

Fig. 1. The level of PS1/ γ -secretase complex increases upon an inhibition of PI3K/Akt pathway (A) Mouse cortical neurons in primary culture were treated with either vehicle (DMSO) or LY294002 for 48 h. The cells were collected and cell lysates were subjected to immunoblotting by anti-PS1 (N-terminal, C-terminal), Nicastrin, Aph-1, or β -actin antibodies (left). The band intensity of each γ -secretase component is normalized by that of β -actin and analyzed by Student's *t*-test. The level of each component was significantly higher in the cells treated with LY294002 compared to that in the cells treated with vehicle (right, $n = 3$, $p < 0.05$). (B) Mouse cortical neurons in primary culture were treated with either vehicle (DMSO) or AKT inhibitor IV for 24 h. Cells were collected and immunoblotted with antibodies against anti-PS1 (N-terminal, C-terminal), Nicastrin, Aph-1, or β -actin. (C) Mouse cortical neurons in primary culture were treated with vehicle, Wortmannin or LY294002 for 24 h. Cells were collected and the total RNA was extracted from the cell lysates. mRNA levels were semi-quantified by RT-PCR. The mRNA levels of γ -secretase components was normalized to that of GAPDH and analyzed by One-way Factorial ANOVA ($n = 3$). (D) Mouse cortical neurons in primary culture were treated with CHX alone or CHX together with LY294002. Cells were collected 0, 12, 24, 48, 72 h after the treatment. Cell lysates were subjected to immunoblotting by anti-PS1 antibody. The expression level of PS1 decreased along with the time after CHX treatment. Co-treatment of cells with CHX and LY294002 inhibited the decrease of PS1. β -tubulin levels were consecutively decreased after CHX treatment regardless of the presence of LY294002. (E) Primary culture neurons were treated with vehicle, LY294002 or lactacystin for 24 h. Proteasomal activity defined by release of 7-amino-4-methylcoumarin from the fluorogenic peptide Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin was measured by fluorescence intensity. Only lactacystin treatment showed significant decrease in proteasome activity ($n = 3$, One-way Factorial ANOVA).

pellets, followed by the RT-PCR analyses of PS1, nicastrin and β -actin mRNA levels (Fig. 1C). We observed no significant difference between the vehicle and a PI3K inhibitor (Wortmannin or LY294002) treatment groups with respect to the mRNA levels of PS1 and nicastrin ($n = 3$). These results indicate that the transcriptions of PS1 and nicastrin were not affected by PI3K inhibition.

We then examined whether PI3K inhibition cause an altered degradation activity of PS1 in neurons, using a protein synthesis inhibitor, cycloheximide (CHX). Mouse primary cultured neurons were incubated with CHX in the presence or absence of LY294002 for 0, 12, 24, 48, 72 h. The protein levels of PS1 and β -tubulin gradually decreased by the treatment with CHX alone, reflecting the protein degradation in the absence of new protein synthesis (Fig. 1D, top, left). On the contrary, simultaneous treatment of cells with CHX and LY294002 maintained the amount of PS1 up to 72 h after the treatment (Fig. 1D, top, right). These results indicate that PI3K inhibition precludes the degradation of PS1 to stabilize its protein expression. Conversely, the decrease in cellular β -tubulin levels was comparable between the cells treated with CHX alone and the cells simultaneously treated with CHX and LY294002 (Fig. 1D, bottom), indicating LY294002 specifically stabilize the level of PS1.

In order to rule out a possibility that PI3K inhibition caused general inhibition of proteasome activity, thereby non-specifically inhibiting the degradation of γ -secretase components as well as many other proteins, we measured the proteasome activity within mouse primary cultured neurons under PI3K inhibition. Mouse primary cultured neurons were treated with vehicle, LY294002, or lactacystin, a specific proteasome inhibitor, for 24 h followed by the measurement of proteasome activity (Fig. 1E). There was no significant difference in proteasome activity between in the cells treated with the vehicle and LY294002, whereas significant decrease in proteasome activity was observed in the cells treated with lactacystin. Thus, LY294002 stabilizes PS1/ γ -secretase components by specifically inhibiting their degradation.

Since the level of PS1 is regulated by the ubiquitin-proteasome system [13,18], we postulated that PI3K inhibition could have altered the ubiquitination status of PS1, thereby stabilizing its protein level. To test this, HEK293 cells were transfected with wild-type PS1 and treated with either PI3K inhibitors (Wortmannin or LY294002) or proteasome inhibitor (lactacystin). After the treatment, cell lysates were fractionated into NP40 soluble or insoluble fractions. Each fraction was immunoprecipitated with anti-PS1 antibody, followed by Western blotting with anti-ubiquitin

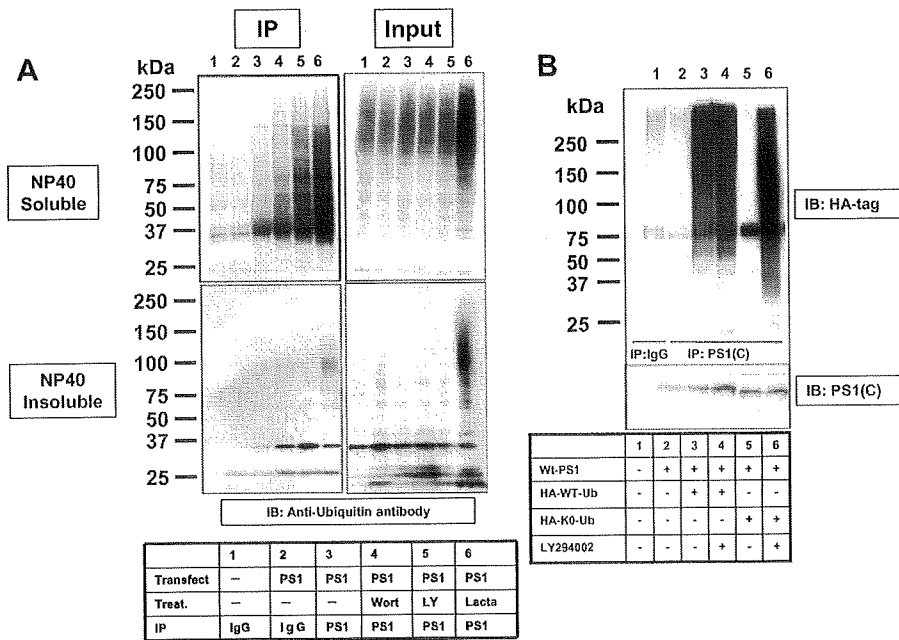


Fig. 2. PI3K inhibition increases multiple mono-ubiquitination of PS1. (A) HEK293 cells were transfected with wild-type PS1 and treated with either PI3K inhibitors (Wortmannin or LY294002) or a proteasome inhibitor (lactacystin). After the treatment, cell lysates were fractionated into NP40 soluble or insoluble fractions. Each fraction was immunoprecipitated with anti-PS1 C-terminal antibody, followed by Western blotting with anti-ubiquitin antibody. Treatment with Wortmannin, LY294002, and lactacystin increased ubiquitinated protein in the immunoprecipitates from NP40 soluble fraction (Upper left panel). Only lactacystin treatment increased total ubiquitinated protein in the NP40 soluble lysate (Upper right panel). In the NP40 insoluble fraction, only lactacystin treatment increased ubiquitinated proteins both in the immunoprecipitate (bottom left panel) and lysate (bottom right panel). (B) HEK293 cells were transiently co-transfected with wild-type human presenilin 1 and with HA-tagged wild-type ubiquitin (HA-WT-Ub) or HA-tagged ubiquitin whose all lysine residues were replaced with arginine (HA-K0-Ub). Cells were treated either with vehicle or LY294002 for 24 h. Cells were harvested and solubilized with 1% SDS to disrupt protein–protein interaction. After dilution of SDS concentration, lysates were immunoprecipitated with anti-PS1 C-terminal antibody. Immunoprecipitates were analyzed by Western blotting using HA-tag antibody. Expression of HA-WT-Ub alone accelerated the ubiquitination of PS1 (3rd lane), which was further enhanced by the treatment with LY294002 (4th lane). The expression of HA-K0-Ub alone did not enhance the ubiquitination of PS1 (5th lane), whereas treatment with LY294002 drastically enhanced the ubiquitination (6th lane).

antibody (Fig. 2A). Interestingly, the ubiquitination of PS1 in the NP40 soluble fraction was enhanced in the cells treated with either of PI3K inhibitors (Wortmannin or LY294002) (Fig. 2A, top left panel, lanes 4 and 5), compared to that in the cells treated with vehicle (Fig. 2A, top left panel, lane 3). Neither Wortmannin nor LY294002 increased total ubiquitinated proteins in the NP40 soluble fraction, and in the insoluble fraction (Fig. 2A, top and bottom right panels, lanes 4 and 5), indicating that proteasome activity itself was not altered by the treatment with these PI3K inhibitors (see also Fig. 1E). On the contrary, lactacystin treatment expectedly increased the level of total ubiquitinated proteins in both soluble and insoluble fractions (Fig. 2A, top and bottom right panels, lane 6), indicating an effective inhibition of proteasome activity by the treatment. Moreover, treatment with PI3K inhibitors did not increase the level of ubiquitinated PS1 in the insoluble fraction (Fig. 2A, bottom left panel, lanes 4 and 5), whereas lactacystin treatment did (Fig. 2A, top left panel, lane 6).

These results suggest that the ubiquitination of PS1 under PI3K inhibition might have different property from that observed under proteasome inhibition. Ubiquitin is first linked to a target protein via covalent bond between its C-terminus glycine residue (G76) and a lysine (K) residue in the target protein. Ubiquitin chain is subsequently achieved by the sequential conjugation of an internal K residue of ubiquitin (i.e. K6, 11, 27, 29, 33, 48, or 63) to the G76 residue of a new ubiquitin. Polyubiquitin chains linked via K48 are typically associated with protein degradation by the proteasome [18,12,24]. On the other hand, multiple mono-ubiquitination, achieved by the addition of multiple monomeric ubiquitin molecules to K residues of target proteins has been attributed to various other cellular functions [1,19].

In order to assess the mode of PS1 ubiquitination in the presence of PI3K inhibitor, HEK293 cells were transiently co-transfected with wild-type PS1 together with either HA-tagged wild-type ubiquitin (HA-WT-Ub) or HA-tagged ubiquitin whose all lysine residues were replaced with arginine (HA-K0-Ub). HA-K0-Ub cannot form covalent bond except for the terminal carboxyl residue, thus considered to represent multiple mono-ubiquitination. Cells were treated with either vehicle or LY294002, followed by the IP-Western blotting to detect ubiquitinated PS1. In order to avoid a possibility that immunoprecipitation with anti-PS1 antibody pulls down PS1-interacting protein together with PS1, which contaminates the ‘true’ ubiquitination signal of PS1, cells were first lysed with high concentration of SDS to disrupt the protein–protein interaction except for covalent bonds. The lysates were subsequently diluted to be applicable for IP. Expression of HA-WT-Ub alone enhanced the ubiquitination of PS1 in our experimental system, which was further accelerated in the presence of PI3K inhibitor, LY294002 (Fig. 2B). In contrast to the HA-WT-Ub expression, the expression of HA-K0-Ub caused minimal ubiquitination of PS1 in the absence of PI3K inhibition. Surprisingly, treatment with LY294002 markedly increased the ubiquitination of PS1 by the HA-K0-Ub. Although we could not rule out a possibility that the linkage between the K residue of the endogenous ubiquitin and the terminal carboxyl residue of HA-K0-Ub formed polyubiquitin chains under PI3K inhibition, these results suggest that PI3K inhibition could induce multiple mono-ubiquitination of PS1.

Recent studies have shown that ubiquitination acts as a signal for intracellular trafficking in addition to the proteasomal function [1,19]. In order to prove that the PI3K inhibition and the proteasome inhibition drive differential modes of ubiquitination, we

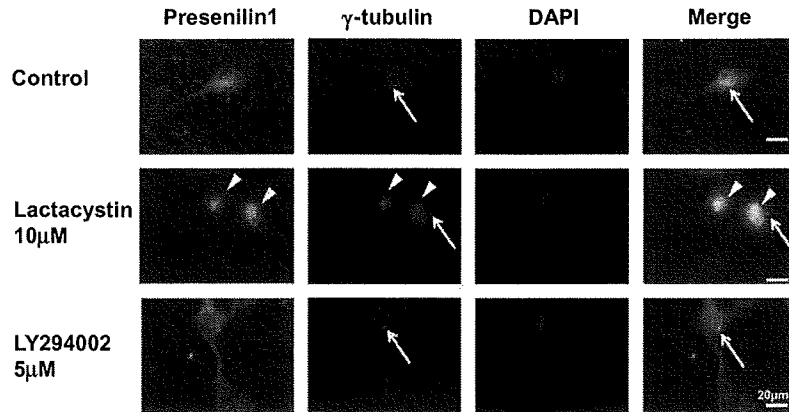


Fig. 3. PI3K inhibition does not cause accumulation of PS1 in the aggresome. Primary neurons were treated with vehicle (DMSO), lactacystin or LY294002. After treatment, cells were immunostained with antibodies against PS1 (green) and γ -tubulin (red). Nucleus was stained with DAPI (blue). In control cells (top panels), PS1 is distributed around the nucleus with minimal co-localization with γ -tubulin, which represents immunoreactivity of a centrosome (arrows). After lactacystin treatment (middle panels), prominent perinuclear co-localization of PS1 and γ -tubulin (arrowheads) around the centrosome (arrows) was observed, indicating the accumulation of PS1 in the aggresome. LY294002 (bottom panels) treatment did not enhance the co-localization of PS1 with γ -tubulin (arrows).

investigated the intracellular localization of PS1 after PI3K, as well as proteasome inhibition. Mouse primary cultured neurons were triply stained with the anti-PS1 antibody, the anti- γ -tubulin antibody and DAPI after vehicle, LY294002 or lactacystin treatment. γ -Tubulin was used as a marker of a centrosome or an aggresome, as previously reported [13]. In control cells, PS1 immunoreactivity was observed mainly in perinuclear area, probably reflecting ER distribution (Fig. 3, top). γ -Tubulin was visualized as a perinuclear spot, representing the distribution of a centrosome (Fig. 3, top, arrows). In cells treated with lactacystin, PS1 was largely colocalized with γ -tubulin in the perinuclear area (Fig. 3, middle panels, arrowheads), indicating the redistribution of PS1 to an aggresome, which was formed around the centrosome (Fig. 3, middle panels, arrows). Interestingly, in cells treated with LY294002, the perinuclear co-localization of PS1 with γ -tubulin was negligible, whereas PS1 was likely to be widely redistributed into the intracellular membranes (Fig. 3C, bottom panels). γ -Tubulin immunoreactivity was similar to that in control cells (Fig. 3C, bottom panels, arrows), reflecting the intracellular distribution of a centrosome. These results suggest that an accelerated ubiquitination of PS1 under PI3K inhibition could alter the intracellular localization of PS1 in a different fashion from that under proteasomal inhibition.

Since PS1/ γ -secretase is deeply involved in A β production, deeper knowledge into its metabolism under physiological as well as pathological settings is important for investigating the pathogenesis of AD. In the present study, we have demonstrated that PI3K inhibition leads to an accumulation of ubiquitinated PS1. This accelerated ubiquitination after PI3K inhibition was suggested to be different from the proteasome-targeting poly-ubiquitination of PS1, because of following experimental results: (1) Protein levels of PS1/ γ -secretase were increased rather than decreased after PI3K inhibition. (2) The mode of ubiquitination was considered to be the multiple mono-ubiquitination rather than the poly-ubiquitination according to the HA-KO-Ub experiment. (3) An accelerated ubiquitination of PS1 after PI3K inhibition led to different intracellular distribution of PS1 from that observed after proteasomal inhibition. Thus, it can be postulated that the multiple-mono-ubiquitination of PS1 after PI3K inhibition could have altered the subcellular distribution of PS1, thereby segregating it from proteasome-mediated degradation, although the precise localization of PS1 after PI3K inhibition was not clarified in this study. It has previously been demonstrated that PS1 is degraded by the proteasome upon binding of msel-10 and following poly-ubiquitination [16]. It is un-

clear whether msel-10 is involved in the multiple-mono-ubiquitination of PS1 under PI3K inhibition. In addition, whether GSK-3 β -mediated direct phosphorylation of PS1 [14,22,23] is involved in this mode of ubiquitination needs to be clarified. The physiological significance of the ubiquitination of PS1 under PI3K inhibition can be an interesting target of future study.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Imai for kindly providing plasmids encoding ubiquitin, Ms. Asada-Utsugi and Dr. Shimozono for technical assistance. The work was financially supported by Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (20300124) and the Research Grant from Takeda Science Foundation.

References

- [1] F. Acconcia, S. Sigismund, S. Polo, Ubiquitin in trafficking: the network at work, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 1610–1618.
- [2] L. Bakí, J. Shioi, P. Wen, Z. Shao, A. Schwarzman, M. Gama-Sosa, R. Neve, N. Robakis, PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations, *EMBO J.* 23 (2004) 2586–2596.
- [3] A. Bergman, E. Hansson, S. Pursglove, M. Farmery, L. Lannfelt, U. Lendahl, J. Lundkvist, J. Näslund, Pen-2 is sequestered in the endoplasmic reticulum and subjected to ubiquitylation and proteasome-mediated degradation in the absence of presenilin, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 16744–16753.
- [4] R. Bhat, S. Budd Haeberlein, J. Avila, Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies, *J. Neurochem.* 89 (2004) 1313–1317.
- [5] D. Edbauer, E. Winkler, J. Regula, B. Pesold, H. Steiner, C. Haass, Reconstitution of gamma-secretase activity, *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 486–488.
- [6] W. Esler, W. Kimberly, B. Ostaszewski, T. Diehl, C. Moore, J. Tsai, T. Rahmati, W. Xia, D. Selkoe, M. Wolfe, Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 428–434.
- [7] R. Francis, G. McGrath, J. Zhang, D. Ruddy, M. Sym, J. Apfeld, M. Nicoll, M. Maxwell, B. Hai, M. Ellis, A. Parks, W. Xu, J. Li, M. Gurney, R. Myers, C. Himes, R. Hiesch, C. Ruble, J. Nye, D. Curtis, Aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation, *Dev. Cell* 3 (2002) 85–97.
- [8] M. Glickman, A. Ciechanover, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 373–428.
- [9] C. Goutte, Genetics leads the way to the accomplices of presenilins, *Dev. Cell* 3 (2002) 6–7.
- [10] G. He, H. Qing, F. Cai, C. Kwok, H. Xu, G. Yu, A. Bernstein, W. Song, Ubiquitin-proteasome pathway mediates degradation of APH-1, *J. Neurochem.* 99 (2006) 1403–1412.
- [11] G. He, H. Qing, Y. Tong, F. Cai, S. Ishiura, W. Song, Degradation of nicastrin involves both proteasome and lysosome, *J. Neurochem.* 101 (2007) 982–992.
- [12] T. Jensen, M. Loo, S. Pind, D. Williams, A. Goldberg, J. Riordan, Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing, *Cell* 83 (1995) 129–135.

- [13] J. Johnston, C. Ward, R. Kopito, Aggregates: a cellular response to misfolded proteins, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 1883–1898.
- [14] F. Kirschenbaum, S. Hsu, B. Cordell, J. McCarthy, Glycogen synthase kinase-3beta regulates presenilin 1 C-terminal fragment levels, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 30701–30707.
- [15] R. Kohno, H. Sawada, Y. Kawamoto, K. Uemura, H. Shibasaki, S. Shimohama, BDNF is induced by wild-type alpha-synuclein but not by the two mutants, A30P or A53T, in glioma cell line, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318 (2004) 113–118.
- [16] J. Li, A. Pauley, R. Myers, R. Shuang, J. Brashler, R. Yan, A. Buhl, C. Ruble, M. Gurney, SEL-10 interacts with presenilin 1, facilitates its ubiquitination, and alters A-beta peptide production, *J. Neurochem.* 82 (2002) 1540–1548.
- [17] Y. Li, M. Xu, M. Lai, Q. Huang, J. Castro, J. DiMuzio-Mower, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J. Neduvellil, R. Register, M. Sardana, M. Shearman, A. Smith, X. Shi, K. Yin, J. Shafer, S. Gardell, Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1, *Nature* 405 (2000) 689–694.
- [18] P. Marambaud, K. Ancolio, E. Lopez-Perez, F. Checler, Proteasome inhibitors prevent the degradation of familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 and potentiate A beta 42 recovery from human cells, *Mol. Med.* 4 (1998) 147–157.
- [19] C. Pickart, Ubiquitin enters the new millennium, *Mol. Cell* 8 (2001) 499–504.
- [20] H. Steiner, E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka, C. Haass, PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39062–39065.
- [21] N. Takasugi, T. Tomita, I. Hayashi, M. Tsuruoka, M. Niimura, Y. Takahashi, G. Thinakaran, T. Iwatsubo, The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex, *Nature* 422 (2003) 438–441.
- [22] C. Twomey, J. McCarthy, Presenilin-1 is an unprimed glycogen synthase kinase-3beta substrate, *FEBS Lett.* 580 (2006) 4015–4020.
- [23] K. Uemura, A. Kuzuya, Y. Shimozone, N. Aoyagi, K. Ando, S. Shimohama, A. Kinoshita, GSK3beta activity modifies the localization and function of presenilin 1, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 15823–15832.
- [24] C. Ward, S. Omura, R. Kopito, Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway, *Cell* 83 (1995) 121–127.
- [25] C. Weihl, G. Ghadge, S. Kennedy, N. Hay, R. Miller, R. Roos, Mutant presenilin-1 induces apoptosis and downregulates Akt/PKB, *J. Neurosci.* 19 (1999) 5360–5369.
- [26] M. Wolfe, W. Xia, B. Ostaszewski, T. Diehl, W. Kimberly, D. Selkoe, Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity, *Nature* 398 (1999) 513–517.

ファルマシア

別刷

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略

村上 学

Gaku MURAKAMI

京都大学大学院医学研究科
臨床神経学大学院生

井上治久

Haruhisa INOUE

京都大学物質-細胞統合システム拠点
iPS 細胞研究センター准教授

高橋良輔

Ryosuke TAKAHASHI

京都大学大学院医学研究科
臨床神経学教授

1 はじめに

神経変性疾患は、特定の神経系が選択的に変性・細胞死を生じる疾患の総称である。神経変性疾患の神経病理学的な特徴は、神経細胞及び非神経細胞の内外に認められる脳内のタンパク質凝集物(封入体)である。そのうち筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位及び下位運動ニューロンが選択的に変性していく疾患である。40~70歳代で発症し、平均発症年齢は約65歳である。通常発症後四肢及び球麻痺が進行性の経過をたどり、3~5年で呼吸不全などで死亡することが多い。ALSの約90%は孤発性、約10%は家族性である。¹⁾ 高次脳機能など、その他の神経系には目立った症状を認めず、運動神経が選択的に侵され、患者の苦痛が大きいこと、症状の重篤さにも関わらず有効な治療がないことより、治療方法の開発が精力的に行われてきた。

1993年に、家族性ALSの一部はCu/Zn superoxide dismutase(SOD1)の変異による¹⁾ことが発見された。その後の研究で、家族性ALSの約20%がSOD1変異によるとされたが、最近の学会報告では日本では家族性ALSの50%前後がSOD1変異による。また、孤発性ALSの数%がSOD1変異によることも明らかになった。²⁾ 変異SOD1は活性を残留しているものもあり、その活性低下と臨床経過とは相関せず、変異SOD1タンパク質の毒性による運動神経変性と考えられる。

さらに最近になって、ALS患者剖検脳脊髄運動神経細胞のタンパク質凝集物の主要構成成分がtransactivation responsive element(TAR) DNA-binding protein of 43 kDa(TDP-43)であることが判明した。^{3,4)} 驚くべきことに、その後の遺伝学的解析によって、家族性及びごく一部の一見孤発性にみえるALSが、TDP-43遺伝子の変異によって発症す

ることも次々と報告された。⁵⁾

本稿では、SOD1及びTDP-43の関与するALSの治療戦略について概説する。

2 ALSの病態仮説

SOD1関連ALS

ALSの病態モデルとして、変異SOD1トランスジェニックマウスによる研究が精力的に行われ、様々な病態仮説が提唱されている。酸化ストレス、グルタミン酸による興奮毒性、炎症性機序、ミトコンドリア異常、軸索輸送障害、小胞体ストレス、ユビキチン・プロテアソームシステムやオートファジーなどのタンパク質品質管理機構の破綻、凝集タンパク質による細胞毒性などである。

また変異SOD1トランスジェニックマウスモデルの解析により、変異SOD1が神経細胞に対して毒性を発揮するだけでなく(自律性神経細胞毒性)、アストロサイトやミクログリアといった非ニューロン細胞内の変異SOD1タンパク質発現が、ニューロンの変性を促進するという、非自律性神経細胞毒性機序も報告されている。^{6,7)}

しかし変異SOD1患者及びモデルマウスでは、一部報告⁸⁾を除いて細胞内TDP-43タンパク質凝集がみられず、核移行性の変化も原則的にはみられない⁹⁾ため、孤発性ALSのモデルとしては問題点が指摘されている。

TDP-43関連ALS

近年発表されたTDP-43の病態仮説については、さらに他の機序が提唱されている。ALS患者剖検組織においてはTDP-43のリン酸化^{3,10)}カスパーゼによる切断¹¹⁾がみられ、TDP-43に対する免疫組織染色では核の染色性が失われ細胞質に移行する。^{3,4)} TDP-43はRNA結合ドメインを持ち、種々のRNA及びタンパク質に結合して、核内において

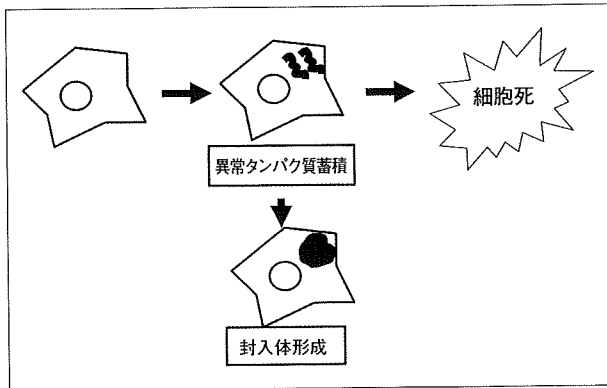


図1 異常タンパク質による細胞毒性

異常タンパク質が蓄積すると、それを分解するだけでなく、封入体に凝集して無毒化する。しかし、細胞の処理能力を超えるタンパク質が蓄積すると、細胞死を引き起こす。

mRNA のスプライシングなどを行っている。¹²⁾ そのため、細胞内の修飾された TDP-43 の核移行が低下することにより核内の TDP-43 の機能低下を来とし、毒性を発揮するという機能喪失モデルも提唱されている。

他の神経変性疾患同様、変異タンパク質が毒性を獲得して神経細胞障害、細胞死を起こす可能性も考えられる (gain of toxic function モデル) (図1)。細胞内では、異常タンパク質を分解したり、無毒な封入体に凝集させることで対応していくと考えられるが、その防御機構を超えて異常タンパク質が蓄積すると細胞毒性を発揮して細胞死を引き起こすものと考えられる。

3 ALS 治療開発の現状

先述のように、ALS では変異 SOD1 トランスジェニックマウスが家族性 ALS の病態モデルとして確立しており、その動物モデルによる治療法開発が行われている。例えば、酸化ストレスに対し抗酸化剤であるビタミン E や、ミトコンドリア機能改善目的にコエンザイム Q₁₀ で運動神経症状の進行を遅延し生存期間を延長し、有効性が認められた。¹³⁾ また、シクロオキシゲナーゼを抑制し抗炎症作用を有するミノサイクリンなども有効性が認められた。¹³⁾

また、アストロサイトのグルタミン酸トランス

ポーター1の発現を上昇させる既存薬剤のハイスループット・スクリーニングを行い、第3世代セフェム系抗生物質であるセフトリアキソンが発見され、¹⁴⁾ ヒトへの臨床試験も行われている。

他に、神経栄養因子による神経保護を目指した治療も検討されている。インスリン様増殖因子 (IGF-1) などが有効性を認めた。¹³⁾

そのほか様々な治療アプローチがなされてきたが、いずれの薬剤も臨床試験で明確な有効性を証明できず、現在 ALS に対し有効性が証明された薬剤はグルタミン酸遊離阻害や興奮性アミノ酸受容体との非競合的阻害、電位依存性 Na⁺ チャンネル阻害等の作用を有するリルゾールのみである。しかしリルゾールによる延命効果は約3か月に留まり、筋力・運動機能の改善は望めず、その効果は限定的である。¹⁵⁾

4 SOD1 タンパク質量制御による家族性 ALS の治療法

変異 SOD1 トランスジェニックマウスでは、トランスジーンのコピー数が多いほど表現型が重篤である。¹⁶⁾ また、変異 SOD1 トランスジェニックラットでは、トランスジーンのコピー数の多いラットのみが ALS を発症し、コピー数の少ないラットでは発症しない。¹⁷⁾ したがって、変異 SOD1 に関連した ALS では、変異 SOD1 の量を減らすことが治療につながる可能性がある。

実際の実験治療として、RNA 干渉や antisense oligonucleotide を用いてタンパク質発現量を低下させることで病態を改善した、という報告がある。RNA 干渉を用いた実験¹⁸⁾ では、変異 SOD1 mRNA に相補的な siRNA を変異 SOD1 マウスにかけ合わせたダブルトランスジェニックマウスで、その生存期間が著明に延長したという報告がある。また、antisense oligonucleotide を脳室内に投与し、変異 SOD1 タンパク質の細胞内産生抑制を行ったマウスでも表現型の改善が見られる。¹⁹⁾

さらに、lox 配列で変異 SOD1 遺伝子を挟み SOD1 本来のプロモーターで変異 SOD1 を発現して、通常の変異 SOD1 マウスと同様に ALS を発症するトランスジェニックマウスを組織特異的 Cre

発現マウスとかけ合わせることによって、運動ニューロンでのみ変異 SOD1 発現を低下させると ALS の発症が遅延し、ミクログリアでのみ変異 SOD1 発現を低下させると疾患の進行を遅らせたという報告がある。⁶⁾ 同様の手法で、アストロサイト内変異 SOD1 発現低下により疾患の進行を遅らせたという報告もある。⁷⁾

他の神経変性疾患モデルでも、原因タンパク質発現量を減少させることで治療につながる可能性が示唆されている。ハンチントン病はハンチンチン (Htt) というタンパク質のポリグルタミン (polyQ) が異常に増えることで、そのタンパク質の凝集、神経細胞変性が認められる疾患であり、polyQ Htt を過剰発現するトランスジェニックマウスはハンチントン病のモデルとして知られている。そのマウスの polyQ 発現量を、Tet-Off システムを用いて後天的に減少させると、発症を抑えられたという報告がある。²⁰⁾ また、アルツハイマー病モデルである変異タウトランスジェニックマウスでも、同様のシステムで発現量を抑えることで、記憶機能の改善及び神経細胞変性の抑制が観察されている。²¹⁾

以上から、我々は SOD1 の転写を抑制して SOD1 タンパク質量を減少する低分子を、低分子化合物・既存薬ライブラリのハイスループット・スクリーニング・システム (図 2) を構築して、家族性 ALS 治療薬スクリーニングを行っている。我々は SOD1 の本来のプロモーターの支配下にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現するコンストラクトを構築した。

化合物がプロモーターに作用し転写を抑制すれば、ルシフェラーゼの発現量が低下しルシフェラーゼの基質から産生される蛍光物質の量が低下する。アストロサイトが非自律性神経細胞死、疾患の進行に関連することから、ヒトアストロサイト由来の細胞株を使用している。また、ルシフェラーゼ反応基質を 96-ウェル・プレート上で自動分注後吸光度を測定する装置を用いて測定している。このような方法でこれまでに 9,600 種類の化合物をスクリーニングし、蛍光物質の産生を減少させる、すなわち SOD1 の転写を抑制する化合物を 177 種類見いだしており、これからさらに ALS モデル細胞や ALS

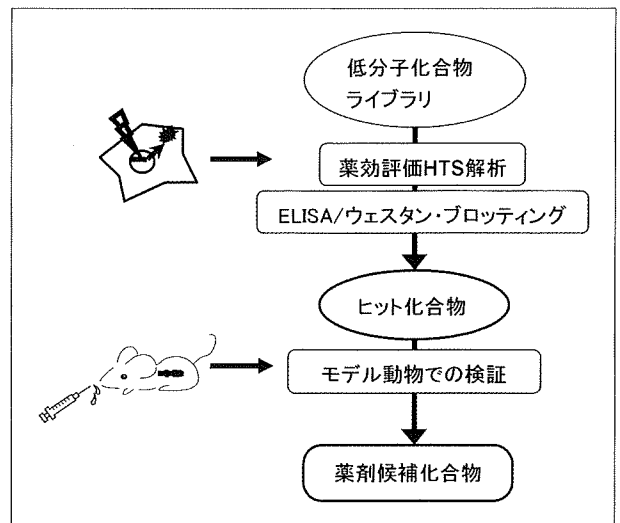


図 2 我々の ALS 治療開発戦略の概要

SOD1 プロモーター下にルシフェラーゼを発現するコンストラクトを導入した、ヒトアストロサイト由来細胞株を用いて、SOD1 転写を抑制する化合物をスクリーニングする。ELISA やウェスタン・ブロッティングで SOD1 タンパク質量を特異的に減少する化合物を抽出する。変異 SOD1 トランスジェニックマウスでその効果を確認する。

モデル動物での効果を確認して、臨床的に有用な化合物を絞り込んでいく予定である。低分子化合物は、大量生産が可能であり、安価で安定した供給を行うことが可能となる。また、既存薬を用いればヒトへの使用における安全性も既に確認されており、速やかな臨床への応用も可能となる。我々の開発した方法は、ALS 治療開発における新たなアプローチの 1 つとなるものと考える。

5 SOD1 タンパク質を減少させることによる問題点

SOD1 は細胞内に発生した superoxide radicals を過酸化水素に分解する酵素であり、抗酸化ストレス酵素の 1 つに挙げられる。したがって、SOD1 を減少させることは、酸化ストレス反応に対する脆弱性を来す可能性がある。

SOD1 ノックアウトマウスの解析によると、脊髄運動神経軸索を切断した後の神経細胞死が SOD1 非ノックアウトマウスに比して多く見られる。²²⁾ ほかに、神経筋接合部の形成不全や軸索変性が、高齢の SOD1 ノックアウトマウスで見られるという報告もある。²³⁾ したがって、SOD1 を大きく低下させることは脊髄運動神経変性を来す可能性

がある。

ただし、SOD1ノックアウトマウスの寿命は非ノックアウトマウスに比べ著変が見られない。²⁴⁾ さらに、SOD1ヘテロノックアウトマウスはノックアウトマウスに比して軸索切断による神経細胞死の程度が軽度である。²⁴⁾ また、他のアンチオキシダントによる代償も期待できるため、SOD1を特異的部分的に減少させることが、重篤な副作用を来さずに、治療効果を得るために重要である。

さらに、コピー数が多い野生型 *SOD1* 遺伝子のトランスジェニックマウスでも軸索変性やミトコンドリアの変性、脊髄運動ニューロンの減少が、高齢になれば出現することが報告されている。²⁴⁾ 変異型 SOD1 と野生型 SOD1 のダブルトランスジェニックマウスは、野生型 SOD1 量に応じて進行が速くなるとの報告²⁴⁾ もあり、野生型 SOD1 細胞内産生も制御する試みは相乗的に有効である可能性がある。

先述のように、他のアプローチで明らかな有効性を認めた治療がほとんどないこともあり、原因となる異常タンパク質を直接減少させるアプローチが有望と考えられることから、SOD1 タンパク質量を減少させる有用性は、部分的特異的に行うことができれば、そのリスクよりも大きく、根本的な治療につながると考えられる。

6 孤発性 ALS に対する治療的アプローチ

先述のように、孤発性 ALS では TDP-43 タンパクの細胞質内封入体を認め、核における染色性が失われている。核移行シグナルを欠損させた *TDP-43* 遺伝子ないし、易凝集性の高い C 末端 *TDP-43* 遺伝子に GFP を付して導入した TDP-43 凝集細胞モデルを用いて、タンパク質凝集を抑制させる薬剤が

報告されている。²⁵⁾

ただし、TDP-43 に関連した ALS の病態生理はまだ未解明の部分が多く、今後 TDP-43 の生理的機能及び変異 TDP-43 の神経細胞に対する影響の詳細な解析がまたれる。

7 おわりに

ALS、特に変異 SOD1 関連 ALS の病態に沿った治療戦略について概説した。精力的な研究がなされてはいるが、未だ病勢を決定的に改善する薬剤は開発されていない。この難病に対する治療法が早く発見され、多くの患者が治療される日が来ることを望む。

文 献

- 1) Rosen D. R. *et al.*, *Nature*, 362, 59-62 (1993).
- 2) Andersen P. M. *et al.*, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 6, 37-46 (2006).
- 3) Arai T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 602-611 (2006).
- 4) Neumann M. *et al.*, *Science*, 314, 130-133 (2006).
- 5) Lagier-Tourenne C. *et al.*, *Cell*, 136, 1001-1004 (2009).
- 6) Boilee S. *et al.*, *Science*, 312, 1389-1392 (2006).
- 7) Yamanaka K. *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 11, 251-253 (2008).
- 8) Shan X. *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 458, 70-74 (2009).
- 9) Mackenzie I. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 61, 427-434 (2007).
- 10) Hasegawa M. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 64, 60-70 (2008).
- 11) Zhang Y. J. *et al.*, *J. Neurosci.*, 27, 10530-10534 (2007).
- 12) Buratti E. *et al.*, *Front. Biosci.*, 13, 867-878 (2008).
- 13) Bruijn L. *et al.*, *Expert. Rev. Neurother.*, 6, 417-428 (2006).
- 14) Rothstein J. D. *et al.*, *Nature*, 433, 73-77 (2005).
- 15) Miller R. G. *et al.*, *Cochrane Database Syst. Rev.*, (1), CD 001447 (2007).
- 16) Dal Canto M. *et al.*, *Brain Res.*, 676, 25-40 (1995).
- 17) Nagai M. *et al.*, *J. Neurosci.*, 21, 9246-9254 (2001).
- 18) Saito Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280, 42826-42830 (2005).
- 19) Smith R. A. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 116, 2290-2296 (2006).
- 20) Yamamoto A. *et al.*, *Cell*, 101, 57-66 (2000).
- 21) SantaCruz K. *et al.*, *Science*, 309, 476-481 (2006).
- 22) Reasume A. *et al.*, *Nat. Genet.*, 13, 43-47 (1996).
- 23) Flood D. G. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 155, 663-672 (1999).
- 24) Jaarsma D. *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, 7, 623-643 (2000).
- 25) Yamashita M. *et al.*, *FEBS Lett.*, 583, 2419-2424 (2009).

