

### C. 研究結果

L4 腰髄の運動ニューロン数は、Tg マウスは、vehicle 投与群、EGF+FGF2 投与群とも、Non-Tg マウスよりも明らかに減少しており、vehicle 投与群、EGF+FGF2 投与群間で有意な差はなかった (図 1)。

BrdU 陽性細胞数は、vehicle 投与群では、Tg マウスにおいて Non-Tg マウスの 2 倍増加しており、多くの BrdU 細胞が白質に存在した。Tg マウスの灰白質では、BrdU 陽性細胞は後角よりも前角に多く存在した。EGF+FGF2 投与により、Tg マウス、Non-Tg マウスとも vehicle 投与群に比べ BrdU 陽性細胞数は増加した (図 2)。

BrdU との二重免疫染色では、EGF+FGF2 投与の有無に関わらず Tg マウス、Non-Tg マウスとも、BrdU 陽性細胞の多くが nestin を発現しており、次いで GFAP の発現が多かったが、BrdU+NeuN 二重陽性細胞は存在しなかった (図 2)。

BrdU+nestin 二重陽性細胞数は、Tg マウスにおいて増加しており、EGF+FGF2 投与によりさらに増加した。Tg マウス、Non-Tg マウスとも BrdU+nestin 二重陽性細胞は、中心管周囲や灰白質より白質に多く存在したが、Tg マウスの灰白質では後角よりも前角に多く存在した。EGF+FGF2 投与により、前角での BrdU+nestin 二重陽性細胞数はさらに増加した (図 2)。

BrdU+GFAP 二重陽性細胞数は、Tg マウス、Non-Tg マウスとも、中心管周囲や灰白質より白質に多く存在したが、Tg マウスの灰白質では後角よりも前角に多く存在した。vehicle 投与群では Tg マウスにおいて Non-Tg マウスより増加しており、EGF+FGF2 投与をすると、Tg マウス、Non-Tg マウスとも vehicle 投与群に比べやや増加した (図 2)。

BrdU、nestin、GFAP の三重免疫染色では、Tg マウス、Non-Tg マウスの灰白質や白質、中心管周囲とも、多くの BrdU+nestin 二重陽性細胞は GFAP を発現しなかった。

### D. 考察

BrdU 陽性細胞数は、vehicle 投与群では Tg マウスにおいて増加しており、発症した ALS 脊髄では細胞増殖が活性化していることを示唆している。一般的に中枢神経では、nestin は神経幹細胞のマーカーと考えられているが、最近の報告で神経幹細胞が GFAP を発現する、また活性型アストロサイトが nestin を発現することがわかっている。本研究では、BrdU、nestin、GFAP の三重免疫染色の分析で、多くの BrdU+nestin 二重陽性細胞は GFAP を発現しなかったことから、BrdU+nestin 二重陽性細胞の多くが増殖した神経幹細胞であると考えた。BrdU+nestin 二重陽性細胞数は、vehicle 投与群では Tg マウスにおいて増加しており、発症した ALS 脊髄では神経幹細胞の増殖が活性化していることを示唆している。

神経再生は増殖、移動、分化の 3 ステップに分けられるため、EGF+FGF2 投与による神経幹細胞増殖促進は 7 日間のみとし、その後の 14 日間を移動、分化の期間に当てた。EGF、FGF2 は神経保護効果もあるが、今回の投与方法では Tg マウスの運動ニューロン死は防げず、神経保護効果は発揮されなかった。

Tg マウスの灰白質では、BrdU+nestin 二重陽性細胞は後角よりも前角に多く存在し、EGF+FGF2 投与により増強した。この結果は、SOD1 遺伝子変異による運動ニューロン死が神経幹細胞の前角での増殖および前角への移動が活性化し、EGF+FGF2 投与によりさらに増強されることを示唆している。

また Tg マウスの灰白質では、BrdU+nestin

二重陽性細胞は BrdU+GFAP 二重陽性細胞よりも多く、神経幹細胞はアストロサイトに分化するよりは、多くが未分化な状態で存在したことを示している。

本研究では、発症した ALS 脊髄において、神経幹細胞の増殖、特に前角での増殖および前角への移動が活性化しており、EGF+FGF2 投与により活性化されることを示した。

### E. 結論

発症した ALS 脊髄では神経幹細胞の増殖、特に前角での増殖および前角への移動が活性化しており、EGF+FGF2 投与によりそれはさらに活性化される。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究報告

#### 1. 論文発表

Ohta Y, Nagai M, Nagata T, Murakami T, Nagano I, Narai H, Kurata T, Shiote M, Shoji M, Abe K: Intrathecal injection of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes proliferation of neural precursor cells in the spinal cords of mice with mutant human SOD1 gene. *J Neurosci Res.* 84: 980-992, 2006

#### 2. 学会発表

なし

### 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

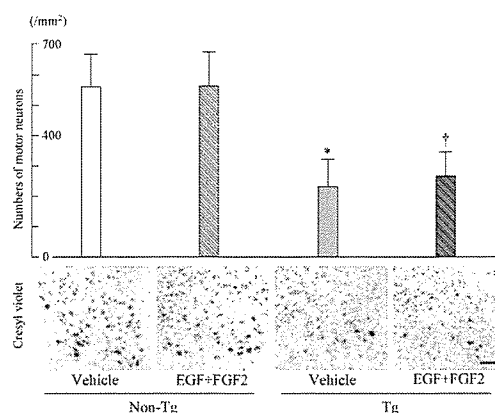


図 1. L4 腰髄における運動ニューロン数

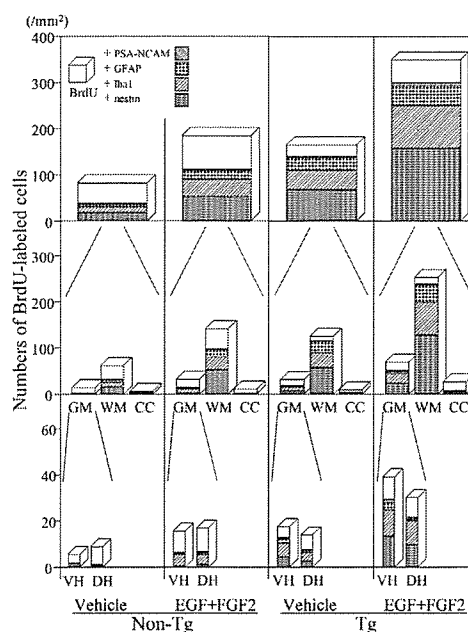


図 2. L4 腰髄における BrdU 陽性細胞数

筋萎縮性側索硬化症(ALS)トランスジェニックマウスの肝臓・腎臓・心臓における一過性  
組織変性からの回復と HGF/活性型リン酸化 cMet(pcMet)システムの調整機構：  
変性運動ニューロンに対する HGF 治療の戦略的拠点

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マウス：G1H-G93A マウスにおいては、G93A-SOD1 ストレスにより、脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至る。しかし、肝臓、腎臓、心臓においては、一度は変性組織像を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。肝臓、腎臓、心臓における組織学的回復機構には、HGF/活性型リン酸化 cMet(pcMet)システムの up-regulation 機構が寄与していた。一方、G93A-SOD1 ストレスに対し、脊髄前角細胞は内因性生存機構として、HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を惹起し続けるが、最終的には、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。即ち、細胞死のプロセスを歩む脊髄前角細胞に対して、HGF 治療による組織学的完全回復の病理組織的論拠たり得る。

共同研究者：加藤雅子<sup>1</sup>、船越 洋<sup>2</sup>、角山圭一<sup>2</sup>、中村敏一<sup>2</sup>、青木正志<sup>3</sup>、糸山泰人<sup>3</sup>

<sup>1</sup>鳥取大学医学部病院病理部門、<sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野、<sup>3</sup>東北大学大学院医学系研究科神経内科分野

A. 研究目的

変異 SOD1 を伴った生体系においては、変異 SOD1 ストレスは脊髄前角細胞だけでなく、肝臓、腎臓、心臓の各組織にも影響を及ぼすが、神経系と異なり、これら組織では、細胞死に至らない。今回我々は、肝臓・腎臓・心臓の各組織の組織変化に着目し、これらの各臓器の細胞が、変異 SOD1 ストレスから、どのようなメカニズムで自らを守って生存しているのかについて、我々は HGF/活性型リン酸化 cMet(pcMet)システムの観点から解析した。ALS-変異 SOD1 ストレスに対する脊髄前角細胞死の治療戦略目的として、HGF/pcMet システムの観点から、ALS-変異 SOD1 トランスジェニックマウスの肝臓・腎臓・心臓における

一過性組織変性からの組織回復機序の病態解明を行う。

B. 研究方法

脊髄、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の経時的病理組織学的解析には、ALS SOD1 トランスジェニックマウス：G1H-G93A マウスを使用し、対照には同時期の同胞を用いた。G1H-G93A マウスでは神経症状発症前の生後 90 日齢、神経症状発症時の生後 100 日齢、神経症状進展期の生後 110 日齢、終末期に相当する生後 120 日齢までの 4 時点で臨床症状を解析した後、マウス体重 1 Kg 当たり 1 ml のペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射にて、麻酔を施行する。完全に麻酔下にあることを確認した後、開腹・開胸を行い、左心室・大動脈経路にて、37 °C の生理的食塩水の灌流にて全身臓器の血液を完全に除去する。全身臓器血液の完全除去後、直ちに、4%パラホルムアルデヒド・0.1M カコジル酸緩衝液(pH7.3)にて灌流固定し

た後、脊髄、肝臓、腎臓、心臓の各臓器を取り出した。取り出された各臓器組織はそれぞれパラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した後、マイクロトームにてパラフィン切片とする。

パラフィン切片は、HE 染色法を施すと同時に、HGF/pcMet システムの検索として免疫組織化学的解析を施行した。即ち、rabbit polyclonal anti-rat HGF antibody と rabbit polyclonal anti-c-Met phosphospecific antibody の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。

### C. 研究結果

#### 1. 病理組織的所見

同胞における組織像：すべての日齢を通じて、脊髄組織は正常脊髄組織所見そのものであった。肝臓・腎臓・心臓の各臓器の組織所見においても、すべての日齢を通じて、全く異常なく正常組織所見であった。神経症状発症前の生後 90 日齢の時点における病理組織変化：脊髄組織では、脊髄前角細胞数には変化がみられないが、軽度ながら脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに空胞病理所見 (vacuolation pathology) を認めた。即ち、肝臓組織では、空胞形成を伴う水腫状変性肝細胞 (swollen hydropic hepatocyte) と好酸性暗肝細胞 (dark eosinophilic hepatocyte) とが混在した変性像を示した。この日齢では、swollen hydropic hepatocyte の数のほうが dark eosinophilic hepatocyte の数に比べ多数認められた。腎臓組織では、極く軽度ではあるが、尿細管上皮に肝細胞と同様の空胞形成を伴う swollen hydropic change がみられた。心臓では、swollen hydropic change を呈する心筋細胞を認め、肝臓と腎臓と同質の病理変性所見を呈した。神経症状発症時の生後 100 日時点における病理組織変化：脊髄組織では、著明な vacuolation pathology を認め、脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに多数の空胞が見られた。残存した脊髄前角細胞はやや小型化を示し、脊髄前角細胞数自体はわずかながら減少傾向を示した。

肝臓組織では、依然として、swollen hydropic hepatocyte と dark eosinophilic hepatocyte とが混在した変性所見を示したが、生後 90 日齢の肝臓組織に比べ、両タイプの変性細胞の占める割合が変化していた。即ち、swollen hydropic hepatocyte の数の占める割合が減少し、dark eosinophilic hepatocyte 数の割合が増加した。また、swollen hydropic hepatocyte および dark eosinophilic hepatocyte のいずれにも空胞形成が認められたが、その大きさは、90 日齢時点の空胞と比較すると、その大きさは減少し、小型化していた。腎臓組織では、空胞を伴う swollen hydropic change を示す尿細管上皮細胞の数が増加し、一部には、好酸性が強調され、細胞丈が減少し、小型化を示した腎尿細管上皮 (小型好酸性腎尿細管上皮:small-sized eosinophilic cell) も認めた。そのため、尿細管腔は拡大していた。心臓では、生後 90 日齢の心臓に比べ、swollen hydropic change を呈する心筋細胞数は減少したものの、依然、swollen hydropic change を呈する心筋細胞を認めた。生後 120 日齢の終末期における病理組織変化：脊髄組織では、脊髄前角細胞は高度に変性・脱落・消失し、反応性アストロサイトの増生と高度のグリオシスを認めた。同時に、封入体病理所見 (inclusion pathology) としては、Lewy body-like hyaline inclusion と astrocytic hyaline inclusion との両封入体を多数認めた。また vacuolation pathology としては、脊髄前角細胞胞体内やニューロピルに多くの空胞を依然認めた。注目すべき所見は、肝臓、腎臓、心臓の各臓器組織においては、脊髄組織とは対照的に、swollen hydropic change や eosinophilic change 等の変性所見は認められず、肝細胞、腎尿細管上皮、心筋線維はほぼ正常組織所見に復していた。

#### 2. HGF/pcMet システムの調節機構の免疫組織化学的解析

同胞における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析：脊髄組織における HGF の免疫組織化学的解析では、すべての日齢を通じて、ほとんどすべての脊髄前角細胞は HGF を発現し、

その発現レベルは多少の variation を伴いながら、免疫組織化学的には HGF 発現は同定可能なレベルであった。HGF の受容体である活性型リン酸化 cMet(pcMet)の免疫組織学的解析では、HGF とは対照的に、すべての日齢を通じて、すべての脊髄前角細胞は pcMet の発現を認めなかった。肝臓・腎臓・心臓の各臓器の HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析では、肝細胞、腎尿細管上皮、心筋細胞では、すべての日齢を通じて、HGF 及び pcMet の発現は認めなかった。

神経症状発症前の生後 90 日齢の時点における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析：HGF の免疫組織学的解析では、ほとんどすべての脊髄前角細胞は、HGF を正常脊髄前角細胞と同一レベルで発現し、その発現様式、発現強度は同胞脊髄における正常脊髄前角細胞と同一であった。c-Met 受容体の活性化の指標であるリン酸化 c-Met (pcMet) の発現についても、脊髄前角細胞では全く認められなく、同胞脊髄における正常脊髄前角細胞と同一所見であった。しかし、生後 90 日齢の肝臓の HGF 発現については、発現強度の variation を有しながら、一部の swollen hydropic hepatocyte および dark eosinophilic hepatocyte に HGF 陽性所見が認められた。HGF の発現様式は HGF 陽性細胞と HGF 陰性細胞とが入り交じったモザイク染色様式を示した。HGF の活性型受容体である pcMet の肝臓における発現についても、HGF 発現様式と同一であった。即ち、生後 90 日齢の肝臓では、一部の肝細胞に HGF/pcMet システムの up-regulation 機構が認められた。腎臓では、一部の尿細管上皮に HGF 及び pcMet の発現が認められ、肝臓と同様に、heterogeneity を示しながらも、HGF/pcMet システムの up-regulation 機構が認められた。心臓でも、肝臓・腎臓と同様に、heterogeneity を示しながらも、一部の心筋細胞に HGF/pcMet システムの up-regulation 機構が認められた。神経症状発症時の生後 100 日時点における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析：生後 100 日齢の時点では、ほとんど全ての脊髄前角細胞にお

いて HGF と pcMet の強発現がみられ、高度の HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を認めた。この時期の肝臓では、dark eosinophilic hepatocyte と swollen hydropic hepatocyte との両細胞の一部に HGF と pcMet との強発現があり、強発現している細胞と発現していない細胞とが入り交じったモザイク様式の発現パターンが著しく強調された。即ち、生後 100 日齢の肝臓においては、heterogeneity を示しながら、HGF/pcMet システムの高度の up-regulation 機構が認められた。腎臓では、swollen hydropic change と small-sized eosinophilic change とを示す両タイプの尿細管上皮細胞と糸球体内のメザンギウムの一部の細胞群においては、HGF/pcMet システムを up-regulate させていた。心臓でも、肝臓・腎臓と同様に、生後 90 日齢の心筋細胞に比べ、一部の心筋細胞には、heterogeneity を示しながら、より高度の HGF/pcMet システムの up-regulation が認められた。生後 120 日齢の終末期における HGF/pcMet システムの免疫組織化学的解析：脊髄組織では、一部の脊髄前角細胞は HGF/pcMet システムの破綻を示すものの、多くの脊髄前角細胞はまだ HGF/pcMet システムを up-regulate させていた。注目すべき所見は、肝臓、腎臓、心臓の各臓器においては、正常組織所見に復するに従い、脊髄組織とは対照的に、HGF/pcMet システムの発現レベルは低下しはじめ、ほぼ正常状態である HGF/pcMet システムの発現停止状態を示した。即ち、生後 120 日齢では肝臓、腎臓、心臓は正常組織像を示し、HGF と pcMet との発現は認めなかった。

#### D. 考察

正常脊髄の HGF/活性型リン酸化 cMet(pcMet)システムの免疫組織化学的解析により、正常状態においては、脊髄前角細胞は HGF を一定レベル発現しているが、脊髄前角細胞における HGF の受容体である cMet はチロシン残基のリン酸化は受けていなく、活性型 pcMet は発現していなかった。即ち、正常脊髄前角細胞は HGF の cMet を介するシグナルを細胞内に伝達していないことが判明し、

に伝達していないことが判明し、HGF/pcMet システムを賦活化していないことが明らかとなった。

G1H-G93A マウスの神経症状発症時の生後 100 日時点においては、ほとんど全ての脊髄前角細胞において高度の HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を認め、生後 120 日齢の終末期においてさえ、一部の脊髄前角細胞は HGF/pcMet システムの破綻を示すものの、多くの脊髄前角細胞はまだ HGF/pcMet システムを up-regulate させていた。この脊髄前角細胞における HGF/pcMet システムの解析結果は、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスに対して、細胞死回避のために内因性 HGF/pcMet システムを upregulate させていたことを意味する。しかし、最終的には脊髄前角細胞は HGF/pcMet システムの upregulation という内因性生存機構さえも振り切るかたちで、細胞死に至ってしまう。即ち、G1H-G93A マウスにおける脊髄前角細胞は、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスにより、最終的には脊髄前角細胞は細胞死を生ずる。しかし、ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスに対して、脊髄前角細胞は無抵抗に細胞死を受け容れているのではないことが解明され、内因性生存機構の一つとしての HGF/pcMet システムの存在を明らかにした。

G1H-G93A マウスにおける肝臓、腎臓、心臓の各臓器の経時的組織変化は、ほぼ画一的であり、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞は脊髄前角細胞より早期に一過性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ほぼ正常組織像に復していた。この肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞における HGF/pcMet システムの経時的変化をみると、まだ脊髄前角細胞が HGF/pcMet システムを upregulate させていない生後 90 日齢において、肝臓、腎臓、心臓の各臓器の細胞は ALS-G93A 変異 SOD1 ストレスに対して、HGF/pcMet システムを upregulate させていた。神経症状発症時の生後 100 日齢頃の肝臓、腎臓、心臓において、最も高度に HGF/pcMet システムを upregulate させてい

たが、正常組織像に復するに従い HGF 及び pcMet の発現レベルは低下を認めた、生後 120 日齢では、正常状態である HGF/pcMet システムをほぼ停止した。即ち、ALS-変異 SOD1 ストレスにより脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至るが、肝臓、腎臓、心臓においては、一度は変性組織像を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。この組織学的完全回復機構の一つに内因性 HGF/pcMet システムの up-regulation 機構の存在を明らかにできた。一方、ALS-変異 SOD1 ストレスに対し、脊髄前角細胞は内因性生存機構として、HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を惹起し続けるが、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。本研究の解析により、細胞死のプロセスを歩む変性運動ニューロンへの HGF 治療の正当性に対する組織学的完全回復の病理組織的論拠たり得る。

#### E. 結論

筋萎縮性側索硬化症(ALS) SOD1 トランスジェニックマウスにおいては、ALS-変異 SOD1 ストレスにより脊髄前角細胞は変性組織像を呈し、最終的には細胞死に至る。しかし、肝臓、腎臓、心臓においては、一度は変性組織像を呈するものの、最終的にはほぼ完全に組織学的回復を呈した。この組織学的完全回復機構の一つに内因性 HGF/活性型リン酸化 c-Met(pcMet) システムの up-regulation 機構の存在を明らかにした。一方、ALS-変異 SOD1 ストレスに対し、脊髄前角細胞は内因性生存機構として、HGF/pcMet システムの up-regulation 機構を惹起し続けるが、この機構を振り切るかたちで細胞死に至る。即ち、細胞死のプロセスを歩む変性運動ニューロンへの HGF 治療の正当性に対する組織学的完全回復の病理組織的論拠たり得る。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

## 1. 論文発表

1) Kato M, Kato S, Abe Y, Nishino T, Ohama E, Aoki M, Itoyama Y. Histological recovery of the hepatocytes is based on the redox system upregulation in the animal models of mutant superoxide dismutase (SOD)1-linked amyotrophic lateral sclerosis. *Histol and Histopathol* 2006; 21 (7): 729-742.

2) Kato M, Kato S, Horiuchi S, Nagai R, Horie Y, Hayashi K. Mallory bodies in hepatocytes of alcoholic liver disease and primary biliary cirrhosis contain N-(carboxymethyl)lysine-modified cytokeratin, but not those in hepatic carcinoma cells. *Yonago Acta medica* 2006; 49 (3): 83-92

3) Sumi H, Nagano S, Fujimura H, Kato S, Sakoda S. Inverse correlation between the formation of mitochondria-derived vacuoles and Lewy-body-like hyaline inclusions in G93A superoxide-dismutase-transgenic mice. *Acta Neuropathol* 2006 112 (1): 52-63.

## 2. 学会発表

1) Kato S, Kato M, Ohama E, Abe Y, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Hirano A. Immunohistochemical dynamics of the redox system in the motor neurons in ALS: Self-survival mechanism under ALS stress. XVIth International Congress of Neuropathology, September 10-15, 2006, San Francisco, USA.

2) Kato S, Kato M, Ohama E, Abe Y, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Hirano A. Redox System Up-Regulation in ALS Motor Neurons: A Survival Mechanism under Stress. 17th International Symposium on ALS/MND November 30–December 2, 2006, Yokohama, Japan.

3) 加藤信介, 加藤雅子, 篠沢隆雄, 平野朝雄, 大浜栄作. ALSにおける新しい神経成長因子ミッドカイン(MK)に関する研究: モノクローナル抗体作成とALSの免疫組織化学的解析. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会 (2006, 5月24–26日, 岡山).

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, 大浜栄作. 変異SOD1を伴うALSモデル動物肝の終末期における正常肝細胞回復機構の解明: レドックスシステムからのアプローチ. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会 (2006, 5月24–26日, 岡山).

5) 隅 寿恵, 長野清一, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. 変異SOD1(G93A)miceにおけるvacuoleとLBHI形成の関係. 第47回日本神経病理学会総会学術研究会 (2006, 5月24–26日, 岡山).

6) 加藤雅子, 加藤信介, 堀江 靖, 林 一彦. 家族性筋萎縮性側索硬化症のモデル動物を用いた肝と脊髄の経時的病理組織像の検討. 第95回日本病理学会総会 (2006, 4月30日–5月2日, 東京).

7) 隅 寿恵, 長野清一, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. 変異SOD1(G93A)miceにおけるvacuoleとLBHI形成の関係. 第47回日本神経学会総会 (2006, 5月11–13日, 東京).

8) 村上哲郎, 倉田智子, 太田康之, 奈良井恒, 瓦林 毅, 武久 康, 永井真理子, 東海林幹夫, 加藤信介, 阿部康二. 抗ヒトSOD1特異的抗体によるALSモデルマウスの検討. 第47回日本神経学会総会 (2006, 5月11–13日, 東京).

## 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

## Co-chaperone Mrj を遺伝子導入した線虫の作製の試み

研究者 小山信吾 \*桑原知樹 荒若繁樹 \*岩坪 威 加藤丈夫  
所 属 山形大学生命情報内科学、\*東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室

### 研究要旨

変異 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。また、Pan-neuron に発現が期待できる unc-119 プロモーター下で核型 Mrj および細胞質型 Mrj を発現する線虫の作製を試みた。今後は、Mrj が個体レベルで変異型 SOD1 による神経細胞障害を改善するかどうか検討していく。

### A.研究目的

SOD1 を過剰発現させた培養細胞 (COS7 細胞、SH-SY5Y 細胞) を用いて SOD1 重合化仮説を検討するため、野生型 SOD1 と変異型 SOD1 の可溶性の相違、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、Heat shock protein (Hsp) 70、Mrj が変異型 SOD1 の可溶性変化に及ぼす影響を検討する。また、Hsp や Mrj が及ぼ

す効果についてより個体レベルで検討するため、Mrj 発現線虫を作製する。

### 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。Mrj 発現線虫は野生型線虫 (N2) に unc-119 プロモーター下で Mrj-A (核型) および Mrj-B (細胞質型) を発現させ、UV 照射により integrant strain を作製した。

(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。Pan-neuron に発現が期待できる unc-119 プロモーター下で Mrj-A および Mrj-B を発現する線虫ラインが得られた。本線虫の神経細胞内に Mrj-A および Mrj-B が発現を免疫組織化学および Western blot で確認した。

### 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。また、変異型 SOD1 による神経細胞機能障害が Mrj により改善されるかどうかを個体レベルで検討するために Mrj 発現線虫を作製した。Pan-neuron に発現するプロモーター下で Mrj 発現線虫を作製した。今後は、変異型 SOD1 による筋萎縮性側索硬化症モデル線虫を作製し、Mrj の細胞毒性改善効果を検討したい。

### E. 結論

Co-chaperone Mrj は Triton-X 不溶性 SOD1 分子種を抑制し、Hsp70 の作用増強効果を認めた。今後、SOD1 発現線虫の作製とともに、Mrj の機能解析を行う予定である。

#### G.研究発表

##### 1.論文発表

Shingo Koyama, Shigeki Arawaka, Ren Chang-Hong, Manabu Wada, Toru Kawanami, Keiji Kurita, Masaaki Kato, Makiko Nagai, Masashi Aoki, Yasuto Itoyama, Gen Sobue, Pak H.Chan, Takeo kato :

Alteration of familial ALS-linked mutant SOD1 solubility with disease progression: Its modulation by the proteasome and Hsp70. Biochem.Biophys.Res.Commun.2006;343: 719-730

##### 2.学会発表

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

第 47 回日本神経学会総会,東京 ; 2006 年 5 月

#### H.知的財産権の出願・登録状況

なし

## ラット脊髄培養細胞を用いた運動ニューロン死の検討 -プロテアソーム障害と小胞体関連ストレス-

研究協力者 菊地誠志<sup>1)</sup>  
辻 幸子<sup>2)</sup>, 田代 淳<sup>2)</sup>, 新保和賢<sup>2)</sup>, 佐々木秀直<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup> 国立病院機構札幌南病院神経内科  
<sup>2)</sup> 北海道大学大学院医学研究科病態神経学講座神経内科

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）における最大の特徴は運動ニューロンの選択的な障害であり、我々の施設では培養細胞を用いて運動ニューロンの特異的脆弱性に関わる分子機構の解明を目指してきた。ALS の病態に関わる分子機構はいくつかの候補があるが、我々はプロテアソームと小胞体（ER）ストレスに関して、特異的脆弱性を中心に検討した。ラット胎児脊髄の分散培養とラット新生仔脊髄スライスカルチャーを用いて2種類のプロテアソーム阻害剤（ラクタシスチン、エボキシミシン）に暴露したところ、いずれも、運動ニューロンが非運動ニューロンに比べ障害されやすかった。更に、ウエスタンブロットでの検討ではプロテアソーム障害下で ER ストレスが誘導されていた。しかし、ER ストレス誘導薬剤として知られる Brefeldin A と Tunicamycin で検討したところ、前者では運動ニューロンが特に脆弱であったが、後者ではむしろ後角ニューロンの方が脆弱な傾向があり、ER ストレスが運動ニューロンの特異的脆弱性に関与しているかは、更に検討が必要である。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は全身の運動ニューロンが選択的に障害され、残存するニューロン内にユビキチン陽性の封入体が出現することが重要な病理所見上の特徴である。障害が運動ニューロンの選択的に起こる特異性を決める因子は、疾患の原因究明に非常に重要であり、いくつか候補が挙げられているが未だ十分解明されていない。神経変性疾患全般において蛋白の misfolding が主要な病態であることから、ユビキチン・プロテアソーム系障害や ER ストレスが注目されており、ALS でもその関与

が疑われる。

我々は、一昨年 of 報告会で培養運動ニューロンを用いて運動ニューロンがプロテアソーム障害に特に脆弱であることを報告した。ER ストレスに関しては変異 SOD1 トランスジェニックマウスの病理で ER ストレスが誘導されていることを示唆する報告がある。また、プロテアソームは ER 関連分解に関与することから、プロテアソーム障害が ER ストレスを誘導するという報告があり、我々の系でもプロテアソーム障害と ER ストレスとの関連や運動ニューロンの脆弱性に関与しているか検討した。

## B. 研究方法

SD ラット胎児 (14E) 脊髄から得たニューロンの分散培養, または同新生仔 (P6) の脊髄スライスカルチャーにプロテアソーム阻害剤

(Lactacystin, Epoxomicin), ER ストレス誘導剤 (Brefeldin A:BFA, Tunicamycin:TM) を暴露し, 72 時間まで観察した.

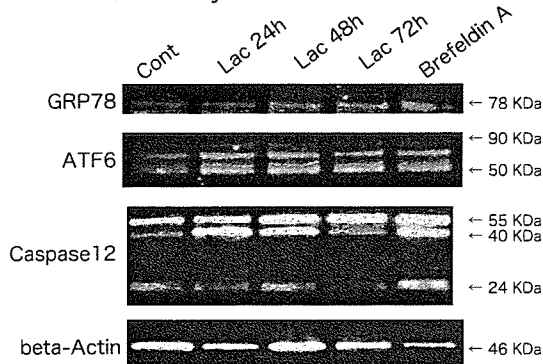
動物実験は, 本学医学部動物実験に関する指針に基づき, 承認を得て行った.

## C. 研究結果

Lactacystin, Epoxomicin の両プロテアソーム阻害剤は分散培養法で SMI32 陽性ニューロンに対し特に強い毒性を示した. スライス培養でも同様に前角運動ニューロンは特に強く障害された.

Lactacystin または Epoxomicin に暴露したスライス培養のライセートをウエスタンブロットで検討すると, GRP78 の誘導, 活性型 ATF6, 活性化型カスパー 12 の増加などがあり, 脊髄全体として ER ストレスが誘導されていた (図 1).

図 1) Lactacystin は ER ストレスを惹起した



更に ER ストレスは運動ニューロンの特異的脆弱性に関与するか検討した. BFA は ER ストレスを誘導し, 運動ニューロンを特に強く障害したが (図 2), TM では運動ニューロンへの特異性はなく, むしろ後角ニューロンの方が障害されやすかった (図 3) ことから, ER ストレスが運動ニューロンの特異的障害に関与しているとは結論できなかった. BFA ではゴルジ装置の

分断化する作用が解っているが, 我々の培養分散脊髄でもゴルジの分断化が見られた (図 4).

図 2) Brefeldin A は運動ニューロンを特に障害する

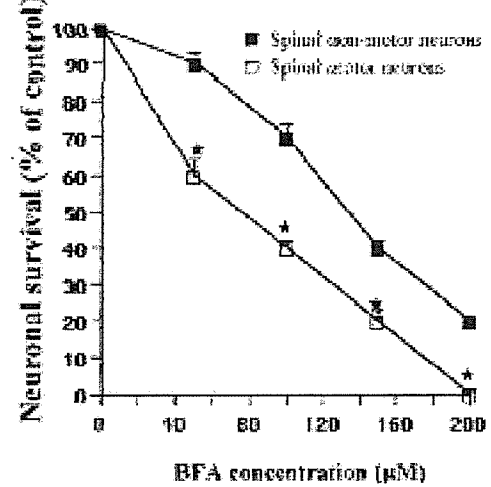
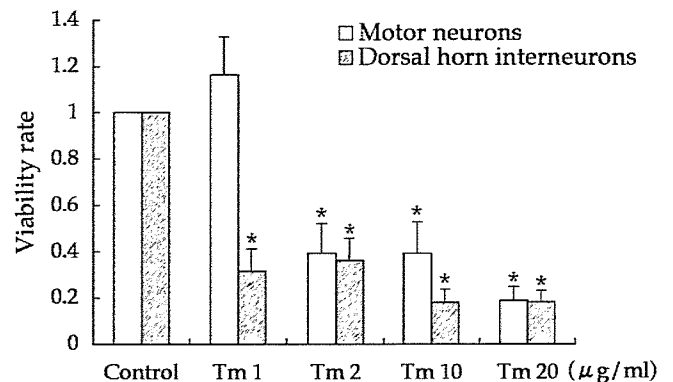


図 3) Tunicamycin の毒性は運動ニューロンに特異性はなかった



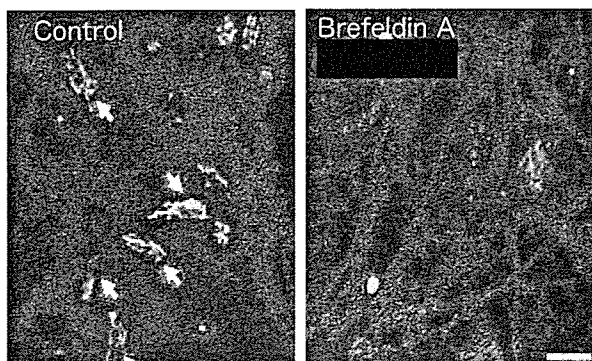
## D. 考察

二種のプロテアソーム阻害剤はともに運動ニューロンを特に強く障害し, かつ ER ストレスを誘導したが, 二種の ER ストレッサー BFA と TM では運動ニューロン障害性に差が見られ, ER ストレスが運動ニューロンの特異的脆弱性と関連しているとは結論できなかった. 更に Thapsigargin など第三の ER ストレッサーでの検討が必要と考えられる.

BFA は運動ニューロンを特に強く障害したが, BFA には ER ストレス誘導の他にも, ER-ゴルジ

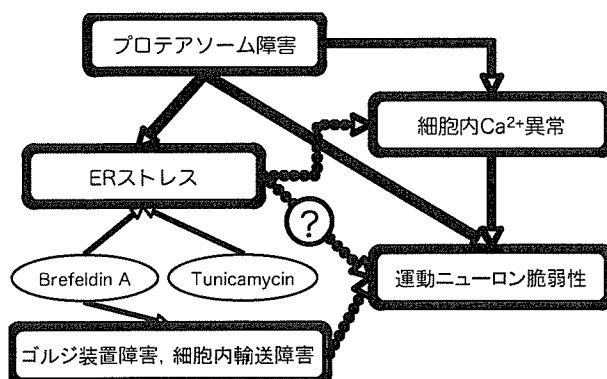
#### 図4) Brefeldin Aはゴルジ装置を破壊した

GM130抗体 (ゴルジ染色)



間の物質輸送障害, ゴルジ分断化などの作用が知られており, これらが運動ニューロンにとっては重要な作用であった可能性が考えられる. ALSでもゴルジ装置の形態異常が見られることから, ゴルジ障害は今後の検討を要すると思われる.

トランスジェニックマウスでのERストレスの誘導が免疫染色などにより検討されているが, 変異SOD1は普遍的に発現していることからERストレスが運動ニューロンでのみに誘導されているとは考えがたく, 今回の結果からはERストレスが実際に運動ニューロンの選択的変性にどの程度本質的な障害をもたらしているのかといった解釈には注意が必要であると



思われる.

プロテアソーム障害の下流の機序についてもERストレス以外の視点から更に検討していきたいと考えている.

#### E. 結論

プロテアソーム障害はラット培養脊髄においてERストレスを惹起したが, ERストレスが運動ニューロンに対し選択的に強い障害を与えた要因であるとは特定できなかった.

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tashiro J, Kikuchi S, Shinpo K, et al.. Role of p53 in neurotoxicity induced by the endoplasmic reticulum stress agent tunicamycin in organotypic slice cultures of rat spinal cord. J Neurosci Res 85(2):395-401. 2006

##### 2. 学会発表

田代 淳, 菊地誠志, 新保和賢, 他. ラット脊髄器官培養における脊髄神経細胞に対する小胞体ストレス誘導薬剤の影響. 第47回日本神経学会総会. 2006年, 東京.

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得      なし
2. 実用新案登録      なし
3. その他      特になし

## 筋萎縮性側索硬化症における免疫補助分子 CD40 の解析

研究協力者 佐古田三郎 大阪大学医学部神経機能医学（神経内科）教授

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は脊髄前角の運動ニューロンが不可逆的進行性に障害される致死性の疾患である。その病態にシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)や誘導型 NO 合成酵素(iNOS)の産生亢進等のグリア細胞を基盤とした炎症機転の関与が示唆されている。これまでに正常および ALS モデルマウスの G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウス (G93A-Tg)の脊髄組織、培養系を利用し病的状態では免疫補助分子 CD40 が活性化グリア細胞に高発現しその下流で誘導される COX-2 や iNOS を介した神経細胞障害が起こることを示してきた。さらにグリア細胞における CD40 シグナルは Sema4D/CD100 によって増強されることも示した。また G93A-Tg と CD40KO マウスの交配実験を行い生体内における CD40 の意義を検討したが CD40KO マウスでは症状の発症、進行がともに早くなることが判明した。

### A. 研究目的

近年アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患の病態に炎症機転が重要であることが判明してきた。我々はこれらの神経変性疾患を免疫・炎症機転から、immuno-inflammatory disease, あるいは neuroinflammatory disease として捉え病態を解析してきた。つまり中枢神経系(CNS)における免疫担当細胞ともいべきグリア細胞を基盤とした神経細胞障害機構について炎症機転の制御に重要な働きをしていると予想された CD40 についてその関与の証明、および炎症機転制御による治療の可能性について探っていくことが目的である。

### B. 研究方法

1) 中枢神経系(CNS)細胞での CD40 シグナルを調節すると考えられる Sema4D/CD100 分子発現および機能の検討

まず Sema4D/CD100 分子およびそのレセプター (CD72, Plexin-B1) の CNS 細胞、および脳、脊髄における発現を mRNA、蛋白レベルで検討した。初代培養神経細胞は胎生 16 日齢(E16)、アストロサイトは新生仔 (P1~2)、ミクログリアは P1~2 マウス脳より調製した混合グリア細胞から精製した (P1~2+14 DIV)。mRNA の発現は半定量的 RT-PCR を用いて、蛋白の発現はウエスタンブロットを用い定量した。さらに正常および病的状態での脊髄組織における発現を正常マウス、G93A-Tg マウスを利用し免疫組織化学的に検討した。

2) Sema4D/CD100 が CD40 を介した炎症機転を制御することの検討

ミクログリアを少量の IFN- $\gamma$  存在下で抗 CD40 抗体(HM-40-3)で刺激し、これにリコンビナント Sema4D/CD100 を加えたときの MAP キナーゼのリン酸化をウエスタンブロ

ットを用い検討した。また同様の条件で下流で発現する iNOS の検討も行った。

### 3) CD40 の生体内における意義の検討

G93A-Tg と CD40 欠失(-/-)マウスを交配し作成した G93ACD40<sup>-/-</sup>、G93ACD40<sup>+/+</sup>の症状の比較検討をおこなった。

## C. 研究結果

### 1) 中枢神経系(CNS)細胞での CD40 シグナルを調節すると考えられる Sema4D/CD100 分子発現および機能の検討

Sema4D/CD100 およびそのレセプターである CD72, Plexin-B1 は mRNA レベルでは神経細胞、アストロサイト、ミクログリアのいずれにも発現していた。蛋白レベルでは Sema4D/CD100 は主に神経細胞に、Plexin-B1 は神経細胞、アストロサイトに主に発現し、ミクログリアに軽度発現。CD72 はグリア細胞に発現していた。免疫染色では Sema4D/CD100, Plexin-B1 は主に脊髄前角の運動ニューロンと考えられる大型細胞に発現しており、G93A-Tg マウス脊髄ではでは反応性グリア細胞と考えられる細胞に高発現していた。

### 2) Sema4D/CD100 が CD40 を介した炎症機転を制御することの証明

ミクログリアを少量の IFN- $\gamma$  存在下で抗 CD40 抗体(HM-40-3)で刺激し、これにリコンビナント Sema4D/CD100 を加えると ERK, p-38, JNK の MAP キナーゼのうち ERK のリン酸化のみ著明に増強された。同様の条件下で産生される iNOS を検討したところ iNOS 産生は ERK 阻害剤により有意に抑制されるが、

p-38, JNK 阻害剤では影響を受けなかった。また同条件で CD72 刺激を加えても iNOS の発現は不変であった。

### 3) CD40 の生体内における意義の検討

G93A-Tg と CD40<sup>-/-</sup>マウスを交配し作成した G93ACD40<sup>-/-</sup>の症状の発現時期、罹病期間、死亡の何れもが G93ACD40<sup>+/+</sup>マウスに比べ短縮していた。

## D. 考察

Sema4D/CD100 およびそのレセプター Plexin-B1, CD72 は CNS において何れも発現しているが G93A-Tg マウス脊髄のような病態においては反応性グリア細胞に発現が亢進している。Sema4D/CD100 は CNS では Plexin-B を介した細胞形態に影響をおよぼし、免疫細胞では CD72 を介して CD40 シグナルを増強することがこれまで報告されていたが、今回の実験により CD100 が CNS ミクログリアにおいて CD72 ではなく Plexin-B を介して CD40 シグナルを増強することにより iNOS のような炎症関連分子を増幅していることが示唆された。

交配実験では予想に反し G93ACD40<sup>-/-</sup>マウスの平均発症、生存期間は G93ACD40<sup>+/+</sup>に比べて有意に短縮していた。これは生理的条件下でも主に神経細胞に発現している CD40 シグナルが神経細胞の維持に必要であることを示唆するものである。病的状態でも主に反応性グリア細胞に過剰に発現する CD40, Sema4D/CD100, Plexin-B1 等による炎症機転が神経細胞障害に関与していることが推察され、CD40 シグナルを完全に遮断するのでは

なく、その過剰な発現を制御することが治療につながるのではないかと考える。

#### E. 結論

免疫セマフォリン Sema4D/CD100 及びそのレセプターである Plexin-B1 は G93A-Tg 脊髄の反応性グリア細胞に発現し、CD40 を介した炎症機転を増強している可能性が示唆された。CD40 シグナルを制御してゆくことが ALS をはじめとした neuroinflammatory disease の治療につながる可能性が示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hisae Sumi, Seiichi Nagano, Harutoshi Fujimura, Shinsuke Kato and Saburo Sakoda. Inverse correlation between the formation of mitochondria-derived vacuoles and Lewy-body-like hyaline inclusions in G93A superoxide-dismutase-transgenic mice.

Acta Neuropathologica 112: 52-63, 2006

##### 2. 学会発表

奥野龍禎、中辻裕司、熊ノ郷淳、森谷真之、菊谷仁、佐古田三郎。中枢神経系の炎症機転における免疫セマフォリン Sema4D/CD100 の役割。第18回日本神経免疫学会 2006年

渡邊将平、長野清一、佐古田三郎。変異 SOD1 におけるシステイン 111 残基の役割。

日本神経学会総会 2006年

隅寿恵、長野清一、藤村晴俊、加藤信介、佐

古田三郎。変異 SOD1(G93A)mice における vacuole と LBHI 形成の関係。第47回日本神経学会総会 2006年

隅寿恵、長野清一、藤村晴俊、加藤信介、佐古田三郎。変異 SOD1(G93A)mice における vacuole と LBHI 形成の関係。第47回日本神経病理学会総会学術研究会 2006年

Shohei Watanabe, Seiichi Nagano, Ashley Bush, and Saburo Sakoda. Cysteine111 residue affects aberrant affinity for copper in mutant Cu/Zn superoxide dismutase. Annual Meeting of Society for Neuroscience 2006

Shohei Watanabe, Seiichi Nagano, Ashley Bush, and Saburo Sakoda. The Role of Cysteine111 Residue in Mutant Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1). International Symposium on ALS 2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |      |
|-----------|------|
| 1. 特許取得   | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他    | 該当なし |



## 『ヒト Cu/Zn-SOD の Cys111 の酸化に関する研究』

研究協力者 谷口直之 大阪大学微生物研究所疾患糖鎖学・教授

**研究要旨** Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ（Cu/Zn-SOD、以下 SOD1）は生体にとって有害なスーパーオキシドを酸素と過酸化水素に変換する酵素で、酸化ストレスから生体を守る役割を果たしている。本酵素の変異体が家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）の原因になることが明らかになっているが、その発症機構はまだ解明されていない。FALS 患者や変異 SOD1 トランスジェニックマウスだけでなく、弧発性の ALS 患者でも SOD1 免疫陽性の封入体が観察されており、ALS では凝集した SOD1 の関与が示唆されている。野性型 SOD1 も過酸化水素などで酸化させると凝集化が起こり、変異 SOD1 と同じような毒性を持つようになることが示唆され始めてきた。Cys111 はタンパク質分子の外側にある Greek key loop 内に存在し、特に反応性が高いと予想される。これまで著者らは、この Cys111 の SH 基に SS 交換反応で 2-ME を導入した SOD1 タンパク質が野生型の SOD よりも熱に安定で酸化されにくいことを明らかにしてきた。今年度は、Cys111 が他のアミノ酸残基よりも速く酸化されること、SH 基がスルフィン酸(SO<sub>2</sub>H)またはスルホン酸(SO<sub>3</sub>H)になることを MALD-TOF-MS および LC-ESI-MSMS で同定した。さらに Cys111 がスルホン酸(SO<sub>3</sub>H)になった酸化型 SOD1 を特異的に認識する抗体を作製し、現在検討中である。本抗体は ALS への酸化ストレスの関与の解明に役立つと期待できる。また変異 SOD1 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。

共同研究者

藤原範子<sup>1</sup>、中の三弥子<sup>2</sup>、松本紋子<sup>2</sup>、  
鈴木敬一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>兵庫医科大学学生化学

<sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科生化学

### A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子が 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 SOD1 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、および弧発性の ALS 患者では SOD1 免疫陽性の封入体が観察されており、特に変異 SOD1 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。また活性酸素種が aggregation を起こす可能性も示唆されている。SOD1 タンパク自身に及ぼす酸化ストレスの影響を検討し、ALS への酸化ストレスの関与を明らかにするための手段を探ることを目的とした。またシステイン残基の酸化との関連性を検討するために、Cys111 の SH 基に 2-メルカプトエタノール (2-ME) を導入した

2-ME-SOD1 を用いて、SOD1 の酸化における Cys111 の役割を検討した。

## B. 研究方法

2-ME を導入した SOD1 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-MS 解析で確認した。さらに 2-ME を加えて Cys111 の 2-ME がはずれて元の野生型 SOD1 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 SOD1 に戻ることが示唆されたため、その SOD1 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 SOD1 を 2-ME-SOD1、はずして元に戻したものを re-SOD1 と呼ぶことにする。この 2 つの SOD1 を用いて、酸化に対する反応性を比較検討した。re-SOD1 を酸化すると還元 SDS-PAGE で上にシフトした 2 本目のバンドが現れた。このバンドは酸化修飾された SOD1 と予想されたため、その分子を MALD-TOF-MS および LC-ESI-MSMS を用いて同定を行った。

## 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-MS 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。

次に種々の濃度の過酸化水素を両 SOD1 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-SOD1 では主に 2 本のバンドになり、時間がたつと SOD1 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-SOD1 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た。回転式攪拌器でゆっくり攪拌させる空気酸化によっても、re-SOD1 は 2 本目のバンドを出現させることがわかった。この空気酸化 re-SOD1 を MonoQ カラムにかけると、2 本のピークに分かれた。それぞれのピーク部分をウエスタンブロッティングすると、1 本目のピークは 1 本の SOD1 バンド、2 本目のピークは 2 本のバンドが観察された。MS 解析によって、2 本目のピークには元の SOD1 の質量と約 45 大きい質量の 2 種類の SOD1 が存在することがわかった。SDS-PAGE で分離した 2 本のバンドのそれぞれを切り出し、トリプシン処理し、Cys111 を含むペプチドの質量を調べたところ、上のバンドからはペプチドの質量+32 および+48 の質量数が得られた。さらに 2 本バンドの MonoQ カラム画分をリジエンドペプチダーゼ処理して得られたペプチドを MSMS 解析することで、Cys111 はスルフィン酸 (SO<sub>2</sub>H) およびスルホン酸 (SO<sub>3</sub>H) に酸化されることを証明した。隣の His110 や酸化されやすいと報告されてきた His120 は酸化されていないことを証明した。また、Cys111 をスルホン酸にした合成ペプチドを免疫して作製した抗体は上バンドを強く認識することがわかった。Cys111 はマイルドな酸化条件下でも酸化されやすく、酸化された SOD1 は SDS-PAGE では上にシフトすることが明らかになった。

## D. 考察

哺乳類の中でヒトのみが Cys111 を有する。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 SOD1 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。本研究の結果より、Cys111 はマイルドな酸化条件下でも酸化されやすく、スルフィン酸 (SO<sub>2</sub>H) およびスルホン酸 (SO<sub>3</sub>H) になることがわかった。従って、Cys111 のフリーの SH 基をマスクすることによって変異 SOD1 の不安定性や酸化による凝集性を低減できると考えられる。変異 SOD1 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。また、新規に作製した酸化 SOD1 特異抗体は ALS への酸化ストレスの関与の解明に役立つと期待できる。

#### E. 結論

Cys111 はマイルドな酸化条件下でも酸化されやすく、スルフィン酸 (SO<sub>2</sub>H) およびスルホン酸 (SO<sub>3</sub>H) になる。Cys111 を 2-ME で修飾した SOD 1 は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

なし

##### 2. 学会発表

Fujiwara N, Nakano M, Ookawara T, Eguchi T, Yoshihara D, Taniguchi N and Suzuki K: Role of Cys111 on the stability of human Cu/Zn-SOD: implication for ALS, IUBMB 2006, June 18 – 23, 2006, Kyoto, Japan, p293

Fujiwara N, Nakano M, Ookawara T, Eguchi T, Yoshihara D, Taniguchi N and Suzuki K: Role of Cys111 in structural stability of human copper/zinc-

superoxide dismutase, ISBC2006, The Second International Symposium on Biomolecular Chemistry, August 6 -9, 2006, FIBER Konan University, Japan, p11

Fujiwara N, Nakano M, Ookawara T, Eguchi T, Yoshihara D, Taniguchi N and Suzuki K: Identification of oxidized Cys111 in human Cu/Zn-Superoxide Dismutase, SFRMB's 13<sup>th</sup> Annual Meeting November 15 – 19, Denver, Colorado, USA, 2006, Vol. 41, S134

Fujiwara N, Nakano M, Ookawara T, Eguchi T, Yoshihara D, Taniguchi N and Suzuki K: Involvement of Cys111 in a stability of human copper/zinc-superoxide dismutase, 17<sup>th</sup> International Symposium on ALS/MND, November 30 – December 2, Yokohama, Japan, 2006, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Vol.7, p137

藤原範子、中の三弥子、大河原知水、江口裕伸、吉原大作、谷口直之、鈴木敬一郎：ヒト Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼの安定性に関与する Cys111 の酸化について、過酸化脂質フリーラジカル学会、第 30 回大会、2006. 10. 20-21、東京。(過酸化脂質研究, 30, p39, 2006.)

#### 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

分担研究者 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を示し、感染から回復する能力を持つことを見出した。また、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で発現させても神経細胞は細胞変性を示さないことも見出した。ではなぜポリオウイルス感染神経細胞が最終的に細胞変性効果を示すかが不明である。そこで、2A プロテアーゼ以外にも細胞変性に関与するウイルス遺伝子産物が存在する可能性を追求した。結果的に、ポリオウイルスのキャプシド蛋白質（P1）も細胞変性効果に関与することを明らかにした。

### 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に研究を行ってきた。昨年度までに、神経細胞はポリオウイルスの1回の感染には抵抗性を示すこと、細胞変性に中心的役割を持つポリ

オウイルス特異的 2A プロテアーゼの単独発現にも抵抗性を示すことなどを明らかにしてきた。しかしながら、これらの結果は、ポリオウイルス感染神経細胞が結局は細胞変性効果を示す事実を説明することにはならない。さらに、2A プロテアーゼ以外にも細胞変性に関与するウイルス遺伝子産物が存在することを示唆している。そこで、今年度は 2A プロテアーゼを保持しないポリオウイルス変異株を作製し、その細胞変性効果を調べることを目的とした。