

2005013/2 A

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

上位運動神経優位 ALS の分子病態解明と治療薬の開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 穰衛

平成18(2006)年3月

目 次

研究者一覧	1
I. 総括研究報告	
上位運動神経優位 ALS の分子病態解明と治療薬の開発	
池田 穰衛	4
II. 分担研究報告	
1. 家族性 ALS : SOD1 遺伝子変異陽性および陰性例の臨床病理	
祖父江 元	12
2. ALS2 遺伝子改変マウスの作出	
岩倉 洋一郎	16
3. 臨床的特徴のある変異 SOD 1 遺伝子導入マウスの作製および神経細胞死における封入体の意義の検討	
青木 正志	19
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	27

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 分子神経科学部門	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 細胞機能研究分野	教授
	青木 正志	東北大学大学院医学系研究科 神経内科学	助手

I. 総括研究報告

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）

総括研究報告書

上位運動神経優位 ALS の分子病態解明と治療薬の開発

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（amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は、選択的な上位・下位運動神経変性を病因とする難治性神経疾患である。本研究では、一群の上位運動神経疾患の原因遺伝子である *ALS2* 遺伝子に注目し、個体レベルでの *ALS2* 分子機能解析を軸に、ALS における選択的な運動神経変性の分子機序の解明と治療薬開発、ALS 治療法・治療薬開発の具体化につながる知見と素材を得ることを目的としている。研究初年度である平成 17 年度は、以下のような研究成果が得られた。（1）*Als2* 欠損マウスに由来した初代培養細胞系を用いた解析により、*ALS2* タンパク質機能喪失がエンドゾーム融合の遅延をもたらすことが明らかとなった。（2）*Als2* 遺伝子欠損マウス（ALS2 モデルマウス）の神経病理学的解析を行い、*Als2* 遺伝子欠失が小脳プルキンエ細胞ならびに運動神経軸索の加齢依存的減少をもたらすことが判明した。（3）家族性 ALS 症例について、*SOD1* 遺伝子変異陽性例と陰性例に分け、それぞれの臨床病理像を解析した。（4）巨大な遺伝子を操作を可能にする Cre-loxP システムを利用した発生工学技術を確立した。（5）L84V および H46R 変異 *SOD1* 遺伝子トランスジェニック (Tg) マウスを解析した結果、H48R 変異 Tg マウスが安定した表現型を示し、新規治療法開発のためのモデル系として適していることが明らかとなった。今後、これらの研究成果を基盤として、さらに ALS における選択的な運動神経変性の分子背景についての解析を行い、ALS 治療薬開発への展開の具体化を目指す計画である。

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
青木 正志 東北大学大学院医学系研究科
神経内科学 助手

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、運動神経の機能障害・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 関連運動神経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。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis; ALS）は、上位および下位の運動神経の選択的な変性と筋萎縮を伴う進行性の難治性神経疾患である。長年にわたる研究にも関わらず、未だ ALS 発症の本態は不明である。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。

近年、我々は、上位運動神経変性を主徴とする家族性若年発症型 ALS（ALS2 型）の原因遺伝子（*ALS2*）を発見した（Nat Genet 29:166-173, 2001）。その後、欧米における一連の神経疾患遺伝子解析から、我々が解析した ALS2 型に加えて、*ALS2* 遺伝子は上位運動神経変性を特徴とする一群の運

動神経変性疾患[若年発症型原発性側索硬化症(PLSJ)、痙性対麻痺(HSP/IAHSP)]の原因遺伝子であることが判明した。一方、我々は、*ALS2* 遺伝子産物(ALS2タンパク質)の生化学・分子生物学的解析と *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出ならびに当該個体(F2)レベルでの生体内機能の解析を行ってきた。その結果、ALS2タンパク質が低分子量Gタンパク質Rab5に特異的な guanine nucleotide exchange factor “Rab5GEF”であることを発見した(Hum Mol Genet 12: 1671-1687, 2003)。さらに、ALS2タンパク質は、自らのRab5GEF活性を背景にエンドゾーム動態調節に関わっていること、これら生化学的活性と細胞内局在にはALS2分子同士の複合体形成が必須であることを明らかにした(J Biol Chem 279: 38626-38635, 2004)。*ALS2* 遺伝子変異に起因した運動神経疾患は劣性遺伝形式を示すことから、ALS2タンパク質の機能(Rab5GEF)喪失(loss of function)が上位運動神経変性の分子背景となっており、正常なALS2タンパク質とその分子機能環境が上位運動神経の機能と生存に必須であると考えられる。従って、ALS2タンパク質は、運動神経の機能分化・維持・生存の分子背景に迫る新たな分子プローブであると言える。しかし、ALS2タンパク質の生物機能、即ち上位運動神経の生存および機能維持、上位運動神経細胞内での挙動と役割は未だ不明である。

以上の背景を踏まえ、本研究では一群の上位運動神経疾患の原因遺伝子である *ALS2* 遺伝子に注目し、個体レベルでのALS2分子機能解析を軸に、ALSにおける選択的な運動神経変性の分子機序の解明と治療薬開発、ALS治療法・治療薬開発の具体化につながる知見と素材を得ることを目指す。研究計画は3年間を予定しており、研究初年度である平成17年度は、1) ALS2タンパク質の神経細胞内挙動の解析(池田)。2) *Als2* 遺伝子欠損マウスの神経病理学的解析(池田、岩倉)。3) 家族性ALS: *SOD1* 遺伝子変異陽性および陰性例の臨床病理解析(祖父江)。4) ALSモデルマウスの作出(岩倉、池田)。5) ALSモデルマウスの神経病理解析および神経細胞死における封入体の意義の検討(青木)、の5項目の研究を遂行する。

本研究では、これらの研究を通じて、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

1. ALS2タンパク質の神経細胞内挙動の解析(池田)

第1項目の研究では、各種ALS2発現コンストラクトを培養および初代培養神経細胞に導入し、ALS2分子の細胞内局在ならびに挙動を経時的に観察した。特に、内因性ALS2分子を完全に喪失している *Als2* 欠損マウス(*Als2*-null)由来の細胞を用いて、正常および病変型ALS2タンパク質による細胞内エンドゾーム動態調節機能、および神経細胞機能(生着、移動、棘突起分化、成長円錐、シナプス構造、生存)への効果を詳細に観察した。

2. *Als2* 遺伝子欠損マウスの神経病理学的解析(池田、岩倉)

第2項目の研究では、我々が作出した *Als2* 遺伝子欠損マウス(ALS2分子のほぼ全長を欠失)の行動学的、神経病理学的、および神経生理学的解析を実施した。具体的には、混血F2遺伝的背景(12901a/C57BL6)を有する個体の2年間に渡る体重、運動能力等の経時的観察を行った。また、7ヶ月齢の成体マウスと18-20ヶ月齢の老齢個体の中枢・末梢神経組織全体を対象とした形態学的、免疫組織学的、電気生理学的な比較解析により、ALS2タンパク質機能喪失による神経変性ならびに加齢の影響に関して検討した。本研究は、ロバート・ブラウン教授(ハーバード大学/MGH)の研究協力を得ながら実施した。

3. 家族性ALS: *SOD1* 遺伝子変異陽性および陰性例の臨床病理解析(祖父江)

家族性ALS(FALS)の原因の一部として *SOD1* 遺伝子変異が報告されたのち、多数の遺伝子変異パターンと臨床病理像の記述がなされてきた。それにも関わらず、我が国におけるFALSの全体像

は十分に把握されていない。第3項目に関しては、このような背景を踏まえて、*ALS2*をはじめ新規ALS関連遺伝子と病態との関わりを研究する基礎資料として、*SOD1*変異陽性と陰性例のFALSの臨床病理像を検討し、今後の課題を明らかにすることを目的とした。

4. ALSモデルマウスの作出 (岩倉、池田)

*Als2*遺伝子は34個のエクソンが約75kbにわたって存在する巨大な遺伝子であり、このような遺伝子进行操作するにはCre-loxPシステムを利用した発生工学技術の確立が必要不可欠である。第4項目に関しては、10個の遺伝子が220kbにわたってクラスターを形成しているOAS遺伝子座をモデルとして、Cre-loxP組換えを利用して170kbにおよぶ長大領域欠損マウスの作製を試みた。また近年、*ALS2*分子とALS(*SOD1*)病変型*SOD1*分子との結合が報告されている。そこで、変異型*SOD1*分子が*ALS2*分子機能を障害し、上位および下位運動神経変性を起こす可能性について解析するため、遅延発症型ALSモデルマウス(H46RSOD1マウス:青木)と*Als2*(-/-)(*Als2*-null)マウスを交配することにより、H46RSOD1/*Als2*(-/-)マウスの作出を試みた。

5. ALSモデルマウスの神経病理解析および神経細胞死における封入体の意義の検討 (青木)

第5項目に関しては、家族性ALSにおいて臨床型の異なる2種類のCu/Zn SOD(*SOD1*)遺伝子変異(L84VおよびH46R)を導入したトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、その病態を比較した。また、併せて病的神経細胞に観察される封入体と神経細胞死との関連について、ウエスタンブロット法および免疫組織学的手法により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で計画している全ての遺伝子解析、遺伝子改変実験、動物実験、*Als2*遺伝子改変マウスの交配と系統樹立及び実験材料の採取については、各大学における倫理委員会、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. 神経細胞における*ALS2*タンパク質の発現および細胞内局在

ウエスタンブロット法により、神経系における*ALS2*タンパク質の発現を解析した結果、神経系の発達・成熟過程において、*ALS2*タンパク質の発現は胎児期に低く、生後7-21日後に一過性に上昇し、その後はやや低く保たれることが明らかとなった。培養神経細胞を用いた解析により、*ALS2*タンパク質は、細胞体、樹状突起、ならびに軸索先端のエンドゾーム様膜状構造体に局在することが明らかとなった。

2. *Als2*遺伝子欠損マウスの作出ならびに解析

ヒトALS2型の原因遺伝子産物の生体での分子機能を解明するため、マウス相同遺伝子*Als2*ノックアウト(*Als2*-null)マウスを作出した(Hadano *et al*, Hum Mol Genet, 2006)。24ヶ月齢までの継続的観察により、*Als2*-nullマウスは、発育、生殖機能、ならびに行動学的には顕著な異常表現型を示さないことが判明した。しかしながら、詳細な免疫組織学的・電気生理学的解析により、老齢期において進行性の小脳プルキンエ細胞の脱落、運動神経細胞の機能的ならび形態学的異常が見いだされた。また、老齢*Als2*-nullマウスの神経系において、広範な活性グリアおよび星状グリア細胞の増加が観察された。さらに、細胞学的解析により*Als2*-null由来の細胞においては、エンドゾーム動態の変調が生じていることが明らかとなった。

3. 家族性ALS: *SOD1*遺伝子変異陽性および陰性例の臨床病理

今回我々は、関連施設のFALS症例21家系について*SOD1*遺伝子変異陽性例と陰性例に分け、それぞれの臨床病理像をまとめた。11家系は*SOD1*遺伝子変異陽性であり、変異型ごとの臨床像の多様性と同一家系内での臨床像の多様性が示された。10家系の*SOD1*遺伝子変異陰性家系のうち4家系で剖検例が得られ、孤発性ALSと変わらない病理像を示す古典型と運動ニューロン系の変性

以外に脊髄後索中間根帯、Clerk 柱、Onuf 核などの変性を示す多系統変性型があった。

4. ALSモデルマウスの作出

我々は、ALS2疾患モデルマウスとしてエクソン3を破壊した*Als2*遺伝子欠損マウスを作出した。しかし、*Als2*遺伝子欠損マウスを加齢させてもヒトALS様の症状は認められず、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。一方、*Als2*遺伝子は34個のエクソンが約75kbにわたって存在する巨大な遺伝子であり、このような遺伝子を操作するにはCre-loxPシステムを利用した発生工学技術の確立が必要不可欠である。そこで、220kbにわたるOASクラスター遺伝子座をモデルとして、Cre-loxP組換えを利用した170kbにおよぶ長大領域欠損マウスの作製を試み、樹立に成功した。また、遺伝的背景のばらつきによる因子を排除したよる精緻な解析を行うため、10世代の戻し交配により樹立した2系統の純系*Als2*欠損マウス (C57/BL6JおよびFVB/N) を樹立した。現在、純系*Als2*遺伝子欠損マウスと遅延発症型ALSモデルマウス (H46RSOD1マウス) との交配を継続し、H46RSOD1/*Als2*(-/-) マウスの作出を行っている。

5. 臨床的特徴のある変異*SOD1*遺伝子導入マウスの作製および神経細胞死における封入体の意義の検討

家族性ALSにおいて臨床型の異なる2種類の変異*SOD1*遺伝子 (L84VおよびH46R) を導入したTgマウスを作製し、その病態を比較した。これらのマウスはヒト家系における変異による経過の違いおよび病型をよく再現していた。特にH46RSOD1マウスは表現型が安定しており、新規治療法開発のための遺伝子導入や薬物評価に適していると考えられた。また、変異*SOD1* 蛋白発現量の異なるTgマウス系統における封入体の頻度と症状経過を比較し、封入体が細胞傷害性に働いていないことを明らかにした。さらに、封入体において活性化型Caspase12反応性が認められることから、この封入体が小胞体ストレスからの細胞死へのシグナルと何らかの関連を持ち、これを抑制するこ

とで細胞保護性に働いている可能性が示唆された。

D. 考察

本研究において注目する*ALS2* 遺伝子は、当初家族性ALS2型の原因遺伝子として発見されたが、その後の解析によりあるタイプの家族性原発性側索硬化症および痙性対麻痺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10家系から10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* タンパク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。従って、患者においては、正常な*ALS2* タンパク質の翻訳、ならびに*ALS2* タンパク質の本来発揮すべき機能が損なわれ、それにより運動神経細胞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神経細胞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。

本研究では、ヒトALS2型の原因遺伝子産物の生体での分子機能を解明するため、マウス相同遺伝子*Als2* ノックアウト (*Als2*-null) マウスを作出した。24ヶ月齢までの継続的観察により、*Als2*-null マウスは、発育、生殖機能、ならびに行動学的には顕著な異常表現型を示さないことが判明した。しかしながら、詳細な免疫組織学的・電気生理学的解析により、老齢期において進行性の小脳プルキンエ細胞の脱落、運動神経細胞の機能的ならび形態学的異常が見いだされた。さらに、細胞学的解析により*Als2*-null由来の細胞においては、エンドゾーム動態の変調が生じていることが明らかとなった。マウスにおいて、*ALS2* タンパク質の機能的喪失がヒトにおいてみられる様な重篤な疾患症状を呈しない理由に関しては現時点では明確でないが、当該マウスは*ALS2* タンパク質の生体内での生理機能を解明する上での重要な実験系を供給するものと考えられた。本実験の問題点として、解析に使用したマウスが

混血型 *Als2* 遺伝子欠損マウス (12901a/C57BL6 F2) であったため、個体間の遺伝的背景のばらつきが大きく、そのため解析の精度が低下したことが挙げられる。この問題点を解決し、遺伝学的背景のばらつきによる因子を排除したより精緻な解析を行うため、本研究ではさらに、10 世代の戻し交配により 2 系統の異なった遺伝的背景を有する純系 *Als2* 欠損マウス (C57/BL6J および FVB/N) を樹立した。今後、これらのマウスの行動学的、神経病理学的解析を行うことにより、遺伝的背景の違いによる *Als2* 遺伝子欠損の影響を個体レベルで解明できることが期待される。

一方、近年、*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 タンパク質が変異した *SOD1* 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との報告がある。このことは、*ALS2* 遺伝子産物が、運動神経疾患の発症過程においての調節因子である可能性を示唆するものである。本研究では、ALS (*SOD1*) マウスと *Als2* 遺伝子欠損マウスとの交配による *Als2* 遺伝子欠損 ALS マウスを作出し、ALS2 タンパク質機能障害と病変型 *SOD1* による運動神経変性との相関についての解析に着手した。現在は、得られた純系 *Als2* 遺伝子欠損マウスと病状の表現型が安定している遅発性 H46RSOD1 マウスとの交配を継続しており、研究は順調に進捗している。今後の解析により、ALS 発症に関連した異なった遺伝子間の相互作用および神経細胞死との関連についての分子基盤が明らかにされることが期待される。

本研究は、最終的には ALS 治療薬開発への展開を目指すものである。この目的を達成するため、神経細胞アポトーシス抑制因子を選択的に発現誘導する新規低分子化合物を用いて ALS (*SOD1*) マウスへの治療効果と神経病理学的解析も併せて行う計画である。我々は、ALS (*SOD1*) マウスへの当該低分子化合物経口投与実験系を確立しており、今後これらの手技ならびにこれまでに作出してきた ALS モデルマウスを用いて、薬効 (発症遅延、症候軽減、延命効果) についての詳細な観察と神経病理学的な解析を行う計画である。

E. 結論

本研究の遂行により、(1) ALS2 タンパク質機能喪失がエンドゾーム融合の遅延をもたらすこと、(2) *Als2* 遺伝子欠失が小脳プルキンエ細胞ならびに運動神経軸索の加齢依存的減少をもたらすこと、(3) 家族性 ALS 症例について、*SOD1* 遺伝子変異陽性例と陰性例に分け、それぞれの臨床病理像を解析したこと、(4) 巨大な遺伝子を操作を可能にする Cre-loxP システムを利用した発生工学技術を確立したこと、(5) H48R 変異 Tg マウスが安定した表現型を示し、新規治療法開発のためのモデル系として適していること、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ことから、*ALS2* 遺伝子変異による運動神経細胞機能障害・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。今後の研究により、ALS2 タンパク質の分子のおよび個体レベルでの機能が明らかにされ、ALS およびその関連運動神経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) Hadano S, Benn SC, Kakuta S, Otomo A, Sudo K, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Shefner JM, Cox GA, Iwakura Y, Brown RH Jr, and Ikeda JE: Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet* 15: 233-250, 2006.

2) Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Suga E, and Ikeda JE: ALS2CL, a novel ALS2 interacting protein, modulates the ALS2-mediated endosomal dynamics. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 6 (suppl 1): 22, 2005.

3) Hadano S and Ikeda JE: Purification and functional analyses of ALS2 and its homologue. *Methods in Enzymology* vol. 403, GTPases Regulating Membrane Targeting and Fusion (Edited by William E. Balch, Channing J. Der, and Alan Hall), Elsevier Inc., San Diego/California, USA, p310-321, 2005.

4) 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* 25: 794-806, 2005.

5) 秦野伸二：筋萎縮性側索硬化症原因遺伝子、予防医学事典（松島綱治、酒井敏行、石川昌、稲寺秀邦 編）、朝倉書店、東京、p251-253、2005.

2. 学会発表

1) Hadano S: ALS2CL, a novel ALS2 interacting

protein, modulates the ALS2-mediated endosomal dynamics. 16th International Symposium on ALS/MND, Dublin, Ireland, 2005.

2) Hadano S, Benn SC, Kakuta S, Otomo A, Sudo K, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Shefner JM, Cox GA, Iwakura Y, Brown RH Jr, and Ikeda JE: Mice deficient in ALS2 exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. A Genetics Society of America MEETING; GENETIC ANALYSIS: Model Organisms to Human Biology, Program and Abstracts, p82 (164A), San Diego/California, USA, 2006.

3) Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Suga E, and Ikeda JE: ALS2CL, a novel ALS2 homologous protein, interacts with ALS2: A possible functional modulator for ALS2. *神経化学* 44、198 (P1-060)、第48回日本神経化学会（福岡）大会抄録号、福岡、2005.

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

家族性 ALS：SOD1 遺伝子変異陽性および陰性例の臨床病理

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

家族性 ALS (FALS) の原因の一部として *SOD1* 遺伝子変異が報告されたのち、多数の遺伝子変異パターンと臨床病理像の記述がなされてきた。しかしながら我が国における FALS の全体像は十分に把握されていない。今回我々は関連施設の FALS 症例 21 家系について *SOD1* 遺伝子変異陽性例と陰性例に分け、それぞれの臨床病理像をまとめた。11 家系は *SOD1* 遺伝子変異陽性であり、変異型ごとの臨床像の多様性と同一家系内での臨床像の多様性が示された。10 家系の *SOD1* 遺伝子変異陰性家系のうち 4 家系で剖検例が得られ、孤発性 ALS と変わらない病理像を示す古典型と運動ニューロン系の変性以外に脊髄後索中間根帯、Clark 柱、Onuf 核などの変性を示す多系統変性型があった。*ALS2* をはじめ、新規 ALS 関連遺伝子と病態との関わりを研究する基礎資料として、今後さらに多数例で、我が国における FALS の臨床病理像をまとめ、分類することが望まれる。

A. 研究目的

家族性 ALS (FALS) は病理学的に、運動系に限局した変性を示す古典型と運動ニューロン系のみならず後索中間根帯・Clark 柱・脊髄小脳路の変性を伴う多系統変性型があることが 1967 年 Hirano ら¹⁾により示された。その後 1984 年向井らの報告²⁾など我が国の FALS の臨床特徴をまとめる試みがなされた。1993 年優性遺伝性家族性 ALS (ADFALS) の一部で *SOD1* 遺伝子変異が存在することが見出され、我が国においても多数の *SOD1* 遺伝子変異パターンと臨床病理像に関する報告³⁾がなされた。しかしながら我が国の FALS 全体における *SOD1* 遺伝子変異陽性率などの疫学は不明であり、*SOD1* 遺伝子変異陰性 FALS の臨床病理像のまとめも十分におこなわれていない。*ALS2* をはじめとする新規 ALS 関連遺伝子についての臨床および神経病理学的解析を進め、病態解明研究を推進するためにはこれらの基礎的情報が重要である。

以上の背景を踏まえ FALS 症例を *SOD1* 遺伝子変異陽性例と陰性例に分け、臨床病理像を検討し、今後の課題を明らかにすることとした。

B. 研究方法

名古屋大学神経内科および関連施設において診療を行った家族歴を有する ALS 患者 21 家系について、*SOD1* 遺伝子変異の有無を調べ、臨床像、病理像につきまとめた。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析にあたっては名古屋大学医学部倫理委員会の承認を受けた書式および手順に従い、文書による同意を得た。

C. 研究結果

21 家系のうち 11 家系に *SOD1* 遺伝子変異を認められた。*SOD1* 遺伝子変異陽性例、陰性例それぞれの臨床像を表 1 および表 2 に示す。

SOD1 遺伝子変異家系においては、すでに報告されているような変異型ごとの経過年数の違いが認められた。その一方で同じ家系内の症例ごとの臨床像の違いが認められた。Gly93Ser 変異の家系 1 において、症例 A は早期から頭部 MRI にて前頭

表 1 SOD1 遺伝子変異陽性家系の臨床像

家系	mutation	発症者数	発症年齢 (才)	平均経過 (年)	初発部位	深部反射	感覚障害	自律神経障害	痴呆
1	Gly 93 Ser	5	49.6±15.7	8.0±2.6	下肢	低下	+	+	-
2	Gly 93 Ser	2	60.0±14.1	6.0±1.4	下肢	N.S	N.S	N.S	N.S
3	Gly 93 Ser	4	51.8±15.1	7.3±0.5	下肢	低下	-	-	-
4	Gly 93 Ser	3	52.7±17.5	2.0±1.7	下肢	亢進	-	-	-
5	Leu 106 Val	4	43.3±19.6	1.6±0.3	下肢	N.S	N.S	N.S	N.S
6	Leu 106 Val	3	44.0±25.5	1.8±0.4	下肢	亢進	-	-	-
7	Leu 106 Val	4	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S
8	Asn 86 Ser	2	45.5±10.6	2.4±1.6	下肢	低下	-	-	-
9	Cys 146 Arg	4	50.3±7.0	0.5±0.3	下肢	亢進	-	-	-
10	His 46 Arg	3	43.3±3.2	15.3±9.5	下肢	低下	-	-	-
11	His 46 Arg	5	55.8±8.1	16.2±2.7	下肢	低下	-	-	-

表 2 SOD1 遺伝子変異陰性家系の臨床像

家系	発症者数	発症年齢 (才)	平均経過 (年)	初発部位	深部反射	感覚障害	自律神経障害	痴呆
1	2	52	1.3	上肢	正常	-	-	±
2	3	48±5.2	1.6±0.9	下肢	亢進	-	-	-
3	2	65.3±1.8	1.6±0.0	上肢	亢進	-	-	-
4	4	53±21.2	1.3±0.3	下肢	低下	-	-	-
5	4	42.5±11.2	4.6±3.2	上肢	亢進	-	-	-
6	2	41.5±0.7	2.5±0.7	下肢	亢進	-	-	-
7	2	21.5±2.1	30±42	下肢	低下	-	-	-
8	2	54.5±20.5	5.5±3.5	下肢	亢進	-	-	-
9	2	50	10	上肢	低下	+	-	-
10	2	52	2	構音障害	亢進	+	-	-

側頭葉の萎縮を認め、感覚障害や自律神経障害は伴わないのに対して、従兄弟にあたる症例 B では前頭側頭葉の萎縮を認めず、早期から感覚障害を伴った。また Asp86Ser 変異家系の症例 C は両側顔面神経麻痺で発症したのに対して、兄弟にあた

る症例 D は両下肢の脱力で発症した。Gly93Ser 変異家系は 4 家系あったが、いずれも発症年齢が世代を経るごとに早くなる anticipation がみられた。

表3 SOD1 遺伝子変異陰性家系の病理

症例	年齢/ 経過	下位運動 ニューロン 脱落	Bunina 小体	上位運動 ニューロン 脱落	Clarke柱/ 脊髄小脳路/ 後索中間根帯 変性	Onuf核 脱落	側頭葉 皮質変性	型
1	54Y/ 16M	+	+	±	—	—	+	古典型 ALS+ALS-D
2	66Y/ 19M	+	—	+	+	+	—	多系統変性型 ALS
3	55Y/ 31M	+	+	+	—	—	—	古典型 ALS
4	70Y/ 18M	+	±	+	—	—	—	古典型 ALS

SOD1 遺伝子変異陰性例については表3に示すように、4家系において1例ずつ剖検例があった。症例1では Bunina 小体など古典型 ALS に合致する所見ともに側頭葉皮質II層小型神経細胞内に ubiquitin 陽性封入体を認め ALS-D の所見を示した。症例2では上位下位運動ニューロンの変性に加え、後索中間根帯、Clarke 柱、Onuf 核の変性を認め、多系統変性型の病理像を示した。症例3および症例4は孤発性ALSと病理上区別できない古典型 ALS の病理像を示した。

D. 考察

SOD1 遺伝子変異陽性 FALS は mutation ごとの多様性と同一家系内での多様性を示す例が存在し、同一家系内での多様性は SOD1 遺伝子変異以外の modifier が存在することを示すと考えた。より多くの症例での遺伝子型、臨床型関連の解析が望まれる。

SOD1 遺伝子変異陰性 FALS の臨床・病理像は運動ニューロンに変性が限局した古典型ALSと同じ像をとる型と多系統変性型に分けられた。さらに症例を蓄積し、分類をすすめていく必要がある。特に古典型ALSの像を示すFALSは今後孤発性ALS

の病態を解明するうえで重要な手がかりを提供する可能性があり、症例の蓄積と連鎖解析などの遺伝子解析を進めていく必要がある。

E. 結論

- ・ SOD1 遺伝子変異陽性 FALS の多様性について、mutation ごとの違い、同一家系内での違いをそれぞれより多数例で蓄積する必要がある。
- ・ SOD1 遺伝子変異陰性 FALS について、より多くの症例の蓄積と分類が必要である。

(参考文献)

- 1) Hirano A *et al*: *Ann Neurol* 16: 232-243, 1967.
- 2) 向井ら: *神経内科* 20: 140-147, 1984.
- 3) Aoki M *et al*: *Ann Neurol* 37: 676-679, 1995.

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Banno H, Adachi H, Katsuno M, Suzuki K, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, and Sobue G: Mutant androgen receptor accumulation

in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: a pathogenic marker. *Ann Neurol* 59: 520-526, 2005.

2) Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, Doyu M, and Sobue G: Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16801-16806, 2005.

3) Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Sang C, Tanaka F, Inukai A, Doyu M, and Sobue G: 17-AAG, an Hsp90 inhibitor, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration. *Nature Med* 11: 1088-1095, 2005.

4) Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, and Sobue G: Gene

expression profile of motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 57: 236-251, 2005.

5) Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Waza M, Sang C, Nakagomi Y, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A, Yoshida M, Hashizume Y, and Sobue G: Widespread nuclear and cytoplasmic mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain* 128: 659-670, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録
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 遺伝子改変マウスの作出

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細胞機能研究分野 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。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 疾患モデルマウスとしてエクソン 3 を破壊した *Als2* 遺伝子欠損マウスを作出した。しかし *Als2* 遺伝子欠損マウスを加齢させてもヒト ALS 様の症状は認められず、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。一方、*Als2* 遺伝子は 34 個のエクソンが約 75kb にわたって存在する巨大な遺伝子であり、このような遺伝子を操作するには Cre-loxP システムを利用した発生工学技術の確立が必要不可欠である。そこで、220kb にわたる OAS クラスター遺伝子座をモデルとして、Cre-loxP 組換えを利用した 170kb におよぶ長大領域欠損マウスの作製を試み、樹立に成功した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（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目的とした。これまでに、エクソン 3 を破壊した *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出を行った。しかし *Als2* 遺伝子欠損マウスを加齢させてもヒト ALS 様の症状は認められず、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。一方、*Als2* 遺伝子は 34 個のエクソンから構成され、それらが約 75kb にわたって存在する巨大な遺伝子である。このような遺伝子を操作するには Cre-loxP システムを利用した発生工学技術の確立が必要不可欠である。そこで、10 個の遺伝子が 220kb にわたってクラスターを形成している OAS 遺伝子座をモデルとして、Cre-loxP 組換えを利用して 170kb におよぶ長大領域欠損マウスの作製を試みた。

B. 研究方法

Cre-loxP による長大領域欠損モデルとして、まず OAS クラスター遺伝子座の両端に位置する *Oas1d* および *Oas2* 遺伝子に loxP 配列を挿入するように、薬剤耐性遺伝子としてそれぞれ neo 耐性遺伝子・hyg 耐性遺伝子を用いてターゲティングベクターを構築する。まず *Oas1d* ターゲティングベクターをマウス 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 法により同定した後、*Oas2* ターゲティングベクターを用いて同様に相同組換え体を同定する。続いて、C57BL/6 由来の 8 細胞期胚と ES 細胞を共培養する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 *flox* マウスを得る。*flox* マウスの受精卵に Cre 発現プラスミド pCAG-Cre をマイクロインジェクションすることにより loxP 挿入部位で 170kb の組換えを起こさせ、長大領域欠損マウスを得る。

（倫理面への配慮）

OAS クラスター欠損マウスについては東京大学医科学研究所、*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う。

C. 研究結果

Als2 遺伝子欠損マウスの作出に成功したが、12-18ヶ月齢まで加齢させて観察を行っても *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。一方、*Oas1d* ターゲティングベクターを ES 細胞株 E14.1 に導入し、相同組み換え体を 3 クローン同定した。さらにこのクローンに *Oas2* ターゲティングベクターの導入を行い、相同組み換え体を 17 クローン同定した。このうち 2 クローンについてキメラマウス作製を行い、生殖系列キメラを得た。ヘテロ変異マウスと交配により得られた一細胞期胚に Cre 発現プラスミドをマイクロインジェクションしたところ、11 匹の中で 5 匹が 170kb の組み換えを起こしていることを PCR 法およびサザンハイブリダイゼーション法により確認した。

D. 考察

Tunisia 型 *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が認められないことから、(1) マウスには ALS2 の機能を相補する機構が存在する (2) 神経細胞の生存期間と寿命の違いなどの他に、(3) Tunisia 型の変異はマウスでは影響が少ないという可能性も考えられた。そのため、神経細胞に対して刺激または負荷をかけるなどの検討に加えて、*Als2* 遺伝子の様々な遺伝子改変を行うことが必要であると考えられる。また、100kb を超える長大な領域にわたって存在する遺伝子を操作する方法として Cre-loxP システムの利用を試み、*in vivo* で 170kb の組み換えを起こさせることに成功したことから、今後、*Als2* 遺伝子座へ応用することも可能であると考えられる。

E. 結論

Tunisia 型 *Als2* 遺伝子欠損マウスの作出に成功したが、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が明らかとなった。また、疾患モデルの作出にあたり、さらなる改変のための技術として Cre-loxP システムを用いた *in vivo* での長大遺伝子領域の組み換え技術を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hadano S, Benn SC, Kakuta S, Otomo A, Sudo K, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Shefner JM, Cox GA, Iwakura Y, Brown RH Jr, and Ikeda JE: Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet* 15: 233-250, 2006.

2) Matsuki T, Nakae S, Sudo K, Horai R, and Iwakura Y: Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol* 18: 399-407, 2006.

3) Chida D, Imaki T, Suda T, and Iwakura Y: Involvement of CRH- and IL-6-dependent proopiomelanocortin induction in the anterior pituitary during hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by IL-1 α . *Endocrinology* 146: 5496-5502, 2005.

4) Chida D, Osaka T, Hashimoto O, and Iwakura Y: Combined IL-6 and IL-1 deficiency causes obesity in young mice. *Diabetes*, in press.

5) Zhu Y, Saito K, Murakami Y, Asano M, Iwakura Y, and Seishima M: Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interactions in the mouse hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci Lett* **393**: 122-126, 2006.

6) Honore P, Wade CL, Zhong C, Harris RR, Wu C, Ghayur T, Iwakura Y, Decker MW, Faltynek C, Sullivan J, and Jarvis MF: Interleukin- $\alpha\beta$

gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav Brain Res* **167**: 355-364, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

臨床的特徴のある変異 SOD1 遺伝子導入マウスの作製および神経細胞死における封入体の意義の検討

研究分担者 青木 正志

東北大学大学院医学系研究科神経内科 助手

研究要旨

家族性 ALS において臨床型の異なる 2 種類の Cu/Zn SOD (*SOD1*) 遺伝子変異 (L84V および H46R) を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、その病態を比較した。これらのマウスはヒト家系における変異による経過の違いおよび病型をよく再現していた。特に H46R 変異 Tg マウスは表現型が安定しており、新規治療法開発のための遺伝子導入や薬物評価に適していると考えられた。また、変異 SOD1 蛋白発現量の異なる Tg マウス系統における封入体の頻度と症状経過を比較することにより、封入体が細胞傷害性に働いていないことを示した。さらには、封入体において活性型 Caspase12 反応性が認められることから、この封入体が小胞体ストレスからの細胞死へのシグナルとも何らかの関連を持ち、これを抑制することで細胞保護性に働いている可能性が示唆された。

研究協力者

割田 仁、加藤昌昭、石垣あや、神位りえ子、糸山泰人（東北大学大学院医学系研究科）

ている。変異の大部分は点突然変異であり、変異の種類によって臨床経過が異なることが報告されている。

ヒト変異 *SOD1* 遺伝子導入マウス、ラットが作製されており、脊髄前角の運動神経脱落を伴う ALS 様の症状発現を示すことが知られている。このモデル動物では脊髄においてヒト ALS 患者病理像にも認められる Lewy-body like hyaline inclusion の出現を認める。

本研究では *SOD1* 遺伝子変異を伴う家族性 ALS として、臨床経過が著しく早く上肢から発症を認める L84V 変異と、経過が数十年と長く下肢より発症する H46R 変異それぞれを導入した Tg マウスの病態解析をする。さらには変異 SOD1 Tg マウスにおいて認められる Lewy-body like hyaline inclusion の頻度と変異 SOD1 蛋白の発現量、症状経過との関連を検討することおよび小胞体ストレス関連蛋白を免疫組織化学的に検討することにより、封入体と神経細胞死の関連について検討を行った。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（以下 ALS）は主として中年以降に上肢または下肢の脱力、あるいは球麻痺症状で発症し、数年の経過で四肢の脱力、筋萎縮が進行し、呼吸筋の麻痺により死に至る神経変性疾患である。ALS 発症者の大半は孤発性だが、5-10%が家族性を示し、家族性 ALS の多くは常染色体優性遺伝形式をとることが知られている。1991 年に一部の家族性 ALS 家系の病因遺伝子が第 21 染色体上に連鎖することが明らかとなり、さらに 1993 年にその原因遺伝子が *SOD1* 遺伝子であることが明らかになった。2001 年には家族性 ALS（常染色体劣性遺伝形式）における第 2 の原因遺伝子 *ALS2* が東海大学の秦野・池田らによって同定され、その機能および *SOD1* との関連が注目されている。

現在までに家族性 ALS の約 20%で *SOD1* 遺伝子の変異が認められ、100 種類以上の変異が報告され

B. 研究方法

ヒト Cu/Zn SOD 遺伝子全長とプロモーター領域

を含む 11.5 k b p の領域をベクターに組み込み、L84V、H46R 二種類の変異を導入、マウス受精卵に Injection してトランスジェニックマウスを得た。その中で、L84V が 3 系統、H46R が 1 系統で ALS 様の四肢脱力、筋萎縮の症状発現が確認された。これらのマウスの臨床症状、経過、Cu/Zn SOD 活性と、終末期腰髄膨大部の病理像を比較検討した。また、神経細胞の変性への小胞体ストレスの関与を検討するために L84V 変異 Tg マウス 6 ヶ月齢(終末期) 脊髄において GRP78 抗体および活性型 Caspase-12 (国立精神神経センター 桃井隆博士より供与)を用いた Western-blotting、免疫染色と、Caspase-12 および Caspase-3 抗体を用いた免疫染色を行った。

L84V 変異 SOD1 導入 Tg マウスにおいては蛋白発現量の異なる 3 系統 (L84V-51, 13, 191) の症状経過と、終末期腰髄膨大部における封入体の病理像を比較検討した。

(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努めた。

C. 研究結果

L84V 変異、H46R 変異 Tg マウスにおいて全経過が約 185 日のラインで比較すると、変異蛋白の発現量はそれぞれ 7.8 倍、20 倍と H46R 変異マウスの変異蛋白発現量のほうが約 2.5 倍多かった。しかしながら、発症から死亡までの臨床経過はそれぞれ平均 8.6 日、27.5 日と L84V 変異マウスのほうが明らかに早かった。SOD 活性は H46R 変異マウスで正常マウス 20%と低下を認め、L84V 変異マウスでは 103%とほぼ正常マウスと同等の活性を示した。

脊髄前角の神経細胞脱落、グリオシスは両変異ともに認められた。既存のマウスにて報告されている空胞変性の出現は今回作製した 2 種類の変異マウスともにほとんど認められなかった。神経

細胞、グリア細胞内に認められる Lewy-body like inclusion は 2 つの変異マウスでともに認められたが、H46R 変異マウスにおいて一切片あたり平均 11.6 個と著明に認められるのに対して、L84V 変異マウスでは平均 4.3 個とその頻度は低かった。

L84V 変異 Tg マウスにおいては、脊髄の Western-blotting にて GRP78 の高発現が認められ、免疫染色においても抗 GRP78, 抗活性型 caspase12 抗体にて神経細胞の染色性が認められたことから、小胞体ストレスを介した細胞死へのシグナルが働いていることが示唆された。

L84V 変異 Tg マウスでは蛋白発現量の異なる 3 系統にて ALS 様の症状発現を認めており、すべての系統においてこれまでに報告されているのと同様に HE 染色にて中心部がエオジン好性で周辺に Halo を伴った封入体の形成が認められている。この封入体は Ubiquitin、SOD 抗体陽性である。さらにはまた、活性型 caspase12 は抗 Ubiquitin 抗体にて反応性を持つ封入体にも存在することが認められた。

L84V 変異 Tg マウス 3 系統 (L84V-51, 191, 13) における変異 SOD1 蛋白発現量はそれぞれマウス SOD1 蛋白と比較して 7.8 倍、9.0 倍、5.4 倍であり、それぞれの生存期間は 184 ± 29 日、 202 ± 22 日、 290 ± 23 日と発現量の少ない系統のほうが長い経過を示していた。しかしながら、各系統における終末期の腰髄 1 切片辺りの封入体数はそれぞれ 4.3 ± 1.5 個、 4.7 ± 0.6 個、 7.0 ± 1.0 個と変異蛋白の発現量が少なく、経過の長い系統のほうがむしろ多いという結果であった (図)。

D. 考察

L84V 変異が H46R 変異よりも発症に必要とされる蛋白量が少なく、なおかつ発症から死亡までの経過が急速であり、これは L84V 変異蛋白のほうが H46R 変異蛋白よりも細胞毒性が高いことを示しており、急速な経過を示す L84V 変異、緩徐な経過を示す H46R 変異というヒト家系での臨床形を再現していると思われた。