

HJ, Shibata S, Sato I, Sadafumi Suzuki S, Ogawara M, Takamatsu K and Okano H. : Cell surface N-glycans mediated isolation of mouse neural stem cells. J. Neurochem. 110(5):1575-1584, 2009.

8)

Oishi K, Watatani K, Itoh Y, Okano H, Guillemot F, Nakajima K and Gotoh Y. : Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106(31):13064-13069, 2009.

9)

Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H and Nomura T. : Efficient generation of transgenic nonhuman primates using common marmoset embryos. Nature, 459(7246):523-527, 2009. (\*H. Okano is the corresponding author in this paper)

10)

Kiso M, Tanaka S, Saba R, Matsuda S, Shimizu A, Ohyama M, James-Okano H, Shiroishi T, Okano H and Saga Y. : Cyclic alopecia caused by the disruption of Sox21-mediated hair shaft cuticle differentiation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 106(23):9292-9297.

12)

Okano H and Temple S. : Cell types to order: Temporal specification of CNS stem cells. Current Opinion in Neurobiology, 19: 112-119, 2009.

## H.知的所有権の取得状況(予定を含む)

### 1.特許取得

【平成21年度】国内3件 海外4件

【国内】

(1)

発明の名称 神経幹細胞の増殖誘導方法

出願番号 特願 2003-578547

出願人 株式会社G B S研究所

特許番号 特許第 03984959 (2009.7.13)

発明者 戸田 正博、岡野 栄之、河上 裕、戸山 芳昭、三上 裕嗣、坂口 正徳

(2)

発明の名称 脊髄損傷サルモデルの作成法及びその利用

出願番号 特願 2003-546653

特許番号 特許第 4332650 (2009.7.3)

出願人 独立行政法人科学技術振興機構  
学校法人慶應義塾

発明者 岡野 栄之、戸山 芳昭、中村 雅也、野村 達次、谷岡 功邦、安東 潔、金村 米博

(3)

発明の名称 記憶障害治療剤

出願番号 特願 2003-559527

特許番号 特許第 4374469 (2009.9.18)

出願人 独立行政法人科学技術振興機構  
学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、島崎琢也、長尾省吾、松本義人

【海外】

(1)

発明の名称 インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤

出願番号 ロシア 2005130011

特許番号 ロシア 2358761 (2009.6.20)

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、吉崎和幸

(2)

発明の名称 IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する内耳障害治療剤

出願番号 アメリカ 10/593,776

特許番号 アメリカ 7498031 (2009.3.3)

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 藤岡正人、岡野ジェイムス洋尚、小川郁、岡野栄之、神崎晶

(3)

発明の名称 インターロイキン-6 アンタゴニ  
ストを含有する脊髄損傷治療剤

出願番号 オーストラリア 2004212843

特許番号 オーストラリア 2004212843(2009.10.08)

出願人 中外製薬(株)、学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田誠司、中村雅也、吉崎  
和幸

(4)

発明の名称 神経幹細胞の増殖抑制剤

出願番号 アメリカ 11/704,185

特許番号 特許査定 (2009.9.29)

出願人 学校法人慶應義塾 (独)産業技術  
総合研究所

発明者 岡野栄之、坂口昌徳、澤本和延、平林  
淳

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

出願特許

【平成21年度】(国内2 国外4)

【国内】

(1)

発明の名称 シュワン前駆細胞の製造方法及  
び増殖方法

出願番号(出願日): 特願 2009-178340  
(2009.7.30)

出願人名学 校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、中村雅也、戸山芳昭、石井  
賢、高木岳彦

(2)

発明の名称 分化細胞由来多能性幹細胞の樹  
立方法

出願番号(出願日): 特願 2009-181009  
(2009.8.3)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、松崎有未、新部邦透、森川  
暁、馬淵洋、永井康夫

【海外】

(1)

発明の名称 人工多能性幹細胞の選択方法

出願番号(出願日): アメリカ 61/217,362  
(2009.5.29)

出願人名 学校法人慶應義塾

国立大学法人京都大学

発明者 岡野栄之、岡田洋平、山中伸弥、三  
浦恭子

(2)

発明の名称 分化細胞由来誘導多能性幹細胞  
由来の二次ニューロスフェアの選択方法、その  
選択方法によって選択されたクローン、及びそ  
のクローンの使用方法

出願番号(出願日): PCT/JP2009/003755  
(2009.8.5)

基礎出願(優先日): アメリカ 61/086,369  
(2008.8.5)

出願人名 学校法人慶應義塾 国立大学法人  
京都大学

発明者 岡野栄之、中村雅也、辻収彦、山中伸  
弥、三浦恭子

(3)

発明の名称 神経分化促進剤

出願番号(出願日): PCT/JP2009/003195  
(2009.7.8)

基礎出願(優先日): アメリカ 61/088,521  
(2008.8.13)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、島崎琢也、仲勇人

(4)

発明の名称 神経幹細胞製造方法

出願番号(出願日): PCT/JP2009/005856  
(1009.11.4)

基礎出願(優先日): アメリカ 61/198,365

(2008.11.5)

出願人名 学校法人慶応義塾

発明者 岡野栄之、赤松和土

出願準備中

【国内】 1件

(1)

発明の名称 神経幹細胞の自己複製促進剤およびその使用方法

出願番号(出願日): 準備中 (2010.3月末)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 並木 淳、岡野栄之

【海外】 2件

(1)

発明の名称 神経損傷治療剤及び神経損傷治療方法

出願番号(出願日): PCT 出願準備中(2010.2.3)

基礎出願(優先日): 米国 61/206,711

(2009.2.3)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、岡田洋平、中村雅也、海苔聡、高橋勇一郎

(2)

発明の名称 分化細胞由来多能性幹細胞の樹立方法

出願番号(出願日): PCT 出願準備中(2010.2.3)

基礎出願(優先日): 特願 2009-181009

(2009.8.3)

出願人名 学校法人慶應義塾

発明者 岡野栄之、松崎有未、新部邦透、森川暁、馬淵洋、永井康夫

## GluR2 RNA 編集異常と TDP-43 蛋白のプロセッシング異常

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<sup>1)</sup>

研究協力者：山下雄也<sup>1)</sup>、日出山拓人<sup>1)</sup>、寺本さやか<sup>1)</sup>

所属：<sup>1)</sup> 東京大学神経内科

### 研究要旨

RNA 編集酵素 ADAR2 の活性低下による AMPA 受容体サブユニット GluR2 Q/R 部位の RNA 編集低下、および TDP-43 陽性の細胞質封入体形成は孤発性 ALS 運動ニューロンに見られる疾患特異的分子変化である。また、これら 2 種の分子異常は、同一の運動ニューロンで生じていることが明らかにされ、両者の間には分子連関が存在することが示唆される。本研究では、TDP-43 の変化が ADAR2 活性低下、RNA 編集異常の上流である可能性について検討した。培養細胞 2 系統を用い、野生型 TDP-43、TDP-43 siRNA、あるいは様々な TDP-43 変異体を導入し、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率、ADAR2 mRNA の発現量、GluR2 pre-mRNA の発現量、酵素対基質量比の変化を検討したが、導入前後で ADAR2 活性に有意な変化はみられなかった。このことは、孤発性 ALS 運動ニューロンでおきている ADAR2 活性低下が TDP-43 プロセッシング異常によるものではないことを示唆している。

### A. 研究目的

RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の活性低下による AMPA 受容体サブユニット GluR2 Q/R 部位の RNA 編集低下は孤発性 ALS 運動ニューロンに生じている疾患特異的な分子変化である<sup>1,2</sup>。他方、孤発性 ALS の運動ニューロンには TDP-43 陽性の細胞質封入体が形成され、同時に核内 TDP-43 免疫活性が消失することも疾患特異性が高いことが病理学的に明らかにされている<sup>3,4</sup>。ADAR2 のノックアウトマウスがけいれん重積で死亡し<sup>5</sup>、コンディショナルノックアウトマウスでは運動ニューロンの変性が生ずること<sup>6</sup>、TDP-43 遺伝子変異が ALS 発症の責任遺伝子異常の一つであること<sup>7,8</sup>が明らかにされていることから、これらの分子変化が ALS に病因的意義を持つものと想定されている。GluR2 の RNA 編集異常、TDP-43 蛋白のプロセッシング異常は、ともにこれまでに孤発性 ALS に見出さ

れた分子変化の中でも最も疾患特異性が高い分子変化であり、SOD1 関連家族性 ALS の運動ニューロンには見出されていない<sup>9,10</sup>。さらに両者の分子連関を免疫組織化学にて検討したところ、孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 活性低下と TDP-43 陽性封入体形成は同一のニューロンに見られることが明らかになり (Aizawa H. et al., in submission)、両者には分子連関があることがわかった。

そこで本報告で、TDP-43 の変化が RNA 編集異常の上流の変化であるのか下流の変化であるのか調べるためにまず TDP-43 の変化が RNA 編集異常の上流の変化である可能性について検討を行った。

### B. 研究方法

野生型 TDP-43、TDP-43 siRNA、TDP-43 変異体（核内移行シグナル (NLS) 欠損変異体、核外移行シグナル (NES) 欠損変異体、断片化

C 末端変異体、家族性 ALS 由来 A315T、M337V 変異体) をリポフェクトアミン LTX あるいはリポフェクトアミン RNAi Max を用いて、RNA 編集率測定システムである TetHeLaG2m 細胞<sup>11</sup> あるいは Neuro2a 細胞に遺伝子導入した。導入効率は RT-PCR により検討した。培養 72 時間後に、total RNA を回収し、RT-PCR 及び制限酵素処理を行い、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率を測定した。RNA 編集率に変化のあったものは、その機序を調べる目的で ADAR2 mRNA、GluR2 pre-mRNA の発現量を定量 RT-PCR で測定し、RNA 編集率を規定する一因子として報告されている ADAR2 mRNA 対 GluR2 pre-mRNA 比(酵素対基質量比) を計算した。

#### (倫理面への配慮)

研究の方法について、研究倫理委員会、動物実験委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

野生型 TDP-43 を過剰発現させたとき GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は、TetHeLaG2m 細胞において変化せず、Neuro2a 細胞において有意に減少した。一方、TDP-43 siRNA にてノックダウンしたとき、RNA 編集率は、TetHeLaG2m 細胞において有意に増加し、Neuro2a 細胞において変化しなかった。RNA 編集率の変化した作用機序を調べる目的で ADAR2 mRNA、GluR2 pre-mRNA の発現量を測定し、酵素対基質量比を求めた。しかしながら RNA 編集率の変化した細胞で ADAR2 mRNA、GluR2 pre-mRNA の発現量と酵素対基質量比に有意な変化は見られなかった。

次に核内、あるいは核外で TDP-43 が ADAR2 と相互作用するか調べる目的で、NLS 欠損変異体、NES 欠損変異体を過剰発現し、RNA 編集率を測定した。両変異体とも RNA 編集率に優位な変化は見られなかった。

次に患者脳内で蓄積しやすいと考えられている TDP-43 の C 末端断片を過剰発現し、RNA 編集率を測定した。Neuro2a 細胞において、TDP-43 断片(89-414)で RNA 編集率が減少し、TDP-43 断片(220-414)で有意に増加した。両者とも、導入による ADAR2 mRNA 発現量に変化がなく GluR2 pre-mRNA の発現量が TDP-43 断片(89-414)導入で有意に減少した。

次に家族性 ALS 由来の 2 種の TDP-43 変異体(A315T、M337V) の RNA 編集率への影響の検討を行った。両変異とも RNA 編集率に影響しなかった。

### D. 考察

ADAR2 活性低下と TDP-43 蛋白のプロセシング異常とは、孤発性 ALS 運動ニューロンに特異的に生じている現象であり、さらに両者の分子連関を孤発性 ALS 運動ニューロンの免疫組織化学にて検討した結果、ADAR2 活性低下と TDP-43 陽性封入体形成は分子連関があることがわかった(Aizawa H., in submission; 郭 伸他、変性班 2009 年度報告書)。

本報告で、TDP-43 の変化が RNA 編集異常の上流である可能性について検討を行い、その結果、TDP-43 のプロセシング異常が直接 RNA 編集低下を引き起こしている可能性はないことが示唆された。すなわち、1) 野生型 TDP-43、様々な変異体 TDP-43 の過剰発現と TDP-43 のノックダウンでは、野生型 TDP-43 を過剰発現、ノックダウンした培養細胞 2 系統で、ともに RNA 編集率の変化にリバーシブルな変化がなく、ADAR2 mRNA、GluR2 pre-mRNA の発現量に有意な変化が見られなかった、2) 核内外に局在させた核局在シグナル欠損の TDP-43 変異体、家族性 ALS 由来の 2 種の TDP-43 変異体導入のいずれでも RNA 編集率に変化が見られなかった、3) RNA 編集率に若干の変化をもたらした TDP-43 の C 末端断片は ADAR2 mRNA の発

現量に変化を与えず、GluR2 pre-mRNA の発現量を変えることで RNA 編集率を変化させたことが明らかとなった。

ADAR2 活性低下と TDP-43 蛋白のプロセシング異常とは、孤発性 ALS の同一運動ニューロンに特異的に生じている現象であることから、今後は、RNA 編集異常の下流に TDP-43 プロセシング異常がある可能性について検討を行い、その分子メカニズムを解明していくことで、孤発性 ALS の病因解明に近づけるものと考えられる。

## E. 結論

孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 活性低下と TDP-43 陽性封入体形成の分子連関は、TDP-43 の変化が RNA 編集異常の上流ではないことが明らかとなった。

F.健康危険情報：なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sawada J, et al. (2009) *Neurosci Res* 64:251-258, 2009.
2. Kwak S, et al. *Neuropathology*, doi:10.1111/j.1440-1789.2009.01090.x..

### 2. 学会発表

1. 郭 伸：「興奮性神経細胞死から見た ALS」ALS シンポジウム。第 50 回日本神経病理学会，高松，June 4-6, 2009.
2. 郭 伸：シンポジウム「精神・神経・筋疾患のトランスレーショナルリサーチ」第 52 回日本神経化学会，伊香保，June 22-24, 2009.
3. 郭 伸，他：「生体機能と創薬シンポジウム」。日本薬学会，東京，August 26-27, 2009.
4. 郭 伸：シンポジウム「神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」第 32 回日本神経科学大会，名古屋，September 13-18, 2009.

5. Hideyama T, et al. *The 20<sup>th</sup> International Symposium on MND/ALS. 2009*, Berlin, 8-10 Dec, 2009.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）：なし

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

## I. 引用文献

1. Kawahara, Y., et al. *Nature* 427, 801 (2004).
2. Kwak, S. & Kawahara, Y. *J Mol Med* 83, 110-120 (2005).
3. Arai, T., et al. *Biochem Biophys Res Com* 351, 602-611 (2006).
4. Neumann, M., et al. *Science* 314, 130-133 (2006).
5. Higuchi, M., et al. *Nature* 406, 78-81 (2000).
6. Hideyama, T., et al. *Abstr. Soc Neurosci* 745, 17 (2008).
7. Sreedharan, J., et al. *Science* 319, 1668-1672 (2008).
8. Yokoseki, A., et al. *Ann Neurol* 63, 538-542 (2008).
9. Mackenzie, I.R., et al. *Ann Neurol* 61, 427-434 (2007).
10. Tan, C.F., et al. *Acta Neuropathol (Berl)* 113, 535-542 (2007).
11. Sawada J, et al. *Neurosci Res* 64, 251-258, (2009).

## 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

分担研究者：高橋 良輔 京都大学医学部神経内科・教授  
研究協力者：村上 学 京都大学医学部神経内科・大学院生  
井上 治久 iPS細胞研究センター・准教授  
月田 香代子 iPS細胞研究センター・教務補佐員  
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10種類の化合物とその構造式類似の既存薬でSOD1の発現を低下させることをELISA及びウェスタン・ブロッティングで確認した。

### 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。

9,600 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 177 種類の化合物といくつかの既存薬を一次スクリーニングで同定した。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。WST-1 アッセイでその効果が細胞毒性によるものであることを除外し、ELISA で SOD1 蛋白の実際の発現低下を 177 のヒットの内 10 化合物で確認した。その中で最も効果の高い 2 化合物に構造式類似的の既存薬でも同様の結果を見出し、ウェスタン・ブロットングで SOD1 蛋白が実際に減少していることを確認した。

#### 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。この化合物が SOD1 転写を抑制するメカニズムを検討するとともに、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

Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S.(2009) Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J Neurosci Res*. 87:576-85.

Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, Takahashi R, Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A.(2009) N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio. *J Neurochem* 108(2): 350-60.

Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T.(2009) Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer*. 125, 2029-35.

Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi

M, Kinoshita A, Takahashi R.(2009) Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice. *Brain Res*. 1294:202-10.

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, Takahashi R.(2009) A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. *Neurosci Res*. 65, 263-71.

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, Takahashi R.(2009) Loss of PINK1 in medaka fish (*Oryzias latipes*) causes late-onset decrease in spontaneous movement. *Neurosci Res*. in press.

Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S, Sawada H.(2009) Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Nov 11. [Epub ahead of print]

Takahashi R. (2009) Edaravone in ALS. (commentary) *Exp Neurol*. 217:235-6

村上 学, 井上治久, 高橋良輔 (2009) : 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略、ファルマシア、45、1009-1112

Inoue, H., Kondo, T., Lin, L., Mi S., Isacson O., Takahashi, R.(2009) Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative Diseases, **In Protein folding and misfolding: neurodegenerative diseases**, ed. Ovadi, J.

##### 2. 学会発表

Inoue H • Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research • International Symposium: New Approach for Molecular Neuropathology, Tokyo, Japan. 2009 Aug 13.

Inoue H • Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research • The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan. 2009 Sep 16.

Inoue H • Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research • The Workshop, San Francisco, USA. 2009 Jun 8.

Inoue H • Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research •



Seweden-Japan Joint Colloquim: Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology, Stockholm,Sweden.2009 Sep 5.

Inoue H • Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research • 5th Symposium sur la SLA,Quebec,CANADA.2009 Sep 25.

Inoue H • Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research • Gladstone Institute of Cardiovascular Disease: Seminar,San Francisco, USA.2009 Oct 26.

Inoue H • Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research • Joint iPS Meeting,Toronto,CANADA.2009 Oct 28.

村上 学、日本神経科学学会、2009年9月16-18日

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

## 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

最近、損傷ミトコンドリアのオートファジー経路による品質管理にユビキチンリガーゼ“Parkin”が関与していることが報告された。われわれも様々な細胞の細胞質の大部分の Parkin がミトコンドリアの脱共役剤 ‘uncoupler’ である CCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)処理によって膜電位が低下したミトコンドリアに移行することを確認した。そして Parkin 移行後に、ミトコンドリアの外膜表面が抗ユビキチン抗体で濃染されることから、Parkin の真の標的分子がミトコンドリア表面膜に存在する可能性を示唆した。その後、ユビキチン化されたミトコンドリアは時間経過と共に消失し、この消失はオートファジー欠損 MEFs(マウス胎児線維芽細胞)では、観察されなかった。この結果は、選択的オートファジーがミトコンドリアの品質管理 (Mitophagy) に関与している可能性を強く示唆している。さらに本年、哺乳動物細胞で PINK1(PTEN-induced putative kinase 1)が Parkin の上流で機能していることを見出した。この結果から、PINK1-Parkin 経路がミトコンドリアの障害状態を感知して、損傷したミトコンドリアをオートファジーでクリアランス (浄化) していることが判明した。この品質システムは神経細胞の健康維持に必須な役割を果たしていると考えられ、その制御化合物は神経変性疾患の有力な治療薬になることが示唆された。

### A. 研究目的

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きた。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われわれの動物オートファジーの発生工学的研究から、基底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 (Komatsu et al., J Cell Biol 2005, Nature 2006, Cell 2007)。

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。詳細な解析からオートファジーの減弱によるニューロン死は、軸索のスエリング (膨張) による

ことを突き止めた。その原因としては、電子顕微鏡による形態学的解析からオルガネラ、とくにミトコンドリアの品質管理の破綻が強く示唆された(Komatsu et al., PNAS 2007)。

PINK1 や Parkin は常染色体劣勢若年性パーキンソン病の責任遺伝子として有名であるが、実はこれらの翻訳産物は多くの神経細胞 (ニューロン) で発現量が高いため、これらのタンパク質の機能はパーキンソン病に限定されず、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発症に間接的に関係していると考えられている。実際 ALS を含む多くの神経変性疾患の患者の脳/脊髄の病理所見においてミトコンドリア等のオルガネラの異常が観察されている。

本研究では、ミトコンドリアの品質管理における PINK1 や Parkin の役割について、選択的オートファジー (Mitophagy) の作用機序を中心に検討した。

### B. 研究方法

### 培養細胞への遺伝子導入

For transformation of MEFs, pMXs-puro plasmids harboring genes of interest were packaged into individual retroviruses using PLAT-E cells and transfected as described previously.

### 細胞分画・免疫沈降・免疫細胞染色

To depolarize the mitochondria, HeLa and SH-SY5Y cells were treated with 10  $\mu$ M CCCP and MEFs with 30  $\mu$ M CCCP, respectively. For fractionation experiments, HeLa and SH-SY5Y cells were treated with CCCP for 1 - 5 h and subsequently treated with 1mM dithiobis[succinimidyl propionate] (DSP, Pierce) in PBS for 1 h on ice, inactivated by 10 mM glycine in PBS three times, and suspended in chappell-perry buffer (0.15M KCl, 20 mM HEPES-NaOH, pH 8.1, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, protease- and phosphatase-inhibitor [Roche]). Cells were disrupted by 5 passages through a 25-gauge needle (with 1-ml syringe), debris was removed by centrifugation at 1,000 g for 7 min, and the supernatant was subjected to 10,000 g for 10 min to separate mitochondria-rich fraction from cytosol-rich fraction. Immunoblotting and immunoprecipitation were performed by conventional methods. The cell lysate was collected in the presence of 10 mM N-ethylmaleimide to protect ubiquitylated Parkin from de-ubiquitylation enzymes. To monitor the degradation of endogenous PINK1, HeLa cells were treated with 10  $\mu$ M CCCP and 50  $\mu$ g/ml cyclohexamide as depicted in Fig. 3K and were subjected to immunoblotting. For immunofluorescence experiment, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 50  $\mu$ g/ml digitonin and stained using a standard protocol. To monitor the mitochondrial membrane potential, MEFs were treated with 50 nM MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) for 15 min, washed three times and incubated for an additional 10 min before fixation.

### 抗体

Antibodies used in this study are as follows: anti-Actin (AC-40, Sigma), anti-Cytochrome-c (6H2.B4, BD), anti-Flag (M2, Sigma), anti-GFP (3E6, Wako chemical; A6455, Invitrogen), anti-HA (12CA5, Roche), anti-Hsp70 (SR-B810, MBL), anti-Lactate Dehydrogenase (LDH) (ab2101, Abcam), anti-Parkin (#2132, Cell Signaling for immunocytochemistry; PRK8, Sigma for immunoblotting), anti-PINK1 (BC100-494, Novus), anti-Tom20 (FL-145 and F-10, Santa Cruz Biotech), anti-Ubiquitin (P4D1, Santa Cruz; FK2, MBL) and anti-V5 (Invitrogen).

### (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] 損傷ミトコンドリアへの Parkin の移行

ミトコンドリアの内膜に存在する呼吸鎖、特に complex I の活性低下 (膜電位の低下) が、パーキンソン病をはじめとして多くの神経細胞で観察されている。そこで、内在性のパーキンが存在しない (Parkin 抗体を用いた Western Blot 解析で検出できない) HeLa 細胞に GFP-Parkin を導入した後、ミトコンドリアの uncoupler (脱共役剤) である CCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)処理 (10  $\mu$ M) してミトコンドリア内膜の電子伝達系を破壊し、膜電位を強く低下させた。そして GFP-Parkin の細胞内局在について共焦点顕微鏡で観察した結果、30 分以内に細胞質に拡散的に存在していた Parkin が大量にミトコンドリアの外表面に移行した。このミトコンドリアに移行した Parkin は、ミトコンドリア外膜のタンパク質である Tom20 と共染色した結果、両者は完全にマージした。即ち、ミトコンドリアに移行した Parkin は、外膜に結合していると考えられた。

さらに CCCP 処理後、抗 Parkin 抗体 FK2 で細胞染色すると、Parkin と同じように CCCP 依存的にミトコンドリアの外膜が濃染 (Tom20 と共染) された。その後の経過をみると、24 時間後には GFP-Parkin を導入した細胞のミトコンドリアのみが消失した。しかもこの消失は、オートファジー (Atg7) が欠損した MEFs (mouse embryonic fibroblasts) では、大幅に抑制されたことから、膜電位を失ったミトコンドリアはオートファジーによって選択的に分解されている可能性が示唆された。このオートファジーによる選択的なミトコンドリア分解は、Mitophagy と呼ばれている。Parkin はこの膜電位低下 (損傷) に依存した Mitophagy に必須な役割を果たしていることが示唆された。

#### [結果 2] PINK1 依存的な Parkin のミトコンドリア移行

ハエ (*Drosophila*) の遺伝学的研究から

PINK1 はミトコンドリアの形態維持に必須であること、そして Parkin と同じ経路に存在することが報告されていた。さらにこの経路において PINK1 は、Parkin の上流に位置することも示唆されていた。その理由は、PINK1 欠失は Parkin の過剰発現で抑制されるが、Parkin 欠失は PINK1 の過剰発現で相補されないからである。

そこで損傷ミトコンドリアへの Parkin の移行に PINK1 が関係しているのか否かを調べるために PINK1 欠損 MEFs にレトロウイルスに組み込んだ GFP-Parkin を導入し、CCCP 処理(30  $\mu$ M, 3 時間)を行った。その結果、野生株 MEFs では、Parkin は損傷ミトコンドリアに移行したが、PINK1 欠損 MEFs では、全く移行しなかった。そこで、PINK1 欠損 MEFs にレトロウイルスに PINK1 を組み込んで導入した戻し実験をすると、CCCP による Parkin のミトコンドリア移行は、完全に回復した。この結果は、PINK1 が Parkin の損傷ミトコンドリアへのリクルート因子であることを示唆している。

#### [結果 3] PINK1 の機能解析

PINK1 は N-末端側に仮想的なミトコンドリア移行シグナル(典型的な構造ではない)領域をもち C-末端側半分領域に Ser/Thr タンパク質キナーゼ領域 (serine/threonine-protein kinase) を持っている。そこで、N-末端側ドメインを削除し PINK1 がミトコンドリアに移行できないようすると、Parkin の損傷ミトコンドリアへのリクルートは、完全に阻害された(具体的には、PINK1 欠損<sup>(-/-)</sup>MEFs にレトロベクターで欠損変異体 PINK1 を導入・発現させた戻し実験)。この結果、PINK1 のミトコンドリア局在が Parkin の損傷ミトコンドリアへのリクルートに不可欠であることが判明した。

さらに PINK1 のキナーゼ不活性型変異体(触媒部との Ser/Thr 残基を変異させた kinase dead PINK1)も、同様な戻し実験において Parkin の損傷ミトコンドリア移行が全く快復しなかった。したがって PINK1 のタンパク質キナーゼ活性が Parkin の損傷ミトコンドリアへのリクルート因子としての機能に必須であることが判明した。

[結果 4] PINK1 は膜電位依存的な mitophagy に必須である。

最終的に PINK1 がミトコンドリアの膜電位に依存した Mitophagy に必須であるか否かを検討した。Parkin をレトロウイルスで導入した野生型 MEFs と PINK1 欠損 MEFs に CCCP 処理して 24 時間後に、ミトコンドリア量を Tom20 の染色度で観察した。野生型 MEFs のミトコンドリア量は、CCCP 処理によって激減したが、Parkin が発現していない MEFs ではミトコンドリアの消失は、ほとんど観察されなかった。一方、同じ実験を PINK1 欠損 MEFs で検討すると、ミトコンドリアの有意な減少は、明確に阻害された。この結果から、PINK1 が膜電位低下と Parkin に依存した Mitophagy に必須であることが判明した。

#### D. 考察

本研究により、PINK1 と Parkin によるミトコンドリアの品質管理機構が明確になった。この損傷ミトコンドリアのオートファジーによるクリアランス(浄化)は、分裂増殖しない神経細胞の恒常性維持に必須であると思われる。ミトコンドリアは、代謝エネルギー即ち ATP 合成に大きな役割を担っているが、内膜の呼吸鎖(電子伝達系)での ATP 産生には副産物としての Reactive Oxygen Species (ROS)が恒常的に生成され、その結果、ミトコンドリアのタンパク質・脂質・DNA は、絶えず傷害の危機に曝されている。したがって、ニューロンの維持に損傷ミトコンドリアの品質管理が、非常に重要な役割を果たしていることが近年、判明してきた。

PINK1 がミトコンドリアの外膜に局在することから、膜電位の異常を感知していると思われる。今後は、この感知機構の解明が大きなテーマとなるであろう。

本研究から PINK1 のタンパク質キナーゼ活性が、Parkin の損傷ミトコンドリアへの移行に必須であることが判明したが、CCCP 処理後の Parkin を 2 次元電気泳動(2D-PAGE)で観察しても分子量・等電点に変化がないことから、Parkin が PINK1 の直接のターゲットでないと考えられた。今後 PINK1 の標的分子を探索することが、この経路の機構解明に重要である。

#### E. 結論

PINK1 は Parkin を損傷ミトコンドリアへ輸送させるリクルート因子である。PINK1 と

Parkin によるミトコンドリアの品質管理 (PINK1/Parkin による膜電位依存的な Mitophagy) は、非分裂細胞であるニューロンの健康維持に必須である。

## F. 健康危険情報

無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., and Tanaka, K. (2009) Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J.* 28, 359 - 371
- (2) Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., and Czaja M. J. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131-1135.
- (3) 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* 137, 549-559.
- (4) Saeki, Y., Toh-e, A., Kudo, T., Kawamura, H., and Tanaka, K. (2009) Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell* 137, 900-913.
- (5) Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2009) Assembly pathway of the mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell* 137, 914-925.
- (6) Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A. M., Ishimaru, N., Koyasu, S., Tanaka, K., and Takahama, Y. (2010) Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8 T cells. *Immunity* in press.
- (7) Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., and Yamamoto, M. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through

Keap1-inactivation. *Nat. Cell Biol.* in press.

- (8) Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10, 104-115.
- (9) Tanaka, K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys Biol Sci* 85, 12-36.
- (10) Matsuda, N. and Tanaka, K. (2010) Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease? *J Alzheimer's Dis.* 19, 1-9.

### 2. 学会発表

- (1)田中啓二：細胞内大規模タンパク質分解システムの作動機構と生理機構. 日本分子生物学会第9回春期シンポジウム (090511-12) 分子生物学の新たな胎動ー宮崎から黎明の曙光ー (平成21年5月11-12日) 宮崎
- (2)Keiji Tanaka : Molecular Assembly and Diversity of Proteasomes . Ubiquitin, Ubiquitin-like Proteins and Proteasomes: Functions and Dysfunctions, Inserm Workshop (June 10-12, 2009) Saint-Raphael, France
- (3)Keiji Tanaka : Molecular Assembly and Diversity of Eukaryotic Proteasomes. Proteolysis Research: Succession and Development, Tokyo Garden Palace (July 5th, 2009) Tokyo, Japan
- (4)Keiji Tanaka : Molecular Assembly and Diversity of Eukaryotic Proteasomes. EMBO CONFERENCE on "Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers in Health and Disease" Riva Del Garda, September 22nd to 26th, 2009, Italy
- (5)田中啓二：オートファジーと神経変性疾患. 第1回ニューロフォーラム東京、京王プラザホテル (2009年10月1日)東京
- (6)Keiji Tanaka : Molecular Mechanisms of Chaperone-assisted Proteasome Assembly. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. The 4th Annual Meeting of The Biomedical Society for Stress Response, October 6 - 9, Sapporo, Japan

## H. 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

## 血管内投与型 AAV ベクターの開発

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・教授

研究協力者：村松慎一<sup>1</sup>, 奈良優子<sup>1</sup>, 宮内ひとみ<sup>1</sup>, 綾部啓子<sup>1</sup>, 滝野直美<sup>1</sup>, 島崎久仁子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>自治医科大学 神経内科学部門, <sup>2</sup>同 神経脳生理学部門

### 研究要旨

血管内投与により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可能なアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを開発した。各種の型の AAV のカプシド蛋白およびゲノム配列を改変し、神経細胞特異的プロモーターにより GFP 蛋白を発現するベクターを作製した。マウスの血管内に投与し 4 週間後に組織を解析した結果、脳の広範な領域と脊髄の神経細胞で GFP の発現が認められた。

### 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血管内投与により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

血管内投与後に脳内へ移行しやすい AAV ベクターを見出すため、AAV1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 など各種の型のカプシド蛋白を持ち、GFP を発現する pseudotype AAV ベクターを作製した。一部の型では、カプシド蛋白の数か所のアミノ酸配列を置換し、発現カセットの塩基配列も改変したベクターを作製した。また、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)の誘導体を化学合成しカプシド蛋白を修飾した。これらのベクターをマウスの血管内に投与し 4 週間後に組織を解析した。

### C.研究結果

野生型カプシドを持つ AAV8, AAV9 ベクターでは、脳内の少数の神経細胞およびグリア細胞に GFP の発現が認められたが、脊髄の神経細胞では発現が見られなかった。神経細胞特異的プロモーターを搭載した改良型 AAV ベクターでは、脳の広範な領域と脊

髄の神経細胞で GFP の発現が認められた。脊髄の ChAT 陽性細胞では 20%程度に GFP の発現が得られた。

### 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・ゲノムの改変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、開発した改良型ベクターでは、血管内投与により脊髄の運動神経細胞へ遺伝子導入が可能であり、臨床応用への期待が持てる。血液脳関門を通過する詳細な機序は不明であるが、炎症反応や組織破壊は認めていない。今後、治療用遺伝子を搭載したベクターの開発を行う。

### E.結論

カプシド蛋白およびゲノム配列を改変し、血管内投与により効率よく神経細胞へ遺伝子導入可能な AAV ベクターを開発した。

### F.健康危険情報

なし

### G.研究発表

#### 1. 論文発表

1. Muramatsu, S, Okuno T, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y and Tsukada H: Multi-tracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease. Synapse, 63:541-548, 2009.
2. Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N: Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. PLoS ONE, 4:e6318, 2009.

## 2.学会発表

1. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I : "Aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease: results from an open-label, phase I trial " , The American society of gene therapy (ASGT)'s 12<sup>th</sup> annual meeting, San Diego, May 29, 2009.
2. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I : Phase I trial of AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase for parkinson's disease. The Japan society of gene therapy's 15<sup>th</sup> annual meeting. Osaka, July 11, 2009.

## H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得
3. 実用新案登録
4. その他

なし



## 「初代培養ミクログリアに対するリコンビナント mutant SOD1<sup>G93A</sup>の作用と 遺伝子発現プロファイリング」

研究分担者：船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学・准教授  
研究協力者：島田(大谷) 若菜 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学  
藤原 範子 東北大学医学系研究科神経内科学  
谷口 直之 東北大学医学系研究科神経内科学  
中村 敏一 大阪大学先端科学イノベーションセンター

研究要旨: Mutant SOD1 発現 ALS トランスジェニックマウスの発症後の病態進行がミクログリアにより critical に修飾されることが明らかとなり、発症後の ALS 病態進行抑制治療の標的としてミクログリア細胞による cell autonomous な運動ニューロン毒性修飾の制御が考えられる。さらに ALS 進行過程で運動ニューロンのクロモグラニン分泌顆粒から変異 SOD1 が放出されることでミクログリアの活性化がおこることが報告された。したがって、ALS 病態進行に伴い運動ニューロンから細胞外に放出される変異 SOD1 によるミクログリアの修飾が ALS 病態進行に重要な寄与をしている可能性があるが、SOD1 が変異することで (1) SOD1 にどのような生化学的変化を惹起し、(2) ミクログリアに対する病態生理学的作用を変化させるのか、その詳細は十分明らかとされていない。

本研究では、運動ニューロンから放出された変異 SOD1 のミクログリアに対する作用を、初代培養ミクログリアに変異 SOD1 もしくは野生型 SOD1 を添加した際の遺伝子変動および細胞形態の評価により比較・解析することを目的とした。大腸菌由来リコンビナント Mutant SOD1<sup>G93A</sup>、野生型 SOD1 およびその分画で Pure なラット初代培養ミクログリアを処理した後 RNA を抽出し、DNA Array 法にて変動遺伝子を解析・遺伝子プロファイリングを行った。その結果、Mutant SOD1<sup>G93A</sup> によりミクログリアにおける種々の因子の発現制御および細胞形態変化が明らかとなったが、中でも炎症性サイトカイン群の発現制御が著しかった。この結果は、変異 SOD1 がミクログリアを活性化させると同時に各種サイトカインを産生、放出することで ALS 病態進行過程において運動ニューロン変性に寄与する可能性を支持する。また、野生型 SOD1 に於いても野生型 SOD1 の分画によりミクログリアの遺伝子発現を修飾することが明らかとなった。さらに、本研究でミクログリア細胞における HGF-c-Met 活性化経路の一部の遺伝子に発現変化を認めたことから、ALS 病態過程において少なくともミクログリアの一部の subpopulation における HGF-c-Met 系の制御が ALS 病態修飾への意義をもつ可能性が示唆された。今後、HGF-c-Met 系の遺伝子変化の意義を明らかにしていくとともに、本研究をさらに発展させ ALS 病態過程に於けるミクログリアの修飾を標的とした治療戦略および SOD1 による ALS 病態発症の分子機序解明に生かしていきたい。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンの進行性変性・脱落による運動機能不全により呼吸・嚥下筋障害がおこり最終的に死亡する最も悲惨な神経変性疾患の1つで、現時点で有効な治療法は開発されていない。家族性 ALS

(FALS) の原因遺伝子として Superoxide dismutase 1 (SOD1) の変異が報告されているが、その変異アミノ酸部位は 100 箇所以上あり、従来想定されていた loss-of-function 型機序ではなく、gain-of-function 型機序が想定されている。この変異により運動ニューロンが変性す

るのは、(a) 運動ニューロンに発現する変異 SOD1 が運動ニューロン細胞内で toxic character を示すことに加えて、(2) 運動ニューロンのクロモグラニン分泌顆粒から変異 SOD1 が細胞外に放出され、その変異 SOD1 がミクログリアに作用しその活性化を惹起し、運動ニューロンに対する神経毒性を介して ALS の病態を修飾している可能性が示唆されている (Urushitani *et al.*, Nat Neurosci., 2006)。さらに、変異 SOD1 発現トランスジェニックマウスにおける発症後の病態進行にミクログリアが critical に機能することが報告されている (Boillee, Yamanaka *et al.*, Science 2006; Beers *et al.*, PNAS, 2006)。したがって、ALS 病態進行に伴い運動ニューロンから細胞外に放出される変異 SOD1 によるミクログリアの修飾が ALS 病態進行に重要な寄与をしている可能性があるが、SOD1 が変異することで

(1) SOD1 にどのような生化学的変化が惹起されるか、

(2) ミクログリアに対する病態生理学的作用が惹起されるのか、

その詳細は十分明らかとされていない。

本研究では、運動ニューロンから放出された変異 SOD1 のミクログリアに対する作用を、変異 SOD1、野生型 SOD1 およびその分画を対照として初代培養細胞系を用いて細胞形態、さらには遺伝子変動の観点から比較・解析することを目的とした。

## B. 研究方法

生後2日齢のラット大脳から常法にてミクログリアを精製・培養した。初代培養ミクログリアに大腸菌の系で調整したリコンビナント Mutant SOD1<sup>G93A</sup>、野生型 SOD1 とその分画を DMEM 含有培地中に血清無添加の条件で添加して以下の解析を行った。対照としては SOD1 の溶解液のみ (溶媒のみ) で処理した培養ミクログリアを用いた。

### (1) ミクログリアの細胞形態の修飾の評価

ミクログリアの細胞形態をミクログリアのマーカー抗体で染色し解析した。

### (2) ミクログリアの遺伝子プロファイリング

(クラスター解析およびパスウェイ解析を含めて)

ミクログリア細胞から RNA を抽出し、Agilent 2100 バイオアナライザーで Quality 検定後、溶媒のみで処理したミクログリア由来サンプルを Cy3 で、残りの各サンプルを Cy5 でラベルし、DNA Array 法にて変動遺伝子の遺伝子プロファイリングを行った。

## C. 研究結果

### (1) ミクログリアの形態変化の評価

溶解液のみを添加した対照群と比較して、Mutant SOD1G93A 添加例では round shape (アメーバ状) の形態をとる細胞が多かった。その形態は、in vivo において活性化型細胞に比較的類似していた。一方、野生型 SOD1 添加例においても round shape の細胞が比較的多く認められた。この結果は、野生型 SOD1 も状態によって Mutant に近い作用を示す可能性を示している。そこで、野生型 SOD1 を分画し、その各分画を添加したところ、Fraction A と Fraction B で形態に差を認め、一方に round shape を比較的多く認め、他方には、突起を伸展した形態を取る細胞の population が多かった。以上から、同じ野生型でも状態によってミクログリアに対する作用が異なることが明らかとなった。

### (2) 遺伝子プロファイリング

上記形態の相違が何を反映するかをより詳細に見るためには、ミクログリアの遺伝子プロファイリングが有効と期待される。Pure な初代培養ミクログリアへの SOD1 添加後の DNA Array 解析を行った結果、Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 添加により多くの遺伝子発現が変化することが明らかとなった。一方、野生型 SOD1 添加ミクログリアでは

Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 添加サンプルとは異なる結果であった。但し両者を比較した際、一部両者で同じ方向の発現制御を受けることが明らかとなった。この点を詳細に解析するため、野生型 SOD1 についてはその分画に分け、それぞれでマイクログリアを処理した際の遺伝子発現について解析した。以下結果を要約すると、

(a) マイクログリアの活性化を反映するとされる遺伝子マーカー群の評価

例えば、Resting 型マイクログリアの1つの指標とされる P2Y12 については、野生型 SOD1 処理サンプルで発現が高く、Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 添加例では、野生型と比較してそのレベルは低い結果であった。一方、Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 添加例では、野生型 SOD1 添加マイクログリアと比較して、MHCII が高い結果であった。これらの結果から、P2Y12 および MHCII の発現レベルの観点からは、野生型に比べ Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 添加マイクログリアでは、より活性化型になっていることが明らかとなった。

(b) 炎症性サイトカイン群の発現制御

Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 処理マイクログリアにおいて、種々のインターロイキンをはじめとする inflammatory factors の著しい発現上昇を示した。一方、野生型 SOD1 においてはこれとは異なる結果であった。但し、野生型 SOD1 添加マイクログリアについても一部 Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 添加マイクログリアの変化の方向の一致する遺伝子を認めた。この結果から野生型 SOD1 も状態によっては Mutant SOD1 と同様の作用を示すことが示唆された。

(c) HGF-c-Met cascade 遺伝子群の発現変化

詳細なパスウェイ解析の結果、Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 添加により野生型 SOD1 添加に比べて c-Met と、HGF-c-Met 活性化経路の遺伝子発現が変化していることが明らかとなった。このことから、Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 添加によるマイクログリアへの作用の一部は HGF-c-Met 系の修飾により担われている可

能性が示唆された。

(d) 野生型 SOD1 の各分画のマイクログリアへの遺伝子発現プロファイル修飾の可能性

野生型 SOD1 の各分画（研究協力者である兵庫医大藤原准教授、大阪大学谷口直之名誉教授らにより調整）の添加で遺伝子発現プロファイルが異なっていた。特に resting マイクログリアのマーカーの1つである P2Y12 や各種サイトカインおよび増殖因子の発現が修飾された。この結果から、同じ野生型 SOD1 であっても、その分子の状態によりマイクログリアへの添加時の作用に差があることが明らかとなった。

D. 考察

(1) Mutant SOD1<sup>G93A</sup> のマイクログリアの形態変化と遺伝子発現修飾と病態生理学的意義—野生型 SOD1 およびその分画のマイクログリアへの遺伝子発現修飾

Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 処理による pure な初代培養マイクログリアに対する形態変化と遺伝子プロファイリングを施行した。その結果、野生型 SOD1 においても分画により Mutant SOD1<sup>G93A</sup> の添加時と同様の形態をとる Fraction を認めた。SOD1 の酸化状態を含め野生型 SOD1 においても Mutant と同様の作用を示す可能性が示唆され、Mutation による病態への寄与の分子基盤を解明する上で重要な知見となった。今後さらに詳細の解析を進めることでより明らかにしていきたい。一方、遺伝子プロファイリングの観点でみると、Mutant SOD1<sup>G93A</sup> 添加により種々の因子の発現制御が明らかとなったが、中でも炎症性サイトカインの発現制御が著しかった。これらの本研究結果は、変異 SOD1 がマイクログリアを活性化させると同時に各種サイトカインを産生、放出することで ALS 病態進行過程において cell autonomous な運動ニューロン毒性の修飾に寄与する可能性を支持している。

## (2) HGF-c-Met 系を介した意義

一方で、私達は多機能性増殖因子である肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) が、運動ニューロンに対する強力な神経栄養活性をもつことから、HGF による ALS の病態進行阻止、改善効果について検討してきた。HGF を遺伝子工学的あるいは蛋白質工学的に供給すると、ALS モデルトランスジェニック動物の病態進行が遅延し、運動機能の改善および寿命の延長効果が得られることを示してきた (Sun, Funakoshi *et al.*, 2002; Kadoyama, Funakoshi *et al.*, 2007; Ishigaki, Aoki *et al.*, 2007; Kadoyama, Funakoshi *et al.*, 2009)。これらの解析から、HGF は運動ニューロンに対する直接的神経栄養作用を示すことに加えて、グリア細胞の中でもアストロサイトおよびミクログリアのグリオシスを抑制し、さらにはアストロサイトの機能改善効果 (グルタミン酸トランスポーター EAAT2/GLT-1) を示すことを報告し、現在 ALS への臨床適用を目指し、安全性試験および Pharmacokinetics 解析の最終段階を実施中である。これらの背景から本研究でミクログリア細胞における HGF-c-Met cascade 系の一部の遺伝子に発現変化を認めたことから、ALS 病態過程において少なくともミクログリアの一部の subpopulation における HGF-c-Met 系の制御が ALS 病態修飾への意義をもつ可能性が示唆された。今後、HGF-c-Met 系の遺伝子変化の意義も明らかにしていきたい。

## E. 結論

Mutant SOD1<sup>G93A</sup> と野生型 SOD1 の初代培養ミクログリア細胞の遺伝子発現修飾を網羅的に評価した。その結果、ミクログリアの活性化マーカーや各種サイトカインの発現が大幅に修飾されることが明らかとなった。さらに HGF-c-Met 系の発現も修飾された。HGF-c-Met 系を修飾する等、ALS におけるミクログリアの遺伝子発現変化を有利に修飾できたら、発症後の ALS 病態

改善に寄与するものと期待される。

## F. 健康危険情報

特記なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kadoyama K, Funakoshi H, Ohya-Shimada W, Nakamura T, Matsumoto K, Matsuyama S, Nakamura T. Disease-dependent reciprocal phosphorylation of serine and tyrosine residues of c-Met/HGF receptor contributes disease retardation of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res.* 65(2): 194-200, 2009.
- (2) Kanai M, Nakamura T, 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.* 64(1): 111-7, 2009.
- (3) Hocking JC, Hehr CL, Bertolesi G, Funakoshi H, Nakamura T, McFarlane S. LIMK1 acts downstream of BMP signaling in developing retinal ganglion cell axons but not dendrites. *Dev Biol.* 330(2): 273-85, 2009.
- (4) Kanai M, Funakoshi H, Takahashi H, Hayakawa T, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol Brain.* 2(1): 8, 2009.
- (5) Tanaka, S., Miyata, T., Fujita, T., Kawahara, E., Tachino, K., Funakoshi, H., Nakamura, T. Differing responses of satellite cell activity to exercise training in rat skeletal muscle. *Neurosci. Res.* 65 (2), 194-200, 2009.
- (6) 船越 洋、神経栄養因子・再生因子による神経疾患の疾患進行・再生の分子機構の解析と適用、ブレインサイエンス・レビュー2010、in press.
- (7) 野間 さつき、船越 洋、中村 敏一、肝細胞増殖因子 (HGF) : HGF levels in serum,