

20030714

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発
(H15-こころ-020)

平成15年度 総括・分担研究報告書

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)

平成 1 6 (2004) 年 3 月

目 次

I 総括研究報告書

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発	1
祖父江 元	

II 分担研究報告書

1 運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発	10
道勇 学	
2 運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発	13
犬飼 晃	
3 運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発	15
田中啓二	

III 研究成果の刊行に関する一覧	21
-------------------	----

IV 研究成果の刊行物・別刷	29
----------------	----

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発

主任研究者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学教授

研究要旨

1) ALS について

運動ニューロン変性をおこす分子病態を解明し、それに基づく治療開発を行った。Dorfin は変異 SOD1(mSOD1)のみを認識してユビキチン化し分解を促進するユビキチンリガーゼ (E3) である。培養細胞モデルにおいては、Dorfin を発現させることにより、mSOD1 による神経細胞障害が抑制される。今回 chicken β -actin プロモータ制御下に Dorfin を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作出し、ALS モデルマウスである mSOD1-Tg マウスと交配した。Dorfin 高発現により生存期間の延長と SOD1 蓄積の軽減が観察され、ユビキチン プロテアソーム系の活性化による mSOD1 による運動ニューロン障害の治療の可能性が示唆された。

2) SBMA について

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) に対する LHRH アナログ (leuprorelin) の臨床試験については、現在、30 才以上 70 才未満の 50 名の SBMA 患者を対象として、leuprorelin 投与群と placebo 投与群の 2 群からなる無作為化比較試験を開始している。1 年間の患者の死亡、ADL、筋力 (定量化筋力測定 MVIC)、嚥下機能、全般的運動機能、誤嚥性肺炎などの合併症発生頻度などを観察する。試験終了した後、データの解析を行う予定である。また、ポリグルタミン病の転写障害仮説に基づき、治療開発を目的として SBMA の Tg マウスにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である sodium butyrate (SB) を経口投与した。SB によりヒストン H3 のアセチル化亢進が認められ、マウスの症状および病理所見は有意に改善した。SB は多剤併用療法の選択肢となりうるが、その効果は狭い濃度範囲でのみ認められ、臨床応用にあたっては慎重な検討が必要と考えられた。

3) 運動ニューロン変性とユビキチンシステム

運動ニューロン疾患を含む様々な神経変性疾患の発症機構として、細胞内の蛋白質の品質管理 (立体構造の正常と異常を区別して、損傷蛋白質を選択的に除去する機構) の破綻が示唆されてきているが、その詳細なメカニズムは不明である。サイトゾル (細胞質) での蛋白質の品質管理に関与する CHIP (シャペロン依存型ユビキチンリガーゼ) と小胞体における異常蛋白質の廃棄 (ERAD 小胞体関連分解) に関与する SCF^{Fbs} (糖鎖を認識するユビキチンリガーゼ) について分子から個体レベルでの解析を行い、これらの酵素が蛋白質の品質管理に果たす役割を解明した。さらにオートファジー (自食作用) も蛋白質の品質管理に関与することを発見し、細胞内の品質管理には、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系が連携していることを世界で初めて証明した。

分担研究者

道勇 宇 名古屋大学大学院医学系研究科
神経内科学講師

大飼 晃 名古屋大学医学部附属病院 神経
内科学助手

田中啓二 東京都医学研究機構東京都臨床医
学研究所 副所長

A 研究目的

Dorfin は、遺伝子発現プロファイリングを行うことで、孤発性 ALS 脊髄において発現が増加している遺伝子として我々がクローニングした新規分子である Dorfin は、N 末側に RING-finger / IBR ドメインを有するユビキチンリガーゼ(E3)をコードしている 孤発性 ALS および家族性 ALS のいずれにおいても、運動ニューロン内にユビキチン化封入体が出現することが病理学的特徴であるが、Dorfin は ALS のユビキチン化封入体に局在している さらに我々は、Dorfin は野生型 SOD1 とは反応せず、家族性 ALS の原因となる mSOD1 のみを特異的に認識してユビキチン化し、プロテアソームでの分解を促進する「タンパク質品質管理」能力を有する E3 であることをこれまでに報告した mSOD1 を発現する培養細胞モデルにおいては、Dorfin を共発現させることにより、mSOD1 による神経細胞障害が抑制される 従って in vivo においても、Dorfin の発現を増強することにより、mSOD1 による運動ニューロン障害が軽減することが期待できる そこで我々は、Dorfin を高発現する Tg マウスを作出し、家族性 ALS のモデル動物である mSOD1-Tg マウスと交配することにより、mSOD1 による運動ニューロン障害の治療を試みた

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、成人男性に発症する下位運動ニューロン疾患であり、アンドロゲン受容体 (AR) の CAG リピートの異常延長を病因とし、成人発症の運動ニューロン疾患としては ALS に次いで頻度の多いものである。SBMA の病態はハンチントン病などの他のポリグルタミン病と共通する点が多く、これらの疾患では、ポリグルタミン鎖を有する変異 AR が

核内に集積し、CBP などの転写関連因子の機能を阻害して転写障害をもたらすことが、神経細胞の機能障害ひいては細胞死に繋がると考えられている。Sodium butyrate などの HDAC 阻害剤はヒストンのアセチル化を促進することから、ポリグルタミン病における転写障害を軽減する可能性が示唆されている。変異 AR の核内集積を抑制する LHRH アナログの臨床試験を実施するとともに、転写障害への治療介入として、SBMA マウスに対する sodium butyrate (SB) の治療効果を検討した。

また、運動ニューロンの恒常性維持 (監視) 機構を蛋白質代謝の動態に着目して研究すると共に、その破綻の結果として発症する神経変性疾患の原因解明と治療法開発を目指し検討を行った。とくにニューロン変性疾患の患者の病変部の病理所見においてしばしば観察されている抗ユビキチン抗体陽性の蛋白質凝集体 (封入体) の形成は、ユビキチン代謝系の破綻が深く関与している。従って、この封入体の形成機構と処理機構の解明は、運動ニューロン疾患の発症機構解明に大きく貢献することが期待される。本研究においては、プロテアソーム系とリソソーム系という二種の異常蛋白質処理の分子機構を解明することにより、運動ニューロン疾患の発症機構解明を目指した。

B 研究方法

Dorfin-Tg マウスの作出 pCAGGS ベクターを用いて chicken β -actin プロモータ調節下に全身で全長 Dorfin を発現するコンストラクトを作製した コンストラクト DNA を BDF1 マウス受精卵にマイクロインジェクションすることにより Tg マウスを作出した 導入遺伝子の確認は、マウス tail ゲノムのサザンプロットにより行った 導入遺伝子の発現の確認を RT-PCR, ウェスタンブロット, 免疫組織化学により行った mSOD1-Tg マウス (B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur Jackson Laboratory) マウス雄と Dorfin-Tg マウス雌を交配し、mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスを作出した 各週齢ごとに mSOD1/Dorfin-Tg マウスの臨床症状の観察, 体重測定, 行動・運

動解析 (Rotarod, cage activity) を、mSOD1-Tg マウスと比較しながら行った。また、Tg マウス組織より RNA, DNA, タンパク質の抽出を行い、分子生物学的解析や免疫組織化学的解析を行った。

HDAC 阻害剤による SBMA マウスの治療 2、4、8、16g/l の濃度で SB 水溶液を調整し、給水瓶により 5 週齢からマウスに ad libitum で経口投与した。マウスの症状は Rotarod や cage activity による運動機能測定や、体重、生存期間の測定を行い評価した。ヒストンのアセチル化はアセチル化ヒストンに対する特異的抗体を用いた免疫組織化学およびウエスタンブロットにより解析した。

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) に対する LHRH アナログ (leuprorelin) の臨床試験 現在、30 才以上 70 才未満の 50 名の SBMA 患者を対象として、leuprorelin 投与群と placebo 投与群の 2 群からなる無作為化比較試験を開始している。1 年間の患者の死亡、ADL、筋力 (定量化筋力測定 MVIC)、嚥下機能、全般的運動機能、誤嚥性肺炎などの合併症発生頻度などを観察する。試験終了した後、データの解析を行う予定である。

(倫理面への配慮)

臨床試験にあたっては、実施の目的と方法について、対象となる患者に文書による説明を行う。文書によるインフォームド・コンセントが得られたもののみを対象とし、試験への参加が患者の自由意思に基づくものであること、参加撤回はいつでも可能であること、および不参加や参加取り下げにより患者が不利益な取扱いを受けないことも、文書に明記し、説明する。患者の個人情報 は特定の責任者の元番号にて取り扱い、試験の結果が公表される場合であっても、患者に関わる秘密は保全するものとする。これまでの臨床使用の経験から、leuprorelin の安全性については確認されているが、万一予期せぬ副作用が生じた場合には迅速かつ適切な診断と治療を行い、それにかかる費用は当講座にて負担するものとする。重篤な副作用がみられた場合、および患者からの撤回の要請が合った場合にはすみやかに試験を中止する。以上の対策により、試験中参加する患者の人権及び利益が保護され

るよう最大限配慮する。我々は以上に示した患者の人権及び利益の保護に関するプロトコールを名古屋大学医学部 IRB に既に提出しており、平成 14 年 7 月 24 日付けで承認を得ている。動物実験は名古屋大学動物実験指針に基づき、動物の苦痛の緩和除去に十分配慮した。

ユビキチン・プロテアソーム系の解析 発生工学的な方法としては、定法に従ってストレートに遺伝子改変 (ノックアウト) マウスを作製した他、目的遺伝子に “lox” を挿入して標的遺伝子の発現を “on of” に調節できるコンディショナル (条件的) ノックアウト マウスも作製した。生化学的方法として、関連分子を大腸菌あるいは昆虫細胞系で発現・精製し、得られたリコンビナント蛋白質を用いて再構成ユビキチン化システムを構築した。このインビトロのアッセイ (評価) 系を用いて、種々のユビキチンリガーゼ活性を検定した。細胞生物学的な方法として、目的蛋白質をコードした cDNA を細胞内に導入して発現させ、この効果に対する (ユビキチン化反応を含む) 細胞応答を観察した。また標的遺伝子の siRNA を細胞内に導入して目的蛋白質の発現を抑制し loss-of-function の表現型 (細胞に与える影響) を観察した。構造生物学的には、目的蛋白質を大腸菌あるいは昆虫細胞系で大量に発現させた後、単一標品に精製した。精製蛋白質を結晶化してその立体構造を原子レベルで解析した。また必要に応じて NMR (核磁気共鳴装置) を使用して相互作用するアミノ酸残基を同定した。

C 研究結果

Dorfin-Tg の作製 Dorfin-Tg マウスが 5 系統得られ、そのうち比較的高コピー数の Dorfin が導入された Tg マウスが 2 系統得られた。サザンブロットにより高コピー数の Dorfin-Tg マウスでは、約 20 コピーの Dorfin 遺伝子が導入されていた。Dorfin-Tg マウスの各臓器より抽出した RNA を用いた RT-PCR では、Dorfin 導入遺伝子は Tg マウスの全身で発現しており、脳および脊髄において高い発現が見られた。筋肉での Dorfin 発現が特に高かったが、これは β -actin をプロモータに用いたことに起因していると考えられた。マウス脊髄ホモジネートを用い

たウェスタンブロットでは、～100kDa の全長 Dorsin が発現しており、免疫組織化学によって脊髄前角運動ニューロン内および周囲のグリア細胞内に導入した Dorsin が発現していることを確認した。Dorsin の高発現のみでは、生後 1 年以上経過を観察した限りにおいては運動機能や病理組織所見などには、明らかな異常を認めず、non-Tg との相違は見られなかった。

Dorsin 高発現による ALS の治療 ALS 症状の発症時期は、mSOD1-Tg(mSOD1/-)では生後 109 日、ダブル Tg マウス(mSOD1/Dorsin)では、109 日と差は認められなかった。生存期間については、mSOD1-Tg(mSOD1/-)は生後 131 日、ダブル Tg マウス(mSOD1/Dorsin)では、153 日と有意差が認められ、Dorsin の高発現は mSOD1-Tg マウスの罹病期間および生存期間を延長した。mSOD1-Tg マウス脊髄前角組織においては、運動ニューロンおよび周囲のニューロピルに SOD1 およびユビキチンの蓄積が観察され、その蓄積は ALS 症状の進行とともに増加することが知られている。Dorsin は、mSOD1 を特異的に認識して、プロテアソームによりその分解を促進する E3 活性を有することから、実際に *in vivo* においても mSOD1 量が減少しているかどうかを免疫組織化学的に検討した。mSOD1/Dorsin マウスでは mSOD1/- に比較して、SOD1 およびユビキチン蓄積の軽減が観察された。

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) に対する LHRH アナログ (leuprorelin) の臨床試験 現在二重盲験にて試験続行中である。

SB による SBMA マウスの治療 SB 4g/l の投与により、運動機能の発症が有意に遅延し、症状の進行も抑制された。また脊髄前根の軸索萎縮や神経原性筋萎縮などの病理所見にも有意な改善が認められた。8g/l では発症の遅延はみられたものの運動機能障害の進行は抑制されなかった。より低い濃度 (2g/l) や高い濃度 (16g/l) では運動機能改善効果は乏しかった。16g/l の投与ではむしろ生存期間の短縮傾向が認められた。ヒストン H3 のアセチル化は野生型に比べ Tg において有意に低下しており、SB

の投与により用量依存性に増加した。SB 投与によっても変異 AR の核内集積には変化は認められなかった。

品質管理ユビキチンリガーゼ CHIP の機能解析 CHIP は Hsp70 や Hsp90 と会合し、これらの分子シャペロンが捕捉した変性蛋白質を選択的にユビキチン化するリガーゼである。Hsp70 の作用には Hsp40 のようなコシャペロンが必要であるが、本年、われわれはニューロン特異的な Hsj-1 (DnaJ ドメインを有し Hsp70 と相互作用することができるコシャペロン) を CHIP の新規パートナー分子として同定した。現在、Hsj-1 のノックアウトマウスを作製中である。また CHIP が DRiPs (フォールディングに失敗した蛋白質の急速分解) に関係していることも突き止めた。DRiPs 経路の損傷は、細胞内に異常蛋白質の蓄積を誘発する可能性が予想されるので、この分解系に関わるユビキチンリガーゼの同定は非常に重要であった。さらに CHIP のノックアウトマウスを作製した結果、CHIP 欠損マウスは失調性歩行異常の症状を呈し神経細胞の機能異常が示唆された (投稿準備中)。一方、Northern-blot 及び Western-blot 分析から CHIP と Hsj-1 が、運動ニューロンを含む種々のニューロンに高発現していることも見出した。したがって CHIP はニューロン細胞の健康を守るユビキチンリガーゼとして生理的に極めて重要であることが示唆された。

糖鎖識別ユビキチンリガーゼの研究 近年、小胞体ストレスとニューロン死の関係が注目されている。それは unfolded protein response (異常蛋白質による小胞体のストレス応答) の異常が Ask1-JNK シグナリングを介した細胞死に直接カップルしていることが明らかになってきたからである。小胞体ストレスに対する応答の一つに ERAD (小胞体関連分解) がある。よく知られているように膜蛋白質や分泌蛋白質などは翻訳と共役して細胞質から小胞体に移行し、そこで高次構造形成が行われる。しかし小胞体内においては、かなりの蛋白質がフォールディングに失敗する (その確立は 30-50% と推測されている)。ERAD は小胞体内のミスフォルト蛋白質や余剰サブユニットを細胞質へ逆行輸送しユビキチン-プロテアソーム系により分解

する品質管理機構である。

Fbs1 の機能解析 われわれは N 結合型糖蛋白質の結合する細胞内レクチンを探索する目的で、高マンノース糖鎖をもったフェチュインをリガンドとした親和性クロマトグラフィーを作製してウシ脳抽出液を解析した結果、Fbx2 (本年 Fbs1 と改名) の分離に成功した。Fbs1 はニューロンに特異的に発現している F-box 蛋白質であり、SCF 複合体 (Skp1-Cullin1-F box-Roc1) 型ユビキチンリガーゼの標的識別サブユニットであった。試験管内再構成系を用いた解析から、本 SCF^{Fbs1} 複合体が N 型糖鎖依存的に糖蛋白質をポリユビキチン化するユビキチンリガーゼであることが判明した。そして (基質結合能は保持しているが) SCF 複合体を形成しないドミナントネガティブ Fbs1 変異体を強制発現させたところ既知の ERAD 基質 (異常 CFTR 農胞性線維症の責任遺伝子産物や余剰に生合成される T 細胞リセプター TCR α サブユニット) の分解が抑制されたことから SCF^{Fbs1} は ERAD 機構で作用していることが裏付けられた。さらに興味深いことに、Fbs1 を過剰発現させると、プロテアソーム阻害剤で誘導される Aggresomes (ERAD 基質の分解異常による異常蛋白質の凝集体) の形成を完全にブロックした。この結果は、Fbs1 が封入体形成に関係している可能性を示唆するものとして注目される。併せて本年、われわれは Fbs1 の X 線結晶解析により Fbs1 の立体構造を解明した。この結果、Fbs1 が糖鎖を結合する様式が原子レベルで判明した。この結合様式は、NMR による解析結果からも確認した。本年、さらにわれわれは、ユビキチンに発現している SCF^{Fbs1} のファミリー酵素として SCF^{Fbs2} を見出した。そして SCF^{Fbs2} も ERAD に関与することを証明し、糖鎖識別リガーゼ酵素が小胞体における品質管理機構に普遍的に重要な役割を果たしていることを案されているが、この魅力的な提案機構において SCF^{Fbs} ファミリー酵素群が品質管理リガーゼとして重要な役割を果たしていることが示唆された。

オートファジー (自食作用) の遺伝学的機能解析 オートファジーはオートファゴソーム (自食胞 細胞成分を取り込んだ二重膜小胞) による標的成分の取り囲みの形

成機構であり、その後リソソーム/液胞と融合して内容物を分解する細胞内の蛋白質分解機構である。近年、異常オートファジーが多くの変性組織部位の病理像の形態学的観察から報告されており、オートファジーの異常あるいは亢進がこれらの疾病の発症機構に関与する可能性が示唆されている。しかしこれまで、高等動物でのオートファジーを分子レベルで解析する実験系は皆無であった。また最近、オートファゴソーム形成に関する Atg (autophagy) システムが発見され、注目されている。これは Atg8 と Atg12 をモディファイヤーとする翻訳後修飾機構であり、オートファゴソーム (自食胞) の膜形成に必須なユビキチン化類似のモディファイヤーシステムである。そこで本年、われわれは、この二つの Atg システムの共通の活性化因子 Atg7 の条件的ノックアウトマウスを作製した。そして肝臓でオートファジーを完全に欠損させると、顕著な肝臓の肥大と肝炎を引き起こすのみならず、ユビキチン化蛋白質の凝集体が細胞内に大量に集積した。このことは、オートファジー依存性の蛋白質分解系が非分裂細胞であるニューロンにおいてもユビキチン代謝関連の蛋白質の品質管理システムにおいて大きな役割を果たしていることを示唆している。

D 考察

Dorfin は我々が同定した E3 活性を有する新規分子であり、培養細胞を用いた *in vitro* における検討では、野生型 SOD1 とは反応せず、mSOD1 と特異的に結合してユビキチン化し、mSOD1 のプロテアソームでの分解を促進することや、mSOD1 の凝集体を減少させ神経細胞死を抑制することをこれまでに報告してきた 本研究においては、Dorfin が *in vivo* においても mSOD1 特異的 E3 として機能し、実際に mSOD1-Tg マウスの臨床症状や経過を改善するかどうかを検討した 全長 Dorfin を β -actin プロモータ調節下に全身に発現する Dorfin-Tg マウスの作出を試み、mSOD1-Tg マウスと交配することで Dorfin 高発現の治療効果を観察した

mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスにおいては、ALS 症状の発症時期に変化は見られなかったが、生存期間を有意に延長した免疫組織化学的検討においても、ダブル Tg マウスにおいて、SOD1 の蓄積の減少が観察され、これまでの *in vitro* での検討結果とよく一致している。今回の結果は、Dorfin の高発現が mSOD1 による運動ニューロン障害の治療に *in vivo* でも有効であることを示していると考えられる。発症時期に変化が見られなかった理由は不明であるが、罹病期間を延長することにより生存期間を延長しえたことは、実際に発症後より治療を始めざるをえない臨床への応用を考える上でも Dorfin による治療が有望であることを示唆していると思われる。mSOD1 による運動ニューロン障害の病態機序として、mSOD1 の蓄積の結果、チトクローム c の放出とカスパーゼの活性化が起こり運動ニューロン死が生じるというアポトーシス経路の関与が考えられている。これまでに、抗アポトーシスタンパク質の高発現やカスパーゼ阻害剤の投与により mSOD1-Tg マウスを治療する試みが行われ、ある程度の有効性が示されてきた。我々が今回報告した E3 の発現増強によりユビキチン・プロテアソーム系を活性化し、mSOD1 蓄積を減少させることに基づく mSOD1-Tg の治療の試みは、mSOD1 による運動ニューロン障害カスケードのより上流での治療的介入であり、ユビキチン・プロテアソーム系の活性化による神経変性疾患の治療は、異常タンパク質の蓄積が原因であると推定されている ALS 以外のさまざまな神経変性疾患の治療戦略においても今後ますます重要な方法論になると考えられる。

SB の SBMA マウスに対する治療効果は用量依存性であり、その therapeutic window が極めて狭いことが示された。とくに高濃度ではヒストンのアセチル化は促進できるものの、毒性により生存期間を短縮させると考えられた。また、SB 投与によっても変異 AR の核内集積には変化がないことから、その治療効果は転写改善に基づくものと考えられた。SB は SAHA や Phenyl butyrate などと同様、悪性腫瘍に対する化学療法と

して Phase I~II の臨床試験が実施されており、腫瘍増殖抑制効果とともに中枢神経系への移行を示す研究結果が得られている。今後 SB の臨床応用を考えるにあたっては、毒性の軽減し最大限の治療効果を引き出せるよう、投与量や投与間隔、投与経路につき十分な検討が必要と考えられる。各 HDAC 阻害剤には HDAC isoform の選択性があることも指摘されており、2 種類以上の阻害剤の組み合わせや、他の薬剤との併用療法についても検討を考慮している。

アルツハイマー病 パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症 (ALS) をはじめ多くの神経変性疾患での病理所見として、ユビキチン化された異常蛋白質の集積が残存ニューロン内に頻りに観察されていることから、蛋白質の品質管理機構の破綻がこれらの疾患に共通した発症原因になっている可能性が高まっている。われわれは、これらの知見を分子レベルで理解するための成果として、今回、二種のユビキチンリガーゼを発見し、その構造と機能および分子遺伝学的研究を行った。即ち、細胞質と小胞体 (各々サイトソル・核蛋白質と膜・分泌蛋白質を合成している画分) での品質管理において重要な役割を演じているシャペロン型リガーゼ CHIP と N-結合型糖蛋白質 (ERAD の主な基質) に特異的に作用するユビキチンリガーゼ (SCF^{Fbs1}/SCF^{Fbs2}) を見出し、分子レベルでの機能解析に成功した。さらに、オートファジー リソソーム系についても併せて遺伝学的研究を進めた。この結果、非分裂細胞における異常蛋白質の廃棄処理に、ユビキチン・プロテアソーム系 (選択的蛋白質分解機構) とオートファジー リソソーム系 (非選択的蛋白質分解機構) が協同で作用していることが判明した。今後、これらの発見を基盤に蛋白質の品質管理機構を解明して、神経変性疾患の発症機能の共通のメカニズム解明を目指す。

E 結論

Dorfin を高発現することにより、mSOD1-Tg マウスの生存期間が延長し、脊髄における SOD1 の蓄積に改善が認められた。今後は Dorfin-Tg ホモマウスを作出し

て Dorfin の発現量を増加させ、mSOD1-Tg マウスの治療にさらに改善が見られるかどうかを検討する

Sodium butyrate はポリグルタミン病の治療薬として期待されるが、その効果は用量に大きく依存しており、臨床応用にあたって投与方法の慎重な設定が必要であると考えられる。今後多剤併用量などについても検討すべきである。

CHIP の新奇なパートナーとして Hsj-1 を発見した。併せて CHIP のノックアウトマウスを作製し、CHIP 欠損マウスが失調性歩行異常の症状を呈することを解明した。ERAD に関与する糖鎖識別ユビキチンリガーゼとしてニューロン特異的な SCF^{Fbs1} とユビキタスに発現している普遍的 SCF^{Fbs2} を発見した。そして、キトビオース（蛋白質の Asp 残基に結合する GlcNAc-GlcNAc 糖）が結合した Fbs1 の立体構造解析（X 線結晶解析や NMR 解析）に成功し、原子レベルで標的識別機構を解明した。オートファジー（自食作用）の遺伝学的機能解析を行うために、オートファゴソーム（自食胞）形成の条件的ノックアウトマウスを作製し、オートファジーを欠失させるとユビキチン陽性の封入体が大量に蓄積することを見出した。この結果、細胞内で発生した多くの異常蛋白質は、ユビキチン プロテアソーム系のみならずオートファジー・リソソーム系によっても処理されることが判明した。従って細胞（蛋白質）の homeostasis は、これまで独立して作用していると考えられていた二つの蛋白質分解システムの共同作業により監視・維持されていることが判明した。これらの研究成果は、運動ニューロンの変性機構を解明するための有益な情報を提供するものである。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Minamiyama, M, Katsuno, M, Adachi, H, Waza, M, Sang, C, Kobayashi, Y, Tanaka, F, Doyu, M, Inukai, A, and Sobue, G

Sodium Butyrate Ameliorates Phenotypic Expression in a Transgenic Mouse Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy *Hum Mol Genet* 2004 (in press)

Katsuno, M, Adachi, H, Tanaka, F, and Sobue, G Spinal and bulbar muscular atrophy ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives *J Mol Med* 2004 (in press)

Katsuno, M and Sobue, G Polyglutamine diminishes VEGF, passage to motor neuron death? *Neuron* 41 677-679, 2004

Katsuno, M, Adachi, H, and Sobue, G, Sweet relief for Huntington disease *Nat Med* 10 123-124, 2004

Katsuno, M, Adachi, H, Doyu, M, Minamiyama, M, Sang, C, Kobayashi, Y, Inukai, A, and Sobue, G Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy *Nat Med* 9 768-773, 2003

Adachi, H, Katsuno, M, Minamiyama, M, Sang, C, Pagoulatos, G, Angelidis, C, Kusakabe, M, Yoshiki, A, Kobayashi, Y, Doyu, M, and Sobue, G Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein *J Neurosci* 23, 2203-2211, 2003

Katsuno, M, Adachi, H, Inukai, A, and Sobue, G Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy *Cytogenet Genome Res* 100 243-251, 2003

Sobue, G, Adachi, H, and Katsuno, M Spinal and bulbar muscular atrophy

(SBMA) In Neurodegeneration The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders Dickson Dickinson ed INS Neuropath Press, LA, USA, pp275-279, 2003

Takeuchi, H , Niwa, J , Hishikawa, N , Ishigaki, S , Tanaka, F , Doyu, M , and Sobue, G Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis J Neurochem **89** 64-72, 2004

Hishikawa, N , Niwa, J , Doyu, M , Ito, T , Ishigaki, S , Hashizume, Y , and Sobue, G Dorfin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis Am J Pathol **163** 609-619, 2003

Ito, T , Niwa, J , Hishikawa, N , Ishigaki, S , Doyu, M , and Sobue, G. Dorfin localizes to lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1 J Biol Chem **278** 29106-29114, 2003

Ando, Y , Liang, Y , Ishigaki, S , Niwa, J , Jiang, Y , Kobayashi, Y , Yamamoto, M , Doyu, M , and 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 **28** 839-846 2003

Sakata, E , Yamaguchi, Y , Kurimoto, E , Kikuchi, J , Yokoyama, S , Yamada, S , Kawahara, H , Yokosawa, H , Hattori, N , Mizuno, Y , Tanaka, K , and Kato, K Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes with the ubiquitin-like domain EMBO Rep **4** 301-306, 2003

Tanahashi-Hori, T , Tanahashi, N , Tanaka, K , and Chiba, T Conditional knockdown of proteasomes results in cell-cycle arrest and enhanced expression of molecular chaperones Hsp70 and Hsp40 in chicken DT40 cells J Biol Chem **278** 16237-16243, 2003

Yoshida, Y , Tokunaga, F , Chiba, T , Iwai, K , Tanaka, K , and Tai, T Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. J Biol Chem **278** 43877-43884, 2003

Hirano, Y , Murata, S , Tanaka, K , Shimizu, M , and Sato, R SREBPs are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26S proteasome pathway J Biol Chem **278** 16809-16819, 2003

Matsuzaki, H , Daitoku, H , Hatta, M , Tanaka, K , and Fukamizu, A Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation Proc Natl Acad Sci USA **100** 11285-11290, 2003

Kim S J , Sung, J Y , Um, J W , Hattori, N , Mizuno, Y , Tanaka, K , Paik, S R , Kim, J , and Chung, K C Parkin cleaves intracellular α -synuclein's inclusions via the activation of calpain J Biol Chem **278** 41890-41899, 2003

Kim, M , Tezuka, T , Tanaka, K , and Yamamoto, T Cbl-c suppresses v-Src-induced transformation through ubiquitin-dependent protein degradation Oncogene **23** 1645-55, 2003

Araki, K , Kawamura, M , Suzuki, T , Matsuda, N , Kanbe, D , Ishii, K , Ichikawa, T , Kumanishi, T , Chiba, T , Tanaka , K , and Nawa , H A palmitoylated RING finger ubiquitin ligase and its homologue, both

enriched in the brain membranes J Neurochem 86 749-762, 2003

Imai, J, Maruya, M, Yashiroda, H, Yahara, I, and Tanaka, K The molecular chaperone Hsp90 interacts with 26S proteasomes and regulates their assembly EMBO J 22 3557-3567, 2003

Ogura, T and Tanaka, K Dissecting various ATP-dependent steps in proteasomal degradation Mol Cell 11 3-5, 2003

Imai, J, Yashiroda, H, Maruya, M, Yahara, I, and Tanaka, K Proteasomes and molecular chaperones cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolded proteins Cell Cycle 2 585-590, 2003

Mizushima, T, Hirao, T, Yoshida, Y, Lee, S J, Chiba, T, Iwai, K, Yamaguchi, Y, Kato, K, Tsukihara, T, and Tanaka, K Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase Nature Struct & Mol Biol 11 365-370, 2004

Komatsu, M, Chiba, T, Tatsumi, K, Iemura, S, Tanida, I, Okazaki, N, Ueno, T, Kominami, E, Natsume, T, and Tanaka, K A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier EMBO J (in press)

2 学会発表

Adachi, H, Katsuno, M, Minamiyama, M, Sang, C, Kobayashi, Y, Doyu, M, and Sobue, G HSP70 chaperone over-expression ameliorates phenotypes of the SBMA transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant AR protein Molecular Mechanisms of neurodegeneration (Milan, Italy) May, 2003

Adachi, H, Katsuno, M, Kobayashi, Y, and Sobue, G Widespread distribution of nuclear and cytoplasmic mutant AR protein complex in the nervous system and visceral organs of patients with spinal and bulbar muscular atrophy Gordon Conference on CAG repeat (Il Ciocco, Italy) May, 2003

Katsuno, M, Adachi, H, Minamiyama, M, Kobayashi, Y, and Sobue, G Hormonal intervention therapy in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscle atrophy (SBMA) Gordon conference on CAG triplet repeat disorders (Il Ciocco, Italy) May, 2003

Adachi, H, Katsuno, M, Minamiyama, M, Waza, M, Sang, C, Kobayashi, Y, Inukai, A, Doyu, M, and Sobue, G Widespread Occurrence of nuclear and cytoplasmic mutant AR accumulation in the neural and nonneural tissues of SBMA patients 33rd The Society for Neuroscience Annual meeting (New Orleans, USA) Nov, 2003

Tanaka, K The ubiquitin-proteasome pathway and the protein quality control of the cell 日米科学技術協力事業「組み換えDNA」(NIH, USA) Feb, 2003

Tanaka, K Ubiquitin E3 ligases responsible for the protein quality control in cells (Clermont-Ferrand, France) Apr, 2003

H 知的財産権の出願 登録状況

1 特許取得

球脊髄性筋萎縮症の病態を再現する非ヒト動物、及び球脊髄性筋萎縮症治療剤。2002年8月19日出願(特願2002-238599)。

2 実用新案登録

なし

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発

分担研究者 道勇 学 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学講師

研究要旨 Dorfin は孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS)および SOD1 遺伝子変異を有する家族性 ALS のいずれにおいても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、野生型 SOD1 とは反応せず、変異 SOD1(mSOD1)のみを認識してユビキチン化し分解を促進するユビキチンリガーである 培養細胞モデルにおいては、Dorfin を発現させることにより、mSOD1 による神経細胞障害が抑制される。そこで、chicken β -actin プロモータ制御下に Dorfin を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作出し、ALS モデルマウスである mSOD1-Tg マウスと交配することにより、mSOD1 による運動ニューロン障害の治療を試みた

A 研究目的

Dorfin は、遺伝子発現プロファイリングを行うことで、孤発性 ALS 脊髄において発現が増加している遺伝子として我々かクローニングした新規分子である Dorfin は、N 末側に RING-finger / IBR トメインを有するユビキチンリガーゼ(E3)をコードしている。孤発性 ALS および家族性 ALS のいずれにおいても、運動ニューロン内にユビキチン化封入体か出現することか病理学的特徴であるが、Dorfin は ALS のユビキチン化封入体に局在している。さらに我々は、Dorfin は野生型 SOD1 とは反応せず、家族性 ALS の原因となる mSOD1 のみを特異的に認識してユビキチン化し、プロテアソームでの分解を促進する「タンパク質品質管理」能力を有する E3 であることをこれまでに報告した mSOD1 を発現する培養細胞モデルにおいては、Dorfin を共発現させることにより、mSOD1 による神経細胞障害が抑制される

従って *in vivo* においても、Dorfin の発現を増強することにより、mSOD1 による運動ニューロン障害が軽減することか期待できる。そこで我々は、Dorfin を高発現する Tg マウスを作出し、家族性 ALS のモデル動物である mSOD1-Tg マウスと交配することにより、mSOD1 による運動ニューロン障

害の治療を試みた

B 研究方法

1 Dorfin-Tg マウスの作出 pCAGGS ヘクターを用いて chicken β -actin プロモータ調節下に全身で全長 Dorfin を発現するコンストラクトを作製した。コンストラクト DNA を BDF1 マウス受精卵にマイクロインジェクションすることにより Tg マウスを作出した。導入遺伝子の確認は、マウス tail ゲノムのサザンブロットにより行った。導入遺伝子の発現の確認を RT-PCR, ウェスタンブロット, 免疫組織化学により行った

2 Dorfin による mSOD1-Tg マウスの治療 mSOD1-Tg マウスとして、B6SJL-TgN(SOD1-G93A)1Gur (Jackson Laboratory)を用いた mSOD1-Tg マウス雄と Dorfin-Tg マウス雌を交配し、mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスを作出した

各週齢ごとに mSOD1/Dorfin-Tg マウスの臨床症状の観察、体重測定、行動 運動解析 (Rotarod, cage activity) を、mSOD1-Tg マウスと比較しながら行った。また、Tg マウス組織より RNA, DNA, タンパク質の抽出を行い、分子生物学的解析や免疫組織化学的解析を行った

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験動物（マウス）の取り扱いにつき名古屋大学動物実験指針にもとつき、動物の苦痛の除去・軽減に注意しつつ実験を行った

C 研究結果

Dorfin-Tg マウスが 5 系統得られ、そのうち比較的高コピー数の Dorfin が導入された Tg マウスが 2 系統得られた。ササンプロットにより高コピー数の Dorfin-Tg マウスでは、約 20 コピーの Dorfin 遺伝子が導入されていた

Dorfin-Tg マウスの各臓器より抽出した RNA を用いた RT-PCR では、Dorfin 導入遺伝子は Tg マウスの全身で発現しており、脳および脊髄において高い発現が見られた。筋肉での Dorfin 発現が特に高かったか、これは β -actin をプロモータに用いたことに起因していると考えられた

マウス脊髄ホモンネットを用いたウェスタンプロットでは、 $\sim 100\text{kDa}$ の全長 Dorfin が発現しており、免疫組織化学によって脊髄前角運動ニューロン内および周囲のグリア細胞内に導入した Dorfin が発現していることを確認した。Dorfin の高発現のみでは、生後 1 年以上経過を観察した限りにおいては運動機能や病理組織所見などには、明らかな異常を認めず、non-Tg との相違は見られなかった

ALS 症状の発症時期は、mSOD1-Tg(mSOD1^{-/-})では生後 1090 日、ダブル Tg マウス(mSOD1/Dorfin)では、1094 日と差は認められなかった。生存期間については、mSOD1-Tg(mSOD1^{-/-})は生後 1315 日、ダブル Tg マウス(mSOD1/Dorfin)では、1530 日と有意差が認められ、Dorfin の高発現は mSOD1-Tg マウスの罹病期間および生存期間を延長した

mSOD1-Tg マウス脊髄前角組織においては、運動ニューロンおよび周囲のニューロピルに SOD1 およびユビキチンの蓄積が観察され、その蓄積は ALS 症状の進行とともに増加することか知られている。Dorfin は、mSOD1 を特異的に認識して、プロテアソームによりその分解を促進する E3 活性を有することから、実際に *in vivo* においても mSOD1 量が減少しているかどうかを免疫組織化学的に検

討した。mSOD1/Dorfin マウスでは mSOD1^{-/-}に比較して、SOD1 およびユビキチン蓄積の軽減が観察された

D 考察

Dorfin は我々が同定した E3 活性を有する新規分子であり、培養細胞を用いた *in vitro* における検討では、野生型 SOD1 とは反応せず、mSOD1 と特異的に結合してユビキチン化し、mSOD1 のプロテアソームでの分解を促進することや、mSOD1 の凝集体を減少させ神経細胞死を抑制することをこれまでに報告してきた。本研究においては、Dorfin が *in vivo* においても mSOD1 特異的 E3 として機能し、実際に mSOD1-Tg マウスの臨床症状や経過を改善するかどうかを検討した。全長 Dorfin を β -actin プロモータ調節下に全身に発現する Dorfin-Tg マウスの作出を試み、mSOD1-Tg マウスと交配することで Dorfin 高発現の治療効果を観察した

mSOD1/Dorfin ダブル Tg マウスにおいては、ALS 症状の発症時期に変化は見られなかったが、生存期間を有意に延長した。免疫組織化学的検討においても、ダブル Tg マウスにおいて、SOD1 の蓄積の減少が観察され、これまでの *in vitro* での検討結果とよく一致している。今回の結果は、Dorfin の高発現が mSOD1 による運動ニューロン障害の治療に *in vivo* ても有効であることを示していると考えられる。発症時期に変化が見られなかった理由は不明であるか、罹病期間を延長することにより生存期間を延長しえたことは、実際に発症後より治療を始めざるをえない臨床への応用を考える上でも Dorfin による治療が有望であることを示唆していると思われる

mSOD1 による運動ニューロン障害の病態機序として、mSOD1 の蓄積の結果、チトクローム c の放出とカスパーゼの活性化が起り運動ニューロン死が生じるというアポトース経路の関与が考えられている。これまでに、抗アポトースタンパク質の高発現やカスパーゼ阻害剤の投与により mSOD1-Tg マウスを治療する試みが行われ、ある程度の有効性が示されてきた。我々が今回報告した E3 の発現増強によりユビキチン・プロテアソ-

ム系を活性化し、mSOD1 蓄積を減少させることに基つく mSOD1-Tg の治療の試みは、mSOD1 による運動ニューロン障害カスケードのより上流での治療的介入であり、ユビキチン プロテアソーム系の活性化による神経変性疾患の治療は、異常タンパク質の蓄積が原因であると推定されている ALS 以外のさまざまな神経変性疾患の治療戦略においても今後ますます重要な方法論になると考えられる

E 結論

Dorfin を高発現することにより、mSOD1-Tg マウスの生存期間が延長し、脊髄における SOD1 の蓄積に改善が認められた。今後は Dorfin-Tg ホモマウスを作出して Dorfin の発現量を増加させ、mSOD1-Tg マウスの治療にさらに改善が見られるかどうかを検討する

F 健康危険情報 なし

G 研究発表

1 Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G (2004) Dorfin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis *J Neurochem* **89** 64-72

2 Katsuno M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G (2003) Leuporelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy *Nat Med* **9** 768-73

3 Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, Sobue G (2003) Dorfin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis *Am J Pathol* **163** 609-19

4 Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G (2003) Dorfin localizes to lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1 *J Biol Chem* **278** 29106-14

5 Ando Y, Liang Y, Ishigaki S, Niwa J, Jiang Y,

Kobayashi Y, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G (2003) 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* **28** 839-46

6 Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G (2003) Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein *J Neurosci* **23** 2203-11

H 知的財産権の出願・登録状況 なし

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発

分担研究者 大飼 晃 名古屋大学医学部附属病院神経内科学助手

研究要旨 球脊髄性筋萎縮症のトランスジェニックマウスに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である sodium butyrate (SB) を経口投与した。SB によりヒストン H3 のアセチル化亢進が認められ、マウスの症状および病理所見は有意に改善した。SB は多剤併用療法の選択肢となりうるが、その効果は狭い濃度範囲でのみ認められ、臨床応用にあたっては慎重な検討が必要と考えられた。

A 研究目的

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は、成人男性に発症する下位運動ニューロン疾患であり、アンドロゲン受容体 (AR) の CAG リピートの異常延長を病因とする。SBMA やハンチントン病などのポリグルタミン病では、ポリグルタミン鎖を有する変異 AR が核内に集積し、CBP などの転写関連因子の機能を阻害して転写障害をもたらすことが、神経細胞の機能障害ひいては細胞死に繋がると考えられている。CBP などの核内タンパクはヒストンアセチル化 (HAT) 活性を有しており、細胞モデルにおいては、CBP の機能阻害によりヒストンのアセチル化が低下することが転写障害の主因と考えられているが、In vivo での証明は十分にされていない。他方、Sodium butyrate などの HDAC 阻害剤はヒストンのアセチル化を促進することから、ポリグルタミン病における転写障害を軽減する可能性が示唆されているが、動物モデルでの検討は不十分である。今回、転写障害への治療介入として、SBMA マウスに対する sodium butyrate (SB) の治療効果を検討した。

B 研究方法

2、4、8、16g/l の濃度で SB 水溶液を調整し、給水瓶により 5 週齢からマウスに ad libitum で経口投与した。マウスの症状は Rotarod や cage activity による運動機能測定や、体重、生存期間の測定を行い評価した。ヒストンのアセチル化はアセチル化ヒストンに対する特異的抗体を用いた免疫組織化

学およびウエスタンブロットにより解析した。

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) に対する LHRH アナログ (leuprorelin) の臨床試験については、現在、30 才以上 70 才未満の 50 名の SBMA 患者を対象として、leuprorelin 投与群と placebo 投与群の 2 群からなる無作為化比較試験を行っている。1 年間の患者の死亡、ADL、筋力 (定量化筋力測定 MVIC)、嚥下機能、全般的運動機能、誤嚥性肺炎などの合併症発生頻度などを観察する。試験終了した後、データの解析を行う予定である。

(倫理面への配慮)

臨床試験にあたっては、実施の目的と方法について、対象となる患者に文書による説明を行う。文書によるインフォームド・コンセントが得られたもののみを対象とし、試験への参加は患者の自由意思に基づくものであること、参加撤回はいつでも可能であること、および不参加や参加取り下げにより患者が不利益な取扱いを受けないことも、文書に明記し、説明する。患者の個人情報や特定の責任者の元番号にて取り扱い、試験の結果が公表される場合であっても、患者に関わる秘密は保全するものとする。これまでの臨床使用の経験から、leuprorelin の安全性については確認されているが、万一予期せぬ副作用が生じた場合には迅速かつ適切な診断と治療を行い、それにかかる費用は当講座にて負担するものとする。重篤な副作用がみられた場合、および患者からの撤回の要請があった場合にはすみやかに試験を中止する。以上の対策により、試験中参加する患者の人権及び利益が保護されるよう最大限配慮する。我々は以上に示した患者の人権及び利益の保護に関するプロトコルを名古屋大学医学部 IRB に既に提出しており、平成 14 年

7月24日付けて承認を得ている。動物実験は名古屋大学動物実験指針に基づき、動物の苦痛の緩和除去に十分配慮した。

C 研究結果

SB 4g/l の投与により、運動機能の発症が有意に遅延し、症状の進行も抑制された。また脊髄前根の軸索萎縮や神経原性筋萎縮などの病理所見にも有意な改善が認められた。8g/l では発症の遅延はみられたものの運動機能障害の進行は抑制されなかった。より低い濃度 (2g/l) や高い濃度 (16g/l) では運動機能改善効果は乏しかった。16g/l の投与ではむしろ生存期間の短縮傾向が認められた。ヒストン H3 のアセチル化は野生型に比べ Tg において有意に低下しており、SB の投与により用量依存性に増加した。SB 投与によっても変異 AR の核内集積には変化は認められなかった。

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) に対する LHRH アナログ (leuprorelin) の臨床試験については、現在二重盲験にて試験続行中である。

D 考察

SB の SBMA マウスに対する治療効果は用量依存性であり、その therapeutic window が極めて狭いことが示された。とくに高濃度ではヒストンのアセチル化は促進できるものの、毒性により生存期間を短縮させると考えられた。また、SB 投与によっても変異 AR の核内集積には変化がないことから、その治療効果は転写改善に基づくものと考えられた。

SB は SAHA や Phenyl butyrate などと同様、悪性腫瘍に対する化学療法として Phase I/II の臨床試験が実施されており、腫瘍増殖抑制効果とともに中枢神経系への移行を示す研究結果が得られている。今後 SB の臨床応用を考えるにあたっては、毒性の軽減し最大限の治療効果を引き出せるよう、投与量や投与間隔、投与経路につき十分な検討が必要と考えられる。各 HDAC 阻害剤には HDAC isoform の選択性があることも指摘されており、2 種類以上の阻害剤の組み合わせや、他の薬剤との併用療法についても検討を考慮している。

E 結論

Sodium butyrate は動物モデルにおいてもヒストンのアセチル化を亢進し、ポリグルタミン病の治療薬として期待されるか、その効果は用量に大きく依存している。臨床応用にあたっては、投与方法の慎重な設定および多剤併用療法の検討が必要であると考えられる。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Minamiyama, M., Katsuno, M., Adachi, H., Waza, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Tanaka, F., Doyu, M., Inukai, A., and Sobue, G. Sodium Butyrate Ameliorates Phenotypic Expression in a Transgenic Mouse Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy *Hum Mol Genet* 2004 (in press)

Katsuno, M., Adachi, H., Inukai, A., and Sobue, G. Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy *Cytogenet Genome Res* 100 243-251, 2003

2 学会発表

Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Waza, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Inukai, A., Doyu, M. and Sobue, G. Widespread Occurrence of nuclear and cytoplasmic mutant AR accumulation in the neural and nonneural tissues of SBMA patients 33rd The Society for Neuroscience Annual meeting (New Orleans, USA) Nov, 2003

H 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

球脊髄性筋萎縮症の病態を再現する非ヒト動物、及び球脊髄性筋萎縮症治療剤。2002年8月19日出願 (特願 2002-238599)。

2 実用新案登録

なし

運動ニューロン疾患の病態に基づく治療法の開発

分担研究者 田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所・副所長

研究要旨 生体は遺伝子変異や環境汚染などによりしはしは分子（蛋白質）レベルでストレスを感受し恒常性の破綻をきたす。とくに運動ニューロンのような非分裂細胞がストレスを過剰に感受すると、アポトーシスを誘発しニューロンは死滅する。この状態が長期間持続すると、ほとんどのニューロンが脱落し変性疾患に陥る。最近、運動ニューロン疾患を含む様々な神経変性疾患の発症機構として、細胞内の蛋白質の品質管理（立体構造の正常と異常を区別して、損傷蛋白質を選択的に除去する機構）の破綻が示唆されてきているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、サイトソル（細胞質）での蛋白質の品質管理に関与する CHIP（シャペロン依存型ユビキチンリガーゼ）と小胞体における異常蛋白質の廃棄（ERAD 小胞体関連分解）に関与する SCF^{Fbs}（糖鎖を認識するユビキチンリガーゼ）について分子から個体レベルでの解析を行い、これらの酵素が蛋白質の品質管理に果たす役割を解明した。さらにオートファジー（自食作用）も蛋白質の品質管理に関与することを発見し、細胞内の品質管理には、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系が連携していることを世界で初めて証明した。

A. 研究目的

運動ニューロンの恒常性維持（監視）機構を蛋白質代謝の動態に着目して研究すると共に、その破綻の結果として発症する神経変性疾病の原因解明と治療法開発を目指す。とくにニューロン変性疾患の患者の病変部の病理所見においてしばしば観察されている抗ユビキチン抗体陽性の蛋白質凝集体（封入体）の形成は、ユビキチン代謝系の破綻が深く関与している。従って、この封入体の形成機構と処理機構の解明は、運動ニューロン疾患の発症機構解明に大きく貢献することか期待される。本研究においては、プロテアソーム系とリソソーム系という二種の異常蛋白質処理の分子機構を解明することにより、運動ニューロン疾患の発症機構解明を目指した。

B 研究方法

1) 発生工学的的方法 定法に従ってストレートに遺伝子改変（ノックアウト）マウスを作製した他、目的遺伝子に“lox”を挿入して標的遺伝子の発現を“on・of”に調節できるコンディショナル（条件的）ノックアウトマウスも作製した。

2) 生化学的方法 関連分子を大腸菌あるいは昆虫細胞系で発現・精製し、得られたリコンビナント蛋白質を用いて再構成ユビキチン化システムを構築した。このインビトロのアッセイ（評価）系を用いて、種々のユビキチンリガーゼ活性を決定した。

3) 細胞生物学的的方法 目的蛋白質をコートした cDNA を細胞内に導入して発現させ、この効果に対する（ユビキチン化反応を含む）細胞応答を観察した。また標的遺伝子の siRNA を細胞内に導入して目的蛋白質の発現を抑制し loss-of-function の表現型（細胞に与える影響）

を観察した。

4) 構造生物学的方法 目的蛋白質を大腸菌あるいは昆虫細胞系で大量に発現させた後、単一標品に精製した。精製蛋白質を結晶化してその立体構造を原子レベルで解析した。また必要に応じて NMR (核磁気共鳴装置) を使用して相互作用するアミノ酸残基を同定した。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は、主として培養細胞およびマウスを用いた基礎的研究およびリコンビナント蛋白質を用いた生化学的研究である。従って、これらの実験の実施には、倫理面への配慮は不要であった。

C. 研究結果

[研究 1] 品質管理ユビキチンリカーゼ CHIP の機能解析 CHIP は Hsp70 や Hsp90 と会合し、これらの分子シャペロンが捕捉した変性蛋白質を選択的にユビキチン化するリガーゼである。Hsp70 の作用には Hsp40 のようなコシャペロンが必要であるが、本年、われわれはニューロン特異的な Hsj-1 (DnaJ ドメインを有し Hsp70 と相互作用することができるコシャペロン) を CHIP の新規パートナー分子として同定した。現在、Hsj-1 のノックアウトマウスを作製中である。また CHIP が DRiPs (フォールディングに失敗した蛋白質の急速分解) に関係していることも突き止めた。DRiPs 経路の損傷は、細胞内に異常蛋白質の蓄積を誘発する可能性が予想されるので、この分解系に関わるユビキチンリガーゼの同定は、非常に重要であった。さらに CHIP のノックアウトマウスを作製した結果、CHIP 欠損マウスは失調性歩行異常の症状を呈し神経細胞の機能異常が示唆された (投稿準備中)。一方、Northern-blot 及び Western-blot 分析から CHIP と Hsj-1 が、運動ニューロンを含む種々のニューロンに高発現して

いることも見出した。したがって CHIP はニューロン細胞の健康を守るユビキチンリカーゼとして生理的に極めて重要であることが示唆された。

[研究 2] 糖鎖識別ユビキチンリカーゼの研究 近年、小胞体ストレスとニューロン死の関係が注目されている。それは unfolded protein response (異常蛋白質による小胞体のストレス負荷応答) の異常か Ask1-JNK シグナリングを介した細胞死に直接カノプルしていることが明らかになってきたからである。小胞体ストレスに対する応答の一つに ERAD (小胞体関連分解) がある。よく知られているように膜蛋白質や分泌蛋白質などは翻訳と共役して細胞質から小胞体に移行し、そこで高次構造形成が行われる。しかし小胞体内においては、かなりの蛋白質がフォールディングに失敗する (その確立は 30-50% と推測されている)。ERAD は小胞体内のミスフォールド蛋白質や余剰サブユニットを細胞質へ逆行輸送しユビキチン・プロテアソーム系により分解する品質管理機構である。

最近、われわれは N 結合型糖蛋白質の結合する細胞内レクチンを探索する目的で、高マンノース糖鎖をもったフェチュインをリカントとした親和性クロマトグラフィーを作製してウシ脳抽出液を解析した結果、Fbx2 (本年 Fbs1 と改名) の分離に成功した。Fbs1 はニューロンに特異的に発現している F-box 蛋白質であり、SCF 複合体 (Skp1-Cullin1-F box-Roc1) 型ユビキチンリガーゼの標的識別サブユニットであった。試験管内再構成系を用いた解析から、本 SCF^{Fbs1} 複合体が N 型糖鎖依存的に糖蛋白質をポリユビキチン化するユビキチンリカーゼであることが判明した。そして (基質結合能は保持しているが) SCF 複合体を形成しないドミナントネカティブ Fbs1 変異体を強制発現させたところ既知の ERAD 基質 (異常

CFTR 濃胞性線維症の責任遺伝子産物や余剰に合成される T 細胞リセプター TCR α サフユニット)の分解が抑制されたことから SCF^{Fbs1} は ERAD 機構で作用していることが裏付けられた。さらに興味深いことに、Fbs1 を過剰発現させると、プロテアソーム阻害剤で誘導される Aggresomes (ERAD 基質の分解異常による異常蛋白質の凝集体)の形成を完全にブロックした。この結果は、Fbs1 が封入体形成に関係している可能性を示唆するものとして注目される。

併せて本年、われわれは Fbs1 の X 線結晶解析により Fbs1 の立体構造を解明した。この結果、Fbs1 が糖鎖を結合する様式が原子レベルで判明した。この結合様式は、NMR による解析結果からも確認した。本年、さらにわれわれは、ユビキタスに発現している SCF^{Fbs1} のファミリー酵素として SCF^{Fbs2} を見出した。そして SCF^{Fbs2} も ERAD に関与することを証明し、糖鎖識別リガーゼ酵素が小胞体における品質管理機構に普遍的に重要な役割を果たしていることを案されているが、この魅力的な提案機構において SCF^{Fbs} ファミリー酵素群が品質管理リガーゼとして重要な役割を果たしていることが示唆された。

[研究 3] オートファジー (自食作用) の遺伝学的機能解析 オートファジーはオートファゴソーム (自食胞 細胞成分を取り込んだ二重膜小胞) による標的成分の取り込みの形成機構であり、その後リソソーム/液胞と融合して内容物を分解する細胞内の蛋白質分解機構である。近年、異常オートファジーが多くの神経変性疾患やミオパチー患者の変性組織部位の病理像の形態学的観察から報告されており、オートファジーの異常あるいは亢進がこれらの疾病の発症機構に関与する可能性が示唆されている。しかしこれまで、高等動物でのオートファジーを分子レベルで解析す

る実験系は皆無であった。

最近、オートファゴソーム形成に関する Atg (autophagy) システムが発見され、注目されている。これは Atg8 と Atg12 をモティファイヤーとする翻訳後修飾機構であり、オートファゴソーム (自食胞) の膜形成に必須なユビキチン化類似のモティファイヤーシステムである。そこで本年、われわれは、この二つの Atg システムの共通の活性化因子 Atg7 の条件的ノックアウトマウスを作製した。そして肝臓でオートファジーを完全に欠損させると、顕著な肝臓の肥大と肝炎を引き起こすのみならず、ユビキチン化蛋白質の凝集体が細胞内に大量に集積するという驚くべき結果を得た (投稿中)。このことは、オートファジー依存性の蛋白質分解系が非分裂細胞であるニューロンにおいてもユビキチン代謝関連の蛋白質の品質管理システムにおいて大きな役割を果たしていることを示唆している。

D. 考察

アルツハイマー病・パーキンソン病・筋萎縮性側索硬化症 (ALS) をはじめ多くの神経変性疾患での病理所見として、ユビキチン化された異常蛋白質の集積が残存ニューロン内に頻繁に観察されていることから、蛋白質の品質管理機構の破綻がこれらの疾患に共通した発症原因になっている可能性が高まっている。われわれは、これらの知見を分子レベルで理解するための成果として、今回、二種のユビキチンリガーゼを発見し、その構造と機能および分子遺伝学的研究を行った。即ち、細胞質と小胞体 (各々サイトゾル・核蛋白質と膜・分泌蛋白質を合成している画分) での品質管理において重要な役割を演じているシャペロン型リカーゼ CHIP と N-結合型糖蛋白質 (ERAD の主な基質) に特異的に作用するユビキチンリカーゼ (SCF^{Fbs1}/SCF^{Fbs2}) を見出し、分子レベルでの機能

解析に成功した。さらに、オートファジー・リソソーム系についても併せて遺伝学的研究を進めた。この結果、非分裂細胞における異常蛋白質の廃棄処理に、ユビキチン・プロテアソーム系（選択的蛋白質分解機構）とオートファジー・リソソーム系（非選択的蛋白質分解機構）が協同で作用していることが判明した。今後、これらの発見を基盤に蛋白質の品質管理機構を解明して、神経変性疾患の発症機能の共通のメカニズム解明を目指す。

E. 結論

<結論1> CHIP の新奇なパートナーとして Hsj-1 を発見した。併せて CHIP のノックアウトマウスを作製し、CHIP 欠損マウスが失調性歩行異常の症状を呈することを解明した。<結論2> ERAD に関与する糖鎖識別ユビキチンリカーゼとしてニューロン特異的な SCF^{Fbs1} とユビキチンに発現している普遍的 SCF^{Fbs2} を発見した。そして、キトヒオース（蛋白質の Asp 残基に結合する GlcNAc-GlcNAc 糖）が結合した Fbs1 の立体構造解析（X線結晶解析や NMR 解析）に成功し、原子レベルで標的識別機構を解明した。<結論3> オートファジー（自食作用）の遺伝学的機能解析を行うために、オートファゴソーム（自食胞）形成の条件的ノックアウトマウスを作製し、オートファジーを欠失させるとユビキチン陽性の封入体が大量に蓄積することを見出した。この結果、細胞内で発生した多くの異常蛋白質は、ユビキチン・プロテアソーム系のみならずオートファジー・リソソーム系によっても処理されることが判明した。従って細胞（蛋白質）の homeostasis は、これまで独立して作用していると考えられていた二つの蛋白質分解システムの共同作業により監視・維持されていることが判明した。これらの研究成果は、運動ニューロンの変性機構を解明

するための有益な情報を提供するものである。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1 論文発表

- Sakata, E, Yamaguchi, Y, Kurimoto, E, Kikuchi, J, Yokoyama, S, Yamada, S, Kawahara, H, Yokosawa, H, Hattori, N, Mizuno, Y, Tanaka, K, and Kato, K Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes with the ubiquitin-like domain EMBO Rep 2003, 4 301-306
- Tanahashi-Hori, T, Tanahashi, N, Tanaka, K, and Chiba, T Conditional knockdown of proteasomes results in cell-cycle arrest and enhanced expression of molecular chaperones Hsp70 and Hsp40 in chicken DT40 cells J Biol Chem 2003, 278 16237-16243
- Yoshida, Y, Tokunaga, F, Chiba, T, Iwai, K, Tanaka, K, and Tai, T Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains J Biol Chem 2003, 278 43877-43884
- Hirano, Y, Murata, S, Tanaka, K, Shimizu, M, and Sato, R SREBPs are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26S proteasome pathway J Biol Chem 2003, 278 16809-16819
- Matsuzaki, H, Daitoku, H, Hatta, M, Tanaka, K, and Fukamizu, A Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100 11285-11290
- Kim S J, Sung, J Y, Um, J W, Hattori, N, Mizuno, Y, Tanaka, K, Paik, S R, Kim, J, and Chung, K C Parkin cleaves intracellular α -synuclein's inclusions via the activation of calpain J Biol Chem 2003, 278 41890-41899
- Kim, M, Tezuka, T, Tanaka, K, and Yamamoto, T Cbl-c suppresses v-Src-induced transformation through ubiquitin-dependent protein degradation Oncogene 2003, 23 1645-55
- Araki, K, Kawamura, M, Suzuki, T, Matsuda, N, Kanbe, D, Ishii, K, Ichikawa, T, Kumanishi, T, Chiba, T, Tanaka, K, and Nawa, H A palmitoylated RING finger ubiquitin ligase and its homologue, both enriched in the brain membranes J Neurochem 2003, 86 749-762
- Imai, J, Maruya, M, Yashiroda, H, Yahara, I, and Tanaka, K The molecular chaperone Hsp90 interacts with 26S proteasomes and regulates their assembly EMBO J 2003, 22 3557-3567
- Ogura, T and Tanaka, K Dissecting various ATP-dependent steps in proteasomal