

200833017B

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

NAD・Sir2依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 荒木 敏之

平成21(2009年)3月

## 目次

I. 総合研究報告 NAD・Sir2依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤 荒木敏之 館野美成子	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	23
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	24

NAD・Sir2 依存性軸索保護機構を用いた神経変性疾患治療とその分子基盤

研究代表者 国立精神神経センター 神経研究所 部長 荒木 敏之

研究要旨

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

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

本研究は、NAD 合成反応系改変による神経軸索保護としては NMNAT 活性の過剰発現が最も有効な方法であり、このメカニズムは、既に知られている神経細胞内の NAD 産生亢進のほかに、ミトコンドリアのエネルギー産生機構に影響を与えることで強い神経保護効果をもたらすことを示した。さらに、軸索変性に関わる細胞内反応としてユビキチンリガーゼである ZNRF1 が Akt-GSK3beta 系を制御するメカニズムを明らかにした。

軸索変性過程は神経細胞死とは独立した細胞内反応系であるが、細胞体の死の上流に位置するメカニズムでは必ずしもなく、また全ての軸索変性を伴う病理プロセスは多様で、NMNAT 活性の過剰発現が保護的に作用できるわけではない。軸索変性過程の多様性の詳細を解明することが疾患治療への応用につながるものと考えられる。

分担研究者 国立精神神経センター 神経研究所 室長 館野 美成子

神経軸索変性は、細胞死の防止(たとえば bcl2 の過剰発現など)によっては抑制できないことから細胞死とは独立したプロセスであると考えられるが、その一方で、軸索変性は神経細胞死に先立って見られ、軸索変性過程のいずれかが細胞死のプロセスをスタートする引き金を引き、最終的な細胞死に至ると考えられる。これらのことから、軸索変性を抑制できれば神経変性疾患の症状も抑制され、また軸索だけでなく神経細胞体も保護される可能性が高いと考えられ、

A. 研究目的

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

実際そのような方法での神経保護も既に観察されている。

我々はこれまでに自然発症変異マウス *wlds* において観察される神経傷害後の著明な軸索変性遅延の原因が NAD 合成酵素活性の亢進と、それに伴う NAD 依存性蛋白デアセチル化酵素 Sir2 の活性化によるものであることを明らかにした。NAD-Sir2 による神経軸索保護効果は、特に老化とともに進行する神経変性疾患など神経系の難病において神経保護による治療効果をもたらす可能性がたかく、このメカニズムによる軸索保護の分子機構の詳細を解明することは非常に重要な意義をもっている。

本研究プロジェクトにおいては、NAD・Sir2 依存性軸索保護のメカニズムを解明し、神経疾患への治療応用を実現することを目的としている。

具体的には 1) 軸索保護をもたらす細胞内シグナル伝達機構の解明、2) ウイルスベクター等を用いた遺伝子治療に関する基礎的技術の開発、3) トランスジェニックマウスの作成、並びに疾患モデルマウスとの掛けあわせによる治療効果の検討、を行うことを目標とした。

## B. 研究方法

### 1) 神経保護をもたらす細胞内シグナル伝達機構の解明

i) NAD-Sir2 依存性神経軸索保護効果を最も効果的に行なうための NAD 合成反応系の改変の方法に

ついて

NAD 産生反応系の各酵素の過剰発現並びにそれらの酵素の基質の投与の、神経軸索の *in vitro* での傷害後変性モデルにおける軸索保護効果を明らかにするために、図 1 に示した各酵素の過剰発現ならびに各基質/前駆物質の投与を行なった。

神経細胞は E12.5 のマウス胎児から取り出した後根神経節を *Explant culture* によって用いた。神経突起の伸展と Cytosine arabinoside 投与による分裂細胞 (Schwann 細胞など) の除去の後、培養開始後約 7~10 日目の細胞を実験に用いた。

各酵素の過剰発現にはレンチウイルスベクターを用いた強制発現システムを用いた。目的蛋白の発現にはユビキチンプロモータを用い、IRES-EGFP コンストラクトをつなぐことにより、目的遺伝子の発現を蛍光顕微鏡下で EGFP の発現を見ることで確認したあと、神経突起を細胞体から切り離すことによって突起の変性を誘導した。

各基質/前駆物質に関しては、上述の初

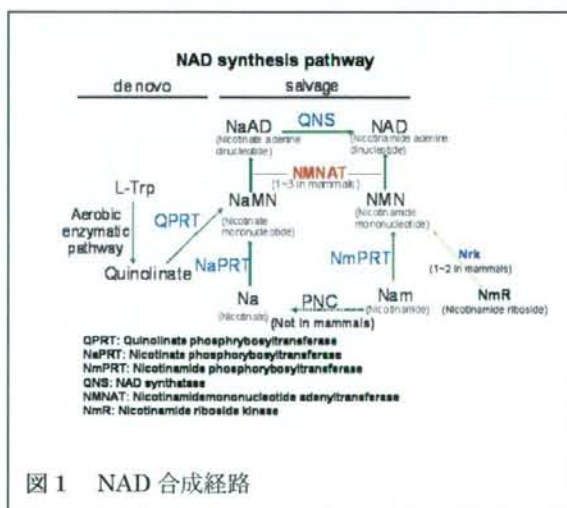


図 1 NAD 合成経路

代培養後根神経節細胞の培養液中に 100 $\mu$ M~1 mM の濃度で加え、約 24 時間後に同様に神経突起を細胞体から切り離すことによって突起の変性を誘導した。

神経突起の変性の進行はそれぞれの実験において、変性誘導前と比較して変性開始後 12, 24, 48, 72 時間後に残存している神経突起の割合 (%) を計測することによって評価した。

#### ii) 細胞内シグナル伝達機構に関する検討

NMNAT 過剰発現細胞における遺伝して転写レベルでの変化を明らかにするためにマイクロアレー法 (Affimetrics GeneChip) を用い、*wlds* マウスと正常 C57BL/6 マウスそれぞれの後根神経節から生成した RNA をサンプルとして、両者の網羅的比較を行なった。

またこれまでに Sir2/Sirt1 の基質として Sirt1 によりデアセチル化されることが知られている Foxo1, Foxo3a, Foxo4, p53, NF $\kappa$ B が NAD $\cdot$ Sir2 依存性軸索保護システムにおける Sir2 の下流の細胞内機序として作用しているかどうかを明らかにするため、1) で述べた *in vitro* 傷害後神経突起変性モデルにおいて、培養液中加入した NAD による軸索保護効果を siRNA (Foxo1, Foxo3a, Foxo4) あるいは NF $\kappa$ B superrepressor 分子が阻害するかどうか、あるいは初代培養神経細胞における NAD $\cdot$ Sir2 依存性軸索保護が p53 ノックアウト動物から取り出した神経細胞において成立するかどうかを検討した。

#### iii) NAD $\cdot$ Sir2 依存性軸索保護機構の有効

#### 性の範囲の検討

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

一方で、たとえば Parkinson 病モデルを *wlds* マウスにおいて作成した場合には、神経突起が変性から保護される一方、神経突起が残存している間にも細胞体の死が起きることが観察されている。このような例は他のいくつかのモデルにおいても観察・報告されているが、これらのことから、神経突起の変性は神経細胞体の死 (細胞死) とは独立した現象であるが、神経突起の変性が時間的経過として細胞死より先に起こるものの、これらの現象の間には必ずしも因果関係は無い可能性が考えられる。NAD $\cdot$ Sir2 依存性メカニズムが神経突起を保護するケースは非常にさまざまな神経変性のプロセスにおいて認められているが、どのような場合に神経突起だけでなく細胞全体がこのメカニズムで保護されるのかは明らかではなかったが、この「有効性の範囲」は NAD $\cdot$ Sir2 依存性神経保護がどのような細胞内反応機序を介するものなのか、ということにも深く関係しており、重要な意義を

持っていると考えられる。

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

iv) 軸索変性遅延をきたす細胞内反応のスクリーニング

NAD<sup>+</sup>-Sir2 依存性軸索保護メカニズムに限らず、軸索変性の細胞内メカニズムに関する反応全般をスクリーニングする目的で、様々なスクリーニングを行った。第 1 に、cDNA 発現ライブラリを用い、神経様に分化する Neuro 2 A 細胞に Vincristine を投与して誘導する細胞突起退縮を抑制するクローンのスクリーニングを行った。第 2 に、市販の Kinase、Phosphatase に対する阻害剤ライブラリーを入手し、それぞれの化合物が軸索変性過程に対して影響を及ぼすかどうかを、初代培養 DRG 神経細胞を用いて検討した。

2) ウイルスベクター等を用いた遺伝子治療に関する基礎的技術の開発

i) AAV ベクターを用いた疾患モデルに対する治療効果の検討

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

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

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

ii) NMNAT 活性過剰発現の神経疾患に対する治療効果に関する検討

NMNAT 活性過剰発現の神経疾患治療効果に関しては、*wlds* マウスを用いた検討に関する報告がなされている。それらによると、*wlds* マウスにおいて作成された末梢神経損傷、虚血性脳障害、一部の変性疾患モデルにおいては著明な神経保護効果を示す一方、変異型 SOD1 を発現する家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) モデルに対しては、殆ど神経保護効果を示さないことが報告されている。今回我々は NMNAT 活性が極めてたかい NMNAT3-Tg マウスを作成しえ

たため、このマウスを用いることで、これまで Wlds マウスによる保護効果が得られなかった疾患モデルに対する保護効果が示せるかどうかを検討した。

### 3) NMNAT 過剰発現 Tg マウスのフェノタイプ解析

NMNAT 活性の過剰発現による軸索変性遅延効果と、これによる神経変性疾患治療効果をモデル動物体内で明らかにするため、NMNAT 活性を過剰発現するモデルマウスの作成を行なった。

トランスジーンの生体内での十分な発現レベルを実現するため、神経系でも十分な

発現が得られることを確認済みである CAG プロモータを用い、NMNAT1, NMNAT3 の各ファミリーメンバーの過剰発現モデルを作成することとした(図2参照)。申請時の計画ではこれらに併せて、上述(1・i)の研究によって同定した、NAD 合成反応系の酵素のなかで過剰発現による軸索保護効果が最も強いものを過剰発現するモデルも作成する予定であったが、後述するように NMNAT の過剰発現が最も強い軸索

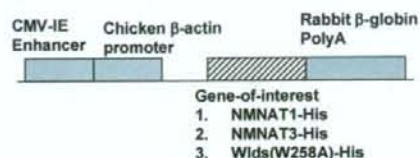


図2 トランスジェニックマウス作成のためのコンストラクト

保護効果を示したため、NMNAT 以外の酵素の過剰発現モデルについては作成しなかった。

なお、Negative コントロールとして、自然発症変異マウス wlds において発現している Wlds 蛋白に W258A 変異を導入したも

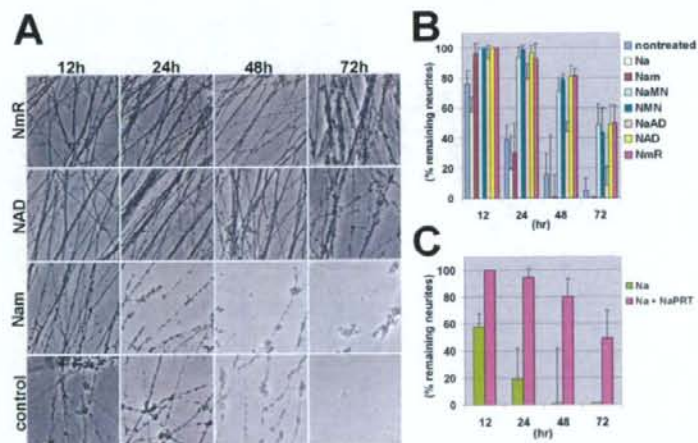


図3 In vitro ワーラー変性モデルにおいて NAD 合成反応中間産物を投与した際の軸索変性遅延効果

図1に示した NAD 合成反応の各中間産物投与 24 時間後に In vitro ワーラー変性を誘導し、12, 24, 48, 72 時間後の代表的な写真 (A) と各時間後に残存する神経突起数、実験開始前の神経突起数に対する比率を表示した (B)。NaMN, NMN, Nmr が NAD と同程度の軸索変性遅延効果を示した。(C) は Na 投与を通常 DRG 神経細胞との NaPRT 過剰発現した DRG 神経細胞において行なった場合の軸索変性遅延効果を示しており、Na が軸索変性遅延効果を発揮するためには NaPRT の過剰発現が必要であることが示された。

の (Wlds 蛋白における NAD 合成酵素活性中心に存在し、この変異を導入することにより NMNAT 活性が無くなる) の過剰発現マウスモデルを合わせて作成した。それぞれのトランスジーン由来蛋白の発現の確認のため、各蛋白は C 末端に Hexahistidine タグをつけた状態で発現させるようデザインした。

トランスジェニックマウスの作成は ICR マウス受精卵へのマイクロインジェクションによる定法によって行なった。トランスジーン発現は、PCR によって確認したのち、サザンブロット解析、ウェスタンブロット解析によって発現量の定量的比較検討を行なった。

神経軸索変性からの保護に関するフェノ

タイプについては、坐骨神経切断モデルを用い、一定期間後の Neurofilament の Immunoreactivity の残存や形態学的変化によって評価を行った。さらに、軸索変性遅延効果の認められた Tg マウスとそうでないマウスの、それぞれのグループ間におけるトランスジーン由来蛋白の発現部位、ミトコンドリアの電子伝達系構成蛋白の発現レベル、ミトコンドリア呼吸機能的解析結果に関する比較を行った。

作成した Tg マウスのうち、後述のように、軸索変性遅延効果と最も強い NMNAT 活性とを示した NMNAT3-Tg マウスと、家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) モデルマウスである SOD1 (G93A) Tg マウスとの交配

をおこない、FALS モデルにおける軸索変性、運動神経細胞死、更には疾患の発症時期、寿命に対する NMNAT 活性過剰発現の効果を、検討した。

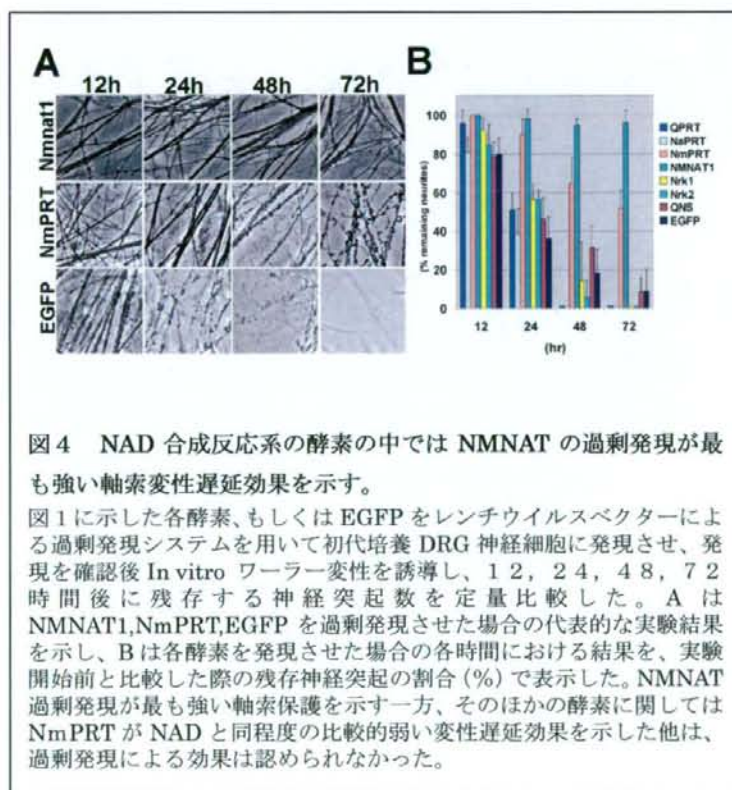


図4 NAD 合成反応系の酵素の中では NMNAT の過剰発現が最も強い軸索変性遅延効果を示す。

図1に示した各酵素、もしくはEGFPをレンチウイルスベクターによる過剰発現システムを用いて初代培養DRG神経細胞に発現させ、発現を確認後In vitroワーラー変性を誘導し、12、24、48、72時間後に残存する神経突起数を定量比較した。AはNMNAT1, NmPRT, EGFPを過剰発現させた場合の代表的な実験結果を示し、Bは各酵素を発現させた場合の各時間における結果を、実験開始前と比較した際の残存神経突起の割合(%)で表示した。NMNAT過剰発現が最も強い軸索保護を示す一方、そのほかの酵素に関してはNmPRTがNADと同程度の比較的弱い変性遅延効果を示した他は、過剰発現による効果は認められなかった。

#### 倫理面への配慮

本研究で行う動物実験および遺伝子組み換え実験は関係法令および指針に基づき、実施場所である国立精神・神経センター神経研究所の定める「小型実験動物倫



理指針」、「小型実験動物研究施設の運営に関する規則」および「組み換え DNA 実験安全規則」、「組み換え DNA 実験内部規則」に従って行った。

### C. 研究成果

#### 1) 神経保護をもたらす細胞内シグナル伝達機構の解明

i) NAD-Sir2 依存性神経軸索保護効果を最も効果的に行なうための NAD 合成反応系の改変の方法について

これまでの研究において、我々は、*In vitro* ワーラー変性モデルにおいて

NMNAT 1 の

過剰発現、なら

びに培養

液中への

NAD の投与

によって軸

索変性遅延

効果を観察

できること

を示した。本

研究におい

ては同様の

方法によっ

て、NAD 合

成反応系に

おける他の

酵素の過剰

発現、並び

に NAD 合成

反応中間

産物の培養液中への投与の効果を検討した。

NAD 合成中間産物に関しては、NAD の前駆物質である NMN、NaMN はいずれも 1 mM で以前に報告した NAD の示す軸索保護と同程度の保護効果を示した。次に、さらに前段階の前駆物質であるニコチンアミド、ニコチン酸の効果を検討したところ、いずれも有意な軸索保護効果を示さなかった (図 3)

最近 NAD の前駆物質として、以前から知られていた物質に加えて、Nicotinamide riboside (NmR) の重要性が報告されている。このため、NmR の軸索保護効果を調べたところ、NmR は NAD と同レベルの軸索保護効果を示した (図 3)。

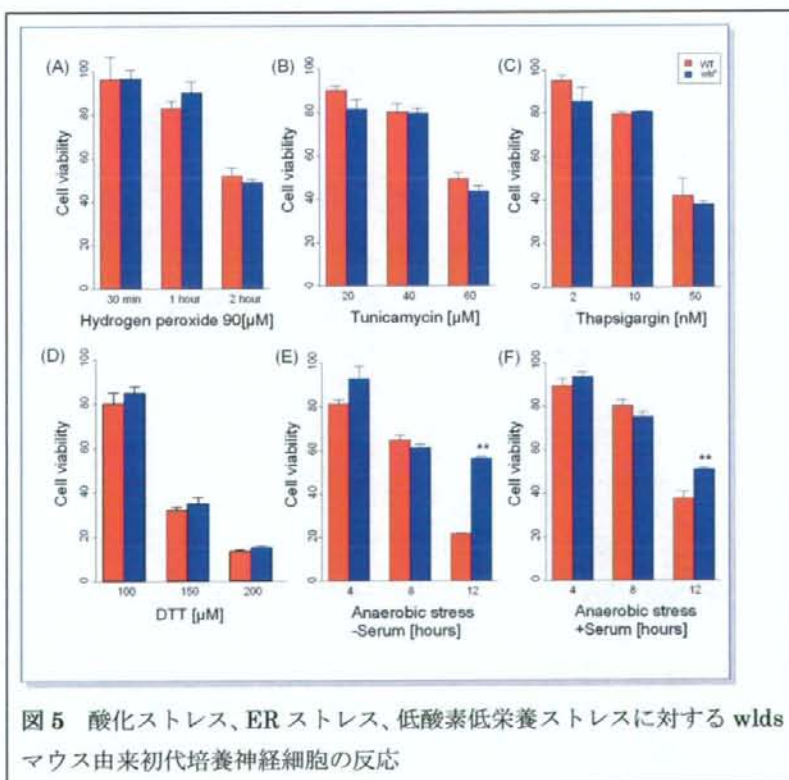


図 5 酸化ストレス、ER ストレス、低酸素低栄養ストレスに対する *wlds* マウス由来初代培養神経細胞の反応

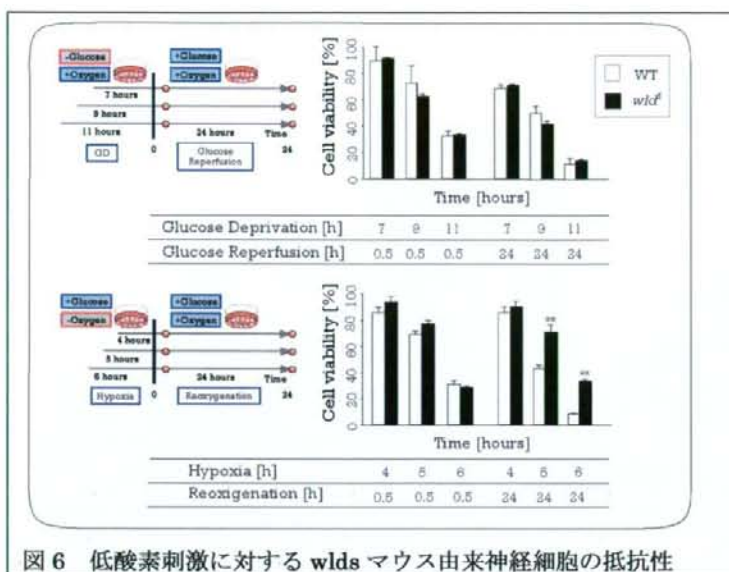


図6 低酸素刺激に対する *wlds* マウス由来神経細胞の抵抗性

NAD 合成系の各酵素 (NMNAT, QPRT, NmPRT, NPRT, Nr1: 略号については図1 参照) に関しては、それぞれの過剰発現のためのレンチウイルスベクターを作成し、それらを用いてまず、HEK293T 細胞を感染させ、それぞれのベクターが酵素活性をもった目的とする蛋白を発現させることを確認した。ついで、各ベクターを初代培養 DRG 神経細胞に感染させ、軸索保護効果を検討したところ、既に報告した NMNAT 以外はいずれの酵素もあきらかな効果を示さなかったが NmPRT は弱い軸索保護効果を示した (図4)。

この実験で用いた培養液にはニコチン酸は含まれないが、ニコチン

ンアミドは生理的濃度に近い濃度で含まれている。この軸索保護実験で NmPRT の過剰発現は保護効果を示すのに NPRT は効果がなかったのは、それぞれの酵素に対する基質が培養液中に存在するかどうか依存している可能性が考えられたため、上記の実験に加えて、(培

養液中のニコチン酸+NPRT 過剰発現) (培養液中のニコチンアミド+NmPRT 過剰発現) による軸索保護効果を検討したところ、いずれの場合においても、培養液に NAD を加えた場合と同程度の軸索保護が認めら

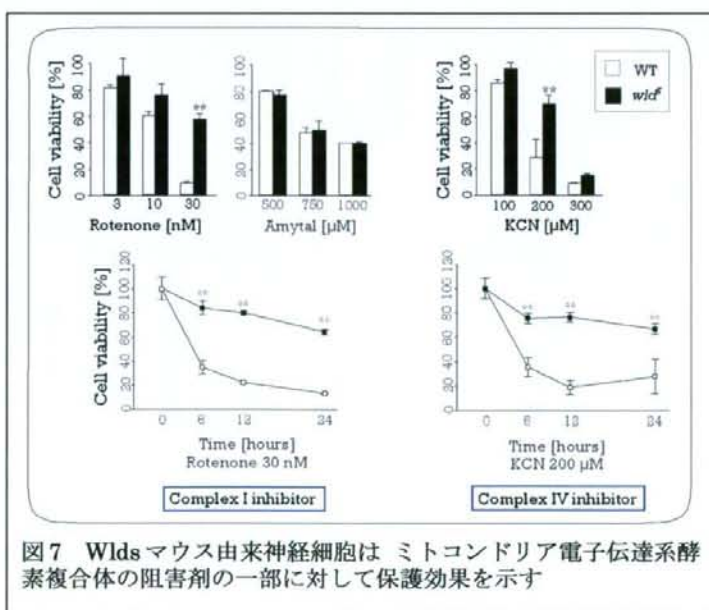


図7 *Wlds* マウス由来神経細胞は ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体の阻害剤の一部に対して保護効果を示す

れた (図 3)。

これらのことから、ニコチン酸が NaPRT によって NaMN に、ニコチンアミドが NmPRT によって NMN に、それぞれ変換される反応系は、神経細胞においては利用可能であるものの、通常の神経細胞においては Constitutive に Active な反応系とはいえないものと考えられた。一方、Nicotinamide Riboside 投与が軸索変性遅延に有効であったことから、Nicotinamide Riboside が Nr1k によって NMN に変換される反応は Constitutive に存在するものと考えられた。

#### ii) 細胞内シグナル伝達機構に関する検討

マイクロアレイ解析の結果、wlds マウス神経節由来 RNA において正常動物に比較

して発現レベルが 2 倍以上亢進或いは低下しているものは非常に少なく、NAD・Sir2 依存性軸索保護システムにおいて、Sir2 が、多数の遺伝子の発現調節に関与するような転写因子の機能調節を行なっているとは考えられないという結果となった。

この結果と一致するように、FOXO ファミリーの各蛋白、p53、NF $\kappa$ B の機能阻害も NAD・Sir2 依存性軸索保護には無関係であることが示された。

#### iii) NAD・Sir2 依存性軸索保護機構の有効性の範囲の検討

それぞれのストレス刺激を与えた場合の結果を図 5 に示す。これらのストレス刺激によって生じる神経突起変性に対しては、いずれの刺激に対しても NAD・Sir2 依存

性メカニズムは保護作用を示すことが既にわかっているが、今回の実験モデルにおいては、酸化ストレス、ER ストレスによる神経細胞死に対する NAD・Sir2 依存性メカニズムによる保護効果は認められなかった。一方、低酸素、もしくは低酸

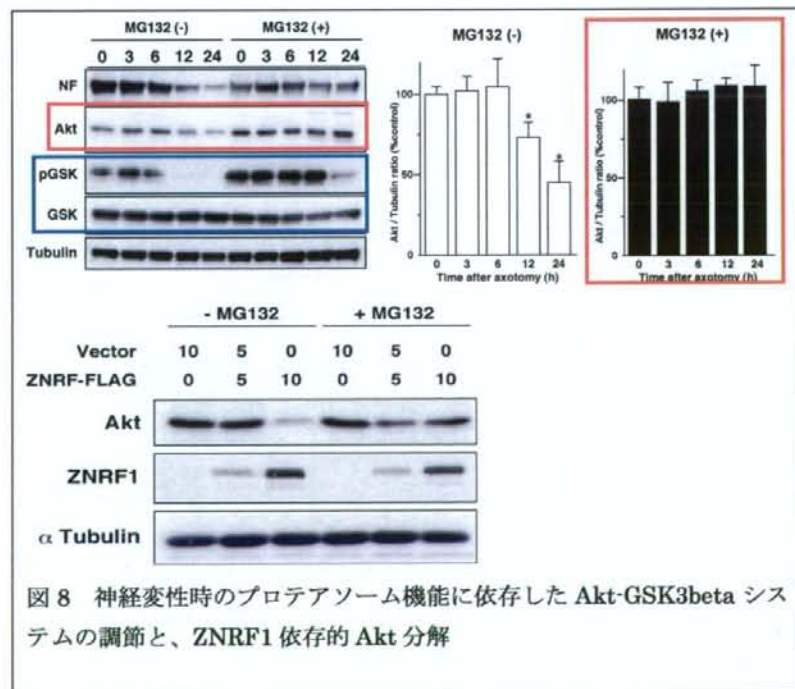


図 8 神経変性時のプロテアソーム機能に依存した Akt-GSK3beta システムの調節と、ZNRF1 依存的 Akt 分解

素+低栄養刺激による細胞死に対する保護効果は明瞭に認められた。

OGDに対する保護メカニズムの詳細を更に検討するため、低酸素、低栄養のいずれに対する保護効果があるのかを調べたところ、低酸素に対して保護があり、特に再酸素化に際して惹起される細胞傷害に対する保護効果を認めることが明らかとなった。(図6)

低酸素・再還流による細胞傷害に関してはミトコンドリアの関与が考えられたため、次に、同じ初代培養大脳皮質神経細胞へのストレスモデルを用いて、既に知られているミトコンドリア電子伝達系酵素複合体のそれぞれに対する阻害作用を有する化合物に対するNMNAT活性過剰発現による保護効果を検討した。その結果、Complex1の阻害剤のうちRotenoneを投与した場合と、Complex4の阻害剤のうちKCNを投与した場合の細胞毒性に対する保護効果を認めたが、これら以外の阻害剤に対しては保護効果は認められなかった。(図7)

iv) 軸索変性遅延をきたす細胞内反応のスクリーニング

キナーゼ阻害剤ライブラリ (Roche) を用いた検討の結果、GSK3beta阻害剤が *in vitro* ワーラー変性過程を抑制することを発見した。

GSK3betaはAktによるリン酸化によって機能制御を受け、GSK3betaリン酸化が、GSK3betaを不活性化することが以前より知られている。今回、我々はAktによるGSK3betaリン酸化が、GSK3beta阻害剤と同様に *in vitro* ワーラー変性過程を抑制することを見出した。

これまでの報告、ならびに我々のPreliminaryな結果から、軸索変性の進展にはプロテアソームの機能が必要であることがわかっている。今回、我々は軸索変性過程でプロテアソーム分解をうけることを見出し、その反応に関与するユビキチンリガーゼとしてZNRF1を同定した。ZNRF1は軸索変性の際にAktと結合し、Aktを分解することによって、GSK3betaを活性化し、軸索変性過程を進行させる方向に制御しているものと考えられた。(図8)

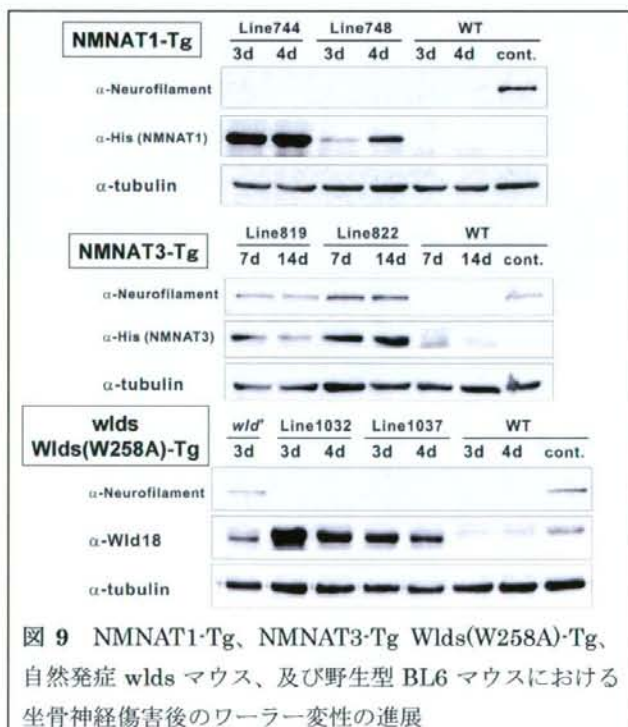
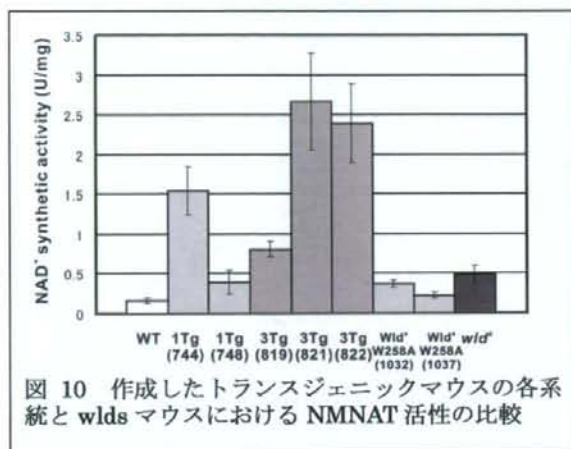


図9 NMNAT1-Tg、NMNAT3-Tg Wlds(W258A)-Tg、自然発症 wlds マウス、及び野生型 BL6 マウスにおける坐骨神経傷害後のワーラー変性の進展



## 2) ウイルスベクター等を用いた遺伝子治療に関する基礎的技術の開発

AAV ウイルスベクターを用いた高タイトーのベクター作成を行った。

AAV の異なる Serotype の中では AAV2,5,9 を用いた場合の神経細胞における発現を確認した結果、いずれのタイプでもマウス脳内での発現が認められたが、神経細胞に対する毒性、パーキンソン病モデルに対する適用を想定した場合の黒質神経細胞への発現効率などを考慮し、AAV1 ベクターを用いた場合の発現が最も良好であることを確認した。

ウイルスベクターを用いた実際の治療モデルについては、本研究の実施期間内に完了することができなかった。

## 3) NMNAT 過剰発現 Tg マウスのフェノタイプ解析

NMNAT1, NMNAT3, 変異型 *Wlds* の各遺伝子につき、得られた F0 マウスのうちトラン

スジーンが導入されたものを、各 F0 マウス組織から抽出したゲノム DNA をテンプレートとする PCR 反応によって確認し、それぞれの遺伝子につき、13 匹、15 匹、9 匹のトランスジーン陽性 F0 マウスを得た。

トランスジーン由来の蛋白の発現確認は His タグを持つ過剰発現蛋白の Immunoblot により行い、さらに各 Tg マウス脳組織における NMNAT 活性を測定して *wlds* マウス、野生型マウスにおける酵素活性

と比較した。

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

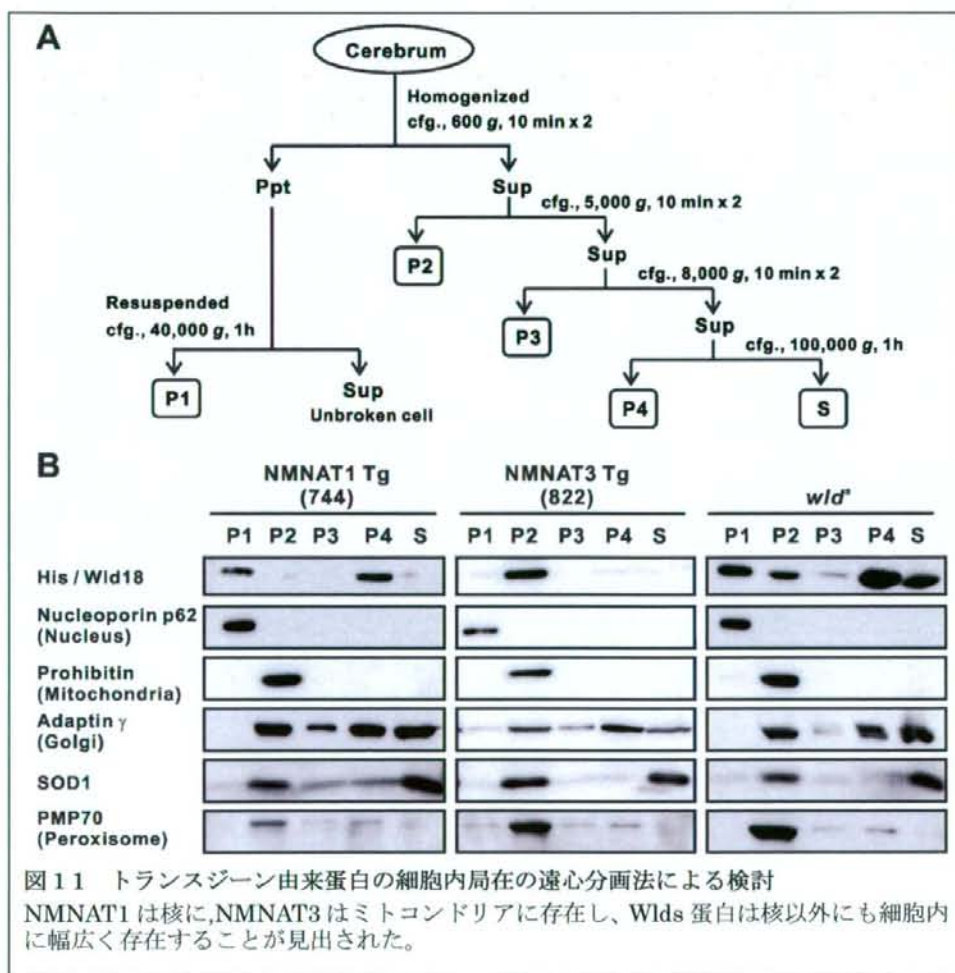
次にこれらのマウスにおける神経軸索変性を比較検討するため、坐骨神経傷害モデルにおけるワーラー変性の進展を、傷害部位より末梢側の Neurofilament の immunoreactivity の発現によって検討した。(図 9) このモデルにおいては、野生型マウスを用いた場合、神経傷害後直ちにワーラー変性が進行し、傷害の 3 日後には Neurofilament の発現が全く確認できないが、*wlds* マウスでは傷害の 2 週間後にも Neurofilament の発現を認める。

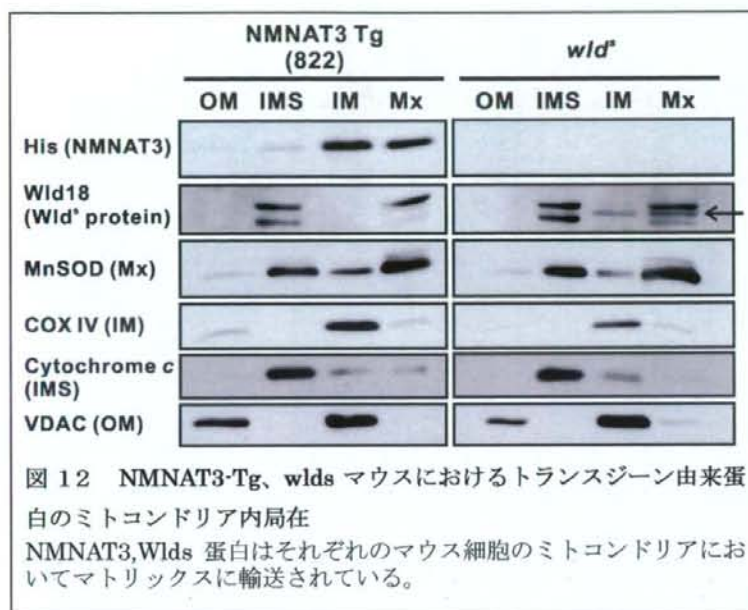
NMNAT1-Tg においては、Neurofilament の発現低下は野生型マウスと殆ど同じで軸索変性遅延効果は殆ど認め

られなかった。今回得られた NMNAT1-Tg マウスの中で NMNAT1 発現レベルが最も高く *wlds* マウスよりも神経組織中の NMNAT 活性が高い系統においても、*wlds* で見られるようなワーラー変性遅延効果を認めなかった。また *Wlds* (W258A) -Tg マウスにおいても軸索変性遅延を認めなかった。

一方、NMNAT3-Tg においては、Neurofilament 発現は2週間後も認められ、自然発症 *wlds* マウスと同じ程度のワーラー

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





軸索変性遅延効果を認めた NMNAT3-Tg のうち最も NMNAT 活性が低いラインと、軸索変性遅延を認めなかった NMNAT1-Tg のうち最も NMNAT 活性が高かったラインを比較すると、組織 Lysate 中での単位蛋白量あたりの NMNAT 活性は軸索変性遅延効果を認めた NMNAT3-Tg の方がより高かった。(図 10) このことは、軸索変性遅延フェノタイプの発現のためには NMNAT 活性の過剰発現が必要であるが、軸索変性遅延効果は細胞内の NMNAT 活性レベルと単純な比例関係にあるのではないことを示しており、それ以外の要因の必要性が示唆された。

NMNAT1 は核に、NMNAT3 はミトコンドリアに、それぞれ存在することが知られていることから、活性レベル以外の要因として NMNAT 活性の細胞内存在部位が重要である可能性が考えられた。*wlds* マウスにおいて軸索変性遅延の原因となっている Wlds 蛋白質に関しては、UFD2a の N 末端側

70 アミノ酸に NMNAT1 の全長が融合したものであり、NMNAT1 は核移行シグナルを持っているため核に存在するものと考えられたが、今回遠心分画法をもちいて詳細に細胞内局在を検討したところ、Wlds 蛋白質は核だけではなく、細胞内に広く分布し

ており、NMNAT3 が存在するミトコンドリアにも存在することがわかった。(図 11)

Wlds 蛋白質と NMNAT3 蛋白質のミトコンドリア内での存在部位をさらに遠心分画法を用いた Subfractionation 法によって検討したところ、いずれの蛋白質も、ミトコンドリアの Matrix に存在することが確認された。このことは、本来ミトコンドリアに存在する NMNAT3 だけではなく、Wlds 蛋白質も単にミトコンドリアの周辺に存在したり外膜に接着しているのではなく、マトリックスに輸送されていることを示しており、これらのタンパクがミトコンドリアにおいて何らかの機能を果たすことによって軸索変性遅延フェノタイプに寄与している可能性が考えられた。(図 12)

軸索変性遅延フェノタイプを示すマウスにおけるミトコンドリアの特性を検討するため、まず神経組織中におけるミトコンドリア量に関する検討を行った。ミトコンド

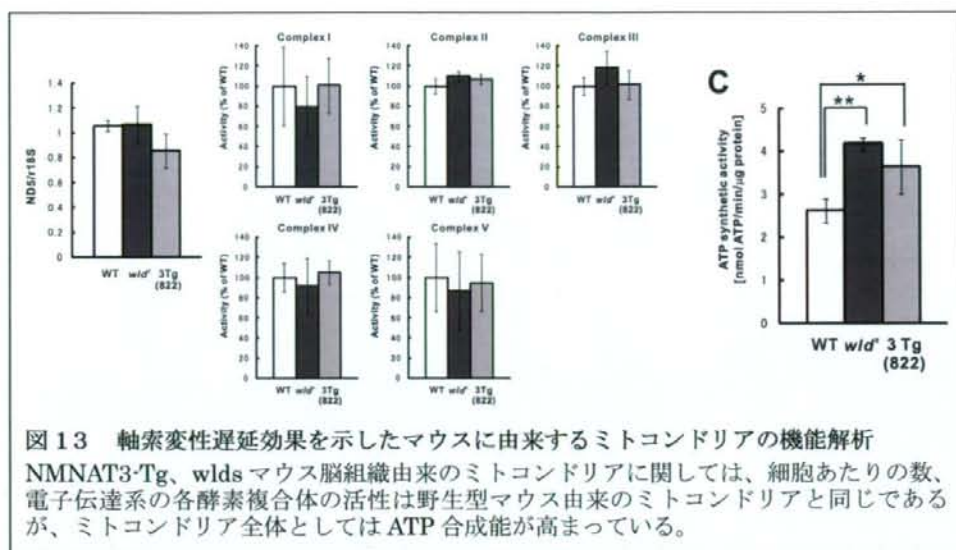


図 13 軸索変性遅延効果を示したマウスに由来するミトコンドリアの機能解析  
 NMNAT3-Tg、wlds マウス脳組織由来のミトコンドリアに関しては、細胞あたりの数、電子伝達系の各酵素複合体の活性は野生型マウス由来のミトコンドリアと同じであるが、ミトコンドリア全体としては ATP 合成能が高まっている。

リア量に関しては、ミトコンドリア電子伝達系を構成する蛋白のうち各酵素複合体の代表的構成成分の発現量、体細胞ゲノム DNA 量とミトコンドリアゲノム DNA 量の比率を用いて比較したが、いずれの場合にも軸索変性に関するフェノタイプによって違いは認められず、NMNAT 活性の過剰発現による細胞全体でのミトコンドリア量の変動はないものと考えられた。さらに、NMNAT 活性を過剰発現したミトコンドリアの電子伝達系の酵素活性をそれぞれの酵素複合体ごとに測定したが、酵素複合体 I-V のそれぞれにおいて、酵素活性は変化していなかった。

一方、それぞれのマウス脳組織からミトコンドリアを分離し、単位ミトコンドリア量あたりの ATP 合成能を比較検討したところ、上述のように各酵素複合体の活性には変動がなかったにもかかわらず、ミトコンドリア全体を取り出して測定した場合の ATP 合成能は、軸索変性遅延フェノタイプを示すマウスにおいて ATP 合成能が向上していることが認められた。このような変

化が、軸索変性遅延フェノタイプと関係している可能性が考えられた。(図 13)

#### NMNAT 活性過剰発現の神経疾患に対する治療効果に関する検討

変異型 SOD1 過剰発現による FALS マウスモデルにおいては、脊髄運動神経細胞の細胞死に先立って運動神経軸索の変性を認めることが知られているが、wlds マウスと FALS モデルマウスの交配によって FALS モデルマウスの症状の軽減は認められず、寿命にも変わりがないことが報告されている。wlds マウスにおける NMNAT 活性は UFD2a プロモータによって発現しているが、この活性はマウスの老化と共に低下するものと考えられ、このことが wlds マウスとの交配によって保護が出現しない原因となっている可能性が考えられる。今回我々が作成した NMNAT3-Tg の中で最も Transgene の発現量が多く、高齢においても NMNAT 活性の発現が低下しないマウスと、SOD1(G93A)-Tg マウスとを交配して



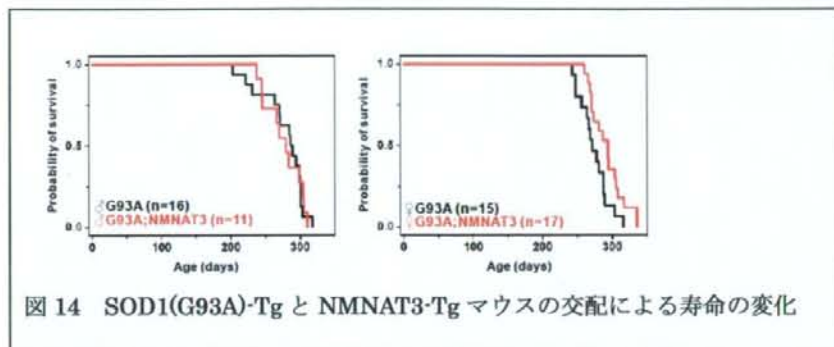


図 14 SOD1(G93A)-Tg と NMNAT3-Tg マウスの交配による寿命の変化

SOD1(G93A)-Tg マウスにおける神経変性の進行を観察した。

NMNAT3-Tg マウスは NMNAT 活性を高齢に至るまで維持していることが確認されたが NMNAT3 を過剰発現する

SOD1(G93A)-Tg オスマウスについては、発症時期、寿命は変わらず、運動神経変性も通常の SOD1(G93A)-Tg マウスと同様に進行した。SOD1(G93A)-Tg メスマウスは発症時期、寿命ともにわずかではあるが有意な延長を認めた。(図 14)

#### D. 考察

細胞内の NAD 合成反応系に関しては、従来細菌・酵母において主として研究されてきた。図 1 に示すような経路はこれらに対応する酵素が哺乳動物にも存在する場合にはそのような反応経路が存在するという仮定に基づいて作成されたもので、実際に哺乳動物の細胞においてどのような経路で NAD が合成されているのかについての研究は限られていた。我々の研究は、培養神経細胞において、軸索保護を Readout とすることにより、神経細胞における NAD の生理的な合成経路をはじめて明らかにした。

我々の実験結果は、少なくとも一旦分化

した神経細胞においては、ニコチンアミド、ニコチン酸を開始物質とする NAD の合成系

は、いずれも通常は不活性であることを示している。(基質のみを投与した場合には軸索保護が起こらないことは、通常十分な酵素活性が細胞内にはないことを意味していると考えられる。) この結果は、神経細胞以外では、膵臓ベータ細胞における NAD 代謝を研究しているグループから、NmPRT の活性が NAD 合成に不可欠である、という報告を行なっているのとは異なった結果であり、細胞種によって異なった NAD 合成系路があることが示唆される。ニコチンアミド、ニコチン酸とは異なり、NmR は基質単独の投与で NAD と同じ程度の軸索保護効果を示したことから、神経細胞においては、NmR に由来する NAD 合成反応が生理的に重要である可能性が示唆されている。

哺乳動物の神経系において、NmR がどのようにして供給されるのかは未だ明らかでないが、NmR が神経に比較的特異的な NAD の原材料として作用するならば、生体内に投与する場合には NAD 自身よりは副作用が少ない可能性もある。今後この物質の生体内における代謝に関して、更に検討する必要がある。

NMNAT 活性過剰発現による神経軸索保

護効果の細胞内機序として、2004年に発表された論文において我々はNAD依存性蛋白脱アセチル化酵素であるSirt1の活性化を想定した。一方、この想定機序とは一見矛盾する実験結果がいくつか報告されている。例えばwldsマウスでは神経組織中のNMNAT活性の上昇にもかかわらず、組織中のNAD含有量は増えていないことが報告されており、この結果はNADの細胞内濃度上昇を介してSirt1が活性化される、という仮説に反するとも考えられる。また、今回の我々の実験において、NMNAT1-Tgマウスでは軸索保護効果が認められないことは、Sirt1活性化仮説と合致しない。

今回のTgマウスによる検討の結果、我々はNMNAT活性のミトコンドリアへの局在がミトコンドリア機能へ与える影響が軸索保護効果に重要な役割を持っているのではないかと考えるに至った。NMNAT活性の神経細胞への過剰発現は、NAD過剰産生効果を介してSirt1活性化をきたす効果と、ミトコンドリア機能に対する効果の両方があり、*in vitro* ワーラー変性モデルにおいて細胞培養液中にNADを投与した場合の神経突起変性遅延効果がSirt1の発現抑制によって阻害されることから、神経細胞内のNAD濃度が上昇した場合にはSirt1活性化を介したメカニズムが寄与することには疑いがないが、wldsマウス、あるいは今回作成したNMNAT3-Tgマウスにおいては、このメカニズムの寄与は小さく、NMNAT活性のミトコンドリア機能に対する影響が軸索変性遅延効果に大きく寄与しているものと考えられた。

今回作成したTgマウスを用いた検討に

おいては、ミトコンドリアのATP合成能の向上を認めたにもかかわらず、個々の電子伝達系酵素複合体の発現量や酵素活性には明らかな変化を認めなかったことから、NMNAT酵素活性のATP産生に対する影響は電子伝達系には直接的な影響を及ぼさない様式によるものであることが推定される。このことは、大脳皮質神経細胞の初代培養においてミトコンドリア電子伝達系酵素複合体の阻害剤を投与した実験の結果からも推定され、たとえば酵素複合体Vに対する阻害剤の毒性に対する保護効果はないことから、NMNAT酵素活性が直接ATP合成に関与したり、ATP合成反応の活性化などに作用しているわけではないと考えられる。ここで一つの可能性としては、ROS産生の阻害効果である。ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体の阻害剤のうち、一部のROS産生と関与したステップに対してNMNAT過剰発現神経細胞が保護効果を持つことは、この可能性を支持するものとも考えられる。今後、NMNAT活性の過剰発現に伴うミトコンドリアの機能変化がどのような分子レベルでの実態を伴うものであるかに関する解析を更に行う必要がある。

Tgマウス作成実験から想定される、このようなミトコンドリアにおけるメカニズムは、当初想定していたNMNAT発現上昇→NAD産生亢進→Sirt1活性化という反応経路とは異なるものである。我々が以前の論文で示したように、*in vitro* ワーラー変性モデルにおいて培養液中にNADを投与することによって得られる軸索保護効果はSirt1に対するsiRNAによって特異的に阻害されることから、NAD産生亢進→Sirt1

活性化という反応経路は正しいと考えられるが、神経細胞に NMNAT を過剰発現させた場合には、NAD 産生亢進効果よりも、ミトコンドリアの機能に対する影響による効果が顕著であり、NAD 産生亢進-Sirt1 活性化による効果はあるにしても大変弱いものであることが考えられた。

wlds マウスに見られる軸索変性遅延効果の神経疾患治療に関しては当初非常に幅広い応用が期待され、実際異なる発症機序に基づく神経変性に対して NMNAT 活性過剰発現マウスは神経保護的治療効果を示すことが明らかになっているが、その一方で今回の FALS モデルマウスのように、NMNAT 活性過剰発現では殆ど保護・治療効果の得られない例の存在することが明らかとなった。FALS モデルにおいても、神経細胞死に先立って神経軸索変性が進行することは知られているが、その背景にある細胞内反応は同じではないことが示唆される結果となった。

一方で NMNAT 活性過剰発現によって軸索変性と細胞死の両方が阻害される例も依然として数多く報告されている。このことは、神経変性のプロセスにおいて、時系列的に先に起こる軸索変性が、その反応過程の中のどこかで細胞死を開始させているという考えよりも、軸索変性と細胞死はそれぞれが独立した反応プロセスであって、神経変性の病態によって NMNAT 活性過剰発現がその両方を阻止できる場合やいずれか一方だけを阻止できる場合がある、という考えをより強く支持するものと考えられる。

## E. 結論

1) 神経細胞における NAD 合成反応系としては Nicotinamide、Nicotinic acid から合成される典型的な Salvage 経路はそれぞれを基質とする酵素が何れも構成的に発現していないため不活性であり、Nicotinamide riboside から Nicotinamide riboside kinase を経て合成される経路が重要である可能性が考えられた。また、NMNAT 活性の神経細胞への過剰発現が、NAD 合成反応系の改変によって得られる軸索変性遅延効果のなかでも最も強力であると考えられた。

2) NMNAT1、NMNAT3、Wlds(W258A)-Tg マウスを作成し、wlds マウス、野生型マウスと比較を行う研究により、NMNAT 活性過剰発現による軸索変性遅延効果には NMNAT 活性のミトコンドリアマトリックスへの局在が重要であると考えられた。ミトコンドリアに局在する NMNAT により、ミトコンドリアの ATP 産生能の向上が認められたことから、このようなミトコンドリア機能の改変が、NMNAT 活性過剰発現による軸索変性遅延効果の分子メカニズムである可能性が考えられた。

3) NMNAT 酵素活性を過剰発現する初代培養大脳皮質神経細胞は、低酸素・再酸素化による細胞毒性に対して保護効果を示した。さらにミトコンドリア電子伝達系酵素複合体に対する阻害剤の細胞毒性に対しても、一部の阻害剤に対する保護効果を示すことが明らかとなり、NMNAT 過剰発現による神経細胞保護効果は、ATP 産生の直接

的な活性化ではなく、酸化ストレスの産生抑制などの効果を介したものである可能性が示唆された。

4) 変異型 SOD1 過剰発現による FALS モデルマウスの神経軸索変性、神経細胞死に対し NMNAT 過剰発現は神経保護的治療効果を示さず、神経細胞死に先立って神経軸索変性が進行する場合であってもその背景にある分子機序は多様である可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sasaki, Y. Araki, T. & Milbrandt J. Stimulation of NAD biosynthetic pathways delays axonal degeneration after axotomy. *J. Neurosci.* 26:8484-91(2006).

Saito, F. Araki, T. ZNRF1 regulates glutamine synthetase protein expression in Schwann cells via a ubiquitin-proteasome pathway. *Neurosci Res.* 59(Suppl.1): S80 (2007)

Wakatsuki S, Yumoto N, Komatsu K, Araki T., Sehara A. Roles of meltrin beta/ADAM19 in progression of Schwann cell differentiation and myelination during sciatic nerve regeneration. *J. Biol.Chem.* 284: 2957-2966, 2009

Tateno M., Kato S, Sakurai T, Nukina N,

Takahashi R, Araki T. Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Hum Mol Genet* 18: 942-955, 2009

### 2. 学会発表

国内学会

シンポジウム講演

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

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

佐々木 洋、荒木敏之

神経変性過程における軸索の変性と保護の分子機構  
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.9, 2008

若月修二, 荒木敏之

神経変性軸索の変性とその細胞内シグナル  
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 神戸, 12.9, 2008

荒木敏之

神経細胞における NAD 合成酵素 NMNAT の発現による細胞保護機構