

脳研究所からの凍結脳組織は、書類による審査を経て譲渡されたものであり、倫理上問題はない。

C. 研究結果

免疫組織化学的に、正常対照脳では神経細胞の胞体およびニューロピルが NBR1 抗体でごく淡く染色された。グリア細胞は染色されなかった。一方、PD および DLB のレビー小体、MSA の glial cytoplasmic inclusion は高頻度に NBR1 強陽性であった。タウオパチー (AD、PSP、CBD) に認められる神経原線維変化やグリア封入体 (coiled bodies) のごく一部は NBR1 陽性であった。一方、ピック病のピック小体、PSP の tuft-shaped astrocytes、CBD の astrocytic plaques、AGD の嗜銀顆粒、ALS のブニナ小体やスケイン様封入体、FTLD-TDP の TDP-43 陽性神経細胞およびグリア封入体は NBR1 陰性であった。

ウェスタンブロット解析により、DLB および AD の側頭葉皮質では正常対照と比較し NBR1 量に有意差は認められなかったが、MSA 小脳白質では NBR1 量が正常対照の約 2.5 倍に増加していた。

D. 考察

今回の病理学的解析から NBR1 は特にシヌクレイノパチーに出現する細胞内封入体に高頻度に局在していた。これまでの報告から、シヌクレイノパチーではオートファゴソーム膜構成タンパク質の質的、量的変化が観察される。また、ヒト培養細胞を用いた検討では、オートファゴソーム膜構成タンパク質の障害により

p62 および NBR1 の凝集体が形成される。つまり、シヌクレイノパチーではオートファゴソーム膜構成タンパク質の変性により、p62 および NBR1 の凝集が起きやすい環境となっており、病態との関連が示唆される。また、生化学的解析から MSA 小脳白質では p62 および NBR1 量が正常対照例と比較して有意に増加しており、オートファジーの障害が強く示唆された。

E. 結論

NBR1 はシヌクレイノパチー (PD、DLB、MSA) に出現する封入体に主に局在していた。特に、MSA 小脳白質では NBR1 および p62 と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。シヌクレイノパチーの病態の改善を考えるうえで、オートファジーの活性化は有効な方法かもしれない。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Odagiri S, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Autophagic adapter protein NBR1 is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions and is involved in aggregate formation in α -synucleinopathy. *Acta Neuropathol*, 2012; 124: 173-186
- 2) Tanji K, Odagiri S, Maruyama A, Mori F, Kakita A, Takahashi H,

Wakabayashi K: Alteration of autophagosomal proteins in multiple system atrophy. Neurobiol Dis, 2012; 49: 190-198

- 3) Odagiri S, Tanji K, Mori F, Miki Y, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Brain expression level and activity of HDAC6 protein in neurodegenerative dementia. Biochem Biophys Res Comm, 2013; 430: 394-399

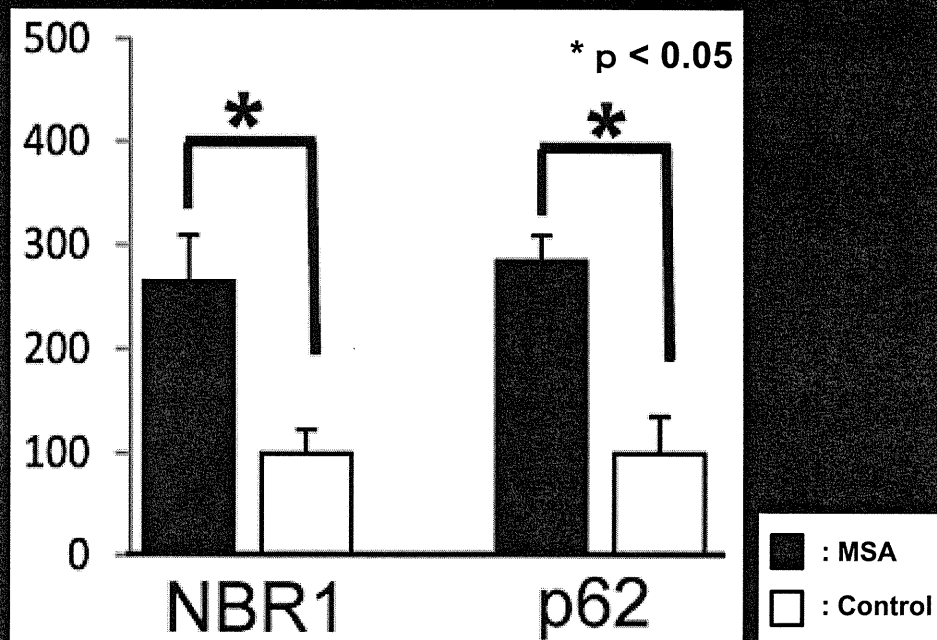
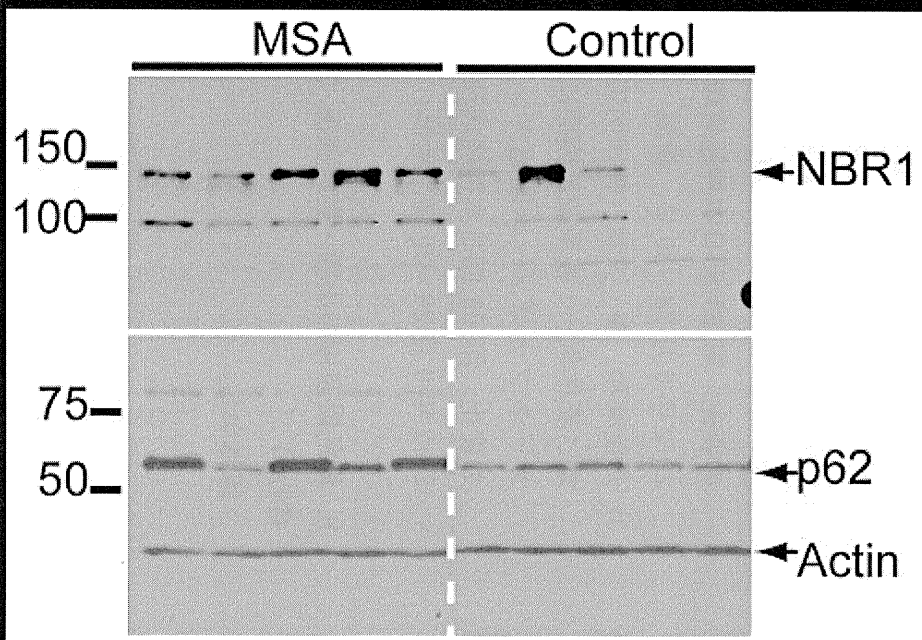
2. 学会発表

- 1) 小田桐沙織、丹治邦和、森 文秋、柿田明美、高橋 均、若林孝一：神経変性疾患における autophagic adapter protein (NBR1)の関与. 第 53 回日本神経病理学会, 2012年6月28~30日, 新潟
- 2) 丹治邦和、森 文秋、柿田明美、高橋均、若林孝一：レビー小体病におけるオートファゴソーム関連タンパク質の変化. 第 53 回日本神経病理学会, 2012年6月28~30日, 新潟
- 3) 丹治邦和、森 文秋、柿田明美、高橋均、若林孝一：多系統萎縮症におけるオートファゴソーム関連タンパク質の変化. 第 53 回日本神経病理学会, 2012年6月28~30日, 新潟

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。

多系統萎縮症ではオートファジーアダプタータンパク質が増加している



神経変性疾患における家族性 ALS 関連蛋白の免疫組織化学的検討

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 森 文秋、丹治邦和（弘前大学医学研究科脳神経病理学講座）
豊島靖子、高橋 均（新潟大学脳研究所病理学分野）
柿田明美（新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野）
佐々木秀直（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）
吉田眞理（愛知医科大学加齢医科学研究所神経病理部門）

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は通常孤発性であるが、家族性 ALS（fALS）では 15 種の原因遺伝子が同定されており、そのコード蛋白（fALS 関連蛋白）は fALS の神経細胞に封入体として蓄積している。これらのうち、FUS などいくつかの fALS 関連蛋白は、ALS 以外の神経変性疾患の封入体にも認められる。そこで、孤発性 ALS を含む種々の神経変性疾患剖検脳における fALS 関連蛋白の免疫反応性について検討した。15 種中 8 種の fALS 関連蛋白（FUS、TDP-43、FIG4、Optineurin、VCP、Ubiquilin-2、SIGMAR1、CHMP2B）が種々の頻度と組み合わせで神経変性疾患の細胞内封入体に存在していた。これら fALS 関連蛋白の機能には、DNA/RNA 代謝、細胞内蛋白分解、細胞内輸送などがある。fALS 関連蛋白の細胞内封入体への局在は、本来、果たすべき機能が障害されていることを示唆している。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は通常孤発性であるが、家族性 ALS（fALS）では 15 種の原因遺伝子が同定されており、そのコード蛋白（fALS 関連蛋白）（SOD1、ALS2、Senataxin、FUS、VAPB、Angiogenin、TDP-43、FIG4、Optineurin、Ataxin-2、VCP、Ubiquilin-2、SIGMAR1、CHMP2B、Profilin1）は fALS の神経細胞に封入体として蓄積している。これらのうち、FUS などいくつかの fALS 関連蛋白は、ALS 以外の神経変性疾患の封入体にも認められる。そこで、

種々の神経変性疾患剖検脳における fALS 関連蛋白の免疫反応性について検討した。

B. 研究方法

タウオパチー（アルツハイマー病、ピック病、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症）、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）、TDP-43 プロテイノパチー（孤発性 ALS、前頭側頭葉変性症）、ポリグルタミン病（ハンチントン病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、脊髄小

脳変性症 1 型 (SCA1)、SCA2、SCA3)、核内封入体病および正常対照のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製。fALS 関連蛋白に対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

(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。

C. 研究結果

15 種中 8 種の fALS 関連蛋白 (FUS、TDP-43、FIG4、Optineurin、VCP、Ubiquilin-2、SIGMAR1、CHMP2B) が種々の頻度と組み合わせで神経変性疾患の細胞内封入体に存在していた。タウオパチーでは、いずれの封入体も fALS 関連蛋白に陰性であった。FUS ならびに SIGMAR1 は、ポリグルタミン病と核内封入体病の核内封入体に陽性であった。TDP-43 は、TDP-43 プロテイノパチーの細胞質封入体と SCA2 の核内封入体に陽性を示した。FIG4 は、脳幹型ならびに皮質型レビー小体、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、SCA3 および核内封入体病の核内封入体に陽性を示した。OPTN と UBQLN2 は TDP-43 プロテイノパチーならびにシヌクレイノパチーの細胞質封入体、ポリグルタミン病および核内封入体病の核内封入体に陽性を示した。VCP は、TDP-43 プロテイノパチーならびにシヌクレイノパチーの神経細胞内封入体、ポリグルタミン病および核内封入体病の核内封入体に陽性を示した。CHMP2B は、シヌクレイノパチーの細胞質封入体に陽性を示した。正常対照でも黒質のマリネスコ小体が、FIG4、Optineurin、

VCP、Ubiquilin-2、SIGMAR1、CHMP2B 陽性であった。

D. 考察

これら fALS 関連蛋白の機能には、DNA/RNA 代謝、細胞内蛋白分解、細胞内輸送などがある。fALS 関連蛋白の細胞内封入体への局在は、本来、果たすべき機能が障害されていることを示唆している。シヌクレイノパチー、TDP-43 プロテイノパチー、ポリグルタミン病、核内封入体病には、fALS 関連蛋白の機能障害が生じている可能性があり、今後、fALS 関連蛋白を標的とした細胞モデルならびに動物モデルで検証していく必要がある。

E. 結論

fALS 関連蛋白は ALS 以外の神経変性疾患の病理発生機序にも関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori F, Tanji K, Odagiri S, Hattori M, Hoshikawa Y, Kono C, Yasui K, Yokoi S, Hasegawa Y, Kamitani T, Yoshida M, Wakabayashi K: Ubiquitin-related proteins in neuronal and glial intranuclear inclusions in intranuclear inclusion body disease. *Pathol Int*, 2012; 62: 407-411
- 2) Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima

- Y, Yoshida M, Ikeda T, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. *Acta Neuropathol*, 2012; 124: 149-151
- 3) Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Autophagy-related proteins (p62, NBR1 and LC3) in intranuclear inclusions in neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*, 2012; 522: 134-138
- 4) Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Optineurin immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions of polyglutamine diseases (Huntington's, DRPLA, SCA2, SCA3) and intranuclear inclusion body disease. *Acta Neuropathol*, 2012; 123: 747-749
- 5) Tanikawa S, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Endosomal sorting related protein CHMP2B is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions in alpha-synucleinopathy. *Neurosci Lett*, 2012; 527: 16-21
- ポリグルタミン病と核内封入体病における optineurin の発現. 第 53 回日本神経病理学会, 2012 年 6 月 28~30 日, 新潟
- 2) 森 文秋、丹治邦和、小田桐紗織、服部 学、星川恭子、河野親夫、安井敬三、横井聡、長谷川康博、神谷 哲、吉田眞理、若林孝一: 核内封入体病におけるユビキチン関連蛋白の免疫組織化学的検討. 第 53 回日本神経病理学会, 2012 年 6 月 28~30 日, 新潟
- 3) 森 文秋、丹治邦和、小田桐紗織、豊島靖子、柿田明美、吉田眞理、高橋 均、若林孝一: ポリグルタミン病と核内封入体病におけるオートファジー関連蛋白の発現. 第 53 回日本神経病理学会, 2012 年 6 月 28~30 日, 新潟

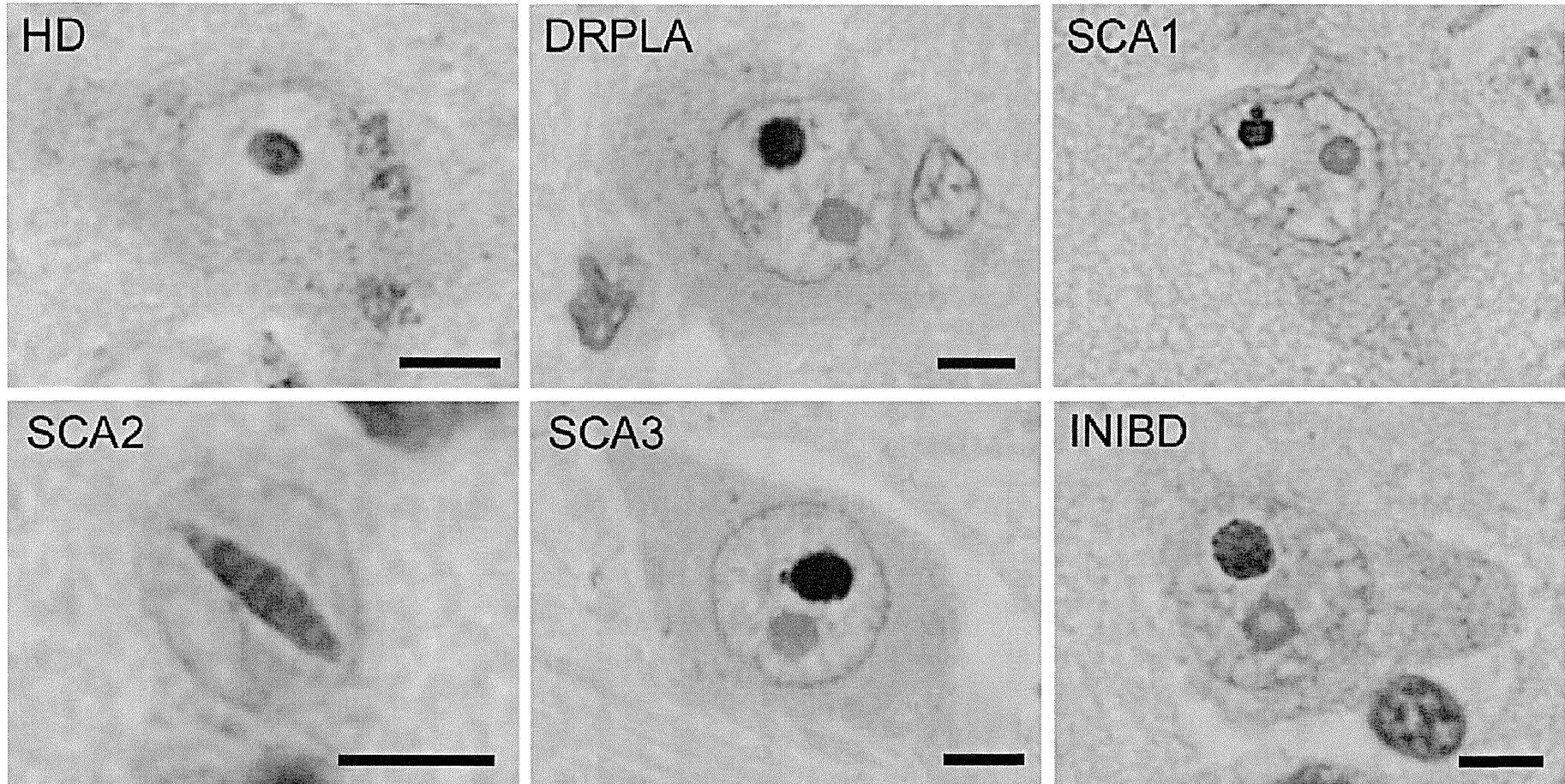
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし。

2. 学会発表

- 1) 森 文秋、丹治邦和、豊島靖子、柿田明美、吉田眞理、高橋 均、若林孝一:

ポリグルタミン病の封入体には家族性ALS関連蛋白が局在する



Optineurin (ALS12の原因遺伝子蛋白)免疫染色

Machado-Joseph 病における ^1H -MRS および ^{31}P -MRS 所見

研究分担者 佐々木秀直（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）
共同研究者 矢部一郎（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）
Khin Khin Tha、濱口裕行
（北海道大学大学院医学研究科放射線医学分野）
佐久嶋 研、加納崇裕
（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）
寺江 聡（北海道大学大学院医学研究科放射線医学分野）

研究要旨

ポリグルタミン病の病態機序は未解明であるが、発症に関する分子機構の解明により、近い将来、新規薬物療法の開発も期待されている。しかしながら、新規薬剤が開発されたとしても、疾病の性質上、症候と重症度による効果の判定には年単位の時間がかかることが予想されている。そのため、短期間で効果を評価できる指標の開発が急務である。そのような指標の候補として、我々は以前、Machado-Joseph 病 (MJD) において ^{31}P -MRS を腓腹筋にて行い、その筋エネルギー代謝を検討し、筋エネルギー代謝の指標である V_{\max} がサロゲートマーカーの候補になり得る可能性について報告した。今回、新たなバイオマーカー候補としての可能性を検討すべく、中枢神経において ^{31}P -MRS および ^1H -MRS を施行した。その結果、患者群と健常者群の比較では ^1H -MRS における小脳と橋の NAA/Cr が患者群で有意に低下していた ($P=0.0485$, $P=0.002$)。 ^1H -MRS の他の部位や ^{31}P -MRS の測定結果には両群間で有意差は認められなかった。相関解析では、罹病期間と相関する項目は認められなかったが、小脳半球の NAA/Cr と重症度 SARA ($P=0.0187$) および橋の V/V_{\max} と SARA ($P=0.0080$) が有意に相関していた。この結果は、 ^{31}P -MRS および ^1H -MRS は MJD の重症度を反映するバイオマーカー候補である可能性を示唆している。

A. 研究目的

背景；ポリグルタミン病の病態機序はまだ十分には解明されていないが、ユビキチン-プロテアソーム系の障害や蛋白相互作用の異常により発症すると推定されている。発症に関連する分子機構の解明により、近い将来、新規薬物療法の開

発も期待されている。しかしながら新規薬剤が開発されたとしても、疾病の性質上、症候と重症度による効果の判定には年単位の時間がかかることが予想される。そのため、短期間で効果を評価できる指標の開発が急務である。こうした現状において、ポリグルタミン病である

Machado-Joseph病(MJD)における筋エネルギー代謝を ^{31}P -MR spectroscopy (MRS)で検討し、 V_{max} がMJDにおいて有効性判定の生化学的指標になり得ることを報告した。しかしながら、測定にはMRI機器以外の装置が必要であり、簡便性の点で問題があった。このことは、一般的検査として普及するための障壁となる。そこで、今回、新たなバイオマーカー候補としての可能性を検討すべく、中枢神経において ^{31}P -MRSおよび ^1H -MRSを施行した。

目的; MJDの中枢神経において、 ^{31}P -MRSおよび ^1H -MRSを測定し、有効性判定の生化学的指標としての可能性を検証する。

B. 研究方法

MJD患者10名と健常対照者8名を対象に本検査を実施した。3T-MRI (Achieva 3.0T TX (Philips Medical System, Best, The Netherlands) を用い、 ^{31}P -MRS および ^1H -MRS を歯状核を含む小脳半球、前提神経核を含む橋、後頭葉、前頭葉のそれぞれ左に5mm x 5mmの大きさで関心領域を設定し施行した。

^{31}P -MRSにおいてはPCr/Piと V/V_{max} を、 ^1H -MRSにおいてはNAA/Crを評価項目とした。また、本検査の1カ月前後に神経診察を行い、疾患重症度をScale for the assessment and rating of ataxia (SARA)によって評価した。

統計学的解析には、群間比較においてはWilcoxon rank-sum testを、相関解析にはPearson's correlation analysisを使用した。

(倫理面への配慮)

本研究については、北海道大学医学研究科医の倫理委員会の承認を得た。対象者には研究の趣旨を文書で説明し、文書にて同意を得た。

C. 研究結果

患者群と健常者群の比較では ^1H -MRSにおける小脳と橋のNAA/Crが患者群で有意に低下していた ($P=0.0485$, $P=0.002$) (図1)。

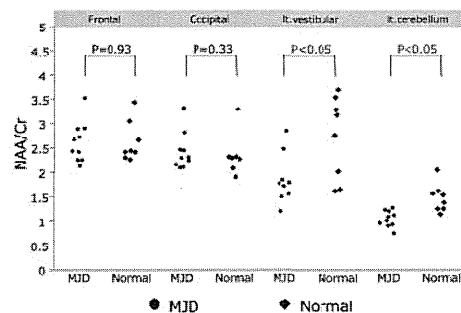


図1. ^1H -MRSにおける小脳と橋のNAA/Crが患者群で有意に低下していた。

^1H -MRSの他の部位や ^{31}P -MRSの測定結果には両群間で有意差は認められなかった。相関解析では、罹病期間と相関する項目は認められなかったが、小脳半球のNAA/CrとSARA ($P=0.0187$)および橋の V/V_{max} とSARA ($P=0.0080$)が有意に相関していた (図2)。前頭葉や後頭葉で相関する項目は認められなかった。

D. 考察

過去の報告では、MJDにおいて小脳における ^1H -MRS測定値が、重症度と相関するとした報告はあるが、脳幹を含めた他の中枢神経において ^1H -MRS測定値を検討し

た報告や、 ^{31}P -MRS を中枢神経で施行した報告は現在のところなされていない。限られた症例数で行った検討であることや、測定値と病態との関連が不明であるが、中枢神経における ^{31}P -MRS および ^1H -MRS は MJD の重症度を反映するバイオマーカー候補である可能性を示唆する結果であり、今後より多数例での検証が必要である。

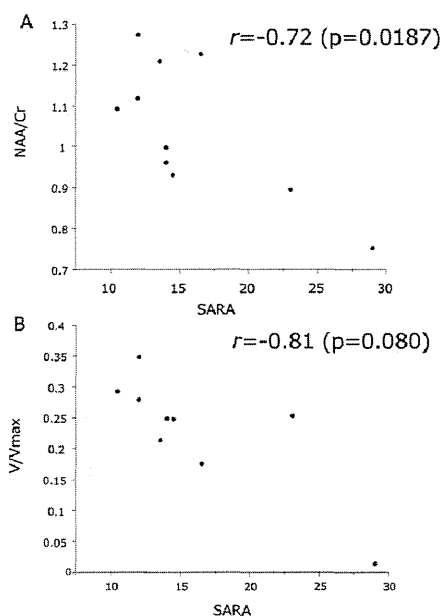


図 2. A) ^1H -MRS において小脳半球の NAA/Cr と SARA は有意に相関していた ($P = 0.0187$)。B) ^{31}P -MRS において橋の V/Vmax と SARA ($P = 0.0080$) が有意に相関していた。

E. 結論

橋および小脳における ^{31}P -MRS および ^1H -MRS は MJD の重症度を反映するバイオマーカーとなり得る可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki H, Matsushima M, Hama Y, Sakushima K, Nakamura M, Yabe I, Oba K, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J: Plasma matrix metalloproteinase-3 correlates with the clinical severity in men with multiple system atrophy. *Neurology and Clinical Neuroscience*, 2013, in press
- 2) Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Ikeda T, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. *Acta Neuropathol*, 2012; 124(1): 149-51
- 3) 矢部一郎, 佐々木秀直: 脊髄小脳変性症の治療の進歩. *神経治療学*, 2012; 29: 395-400

2. 学会発表

- 1) Sasaki H: Genetic news in multiple system atrophy. 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 2012. 6. 21, Convention Centre Dublin, Dublin, Ireland
- 2) 佐々木秀直: 【教育セミナー4】多系統萎縮症の自律神経障害について. 第 65

回日本自律神経学会総会，2012年10月26日，都市センターホテル，東京

- 3) 矢部一郎，緒方昭彦，佐々木秀直：一卵性双生児で片方に非罹者を有する多系統萎縮症の2例．第53回日本神経学会学術大会，2012年5月25日，東京国際フォーラム，東京
- 4) 佐々木秀直，矢部一郎，佐久嶋 研、浜 結香，内海 潤，高橋育子，佐藤和則，松島理明：多系統萎縮症における血中 matrix metalloproteinase 3 (MMP3) と tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)の意義．第53回日本神経学会学術大会，2012年5月25日，東京国際フォーラム，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

- 1) 特願 2012-289082；神経変性疾患の検査と治療に対するmiRNA又はその標的遺伝子の利用
- 2) 特願 2012-289083；神経変性疾患の制御因子

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当無し

Machado-Joseph病 (MJD) における¹H-MRSおよび³¹P-MRS所見

佐々木秀直¹⁾、矢部一郎¹⁾、Khin K Tha²⁾、濱口裕行²⁾、佐久嶋 研¹⁾、加納崇裕¹⁾、寺江 聡²⁾

所 属：1) 北海道大学医学研究科神経内科学分野

2) 北海道大学医学研究科放射線医学分野

ポリグルタミン病研究の進歩により新規薬剤が開発される可能性

症状の評価のみでは、治療効果判定に時間がかかるので、簡便な指標が必要

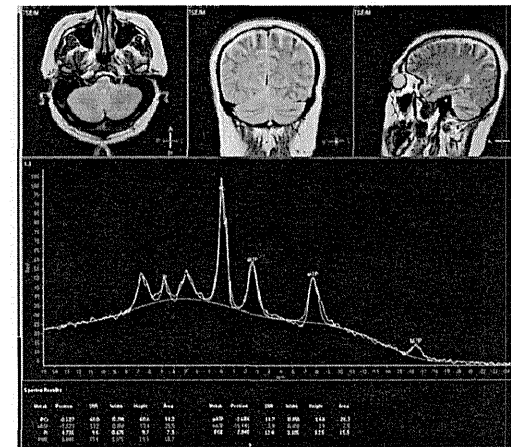
我々は³¹P-MRSによる筋エネルギー代謝測定が候補に成る得ることを以前に報告

新たに中枢神経の¹H-MRSと³¹P-MRSを候補として検討

ポリグルタミン病であるMJD患者にて測定

¹H-MRS における小脳と橋のNAA/Crが患者群で有意に低下し、小脳半球のNAA/Crと橋のV/Vmaxが重症度と有意に相関していた。

橋および小脳における³¹P-MRSおよび¹H-MRSはMJDの重症度を反映するバイオマーカーとなり得る可能性がある。



脊髄小脳変性症における髄液サイトカインのサロゲートマーカーとしての意義

研究分担者 吉良 潤一（九州大学大学院医学研究院 神経内科学）
共同研究者 山崎 亮（九州大学大学院医学研究院 神経治療学）

研究要旨

孤発性（非遺伝性）脊髄小脳変性症（SCD）と多系統萎縮症（MSA）は症状が類似しているため鑑別が困難で、早期診断のための代用マーカー探索が急務である。今回我々は、MSA患者 16 例、SCD 患者 10 名、パーキンソン病患者 15 名および健常対照者 15 名の髄液中サイトカインおよび神経由来蛋白質濃度を ELISA と蛍光ビーズサスペンションアレイアッセイで測定し、MSA と SCD の鑑別に有用なマーカーを探索した。単項目比較では IL-8 が感度 0.6、特異度 0.88、IL-6 が感度 0.7、特異度 0.81 でそれぞれ MSA において有意に高値であった。また複数項目の同時測定では、IL-13/IP-10 が感度 0.90、特異度 0.81、IL-8/IL-17 が感度 0.80、特異度 0.81 と有用である事が示唆された。これらのサイトカインはいずれも MSA で高値であった事から、MSA における炎症性機序の関与が強く示唆された。

A. はじめに

多系統萎縮症 (Multiple System Atrophy, MSA) は、これまで独立した疾患として認識されていたパーキンソン症状を主症状とする線状体黒質変性症 (Striato-Nigral Degeneration, SND)、小脳失調を主症状とするオリブ橋小脳萎縮症 (Olivio-Ponto-Cerebellar Atrophy, OPCA) および自律神経症状を主とするシャイ・ドレーガー症候群 (Shy-Drager Syndrome, SDS) を統合した概念として 1969 年に提唱され(1)、病理学的にグリア細胞質封入体 (Glial cytoplasmic inclusion, GCI) を共通に持つ事が 1989 年に明らかになってからはその疾患概念が確立した(2)。MSA のうち、パーキンソ

ニズムを主とする病型群を MSA-P、小脳失調を優位とする病型群を MSA-C とし、SDS は用いない事となった(3)。

一方、脊髄小脳変性 (Spinocerebellar degeneration, SCD) は日本国内に 34,000 人以上いると推定され、その 3 割が遺伝性、残りの 7 割は孤発性と考えられている。MSA はこの孤発性の 7 割、14,000 例を占め、のこりの 3 割が皮質性小脳萎縮症 (Cortical Cerebellar Atrophy) と思われる。

MSA と CCA は疾患初期こそ症状が酷似しているが、CCA はその後も緩徐に進行する小脳失調症を呈するのみであるのに対し、MSA はパーキンソニズムや自律神経失調症を来し、4-5 年後の自力での起立可

能な患者の割合は43%(CCAでは76%)(4)、歩行時に杖などの補助具が必要になる間での期間は4.7年(CCAは11.1年)(5)と重症化しやすい。このように機能予後、生命予後が大きく異なる疾患でありながら、確定診断は生検組織病理学的検査でのGCIの有無しかないのである。

本研究では、MSA、SCD患者髄液におけるサロゲートマーカーの探索、及び、複数のマーカーを組み合わせた際に得られる、より鋭敏な複合マーカーの探索を目的とした。

B. 研究方法

九州大学神経内科を受診し、髄液検査を受けたSCD10例、MSA16例、パーキンソン病(PD)10例およびその他の神経疾患(OND)15例の凍結保存髄液を対象に、蛍光ビーズサスペンションアレイシステム(BioPlex)を用いて27種のサイトカイン、ケモカイン、成長因子濃度(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 、CXCL8/IL-8、CXCL10/IP-10、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1 α 、CCL4/MIP-1 β 、CCL5/RANTES、CCL11/eotaxin、G-CSF、GM-CSF、PDGFbb、bFGF、VEGF、IL-1ra)を測定した。また、Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法を用いて髄液中の α -synuclein、Tau、neurofilament heavy chainを測定した。

測定結果は、各項目間の測定平均値をone-way ANOVAにて検定した。また、段階的多変量ロジスティック回帰分析を行い、単項目および2項目複合によるROC、AUCを算出し、各測定項目の感度、特異度を

算出した。

C. 研究結果

単項目ごとの比較では、NF-L(p=0.035)、IL-6(p=0.02)、IL-8(p=0.025)、IL-13(p=0.037)、IP-10(CXCL10)(p=0.048)においてMSAとSCDで有意差がみられた(図1)。また、段階的多変量ロジスティック回帰分析の結果、2項目測定を組み合わせではIL-13とIP-10の同時測定が感度92%、特異度81%で両者の鑑別に有用であった(表1)。

D. 考察

今回の検討で、MSA患者ではSCD患者と比較し、炎症性サイトカインの上昇が顕著にみられた。今回有意差がみられたIL-13、IP-10(CXCL10)、IL-8(CXCL8)、IL-6はすべてMSA群で高値であったが、IL-13はTh2サイトカイン、IP-10とIL-8は主に単球から放出され、それぞれT細胞および好中球に作用するケモカイン、IL-6は炎症性サイトカインと多様で、ある一定の免疫機構活性化を反映するようなものでなくむしろ一般的なグリア炎症に伴う二次的な活性化も考えられた。ただし、単球から放出されるサイトカインも多く、またMSAでは活性化マクロファージが特徴的にみられる(6)ことから、これらの活性化マクロファージが炎症性サイトカイン高値に寄与している可能性が考えられる。グリア炎症は中枢神経系の障害度を反映していると考えられるので、これらの炎症性サイトカインの同一患者における経時的検討により、疾患の罹病期間や重症度と相関するサイトカインを絞り込

む事が可能となり、真の意味でのサロゲートマーカーとなりうる事が考えられた。

また、今回は複数項目の同時測定による MSA と SCD を鑑別する上での感度と特異度を算出し、IL-13 と IP-10 の同時測定が両疾患の鑑別に有用である事が判明した。このことはつまり、これらの 2 項目は独立している事を示唆しており、Th2 系の免疫反応と単球由来のケモカインの MSA における活性化が疾患の病態形成に何らかの役割を担っている事が示唆された。

E. 結論

MSA-C 患者髄液では SCD と比較し炎症性サイトカインの高値を認めた。複数項目の同時測定により、MSA-C と SCD の鑑別におけるバイオマーカーとしての有用性がさらに高まった。今後は、これらのサイトカインが MSA で上昇する病態機序、および疾患の重症度との相関を明らかにする必要がある。

文献

- 1) Graham JG, Oppenheimer DR: Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. JNNP 1969; 32(1): 28-34
- 2) Papp MI, Kahn JE and Lantos PL: Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). JNS 1989; 94(1-3): 79-100
- 3) Gilman S, Low PA, Quinn N et al: Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. JNS 1999; 163(1): 94-98
- 4) Tsuji S, Onodera O, Goto J et al: Sporadic ataxias in Japan—a population based epidemiological study. Cerebellum 2008; 7(2): 189-197
- 5) Abele M, Burk K, Schols L et al: The aetiology of sporadic adult-onset ataxia. Brain 2002; 125(5): 961-968
- 6) Yokoyama T, Hasegawa K, Horiuchi E et al: Multiple system atrophy (MSA) with massive macrophage infiltration in the ponto-cerebellar afferent system. Neuropathology 2007; 27: 375-377

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

なし

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

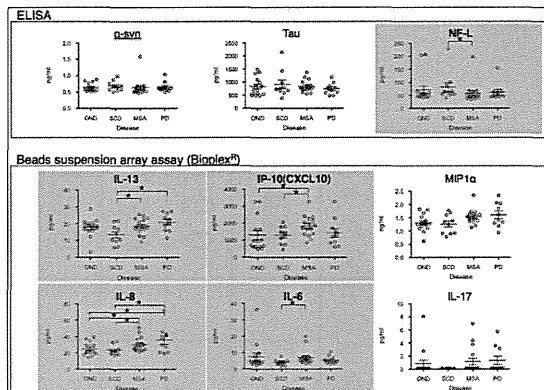


図1：各種サイトカイン測定結果

表1：SCDとMSAの鑑別における、複数項目同時測定の感度／特異度

	特異度	感度	AUC
IL-13 / IP-10	0.81	0.90	0.84
IL-6 / IL-13	0.75	0.80	0.83
IL-13 / IL-17	0.75	0.80	0.86
IL-8 / IL-17	0.81	0.80	0.86
IL-6 / IL-13 / IL-17	0.81	0.94	0.94

表1 測定対象

	SCD (10)	MSA (16)	PD (10)	OND (15)
性別 (男:女)	5:5	9:7	3:7	9:6
検体採取時 年齢 (歳)	52.8±19.6	60.7±7.8	57.7±13.6	60.1±18.7
罹病期間 (年)	4.2±3.1	2.1±1.5	1.9±1.0	NA

SCD: Spinocerebellar Degeneration, MSA: Multiple System Atrophy (C 14, P 2)
 OND: other neurological disorders (myelopathy, NPH, myopathy etc)

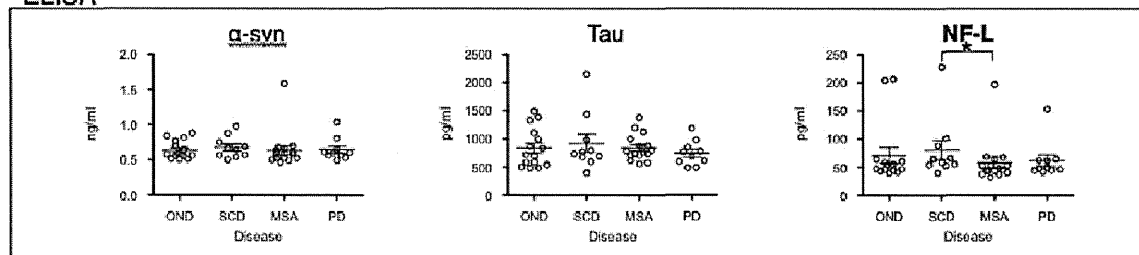
測定: 神経系由来蛋白(NF-L, Tau, α-synuclein)→ELISA
 髄液中サイトカイン→蛍光ビーズサスペンションアレイアッセイ (Bioplex^R)

解析: 単項目比較→Mann-Whitney test

多項目比較→Logistic regression analysis

診断力評価→ROC曲線解析

ELISA



Beads suspension array assay (Bioplex^R)

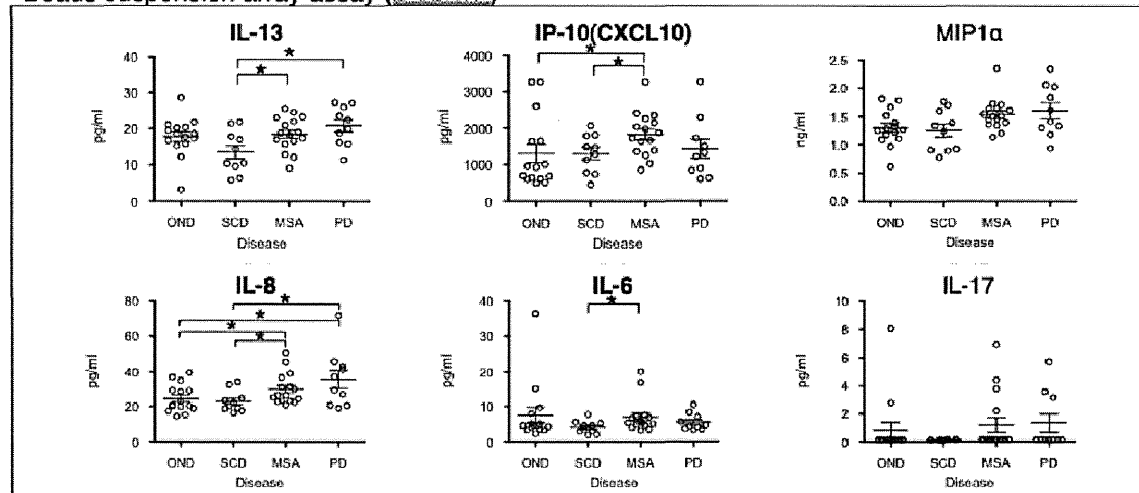


図1 各種サイトカイン測定結果(髄液)

表2 SCDとMSAの鑑別における、複数項目同時測定の感度/特異度

	特異度	感度	AUC
IL-13 / IP-10	0.81	0.90	0.84
IL-6 / IL-13	0.75	0.80	0.83
IL-13 / IL-17	0.75	0.80	0.86
IL-8 / IL-17	0.81	0.80	0.86
IL-6 / IL-13 / IL-17	0.81	0.94	0.94

6種の神経変性疾患患者脳脊髄液における 共通の変動因子と個別の変動因子の探索的プロテオーム解析

研究協力者 内海 潤
(北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野、がん研究会がん研究所)

共同研究者 藤井清永 (北海道大学大学院薬学研究院構造生物学)
東海林幹夫 (弘前大学大学院医学研究科脳神経内科学講座)
矢部一郎 (北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野)
佐久嶋 研 (北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野)
廣谷 真 (北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野)
加納崇裕 (北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野)
堀内正隆 (北海道大学大学院薬学研究院構造生物学)
佐々木秀直 (北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野)

研究要旨

AD、MCI、PD、MSA、ALS、MS の患者および健常者（総数 24 例）から採取された脳脊髄液（CSF）を、質量分析によるプロテオーム解析によって変動したタンパク質群を同定し、さらに機能解析して、神経組織内のイベントを推定した。その結果、154 種のタンパク質が相互評価可能なレベルで検出され、高収量で共通的な 57 種と低収量で疾患個別的な 97 種に分けることが可能であった。前者は、炎症と組織リモデリング、後者は神経網再構築というイベントに関与していることが推定された。

A. 研究目的

神経変性疾患では、神経細胞の変性に伴う共通的なイベントと疾患特異的なイベントが起こっていると考えられる。6 種の神経変性疾患の脳脊髄液（CSF）におけるプロテオーム解析で、そのイベントを推定する。

B. 研究方法

AD、MCI、PD、MSA、ALS、MS の患者および健常者（総数 24 例）からイ

ンフォームドコンセントを得た上で採取された患者脳脊髄液（CSF）を、前処理でアルブミン等の過剰タンパク質を除去した後、LC-ESI-MS（LTQ-Orbitrap hybrid）によるプロテオーム解析を行った。得られたデータは、パルスカウントから半定量化処理し、散布図解析から検出因子の変動幅を調べて、疾患における共通因子と個別因子を探索的に解析した。検出された因子の機能を調べるバイオインフォマティクス解析（ネットワーク

解析とオントロジー解析)は、MetaCore® ver.10 を用いて行い、その結果から、検出因子が誘導されるイベントを推定した。

(倫理面への配慮)

研究は医の倫理委員会、病院の自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

154 種のタンパク質が相互評価可能なレベルで検出され (図 a)、高収量の 57 種と低収量の 97 種に分けることが可能であった (図 b)。高収率群は 6 種の疾患で変動幅が小さく、他方、低収率群は個別疾患で変動幅が異なっていた。図 c のとおり、収率順に列記した検出因子の機能を調べてみると、高収率群は細胞マトリックス外タンパク質の再構成および結合組織のタンパク質分解プロセスに関与しており、他方、低収率群は神経新生の軸索のガイダンス及びシナプス形成に関与するタンパク質群であった。これらの結果は、神経変性疾患では、炎症と組織リモデリングが共通的なイベントであり、他方、神経網再構成が疾患個別的なイベントであることを示唆している。

D. 考察

本研究は、神経変性の病巣のイベントが、共通的なプロセスと疾患特有のプロセスの 2 つの機序で起こっているという仮説の下、CSF 中に検出されたタンパク質の挙動から推定を行ったものである。MS は脱髄疾患で炎症性疾患と言えるが、これも含めて解析した。その結果、6 種の疾患で、仮説に反せず、共通的に高収率で検出されるタンパク質群と疾患個別

的に低収率で検出されるタンパク質群に分けることができた。さらに、これらのタンパク質の機能は、炎症と組織リモデリングが共通的なイベントであり、他方、神経網再構成が疾患個別的なイベントであると推定された。これら個別的な変動因子からは、各疾患のバイオマーカー候補となり得る因子が、それぞれ同定された。

E. 結論

6 種の神経変性疾患の探索的プロテオーム解析から、炎症と組織リモデリングという共通的なイベントと神経網再構築という疾患個別的なイベントがあることが推定された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sasaki H, Matsushima M, Hama Y, Sakushima K, Nakamura M, Yabe I, Oba K, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J: Plasma matrix metalloproteinase-3 correlates with the clinical severity in men with multiple system atrophy. *Neurology and Clinical Neuroscience*, 2013, in press

2. 学会発表

1) 佐々木秀直, 矢部一郎, 佐久嶋 研, 浜 結香, 内海 潤, 高橋育子, 佐藤和則, 松島理明: 多系統萎縮症におけ

る血中 matrix metalloproteinase 3 (MMP3) と tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)の意義.
第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京国際フォーラム, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

特願 2012-217823 : 神経系の変性疾患の検出方法 (2012 年 9 月 28 日出願)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし