

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591175
 研究課題名（和文） 小児期発症神経変性疾患での酸化ストレスの解明と抗酸化療法の開発
 研究課題名（英文） Oxidative stress in child-onset neurodegenerative disorders.

研究代表者
 田沼 直之（TANUMA NAOYUKI）
 東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
 研究者番号：00281676

研究成果の概要：小児期発症神経変性疾患の神経変性に酸化ストレスが関与していることを明らかにするために、ELISA 法による生体試料（尿、髄液）中の酸化ストレスマーカー測定と剖検脳を用いた神経病理学的解析を行った。その結果、Lafora 病、歯状核赤核淡蒼球レイ体萎縮症 DRPLA、色素性乾皮症 XP などの神経変性に酸化ストレスが関与していることが明らかになった。また、重症心身障害の呼吸障害や肝脂肪変性、急性脳症やけいれん重積症においても酸化ストレスの関与が示唆され、これらの治療のための抗酸化療法の開発が望まれる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：酸化ストレス、神経変性疾患、急性脳症、重症心身障害、ELISA、免疫組織化学染色、抗酸化療法

1. 研究開始当初の背景

生体にとって酸素は必要不可欠なものである。酸素から生じる活性酸素は、生体内で抗酸化システム（例えば Superoxide Dismutase (SOD) は活性酸素を過酸化水素に、Glutathione Peroxidase は過酸化水素を水に変化させるなど）という処理系が働き除去されているが、これらの処理が追いつかない時、活性酸素が核酸 (DNA)、脂質、蛋白質などの生体高分子を修飾・傷害し酸化物は細胞内に蓄積する。この状態が酸化ストレスである。

過度の酸化ストレスでは傷害が修復されないうまま、細胞死、トランスフォーメーションを誘導し、さまざまな疾患を引き起こすことが推定されている。活性酸素は寿命が短く不安定なために測定は不可能であるが、酸化ストレス状態に陥った際に酸化物は速やかに細胞から血液を経て尿へと排泄される。生体がどの程度の酸化ストレスにさらされているかは、これら酸化物（酸化ストレスマーカー）を測定することで評価可能である。さらに病理組織学的にも酸化ストレスマーカー

を染色し病態への関与を証明することが可能である。このような手法を用いてこれまでに、がん、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病において、酸化ストレスが病態に関与していることが明らかにされている。さらにアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの神経変性疾患で神経変性に酸化ストレスが関与していることが、剖検脳を用いた神経病理学的検討や ELISA 法による生体試料（尿、血液、髄液）中の酸化ストレスマーカー測定から示されつつある。しかしながら、これまでの報告で剖検脳と生体試料の両面から検討しているものはなかった。一方小児においては、アトピー性皮膚炎、気管支喘息などのアレルギー性疾患で酸化ストレスが病態に関与しているという報告があるが、小児神経疾患については十分な検討がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、小児期発症神経変性疾患においても、成人にみられる神経変性疾患と同様に酸化ストレスが神経変性に関与していることを明らかにすることを目的とする。さらに、成人では脳梗塞に対してフリーラジカル除去作用を有するエダラボン（商品名ラジカット）が既に抗酸化療法として実用化され、ALS など神経変性疾患に対しても試験的に投与が行われ、一部効果を挙げている。本研究により、小児期発症神経変性疾患において酸化ストレスが神経変性に関与していることを明らかにし、これまで治療法の確立されていなかったこれらの疾患に対して抗酸化療法が試みられる可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 剖検脳を用いた神経病理学的解析
小児期発症神経変性疾患の剖検脳を用いて、以下の解析を行った。①前頭葉・頭頂葉・側頭葉の大脳皮質、海馬・扁桃核、線条体・淡蒼球、視床、小脳皮質・歯状核、中脳、橋、延髄部に関して連続切片を作製し、Hematoxylin & Eosin (HE)染色、Klüver-Barrera (KB)染色、抗 GFAP 免疫染色などの染色を行い神経細胞やグリア細胞密度を視察的方法と画像解析ソフトを用いて評価した。②連続切片において DNA の酸化的障害産物である、8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG)、脂質酸化については初期段階のマーカー Hexanoyl Lysine 付加体 (HEL)、後期段階のマーカー Acrolein 付加体 (ACR)、4-Hydroxy-2-Nonenal Modified Protein (4-HNE)、蛋白質の酸化的障害産物 Advanced Glycation End Product (AGE) などの免疫染色を行った。さらに、酸化的障害を制御する脳内の主たる抗酸化酵素である Superoxide Dismutase (Cu/ZnSOD, MnSOD) の表出を免疫組織化学

的に検討し、酸化的障害関連物質（酸化ストレスマーカー）沈着との関係を調べた。さらに、重症心身障害児者の剖検組織（肝臓）を用いて、同様の免疫組織化学染色を実施した。

(2) ELISA 法による生体試料の解析

剖検脳を用いた解析と同様に小児期発症神経変性疾患患者について、生体試料（尿、血液、脳脊髄液）を用いて酸化ストレスマーカーを ELISA 法にて測定した。さらに、重症心身障害児者の尿を用いた酸化ストレスマーカー解析も行った。また、急性脳炎・脳症や熱性けいれん重積患者の髄液を用いた ELISA 解析も行った。

4. 研究成果

(1) Lafora 病と酸化ストレス

進行性ミオクロノスτέんカンの病因として重要な Lafora 病において、酸化ストレスの病態への関与について検討を行った。剖検脳を用いた免疫染色の結果では、DNA 酸化的障害産物 (8-OHdG) や脂質酸化的障害産物が神経細胞の核に陽性であったが、Lafora 小体とは一致しなかった (図 1)。さらに、Lafora 病患者尿中 8-OHdG は正常対照に比べ上昇していた。このことから Lafora 病の神経変性に酸化ストレスが関与していることが示唆されたが、Lafora 小体形成とは別の機序が考えられた。

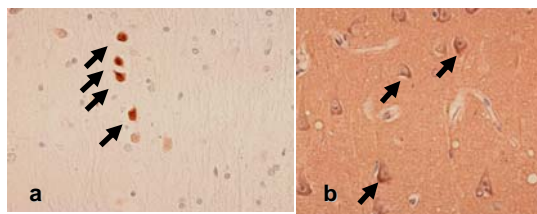


図 1 Lafora 病剖検脳での酸化ストレスマーカー沈着：(a) 淡蒼球での 8-OHdG 沈着, (b) 海馬での HEL 沈着

(2) 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 DRPLA と酸化ストレス

Lafora 病と同じく進行性ミオクロノスτέんカンを呈する歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 DRPLA においても酸化ストレスが神経変性に関与しているか検討した。DRPLA では剖検脳の大脳基底核において核酸の酸化的障害産物 8-OHdG、脂質の酸化的障害産物 4-HNE が沈着し (図 2)、抗酸化酵素 Cu/ZnSOD の表出低下を認めた。これらの所見から、DRPLA の神経変性に酸化ストレスが関与していることが示唆された。

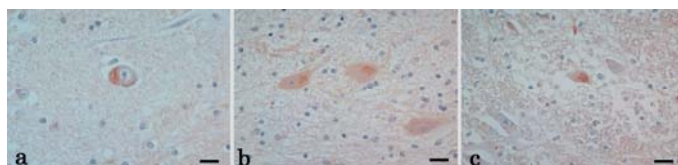


図 2 DRPLA 剖検脳での脂質酸化ストレスマーカー4-HNE の神経細胞胞体内沈着：淡蒼球 (a)、小脳歯状核 (b)、橋縫線核 (c)

(3) 色素性乾皮症(XP)と酸化ストレス

色素性乾皮症 (XP) 患者ではヌクレオチド除去修復 (NER) の障害により日光過敏症や皮膚ガンなどの皮膚症状がみられる。XP は遺伝的相補性から NER 欠損を伴う A~G 群と NER 自体は正常であるバリエーション群 (XPV) の 8 つに分類され、日本では A 群 (XPA) と XPV が多いと言われる。A・B・D・G 群では皮膚症状に加えて神経症状がみられ、中でも日本の XP 患者の約 55% を占める XPA での神経障害は進行性かつ重篤である。神経症状は嚴重な遮光を行っても年齢とともに進行する。我々は XP 患者での頭部 MRI 定量解析や電気生理学的検査、XP 患者剖検脳での神経病理学的解析を通じて、神経変性での酸化ストレスの関与、モノアミン神経の選択的障害などを明らかにして来た。本研究ではさらに XP 患者の尿中酸化ストレスマーカーの解析を行った。表 1 に XPA 7 例と D 群 XP (XPD) 1 例ならびに対照 17 例での解析結果をまとめた。年長例を中心に XPA 7 例中 5 例で脂質に対する早期段階の酸化ストレスマーカー Hexanoyl-lysine adduct (HEL) の上昇がみられそのうち 4 例で DNA に対する酸化ストレスマーカー 8-OHdG、2 例で脂質後期段階マーカー Acrolein-lysine adduct がそれぞれ上昇していた。表中「↑」は対照の測定値の平均 + 2SD 以上の高値を意味する。経年的な測定を施行しえた XPA6 では年齢ならびに神経症状の進行に応じた HEL・8-OHdG の漸増現象がみられた。表中「**」は「一定期間での複数回測定の平均」を意味する。神経症状がそれ程進行していない XPD1 においても HEL・8-OHdG 上昇が確認された。XP 患者全体での 8-OHdG・HEL 平均値は、対照に比べて有意の高値を示していた。

(4) 重症心身障害児 (者) と酸化ストレス
 重度の呼吸障害を呈する重症心身障害児 (者) において、核酸・脂質に対する酸化ストレスマーカーの尿中排泄を検討した。呼吸障害の重症度と酸化ストレスマーカー値の相関を見出した (表 2)。
 さらに、重症心身障害児 (者) の肝脂肪変性・線維化に酸化ストレスが関与している可能性を病理組織材料を用いて明らかにした。肝

脂肪変性を伴った症例では、脂質に対する酸化ストレスマーカー 4-HNE の沈着が肝細胞で認められた (図 3)。以上の所見から、重症心身障害児 (者) の肝線維化の病態に対する脂質過酸化の関与が考えられた。

表 1 色素性乾皮症と尿中酸化ストレスマーカー

症例 対照 (17例, 8~58歳)	年齢・性 (平均±2SD)	呼吸障害 (平均±2SD)	聴力障害 (平均±2SD)	8-Hydroxy- 2'-deoxyguanosine (ng/mg creatinine)	Hexanoyl-lysine adduct (nmol/mg creatinine)	Acrolein-lysine adduct (nmol/mg creatinine)
XPA1	** 29歳・男性	気管切開	重度	23.3 ↑	188.3 ↑	221.3
XPA2	26歳・男性	気管切開	重度	15.3	149 ↑	76
XPA3	24歳・女性	気管切開	重度	38.1 ↑	937.6 ↑	427.7 ↑
XPA4	22歳・女性	レボドパ	中等度	40 ↑	520.6 ↑	392.6 ↑
XPA5	19歳・男性	レボドパ	重度	14.6	43.7	141.4
XPA6	18歳・男性	(中等度)	重度	10.8	(n/a)	203.4
XPA6	19歳・女性	レボドパ	重度	19.5 ↑	536.6 ↑	78.2
XPA6	** 17歳・女性	レボドパ	中等度	12.7	211.5 ↑	(n/a)
XPA7	** 16歳・女性	(中等度)	中等度	12.8	94.6	215.9
XPD1	7歳・男性	(c)	軽度	13.6	117.6	189.2
XP	9歳・男性	(c)	軽度	28.9 ↑	166.1 ↑	187.2
		(平均±SD)		20.9±10.4	296.6±281.5	213.3±116.3
		(T検定, p value)		0.008	0.031	0.1109

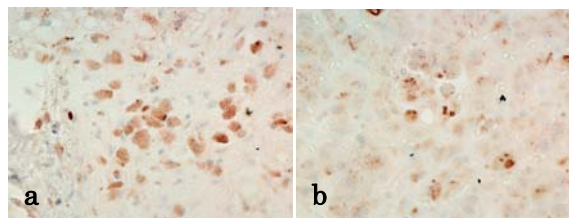


図 3 重症心身障害者脂肪肝における 4-HNE 染色。グリソン鞘周囲優位に、肝細胞の胞体に細顆粒状の陽性所見を認めた (a)。肝小葉中心部優位に、肝細胞の胞体に細顆粒状の 4-HNE 陽性所見がみられた (b)。

- motor and intellectual disabilities. Brain Dev. 30; 402-409, 2008. 査読有.
- ⑥ Miyata R, Hayashi M, Tanuma N, Shioda K, Fukatsu R, Mizutani S. Oxidative stress in neurodegeneration in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. J. Neurol. Sci. 264; 133-139, 2008. 査読有.
- ⑦ Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. Acta Neuropathol. 112; 195-204, 2006. 査読有.
- ⑧ 田沼直之、松本陽. 多発性硬化症の病変形成機構とケモカインの役割. 神経研究の進歩 50; 627-635, 2006. 査読無.
- ⑨ Shiihara T, Kato M, Ichiyama T, Takahashi Y, Tanuma N, Miyata R, Hayasaka K. Acute encephalopathy with status epilepticus: Bilateral mesial temporal and claustral lesions, associated with a peripheral marker of oxidative DNA damage. J. Neurol. Sci. 250; 159-161, 2006. 査読有.

[学会発表] (計 9 件)

- ① Tanuma N, Miyata R, Hayashi M, Kubota M. Oxidative stress biomarkers in febrile seizures. The 11th Annual Meeting of the Infantile Seizure Society. International Symposium on Febrile Seizures and Related Conditions. 2008年4月10日. ロイヤルオークホテル (大津).
- ② 田沼直之、宮田理英、林雅晴、熊田聡子. 髄液タウ蛋白が高値を示した二峰性けいれんと遅発性拡散能低下を呈する急性脳症の1例. 第111回日本小児科学会学術集会. 2008年4月26日. 東京国際フォーラム (東京).
- ③ 田沼直之、宮田理英、林雅晴、久保田雅也、高梨潤一、奥村彰久. 第50回日本小児神経学会総会. 2008年5月30日. ホテル日航東京 (東京).
- ④ 田沼直之、宮田理英、林雅晴、久保田雅也. 有熱時けいれん重積/群発における髄液酸化ストレスマーカー. 第49回日本小児神経学会総会. 2007年7月6日. 大阪国際会議場 (大阪).
- ⑤ Tanuma N, Miyata R, Hayashi M, Kubota M. Cerebrospinal fluid levels of oxidative stress markers in patients with prolonged/repetitive febrile seizures. The 3rd Congress of Asian

Society for Pediatric Research. 2007年10月7日. 学術情報センター (東京).

- ⑥ Tanuma N, Hachiya Y, Miyata R, Hayashi M. Oxidative stress in patients with severe motor and intellectual disabilities. 10th International Child Neurology Congress. 2006年6月12日. モントリオール (カナダ).
- ⑦ Tanuma N, Sakuma H, Matsumoto Y. Chemokine gradients play a role in lesional expansion of secondary progressive multiple sclerosis. The 8th International Congress of Neuroimmunology, 2006年10月16日. 名古屋国際会議場 (名古屋).
- ⑧ 田沼直之、八谷靖夫、濱野喜美子、宮田理英、林雅晴. Lafora病の神経変性に関する神経病理学的検討. 第109回日本小児科学会学術集会. 2006年4月21日. ホテル日航金沢 (金沢).
- ⑨ 田沼直之、宮田理英、林雅晴、由井崇子、荒木聡. 色素性乾皮症における酸化的障害～ELISA法による酸化ストレスマーカー測定の前備的検討～. 第48回日本小児神経学会総会. 2006年6月1日. 東京ベイホテル東急 (浦安).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田沼 直之 (TANUMA NAOUYUKI)
東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号: 00281676

(2) 研究分担者

林 雅晴 (HAYASHI MASAHARU)
東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
研究者番号: 00280777