

200833021A

厚生労働省科学研究費補助金  
(こころの健康科学研究事業)

**運動ニューロン変性に関わる分子の同定と  
病態抑止治療法の開発**

平成 20 年度 総括・分担研究報告書  
(H18 - こころ - 一般 - 022)

研究代表者 祖父江 元

(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

運動ニューロン変性に関わる分子の同定と病態抑止治療法の開発

祖父江 元 …………… 1

### II. 分担研究報告

1. Dorsfin による ALS 新規治療法開発と孤発性 ALS 疾患モデルの開発

田中 章景 …………… 11

2. 分子病態に基づく球脊髄性筋萎縮症の治療法開発

勝野 雅央 …………… 16

3. 運動ニューロン変性に関わる分子の同定と病態抑止治療法の開発

田中 啓二 …………… 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧 …………… 25

IV. 研究成果の刊行物・別冊

## I. 総括研究報告

## 運動ニューロン変性に関わる分子の同定と病態抑止治療法の開発

研究代表者：祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学教授

### 研究要旨

#### 1. 球脊髄性筋萎縮症の分子病態解明と病態抑止治療法

SBMA モデルマウスにおけるプロテアソーム活性を測定したところ、脊髄では進行期においても活性が保たれており、骨格筋では活性が亢進していた。Hsp90 阻害剤である 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) を SBMA マウスモデルに経口投与したところ、変異 AR 蛋白質の減少および熱ショック蛋白質の発現誘導が認められ、マウスの運動機能および寿命の改善が認められた。一方、SBMA 患者に対するリユープロレリン酢酸塩の第 II 相臨床試験では、48 週間のプラセボ対照比較試験ではリユープロレリン酢酸塩による血清 CK の有意な低下、陰囊皮膚における 1C2 (抗ポリグルタミン抗体) 陽性細胞数の有意な減少、および嚥下造影における食道入口部開大時間の有意な改善が認められ、その後の継続試験ではリユープロレリン酢酸塩の長期投与 (144 週) により運動機能スコア (ALSFRS-R) の悪化が有意に抑制されることが明らかとなった。

#### 2. 筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と病態抑止治療法

E3 ユビキチンリガーゼ Dofin のトランスジェニック (Tg) マウスと変異 SOD1 Tg マウスの交配によるダブル Tg マウスを作成し、in vivo における治療効果を検証した。その結果、ダブル Tg マウスでは変異 SOD1 の脊髄前角における沈着や運動ニューロンの神経細胞死、軸索変性を抑制し、運動能力の改善、生存期間の延長をもたらした。一方、ALS の大部分を占める孤発性 ALS では、患者脊髄の運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルの結果に基づき、dynactin-1 の遺伝子発現低下を線虫運動ニューロンに展開し疾患モデルの開発を行った。この結果、dynactin-1 ノックダウン (KD) 線虫では、患者で見られる cyclin C の発現増加と核内移行が再現されており、さらに cyclin C の核内過剰発現線虫モデルでは、dynactin-1 KD 同様に運動ニューロン障害を示す表現型が得られた。

#### 3. 運動ニューロン疾患における恒常性監視機構の異常と治療開発

プロテアソームは非分裂細胞であるニューロンにおけるタンパク質の品質管理に重要であることが示唆されているが、これまでは阻害剤を用いた in vitro の研究が主流であった。我々は、最近、プロテアソームの分子集合に係わる因子として Proteasome Assembling Chaperone (PAC) 1-4 を発見した。本研究では、PAC1 の欠損マウスを作成し、プロテアソームの量を徐々に削減した場合におけるニューロンの動態について解析することを目指した。そのために我々は PAC1 条件付き遺伝子欠損マウスを作成し、多面的な解析を行った。PAC1 全身欠損マウスは早期胎生致死となったことから、シャペロン依存的なプロテアソームの分子集合機構がマウスの個体発生に必須であることが判明した。さらに中枢神経系特異的に PAC1 を欠損したマウスを作成したところ、プロテアソームの低下と並行して、平衡感覚・発育異常が見られることに加え、大脳皮質、小脳皮質において特徴的な層状構造の形成が阻害されるという reeler, yotari マウスに酷似した様態を示すことが明らかとなった。現在、プロテアソームのレベル低下が様々なニューロンに及ぼす影響についての詳細に解析中である。

## A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は成人発症の運動ニューロン疾患であり、いずれも有効性が確立された治療法はなく、予後は極めて悲観的であり、克服が切望されている難治性疾患である。両者の症状や病理所見は類似点が多く、その病態にも共通する点が少なくないと考えられている。我々はこれまで、ALS と SBMA に共通する病態機構の解明とそれに基づく治療法開発を目指し、研究を進めてきた。

昨年度までに我々は、蛋白質の品質管理機構である分子シャペロンとユビキチン-プロテアソーム系の機能調節による SBMA の病態抑止治療を検討してきた。本年度は SBMA マウスにおけるユビキチン-プロテアソーム系の機能を定量的に解析するとともに、経口 Hsp90 阻害剤である 17-DMAG をマウスに投与し、神経変性に対する治療効果を検討した。

また、これまで我々は、テストステロン依存性に変異アンドロゲン受容体が核内集積することが、本疾患における神経変性の病態の根幹であることを明らかにしてきた。強力なテストステロン分泌抑制作用を有する LHRH アナログであるリュプロレリン酢酸塩を SBMA のモデルマウスに投与すると神経症状と病理所見が著しく改善することから、本剤は SBMA の治療薬として有望と考えられることから、本研究では患者を対象としたリュプロレリン酢酸塩のプラセボ対照比較試験 (第 II 相臨床試験) を行い、本剤の有効性と安全性を検討した。

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 研究では、約 10% を占める遺伝性 ALS の一部で原因遺伝子が同定され、特に SOD1 遺伝子の変異型を組み込んだトランスジェニック (Tg) 動物の作成と解析により多くの知見が積み重ねられてきた。我々が、ALS 患者脊髄よりクローニングした新規 E3 ユビキチンリガーゼ Dorfin は、種々の変異 SOD1 を基質とし、これらをユビキチン化しプロテアソームにより分解することで、培養細胞レベルにおいて神経細胞死を抑制する。そこで、この知見をマウスレベルに展開し、変異 SOD1 Tg マウスにおける Dorfin の治療効果を検証することを目的とした。

一方、孤発性 ALS については、現在もその

病因、病態には不明な点が多く、病態を反映した優れた動物モデルの作成が切望されている。これまでに、我々は孤発性 ALS 患者脊髄から運動ニューロンを単離することにより、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成し、これらの発現動態を神経変性マーカーとの関係で検討してきた。この結果、神経変性過程の上流で発現変化を来している遺伝子として dynactin-1 を同定することに成功した。そして、dynactin-1 の患者脊髄運動ニューロンにおける遺伝子の発現変化 (発現低下) を線虫に展開することにより、運動ニューロン障害を示唆する運動機能障害の表現型である coiler UNC と運動ニューロン変性が生じることを明らかにした。今年度は、この線虫モデルを用い、dynactin-1 発現低下による神経変性メカニズムについて、特に細胞周期関連分子である cyclin C との関係において検討を行った。

真核生物の 20S プロテアソームは  $\alpha_7\beta_7$  (ハーフプロテアソーム) の 2 層のリングが 2 回軸対称により四層リングの複合体 ( $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ ) を形成しており、その分子集合過程は①  $\alpha$  リングの形成、②  $\alpha$  リングへの  $\beta$  サブユニット結合によるハーフプロテアソームの形成、③ ハーフプロテアソーム 2 分子の会合による 20S プロテアソーム形成の順に行われている。この過程において我々は、①の  $\alpha$  リング形成時にシャペロンタンパク質 PAC1-PAC2<sup>1)</sup> 及び PAC3-PAC4 複合体 (酵母では Pba1-Pba2、Dmp1/Pba4-Dmp2/Pba3 複合体)<sup>2, 3)</sup> が関与し、②、③の過程ではもう一つのシャペロンである Ump1 が関与していることを突き止めた。さらに  $\beta$  リング形成には  $\beta$  サブユニットのプロペプチドや C-端の延長鎖 (これらは分子内シャペロンと呼ばれている) が重要な役割を担っていることを明らかにした。このように真核生物の 20S プロテアソームの複合体形成は、複数の分子シャペロンによって支援された逐次の多段階機構で行われることが判明した。これらの研究によりプロテアソームが、正しく複合体を構築するためには、各構成サブユニットのホモオリゴマー形成、誤った部位への結合、不完全な複合体形成等の阻止が必須であり、シャペロンタンパク質はこれらを効率よく解決する合理的なシステムであることが分かつ

てきた。そこで本研究では、PAC 依存性のプロテアソームの形成活性を調節して、細胞内のプロテアソームの量を制限することが可能なマウスを作出することを旨とした。作出した PAC1 遺伝子を条件的に不能にするマウスを用いて、中枢神経系細胞の機能におけるプロテアソームの役割の解明を行った。

## B. 研究方法

### SBMA マウスに対する 17-DMAG の効果

SBMA マウスモデルにおけるプロテアソームのキモトリプシン様活性および 35S 標識ユビキチン化 cIAP1 による蛋白質分解活性を測定し、17-DMAG を隔日で SBMA モデルマウスに経口投与し、運動機能や病理学的所見などにおける治療効果を解析した。運動機能はロータロッドなどによる行動解析により評価し、病理学的解析は抗ポリグルタミン抗体 (1C2) を用いた免疫組織化学などにより行った。

### SBMA に対するリュープロレリン酢酸塩の第 II 相臨床試験

50 例の被験者を対象に 1 年間のプラセボ対照二重盲検試験を行った。対象は遺伝子診断で診断が確定された SBMA 患者であり、独歩もしくは杖を用いて歩行が可能な 30 歳～70 歳の育児希望のない患者とした。また、1 年間の臨床試験を終えた 49 例の被験者を対象として、希望者に 2 年間の leuprorelin 継続投与を行い、投与を行わなかった群との比較を行った。プロトコールは名古屋大学附属病院 IRB の承認を得ており、文書による同意を得た被験者を対象とした。主要評価項目は日本版 ALSFRS-R とし、副次評価項目として陰嚢皮膚の抗ポリグルタミン抗体陽性細胞数の割合、血清 CK、AST、ALT、嚥下機能指標、呼吸機能検査等を測定した。

### Dorfin による変異 SOD1 マウスの治療

全長ヒト Dorfin を PCR にて増幅し、chicken- $\beta$ -actin プロモーターの下流に挿入したベクターをマイクロインジェクションして Tg マウスを作成した。#513 と #526 の 2 ラインの Dorfin Tg マウスをヒト変異 SOD1 (G93A) マウスと交配したダブル Tg マウスを作成し、歩行機能 (フットプリント)、ロータロッドにおける運動機能、生存期間

についての検討を行った。さらに、病理所見では脊髄前角運動ニューロン数、脊髄前根大径有髄線維密度を測定するとともに、抗 SOD1 抗体、抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織化学的検討、ウェスタンブロットングを行った。

### Dynactin-1 ノックダウン線虫の解析

コリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターである *acr-2* 支配下に、ヒト dynactin-1 の相同体である *dnc-1* を標的とした shRNA を発現可能なベクターを作成し、野生型線虫にマイクロインジェクションし変異体を作成した。コントロール群として、線虫とは無関係な LacZ 遺伝子を標的とした shRNA を発現させた。また、運動ニューロンの同定及び shRNA の導入の確認を容易にするために GFP を共発現させた。また、この dynactin-1 KD 線虫における cyclin C の発現量変化を調べるために、内因性の *cic-1* の mRNA レベルを whole mount in situ hybridization 法にて評価した。また、cyclin C の局在変化の検証のために、TagRFP を融合した *cic-1* (TagRFP-*cic-1*) を共発現した。さらに、cyclin C の核内移行が線虫の表現型に及ぼす影響を確認する目的で、核移行シグナル付き GFP を融合した *cic-1* (NLS-GFP-*cic-1*) を線虫に発現させた。運動機能の解析は、一定時間内の首振り回数、累積生存率をパラメータとした。

### PAC1 の機能解析

最初に Flip-FRT & cre-lox システムを利用した条件付き PAC1 欠損マウスを作成した。この変異マウスと種々のプロモーター制御下 Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウス (Tg) と掛け合わせることで PAC1 欠損マウスを作成することが可能になった。今回は Cre リコンビナーゼを全身および神経幹細胞特異的に発現させ PAC1 を欠損させることで解析を行った。全身発現にはアデノウイルス EIIa プロモーター、神経幹細胞発現にはマーカー分子として知られる Nestin のプロモーターを利用したトランスジェニックマウスを用いた。その他の解析方法としては、形態学的手法とプロテアソームの解析を中心とした生化学的手法を駆使して行った。

(倫理面への配慮)

患者検体を用いた研究については、臨床研究に関する倫理指針を遵守して行った。また、本研究を行うに当たっては、名古屋大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得て施行した。臨床試験の実施に当っては名古屋大学医学部附属病院 IRB の承認のもと、文書による説明・同意を得た上で、被験者の自由意志およびプライバシーをそこなうことのないよう配慮した。実験動物(マウス)については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律および動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、名古屋大学動物実験指針に基づいて安楽死や size reduction など動物の苦痛の除去・軽減に細心の注意を払いつつ実験を行った。

### C. 研究結果

#### SBMA マウスに対する 17-DMAG の効果

SBMA マウスの脊髄におけるプロテアソーム活性は進行期においても野生型と同程度に保持されており、骨格筋ではその活性が亢進していた。20S および 19S プロテアソームサブユニットの発現量も SBMA マウス脊髄では野生型と同程度であったが、骨格筋では発現の亢進が認められた。生体におけるユビキチン-プロテアソーム系のレポーターである変異ユビキチン (Ub<sup>G67V</sup>) の高発現マウスと SBMA マウスを交配した解析においても、ユビキチン-プロテアソーム系の機能が維持されていることが示された。17-DMAG は 17-AAG と同様に AR と p23 の結合を阻害し、変異 A のプロテアソームにおける分解を選択的に促進した。17-DMAG を SBMA マウスモデルに経口投与したところ、変異 AR 蛋白質の減少および Hsp70・Hsp40 などの熱ショック蛋白質の発現誘導が認められた。病理学的には 17-DMAG により変異 AR の核内集積が抑制され、脊髄における反応性グリオシスの改善が認められた。また、マウスの運動機能 (rotarod, cage activity)、体重、および寿命の有意な改善が認められた。

#### SBMA に対するリュープロレリン酢酸塩の第 II 相臨床試験

SBMA は緩徐進行性の疾患で、病態を反映するバイオマーカーが確立されていない

ため、まずサロゲートエンドポイントとなりうる臨床評価指標を探索した。とくに予後に直結する球麻痺の解析方法として嚥下造影に注目し、空間的・時間的解析による嚥下機能の定量化を検討した。その結果、食道入口部開大時間が患者の重症度と最もよく相関し、再現率の高い優れたマーカーであることが明らかとなった。そこで、運動機能スコア (ALSFRS-R) を主要評価項目、食道入口部開大時間などを副次的評価項目とする第 II 相臨床試験をデザインし、SBMA 患者に対するリュープロレリン酢酸塩の治療効果を検討した。50 例の被験者を対象に試験を行ったところ、48 週間のプラセボ対照比較試験ではリュープロレリン酢酸塩による血清テストステロンの有意な低下、血清 CK の有意な低下、陰囊皮膚における 1C2 (抗ポリグルタミン抗体) 陽性細胞数の有意な減少、および嚥下造影における食道入口部開大時間の有意な改善が認められ、その後の継続試験ではリュープロレリン酢酸塩の長期投与(144 週)により運動機能スコア (ALSFRS-R) の悪化が有意に抑制されることが明らかとなった。有害事象は前立腺癌患者に対する臨床試験の成績と比べ明らかな差は乏しかった。

#### Dorfin による変異 SOD1 マウスの治療

#513 ラインの Dorfin/G93A SOD1 ダブル Tg マウスの平均生存期間は 144.9 日、G93A SOD1 マウスでは 134.4 日、一方、#526 ラインのダブル Tg マウスでは 142.2 日、対応する G93A SOD1 マウスでは 131.7 日 ( $P < 0.01$ ) と、約 10 日間の延長を認めた。さらに最大生存期間は、#513 Dorfin/G93ASOD1 ダブル Tg マウスと G93A SOD1 マウスで各々 175 日、155 日、#526 Dorfin/G93ASOD1 ダブル Tg マウスと G93A SOD1 マウスで各々 167 日、148 日と、Dorfin の過剰発現により約 20 日間の延長がみられた。

18 週齢におけるローターロッド解析では、#513 ダブル Tg マウス vs G93A SOD1 マウスで  $160.8 \pm 34.2s$  vs  $67.8 \pm 25.5s$ 、#526 ダブル Tg マウス vs G93A SOD1 マウスで  $135.8 \pm 29.8s$  vs  $86.0 \pm 27.0s$ 、同じく 18 週齢における歩幅は #513 において  $29.9 \pm 5.8mm$  vs  $20.1 \pm 3.0mm$  ( $p < 0.05$ )、#526 で  $50.1 \pm 5.6mm$  vs  $26.0 \pm 4.5mm$  ( $p < 0.01$ ) と Dorfin 過剰発現による有意な運動機能の改善を認めた。

病理学的検討においては、#526 ラインのダブル Tg マウスの片側腰髄前角における残存神経細胞数は、G93A SOD1 Tg マウスに比して有意に保たれていた ( $P < 0.05$ )。さらに、腰髄前根の有髄神経線維のヒストグラムを解析すると、大径有髄線維の数は G93A SOD1 Tg マウスでは年齢とともに減少したが、#526 ダブル Tg マウスでは 18 週齢においても保たれていた。

Dorfin 過剰発現が、変異 SOD1 蛋白量に及ぼす影響を 18 週齢において検討したところ、#526 ダブル Tg マウスでは免疫組織化学における SOD1 陽性領域は 2.66% であり、G93ASOD1 Tg マウスの 3.45% に比し、有意に少なかった。また、ウェスタンブロットングにおける検討でも、脊髄の可溶性分画の変異 SOD1 量は有意に低下していた ( $p < 0.01$ )。

#### Dynactin-1 ノックダウン線虫の解析

孤発性 ALS 脊髄運動ニューロン特異的遺伝子プロファイリングから得られた遺伝子の中でも、有意な発現増加と細胞質から核への局在変化を来したのものとして、細胞周期関連因子である cyclin C に着目した。そこで、dynactin-1 KD 線虫が、この cyclin C の発現変化をシミュレートしているかどうかを検討した。その結果、adult stage のコントロール群 (LacZ KD モデル) の運動ニューロンにおいては、cic-1 (ヒト cyclin C の相同体) の mRNA の発現は抑制されていたが、dnc-1 KD モデルでは、cic-1 の mRNA は顕著に増加していた。dnc-1 KD による cic-1 の局在変化を検証するため、TagRFP を融合した cic-1 (TagRFP-cic-1) を共発現したところ、コントロール群では TagRFP-cic-1 は核外に局在したが、dnc-1 KD モデルでは、一部の運動ニューロンにおいて、TagRFP-cic-1 の核移行が認められた。次に、cyclin C の発現増加、核内移行の意義を検証する目的で、核移行シグナル付き GFP を融合した cic-1 (NLS-GFP-cic-1) を単独で高発現させると、dnc-1 KD に類似した coiler UNC の表現型と、進行性の首振り回数の低下、累積生存率の低下が認められた。

#### 酵母 Dmp1-Dmp2 複合体の立体構造

20S プロテアソームの分子集合に関与する Dmp1-Dmp2 複合体は出芽酵母の非必須遺

伝子破壊株ライブラリーからアミノ酸アナログ感受性となる出芽酵母変異株を探索することによって同定した。その後の解析から、この複合体が直接結合する分子がプロテアソームの  $\alpha 5$  サブユニットであること、さらに完成した 20S プロテアソーム複合体には Dmp1-Dmp2 複合体が含まれていないことから、この複合体が高次構造形成に関与するシャペロン因子であることを明らかにした。本年度、我々は Dmp1-Dmp2 複合体と Dmp1-Dmp2 と  $\alpha 5$  サブユニット複合体の X 線結晶構造解析を行い、立体構造を決定した (名古屋市立大学・水島恒裕/加藤晃一らとの共同研究)。興味深いことに Dmp1 と Dmp2 の立体構造は一次構造上有意な相同性を示さないにもかかわらず非常によく似ていた。さらに Dmp1-Dmp2- $\alpha 5$  サブユニット複合体の立体構造解析から Dmp1-Dmp2 は  $\alpha$  リングに  $\beta$  リング側から結合し二量体の境界領域で  $\alpha 5$  サブユニットを認識しており、その結合部位は  $\beta$  サブユニットよりリングの内側に位置することも判明した。また  $\beta$  サブユニット側から  $\alpha$  リングに結合しているため、 $\beta$  リングと Dmp1-Dmp2 が共存できないことが明らかとなった。次に Dmp1-Dmp2 と  $\alpha$  リングの複合体モデル作出により、Dmp1-Dmp2 が  $\alpha 4, \alpha 5, \alpha 6$  と結合面を持つプロテアソーム中間体モデルを提案した。その結果、Dmp1-Dmp2 は 20S プロテアソームの複合体構築において  $\beta 4$  が  $\alpha$  リングに結合する際にプロテアソーム中間体から解離することが示された<sup>3)</sup>。

#### 哺乳類 20S プロテアソームの触媒機能を司る $\beta$ リングの形成経路

$\beta$  リングの形成機構の解析は 20S プロテアソームを構成する各々の  $\beta$  サブユニットを siRNA (small interfering RNA) によりノックダウンすることで  $\beta$  リングの形成を途中段階で阻害し、それにより生じた中間状態を解析する方法で行った。その結果、 $\beta$  サブユニットの  $\alpha$  リングに対する結合は決まった順序で行われており、 $\alpha$  リングに  $\beta 2, 3, 4, 5, 6$  の順番で結合することが明らかになった。さらに  $\beta 1$  は  $\beta 2, 3$  が結合した後であればいつでも結合できること、最後に  $\beta 7$  が結合しハーフプロテアソームを完成することが判明した。このプロセスにおいて、PAC1-PAC2、PAC3-PAC4 は  $\alpha$  リング形成時に結合しており、一方、Ump1



は哺乳類では酵母の場合と異なりβ2 と同時にαリングに結合することが判明した(酵母では Ump1 がハーフプロテアソームの二量体化に関与することが知られている)。PAC3-PAC4 はβ3 の結合により解離し、Ump1 はハーフプロテアソームから 20S プロテアソームを形成する際に分解される。さらに PAC1-PAC2 は 20S プロテアソームが完成した後で分解されることが明らかになった。

#### 全身 PAC1 欠損マウスの解析

PAC1 全身欠損マウスについてであるが、このマウスはヘテロ接合体の場合はほぼ外見上野生型と変わらなかった。ホモ接合体に関しては出生後の遺伝子型解析で確認することができなくなったため胎生致死であることが推察された。胎児期における異常を解析するために切片を作成し形態学的な解析を試みた。その結果 E6.5、E7.5 においてメンデルの法則に従って胎児の消失が起きているものが確認できた。またそれらは E6.0 における抗 PAC1 抗体による免疫染色から PAC1 が完全に欠損した個体であることを確認できた。これらのことから PAC1 の全身欠損マウスは着床後早期の発達異常による胎生致死となることが明らかになった。

#### 中枢神経系 PAC1 欠損マウスの解析

次に神経幹細胞 Nestin プロモーター制御下で PAC1 を欠損させたマウスの解析を行った。こちらもヘテロ接合体では野生型と表現系は変わらなかった。ヘテロ接合体では生後 1 週頃から発育異常、平衡感覚・歩行異常が顕著になり、生後 3 週で死亡する(咀嚼、嚥下運動機能低下による栄養摂取の障害によるものと考えられる)。3 週齢の大脳、小脳、小脳の前庭核をグリセロール密度勾配遠心により分離し 20S プロテアソーム、26S プロテアソームのペプチダーゼ活性を測定すると 20S プロテアソームに関してはほぼ完全に消失し、26S プロテアソームに関しては 2-3 割近くまで減少していた。形態学的にみると特に小脳における特徴的な層構造形成が顕著に阻害されていることが分かった。経時的な解析を行うと、この PAC1 ホモ欠損マウスの小脳は外見上、出生直後から発達が進んでいないことが分かった。さらに生後に増殖・移動を繰り返し小脳

の大部分を占めるようになる顆粒球の異常が原因ではないかと考え、核酸アナログである BrdU の取り込み実験を行い解析すると小脳において顆粒球前駆細胞または顆粒球の増殖する割合がホモ欠損体では極度に低下していることが観察された。またもう一つの知見としては大脳、小脳において同程度のプロテアソームのペプチダーゼ活性が低下しているにもかかわらず、3 週齢ホモ欠損体の特に小脳では不特定複数のユビキチン強陽性細胞が確認された。これは 2 週齢以降の小脳から確認できた。

#### D. 考察

##### SBMAについて

SBMAなどの神経変性疾患の病態の根本は、異常な構造を持つ変異蛋白質が、生態の防御機構を凌駕して細胞内に蓄積することと考えられている。このため、蛋白質の品質管理機構であるユビキチン-プロテアソーム系と分子シャペロンを活性化することで変異蛋白質の毒性を軽減できれば、神経変性の病態を阻止できると予想される。今回の検討では、SBMAのモデルマウスではユビキチン-プロテアソーム系の機能が維持されていること、およびその機能を活性化させる薬物治療が、マウスの運動機能や病理所見を改善することが示された。ユビキチン-プロテアソーム系は SBMAをはじめとする神経変性疾患の治療標的として極めて重要と考えられる。一方、我々のこれまでの検討により、テストステロンの分泌阻害が変異アンドロゲン受容体の核内凝集を強力に阻害することが明らかとなっていたが、リュープロレリン酢酸塩の第 II 相臨床試験においても、病因蛋白質の凝集阻害効果が示された。さらに、リュープロレリン酢酸塩の長期投与により、患者の運動機能が改善する傾向も示された。現在、この結果を第 III 相大規模臨床試験において検証しているところである。

##### ALSについて

Dorfin を含むいくつかの E3 ユビキチンリガーゼは、変異 SOD1 蛋白質を認識し減少させることが *in vitro* の培養細胞レベルで証明されているが、*in vivo* における検証はなされていない。我々は、今回、Dorfin/G93A SOD1 ダブル Tg マウスと G93A SOD1 Tg マウスの比較

によりDorfin過剰発現による治療効果を検討した。この結果、Dorfinは、変異SOD1の脊髄前角における沈着や運動ニューロンの神経細胞死、軸索変性を抑制し、マウスの運動能力の改善、生存期間の延長をもたらすことが明らかとなった。

孤発性ALS患者運動ニューロンにおいて神経変性早期より認められた遺伝子発現変化であるdynactin-1の発現低下をシミュレートするdynactin-1 KD線虫において、同じく患者で認められたcyclin Cの発現上昇、核内移行という現象が再現された。また、cic-1(cyclin C)の高発現により、dnc-1 KDモデルに類似した表現型を示すことから、孤発性ALS運動ニューロンで認められた、cyclin Cの発現量増加や核移行は単なる二次的な分子変化ではなく、運動ニューロン変性の重要な分子病態の一つであることが示唆された。

#### 運動ニューロン疾患における恒常性監視機構について

今回の遺伝子改変(PAC1欠損)マウスを用いた研究によりプロテアソーム複合体の存在が生理学的に重要であることが改めて示された。全身欠損マウスの解析では胎児期の初期発達に必須であることが示唆された。また神経幹細胞特異的欠損マウスの解析においては小脳の形成障害という興味深い現象を引き起こすことを観察でき、プロテアソームの形成、活性の低下とマウスを個体とした生理学的な異常の2つの関係性を明確に示すことができた。しかし、今回の小脳における現象はプロモーターとして用いたNestinの発現時期特異性、プロテアソームの活性減弱スピード、小脳の特徴的な発達過程等を複合的に考えることが必要であり、以上の要因を考慮するとプロテアソームがほかの脳組織に比して小脳の形成に選択的に関与しているとは断言できない。

#### E. 結論

##### SBMAについて

今回の検討により、17-DMAGがユビキチン-プロテアソーム系を介して変異アンドロゲン受容体の分解を促進し、SBMAモデルマウスにおける神経変性過程を阻止することが示された。また、テストステロンの分泌を阻害

することにより、SBMA患者においても変異アンドロゲン受容体の核内凝集が阻害され、神経障害の進行が抑制される可能性が示唆された。

#### ALSについて

ALS研究において重要な役割を果たしてきている変異SOD1マウスモデルにおいて、E3ユビキチンリガーゼDorfinの有意味な治療効果を示すことができた。一方、新たな孤発性ALSモデルの開発に取り組み、孤発性ALS患者脊髄運動ニューロンの遺伝子プロファイリングにより同定したdynactin-1のノックダウン線虫が、同じく患者で見られるcyclin Cの遺伝子発現をシミュレートし、孤発性ALSの重要な病態を反映する疾患モデルとして機能することを明らかにした。

#### 運動ニューロン疾患における恒常性監視機構について

PAC1 全身欠損マウスは、着床後早期の発達異常による胎生致死となり、シャペロン依存性のプロテアソームの形成がマウスの個体発生に重要であることが初めて明らかになった。次に神経幹細胞で発現しているNestinのプロモーター制御下でPAC1を欠損させたマウスを作成し、ニューロンの挙動を解析した。中枢神経系特異的PAC1欠損マウスは、生後1週頃から発育異常、平衡感覚・歩行異常が顕著になり、生後3週で死亡した。形態学的にみると大脳皮質や小脳における特徴的な層構造形成が顕著に阻害されていることが分かった。

#### F. 健康危険情報

無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Sobue G. Pathogenesis-targeting Therapeutics for Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA). *Neuropathology* [in press].
- 2) Banno H, Katsuno M\*, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G\*. Neuropathology and therapeutic intervention in spinal and bulbar muscular atrophy. *Int. J. Mol. Sci.* [in press]. \*corresponding authors.
- 3) Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H,

- Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph. Lateral Scler.* [in press].
- 4) Katsuno M\*, Adachi H, Sobue G\*. Getting a handle on Huntington's disease: the case for cholesterol. *Nat Med.* 15: 253-254, 2009. \*corresponding authors.
  - 5) Young JE, Garden GA, Martinez RA, Tanaka F, Sandoval CM, Smith AC, Sopher BL, Lin A, Fischbeck KH, Ellerby LM, Morrison RS, Taylor JP, La Spada AR. Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk. *J. Neurosci.* 29: 1987-1997, 2009
  - 6) Morozumi S, Kawagashira Y, Iijima M, Koike H, Hattori N, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Intravenous immunoglobulin treatment for painful sensory neuropathy associated with Sjögren's syndrome. *J. Neurol. Sci.* 279: 57-61, 2009.
  - 7) Banno H, Katsuno M\*, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G\*. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann. Neurol.* 65: 140-150, 2009. \*corresponding authors.
  - 8) Watanabe H, Hirayama M, Noda A, Ito M, Atsuta N, Senda J, Kaga T, Yamada A, Katsuno M, Niwa T, Tanaka F, Sobue G. B-type natriuretic peptide and cardioalvalvulopathy in Parkinson disease with dopamine agonist. *Neurology* 72: 621-626, 2009.
  - 9) Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10: 104-115, 2009.
  - 10) Tanaka K. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 85: 12-36, 2009.
  - 11) Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in a SBMA model mouse. *Hum. Mol. Genet.* 18: 898-910, 2009.
  - 12) Takeuchi Y, Katsuno M\*, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G\*. Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve* 38: 964-971, 2008. \*corresponding authors
  - 13) Iijima M, Koike H, Hattori N, Tamakoshi A, Katsuno M, Tanaka F, Yamamoto M, Arimura K, Sobue G. Prevalence and incidence rates of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in the Japanese population. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79: 1040-1043, 2008.
  - 14) Katsuno M\*, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G\*. Molecular Genetics and Biomarkers of Polyglutamine Diseases. *Current Mol. Med.* 8: 221-234, 2008. \*corresponding authors
  - 15) Suenaga M, Kawai Y, Watanabe H, Atsuta N, Ito M, Tanaka F, Katsuno M, Fukatsu H, Naganawa S, Sobue G. Cognitive impairment in spinocerebellar ataxia type 6. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79: 496-499, 2008.
  - 16) Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain* 131: 229-239, 2008.
  - 17) Yashiroda H, Mizushima T, Okamoto K, Kameyama T, Hayashi H, Kishimoto T, Kasahara M, Kurimoto E, Sakata E, Suzuki A, Hirano Y, Murata S, Kato K, Yamane T, Tanaka K. Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 228 - 236, 2008.
  - 18) Hirano Y, Kaneko T, Okamoto K, Bai M, Yashiroda H, Furuyama K, Kato K, Tanaka K, Murata S. Dissecting b-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J.* 27: 2204-2213, 2008.
- ## 2. 学会発表
1. Adachi H, Tokui K, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka F, Sobue G. An oral Hsp90 inhibitor ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. Neuroscience 2009, Washington DC, USA, Nov 15-19, 2008.
  2. Katsuno M, Kawashima M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Suga N, Adachi H, Tanaka F, Sobue G: Skeletal muscle involvement in spinal and bulbar muscular atrophy. The 19th International Symposium on ALS/MND. Birmingham, UK, Nov 3-5, 2008.
  3. Tanaka K. The Novel Thymoproteasome Regulates Development of CD8<sup>+</sup> T Cells. 33<sup>rd</sup> FEBS Congress & 11<sup>th</sup> IUBMB Conference (Symposium on the ubiquitin-proteasome system) Peace and Friendship Stadium, Athens, Greece, June 30, 2008.
  4. Tanaka K. Unexpected encounter with immunity during my proteasome study. Japan-German Immunology Seminar 2008 : Immune Regulation in Health and Disease. Fukuoka, Japan, November 3-6, 2008.
  5. 田中章景、和座雅浩、丹羽淳一、祖父江 元。孤発性 ALS 病態関連分子の探索と疾患モデルの開発。第 49 回日本神経学会総会シンポ

ジウム 横浜 2008 年 5 月 16 日.

6. 田中啓二. Protein Degradation and Neurodegenerative Diseases. Neuroscience 2008 第 31 回日本神経科学大会.特別講演. 東京. 2008 年 7 月 10 日.
7. 田中啓二. タンパク質分解と病態生理学 (Proteolysis and Pathophysiology). 第 2 回 Diabetes Leading-edge Conference: 静岡, 2008 年 8 月 9 日.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

## II. 分担研究報告

## Dorfin による ALS 新規治療法開発と孤発性 ALS 疾患モデルの開発

研究分担者 田中 章景 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学准教授  
研究協力者 和座 雅浩<sup>1)</sup>、曾根 淳<sup>1)</sup>、丹羽 淳一<sup>2)</sup>、蔣 月梅<sup>1)</sup>、黄 哲<sup>1)</sup>、  
河合 香里<sup>1)</sup>、勝又 竜<sup>1)</sup>、山本 正彦<sup>3)</sup>、道勇 学<sup>4)</sup>  
<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学  
<sup>2</sup>愛知医科大学脳卒中センター  
<sup>3</sup>愛知学院大学心身科学部  
<sup>4</sup>愛知医科大学神経内科

**研究要旨** E3 ユビキチンリガーゼ Dorfin は変異 SOD1 を特異的に認識し、ユビキチンプロテアソーム系で分解し、変異 SOD1 の神経細胞毒性を抑制することが培養細胞レベルにおいて証明されている。そこで Dorfin トランスジェニック(Tg)マウスと変異 SOD1 Tg マウスの交配によるダブル Tg マウスを作成し、in vivo における治療効果を検証した。その結果、ダブル Tg マウスでは変異 SOD1 の脊髄前角における沈着や運動ニューロンの神経細胞死、軸索変性を抑制し、運動能力の改善、生存期間の延長をもたらすことが明らかとなり、Dorfin による ALS 治療の可能性を示した。一方、ALS の大部分を占める孤発性 ALS では、患者脊髄の運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルの結果に基づき、dynactin-1 の遺伝子発現低下を線虫運動ニューロンに展開し疾患モデルの開発を行った。この結果、dynactin-1 ノックダウン(KD)線虫では、患者で見られる cyclin C の発現増加と核内移行が再現されており、さらに cyclin C の核内過剰発現線虫モデルでは、dynactin-1 KD 同様に運動ニューロン障害を示す表現型が得られた。これにより、dynactin-1 遺伝子発現レベルの低下による神経変性機序の一つとして、細胞周期の deregulation が深く関与していることが示唆された。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)研究では、約 10% を占める遺伝性 ALS の一部で原因遺伝子が同定され、特に SOD1 遺伝子の変異型を組み込んだトランスジェニック(Tg)動物の作成と解析により多くの知見が積み重ねられてきた。我々が、ALS 患者脊髄よりクローニングした新規 E3 ユビキチンリガーゼ Dorfin は、種々の変異 SOD1 を基質とし、これらをユビキチン化しプロテアソームにより分解することで、培養細胞レベルにおいて神経細胞死を抑制する。そこで、この知見をマウスレベルに展開し、変異 SOD1

Tg マウスにおける Dorfin の治療効果を検証することを目的とした。

一方、孤発性 ALS については、現在もその病因、病態には不明な点が多く、病態を反映した優れた動物モデルの作成が切望されている。これまでに、我々は孤発性 ALS 患者脊髄から運動ニューロンを単離することにより、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成し、これらの発現動態を神経変性マーカーとの関係で検討してきた。この結果、神経変性過程の上流で発現変化を来している遺伝子として dynactin-1 を同定することに成功した。そし

て、dynactin-1 の患者脊髄運動ニューロンにおける遺伝子の発現変化（発現低下）を線虫に展開することにより、運動ニューロン障害を示唆する運動機能障害の表現型である coiler UNC と運動ニューロン変性が生じることを明らかにした。今年度は、この線虫モデルを用い、dynactin-1 発現低下による神経変性メカニズムについて、特に細胞周期関連分子である cyclin C との関係において検討を行った。

## B. 研究方法

### 【Dorfin による変異 SOD1 マウスの治療】

全長ヒト Dorfin を PCR にて増幅し、chicken- $\beta$ -actin プロモーターの下流に挿入したベクターをマイクロインジェクションして Tg マウスを作成した。#513 と #526 の 2 ラインの Dorfin Tg マウスをヒト変異 SOD1 (G93A) マウスと交配したダブル Tg マウスを作成し、歩行機能（フットプリント）、ローターロードにおける運動機能、生存期間についての検討を行った。さらに、病理所見では脊髄前角運動ニューロン数、脊髄前根大径有髄線維密度を測定するとともに、抗 SOD1 抗体、抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織化学的検討、ウェスタンブロッティングを行った。

### 【dynactin-1 ノックダウン線虫の解析】

コリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターである *acr-2* 支配下に、ヒト dynactin-1 の相同体である *dnc-1* を標的とした shRNA を発現可能なベクターを作成し、野生型線虫にマイクロインジェクションし変異体を作成した。コントロール群として、線虫とは無関係な LacZ 遺伝子を標的とした shRNA を発現させた。また、運動ニューロンの同定及び shRNA の導入の確認を容易にするために GFP を共発現させた。また、この dynactin-1 KD 線虫における cyclin C の発現量変化を調べるために、内因性の *cic-1* の mRNA レベルを whole mount in situ hybridization 法にて評価した。また、cyclin C の局在変化の検証のために、

TagRFP を融合した *cic-1* (TagRFP-*cic-1*) を共発現した。さらに、cyclin C の核内移行が線虫の表現型に及ぼす影響を確認する目的で、核移行シグナル付き GFP を融合した *cic-1*(NLS-GFP-*cic-1*) を線虫に発現させた。運動機能の解析は、一定時間内の首振り回数、累積生存率をパラメーターとした。

## C. 研究結果

### 【Dorfin による変異 SOD1 マウスの治療】

#513 ラインの Dorfin/G93A SOD1 ダブル Tg マウスの平均生存期間は 144.9 日、G93A SOD1 マウスでは 134.4 日、一方、#526 ラインのダブル Tg マウスでは 142.2 日、対応する G93A SOD1 マウスでは 131.7 日 ( $P < 0.01$ ) と、約 10 日間の延長を認めた。さらに最大生存期間は、#513 Dorfin/G93ASOD1 ダブル Tg マウスと G93A SOD1 マウスで各々 175 日、155 日、#526 Dorfin/G93ASOD1 ダブル Tg マウスと G93A SOD1 マウスで各々 167 日、148 日と、Dorfin の過剰発現により約 20 日間の延長がみられた。

18 週齢におけるローターロード解析では、#513 ダブル Tg マウス vs G93A SOD1 マウスで  $160.8 \pm 34.2s$  vs  $67.8 \pm 25.5s$ 、#526 ダブル Tg マウス vs G93A SOD1 マウスで  $135.8 \pm 29.8s$  vs  $86.0 \pm 27.0s$ 、同じく 18 週齢における歩幅は #513 において  $29.9 \pm 5.8mm$  vs  $20.1 \pm 3.0mm$  ( $p < 0.05$ )、#526 で  $50.1 \pm 5.6mm$  vs  $26.0 \pm 4.5mm$  ( $p < 0.01$ ) と Dorfin 過剰発現による有意な運動機能の改善を認めた。

病理学的検討においては、#526 ラインのダブル Tg マウスの片側腰髄前角における残存神経細胞数は、G93A SOD1 Tg マウスに比して有意に保たれていた ( $P < 0.05$ )。さらに、腰髄前根の有髄神経線維のヒストグラムを解析すると、大径有髄線維の数は G93A SOD1 Tg マウスでは年齢とともに減少したが、#526 ダブル Tg マウスでは 18 週齢においても保たれていた。

Dorfin 過剰発現が、変異 SOD1 蛋白量に及ぼす影響を 18 週齢において検討したところ、#526 ダブル Tg マウスでは免疫組織化学にお

る SOD1 陽性領域は 2.66%であり、G93ASOD1 Tg マウスの 3.45%に比し、有意に少なかった。また、ウェスタンブロットングにおける検討でも、脊髄の可溶性分画の変異 SOD1 量は有意に低下していた ( $p < 0.01$ )。

#### 【dynactin-1 ノックダウン線虫の解析】

孤発性 ALS 脊髄運動ニューロン特異的遺伝子プロファイリングから得られた遺伝子の中でも、有意な発現増加と細胞質から核への局在変化を来したのものとして、細胞周期関連因子である cyclin C に着目した。そこで、dynactin-1 KD 線虫が、この cyclin C の発現変化をシミュレートしているかどうかを検討した。その結果、adult stage のコントロール群 (LacZ KD モデル) の運動ニューロンにおいては、cic-1 (ヒト cyclin C の相同体) の mRNA の発現は抑制されていたが、dnc-1 KD モデルでは、cic-1 の mRNA は顕著に増加していた。dnc-1 KD による cic-1 の局在変化を検証するため、TagRFP を融合した cic-1 (TagRFP-cic-1) を共発現したところ、コントロール群では TagRFP-cic-1 は核外に局在したが、dnc-1 KD モデルでは、一部の運動ニューロンにおいて、TagRFP-cic-1 の核移行が認められた。次に、cyclin C の発現増加、核内移行の意義を検証する目的で、核移行シグナル付き GFP を融合した cic-1 (NLS-GFP-cic-1) を単独で高発現させると、dnc-1 KD に類似した coiler UNC の表現型と、進行性の首振り回数の低下、累積生存率の低下が認められた。

#### D. 考察

##### 【Dorfin による変異 SOD1 マウスの治療】

Dorfin を含むいくつかの E3 ユビキチンリガゼは、変異 SOD1 蛋白を認識し減少させることが *in vitro* の培養細胞レベルで証明されているが、*in vivo* における検証はなされていない。我々は、今回、Dorfin/G93A SOD1 ダブル Tg マウスと G93A SOD1 Tg マウスの比較により Dorfin 過剰発現による治療効果を検討した。この結果、Dorfin は、変異 SOD1 の脊髄前角に

おける沈着や運動ニューロンの神経細胞死、軸索変性を抑制し、マウスの運動能力の改善、生存期間の延長をもたらすことが明らかとなった。

Dorfin は特異的に変異 SOD1 を認識し、ユビキチンプロテアソーム系によりこれを分解するが、この特異性は変異 SOD1 に起因する ALS の治療にとって長所となる。しかし、平均生存期間の延長が約 10 日間ということではわかるように必ずしも劇的な効果とは言い難い。Dorfin は *in vivo* においては、その発現レベルは厳密に調節されているが、 $\beta$ アクチンプロモーターの下に外部から強制的に過剰発現させた Dorfin は、短い半減期により直ちに分解されてしまうと考えられる。この点において、Dorfin-CHIP キメラ蛋白のような Dorfin の E3 活性を持ち、より長い半減期を持つ蛋白の応用が治療法開発の上で重要であると考えられた。

##### 【dynactin-1 ノックダウン線虫の解析】

我々の目標は、孤発性 ALS の病態をシミュレートする優れた動物モデルを作成し、病態解明、治療法開発に繋げることである。本研究の最も重要な意義は、孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおいて神経変性早期より認められた遺伝子発現変化である dynactin-1 の発現低下をシミュレートする dynactin-1 KD 線虫において、同じく患者で認められた cyclin C の発現上昇、核内移行という現象を再現したことである。

また、cic-1 (cyclin C) の高発現により、dnc-1 KD モデルに類似した表現型を示すことから、孤発性 ALS 運動ニューロンで認められた、cyclin C の発現量増加や核移行は単なる二次的な分子変化ではなく、運動ニューロン変性の重要な分子病態の一つであることが示唆された。

現在我々は、dynactin-1 KD により誘発される細胞周期異常のメカニズムの解明、およびその是正による治療法開発を進めるとともに、Cre-LoxP システムによる dynactin-1 コンディショナルノックアウトマウスの作成により、疾患モデルの線虫からマウスへの展開を図って



いる。

## E. 結論

ALS 研究において重要な役割を果たしてきている変異 SOD1 マウスモデルにおいて、E3 ユビキチンリガーゼ Dofin の有意な治療効果を示すことができた。一方、新たな孤発性 ALS モデルの開発に取り組み、孤発性 ALS 患者脊髄運動ニューロンの遺伝子プロファイリングにより同定した dynactin-1 のノックダウン線虫が、同じく患者で見られる cyclin C の遺伝子発現をシミュレートし、孤発性 ALS の重要な病態を反映する疾患モデルとして機能することを明らかにした。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Young JE, Garden GA, Martinez RA, Tanaka F, Sandoval CM, Smith AC, Sopher BL, Lin A, Fischbeck KH, Ellerby LM, Morrison RS, Taylor JP, La Spada AR. Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk. *J Neurosci.* 29: 1987-1997, 2009
2. Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol.* 65: 140-150, 2009
3. Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph Lateral Scler.* in press
4. Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet.* 18: 898-910, 2009
5. Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G; Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 276: 163-169, 2009
6. Takeuchi Y, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 38: 964-971, 2008
7. Yamamoto M, Tanaka F, Tatsumi H, Sobue G. A strategy for developing effective amyotrophic lateral sclerosis pharmacotherapy: from clinical trials to novel pharmacotherapeutic strategies. *Expert Opin Pharmacother.* 9: 1845-1857, 2008
8. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Tanaka F, Adachi H, Sobue G. Molecular genetics and biomarkers of polyglutamine diseases. *Curr Mol Med.* 8: 221-234, 2008
9. Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain.* 131: 229-239, 2008

## 2. 学会発表

1. 田中章景、和座雅浩、丹羽淳一、祖父江 元.  
孤発性 ALS 病態関連分子の探索と疾患モデルの開発. 第49回日本神経学会総会シンポジウム 横浜 2008年5月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 分子病態に基づく球脊髄性筋萎縮症の治療法開発

研究分担者 勝野 雅央 名古屋大学高等研究院 特任講師

研究要旨 球脊髄性筋萎縮症(SBMA)モデルマウスにおけるユビキチン-プロテアソーム系の機能を解析するとともに、Hsp90 阻害剤である 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) の経口投与による SBMA の治療の可能性について検討した。SBMA モデルマウスの脊髄のプロテアソーム活性は進行期においても保たれており、骨格筋では野生型マウスに比べプロテアソーム活性が亢進していた。17-DMAG を SBMA マウスモデルに経口投与したところ、変異 AR 蛋白質の減少および熱ショック蛋白質の発現誘導が認められ、マウスの運動機能および寿命の改善が認められた。一方、SBMA 患者に対するリュープロレリン酢酸塩の有効性と安全性を第Ⅱ相臨床試験において検討したところ、48 週間のプラセボ対照比較試験ではリュープロレリン酢酸塩による血清 CK の有意な低下、陰嚢皮膚における 1C2 (抗ポリグルタミン抗体) 陽性細胞数の有意な減少、および嚥下造影における食道入口部開大時間の有意な改善が認められ、その後の継続試験ではリュープロレリン酢酸塩の長期投与 (144 週) により運動機能スコア (ALSFRS-R) の悪化が有意に抑制されることが明らかとなった。

### A. 研究目的

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は成人男性に発症する下位運動ニューロン疾患で、その原因はアンドロゲン受容体 (AR) 第 1 エクソン内の CAG リピートの異常延長である。主症状は緩徐進行性の四肢筋力低下・筋萎縮と球麻痺であり、筋力低下の発症は 30-60 才ごろである。神経障害のほか、女性化乳房に代表されるアンドロゲン不応症状や血清クレアチンキナーゼ (CK) 高値、肝機能障害、耐糖能異常、高脂血症などを合併することも少なくない。病理学的には脊髄前角細胞や顔面神経核、舌下神経核の選択的変性、脱落が認められ、残存する神経細胞の核内には病因蛋白質である変異アンドロゲン受容体の集積が認められる。根本的治療は存在せず、緩徐進行性の経過をたどり、球麻痺に起因する呼吸器感染が死因となることが多い。

昨年度までに我々は、蛋白質の品質管理機構で

ある分子シャペロンとユビキチン-プロテアソーム系の機能調節による SBMA の病態抑止治療を検討してきた。これまでの検討により、Hsp90 阻害剤である 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) がポリグルタミンの延長した変異 AR 蛋白質のプロテアソームにおける degradation を選択的に誘導し、SBMA モデルマウスの運動機能および寿命を改善することが明らかとなっている。本治療法の理論的根拠は、SBMA においてユビキチン-プロテアソーム系の機能が保持されていることであるため、本年度は SBMA マウスにおけるユビキチン-プロテアソーム系の機能を定量的に解析するとともに、経口 Hsp90 阻害剤である 17-DMAG をマウスに投与し、神経変性に対する治療効果を検討した。

また、これまで我々は、テストステロン依存性に変異アンドロゲン受容体が核内集積する

ことが、本疾患における神経変性の病態の根幹であることを明らかにしてきた。強力なテストステロン分泌抑制作用を有する LHRH アナログであるリュープロレリン酢酸塩を SBMA のモデルマウスに投与すると神経症状と病理所見が著しく改善することから、本剤は SBMA の治療薬として有望と考えられることから、本研究では患者を対象としたリュープロレリン酢酸塩のプラセボ対照比較試験（第Ⅱ相臨床試験）を行い、本剤の有効性と安全性を検討した。

## B. 研究方法

### 1) SBMA マウスに対する 17-DMAG の効果

SBMA マウスモデルにおけるプロテアソームのキモトリプシン様活性および 35S 標識ユビキチン化 cIAP1 による蛋白質分解活性を測定し、17-DMAG を隔日で SBMA モデルマウスに経口投与し、運動機能や病理学的所見などにおける治療効果を解析した。運動機能はロータロッドなどによる行動解析により評価し、病理学的解析は抗ポリグルタミン抗体 (1C2) を用いた免疫組織化学などにより行った。

### 2) SBMA に対するリュープロレリン酢酸塩の第Ⅱ相臨床試験

50 例の被験者を対象に 1 年間のプラセボ対照二重盲検試験を行った。対象は遺伝子診断で診断が確定された SBMA 患者であり、独歩もしくは杖を用いて歩行が可能な 30 歳～70 歳の挙児希望のない患者とした。また、1 年間の臨床試験を終えた 49 例の被験者を対象として、希望者に 2 年間の leuprorelin 継続投与を行い、投与を行わなかった群との比較を行った。プロトコールは名古屋大学附属病院 IRB の承認を得ており、文書による同意を得た被験者を対象とした。主要評価項目は日本版 ALSFRS-R とし、副次評価項目として陰嚢皮膚の抗ポリグルタミン抗体陽性細胞数の割合、血清 CK, AST, ALT、嚥下機能指標、呼吸機能検査等を測定した。

### (倫理面への配慮)

患者検体を用いた研究については、臨床研究に関する倫理指針を遵守して行った。また、本研究を行うに当たっては、名古屋大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得て施行した。臨床試験の実施に当たっては名古屋大学医学部附属病院 IRB の承認のもと、文書による説明・同意を得た上で、被験者の自由意志およびプライバシーをそこなうことのないよう配慮した。実験動物（マウス）については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律および動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、名古屋大学動物実験指針に基づいて安楽死や size reduction など動物の苦痛の除去・軽減に細心の注意を払いつつ実験を行った。

## C. 研究結果

### 1) SBMA マウスに対する 17-DMAG の効果

SBMA マウスの脊髄におけるプロテアソーム活性は進行期においても野生型と同程度に保持されており、骨格筋ではその活性が亢進していた (Tokui et al., *Hum Mol Genet* 2009)。20S および 19S プロテアソームサブユニットの発現量も SBMA マウス脊髄では野生型と同程度であったが、骨格筋では発現の亢進が認められた。生体におけるユビキチン-プロテアソーム系のレポーターである変異ユビキチン (Ub<sup>G67V</sup>) の高発現マウスと SBMA マウスを交配した解析においても、ユビキチン-プロテアソーム系の機能が維持されていることが示された。17-DMAG は 17-AAG と同様に AR と p23 の結合を阻害し、変異 A のプロテアソームにおける分解を選択的に促進した。17-DMAG を SBMA マウスモデルに経口投与したところ、変異 AR 蛋白質の減少および Hsp70・Hsp40 などの熱ショック蛋白質の発現誘導が認められた。病理学的には 17-DMAG により変異 AR の核内集積が抑制され、脊髄における反応性グリオシスの改善が認められた。また、マウスの運動機能 (rotarod, cage activity)、体重、および寿命の有意な