

High-Resolution (Hi-Res) DNA Melting 解析 により検出された新規 SOD1 遺伝子変異

河又千鶴，森田光哉，中野今治
自治医科大学 神経内科

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）における SOD1 遺伝子変異の有無を多検体において簡便にスクリーニングする方法として，High Resolution (Hi-Res) DNA Melting 法を用いて解析を行った。いくつかの既知の遺伝子変異について解析したところそれぞれ異なる融解曲線を示し、正常群と明確に区別された。また、この解析を用いて緩徐進行性の孤発症例に S134T の新しい変異が確認された。

A.研究目的

SOD1 遺伝子変異は家族性 ALS の約 20%に認められるといわれているが、孤発性 ALS の数%にも SOD1 遺伝子変異の報告がある。遺伝子変異の有無を多検体において簡便に検査する方法として、我々は High-Resolution Melting (Hi-Res) 解析に注目し、今回 SOD1 遺伝子について解析を行った。

B.研究方法

<対象>

臨床的に ALS と診断された 13 症例にすでに遺伝子変異が確認されている検体をポジティブコントロールとして加え、SOD1 遺伝子の 5 つの Exon において Hi-Res Melting 解析を行った。

<方法>

①DNA の抽出：患者さんの同意を得た上で採血を行い、白血球より DNA を抽出した。

②PCR での DNA 増幅：通常の PCR 反応液に蛍光色素（LC Green）を加え、最適化した条件で PCR を施行した。

③Hi-Res Melting 解析：Hi-Res Melting 機器に PCR 産物を入れた後過熱し、その融解曲線を解析することで変異の有無をスクリーニングした。

④塩基配列確認：解析にて異常を認めたサンプルに

おいて PCR 産物のシーケンシングを行い、塩基配列を確認した。

C.研究結果

<Hi-Resolution (Hi-Res) DNA Melting 解析>

Hi-Res Melting 解析とは、二本鎖 DNA を加熱して一本鎖 DNA になる割合を融解曲線として描き、変異の有無を検出する方法である。融解曲線は、二本鎖 DNA が温度の上昇に伴い水素結合が切れ一本鎖 DNA に解離する。この過程を二本鎖 DNA に結合しているときは蛍光を発生し、二本鎖 DNA から外れると蛍光を生じない色素（LC Green）を使って追跡する。PCR 増幅産物の熱変性を蛍光強度の変化として連続的に測定して得られる曲線が融解曲線である。ヘテロ接合があったときに、PCR にて 4 種類の一本鎖 DNA となる。その結果 4 種類の二本鎖 DNA 分子がつけられ、ホモデュプレクス 2 種類とヘテロデュプレクス 2 種類となり、それぞれの融解曲線を描くことになる。結果としてヘテロデュプレクスの存在のために融解曲線が変化して、変異の存在が示唆されることになる（図 1）。さらにそれぞれの温度において、正常サンプル群との融解率の差をグラフにしたものが difference curve である。この解析により、二倍体 DNA の二つのコピー

間に相違があるか否かを知ることが出来る。

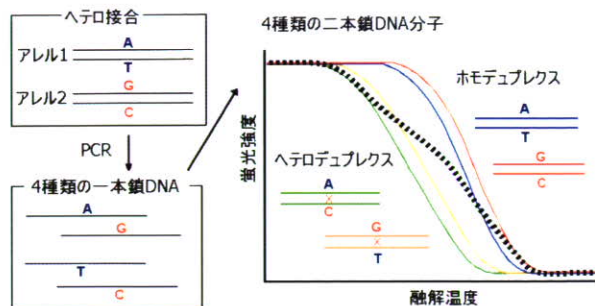


図1 融解曲線の変化：ヘテロデュプレックスの存在の為に融解曲線が変化する。

<SOD1 遺伝子 Exon5 における

Hi-Res Melting 解析結果>

既知の遺伝子変異を有する 5 検体 (G127X, A140A, L144F, L144F type2, L144FVX) に加え、明らかな家族歴が認められない ALS 13 症例について Hi-Res Melting 解析を行った。既知の遺伝子変異を有する検体ではそれぞれ異なる融解曲線を示し、コンピューターの自動解析では異なる変異であることが示された。また解析は duplicate で行ったが、再現性は良好であった (図2)。

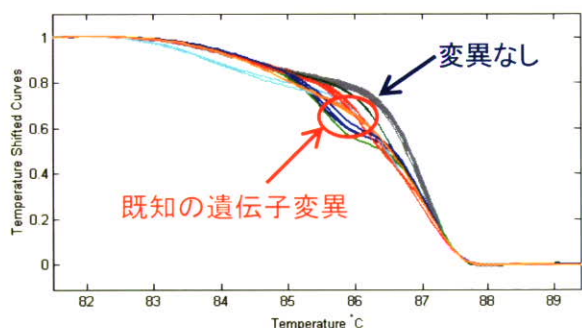


図2 既知の遺伝子変異における融解曲線

孤発性 ALS13 症例のうち 1 症例において融解曲線の変化を認め、塩基配列を確認したところ、Exon5 の 404 番目の G が C に変異した結果、134 番目の Ser が Thr に変化した新しい変異を確認した(図3)。

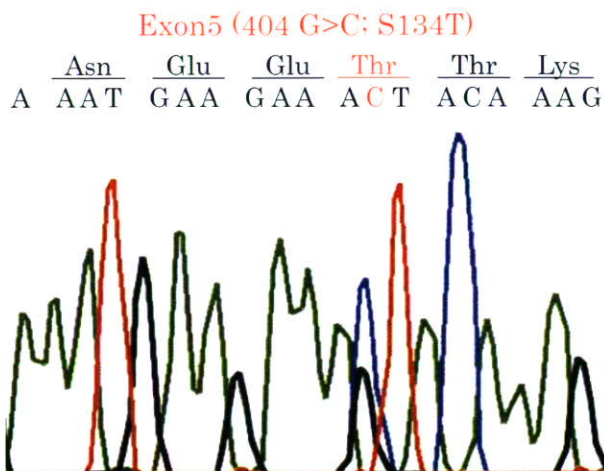


図3 S134T 変異の塩基配列

<S134T 変異の臨床経過>

67 歳男性。歩行困難を主訴に来院。家族歴は認められない。62 歳の時に歩行時のふらつきが出現し、65 歳の時に杖歩行となり、66 歳には這って移動するようになった為、67 歳初診となった。この時、四肢遠位筋の筋力低下を認め起立・歩行は不可能であった。深部腱反射は下肢で消失しており、病的反射や感覚障害は認められなかった。構音障害や嚥下障害、舌の萎縮・線維束収縮はなく、脳神経系の異常を認めなかった。運動神経伝導検査にて CMAP の振幅低下を認めたが伝導速度は正常であり、感覚神経伝導検査は正常であった。針筋電図検査にて、胸鎖乳突筋および傍脊柱筋にて活動性の神経原性変化を認めた。診断として ALS がもっとも示唆されたが、上位運動ニューロン徴候を認めず、診断確定には至らなかった。

その後、徐々に四肢筋力低下が進行し、発症 9 年目に呼吸不全にて死亡した。剖検は得られなかった。死後行われた Hi-Res Melting 解析を用いた遺伝子検査にて S134T の遺伝子異常を認め、ALS の診断が支持された。

D.考察・結論

比較的長い経過を示し、上位運動ニューロン徴候が認められなかった孤発 ALS 患者に、Hi-Res Melting 解析を用いて S134T の新たな遺伝子変異を認めた。

Hi-Res Melting 解析は SOD1 遺伝子において、多検体を比較的簡便にスクリーニングするのに有用である。今後さらに多くの症例において同様の手段で遺伝子変異の有無を検索する予定である。

F.文献

・ Luming Zhou et al. Clinical Chemistry, 1770-1777, 2005

G.健康危険情報：特になし

H.研究発表：

1. 論文発表

河又千鶴、森田光哉、柴田亮行、中野今治：新しい SOD1 遺伝子変異をみとめた家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）の症例：剖検結果をふまえて。臨床神経学 47(5)：211-216, 2007.

2. 学会発表

Kawamata C, Morita M, Nakano I: Two novel SOD1 mutations, L144FVX and S134T in Japanese ALS cases. 18th International Symposium on ALS/MND. Toronto, 1-3 December 2007.

I.知的所有権の取得状況：なし

ALS モデルマウスにおけるオートファジーについて

森本展年¹⁾

永井真貴子¹⁾、倉田智子¹⁾、宮崎一徳¹⁾、武久康¹⁾、池田佳生¹⁾、神谷達司¹⁾、阿部康二¹⁾

1) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 神経病態内科学

研究要旨

ALS におけるオートファジーの関与について、G93A 変異型 SOD1 遺伝子導入マウス (Tg) を用いて検討した。発症後の週齢で LC3-II の発現量が Tg において non-Tg マウスよりも増加しており、ALS の病態におけるオートファジー亢進が示唆された。また発症初期の Tg マウスにおいてリン酸化 mTOR 陽性細胞の割合が有意に低下しており、リン酸化 mTOR がオートファジーの調節に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

ALS は運動ニューロンが選択的に変性・脱落し、筋萎縮・脱力など高度の運動障害を生じる神経変性疾患である。オートファジーはユビキチン・プロテアソーム系と並んで、細胞内の蛋白やオルガネラの処理や品質管理を行っていると考えられている。近年、オートファジー関連蛋白のノックアウトマウスにおいて、広汎に分布するユビキチン陽性の神経細胞内封入体の出現が報告され、このマウスは運動障害を呈することから、オートファジー機構の障害と神経変性疾患発症の関係が注目されている。本研究では、ALS モデル動物である G93A 変異型 SOD1 トランスジェニックマウス (Tg) を用い、オートファジーで重要な蛋白である LC3 とその制御に関わる mTOR の動態について検討し、ALS の病態におけるオートファジーの関与を解明する事を目的とする。

B. 研究方法

Tg マウスと週齢を一致させたノントランスジェニックマウス (non-Tg) をそれぞれ、10 週齢 (発症前)、17 週齢 (発症初期)、19 週齢 (発症後期) の時点で 4 %パラフォルムアルデヒドを用いて灌流固定後、腰髄を採取し、免疫染色に使用した。また同時点で生理食塩水による脱血処理を行い、腰髄を分離採取し、Western-blot に使用した。脊髄運動ニュー

ロンについて Nissl 染色及び、抗 LC3 抗体、抗リン酸化 mTOR 抗体を用いて免疫染色を行った。また、LC3 抗体を用いた Western-blot では LC3-I、LC3-II を半定量的に評価した。

(倫理面への配慮)

岡山大学の動物実験倫理規定に従って、動物を愛護的に扱い、動物の使用数を最小限にとどめた。

C. 研究結果

抗 LC3 抗体を用いた免疫染色では、Tg、non-Tg ともに運動ニューロンの細胞質がほぼ均一に染色された。Western-blot では発症初期と発症後期において Tg では non-Tg よりも LC3-II が増加していた。LC3-II はオートファゴソーム形成の程度と相関することが証明されているため、Tg では non-Tg に比べオートファゴソーム形成が増加していると解釈できた。リン酸化 mTOR を用いた免疫染色では発症初期の Tg でリン酸化 mTOR 陽性細胞の割合が有意に減少していた。

D. 考察

Tg では non-Tg に比べオートファゴソーム形成が増加しており、このことはオートファジーの亢進を示唆していると考えた。リン酸化 mTOR は Tg においてオートファジーの調節に関与している可能性があると考えられた。

E. 結論

ALS モデルマウスの運動ニューロンでは発症後にオートファジーが亢進している可能性が示され、mTOR がその調節に関与している可能性がある。

F. 文献

Kabeya, Y. et al.: J Cell Sci. 117, 2805-2812, 2004

Mizushima, N. et al.: Int J Biochem Cell Biol. 36, 2491-2502, 2004

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Morimoto, N. et al.: Brain Research 1167, 112-117, 2007

2. 学会発表

なし

I. 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 なし

Wobbler マウスに対する atorvastatin の運動神経保護効果

分担研究者：岩崎泰雄¹⁾，

研究協力者：岩本康之介¹⁾，池田 憲¹⁾，吉井康裕¹⁾，川瀬祐士¹⁾，狩野 修¹⁾

東邦大学医療センター大森病院神経内科¹⁾

研究要旨 筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する有効な治療薬を見出すために、脊髄運動神経細胞に変性が生じるモデル動物である wobbler マウスを用いて、スタチン製剤である atorvastatin の神経保護効果について検討した。Atorvastatin の 0.01 %混合粉末飼料(投与量:10mg/kg 相当)の投与は、前肢の運動機能が有意に改善した。本薬剤を長期投与(8週間以上)してもマウスの体重変化に影響はなかった。上腕二頭筋の筋萎縮と ChAT 活性の低下を有意に抑制した。脊髄運動神経細胞の死滅は、atorvastatin 投与により有意に抑制された。スタチン製剤である本薬剤には、傷害された運動神経細胞や脱神経筋に対して保護的に作用することが確認された。

A. 研究目的

ALS 患者に対する新薬を開発するために、運動神経細胞の培養系、坐骨神経や顔面神経の外傷モデル、ALS モデル動物など多く運動ニューロン障害実験系が治療研究に用いられている。今回は、脊髄運動神経細胞に変性が生じる wobbler マウスに対するスタチン製剤である atorvastatin の神経保護効果について検討した。

B. 研究方法

1) Atorvastatin の 0.01 %混合粉末飼料(投与量:10mg/kg 相当)を作成した。Wobbler マウスの発病直後(生後 3-4 週齢)から、atorvastatin 混餌および一般粉末飼料を4週間以上、自由投与した。2) 運動機能の評価は薬剤投与の開始から毎週、前肢の屈曲拘縮の程度(正常から高度拘縮の5段階評価)と特殊な dynamometer を用いて両前肢の筋力を定量的に評価した。マウスの両前肢が中程度以上に拘縮した時点を運動機能の廃絶として、症候学的な評価を終了した。混餌食の摂取状況を週に2回観察し、体重を毎週測定した。3) 神経筋病理学的を検討は、4週間の薬物投与終了後(生後 7-8 週齢)、右側の上腕二頭筋の湿重量を計測した後に ATPase 染色標本を作製し、筋線維の平均直径を求めた。左側の上腕二頭筋は ChAT 活性を測定した。二頭筋切除後に経心的灌流固定を行い、脊髄C₅₋₆の Nissl 染色標本を作製し、明瞭な核小体を有する

大型運動ニューロン(≥30 μm)の残存数を算出した。

(倫理面への配慮)

倫理面に関しては、本研究が non-human animal experimental trial であるため、実験施設の動物倫理委員会ガイドラインに準じて施行した

C. 研究結果

前肢の運動機能評価は、機能廃絶の期間が対照群に比べて、atorvastatin 投与群で平均4.7週間、有意に延長した(P<0.01)。前肢の筋力測定に関しても、atorvastatin を投与した2週間後から筋力低下の進行を有意に遅延した(P<0.02)(図1)。本薬剤を長期投与(8週間以上)してもマウスの体重変化に影響はなかった。上腕二頭筋の所見は、atorvastatin は筋萎縮(P<0.01)と ChAT 活性の低下(P<0.05)を有意に抑制した(図2 & 3)。脊髄運動神経細胞の死滅は、atorvastatin 投与により有意に抑制された(P<0.01)(図4)。

図1 前肢の筋拘縮と筋力低下

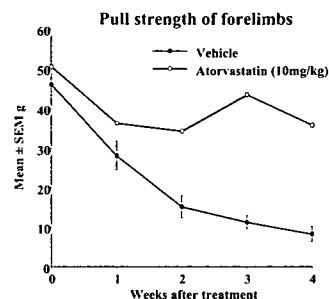


図2 上腕二頭筋の筋重量と筋線維平均直径

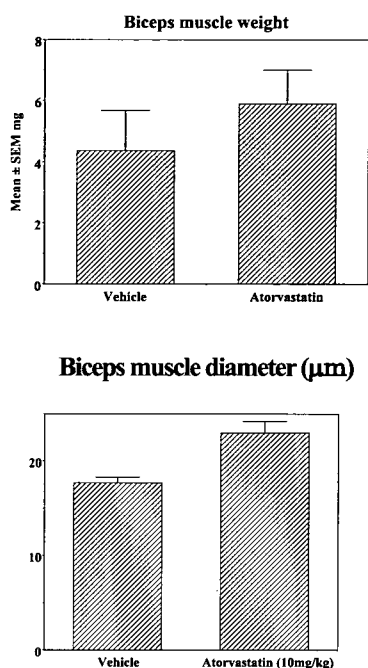


図3 上腕二頭筋のChAT 活性

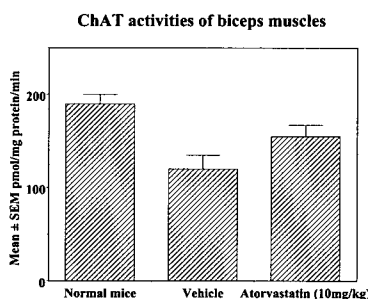
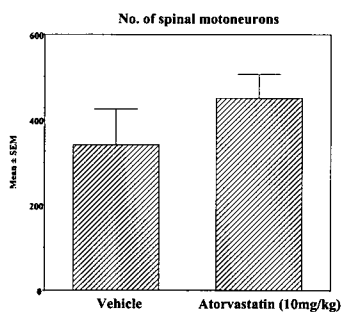


図4 脊髄運動神経細胞の残存数



D. 考察

スタチン製剤であるatorvastatinには、脳血管を含めた神経系に対して多機能効果を有することが着目されていた。脳卒中モデルでは、本薬剤には血管新生と神経の可塑性を促進し、¹⁾ 神経成長因子であるVEGFとBDNFを増強することが報告されている。²⁾ また、

Anti-apoptosisとしても、脊髄損傷モデルラットにおいて、atorvastatinは神経細胞と希特突起膠細胞のアポトーシスを軽減することが報告されている。³⁾ 本薬剤は、ラット胎児の脳神経細胞培養において、Akt経路やErk経路のリン酸化を促進する機序も知られている。⁴⁾ 神経毒であるグルタミン酸を投与した脳神経細胞培養において、atorvastatinは神経保護効果を有する。⁵⁾ 運動神経細胞に対しては、著者らがグルタミン酸を添加したラット脊髄器官培養において、atorvastatinは運動神経細胞の死滅を有意に抑制することを報告した。⁶⁾ さらに、in vivoの実験系でも新生ラットの坐骨神経切除後に生じる運動ニューロン死を本薬剤は有意に軽減する効果を示している。⁷⁾ 今回の実験から、スタチン製剤であるatorvastatinには、傷害されたwobblerマウスの運動神経細胞や脱神経性の萎縮筋に対しても保護的に作用することが確認された。

E. 結論

1) アトロバスタチン経口投与によりwobblerマウスの運動機能障害と神経筋病理学的所見が明らかに軽減された。2) 本薬剤は、他の運動ニューロン損傷モデルであるグルタミン酸中毒培養や軸索切断後の運動ニューロン死に対しても有効性が確認されている。3) 今後は、他のスタチン製剤との効果を比較・検討していく必要があると考えられた。

F. 文献

- 1) Chen J, et al. J Cereb Blood Flow Metab 25: 281-290, 2005
- 2) Chen J, et al. Neuroscience 141: 737-744, 2006
- 3) Pannue R, et al. J Neurosci Res 79: 340-350, 2005
- 4) Chen J, et al. Ann Neurol 53: 743-751, 2003
- 5) Bosel J, et al. J Neurochem 92: 1386-1398, 2005
- 6) Iwasaki Y, et al. 130th Annual Meeting of the American Neurological Association, San Diego, 2005
- 7) Iwasaki Y, et al. 132nd Annual Meeting of the American Neurological Association, Washington DC, 2007

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

I. 知的所有権の取得状況

なし

変異 SOD1 の小胞体内蓄積をターゲットとした家族性筋萎縮性側索硬化症治療 の遺伝の開発

山下 賢、森 麗、木村 円、前田 寧、平野 照之、内野 誠
熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野

研究要旨

変異 SOD1 マウスでは週齢および組織依存的に、変異 SOD1 が運動神経の小胞体(ER)に蓄積し、ER ストレスによってアポトーシスを来す。ER シャペロン BiP は ER ストレスのトリガーであるとともに、misfolding 蛋白の refolding や細胞質への逆行性輸送など種々の機能を有する。BiP の SOD1 発現に及ぼす影響を解明するために、BiP siRNA を野生型もしくは変異型 SOD1 発現細胞に導入すると、用量依存的に変異 SOD1 含量が増加し、CHOP の誘導により変異 SOD1 発現細胞のアポトーシスを引き起こした。さらに BiP を野生型もしくは変異型 SOD1 発現細胞に過剰発現すると、ER への変異 SOD1 蓄積が軽減され、変異 SOD1 蛋白の分解が促進された。BiP は変異 SOD1 の ER への流入を阻害、もしくは細胞質への逆行性輸送を促進することにより小胞体関連分解を引き起こし、変異 SOD1 の ER 内蓄積を軽減することが示唆された。BiP は家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療の重要な候補遺伝子となりうる。

A.研究目的

ヒト SOD1 変異による家族性 ALS のモデルマウスでは、週齢依存的および組織特異的に変異 SOD1 蛋白が運動ニューロンの小胞体(ER)内に蓄積しており、その結果運動ニューロンが ER ストレスによって、アポトーシスを来すことが明らかとなっている¹⁾。この ER 内への変異 SOD1 蛋白の選択的な蓄積が、運動ニューロン変性のトリガーとなっている可能性に着目し、小胞体シャペロンや小胞体関連分解(ERAD)に関連する分子が、変異 SOD1 蛋白の発現および分解に及ぼす影響について検討し、それらの遺伝子を家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療の開発へと応用させることを目的としている。

B.研究方法

小胞体シャペロン BiP は ER ストレスのトリガーであるとともに、misfolding 蛋白の refolding や細胞質への

retrotranslocation など種々の機能を有することが知られている。野生型および変異型 SOD1 を発現する神経細胞において、BiP を knock-down もしくは過剰発現することによって、変異 SOD1 蛋白の発現および分解に及ぼす影響を観察し、変異 SOD1 蛋白の小胞体内蓄積の軽減効果について検討を行う。

C.研究結果

BiP および SOD1(WT, G93A, G85R)を NSC34 運動ニューロン細胞に共発現すると、BiP は変異 SOD1(G93A, G85R)とより選択的に相互作用した。そこで BiP の SOD1 発現に及ぼす影響を明らかにするために、BiP siRNA を SOD1(WT, G93A, G85R)発現 NSC34 細胞に導入したところ、用量依存的に変異 SOD1 の含量の増加を認め、CHOP が誘導されることによって(図1)、変異 SOD1 発現細胞のアポトーシスを引き起こした(図2)。BiP が変異 SOD1 の毒性軽減に重要な役割を果たすことが推測され

ため、BiP 発現ベクターを SOD1(WT, G93A, G85R) 発現 NSC34 細胞に導入したところ、小胞体内への変異 SOD1 蓄積が軽減され(図3)、Pulse-Chase assay から変異 SOD1 の分解が促進されたことが明らかとなった(図4)。

図1. BiP siRNA は用量依存的に変異 SOD1 含量の増加と CHOP の誘導をもたらす

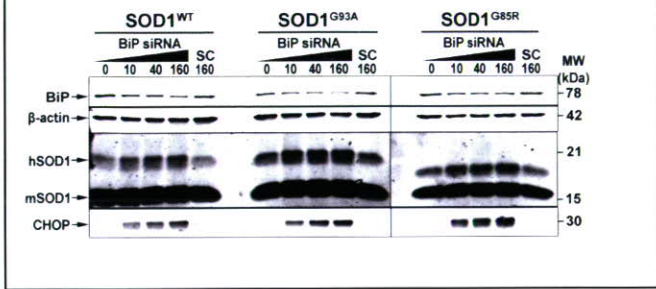


図2. BiP siRNA は変異 SOD1 の毒性を増強する

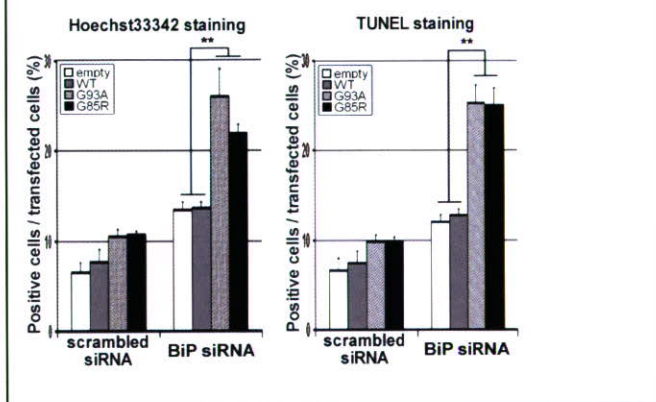
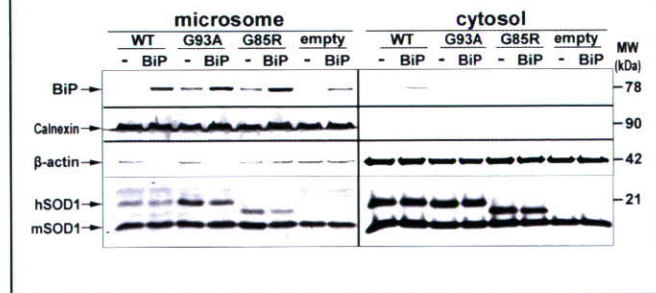


図3. BiP の過剰発現は小胞体内への変異 SOD1 蓄積を軽減する



D. 考察

BiP は変異 SOD1 蛋白の小胞体内への流入を阻害すること、もしくは細胞質への retrotranslocation を促進することによって ERAD を引き起こし、変異 SOD1 の小

胞体内蓄積を軽減する可能性が示唆された(図5)。

図4. BiP 過剰発現による変異 SOD1 の蓄積軽減は SOD1 蛋白の分解の促進による

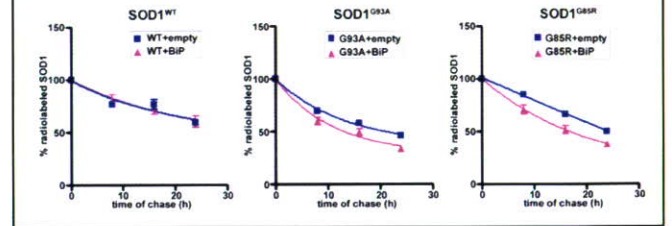
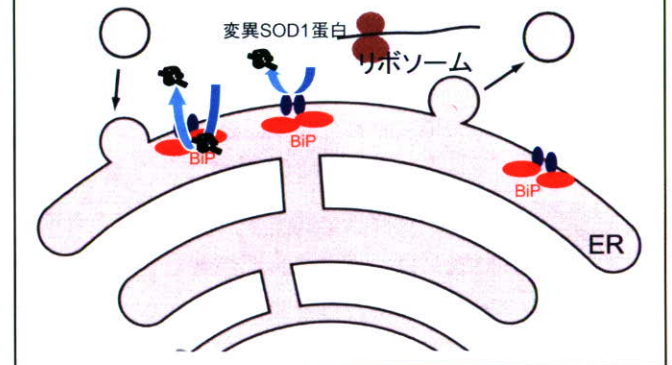


図5. BiP は SOD1 蛋白の折りたたみや retrotranslocation に重要な役割を果たす



E. 結論

変異 SOD1 の小胞体内蓄積の軽減効果を有する BiP は、家族性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療の重要な候補遺伝子となりうる。

F. 文献

1) Kikuchi H, et al. *PNAS*, 103: 6025-6030, 2006.

G. 健康危険情報

特記事項なし。

H. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

I. 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：なし

変異 SOD1 結合蛋白の網羅的検索

中島健二，渡辺保裕，森田恵里，中野俊也，北山通朗，安井建一
鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経内科部門

研究要旨

家族性筋萎縮性側索硬化症（FALS）の病態を解明するため，変異 SOD1 と相互作用する蛋白を包括的に探索する．C 末端に FLAG 配列を付加した 2 塩基欠失変異 SOD1 蛋白（DF）を強制発現するマウス，FLAG 配列を付加した野生型 SOD1（WF）を発現するマウスおよび野生型マウス（NTG）の脊髄組織を用いた．抗 FLAG アフィニティーゲルにより FLAG 付加 SOD1 および相互作用蛋白を選択的に精製し，LC-MS/MS で解析した．WF の解析で 4 蛋白，NTG の解析で 3 蛋白，DF では 34 種の蛋白（サブユニット）が同定された．ALS 疾患マウスである DF でのみ多種多数の相互作用蛋白が認められ，FALS 発症への関与が考えられた．

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病因として，過剰興奮毒性，蛋白凝集，Ca 代謝異常，軸索輸送障害，ミトコンドリア機能異常など，多岐にわたる細胞内機能異常が報告されている¹⁾．Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子異常による家族性 ALS

（FALS）においてはこれらの異常が単一の変異 SOD1 分子に起因する（gain of function）と考えられている．①変異蛋白の凝集毒性，②変異 SOD1 特異的な化学反応（peroxynitrite の産生など），が” gain of function” の本態として有力である¹⁾が，詳細な機序は不明である．本研究では，この病態を明らかにするため，変異 SOD1 蛋白と相互作用する蛋白を包括的に探索する．

B.研究方法

C 末端に FLAG 配列を付加した 2 塩基欠失変異 SOD1 蛋白（DF 蛋白）を発現するトランスジェニックマウス（DF）²⁾，FLAG 配列を付加した野生型 SOD1（WF 蛋白）を発現するマウス（WF）および野生型 C57BL/6 マウス（NTG），いずれも日齢 145 日（n=4）を対象とする．ヒト野生型 SOD1 がサブユニットあたり 153 アミノ酸の 2 量体蛋白であるのに対し，DF 蛋白は 2

塩基欠失のため 130 アミノ酸のみの蛋白として産生される．さらに DF 蛋白はダイマー形成に必須の C57-C146 のジスルフィド結合³⁾を欠くため，図 1 に示すとおり単量体蛋白として存在することが想定される．

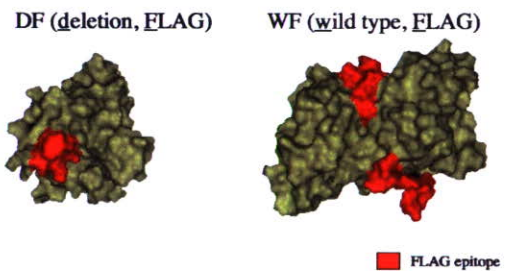


図 1. DF および WF 型 SOD1 の構造シミュレーション
ヒト野生型 SOD1 に FLAG 配列を付加した WF が 2 量体を形成するのに対し，DF は単量体で存在すると考えられる．

各マウスの全脊髄を 1% Triton X-100 を含む抽出バッファーでホモジェナイズし可溶性分画を分離する．抗 FLAG アフィニティーゲルにより FLAG 付加 SOD1 および相互作用蛋白のみを精製，トリプシン消化後，liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 解析に供する．得られたペプチド情報を蛋白データベースと照合することで変異 SOD1 に結合する蛋白を網羅的にリストアップする．

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験に関しては、鳥取大学の当該安全委員会において承認を得た（承認番号：16-②-2）。本研究における動物実験および動物の取り扱い、鳥取大学動物実験委員会の承認を得て、これを遵守して行った（承認番号：04-S-6 および 04-S-9）。

C. 研究結果

WF の解析では、相互作用蛋白はマウス由来 SOD1, heat shock protein (HSP) 70 ファミリー蛋白など計 4 蛋白であった (Table 1)。この結果より WF 蛋白がマウス由来の SOD1 とヘテロダイマーを形成する可能性が強く示唆された。NTG の解析においては、3 種類の蛋白を同定するのみであった (表 1)。

表 1

WF (145) spinal cord				NTG (145) spinal cord					
No.	Protein	Abbreviation	Probability score	No. of peptide	No.	Protein	Abbreviation	Probability score	No. of peptide
HSPs and protein degradation									
1	heat shock cognate 70	Hsc70	30.17	3					
2	heat shock protein 70-2	Hsp70-2	30.16	3					
Glycogenolysis, glycolysis, and TCA cycle									
					1	pyruvate kinase	PKM	50.22	5
Cytoskeleton and structure									
3	keratin	KRT	30.21	3	2	keratin	KRT	50.21	6
					3	β actin	ACTB	30.21	3
Others									
4	mouse Cu/Zn superoxide dismutase	SOD1	20.22	3					

一方 DF では、34 種の蛋白が同定された。内訳は HSP70 ファミリー蛋白, ATPase, 解糖・TCA 回路, 細胞骨格, 膜 (輸送) 蛋白, 蛋白合成などであった。DF においてはマウス由来 SOD1 蛋白は同定されず, DF 蛋白が二量体を形成しないことが確認された。

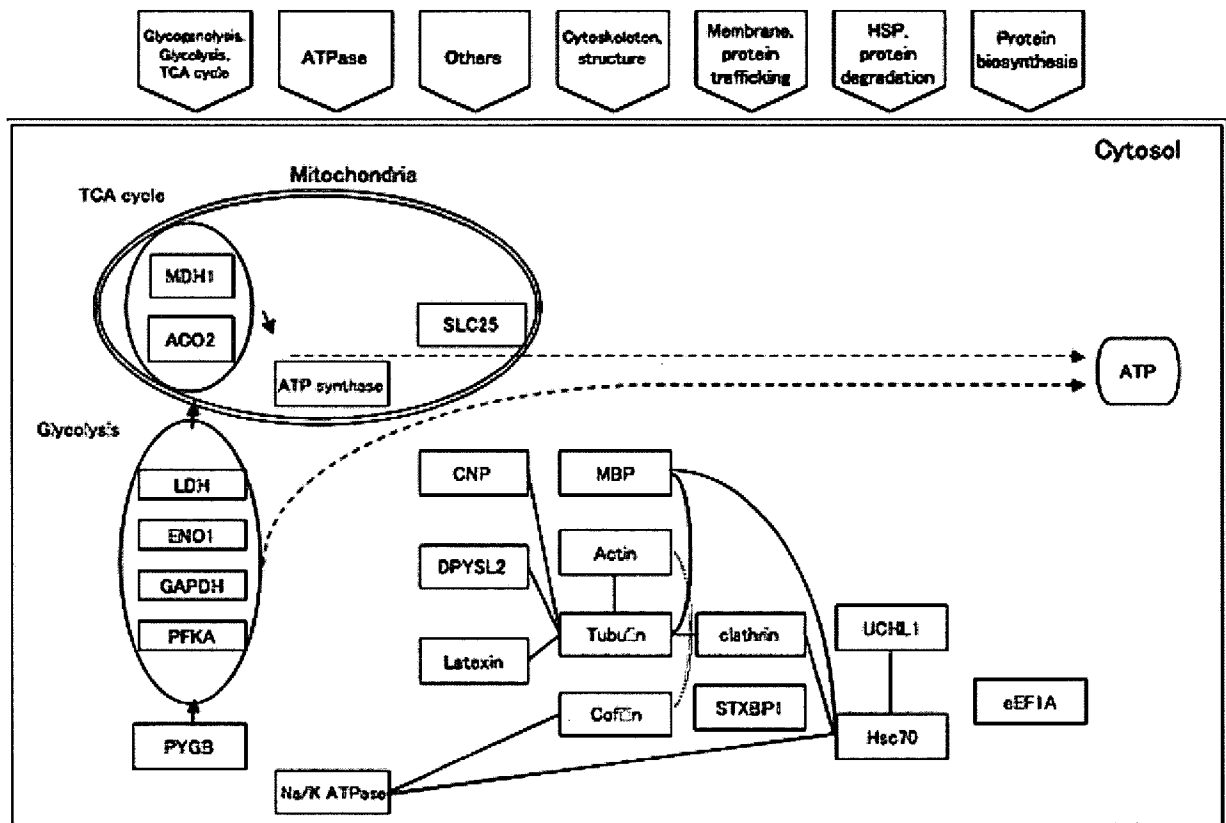


図 2 DF 蛋白に対する結合蛋白

WF に対し, DF では広範囲にわたる細胞内コンポーネントとの間で結合が認められた。白抜きは非神経細胞で主に発現が認められる蛋白を示す。主に Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems, USA) を用いて, 結合蛋白同士で直接に関連するものは実線および点線で示した。略号 (MDH1: malate dehydrogenase 1, ACO2: aconitase 2, LDH: lactate dehydrogenase, ENO1: α enolase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, PFKA: phosphofructokinase 1, PYGB: brain glycogen phosphorylase, SLC25: solute carrier family 25, CNP: 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase I, DPYSL2: dihydropyrimidinase-like 2, MBP: myelin basic protein, CLTC: clathrin heavy chain, STXBP1: syntaxin binding protein 1, UCHL1: ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, Hsc70: heat shock cognate 70, eEF1A: eukaryotic translation elongation factor 1)。

D. 考察

ALS を発症しない WF マウスに対し、疾患マウスである DF でのみ多種の相互作用蛋白が認められた。この原因として、DF 蛋白が単量体で存在し、2 量体で存在する時は隠れている疎水性部分がむき出しになっていることが重要であると推察された。さらに A4V, G37, G85R, G93A 変異においても、その一部が in vivo で単量体であることが示されており⁴⁾、単量体 SOD1 が広範囲の蛋白と相互作用し本来の機能を障害することにより ALS を発症するに至る可能性が考えられた。

E. 結論

変異 SOD1 (monomer) は “sticky” であり、多岐にわたる細胞内機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。さらに野生型 SOD1 と同様の dimer を構造を形成する変異 SOD1 においても、一部は monomer で存在するとの報告が蓄積されている⁴⁻⁶⁾。このことより、Monomer 型変異 SOD1 の “stickiness” は、変異 SOD1 全般の “gain of function” を説明しうる可能性がある。

F. 文献

1. Pasinelli P, et al. Nat Rev Neurosci, 710-23, 2006.
2. Watanabe Y, et al. Brain Res Mol Brain Res, 12-20, 2005.
3. Lindberg MJ, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 15893-8, 2004.
4. Rakhit R, et al. Nat Med, 754-9, 2007.
5. Caplow M, et al. Amyloid, 226-35, 2006.
6. Arnesano F, et al. J Biol Chem, 47998-8003, 2004.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Fukada Y, et al. Brain Res, 1-10, 2007.

2. 学会発表

18th International Symposium on ALS / MND
Amyotrophic lateral sclerosis 8, 165, 2007

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

申請中

「エキソン5において2塩基欠失を有する SOD1 遺伝子を導入した、遺伝子導入非ヒト動物」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

孤発性 ALS の運動ニューロン変性における Dynactin1 の役割

（分担）祖父江 元¹⁾

研究協力者 和座雅浩¹⁾ 田中章景¹⁾ 黄 哲¹⁾ 蔣 月梅¹⁾ 勝野 雅央^{1,3)} 曾根 淳¹⁾ 飯島雅博¹⁾
井口洋平¹⁾ 山田新一¹⁾ 山本 正彦²⁾

- 1) 所属 名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学
- 2) 所属 愛知学院大学 心身科学部 健康科学科
- 3) 所属 名古屋大学大学院高等研究院

研究要旨

孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)は現在もその病因は不明のままであり、病態関連分子に関する情報が乏しく疾患モデルが存在しないことが。我々は孤発性 ALS 患者脊髄から、レーザーマイクロダイセクションによる運動ニューロンのサンプリングにより、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成、その結果運動ニューロンにおける dynactin1 の遺伝子発現レベルの低下は、早期かつユニバーサルに認められる現象であることが分かった。この遺伝子変化を培養細胞および線虫に展開したところ、siRNA による選択的な dynactin1 遺伝子ノックダウン法は双方のモデルにおいて神経細胞変性を誘発した。dynactin1 遺伝子発現レベルの低下は、ALS 発症の上流に位置する重要なイベントであると考察され、孤発性 ALS の病態の一部を反映するモデルになる可能性がある。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に関する研究においては、約 10%をしめる遺伝性 ALS の一部のものは原因遺伝子が同定され、そのトランスジェニックマウスモデルの作成により一定の成果が得られている。しかしヒト ALS 患者のほとんどを占める孤発性 ALS については、現在もその病因は不明のままであり、より病態を反映した優れた動物モデルの作成が切望されている。

これまでに我々は孤発性 ALS 患者脊髄から、レーザーマイクロダイセクションにより運動ニューロンを単離することにより、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成、4845 遺伝子中、コントロール例に比べ有意な発現上昇を示す 52 遺伝子 (1%)、発現低下を示す 144 遺伝子 (3%) を同定することに成功した。こうした発現変化の中でも、その中

でも、発現動態や神経変性マーカーとの関係を詳細に検討することにより、dynactin1 の遺伝子発現低下が、神経変性過程の初期よりしかもユニバーサルに生じていることを明らかにした。孤発性 ALS のモデルを作成するにあたり、このような神経変性過程の比較的上流に位置する病態をシミュレートすることが重要と考えられる。今回は培養細胞モデル及び線虫モデルにおいて、dynactin1 の選択的な発現量低下が、運動ニューロン変性を誘発するかを検証する。

B. 研究方法

まず、我々が遺伝子発現プロファイルの結果見だし、運動ニューロン特異的な発現変化を確認した ALS 病態関連分子の発現動態を様々な病期の孤発性 ALS 20 例および正常コントロール 7 例の腰髄を用い

て検討した。解析対象は、転写因子の early growth response 3 (EGR3)、軸索輸送関連の dynactin1、細胞死抑制作用があるとされる acetyl-CoA transporter (ACATN)、細胞死促進にはたらく death receptor 5 (DR5)、および、細胞周期関連遺伝子であり、細胞死促進に働くとされる cyclin C(CCNC)、および現時点で機能不明な KIAA0231 の6 遺伝子である。また、神経変性のマーカーとして、残存運動ニューロン数、リン酸化ニューロフィラメント H、ユビキチン化蛋白の3つを用い、神経変性に従って上記 ALS 病態関連遺伝子の発現がどのように変化していくかを検討した。発現程度は、in situ hybridization または免疫組織化学的に、信号強度を定量化することにより解析した。

培養細胞モデルとしては、neuroblastoma cell 由来の SH-SY5Y 細胞において siRNA による dynactin1 ノックダウンを行い、神経細胞の形態変化、MTT アッセイおよび PI staining を行った。アポトーシス関連では DNA ladder assay、caspase3 ウェスタンブロット、Tunel 法による検討を加えた。

線虫モデルにおいては、コリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターである *acr-2* 支配下に、ヒト dynactin1 の相同体である *dnc-1* を標的とした二本鎖 RNA を発現可能なベクターを作成し、野生型線虫にマイクロインジェクションし変異体を作成した。コントロール群として、線虫とは無関係な LacZ 遺伝子を標的とした二本鎖 RNA を発現させた。また、運動ニューロンの同定及び二本鎖 RNA の導入の確認を容易にするために GFP を共発現させた。運動機能の解析は、一定時間内の首振り回数、累積生存率、水中でのむち打ち回数をパラメーターとした。内因性の *dnc-1* の mRNA レベルは whole mount in situ hybridization 法にて評価した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守した。

C. 研究結果

【ALS 病態関連分子の発現動態】

A. 残存運動ニューロン数との関連

遺伝子発現変化をきたした運動ニューロンの割合を ALS20 例において検討したところ、残存運動ニューロンの 80%以上で発現が変化している ALS 例数が DCTN1 では 20 例全例、EGR3, ACATN では 14 例であったのに対して、KIAA0231, DR5, CCNC では各々9例、5例、0例であった。また、残存ニューロンが減少するとともに遺伝子発現変化を生じる運動ニューロンの割合は増加するが、特に dynactin1 では運動ニューロン数が保たれている段階からすでにほとんどのニューロンで遺伝子発現が低下していた。

B. ニューロフィラメント H(NFH)蓄積との関連

ALS では神経変性に従い NFH の蓄積が生じることが知られている。遺伝子発現の定量化による検討を加えると、ACATN, KIAA0231, DR5, CCNC では NFH が蓄積するに従い次第に発現レベルが上昇するという相関を認めた。一方、DCTN1 や EGR3 では、コントロールと変わらないような NFH の density の細胞においてもすでに発現レベルが低下していた。

ALS 運動ニューロン特異的な発現変化をきたした遺伝子のうち、発現上昇が見られた遺伝子は 54、発現低下が認められたものは 144 であった。発現変化をきたした遺伝子の real time RT-PCR および in situ hybridization または免疫組織学的にも発現変化を確認した。これらの結果、dynactin1 の遺伝子発現変化は、ALS 発症の早期のイベントであると考察した。

【ALS 培養細胞モデルの作成と解析】

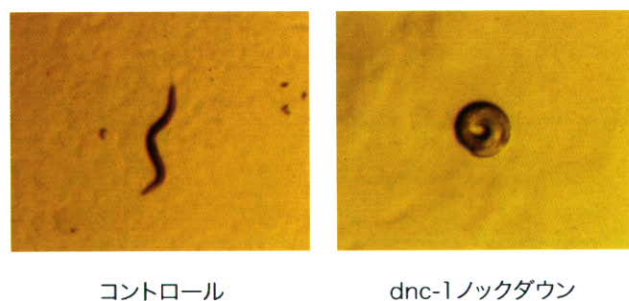
SH-SY5Y cells における siRNA 法による dynactin1 ノックダウンの結果、72-96 時間後の dynactin1 発現レベルを、タンパク質レベルにおいてコントロール群の 30-40%にまで抑制できるシステムを構築することができた。MTT assay, PI staining の結果、dynactin1 ノックダウンにより神経細胞の突起の退縮と、時間依存性に細胞死が生じることを確認し

た。DNA ladder assay、caspase3 ウェスタンブロット、Tunel 法における検討では、dynactin1 ノックダウンによる細胞死がアポトーシス性である証拠は現在のところ得られておらず、引き続き dynactin1 ノックダウンによる細胞死のメカニズムを検証中である。

【ALS 線虫モデルの作成と解析】

線虫モデルにおいては、dnc-1 ノックダウン群はコントロール群 (LacZ 遺伝子ノックダウン) に比して、生存率の短縮、首振り回数の低下、水中でのむち打ち回数の低下が認められた。さらにノックダウン群においては、より運動機能障害が重篤な個体において Coiler uncoordinated の表現型が認められた (図 1)。この表現型は、コリン作動性運動ニューロンの VA ニューロンの正常なシナプス形成に必須である unc-4 遺伝子の種々の変異体で出現する表現型であり、運動ニューロンの機能障害と変性を示唆する。またノックダウン群においては、運動ニューロン軸索の形態異常が認められた。

図 1



D. 考察

dynactin1 はそのパートナープロテインである dynein とともに逆行性軸索輸送を制御するモーター蛋白質であり、効率的なタンパク輸送を担っていることが知られている。dynein 遺伝子変異によりマウスに (Hafezparast M et al. Science 2003)、また dynactin1 遺伝子変異によりヒトに運動ニューロン障害をおこすことが知られている (Puls I et al. Nat Genet 2003)。しかし、これらの遺伝子変異は孤発性

ALS に共通するものではない。本研究は dynactin1 遺伝子の変異ではなく、ヒト ALS で明らかとなったその発現レベルが下がることが、運動ニューロン変性を誘発することを証明しており、ALS 病態をより忠実に反映していると言える。

一方で我々は、ALS と同じく運動ニューロン病に分類される球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) においても、dynactin1 の発現レベルの低下が発症早期に認められることを、トランスジェニックマウスを用いた解析により証明している。孤発性 ALS において、何故運動ニューロンが選択的に障害されるかは不明のままであるが、運動ニューロンは長い軸索を持っており、軸索輸送の機能低下の影響を特に受けやすいことが知られており、dynactin1 の発現レベルの低下による軸索輸送の障害は、運動ニューロンの脆弱性を説明するひとつの理由になると思われる。

現在我々は、dynactin1 のコンディショナルノックアウトマウスの作成も同時進行させており、dynactin1 ノックダウンによる細胞死メカニズムをさらに詳細に解析している。

E. 結論

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 および 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り、ALS 発症の上流に位置する重要なイベントであると考察される。また、dynactin1 遺伝子ノックダウンモデルは、孤発性 ALS の少なくとも一部の病態を反映していると予想され、その有用なモデルとなりうる可能性を秘めている。

F. 文献

- Jiang YM et al, *Ann Neurol* 57: 236-251, 2005.
- Jiang YM et al, *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 617-627, 2007

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Jiang YM et al, *Ann Neurol* 57: 236-251, 2005.
2. Waza M et al, *Nat Med* 11, 1088-1095, 2005
3. Tanaka F et al. *Ann NY Acad Sci.* 1086:1-10, 2006
4. Katsuno M et al, *J Neurosci.* 26:12106-12117, 2006
5. Yamada S et al, *J Biol Chem.* 281: 23842-23851, 2006
6. Jiang YM et al, *J Neuropathol Exp Neurol* 66. 617-627, 2007
7. Niwa J et al, *J Biol Chem* 282. 28087-28095, 2007
8. 田中章景ら、難病と在宅ケア 13 巻、66-69, 2007

2. 学会発表

・発行誌名巻号・ページ・発行年等も記入

1. Tanaka F et al, *17 th International Symposium on ALS/MND* Yokohama, Japan, Oct 2006
2. Katsuno M et al, *17 th International Symposium on ALS/MND*, Yokohama City, Japan, Oct 2006
3. Tanaka F et al. *The 4th Asian Congress of Hyperthermic Oncology (ACHO)*, Nara City, Japan , tember 2006
3. 勝野雅央ら、日本神経学会 名古屋、2007 年
4. 田中章景ら、日本神経学会 名古屋、2007 年

I. 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

なし

ALS モデルラットにおける軸索機能評価

報告者氏名 川畑佳子¹⁾、野寺裕之¹⁾、梶龍兒¹⁾
所属 ¹⁾ 徳島大学神経内科

研究要旨

最近 ALS では種々のイオンチャネル異常の病態への関与が報告されているが、threshold tracking 法を用いた軸索機能検査法にて、軸索膜に存在する種々のイオンチャネルの機能を非観血的に評価することが可能である。threshold electrotonus 法 (TE 法) を用い、孤発性ヒト ALS (SALS) に対し、経時的に K⁺チャネル機能の評価を行った。また変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックラット (H46R) に対しても TE 法を施行し、SALS と比較した。SALS に対し TE 法にて脱分極性条件刺激を与えた場合に、発症早期では興奮性の増加が認められ、fast K⁺チャネルの機能低下によるものと考えられた。また変異 SOD トランスジェニックラットでは上記の変化は明らかではなかった。

A. 研究目的

神経軸索の機能はインパルスを伝達する事であるが、伝達のためには軸索が静止膜電位から脱分極する必要がある。静止膜電位は主に Na⁺と K⁺イオンの軸索膜内外での濃度差により規定され、イオンの濃度差を規定するのは各イオンチャネルの機能によるところが大きい。そのため、イオンチャネルの機能異常は神経機能異常を引き起こし、興奮性が亢進すれば症状として筋痙攣、ピクツキ (fasciculation)、しびれ、痛みなどが生じ、興奮性の低下では脱力、感覚鈍麻などが起こり得る。ALS では種々のイオンチャネル異常が報告されている。これまでの TE 法による SALS に対する検索では、長い脱分極性条件刺激を加えた際に正常群と比較して上方への変異が認められ、slowK⁺チャネルの機能不全が報告されている

(Kanai, et al.: Brain, 129, 953-962, 2006, Vucic, et al.: Clin Neurophysiol, 117, 1458-1466, 2006)。

今回我々は SALS に対して経時的に TE 法を行い、発症後時期による K⁺チャネルの機能の変化と症状との関連について評価した。また変異 SOD トランスジェニックラットに対しても TE 法を施行し、SALS と比較した。

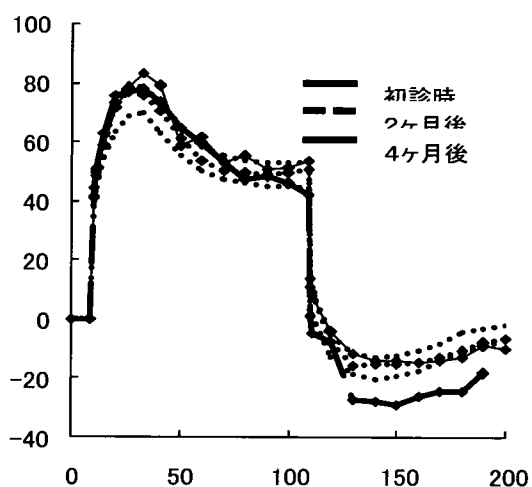
B. 研究方法

SALS 2 名に対し、刺激電極の陰極を正中神経あるいは尺骨神経上に、陽極を神経から離れた近位におき、記録電極は通常の CMAP 記録部位上に設定し、初診時、2 カ月後、4 カ月後の計 3 回 TE 法を施行した。また、野生型ラット雄 7 匹および発症後変異 SOD トランスジェニックラット (H46R) 雄 8 匹に対し、刺激電極 (皿電極) の陰極を尾根部から 1.5cm 遠位に、陽極を尾根部におき、記録電極 (針電極) 陰極を尾根部から 7.5cm、陽極を尾根部から 9.5cm の部位にそれぞれ設定し、皮膚温は 32 度とした。変異 SOD トランスジェニックラット (H46R) はこれまでに体重減少開始時期と発症時期がほぼ同時で 20-22 週で発症すると報告されており (Nagai, et al.: J. Neurosci., 21, 9246-54, 2001)、当施設でも同時期を境として体重減少を認めたため、22 週齢以降を発症とした。

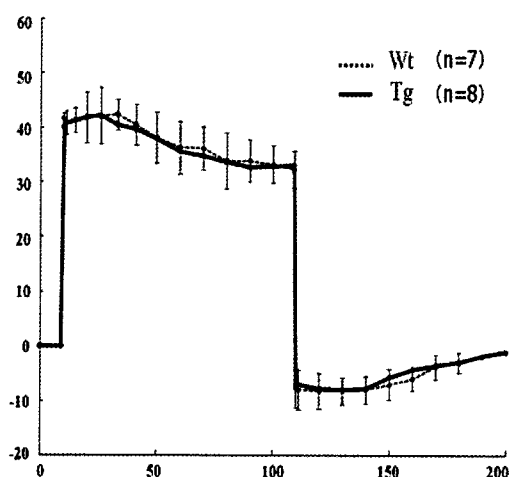
C. 研究結果

SALS では 2 例とも TE 法にて短い脱分極性条件刺激を加えた際に、初診時に上方への変異を認め、経過とともに変化は消失した (グラフ 1)。発症後の変異 SOD トランスジェニックラット (H46R) におい

ては上記の変化は明らかでなかった（グラフ2）。



グラフ1：縦軸 閾値減少率（%）、横軸 条件刺激開始から試験刺激までの時間（ms）。初診時に条件刺激が10-30msの際、コントロールと比較してグラフの上方への変位を認め、経過により次第に低下を示している。



グラフ2：縦軸 閾値減少率（%）、横軸 条件刺激開始から試験刺激までの時間（ms）。トランスジェニックラットにおいては、コントロールと比較してグラフの変化は明らかでなかった。

D. 考察

SALS 初診時に認められた短い脱分極性条件刺激を加えた差異の波形の上方への変位は神経軸索が興奮しやすい状態にあることを示唆している。神経軸索の興奮性を制御する機能をもつイオンチャンネルには Na^+ チャンネルと K^+ チャンネルがある。 K^+ チャンネルには kinetics の異なる2種類のサブタイプに分けられ、早い K^+ チャンネルは $\text{Kv}1.1$ が代表的であり、遅い K^+ チャンネルの代表は $\text{KCNQ}2/3$ である。電位依存性 Na^+ チャンネルの開口により Na^+ が細胞内に流入し、軸索の脱分極がおこるが、それを静止膜電位に戻す働きがあるのが K^+ チャンネルであり、 K^+ チャンネルの機能低下により神経軸索の興奮性が上昇する。それにより fasciculation が引き起こされる可能性が指摘されている。また、異常に興奮した神経軸索を正常化しようと $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger が作用する事で細胞内に細胞毒性をもつ Ca^{2+} が流入することで神経変性を更に増悪させると考えられている。今回、ALS 患者の軸索興奮性を経時的に観察したが、初期には K^+ チャンネル機能低下を示す波形を呈したものの、後期にはそのような変化はむしろ消失した。これは、ALS 発症早期には K^+ チャンネル機能異常が前面に立つ病態であるが、進行が進むにつれ、二次的変化（軸索膜電位の脱分極側へのシフト、 Na^+/K^+ ポンプの障害など）が複雑に作用する事があると考えられる。つまり、 K^+ チャンネル機能異常は ALS の病態を説明する鍵である可能性が高く、 K^+ チャンネル機能制御が ALS 治療に結びつくかもしれない。

E. 結論

発症早期の SALS においてはこれまで報告されている slow K^+ チャンネルの機能異常に加えて、fast K^+ チャンネルの機能低下がある。これは fasciculation の原因である可能性がある。

F. 文献

- Kanai, et al. : Brain, 129, 953-962, 2006
 Vucic, et al. : Clin Neurophysiol., 117, 1458-1466, 2006
 Nagai, et al. : J. Neurosci. , 21, 9246-54, 2001

G.健康危険情報

なし

H.研究発表

1.論文発表

Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS.
de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD,
Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H,
Shefner J, Swash M. : Clin Neurophysiol. , 2007 in
press

2.学会発表：なし

I.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