

20030733

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

ALS 2 分子病態解明とALS 治療技術の開発

平成15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16 (2004) 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	-----	8
2. ALS2 モデル疾患マウスの作出		
岩倉 洋一郎	-----	11
3. ALS2 蛋白の分子動態解析		
成宮 周	-----	14
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17
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。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。本研究事業では、我々が単離・同定した家族性 ALS の新たな遺伝子“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 あるいは類似運動ニューロン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15年度(研究計画2年目)においては、(1) 本邦の孤発性 ALS および ALS 類似疾患 (原発性側索硬化症、痙性対麻痺、脊髄性筋萎縮症) 患者の臨床症候および DNA の集積 (総計 115 症例)、収集した患者における ALS2 遺伝子配列解読、ならびに ALS2 遺伝子上の新規 SNP および欠失・挿入配列多型の同定 (合計 61ヶ所)、(2) *Als2* ノックアウトマウスの作出、(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解明、ならびに ALS2 蛋白質の多量体形成が Rab5 活性化およびその活性に依存したエンドソーム動態調節に必須であることの発見、などの成果が得られた。

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)

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・進行に係わると思わ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

ならびに ALS 関連運動ニューロン疾患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 項目の研究を遂行する。(1) 本邦の孤発性 ALS および ALS 類似運動ニューロン疾患 (原発性側索硬化症、痙性対麻痺、脊髄性筋萎縮症) 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 あるいはその他の運動ニューロン疾患の症候や予後、さらには発症そのものに関わる修飾因子 (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 G 蛋白質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) 孤発性 ALS および類似運動ニューロン疾患患者の集積、試料収集ならびに DNA (SNP) 解析

第 1 項目の研究では、本邦の孤発性 ALS および ALS 類似運動ニューロン疾患 (原発性側索硬化症、痙性対麻痺、脊髄性筋萎縮症) 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) *ALS2* モデル疾患マウスの作出

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 エクソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、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。本年度は、昨年度までに作製したキメラマウスから、生殖系列キメラマウスを同定し、その後計画的交配により最終的に *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出を試みた。

(3) *ALS2* 蛋白質の分子動態と神経変性機序について

第 3 項目に関しては、*ALS2* 蛋白質の細胞および生体内における分子機能を解明することを目指す。本年度は、*ALS2* の DH/PH ドメインの神経細胞形態における役割をさらに探るため、これが活性化すると思われる Rho 情報伝達の神経系での役割を特に Rho 下流のエフェクター分子に注目して解析した。また、このドメイン自身の触媒活性の検討を昨年度に引き続き行った。さらに、昨年度までに明らかになった *ALS2* 蛋白質 C 末端領域の VPS9 ドメインが有する Rab5

活性化およびエンドソーム動態調節メカニズムを解明するため、酵母 two-hybrid 法を用いることにより、ALS2 に結合する活性調節因子の単離・同定を試みた。

(倫理面への配慮)

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、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 および類似運動ニューロン疾患患者の集積、試料収集、ならびに DNA (SNP) 解析

第一項目の研究については、名古屋大学において約 100 例の孤発性 ALS 患者を集積し、El Escorial に基づく臨床表現型の解析、当該患者の遺伝子の収集、および ALS2 遺伝子変異解析を行った（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では孤発性 ALS および家族性痙性対麻痺患者の資料収集にあたり、家族性形成対麻痺 2 症例の試料収集ならびに解析を行った（青木）。これまでに、収集した 115 例の患者試料についての ALS2 遺伝子の全 34 エクソンならびに遺伝子プロモーターの 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 57 ヶ所（5' 上流プロモーター領域；7 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；35 ヶ所）であった。また、イントロンにおける 3 ヶ所の欠失および 1 ヶ所の挿入多型が見いだされた。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（5 ヶ所）や、115 症例中 1 症例でのみ見いだされているような稀な SNP、あるいはその逆に多型出現頻度の高いものが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 モデル疾患マウスの作出については、昨年度

作出に成功した 6 クローンの ES 細胞に由来するキメラマウスから 2 系統の生殖系列キメラマウスが得られ（岩倉）、そしてこれらのキメラマウスを交配させることにより、最終的に目的とする *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出に成功するという成果を得ることができた（岩倉、池田）。解析に必要な個体数を確保するため、現在計画的交配を継続しており、現時点ですでに F2 マウスをおよそ 200 個体得ており（池田）、次年度に向けての ALS2 の分子病態解析を行う研究体制を整えることができた。

(3) ALS2 蛋白質の分子動態と神経変性機序について

ALS2 蛋白質の分子動態と神経変性機序については、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される 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昨年度に引き続き行った（成宮）。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（mDia）にも退縮（ROCK；Rho キナーゼ）にも働くことを見出し、各下流分子の分子作用メカニズムについての解析を行った。ROCK の神経系での役割を探るためそのアイソフォームの一つである ROCK-II 遺伝子を欠損したマウスを作製したが、これまでのところ脳脊髄において神経構築の異常は観察されていない（成宮）。また、mDia の分子機能を、GFP-fusion を用いた speckle 法で解析し、これが真直ぐなアクチン線維の形成に働いていることを *in vivo* で立証した（成宮）。さらに、mDia のアイソフォームの一つ mDia3 が分裂期微小管の染色体キネトコアへの安定的結合に関与していることを示した（成宮）。後者では、DH/PH ドメインに結合する基質 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、池田）。一方、ALS2 蛋白質に結合する因子の探索過程で、ALS2 蛋白質自体がその C 末端領域を介して結合することを見いだした（池田）。そして、ALS2 蛋白質が生体内では多量体形成をしていること、さらに ALS2 蛋白質が有する Rab5 の活性化およびその活性化を介するエンドソーム動態調節においては、ALS2 蛋白質多量体形成が必須であるという知見が得られた（池田）。

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 9 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、イタリア、パキスタン、およびイスラエルの小児発症上向性痙性麻痺 (infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis: IAHS) の 6 家系で見いだされている。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ていると考えられる。*ALS2* 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。

近年、Al-Chalabi らはイギリスおよびアメリカの ALS 患者、また Hand らはカナダおよびフランスの ALS 患者における *ALS2* 遺伝子変異の検索に関しての報告をしているが、いずれの解析においても *ALS2* 遺伝子における変異の発見には至っていない。本邦においても、我々の継続的な検索にもかかわらず、現時点では *ALS2* 遺伝子変異を持つ患者は見いだされていない。従って、*ALS2* 遺伝子変異は、ある種の家族性 ALS のみならず、その関連運動ニューロン疾患の原因となっている反面、ALS 症例の大多数を占める孤発性

ALS (SALS) の直接的原因ではない可能性が高いと考えられた。しかし一方で、*ALS2* 遺伝子が運動ニューロン疾患の調節因子であることを示す報告もなされている。2004 年に Kanekura らは、*SOD1* 遺伝子変異により引き起こされる家族性 ALS 1 型のモデル細胞において、*ALS2* 蛋白質が変異した *SOD1* 蛋白質と結合することにより変異 *SOD1* の毒性を減弱させ、それにより細胞死を抑制することを示した。このことは、*ALS2* 遺伝子産物が、*ALS2* 遺伝子変異を原因としない運動ニューロン疾患の発症過程において、の調節因子として機能していることを示唆するものである。

これまでの *ALS2* 遺伝子変異解析の過程で、*ALS2* 遺伝子上の多数の遺伝子配列多型が発見されている。本研究により、我々はすでに 61 ヶ所の遺伝子多型配列を *ALS2* 遺伝子ならびにそのプロモーター配列上に見いだすことに成功している。また同様に、Al-Chalabi らおよび Hand らは、それぞれ合計 21 ヶ所と 26 ヶ所の多型配列を同定している。各々の解析結果を比較したところ、日本人 ALS 患者において発見された 61 ヶ所の多型配列中 12 ヶ所が Al-Chalabi らの報告と一致し、また 14 ヶ所の多型が Hand らの報告と一致した。また、我々を含めた 3 つの研究において共通して見いだされた多型は合計 7 種類であった。これらのことは、一部の多型配列は民族あるいは人種の差に関わらず、それぞれの集団において保存されているものの、大多数の多型配列 (特に頻度の少ないもの) については、各民族・人種においてユニークであることを示している。特に、我々が既に日本人の ALS 患者において発見した他に報告例を見ない 42 種類の多型配列は、今後の遺伝子変異・多型と臨床症候の相関関係の解析、ならびに運動ニューロン疾患における症候調節因子 (あるいは危険因子) としての *ALS2* 遺伝子の役割を解明する上において非常に有用な遺伝学的マーカーとなると考えられる。

一方、*ALS2* 蛋白質およびその機能ドメインの分子的作用に関して、これまで我々は、DH/PH ドメインの Rho 情報伝達の神経系での新たな分子機能の同定、*ALS2* 蛋白質の Rab5 低分子量 G 蛋白質特異的 GEF 活性の同定、さらに *ALS2* 蛋白質のエンドソーム動態への調節機能の同定などの成果を挙げてきた。これらの

結果に基づき、ALS2 蛋白質はその特異的低分子量G 蛋白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分子であると推定されている。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あるいはシグナル伝達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と思われる。今後のより詳細な研究により、ALS2 蛋白質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されることが期待される。

最後に、本年度の本研究の成果の中で特記すべきものとして、ALS2 モデルマウスとしての *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出に成功したことが挙げられる。この成果により、今後の ALS2 疾患に関する分子病態解析ならびに ALS2 蛋白質の個体における生理学的役割の研究が可能となり、当該研究の飛躍的進捗が期待される場所である。そして、ALS2 蛋白質の分子機能の欠損が実際の ALS2 ならびにその関連運動ニューロン疾患の分子病態の本質であるか否かに関しても、作製されたモデルマウスを解析することにより証明できるものと考えている。

E. 結論

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 *Als2* 遺伝子欠損マウスを用いた分子病態解析を行っている。今後、このような実験を通して ALS2 蛋白質の分子的小および固体レベルでの機能が明らかにされることが期待される。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された 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 およびその類似・関連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) Storbeck CJ, Drmanic S, Daniel K, Waring JD, Jirik FR, Parry DJ, Ahmed N, Sabourin LA, Ikeda JE, Korneluk RG : Inhibition of myogenesis in transgenic mice expressing the human DMPK 3' -UTR. *Hum Mol Genet* 3(6):589-600, 2004

2) Tanaka K, Shouguchi-Miyata J, Miyamoto N, Ikeda JE : Novel nuclear shuttle proteins, HDBP1 and HDBP2, bind to neuronal cell-specific cis-regulatory element in the promoter for the human Huntington's disease gene. *J Biol Chem* 279(8):7275-86, 2004

3) Nagano I, Murakami T, Shiote M, Manabe Y, Hadano S, Yanagisawa Y, Ikeda JE, Abe K : Single-nucleotide polymorphisms in uncoding regions of *ALS2* gene of Japanese patients with autosomal-recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 25(5):505-9, 2003

4) Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Shouguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E, Yasuda M, Osuga H, Nishimoto T, Narumiya S, Ikeda JE : ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. *Hum Mol Genet* 12(14):1671-87, 2003

2. 学会発表

- 1) Ryota Kunita, Shinji Hadano, Asako Otomo, Hikaru Mizumura, Takeya Okada, Kyoko Suzuki, Shuh Narumiya, Joh-E Ikeda : The DH/PH domain of ALS2 strongly enhances the C-terminal MORN/VPS9 domain-mediated endosome fusions. KYESTONE Symposia, Traffic Control: Rab GTPases in Vesicular Transport, p55, 2004
- 2) Asako Otomo, Shinji Hadano, Takeya Okada, Hikaru Mizumura, Ryota Kunita, Hitoshi Nishijima, Junko Showguchi-Miyata, Yoshiko Yanagisawa, Eri Kohiki, Etsuko Suga, Masanori Yasuda, Hitoshi Osuga, Takeharu Nishimoto, Shuh Narumiya, Joh-E Ikeda : Amyotrophic lateral sclerosis type 2 gene encodes protein, ALS2, is a novel guanine nucleotide exchange factor for Rab5 and implicates in endosomal dynamics. KYESTONE Symposia Traffic Control: Rab GTPases in Vesicular Transport, p57, 2004
- 3) Asako Otomo, Shinji Hadano, Takeya Okada, Hikaru Mizumura, Ryota Kunita, Hitoshi Nishijima, Junko Showguchi-Miyata, Yoshiko Yanagisawa, Eri Kohiki, Etsuko Suga, Masanori Yasuda, Hitoshi Osuga, Takeharu Nishimoto, Shuh Narumiya, Joh-E Ikeda : ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. 神経化学 42(2,3), P264, 2003
- 4) Shinji Hadano, Asako Otomo, Yoshiko Yanagisawa, Junko Showguchi-Miyata, Kyoko Suzuki, Ryota Kunita, Hikaru Mizumura, Joh-E Ikeda : ALS2 C-terminal like (ALS2CL): identification characterization of the novel conserved gene that encodes a protein highly homologous to the carboxy-terminal half of the ALS2 protein. 神経化学 42(2,3), P264, 2003
- 5) 田中一則, 宮本なつき, 池田穰衛 : 酸化ストレス応答によるHD遺伝子転写調節領域結合因子の細胞内局在変化. 第26回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, P595, 2003
- 6) 大友麻子, 秦野伸二, 岡田武也, 水村光, 國田竜太, 西嶋仁, 将口(宮田)淳子, 柳澤佳子, 古曳英理, 須賀恵津子, 安田政実, 大須賀等, 西本毅治, 成宮周, 池田穰衛 : 筋萎縮性側索硬化症2型遺伝子産物ALS2のRab5GEF活性とエンドソーム動態調節機能. 第26回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, P1030, 2003
- 7) 國田竜太, 秦野伸二, 大友麻子, 水村光, 鈴木恭子, 成宮周, 池田穰衛 : ヒトALS2タンパク質の初期エンドソーム融合はALS_DH/PHドメインによって特異的に増強される. 第26回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, P1030, 2003
- 8) 秦野伸二, 大友麻子, 柳澤佳子, 将口(宮田)淳子, 鈴木恭子, 國田竜太, 水村光, 池田穰衛 : ALS2CL:新規ALS2相同遺伝子の同定とその構造解析. 第26回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, P1031, 2003
- 9) Ryota Kunita, Asako Otomo, Joh-E Ikeda : Identification and Characterization of Novel members of the CREG Family Putative Secreted Glycoproteins Expressed Specifically in Brain. XIX INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, P120, 2003
- 10) Kazunori Tanaka, Natsuki Miyamoto, Junko Showguchi-Miyata, Joh-E Ikeda : MOLECULAR BEHAVIOR OF NOVEL NUCLEAR SHUTTLE PROTEINS, HDBP1 AND HDBP2, WHICH ARE CANDIDATE TRANSCRIPTIONAL REGULATORS FOR THE HUMAN HUNTINGTON'S DISEASE GENE. XIX INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, P184, 2003

11) Shinji Hadano, Yoshiko Yanagisawa, Junko Showguchi-Miyata, Asako Otomo, Ryota Kunita, Hikaru Mizumura K, Joh-E Ikeda : Identification and Characterization of a novel gene ALS2 C-terminal like(ALS2CL)which encodes a protein highly homologous to the carboxy-terminal half of the ALS2 protein. XIX INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, P70, 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

ALS の病態発現に関わる因子の探索のため、名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもと、患者に対する十分なインフォームドコンセントを得たうえで、採血による遺伝子収集と臨床情報の収集を行った。これらの検体をもとに、我が国における ALS の病態発現に対する *ALS2* 遺伝子変異の関与について調べるために、*ALS2* 遺伝子変異のスクリーニング、および *ALS2* 遺伝子多型の同定を行った。97 例の孤発性 ALS (SALS) 検体について解析したところ、アミノ酸置換を伴う 5 個所の SNPs を含む多数の多型が検出された。これら SNPs が疾患発症と関連した変異であるか否かに関しては、さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

2001 年に家族性 ALS を引き起こす第二の遺伝子異常として *ALS2* 遺伝子が同定された。この *ALS2* 遺伝子変異が我が国における ALS の病態発現について、どの程度関与しているかを調べる必要がある。今回、我々は *ALS2* 遺伝子変異を有する患者が、我が国の一見孤発性を示す ALS 患者の中に存在する可能性、および *ALS2* 遺伝子の多型が孤発性 ALS の症候や予後、さらには発症そのものに関わる危険因子として作用している可能性の 2 つの観点から解析を行った。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

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。本研究では、SALS 患者の DNA と臨床症候を集積し、*ALS2* 遺伝子異常の有無を確認していく。また、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。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、直接シーケ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の検討も併せて行う。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、昨年度までに収集した 97 例の SALS 患者の *ALS2* 遺伝子の全 3 4 エクソンならびに *ALS2* 遺伝子プロモーター領域のゲノム塩基配列を解読した。その結果、昨年度までに発見された 44 個所の多型配列に加えて、新たに 15 個所の SNPs および 2 個所の欠失多型を発見した。また、61 個所中 15 個所の SNPs は出現頻度が高い多型であることから、*ALS2* 遺伝子ゲノム領域の遺伝子ハプロタイプを決定することに有用であると考えられた。さらに、アミノ酸置換を伴う 5 個所の SNPs を含む多数の多型も検出された。これら SNPs が疾患発症と関連した変異であるか否かに関しては、さらに検討する必要がある。

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、これまでの疾患の対照となる正常人のDNAサンプルの収集ならびにALS2遺伝子の解析を進めていく。その上で、正常人の遺伝子配列型とSALS患者の配列型を統計的に比較することにより、これまでに発見された遺伝子多型の疾患発症への関与を推定することが可能になると考えられる。

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、これまでに多数発見されたSNPsをはじめとする遺伝子多型を利用することにより、ALS2遺伝子がSALSを含めたALSならびにその関連疾患発症に関与しているか否かについての遺伝学的な解析が可能となる。そして、もし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) Koike H, Misu K, Sugiura S, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Mukai E, Ando Y, Ikeda S, Sobue G: Pathologic differences between early- and late-onset type I (TTR Met30) familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* in press, 2004

2) Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: Dopamine prevents cell

death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89(1):64-72, 2004

3) Katsuno M, Sobue G: Polyglutamine diminishes VEGF; passage to motor neuron death? *Neuron* 44(5):677-679, 2004

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

5) Katsuno M, Adachi H, Sobue G: Sweet relief for Huntington disease. *Nat Med* 10(2):123-124, 2004

6) Watanabe H, Fukatsu H, Katsuno M, Sugiura M, Hamada K, Okada Y, Hirayama M, Ishigaki T, Sobue G: Multiple regional 1H-MR spectroscopy in multiple system atrophy: NAA/Cr reduction in pontine base as a valuable diagnostic marker. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(1):103-109, 2004

7) Wada M, Kimura M, Daimon M, Kurita K, Kato T, Johmura Y, Johkura K, Kuroiwa Y, Sobue G: An unusual phenotype of McLeod syndrome with late onset axonal neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(12):1697-1698, 2003

8) Nodera H, Bostock H, Kuwabara S, Sakamoto T, Asanuma K, Jia-Ying S, Ogawara K, Hattori N, Hirayama M, Sobue G, Kaji R: Nerve excitability properties in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 127(Pt 1):203-211, 2003

9) Katsuno M, Adachi H, Inukai A, Sobue G: Transgenic mouse models of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Cytogenet Genome Res* 100(1-4):243-251. Review, 2003

- 10) Mori K, Iijima M, Sugiura M, Koike H, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G: Sjogren's syndrome associated painful sensory neuropathy without sensory ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 74(9):1320-1322, 2003
- 11) Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, Ito T, Ishigaki S, Hashizume Y, 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(2):609-619, 2003
- 12) Koike H, Iijima M, Sugiura M, Mori K, Hattori N, Ito H, Hirayama M, Sobue G: Alcoholic neuropathy is clinicopathologically distinct from thiamine-deficiency neuropathy. *Ann Neurol* 54(1):19-29, 2003
- 13) Katsuno M, Adachi H, Doyu M, Minamiyama M, Sang C, Kobayashi Y, Inukai A, Sobue G: Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Med* 9(6):768-773, 2003
- 14) Ito T, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Doyu M, Sobue G: Dorfin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem* 278(31):29106-29114, 2003
- 15) Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y, Adachi H, Kobayashi Y, Sobue G, Ohtsuka K, Hatayama T: Hsp105alpha suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity. *J Biol Chem* 278(27):25143-25150, 2003
- 16) Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Pagoulatos G, Angelidis C, Kusakabe M, Yoshiki A, Kobayashi Y, Doyu M, 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(6):2203-2211, 2003
- 17) Hamada K, Hirayama M, Watanabe H, Kobayashi R, Ito H, Ieda T, Koike Y, Sobue G: Onset age and severity of motor impairment are associated with reduction of myocardial 123I-MIBG uptake in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(4):423-426, 2003
- 18) Abe Y, Kachi T, Kato T, Arahata Y, Yamada T, Washimi Y, Iwai K, Ito K, Yanagisawa N, Sobue G: Occipital hypoperfusion in Parkinson's disease without dementia: correlation to impaired cortical visual processing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(4):419-422, 2003
- 19) Hishikawa N, Hashizume Y, Yoshida M, Sobue G: Clinical and neuropathological correlates of Lewy body disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 105(4):341-350, 2003
- 20) Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M, Yoshikawa H, Ohnishi A, Hayasaka K, Onodera O, Baba M, Yasuda H, Saito T, Nakashima K, Kira J, Kaji R, Oka N, Sobue G; 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(Pt 1):134-151, Review, 2003

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なターゲティングベクターをマウス ES 細胞に導入し、相同組み換えクローンを単離・同定した。これら ES 細胞を用いてキメラマウスの作製を行ったところ 2 クローンから生殖系列キメラマウスが得られ、交配により Tunisia 型 *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出に成功した。しかしながら、*Als2* 遺伝子欠損マウスは 9 ヶ月齢現在において、ヒトの筋萎縮性側索硬化症様の病態を示してはいない。

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 "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行った。

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、マウス ES 細胞に導入・選抜を行い、相同組み換え体をサザンハイブリダイゼー

ション法および PCR 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、交配により Tunisia 型 *Als2* 遺伝子欠損マウスを得た。

(倫理面への配慮) *Als2* 遺伝子欠損マウスについては、東京大学医科学研究所およびに東海大学伊勢原キャンパス組み換え DNA 実験安全委員会ならびに動物実験委員会の承認と指針に基づいて取り扱った。

C. 研究結果

Tunisia 型 *Als2* ターゲティングベクターをマウス 129/Ola 由来 ES 細胞株 E14.1 に導入し、相同組み換え体を 14 クローン同定した。このうち 6 クローンについて、キメラマウス作製を行い、2 クローン (17C6 および 21B5) より生殖系列キメラが得られた。交配によりヘテロ変異マウスが得られ、さらにヘテロ変

異マウス同士を交配することによりホモ変異マウスを得た。ホモ変異マウスは遺伝子およびタンパク質レベルでALS2の発現が失われていることから、*Als2* 遺伝子欠損マウスの作出に成功したことを確認した。9ヶ月齢まで観察を行ったが、*Als2* 遺伝子欠損マウスはヒトの筋萎縮性側索硬化症様の病態は示さなかった。

D. 考察

Tunisia型 *Als2* 遺伝子欠損マウスは9ヶ月齢においてもヒトの筋萎縮性側索硬化症様の病態を示さないことから、(1) マウスでの発症はより晩発性、(2) ヒトと異なりマウスにはALS2の機能を相補する機構が存在する、(3) マウスの遺伝的背景の影響を受ける(今回の解析に用いたマウスは129/OlaとC57BL/6JのF2交雑系)、などの可能性が考えられる。

E. 結論

Tunisia型 *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出に成功したが、9ヶ月齢においてもヒトの筋萎縮性側索硬化症様の病態は認められなかった。今後加齢による変化を観察すると共に、病理的变化を詳細に検討する。

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, Shioda S.: Suppression of oxidative neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion in mice lacking interleukin-1.

Neurosci Res 45(3):313-324, 2003

3) Matsuki T, Horai R, Sudo K, Iwakura Y: IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. J Exp Med 198(6):877-888, 2003

4) Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karagogeos D. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. J Cell Biol 162(6):1161-1172, 2003

5) Takeda Y, Akasaka K, Lee S, Kobayashi S, Kawano H, Murayama S, Takahashi N, Hashimoto K, Kano M, Asano M, Sudo K, Iwakura Y, Watanabe K: Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup. J Neurobiol 5;56(3):252-265, 2003

6) Wheeler RD, Brough D, Le Feuvre RA, Takeda K, Iwakura Y, Luheshi GN, Rothwell NJ: Interleukin-18 induces expression and release of cytokines from murine glial cells: interactions with interleukin-1 beta. J Neurochem 85(6):1412-1420, 2003

7) Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y: IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. Proc Natl Acad Sci U S A 100(10):5986-5990, 2003

8) Asano M, Nakae S, Kotani N, Shirafuji N, Nambu A, Hashimoto N, Kawashima H, Hirose M, Miyasaka M, Takasaki S, Iwakura Y: Impaired

selectin-ligand biosynthesis and reduced inflammatory responses in beta-1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. *Blood* 102(5):1678-1685, 2003

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

9) Nakae S, Komiyama Y, Yokoyama H, Nambu A, Umeda M, Iwase M, Honma I, Sudo K, Horai R, Asano M, Iwakura Y: IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int Immunol.* 15(4):483-490, 2003

10) Nakae S, Komiyama Y, Narumi S, Sudo K, Horai R, Tagawa Y, Sekikawa K, Matsushima K, Asano M, Iwakura Y: IL-1-induced tumor necrosis factor-alpha elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing IFN-gamma-inducible protein 10 in the elicitation phase of the contact hypersensitivity response. *Int Immunol* 15(2):251-260, 2003

11) Tanaka J, Ishida T, Choi BI, Yasuda J, Watanabe T, Iwakura Y: Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle - dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. *AIDS* 17(2):167-175, 2003

12) Iwakura, Y: Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I *tax* gene. In "Two decades of adult T-cell leukemia and HTLV-I research", (eds. K. Sugamura, R. Uchiyama, M. Matsuoka, and M. Kannagi), Gann Monograph on Cancer Research, 50, Japan Scientific Societies Press and Karger, Tokyo, 197-218, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 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 蛋白の分子動態解析

分担研究者 成宮 周

京都大学医学研究科 神経・細胞薬理学

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の検討を行った。既に前年度の研究で、Rho が下流分子の使い分けにより軸索の退縮にも伸長にも働くことを見出した。前者では Rho から ROCK (Rho キナーゼ)に至る経路が、後者では、Rho から mDia に至る経路が主として働く。今年度は、ROCK の神経系での役割を探るためそのアイソフォームの一つである ROCK-II 遺伝子を欠損したマウスを作製したが、これまでのところ脳脊髄において神経構築の異常は観察されていない。また、mDia の分子機能を、GFP-fusion を用いた speckle 法で解析し、これが真直ぐなアクチン線維の形成に働いていることを *in vivo* で立証した。さらに、mDia のアイソフォームの一つ mDia3 が分裂期微小管の染色体キネトコアへの安定的結合に関与していることを示した。これは、mDia を介する微小管安定化が分裂期、間期を問わず働く重要な機構であることを意味し、同様の機構が神経細胞突起の形成・維持にも働いている可能性を示唆するものである。

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）

1. ROCK-II 遺伝子の protein kinase domain の一部をコードする exon 3 の大半を β -galactosidase - Neomycin - resistance gene で置換し targeting vector を作製した。これを

用いて gene targeting を行い、ROCK-II 遺伝子欠損マウスを作製、解析を行った。この研究は京都大学の実験動物に対するガイドラインの下で行った。

2. Rho 情報伝達の下流で、神経突起伸長を行う mDia ファミリー蛋白質群に焦点をおき、そのアクチン重合活性、微小管安定化活性につき解析をおこなった。前者については、GFP-mDia を極低濃度で発現させた培養細胞を用い、導入した mDia 分子がどのようなアクチン線維構築をおこしどのように挙動するか解析を行った。また、後者については、mDia アイソフォームの一つ、mDia3 の分裂細胞での働きについて RNAi を用いて検討した。

C. 研究結果

1. ROCK-II は神経系で dominant に存在する ROCK アイソフォームである。このため、遺伝子欠損