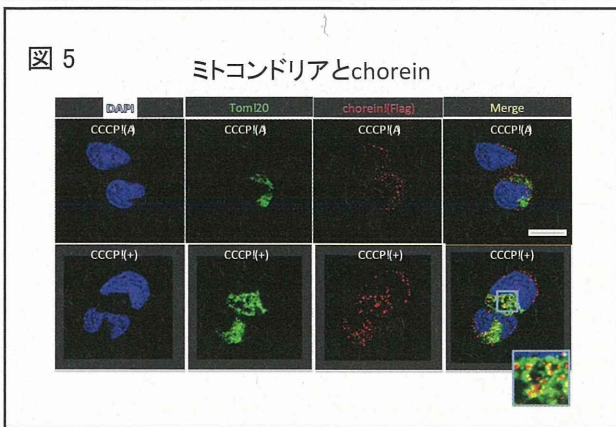
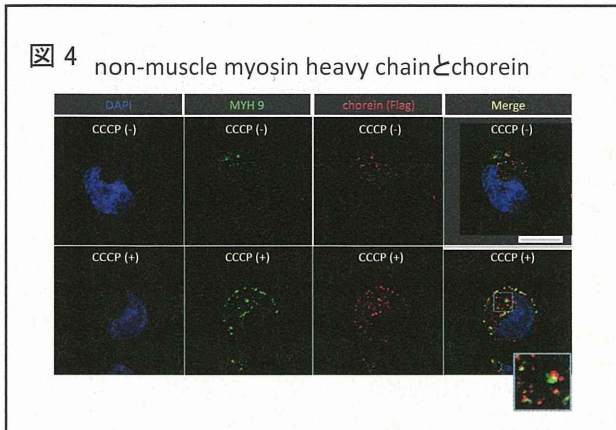


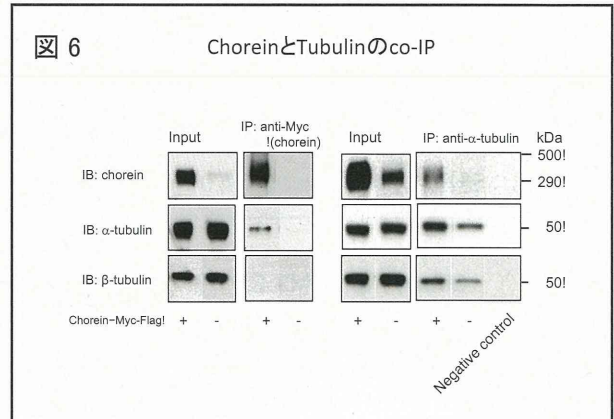
(4) 免疫蛍光染色

non-muscle myosin heavy chain、 β -actin およびミトコンドリア外膜の Tom20 と chorein の共在について免疫蛍光法によって確認したところ、non-muscle myosin heavy chain と chorein との共在が CCCP 添加後は添加前に比べて明らかに増加していた (図 4)。また、CCCP 添加後は Tom20 と chorein の共在も増加していた (図 5)。



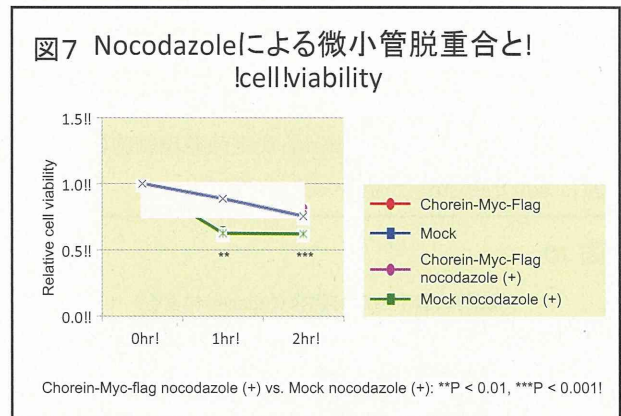
(5) chorein と α -tubulin の免疫沈降

chorein 安定強発現細胞から抽出したタンパク質について抗 myc 抗体のビーズや抗 α -tubulin 抗体ビーズによって免疫沈降を行った。Western blot で chorein は α -tubulin と共沈している事が示された (図 6)。



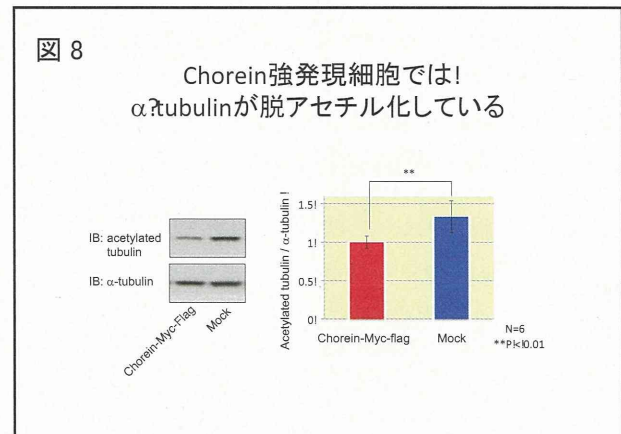
(6) 微小管脱重合と cell viability

Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞に対して微小管脱重合剤である Nocodazole を培地に添加し、経時的に MTS assay によって cell viability を比較した。Nocodazole 添加1時間後、2時間後において chorein 安定強発現細胞は Mock 細胞と比較して、cell viability が有為に高かった (図 7)。



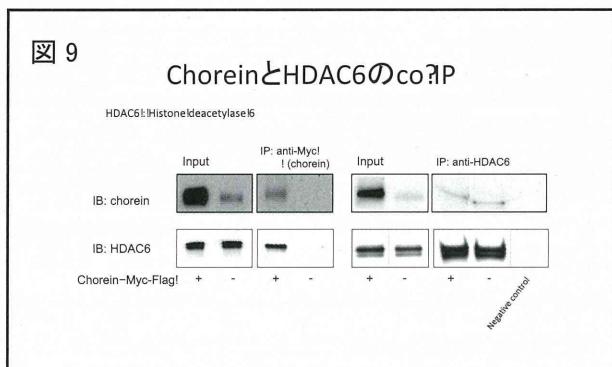
(7) α -tubulin のアセチル化の検討

Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞を用い、acetylated tubulin の Western blot 法による免疫反応の比較を行ったところ、chorein 強発現細胞では Mock 細胞と比較して acetylated tubulin の免疫反応が有意に低く、chorein 安定強発現細胞では α -tubulin の脱アセチル化が亢進している事が示唆された (図 8)。



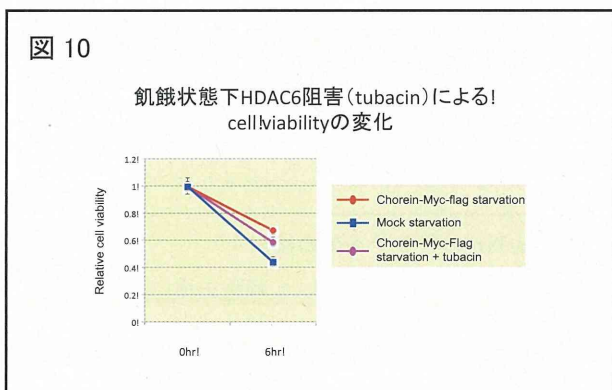
(8) chorein と HDAC6 の免疫沈降

α -tubulin の脱アセチル化に關与する HDAC6 と chorein について免疫沈降を行い、共沈物のウェスタンブロットを行った所、HDAC6, chorein のバンドを認め、両タンパク質が共沈していることが示された (図 9)。



(9) α -tubulin に対する HDAC6 特異的阻害剤による cell viability

α -tubulin に対する HDAC6 特異的阻害剤である tubacin を添加した培地を用いて飢餓誘発 6 時間後の cell viability を比べると、tubacin を添加した chorein 安定強発現細胞は加えていない chorein 安定強発現細胞に比べて有意に cell viability が低かった (図 10)。



D. 考察

chorein 安定強発現細胞は CCCP を加えてミトコンドリア膜電位消失させ障害を加えたり、飢餓誘発による細胞障害を加えても cell viability が維持されており、chorein により CCCP によるミトコンドリア障害が誘導する細胞死や飢餓誘発性細胞死が抑制されることが示唆された。

CCCP 添加前後で免疫沈降をおこなったところ、chorein 安定強発現細胞において CCCP 添加後では non-muscle myosin と β -actin のバンドが強く染まり、それらとの免疫染色では chorein との共在が増えており、ミトコンドリア障害が生じたときに myosin や β -actin との結合が強まることが示唆された。また、ミトコンドリア外膜に存在する

Tom20 と chorein の共在も増加しており、ミトコンドリア障害により、chorein の一部はミトコンドリアに集積することが示唆された。

また、chorein は免疫沈降によって α -tubulin や HDAC6 と共沈し、chorein 安定強発現細胞株で脱アセチル化が亢進していることから chorein は α -tubulin、HDAC6 と相互作用しており、 α -tubulin の脱アセチル化に關与している可能性が示唆された。 α -tubulin はアセチル化を受けることによって β -tubulin とヘテロ二量体を形成し、この二量体が重合して微小管形成に關与する。逆に脱アセチル化を受けることによって微小管、ヘテロ二量体が脱重合し、可逆的に細胞遊走や細胞骨格形成に關与していることも知られている。chorein 強発現細胞は微小管脱重合阻害剤による細胞障害に対して耐性を持つことから、chorein は微小管の安定化作用を有する事が示唆された。chorein 強発現細胞は飢餓誘発性細胞死に対して抑制的に働くが、HDAC6 の α -tubulin に対する作用を特異的に阻害する tubacin によってこの作用が弱まる事から chorein は HDAC6 の α -tubulin に対する脱アセチル化を促進することによって細胞に飢餓誘発性細胞死に対する耐性を持たせることが示唆される。

HDAC6 は、オートファジーやマイトファジーとも関与することが報告されており、chorein は myosin や actin, α -tubulin 等の細胞骨格系タンパク質と相互作用し、tubulin のアセチル化などを介して細胞骨格形成やオートファジーを介した不良細胞内小器官のクリアランスに關与する事が示唆された。

E. 結論

chorein は myosin や actin などとの結合を深め、ミトコンドリアに集積し、ミトコンドリア膜電位消失による細胞死を抑制することが示唆された。また、chorein は α -tubulin や HDAC6 と相互作用することが示唆され、細胞骨格形成やオートファジーやマイトファジーなどを介した細胞内小器官クリアランスに關与しており、ChAc の分子病態のひとつは、これらの機構の破綻による可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimo H, Nakamura M, Tomiyasu A, Ichiba M, Ueno SI, Sano A: Comprehensive analysis of the genes responsible for neuroacanthocytosis in mood disorder and schizophrenia, **Neurosci. Res.**, 69: 196-202, 2011

Tomiyasu A, Nakamura M, Ichiba M, Ueno S, Saiki S, Morimoto M, Kobal J, Kageyama Y, Inui T, Wakabayashi K, Yamada T, Kanemori Y, Jung HH, Tanaka H, Orimo S, Afawi Z, Blatt I, Aasly J, Ujike H, Babovic-Vuksanovic D, Josephs KA, Tohge R, Rodrigues GR, Dupre N, Yamada H, Yokochi F, Kotschet K, Takei T, Rudzinska M, Szczudlik A, Penco S, Fujiwara M, Tojo K, Sano A: Novel pathogenic mutations and copy number variations in the VPS13A Gene in patients with chorea-acanthocytosis, **Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.**, 156: 620-631, 2011

Hayashi T, Kishida M, Nishizawa Y, Iijima M, Koriyama C, Nakamura M, Sano A, Kishida S: Subcellular localization and putative role of VPS13A/chorein in dopaminergic neuronal cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 419: 511-516, 2012

Sangatsuda Y, Nakamura M, Tomiyasu A, Deguchi A, Toyota Y, Goto Y, Nishino I, Ueno S, Sano A: Heteroplasmic m.1624C>T mutation of the mitochondrial tRNA^{Val} gene in a proband and his mother with repeated consciousness disturbances, **Mitochondrion.**, 12: 617-622, 2012

Shiokawa N, Nakamura M, Sameshima M, Deguchi A, Hayashi T, Sasaki N, Sano A: Chorein, the protein responsible for chorea-acanthocytosis, interacts with β -adducin and β -actin. **Biochem Biophys Res Commun.** 441: 96-101, 2013

総説

富安昭之、中村雅之、佐野 輝; 有棘赤血球舞踏病における VPS13A 遺伝子のコピー数変異. 生体の科学 62 巻 6 号, 560-564 (2011)

2.学会発表

佐野輝: 「舞踏病原因遺伝子 VPS13A 変異による精神障害発症機構」第 54 回日本神経化学学会年会 シンポジウム「精神障害の新規分子について—最近の知見から—」、石川、2011 年 9 月

Hayashi T, Kishida M, Nishizawa Y, Iijima M, Koriyama C, Nakamura M, Sano A, Kishida S: Chorein is involved in exocytosis of dene core vesicles in differentiated PC12 cells, 11th biennial meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry /55th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, October1-2, 2012, Kobe Japan

Deguchi A, Nakamura M, Shiokawa N, Sasaki N, Sano A: Chorein interacts with cytoskeletal proteins in HEK293 cells, 11th biennial meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry /55th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, October1-2, 2012, Kobe Japan

Shiokawa N, Nakamura M, Sameshima M, Deguchi A, Sano A: Proteomics approach to identify chorein-interacting proteins, 11th biennial meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry /55th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, October1-2, 2012, Kobe Japan

HEK293 cells treated with a chemical inhibitor of oxidative phosphorylation. The 56th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, June 20-23, 2013, Kyoto Japan

Deguchi A, Nakamura M, Shiokawa N, Sasaki N, Sano A: Chorein interacts with cytoskeletal proteins in
Shiokawa N, Nakamura M, Deguchi A, Sasaki N, Sano A: Identification of binding partners of chorein.

The 56th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, June 20-23, 2013, Kyoto Japan

Sasaki N, Nakamura M, Shiokawa N, Deguchi A, Sano A: Chorein interacts with cytoskeletal proteins on nutrient starvation in HEK293 cells. The 56th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, June 20-23, 2013, Kyoto Japan

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の診断には、針筋電図を中心とした電気生理学的手法が広く用いられている。本研究ではまず、針筋電図所見のうち、線維束自発電位（fasciculation potential; Fasc）について注目し、Fascを重視した新しいAwajiアルゴリズムの有用性について検討した。結果としては、Awajiアルゴリズムにおいては、上位運動ニューロン徴候の領域数の条件が改訂El Escorial基準より厳しいために、かえって感度が下がることを報告した。またALSで治験の電気生理マーカーとしても用いられている、運動単位推定法（MUNE）において、遠隔電場電位の混入という問題点があることを初めて指摘した。ALSで神経反復刺激試験（RNS）での漸減反応（Decr）が見られることは知られているが、頸椎症性筋萎縮症（CSA）では特に僧帽筋ではDecrは見られず、僧帽筋RNSがALS診断に有用であることを示唆した。

研究分担者：園生 雅弘

所属機関名：帝京大学医学部 神経内科

A.研究目的

1) ALSにおける線維束自発電位と診断基準についての検討

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は進行性かつ予後不良な疾患であり、早期の正確な診断が望まれる。その診断基準としては、改訂版El Escorial基準(R-EEC)が広く用いられてきたが、特に病初期における診断感度の低さが指摘されてきた。その理由の一つとして、線維束自発電位(fasciculation potentials; Fasc)が過小評価されていることがあげられる。新しいALSの電気診断基準であるAwajiアルゴリズムは、Fascを重視したという特徴がある。本研究では、AwajiアルゴリズムとR-EECの診断感度について比較・検討した。

2) MUNEへの遠隔電場電位混入の問題についての検討

運動単位推定(MUNE)は下位運動ニューロン障害の定量的評価法として広く用いられており、特に、尺骨神経刺激によるhypothenar MUNEが汎用されている。近年、尺骨神経刺激の複合筋活動電位(CMAP)には遠隔電場電位(FFP)が寄与することが明らかとなった。hypothenar MUNEにもFFPが寄与する可能性が指摘されていたが、このことを実際に検討した報告はなかった。本研究では、表面運動単位電位(SMUP)の起源筋を、尺骨神経支配の手内筋それぞれに記録電極を装着することによって詳細に同定することを目的とした。

3) ALSにおける神経反復刺激試験の診断的有用性についての検討

ALS診断に汎用されている針筋電図は、侵襲性が高いことが欠点である。本研究では、非侵襲的な神経反復刺激試験(RNS)が針筋電図の役割の一部を代替するものとして、ALS診断に応用できないかについて、頸椎症性筋萎縮症(CSA)との比較を行って検討した。

B.研究方法

1) ALSにおける線維束自発電位と診断基準についての検討

2004年から2008年の5年間に、臨床的にALSが疑われ、針筋電図検査を施行された176例の患者の中から、検査時にR-EECないしAwajiアルゴリズムでconfirmed ALS(definite, probable, probable laboratory supported (PRLS) ALS)に分類された64例、遺伝子検査でSOD1遺伝子の変異が証明された2例、フォローアップ中にconfirmed ALSカテゴリーに到達した27例、上記のいずれでもないが、フォローアップ中にendpoint(人工呼吸器の導入、胃瘻造設、死亡)に到達した46例の計139例を抽出し、本研究の検討対象とした。これらの対象患者における検査時の診断カテゴリーをR-EECとAwajiアルゴリズムを用いて分類し、それぞれの診断基準における各診断カテゴリーの割合を評価した。さらに、安静時活動の筋別出現頻度についても検討した。

2) MUNEへの遠隔電場電位混入の問題についての検討

対象は27~54歳の健常者20例。小指外転筋(ADM)の他、尺骨神経支配の他の小指球筋(other hypothenar)、背側・掌側骨間筋(IOD1~4、IOP1~3)、母指内転筋、

それぞれの筋腹上に探查電極を置き、前腕遠位に共通の近位基準電極 (pref) を置いた。多点刺激法による hypothenar MUNE を通常の方法で施行し、ルーチン誘導で negative area 25 μ Vms 未満、negative amplitude 10 μ V 未満、ないし、positive onset の SMUP は除外した。近位基準電極誘導で最大陰性波が記録される筋が、各 SMUP の起源に相当するものとして同定を行い、記録された SMUP の筋別の起源、その面積を解析し、さらに ADM と non-ADM に分けて集計した。

3) ALS における神経反復刺激試験の診断的有用性についての検討

2013 年の 1 月より 12 月まで、ALS ないし CSA の連続症例についての前向き研究を行った。ALS のエントリー基準は、臨床症候及び針筋電図から ALS と確信できた症例で、R-EEC と Awaji アルゴリズムに基づいて、診断カテゴリーを分類した。

被験筋としては、短母指外転筋 (APB)、僧帽筋 (Trap)、三角筋 (Del) の 3 筋を選択した。3Hz 反復刺激を行い、CMAP の頂点間振幅で、4 発目で 5% を超える漸減現象 (Decr) が見られた例を異常と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究すべては帝京大学倫理委員会にて承認され、また被験者に研究内容・目的を説明して同意を得た。

C. 研究結果

1) ALS における線維束自発電位と診断基準についての検討¹⁾

139 例の患者シリーズにおいて、Confirmed ALS の割合は R-EEC で 43%、Awaji アルゴリズムで 37% と、R-EEC で高い結果であった。その理由として、上位運動ニューロン (upper motor neuron; UMN) 徴候が 1 身体領域のみで見られ、針筋電図の所見をもとに R-EEC で PRLS ALS に分類された 20 例のうち、13 例が Awaji アルゴリズムを適用することで possible ALS にダウングレードされたことが考えられた。

Fasc の被験筋別の検討では、僧帽筋、上腕三頭筋、上腕二頭筋、内側広筋などの近位筋でより多く観察され、第一背側骨間筋、前脛骨筋では少なかった。また、舌、胸鎖乳突筋、傍脊柱筋では随意収縮活動が混入しやすく FPs の観察には不適であると考えられた。

線維自発電位/陽性鋭波などの脱神経電位は、第一背側骨間筋、前脛骨筋などの遠位筋、傍脊柱筋にも高頻度に見

られた。

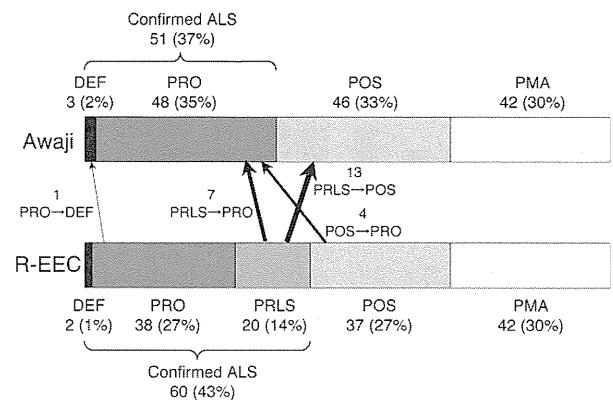


図 1: Awaji アルゴリズム、R-EEC による各診断カテゴリーの割合

Awaji アルゴリズムの適用により、probable-laboratory supported (PRLS) のうちのかなりの例が possible (POS) にダウングレードする。

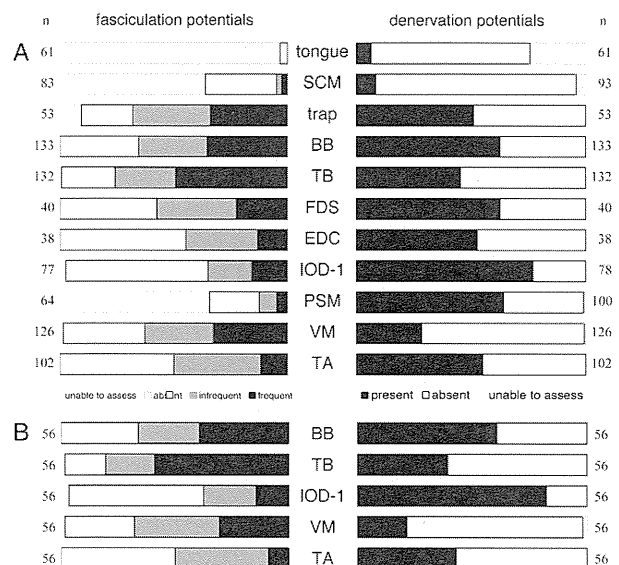


図 2: ALS における安静時活動の分布パターン

A: 左が線維束自発電位 (FPs)、右が脱神経電位。FPs は僧帽筋、上腕二頭筋、上腕三頭筋、内側広筋で多い。脱神経電位は上腕筋よりも背側骨間筋に、内側広筋よりも前脛骨筋に多い。

B: 筋選択のバイアスを除くため、上腕二頭筋、上腕三頭筋、背側骨間筋、内側広筋、前脛骨筋の 5 筋すべてを検査してあった症例で行った同様の検討。A と同様の結果が得られた。

2) MUNE への遠隔電場電位混入の問題についての検討

20 名の被験者から合計 460 SMUPs が記録され、うち 228 SMUPs が採用された。残りの 232 SMUPs のうち、101 はサイズが小さいため、131 は positive onset のために除外された。図 3 に記録された SMUP の筋別の起源の内訳を示す。

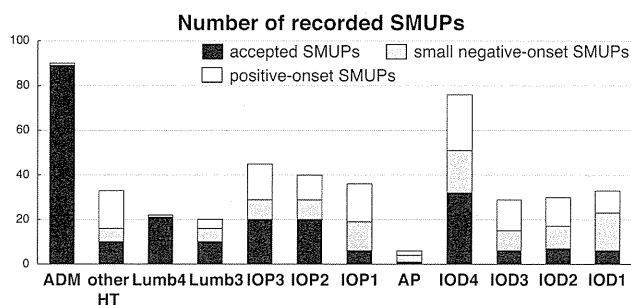


図3：記録されたSMUPの筋別割合
採用されたSMUPsのうち39.0%がADM由来、61.0%がnon-ADM由来であった。Other hypothenarを併せても、小指球筋由来SMUPは43.4%にとどまった。ADM以外では、IOD4(14.0%)、Lumb4(9.2%)、IOP3(8.8%)、IOP2(8.8%)など手の尺側半分の固有手筋に由来するSMUPが多かった。ADM、Lumb4以外では小さいないし陽性の除外SMUPがかなりみられた。除外SMUPも含めるとADM由来は19.6%に低下した。各個人でみると、ADM SMUPの割合は18~73%と様々であった。

図4に筋別のSMUP平均面積を示した。ADM SMUPは他筋に比べて面積が際立って大きく、他筋ではLumb4、Lumb3がやや大きい、他はADMの1/4ないしそれ以下であった。

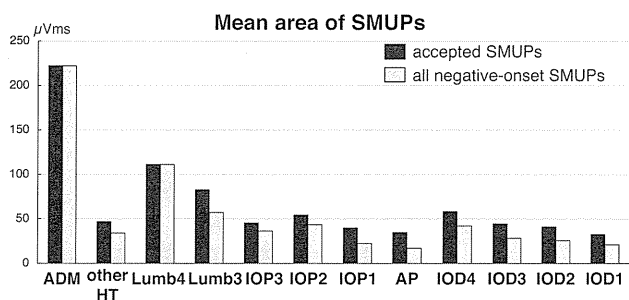


図4：SMUP areaの各筋別平均

図5にSMUP面積のヒストグラムを示した。これで見ると、ADM SMUPとnon-ADM SMUPにはかなり重なりが見られた。

A: SMUPs from standard MUNE

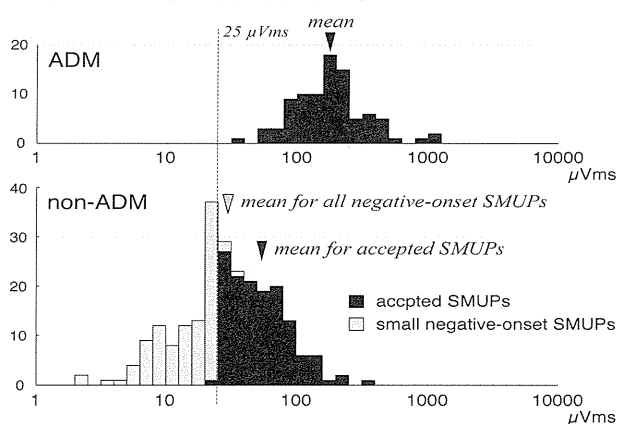


図5：ADMとnon-ADM SMUPそれぞれについてのSMUP面積のヒストグラム

3) ALSにおける神経反復刺激試験の診断的有用性についての検討

ALS 44例(男性28例、女性16例、29-86歳)、CSA 32例(男性28例、女性4例、32-80歳)がエントリーされた。ALSの診断カテゴリーでは、PMA (progressive muscular atrophy)が43%と比較的多かった。

ALS・CSA両群でのRNSの陽性率を表1に示す。APBやDelではCMAP著明低下によるRNS施行不能症例が一部にあった。

	APB	Trap	Del
ALS (n=44)	12/42*	16/44	26/44
感度	29%	36%	59%
CSA (n=32)	1/31*	0/32	3/25*
感度	3%	0%	12%
(特異度)	(97%)	(100%)	(88%)

表1 各疾患群のDecr陽性率筋別比較

*CMAP著明低下によるRNS施行不能症例あり

表に示すように、一般にALSの方でDecrを高頻度に認めた。ただし、APBやDelではCSAでも少数例、Decrを認める症例があった。これは、CSAでも亜急性期にはdecrementが出現しうると考えられる。これに対して、Trapでは、CSAでDecrがみられる例は1例もなく、ALSとCSAの鑑別での特異度は100%であった。Trapの感度は36%とそれほど高くないが、100%の優れた特異度を有する事から、ALSの診断において有用であることが示唆された。

D. 考察

1) ALSにおける線維束自発電位と診断基準についての検討

これまでのいくつかの報告では、Awaji アルゴリズムを用いることでALSの診断感度は、報告によって差はあるが、R-EECに比べて軽度ないし著明に改善したとされていた。しかし、我々の検討では、これまでの報告とは異なりAwaji アルゴリズムはR-EECよりも診断感度が低かった。その理由は、既に述べたように、UMN1領域のALSはR-EECではPRLSとなってconfirmed ALSになりうるが、Awajiではconfirmed ALSに分類されるためにはUMN徴候が2領域以上必要なので、possibleにとどまったためである。Awaji アルゴリズムで診断感度が著明に上昇したとする報告については、種々の問題点を指摘できる。

R-EECと異なり、Awaji アルゴリズムで重要視されているFascは、ALS患者139例中124例(89%)で認められ、PMAにおいても、88%の症例で観察されたことから、ALS

の筋電図診断に有用な活動であると考えられる。我々の検討では、僧帽筋、上腕三頭筋、上腕二頭筋、内側広筋といった近位筋での出現頻度が高く、第一背側骨間筋、前脛骨筋など遠位筋で少ないという結果であったが、その機序は不明である。しかし、このような ALS における筋ごとの Fasc の分布パターンや筋の特性（安静のとりやすさなど）についての知識は、被検筋の選択に際して有用であり、診断感度を改善しようとする。

2) MUNE への遠隔電場電位混入の問題についての検討

これまで、hypothernar MUNE において遠方の筋からの SMUP は、positive onset や小さい SMUP を除外することで適切に除くことができると信じられていた。しかし、今回の検討で、ADM あるいは小指球以外の筋由来の SMUP でも、陰性の立ち上がり有して、基準を満たす場合が多くあり、ルーチン誘導のみでは ADM SMUP との鑑別が困難であることが示された。

小さい non-ADM SMUP の多量の混入のために、hypothernar MUNE にはいくつかの問題点が生ずる。第一に、先行研究³⁾でも示されたように、より小さい non-ADM SMUP は健常者では面積基準によってかなりが除外されるが、神経原性疾患ではこれらも大きくなって基準を満たすようになるため、結果的に健常者と神経原性患者の差が縮まって感度が低下する可能性がある。第二に non-ADM と ADM SMUP の記録される割合は個人によって様々であり、この偶然によって MUNE の値が大きく左右されて信頼性が低下する。第三に、MUNE の値の意味付けが不明確となる。記録される SMUP の過半数は小指球の外由来の筋なので、hypothernar MUNE とはもはや言えない。多くの小さい non-ADM SMUP は除外されるので、すべての尺骨神経支配小手筋に含まれる運動単位数でもない。その中間の何かということになる。

このような MUNE の問題点を克服し、より信頼度の高い運動ニューロン疾患評価のための電気生理学的代理マーカーを開発することが急務である。

3) ALS における神経反復刺激試験の診断的有用性についての検討

ALS での RNS 異常は古くから記載されているが、それを ALS 診断に応用しようという観点の研究はこれまでになかった。我々は ALS で特に僧帽筋を含む近位筋優位に Decr を高頻度に認めること⁴⁾、また僧帽筋での針筋電図異常は CSA では見られず、ALS に特異的な所見であることを報告し

てきた。このことから僧帽筋を含む RNS を ALS 診断に応用することを着想したのだが、僧帽筋 RNS は技術的に pseudofacilitation 現象を生じ易い問題がある。我々は、臥位にて肩を受動的に挙上することで、安定した RNS 波形を得ることができることを報告した。本研究での僧帽筋 RNS もすべてこの方法で施行したものである。

RNS の利点としては、痛みが少ないこと、良好な再現性が期待できることなどが挙げられる。従って、針筋電図の役割の一部を RNS で代替できないかを考えることには意義がある。例えば上肢の一つ筋で安静時活動+随意収縮の神経原性の基準が満たされる時、もう 1 筋として僧帽筋 RNS を用いる方法が考えられる。これは、針筋電図と臨床症候のような異なる modality の LMN 障害の証拠を自由に併用して構わないという Awaji 基準のコンセプトを援用したものである。即ち、RNS での Decr は、少なくとも臨床症候よりも客観的で確実な LMN 障害の証拠と考えられるため、このような方法が考慮できるものとする。

E. 結論

1) Awaji アルゴリズムは R-EEC よりも ALS の診断感度が低かった。また、FPs の出現頻度は筋によって異なるので、出現頻度の高い筋を被検筋に選択することが重要であると考えられた。

2) 小さい non-ADM SMUP の多量の混入は hypothernar MUNE の意味づけを不明確し、その信頼性を低下させる。

3) 侵襲の少ない RNS、特に僧帽筋 RNS は、ALS における下位運動ニューロン障害の検出手段として針筋電図を代替できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Higashihara M, Sonoo M, Yamamoto T, et al. Evaluation of spinal and bulbar muscular atrophy using the Clustering Index method. *Muscle Nerve* 2011; 44: 539-46.

2) Kawamura Y, Sonoo M, Higashihara M, et al. Origin of surface MUPs in hypothernar motor unit number estimation. *Muscle Nerve* 2013; 48: 185-90.

3) Higashihara M, Sonoo M, Yamamoto T, et al. Far-field potentials in hypothernar motor unit number estimation. *Muscle Nerve* 2013; 48: 191-7.

4) Iwanami T, Sonoo M, Hatanaka Y, et al. Incremental responses to repetitive nerve stimulation (RNS) in motor neuron disease. *Clin Neurophysiol* 2011; 122:

2530-6.

5) Sonoo M, Kurokawa K, Higashihara M, et al. Origin of far-field potentials in the ulnar compound muscle action potential. *Muscle Nerve* 2011; 43: 671-8.

6) Uesugi H, Sonoo M, Stalberg E, et al. "Clustering index method": a new technique for differentiation between neurogenic and myopathic changes using surface EMG. *Clin Neurophysiol* 2011; 122: 1032-41.

7) Hokkoku K, Sonoo M, Higashihara M, et al. EMGs of the flexor digitorum profundus muscle in inclusion body myositis. *Muscle Nerve* 2012; 46: 181-6.

2.学会発表

1) 東原真奈, 園生雅弘. Awaji 診断基準の有用性と fasciculation potentials の診断的意義. 第41回日本臨床神経生理学会学術大会, 静岡, 11, 2011.

2) Sonoo M, Stalberg E: Size Index revisited. 58th annual scientific meeting of American association of neuromuscular and electrodiagnostic medicine, San Francisco, 9, 2011.

3) Kawamura Y, Sonoo M, Higashihara M et al. Origins of single MUPs in hypothenar MUNE reveal its limitation. XXth International SFEMG and QEMG Course and XIIth QEMG Conference, Istanbul, 6, 2012.

4) Sonoo M, Stalberg E. Size Index revisited: proposal of the revised Size Index (rSI). XXth International SFEMG and QEMG Course and XIIth QEMG Conference, Istanbul, 6, 2012.

5) Higashihara M, Sonoo M, Kobayashi M, et al. Clustering of discharges of fasciculation potentials. 59th annual scientific meeting of American association of neuromuscular and electrodiagnostic medicine, Orlando, 10, 2012.

6) 河村保臣, 園生雅弘, 東原真奈他 hypothenar MUNE において記録される single MUP の起源について. 第42回日本臨床神経生理学会学術大会, 東京, 11, 2012.

7) Kawamura Y, Sonoo M, Higashihara M, Hatanaka Y: Origins of surface motor unit potentials in hypothenar motor unit number estimation. 60th annual scientific meeting of American association of neuromuscular and electrodiagnostic medicine, San Antonio, 10, 2013

8) Ogawa G, Sonoo M, Hatanaka Y: Clinical consideration of 14 myasthenia gravis patients manifested as dropped head syndrome. 5th Asian and Oceanian Congress of Clinical Neurophysiology, Bali, 8, 2013.

9) Uchino K, Ogawa G, Chiba T, Hokkoku K, Hatanaka Y, Sonoo M: Etiological consideration of 26 patients with dropped head syndrome. 21st World Congress of Neurology, Vienna, 9, 2013.

10) Hatanaka Y, Chiba T, Kuwabara M, et al. Diagnostic utility of repetitive nerve stimulation test of the trapezius muscle in amyotrophic lateral sclerosis, 66th annual meeting of American Academy of Neurology, Philadelphia, 2014 (予定).

11) 畑中裕己, 千葉隆司, 小川剛他:第55回日本神経学会総会, 福岡, 2014 (予定)

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし

神経変性疾患に関する調査研究
研究代表者 中野 今冶 東京都立神経病院

研究要旨

我々は、この3年間、神経変性疾患に関する臨床病理学的研究を行い、1) 孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の1例において、*SQSTM1* 遺伝子の複合ヘテロ変異及び特異な下位運動ニューロン病理が存在していたこと、2) 原発性側索硬化症(PLS)は上位運動ニューロン症状を初発・主症状とし、剖検時、下位運動ニューロンはほぼ保たれ、高度に上位運動ニューロンを侵すALSの病態に、FTLD-TDPとそれに酷似する生化学的所見を伴うユニークなTDP-43プロテインパチーであること、さらに3) 進行性核上性麻痺(PSP)の臨床病理は多様であり、PSP-PNLA (PSP-Pallido-nigro-luysian atrophy)では、歩行障害が強く、眼球運動障害が軽度であるなど、非典型的なPSP様の症候を呈し、比較的長期に経過し、病理組織学的にはPSPとは異なるアストロサイトのタウ病理を示すこと、を報告した。

研究分担者：高橋 均

所属機関名：新潟大学脳研究所病態神経科学病理学

A. 研究目的

神経変性疾患、とくに筋萎縮性硬化症、パーキンソン病、及びその類縁疾患の病態を臨床病理学的に調査、研究する。

B. 研究方法

多くの神経変性疾患剖検例を対象に、病理組織学的及び免疫組織化学的、さらに生化学的、分子生物学的手法を用いて、その診断学の確立や病態解明を指向する臨床病理学的研究を行う。

(倫理面への配慮)

剖検例については、研究教育目的での使用や遺伝子検索を含む多くの観点から、その病理学的検索に関するご遺族の同意を得て解剖がなされている。

C. 研究結果

1) 死亡時75歳男性。家族歴に特記事項なし。72歳時に両手の脱力を自覚、2ヶ月後に下肢の脱力が出現した。発症5ヵ月後、顔面・体幹・四肢の筋萎縮・筋力低下、筋線維束性収縮腱反射の低下を認め、ALSと診断。発症29ヶ月、痰の呼吸苦にて入院、延命治療は行わない方針となり、呼吸困難にて死亡(全経過30ヶ月)。病理学的には、下位運動ニューロン優位のALSで、その残存ニューロンの胞体にはプニナ小体、ユビキチン、FUS、あるいはSOD-1陽性構造物は認められず、p62陽性/pTDP-43陰性の不定形な封入体が認められた(Fig. 1)このような特異な下位運動ニューロン変性の存在から、*SQSTM1* 遺伝子を検索したところ、複合ヘテロ変異(p. [Val190Met]; [Val153Ile])が観察された。

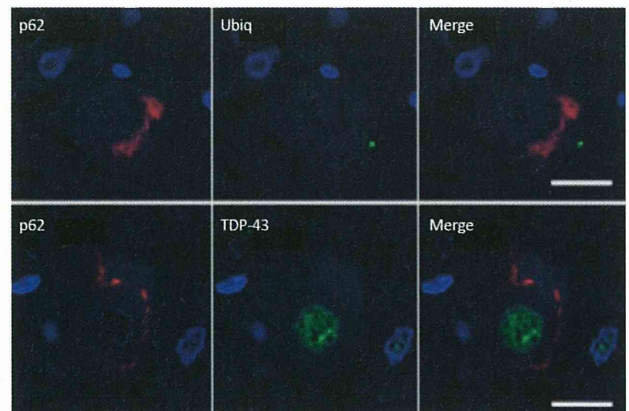


Fig. 1 舌下神経核神経細胞胞体内のp62陽性封入体はユビキチン陰性(上)、TDP-43陰性(下)である。核内の内在性TDP-43は保たれている(下)。

2) 筋萎縮性側索硬化症(ALS)は上位および下位運動ニューロン(UMN and LMN)を侵すもっとも知られた運動ニューロン疾患である。一方、原発性側索硬化症(PLS)は臨床的にUMNのみを侵す運動ニューロン疾患として定義されているが、病理学的には、ユビキチン免疫導入以来、UMNに加えLMNにも変性を認める例や大脳の萎縮(前頭側頭葉変性)が明らかな例などの報告がみられ、純粋な病理型としてのPLSの存在は否定的である。2006年、神経細胞内ユビキチン封入体を示す前頭側頭葉変性症(FTLD)およびALSに共通の病的タンパクとして新たにTDP-43が同定された。我々は、臨床病理学的にPLSの特徴を示した2剖検例(死亡時60歳、女性、全経過6年4ヶ月;同82歳、女性、全経過7年4ヶ月)について、病的TDP-43(pTDP-43)沈着の広がりとその程度(Fig. 2)、さらにその生化学的プロファイルについて解析した。その結果、PLSはUMN症状を初発・主症状とし、剖検時、LMNはほぼ保たれ、高度に

UMN を侵す ALS の病態に、FTLD-TDP とそれに酷似する生化学的所見を伴うユニークな TDP-43 プロテノパチーである可能性が示された。

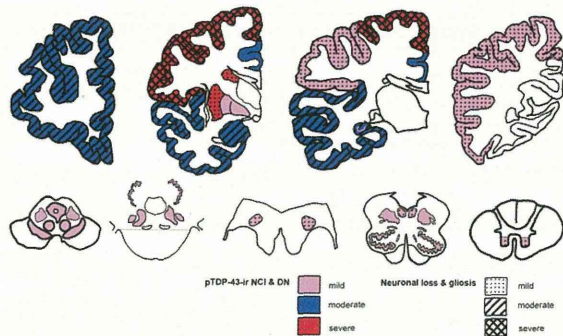


Fig. 2 pTDP-43 陽性封入体の分布と変性の程度

3) PSP-PNLA は 2008 年に Ahmed ら (Brain 131: 460-72, 2008) が報告した PSP 中のまれな一群で、本邦で古くから報告のある pallido-nigro-luysian atrophy (PNLA) と同一の疾患と考えられる。我々はこの疾患の 3 剖検例 (症例 1: 死亡時 81 歳、女性、全経過 24 年; 症例 2: 同 65 歳、男性、全経過 9 年; 症例 3: 同 86 歳、男性、全経過 4 年) を経験し、臨床病理学的、生化学的な検討を加えた。3 症例は、歩行障害が強い、眼球運動障害が軽度であるなど非典型的な PSP 様の症候を呈し比較的長期に経過、病理組織学的には axonal spheroid を伴う高度な変性を淡蒼球、視床下核、黒質に認めるが、タウ病理に乏しいという特徴があった。また、免染や銀染色で典型的な tuft-shaped astrocyte がみられず (Fig. 3)、PSP とはアストロサイトのタウ病理が異なると思われ、病理組織学的に本疾患を特徴付ける所見である可能性が示唆された。

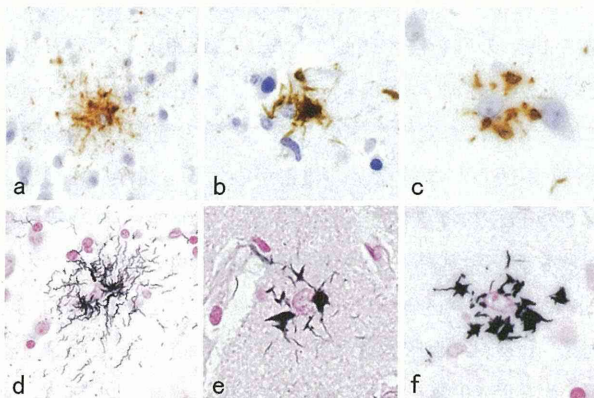


Fig. 3 PSP 症例 (a, d)、症例 2 (b, e)、症例 3 (c, f) のアストロサイトのタウ病理。症例 2, 3 は典型的な tufted

astrocyte (a, d) に比し突起が太くて短い。 a, b, c: AT8 免疫染色、d, e, f: Gallyas-Braak 染色

4) その他

加えて、我々は ALS では高頻度に 4-repeat タウオパチーのひとつである嗜銀顆粒性認知症病変が共存すること、遺伝性ポリグルタミン病である SCA2 では、ALS 類似の TDP-43 陽性封入体を広範に認めること、さらに ALS の大脳皮質における TDP-43 組織像の多様性について、臨床病理学的並びに生化学的に解析した。

D. 考察

1) 経過が比較的緩徐、かつ下位運動系の変性が優位の ALS である。p62 単独陽性構造の胞体内出現をはじめ、下位運動系の細胞病理所見は ALS として特異であると考えられた (Shimizu et al. Acta Neuropathol 126: 453-459, 2013)。発表後の今日、SQSTM1 遺伝子における Val190Met 及び Val153Ile の双方の変異を伴う例はこれまで報告がないが、各々の変異は極めてまれではあるが非 ALS の正常者においても認められることが知られている。今後、ALS 発症の原因 (ホモ)、あるいはその危険因子としての本遺伝子の可能性について、さらなる検討を行うこととしたい。

2) 2003 年、当教室では臨床的に PLS と診断された 1 剖検例 (上述の死亡時 82 歳、女性例) について報告した (Tan et al. Acta Neuropathol 105: 615-620, 2003)。非常に強い上位運動ニューロンの変性に加え、ごく少数ながら下位運動ニューロンに ALS の細胞病理学的指標とされるブニナ小体やユビキチン陽性、タウ、シヌクレイン陰性の封入体を認め、さらには大脳では FTLD-U の所見を併せ持った非常に興味深い症例だった。さらに 1 剖検例を加えた今回の検索から、PLS は UMN 症状を初発・主症状とし、剖検時、LMN はほぼ保たれ、高度に UMN を侵す ALS の病態に FTLD-TDP を伴う臨床病理学的並びに生化学的にユニークな TDP-43 プロテノパチーではないかと考えられた (Kosaka et al. Neuropathology 32: 373-384, 2012)。

3) PSP-PNLA は変性部位、アストロサイトのタウ病理ともに典型的な PSP とは異なる。サルコシル不溶分画の低分子量タウの Western blotting は PSP パターンを示したが、病理組織学的所見 (アストロサイトのタウ病理など) との詳細な対比によって、今後、4-repeat tauopathy が細分化されてゆく可能性が考えられたその後、検討症例を追加し、現在、英文論文の発表を準備中である。

4) その他

ALS における嗜銀顆粒性認知症の共存及びする遺伝性ポリグルタミン病である SCA2 における ALS 類似の TDP-43 陽性封入体を広範な出現については、既に発表の論文を参照されたい(Soma et al. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38: 54-60, 2012; Toyoshima et al. *Acta Neuropathol* 122: 375-378, 2011)。

ALS の大脳皮質における TDP-43 組織像の多様性に関する臨床病理学および生化学的解析については、Mackenzie らによって提案された FTLD-TDP 分類 (*Acta Neuropathol*, 2011)とは異なる、より詳細なリン酸化 TDP-43 病理に準拠した、臨床像との関わりをも示す「ALS からみた ALS のための病型分類」を完成させるべく、さらなる検討を行っているところである。

E. 結論

神経変性疾患の的確な診断、ひいては病態解明および治療法開発に資する臨床病理学的研究データの蓄積は、神経難病に苦しむ患者並びにその家族・介護者に報いる実地臨床の進歩、発展に必要不可欠なものである。

付記：これらの研究は、高橋 均を研究総括者として、相馬健一、豊島靖子、小阪崇幸、竹内亮子、清水 宏 (本研究所病理学分野) を中心に、所内外の多くの先生との共同で行われたものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

- (1) Toyoshima Y, Tanaka H, Shimohata M, et al. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is associated with TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* 122: 375-378, 2011
- (2) Orimo S, Uchihara T, Kanazawa T, et al. Unmyelinated axons are more vulnerable to degeneration than myelinated axons of the cardiac nerve in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37: 791-802, 2011
- (3) Soma K, Fu Y-J, Wakabayashi K, et al. Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.

Neuropathol Appl Neurobiol 38: 54-60, 2012

- (4) Kosaka T, Fu Y-J, Shiga A, et al. Primary lateral sclerosis: upper-motor-predominant amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal lobar degeneration - immunohistochemical and biochemical analyses of TDP-43. *Neuropathology* 32: 373-384, 2012
- (5) Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, et al. Alteration of *POLDIP3* splicing associated with loss of function of TDP-43 in tissues affected with ALS. *PLoS One* 7: e43120, 2012
- (6) Tada M, Coon EA, Osmand AP, et al. Coexistence of Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis: a clinicopathologic study. *Acta Neuropathol* 124: 749-760, 2012
- (7) Konno T, Shiga A, Tsujino A, et al. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84: 398-401, 2013
- (8) Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, et al. Transportin 1 accumulates in FUS inclusions in adult-onset ALS without *FUS* mutation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39: 580-584, 2013
- (9) Shimizu H, Toyoshima Y, Shiga A, et al. Sporadic ALS with compound heterozygous mutation in the *SQSTM1* gene. *Acta Neuropathol* 126: 453-459, 2013
- (10) Ishihara T, Ariizumi Y, Shiga A, et al. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 22: 4136-4147, 2013
- (11) Kimura T, Jiang H, Konno T, et al. Bunina bodies in motor and non-motor neurons revisited: a pathological study of an ALS patient after long-term survival on a respirator. *Neuropathology* (in press)

2. 学会発表

- (1) 相馬健一, 付 永娟, 若林孝一, ほか. 筋萎縮性側索硬化症における嗜銀顆粒性認知症の共存について. 第 52 回日本神経病理学会, 2011, 6, 4, 京都
- (2) 豊島靖子, 宮原弘明, 米持洋介, ほか. 高度な pallido-nigro-luysial atrophy を伴うモタウ病理

- に乏しい進行性核上性麻痺の二例. 第 52 回日本神経病理学会, 2011, 6, 3, 京都
- (3) 他田真理, 柿田明美, 志賀 篤, ほか. 上位運動ニューロンの組織変性が下位のそれに比し高度であった ALS 剖検例の検討. 第 53 回日本神経病理学会, 2012, 6, 30, 新潟
- (4) 清水 宏, 豊島靖子, 荒川恵子, ほか. 下位運動神経細胞に p62 陽性/TDP-43 陰性の胞体内封入体を認めた ALS の一例. 第 53 回日本神経病理学会, 2012, 6, 30, 新潟
- (5) 竹内亮子, 豊島靖子, 田中 一, ほか. 比較的長期に経過した ALS-FUS の一剖検例. 第 53 回日本神経病理学会, 2012, 6, 30, 新潟
- (6) Kosaka T, Fu YJ, Shiga A, *et al.* Primary lateral sclerosis: an immunohistochemical and biochemical study of pathological TDP-43 in two cases : The 8th International Conference on Frontotemporal Dementias, 5-7 September 2012, Manchester, UK
- (7) Takahashi H. Neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis - Discovery of TDP-43 and subsequent development. Seoul Neuropathology Forum - The Neuropathology Study Group of the Korean Society of Pathologists, 8 December 2012, Seoul, Korea
- (8) 竹内亮子, 志賀 篤, 他田真理, ほか. 筋萎縮性側索硬化症の大脳皮質における TDP-43 の組織学および生化学的解析. 第 54 回日本神経病理学会, 2013, 4, 25, 東京
- (9) 横山裕一, 豊島靖子, 志賀 篤, ほか. Pallido-nigro-luysian atrophy の一剖検例. 第 54 回日本神経病理学会, 2013, 4, 26, 東京
- (10) 木村正志, 瀬戸牧子, 岩永圭介, ほか. 多系統に変性をきたした孤発性 ALS の人工呼吸管理による長期生存例. 第 54 回日本神経病理学会, 2013, 4, 26, 東京

3. その他
なし

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

ALS TDP-43 proteinopathy FTLD

難治性疾患克服研究事業神経変性疾患に関する調査研究班
 研究分担者: 高橋 均
 所属機関名: 新潟大学脳研究所病態神経科学病理学分野

側頭葉のTDP-43組織像

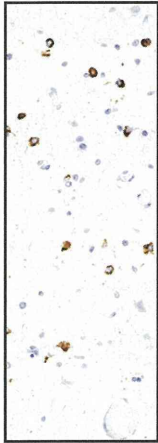
あり ↓ なし

変性神経突起(DN)

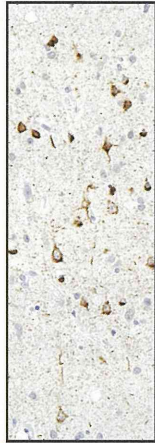
少 ↓ 多

ALSの大腦皮質における
TDP-43組織像の解析

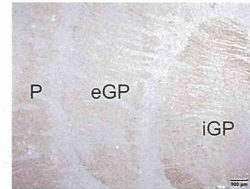
sparse DN群



abundant DN群



① レンズ核にDN多数



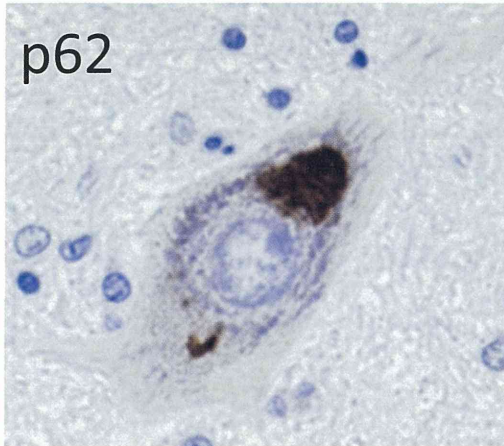
- ② 下位運動ニューロンの脱落が軽い
- ③ 生命予後が不良

神経細胞が残っているにも関わらず、症状進行

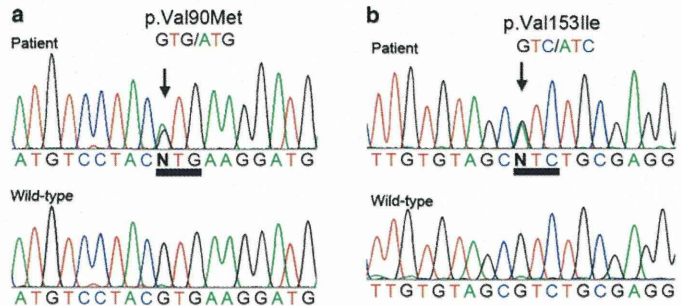
細胞死より前に機能不全が起きているのでは？

SQSTM1遺伝子に複合ヘテロ接合性変異を認めたALSの1剖検例

- ✓ 近年ALS患者に、p62蛋白質をコードするSQSTM1遺伝子に、ヘテロ接合性変異が見いだされたが、変異の病的意義は十分明らかにされていない。



難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する調査研究班
研究分担者: 高橋 均
所属機関名: 新潟大学脳研究所病態神経科学病理学分野



SQSTM1遺伝子の複合ヘテロ接合体であるALSの剖検例で、
下位運動神経細胞に、p62単独陽性の胞体内封入体が認められた。



P62陽性の特異な封入体は、
SQSTM1複合ヘテロ接合性変異の重要性を示唆している

神経変性疾患に関する調査研究
研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

1. *Optineurin (OPTN)* 遺伝子変異を伴う筋萎縮性側索硬化症 (OPTN-ALS) 患者 5 例の臨床所見と 2 例の神経病理所見を検討した。臨床的には中年発症で進行性の上位・下位運動ニューロン徴候に加えて手指変形が認められた。神経病理学的には、運動神経脱落に加えて劣性変異例では黒質・被殻・淡蒼球の変性が認められた。残存運動神経細胞の Golgi 装置は断片化し、神経細胞およびグリア細胞の細胞質内に TDP-43 陽性封入体が認められた。以上から OPTN-ALS は孤発性 ALS と共通の機序で発症している可能性が示唆された。
2. ALS のうち約 10% を占める家族性 ALS の主要な原因遺伝子である superoxide dismutase 1 (SOD1) は、変異 SOD1 蛋白が毒性を獲得することにより運動ニューロン変性を来す。我々は、SOD1 転写活性を抑制する低分子化合物を同定するためのハイスループット・アッセイ系を確立した。この系より見出された既存薬 X はマウスの脊髄内 SOD1 発現量を減少させ、腰髄神経前根及び前角細胞の変性を抑制し、生存日数を延長した。
3. 疫学研究から *glucocerebrosidase (GBA)* のヘテロ接合型変異がパーキンソン病 (PD) の強い危険因子であると報告された。我々は TILLING (targeted induced local lesions in genomes) 法にて GBA ナンセンス変異メダカを作製し解析を行なった。同変異ホモ接合型メダカは脳に α -synuclein の凝集体を形成し、その病態機序としてオートファジー・ライソソーム系の異常を考えた。

研究分担者：高橋 良輔

所属機関名：京都大学大学院医学研究科 臨床

神経学 神経内科

A. 研究目的

1. 本研究では *Optineurin (OPTN)* 変異を伴う ALS (OPTN-ALS) の臨床病理学的特徴を明らかにすることを目的とする。

2. 筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、上位及び下位運動ニューロンが選択的に変性する致死的な神経変性疾患である。ALS では進行性の筋力低下、麻痺を生じ、発症より 5 年以内に呼吸不全に至る。全 ALS の約 10% を占める家族性 ALS の内、約 25% は superoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子変異によるものである。

変異 SOD1 蛋白が獲得した神経毒性が増強することにより、ALS を発症すると考えられる。変異 SOD1 蛋白の発現レベルが、運動ニューロン疾患の進行や重篤度を規定することが種々の先行研究で示唆されている。従って SOD1 蛋白の発現を抑制することは SOD1 関連家族性 ALS に治療効果を有すると考えられる。そこで我々は、SOD1 の転写活性を抑制する化合物を同定するためハイスループット・スクリーニング (HTS) 系を確立したことを報告した。

本研究で我々は、既に臨床で使用されている既存薬 X が SOD1 の転写を抑制することを見出し、変異 SOD1 トランスジ

ェニックマウス由来アストロサイトでも SOD1 蛋白発現抑制作用を示した。さらに、主要な ALS モデルの一つである変異 SOD1 トランスジェニックマウスに投与することで、治療効果を有することを見出した。既存の分子標的薬を用いたことによって、治験までの過程を大幅に短縮できる可能性がある。

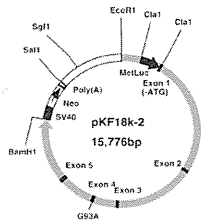
3. パーキンソン病 (PD) は運動障害を主徴とする進行性の神経変性疾患であり、病理学的には α -シヌクレイン (α -syn) の凝集体である Lewy body 形成を伴うドパミン神経細胞死を特徴とする。我が国の患者数は 15 万人以上であり、病態解明・治療法開発は急務である。最近、ライソソーム蓄積病であるゴーシェ病の病因遺伝子である *glucocerebrosidase (GBA)* のヘテロ接合型変異が、オッズ比約 28 倍の強力な孤発性 PD の危険因子となることが判明した。しかし GBA 変異が PD を引き起す機序は不明な点が多く、この解明が PD の病態解明と治療法開発に大きく寄与すると考え、我々はメダカをモデル動物とし解明を試みた。

B. 研究方法

1. ヘテロ接合 E478G *OPTN* 変異を伴う優性遺伝性 ALS 1 家系 3 姉妹 (次女・三女で遺伝子変異確定、次女を剖検、

三女は存命中) およびホモ接合 Q398X *OPTN* 変異を伴う劣性遺伝性 ALS 2 家系 2 例 (うち剖検 1 例) を臨床・神経病理学的に検討した。

2. (a) SOD1 プロモータ下にルシフェラーゼ・レポーターを発現する細胞株の作製



5' 及び 3' 非翻訳領域を含む、ヒト SOD1 のゲノム・プロモータを用いた。SOD1G93A トランスジェニックマウスのもと同じ (gPrSOD1-Luc) で、SOD1 プロモータの生理活性を反映する。H4 細胞株

は 37°C で、DMEM (10%FBS, penicillin/streptomycin, G418 加) 培養した。SgfI で切断、FuGENE 6 Transfection Reagent でトランスフェクションし、恒常的に発現する株をクローニングした。サザン・ブロッティング、ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイで選別した。

(b) 使用化合物ライブラリ

gPrSOD1-ルシフェラーゼ細胞株を用いた HTS アッセイを行い、京都大学化学研究所から供与された 9,600 化合物をスクリーニングした。

(c) HTS アッセイ

gPrSOD1-ルシフェラーゼ細胞株を種々の化合物で処理し 96 ウェルプレートでルシフェラーゼ活性を検出した。細胞は overnight 前培養後最終濃度 40 μ M で処理しさらに 16 時間培養した。Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter System で分泌ルシフェラーゼ活性を測定した。vehicle 処理群との比で信号の自然減衰を補正した。アッセイ精度は Z factor (Z') で評価した。化合物のヒット選別条件は、陰性対照の平均値-3SD を下回る場合とした。 Z' 値が 0 未満の試行は選別から外した。さらに 2 回アッセイを行った。

(d) 濃度依存性試験及び細胞毒性試験

細胞を overnight で前培養し化合物添加培地に交換し濃度を振った。さらに 16 時間培養しルシフェラーゼ活性を測定した。40 μ M で-3SD 以上の SOD1 発現抑制作用を有するもののみ解析した。

H4 細胞で WST-1 アッセイを行いルシフェラーゼ活性を非特異的に減弱させる化合物を除外した。overnight 前培養、化合物添加培地に交換し 0-40 μ M に濃度を振りさらに 16 時間培養し WST-1 を 10 μ L/well 加え 1 時間培養し 450nm 吸光度を測定した。40 μ M で蛍光が非治療細胞に比べ-2SD 以上減弱した場合有意な細胞毒性と判断した。

(e) ELISA アッセイ

ELISA とウェスタンブロッティングで内因性 SOD1 蛋白レベルを判定した。H4 細胞を overnight 前培養、ヒット化合物添加培地に交換し 48 時間培養し PBS 洗浄しプロテアーゼ阻害剤加 1% Triton-X 液で細胞溶解した。抗体を用いたサンドイッチ法によるヒト SOD1-ELISA を行った。EIA 用 96 ウェルアッセイプレートに rabbit anti-SOD1 antibody でコーティングした。4°C overnight 後、PBS 洗浄し 3%ウシ血清アルブミン(BSA)液でブロッキングした。細胞溶解液を加えた。overnight 4°C 後 PBS 洗浄し mouse anti-SOD1 antibody を加え 1 時間室温でインキュベート、PBS 洗浄後 HRP-goat anti-mouse IgG antibody で検出した。1 時間室温でインキュベートし基質を反応させた。1M リン酸 Na で反応停止後 450nm 吸光度変化比を測定した。細胞溶解液中の SOD1 濃度は検量線の 1.0-125 ng/mL 間の直線変化域で算出した。

細胞溶解液は SDS-PAGE を行い、PVDF membranes にトランスファーした。3% BSA 液でブロッキングし anti-SOD1 antibody でプローブ、次に anti- β -actin antibody で再プローブした。

(f) 定量的リアル・タイム RT-PCR

LightCycler SYBR green I を用いて、LightCycler 480 sequence detection system で行った。総 RNA の抽出は TriPure Isolation Reagent を用いた。標的 mRNA の相対量は β -actin の mRNA で補正した。

(g) ウェスタン・ブロッティング

プロテアーゼ阻害剤及びフォスファターゼ阻害剤加 1% Triton-X 液で細胞を溶解した SDS-PAGE、PVDF membranes にトランスファー、3% BSA 液でブロッキングした。anti-SOD1 antibody、次に anti- β -actin antibody でプローブした。

(h) NF- κ B 活性測定ルシフェラーゼ・アッセイ

H4 細胞を overnight 前培養し 48 時間後、FuGENE 6 Reagent で NF- κ B reporter plasmid ((Ig κ)3 conaluc plasmid) をトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は Drug X で処理して 4 時間後、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。

(i) 行動解析及び SOD1G93A マウスの発症と生存日数の観察

雄のヒト SOD1G93A 遺伝子トランスジェニックマウスを野生型の雌と交雑した。マウスに既存薬 X を経口ゾンデで投与した。投与期間は 26 週齢から 32 週齢の 6 週間投与した。マウスの生存を毎日評価し、週に 2 回体重測定及び ALS grading scale の評価を、薬剤投与グループとは異なる

る施行者が盲目的に行った。投与開始時の体重のピーク時を onset、10%の減少を認めた時点 Early disease と定義した。End-stage はマウスを側臥位にして 30 秒以内に体勢を直すことができなくなることを観察した時期と定義した。

(j) SOD1G93A マウス脊髄内 SOD1 発現の解析

マウスは腹腔内麻酔で麻酔し、脱血還流した。組織は 1% Triton-X 100 を含む溶解液でホモジェナイズした。5 μ g の脊髄から採取した蛋白を入れ、SDS-PAGE を行い、PVDF membranes にトランスファー、3% BSA 液でブロッキングした。

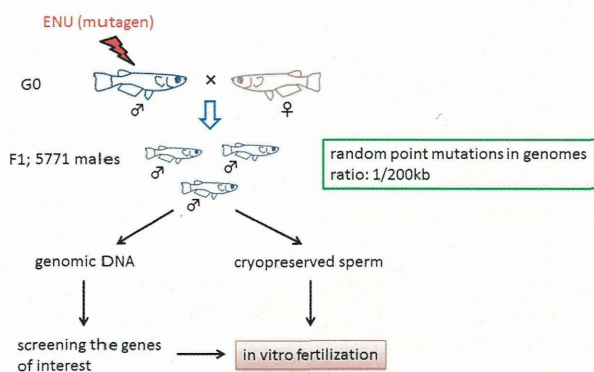
(k) 組織解析

マウスは PBS で還流した後、4% buffered paraformaldehyde で固定した。脊髄は同じ溶液で後固定した。腰髄膨大部を取り出し、パラフィン包埋、6 μ m の厚さで連続切片を作成した。

(m) 統計

定量解析は one way-ANOVA もしくは Students t-test で行った。生存分析は Long-rank test で行った。ソフトウェアは Prism 5 を使用した。

3. モデル動物としてメダカ近交系 Cab を用いた。TILLING (targeted induced local lesions in genomes) 法 (下図) にて GBA 変異メダカを作成し、その表現型を解析した。また、神経細胞特異的 Growth-associated protein 43 (GAP-43) プロモーター下に GBA を発現するトランスジェニックメダカを作製し、レスキュー実験を行った。



(倫理面への配慮)

剖検組織は剖検時に遺族から研究目的の使用に関する同意を得ており、匿名化して厳重に保管している。病理診断については、臨床病理検討会を開いて最終診断を確定し、主治医およびご遺族に報告している。

京都大学における動物実験の実施に関する規定に準じて対策・措置を講じた。

C. 研究結果

1. 5 例とも中年発症で進行性の上位・下位運動ニューロン徴候を主症状とし、知覚障害や小脳症状、自律神経症状などはみられず、典型的な ALS の臨床像を呈した。しかし 3 例 (優性 2 例、劣性 1 例) では進行が緩徐で、人工呼吸器を装着せずに 9 年以上生存している。また、これら 3 例では著明な手指変形が認められたが、単純レントゲンでは明らかな骨破壊像は認められず、ジストニアによる手指変形である可能性が示唆された。さらにこれら 3 例では頭部 CT/MRI にて側頭葉萎縮が認められ、うち優性変異 2 例では抑うつなどの精神症状が認められた。

優性変異例の神経病理所見は、固定後脳重 1,250 g で、外観上は明らかな異常は認められなかったが、断面では軽度の側頭葉内側萎縮がみられた。

光顕的には、脊髄錐体路は淡明化しており、脊髄前角細胞と脳幹の運動神経細胞は明らかに脱落していた。OPTN に対する免疫組織化学では、前角細胞の細胞質内に OPTN の蓄積が認められたが、明らかな封入体は形成していなかった。Golgi 装置に対する免疫染色では、残存運動神経の約 70% において Golgi 装置が断片化していた。さらに TDP-43 に対する免疫染色では、脊髄・脳幹運動ニューロンの細胞質内に円形・スケイン様封入体 (TDP-NCI) が認められたが、これらの封入体は、孤発性 ALS とは異なり OPTN 免疫反応性を欠いていた。

大脳では、運動皮質は比較的保たれていたが、残存 Betz 細胞の Golgi 装置は断片化していた。また、前頭・側頭葉には TDP-43 陽性グリア細胞質内封入体 (TDP-GCI) がわずかに認められたが、TDP-NCI は脊髄・脳幹以外にはみられなかった。一方、側頭葉内側の迂回回と扁桃体には嗜銀性顆粒がみられ、嗜銀顆粒性疾患の合併が疑われた。

劣性変異例の神経病理所見は、固定後脳重 840 g で、外観上、著明な中心前回 (運動皮質) 萎縮と、軽度の前頭・側頭葉萎縮が認められた。断面では被殻が褐色調を呈しており、側頭葉内側部は軽度萎縮していた。

光顕的には、脊髄錐体路は著明に淡明化しており、脊髄前角細胞も脱落していた。OPTN に対する免疫組織化学では有意な染色性は認められず、この症例では OPTN が欠損していることが示された。Golgi 装置に対する免疫染色では、ほぼすべての残存運動神経で断片化が認められた。TDP-43 免疫染色では、優性変異例と同様の TDP-NCI が脊髄前角細胞・脳幹運動神経の細胞質に認められた。

大脳では、運動皮質と被殻は高度に変性し、著明な gliosis と microglia の浸潤が認められ、淡蒼球・黒質

にも神経細胞脱落がみられた。さらに、TDP-NCI, TDP-GCI が前頭・側頭葉をはじめ、海馬、尾状核・淡蒼球・視床・黒質・青斑核・橋核・下オリーブ核などに広範に認められた。また、本症例でも側頭葉内側の迂回回と扁桃体に嗜銀性顆粒がみられた。



図1 優性症例の臨床神経病理所見

左上：三女にみられた手指変形。

右上：錐体路（矢印）と脊髄前角（矢じり）に変性が認められる。

左下：Golgi 装置に対する免疫染色。Golgi 装置が断片化した前角細胞（矢印）と、保たれた前角細胞（矢じり）が認められる。

右下：脊髄前角細胞の TDP-43 免疫染色。スケイン様細胞質内封入体（矢印）を認める。

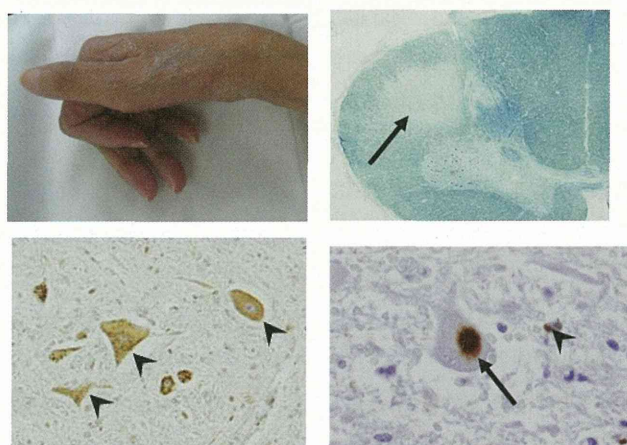


図2 劣性症例の臨床神経病理所見

左上：手指変形。

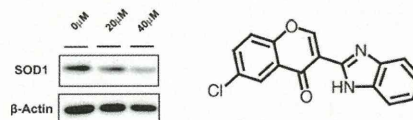
右上：錐体路（矢印）と脊髄前角変性を認める。

左下：Golgi 装置に対する免疫染色。すべての前角細胞で Golgi 装置が断片化している（矢じり）。

右下：脊髄前角の TDP-43 免疫染色。円形細胞質内封入体（矢印）とグリア細胞質内封入体（矢じり）を認める。

2. (a) HTS アッセイ

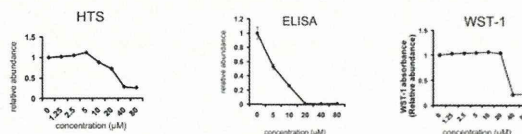
ルシフェラーゼ活性とサザン・ブロッティングの結果より、gPrSOD1-Luc を恒常的に発現するクローンを選別しスクリーニングに使用した。Z' 値の平均値は 0.39 (range, -0.04-0.75) であった。SOD1 の転写を有意に抑制しうるヒット化合物を 120 種類同定した。濃度依存性反応の乏しい化合物は除外した。WST-1 アッセイにより非特異的細胞毒性を有すると考え除外した化合物は 5 種類あった。ELISA にて、残り 115 化合物の内、2 種類が内因性 SOD1 蛋白レベルを濃度依存的に低下させた。ELISA で有意な SOD1 蛋白レベルの低下を認めない化合物は採用しなかった。レポーター・アッセイ及び ELISA で SOD1 の発現抑制効果を解析した。2 化合物の内、EC50 が良好な 1 化合物 052C9 (下右図) をウェスタン・ブロッティングにてさらに検証した。H4 細胞において、 β -アクチンの発現を低下させることなく、内因性 SOD1 蛋白レベルを有意に低下させた (下左図)。



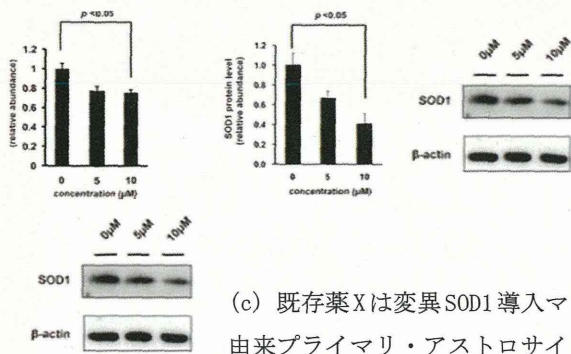
(b) 既存薬 X は H4 細胞の SOD1 転写を抑制する

他の 2 化合物が共通の特徴的な化学構造を有し、同様の構造を持つ既存薬 X も SOD1 プロモータ活性を抑制するか検討した。既存薬 X は SOD1 プロモータ活性を低下させた (下左図)。

ELISA の結果、既存薬 X は細胞毒性を認める濃度より低濃度で内因性 SOD1 蛋白発現レベルを H4 細胞において低下させた (下右図)。

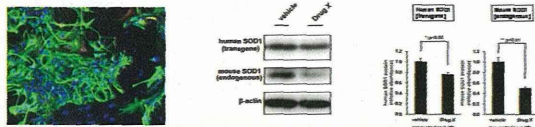


次に定量的リアル・タイム RT-PCR 及びウェスタン・ブロッティングによる解析、既存薬 X が SOD1 の蛋白レベル (下右中図)、mRNA レベル (下左図) でも発現を低下することを認めた。

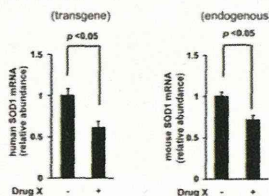


(c) 既存薬 X は変異 SOD1 導入マウス由来プライマリ・アストロサイトの SOD1 発現も低下させる

我々は変異 SOD1 導入マウスからプライマリ・アストロサイトを採取し(下左図)既存薬 X が SOD1 発現を抑制することを認めた(下右図)。

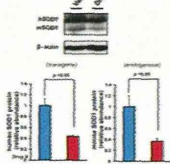


(d) 既存薬 X は SOD1G93A 導入マウスの脊髄内 SOD1 発現を低下させる



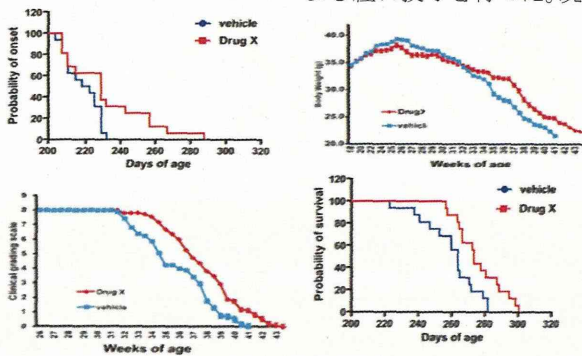
SOD1G93A マウスに 4 週間既存薬 X を経口投与した。既存薬 X はマウス脊

髄内 SOD1 の mRNA レベルは有意に低下していた(下左中図)。既存薬 X をより長期間経口投与(6 週間)し蛋白レベルも有意に減少させた(下右図)。



(e) 既存薬 X は SOD1G93A トランスジェニックマウスに投与すると ALS 症状を改善する

SOD1G93A 低コピーマウスに 26 週齢(マウスの体重増加がほぼ完了=発症)より既存薬 X (30mg/kg)を毎日ゾンデによる経口投与を行った。既存



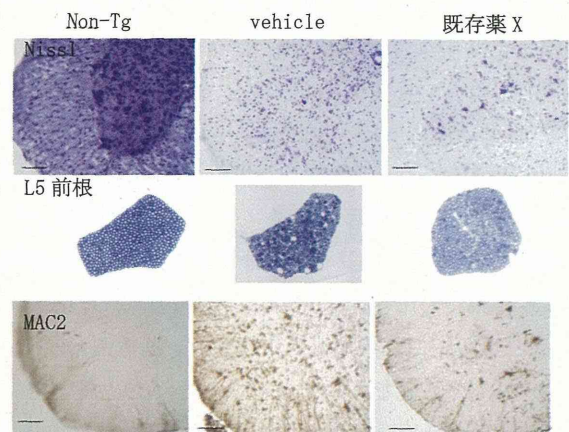
薬治療群マウス(n=16)及び vehicle 投与群マウス(n=16)をモニターし毎日生存の有無を確認し1週間に2回体重と ALS 症状スコアを観察した。既存薬 X 治療群は有意に ALS

症状スコアの悪化を遅延し(下左図)体重減少も遅延した(下右図)。

SOD1 マウスの Early disease までの期間を 14 日間延長した(既存薬 X 治療群, 233 ± 6 days, vehicle 治療群 219 ± 2 days; log rank, $\chi^2=5.0$, $P<0.05$) (下左図)。さらに既存薬 X は SOD1 マウスの生存日数を 16 日間延長した(既存薬 X 治療群, 276 ± 3 days, vehicle 治療群, 260 ± 4 days; log rank, $\chi^2=7.1$, $P<0.01$) (下右図)。

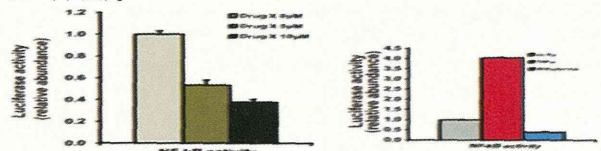
(e) 既存薬 X は運動ニューロン変性を抑制する

腰髄 L5 神経根のトルイジン・ブルー染色及び腰髄膨大部の Nissl 染色にて脊髄前角細胞の変性を抑制することを観察した(下図)。



(f) 既存薬 X は神経炎症、NF- κ B を抑制する

既存薬 X は MAC2 陽性活性化型ミクログリアの増生を抑制した(上図)。NF- κ B は神経炎症の主要な転写因子で SOD1 転写調節因子の一つでもある。NF- κ B レポーターアッセイ((Ig κ)3 conaluc)で既存薬 X が NF- κ B の活性を低下した(下図)。



3. TILLING ライブラリーをスクリーニングすることにより、メダカ GBA (全 522 アミノ酸) のうち 337 番目のアミノ酸がストップコドンに変異したナンセンス変異体が見つかり、人工授精にて同変異体を作製した。同変異ホモ接合体(GBA^{-/-})の脳の glucocerebrosidase(GCase)酵素活性は完全に欠損していた(図 1)。GBA^{-/-}は月単位で生存し、受精後 2 か月で行動異常を示し、5 か月までに死亡した

(図1)。3か月の時点で脳を用いて GBA の基質である glucocerebroside の定量解析を行ったところ、GBA^{-/-}で著明に蓄積していたのに対し、異性体である galactocerebroside には変化を認めなかった。3か月の時点での病理学的解析では、著明なミクログリアの増生を認め、細胞死を散見した。同時点でドパミン、ノルアドレナリン、セロトニン神経細胞を数えたが、これら全てにおいて神経細胞脱落を認め、非特異的な神経細胞死を起していると考えた。

我々はメダカ α -syn に対する特異性の高い抗体の作出に成功した。同抗体を用いた免疫組織染色では α -syn の凝集体を散見した (図2)。透過型電子顕微鏡による観察で、多数のオートファゴソームの蓄積を伴う軸索の腫脹 (スフェロイド) を認め、メダカ α -syn 抗体による免疫電顕にて同部位に α -syn の蓄積を認めた (図2)。このスフェロイドは LC3 抗体による染色でも強陽性部位として確認され、蛍光二重染色で α -syn と共局在することが確認できた。さらに、免疫組織染色による解析で、オートファジーの基質である p62 陽性の凝集体を認め、Cathepsin D 抗体による染色性の低下とライソソーム形態異常を認めた (図3)。このライソソーム形態異常は透過型電子顕微鏡による観察でも確認され、内部に繊維状構造物の蓄積を認めた (図4)。この繊維状構造物はヒト剖検例との類似性から、GBA の基質である glucocerebroside の蓄積をみているものと考えた。なお蛍光二重染色では、LC3 抗体で強陽性となるスフェロイドと p62 陽性凝集体は共局在しなかった。ユビキチンと p62 は共局在した。

最後に、神経細胞特異的 GAP-43 promoter による GBA 発現トランスジェニックラインとの掛け合わせによるレスキュー実験を行ったところ、GBA^{-/-}で観察された行動異常と病理学的異常は改善し、これら異常が GBA 変異由来であることが確認できた。

Medaka_GBA 522 aa
 DNA sequence ...GCCGTCCACTG(G>A)TACATGGAC...
 Amino acid 334... A V H W>stop Y M D ...340

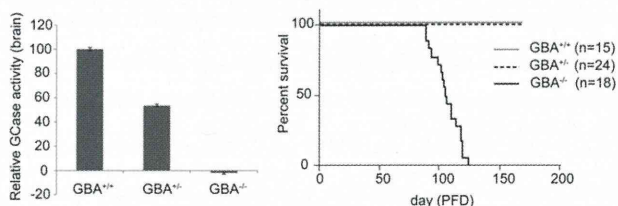


図1
 上: TILLING ライブラリーから見つかった GBA ナンセンス変異。
 下: 3か月の脳 GCase 酵素活性測定結果。
 右下: 生存曲線。

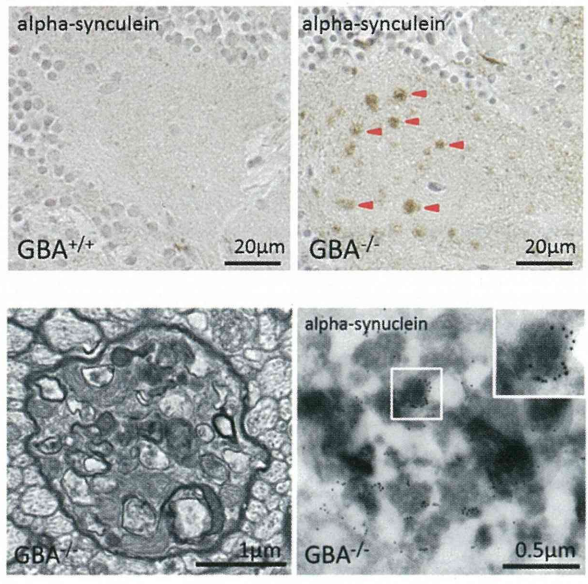


図2
 上: 3か月の α -syn 免疫染色。GBA^{-/-}において α -syn 陽性の凝集体を認めた。
 左下: 透過型電子顕微鏡像。軸索の腫脹 (スフェロイド) と、その内部にオートファゴソームの蓄積を認めた。
 右下: メダカ α -syn 抗体による免疫電顕。スフェロイド内に α -syn の蓄積を認めた。

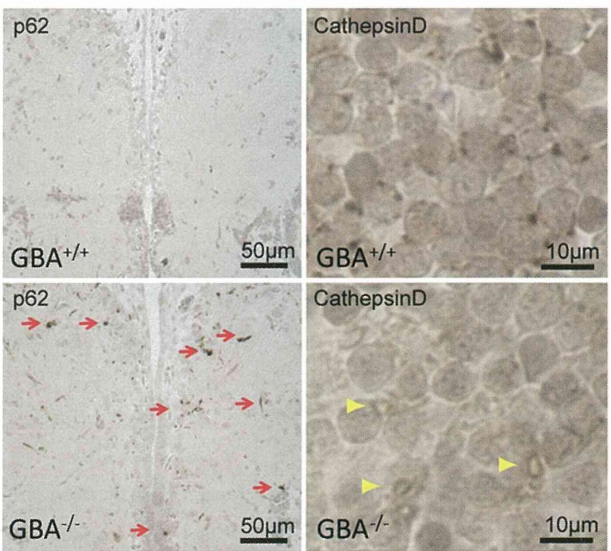


図3
 左: 3か月の p62 免疫染色。GBA^{-/-}において p62 陽性の凝集体を認めた。
 右: Cathepsin D 免疫染色。GBA^{-/-}において染色性の低下とライソソーム形態異常を認めた。