

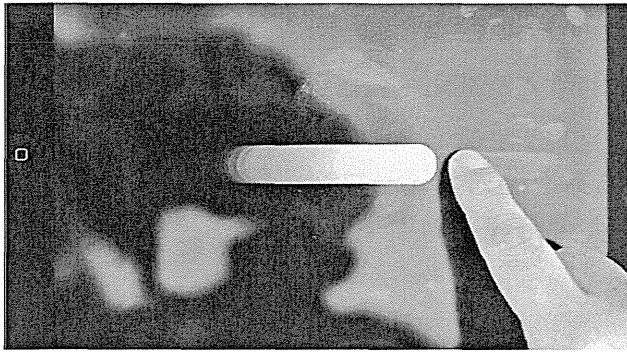
Genetics or Environment? Journal of
Parkinson's Disease, 2012; 2:
7-18

- 4) Shimohata T, Nakayama H, Tomita M,
Ozawa T, Nishizawa M. Daytime
sleepiness in Japanese patients
with multiple system atrophy:
prevalence and determinants. BMC
Neurol, 2012; 12: 130

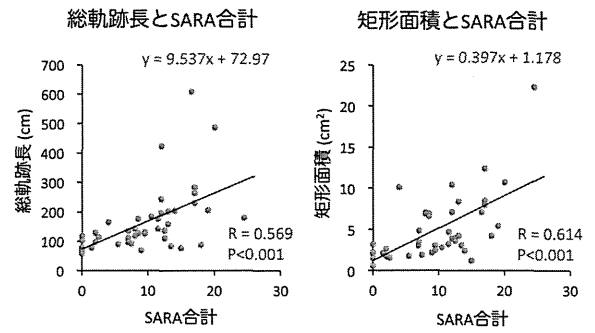
G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む。）

とくになし。

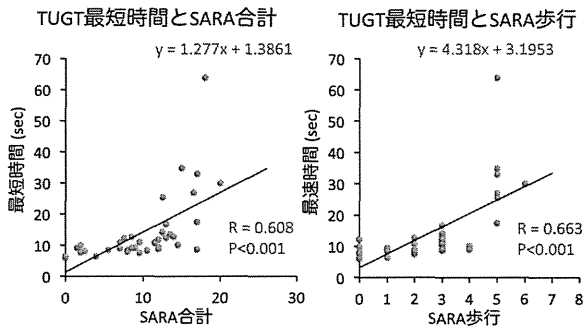
視標追跡法による等速直線反復運動試験
検査実例



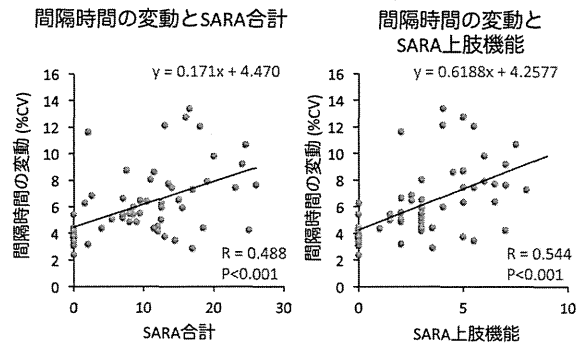
結果(1)：重心動揺検査の総軌跡長・矩形面積



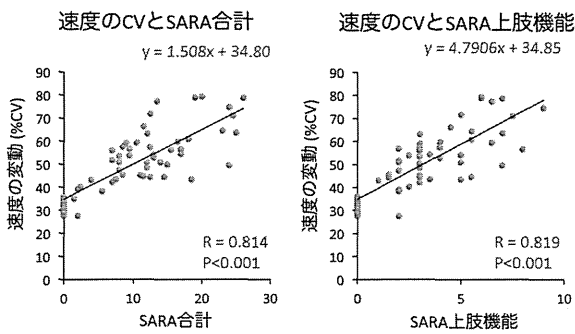
結果(2)：TUGT 最短時間



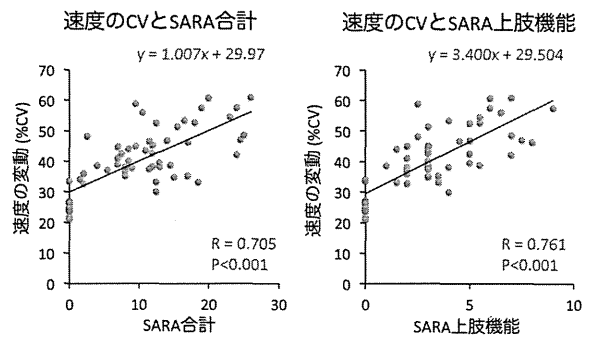
結果(3)：タッピング試験の時間変動



結果(4)：等速直線反復運動の速度の変動



結果(5)：等速曲線反復運動の速度の変動



脊髄小脳変性症の失調の背景にある視床ニューロン活動 —生理学的機序に基づく失調治療への展望—

研究分担者 吉田 邦広（信州大学医学部神経難病学講座）
共同研究者 橋本 隆男（相澤病院神経疾患研究センター）
後藤 哲哉（信州大学医学部脳神経外科）
Abirami Muralidharan, Kenneth B. Baker, Jerrold L. Vitek
(Neuromodulation Research Center, Department of
Neurology, University of Minnesota)

研究要旨

小脳失調における視床ニューロン発火異常を検討した。対象は脊髄小脳変性症（spinocerebellar ataxia, SCA）4例と本態性振戦（essential tremor, ET）4例。視床 Vim 核の手術中に Vim 核ニューロン発火を安静状態で記録し、SCA64 ニューロンと ET50 ニューロンの発火を解析した。発火頻度は SCA（ 16.5 ± 13.5 spikes/sec）が ET（ 18.8 ± 12.7 spikes/sec）より少し低かったが有意差はなかった。周期性発火の程度とバースト発火の程度も差はなかった。末梢感覚入力に対する陽性反応は、SCA では 42.2%であり ET の 70.0%に比べて有意に低かった。小脳失調の背景には、末梢の感覚入力を小脳が処理して視床から前頭葉に送る運動調節出力の減少がある。運動調節出力を増強する介入は失調を改善させる治療法となり得る。

A. 研究目的

小脳は視床を介して大脳皮質機能を調節することにより運動を制御している¹⁾。脊髄小脳変性症（spinocerebellar ataxias, SCAs）は小脳と小脳と接続する経路の変性疾患であり、眼球運動異常、失調、動作振戦などを主症状とする。本態性振戦（essential tremor, ET）は動作振戦を主症状とする疾患であるが失調はほとんど伴わない。ETの一部は小脳の変性を有する²⁾。視床の中間腹側核（ventral intermediate nucleus, Vim）の定位脳手術により ET ならびに SCA 患者

の振戦が抑制され、治療として非常に有用である^{3,4)}。我々は、術中に Vim のオリエンテーションを得るために、視床の単一ニューロン発火を記録している。視床大脳皮質投射の中継地である Vim 活動は失調の活動異常を含むと考えられる。SCA と ET の Vim ニューロン活動を比較することにより、失調の背景にある Vim ニューロン活動異常を明らかにした。さらに、それに基づいた失調治療の可能性を検討した。

B. 研究方法

症例は、SCA4 例:62 - 69 歳, 2 f / 2 m, 3 脳刺激術, 1 凝固術, ET4 例:57 - 71 歳, 1 f / 3 m, 3 脳刺激術, 1 凝固術. SCA は孤発例 1 例, SCA6 が 2 例, SCA31 が 1 例であり, 1 例が片手の支持で歩行可能, 3 例は補助器使用で歩行距離は 10m 以下だった. ET は明らかな失調はなかった.

Vim 単一ニューロン発火を安静状態で記録した. 記録電極は微小電極 (elgiloy, 0.2 - 1.0M Ω) で, filter 条件は band-pass: 300 - 10kHz とした. ニューロン発火の以下のパラメータを解析した. 1) 平均発火頻度, 2) バースト発火の時間%, 3) 発火のパワースペクトラム解析, 4) 末梢感覚入力に対する発火反応.

C. 研究結果

視床 DBS と凝固術は, SCA と ET の動作振戦を著明に抑制した. しかし, SCA の失調に対しては明らかな効果はみられなかった. SCA64 ニューロンと ET50 ニューロンの発火を解析した. 発火頻度は SCA (16.5 \pm 13.5 spikes/sec) が ET (18.8 \pm 12.7 spikes/sec) より少し低かったが有意差はなかった. 周期性発火の程度とバースト発火の程度も差はなかった. 末梢感覚入力に対する陽性反応は, SCA では 42.2% であり ET の 70.0% に比べて有意に低かった (χ^2 検定, $p < 0.01$).

D. 考察

Vim DBS は振戦を駆動する視床-皮質投射の oscillation をブロックして振戦を抑制すると考えられる. 一方, 失調に対しては実質的な改善はなかった. 失調は異常発火パターンによるものではなく,

視床の破壊術や刺激術では小脳の機能欠落を補正できないことが示唆される. 実際に, Vim ニューロンの発火頻度, バースト発火, 周期性発火は SCA と ET で差がなかった. SCA では ET に比べて末梢からの感覚入力に対する反応性が低下しており, 末梢からの感覚入力に基づく小脳の運動調節の減少が失調の背景にあると考えられる. この結果から, 失調治療のアイデアとして, 末梢から小脳へのフィードバック, 小脳における感覚入力処理, それに小脳から大脳への運動調節出力を増強する方法があれば, 治療に結びつく可能性がある.

E. 結論

小脳失調の背景には末梢感覚入力に基づく小脳から運動野への運動調節の減少がある (主に feedback の障害). 末梢感覚入力に基づく小脳から前頭葉への運動調節を増強する介入は, 失調を改善させる可能性がある. 治療介入としては以下の部位が考えられる. 1) 末梢感覚入力の増強, 2) 小脳での運動調節機能回復, 3) 視床での小脳出力の増強, 4) 前頭葉での小脳出力の処理能力の増強.

参考文献

1. Asanuma C, et al: Distribution of cerebellar terminations and their relation to other afferent terminations in the ventral lateral thalamic region of the monkey. Brain Res Rev 1983; 5: 237-265
2. Benito-León J, Louis ED: Essential tremor: emerging views of a common

disorder. Nat Clin Pract Neurol, 2006; 2: 666-78

3. Schuurman PR, et al: A comparison of continuous thalamic stimulation and thalamotomy for suppression of severe tremor. N Eng J Med, 2000; 342: 461-468
4. Shimojima Y, et al: Thalamic stimulation for disabling tremor in a patient with spinocerebellar degeneration. Stereotact Funct Neurosurg, 2005; 83: 131-134

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

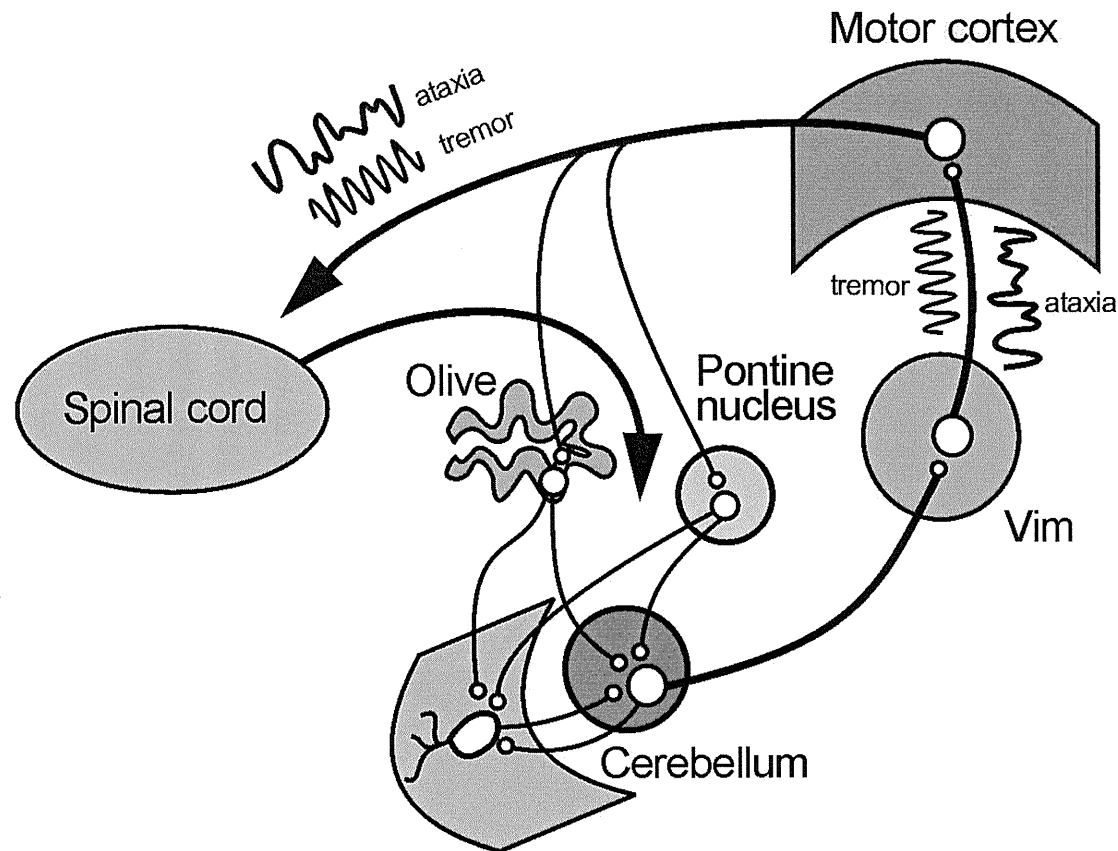
2. 学会発表

- 1) Hashimoto T, et al: Neuronal activity of human thalamus underlying ataxia in spinocerebellar ataxias. Neuroscience 2012, 2012.10.14, New Orleans
- 2) 橋本隆男 ら.: 脊髄小脳変性症の失調の背景にある視床ニューロン活動. 第42回日本臨床神経生理学会, 2012年11月10日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

- 1.小脳失調の背景には末梢感覚入力に基づく小脳から運動野への運動調節の減少がある（feedbackの障害）。
- 2.末梢感覚入力に基づく小脳から前頭葉への運動調節を増強する介入は，失調を改善させる可能性がある。



「純粋小脳型脊髄小脳変性症における外乱導入法の違いによる プリズム順応の変化」に関する研究

研究分担者 宇川義一（福島県立医大神経内科）
共同研究者 花島律子、大南伸也、代田悠一郎、堤 涼介
（東京大学神経内科）

研究要旨

ヒト小脳の運動順応機能を評価する方法が充分ではないため、簡便な検査法の開発を目指した。プリズム眼鏡装着下の手指運動の順応（プリズム順応）を脊髄小脳変性症(SCD)の評価に用いられるか検討した。今回は、外乱を急に与えたとき（abrupt 法）と徐々に外乱を与えた場合（gradual 法）で、プリズム順応の違いを、純粋小脳型 SCD13 人と健常ボランティアで検討した。標的と手の到達場所との誤差の推移をプロットし、順応後プリズム眼鏡を外した時の逆方向への誤差（aftereffect）を評価した。健常ボランティア群では両方法での aftereffect には差がなく、SCD 群では両方法とも健常ボランティア群に比べ aftereffect が減少した。abrupt 法では意識的な補正が行われやすく gradual 法のほうが小脳の機能を検出し易いという仮説があるが、今回の検討ではプリズム順応では両方法で同等に評価が可能であることが示された。

A. 研究目的

ヒトにおいて、小脳の機能を客観的に評価する方法は充分ではないため、臨床現場で簡単に使用できる検査法の開発を目指すことを目的とし、プリズム眼鏡で外乱を与えた環境における、手指運動が順応していく過程（プリズム順応）を用いて、小脳の運動順応の簡便な評価法として用いることができないか検討を行った。本年度は、特にプリズムによる視覚偏移の外乱の与え方によって、プリズム順応が異なるか検討し、より小脳順応機能の検出が高まる方法を模索した。

B. 研究方法

プリズムメガネで視野を水平方向に偏倚させた環境下で、ターゲットに手を当てる課題を行い、ターゲットと実際に手が当たった場所との誤差の推移を記録した。また順応が起きたあとにプリズム眼鏡を外した場合に、逆方向への誤差が生じる aftereffect も順応の指標として用いる。
急な外乱を与える方法（abrupt 法）は、30 回プリズムなしで 25 cm 先の標的に向かって指を当てるタスクを行った後、20 度のプリズム眼鏡をかけて 50 回施行する。その後、プリズム眼鏡を外し再び 30 回タ

スクを行った。段階的に少しずつ外乱を与える方法 (gradual 法) では、プリズム装着時の施行を 100 回とし、プリズム眼鏡の偏倚を徐々に加えていき、90 回目で 20 度の偏倚を起こすようにし、100 回まで保持した。

対象は純粋小脳型 SCD13 人 (SCA6, SCA31 など) と健常ボランティアである。

(倫理面への配慮)

倫理委員会で承認を得て行い、書面でインフォームドコンセントを得ている。疲労しないように適宜休憩を入れて行っている。

C. 研究結果

健常ボランティアにおいて、abrupt 法と gradual 法で同等の aftereffect が得られ、両方法の間に有意な違いはなかった。SCD 群では、両方法とも健常ボランティアに比較して、aftereffect が減少していた。

D. 考察

一般に外乱を与えた場合の運動順応課題では、abrupt 法では外乱が意識に上りやすく大脳皮質レベルの意識的な補正が加わり、小脳機能のみの順応ではない可能性が考えられている。したがって、gradual 法は純粋な小脳の学習機能を評価できるという仮説がある。しかし、この仮説に反して、外力により運動障害した場合、この仮説に反して SCD では gradual 法で aftereffect が維持されたと報告 (Criscimagna-Hemminger et al 2010) もある。このように、これまでに abrupt 法と gradual 法の違いの一定の見

解は得られていない。

プリズム順応を脊髄小脳変性症の順応機能障害の評価に用いるためには、純粋な小脳の順応機能を反映する方法であることが求められるため、今回は両方法を比較した。

今回、プリズム順応課題においては、健常ボランティア群では両方法での aftereffect の程度には有意差はなく、順応の程度には方法によって差がみられないと考えられた。

また、SCD 群では両方法とも、健常ボランティア群に比べて、aftereffect の減少がみられ、どちらかの方法では異常が検出できないということもなかった。

プリズム順応課題では、abrupt 法によっても意識的な補正の要素が入らずに行えていると考えられる。

また、既報告の外力による運動障害のタスクでは gradual 法では aftereffect が消失してしまったが、これは外力を与えるロボットアームからの体性感覚の入力や、手の軌跡が見えることによる視覚入力などによる小脳以外の補正機能によるものと考えられる。プリズム順応課題ではこれらの要素が除外されているため、gradual 法で逆に aftereffect が消失するという現象もみられなかった。

以上より、簡単に行える abrupt 法でも十分に小脳順応機能を評価できると考えられる。

E. 結論

プリズム順応課題では、abrupt 法でも gradual 法でも同等に小脳順応機能の障害を評価できると考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terao Y, Fukuda H, Shirota Y, Yugeta A, Yoshioka M, Suzuki M, Hanajima R, Nomura Y, Segawa M, Tsuji S, Ugawa Y: Deterioration of horizontal saccades in progressive supranuclear palsy. *Clin Neurophysiol*, 2013; 124(2): 354-63
- 2) Groiss SJ, Ugawa Y: Cerebellar stimulation in ataxia. *Cerebellum*, 2012; 11(2): 440-442
- 3) Kikuchi S, Mochizuki H, Moriya A, Nakatani-Enomoto S, Nakamura K, Hanajima R, Ugawa Y: Ataxic hemiparesis: neurophysiological analysis by cerebellar transcranial magnetic stimulation. *Cerebellum*, 2012; 11(1): 259-263
- 4) Ohminami S, Tsutsumi R, Shirota Y, Kitazawa S, Uchimura M, Inoue M, Matsuda S, Shimizu T, Tanaka N, Ichikawa Y, Goto J, Tsuji S, Ugawa Y, Terao Y, Hanajima R: Prism adaptation in spinocerebellar ataxia. *Clinical Neurophysiol*, abstract in press
- 5) Tsutsumi R, Shirota Y, Ohminami S, Terao Y, Ugawa Y, Hanajima R: Conditioning intensity-dependent interaction between short-latency interhemispheric inhibition and short-latency afferent inhibition. *J Neurophysiol*, 2012; 108(4): 1130-1137
- 6) Shirota Y, Hamada M, Terao Y, Ohminami S, Tsutsumi R, Ugawa Y, Hanajima R: Increased primary motor cortical excitability by a single-pulse transcranial magnetic stimulation over the supplementary motor area. *Exp Brain Res*, 2012; 219(3): 339-349
- 7) Sugiura Y, Ogiwara I, Hoshi A, Yamakawa K, Ugawa Y: Different degrees of loss of function between GEFS+ and SMEI Nav 1.1 missense mutants at the same residue induced by rescuable folding defects. *Epilepsia*, 2012; 53(6): e111-114
- 8) Groiss SJ, Mochizuki H, Furubayashi T, Kobayashi S, Nakatani-Enomoto S, Nakamura K, Ugawa Y: Quadri-pulse stimulation induces stimulation frequency dependent cortical hemoglobin concentration changes within the ipsilateral motor cortical network. *Brain Stimul*, 2013; 6(1): 40-8
- 9) Nakatani-Enomoto S, Hanajima R, Hamada M, Terao Y, Matsumoto H, Shirota Y, Okabe S, Hirose M, Nakamura K, Furubayashi T, Kobayashi S, Mochizuki H, Enomoto H, Ugawa Y: Bidirectional modulation of sensory cortical excitability by quadripulse transcranial magnetic stimulation (QPS) in humans. *Clin Neurophysiol*, 2012; 123(7):

1415-1421

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

2. 学会発表

- 1) 大南伸也他：プリズム順応課題を用いた脊髄小脳変性症の生理学的解析. 第53回日本神経学会学術大会, 2012年5月22日～25日, 東京
- 2) 花島律子: オープニングセミナー7 運動失調の臨床再考 プリズム適応の応用によるヒト小脳入力系機能障害の検出. 第6回 パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2012年10月11日～13日, 京都
- 3) 大南伸也他：プリズム順応課題を用いた脊髄小脳変性症の生理学的解析. 第6回 パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2012年10月11日～13日, 京都
- 4) 大南伸也他：プリズム順応課題を用いた脊髄小脳変性症の生理学的解析. 第42回日本臨床神経生理学会・学術大会, 2012年11月8日～10日, 東京
- 5) Ohminami S, et al: Prism adaptation in spinocerebellar ataxia. The movement disorder society's 16th international congress of Parkinson's disease and movement disorders, 2012.6.17-21, Dublin
- 6) Ohminami S, et al: Prism adaptation in spinocerebellar ataxia 2nd Workshop on Synaptic plasticity from Bench to Bed Side, 2012.9.29-10.1, Tarmina

運動機能障害を認めない多系統萎縮症の臨床病理学的検討

研究分担者 祖父江 元（名古屋大学大学院医学系研究科神経内科）
共同研究者 伊藤瑞規、渡辺宏久、陸雄一、熱田直樹、千田謙、中村亮一、
渡辺はづき、原一洋、坪井崇
（名古屋大学大学院医学系研究科神経内科）
岩崎靖、辰己新水、三室マヤ、吉田眞理
（愛知医科大学 加齢医科学研究所）

研究要旨

現在の多系統萎縮症（MSA）の臨床診断基準では、運動失調やパーキンソン症候などの運動機能障害と自律神経機能障害を同時に認めることにより初めて MSA と診断できるが、病初期に自律神経障害のみを呈し、運動機能障害を認めない症例が存在し、このような症例に対する認識が不十分であると考えられる。そこで、このような症例の臨床病理学的検討を行った。病理学的に診断された MSA 連続 102 例中 6 例で運動機能障害に関与する部位での病理変化が極めて軽かったが、自律神経障害に関与する部位では著明な病理学的異常所見を認めた。6 例中 4 例で死亡に至るまで運動機能障害をほぼ認めなかったが、全例で明らかな自律神経障害を認めた。MSA の中には運動機能障害を認めないため臨床診断基準を満たさないが、明らかな自律神経障害のみを認める一群があることを認識する必要があると考える。このことは今後の臨床診断基準を考えるうえで極めて重要である。

A. 研究目的

現在の多系統萎縮症（MSA）の臨床診断基準では、小脳失調やパーキンソニズムなどの運動機能障害と起立性低血圧や排尿障害などの自律神経機能障害を、ともに認めることにより初めて MSA と診断することが可能である。しかしながら、特に病初期の MSA において自律神経障害のみを呈し、運動機能障害を認めない症例が存在し、この運動機能障害を認めない状態のまま亡くなる症例も極少数ながら

存在している。今回、我々はこのような運動機能障害を認めないまま亡くなった MSA 患者の臨床病理学的検討を行うこととした。

B. 研究方法

対象は、愛知医科大学加齢医科学研究所で病理学的に診断された MSA 連続 102 例（男性 54 例、女性 48 例。平均死亡時年齢：65.6±7.4 歳。平均罹病期間：6.9±4.0 年）。MSA の病理学的診断基準は

α -synuclein と Gallyas 染色で陽性を示す glial cytoplasmic inclusions (GCI) を認めることとし、102 例全例で GCI を認めた。さらに、オリブ小脳系と線条体黒質系の病理学的変化をグレード分けし、これらの病変がない、もしくは軽度の症例で、かつ臨床的に運動機能障害を認めなかった、もしくは終末期に極軽度認めた症例を選択し、これらの症例を運動機能障害を認めない MSA として抽出し、その病理学的特徴、および臨床的特徴を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関する倫理指針を遵守し、研究対象者に対する人権擁護上の配慮を行った。

C. 研究結果

MSA 連続 102 例中 6 例でオリブ小脳系および線条体黒質系の病理学的異常所見が極めて軽い、もしくはほとんど認めなかった。この 6 例のうち、1 例は運動機能障害として小脳失調を発症早期から認めており、もう 1 例は病理学的に Binswanger 病を合併していたため、2 例を対象から除外し、合計 4 名で解析を行った。

臨床的には、これら 4 例全例で臨床診断は Shy-Drager 症候群の診断を受けており、病初期から全例で排尿障害を含む 2 つ以上の明らかな自律神経障害 (4 例で排尿障害、3 例で起立性低血圧、2 例で呼吸機能異常) を認めた。また、全例が突然死により 2 年以内に死亡されており、他のタイプの MSA よりも罹病期間が短かった。

病理学的には、オリブ小脳系および線条体黒質系の病理学的異常所見は極めて軽かったが、自律神経障害と関連があると思われる、迷走神経背側運動核や延髄腹外側野、胸髄中間外側核、Onuf 核では著明な神経細胞脱落とグリオシスを認めた。また、いずれの症例も大脳にも神経細胞の脱落は認めなかったが、GCI は認められ、早期から大脳も障害されている可能性も示唆された。

D. 考察

初発症状として自律神経障害で発症する MSA は全体の 28%程度と報告されている。現在の MSA の臨床診断基準では、運動機能障害と自律神経機能障害を同時に認めることが必要であるが、これら両者を認めるようになるには 2 年程度の経過が必要と報告されている。今回の症例においても全例が 2 年以内に突然死により亡くなられており、このような症例では自律神経障害のみを呈しているため、現行の診断基準で MSA と診断することはできない。

我々は MSA における自律神経障害の特徴として、排尿障害の頻度が高いこと、病初期から 2 つ以上の自律神経機能異常を呈することを示してきたが、今回の検討においても同様の結果を得ることができた。また、我々は以前より、MSA において早期から大脳病変が存在している可能性を MRI などの画像検査によって示してきたが、今回の検討により病理学的にも早期から GCI などの病変を大脳に認めることが証明された。

今後、新規薬剤が開発された際に病初期

の症例においてその薬効を検討することが重要であると考えられ、今後、診断基準を改定する際には、自律神経障害のみを呈する症例の存在や大脳病変の存在にも注目する必要があると考えた。

E. 結論

MSA の中には運動機能障害を認めないため臨床診断基準を満たさないが、明らかな自律神経障害を認め、突然死をする一群があることを認識する必要があると考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, et al: Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. Nat Med, 2012; 18(10): 1531-8
- 2) Miyai I, Ito M, Hattori N, et al: Cerebellar ataxia rehabilitation trial in degenerative cerebellar diseases. Neurorehabil Neural Repair, 2012; 26(5): 515-22

2. 学会発表

- 1) 伊藤瑞規、渡辺宏久、熱田直樹他：多系統萎縮症における volumetry・拡散テンソル像を用いた大脳病変の広がり．第 53 回日本神経学会学術大会，2012 年 5 月 22 日～25 日，東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

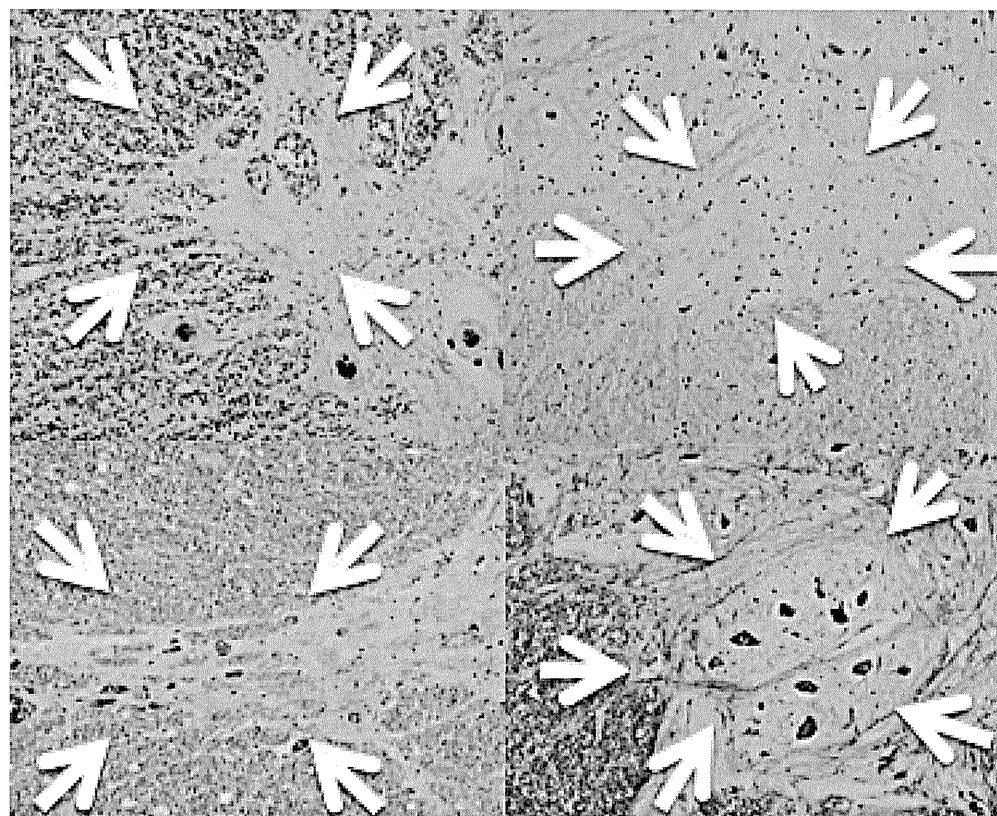
自律神経障害のみを呈する多系統萎縮症(MSA)症例が存在

臨床的特徴

罹病期間	排尿障害	起立性低血圧	呼吸障害	運動障害	死因
2年	+	+	+	±	突然死
2年	+	+	NA	±	突然死
2年	+	-	+	±	突然死
1.4年	+	+	NA	-	突然死

中間質外側核

Onuf核



MSA

正常

臨床的特徴

- 2年以内に突然死で死亡
- 排尿障害を含む2つ以上の自律神経障害を早期から認める

病理学的特徴

- 中間質外側核やonuf核などの著明な神経細胞脱落を認める
- 運動に関連する核はほぼ正常所見

自律神経障害のみを認めるMSA症例が存在することを認知する必要がある

Propagation 仮説の背景となる α -synuclein の細胞内取り込み機構の解析

研究分担者 武田 篤（東北大学大学院医学系研究科神経内科学分野）

共同研究者 長谷川 隆文、菊池昭夫

（東北大学大学院医学系研究科神経内科学分野）

研究要旨

近年パーキンソン病(PD)などに代表される神経変性疾患において、異常凝集タンパクが神経-神経あるいは神経-グリア細胞間を伝播し周辺細胞に変性をもたらす可能性が相次いで報告され注目を集めている。病原性タンパク伝播により病理変化が周辺組織へ拡大するというプリオン仮説は神経変性疾患における新たな病態パラダイムとして興味をもたれる一方、そのメカニズムについては未知の点が多い。本研究ではPDと関連疾患における α シヌクイレン細胞間伝播の背景にある分子機構を明らかにすると共に、異常タンパク伝播阻止を基軸とした新たな治療介入の可能性について細胞生物学的検討を行った。

A. 研究目的

胎児ドパミン神経移植を受けたパーキンソン病(PD)患者のドナー由来神経細胞に α -シヌクレイン(α S)陽性のLewy小体様封入体が確認されたという報告以来、多くの変性疾患において異常タンパクが細胞間を伝播する現象が相次いで示され、所謂プリオン仮説として注目を集めている。Lewy body diseaseの病理変化についてはBraakらが提唱する脳幹上行仮説に加え、Murayamaらは嗅球扁桃体進展説を提唱しているが、我々も後者の説を支持する証拠として、PD患者における嗅覚障害が将来の認知機能低下の予後規定因子となる研究結果を報告している(文献1)。さらにアミロイドPETイメージングを用いた多系統萎縮症患者の経時的観

察においても、大脳白質や被殻におけるアミロイド沈着物が時間と共に周辺部位へ拡大する現象を確認している(文献2)。本研究では α S細胞間伝播の背景にある α S取り込み・分泌を制御する分子機構を解明することを目的に細胞生物学的解析を行った。

B. 研究方法

SH-SY5Y神経細胞、初代培養ラット大脳皮質神経細胞およびKG1Cオリゴデンドログリア(ODG)細胞の培地に野生型ならびにA53T・A30P変異型組み換え α S(1-10 μ M)を一定時間添加後、免疫染色法および細胞分画サンプルを用いたウェスタンブロット法(WB)により細胞内 α S取り込みを観察した。取り込まれた

α S の小胞輸送系における存在を確認するため、エンドソーム・リソソームマーカーとの共局在について共焦点レーザー顕微鏡を用い観察した。また α S 取り込み過程におけるエンドサイトーシスの関与を確認するため、同過程の key molecule である内因性ダイナミン 1 を K44A ドミナントネガティブ (DN) 変異体あるいは siRNA 発現により抑制すると共に、ダイナミン GTP hydrolysis 阻害剤 (sertraline) 投与の影響についても検討した。

C. 研究結果

培地に添加した α S は経時的かつ濃度依存的に神経・ODG 細胞へ取り込まれ、SDS 抵抗性オリゴマーを形成すると同時に (図 1) 患者脳内にみられる Lewy 小体・グリア細胞内封入体 (GCI) 類似の細胞内凝集体を形成した。細胞内取り込みは 3 種類のシヌクレインファミリー分子の中で α S に特異な現象であり、凝集傾向は家族性 PD 変異型 α S でより顕著であった。また putative lipid-binding domain とされる N 末端配列の欠損により α S の細胞内取り込みが有意に減少することが確認された。取り込まれた α S の一部は エンドソームマーカー Rab5A およびリソソームマーカー Lamp-1 と共局在を示し、リソソーム阻害剤である bafilomycin 投与により細胞内において SDS 不溶性 α S オリゴマー蓄積が誘導された。さらに神経・ODG 細胞内への α S 取り込みは DN 変異体・siRNA による内因性ダイナミン 1 抑制ならびにダイナミン阻害剤である sertraline の培地内投与に

より顕著に減少することが確認された (文献 3)。

D. 考察

細胞外 α S は数分間という短時間で神経・ODG 細胞内へ移行し、凝集化することが確認された。内在性 α S を有さない ODG においても SDS 不溶性の α S 蓄積がみられたことから、 α S 凝集・蓄積には内在性 α S の存在が必須ではないことが予想され、ODG では神経細胞とは別に内在化した α S が凝集しやすい細胞内環境が存在する可能性も推定された (文献 4)。

α S は N 末端に両親媒性の配列を有し脂質膜と親和性をもつと考えられているが、今回の実験においても N 末配列の存在が α S 細胞内移行において重要であることが確認された。さらに神経・ODG 細胞両者において α S の取り込みはダイナミン発現抑制および機能阻害により顕著に減少することから、ダイナミン分子が関与するエンドサイトーシスが同過程において重要であることが推察された。

E. 結論

α S 取り込みにはダイナミンが関与するエンドサイトーシス機構が重要であり、細胞内へ侵入した α S はエンドソーム、リソソームへと運搬され分解処理されることが示された。細胞間における異常タンパク伝播は各種神経変性疾患に普遍的にみられる現象である可能性がある一方、個々の疾患毎に異常タンパク伝播に関与する分子機構が異なる可能性もある (文献 5)。今後 α S の吸収・分解・分泌に関与する細胞内小胞輸送システムをさらに

詳細に明らかにし、異常タンパク伝播阻止に着目した新たなシヌクレイノパチーの治療方法を提案したいと考えている。

F. 健康危険情報

特記すべき事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Baba T, et al: Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: a 3 year longitudinal study. *Brain*, 2012; 135: 161-9
- 2) Kikuchi A, et al: In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain*, 2010; 133: 1772-8
- 3) Konno M, et al: Suppression of dynamin GTPase decreases alpha-synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol Neurodegener*, 2012; 7(1): 38
- 4) Hasegawa T, et al: Role of TPPP/p25 on alpha-synuclein mediated oligodendroglial degeneration and the protective effect of SIRT2 inhibition in a cellular model of multiple system atrophy. *Neurochem*

Int, 2010; 57: 857-66

- 5) Hasegawa T, et al: The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of alpha-synuclein. *PLoS ONE*, 2012; 6(12): e29460

2. 学会発表

- 1) Hasegawa T, et al: The AAA-ATPase VPS4 regulates Extracellular Secretion and Lysosomal Targeting of Alpha-synuclein. NRF-JSPS Asian Science Seminar-New Perspectives in the Neuroscience of Psychiatric and Neurological Disorders, 2012. 02.13, Seoul, Korea
- 2) Hasegawa T, et al: The AAA-ATPase VPS4 regulates Extracellular Secretion and Lysosomal Targeting of α -synuclein. 16th International Congress of parkinson's Disease and Movement Disorders, 2012. 06.17, Dublin, Ireland
- 3) 長谷川隆文: α -synuclein の細胞間 Propagation の機序. 厚労科研神経変性疾患に関する調査研究班 H24 年度ワークショップ, 2012 年 7 月 20 日, 東京
- 4) 長谷川隆文: α -synuclein 細胞間伝播に關与する細胞内小胞輸送系の解明. 平成 24 年度 第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コングレス, 2012 年 10 月 11 日, 京都

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

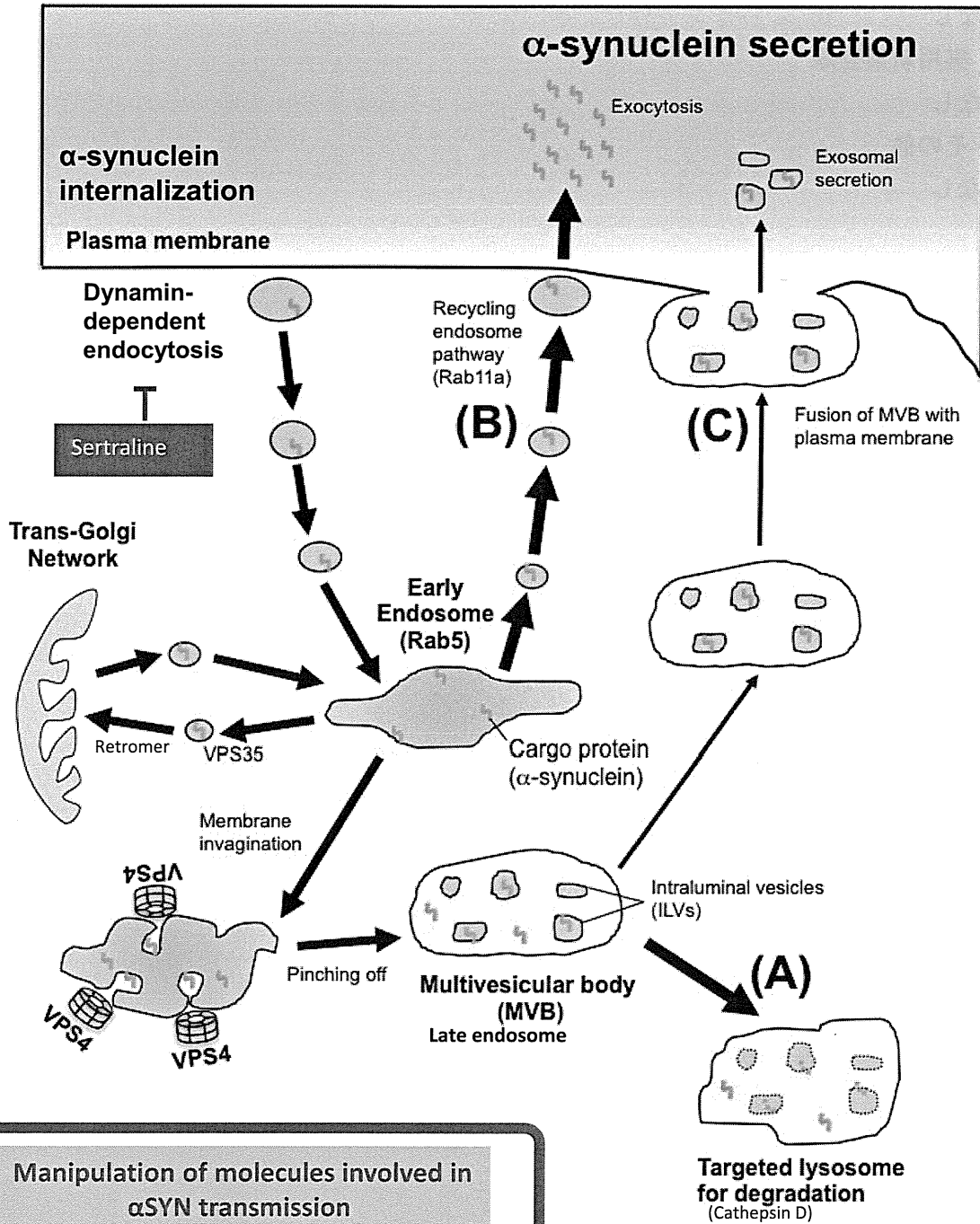
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Vesicular transport machinery involved in cell-to-cell transmission of α -SYN



Manipulation of molecules involved in α SYN transmission

↓

Delay the progression of disease

Therapeutic strategy aiming at the inhibition of transcellular spreading of α SYN pathology

神経変性疾患における autophagic adapter protein (NBR1) の 免疫組織化学的・生化学的検討

研究分担者 若林孝一（弘前大学医学研究科脳神経病理学講座）
共同研究者 丹治邦和、森 文秋（弘前大学医学研究科脳神経病理学講座）
柿田明美（新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター）
高橋 均（新潟大学脳研究所病理学分野）

研究要旨

p62 および NBR1 は選択的オートファジーに寄与し、特に p62 は種々の神経変性疾患における封入体に存在する。しかし、NBR1 の神経変性疾患への関与は不明である。そこで今回、神経変性疾患剖検脳を用い、免疫組織化学的および生化学的解析を行った。NBR1 はシヌクレイノパチー（パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症）に出現する封入体に主に局在していた。特に、多系統萎縮症小脳白質では NBR1 および p62 ともに発現量が増加していたことから、オートファジーの障害が示唆された。

A. 研究目的

オートファジーは飢餓状態などで誘導され、アミノ酸の分解およびリサイクルに関与している。さらに、障害された細胞小器官やユビキチン化された分子などを選択的に分解する役割も有する（選択的オートファジー）。p62 および NBR1 は、ユビキチン結合ドメインおよびオートファゴソーム膜構成タンパク質結合部位を有することにより、選択性オートファジーに寄与することが報告されている。これまで p62 は種々の神経変性疾患における封入体に局在することが知られているが、NBR1 の神経変性疾患への関与は不明である。そこで今回、神経変性疾患剖検脳を用い、免疫組織化学的および生化学的解析を行った。

B. 研究方法

免疫組織化学的検討には、パーキンソン病 (PD)、レビー小体型認知症 (DLB)、多系統萎縮症 (MSA)、アルツハイマー病 (AD)、ピック病、進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD)、嗜銀顆粒性認知症 (AGD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭葉変性症 (FTLD-TDP)、正常対照の脳を用いた。NBR1 蛋白の定量には、DLB、AD、MSA、正常対照の凍結脳組織（側頭葉皮質、小脳白質）を用い、ウェスタンブロット解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究で使用した剖検脳組織は研究に用いることに関し文書により家族の同意が得られたものである。また、新潟大学