

D. 考察

類似の TDP-43 の核移行に関する検討は Winton らが報告しているが、彼らは Myc タグを付加したコンストラクトを使用している。また形成された凝集体が患者組織に蓄積している TDP-43 構造物と同じ性質を有しているかは不明である。本実験で作製した細胞モデルはタグのない TDP-43 の発現によるものであり、抗リン酸化 TDP43 抗体、及び抗ユビキチン抗体との反応性も確認している。また、TDP-43 の核移行配列、あるいは RNA 認識配列の障害に加え、プロテソームの障害が TDP-43 凝集体の形成を促進することも明らかにした。

E. 結論

今回構築した細胞内 TDP-43 蓄積モデルは、患者脳に見られる細胞内凝集体と形態や性質が類似したモデルであり、TDP-43 の蓄積機構の解明だけでなく、その細胞内蓄積を抑制する薬剤や遺伝子などのスクリーニングや治療薬の開発に応用でき、非常に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

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). Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 583: 394-400, 2009.
- 2). Arai T Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Iritani S, Onaya M, Akiyama H, Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies *Acta Neuropathol. Online* Jan 13, 2009.

3). Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol. Online* Nob 28, 2008.

4). Schwab C, Arai T, Hasegawa M, Yu S McGeer PL. Colocalization of TDP-43 and Huntingtin in inclusions of Huntington's disease *J Neuropathol Exp Neurol* 67:1159-65, 2008.

5). Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hisanaga SI, Hasegawa M, Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTLD-U and ALS. *FEBS Lett* 582: 2899-2904, 2008.

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

2. 学会発表

- 1). 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Thomas Beach, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) FTD における TDP-43 蓄積の意義. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜 [2008/05/17]
- 2). 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Beach T, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) FTLD、ALS に蓄積する異常 TDP-43 の解析. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/11]
- 3). 犬飼有紀, 野中隆, 新井哲明, 吉田眞理, 橋詰良夫, 秋山治彦, 久永眞市, 長谷川成人 (2008) TDP-43 における Ser409/410 の異常リン酸化. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]
- 4). 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人

(2008) TDP-43 断片の発現による細胞内凝集体の形成. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]

5). 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人 (2008) TDP-43 の細胞内封入体モデルの作製. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/11]

6). 新井哲明, 長谷川成人, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Beach T, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) TDP-43 の蓄積を中心とした神経病理. 第 27 回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]

7). Nonaka T, Arai T, Akiyama H, Buratti E, Baralle F E, and Hasegawa M (2008) Intracellular aggregation of phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 in SH-SY5Y cells. International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA [2008/07/27]

8). Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Ikeda K, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H (2008) Accumulation of phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA [2008/07/28]

9). 新井哲明, 長谷川成人, 西原真杉, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Thomas G Beach, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) 遺伝子変異と FTD: Progranulin 遺伝子を含めて. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜 [2008/05/17]

10). 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, 近藤ひろみ, 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 (2008) 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 [2008/05/20]

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

1). 特願 2008-101899. 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人: TDP-43 蓄積細胞モデル. 出願人: 財団法人東京都医学研究機構, 出願日: 平成 20 年 4 月 9 日

2). 特願 2008-095035. 糸川昌成, 新井誠, 長谷川成人, 野中隆, 秋山治彦, 新井哲明: 遺伝子変異を用いた筋萎縮性側索硬化症の予測法. 出願人: 財団法人東京都医学研究機構, 出願日: 平成 20 年 4 月 1 日

3). 特願 2007-178583. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 秋山治彦: TDP-43 凝集体に特異的に結合する抗体. 出願人: 財団法人東京都医学研究機構, 出願日: 平成 19 年 7 月 6 日

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

ALS モデルマウスのグリア細胞における分子病態の解明

研究分担者：山中 宏二（理化学研究所脳科学総合研究センター・ユニットリーダー）

研究協力者：山下 博史，渡辺 祥司，藤森 典子

理化学研究所脳科学総合研究センター・山中研究ユニット

研究要旨：ALS モデルマウスのグリア細胞における分子病態解明の一環として本年度はミクログリアが関与する自然免疫経路の検討を行った。まず、変異 SOD1 マウスの疾患進行期の脊髄病巣における mRNA 発現プロファイルの網羅的解析により、TLR2, CD14 など自然免疫系の受容体の発現亢進を確認した。さらに、自然免疫経路のシグナル伝達に必須の分子である MyD88, Trif ノックアウトマウスと SOD1^{G93A} マウスとの交配実験を行い、自然免疫経路のシグナル伝達抑制により疾患進行が加速し、マウスの生存期間が著しく短縮した。ALS モデルにおいて自然免疫経路の破綻はその疾患進行を加速すると考えられる。

A. 研究目的

ALS モデルマウスにおいてミクログリア由来のサイトカイン産生の異常亢進がみられる原因の一つとして自然免疫経路の活性化が考えられる。自然免疫は病原体の侵入などに対して初期に発動される生体応答であり、マクロファージや樹状細胞に発現する Toll-like 受容体 (TLR) を介して病原体の構成成分を認識し、炎症反応や免疫反応が応答される。神経系ではおもにミクログリアに TLR の発現がみられ、感染防御機構に重要な役割を果たしている。変異 SOD1 マウスの病巣では、感染とは関係なく疾患の進行に伴って TLR2 の発現亢進が報告され、ALS 病態における自然免疫経路の関与が示唆されている。そこで、本研究では ALS モデルマウスにおける自然免疫経路を抑制することにより疾患進行速度への影響を検討する。

B. 研究方法

まず、疾患進行期の ALS モデルマウス SOD1^{G85R}, SOD1^{G137R} の脊髄病巣の DNA マイクロアレイによる解析から自然免疫関連分子の発現異常を検討した。さらに ALS モデルである SOD1^{G93A} マウスと Toll-like 受容体を介したシグ

ナル伝達に必須の分子である MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88), Trif (TIR domain-containing adaptor inducing IFN β) ノックアウトマウスとの 3 重交配実験を行い、疾患の進行速度や生存期間延長の効果を検討した。MyD88, Trif のノックアウトマウスとの交配により、すべての TLR シグナル伝達を特異的に抑制することが可能である。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料の使用はなく該当しない。

C. 研究結果

SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}, SOD1^{G93A}/Trif^{-/-} の個体は交配により得られたが、SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}/Trif^{-/-} の個体はこれまで得られていない。また、SPF 飼育環境においてこれらの個体に明らかな感染症はみられなかった。SOD1^{G93A} マウスと比較して、SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}, SOD1^{G93A}/Trif^{-/-} の双方において有意な生存期間の短縮が見られた（平均生存期間、SOD1^{G93A}: 164 日；SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}: 144 日；SOD1^{G93A}/Trif^{-/-}: 141 日）が、発症時期の変化は認めないことから、疾患進行が加速していると考えられた。

D. 考察

MyD88 は 10 種類以上ある TLR のうち TLR3 以外のシグナル伝達に関与し、Trif は TLR3, 4 を介したシグナル伝達に関与する。MyD88, Trif のいずれのシグナル伝達を遮断した場合でも疾患進行が加速していることから、両者に共通した Toll-like 受容体 TLR4 からのシグナル伝達が、ALS モデルの疾患進行を制御する因子の一つである可能性が示唆された。しかしながら、複数の TLR が制御している可能性も考えられ、さらなる検討を要する。

E. 結論

ALS モデルにおいて自然免疫経路の破綻はその疾患進行を加速すると考えられる。今後、これらのマウスの脊髄病巣におけるグリア細胞の活性化の検討や、ミクログリアにおいて、どのような炎症性サイトカインや他の分子の発現プロファイルが疾患進行の加速に関与しているのかを検討することを通じて、その分子病態を明らかにする。さらに、SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-}/Trif^{-/-}の個体が得られれば、その生存期間の検討を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Cleveland DW et al. Gigaxonin controls vimentin organization through tubulin chaperone-independent pathway. *Hum Mol Genet* published online on Jan 24, 2009.

2) Ilieva H et al. Mutant dynein (Loa) triggers proprioceptive axon loss that extends survival only in the SOD1 ALS model with highest motor neuron death. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 12599-12604, 2008.

3) Furukawa Y et al. Complete loss of post-translational

modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in familial form of ALS.

J Biol Chem 283: 24167-24176, 2008.

4) Yamanaka K et al. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice.

Proc Natl Acad Sci USA 105: 7594-7599, 2008.

2. 学会発表

1) Yamanaka K. Astrocytes and microglia determine disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. Cold Spring Harbor 2008 Meeting on Glia in Health & Disease, USA. 2008 年 7 月.

2) Yamanaka K. Glial cells as central contributors to non-cell autonomous neurodegeneration in ALS. BMB2008 (第 81 回日本生化学会, 第 31 回日本分子生物学会合同大会) シンポジウム, 神戸. 2008 年 12 月.

3) 山中宏二ら 第 49 回日本神経学会総会, 横浜. 2008 年 5 月

4) 山中宏二ら 第 31 回日本神経科学大会, 東京. 2008 年 7 月.

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし

Ⅲ. 研究報告(研究協力者)

TAT 蛋白髄腔内投与による ALS モデルマウスへの蛋白治療の試み

研究協力者：阿部 康二 岡山大学医学部神経内科 教授

研究要旨：ALS モデルマウスである SOD1 (G93A) Tg マウスに TAT 蛋白髄腔内投与による蛋白治療を試みた。その結果、TAT 蛋白は持続髄腔内投与にてマウスの脊髄運動ニューロンに良好に取り込まれ、TAT-FNK の持続髄腔内投与にて、ALS の発症、生存期間を延長し、clinical score を改善した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症は運動ニューロンが選択的に変性し、このため筋萎縮・脱力を来し数年の経過で死に至る神経変性疾患である。しかし病態の解明は十分でなく、いまだ有効な治療はなく、新規治療法の開発が強く求められる。

近年、HIV1 の転写活性化蛋白質である transcriptional activator protein (TAT) 由来の protein transduction domain (PTD) に結合した蛋白質が、細胞膜や血液脳関門を通過し、神経を含む、さまざまな組織、細胞に取り込まれることが判明した。これを利用し、蛋白治療として、TAT の PTD と結合させた蛋白質を細胞内に導入することで、さまざまな疾患への治療応用が期待されている。そして、抗アポトーシス作用をもつ Bcl-X_L 蛋白の 3 つのアミノ酸を置換した FNK 蛋白に TAT を結合した TAT-FNK が、脳梗塞モデルマウスにて良好な治療成績を挙げた。また、抗アポトーシス作用をもつ Bcl2 の overexpression とアデノウイルスを用いた Bcl2 遺伝子導入は、ALS モデルマウスに対し良好な治療成績を挙げている。

そこで本研究では、ALS モデルマウスである、SOD1 (G93A) Tg マウスに、TAT-FNK を用いた蛋白治療を試みた。投与方法は、より効率的に脊髄運動ニューロンに TAT 蛋白を導入するため、osmotic minipump を用いた持続髄腔内投与法を試みた。

B. 研究方法

TAT-FNK 蛋白が持続髄腔内投与の間に抗アポトーシス効果が失活しないかを確認するため、STS を投与することでアポトーシスを誘発した SH-SY5Y 細胞に、37°C で 28 日間 incubate した TAT-FNK と incubate していない TAT-FNK を投与し、抗アポトーシス効果を比較した。

TAT 蛋白が持続髄腔内投与にて、脊髄運動ニューロンに取り込まれるかを確認するため、91 日齢の Wt マウスに 7 日間、osmotic minipump を用いて TAT-GFP (3.5×10^{-2} nmol または 3.5×10^{-1} nmol) または TAT-FNK (3.5×10^{-1} nmol) を持続髄腔内投与し、その 7 日後に L4 腰髄を灌流固定し、切片にして、抗 GFP 抗体、ニューロフィラメントに反応する SM132 抗体、抗 Bcl-X_L 抗体で免疫染色を行った。

TAT-FNK 持続髄腔内投与の治療効果を確認するため、91 日齢の SOD1 (G93A) Tg マウスに、28 日間、osmotic minipump を用いて人工髄液または TAT-GFP (1.4 nmol)、TAT-FNK (1.4 nmol) の持続髄腔内投与を行い、発症日、生存期間、clinical score (Rotarod test、wheel running、体重変化) を記録した。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は本学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で、動物愛護面に配慮し、利用動物数を極力減らすように努めた。

C. 研究結果

STS を投与しアポトーシスを誘発した SH-SY5Y 細胞に対し、37°C で 28 日間 incubate した TAT-FNK と incubate していない TAT-FNK では、抗アポトーシス効果に差は認めなかった。

抗 GFP 抗体での L4 腰髄免疫染色の結果、TAT-GFP は 7 日間の持続髄腔内投与にて、脊髓前角の 20 μ m 以上の大型細胞に取り込まれ、抗 GFP 抗体と SMI32 抗体との二重染色の結果、GFP 陽性細胞は SMI32 陽性であり、TAT-GFP は脊髓運動ニューロンに取り込まれたことが判明した。抗 Bcl-X_L 抗体での L4 腰髄免疫染色の結果、TAT-FNK は 7 日間の持続髄腔内投与にて、TAT-GFP と同様に脊髓前角の大型細胞に取り込まれており、脊髓運動ニューロンに取り込まれたことが判明した。

28 日間の TAT-FNK の持続髄腔内投与により、人工髄液や TAT-GFP と比較して、Tg マウスの発症日（人工髄液 98.9 \pm 3.0 日、TAT-GFP 98.3 \pm 4.4 日、TAT-FNK 107.8 \pm 7.3 日）、生存期間（人工髄液 130.8 \pm 7.0 日、TAT-GFP 129.8 \pm 10.0 日、TAT-FNK 143.7 \pm 9.3 日）は有意に延長し、clinical score は有意に改善した。

D. 考察

37°C で 28 日間 incubate した TAT-FNK の抗アポトーシス効果は失活しておらず、28 日間の持続髄腔内投与の間に TAT-FNK の抗アポトーシス効果は失活しない可能性が高いと考えた。

3.5 \times 10⁻²nmol の TAT-GFP が 7 日間の持続髄腔内投与で脊髓運動ニューロンに取り込まれたが、今までニューロンに関して報告されている TAT 蛋白投与量の中では最少の投与量であり、osmotic minipump を用いた持続髄腔内投与法は、より効率的に脊髓運動ニューロンに TAT 蛋白を導入する方法であると考えられた。また

TAT-GFP に限らず、TAT-FNK も持続髄腔内投与法にて良好に脊髓運動ニューロンに取り込まれることが判明した。

ALS 発症前から、Bcl2 発現が減少傾向となり、アポトーシスを促進する BAX の発現が増加傾向となるため、ALS 発症直前の 91 日齢から 28 日間、TAT-FNK を持続髄腔内投与することにした。それにより、ALS モデルマウスの発症、生存期間は有意に延長し、clinical score が有意に改善したことより、TAT-FNK による蛋白治療は ALS に対する有効な治療法になりえると考えられた。また将来的に、他の治療効果を持つ蛋白も TAT を結合させることで、ALS 治療に応用することが期待できると考えられた。

E. 結論

Osmotic minipump を用いた持続髄腔内投与法は、TAT 蛋白をマウスの脊髓運動ニューロンに導入する有効な手段であり、ALS モデルマウスへの TAT-FNK 持続髄腔内投与は、有効な治療方法である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究報告

1. 論文発表

Ohta Y, Kamiya T, Nagai M, Nagata T, Morimoto N, Miyazaki K, Murakami T, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Asoh S, Ohta S, Abe K: Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 86: 3028-3037, 2008

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ALS 治療薬：キサンチン脱水素酵素(XDH)阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物と XDH 阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質となる化合物（痛風薬：アロプリノール）との比較

研究協力者：加藤信介 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経病理部門・准教授
共同研究者：加藤雅子 鳥取大学医学部分子病理学教室
西野武士、阿部靖子 日本医科大学医学部生化学第一教室

研究要旨：キサンチン脱水素酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物として化合物(1)：1-[3-シアノ-4-(2,2-ジメチルプロポキシ)フェニル]-1H-ピラゾール-4-カルボン酸と化合物(2)：4-(5-ピリジン-4-イル-1H-[1,2,4]トリアゾール-3-イル)ピリジン-2-カルボニトリルを、ALS モデル動物である B6SJL-TgN [SOD1-G93A] 1Gur (G1H-G93A トランスジェニックマウス)に、生後 80 日より 5mg/kg の化合物(1)または化合物(2)をそれぞれ連日経口投与した。プラセボとしては化合物(1)および(2)の溶剤であるメチルセルロースを用いた。臨床症候学的結果については、化合物(1)および(2)は、プラセボより、有意な発症遅延効果、生存期間延長効果、病悩期間延長効果を認めた。運動負荷試験の結果については、化合物(1)および(2)は、伸展反射試験・傾斜面角度試験・フットプリント試験・ロタロッド試験・ビームバランス試験の各試験に関して、プラセボより、有意な有効効果を示した時期が必ず存在していた。

A. 研究目的

これまでに、われわれは、筋萎縮性側索硬化症（以下、ALS）の新規治療薬として、キサンチン脱水素酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物(3)：2-(3-シアノ-4-イソプロトキシフェニル)-4-メチル-5-チアゾールカルボン酸が、全く意外にも、顕著に優れたALS治療作用を示すことをALS動物モデルにおいて示した。今回、同様にキサンチン脱水素酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物で、しかも前回報告した化合物(3)とは異なった構造式を有する2種類の化合物(1)および(2)が同様の優れたALS治療作用を示すことを見出した。これによる当該化合物を特徴とするALS治療薬の開発とその基盤研究を研究目的とする。

B. 研究方法

1. 薬剤：化合物(3)とは異なる、XDH 阻害作

用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない新たな2種類の化合物(1)(2)をそれぞれ田辺三菱製薬 [化合物(1)]、富士薬品 [化合物(2)]より供与を受けた。即ち、1-[3-シアノ-4-(2,2-ジメチルプロポキシ)フェニル]-1H-ピラゾール-4-カルボン酸 [化合物(1)]と4-(5-ピリジン-4-イル-1H-[1,2,4]トリアゾール-3-イル)ピリジン-2-カルボニトリル [化合物(2)]の2種類である。

2. 投与方法：化合物(1)・(2)およびアロプリノールをメチルセルロース（溶剤）に溶解させ、5mg/kg を1日1回経口的に投与し、プラセボは、メチルセルロースのみを使用した。

3. 実験動物：雄の B6SJL-TgN [SOD1-G93A] 1Gur (G1H-G93A トランスジェニックマウス, JR2726, Jackson Laboratory, Bar Harbor, 米国)と雄の野生型同腹仔マウスを使用した。

4. マウスの臨床症候学的評価：マウスの臨

床症候学的評価は、昨年と同様に、ステージ0度(=正常)から5度(=高度四肢麻痺、もしくは瀕死状態)の6段階評価をした。

5. マウスの運動負荷試験：5種類の運動負荷試験を昨年と同様に施行し、同一の段階評価を施行した。即ち、伸展反射試験(3段階評価)・傾斜面角度試験(4段階評価)・フットプリント試験(5段階評価)・ロタロッド試験(4段階評価)・ビームバランス試験(3段階評価)である。

6. プラセボ・薬剤投与方法による実験デザイン：プラセボ・化合物(1)・(2)およびアロプリノールの投与により、4群の投与実験群に分けて行い、4群ともに生後80日より経口投与実験を施行した。

[倫理面への配慮]

すべての遺伝子操作は本学遺伝子組換え実験指針に従い、動物実験は本学動物実験委員会指針に従った上に、倫理面及び動物愛護面に配慮し、当該実験を実施した。

C. 研究結果

1. プラセボ・薬剤投与の各実験群の臨床症候学的評価の結果

1) プラセボ投与実験群におけるG1H-G93Aマウスの発症日は、 99.9 ± 2.4 日、生存期間は、 119.7 ± 3.3 日、病悩期間 20.8 ± 2.3 日であった。プラセボ投与実験群の正常対照である野生型同腹仔マウスでは、全例臨床症候学的評価のステージは全経過を通じて0度であった。

2) 化合物(1)投与治療実験群および化合物(2)投与治療実験群は、プラセボ投与実験群より、発症日を有意に遅延させる発症遅延効果、生存期間を有意に延長させる生存期間延長効果、病悩期間を有意に延長させる病悩期間延長効果($P < 0.05$, Mann-Whitney U検定)を認めた。臨床症候学的には、ステージ1度から4度の各項目においてそれぞれ有意差($P < 0.05$, Mann-Whitney U検定)を持って延長していた。

3) アロプリノール投与実験群では、プラセボ投与群と比べて臨床症候学的評価の各項目

の評価において有意差はなかった。

3. プラセボ・薬剤投与の各実験群の運動負荷試験の結果：

1) プラセボ投与実験群の正常対照群である野生型同腹仔マウスでは、伸展反射試験、傾斜面角度試験、フットプリント試験、ロタロッド試験、ビームバランス試験の各運動負荷試験において、それぞれのスコアは全経過を通じて10匹全例スコア=0であった。

2) 化合物(1)投与治療実験群および化合物(2)投与治療実験群は、プラセボ投与群に比べて伸展反射試験(105-120日)、傾斜面角度試験(110-130日)、フットプリント試験(105-130日)、ロタロッド試験(105-115日)、ビームバランス試験(105-115日)の各時点の試験で、有意な運動能力の有効性($p < 0.05$, Mann-Whitney U検定)が認められた。

3) アロプリノール投与実験群では、プラセボ投与群と比べて5種類すべての運動負荷試験の各試験項目の評価において有意差はなかった。

D. 考察

われわれは現在までに、ALSの新規治療薬として、キサンチン脱水素酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物として、構造式の異なる3種類の化合物(1)・化合物(2)・化合物(3)について、3種類とも等しく、顕著に優れたALS治療作用を示すことを、ALS動物モデルを用いた実験の結果から示した。一方、キサンチン脱水素酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質となるアロプリノールにはALS治療作用を認めなかった。即ち、キサンチン脱水素酵素阻害作用を有した上で、プリンサルベージ回路の基質とならない化合物はALS治療薬となり、プリンサルベージ回路の基質となる化合物：アロプリノールは痛風薬にとどまる事実は、当該化合物を含め、ALSストレスによる運動神経細胞死抑制機序解明の一助となる。

E. 結論

キサンチン脱水素酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物(1): 1-[3-シアノ-4-(2, 2-ジメチルプロポキシ)フェニル]-1H-ピラゾール-4-カルボン酸と化合物(2): 4-(5-ピリジン-4-イル)-1H-[1, 2, 4]トリアゾール-3-イル)ピリジン-2-カルボニトリルは、ALS の治療薬にたり得る。

F. 健康危険情報: なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sumi H, Kato S, Mochimaru Y, Fujimura H, Etoh M, Sakoda S: Nuclear TAR DNA Binding Protein 43 Expression in Spinal Cord Neurons Correlates With the Clinical Course in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68 (1): 37-47, 2009.
- 2) 加藤信介: ALS1 の神経病理と発症機序. *Clinical Neuroscience* 26(3): 319-322, 2008.

2. 学会発表

- 1) 西野武士、加藤信介: 抗痛風薬の1つの利用法を例に本学会を考える. 第41回日本痛風・核酸代謝学会総会, 福井, 2月14-15日, 2008.
- 2) 加藤雅子、加藤信介、堀江 靖、北村幸郷、寺田忠史、林 一彦: マロリー小体形成機序: 最終糖化反応物による修飾. 第97回日本病理学会総会、金沢、5月15-17日、2008.
- 3) 隅 寿恵、加藤信介、藤村晴俊、佐古田三郎: ALS1にもTDP43 pathologyは存在する. 第49回日本神経学会総会、横浜、5月15-17日、2008.
- 4) 加藤信介、山岸覚、小山佳久、片山泰一、

谷口 学、人見淳一、松崎伸介、加藤昌明、青木正志、糸山泰人、大浜栄作、加藤雅子、平野朝雄、遠山正彌: *In vitro*系におけるLBHI/Ast-HI形成機序と*In vitro* ALSモデル開発の基盤研究. 第49回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、5月20日-22日、2008.

- 5) 隅 寿恵、新沢康英、加藤信介、井岡正人、松岡洋祐、岡部 勝、衛藤昌樹、辻元賀英、佐古田三郎: Ca 非依存性 phospholipase A2 β ノックアウトマウス神経系における経時的病理学的検討. 第49回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、5月20日-22日、2008.
- 6) 加藤信介、山岸覚、小山佳久、片山泰一、谷口学、人見淳一、松崎伸介、加藤昌明、青木正志、糸山泰人、大浜栄作、加藤雅子、平野朝雄、遠山正彌、中島健二: ヒトFALS・ALSマウスと*In vitro* ALSモデルとの共通点に関する基盤研究. 第84回日本神経学会中国・四国地方会、米子、7月5日、2008.
- 7) 藤原範子、中の三弥子、大河原知水、吉原大、横江俊一、加藤信介、谷口直之、鈴木敬一郎: ヒトCu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)のCys¹¹¹の酸化と酸化型SOD1特異抗体の作製. 第61回日本酸化ストレス学会学術集会:京都、6月19-20日、2008.

H. 知的所有権の取得状況 (予定も含む)

発明の名称: 筋萎縮性側索硬化症治療薬
特願 2006-196343
PCT/JP2007/000765

孤発性筋萎縮性側索硬化症患者ゲノムの CNV(copy number variation)解析 (第 2 報)

研究協力者：加藤丈夫¹⁾
共同研究者：佐藤秀則^{1,2)}、飯島 寛²⁾、江見 充^{1,2)}、川並 透¹⁾、
栗田啓司¹⁾、豊島 至³⁾、祖父江 元⁴⁾
所属：¹⁾山形大学第三内科、²⁾DNA チップ研究所、
³⁾秋田大学医学教育センター、⁴⁾名古屋大学神経内科

研究要旨：孤発性 ALS 83 例および正常対照 (control) 100 例の末梢血 DNA を用いて、quantitative real-time PCR 法によりコピー数異常の有無を比較・検討した。解析した領域は、昨年度報告した染色体 A の CNV 領域 B の上流 (-5 kb および -10 kb 領域) および下流領域 (+5 kb および +10 kb 領域) である。この領域には 2 つの遺伝子 (上流に遺伝子 X、下流に遺伝子 Y) が存在する。孤発性 ALS では、遺伝子 X の 3' 領域から遺伝子 Y の 5' 領域に及ぶセグメントのコピー数が、control と比較して有意に多かった。したがって、孤発性 ALS では遺伝子 X あるいは遺伝子 Y の発現の異常 (量的異常あるいは構造異常) が生ずる可能性があり、これが孤発性 ALS の病態に関与している可能性がある。

A. 研究目的

昨年度は DeCODE CNV chip を用いて少数例の孤発性筋萎縮性側索硬化症 (孤発性 ALS、11 例) と non-ALS 例 (63 例) の CNV 解析をゲノムワイドに行い、ALS と有意な関連のある CNV を複数同定した。今年度はこれらの部位に対して孤発性 ALS と対照例の解析対象数を増やし、quantitative real-time PCR (qPCR) 法を用いてコピー数異常の有無を検討した。

B. 研究方法

DeCODE CNV chip による解析で孤発性 ALS と non-ALS 間で有意な差 (logistic $P=1.22 \times 10^{-7}$) が認められた染色体 A の CNV 領域 B について、上流領域 (-5 kb、-10 kb) および下流領域 (+5 kb、+10 kb) のプローブを合成し、qPCR 法で解析した。検体 DNA は、孤発性 ALS 83 例および正常対照 (control) 100 例の末梢血より抽出・精製した。

(倫理面への配慮)

本研究は山形大学医学部倫理委員会の承認を

得てから実施し、研究対象者からは文書で同意を得た。

C. 研究結果

CNV 領域 B は遺伝子 X の 3' 領域上にあり、今回の qPCR 法による解析では、その上流領域 (-5 kb 領域、-10 kb 領域) では孤発性 ALS と control 間でコピー数に有意な差が認められなかった (-5 kb 領域: $p=0.987$, OR=NA; -10 kb 領域: $P=0.987$, OR=NA)。一方、CNV 領域 B の下流領域 (+5 kb 領域、+10 kb 領域) では両者間でコピー数に有意な差が認められた (+5 kb 領域: $p=1.54 \times 10^{-5}$, OR=7.13, 95%CI: 2.93-17.39; +10 kb 領域: $P=7.72 \times 10^{-9}$, OR=8.57, 95%CI: 4.13-17.76)。

D. 考察

今回解析した領域には 2 つの遺伝子が存在し、上流から下流に向かって遺伝子 X、遺伝子 Y が位置する。遺伝子 X の 3' 領域 (CNV 領域 B) の CNV により、構造異常をもった蛋白質 (遺伝子

X の産物) が生成される可能性が考えられる。一方、CNV 領域 B の下流領域である+5 kb 領域および+10 kb 領域は、遺伝子 Y の上流領域に相当する。遺伝子 Y のプロモーター領域の CNV により、遺伝子 Y の転写に影響を与える可能性も考えられる。今後、上記の可能性について検討し、これらの遺伝子/蛋白質による運動ニューロン死の病態解明が必要である。

E. 結論

遺伝子 X の 3'領域から遺伝子 Y の 5'領域に及ぶセグメントのコピー数の増加は、孤発性 ALS の病因・病態に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

なし

変異型 SOD1 による小胞体ストレスへの関与

研究協力者: 佐々木秀直¹⁾

共同研究者: 加納崇裕¹⁾²⁾ 富山鎮次²⁾

¹⁾北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野

²⁾北海道大学大学院医学研究科生化学講座医化学分野

研究要旨: 変異型 SOD1 による神経毒性の機序に小胞体ストレスが関与することが以前より指摘されているが、その分子機構は未だ明らかではない。最近、小胞体関連分解 (ERAD) において変異型 SOD1 が小胞体ディスロコン構成分子 Derlin と結合し、異常構造タンパク質の小胞体からサイトゾルへの逆行輸送を阻害することが報告された。そこでこの逆行輸送への変異型 SOD1 による影響を検討することで小胞体ストレスを生じる機序の解明を目的とする。

A. 研究目的

Derlin/VCP によって逆行輸送されると考えられている T 細胞抗原受容体 T-cell receptor α -subunit (TCR α) の小胞体内への蓄積および細胞質での凝集形成を観察することで、変異型 SOD1 によって生じる小胞体ストレスのモデルシステムとして利用できるかを検討した。

B. 研究方法

TCR α の C 末端に GFP を結合した融合タンパク質を恒常的に発現する HeLa 細胞を作製し、そこに SOD1 野生型と変異型 (G93A) をそれぞれ一過性に発現させて蛍光顕微鏡で TCR α の凝集を観察した。また MG132 を培地に添加し薬剤応答性小胞体ストレスを比較した。さらに TCR α と SOD1 野生型、変異型 (G93A) をそれぞれ HEK-293T 細胞に共発現させ、シクロヘキサミド存在下で TCR α の分解速度を比較した。

C. 研究結果

HeLa 細胞では変異型 SOD1 を過剰発現させても TCR α の凝集は認められなかった。しかしプロテアソーム阻害剤である MG132 の存在下では、TCR α の凝集体が出現することが判明した。さらに、変異型 SOD1 を発現させると MG132 存在下で TCR α の凝集体を形成する細胞数が減少する

ことが判明した。

また、HEK-293T 細胞において野生型 SOD1 を発現させても TCR α の分解に変化はみられないが、変異型 SOD1 を発現させると可溶性成分における TCR α の分解が促進された(図)。

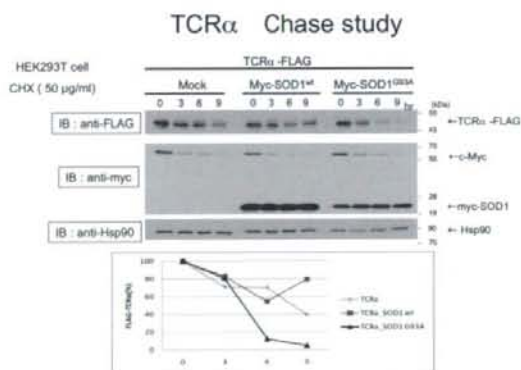


図. TCR α を HEK293T 細胞に一過性に発現させ、CHX でタンパク合成を阻害した後の、タンパク質量の経時変化を示す。c-Myc は positive control。SOD1^{wt}; 野生型 SOD1, SOD1^{G93A}; 変異型 SOD1, CHX; シクロヘキサミド。

D. 考察

これらのことから変異型 SOD1 により小胞体からの逆行輸送が阻害されたためにサイトゾルでの TCR α の凝集体形成が抑制されたと考えられる。また変異型 SOD1 により可溶性成分の TCR α の分解が促進されたのか、もしくは不溶性成分へ移行したのかを検討する必要がある。

E. 結論

ERAD により分解を受ける TCR α が変異型 SOD1 により影響を受けることが判明した。今後は神経細胞やグリア細胞系などの細胞株を使用し、変異型 SOD1 による小胞体ストレス及び TCR α の挙動への影響を検討する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsujii-Akimoto S, Yabe I, Niino M, Kikuchi S, Sasaki H. Cystatin C in cerebrospinal fluid as a biomarker of ALS. Neurosci Lett (in press)

2. 学会発表

辻（秋本）幸子，菊地誠志，矢部一郎，佐々木秀直．筋萎縮性側索硬化症患者における髄液シスタチン C の検討：第 49 回日本神経学会総会，横浜，2008

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に關与する

研究協力者: 佐古田三郎 大阪大学神経内科教授

共同研究者: 隅寿恵¹⁾、加藤信介²⁾、持丸祐子³⁾、藤村晴俊⁴⁾、衛藤昌樹¹⁾、

¹⁾ 大阪大学神経内科、²⁾ 鳥取大学脳神経病理、

³⁾ 大阪大学数理保健学、⁴⁾ 国立療養所刀根山病院神経内科

研究要旨: TDP-43 が筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態にどのように關係するかを明らかにするために、孤発型 ALS 症例 (SALS, n=18)及び SOD1 遺伝子に関連した ALS1 症例(n=6) 及び変異 SOD1(G93A)トランスジェニックマウス(G1L マウス)の脊髄について臨床経過と TDP の発現を含めた病理像を解析した。経過の速い SALS 症例では、TDP-43 の発現が核に陰性で細胞質に陽性の細胞や、TDP-43 陽性の細胞質内封入体を多数認めた。一方、経過の緩やかな SALS 症例では TDP-43 陽性封入体は有意に数が少なかった。G1L マウスでは経過の緩やかなマウスほど TDP 強陽性の神経細胞核が目立ち、核の TDP 免疫反応性は寿命に正の相関を示した。TDP 強陽性の神経細胞核は大きく円形であり、弱陽性の核は小さかった。ALS における神経細胞核の TDP-43 発現レベルは臨床経過に相関し、運動神経細胞死に対して防御的に働く可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身の筋力低下が進行し、経過数年で死に至る神経難病である孤発性筋萎縮性側索硬化症 (sporadic amyotrophic lateral sclerosis, SALS)の原因は、いまだその多くが不明である。近年、TAR DNA binding protein 43 (TDP-43)が SALS の病理学的診断マーカーともいえる神経細胞内封入体の重要な成分であることが報告され(Arai et al. BBRC 2006, Neumann et al. Science 2006)、TDP-43 が SALS の病因に深く關与する可能性が示唆されている。核蛋白である TDP-43 は RNA に結合して、遺伝子のスプライシングを修飾する(Buratti et al. J Biol Chem 2005)と報告されるが、その機能について不明な点が多い。TDP-43 が ALS の病態にどのように關与するのか明らかにすることを目的として臨床病理学的検討を行った。

B. 研究方法

SALS 症例 (n=18)及び SOD1 遺伝子に関連した ALS1 症例(n=6)の腰髄におけるホルマリン固定パラフィン切片に対し、TDP-43(Protein Tec, 1:3000)、ヒト SOD1 (MBL, 1:10000)に対する抗体を用いて免疫組織学的染色を施行し、病理学的に解析した。径 37 マイクロメートル以上的大型神経細胞数、TDP 陽性の細胞質内封入体の数について神経細胞、グリア細胞に分けてカウントした。また、大型神経細胞の TDP-43 対

例については罹病期間が2年半以内と経過の早い群 (13 例)、5 年以上と経過の緩徐な群 (5 例)に分けて統計学的に(Wilcoxon rank sum test)比較解析した。

B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur^{dl} (G1L) end stage マウスとコントロールマウスを深麻酔し、4%パラホルムアルデヒドにてかん流固定してパラフィンブロックを作成した。TDP-43(Protein Tec, 1:600)と SOD1 (MBL, 1:10000)に対する抗体を用いて免疫組織学的染色を施行し病理学的に解析し、寿命との関連性を統計学的に検討した(Spearman correlation coefficient with 95% CI)。ALS1 に疾患特異的な異常構造物である Lewy body like hyaline inclusion (LBHI)の形成についても H&E 染色で定量評価し、TDP-43 の染色性との関連性を統計学的に検討した(Spearman correlation coefficient with 95% CI)。

「倫理面への配慮」

ALS 症例の解析では剖検脳を用いたが、ご遺族の篤志により施行が可能である点に十分配慮して研究を遂行した。マウスの飼育と sacrifice の方法については「大阪大学動物実験施設の動物の飼育と使用に対するガイドライン」に基づいて行い、また病理解析に必要な最低限な数のマウスを研究使用した。

C. 研究成績

罹病期間が2年半以内と経過の速い SALS 症例

では、症例ごとに頻度の差を認めるものの、すべての症例において TDP-43 に核が陰性で細胞質が陽性の神経細胞や TDP 陽性の細胞質内封入体を神経細胞、グリア細胞内に多数認めた。一方、5年以上と経過の緩徐な SALS 症例では、それら TDP-43 の分布異常が非常に少なく、統計学的に 2 群の差は有意であった($p=0.0002$)。ALS1 症例では 6 例中 1 例(SOD1 遺伝子変異; C111Y)にのみ、TDP 陽性の細胞質内封入体を多数認め、またそれらは SOD1 と共に局在していた。GIL マウスにおいても TDP 陽性の細胞質内封入体を多数認め、それらは SOD1 と共に局在していた。残存する神経細胞の核における TDP-43 免疫反応性に個体差を認め、弱いものから強いものまで 4 段階にステージ分類したところ、神経細胞核の TDP-43 の発現が強いほど統計学的有意に寿命が長く、核の TDP 免疫反応性は寿命に正の相関を示した($r=0.77$; 95% CI, 0.22-0.95)。一方で核の TDP 免疫反応性は SOD1 凝集である LBHI 数と負の相関を示した($r=-0.87$; 95% CI, -0.97 to -0.47)。核の TDP-43 の発現が強い GIL マウスで多数認められる TDP-43 強陽性の神経細胞核は大きく円形であり、少数混在する TDP-43 弱陽性の核は小さく変形していた。

D. 考察

経過の早い SALS 症例で多数見られた TDP-43 の分布異常は、細胞核の TDP-43 発現が低下し、細胞質内に TDP-43 陽性の異常構造物が見られる像であると説明されるが、経過の緩やかな SALS 症例でこの像が有意に少なかった。また ALS1 モデルマウスにおいて神経細胞核の TDP-43 発現が高いほど経過が緩徐であるという解析結果から、神経細胞核における TDP-43 の発現が保たれていると神経細胞死に対して抵抗性が生じる可能性が考えられた。これまで ALS1 症例では TDP-43 陽性の封入体は認められないと報告されてきたが、保有する変異 SOD1 遺伝子(C111Y)によっては ALS 症例における SOD1 凝集物に TDP-43 が共存することが示された。これは GIL マウスでも同様であったので、SALS のみならず ALS1 でも TDP-43 の分布異常が生じることが示された。これは変

異 SOD1 遺伝子の凝集毒性を含めた複数の細胞ストレスから細胞内に TDP-43 の分布異常が生じることが示唆される。

培養細胞において TDP-43 の発現を消失させると、核が変形し細胞サイクル異常が生じてアポトーシスを来すとの報告 (Ayala et al. Proc natl Acad Sci USA 2008)があり、TDP-43 は神経細胞の核において非常に重要な機能を果たしていると考えられる。神経細胞がどのようにして核に TDP-43 発現を保持するのかについてのメカニズムは現時点では不明であるが、そのメカニズムを明らかにすることは新しい治療開発へとつながる。

E. 結論

神経細胞核における TDP-43 の発現量は ALS の臨床経過に関与する。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nuclear TAR DNA binding protein 43 expression in spinal cord neurons correlates with the clinical course in amyotrophic lateral sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 68;37-47 (2009) Hisae Sumi, Shinsuke Kato, Yuko Mochimaru, Harutoshi Fujimura, Masaki Etoh, Saburo Sakoda

2. 学会発表

08 年度神経学会総会にて

「ALS1 にも TDP-43 pathology は存在する」
隅寿恵、加藤信介、藤村晴俊、衛藤昌樹、佐古田三郎

「変異 SOD1 の神経毒性メカニズムについて」

岸上 仁、長野清一、佐古田三郎

H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

『家族性 ALS の凝集体形成機構の解明と治療法への応用』

研究協力者：谷口直之 大阪大学微生物病研究所疾患糖鎖学¹・教授
共同研究者：松本紋子¹、藤原範子² 兵庫医科大学学生化学²

研究要旨：異常タンパク質のミスフォールディングや凝集体形成は、ポリグルタミン病やアルツハイマー病、パーキンソン病に限らず、筋萎縮性側索硬化症(ALS)においてもみられ、それぞれの疾患特有の発症メカニズムと共に、多彩な神経疾患に類似した発症メカニズムも存在すると考えられている。Huntingtin、Tau、Amiloyd b、a-SynucleinなどはTransglutaminase (TG)の基質となり、架橋反応により重合体を形成する。また、TGの阻害剤であるCystamineの投与により、ハンチントン病モデルマウスにおいて延命効果が多数報告されている。私達は家族性ALS(FALS)変異型Cu、Zn-superoxide dismutase (SOD1)やアポ型SOD1がTGの基質になることを確認した。SOD1の凝集体形成機構をTGに着目して検討し、さらに治療法へ発展できることを期待している。

A. 研究目的

Transglutaminase (TG: protein-glutamine g-glutamyltransferase, EC 2.3.2.13)はタンパク質中のグルタミン残基の g-カルボキシアミド基と各種の一級アミン(L-リジンの e-アミノ基等)との間のアシル基転移反応をカルシウム存在下で触媒する酵素である。現在までに9種類のアイソフォーム(α XIIIa, TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6, TG7, Band4.2)が報告されている。タンパク質中のリジン残基がアシル受容体として反応した場合には、タンパク質分子間または分子内に e-(g-Glu)-Lys 架橋が形成され、これによりタンパク質の重合等が起こる。Huntingtin、Tau、Amiloyd bA4、a-SynucleinなどはTGの基質となり得ることが *in vitro* や培養細胞を用いた実験で確認されている。Tissue TG (TG2) 活性の上昇に伴い、基質となる原因タンパク質の多量体化や、他のタンパク質を含む凝集体の形成が見られることより、ハンチントン病やアルツハイマー病、パーキンソン病などにTGが関与していると考えられている。凝集体には分子シャペロンやユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質も検出されており、コンフォメーションの変化に対して分子シャペロンが作用するが、最終的にはプロテアソームによる分解処理が完了せずに凝集体が蓄積するのではないかと考えられている。封入体は細胞内のミスフォールドしたタンパク質を無毒

化する為に細胞が防御反応として形成しているとの報告もあり、可溶性の中間体である数量体などの方が強い毒性を持つことも報告されている。さらに、TGの阻害剤であるCystamineの投与により、ハンチントン病モデルマウスにおいて延命効果が多数報告されている。

異常タンパク質のミスフォールディングや凝集体形成はALSにおいてもみられるが、TGが関与しているのかどうか報告はない。おそらくTGの基質スクリーニングに野生型SOD1も取り上げられたであろうが、基質とならなかったであろう。FALSの病態には変異型SOD1が関与しているため、TGの基質特異性を検討した。その結果、私達はFALSでみられる変異型SOD1や金属の結合していないアポ型SOD1がTG2の基質になることを確認した。様々な論文に見られる、anti-SOD1抗体を用いたSDS/還元剤によっても単量体にならない、SOD1の共有結合による可溶性の数-多量体の形成にTGが関与しているのではないかと、また非還元条件下でのSDS-PAGE/ウエスタンブロッティングにて検出される、SOD1のシステイン残基を介する数-多量体の形成にTGのProtein disulfide isomerase (PDI)活性が関与しているのではないかと推測し、FALSにおけるSOD1の凝集体形成機構を生化学的に解明しようと試みた。

B. 研究方法

リコンビナント human SOD1 は、バキュロウイルスを用いて Sf9 細胞に過剰発現させ生成した。また 6 番目と 11 番目のシステイン残基に変異を加えた SOD1 (C6A/C111S: -AS と表示、WT-AS、G94A-AS、H46R-AS、H48Q-AS) は大腸菌にて作成した。Transglutaminase from guinea pig liver はオリエンタル酵母株式会社から購入した。1 μ M SOD1、0.1 mM DTT、10 nM TG2、5 mM CaCl₂ を 37 度で 2 時間反応させ、還元条件下で SDS-PAGE した後、ウエスタンブロッティングにて TG2 による SOD1 の架橋反応の有無を確認した。ウエスタンブロッティングには Santa Cruz Biotechnology Inc の sc-11407 または sc-17767 抗体を用いた。培養細胞は human SOD1 (WT, G37R, G41D, G85R) を発現させた N2a (mouse neuroblastoma) を用いた。Human TG2 は Nucleofector Kit V (Amaxa Biosystems, Germany) を用いて Amaxa III の T-024 (N2a 用) プログラムにて電圧ポレーションによりトランスフェクトした。細胞は 72 時間後に回収し、0.5 % NP-40 を含む PBS により可溶性画分を遠心分離にて採取した。Human TG2 の cDNA (pcDNA3.1-tTG) は Dr. G. V. W. Johnson (University of Alabama Birmingham, USA) から供与していただいた。

C. 研究結果

Human SOD1 の立体構造は図 1 に示した通り、タンパク質表面には多数のリジン残基やグルタミン残基が露出しており、TG の基質になる

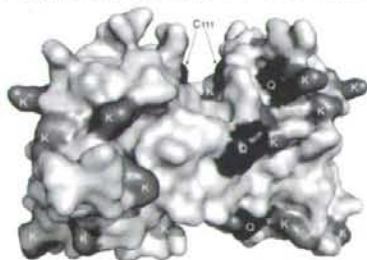


図 1. Human SOD1 (二量体) の立体構造 (Protein Data Bank #1SPD)。SOD1 表面に露出しているグルタミンは Q、リジンは K、システインは C で示す。

可能性があり、その結果、SOD1 間や他のタンパク質との間に共有結合による架橋が形成されることが予想される。アポ型 SOD1 やミスフォールディング、アンフォールディングにより立体構造に変化が生じると、FALS の変異 SOD1 だけでなく野生型 SOD1 も TG の基質になるであろうと予想された。そこでリコンビナント human SOD1 を精製し、市販の TG2 と Ca²⁺ 存在下でインキュベートし、SOD1 が TG2 の基質になり得るかどうかが検討した (図 2)。その結果、

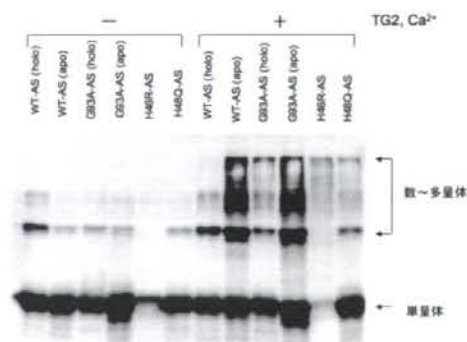


図 2. FALS 変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 は TG2 の基質となり数-多量体を形成する。

FALS 変異 SOD1 は TG2 の酵素反応によって、数-多量体を形成することが確認された。また野生型 SOD1 もアポ型であれば基質になることが確認された。これらの数-多量体は SDS-PAGE の際にサンプルバッファーとして 2 % SDS や還元剤 (5 % b-mercaptoethanol) を含み、100 度で 5 分インキュベートしても残存することより、共有結合であることが示唆される。また TG2 による Ca²⁺ 非依存性の共有結合による数-多量体の形成には SOD1 の C6A/C111S 変異による影響は見られなかった。

次に human SOD と TG2 を共発現させた細胞で検討した。0.5 % NP-40 含有の PBS を用いて可溶性画分を遠心分離にて分取し、ウエスタンブロッティングにて SOD1 を検出した (図 3)。N2a 細胞に G37R を過剰発現させただけでは可溶性画分に数-多量体は検出されなかったが、

さらに TG2 を過剰発現させると数~多量体が検出された。

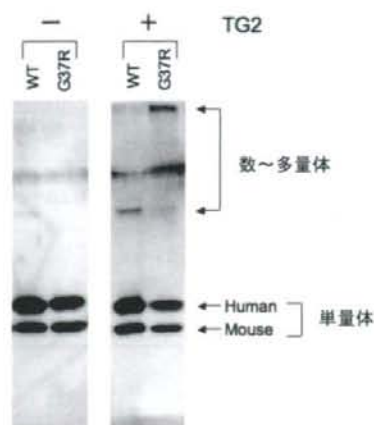


図3. N2a 細胞において TG2 は FALS 変異型 SOD1 の数~多量体形成を促進する。

D. 考察

TG2 には Ca^{2+} 非依存性の PDI 活性があるとの報告がなされたが、TG2 のシステイン残基をアルキル化しても PDI 活性が残存するため、酵素反応の詳細な機構は不明である。最近、TG2 のノックアウトマウスとの比較によって、ミトコンドリア電子伝達系の複合体の形成に Ca^{2+} 非依存性の PDI 活性が関与しているのではないかとの報告もある。私たちの実験においても、精製 TG2 と SOD1 を Ca^{2+} 非存在下で反応させ、非還元条件下で SDS-PAGE/ウエスタンブロッティングで確認すると、S-S 結合由来の数~多量体が FALS 変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 において検出された。この数~多量体は還元条件下では確認されなかったことより、 Ca^{2+} 非依存的な TG2 の PDI 活性の関与が示唆される。多くの ALS 関連の論文で、S-S 結合を介する SOD1 の数~多量体の存在が報告されている。TG2 の PDI 活性は生理的な Ca^{2+} 濃度における反応なため、重要であろう。N2a 細胞を用いて、細胞質やミトコンドリア、マイクロソームなどに分画し、数~多量体の形成を検討中である。また TG は様々なアポトーシス関連タンパク質にも作用し、アポトーシスを制御することも多数報

告されているので、細胞死への関与も検討中である。

TG の阻害剤である Cystamine の投与がハンチントン病モデルマウスにおいて有効であり、臨床応用にむけての研究が進められている。そのため、ALS モデルにおける Cystamine の効果を N2a 細胞にて検討し、治療法へと応用できることを期待している。

E. 結論

FALS 変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 は TG2 の基質となり、 Ca^{2+} 依存的に共有結合による SOD1 の数~多量体の形成が認められた。また Ca^{2+} 非依存的に S-S 結合による SOD1 の数~多量体も確認され、TG2 の PDI 活性によると考えられた。ALS における凝集体形成機構は不明であったが、FALS 変異型 SOD1 やアポ型 SOD1 が特異的に TG の基質となり、数~多量体を形成することが確認できた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Wang X, et al. J Biochem. In press.
- (2) Kitazume S, et al. Glycobiology. In press.
- (3) Nakano M, et al. Glycobiology. In press.
- (4) Okada T, et al. Glycobiology. In press.
- (5) Inohara H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 376: 605-10.
- (6) Akama R, et al. Proteomics. 2008; 8: 3221-8.
- (7) Suzuki T, et al. Anal Biochem. 2008; 381: 224-32.
- (8) Kim YS, et al. Proteomics. 2008; 8: 3229-35.
- (9) Kotani N, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 7405-9.
- (10) Nakagawa T, et al. J Proteome Res. 2008; 7: 2222-33.
- (11) Park YS, Taniguchi N. Ann N Y Acad Sci. 2008; 1126: 185-9.
- (12) Nakano M, et al. Int J Cancer. 2008; 122: 2301-9.
- (13) Kizaki T, et al. Immunology. 2008; 124: 348-56.