

厚生労働省科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

ALS2分子病態解明とALS治療技術の開発

平成14年度 研究報告書

主任研究者 池田 穰衛
東海大学総合医学研究所分子神経科学部門
平成15(2003)年3月

目 次

研究者一覧

I. 総括研究報告

ALS2 分子病態解明と ALS 治療技術の開発

池田 穰衛 ----- 1

II. 分担者報告

1. ALS 及びその関連疾患患者の症候及び試料の収集と遺伝子分析

祖父江 元 ----- 6

2. ALS2 モデル疾患マウスの作出

岩倉 洋一郎 ----- 9

3. ALS2 蛋白の分子動態解析

成宮 周 ----- 12

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

研究者一覽

ALS2 分子病態解明と ALS 治療技術の開発
研究者一覧

	氏名	所属	職名
主任研究者	池田 穰衛	東海大学総合医学研究所	教授
分担研究者	祖父江 元	名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学	教授
	岩倉 洋一郎	東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター	教授
	成宮 周	京都大学医学研究科神経・細胞薬理学	教授
研究協力者	中野 今治	自治医科大学神経内科	教授
	青木 正志	東北大学医学部神経内科	講師

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

ALS2 分子病態解明と ALS 治療技術の開発

主任研究者 池田 穰衛

東海大学総合医学研究所分子神経科学部門教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は上位運動ニューロンおよび下位運動ニューロンの選択的変性を特徴とする神経変性疾患である。ALS の分子病態は未だ不明であり、その治療薬ならびに治療法も確立されていない。本研究では、我々が同定した家族性若年発症型 ALS 原因遺伝子 “ALS2 遺伝子” に注目し、以下の 3 項目の研究を行う； (1) ALS2 遺伝子が ALS あるいは ALS 周辺疾患の病態における修飾因子として働いている可能性に関する研究、 (2) ALS2 疾患モデル動物としての *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出、 (3) ALS2 遺伝子産物 (ALS2 蛋白質) およびその機能ドメイン (グアニンヌクレオチド交換因子; GEF) の細胞内分子機能に関する研究。そして、これらの研究を通して、最終的に ALS の分子動態解明と治療技術の開発を目指す。平成 14 年度 (研究計画初年度) においては、

(1) 本邦の孤発性 ALS および ALS 周辺疾患 (原発性側索硬化症、痙性対麻痺) 患者の臨床症候および DNA の集積、ならびに ALS2 遺伝子配列解読実験系の確立、 (2) *Als2* ノックアウトコンストラクトの作製、相同組換え体 ES クロンの分離、ならびにキメラマウスの作出、 (3) Rho 情報伝達の神経系軸索伸長および退縮に関する新規分子作用の同定、ならびに ALS2 遺伝子産物 (ALS2 蛋白質) の Vps9 ドメインにおける Rab5 低分子量 GTPase 活性化機能の発見という成果が得られた。

分担研究者

祖父江 元 (名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学 教授)

岩倉 洋一郎 (東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター 教授)

成宮 周 (京都大学医学研究科神経・細胞薬理学 教授)

研究協力者

中野 今治 (自治医科大学神経内科 教授)

青木 正志 (東北大学医学部神経内科 講師)

たり 1-2 人と決して低くない頻度である。ALS の発症・進行に係わるとされる幾つかの危険因子は知られているものの、確固たる生化学的情報も少なく、分子病態も未だ不明で、分子レベルでの確定診断法ならびに治療法も確立されていない。ALS 患者の大多数は孤発例で、家族性の発症頻度は僅か 10% 程度である。しかし、すべての ALS は、運動ニューロンの機能障害・変性という点においては共通することから、家族性 ALS の原因遺伝子に注目した分子病態研究は、孤発性 ALS の分子発症機序の解明と ALS の治療技術の開発に効果的な研究戦略の一つと考えられる。

我々は、家族性 ALS の原因遺伝子としては、ALS 1 型の原因遺伝子 (*SOD1* 遺伝子) に次いで 2 番目となる、若年発症型 ALS 2 型原因遺伝子 “ALS2 遺伝子” を同定した (Nature Genetics 29:166-173, 2001)。本研究では、この ALS2 遺伝子に注目し、以下の 3 項目の研究を行う。(1) 本邦の孤発性 ALS および ALS 周辺疾患 (原発性側索硬化症、痙性対麻痺) の患者を対象として、患者 ALS2 遺伝子における多型および変異配列を同定することにより、ALS2 遺伝子が ALS あるいは ALS 周辺疾患

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は上位運動ニューロンおよび下位運動ニューロンの選択的変性を特徴とする “heterogeneous group of inexorable neurodegenerative disorders” である。我が国における ALS 発症頻度は欧米諸国の例に等しく 10 万人当

の症候や予後、さらには発症そのものに関わるにおける修飾因子（あるいは危険因子）として働いている可能性に関して検討する。

(2) ALS2は劣性遺伝形式を示す疾患であることから、ALS2疾患モデル動物としては*Als2*遺伝子欠損マウス (*Als2*-KO Mouse) を作出する。そして、作出したモデルマウスの分子病態解析を行う。

(3) *ALS2*遺伝子産物 (ALS2蛋白質) の細胞内挙動と機能解析を行う。ALS2蛋白質はそのアミノ酸配列中に複数のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の機能ドメイン配列が存在することから、ALS2がある種の低分子量GTPaseの活性化因子であると推定される。ここでは、そのような推定分子機能を手掛かりにして、ALS2蛋白質の有する実際の細胞内分子機能を解明し、運動ニューロンの機能障害ならびに変性における分子的役割を明らかにする。以上のような3項目の研究を通して、本研究では最終的にALSの分子動態解明と治療法開発のための知見・情報の収集、基本技術ならびに実験系の確立を目指す。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

(1) 第1項目の研究では、本邦の孤発性 ALS および ALS 周辺疾患 (原発性側索硬化症、痙性対麻痺) 患者の臨床症候の解析およびDNA試料の収集を行う。そして、それらを *ALS2* 遺伝子配列解析に供し、病態発現における *ALS2* 遺伝子変異・多型の関与について解析する。本研究では、*ALS2* 遺伝子全長の 80Kb のゲノム領域中の 18kb のゲノム配列を解読する。該当領域には、*ALS2* 遺伝子のプロモーター領域、全 34 エクソンおよび各エクソン・イントロンの境界領域が含まれている。方法は、患者末梢血液から抽出したゲノミック DNA を鋳型としてプロモーターおよび各エクソンを含むゲノム領域を PCR 法により増幅し、その増幅産物の遺伝子配列を解読するものである。得られた配列は、コンピュータ解析ソフトにより配列比較を行い、遺伝子多型および変異を検出する。そして、最終的に得られた多型・変異と臨床症候との相関を統計学的手法により解析する。

(2) 第2項目の研究では、ALS2 疾患モデルマウスを作出する。先に我々が同定したチュニジアの ALS2 家系の遺伝子変異は、*ALS2* 遺伝子の第3エクソンに

おける一塩基対欠失であることから、その変異と同等の変異マウスを作製することを意図して、マウス *Als2* 相同遺伝子の第3エクソン以降が欠損するようにターゲティングベクターをデザインした。そして、そのターゲティングベクターをマウス ES 細胞に導入し、相同組換え体クローンを得、さらにそれらをキメラマウス作製に供した。

(3) 第3項目に関しては、本年度は ALS2 蛋白質アミノ酸配列中に存在する2つの GEF ドメイン (DH/PH および Vps9) に注目して、それら分子機能の解明を目指した。DH/PH ドメインは、Rho 系の低分子量 GTPase の活性化因子であると推定されることから、Rho 情報伝達の神経系での分子機能と ALS2 の DH/PH 自身の触媒活性の検討を行った。一方、Vps9 ドメインは、Rab 系の低分子量 GTPase を基質として機能している可能性を考慮し、ALS2 の Vps9 ドメインの本来の基質の同定を生化学的および細胞生物学的手法により試みた。

(倫理面への配慮)

ALS 患者および健常者における *ALS2* 遺伝子変異および遺伝子多型については、倫理委員会の承認に基づき ALS 患者とその家族および健常者の方々の納得と協力 (インフォームドコンセント) を得た上で実施した。また、動物実験に際しては各大学における組換え DNA 実験安全委員会ならびに動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

(1) 孤発性 ALS および痙性対麻痺患集積と資料収集ならびに DNA (SNP) 解析名古屋大学において、約 100 例の孤発性 ALS 患者を集積し、ElEscorial に基づく臨床表現型の解析を開始し、同時に当該患者の遺伝子の収集と *ALS2* の遺伝子変異解析に着手した (祖父江)。自治医科大学では、孤発性 ALS 患者 44 症例、痙性対麻痺 4 症例の試料収集が完了した (中野)。東北大学およびその関連施設の孤発性 ALS および家族性痙性対麻痺患者の資料収集にあたり、倫理委員会の指針を遵守した新たな計画が進行中である (青木)。孤発性若年発症型 ALS (6 例)、孤発性 ALS (2

例)、家族性で劣性と思われる ALS (3 例)、痙性対麻痺 (2 例)、さらに祖父江らが集積した孤発性 ALS 患者 48 症例についての ALS2 遺伝子の全 34 エクソンの DNA 解析を完了した (池田)。現在までに見いだされた SNP 数は、総計 44 ヶ所 (5' 上流プロモーター領域; 3 ヶ所、翻訳エクソン内; 10 ヶ所、3' 非翻訳領域; 5 ヶ所、イントロン領域; 26 ヶ所) であった。また、イントロンにおける 1 ヶ所の欠失 (5bp 欠失; hetero) および 1 ヶ所の挿入配列 (1bp 挿入; hetero) が見いだされた。これらの多型の中には、翻訳されるアミノ酸の置換を伴う SNP や、61 症例中 1 症例でのみ見いだされているような稀な SNP も存在することが明らかとなった。

(2) ALS2 モデル疾患マウスの作出

Als2 遺伝子のエクソン 3 の一部を欠損させ、代わりにネオマイシン耐性遺伝子を挿入したコンストラクトを構築した (池田)。このコンストラクトを ES 細胞 (E14.1) に導入し、ネオマイシン耐性クローンを 14 クローン選別した。これらのクローン細胞と 8 細胞期胚とを凝集させ子宮に移植することにより、4 クローンの ES 細胞に由来するキメラマウス (キメラ率 100% の♂) が合計で 43 匹得られた (岩倉)。現在、生殖系列キメラマウスの同定を行っている。

(3) ALS2 蛋白質の分子動態と神経変性機序について

ALS2 の DH/PH ドメインの神経細胞形態における役割を探るため、これが活性化されると思われる Rho 情報伝達の神経系での役割とこのドメイン自身の触媒活性の検討を行った。前者では、これまで神経突起退縮のみに働くと考えられていた Rho が下流分子の使い分けにより軸索の伸長にも退縮にも働くことを見出した。後者では、DH/PH ドメインを含む幾つかの ALS2 断片を、HeLa、3T3、NIH-115 などの細胞で発現しその表現形から基質 Rho 蛋白質の同定を試みたが、これまでのところ不明に終わっている (成宮)。ALS2 の Vps9 ドメインに関しては、それが Rab5 低分子量 GTPase を特異的に活性することを見いだした。さらに、この機能は ALS2 の DH/PH ドメインによって強調されることが半明した (池田)。また、この機能は細胞質内輸送やシグナル伝達に必須のエンドソ-

ム動態の調節に密接に関わっている事が示唆された。

D. 考察

ALS2 遺伝子は、当初常染色体劣性遺伝形式を示す若年発症 ALS 2 型および若年発症家族性原発性側索硬化症 (PLSJ) の原因遺伝子として同定されたものであるが、近年の海外における研究により当該遺伝子がそれらの疾患のみならず、あるタイプの家族性痙性対麻痺 (HSP) の原因遺伝子であることが明らかとなってきた。これまでの *ALS2* 遺伝子変異に関する研究から、現時点で合計 8 つの遺伝子変異が発見されている。我々が同定したチュニジアの *ALS2* 家系を筆頭に、クウェートおよびサウジアラビアの PLSJ の 2 家系、フランスおよびイタリアの小児発症上向き痙性麻痺 (infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis: IAHS) の 4 家系、およびパキスタンの小児発症複合型遺伝性痙性対麻痺 (infantile-onset autosomal recessive complicated HSP) の 1 家系で変異が発見されている。しかし、本邦では *ALS2* 遺伝子変異を持つ患者は見いだされていない。これらの遺伝子変異で重要な点は、いずれのケースも近親婚による劣性遺伝病であることから、患者における遺伝子変異は相同染色体間で同一であり、よって両アレルの *ALS2* 遺伝子がともに不活化されていることである。したがって、患者においては、正常な *ALS2* 蛋白質の翻訳、ならびに *ALS2* 蛋白質の本来発揮すべき機能が損なわれ、それにより運動ニューロン機能障害および細胞死が引き起こされると考えられる。また、遺伝子変異および臨床症状の対比から、*ALS2* 遺伝子の機能喪失は主に上位運動ニューロンの機能障害および変性に関与していると想定されている。以上のことを総合して考えると、*ALS2* 遺伝子は ALS を含めたある種の運動ニューロン疾患の共通した運動ニューロン変性のコントロール因子であると想定することが可能である。我々は、本研究の第 1 項目で実施している包括的な *ALS2* 遺伝子変異・多型検索により、すでに 40 個所以上の塩基配列多型を *ALS2* 遺伝子内に同定している。今後の遺伝子変異・多型と臨床症候の相関関係の解析により、*ALS2* 遺伝子変異・多型がある特定の ALS 疾患症候の直接的原因であることに加えて、運動ニューロン疾

患全般に係わる症候調節因子（あるいは危険因子）であることが実証されると期待される。

一方、第2項目の実験により、すでにキメラマウスが得られていることから、次年度には *Als2* ノックアウトマウスが作出されることが期待される。さらに、第3項目の研究により、Rho 情報伝達の神経系での新たな分子機能が同定され、さらに ALS2 が Rab5 低分子量GTPase の特異的 GEF であること、エンドソーム動態の調節に密接に関わっている事などが明らかになった。従って、ALS2 蛋白質は、特異的低分子量GTPase 質活性化を介して様々な細胞内物質輸送やシグナル伝達に関与していると推定される。今後のより詳細な研究により、ALS2 の細胞内分子機能およびそのシグナル伝達系の実体が明らかになることが期待される。また、これらの分子機能の欠損が実際の疾患の分子病態の本質であるか否かに関しても、作製されるモデルマウスを解析することにより証明できると考えている。

E. 結論

近年、多くの神経変性疾患発症の分子機構として細胞内物質輸送系の異常が想定されていることから、*ALS2* 遺伝子変異による運動ニューロン機能障害・細胞死も類似の分子メカニズムにより引き起こされている可能性が高い。現在、我々は発症分子メカニズムの解明に向けて、生化学的・細胞生物学的手法による ALS2 蛋白質の分子機能解析、およびノックアウトマウスの作製による ALS2 モデルマウスの作出を行っている。今後、このような実験を通して ALS2 蛋白質の分子のおよび固体レベルでの機能が明らかになるであろう。それにより、現在行っている *ALS2* 遺伝子の包括的変異・多型解析により明らかになった *ALS2* 遺伝子配列変異・多型の生物学的な意義 (*ALS2* 遺伝子発現レベルあるいは ALS2 蛋白質機能そのものに対する影響) も解明され、ALS およびその周辺疾患の臨床症候の分子的理解、分子診断法、治療法・治療薬開発への道が開かれるものと考えている。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang, F., Corbett, D., Osuga, H., Osuga, S., Ikeda, J.-E., Slack, R. S., Hogan, M. J., Hakim, M., and Park, D. S.: Inhibition of cyclin-dependent kinase improves CA1 neuronal survival and behavioral performance after global ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 171-182, 2002.
- 2) Xu, M., Okada, T., Sakai, H., Miyamoto, N., Yanagisawa, Y., MacKenzie, A. E., Hadano, S., and Ikeda, J. - E.: Functional human NAIP promoter and transcriptional elements of the human NAIP and ϕ NAIP genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1574 (1), 35-50, 2002.
- 3) Okada, T., Gondo, Y., Goto, J., Kanazawa, I., Hadano, S., and Ikeda, J. - E.: Unstable transmission of the RS447 human megasatellite tandem repetitive sequence that contains the USP17 gene encoding a functional deubiquitinating enzyme. *Hum. Genet.* 110 (4), 302-313, 2002.
- 4) Singaraja, R. R., Hadano, S., Metzler, M., Givan, S., Wellington, C. L., Warby, S., Yanai, A., Gutekunst, C. -A., Leavitt, B. R., Yi, H., Fichter, K., Gan, L., McCutcheon, K., Chopra, V., Michel, J., Hersch, S. M., Ikeda, J. -E., and Hayden, M. R.: HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Hum. Mol. Genet.* 11 (23), 2815-2828, 2002.
- 5) Kunita, R., Otomo, A., and Ikeda, J.-E.: Identification and characterization of novel members of the CREG family, putative secreted glycoproteins expressed specifically in brain. *Genomics* 80(5), 456-460, 2002.

2. 学会発表

- 1) Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., Miyamoto, N., and Ikeda, J. - E. : Functional analysis of the putative transcription factors for the human Huntington' s disease gene. Human Genome Meeting 2002, Programme and Abstract book, p115 (poster no:148), Shanghai, China, April 14-17, 2002.
 - 2) Hadano, S., Hand, C. K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R. S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., Figlewicz, D. A., Kwiatkowski, T., Hosler, B. A., Sagie, T., Skaug, J., Nasir, J., Brown, R. H., Jr., Scherer, S. W., Rouleau, G. A., Hayden, M. R., and Ikeda, J. -E. : Identification and characterization of the ALS2 causative gene that encodes a protein containing multiple GEF domains. Human Genome Meeting 2002, Programme and Abstract book, p191 (poster no:420), Shanghai, China, April 14-17, 2002.
 - 3) Hadano, S. : A causative gene underlying familial amyotrophic lateral sclerosis 2 (ALS2). The Third International Symposium on the Study of Brain Function. Program, P112 (019-1), Fukuoka, Japan, May 9-10, 2002.
 - 4) Ikeda, J. -E., Otomo, A., Kunita, R., Yoshida, E., Hadano, S., and Osuga, H. :ALS2 gene accounting for amyotrophic lateral sclerosis 2 encodes multi guanine exchange factor (GEF) domains acting for small GTPases. 神経化学 41 (3)、第 45 回日本神経化学会大会抄録号、p354 (P01-F-18/MS4-6)、札幌、July 17-19、2002.
 - 5) 田中一則、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛 :Functional analysis of the putative transcription factors for human Huntington' s disease gene. 神経化学 41 (3)、第 4 5 回日本神経化学会 (札幌) 大会抄録集号 41 (3)、p355 (P01-F-19)、札幌、July 17-19、2002.
 - 6) Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., Miyamoto, N., and Ikeda, J. - E. : Molecular behavior of the putative transcriptional factors for the human Huntington' s disease. THE 15th NAITO CONFERENCE ON MOLECULAR BIOLOGICAL APPROACHES FOR INTRACTABLE DISEASE [III]. PROGRAM, ABSTRACTS, LIST OF PARTICIPANTS, p82 (PS [II]-27)、葉山 (湘南国際村センター、神奈川)、October 2-5、2002.
 - 7) 池田穰衛 :NAIP の抗アポトーシス機序と神経変性防御薬の開発. 生化学 74 (8)、第 75 回日本生化学会大会発表抄録集、p645 (2S28-6)、京都、October 14-17、2002.
 - 8) 田中一則、宮本なつき、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛 :ハンチントン病遺伝子転写調節候補因子の細胞内分子動態、第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、P766 (21-0406)、横浜、December 11-14、2002.
 - 8) 國田竜太、大友麻子、池田穰衛 :脳特異的に発現する新規推定分泌糖タンパク質、ヒト CREG2 並びにマウス Creg2 の cDNA 単離と発現解析. 第 25 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p583 (1P-0962)、横浜、December 11-14、2002.
 - 9) 田中一則、宮本なつき、将口 (宮田) 淳子、池田穰衛 :Nuclear Shuttle 活性を有する転写調節因子の解析 :ハンチントン病遺伝子転写の分子機序、第 20 回染色体ワークショップ、p31 (38)、京都、January 30-February 1、2003.
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 特記すべきことなし
 2. 実用新案登録 特記すべきことなし
 3. その他 特記すべきことなし

II. 分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書
ALS 及びその関連疾患患者の症候及び試料の収集と遺伝子分析
分担研究者 祖父江 元
名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 教授

研究要旨

家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)において、近年新たに遺伝子変異が明らかになった ALS2 について、本邦における存在とその頻度を確認する。また、この ALS2 遺伝子が孤発性 ALS (SALS) の発症あるいは症候に関わる modifier gene である可能性を、ALS2 遺伝子多型を解析することによって明らかにする。本年度は、解析の準備段階として、これら患者の臨床症候および DNA の集積を行った。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の多くは孤発性(SALS)であるが、一部に家族歴を有する例(FALS)がある。現時点において、FALSには、*SOD1* 遺伝子異常による ALS1 および *alsin* 遺伝子変異による ALS2 が知られている。ALS1 は本邦でもその存在が広く確認されているが、ALS2 については 2001 年に遺伝子変異が報告されたばかりで、現時点では、中東、北アフリカ地域の家系が主であり、本邦における存在、頻度は明らかではない。そこで、本研究においては、FALS の中に ALS2 遺伝子異常を伴う症例が存在するか否かを全国レベルで調査する。一方、SALS に関しては、その発症あるいは症候に関わる何らかの modifier gene の存在が想定されている。そこで、ALS2 遺伝子がこの modifier gene になっている可能性について、遺伝子内 SNPs をはじめとした多型を解析することによって明らかにする。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

名古屋大学神経内科では、FALS の遺伝子診断として *SOD1* 遺伝子異常の有無を確認しているが、このうち *SOD1* 遺伝子異常が証明されなかった例を対象として、ALS2 遺伝子変異の有無を解析する。また、SALS に関しては患者 DNA と臨床症候を集積し解析対象とする。ALS2 は常染色体劣性遺伝形式をとる疾患なので、家族歴のはっきりしない SALS の中に ALS2 が含まれている可能性がある。この点において、SALS 例についても ALS2 遺伝子異常の有無を確認していく。さらに、ALS2 遺伝子内の SNPs をはじめとする遺伝子多型を発見し、直接シーク

エンス法をはじめとする genotyping によって、この多型が SALS の発症あるいは症候を修飾している可能性について検討を行う。これら患者 DNA および臨床症候の集積、および解析については名古屋大学医学部倫理委員会にて承認済みである。

C. 研究結果

本年度は、約 100 例の SALS 患者の臨床症候と DNA を集積した。臨床症候の内容は、性別、発症年齢、家族歴の内容、初発症状、現在の ADL と ADI、悪化の経過、経管栄養、気管切開、人工換気施行の有無とその経過、筋力低下・筋萎縮の分布、四肢痙性の有無、深部反射・病的反射の有無、痴呆の有無、錐体外路症状の有無、他の随伴する神経症状の有無、電気生理検査所見などを包含している。遺伝子解析については、現在この SALS 例の DNA を使い、ALS2 遺伝子の解析に着手し始めたところである。家族例を有する FALS 例については、全国的にも症例数は必ずしも多くないので、引き続きその集積に努める。

D. 考察

次年度は、今年度に引き続き、さらに症例の集積に努めるとともに ALS2 遺伝子の解析を進めていく。

E. 結論

本研究により、本邦における ALS2 の頻度および、その臨床症候が明らかになると考えられる。また、もし多数例の ALS2 患者が発見され、さらに複数の変

異部位が見つかった場合は、変異部位と臨床症候の関係を解析することが可能になるものと思われる。さらに *ALS2* 遺伝子内多型が SALS の発症や症候に関連することが証明されれば SALS の病態解明に大きく貢献することになると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G: HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the *SBMA* transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. *J Neurosci*, in press
- 2) Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa N, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G and the Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan: Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain*, 126(1): 134-151, 2003
- 3) Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G: Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 277(52): 50966-50972, 2002
- 4) Koike H, Misu K, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Ando E, Yamamoto M, Hattori N, Sobue G: Type I (transthyretin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form. *Arch Neurol*, 59(11): 1771-1776, 2002
- 5) 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 cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 80: 158-167, 2002
- 6) Mori K, Hattori N, Sygiura M, Koike H, Misu K, Ichimura M, Hirayama M, Sobue G: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting with features of GBS. *Neurology*, 58: 979-982, 2002
- 7) Ikeda S, Nakazato M, Ando Y, Sobue G: Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan. *Neurology*, 58: 1001-1007, 2002
- 8) Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba K, Abe Y, Tamakoshi A, Doyu M, Hirayama M, Sobue G: Progression and prognosis in multiple system atrophy. An analysis of 230 Japanese patients. *Brain*, 125: 1070-1083, 2002
- 9) Ishigaki S, Liang Y, Yamamoto M, Niwa J, Ando Y, Yoshihara T, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G: X-linked inhibitor of apoptosis protein is involved in mutant SOD-1 mediated neuronal degeneration. *J Neurochem*, 82: 576-584, 2002
- 10) Katsuno M, Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G: Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron*, 35: 843-854, 2002
- 11) Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, Sobue G: Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem*, 277(39): 36793-36798, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

ALS2 モデル疾患マウスの作出

分担研究者 岩倉洋一郎

東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター・教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は上位運動ニューロンおよび下位運動ニューロンの選択的変性を特徴とする難病である。ALSの根治療法・治療薬の開発には、ALS発症原因遺伝子を用いてALSの分子病態ならびに運動神経変性の分子機序を明らかにすることが必須である。常染色体劣性遺伝形式を示す家族性ALS2型の原因遺伝子ALS2が単離・同定されたことから、我々はALS2発症の分子病態解析系の確立とALS2発症の病理生化学的および分子生物学的機序について解析するために、ALS2疾患モデルマウスとして*Als2*遺伝子欠損マウスの作出を行った。ALS2タンパク質のほぼ全域を欠損するTunisia家系と同様にエクソン3に終止コドン挿入するようにターゲティングベクターを構築し、マウスES細胞に導入した。PCR法およびサザンブロットリング法によりスクリーニングを行い、相同組み換え体を14クローン同定した。相同組み換え効率は2.8%であった。相同組み換えクローンを用いてキメラマウス作製を行い、4クローンからES細胞のキメラ寄与率の高い個体が得られた。現在、これらのキメラマウスより子孫マウスを得、生殖系列への伝達を検証している。まもなくTunisia型*Als2*遺伝子ヘテロ欠損マウスが得られる見込みである。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は上位運動ニューロンおよび下位運動ニューロンの選択的変性を特徴とする“heterogenous group of inexorable neurodegenerative disorders”である。ALSの根治療法・治療薬の開発には、ALS発症原因遺伝子を用いてALSの分子病態ならびに運動神経変性の分子機序を明らかにすることが必須である。常染色体劣性遺伝形式を示す家族性ALS2型の原因遺伝子ALS2が単離・同定されたことから、我々はALS2発症の分子病態解析系を確立するために、ALS2疾患モデルマウスの作出を試みた。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

ALS2疾患モデルマウスとして、ALS2タンパク質のほぼ全域を欠損するTunisia家系型の遺伝子欠損マウスの作製を計画した。Tunisia型で認められる変異と同様に、エクソン3より欠損するようターゲティングベクターを構築した。すなわち、エクソン3にネオマイシン耐性遺伝子を挿入する形で相同領域を5'側に9.5kb、3'側に1.2kb持ち、ネガティブセレクション用に3'末端にDT-A遺伝子を組み込んだデザインとした。ター

ゲティングベクターをマウスES細胞E14.1に導入した後にG418存在下で組み換え体を選抜した。相同組み換え体はPCR法およびサザンブロットリング法により同定した。続いて、C57BL/6由来の8細胞期胚2つの間にES細胞をサンドイッチの要領で挟み込んだ状態で1晩培養を行うことによりキメラ胚盤胞を形成させる「アグリゲーションキメラ法」によりキメラマウスを作出した。

（倫理面への配慮）*Als2*遺伝子欠損マウス作製計画は、東京大学医科学研究所組み換えDNA実験安全委員会ならびに動物実験委員会の承認を得ており、文部科学省組換えDNA実験指針、および東京大学動物実験実施マニュアルに基づいて取り扱う。

C. 研究結果

Tunisia型*Als2*ターゲティングベクターをE14.1にエレクトロポレーションにより導入し、G418存在下で耐性クローンを選抜・単離した。509クローンについて、PCR法およびサザンブロットリング法によりスクリーニングを行い、相同組み換え体を14クローン同定した。相同組み換え効率は2.8%であった。続いて相同組み換えクローンから選抜した6クローン（2A3, 6A2, 9A6,

17C6, 19A5, 21B5) について、キメラマウス作製を行った。毛色による判定から、9A6, 17C6, 19A5, 21B5 より ES 細胞のキメラ寄与率の高い個体が得られた。このうち、17C6 由来のキメラマウスより生殖系列キメラが得られたことを確認しており、まもなく Tunisia 型 *Als2* 遺伝子ヘテロ欠損マウスが得られる見込みである。

D. 考察

Tunisia 型 *Als2* ターゲティングベクターによる E14.1 での相同組み換え率は 2.8% であり、標準的な効率であった。単離された相同組み換え ES クローンを用いてのキメラ作製は、効率があまりよくなかったものの、最終的には 30 匹を超えるキメラマウスを得ることができ、ヒトと同様に *Als2* 遺伝子のヘテロ欠損による影響は特にならぬものと考えられた。

E. 結論

Als2 遺伝子欠損 ES 細胞を用いてキメラマウスの作製を行っており、まもなくヘテロ欠損マウスが誕生する予定である。これらのヘテロ欠損マウス同士の交配により得られる Tunisia 型 *Als2* 遺伝子ホモ欠損マウスは、ヒト ALS2 の疾患モデルとして非常に有効な ALS2 発症の分子病態解析系となることが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohtaki, H., Funahashi, H., Dohi, K., Oguro, T., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Yin, L., Matsunaga, M., Goto, N., and Shioda, S. Suppression of oxidative neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion in mice lacking interleukin-1. *Neuroscience Res.*, in press.

2) Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. Interleukin 1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

3) Ikegaya, Y., Delcroix, I., Iwakura, Y., Matsuki, N., and Nishiyama, N. Interleukin-1 α abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission. *Synapse*, 47, 54-57 (2003).

4) Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Honma, I., Sekikawa, K., Asano, M., and Iwakura, Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, resulting in the suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, 17, 375-387 (2002).

5) Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.*, 3, 667-672 (2002).

6) Konishi, H., Tsutsui, H., Murakami, T., Yumikura-Futatsugi, S., Yamanaka, K., Tanaka, M., Iwakura, Y., Suzuki, N., Fuchs, E. V., Takeda, K., Akira, S., Nakanishi, K., and Mizutani, H. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 11340-11345 (2002).

7) Mizushima, H., Cheng, J-Z., Dohi, K., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Hirabayashi, T., Arata, S., Nakajo, S., Takaki, A., Ohtaki, H., and Shioda, S. Reduced postischemic apoptosis in the hippocampus of mice deficient in interleukin-1. *J. comparative Neurol.*, 448, 203-216 (2002).

8) Yamamoto, S., Oka, S., Inoue, M., Shimuta, M., Manabe, T., Takahashi, H., Miyamoto, M., Asano, M., Sakagami, J., Sudo, K., Iwakura, Y., and Kawasaki, T. Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. *J. Biol.*

Chem., 277, 27227-27231 (2002).

9) Brough, D., LeFeuvre, R. A., Iwakura, Y., and Rothwell, N. J. Purinergic (P2X7) receptor activation of microglia induces cell death via an interleukin-1-independent mechanism. *Mol. Cell Neurosci.*, 19, 272-280 (2002).

10) Iwakura, Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: Consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13, 341-355 (2002).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究要旨

ALS2 には、Rho ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質の活性化モチーフとして知られる DH/PH ドメインが存在する。このドメインの機能とこの欠損が筋萎縮性側索硬化症の症状発現に果たす役割を検討するため、これが活性化されると思われる Rho 情報伝達の神経系での役割とこのドメイン自身の触媒活性の検討を行った。前者では、これまで神経突起退縮のみに働くと考えられていた Rho が下流分子の使い分けにより軸索の伸長にも退縮にも働くことを見出した。後者では、DH/PH ドメインを含む幾つかの ALS2 断片を、HeLa、3T3、N1E-115 などの細胞で発現しその表現型から基質 Rho 蛋白質の同定を試みたが、これまでのところ不明に終わっている。

A. 研究目的

ALS2 は、分子内に DH (Dbl homology) domain と PH (Pleckstrin homology) domain が tandem に並んだ構造をもつが、これは Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質より GDP を遊離し GTP に交換する Rho 活性化因子の指紋モチーフである。このことより、ALS2 は、なんらかの Rho ファミリー蛋白質を活性化して働いている可能性が強い。本分担研究の目的は、この仮説を検証し、ALS2 によって活性化される Rho ファミリー蛋白質のメンバーを同定、これが神経細胞で働く機能を明らかにし、ALS2 分子の異常と筋萎縮性側索硬化症の病態との関連を明らかにすることである。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

ALS の DH/PH を含む各種の断片変異体を作成し、これを培養細胞に発現したときに生ずる表現型をもとに、これが Rho ファミリー蛋白質のどれを活性化しているかを推定し、その蛋白質の活性化を *in vitro* の系で確かめる。

Rho 蛋白質の活性化が、神経細胞の形態にどのような効果を現すか、また、その効果がどのようなシグナル伝達を介して行われるかを解析し、筋萎縮性側索硬化症での病態発現の理解を促進する。

C. 研究結果

Rho ファミリーには、RhoA, Rac1, Cdc42 などがあ

り、これらは、HeLa 細胞、Swiss や NIH3T3 などの線維芽細胞で各々 stress fibers, lamellipodia, filopodia の形成を誘導する。また、N1E-115 などの神経芽腫細胞では、Rho の活性化は、神経突起の退縮を起こす。そこで、ALS2 の DH/PH を含む各種断片を上記の細胞に強制発現することにより、表現型を解析した。これら分子の発現は、分子末端に付けた GFP の発現により確認した。コントロールには RhoA, Rac1, Cdc42 の活性化変異体、Cdc42 の活性化因子として知られている Dbl を用いた。その結果、ALS2 の DH/PH 領域の発現は、上記のコントロール分子が各々の表現型を呈する条件下で上記各細胞に有意の変化を起こさなかった。

Rho 蛋白質の神経細胞形態制御に対する表現型とその経路を、マウス小脳顆粒細胞の初期培養系を用いて解析した。まず、ケモカイン SDF1 α が、小脳形態形成における Rho 上流シグナルであることを突き止めた。さらに引き続き、SDF1 α 処理により得られる軸索突起への影響を調べた。すると、従来から知られていた Rho 依存的突起形成抑制効果に加え、新たに Rho 依存的突起伸展という成分も存在することを明らかにした。Rho 依存的突起伸展に関与する標的 Rho 蛋白質を検索し、mDia1 が必須な役割を果たしていることを同定した。

D. 考察

1の研究結果から、ALS2のDH-PH domainが働くRhoファミリー蛋白質は、このファミリーの典型的なメンバーであるRhoA, Rac1, Cdc42でない可能性が強くなった。今後は、その他のメンバーであるRhoBやRhoDに対する活性を検討する。また、2の実験の結果から、軸索伸長には、Rhoエフェクターのなかで、mDiaの働きが重要であることが明らかになった。今後、ALS2の標的Rho蛋白質を同定する過程のなかで、mDiaの働きも検討したい。

E. 結論

本年度の研究から、ALS2の標的Rho蛋白質について対象を狭めることができた。また、Rho蛋白による神経細胞形態制御機構について新しい知見を得ることができた。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsuji, T., Ishizaki, T., Okamoto, M., Higashida, C., Kimura, K., Furuyashiki, T., Arakawa, Y., Birge, R. B., Nakamoto, T., Hirai, H., & Narumiya, S. (2003) ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* 157, 819-830.

2) Chevrier, V., Piel, M., Collomb, N., Saoudi, Y., Frank, R., Paintrand, M., Narumiya, S., Bornens, M. & Job, D. (2002) The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *J. Cell Biol.* 157, 807-817.

3) Narumiya, S. & Mabuchi, I. (2002) Spinning actin to divide. *Nature*, 419, 27-28.

4) Furuyashiki, T., Arakawa, Y., Takemoto-Kimura, S., Bito, H. & Narumiya, S. (2002) Multiple

spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated Ca²⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 14458-14463.

5) Matsuoka, Y., Furuyashiki, T., Bito, H., Ushikubi, F., Tanaka, Y., Kobayashi, T., Muro, S., Satoh, N., Kayahara, T., Higashi, M., Mizoguchi, A., Shichi, H., Fukuda, Y., Nakao, K., & Narumiya, S. (2003) Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial endotoxin in mice deficient in prostaglandin E receptor EP1 and EP3 subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, in press

6) Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Bao, Y.V., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W.S., Semba, K., Satoh, T., Nosaka, T., Inagaki, M. & Kitamura, T. (2003) Phosphorylation of MgcRacGAP by aurora B kinase leads to induction of latent GAP activity towards RhoA during mitosis; identification of a RhoGAP indispensable for the completion of cytokinesis. *Develop. Cell*, in press

7) Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N., & Narumiya, S. (2003) Control of axon elongation via an SDF-1 α /Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol.*, in press

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

III. 研 究 成 果 一 覽