

chaperone for superoxide dismutase (CCS) の  
関与. 第48回日本神経病理学会総会学術研  
究会 (2007, 5月30-6月1日, 東京)

- 18) 加藤雅子, 加藤信介, 緒浜栄作. ヒト変異  
SDS1 導入 ALS-トランスジェニックマウス  
における肝臓・腎臓・心臓における一過性  
組織変化からの回復機構の存在. 第48回日  
本神経病理学会総会学術研究会 (2007, 5  
月30-6月1日, 東京)

#### H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

発明の名称: 筋萎縮性側索硬化症治療薬

特願2006-196343

PCT/JP2007/000765

## 「ALSモデルマウスを用いた変異型SOD1のsolubilityに関する研究」および「孤発性ALS患者ゲノムのcopy number variation 解析」

研究協力者：加藤 丈夫 (山形大学医学部生命情報内科(第三内科) 教授)  
共同研究者：小山 信吾<sup>1)</sup>, 荒若 繁樹<sup>1)</sup>, 川並 透<sup>1)</sup>, 栗田 啓司<sup>1)</sup>,  
佐藤 秀則<sup>1,2)</sup>, 江見 充<sup>1,2)</sup>, 糸山 泰人<sup>3)</sup>, 祖父江 元<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>山形大学医学部生命情報内科(第三内科), <sup>2)</sup>ヒュービット・ジェノミックス  
<sup>3)</sup>東北大学医学部神経内科, <sup>4)</sup>名古屋大学医学部神経内科

**研究要旨：**筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロン死の病態メカニズムを明らかにするため、「ALSモデルマウスを用いた研究(研究①)」および「孤発性ALS患者ゲノムのcopy number variation (CNV)解析(研究②)」を行った。研究①では、変異型SOD1トランスジェニックマウスの運動ニューロン死には不溶性変異型SOD1単量体が重要な役割を演じている可能性を示した。研究②では、CNVがヒト孤発性ALSの病因・病態に関与している可能性を示した。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロン死の病態メカニズムを明らかにするため、以下の2つの研究(研究①および研究②)を行った。

#### 研究①

(ALSモデルマウスを用いた研究)：

家族性ALS患者の一部に認められる変異型Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子をマウスに導入すると、ヒトALSに類似の運動症状を発症し、脊髄の病変部に変異型SOD1の凝集・沈着物(封入体)が認められる。したがって、変異型SOD1の不溶化が運動ニューロン死の病態に関与している可能性が指摘されている。そこで、変異型SOD1のsolubilityの変化がいつ起こるのか(発症前か、発症後か)を明らかにするため本研究を行った。

#### 研究②

(孤発性ALS患者ゲノムのCNV解析)：

ヒト孤発性ALS(SALS)の発症や病態に関与する疾患感受性遺伝子を明らかにするため、ゲノムワイドにCNV(copy number variation)解析を行った。

### B. 研究方法

研究①：

ヒト野生型(wt)および変異型(H46R)SOD1を過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスの脊髄から抽出したSOD1のsolubilityについて経時的に解析した。SOD1のsolubilityの程度については、SOD1が中性リン酸緩衝液(PBS)、1% Triton X-100溶液、5% SDS溶液、8M尿素溶液、および88%ギ酸溶液に溶けるか否かで評価した。

研究②：

日本人SALS患者11例の末梢血よりDNAを抽出し、下記のCNV chipにて解析した。また、対照例として日本人non-ALS患者63例のDNAを同様に解析した。用いたCNV chipは、性染色体を除くゲノム上の15,000以上のCNV segments(合計200 Mb)をカバーする約44,000のマーカーを搭載し、ゲノム上に散在するほとんど全てのCNV領域をカバーすることができる。尚、本研究計画は山形大学医学部倫理審査委員会の承認を得て実施し、対象者からは文書でインフォームド・コンセントを得た。

## C. 研究結果

### 研究①：

ヒト wt-SOD1-Tg mice 脊髄の野生型 SOD1 は PBS あるいは 1% Triton X-100 溶液で完全に可溶化され、還元状態下の SDS-PAGE で全て単量体の位置に泳動された。一方、H46R-SOD1-Tg mice 脊髄の変異型 SOD1 は単量体だけでなく、分子量の大きい多量体も形成された。1% Triton X-100 溶液に不溶性の単量体 H46R-SOD1 は運動麻痺症状出現前から認められ、経過とともに増量した。これらの不溶性 H46R-SOD1 単量体の一部は 5% SDS 溶液にも不溶性で、8M 尿素溶液あるいは 88% ギ酸溶液によりはじめて可溶化される分子種も存在した。一方、不溶性の多量体 H46R-SOD1 は運動麻痺症状出現後に増量した。この時期には、免疫組織化学染色で脊髄に SOD1 陽性の封入体が多数認められた。

### 研究②：

複数のゲノム領域において、SALS 患者と対照者間で種々の CNV の違いを認めた。ゲノム上の locus-x のマーカーは、対照者の 86% (n=54) で 2 コピー、14% (n=9) で 3 コピーであった。一方、SALS では全例 (n=11) が 3 コピーであった。SALS と対照者間では統計学的に有意な差が認められた (logistic  $p = 3.87 \times 10^9$ )。また、ゲノム上の locus-y のマーカーは、対照者の 98% (n=59) で 2 コピー、2% (n=1) で 3 コピーであったのに対して (3 名の対照者では CNV 解析は不成功)、SALS では 27% (n=3) で 2 コピー、73% (n=8) で 3 コピーであった。SALS と対照者間では統計学的に有意な差が認められた (logistic  $p = 2.69 \times 10^8$ )。

## D. 考察

### 研究①：

不溶性変異型 SOD1 単量体は運動症状出現前より増量することが明らかとなった。このことより、変異型 SOD1-Tg mice の運動ニューロン死には不溶性変異型 SOD1 単量体が重要な役割を演じている可能性がある。一方、不溶性変異型 SOD1 多量体は症状の進行に伴い増量してくるので、症状の悪化に関与している可能性、あるいは逆に、不溶性変異型 SOD1 単量体から多量体に変化することにより、不溶性変異型単量体の毒性を軽減している可能性も考えられる。

### 研究②：

- 1) 今回のゲノムワイド CNV 解析で明らかとなった候補 CNV を別の方法 (real-time qPCR 等) を用いて、現在、多数例で大規模に検証を進めている。
- 2) SALS の発症に特定の CNV (コピー数異常) が寄与するかどうか、さらに、CNV 領域に SALS のリスクとなる遺伝子が存在するかどうか、明らかにする必要がある。
- 3) 大きなリスクとなる遺伝子を特定できれば、それによる運動ニューロン死の病態を解明し、さらに、そこをターゲットとした SALS の創薬研究が可能となると思われる。

## E. 結論

### 研究①：

変異型 SOD1-Tg mice の運動ニューロン死には不溶性変異型 SOD1 単量体が重要な役割を演じている可能性がある。

### 研究②：

CNV がヒト SALS の病因・病態に関与している可能性がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koyama S, et al: Alteration of familial ALS-linked mutant SOD1 solubility with disease progression: its modification by the proteasome and Hsp70. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 719-730, 2006
- 2) Sato T, et al: Rapid disease progression correlates with instability of mutant SOD1 in familial ALS. *Neurology* 65, 1954-1957, 2005
- 3) Ren C-H, et al: Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 194, 203-211, 2005
- 4) Kato T, et al: Galectin-1 as a potential therapeutic agent for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets* 6, 407-418, 2005

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし

## ALS患者の脳脊髄液中シスタチンCの検討

研究協力者：菊地 誠志 (国立病院機構札幌南病院神経内科 診療部長)  
共同研究者：辻 幸子<sup>1)</sup>、新保 和賢<sup>1)</sup>、田代 淳<sup>1)</sup>、矢部 一郎<sup>1)</sup>、  
佐々木秀直<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>北海道大学大学院医学研究科神経内科

**研究要旨：【目的】**(1)筋萎縮性側索硬化症(ALS)の早期診断において髄液シスタチンCの有効性を検討する。(2)ALSの病態への小胞体ストレスの関与を検討する。(3)骨髄間質細胞(BMSCs)の神経保護作用を検討する。**【方法】**(1)ALS患者14名、多発末梢神経障害患者13名、その他疾患16名から採取した髄液を、サンドイッチELIZA法にて測定した。(2)(3)ラット脊髄培養細胞、骨髄間質細胞を用いて検討した。**【結果】**(1)ALS患者群では髄液中シスタチンC濃度は他群と比べ有意に低濃度であった。(2)プロテアソーム障害下で運動ニューロンが特異的に障害されるモデルでは小胞体ストレスが誘導されていたが、小胞体ストレス誘導剤に直接脊髄培養細胞を暴露した結果からは、小胞体ストレスは運動ニューロンの特異的脆弱性を決める因子ではないと考えられた。(3)骨髄間質細胞は、脊髄スライス培養のグリオーシスを抑制し、神経幹細胞を活性化した可能性がある。**【結論】**(1)髄液シスタチンCはALSの早期診断の補助診断として有望である。(2)小胞体ストレスの病態への関与度は必ずしも高くはないかもしれない。(3)骨髄間質細胞は脊髄の再生環境を整える可能性がある。

### A. 研究目的

- (1) 髄液シスタチンCの診断への有効性を検討した。
- (2) ALSの病態において小胞体ストレスの運動ニューロン障害の関与を検討した。
- (3) 骨髄間質細胞(BMSCs)による細胞療法の可能性を検討した。

### B. 研究方法

- (1) 2005年10月～2007年9月までに北海道大学病院で診断されたALS14名、多発末梢神経障害13名、その他の疾患コントロール16例を対象とした。髄液は臨床診断目的で採取した際に、保存・研究に関して文書による同意を得て、測定まで-80℃で保存した。測定直前に解凍し使用した。測定はヒトシスタチンC測定ELIZAキット(R&D)を用いて、サンドイッチELIZA法で行った。統計解析は、有意水準5%で一元配置分散分

析とpost-hocテスト(Student-Newman-Keuls検定)を行った。

- (2) 胎生14日ラット脊髄ニューロンの分散培養と、生後6日ラット脊髄スライス培養を用いて、小胞体ストレス誘導物質やプロテアソーム阻害剤に暴露し、運動ニューロンの脆弱性を検討した。
- (3) 生後6日ラット脊髄スライス培養と雌成体ラット骨髄間質細胞を二重培養し、スライス培養の変化を検討した。

### C. 研究結果

- (1) 各群の平均年齢、男女比を表2に示す。髄液シスタチンCの疾患別濃度を図1に示す。各群における平均値はALS群  $5.5 \pm 0.3$ mg/L、多発末梢神経障害群  $6.7 \pm 0.4$ mg/L、疾患コントロール群  $6.9 \pm 0.3$ mg/Lであった。有意水準を5%とすると、ALS群が他の2群に対し有意に低下していた(vs末梢神経障害

p=0.024、vs疾患コントロール群 p=0.014、  
図1)。髄液採取時に進行性球麻痺と診断された症例においては、シスタチンC低下の程度は軽度であった。

- (2) プロテアソーム障害下での運動ニューロン特異的細胞死を平成16年度までに報告したが、18年度はこの過程で小胞体ストレスが誘導されることを明らかにした。しかし、二種類の小胞体ストレス剤でラット脊髄ニューロンを処理すると、Brefeldin Aは運動ニューロン有意に障害をもたらすが、Tunicamycinはむしろ後角ニューロンを有意に傷害した。運動ニューロン選択的脆弱性の主因は小胞体ストレスとは異なると考えられた。
- (3) 骨髄間質細胞は脊髄スライス培養で通常起こるグリオシスを抑制した。培養開始後にBrdUを取り込んだNestin陽性細胞を増殖させた。

#### D. 考察

- (1) ALSの臨床的な治療研究を成功させるためには、早期の確定診断が重要である。また、進行性球麻痺や下位運動ニューロン優位型では、ALSを強く疑っても確定診断できず、臨床上しばしば問題となり、バイオマーカーの応用が望まれる。シスタチンCがバ

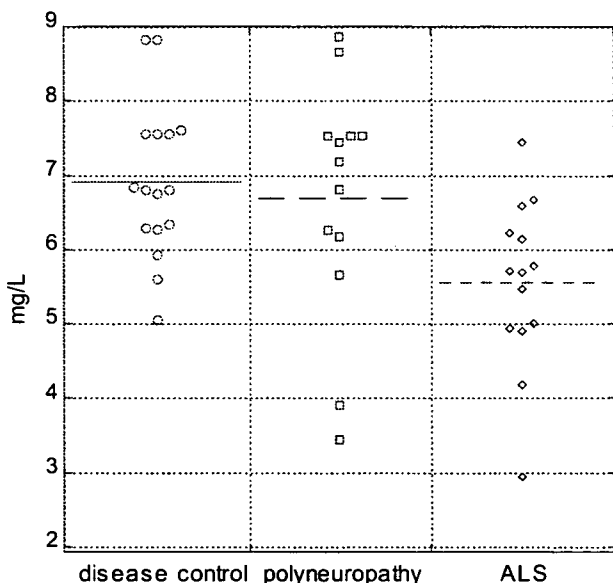


図1 髄液Cystatin C

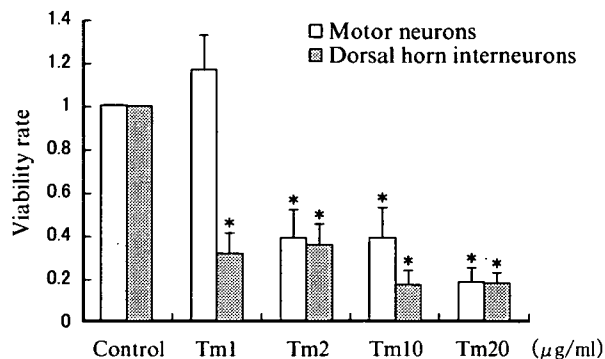


図2 Tunicamycin処理による細胞死

イオマーカーとして有望と考えられた。シスタチンCは多くの神経疾患のプロテオミクス解析で変動が報告されているが、 $-20^{\circ}\text{C}$ 下での髄液長期保存によるアーチファクトを指摘されている。今回の測定に当たっては、検体の保管には十分注意し融解後すぐに使用した。

- (2) ALSの運動ニューロン変性過程において小胞体ストレスが誘導されていることが報告されている。しかし、運動ニューロン変性機構の中で中心的な役割を担っているかは未知であり、今回の検討からも治療標的分子として最適かは更に検討を要するものと考えられた。
- (3) 骨髄間質細胞は脊髄の内因性神経幹細胞を活性化させている可能性があり、栄養因子放出などを介した細胞療法が、組織の再生環境を整える作用を有しうると考えられた。

#### E. 結論

- (1) 髄液シスタチンCはALS患者で低値を示し、ポリニューロパチーとの鑑別に有望である。
- (2) 小胞体ストレスは運動ニューロンの選択的脆弱性に必ずしも重要でない可能性が示された。
- (3) 骨髄間質細胞は脊髄の再生環境を整えうる。

#### F. 健康危険情報

なし

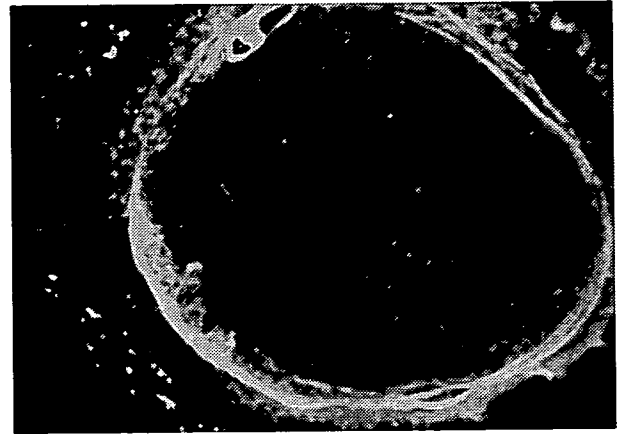
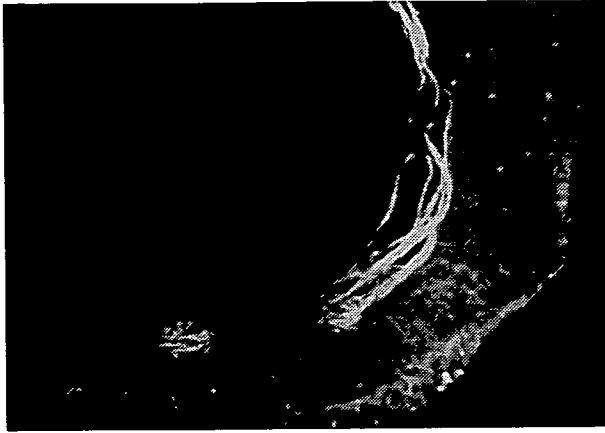


図3

(左) 培養28日目、ラット脊髄スライスカルチャー (右) 脊髄スライスカルチャー+骨髄間質細胞の二重培養。左で見られている著明なグリオシス (赤: GFAP) が抑制され、周辺部にネスチン陽性細胞 (緑) が見られる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tashiro J, et al: *J Neurochem.*, 395-401, 2007

### 2. 学会発表

1) Tsuji S, et al: ALS and MND, Ireland, 2005

2) Tashiro J, et al: ALS and MND, Canada, 2007

## H. 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

## 変異SOD1の修飾を介した神経毒性発現機構の解析

研究協力者：佐古田三郎（大阪大学大学院医学系研究科神経内科学 教授）

**研究要旨：**家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) でみられる変異 Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) の銅親和性を金属親和性クロマトグラフィーにより解析したところ、変異SOD1は野生型ではみられない高銅親和性分画を持つことがわかった。変異SOD1の高銅親和性の発現にはcopper chaperone for SOD1 (CCS) は関与しなかったが、他の何らかの細胞内因子を必要とした。またこの高銅親和性には変異SOD1の遊離システイン残基が重要であり、高銅親和性分画に溶出される変異SOD1は遊離システイン残基が何らかの修飾を受けるとともにモノマーとして存在していた。また高銅親和性変異SOD1は野生型SOD1や低銅親和性分画に存在する変異SOD1に比べ、そのミクログリア系細胞に対するTNF- $\alpha$ やiNOSの誘導能が亢進していた。変異SOD1は遊離システイン残基の修飾によるコンフォメーション変化を介してモノマー化し、それにより異常銅親和性を獲得して酸化ストレスを生じることによりFALS発症に関与している可能性が考えられた。

### A. 研究目的

FALSにおける変異SOD1の毒性の本体として以前より同蛋白内に存在する銅を介した酸化ストレスの関与が指摘されており、我々も変異SOD1トランスジェニックマウスの発症に対する銅キレート剤や抗酸化剤の効果を報告してきた。一方でSOD1活性部位への銅結合の抑制によっても変異SOD1による神経細胞死は抑制されず、活性部位の銅の関与は否定的とみられている。しかしながら活性部位での銅結合が低下した変異型(H46R)においては他の部位での銅結合も推測されており、変異SOD1と銅との相互作用の性質を明らかにすることはFALSの病態を知る上で重要であると考えられる。そこでSOD1蛋白全体としての銅親和性を検討するため、銅飽和カラムを用いた金属親和性クロマトグラフィー(Cu-IMAC)を行い変異SOD1の溶出パターンを野生型と比較した。またH46R変異SOD1での銅結合部位とされるCys111が変異SOD1で特異的にみられた高銅親和性分画に及ぼす影響を検討するとともに、高銅親和性変異SOD1のより詳細な生化学的特徴、その細胞毒性の有無を解析した。

### B. 研究方法

まず野生型もしくは変異ヒトSOD1を発現するトランスジェニックマウス脊髄、酵母より細胞破碎液を調製し、これらをCu-IMACカラムに通して洗浄した後、漸増濃度の銅キレート剤(イミダゾール)溶液により蛋白を銅親和性に応じて溶出した。SOD1の溶出パターンは各フラクションのWestern blotにより確認した。次にSf21細胞にて発現後疎水性およびイオン交換クロマトグラフィーにより精製した野生型、変異SOD1を用い、野生型マウス脊髄細胞破碎液との共培養の有無による溶出パターンの変化を観察した。さらに変異SOD1およびそのCys111をセリンに置換したもの(C111S)をCOS7細胞で発現させ、それぞれのCu-IMAC溶出パターンを解析した。また各SOD1のコンフォメーションの相違を細胞破碎液のnative-PAGEにより検討した。

次にカルボキシ末端側にFLAGタグを持つ野生型もしくは変異ヒトSOD1をCOS7細胞で発現させ、その細胞破碎液を用いてCu-IMACを行い、低銅親和性(low affinity component: LAC)および高銅親和性(high affinity component: HAC)分画を得た。各分画にシステイン残基修飾剤であるAMSを反応させた後SOD1 Western

blotを行い、それぞれにおけるSOD1遊離システイン残基の修飾の有無を確認した。次に精製野生型SOD1を過酸化水素あるいはニトロソグルタチオンにより酸化修飾した後にCu-IMACを行い、それぞれの溶出パターンの変化をWestern blotにより解析した。システイン残基どうしの架橋剤であるBMOEで処理したCOS7細胞発現G85R変異SOD1と同様にしてCu-IMAC溶出パターンの変化をみた。さらにLAC、HACそれぞれをゲル濾過クロマトグラフィーにより分離し、各分画中のSOD1の分子量の相違を検討した。最後にLAC、HACそれぞれより抗FLAG抗体を用いた免疫沈降によりSOD1を抽出し、それらを培養ミクログリア系(6-3)細胞の培地中に添加し6時間後に細胞を回収、cDNAを用いたreal-time PCR法により各条件でのTNF- $\alpha$ 、iNOSの発現誘導能の差異を比較検討した。

#### [倫理面への配慮]

動物実験に関しては大阪大学大学院医学系研究科動物実験委員会の指針に基づいて行い、処置時にはネブタールによる深麻酔を用いて苦痛を最小限に抑えた。

### C. 研究結果

数種のトランスジェニックマウス脊髄および酵母のいずれでもCu-IMACにより変異SOD1の一部は野生型よりも遅れて溶出し、銅親和性の上昇を示す分画が存在した。この変異SOD1の高銅親和性分画はCCS欠損酵母株でも同様にみられ、CCS非依存性の現象であった。精製変異SOD1のみでは高銅親和性分画はみられなかったが野生型マウス脊髄細胞破碎液との共培養により出現し、この現象には他の細胞内因子が必要であることが推測された。高銅親和性分画はCOS7細胞で発現させた変異SOD1でもみられたが、C111Sを導入することにより同分画はほとんど消失した。Native-PAGEにより変異SOD1は野生型よりも高分子側に泳動されたが、その泳動パターンはC111S導入により低分子側にシフトした。

LACに存在する野生型・変異SOD1はAMSにより遊離システイン残基が修飾されWestern blotでバンドの高分子側へのシフトがみられたが、

HAC変異SOD1ではAMSによる修飾がほとんどみられなかった。精製野生型SOD1ではCu-IMACによりHACはほとんど出現せずCOS7細胞で発現させた野生型SOD1同様の所見であったが、同蛋白を過酸化水素あるいはニトロソグルタチオンと反応させたところ、Cu-IMACによるHACの出現がみられた。逆にG85R変異SOD1をBMOEにより架橋したところ、ダイマーのサブユニット間で架橋されたSOD1はLACにしか出現しなくなった。ゲル濾過クロマトグラフィーによる検討ではニトロソグルタチオン修飾野生型SOD1、変異SOD1ともLAC SOD1はダイマーとして存在しているのに対し、HAC SOD1はそのほとんどがモノマー化していた。さらに培地へのSOD1添加後の6-3細胞でのTNF- $\alpha$ 、iNOSの発現量は、G85R変異HAC SOD1で野生型およびG85R変異LAC SOD1よりも上昇する傾向がみられた。

### D. 考察

変異SOD1はCCS非依存性に特異的な高銅親和性分画、即ちHACを保持していることを示した。HAC SOD1の出現には他の細胞内因子の関与や遊離システイン残基の修飾が重要であり、かつHAC SOD1はその大部分がモノマー化していることより、変異SOD1では遊離システイン残基、特にダイマー接触面近傍に存在するCys111が細胞内で修飾を受けやすい状態にあり、その修飾によりコンフォメーションの変化した一部の変異SOD1がモノマー化するものと考えられる。このようにしてモノマー化した変異SOD1は異常銅親和性を獲得し、銅結合を介した活性酸素種の産生などの酸化ストレスを惹起して神経細胞死を引き起こすものと推測される。この仮説に立てば酸化ストレスがFALS発症に関与するとする報告とCCSがFALS発症に関与しないとする報告の両者を矛盾なく説明できる。またこのHAC SOD1がLAC SOD1よりも高いミクログリア系細胞活性化能を持つこと、および変異SOD1による神経細胞死にはミクログリアの関与が重要であると示唆されていることより、HAC SOD1がFALSにおける神経細胞毒性の本体となっている可能性が推測される。このHAC SOD1の神経細胞毒性のメカニズムをさらに詳細に検討する必要があるととも



に、その出現の抑制による新規治療法の開発が期待される。

## E. 結 論

変異SOD1の異常銅親和性がFALSにおける神経細胞毒性の本体となっている可能性につき検討した。変異SOD1ではシステインをはじめとするアミノ酸残基が修飾を受けやすい状態にあり、それにより高次構造の変化を起こしてモノマー化した変異SOD1成分が銅との親和性亢進による酸化ストレスなどを介して神経毒性を發揮する可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sato T, Nakanishi T, Yamamoto Y, Andersen PM, Ogawa Y, Fukada K, Zhou Z, Aoike F, Sugai F, Nagano S, Hirata S, Ogawa M, Nakano R, Ohi T, Kato T, Nakagawa M, Hamasaki T, Shimizu A, Sakoda S. Rapid disease progression correlates with instability of mutant SOD1 in familial ALS. *Neurology* 65, 1954-1957, 2005.
- 2) Sumi H, Nagano S, Fujimura H, Kato S, Sakoda S. Inverse correlation between the formation of mitochondria-derived vacuoles and Lewy-body-like hyaline inclusions in G93A superoxide-dismutase-transgenic mice. *Acta Neuropathol* 112, 52-63, 2006.
- 3) Watanabe S, Nagano S, Duce J, Kiaei M, Li QX, Tucker SM, Tiwari A, Brown RHJ, Beal MF, Hayward LJ, Culotta VC, Yoshihara S, Sakoda S, Bush AI. Increased affinity for copper mediated by cysteine 111 in forms of mutant superoxide dismutase 1 linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 42, 1534-1542, 2007.

### 2. 学会発表

- 1) 佐藤貴子, 山本洋一, 中西豊文, 長野清一, 清水 章, 佐古田三郎. 家族性筋萎縮性側索硬化症患者の赤血球内変異/正常SOD1蛋白比と臨床経過の関連性. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005年5月.
- 2) 須貝文宣, 山本洋一, 佐古田三郎. ALSモデルマウスにおけるバルプロ酸の症状進行抑制効果. 第46回日本神経学会総会, 鹿児島, 2005年5月.
- 3) Sato T, Nakanishi T, Yamamoto Y, Andersen PM,

Hamasaki T, Shimizu A, Sakoda S. Relationship between disease progression and stability of mutant SOD1 in FALS. XVIIIth World Congress of Neurology, Sydney, Australia, November 2005.

- 4) 渡邊将平, 長野清一, 佐古田三郎. 変異型SOD1におけるシステイン111残基の役割. 第47回日本神経学会総会, 東京, 2006年5月.
- 5) 隅 寿恵, 長野清一, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. 変異型SOD1 (G93A) miceにおけるvacuoleとLBHI形成の關係. 第47回日本神経学会総会, 東京, 2006年5月.
- 6) Watanabe S, Nagano S, Bush AI, Sakoda S. Cysteine 111 residue affects aberrant affinity for copper in mutant Cu/Zn superoxide dismutase. The Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Atlanta, USA, October 2006.
- 7) Watanabe S, Nagano S, Bush AI, Sakoda S. The role of cysteine 111 residue in mutant copper/zinc superoxide dismutase (SOD1). The 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, Japan, November 2006.
- 8) 岸上 仁, 長野清一, 渡邊将平, 深田 慶, 中西豊文, 佐古田三郎. 変異型SOD1におけるシステイン残基の翻訳後修飾についての検討. 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 2007年5月.
- 9) 隅 寿恵, 長野清一, 藤村晴俊, 加藤信介, 佐古田三郎. ミトコンドリア由来の空胞におけるcopper chaperone for superoxide dismutase (CCS)の関与. 第48回日本神経病理学会総会, 東京, 2007年5月.

## H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

なし

## 変異SOD1の構造学的特性と酸化型SOD1のALSへの関与

研究協力者：谷口 直之 (大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学 教授)  
共同研究者：藤原 範子<sup>1)</sup>, 中の三弥子<sup>2)</sup>, 高宮 里奈<sup>2)</sup>, 松本 紋子<sup>2)</sup>,  
鈴木敬一郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫医科大学学生化学, <sup>2)</sup>大阪大学大学院医学系研究科生化学

**研究要旨：**Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (Cu/Zn-SOD、以下SOD1) は酸化ストレスから生体を守る役割を果たしている。本酵素の変異体が家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の原因になることが明らかになっているが、その発症機構はまだ解明されていない。我々は抗ヒトSOD1モノクローナル抗体 (mAb) との反応性が変性処理によって、野生型SOD1では増大していくのに対し、FALS変異SOD1では逆に減少していくことを明らかにした。これらのmAbはエピトープとしてGreek key loopを認識することから、mAbとの反応性の違いはGreek key loop部分の構造の違いや構造変化の差異を示すと考えられる。Cys111残基は、野生型と変異型でmAbとの反応性の違いが見られたGreek key loop内に存在し、分子の外側にあることから反応性が高いと考えられる。我々は、このCys111残基が他のアミノ酸残基よりも速く酸化され、SH基がスルフィン酸 (SO<sub>2</sub>H) さらにはスルホン酸 (SO<sub>3</sub>H) になることをMALDI-TOF-MS およびLC-ESI-MSMSで同定した。このCys111がスルホン酸 (SO<sub>3</sub>H) に酸化された酸化型SOD1を特異的に認識する抗体を作製し、本抗体がALSモデルマウスの脊髄の封入体と空胞の縁を特異的に染色することを見いだした。この結果は、ALSの病態において酸化ストレスおよび酸化型SOD1が関与していることを示唆するものである。本抗体を用いれば、家族性のみならず孤発性のALSにおける酸化型SOD1の関与を解明できる可能性がある。そして変異SOD1のCys111のSHを特異的に保護する薬剤を開発すればFALSの治療にもつながる可能性があると考えられる。また、変異SOD1が神経細胞に発現させた場合どのような影響があるかを調べるために変異SOD1および野生型SOD1高発現Neuro 2a細胞を作製した。変異SOD1高発現細胞は細胞増殖の遅れがあり、その原因としてG2/M期の遅延が認められた。またファロイジンによるアクチンの染色が低下しており、アクチン骨格に異常が生じていることを見いだした。

### A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) のうち20%はCu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子の変異が原因であることが証明されて以来、現在までに110種類以上の変異が報告されている。しかし、その発症メカニズムはほとんど解明されていない。我々はこれまで変異SOD1は野生型SOD1に比べプロテアソーム系で分解されやすいこと、銅をはずしやすいこと、グルコースとの反応性が高いことなどを見いだしてきた。つまり変異SOD1

タンパクが不安定で、野生型SOD1とでは立体構造上なんらかの差異があることが示唆される。しかし変異SOD1がどのような構造変化を起こしているのかについてはまったく不明のままである。モノクローナル抗体 (mAb) はタンパク質の局所的な構造や構造変化の違いを解析するためにも用いられることから、変異SOD1と野生型SOD1に対するmAbの反応性を検討した。さらにタンパク質全体の構造と不安定性を調べるために、種々の変性処理を施したSOD1タンパクの二次構造の変化を解析し

た。

FALS患者や変異SOD1トランスジェニックマウス、および弧発性のALS患者ではSOD1免疫陽性の封入体が観察されており、特に変異SOD1は生体内で構造変化を起こし、aggregationを起こしやすいことが示唆されている。また活性酸素種がaggregationを起こす可能性も示唆されていることから、SOD1タンパク自身に及ぼす酸化ストレスの影響を検討した。特にCys111はSOD1タンパク分子の外側に存在するために反応性が高い。そこで、Cys111のSH基に2-メルカプトエタノール(2-ME)を導入した2-ME-SOD1および野生型SOD1を用いて、SOD1の酸化におけるCys111の役割を検討した。さらに、このCys111が酸化された酸化型SOD1を特異的に認識する抗体を作製し、ALSにおける酸化型SOD1の関与を検討した。

ALSの運動神経細胞ではニューロフィラメント、チューブリン、アクチン等の細胞骨格系タンパクの異常が報告されている。また細胞周期に関与するタンパク質の異常が報告されており、細胞周期の異常が神経細胞死に関与していることも示唆されている。そこで変異SOD1高発現細胞を用いて変異SOD1が細胞周期に影響を与えるかどうかを検討した。

## B. 研究方法

**【実験1】**野生型および変異型SOD1遺伝子(WT、A4V、G37R、H46R、G93A、およびFALSの変異ではないC111S)のcDNAをバキュロウイルス/昆虫細胞発現系でSOD1を強制発現させ、精製した。これらのSOD1タンパクを種々の変性処理を行い、ウエスタンブロット解析、ELISA、円偏光二色性(CD)解析に供した。モノクローナル抗体のエピトープは、SOD1をリジルエンドペプチダーゼで分解したペプチドおよび合成ペプチドを用いたELISAにて決定した。

**【実験2】**2-MEを導入したSOD1タンパク質は宇部興産から供与していただいた。まず、Cys111にのみ2-MEが結合していること、ほかのCysには2-MEが結合していないことをMALDI-TOF-MS解析で確認した。さらに20 mMの2-MEで処理すると完全に2-MEがとれたSOD1

に戻ることをMALDI-TOF-MS解析で確認した。そこで、2-MEがついたSOD1を2-ME-SOD1、はずして元に戻したものをWT-SOD1と呼ぶことにする。この2つのSOD1を用いて、酸化に対する反応性を比較検討した。WT-SOD1を酸化するとSDS-PAGEで上にシフトした2本目のバンドが現れた。このバンドはCys111残基が酸化修飾されたSOD1と予想されたため、その分子をMALDI-TOF-MS およびLC-ESI-MSMSを用いて同定を行った。さらに、スルホン酸にしたCys111を含むペプチド-KLHをウサギに免疫し、酸化型SOD1に特異的な抗体を作製し、ALSモデルマウスであるG93Atgマウスの脊髄切片の免疫組織染色を行った。

**【実験3】**マウス神経芽細胞Neuro 2a細胞に野生型(WT)および変異型SOD1(G37R、G93A)を高発現させた細胞(以下、WT細胞、G37R細胞、G93A細胞とする)を作製し、cell growth、cell cycleの検討を行った。細胞骨格系タンパクはファロイジン及び抗チューブリン抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

## C. 研究結果

**【実験1】**精製SOD1を3種のmAbを用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、WTやC111Sは強い反応性を示したが、A4V、G37R、G93Aはほとんど反応しなかった。H46Rは弱いながらもすべてのmAbに反応した。ポリクローナル抗体では、すべてのSOD1が同程度に反応した(図1)。

そこでこの現象を解析するために、精製したSOD1を用いてELISAを行ったが、いずれのmAbもA4Vとの反応性が強く、ウエスタンブロット解析の結果を反映しなかった。そこでSDS-PAGE(ウエスタンブロット)を行う時と同じ変性処理(2% SDSと2% 2-MEを加えて加熱)を施したSOD1を用いてELISAを行ったところ、ウエスタンブロット解析の結果と同様の傾向が認められた。

このウエスタンブロット解析を行う時の処理の中には2-MEによる還元、SDSによる変性、熱変性の3つが含まれる。どの変性処理がmAbとの反応性の差異につながるかをそれぞれの変性処理後にELISAを行って検討した。最も大き

な差異をもたらしたのはDTTによる還元処理であった。種々の濃度のDTTで処理し、ELISAを行った。その結果、1 mM以上のDTTによる還元によって、WT、C111SのグループはmAb(ここではmAb(5c-10)の結果を示す)との反応性が増大していくのに対し、FALS変異SOD1であるA4V、G37R、G93Aは逆に減少していくことが明らかになった。緩慢な臨床経過を示す変異で知られるH46Rは野生型のグループに近い傾向が見られた(図2)。

さらに還元処理によってSOD1タンパク全体の構造がどのように変化するかを円偏光二色性(CD)解析にて調べた。まずSOD1タンパクを様々な濃度のDTTで処理したのち遠紫外部のCD解析を行ったところ、WTとC111Sは1mMのDTTで少し影響が認められたが、0.5 mM以下のDTTに対してはまったく構造に変化は認められなかった。一方、FALS変異SOD1タンパクはDTTに影響を受けやすく、0.1 mMのDTT処理で二次構造の変化が認められた。

次に本実験で用いたmAbがSOD1のどの部位を認識するかを決定するためにエピトープマッピングを行った。その結果、mAbは3種類ともヒトSOD1の102番目のセリンから115番目のアルギニンまでの部位、つまりGreek key loopに相当する部分を認識することがわかった。つまり変性すると野生型と変異SOD1では、Greek key loop部分の構造に差異が生じると考えられる。

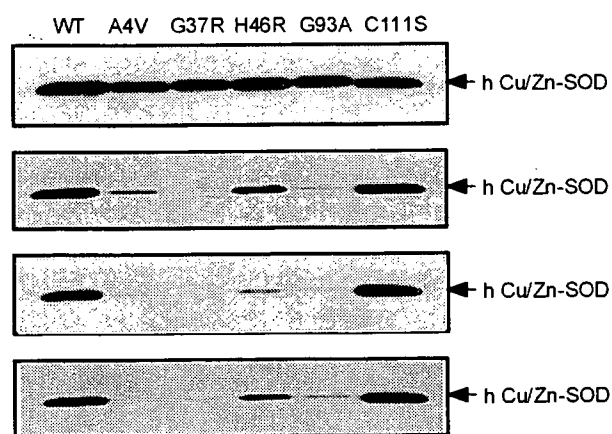


図1 野生型および変異型SOD1のモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析

【実験2】2-ME-SOD1とWT-SOD1に種々の濃度の過酸化水素を加え20分間インキュベート、希釈した後、SDS-PAGEを行った。過酸化水素の濃度が1mM以上になると、WT-SOD1では2本のバンドになり、時間がたつとSOD1が分解され、バンドの色が薄くなっていく様子が見られた。一方、2-ME-SOD1も分解はされたが、その程度は低く、2本目のバンドは認められなかった。従って、この2本目のバンドはGreek key loop部分に存在するCys111に由来することが予想された。さらに、この2本目のバンドは種々のALS変異SOD1を酸化させても産生されるが、C111Sでは認められなかった。回転式攪拌器でゆっくり攪拌させる空気酸化によっても、WT-SOD1は2本目のバンドを出現させることがわかった。SDS-PAGEで分離した2本のバンドのそれぞれを切り出し、トリプシン処理し、Cys111を含むペプチドの質量を調べたところ、上のバンドからはペプチドの質量+32および+48の質量数が得られた。さらに2本バンドのMonoQカラム画分をリジエンドペプチダーゼ処理して得られたペプチドをMSMS解析することで、Cys111はス

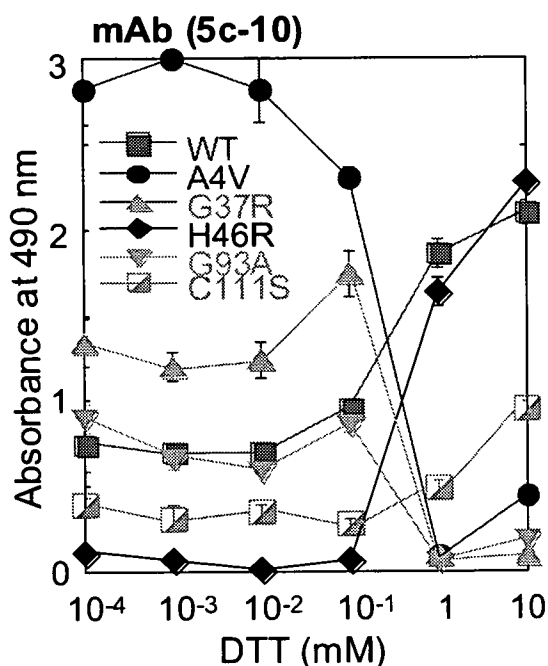


図2 モノクローナル抗体(5c-10)の反応性に対するDTTの影響

野生型および変異型SOD1を種々の濃度のDTTで処理した後、NaHCO<sub>3</sub>バッファー(pH9.6)で希釈しELISAプレートにコート。mAb 5c-10でELISA解析

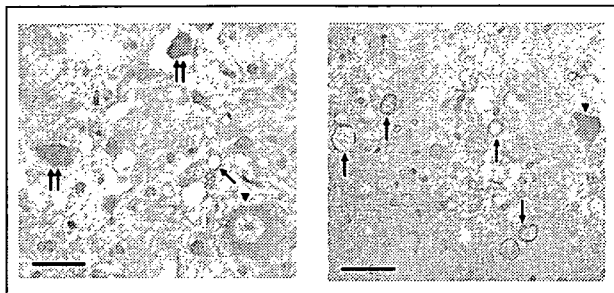


図3 G93Aトランスジェニックマウス脊髄切片の酸化型 SOD1 特異抗体による免疫組織染色

ルフィン酸 (SO<sub>2</sub>H) およびスルホン酸 (SO<sub>3</sub>H) に酸化されること、隣の His110 や酸化されやすいと報告されてきた His120 は酸化されていないことを証明した。また、Cys111 をスルホン酸にした合成ペプチドを免疫して作製した抗体は上バンド、つまり、Cys111 が酸化された『酸化型 SOD1』を特異的に認識することがわかった。本抗体を用いて、ALS モデルマウスの脊髄切片の免疫組織染色を行ったところ、病変部にできた封入体と空砲の縁がこの抗体によって特異的に染色されることを見いだした (図3)。これらの結果は、ALS の病態において酸化ストレスおよび酸化型 SOD1 が関与していることを強く示唆するものである。

【実験3】G37R, G93A の変異 SOD1 高発現 Neuro2a 細胞を作製した。G37R 細胞と G93A 細胞は両者とも野生型 SOD1 高発現細胞に比べて cell growth の遅れが認められた。また、cell cycle の検討を行った所、G37R 細胞と G93A 細胞では G2/M 期の遅延が認められた。FCS (牛胎児血清) を細胞培養液中から取り除くと、WT 細胞ではほとんどの細胞が G0 期に戻るのに対し、変異 SOD1 細胞では約 50% の細胞が G2/M 期に残っていた (図4)。

G2/M 期の遅延として、細胞骨格系の異常が考えられるため、細胞骨格系タンパクの形態を検討した。その結果、すべての細胞においてチューブリンには変化が認められなかったが、ファロイジン染色を行った所、G37R, G93A 細胞に F-アクチンの異常が認められた。

#### D. 考察

mAb を用いたウエスタンブロット解析では FALS 変異 SOD1 はほとんど検出されなかった。

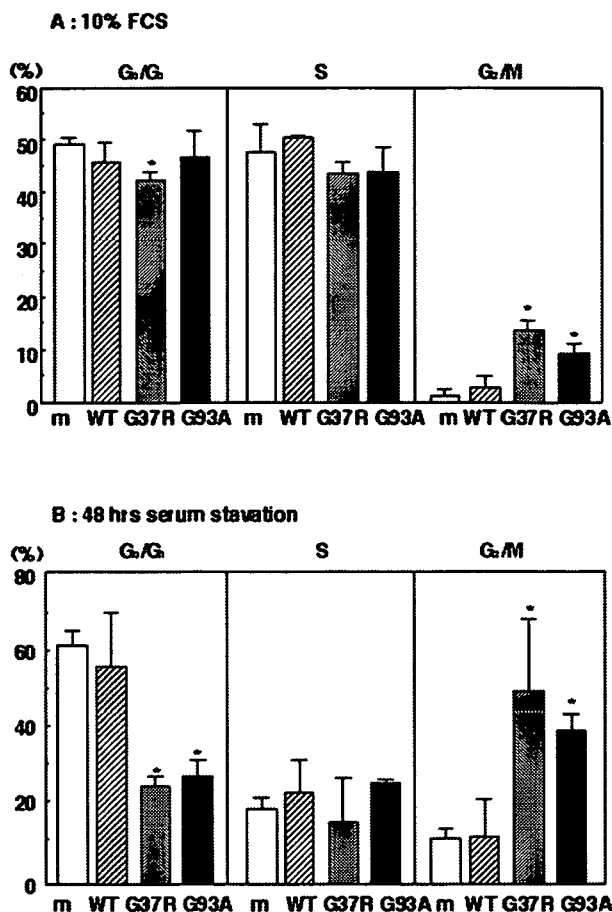


図4 mock、WT、G93A 及び G37R 高発現細胞の細胞周期

また野生型 SOD1 は DTT や熱処理などによって mAb との反応性が増加していくのに対し、FALS 変異 SOD1 では逆に減少していくことが明らかになった。これらの結果は、野生型と変異 SOD1 では還元や熱処理などによって、mAb のエピトープ部位である Greek key loop の構造が異なることを示唆している。Greek key loop は SOD1 ホモダイマーの安定性に大きく寄与しており、この部分が変化しやすいこととタンパク全体の不安定性には深いつながりがあると考えられる。Greek key loop の中にある Cys111 を Ser に変えると安定性が増すという報告がある。本実験においても C111S は WT と同様の傾向を示した。またこれらの実験で用いた FALS 変異 SOD1 タンパクの変異部位がいずれもこのエピトープ部分とは離れた場所にあることも興味深い。なぜエピトープ部位と離れた場所にアミノ酸置換が起こることで mAb との反応性が変わ

るのか、また変性処理によって変化した反応性がなぜ野生型SOD1とFALS変異SOD1で異なるのかについては今後の大きな課題である。これまで、FALS変異SOD1タンパクは不安定であることや凝集体を作りやすいことはいくつか報告されてきている。しかし、どのような構造変化が起こっているのかという詳しい解析はまだなされていない。変性したタンパク質は結晶を作りにくいことから、他の神経変性疾患の原因タンパク質においても変性後の構造解析は進んでいない。従って本研究のようなモノクローナル抗体を用いた解析は微視的な構造変化をとらえるのに有効であると考えられる。今後は新たな抗ヒトSOD1モノクローナル抗体も作製して構造変化の検討を行うことを計画している。特に構造が変化した変異SOD1のみを認識する抗体は早期診断法の開発につながる可能性があり、凝集体形成を阻害する抗体を開発できればALSの治療への可能性が広がると期待される。

また変異SOD1タンパク自身の酸化によっても凝集体が生成することが報告されている。特に、システイン残基同士のS-S結合によって凝集体を形成することが報告されている。本研究では、システイン残基がS-S結合への酸化に寄与するだけでなく、Cys111がスルホン酸へと酸化修飾されることを見いだした。ALSモデルマウスでの病変に見られた酸化型SOD1の存在は、Cys111の酸化が家族性ALSを引き起こす変異SOD1の構造変化や凝集体形成にかかわっていることを示唆している。従って、変異SOD1のCys111のSHを特異的に保護する薬剤やCys111を含むGreek key loopを特異的にマスクするモノクローナル抗体の開発はALSの治療にもつながる可能性があると考えられる。

FALS変異SOD1高発現Neuro2a細胞では、cell growthの遅れが見られ、その原因はG2/M期の遅延によることを明らかにした。また、ファロイジンの染色によりG37R, G93A細胞では、F-アクチン異常が認められた。FALS患者さんの神経細胞死に細胞骨格の異常が深く関わっているという報告や、細胞骨格タンパクの異常があるという報告がなされてきている。例えば、ニューロフィラメントの凝集がALS発症の早い段階で認められること、また変異SOD1トランスジェニックマウスを用いた実験では、 $\beta$ -

アクチンの減少が起こっていることが報告されている。このSOD1の凝集は変異SOD1の立体構造変化により引き起こされ、アクチンを含めた他のタンパクとの異常な結合がALSの原因の一つとなると考えている。

## E. 結論

変異SOD1タンパクはエピトープ部分と離れた場所での1アミノ酸置換にもかかわらず、抗ヒトSOD1モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析でほとんど検出されないことを見出した。また還元や熱などで変性させると、野生型と変異SOD1ではモノクローナル抗体との反応性に違いが出ることを明らかにした。これらの結果はエピトープ部位であるGreek key loopの構造変化に差異があることを示唆している。さらにGreek key loop内にあるCys111残基が容易にスルホン酸にまで酸化されること、SDS-PAGEでは上方にバンドシフトすることを証明した。ALSモデルマウスにおいて、ALSの病変部位である脊髄においても酸化SOD1の沈着が認められた。FALS変異SOD1を高発現させたNeuro2a細胞ではcell growthの遅れ、G2/M期の遅延とF-アクチンの異常が認められた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujiwara N., Miyamoto Y., Ogasahara K., Takahashi M., Ikegami T., Takamiya R., Suzuki K. and Taniguchi N.: Different Immunoreactivity against Monoclonal Antibodies between Wild-type and Mutant Copper/Zinc Superoxide Dismutase Linked to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 5061-5070
- 2) Takamiya R., Takahashi M., Park Y.S. Tawara Y., Fujiwara N., Miyamoto Y., Gu J., Suzuki K. and Taniguchi N.: Overexpression of Mutated SOD1 in Neuroblastoma Cells Results in Cytoskeletal Change. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2005) 288, C253-259
- 3) Fujiwara N., Nakano M., Kato S, Yoshihara D, Ookawara T, Eguchi H, Taniguchi N, Suzuki K.: Oxidative modification to cysteine sulfonic Acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* (2007) 282,

## 2. 学会発表

- 1) Fujiwara N., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) CONFORMATIONAL CHANGES IN GREEK KEY LOOP STRUCTURE OF SOD1 AND ITS IMPLICATION IN ALS: IRN 2005 The 3<sup>rd</sup> Meeting of International Redox Network, November 9 –11, Kyoto, Japan, (Abstract, 28)
- 2) Fujiwara N., Miyamoto Y., Takahashi M., Ookawara, T., Eguchi, H., Suzuki K. and Taniguchi N. (2005) Mutant Copper/Zinc superoxide dismutases linked to amyotrophic lateral sclerosis exhibit a lowered immunoreactivity against monoclonal antibodies recognizing Greek key loop VI compared with wild type under denatured conditions. Neuroscience 2005, Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting, November 12 –16, Washington DC, USA, (Program No. 429.12. 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner)
- 3) Fujiwara N., Nakano M., Ookawara T., Eguchi H., Yoshihara D., Taniguchi N. and Suzuki K.: Role of Cys111 on the stability of human SOD1: implication for ALS, IUBMB 2006, June 18 – 23, Kyoto, Japan, p293, 2006
- 4) Fujiwara N., Nakano M., Ookawara T., Eguchi H., Yoshihara D., Taniguchi N. and Suzuki K.: Role of Cys111 in structural stability of human copper/zinc-superoxide dismutase, ISBC2006, The Second International Symposium on Biomolecular Chemistry, August 6 - 9, 2006, FIBER Konan University, Japan, p11
- 5) Fujiwara N., Nakano M., Ookawara T., Eguchi H., Yoshihara D., Taniguchi N. and Suzuki K.: Identification of oxidized Cys111 in human Cu/Zn-Superoxide Dismutase, SFRMB' s 13<sup>th</sup> Annual Meeting November 15 – 19, Denver, Colorado, USA, 2006, Vol. 41, S134
- 6) Fujiwara N., Nakano M., Ookawara T., Eguchi H., Yoshihara D., Taniguchi N. and Suzuki K.: Involvement of Cys111 in a stability of human copper/zinc-superoxide dismutase, 17<sup>th</sup> International Symposium on ALS/MND, November 30 – December 2, Yokohama, Japan, 2006, Amyotrophic Lateral Sclerosis, Vol.7, p137
- 7) 藤原範子、中の三弥子、大河原知水、江口裕伸、吉原大作、谷口直之、鈴木敬一郎：ヒトCu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼの安定性に関与するCys111の酸化について、過酸化脂質フリーラジカル学会、第30回大会、2006. 10. 20-21、東京。(過酸化脂質研究, 30, p39, 2006.)
- 8) Fujiwara, N., Nakano, M., Yoshihara, D., Ookawara, T., Eguchi, H., Taniguchi, N. and

Suzuki, K. (2007) Role of Cys111 in an oxidative damage of human Cu/Zn-superoxide dismutase, 第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学学会大会、第17回日本神経回路学会大会、合同大会 (Neuro 2007)、9. 10-12, 横浜, (講演要旨集、S119)

- 9) Fujiwara, N., Nakano, M., Yoshihara, D., Ookawara, T., Taniguchi, N. and Suzuki, K. (2007) Role of Cys111 in an oxidative damage and generation of charge isomers of human Cu/Zn-superoxide dismutase, 第30回日本分子生物学会大会、第80回日本生化学会大会、合同大会 (BMB2007)、12. 11–15, 横浜 (講演要旨集、838)

## H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

なし

## ALS治療を目指したポリオウイルスベクターの開発

研究協力者：野本 明男 (東京大学大学院医学系研究科 教授)

**研究要旨：**運動神経細胞特異的な疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療・発症遅延・病態進行遅延を目的としたウイルスベクターとして、運動神経細胞に感染するポリオウイルスの利用法を検討した。ベクターとして使用するためにはポリオウイルス自体が持つ神経毒性を抑える必要がある。本研究により、1)ポリオウイルスによる細胞変性効果の中心的役割を果たすと考えられていた2Aプロテアーゼは神経細胞には強い毒性を示さない、2)ポリオウイルスの神経毒性は、ウイルスのキャプシド蛋白質領域の持続的な発現が要因であり、一回のみの感染では細胞変性は起こらないことなどを明らかにした。そこで、ALS発症阻止効果を示すHGFまたはXIAPのmRNAをウイルスキャプシド蛋白質コーディング領域に挿入し発現を行った。モノシストロニックRNAゲノムを使用した場合、HGFの発現は見られなかった。そこで、EMCVのIRESを使いジシストロニックRNAゲノムを作製し、第1シストロンにHGFを挿入したところ、HGFを発現することに成功した。XIAPも同様の方法で発現に成功した。今後、ALSのマウスモデルを使用して、このベクターの有用性を検討する。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動神経細胞の異常により発症する疾患である。そこで、ALS発症阻止効果を示す、HGF(hepatocyte growth factor)やXIAP(X-linked inhibitor of apoptosis)を発現させるベクターとして、運動神経細胞に感染するポリオウイルス(PV)に着目した。

しかしながら、PV自体が運動神経細胞に対する毒性を有するので、PVをベクターとして使用するためには、この点を解決する必要があった。そこで、まずPVの神経細胞に対する毒性発現のメカニズム解析を行うことを目的とした。

次に、神経毒性を発現することなく、HGFやXIAPの発現が可能なポリオウイルスベクターを構築することを目的とした。

### B. 研究方法

神経細胞(SK-N-SH細胞)またはHeLa細胞にPVを感染させ、その2時間後に抗PV抗体または抗PV受容体抗体を添加し、感染24時間後の細胞変性効果(CPE)を観察した。

キャプシド蛋白質コーディング領域を欠損したRNAをゲノムとして持つPV粒子(DI粒子)は、

当該欠損RNAとPVのキャプシド蛋白質を発現するプラスミドを同時に細胞にトランスフェクションすることにより得た。

2Aプロテアーゼを単独発現させるために、CMVプロモーターの下流に2AプロテアーゼcDNAを持つプラスミドのトランスフェクションを行った。

PVのキャプシド蛋白質発現には、ワクシニアウイルスベクターを利用した。

HGFやXIAPのmRNAはPVゲノムのキャプシド蛋白質コーディング領域に相当する領域に挿入し、ゲノムの形態としては、モノシストロニックなもの、ジシストロニックなもの(RNA複製用蛋白質をEMCVのIRESにより発現させるように構築したもの)の2種類を使用した。

### C. 研究結果

PV感染後、2時間で抗PV抗体または抗PV受容体抗体を添加すると、神経細胞はCPEを発現しなくなった。一方、HeLa細胞は激しいCPEを示した。使用した抗体は感染防御抗体である。感染防御能力のない抗体には、上記の能力は検出されなかった。したがって、最初の感



染で生じた子ウイルス粒子の再感染が抑えられた結果、神経細胞はCPEを示さなくなったと考えられた。つまり、神経細胞は、PVの1回のみの感染には抵抗性を示すと考えられた。

以上の考え方を支持するデータを得るため、抗体を使用せずに1回のみの感染を起こすPVのDI粒子を使用して感染を行った。その結果、HeLa細胞はDI粒子の感染により激しいCPEを呈したが、神経細胞はほとんどCPEを示さなかった。

そこで、DI粒子の複数回の感染を行い神経細胞のCPE発現を観察しようとしたが、予想に反してCPE発現は見られなかった。このようにして、神経細胞はPVの2Aプロテアーゼの連続発現に対する抵抗性を持っている可能性が強く示された。実際に2Aプロテアーゼの単独発現に対し、HeLa細胞は激しいCPEを呈したが、神経細胞はCPEを示さなかった。

スタンダードPVの(複数回)感染により神経細胞はCPEを呈するが、DI粒子の複数回感染ではCPEは現れないため、DI粒子からは発現しないキャプシド蛋白質が神経細胞のCPE発現に関与している可能性が考えられた。そこで、ワクシニアウイルスベクターを使用し、PVキャプシド蛋白質の発現を行った。その結果、PVキャプシド蛋白質の単独発現により、神経細胞はCPEを呈することが明らかとなった。HeLa細胞に対してもキャプシド蛋白質は毒性を示した。

以上の知見から、神経細胞への毒性をなくすためには、PVキャプシド蛋白質領域を欠損させること、すなわち、その領域に外来mRNAを挿入すれば、1回のみ感染するベクターとなり、神経細胞毒性も消失すると考えられた。

この考え方で、HGFまたはXIAPのmRNAを持つウイルスベクターを構築した。PVゲノムRNAは、mRNAとしても働くが、基本的にモノシストロニックmRNAである。外来mRNAをモノシストロニックRNAに挿入した場合、とくにHGFmRNAを使用した場合、レプリコンとしての活性さえ検出されなくなった。検討した結果、ポリオウイルスのゲノムをそのまま用いた場合、分泌型の蛋白質の発現は困難であることが予想された。

そこで、ジシストロニックmRNAとし、第1

シストロンで外来mRNAを、第2シストロンからRNA複製用蛋白質を発現させることとした。第2シストロン発現には、EMCVのIRESを用いた。このPVのジシストロニックRNAを使用して、HGFおよびXIAPの発現に成功した。

## D. 考 察

PVの神経細胞に対する毒性発現の分子メカニズム解析の基盤をつくることができ、さらに神経毒性を示さないとされるPVベクターの構築に成功した。

HGFまたはXIAP発現PVベクターはALSの発症遅延効果や病態進行遅延効果を持つことが期待される。

今後、ALS病態モデルとして知られるSODマウスを使用して、ALS発症に対する効果を検討していく。既にSODマウスとポリオ感受性マウスとの交配により、PVに感受性で、ALSを発症するマウスの作出に成功している。

投与方法は筋肉内接種である。この接種法により、PVに対する血中抗体を回避できることは証明済である。

PVのモノシストロニックRNAベクターでは、なぜ分泌型蛋白質の発現が起こらないかは、現在のところ不明である。分泌シグナルを持つ蛋白質に結合した複製用蛋白質の一部が細胞外に出るためにRNAレプリコン活性も失われる可能性が考えられる。

## E. 結 論

神経細胞毒性を示さないPV発現ベクターを作製することに成功した。今後はモデルマウスを使用したALSの治療・発症遅延・病態進行遅延などの研究を展開する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Blockade of poliovirus-induced cytopathic effect in neural cells by monoclonal antibody against poliovirus or human poliovirus receptor. *J. Virol.* 79:1523-1532, 2005.
- 2) Establishment of a poliovirus oral infection system in human poliovirus receptor-expressing

transgenic mice that are deficient in alpha/beta interferon receptor. *J. Virol.* 81:7902-7912, 2007.

3) Molecular aspect of poliovirus pathogenesis. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 83:266-275, 2007.

## 2. 学会発表

1) 2A protease gene is not essential for poliovirus RNA replicon activity. XIII International Congress for Virology, July 23-28, 2005, San Francisco.

2) Analysis of Anti-poliovirus response of neural cells. XIII International Congress for Virology, July 23-28, 2005, San Francisco.

3) ポリオウイルス感染による神経細胞変性効果 (CPE) 発現機構の研究. 第55回日本ウイルス学会 10月21-23日, 札幌.

## H. 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

## RNAiを用いた筋萎縮性側索硬化症の治療法の開発

研究協力者：水澤 英洋（東京医科歯科大学脳神経病態学 教授）

共同研究者：横田 隆徳<sup>1)</sup>，久保寺隆行<sup>1)</sup>，笹栗 弘貴<sup>1)</sup>，山田 宏美<sup>1)</sup>，  
大平 進嘉<sup>1)</sup>，海野 敏紀<sup>1)</sup>，安斎 政幸<sup>2)</sup>，三谷 匡<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学，<sup>2)</sup>近畿大学先端技術研究所

**研究要旨：**常染色体優性遺伝性疾患でsmall interfering RNA (siRNA) で治療するという究極の遺伝子治療を目指した基礎研究が進行している。我々は3年間の本研究班において1) 新たなRNAi手法を開発することにより、siRNAによって抑制された正常遺伝子による副作用を防げることを*in vivo*で示した。2) 発現型short hairpin RNA (shRNA) を用いる際に最近問題になっているshRNA毒性に対してshRNA発現量を適切に調節することによって副作用を回避できる可能性があることを示した。3) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新しいモデル動物として、家族性および孤発性ALSの新しい原因遺伝子として同定されたangiogenin (ANG) に対して、マウスに存在する複数のANGの発現を一度に抑制するANG-siRNAトランスジェニック (Tg) マウスの作製を試み、そのキメラマウスの産出に成功した。

### A. 研究目的

RNA interferenceは2本鎖RNA (double-stranded RNA: dsRNA) によって配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。shRNAは細胞内でプロセスされてsiRNAとなり、siRNA配列に相補的な配列をもつmRNAを分解する。

我々はsiRNAの*in vivo*における有効性を検証するために、ALSのモデルマウスであるG93A SOD1 TgMをanti-SOD1 shRNA TgMと掛け合わせることで変異SOD1の発現を抑制し発症を防ぐことを報告した (Saito Y *et al*, JBC, 2005)。しかし、治療されたマウスは内因性の野生型SOD1も抑制され、軽度ながら肝障害の副作用が認められた。

また、最近アデノ随伴ウイルス (AAV) 8型によるshRNA過剰発現マウスにおいて致死的な肝障害のshRNA毒性という副作用が報告され、その機序としてmicroRNAのプロセス障害が提案された (Dirk G *et al*, Nature, 2006)。今回これらの問題点についてその評価法及び解決法を検討する。

次にこれらの新規の治療方法を検証するためにALSの新しいモデル動物の作製を試みた。最近ANGが家族性および孤発性ALSの新しい原因遺伝子の候補として報告された (Greenway *et al*, Nat Genet 06)。報告された変異の殆どがANGの機能を低下させることから、ANGのloss of functionがALSの病態に関与している可能性が考えられている (Crabtree *et al*, Biochemistry 07, Wu *et al*, Ann Neurol 07)。マウスには6つのANG遺伝子が報告されているが、我々はその全ての遺伝子が抑制されたsiRNAトランスジェニック (Tg) マウスの作製を試みた。

### B. 研究方法

#### 1) 内因性野生型アリの回復

shRNA治療において抑制された内因性の野生型遺伝子の発現を、我々の新しく考案したshRNA抵抗性遺伝子を用いる方法 (Kubodera T *et al*, Oligonucleotides, 2005) によって補う。shRNA抵抗性野生型SOD1を過剰発現したTgMを作製して、これをanti-SOD1 shRNA TgMと掛け合わせ、作製したDouble TgMの解析によってその*in*

vivoでの有効性を検証する。

## 2) 新規 shRNA 発現 AAV ベクター

SOD1 に対する shRNA 発現 AAV8 ベクターについてトランスジーンを U6-shRNA を 8 つ繋げることで効果を増強する工夫をして、これをマウスに経静脈的に全身性に投与し、その効果と microRNA のプロセス障害を含めた副作用を評価する。

## 3) ANG-siRNA トランスジェニックの作製

各マウス ANG1 ~ 6 遺伝子の中で比較的相同性の高い部位を標的とした siRNA を設計し、それぞれの ANG-shRNA 発現ベクターを作製し、マウス 129 系 ES 細胞に導入した。約 50 の ES クローンに対し、レポーターアッセイにより最も高い ANG 抑制率を示す ES 細胞クローンを選択し、マウス胚盤胞期胚にマイクロインジェクションで導入してキメラマウスを作製した。

### [倫理面への配慮]

マウスを用いた動物実験は東京医科歯科大学の動物実験委員会の規定に基づいて、動物愛護に留意して行った。

## C. 研究結果

### 1) 内因性野生型アリの回復

siRNA 抵抗性ヒト野生型 SOD1 TgM を作製し、抗 SOD1 siRNA TgM と掛け合わせダブル TgM を作製した。

作製したダブル TgM の肝臓・脳・脊髄から抽出した蛋白の WB において、siRNA によって内因性のマウス SOD1 の発現は抑制されたまま、ヒト野生型 SOD1 の発現や SOD1 酵素活性が補われていることを確認した。さらに SOD1 ノックアウトマウスや抗 SOD1 siRNA TgM に認められる脂肪肝と軽度の肝機能障害を、血液生化学検査や組織学的に改善させることを確認した。

### 2) 新規 shRNA 発現 AAV ベクター

$1.5 \times 10^{12}$  vg の anti-SOD1 shRNA 発現 AAV8 ベクターの静脈注射の後、shRNA に起因する明らかな副作用なく、肝臓において長期間持続する SOD1 の発現抑制に成功した。shRNA の発現量を増やすと肝機能障害及び病理学的な肝細胞

壊死が認められたが、ウイルス量を調整することにより siRNA の有効性は保ちつつ、肝障害や microRNA のプロセス障害のない投与方法を見つけることができた。

### 3) ANG-siRNA トランスジェニックの作製

設計した計 12 種類の ANG-siRNA のなかで ANG1 ~ 4 を 80% 程度まで効率よく抑制する ANG-siRNA B-3 を選択した。これを ES 細胞に導入してルシフェラーゼアッセイや内因性 ANG1 mRNA の定量的 RT-PCR により評価したところ、ES クローンによって 1 ~ 90% まで様々な抑制効果を示した。ANG の抑制が胎生致死になる可能性も考慮して、これらの ES 細胞クローンの中から抑制効果の異なる 5 つの ES 細胞クローンを選択し、マウス胚盤胞期胚にマイクロインジェクションにより導入して、キメラマウスの作製に成功した。現在、このキメラマウスと野生型 C57BL/6J マウスを掛け合わせ、Tg マウス (F1) を作製中である。

## D. 考察

- 1) anti-SOD1 shRNA TgM は、shRNA のデザインが変異 SOD1 遺伝子特異的ではないため内因性の野生型 SOD1 の発現も抑制された。これに対し shRNA 抵抗性野生型遺伝子を同時に発現させることで、野生型 SOD1 タンパクの発現が補われ、さらに SOD1 の酵素活性も回復した。本手法により shRNA で抑制された内因性野生型 SOD1 を発現及び機能の両面で補うことができたものと考えられる。
- 2) shRNA 発現 AAV8 ベクターにより shRNA を肝臓に過剰に発現させると著明な肝機能障害が誘導されたが、shRNA の発現を適当な量に調整した場合には標的遺伝子の発現を 90% 以上抑制して、かつ副作用は観察されず、miRNA 量も正常であった。過剰な shRNA は細胞毒性を引き起こす可能性があるが、shRNA の発現を適切に調節すれば、副作用なく有効な RNAi 効果が得られると考えられる。その際に shRNA を 8 つ繋げた我々の AAV ベクターは有用であった。
- 3) ANG は VEGF に続く、第 2 の ALS に関連する血管新生因子である (Lambrechts *et al*, *Trend Mol Med* 06)。これらの血管新生因子が、神経細胞内でどのような機能を発揮するのか