

胚性幹細胞、神経幹細胞を用いた神経系の再生医学

分担研究者：岡野 栄之（慶應義塾大学医学部生理学教室 教授）

研究要旨：マウスES細胞から神経系前駆細胞/幹細胞(NS/PCs)を含むニューロスフェアを誘導する培養法を確立した。このニューロスフェアは、ALSモデルらつとや脊髄損傷モデルマウスの成体脊髄に移植すると生着し、*in vivo*でもニューロンおよびグリア細胞に分化し、さらに機能的改善が得られた。現在、ヒトES細胞や人工多能性幹細胞(iPS細胞)からもニューロスフェアを誘導する方法を構築し、神経再生への応用を行っている。

A. 研究目的

胚性幹細胞(ES細胞)から神経系前駆細胞/幹細胞(ニューロスフェア)を誘導する培養法を確立する。また誘導したニューロスフェアをALSモデルや脊髄損傷モデル動物に移植して神経の再生を行う。さらに、ヒトES細胞やiPS細胞からのニューロスフェアの誘導を行い、神経再生医療へ応用する。

B. 研究方法

我々はマウスES細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを形成させる培養法を確立してきた。この方法を用いて神経幹細胞/前駆細胞(NS/PCs)を培養する過程で様々な因子(Noggin, RA, Shh, Wnt3a, BMP4など)を作用させることで、NS/PCsの時間的・空間的特異性を制御し、様々な領域で生み出されるニューロンやグリア細胞の誘導を行う。

次に誘導したES細胞由来ニューロスフェアを野生型およびALSモデル動物である変異型SOD1(G93A)トランスジェニックラット:mSOD1ラット)の腰髄に移植し、その*in vivo*における生着および分化能を免疫染色法にて解析する。また、脊髄損傷モデルマウス(C57/BL6)を作成し、損傷による炎症が収まり、グリア瘢痕を形成する前の損傷後9日目にES細胞由来ニューロスフェアを移植し、細胞の生着について*in vivo* imaging system (IVIS)、分化および動

物の運動機能の改善について免疫組織化学、およびBBBスコアを用いた評価を行う。

また、将来的な再生医療への応用を念頭に置き、同様の手法を用いて、ヒトES細胞からのEBを介したヒトNS/PCs(ニューロスフェア)の誘導を、また免疫学的拒絶反応や倫理的問題を回避するために、核移植ES細胞や人工多能性幹細胞(iPS細胞)からも同様にNS/PCs(ニューロスフェア)の誘導を行う。

[倫理面への配慮]

動物の飼育・管理は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行われている。また、当研究室におけるヒトES細胞の使用については、文部科学省の「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、平成19年10月31日に「ヒト胚性幹細胞を用いた中枢神経系の再生医学の基礎的研究」として承認され、研究計画はそれに準拠したものとなっている。

C. 研究結果

我々はマウスES細胞から胚様体(Embryoid Body: EB)を経て、多能性神経幹細胞を含む未分化神経系前駆細胞の集合であるニューロスフェアを誘導する培養法を確立してきた。この培養法では、最初に形成した一次ニューロスフェアからはニューロンのみが生み出され、一方で継代して得られる二次、三次ニューロスフェアからはニューロンのみならずグリア細胞が生み出された。また、EB形成時に前脳形成に重要

なNogginまたは後方化因子であるレチノイン酸 (RA) を様々な濃度で作用させることにより、ニューロスフェアの形成効率を上昇させ、ES細胞由来NS/PCsの前後軸に沿った領域特異性を制御することができた。またニューロスフェア形成時に腹側化因子であるSonic hedgehog (Shh) や背側化因子であるWnt3aやBMP4を添加することで、背腹軸に沿った領域特異性を付与することができた。このような時間的・空間的特異性を制御したニューロスフェアからは、神経管前方腹側の前脳型コリン作動性ニューロンや、脊髄腹側より発生する運動ニューロンなど、様々な領域で生み出されるニューロンが誘導された。

そこで、これらのES細胞由来ニューロスフェアの*in vivo*における分化能を検討するため、EGFPで標識したES細胞から低濃度RAを用いてニューロスフェアを誘導し、野生型、および発症前(約90日)のALSモデルラット(mSOD1トランスジェニックラット)の腰髄に移植を行った。移植後それぞれ2週間、4週間で還流固定し、免疫染色法により解析したところ、ES細胞由来の細胞は脊髄内に生着し、NeuN陽性のニューロンに分化し、また、その一部はCholine acetyl transferase (ChAT) 陽性のコリン作動性ニューロンに分化していた。しかし、移植後の生存期間が短いため運動機能の改善を観察することはできなかった。

そこで、もうひとつの疾患モデルである脊髄損傷モデルマウスへの移植を行った。まず、生きたままで移植細胞を可視化するための*in vivo* imaging system (IVIS) を利用するために、改変型のluciferase (CBRLuc) と蛍光タンパク質のVenusを定常発現するES細胞株を樹立した(CAG-CBRLuc-IRES-Venus)。この細胞から低濃度RAを用いて、主にニューロンを生み出す一次ニューロスフェア、ニューロンおよびグリア細胞を生み出す二次ニューロスフェアを誘導し、脊髄損傷後9日目のモデルマウスに移植を行い、手術後6週間までIVISによる解析、および運動機能評価(BBBスコア)を行い、組織学的評価を行った。その結果、ES細胞由来二次ニューロスフェアを移植した群では、一次ニューロスフェア移植群に比べて*in vivo*においてもグリア細胞への分化傾向が強く見られ、さらに、PBS注入群や一次ニューロスフェア移植群に対し、

運動機能の改善がみられた。これらの結果は、ES細胞由来NS/PCs、特に、そこから生み出されるグリア細胞が脊髄損傷の機能的な改善に対しpositiveな役割を果たしていると考えられた。

また、京都大学より分与されたヒトES細胞を用いて、マウスES細胞と同様に胚様体を介したニューロスフェア(神経系前駆細胞)の誘導系を作成した。このヒトES細胞由来ニューロスフェアは、継代して二次、三次以降のニューロスフェアを形成することができ、接着細胞で分化させると神経系の細胞(主にニューロン)を生み出した。

さらに、細胞移植治療における免疫学的拒絶反応や、ES細胞の持つ倫理的問題を回避するために、人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用い、この細胞からもES細胞とほぼ同様の条件でニューロスフェアの形成を行うことができた。やはり接着培養で分化させるとニューロンおよびグリア細胞が生み出されることを見出した。

今後は、さらにヒトES細胞やヒトiPS細胞への応用を行っていく予定である。

D. 考察

マウスES細胞から高率にニューロスフェアを誘導する培養法を作成した。この培養法では、種々の因子を培養中に添加することにより、時間的・空間的特異性を制御することができ、*in vivo*の中枢神経の発生をよく模倣していることから、中枢神経発生の*in vitro*モデルとして有用であると考えられた。さらに、これらの細胞を野生型及びALSモデルラットの腰髄に移植したところ、NeuN陽性、ChAT陽性のニューロンに分化し、*in vivo*における分化能も示された。さらにニューロンのみならずグリアを生み出すことのできる二次ニューロスフェアを脊髄損傷マウスに移植すると、コントロール群や、主にニューロンのみを生み出す一次ニューロスフェアを移植した群に比して運動機能の改善が見られた。これは、ES細胞由来NS/PCsの細胞移植が、神経系疾患において機能改善に寄与できることを示す結果であった。また、疾患や損傷における神経再生において、グリア細胞が特にその機能改善に大きな役割を果たしている可能性を示唆していた。

また、マウスiPS細胞やヒトES細胞からも*in*

*in vitro*におけるニューロスフェアの誘導を行っている。iPS細胞は、倫理的問題や免疫学的拒絶反応に対応するための、ヒトES細胞は将来の臨床応用のための重要なツールになると考えられる。

今後は、脊髄損傷マウスにおける機能改善のメカニズムを明らかにすると同時に、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からのニューロスフェアの培養法をさらに確立し、またそれらを用いた*in vivo*における実験も進めていく予定である。

E. 結論

マウスES細胞からNS/PCsを作成し、時間的・空間的特異性を制御できることを示した。このES細胞由来NS/PCsは*in vivo*でもコリン作動性ニューロンを含むニューロンに分化することができた。また、ES細胞由来二次ニューロスフェアを脊髄損傷マウスに移植したところ機能改善がみられた。さらにヒトES細胞からもNS/PCsを誘導する培養法を作成した。このような*in vitro*培養系は様々な疾患の病態解析、および薬剤スクリーニングなどを*in vitro*で行うためのモデルとして有用であるのみならず、再生医療における移植細胞のドナー細胞として期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 275 (1) :124-142, 2004
- 2) Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S.-i, Shimazaki T, Chino N, Okano H, and Okamoto H. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isll* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Developmental Biology* 278 (2) : 587-606. 2005
- 3) 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 (1) : 119-133. 2006

- 4) Tada H., Ishii S., Kimura H., Hattori H., Okada Y., Suzuki N., Okano HJ. Identification and evaluation of high-titer anti-Sox Group B antibody in limbic encephalitis *Inflammation and Regeneration* 27 (1) : 37-44. 2007

2. 学会発表

- 1) 岡田洋平, 松本有史, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之, ES細胞由来神経系前駆細胞の時間的・空間的特異性制御: マウスES細胞から運動ニューロンへの分化誘導, 幹細胞シンポジウム, 淡路島, 2005年4月
- 2) 岡田洋平, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之, ES細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異性制御機構の解析, 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005年5月
- 3) 松本有史, 岡田洋平, 中村雅也, 糸山泰人, 岡野栄之, ALSモデルラットに対するマウスES細胞由来神経系前駆細胞移植の試み, 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005年5月
- 4) Yohei Okada, Arifumi Matsumoto, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Regeneration of Motor Neurons with embryonic stem cells, 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005年7月(シンポジウム)
- 5) 松本有史, 岡田洋平, 中村雅也, 糸山泰人, 岡野栄之, ALSモデルラットに対するES細胞由来神経系前駆細胞移植, 第28回日本神経科学大会, 横浜, 2005年7月
- 6) Yohei Okada, Arifumi Matsumoto, Takuya Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Regulation of spatio-temporal identities in ES cell-derived neural stem/progenitor cells, Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington DC, November 2005
- 7) 岡田洋平, 松本有史, 石井聖二, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之, ES細胞由来神経幹細胞の時間的・空間的特異性制御, 第28回日本分子生物学会, 福岡2005年12月
- 8) 石井聖二, 岡田洋平, 島崎琢也, 岡野栄之, ストローマ細胞の分泌因子がES細胞由来神経系前駆細胞に及ぼす効果, 第29回日本神経科学大会, 京都, 2006年7月
- 9) 岡田洋平, 松本有史, 石井聖二, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之, ES細胞由来神経幹細胞/前駆細胞の時間的・空間的特異性制御, 第28回日本炎症再生医学会, 東京, 2007年8月
- 10) 岡田洋平, 松本有史, 石井聖二, 島崎琢也, 祖父江元, 岡野栄之, ES細胞由来神経幹細胞/前駆細胞の時間的・空間的特異性制御, 第25回日本ヒト細胞学会, 東京, 2007年8月
- 11) Yohei Okada, Arifumi Matsumoto, Takuya

Shimazaki, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Four-dimensional recapitulation of developing central nervous system by ES cell-derived neural stem/progenitor cells. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting, San Diego, November 2007

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許取得(申請中)

- (1) 発明の名称: 胚性幹細胞からの神経幹細胞、運動ニューロンおよびGABA作動性ニューロンの製造法

発明者: 岡野栄之 島崎琢也

特許第3660601号

申請日: 2001.3.30 (2005.3.25登録)

PCT出願: PCT/JP01/08703

- (2) 発明の名称: 記憶障害治療剤

発明者: 岡野栄之 島崎琢也

長尾省吾 松本義人

出願番号: 特願2002-002433

申請日: 2002.1.11

PCT出願: 無し

- (3) 発明の名称: 記憶障害治療剤スクリーニング法

発明者: 岡野栄之 島崎琢也

長尾省吾 松本義人

出願番号: 特願2003-6298

申請日: 2003.1.14

PCT出願: 無し

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

孤発性ALS運動ニューロンにおけるAMPA受容体サブユニット GluR2のRNA編集異常の病因的意義に関する検討

分担研究者：郭 伸 (東京大学大学院医学系研究科神経内科学 准教授)

研究要旨：孤発性ALSの脊髄運動ニューロンに生じている、グルタミン酸受容体サブタイプAMPA受容体サブユニットであるGluR2のRNA編集異常が、1) 孤発性ALS運動ニューロンに特異的分子異常かどうか、2) 運動ニューロン死と関連するかどうか、を検討した。1) 孤発性ALS30例の剖検脊髄における検討で、この分子異常が全例に見られること、孤発性ALS以外の運動ニューロン疾患であるSOD1関連家族性ALS(ALS1)、SBMAの変性運動ニューロンにはこの分子異常が生じていないことを明らかにした。さらに、GluR2 Q/R部位のRNA編集を特異的に触媒する酵素adenosine deaminase acting on RNA type 2(ADAR2)のmRNA発現レベルが孤発性ALS前角で低下していることを示し、ADAR2活性低下がこの分子異常の原因であることを明らかにした。2) ADAR2活性低下と運動ニューロン死の関係を検討するために、ADAR2のコンディショナルノックアウトマウスを作成した。このマウスは、緩徐進行性の運動機能低下を示し、生存期間も正常対照マウスより有意に短く、ALSに類似した臨床像を呈した。単一運動ニューロンの検討でADAR2を欠損した運動ニューロンはGluR2 Q/R部位のRNA編集を欠如するとともに緩徐進行性の細胞死に陥ることを示し、孤発性ALSに見られるADAR2 mRNA発現低下、GluR2 Q/R部位のRNA編集異常が運動ニューロン死の直接原因であることを明らかにし、この変異マウスの孤発性ALSモデル動物としての妥当性を検討した。

A. 研究目的

孤発性ALSの脊髄運動ニューロンに発現するAMPA受容体サブユニットのGluR2は、Q/R部位がRNA編集されていない未編集型GluR2(Q)が増加している(1)。この分子変化が、1) 他の運動ニューロン疾患を含めた神経変性疾患には見られない孤発性ALSに疾患特異的な分子変化であること、2) RNA編集酵素ADAR2活性低下に依ること、3) 運動ニューロン死に直接関わる分子変化であること、を明らかにし、孤発性ALSのモデル動物の開発を目指す。

B. 研究方法

様々な表現型を持つ孤発性ALS30例剖検脊髄、脳組織、laser microdissectorで切り出した単一運動ニューロン組織につき、GluR2、ADAR2 mRNAの定量、GluR2 Q/R部位その他のA-to-I編集部位の測定を行った。球脊髄性筋萎縮症(SBMA)3例、ヒト変異SOD1遺伝子導入ラッ

ト(G93A, H46R何れも発症例各3例及びそのlittermate各3例)脊髄よりlaser microdissectorで切り出した単一運動ニューロン組織につきGluR2 Q/R部位の編集率を測定した。

Cre-loxP系を用いてADAR2の運動ニューロン選択的コンディショナルノックアウトマウスを作成した。すなわち、ADAR2の活性基であるdeaminase domainを2個のLoxPで挟んだ変異アリルをホモに持つマウス(ADAR2^{lox/lox})を作成し、運動ニューロン選択的にCre recombinaseを発現する2系統の変異マウス(VAChT-Cre.Fast および-Cre.Slow)(6)との交配により、ADAR2^{lox/lox}/VAChT-Cre.Fast(Fast)と-Cre.Slow(Slow)マウスを作製した。ADAR2^{lox}遺伝子の組み替えの有無をin situ hybridization法、PCR法を用いて検討し、運動機能をロータロッド、上肢牽引力により判定した。抗リン酸化ニューロフィラメント抗体(SMI32)、抗ADAR2抗体の二重染色を用いた免疫組織化学により運動

ニューロン数の経時的変化を計測した。対照として、VACHT-Cre およびADAR2^{flax/flax}マウスを用いた。

[倫理面への配慮]

実験方法については東京大学医学部研究倫理委員会の承認を得、動物実験倫理規範に基づいて行った。

C. 研究結果

- 1) 孤発性ALSの脊髄前角組織では表現型の如何に関わらず、30例全例でGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常が認められ、対照例運動ニューロンでは例外なく編集率100%であったことと強い相違が見られた。SBMA症例、変異ヒトSOD1遺伝子導入ラットおよびそのLittermateの運動ニューロンでは何れも編集異常は見られなかった。
- 2) 孤発性ALS脊髄前角ではADAR2 mRNAの発現量が正常対照の1/3に低下していたが、脊髄後角、白質では対照と有意差がなかった。
- 3) コンディショナルノックアウトマウスは、予測通りCre依存性にADAR2遺伝子のノックアウトが生じ、GluR2 Q/R 部位のRNA編集が欠如することを確認した。緩徐進行性の運動機能障害、生存期間短縮がみられ、ADAR2抗体陰性運動ニューロンのみに緩徐進行性の変性脱落が見られた。

D. 考 察

孤発性ALS運動ニューロンに見られるGluR2 Q/R 部位のRNA編集異常は極めて疾患特異性の高い分子異常であり、RNA編集酵素ADAR2の活性低下によりもたらされることが明らかになった。ADAR2のノックアウトマウスにより、ADAR2欠損が緩徐進行性の運動ニューロン死を引き起こすことが明らかになり、上記の分子変化は孤発性ALSの運動ニューロン死を引き起こす疾患特異的分子変化であることが明らかになった。この変異マウスは孤発性ALSのモデル動物と考えられ、病因解明、治療法開発に役立つと期待される。

E. 結 論

孤発性ALSの運動ニューロン死は、疾患特異

的な分子異常であるADAR2活性低下、GluR2 Q/R 部位のRNA編集異常により引き起こされることが明らかになり、この分子異常を正常化することに依る治療法開発の目処が立った。

- 1) Kawahara Y, et al. : Nature 427: 801. 2004
- 2) Kawahara Y, et al. : Neurosci Res 54: 11-14. 2005
- 3) Kwak S, Weiss JH. : Curr Opin Neurobiol. 16: 281-7. 2006
- 4) 郭 伸ら : 厚労省変性班報告書. 2007
- 5) Higuchi, M. et al. : Nature 406, 78-81, 2000
- 6) Misawa, H. et al. : Genesis 37, 44-50, 2003

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawahara Y, Ito K, Ito M, Tsuji S, Kwak S: Novel splice variants of human ADAR2 mRNA: skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites, *Gene* 363:193-201, 2005
- 2) Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, Kwak S: Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death inducing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in ALS1 or SBMA. *Neurosci Res* 54:11-20, 2006.
- 3) Kwak S, Kawahara Y: Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in ALS, *J Mol Med* 83:110-120, 2005
- 4) Kawahara Y, Kwak S: Excitotoxicity and ALS: what is unique about the AMPA receptors expressed on spinal motor neurons? *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 6:131-144, 2005
- 5) Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S: Expression profile of AMPA receptor subunit mRNA in single adult rat brain and spinal cord neurons in situ, *Neurosci Res* 52:228-234, 2005.
- 6) Kwak S, Weiss JH: Calcium permeable AMPA channel in neurodegenerative disease and ischemia. *Current Opinion Neurobiology* 16:281-287, 2006
- 7) Kawahara Y, Sun H, Ito K, Hideyama T, Aoki M, Sobue G, Tsuji S, Kwak S: Underediting of GluR2 mRNA, a neuronal death-causing molecular change in sporadic ALS, does not occur in motor neurons in SBMA patients or SOD1 transgenic rats. *Neurosci Res* 54:11-15, 2006

- | | |
|---|--|
| <p>8) Sun H, Kawahara Y, Ito K, Kanazawa I, Kwak S: Slow and selective death of spinal motor neurons in vivo by intrathecal infusion of kainic acid: implications for AMPA receptor-mediated excitotoxicity in ALS. <i>J Neurochem</i> 98:782-791, 2006.</p> <p>9) Hideyama T, Momose T, Shimizu J, Tsuji S, Kwak S: A PET study on the role of nigral lesions in parkinsonism in patients with ALS. <i>Arch Neurol</i> 63:1719-1722,2006.</p> <p>10) 日出山拓人, 郭 伸: 筋萎縮性側索硬化症のAMPA受容体仮説, Annual Review 2008 神経, 212-221, 2008.
他15編</p> | <p>1. 特許取得
なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|---|--|

2. 学会発表

- 1) Kawahara Y, Ito K, Ito M, Tsuji S, Kwak S: New alternative splicing sites of human ADAR2 mRNA: lack of the exon encoding the dsRNA-binding, and multiple C-terminal splice, *the Gordon Research Conference on RNA Editing*, Ventura, California, Jan 23-28, 2005.
- 2) Hideyama T, Kawahara Y, Ito K, Nishimoto Y, Tsuji S, Kwak S: Alteration of RNA editing enzyme expression in sporadic ALS. *The 16th International Symposium on MND/ALS*, Dublin, Des 8-10, 2005,
- 3) Hideyama T, Kawahara Y, Ito K, Nishimoto Y, Tsuji S, Kwak S: RNA editing in sporadic ALS and other motor neuron diseases. *The 17th International Symposium on MND/ALS*. Yokohama, 30 Nov-2 Des, 2006
- 4) Kwak S: ADAR2 underediting and death of motor neurons in ALS. *the Gordon Research Conference on RNA Editing*, Ventura, California, Jan 15-19, 2007
- 5) Hideyama T, et al: *17th Meeting of the European Neurological Society*, Rhodes, Jun 16-20, 2007
- 6) 郭 伸: 日本薬物動態学会ビジョン・シンポジウム「薬効・毒性・動態 個人間変動の新機軸: Inventions and Innovations in Interindividual Variability of Drug Efficacy, Toxicity and Disposition」、Tokyo, July 19-20, 2007
- 7) Kwak S: Japan-Korea Neuroscience Symposium “Cutting Edge of Neuroscience”, Yokohama, September 13, 2007
- 8) Yamashita T, et al, *37th Annual Meeting Society for Neuroscience*, San Diego, 3-7 November 2007, Abstr Neurosci 591.16, 2007
- 9) Hideyama T, et al, 18th ALS/MND International Symposium, Toronto, 2007年12月2日
他13編

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

ALSモデルマウス病因タンパク質凝集体による 軸索変性と酸化ストレスに関する研究

分担研究者：高橋 良輔 (京都大学医学部神経内科 教授)

研究要旨：ALSモデルマウスにおいて脊髄運動ニューロン軸索において病因タンパク質凝集体が軸索輸送関連分子を巻き込み、軸索輸送を障害する可能性を明らかにした。また、病因タンパク質の凝集増悪因子である酸化ストレスに対して、運動ニューロン軸索が脆弱であることを発見した。ALSに対する治療として、軸索輸送の正常化と抗酸化ストレス療法が相乗的に有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質の1つ変異型SOD1タンパク質は酸化ストレスによって構造変換の促進および凝集化が引き起こされることが知られている。変異型SOD1-TgマウスではSOD1凝集体が運動ニューロン軸索中にも検出されており、軸索部の酸化ストレス脆弱性と大きく関わっている可能性が考えられる。そこで、(1) SOD1変異による酸化ストレスによって軸索内に引き起こされる障害を理解するために、SOD1凝集体の軸索からの分離と解析を試みた。(2) また、酸化ストレス自体が成体体性運動ニューロンおよびその軸索を障害する可能性について検討した。

B. 研究方法

(1) 発症直後のSOD1^{G93A}-Tgマウス(7.5ヶ月齢)および同月齢のSOD1^{wt}-Tgマウスの脊髄腹側より白質を摘出し、0.25% NP-40を含むバッファーを用いて可溶化後、Nycodenz密度勾配遠心法によって分画した。得られた全分画に対してウェスタンブロットを行い、SOD1タンパク質の分布を比較・解析した。

(2) 細胞内における最大の活性酸素産生小器官であるミトコンドリアの活性酸素解毒酵素MnSOD1を、Cre-loxPシステムを用いて、成体マウス脊髄運動ニューロンでコンディショナルノックアウトを行い、成体脊髄運動ニューロンにおける活性酸素産生を増加させた。具体的

には、成体体性運動ニューロンでCreリコンビナーゼを発現するVChT-CreトランスジェニックマウスとMnSODのエクソンを挟む形でイントロン部分にloxP配列を有するfloxed MnSODマウスの交配実験を行った。なお、動物倫理面では動物の苦痛を軽減するよう、所定の「動物実験実施要領」に基づき配慮した。

C. 研究結果

(1) Nycodenz密度勾配遠心分画を抗SOD1抗体を用いてウェスタンブロットしたところ、SOD1^{G93A}-Tgマウスにおいてのみ、凝集して高密度となったSOD1が重い分画に検出された。また、このSOD1凝集体濃縮分画には3種類の軸索輸送関連分子が含まれていることがわかった。さらに、このうちの1種類については抗SOD1抗体を用いた免疫沈降によりSOD1とともに共沈すること、すなわち凝集化したSOD1タンパク質と(直接または間接的に)結合していることが明らかとなった。

(2) MnSODを成体体性運動ニューロンで機能欠損させると、活性酸素量は体性運動ニューロンで増大するが、酸化ストレスによる細胞障害は認めなかった。ただし、軸索切断処置を施すとMnSODコンディショナルノックアウトマウスでは体性運動ニューロン軸索変性が増悪し、軸索もしくは神経終末が酸化ストレスに脆弱であることが明らかになった。

E. 結 論

SOD1^{G93A}-Tgマウスの脊髄運動ニューロン軸索では、SOD1の凝集化に伴い特定の軸索輸送関連分子の巻き込みが起きていることが強く示唆された。このことは、酸化ストレスの増大→変異型SOD1の凝集化と軸索輸送分子の巻き込み→軸索輸送分子が担う担体輸送の障害、という軸索をターゲットとした新たな変異型SOD1毒性の可能性を提示している。また、変異型SOD1は酸化ストレスによって凝集化すること、酸化ストレスの産物であるSOD1凝集体は軸索内にも検出されていることから、軸索における酸化ストレスの役割をMnSODのコンディショナルノックアウトマウスの軸索切断実験を行い、検証した。結果として、体性運動ニューロン軸索の酸化ストレスへの脆弱性が明らかになった。

従って、変異型SOD1凝集体に結合している軸索輸送分子の本来の輸送担体が同定できれば、担体の神経終末もしくは筋肉細胞への補充療法により、軸索輸送が正常化し、運動ニューロン軸索変性の遅延をもたらすことができるかもしれない。本解析により補充すべき新たな標的分子への道筋が示されることを期待する。また軸索を標的とした抗酸化ストレス療法が可能になれば、軸索輸送正常化療法と相乗的治療効果が期待できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Misawa H., Nakata K., Matsuura J., Moriwaki Y., Kawashima K., Shimizu T., Shirasawa T., Takahashi R. Conditional knockout of Mn superoxide dismutase in postnatal motor neurons reveals resistance to mitochondrial generated superoxide radicals. *Neurobiology of Disease* 23, 169-177, 2006.

2. 学会発表

- 1) 舘野美成子, 井上真理子, 荒木敏之, 高橋良輔: SOD1構造異常体の毒性仮説: 軸索輸送障害への関与. 第28回日本神経科学大会, (2005), 横浜
- 2) 舘野美成子, 島崎由美子, 齋藤文典, 高橋

良輔, 荒木敏之: 変異型SOD1タンパクによる軸索輸送障害機構. 第29回日本神経科学大会, (2006), 京都

- 3) Minako Tateno, Ryosuke Takahashi, and Toshiyuki Araki.: SOD1 aggregates within motoneuronal axons do not associate with mitochondria. *The 17th International symposium on ALS/MND*, 2006, Yokohama

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

とくに予定はない。

オートファジーによる運動ニューロン疾患の治療法の開発

分担研究者：田中 啓二 (東京都臨床医学総合研究所 所長代行)

研究要旨：オートファジー(自食作用：self-eating)は、ダイナミックな膜形成によって細胞質成分を隔離した後、生じた小胞(オートファゴソーム)がリソソームと融合することによって取り込んだ内容物を消化(分解)する真核生物に保存されたバルク(大雑把)な蛋白質分解システムである。我々は2005年に条件的にオートファジーが不能となるcKOマウス($Atg7^{Flox/Flox}$)を作製することに世界で初めて成功した。2006年この変異マウスとNestin-Creのトランスジェニック(Tg)マウスを交配し、中枢神経系特異的にオートファジーを欠損させた $Atg7^{Flox/Flox};Nes$ を作製したところ、このニューロン特異的オートファジー不能マウスは反射異常、協調運動障害などの神経変性疾患様症状を示した。驚いたことに、その神経細胞内には加齢と共にユビキチン陽性の蛋白質凝集体(封入体)が蓄積すること、大脳皮質、海馬、小脳顆粒層など広範囲において神経細胞死が観察された。この封入体の形成は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を含む様々な神経変性疾患の発症と密接に関係していることが報告されているが、その形成機構は長い間謎であった。2007年、我々は封入体の形成に関与する新規分子としてp62モレキュルを同定し、封入体形成の分子機構とその意義の解明に成功した。

A. 研究目的

過去四半世紀以上に亘って我々は、ユビキチンをパートナーとする巨大で複雑な蛋白質分解装置であるプロテアソームについて構造・機能・生理・病態などについて包括的な研究を進め、当該分野の世界の研究を牽引してきた。特に最近では、蛋白質の品質管理に関与するユビキチンリガーゼ(連結酵素)としてParkin(常染色体劣性若年性パーキンソン症候群の責任遺伝子産物)、CHIP(分子シャペロン依存性リガーゼ)、Dorfin(ALS患者に見られる変異SODを標的とするリガーゼ)、SCF^{Fbs}(糖鎖を識別しERADに関与するリガーゼ)等の研究を進めてきた。これらの研究を通して我々は、細胞内での蛋白質の品質管理(不良品の選択的除去)の主役を果たしているユビキチン・プロテアソームシステムの破綻(機能減弱)が神経細胞死引いては神経変性を誘導する可能性を示唆してきた。

他方最近、我々は細胞内の不良品を破壊処理するもう一つの蛋白質分解システムとしてオートファジー(自食作用)・リソソーム系システム(主な機能は栄養飢餓に応答して栄養素確保のために自己成分を消化することであり、究極の

生存戦略と見なされている)にも注目してきた。その大きな理由は、オートファゴソームの異常形態を示す病理組織学的知見が神経変性疾患の患者の脳において多数報告されているからであった。そして2005年、我々は発生工学的手法を用いて条件的にオートファジーが不能にすることができるcKO (conditional knockout) マウス($Atg7^{Flox/Flox}$)を作製し、肝臓におけるオートファジー不能マウスが栄養飢餓時の蛋白質分解阻害のみならず定常(富栄養)状態においてもユビキチン陽性封入体や異常オルガネラの蓄積を引き起こすことを明らかにした。2006年にはさらに、この $Atg7^{Flox/Flox}$ マウスをNestin-Cre(ニューロンの幹細胞で発現しているNestinのプロモーターにCre-recombinaseを連結・導入した)トランスジェニックマウスと交配し、中枢神経系の細胞でオートファジーが不能となるマウス($Atg7^{Flox/Flox};Nes$)を作製することに成功した。この変異マウスを用いて中枢神経系におけるオートファジーの役割について蛋白質の品質管理に注目して解析した結果、飢餓に応答する誘導的なオートファジーとは異なった日々低いレベルで恒常的に起こっているオートファジー(恒常的オー

トファジーと命名)の破綻が神経変性疾患を引き起こすことを見出した。これまでは神経細胞死(神経変性疾患)を誘発するためには、アミロイド様の異常凝集する変異蛋白質(アルツハイマー病におけるタウ蛋白質、パーキンソン病における α シヌクレイン、ALSにおける変異SODなど)が存在して、それらが毒性効果を発揮すると考えられていたので、異常な原因物質が無くともオートファジー依存的な蛋白質分解系活性の減弱喪失によって神経変性が誘発されることは、予想外の発見であり世界を吃驚させた。しかもさらに驚いたことにオートファジー不能ニューロンにはユビキチン陽性蛋白質凝集体(封入体)が観察された。これまでユビキチンで分解シグナルを付与された蛋白質はプロテアソームで選択的に分解されると考えられていたので、この概念に大きな変更を迫る発見であった。即ち、ユビキチン化蛋白質がプロテアソームとオートファジーの二つの分解系で処理されることが判明したのである。

この結果は、オートファジーが選択的にユビキチン化した蛋白質を飲み込んで分解している可能性を示唆しており、選択的オートファジー(Selective Autophagy)の存在が現実のものとなってきた。しかし、選択的オートファジーの機構およびその破綻が封入体を形成する機構は、全く不明であった。2007年、我々は選択的オートファジーと封入体形成において中心的な役割を担う分子としてp62/Sqstm1という蛋白質を突き止めた。

本報告書は、高等動物(主としてマウス)におけるオートファジーの遺伝学的解析を中心とした2005-2007年の3年間における研究成果を総括する。

B. 研究方法

「条件付きオートファジー不能マウス($Atg7^{Flox/Flox}$)の作製」

ターゲティングベクターの作製とES細胞のスクリーニングは、既知の方法に準じて行った。ノックアウトES細胞をマウス8細胞期胚にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に移植、得られたヘテロウマスがジャームラインに入っていることをPCRおよびサザンブローディングにより確認した。最終的にヘテロウマスを交配

して条件的 $Atg7$ (モディファイヤー分子である $Atg8$ 及び $Atg12$ の共通の活性化酵素E1)欠損ホモマウス($Atg7^{Flox/Flox}$)を作製した。

「肝細胞特異的オートファジー不能マウス($Atg7^{Flox/Flox}; Mx1$)/($Atg7^{Flox/Flox}; Alb$)の作製」

$Atg7^{Flox/Flox}$ マウスとMx1トランスジェニックマウス(肝臓でインターフェロン γ 依存的に発現するMx1遺伝子あるいはアルブミン(Alb)遺伝子のプロモーターにCreリコンビナーゼを連結して作製したTgマウス)を交配し、肝細胞でオートファジーが不能となるマウス($Atg7^{Flox/Flox}; Mx1$)・($Atg7^{Flox/Flox}; Alb$)を作製した。

「中枢神経系特異的オートファジー不能マウス($Atg7^{Flox/Flox}; Nes$)の作製」

$Atg7^{Flox/Flox}$ マウスとNestin-Creトランスジェニックマウス(ニューロンで特異的に発現しているNestinのプロモーターにCreリコンビナーゼを連結して作製したTgマウス)を交配し、中枢神経(CNS:central nervous system)でオートファジーが不能となるマウス($Atg7^{Flox/Flox}; Nes$)を作製した。

「p62のノックアウトマウスの作製」

p62/Sqstm1ノックアウトマウス(p62^{-/-}マウス)は、筑波大学大学院人間総合科学研究科の石井哲郎博士から供与された。

「 $Atg7$ ・p62のダブルノックアウトマウス」

上記の中枢神経系オートファジー不能マウス($Atg7^{Flox/Flox}; Nes$ マウス)とp62^{-/-}マウスを交配して作製した。

「プルキンエ細胞(Purkinje cell)特異的オートファジー不能マウス($Atg7^{Flox/Flox}; pcp2$)の作製」

$Atg7^{Flox/Flox}$ マウスとpcp2トランスジェニックマウス(プルキンエ細胞で特異的に発現しているpcp2のプロモーターにCreリコンビナーゼを連結して作製したTgマウス)を交配し、プルキンエ細胞でオートファジーが不能となるマウス($Atg7^{Flox/Flox}; pcp2$)を作製した。

「組織化学的及び免疫組織化学染色解析」

$Atg7^{Flox/Flox}; Nes$ と野性型マウスの脳を4%

paraformaldehyde-4% sucroseを含む0.1 Mリン酸バッファー溶液で還流固定した。さらに標準光学顕微鏡による組織化学的解析には、2% paraformaldehyde-2% glutaraldehydeを含む0.1 Mリン酸バッファー溶液、免疫組織化学染色解析には4% paraformaldehyde-0.1% glutaraldehydeを含む0.1 Mリン酸バッファー溶液で固定した。

光学顕微鏡解析は、脳の10- μ m cryosections (凍結切片)をMeyer's hematoxylin and eosin (H&E)で染色した。免疫組織化学染色解析は、anti-human neuronal nuclei (NeuN: Abcam, Cambridge, UK)、anti-glial fibrillary acid protein (GFAP: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、anti-calbindin (Sigma)、anti-myelin basic protein (MBP MCA409S: Serotec, Oxford, UK) and anti-ubiquitin (Dakocytomation)抗体を用いて行った。

TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) アッセイによる細胞死の検定は定法に従って行った。

「電子顕微鏡及び免疫電子顕微鏡」

マウス脳を2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehydeを含む0.1 Mリン酸バッファー溶液で還流固定した。さらに1% OsO₄で固定し、Epon812で包埋した後、超薄層切片を作製した。anti-ubiquitin (1B3) と colloidal gold conjugated secondary antibodyによる免疫金染色は、定法に従って行った。

〔倫理面への配慮〕

本年度の研究は、主としてマウスを用いたインビトロの実験系で行ったので、倫理面への配慮は不要であった。

C. 研究結果

【結果1】肝臓特異的オートファジー欠損マウスの解析：(Komatsu, M. et al. J. Cell Biol. 169, 425-34, 2005)

酵母などの下等単細胞生物においては、オートファジーは飢餓に応答した生存戦略が唯一の働きと考えられてきた。しかしながら、我々は条件付きにオートファジーが不能となるマウス (Atg7^{Flox/Flox}) を作出、肝臓におけるオートファジー不能マウスを作製するために Atg7^{Flox/Flox}: Mx1マウスの腹腔内に polyIpolyC (pIpC: 自

然免疫系を刺激してインターフェロン γ を強く誘導する核酸)を注入してAtg7を欠損させた。Atg7の消失即ちオートファジーの欠損に従って、著名な肝肥大(肝湿重量が5-6倍に増加)・肝細胞死(空砲の出現とTUNEL陽性反応が観察)・肝障害(血清中に肝マーカー酵素群が著名に出現: 肝炎)が観察された。また肝細胞を組織化学的に観察すると、異常なミトコンドリア・ペルオキシソーム・小胞体像が頻りに観察され、これらのオルガネラが恒常的にオートファジーによって代謝されていることが初めて判明した。さらに驚いたことに、肝細胞内にはユビキチン陽性蛋白質凝集体(封入体)が光学顕微鏡・電子顕微鏡を用いた免疫組織化学的手法で観察された。同様な結果は、(Atg7^{Flox/Flox}: Alb)を用いて肝臓特異的にオートファジーを欠損させたマウス肝臓の解析からも得られた(小松ら、未発表)。これまでユビキチンで分解シグナルを付与された蛋白質はプロテアソームで選択的に分解されると考えられていたので、この概念に大きな変更を迫る発見であった。

【結果2】脳(中枢神経系ニューロン)特異的オートファジー欠損マウスの解析：(Komatsu, M. et al. Nature 441, 880-884, 2006)

脳特異的オートファジー欠損マウスを作製したところ、そのマウスは反射異常、協調運動障害などの神経変性疾患様症状を示し、その神経細胞内には加齢と共にユビキチン陽性封入体が蓄積すること、大脳皮質、海馬、小脳顆粒層において神経細胞死が起こることを見いだした。これらのことは、オートファジーは栄養状態が十分に供給された状況にあっても恒常的に活動し蛋白質の代謝回転を担うこと、その破綻は神経変性疾患を引き起こすことを示している。

【結果3】オートファジー欠損による封入体形成の分子機構：(Komatsu, M. et al. Cell 131, 1149-1163, 2007)

我々は超高感度プロテオミクス法により、オートファジーにより選択的に分解される分子p62を同定した。この分子はC末端ubiquitin-associated domainを介してユビキチン鎖と結合する。興味深いことに、この蛋白質はアルコール

ル性肝炎やパーキンソン病、ALSなどの神経変性疾患の細胞内において検出される封入体の主要構成分子である。オートファジー不能細胞において、p62は異常蓄積しp62-ユビキチン陽性の封入体を形成した。驚いたことに、Atg7/p62ダブルノックアウトマウスにおいて封入体形成はほぼ完全に抑制された。このことは、オートファジーによるp62を介したユビキチン化蛋白質の分解が封入体形成を抑制することを強く示唆している。言い換えれば、p62はオートファジーの(そしておそらく他の蛋白質分解システムの)破綻によって生じる封入体形成に必須な分子であることが判明したことになり、長い間謎であった細胞内におけるユビキチン陽性封入体形成の分子機構が解明された。

この結果から、細胞内に発生した異常蛋白質の処理においては、これまで知られていた分子シャペロンによる再生、プロテアソームやオートファジーによる分解(クリアランス・細胞内浄化)という手段以外に、p62依存的に凝集体(封入体)を形成して隔離することが重要な戦略の一つであることが示唆された。即ち、異常に蓄積したユビキチン化蛋白質が再生や分解できない場合(あるいはそれらの蓄積が過剰になった場合)、それら自身には凝集する能力はないが、p62のC末端側・UBAドメインに会合し、p62の自己凝集能(N末端側のPB1ドメイン)を利用して封入体を形成すると推定できる。これは、障害性蛋白質を封入体の中に隔離することによって細胞の恒常性を維持監視する細胞内の品質管理手段と考えられる。

しかし、この方法は危険なシステムであり、封入体を形成する前段階のアミロイド(変性蛋白質のオリゴマー)状態は強い細胞毒性を発揮する。このために封入体形成が適切におこなわれないと、アミロイド様蛋白質が主因となって肝実質細胞やニューロンなどの非分裂細胞を激しく傷害し、組織変性を誘発すると考えられる。実際、オートファジー欠損マウスのように急激な蛋白質のクリアランス異常は、p62経路による封入体形成が間に合わず障害性異常蛋白質の蓄積を引き起こし、細胞死を誘発すると考えられる。p62が存在しない場合、アミロイド様蛋白質の蓄積を免れて一見正常な表現型を示す。しかしながら、この便宜的な手段では恒久的な

細胞保護には適応できず、実際に神経疾患のように長期間の後にこれらのクリアランス異常が蓄積すると、不可逆的な細胞死ひいては組織変性を誘発すると想定される。

【結果4】 オートファジー欠損による神経細胞死の分子機構：(Komatsu, M. et al. Proc Natl Acad Sci USA 104, 14489-14494, 2007)

一方、細胞内のオルガネラの異常は**【結果3】**で見出したp62による異常蛋白質の隔離(蛋白質の品質管理)戦略によって回避できず、オートファジーが欠陥するとその恒常性が維持できずに不可逆的に細胞傷害を導くことから、恒常的オートファジーによるオルガネラの制御は細胞の機能維持に必須である。

実際、我々はロックフェラー大学のYue博士との共同研究により、軸索内のオートファジー(Axonal Autophagy)の存在を見だし、オートファジーによるオルガネラ代謝の重要性を小脳プルキンエ細胞特異的Atg7欠損マウスの解析により明らかにした。同時に、この結果はオートファジー欠損によって起きる神経細胞死が、グリア細胞などの周辺の非ニューロン細胞に影響されずに、自律的な死(Cell Autonomous Death)であることを明らかにした。

D. 考 察

過去十年程度以前から、蛋白質の品質管理とニューロン死の関係が注目を浴びてきた。しかし、そのほとんどは、ユビキチン・プロテアソーム系に関する研究であった。我々は初めて、オートファジーの欠失で神経変性疾患になることを証明した。神経変性疾患との関連で考えると、これまで家族性疾病で、責任遺伝子産物の異常凝集がニューロン死の引き金になることが多くの場合に報告されてきた。例えば、アルツハイマー病におけるtau蛋白質、パーキンソン病における α シヌクレイン、ハンチントン舞踏病におけるハンチンチン、そしてALSにおけるSOD1等である。しかし、これらの蛋白質の変異による異常構造、ひいては凝集体の形成がなくても、オートファジーという蛋白質分解系の機能喪失のみによって神経変性が誘導されることは、画期的な発見であり、今後の神経変性疾患の予防・治療法の開発にいて新戦略が期待で

きる。

しかし、最大の問題はオートファジーの欠損でなぜユビキチン化蛋白質が大量に蓄積するかということである。今回我々は、超高感度プロテオミクス法により、LC3と相互作用する分子としてp62を同定した。p62はPhox and Bem1p (PB1)ドメイン、ジンクフィンガードメイン、ubiquitin-associated domain (UBA)を介してユビキチン鎖を含む多様な分子群と相互作用することができる。興味深いことに、このタンパク質はアルコール性肝炎やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の細胞内において検出される封入体の主要構成分子の一つである。興味深いことにp62はPB1ドメインを介して自発的にオリゴマーを形成する性質を有し、その結果、細胞内で量が増加すれば不溶性の凝集を引き起こすタンパク質である。実際、オートファジー不能肝細胞やオートファジー不能神経細胞において、p62は異常蓄積しp62-ユビキチン陽性の封入体を形成した。

我々は遺伝学的解析から、p62の封入体形成に関する役割を検討し、p62がユビキチン化したタンパク質を選択的にオートファゴソームに輸送させる可能性を示唆した。さらにAtg7・p62のダブルノックアウトマウスの解析から、我々はp62がオートファジーの欠損によるユビキチン化タンパク質の凝集体形成を引き起こす中心的な分子である可能性を示唆した。一方、p62は、TNF α やIL-1/RANKシグナル伝達をRIP1やTRAF6などと相互作用することで調節すると考えられる。実際、p62ノックアウトマウスは、RANK刺激による破骨に異常を示すこと、ERKシグナル異常による過剰脂肪分化により遅発性の肥満・糖尿病を引き起こす。これらの多様な表現型は、p62が自身の異なったドメインを介して多くのタンパク質と相互作用することができることを反映していると思われる。このようにp62は多機能タンパク質として多面的な生理機能を担うことができると思われるが、その詳細な分子機構は依然として不明である。

一方p62が選択的オートファジーに貢献する特異な分子であるとしても、p62依存的な選択的オートファジーとランダムにおこる非選択的オートファジーの度合いや各々の逸脱が神経変性疾患の発症における貢献度などについては、

今後のさらなる検証が必要である。

E. 結論

- 1) 中枢神経系でオートファジーを欠損させると非分裂細胞であるニューロンの変性が誘発され神経変性疾患を発症する。
- 2) オートファジーの欠損ニューロンでは、ユビキチン化蛋白質が異常に蓄積する。
- 3) オートファゴソームの形成に関わるLC3と相互作用する分子としてp62を同定した。p62はユビキチン化蛋白質と相互作用できるUBAドメインをC-末端に持っていることとN-末端側のPB1ドメインに余って自己凝集できる能力を持っていることでユニーク分子である。
- 4) p62は、オートファジー経路で分解されることから、ユビキチン化蛋白質をオートファゴソームに運搬するシャトリング機能を有すると推定された。
- 5) p62欠損マウスニューロンでは、オートファジーの欠損で観察されるユビキチン化蛋白質(封入体)の形成が完全に抑制された。この結果は、p62が封入体形成のキープレイヤーであることを示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida, Y., Fukiya, K., Adachi, E., Iwai, K., and Tanaka, K. (2005) Glycoprotein-specific ubiquitin-ligases recognize N-glycans in unfolded substrates. *EMBO Rep.* 6. 239-244.
- 2) Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, E., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Chiba, T. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169, 425-434.
- 3) Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, and Takashima, A. (2005) In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J. Neurochem.* 94, 1254-1263
- 4) Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005) A heterodimeric

- complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes, *Nature* 437, 1381-1385.
- 5) Sato, S., Chiba, T., Sakata, E., Kato, K., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006) 14-3-3 η is a novel regulator of parkin ubiquitin-ligase. *EMBO J.* 25, 211-221.
 - 6) Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006) Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyzes multiple mono-ubiquitylation in vitro. *J. Biol. Chem.* 281, 3204-3209.
 - 7) Kumanomidou, T., Mizushima, T., Komatsu, M., Suzuki, A., Tanida, I., Sou, Y., Ueno, T., Kominami, E., Tanaka, K., and Yamane, T. (2006) The crystal structure of human Atg4b, a processing and deconjugating enzyme for autophagosome-forming modifiers. *J. Mol. Biol.* 355, 612-618.
 - 8) Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., and Kominami, K. (2006) Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J. Biol. Chem.* 281, 4035-4041.
 - 9) Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. *Nature* 441, 880-884
 - 10) Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Tanaka, K., and Hattori, N. (2006) Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice revealed by ex vivo autoradiography. *J. Neurosci, Res.* 84, 1350-1357.
 - 11) Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S. (2006) A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. *EMBO J.* 25, 4524-4536.
 - 12) Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Natsume, T., Kasahara, M., Tanaka, K., and Murata, S. (2006) Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* 24, 977-984
 - 13) Sakata, E., Yamaguchi, Y., Miyauchi, Y., Iwai, K., Chiba, T., Saeki, Y., Matsuda, N., Tanaka, K., and Kato, K. (2007) Direct interactions between Nedd8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes contribute to up-regulation of cullin-based E3 ligase activity. *Nature Struct. Mol. Biol.* 14, 167-168
 - 14) Yoshida, Y., Murakami, A., Iwai, K., and Tanaka, K., (2007) A Neural-specific F-box protein Fbs1 functions as a chaperone suppressing glycoprotein aggregation. *J. Biol. Chem.* 282, 7137-7144.
 - 15) Mizushima, T., Yoshida, Y., Kumanomidou, T., Hasegawa, Y., Suzuki, A., Yamane, T., and Tanaka, K. (2007) Structural basis for selection of glycosylated substrate by SCF^{Fbs1} ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 5777-5781
 - 16) Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2007) Regulation of CD8⁺ T cell Development by Thymus-specific Proteasomes. *Science* 316, 1349-1353.
 - 17) Komatsu M., Wang QJ., Holstein GR., Friedrich VL., Iwata JI., Kominami E., Chait BT., Tanaka K., Yue Z. (2007) Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 14489-14494
 - 18) Yao, I., Takagi, H., Ageta, H., Kahyo, T., Sato, S., Hatanaka, K., Fukuda, Y., Chiba, T., Morone, N., Yuasa, S., Inokuchi, K., Ohtsuka, T., MacGregor, GR, Tanaka, K., and Setou, M. (2007) SCRAPPER-dependent Ubiquitination Zone Protein RIM1 Regulates Release. *Cell* 130, 943-957
 - 19) Hamazaki J., Sasaki, K., Kawahara, H., Hisanaga, S., Tanaka, K., and Murata, M. (2007) Rpn10-mediated degradation of ubiquitinated proteins is essential for mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6629-6638.
 - 20) Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, N., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131, 1149-1163.
 - 21) Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W.G., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J. L., Withoff, S., Green, D. R. (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450, 1253-1257
 - 22) Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., and Uchiyama, Y. (2008) Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal

- Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury. *Am. J. Pathol.* 172, 454-469.
- 23) Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Suzuki, A., Yuko Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., and Tanaka, K. (2008) Crystal Structure of a Chaperone Complex that Contributes to the Assembly of Yeast 20S Proteasomes. *Nature Struct. Mol. Biol.* (in press)
 - 24) Komatsu, M., Kominami, E., and Tanaka K. (2006) Autophagy and neurodegeneration. *Autophagy*, 2, 315-317.
 - 25) Komatsu, M., Ueno, T., Waguri, S., Uchiyama, Y., Kominami, E., and Tanaka, K. (2007) Constitutive autophagy: Vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death and Different* 14, 887-894
 - 26) Saeki, Y, and Tanaka, K. (2007) Unlocking the proteasome door. *Mol Cell*, 27, 865-867.
 - 27) Murata, S., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2007) Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Current Opinion in Immunology* in press.
 - 28) Takahama, Y., Tanaka, K., and Murata, S. (2007) Modest cortex and promiscuous medulla for thymic repertoire formation. *Trends in Immunology* in press.
2. 学会発表
- 1) Keiji Tanaka : Cellular Apparatus for Proteolysis in Eukaryotes. Large-scale Analysis of Cellular Function -Advanced Technology for Proteomic Biology- January 27-28, 2005 Tokyo, Japan
 - 2) Keiji Tanaka : Recognition of Glycosylated Substrates by SCF^{Fbs} Ubiquitin Ligases. Keystone Symposium "Ubiquitin and Signaling" February 22-27, 2005, Taos Convention Center in Taos, New Mexico, USA
 - 3) Keiji Tanaka : Structure, Function, and Assembly of Mammalian Proteasomes. The 6th Workshop on Proteasomes. April 24-26, 2005, Clermont-Ferrand (France)
 - 4) Keiji Tanaka : Uncovering the mystery of the ubiquitin-proteasome system . The 17th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (plenary lecture) October 17-18, 2005. Seoul, Korea
 - 5) Keiji Tanaka : A multistep-ordered Mechanism for the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . International Symposium on "Life of Proteins" AWAJI YUMEBUTAI (October 30-November 3, 2005. Awaji
 - 6) Keiji Tanaka : Molecular Mechanism of the Assembly of Mammalian Proteasomes. The 21 era COE Program of Osaka University. Symposium [Dynamics of Biological Systems] (January 12-13 2006) Osaka, Japan.
 - 7) Keiji Tanaka : Ablation of autophagy causes neurodegeneration . The Movement Disorder Society' s (MDS) 10th International Congress of Parkinson' s Disease and Movement Disorders (November 1, 2006) , Kyoto, Japan.
 - 8) Keiji Tanaka, Yuko Hirano, and Shigeo Murata : Multiple Chaperones Assist the Assembly of Mammalian 20S Proteasomes . The Fourth NIBB-EMBL Symposium "Biology of Protein Conjugation: Structure and Function" . Okazaki Conference Center, Aichi, Japan (October 3-5, 2006) , Okazaki, Japan.
 - 9) Shigeo Murata, Yuko Hirano, Klavs B. Hendil, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Keiji Tanaka ; Molecular assembly of mammalian 20S proteasomes ; 20th IUBMB (June 23, 2006) Kyoto, Japan.
 - 10) Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu : Protein Quality Control by Constitutive Autophag. The Ubiquitin Family (CSHS Symposium) : Quality Control. April 25 - 29, 2007, New York, USA.
 - 11) Keiji Tanaka and Shigeo Murata : Discovery of thymus-specific proteasomes "thymoproteasomes" that regulate the development of CD8+T cells. COE INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2007 Inamori / Yamauchi Hall, Kyoto University. Friday, June 1st -2nd 2007, Kyoto, Japan
 - 12) Keiji Tanaka : Discovery of Thymoproteasomes - Implication for Thymic Selection - 2007 Korea-Japan Joint Symposium in Seoul (September 5th) Seoul, Korea
 - 13) Keiji Tanaka, and Shigeo Murata : Regulation of Thymic Selection by the Thymus-specific Proteasome " Thymoproteasome" EMBO CONFERENCE / Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Cellular Regulation September 22nd to 26th, 2007, Riva Del Garda, Italy
 - 14) Keiji Tanaka and Masaaki Komatsu Pathophysiology of Constitutive Autophagy. The 20th Naito Conference / Innate Immunity in Medicine and Biology [III] (October 10 - 12, 2007) 湘南国際村センター, 神奈川
 - 15) Keiji Tanaka: Discovery of Thymus-specific Proteasomes " Thymoproteasome" that regulate the Development of CD8+ T Cells. International Symposium on Protein Modification and Degradation in Beijing, SPMD 2007 (Beijing Friendship Hotel, Nov. 4-7, 2007) Beijing, China

G. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ALS 遺伝子治療のための AAV ベクターの開発、 特性および脳内投与における安全性

分担研究者：中野 今治（自治医科大学内科学講座神経内科部門 教授）
研究協力者：村松 慎一¹⁾，小澤 敬也²⁾

¹⁾自治医科大学神経内科，²⁾同 遺伝子治療部門

研究要旨：我々はアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の遺伝子治療を目指している。この3年間は、筋・中枢神経内注入のための AAV ベクターの開発、改良および脳内注入での安全性を検討した。

- 1) 8型 AAV (AAV8) ベクター：このベクターの使用ではラットの海馬初代培養では神経細胞およびグリア細胞でマーカー遺伝子の発現が認められ、線条体への直接注入では広範な領域へ遺伝子導入できた。マウスの静脈内投与では、脳を含めて全身臓器へのベクターの拡散が認められた。今後、AAV8ベクターを応用する際には、組織特異的プロモーターの組み込みなどの工夫が必要であることがわかった。
- 2) 導入遺伝子の発現制御：導入した遺伝子の過剰発現を防ぐ安全機構として、誘導型 Cre recombinase (CreERT2) の発現を doxycycline によって制御する AAV ベクターを開発した。血液凝固第 IX 因子発現ベクターを使用して、このベクターによる発現制御が有効であることを確認した。
- 3) AAV ベクターの脳内注入の安全性：パーキンソン病の遺伝子治療として、実際に AAV ベクターを脳内に投与した2患者では、ベクターゲノムが術直後に一時的に血液中に検出されたが、2日目以降は全血・血清・尿のいずれも検出されず、血中中和抗体の上昇も見られなかった。また、マウス脳内に投与した AAV ベクターゲノムの染色体への組み込みは、LAM-PCR 法などでは検出されなかった。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する遺伝子治療として、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを利用して骨格筋に神経栄養因子 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の遺伝子を導入し、軸策を通して運ばれた GDNF により脊髄の運動神経細胞の脱落を抑制する方法を開発してきた。

この3年間では、AAV ベクターの基礎的研究に取り組み、1) 新しい血清型ベクター AAV8 に関する特性の研究、2) AAV ベクターを用いた導入遺伝子の発現制御研究、3) ヒト脳への注入に於ける安全性の検証、を行った。

B. 研究方法

- 1) AAV8 の特性研究：組織非特異的な CAG または EF1 プロモーターにより、マーカーとして LacZ、GFP、Luciferase のいずれかを発現する AAV8 ベクターを作製した。この AAV8 ベクターを、ラット胎仔 (E17) 海馬の初代培養細胞へ感染させ、遺伝子が導入された細胞を蛍光二重染色により同定した。また、ラットの線条体に定位脳手術的に AAV8 ベクター注入し、マウスの尾静脈への注入を行った。全身臓器におけるマーカー遺伝子の分布を PCR 法で検索するとともに遺伝子発現を組織学的に解析した。
- 2) 導入遺伝子発現制御：Cre recombinase とエ

ストロゲン受容体の変異型リガンド結合部位との融合蛋白CreERT2を、doxycycline (Dox) の存在下でのみ発現するAAVベクター(AAV-tet- CreERT2)を作製した。また、緑色蛍光蛋白質EGFPまたは血液凝固IX因子のいずれかのcDNAをloxP siteの間に挟み、IRES下流に赤色蛍光蛋白質DsRed2のcDNAを組み込んだAAVベクターを作製した。これらのAAVベクターを種々の組み合わせで293細胞に感染させ、tamoxifen (4-OHT)により遺伝子発現が調整可能かどうか検討した。

- 3) ヒト脳への注入に於ける安全性の検証：パーキンソン病 (PD) の遺伝子治療として、実際にAAVベクターをヒト脳内に投与した臨床症例について、ベクター投与後に全血・血清・尿などの体液中のベクターゲノムの有無をPCR法により経時的に評価した。(厚生労働省、文部科学省、環境省の認可を得ている)

C. 研究結果

- 1) AAV8の特性研究：ラット海馬の初代培養では、神経細胞とグリア細胞に遺伝子が導入された。線条体注入では、遺伝子発現は線条体の広範な領域の神経細胞とグリア細胞で見られたが、全身臓器へのベクター拡散は認められなかった。経静脈性注入では、肝臓への集積に加えて、脳を含む諸臓器でマーカー遺伝子の発現が認められた。遺伝子発現の強さは、導入4週間までに最大となりその後減弱した。
- 2) AAV-CreERT2を感染させた細胞では、Doxおよび4-OHTの両者の存在下でのみ、EGFPの緑色蛍光の代わりにDsRed2の赤色蛍光を発する細胞が大多数を占めるようになった。また、血液凝固IX因子の発現量は、Doxおよび4-OHTの両者の存在下でのみ減少した。
- 3) ヒト脳への注入に於ける安全性の検証：PD 2症例の両側被殻に総量 3×10^9 vector genomeの2型AAVベクターを定位脳手術的に注入した。術後連続3日間の全血・血清・尿のいずれにおいてもベクターゲノムは検出されなかった。また、AAVに対する中和抗体の有意な上昇を認めなかった。

D. 考察

- 1) AAV8ベクター：肝臓への集積傾向があるが、全身の骨格筋や脳への遺伝子導入用ベクターとして応用できる可能性がある。血液中への混入により全身臓器への拡散が生じるため、今後、神経細胞特異的プロモーターなどの組み込みが必要と考えられる。遺伝子発現はAAV2などの他の血清型に比べて、早期に最大となる特性があるが、機序は不明である。
- 2) 導入遺伝子の発現制御：多くの治療用遺伝子は過剰発現により有害となるため発現調整が重要である。ALSに対する骨格筋へのGDNF遺伝子導入についても、万一過剰となった際に確実に遺伝子発現を抑制できる安全機構を組み入れる必要がある。今回、経口投与可能な二種類の薬剤を応用した遺伝子発現機構を搭載したAAVベクターを開発した。これらのAAVベクターを応用することにより、ALSにおける臨床試験の早期開始が期待される。
- 3) ヒト脳投与での安全性：2007年7月に米国で、慢性関節リウマチの遺伝子治療としてAAV-TNF α :Fc遺伝子を関節内に注入して死亡した女性の死因はヒストプラズマ症であることが判明した。また、同じ頃、マウスの肝臓へのAAVベクターによる遺伝子導入で、肝細胞癌の発生頻度が高まることが報告されたが、非導入マウスでもその発生頻度が高いことから実験の妥当性に疑問が残る。今回、パーキンソン病の遺伝子治療として脳内に高力価のAAVベクターを投与した2症例では、ベクター投与による副作用は認めておらず、中和抗体の上昇もなかった。

E. 結論

AAVはALS遺伝子治療用ベクターとして安全であると思われる。ただ、万一過剰発現した場合発現調節機構の組み込みや、血清型によっては組織特異的発現機構の組み込みが必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
1) Muramatsu S, Tsukada H, Nakano I, Ozawa K.: Gene therapy for Parkinson's disease using

recombinant adeno-associated viral vectors. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5 (5):663-671, 2005.

- 2) Li XG, Okada T, Kodera M, Nara Y, Takino N, Muramatsu C, Ikeguchi K, Urano F, Ichinose H, Metzger D, Chambon P, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S: Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther*, 13 (1):160-166, 2006.
- 3) Ishikawa T, Morita M, Nakano I: Constant blood flow reduction in premotor frontal lobe regions in ALS with dementia –a SPECT study with 3D-SSP. *Acta Neurol Scand* 116: 340-344, 2007.

2. 学会発表

- 1) Muramatsu S, Nara Y, Kakiuchi T, Onon F, Kodera M, Takino N, Nishiyama S, Harada N, Fukuyama D, Tsuchida J, Terao K, Tsukada H, Nakano I, Ozawa K: *In vivo* assessment of transgene-mediated dopamine synthesis by positron emission tomography in a primate model of Parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 11th annual meeting. Tokyo, July 29, 2005. (abstract p23).
- 2) Xiao W-Z, Matsushita T, Nara Y, Takino N, Nishida H, Kodera M, Sasaki Y, Kikuchi S, Okada T, Hoshi M, Nakano I, Ozawa K and Muramatsu S. Efficient transduction of oligodendrocytes by AAV8 vectors. The Japan society of gene therapy's 12th annual meeting. Tokyo, August 24, 2006. (abstract p24).
- 3) 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.