

2005007698

厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業

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

平成15～17年度 総合研究報告書

主任研究者 糸山 泰人
東北大学大学院医学系研究科神経内科
平成18年3月 印刷

目 次

I. 研究者一覧

II. 総合研究報告書

東北大学大学院医学系研究科神経内科

糸山泰人

III. 総合研究報告書（分担研究者）

1. 変異Cu/Zn-SODの構造学的特性と変異Cu/Zn-SOD高発現細胞に関する研究

大阪大学大学院医学系研究科生化学

谷口直之

2. 家族性筋萎縮性側索硬化症における新規ヒトE3ユビキチンリガーゼNEDL1の機能的役割に関する研究

千葉県がんセンター研究所

中川原 章

3. HGFALS治療薬としての可能性

— HGF 広範囲運動ニューロンに対する機能・作用分子機構解析 —

大阪大学医学系研究科分子再生医学

船越 洋

4. 肝細胞増殖因子(HGF)-cMet システムに基づいた筋萎縮性側索硬化症(ALS) ストレスによる運動神経細胞死阻止に関する基盤研究：ヒト剖検例に関する病理組織学的解析

鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設病理部門

加藤信介

5. ALSに対するHGFなどの神経栄養因子を用いた新規治療法の開発

東北大学病院神経内科

青木正志

IV. 資料

1. 平成15年度 総括研究報告書、研究成果に関する一覧およびその刊行物

2. 平成16年度 総括研究報告書、研究成果に関する一覧およびその刊行物

3. 平成17年度 総括研究報告書、研究成果に関する一覧およびその刊行物

研究者一覽

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

研究者一覧

主任研究者	糸山 泰人	東北大学大学院医学系研究科神経内科	教授
分担研究者	谷口 直之	大阪大学大学院医学系研究科生体制御医学生化学	教授
	中川原 章	千葉県がんセンター研究所	所長
	船越 洋	大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻 組織再生医学講座分子組織再生分野	助教授
	加藤 信介	鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経病理	助教授
	青木 正志	東北大学病院神経内科	助手

総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総合研究報告書

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

主任研究者 糸山 泰人

東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学講座神経内科学分野 教授

研究要旨：本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対して肝細胞増殖因子（HGF）を用いた挑戦的治療法を開発することとそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALSの病因研究および治療研究には変異 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD）遺伝子導入 ALS ラットが重要な役割を果たしている。ALS ラットでのニューロン死のメカニズムはまだ十分明らかにされていないが、変異 Cu/Zn SOD 蛋白は極めて構造変化を起こし易く、ユビキチンリガーゼの NEDL1 や TRAP- δ や Dvl-1 と結合しながら細胞の機能を変化させ最終的には細胞死にいたらせるものと考えられる。この ALS ラットに対してヒトリコンビナント HGF の髄腔内持続投与で ALS に対する有効性を示してきたが、今回 ALS への臨床応用を目指し ALS ラットにおける発症後からの HGF の髄腔内持続投与を行ない、対照 ALS ラットに較べ約 1.6 倍の延命効果が認められた。また、抗 HGF 抗体を ALS ラットの髄腔内へ投与し HGF を中和させると病態を悪化させるので、HGF が ALS 病態の進行を抑制していることが示された。また、孤発性 ALS 患者の脊髄での残存運動ニューロンに HGF とその受容体 c-Met が発現していることが明らかにされ、外来性 HGF の投与が孤発性 ALS の病態進行抑制に有効である根拠が示された。この事実は今後の ALS への HGF 治療の臨床応用について大きなステップと考えられる。新規治療法開発の次なる段階としては、齧歯類に較べヒトにより近い霊長類における HGF 投与の安全試験が必要であり、ヒトの前臨床試験に向けて今後の開発研究の進展が期待される。

分担研究者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科
生化学）

中川原 章（千葉県がんセンター
生化学研究部）

船越 洋（大阪大学大学院医学系研究科
分子組織再生学分野）

加藤信介（鳥取大学医学部 神経病理）

青木正志（東北大学病院 神経内科）

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は病因不明の難治性神経筋疾患であり、運動ニューロンの選択的な細胞死が惹起されて、全身の筋萎縮と脱力が進行し、最終的には呼吸筋の麻痺をきたす極めて予後不良な疾患である。本疾患を予防したり、筋萎縮の進行を止める有効な治療法がなく、ALS は神経難病のなかでも最も苛酷な疾患と考えられている。したがって、ALS の病因と病態の解

明を行ない、それを基盤にした新規治療法の開発が世界的に切望されている。ALS の病因と病態は不明であるが、病因論としては Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) が最も重要なものと考えられる。その根拠の一つとして変異 Cu/Zn SOD を導入したトランスジェニックマウスによる ALS モデルが作製され、普遍的に病因研究と治療研究が可能になったことがあげられる。さらに私共は大型の ALS 動物モデルである変異 Cu/Zn SOD 導入トランスジェニックラットを世界に先駆けて完成した。一方、わが国で発見された神経栄養因子である肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor、以下 HGF) は、運動ニューロンに対する強力な保護作用が知られており、私共は遺伝子工学的に ALS マウスにおける HGF の運動ニューロン死に対する抑制効果を明らかにした。本研究の目的は、ALS の臨床応用を目指し、ALS ラットに対して HGF 蛋白の髄腔内投与実験にて有効性を確立するとともに、その有効性の病態機序を明らかにすることである。

B. 研究方法

ALS の新規治療法の開発を目指し ALS ラットに対してヒトリコンビナント HGF 蛋白の髄腔内持続投与による治療効果を明らかにし、ALS に対する HGF の臨床応用を目指して投与用量、投与時期および有効性の機序解明を行う。

その為に、以下の研究を行う。

1) 新規治療法開発の基盤となる ALS Tg ラットにおける神経細胞死の機序解明

① 変異 Cu/Zn SOD は生体内で構造変化を起こし神経細胞傷害を示すことが考え

られている。構造変化を検証する為にヒト Cu/Zn SOD の全アミノ酸の溶媒露出表面積を計算し立体構造を明らかにした。また、精製 Cu/Zn SOD (野生株および各変異蛋白)を 3 種の mAb を用いてウエスタンブロット解析を行った。

② 今まで、神経芽種の cDNA ライブラリーより神経組織特異的に発現する新規ユビキチンリガーゼ NEDL1 を同定してきている。この NEDL1 は正常な Cu/Zn SOD とは結合せず変異 Cu/Zn SOD と強固な結合体を形成し、細胞内封入体に沈着することを確認してきている。そこで NEDL1 に結合する蛋白の検討を two-hybrid 法を利用して相互作用因子、基質同定を行った。また、NEDL1 特異抗体を用いて家族性 ALS 症例や ALS マウスを用いた免疫染色を行った。細胞死における NEDL1 の関与を検討する目的で培養細胞に NEDL1 および p53 の発現ベクター遺伝子導入して 2 週間にわたって形成された colony formation assay を行った。

2) 臨床応用を目指した ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験の完成と HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

HGF の臨床応用を目指して ALS ラットに対する HGF の髄腔内投与実験を行った。G93A Tg ラットの髄腔内にヒトリコンビナント HGF (hr HGF) を浸透圧ポンプ (Alzet Model 2004) を用いて平均発症時期の 115 日齢から hr HGF 200 μ g/匹を持続投与して、死亡するまでの経過を観察した。内因性ラット HGF が ALS 病態に与える影響を検討する為に、内因性 HGF が誘導されてくる週齢から 4 週間、ウサギポリクローナル抗ラット HGF 特異抗体を 5 μ g/体重 (g) 髄腔

内に持続投与し、発症日、死亡日を観察した。

家族性 ALS 患者の脊髄残存前角神経細胞における HGF 及びそのレセプターである c-Met の発現を免疫組織学的に解析した。孤発性 ALS 40 例、変異 Cu/Zn SOD を伴う家族性 ALS 2 家系 5 症例の各脊髄剖検材料を human HGF 抗体と human c-Met 抗体を用いて免疫染色を行った。

3) HGF を用いた将来的な ALS 治療としての再生医療や遺伝子治療の可能性

HGF を用いた再生医療の開発を目的に ALS ラットにおける内在性神経前駆細胞の HGF に対する反応を解析した。ALS Tg に対して hr HGF (総量 100 $\mu\text{g}/\text{匹}$) を 2 週間にわたって髄腔内に持続投与した後、BrdU で標識される新生細胞数を検討した。また、発症後の ALS ラットに対して上皮細胞成長因子 (EGF) および線維芽細胞成長因子 (FGF-2) を同時投与した群と単独投与群での内在性神経前駆細胞の賦活の有無を検討した。

HGF の ALS モデルラットへの髄腔内投与にての臨床的な有効性は示されているが、将来的に ALS 治療として確立する為には髄腔内投与に勝る方法で HGF を安定した量で脊髄の広範囲にわたって発現する必要がある。この目的で HGF 発現遺伝子治療ベクターをアデノ随伴ウイルスベクター (AAV2、AAV4、AAV5) および複製能欠失型単純ヘルペス I 型ウイルスベクター (HSV1) で脊髄での HGF 発現蛋白量を検討した。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は本学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験

指針に従った上で動物愛護面に配慮しかつ利用動物数を極力減らすように務めた。

C 及び D. 研究結果及び考察

1) 新規治療法開発の基盤となる ALS Tg ラットにおける神経細胞死の機序解明

① ALS 変異を起こすアミノ酸の方が起こさないアミノ酸よりも溶媒露出表面積が小さいことを明らかにした。この事実は ALS 変異を起こすアミノ酸が分子内部に埋もれていることを示している。つまり分子内部のアミノ酸が変異することによって Cu/Zn SOD 分子内部にひずみが生じ、蛋白質全体を不安定化させ、グルコースとの反応性の上昇および銅の外れやすさ、そして活性酸素の産生につながると考えられる。

mAb を用いたウエスタンブロット解析では変異 Cu/Zn SOD はほとんど検出されなかった。また、野生型 Cu/Zn SOD 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、変異 Cu/Zn SOD では逆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と蛋白質全体の不安定性には深いつながりがあると考えられる。

② ヒト NEDL1 の全長配列 (1,585 アミノ酸) を同定した。NEDL1 の組織発現は神経組織に特異的であり、細胞内局在は細胞質であった。また、in vitro 再構成系による検討により NEDL1 のユビキチンリガーゼ活性が証明された。酵母 two-hybrid 法

を利用して NEDL1 の相互作用因子の探索を行ったところ、TRAP- δ と Wnt シグナルの重要なシグナル分配因子である Dishevelled-1 (Dvl-1) が相互作用分子として同定された。さらに Dvl-1 は NEDL1 によりユビキチン化を受け分解に導かれることが明らかになった。また、NEDL1 は正常な Cu/Zn SOD とは結合せず、Cu/Zn Cu/Zn SOD 変異体と特異的に結合し、ユビキチン化によるプロテアソーム依存的分解を引き起こした。興味深いことに、それらの結合や分解は Cu/Zn SOD 変異体を引き起こす重症度と相関していた。これらの事実から、NEDL1 は総体的には変異 Cu/Zn SOD などのミスフォールド蛋白を認識する品質管理ユビキチンリガーゼである可能性が示唆されるが、長期的にはこの分解システムに破綻をきたし組織内凝集体の核になると考えられる。NEDL1 が細胞増殖あるいはアポトーシスにどのような機能を担うかを調べるため、培養細胞に NEDL1 を過剰発現させて colony formation assay を行った結果、アポトーシスが誘導された。そこで、細胞のアポトーシス誘導の重要な蛋白質である p53 の関与の有無について H1299 (p53^{-/-}) と SH-SY5Y (野生型 p53) を用いて colony formation assay 法にて検討したところ、NEDL1 による細胞死の誘導は p53 を介した機構であることが明らかになった。NEDL1 が核内において p53 と結合し、その安定化を介してアポトーシスを誘導する機能を有していることは、家族性 ALS における神経細胞死の分子機序を考えるうえで、極めて重要な知見と考えられる。

2) 臨床応用を目指した ALS ラットに対す

る HGF の髄腔内投与実験の完成と HGF の運動ニューロン死の抑制機序の解明

ALS ラットに対して hr HGF の髄腔内持続投与を ALS 発症期から行うことによって、平均死亡は HGF 投与群が 154.3 ± 16.4 日、対照群が 143.25 ± 17.0 日 ($p=0.02323$) と HGF 投与群が対照群より有意に遅延した。発症から死亡までの平均罹病期間が、HGF 投与群が 27.5 ± 11.1 日間、対照群が 16.9 ± 8.17 日間と、HGF 投与群では対照群の 62.7% の増大を示し、発症期の投与によっても HGF が Tg ラットの罹病期間を大幅に延長させることが示された。発症時期からの投与により罹病期間延長効果が得られたことから、臨床において発症後 ALS と診断されてから ALS 患者に HGF を投与開始しても、病態進行への抑制効果が期待できる可能性が示された。このことは、臨床への応用という点に関して注目すべき結果と考える。また、本 ALS モデルラットにおいて運動ニューロン脱落とともに誘導されてくる内因性のラット HGF を抗 HGF 抗体の髄腔内投与によって中和すると、コントロール群に比して抗 HGF 抗体投与群では、より早期に発症する傾向 ($p=0.1843$)、有意に速い進行 ($p=0.0299$)、より早期の死亡が認められ ($p=0.0463$)、病態が悪化することが明らかとなった。すなわち、抗 HGF 抗体投与は ALS 様病態の進行を促進したと考えられた。このことから、HGF が ALS 様病態の進行を遅らせている重要な生理的抑制因子であることが示唆された。

ALS 患者脊髄組織の免疫染色の結果は、発症後約 3 年までの孤発性 ALS 脊髄残存神経細胞の一部には、HGF とその受容体 c-Met が発現していた。しかし、それ以降

の臨床経過の長い孤発性 ALS では経過と共に HGF-c-Met システムが up-regulate している残存神経細胞数は激減していった。これらの免疫染色の結果は ALS での大部分の残存神経細胞は HGF-c-Met システムが破綻するために細胞死に至るが、一部には HGF-c-Met システムを発現して生存する可能性を保っていることが判明した。

以上より、外来性 HGF の供給は生理的な HGF の病態進行抑制作用を強化するという点でヒト ALS に対する理論的かつ有力な新規治療法になり得ると考えられる。

3) HGF を用いた将来的な ALS 治療としての再生医療や遺伝子治療の可能性

これまでに、ALS ラットモデルの脊髄では発症期以前からグリア新生 (gliogenesis) の亢進が認められるとともに、末期には未分化神経前駆細胞も増殖することを報告してきた。HGF 投与によって病期の進行に伴い、BrdU 陽性細胞数が増加し、ALS 病態下で増加しつつある新生細胞をさらに HGF が増加させることが示された。さらには EGF と FGF-2 を同時に髄腔内持続投与することによって発症後の ALS ラットモデルの脊髄での新生細胞をさらに増加させることが示された。今後はより効果的な内在性神経前駆細胞活性化のために至適投与時期と投与量の検討が必要と考えられる。

将来的な HGF を用いた ALS の遺伝子治療におけるベクターとして検討しているアデノ随伴ウイルスベクター (AAV2 と AAV4) と HSV1 を髄腔内へ投与すると広範囲の脊髄レベルにおいて HGF の発現細胞が認められた。これらの HGF 発現ウイルスベクター投与による HGF 蛋白レベル

を測定すると、内因性 HGF レベルの 2~3 倍に上昇することが脊髄注入実験で認められた。さらに期待されることは、髄腔内投与実験においては広範囲の脊髄において HGF 蛋白が発現することが確かめられ将来的に ALS の治療に有用な方法と考えられた。

E. 結論

本研究の目的は神経難病でも最も苛酷な筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対して肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた挑戦的治療法を開発することとそれに関わる基盤研究を進めることにある。ALS の病因として最も重要視されている変異 Cu/Zn SOD による選択的運動ニューロン死のメカニズムはまだ十分明らかにされていないが、変異 Cu/Zn SOD 蛋白は極めて構造変化を起こし易く、ユビキチンリガーゼの NEDL1 や TRAP- δ や Dvl-1 と結合しながら細胞の機能を変化させ最終的には細胞死にいたらせるものと考えられる。今回の治療実験で ALS ラットにおける発症後からの HGF の髄腔内持続投与にて明らかな延命効果が認められた。この事実は今後の ALS の HGF 治療の臨床応用について大きなステップと考えられる。また、抗 HGF 抗体を ALS ラットの髄腔内へ投与し HGF を中和させると病態を悪化させるので、HGF が ALS 病態の進行を抑制していることが示された。また、孤発性 ALS 患者の脊髄での残存運動ニューロンに HGF とその受容体 c-Met が発現していることが明らかにされ、外来性 HGF の投与が ALS の病態進行抑制に有効である根拠が示された。新規治療法開発の次なる段階としてはこれらの結果をふまえ、

齧歯類に較べヒトにより近い霊長類における HGF 投与の安全試験が必要であり、ヒトの前臨床試験に向けて今後の研究進展が期待される。また、将来的な ALS の HGF 治療の新たな投与方法の研究においては、HGF 遺伝子を組み込んだアデノウイルス随伴ベクターや HSV1 ベクターを髄腔内に 1 回投与することにより脊髄内の運動ニューロンに HGF を長期間しかも広範囲に発現することが動物実験で示され、将来的な ALS に対する HGF の治療に希望を与える結果を得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, Okano H. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83: 119-133, 2006
- 2) Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y. Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology* 25: 365-370, 2005
- 3) Kato S, Kato M, Abe K, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E. Rodex system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* 110: 101-112, 2005
- 4) Fujiwara N, Miyamoto Y, Ogasahara K, Takahashi M, Ikegami T, Takamiya R, Suzuki K, Taniguchi N. Different immunoreactivity against monoclonal antibodies between wild-type and mutant Copper/Zinc superoxide dismutase linked to amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 280: 5061-5070, 2005
- 5) Miyazaki K, Fujita T, Ozai T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel E3 Ubiquitin ligase for dishevelled1, targets mutant superoxide dismutase 1. *J Bio Chem* 279: 11327-11335, 2004
- 6) 船越 洋、中村敏一：ALS と神経栄養因子—HGF による新しい治療法開発の可能性—*脳神経* 55(10): 841-845, 2003

2. 学会発表

- 1) Yamagishi S, Katayama T, Imaizumu K, Katoh M, Aoki M, Itoyama Y, Tohyama M. Analysis of L84V SOD1 mutant in SK-N-SH Cells: 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Nov 7-12, 2003
- 2) 割田 仁 ほか、外来性再生誘導因子投与による ALS モデルラット脊髄神経前駆細胞賦活の試み、第 46 回日本神経学会総会 2005.5 鹿児島

- 3) Fujiwara N, Suzuki K Taniguchi N.
Conformational changes in Greek key
loop structure of Cu/Zn-SOD and its
implication in ALS: IRN 2005 The 3rd
Meeting of International Redox
Network, November 9-11, Kyoto,
Japan (Abstract,28).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

総合研究報告書
(分担研究者)

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

（総合）研究報告書

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

『変異 Cu/Zn-SOD の構造学的特性と変異 Cu/Zn-SOD 高発現細胞に関する研究』

分担研究者 谷口直之 大阪大学大学院医学系研究科生化学・教授

研究要旨 家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）のうち、20%は Cu/Zn-スーパーオキシドディスムターゼ（Cu/Zn-SOD）遺伝子（SOD1）の変異が原因であることが証明されているが、ALS 発症メカニズムは解明されていない。ヒト Cu/Zn-SOD を構成するアミノ酸の溶媒露出表面積を計算し、ALS 変異を起こすアミノ酸の方が起こさないアミノ酸よりも表面積が小さいことを明らかにした。これは ALS 変異を起こすアミノ酸が分子内部に存在し、変異すると SOD 分子を不安定にする可能性があることを示唆している。変異 SOD は野生型 SOD よりも糖化を受けやすく、過酸化水素を発生させやすいことを見いだした。また抗ヒト Cu/Zn-SOD モノクローナル抗体（mAb）との反応性が変性処理によって、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。さらに、Cu/Zn-SOD トランスジェニックラットの脳や脊髄をトリスバッファー、NP-40、そして SDS と段階的に溶解していったところ、ALS の病変部位である脊髄や脳幹のみ NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD を検出することができた。これらの結果は、FALS 変異 SOD タンパクは局所的に野生型 SOD タンパクとは異なる構造に変化し、特に ALS の病変部位である脊髄や脳幹でのみ不溶性のタンパクに変化しやすいと考えられる。このような特性を有する変異 Cu/Zn-SOD が神経細胞に発現させた場合どのような影響があるかを調べるために変異 Cu/Zn-SOD および野生型 Cu/Zn-SOD 高発現 Neuro 2a 細胞（N2a）を作製した。変異 Cu/Zn-SOD 高発現細胞は細胞増殖の遅れがあり、その原因として G2/M 期の遅延が認められた。またファロイジンによるアクチンの染色が低下しており、アクチン骨格に異常が生じていることを見いだした。さらにアクチンが直接変異 Cu/Zn-SOD と結合する可能性を示唆するデータを得た。以上の結果は変異 Cu/Zn-SOD は野生型よりも不安定で構造変化や凝集を起こしやすいこと、糖やアクチンと結合しやすいこと、神経細胞の生育に悪影響を及ぼすことを示唆している。

分担研究者

谷口直之（大阪大学大学院医学系研究科生化学）

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）、鈴木敬一郎（兵庫医科大学生化学）

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、現在までに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。そこで全アミノ酸の溶媒露出面積を計算し、FALS 変異を起こすアミノ酸がどのような位置にあるのかを検討した。我々はこれまで変異 Cu/Zn-SOD は野生型 Cu/Zn-SOD に比べプロテアソーム系で分解されやすいこと、銅をはずしやすいことなどを見いだしてきた。つまり変異 Cu/Zn-SOD は不安定であることが予想される。そこで変異 Cu/Zn-SOD とグルコースの反応性の有無を検討した。変異 Cu/Zn-SOD が不安定であるということは、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が、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も用いられることから、変異 Cu/Zn-SOD と野生型 Cu/Zn-SOD 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、種々の変性処理を施した Cu/Zn-SOD タンパクの

二次構造の変化を解析した。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。そこで ALS 症状を引き起こしているトランスジェニックラットから不溶性の変異 Cu/Zn-SOD タンパク質を精製し、その性質を検討した。ALS の運動神経細胞ではニューロフィラメント、チューブリン、アクチン等の細胞骨格系タンパクの異常が報告されている。また細胞周期に関与するタンパク質の異常が報告されており、細胞周期の異常が神経細胞死に関与していることも示唆されている。そこで変異 Cu/Zn-SOD 高発現細胞を用いて変異 Cu/Zn-SOD が細胞周期に影響を与えるかどうかを検討した。

B. 研究方法

[実験 1] ヒト Cu/Zn-SOD の立体構造からすべてのアミノ酸の溶媒露出面積を計算した。

[実験 2] 野生型および変異型 SOD1 遺伝子（WT、A4V、G37R、H46R、G93A、I113T および FALS の変異ではない C111S）の cDNA をバキュロウイルス/昆虫細胞発現系で Cu/Zn-SOD を強制発現させ、精製した。WT、G37R、G93A、I113T を 100 mM のグルコースとともに1週間および2週間インキュベートし、グライケーションの有無を検出する抗ヘキシトールリジン抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。さらに過酸化水素濃度の測定を行った。

[実験 3] 上記[実験 2] と同じく発現、精製した Cu/Zn-SOD（WT、A4V、G37R、H46R、G93A、C111S）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は、Cu/Zn-SOD をリジルエンドペプチダーゼで分解物および合成ペプチドを用いた ELISA にて決定した。

[実験 4] H46R および G93A トランスジェニックラットの脳および脊髄は東北大学大学院医学系研究科神経内科学講座の糸山先生より供与していただいた。この切片をトリスバッファ、NP-40、そして SDS と段階的に溶解して Cu/Zn-SOD を精製し、その性質を検討した。尿素や塩酸グアニジンなども用いて可溶化の実験を行った。

[実験 5] 神経芽細胞 Neuro 2a (N2a) に野生型 (WT) および変異型 Cu/Zn-SOD (G37R、G93A) を高発現させた細胞 (以下、WT 細胞、G37R 細胞、G93A 細胞とする) を作製し、cell growth、cell cycle の検討を行った。細胞骨格系タンパクはファロイジン及び抗チューブリン抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。さらに変異 Cu, Zn-SOD に結合しているタンパクを検索するため、SOD 発現細胞を 1% Nonidet P-40, 1% Triton の入った溶液で可溶化した画分を抗 Cu/Zn-SOD 抗体で免疫沈降を行い、この免疫沈降物の二次元電気泳動を行った。

C. 研究結果

[実験 1] ALS 変異を起こすアミノ酸の方が起こさないアミノ酸よりも溶媒露出表面積が小さいことを明らかにした。

[実験 2] 変異 Cu/Zn-SOD の方が野生型 Cu/Zn-SOD よりも抗ヘキストールリジン抗体と強く反応した。この結果は変異 Cu/Zn-SOD の方が野生型 Cu/Zn-SOD よりもグライケーションを

受けやすいことを示す。また変異 Cu/Zn-SOD の一つである G93A は WT よりも銅をはずしやすく過酸化水素を発生させやすいことを見いだした。

[実験 3] 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。ポリクローナル抗体では、すべての Cu/Zn-SOD が同程度に反応した (図 1)。

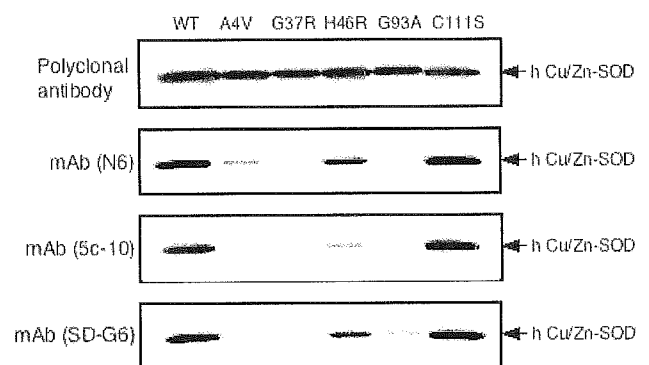


図 1 野生型および変異型 Cu/Zn-SOD のモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析

そこでこの現象を解析するために、精製した Cu/Zn-SOD 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 Cu/Zn-SOD 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。最も大きな差異をもたらしたのは DTT による還元処理であった。種々の濃度の DTT で処理し、ELISA を行った。その結果、1 mM 以上の DTT による還元によって、WT、C111S のグループは mAb (ここでは mAb (5c-10) の結果を示す) との反応性が増大していくのに対し、FALS 変異 Cu/Zn-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)。

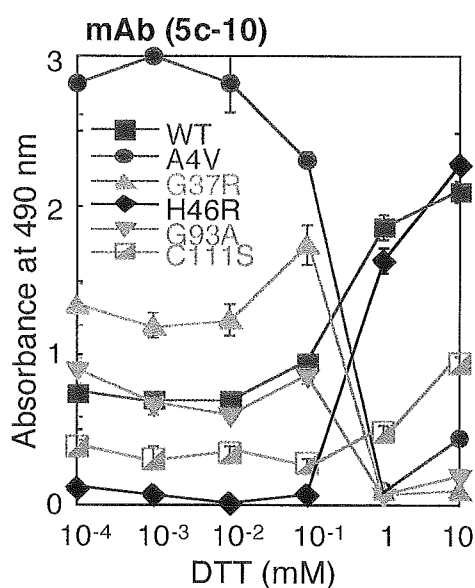


図 2 モノクローナル抗体 (5c-10) の反応性に対する DTT の影響 (野生型および変異型 Cu/Zn-SOD を種々の濃度の DTT で処理した後 NaHCO₃ バッファー (pH9.6) で希釈し ELISA プレートにコート。mAb 5c-10 で ELISA 解析)

さらに還元処理によって Cu/Zn-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 Cu/Zn-SOD

タンパクを様々な濃度の 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。

次に本実験で用いた 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 loop IV (Greek key loop) に相当する部分を認識することがわかった。つまり変性すると野生型と変異 Cu/Zn-SOD では、Greek key loop 部分の構造に差異が生じると考えられる。

[実験 4] H46R および G93A トランスジェニックラットの脳や脊髄から Cu/Zn-SOD を分画したところ、ALS の病変部位である脊髄や脳幹でのみ、NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD を検出することができた。一方、前脳や小脳には NP-40 に溶解する Cu/Zn-SOD は脊髄や脳幹と同量存在していたにもかかわらず NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD は認められなかった。

[実験 5] G37R、G93A の変異 Cu/Zn-SOD 高発現 N2a 細胞を作製した。G37R 細胞と G93A 細胞は両者とも野生型 SOD 高発現細胞に比べて cell growth の遅れが認められた。また、cell cycle の検討を行った所、G37R 細胞と G93A 細胞では G2/M 期の遅延が認められた。FCS (牛胎児血清) を細胞培養液中から取り除くと、WT 細胞ではほとんどの細胞が G0 期に戻るのに対し、変異 SOD 細胞では約 50% の細胞が G2/M 期に残っていた (図 3)。

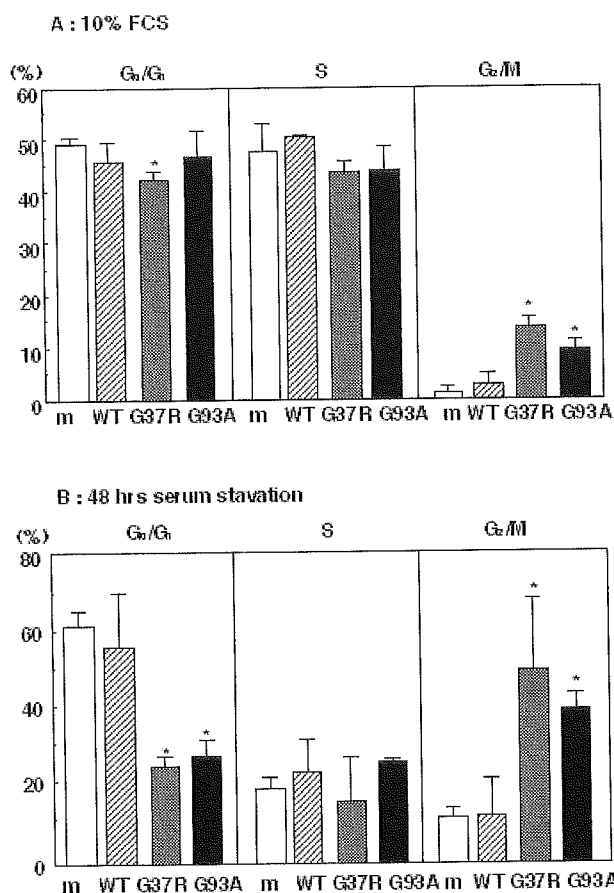


図3 mock、WT、G93A 及び G37R 高発現細胞の細胞周期

G2/M 期の遅延として、細胞骨格系の異常が考えられるため、細胞骨格系タンパクの形態を検討した。その結果、すべての細胞においてチューブリンには変化が認められなかったが、ファロイジン染色を行った所、G37R、G93A 細胞に F-アクチンの異常が認められた。細胞の可溶化画分を抗 Cu/Zn-SOD 抗体で免疫沈降した後に二次元電気泳動をしたところ、40 kDa 付近に G37R 細胞、G93A 細胞ともに WT 細胞では認められないいくつかのスポットが認められた。アクチンの分子量が 43kDa であることから、このスポットのうち一つはアクチンであると考え、抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、WT 細胞の可溶化画分ではア

クチン陽性のスポットは認められなかったが、G37R、G93A 細胞の可溶化画分にはアクチン陽性のスポットが認められた。さらにアクチンが変異 Cu/Zn-SOD と直接結合する可能性を示唆するデータを得た。

D. 考察

ALS 変異を起こすアミノ酸の方が起こさないアミノ酸よりも溶媒露出表面積が小さいことは ALS 変異を起こすアミノ酸が分子内部に埋もれていることを示している。つまり分子内部のアミノ酸が変異することによって SOD 分子内部にひずみが生じ、タンパク質全体を不安定化させる可能性があることを示唆している。この不安定性がグルコースとの反応性の上昇および銅が外れやすさ、そして活性酸素の産生につながると考えられる。

mAb を用いたウエスタンブロット解析では FALS 変異 Cu/Zn-SOD はほとんど検出されなかった。また野生型 Cu/Zn-SOD 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 Cu/Zn-SOD では逆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とタンパク全体の不安定性には深いつながりがあると考えられる。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 Cu/Zn-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 Cu/Zn-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はいくつか報告されてきている。しかし、どのような構造変化が起き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。

以上のような変異 SOD タンパクの特徴が ALS の病変部位で認められる Cu/Zn-SOD 免疫陽性の封入体や凝集体の生成につながると考えられる。しかし、ALS の病変部位である脊髄や脳幹のみ NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD を検出できたことは、変異 Cu/Zn-SOD が生体のどの部位でも凝集を起こしてしまうことではないことを示している。つまり変異 Cu/Zn-SOD が自発的に不溶性になっているのではなく、その病変部位に限られた環境や他の物質が不溶性になるのを助け

ていることが示唆される。ALS の病変部位に特異的な蛋白質のプロテオミクス的な解析が必要であると考えている。

FALS 変異 Cu/Zn-SOD 高発現 N2a 細胞では、cell growth の遅れが見られ、その原因は G2/M 期の遅延によることを明らかにした。また、ファロイジンの染色により G37R, G93A 細胞では、F-アクチン異常が認められた。細胞可溶化画分を抗 Cu/Zn-SOD 抗体で免疫沈降をした後、二次元電気泳動を行った結果、G37R, G93A 細胞では 40 KDa 付近に WT 細胞では認められないいくつかのスポットが確認された。抗アクチン抗体によるウェスタンブロットの結果より、このスポットの一つはアクチンであることを確認した。FALS 患者さんの神経細胞死に細胞骨格の異常が深く関わっているという報告や、細胞骨格タンパクの異常があるという報告がなされてきている。例えば、ニューロフィラメントの凝集が ALS 発症の早い段階で認められること、また変異 Cu/Zn-SOD トランスジェニックマウスを用いた実験では、 β -アクチンの減少が起きていることが報告されている。変異 Cu/Zn-SOD とアクチンとの結合は、変異 Cu/Zn-SOD の凝集とも関わっている可能性もある。この Cu/Zn-SOD の凝集は変異 Cu/Zn-SOD の立体構造変化により引き起こされ、アクチンを含めた他のタンパクとの異常な結合が ALS の原因の一つとなると考えている。Hepatocyte Growth Factor (HGF) は、アクチンを含めた細胞骨格系のタンパクの再構築に有効であることが知られている。HGF を遺伝子導入によってこのアクチンの異常が解消されるかを検討することで、HGF を ALS の治療に用いる有効性についての検討を行いたいと考えている。

E. 結語

ALS 変異を起こすアミノ酸の方が起こさないアミノ酸よりも溶媒露出表面積が小さいことを明らかにした。これは ALS 変異を起こすアミノ酸が分子内部に埋もれており、変異によって SOD の不安定化を招く恐れがあることを示唆している。この変異 SOD の不安定性がグルコースとの反応性の上昇および銅が外れやすさ、そして活性酸素の産生につながる可能性があると考えられる。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明らかにした。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。さらに ALS の病変部位である脊髄や脳幹でのみ、NP-40 不溶性 Cu/Zn-SOD を検出した。変異 Cu/Zn-SOD タンパク質は、これらの病変部位に限られた環境にある物質の助けによって構造変化を起こして不溶化し、封入体を形成することが示唆された。変異 Cu/Zn-SOD を高発現させた細胞には cell growth の遅れ、G2/M 期の遅延と F-アクチンの異常が認められた。抗 Cu/Zn-SOD 抗体を用いた二次元電気泳動より、変異 Cu/Zn-SOD とアクチンが直接結合することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

(2) 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

(3) 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

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