

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591269

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の持続性ナトリウムチャネル障害と神経細胞死に関する生理学的研究

研究課題名(英文)Relation between motor neuronal cell death and persistent sodium current disturbance in ALS

研究代表者

金井 数明(Kanai, Kazuaki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10375751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症や球脊髄性筋萎縮症などの運動ニューロン疾患における運動神経軸索興奮特性の変化などについて、患者における研究なども継続的に行い報告し、またその成果の一部を論文の形で公表した。

筋萎縮性側索硬化症における軸索神経軸索興奮特性の変化の疾患予後に対する影響について解析を行い、特に持続性Na⁺電流が筋萎縮性側索硬化症の強力な予後因子であることを明らかにした。その成果を第53回日本神経学会総会において発表し、論文の形でJournal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry誌において公表した。

研究成果の概要(英文)：We studied the changes of motor nerve axonal excitability properties in motor neuron diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), and we reported the results of the studies as the published articles.

We analyzed the effects of the changes of motor nerve axonal excitability properties in ALS on the disease prognosis, and we found that motor axonal excitability properties were strong predictors for survival in amyotrophic lateral sclerosis: especially, we clarified that axonal persistent sodium currents, estimated by SDTC and latent addition, are strong and independent predictors for shorter survival in patients with ALS. We reported the results as the published article in Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry (J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012;83:734-8.).

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 チャネロパチー 神経軸索興奮特性 ナトリウムチャネル 神経変性

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 等の慢性進行性の運動ニューロン変性疾患では線維束性収縮などの運動単位の自発発射による症状が高頻度に認められ、軸索の興奮性が増大していることが推定されている。この過剰な神経興奮性は運動ニューロンの細胞死とも関連していると考えられる。これらの興奮性変化はALSの運動神経における代謝的な変化(変性の進行によるATP欠乏など)やイオンチャンネルの機能・発現などの変化を反映していると考えられる。イオンチャンネルは様々な神経疾患の分子病態において、遺伝子変異によるものやあるいは発現量や部位の変化など様々な形で関与していることが判明しており、チャンネルパッチという概念が提唱されており注目されている。我々はこれまでイオンチャンネルの各種神経疾患の病態に果たす役割を、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)・下位運動ニューロン疾患などの神経変性疾患で明らかにしており、特にALSに関しては、ALS患者の運動神経軸索における K^+ 電流の低下や持続性 Na^+ 電流の増大を確認し、その臨床病期との関連を報告している (Brain 2006)。この他最近、我々はALSでは同一個人内でも正中神経支配筋の方が尺骨神経支配筋より変性が速く進行するというsplit hand現象があることを見出し (Muscle Nerve 2008)、その生理学的基盤として正中神経の神経興奮性が尺骨神経よりも高いこと、すなわち、持続性 Na^+ 電流の増大と K^+ 電流の低下の所見が正中神経でより目立つことを報告している (Muscle Nerve 2009)。このsplit hand現象は、個人内では遺伝的背景は同一であるにも関わらず神経間で神経変性の進行に差が生じることになるため、その病態生理の解明は新規治療の開発につながる可能性がある。

我々は K^+ 電流の低下や持続性 Na^+ 電流の増大による軸索興奮特性の変化が、Split hand現象のような個々の神経変性の進行速度に影響を及ぼすだけでなく、ALSそのものの病勢進行にも影響を与えるのではないかという仮説を立て、これを検証するために当院におけるALS患者の予後研究を行った。この研究は千葉大倫理委員会で審査され、承認されている。この疫学研究の結果、各種軸索興奮特性の変化は予後に有意な影響を及ぼす可能性が示唆された。

ALSにおけるイオンチャンネル機能変化やそれに伴う K^+ 電流の低下・持続性 Na^+ 電流の増大が運動ニューロン変性にどのように関与しているのか、その詳細は不明である。しかしながら、これを説明し得るALSの病態仮説の1つとして、ミトコンドリア機能異常とそれに伴うエネルギー代謝異常などが考えられる。その中で、ALS患者運動神経で認められた K^+ 電流の低下や持続性 Na^+ 電流の増大による過剰興奮性が、不適切かつ過剰な運動神経細胞の発火を誘発し、その結果ATP

の過剰消費を招きさらにエネルギー代謝を悪化させる、という可能性があるため、ALS患者運動神経で認められる過剰興奮性は注目すべきと考えられる。また実際、近年てんかんや脳梗塞などの領域で K^+ チャンネルや Na^+ チャンネルのmodulatorが神経保護薬として応用できる可能性が示唆されているが、ALSに対する現時点で唯一のエビデンスのある治療薬であるriluzoleは、グルタミン酸系に対する作用のほか、持続性 Na^+ 電流の抑制作用を持つことが知られている。またALSモデルマウス(SOD1 G93A)から得た培養運動ニューロンで持続性 Na^+ 電流の著明な亢進が認められ、細胞の神経変性との関与が指摘されている (Kuo et al., 2005)。

持続性 Na^+ 電流の抑制は新規治療薬の新たな作用点となる可能性があると考えられる。具体的には、持続性 Na^+ 電流の抑制作用を持つ薬剤は、単剤あるいはriluzoleなど既存薬との併用により、運動ニューロンの細胞死を抑制しALSの予後を改善する可能性があるため注目すべきと考えられる。

2. 研究の目的

今回我々は、これまでのALS患者の運動神経軸索興奮性変化で得られた研究成果から、ALS患者で認められた持続性 Na^+ 電流の変化に注目し、これらがALS運動神経軸索における過剰興奮性を生み出し神経変性や進行期における神経生存と関連する可能性を考えた。またこれと同時に他のイオン電流、特に K^+ 電流の変化にも着目し、これらの変化と神経変性との関連について解析を行った。

3. 研究の方法

1) 筋萎縮性側索硬化症における軸索神経軸索興奮特性の変化の疾患予後に対する影響についての研究
千葉大倫理委員会で審査され、承認を受けたうえで、ALS患者における軸索神経軸索興奮特性の変化が疾患予後にどのような影響を及ぼすかを、ALS患者112名に対して調査した。

2) 筋萎縮性側索硬化症患者におけるイオンチャンネル発現変化についての病理学的検討
これまでALSでは運動神経で電位依存性 K^+ チャンネルの発現低下が生じていることがmRNAレベルでは示唆されていたが、実際の蛋白質発現がどうなっているかについては不明であった。千葉大倫理委員会で審査され、承認を受けたうえで、5名のALS患者の病理検体において運動神経前根及び後根に対してナトリウムチャンネル及びカリウムチャンネルの免疫染色を行い、その発現についての検討を行った。

3) 筋萎縮性側索硬化症モデル動物における症状と興奮特性の関連に関する検討
TDP-43過剰発現力ニクイザルモデルにおいて、臨床症状の推移と電気生理学的検査(神

経伝導検査や針筋電図) 所見との関連を検討し、合わせて神経興奮特性変化との関連を検討した。

4) 運動ニューロン疾患患者における神経変性と神経興奮特性変化との関連に関する研究

我々はこれまで ALS では小指外転筋 (-尺骨神経支配) よりも短母指外転筋 (-正中神経支配) の方が萎縮が速く進行するという “split hand syndrome” 現象を報告しており、正中神経と尺骨神経の興奮特性の差がこれに影響を与えている可能性が指摘されている。これに関連し、ALS 患者における正中神経と尺骨神経の興奮特性の差を ALS 患者 21 名にて評価し、対照 17 名と比較した。

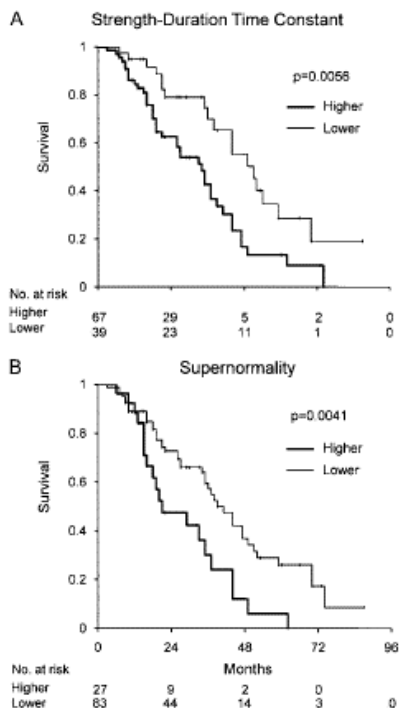
5) 運動ニューロン疾患とその関連疾患における臨床遺伝学的研究

家族性筋萎縮側索硬化症の新規責任遺伝子である C9orf72 についての本邦での患者の臨床像について他機関と共同研究を行った。また上位運動ニューロン障害を呈することがあることが知られる多系統萎縮症における遺伝学的研究を多施設共同研究で行った。

6) 神経軸索興奮性特性における基礎研究
上記のごとく、神経間の興奮性の差が臨床症状につながる可能性が最近示唆されている。これに関連して、感覚神経でも同様な神経興奮特性の差異がある可能性を考え、正中神経と橈骨神経間の神経興奮特性の差異について報告を行った。

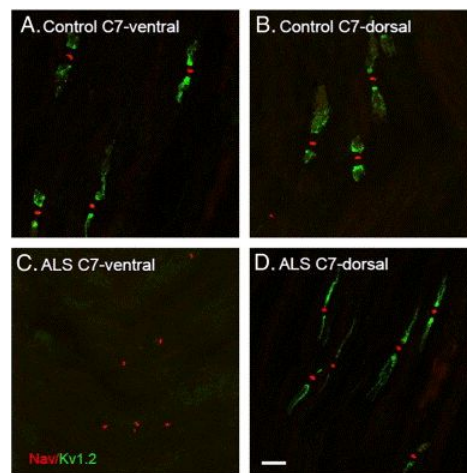
4. 研究成果

1) 筋萎縮性側索硬化症における軸索神経軸索興奮特性の変化の疾患予後に対する影響についての研究



筋萎縮性側索硬化症において、正中神経の運動神経軸索興奮性の指標のうち、持続性 Na⁺電流の指標である Strength-Duration time constant (SDTC) や Latent Addition 法における 0.2ms threshold change といった指標や、あるいは K⁺電流の指標である recovery cycle法における supernormalityなどが疾患の予後に有意な影響を及ぼし、特に SDTC はこれまで既知の ALS の予後因子とは独立であり、かつ非常に強力な予後因子として働くことを見出した。このことは、ALS の疾患予後予測を 1 回の生理学的評価だけで可能にする可能性が示され、病態生理解明のみならず、患者への臨床情報の提供や今後の臨床治験の設定などの際にも有用となる情報が得られる可能性が示された。

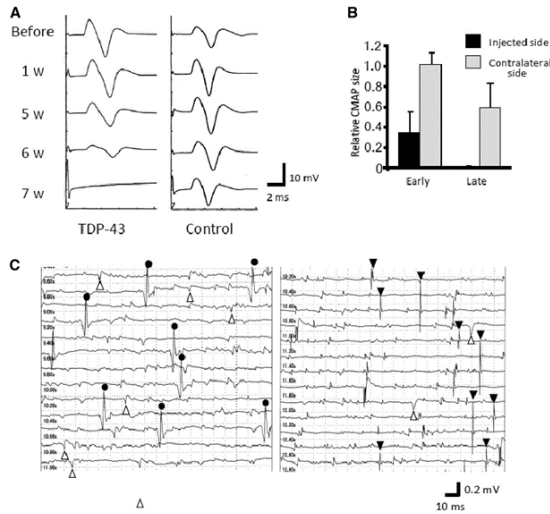
2) 筋萎縮性側索硬化症患者におけるイオンチャンネル発現変化についての病理学的検討



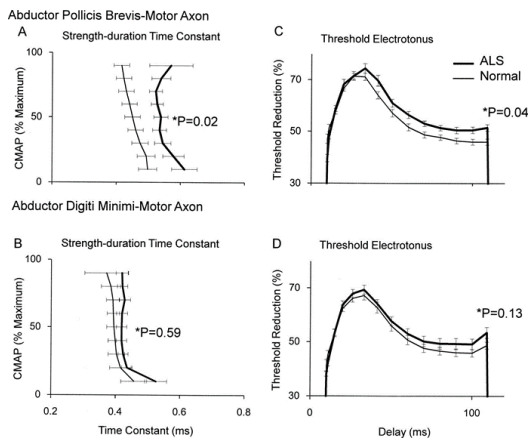
これまで ALS では運動神経で電位依存性 K⁺チャンネルの発現低下が生じていることが mRNA レベルでは視されていたが、実際の蛋白質発現がどうなっているかについては不明であった。今回我々は ALS 患者の前根において、電位依存性 K⁺チャンネルの発現が実際に低下しており、それは後根では生じていないことを確認した。Na⁺チャンネルについては増加は確認できなかった。このため、ALS における運動神経軸索における K⁺チャンネルの発現低下やそれに伴う機能低下を抑制することが疾患の新しい治療点となり得る可能性が改めて示された。

3) 筋萎縮性側索硬化症モデル動物における症状と興奮特性の関連に関する検討

カニクイザルに対して TDP-43 を発現するウイルスベクターを脊髄前角に注射することにより、ALS 患者で認められる筋萎縮や筋力低下が再現されることを見出した。その際に電気生理学的評価を行ったところ、実際の ALS 患者で認められるのと同様な線維束攣縮が頻発していることを見出し、本モデルの特徴であると考えた。



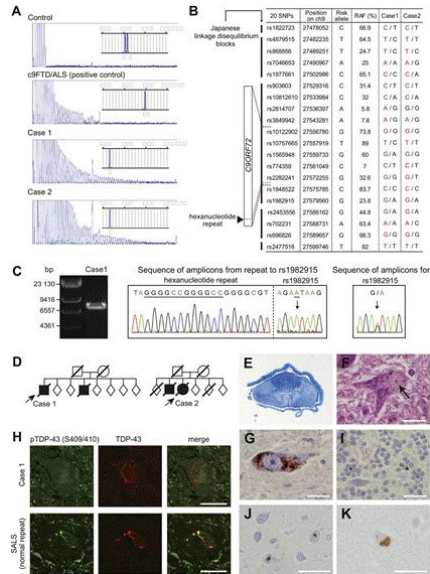
4) 運動ニューロン疾患患者における神経変性と神経興奮特性変化との関連に関する研究



神経興奮性は尺骨神経に比べ正中神経で高く、ALS 患者においては神経興奮特性の変化は尺骨神経よりも正中神経で目立つことが示された。すなわち、正中神経では尺骨神経と比較し、1) K^+ 電流の低下、および 2) 持続性 Na^+ 電流の増大の所見がより目立つことが示された。

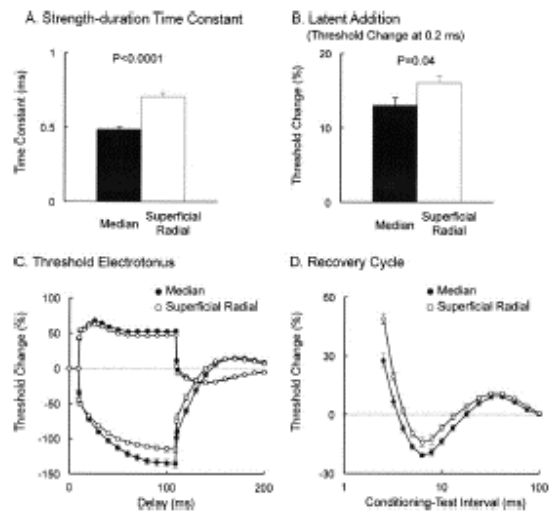
これらの変化はいずれも神経の興奮性増大につながる所見であり、このような神経の過剰興奮性が正中神経と尺骨神経の変性速度の差異につながっている可能性が示唆された。もしこのような興奮性の差異が神経変性の速度の差につながるのであれば、それらの補正は神経変性の抑制につながる可能性があり、今後の治療法開発に重要な示唆を与えるものと考えられる。

5) 運動ニューロン疾患とその関連疾患における臨床遺伝学的研究
 家族性筋萎縮側索硬化症の新規責任遺伝子である C9orf72 についての本邦での患者の臨床像について他機関と共同研究を行ないこれを報告した。



また錐体路徴候も臨床的特徴の1つである多系統萎縮症における遺伝学的研究を多施設共同研究で行ない、新規疾患感受性遺伝子として COQ2 の遺伝子変異を報告した。

6) 神経軸索興奮特性における基礎研究
 これまで運動神経で報告されているような神経間での興奮特性の差異が感覚神経でもある可能性を考え、正中神経と橈骨神経間の神経興奮特性の差異について研究を行った。



その結果、正中神経感覚神経軸索では橈骨神経のものに比べ過分極傾向にある可能性が示され、手掌の無毛部では有毛部に比べより感覚神経が高頻度に発火し、 $Na^+ - K^+$ ATPase がより活動している可能性が示された。このような神経軸索興奮特性の神経間の差異が普遍的にある可能性が示され、運動ニューロン疾患を含む神経疾患の将来の治療に対して新しい知見を加えるものと考えられた。

5. 主な発表論文等
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
 [雑誌論文](計 9 件)
 1. Shibuya K, Misawa S, Arai K, Nakata M, Kanai K, Yoshiyama Y, Ito K, Ise S,

- Noto Y, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Ohmori S, Kitamura H, Sato Y, Kuwabara S. Markedly reduced axonal potassium channel expression in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *Exp Neurol*. 2011; 232: 149-53.
2. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ohkubo T, Ono F, Sakaue F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Yamamoto M, Yokota S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Kumagai J, Yasutomi Y, Mochizuki H, Kuwabara S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain*. 2012; 135: 833-46.
 3. Noto Y, Misawa S, Kanai K, Shibuya K, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Nakagawa M, Kuwabara S. Awaji ALS criteria increase the diagnostic sensitivity in patients with bulbar onset. *Clin Neurophysiol*. 2012; 123: 382-5.
 4. Fujimaki Y, Kanai K, Misawa S, Shibuya K, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Ohmori S, Noto Y, Kugio Y, Shimizu T, Matsubara S, Lin CS, Kuwabara S. Differences in excitability between median and superficial radial sensory axons. *Clin Neurophysiol*. 2012; 123: 1440-5.
 5. Kanai K, Shibuya K, Sato Y, Misawa S, Nasu S, Sekiguchi Y, Mitsuma S, Iose S, Fujimaki Y, Ohmori S, Koga S, Kuwabara S. Motor axonal excitability properties are strong predictors for survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012; 83: 734-8.
 6. Noto Y, Misawa S, Mori M, Kawaguchi N, Kanai K, Shibuya K, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Beppu M, Ohmori S, Nakagawa M, Kuwabara S. Prominent fatigue in spinal muscular atrophy and spinal and bulbar muscular atrophy: evidence of activity-dependent conduction block. *Clin Neurophysiol*. 2013; 124: 1893-8.
 7. Shibuya K, Misawa S, Nasu S, Sekiguchi Y, Mitsuma S, Beppu M, Ohmori S, Iwai Y, Ito S, Kanai K, Sato Y, Kuwabara S. Split hand syndrome in amyotrophic lateral sclerosis: different excitability changes in the thenar and hypothenar motor axons. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84: 969-72.
 8. Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84: 398-401.
 9. Multiple-System Atrophy Research Collaboration: Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee VM, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Ozelius L, Foroud T, Tsuji S. Mutations in C9orf72 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med*. 2013; 369: 233-44.
- [学会発表](計 8 件:うち招待講演 2 件)
1. 金井 数明. ALSにおける末梢運動ニューロン軸索興奮性と臨床的意義(シンポジウム). 第41回日本臨床神経生理学会学会学術大会. 2011年11月11日, 静岡
 2. 金井 数明ら. 筋萎縮性側索硬化症の予後予測におけるlatent addition法の有用性. 第41回日本臨床神経生理学会学術大会. 2010年11月12日, 静岡
 3. 金井 数明, 藤巻 由美, 能登 祐一, 山本 達也, 三澤 園子, 桑原 聡. 長期LH-RHアナログ療法は球脊髄性筋萎縮症の運動神経軸索膜興奮特性異常を改善する. 第53回日本神経学会学術大会. 2012年05月22日~2012年05月25日, 東京
 4. 金井 数明. 軸索興奮特性測定の臨床への貢献(シンポジウム). 第53回日本神経学会学術大会. 2012年05月22日~2012年05月25日, 東京
 5. 金井数明, 藤巻 由美, 能登 祐一, 山本 達也, 鶴沢 顕之, 三澤 園子, 服部 信孝, 桑原 聡. 球脊髄性筋萎縮症に対する長期LH-RHアナログ療法における持続性Na⁺コンダクタンス増大の精密評価. 第42回日本臨床神経生理学会学術大会. 2012年11月08日~2012年11月10日, 東京

6. 金井 数明、横田 隆徳、澁谷 和幹、叶内 匡、大山 彦光、下 泰司、藤巻 基紀、鏡原 康裕、服部 信孝、桑原 聡。軸索持続性 Na⁺ 電流は筋萎縮性側索硬化症の症状進展速度の規定因子である。第 54 回日本神経学会学術大会。2013 年 05 月 29 日 ~ 2013 年 06 月 01 日, 東京
7. 金井 数明、横田 隆徳、澁谷 和幹、叶内 匡、大山 彦光、下 泰司、藤巻 基紀、三笠 道太、鏡原 康裕、服部 信孝、桑原 聡。筋萎縮性側索硬化症の症状進展速度予測における latent addition 法の有用性。第 43 回日本臨床神経生理学会学術大会。2013 年 11 月 07 日 ~ 2013 年 11 月 09 日, 東京
8. Kanai K, Yokota T, Shibuya K, Kanouchi T, Iwai Y, Misawa S, Oyama G, Shimo Y, Fujimaki M, Kagamihara Y, Shimizu T, Hattori N, Kuwabara S. The effects of motor axonal potassium currents on the disease progression of amyotrophic lateral sclerosis. 30th International Congress of Clinical Neurophysiology (ICCN) of the IFCN. 2014 年 3 月 19 日 ~ 2014 年 3 月 23 日, Berlin

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 数明 (Kazuaki Kanai)

順天堂大学・医学部脳神経内科・准教授

研究者番号：10375751

(2) 研究分担者

桑原 聡 (Satoshi Kuwabara)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70282481