

200730040A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

NAD・Sir2 依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 荒木 敏之

平成20(2008)年 3月

目次

I. 総括・分担研究報告

NAD・Sir2 依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

荒木 敏之

館野 美成子

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 9

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 10

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括・分担研究報告書

NAD・Sir2 依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

主任研究者 国立精神神経センター 神経研究所 部長 荒木 敏之

分担研究者 国立精神神経センター 神経研究所 室長 舘野 美成子

研究要旨

カロリー摂取制限は多種多様な生物種において寿命の延長効果を担うことが知られているが、NAD 依存型デアセチル化酵素である Sir2 の活性化がこの効果を介在することから、Sir2 の役割は近年非常に注目を集めている。我々は、神経細胞での NAD 過剰産生が Sir2 の活性化を介して軸索突起の傷害刺激からの保護をもたらすことを過去に明らかにした。

NAD-Sir2 による神経軸索保護効果は、特に老化とともに進行する神経変性疾患など神経系の難病において神経保護による治療効果をもたらす可能性が高く、このメカニズムによる軸索保護の分子機構の詳細を解明することは非常に重要な意義をもっている。

本年度の研究では (1)NAD・Sir2 依存性軸索保護機構の有効性の範囲の検討、(2)Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase(NMNAT)過剰発現トランスジェニックマウス (Tg) のフェノタイプ解析、(3)ウイルスベクターを用いた治療モデル実験の最適化を中心に行った。

A. 研究目的

高齢化社会の進展に伴って、老化とともに進行する疾患への治療アプローチは一層その重要度を増している。神経変性疾患は多くの場合老化と共に進展し、有効な治療法の開発は今後の高齢化社会における喫緊の課題である。

神経軸索変性は、細胞死の防止(たとえば *bcl2* の過剰発現など)によっては抑制できないことから細胞死とは独立したプロセスであると考えられるが、その一方で、軸索変性は神経細胞死に先立って見られ、軸索変性過程のいずれかが細胞死のプロセスをスタートする引き金を引き、最終的な細胞

死に至ると考えられる。これらのことから、軸索変性を抑制できれば神経変性疾患の症状も抑制され、また軸索だけでなく神経細胞体も保護される可能性が高いと考えられ、実際そのような方法での神経保護も既に観察されている。

我々はこれまでに自然発症変異マウス *wlds* において観察される神経傷害後の著明な軸索変性遅延の原因が NAD 合成酵素活性の亢進と、それに伴う NAD 依存性蛋白デアセチル化酵素 Sir2 の活性化によるものであることを明らかにした。NAD-Sir2 による神経軸索保護効果は、特に老化とともに進行する神経変性疾患など神経系の難

病において神経保護による治療効果をもたらす可能性がたかく、このメカニズムによる軸索保護の分子機構の詳細を解明することは非常に重要な意義をもっている。

本研究プロジェクトにおいては、NAD・Sir2 依存性軸索保護のメカニズムを解明し、神経疾患への治療応用を実現することを目的としている。3年計画の2年目にあたる本年度の研究においては、1年目の成果を踏まえて、(1)NAD・Sir2 依存性軸索保護機構の有効性の範囲の検討、(2)Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase(NMNAT)過剰発現トランスジェニックマウス (Tg) のフェノタイプ解析、(3)ウイルスベクターを用いた治療モデル実験の最適化を中心に行った。

B. 研究方法

1) NAD・Sir2 依存性軸索保護機構の有効性の範囲の検討

NAD・Sir2 依存性軸索保護による疾患治療効果に関しては、培養細胞レベルでは我々の研究において抗がん剤 (Vincristine) の神経毒性からの保護においては、神経突起の保護だけでなく細胞死からの保護も観察されたほか、他機関からの報告においては *wlds* マウスと疾患モデル動物との交配において症状の軽減、寿命の延長などの効果が、複数の疾患モデルにおいて認められているなど、モデル動物を用いた実験でも確かめられている。これらの結果は NAD・Sir2 依存性軸索保護の神経疾患治療に対する有用性を示唆している。

一方で、たとえば Parkinson 病モデルを *wlds* マウスにおいて作成した場合には、神

経突起が変性から保護される一方、神経突起が残存している間にも細胞体の死が起きることが観察されている。このような例は他のいくつかのモデルにおいても観察・報告されているが、これらのことから、神経突起の変性は神経細胞体の死 (細胞死) とは独立した現象であるが、神経突起の変性が時間的経過として細胞死より先に起こるものの、これらの現象の間には必ずしも因果関係は無い可能性が考えられる。NAD・Sir2 依存性メカニズムが神経突起を保護するケースは非常にさまざまな神経変性のプロセスにおいて認められているが、どのような場合に神経突起だけでなく細胞全体がこのメカニズムで保護されるのかは明らかではなかった。今年度の研究においては、培養細胞を用いた実験において NAD・Sir2 依存性メカニズムが細胞死を抑制できるのはどのような場合かを検討した。

野生型と *wlds* マウスの大脳皮質神経細胞の初代培養を作成し、神経変性と関連があると考えられているストレス刺激を与えてから一定時間後のそれぞれの細胞の生存率を比較した。ストレスとしては、酸化ストレス (過酸化水素投与)、ER ストレス (Thapsigargin、Tunicamycin または Dithiothreitol 投与)、低酸素・低栄養刺激 (Oxygen-glucose deprivation:OGD) を用い、投与量、投与後測定までの時間などの実験法に関しては過去の報告にしたがって行った。細胞の生存は MTT アッセイによって定量的評価を行った。

2) NMNAT 過剰発現 Tg マウスのフェノタイプ解析

昨年度の研究において我々は、NAD 合成反応系の改変による軸索保護法として最も

有効な方法は何かを、初代培養神経細胞を用いた *in vitro* ワーラー変性モデルを用いて検討し、NAD の直接の合成酵素である NMNAT の過剰発現が最も強力な軸索変性遅延効果を有することを示した。この結果に基づき、*in vivo* での軸索保護による疾患モデル治療効果を検討するため、NMNAT 過剰発現モデルマウスの作成とフェノタイプの検討を行なった。哺乳類においては NMNAT の 3 種のファミリーメンバーが存在することが知られており、Wlds 変異蛋白の一部を構成する NMNAT1 のほかにゴルジ体に主として存在する NMNAT2、ミトコンドリアに主として存在する NMNAT3 がある。神経細胞には NMNAT2 が強く発現している一方、NMNAT1,3 の発現は非常に低いことが知られている。このため、本研究では、NMNAT1Tg、NMNAT3Tg、Wlds(W258A)Tg (Wlds 蛋白の NMNAT 酵素活性部位に変異を導入することにより、NAD 合成酵素活性を持たない Wlds 蛋白を発現する) を作成し、各 Tg マウスにおける軸索変性遅延効果につき、坐骨神経傷害モデルを用いて、Neurofilament の免疫組織化学的検出・電子顕微鏡観察による Microtubule 構造の確認などの形態学的手

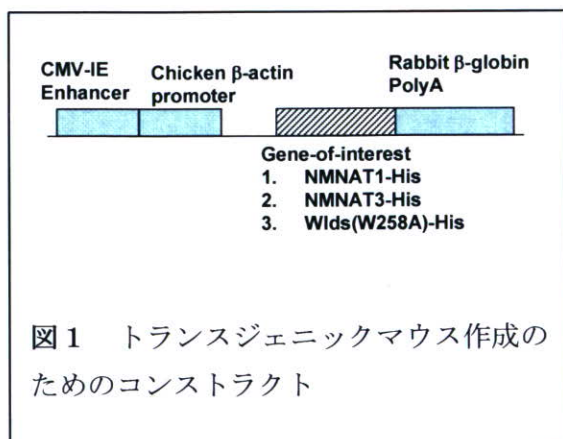
法、ならびに傷害部位より末梢側の神経フラグメントにおける Compound Potential の検出による神経機能的検討をあわせて行なった。なお、Tg マウス作成にあたっては、図 1 に示す発現コンストラクト (大阪大学宮崎純一博士より供与を受けた pCAGGS プラスミドを用いて作成) を用いた。

(3) ウイルスベクターを用いた治療モデル実験

マウスへのパラコート投与によるパーキンソン病モデルに対する Adeno-associated virus (AAV) ベクターを用いた NMNAT 活性の過剰発現実験に関し、疾病モデル作成と、コントロールベクター投与による予備実験を行い、治療用高タイターベクターの作成を行った。

AAV 作成にあたっては、University of Pennsylvania より供与を受けた pAAV システムを用いた。ウイルスタイターはウイルス液を含む Packaging cell lysate を Template とした定量的 RTPCR 法によって検討した。

また、異なる AAV セロタイプによって Green fluorescent protein を野生型マウス脳で発現させ、最も高い発現レベルを実現する方法につき検討を行なった。



倫理面への配慮

本研究で行う動物実験および遺伝子組み換え実験は関係法令および指針に基づき、実施場所である国立精神・神経センター神経研究所の定める「小型実験動物倫理指針」、 「小型実験動物研究施設の運営に関する規則」および「組み換え DNA 実験安全規則」、 「組み換え DNA 実験内部規則」に従って行った。

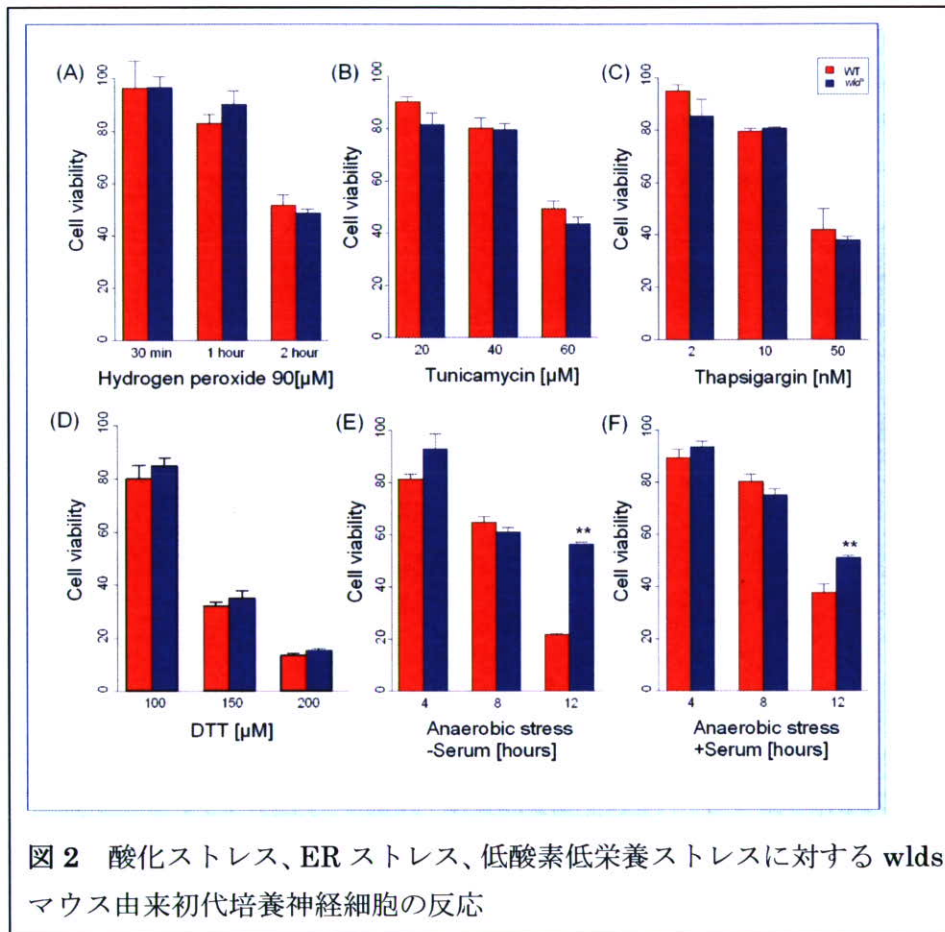


図2 酸化ストレス、ER ストレス、低酸素低栄養ストレスに対する wlds マウス由来初代培養神経細胞の反応

められた。このことは、NAD・Sir2 依存性メカニズムは、神経突起に対するワーラー変性遅延効果とは独立して、細胞死に対する保護効果をもつが、その効果の範囲は限定的である可能性が示唆された。

2) NMNAT 過剰発現 Tg マウスのフェノタイプ解析

C. 研究成果

1) NAD・Sir2 依存性軸索保護機構の有効性の範囲の検討

それぞれのストレス刺激を与えた場合の結果を図2に示す。これらのストレス刺激によって生じる神経突起変性に対しては、いずれの刺激に対しても NAD・Sir2 依存性メカニズムは保護作用を示すことが既にわかっているが、今回の実験モデルにおいては、酸化ストレス、ER ストレスによる神経細胞死に対する NAD・Sir2 依存性メカニズムによる保護効果は認められなかった。一方、低酸素、もしくは低酸素+低栄養刺激による細胞死に対する保護効果は明瞭に認

定法に従い、それぞれの Tg マウスを作成した。トランスジーンゲノムへの導入は PCR と Southern blot 解析によって確認した。トランスジーン由来の蛋白の発現確認は His タグを持つ過剰発現蛋白の Immunoblot により行い、さらに各 Tg マウ

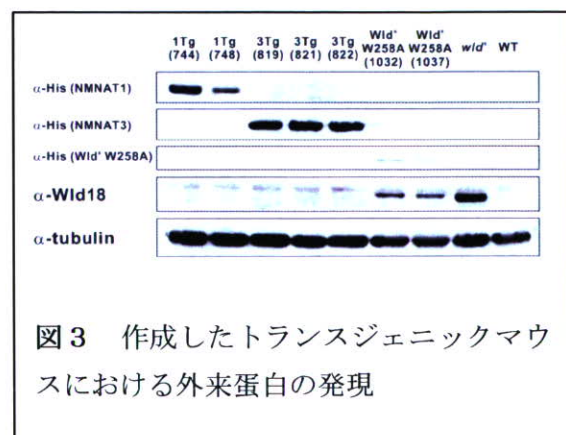


図3 作成したトランスジェニックマウスにおける外来蛋白の発現

ス脳組織における NMNAT 活性を測定して *wlds* マウス、野生型マウスにおける酵素活性と比較した。(図3)

作成した全ての Tg マウスにおいて、異なる外来遺伝子の発現レベルを示す複数の系統を得た。酵素活性の解析においては、NMNAT1、NMNAT3 のいずれの Tg においても自然発症 *wlds* マウスよりも高い NMNAT 酵素活性を示す系統を得た。一方で *Wlds*(W258A)-Tg マウスにおいては、NMNAT 活性は野生型マウスと同程度のレベルであった。

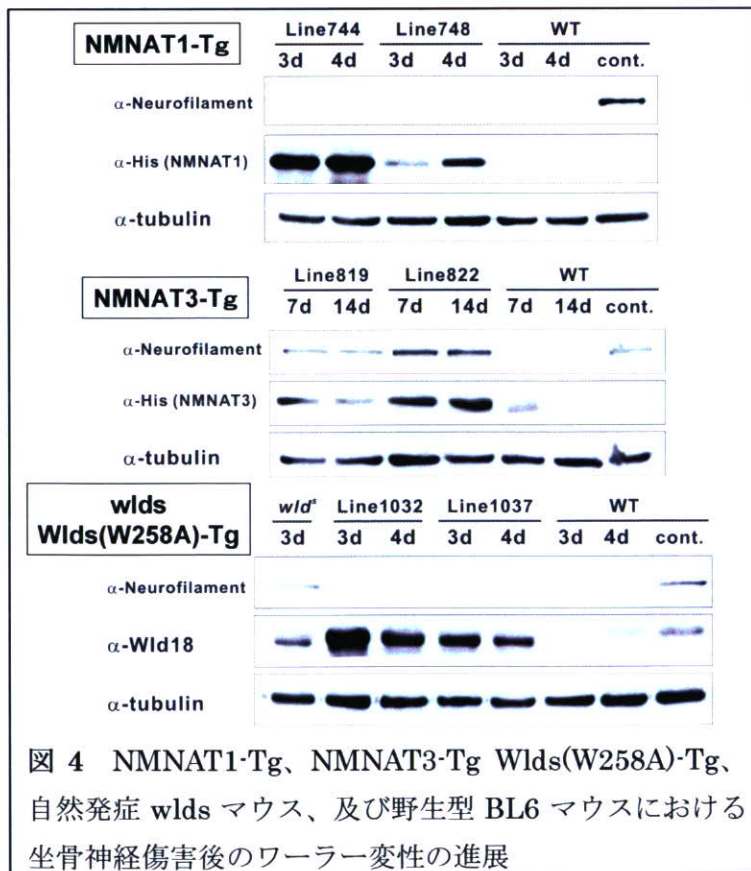
次にこれらのマウスにおける神経軸索変性を比較検討するため、坐骨神経傷害モデルにおけるワーラー変性の進展を、傷害部位より末梢側の Neurofilament の immunoreactivity の発現によって検討した。(図4) このモデルにおいては、野生

型マウスを用いた場合、神経傷害後直ちにワーラー変性が進行し、傷害の3日後には Neurofilament の発現が全く確認できないが、*wlds* マウスでは傷害の2週間後にも Neurofilament の発現を認める。

NMNAT1-Tg においては、Neurofilament の発現低下は野生型マウスと殆ど同じで軸索変性遅延効果は殆ど認められなかった。今回得られた NMNAT1-Tg マウスの中で NMNAT1 発現レベルが最も高く *wlds* マウスよりも神経組織中の NMNAT 活性が高い系統においても、*wlds* で見られるようなワーラー変性遅延効果を認めなかった。また *Wlds*(W258A)-Tg マウスにおいても軸索変性遅延を認めなかった。

一方、NMNAT3-Tg においては、Neurofilament 発現は2週間後も認められ、

自然発症 *wlds* マウスと同じ程度のワーラー変性遅延効果があるものと考えられた。特に、上で全くワーラー変性遅延効果を認めなかった NMNAT1-Tg マウスよりも脳組織中の NMNAT 活性が低い NMNAT3-Tg マウスの系統においても、著明なワーラー変性遅延が認められることが示された。なお、このことは、免疫組織化学、電子顕微鏡による微小管構造の観察、および傷害神経の Compound potential 測定による機能的観察によっても裏付けられた。



これらのことから、昨年までの研究で主として培養細胞を用いて示された NMNAT 過剰発現によるワーラー変性遅延効果は、生体内における NMNAT 活性の過剰発現によっても認められるが、生体内における効果は単に NAD 合成活性の強さのみに依存するのではなく、酵素活性以外の要因もワーラー変性遅延に関与していることが考えられた。

(3) ウイルスベクターを用いた治療モデル実験

AAV ウイルスベクターを用いた高タイトターのベクター作成を行った。

AAV の異なる Serotype の中では AAV2,5,9 を用いた場合の神経細胞における発現を確認した結果、いずれのタイプでもマウス脳内での発現が認められたが、AAV9 ベクターを用いた場合の発現が最も良好であることを確認した。今後このタイプのウイルスベクターを用いた検討を行なうものとした。

D. 考察

1) NAD・Sir2 依存性軸索保護機構の有効性の範囲について

今回の研究の結果、*wlds* マウス由来神経細胞が神経細胞死から保護される場合というのはストレス刺激の種類によるが、限定的な場合に限られる可能性が考えられた。

最近の、*wlds* マウスを用いた疾患モデルとの交配などの実験において、軸索が保護される一方、神経細胞死からの保護が認められないケースが報告され、当初想定していたより多くの場合において、神経軸索保

護と細胞体全体の保護が同時には観察されない例があることが明らかになった。神経疾患の傷害部位と症状の関係において軸索傷害に基づく症状があることは知られており、例えば *wlds* マウスにおいて作成した Parkinson 病モデルにおいて、細胞死が先行して軸索だけが維持されている状態でも症状の軽減が認められることが報告されていることから、軸索保護単独でも臨床的重要性はあるものと考えられるが、神経細胞全体の保護的治療を考える上では、酸化ストレスや ER ストレスを主体とすると考えられる疾患に対しては、NAD・Sir2 依存性メカニズムのほかに細胞体を保護する治療を併用する必要があるもの可能性が考えられた。

神経変性のメカニズムは未だ完全に理解されていないが、NAD・Sir2 依存性メカニズムで保護される細胞変性の細胞内反応は、共通するメカニズムを有するものと考えられる。例えば培養細胞レベルにおける低酸素低栄養ストレスと、モデル動物における *pmn* マウスにおける神経変性が共有するメカニズムは何であるのかの検討を通して神経変性のメカニズムを明らかにできる可能性がある。

2) NMNAT 過剰発現 Tg マウスのフェノタイプ解析

今回の研究において作成した NMNAT 過剰発現マウスのフェノタイプ解析の結果は、これまでの研究結果と一見矛盾する点を多く含んでいる。

まず、NMNAT 酵素活性の過剰発現によるワーラー変性遅延という Phenotype の発現は、この実験を培養細胞で行った場合と

モデル動物体内で行った場合とは異なる結果となることがわかった。即ち、培養細胞における *in vitro* ワーラー変性モデルでは NMNAT1 と NMNAT3 の過剰発現は同様の変性遅延効果を示したが、Tg マウスにおける検討では NMNAT3-Tg のみにワーラー変性遅延があることがわかった。また、自然発症 *wlds* マウスにおいて過剰発現している Wlds 蛋白は NMNAT1 の配列の全長を含んでいるにもかかわらず、NMNAT1-Tg マウスは *wlds* マウスに見られるワーラー変性遅延を示さなかった。特に、蛋白量あたりの NMNAT 活性で比較した場合に *wlds* マウスよりも高い活性を示す NMNAT1-Tg でも軸索保護が認められなかったことは、*in vivo* においては軸索保護の可否は単に神経細胞内の NMNAT 活性の大小によって決定されるものではないことを示している。

酵素活性以外の要因で最も重要ではないかと考えられるのは、NMNAT の細胞内局在である。NMNAT1 は核移行シグナル配列をもち核に存在しているが、NMNAT3 は主としてミトコンドリアに存在している。Wlds 蛋白は NMNAT1 の核移行シグナルによって核に存在すると考えられているが、我々の Preliminary な検討では、核にも存在する一方、核以外にも存在していることが明らかになっており、特に NMNAT3 の存在と共通するミトコンドリアでの局在の意義が注目される。また、培養細胞における過剰発現実験では Lentivirus ベクターを用い Ubiquitin プロモータによる過剰発現を行ったが、この際にはウイルスタイターを高めることによって強力な過剰発現を行っており、本来の存在部位である核以外に

も存在していると考えられる。これらのことから、NMNAT 酵素活性の過剰発現によるワーラー変性遅延のメカニズムには、核以外の NMNAT 活性の局在、特にミトコンドリアにおける局在が重要である可能性が示唆されるものと考えられた。

E. 結論

本年度の研究によって下記の結果を得た。

- 1) 低酸素・低栄養ストレスによる細胞傷害に対し、NAD・Sir2 依存性メカニズムによる神経細胞保護が特に有効である可能性が示唆された。
- 2) NMNAT 酵素活性の過剰発現によるワーラー変性遅延のためには、神経細胞内の NMNAT 酵素活性の上昇に加え、この蛋白の細胞内局在が重要な要素であると考えられた。
- 3) 高タイター AAV 作成を行い、特に AAV9 による発現システムの有効性を確認した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Saito, F. Araki, T.

ZNRF1 regulates glutamine synthetase protein expression in Schwann cells via a ubiquitin-proteasome pathway.

Neurosci Res. 59(Suppl.1): S80 (2007)

2. 学会発表

国内学会

シンポジウム講演

荒木敏之： 神経軸索変性機序における NAD 代謝と Sirtuin の役割. 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同大会 2007.12.11 横浜

荒木敏之： 筋萎縮性側索硬化症の発症機序における軸索輸送機能異常について. 神経の発生・変性・再生—疾患研究の最前線 2008— 2008.2.6 東京

ポスター発表

齋藤文典、荒木敏之：ZNRF1 によるユビキチン・プロテアソーム系を介した、グルタミン合成酵素の発現制御機構. 第 30 回神経科学大会・第 50 回日本神経化学会・第 17 回日本神経回路学会大会 合同大会 2007.9.10 横浜

徳永慎治、荒木敏之：自然発症軸索変性遅延マウス *wlds* 由来神経細胞が示すストレス刺激に対する保護効果. 第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同大会 2007.12.14 横浜

国際学会

(一般発表)

YAHATA, N. & ARAKI, T. : Differential axonal protection against Wallerian degeneration in vivo is observed in mice overexpressing family members of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (Nmnat). 37th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.5, San Diego,

USA.

YAHATA, N. & ARAKI, T. : Differential axonal protection against Wallerian degeneration in vivo is observed in mice overexpressing family members of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT). CDB Symposium 2008, 2008.3.24-26 Kobe, Japan

H.. 知的財産権の出願・登録

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
荒木 敏之	軸索変性メカニズムと神経変性	高橋 良輔	神経変性疾患のサイエンス	南山堂	東京	2007	113-121

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saito, F. Araki, T	ZNRF1 regulates glutamine synthetase protein expression in Schwann cells via a ubiquitin-proteasome pathway.	Neurosci Res.	59、Suppl.1	S80	2007

11

軸索変性メカニズムと 神経変性

荒木 敏之

要旨

神経軸索変性は酵素反応を伴う能動的なプロセスであり、軸索変性を抑制することによって神経を保護し、神経疾患に対する治療的効果を得ることができる可能性があるが、軸索変性の反応機構に関する知見は未だ限られている。

われわれは、自然発症変異マウス *wlds* におけるワーラー変性遅延が、細胞内での NAD 産生酵素の過剰発現と、それに伴う NAD 依存性脱アセチル化酵素 Sir2 の活性化によって引き起こされていることを示した。このメカニズムを利用し、今後、神経疾患の進行抑制や治療などの臨床応用を行える可能性が高い。

キーワード

- Sir2
- 軸索剪定 axonal pruning
- ワーラー変性 Wallerian degeneration

11-1・軸索変性の多様性

神経軸索の変性もしくはそれに類似した過程は、神経系におけるさまざまな生理的・病理的過程において観察される¹⁾。最も典型的な軸索変性は神経軸索の傷害の後に傷害部位より末梢部分で観察される変性であり、ワーラー変性 Wallerian degeneration とよばれるものである。たとえば実験動物としてよく用いられるマウス・ラットにおいては末梢神経である坐骨神経を切断した場合、切断部位より末梢側の軸索は切断後直ちに変性を開始し、約4日後までには神経軸索の構造タンパク質の一つであるニューロフィラメント neurofilament の免疫原性は消失することが知られている(図11-1)。

これに類似した神経変性の過程は、このような機械的切断や坐減以外にもさまざまな病理的・生理的状況において観察される。たとえば、糖尿病、アルコールの慢性的過剰摂取などの代謝性疾患を原因とする末梢神経変性は、末梢神経の変性疾患の原因として最も多いが、このような疾患では神経細胞が長期間にわたり慢性的に傷害刺激に曝露されることによって、神経軸索がその最も末梢側から徐々に退縮する。“dying back” とよばれるこの状態は、軸索変性過程であると考えられる。また、疾患に由来するものだけでなく、いったん完全な連絡を形成していた神経線維連絡がなくなるという意味で軸索変性に類似したプロセスは正常発生・発達過程にも観察され、軸索剪定 axonal

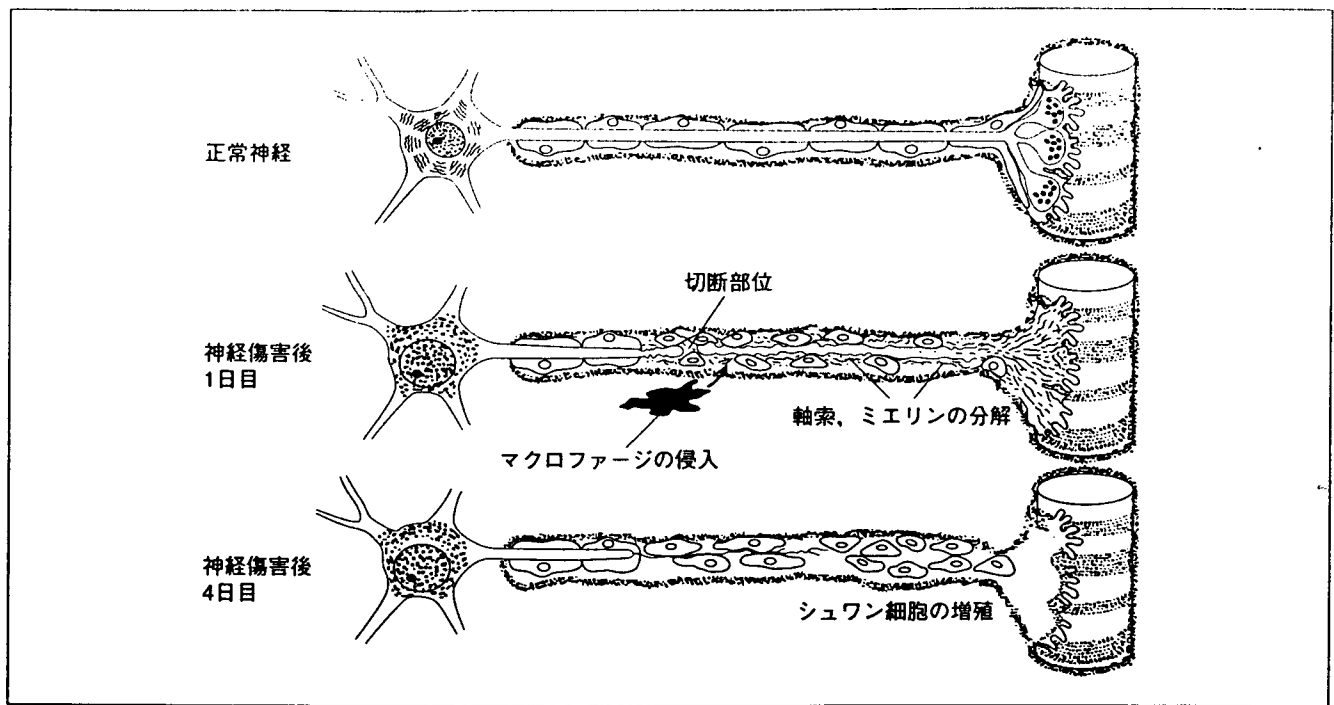


図11-1 神経軸索の傷害後変性（ワラー変性）過程の模式図

[Nicholls JG, et al.: "Function of the Nervous System", 3rd ed, Sinauer Associates, Inc.,を一部改変]

pruning などとよばれているが、軸索剪定過程も軸索変性と見かけ上は類似している。最近のいくつかの論文はこのような軸索剪定過程と軸索変性過程の相違点と類似点を指摘しているが、依然として全貌は明らかでない。

神経軸索変性過程に関する研究は、このような見かけ上類似したメカニズムの分子レベルでの詳細を明らかにすると同時に、疾患治療につながる可能性をもっている。本章では、著者らが近年明らかにした NAD・Sir2 依存性軸索保護機構の発見をめぐる研究結果について概説しながら、軸索変性過程に関する研究の重要性と最近の研究の趨勢などについて述べる。

キーワード解説

- **Sir2**：タンパク質脱アセチル化酵素には NAD 依存性と非依存性のものがあり、Sir2は NAD を必要とするグループの一員である。哺乳類における七つのファミリーメンバー (SIRT1～SIRT7) の機能解析が現在報告されつつある。
- **軸索剪定 axonal pruning**：哺乳類において、たとえば個々の筋線維は発達過程でいったん複数の神経細胞由来の軸索に支配されるが、成熟に伴い単一の軸索による支配となり、残りの軸索はなくなる。このような過程は軸索剪定とよばれる。
- **ワラー変性 Wallerian degeneration**：神経軸索の傷害後変性。末梢神経では、シュワン細胞の突起が折り重なるように見えるビュングナー帯 bands of bungner の形成などが変性に特異的な形態学的特徴とされる。

11-2 • *wld^s* 変異マウス

軸索変性が、抑止可能な反応過程であることは、軸索変性が遅延する自然発症変異マウス *wld^s* の存在によって最もはっきりと示された²⁾。このマウスは実験動物としての飼育環境下では発生、生殖などにおいて正常動物と区別することができないが、神経傷害後の軸索変性が著明に遅延する。たとえば坐骨神経を実験的に切断した場合、正常では直ちに軸索変性が開始され、切断の3~4日後にはニューロフィラメントの免疫原性が完全に消失するが、*wld^s* マウスにおいては切断の2週間後においても切断部より末梢側の神経筋接合部における電気的活動が記録可能である。この変異は常染色体優性遺伝することが知られている。

1990年代の研究によって、このマウスの軸索変性遅延は軸索に内在する変化であってシュワン細胞には無関係であることが示されていたが、2000年前後の一連の論文により、

- 1) *wld^s* マウスの遺伝的変化は第4染色体における約85kbの領域の三重複 triplication によって引き起こされている (図11-2)。
- 2) この85kbの領域に存在する複数の遺伝子のなかで、UFD2aの一部とNMNAT1 (nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1)の全長の融合した異常タンパク質 (Wld^sタンパク質)の発現による機能獲得変異 gain-of-function によって、*wld^s* マウスの表現型が引き起こされていることが明らかになった^{3),4)}。

UFD2aはU-box領域を機能ドメインとするユビキチンリガーゼE3である。またNMNAT1はNAD合成反応系の最終段階に位置してNADを直接合成する反応を触媒するものである (p.116, 解説コラム参照)。われわれはこれらのいずれの領域が *wld^s* 変異マウスの表現型形成に必要であるのかを明らかにするために、“培養細胞を用いたワーラー変性モデル”を開発した⁵⁾。

このモデルは、後根神経節神経細胞の初代培養を行い、神経突起が十分伸展したあと、神経突起を細胞体から切り離すことによって神経突起の変性を誘導するものであるが、神経突起伸展後に外来のタンパク質を過剰発現させることによって、神経突起変性

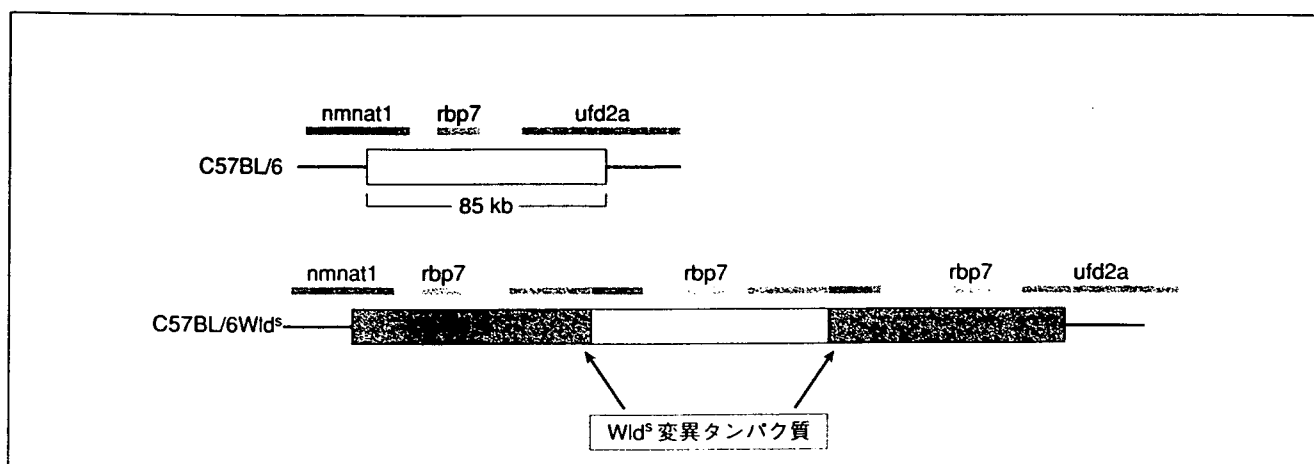


図11-2 ポジショナルクローニングによって明らかになった *wld^s* マウスの遺伝的変異

約85kbの領域の三重複によって変化する遺伝子のなかで、UFD2aのN末端領域とNMNAT1の融合したキメラタンパク質 (Wld^s変異タンパク質)の発現が軸索変性遅延の表現型発現に関与していることがのちに示された。

NAD 合成反応系

NAD 合成反応は、細菌や酵母における反応についてよく研究されており、哺乳類における反応系はおもに酵母において同定された酵素のオルソログ ortholog を同定することによって構築された。それによると、ニコチンアミドまたはニコチン酸から合成される

“サルベージ経路 Salvage pathway” と、トリプトファンから合成される“新生経路 *de novo* synthesis pathway”があり、そのほかにニコチンアミドリボシドから合成される経路がある。

NAD はミトコンドリアの呼吸鎖反応の補酵素として必要である

ことからすべての細胞において不可欠であると考えられるが、それぞれの酵素タンパク質は臓器ごとに異なった発現分布を示し、図に示す可能な反応経路のうちどれが主として用いられているかは臓器ごとに異なる可能性がある。

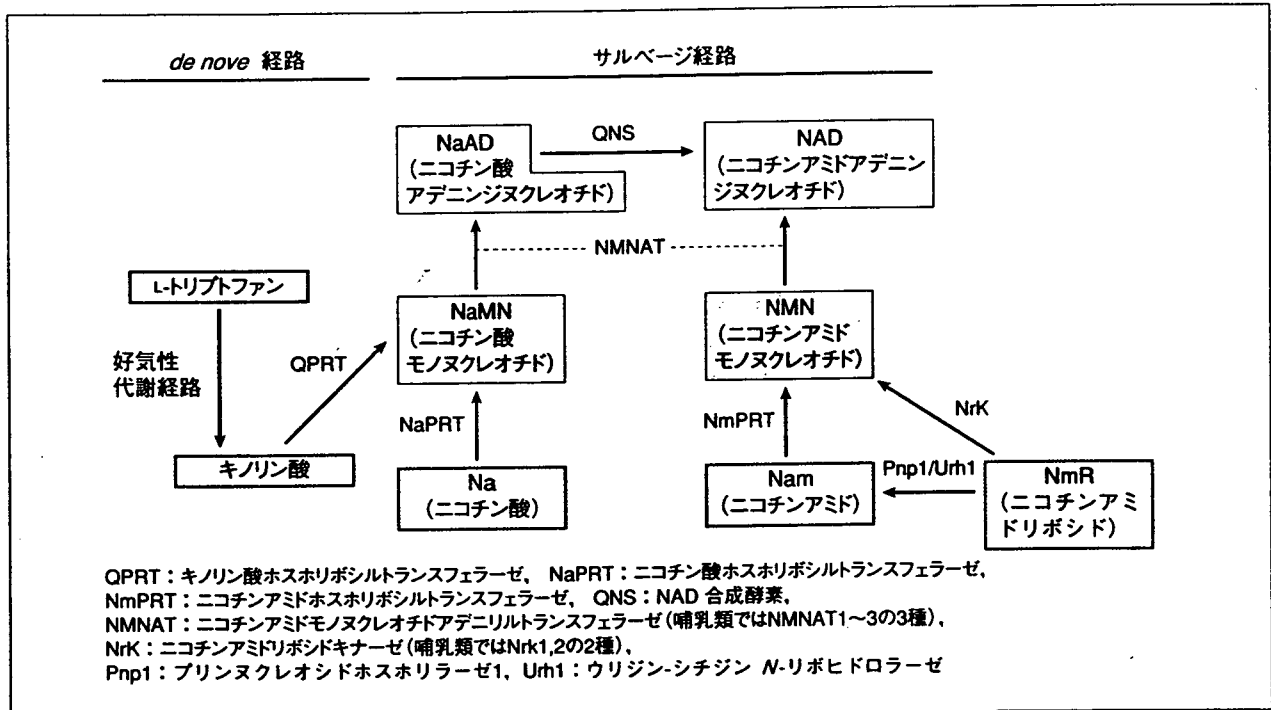


図 NAD 合成反応系

過程における外来タンパク質の影響を評価することができる。本実験を用いて *Wlds* 変異タンパク質を過剰発現したところ *wlds* 変異マウスにおいて観察されるのと同様の神経突起変性の著明な遅延が観察された。このことは、この方法が生体内でみられる軸索変性過程を培養細胞レベルで再現していることを確認するものであり、この方法を用いて *Wlds* 変異タンパク質の各領域の役割を解析することができるものと考えられた (巻頭写真5)。

wlds 変異は優性を示すことから、もし UFD2a 領域が表現型形成に必要であるとするならば N 末端の 70 アミノ酸残基 (ユビキチン鎖延長に直接関与する U-box 領域を含まない) からなる領域は本来の UFD2a の機能を阻害するドミナントネガティブとして作用しているものと考えられ、もし NMNAT1 領域が表現型形成に重要であるなら、NMNAT 酵素活性の機能獲得変異となっているものと考えられた。これらの可能性のうち、いずれが正しいのかを明らかにするため、“培養細胞を用いたワラー変性モデ

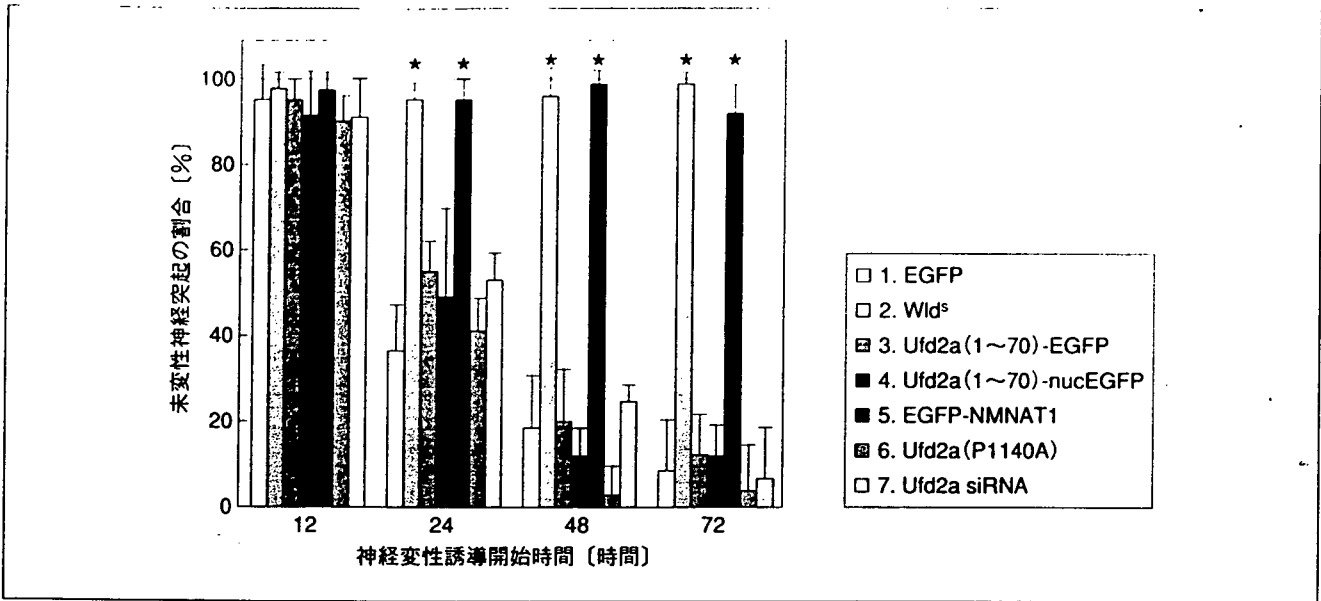


図11-3 NMNAT1の過剰発現が *wld^s* 変異マウスにおける軸索変性遅延を再現する

1~7の各遺伝子の過剰発現の神経突起変性に対する影響を、変性誘導開始後の各時間において残存する突起数の実験開始時の突起数に対する比率によって示している。*Wld^s* 変異タンパク質とNMNAT1の過剰発現のみが軸索変性遅延効果を示した。なお、3はUfd2aのN末端側70アミノ酸残基 (*Wld^s* タンパク質に含まれる領域) にEGFPを結合したキメラタンパク質、4は3のコンストラクトのC末端に核移行シグナルを結合したもので、5はNMNAT1のN末端側にEGFPを結合したもので、6はUfd2aのドミナントネガティブ dominant negative をそれぞれ過剰発現した実験を示している。

ル”を用いた解析を行った (図11-3)。その結果、*Wld^s* 変異タンパク質過剰発現と同様のレベルの神経突起の変性の抑制効果を示すのはNMNAT1の過剰発現のみであることが明らかとなった。さらにわれわれは、培養液中にNADを添加することによっても神経突起変性遅延効果を得ることができることを示した。この効果の発現にはNAD添加後およそ24時間を必要とする (p.118, 図11-4)。

NMNAT1はアミノ酸配列中に核移行シグナルをもち、核内に存在する。*Wld^s* 変異タンパク質もこのため同様に核内に存在する。NMNAT1酵素活性の機能獲得変異が損傷後の軸索に対し保護的な作用をもつと仮定し、*Wld^s* 変異タンパク質の存在部位に着目すると、その下流にある細胞内シグナル伝達としては何であるのかを考えるにあたり、核内でNADを必要とする反応が有力な候補であると考えられる。われわれは、そのなかでNAD依存性タンパク質脱アセチル化酵素であるSir2ファミリー⁶⁾に注目した。Sir2は、酵母から哺乳類の一部に至るまでの非常に幅広い生物種において観察される、カロリー摂取制限による個体の寿命延長効果を担うタンパク質として近年非常に注目されている^{7), 8)}。また、Sir2は、当初ヒストン脱アセチル化酵素 histone deacetylase (HDAC) として報告されたが、最近転写調節因子など多くの核内タンパク質を基質とすることが報告され、これらのタンパク質の機能をアセチル基の添加・除去を通して調節する機構を担っているものと考えられている⁹⁾。

われわれは、Sir2の阻害剤であるSirtinolがNADによる軸索変性遅延を抑制する効果をもつこと、Sir2の活性化剤としての効果をもつことが知られているResveratrolはNADと類似した神経突起変性遅延効果を示すことから、*wld^s* マウスにおいて認められ

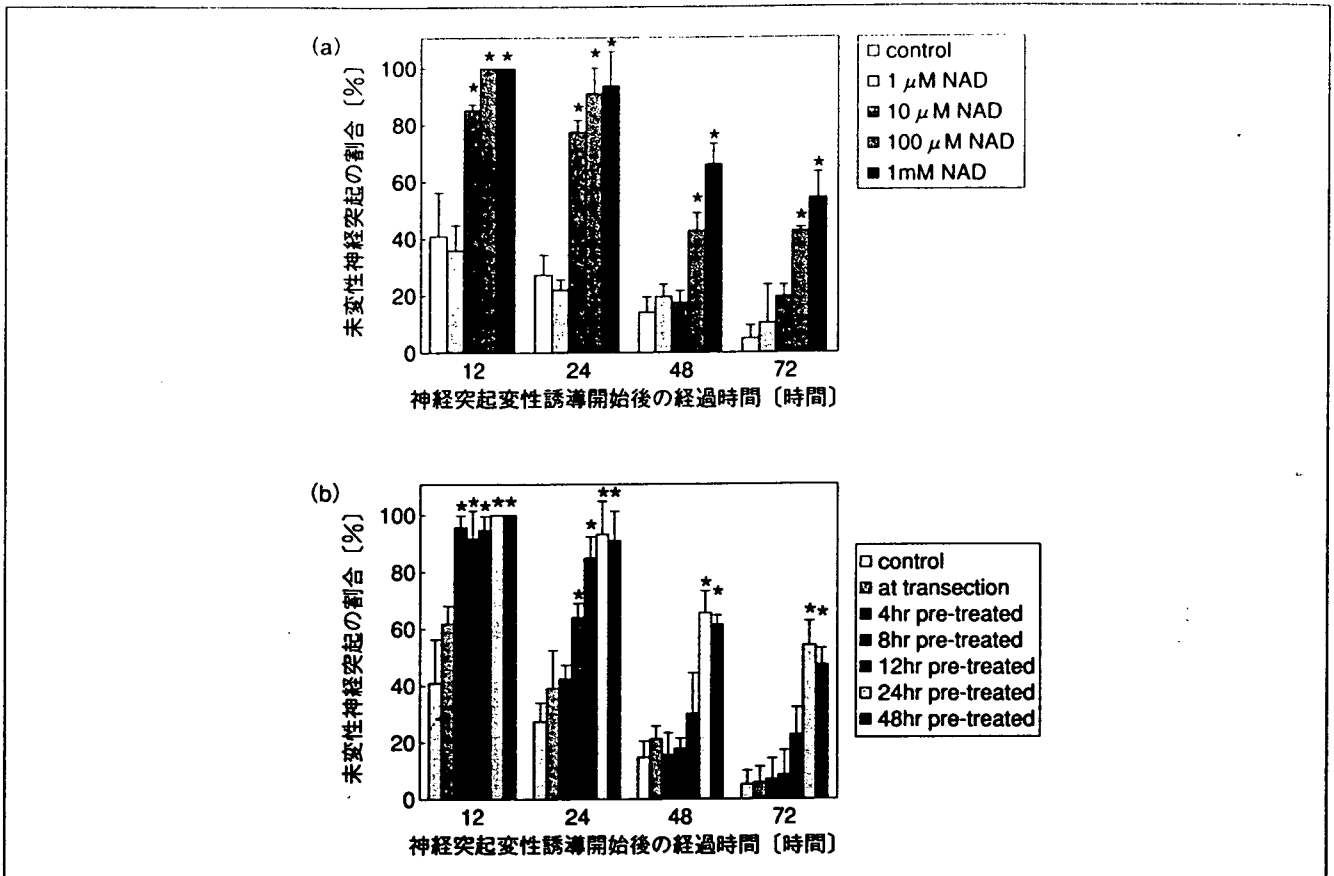


図11-4 培養液中に添加した NAD による神経突起の傷害後変性遅延効果
 (a) 図に示す各濃度の NAD を細胞培養液中に添加した場合の神経突起保護効果. (b) 1 mM の NAD を, 神経突起変性誘導開始の図に示す各時間前に投与した場合の変性遅延効果.

る NMNAT1 の活性亢進は Sir2 を活性化することによって軸索保護効果を示していることを示唆していると考えた. 哺乳類では Sir2 ファミリーは SIRT1~SIRT7 の七つのファミリーメンバーをもつことが知られている. これらの七つそれぞれに対する siRNA を初代培養神経細胞に発現させて NAD による突起変性遅延効果に対する影響をみたところ, SIRT1 に対する siRNA が特異的にこの効果を抑制し, それ以外のファミリーメンバーに対する siRNA は神経突起変性遅延に対する影響を認めなかった (図11-5). このことから, *wld^a* マウスにおいて観察される軸索変性遅延の表現型は NMNAT1 の発現上昇による活性亢進が NAD 産生を高め, これが Sir2 ファミリーのデアセチル化酵素の基質として作用することから SIRT1 が活性化されることによって, 軸索変性遅延効果につながっているものと考えられた.

Sir2 は上述のように寿命を制御する遺伝子として, 近年注目を集めてきたが, その一方で Sir2 と疾患との直接的な関係は知られていなかった. また, 酵母などでは Sir2 はカロリー摂取制限に应答して, 糖代謝関連酵素の発現レベルを調節していることが知られており, 哺乳類でも肝臓, 膵臓など, 糖代謝と直接関連した臓器における機能が検討されてきたが, 血糖の恒常性維持とは無関係な臓器である脳・神経系において Sir2 の果たす役割に関してはまったく知られていなかった. われわれの研究は, Sir2 と疾患の関連の可能性に関して初めて示したものであり, また Sir2 の活性化によって軸索

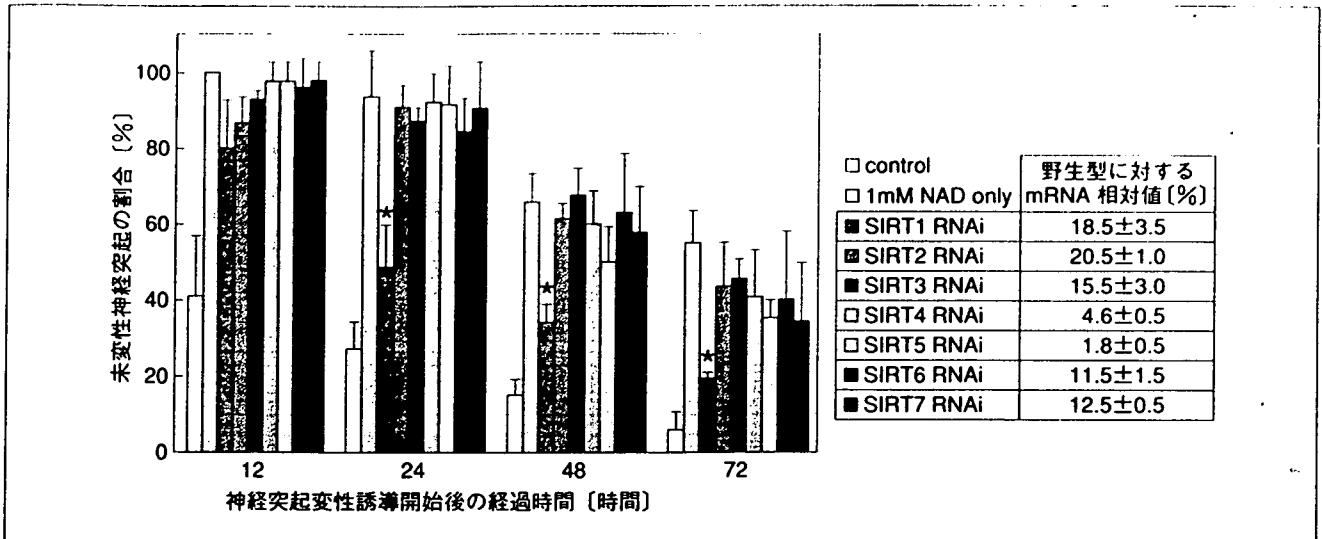


図11-5 Sir2各ファミリーメンバーの、NADによる神経突起の傷害後変性遅延効果に対する寄与。SIRT1のsiRNAによる抑制によって特異的にNADの神経突起保護効果が抑制される。

が変性から保護されることから、神経細胞における老化というのはすなわち軸索の変性を意味するのではないか、という可能性をも示唆していると考えられる。

11-3 • NAD・Sir2 依存性軸索保護機構による神経疾患治療の可能性

wlds マウスにおいて認められる軸索変性遅延効果を神経疾患に対して治療的に用いることができる可能性が以前から指摘されている。上述のように、軸索変性は多くの神経変性疾患の発症過程において神経細胞死の前段階として観察され、また軸索変性自体が疾患の症状の形成にも重要な役割をもっていることが指摘されている。このことは、軸索変性の遅延効果により、神経変性疾患の進行抑制、症状の改善などの効果が期待されることを意味している。実験動物における、軸索変性遅延による疾患の治療効果の検討は *wlds* マウスの表現型出現のメカニズムに関する研究と並行していくつかの研究グループによって行われており、それらの多くが成功している¹⁰⁾。たとえば、

- 1) *wlds* マウスにおいて作製された脳虚血モデルにおいては野生型マウスにおける同様のモデルと比較して病変部位が小さくより軽症である。
- 2) 6-ヒドロキシドーパミン投与によるパーキンソン病モデルを *wlds* マウスで作製した場合、軸索残存による症状の軽減効果などが観察される。
- 3) 若年期に発症する運動神経疾患のモデルとされる *pmn* マウスを *wlds* マウスとかけ合わせることで、*pmn* マウスの寿命が延長し、運動神経症状も改善する。
- 4) 末梢神経の遺伝性障害である Charcot-Marie-Tooth 病のモデルと考えられる MPZ/P0 のノックアウト動物を *wlds* マウスとかけ合わせることで、ミエリン形成障害に由来する軸索変性に対しても遅延効果が認められる。

これらの実験結果は、予想されたように、多くの神経疾患において軸索変性が症状の形成に重要な位置を占めていること、軸索に対する保護効果は神経細胞の死を抑制する

ことにつながり、その結果として神経変性疾患に対する治療的な効果につながることを示している。この現象はそれぞれの疾患の発症機序とは無関係に観察されることから、NAD・Sir2を介した軸索保護機構の臨床応用が可能になれば、数多くの神経疾患に共通した治療法となることが期待される。

その一方でこれまでにNAD・Sir2を介した軸索変性遅延効果が認められない可能性が示唆されている疾患がある。運動神経変性疾患として非常に重要な筋萎縮性側索硬化症(ALS)の動物モデルとされている変異型スーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)を過剰発現するトランスジェニックマウスに関しては、*wlds*マウスとのかけ合わせによる寿命の延長や症状の軽減などの治療的な効果は非常に弱いかほとんど認められないことが報告されている¹⁰⁾。また、運動神経とその標的となる筋細胞との神経連絡形成は、上述のようにいったん形成された神経突起がなくなる過程であるという意味において軸索変性過程の一つであると考えることが可能であるが、*wlds*マウスにおいては成熟型の神経筋連絡の形成に明らかな異常を認めないことが既に報告されている¹¹⁾。

これらの結果の解釈としてはいくつかの可能性がある。その一つは観察上軸索変性に類似した過程であると考えられる過程は分子メカニズムとしては単一ではなく、そのためNAD・Sir2を介したメカニズムで遅延させることができる過程とできない過程がある、という可能性である。可能性の第二としては、軸索変性に類似した過程は分子レベルでも単一であるが、*wlds*マウスにおいて軸索変性遅延表現型の原因となっているWlds変異タンパク質の発現が安定的でないため、*wlds*マウスを用いて行われてきたこれまでの実験結果は分子レベルでの神経軸索変性様過程の多様性を反映するものではない、という考え方が可能である。(wldsマウスにおけるWlds変異タンパク質の発現はUFD2a遺伝子のプロモーターが制御しているが、このタンパク質の発現は成熟型の運動神経連絡が形成される発生過程やALSのSOD1モデルにおいて神経症状の悪化を認める生後7~8カ月齢以降では発現レベルが低下しており、このために十分な軸索変性遅延効果が得られなかった可能性がある。)これらの可能性のうちの、いずれが正しいのか、もしくは第三の可能性があるのかに関しては、今後の課題となっている。

11-4・おわりに

神経軸索変性過程が、アポトーシス apoptosis (プログラム細胞死) に匹敵するような一連のタンパク質新生と酵素反応を介した細胞内反応系である可能性が示唆されたのは比較的最近であり、軸索変性過程に関して知られていることはアポトーシスに比べても非常に少なく、研究はまだその端緒についたばかりであるといつてよい。軸索変性に関する研究は本章で述べたように、神経変性疾患の治療、神経系の生理的な老化現象の理解とその予防につながるものである。今後のこの分野の研究の一層の進展が期待される。

●文献

- 1) Raff MC, Whitmore AV, Finn JF: Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science*, 296: 868-871, 2002.
- 2) Lunn, ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S.: Absence of Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve. *Eur. J. Neurosci.*, 1: 27-33, 1989.

- 3) Conforti L, Tarlton A, Mack TG, Mi W, Buckmaster EA, Wagner D, Perry VH, Coleman MP: A Ufd2/D4Cole1c chimeric protein and overexpression of Rbp7 in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97: 11377-11382, 2000.
- 4) Mack TG, Reiner M, Beirowski B, Mi W, Emanuelli M, Wagner D, Thomson D, Gillingwater T, Court F, Conforti L, Fernando FS, Tarlton A, Andressen C, Addicks K, Magni G, Ribchester RR, Perry VH, Coleman MP: Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nat. Neurosci.*, 4: 1199-1206, 2001.
- 5) Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J: Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science*, 305: 1010-1013, 2004.
- 6) Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L: Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403: 795-800, 2000.
- 7) Kaerberlein M, McVey M, Guarente L: The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.*, 13: 2570-2580, 1999.
- 8) Tissenbaum HA, Guarente L: Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 410: 227-230, 2001.
- 9) Guarente L, Picard F: Calorie Restriction- the SIR2 Connection. *Cell*, 120: 473-482, 2005.
- 10) Coleman M: Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6: 889-898, 2005.
- 11) Hoopfer ED, McLaughlin T, Watts RJ, Schuldiner O, O'Leary DD, Luo L: Wlds protection distinguishes axon degeneration following injury from naturally occurring developmental pruning. *Neuron*, 50: 883-895, 2006.