

## 166. ALS における介在神経が制御する局所ネットワーク解析

佐光 亘

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 臨床神経科学分野

Key words : 筋萎縮性側索硬化症, MRI, MRS, GABA, ReHo

### 緒言

治療法が未だに確立されていない神経変性疾患の中でも、筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、特に予後不良な疾患である。上位・下位運動ニューロンの脱落に起因する上位・下位運動ニューロン徴候両方の検出を必要とする改訂版 El Escorial 診断基準が国際的な診断基準として用いられているが、上位運動ニューロン徴候は、その全経過においてさえ検出困難なこともある。実際に、臨床的に下位運動ニューロン徴候しか認められなかった運動ニューロン病、すなわち ALS の診断基準を満たさない症例を病理学的に調べると、84.6%に上位運動ニューロンの変性を認めたという報告がある<sup>1)</sup>。このような状況では、上位運動ニューロン徴候を検出できないために診断基準を満たさない ALS が少なからず存在することとなり、disease modifying drug などの臨床治験の対象者の登録に支障を来すことが容易に推察される。上述した問題を解決するためにも、上位運動ニューロン徴候に代わりうる中枢神経異常に基づいた新たな診断法の開発が求められている。

我々は、その代替法として、 $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）とそれに関連する異常を想定している。GABA は抑制性神経伝達物質であるが、これを神経伝達物質とする介在神経細胞数の減少が、ALS の大脳皮質において報告されている<sup>2)</sup>。その後、ALS の一次運動野（M1）における GABA の減少が magnetic resonance spectroscopy（MRS）を用いて証明された<sup>3)</sup>。また、動物レベルではあるが、海馬における theta 帯域のオシレーションに GABA 作動性介在神経が関与していることを示唆する報告もあり、GABA 作動性神経細胞が局所ネットワークを制御している可能性がある<sup>4)</sup>。

しかしながら、ALS における GABA と安静時局所ネットワークの関連を評価した研究はこれまでにない。GABA 減少により惹起される安静時局所ネットワーク異常が同定されれば、上位運動ニューロン徴候に代わりうる、病態生理学的背景の確立した中枢神経異常として早期診断に寄与すると考えられる。

ヒトレベルの安静時局所ネットワークを評価する方法として functional magnetic resonance imaging（fMRI）を用いた、局所の神経活動の coherence を評価できる regional homogeneity（ReHo）という方法がある。今回、MRS と安静時 fMRI を用いて、介在神経細胞により制御される局所ネットワーク異常を同定することにより、上位運動ニューロン徴候に代わりうる新規バイオマーカー開発基盤的研究を行った。

### 方法

改訂版 El Escorial 診断基準で possible 以上であった 11 人の ALS 患者と 7 人の対照者が本研究に登録された。性別に関しては、ALS 群では男性 10 人、女性 1 人、対象群では男性 3 人、女性 4 人、年齢はそれぞれ  $65 \pm 11.5$ （平均値  $\pm$  標準偏差）歳、 $73 \pm 14.0$  歳であった。また、ALS 群の罹患期間は  $1.5 \pm 0.96$  年、重症度を表す revised ALS functional rating scale（ALSFRS-R）は  $38 \pm 5.9$  であった。

撮影装置には 3.0T の Discovery 750（GE, Milwaukee, WI）を用いた。

MRI に関しては、安静時の fMRI（RSfMRI）と、spatial normalization のための構造画像として T1-weighted images を撮影した。ReHo maps は標的となる 1 voxel に対する、その周辺の voxels との相関係数からなる。関心周波数帯域は 0.01-0.08 Hz とし、各 voxel における ReHo 値を算出し、ReHo map を作成した。MRS は、MEGA-PRESS を撮影し、LCModel を用いて、水を reference として GABA 濃度を測定した。

我々は、diffusion tensor imaging の解析により、補足運動野（SMA）における異常が ALS の罹患期間と重症度の両方と相関することを見出した<sup>5)</sup>。この知見に基づき、両側 SMA をカバーする関心領域を RSfMRI と MRS で用いた。前者では、automated anatomical labeling により作られた関心領域を、後者では 30 × 30 × 30 mm の関心領域を用いた。

ReHo maps の voxelwise analysis は SPM8 を用いた。voxel-level  $P < 0.001$ 、cluster-level  $P < 0.05$  を閾値とし、ALS 群、対照群間で差のある部位を検索した。

単変量の統計学的解析に関しては正規分布を想定し、群間差には unpaired two-tailed Student t-test、相関解析には Pearson product-moment correlation coefficients を用いた。P 値が 0.05 未満を有意とした。

## 結 果

SMA における GABA 値は、ALS 群で対照群に比し低い傾向はあったが、有意差は見出せなかった（ALS 群： $1.77 \pm 0.877$ 、対照群： $2.36 \pm 0.531$ 、 $P = 0.13$ ）（図 1）。

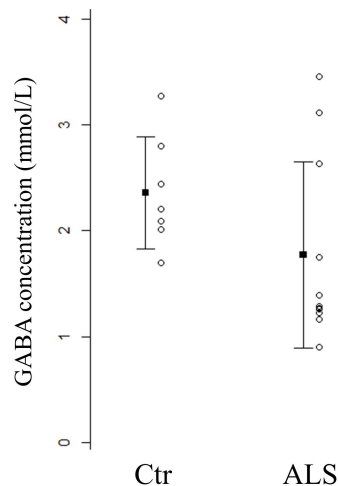


図 1. ALS 群と対照群の SMA における GABA 濃度

○は各対象、■とエラーバーはそれぞれ各群の平均値と標準偏差値を表す。ALS 群と対照群間で GABA 濃度の差は見出されなかった。

Abbreviations: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; Ctr, control subjects; GABA, gamma-aminobutyric acid; SMA, supplementary motor area.

ReHo maps の voxelwise analysis でも有意な部位は得られなかった。しかしながら、ALS 群でのみ、SMA における GABA 濃度は ReHo 値と負の相関を示した（ALS 群： $P = 0.006$ ,  $r = -0.77$ 、対照群： $P = 0.119$ ,  $r = -0.64$ ）（図 2）。

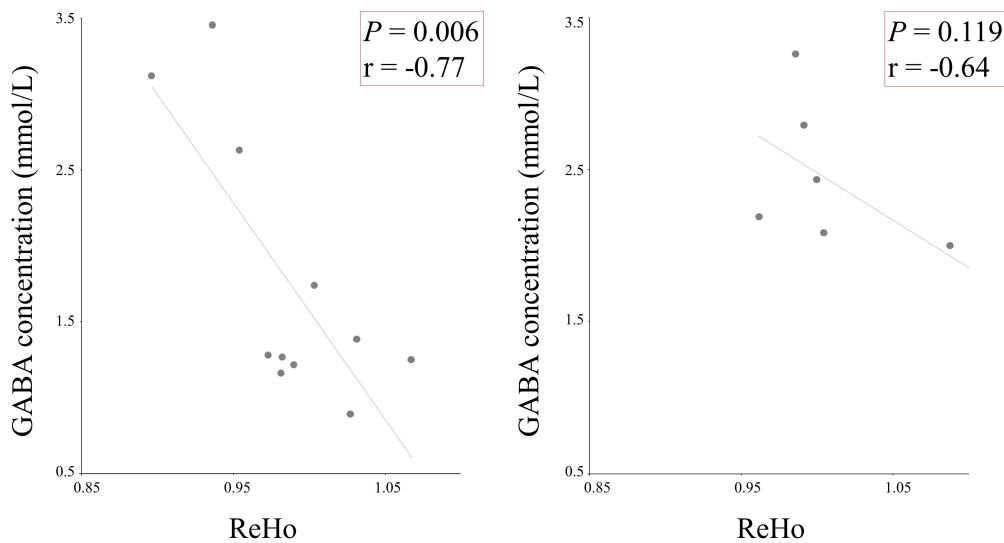


図 2. ALS 群 (左) と対照群 (右) の SMA における GABA 濃度と ReHo 値の相関解析

●は各対象を表す。ALS 群の SMA の GABA 濃度と ReHo 値間には有意な負の相関を認める (左)。一方、対照群では上記傾向は認められるが、有意ではなかった。

Abbreviations: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; GABA, gamma-aminobutyric acid; ReHo, regional homogeneity; SMA, supplementary motor area.

GABA 濃度、ReHo 値ともに、年齢、罹患期間、ALSFERS との相関は認められなかった (GABA 濃度 vs. 年齢:  $P = 0.370$ ,  $r = -0.30$ 、GABA 濃度 vs. 罹患期間:  $P = 0.293$ ,  $r = -0.35$ 、GABA 濃度 vs. ALSFRS:  $P = 0.562$ ,  $r = 0.20$ 、ReHo vs. 年齢:  $P = 0.079$ ,  $r = 0.55$ 、ReHo vs. 罹患期間:  $P = 0.413$ ,  $r = 0.28$ 、ReHo vs. ALSFRS:  $P = 0.398$ ,  $r = -0.28$ )。

## 考 察

本研究では、SMA における GABA 濃度の ALS と対照群間差、あるいは ReHo 値の群間差を示す部位を見出すことはできなかったが、GABA 濃度・ReHo 値間の有意な負の相関が認められた。ALS において、相関係数の絶対値は十分に大きく、GABA と ReHo の関連の強さを示唆する。GABA 濃度が介在神経細胞の数・機能と相関し、それが局所ネットワークを規定しているのであれば、ReHo 値と正の相関が見出されることが予想されたが、実際には逆であり、GABA 濃度が高いと ReHo 値は低く、GABA 濃度が低いと ReHo 値は高い傾向であった。この結果は、GABA 本来の機能である「抑制」を考えれば、単純に GABA が ReHo を抑制していると解釈できる。ReHo は、局所ネットワークではなく、単純に局所の神経活動の強さを表していると解釈できる。

ALS 群の GABA 濃度は、対照群に比べて減少傾向であり、今後対象数が増えれば、有意差が得られることが期待される。ALS 群の GABA 濃度は二層化していたが、GABA 濃度が比較的高値の群、低値の群それぞれのサブグループが持つ意義として、予後、症候など何らかの表現型の差を想定している。また、ALS 進行の病態機序には、ミクログリアやアストロサイトを中心とした中枢神経の免疫・炎症の関与も大きいと考えられている<sup>6)</sup>。タンパク質レベルでの表現型の差として、免疫・炎症に寄与するサイトカインプロファイルの差も候補として考えられる。これらの仮説を検証するためにも、今回撮影が成功した ALS 群の長期経過観察や対照含む症例のさらなる蓄積、サイトカインなど炎症に関連するタンパク質の網羅的解析が必要であり、本研究の今後の展開として行っていきたい。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、徳島大学大学院臨床神経科学分野の和泉唯信、梶龍児、徳島大学大学院放射線医学分野の阿部考志、原田雅史である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Nakamura R, Koike H, Sobue G. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open*. 2014;4(5):e005213. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005213. PMID:24833696.
- 2) Maekawa S, Al-Sarraj S, Kibble M, Landau S, Parnavelas J, Cotter D, Everall I, Leigh PN. Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain*. 2004;127(Pt6):1237-51. PMID:15130949.
- 3) Foerster BR, Dwamena BA, Petrou M, Carlos RC, Callaghan BC, Pomper MG. Diagnostic accuracy using diffusion tensor imaging in the diagnosis of ALS: a meta-analysis. *Acad Radiol*. 2012;19(9):1075-86. doi: 10.1016/j.acra.2012.04.012. PMID:22749050.
- 4) Amilhon B, Huh CY, Manseau F, Ducharme G, Nichol H, Adamantidis A, Williams S. Parvalbumin interneurons of hippocampus tune population activity at theta frequency. *Neuron*. 2015;86(5):1277-89. doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.027. PMID:26050044.
- 5) Sako W, Abe T, Izumi Y, Harada M, Kaji R. Fractional anisotropy in the supplementary motor area correlates with disease duration and severity of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Sci*. 2016;37(4):573-7. doi: 10.1007/s10072-016-2487-z. PMID:26809951.
- 6) Radford RA, Morsch M, Rayner SL, Cole NJ, Pountney DL, Chung RS. The established and emerging roles of astrocytes and microglia in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:414. doi: 10.3389/fncel.2015.00414. PMID:26578880.