

2008JJ069A

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

神経・筋疾患のRNAiを用いた画期的治療法の開発

平成20年度 統括・分担研究報告書

研究代表者 水澤 英洋

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

神経・筋疾患のRNAiを用いた画期的治療法の開発

水澤 英洋

II. 分担研究報告

1. 神経・筋疾患のRNAiを用いた画期的治療法の開発

横田 隆徳

2. カニクイザル脳組織におけるTDP-43の基盤的研究

木村 展之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

研究代表者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院 教授
研究分担者 横田 隆徳 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 助教授
研究分担者 木村 展之 医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センター 研究員

研究要旨

肝臓で産生される変異 transthyretin (TTR) が末梢神経に沈着して発症する家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) に対し、TTR に対する siRNA を肝臓への組織特異性の高いアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) 8 型を用いて FAP モデルマウス及びヒト肝細胞キメラマウスへ投与を試みた。その結果、変異 TTR の発現を長期にわたり著明に抑制することに成功し、shRNA の FAP への臨床応用に大きな可能性を明らかにした。さらに、shRNA の長期治療に際して懸念される microRNA の過剰飽和効果による shRNA 毒性について、shRNA 高発現トランスジェニックマウスの脳において検索した。その結果、shRNA が適当な発現量であれば、標的遺伝子の顕著な抑制下にあっても、microRNA の過剰飽和効果はないことを明らかにし、shRNA の神経変性疾患への臨床応用の安全性について重要な知見を得た。

また、今後の孤発性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療のためのモデルサル作製の基礎実験として、老齢カニクイザル脳において TDP-43 の加齢に伴う基本知見を得た。

A. 研究目的

本研究の目的は、RNA 干渉によるノックダウン技術である siRNA (short interfering RNA) を用いた各種神経筋疾患の画期的治療法開発の基礎研究を行うことである。今年度は神経難病である FAP の根本治療を目指した。原因である変異 transthyretin (TTR) を標的分子として、V30M TTR トランスジェニックマウスおよびヒト肝細胞キメラマウスにおいて short-hairpin RNA (shRNA) 発現 AAV8 の全身静脈投与による遺伝子治療を行う。

また、発現型 shRNA を用いた遺伝子治療に最近問題となっている microRNA のプロセス機構の障害を機序とする shRNA 毒性 (Nature 441:537-541, 2006) について、我々が作製した shRNA 過剰発現トランスジェニックマウスの脳において、その shRNA 毒性の有無を検証してこの副作用の解決方法を見出す。

また、今後の孤発性 ALS の遺伝子治療法開発のために必要なモデルサル作製のために、サル脳内 TDP-43 の病理評価の基礎知見を収集する。

B. 研究方法

1) AAV ベクター作製法: anti-TTR shRNA 発現ベクタープラスミド、パッケージングプラスミド、アデノヘルパープラスミドの 3 種類のプラスミドを HEK293 細胞に導入して AAV ベクターを作製後、分離・精製

した。ウイルス力価は、AAV ベクターより DNA を抽出し、定量的 PCR 法により決定した。

2) マウスへの AAV ベクター投与: FAP のモデルマウスである V30M TTR トランスジェニックマウス及び高置換ヒト肝細胞キメラマウスに対し anti-TTR shRNA 発現 AAV ベクターを 5×10^{10} 、 5×10^{11} v.g./body の用量で経静脈的に投与し、血液生化学で副作用の有無を判定するとともに、経時的に血清変異 TTR を測定することで有効性を評価した。

3) shRNA トランスジェニックマウス作製: マウス ES 細胞に SOD1-shRNA 発現断片を導入し、クローンを選択した。高率に SOD1 タンパクの発現を抑制したクローンからキメラマウスを作製し B6 との掛け合わせにより F1 マウスを得た。大脳から small RNA を抽出して、各種 microRNA の Northern blotting や定量的 RT-PCR による評価、let-7a の標的分子 N-ras, N-myc mRNA の RT-PCR による定量を行った。

(倫理面への配慮)

siRNA は化学合成し変異 cDNA は mutagenesis によって作製しており倫理的問題はない。また、動物実験は各施設の動物実験センター等の規定に従って動物愛護の精神に沿って行っている。

C. 研究結果

1) siRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクター (AAV8) を用いた FAP の遺伝子治療

(a) FAP モデルマウスへの投与

V30M TTR 変異に対して特異的な shRNA(#172)、及び変異に対しては非特異的であるが抑制効率の優れた shRNA(#351)の2種類の shRNA 発現断片を AAV8 型に組み込んで V30M TTR トランスジェニックマウスへ 5×10^{11} v.g./body, 5×10^{10} v.g./body の用量で単回全身投与した。#172 shRNA/AAV8 の低用量では抑制効果は得られなかったが高用量で最大 80%以上の血清変異 TTR 抑制効果が得られ、その効果は約4ヶ月もの長期間持続した。#351 shRNA/AAV8 の低用量でも副作用なく#172 shRNA/AAV8 の高用量とほぼ同等の効果が得られた。

#351 shRNA/AAV8 の高容量では肝障害の副作用が見られたが、容量を適切に調節することにより、安全に長期間の変異 TTR を著明に抑制することが可能であることを示した。

(b) ヒト肝細胞キメラマウスへの投与

マウス肝臓の 70-90%以上が正常ヒト肝細胞に置き換えられたキメラマウスに#351 shRNA/AAV8 を投与しその有効性を血清 TTR の Western blotting で評価したところ、 5×10^{11} v.g./body の投与量で顕著なヒト TTR の発現抑制効果が得られた。さらに、キメラマウスの肝臓にプロセスされた siRNA アンチセンス鎖が Northern blotting により確認され、ヒト TTR mRNA の RT-PCR による定量によっても 5×10^{11} v.g./body の投与量で 90%以上の顕著な抑制効果が確認できた。

2) shRNA トランスジェニックマウスの microRNA 過剰飽和効果

SOD1 shRNA トランスジェニックマウスの大脳において 80%以上の SOD1 遺伝子の発現抑制効果が認められたが、Let7a や miR-124a の microRNA 発現量やその標的分子 N-ras, N-myc の発現に変化がないことを明らかにした。

3) 老齢カニクイザル脳の TDP-43 の基本知見

老齢カニクイザル脳組織では TDP-43 のリン酸化が若齢時から既に生じていること、加齢に伴い TDP-43 の核内移行が低下して細胞質画分に停滞する傾向にあること、そして老齢個体の脳組織では細胞内蓄積病変が確認されることが明らかにした。

D. 考察

肝臓への有効な遺伝子導入デリバリー方法として AAV8 ベクターは有望視されているが、肝臓でのタンパクの長期発現は確立していない。shRNA 発現 AAV8 による標的遺伝子抑制についても長期の効果や副作用の検討は不十分であり、また霊長類での in vivo 効果については報告がない。今回、肝臓で産生される変異 TTR が原因である FAP に対して、モデルマウスである V30M TTR トランスジェニックマウスにおいて、4か月の長期間にわたり変異 TTR を著明にかつ安全に抑制することが可能であることを明らかにした。さらに、AAV8 ベクターの有効性に種差があることが明らかであるが、shRNA 発現 AAV8 がヒトの肝細胞においても TTR の著明な発現抑制に初めて成功した。この2つの研究成果は FAP の AAV8 を用いた shRNA による遺伝子治療を現実的なものにする重要なステップになったと考えている。引き続き本年度に多数例においてその知見をより確かなものになりたい。

発現型 shRNA については、2006年に shRNA と microRNA の細胞内のプロセス機構が共通であるため、shRNA の長期発現の副作用として microRNA の成熟障害が報告され、遺伝子治療の大きな問題となっている。今回、我々の作製した shRNA 過剰発現トランスジェニックマウスにおいて、肝臓と脳の両者において shRNA の発現量を適切に保てば、shRNA の年単位の長期の発現によっても microRNA の成熟に障害がないことが明確に示した。この結果は長期の shRNA 発現が必要となる神経変性疾患などへの臨床応用の安全性を示したものと考えている。

また、今後の孤発性筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療のためのモデルサル作製の基礎実験として、老齢カニクイザル脳の TDP-43 の病理検索を行い、カニクイザル脳組織では TDP-43 のリン酸化が若齢時から既に生じていること、加齢に伴い TDP-43 の核内移行が低下して細胞質画分に停滞する傾向にあること、老齢個体の脳組織では細胞内蓄積病変が確認されることが明らかにした。

E. 結論

神経難病である FAP に対して、V30M TTR トランスジェニックマウスおよびヒト肝細胞キメラマウスにおいて、shRNA 発現 AAV8 の全身静脈投与によって、その原因である変異 TTR の長期の著明な発現抑制に成功し、FAP への siRNA の遺伝子治療に大きな成果を得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T. Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol. *Mol Ther* 16:734-740, 2008
- 2) Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 23:1437-1447, 2008
- 3) Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T. Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice. *FEBS Lett* 583: 213-218, 2009
- 4) Rossi D, Brambilla L, Valori CF, Roncoroni C, Crugnola A, Yokota T, Bredesen DE, Volterra A. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ* 15: 1691-1700, 2008
- 5) Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Gene Dev* 22: 1451-1464, 2008
- 6) 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋. ALS の遺伝子治療. *Clinical Neuroscience* 26(3): 337-339, 2008
- 7) 久保寺隆行, 横田隆徳. ウイルスベクターを用いた shRNA による遺伝子治療の現状と問題点. *Antisense* 12(2):37-47, 2008
- 8) 横田隆徳. 家族性筋萎縮性側索硬化症の RNA 干渉を用いた遺伝子治療. *神経治療学* 25:31-39, 2008
- 9) 横田隆徳: RNA 干渉の神経系への応用. *神経治療学* 25:663-668, 2008
- 10) 横田隆徳. MicroRNA と中枢神経系. *Brain Nerve* 61(2):167-178, 2009

2. 学会発表

- 1) Yokota T, Nishinai K, Saito Y, Mitani T, Mizusawa H. Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol. 11th American Society of Gene Therapy, Boston, 2008.5.30
- 2) 横田隆徳, 水澤英洋. siRNA による神経疾患の遺伝子治療. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 2006.5.11.
- 3) 宇野 佳孝, 桑原 宏哉, 植山 真由美, 吉田 規恵, 仁科一隆, 坂本直哉, 水澤英洋, 横田隆徳. α トコフェロール結合による生体肝への siRNA デリバリー. 第 18 回アンチセンスシンポジウム, 岐阜, 2008.11.17.
- 4) 大平進嘉, 久保寺隆行, 村山祥子, 海野敏紀, 横田繁史, 平井幸彦, 島田 隆, 水上浩明, 明里宏文, 水澤英洋, 横田隆徳. shRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子治療法の開発. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中:

Yokota T, et al. System for delivering nucleic acids for suppressing target gene by utilizing endogenous chylomicron.

(米国特許出願番号 60/990,79:
PCT/JP2008/003523)

II. 分担研究報告

神経・筋疾患の RNAi を用いた画期的治療法の開発

研究分担者 横田 隆徳 東京医科歯科大学 准教授

研究要旨

1) 肝臓で産生される変異 transthyretin(TTR)が末梢神経に沈着して発症する家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)に対し、TTR に対する siRNA を肝臓への組織特異性の高いアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)8 型を用いて FAP モデルマウス及びヒト肝細胞キメラマウスへ投与を試み、変異 TTR の発現を長期にわたって抑制することに成功し、shRNA の FAP への臨床応用に大きな可能性を明らかにした。2) すでに開発した shRNA 高発現トランスジェニックマウスの脳において、標的遺伝子の顕著な抑制下にあっても、長期間の遺伝子治療の副作用として懸念された microRNA の過剰飽和効果はないことを明らかにし、shRNA の神経変性疾患への臨床応用の原理的な安全性を示した。

A. 目的：

siRNA を用いて遺伝性の神経変性疾患、免疫性神経疾患、脳血管障害の siRNA/shRNA による遺伝子治療を行う。

B. 研究方法

1) AAV ベクター作製法：

anti-TTR short hairpin RNA(shRNA)発現ベクタープラスミド、パッケージングプラスミド、アデノヘルパープラスミドの3種類のプラスミドを HEK293 細胞にリン酸カルシウム法によってトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収、凍結・融解法によってベクター粒子を含む細胞溶解液を調整した。そこから塩析さらに iodexanol を用いた密度勾配超遠心法によって AAV ベクターを分離・精製した。ウイルス力価は、AAV ベクターより DNA を抽出し、TaqMan PCR 法によりベクター粒子数を決定した。

2) マウスへの AAV ベクター投与：

FAP のモデルマウスである V30M TTR トランスジェニックマウス(TgM)及び高置換ヒト肝細胞キメラマウスに対し anti-TTR shRNA 発現 AAV ベクターを 5×10^{10} , 5×10^{11} v.g./body の用量で経静脈的に投与し、血液生化学で副作用の有無を判定するとともに経時的に血清変異 TTR を測定することと、肝臓組織の TTR mRNA の RT-PCR による定量で有効性を評価した。

3) shRNA TgM 作製：

マウス ES 細胞に SOD1-siRNA 発現断片を導入し、クローンを選択した。高率に SOD1 タンパクの発現を抑制したクローンからキメ

ラマウスを作製し B6 との掛け合わせにより F1 マウスを得た。大脳から small RNA を抽出して、各種 microRNA の Northern blotting、let-7a の標的分子 N-ras, N-myc mRNA の RT-PCR による定量などを行った。

また、V30M TTR TgM については山梨大学前田秀一郎博士から分与いただき、ヒト肝細胞キメラマウスはフェニックスバイオから購入した。

すべての動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の審査と許可を得て行ない、動物の苦痛を除く最大限の努力をした。

C. 研究結果、D. 考察

1) siRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いた FAP の遺伝子治療

(a) FAP モデルマウスへの投与

FAP の代表的変異である V30M トランスサイレチン (TTR) 変異に対し特異的な shRNA(#172)、及び変異に対しては非特異的であるが抑制効率の優れた shRNA(#351)の2種類の shRNA をデザインした。肝臓に対し組織特異性の高い AAV8 型を用い、V30M TTR TgM へ anti-TTR shRNA 発現 AAV8 型ベクターを 5×10^{11} v.g./body, 5×10^{10} v.g./body の用量で単回全身投与し、血液生化学で副作用を評価するとともに経時的に血清変異 TTR を測定した。

その結果、#172 shRNA/AAV8 の低用量では抑制効果は得られなかったが高用量で最大 80%以上の血清変異 TTR 抑制効果が得られ、その効果は約 4ヶ月もの長期間持続した。#351 shRNA/AAV8 の高用量では 90%の抑制効果が得られたが、投与 2 週間後より一過性に肝機能障

害を認め抑制効果も 5 週後より次第に減弱していった。低用量では副作用なく #172 shRNA/AAV8 の高用量とほぼ同等の効果が得られた(図 1)。

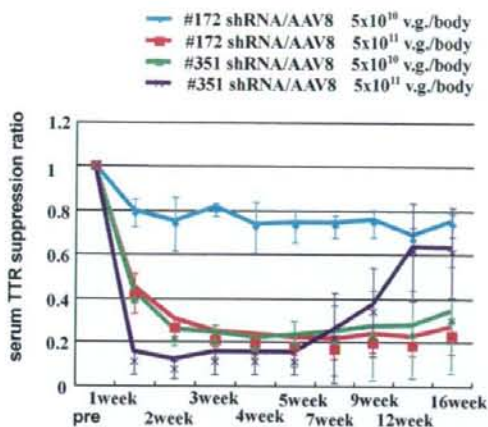


図 1 血清変異 TTR 分泌抑制率

これらの著明な TTR 発現抑制効果は投与後 3 週のマウス肝臓の TTR mRNA の定量によっても確認できている (data not shown)。

高容量で見られた 1 か月後の抑制効果減弱と肝障害は従来報告のある miRNA 過剰飽和効果に合致するものであったが、容量を適切に調節することにより、安全に長期間の変異 TTR を著明に抑制することが可能であることを明確に示した。

(b) ヒト肝細胞キメラマウスへの投与

shRNA 発現 AAV ベクターの有用性を FAP モデルマウスへの投与で示すことができた。続いて、この shRNA 発現 AAV ベクターのヒトにおける有効性を検証する目的で高置換ヒト肝細胞キメラマウスへの投与を試みた。

高置換ヒト肝細胞キメラマウスは免疫不全肝障害マウスにヒトの肝細胞を移植し、マウス肝臓の 70-90%以上が正常ヒト肝細胞に置き換えられたマウスである。

このキメラマウスに #351 shRNA/AAV8 を投与し有効性を血清 TTR の Western blotting で評価したところ、 5×10^{11} v.g./body の投与量で強いヒト TTR の分泌抑制効果が得られた(図 2)。

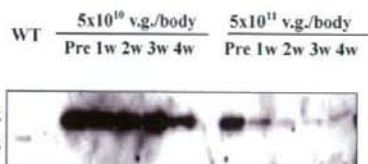


図 2 血清TTRのWB

5×10^{11} v.g./body の投与量でヒト TTR の発現抑制効果が認められた。

さらに、キメラマウスの肝臓にプロセスされた siRNA アンチセンス鎖が Northern blotting により確認され (図 3A)、ヒト TTR mRNA の RT-PCR による定量によっても 5×10^{11} v.g./body の投与量で 90% 以上の顕著な抑制効果が確認できた (図 3B)。

ヒト肝細胞でマウス肝細胞と同じ有効性・siRNA 発現を得るためには約 10 量の AAV 量を必要で、AAV8 によるヒト U6 プロモーターの shRNA 発現効率の種差と考えられたが、肝逸脱酵素上昇や肝臓組織変化はなく、安全に有効なヒト TTR 遺伝子抑制効果が得られた。

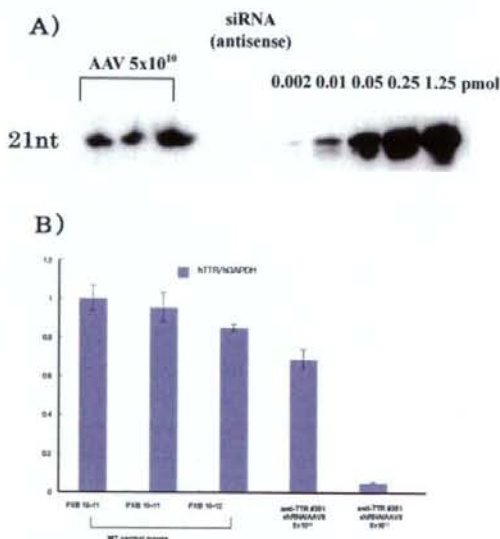


図 3 キメラマウス肝臓における anti-TTR siRNA 発現 (A) と ヒト TTR mRNA 発現抑制 (B)

2) shRNA TgM の microRNA 過剰飽和効果

変性疾患を shRNA で遺伝子治療するには shRNA の長期発現により、microRNA 過剰飽和による副作用が懸念されるので、すでに報告した SOD1 shRNA 高発現トランスジェニック

マウスの脳において、microRNA の発現を検討した。

shRNA TgM の大脳で 80% 以上の SOD1 遺伝子発現抑制が認められたが、Let7a や miR-124a の microRNA 発現量やその標的分子 N-ras, N-myc の発現に変化がないことを明らかにした (図 4)。この事実は脳への shRNA の長期の発現によっても shRNA のプロセス機構を共有する microRNA の成熟に障害がなく、神経変性疾患における shRNA の臨床応用の安全性を示した。

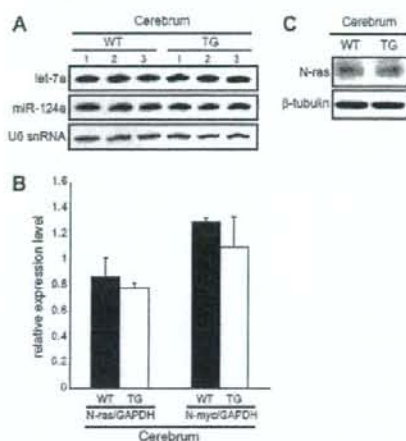


図 4 shRNA トランスジェニックマウスの内因性 microRNA 発現 (A), let-7a の標的分子 N-ras, N-myc mRNA (B), N-ras タンパクの発現量

E. 結論

- 1) マウスモデルおよびヒト肝細胞において shRNA による in vivo 有効を示し、FAP に対する shRNA 遺伝子治療の有用性を明らかにした。
- 2) 神経変性疾患の治療で懸念される長期の shRNA 発現による microRNA 過剰飽和と効果が回避可能なことを shRNATgM を用いて示した。

F. 健康危険情報

健康を損なう実験系は使用していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T. Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol. Mol

Ther 16:734-740, 2008

- 2) Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. J Gastro Hepatol 23:1437-1447, 2008
- 3) Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T. Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice. FEBS Lett 583: 213-218, 2009
- 4) Rossi D, Brambilla L, Valori CF, Roncoroni C, Crugnola A, Yokota T, Bredesen DE, Volterra A. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. Cell Death Differ 15: 1691-1700, 2008
- 5) Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. Gene Dev 22: 1451-1464, 2008
- 6) 久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋. ALS の遺伝子治療. Clinical Neuroscience 26(3) : 337-339, 2008
- 7) 久保寺隆行, 横田隆徳. ウイルスベクターを用いた shRNA による遺伝子治療の現状と問題点, Antisense 12(2):37-47, 2008
- 8) 横田隆徳. 家族性筋萎縮性側索硬化症の RNA 干渉を用いた遺伝子治療. 神経治療学 25:31-39, 2008
- 9) 横田隆徳: RNA 干渉の神経系への応用. 神経治療学 25:663-668, 2008
- 10) 横田隆徳. MicroRNA と中枢神経系. Brain Nerve 61(2):167-178, 2009

2. 学会発表

- 1) Yokota T, Nishinai K, Saito Y, Mitani T, Mizusawa H. Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol. 11th American Society of Gene Therapy, Boston, 2008.5.30
- 2) 横田隆徳, 水澤英洋. siRNA による神経疾患の遺伝子治療. 第 47 回日本神経学会総

- 会, 東京, 2006.5.11.
- 3) 宇野 佳孝, 桑原 宏哉, 植山 真由美, 吉田 規恵, 仁科一隆, 坂本直哉, 水澤英洋, 横田隆徳. α トコフェロール結合による生体肝への siRNA デリバリー. 第 18 回アンチセンスシンポジウム, 岐阜, 2008.11.17.
 - 4) 大平進嘉, 久保寺隆行, 村山祥子, 海野敏紀, 横田繁史, 平井幸彦, 島田 隆, 水上 浩明, 明里宏文, 水澤英洋, 横田隆徳. shRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターによる遺伝子治療法の開発. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008.12.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中:

Yokota T, et al. System for delivering nucleic acids for suppressing target gene by utilizing endogenous chylomicron.

(米国特許出願番号 60/990,79:
PCT/JP2008/003523)

カニクイザル脳組織における TDP-43 の基盤的研究

研究分担者 木村 展之 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター 研究員

研究要旨：

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は未だ病態メカニズムの全容が不明であり、根本的治療法も存在しない難治性疾患の1つであることから、同疾患の克服に向けた研究活動は我が国においても重要性を増しつつある。近年、ALS 患者の脳組織で確認されるユビキチン陽性封入体の構成蛋白として TAR DNA-binding protein of 43 kDa（TDP-43）が同定され、同因子の遺伝子変異が ALS 患者で広く確認されたことから、TDP-43 病態に注目した研究活動が世界的規模で行われている。一方、ALS の新規診断法・治療法を開発するには *in vivo* での評価系を構築することが必須であるが、残念ながら遺伝子導入マウスを含めた既存のモデル動物では TDP-43 病態の再現性が確認されておらず、新規モデル動物の開発が期待されている。

カニクイザルはヒトに近縁な霊長類であり、アルツハイマー病主病変の1つである老人斑が加齢性に再現されることから、加齢性神経変性疾患のモデル動物として高いポテンシャルを有する実験動物種である。そこで本研究では、カニクイザルを用いた新規 ALS モデル動物開発の基盤的研究として、カニクイザル脳組織における TDP-43 の生化学的検索ならびに免疫組織化学的検索を行った。また同時に、若齢から老齢までのカニクイザル脳組織を用いることで、加齢に伴う TDP-43 の性状変化を検索した。その結果、カニクイザル TDP-43 はヒトと同様の生化学的性状および局在性を有することが明らかとなり、新規モデル動物としての大きな可能性が示唆された。更に加齢性変化の検索結果から、①カニクイザル脳組織では TDP-43 のリン酸化が若齢時から既に生じていること、②加齢に伴い TDP-43 の核内移行が低下して細胞質画分に停滞する傾向にあること、そして③老齢個体の脳組織では細胞内蓄積病変が確認されることが明らかとなった。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの変性によって筋繊維の萎縮と筋力低下が引き起こされる神経変性疾患であり、非常に致死性の高い（発症後 3～5 年で死に至る）疾患である。ALS には、遺伝子変異によって家系性に生じる家族性 ALS（FALS）の存在が既に報告されているが、実に 9 割以上が孤発性 ALS（SLAS）患者であり、一刻も早い病因の解明と治療法の確立が望まれている。

ALS 患者脳組織では一部の FALS を除き、タウ陰性ユビキチン陽性封入体の形成という病理組織学的変化が確認されており、その分布は海馬歯状回や大脳皮質神経細胞、脊髄など実に広範に渡っている。また、このユビキチン陽性封入体は前頭側頭葉変性症患者の一部（FTLD-U）やアルツハイマー病患者の一部でも確認されており、新たな proteinopathy としての注目を集めている。そして近年、この封入体の構成成分として TAR DNA-binding protein of 43 kDa（TDP-43）が同定され、FALS のみならず SALS 患者の脳組織からも TDP-43 の遺伝子変異が確認されたことから、同因子の機能不全または獲得毒性が ALS 病態

機構に関与している可能性が非常に高いと考えられる。

現在、変異型 TDP-43 に関する分子生物学的解析が世界的規模で開始されているが、その病態機構に応じた新たな診断法・治療法の確立には、モデル動物を用いた *in vivo* 応用開発研究が必須である。現在、ALS モデル動物として FALS の代表格であるヒト変異型 superoxide dismutase-1（SOD-1）を遺伝子導入したマウスが存在するが、同モデルでは TDP-43 の病理学的変化が再現されないことから、SOD-1 変異に由来する FALS の病態機構は SALS やその他の FALS の病態機構と異なっている可能性が指摘されており、同モデルを用いた広義的 ALS 治療法開発への応用には弱点が存在する。そこで本研究では、最終的な前臨床試験への応用も視野に入れ、ヒトに近縁な霊長類であるカニクイザルを用いた ALS モデルの開発を目指す。

B. 研究対象および方法

初年度である今年度は、カニクイザル脳組織における TDP-43 の生化学的および免疫組織化学的検索を中心とした基盤的研究を行い、次

年度以降の応用・開発研究の根幹とする。

<生化学的検索>

若齢 (4 歳齢 (N=4))、老齢 (25 歳齢 (N=2)・26 歳齢 (N=2))、超老齢 (30 歳齢 (N=2)・32 歳齢・36 歳齢) の三群からなる、合計 12 個体の凍結保存カニクイザル側頭葉皮質を用いた (Table.1)。

脳組織片 (約 0.2g) を抽出 Buffer (25mM Tris-HCl, 0.32M Sucrose, Proteinase Inhibitor Cocktail, pH7.4) 内にてホモジナイズし、超遠心分離によって microsomal fraction (MS 画分)、nuclear fraction (N 画分)、および cytosol fraction (CS 画分) に分画化した。

これらの抽出サンプルをもとに、下記抗体を用いて Westernblot 法による生化学的検索を行った。

検索抗体:

- ① anti-TDP-43 rabbit polyclonal antibody (Proteintech Group)
- ② anti-phosphorylated-TDP-43 (ps409/410-2) rabbit polyclonal antibody (COSMO BIO)
- ③ anti- β -actin mouse monoclonal antibody (Upstate biotechnology)
- ④ anti-NeuN mouse monoclonal antibody (Chemicon)
- ⑤ anti-neuron specific enolase mouse monoclonal antibody (SIGMA)

<免疫組織化学的検索>

若齢 (6 歳齢 (N=2)・7 歳齢 (N=2))、老齢 (25 歳齢 (N=2)・26 歳齢 (N=2))、超老齢 (31 歳齢・32 歳齢 (N=2)・36 歳齢) の三群からなる、合計 12 個体のカニクイザル脳組織切片を用いて (Table.1)、前述した二種類の TDP-43 特異的抗体 (抗体番号①と②) を用いて免疫組織化学的検索を行った。

脳組織は PFA 固定後、定法に従いパラフィン包埋ブロックを作成し、4 μ m に薄切したものを用いた。

組織切片は脱パラフィン後、1%過ヨウ素酸処理によって内因性ペルオキシダーゼを不活化し、続いてオートクレーブ法 (121°C 5 分) によって抗原賦活化処理を行った後に 5%スキムミルク Buffer にてブロッキングを行い、前述した 2 種類の TDP-43 に対する特異的抗体 (抗体番号①と②) を用いて免疫染色を行った。

本実験系におけるカニクイザル年齢群の分類根拠は、過去の検索によって明らかとなった

老人斑形成 (加齢性に形成される AD 主病変の 1 つ) の再現性年齢をもとにしている。即ち、25 歳以上のカニクイザル脳組織ではほぼ例外なく老人斑の形成が確認されることから「老齢群」と分類し、カニクイザルの推測寿命である 30 歳を越えた個体 (ヒトの 90 歳以上に相当) を「超老齢群」に分類した。

C. 研究結果

汎 TDP-43 抗体 (抗体番号①) を用いた Westernblot の結果、カニクイザル脳組織において TDP-43 は 43kDa のバンドとして確認することが出来、ヒトとほぼ同様の発現パターンを確認することができた (Fig.1)。

次に、ALS 病態に最も強く関与すると考えられている、アミノ酸 409 番目と 410 番目がリン酸化された P-TDP-43 を認識する抗体 (抗体番号②) を用いて検索を行ったところ、非常に興味深い加齢性変化が確認された。

P-TDP-43 抗体は、43kDa の全長 TDP-43 バンドとともに、リン酸化によってシフトする 45kDa バンドと、ALS 患者や FTLU 患者で確認される 20~25kDa のスミアバンドを認識する抗体である。

まず MS 画分においては、加齢に伴う 43kDa バンドの緩やかな減少が確認されるとともに、20~25kDa バンドの緩やかな上昇が確認された (Fig.1)。

N 画分では、MS 画分で確認された低分子量バンドは明確には確認することができなかったが、加齢に伴い 43kDa バンドが減少傾向にあった (Fig.1)。

CS 画分では、加齢にともない顕著な 43kDa バンドの増加が確認されたことのみならず、リン酸化を受けた P-TDP43 を示す 45kDa バンドが確認され、しかも若齢動物においても 45kDa のバンドが確認された (Fig.1)。しかしその一方で、MS 画分で確認された低分子量バンドは明確に確認されなかった。

この他、30 歳齢の個体番号 9・10 番では 45kDa バンドのみが確認され、個体番号 10 番では汎 TDP-43 抗体による反応が検出されなかった。

汎 TDP-43 抗体を用いた免疫組織化学的検索の結果、カニクイザル脳組織でもヒトと同様の核局在パターンが確認されたが (Fig.2)、汎 TDP-43 抗体は核に局在する正常 TDP-43 と封入体の双方を染色するため、両者の判別が非常に困難である。一方、P-TDP-43 抗体は免疫染色に用いた場合、核に局在する正常型 TDP-43 は認識せず、ALS および FTLU 患者脳で報

告されている異常型 TDP-43 陽性構造を特異的に認識することが、ヒト脳組織を用いた検索で明らかとなっている。そこで、ALS 以外の神経変性疾患（アルツハイマー病等）でも TDP-43 陽性封入体が頻繁に確認される海馬および側頭葉皮質を中心に、P-TDP-43 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、31・32 歳・2 の 2 個体において、神経細胞内 TDP-43 陽性反応を確認した (Fig.3)。しかしながら、これらの TDP-43 陽性構造物は ALS 患者で確認される細胞内封入体と異なり、瀰漫性細胞内蓄積像として確認された。

D. 考察

本研究の成果によって、カニクイザル脳組織における TDP-43 の生化学的性質とその局在性がヒトとほぼ一致することが明らかとなり、カニクイザルは ALS モデル動物として非常に大きな可能性を有していることが示唆された。また、P-TDP 抗体を用いた検索によって、非常に興味深い TDP-43 の加齢性変化が明らかとなった。

分画化サンプルを用いた Westernblot 検索の結果、老齢動物の MS 画分では 20~25kDa の低分子量バンドが確認されたことから、ALS 患者や FTL D-U 患者と同様の C 末端断片化が生じている可能性が示唆された。

しかしながら、N 画分・CS 画分では明確な低分子量バンドの存在が確認されなかったことから、この低分子量バンドはライソゾーム等の膜構造小器官において代謝過程にある C 末端断片である可能性が高い。これは、老齢個体の神経細胞で確認された P-TDP 陽性像が主に細胞内瀰漫性蓄積像を呈しており、ALS 患者で確認されるような明瞭な封入体形成像が見られなかった結果とも一致している。

全長 TDP-43 は加齢に伴い、N 画分で減少して CS 画分で増加するという傾向が確認された。これは、加齢によって TDP-43 の核内移行が低下または障害されている可能性を示唆する結果である。ALS 患者で同定された変異型 TDP-43 を遺伝子導入した細胞では、変異型 TDP-43 の凝集塊によって正常型 TDP-43 がトラップされ、核内への移行が阻害されることが確認されている (***)。このことから、細胞内凝集塊（または封入体）が TDP-43 の核内移行を阻害することによって TDP-43 の loss-of function を誘発し、神経変性に繋がるという仮説が一般的に支持されているが、加齢に伴う細胞質→核内輸送系の低下（または障害）によって TDP-43 が細胞質内に停滞し、よ

り高度なリン酸化を受けることで凝集塊形成が促進されるという可能性もまた示唆される。

ALS 患者や FTL D-U 患者における TDP-43 陽性封入体と同様、アルツハイマー病患者では神経原線維変化と呼ばれる微小管結合蛋白 tau の凝集病変、パーキンソン病患者では Lewy 小体と呼ばれる α -synuclein の凝集病変が確認されるが、いずれもリン酸化の亢進が病変形成に関与していることが知られている。今回の検索によって、若齢動物の脳組織に由来する CS 画分でも TDP-43 のリン酸化は生じていることが確認されたことから、TDP-43 のリン酸化そのものは生理学的に生じている現象であると考えられる。これは、若齢個体を用いた免疫染色では細胞内蓄積病変が確認されなかったこととも一致する。従って、脳内におけるリン酸化の亢進（または脱リン酸化の低下）は、tau や α -synuclein のみならず TDP-43 も含めた proteinopathy の共通病因である可能性が示唆された。

尚、30 歳齢個体では全長 TDP-43 バンドが消失するという結果が確認されたが、これは用いた脳組織が新鮮採取サンプルではないことに起因する蛋白質の変性である可能性も否めないものの、今回用いた抗体では認識できない TDP-43 の構造的変化が生じている可能性も考えられる。また、細胞内蓄積病変が 31・32 歳齢の脳組織で確認されたことから、カニクイザル脳では 30 歳齢前後が TDP-43 性状変化のターニングポイントになっている可能性が示唆された。

ただし、今回の検索では 36 歳齢個体において明らかな細胞内蓄積病変が確認されなかったことから、更なる詳細な検討が必要であると考えられる。

アルツハイマー病患者では、脱リン酸化酵素 PP2A の活性が低下していることに加え、細胞内輸送機能の障害が病態機構に深く関与している可能性も指摘されている。本研究の結果、カニクイザル脳における TDP-43 のリン酸化は CS 画分で顕著に確認されたことから、核内輸送系の低下によって引き起こされた細胞質内での停滞が TDP-43 のリン酸化を亢進する原因になっている可能性が示唆される。このことから、加齢に伴う核内輸送系の低下・障害メカニズムを明らかにすることもまた、TDP-43 凝集病変形成のメカニズムを解明する一助となる可能性が期待できる。

E. 結論

本研究によって、カニクイザルが優れた

ALS モデル動物になりうる可能性が大いに示唆された。また、一部の老齢動物で TDP-43 陽性細胞質内蓄積病変が確認されたことから、加齢に伴う TDP-43 陽性封入体形成のメカニズムを検索する上でも非常に有用な動物種であることが明らかとなった。

残念ながら、今回の検索に用いたカニクイザルは遺伝学的検索を行っていないため、TDP-43 陽性細胞質内蓄積病変の有無が遺伝的背景グラウンドの影響を受けているのか否かを証明することができなかったが、今後の更なる検討課題としたい。

さらに、加齢に伴う TDP-43 の核内移行の低下および CS 画分でのリン酸化が確認されたことから、核内輸送系の加齢に伴う低下（または障害）のメカニズムを解明することも、TDP-43 病変形成のメカニズムを解明する上で重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okabayashi S, Kimura N. Leucine-rich glioma inactivated 3 is involved in amyloid β peptide uptake by astrocytes and endocytosis *itdels*. *Neuroreport* 19(12): 1175-1179, 2008

2) Kimura N. Nonhuman Primates as the Animal Model for Age-Dependent Diseases. *Women and Aging: New Research (Book)*. In Press.

2. 学会発表

1) Kimura N, Imamura O, Ono F, Terao K. Age-related changes of axonal transport motor proteins: siRNA-induced down-regulation causes accumulation of tau and APP. *International Conference of Alzheimer's Disease and Related Disorders* 2008. Chicago (U.S.A.), 2008.7.26-8.1

2) 木村展之, 柳澤勝彦. カニクイザル脳組織を用いた GM1 ガングリオシド結合型 $A\beta(GA\beta)$ の免疫組織化学的検索. 第 27 回日本認知症学会, 群馬県前橋市, 2008.10.9-11

3) 及川尚人, 木村展之, 柳澤勝彦. カニクイザル脳におけるアルツハイマー病関連蛋白 ($A\beta$, タウ) の解析. 第 27 回日本認知症学会,

群馬県前橋市, 2008.10.9-11

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻 号	ページ	出版年
Nishina K, Unno T, Uno Y, Kubodera T, Kanouchi T, Mizusawa H, Yokota T	Efficient In Vivo delivery of siRNA to liver by conjugation of α -Tocopherol.	Mol Ther	16	734-740	2008
Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M	Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA.	J Gastro Hepatol	23	1437-1447	2008
Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T	Difference in silencing efficiency among tissues and lack of oversaturation of microRNA pathway in short hairpin RNA transgenic mice.	FEBS lett	583	213-218	2009
Rossi D, Brambilla L, Valori CF, Roncoroni C, Crugnola A, Yokota T, Bredesen DE, Volterra A	Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis.	Cell Death Differ	15	1691-1700	2008
Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, Noguchi T, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H	ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1.	Gene Dev	22	1451-1464	2008
久保寺隆行, 横田隆徳, 水澤英洋	ALSの遺伝子治療.	Clinical Neuroscience	26(3)	337-339	2008
久保寺隆行, 横田隆徳	ウイルスベクターを用いたshRNAによる遺伝子治療の現状と問題点.	Antisense	12(2)	37-47	2008
横田隆徳	家族性筋萎縮性側索硬化症のRNA干渉を用いた遺伝子治療.	神経治療学	25	31-39	2008
横田隆徳	RNA干渉の神経系への応用。	神経治療学	25	663-668	2008
横田隆徳	MicroRNAと中枢神経系。	Brain Nerve	61(2)	167-178	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis

D Rossi^{1*}, L Brambilla^{1,4}, CF Valori^{1,4,5}, C Roncoroni¹, A Crugnoia¹, T Yokota², DE Bredesen² and A Volterra^{1,3}

Astrocytes emerge as key players in motor neuron degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Whether astrocytes cause direct damage by releasing toxic factors or contribute indirectly through the loss of physiological functions is unclear. Here we identify in the hSOD1^{G83A} transgenic mouse model of ALS a degenerative process of the astrocytes, restricted to those directly surrounding spinal motor neurons. This phenomenon manifests with an early onset and becomes significant concomitant with the loss of motor cells and the appearance of clinical symptoms. Contrary to wild-type astrocytes, mutant hSOD1-expressing astrocytes are highly vulnerable to glutamate and undergo cell death mediated by the metabotropic type-5 receptor (mGluR5). Blocking mGluR5 *in vivo* slows down astrocytic degeneration, delays the onset of the disease and slightly extends survival in hSOD1^{G83A} transgenic mice. We propose that excitotoxicity in ALS affects both motor neurons and astrocytes, favouring their local interactive degeneration. This new mechanistic hypothesis has implications for therapeutic interventions.

Cell Death and Differentiation (2008) 15, 1691–1700; doi:10.1038/cdd.2008.99; published online 11 July 2008

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive degeneration of corticospinal and spinal motor neurons. In about 1–2% of patients, the disease is linked to mutations in the gene coding for Cu-Zn superoxide dismutase (SOD1).¹ Transgenic animals^{2–4} that overexpress mutant human SOD1s (hSOD1s) develop progressive ALS-like disease. The cascade of events ultimately responsible for motor neuron degeneration, however, remains elusive.

Important insights come from the observations that death of motor cells involves both cell-autonomous and non-cell-autonomous disease mechanisms, implying that mutant hSOD1 expression in neurons is sufficient to trigger the disease,⁵ but also the interaction of motor neurons with the neighboring glial cells contributes to the deleterious process.⁶ These observations have brought attention to the abnormalities affecting glial cells in ALS. In both human cases and animal models, microglia and astrocytes undergo massive activation in regions of motor neuron loss.^{7,8} Microglial alterations were shown to be implicated in disease progression in transgenic mice^{7,9} and the contribution of astrocytes to

motor neuron degeneration is gaining more and more consideration. A recent study reports that mutant hSOD1 expression in astrocytes leads to motor neuron damage and accelerated disease progression by controlling microglial activation.⁸ Moreover, astrocytes expressing mutant hSOD1 were reported to release factors selectively toxic for motor neurons *in vitro*.^{10,11} The presence of mutant hSOD1 in these cells was also described to perturb protective functions of astrocytes towards neurons. While normal astrocytes regulate the expression of the GluR2 subunit of the AMPA receptors in motor neurons, the expression of mutant hSOD1 abolishes this property.¹² Furthermore, both ALS patients and transgenic animals exhibit a defect of the astrocyte-selective glutamate transporter EAAT2/GLT1.^{3,4,13} EAAT2/GLT1 is crucial for controlling the physiological clearance of extracellular glutamate in the spinal cord. Thus, its loss may lead to excitotoxic glutamate levels and this could contribute to the disease progression.^{14–16} Another peculiar abnormality of astrocytes in hSOD1 mutant mice is the presence of Lewy body-like inclusions containing SOD1 and ubiquitin.³ Interestingly, such inclusions are the earliest indicator of disease in

¹Department of Pharmacological Sciences, Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases, University of Milan, Via Balzaretto 9, Milan 20133, Italy; ²Buck Institute for Age Research, 8001 Redwood Blvd, Novato, CA 94945, USA and ³Department of Cell Biology and Morphology, University of Lausanne, Rue du Bugnon 9, Lausanne 1005, Switzerland

*Corresponding author: D Rossi, Department of Pharmacological Sciences, Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases, University of Milan, Via Balzaretto 9, 20133 Milan, Italy. Tel: +39 02 5031 8327; Fax: +39 02 5031 8284; E-mail: daniela.rossi@unimi.it

⁴These authors contributed equally to this work

⁵Current address: Academic Neurology Unit, University of Sheffield, Beech Hill Road, Sheffield S10 2RX, UK

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis; apoptosis; astrocyte; excitotoxicity; metabotropic glutamate receptor

Abbreviations: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; hSOD1, human superoxide dismutase 1; AMPA, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; GluR2, AMPA receptor GluR2 subunit; EAAT2/GLT1, excitatory amino acid transporter 2/glutamate transporter 1; GFAP, glial fibrillary acidic protein; SGPcs, spheroid GFAP-positive cells; SMI32, anti-nonphosphorylated neurofilament H antibody from Sternberger Monoclonals Incorporated; SOD1^{G83A}, SOD1 harboring a single amino acid substitution of glycine to alanine at codon 93; SOD1^{WT}, wild-type SOD1; VGLUT1, vesicular glutamate transporter 1; EAAT1/GLAST, excitatory amino acid transporter 1/glutamate aspartate transporter; TBOA, DL-threo-β-benzoyloxyaspartate; mGluR, metabotropic glutamate receptor; MCPG, (S)-α-methyl-4-carboxyphenylglycine; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; GYK1 52466, 4-[8-Methyl-9H-1,3-dioxolo[4,5-h][2,3]benzodiazepin-5-yl]-benzamine; MPEP, 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine; mGluR5, metabotropic subtype 5 glutamate receptor; DHPG, (RS)-3,5-dihydroxyphenylglycine; DLTG, Asp-Leu-Thr-Asp; NG2, chondroitin sulfate proteoglycan; GDH, glutamate dehydrogenase

Received 26.10.07; revised 19.5.08; accepted 20.5.08; Edited by L Green; published online 11.7.08

hSOD1^{G85R} mice, a transgenic line developing a late-onset, ultrarapid disease progression. Similar inclusions containing activated caspase-3 were subsequently reported in the same hSOD1^{G85R} mice, as well as in hSOD1^{G93A} mice,¹⁷ a transgenic line showing earlier onset but analogously fast disease progression. However, the significance of such astrocytic inclusions remains elusive.

Here, we report in the spinal cord of hSOD1^{G93A} mice that a subset of astrocytes harboring protein inclusions undergoes morphological and biochemical changes that are reminiscent of degenerating cells. Moreover, we demonstrate that the expression of mutant hSOD1s makes astrocytes vulnerable to glutamate through the activation of mGluR5 and that blockage of mGluR5 *in vivo* reduces astrocyte degeneration, postpones disease onset and extends lifespan.

Results

Presence of abnormal spheroid-shaped astrocytes in the lumbar spinal cord of hSOD1^{G93A} mice. To study the morphological and structural changes of astrocytes during the progression of the disease, we first performed immunohistochemical analysis of lumbar spinal cord sections from hSOD1^{G93A} and hSOD1^{WT} transgenic mice,² using the glial fibrillary acidic protein (GFAP) as an astrocytic marker. While no gross abnormalities were detected in the spinal cord of hSOD1^{WT} mice (Figure 1a), we found that most of the GFAP-positive cells present in sections from end-stage hSOD1^{G93A} animals resembled typical reactive astrocytes with elaborated networks of long processes. In addition, we identified a subpopulation of cells displaying fully distinct features (Figure 1b). These cells exhibited a spheroid-shaped cell body with an increased diameter (mean \pm S.E.M.: $13.37 \pm 0.35 \mu\text{m}$; range: 6.7–34 μm ; $n = 88$ from six mice) compared to resting astrocytes ($9.39 \pm 0.13 \mu\text{m}$; range: 4.9–15.9 μm ; $n = 145$ from 6 mice). This unusual morphology was concomitant with a reduction or even absence of GFAP-positive processes, which appeared short and abnormally thick. Immunohistochemical analysis revealed that all of the spheroid GFAP-positive cells (SGPCs) were positive for ubiquitin, which occupied most of the spheroid diameter and overlapped with the compact cap of GFAP (Figure 1c and d). Cells showing thick processes projecting off the cell body exhibited ubiquitin immunoreactivity in both the cell body and the processes (Figure 1c). About one-third of the SGPCs were immunopositive for the active form of caspase-3 (Figure 1e and f). In general, active caspase-3 labeling had a characteristic annular shape and was circumscribed by a GFAP cap (Figure 1e), which appeared thinner and less compact than in the caspase-3-negative SGPCs (Figure 1d and f). Furthermore, active caspase-3-positive SGPCs had less GFAP-positive processes compared to caspase-3-negative SGPCs.

SGPCs appear selectively in the microenvironment of motor neurons before the symptomatic phase of ALS. To investigate whether the presence of SGPCs correlated with the area of the spinal cord affected by the disease, we focused on the distribution of these cells. Importantly, we found that they were placed exclusively in the ventral horns,

where motor neurons are located, while reactive astrocytes were present both in the ventral and dorsal horn regions and in the white matter (Figure 2). To more specifically analyze the distribution of SGPCs in relation to motor neurons, we measured the interdistance between SGPCs and the motor neuron cell bodies labeled with SMI32. SGPCs resulted strictly confined to the microenvironment of motor neurons. In fact, 93% of the spheroid astrocytic cells were located within a 130 μm radius of one to seven motor neurons. In 88% of the cases, the interdistance between the SGPC and the closest motor neuron was $\leq 40 \mu\text{m}$, and in 31% it was $\leq 10 \mu\text{m}$ (Figure 1g).

To explore this phenomenon in more detail, we then looked at the time-course of SGPC formation (Figure 3). Ubiquitin-labeled SGPCs appeared around motor neurons for the first time in 75-day-old mice (Figure 3). Their number increased by 21-fold at 100 days and by 57-fold at the end stage (Figure 3e). Analysis of the time-course of caspase-3 levels in SGPCs revealed that the active caspase-3 appeared at 100 days of age and was present in 18% of the spheroid cells. At the end stage, the percentage of active caspase-3-positive SGPCs had grown to 33% (Figure 3e). Parallel analysis of the neighboring motor neurons revealed a decline of motor cell number, which became statistically significant at around 100 days of age and occurred in parallel to the appearance of the first signs of motor impairment (Figure 7a).^{14,18} Therefore, SGPC formation precedes motor neuron loss and becomes considerable in parallel to degeneration of motor cells and appearance of clinical signs.

Active caspase-3 cleaves the astrocyte GFAP cytoskeleton. The fact that active caspase-3 appears in SGPCs at late time points, when the disease has already progressed, could reflect an advanced state of degeneration of the cells. In fact, the GFAP labeling of active caspase-3-positive SGPCs appeared weaker and less compact compared to caspase-3-negative SGPCs (Figure 1d and f).

Interestingly, caspase-3 was recently shown to cleave GFAP in degenerating astrocytes in Alzheimer's disease, producing a 20 kDa GFAP carboxy-terminal fragment.¹⁹ To investigate whether caspase-3 activity might be responsible for GFAP cleavage in hSOD1^{G93A} mice, we performed western blot analysis on spinal cord homogenates from end-stage hSOD1^{G93A} mice (Figure 4). Homogenates from hSOD1^{G93A} mice contained a low molecular weight GFAP fragment. This fragment had the same mobility of the GFAP fragment obtained by treating homogenates from wild-type mice with recombinant active caspase-3.

Altogether, these data strongly support the conclusion that SGPCs represent a subpopulation of degenerating astrocytes in hSOD1^{G93A} mice.

Expression of mutant hSOD1 confers glutamate vulnerability to astrocytes. Since excitatory afferents and dendrites of spinal motor neurons make synaptic contacts in the ventral horns,²⁰ that is the area of SGPC formation, we decided to label glutamatergic terminals by double immunostaining with antibodies against the presynaptic marker synaptophysin and the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) (Figure 5a). Given that $92 \pm 2.3\%$ of VGLUT1-