

200400742A

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16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17 (2005) 年3月

厚生労働省科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

ALS2 分子病態解明と ALS 治療技術の開発

平成16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17 (2005) 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 \_\_\_\_\_ 10

##### 2. ALS2 モデル疾患マウスの作出

岩倉 洋一郎 \_\_\_\_\_ 13

##### 3. ALS2 蛋白の分子動態解析

成宮 周 \_\_\_\_\_ 16

#### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 研究者一覽

ALS2 分子病態解明と ALS 治療技術の開発  
研究者一覧

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

# I. 總括研究報告

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 発症原因遺伝子の解析を通して 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項目の研究を実施した；（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 の分子病態解明と治療技術の開発を目指す。平成16年度（研究計画最終年度）においては、（1）本邦の孤発性 ALS 患者 115 名と健常者 110 名における ALS2 遺伝子配列多型解析から、ALS2 遺伝子が孤発性 ALS の発症危険因子としての可能性が低いことの証明、（2）*Als2* ノックアウトマウスが1年9ヶ月齢を経過してもヒト ALS 様の運動ニューロン疾患症状を示さないことの確認、（3）Rho 情報伝達の細胞分裂期における新規分子作用の解明、ならびに脳内において ALS2 蛋白質と結合する蛋白質因子の同定の成功、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* 遺伝子における遺伝子配列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 *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を有することから、*ALS2* 蛋白質はある種の低分子量 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* 蛋白質あるいは類縁の蛋白質因子が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 の分子病態解明と治療法開発のための知見・情報収集、基本技術ならびに実験系の確立を目指す。

## B. 研究方法

(1) 孤発性 ALS および痙性対麻痺患者集積と資料収集ならびに 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。また、併せて健常者の血液サンプルの収集を行う。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、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ことを目標とする。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出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取得し、さらにそれらをキメラマウス作製に供した。本年度は、昨年度までに作出した *Als2* 遺伝子欠損マウスの継続観察を行うと



ともに、該当マウスにおける各種遺伝子、蛋白質発現の変動を、生化学的・細胞組織学的手法により解析した。

### (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、これが活性化されると思われるRho情報伝達の細胞ならびに個体における役割を特にRho下流のエフェクター分子に注目して解析した。また、神経系においてALS2蛋白質が担う細胞内分子シグナル系ならびに生理的機能を明らかにするため、免疫沈降法を用いて脳内においてALS2蛋白質と結合する因子の単離・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配列多型については、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 および痙性対麻痺患集積と資料収集ならびに DNA(SNP)解析

孤発性 ALS および痙性対麻痺患集積と資料収集ならびに DNA(SNP)解析については、名古屋大学において、97 例の孤発性 ALS 患者を集積し、ElEscorial に基づく臨床表現型の解析を実施し、同時に当該患者の遺伝子の収集と *ALS2* 遺伝子変異解析・遺伝子配列多型解析を実施した(祖父江、池田)。自治医科大学では、孤発性 ALS 患者 61 症例、痙性対麻痺 7 症例の

試料収集が完了し(中野)、解析が現在も進行中である(池田)。東北大学およびその関連施設の孤発性 ALS および家族性痙性対麻痺患者の資料収集にあたり、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 例の患者ならびに 110 名の健常者の各試料についての *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遺伝子配列多型は、総計 56 ヶ所(5' 上流プロモーター領域; 7 ヶ所、翻訳エクソン内; 16 ヶ所、3' 非翻訳領域; 5 ヶ所、イントロン領域; 28 ヶ所)であった。また、イントロンにおける 2 ヶ所の欠失および 3 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(9 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。これらの遺伝子配列多型における孤発性 ALS の発症および臨床症候への関与の有無を解析するため、孤発性 ALS 患者と健常者の各遺伝子配列多型頻度をカイ 2 乗検定法により統計解析を行った。その結果、いずれの多型においても 5 パーセント未満の危険度での有意性を認めることができなかった。したがって、*ALS2* 遺伝子は、少なくとも本研究で解析した孤発性 ALS 患者群における発症修飾・危険因子ではないと推定された。しかしながら、10%未満の危険度レベルでは有意性を示す多型が複数個観察されたことから、さらに解析数を増やすことにより、有意性を証明できる可能性も残され、*ALS2* 遺伝子多型が ALS 発症に全く無関係であると結論することはできないものと考えられた。

### (2) *ALS2* モデル疾患マウスの作出と解析

*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 2 系統(17C6 および 21B5)の *Als2* 遺伝子欠損マウスのうち 17C6 系統に関して、計画的交配により 240 匹の F2

個体を得た(岩倉、池田)。ウェスタンブロット法によりホモ変異マウス個体における ALS2 蛋白質の発現を解析した結果、その発現が完全に消失していることが判明した。したがって、本研究で用いた *Als2* 遺伝子欠損マウスは、ALS2 蛋白質を全く発現していない個体であることが再確認された。12-21 ヶ月齢まで加齢させて観察を行ったが、*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。また、ALS2 蛋白質の機能との関連が想定される膜輸送・細胞骨格動態に関連した一群の蛋白質の *Als2* 欠損マウス脳神経系における発現を解析したが、*Als2* 遺伝子欠損によりその発現が変動するものは見いだされなかった。一方、免疫組織学的解析を行った結果、24 週齢の *Als2* 欠損マウスの神経系において、活性グリアおよび星状グリア細胞に局在する蛋白質の染色性が上昇していることが判明した。このことは、*Als2* 欠損マウスの神経組織において何らかの傷害が進行し、グリア細胞の増加が起こっている可能性を示唆している。しかし、神経細胞数の変動は観察されていないことから、細胞死が進行しているという証拠は得られなかった。現在、72 週齢のマウスに付いても同様な神経病理学的解析を行っている。以上の解析は、全て 129/O1a と C57BL/6J の交雑系を用いたものであり、遺伝的背景の影響を受けている可能性を否定できない。そのような可能性を排除するため、現在当該遺伝子欠損マウスの遺伝的背景を均質化するための戻し交雑により、C57BL/6J および FVB/N 背景を有する *Als2* 欠損系統への純系化を行っている。

### (3) ALS2 蛋白質の分子動態と神経変性機序について

ALS2 の DH/PH ドメインの神経細胞形態における役割を探るため、これが活性化されると思われる Rho 情報伝達の神経系での役割とこのドメイン自身の触媒活性の検討を昨年度に引き続き行った(成宮)。Rho 経路の神経系での役割を解析する目的で、ROCK-I 遺伝子について

targeting を行い、欠損マウスを作製した。当該マウスを解析した結果、ROCK-I が発生期における特定部位での細胞間を結びつけるようなアクチンミオシンリングの形成に関与していることが明らかとなったが、脳神経での異常は観察されなかった(成宮)。また、mDia1 を RNAi でノックダウンすることによりその分子機能を解析した結果、mDia1 が細胞の極性の発現に関与し、また、細胞接着斑の回転の調節を行っていることを明らかにした(成宮)。さらに、Rho family GEF である Ect2 の細胞分裂期における役割を、Ect2 の RNAi および dominant negative 体の発現などにより解析した結果、Ect2 は分裂前期から中期にかけては Cdc42 の調節因子として核分裂に、分裂後期から終期にかけては Rho の調節因子として働くことを明らかにした(成宮)。一方、ALS2 蛋白質に結合する因子を同定するため、ALS2 に特異的なポリクローナル抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、マウス脳組織抽出液から ALS2 蛋白質と共沈する複数の蛋白質因子の同定に成功した(池田)。また、ゲノム解析から ALS2 蛋白質の C 末端領域と高い相同性を示す蛋白質をコードする新規 *ALS2* 相同遺伝子、ALS2 C-terminal like (*ALS2CL*)、の同定に成功した(池田)。さらに、この *ALS2CL* 蛋白質は、低分子量 G 蛋白質 Rab5 と結合することにより、ALS2 が関与するエンドゾーム動態調節を修飾する可能性を示した(池田)。

### D. 考察

*ALS2* 遺伝子は、2001 年に我々の研究グループにより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。しかし、その後の海外の研究グループ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攣性対麻痺(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つの家系から9種類の遺伝子変異が発見され、いずれの遺伝子変異も正常な *ALS2* 蛋白質の翻訳を喪失させるものであることが明らかにされている。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。特に、*ALS2* 遺伝子変異と臨床症状との関連から、*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ものと想定される。

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。本邦においては、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 の直接的原因ではない可能性が高いと考えられた。また、本研究による孤発性 ALS 患者における *ALS2* 遺伝子配列多型の解析により、*ALS2* 遺伝子の多型配列と孤発性 ALS 発症との間には明確な関連は存在しないことが明らかとなった。しかしながら、統計的には有意とは言えないが、有意性が存在する可能性が残される結果であった。実際、今回の結果に関して特定の遺伝子配列多型の頻度の違いが、もし10倍の人数の患者ならびに健常者を解析した際にも観察されれば、明らかに有意な差として証明することができると推定される。したがって、今回の解析レベルでの結果に基づいた場合には、遺伝子型と疾患発症との間に関連があるとは言えないが、その関連性が全く無いと断言できるデータではないと考えられる。近年、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、変異した *SOD1* 蛋白質と *ALS2* 蛋白質が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ている。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ける調節因子である可能性を示唆するものである。よって、今後も例数を増やして解析を継続することにより、*ALS2* 遺伝子が孤発性 ALS の病態発現に関わる可能性についてさらに詳細に検証してゆく必要があるものと思われる。

一方、*ALS2* モデルマウスとしての *Als2* 遺伝子欠損マウスに関しては、当初生後1年以内には発症することを予想していたが、生後1年9ヶ月を経過した現時点においても当該マウスは疾患発症には至っていない。遅発性の症状を呈する可能性なども考慮し、今後も継続的に観察および解析をする必要があると考えられる。現時点でマウスが発症していないため、当該マウスの神経変性モデル動物としての妥当性を疑われる可能性も否定できない。しかしながら、現存の F2 マウスの場合にはマウスの遺伝学的背景が一定でないなどの問題もあるため、戻し交配による純系化、およびその他の遺伝子改変マウスとの交配などの検討が必要であると考えられる。さらに、たとえ症状が顕在化しない場合においても、詳細な神経病理学的・生理学的解析を進めることにより、神経細胞における *ALS2* 蛋白質喪失の影響が解明され、それにより疾患の分子病態解析が飛躍的に進行する可能性もある。事実、神経病理学的な予備的解析結果から、24週齢の *Als2* 遺伝子欠損マウス (F2) において活性グリアおよび星状グリア細胞の増加が観察されており、今後の詳細な解析が重要と考えられる。

*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。さらに本年度の研究から、Rho 蛋白質による細胞機能制御について新しい知見を得ることができた。これは、神経細胞形態や機能の制御に通じるものであるが、今後これらの作用と ALS2 蛋白質の機能発現の関連を詰めていくことが必要である。また、本年度は免疫沈降法を用いた解析により、マウスの脳内において ALS2 蛋白質と結合して存在する複数の蛋白質因子の同定に成功した。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、今後のこれら結合因子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可能性が高いと考えられる。そして、最終的には ALS2 遺伝子変異による運動ニューロン機能障害・細胞死の分子メカニズムが解明されることが期待される。

## E. 結論

本研究の遂行により、(1) ALS2 遺伝子が少なくとも本研究で解析した孤発性 ALS 患者群における発症危険因子ではないこと、(2) チュニジア型 *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出に成功したが、ヒトの筋萎縮性側索硬化症様の病態は認められず、単純に ALS モデルとなり得ないこと、(3) Rho 蛋白質による細胞機能制御について新しい知見を得られたこと、(4) ALS2 蛋白質に結合する因子の同定に成功したこと、などの成果が得られた。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。従って、ALS2 遺伝子変異による運動ニューロン機能障害・細胞死も類似の分子メカニズ

ムにより引き起こされている可能性が高い。現在、我々は発症分子メカニズムの全容解明に向けて、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、および作出された *Als2* 遺伝子欠損マウスの行動学的・組織病理学的解析を継続して行っている。今後、このような実験を通して ALS2 蛋白質の分子のおよび個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、本研究により明らかにされた ALS およびその関連運動ニューロン疾患患者における *ALS2* 遺伝子配列の変異・多型の生物学的な意義も解明され、そ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, and Korneluk RG : Inhibition of myogenesis in transgenic mice expressing the human DMPK 3' -UTR. *Hum Mol Genet* 13(6) : 589-600, 2004.

2) Tanaka K, Shouguchi-Miyata J, Miyamoto N, and 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) : 7275-7286, 2004.

3) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki K, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Hadano S, and Ikeda JE : Homo-oligomerization of ALS2

through its unique carboxy-terminal region is essential for the ALS2-associated Rab5 guanine nucleotide exchange activity and its regulatory function on endosome trafficking. *J Biol Chem* 279(37): 38626-38635, 2004.

4) Hadano S, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Kunita R, Yanagisawa Y, Showguchi-Miyata J, Mizumura H, and Ikeda JE : ALS2CL, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of ALS2, binds to Rab5 and modulates endosome dynamics. *FEBS Lett* 575(1-3): 64-70, 2004.

5) Okada Y, Sakai H, Kohiki E, Suga E, Yanagisawa Y, Tanaka K, Hadano S, Osuga H, and Ikeda JE : A Dopamine D4 receptor antagonist attenuates ischemia-induced neuronal cell damage via upregulation of neuronal apoptosis inhibitory protein. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005 (in press).

## 2. 学会発表

1) Kunita R, Hadano S, Otomo A, Mizumura H, Okada T, Suzuki K, Narumiya S, and Ikeda JE : The DH/PH domain of ALS2 strongly enhances the C-terminal MORN/VPS9 domain-mediated endosome fusions. *Keystone Symposia, Traffic control: Rab GTPases in Vesicular Transport (J3)*, Abstract p55(207), Breckenridge/Colorado, USA, 2004.

2) Otomo A, Hadano S, Okada T, Mizumura H, Kunita R, Nishijima H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Kohiki E, Suga E, Yasuda M, Osuga H, Nishimoto T, Narumiya S, and Ikeda JE : Amyotrophic lateral sclerosis type 2 gene encodes protein, ALS2, is a novel guanine nucleotide exchange factor for Rab5

and implicates in endosomal dynamics. *Keystone Symposia, Traffic control: Rab GTPases in Vesicular Transport (J3)*, Abstract p57(215), Breckenridge/Colorado, USA, 2004.

3) Tanaka K, Showguchi-Miyata J, Miyamoto N, and Ikeda JE : The analysis of molecular function of nuclear-cytoplasm shuttling proteins, SLC2A4 and ZNF395, which bind to the novel cis-regulatory element in the human HD gene promoter. *Human Genome Meeting 2004, Programme and Abstract book*, p31 (workshop abstract no: 65)/ p114 (poster no: 269), Berlin, Germany, 2004.

4) Hadano S, Kakuta S, Sudo K, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Suzuki K, Iwakura Y, and Ikeda JE : Towards delineation of the pathogenesis for juvenile recessive motor neuron diseases: Generation and characterization of the *Als2* knockout mice. *Human Genome Meeting 2004, Programme and Abstract book*, p30-31 (workshop abstract no: 64)/ p112 (poster no: 262), Berlin, Germany, 2004.

5) Hadano S, Shiina T, Showguchi-Miyata J, Hashimoto N, Aoki M, Inoko H, Sobue G, and Ikeda JE : Single nucleotide polymorphism analysis of the ALS2 gene and its regulatory region in Japanese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 5 (suppl. 2), 73-74 (P22) (15th International Symposium on ALS/MND, Philadelphia, USA, 2004.

6) 池田穰衛 : 劣性遺伝の運動ニューロン疾患 : ALS2 遺伝子変異と神経細胞死の機序. 第45回日本神経学会総会、シンポジウム3-4 脊髄小脳変性症と運動ニューロン疾患、東京、

2004.

7) 秦野伸二：神経疾患の Mechanism-based Remedy. 東海大学総合医学研究所第7回公開研究報告会、プログラム・要旨パンフレット、東京、2004.

8) 秦野伸二：ALS2 の分子病態解析-ALS2 タンパク質の分子機能およびモデルマウス作製の試み-. 第8回新潟神経内科シンポジウム「ALS の病態と治療」、新潟、2004.

9) Hadano S, Kakuta S, Sudo K, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Suzuki K, Iwakura Y, and Ikeda JE : Generation and characterization of the Als2 knockout mice. 神経化学 43 (2-3)、490 (P2-187)、第47回日本神経化学会(大阪)大会抄録号 (Neuro2004)、大阪、2004.

10) Okada Y, Sakai H, Kohiki E, Suga E, Tanaka K, Hadano S, Osuga H, and Ikeda JE : Antiapoptotic effect of the NAIP up-regulating dopamine receptor ligands. 神経化学 43 (2-3)、361 (OB2-07)、第47回日本神経化学会(大阪)大会抄録号 (Neuro2004)、大阪、2004.

11) 池田穰衛：神経変性の mechanism-based 治療技術の開発：筋萎縮性側索硬化症. 神経化学 43 (2-3)、114、第47回日本神経化学会(大阪)大会抄録号 (Neuro2004)、大阪、2004

12) 岡田義則、酒井治美、古曳英理、須賀恵津子、田中一則、秦野伸二、池田穰衛：NAIP 発現誘導 Dopamine D4 antagonist の抗アポトーシス効果. 戦略的創造科学研究推進事業 (CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM”脳神経科学の最先端 2004”、プログラム講演要旨集 p20 (P24)、東京、2004.

13) 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 活性とエンドゾーム動態調節機能. 戦略的創造科学研究推進事業 (CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM”脳神経科学の最先端 2004”、プログラム講演要旨集 p21 (P25)、東京、2004.

14) 國田竜太、大友麻子、水村光、鈴木(宇都宮)恭子、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、秦野伸二、池田穰衛：ALS2 タンパク質多量体形成の生理的意義. 戦略的創造科学研究推進事業 (CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM”脳神経科学の最先端 2004”、プログラム講演要旨集 p21 (P26)、東京、2004.

15) 秦野伸二、角田茂、須藤カツ子、大友麻子、國田竜太、水村光、鈴木(宇都宮)恭子、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、古曳英理、須賀恵津子、宮本なつき、岩倉洋一郎、池田穰衛：Als2 ノックアウトマウスの作出と解析. 戦略的創造科学研究推進事業 (CREST・SORST) JOINT SYMPOSIUM”脳神経科学の最先端 2004”、プログラム講演要旨集 p22 (P27)、東京、2004.

16) 國田竜太、大友麻子、水村光、鈴木(宇都宮)恭子、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、秦野伸二、池田穰衛：ALS2 タンパク質の多量体形成は、ALS2 による低分子量 G タンパク質 Rab5 活性化および細胞内でのエンドゾーム融合活性に必須である. 第27回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、p998 (3PB-422)、神戸、2004.

17) 鈴木恭子、秦野伸二、大友麻子、國田竜太、水村光、将口(宮田)淳子、柳澤佳子、須賀恵津子、池田穰衛：ALS2 相同遺伝子産物 ALS2CL は新規 ALS2 結合タンパク質である. 第27回

日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集、

p998 (3PB-423)、神戸、2004.

18) 秦野伸二、角田茂、須藤カツ子、大友麻子、  
國田竜太、鈴木(宇都宮)恭子、水村光、将口  
(宮田)淳子、柳澤佳子、宮本なつき、古曳英  
理、須賀恵津子、岩倉洋一郎、池田穰衛：若年  
発症型劣性家族性 ALS 疾患モデル A1s2 遺伝子  
欠損マウスの作出と解析. 第 27 回日本分子  
生物学会年会プログラム・講演要旨集、p998  
(3PB-424)、神戸、2004.

#### 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

## 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  
研究分担者 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

本研究では、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。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の可能性を検討するため、収集した検体を用いて、*ALS2* 遺伝子変異のスクリーニング、および *ALS2* 遺伝子配列多型の同定を行った。97 例の孤発性 ALS (SALS) 検体ならびに 110 例の健常者コントロール検体について解析したところ、アミノ酸置換を伴う 9ヶ所の single nucleotide polymorphism (SNP) を含む、合計 61ヶ所の遺伝子配列多型が検出された。患者群と健常者群における各遺伝子配列多型頻度の相関を統計学的手法により解析した結果、各遺伝子型と疾患との間に関連を見いだすことはできなかった。したがって、*ALS2* 遺伝子は、少なくとも本研究で解析した孤発性 ALS 患者群における主要な発症危険因子ではないと推定された。

### 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 の病態発現にどの程度関与しているかを解析することは、ALS 研究の重要課題のひとつと考えられる。本研究では、*ALS2* 遺伝子変異を有する患者が、本邦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* 遺伝子の遺伝子配列多型が孤発性 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 点に関しての検証を行うことを目的とする。

### 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であるため、家族歴のはっきりしない孤発性 ALS の中に *ALS2* 遺伝子異常により発症する患者が

含まれている可能性がある。本研究では、本邦の孤発性 ALS 患者の DNA と臨床症候を集積するとともに健常者の DNA サンプルを収集し、*ALS2* 遺伝子異常の有無を確認していく。また、家族性 ALS 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 SNP をはじめとする遺伝子配列多型を発見し、直接シーケンス法をはじめとする genotyping によって、この多型が孤発性 ALS 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。具体的に本研究では、*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、患者ならびに健常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。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・解析した 97 例の孤発性 ALS 患者に加えて 110 名の健常者の *ALS2* 遺伝子の全 34 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、アミノ酸置換を伴う 9ヶ所の SNP を含む、合計 61ヶ所の遺伝子配列多型が検出された。これらの遺伝子配列多型における孤発性 ALS の発症および臨床症候への関与の有無を解析するため、孤発性 ALS 患者と健常者の各遺伝子配列多型頻度をカイ 2 乗検定法により統計解析を行った。その結果、いずれの多型においても 5 パーセント未満の危険度での有意性を認めることができなかった。したがって、*ALS2* 遺伝子は、少なくとも本研究で解析した孤発性 ALS 患者群における発症危険因子ではないと推定された。しかしながら、10% 未満の危険度レベルでは有意性を示す多型が複数個観察されたことから、さらに解析数を増やすことにより、有意性を証明できる可能性も残され、*ALS2* 遺伝子多型が ALS 発症に全く無関係であると結論することはできないものと考えられた。

### D. 考察

本研究では、*ALS2* 遺伝子の多型配列と孤発性 ALS 発症との関連性を証明することはでき

なかった。しかしながら、結果の項目でも述べた通り、統計的には有意とは言えないが、有意性が存在する可能性が残される結果であった。実際、今回の結果に関して特定の遺伝子配列多型の頻度の違いが、もし 10 倍の人数の患者ならびに健常者を解析した際にも観察されれば、明らかに有意な差として証明することができるかと推定される。したがって、今回の解析レベルでの結果に基づいた場合には、遺伝子型と疾患発症との間に関連があるとは言えないが、その関連性が全く無いと断言できるデータではないと考えられる。よって、今後も例数を増やして解析を継続することにより、*ALS2* 遺伝子が孤発性 ALS の病態発現に関わる可能性についてさらに詳細に検証すること必要であるものと思われる。

### E. 結論

本邦における孤発性 ALS 患者ならびに健常者の *ALS2* 遺伝子の遺伝子配列多型を解析することにより、*ALS2* 遺伝子が ALS ならびにその関連疾患発症に関与しているか否かに関しての遺伝学的な解析を行った。患者群と健常者群における各遺伝子多型頻度の相関を統計学的手法により解析した結果、各遺伝子型と疾患との間に関連を見いだすことができなかった。したがって、*ALS2* 遺伝子は、少なくとも本研究で解析した孤発性 ALS 患者群における発症危険因子ではないと推定された。

### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Iemura S, Natsume T, Hori S, Kakizuka A, Tanaka K, and Sobue G : Physical and functional interaction between Dorsin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J Biol Chem* 279 (49): 51376-51385, 2004.

2) Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, and Sobue G: Spinal and bulbar muscular atrophy: Ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspective. *J Mol Med* 82 (5): 298-307, 2004.

3) Katsuno M, and Sobue G: Polyglutamine diminishes VEGF: Passage to motor neuron death? *Neuron* 41 (5): 677-679, 2004.

4) Koike H, Misu K, Sugiura S, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Mukai E, Ando Y, Ikeda S, and Sobue G: Pathologic differences between early- and late-onset type I (TTR Met30) familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 63 (1): 129-138, 2004.

5) Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, and Sobue G: Dorsin 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.

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

7) Waranabe H, Fukatsu H, Katsuno M, Sugiura M, Hamada K, Okada Y, Hirayama M, Ishigaki T, and Sobue G : Multiple regional <sup>1</sup>H-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.

## 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

研究分担者 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 *Als2* 遺伝子欠損マウスを加齢させてもヒトの筋萎縮性側索硬化症様の病態は認められず、単純にヒトの疾患モデルとなり得ないことが明らかとなった。

### 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。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

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・選抜し、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。