

厚生労働科学研究費補助金

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17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 池田 穰衛

平成20（2008）年3月

# 目 次

研究者一覧	-----	1
I. 総合研究報告		
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21
III. 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	東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学	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	講師

# I. 総 合 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

主任研究者 池田 穰衛  
東海大学医学部基礎医学系分子生命科学教授

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、選択的な上位・下位運動ニューロン変性を病因とする難治性運動ニューロン疾患（MND）である。長年にわたる研究にも関わらず、未だ分子病態は不明である。本研究が対象としている *ALS2* 遺伝子は近年発見されたもので、一群の上位運動ニューロン疾患（ALS2、PLSJ、SPG、IAHSP）の原因遺伝子であり、その遺伝子産物である“ALS2”は運動ニューロンの生存・機能維持における必須分子と考えられている。本研究は、個体・細胞レベルでのALS2分子機能解析を基軸に、ALSにおける選択的な運動ニューロン変性の分子機序の解明と治療薬開発に重点を置き、ALS治療法・治療薬開発の具体化に繋がる知見と素材を得ることを目的としている。具体的には、我々の先行研究成果であるALS2及びその関連因子、*Als2* 遺伝子欠損マウス、変異SOD1発現マウス、神経細胞死抑制低分子化合物を用いて、ALSの選択的な運動ニューロン変性の解明と治療薬の開発を目指し、研究を遂行した。その結果、ALS2有する新たな分子・生理機能が明らかにされた。また、NAIPを選択的に誘導する低分子化合物のALSマウスへの投与実験を通して、新規のALS/MND治療候補薬を同定することに成功した。今後、ALS/MND治療薬開発への具体化に向けて、同定された化合物の詳細な薬効分子機序の解明が必要と考えられる。また、同定されたALS2の分子・生理的機能を手掛かりとして、ALS/MNDにおける選択的な運動ニューロン機能障害・変性の分子背景についての理解が進み、ALS2分子機能をターゲットにした新たなALS/MND治療への展開も期待される。

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講師)

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis; ALS）は、上位及び下位の運動ニューロン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。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並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、運動ニューロンの機能障害・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並びに運動ニューロン疾患（motor neuron disease; MND）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。

近年、申請者らは、上位運動ニューロン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。その後、欧米における一連の神経疾患遺伝子解析から、申請者らが解析したALS2型に加えて、*ALS2* 遺伝子は上位運動ニューロン

変性を特徴とする一群の MND[若年発症型原発性側索硬化症 (PLSJ)、小児性痙性対麻痺 (IAHSP)]の原因遺伝子であることが判明した。一方、申請者らは、ALS2 遺伝子産物 (ALS2/alsin) 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並びに当該個体レベルでの生体内機能の解析を行ってきた。その結果、ALS2 が低分子量 G タンパク質 Rab5 に特異的な guanine nucleotide exchange factor (GEF) であることを発見した。さらに、ALS2 は、自らの Rab5-GEF 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 分子同士との複合体形成が必須であることを明らかにした。ALS2 遺伝子変異に起因した運動ニューロン疾患は劣性遺伝形式を示すことから、ALS2 の機能喪失 (loss of function) が上位運動ニューロン変性の分子背景となっており、正常な ALS2 とその分子機能環境が上位運動ニューロンの機能と生存に必須であると考えられる。従って、ALS2 は、運動ニューロンの機能分化・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 の神経細胞内での挙動と役割は未だ不明な点が多い。

一方、ALS/MND を初めとする多くの神経変性疾患見られる神経細胞死の分子背景としては、酸化ストレスや活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS)、ミトコンドリア機能傷害、カルシウム恒常性異常、異常蛋白質の蓄積などが想定されている。我々は、これまでに下位運動ニューロンの変性・脱落を特徴とする難治性運動ニューロン変性疾患である脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy; SMA) の重篤度に関わる因子として神経細胞死抑制因子 (NLR-family apoptosis inhibitory protein; NAIP) を同定し、NAIP が酸化ストレス・ROS による神経細胞死に対する生体内防御因子として機能していることを示してきた。従って、何らかの方法により内因性 NAIP レベルを高めることができれば、脳神経系における神経細胞死が抑制され、その結果として疾患発症の遅延・治療に向けての効果が期待できる。すなわち、NAIP を分子標的とすることにより、新たな ALS/MND 治療薬・治療法の開発が可能になると考えられる訳である。

以上を踏まえ、本研究では一群の運動ニューロン疾患の原因遺伝子産物である ALS2 及び NAIP に注目し、個体・細胞レベルでの ALS2 分子機能解析を軸に、ALS/MND における選択的な運動ニューロン変性の分

子機序の解明を目指すとともに、内因性 NAIP を標的分子とする活性化化合物のスクリーニングによる新規 ALS/MND 治療候補薬の同定を行なう。そして、最終的に ALS/MND の分子病態解明と ALS/MND 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。

## B. 研究方法 (年度別)

### 1. 平成 17 年度の研究実施計画の概要

#### (1) ALS2 の神経細胞内挙動の解析 (池田)

本項では、各種 ALS2 発現コンストラクトを培養及び初代培養神経細胞に導入し、ALS2 分子の細胞内局在並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 (*Als2*-KO) マウス由来の細胞を用いて、正常及び病変型 ALS2 による細胞内エンドゾーム動態調節機能を詳細に観察した。

#### (2) *Als2* 遺伝子欠損マウスの神経病理学的解析 (池田、岩倉)

本項では、申請者らが作出した *Als2*-KO マウスの行動学的、神経病理学的、及び神経生理学的手法により解析した。具体的には、混血 F2 遺伝子背景 (12901a/C57BL6) を有する個体の 2 年間に渡る体重、運動能力等の継時観察を行った。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 機能喪失による神経変性並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 遺伝子変異陽性及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にもかかわらず、我が国における FALS の全体像は十分に把握されていない。本項では、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* 変異陽性及び陰性例の 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)

*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。本項では、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。

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

本項では、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 及び 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、免疫組織学的手法により解析した。

## 2. 平成 18 年度の研究実施計画の概要

(1) ALS2 分子機能の細胞生物学的解析 (池田)

内因性 ALS2 分子を完全に喪失している *Als2*-KO、及びヒト *ALS2* 遺伝子プロモーター制御下で *ALS2* 遺伝子を高発現する遺伝子導入 (*ALS2*-tg) マウス由来の初代培養神経細胞を用いて、神経細胞の生着、移動、軸索伸長、成長円錐・シナプス構造、細胞内膜小胞動態等の観察を行い、ALS2 の神経細胞内での分子機能に関して検討した。また、これまでの研究により、ALS2 は細胞内においては通常不活性な状態で存在するが、何らかの刺激により活性化することにより、細胞内でのエンドゾーム動態調節を行っていることが明らかにされているが、その活性化機構は不明である。本研究では、ALS2 の活性化上流因子の探索、ALS2 の活性化に伴う ALS2 細胞内動態並びに細胞内生理機能に関して解析した。

(2) 新規 ALS モデルマウスの作出及び解析 (池田、岩倉、青木)

我々が作出した混血型 *Als2*-KO マウス (12901a / C57BL6 F2) は生後 24 ヶ月齢においても外見上は顕著な病徴を示さない。しかしながら、中枢・末梢神経組織全体を対象とした神経病理学的な解析により、ALS2 機能喪失により、老齢マウスにおいて小脳プルキンエ細胞並びに運動神経軸索の減少することが明らかとなった。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、10 世代以上の戻し交配により 2 系統のコンジェニック系 *Als2*-KO マウス (C57/BL6J 及び FVB/N) を作出し、その行動学的、神経病理学的解析を行った。また、近年 ALS2 分子と病変型 SOD1 分子との結合が報告され

ている。分担研究者青木 (東北大学) は、独自に遅延発症型 ALS モデルマウス (変異 SOD1<sup>H46R</sup> 発現マウス) を作出している。ALS2 と変異 SOD1 の家族性 ALS 原因遺伝子産物の個体レベルでの分子連関を明らかにするため、H46RSOD1 マウスとコンジェニック系 *Als2*-KO マウスを交配して、H46R 変異 SOD1-tg/ *Als2*-KO マウスを作出した。さらに、*ALS2*-tg マウスと変異 SOD1<sup>H46R</sup> 発現マウスを交配して *ALS2*/H46R 変異 SOD1 ダブル tg マウスを作出した。

(3) 低分子化合物による ALS 治療法開発の試み (池田、青木)

本項では、神経細胞アポトーシス抑制因子 (NAIP) を選択的に発現誘導する低分子化合物を用いた H46R 変異 SOD1-tg マウスへの治療効果 (発症前投与実験) に関して検討した。NAIP 遺伝子は MND の一つである脊髄性筋萎縮症 (SMA) の重篤度に関わる modifier であると想定されている。NAIP は酸化ストレスや ROS によって誘導される細胞死を選択的に抑制するとともに、内・外因性 NAIP の強制発現は様々な神経変性疾患モデル動物において神経細胞の保護 (神経細胞死抑制) に寄与する。これらの NAIP 機能に着目して、独自に開発した NAIP-ELISA と *in vitro* 酸化ストレス性細胞死抑制活性定量系を駆使して、向脳神経低分子化合物を出発材料に用いて、NAIP 機能を昂進・活性化する化合物を選抜した。この化合物の薬理特性と一過性脳虚血モデル動物並びに変異 SOD1<sup>H46R</sup> 発現マウスでの薬効について解析した。

(4) 異常蓄積タンパク質分解による ALS 治療法開発の試み (祖父江)

強力な異常タンパク質分解活性を有する古細菌プロテアソームに注目した新たな ALS 治療法の開発を試みた。

(5) 中枢神経系でのサイトカインの役割 (岩倉)

ALS の発症・病態形成には、酸化ストレスの他に炎症の関与も示唆されている。また、我々の解析から、*Als2*-KO マウスにおいても、加齢とともにアストログリア細胞、マイクログリア細胞の活性化を観察しており、疾患発症との関連が推察される。本研究では、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 ファミリーと IL-17 ファミリーに注目し、中枢神経系の炎症におけるサイトカインの役割を解析した。

(6) 神経栄養因子投与による ALS 治療法開発の試み (青木)

神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF)

及び肝細胞増殖因子 (HGF) の髄腔内投与による ALS 治療効果に関して検討した。

### 3. 平成19年度の研究実施計画の概要

#### (1) ALS2 分子機能及び疾患分子病態の解析 (池田)

これまでの解析結果から、ALS2 は細胞内においては自身の有する Rab5 活性化作用を介して、エンドゾーム動態並びにマクロピノサイトーシスの調節に関与していることが明らかとなってきた。本項では、ALS2 の神経細胞に選択的な分子機能を同定するため、*Als2*-KO マウスに由来する初代培養大脳皮質神経細胞並びに繊維芽細胞におけるマクロピノサイトーシス活性の定量的解析を行なった。また、近年の分子遺伝学的解析により、*ALS2* 遺伝子のミスセンス変異を有す患者家系が見いだされた。本研究では、これら変異遺伝子に由来する変異 ALS 蛋白質の分子機能についても、生化学的・細胞生物学的手法により解析した。

#### (2) ALS/MND 治療薬の開発 (池田、青木)

本項では、NAIP を選択的に誘導する新規低分子化合物のスクリーニング、得られた候補化合物の ALS モデルマウスへの発症前並びに発症後継続投与実験を行った。特に、本研究では、安定した疾患表現型を示し、新規治療法開発のためのモデル系として適しているとされる変異 *SOD1<sup>H46R</sup>* 発現マウスを用いた。そして、その薬効 (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なうことにより、新規低分子化合物のマウス個体での神経細胞死抑制及び疾患治療効果について検討した。

#### (3) ALS 新規疾患モデルの開発 (祖父江)

*Dynactin1* を標的とした ALS 新規疾患モデル開発を試みた。

#### (4) 発生工学手法を用いた疾患モデルマウスの作製 (岩倉)

ALS 患者では副腎の機能異常が認められ糖質コルチコイドの分泌が低下するなど、ストレス応答が低下していることが報告されている。我々は糖質コルチコイドの分泌を調節する ACTH の受容体と考えられているメラノコルチン 2 型受容体 (MC2R) に注目し、MC2R 遺伝子を欠損した (*Mc2r<sup>-/-</sup>*) マウスを遺伝子ターゲット法により樹立し、その表現型を解析した。

#### (5) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) ラットモデルにおける細胞外微小環境 (青木)

ALS における神経再生療法開発を念頭に、細胞外基

質の主要構成成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の発現を ALS ラットモデルで検討した。

#### (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、遺伝子改変マウスの交配と系統樹立については、各研究機関における倫理委員会、遺伝子組換え生物に関する実験安全委員会、並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 (年度別)

#### 1. 平成17年度の研究成果

(1) 神経細胞におけるALS2の発現及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は、細胞体、樹状突起、並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並びに解析

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、*Als2*-KOマウスを作出した。24ヶ月齢までの継続的観察により、*Als2*-KOマウスは、発育、生殖機能、並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、運動ニューロン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*-KOマウスの神経系において、広範な活性ミクログリア及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*-KO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) *SOD1*遺伝子変異陽性及び陰性例の臨床病理

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

*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。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系統のコンジェニック系*Als2*-K0マウス(C57BL/6及びFVB/N)を樹立した。コンジェニック系*Als2*-K0マウスと遅延発症型ALSモデルマウス(変異SOD1<sup>H46R</sup>発現マウス)との交配を行い、H46RSOD1/*Als2* (-/-)マウスの作出を行った。

#### (5) 臨床的特徴のある変異SOD1遺伝子導入マウスの作製及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及び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及び病型をよく再現していた。特に変異SOD1<sup>H46R</sup>発現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。

## 2. 平成18年度の研究成果

### (1) ALS2の神経軸索伸長促進作用

本項目では、内因性ALS2分子を完全に喪失している*Als2*-K0マウス、及びALS2遺伝子を高発現するALS2-tgマウス由来の初代培養海馬神経細胞を用いて、神経細胞の生着、移動、軸索伸長、成長円錐・シナプス構造、細胞内膜小胞動態等の観察を行った。その結果、ALS2はStage3(未成熟期)神経細胞においては成長円錐におけるアクチン陽性膜小胞(マ

クロピノソーム)に分布し、Stage5(成熟期)では軸索及び樹状突起内のエンドゾーム様膜小胞に分布することが判明した。また、*Als2*-K0神経細胞を用いた解析によりALS2は軸索伸長を調節する因子であることが判明した。さらに、その軸索伸長調節は、ALS2による低分子量Gタンパク質Rab5の活性化を介して行われている可能性が示された。

### (2) ALS2のマクロピノサイトーシスへの関与

これまでの研究により、ALS2は細胞内においては通常不活性な状態で存在するが、何らかの刺激により活性化することにより、細胞内でのエンドゾーム動態調節を行っていることが明らかにされている。しかし、その活性化機構は不明である。そこで本項目では、ALS2の活性化上流因子の探索を行った。その結果、活性型低分子量Gタンパク質Rac1がALS2の細胞膜への親和性並びに細胞内でのエンドゾーム融合活性を顕著に増大させることが判明した。さらに、ALS2が活性型Rac1と直接結合することから、Rac1がALS2の直接的な上流活性化因子(ALS2はRac1のエフェクター)であることが示された。さらに、ALS2の活性化に伴うALS2細胞内動態並びに細胞内生理機能に関して解析した結果、ALS2はRac1により活性化されるとともに、Rac1の活性化により誘起される細胞でのマクロピノサイトーシスに伴って細胞膜からマクロピノソームへと移行することが判明した。詳細な細胞生物学的解析により、ALS2は自身が存在しているマクロピノソームとクラスリン依存性エンドサイトーシスにより生じた初期エンドゾームとの異種性エンドゾーム融合に関与することが判明した。さらに、ALS2は自身が存在しているマクロピノソームの同種性エンドゾームの融合、並びにエンドゾーム成熟にも寄与しているものと推定された。

### (3) 新規ALSモデルマウスの作出及び解析

本項目では、疾患遺伝子変異を忠実に再現した遺伝子改変マウス(新規ALS/MNDモデル動物)を作出することを目指す。本年度は、これまでに作出した*Als2*-K0マウスのコンジェニック化(C57/BL6J及びFVB/Nバックグラウンド;N10~N12)を完了した。また、コンジェニック系*Als2*-K0マウスとALS2-tgマウス並びに変異SOD1<sup>H46R</sup>発現マウスとの交配を行い、*Als2*-K0/ALS2-tg、*Als2*-K0/H46R変異SOD1-tg、並びにALS2/H46R変異SOD1ダブルtgマウスを作出し、現在当該マウスの行動・生理学的解析を実施・継続している。

#### (4) 低分子化合物による神経変性疾患治療法開発

本項目では、NAIP を選択的に発現誘導する新規低分子化合物を用いた ALS 治療法の開発を試みた。まず、細胞内 NAIP を定量的に解析するために、1 次抗体として 1B9 抗体を、2 次抗体として ME1 抗体を使用した NAIP double-antibody sandwich ELISA (NAIP-ELISA) 法を開発した。NAIP-ELISA 系を用いて脳神経関連の 953 個の低分子化合物をスクリーニングし、NAIP 発現誘導する化合物を 30 個同定した。その 30 化合物すべてにおいて培養細胞での NAIP 発現レベルの有意な上昇活性が認められ、フリーラジカル産生促進剤である menadione による酸化ストレス性細胞死を抑制することが判明した。その中で、もっとも強力な細胞死抑制活性を示した化合物 L-745, 870 の細胞死抑制活性を *in vitro* 及び *in vivo* 実験で解析した。細胞死抑制活性は、非神経系や神経系などの細胞株のみならず初代培養細胞系においても同等の抑制活性が確認された。さらに、L-745, 870 による NAIP 発現レベルの有意な上昇活性は、L-745, 870 の濃度依存的に誘導され、細胞死も濃度依存的に抑制された。細胞死を誘発する種々のストレスの中で酸化ストレスのみ特異的に抑制活性を示し、酸化ストレス以外のストレスに対しては抑制活性を示さなかった。さらに、NAIP-RNA 干渉実験により、NAIP 発現を減少させると細胞死抑制活性も同様に低下したことから、その抑制作用は NAIP 発現の上昇を介していると考えられた。また、NAIP 以外の細胞死抑制タンパク質の発現増加は示されず、他の細胞死抑制因子の関与も否定された。次に、砂ネズミでの一過性前脳虚血モデル実験を行ったところ、L-745, 870 は海馬 CA1 領域の NAIP 発現を上昇させ、同時に虚血性の神経細胞死に対して保護的に作用することが確認された。さらに、変異 SOD1<sup>H46R</sup> 発現マウスに L-745, 870 を発症前経口投与したところ、コントロール群に対して薬剤投与群 (20mg/kg) では発症日 (コントロール群 vs 薬剤投与群; 126.2±4.0 vs 132.5±5.1, p<0.01)、並びに生存日 (コントロール群 vs 薬剤投与群; 163.2±8.2 vs 174.6±9.1, p<0.01) が有意に遅延し、個体レベルでの薬効が確認された。

#### (5) 異常蓄積タンパク質分解による ALS 治療法開発の試み

強力な異常タンパク質分解活性を有する古細菌プロテアソームが哺乳動物細胞の中でも毒性なく機能

的複合体として再構成され、家族性 ALS の原因の一つである変異 SOD1 の細胞内での分解を強力に促進して神経細胞毒性を軽減しうることを見出した。

#### (6) 中枢神経系におけるサイトカインの役割

脳脊髄炎の発症には IL-1、IL-17 とともに重要な役割を担っていることが明らかになった。

#### (7) 神経栄養因子投与による ALS 治療法開発

神経栄養因子の発症後の病態進行抑制効果の有無を検討した。髄腔内持続投与法は ALS の病態の首座である脊髄運動ニューロンへの効率的な薬剤導入法としてすぐれていると考えられた。

### 3. 平成 19 年度の研究成果

#### (1) 神経細胞選択的な ALS2 の分子機能

本項目では、ALS2 がマクロピノサイトーシスに及ぼす影響について解析するため、内因性 ALS2 分子を完全に喪失している *Als2*-KO マウス及び正常マウス由来の初代培養大脳皮質神経細胞及び繊維芽細胞を用いて、血清刺激依存性の Horseradish peroxidase (HRP) 取込み活性の定量的解析を行なった。その結果、ALS2 の欠損により大脳皮質神経細胞での HRP 取込み活性が有意に低下することが判明した。しかし、繊維芽細胞においては、ALS2 存在の有無による HRP 取込み活性の変動はみられなかった。従って、ALS2 分子は、神経細胞に選択的なマクロピノサイトーシス調節活性を有するものと推定された。

#### (2) 変異 ALS2 の細胞内挙動異常と機能喪失機構

これまでの研究により、ALS2 は低分子量 G 蛋白質 Rac1 により活性化され、細胞膜上へと局在化するとともに、Rac1 の活性化により誘起される細胞でのマクロピノサイトーシスに伴って細胞膜からマクロピノソームへと移行することが明らかにされている。さらに、ALS2 は自身が存在しているマクロピノソームとクラスリン依存性エンドサイトーシスにより生じた初期エンドゾームとの異種性エンドゾーム融合、自身が存在しているマクロピノソームの同種性エンドゾームの融合、並びにエンドゾーム成熟にも寄与していると推定されている。これらの知見から、ALS2 が正常な機能を発揮する上で、ALS2 の細胞内局在動態が重要であると考えられる。本項目では、近年発見された ALS2 ミスセンス変異により発症する疾患の分子基盤を解明するため、2 種類の変異 ALS2 の Rac1 への応答性並びに細胞内局在について解析した。その結果、何れの変異体 ALS2 蛋白質も Rac1 依存性の細

胞膜への局在化能をほぼ消失していることが判明した。これら変異体は、Rab5に対する活性化領域である正常なVPS9ドメインを保持しており、また生化学的にもRab5活性可能を保持している。従って、これらのALS2遺伝子変異によるMNDの発症には、ALS2の細胞内での局在変調が起因していることが示唆された。

### (3) 低分子化合物による神経変性疾患治療法開発

本項目では、NAIP を選択的に発現誘導する新規低分子化合物を用いた ALS 治療法の開発を試みた。昨年度までに、NAIP double-antibody sandwich ELISA (NAIP-ELISA) 法と *in vitro*での細胞死抑制活測定を併用した化合物スクリーニングにより、ヒット化合物 L-745,870 を同定した。さらに、当該化合物が虚血性の神経細胞死に対して保護的に作用すること、H46R 変異 SOD1-tg (ALS モデル) マウスへの発症前経口投与により有意な治療効果が得られることを明らかにした。本年度は、治療効果機序解明のための分子病態解析、並びに同モデルマウスへの発症後投与の効果について解析・検討した。その結果、当該化合物の ALS モデルマウスへの継続的投与（発症前投与）により疾患症状の軽減と平行して、運動ニューロン脱落の抑制、並びにミクログリア活性化の抑制効果が得られた。さらに、当該化合物の同モデルへの発症後投与においても有意な運動機能改善及び延命効果が得られた。従って、化合物 L-745,870 は ALS/MND に対する有望な新規治療候補薬であると考えられた。

### (4) ALS 新規疾患モデルの開発

ALS 患者脊髄運動ニューロンの遺伝子プロファイリングにて同定した選択的な dynactin1 遺伝子発現レベルの低下は、*in vitro* 及び *in vivo* 双方のモデルにおいて、神経細胞の機能障害及び変性を誘発する十分条件であった。また dynactin1 遺伝子ノックダウンモデルは、孤発性 ALS の重要な病態を反映する疾患モデルとなりうることが期待される。

### (5) 発牛工学手法を用いた疾患モデルマウス作製

Mc2r<sup>-/-</sup>マウスは、出生直後に大部分が死亡する点はヒトと異なるが、生存した場合は副腎低形成を示す糖質コルチコイド欠乏症の病態をよく反映しており、疾患モデルとして有用であることがわかった。

### (6) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) ラットモデルにおける細胞外微小環境

コントロールに比し ALS ラットモデル脊髄では、病変の主座である前角とその周囲白質を中心に CSPG

が発症前から有意に沈着亢進していた。CSPG の分子種によって発現変動には相違がみられた中で neurocan は胎生期に出現して成体では検出されにくい全長型アイソフォーム発現が確認され、再生に対して非許容的な環境が形成されている可能性が明らかとなった。

## D. 考察

### 1. 研究成果についての学術的考察

ALS2 遺伝子は、当初家族性 ALS 2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及び小児性痙性対麻痺の原因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 12 家系から 12 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遺伝子産物 ALS2 の翻訳を喪失させるものであることが示唆されている。従って、患者においては、正常な ALS2 翻訳並びに ALS2 の本来発揮すべき機能が損なわれ、それにより運動ニューロン機能障害及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ニューロンの機能障害及び変性に関与しているものと想定される。

我々は、これまで ALS2 の生化学・分子生物学的解析と *Als2*-KO マウスの作出並びに当該個体レベルでの生体内機能の解析を行ってきた。その結果、ALS2 が低分子量 G タンパク質 Rab5 に特異的な GEF であることを発見した。また、ALS2 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 分子同士との複合体形成が必須であることを明らかにした。さらに、我々は、低分子量 G 蛋白質である Rac1 が ALS2 の制御上流因子であることを明らかにするとともに、ALS2 並びにその調節因子 (Rac1 など) が、細胞内においてエンドゾーム、膜小胞等の移送及び融合等に深く関わること、ALS2 が神経細胞においては軸索伸長及びマクロピノサイトーシスの調節に関与していることなどを明らかにした。一方、作出した *Als2*-KO マウスは、発育、生殖機能、並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。マウスにおいて、ALS2 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、ALS2 と機能的に類似した

Rab5GEF 分子 (VPS9 ファミリー分子) の作用の種差が関連している可能性が考えられる。何れにせよ、ALS2 遺伝子変異に起因した ALS/MND は劣性遺伝形式を示すことから、ヒトにおいては ALS2 の機能喪失は上位運動ニューロン変性の分子背景となっており、正常な ALS2 とその分子機能環境が上位運動ニューロンの機能と生存に必須であると考えられる。今後、サルを含めた霊長類とマウス等の齧歯類における ALS2 並びにその類縁分子の生理的機能の類似点及び相違点の解明が必要であると考えられる。

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 が変異 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 ALS/MND の発症過程における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、変異 SOD1<sup>H46R</sup> 発現マウスとコンジュニック系 *Als2*-KO マウスとの交配による *Als2* 遺伝子欠損型変異 SOD1<sup>H46R</sup> 発現マウスを作出し、ALS2 機能障害と病変型 SOD1 による運動ニューロン変性との相関についての解析に着手し、それらマウスの作出に成功した。現在、当該マウスの行動・生理学的解析を実施・継続しており、既に ALS2 機能喪失が変異 SOD1 発現により引き起こされる運動ニューロン疾患症候を悪化させるとの予備的結果を得ている。このような解析をさらに進めることにより、個体レベルでの ALS2 の新たな生理機能が明らかにされるとともに、ALS/MND 発症に関連した異なった遺伝子の相互作用及び神経細胞死との関連についての新たな側面での分子基盤が明らかにされることが期待される。

一方、ALS/MND を初めとする多くの神経変性疾患見られる神経細胞死の分子背景としては、酸化ストレスや ROS、ミトコンドリア機能傷害、カルシウム恒常性異常、異常タンパク質の蓄積、などが想定されている。我々は、これまでに下位運動ニューロンの変性・脱落を特徴とする難治性運動神経変性疾患である SMA の重篤度に関わる因子として NAIP を同定し、それが酸化ストレス・ROS による神経細胞死に対する生体内防御因子として機能していることを示してきた。本研究では、この NAIP の分子機能に着目し、内因性 NAIP を標的分子とする活性化化合物のスクリーニング系及び *in vitro* 酸化ストレス性細胞死抑制活性測定法の併用することにより、神経向性化合物群の中から複数の細胞死抑制活性を有するヒット化合物

を選抜した。これらの化合物の中の 1 つであるドーパミン D4 受容体拮抗剤 (L-745, 870) は、最も強い *in vitro* 酸化ストレス性細胞死抑制活性を示し、さらに当該化合物を経口投与した砂ネズミにおいては、脳虚血時に観察される海馬 CA1 ニューロンの細胞死が効果的に抑制されることを明らかにした。これらの結果は、NAIP が酸化ストレスや ROS に起因する細胞死の選択的な抑制効果を介して脳細胞の傷害・神経変性を軽減していることを示しており、よって NAIP は神経細胞死を伴う疾患の治療や予防に有効であると考えられる。そこで、本研究では当該化合物を用いた ALS/MND の治療薬としての可能性について検証するため、安定した疾患表現型を示し、新規治療法開発のためのモデル系として適しているとされる変異 SOD1<sup>H46R</sup> 発現マウスへの発症前並びに発症後経口投与を行なった。その結果、L-745, 870 化合物の ALS モデルマウスへの継続的経口投与により疾患症状の軽減並びに延命効果が得られた。神経病理学的な解析により、当該化合物がミクログリアの活性化を抑制するとともに、運動ニューロンの変性・脱落を遅延させる効果を有することも明らかとなった。当該化合物の薬効分子機序の詳細は今後の解析を待たねばならないが、L-745, 870 は ALS/MND に対する有望な新規治療候補薬であると考えられた。L-745, 870 化合物は、当初抗精神病に対する治療薬として開発され、ヒトでの安全性試験 (Phase I) を終え臨床研究 (Phase IIa) で薬効が認められず開発は中断されている。今後、ALS/MND 患者を対象とした臨床試験への展開が待たれる。また、併せて L-745, 870 をヒット化合物としてその類縁化合物に関しても検討し、神経疾患治療薬開発へ向けて研究を進展させる計画である。このような神経細胞死抑制低分子化合物を初めとする ALS 治療薬・治療法に関する研究の遂行は、未だ有効な治療法の存在しない ALS/MND の治療法確立・実現に向けての着実な一歩になるものと期待される。

## 2. 研究成果の達成度について

研究は、実施期間を通じてほぼ順調に進捗し、着実な成果が得られたと考えられる。具体的には、混血型の *Als2*-KO マウスの解析に関しては、R. Brown 教授 (Harvard 大学) の研究協力を得ながら、当該マウスにおける加齢性の神経構造・機能的異常の検出に成功した。しかし、遺伝学的背景のばらつきによる

因子を排除した2系統のコンジェニック系*Als2*-KOマウスに関しては、現時点でようやく24ヶ月齢まで加齢した個体が得られた状況であり、個体解析が当初の計画より若干遅れることとなった。今後の研究の継続が望まれる。一方、ALS2の分子機能に関しては、その上流活性化因子を世界に先駆けて同定することに成功するとともに、ALS2がマクロピノサイトーシスというこれまでに全く注目されていなかった生理的機能の調節を担っていること、神経細胞での軸索伸長調節因子であること等の着実な成果が得られた。ALS/MND治療薬の開発に関しては、独自の低分子化合物スクリーニングにより得られたL-745,870化合物が、変異SOD1<sup>H46R</sup>発現ALSモデルマウスへの発症前のみならず発症後投与においても治療効果を示すことが確認された。これは、当初の目標であるALS/MND治療法・治療薬開発の具体化につながる知見と素材の獲得に結びつく重要な成果であるとともに、NAIPを標的分子とするALS/MND治療薬開発の preclinical proof-of-conceptが得られたことを意味するものと考えられる。

### 3. 研究成果の学術的意義について

近年、神経変性疾患の原因遺伝子に関する知見が飛躍的に蓄積してきた。その結果、神経変性の分子背景として、アポトーシス、酸化及び興奮性ストレス、異常蛋白質の凝集及び分解異常、細胞骨格の異常、モーター蛋白質の異常などが挙げられている。しかし、ALS/MNDの分子病態は未だ不明で、ALS/MND治療法・治療薬の開発に連なる具体的な知見や素材も極めて少ない。本研究で焦点を当てるALS2遺伝子は、臨床症候を異にする一群の上位運動ニューロン疾患の原因遺伝子であり、その産物“ALS2”の機能喪失が上位運動ニューロン変性の主要な分子背景となっていると推定される。しかし、現在のALS/MNDの分子病態解析並びに疾患発症メカニズムに関する解析については、下位運動ニューロン機能障害・細胞死の研究が主流となっている。ALS/MNDの多くが下位のみならず上位運動ニューロンの傷害をとまなうことを考慮すると、ALS2遺伝子異常に起因する上位運動ニューロン優位ALS/MNDにおける分子病態解析の意義は極めて大きい。本研究は、個体・細胞レベルでのALS2分子機能解析を軸に、ALS/MNDの選択的な運動ニューロン変性機序の解明と治療薬開発に焦点を絞っており、その遂行によりALS治療法・治療

薬開発具体化につながる新たな知見と素材が得られた。今後のさらなる基礎研究及び臨床応用的研究により、ALS/MNDにおける選択的な運動ニューロン機能障害・変性の分子背景についての包括的理解が進み、NAIPのみならずALS2タンパク質を含めた新たな分子を標的にした治療法開発への展開が具体化することが期待される。

### 4. 研究成果の行政的意義について

現段階では、本研究による基礎研究の成果として得られた個体・細胞レベルでのALS2分子機能に関する知見は、ALS/MNDにおける選択的神経変性の分子背景について理解に大きく貢献するものの、その成果がALSをはじめとする種々のMNDの診断、治療法、並びに治療薬開発に活用されるためにはさらに詳細な研究が必要である。しかし、本研究によるマクロピノサイトーシス機能異常を背景にした新たな疾患発症メカニズムの提唱は、今後の疾患研究行政施策策定に対する新しい科学的根拠を提供しているものと考えられる。一方、ALS/MNDの治療薬開発については、本研究の成果によりNAIPを標的分子とするALS/MND治療薬開発の preclinical proof-of-conceptを得ることができた。よって、今後のNAIPを選択的に誘導する低分子化合物の更なるスクリーニング、L-745,870化合物をはじめとするALS/MND治療候補薬の臨床試験への展開、及び治療薬としての実用化推進に向けての行政施策的サポートが期待される。

### E. 結論

本研究により、ALS2が有する新たな分子・生理機能が明らかにされた。また、NAIPを選択的に誘導する低分子化合物のALSモデルマウスへの投与実験を通して、新規のALS/MND治療候補薬を同定することに成功した。今後、ALS/MND治療薬開発への具体化に向けて、同定された化合物の詳細な薬効分子機序の解明が必要と考えられる。また、同定されたALS2の分子・生理的機能を手掛かりとして、ALS/MNDにおける選択的な運動ニューロン機能障害・変性の分子背景についての理解が進み、ALS2分子機能をターゲットにした新たなALS/MND治療への展開も可能となると期待される。

### 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

(主任研究者：池田穰衛)

- 1) Hadano S, Ikeda JE: Purification and functional analyses of ALS2 and its homologue. *Methods Enzymol* **403**: 310-321, 2005.
- 2) Okada Y, Sakai H, Kohiki E, Suga E, Yanagisawa Y, Tanaka K, Hadano S, Osuga H, 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.
- 3) 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.
- 4) 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, 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** (2): 233-250, 2006.
- 5) 秦野伸二、池田穰衛：神経系疾患の遺伝子学。最新医学 **61** (9) (増刊号：臨床遺伝子学'06) : 1956-1970, 2006.
- 6) Sato E, Kimura N, Yokoo M, Miyake Y, Ikeda JE : Morphodynamics of ovarian follicles during oogenesis in mice. *Microsc Res Tech* **69** (6): 427-435, 2006
- 7) Tanaka K, Miyamoto N, Shouguchi-Miyata J, Ikeda JE : HFM1, the human homologue of yeast Mer3, encodes a putative DNA helicase expressed specifically in germ-line cells. *DNA Seq* **17** (3): 242-246, 2006.
- 8) Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Osuga H, Ikeda JE : ALS2CL, a novel ALS2-interactor, modulates ALS2-mediated endosome dynamics. *Biochem Biophys Res Commun* **354** (2): 491-497, 2007.
- 9) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE: The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis. *J Biol Chem* **282** (22): 16599-16611, 2007.
- 10) Hadano S, Kunita R, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Ikeda JE: Molecular and cellular function of ALS2/alsin: Implication of membrane dynamics in neuronal development and degeneration. *Neurochem Int* **51** (2-4): 74-84, 2007.
- 11) Tanaka K, Okada Y, Kanno T, Otomo A, Yanagisawa Y, Shouguchi-Miyata J, Suga E, Kohiki E, Onoe K, Osuga H, Aoki M, Hadano S, Itoyama Y, Ikeda JE: A dopamine receptor antagonist L-745,870 suppresses microglia activation in spinal cord and mitigates the progression in ALS model mice. *Exp Neurol*, in press.
- 12) Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Onoe K, Osuga H, Hadano S, Ikeda JE: ALS2/alsin deficiency in neurons leads to mild defects in macropinocytosis and axonal growth. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.

(分担研究者：祖父江元)

- 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.
  - 6) Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G: Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis.* **25**:331–341, 2007.
  - 7) Tanaka F, Niwa J, Ishigaki S, Katsuno M, Waza M, Yamamoto M, Doyu M, Sobue G: Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1086**:1–10, 2006.
  - 8) Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tokui K, Banno H, Suzuki K, Onoda Y, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: Reversible disruption of dynactin 1-mediated retrograde axonal transport in polyglutamine-induced motor neuron degeneration. *J Neurosci* **26**: 12106–12117, 2006.
  - 9) Yamada S, Niwa J, Ishigaki S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Sobue G: Archaeal proteasomes effectively degrade aggregation-prone proteins and reduce cellular toxicities in mammalian cells. *J Biol Chem* **281**: 23842–23851, 2006.
  - 10) Waza M, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein. *J Mol Med* **84**: 635–646, 2006.
  - 11) Katsuno M, Adachi H, Waza M, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: Pathogenesis, animal models and therapeutics in Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Exp Neurol* **200**: 8–18. 2006.
  - 12) Banno H, Adachi H, Katsuno M, Suzuki K, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: Mutant androgen receptor accumulation in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: A pathogenic marker. *Ann Neurol* **59**: 520–526, 2006.
  - 13) Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G: CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain* **131**: 229–239, 2008.
  - 14) Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J Biol Chem* **282**: 28087–28095, 2007.
  - 15) Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G: Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**: 617–627, 2007.
  - 16) Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G: CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. *J Neurosci* **27**(19): 5115–5126, 2007.
  - 17) Yang Z, Chang YJ, Yu IC, Yeh S, Wu CC, Miyamoto H, Merry DE, Sobue G, Chen LM, Chang SS, Chang C: ASC-J9 ameliorates spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via degradation of androgen receptor. *Nat Med* **13**: 348–353, 2007.
  - 18) Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G: Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis* **25**: 331–341, 2007.

(分担研究者：岩倉洋一郎)

- 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  $\alpha$ . *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* **55**: 971-977, 2006.
- 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.
- 7) Matsuki T, Nakae S, Sudo K, Horai R, 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.
- 8) Uetani N, Chagnon MJ, Kennedy TE, Iwakura Y, Tremblay ML: Mammalian motoneuron axon targeting requires receptor protein tyrosine phosphatases  $\sigma$  and  $\delta$ . *J Neurosci* **26**: 5872-5880, 2006.
- 9) Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y: IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**: 566-573, 2006.
- 10) Okada K, Inoue A, Okada M, Murata Y, Kakuta S, Jigami T, Kubo S, Shiraishi H, Eguchi K, Motomura M, Akiyama T, Iwakura Y, Higuchi O, Yamanashi Y: The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* **312**: 1802-1805, 2006.
- 11) Kayasuga Y, Chiba S, Suzuki M, Kikusui T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Kotaki H, Horai R, Iwakura Y, Nishihara M: Alteration of behavioural phenotype in mice by targeted disruption of the progranulin gene. *Behav Brain Res* **185**: 110-118, 2007.
- 12) Kina S, Tezuka T, Kusakawa S, Kishimoto Y, Kakizawa S, Hashimoto K, Ohsugi M, Kiyama Y, Horai R, Sudo K, Kakuta S, Iwakura Y, Iino M, Kano M, Manabe T, Yamamoto T: Involvement of protein-tyrosine phosphatase PTPMEG in motor learning and cerebellar long-term depression. *Eur J Neurosci* **26**: 2269-2278, 2007.
- 13) Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y: Melanocortin receptor 2 is required for adrenal gland development, steroidogenesis and neonatal gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 18205-18210, 2007.
- 14) Tamagawa A, Kolosova I, Endo Y, Gerlinskaya L, Iwakura Y, Moshikin M: Interleukin-1 deficiency and aggressiveness in male mice. In "Psychoneuroendocrinology Research Trends", M. T. Czerbnska ed., Nova Science Publishers, Inc., pp1-16, 2007.



(分担研究者：青木正志)

- 1) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y, and Okano H: Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* **83**: 119-133, 2006.
  - 2) Aoki M, Kato S, Nagai M, and Itoyama Y: Development of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis expressing a human SOD1 transgene. *Neuropathology* **25**: 365-370, 2005.
  - 3) Ikeda K, Aoki M, Kawazoe Y, Sakamoto T, Hayashi Y, Ishigaki A, Nagai M, Kamii R, Kato S, Itoyama Y, and Watabe K: Motoneuron degeneration after facial nerve avulsion is exacerbated in presymptomatic transgenic rats expressing human mutant Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurosci Res* **82**: 63-70, 2005.
  - 4) Kato S, Kato M, Abe Y, Matsumura T, Nishino T, Aoki M, Itoyama Y, Asayama K, Awaya A, Hirano A, and 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* **110**: 101-112, 2005.
  - 5) Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Arawaka S, Kawanami T, Kurita K, Kadoya T, Aoki M, Itoyama Y, and Kato T: Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* **194**: 203-211, 2005.
  - 6) Koyama S, Arawaka S, Chang-Hong R, Wada M, Kawanami T, Kurita K, et al.: Alteration of familial ALS-linked mutant SOD1 solubility with disease progression: its modulation by the proteasome and Hsp70. *Biochem Biophys Res Commun* **343**: 719-730, 2006.
  - 7) Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, et al.: Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* **83**: 119-133, 2006.
  - 8) Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Warita H, Kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y: Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model. *J Neuropathol Exp Neurol* **66**(11): 1037-1044, 2007.
  - 9) Yamagishi S, Koyama Y, Katayama T, Taniguchi M, Hitomi J, Kato M, Aoki M, Itoyama Y, Kato S, Tohyama M: An *in vitro* model for Lewy body-like hyaline inclusion/astrocytic hyaline inclusion: induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 Mutation. *PLoS ONE* **2**(10): e1030, 2007.
  - 10) Mizuno H, Warita H, Aoki M, Itoyama Y: Accumulation of chondroitin sulfate proteoglycans in the microenvironment of spinal motor neurons in ALS transgenic rats. *J Neurosci Res*, *in press*.
2. 学会発表  
(主任研究者：池田穰衛)
- 1) 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.
  - 2) Hadano S: ALS2CL, a novel ALS2 interacting protein, modulates the ALS2-mediated endosomal dynamics. 16th International Symposium on ALS/MND, Dublin, Ireland, 2005.
  - 3) 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.
  - 4) 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, Ikeda JE: Mice deficient in ALS2/alsin exhibit

- age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Abstracts, p292 (2P-A-364), Kyoto, Japan (June 18-23, 2006).
- 5) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE: Molecular dissection of the ALS2-associated multiple GEF domain functions. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Abstracts, p362 (2P-C-121), Kyoto, Japan (June 18-23, 2006).
  - 6) Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Ikeda JE: ALS2CL, a novel ALS2 interacting protein, modulates ALS2-mediated endosomal dynamics. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Abstracts, p293 (2P-A-365), Kyoto, Japan (June 18-23, 2006).
  - 7) 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, Ikeda JE: Loss of ALS2 in mice produces age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *神経化学* 45(2-3)、452 (P1-N-087)、第 49 回日本神経化学会(名古屋)大会抄録号、名古屋 (September 14-16, 2006) .
  - 8) Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Onoe K, Hadano S, Ikeda JE: ALS2 is localized to endosomes in cultured hippocampal neurons and implicated in axon elongation. *神経化学* 45 (2-3)、321 (WS-7-1)、第 49 回日本神経化学会(名古屋)大会抄録号、名古屋 (September 14-16, 2006) .
  - 9) Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Onoe K, Hadano S, Ikeda JE: ALS2 is localized to endosomes in primary cultured hippocampal neurons and implicated in axon elongation. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 7 (suppl. 1), 52-53 (C70) (17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama/Kanagawa, Japan, November 30-December 2, 2006).
  - 10) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE: ALS2 is a novel Rac1-regulated macropinosomal Rab5GEF that mediates interconnection between distinct endocytic pathways. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 7 (suppl. 1), 53 (C71) (17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama/Kanagawa, Japan, November 30-December 2, 2006).
  - 11) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE: Rac1 regulates the endosomal localization and function of the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin via Rac1-activated macropinocytosis. The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting, Program p174 (2511/B432), San Diego/California, U. S. A., (December 9-13, 2006).
  - 12) Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Osuga H, Ikeda JE: ALS2CL is a novel ALS2-interacting protein that modulates ALS2-mediated endosome dynamics. *Keystone Symposia, Molecular Mechanisms of Neurodegeneration (A4)*, Abstract p71(319), Taos/New Mexico, U. S. A. (January 16-21, 2007).
  - 13) Tanaka K, Okada Y, Sakai H, Otomo A, Hadano S, Osuga H, Ikeda JE: NAIP-based neuroprotection drug screening. 9th Annual Meeting of American Society for Experimental Neurotherapeutics, Program Book, p17 (Poster Abstract #5), Washington, DC, U. S. A. (March 8-10, 2007).
  - 14) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE: The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated macropinocytosis. *Human Genome Meeting 2007, Programme and Abstract book*, p23 (workshop no: 41)/p87 (poster no:157), Montreal/Quebec, Canada (May 21-24, 2007).
  - 15) Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Onoe K, Osuga H, Hadano S, Ikeda JE: ALS2/alsin is localized to endosomes in primary

cultured hippocampal neurons and implicated in axon elongation. Human Genome Meeting 2007, Programme and Abstract book, p88 (poster no: 160), Montreal/Quebec, Canada (May 21-24, 2007).

16) Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Otomo A, Kunita R, Mizumura H, Osuga H, Ikeda JE: ALS2CL, a novel ALS2-interactor, modulates ALS2-mediated endosome dynamics. Human Genome Meeting 2007, Programme and Abstract book, p90 (poster no: 167), Montreal/Quebec, Canada (May 21-24, 2007).

17) Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki-Utsunomiya K, Hadano S, Ikeda JE: The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector via Rac1-activated macropinocytosis. *神経化学* 46 (2-3), 399 (O1P-J03)、第50回日本神経化学会(横浜)大会抄録号、横浜 (September 10-12, 2007) .

18) Tanaka K, Kanno T, Shouguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Suga E, Okada Y, Aoki M, Osuga H, Ikeda JE: Slowing the progression of neuronal degeneration in ALS mouse model using NAIP-upregulating compounds that selectively inhibit oxidative stress-induced cell death. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 8 (suppl 1): 154 (P146) (18th International Symposium on ALS/MND, Toronto/Ontario, Canada, December 1-3, 2007).

19) Hadano S, Otomo A, Suzuki-Utsunomiya K, Kunita R, Aoki M, Itoyama Y, Ikeda JE: Loss of ALS2/alsin exacerbates motor dysfunction in a mutant SOD1-expressing mouse ALS model. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 8 (suppl 1), 159-160 (P155) (18th International Symposium on ALS/MND, Toronto/Ontario, Canada, December 1-3, 2007).

(分担研究者: 岩倉洋一郎)

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, Ikeda JE: Mice deficient in ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and

altered endosome trafficking. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto), ABSTRACTS p292, June 18 - 23, 2006.

2) 秦野伸二、Susanna C. Benn、角田茂、大友麻子、須藤カツ子、國田竜太、鈴木(宇都宮)恭子、水村光、Jeremy M. Shefner、Gregory A. Cox、岩倉洋一郎、Robert H. Brown、池田稯衛: Loss of ALS2 in mice produces age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking、第49回日本神経化学会(名古屋)、2006年9月14~16日

3) 石亀晴道、角田茂、永井武、中江進、小宮山寛、須藤カツ子、笹川千尋、岩倉洋一郎: Differential roles for interleukin (IL)-17 and IL-17F in inflammatory response and host defense、第36回日本免疫学会総会(大阪)、2006年12月11~13日

4) 若林千里、岩倉洋一郎: IL-1受容体アンタゴニストノックアウトマウスにおいて誘導される不安様行動の解析、Neuro2007 第30回日本神経科学大会(横浜)、2007年9月10日~12日。

5) 千田大、中川真一、相良 洋、久保光正、岩倉洋一郎: メラノコルチン2型受容体は、副腎皮質の発生、ステロイド合成、糖新生に必要である、第30回日本分子生物学会年会(横浜)、2007年12月11日~15日。

(分担研究者: 青木正志)

1) 割田 仁 ほか: 外来性再生誘導因子投与によるALSモデルラット脊髄神経前駆細胞賦活の試み。第46回日本神経学会総会、鹿児島、2005。

2) Aoki M, Ishigaki A, Nagai M, Warita H, kato S, Kato M, Nakamura T, Funakoshi H, Itoyama Y. Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor at the onset of paralysis slows disease progression in a rat of ALS. 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, Japan, 30 November - 2 December, 2006

3) Warita H, Aoki M, Nagai M, Ishizaki A, Mizuno H, Funakoshi H, Itoyama Y. Intrathecal infusion of antihepatocyte growth factor antibody exacerbates disease progression in a rat model of ALS. 17th International Symposium on ALS/MND,

Yokohama, Japan, 30 November – 2 December, 2006

- 4) 割田 仁 ほか、ALS モデルラット髄腔内へのコンドロイチン分解酵素持続投与, 第 48 回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋.
- 5) 水野秀紀 ほか、ALS モデルラット脊髄におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの変化, 第 48 回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋.
- 6) 青木正志 ほか、ALS モデルラット脊髄変性における内因性 HGF/c-Met 機構の意義, 第 48 回日本神経学会総会 2007. 5 名古屋.
- 7) 割田 仁 ほか、髄腔内成長因子投与による変異 *SOD1* 遺伝子導入ラット NG2 陽性神経前駆細胞の活性化, Neuro2007 [第 30 回日本神経科学大会・第 50 回日本神経化学会大会・第 17 回日本神経回路学会大会合同学会] 2007. 9 横浜.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

(分担研究者：祖父江 元)

凝集体形成性タンパク質分解用の発現コントラクト、及び凝集体形成性タンパク質が凝集体を形成することを抑制する方法 (特許出願中 2006-076789)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし