

10030716

厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症に対する  
肝細胞増殖因子（HGF）を用いた  
挑戦的治療法の開発とその基盤研究

平成15年度 研究報告書

主任研究者 糸山泰人

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学

平成16年3月 印刷

# 目 次

## I. 研究者一覧

## II. 総括研究報告 ..... 1

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学 糸山 泰人

## III. 研究報告（分担研究者）

1. ALS を引き起こす変異 Cu/Zn-SOD 蛋白質の構造変化と不安定性に関する研究 ..... 7  
大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学 谷口 直之
2. Dishevelled-1 をターゲットとする新規ヒトユビキチンリガーゼNEDL1の同定と  
そのSOD1 変異体との結合および分解に関する研究 ..... 12  
千葉県がんセンター生化学研究部 中川原 章
3. 新しい筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療法開発の基盤研究  
—— HGF の観点から —— ..... 15  
大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻  
組織再生医学講座分子組織再生分野 船越 洋
4. ALS ラットモデルに対する髄腔内投与による新規治療法の開発に関する研究 ..... 18  
東北大学病院神経内科 青木 正志

## IV. 研究成果一覧

# 研 究 者 一 覽

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた  
挑戦的治療法の開発とその基盤研究

研究者一覧

主任研究者	糸山 泰人	東北大学大学院医学系研究科神経科学講座 神経内科学	教授
分担研究者	谷口 直之	大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学	教授
	中川原 章	千葉県がんセンター生化学研究部	部長
	船越 洋	大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻 組織再生医学講座分子組織再生分野	助教授
	青木 正志	東北大学病院神経内科	助手

# 總 括 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法の開発と  
その基盤研究

主任研究者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経科学講座神経内科学分野 教授

分担研究者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科

生化学）

中川原章（千葉県がんセンター生化学研究部）

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科

分子組織再生学分野）

青木正志（東北大学病院神経内科）

解な治療効果を示し、次世代の ALS の治療薬として注目されている。一方、本研究グループで開発された ALS Tg ラットは HGF の髄腔内投与実験を可能にさせ、予備実験では臨床的にも病理的にも有効性を示している。これらの結果を基盤に運動ニューロンの選択的細胞死のメカニズムと HGF の有効性の機序を解明しつつ HGF を用いた ALS の新規治療法を確立していきたい。

## A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は病因不明の進行性の難治性神経筋疾患である。運動ニューロンの選択的な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行し、最終的には呼吸筋の麻痺をきたすという極めて予後が不良な疾患であり、未だ筋萎縮の進行を止める有効な治療法が確立していない。世界的にも ALS に対する新たな治療法が切望されているが、国内外での臨床試験の結果は絶望的なものと云わざるをえない。本研究の目的はこの神経難病 ALS に対して挑戦的な治療法の開発と確立をめざすことである。

日本で発見された新規の神経栄養因子である肝細胞増殖因子（HGF）は ALS トランスジェニック（Tg）マウスに対して遺伝子工学的に明

## B. 研究方法

ALS の病因と病態は不明であるが、家族性 ALS の病因遺伝子 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）の関与が最も重要なものと考えられる。本研究グループは変異 SOD1 導入 ALS モデル動物に対して HGF の治療実験を完成させ、早期に臨床応用にもってゆくことを目的として、①新規治療法開発に必要な神経細胞死の機序解明、②HGF の運動ニューロン死抑制機序の解明、③ ALS モデル動物に対する HGF の髄腔内投与実験の研究を行う。

1) 新規治療法開発に必要な神経細胞死の機序解明

①変異 SOD1 は生体内で構造変化を起こし

aggregation を起し神経細胞毒性を示すことが考えられている。この構造変化の機序を解析する為にもモノクローナル抗体 (mAb) の反応性を検討した。正常 SOD と変異 SOD1 (G93A、G37R、A4V、H46R) の cDNA を昆虫細胞発現ベクターに組み込み、それぞれの SOD 蛋白を精製し 3 種の mAb を反応させた。

②神経芽種の発現遺伝子解析の過程で同定された新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 に結合するタンパクの検討を酵母 two-hybrid 法により行ったところ、小胞体トランスロコンを構成し SOD1 変異体と結合することが報告されている TRAP- $\delta$  が同定された。そこで、NEDL1 が品質管理ユビキチンリガーゼとしても機能し、ミスフォールド蛋白としての SOD1 変異体に作用するのか、作用するのであればそれは遺伝子治療の可能性が考えられるのか、あるいは病的な意味があるのかなどを明らかにした。

2) HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

①HGF が ALS Tg マウスに有効であることは HGF-ALS ダブル Tg マウスによって遺伝子工学的手法によって示されている。しかしこの効果は発症から死亡までの disease duration の延長には及んでいない点を実際の ALS 治療には問題点であった。そこで ALS Tg マウスの末期において disease duration に関与する各種活性化型カスパーゼや Bcl ファミリー分子に与える HGF の影響を解析した。

②将来的に HGF を用いた遺伝子治療の可能性を見据えて HSV や AAV の発現ウイルスベクターの構築を検討した。

3) ALS モデル動物に対する HGF 髄腔内投与実験

次世代の ALS 治療薬として注目されている HGF の臨床応用を目指して ALS ラットに対する

HGF の髄腔内投与実験を行う。G93A Tg ラットの髄腔内にリコンビナントヒト HGF (rh HGF) を浸透圧ポンプ (Alzet Model 2004) を用いて持続投与した。3 群(各群 n=8)の Tg ラットそれぞれに vehicle (PBS) および rh HGF の 40  $\mu$  g と 200  $\mu$  g を ALS を発症していない 100 日齢から一ヶ月間にわたって投与してその臨床病像と脊髄内における運動ニューロン数を定量化して比較した。さらに G93A Tg ラットに対する ALS 発症後の病態進展に対する HGF の効果を検討した。rh HGF 蛋白 200  $\mu$  g と vehicle をそれぞれ 8 匹の G93A Tg ラットの髄腔内に臨床的に発症時期の直前である 115 日齢から 4 週間持続投与し、その体重と発症日と寿命の観察を行った。

## C. 及び D. 研究結果及び考察

1) 新規治療法開発に必要な神経細胞死の機序解明

①3 種の mAb は野生型 SOD1 には強い反応性を示したが、A4V、G37R、G93A はほとんど反応しなかった。また、DTT や SDS や熱処理によって野生型 SOD1 は mAb との反応性が增大したが、A4V、G37R、G93A は逆に減弱していった。3 種類の mAb は SOD1 の Greek key loop 部分を認識するので、この Greek key loop 部分では、野生型と変異型では還元や熱などによって変性した構造が異なることを示唆している。Greek key loop 部分は SOD1 ホモダイマーの安全性に大きく寄与しており、この部分が変化しやすいことはタンパク全体の不安定性や aggregation のなりやすさにつながると考えられる。

②新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 は、Dishevelled-1 (Dvl-1) をユビキチン化の基質とし、また小胞体トランスロコンの構造タンパ

クである TRAP- $\delta$  と結合した。NEDL1 は正常な SOD1 とは結合せず SOD1 変異体と特異的に結合し、ユビキチン化による分解を引き起こした。興味深いことには、その結合、ユビキチン化、分解および SOD1 二量体化の程度は、SOD1 変異体が引き起こす ALS の重症度と相関性を示した。免疫組織化学染色でも NEDL1 はヒト FALS 並びに SOD1 変異体 Tg マウスの脊髄運動ニューロン Lewy body-like hyaline inclusions (LBHI) に陽性であった。加えて NEDL1 の基質である Dvl-1 と SOD1 変異体の異常な相互作用が新たに惹起され、Dvl-1 の機能である Wnt 分配因子機能に障害が生じた。以上の結果から、SOD1 変異体は神経特異的品質管理ユビキチンリガーゼとしての NEDL1 によるユビキチン化を受けるが、結果的に、NEDL1、TRAP- $\delta$ 、Dvl-1 などと細胞内タンパク質凝集体を形成し、それら構成因子やオルガネラの機能障害を引き起こすことが SOD1 変異体由来の FALS の発症の一因となっている可能性が示唆された。

## 2) HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

①ALS-HGF Tg と ALS Tg につき HGF による発症前後での各種 ALS 病態進行分子機構に対する影響について解析した。ALS Tg において活性型カスパーゼ 9 は ALS 発症中期の運動ニューロンに誘導され、ALS 末期には一部反応性アストロサイトにも誘導された。HGF レベルが高く維持された ALS-HGF Tg マウスは 8 か月齢でも生存し、そのマウスにおいては活性型カスパーゼ 9 の誘導が抑制されるとともに運動ニューロンの変性も抑制されていた。すなわち ALS の disease duration の進行に関わる主要分子機構である活性型カスパーゼ 9 の誘導を、HGF が抑制する効果を明らかにした。このことから ALS 末期の脊髄に十分量の HGF 蛋白を持続的に供給する手段を開発することによりさらなる

ALS の寿命延長を期待できると考えられた。

②髄腔内投与以外の将来に向けた新しい HGF 供給法の検討の為に、各種の HGF 発現ウイルスベクターの構築と解析および投与法の検討を行なった。HGF 発現ウイルスベクター即ち HSV-HGF および各種 AAV-HGF の構築を全て終了し、ウイルスベクターの HGF の発現を、ELISA 法、ウェスタンブロット法、生物アッセイ法で解析したところ、いずれも発現ベクターの作成に成功していることを確認した。今後、ALS モデル動物で HGF 発現ウイルスベクターの理想的投与法を確認できれば、現在進めている髄腔内 HGF 投与療法に加えて新たな HGF 治療法の開発も期待される。

## 3) ALS モデル動物に対する髄腔内投与実験

HGF の臨床応用のために ALS ラットに対して rhHGF の髄腔内持続投与を行なった。HGF 投与群においては vehicle 投与群に比較して有意に腰髄運動ニューロン数が保たれていることが明らかになり、このことは HGF 投与量に依存的であった。臨床的には対照 (vehicle) 群と比較して rh HGF 蛋白 200  $\mu$ g / 固体群では発症日には差が認められなかったが、発症から死亡までの平均罹病期間は対照群の 16.9 日に対して HGF 投与群では 27.5 日であり、有意に延長が認められた。HGF の投与開始の 115 日齢は臨床的発症直前であり、病理学的には既に脊髄前角の運動ニューロンの脱落が認められる時期である。この時期での投与で約 63% の罹病期間の延長効果が確認されたことは、HGF の髄腔内持続投与の臨床応用が十分に期待される。今後は HGF 有効性のメカニズムのさらなる解明と、髄腔内投与における副作用の有無などについてもより詳細な検討が必要である。

## E. 結論



本研究の目的は苛酷な神経難病の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する次世代の新規治療薬として期待される肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた挑戦的治療法の開発とそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALS の病因として最も重要視されている変異 SOD1 による選択的運動ニューロン死のメカニズムはまだ十分明らかにされていない。今回、SOD1 変異体は新規の神経特異的ユビキチンリガーゼである NEDL1 のユビキチン化を受けるが、最終的に NEDL1、TRAP- $\delta$ 、Dvl-1 などの細胞内タンパク質凝集体を形成し機能障害を引き起こすことが神経細胞死の一因ではないかと示唆された。HGF はその凝集体形成で引き起こされたシグナル伝達の改善に寄与して細胞死を抑制する可能性も考えられる。HGF が ALS Tg マウスに対して遺伝子工学的に有効性を示すものの disease duration を十分に延長させない弱点があった。今回 HGF が ALS 病変進行に重要な活性型カスパーゼ 9 の誘導を抑制することが明らかにされ、HGF の持続供給投与方法が改善されたら更に延命効果が期待されると考えられた。HGF の ALS 患者への臨床応用を目指して本研究グループで開発された ALS Tg ラットに対し髄腔内持続 HGF 投与実験を行ってきている。今回 ALS が臨床的に発症する時期から HGF を投与しても有意に ALS の罹病期間を延長することが示され、臨床応用に向けて次なるステップへ進むことが可能になった。

#### 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

Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose

Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel E3 ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. J Biol Chem. (in press)

Takamiya R, Takahashi M, Theingi M, Park Y-S, Miyazawa N, Endo T, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Miyamoto Y, Fujii J, Taniguchi N. Glycation proceeds faster in mutated Cu,Zn-superoxide dismutases related to familial amyotrophic lateral sclerosis. FASEB J 17:938-940, 2003

Kato S, Saeki Y, Aoki M, Nagai M, Ishigaki A, Itoyama Y, Kato M, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E. Histological evidence of redox system breakdown caused by superoxide dismutase 1(SOD1) aggregation is common to mutant SOD-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis patients and transgenic rats expressing human mutant SOD1. Acta Neuropathol (Berl), 107:149-158, 2004

Kato S, Funakoshi H, Nakamura T, Kato M, Nakano I, Hirano A, Ohama E. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. Acta Neuropathol (Berl). 106(2):112-120, 2003

##### 2. 学会発表

Fujiwara N, Miyamoto Y, Takahashi M, Takamiya R, Honke K, Suzuki K, Taniguchi N. Differences in stability and conformational change between wild-type and mutant

copper, zinc-superoxide dismutase linked with familial amyotrophic lateral sclerosis. HUPO 2<sup>nd</sup> Annual & IUBMB XIX Joint World Congress, October 8-11, Montreal, Canada (Late Breaking Abstract, 28, 2003).

青木正志、永井真貴子、加藤昌昭、石垣あや、松本有史、割田 仁、船越 洋、中村敏一、糸山泰人、HGF 髄腔内持続投与による ALS トランスジェニックラットにおける運動ニューロン死の抑制; 第 44 回日本神経学会総会 2003.5 横浜

#### H. 知的財産の出願・登録状況

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

# 分 担 研 究 報 告

厚生省研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

「筋萎縮性側索硬化症に対する肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法の開発とその  
基盤研究」

『ALS を引き起こす変異 Cu/Zn-SOD 蛋白質の構造変化と不安定性に関する研究』

分担研究者 谷口直之 大阪大学大学院医学系研究科生化学・教授

研究要旨 家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）のうち、20%は Cu/Zn-スーパーオキシド  
ディスムターゼ（Cu/Zn-SOD）遺伝子(SOD1)の変異が原因であることが証明されている  
が、ALS の発症に直接結び付くメカニズムは解明されていない。そこで、変異 SOD タンパ  
クと野生型 SOD タンパクでは何が異なるのか、100 種類以上報告されている変異 SOD タ  
ンパクに共通する性質は何なのかを探索した。その結果 FALS 変異 SOD タンパクはたった  
1 個のアミノ酸置換にもかかわらず、3 種類の抗ヒト Cu/Zn-SOD モノクローナル抗体  
（mAb）を用いたウエスタンブロット解析でほとんど検出されないことを見出した。また、  
野生型 SOD タンパクは DTT や熱処理などによって3種の mAb との反応性が增大していく  
のに対し、FALS 変異 SOD タンパクは反対に減少していくことを明らかにした。これらの  
mAb はエピトープとして Greek key loop を認識することから、mAb との反応性の違いは  
Greek key loop 部分の構造の違いや構造変化の差異を示すと考えられる。従って FALS 変  
異 SOD タンパクが局所的に野生型 SOD タンパクとは異なる構造に変化することが  
aggregation のなりやすさや不安定性の原因となり、ひいては ALS を引き起こす病因とな  
る可能性が示唆される。

分担研究者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科生化学・教授）

共同研究者

藤原範子（兵庫医科大学生化学・講師）

宮本泰豪（大阪府成人病センター・主任研究員）

高橋素子（大阪大学大学院医学系研究科生化学・助手）

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）のうち、20%は Cu/Zn-スーパーオキシドディスムターゼ（Cu/Zn-SOD）遺伝子(SOD1)の変異が原因であることが証明されて以来、今まで100種類以上の変異が報告されている。しかし、その発症メカニズムはほとんど解明されていない。FALS 患者や変異 SOD1 トランスジェニックマウスでは Cu/Zn-SOD 免疫陽性の封入体が観察されており、変異 Cu/Zn-SOD は生体内で構造変化を起こし、aggregation

を起こしやすいことが示唆されている。この aggregation が神経細胞に対して毒性をもつことも示唆されている。また、我々は変異 Cu/Zn-SOD は野生型 Cu/Zn-SOD に比べ、糖化を受けやすいこと<sup>1)</sup> やプロテアソーム系で分解されやすいことなどを見出してきた。これらの結果は変異 Cu/Zn-SOD と野生型 Cu/Zn-SOD では立体構造上なんらかの差異があることを示唆している。しかし、変異 Cu/Zn-SOD がどのような構造変化を起こしているのかについてはまったく不明のままである。モノクローナル抗体(mAb)はタンパク質の局所的な構造や構造変化の違いを解析するために用いられる。そこで、変異 SOD タンパクと野生型 SOD タンパクに対する mAb の反応性を検討した。さらにタンパク質全体の構造と不安定性を調べるために、さまざまな変性処理をした SOD タンパクの CD 解析を行った。

## B. 研究方法

野生型および変異型 SOD1 遺伝子(WT, A4V, G37R, H46R, G93A, C111S (FALS の変異ではない)) の cDNA をバキュロウイルス/昆虫細胞発現系のベクター (pVL1392) に組み込み、Sf21 昆虫細胞で Cu/Zn-SOD タンパクを強制発現させた。陰イオン交換カラム、ヒドロキシアパタイトカラムにて Cu/Zn-SOD タンパクを精製した。Cu/Zn-SOD タンパクは各種変性処理をし、ウエスタンブロット解析、ELISA、円偏光二色性 (CD) 解析に供した。モノクローナル抗体のエピトープマッピングは、Cu/Zn-SOD タンパクをリジルエンドペプチダーゼで分解し、逆相カラム (C18)

を用いた HPLC でペプチドを分離し、そのペプチドに対する反応性を ELISA で測定した。さらに詳細なエピトープマッピングは合成ペプチドを用いて決定した。

## C. 研究結果

精製 Cu/Zn-SOD を用いて、mAb に対する反応性の違いを調べた。精製 Cu/Zn-SOD を 3 種の mAb を用いてウエスタンブロット解析を行った。その結果、WT や C111S は強い反応性を示したが、A4V, G37R, G93A はほとんど反応しなかった。H46R は弱いながらもすべての mAb に反応した。このニトロセルロース膜を脱ハイブリし、ポリクローナル抗体でもう一度反応させると、すべての Cu/Zn-SOD が同程度に反応した。従ってニトロセルロース膜上には変異 SOD タンパクも同量存在するが、mAb には反応しにくいことが明らかになった。

そこでこの現象を解析するために、精製した SOD タンパクを用いて ELISA を行ったが、いずれの mAb も A4V との反応性が強く、ウエスタンブロット解析の結果を反映しなかった。そこでウエスタンブロットを行う時と同じ処理 (boil with 2% SDS and 2% 2-ME) を施した SOD タンパクを用いて ELISA を行ったところ、ウエスタンブロット解析の結果と同様の傾向が認められた。

ウエスタンブロットを行う時と同じ処理の中には 2-ME による還元、SDS による変性、熱変性の 3 つが含まれる。どの変性処理が mAb との反応性の差異につながるかをそれぞれの変性処理後に ELISA を行って検討した。1 mM 以上の DTT による還元によって、WT, C111S

のグループは3種の mAb との反応性が增大していくのに対し、FALS 変異 SOD、A4V、G37R、G93A は逆に減少していくことが明らかになった。H46R は FALS mutant であるにもかかわらず、WT のグループに近い傾向が見られた。また SDS や熱処理によっても mAb によって差はあるものの、変性すると WT、C111S のグループは mAb との反応性が增大し、逆に A4V、G37R、G93A は減弱していった。

では本実験で用いた mAb はヒト Cu/Zn-SOD のどの部分を認識するのであろうか？そこでエピトープマッピングを行ったところ、mAb は3種類ともヒト Cu/Zn-SOD の 102 番目のセリンから 115 番目のアルギニンまでの部位、つまり Greek key loop に相当する部分を認識することがわかった。従って mAb との反応する Greek key loop 部分では、野生型と変異 Cu/Zn-SOD では還元や熱などによって変性した構造が異なることを示唆している。なお、SOD タンパクとの反応性が native、変性処理後ともに少しずつ異なることから、これら mAb の厳密なエピトープはそれぞれ違う構造を認識すると考えられる。

次に DTT などの処理によって SOD タンパク全体の構造がどのように変わるのかを円偏光二色性 (CD) 解析を用いて調べた。まず WT と A4V を様々な濃度の DTT で処理したのち遠紫外部の CD 解析を行ったところ、WT は 1 mM の DTT で少し影響が認められたが、0.5mM 以下の DTT に対してはまったく構造に変化は認められなかった。一方、A4V は DTT に非常に sensitive で 0.01 mM から変化が現れ、濃度依存的に構造が変化した。2つの isodichroic points が見られることから、DTT

による変性が非特異的な凝集ではなく、2 状態転移が起こっていることが示唆された。他の FALS mutant タンパクはすべて DTT に影響を受けやすく、A4V と同様の CD パターンを示したが、C111S は WT と同様 1 mM の DTT に耐性であった。しかし、熱や SDS による変性処理に対しては H46R と A4V のみが非常に不安定で、他の FALS mutant タンパクは WT と同程度に安定であった。

#### D. 考察

FALS 変異 SOD タンパクはたった1個のアミノ酸置換にもかかわらず、3 種類の抗ヒト Cu/Zn-SOD モノクローナル抗体 (mAb) を用いたウエスタンブロット解析でほとんど検出されないことを見出した。また、野生型 SOD タンパクは DTT や熱処理などによって3種の mAb との反応性が増加していくのに対し、FALS 変異 SOD タンパクは反対に減少していくことが明らかになった。これらの結果は、mAbのエピトープ部分である Greek key loop 部分では野生型と変異 Cu/Zn-SOD では還元や熱などによって変性した構造が異なることを示唆している。Greek key loop 部分は Cu/Zn-SOD ホモダイマーの安定性に大きく寄与しており、この部分が変化しやすいことはタンパク全体の不安定性にもつながると考えられる。Greek key loop の中にある Cys111 を Ser に変えると安定性が増すという報告がある。本実験においても C111S は WT と同様の傾向を示した。またこれらの実験で用いた FALS 変異 SOD タンパクの変異部位がいずれもこのエピトープ部分とは離れた場所にあることも興味深い。なぜエピトープ部位と離れ

た場所にアミノ酸置換が起こることでエピトープ部位との反応性が変わるのか、また変性処理によって変化した反応性がなぜ野生型 SOD と FALS 変異 SOD で異なるのかについては今後の大きな課題である。

これまで、FALS 変異 SOD タンパクは不安定であることや aggregation を作りやすいことが示されてきた。しかし、どのような構造変化が起こっているのかという詳しい解析はまだなされていない。変性したタンパク質は結晶を作りにくいことから、他の神経変性疾患の原因タンパク質においても変性後の構造解析は進んでいない。従って本研究のようなモノクローナル抗体を用いた解析は微視的な構造変化をとらえるのに有効であると考えられる。果たして FALS 変異 SOD タンパクが局所的に野生型 SOD タンパクとは異なる構造に変化することが aggregation のなりやすさや不安定性の原因となるのかどうか、もしそうであればどのようなメカニズムで ALS を引き起こすのか、について検討していきたいと考えている。

#### E. 結語

FALS 変異 SOD タンパクはエピトープ部位と異なる場所に 1 個のアミノ酸置換が起こることでモノクローナル抗体との反応性が変わることで、また DTT による還元などの変性処理によって変化した反応性が野生型 SOD と FALS 変異 SOD で異なることを明らかにした。モノクローナル抗体を用いて FALS 変異 SOD の構造変化を詳細に検討することは ALS 発症メカニズムの解明につながる可能性がある。

F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takamiya R., Takahashi M., Theingi M., Park Y- S, Miyazawa N., Endo T., Fujiwara N., Sakiyama H., Misonou Y., Miyamoto Y., Fujii J. and Taniguchi N. (2003) Glycation Proceeds Faster in Mutated Cu, Zn-Superoxide Dismutases Related to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. **FASEB J.**, 17, 938-940.

##### 2. 学会発表

Fujiwara N., Miyamoto Y., Takahashi M., Takamiya R., Honke K., Suzuki K. and Taniguchi N. (2003) DIFFERENCES IN STABILITY AND CONFORMATIONAL CHANGE BETWEEN WILD-TYPE AND MUTANT COPPER, ZINC-SUPEROXIDE DISMUTASE LINKED WITH FAMILIAL AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX Joint World Congress, October 8 -11, Montreal, Canada (Late Breaking Abstracts, 28, 2003.)

Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S., Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Suzuki K. and Taniguchi N. (2003) OVEREXPRESSION OF MUTATED CU, ZN-SODS IN NEUROBLASTOMA CELLS RESULTS IN CYTOSKELETAL CHANGE. HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX Joint World Congress, October 8 -11, Montreal, Canada (Late Breaking Abstracts, 23, 2003.)

Fujiwara N., Miyamoto Y., Takahashi M.,  
Ookawara T., Eguchi H., Ogasahara K., Endo T.,  
Takamiya R., Honke K., Tsukihara T., Suzuki K.  
and Taniguchi N. (2003) Differences in  
conformational change monitoring with monoclonal  
antibodies between wild-type and mutant Cu, Zn-  
SOD linked with Familial Amyotrophic Lateral  
Sclerosis. :第76回日本生化学会大会.10.15-18,  
横浜. (生化学, 75, 862, 2003.)

Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S., Tawara Y.,  
Fujiwara N., Miyamoto Y., Suzuki K. and Taniguchi  
N. (2003) Overexpression of Mutated Cu, Zn-SOD  
in Neuroblastoma Cells Results in Cytoskeletal  
Change. : 第76回日本生化学会大会.10.15-18,  
横浜. (生化学, 75, 829, 2003.)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



Dishevelled-1 をターゲットとする新規ヒトユビキチンリガーゼ NEDL1 の同定と  
その SOD1 変異体との結合および分解に関する研究

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究所生化学研究部 部長

**研究要旨**

家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)の約 20%は SOD1 遺伝子の生殖系列における変異から生じるが、その詳細な分子機構は不明なままである。自然退縮を引き起こす神経芽種より同定された神経組織特異的に発現する新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 は、Dishevelled-1(Dvl-1)をユビキチン化の基質とし、また小胞体トランスロコンの構成タンパクである TRAP- $\delta$ と結合した。ちなみに、TRAP- $\delta$ は SOD1 変異体と特異的に結合することが報告されているがその意義は不明であった。そこで、SOD1 変異体が異常蛋白として認識され、TRAP- $\delta$ を介して NEDL1 からユビキチン化を受けるか否かを検討したところ、NEDL1 は正常な SOD1 とは結合せず SOD1 変異体と特異的に結合し、ユビキチン化による分解を引き起こした。また、興味深いことに、その結合、ユビキチン化、分解および SOD1 二量体化の程度は、SOD1 変異体を引き起こす疾患の重症度と相関性を示した。免疫組織化学染色でも NEDL1 はヒト FALS 並びに SOD1 変異体 Tg マウスの脊髄運動ニューロン Lewy body-like hyaline inclusions (LBHI)に陽性であった。加えて、NEDL1 が SOD1 変異体を標的とすることにより、本来の NEDL1 の基質である Dvl-1 と SOD1 変異体の異常な相互作用が新たに惹起され、Dvl-1 の機能に障害が生じた。その相互作用もまた、SOD1 変異体を引き起こす疾患の重症度と相関が見られた。以上の結果から、SOD1 変異体は神経特異的な品質管理ユビキチンリガーゼとしての NEDL1 によるユビキチン化を受けるが、結果的に、NEDL1、TRAP- $\delta$ 、Dvl-1 などと細胞内タンパク質凝集体を形成し、それら構成因子やオルガネラの機能障害を引き起こすことが SOD1 変異体由来の FALS の発症の一因となっている可能性が示唆された。

**A. 研究目的**

神経芽種の発現遺伝子解析の過程で同定された新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 に結合するタンパク質の検討を酵母 two-hybrid 法により行ったところ、小胞体トランスロコンを構成し SOD1 変異体と結合することが報告されている TRAP- $\delta$ が同定された。そこで、NEDL1 が、品質管理ユビキチンリガーゼとしても機能し、ミスフォールド蛋白としての SOD1 変異体に作用するのか、作用するならばそれは遺伝子治療の可能性が考えられるのか、あるいは病的な意味があるのかなどを明らかにすることを目的とした。

**B. 研究方法**

(1) NEDL1 の全長同定、マウス ortholog の同定、組織発現、細胞内局在、活性同定

独自に作成した神経芽種 cDNA ライブラリー、およびヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを用いた。発現解析は、ノザンブロットティング及びヒト脳部位別 cDNA を用いた RT-PCR を行った。細胞内局在の検討には共焦点顕微鏡を用いた。また *in vitro* の再構成系によるユビキチンリガーゼ活性の検討を行った。

(2) 相互作用因子、基質同定、チェイス実験、NEDL1 基質蛋白間での相互作用

酵母 two-hybrid 法を利用した相互作用因子、基質同定を行った。また、得られた相互作用候補因子は培養細胞を用いた一過性の遺伝子発現による免疫沈降法並びにウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* 転写/翻訳法によりで結合の確認を行った。また、培養細胞内でのユビキチン化の検討も行った。さらに蛋白質合成阻害剤サイクロヘキシミドを用い

たチェイス実験により SOD1 変異体蛋白の半減期の検討も行った。

(3) 結合部位同定

NEDL1 の機能ドメインに対する欠失変異体及び部分変異体を作製し一過性の遺伝子発現による免疫沈降法及びプルダウン法により結合部位を決定した。

(4) 免疫組織化学染色

NEDL1 特異抗体を用い、コドン 126 の 2 塩基フレームシフト家系の FALS 症例、及び H46R 変異の Tg マウスを用いた免疫組織化学染色を行った。

C. 研究結果

(1)NEDL1 の同定、マウス ortholog の同定、組織発現、細胞内局在、活性

ヒト NEDL1 は、神経芽種、ヒト胎児脳ライブラリーに対するスクリーニング及びゲノム情報に基づき全長配列を同定したところ 1,585 アミノ酸からなる NEDD4 ファミリーに属する HECT 型ユビキチンリガーゼをコードすることが予測された (図 1)。

NEDL1 の組織別発現は、成人脳、胎児脳、脊髄などほぼ神経組織に特異的と考えられる組織局在を示す結果が得られた。細胞内局在は細胞質であった。さらに実際分子活性を有するか否か検討するために *in vitro* の再構成系によるユビキチンリガーゼ活性の検討を行ったところ、NEDL1 のユビキチンリガーゼ活性が証明された。

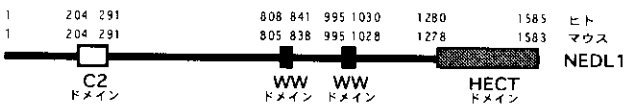


図1. NEDL1のドメイン構造

C2ドメイン：カルシウム/リン脂質に結合する。WWドメイン：プロリン残基に富む配列に結合する。HECTドメイン：ユビキチン結合酵素(E2)と結合し、ユビキチン付加活性を持つ。上段、下段数字はヒト、マウスのアミノ酸番号。アクセッション番号：Human NEDL1, AB048365; mouse Nedl1, AB083710。

(2)相互作用因子としての TRAP- $\delta$ 、基質としての Dvl-1 の同定

酵母 two-hybrid 法を利用して NEDL1 のふたつの WW ドメインをベイトとした相互作用因子の探索を行ったところ、複数の陽性クローンが得られ、得られた相互作用候補因子は培養細胞を用いた一過性の遺伝子発現による免疫沈降法で結合の確認を行った。その結果、小胞体トランスロコンの構成タンパクである TRAP- $\delta$ や Wnt シグナルの重要なシグナル分

配因子である Dvl-1 が相互作用分子として同定された。さらに Dvl-1 は NEDL1 によりユビキチン化を受け分解に導かれることが判明した。

(3)NEDL1 の標的としての SOD1 変異体の同定

TRAP- $\delta$ は SOD1 変異体(G85R 及び G93A)と特異的に結合することが報告されていたが(Kunst *et al.*, Nat. Genet. 15:91-94, 1997)、その病態生理学的意義は不明であった。われわれは NEDL1 が品質管理ユビキチンリガーゼとしても機能し、ミスfold蛋白としての SOD1 変異体に TRAP- $\delta$ を介して作用している可能性を考え、上述と同様に強制発現系での免疫沈降法で結合の確認を行った。すると予想通り NEDL1 は正常な SOD1 とは結合せず、SOD1 変異体と特異的に結合し、ユビキチン化によるプロテアソーム依存的分解を引き起こしたが、興味深いことに、その結合、ユビキチン化、分解、および SOD1 変異体の二量体化の程度は SOD1 変異体を引き起こす疾患の重症度と相関性を示した (図 2)。

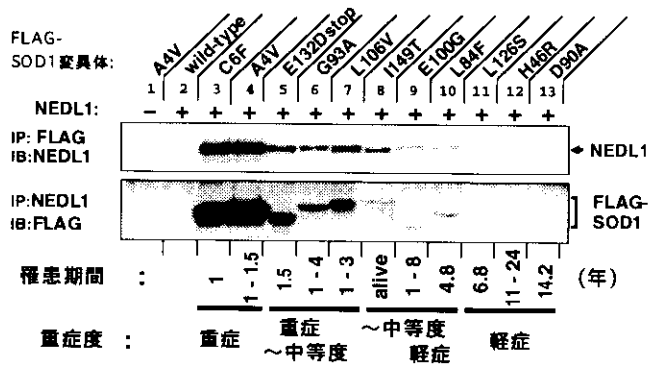


図2. NEDL1、SOD1変異体の結合

NEDL1はSOD1変異体と結合するが変異体によって結合の強さは大きく異なる。SOD1変異体を引き起こす疾患の重症度と相関性がある。WTのSOD1とは結合しない。

(4)NEDL1 結合部位同定

NEDL1 の機能ドメインに対する欠失変異体並びに部分変異体を作製し、結合部位を決定した。NEDL1 の明らかな機能ドメインとしては C2 ドメイン、WW ドメイン 1、WW ドメイン 2、HECT ドメインがあり、NEDL1 と SOD1 変異体(G93A)の結合には C2 ドメインと WW ドメイン 1 の間の領域が必須であることが判明した。ウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* 転写/翻訳法により結合の直接性を検討したところ、SOD1 変異体と TRAP- $\delta$ は直接結合、NEDL1 と SOD1 変異体は間接結合と考えられた。

(5)免疫組織化学染色

FALS に特徴的な病理所見として前角運動ニューロンなどの細胞質に Lewy body-like hyaline inclusion が認められ、抗 Cu/Zn SOD 抗体、抗ユビキチン抗体で陽性であることが挙げられる。従ってわれわれは NEDL1 特異抗体を用い、コドン 126 の 2 塩基フレームシフト家系の FALS 症例、及び H46R 変異の Tg マウスを用いた免疫組織化学染色を行った。予想通りいずれも NEDL1 陽性であることが確認された。

#### (5) NEDL1 の基質間での干渉作用

NEDL1 が品質管理ユビキチンリガーゼとして機能している際、正常の基質は何らかの影響を受けているのかを検証するために NEDL1 存在下非存在下での SOD1 変異体と Dvl-1 の相互作用の可能性を検討した。その結果 NEDL1 存在下では SOD1 変異体と Dvl-1 の強固な相互作用が惹起され、Dvl-1 で誘導される c-Jun のセリン 63 番のリン酸化が SOD1 変異体によって抑制された。

#### D. 考察

自然退縮を引き起こす神経芽種より同定された神経組織特異的に発現する新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 は、正常時には Dvl-1 をユビキチン化し、また、SOD1 変異体特異的に結合することが報告されている小胞体膜タンパク TRAP- $\delta$ と相互作用することが考えられた。さらに、SOD1 が正常である限り NEDL1 や TRAP- $\delta$ は SOD1 と相互作用することはなかった。ところが、SOD1 変異体存在下では、NEDL1 は新たに品質管理ユビキチンリガーゼとしての機能を付与され (TRAP- $\delta$ 存在下に、或いは非存在下に) SOD1 変異体をユビキチン化し分解に導いた。しかし長期的には (或いはある閾値を超えると)、SOD1 変異体の凝集活性のために ( $\beta$ -シートからなる SOD1 タンパクは元々強い凝集性を秘めたタンパクである) その分解システムに破綻を来し細胞内凝集体の核となってしまうと考えられた。

TRAP- $\delta$ は小胞体トランスロコンの構成タンパクとして TRAP 四量体を形成しトランスロコンを介した小胞体関連分解に関与することが示唆されている。また酵母では HECT 型ユビキチンリガーゼが小胞体-ゴルジを介した品質管理に関わっている可能性が示されている。さらに、NEDL1 の基質である Dvl-1 は Wnt シグナルのシグナル変換分子であり平面内細胞極性などの形態形成に関わる分子である。

従って、NEDL1 は、SOD1 変異体で誘導される細胞障害として生じるゴルジ装置の崩壊や小胞体ストレスの惹起、さらには細胞骨格系の異常などの分子機構と関連していることが示唆された。また、Wnt 細胞内情報伝達系は、HGF のそれとクロストークしていることが報告されており、本研究の発展が、HGF シグナル伝達系を利用した家族性筋萎縮性側索硬化症の治療法開発に貢献することが期待される。

#### E. 結論

一部の FALS を引き起こす SOD1 変異体は神経特異的品質管理ユビキチンリガーゼとしての NEDL1 によるユビキチン化を受けるが、結果的に NEDL1、TRAP- $\delta$ 、Dvl-1 などと細胞内タンパク凝集体を形成し、それら構成因子やオルガネラの機能障害を引き起こすことが、SOD1 変異体由来の家族性筋萎縮性側索硬化症の発症の一因となっている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) Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel E3 ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* (in press)
- 2) Ohira M, Morohashi A, Inuzuka H, Shishikura T, Kawamoto T, Kageyama H, Nakamura Y, Isogai E, Takayasu H, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Goto T, Sato S, Nakagawara A. Expression profiling and characterization of 4,200 genes cloned from primary neuroblastomas: Identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets. *Oncogene* 22:5525-5536, 2003.

(他、英文論文 16 編)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中 1 件

# 新しい筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療法開発の基盤研究

## —HGF の観点から—

分担研究者：大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野 助教授 船越 洋

### 研究要旨

HGF は運動ニューロンを標的とし、強力な神経栄養活性を示すことが *in vitro* においても *in vivo* においても明らかにされている。特に HGF の受容体である c-Met の遺伝子のシグナル発信に重要なチロシン残基を変異したマウスでは、運動ニューロン数が減少し、筋肉への神経投射が大幅に改編してしまうことから生理的運動ニューロン栄養因子と考えられる。私達は HGF がとりわけ運動ニューロンに強い神経栄養活性を示すことに着目し HGF の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する機能解析を行い、HGF が ALS-Tg マウスの発症を遅延させ、これまでの他の治療研究報告に比べ寿命を大幅に延長できることを明らかとしてきた。一方で、発症後死亡までの期間 (duration) は延長しなかった。その理由として疾患末期に内因性 HGF に比べ十分量の HGF を発現できていなかったためと考えられた。本年度 HGF の詳細な作用分子機構の解析から、HGF は ALS の duration 決定に重要な活性型カスパーゼ9の発現誘導を抑制する機能を持つことを明らかとした。このことは、HGF の供給法改善により HGF は ALS の duration をも延長し、これまで以上に寿命を延長できるポテンシャルを持っていることを示唆している。本年度具体的な新しい HGF 供給法として各種ウイルスベクターの投与方法の解析と各種 HGF 発現ウイルスベクターの構築を行った。今後、モデル動物で HGF の理想的投与方法を確立できれば、HGF によるヒト ALS の新しい治療法開発が具体化できると期待される。

### 1. 目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は運動ニューロンが特異的に進行性に変性する致死性疾患で家族性 (FALS) と孤発性 (SALS) に分類されるが、前者の原因遺伝子として SOD1 の各種遺伝子変異と ALS2 が明らかとされている。特に SOD1 の変異は70ヶ所以上報告され数も多いことが知られ、私達は SOD1 の変異遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (ALS-Tg) を用いて解析を進めている。解析を進めるにあたって、まず神経特異的に HGF を発現するトランスジェニックマウス (HGF-Tg) を作成し、これと ALS-Tg を交配する

ことで ALS-Tg の運動ニューロンに効率良く HGF 遺伝子を供給した際の効果を解析した。その結果、HGF 供給により ALS マウスの運動ニューロン死が大幅に抑制され、運動機能も改善、これまでの他の治療研究報告に比べ寿命が大幅に延長することが明らかとなった。この効果はこれまでの報告にくらべ強くその作用機序が重要となったが、これまでの解析で HGF は運動ニューロンに対する直接作用としてカスパーゼ1の誘導を抑制、また反応性グリア細胞に機能してグリア細胞の機能を改善することで間接的に運動ニューロンのグルタミン酸毒性を緩和している可能性が示唆された。HGF が運動ニューロンに加えグリア細胞にも機能する