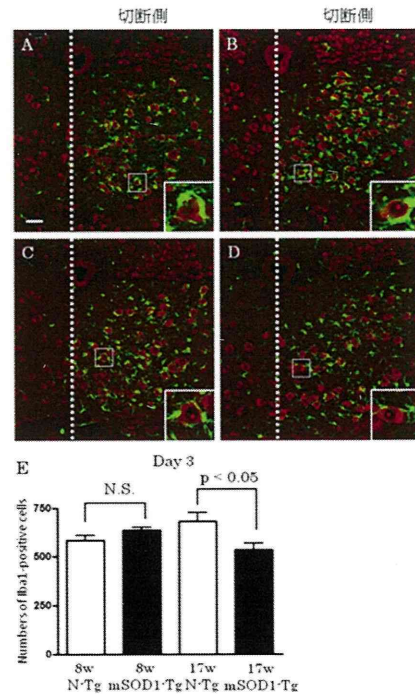


図 3. mSOD1-Tgマウスの成熟期のみにおける神経切断3日後のミクログリアの反応性低下 (赤: Nissl染色、緑: 抗Iba1抗体) (A) 8週齢N-Tg (B) 8週齢mSOD1-Tg (C) 17週齢N-Tg (D) 17週齢mSOD1-Tg (E) 切断側の舌下神経核のミクログリア数 (Bar = 50µm)

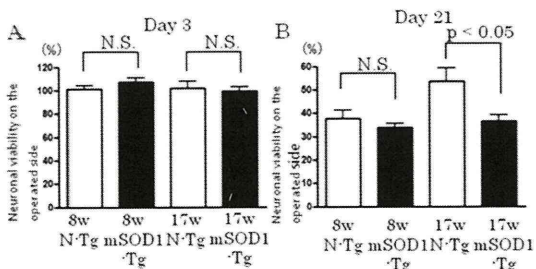


図 2. mSOD1-Tgマウスの成熟期のみにおける神経切断後の舌下神経細胞残存率の低下 (A) 3日後 (B) 21日後

③切断3日後のミクログリア数のN-TgマウスとmSOD1-Tgマウスの比較では、8週齢では有意差はなかったが、17週齢では(N-Tg:  $682.3 \pm 44.1$ , mSOD1-Tg:  $535.7 \pm 33.0$ ,  $p < 0.05$ )とmSOD1-Tgマウスで低下を認めた。(図3)

④切断7日後のCD3陽性T細胞数のN-TgマウスとmSOD1-Tgマウスの比較では、8週齢では有意差はなかったが、17週齢では(N-Tg:  $38.8 \pm 6.6$ , mSOD1-Tg:  $10.8 \pm 5.0$ ,  $p < 0.05$ )とmSOD1-Tgマウスで浸潤の減少を認めた。また、CD4陽性T細胞の浸潤はあったが、CD8陽性T細胞の浸潤は認めなかった。(図4)

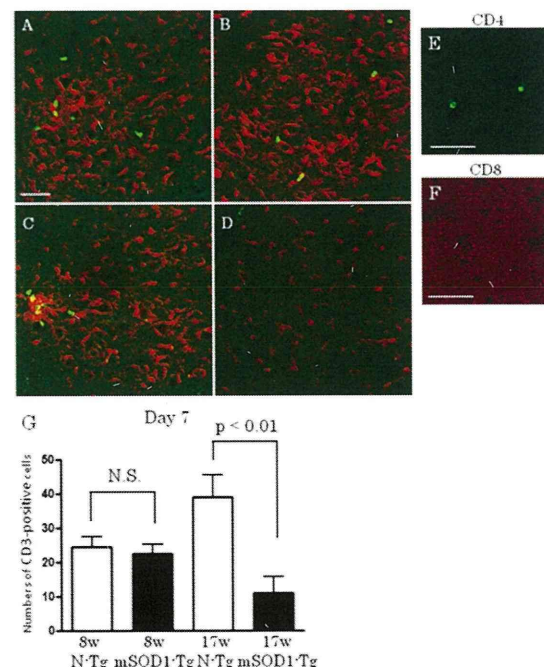


図 4. mSOD1-Tgマウスの成熟期のみにおける神経切断7日後のCD3陽性T細胞浸潤の低下 (赤: 抗Iba1抗体、緑: 抗CD3抗体) (A) 8週齢N-Tg (B) 8週齢mSOD1-Tg (C) 17週齢N-Tg (D) 17週齢mSOD1-Tg (E) CD4陽性T細胞 (F) 抗CD8抗体 (G) 切断側の舌下神経核のCD3陽性T細胞浸潤数 (Bar = 50µm)



⑤切断3日後の8週齢および17週齢のN-TgマウスとmSOD1-Tgマウスの反応性ミクログリアでは神経保護マーカーのGDNF、IGF-1、Arg1、神経毒性マーカーのiNOS、抗原提示のMHC classIIの発現がみられた。(図5)

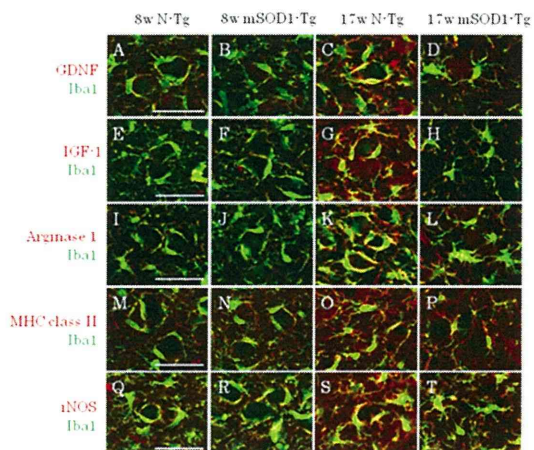


図5. 舌下神経切断3日後の二重免疫組織学的染色(緑:抗Iba1抗体、赤:(A-D:抗GDNF抗体、E-H:抗IGF-1抗体、I-L:抗Arginase 1抗体、M-P:抗MHC classII抗体、Q-T:抗iNOS抗体)(Bar = 50 $\mu$ m)

#### D. 考察

新生動物における末梢神経切断では、50%以上の脊髄運動ニューロン死がおきるが、成熟に伴い生後4週以降では90%以上の神経細胞が生存する(Pollin et al., 1991)。この年齢依存性変化は神経細胞の成長因子依存性の変化との関連が示唆されている(Lowrie and Vrbova, 1992)。本研究では、成熟に伴う神経細胞生存率の上昇および神経栄養因子を発現するミクログリア数、T細胞数の増加傾向を認めたが、mSOD1-Tgマウスでは疾患進行に伴い、逆に神経細胞生存率の減少およびミクログリア数、T細胞数の減少を認め、変異SOD1による正常成熟に関連した免疫反応の破綻が示唆された。

また、CD4陽性T細胞によるMHC classII発現ミクログリアを介した、顔面神経切断後の運動ニューロン生存への保護的な関与が報告されているが(Serpe et al., 2003)、本研究では神経栄養因子やMHC classIIを発現するミクログリア、CD4陽性T細胞の増加が神経生存率と一致してみられたことから、免疫細胞による神経細胞保護効果が示唆された。

ALSにおいてミクログリアは炎症性サイトカインや活性酸素により運動ニューロン変性を加速すると考えられてきたが(Boillee et

al., 2006)、私たちの以前の研究にてG-CSF投与のミクログリアの機能回復によりALSモデルマウスの末梢神経切断後の神経細胞生存率上昇が明らかになった(Yamasaki et al., 2010)。そして、本研究ではミクログリアのフェノタイプ(神経障害性のM1ミクログリア、神経保護性のM2ミクログリア(Henkel et al., 2009))の違いは明らかではなく今後他の方法での検討が必要である。mSOD1-Tgマウスでは成熟に伴い神経細胞脆弱性に一致してミクログリアとT細胞の数が減少することから、ALSモデルマウスでは成熟に伴い神経保護的なミクログリア、T細胞の機能低下がおこることが示唆された。したがって、ALSではミクログリア抑制ではなく神経保護的なミクログリア、T細胞の機能回復が新規治療標的と考えられた。

#### E. 結論

急性神経傷害においてN-Tgマウスでは成熟に伴い、ミクログリアとT細胞の神経保護機能が増加していると考えられた。成熟N-TgマウスとmSOD1-Tgマウスのミクログリアの表現型の違いは明らかではなかったが、進行期のmSOD1-Tgマウスでは神経細胞の脆弱性に一致してミクログリアとT細胞の数が減少しており、変異SOD1はミクログリアとT細胞の成熟に伴う保護機能を低下させることが示唆された。

#### 参考文献:

- Pollin et al., *Development* 112, 83-89. 1991  
 Lowrie and Vrbova, *Trends Neurosci.* 15, 80-84. 1992  
 Serpe et al., *Brain Behav. Immun.* 17, 393-402. 2003  
 Boillee et al., *Science* 312, 1389-1392. 2006  
 Yamasaki et al., *J. Neuroimmunol.* 229, 51-62. 2010  
 Henkel et al., *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4, 389-398. 2009

#### 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

福永真実ら: 進行期 mSOD1-Tg マウスにお

ける急性神経細胞障害に対するミクログリア  
の反応性低下. 第 52 回日本神経学会総会.  
2011

Mami Kawamura et al., Impaired  
neuroprotective response of microglia to  
acute neuron injury in the disease  
progression stage but not in the  
presymptomatic stage in an ALS model. the  
22<sup>nd</sup> International Symposium on  
ALS/MND. 2011

H. 知的所有権の所得状況 (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

## SOD1<sup>G93A</sup> ALS マウスに対する免疫治療 —プロテアーゼ耐性領域を抗原とした検討—

研究分担者 中島健二

研究協力者 渡辺保裕，河瀬真也，安井建一，北山通朗，中野俊也  
鳥取大学医学部医学科脳神経医科学講座 脳神経内科学分野

### 研究要旨

【目的】筋萎縮性側索硬化症（ALS）マウスにおいて，Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）蛋白を抗原とする免疫療法の有効性が報告されている．しかし治療効果を有する抗原部位（ペプチド領域）は明確にされていない．我々の共同研究グループは，過去に SOD1 蛋白の凝集においてコアとなるプロテアーゼ耐性ペプチド領域 3 ヶ所を同定した．本検討ではこれらのペプチド領域での免疫治療の検討を行った．

【方法】SOD1 のアミノ酸領域 12-23AA（SOD1<sup>G12-K23</sup>），93-115AA（SOD1<sup>G93-R115</sup>），137-153AA（SOD1<sup>T137-Q153</sup>）をペプチド合成し免疫効果を検討した．【結果】コア領域を免疫した治療群で運動機能，発症，生存に对照（アジュバント単独投与群）と比較して有意差を認めなかった．【結論】本検討ではプロテアーゼ耐性領域ペプチドによる受動免疫において治療効果を示せなかった．

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）マウスにおいて，Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）蛋白を抗原とする免疫療法の有効性が報告されている<sup>1)</sup>．治療効果を有する抗原部位（ペプチド領域）は明確ではないなど，治療効果発現機序に関しては不明な点が多い．我々の共同研究グループは，SOD1 蛋白の凝集においてコアとなるプロテアーゼ耐性ペプチド領域 3 ヶ所を同定した（図 1A）．これらの領域は，国内の他のグループが報告した凝集領域と合致していた<sup>2)</sup>．ALS の病態が凝集毒性であるならば，コア領域が強く疾患に関与していると想定し（図 1B），これらの領域での免疫治療を検討した．

### B. 研究方法

コア領域として同定された SOD1 のアミノ酸領域 12-23AA（SOD1<sup>G12-K23</sup>，N 末端に cysteine を付加），93-115AA（SOD1<sup>G93-R115</sup>，111 位に cysteine），137-153AA（SOD1<sup>T137-Q153</sup>，146 位に cysteine）を peptide 合成し，keyhole limpet hemocyanin（KLH）と結合させて Freund アジュバントを用いて免疫した（図 2A）．

A  
ATKAVCYLKGDDG**PYGGILINFEQK**ESNGPVKVGWSIKGLTEGLGHGFVHEFGDNTAGCT  
SAGPHFNPLSRKHGGPKDEERHYVDLGNVTAQDK**GVA**DVS**IEDSVISLSGDHCILIGRT**  
LVVHEKADDLKGKGGNEESTKTGNAGSRLACGYIGIAQ

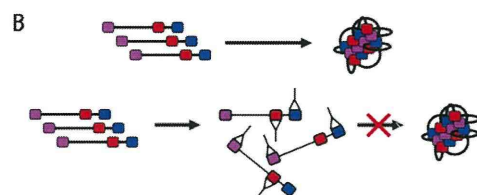


図 1A ヒト野生型 SOD1 のアミノ酸配列．プロテアーゼ耐性領域のアミノ酸配列を示し，N 末端側から桃，赤，青に色分けしている．

図 1B プロテアーゼ耐性のコア領域は SOD1 の凝集に強く関与していると考えられ（上段），コア領域に対する抗体により SOD1 蛋白の凝集が抑制される概念を下段に示した．

果を検討した（図 2B）．3 領域の同時免疫に関しては，アジュバントを AbISCO に変更し，投与経路を腹腔内から皮下へ変更して再検討をおこなった（図 2B）．免疫スケジュールは図 2C に示した．

（倫理面への配慮）

組換え DNA 実験，動物実験および動物の取り扱い



に関しては、鳥取大学の当該委員会での承認を得てこれを遵守して行った。

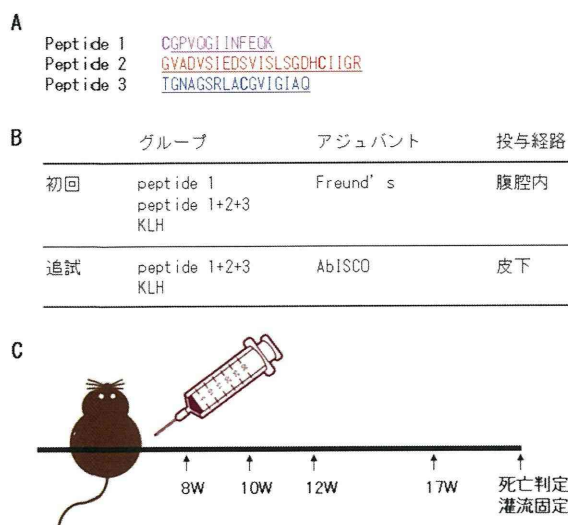


図 2A 免疫に用いたアミノ酸配列を示す。N 末端から順に peptide 1, 2, 3 と称する。  
 図 2B 初回検討では 3 グループ、追試では 2 グループでの検討を行った。使用したアジュバント、投与経路を示す。  
 図 2C 8 週に初回免疫, 10, 12, 17 週に追加免疫を行った。

### C. 研究結果

実験に先立ち、野性型マウスで peptide 接種後の抗体産生について検討を行った。各 peptide 接種にて抗体産生が確認された (図 3A, B, C)。各 peptide を免疫したマウスのプール血清は、市販の抗 SOD1 抗体 (SOD100) と同程度に SOD1 蛋白を認識することを確認した (図 3D)。

初回の検討で、SOD1<sup>G12-K23</sup> 単独の免疫群と、3 種の領域を同時に免疫した治療群の両者とも体重、hind limb score、発症、生存の項目で対照 (KLH 単独投与群) と比較して有効性は見出せなかった (図 4A, B, C, D)。病期をみると 3 種 peptide の同時免疫群において、対照と比較して良好な傾向が認められたが、統計的な有意差は示さなかった (図 4E)。

AbISCO に変更して再検討した 3 領域の同時免疫群に関しても、臨床症状の若干の改善傾向を認めたものの KLH 投与群と比較して有意差に至らなかった (図 5A, B, C, D)。初回検討と同様、病期の検討では 3 領域の同時免疫群で良好な傾向を示したが統計的な有意差には至らなかった (図 5E)。

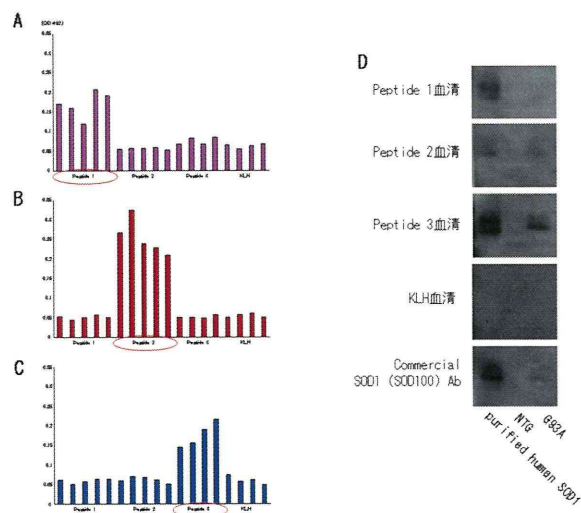


図 3A, B, C 血清の peptide 抗体の誘導を検討する ELISA。横軸は個々のマウス、縦軸は吸光度を示す。各 peptide で免疫したマウスは、該当する peptide に対する抗体価が上昇しており、抗体産生が行われていることを示す。  
 図 3D 各 peptide の免疫したマウス群での pool 血清を一次抗体とした western 解析。市販のヒト SOD1 精製品、野性型マウス (NTG) の脊髄ホモジネート、SOD1<sup>G93A</sup> マウス (G93A) の脊髄ホモジネートを泳動。各血清は市販の抗 SOD1 抗体 (SOD100) と同程度に SOD1 を認識しているが、KLH のみを投与したプール血清は SOD1 を認識しない。

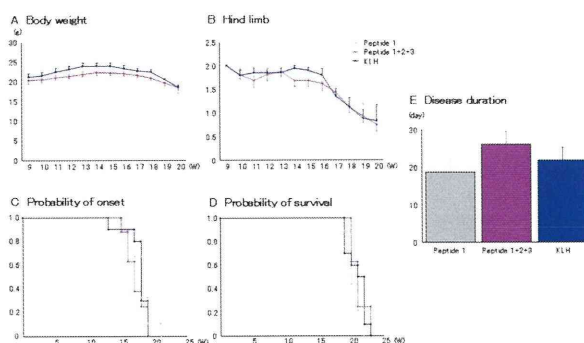


図 4 Peptide 1 領域もしくは peptide 1, 2, 3 の同時免疫群において体重 (A)、hind-limb reflex score (B) とともに治療群と対照 (KLH) 群との間で有意な差は認めなかった。発症週齢 (C)、死亡週齢 (D) の Kaplan-Meier 解析でも両群とも有意な差を認めない。病期において peptide 1, 2, 3 の同時免疫群で対照に比較して良好な傾向がみられたが統計的な有意差には至らなかった (E)。

3 領域の peptide 領域の ELISA において、各領域の抗体の産生を検討したが、全てのマウスで peptide 抗体の誘導を認めた (図 6A)。peptide 免疫が有効な傾向を示した病期に関して個々の peptide 領域の抗

体価との相関を検討したが、有意な相関は認めなかった (図 6B, C, D)。

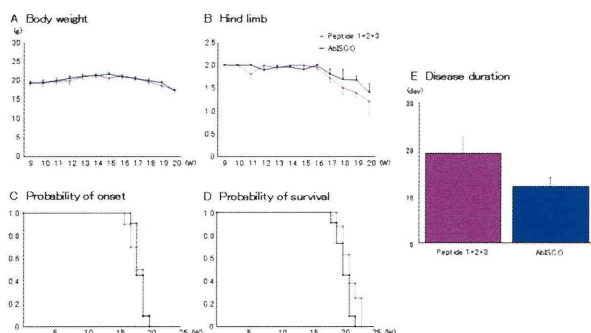


図5 追試においても peptide 1, 2, 3 の同時免疫群は対照 (KLH) 群と比較して、体重 (A)、hind-limb reflex score (B) とともに治療群との間で有意な差は認めず、発症週齢 (C)、死亡週齢 (D) の Kaplan-Meier 解析でも両群とも有意な差を認めなかった。初回の検討と同様に病期において peptide 1, 2, 3 の同時免疫群で対照と比較して良好な傾向がみられたが統計的に有意差には至らなかった (E)。

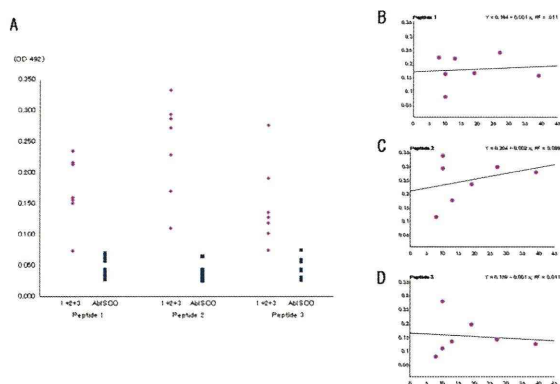


図6A 3領域の peptide 領域の ELISA において、各領域の抗体の産生を示す。  
図6B, C, D 抗体価と病期との相関を個々の peptide 領域で検討したが、有意な相関は認めなかった。

#### D. 考察

初回の検討で、SOD1<sup>G12-K23</sup> 単独の免疫群と、3種の領域を同時に免疫した治療群の両者とも運動機能、発症、生存に対照 (KLH 単独投与群) と比較して有効性は見出せなかった。アジュバントを AbISCO に、投与経路を皮下に変更して再検討を行ったが、病期の若干の改善傾向を認めたものの3領域の同時免疫群と AbISCO 投与群との間で有意な差は認めなかった。一方で、全てのマウスにおいて目的のペプチドに対する抗体の誘導は確認

された。

高発現 SOD1<sup>G93A</sup> マウスを用いた既報告では能動免疫の有効性は報告されておらず、抗体が治療効果を発揮するのを上まわる変異 SOD1 蛋白の量的な存在が原因と考えられている<sup>1)</sup>。SOD1 に対する抗体を投与する髄腔内へ投与する他動免疫により高発現 SOD1<sup>G93A</sup> マウスにおいても有意な寿命の延長、有意な体重減少の抑制効果が認められる<sup>1)</sup> ことより、我々は効果的な抗体が十分量存在すれば高発現 SOD1<sup>G93A</sup> マウスでも能動免疫の有効性が証明しうると考えた。すなわち、本研究での作業仮設として、SOD1 の全領域にランダムに産生される抗体に対し、凝集コア領域特異的に高い濃度の抗体を誘導することにより、他高発現 SOD1<sup>G93A</sup> マウスに対する治療効果を期待した (図 7)。結果として本検討では有意な治療効果が得られなかったため、凝集コア領域特異的な免疫治療の効果の有無に関しては、高発現 SOD1<sup>G93A</sup> マウス以外の過去に受動免疫での効果が証明されているマウスでの再検討が必要と考えられた。

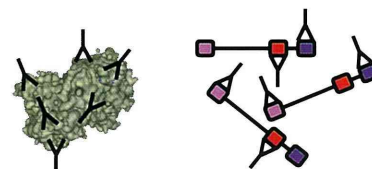


図7 SOD1 の種類の領域への抗体誘導に対し、凝集コアをターゲットとして高い濃度の抗体を誘導することにより高い治療効果がえられると考えた。

#### E. 結論

本検討ではプロテアーゼ耐性領域ペプチドによる受動免疫において治療効果を示せなかった。本検討で用いたマウスは SOD1<sup>G93A</sup> 高発現マウスであり、過去に自動免疫による免疫治療の効果が示されていない。SOD1<sup>G93A</sup> 低発現マウスでの検討を進めるとともに、他の抗原部位の検討をおこなう必要がある。

#### F. 文献

1) Urushitani M, et al, Proc Natl Acad Sci USA 104: 2495-2500, 2007.

2) Furukawa Y, et al. J Biol Chem 285: 22221-31, 2010.

## 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

第 28 回 日本神経治療学会総会

渡辺保裕ほか, 2 塩基欠失 ALS モデルマウスにおけるペプチド免疫治療.

第 29 回 日本神経治療学会総会

渡辺保裕ほか, SOD1 プロテアーゼ耐性領域ペプチドを用いた ALS に対する免疫治療 - G93A 変異 SOD1 高発現マウスでの検討 -

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

「家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) 発症するトランスジェニックマウス」中島健二ら (特許第4590638号).

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## ALS の予後規定因子：軸索持続性 Na 電流は生存期間と関連する

研究分担者 桑原 聡

研究協力者 澁谷和幹, 金井数明, 三澤園子

千葉大学大学院医学研究院 神経内科学

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）において、持続性 Na 電流増大に基づく軸索の興奮性増大が生じていることが指摘されている。ALS における正中運動神経軸索の持続性 Na 電流増大と予後の関連について検討した。ALS において持続性 Na 電流増大は生存期間と有意に相関しており、年齢、発症部位など既知の因子とは独立した強力な予後不良因子であった。持続性 Na 電流増大に由来する軸索の過剰興奮性は、軸索内への過剰な Na 電流の流入、酸化ストレスの増大などを介し、運動ニューロン死を加速させることが示唆された。また、持続性 Na チャンネル阻害は新規治療の作用点となる可能性がある。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）において運動神経軸索の持続性 Na<sup>+</sup>電流亢進等に基づく軸索興奮性増大が報告されている（Kanai et al., Brain 2006）。ALS に特徴的な所見である広範な線維束性収縮も運動神経の興奮性増大に由来する可能性があり、このような過剰な軸索興奮性の増大は運動ニューロン死を加速させ、病態の進行に関与する可能性がある。

現在、ALS における予後規定因子として発症年齢、発症部位、肺活量などが挙げられているが、運動神経の軸索特性と予後の関連についての検討はなされていない。軸索興奮性（持続性 Na<sup>+</sup>電流）と予後の関連について検討した。

### B. 研究方法

2001 年から 2010 年までに当院を受診し、初診時に改訂 El Escorial 基準で probable 以上、もしくは possible であったが気管切開あるいは死亡まで追跡した ALS の診断が確実と考えられる症例のうち、初診時に正中神経の運動神経軸索興奮性測定が行なわれていた 112 例を抽出した。性別、初発部位、発症年齢、肺活量（%VC）、正中神経複合筋活動電位振幅に加え、正中運動神経の持続性

Na 電流（強さ・時間曲線の時定数[Strength-duration time constant, SDTC]により評価）と、発症からエンドポイント（死亡または気管切開）までの期間の関連について、ログランク検定、Cox Hazard モデルを用いて検討した。

### \*倫理面への配慮

本研究は千葉大学倫理委員会の承認を得ている。また個人情報保護に関しては細心の留意を行った。

### C. 研究結果

単変量解析では、高齢（60 歳以上）発症（ハザード比 [HR] 1.8、P=0.06）、球症状発症（HR 1.8、P=0.025）、肺活量低下（%VC、75%以下）（HR 2.1、P=0.017）は生存期間短縮と有意に相関しており、既報告と合致した。また、持続性 Na<sup>+</sup>電流増大も生存期間短縮と有意に相関した（HR 2.2、P=0.0056）。

Cox hazard model による多変量解析では、持続性 Na 電流の増大は既知の予後因子と独立した強い予後不良因子であった（HR 4.1、P=0.0018）。生存期間中央値は持続性 Na 電流増大群で 34 ヶ月、正常群で 51 ヶ月であった。両群間に罹病期間、CMAP 振幅の差はなく、重症度、進行度に差はな

いと考えられた。また、評価時の正中神経の CMAP 振幅によるサブ解析では、CMAP 振幅が正常範囲 (5mV 以上) の群では、軸索 Na 電流は有意な予後因子 (P=0.0026) であったが、CMAP 振幅低下群では有意な予後への影響はなく (P=0.22)、軸索 Na 電流は発症早期において、より病態進行へ影響している可能性が考えられた。

#### D. 考察

ALS において正中運動神経の軸索持続性 Na 電流の増大は他の因子と独立した強い予後不良因子であり、その影響は発症早期に強い可能性が示唆された。

持続性 Na<sup>+</sup>電流の増大は、軸索の自発発射 (fasciculation、筋痙攣) 等から軸索内への過剰な Na<sup>+</sup>イオン流入を生じる。軸索内への Na<sup>+</sup>イオン負荷は Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換輸送体の亢進を介した Ca<sup>2+</sup>イオンの過剰流入、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ポンプの負荷を介した ATPase の枯渇や代謝不全から、運動ニューロン死を加速させる可能性がある。また、持続性 Na<sup>+</sup>電流の増大は酸化ストレスの増大からミトコンドリア機能障害、軸索輸送障害を生じ、ALS の病態をさらに増悪させる可能性がある。

ALS において、短母指外転筋、第一背側骨間筋が、小指外転筋と比較し、早期から萎縮する解離性小指筋萎縮 (split hand) という現象が特異的にみられることが知られている (Kuwabara et al., Muscle Nerve 2008)。短母指外転筋、第一背側骨間筋は小指外転筋に比し、正常人においても軸索持続性 Na 電流が増大していることが示されている。上記の知見は、持続性 Na 電流増大が ALS において進行を加速する因子であることを支持する所見と考えられる。

以上より、ALS において、運動神経の軸索持続性 Na 電流の阻害は神経保護的に作用し進行を遅らせる可能性がある。過去に行われた Na チャネル阻害作用のある topiramate の臨床試験では有効性は証明されなかった (Cudkowiec et al., 2003)。しかし、topiramate の末梢運動神経軸索の持続性 Na チャネルへの阻害効果については明らかでは

ない。同様の Na チャネル阻害薬である mexiletine は、ヒト運動ニューロン軸索の持続性 Na 電流を抑制し、その効果を軸索興奮性検査によりモニタリングできることが示されている (Kuwabara et al., Clin Neurophysiol 2005)。今後、ALS における mexiletine の有効性に関する多施設共同の群間比較試験を展開する予定である。本試験では、ALS の臨床的な進行度と持続性 Na 電流のモニタリングを行い、Na チャネル阻害が ALS において神経保護的に作用し進行抑制に働く新規の治療点となりうるかについて検討する。

#### E. 結論

ALS において運動神経軸索持続性 Na<sup>+</sup>電流の増大は独立した予後不良因子であり、軸索の過剰な興奮性増大は運動ニューロン死を加速させる可能性がある。末梢運動神経の持続性 Na チャネルは ALS における新規治療のターゲットとなる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Misawa S, Noto Y, Shibuya K, Iose S, Sekiguchi Y, Nasu S, Kuwabara S. Ultrasonographic detection of fasciculations markedly increases diagnostic sensitivity of ALS. *Neurology*. 2011;77(16):1532-7.
2. Shibuya K, Misawa S, Arai K, Nakata M, Kanai K, Yoshiyama Y, Ito K, Iose S, Noto Y, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Ohmori S, Kitamura H, Sato Y, Kuwabara S. Markedly reduced axonal potassium channel expression in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *Exp Neurol*. 2011;232(2):149-53.
3. Noto YI, Misawa S, Kanai K, Shibuya K, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Nakagawa M, Kuwabara S. Awaji ALS criteria increase the diagnostic

- sensitivity in patients with bulbar onset. Clin Neurophysiol. 2011 (in press)
4. Uchiyama T, Sakakibara R, Yamamoto T, Ito T, Yamaguchi C, Awa Y, Yanagisawa M, Higuchi Y, Sato Y, Ichikawa T, Yamanishi T, Hattori T, Kuwabara S. Urinary dysfunction in early and untreated Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2011;82(12):1382-6.
  5. Noto Y, Misawa S, Kanai K, Sato Y, Shibuya K, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Ohmori S, Nakagawa M, Kuwabara S. Activity-dependent changes in impulse conduction of single human motor axons: a stimulated single fiber electromyography study. Clin Neurophysiol. 2011;122(12):2512-7.
  6. Makino T, Ito S, Kuwabara S. Involvement of pontine transverse and longitudinal fibers in multiple system atrophy: a tractography-based study. J Neurol Sci. 2011;303(1-2):61-6.
  7. Noto Y, Kanai K, Misawa S, Shibuya K, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Nakagawa M, Kuwabara S. Distal motor axonal dysfunction in amyotrophic lateralsclerosis. J Neurol Sci. 2011;302(1-2):58-62.
  8. Noto Y, Shibuya K, Sato Y, Kanai K, Misawa S, Sawai S, Mori M, Uchiyama T, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Kasai T, Tokuda T, Nakagawa M, Kuwabara S. Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: specificity, sensitivity, and a possible prognostic value. Amyotroph Lateral Scler. 2011;12(2):140-3.

## 2.学会発表

第 52 回日本神経学会学術集会にて発表。

## 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