

# 運動ニューロン疾患の病態関連分子の同定と 治療法の開発

(H12-こころ-010)

平成14年度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・分担研究報告書

平成15年3月

主任研究者 祖父江 元

(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

## 目次

### I. 総括研究報告書

運動ニューロン疾患の病態関連分子の同定と治療法の開発 祖父江 元	----- 1
-------------------------------------	---------

### II. 分担研究報告書

1. 遺伝子発現プロファイリングによる筋萎縮性側索硬化症病態 関連分子の同定 道勇 学	----- 5
2. 孤発性 ALS の疾患感受性遺伝子同定のための全ゲノム領域 を対象とした関連解析 中野 亮一	----- 8

III. 研究成果の刊行に関する一覧	-----13
--------------------	---------

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 運動ニューロン疾患の病態関連分子の同定と治療法の開発

主任研究者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学研究科神経内科学教授

研究要旨 孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 脊髄における遺伝子発現プロファイル解析およびゲノムワイドな疾患感受性遺伝子座の解析により、ALS 病態関連遺伝子を包括的に探索した。分子インデックス法および cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルの解析から、孤発性 ALS および ALS モデル動物である変異 SOD1 トランスジェニックマウス脊髄において、炎症・アポトーシス関連分子、ユビキチン・プロテアソーム系関連分子が病態に重要な役割を果たしていることが推察された。この中から同定した *Dorfin* は、孤発性 ALS および SOD1 変異に伴う家族性 ALS 脊髄運動ニューロン内に出現するユビキチン化封入体に局在していた。*Dorfin* は、野生型 SOD1 とは結合せず、変異 SOD1 のみをユビキチン化しプロテアソームによる分解を促進することで、変異 SOD1 による神経細胞死を抑制する分子であった。孤発性 ALS の全ゲノム領域に渡るマイクロサテライトマーカーを用いた関連解析の結果から、第 13、18 番染色体および X 染色体などに 9 カ所の疾患感受性遺伝子の存在候補領域が見いだされ、孤発性 ALS の発症機序の解明やオーダーメイド治療の開発に寄与することができると考えられた。

### 分担研究者

道勇 学 名古屋大学大学院神経内科学講師  
中野 亮一 新潟大学脳研究所神経内科学講師

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、成人以降に大脳・脳幹・脊髄の運動ニューロンが選択的に変性死する運動ニューロン病の代表的疾患である。ALS 全体の 5~10% を占める家族性 ALS の約 20% が Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異を原因としているが、90% 以上は孤発性に発症し、単一の遺伝子異常ではなく多数の遺伝子が複雑に関与して発症するものと考えられている。ALS の病態の分子機序については、これまでのところ十分解明されていないため治療法がなく、その原因究明が急務である。ALS の運動ニューロン変性死に伴い病変部位において発現が特異的に変化している遺伝子や、ヒトゲノム内の ALS 疾患感受性遺伝子などの ALS 病態関連遺伝子を同定できれば、ALS の発症機序の解明や治療法の開発に有用と考えられる。

ALS の主たる病変部位である脊髄において、変性する運動ニューロンの中では様々な遺伝子の発現変化が生じていると推定される。ALS 特異的に発現変化を生じている遺伝子を明らかにすることにより、ALS の病態機序解明に結びつく知見が得られるものと考えられる。一方、孤発性 ALS にもアルツハイマー病における APOE4 のような発症を促進する何らかの疾患感受性遺伝子が存在することが推定され、患者ゲノムの全領域をカバーして疾患・対照関連解析することにより ALS 感受性遺伝子座が同定できるものと思われる。

我々は、1) 分子インデックス法および cDNA マイクロアレイの二つの高感度な遺伝子発現プロファイリング技術を用いて、孤発性 ALS 脊髄および現在最も優れた ALS モデル動物である G93A 変異 SOD1 トランスジェニック(Tg)マウス脊髄における遺伝子発現プロファイリングを行なうことによる ALS 特異的な遺伝子発現変化の探索、2) ヒト ALS 患者の全ゲノム領域において疾患・対照関連解析を、昨年よりさらに症例を増やして行うことによ

る ALS 疾患感受性遺伝子座の同定, を試みた。

## B. 研究方法

### 1) 分子インデックス法および cDNA マイクロアレイを用いた ALS 脊髄における遺伝子発現プロファイル解析

分子インデックス法により, ヒト孤発性 ALS および正常対照腰髄前角の全発現遺伝子(mRNA)の 3' 側断片を, 3 種類のクラス IIIS 制限酵素, 64 種類のアダプター, および 3 種類のアンカーオリゴ dT プライマーの組み合わせにより合計 576 グループに区分し, 網羅的に発現プロファイルを作成した。

各々のプロファイルをポリアクリルアミドゲル上で ALS と正常対照を比較することにより, 疾患で発現に明らかな差のある遺伝子断片を同定し, 切り出してクローニングし遺伝子配列を決定した。

さらに, ここで得られた遺伝子をスポットしたカスタム cDNA アレイを作成し, 孤発性 ALS 8 例, 正常対照 8 例を用いて, ALS 多数例で常に発現に差のある遺伝子を同定し, 定量 RT-PCR を用いて確認した。発現に差のあった新規遺伝子については, ヒト脳 cDNA ライブラリーより, 5' RACE および 3' RACE 法により全長 cDNA をクローニングした。クローニング後, 発現ベクターに組込んでタンパク質をほ乳動物細胞に発現させ, 機能解析を行った。G93A 変異 SOD1 Tg マウスについては, 7, 11, 14, 17 週齢の腰髄ホモジネートを用いて littermate と比較することにより, cDNA マイクロアレイ(Incyte Life array: 10,000 cDNA)を用いて経時的に発現に差異のある遺伝子の検討を行った。

### 2) ヒト ALS 患者の全ゲノム領域における ALS 疾患感受性遺伝子座の同定

孤発性 ALS 患者群 109 人 (男性 66 人, 女性 43 人, 平均年齢 59.5 ± 11.1 歳), 対照群 110 人 (男性 58 人, 女性 52 人, 平均年齢 72.5 ± 6.4 歳) を対象とした。遺伝子解析は末梢白血球より抽出した高分子 DNA をテンプレートとして, 全ゲノム領域に約 4.6cM 間隔で分布する 811 個のマイクロサテライトマーカー(ABI PRISM Linkage Mapping Set HD-5)を用いて PCR を行った。ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)に泳動したゲ

ータを GeneMapper software (Applied Biosystems)を用い解析し, 孤発性 ALS 患者群と対照群でマーカーごとに遺伝子型頻度の違いを $\chi^2$  test (2×n Table)を用い比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は事前に各々の分担研究者の所属する大学倫理委員会より承認を得ており, 剖検組織および RNA・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った後, 文書により同意を得て行った。また実験動物の扱いには各々の分担研究者の所属大学動物実験施設の指針に従い, 苦痛を与えず行うよう配慮した。

## C. 研究結果

1) 孤発性 ALS 脊髄において, 正常対照と比較して発現に差のある遺伝子を分子インデックス法を用いることにより 84 個同定した。さらに, 多数例の孤発性 ALS について, この 84 個の遺伝子 cDNA をスポットしたカスタムアレイおよび定量 RT-PCR を用いて検討したところ, 11 個の遺伝子の発現が常に ALS 脊髄において変化していた。この中には, 炎症・サイトカイン関連分子, アポトーシス関連分子, ユビキチン-プロテアソーム系関連分子などが含まれていた。この中からクローニングした新規分子 Dorfin はユビキチンリガーゼであり, Dorfin に対する特異抗体を作製し, ALS 剖検病理組織を検索したところ, Dorfin は孤発性 ALS 運動ニューロン内のユビキチン化封入体に局在していた。Dorfin は, SOD1 変異に伴う家族性 ALS のユビキチン化封入体にも存在していた。Dorfin は, 野生型 SOD1 には反応せず, 変異 SOD1 のみを認識してユビキチン化し, プロテアソームによる分解を促進する活性を有していた。Dorfin を強制発現させることにより, 培養神経細胞への変異 SOD1 の毒性を軽減した。G93A 変異 SOD1 Tg マウス脊髄を用いた解析では, ALS 症状発現に伴い経時的に, TNF- $\alpha$ などの炎症・サイトカイン関連分子の発現が増加し, 逆にアポトーシス阻害因子である XIAP の発現が減少していた。

2) 疾患・対照関連解析の結果, p 値が 0.001 以下

を示したのは第 13 番染色体上の D13S124 ( $p=0.00071$ )と第 18 番染色体上の D18S1129 ( $p=0.00036$ )の 2 マーカーであった。その他 7 マーカー (D3S3706, D12S364, D13S219, D14S1050, D15S153, D20S178, DXS1047)でも  $0.001 < p < 0.01$  を示した。これらの低い  $p$  値をとったマーカーの近傍に多型性に富むマイクロサテライトマーカーを新たに複数設定し、関連解析を行った。その結果、DXS1047 ( $p=0.0037$ )の 89kbp 上流のマーカー (X1047-1,  $p=0.022$ )と 11kbp 下流のマーカー (X1047-2,  $p=0.042$ )でそれぞれ 0.05 を下回る  $p$  値を得た。D18S1129 のアレル 8 の頻度だけは孤発性 ALS において少なかった。

#### D. 考察

分子インデックス法および cDNA マイクロアレイを用いて孤発性 ALS および G93A 変異 SOD1 Tg マウス脊髄における遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析することにより、炎症・サイトカイン関連分子、アポトーシス関連分子、ユビキチン-プロテアソーム系関連分子などの多数の遺伝子が ALS の病変形成と密接に関わっていることが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子の中から数個の新規遺伝子も同定したが、中でも我々が見いだした Dorfin はユビキチンリガーゼ活性を有する新規分子であり、ALS 脊髄運動ニューロン内に見られるユビキチン化封入体に局在していた。Dorfin は、SOD1 遺伝子変異が原因となる家族性 ALS においては、変異 SOD1 タンパク質のユビキチン依存性分解・除去を通して、神経細胞保護的に働いていると考えられた。野生型 SOD1 とは反応せず、変異 SOD1 のみを認識することから、Dorfin は神経細胞内においてタンパク質の折り畳み異常を認識して除去する、いわゆる「タンパク質品質管理ユビキチンリガーゼ」として機能している分子であると推定される。Dorfin が孤発性 ALS においても家族性 ALS と同様に運動ニューロン内のユビキチン化封入体に存在していることから、Dorfin の基質となっている孤発性 ALS で蓄積する異常タンパク質を明らかにできれば、孤発性 ALS の原因解明や治療法開発に向けて大きく寄与できるものと思

われる。また、Dorfin を高発現するトランスジェニックマウスと変異 SOD1 トランスジェニックマウスを交配することにより、Dorfin による ALS 治療の試みを現在行っている。

孤発性 ALS の全ゲノムを対象として疾患・対照関連解析を昨年よりさらに症例を増やして行い、第 13, 18 番染色体および X 染色体などに 9 カ所の疾患感受性遺伝子の存在候補領域を見いだした。これらマーカーの近傍に高密度に分布する新たな多型マーカーを設定して追加解析を行った結果、X 染色体上に 3 つのマーカーが連続して 0.05 を下回る  $p$  値を示す 100kbp に渡る興味深い領域を同定した。今後、さらに検体数を増やすことに加え、異なる遺伝的背景を持った人種なども対象として関連解析を行い検討することも必要である。

#### E. 結論

分子インデックス法および cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングを応用することにより、ALS 病態に関連した分子が多数同定できた。中でも Dorfin は神経細胞毒性を持つ有害なタンパク質をユビキチン化し除去することで神経細胞を保護する分子と考えられ、今後 Dorfin の基質を同定することにより、孤発性 ALS の病態解明へ前進するものと思われた。さらに、ヒトゲノム全領域に渡る、疾患・対照関連解析を行ない、第 13, 18 番染色体および X 染色体などに 9 カ所の孤発性 ALS の疾患感受性遺伝子の存在候補領域を見いだした。これらの本研究の成果は、将来の孤発性 ALS の発症機序解明やテラーメイド治療の開発に大きく寄与できるものと考えられた。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

(1) Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos N, Kusakabe M, Yoshiki A, 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 (2003)

- (2) Ando Y, Liang Y, Ishigaki S, Niwa J, Jiang Y, Kobayashi Y, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. Caspase-1 and -3 mRNAs are differentially upregulated in motor neurons and glial cells in mutant SOD1 transgenic mouse spinal cord - A study using laser microdissection and real-time RT-PCR. *Neurochem Res.* in press (2003)
- (3) 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**, 843-54. (2002)
- (4) Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, Sobue G. Dornin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem.* **277**, 36793-8. (2002)
- (5) Ishigaki S, Niwa J, Ando Y, Yoshihara T, Sawada K, Doyu M, Yamamoto M, Kato K, Yotsumoto Y, Sobue G. Differentially expressed genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis spinal cords--screening by molecular indexing and subsequent cDNA microarray analysis. *FEBS Lett.* **531**, 354-8. (2002)
- (6) 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**, 50966-72. (2002)
- (7) 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 SOD1-mediated neuronal degeneration. *J Neurochem.* **82**, 576-84. (2002)
- (8) 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**, 158-67. (2002)
- (9) Takeuchi H, Kobayashi Y, Yoshihara T, Niwa J, Doyu M, Ohtsuka K, Sobue G. Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. *Brain Res.* **949**, 11-22. (2002)
- (10) Iwai K, Yamamoto M, Yoshihara T, Sobue G. Anticipation in familial amyotrophic lateral sclerosis with SOD1-G93S mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **72**, 819-20. (2002)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## 遺伝子発現プロファイリングによる筋萎縮性側索硬化症病態関連分子の同定

分担研究者 道勇 学 名古屋大学大学院医学研究科神経内科学講師

研究要旨 孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 脊髄における遺伝子発現プロファイルを解析することにより、ALS 病態関連遺伝子を包括的に探索した。分子インデックス法および cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルの解析から、孤発性 ALS および ALS モデル動物である変異 SOD1 トランスジェニックマウス脊髄において、炎症・アポトーシス関連分子、ユビキチン・プロテアソーム系関連分子が病態に関与していることが明らかとなった。この中から同定した *Dorfin* は、ALS 脊髄運動ニューロン内に出現するユビキチン化封入体に局在しており、変異 SOD1 を特異的にユビキチン化しプロテアソームによる分解を促進することで神経細胞を保護する新規分子であった。さらに、単離運動ニューロンから遺伝子発現プロファイリングを行うシステムを、レーザーマイクロディセクション技術と cDNA マイクロアレイ技術や蛍光プローブを用いた *real-time RT-PCR* 技術を組み合わせることにより開発した。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、成人以降に大脳・脳幹・脊髄の運動ニューロンが選択的に変性死する運動ニューロン病の代表的疾患である。ALS 全体の5~10%を占める家族性ALSの約20%がCu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異を原因としているが、90%以上は孤発性に発症し、単一の遺伝子異常ではなく多数の遺伝子が複雑に関与して発症するものと考えられている。ALS 病態の分子機序については、これまでのところ十分解明されていず、根本的な治療法もないため、その原因究明が急務である。ALS の運動ニューロン変性死に伴い病変部位において発現が特異的に変化している遺伝子を同定できれば、ALS の発症機序の解明や治療法の開発に有用と考えられる。

ALS の主たる病変部位である脊髄において、変性する運動ニューロンの中では様々な遺伝子の発現変化が生じていると推定される。ALS 運動ニューロン特異的に発現変化を生じている遺伝子を明らかにすることにより、ALS の病態機序解明に結びつく知見が得られるものと考えられるが、中枢神経系はニューロン、グリア細胞、上皮細胞など

系統の異なる細胞群が混在する組織であるため、運動ニューロンを単離してその遺伝子発現プロファイルを解析することが病態解明に必要である。

我々は、1) 分子インデックス法および cDNA マイクロアレイを用いて、孤発性 ALS 脊髄および ALS モデル動物である G93A 変異 SOD1 トランスジェニック(Tg)マウス脊髄における遺伝子発現プロファイリングを行なうことによる ALS 特異的な遺伝子発現変化の探索、2) 運動ニューロンを単離して遺伝子発現解析を行うシステムの開発、を試みた。

### B. 研究方法

1) 分子インデックス法および cDNA マイクロアレイを用いた ALS 脊髄における遺伝子発現プロファイル解析

分子インデックス法により、ヒト孤発性 ALS および正常対照腰髄前角の全発現遺伝子(mRNA)の3'側断片を、576 グループに区分して網羅的な発現プロファイルを作成した。各々の ALS のプロファイルをポリアクリルアミドゲル上で正常対照を比較することにより、発現に明らかな差のある遺伝子断片を同定し、切り出してクローニングし cDNA

の塩基配列を決定した。さらに、得られた cDNA をスポットしたカスタム cDNA アレイを作成し、孤発性 ALS 8 例、正常対照 8 例を用いて、ALS で常に発現が変化している遺伝子を同定し、定量 RT-PCR にて確認した。発現に差のある新規遺伝子については、ヒト脳 cDNA ライブラリーより、5' RACE および 3' RACE 法などにより全長 cDNA をクローニングした。クローニング後、発現ベクターに組込んでタンパク質をほ乳動物細胞に発現させ、機能解析を行った。G93A 変異 SOD1 Tg マウスについては、7, 11, 14, 17 週齢の腰髄ホモジネートを用いて littermate と比較することにより、cDNA マイクロアレイを用いて経時的に解析した。

## 2) 運動ニューロンの単離と遺伝子発現解析を行うシステムの開発

G93A 変異 SOD1 Tg マウスとその littermate を用い、腰髄より凍結切片作成後、PALM (Positioning and Ablation with Laser Microbeams) 装置 (Zeiss) を用いたレーザーマイクロダイセクションにより運動ニューロンを単離した。2, 20, 200 個の細胞を用いて TaqMan probe を用いた real-time RT-PCR 法にて GAPDH の遺伝子発現を定量し、極微量の単離運動ニューロンのサンプルから遺伝子発現が定量的に測定可能であるかどうか検討した。次に、単離した約 20 個の運動ニューロンを用いて、アポトーシス関連分子である caspase-1 および caspase-3 について各週齢の Tg マウスにおける変化を解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究は事前に名古屋大学大学院倫理委員会より承認を得ており、剖検組織および RNA 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った後、文書により同意を得て行った。また実験動物の扱いには動物実験施設の指針に従い、苦痛を与えず行うよう配慮した。

## C. 研究結果

1) 多数例の孤発性 ALS について、分子インデックス法により得た 84 個の cDNA をスポットしたカスタムアレイおよび定量 RT-PCR を用いて検討した

ところ、11 個の遺伝子の発現が常に ALS 脊髄において変化していた。この中には、炎症・サイトカイン関連分子、アポトーシス関連分子、ユビキチン-プロテアソーム系関連分子などが含まれていた。この中からユビキチンリガーゼ活性を持つタンパク質をコードしている *Dorfin* をクローニングした。*Dorfin* に対する特異抗体を作製し、ALS 剖検病理組織を検索したところ、*Dorfin* は孤発性 ALS 運動ニューロン内のユビキチン化封入体に局在していた。*Dorfin* は、SOD1 変異に伴う家族性 ALS のユビキチン化封入体にも存在しており、変異 SOD1 のみを認識してユビキチン化し、プロテアソームによる分解を促進する活性を有していた。*Dorfin* を強制発現させることにより、培養神経細胞に対する変異 SOD1 の毒性を軽減した。G93A 変異 SOD1 Tg マウス脊髄を用いた解析では、ALS 症状発現に伴い経時的に、TNF- $\alpha$  などの炎症・サイトカイン関連分子の発現が増加し、逆にアポトーシス阻害因子である XIAP の発現が減少していた。

2) 脊髄より単離した細胞より抽出した RNA について、運動ニューロンやグリア細胞の特異的発現遺伝子マーカーにより検討した結果、レーザーマイクロダイセクション法を用いることにより、脊髄運動ニューロンを周囲のグリア細胞の混入なく単離することが可能であった。また、単離した運動ニューロンにおける遺伝子発現の測定が、遺伝子により細胞 2 個程度から十分定量的に可能であった。Tg マウスを用いた経時的解析から、ALS 症状発症前に、運動ニューロン特異的にアポトーシス実行分子である caspase-1 の発現増加が観察され、発症とともに caspase-3 の発現が運動ニューロンおよび周囲のグリア細胞で増加した。

## D. 考察

分子インデックス法および cDNA マイクロアレイを用いて孤発性 ALS および G93A 変異 SOD1 Tg マウス脊髄における遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析することにより、炎症・サイトカイン関連分子、アポトーシス関連分子、ユビキチン-プロテアソーム系関連分子などの多数の遺伝子が ALS の病変形成と密接に関わっていることが明らかと



なった。さらに、これらの遺伝子の中から数個の新規遺伝子を同定したが、中でも我々が見いだした *Dorfin* はユビキチンリガーゼ活性を有する新規分子であり、ALS 脊髄運動ニューロン内に見られるユビキチン化封入体に局在していた。*Dorfin* は、SOD1 遺伝子変異が原因となる家族性 ALS においては、変異 SOD1 タンパク質のユビキチン依存性分解・除去を通して、神経細胞保護的に働いていると考えられた。*Dorfin* が孤発性 ALS においても家族性 ALS と同様に運動ニューロン内のユビキチン化封入体に存在していることから、*Dorfin* の基質となっている孤発性 ALS で蓄積する異常タンパク質を明らかにできれば、孤発性 ALS の原因解明や治療法開発に向けて大きく寄与できるものと思われる。

神経系は多種類の細胞からなる複雑な組織であるため、変性するニューロンに焦点を合わせた研究がこれまでは困難であった。我々は、近年開発された新しいテクノロジーであるレーザーマイクロダイセクションによるニューロンの単離と、蛍光プローブを用いた *real-time* RT-PCR による高感度な遺伝子発現量の定量を組み合わせることにより、ALS 脊髄より単離した運動ニューロンのみにおける遺伝子発現プロファイルを描出できるシステムを確立した。実際にこのシステムを用いて、G93A 変異 SOD1 Tg マウス脊髄運動ニューロンにおいて、*caspase-1* の発現が ALS 症状発現以前から増強していることを示すことができた。今後さらに詳細に ALS における運動ニューロン変性機序を解明する上で、このシステムは極めて有用であると思われる。

#### E. 結論

分子インデックス法および cDNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングを応用することにより、ALS 病態関連分子が多数同定できた。中でも *Dorfin* は ALS のユビキチン化封入体形成などに深く関わる重要な分子であると考えられた。また、今後より詳細に運動ニューロン変性の分子過程を明らかにすることに役立つと思われる運動ニューロンを単離して遺伝子発現プロファイ

ルを解析するシステムを開発した。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

(1) Ando Y, Liang Y, Ishigaki S, Niwa J, Jiang Y, Kobayashi Y, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G. Caspase-1 and -3 mRNAs are differentially upregulated in motor neurons and glial cells in mutant SOD1 transgenic mouse spinal cord - A study using laser microdissection and real-time RT-PCR. *Neurochem Res.* in press (2003)

(2) Ishigaki S, Niwa J, Ando Y, Yoshihara T, Sawada K, Doyu M, Yamamoto M, Kato K, Yotsumoto Y, Sobue G. Differentially expressed genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis spinal cords--screening by molecular indexing and subsequent cDNA microarray analysis. *FEBS Lett.* **531**, 354-8. (2002)

(3) 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**, 36793-8. (2002)

(4) 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 SOD1-mediated neuronal degeneration. *J Neurochem.* **82**, 576-84. (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**, 158-67. (2002)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## 孤発性 ALS の疾患感受性遺伝子同定のための全ゲノム領域を対象とした関連解析

分担研究者：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）の原因は未だ不明であるが、多くの因子が発症に関与していると考えられている。SALS にもアルツハイマー病における APOE4 のように発症を促進する疾患感受性遺伝子が存在する可能性があり、疾患感受性遺伝子の同定を目指して第一段階として疾患・対照関連解析を行った。本邦の SALS109 例と対照群 110 例のゲノム DNA を用いて、全ゲノム領域に約 4.6cM 間隔で分布する 811 種類のマイクロサテライトマーカーを用いて関連解析を行った結果、第 13、18 番染色体および X 染色体などに 9 カ所の疾患感受性遺伝子の存在候補領域を見いだした。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンが選択的かつ系統的に障害され、進行性の筋萎縮、筋力低下を呈する原因不明の神経変性疾患である。大部分は孤発例であるが、約 10% は遺伝性に発症し、家族性 ALS (FALS) と呼ばれている。FALS の多くは常染色体優性遺伝形式をとり、約 20% の症例は Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子変異を原因としている。最近、チュニジアなどの常染色体劣性遺伝形式をとる家系の解析から、若年性 FALS の原因遺伝子として 2q33 に存在する ALS2 が同定されたが、FALS 家系の連鎖解析から FALS の原因遺伝子は少なくともさらに 5 つは存在することが考えられ、運動ニューロンの変性に関わる分子は多様であることが示唆されている。分子遺伝学の進歩により FALS の原因解析が徐々に進んできている一方で、ALS の大部分を占める孤発性 ALS (SALS) の病因はいまだに不明である。

アルツハイマー病は ALS と同様に家族性発症例と孤発性発症例が存在する神経変性疾患であるが、家族性アルツハイマー病の一部はアミロイド前駆体蛋白遺伝子やプレセニリン遺伝子

が原因遺伝子として同定されており、また孤発性の例ではアポリポ蛋白 E の遺伝子多型のうち APOE4 が発症年齢を若年化させ、アルツハイマー病の発症を促進する疾患感受性遺伝子として同定されている。FALS の原因遺伝子が多数存在することからも、SALS の場合にも運動ニューロンの変性メカニズムに関与する疾患感受性遺伝子が複数存在することが予想される。このような背景から我々は SALS の疾患感受性遺伝子同定のため、全ゲノム領域における疾患・対照関連解析を計画した。

### B. 研究方法

(1) 対象 新潟県またはその近県在住の SALS 患者群 109 人 (男性 66 人、女性 43 人、平均年齢  $59.5 \pm 11.1$  歳)、対照群 110 人 (男性 58 人、女性 52 人、平均年齢  $72.5 \pm 6.4$  歳) から十分なインフォームド・コンセントを行い採血した。SALS 患者の病型は上肢型、下肢型、球麻痺型を含む。対照群は、神経内科の外来に通院中で 60 歳以上の運動神経疾患を持たない方にご協力いただいた。

(2) 遺伝子型解析 末梢血白血球より抽出した高

分子 DNA をテンプレートとして、全ゲノム領域に約 4.6cM 間隔で分布する 811 個のマイクロサテライトマーカー (ABI PRISM Linkage Mapping Set HD-5) を用いて PCR を行った。384 well plate に分注ロボット (Biomek2000, FX) を用い DNA サンプルや試薬類を分注し、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) で PCR を行い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) に泳動した。そのデータを GeneMapper software (Applied Biosystems) を用い解析し、Oracle database にストックした。

(3)統計解析 Oracle database よりデータを取り出し、SALS 患者群とコントロール群でマーカーごとに遺伝子型頻度の違いを  $\chi^2$  test ( $2 \times n$  Table) を用い比較した。低い p 値を示したマーカーに関しては、SALS とコントロール群で特に差異のあったアレルの関与を検定するためオッズ比と  $\chi^2$  test ( $2 \times 2$  Table) を行った。X 染色体に関しては、男性は 1 アレル、女性は 2 アレルとして計算した。

(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。

のは第 13 番染色体上の D13S1243 ( $p=0.00071$ ) と第 18 番染色体上の D18S1129 ( $p=0.00036$ ) の 2 マーカーであり、その他 7 マーカー (D3S3706, D12S364, D13S219, D14S1050, D15S153, D20S178, DXS1047) でも  $0.001 < p < 0.01$  を示した (表 1, 図 1)。これらの低い p 値をとったマーカーの近傍に多型性に富むマイクロサテライトマーカーを新たに複数設定し、関連解析を行った。その結果、DXS1047 ( $p=0.0037$ ) の 89kbp 上流のマーカー (X1047-1,  $p=0.022$ ) と 11kbp 下流のマーカー (X1047-2,  $p=0.042$ ) でそれぞれ 0.05 を下回る p 値を得た。

また、0.01 よりも低い p 値を示した上記の 9 マーカーに関して、特に p 値を低くすることに影響のあったアレル、つまり両群間で出現頻度に差のあったアレルを抽出し、そのアレルと残りのアレルをまとめたもので  $2 \times 2$  Table をつくり  $\chi^2$  test を行った (表 2)。6 個のアレルが  $p < 0.01$  を示し、そのうち D18S1129 のアレル 8 の頻度だけは SALS において少なかった。

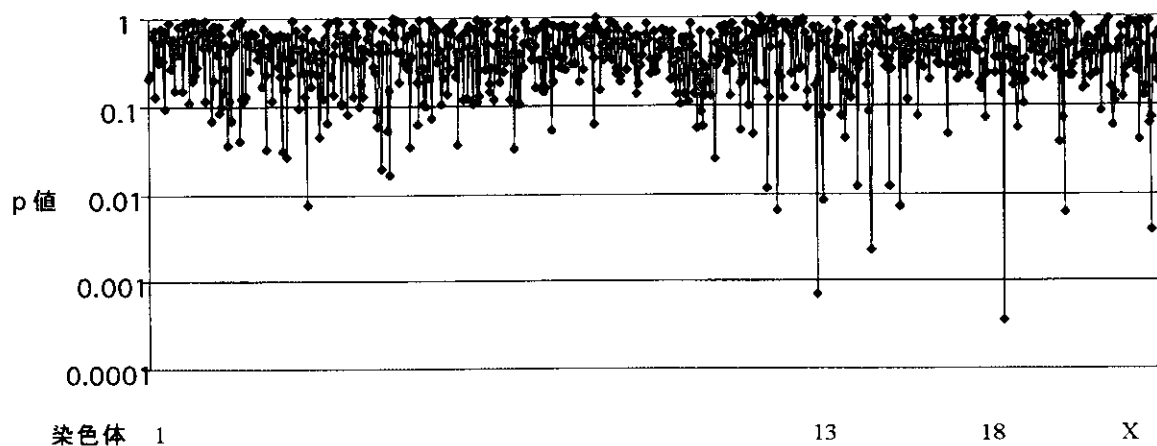


図 1 811 マーカーの p 値

左側に第 1 染色体の短腕から右側に X 染色体の長腕がくるように 811 マーカーを順に並べ、その p 値を示した。

### C. 研究結果

関連解析の結果、p 値が 0.001 以下を示した

Marker	Position(cM)	p value
D3S3706	12.8	0.0076
D12S364	32.8	0.0064
D13S1243	11.5	0.00071
D13S219	30.7	0.0085
D14S1050	98.8	0.0022
D15S153	62.1	0.0071
D18S1129	82.3	0.00036
D20S178	66.0	0.0061
DXS1047	150.3	0.0037

表1 低いp値を示したマーカー

p値が0.01より低い値をとったマーカーを示した。positionはGenethonのデータベースを参考にした。Bonferroniの補正(0.000062)を行うと統計学的には有意とは言えない。

	No. of alleles	Significant alleles	No.(%) of		OR(95%CI)	c <sup>2</sup>	p value
			ALS	control			
D13S3706	7	2	35(17)	17(8)	2.50(1.35-4.63)	8.98	0.0027
		3	60(30)	90(41)	0.61(0.41-0.91)	5.77	0.016
		5	28(14)	47(21)	0.59(0.35-0.99)	4.06	0.044
D18S1129	10	2	19(9)	7(3)	3.16(1.30-7.68)	7.06	0.0079
		8	14(7)	34(15)	0.41(0.21-0.78)	7.59	0.0059
		10	8(4)	0		6.88	0.0087
DXS1047	13	5	24(17)	10(6)	3.13(1.44-6.79)	8.97	0.0027
		10	9(6)	24(15)	0.39(0.18-0.88)	5.45	0.02
X1047-1*	7	1	0	6(4)		3.57	0.06
		6	12(8)	30(18)	0.41(0.20-0.84)	6.23	0.012
X1047-2*	35	9	0	6(4)		3.51	0.061
		11	16(13)	5(3)	4.15(1.48-11.68)	8.33	0.0039
		17	2(2)	13(9)	0.17(0.04-0.76)	5.50	0.019

表2 ALS群と対照群で特に頻度に差のあるアレル

低いp値を呈したマーカーで、特に差のあるアレルを選びそのアレルの影響を解析するためオッズ比(OR)と2×2Tableで $\chi^2$ 検定を行いp値を計算した。

#### D. 考 察

今回、SALS の全ゲノムを対象として疾患・対照関連解析を行い、 $p < 0.001$  を示す 2 マーカーと、 $0.001 < p < 0.01$  を示す 7 マーカーを同定した。また、これら 9 マーカーの近傍に高密度に分布する新たな多型マーカーを設定して追加解析を行い、X 染色体上に 3 つのマーカーが連続して 0.05 を下回る p 値を示す 100kbp に渡る興味深い領域も同定した。

ALS の有病率は人口 10 万人当たり 4~6 で、男女比は 1.2~2 : 1 と男性に多い。我々の解析で、X 染色体上に連続して低い p 値を示すマーカーのある領域が存在するという結果は、このような有病率の男女差、つまり男性のほうが ALS に罹患しやすいという事実と照らし合わせても興味深い結果だと思われ、X 染色体上に疾患感受性遺伝子が存在する可能性が示唆される。

SALS 群と対照群間で出現頻度に差のあったアレルについて検討した結果から (表 2)、ALS 群と対照群で特に頻度の異なるアレルが存在しており、5 つのアレルは ALS 群で頻度が高いが、1 つのアレルは ALS 群で頻度が低くなっている。ALS で頻度の低いアレルは、ALS 抵抗性の遺伝子と関連している可能性もあると考えられる。

本研究では、全ゲノム領域に分布する 811 マーカーの解析をしていることから、多重検定という問題が生じてしまうため、結果の解釈は慎重に行う必要がある。偽陽性を避けるためには、一般的に Bonferroni の補正を行うのが良いといわれているが、この補正を用いると、 $0.05/811=0.000062$  が有意水準となり、今回低い p 値を示したマーカー全てがまだ有意な値ではないということになってしまい、この結果は慎重に扱う必要がある。そのため、十分に検体数を大きくした場合の p 値が有意水準に達するか検討することも不可欠であるが、検体数を単に増やすだけでなく、別の遺伝的背景を持った人種など、全く異なった集合で新たなサンプルセットを収集して関連解析を行い、同じマーカーで有意な結論が導き出せるか検討することも必要である。一方で、Bonferroni の補正は非常に

厳しい補正であり、ファーストスクリーニングとしてこのような厳しい補正をせず、広く候補領域を拾い上げることも大切であると考ええる。

また、全ゲノム領域を対象とした解析では解析するマーカー数が重要で、可能な限り多く解析できればもれなく全ゲノムをカバーしたこととなるが、実際には解析できるマーカー数にも限度があり、できるだけ少ないマーカーで効率的な解析を行うことが必要である。そのためには一般的に連鎖不平衡がどれくらいの距離で保たれているかを知る必要がある。尋常性乾癬の HLA クラス I 領域のマイクロサテライトマーカーを用いた研究では、連鎖不平衡は少なくとも 100kbp は保たれているとしている。また、アルデヒドデヒドロゲナーゼ 2 に関する研究では、400kbp 保たれていると報告している。今回の研究では、マーカー間の距離は約 4.6cM と広く、ゲノム上の連鎖不平衡部位をもれなく検出するには不十分であり、今後は解析するマーカーを増やす必要がある。

関連解析においても一つ重要なことは、適切な対照群の収集である。全く遺伝的背景の異なる人種などを対照にすると偽陽性、偽陰性が起こる可能性があり、疾患群と可能な限り遺伝的背景の同じグループを対照群とするべきである。本解析では疾患群、対照群とも新潟県もしくはその周辺の県出身者であり、対照群は我々の神経内科外来を受診した患者の中から 60 歳以上で運動神経症状を有さないものとした。理想的には、患者の配偶者などを対照群とすべきであるが、日本は元々民族移動のほとんどない島国であるため、今回の解析でも遺伝的均一性は十分保たれていると考えられる。

#### E. 結 論

SALS に関する全ゲノム領域に渡る関連解析を行い、疾患感受性遺伝子が存在する可能性のある 9 領域を示した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 投稿中

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## 研究成果の刊行物に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein. <b>J Neurosci</b> , in press	2003	Society for Neuroscience	Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Kobayashi Y, <u>Doyu M</u> , <u>Sobue G</u>
Alcoholic neuropathy is clinicopathologically distinct from thiamine-deficiency neuropathy. <b>Ann Neurol</b> , in press	2003	Wiley	Koike H, Iijima M, Sugiura M, Mori K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, <u>Sobue G</u>
HLA antigens in Japanese patients with anti-Hu antibodies. <b>Neurology</b> , in press	2003	Lippincott-Raven	Tanaka M, Tanaka K, <u>Nakano R</u> , Inuzuka T, Tsuji S, Shinozawa K, Kojo T, Matsui T, Kumamoto T, Suzumura, A
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. <b>Brain</b> , 126(1): 134-151	2002	Oxford University Press	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, <u>Sobue G</u> and the Study Group for Hereditary Neuropathy in Japan
Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. <b>J Biol Chem</b> , 277(52): 50966-50972	2002	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology	Takeuchi H, Kobayashi Y, Ishigaki S, <u>Doyu M</u> , <u>Sobue G</u>
Type I (transthyretin Met30) familial amyloid polyneuropathy in Japan: early- vs late-onset form. <b>Arch Neurol</b> , 59(11): 1771-1776	2002	JAMA	Koike H, Misu K, Ikeda S, Ando Y, Nakazato M, Ando E, Yamamoto M, Hattori N, <u>Sobue G</u>
Familial transthyretin type amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity. <b>Neurology</b> , 58: 1001-1007	2002	Lippincott - Raven	Ikeda S, Nakazato M, Ando Y, <u>Sobue G</u>
Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting with features	2002	Lippincott - Raven	Mori K, Hattori N, Sugiura M, Koike H,

of GBS. <b>Neurology</b> , 58: 979-982			Misu K, Ichimura M, Hirayama M, <u>Sobue G</u>
Progression and prognosis in multiple system atrophy: An analysis of 230 Japanese patients. <b>Brain</b> , 125: 1070-1083	2002	Oxford University Press	Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba I, Abe Y, Tamakoshi A, <u>Doyu M</u> , Hirayama M, <u>Sobue G</u>
Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cord of a mutant SOD 1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. <b>J Neurochem</b> , 80: 158-67	2002	Blackwell Science Ltd.	Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, <u>Doyu M</u> , <u>Sobue G</u>
X-linked inhibitor of apoptosis protein is involved in mutant SOD-1 mediated neuronal degeneration. <b>J Neurochem</b> , 82: 576-584	2002	Blackwell Science Ltd.	Ishigaki S, Liang Y, Yamamoto M, Niwa J, Ando Y, Yoshihara T, Takeuchi H, <u>Doyu M</u> , <u>Sobue G</u>
Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. <b>Neuron</b> , 35: 843-854	2002	Cell Press	Katsuno M, Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Sang C, Kobayashi Y, <u>Doyu M</u> , <u>Sobue G</u>
Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. <b>J Biol Chem</b> , 277(39): 36793-36798	2002	The American Society for Biochemistry and Molecular Biology	Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, <u>Doyu M</u> , Murata S, Tanaka K, Taniguchi N, <u>Sobue G</u>
SOD1 変異家族性 ALS の臨床像. <b>Brain Medical</b> , 141-17	2002		<u>中野亮一</u>



20020908

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.13-P.14の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。