

## レドックスシステムに立脚した ALS ストレスによる 細胞死回避に関する基盤研究

研究協力者 加藤信介 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門 助教授

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症(ALS) SOD1 トランスジェニック動物においては、神経症状を発症する前臨床症状期の肝細胞に vacuolation pathology を有する swollen hepatocyte と eosinophilic hepatocyte の変性像が認められた。終末期の脊髄には、脊髄前角細胞の高度変性脱落に加え、変異 SOD1 に特有な病理像である inclusion 及び vacuolation pathology が出現していた。一方、終末期の肝は、正常組織像を呈していた。この肝細胞正常回復機構に関しては、変異 SOD1 ストレスに対して、多くの肝細胞がレドックスシステムの基幹酵素であるペルオキシレドキシシン(Prx)やグルタチオンペルオキシダーゼを upregulate させ、自ら守って生存することにより、正常細胞回復機構の一助としていたことを確認した。この肝における内因性レドックスシステム生存メカニズムを脊髄前角細胞に応用するために、レドックスシステム生存メカニズムの基幹酵素である Prx cDNA 及び精製リコンビナント Prx を作製した。この細胞死回避生存メカニズムの基幹酵素を脊髄前角細胞に導入することにより、脊髄前角細胞死回避、即ち、ALS の画期的治療法確立を目指す。

共同研究者：加藤雅子<sup>1</sup>、青木正志<sup>2</sup>、糸山泰人<sup>2</sup>、西野武士<sup>3</sup>、平野朝雄<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>鳥取大学病理部、<sup>2</sup>東北大学大学院神経内科、  
<sup>3</sup>日本医科大学第一生化学、<sup>4</sup>米国 Montefiore Medical Center 神経病理部門

### A. 研究目的

変異 SOD1 ALS ストレスに対する肝細胞死回避機構の一つであるレドックスシステムを脊髄前角細胞死回避に応用する。この応用のために、第一に ALS SOD1 トランスジェニック動物の肝細胞は変異 SOD1 ストレス（毒性）に対して、前臨床症状期には vacuolation pathology を伴う swollen hepatocyte や eosinophilic hepatocyte を示す変性像を呈するが、終末期には肝は正常組織像に回復していることを呈示する。第二に、脊髄前角細胞は、変異 SOD1 ストレスに対して、一部の脊髄前角細胞はレドックスシステムを upregulate して、自らを守って生存の可能性を探

るが、最終的にはドックスシステムが破綻するために脊髄前角細胞死にいたることを呈示する。第三に、変異 SOD1 ストレスに対して、多くの肝細胞はレドックスシステムを upregulate し、破綻することなくドックスシステムを維持することで、肝細胞正常回復機構の一助としていたことを呈示する。第四に、レドックスシステムの基幹酵素である精製リコンビナントペルオキシレドキシシン (Prx) を大量に作製する。以上より、レドックスシステムの基幹酵素である Prx を脊髄前角細胞に導入することにより脊髄前角細胞のレドックスシステム破綻を阻止し、脊髄前角細胞死回避、即ち、ALS の画期的治療に応用することを本研究の目的とする。

### B. 研究方法

脊髄組織の解析には、ALS SOD1 トランスジェニック動物とヒト剖検例を用いた。ALS SOD1 トランスジェニック動物として、マウス

ではG93A トランスジェニックマウス高コピー群(G93A-G1H)と G93A トランスジェニックマウス低コピー群(G93A-G1L)の2系統と G93A トランスジェニックラットを検索した。対照にはそれぞれの同胞を使用した。ヒト剖検例としては、発症後6ヶ月から11年5ヶ月の孤発性ALS(SALS) 40症例(男性19例、女性21例、年齢43歳から86歳)、SOD1 遺伝子異常を伴う家族性ALS (FALS) として Japanese Oki Family (コドン126の2塩基欠失)2症例(1年6ヶ月、11年)と American C 家系(A4V)3症例(7ヶ月、8ヶ月、1年)、対照として正常20症例(男性11例、女性9例、年齢33歳から75歳)を検索した。肝組織の検索には、変異SOD1 ストレスに対する肝細胞回復機構を解析する目的で、ALS SOD1 トランスジェニック動物(G93A-G1H, G93A-G1L, G93A ラット)を使用し、対照にはそれぞれの同胞を用いた。G93A-G1H では生後90日から終末期(120日)までの4時点(90日、100日、110日、120日)、G93A-G1L では、生後110日から終末期(250日以後)までの7時点(110日、120日、150日、180日、190日、215日、250日以後)、G93A ラットでは生後70日から終末期(180日以後)までの6時点(70日、90日、110日、130日、150日、180日以後)で検体採取を行い、実験に供した。

各組織材料からパラフィンブロックを作製し、HE 染色法を施すと同時に、レドックスシステム検索として免疫組織化学的解析を施行した。即ち、レドックスシステムの基幹酵素であるペルオキシレドキシ(Prx)I, PrxII, グルタチオンペルオキシダーゼ(GPxI)の各精製ポリクローナル抗体を使用し、ABC法との組み合わせで、DAB 発色にて可視化した。同時にラット PrxII cDNA をラット肝 cDNA ライブラリーより primer , 5'-TTCCATGGCCTCCGGCAACGCGCACAT-3' と 5'-TTGGATCCATCTCAGTTGTGTTTGGAG-3'を用いて、PCR法にて、増幅して抽出した。次にラット PrxII cDNA をカナマイシン耐性大腸菌発現ベクター pET30a に挿入したプラスミ

ドを設計して、ストレイン BL21 大腸菌内で発現させて、大量の精製リコンビナントラット PrxII を作製した。同様な手法にて、精製リコンビナント PrxI も作製した。今回使用した PrxI, PrxII の各抗体はそれぞれ精製リコンビナントラット PrxI, PrxII を抗原として新たに作製したものである。Western blot 解析は、G93A-G1H の各病期(90日、100日、110日、120日)の肝と同胞肝の新鮮凍結組織を用いた。

### C. 研究結果

#### 1. ALS SOD1 トランスジェニック動物における肝組織像の経時的形態変化

G93A-G1H の前臨床症状期の生後90日齢肝は、vacuolation pathology を伴う多数の swollen hepatocyte と少数の eosinophilic hepatocyte とが混在する変性像を示した。生後100日齢では、eosinophilic hepatocyte が増加し、swollen hepatocyte が減少した変性像を呈した。しかし、生後110日齢と終末期の120日齢の肝細胞は正常組織像を示した。G93A-G1L では、前臨床症状期の生後110日齢と120日齢の肝は、正常組織像を示していたが、150日齢の肝は、vacuolation pathology を伴う多数の swollen hepatocyte と少数の正常肝細胞とが混在する像を示した。最も変化の著しかった180日齢と190日齢の肝は殆どが vacuolation pathology を伴う swollen hepatocyte の像であった。生後215日齢の肝細胞は小型化していた。終末期の250日齢以後の肝細胞は正常組織像に復していた。G93A ラットの前臨床症状期の生後70日齢と90日齢の肝は、正常組織像を示していた。発症直前の最も変化の著しかった110日齢の肝は、vacuolation pathology を伴う多数の swollen hepatocyte と少数の eosinophilic hepatocyte とが混在する変性像を示した。発症直後の生後130日の肝では eosinophilic hepatocyte が増加し、150日齢と180日以後の終末期の肝はほぼ正常組織像を示した。即ち、ALS SOD1 トランスジェニック動物の系統とは無関係に、脊髄前角細胞に病的変化のない前臨床症状期の肝は既に変性像を呈していて、脊髄前角細胞が高度障害され

消失する終末期には、肝は正常組織像に復していた。

## 2. ヒト ALS 及び ALS SOD1 トランスジェニック動物の脊髄前角細胞におけるレドックスシステムの経時的変化

ヒト・ラット・マウスの正常脊髄の免疫組織化学的解析では、ほとんど全ての前角細胞の胞体および樹状突起がびまん性に PrxII を発現し、核も一部で陽性所見を示した。GPxI 染色でも、ほとんどの前角細胞の胞体および樹状突起がびまん性に染色され、核は染色性を示さなかった。即ち、正常脊髄前角細胞ではレドックスシステムの基幹酵素 PrxII/GPxI を一定レベル発現することにより、レドックスシステムを維持していた。

SALS の多くの残存前角細胞は、PrxII と GPxI の両者を発現していなかった。病期期間が4年までの SALS の残存前角細胞の一部には、PrxII/GPxI の両者強陽性、即ち、レドックスシステムを upregulate させている残存前角細胞が認められた。特に、発症後 2、3 年の SALS において、残存神経細胞の一部にレドックスの upregulation を示す神経細胞が目立った。それ以後は、ALS 経過と共に、レドックスシステムを upregulate させている残存前角細胞は激減した。一方、PrxII/GPxI を発現しない、即ち、レドックスシステムの破綻した残存神経細胞は SALS の経過と共に増加した。FALS 及び ALS SOD1 モデル動物では、レビー小体様硝子様封入体 (Lewy body-like hyaline inclusion, LBHI) が一部の残存前角神経細胞に認められ、SOD1、PrxII、GPxI の三者に強陽性を示した。LBHI を胞体内に形成している神経細胞胞体は、PrxII/GPxI ほとんど発現せず、レドックスシステムが破綻していた。ALS SOD1 モデル動物における発症時期の LBHI を持たない残存前角神経細胞の一部には、PrxII/GPxI の両者を同時強発現して、レドックスシステムを upregulate している神経細胞が認められた。しかし、多くの残存前角神経細胞は、PrxII/GPxI を発現せず、レドックスシステムに破綻を来していた。終末期では、SOD1/PrxII/GPxI 三者強陽性を示す封入体を認

めるものの、ほとんどすべての残存神経細胞は、PrxII/GPxI を発現せずレドックスシステムの破綻を認めた。

## 3. ALS SOD1 トランスジェニック動物の肝細胞におけるレドックスシステムの経時的変化

ヒト・ラット・マウスの正常肝の免疫組織化学的解析では、ほとんど全ての肝細胞がびまん性に PrxI/PrxII を発現し、核も一部で陽性所見を示した。GPxI 染色でも、ほとんどの肝細胞がびまん性に染色され、核は染色性を示さなかった。即ち、正常肝細胞ではレドックスシステムの基幹酵素 PrxI/PrxII/GPxI を一定レベル発現することにより、レドックスシステムを維持していた。

G93A-G1H の生後 90 日齢肝は、レドックスシステムの基幹酵素 PrxI/PrxII/GPxI を高発現している少数の hepatocyte とレドックスシステムの基幹酵素を低発現している多数の hepatocyte が heterogeneity を呈して混在していた。生後 100 日齢では、レドックスシステムを高度に upregulate している hepatocyte の数が増加し、低発現している hepatocyte と heterogeneity を示して混在していた。しかし、正常組織像を示した生後 110 日齢と終末期 (120 日齢) 肝細胞のレドックスシステムの基幹酵素 PrxI/PrxII/GPxI は、ほぼ正常の染色性を示した。G93A-G1L では、正常組織像を示していた生後 110 日齢と 120 日齢の肝レドックスシステムの免疫組織化学的染色強度は正常染色強度を示していた。生後 150 日齢の肝レドックスシステムは、upregulate している少数の hepatocyte に downregulate している多数の hepatocyte が混在していた。最も組織変化の著しかった 180 日齢と 190 日齢の肝では、高度に upregulate している hepatocyte が大部分を占めていた。正常組織像に復していた終末期の 250 日齢以後の肝細胞は、ほぼ正常の染色性を示した。G93A ラットの正常組織像を示していた生後 70 日齢と 90 日齢の肝は、ほぼ正常の染色性を示した。生後 110 日齢の肝では、レドックスシステムの基幹酵素を高発現している少数の hepatocyte と低発現している多数の hepatocyte とが heterogeneity を示して混在して

いた。発症直後の生後 130 日の肝では、レドックスシステムを高度に upregulate している hepatocyte が増加し、低発現している hepatocyte と混在していた。ほぼ正常組織像を示した 150 日齢と 180 日以後の終末期の肝は、ほぼ正常の染色性を示した。

#### 4. Western blot 解析結果

G93A-G1H の新鮮肝組織を用いた PrxI の Western blot 解析では、G93A-G1H の生後 90 日齢肝は、同胞対照群に比べ、PrxI の発現量は低下していた。生後 100 日齢肝では、PrxI の発現量は同胞対照群より増加していた。生後 110 日齢と終末期の 120 日齢肝の発現量は同胞対照群と同じであった。即ち、生後 100 日齢肝では、total tissue homogenate で解析してもレドックスシステム基幹酵素の発現量が同胞対照群より増加していた事実と、免疫組織化学的にレドックスシステムを高度に upregulate している hepatocyte と低発現している hepatocyte とが混在していたという事実とから、変異 SOD1 に対して、hepatocyte の一部には極めて高度にレドックス基幹酵素を誘導する能力があること判明した。

#### D. 考察

ヒト SALS・FALS 及び ALS SOD1 モデル動物においては、原因不明の ALS ストレスあるいは変異 SOD1 ストレス (毒性) に対して脊髄前角細胞は傷害され、細胞死に至る。レドックスシステムに着目すると、発症期間中の一部の残存脊髄前角細胞は、細胞死回避のために内因性レドックスシステムを upregulate させていた。しかし、長期間にわたる ALS ストレスに対し最終的にはすべての脊髄前角細胞はレドックスシステムを維持できなくなり、破綻をきたし、やがては脊髄前角細胞死を迎えた。ALS SOD1 モデル動物の変異 SOD1 ストレス下の肝の経時的組織変化は、肝細胞は脊髄前角細胞より早期に変性像を示すものの、脊髄前角細胞が高度脱落した脊髄組織の荒廃を認める終末期には正常組織像に復していた。この肝におけるレドックスシステムの経時的変化は、変異 SOD1 スト

レスに対して、肝細胞の最も病理組織変化が高度な時期では、脊髄前角細胞と同様に病的肝細胞は内因性レドックスシステムを upregulate させていた。しかし、レドックスシステム破綻をきたす脊髄前角細胞とは異なり、肝細胞は、全経過を通じて内因性レドックスシステムを維持し、破綻を生じさせなかった。

一方、レドックスシステムは Prx と GPx を基幹酵素として、SOD1 にリンクし、スーパーオキシドラジカルから SOD1 により変換される過酸化水素を安全な水と酸素に分解するシステムであると同時に、細胞の生存・維持には不可欠なシグナルトランスダクションシステムでもある。また、レドックスシステムの基幹酵素の一部は、分子チャペロンとして作用することにより、ミスフォールドした変異 SOD1 などの異常蛋白質を修復・除去する。それ故、肝細胞は脊髄前角細胞とは異なり、全経過を通じて内因性レドックスシステムを維持し、破綻させないことで、レドックス生存機構により細胞死を抑制し、病的形態的変化を完全に回復させる正常細胞回復機構の一助にレドックス機構を活用していることが推測される。このレドックス生存機構仮説に基づき、今回、我々は、レドックスシステム基幹酵素の一つである Prx cDNA 及び精製リコンビナント Prx 蛋白質の両者を作製した。これらの作製成果は、レドックスシステム基幹酵素の cDNA を神経細胞発現ベクタに挿入し ALS SOD1 モデル動物に投与することにより、遺伝子学的に脊髄前角細胞に導入することを可能にする。あるいは、精製リコンビナントレドックス基幹酵素そのものを髄腔内投与により、直接脊髄前角細胞に導入することも可能にする。このようにしてレドックスシステム基幹酵素を強制的に脊髄前角細胞に導入することで、最終的に total cell death のプロセスを歩む脊髄前角細胞に、少なくとも肝細胞以上に常に内因性レドックスシステムの基幹酵素を発現させることが可能となる。この戦略は、肝細胞が一度は重大な病的形態変化を生じたものの完全に回復できるという事実に立脚すれば、脊髄前角細胞の完全回復、即ち、ALS の

画期的治療法確立につながる。

#### E. 結論

肝細胞が変異SOD1 ストレスからの細胞死回避機構の一助にレドックスシステムを有していることを確認し、レドックスシステム基幹酵素である PrxI cDNA 及び精製リコンビナント Prx を作製した。この細胞死回避システムの基幹酵素を脊髄前角細胞に導入することにより、脊髄前角細胞死回避、即ち、ALS の画期的治療法確立を目指す。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kato S, Kato M, Abe Y, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, Ohama E: Redox system expression in the motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS, superoxide dismutase 1 (SOD1)-mutated familial ALS, and SOD1-mutated ALS animal models. *Acta Neuropathol* 2005, 110(2): 101-112.
- 2) Aoki M, Kato S, Nagai M, Itoyama Y: Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology* 2005, 25(4): 365-370.
- 3) Ikeda K, Aoki M, Kawazoe Y, Sakamoto T, Hayashi Y, Ishigaki A, Nagai M, Kamii R, Kato S, Itoyama Y, Watabe K: Motoneuron degeneration after facial nerve avulsion is exacerbated in presymptomatic transgenic rats expressing human mutant Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurosci Res* 2005; 82(1): 63-70.
- 4) Fukada M, Kato S, Miyoshi M, Yamaguchi K, Imoto T, Watanabe T: Systemic administration of

lipopolysaccharide upregulates angiotensin II expression in rat renal tubules: immunohistochemical and ELISA studies. *Peptides* 2005, 26(11): 2215-2221.

##### 2. 学会発表

- 1) 加藤信介, 加藤雅子, 青木正志, 糸山泰人, 阿部靖子, 西野武士, 朝山光太郎, 栗屋昭, 平野朝雄, 大浜栄作. 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における残存運動神経細胞生存機序としてのレドックス機構 upregulation の解明. 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005, 宇都宮).
- 2) 加藤信介. 脱髄疾患の病理 (含 PML): 第46回日本神経学会教育コース「神経病理学の基礎」第46回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005, 宇都宮).
- 3) 加藤信介. SOD1 遺伝子異常を伴う生体系における細胞死のメカニズム: AGE 形成に伴う凝集毒性. 第15回日本メイラード学会 (2005, 大阪).
- 4) 加藤雅子, 加藤信介, 青木正志, 糸山泰人, 阿部靖子, 西野武士, 朝山光太郎, 大浜栄作. 変異SOD1を伴う家族性筋萎縮性側索硬化症のモデル動物における肝の経時的病理組織像の検討: 肝細胞と脊髄前角細胞の比較. 第46回日本神経病理学会総会学術研究会 (2005, 宇都宮).
- 5) 加藤雅子, 加藤信介, 堀江 靖. 肝細胞癌におけるfetal glycoprotein 68の発現の検討. 第94回日本病理学会総会 (2005, 横浜).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: 準備中。
2. 実用新案登録: なし。
3. その他: なし

## 家族性筋萎縮性側索硬化症の細胞モデルにおける 分子シャペロン Mrj が及ぼす変異型 SOD1 の可溶性変化

研究協力者 山形大学医学部生命情報内科学 小山信吾 荒若繁樹 加藤丈夫

### 研究要旨

変異型 SOD1 による ALS 発症メカニズムは未だ不明であるが、変異型 SOD1 タンパク質凝集体が細胞毒性を発揮するという「重合化仮説」が提唱されている。本研究は「変異型 SOD1 の可溶性変化」に焦点をあて、本来可溶性タンパク質である野生型 SOD1 と変異型 SOD1 の可溶性の相違について検討し、ユビキチン・プロテアソーム分解系や、Heat shock protein (Hsp) 40、Hsp70、Mrj (mammalian relative of DnaJ) が変異型 SOD1 の可溶性変化に及ぼす影響を検討した。野生型 SOD1 と比較して変異型 SOD1 ではプロテアソーム阻害剤の濃度依存性に可溶性変化を生じ、Triton-X 100 不溶性分子種の増加を認めた。核に局在した Mrj (HSJ2a) は不溶性 SOD1 を減少させる効果は認めなかったが、細胞質に分布した Mrj (HSJ2b) により不溶性 SOD1 の減少を認めた。Mrj 単独の効果は Hsp70 とほぼ同程度に Triton-X100 不溶性の変異型 SOD1 分子種を減少させたが、Hsp70 の作用増強効果は Hsp40 とほぼ同程度であった。

### A.研究目的

SOD1 重合化仮説を検討するための基礎的情報となる変異型 SOD1 の可溶性変化に焦点をあて、1. 本来可溶性タンパク質である野生型 SOD1 と変異型 SOD1 の可溶性の相違について検討する。2. ユビキチン・プロテアソーム分解系と野生型および変異型 SOD1 の可溶性変化との関係を検討する。3. Heat shock protein (Hsp) 40、Hsp70、Mrj が変異型 SOD1 の可溶性変化に及ぼす影響を検討する。

### B.研究方法

家族性筋萎縮性側索硬化症のモデルとして、SOD1 を過剰発現させた培養細胞 (COS7 細胞、SH-SY5Y 細胞) を PBS バッファー、1 %Triton X-100/ PBS バッファー、5 %SDS/ PBS バッファーを用いて分画し、ウエスタンブロットを行い、変異型 SOD1 の可溶性変化を検討した。プロテアソーム阻害剤 (MG132 あるいは lactacystin) の添加により、プロテアソーム分解系と SOD1 の可溶性変化との関係を検討した。SOD1 と Hsp40、Hsp70、Mrj

を共発現させることで Hsp が及ぼす SOD1 の可溶性変化を検討した。

(倫理面への配慮) ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準じた。

#### C. 研究結果

COS7 細胞に SOD1 を過剰発現させ (pcDNA3.1 ベクター)、プロテアソーム阻害剤である MG132 を添加すると、変異型 SOD1 は SDS 可溶性画分、SDS 不溶性画分において MG132 濃度依存性の増加を示し、2 量体、高分子量種の形成を認めた。SH-SY5Y 細胞を用いた場合や異なるプロテアソーム阻害剤である lactacystin を用いても同様の結果を示した。COS7 細胞に pEF-BOS ベクターを用いて SOD1 を過剰発現させると、プロテアソーム阻害剤を添加しない状態でも SDS 可溶性画分、SDS 不溶性画分に変異型 SOD1 が観察された。変異型 SOD1 分子種は Hsp70 の共発現により SDS 可溶性画分、SDS 不溶性画分で減少した。核に局在した Mrj (HSJ2a) は不溶性 SOD1 を減少させる効果は認めなかったが、細胞質に分布した Mrj (HSJ2b) は Hsp70 とほぼ同程度に Triton-X100 不溶性の変異型 SOD1 分子種を減少させた。Mrj は Hsp40 とほぼ同程度に Hsp70 の作用増強効果を示した。

#### D. 考察

変異型 SOD1 はプロテアソーム阻害剤の濃度依存性に Triton X-100 不溶性/SDS 可溶性 SOD1 分子種が増加した。この可溶性が低下した SOD1 分子種が凝集体形成の過程における中間体である可能性が

考えられた。変異型 SOD1 の可溶性変化におけるプロテアソーム活性の関与が示された。SOD1 と Hsp70、Mrj の過剰発現は、Triton-X100 不溶性/SDS 可溶性の変異型 SOD1 分子種を減少させたが、PBS 可溶性画分や Triton X-100 可溶性画分 SOD1 の変化は乏しかった。これより Hsp が可溶性の低下した変異型 SOD1 分子種を認識し、リホールディングよりも分解の方向へ向かわせている可能性が考えられた。

#### E. 結論

分子シャペロンによる不溶性 SOD1 の抑制が家族性筋萎縮性側索硬化症の治療戦略の一つとなりうる可能性が考えられた。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 脊髄スライス培養に対する骨髄間質細胞の効果

研究協力者 菊地誠志，辻 幸子，田代 淳，佐々木秀直  
（北海道大学大学院医学研究科神経内科学）

**研究要旨** 細胞療法としての骨髄間質細胞（BMSCs）の効果に着目し，脊髄スライス培養と共培養することで BMSCs の脊髄に対する作用を検討した。BMSCs は何らかの液性因子を介して非接触条件下でスライス培養のグリオシスを抑制し神経幹細胞マーカーである nestin を発現した細胞を増加させた。再生医療において内因性幹細胞の動員とグリア新生に傾きやすい脊髄の環境を変化させることで，再生初期に有用である可能性があると考えられた。BMSCs とスライスカルチャーを直接接触させた培養では BMSCs がニューロンに沿って突起を伸ばす形態変化が見られた。細胞移植療法で運動ニューロンの極近傍から高濃度の栄養因子を提供することが期待でき，新たな治療法となりうる可能性があると考えられた。

### A. 研究目的

近年，骨髄間質細胞（BMSCs）の移植実験により脳梗塞や脊髄損傷モデルマウスの病巣縮小や症状改善が報告されている。当初 BMSCs は多分化能を持ち病巣で神経系細胞に分化することを期待されていたが，その効果の本態は神経栄養因子放出など分化以外の作用であると考えられるようになってきた。そこで，BMSCs が筋萎縮性側索硬化症（ALS）治療へ応用しうるか基礎データを収集するため，ラット脊髄スライスカルチャーと BMSCs を同時に培養する系を確立しその作用に

ついて検討した。

### B. 研究方法

当研究での実験動物の取り扱いには北海道大学医学部動物実験に関する指針に基づいて行った。

BMSCs は成体（SD）ラットの両側大腿骨よりフラッシュして採取し，溶血処理，遠心後回収しプラスチックフラスコに接着する性質を用いて培養した。第2～7継代で使用した。脊髄スライスカルチャーは生後6日目SDラットから採取した腰膨大部を400 $\mu$ mに水平断し6穴プレート内に置いた膜上で培養する。両者を同時に



培養する場合、①あらかじめ数日間 6 穴プレートの底に BMSCs を培養しておきスライスカルチャーをスタートし、両者の接触のない状態で培養 (bi-culture)、または②スライスカルチャーの上に直接 BMSCs を載せて両者が接触した状態で培養 (co-culture) を行った。

Co-culture の BMSCs は GFP トランスジェニックマウスから採取した (北大神経外科・黒田徹先生と共同研究)。

### C. 研究結果

Bi-culture では通常のスライスカルチャーで見られるスライスの増大・増高が見られず、辺縁が不明瞭となった。各スライスあたりのタンパク量も通常のスライスカルチャーに比べ優位に少なかった。スライスの増大・増高はグリオシスを反映していると考えられていることから、培養 28 日目にアストロサイトのマーカーである GFAP で免疫染色を行った。両者の違いが特に明瞭だったスライス辺縁付近に注目すると、bi-culture では GFAP 陽性アストロサイトの増生が抑制されていた。また、bi-culture では通常のスライスカルチャーでは殆ど見られない Nestin 陽性・GFAP 陰性細胞が出現していた。ウェスタンブロット法でも GFAP 量は bi-culture で少なかったが、Nestin は両方で差はなかった。

Bi-culture で見られた nestin 陽性細胞の増殖能を見るため bromodeoxyuridine (BrdU) で標識した。培養 7 日目に BrdU 標識し 24 時間後に固定染色したところ

BrdU・Nestin 二重陽性細胞は見られなかったが、培養開始直後から 24 時間 BrdU 標識し培養 8 日目に固定染色したところ二重陽性細胞が見られた。この結果から培養早期に増殖した細胞が nestin を発現し増殖停止したと考えられた。

Co-culture では BMSCs にニューロンマーカーの発現は見られなかったが、ニューロンと似たような形態をとってスライス培養由来のニューロン軸索に絡みつくように突起を伸ばしている細胞が少数ながら見られた。また、細胞塊を形成する傾向がありこの細胞塊にはスライスから伸びた軸索が絡みつくような像を示し BMSCs は軸索伸張を促しているものと考えられた。

### D. 考察

Bi-culture の結果からは BMSCs が何らかの液性因子を介してグリオシスを抑制し、nestin 陽性細胞を増加させた。グリオシスの抑制は既存のアストロサイト増殖の抑制が主な作用と考えられる。Nestin は神経幹細胞のマーカーであるが、今回増加した nestin 陽性細胞は BrdU ラベリングの結果からスライス作製時に増殖してできたものである。幹細胞の定義である自己複製能や多分化能は示せておらず、現時点では幹細胞と同定することはできない。しかし、過去の脊損などの疾患モデルの報告から損傷により内因性幹細胞の活性化が促されうることや脊髄が神経幹細胞に対しグリア新生に働く環境であることを考慮すると、bi-culture で見

られた Nestin 陽性細胞はスライス作製の刺激で神経幹細胞が増殖, nestin を発現した後, 本来グリア新生に向かう環境であったものが BMSCs の作用によりグリア新生が抑制され未分化な状態で留められたものと考えた.

Co-culture で見られたニューロンに沿うような変形能や軸索伸張作用は, 細胞療法として移植した場合にニューロンの極近傍から持続的かつ高濃度に栄養因子を送り込む支持細胞として働くことが期待でき, 新規治療法としての可能性を開くものであると考えられた.

#### E. 結論

BMSCs は培養脊髄に対し①グリオシス抑制, ②神経幹細胞の未分化状態維持, ③神経に沿うような変形能, ④軸索伸張作用を持つことを示した.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Proteasome Inhibition Induces Selective Motor Neuron Death in Organotypic Slice Cultures. J Neurosci Res 82; 443-451 (2005)

##### 2. 学会発表

- プロテアソーム障害による脊髄運動ニューロン変性. 第46回日本神経学会総会 (平成17年, 鹿児島)
- Bone marrow stromal cells promote proliferation of potential neural stem cells in organotypic spinal cord slice

cultures. 16th International Symposium on ALS/MND. Dublin. (2005, Dublin)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## システイン残基を介した変異 SOD1 の毒性発現機構の解析

研究協力者 佐古田三郎 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学・教授

研究要旨 家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) でみられる変異 Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) の銅親和性を金属親和性クロマトグラフィーにより解析した。その結果変異 SOD1 の銅親和性は野生型 SOD1 よりも上昇していた。変異 SOD1 の異常銅親和性の発現には copper chaperone for SOD1 (CCS) は関与しなかったが、他の何らかの細胞内因子を必要とした。またこの異常銅親和性には変異 SOD1 の 111 番目のシステイン残基 (Cys111) が重要であった。SOD1 の銅親和性とそのコンフォメーション変化、神経細胞毒性には関連がみられ、変異 SOD1 はこの異常銅親和性を介した酸化ストレスにより FALS 発症に関与している可能性がある。

### A. 研究目的

FALS における変異 SOD1 の毒性の本体として、以前より同蛋白由来の銅を介した酸化ストレスの関与が指摘されてきた。しかしながら SOD1 活性部位への銅運搬シャペロンである CCS の欠損によっても変異 SOD1 による神経細胞死は抑制されず、活性部位の銅の関与は否定的とみられている。一方で活性部位での銅結合が低下した変異型 (H46R) においては他の部位での銅結合が推測されており、変異 SOD1 と銅との相互作用を明らかにすることは FALS の病態を知る上で重要であると考えられる。そこで SOD1 蛋白全体としての銅親和性を検討するため、銅飽和カラムを用いた金属親和性クロマトグラフィー (Cu-IMAC) を行い変異 SOD1 の溶出パターンを野生型 SOD1 と比較した。さらに H46R 変異 SOD1 での銅結合部位とされる Cys111 が変異 SOD1 の銅親和性に及ぼす影

響を解析し、その高次構造、神経細胞毒性との関連を比較検討した。

### B. 研究方法

まず野生型もしくは変異ヒト SOD1 を発現するトランスジェニックマウス脊髄、酵母より蛋白溶解液を調製し、これらを Cu-IMAC カラムに通して洗浄した後、漸増濃度の銅キレート剤 (イミダゾール) 溶液により蛋白を銅親和性に応じて溶出した。SOD1 の溶出パターンは各フラクションの Western blot により確認した。次に Sf21 細胞にて発現後疎水性およびイオン交換クロマトグラフィーにより精製した野生型、変異 SOD1 を用い、野生型マウス脊髄蛋白溶解液との共培養の有無による溶出パターンの変化を観察した。さらに変異 SOD1 およびその Cys111 をセリンに置換したもの (C111S) を COS7 細胞で発現させ、それぞれの Cu-IMAC 溶出パターンを解析した。また各 SOD1 のコンフォメーシ

ヨンの相違を蛋白溶解液の native-PAGE により検討するとともに、各 SOD1 を Neuro2A 細胞に発現させた後 propidium iodide 染色での陽性細胞を計測し、それぞれの神経細胞毒性をみた。

(倫理面への配慮) 動物実験に関しては大阪大学医学部医学科動物実験委員会の指針に基づいて行い、処置時にはネンブタールによる深麻酔を用いて苦痛を最小限に抑えた。

### C. 研究結果

数種のトランスジェニックマウス脊髄および酵母のいずれでも Cu-IMAC により変異 SOD1 は野生型 SOD1 より遅れて溶出し、銅親和性の上昇を示した。この変異 SOD1 の銅親和性の上昇は CCS 欠損酵母株でも同様に観察され、CCS には依存しない現象であると考えられた。精製変異 SOD1 では銅親和性の上昇はみられなかったが野生型マウス脊髄蛋白溶解液との共培養により上昇傾向を示し、この現象には他の細胞内因子が必要であることが推測された。異常銅親和性は COS7 細胞で発現した変異 SOD1 でもみられたが、C111S の導入によりその銅親和性は減少した。Native-PAGE により変異 SOD1 は野生型 SOD1 よりも高分子側に泳動されたが、その泳動パターンは C111S 導入により低分子側にシフトした。Neuro2A 細胞において変異 SOD1 は野生型 SOD1 よりも高い細胞毒性を示したが、C111S 導入によりその毒性は軽減される傾向にあった。

### D. 考察

変異 SOD1 は CCS 非依存性に異常銅親和性を保持しており、この異常銅親和性を介した銅結合により変異 SOD1 が活性酸素種の産生などの酸化ストレスを惹起し、神経細胞死を引き起こす可能性が考えられた。この仮説に立てば、酸化ストレスが FALS 発症に

関与するとする報告と CCS は FALS 発症に関与しないとする報告の両者を矛盾なく説明できる。さらにこの変異 SOD1 の異常銅親和性には他の細胞内因子の関与や Cys111 が重要であることより、変異 SOD1 蛋白の修飾あるいはコンフォメーションの状態が銅親和性の重要な規定因子となっていることが示唆された。

### E. 結論

変異 SOD1 の異常銅親和性が FALS における神経細胞毒性の本体となっている可能性につき検討した。この異常銅親和性の軽減により FALS の発症を抑制でき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

Sato T, Nakanishi T, Yamamoto Y, Andersen PM, Ogawa Y, Fukada K, Zhou Z, Aoike F, Sugai F, Nagano S, Hirata S, Ogawa M, Nakano R, Ohi T, Kato T, Nakagawa M, Hamasaki T, Shimizu A, Sakoda S. Rapid disease progression correlates with instability of mutant SOD1 in familial ALS. *Neurology* 65, 1954-1957, 2005.

#### 2. 学会発表

佐藤貴子、山本洋一、中西豊文、長野清一、清水 章、佐古田三郎. 家族性筋萎縮性側索硬化症患者の赤血球内変異/正常 SOD1 蛋白比と臨床経過の関連性. 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月.

須貝文宣、山本洋一、佐古田三郎. ALS モデルマウスにおけるバルプロ酸の症状進行抑制効果. 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月.

Sato T, Nakanishi T, Yamamoto Y, Andersen PM, Hamasaki T, Shimizu A, Sakoda S. Relationship

between disease progression and stability of mutant SOD1 in FALS. XVIIIth World Congress of Neurology, Sydney, Australia, November 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## ヒト Cu/Zn-SOD の安定性に関与する Cys111 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 (familial ALS; FALS) の原因遺伝子の 1 つは Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) である。FALS 患者や変異 SOD1 トランスジェニックマウスだけでなく、孤発性の ALS 患者でも Cu/Zn-SOD 免疫陽性の封入体が観察されており、ALS では凝集した Cu/Zn-SOD の関与が示唆されている。Cu/Zn-SOD にはシステイン残基が 4 つあり、Cys6 と Cys111 はフリーのシステインで Cys57 と Cys146 は S-S 結合をしている。Cys111 はタンパク質の外側にある Greek key loop 内に存在し、ホモダイマーが向かい合った位置するため、Cys111 の SH 基は特に反応性が高いと予想される。この Cys111 の SH 基に SS 交換反応で 2-ME を導入した Cu/Zn-SOD タンパク質の酸化や安定性に及ぼす影響を検討した。その結果、2-ME 化した SOD は野生型の SOD よりも熱に安定で酸化されにくいことが明らかになった。以上の結果は、Cys111 の SH 基を 2-ME でマスクすると SOD を安定化させることが可能であることを示唆する。変異 SOD の Cys111 の SH を特異的に保護する薬剤の開発は FALS の治療につながる可能性があると考えられる。

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）

共同研究者

藤原範子（兵庫医科大学生化学）

中の三弥子（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の原因遺伝子が SOD1 であることが報告されて以来、現在まで 100 以上の変異が報告されている。変異

Cu/Zn-SOD が toxic な作用を有することは様々な実験で明らかにされているが、その毒性の本体、さらにはいかなるメカニズムで運動神経を障害するかは全く不明である。また、FALS 患者や変異 SOD1 トランスジェニックマウス、および孤発性の ALS 患者では Cu/Zn-SOD 免疫陽性の封入体が観察されており、特に変異 Cu/Zn-SOD は生体内で構造変化を起こし、aggregation を起こしやすいことが示唆されている。aggregation の起こしやすさはそのタンパク質の不安定性と関連していると考えられている。逆に不安定なタンパク質を安定なタンパク質にしてやれば、aggregation を防ぐことが可能

になると考えられる。変異 SOD を生体内で安定なタンパク質にするという発想で、新規治療法を探ることにした。

Cu/Zn-SOD にはシステイン残基が 4 つあり、Cys6 と Cys111 はフリーのシステインで Cys57 と Cys146 は S-S 結合をしている。哺乳類ではヒトだけが 111 番目の Cys を持っており、他の哺乳類、酵母や植物では、システインではなく、セリンに置き換わっている。セリンに置き換わった SOD の方が安定であるという報告もある。また Cys111 はタンパク質の外側にある Greek key loop 内に存在し、ホモダイマーが向かい合った位置するため、Cys111 の SH 基は特に反応性が高いと予想される。そこで、この反応性が高いと考えられる Cys111 の SH 基に SS 交換反応で 2-メルカプトエタノール (2-ME) を導入した Cu/Zn-SOD タンパク質の酸化や安定性に及ぼす影響を検討した。

## B. 研究方法

2-ME を導入した Cu/Zn-SOD タンパク質は宇部興産から供与していただいた。まず、Cys111 にのみ 2-ME が結合していること、ほかの Cys には 2-ME が結合していないことを MALD-TOF-MASS 解析で確認した。さらに 2-ME を加えて S-S 交換反応で Cys111 の 2-ME がはずれて元の野生型 SOD に戻るかどうかを検討した。20 mM の 2-ME で処理すると完全に 2-ME がとれた SOD に戻ることが示唆されたため、SOD をトリプシン処理し、Cys111 を含むペプチドにも 2-ME が結合していないことを確かめた。そこで、2-ME がついた SOD を 2-ME-SOD、はずして元に戻したものを re-SOD と呼ぶことにする。この 2 つの SOD を用いて

熱に対する安定性を円偏光二色性 (CD) 解析で調べた。また両 Cu/Zn-SOD に過酸化水素を添加し、酸化 (分解) の程度を SDS-PAGE にて検討した。

## C. 研究結果

Cys111 にのみ 2-ME が結合していること、もう 1 つのフリーのシステインである Cys6 には 2-ME が結合していないことを MALD-TOF-MASS 解析で確認した。さらに 20 mM の 2-ME とインキュベートすることで、Cys111 の 2-ME がはずれて元の SH 型のシステインになることを確認した。2-ME がついた 2-ME-SOD と元に戻した re-SOD を種々の温度下で CD 解析を行った。70°C までは両者とも安定で差は認められなかったが、75°C 以上になると差が始め、re-SOD の方が 2-ME-SOD よりも不安定であることがわかった。Cys111 の SH を 2-ME でマスクした 2-ME-SOD は re-SOD よりも熱安定性が高いことが明らかになった。

次に種々の濃度の過酸化水素を両 SOD に加え 20 分間インキュベート、希釈した後、SDS-PAGE を行った。過酸化水素の濃度が 1 mM 以上になると、re-SOD では主に 2 本のバンドになり、時間がたつと SOD が分解され、バンドの色が薄くなっていく様子が見られた。一方、2-ME-SOD も分解はされたが、その程度は低く、2 本目のバンドは認められなかった。従って、この 2 本目のバンドは Cys111 に由来することが予想される。両 SOD を過酸化水素で酸化したのち MonoQ カラムにかけると、1 本だったピークは複数のピークにわかれた。それぞれのピーク部分をウエスタンブロットティングすると、SOD のメインバンドの下に分解物のバンドが

見られた。またカラムに残ったものを 0.5 M の塩化カリウムで洗い出した部分には高分子の SOD に由来するバンドが見られた。MonoQ カラムのパターンは両 SOD と同じだったが、2-ME-SOD よりも re-SOD の方に分解物や高分子のバンドが多く認められた。つまり、2-ME-SOD は酸化による分解や凝集も起こしにくいことが明らかになった。

#### D. 考察

Cys6 には家族性 ALS を引き起こす変異が認められているが、Cys111 の変異は報告例がない。つまり、すべての FALS 変異 Cu/Zn-SOD には Cys111 のフリーの SH 基が存在し、酸化や他分子との会合が起こりやすい状態にある。以上の結果より、Cys111 のフリーの SH 基をマスクすることによって変異 Cu/Zn-SOD の不安定性や凝集性を低減できる可能性が示唆された。変異 SOD の Cys111 の SH を特異的に保護する薬剤を開発すれば FALS の治療にもつながる可能性があると考えられる。

#### E. 結語

Cys111 を 2-ME 化した Cu/Zn-SOD は熱に安定で酸化分解や凝集を起こしにくい。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Fujiwara N., Miyamoto Y., Ogasahara K., Takahashi M., Ikegami T., Takamiya R., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) 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

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

##### 2. 学会発表

Fujiwara N., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) CONFORMATIONAL CHANGES IN GREEK KEY LOOP STRUCTURE OF CU/ZN-SOD AND ITS IMPLICATION IN ALS: IRN 2005 The 3<sup>rd</sup> Meeting of International Redox Network, November 9–11, Kyoto, Japan, (Abstract, 28)

Fujiwara N., Miyamoto Y., Takahashi M., Ookawara, T., Eguchi, H., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) Mutant Copper/Zinc superoxide dismutases linked to amyotrophic lateral sclerosis exhibit a lowered immunoreactivity against monoclonal antibodies recognizing Greek key loop VI compared with wild type under denatured conditions. *Neuroscience 2005*, Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting, November 12–16, Washington DC, USA, (Program No. 429.12. 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



## 神経細胞のポリオウイルス抵抗性

研究協力者 野本 明男 東京大学大学院医学系研究科教授

運動神経細胞特異的な疾患である筋萎縮性側索硬化症の治療を目的としたウイルスベクターとして、運動神経細胞に感染するポリオウイルスの利用法を検討している。ベクターとして使用するには、ポリオウイルス自体が持つ神経毒性を抑える必要がある。研究の過程で、神経細胞はポリオウイルスの1回の感染には抵抗性があり、感染から回復する能力を持つことを示唆する結果が得られた。すなわち、1) 感染させた後に感染防御抗体を添加すると細胞変性を示さない、2) 1回のみ感染可能で子ウイルス粒子産生に到らないポリオウイルスの欠陥干渉粒子の感染では細胞変性を示さない、3) 細胞変性に中心的役割を持つポリオウイルス特異的 2A プロテアーゼを単独に発現させても神経細胞は細胞変性を示さない、などの結果を得た。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動神経細胞の異常により発症する疾患である。そこで、ALS 治療用ベクターとして運動神経細胞に向性を持つポリオウイルス（PV）に着目した。しかしながら、PV 自体が運動神経細胞に対する毒性を持っており、ウイルスベクターとして使用するには、この点を解決する必要がある。そこで、神経細胞に対する PV の毒性発現現象を解析することを目的とした。

昨年度までに、PV の感染 2 時間後に感染防御抗体を添加すると、神経細胞は細胞変性を示さなくなることを見出してい

る。しかし、この実験系では抗体添加という操作が入るため、細胞内に侵入した抗体の働きについて論じなければならず、最終的な結論は得られない。そこで、ゲノムのキャプシド蛋白質コーディング領域を欠損した PV の欠陥干渉 (DI) 粒子を使用し、感染実験を行うこととした。また、PV 特異的 2A プロテアーゼの連続発現による細胞変性も検討した。

### B. 研究方法

PV の RNA ゲノムのキャプシド蛋白質コーディング領域を欠損した RNA を調製した。PV のキャプシド蛋白質 (P1) を

全域発現するワクシニアウイルスベクター (VV-P1) を HeLa 細胞に感染させ、2 時間後に上記欠損 RNA をトランスフェクションし、欠損 RNA をゲノムとして持つ PV 粒子 (DI 粒子) を得た。さらに、VV-P1 感染細胞に DI 粒子を重感染させることにより、DI 粒子量を増やして実験に用いた。

DI 粒子は HeLa 細胞には強力な細胞変性効果を示すので、DI 粒子の感染価は HeLa 細胞で測定し、HeLa 細胞と神経細胞に対するスタンダード PV の感染効率を考慮して神経細胞 (SK-N-SH 細胞) に対する DI 粒子調製液の感染価を決定した。神経細胞に対する感染は全細胞に感染するに十分な DI 粒子量を用い、感染 24 時間後に細胞を観察した。PV 特異的 2A プロテアーゼは CMV プロモーターを使用した発現プラスミドベクターに組み込み、細胞へトランスフェクションし、48 時間後の細胞の状態を観察した。

(倫理面への配慮)

In vitro での実験のみであるので該当しない。

### C. 研究結果

DI 粒子は HeLa 細胞に対しては強い毒性があり、全部の細胞に細胞変性効果が観察された。しかしながら、神経細胞に対しての効果は微弱であった。このことは、予想したように神経細胞は PV に対する抵抗性を持ち、1 回の PV 感染に対しては回復する能力があることを示すものである。DI 粒子が感染すると、感染細胞中には PV 特異的 2A プロテアーゼが産生される。2A プロテアーゼは細胞変性に中心

的役割を果たすとされているので、神経細胞に対する 2A プロテアーゼの影響を観察した。その結果、神経細胞は 2A プロテアーゼが発現しても細胞変性効果を示さないことが明らかとなった。一方、HeLa 細胞は激しい細胞変性をしめした。

### D. 考察

これまで PV の 2A プロテアーゼによって細胞変性効果が現れると世界中で信じられてきた。事実、2A プロテアーゼの単独発現で HeLa 細胞は変性する。主に使用した SK-N-SH 細胞のみではなく、IMR-32 細胞も同様の現象を示すので、ここに神経細胞の特殊性を見出すことが出来た。現在までの研究では、PV ベクターのゲノムから 2A プロテアーゼのコーディング領域を欠損させることを念頭に置いていたが、今年度の研究により、神経細胞 (少なくとも培養神経細胞) で外来遺伝子を発現させる際には、2A プロテアーゼ領域を欠損させる必要がないことが示唆された。2A プロテアーゼは、PV の RNA 合成や蛋白質合成の効率を上げるために必要と言われているので、2A を発現する PV ベクターが使用可能であることは大変幸運であると考えている。

神経細胞に対する PV の毒性がどのウイルス特異的蛋白質によるのかを今後検討する必要がある。現在、DI 粒子に欠損している P1 領域のウイルス蛋白質 (キャプシド蛋白質) に注目し、PV の神経細胞毒性発現機構を解析している。

### E. 結論

ALS 治療に有用と考えられている HGF

を発現させるウイルスベクターとして、PV が有用であることを示すことが出来た。すなわち、PV の 2A プロテアーゼは神経細胞に対し強力な毒性を示さないの  
で、2A プロテアーゼを発現する PV ベクターが使用可能であることが示された。現在までに構築した 2A プロテアーゼ領域欠損ベクターは、どれも RNA レプリコンとしての活性低下が観察されていたので、外来 mRNA の発現効率に関し不安があったが、今年度の研究でこの心配は不必要である可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Blockade of poliovirus-induced cytopathic effect in neural cells by monoclonal antibody against poliovirus or human poliovirus receptor.

J. Virol.,79:1523-1532,2005.

##### 2. 学会発表

2A protease gene is not essential for poliovirus RNA replicon activity.

XIII International Congress for Virology, July 23-28, San Francisco.

Analysis of anti-poliovirus response of neural cells.

XIII International Congress for Virology, July 23-28, San Francisco.

#### 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。

## siRNA 過剰発現による SOD1 ノックダウンマウスを用いた 筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療

研究協力者 水澤英洋<sup>1)</sup>、  
横田隆徳<sup>1)</sup>、齋藤友紀<sup>1)</sup>、伊藤 薫<sup>1)</sup>、笹栗弘貴<sup>1)</sup>、三谷 匡<sup>2)</sup>、

<sup>1)</sup> 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

<sup>2)</sup> 近畿大学 先端技術総合研究所

### 研究趣旨

Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1)に対する small interfering RNA(siRNA)トランスジェニックマウスを作製し、ES 細胞レベルでマウスに導入したところ、siRNA を過剰に発現したトランスジェニックマウス(TgM)が作製できた。このマウスでは全身性に SOD1 タンパクの発現が抑制されていた。

SOD1-siRNA TgM と G93A SOD1 TgM の掛け合わせにより、SOD1-siRNA トランスジェニックと G93A SOD1 トランスジェニックの両方を有するダブル TgM が作製できた。このマウスにおいて G93A SOD1 タンパクの発現抑制が認められ、今までのところ ALS 発症と罹病期間を著明に延長した。この治療効果は今日まで報告された多くの G93A SOD1 TgM の治療実験のなかで最良の結果であり、画期的な成果と考えられる。ヒトにおいても siRNA がうまくデリバリーできれば強力な治療法になるものと思われる。

### はじめに

RNA interference は二本鎖 RNA (double-strandedRNA: dsRNA) によって配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。細胞内に導入された dsRNA が約 21 塩基の短い断片に分断され(siRNA)、これが RNA-ヌクレアーゼ複合体である RISC(RNA induced silencing complex)の形成を誘導し、siRNA 配列に相補的な配列をもつ mRNA を分解すると考えられている<sup>1)</sup>。

ALS の原因の一つとして SOD1 遺伝子変異があげられ、疾患の発症に変異タン

パクの gain of toxic function が関与していることが想定されている。この変異タンパクの発現を抑制することで疾患の発症や進行を防げる可能性があり、本研究では siRNA を用いて変異遺伝子の発現抑制をして家族性 ALS のモデル動物である G93A SOD1 TgM の治療を試みた。

### 方法

#### 1) SOD1-siRNA TgM の作製

SOD1 mRNA に対する siRNA 発現断片を作製し、受精卵へのマイクロインジェクション法と ES 細胞を用いた方法の二つの方法でマウスに導入した。