

# 筋萎縮性側索硬化症の病態と治療戦略

阿部 康二 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

## 研究要旨

近年、変異型 SOD1 を導入したマウスにおいて、運動ニューロン死の機序が徐々に解明されつつある。我々は、軸索輸送および生存シグナルの2点に着目して、これらの変化を発症前の G93A 変異マウスで調べた。その結果、20 週齢前の若年マウスで坐骨神経結紮による kinesin, dynein の蓄積の低下がみられ、順行性および逆行性軸索輸送が早期に低下していることが明らかになった。これに加え、PI3-K および Akt も早期に低下が認められ、生存シグナルの低下が早期に出現することが推定された。これらの現象を抑制し運動ニューロンの生存を維持するために、動物モデルおよび筋萎縮性側索硬化症患者で神経栄養因子の投与を施行し、その効果を検討中である。

## はじめに

Cu/Zn superoxide dismutase (superoxide dismutase 1, SOD1) 遺伝子の変異が家族歴を有する筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) の原因として発見されて以来<sup>1)</sup>、変異 SOD1 が運動ニューロンに及ぼす細胞傷害メカニズムの解明を通じて ALS の治療法を開発しようという試みが活発に行われてきた。その結果、変異 SOD1 遺伝子を導入した培養細胞やトランスジェニックマウスを用いた実験から ALS の病態に迫る様々な知見が得られ、神経内科分野において難病中の難病と言われた ALS の病態についてもかなりの新しい事実が判明してきている。しかしながらその本質的な原因は未だに完全には解明されておらず、さらなる研究の進歩と早急な治療法の開発が急務となっている。我々は変異 SOD1 を導入したトランスジェニックマウスを用いて ALS の病態に迫り、さらにそれらの結果に基づいて実際の ALS 患者に対する有効な治療法の確立をめざしており、本稿では当施設における研究の結果とそれに基づいた ALS の治療戦略について概説する。

## 方 法

家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial ALS, FALS) から見つかった SOD1 遺伝子変異 (G93A) を導入した transgenic mice は 25 週齢以降に脊髄前角の motor neuron の数が減少しはじめ、約 35 週齢で後肢の筋力低下を生じ約 1 週間の経過で死亡する。病理学的には脊髄 motor neuron の変性・消失や空胞化、および neurofilament の蓄積を主な所見とする<sup>2)</sup>。我々はまずこの transgenic mice を用いて軸索輸送の障害について検討するために、19 週齢および 30 週齢の transgenic (Tg) mice の坐骨神経を結紮し、

結紮部位における順行性および逆行性軸索輸送成分である kinesin および dynein の蓄積の程度を non-transgenic wild-type (Wt) littermates と比較した。また、大腸菌由来の lacZ 遺伝子を導入した adenovirus を 36 週齢のマウスの腓腹筋に筋注し、逆行性輸送によって運ばれる LacZ タンパクの量と速度について Tg および Wt mice で検討した。さらに、ALS における生存シグナルの関与について検討するために phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)、およびその主な effector である Akt/protein kinase B の発現について immunostaining と western blotting を用いて検討した。

## 結 果 および 考 察

19 週齢の Tg mice では結紮部位近位側での kinesin の染色性 (蓄積) が Wt mice に比べて有意に低下しており、35 週齢の Tg mice ではさらに染色性は低下していた。一方、結紮部位遠位側の dynein の染色性 (蓄積) は 19 週齢では Tg と Wt mice では有意差は認められなかったが、35 週齢では Tg mice で dynein の染色性 (蓄積) の有意な低下が認められた。すなわち Tg mice では kinesin に代表される速い順行性軸索輸送が発症前早期から選択的に障害されており、発症後期になって逆行性軸索輸送の障害が加わると考えられた<sup>3)</sup>。また大腸菌由来の lacZ 遺伝子を導入した adenovirus を 36 週齢のマウスの腓腹筋に筋注した実験からも発症後期における逆行性軸索輸送が低下していることが明らかとなった<sup>4)</sup>。

Tg mice における生存シグナルに関する検討では、18 週齢の Tg mice で PI3-K の発現は immunostaining および western blotting で低下しており、25 週齢では PI3-K および Akt いずれ

も Tg mice では Wt mice に比べて発現が低下していた<sup>9)</sup>。さらに、我々の検討では Tg mice では 25 週齢ころから脊髄前角の motor neuron が減少し始めることが分かった<sup>9)</sup>。すなわち、我々が用いている Tg mice が筋力低下によって発症するのは前述の通り 30 週齢以降であるが、25 週齢以降には既に脊髄前角の motor neuron の数が減少しはじめ、さらに軸索輸送の障害や生存シグナルの低下が始まるのはそれよりも早期であることが明らかとなった<sup>3,9,10)</sup>。

すなわち、臨床的に障害が明らかとなるずっと前から上記を中心とした様々な異常は既に始まっており、臨床で明らかな異常を来した段階では病状は進んでしまっていると考えられる。したがって、実際の臨床においても同様に、筋力低下や筋萎縮などの ALS の症状が出現した時点ではすでに病状はかなり進行している可能性が高く、これらの症状が出現するよりもいかに早期から ALS と診断し、有効な治療を開始することが重要であり、鋭敏な診断方法を早急に確立することが急務である。

一方、早期に ALS と診断できたとして、適格な治療法を行うことも併せて必要であるが、未だ有効な治療法は確立されていない。我々は神経保護という観点から神経栄養因子に注目し、ALS 患者に insulin-like growth factor (IGF) の髄腔内投与を試みている。当施設で年齢や病状などをもとに適応基準 (70 才以下、Norris scale 65 以上など) を定め、IGF による治療を希望し、かつこの基準をみたす患者の腰髄腔内にリザーバーを留置し、そこから高用量 (150 µg/day) あるいは低用量 (25 µg/day) の IGF を 9 ヶ月間投与するものである。現在患者のエントリーを終了、治療を開始し、その効果を評価しつつある段階であるが、IGF が ALS の症状の進行の防止あるいは延命に効果があることを期待している。

以上のように、我々は変異 SOD1 Tg mice において、各種の異常が発症する前に既に始まっていることを様々な手法を用いて明らかにしてきた。これは ALS における早期の治療開始の重要性を示唆するだけでなく、ALS における motor neuron 変性メカニズムを解明する上で非常に重要である。また治療法の開発も今後の重要な課題であり、引き続き積極的に取り組んでいきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Rosen DR, et al: Nature 362:59-62, 1993
- 2) Gurney ME, et al: Science 264:1772-1775, 1994
- 3) Wanta H, et al: Brain Research 819:120-131, 1999

4) Murakami T, et al: Neuroscience Letters 308: 149-152, 2001

5) Wanta H, et al: Apoptosis 6: 345-352, 2001

6) Cleveland DW, et al: Nature Neuroscience 2: 50-56, 1999

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

## HGFの神経系における機能解析と新しい神経栄養因子の探索および同定

### —神経変性疾患の新しい治療法開発をめざして—

分担研究者 船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科助手（医学部内講師）

#### 研究要旨

高齢化社会を目前とし、神経変性疾患の治療法開発は急務となっている。神経変性疾患は神経細胞死およびその軸索変性を共通病態とするため、これを効果的に阻止できる可能性をもつ神経栄養因子治療に期待がかかっている。私達は、新しい神経栄養因子としての肝細胞増殖因子（HGF）に着目し、神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス（HGF-Tg）を作成し、HGF の神経変性疾患における機能解析を行った。その結果、HGF-Tg と筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデル Tg マウスを交配すると、ALS マウスの神経細胞死が抑制され寿命が著明に延長することが明らかとなった。これに加え、HGF のアルツハイマー病やパーキンソン病における機能解析も進めている。一方、各々の神経変性疾患により適切な神経栄養因子とその受容体の探索は重要課題である。私達は、HGF ファミリー分子（HLP）および神経特異的チロシンキナーゼ型受容体“Sky”のリガンド（Gas6）の2つを新しい神経栄養因子として同定した。さらに、Sky のファミリー受容体“Xksy”のクローニングに成功した。これらの新しい神経栄養因子と受容体は、HGF と共に神経変性疾患治療の突破口を開く重要な分子と考えられる。

#### A. 研究目的

HGF は新しい神経栄養因子として多くの重要な神経細胞に対して生存促進作用や神経突起伸長作用を示すこと、また HGF は多機能性因子として神経栄養以外の多岐な作用による効果を期待できることから、私達は HGF の神経変性疾患に対する機能解析を進めている。本研究では、HGF を神経特異的に発現するトランスジェニックマウス（HGF-Tg）と ALS モデル Tg マウス（ALS-Tg）とのダブル Tg マウスを作成することで、HGF 遺伝子を ALS-Tg に長期間供給した効果を解析するとともに、Tg-マウスからグリア細胞や神経細胞を培養し、HGF の ALS に対する作用メカニズムをより詳細に解析した。一方、私達は、神経変性疾患治療に有利な新規神経栄養因子の探索と同定をめざして検討した。

#### B. 研究方法

##### (I) HGF の ALS に対する機能解析

(1) 神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス（HGF-Tg）と変異 SOD1 発現トランスジェニックマウス（ALS-Tg）を交配し、ダブル Tg マウスを作成、寿命、運動機能、神経細胞死、軸索変性、HGF、c-Met

他各種分子について組織染色、免疫染色、ウエスタンブロットや行動解析法を用いて解析した。HGF の作用メカニズムを、Tg-マウスからグリアおよび神経細胞を精製・培養し解析した。

##### (II) HLP の神経栄養活性の解析

(1) HLP, Ron の発現と、培養鶏胚感覚神経節に対する HLP の神経栄養作用を解析した。

##### (III) 神経系特異的チロシンキナーゼ型受容体“Sky”とそのリガンド“Gas6”の神経栄養活性の解析

(1) Sky および Gas6 とそのファミリー分子の発現解析（RNase プロテクションアッセイ、免疫染色法）—発生段階および末梢神経損傷モデルにおける発現制御の解析  
(2) 初代培養神経細胞を用いた Gas6 の神経栄養活性の解析（FDA/PI 2 重染色による生存解析）

##### (IV) Sky ファミリー受容体の分子クローニングと機能解析

(1) Sky ファミリーの共通配列を基にファミリー受容体“Xksy”をクローニングした。  
(2) Xksy の機能は、EGF 受容体と Xksy のキメラ（EGFR/Xksy）を作成し、テトラサ

イクリン制御システムを用いて解析した。  
(倫理面への配慮)  
実験にあたっては倫理面に十分配慮を行った。

### C. 研究結果

#### (I) HGF の ALS-Tg の運動ニューロン死を抑制作用と寿命延長効果。

- (1) ALS-Tg と HGF-Tg を交配すると、ALS-Tg の運動ニューロン死が抑制され、運動機能の改善、寿命延長効果が得られた。
- (2) HGF は運動ニューロンへのカスパーゼ-1 と iNOS の誘導を抑制し、アストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーター (EAAT2) のレベル低下を改善した。

#### (II) HLP の神経栄養因子としての同定

- (1) HLP は培養鶏胚神経節細胞に対して神経栄養作用を示した。この作用は HGF より発生の進んだ感覚神経に認められた。
- (2) HLP の神経栄養作用は、Ron の細胞外ドメインとイムノグロブリン Fc とのキメラ分子 (Ron-Fc) により中和された。

#### (III) Gas6 の神経栄養因子としての同定

Gas6 が神経栄養活性を持つことを、海馬ニューロンではじめて示した。

#### (IV) Sky ファミリー受容体の分子クローニングと機能解析

- (1) アフリカツメガエルから新規 Sky ファミリー受容体 "Xksy" をクローニングした。
- (2) EGFR/Xksy を細胞に遺伝子導入し解析した結果、Xksy は細胞の分化、移動に重要な機能を持ち、その発現から胚発生と初期神経発生に重要であると示唆された。

### D. 考察

本研究では、新規神経栄養因子としての HGF が、致死性疾患である ALS の病因遺伝子を発現する ALS-Tg に対する治療効果を神経特異的 HGF-Tg を用い解析した。その結果、ALS-Tg 神経細胞への HGF の長期間供給により、神経細胞死と神経軸索変性が抑制され、寿命が延長した。寿命延長効果はマウスで約 1 ヶ月、人に換算すると約 6 年に相当した。

一方、HGF の寿命延長効果が約 1 ヶ月で

弱まったか原因を明らかにすることは、今後の治療戦略上重要である。HGF レベルは、疾患末期において、ALS-Tg と ALS/HGF-Tg の間での差が小さくなっていた。この結果は、HGF の供給を維持できれば、効果をより延長できることを示唆する。私達は、HGF 供給法を検討している。

一方、新しく HLP と Gas6 を神経栄養因子として同定した。これらは、神経変性疾患の新しい治療薬候補として意義深い。

### E. 結論

HGF は ALS を代表とする神経変性疾患の治療薬として期待される。また、今回新しく神経栄養因子として HLP および Gas6 を同定した。

### G. 共同研究者

宣雄 大阪大学大学院医学系研究科  
中村敏一 大阪大学大学院医学系研究科

### H. 研究論文発表

- (1) Kishi YA, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, Molecular cloning, expression and partial characterization of Xksy, a Xenopus member of the Sky family of receptor tyrosine kinases, Gene, in press.
- (2) Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matsumoto K, Nakamura T, Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. J Neurosci Res, in press.
- (3) Funakoshi H, Nakamura T. Identification of HGF-like protein as a novel neurotrophic factor for avian dorsal root ganglion sensory neurons. Biochem Biophys Res Commun. 283(3): 606-612, 2001.
- (4) Nakamura K, Funakoshi H, Tokunaga F, Nakamura T. Molecular cloning of a mouse scavenger receptor with C-type lectin (SRCL)(1), a novel member of the scavenger receptor family. Biochim Biophys Acta. 1522(1): 53-58, 2001.
- (5) Nakamura K, Funakoshi H, Miyamoto K, Tokunaga F, Nakamura T. Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. Biochem Biophys Res Commun. 280(4): 1028-1035, 2001.

研 究 協 力 者

研 究 報 告

## 孤発性 ALS の全ゲノム領域を対象とした関連解析

中野 亮一 新潟大学医学部附属病院神経内科講師

研究要旨：孤発性筋萎縮性側索硬化症(SALS)には疾患感受性遺伝子が存在し、発症に関与している可能性がある。疾患感受性遺伝子の存在する可能性のある領域を探る目的で、今回はじめて本邦の SALS 患者を対象にした、全ゲノム領域についての関連解析を行った。ヒト染色体全体を 4.6cM 間隔でカバーするマイクロサテライトマーカー（811 種類）を用いて、SALS 群（84 名）と対照群（95 名）間の多型パターンを統計解析（ $\chi^2$  検定,  $2 \times n$  Table）した。その結果、第 18 染色体の 1 カ所、X 染色体の 2 カ所において多型パターンに違いを認め、疾患感受性遺伝子の存在する可能性のある領域と考えられた。

研究協力者：福島隆男<sup>1)</sup>、菊川公紀<sup>2)</sup>、  
犬塚 貴<sup>3)</sup>、宮下哲典<sup>4)</sup>、桑野良三<sup>4)</sup>、  
辻 省次<sup>1)</sup>

- 1) 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門  
神経内科学分野
- 2) 国立療養所西新潟中央病院神経内科
- 3) 岐阜大学医学部高齢医学講座
- 4) 新潟大学遺伝子実験施設

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の 90%以上を占める孤発性 ALS の原因は未だに不明である。ALS の発症機構には多くの因子が関与している可能性が高いことが指摘されており(Eisen A. Amyotrophic lateral sclerosis is a multifactorial disease. Muscle Nerve 18:741-752, 1995 など)、孤発性 ALS の発症に関与する疾患感受性遺伝子(susceptibility gene)が存在する可能性があり、それを同定することができれば、ALS の発症メカニズムの解明や治療法の開発に有用と思われる。

このような疾患感受性をもたらすような遺伝子上の変異が生じた際には、その近傍に存在した多型性は集団の中において疾患感受性遺伝子の当該変異と共に子孫に伝えられる可能性が高く、発症者において高頻度に出現することが期待される。従って、ALS 発症者群において多型パターンに偏りの認められるゲノム領域を見いだすことができれば、そこに疾患感受性遺伝子が存在する可能性がある。今回、本邦の ALS 患者群について、全ゲノム領域を対象としてマイクロサテライト多型を用いた関連研究

(association study)を行い、疾患感受性遺伝子の存在する可能性のあるゲノム領域を検索した。

### B. 研究方法

対象は本邦の孤発性ALS 84名（男性50名、女性34名、平均年齢 $58.6 \pm 10.4$ 歳）、と対照群95名（男性52名、女性43名、平均年齢 $70.8 \pm 7.4$ 歳）とした。対照群は正常者およびALS以外の疾患患者（高血圧、糖尿病、緊張型頭痛、脳梗塞、頸椎症、末梢神経障害、てんかん、くも膜下出血、重症筋無力症、本態性振戦などで、神経変性疾患は含まれていない）で60歳以上の者とした。末梢血白血球より抽出したゲノムDNAを用いて、全ゲノム領域を4.6cM間隔（811種類）でカバーするマーカー(ABI PRISM Linkage Mapping Set-HD5)による多型解析を行った。各マイクロサテライトマーカー毎に孤発性ALS群と対照群間で多型パターンに違いがあるか、統計解析（ $\chi^2$ 検定、 $2 \times n$  Table）を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は事前に新潟大学倫理委員会より承認を得ており、ゲノムDNAの収集にあたっては、本研究の目的や方法などについて口頭および文書により十分な説明を行い、文書により同意を得て行った。

### C. 研究結果

第1染色体からX染色体に至る、811種類のマイクロサテライトマーカー毎のp値を図1に示す。この中で、第18染色体の1カ所（図2）、およびX染色体の2カ所（図3）のマイクロサテライトマーカーについては $p < 0.001$ を示した。

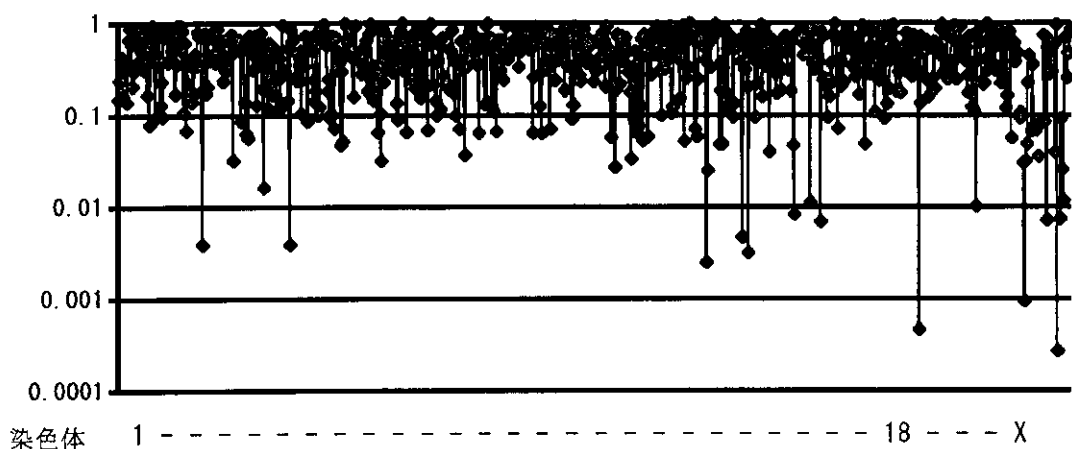


図 1 : 811 種類のマイクロサテライトマーカーについてそれぞれの p 値を第 1 染色体から X 染色体に至るまで順番に並べて表示したもの。

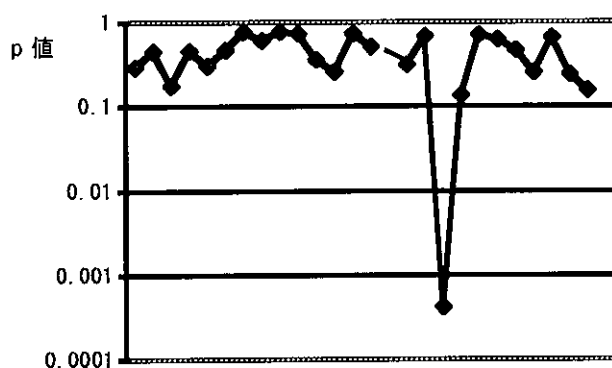


図 2 : 第 18 染色体上の p 値の一部を拡大して表示したもの。矢印で示したマーカーでは、 $p=0.00042$

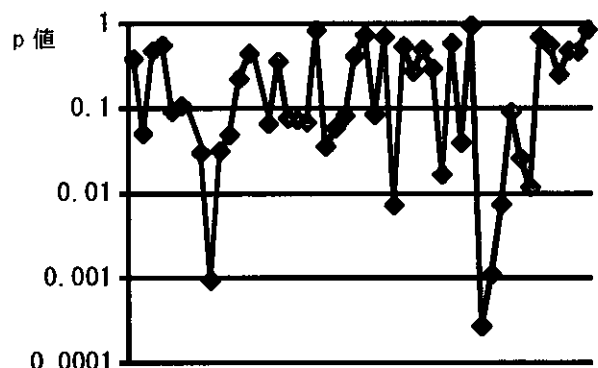


図 3 : X 染色体上の p 値の一部を拡大して表示したもの。矢印で示したマーカーでは、 $p=0.00093$  および  $p=0.00027$

#### D. 考 察

全ゲノム領域における関連解析を日本人孤発性 ALS に対して初めて試み、第 18 染色体、X 染色体において 3 カ所で p 値の低い領域を認めた。しかし、今回は約 800 種類のマイクロサテライトマーカーによる多重検定を行っていることから、偽陽性が発現する可能性が高く、p 値は  $0.05/800=0.0000625$  より小さな値が必要であり、この 3 カ所のゲノム領域も现阶段では有意であるとは言えない。今後さらに近傍のマーカーについて解析を行う必要がある。また、今回の解析対象サンプルが少数のために検出力が弱いことが、有意差の得られない原因である可能

性があり、サンプル数を増加することも不可欠である。今回、候補領域として考えた 3 カ所については今後さらに確実性が増した場合は遺伝背景の異なる人種での検証を行うことも必要である。

#### E. 結 論

第 18 染色体の 1 カ所、X 染色体の 2 カ所に ALS の疾患感受性遺伝子存在領域として有望な領域を見出した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

菊地誠志 北海道大学大学院医学研究科神経内科学助手

**研究要旨** ラット培養脊髄ニューロンに、半減期の長い NO ドナーである NOC18 を暴露した際認められる神経細胞死は運動ニューロン選択的脆弱性を示した。その毒性はプロスタグランジン E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) 前投与により抑制された。ALS の治療薬としての可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

ALS の治療の可能性を探る目的で今回はプロスタグランジン E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) に注目し、その運動ニューロンに対する保護作用を解析した。

#### B. 研究方法

胎生 14 日ラット胎児より確立した培養脊髄ニューロンを用いた。培養 7 日目に NOC18 を 100、250、500 μM を 24 時間暴露した。PGE<sub>1</sub> は 1-100 nM を 24 時間前処置した。MEK 阻害薬である、PD98059、あるいは p38MAPK 阻害薬である SB203580 を PGE<sub>1</sub> 暴露 1 時間前に前処置し、暴露中も同時投与した。免疫染色にて運動ニューロン (SMI 32 染色陽性)、非運動ニューロン (MAP2 染色陽性) を同定し、その数を数えて生存率を評価した。ミトコンドリア代謝能指標として MTS 分析、ミトコンドリア膜電位指標として JC-1、アポトーシス指標として Hoechst 染色、フリーラジカル発生指標として DCF-DA、グルタチオン濃度測定を施行した。細胞内 cAMP 測定、Western blot、RT-PCR 解析も検討した。

#### C. 結果

NOC18 は用量依存性に培養脊髄ニューロン毒性を示した (p<0.01)。運動ニュー

ロンは非運動ニューロンに比較して脆弱であった (NOC18 250 μM にて p<0.01)。毒性は用量依存性にアポトーシス様核変化、フリーラジカルの上昇、グルタチオン濃度の減少、ミトコンドリア代謝能および膜電位低下を来した。PGE<sub>1</sub> 前処置により上記毒性、変化は全て軽減した。RT-PCR にて培養脊髄ニューロンでの EP4 発現を確認した。細胞内 cAMP 濃度は PGE<sub>1</sub> 投与により上昇した。Western blot で PGE<sub>1</sub> による Bcl-2 発現増加を確認した。PGE<sub>1</sub> の保護作用は MEK 阻害剤で部分的に減少した。PGE<sub>1</sub> はチオレドキシンの発現も上昇させていた。

#### D. 考察

PGE<sub>1</sub> は培養脊髄ニューロンにおける NOC18 による毒性に対して保護作用を示した。この毒性は運動ニューロンを比較的选择的に障害した。PGE<sub>1</sub> は NOC18 毒性によるアポトーシス、フリーラジカル発生、グルタチオン濃度減少、ミトコンドリア障害を全て改善させた。培養脊髄ニューロンにおける PGE 受容体として、Gs 蛋白の共役するとされる EP4 の存在を確認した。保護作用の機序には、おそらく EP4 を介する cAMP 上昇とそれに引き続く Bcl-2 及びチオレドキシンの発現上昇が関与していると考えられた。MAPK 経



路も部分的に関与していることが示唆された。

#### E. 結論

PGE<sub>1</sub>には培養脊髄ニューロンにおけるNOC18毒性に対する保護作用があり、ALS治療薬としての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

1) Kikuchi S, Shinpo K, Niino M, Tsuji S, Iwabuchi K, Ono K, Tashiro K  
Prostaglandin E<sub>1</sub> protects cultured spinal neurons against the effects of nitric oxide toxicity. Neuropharmacology, in press

##### 2. 学会発表

1) Shinpo K., Kikuchi S., Takeuchi M., Makita Z., Tashiro K.

N<sup>e</sup>-(carboxymethyl)lysine Production by NO Donors in Rat Cultured Glial cells.

ADPD 2001(第5回アルツハイマー病・パーキンソン病国際カンファランス)

2) 新保和賢、菊地誠志、竹内正義、田代邦雄

ラット培養グリアにおけるNOドナーによるCML産生の検討

第42回日本神経内科学会総会 東京、2001年5月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

予定なし。

厚生科学研究費補助金（特定疾患研究事業）  
研究報告書

変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおける  
病態関連発現遺伝子プロファイル解析に関する研究

道勇 学		名古屋大学医学部神経内科学講座講師
小林 靖	吉原 剛	名古屋大学医学部神経内科学講座
山本正彦	石垣診祐	
梁えきとう	丹羽淳一	
竹内英之	祖父江 元	

研究要旨

レーザービームを用いて運動ニューロンを単離してその発現遺伝子プロファイルを解析する手法を用い ALS を始めとする運動ニューロン疾患の新しい病態解明・新規治療法開発システムの構築を試みた。変異 SOD1 トランスジェニックマウスから単離した運動ニューロンより RNA を抽出し T7RNA ポリメラーゼ法を用い増幅を行い、蛍光標識後 cDNA マイクロアレーにて対照例との間で発現量に変動を認める遺伝子群を同定した。また脊髄ホモジュネートの cDNA マイクロアレー解析を組み合わせることでより詳細に病態機序解明を試みた。この中でもユビキチン・プロテアゾーム関連遺伝子群が病初期より運動ニューロンのみで up-regulate され、一方病後期では脊髄ホモジュネートで炎症関連遺伝子群が up-regulate されていたのが注目すべき点であった。このシステムをさらに発展させ有機的に統合させることで、いわゆるゲノム創薬に繋がった運動ニューロン疾患の新しい病態解明・新規治療法開発戦略が描けると考える。

A. 研究目的

運動ニューロン疾患には筋萎縮性側索硬化症 (ALS) をはじめとするいくつかの疾患が含まれるが、選択的運動ニューロン死が共通の最終の common pathway である。しかしこの運動ニューロン死の機序は現在のところ不明である。その病態形成には多くの因子が関与していると考えられ、現在のところ病態解明の糸口さえ見出されていない。ヒトゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムの塩基配列および発現遺伝子についての情報が解明されようとしている。この成果をもとに疾病の病態解明および新規治療法を開発を志すものが「ゲノム創薬」である。我々はこの考えに基づき ALS を始めとする運動ニューロン疾患の病態解明・新規治療法開発戦略を以下のように考えている。近年、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、single cell の状態で細胞を集め、RNA 増幅法により発現遺伝子プロファイルを作成することが可能となってきた。さらにマイクロアレー又は DNA チップを用いることにより、多数の遺伝子の発現を定量的に測定することが可能となってきた。神経組織は神経細胞、グリア細胞、上皮細胞など lineage の異なる細胞群

が混在する組織であり、疾患の病態もおそらくこれらの lineage によって大きく異なっていることが考えられる。特に運動ニューロン疾患のように脊髄前角運動ニューロンが選択的に変性死に陥るような疾患では、脊髄を構成する細胞群に占める脊髄前角運動ニューロンの割合は極めて小さいために運動ニューロンを単離してその発現遺伝子プロファイルを解析することが病態解明に有効であると考えている。

B. 研究方法

1) 運動ニューロン発現遺伝子プロファイル解析

変異 SOD1 (G93A) トランスジェニックマウス (mSOD1 Tg) とその littermate を用い、雄性 8, 14 週令の腰髄膨大部凍結組織を用いた。各々の凍結切片作成後、PALM を用いレーザーマイクロダイセクション法にて脊髄前角運動ニューロンを切り出した。50 個の脊髄前角運動ニューロンを 1 サンプルとし、RNA 抽出後 cDNA を作成し T7 RNA polymerase により増幅した。増幅後サンプルを mSOD1 Tg は Cy3de, 対照例を Cy5 で蛍光標識後 cDNA マイクロアレー (Incyte 社: Life array: 10,000 cDNA) にハイブリダイズ・洗浄後定量化し遺伝子発現量の変化を検討した。また脊髄ホモジュネートに

つても同様に 8, 14 週令の腰髄膨大部凍結組織を用いて解析を行った。cDNA の機能別分類は Incyte 社の分類に従った。

#### (倫理面への配慮)

名古屋大学医学部実験動物取り扱い指針に従い本研究を行った。

### C. 研究結果

cDNA マイクロアレーによる発現遺伝子プロファイル解析において cDNA の機能別に分けて運動ニューロンにおいては病初期でユビキチン・プロテアゾーム関連遺伝子が mSOD1Tg で up-regulate されていた。同時期の脊髄ホモジュネートではユビキチン・プロテアゾーム関連遺伝子の発現変動は認めず、運動ニューロン特異的な変化であると考えられた。一方病後期において脊髄ホモジュネートで炎症関連遺伝子群が mSOD1Tg で up-regulate されていた。同時期の運動ニューロンではこのような変動は認めず、これはおもにグリア細胞に由来する変化であると考えられた。定量 RT-PCR および免疫染色でその mRNA および蛋白レベルでの発現量の検証をしたところ、いづれも cDNA マイクロアレーでのデータと矛盾を見なかった。

### D. 考察

今回の結果で特に病初期においてユビキチン・プロテアゾーム関連遺伝子が mSOD1Tg で up-regulate されていたは重要な知見であると考えられる。最近各種封入体を認める神経変性疾患をコンフォメーション病とした概念で捉えようとする考えがある。本研究で用いた mSOD1Tg はまさにコンフォメーション病のひとつである FALS の動物モデルであり、病理学的にも変異 SOD1 よりなる細胞質封入体を認めるものである。このように封入体を認める疾患ではその病態に細胞内ユビキチン・プロテアゾーム系の関与がいられている。本研究の結果で臨床症状のない極く初期の時期より病変の主座である運動ニューロンでユビキチン・プロテアゾーム関連遺伝子が up-regulate されていることは、ユビキチン・プロテアゾーム系因子を動かすことで変異 SOD1 に起因する細胞毒性を軽減させ、運動ニューロン変性を抑制できる可能性を示唆するものである。

### E. 結論

レーザービームを用いて運動ニューロンを単離してその発現遺伝子プロファイルを解析する手法を用い ALS を始めとする運動ニューロン疾患の新しい病態解明・新規治療法開発

システムは極めて有用であり、このシステムをさらに発展させ有機的に統合させることで、いわゆるゲノム創薬に繋がった運動ニューロン疾患の新しい病態解明・新規治療法開発戦略が描けると考える。

### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

### G. 研究発表

#### 論文発表

1. Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G: Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cord of a mutant SOD 1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, in press, 2002
2. Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba I, Abe Y, Tamakoshi A, Doyu M, Hirayama M, Sobue G: Progression and prognosis in multiple system atrophy: An analysis of 230 Japanese patients. *Brain*, in press, 2002
3. Kobayashi Y, Sobue G: Protective effect of chaperones on polyglutamine diseases. *Brain Res Bull*, 56(3-4): 165-8, 2001
4. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M, Sobue G, Koide T, Tsuji S, Lang J, Kurokawa K, Nishimoto I: A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Ab. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11): 6336-41, 2001
5. Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Do J, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G: Transgenic mice with an expanded CAG repeat controlled by the human AR promoter show polyglutamine nuclear inclusions and neuronal dysfunction without neuronal cell death. *Hum Mol Genet*, 10(10): 1039-1048, 2001
6. Doyu M, Sawada K, Mitsuma N, Niwa J, Yoshimoto M, Fujii Y, Sobue G, Kato K: Gene expression profile in Alzheimer's brain screened by molecular indexing. *Brain Res, Mol Brain Res*, 87(1): 1-11, 2001
7. Qiao S, Iwashita T, Furukawa T, Yamamoto M, Sobue G, Takahashi M: Differential effects of leukocyte common antigen-related protein on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant proteins. *J Biol Chem*, 276(12): 9460-7, 2001
8. Ishigaki S, Niwa J, Yoshihara T, Mitsuma N, Doyu M, Sobue G: Two novel genes, human neugrin and mouse m-neugrin, are upregulated with neuronal differentiation in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Com*, 279: 526-533, 2000

**研究要旨** ALS をはじめとする神経変性疾患の成因に酸化ストレスが関わっていることが知られている。今回 ALS 患者にフリーラジカスカベンジャー、エダラボンを投与し、酸化ストレスのマーカーとして知られる髄液中 **3-nitrotyrosine** (3NT) が投与前後で変化するか、観察を行った。その結果、21 例中 11 例において 3NT は減少し、投与前 0.77ng/ml であったのが投与後 0.34ng/ml に減少し、その差は有意であった ( $p=0.02$ )。本剤を含めたラジカスカベンジャーは ALS 治療に期待できる薬剤と考えられた。

#### A. 研究目的

近年 ALS をはじめとする神経変性疾患において、酸化ストレスによる神経障害が大きな役割を果たしていることが知られてきた。3NT は酸化ストレスのマーカーとして知られており、NO と superoxide の反応物の peroxynitrite が、チロシン残基に結合した結果生じる物質である。3NT はニューロフィラメントの L 鎖に結合しリン酸化を阻害し、ニューロフィラメントの assembly を障害することにより、神経変性をもたらす可能性が考えられている。本研究では、ラジカスカベンジャー、エダラボンが ALS における 3-NT の上昇を抑制できるか研究を行った。

#### B. 対象及び方法

対象は、国府台地区倫理委員会において承認された臨床試験「筋萎縮性側索硬化症を対象としたフリーラジカスカベンジャー（エダラボン）の有効性と安全性の検討（1）」および、国府台病院治験審査委員会において承認された治験「MCI-186（エダラボン）の筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対する探索的試験（第Ⅱ相）」に参加した ALS 患者。いずれの試験においても 3NT の測定は副次評価項目としてあらかじめ設定してある。

エダラボンはいずれの試験においても 1 日 30mg を 3NT の測定方法は、競合的 EIA 法を用いた。

本研究は国府台地区倫理委員会、および国府台病院治験審査委員会において被験者の安全性、負担などについて十分審議を重ねて承認を受けている。

#### C. 研究結果

ALS 患者に本剤投与後、21 例中 11 例において髄液中 3NT は低下し、3 例において上昇を示した。7 例は投与前後も 3NT は検出されなかった。投与後の 3NT の減少は有意であった（投与前  $0.7719 \pm 0.9364$  ng/ml、投与後  $0.3400 \pm 0.3939$  ng/ml、 $n=21$ 、 $p=0.0203$ 、paired t 検定）。

#### D. 考察

3NT は神経変性疾患、自己免疫性神経疾患の多くで神経変性に関与していることが推測されている。すなわちアルツハイマー病においては Neurofibrillary Tangle に、パーキンソン病ではレビー小体に、多発性硬化症では急性期病変で 3NT の免疫染色の反応がみられていると報告されている。そして ALS には脊髓前角細胞に 3NT の沈着がみられ、剖検脊髓組織で上昇しており、ALS 患者髄液でも正常対照に比し増加していると報告されている。このことは原因は異なっても最終的に神経細胞が障害を受けるプロセスにおいて酸化ストレスが役割を果たしていると考えられる。さらに最近では、3NT を線状体に投与するとパーキンソンモデル動物ができるなど、3NT 自体も神経毒性を有することが示唆されている。したがって、3NT を低下させる作用のある薬物は ALS をはじめとした神経難病に効果が期待できる。

今回の研究で、フリーラジカスカベンジャー、エダラボンは ALS 患者髄液中 3NT を低下させる作用があることがわかった。エダラボンは

水溶液中でアニオンになり、ハイドロキシルラジカル、ペルオキシルラジカルなどの不対電子を受け取り、自らがラジカルとなるが、細胞膜を傷害することなく体外に排泄される。本剤は平成 13 年 3 月に急性期脳梗塞患者を対象に承認された薬剤であり、本邦オリジナルである。

今回対象となった臨床試験は、主要評価項目を半年後の ALS 機能障害度の変化としている。さらに今後各症例の臨床症状を追跡することにより、3NT の低下と臨床効果との関係を明らかにすることが可能であろう。

#### E. 結論

ALS 患者にエダラボンを投与したところ、3NT が有意に低下した。本剤を含めたフリーラジカルスカベンジャーは ALS をはじめとする神経難病治療薬として期待できると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

#### 論文発表

1) Yoshino H, Harukawa H, Asano A.: IgG antiganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome with bulbar palsy. J. Neuroimmunol 105:195-201, 2000.

2) Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Nakamura Y, Yanagawa H, Sato T.: Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. Neurology 55:718-721, 2000.

#### 学会発表

1) 吉野英. 免疫性神経疾患及び ALS における髄液中 3-nitrotyrosine の検討. 第 42 回日本神経学会総会 (2001 年 5 月, 東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許願 (平成 14 年 1 月 31 日申請)

発明者: 吉野 英

特許出願人: 三菱ウエルファーマ株式会社、国立精神・神経センター総長

発明の名称: 神経変性疾患の予防又は治療薬

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
研究報告書

培養脊髄運動ニューロンの軸索輸送に対する AMPA 受容体作用とそのシグナル伝達  
比留間弘美、川上 倫 北里大学医学部生理学

**研究要旨** 培養脊髄運動ニューロンの軸索輸送に対する AMPA 受容体作用と、そのシグナル伝達について検討した。速い軸索輸送の観察と測定をビデオ増感顕微鏡を用いて行った。各種作動薬や阻害薬を用いた結果から、培養運動ニューロンにおいて AMPA 受容体の活性化は  $Ca^{2+}$  の細胞内流入に続く CaM II キナーゼ活性化および Cdk5 活性化を介してタウ蛋白リン酸化が起こり軸索輸送を抑制することが明らかとなった。培養腹側脊髄ニューロンにおいて、AMPA 受容体の活性化はニューロフィラメントのリン酸化と細胞死を誘導することが判明した。これらの実験結果は、ALS の病態における運動ニューロンの速い軸索輸送の障害、変性、細胞死の機構解明に示唆を与えるものと考えられる。

#### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）における運動ニューロン死に、グルタミン酸 AMPA 受容体作用の関与が示唆されてきた。一方、運動ニューロンにおける軸索輸送の障害は ALS の病態の成立機序に密接に関わると考えられている。本研究では培養運動ニューロンの速い軸索輸送に対する AMPA 受容体作用とそのシグナル伝達、蛋白リン酸化機序について検討した。

#### B. 研究方法

##### <細胞培養>

新生仔ラットの脊髄腹側部を切り出し、パイン処理により神経細胞を分離し、Neurobasal Medium 中で 1 週間培養した。

##### <軸索輸送の観察>

ビデオ増感顕微鏡を用いて、培養細胞の軸索中を輸送される粒子をリアルタイムで観察した。コントロール観察期間の後、薬物を持続的に 30 分間投与し、順行性、逆行性に移動する粒子数を測定した。

##### <免疫細胞化学>

観察実験終了後、各々の細胞につき、運動ニューロンのマーカーである SMI32（脱リン酸化ニューロフィラメントに対する抗体）を用いて蛍光染色を行い運動ニューロンの

同定を行った。同定された運動ニューロンについて、順行性、逆行性に移動する粒子数の経時的変化を解析した。脱リン酸化ニューロフィラメントの検索は、SMI31 を用いて行った。

本研究における実験は、北里大学医学部動物実験・倫理委員会の承認、指導のもとに行われた。特に、動物を殺す際には、深い麻酔により安楽死させた。

#### C. 研究結果

##### <軸索輸送に対する AMPA 受容体作用>

AMPA 受容体作動薬である AMPA (100  $\mu$ M) を持続的に投与すると、順行性、逆行性に輸送される粒子数はコントロール（薬物投与前）の約 50%まで減少した。このことから、AMPA 受容体活性化により、運動ニューロンの軸索輸送が抑制されることが示唆された。

##### <無 $Ca^{2+}$ 細胞外液下における AMPA 受容体作用>

無  $Ca^{2+}$  細胞外液下で AMPA (100  $\mu$ M) を投与したところ、AMPA による抑制作用は認められなかった。このことから、AMPA 受容体作用は  $Ca^{2+}$  の細胞内流入を介して発現することが示唆された。

$Ca^{2+}$  が流入することにより、タウ蛋白がリ

ン酸化される可能性がある<sup>1)</sup>。タウ蛋白のリン酸化は微小管を脱重合させ、軸索輸送障害を引き起こすことが示唆されている<sup>2)</sup>。そこで、運動ニューロンの細胞内タウ蛋白のリン酸化が軸索輸送に及ぼす影響について調べた。

<タウ蛋白リン酸化を促すオカダ酸の軸索輸送に及ぼす影響>

1  $\mu\text{M}$  のオカダ酸を細胞に持続的に投与すると、軸索輸送はコントロールの約 20%に減少した。同時に、神経線維の退縮が認められた。このことから、タウ蛋白リン酸化は速い軸索輸送の障害と神経線維変性を引き起こすことが示唆された。

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に依存し、タウ蛋白をリン酸化する細胞内経路には、1) CAM II キナーゼ活性化を介する経路<sup>1)</sup>、2) カルパイン活性化に続く Cdk5 活性化を介する経路<sup>3)</sup>が挙げられる。AMPA 受容体の軸索輸送抑制作用がこれらの経路を介する可能性について検討した。

<AMPA 受容体の軸索輸送抑制作用に対する KN-62 (CAM II キナーゼ阻害薬) 前処置の効果>

CAM II キナーゼ阻害薬である KN-62 (10  $\mu\text{M}$ ) を前処置し、AMPA (100  $\mu\text{M}$ ) を投与したところ、AMPA の軸索輸送抑制作用は軽減した (コントロールの約 90%に減少)。このことから、AMPA 受容体作用の一部は CAM II キナーゼ活性化を介して発現することが示唆された。

<AMPA 受容体の軸索輸送抑制作用に対する calpain inhibitor 1 (カルパイン阻害薬) 前処置の効果>

カルパイン阻害薬である calpain inhibitor 1 (10  $\mu\text{M}$ ) を前処置し、AMPA (100  $\mu\text{M}$ ) を投与したところ、AMPA の軸索輸送抑制作用は軽減した (コントロールの約 85%)。このことから、AMPA 受容体作用の一部はカルパイン活性化を介して発現することが示唆された。

<AMPA 受容体の軸索輸送抑制作用に対する butyrolactone 1 (Cdk5 阻害薬) 前処置の

効果>

Cdk5 阻害薬である butyrolactone 1 (10  $\mu\text{M}$ ) を前処置し、AMPA (100  $\mu\text{M}$ ) を投与したところ、AMPA の軸索輸送抑制作用は軽減した (コントロールの約 80%)。このことから、AMPA 受容体作用の一部は Cdk5 活性化を介して発現することが示唆された。

<AMPA 受容体活性化によるニューロフィラメントのリン酸化作用>

タウ蛋白リン酸化が起こる際、ニューロフィラメントのリン酸化も起こる場合がある<sup>4)</sup>。そこで、腹側脊髄の培養神経細胞 (運動ニューロンを含む) を用いて、AMPA 受容体の活性化がニューロフィラメントのリン酸化を引き起こすか否かについて調べた。オカダ酸 (1  $\mu\text{M}$ 、30 分暴露) と同様、AMPA (100  $\mu\text{M}$ 、30 分暴露) はリン酸化ニューロフィラメント抗体 (SMI31) 陽性細胞の割合を増加させた。よって、AMPA 受容体の活性化はニューロフィラメントリン酸化を誘導することが明らかとなった。

<AMPA 受容体活性化による神経細胞死の誘導>

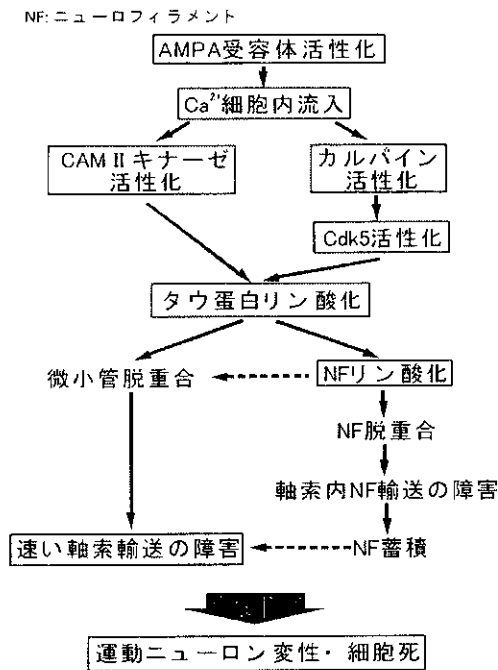
AMPA (100  $\mu\text{M}$ ) は培養脊髄ニューロンにおいて細胞死を引き起こしたが、この作用の進行は緩徐であった。一方、オカダ酸 (1  $\mu\text{M}$ ) は進行性に細胞死を引き起こした。

## D. 考察

以上の結果から、運動ニューロンにおいて AMPA 受容体の活性化は、 $\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入につづく CAM II キナーゼ活性化、および、カルパイン活性化につづく Cdk5 活性化を介したタウ蛋白リン酸化によって軸索輸送を抑制すると考えられる。タウ蛋白がリン酸化されると微小管が脱重合する<sup>2)</sup>ので速い軸索輸送が障害されると考えられる。一方、AMPA 受容体の活性化は脊髄ニューロンにおいてニューロフィラメントのリン酸化を引き起こした。ニューロフィラメントのリン酸化によりニューロフィラメントの脱重合が起こることが知られている<sup>4)</sup>。この脱重合により軸索内ニューロフィラメント輸送が

障害されニューロフィラメントの蓄積が起これると考えられている<sup>4)</sup>。ニューロフィラメントの蓄積はALSの組織像に特徴的である。最近、ニューロフィラメントは速い軸索輸送で運ばれている(静止している時間が長いので遅い輸送で運ばれているように見える)ことが報告された<sup>5,6)</sup>。速い軸索輸送の障害は、ニューロフィラメントのリン酸化による微小管の脱重合によっても起こる<sup>7)</sup>。さらにニューロフィラメントの蓄積により速い軸索輸送が障害を受けることも知られている<sup>8)</sup>。これらより、ALSの成因において速い軸索輸送の障害も遅い軸索輸送の障害とともに重要な因子であると考えられる。

### AMPA受容体活性化作用の機序



### E. 結論

培養運動ニューロンにおいて AMPA 受容体の活性化は  $Ca^{2+}$  の細胞内流入、CAM II キナーゼ活性化およびカルパイン活性化につづく Cdk5 活性化を介してタウ蛋白をリン酸化し、速い軸索輸送を抑制する。一方、AMPA 受容体の活性化は脊髄ニューロンのニューロフィラメントのリン酸化と細胞死を誘導する。AMPA 受容体活性化によるこれらの作用は、ニューロフィラメントの蓄積と軸索輸

送障害を特徴とする ALS の成因と病態に示唆を与えるものと考えられる。

### 文献

- 1) Gupta RP, Abou-Donia MB: Tau phosphorylation by diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hen brain supernatant inhibits its binding with microtubules: role of  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II in tau phosphorylation. Arch Biochem Biophys 365: 268-278, 1999.
- 2) Garcia ML, Cleveland DW: Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. Curr Opin Cell Biol 13: 41-48, 2001.
- 3) Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH: Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. Nature 405: 360-364, 2000.
- 4) Nguyen MD, Lariviere RC, Julien JP: Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. Neuron. 30: 135-147, 2001.
- 5) Prahlad V, Helfand BT, Langford GM, Vale RD, Goldman RD: Fast transport of neurofilament protein along microtubules in squid axoplasm. J Cell Sci 113: 3939-3946, 2000.
- 6) Wang L, Ho CL, Sun D, Liem RK, Brown A: Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses. Nature Cell Biology 2: 137-141, 2000.
- 7) Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K: Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. Proc Nat Acad Sci USA 94: 298-303, 1997.
- 8) Nixon RA, Sihag RK: Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. Trends Neurosci 14: 501-506, 1991.

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

1. 論文発表  
未

2. 学会発表  
未

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



変異 SOD1 のタンパク化学的異常によるプロテアソーム分解機能異常と運動ニューロン死の関連についての研究

高橋 良輔 理研脳センター・運動系神経変性研究チーム・チームリーダー

研究要旨：今回我々は、変異 SOD1 タンパクのタンパク化学的異常に着目し、運動ニューロン死との関連を検討した。その結果、変異 SOD1 タンパクが 1)折りたたみ異常によって溶解性が変化し、2)酸化ストレスによって多量体を形成すること、こうしたタンパク化学的異常がユビキチン・プロテアソームタンパク分解系に認識されることを明らかにした。また、変異 SOD1 を恒常発現させるとプロテアソーム機能が抑制され、さらに運動ニューロンがプロテアソーム抑制薬に対して脆弱であった。本所見は多くの変異 SOD1 による ALS の病態を説明しうる知見と考えられる。

#### A. 研究目的

変異 SOD1 を有する家族性筋萎縮性側索硬化症 (Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, FALS) 患者の脊髄運動ニューロンにおいてユビキチン化封入体が観察されることから、変異 SOD1 の分解異常が病態に関与している可能性がある。我々は変異 SOD1 が何らかのタンパク化学的異常によってユビキチン化されるとの仮説を立て、変異 SOD1 タンパクによる運動ニューロン死のメカニズムを調べた。

#### B. 研究方法

マウス神経芽細胞腫由来不死化細胞 (N2a) に野生型・変異型 SOD1 遺伝子を一過性、あるいは恒常発現させ、プロテアソーム阻害薬、あるいは酸化ストレスとして過酸化水素を投与し、生存率の評価と Western blotting、プロテアソーム活性測定を行なった。Western blotting の際には、界面活性剤を含むバッファーに溶解し、溶性画分と不溶性画分に分けて泳動した。さらに、胎仔マウス脊髄運動ニューロン培養の系を確立し、プロテアソーム阻害薬投与による運動ニューロンの生存率を非運動ニューロンのそれと比較検討した。

C. 研究結果：N2a 細胞にヒト SOD1 遺伝子を一過性発現させると、変異型 SOD1 は野生型に比べて発現量が低いが、プロテアソーム阻害薬であるラクタシスチンを加えると、変異 SOD1 のみ不溶性画分で発現量が増加し、細胞の生存率も低下した。さらにヒト SOD1 のカルボキシル末端に FLAG タグを付加したものを一過性導入して同様の実験を行なうと、野生型も界面活性剤の溶解性が低下し、生存率はベクターコントロールと比べて低下していた。しかし、ラクタシスチンの効果は FLAG タグのない SOD1 と同様、変異型のみ不溶性画分での増大現象を認めた。N2a 細胞において、変異 SOD1 は早発現早期からユビキチン化されたが、野生型はされなかった。過酸化水素付加による酸化ストレスを与えると、変異 SOD1 タンパクの溶解性が低下し、多量体を形成した。加えて、酸化ストレスに暴露された変異 SOD1 はよりユビキチン化された。ヒト SOD1 タンパクを恒常発現する N2a 細胞株を樹立し、プロテアソーム活性を測定すると、変異型で、野生型に比べ低下していた。胎仔マウス脊髄初代培養運動ニューロンはラクタシスチンに対して、非運動ニューロンに比べ脆弱であった。

#### E. 結論

変異 SOD1 タンパクは溶解性の低下、酸化ストレスに対する多量体形成というタンパク化学的異常を有しており、ユビキチン化を受けやすい。さらに変異 SOD1 の持続発現によりプロテアソーム機能は低下し、運動ニューロンはこの状態に対して脆弱である。以上の結果は変異 SOD1 による病理変化、選択的運動ニューロン死の機序を説明しうる知見である。

#### F. 健康危険情報：なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

漆谷真、高橋良輔：筋萎縮性側索硬化症 病態解明と治療の現状。Molecular Medicine 38, 1262-1272, 2001

Imai Y, et al: Cell 105: 891-902 (2001)

Suzuki Y, et al: Mol. Cell 8: 613-21 (2001)

##### 2. 学会発表

井上治久、岩里琢治、館野美成子、三澤日出巳、糸原重美、高橋良輔：コリン作動性神経特異的遺伝子発現制御システムの確立。第 41 回日本神経学会総会、(2001)、東京

漆谷真、月田香代子、高橋良輔、橋本光弘、御子柴克彦。アデノウイルスベクターを用いた、胎仔マウス初代培養運動ニューロンへのヒト変異 SOD1 遺伝子導入。第 41 回日本神経学会総会 (2001)、東京

漆谷真、月田香代子、高橋良輔。変異ヒト SOD1 の界面活性剤への不溶性と、運動ニューロン死との関連。日本神経科学・神経化学合同大会 (2001)、京都

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

とくに予定はない。

AMPA 受容体各サブユニット mRNA 発現の定量的解析  
—特に ALS の病因との関連から脊髄運動ニューロンの GluR2 サブユニットに注目して—

郭 伸 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学

研究要旨：ALS の脊髄前角では AMPA 受容体サブユニットである GluR2 mRNA の発現および編集率が低下しており、AMPA 受容体を通じた  $Ca^{2+}$  流入の増大が脊髄運動ニューロンに特異的な細胞死に大きく関わっていると考えられる。また、脊髄運動ニューロンには GluR2 の発現が少ないためもともと AMP 受容体の  $Ca^{2+}$  透過性が高く、興奮性神経細胞死に感受性が高いとする報告もある。本研究では、GluR2 発現量が運動ニューロン、ALS で減少しているかどうかを検証するために、脊髄運動ニューロン組織を用いた定量 RT-PCR により GluR1～GluR4 各サブユニットの発現量を定量し比較検討した。正常対照例では AMPA 受容体 mRNA レベルは大脳皮質>小脳>白質=脊髄で、GluR2 は 80%以上を占めていた。単一ニューロン組織を用いた解析では脊髄運動ニューロンの AMPA 受容体 mRNA 発現量は ALS と正常対照で変わらず、その殆どが GluR2 であった。ヒト中枢神経の AMPA 受容体は GluR2 が主要な構成サブユニットであり、運動ニューロンも ALS のものを含め同様であった。従って、サブユニット構成の上から運動ニューロンの脆弱性は結論づけられず、AMPA 受容体を介した神経細胞死には RNA 編集異常による要素の方が大きいことが確かめられた。

#### A. 研究目的

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病因仮説のうち、グルタミン酸受容体のサブタイプである AMPA 受容体を介する細胞死のメカニズムの関与を示唆する知見が蓄積している。脊髄運動ニューロンは AMPA 受容体を介する神経細胞死に対する脆弱性が高く、細胞死に先立って細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇することが培養神経細胞により明らかにされている。AMPA 受容体の  $Ca^{2+}$  透過性は GluR2 がサブユニットの中に含まれているかどうかにより決定され、編集された GluR2 を含まない場合には  $Ca^{2+}$  透過性になる。脊髄運動ニューロンには GluR2 の発現が少ないために AMP 受容体の  $Ca^{2+}$  透過性が高く興奮性神経細胞死に感受性が高いことが ALS における選択的細胞死の要因ではないか、との報告がある。しかし、ニューロンにおける AMPA 受容体サブユニットの発現量を定量したものは、動物培養細胞におけるもののみであり、ヒト脊髄運動ニューロンでは *in situ* hybridization や免疫組織化学による定性的な結果からの類推にすぎない。

本報告では、ヒト単一運動ニューロンにおける AMPA 受容体サブユニット GluR1～GluR4 の mRNA を定量 RT-PCR により測定し、単一ニューロンにおける AMPA 受容

体サブユニット構成比を知り、Ca 透過性の高低を推定する根拠を得ることを目的とした。

#### B. 研究方法

剖検時凍結保存した正常 (3 例) および ALS (3 例) 剖検脊髄より、昨年報告した方法により脊髄運動ニューロンを切り出し、total RNA を抽出した。蛍光プローブを用いたプライマーにより LightCycler (Roche Diagnostics)を用いて定量 RT-PCR を GluR1～GluR4 につき行った。量比はアクチンに対するコピー数で表した。正常対照例は大脳皮質、白質、小脳、脊髄前角、後角、前索、後索の組織からの検討も加えた。

(倫理面への配慮)

剖検組織の使用にあたっては、原則研究倫理委員会の承認の下文書によるインフォームドコンセントを得られた試料を用いた。匿名性に留意し、病的に確定診断のついた症例のみを用いた。

#### C. 研究結果

正常対照の組織からの定量 RT-PCR では、大脳皮質が最も高く、小脳、白質・脊髄の順であった。GluR2 は部位にかかわらず 80%以上を占めていた。脊髄運動ニューロンは、10 個の細胞を同一切片から集めた組織によ

り検討したが、発現量、GluR2 比とも ALS と正常対照で差はなかった。GluR2 は前サブユニットの 50~95% を占めていた。

#### D. 考察

以上の結果は、脊髄運動ニューロンの AMPA 受容体はサブユニット構成の上で他の部位のニューロンにおけるものと違いはなく、GluR2 が主体であること、ALS の運動ニューロンには構成サブユニット上の変化はみられないこと、を明らかにした。したがって、筋萎縮性側索硬化症に選択的な脊髄運動ニューロン死には、GluR2 の発現低下による AMPA 受容体の特性変化が原因である可能性が低いことが明らかである。

我々は GluR2 mRNA の Q/R サイトでの RNA 編集が減少していることが、ALS の病因と深く関わっていることを主張してきたが、ALS 脊髄運動ニューロンは GluR2 を豊富に発現していることが明らかになり、RNA 編集の低下は AMPA 受容体の特性変化に大きな影響を与えると考えられ、我々の仮説を支持する結果である。

#### E. 結論

ヒト中枢神経で AMPA 受容体サブユニットの発現比率を初めて定量的に示した。特に単一脊髄運動ニューロンを用いた検討で、脊髄運動ニューロンにおいても AMPA 受容体のサブユニット構成には変化がないことが明らかになった。ALS の病因には、GluR2 の発現レベルの変化ではなく、RNA 編集の変化が深く関わっている可能性が高まった。

F. 健康危険情報：なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Kwak S, Takuma H, Kanazawa I: Molecular changes of AMPA receptor subunits in ALS spinal cord. In *Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis*. (Eds. Abe K) Elsevier Science BV, Amsterdam, pp197-202, 2001.
- (2) 孫慧、郭 伸：脊髄介在ニューロンの働き、*Clinical Neuroscience*19:756-760, 2001.
- (3) 郭 伸：筋萎縮性側索硬化症、今日の診断指針 第5版、総編集 亀山正邦、亀田治男、高久史磨、阿部令彦、医学書院、東京、2002、印刷中。
- (4) 河原行郎、郭 伸；筋萎縮性側索硬化症における AMPA 受容体異常、*Brain Medical*, 2002、印刷中。

##### 2. 学会発表

- (1) 河原行郎、他：筋萎縮性側索硬化症 AMPA 受容体サブユニットに生じている RNA 編集変化の単一運動ニューロンを用いた解析、第 42 回日本神経学会総会、2000.5.11. 東京
- (2) 孫慧、他：カイニン酸の髄注による ALS モデル動物の作成、第 42 回日本神経学会総会、2000.5.13. 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

FALS におけるミトコンドリア病態とカルニチンの保護作用解析

井上正康 大阪市立大学大学院医学研究科教授

**研究要旨** FALS 変異 SOD は活性酸素産生の主座であるミトコンドリア及びペルオキシソーム膜への親和性が低下し、これによりミトコンドリアなどで活性酸素消去不全が起こる可能性を見いだした。この可能性を検証するために、FALS のモデルマウスを用いてミトコンドリア病態を解析した。また、ミトコンドリア膜保護作用を有するカルニチンが本病態マウスの神経・筋機能を保護し、寿命延長効果があることを明らかにした。

**A. 研究目的**

FALS の発症に Cu/Zn-SOD の点突然変異が関与することが判明したが、その分子機構は不明である。SOD 変異が分子構造維持に関与する部位に集中していることから、その細胞内局在性変化を検討し、正常 Cu/Zn-SOD がミトコンドリアやペルオキシソームなどに濃縮局在していること、および変異 SOD では両膜への結合性が低下していることを明らかにした。本疾患は他の臓器に比較してミトコンドリア依存性の高い運動神経が特異的なターゲットとなることから、FALS ではミトコンドリア局所での活性酸素病態が増強し、アポトーシスを誘起する可能性を示唆した。さらに、ミトコンドリア依存性アポトーシスでは、長鎖脂肪酸が重要であることを解明し、FALS にも長鎖脂肪酸毒性が関与している可能性が示唆された。本研究では、FALS におけるミトコンドリア障害の関与、及び長鎖脂肪酸をエネルギーに変換するカルニチンによる治療効果を検討した。

**B. 研究方法**

1. G93A FALS トランスジェニックマウス (Tg) の脊椎および筋の脂質過酸化物 (4-HNE) 及び 8OH-dG を経時的に解析した。
2. PC12 細胞のミトコンドリア膜脱分極及びミトコンドリア依存性アポトーシスに及ぼすカルニチンの保護作用を検討した。
3. カルニチン (400 mg/kg/day) を含む飲水を Tg に与え、運動能力、発症時期、進行速度、及び寿命に対するカルニチンの作用を検討した。

(倫理面への配慮)

動物の扱いに関しては、本学動物実験規定に従った。

**C. 研究結果**

(1) FALS Tg の酸化障害解析

Tg の脊椎と腓腹筋の脂質過酸化を検討した結果、進行に伴い過酸化レベルが上昇していた。また、8OH-dG レベルも上昇していた。

(2) PC12 細胞のミトコンドリア膜脱分極におけるカルニチンの影響