

Table 3
Health Care Recipients' Priorities for Health Care Outcome

Rank Order	Community-Dwelling Older Adults (n = 2637)			Family Members of Patients With Dementia (n = 333)			Patients in Geriatric Outpatient Clinics (n = 512)			Adult Day Care Participants (n = 795)		
	Outcome	Mean	95% CI	Outcome	Mean	95% CI	Outcome	Mean	95% CI	Outcome	Mean	95% CI
1	Effective treatment of illness	4.23	4.11–4.36	Effective treatment of illness	3.04	2.76–3.32	Effective treatment of illness	2.79	2.58–3.00	Improvement of physical function	3.64	3.42–3.86
2	Reduction of carer burden	4.56	4.44–4.67	Improvement of physical function	4.49	4.19–4.78	Improvement of physical function	4.06	3.84–4.29	Effective treatment of illness	4.33	4.11–4.55
3	Improvement of physical function	5.24	5.13–5.36	Maintaining high level of activity	5.11	4.76–5.45	Improvement of quality of life	5.46	5.19–5.73	Reduction of carer burden	5.40	5.18–5.63
4	Maintaining high level of activity	5.88	5.76–5.99	Reduction of carer burden	5.29	4.98–5.61	Reduction of carer burden	5.52	5.28–5.77	Improvement of quality of life	6.08	5.86–6.30
5	Resolution of assessed problems	5.91	5.76–6.05	Improvement of mental health	5.53	5.24–5.82	Improvement of mental health	5.81	5.58–6.04	Maintaining high level of activity	6.12	5.88–6.37
6	Improvement of mental health	6.26	6.15–6.36	Improvement of quality of life	5.80	5.48–6.13	Maintaining high level of activity	5.97	5.66–6.28	Improvement of mental health	6.38	6.17–6.58
7	Improvement of quality of life	6.36	6.23–6.49	Resolution of assessed problems	5.98	5.69–6.27	Resolution of assessed problems	6.17	5.93–6.42	Patient satisfaction with care	6.44	6.24–6.64
8	Patient satisfaction with care	6.81	6.70–6.92	Patient satisfaction with care	6.01	5.70–6.31	Patient satisfaction with care	6.72	6.47–6.96	Resolution of assessed problems	6.45	6.26–6.65
9	Efficient use of resources	6.91	6.81–7.02	Efficient use of resources	7.49	7.21–7.76	Efficient use of resources	7.46	7.24–7.69	Efficient use of resources	6.57	6.36–6.77
10	Improvement of social functioning	7.44	7.32–7.56	Improvement of social functioning	9.17	8.90–9.45	Improvement of social functioning	8.42	8.18–8.65	Improvement of social functioning	8.22	8.03–8.42
11	Avoiding institutional care	8.43	8.31–8.56	Avoiding institutional care	9.86	9.60–10.12	Avoiding institutional care	9.39	9.16–9.62	Avoiding institutional care	8.61	8.41–8.81
12	Reduction of mortality	9.98	9.87–10.08	Reduction of mortality	10.23	9.99–10.48	Reduction of mortality	10.22	10.00–10.44	Reduction of mortality	9.75	9.55–9.95

CI, confidence interval.

groups indicated physicians' strong preference for this item. All the physician groups also considered "patient satisfaction," "maintaining a high level of activity," and "improvement of physical function" important after "improvement of quality of life," with some variation in the order of their preferences. Geriatricians ranked "effective treatment of illness" the third most important, in contrast to the other two physician groups that ranked this item lower. Adult day care staff ranked "improvement of quality of life" and "maintaining a high level of activity" first and second, respectively, but placed "reduction of carer burden" the third most important, unlike physicians.

With regard to the receiving side of health care, "effective treatment of illness," "improvement of physical function," and "reduction of carer burden" were given high priority, whereas "improvement of quality of life" tended to be perceived as less important.

All the groups, including both health care providers and recipients, ranked "reduction of mortality" the least important, followed by "avoiding institutional care," "improvement of social functioning," and "efficient use of resources," except for the adult day care staff who ranked "improvement of social functioning" higher than "effective treatment of illness."

Stratification analysis demonstrated that the results from physicians were not influenced by sex (male vs female, data not shown); however, physicians older than 60 years tended to rank "effective treatment of illness" and "improvement of physical function" higher compared with younger physicians, who appeared to prioritize "patient satisfaction" and "maintaining a high level of activity." Physicians with more than 30 years' experience, most of whom were older than 60 years, showed a similar tendency, prioritizing "effective treatment of illness" and "improvement of physical function." The results from adult day care staff were identical across groups stratified by age, years of experience, and qualification (data not shown).

The results from the health care recipients did not differ by nursing care level (relatively independent vs limited impairment or higher, or limited impairment vs needing extensive help or higher) for adult day care participants and patients in geriatric outpatient clinics, the existence of relatives who required nursing care (present vs absent) for patients in geriatric outpatient clinics, study site for patients in geriatric outpatient clinics and community-dwelling older adults, or sex for all health care recipient groups (data not shown). Although stratification by age showed that the three measures given highest priority were the same across the age groups (65 to 74 vs older than 75) in community-dwelling older adults, the younger group ranked "reduction of carer burden" first, whereas the older group ranked "effective treatment of illness" first (data not shown).

Discussion

This study is, to our knowledge, the largest survey ever conducted to describe health outcome prioritization in geriatric medicine. We aimed to obtain a comprehensive picture of the views of those involved in decision-making processes in geriatric medicine and compare views between health care providers and recipients. We chose four groups each from providers and recipients that are considered relevant to our purpose. The mean response rate was close to 50%, which was good for a large-scale postal survey and ensured the representative nature of our respondents.

This survey demonstrated that there may be an important gap in health outcome prioritization between health care providers and recipients in geriatric medicine. All health care provider groups, notably physicians, expressed a strong preference for improvement in quality of life (QOL) as a priority of care, whereas health care recipients gave the highest priority to effective treatment of diseases and tended to put lower importance on QOL. In the context of clinical medicine, QOL is often used as a nonspecific, all-encompassing term to describe

nonmortality outcomes averaged over multiple domains (ie, physical, social, and psychological functioning and well-being). Consideration of QOL is essential for the selection of a treatment option, particularly when conditions are noncurative and chronic.¹⁵ Therefore, it is not surprising that physicians who regularly see older patients with multiple chronic conditions consider QOL the most important health care outcome. On the other hand, the term QOL may not be familiar to many health care recipients, and we cannot exclude the possibility that QOL might be confused with other terms, such as standard of living.

Most health care recipients ranked effective treatment of diseases as the most important, suggesting that patients are concerned about their own particular symptoms rather than nonspecific QOL, arguing for efforts to examine the symptoms most concerning to patients. The high importance of effective treatment of diseases ascribed by health care recipients, but not physicians, also implies the significance of the often-neglected aspect of inappropriate prescribing in older adults: underuse of medication likely to be beneficial to older adults. Increased evidence has suggested that failure to prescribe indicated, beneficial medication is common in older adults,^{7,8,16} and recent attempts to provide an explicit list of appropriate, indicated medication for older adults are justified.¹⁰

Interestingly, views on patient satisfaction were also different. All physician groups ranked patient satisfaction as the second top priority, whereas health care recipients considered this to be less important. This tendency has been demonstrated in a prior small study in England more than 15 years ago.¹² Recently, patient satisfaction has been increasingly used to measure health care qualities and compare health plans or physicians.¹⁷ However, our finding may argue against the value of patient satisfaction as a performance measure in geriatric medicine, especially in light of recent evidence suggesting that higher patient satisfaction is accomplished at the sacrifice of increased use of health care resources and may not be directly associated with technical quality of care or improved outcome.^{17,18}

We observed agreement on several items between health care providers and recipients. The importance of physical and mental function, such as maintaining activity or improving physical function, was expressed by both health care providers and recipients. This finding was consistent with prior studies in older adults with multiple chronic conditions^{12,19} or terminal conditions,^{20,21} suggesting that physical and mental function should be an essential factor to consider as a health care outcome in various care settings for older patients.

Reduction in mortality was given the lowest priority by all the groups in health care providers and recipients alike. This view is similar to that observed in previous studies.^{12,19} This finding supports the contention that treatment interventions should be assessed in terms of reduced morbidity and improved QOL in addition to reduced mortality.

In this survey, respondents' characteristics, except age, had limited influence on their views on health outcome prioritization within each group. Geriatricians older than 60 years and community-dwelling adults older than 75 years gave higher priority to effective treatment of diseases compared with their younger counterparts. This suggests that health outcome priorities may not be stable, and can change as respondents age or differ from generation to generation. The cross-sectional design of our survey prevented us from separating the age effect from the secular trend, and further studies will be required to examine the time- or setting-dependent variability of health outcome prioritization.

This study has several limitations. First, although the average response rate was high for a postal survey, it was lower in physician groups than in health care recipient groups (26% to 48% vs 44% to 61%, Table 1). Thus, selection bias cannot be excluded. Second, it was not sure that health care recipients, particularly adult day care participants, correctly understood the study terminology. Third, some of the

items used in the survey were not mutually exclusive. Nevertheless, a similar trend in priorities of outcome measures according to either side of health care providers or recipients suggests that the overall results were not significantly affected by these limitations.

Conclusion

We demonstrated that there was significant agreement and disagreement of health outcome prioritization between health care providers and recipients in geriatric medicine. Health care providers and recipients agreed on high priority for function and low priority for reduction in mortality, but there was obvious disagreement in how they perceived QOL, treatment effect, and patient satisfaction as goals of care. Such disagreement necessitates better communication between providers and recipients to reach goals of care that are mutually understandable and tailored to meet patients' specific needs. The low importance of reduction in mortality and patient satisfaction ascribed by health care recipients may question the value of these outcomes as a way to assess treatment interventions and quality of care. We propose that the priorities of health care outcomes and their differences between providers and recipients demonstrated in this study should be taken into account in the health care of older patients and the design of health care policies and research.

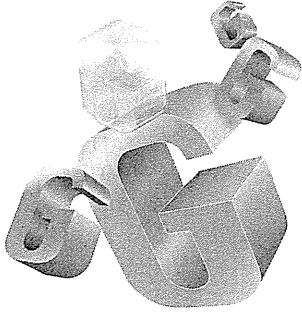
Acknowledgments

We thank the following individuals for helping the acquisition and/or interpretation of data: Dr Yumi Kameyama, Dr Kiyoshi Yamaguchi, and Dr Sumito Ogawa, Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo; Dr Katsuya Iijima, Institute of Gerontology, The University of Tokyo; Dr Yoichi Kosaka, Department of Geriatric Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine; Dr Hiroyuki Umegaki and Dr Yusuke Suzuki, Department of Geriatric Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine; and Dr Yukihiko Ikehata and Dr Ban Mihara, Japan Association of Medical and Care Facilities.

References

1. Tamiya N, Noguchi H, Nishi A, et al. Population ageing and wellbeing: Lessons from Japan's long-term care insurance policy. *Lancet* 2011;378:1183–1192.
2. Ministry of Internal Affairs and Communications Statistics Bureau, Director General for Policy Planning and Statistical Research and Training Institute. Population Estimate. 2012. Available at: <http://www.stat.go.jp/english/index.htm>. Accessed July 8, 2012.
3. Scott IA, Guyatt GH. Cautionary tales in the interpretation of clinical studies involving older persons. *Arch Intern Med* 2010;170:587–595.
4. Barnett K, Mercer SW, Norbury M, et al. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: A cross-sectional study. *Lancet* 2012;380:37–43.
5. Boyd CM, Darer J, Boulton C, et al. Clinical practice guidelines and quality of care for older patients with multiple comorbid diseases: Implications for pay for performance. *JAMA* 2005;294:716–724.
6. Tinetti ME, Bogardus ST Jr, Agostini JV. Potential pitfalls of disease-specific guidelines for patients with multiple conditions. *N Engl J Med* 2004;351:2870–2874.
7. Hanlon JT, Schmader KE, Ruby CM, Weinberger M. Suboptimal prescribing in older inpatients and outpatients. *J Am Geriatr Soc* 2001;49:200–209.
8. Higashi T, Shekelle PG, Solomon DH, et al. The quality of pharmacologic care for vulnerable older patients. *Ann Intern Med* 2004;140:714–720.
9. American Geriatrics Society. Updated Beers Criteria for potentially inappropriate medication use in older adults. *J Am Geriatr Soc* 2012;60:616–631.
10. Gallagher P, Ryan C, Byrne S, et al. STOPP (Screening Tool of Older Person's Prescriptions) and START (Screening Tool to Alert doctors to Right Treatment). Consensus validation. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2008;46:72–83.
11. Kaur S, Mitchell G, Vitetta L, Roberts MS. Interventions that can reduce inappropriate prescribing in the elderly: A systematic review. *Drugs Aging* 2009;26:1013–1028.
12. Roberts H, Khee TS, Philip I. Setting priorities for measures of performance for geriatric medical services. *Age Ageing* 1994;23:154–157.
13. Voigt I, Wrede J, Diederichs-Egidi H, et al. Priority setting in general practice: Health priorities of older patients differ from treatment priorities of their physicians. *Croat Med J* 2010;51:483–492.

14. Junius-Walker U, Stolberg D, Steinke P, et al. Health and treatment priorities of older patients and their general practitioners: A cross-sectional study. *Qual Prim Care* 2011;19:67–76.
15. Symonds T, Berzon R, Marquis P, Rummans TA. The clinical significance of quality-of-life results: Practical considerations for specific audiences. *Mayo Clin Proc* 2002;77:572–583.
16. Gurwitz JH. Polypharmacy: A new paradigm for quality drug therapy in the elderly? *Arch Intern Med* 2004;164:1957–1959.
17. Fenton JJ, Jerant AF, Bertakis KD, Franks P. The cost of satisfaction: A national study of patient satisfaction, health care utilization, expenditures, and mortality. *Arch Intern Med* 2012;172:405–411.
18. Chang JT, Hays RD, Shekelle PG, et al. Patients' global ratings of their health care are not associated with the technical quality of their care. *Ann Intern Med* 2006;144:665–672.
19. Fried TR, Tinetti ME, Iannone L, et al. Health outcome prioritization as a tool for decision making among older persons with multiple chronic conditions. *Arch Intern Med* 2011;171:1854–1856.
20. Rosenfeld KE, Wenger NS, Kagawa-Singer M. End-of-life decision making: A qualitative study of elderly individuals. *J Gen Intern Med* 2000;15:620–625.
21. Fried TR, Bradley EH, Towle VR, Allore H. Understanding the treatment preferences of seriously ill patients. *N Engl J Med* 2002;346:1061–1066.



酸化ストレスマーカー

布村明彦*¹，玉置寿男*²

抄 録

アルツハイマー病 (AD) 脳で認められる酸化ストレス (OS) マーカーの一部は，脳脊髄液，血液，および尿中でも検出可能であり，診断バイオマーカー候補として注目されている。OS マーカーとして最も検討されている脳脊髄液中の F₂-イソプロスタンは，アミロイドβやタウとは異なり，軽度認知障害から AD への移行期間中に有意に増加する。OS マーカーには，AD 前駆期から発症後早期における進行度や介入効果のモニタリング機能が期待される。

Key words : アルツハイマー病，バイオマーカー，脳脊髄液，F₂-イソプロスタン，軽度認知障害，酸化ストレス

老年精神医学雑誌 24 : 140-147, 2013

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) の危険因子，すなわち，加齢，APOE 遺伝子 ε4 アレル，頭部外傷，脳血管障害，肥満，高血圧，糖尿病，高インスリン血症，高コレステロール血症，喫煙，殺虫剤曝露，飲料水中のアルミニウム，高カロリー摂取，運動不足などは，いずれも酸化ストレス (oxidative stress ; OS) の増強あるいは OS 防御機構の減弱と関連している^{22, 23)}。また，AD の防御因子，すなわち，APOE 遺伝子 ε2 アレル，ビタミン C，ビタミン E，葉酸，魚摂取，ワイン適量摂取，適度な運動，知的刺激のある余暇活動などは，いずれも OS 防御機構の増強と関連している^{22, 23)}。

実験的には，家族性アルツハイマー病を引き起こす遺伝子変異を導入した培養細胞や遺伝子改変

動物では，OS の増加や OS に対する脆弱性が認められる。また，培養細胞への OS 負荷によって，β-セクレターゼ (BACE1) の発現増加，アミロイドβ (amyloid β ; Aβ) の蓄積，およびリン酸化タウの誘導が生じる。さらに，遺伝子改変 AD モデル動物に抗酸化酵素スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase ; SOD) のノックアウト (あるいは過剰発現) を掛け合わせると，脳の Aβ 蓄積が促進 (あるいは遅延) されることも知られている^{22, 23, 25)}。

以上のことから，OS は AD の発症に本質的な役割を果たすと考えられ，早期診断マーカー開発のうえでも予防・早期治療法開発のうえでも OS は重要なターゲットのひとつである。

1 脳の酸化傷害

1. アルツハイマー病脳における酸化ストレス (OS) マーカーの検出

1) 各種 OS マーカー

化学的に不安定な活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) そのものを生体内で証明すること

* 1 Akihiko Nunomura : 山梨大学大学院医学工学総合研究部 精神神経医学講座

* 2 Toshio Tamaoki : 山梨大学大学院医学工学総合研究部 精神神経医学講座，社会医療法人 加納岩日下部記念病院 精神科

* 1 〒 409-3898 山梨県中央市下河東 1110

□特集

表1 アルツハイマー病 (AD) および軽度認知障害 (MCI) 患者の剖検脳, 脳脊髄液, 血液および尿における酸化ストレスマーカーの変化

酸化ストレスマーカー	剖検脳	脳脊髄液	血液	尿
脂質過酸化物				
F ₂ -イソプロスタン (IsoP)	AD ↑ MCI ↑	AD ↑ MCI ↑	AD (血漿) ↑→ MCI (血漿) ↑→	AD ↑→ MCI ↑→
4-ヒドロキシノネナール (4-HNE)	AD ↑ MCI ↑	AD ↑	AD (血漿) ↑ AD (リンパ球ミトコンドリア) ↑	
アクロレイン	AD ↑ MCI ↑			
マロンジアルデヒド (MDA)	AD ↑→ MCI ↑	AD ↑	AD (血漿) ↑→, (血清) ↑ AD (赤血球) ↑ MCI (血漿) ↑, (血清) ↑	
チオバルビツール酸反応物質 (TBARS)	AD ↑→ MCI ↑		AD (血漿) ↑→, (赤血球) ↑	
タンパク質の酸化修飾産物				
カルボニル化タンパク質	AD ↑ MCI ↑→	AD ↑→	AD (血漿) ↑→, (血清) → AD (リンパ球ミトコンドリア) ↑ MCI (血漿) ↑	
3-ニトロチロシン (3-NT)	AD ↑ MCI ↑	AD ↑→	AD (血漿) ↑→, (血清) ↑ AD (リンパ球ミトコンドリア) ↑	
核酸の酸化修飾産物				
8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG; 酸化DNAヌクレオシド)	AD ↑→ MCI ↑	AD ↑	AD (リンパ球・白血球) ↑ MCI (白血球) ↑	AD ↑
8-ヒドロキシグアノシン (8-OHG; 酸化RNAヌクレオシド)	AD ↑ (進行期↓) MCI ↑	AD ↑	AD (血清) →	
終末糖化産物				
カルボキシメチルリジン	AD ↑	AD ↑	AD (血清) ↓→	
ペントシジン	AD ↑	AD →	AD (血清) →	

↑: 健常対照に比べて有意な増加, →: 健常対照に比べて有意な変化なし, ↓: 健常対照に比べて有意な減少, ↑→: 増加と不変の両方の報告あり, ↓→: 減少と不変の両方の報告あり

(出典: 文献1, 14, 15, 22~24, 26, 30, 33~35, 37より筆者ら作成)

は困難であるが, ROSによる生体成分の化学修飾産物が組織化学的ならびに生化学的に検出され, OSマーカーとして確立されている。AD剖検脳では, 脂質過酸化物 (F₂-イソプロスタン (isoprostane; IsoP), 4-ヒドロキシノネナール (4-hydroxy-2-nonenal; 4-HNE), アクロレイン, マロンジアルデヒド (malondialdehyde; MDA), チオバルビツール酸反応物質 (2-thiobarbituric acid reactive substances; TBARS) など), タンパク質の酸化修飾産物 (カルボニル化タンパク質, 3-ニトロチロシン (3-nitrotyrosine; 3-NT) など), および核酸の酸化修飾産物 (酸化DNAヌクレオシドである8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-hydroxydeoxyguanosine; 8-OHdG) や酸化

RNAヌクレオシドである8-ヒドロキシグアノシン (8-hydroxyguanosine; 8-OHG) など) が著明に増加していることが報告されている。また, 終末糖化産物であるカルボキシメチルリジンやペントシジンなども生成反応にROSが関与していることからOSマーカーに数えられており, AD脳で増加していることが報告されている (表1)^{1, 14, 15, 22, 24, 35)}。

2) OS防御系のマーカー

生体はOSに対して優れた防御系を有しており, OSの増強時に防御力を代償性に充進させる反応が認められる。実際にAD剖検脳においてSOD, グルタチオンペルオキシダーゼ, グルタチオンリダクターゼ, カタラーゼなどのフリーラジカル・

ROS 生成抑制酵素の発現量あるいは活性に変化が認められている。また、フリーラジカル・ROS 生成反応の触媒となる遷移金属に結合するトランスフェリンやセルロプラスミンも OS 防御系の一部と考えられ、AD 剖検脳において変化が報告されている。そのほかに、フリーラジカル捕捉型抗酸化物質であるビタミン E とグルタチオンや、酸化損傷修復型抗酸化物質オキソグアニングリコシラーゼ-1 も検討されている。また近年、MR スペクトロスコピーを用いた生体脳内グルタチオンの検出も報告されている。しかし、これら OS 防御系マーカには代償的増加が観察されることもあり、AD 脳における増減には一定の傾向を見いだすことができない (表 2)^{1, 14, 15, 35)}。AD 脳組織の抗酸化能 (トロロックス当量) は、脳病理の進行とともに増加すると報告されている³⁶⁾。

3) AD 病理カスケードと OS マーカー

AD 脳における酸化傷害 (oxidative damage) が神経細胞の変性過程の早期段階の変化であることを示唆する所見が多数集積されていることは注目すべきであり、AD 脳を特徴づける A β 蓄積 (老人斑沈着) およびリン酸化タウ蓄積 (神経原線維変化形成) と酸化傷害との関連性について興味深いデータが得られている。すなわち、AD 剖検脳における 8-OHG や 3-NT の増加は、老人斑沈着が軽度の症例や罹病期間が短い症例でより高度であり、AD の変性が顕著な海馬では、神経原線維変化を伴わない神経細胞のほうが神経原線維変化を有する神経細胞より酸化傷害が高度である^{22~24, 26)}。

このような AD 病理カスケードの早期段階に強調される酸化傷害は、OS マーカーのうち比較的容易に分解・除去されると考えられる 8-OHG や 3-NT を用いた場合に明瞭に観察される (OS の定常状態マーカー)。脂質過酸化物質、カルボニル化タンパク質、終末糖化産物などは組織蓄積性があり、早期から進行期のどのステージの AD 脳においても観察される (OS の履歴マーカー)^{24, 26)}。

2. ダウン症候群脳における OS マーカーの検出

ダウン症候群患者の脳は、加齢に伴って成人早期に AD 脳と同一の病理学的変化を呈するため、その年齢階級別検討は、AD 病理の時系列的変化の解析に寄与する。ダウン症候群脳では、8-OHG や 3-NT は A β 沈着開始に先行して出現することが観察され、酸化傷害が AD 病理カスケードの早期段階に生じていることが示唆された²⁴⁾。

3. MCI 脳および preclinical AD 脳における OS マーカーの検出

AD やその他の認知症の前段階と位置づけられている軽度認知障害 (mild cognitive impairment ; MCI) 患者の剖検脳において、すでに脂質、タンパク質、および核酸の酸化傷害が認められる。すなわち、MCI 脳においても AD 脳と同様に、IsoP, 4-HNE, アクロレイン, MDA, TBARS, カルボニル化タンパク質, 3-NT, 8-OHdG, 8-OHG などが検出されている (表 1)^{14, 22~24, 26, 35)}。また、MCI 脳において OS 防御系のマーカーにも変動が認められている (表 2)^{1, 14)}。

近年、アミロイドイメージングの進歩などにより、MCI ステージよりさらにさかのぼった前臨床期である preclinical AD ステージに注目が集まっているが、preclinical AD 剖検脳における OS マーカーの検討も報告されている²⁷⁾。すなわち、海馬では 4-HNE, アクロレイン, 8-OHdG, および 8-OHG の増加が報告されているのに対して、大脳皮質では 4-HNE, アクロレイン, カルボニル化タンパク質, 3-NT, および 8-OHG の増加は認められなかったと報告されている。Preclinical stage では脳部位によって酸化傷害の程度に差がある可能性があるが、今後さらに検討を要する²⁷⁾。

4. AD モデル動物脳における OS マーカーの検出

AD の遺伝子改変動物モデルの脳では、OS マーカーとして IsoP, 4-HNE, MDA, TBARS, カルボニル化タンパク質, 8-OHG などが観察されている^{26, 28, 31, 35)}。とくに IsoP, 4-HNE, MDA, および TBARS については、実験動物脳の A β 沈着開

□特集

表2 アルツハイマー病 (AD) および軽度認知障害 (MCI) 患者の剖検脳, 脳脊髄液および血液における酸化ストレス防御系マーカーの変化

酸化ストレス防御系マーカー	剖検脳	脳脊髄液	血液
フリーラジカル・活性酸素生成抑制型抗酸化物質			
スーパーオキシドジスムターゼ1 (SOD1, Cu/Zn-SOD)	AD 発現量 ↑ 活性 ↑ → ↓, (Syn) 活性 ↓ MCI 活性 ↓, (Syn) 活性 ↓	AD 活性 ↓	AD (血漿) 発現量 ↑ 活性 ↓ →, (血清) 活性 ↓ AD (赤血球) 発現量 → 活性 ↑ → ↓ MCI (血漿) 発現量 ↓, (血清) 活性 ↓ MCI (赤血球) 発現量 ↓ AD (リンパ球) 発現量 ↑
スーパーオキシドジスムターゼ2 (SOD2, Mn-SOD)	AD (Mit) 活性 ↓ MCI 発現量 ↑, (Mit) 活性 ↓		
グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)	AD 活性 ↑ →, (Mit) 活性 ↓, (Syn) 活性 ↓ MCI 発現量 → 活性 →, (Mit) 活性 →, (Syn) 活性 ↓		AD (血漿) 発現量 ↑ → 活性 ↑ ↓ AD (血清) 活性 ↓, (赤血球) 活性 → MCI (血漿) 活性 ↓ →, (血清) 活性 ↓ AD (血漿) 活性 ↓, (赤血球) 活性 → MCI (血漿) 活性 ↓
グルタチオンリダクターゼ (GR)	AD 活性 ↑, (Mit) 活性 ↓, (Syn) 活性 ↓ MCI 発現量 ↑ 活性 →, (Mit) 活性 →, (Syn) 活性 ↓		
カタラーゼ	AD 活性 ↑ ↓, (Syn) 活性 ↓ MCI (Syn) 活性 ↓		AD (血漿) 発現量 → 活性 ↑ ↓ MCI (血漿) 活性 →
トランスフェリン	AD ↓		AD (血清) →
セルロプラスミン	AD ↑ ↓		AD (血清) ↑ →
フリーラジカル捕捉型抗酸化物質			
ビタミンC			AD (血漿) ↓ →, MCI (血漿) ↓
ビタミンE	AD ↑		AD (血漿) ↓ →, MCI (血漿) ↓ →
カロテノイド			AD (血漿) ↓ →, MCI (血漿) ↓ →
グルタチオン (GSH)	AD (Mit) ↓, (Syn) ↓ MCI ↓, (Mit) ↓, (Syn) ↓		AD (血漿) ↓ →, MCI (血漿) ↓
還元型 / 酸化型グルタチオン比	AD (Mit) ↓, (Syn) ↓ MCI ↓, (Mit) ↓, (Syn) ↓		AD (血漿) ↓, MCI (血漿) ↓
還元型 / 全コエンザイム Q-10 比		AD ↓	
尿酸		AD ↑ ↓	AD (血漿) ↓, MCI (血漿) ↓
パラオキシナーゼ1 (PON1)			AD (血漿) 活性 ↓
酸化損傷修復型抗酸化物質			
オキソグアニングリコシラーゼ-1 (OGG1)	AD (核分画) 発現量 ↓ 活性 ↓ MCI (核分画) 発現量 ↓ 活性 ↓		AD (リンパ球) 発現量 ↓
総合的抗酸化能			
総抗酸化能	AD ↑		AD (血漿) ↓ →, (血清) ↓ MCI (血清) ↓

Mit: ミトコンドリア分画, Syn: シナプトソーム分画

↑: 健常対照に比べて有意な増加, →: 健常対照に比べて有意な変化なし, ↓: 健常対照に比べて有意な減少, ↑ → ↓: 増加, 変化なし, あるいは減少のいずれの報告もある

(出典: 文献1, 14, 15, 24, 26, 30, 33~35, 37より筆者ら作成)

始以前に有意に増加することが報告されている^{28, 31)}。

2 アルツハイマー病バイオマーカーとしての酸化ストレスマーカー

1. AD 生体試料（脳脊髄液，血液，尿）中の OS マーカーの検出

AD 剖検脳で増加している OS マーカーの一部は，脳脊髄液（cerebrospinal fluid；CSF）のみならず血液や尿でも検出可能であり，AD の診断バイオマーカーの候補として注目されている。しかも，MCI 段階ですでに生体試料中の OS マーカーの一部が増加していることから（表 1）^{14, 15, 22-24, 26, 30, 33, 34, 37)}，それらは早期診断バイオマーカーの候補として期待されている。また，OS 防御系マーカーの変動も，AD および MCI 患者の CSF 中や血液中で観察されている（表 2）^{14, 15, 24, 26, 30, 33, 34, 37)}。OS 防御系マーカーのうち，抗酸化酵素の発現量・活性の増減は剖検脳における所見と同様に一定の傾向が認められない。他方，血液中のフリーラジカル捕捉型抗酸化物質や総抗酸化能は低下の報告が多く，バイオマーカー候補として有望な可能性がある。

2. CSF 中の F₂-イソプロスタニン (IsoP)

1) CSF 中 IsoP の測定

種々の OS マーカーのうち，AD バイオマーカーとしての重要性について最も頻繁に検討され，比較的一致した結果が得られているのは CSF 中 IsoP である^{7, 14)}。IsoP は，細胞膜中のリン脂質が直接 ROS により非酵素的に過酸化を受けて生成し，ホスホリパーゼによって切り出されて間質液，CSF，血液，あるいは尿中に出現する¹⁴⁾。その生化学的検出にはガスクロマトグラフィー質量分析（gas chromatography-mass spectrometry；GC-MS），液体クロマトグラフィー質量分析（liquid chromatography-mass spectrometry；LC-MS），酵素免疫測定（enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA）などが用いられている^{14, 35)}。

死後脳の脳室から採取された CSF 中の IsoP は，

対照より増加しているのみならず，脳重量の減少や脳萎縮の程度と相関する¹⁴⁾。腰椎穿刺による CSF 中の IsoP は，脳室内 CSF 中の IsoP よりも低値であるが（濃度勾配によると考えられる）¹⁴⁾，AD では対照に比べて平均 60~200% 増加しており，MCI では AD と対照の中間的測定値を示す³⁵⁾。認知機能正常な成人を対象にした検討では，CSF 中 IsoP は加齢と相関して増加し，CSF 中の A β ₄₂ の減少およびタウの増加が認められる成人では，IsoP は有意に増加していた¹⁹⁾。

2) CSF 中 IsoP の疾患特異性

CSF 中 IsoP の増加は AD に特異的ではなく，ハンチントン病，脳血管障害，頭部外傷でも増加が観察されている¹⁶⁾。他方，前頭側頭型認知症では脳の IsoP は増加せず³⁶⁾，CSF 中 IsoP は AD より有意に低いと報告されている¹⁰⁾。認知症鑑別診断上重要なレビー小体型認知症では，剖検脳における脂質の酸化傷害⁴⁾や CSF 中の還元型グルタチオンの減少¹⁵⁾が報告されているが，CSF 中 IsoP に関する報告は見当たらない¹⁵⁾。CSF 中 IsoP の疾患特異性は今後さらに検討を要するが，CSF 中の総タウおよび A β ₄₂ の測定値と IsoP とを組み合わせて解析することによって AD 診断マーカーとして感度 84%，特異度 89% という結果が得られたという報告もある¹⁷⁾。

3) CSF 中 IsoP の縦断的变化

ニューヨーク大学の de Leon のグループは，健常高齢者と MCI 患者を対象に CSF と脳画像の縦断的追跡研究を行った^{3, 5)}。4 年間の追跡期間で，健常者にとどまる高齢者群，MCI へ移行する高齢者群，および MCI から AD への移行群をベースライン時点の CSF 中 IsoP によって 100% 確実に分けることができるという⁵⁾。また，2 年間の追跡期間で MCI から AD への移行群，stable MCI 群，stable 健常群の 3 群間を比較検討したところ，CSF 中の IsoP，総タウ，リン酸化タウ，および A β ₄₂/A β ₄₀ 比はいずれもベースライン時点および追跡後の両時点で MCI-AD 移行群と他の 2 群との間に有意差が認められた³⁾。興味深い点は，これ

□特集

らのCSF中マーカーのうちIsoPのみが追跡期間中に有意な変化(longitudinal effects)を示したことであり、CSF中IsoPはAD早期診断バイオマーカーのなかでもMCIからAD発症に至るまでの病態の進行度が反映される指標として有望である³⁾。

最近のKesterら¹³⁾の報告でも、CSF中IsoPに関して同様の観点が強調されている。すなわち、CSF中 $A\beta_{42}$ およびリン酸化タウは、健常高齢者、MCI、ADの3群を鑑別するうえで有用なマーカーであるが、これらのマーカーにはない特徴として、CSF中のIsoPは平均2年間の追跡期間中に有意な増加を示し、進行度をモニターする指標として有用性が期待される、と述べられている。IsoP変化量は、Mini-Mental State Examination得点の変化量と相関し、MCI-AD移行群ではstable MCI群よりも有意に大きい。

4) ADの遺伝的要因とCSF中IsoP

ADの遺伝的要因との関連性をみると、正常高齢者のうちAPOE遺伝子 $\epsilon 4$ アレル保有者では加齢に伴うCSF中IsoPの増加が認められることが報告されている⁹⁾。また、母方にAD家族歴を有する成人²⁰⁾や、家族性アルツハイマー病の遺伝子変異を有するpreclinical AD例³²⁾においてもCSF中IsoPの増加が認められている。これらの知見から、CSF中IsoPがAD発症前の潜行性の病態進行過程が反映される指標として重要であることが示唆された¹⁹⁾。

3. 血漿・尿中のIsoP

血漿中あるいは尿中のIsoPについては、ADで増加するという報告(ペンシルベニア大学のPraticòのグループなど)と変化がないという報告(ワシントン大学のMontineのグループなど)とがあり、一致していなかった^{14,33,34)}。実験的検討でも、頭部外傷による動物脳のIsoP増加は血中と尿中のIsoP増加に反映されるというPraticòグループの報告²⁹⁾とカイニン酸による動物脳のIsoP増加は血中と尿中のIsoPレベルには反映されないというMontineグループの報告¹⁸⁾とは主

張が分かれていた。結果の不一致の原因はIsoP検出方法の違いや対照の取り方の違いなどが考えられた¹¹⁾。近年の追試では、AD患者とMCI患者の血漿中あるいは尿中のIsoP増加は認められないと報告されており^{12,21)}、AD患者の血中と尿中のIsoPにはCSF中IsoPのような一貫した変化は認められない、という認識が優勢である。

このように、血中や尿中で測定されるバイオマーカーには、脳の病態は忠実に反映されない可能性がある。そうであれば、末梢性あるいは全身性の変化が反映されている可能性が高い血中や尿中のOSマーカーは、ADの病態を考察するときにまったく無意味だろうか。ADの危険因子とされる多くの生活習慣や生活習慣関連疾患はそれだけで血中や尿中のOSマーカーを変動させうる¹⁴⁾。孤発性ADのような多因子疾患では、末梢性・全身性の変化もetiologically重要な意味をもつ可能性がある。したがって、血中や尿中のOSマーカーは、AD発症前のリスク評価や介入効果判定の指標として、一定の役割を果たす可能性がある。

酸化ストレスマーカーとアルツハイマー病治療モニタリング

OSマーカーの変化を指標にAD予防・治療介入の効果を検討するうえで、非常に示唆に富む2つのランダム化比較試験(randomized controlled trial; RCT)が最近報告されている。ひとつは、軽度～中等度AD患者を対象にビタミンE、ビタミンC、および α リポ酸の混合投与の効果を検討したRCT⁸⁾である。このRCTでは、16週間の治療によってCSF中のOSマーカー(IsoP)は減少したが、CSF中 $A\beta_{42}$ に変化はなく、驚いたことに認知機能低下は加速された。もう1つのRCTは、健忘型MCI患者を対象に低飽和脂肪・低グリセミック指数の食餌介入の効果を検討した報告である²⁾。このRCTでは、4週間の介入によってCSF中OSマーカー(IsoP)の減少と $A\beta_{42}$ の増加、および記憶機能の改善が認められた。これら2つのRCTではともにCSF中OSマーカーの減少が

認められており、適当な介入により確実に CSF 中 OS マーカーを減少させることが明らかになった。しかし、2つの RCT で認知機能に現れた結果は正反対であった。試験対象の違い（前者は AD 患者、後者は MCI 患者）および OS 制御のストラテジーの違い（前者は抗酸化物質投与による外因性 OS 制御、後者は代謝のシフトによる内因性 OS 制御）が結果を左右した可能性がある。

おわりに

AD バイオマーカーとして OS マーカーにはどのような役割が最も期待されるだろうか。これまでの知見をまとめると、OS マーカーは、正常高齢者あるいは preclinical AD から MCI への移行過程ならびに MCI から AD への移行過程における進行度判定の指標や介入効果判定の指標となることが期待される⁶⁾。今後、信頼性や再現性の追求と同時に、非侵襲性、簡便性、および低価格性の条件を備えた OS マーカーが AD バイオマーカーとして確立されることが望まれる。

文 献

- 1) Ansari MA, Scheff SW : Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*, **69** : 155-167 (2010).
- 2) Bayer-Carter JL, Green PS, Montine TJ, Van Fossen B, et al.: Diet intervention and cerebrospinal fluid biomarkers in amnesic mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, **68** : 743-752 (2011).
- 3) Brys M, Pirraglia E, Rich K, Rolstad S, et al.: Prediction and longitudinal study of CSF biomarkers in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, **30** : 682-690 (2009).
- 4) Dalfó E, Ferrer I : Early alpha-synuclein lipoxidation in neocortex in Lewy body diseases. *Neurobiol Aging*, **29** : 408-417 (2008).
- 5) de Leon MJ, Mosconi L, Li J, De Santi S, et al.: Longitudinal CSF isoprostane and MRI atrophy in the progression to AD. *J Neurol*, **254** : 1666-1675 (2007).
- 6) Fagan AM, Perrin RJ : Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomark Med*, **6** : 455-476 (2012).
- 7) Galasko D, Montine TJ : Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomark Med*, **4** : 27-36 (2010).
- 8) Galasko DR, Peskind E, Clark CM, Quinn JF, et al.: Antioxidants for Alzheimer disease ; A randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. *Arch Neurol*, **69** : 836-841 (2012).
- 9) Glodzik-Sobanska L, Pirraglia E, Brys M, de Santi S, et al.: The effects of normal aging and ApoE genotype on the levels of CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **30** : 672-681 (2009).
- 10) Grossman M, Farmer J, Leight S, Work M, et al.: Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **57** : 721-729 (2005).
- 11) Irizarry MC : Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. *NeuroRx*, **1** : 226-234 (2004).
- 12) Irizarry MC, Yao Y, Hyman BT, Growdon JH, et al.: Plasma F2A isoprostane levels in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*, **4** : 403-405 (2007).
- 13) Kester MI, Scheffer PG, Koel-Simmelink MJ, Twaalfhoven H, et al.: Serial CSF sampling in Alzheimer's disease ; Specific versus non-specific markers. *Neurobiol Aging*, **33** : 1591-1598 (2012).
- 14) Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, et al.: Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev*, **8** : 285-305 (2009).
- 15) Mao P : Oxidative stress and its clinical applications in dementia. *J Neurodegener Dis*, **2013** : article ID 319898 (2013).
- 16) Montine KS, Quinn JF, Zhang J, Fessel JP, et al.: Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids*, **128** : 117-12 (2004).
- 17) Montine TJ, Kaye JA, Montine KS, McFarland L, et al.: Cerebrospinal fluid A β 42, tau, and f2-isoprostane concentrations in patients with Alzheimer disease, other dementias, and in age-matched controls. *Arch Pathol Lab Med*, **125** : 510-512 (2001).
- 18) Montine TJ, Quinn JF, Milatovic D, Silbert LC,

- et al.: Peripheral F₂-isoprostanes and F₄-neuroprostanes are not increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **52** : 175-179 (2002).
- 19) Montine TJ, Peskind ER, Quinn JF, Wilson AM, et al.: Increased cerebrospinal fluid F₂-isoprostanes are associated with aging and latent Alzheimer's disease as identified by biomarkers. *Neuromolecular Med*, **13** : 37-43 (2011).
- 20) Mosconi L, Glodzik L, Mistur R, McHugh P, et al.: Oxidative stress and amyloid-beta pathology in normal individuals with a maternal history of Alzheimer's. *Biol Psychiatry*, **68** : 913-921 (2010).
- 21) Mufson EJ, Leurgans S : Inability of plasma and urine F_{2A}-isoprostane levels to differentiate mild cognitive impairment from Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*, **7** : 139-142 (2010).
- 22) Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, et al.: Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, **65** : 631-641 (2006).
- 23) Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, et al.: Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **6** : 411-423 (2007).
- 24) Nunomura A, Hofer T, Moreira PI, Castellani RJ, et al.: RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol*, **118** : 151-166 (2009).
- 25) Nunomura A, Tamaoki T, Tanaka K, Motohashi N, et al.: Intraneuronal amyloid β accumulation and oxidative damage to nucleic acids in Alzheimer disease. *Neurobiol Dis*, **37** : 731-737 (2010).
- 26) Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, et al.: Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. *Neurotox Res*, **22** : 231-248 (2012).
- 27) Nunomura A, Tamaoki T, Motohashi N, Nakamura M, et al.: The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons. *J Neuropathol Exp Neurol*, **71** : 233-241 (2012).
- 28) Praticò D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, et al.: Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci*, **21** : 4183-4187 (2001).
- 29) Praticò D, Reiss P, Tang LX, Sung S, et al.: Local and systemic increase in lipid peroxidation after moderate experimental traumatic brain injury. *J Neurochem*, **80** : 894-898 (2002).
- 30) Puertas MC, Martínez-Martos JM, Cobo MP, Carrera MP, et al.: Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol*, **47** : 625-630 (2012).
- 31) Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, et al.: Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, **44** : 2051-2057 (2008).
- 32) Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, et al.: Biochemical markers in persons with pre-clinical familial Alzheimer disease. *Neurology*, **71** : 85-92 (2008).
- 33) Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, et al.: Circulating biomarkers of cognitive decline and dementia. *Clin Chim Acta*, **364** : 91-112 (2006).
- 34) Song F, Poljak A, Smythe GA, Sachdev P : Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*, **61** : 69-80 (2009).
- 35) Sonnen JA, Breitner JC, Lovell MA, Markesbery WR, et al.: Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models. *Free Radic Biol Med*, **45** : 219-230 (2008).
- 36) Tayler H, Fraser T, Miners JS, Kehoe PG, et al.: Oxidative balance in Alzheimer's disease ; Relationship to APOE, Braak tangle stage, and the concentrations of soluble and insoluble amyloid- β . *J Alzheimers Dis*, **22** : 1363-1373 (2010).
- 37) Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, et al.: Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **26** : 59-68 (2011).
- 38) Yao Y, Zhukareva V, Sung S, Clark CM, et al.: Enhanced brain levels of 8, 12-iso-iPF₂alpha-VI differentiate AD from frontotemporal dementia. *Neurology*, **61** : 475-478 (2003).

加齢と神経変性疾患における RNA 酸化傷害

布村 明彦*

Role of Oxidative RNA Damage in Aging and Neurodegenerative Disorders

Akihiko Nunomura*

Abstract

It is now clear that RNA species not only encode proteins but also fulfill critical roles in regulating gene expression. Compared to other species, humans probably contain more non-coding RNAs, especially in the brain, where the non-coding RNAs may play a significant role in cognition. In neurons of human and rodent brains, oxidative damage to nucleic acids, predominantly to RNA, increases as a function of age; this may play a crucial role in the development of age-associated neurodegeneration. Indeed, compared to age-matched controls, patients with neurodegenerative disorders, including Alzheimer disease, Parkinson disease, dementia with Lewy bodies, and amyotrophic lateral sclerosis, show higher levels of neuronal RNA oxidation. Furthermore, oxidative damage to RNA has been found in cellular and animal models of neurodegeneration. RNA oxidation has been hypothesized to cause aberrant expression of microRNAs and proteins and subsequently initiate inappropriate cell fate pathways. Interestingly, accumulating evidence obtained from studies on either human samples or experimental models coincidentally suggests that RNA oxidation is a feature of neurons in the aging brain and more prominently observed in vulnerable neurons at an early-stage of age-associated neurodegenerative disorders, indicating that RNA oxidation actively contributes to the prodromal stage, onset, and development of these disorders. Further investigations aimed at understanding the processing mechanisms related to oxidative RNA damage and its consequences may provide significant insights into the pathogenesis of neurodegenerative disorders and pave the way for novel therapeutic strategies.

Key words : aging, 8-hydroxyguanosine, neurodegeneration, oxidative stress, RNA

はじめに

さまざまな生物種におけるゲノム解析プロジェクトの完了によって、予想外にも蛋白質をコードする遺伝子の数は下等生物から高等生物に至るまで大差がないことが明らかになった¹⁾。他方、高等生物には下等生物に比べて蛋白質をコードしない DNA 領域がより多く存在することが明らかになり、非コード DNA 領域の割合と生物

の複雑さの間には強い相関が見出された²⁾。非コード DNA 領域の割合はヒトでは実に 98.8% に達し、その大部分は non-coding RNA (ncRNA) へと転写されており、これらがヒトの高次脳機能に深く関与している可能性が指摘された^{1,2)}。

近年、ncRNA による遺伝子発現制御機構が解明されつつあり、発生期の遺伝子調節のみならず、加齢、認知機能、あるいは神経変性にも ncRNA が重要な役割を果たしている可能性が指摘され始めた¹⁻⁴⁾。さらに、

* 山梨大学大学院医学工学総合研究部精神神経医学講座 (〒409-3898 山梨県中央市下河東 1110) Department of Neuropsychiatry, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi

ncRNA の品質管理機構の破綻と疾病の関連性も注目されている⁵⁾。このような近年の RNA バイオロジーの急展開を受け、RNA 酸化傷害と疾病の関連性が注目され始め⁶⁻⁹⁾、神経系の RNA 酸化傷害に関する知見も集積されつつある¹⁰⁻¹³⁾。

I. DNA と RNA の酸化

DNA の酸化傷害に関しては多数の研究があり、塩基の酸化、断片化（一本鎖切断、二重鎖切断）、架橋結合形成（DNA 鎖間架橋、DNA 鎖内架橋、DNA-蛋白質架橋）などの損傷が知られているが^{14,15)}、RNA の酸化傷害に関する研究はいまだに少数である。しかしながら RNA は、その構造的特徴と細胞内局在から DNA よりも酸化傷害を受けやすいと推測される^{6,7,16)}。すなわち RNA は、大半が一本鎖構造で塩基間の水素結合による保護がなく、ヒストンなどの特異的結合蛋白質による保護が少ないうえに、活性酸素種（reactive oxygen species：ROS）の主な発生源であるミトコンドリアの近傍に多量に存在する。

実際に高速液体クロマトグラフィーを用いた検討で、単離 DNA/RNA¹⁷⁾、大腸菌¹⁸⁾、マウス胚性線維芽細胞¹⁹⁾、アカゲザル白血球²⁰⁾、ヒト白血球²¹⁾、ヒト皮膚線維芽細胞²²⁾、ヒト肺上皮細胞²³⁾、ラット骨格筋²⁴⁾、ラット肝^{17,25)} などにおいて、酸化 DNA よりも酸化 RNA が多量に検出されたと報告されている。

これらの検討では、核酸の酸化の指標として、酸化 DNA 塩基である 8-ヒドロキシデオキシグアニン（8-OH-dGua）[あるいは酸化 DNA ヌクレオシドである 8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OH-dGuo）] および酸化 RNA 塩基である 8-ヒドロキシグアニン（8-OH-Gua）[あるいは酸化 RNA ヌクレオシドである 8-ヒドロキシグアノシン（8-OH-Guo）] が用いられている。

例えば、マウス胚性線維芽細胞では、DNA 中のデオキシグアニン 100 万個あたりの 8-OH-dGua は 0.4 個であるのに対し、RNA 中のグアニン 100 万個あたり 8-OH-Gua は 10.3 個であり、酸化 DNA 塩基の 25 倍の比率で酸化 RNA 塩基が検出されている¹⁹⁾。

また、尿中に 8-OH-dGuo よりも 8-OH-Guo が多量に検出されることが、ラット²⁶⁾、健康者²⁶⁾、高齢者²⁷⁾、遺伝性ヘモクロマトーシス患者²⁸⁾、スチレンあるいはベンゼンに職業的に曝露された労働者^{29,30)} において報告されている。老化促進モデルマウス SAMP8 およびその対照マウス SAMR1³¹⁾、あるいはアカゲザル²⁰⁾ では、尿中と血漿中の両方で 8-OH-dGuo よりも 8-OH-Guo が多量

に検出されたと報告されている。したがって、RNA 酸化傷害は正常の代謝過程でも生じるが、老化やある種の病態・環境条件により増大し、生体は酸化傷害を受けた RNA の修復機構を有していることが示唆される。

最近、糖尿病患者において、尿中 RNA 酸化物のレベルが総死亡率や糖尿病関連死亡率と相関することが報告され³²⁾、『Nature Reviews Endocrinology』誌の Research Highlights に取り上げられた³³⁾。尿中 RNA 酸化物と死亡率との間に認められた関連性は、尿中 DNA 酸化物では認められなかったと報告されており³²⁾、RNA の酸化傷害に特異的なメカニズムが病態に関与している可能性がある。

II. RNA の酸化とその生物学的影響

1. 酸化 RNA の生成と塩基の誤対合

酸化修飾を受けた塩基は、核酸中に 20 種類以上検出されている^{14,15,34,35)}。酸化修飾に対する反応性は、核酸塩基の中でグアニンが最も高く³⁶⁾、その酸化物である 8-OH-Gua が酸化核酸塩基の中で最も多量に検出される⁹⁾。酸化塩基 8-OH-Gua あるいは酸化ヌクレオシド 8-OH-Guo が RNA 中に生成される過程には、RNA 塩基が直接的に酸化される場合とヌクレオチド・プール中の酸化塩基が RNA に取り込まれる場合とがある（Fig. 1）^{35,36)}。8-OH-Gua、8-OH-Guo 以外にも 8-ヒドロキシアデノシン、5-ヒドロキシシチジン、および 5-ヒドロキシウリジンが酸化 RNA 中に認められている³⁶⁾。

8-OH-Gua は、グアニンの本来の対合相手であるシトシンだけではなくアデニンと誤対合を生じるため、RNA 中の 8-OH-Gua は翻訳の誤りや阻害の原因になる^{35,37)}。

2. RNA 鎖切断

最近、核酸塩基ラジカルによる RNA 鎖切断も報告されている。ヒドロキシルラジカルによる RNA 傷害の 40% は直接的な RNA 鎖切断であるという³⁸⁾。

3. 酸化 RNA による蛋白質合成障害

メッセンジャー RNA（mRNA）の酸化がもたらす生物学的影響は、培養細胞系で検討された。その結果、酸化 mRNA によって蛋白質の発現レベルが低下し、正常な蛋白質の機能も障害されるのみならず、蛋白質凝集に関連する異常蛋白質が生成される可能性が示唆されている³⁹⁾。すなわち、mRNA 中の酸化塩基は翻訳の停止あるいは遅延を引き起こすことが明らかにされ⁴⁰⁾、酸化

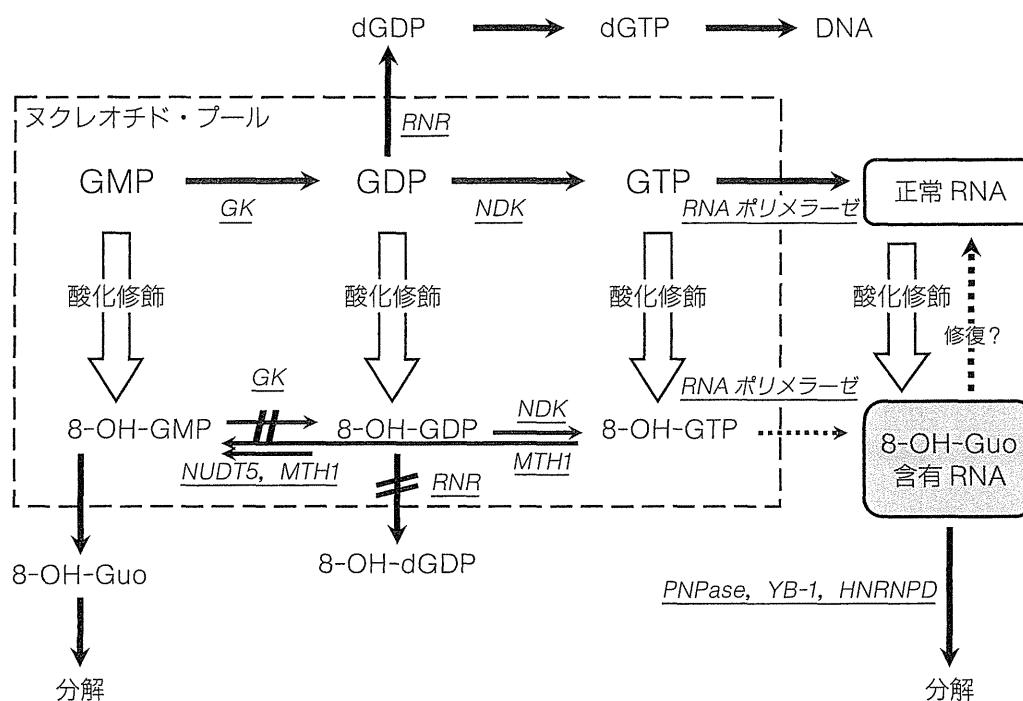


Fig. 1 8-OH-Guo 含有 RNA の生成とその防御系

8-OH-Guo 含有 RNA は RNA の直接的な酸化のほか、酸化ヌクレオチドの RNA への取り込みによって生成される。酸化ヌクレオチド取り込み防止機構として、MutT ホモログ 1 (MTH1) や nudix type 5 (NUDT5) による酸化ヌクレオチド分解能、ならびにグアニル酸キナーゼ (GK)、リボヌクレオチド還元酵素 (RNR)、および RNA ポリメラーゼが示す識別機能 (酸化ヌクレオチドに対する選択的不活性) が挙げられる。また、8-OH-Guo 含有 RNA に結合する蛋白質として、ポリヌクレオチド加リン酸分解酵素 (PNPase)、Y ボックス結合蛋白質 1 (YB-1)、およびヘテロ核リボヌクレオ蛋白質 D 0 (HNRNPD) が知られており、これらは酸化 RNA と正常 RNA の識別および酸化 RNA の選択的分解に寄与しているのかもしれない。

mRNA の翻訳の結果、短縮ポリペプチドの蓄積が生じることが観察されている⁴¹⁾。

リボソーム RNA (rRNA) の酸化の影響も培養細胞系で検討された結果、蛋白質合成の顕著な低下をもたらすことが明らかにされている⁴²⁾。

4. マイクロ RNA の酸化

マイクロ RNA (miRNA) の直接的な酸化の影響は未解明である。酸化修飾が実際に miRNA に生じるのか、酸化修飾を受けた miRNA の機能が変化するのかなどについては不明であるが、Nelson ら⁴³⁾ は酸化 miRNA が神経変性の引き金になる可能性を指摘している。

III. RNA 酸化傷害に対する防御系

1. 酸化 RNA の分解および修復

傷害された RNA を処理する機構としては、修復よりも分解が主体であろうと考えられている。しかし、酸化

RNA に対して特異的な分解能を有するリボヌクレアーゼ (RNase) は知られていない⁷⁾。傷害された RNA の修復機転としては、アルキル化損傷修復酵素である AlkB [ヒト AlkB ホモログ 3 (hABH3)] が DNA のみならず RNA にも有効であることが報告されている⁴⁴⁾。また、最近、塩基除去による酸化 DNA 修復に関与することが知られているアプリン・アピリミジン・エンドヌクレアーゼ/レドックス・エフェクター因子 1 (APE/Ref-1) が、rRNA の品質管理にも関与する可能性が示唆されている⁴⁵⁾。

2. 酸化ヌクレオチドの分解および識別

細胞質内のヌクレオチド・プールにおいて酸化されたヌクレオチドは DNA や RNA に取り込まれる可能性があるが、その取り込みを防止する機構を細胞は備えている^{6,7)}。すなわち、MutT [哺乳動物 MutT ホモログ 1 (MTH1)] や nudix type 5 (NUDT5) による酸化ヌクレオチド分解能^{35,37,46,47)}、ならびにグアニル酸キナーゼ (GK)、リボヌクレオチド還元酵素 (RNR)、および

Table 1 加齢に関連する RNA 酸化傷害の増加の報告

対象	材料/方法	報告者 (報告年)
ヒトの加齢		
認知症のない 65 例 (年齢 0.3~86 歳)	脳 (海馬, 大脳皮質)/ICC	Nunomura, et al (2012)
健常な 300 例 (年齢 21~85 歳)	尿/HPLC・MS-MS	Andreoli, et al (2011)
高齢の 198 双生児組 (年齢 62~83 歳)	尿/UPLC・MS-MS	Broedbaek, et al (2011)
実験動物の加齢		
アカゲザル <i>Macaca mulatta</i> (1, 5, 10, 15, 20, 25 歳)	白血球, 血漿, 尿/HPLC・MS-MS	Shi, et al (2012)
フィッシャー 344 ラット (6, 26 月齢)	脳 (海馬)/ICC	Liu, et al (2002)
フィッシャー 344 ラット (6, 24 月齢)	脳 (小脳)/HPLC・ECD, ICC	Cui, et al (2009)
老化促進モデルマウス SAMP8 (8, 12 月齢)	脳 (海馬)/ICC	Song, et al (2011)
	脳 (大脳皮質)/ICC	Shi, et al (2012)
SAMP8 および対照マウス SAMR1 (1, 4, 8, 12 月齢)	(SAMR1 に比べて SAMP8 でより顕著な加齢性の増加) 脳, 肺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 精巣/HPLC・MS-MS	Gan, et al (2012)
フィッシャー 344/ブラウンノルウェイ ラット (6, 32 月齢)	血漿および尿/HPLC・MS-MS 骨格筋 (腓腹筋)/HPLC・ECD	Hofer, et al (2008)
フィッシャー 344 ラット (6, 24 月齢)	肝臓/HPLC・ECD	Seo, et al (2006)
フィッシャー 344/ブラウンノルウェイ ラット (8, 18, 29, 37 月齢)	(ミトコンドリア RNA) 骨格筋 (大腿四頭筋), 肝臓/HPLC・ECD	Seo, et al (2008)

[略語] ECD: 電気化学検出, HPLC: 高速液体クロマトグラフィー, ICC: 免疫細胞化学, MS-MS: タンデム質量分析, UPLC: 超高速液体クロマトグラフィー

RNA ポリメラーゼが示す識別機能^{7,37,46}である (Fig. 1)。

3. 酸化 RNA に対する特異的結合蛋白質

8-OH-Guo 含有 RNA に結合する蛋白質として, ポリヌクレオチド加リン酸分解酵素 (PNPase)⁴⁸, Y ボックス結合蛋白質 1 (YB-1)⁴⁹, およびヘテロ核リボヌクレオ蛋白質 D 0 (HNRNPD)⁵⁰ が報告されている。これらの蛋白質は酸化 RNA と正常 RNA の識別に寄与しているのかもしれない⁴⁸⁻⁵⁰。

IV. 加齢に伴う RNA 酸化傷害

加齢に伴って脳で酸化 RNA の増加が認められることが, ヒト (海馬, 大脳皮質)⁵¹, ラット (海馬, 小脳)^{52,53}, および老化促進モデルマウス SAMP8 (海馬, 大脳皮質)^{54,55} において報告されている。脳以外では, ヒトの尿^{56,57}, アカゲザルや SAMP8 の尿と血液材料^{20,31}, およびラットや SAMP8 の身体諸臓器^{24,31,58,59} において加齢に伴う酸化 RNA の増加が観察されている (Table 1)。

V. 神経精神疾患における RNA 酸化傷害

1. アルツハイマー病とパーキンソン病 (Table 2)

神経細胞における転写あるいは翻訳の正確性の障害は, 異常な蛋白質の蓄積と神経細胞死を引き起こすことから, RNA 傷害は神経疾患の基盤になり得る^{60,61}。8-OH-dGuo あるいは 8-OH-Guo に特異性の高い抗体の開発により, 剖検脳を用いた検討が可能になった^{62,63}。

1999 年, アルツハイマー病 (Alzheimer disease: AD) 脳およびパーキンソン病 (Parkinson disease: PD) 脳の疾患に脆弱な神経細胞群において, 8-OH-dGuo および 8-OH-Guo の増加が報告された^{16,64}。AD 脳および PD 脳の神経細胞内で, 8-OH-dGuo/8-OH-Guo 免疫反応は細胞質に優位であり, ミトコンドリア DNA あるいは RNA が酸化傷害のターゲットとなっていることが推定された。

AD 脳では, この免疫反応が RNase 前処理によって著しく減弱するのに対して DNase 前処理では影響されないことから, 免疫反応は RNA 由来が主体であると考えられた¹⁶。この推定は, 免疫電顕的に 8-OH-dGuo/8-OH-Guo 免疫反応の分布がリボソームの局在に一致するという所見からも支持された⁶⁵。

Table 2 神経精神疾患における神経細胞内 RNA 酸化傷害の報告

神経精神疾患	材料/方法	報告者 (報告年)
アルツハイマー病と関連疾患		
アルツハイマー病	脳 (海馬, 大脳皮質)/ICC	Nunomura, et al (1999) Castellani, et al (2011) Song, et al (2011)
	脳 (海馬, 大脳皮質)/IEM	Nunomura, et al (2001)
	脳 (海馬, 大脳皮質)/IB, RT-PCR (mRNA)	Shan, et al (2003)
	脳 (海馬)/IB, RT-PCR (rRNA)	Honda, et al (2005)
	脳 (大脳皮質)/IB, RT-PCR (rRNA)	Ding, et al (2005)
	脳 (海馬, 大脳皮質)/GC-MS	Weidner, et al (2011)
	脳脊髄液/HPLC	Abe, et al (2002)
家族性アルツハイマー病	脳 (大脳皮質)/ICC	Nunomura, et al (2004)
軽度認知障害 (MCI)	脳 (大脳皮質)/IB, RT-PCR (rRNA)	Ding, et al (2005)
	脳 (海馬)/ICC	Lovell, et al (2008)
	脳 (大脳皮質)/ICC	Nunomura, et al (2012)
Preclinical アルツハイマー病*)	脳 (海馬)/ICC	Lovell, et al (2011)
ダウン症候群	脳 (大脳皮質)/ICC	Nunomura, et al (2000)
シヌクレイノパチー		
パーキンソン病	脳 (黒質)/ICC	Zhang, et al (1999)
	脳脊髄液/HPLC	Abe, et al (2003)
パーキンソン病/多系統萎縮症	脳脊髄液/ELISA	Kikuchi, et al (2002)
レヴィ小体型認知症	脳 (海馬, 大脳皮質)/ICC	Nunomura, et al (2002)
筋萎縮性側索硬化症 (ALS)		
家族性/孤発性 ALS	脳 (大脳皮質運動野) および脊髄/IB	Chang, et al (2008)
CAG リピート病		
歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症	脳 (レンズ核)/ICC	Miyata, et al (2008)
プリオン病		
家族性/孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病	脳 (大脳皮質)/ICC	Guentchev, et al (2002)
ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病	脳 (海馬, 大脳皮質)/ICC	Petersen, et al (2005)
精神疾患		
統合失調症	脳 (海馬)/ICC	Che, et al (2010)
双極性障害/大うつ病性障害	脳 (海馬)/ICC	Che, et al (2010)
その他		
亜急性硬化性全脳炎	脳 (大脳皮質)/ICC	Hayashi, et al (2002)
色素性乾皮症 (A群)	脳 (淡蒼球)/ICC	Hayashi, et al (2005)
肝硬変による肝性脳症	脳 (大脳皮質)/IB	Görg, et al (2010)
糖尿病性ケトアシドーシスによる致死性脳浮腫	脳 (海馬, 小脳)/ICC	Hoffman, et al (2011)

*Preclinical アルツハイマー病脳に関する筆者らの検討 (大脳皮質/ICC) では, 対照脳との間に RNA 酸化の程度に差がなかった⁵¹⁾。

〔略語〕 ELISA: 酵素免疫結合吸着測定法, GC-MS: ガスクロマトグラフ質量分析法, HPLC: 高速液体クロマトグラフィー, IB: イムノプロット, ICC: 免疫細胞化学, IEM: 免疫電子顕微鏡法, RT-PCR: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

2. そのほかの神経精神疾患 (Table 2)

酸化 RNA は生化学的な検討によって, 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) 患者の剖検組織 (大脳皮質運動野, 脊髄) にも証明された⁶⁶⁾。そのほかにも, 神経細胞内 RNA 酸化は, ダウン症候群⁶⁷⁾, レヴィ小体型認知症 (dementia with Lewy body: DLB)⁶⁸⁾, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症⁶⁹⁾, クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD)⁷⁰⁾, および亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis: SSPE)⁷¹⁾ の剖検脳にも認められた。また, 酸化 RNA は家族性の発症様式を示す患者, すなわち, 家族性の AD⁷²⁾, ALS⁶⁶⁾, プリオン病 (家族性 CJD⁷⁰⁾ およびゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病⁷³⁾ にも認められる。

ヌクレオチド除去修復酵素の先天的欠損で発症し, 日光過敏性の皮膚症状と進行性神経症状を呈する色素性乾

皮症候群 (Xeroderma pigmentosum) は, 日光過敏性の皮膚症状と進行性神経症状を呈する色素性乾

皮症患者の脳でも、神経細胞の核内 DNA のみならず細胞質内 RNA の酸化が観察される⁷⁴⁾。

近年、統合失調症、双極性障害、うつ病といった精神疾患⁷⁵⁾、あるいは肝性脳症⁷⁶⁾や糖尿病性ケトアシドーシスによる致死性脳浮腫⁷⁷⁾といった重篤な身体疾患に基づく脳障害でも、脳の神経細胞内 RNA 酸化が報告されている。

以上のように、神経細胞内 RNA 酸化は広範な領域の神経精神疾患の病態に関連していると考えられ、進行性の神経変性のみならず、可逆性の障害にも関与している可能性がある。

3. 縁取り空胞型ミオパチー

縁取り空胞 (rimmed vacuole : RV) にはアミロイド β ($A\beta$) やユビキチンの存在が指摘され、AD 病理との同源性が注目されているが、RV 型ミオパチー患者の筋細胞にも酸化 RNA が観察される⁷⁸⁾。

4. RNA 種と酸化脆弱性

酸化 RNA のプロット法による検討は mRNA に焦点が絞られることが多かった。脳組織から溶出したポリ (A)⁺mRNA を抗 8-OH-Guo モノクローナル抗体を用いて免疫沈降し、沈降物に対して相補的 DNA を作製してサザンプロット法によって検出する手法が用いられた^{39,66,79)}。

AD 脳の前頭葉皮質では、mRNA の実に 30~70% が酸化されていたのに対し、年齢を一致させた対照脳の酸化 mRNA はわずか 2% であったと報告されている⁷⁹⁾。興味深いことに、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (reverse transcription polymerase chain reaction : RT-PCR) による酸化 mRNA の配列解析の結果、AD 脳ではいくつかの mRNA 種がより酸化されやすいことが判明した³⁹⁾。試験管内では RNA 中の連続するグアニン塩基が酸化されやすいことが示されているが⁸⁰⁾、AD 脳内で酸化されやすい mRNA 種に共通のシーケンスモチーフや構造は見出されなかったという³⁹⁾。酸化に脆弱な mRNA 種にアミロイド前駆体蛋白質 (amyloid precursor protein : APP) やタウ蛋白の mRNA は含まれなかったが、p21ras, MAPK キナーゼ 1, カルボニルレダクターゼ, スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1), アポリポ蛋白質 D, カルパインなど AD の病態と関連する分子が含まれていた³⁹⁾。

mRNA は細胞内 RNA のわずか数% を占めるにすぎないが、より細胞内含有量が多く、神経細胞内に特に豊富な rRNA に関しても、AD 脳から抽出されたりポ

ソーム画分における 8-OH-Guo の増加がプロット法によって証明されている^{42,81)}。rRNA は、トランスファー RNA (tRNA) に比べて鉄結合能が高く、フェントン反応による酸化 RNA 生成は tRNA の 13 倍に上るといふ⁴²⁾。

5. 神経細胞群の選択的脆弱性

免疫細胞化学的検討^{16,51,64,68)} およびプロット法による検討^{39,66,81)} から、各種神経変性疾患に選択的脆弱性を示す細胞群の分布に一致して酸化 RNA が観察されることが示されている。すなわち、AD や DLB の海馬や大脳新皮質、PD の黒質、ALS の大脳皮質運動野と脊髄で 8-OH-Guo の増加が認められるが、AD, PD および ALS の小脳では 8-OH-Guo の有意な変化は認められていない^{16,39,51,64,66,81)}。また、免疫細胞化学的検討からは、酸化 RNA がグリア細胞よりも神経細胞優位に観察されることが明らかにされている^{16,64,65,67,68)}。

6. 神経変性疾患のマーカーとしての可能性

Preclinical AD (AD 病理陽性無症候期)、軽度認知障害 (mild cognitive impairment : MCI)、および軽症 AD の剖検脳の検討から、酸化 RNA が AD 早期診断マーカーとして確立されることが期待されている⁵¹⁾。酸化 RNA ヌクレオシド 8-OH-Guo の有意な増加は、剖検脳組織だけではなく、AD および PD 患者の脳脊髄液⁸²⁻⁸⁴⁾、あるいは PD 患者の血清中でも観察されることが報告されている⁸⁴⁾。酸化 RNA の診断マーカーとしての臨床的有用性については、より大きなサンプルサイズで検討される必要がある。

初老期の標準体重~軽度肥満の対象者にカロリー制限や運動介入を行い、白血球中の酸化 RNA を減少させたという報告がある⁸⁵⁾。これらの介入は、内因性抗酸化システムの活性化と関連し、神経変性疾患の予防でも注目されている^{10,86)}。酸化 RNA は神経変性疾患の予防介入の評価に適するマーカーであるかもしれない。

VI. 実験系における RNA 酸化傷害 (Table 3)

1. ALS のヒト遺伝子変異導入動物

酸化傷害と神経変性の遺伝学的関連性は、家族性 ALS の約 20% を占める SOD1 遺伝子変異の存在⁸⁷⁾ から支持される。SOD1 遺伝子変異による神経変性は、SOD1 の酵素としての活性低下によるのではなく、変異 SOD1 が獲得した細胞毒性 (gain of toxic function) によるとする考えが有力である⁸⁸⁾。ALS を引き起こすこ

Table 3 実験動物中枢神経系あるいは培養神経細胞における RNA 酸化傷害の報告

実験モデル	材料/方法	報告者 (報告年)
遺伝子変異導入動物		
変異ヒト <i>APP/PSI</i> 遺伝子ダブルノックインマウス (アルツハイマー病モデル)	脳 (大脳皮質)/ICC	Lovell, et al (2009)
変異ヒト <i>SOD1</i> 遺伝子トランスジェニックマウス (ALS モデル)	脊髄 (運動ニューロン, オリゴデンドロサイト)/ICC, IB, RT-PCR (mRNA)	Chang, et al (2008)
低酸素曝露モデル		
成ラット間欠的低酸素曝露	脳 (海馬)/ICC	Row, et al (2003)
エタノール曝露モデル		
思春期ラット慢性エタノール曝露	脳下垂体/ICC	Ren, et al (2005)
神経毒曝露モデル		
MPTP 曝露マウス (パーキンソン病モデル)	脳 (黒質)/ICC	Yamaguchi, et al (2006)
カイニン酸 (興奮性神経毒) 曝露マウス	脳 (海馬)/ICC	Kajitani, et al (2006)
カイニン酸曝露 <i>MTH1</i> ノルマウス	脳 (海馬)/ICC	Kajitani, et al (2006)
肝性脳症モデル		
アンモニア曝露ラット	脳 (大脳皮質)/ICC, IB, RT-PCR (mRNA, rRNA)	Görg B, et al (2008)
門脈結紮ラット (高アンモニア血症)	脳 (大脳皮質)/IB	Brück, et al (2011)
外傷モデル		
脊髄半切ラット	脊髄 (前角・後角)/ICC	King, et al (2006)
脊髄圧迫ラット	脊髄 (前角)/ICC	Huang, et al (2007)
培養神経細胞モデル		
プロテアソーム阻害	星状細胞・神経細胞混合培養系/ICC, IB	Ding, et al (2004)
H ₂ O ₂ , グルタミン酸, アミロイド β 曝露	ラット初代培養大脳皮質神経細胞/ICC, IB, RT-PCR (mRNA)	Shan, et al (2007)

[略語] APP: アミロイド前駆体蛋白質, IB: イムノプロット, ICC: 免疫細胞化学, MPTP: 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン, MTH1: MutT ホモログ 1, PS1: プレセニリン 1, RT-PCR: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応, SOD1: 銅・亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ

とが知られている種々の変異 *SOD1* (G93A, G37R, G85R, G127X, His46R/His48Q) を導入したトランスジェニック (Tg) マウスでは, *SOD1* 活性や発現レベルはさまざまであるが, いずれの *SOD1* 変異でも脊髄の酸化 mRNA の著明な増加が観察されることは注目すべきである⁶⁶⁾。各種変異 *SOD1* 蛋白質はミトコンドリア異常と関連することによって酸化傷害の増大を引き起こしているのかもしれない⁶⁹⁾。

また, G93A 変異 *SOD1* 導入 Tg マウスに関して, 特に酸化に脆弱な mRNA の存在について論じられている。AD 脳での所見³⁹⁾と同様に, 酸化されやすい mRNA 種に共通のシーケンスモチーフや構造は見出されなかったが, *SOD1*, ダイナクチン 1, 小胞関連膜蛋白質, ニューロフィラメント・サブユニット, ミトコンドリア電子伝達系関連蛋白質など ALS の病態と関連する分子が見出されている⁶⁶⁾。

2. アルツハイマー病のヒト遺伝子変異導入動物 家族性 AD の原因遺伝子である *APP* 遺伝子の

KM670/671NL 変異 (スウェーデン変異) およびプレセニリン 1 (*PS1*) 遺伝子の P264L 変異を導入したダブルノックインマウスにおいて, 大脳皮質神経細胞における顕著な酸化 RNA の増加が免疫細胞化学的に報告されている⁹⁰⁾。

3. 低酸素・エタノール・神経毒曝露モデル

間欠的低酸素に曝露した成ラットでは空間記憶障害が出現するが, 同時に海馬で酸化 RNA の増加が観察されたと報告されている⁹¹⁾。また, エタノール曝露ラットの脳下垂体でも酸化 RNA の増加が観察されている⁹²⁾。

PD 動物モデルの 1 つに数えられる 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (MTPT) 曝露マウスの黒質⁹³⁾や興奮性神経毒カイニン酸曝露マウスの海馬⁹⁴⁾においても酸化 RNA の増加が観察されている。

4. 肝性脳症モデル

ラットの急性アンモニア中毒によって一過性の昏睡状態が誘発されるが, 同時に大脳皮質の神経細胞および血

管周囲星状細胞において可逆性に酸化 RNA の増加が生じることが観察されている⁹⁵⁾。ラットの門脈結紮による高アンモニア血症でも大脳皮質において酸化 RNA の増加が観察される⁹⁶⁾。

5. 外傷モデル

ラット脊髄の外傷（半切あるいは圧迫）でも神経細胞内に酸化 RNA の増加が観察される^{97,98)}。中枢神経系の外傷では初期損傷そのものによる影響のみならず、酸化傷害に関連した二次的変性過程が重要視されている^{97,98)}。

6. 培養神経細胞モデル

培養細胞実験からも RNA 酸化傷害と神経変性の関連性が支持されている。神経変性のモデルとして、蛋白質凝集、アポトーシス経路活性化、ミトコンドリア障害などと関連するプロテアソーム阻害を星状細胞・神経細胞混合培養系に加えると、酸化された DNA および RNA が観察される⁹⁹⁾。興味深いことに、このプロテアソーム阻害モデルでは、AD 脳での所見¹⁰⁾と一致して、酸化傷害は DNA よりも RNA 優位かつグリア細胞よりも神経細胞優位に生じることが報告されている⁹⁹⁾。

ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いたモデルでは、 H_2O_2 、グルタミン酸、および $A\beta$ 曝露によって RNA 酸化傷害が生じることが報告されている⁴⁰⁾。

VII. 神経変性の早期変化としての RNA 酸化傷害

RNA 酸化傷害が非常に広範な神経精神疾患で共通して認められることから (Table 2)、これが各種疾患カスケードの後期段階に生じるありふれた随伴現象であり、単に各種の病態が進行して神経機能障害が生じた後の結果をみているに過ぎないのではないかと、という疑問が生じるかもしれない。しかし、この疑問は、少なくとも AD やそのほかの神経変性疾患に関しては否定されるであろう。実際に多くの観察所見によって、神経変性の早期段階における RNA 酸化傷害の関与が支持されている。

1. アルツハイマー病

AD 剖検脳において 8-OH-Guo を指標にした免疫細胞化学的検討では、RNA 酸化傷害は $A\beta$ 沈着が軽度の症例や罹病期間が短い症例でより高度であり、AD の変性が顕著な海馬では、神経原線維変化を伴わない神経細胞のほうが神経原線維変化を有する神経細胞より RNA 酸

化傷害が高度である^{65,86)}。また、AD 病理の初期変化と考えられる神経細胞内の $A\beta$ 蓄積と RNA 酸化傷害は同一の神経細胞で観察されている¹⁰⁰⁾。最近のガスクロマトグラフ質量分析 (gas chromatograph-mass spectrometer : GC-MS) による検討では、進行期の AD 脳では 8-OH-アデニン是对照脳よりも増加しているが、8-OH-Gua はむしろ減少していたと報告されている¹⁰¹⁾。これらの剖検脳所見に合致して、AD 患者脳脊髄液では、罹病期間が短いほど、あるいは認知機能スコアが高いほど、8-OH-Guo が高値を呈することが報告されている⁸²⁾。

AD 早期段階における RNA 酸化傷害の関与は、*APP* あるいは *PS1* の遺伝子変異を有する家族性 AD の検討からも支持されている。すなわち、家族性 AD 脳においても RNA 酸化傷害は $A\beta$ 沈着が軽度の症例でより高度であった⁷²⁾。

2. 軽度認知障害と preclinical アルツハイマー病

AD やそのほかの認知症の前段階と位置づけられている MCI 例の剖検脳でも既に RNA 酸化傷害が認められている^{51,81,102)}。MCI よりさらに遡って preclinical AD の剖検脳に関しては、現時点で結果が不一致である。すなわち、preclinical AD の海馬神経細胞で酸化 RNA の増加が認められたという報告¹⁰³⁾と大脳皮質神経細胞で酸化 RNA の増加が認められなかったという報告⁵¹⁾がある。これが単に脳部位の違いによる不一致なのか、今後の検討を要する。

3. ダウン症候群

加齢に伴って成人早期に AD 脳と同一の病理学的変化を呈するダウン症候群の剖検脳を用い、年代別に時系列的検討が行われている。その結果、 $A\beta$ 沈着が顕著になる 30 歳代よりも早い年代に RNA 酸化傷害のピークが観察され、RNA 酸化傷害は $A\beta$ 沈着に先行して出現すると推定されている⁶⁷⁾。

4. パーキンソン病

脳脊髄液中の酸化 RNA の検討では、AD 患者の所見⁸²⁾と同様に、PD 患者においても罹病期間が短いほど、酸化 RNA が高値を呈することが報告されている⁸³⁾。

5. 亜急性硬化性全脳炎

変性疾患だけではなく、変異麻疹ウイルスによる遅発性ウイルス感染である SSPE においても早期段階に

RNA 酸化傷害が生じることが示唆されている⁷¹⁾。すなわち、剖検脳の検討で AD 脳の所見⁶⁵⁾と同様に、SSPE においても罹病期間の短い症例で顕著な RNA 酸化傷害が観察された⁷¹⁾。

6. ALS のヒト遺伝子変異導入動物

家族性 ALS の SOD1 遺伝子変異 (G93A 変異) を導入した Tg マウスの時系列的検討によって、RNA 酸化傷害が脊髄運動ニューロンの変性過程の早期段階に関与していることが極めて精緻に検討されている⁶⁶⁾。このモデル動物では、脊髄運動ニューロンにおける酸化 RNA の増加は 60 日齢で観察される。しかし、この段階では、神経細胞の核やクロマチンの形態変化、ユビキチン化蛋白質の蓄積は観察されず、わずかに電子顕微鏡レベルでミトコンドリアの形態変化が軽度が生じているのみである。動物に神経症状が出現する 90~120 日齢になって、初めて核やクロマチンの形態変化、ユビキチン化蛋白質の蓄積、およびミトコンドリアの空胞化を伴う変性神経細胞が観察される。この時点では RNA 酸化傷害は不顕在化する⁶⁶⁾。

7. 培養神経細胞モデル

ラット初代培養大脳皮質神経細胞に対して種々の酸化ストレスを加え、その後の時系列変化を観察することにより、RNA 酸化傷害が後に細胞死に至る細胞群の一次的变化であることが報告されている⁴⁰⁾。すなわち、このモデルによって、RNA 酸化傷害は神経細胞死に至る変性過程の結果でも無害な随伴現象でもないこと、および RNA 酸化傷害があるレベルに達すると蛋白質合成障害を介して細胞死が引き起こされることが明らかにされた⁴⁰⁾。

8. 酸化傷害マーカーとしての酸化 RNA

In situ の各種酸化傷害マーカーは、組織における安定性 (分解抵抗性) から、酸化傷害の累積を反映する積分的指標 (history marker) とその時点での酸化傷害をスナップショット的に捉える微分的指標 (steady-state marker) に大別することができる。すなわち、カルボニル化蛋白質、脂質過酸化物、糖化最終産物などは、架橋結合形成を伴っているため分解されにくく、組織蓄積性が高いので、history marker である。他方、8-OH-Guo などの酸化ヌクレオシドやニトロ化蛋白質などは比較的容易に分解されるため、steady-state marker であると考えられる^{13,104)}。

例えば AD 剖検脳では、history marker であるカル

ボニル化蛋白質、4-ヒドロキシノネナール、F₂-イソプラスタン、およびカルボキシメチルリジンは神経原線維変化の有無に関係なく神経細胞内に認められる¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾。これに対して steady-state marker である 8-OH-Guo は、神経原線維変化のない神経細胞に優位であった^{65,67)}。以上の観察所見は、神経細胞変性過程の中で特に初期に酸化傷害が高度である、と考えれば矛盾が生じない。8-OH-Guo 以外の steady-state marker である 3-ニトロチロシンについても、AD 脳およびダウン症候群脳における神経細胞内レベルは 8-OH-Guo レベルと合致しており、病理形成が軽度の症例でより高度であった^{65,67)}。

VIII. RNA 酸化を引き起こす活性酸素源

脳は、体重の約 2% の重量で全身の 20~25% の酸素を消費するが、酸化されやすい不飽和脂肪酸に富むうえに一部の抗酸化酵素の発現は低く (脳のカタラーゼ含有量は心臓や肝臓の 10~20% にすぎない)、酸化傷害に脆弱である^{109,110)}。したがって、脳の神経細胞は正常の代謝過程でミトコンドリア電子伝達系から産生されるスーパーオキシド (O₂⁻)、過酸化水素 (H₂O₂)、ヒドロキシルラジカル (•OH) などの ROS に曝露される¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾。

•OH はその高い反応性のために、組織内ではわずかに数ナノメートルしか拡散できず¹¹²⁾、O₂⁻ は細胞膜をほとんど透過しない¹¹³⁾。神経変性疾患における中枢神経系の神経細胞では細胞質中の RNA 種が広範に酸化傷害を受けていることから、広範囲に拡散可能な H₂O₂¹¹⁴⁾ から生じた •OH による攻撃を受け、酸化 RNA 種が生成されていると推定される⁴²⁾。H₂O₂ から •OH が生じる反応は遷移金属イオンの触媒下に進行するフェントン/ハーバー-ワイス反応である。

AD 脳では、ミトコンドリア異常が ROS 発生源としても遷移金属イオンの供給源としても関与している可能性が高い (Fig. 2)¹¹⁵⁻¹¹⁸⁾。実際に、AD 脳海馬から抽出されたリボソームはレドックス活性の高い鉄の含有量が対照脳に比べて顕著に高く、鉄は rRNA と結合していることが明らかにされている⁴²⁾。したがって、ミトコンドリア異常と金属ホメオスタシス異常は、AD 脳の RNA 酸化傷害を引き起こす ROS 生成に密接に関連している¹¹⁹⁾。PD 脳の黒質においても、ミトコンドリア異常^{120,121)}と金属イオン調節障害^{122,123)}が報告されており、これらは神経変性に共通のメカニズムであるかもしれない。