

プロテアソーム障害による運動ニューロン変性

菊地誠志¹⁾, 辻 幸子¹⁾, 田代 淳¹⁾, 新保和賢¹⁾, 佐々木秀直¹⁾, 森若文雄²⁾, 田代邦雄²⁾

¹⁾北海道大学大学院医学研究科神経内科学

²⁾北海道医療大学心理科学科

研究趣旨

ラット脊髄スライス培養を用いて、プロテアソーム障害が運動ニューロンに及ぼす毒性について検討した。プロテアソーム特異的阻害剤であるラクタシスチンに曝露しプロテアソーム活性を正常の30%程度まで障害させると、運動ニューロンは神経突起の断片化やリン酸化ニューロフィラメントの増加が見られるようになり、72時間後には有意に脱落するが、後角ニューロンでは特に変化は見られなかった。免疫染色では運動ニューロンはカルレチニン、カルビンディンなどのカルシウム結合蛋白は陰性で、細胞内カルシウムキレーターBAPTA-AMの添加で運動ニューロン死は有意に減少したことから、カルシウム動態が運動ニューロンの脆弱性に関与していると考えられた。ラクタシスチン曝露後、脊髄全体としては活性型カスパー3が出現するが運動ニューロンに一致した発現ではなく、汎カスパー3阻害剤z-VAD-fmkでは運動ニューロン保護効果は見られなかったことから、この運動ニューロン死はカスパー3に依存性しない細胞死である可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、神経変性疾患の病態形性においてユビキチン・プロテアソーム系障害が関与している可能性が指摘されている。筋萎縮性側索硬化症（ALS）においても、我々を含めた複数のグループから分散培養系での検討でプロテアソーム障害に対する運動ニューロンの特異的脆弱性の報告があるⁱⁱ。また、後肢初発ALSモデルであるSOD1^{G93A}トランスジェニックマウスで発症直前に腰髄のプロテアソーム活性が局所的に低下するという報告もあるⁱⁱⁱ。しかし、プロテアソーム障害から運動ニューロン死に至る経路の詳細は明らかでなく、スライス培養で運動ニューロ

ンの特異的脆弱性に否定的な報告もでてきている^{iv}。このような背景から、我々はラット脊髄スライス培養を用いて、プロテアソーム障害から運動ニューロン死に至る過程において（1）他のニューロンに比した脆弱性の有無、（2）細胞死の機序について検討をおこなった。

B. 研究方法

生後6日目のSDラットから取り出した脊髄腰膨大を400 μ mにスライスし、2週間培養した。10~11日目にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンに曝露し免疫組織染色などで評価した。

本研究は北海道大学医学部動物実験に関する

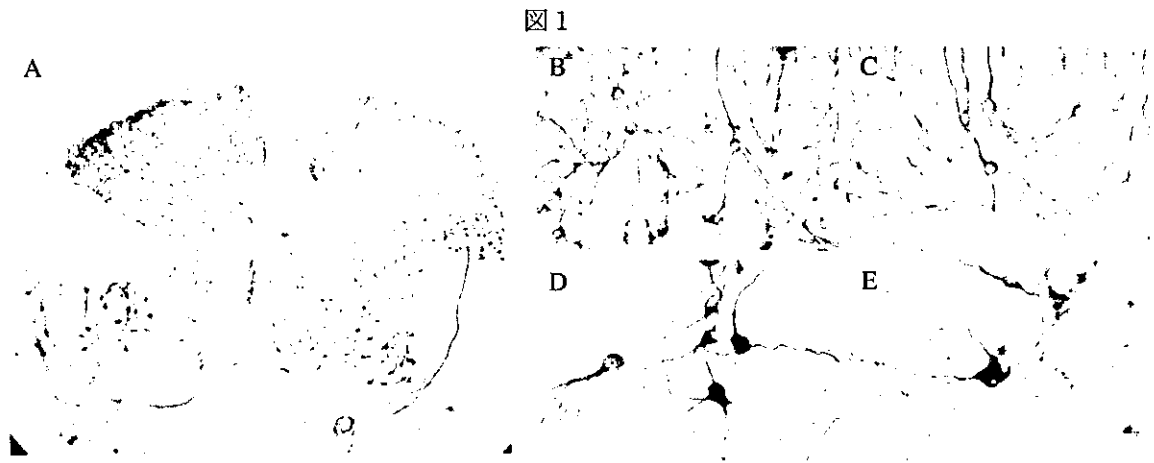


図1
(A) 培養 14 日目コントロールの SMI-32 染色全体像. 前角に運動ニューロンが集簇している. (B) (D) コントロールの強拡大像. (C) (E) ラクタシスチン ($5\mu\text{M}$) 曝露 72 時間後. 前角 (E) では運動ニューロンが著明に変性, 脱落しているが, 後角ニューロン (C) には変化は見られない.

指針に基づいて行った.

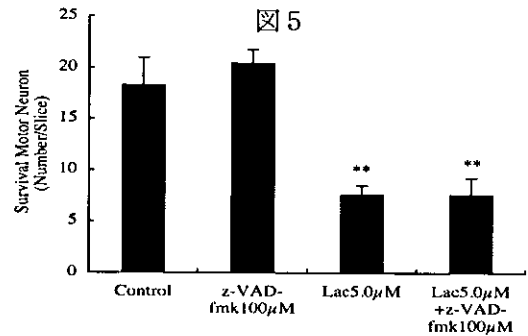
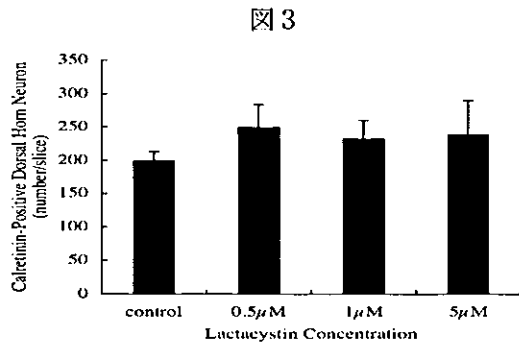
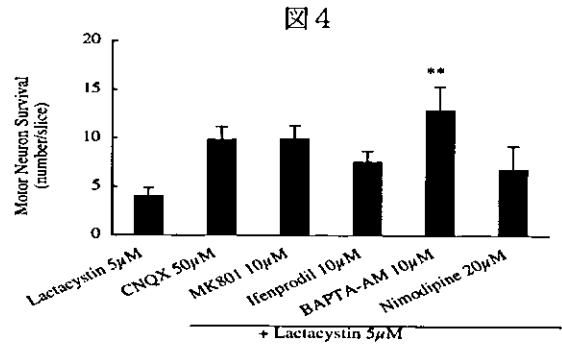
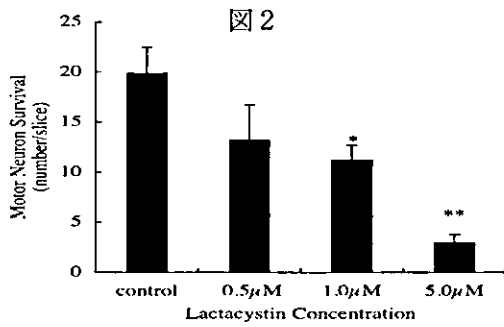
C. 研究結果

ラクタシスチン $5\mu\text{M}$ に曝露するとスライス全体のプロテアソーム活性はコントロールの 30~40%に低下した. 非リン酸化ニューロフィラメント抗体 (SMI-32) で免疫染色すると曝露後約 36 時間から前角運動ニューロンで突起の断片化が見られるようになり, 72 時間では運動ニューロンの脱落が見られたが, 後角ニューロンではこのような変化は見られなかった (図 1, 2). ALS ではリン酸化ニューロフィラメントの増加が出現することから, SMI-32 と抗リン酸化ニューロフィラメント抗体 (SMI-31, -34) との二重染色を行ったところ, 時間とともに二重陽性運動ニューロンが増加した.

ALS で傷害されやすい運動ニューロンはカルシウム結合蛋白の発現が少なくカルシウム緩衝能が低いことが報告されている⁹. 我々の系でも緩衝能の高いカルシウム結合蛋白であるカルビンディン, カルレチニンは運動ニューロンでは

免疫染色で陰性だった. カルレチニン陽性後角細胞はラクタシスチン $5\mu\text{M}$ に曝露しても有意な変化はなかった (図 3, $p>0.05$). 更に, 細胞内カルシウムキレーター-BAPTA-AM をラクタシスチンと同時に添加すると運動ニューロンは有意に保護された (図 4, $p<0.01$).

次に, アポトーシスの関与を調べるため, 活性化型カスパー 3 で免疫染色を行うと, コントロールでは陰性に対し曝露群では脊髓全体に陽性細胞を認め, ウェスタンブロットでも活性化型に相当する 17KD に曝露後 72 時間でバンドが出現した. しかし, SMI-32 との二重染色では活性化型カスパー 3 陽性細胞は運動ニューロンとは一致せず, 運動ニューロンではアポトーシス様の核変化も見られなかった. 更に, 汎カスパー阻害剤 z-VAD-fmk ($100\mu\text{M}$) を添加しても保護効果は見られなかった (図 5) ことから, 運動ニューロン死はカスパー依存性アポトーシスとは異なる機序であることが推察された.



D. 考察

運動ニューロンは特にプロテアソーム障害に脆弱であること、初期には神経突起の変性とニューロフィラメントのリン酸化を伴うこと、カルシウム動態が重要であること、カスベース非依存性細胞死であることを示した。神経変性の過程において様々なカスケードがクロストークしていると思われるが、今回の我々の結果はプロテアソーム障害が運動ニューロンの特異的脆弱性を決める重要な要素である可能性を示している。実際のALS患者ではcytosolic protease活性の変化はないとの報告が1件ある^{vi}のみでプロテアソーム活性について詳細に検討した報告はなく、今後の検討が待たれる。今後、プロテアソーム障害の下流の経路について詳細を明らかにできればALSの病態解明と進行抑制に有用であろうと考えている。

E. 結論

運動ニューロンはプロテアソーム障害に特に脆弱であり、ALSにおいて傷害されるニューロ

ンの選択性に関与している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表 投稿中
2. 学会発表 未

H. 知的財産権の出願、登録状況 なし

-
- ⁱ Kikuchi S, et al. J Neurosci Res 69; 373-381 (2002)
ⁱⁱ Urushitani M, et al. J Neurochem 83; 1030-1042 (2002)
ⁱⁱⁱ Kabashi E, et al. J Neurochem 89; 1325-1335 (2004)
^{iv} Vlug AS, et al.: ALS other motor neuron disorders; 16-21 (2004)
^v Vanselow BK, et al. J Physiol 525; 433-445 (2000)
^{vi} Shaw PJ, et al. J Neurol Sci 139 Supple; 71-75 (1996)

厚生省研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

研究報告書

「筋萎縮性側索硬化症の病因・病態に関わる新規治療法の開発に関する研究班」

『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』

研究協力者 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 発症メカニズムは解明されていない。我々は、FALS 変異 SOD タンパクはわずか 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、これらの mAb との反応性が DTT や熱処理などによって、野生型 SOD タンパクでは増大していくのに対し、FALS 変異 SOD タンパクで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凝集化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。

共同研究者

藤原範子 (兵庫医科大学生化学)、宮本泰豪 (大阪府成人病センター)、高橋素子 (佐賀大学医学部分子生命科学講座 細胞生物学分野)、高宮里奈 (大阪大学大学院医学系研究科生化学)

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、凝集化を起こしやすいことが示唆されている。この凝集体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, および FALS の変異ではない C111S) 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 タンパクは種々の変性処理を行い、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ところ、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 (図 1)。

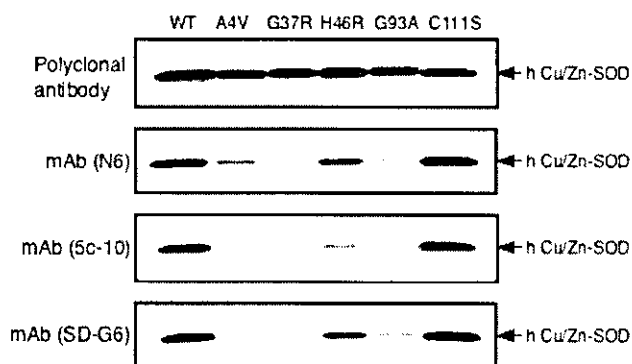


図 1 野生型および変異型 Cu/Zn-SOD のモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析

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 SDS 電気泳動 (ウエスタンブロット) を行う時と同じ変性処理 (2% SDS と 2% 2-ME を加えて加熱) 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。

このウエスタンブロット解析を行う時の処理の中には 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 mAb との反応性が增大していくのに対し、FALS 変異 SOD である A4V、G37R、G93A は逆に減少していくことが明らかになった。緩慢な臨床経過を示す変異で知られる H46R は野生型

のグループに近い傾向が見られた (図2)。

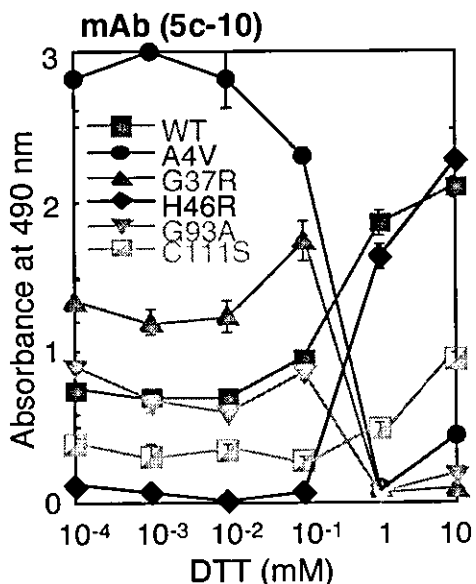


図2 モノクローナル抗体(5c-10)の反応性に対する DTT の影響 (野生型および変異型 Cu/Zn-SOD を種々の濃度の DTT で処理した後 NaHCO₃ バッファー (pH9.6) で希釈し ELISA プレートにコート。mAb 5c-10 で ELISA 解析)

また SDS や熱処理によっても、mAb によって差はあるものの、変性させると WT、C111S のグループは mAb との反応性が増大し、逆に A4V、G37R、G93A は減弱していった。

本実験で用いた mAb が Cu/Zn-SOD のどの部位を認識するかを決定するためにエピトープマッピングを行った。その結果、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、還元や熱などで変性すると、野生型と変異 Cu/Zn-SOD では、この Greek key loop 部分の構造に差異があることを示唆している。なお、3 種類の mAb は、各 SOD タンパクとの反応性が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思われる。

次に変異処理によって SOD タンパク全体の構造がどのように変化するかを円偏光二色性 (CD) 解析にて調べた。まず SOD タンパク質を様々な濃度の DTT で処理したのち遠紫外部の CD 解析を行ったところ、WT と C111S は 1 mM の DTT で少し影響が認められたが、0.5 mM 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、FALS 変異 SOD タンパクは DTT に影響を受けやすく、0.1 mM の DTT 処理で二次構造の変化が認められた。熱や SDS による変性処理に対しても FALS 変異 SOD タンパクは不安定で、H46R と A4V が特に構造変化を起こしやすいことが明らかになった。

D. 考察

FALS 変異 SOD タンパクはわずか 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) を用いたウェ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 mAb との反応性が増加していくのに対し、FALS 変異 SOD タンパクで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、野生型と変異 Cu/Zn-SOD では還元や熱処理などによって、mAb のエピトープ部位である Greek key loop の構造が異なることを示唆している。Greek key loop 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 mAb 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凝集体を作りやすいことが報告されている。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。今後は新たな抗ヒト Cu/Zn-SOD モノクローナル抗体も作製して構造変化の検討を行うことを計画している。特に構造が変化した変異 Cu/Zn-SOD のみを認識する抗体は早期診断法の開発につながる可能性があり、凝集体形成を阻害する抗体を開発できれば ALS の治療への可能性が広がると期待される。

E. 結語

FALS 変異 SOD タンパクはエピトープ部分と離れた場所での 1 アミノ酸置換にもかかわらず、抗ヒト Cu/Zn-SOD モノクローナル抗体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。また還元や熱などで変性させると、野生型と変異 Cu/Zn-SOD ではモノク

ローナル抗体との反応性に違いが出ることを示した。これらの結果はエピトープ部位である Greek key loop の構造変化に差異があることを示唆している。FALS 変異 SOD の構造変化を詳細に検討することは、ALS の発症メカニズム解明や治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fujiwara N., Miyamoto Y., Ogasahara K., Takahashi M., Ikegami T., Takamiya R., Suzuki K. and Taniguchi N.: Different Immunoreactivity against Monoclonal Antibodies between Wild-type and Mutant Copper/Zinc Superoxide Dismutase Linked to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* (2005) **280**, 5061-5070

(2) Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S. Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Gu J., Suzuki K. and Taniguchi N.: Overexpression of Mutated Cu,Zn-SOD in Neuroblastoma Cells Results in Cytoskeletal Change. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2005) **288**, C253-259

2. 学会発表

藤原範子、宮本泰豪、高橋素子、大河原知水、江口裕伸、谷口直之、鈴木敬一郎 (2004) 家族性筋萎縮側索硬化症 (FALS) の原因となる変異 Cu/Zn-スーパーオキシドディスムターゼの構造変化と不安定性. 過酸化脂質・フリーラジカル学会第 28 回大会. 10. 28-29, 名古屋. (過酸化脂質研究, 28, 42, 2004.)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

研究要旨:変異 SOD1 の凝集機構を明らかにするため、凝集を制御する分子として、変異 SOD1 の凝集における遊離脂肪酸の影響を検討した。変異 SOD1 の凝集において、飽和脂肪酸は影響しなかったが、不飽和脂肪酸は変異 SOD1 の凝集を著しく促進した。不飽和脂肪酸と SOD1 の結合は SOD1 のコンフォメーションに大きく依存し、不飽和脂肪酸はコンフォメーションの異常と思われる変異 SOD1 及び apo-SOD1 に特異的に結合した。変異 SOD1 の凝集効率是不飽和脂肪酸との結合と相関しており、不飽和脂肪酸は変異 SOD1 の凝集を促進する分子であると結論付けた。不飽和脂肪酸により作られた変異 SOD1 の凝集物は粒子状の構造をしており、細胞毒性を持つことが示された。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症における凝集体の形成は SOD1 の変異による立体構造の異常が原因として推測されるが、そのメカニズムは明らかではない。コンフォメーション異常のタンパク質の凝集には他のタンパク質、脂質、金属イオン、ラジカルなどの分子が凝集を促進或いは抑制するなど、深い関わりが報告されている。我々は、異常タンパク質の凝集を制御する分子として、遊離脂肪酸に着目し、変異 SOD1 の凝集における不飽和脂肪酸の効果を試験管内で検討した。

B. 研究方法

ヒト SOD1 及びその変異体は大腸菌で発現させ組み換えタンパク質として精製した。SOD1 は銅と亜鉛を含む含金属酵素であり、精製した SOD1 は試験管内で金属イオンを結合させ、holo 酵素として使用した。金属イオンを含まない apo 酵素は SOD1 を酸性溶液に透析し得た。凝集物は SOD1 タンパク質を 37°C で一定時間保温し得た。凝集程度は非還元 SDS-PAGE、グリセロール密度勾配遠心法、電子顕微鏡による検鏡などで測定した。凝集物の細胞毒性は分化させた neuro2a 細胞に凝集物を加え、18 時間培養後、MTS 還元、trypan blue 染色で評価した。

C. 研究結果: SOD1 にアラキドン酸を加え 37°C で 90 分間反応させ、野生 SOD1 と変異 SOD1 の凝集を比較した結果、holo 酵素においては凝集物が観察されなかったが、apo 酵素は変異と関係なく凝集した。アラキドン酸を加えてないコントロールにおいて、凝集物は見られなかった。apo-SOD1 の凝集はアラ

キドン酸の濃度に大きく依存した。また、アラキドン酸だけではなく、オレイン酸、リノレン酸も同様の凝集促進効果がみられたが、飽和脂肪酸であるステアリン酸は効果が見られなかった。アラキドン酸による apo-SOD1 の凝集をグリセロール密度勾配遠心法により確認したところ、およそ 80% 程度の SOD1 が 400kDa 以上の凝集物を形成した。一方、SOD1 の凝集は変異と関係なく、主に apo 酵素において見られる事から、変異が凝集の直接的な原因ではなく、変異によるコンフォメーションの不安定性が凝集に影響すると考えた。holo 酵素を熱処理した後、不飽和脂肪酸により凝集を誘導した結果、変異 SOD1 は著しく凝集したが、野生 SOD1 は変化がなかった。SOD1 と不飽和脂肪酸との結合を解析した結果、apo-SOD1 及び熱処理した変異 SOD1 はオレイン酸と結合したが、holo の野生 SOD1 は結合しなかった。これらの結果から、SOD1 の凝集と不飽和脂肪酸結合はタンパク質分子のコンフォメーションと相関すると考えられた。不飽和脂肪酸による apo-SOD1 の凝集物を電子顕微鏡で観察した結果、粒子状の塊であった。neuro2a 細胞を用いた細胞毒性の実験結果、粒子状凝集物を加えた細胞から著しい細胞死が観察された。

D. 考察

Superoxide dismutase 1 (SOD1) の遺伝子変異が原因である家族性筋萎縮性側索硬化症は、運動ニューロン及びアストロサイトにおいて凝集体が観察されるなど、コンフォメーション病としての特徴を持つ。細胞内の変異 SOD1 の半減期は野生型にくらべ短く、プロテアソームにより分解されると知られており、プ

プロテアソーム活性を抑制すると、変異 SOD1 の凝集体が観察される。これらのことから、病態における凝集形成はコンフォメーション異常の変異 SOD1 がシャペロンやプロテアソームなどのタンパク質品質管理システムの処理能力を上回る結果であり、凝集体形成を促進する物質の関与が推測される。本研究の結果が示す、変異 SOD1 の凝集における不飽和脂肪酸の凝集促進効果および凝集物の細胞毒性は、家族性筋萎縮性側索硬化症の病理機序に不飽和脂肪酸の関与する可能性を提示すると考えられる。

E. 結論

不飽和脂肪酸は変異 SOD1 の凝集を促進する分子であることが示された。その機構は変異 SOD1 の構造的不安定性により不飽和脂肪酸と結合し易くなる性質と相関すると考えられた。さらに、不飽和脂肪酸による変異 SOD1 の凝集体は粒子状の構造を取っており、細胞毒性を持つことが示された。今後、細胞内の変異 SOD1 の凝集における不飽和脂肪酸の役割、産生経路、凝集との相関性及び凝集物の毒性機序を解析することが大きな課題である。

F. 健康危険情報:なし

G 研究発表

1. 論文発表

Urushitani M, et al: J. Neurochem. 90: 231-244 (2004)

Tateno M, et al: Hum Mol Genet. 13: 2183-2196. (2004)

2. 学会発表

高橋良輔:変異 SOD1 による運動ニューロン変性のメカニズム。平成16年度生理学研究所研究会「細胞死の新たな生理機能とそのシグナル伝達」、岡崎 (2004.11.30)

H. 知的財産権の出願・登録状況

とくに予定はない。

ALSにおけるAMPA受容体RNA editing異常の検討

研究協力者 郭 伸 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学

研究要旨: 孤発性ALS脊髄運動ニューロンに特異的に生じている、グルタミン酸受容体サブタイプであるAMPA受容体のGluR2サブユニットQ/R部位におけるRNA編集異常の原因を探るために、RNA編集酵素であるADAR2のmRNA variantをヒト脳で検討した。その結果、ヒトADAR2 mRNAには、48種類のsplicing variantが存在しうることが明らかになった。小脳核分画のウェスタンプロットでは、long C terminusを持つ、2種類の活性型タンパクが発現していた。このlong C terminusを有するタンパクをコードするmRNAは全体の10%以下であり、ADAR2の活性が、RNA splicingの段階で行われている可能性を示している。

A. 研究目的

我々は、グルタミン酸受容体サブタイプであるAMPA受容体のサブユニットGluR2 mRNAのQ/R部位RNA editingがALS患者の脊髄運動ニューロンで選択的に低下していることを明らかにした。この分子変化は孤発性ALSの病因と密接に関わるものなので、その原因を明らかにすることは、特異的治療法の開発にとり重要である。

GluR2 mRNAのQ/R部位RNA editingはRNA編集酵素であるadenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2)により特異的に触媒されるので、この分子変化は、ADAR2の活性低下によると考えられる。ADAR2の活性を規定する因子のひとつに総mRNA量、ADAR2 mRNA対GluR2 mRNA比が明らかにされているが、ADAR2のmRNAには多くのsplicing variantが存在することが知られており、variantにより活性への影響が異なることが考えられる。多数のsplicing variantがどのようにADAR2活性を制御しているかを明らかにすることにより、ALSの特異治療への道が開けると考えられる。

B. 研究方法

凍結保存ヒト剖検脳より抽出したtotal RNAを用いて、様々なプローブ、プライマーペアにより、ADAR2に対するノーザンブロットティング、RT-PCRを行った。また、胎児脳、新生児脳、成人脳を用いて、ヒト大脳、小脳組織より、不連続蔗糖密度勾配法により得た核分画抽出物に対するウェスタンプロットティングを行った。3種の抗ADAR2抗体を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

研究倫理委員会の承認下で実験を行い、剖検組織は文書による承諾を得られた試料を用いた。

C. 研究結果

ADAR2 mRNAには多数のsplicing variantが存在し、今回新たに、1) RNA結合ドメインをコードするexon 2を欠失したvariant (exon 2 skipping)、2) long C terminusをコードするが、exon 9の3'側を欠失したvariant、の2種が無視できない量発現していることを明らかにした。

ヒト小脳核分画のウェスタンプロットティングの結果からは、long C terminusを持つタンパク2種類のみが発現しており、発生、部位による明らかな違いはみられなかった。

ノーザンブロットティングの結果からは、多数のsplicing variantの存在が確認され、long C terminusを持つタンパクに翻訳されるmRNA variantは、全体のmRNAの10%以下にすぎないことが明らかになり、大部分は、不活性型のshort C terminusをコードするか、更にプロセッシングを受けて他のvariantに移行することが明らかになった。

D. 考察

ヒトADAR2遺伝子は10個のexonから成る。ADAR2 mRNAには多くのsplicing variantが存在し、しかも、それぞれの翻訳タンパクの活性が異なるため個々のsplicing variantの発現パターンは酵素活性に反映している可能性が論ぜられている。我々は、ADAR2 mRNAの分析により、新しいsplicing variant 2種を見出し、他のvariantと共に、発生段階、脳部位による発現パターンの違いの有無を検討した。

新たに見出されたvariantのexon 2 skippingは、frameshiftにより下流のexonに新たなストップコドンを生じていることから、活性型タンパクに翻訳されるとは考えにくいsplicing variantである。第2のexon 9に位置するsplicing siteは、long C terminusをコードするストップコドンの83塩基下流に位置する。このsplicing variantはC端に新しいisoformを

もつ活性型 ADAR2 に翻訳されると考えられる。この2種の isoform を加え、理論的には48種の RNA splicing variant が存在すると考えられる。実際にノーザンブロットイング、RT-PCR 法により複数の mRNA がヒト脳に存在することが確かめられた。

とくに C 端には4種の variant があり、long C terminus をコードする2種のみが活性型 ADAR2 に翻訳され、ADAR2 活性制御に主要な役割を持つと考えられる。ヒト小脳の核分画抽出物によるウェスタンブロットイングでは、long C terminus を持つメジャーバンドが2本確認できた。ただし、活性型タンパクに翻訳される splicing variant は10%以下であり、ADAR2 は splicing を通じて活性調節を行っている可能性を示している。

E. 結論

ALS 脊髄運動ニューロンでは、神経細胞死と深く関連している GluR2 Q/R 部位の RNA 編集に関わる ADAR2 の活性調節が、RNA splicing を通じて行われている可能性がある。ALS の神経細胞で、この調節機構がどのような変化を受けているかを解明することは病因の解明・特異的治療法開発につながると考えられる。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Ito M, Kanazawa I, Kwak S: Regulation of glutamate receptor RNA editing and ADAR mRNA expression in developing human normal and Down's syndrome brains. *Dev Brain Res* 148 : 151-155, 2004.
2. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Aizawa H, Kanazawa I, Kwak S: RNA editing and death of motor neurons in ALS. *Nature* 427:801, 2004
3. Kawahara Y, Ito K, Sun H, Ito M, Kanazawa I, Kwak S: GluR4c, an alternative splicing isoform of GluR4 is abundantly expressed in adult human brain. *Mol Brain Res* 127 : 150-155, 2004.
4. Kwak S, Kawahara Y: Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in ALS, *J Mol Med*, DOI: 10.1007/s00109-004-0599-z, 2004

他11編

2. 学会発表

1. Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I,

Tsuji S, Kwak S: Selective death of rat spinal motor neurons in vivo by intrathecal kainite infusion: an ALS model by AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *The 15th International Symposium on MND/ALS*, Philadelphia, Dec 2-4, 2004, *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders* 5 (suppl 2) 90, 2004.

2. Kawahara Y, Ito K, Ito M, Tsuji S, Kwak S: New alternative splicing sites of human ADAR2 mRNA: lack of the exon encoding the dsRNA-binding, and multiple C-terminal splice, *the Gordon Research Conference on RNA Editing*, Ventura, California, Jan 23-28, 2005.
3. 河原行郎、郭 伸、伊藤杏子、孫慧、相澤仁志、金澤一郎：ALS 脊髄運動ニューロンにおける GluR2 編集率の特異的低下、第45回日本神経学会総会 12-14 May、2004.
4. 孫慧、河原行郎、伊藤杏子、青木正志、金澤一郎、郭 伸：ALS ラットモデルにおける AMPA 受容体の分子変化と病因との関連、第45回日本神経学会総会、東京、12-14 May、2004.
5. 郭 伸、孫慧、河原行郎、伊藤杏子：AMPA 受容体を介した神経細胞死による ALS モデルラットの開発、第27回日本神経科学・日本神経化学合同大会、大阪、22-24, September 2004、Kwak S, Sun H, Kawahara Y, Ito K: An ALS rat model by AMPA receptor-mediated excitotoxicity, *Neurosci Res* 50(suppl1) S145, 2004.
6. 河原行郎、伊藤杏子、孫慧、郭 伸：成人脳に高発現する GluR4 サブユニットの新規選択的スプライシングアイソフォーム、第27回日本神経科学・日本神経化学合同大会、大阪、22-24, September 2004, Kawahara Y, Ito K, Sun H, Ito M, Kanazawa I, Kwak S: GluR4c, an alternative splicing isoform of GluR4 is abundantly expressed in adult human brain, *Neurosci Res* 50(suppl1) S74.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

食品成分カルニチンによるミトコンドリアの保護と筋萎縮性側索硬化症の治療

吉良幸美 井上正康

研究要旨 FALS 変異 SOD は、活性酸素産生の主座であるミトコンドリア及びペルオキシソーム膜への親和性が低下し、ミトコンドリア局所での酸化障害が誘起されこれが FALS の病態発症要因になることを検証してきた。FALS モデルマウス（G93A-SOD1 トランスジェニックマウス）ではミトコンドリア障害がみられ FALS 病態にミトコンドリア障害が関与していることが明らかになった。また、ミトコンドリア膜保護作用を有するカルニチンには本病態マウスの神経・筋機能を保護し、寿命延長効果があった。カルニチンは病態発症後においても同様の効果を示すことより FALS 及び ALS の治療薬として有用であることが示唆された。

研究協力者：井上正康 大阪市立大学大学院
医学研究科分子病態学講座教授

共同研究者：吉良幸美 大阪市立大学医学部
共同研究室

細胞死には、長鎖遊離脂肪酸が関与していること及び長鎖脂肪酸の毒性はカルニチンにより抑制される事が判明した。本研究では FALS 病態発症におけるミトコンドリア障害の関与とカルニチンによる治療効果に注目し検討した。

A. 研究目的

FALS の発症に Cu/Zn-SOD (SOD1)の点突然変異が関与することが判明したが、その病態発症の分子機構及び治療法は確立されていない。我々はこれまで SOD1 の細胞内局在と酸化障害の関係に注目し正常 SOD1 がミトコンドリアやペルオキシソームなどに濃縮局在していること、および変異 SOD では両膜への結合性が低下していることを明らかにした。本疾患は他の臓器に比較しミトコンドリア依存性の高い神経や骨格筋が特異的なターゲットとなることから、FALS ではミトコンドリア局所での活性酸素病態が増強し、ミトコンドリア依存性細胞死が誘起されている可能性を示唆した。ミトコンドリア依存性

B. 研究方法

1. FALS Tg の活性酸素産生及び酸化障害の解析：G93A-SOD1 トランスジェニックマウス(FALS Tg)の肝よりミトコンドリアを分離し O_2^- 反応性の高感度プローブ L-012 を用いて O_2^- 産生を解析した。また、同時期の脊椎及び筋肉の細胞障害を解析した。

2. mtDNA 障害の解析：FALS Tg の脊髄及び筋より DNA を抽出し、ミトコンドリア遺伝子を PCR により増幅後 Direct Sequence によりミトコンドリア DNA (mtDNA)の変異を解析した。

3. カルニチンによる治療効果の解析：
FALS Tg の病態発症前後よりカルニチン (60

mg/kg/day) を与え運動能力、発症時期、寿命に対する影響及び筋細胞死の抑制効果を生化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

動物の扱いに関しては、本学動物実験規定に従った。

C. 研究結果

(1) FALS Tg の活性酸素産生及び酸化障害

Normal 及び発症後の Tg 肝より分離したミトコンドリアからの O_2^- 産生を化学発光法により比較したところ、Tg は Normal に比較し O_2^- 産生が亢進していた。また、発症後の脊椎と筋の脂質過酸化が亢進し FALS Tg の脊椎や筋ではミトコンドリア依存性の細胞障害が誘起されている可能性が示唆された。

(2) FALS Tg の mtDNA 変異

Normal 及び FALS Tg (発症後末期) の脊椎および筋の mtDNA 変異を解析した結果、FALS Tg は Control に比較し mtDNA 変異が加速していた。

(3) カルニチンの治療効果

G93A FALS Tg の病態発症前後よりカルニチン投与を行い治療効果を検討した結果、発症前投与群では発症が約 1 ヶ月遅延し、約 1 ヶ月の延命効果が、発症後治療群では約 2 週間前後の延命効果が認められた。また、カルニチン治療群では筋細胞のアポトーシスや酸化障害の抑制効果が認められた。

D, E. 考察及び結論

FALS 患者で見られた変異部位は SOD 分子の立体構造に影響する特性が強く、変異 SOD1 の多くは分子構造特性が変化していることが示唆される。SOD による O_2^- の細胞

内消去反応は拡散律速で起こらなければならない。したがって、SOD1 が活性酸素産生の主座であるミトコンドリアやペルオキシゾーム膜表面に結合局在化していることは極めて重要である。これにより、両オルガネラから細胞質側にリークしてくる O_2^- をその膜表面で効率良く消去していると考えられる。変異 SOD1 はこれらへの結合能が低下していることより、その局在性変化が細胞内 O_2^- の消去不全を誘起し、活性酸素傷害が蓄積しうる可能性が示唆された。実際、FALS モデルマウスのミトコンドリアからは O_2^- 産生の亢進が見られ、mtDNA 変異も加速していることからミトコンドリア障害が病態発症と密接な関わりを持つことが示唆された。ミトコンドリア依存性細胞死には長鎖遊離脂肪酸による膜毒性が関与していることおよびこの長鎖脂肪酸の膜毒性を抑制するカルニチンが神経細胞死を抑制しうるということが判明した。カルニチンが FALS の治療薬として有用か否かを FALS Tg の病態発症前後に投与し検討した結果、発症前でも発症後でもカルニチンによる寿命延長効果及び運動機能低下抑制効果がみられた。本所見は、家族性および孤初性 ALS の治療薬としてカルニチンが有効であり、カルニチンのようなミトコンドリア保護剤を用いた治療法を試みる意義があることを示唆する。カルニチンは食品成分として副作用が少ない事が予想されるが、既存の治療薬との併用に問題がないかまた、他のミトコンドリア保護作用を持つ薬剤との併用により効果を増大させることが可能かどうか等の検討を行う必要がある。

F. 健康危機情報：特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kira Y, Sato E et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 399 : 96-102, 2002.
2. Chang B J, Nishikawa M et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 405 : 55-64, 2002.
3. Nishikawa M, Nishiguchi S et al., *Cancer Research.* 61: 1843-1845, 2001.
4. Inoue M, Sato E et al., *Free Rad. Res.* 33: 757-770, 2001.
5. Nishikimi A, Kira Y et al, *Biochem J.* 356: 621-626, 2001.

2. 学会発表

1. 吉良幸美. 筋萎縮性側索硬化症におけるミトコンドリア障害の解析及びカルニチンによる治療効果の検討. 第 24 回日本フリーラジカル学会 (2002 年 5 月, 大阪)
2. Kira Y et al, Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. 第 77 回日本生化学会 (2003 年 10 月, 横浜)
3. Kira Y et al. Mitochondrial dysfunction underlies the etiology of muscular dystrophy. 第 77 回日本生化学会 (2004 年 10 月, 横浜)

In vivo 発現調節ベクターを応用した神経変性疾患の遺伝子治療

中野今治
自治医科大学神経内科教授

研究要旨

神経変性疾患に対する遺伝子治療として神経細胞や骨格筋へ治療用遺伝子導入を行った場合に導入した遺伝子の過剰発現を防ぐ安全機構として、誘導型Cre/loxP systemを応用したAAVベクター(AAV-CreERT2)を開発した。ラットのパーキンソン病モデルにおいてこのベクターによる発現調節が有効であることを確認した。

共同研究者：

村松慎一、李小剛、奈良優子、古寺美加、滝野直美、
池口邦彦：自治医科大学 神経内科
岡田尚巳、小澤敬也：同 遺伝子治療
一瀬 宏：東京工業大学 生命理工学部
Daniel Metzger, Pierre Chambon : IGBMC

B. 研究方法

Cre recombinase とエストロゲン受容体 α の変異型リガンド結合部位との融合蛋白を発現する AAV ベクター (AAV-CreER^{T2})、Cre recombinase を発現する AAV ベクター (AAV-Cre)、LacZ を発現する AAV ベクター (AAV-LacZ) を作製した。効率よくドパミンを合成するために必要な三種類の酵素、チロシン水酸化酵素 (TH)、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)、GTP cyclohydrolase I (GCH) をそれぞれ発現する AAV ベクターを作製し、このうち TH 発現ベクターでは TH の両側に loxP 配列を挿入した (AAV-floxed TH)。選択的神経毒 6-OHDA によるラットのパーキンソン病モデルの線条体に AAV-floxed TH, AAV-AADC, AAV-GCH を, AAV-Cre, AAV-CreER^{T2} のいずれかとともに注入し, AAV-CreER^{T2} を注入したラットの一部にはさらに 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) を投与した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する遺伝子治療として、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用して骨格筋に神経栄養因子 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の遺伝子を導入し、軸策を通して運ばれた GDNF により脊髄の運動神経細胞の脱落を抑制する方法を開発してきた。従来、ウイルスベクターによる遺伝子治療では、治療用遺伝子をいかに効率よく目的の細胞に導入し、長期間の発現を得るかということが大きな目標となっていたが、AAV を使用することにより、少なくとも神経細胞や筋肉に関する限り問題なくこの技術的な課題を克服できるようになってきている。そこで、臨床応用を視野に入れた次の目標としては、遺伝子発現を調整する機構の開発である。昨年度、試作した誘導型 Cre/loxP system を応用した遺伝子発現を調整可能な AAV ベクターがモデル動物で有効であることを確認する。

C. 考察

遺伝子治療の臨床応用に際して、導入した遺伝子の発現調節が重要な課題となってきている。これまでに、Tet on/off system、Rapamycin system などが開発されている。これらの方法では、遺伝子発現の増強あるいは減弱を得るために tetracycline あるいは Rapamycin といった誘導物質を服用し続ける必要があり、実用的とは言い難い。ALS に対

する骨格筋への GDNF 遺伝子導入では、これまでのマウスの実験においては GDNF の過剰産生による副作用は認められていないが、今後臨床試験を視野に入れた場合、万一過剰となった際に確実に遺伝子発現を抑制できる安全機構を組み入れる必要がある。今回の実験結果では、ラットのパーキンソン病モデル動物において脳内のドパミン産生を誘導的に調整できることが明らかになった。CreER¹² を搭載した AAV ベクターは、過剰発現を防ぐ遺伝子治療用ベクターとして有用である。

E. 結論

誘導型 Cre/loxP system を応用した AAV ベクター(AAV-CreER¹²)による発現調節は、パーキンソン病のモデル動物で有効であり、今後治療用遺伝子の発現抑制機構として有望と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 奈良優子, 村松慎一, 中野今治: ES 細胞による治療. 特集 パーキンソン病 日本臨床, 62(9): 1643-1647, 2004.

2) 中野今治: Parkinson 病の遺伝子治療に向けて. 医学の歩み Vol.208, No.6: 589-595, 2004.

2.. 学会発表

1) Tsuchiya K, Sano M, Shiotsu H, Akiyama H, Watabiki S, Taki K, Kondo H, Nakano I, Ikeda K: Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration mimicking spinal progressive muscular atrophy exists: A additional autopsy case with a clinical course of 19 years. *Neuropathology*. 24: 228-235, 2004.

2) Muramatsu S, Nakayama T, Nara Y, Suzuki Y, Nagata M, Ono F, Kondo Y, Terao K, Tsukada H, Inoue N, and Nakano I: Restoration of dopamine function in a primate model of Parkinson's disease after transplantation of primate ES cell-derived neural stem cells, *Keystone symposium, Keystone*, Jan 26, 2004.

3) Muramatsu S and Nakano I: Cell transplantation and gene therapy; preclinical studies in animal models of Parkinson disease. Nagoya Symposium "Neural transplantation and repair of disturbed brain function",

Nagoya, Feb 21, 2004.

4) 村松慎一, 中山孝, 鈴木豊, 奈良優子, 永田三保子, 近藤靖, 寺尾恵治, 塚田秀夫, 井上順雄, 中野今治: パーキンソン病モデルサルへの ES 細胞由来神経幹細胞の移植. 第 3 回日本再生医療学会, 幕張, 2004 年 3 月 24 日.

5) Muramatsu S, Ono F, Nara Y, Kodera M, Takino N, Tsuchida J, Kawasaki K, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K, Nakano I, and Ozawa K: AAV-vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase restored L-dopa efficacy in a primate bilateral model of Parkinson's disease. *The American society of gene therapy's 7th annual meeting*, Minneapolis, June 3, 2004.

6) Muramatsu S, Li Xg, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Nakano I, Ozawa K: A fail-safe system for gene therapy of Parkinson's disease; Application of removable expression cassette to prevent overproduction of dopamine in a rat model. *The American society of gene therapy's 7th annual meeting*, Minneapolis, June 4, 2004.

7) 村松慎一, 李小剛, 古寺美加, 池口邦彦, 岡田尚巳, 浦野扶美, 一瀬宏, Daniel Metzger, Pierre Chambon, 小澤敬也, 中野今治: 誘導的に Cre リコンビナーゼを活性化する AAV ベクターを応用したより安全なパーキンソン病の遺伝子治療の開発. 第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 2004 年 7 月 13 日.

8) Li Xg, Muramatsu S, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Nakano I, and Ozawa K: Inducible reduction of transgene expression as a fail-safe system for gene therapy of neurodegenerative diseases, *The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy*, Tokyo, August 5, 2004.

9) Muramatsu S, Kakiuchi T, Ono F, Kodera M, Nara Y, Takino N, Nishiyama S, Harada N, Fukuyama D, Tsuchida J, Ikeguchi K, Fujimoto K, Terao K, Tsukada H, Nakano I, and Ozawa K: *In Vivo* monitoring of transgene expression in a primate model of Parkinson's disease; Potential application of positron emission tomography in gene therapy, *The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy*, Tokyo, August 5, 2004.

10) Muramatsu S, Nakayama T, Kakiuchi T, Nishiyama S, Harada N, Suzuki Y, Konishi N, Okuno T, Ono F, Nagata M, Nara Y, Takino N, Kodera M, Terao K, Kondo Y, Nito S, Inoue N, Tsukada H, and Nakano I: Transplantation of neural stem cells derived from primate ES cells in a primate model of Parkinson's disease. JMS 21st Century COE Program Nikko International Symposium, Nikko, September 25, 2004.

11) Muramatsu S, Ono F, Nara Y, Kodera M, Takino N, Tsuchida J, Kawasaki K, Ikeguchi K, Fujimoto K, Terao K, Tsukada H, Ozawa K, and Nakano I: AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase restored L-dopa efficacy in a primate model of Parkinson's disease. Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting, San Diego, October 23, 2004.

12) Nara Y, Muramatsu S, Takino N, Kodera M, Shimazaki K, Yamakado M, and Nakano I: Migration into the neurogenic area promotes neuronal differentiation after intraventricular transplantation of neural stem cells derived from embryonic stem cells. Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting, San Diego, October 26, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1) 米国特許申請 No. 10/327,620. Adeno-Associated Virus-Mediated Delivery of GDNF to Skeletal Muscles. 平成 14 年 12 月 19 日申請

2) 米国特許申請 No.10/096,723. Methods of Treating Parkinson's Disease Using Recombinant Adeno-Associated Virus. 平成 13 年 3 月 14 日申請

研究報告書

筋萎縮性側索硬化症の病態における免疫補助分子 CD40 の解析

研究者 佐古田三郎 大阪大学医学部神経機能医学（神経内科）教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は脊髄前角の運動ニューロンが不可逆的進行性に障害される致死性疾患である。近年その病態にシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)の関与が示唆されているがその発現機構については不明な点が多かった。本実験では正常および ALS モデルマウスの SOD-Tg マウスの脊髄組織、培養系を利用し以下のことを明らかにした。正常中枢神経系では免疫補助分子 CD40 は神経細胞にほぼ選択的に発現しているが病的組織においては活性化グリア細胞に高発現が認められた。脊髄の神経-グリア混合培養系で CD40 刺激によりグリア細胞に COX-2 が誘導され運動ニューロン死が誘起された。さらにこの運動ニューロン死は COX-2 阻害剤により有意に軽減された。以上より ALS 脊髄において反応性グリア細胞に高発現する CD40 の下流で COX-2 が誘導され運動ニューロン障害をきたしていることが示唆された。

A. 研究目的

近年アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患の病態に炎症機転が重要な働きをしていることが徐々に明らかにされてきた。我々はこれらの神経変性疾患を免疫・炎症機転から、immuno-inflammatory disease, あるいは neuroinflammatory disease として捉え病態を解析する必要があると考えている。そこで中枢神経系(CNS)における免疫担当細胞ともいべきグリア細胞を基盤とした神経細胞障害機構について焦点をあてそこでの炎症機転の制御に重要な働きをしていると予想される CD40 についてその関与の証明、および炎症機転制御の可能性について探っていくことが目的である。

B. 研究方法

1) 中枢神経系(CNS)細胞での CD40 および炎症関連分子発現の検討

まず CD40 をはじめとした免疫・炎症関連分子の CNS 細胞、および脳、脊髄における発現を mRNA、蛋白レベルで検討した。初代培養神経細胞は胎生 16 日齢(E16)のマウス脳より、アストロサイトは新生仔(P1~2)マウス脳より調製した。ミクログリアは P1~2 より調製した混合グリア細胞から 14 日目に精製した(P1~2+14 DIV)。神経細胞の細胞株としては PC12 を利用した。mRNA の発現は半定量的 RT-PCR を用いて、蛋白の発現はウエスタンブロットを用い、それぞれベータアクチンを内部標準として定量した。次に正常状態および病的状態での脳、脊髄組織における発現を正常マウス、脊髄損傷モデルマウス、ALS モデルである SOD-Tg マウスを利用し免疫組織化学的に検討した。脊髄損傷モデルマウスは 3 ヶ月齢のマウスの下部胸髄をメスで半切し脊髄損傷を作成し反応性グリア細胞での発現をみた。

2) CD40 が CNS で機能していることの証明

CD40 を介して下流で炎症関連分子の発現が制御されていることを細胞培養系を用いて検討した。培養アストロサイト、ミクログリアを抗 CD40 抗体(HM-40-3), IFN- γ , LPS, やそれらの組み合わせで刺激したときの IL-1, TNF- α , NO, COX-2 等の産生を RT-PCR およびウエスタンブロットを用いて検量した。グリア細胞および神経、運動神経細胞の混在する脊髄初代培養系を利用し CD40 が神経細胞死におよぼす影響を神経への直接作用、グリア細胞を介した間接的作用の両面から検討した。脊髄初代培養は E12.5 日齢マウス脊髄をもちいた。

(倫理面への配慮)

本実験で使用したマウスに関しては大阪大学医学部動物実験委員会の審査承認を受けている。

C. 研究結果

1) CNS 細胞での CD40 の発現

CD40 の発現について培養系において神経細胞、アストロサイト、ミクログリアのすべての細胞に mRNA, 蛋白ともに発現していた。神経細胞においては分化にともない発現されることがわかった。ただし培養グリア細胞には分化神経細胞よりも CD40 が高発現していた。次に免疫組織化学的に vivo での発現を検討したところ成熟マウスの正常脳・脊髄では主に神経細胞のみに発現が認められ、特に脊髄組織においては神経細胞のなかでも運動ニューロンと推察される前角の大型神経細胞に高発現が認められた。反応性グリアにおける発現を検討するため外傷モデルを作成したがほぼ全てのミクログリアと多くのアストロサイトに発現誘導されることを

確認した。ALS モデルの SOD-Tg マウス脊髄の反応性グリアにおいても CD40 が高発現していることが確認された。

2) CD40 の CNS における機能の評価

培養系を用いミクログリア、アストロサイトを CD40 の刺激抗体で処理すると TNF- α , iNOS, COX-2 が産生されることを確認した。つぎに ALS の病態への関与が考えられている COX-2 に焦点を絞り CD40 を介して誘導された COX-2 が神経細胞死に関与するかどうかマウス脊髄の混合培養(E12.5 + 11DIV: アストロサイト 45~50%, ミクログリア 1~2%, 神経細胞 45~50%, SMI32+運動ニューロン 2~3%)を利用し検討した。この混合培養細胞を CD40 刺激すると COX-2 がグリア細胞に高発現し、48 時間後に fix 後顕微鏡下に SMI32+運動ニューロンを計数したところ有意に減少していた。同時に COX-2 阻害剤の NS398 を投与するとこの細胞減少は有意に抑制された。CD40 欠失マウス由来の混合培養に CD40 刺激を加えても運動ニューロン死は来さないがこの培養系に正常型グリア細胞を加え同様に刺激すると運動ニューロン死を来し、これは再度 COX-2 阻害剤によって抑制されることが確認された。

D. 考察

CD40 が培養細胞では神経、グリアすべての細胞に発現していること。正常神経系組織では神経細胞に、外傷、神経変性疾患モデルマウスでは反応性グリア細胞に発現していることが確認された。培養グリア細胞を用い CD40 の下流で IL-1, TNF- α , NO, COX-2 等の炎症関連分子

が誘導されることも確認された。COX-2 に関しては神経細胞にも発現しているが免疫組織学的に神経細胞ではなくグリア細胞で CD40 との共発現が認められた。グリアー神経細胞混合培養系において CD40 刺激により運動神経細胞死が誘導されこれは COX-2 阻害剤により抑制され、さらに CD40 欠失培養系では神経細胞死は認められず、正常型グリア細胞を加えた時のみに神経細胞死が誘導された。純神経細胞培養系では同様の刺激で神経細胞死は見られなかった。以上のことを総合すると病的状態においては反応性グリア細胞に CD40 が高発現しその下流で誘導された COX-2 を介した神経細胞死が来されていることが示唆された。

E. 結論

ALS 脊髄において反応性グリア細胞に高発現する CD40 の COX-2 を介した運動ニューロン障害の関与が示唆された

G. 研究発表

1. 論文発表

Inoue K, Fujimura H, Ogawa Y, Satoh T, Shimada K, Sakoda S. Familial amyotrophic lateral sclerosis with a point mutation (G37R) of the superoxide dismutase 1 gene: a clinicopathological study. *ALS and MND* 3: 244-247, 2002

Ken Koguchi, Yuji Nakatsuji, Kei-Ichi Nakayama, Saburo Sakoda. Modulation of astrocyte proliferation by cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. *Glia* 37: 93-104, 2002

Nagano S, Fujii Y, Yamamoto T, Taniyama M, Fukada K, Yanagihara T, Sakoda S. The efficacy of trientine or ascorbate alone compared to that of the combined treatment with these two agents in familial amyotrophic lateral sclerosis model mice. *Exp. Neurol.* 179(2):176-180, 2003

Ken Koguchi, Yuji Nakatsuji, Tatsusada Okuno, Makoto Sawada, Saburo Sakoda. Microglial cell cycle-associated proteins control microglial proliferation in vivo and in vitro and are regulated by GM-CSF and density-dependent inhibition. *Journal of Neuroscience Research* 74 : 898-905, 2003

Sato T, Yamamoto Y, Nakanishi T, Fukada K, Sugai F, Zhou Z, Okuno T, Nagano S, Hirata S, Shimizu A, Sakoda S. Identification of two novel mutation in the Cu/Zn superoxide gene with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 218(1): 79-83, 2004.

Zhou Z, Yamamoto Y, Sugai F, Yoshida K, Kishima Y, Sumi H, Nakamura H, Sakoda S. Hepatoma-derived growth factor is a neurotrophic factor harbored in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 279(26):27320-27326, 2004

Okuno T, Nakatsuji Y, Kumanogoh Y, Koguchi K, Moriya M, Fujimura H, Kikutani H, Sakoda S. Induction of cyclooxygenase-2 in reactive glial cells by the CD40 pathway: relevance to amyotrophic lateral sclerosis. *J. of Neurochem.*