

ALS における RNA 編集異常の検討

分担研究者 郭 伸, 東京大学神経内科

研究協力者：日出山拓人, 伊藤杏子, 河原行郎, 西本祥仁, 東京大学神経内科；
青木正志 東北大学神経内科；祖父江元 名古屋大学神経内科；
柿田明美, 高橋均 新潟大学脳研病理

研究趣旨 我々は、孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 脊髄運動ニューロンの細胞死にはグルタミン酸受容体である AMPA 受容体の GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集低下が病因的意義を持つことを報告してきた。本報告では、1) 運動ニューロンが変性する 2 疾患、変異 SOD1 による家族性 ALS 及び球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の単一運動ニューロン組織でこの分子変化が生じていないことを明らかにし、孤発性 ALS に疾患特異的であることを更に確認した。また、2) この RNA 編集に関わる酵素である adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) の活性が、孤発性 ALS の前角では低下していることを示し、ADAR2 mRNA 発現レベルがその活性を規定する因子の一つであることを考察した。

A. 研究目的

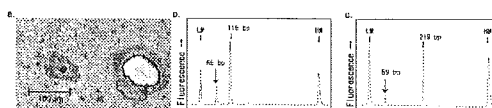
孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 脊髄運動ニューロンにおいてグルタミン酸受容体である AMPA 受容体の GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集が低下しており、これが AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性を増加させ細胞内 Ca^{2+} 濃度を上場させるメカニズムを通じて、孤発性 ALS の運動ニューロン死に直接関わる、疾患特異的かつ細胞選択的な変化であることを我々は報告した⁴。正常な運動ニューロンにおける GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集は、100% に保たれており、孤発性 ALS でこの部位の RNA 編集が低下する分子メカニズムを明らかにすることは、病因解明、特異的治療法の開発にとり枢要である。今回、1) 運動ニューロンが変性する 2 疾患、変異 SOD1 による家族性 ALS (ALS1) 及び球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) におけるこの分子変化の有無を調べ疾患特異性に検討と加える、2) この RNA 編集は、adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) により特異的に触媒されるので、ALS において ADAR2 活性が低下しているかどうかを検討する。

B. 研究方法

材料：変異ヒト SOD1 トランスジェニックラット G93A, H46R の発症例 (各 n=3) 及びその同腹同胞の脊髄 (各 n=3)。SBMA 患者剖検脊髄 (3 例、71、78、60 歳、CAG リピート数それぞれ 48、42、

44)。正常剖検ヒト脊髄 (n=9)。孤発性 ALS 剖検脊髄 (n=9)。

方法：脊髄組織 (前角、後角、白質)、脳組織 (前頭葉皮質、脳梁、小脳) を実体顕微鏡下に、運動ニューロン組織を laser microdissector (Leica, Germany) を用いて、切り出し、GluR2, ADAR2 mRNA の定量を realtime PCR system (Roche Diagnostics) で行い、GluR2 Q/R 部位、カイニン酸受容体サブユニット GluR6 mRNA の Q/R 部位、電位依存性カリウムチャネル Kv1.1 mRNA の I/V 部位の RNA 編集率は、各 RT-PCR 産物を制限酵素処理し、Bioanalyzer2100 (Agilent) による消



化断片の定量により測定した (図 1)。

図 1：前角運動ニューロンの切り出しと GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率の解析。A) SBMA 患者運動ニューロンの切り出し前 (左) と laser microdissector により切り出したあと (右)、SBMA (B)、および変異ヒト SOD1 トランスジェニックラット (c) 前角運動ニューロンにおける GluR2 RT-PCR 産物の Bbv-1 消化断片。いずれも内因性 Bbv-1 部位による切断を受けた 2 本のバンドのみが見られ、Q/R 部位は 100% 編集されていることを示す。(文献⁷)

C. 研究結果

1) 疾患特異性の検討

変異ヒト SOD1 トランスジェニックラットの凍結脊髄切片より前角大径運動ニューロンを 55 個 (G93A 発症ラット)、22 個 (同腹野生型ラット)、62 個 (H46R 発症ラット)、20 個 (同腹野生型ラット) 切り出した。全ての運動ニューロン組織から GluR2 mRNA に由来する PCR 産物が得られ、その Q/R 部位は 100% 編集されていた。SBMA 3 症例の凍結脊髄から、100 個以上の運動ニューロンを切り出した。そのうち、計 44 個 (各例 12, 16, 16 個) で GluR2 mRNA に由来する PCR 産物が得られ、その全てで Q/R 部位は 100% 編集されていた (図 1 b, c)。

2) ADAR2 活性の検討

前角組織における検討で、ALS 例では GluR2 Q/R 部位の編集率低下がみられ、ADAR2 mRNA 発現レベルは beta-actin 比で正常対照に比し有意に低下していたが、GluR2 mRNA 発現レベルには有意差がなかった (図 2 a, b, c)。編集酵素 ADAR2 とその基質である GluR2 mRNA 比も ALS では有意に低下していた (図 2 d)。個々の症例で見ると、ALS 前角では、ADAR2 /GluR2 比と GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率との間に相関が見られた。後角、正常対照前角、後角では、ADAR2 /GluR2 比に関わらず、RNA 編集率は 95% 以上に保たれていた。白質組織 (正常対照大脳、脊髄、ALS 脊髄) では、RNA 編集率は 70-95% にばらついていて、ADAR2 /GluR2 比は ALS 前角組織より低い例も稀ならず存在した。

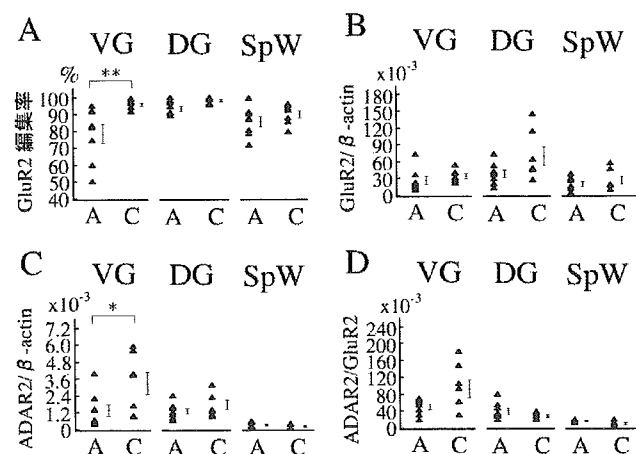


図 2 ALS 群とコントロール群脊髄組織間での、GluR2 編集率と ADAR2 発現量の比較。A) ALS 群 (A; n = 8) と、コントロール群 (C; n = 7) 脊髄組織内での、部位別 GluR2 編集率。mean \pm SEM も示した。脊髄前角 (VG) では、ALS 群で有意に低下していた (Mann-Whitney U test, ** $p < 0.01$)。B) GluR2 mRNA 発現量は ALS 群と、コントロール群では有意差を認めなかった。C) ADAR2 mRNA 発現量は、VG では、ALS 群で有意に低下していた。D) ADAR2 mRNA 発現量を、GluR2 mRNA に対する比は、VG では ALS 群と、コントロール群で、低下傾向を認めた。(文献 6)

正常ヒト脊髄における ADAR2 基質の RNA 編集率は、GluR2 Q/R 部位は 100% に保たれていたが、GluR6 Q/R 部位、kv1.1I/V 部位は症例により、また運動ニューロンによりばらついていて、特に、kv1.1 の編集率は、前角内側では低く外側では高い顕著な傾向が見られた。ALS 前角組織でも、症例により編集率が大きくばらつく傾向が GluR6、kv1.1 共に見られ、正常対照との間に有意な違いは見られなかった。

D. 考察

1) 孤発性 ALS における GluR2 RNA 編集異常の疾患特異性について

GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集低下が孤発性 ALS に疾患特異的、且つ運動ニューロンに細胞選択的分子異常であることについては、これまで検討を加えてきたが⁴、孤発性 ALS 以外の運動ニューロン疾患における運動ニューロン死との関連は未検討事項であった。本報告では、2 系統のヒト変異 SOD1 トランスジェニックラットおよび SBMA 患者単一脊髄運動ニューロン組織を用いて、変性に陥っている運動ニューロンでも、この分子異常が生じていないことを示した。すなわち、変異 SOD1 による運動ニューロン死、アンドロゲン受容体のポリグルタミン鎖過剰伸長による運動ニューロン死のいずれにも、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は関わっていないことが明らかになった⁷。したがって、変異 SOD1 に連鎖した家族性 ALS (ALS1)、SBMA と運動ニューロン死のメカニズムは、孤発性 ALS とは異なると考える。

ALS1 では、AMPA 受容体を介する神経細胞死が関与していることを支持する知見がモデル動物を用いた検討で示されている。すなわち、GluR2 欠損マウスと、変異 SOD1 トランスジェニックマウスの掛け合わせにより、興奮性アミノ酸であるカイニン酸に対する毒性が増加したこと¹⁴、GluR2 の過剰発現によりモデル動物の生存が延長したこと¹³、モデル動物で発現が増加している GluR3 に対するアンチセンス mRNA の投与により生存が延長したこと¹¹ (但しこの論文では、GluR3 のタンパク減少は確認できていないので、実際に GluR3 のノックダウンによるメカニズムかどうかは明らかでない)、等がその根拠になる。したがって、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体の増加により運動ニューロン死がもたらされたと考えられるが、そのメカニズムは、GluR2 の相対的減少による、GluR2 を含まない AMPA チャネルの割合増加と考えられる。したがって、Ca²⁺透過性 AMPA チャネルを増加させるメカニズムには少なくとも 2 種類が存在し、孤発性 ALS では GluR2 Q/R 部位の RNA 編集低下により未編集 GluR2 を含む AMPA 受容体の増加、家族性 ALS1 では GluR3 の発現増加による相対的 GluR2 割合の減少による GluR2 を含まない AMPA 受容体の増加による可能性がある。さらに、前者はそれのみで細胞死を引き起こすが、後者は、興奮毒性を増強する作用はあつて

もそれのみでは神経細胞死を引き起こさない。このように、孤発性 ALS と変異 SOD1 に伴う家族性 ALS (ALS 1) とは細胞死にいたるメカニズムが異なるので (図 3)、ALS 1 のモデル動物による孤発性 ALS 治療薬の開発には自ずから限界がある。

GluR2 の減少による神経細胞死の可能性に関しては、脳虚血によって GluR2 の発現が低下し、同様に Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルを増やすことが神経細胞死につながるという説があり¹⁰、GluR2 欠損マウスのニューロンは虚血に対する脆弱性が増し¹、GluR2 の過剰発現により細胞死を阻止できる⁹とされ、ALS 1 の動物モデルにおける結果に類似している。また、カイニン酸の持続髄注による ALS モデルラット^{8,12}においても、ALS 1 モデルマウス同様 GluR3 mRNA の upregulation が運動ニューロン特異的にみられ、この分子変化は、持続的な AMPA 受容体の刺激により二次的に生ずる可能性が高い。したがって、ALS 1 では、AMPA 受容体を持続的に刺激するような細胞環境が生じ、これにより二次的に GluR3 の発現増加を通じて、 Ca^{2+} 透過性 AMPA チャネルが増加したと考える (図 3)。

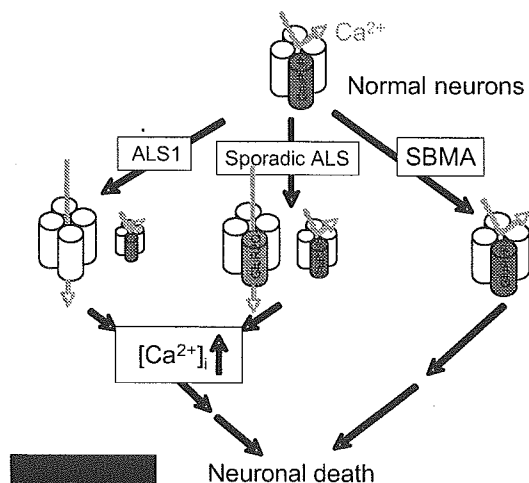


図 3 : AMPA 受容体を介した細胞死のメカニズム。正常の神経細胞では殆どの AMPA 受容体は GluR2 を含み Ca^{2+} 非透過性である。孤発性 ALS、変異 SOD1 による家族性 ALS (ALS 1) のいずれにも AMPA 受容体を介する細胞死のメカニズムが働いている証拠があるが、両者の分子機構は異なる。(左) ALS 1 では GluR2 の割合の減少により GluR2 を含まない AMPA 受容体の割合が増え、AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性が亢進する。(中) 孤発性 ALS では GluR2 の RNA editing が落ち、未編集の GluR2 Q を含む AMPA 受容体が増えることで AMPA 受容体の Ca^{2+} 透過性が亢進する。このいずれの場合も AMPA 受容体からの Ca^{2+} 流入が増え、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介した細胞死のカスケードが働く。(右) SBMA における運動ニューロンの神経細胞死には AMPA 受容体を介したメカニズムは関与していないと考えられる。

SBMA の残存運動ニューロンは極めて少なく、採取した細胞でも GluR2 に対する RT-PCR が可能であったものはそのうち 3 割前後であった。検索できた運動ニューロンは比較的変性過程が早期のため変性を免れていることが予想されるものの、変性に至る過程が緩徐であることを考えると、変性過程を完全に免れているとは考えにくい。本研究で GluR2 mRNA Q/R 部位の編集率が全例で 100% に保たれていることが明らかになり、SBMA では RNA 編集異常が細胞死に関与している可能性は低い。以前報告した、歯状核ルイ体淡蒼球萎縮症プルキンエ細胞における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が保たれていたこと⁴と考察合わせると、ポリグルタミン鎖延長による神経変性疾患の細胞死には、GluR2 RNA 編集異常は関与していない可能性が高く、神経細胞死の過程が極めて緩徐であることと相俟って、孤発性 ALS とは異なるメカニズムによることを示唆する。また、AMPA を介する細胞死が関与していることを示唆する報告もない (図 3)。

2) RNA 編集酵素 ADAR2 活性について

GluR2 Q/R 部位の RNA editing は adenosine deaminase acting on RNA type 2 (ADAR2) により特異的に触媒されるという齧歯類脳での報告があり²、ヒト脳でもこれと矛盾しない体内分布をとり、白質では GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は GluR2 mRNA を基準とした ADAR2 mRNA 発現レベルに依存している⁵。したがって、ヒト脳でも GluR2 Q/R 部位の RNA 編集は ADAR2 が触媒すると考えられる。

ALS 前角組織で、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が mRNA レベルで ADAR2 /GluR2 比と相関していたことは、ADAR2 が GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を触媒しているとする仮説に合致し、また、ADAR2 mRNA の対基質 (GluR2 mRNA Q/R 部位) 発現レベルは ADAR2 活性を規定する因子の一つであることを意味している。すなわち、ADAR2 mRNA の過剰発現により、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集を回復できる可能性を示している。しかし、ADAR2 /GluR2 比が ALS 前角組織より低い編集率がほぼ 100% である正常対照組織も見られ、ADAR2 活性の調節機構は、ADAR2 mRNA 発現レベル以外の因子が働いている可能性が高い。

また、ADAR2 の基質である、GluR6 Q/R 部位、kv1.1 I/V 部位の編集率は、正常対照の脳脊髄組織、運動ニューロン組織で、症例間、ニューロン間に大きなばらつきがあったことは、細胞により、また基質により、ADAR2 活性が調節されている可能性を示し、ADAR2 mRNA 発現レベル以外の因子が関与している可能性を示している。このことは、ALS の脊髄前角組織で、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が、これら 2 基質の編集率と相関しなかったことに合致する。

ADAR2 活性調節機構としては、我々が新たに発見したものを含む、48 種にもものぼる ADAR2

mRNA スプライスヴァリエントのうち、タンパクに翻訳されるヴァリエントは 10%以下にすぎないという、RNA プロセッシングにおける調節機構³もあり、複雑である。

E. 結論

1) GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が孤発性 ALS 運動ニューロンに特異的に生じている神経細胞死に深く関与する分子変化であり、変異 SOD1 に伴う家族性 ALS (ALS1)、SBMA の運動ニューロン死には関与していない。

2) この分子異常を生ずるメカニズムには RNA 編集酵素である ADAR2 活性低下が関与している。ADAR2 活性の調節機構は複雑で、総 ADAR2 mRNA 発現量以外の因子が想定される。

3) ADAR2 活性の制御機構を解明することにより、ALS 運動ニューロンで低下している ADAR2 活性を回復する手段が得られ、特異治療に結びつくと考えられる。

文献

1. Anzai T et al. *Neurosci Res* **46**, 41-51 (2003).
2. Higuchi M et al. *Nature* **406**, 78-81 (2000).
3. Kawahara Y et al. *Gene* **363**, 193-201 (2005).
4. Kawahara Y et al. *Nature* **427**, 801 (2004).
5. Kawahara Y et al. *Eur J Neurosci* **18**, 23-33 (2003).
6. Kawahara Y et al. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **6**, 131-144 (2005).
7. Kawahara Y et al. *Neurosci Res* **54**, 11-14 (2006).
8. Kwak S et al. *Neurosci Res* **50(suppl1)**, S145 (2004).
9. Liu S et al. *Neuron* **43**, 43-55 (2004).
10. Pellegrini-Giampietro DE et al. *Trends Neurosci* **20**, 464-470 (1997).
11. Rembach A et al. *J Neurosci Res* **77**, 573-582 (2004).
12. Sun H et al. *ALS and other motor neuron disorders* **5**, 90 (2004).
13. Tateno M et al. *Hum Mol Genet* **13**, 2183-2196 (2004).
14. Van Damme P et al. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 605-612 (2005).

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawahara Y, Ito K, Ito M, Tsuji S, Kwak S: Novel splice variants of human ADAR2 mRNA: skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites, *Gene* **363**:193-201, 2005

Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, Kwak S: Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci Res* **54**:11-20, 2006.

Kwak S, Kawahara Y: Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in ALS, *J Mol Med* **83**:110-120, 2005

Kawahara Y, Kwak S: Excitotoxicity and ALS: what is unique about the AMPA receptors expressed on spinal motor neurons? *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **6**:131-144, 2005

Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S: Expression profile of AMPA receptor subunit mRNA in single adult rat brain and spinal cord neurons *in situ*, *Neurosci Res* **52**:228-234, 2005.

他 10 編

2. 学会発表

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.

Hideyama T, Kawahara Y, Ito K, Nishimoto Y, Tsuji S, Kwak S: Alteration of RNA editing enzyme expression in sporadic ALS. *The 16th International Symposium on MND/ALS*, Dublin, Des 8-10, 2005,

他 5 編

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

SOD1 凝集体の軸索内移動

分担研究者 高橋 良輔 京都大学医学部神経内科・教授

研究要旨：SOD1 変異をもつ家族性筋萎縮性側索硬化症患者・動物モデルでは、病変部位特異的に検出される SOD1 タンパク凝集体と発症との関係が指摘されているが、凝集体が有する細胞毒性については未だ不明である。我々は、G93A 変異型 SOD1 トランスジェニックマウスにおいて、SOD1 凝集体は軸索分画に最も蓄積し、発症に先行して運動ニューロン軸索内を順行性に移動することを見出した。このことは、SOD1 凝集体が他の輸送担体の輸送システムを拮抗阻害・攪乱する可能性を示唆しており、軸索輸送障害に極めて脆弱な運動ニューロンでは大きな細胞毒性となり得ることから、新たな治療の方向性が示唆された。

A. 研究目的

SOD1 凝集体が有する細胞毒性を解明することは、有効な治療法の道筋を立てるために必須と考えられる。我々も含めたこれまでの研究により、難分解性である SOD1 凝集体の細胞内蓄積はタンパク分解システム（プロテアソーム系）の破綻という致死的な状況をもたらす可能性が示唆されたので、今後はこの毒性を緩和・阻害する手段を検討する予定である。一方、それ以外の毒性の可能性も見落とさないために、本年度は SOD1 凝集体の細胞内・組織内局在を解析し、新たな毒性の推察を試みることにした。

B. 研究方法

実験材料には、家族性筋萎縮性側索硬化症（Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, FALS）の動物モデル、G93A 変異型 SOD1 トランスジェニック（SOD1^{G93A}-Tg、GIL ライン）を用いた。様々な月齢の SOD1^{G93A}-Tg から脊髄を摘出して細胞分画を行い、ウェスタンブロット法により SOD1 凝集体の細胞内局在を解析した。分画法には改良を加え、核と神経軸索も回収して他オルガネラ分画と同様に比較・評価できるようにした。また、レ

ザーマイクロダイセクション法を用いて脊髄無固定凍結切片を 4 領域（腹側白室、腹側灰白質、背側白質、背側灰白質）に分割し、ウェスタンブロットを行い、SOD1 凝集体の出現領域および病状の進行に伴う脊髄内局在変化を解析した。さらに、凝集体の軸索への移動を検討するために、脊髄神経前根・後根を摘出し、一定長に切断後、各断片をウェスタンブロットで解析した。なお、動物倫理面では動物の苦痛を軽減するよう、所定の「動物実験実施要領」に基づき配慮した。

C. 研究結果

細胞分画の解析から、SOD1 凝集体は核・軸索およびミトコンドリアが濃縮された 2 分画に最初に検出されるが、その後は核・軸索分画への蓄積がすさまじく、発症期には 60%以上の凝集体は核・軸索分画に存在することがわかった。脊髄組織内では凝集体は腹側灰白質に出現し、発症期には腹側灰白質にも大量に認められた。さらに神経前根・後根の解析では、凝集体は発症前の SOD1^{G93A}-Tg で既に（前根特異的に）最も脊髄寄りの断片中に検出され、病気の進行とともに抹消側の軸索断片にも広がっていくことが示された。

従って、SOD1 凝集体は発症に先行して運動ニューロン細胞体から軸索へと局在を変化させ、発症期には相当量の凝集体が軸索中に存在していることが強く示唆された。

E. 結論

近年の遺伝学的解析および遺伝子改変マウスの研究結果から、下位運動ニューロンは軸索輸送障害に対してとりわけ高い脆弱性を有することが示された。実際、変異型 SOD1-Tg では発症に先行して部分的に軸索輸送が障害されることが報告されていたが、その原因は全く不明であった。我々の今回の報告は、SOD1 凝集体が直接的に軸索輸送障害に関与している可能性を初めて示したと考えられる。なぜなら、SOD1 凝集体の軸索内移動は軸索輸送機構に則っている可能性が高く、その場合、他輸送担体の輸送を担うモーター分子や adaptor, scaffolding proteinsなどを sequester していることが予想されるからである。これら sequester される分子および結果的に輸送量が減少する担体等が同定できれば、近年進歩が目覚ましい遺伝子導入技術（補充療法）の新しいターゲットとなり得ることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kim Y-J, et al: J. Biol. Chem.,
280: 21515- 21521 (2005)

Urushitani M, et al: Nat Neurosci.
9:108-18 (2006)

2. 学会発表

館野美成子, 井上真理子, 荒木敏之, 高橋良輔: SOD1 構造異常体の毒性仮説: 軸索輸送障害への関与。第 28 回日本神経科学大会、(2005)、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

とくに予定はない。

オートファジーによる運動ニューロン疾患の治療法の開発

分担研究者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所・副所長

研究要旨 オートファジー（自食作用）は、ダイナミックな膜形成（オートファゴソーム形成）によって細胞質成分を飲み込んだ後、リソソームと融合することによって内容物を消化する真核生物に保存されたタンパク質分解システムである。われわれは条件的にオートファジーが不能となるマウス（Atg7^{Flox/Flox}）を作製、この変異マウスと Nestin-Cre のトランスジェニックマウスを交配し、中枢神経系特異的にオートファジーを欠損させた Atg7^{Flox/Flox}:Nes マウスを作製した。このオートファジー不能マウスは反射異常、協調運動障害などの神経変性疾患様症状を示し、その神経細胞内には加齢と共にユビキチン陽性封入体が蓄積すること、大脳皮質、海馬、小脳顆粒層において神経細胞死が起こることを見いだした。この結果、オートファジーの障害によって神経変性疾患が発症することが初めて明らかとなった。さらに本研究から、ユビキチン化タンパク質がプロテアソームとオートファジーの二つの分解系で独立的に処理されることも初めて判明した。これらの結果は、オートファジーを誘導する薬剤の開発が神経変性疾患の治療に有効となる可能性を示唆している。

A. 研究目的

近年、ALS (amyotrophic lateral sclerosis 筋萎縮性側索硬化症) を含む多くの神経変性疾患がニューロン内におけるタンパク質の品質管理の破綻によって発症するとする仮説が提唱されてきた。例えば、家族性 ALS の責任遺伝子である疾患型変異 SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) は運動ニューロン内で凝集し有害性となって神経細胞死を誘発することが明らかとなっている。そしてこの ALS の発症には SOD1 の変異による酵素活性の喪失が原因でなくこの酵素が凝集体もしくは封入体をつくること神経細胞死・運動ニューロンの変性脱落の原因となることが明確になってきた。そしてこれらの封入体がユビキチン (タンパク質分解のマーカ分子) の抗体で濃染されることが見出され、ALS の発症にユビキチン代謝系 (の破綻) が関与する可能性が高まってきた。これまでわれわれはユビキチン依存性タンパク質分解システムにおいて、タンパク質の品質管理に係るユビキチン連結酵素 (リガーゼ) として Parkin, CHIP, SCF^{Fbs} 等の研

究を進めてきた (1-3)。さらに疾患型変異 SOD1 を特異的にユビキチン化してプロテアソーム (真核生物の ATP 依存性プロテアーゼ複合体) 依存的に分解するリガーゼとして Dorfin を見出し、Dorfin が運動性ニューロンの破綻に伴った神経変性疾患の発症に関与することも示唆してきた (4-6)。このようにわれわれは、品質管理の主役を果たしているユビキチン代謝系の破綻が神経細胞死引いては神経変性を誘導する機構について研究してきた。本プロジェクトでは、これらの研究を発展させ、運動ニューロンの恒常性を維持し、ALS 発症を予防しかつ治療するための根本方法の開発を目指す。

一方最近、細胞内の不要品を処理するタンパク質分解システムとしてオートファジー (自食作用)・リソソーム系の重要性がクローズアップされてきている。しかし、酵母などの下等単細胞生物においては、オートファジーは飢餓に応答した生存戦略が唯一の働きと考えられてきた。そして栄養状態が十分に供給されて飢餓に陥らない脳にあっては、オートファジーの役割は大きくないと考えが一般化していた。しかし他方、見逃せない事

実としてオートファゴソームの異常形態を示す病理組織学的知見も神経変性疾患の患者の脳において多数報告されてきている。そこでわれわれは発生工学的手法を用いてオートファジーを自在に欠失させることの出来る条件的にオートファジーが不能となるマウス (Atg7^{Flox/Flox}) を作製することを目指し、最近このマウスの作製に成功した (7)。そして肝臓におけるオートファジー不能マウスが栄養飢餓時のタンパク質分解阻害のみならず定常 (富栄養) 状態においてもユビキチン陽性封入体や異常オルガネラの蓄積を引き起こすことを明らかにした (7)。本年はさらに、この Atg7^{Flox/Flox} マウスを Nestin-Cre (ニューロンの幹細胞で発現している Nestin のプロモーターに Cre-recombinase を連結・導入した) トランスジェニックマウスと交配し、中枢神経系でオートファジーが不能となるマウス (Atg7^{Flox/Flox};Nes) の作製に成功した。このマウスを用いて中枢神経系におけるオートファジーの役割についてタンパク質の品質管理に注目して解析した。その結果、オートファジーがニューロンにおいて恒常的に活動しタンパク質の代謝回転を担うこと、そしてその破綻が神経変性疾患を引き起こすことを見出した (10)。

B. 研究方法

「条件付きオートファジー不能マウス (Atg7^{Flox/Flox}) の作製」

ターゲティングベクターの作成 : Atg7 はオートファゴソーム形成に必須なユビキチン様翻訳後修飾分子 Atg8/LC3 及び Atg12 タンパク質結合システムの共通の (E1 様) 活性化酵素である。その (ユビキチンとチオエステル結合を作る) 触媒システイン残基はエキソン 14 にコードされている。そこで 17 のエクソンから構成されている Atg7 遺伝子のエクソン 14 をノックアウトするために、Cre-loxP technology を用いてイントロン 14 にネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだターゲティングベクターを構築した。

ES 細胞のスクリーニング : 作製したターゲティングベクターをマウス TT2 細胞にエレクトロポレーションで導入した後、0.2 mg/ml の G418 存在下で培養し、薬剤耐性細胞をピックアップした。PCR およびサザンブ

ロティングによりノックアウト ES 細胞を探索した。得られたクローンについては、マウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、翌日仮親の子宮に移植した。得られたヘテロマスがジャームラインに入っていることを PCR およびサザンブロティングにより検証した。最終的にヘテロマスを交配して条件的 Atg7 欠損ホモマウス (Atg7^{Flox/Flox}) を作製した。

「中枢神経系 (CNS: central nervous system) オートファジー不能マウス (Atg7^{Flox/Flox};Nes) の作製」

条件的オートファジー不能マウス (Atg7^{Flox/Flox};Nes) と Nestin-Cre トランスジェニックマウスを交配し、中枢神経でオートファジーが不能となるマウス (Atg7^{Flox/Flox};Nes) を作製した。

「Western ブロット解析」

SDS-PAG で試料を分析後 Atg7, Atg5, LC3, Rpt1, Rpn2 and $\alpha 5$ の抗体を用い、定法に従い Western ブロット解析を行った。

「組織化学的及び免疫組織化学染色解析」

Atg7^{Flox/Flox};Nes と 野性型マウスの脳を 4% paraformaldehyde-4% sucrose を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で還流固定した。さらに標準光学顕微鏡による組織化学的解析には、2% paraformaldehyde-2% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液、免疫組織化学染色解析には 4% paraformaldehyde-0.1% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で固定した。

光学顕微鏡解析は、脳の 10- μ m cryosections (凍結切片) を Meyer's hematoxylin and eosin (H&E) で染色した。免疫組織化学染色解析は、anti-human neuronal nuclei (NeuN: Abcam, Cambridge, UK), anti-glial fibrillary acid protein (GFAP: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), anti-calbindin (Sigma), anti-myelin basic protein (MBP MCA409S: Serotec, Oxford, UK) and anti-ubiquitin (Dakocytomation) 抗体を用いて行った。

TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) アッセイによる細胞死の検定は定法に従って行った。

「電子顕微鏡及び免疫電子顕微鏡」

マウス脳を 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファ溶液で還流固定した。さらに 1% OsO₄ で固定し、Epon812 で包埋した後、超薄層切片を作製した。anti-ubiquitin (1B3) と colloidal gold conjugated secondary antibody による免疫金染色は、定法に従って行った。

「沈降速度解析」

グリセロール密度勾配による沈降速度解析は、10-40% [v/v] のグリセロール密度勾配で、超遠心 (22 h, 100,000 x g) を行った。30 チューブに分画後、分離した各画分を Western ブロット解析やプロテアソームの活性測定に使用した。

「プロテアソームの活性測定」

プロテアソームのペプチダーゼ活性は、蛍光ペプチド基質 succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Suc-LLVY-MCA) を用いて測定した。オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) を基質にした ATP 依存性のタンパク質分解活性は、以前に述べた方法 (5) で行った。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は、主としてマウスを用いたインビトロの実験系で行ったので、倫理面への配慮は不要であった。

C. 研究結果

[結果 1] *Atg7^{f/f}:Nes* マウスの行動解析

中枢神経系 (CNS) でオートファジーを欠損させた (生後 20 日目の) マウスは、異常な limb-clasping 反応を示し、また rotarod 試験でハンチントン舞踏病など小脳変性に見られるのと類似の神経失調症状を示した。なお、*Atg7^{f/f}:Nes* マウスでのオートファジーは生後 (P0) においてほぼ完全に欠損しており、生後 4 週目くらいからマウスが死に始め 28 週間後には、全てのマウスが死に至った。これらの表現型は、雌雄で変化がなかった。

[結果 2] オートファジーが欠損した大脳及び小脳皮質におけるニューロン死と神経変性
組織化学的解析 (H&E 染色) から、オート

ファジーが欠損した生後 56 日目のマウス大脳及び小脳皮質においては、ニューロンの大幅な減少が見られた。とくに大脳皮質では大きな pyramidal ニューロンが顕著に欠落しており、逆に glial fibrillary acidic protein (GFAP) で染色されるグリア細胞の増殖が観察された。また小脳皮質では、Purkinje marker, calbindin での染色像からプリキンエ細胞の大規模な欠落が観察された。

さらに TUNEL staining で検定した結果、オートファジーが欠損した大脳皮質、海馬、小脳顆粒層において激しいニューロン死が観察された。

[結果 3] オートファジーを欠損させたニューロンにおけるユビキチン抗体陽性封入体の出現

ユビキチン抗体を用いた免疫組織染色による観察から、大脳皮・小脳皮質・視床下部・海馬・橋・小脳扁桃など広範囲のニューロンにおいてユビキチン抗体陽性の封入体の出現が観察された。このユビキチンを含む大きな封入体は、免疫電子顕微鏡観察によっても確認された。そしてこのユビキチン陽性の凝集体は、最初、可能性画分に検出されたが、時間経過と共に不溶性画分に移行し封入体を形成することが判明した。さらにこのユビキチンを含む封入体は、生後から致死に至る期間、即ち aging に従ってその数とサイズが増大した。興味深いことに、ユビキチン陽性の凝集体・封入体の出現は、上記したオートファジー欠損の大脳皮質において激しく増殖しているグリア細胞内では、観察されなかった。

[結果 4] オートファジーを欠損させたニューロンにおけるプロテアソームの機能動態
ユビキチンを含む凝集体引いては大きな封入体の形成は、プロテアソームの機能低下が関係してことが、これまでの多数の研究から報告されている。そこで、オートファジーの欠損によってプロテアソームの機能破綻がおきるか否かについて検討した。オートファジーを欠損させた脳の抽出液をグリセロール密度勾配遠心法で分画し、プロテアソームの質的・量的変動を詳細に測定した。その結果、Suc-LLVY-MCA 活性及び ODC 分解活性とも野性型マウスに比較して有意な相違は検出できなかった。またプロテアソームを構

成する様々なサブユニットに対する抗体を用いた Western ブロット解析から、プロテアソームの量的変動も全く観察されなかった。これらの結果から、オートファジーを欠損させたニューロンにおいてプロテアソームの機能異常は、発生していないことが明確になった。即ち、細胞内のユビキチン化タンパク質は、プロテアソーム系とオートファジー系によって独立的に処理されていることが示唆された。

D. 考察

過去十年程度以前から、タンパク質の品質管理とニューロン死の関係が注目を浴びてきた。しかし、そのほとんどは、ユビキチン・プロテアソーム系に関する研究であった。今回初めて、オートファジーの欠損で神経変性疾患になることが判明した。神経変性疾患との関連で考えると、これまで家族性疾患で、責任遺伝子産物の異常凝集がニューロン死の引き金になることが多くの場合に報告されてきた。例えば、アルツハイマー病における tau タンパク質、パーキンソン病における α シヌクレイン、ハンチントン舞踏病におけるハンチンチン、そして ALS における SOD1 等である。しかし、これらのタンパク質の変異による異常構造、ひいては凝集体の形成がなくても、オートファジーというタンパク質分解系の機能喪失のみによって神経変性が誘導されることは、画期的な発見であり、今後の神経変性疾患の予防・治療法の開発において新戦略が期待できる。本実験では、全てのニューロンオートファジーを欠損させたが、今後は、個別のニューロン、例えば、運動ニューロンのみにおいてオートファジーを欠損させ得る変異マウスの作製を試みたい。最後に本研究の独創的な発見は、これまでユビキチンはプロテアソームへの分解シグナル分子と考えられてきたが、この経路以外にオートファジーを経由してリソソームへ誘う分解シグナルにも成り得ることを明確に証明したことである。この発見は、膨大なユビキチン・プロテアソームシステムの研究を考えると、驚くべき事象と思われる。またこれまで、オートファジーは、栄養素確保という生存戦略応答のために準備された非選択的なタンパク質分解システムと考えられてきたが、本研究からオートファジーがユビキ

チン化タンパク質を選択的に分解することが判明した。このオートファジーによる選択的タンパク分解の分子機構解明とその病態生理学的意義の解明は、今後の大きな課題である。

E. 結論

- 1) 中枢神経系でオートファジーを欠損させると非分裂細胞であるニューロンの変性が誘発され神経変性疾患を発症する。
- 2) 増殖可能なグリア細胞では、オートファジーの欠損は、ほとんど影響しない。
- 3) オートファジーの欠損は、プロテアソームの質的機能および量的動態に全く影響しない。
- 4) ユビキチン化タンパク質は、プロテアソームとオートファジーで独立に処理される。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yoshida, Y., Fukiya, K., Adachi, E., Iwai, K., Tanaka, K. (2005) Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded. *EMBO Rep.* 6. 239-244.
- (2) Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Kotliarova S, Murata S, Tanaka K, and Nukina N. (2005) Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem.* 280, 11635-11640
- (3) Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, and Takashima A. (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem.* 2005; 94:1254-1263
- (4) Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N, and Tanaka, K., (2006) 14-3-3 \square is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J.* 25, 211-221.
- (5) Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, M. (2005) A novel heterodimeric complex that promotes

- the assembly of mammalian 20S proteasomes, *Nature* 437, 1381-1385.
- (6) Niwa, J., Ishigaki, S., Doyu, M., Kato, K., Suzuki, T., Tanaka, K., and Sobue, G. (2001) A novel human RING-finger/IBR family protein, Dorfin, resides in centrosome and mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 706-713.
- (7) Niwa, J., Ishigaki, S., Hishikawa, N., Yamamoto, M., Dyu, M., Murata, S., Tanaka, K., Taniguchi, N., Sobue, G. (2002) Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 277, 36793-36798.
- (8) Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K., and Sobue, G. (2004) Physical and functional interaction between Dorfin and VCP that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J. Biol. Chem.*, 279, 51376-51385.
- (9) Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, E., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Chiba, T. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in *Atg7*-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169, 425-434.
- (10) Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K., Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. *Nature* under revision.

2. 学会発表

- Keiji Tanaka : Cellular Apparatus for Proteolysis in Eukaryotes. Large-scale Analysis of Cellular Function -Advanced Technology for Proteomic Biology- January 27-28, 2005 Tokyo, Japan
- Keiji Tanaka : Recognition of Glycosylated Substrates by SCF^{Fbs} Ubiquitin Ligases. Keystone Symposium "Ubiquitin and Signaling" February 22-27, 2005, Taos Convention Center in Taos, New Mexico, USA
- Keiji Tanaka : Structure, Function, and Assembly of Mammalian Proteasomes. The 6th Workshop on Proteasomes. April 24-26, 2005, Clermont-Ferrand (France)
- Keiji Tanaka : Uncovering the mystery of the

- ubiquitin-proteasome system . The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (plenary lecture) October 17-18, 2005. Seoul, Korea
- Keiji Tanaka : A multistep-ordered Mechanism for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . International Symposium on "Life of Proteins" AWAJI YUMEBUTAI (October 30-November 3, 2005. Awaji
- Keiji Tanaka : Structure, Assembly and Functions of Mammalian Proteasomes. 2nd Meeting of Bone Biology Forum. November 18-19, 2005, Mishima

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

AAV8 ベクターによる遺伝子導入の特性

分担研究者 中野今治（自治医科大学神経内科）

共同研究者

村松慎一¹, Xiao Wei-zhong^{1,2}, 奈良優子¹, 古寺美加¹, 滝野直美¹, 西田紘子¹, 松下卓², 岡田尚巳²,
菊池哲³, 佐々木康朗⁴, Mark Kay⁵, 星美奈子^{3,4}, 小澤敬也², Hiroaki Nakai⁵

¹自治医科大学 神経内科部門, ²同 遺伝子治療部門, ³東京工業大学 生命理工学部,

⁴三菱化学生命科学研究所 生命科学研究部, ⁵Stanford University Pediatrics & Genetics

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する遺伝子治療において、中枢神経と全身の骨格筋に治療用遺伝子を導入する方法として、8型アデノ随伴ウイルス (AAV8) ベクターの応用の可能性を検討するため、その遺伝子導入の特性を検討した。AAV8 ベクターにより、ラットの海馬初代培養では神経細胞およびグリア細胞でマーカー遺伝子の発現が認められ、線条体への直接注入では広範な領域へ遺伝子導入できた。マウスの静脈内投与では、肝臓への集積の他、脾臓、肺、小腸、心臓、血管平滑筋、脳など全身臓器へのベクターの拡散が認められた。遺伝子発現は4週間以降に低下した。今後、AAV8 ベクターを応用する際には、組織特異的プロモーターの組み込みなどの工夫が必要である。

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、軸索を通して運ばれた 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。全身の骨格筋および中枢神経系へ効率よく遺伝子導入を行うために、最近開発された AAV8 ベクターの遺伝子導入の特性を検討する。

B. 研究方法

組織非特異的な CAG または EF1 プロモーターにより、マーカーとして LacZ, GFP, Luciferase のいずれかをそれぞれ発現する各種の AAV8 ベクターを作製した。これらの AAV8 ベクターを、ラット胎仔 (E17) 海馬の初代培養細胞へ感染させ、遺伝子が導入された細胞を蛍

光二重染色により同定した。また、ラットの線条体に定位脳手術的に AAV8 ベクター注入した。さらに、マウスの尾静脈への注入を行った。全身臓器におけるマーカー遺伝子の分布を PCR 法で検索するとともに遺伝子発現を組織学的に解析した。

C. 研究結果

ラット海馬の初代培養では、神経細胞に加え、アストロサイトとオリゴデンドロサイトにも遺伝子導入された (図1)。線条体への注入では、広範な領域に遺伝子発現が認められ、神経細胞およびグリア細胞に遺伝子導入できた (図2)。全身臓器へのベクターの拡散は認められなかった。頸静脈あるいは尾静脈への注入では、肝臓への集積が見られた。マウス尾静脈への注入では、肝臓で高率の遺伝子発現が得られた (図3) ほか、脾臓、肺、小腸、心臓、血管平

滑筋など全身の臓器でマーカー遺伝子の発現が認められ、ベクターが広範に拡散していた。遺伝子発現の強さは、導入4週間までに最大となりその後減弱した。

D. 考察

AAV8 ベクターは、肝臓への集積傾向があるが、全身の骨格筋や脳への遺伝子導入用ベクターとして応用できる可能性がある。血液中への混入により全身臓器への拡散が生じるため、今後、神経細胞特異的プロモーターなどの組み込みが必要と考えられる。遺伝子発現は AAV2 などの他の血清型に比べて、早期に最大となる特性がある。この機序としては、細胞内でのウイルスカプシドの uncoating が速い可能性などが

考えられているが、詳細は明らかでない。発現が強いことに関しては、却って細胞毒性を生じる可能性があるため、遺伝子発現調節機構の組み込みが必要になると考えられる。

E. 結論

AAV8 ベクターは、ALS の遺伝子治療用ベクターとして応用できる可能性があるが、遺伝子発現調節機構や神経細胞特異的プロモーターなどの組み込みなどが必要と考えられる。

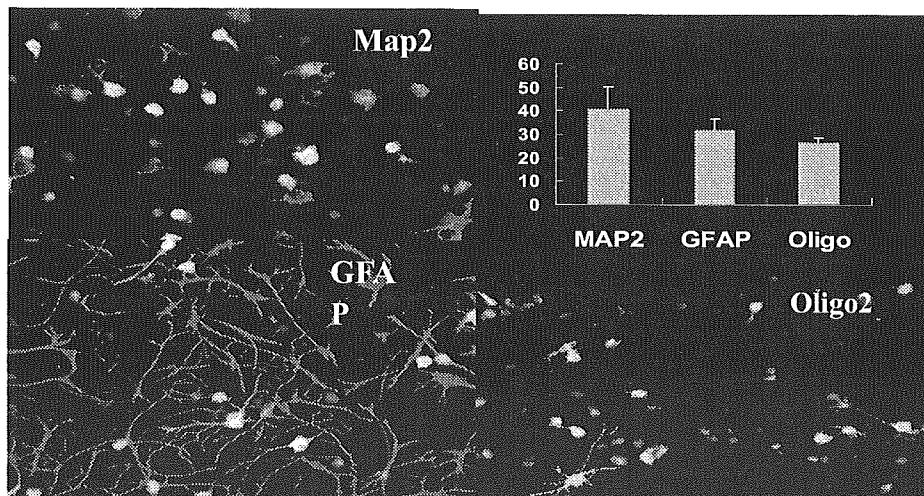


図1. ラット胎仔の初代培養に AAV8-CAG-EGFP を感染させた。Neuron (Map2), Astrocyte (GFAP), Oligodendrocyte (Oligo2) のいずれにも GFP の発現が認められる。

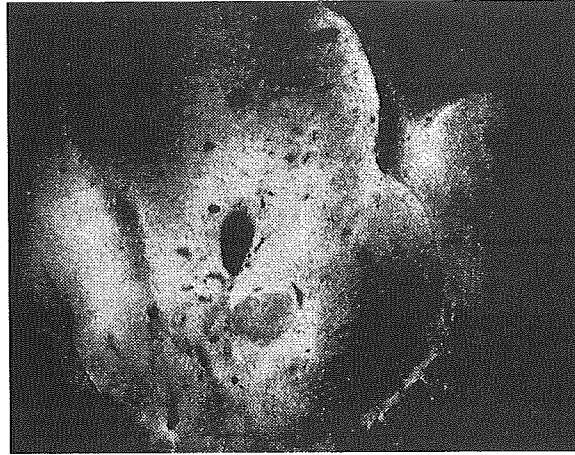


図2. ラット線条体へAA8-CAG-EGFP を定位脳手術により注入した。4週間後、広範な領域で発現が認められる。

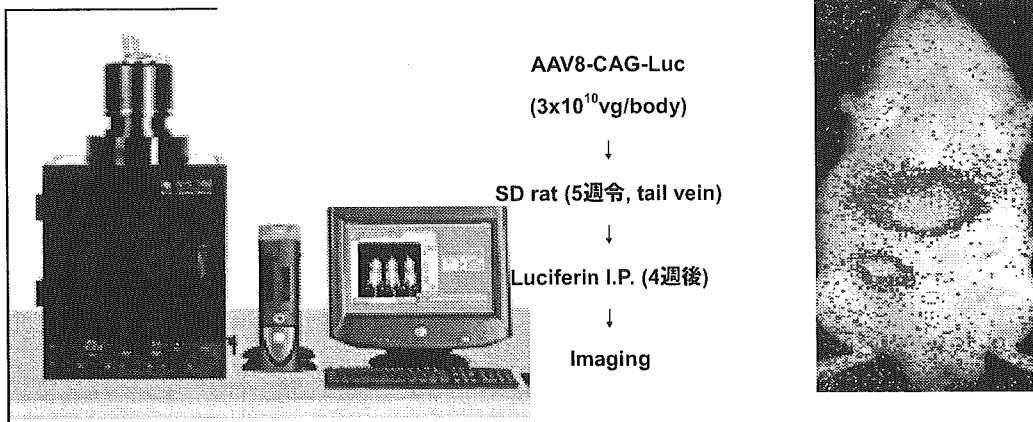


図3. ラット線条体へAA8-CAG-EGFP を定位脳手術により注入した。4週間後、広範な領域で発現が認められる。

HGF は ALS 運動ニューロンに効率よくシグナル伝達する —c-Met 受容体側の調節を介したシグナル調節—

分担研究者 船越洋 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学 助教授

研究協力者 角山圭一、中村敏一 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学

研究要旨

ALS は運動神経特異的変性を起こす致死性疾患で現在有効な治療法がない。HGF は強力な運動神経栄養因子であり、もし ALS の神経に効率的に HGF シグナルを伝達できたら神経変性抑制に有用と期待される。私達はこれまで ALS モデルトランスジェニックマウス (ALS-Tg) と神経特異的 HGF 発現 Tg マウス (HGF-Tg) の交配研究により、HGF が ALS 脊髄運動神経の変性を抑制すること示してきたが、脳幹運動神経への機能や作用分子機構の解析は不十分であった。今回は、HGF の ALS 脳幹運動神経への効果とシグナル分子機構について c-Met/HGF 受容体のチロシン残基へのリン酸化の観点から評価した。その結果 ALS/HGF-Tg では脳幹運動神経の変性も抑制されることが明らかとなった。また ALS-Tg では脳幹運動神経での c-Met のチロシンリン酸化が観察され、そのリン酸化は ALS/HGF-Tg でより顕著であった。一方 HGF-Tg では HGF が供給されているにもかかわらずリン酸化が極度に弱かった。このことから、HGF が正常細胞に比べて ALS の神経細胞においてより効率的にシグナル伝達し、即ち ALS 神経細胞により特異的に作用することで HGF が ALS 治療薬として効果的かつ安全に広範囲脊髄脳幹神経変性を抑制する可能性が示された。また、HGF と c-Met は骨格筋に発現し、筋肉運動を制限することで発現制御を受けることが明らかとなり、HGF の ALS 筋肉での機能も示唆された。今後 HGF による安全な ALS 治療法確立に向けさらに研究を進展させたい。

はじめに

ALS は、脊髄・脳幹運動ニューロンが特異的に変性脱落する致死性疾患であり、現時点で有効な治療法がない。知能が正常であり運動機能が低下していくことを自覚しながらそれを享受していかなければならない意味でも、家族の方や社会を巻き込んだ疾患である意味でも今世紀解決すべき重要疾患と言える。私達は、ヒト ALS の原因遺伝子 (SOD1G93A) 発現 Tg マウス (ALS-Tg) に HGF をトランスジェニックマウスのアプローチで神経特異的に供給することで、ALS-Tg の脊髄運動神経細胞の変性を抑制し、四肢運動機能の改善および寿命の延長効果が得られることを報告した。その上ヒト ALS 患者さんの脳病理組織において、HGF と c-Met が ALS-Tg と同様の発現

制御を受けることが明らかとした。また家族性 ALS (FALS) に加え、弧発性 ALS (SALS) においても同様の発現制御を受けたことから (Kato, Funakoshi et al., 2003)、HGF は FALS に加えて SALS についても有効と期待された。しかし、ALS は脊髄に加え脳幹運動神経細胞も変性することが知られるが、これに対する HGF の効果が不明であった。また、HGF は ALS に罹患した神経細胞に有効に機能するのか、それとも一般的に c-Met 発現細胞に機能する、いいかえると HGF 治療を考える際、ALS に罹患し HGF が作用してほしい細胞により有効に作用するか、またその分子機構は不明であった。さらに、HGF, c-Met 系の筋肉における発現制御が不明であった。

私達は以上の点を明らかにする目的で研究を進めた。

方法

- (1) ダブルトランスジェニックマウスの作成 Tg-SOD1G93A (ALS-Tg) と神経特異的 HGF 発現トランスジェニックマウス (HGF-Tg) を交配することで HGF 遺伝子を ALS の神経細胞に長期間発現させた (ALS/HGF-Tg) (効果を Wildtype, HGF-Tg, ALS-Tg, ALS/HGF-Tg の 4 群で解析した Sun, Funakoshi et al., J. Neurosci., 2002 に準じた)。
- (2) 解析: 組織解析に加えて、c-Met のチロシンリン酸化を評価することで HGF の細胞へのシグナル伝達の指標とした。一方、c-Met 抑制に機能するは juxtamembrane 領域の Ser985 のリン酸化は、同領域のリン酸化ペプチドを作製し免疫して得た Ser985 リン酸化ペプチドポリクローナル抗体を用いて免疫染色により評価した。

結果と考察

- (1) c-Met は脳幹運動神経細胞に発現している: c-Met 受容体は、顔面・舌下といった脳幹部の成体運動神経細胞において発現していた。さらに ALS-Tg においても同様に c-Met 受容体が発現していた。
- (2) HGF は脳幹運動ニューロンの神経変性を抑制する: HGF が脳幹運動ニューロンに発現する c-Met に作用することで、ALS の神経変性を抑制するか否かを ALS-Tg と HGF-Tg を交配することで評価した。その結果、これまで明らかにしてきた脊髄の運動ニューロンと同様に、HGF は ALS の脳幹運動ニューロンの神経変性を抑制することが明らかとなった。そこで、これまで明らかにしてきた脊髄運動神経細胞に加えて、HGF が脳幹運動神経の変性を抑制すること、すなわち HGF が ALS に罹患変性することが知られる広範囲運動神経細胞に機能できることが明らかとなった。
- (3) ALS による c-Met のチロシンおよびセリン (c-Met の Ser985) reciprocal なリン酸化調節 HGF のシグナル伝達を c-

Met のチロシンリン酸化により評価した。運動神経細胞の c-Met チロシンリン酸化は、正常マウスにおいては検出限界以下であった。驚くことに、HGF 単独の Tg マウス (HGF-Tg) では、運動神経細胞における c-Met のチロシンリン酸化は detection limit 以下であった。このことから、HGF は正常運動神経細胞に比べて、ALS 神経細胞でより効率よく濃度依存的にシグナルを伝達できることが明らかとなった。このことは、ALS に対する安全な HGF 治療法開発の基盤となり得ることを示唆している。

- (4) c-Met 中にある c-Met のチロシンリン酸化を負に制御するドメイン (Ser985 のリン酸化) から見た ALS 神経の HGF シグナル伝達: Ser985 は、Wildtype, HGF-Tg でリン酸化を受け、一方 ALS-Tg と ALS/HGF-Tg では脱リン酸化される。8ヶ月例の Wildtype, HGF-Tg, ALS-Tg, ALS/HGF-Tg の c-Met Ser985 のリン酸化を、特異抗体で免疫染色したところ、Ser985 は、Wildtype, HGF-Tg でリン酸化を受けており、ALS-Tg と ALS/HGF-Tg では脱リン酸化されていた。Ser985 は c-Met のチロシンリン酸化、即ちシグナル伝達を負に制御することから、ALS において c-Met Ser985 の脱リン酸化が、HGF シグナルが ALS で効率よく伝達する上で有利と考えられた。Hashigasako らは、Ser985 の脱リン酸化には Protein Phosphatase2A (PP2A) が重要 (Hashigasako A, Nakamura T et al., JBC, 2004)、また ALS の脳で実際に PP2A が上昇することから (Hu et al., J.Neurochem,2003)、ALS では PP2A 等の制御を介して Ser985 の脱リン酸化を起こすことで HGF による c-Met の速やかなチロシンリン酸化が進むように生体内で巧妙に調節されていると示唆された。
- (5) HGF と c-Met は骨格筋で発現して筋肉の負荷に依存して発現制御を受けている: HGF と c-Met は筋肉において発現し、筋肉運動を制限することで発現制御を受けることが明らかとなった。今後は、筋肉に於ける HGF, c-Met の発現制御から見た ALS に有用な HGF もしく

は理学治療法の開発も視野に入れた研究発展を目指す予定である。

まとめ

HGFは、c-Met側のSer985リン酸化制御を介してALSの神経細胞により効率的にシグナルを伝達することが示唆された。HGFは従来報告してきた脊髄に加え脳幹運動神経での神経変性進行阻止・改善に向けてもALS神経に効率的に作用する安全な治療薬となることが期待された。今後臨床適用に向けさらに研究を発展させたい。

研究協力者

1. 青木正志、糸山泰人、東北大神経内科
2. 加藤信介、鳥取大学脳研病理
3. 立野勝彦、金沢大学基礎理学療法科
4. 竹尾聡、東京薬科大学薬理学教室

文献

1. Zhao MZ, et al., Novel therapeutic strategy for stroke in rats by bone marrow stromal cells and ex vivo HGF gene transfer with HSV-1 vector. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1-13, 2006.
2. Ishihara N, et al., Inhibition of apoptosis-inducing factor translocation is involved in protective effects of hepatocyte growth factor against excitotoxic cell death in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 95(5):1277-1286, 2005.
3. Isogawa K, et al., Anxiolytic effect of hepatocyte growth factor infused into rat brain. *Neuropsychobiology* 51(1):34-38, 2005.
4. Tanaka S, et al., Expression of Hepatocyte Growth Factor in Rat Skeletal Muscle. *J Phys Ther Sci* 17:109-113, 2005.
5. 大谷若菜他., Hepatocyte growth factor (HGF) 日本臨床 :116-122, 2005

Ⅲ. 研究報告（研究協力者）

ラット脊髄への幹細胞移植の試み

研究協力者 阿部康二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経病態内科学 教授

研究要旨：筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療を目的として、ラット脊髄前角に運動ニューロンの補充を試みた。運動ニューロンはレチノイン酸・ソーニックヘッジホッグを用いて胚性幹細胞から分化誘導した。運動ニューロンはレシピエントの脊髄で3週間生存し、神経突起を伸長した。

協同研究者：永井真貴子¹、村上哲郎¹、
武久康¹、太田康之¹、奈良井恒¹、倉田智子¹、
東海林幹夫¹、Serge Przedborski²、
Hiroshi Mitsumoto²（1. 岡山大学医学部神経
内科、2. コロンビア大学神経内科）

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症は運動ニューロンが選択的に変性し、このため筋萎縮・脱力を来し数年の経過で死に至る神経変性疾患である。これまで神経栄養因子の投与などが試みられ、筋脱力症状の進行を緩徐にする、寿命を延ばす効果が報告されてきた。本研究では、胚性幹細胞から運動ニューロンを分化誘導し、脊髄前角に移植することで運動ニューロンを補充することを目的とする。

B. 研究方法

胚性幹細胞（ES cell）は、運動ニューロンの発生期に特異的に発現する HB9 のプロモーターの支配下で緑色蛍光タンパク（GFP）が発現するように作製されたトランスジェニックマウスから確立した。このトランスジェニックマウスの脊髄では運動ニューロンのみが GFP を発現する。確立した

ES cell をレチノイン酸、ソーニックヘッジホッグ（Shh）を加えた培地で培養し、運動ニューロンに分化させた（ES-MN）。分化誘導の確認のため、アストロサイト上で ES-MN を培養し、形態を観察し、また神経細胞特異的なマーカーである MAP2、運動ニューロン特異的なマーカーである Islet 1/2、コリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）で免疫染色した。ES-MN を生後2日のラット脊髄にガラスピペットを使用して移植した。ラットはシクロスポリンを投与して免疫抑制をして3週間飼育し、その後4% PFA を用いて灌流固定し、脊髄を切片にして移植された細胞を観察した。

（倫理面への配慮）

移植にあたってラットは氷上で麻酔し、手術時の痛みがないように配慮した。術後は37度に保温し、元のケージの床敷きでくろみ、母ラットに返した。

C. 結果

ES cell からレチノイン酸、Shh を用いて分化誘導した細胞は30%が GFP を発現しており、運動ニューロンに分化したと考えられた。それらをアストロサイト上で培養すると、長い神経突起を伸ばし、また神経細

胞のマーカーである MAP2、運動ニューロンのマーカーである Islet 1/2、ChAT を発現していた。また、他の神経細胞とシナプス生存していた。形態学的には神経突起を伸ばし、MAP2、Islet 1/2、ChAT を発現していた。神経突起は、移植した脊髄前角から対側までも灰白質内を伸長し、白質に突き当たると白質と灰白質の境界を伸長した。

を形成していた。レシピエントラット脊髄に移植した運動ニューロンは、3 週間後も

D. 考察

マウス ES cell から運動ニューロンが分化できることが証明された。脊髄に移植すると、運動ニューロンの性質を保持したまま最低 3 週間は生着し、神経突起を伸長することが分かった。神経突起の伸長する方向からは白質からの軸索伸長抑制因子の存在が考えられ、これを克服する必要があると考えられた。

E. 結論

ES Cell から運動ニューロンを分化誘導してラット脊髄に移植した。運動ニューロンはレシピエントの脊髄で 3 週間生存し、神経突起を伸長した。

G. 研究発表

- 1.Narai H et al. J Neurosci Res 82:452-7 (2005)
- 2.Nagano I et al. J Neurol Sci 235:61-8 (2005)
- 3.Nagano I et al. Neurol Res 27:768-72 (2005)