

バク質の Venus を定常発現する ES 細胞株を樹立した (CAG-CBR/luc-IRES-Venus)。この細胞から低濃度 RA を用いてニューロンを主に生み出す一次ニューロスフェア、ニューロンおよびグリア細胞を生み出す二次ニューロスフェアを誘導し、脊髄損傷後 9 日目のモデルマウスに移植し、手術後 6 週間まで IVIS による解析、および運動機能評価 (BBB スコア)、組織学的評価を行った。IVIS を用いた解析では、一次ニューロスフェア、二次ニューロスフェアを移植した群において、それぞれ、最初の 1 週間で生着細胞数は減少するものの、6 週間後には、約 20% 程度の細胞が生着し、異常な腫瘍性の増殖は見られなかった。また、組織学的解析においては、二次ニューロスフェアを移植した群では、一次ニューロスフェア移植群に比べて *in vivo* においてもグリア細胞への分化傾向が強く見られ、さらに、PBS 注入群や一次ニューロスフェア移植群に対し、脊髄の萎縮や脱髄の程度が軽減し、5-HT 陽性ファイバーが多く見られた。また、BBB スコアを用いた運動機能解析では、二次ニューロスフェア移植群において優位な機能改善がみられた。これらの結果は、ES 細胞由来 NS/PCs、特に、そこから生み出されるグリア細胞が脊髄損傷の機能的な改善に対し positive な役割を果たしていると考えられた。

また、京都大学より分与されたヒト ES 細胞を用いて、マウス ES 細胞と同様に胚様体を介して NS/PCs をニューロスフェアとして誘導する方法を開発した。このヒト ES 細胞由来ニューロスフェアは、継代して二次、三次以降のニューロスフェアを形成することができ、接着細胞で分化させると神経系の細胞 (主にニューロン) を生み出した。また、電気生理学的解析を行ったところ、活動電位、および内向き Na^+ 電流が観察され、機能的なニューロンであることが示された。

さらに、細胞移植治療における免疫学的拒絶反応や、ES 細胞の持つ倫理的問題を回避するために、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用い、この細胞からも ES 細胞とほぼ同様の条件でニューロスフェアの形成を行うことができた。また、やはり接着培養で分化させるとニューロンおよびグリア細胞が生み出され、電気生理学的解析により、活動電位、および内向き Na^+ 電流が観察されたことから、ヒト iPS 細胞からも機能的なニューロンが生み出されていることが明らかになった。

今後は、さらにヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を用いた神経再生への応用を行っていく予定

である。

D. 考察

マウス ES 細胞から誘導した主にニューロンを生み出すニューロスフェアと、ニューロンおよびグリア細胞を生み出す二次ニューロスフェアを脊髄損傷マウスに移植すると、二次ニューロスフェアを移植した群において、脊髄の萎縮や脱髄の程度が減少し、さらに運動機能の改善が見られた。これは、ES 細胞由来 NS/PCs の細胞移植が、神経系疾患において機能改善に寄与できることを示す結果であった。また、疾患や損傷における神経再生において、特にグリア細胞が、その機能改善に大きな役割を果たしている可能性を示唆していた。

また、ヒト ES 細胞や iPS 細胞からも *in vitro* で NS/PCs をニューロスフェアとして誘導することが可能になった。ヒト ES 細胞由来 NS/PCs の誘導法は将来の神経再生医療のみならず、*in vitro* のヒトニューロンのモデルとしても重要なツールになると思われる。また、ヒト iPS 細胞は、倫理的問題や免疫学的拒絶の問題を解決する上に、さらに、ヒト神経疾患患者から樹立したヒト iPS 細胞を用いることができれば、神経変性疾患の病態解析のための重要なツールになると考えられる。

E. 結論

マウス ES 細胞から誘導したニューロスフェアを脊髄損傷マウスに移植したところ機能改善がみられた。さらにヒト ES 細胞からも NS/PCs を誘導する培養法を開発した。このような *in vitro* 培養系は様々な疾患の病態解析、および薬剤スクリーニングなどを *in vitro* で行うためのモデルとして有用であるのみならず、再生医療における移植細胞のドナー細胞として期待される。また、ヒト神経疾患患者由来 iPS 細胞から様々なニューロンを誘導することができれば、神経変性疾患の病態解析において有用なツールになると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 275(1):124-142, 2004

- 2) Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S.-i, Shimazaki T, Chino N, Okano H, and Okamoto H. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *Isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Developmental Biology* 278(2): 587-606. 2005
- 3) Matsumoto, A., Okada, Y., Nakamichi, M., Nakamura, M., Toyama, Y., Sobue, G., Nagai, M., Aoki, M., Itoyama, Y., and Okano, H. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 83(1): 119-133. 2006
- 4) Tada H., Ishii S., Kimura H., Hattori H., Okada Y., Suzuki N., Okano HJ. Identification and evaluation of high-titer anti-Sox Group B antibody in limbic encephalitis *Inflammation and Regeneration* 27 (1): 37-44. 2007
- 5) Naka H., Nakamura S., Shimazaki T., Okano H. Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in central nervous system development. *Nature Neurosci.* 11(9): 1014-1023. 2008
- 6) Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell.* 10;2(4):392-403. 2008
- 7) Okada Y, Matsumoto A., Shimazaki T., Enoki R., Koizumi A., Itoyama Y., Sobue G., Okano H. Spatio-temporal recapitulation of central nervous system development in murine ES cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26(12):3086-98.2008
- 8) Ogawa D, Okada Y, Nakamura M, Kanemura Y, Okano HJ, Matsuzaki Y, Shimazaki T, Ito M, Ikeda E, Tamiya T, Nagao S, Okano H, Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term in vitro maintenance. *J. Neurosci.Res.* 87(2):307-317.2009

2. 学会発表

- 1) Yohei Okada, Arifumi Matsumoto, Takuya Shimazaki, Amane Koizumi, Ryosuke Enoki, Seiji Ishii, Yasuto Itoyama, Gen Sobue, Hideyuki Okano, Spatio-temporal recapitulation of central nervous system development by ES cell-derived neural stem/progenitor cells. 第 31 回日本神経科学

大会、東京、2008 年 7 月

- 2) 岡田洋平、富里周太、幸田和久、島崎琢也、祖父江元、柚崎通介、岡野栄之、胚性幹細胞 (ES 細胞) からの神経幹細胞の誘導とその特性の解析、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 年 12 月
- 3) Okada, Y., Tomisato, S., Kohda, K., Sobue, G., Yuzaki, M., Okano, H., Derivation and characterization of human ES cell-derived neural stem/progenitor cells, The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting, San Francisco, December, 2008

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得 (申請中)

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

発明者：岡野栄之 島崎琢也

特許第 3660601 号

申請日：2001.3.30 (2005.3.25 登録)

PCT 出願：PCT/JP01/08703

- (2)発明の名称：記憶障害治療剤

発明者：岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号：特願 2002-002433

申請日：2002.1.11

PCT 出願：無し

- (3)発明の名称：記憶障害治療剤スクリーニング法

発明者：岡野栄之 島崎琢也 長尾省吾 松本義人

出願番号：特願 2003-6298

申請日：2003.1.14

PCT 出願：無し

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

RNA 編集酵素 ADAR2 コンディショナルノックアウトによる 孤発性 ALS モデルマウスの分子病態解析

研究分担者：郭 伸，東京大学大学院 医学系研究科 神経内科学 准教授¹⁾
研究協力者：日出山 拓人¹⁾，山下 雄也¹⁾，木村 大輔^{1, 2)}，鈴木 岳之²⁾，辻 省次¹⁾，
Miyoko Higuchi³⁾，Peter H. Seeburg³⁾，高橋 良輔⁴⁾，三澤 日出巳⁵⁾

所属：¹⁾ 東大神経内科，²⁾ 慶大基礎生物，³⁾ Max-Planck Institute，
⁴⁾ 京大神経内科，⁵⁾ 慶大薬理

研究要旨：孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンでは，グルタミン酸受容体サブタイプである AMPA 受容体サブユニット GluR2 の Q/R 部位における RNA 編集が低下し，この部位の RNA 編集を触媒する adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) mRNA 発現量が低下している。この分子病態が孤発性 ALS にどう関連するかを検討するために作成し，昨年度報告した ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスにつき，分子病態の解析を加えた。ADAR2 のノックアウトにより，運動ニューロンが緩徐進行性の細胞死に陥るが，運動ニューロンにより脆弱性が異なり，外眼筋運動ニューロンには細胞死が起こらないことを明らかにした。ADAR2 により触媒される RNA 編集部位のうち，GluR2 Q/R 部位以外の RNA 編集異常は神経細胞死に関与しないことを，ADAR2 活性なしに編集型 GluR2 を発現する変異マウス GluR-B(R)との交配により明らかにした。さらに，ヘテロのコンディショナルノックアウトマウスの解析から ADAR2 遺伝子発現が 50%に落ちると GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が 100%を割り運動ニューロン死が生ずること，従って GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が 100%完全に行われることは運動ニューロンの生存にとり必須であること，を明らかにした。以上より，孤発性 ALS 運動ニューロンに生じている ADAR2 mRNA 発現低下，GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は神経細胞死に直結する分子異常であり，この変異マウスは孤発性 ALS の分子病態をよく反映する疾患モデルマウスであることを明らかにした。

A. 研究目的

昨年度の本研究会議で，RNA 編集酵素である ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA type 2) のコンディショナルノックアウトマウスを作成し，ADAR2 活性低下により緩徐進行性の運動ニューロン死が引き起こされることを報告した。この結果は，孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンに見出された，AMPA 受容体 GluR2 サブユニットの Q/R 部位での RNA 編集率低下，ADAR2 mRNA の発現低下という疾患特異的分子異常が脊髄運動ニューロン死の直接原因であることを示している。この変異マウスでは，コリン作動性ニューロンで ADAR2 が缺失するので，脊髄運動ニューロン以外のコリン作動性脳運動神経核にも同様の神経細胞死が起こる

か，それとも運動神経核により脆弱性が異なり ALS 脳神経核に見られるような選択的な脆弱性が見られるかどうかを検討した。さらに，運動ニューロン死に，GluR2 Q/R 部位以外の ADAR2 により触媒される RNA 編集部位の RNA 編集異常が関与しているかどうかを，ADAR2 活性なしに編集型 GluR2 を発現する GluR-B(R)遺伝子の導入により検討した。また，ADAR2 活性のどの程度の低下が，GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常を引き起こすのか，GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が何%の GluR2 mRNA に生じたときに運動ニューロン死が引き起こされるのか，を片方の ADAR2 アリルにのみ変異を持つヘテロ変異マウスにより検討した。

B. 研究方法

1) 運動脳神経核：12 カ月齢 ADAR2

$^{flox/flox}/VChT-Cre.Fast$ マウスと対照マウスとで以下の比較を行った。外眼筋神経核（動眼神経核 III, 滑車神経核 IV, 外転神経核 VI), 三叉神経運動核 Vm, 顔面神経核 VII, 迷走神経核 X, 舌下神経核 XII の神経細胞数, 脊髄 (C5, L5) 前角大径ニューロン, 小径ニューロンおよび前根 (L5) の軸索数を算定した。また, 脳神経諸核を切り出し, GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率を測定した。

2) GluR-B(R) : ADAR2 活性なしに編集型

GluR2 を発現するように GluR2 遺伝子を改変した GluR-B(R)マウスと ADAR2

$^{flox/flox}/VChT-Cre.Fast$ マウスとを掛け合わせた, ADAR2 $^{flox/flox}/VChT-Cre.Fast/$ GluR-B(R)マウスを作成し, 6 カ月齢における行動変化, 運動ニューロン死変化を ADAR2 $^{flox/flox}/VChT-Cre.Fast$ マウスおよび ADAR2 $^{flox/flox}$ マウス (対照) と比較検討した。

3) ヘテロ変異マウス : ADAR2

$^{flox/+}/VChT-Cre.Fast$ マウスの脊髄運動ニューロンについてニューロン数の算定 (12 カ月齢), GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率測定 (2 カ月齢), 脊髄の免疫組織化学を行った。

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

C. 研究結果

1) コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスの脳神経核については, III, IV, VI の神経細胞数に減少はなく, VII, XII の大径運動ニューロンに脊髄運動ニューロン同様に減少が認められた。一方, GluR2 Q/R 部位の編集率は何れの神経核でも低下を認めた。

2) GluR-B(R) と掛け合わせた ADAR2

$^{flox/flox}/VChT-Cre.Fast/$ GluR-B(R)マウスの表現

型は 6 カ月齢まで対照群と有意差が無く, 脊髄運動ニューロン数にも有意差を認めなかった。3) ヘテロ変異マウスの脊髄運動ニューロンには GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常を示すものが 2 割前後有り, 運動ニューロン数も同程度減少していた。脊髄前角には GFAP 陽性のグリオシスが見られた。

D. 考察

昨年度, ADAR2 $^{flox/flox}/VChT-Cre.Fast$ マウスの解析により, ADAR2 活性のない運動ニューロンは緩徐進行性のニューロン死に陥ることを脊髄運動ニューロンの解析から明らかにしたが, この神経細胞死は数ある ADAR2 基質の中でも GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常のみによっていることが, ADAR2 活性なしに編集型 GluR2 を発現する GluR-B(R)マウスとの交配により明らかになった。

脳神経核における GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は対照群が 100% に保たれていたのに対し, III, VII, XII では 90% 以下に減少していた。神経細胞数は, 顔面神経核, 舌下神経核などの運動ニューロン脳神経核においても大径ニューロン主体の減少が見られたが, 外眼筋運動神経核の神経細胞数は対照と有意な差がなかった。このことは, ニューロン種により AMPA 受容体神経毒性に対する脆弱性の違いがあり, 外眼筋運動ニューロンでは ADAR2 活性が低下しても神経細胞死に陥りにくいことを示している。この変異マウスに見られた病変の選択性は ALS に見られるものに相同であり, AMPA 受容体を介する神経細胞死が病因として働いている更なる証拠を示していると考えられる。

ヘテロの変異マウスにおいても脊髄運動ニューロンに緩徐進行性の細胞死が生じたことは, ADAR2 遺伝子発現が 50% 程度に低下すると未編集型 GluR2 mRNA が出現すること, 未編集 GluR2 の存在は僅かであっても運動ニューロンの生存を脅かすものであることを意味し

ている。ADAR2 活性が低下している孤発性 ALS 運動ニューロンは同様の分子病態により細胞死に陥ると考えられ、分子病態を忠実に反映するモデルであると考えられる。

E. 結論

孤発性 ALS 運動ニューロンに見られる、ADAR2 活性低下、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は選択的運動ニューロン死の直接原因であり、病変の選択性をよく説明する。ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウスは孤発性 ALS の分子病態を反映する動物モデルである。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1.論文発表：

- 1)Nishimoto Y, et al. *Neurosci Res* 61:201-6, 2008,
- 2)Kwak S, et al. *RNA Biol* 5:5-15,2008,
- 3)Buckingham SD, et al. *BioEssays* 30:193-7, 2008.

4)Kwak S, et al. *Amino Acid Receptor Res*, Nova Sci Pub. NY. 293-310, 2008

他 9 編

2.学会発表：

- 1) 日出山拓人ら. 第 49 回神経学会総会, 横浜, 2008.5.14-16.
 - 2) 郭 伸ら. 第 31 回神経科学大会, 東京, 2008.7.9-11.
 - 3) Hideyama T, et al. *6th FENS*, Geneva, 12-16 Jul 2008.
 - 4) 郭 伸. 第 7 回日本認知症学会, 前橋, 2008.10.10-11.
 - 5) Hideyama T, et al. *19th ALS/MND International Symposium*, Birmingham, 3-5 Nov 2008.
 - 6) Yamashita T, et al. *38th Annual Meeting Society for Neuroscience*, Washington, 15-19 Nov 2008
 - 7) Hideyama T, et al. *38th Annual Meeting Society for Neuroscience*, Washington, 15-19 Nov 2008
- 他 5 編.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

低分子化合物と幹細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症の治療法の研究

研究分担者：高橋 良輔 京都大学医学部神経内科・教授
研究協力者：井上 治久 京都大学医学部神経内科・助教
村上 学 京都大学医学部神経内科・大学院生
月田 香代子 京都大学医学部神経内科・技術補佐員
中辻 憲夫 京都大学物質—細胞統合システム拠点・センター長
上杉 志成 京都大学物質—細胞統合システム拠点・教授
饗庭 一博 幹細胞創薬研究所・主任研究員
天貝 裕地 幹細胞創薬研究所・所長
浅井 康行 リプロセル 取締役

研究要旨: 家族性 ALS の原因遺伝子の1つである変異 SOD1 の転写活性を抑制する低分子化合物(もしくは既存薬)を同定するためのハイスループットスクリーニングシステムを開発した。濃度依存性 SOD1 の発現量を減少させる 158 種類の化合物といくつかの既存薬を同定した

A. 研究目的

これまでの研究から、以下のことが明らかである。1. 変異 SOD1 G93A high copy マウスは low copy マウスよりも ALS 症状が重篤である (Dal Canto et al. Brain Res.676: 25-40, 1995)、2. 変異 SOD1 ラットでは高発現ラインのみ発症する (Nagai et al. J.Neurosci. 21: 9256-9254, 2001)、3. RNA 干渉による治療により変異 SOD1 マウスで症状改善を認める (Saito et al. J. Biol. Chem. 280: 42826-42830, 2005)、4. 脊髄運動ニューロンあるいはミクログリアの変異 SOD1 発現量が、変異 SOD1 マウスの発症時期と症状進行を規定している (Boillée et al. Science 312: 1389-1392, 2006)。以上から、変異 SOD1 の発現量を抑制することが、変異 SOD1 による ALS に対して治療効果を有する可能性が示唆される。そこで、SOD1 の転写をモニタリングできるアッセイ系を樹立することを試みた。最終的に、変異 SOD1 の転写を抑制する低分子化合物(もしくは既存薬)による治療薬開発を目的とする。

B. 研究方法

ヒト SOD1 のゲノムを用いて、SOD1 の promoter 制御下に分泌型ルシフェラーゼを発現するベクターを構築する。ヒトグリア細胞細胞株にそのベクターを導入し、恒常的に分泌型ルシフェラーゼを発現するクローンを樹立する。上清のルシフェラーゼを測定し、変異 SOD1 転写活性

を抑える低分子化合物もしくは既存薬を同定する。すでに細胞死を誘発することにより SOD1 の転写を抑制することが知られているマイトマイシン C を陽性対照として用いる。また、低分子化合物(もしくは既存薬)の濃度依存性に SOD1 の転写が抑制されるかを検討する。

C. 研究結果

パイロットスタディでは、Z'-factor は、0.5~1.0 であった。

12,000 種類の低分子化合物のうち、濃度依存性に SOD1 の発現量を減少させる 158 種類の化合物といくつかの既存薬を同定した。また、同定した既存薬の中には、変異 SOD1 マウスを用いた治療実験で治療効果を示されているものも含まれていた。

D. 考察 および E. 結論

FALS 標的分子の発現モニタリングシステムとそれを用いたアッセイ系を確立した。今後、このシステムが、変異 SOD1 マウス等を用いた治療実験と共に、FALS 治療薬開発に寄与するかどうか、幹細胞由来モデルでの実験をあわせて、検証していく。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1.論文発表

Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H. and Cleveland, D.W. (2008 Feb 3) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. **Nat. Neurosci.** 11, 251-253

Moriwaki, Y., Kim, Y.J., Ido, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Endo, S. and Takahashi, R. (2008) L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependant manner. **Neurosci. Res.** 61, 43-8

Ogawa, M., Mizuguchi, K., Ishiguro, A., Koyabu, Y., Imai, Y., Takahashi, R., Mikoshina, K. and Aruga, J. (2008) Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase. **Gene Cells**, 13, 397-409

Imai, Y., Gehrke, S., Wang, H.Q., Takahashi, R., Hasegawa, K., Oota, E. and Lu, B. (2008) Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in Drosophila. **EMBO J.** 27, 2432-43.

Wang, H.Q., Imai, Y., Inoue, H., Kataoka, A., Iita, S., Nukina, N. and Takahashi, R. (2008) Pael-R transgenic mice crossed with parkin deficient mice displayed progressive and selective catecholaminergic neuronal loss. **J. Neurochem.** 107, 171-85.

Fujiwara, M., Marusawa, H., Wang, H.Q., Iwai, A., Ikeuchi, K., Imai, Y., Kataoka, A., Nukina, N., Takahashi, R. and Chiba, T. (2008) Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, 27, 6002-11.

Kawamoto, Y., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Inoue, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Budka, H., Martins, L.M., Downward, J. and Takahashi, R. (2008) Accumulation of HtrA2/Omi in neuronal and glial inclusions in brains with alpha-synucleinopathies. **J. Neuropathol Exp Neurol.**, 67, 984-93.

Inoue, H., Kondo, T., Lin, L., Mi, S., Isacson, O. and Takahashi, R. (2008) Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative, "Disease Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases" Ovadi, J. and Orosz. F. Springer, Hungary, 97-109

竹内啓喜、高橋良輔：パーキンソン病の成因、日本老年医学会雑誌、44、415-421、2008

松井秀彰、高橋良輔：パーキンソン病、蛋白質

核酸 酵素、53、981—981、2008

山門穂高、高橋良輔： α シヌクレイン、蛋白質 核酸 酵素、53、1102-1102、2008

小林芳人、高橋良輔：Pakin 遺伝子、蛋白質 核酸 酵素、53、1076-1076、2008

江川齊宏、高橋良輔：Pael 受容体、蛋白質 核酸 酵素、53、1075-1075、2008

高橋良輔：神経変性疾患研究の進歩、日本内科学会雑誌、97、2243-2249、2008

高橋良輔：神経変性疾患研究の課題、臨床神経学、48、903-905、2008

高橋良輔：神経変性疾患とゲノム、ゲノム医学、8、88-89、2008

麓 直浩、富本秀和、井上治久、福山秀直、高橋良輔：下肢単麻痺を呈した延髄内側梗塞の1例、神経内、68、92-94、2008

2.学会発表

高橋良輔：はじめに一神経変性疾患研究の課題、第49回日本神経学会総会シンポジウム「神経変性疾患研究の焦点-新たな病的因子の登場と臨床への展望」、2008.5.16、横浜

北口浩史、富本秀和、猪原匡史、植村健吾、木原武士、浅田めぐみ、木下彩栄、高橋良輔：慢性脳虚血は α シヌクレインを促進する、第49回日本神経学会総会、2008.5.15、横浜

河本恭裕、小林芳人、高橋良輔、秋口一郎：alpha-synuclein 関連疾患脳内の封入体におけるOmi/HtrA2の蓄積第49回日本神経学会総会、2008.5.15、横浜

井上治久、高橋良輔：パーキンソン病における治療標的としての軸索再生、Neuroscience2008、シンポジウム「中枢神経系疾患に於ける軸索再生/変性のメカニズム」、2008.7.9、東京

高橋良輔：AAN と MDS の取り組み、第2回 Movement Disorder Society, Japan 学術集会、オープニングセミナー「パーキンソン病治療ガイドライン update」、2008.10.2、京都

近藤孝之、井上治久、富本秀和、高橋良輔：自

自律神経障害の新たな疾患概念； Autoimmune Autonomic Ganglionopathy、第 61 回日本自律神経学会総会、シンポジウム「自律神経学における最近のトピックス」、2008.11.7、横浜

Ryosuke Takahashi：The molecular mechanisms underlying parkin-related parkinsonism, BMB2008、シンポジウム「神経変性疾患関連遺伝子探索と機能解析」、2008.12.11、神戸

H. 知的所有権の取得状況
とくに予定はない。

オートファジーによる運動ニューロン疾患の治療法の開発

研究分担者：田中 啓二 東京都臨床医学総合研究所・所長代行

研究要旨：細胞内には複数のタンパク質分解経路が存在し、それぞれが独立的に時には協調的に働くことにより、細胞の恒常性を維持・監視する役割を担うと考えられる。その一つである、オートファジー（self-eating:自食作用）は一般に非選択的なタンパク質分解経路であると考えられている。栄養飢餓などの刺激により、細胞質の単膜構造体・隔離膜が伸長しオルガネラを含む細胞質成分を取り囲んだ脂質二重膜構造体（オートファゴソーム）が形成される。オートファゴソームは速やかにリソソーム（酵母の液胞）と融合し、その内容物はリソソーム内の消化酵素により構成成分（タンパク質の場合、アミノ酸）にまで分解され、再利用される。これまでオートファジーは、自己分解によるアミノ酸供給が主な役割であり、実際、栄養飢餓などで激しく誘導されることが知られていたが、マウス遺伝学を駆使した我々の動物オートファジーの発生工学的研究から、基礎レベルで恒常的に起こっているオートファジー（恒常的オートファジー）が細胞の恒常性維持に不可欠であり、その破綻が様々なヒト疾病の発症原因となることが判明した。しかし、恒常的オートファジーの破綻による病態発症機構は不明であった。ごく最近我々は、そのプロセス（恒常的オートファジー）において中心的な役割を担っている分子としてユビキチン結合タンパク質 p62 の同定に成功した。本年度は p62 が仲介する選択的オートファジーの分子から個体レベルの研究を包括的に推進した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS: amyotrophic lateral sclerosis）を含む多くの神経変性疾患の患者の脳/脊髄の病理所見から疾患選択的に脱落するニューロン内においてユビキチン陽性の異常なタンパク質凝集体（封入体）の蓄積することが数多く報告されている。即ち、封入体もしくはその前駆体ともいべきβシート構造をもった凝集性タンパク質のオリゴマーやプロトフィブリル（アミロイド様タンパク質）の形成が毒性を発揮し神経細胞死を誘発することが明らかとなりつつある。したがってこのような封入体の形成機構を解明することは、神経変性疾患の発症機構の解明とその阻止手段の開発に貢献するための重要なポイントになると思われる。

最近、我々は細胞内の不良品を処理（分解除去）する大規模なタンパク質分解システムであるオートファジー（自食作用: Self-eating）・リソソーム系の破綻が神経細胞内におけるユビキチン陽性封入体の形成に関係するという新概念をオートファジーの遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルの研究から提唱してきた（Komatsu et al., J Cell Biol 2005, Komatsu et al., Nature 2006, Komatsu et al., PNAS 2007）。

さらに凝集体の蓄積（封入体形成）に関して、選択的オートファジー経路に關与するキー分子として p62 モレキュルを同定することに成功した（Komatsu et al., Cell 2007）。本年は、構造生物学的研究により、このオートファジーと p62 の相互作用について原子レベルでの解析に成功した。

他方、オートファゴソームの形成に必須である Atg12 タンパク質結合システムと Atg8/LC3 タンパク質結合システムの二つの経路の役割については、長い間謎であった。そこで我々は Atg8/LC3 タンパク質結合システムに特異的な E2 酵素である Atg3 欠損マウスを新たに作製して、オートファゴソーム形成における Atg8/LC3 タンパク質結合システムの個別的な役割の解明を目指した。

B. 研究方法

「LC3-LRS 複合体の立体構造解析」

既報の方法で作製した LC3 の結晶に合成した p62 分子内の LRS ペプチド: 11 アミノ酸 (Ser-334-Ser-344) を染みこませて形成させた複合体を Spring8 で解析し立体構造を解明した。

Crystallization and data collection—Crystals of LC3-LRS peptide complex were obtained at 15°C

by the hanging-drop vapor-diffusion method, with a mixture of 2.0 μ l of protein and the same volume of reservoir solution (0.1 M HEPES, pH 7.5 and 25% w/v Polyethylene glycol 3,350). Although crystals formed in 2 days, they were not sufficient for crystal structure determination. Initial crystals were used to generate larger crystals by microseeding. During the microseeding experiments, the concentration of the precipitant was varied. Single crystals suitable for X-ray diffraction measurement were finally obtained with reservoir conditions consisting of 0.1 M HEPES, pH 7.5 and 23% w/v polyethylene glycol 3,350. Crystals were transferred to cryoprotective solution containing 10% v/v glycerol, 0.1 M HEPES, pH 7.5, and 23% w/v polyethylene glycol 3,350 for 30 seconds. Diffraction data sets for the LC3-p62 complex were collected at 100 K on beamline BL44XU (SPring-8, Japan). Data processing and reduction were carried out with the DENZO/SCALEPACK. The crystal forms of LC3-p62 complex belong to the $P2_1$ space group and two molecules in the asymmetric unit.

Structure determination and refinement—The structure of the LC3-p62 complex was determined by molecular replacement using MOLREP with LC3 (PDB ID code 1UGM) as a search model. An initial model was constructed using ARP/wARP. Manual building was then carried out using the program XtalView and alternated with several cycles of refinement using the program REFMAC5. The final refined model consists of residues 2 to 122 and residues 1 to 122 of the molecules in the asymmetric unit. For the p62 peptide, the density allowed building 10 residues complexed to one molecule and 7 residues complexed to the second molecule. There were no residues in the disallowed regions of the Ramachandran plot. Structure figures were generated using CCP4MG and PyMOL.

「Atg3 欠損マウスの作製」

ターゲティングベクターの作製と ES 細胞のスクリーニングは、定法に従って行った。ノックアウト ES 細胞をマウス 8 細胞期胚にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に移植、得られたヘテロウマスがジャームラインに入っていることを PCR およびサザンブローディングにより確認した。最終的にヘテロウマスを交配して Atg3 欠損マウスを作製した。

「組織化学的及び免疫組織化学染色解析」

Atg3 欠損(KO)マウス (Atg3^{-/-}) と 野性型マウスの脳を 4% paraformaldehyde-4% sucrose を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で還流固定した。さらに標準光学顕微鏡による組織化学的解析には、2%

paraformaldehyde-2% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液、免疫組織化学染色解析には 4% paraformaldehyde-0.1% glutaraldehyde を含む 0.1 M リン酸バッファー溶液で固定した。

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

「電子顕微鏡及び免疫電子顕微鏡」

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

[結果 1] オートファジーを介した p62 の選択的分解経路が存在することは明白であるが、その分子メカニズムは不明なままだった。ごく最近、我々はマウス p62 分子内の 11 アミノ酸 (Ser-334-Ser-344) が LC3 によって認識される配列 (LC3-recognition sequence; LRS) であることを見出した。LRS は種間で高度に保存された酸性アミノ酸クラスター及び疎水性アミノ酸 (DDDWXXL) を有していた。さらに、LRS と LC3 の共結晶構造解析から、(1) LRS 内 Trp-340 及び Leu-343 と LC3 のユビキチンフォールド内の二つの疎水性ポケットとの相互作用、(2) LRS 内酸性クラスターと LC3 分子表面の塩基性アミノ酸との相互作用が明らかになった。In vivo の解析から、LC3 との相互作用能を欠失した変異 p62 は、オートファジーによる分解を逃れ PB1 ドメイン (p62 のオリゴマー形成に必須なドメイン) 依存的にユビキチン化タンパク質を含んだ封入体を形成することが判明した。すなわち LC3 を介した p62 の選択的分解阻害のみで、封入体形成が十分であることを意味する

(Ichimura et al., J Biol Chem 2008; Ichimura et al., Autophagy 2008)。この結果、オートファジーの障害に起因した封入体形成におけるLC3とp62の相互作用の重要性と分子的基盤が確立した。

[結果2] オートファゴソーム形成の起源を説明することは、オートファジー研究の本質の一つである。オートファゴソーム形成には二つのユビキチン様修飾反応系 Atg12 および Atg8 (高等動物では LC3) 反応系が必須である。これまでに、Atg5 (Atg12 の標的タンパク質) および Atg7 (二つの反応系の共通の E1 様酵素) 欠損マウスが作製・解析され、高等動物におけるオートファジーの様々な生理機能が明らかにされてきた。しかしながら、これらマウスは Atg12 と Atg8 の両反応系の阻害を伴う。今回、我々はオートファゴソーム形成における Atg8 反応系の役割を解析するために、Atg8 反応系特異的 E2 様酵素・Atg3 欠損マウスを作製し解析を行なった。Atg3 欠損マウスは、大きな形態的異常を示さずメンデルの比率で出生したが、出生後1日以内に死亡した。このマウスにおいて Atg8 反応系は完全に遮断され、Atg5 および Atg7 欠損マウスと同様に哺乳させない条件下において低アミノ酸状態を引き起こした。Atg3 欠損マウス繊維芽細胞 (MEFs) において、Atg12-Atg5-Atg16L 複合体は隔離膜への局在を示す一方、隔離膜からの解離は野生型 MEFs と比べて有意に遅延していた。驚いたことに、Atg3KO MEFs において一見正常なオートファゴソーム様構造体の形成が確認された。しかしながら、この構造体は、野生型 MEFs のオートファゴソームと比較すると小さく、また、Atg3KO MEFs においてオートリソソームは確認されないことから、リソソームとの融合が出来ないと想定される。実際、Atg3KO MEFs において、長寿命タンパク質の分解は有意に抑制されていた。連続超薄切片を用いた電子顕微鏡観察では、Atg3KO MEFs に見られる隔離膜の多くは、両端が融合できずに隔離膜が入り組んだ構造を呈することが示された。以上のことから、Atg3 欠損は、次に示すオートファゴソーム形成における複数の段階に障害を起こすと考えられる。

- I. LC3 と PE の結合および LC3 の隔離膜へのリクルート不全。
- II. Atg12-Atg5-Atg16 複合体の隔離膜からの解離遅延 (Atg3KO マウスでは、ある程度 Atg12-Atg5 の形成障害が起こるが、この解離遅延に影響されるのかもしれない)。

III. 隔離膜の伸張不全。

IV. 隔離膜両端の融合不全。

但し、Atg5 陽性のドット構造体の de novo 生成も、Atg3 欠損細胞において減少していたことから、隔離膜新生も障害を受けると考えられる。オートファゴソームの膜の起源はオートファジー研究の核心の一つであり、酵母・高等動物を問わず盛んに解析が行なわれている。我々の作製した Atg3KO マウス・細胞は、オートファゴソームの起源を探る強力なツールとなると考えられる (Sou et al., Mol Biol Cell 2008)。

D. 考察

オートファゴソーム局在タンパク質 LC3 との結合を介した p62 のオートファジーによる選択的な代謝障害が、ユビキチン陽性・p62 陽性の封入体形成を引き起こすことを見出すと共に p62 遺伝子を欠損したマウスでは、オートファジー欠損に伴う封入体形成がほぼ完全に抑制されることを見出した。重要なことに、ユビキチンと p62 を含む封入体は、アルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、アルコール性肝炎、脂肪肝、肝細胞癌などの肝疾患で集中的に同定されている。上述の研究成果は、ヒト疾患で確認される封入体形成がオートファジーの減弱に起因しうること、そして p62 が封入体形成の責任分子であることを強く示唆するものであり、神経変性疾患や肝疾患の新しい予防法・治療法開発に役立つと考えられる (Yue et al., Biochem Biophys Acta - Mol Cell Res. in press, 2009)。

E. 結論

1) オートファゴソームの形成に関わる LC3 と相互作用する分子として同定した p62 は、ユビキチン化タンパク質と相互作用できる UBA ドメインを C-末端に持っていると共に N-末端側の PB1 ドメインの自己凝集できる能力を持っている。マウス p62 分子内の 11 アミノ酸 (Ser-334-Ser-344) が LC3 によって認識される配列 (LC3-recognition sequence; LRS) であることを同定すると共に X線結晶構造解析によって、LC3-LRS 複合体の立体構造解析に成功した。

2) Atg3 (Atg8 反応系特異的 E2 様酵素) 欠損マウスを作製に成功した。表現型は Atg7 (Atg8 反応系特異的 E1 様酵素) 欠損マウスと類似していたが、オートファゴソーム膜の形成機構に新知見を得た。即ち、Atg3 欠損マウスでは、一見正常なオートファゴソーム様構造体が形成できるが、リソソームと癒合したオートリソ

ソームの形成に欠陥があった。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., and Uchiyama, Y. (2008) Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury. **Am. J. Pathol.** 172, 454-469
- (2) Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M. (2008) Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. **J Biol Chem.** 283, 22847-22857.
- (3) Sou, Y., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Komatsu, M., (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. **Mol Biol Cell** 19, 4762-4775.
- (4) Tokui, K., Adachi, H., Waza, M., Katsuno, M., Minamiyam. M., Doi, H., Dantumac, N. P., Hamazaki, J., Tanaka, K., Murata, S., Tanaka, F., and Sobue, G. (2009) 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in a SBMA model mouse. **Hum Mol Genet** in press.
- (5) Kimura, Y., Yashiroda, H., Kudo, T., Koitabashi, S., Murata, S., Kakizuka, A., and Tanaka, K. (2009) An inhibitor of deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. **Cell** in press.
- (6) Ichimura, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2008) Selective turnover of p62/a170/Sqstm1 by autophagy. **Autophagy** 4, 1063-1066.
- (7) Tanaka, K. (2009) The proteasome: Overview of Structure and Functions. **Proc. Jpn. Acad. Ser B Phys Biol Sci.** 85, 12-36.
- (8) Matsuda, N. and Tanaka, K. (2009) Does impairment of ubiquitin-proteasome system predispose to neurodegenerative disorders? **J Alz D** in press
- (9) Yue, Z., Friedman, L., Komatsu, M., and Tanaka, K. (2009) The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. **Biochem Biophys Acta – Mol Cell Res.** in press

2. 学会発表

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。July 10, 2008 (東京フォーラム) 東京。

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：静岡県沼津市淡島ホテル (平成20年8月9日) 静岡

Keiji Tanaka：The Novel Thymoproteasome Regulates Development of CD8⁺ T Cells. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference (Symposium on the ubiquitin-proteasome system) Peace and Friendship Stadium, June 30, 2008, Athens, Greece.

Keiji Tanaka：Unexpected encounter with immunity during my proteasome study. Japan-German Immunology Seminar 2008：Immune Regulation in Health and Disease. (November 3-6, 2008) Fukuoka, Japan

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

カプシド修飾による AAV ベクターの改良

研究分担者：中野今治 自治医科大学内科学講座神経内科学部門
研究協力者：村松慎一¹、奈良優子¹、宮内ひとみ¹、滝野直美¹、島崎久仁子²、
堀雄一郎³、水上 進³、菊地和也³
¹自治医科大学 神経内科学部門、²同 神経脳生理学部門、
³大阪大学大学院 工学研究科

研究要旨：アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを使用して脳と脊髄の運動神経細胞に治療用遺伝子を効率よく導入する方法の開発を行った。血管内皮細胞との親和性を高めるペプチド配列をカプシドに挿入した2型 AAV(AAV2)を作製した。また、カプシドを構成する VP3 蛋白に Rabies virus 由来の RVG ペプチドを化学結合した。これらのベクターを使用して脳内あるいは筋肉内投与による逆行性移送および血管内投与による脳内移行の促進を試みた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する遺伝子治療として、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを応用して治療用の遺伝子を脳および脊髄の運動神経細胞へ送達する方法を開発する。

B. 研究方法

- 1) AAV ベクターの血管内投与による脳内への移行を促進するため、血管内皮細胞との親和性を高めるペプチド配列を AAV2 のカプシド蛋白の一部に遺伝子組換えにより挿入した。
- 2) 神経細胞への親和性を持つ Rabies virus の糖タンパク質由来の RVG ペプチド(29 アミノ酸)の誘導体を Fmoc 固相法により化学合成した。この誘導体を使用して緑色蛍光蛋白 EGFP を発現する AAV2 および AAV1 ベクターのカプシド蛋白を化学修飾した。RVG 修飾した EGFP 発現ベクターをマウスの脳および筋肉に注入して神経細胞への遺伝子導入特性につき検討した。

C. 研究結果

- 1) AAV2 カプシドの外側に表出していると推定される 582 残基以降に QPEHSST 配列を挿入した AAV2-EGFP では、明らかな脳内移行の増加は認められなかった。

- 2) 効率よく RVG 修飾するための諸条件を検討し、カプシドを構成する VP3 蛋白に RVG ペプチドを結合した。線条体内投与では、少数の黒質緻密部神経細胞への逆行性移送が認められたが、四肢の筋肉内投与では脊髄での発現は見られなかった。

D. 考察

従来、AAV ベクターは、脳内での逆行性輸送および筋肉内投与による末梢神経終末から脊髄への輸送についての報告があるがその効率は高くない。カプシドの修飾によりこの点を改善できれば新たな治療用遺伝子の応用が可能になる。今回、修飾を行った AAV2 では明らかな逆行性輸送の増加は見られなかったが、今後、修飾比率を高めることにより改善が期待できる。8型 AAV(AAV8)および9型 AAV(AAV9)では、マウスの血管内投与により脳および脊髄に遺伝子導入されることが知られており、これらのベクターを使用した検討も行う予定である。

E. 結論

遺伝子組換えおよび化学修飾により逆行性輸送の効率を高めることを目標に AAV ベクターのカプシドの改変を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach T.G, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H.: Phosphorylated TDP-43 in fronto temporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64: 60-70, 2008.

2. Yokota O, Tsuchiya K, Terada S, Ishizu H, Uchikado H, Ikeda M, Oyanagi K, Nakano I, Murayama S, Kuroda S, Akiyama H: Basophilic inclusion body disease and neuronal intermediate filament inclusion disease: a comparative clinicopathological study. *Acta Neuropathol.* 115: 561-575, 2008

2. 学会発表

1. Muramatsu S, Ono F, Takino N, Asari S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Tsukada H, Terao K, Ozawa K, Nakano I: Long-term behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease with persistent gene expression of dopamine-synthesizing enzymes. American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting. Boston, May 28-June 1, 2008. (Abstract P.S264) (*Molecular Therapy* 16; Suppl. 1, May 2008)

2. 熱田直樹、祖父江 元、中野今治、青木正志、湯浅龍彦、辻 省次、高野弘基、林 秀明、梶 龍兒、溝口功一、藤田卓司、小長谷正明、饗場郁子、長谷川一子、谷口 彰、葛原茂樹：多施設共同 ALS 自然歴把握、遺伝子収集システムの構築. 第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15 日—17 日 (プログラム・抄録集 p.231)

3. 河又千鶴、森田光哉、中野今治: High-Resolution DNAMelting(HRM)解析を用いた筋萎縮性側索硬化症の SOD1 遺伝子解析. 第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15 日—17 日 (プログラム・抄録集 p.289)

4. 新井哲明、長谷川成人、秋山治彦、野中 隆、亀谷富由樹、池田研二、近藤宏美、下村洋子、羽賀千恵、土谷邦秋、吉田眞理、橋詰良夫、新里和弘、大島健一、森田光哉、中野今治：患者脳に蓄積した TDP-43 のリン酸化部位に関する検討. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、2008 年 5 月 20 日—22 日 (プログラム・抄録集 p.77)

5. 新井哲明、長谷川成人、秋山治彦、野中 隆、亀谷富由樹、池田研二、近藤宏美、下村洋子、羽賀千恵、土谷邦秋、吉田眞理、橋詰良夫、新里和弘、大島健一、森田光哉、中野今治：神経変性疾患におけるリン酸化 TDP-43 の蓄積. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、2008 年 5 月 20 日—22 日 (プログラム・抄録集 p.78)

6. 松坂恵介、大田泰徳、藤原雅代、中瀬浩史、中野今治、深山正久、大橋健一：脊髄根に高度のアミロイド沈着を来した孤発性 ALS アミロイドポリニューロパチーの解剖例. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、2008 年 5 月 20 日—22 日 (プログラム・抄録集 p.136)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

ナシ

HGF-c-Met system のミクログリアへの機能解析 —HGF の発症後 ALS 治療適用の至適化をめざして—

研究分担者：船越 洋¹⁾・准教授¹⁾大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
研究協力者：大谷 若菜¹⁾・特任研究員¹⁾大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
角山 圭一²⁾・准教授²⁾姫路独協薬科大学
中村 敏一³⁾・特任教授³⁾大阪大学先端科学イノベーションセンター

研究要旨：HGF は、これまで運動ニューロンに対する直接神経栄養作用を介して、ALS モデルトランスジェニック動物の運動機能の改善、寿命延長効果を示すことを明らかにしてきた。本研究では、ALS の発症後の病態進行に重要なミクログリアの特性変化に対する HGF の作用を評価した。その結果、HGF は *in vitro* ではミクログリアに直接作用しその特性を変化させること、c-Met の inhibitor を使用すると逆の反応がおこることを明らかにした。HGF は発症時投与でも ALS モデルトランスジェニックラットの寿命延長効果を示すが、HGF のミクログリアへの直接作用が、その分子機序の 1 つと示唆された。

A. 研究目的

発症後の ALS 進行には変異 SOD1 発現ミクログリアが寄与することが、変異 SOD1G93A 発現トランスジェニックマウス (Tg-マウス) からミクログリア特異的に SOD1G93A を遺伝子工学的に減少させることで示された (Boillee, Yamanaka et al., Science 2006)。このことから SOD1G93A を発現するミクログリアは主に活性化ミクログリアのマーカーとされる Mac2 陽性細胞であるが、この細胞が発症後の病態進行促進に機能する事が明らかとなった。いいかえると活性化型ミクログリアの 1 部は、発症後病態進行に寄与するといえる。一方、ALS モデル Tg-マウスのミクログリアを野生型へ置換すると疾患進行が抑制されることが報告された

(Beers et al., PNAS, 2006)。したがって発症後 ALS への治療法開発には、ミクログリア依存的 ALS

疾患進行の分子機序を解明し、その機序の解除や、ミクログリアの特性の野生型への変換が治療法開発に有用と期待される。我々は HGF が ALS モデルマウスの疾患進行を抑制し、その際ミクログリオシスを低減することを示してきた。本研究では、HGF-c-Met system のミクログリアへ直接機能できるか否か、またその際 ALS 進行に重要なミクログリアの特性を修飾できるかという観点に焦点をあて解析を施行した。

B. 研究方法

- (1) 培養系として E12.5 日齢マウス胎仔からの初代脊髄細胞培養系 (Urushitani らの方法) と P1.5 日齢ラット大脳皮質と脊髄からの初代ミクログリア細胞培養系を用いた。
- (2) ミクログリア細胞への HGF-c-Met system の機能解析には、recombinant ヒト HGF 蛋白質 (rhHGF) および c-Met inhibitor (SU11274) を用いた。
- (3) 免疫染色には、各種神経系細胞のマーカー抗体による蛍光染色 (MAP2, NeuN, SMI32, Iba1, Mac2 & GFAP) と c-Met および phospho-c-Met^{1230,1234,1235} (活性化型 c-Met) の蛍光多重染色を用いた。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験では、動物愛護につとめ、最少数の動物を用いて実験した。また、実験に際しては大阪大学医学部のルールにのっとり実験を行った。

C. 研究結果

- (1) 初代培養脊髄細胞の中での c-Met 陽性細胞の同定：蛍光多重免疫染色の結果、初代培養脊髄細胞の中では c-Met は脊髄運動ニューロンに最も発現が高く、多くのニューロンとミクログリアに発現すること (HGF responsive cells) が明らかになった。ミクログリアにおける c-Met 免疫染色性は、一部の特徴的形態を示す細胞で c-Met 免疫染色性が高い特徴が認められた。初代

培養脊髄細胞の中における

phospho-c-Met^{1230,1234,1235}陽性細胞 (c-Met活性化型細胞) は、いくつかの細胞のpopulationに認められたが、中でもミクログリア細胞で免疫染色性が高く、ミクログリアが直接HGF 標的細胞であることが確認された。

(2) 培養ミクログリア細胞：培養ミクログリア細胞においては、c-Met は大部分のミクログリアで発現し、リン酸化 (phospho-c-Met^{1230,1234,1235}) されることが明らかとなった。

(3) rhHGFおよびc-Met inhibitor (SU11274)処理による初代培養ミクログリアの形態変化：形態で評価すると、rhHGF およびc-Met inhibitor (SU11274) 処理により、ミクログリアの形態が相反的に修飾された。

D. 考察

HGF を神経系に供給すると、ALS モデルトランスジェニックマウスおよびラットの病態進行を抑制し、治療効果を示す事が明らかとなった (Sun, Funakoshi 他, 2002; Kadoyama, Funakoshi 他, 2007; Ishigaki, Aoki 他, 2007)。これらの研究は主に発症前から供給した場合の効果としては、他の研究報告と比較しても著しい効果といえる。しかし、臨床適用を考慮した場合、発症時もしくは発症後投与が現実的である。その発症後の病態進行のKeyとされるのが、ミクログリア細胞であり、その特性が病態の増悪に寄与したり、改善に寄与したりする重要要素と考えられている。HGF は運動ニューロンに対しては直接神経栄養作用を示し、このことがALSの治療に貢献している事は疑いがない。この効果に加えて、本研究では、HGF がミクログリア細胞を直接の標的細胞とし、ミクログリアの特性を修飾する事が明らかとなった。これは、HGF を ALS トランスジェニックラットに発症時投与しても寿命延長効果をもつことの分子基盤として重要である (Ishigaki, Aoki 他, 2007)。私達は、本研究で、ある subpopulation のミクログリアで特に c-Met の発現が高い事を突き止めた。発症後投与による ALS 治療法開発には、この分子機構の更なる解析と、有効な投与方法への改良が有効と期待される。

E. 結論

HGF-c-Met system はミクログリアに直接作用し、その特性を調節することでもALS進行を阻止する機序が示唆された。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

- (1) Suzuki Y, Funakoshi H, Machide M, Matsumoto K, Nakamura T. Regulation of cell migration and cytokine production by HGF-like protein (HLP) / macrophage stimulating protein (MSP) in primary microglia. *Biomed Res.* 29(2): 77-84, 2008.
- (2) Akita H, Takagi N, Ishihara N, Takagi K, Murotomi K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, Takeo S. Hepatocyte growth factor improves synaptic localization of the NMDA receptor and intracellular signaling after excitotoxic injury in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 210(1): 83-94, 2008.
- (3) Kanai M., Nakamura T., and Funakoshi H. Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene: differential regulation in the mouse nervous system during development. *Neurosci. Res.*, 2009, in press.
- (4) Tanaka S., Miyata T., Fujita T., Kawahara E., Tachino K., Funakoshi H., and Nakamura T. Differing responses of satellite cell activity to exercise training in rat skeletal training in rat skeletal muscle. *JPTS*, 2009, in press.
- (5) Takeo S, Takagi N, Takagi K, Date I, Ishida K, Bessho S, Nakamura T, Tanonaka K. Hepatocyte growth factor suppresses ischemic cerebral edema in rats with microsphere embolism. *Neurosci Lett.* 448(1):125-9, 2008.

2. 学会発表

- (1) Funakoshi H., Ohya W., and Nakamura T., Hepatocyte growth factor (HGF) as a novel and versatile neurotrophic factor during development and regeneration of the nervous system. Katzir Conference on Life and Death in the Nervous System: NGF2008, *Symposium*. Kfar Blum, Upper Galilee, Israel, Sept, 2008
- (2) Funakoshi H., and Nakamura T., HGF as a versatile and critical neurotrophic factor during development and regeneration of the nervous system. *Neuroscience 2008, The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Symposium*, 2008.
- (3) Ohya W., Funakoshi H., and Nakamura T., Modulation of microglial characteristics by HGF: a new potential approach to attenuate the progression of disease in a transgenic mouse

model of ALS. Neuroscience 2008, The 31st
Annual Meeting of the Japan Neuroscience
Society, Oral, 2008.

H. 知的所有権の取得状況

- 1.特許取得
特記なし。
- 2.実用新案登録
特記なし。
3. その他
特記なし。

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた新規免疫療法開発研究

研究分担者：漆谷 真¹⁾ ¹⁾滋賀医科大学・分子神経科学研究センター
研究協力者：竹内成子¹⁾、佐藤尚志¹⁾、館野美成子²⁾、遠山育夫¹⁾
²⁾国立精神神経センター・神経研究所

研究要旨：ALS に対する免疫療法を開発するため、本年度はまず低発現型 G93A SOD1 トランスジェニックマウスを用いて原因タンパクを標的としたワクチン療法を行い、効果の有無と抗体のサブクラスの治療効果に与える影響について検討した。ワクチンとして変異型と同じ G93A 型 SOD1 に加え、変異 SOD1 の性質を獲得することが知られている野生型アポ状態の SOD1 を大腸菌より精製した。変異型、野生型アポ SOD1 ワクチンは発症遅延、寿命延長の両者に有効であったが、野生型がより有効であった。IgG サブクラスの解析から、この効果は IgG2b の抗体価と相関しており、IgG1/IgG2b あるいは IgG1/IgG2c 比は変異型に比し野生型では低値を示した。一方、変異型では IgG1 の抗体価は発症時期、寿命と負の相関を示していた。本結果は免疫療法に Th1 系の細胞性免疫が保護的役割をする可能性を示しており、免疫調整療法の有効性を示唆する。さらに野生型 SOD1 ワクチンが有効であったことは、変異型によらず病原配列は共通する可能性を示唆しており、より汎用性の高いワクチンとなり得る。

A. 研究目的

我々は、以前に低発現型である G37R 型変異 SOD1 トランスジェニックマウスに対して、変異 SOD1 組換えタンパクによるワクチン療法が有効であることを示したが、高発現型 G93A SOD1 トランスジェニックマウスでは無効であり、発現量の問題と考察した。しかしながら、近年、特に Tリンパ球を中心とする、全身免疫反応の異常が SOD1 マウスのみならず ALS 患者でも報告されており、抗原抗体反応に加えて、それに関連する免疫反応が治療効果の背景にある可能性がある。我々は免疫療法効果の機序について、今回は低発現型の G93A 型 SOD1 トランスジェニックマウスを用いたワクチン療法を行い、抗原や、IgG のサブクラスと治療効果との関連を検討した。

B. 研究方法

低発現型 G93A トランスジェニックマウスに対し、大腸菌にて精製した G93A 型変異 SOD1、野生型 SOD1 を非活性のアポ状態で Ribi アジュバントとともに 4 回接種し、発症・寿命について

コントロール群（生食+アジュバント）と比較検討した。3 回目の接種が終了した 150 日目に採血し、血清中 whole IgG、IgG サブクラス(IgG1, IgG2b, 2c)を ELISA 法で測定し、発症、寿命との関連を調べた。

C. 研究結果

両ワクチンは G93A マウスの発症、寿命の延長に有効であったが、野生型 SOD1 は変異型に比しより有効であった。野生型ワクチンにおいて、抗体価は変異型ワクチンに比べ低値であったが、発症時期と寿命は、抗体価と正の相関傾向を示していた。一方、G93A 型の相関は高抗体価にも関わらず、治療効果と野生型に比し弱かった。そこで IgG サブクラス解析を行ったところ、G93A SOD1 に対する IgG1 は寿命と負の相関を、IgG2b は正の相関を示し、その傾向は野生型アポによるワクチンで明瞭であった。

D. 考察

本結果は ALS のワクチン療法においては Th1 系の賦活化が効果発現に重要であり、Th2 系が

重要と考えられているアルツハイマー病の免疫療法とは対照的である。これは近年注目されているTリンパ球のALSに対する保護的役割を支持する結果と考えられ、発症と疾患の進行におけるTh1系、Th2系の各炎症反応の関与について明らかにすることによってALSの免疫療法の可能性が広がるものと期待される。また、野生型アポSOD1がワクチンとして有効であったことは、変異SOD1による病態が変異特異的ではなく、何らかの共通構造を介している可能性を示唆している。

E. 結論

低発現型G93Aトランスジェニックマウスに対しても病原タンパクに対するワクチンは一定の効果を示した。しかしながら、抗原による免疫反応の違いが治療効果に影響することが明らかとなった。特にTh1系の賦活化で産生されるIgG2bの抗体価と治療効果が正の相関をすることから、今後ワクチン接種に伴う獲得免疫系を解析することにより、免疫療法の応用性が広がる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

1. 漆谷 真. ALSモデルマウスの免疫療法と今後の展望. *Brain and Nerve* 2008, 60, 643-651
2. Gros-Louis F, Kriz J, Kabashi E, McDearmid J, Millemcamps S, Urushitani M, Lin L, Dion P, Zhu Q, Drapeau P, Julien J-P, Rouleau GA. Als2 mRNA splicing variants detected in KO mice rescue severe motor dysfunction phenotype in Als2 knock down zebrafish. *Hum Mol Genet* 2008 17:2691-2702

3. Urushitani M, Abou Ezzi S, Matsuo A, Tooyama I, Julien JP. The endoplasmic reticulum-Golgi pathway is a major target for translocation and aggregation of mutant superoxide dismutase linked to ALS. *FASEB J* 2008, 22: 2476-2487.

2. 学会発表

1. Satoh T, Takeuchi S, Saitoh A, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal strangulation induced peripheral accumulation and nuclear reduction of TDP43 in brainstem motor neurons. Annual Meeting of Neuroscience, 2008, November, Washington D.C.
2. Dupre N, Gros-Louis F, Andersen P, Urushitani M, Meininger V, Salachas F, Camu W, Bouchard JP, Rouleau G, Julien JP. Genetic screening study of CHGA and CHGB variants in a cohort of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Annual meeting of American Academy of Neurology, 2008 April, Chicago

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

3. 実用新案登録

なし

3. その他

TDP-43 proteinopathy 細胞モデルの構築

研究分担者：長谷川成人（東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム）

研究協力者：野中 隆¹⁾， 亀谷富由樹¹⁾， 新井哲明²⁾， 秋山治彦²⁾

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム

²⁾ 東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム

研究要旨：前頭側頭葉変性症（FTLD）や筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脳に出現するユビキチン陽性の細胞内凝集体の主要構成成分として TDP-43 が同定された。我々は培養細胞を用いて、TDP-43 の細胞内凝集体モデルの構築を試みた。TDP-43 の部分欠損変異体を SH-SY5Y 細胞に発現することにより、抗リン酸化 TDP-43 特異抗体および抗ユビキチン抗体に陽性の細胞内凝集体の形成が観察された。本細胞モデルは TDP-43 を標的とした ALS の治療薬の探索に有用であると考えられる。

A. 研究目的

前頭側頭葉変性症（FTLD）や筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者脳に出現するユビキチン陽性の細胞内異常構造物の主要構成成分として TDP-43 が同定された。TDP-43 は不均一核リボヌクレオタンパク質（hnRNP）の一種であり、核に局在し、転写制御などに関与することが知られているが、その細胞内蓄積機構および細胞障害性機構については不明である。これらを解明するために、我々は培養細胞を用いて、TDP-43 の細胞内凝集体モデルの構築を試みた。

B. 研究方法

TDP-43 に存在する塩基性アミノ酸クラスター領域を欠損させた変異体を作製し、核移行シグナルについて検討した。また、green fluorescent protein (GFP) に融合した種々の TDP-43 断片を構築した。これらの変異体を、それぞれ神経芽細胞 SH-SY5Y に一過性に発現させ、これらの変異体の発現による TDP-43 細胞内凝集体形成について検討した。

（倫理面への配慮）

すべての遺伝子操作は当研究所の専門委員

会に遺伝子組換え生物等の使用等に関わる申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C. 研究結果

TDP-43 の 78-84 残基の配列が、核移行シグナルとして機能することが判明した。この欠損変異体を細胞に発現させ、さらにプロテアソーム阻害処理を行うと、細胞質に凝集体が出現した。これらは、抗リン酸化 TDP-43 特異抗体および抗ユビキチン抗体に陽性を示した。GFP が結合した種々の TDP-43 断片を発現させたところ、いくつかの断片において細胞内凝集体の形成が認められ、これらも抗リン酸化 TDP-43 特異抗体および抗ユビキチン抗体で染色された。TDP-43 は、嚢胞性線維症の原因遺伝子である嚢胞性線維性膜貫通調節因子（CFTR）のスパライシング調節因子であり、CFTR のエクソン 9 をスキップする活性を持つことが報告されている。細胞内凝集体形成が認められた変異体について CFTR エクソン 9 スキップアッセイを行ったところ、全ての変異体においてスキップ活性が認められなかった。TDP-43 の機能異常が、その細胞内蓄積と関連することが示唆される