

200936074A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築

(H21-難治-一般-019)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 祖父江 元

(名古屋大学大学院医学系研究科教授)

平成 22 (2010) 年 3 月

目次

I. 総括研究年度終了報告	
筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に 関する研究	
祖父江 元	1
II. 分担研究年度終了報告	
1. 筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に 関する研究	
青木 正志	5
2. 筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に 関する研究	
森田 光哉	8
3. 筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に 関する研究	
和泉 唯信	9
4. 筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に 関する研究	
田中 章景	11
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	15

I. 総括研究年度終了報告

筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に関する研究

研究代表者 祖父江 元

名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 教授

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）について、患者の十分なインフォームドコンセントのもとで DNA および B-cell line 化した細胞を大規模に保存し、ALS 遺伝子・生体試料リソースを構築した。これまでに 378 例の登録、試料保存を行い、3 つの解析研究に検体を提供した。今後、我が国発の ALS 研究を支える貴重な研究リソースとなりうる。

<研究分担者>

青木 正志 東北大学病院神経内科講師
森田 光哉 自治医科大学内科学講座
神経内科学部門講師
和泉 唯信 徳島大学病院臨床神経科学
診療支援医師
田中 章景 名古屋大学大学院医学系
研究科准教授

研究の対象は神経内科医が ALS と診断し本人に告知した患者とした。各実施医療機関において文書による同意の得られた患者から採血を行い、連結可能匿名化を行った後、外部委託施設に血液検体を送付し、DNA 抽出および B-cell line 化を行った。処理された検体は名古屋大学大学院医学系研究科内に設置する検体保存センターにて保管した。既知の ALS 関連遺伝子多型の検索を行った際に、SOD1 遺伝子変異など家族性 ALS を引き起こしうる遺伝子異常が万が一発見された場合、その結果を知りたいかどうか文書での同意の際に確認するものとした。もし希望があれば、主治医を通じてその結果を知らせる形とし、必要に応じて遺伝カウンセリングによる支援を行った。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は根治的治療法の存在しない神経難病である。ALS 患者のゲノム遺伝子を大規模に蓄積し、ALS の発症、病像の多様性、進行などに影響する遺伝子多型を探索し、その生物学的意義を確認していく研究は病態解明の突破口になりうる。本研究は神経変性疾患に関する調査研究班（神経変性班）におけるプロジェクト（JaCALS）で収集された ALS 患者遺伝子リソースをもとにさらなる検体の蓄積を行い、我が国の研究者が共同で利用可能な研究資源を構築することを目的とした。

医師による臨床評価は、発症年齢、病型、初発症状、肺活量、筋力低下の分布と程度、上位および下位運動ニューロン障害の分布、針筋電図所見、重症度、眼球運動障害、感覚障害の有無、各処置の導入時期などにつき行った。改訂版 El Escorial 診断基準による診断を検証できるようにした。臨床データシートは DNA

B. 研究方法

と同じ匿名符号を付記され、連結可能匿名化された状態で各実施医療機関から中央事務局に送付され、データベースに入力した。

ALSに罹患しておらず、患者と血縁関係ではなく、文書での同意が得られた人について採血を行い正常対照検体とした。正常対照検体については連結不可能匿名化の状態外部委託施設に送付し、DNA抽出およびB-cell line化を行った。

検体保存センターにおいてDNAは凍結保存、B-cell lineについては液体窒素保管容器内で保存した。神経変性班において実施しているJaCALSにも登録している患者の場合、匿名符号は共通とし、検体はJaCALSの前向き臨床情報と結びつけて解析可能な状態とした。

以上のようにして構築した匿名化された検体リソースは、我が国の研究者に開かれたものとした。神経変性班および本研究参加施設に属する研究者の中から運営委員会を組織し、検体リソースは運営委員会が管理した。解析研究プロジェクトは、その研究計画を運営委員会が審査し、検体提供の是非を判断した。解析研究計画は解析担当施設倫理委員会の承認を前提とした。

神経変性班関連施設において、既にALSとの関連が示唆されている遺伝子について遺伝子多型のスクリーニング解析を開始した。また、それらの生物学的意義を確認する基礎的研究を進めた。SNPs等の遺伝子多型を用いたゲノムワイドALS病態関連遺伝子探索に対しても検体を提供した。ゲノムワイド遺伝子多型解析は神経変性班関連施設での実施以外に、理化

学研究所ゲノム科学総合研究センターとの共同研究を推進した。

（倫理面への配慮）

すべての研究参加者に十分な説明を行い、文書での同意を取得し、各実施医療機関内での連結可能匿名化を行った。研究計画はすべての研究実施施設で倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

全国21施設で検体登録可能な体制を構築した。現在までに378例の筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者を登録（JaCALS）し、同数のゲノムDNAを保存した。JaCALSにおいて蓄積された遺伝子リソースについて、運営委員会での審査に基づき独立行政法人理化学研究所ゲノム医科学研究センターにおけるゲノムワイド関連解析、自治医科大学神経内科における既知のALS関連遺伝子異常スクリーニング、徳島大学医学部神経内科における新規ALS関連遺伝子候補のバリデーションの3つのプロジェクトに匿名化されたALS患者DNAを提供し、共同研究を推進した。これらのうちゲノムワイド関連解析では新規のALS関連遺伝子多型候補が抽出され、論文投稿の準備が進んでいる。

D. 健康危険情報

特記なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F,

Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. *J Biol Chem.* 2009;284:22059-66.

Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 2010;88:123-35.

Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G; Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009;276:163-9.
Kamada M, Maruyama M, Tanaka E, Morino H, Wate R, Ito H, Kusaka H, Kawano Y, Miki T, Nodera H, Izumi Y, Kaji R, Kawakami H: Screening for TARDBP mutations in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009;282: 69-71

田中章景, 坂野晴彦, 井口洋平, 勝野雅央, 祖父江元 【神経疾患治療の進歩】
運動ニューロン疾患の治療の進歩 神経治療学 26 巻 4 号 Page471-475(2009)

坂野晴彦, 勝野雅央, 鈴木啓介, 井口洋平, 足立弘明, 田中章景, 祖父江元
【神経・筋疾患の分子標的治療】 運動ニューロン疾患の分子標的治療 BRAIN and

NERVE: 神経研究の進歩 61 巻 8 号
Page891-900(2009)

勝野雅央, 坂野晴彦, 鈴木啓介, 足立弘明, 田中章景, 祖父江元【神経変性疾患研究の新機軸 その新たな研究戦略が謎を解く】 運動ニューロン疾患の病因解析と治療法の開発 細胞工学 28 巻 5 号
Page456-460(2009)

青木正志、運動ニューロン疾患 最近の治療薬の開発の現状は、EBM 神経疾患の治療、中外医学社 324-9 (2009-2010)

F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得

出願 1 件 「筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 感受性遺伝子の同定」祖父江元 (共同出願)

2. 実用新案登録 特記なし

3. その他 特記なし

Ⅱ. 分担研究年度終了報告

筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に関する研究

研究分担者 青木正志 東北大学病院神経内科 講師

研究要旨

〔目的〕筋萎縮性側索硬化症(ALS)は上位および下位運動ニューロンを侵す神経変性疾患であり、一部は superoxide dismutase 1 (SOD1) などの遺伝子変異による家族性 ALS であることが知られている。最近 Fused in sarcoma/translated in liposarcoma 遺伝子(*FUS/TLS*, 以下 *FUS*)の変異が家族性 ALS の原因として報告された。本研究では遺伝子バンクの構築にあたり、日本人家族性 ALS における *FUS* 異常の頻度の検討を行った。〔方法〕東北大学ではこれまでに家族性 ALS 79 家系の遺伝子を集積している。この中で SOD1 変異が見つかった 14 家系を除き、常染色体優性遺伝の遺伝形式を持つ 54 家系について *FUS* の全エクソンのスクリーニングを行った。〔結果および考察〕今回遺伝子解析を行った家族性 ALS 54 家系中 5 家系に *FUS* 異常を認めた。5 世代にわたって臨床像の詳細を知ることができた *FUS* の R521C 変異に伴う大家系では 46 人のうち半分にあたる 23 人が家族性 ALS を発症しており浸透率は 100%と非常に高いと考えられた。平均 35.3 歳で筋力低下を発症し、死亡年齢は 37.2 歳であり病期の進行も急速であった。典型例の剖検所見では運動ニューロンの変性のみならず脳幹被蓋部の著明な萎縮を認めた。さらに脳幹部の神経細胞内に好塩基性の封入体を認め、ユビキチン陽性、TDP-43 陰性であった。〔結論〕日本人家族性 ALS において *FUS* 遺伝子変異は比較的高頻度に認められた。遺伝子バンクを構築していく過程において家族性 ALS の原因遺伝子をスクリーニングしていくことが重要である。

研究協力者

鈴木直輝、割田 仁、糸山泰人
(東北大学大学院医学系研究科神経内科)

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は上位および下位運動ニューロンを侵す神経変性疾患であり、10%前後が superoxide dismutase 1 (SOD1) など 10 以上の遺伝子変異による家族性 ALS であることが知られている。それ以外の約 90%を占める症例は孤発性であり、原因は不明のままである。近年の遺伝学的研究の進歩により、孤発性症例多数例のゲノムワイド遺伝子解析により疾患感受性遺伝子の同定が進められている。このためには全国的な研究組織による臨床情報を伴った遺伝子バンクの構築が必要である。本研究は神経難病である ALS の病態解明に結びつく可能性が高く、その成

果は国民の医療および福祉の向上に直接結びつき、期待される社会的貢献度は大きいものと考えられる。

一方、家族性 ALS 症例の原因遺伝子として最近最近 Fused in sarcoma/translated in liposarcoma 遺伝子(*FUS/TLS*, 以下 *FUS*)の変異がアフリカ、ヨーロッパ、アメリカの各人種において家族性 ALS の原因として報告された。本研究では遺伝子バンクの構築にあたり、日本人家族性 ALS における *FUS* 異常の頻度の検討を行った。

B.研究方法

東北大学ではこれまでに家族性 ALS 79 家系の遺伝子を集積している。この中で SOD1 変異が見つかった 14 家系を除き、常染色体優性遺伝の遺伝形式を持つ 54 家系について *FUS* の全エクソンのスクリーニングを行った。自験の大家系について

各症例の臨床像を検査・画像所見を含めて詳細に調査し臨床経過を検討した。本家系での剖検例について形態学的・免疫組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

個人を同定できない形で発表し、個人情報には鍵のかかる戸棚に保管、DNA は連結可能匿名化で保存している。東北大学倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

遺伝子解析を行った 5 家系に *FUS* 異常(S513P, K510E, R521C, R514S, H517P) を認めた。家族性 ALS79 家系のうちの 5 家系は 6.3 %を占めていることになる。5 世代にわたって臨床像の詳細を知ることができた *FUS* の R521C 変異に伴う大家系では 46 人のうち半分にあたる 23 人が FALS を発症しており浸透率は 100%と非常に高く見積もられた。35.3 歳で筋力低下を発症し、構音障害、嚥下障害、筋痙縮や筋萎縮を呈する。平均死亡年齢は 37.2 歳であり人工呼吸器を必要とするまで平均 23 ヶ月と若年発症・急速進行性の経過を取ることがわかった。

R521C 変異例の剖検所見: 剖検時 40 歳、全経過は 9 年 2 か月。脳重量は 1170g で、肉眼所見では脊髄・錐体路の萎縮は対称性に高度に見られた。中脳被蓋の萎縮も顕著であった。組織学的には、通常の ALS の所見に加え、中脳被蓋の萎縮、黒質、青斑核、視床下核、淡蒼球(特に内節)にも広範に変性脱落の所見が見られた。脊髄でも運動ニューロンの著明な減少に加え、後索は淡明化し、中でも middle root zone の脱落が高度であった。多系統にわたる神経変性が特徴であると考えられた。さらに脳幹部の神経細胞内に好塩基性の封入体を認め、ユビキチン陽性、TDP-43 陰性であった。*FUS* の染色性は細胞質により強く認められた。

D. 考察

FUS 変異を伴う ALS の発症様式は、球麻痺から来るもの四肢から来るものなど様々だが、共通して 30 から 40 代と若年発症であるという点が挙げられる。また、人工呼吸器が必要となるまでの disease duration は 2 年弱と病気の進行が非常に早いことも特徴である。変異部位は *FUS* の C 末端部分に集中しており、R521C は全世界で共通してみられる重要な変異である。

中脳被蓋で見られた basophilic inclusion は TDP43 陰性であり basophilic inclusion body disease (BIBD) という病理学的疾患概念に含めることができる。過去に報告された BIBD の剖検脳で高頻度に *FUS* 陽性の細胞質封入体が見られたという論文(Munoz et al.)があり臨床診断は FTD with behavioral disturbance などとなっているが、7 例中 6 例は最終的に motor neuron disease の所見を呈していたとされる。本家系の剖検所見は脳幹部の basophilic inclusion body の存在が特徴であるとして既に 2001 年に土谷邦秋らのはじめての家族性 BIBD として報告している。免疫組織化学ではユビキチン・タウ・ニューロフィラメントも陰性であったと記載しており、厳密な意味からも BIBD の範疇に含まれる家系であり、初めての *FUS* 変異を伴った BIBD 症例であった。*FUS* 関連疾患と TDP43 関連疾患との関係性の解明も今後の重要な課題である。

E. 結論

日本人家族性 ALS において *FUS* 変異は 79 家系中 5 家系 (6.3 %) であり、比較的高頻度に認められた。遺伝子バンクを構築していく過程において家族性 ALS の原因遺伝子をスクリーニングしていくことが重要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2.学会発表

鈴木直輝、青木正志ら：若年発症・急速進行・好塩基性封入体を特徴とし FUS/TLS に変異を持つ日本人家族性筋萎縮性側索硬化症の3家系. 第54回日本人類遺伝学会（2009年9月24日 於：東京）

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

なし

筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に関する研究

研究分担者 森田光哉

自治医科大学 内科学講座 神経内科学部門 講師

研究要旨

ALS の自然歴を明らかにするとともに、発症・進行・予後に影響を及ぼす因子を解析するため、ALS の臨床・遺伝情報を統合したバンクをつくることを目的とした。

当施設より 34 症例の登録を行い、定期的に臨床情報の評価を行っている。

A. 研究目的

ALS も自然歴を明らかにするとともに、発症・進行・予後に影響を及ぼす因子を解析する。また ALS の臨床・遺伝情報を統合したバンクをつくることを目的とする。

Chizuru Akimoto, Mitsuya Morita, Imaharu Nakano: High resolution melting (HRM) analysis for mutation screening of the Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) gene. American Academy of Neurology 61st Annual Meeting, April 25-May 2, 2009, Seattle, USA

B. 研究方法

同意を得た患者の臨床評価を 3 ヶ月に一度行い、また血液については連結可能匿名化した上で遺伝子バンクに保存する。

研究の開始前に、当施設の遺伝子解析倫理委員会に申請を行い許可を得た。

Chizuru Akimoto, Mitsuya Morita, Imaharu Nakano: High resolution melting (HRM) analysis for mutation screening of the Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) gene. 19th World Congress of Neurology, 24-30 October, 2009, Bangkok, Thailand

C. 研究結果

34 名の方より同意を取得し、血液を遺伝子バンクへ送付した。また臨床症状については定期的に評価を行っている。

Chizuru Akimoto, Mitsuya Morita, Imaharu Nakano: SPG4 mutations in a collection of Japanese patients with hereditary spastic paraplegia. 20th international symposium on ALS/MND, 8-10 December, 2009, Berlin, Germany.

D. 健康危険情報

特に問題となることはない

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

F. 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

筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に関する研究

研究分担者 和泉唯信
徳島大学病院神経内科 診療支援医師

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の自然歴、遺伝子バンク構築のための多施設共同研究（JaCALS）に64名のALS患者の協力を得た。全例で遺伝子バンクに参加をいただいた。この研究に付随して受診の状況も調査したが70歳以上で発症の患者の方が70歳未満で発症の患者に比べて当院への受診が遅い傾向にあった。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の自然歴、遺伝子バンク構築のための多施設共同研究（JaCALS）に参加した患者の状況を評価する。

B. 研究方法

当院に受診したALS患者にJaCALSのシステムを説明する。参加に同意された患者を発症年齢70歳未満の群と70歳以上の群に大別し臨床症状、受診状況を比較する。

（倫理面への配慮）

JaCALSへの参加は自由意志とする。また、同意の撤回を妨げない。

C. 研究結果

2007年7月から2009年12月まででJaCALSに登録したALS患者は64名。70歳未満発症群は47名、70歳以上発症群は17名であった。男女比はそれぞれ29:18、8:9であり、高齢発症で性差が少ない傾向にあった。発症部位は70歳未満発症群で、球症状9名、上肢19名、下肢18名、体幹1名であり、70歳以上発症群では、球

症状7名、上肢2名、下肢8名、体幹0名で、高齢発症で下肢発症、球症状発症の割合が高い傾向にあった。発症から当院受診までの期間はそれぞれ13.6、16.6ヶ月であった。当院受診時のALS Functional Rating Scale (ALSFRS)は70歳未満発症群36.5、70歳以上発症群33.4であった。70歳以上発症の方で受診がより遅れる理由として、医師及び患者とも専門病院への紹介や受診に消極的な事が考えられた。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

Kamada M, Maruyama M, Tanaka E, Morino H, Wate R, Ito H, Kusaka H, Kawano Y, Miki T, Nodera H, Izumi Y, Kaji R, Kawakami H: Screening for TARDBP mutations in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurological Sci 284: 69-71, 2009.

2. 学会発表

織田雅也, 和泉唯信, 日地正典, 伊藤聖,

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
（分担）研究年度終了報告書

野寺裕之，梶龍兒，西尾久英：Survival
motor neuron 2 遺伝子のホモ接合型欠損
を認めた下位運動ニューロン疾患の1例。
第86回日本神経学会中国・四国地方会，
広島，2009年6月。

F. 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

筋萎縮性側索硬化症患者の遺伝子・生体試料バンクの構築に関する研究

田中 章景

名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 准教授

研究要旨

名古屋大学医学部附属病院において、筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者の十分なインフォームドコンセントのもとで、DNA および B-cell line 化した細胞を大規模に保存し、ALS 遺伝子・生体試料リソースを構築した。これまでに 97 例の登録、試料保存を行い、運営委員会の管理のもと活用できる体制を整えた。

A. 研究目的

神経変性疾患に関する調査研究班（神経変性班）におけるプロジェクト（JaCALS）で構築された ALS 患者遺伝子リソースシステムを拡大発展させ、我が国の研究者が共同で利用可能な研究資源を構築することを目的とした。

B. 研究方法

研究の対象は神経内科医が ALS と診断し本人に告知した患者とした。各実施医療機関において文書による同意の得られた患者から採血を行い、連結可能匿名化を行った後、外部委託施設に血液検体を送付し、DNA 抽出および B-cell line 化を行った。処理された検体は名古屋大学大学院医学系研究科内に設置する検体保存センターにて保管した。既知の ALS 関連遺伝子多型の検索を行った際に、SOD1 遺伝子変異など家族性 ALS を引き起こしうる遺伝子異常が万が一発見された場合、その結果を知りたいかどうか文書での同意の際に確認するものとした。もし希望があれば、主治医を通じてその結果を知らせる形とし、必要に応じて遺伝カウ

セリングによる支援を行った。

医師による臨床評価は、発症年齢、病型、初発症状、肺活量、筋力低下の分布と程度、上位および下位運動ニューロン障害の分布、針筋電図所見、重症度、眼球運動障害、感覚障害の有無、各処置の導入時期などにつき行った。改訂版 El Escorial 診断基準による診断を検証できるようにした。臨床データシートは DNA と同じ匿名符号を付記され、連結可能匿名化された状態で各実施医療機関から中央事務局に送付され、データベースに入力した。

ALS に罹患しておらず、患者と血縁関係ではなく、文書での同意が得られた人について採血を行い正常対照検体とした。正常対照検体については連結不可能匿名化の状態外部委託施設に送付し、DNA 抽出および B-cell line 化を行った。

検体保存センターにおいて DNA は凍結保存、B-cell line については液体窒素保管容器内で保存した。神経変性班において実施している JaCALS にも登録している患者の場合、匿名符号は共通とし、検体は JaCALS の前向き臨床情報と結び

つけて解析可能な状態とした。

（倫理面への配慮）

すべての研究参加者に十分な説明を行い、文書での同意を取得し、各実施医療機関内での連結可能匿名化を行った。研究計画はすべての研究実施施設で倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

名古屋大学医学部附属病院において、2010年2月までに97例のALS患者を登録し、同数のゲノムDNAおよび株化細胞を保存した。これらは本研究プロジェクトにおける共通のリソースの一部として、運営委員会の管理のもとで広く活用できる体制を整えた。

D. 健康危険情報

特記なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. *J Biol Chem.* 2009;284:22059-66.

Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.*

2010;88:123-35.

Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G; Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009;276:163-9.

田中章景, 坂野晴彦, 井口洋平, 勝野雅央, 祖父江元 【神経疾患治療の進歩】運動ニューロン疾患の治療の進歩 *神経治療学* 26 巻 4 号 Page471-475(2009)

坂野晴彦, 勝野雅央, 鈴木啓介, 井口洋平, 足立弘明, 田中章景, 祖父江元 【神経・筋疾患の分子標的治療】運動ニューロン疾患の分子標的治療 *BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩* 61 巻 8 号 Page891-900(2009)

勝野雅央, 坂野晴彦, 鈴木啓介, 足立弘明, 田中章景, 祖父江元 【神経変性疾患研究の新機軸 その新たな研究戦略が謎を解く】運動ニューロン疾患の病因解析と治療法の開発 *細胞工学* 28 巻 5 号 Page456-460(2009)

F. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

特記なし。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

祖父江 元 (名古屋大学大学院医学系研究科)
 青木 正志 (東北大学病院神経内科)
 森田 光哉 (自治医科大学内科学講座神経内科学部門)
 和泉 唯信 (徳島大学病院神経内科)
 田中 章景 (名古屋大学大学院医学系研究科)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G	Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurosci Res.	88	123-35	2010
Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G	TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases.	J Biol Chem.	284	22059-66	2009
Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G	Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurol Sci	276	163-9	2009
Kamada M, Maruyama M, Tanaka E, Morino H, Wate R, Ito H, Kusaka H, Kawano Y, Miki T, Nodera H, Izumi Y, Kaji R, Kawakami H	Screening for TARDBP mutations in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis.	J Neurol Sci	284	69-71	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Dorfin Ameliorates Phenotypes in a Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Jun Sone,¹ Jun-ichi Niwa,^{1,2} Kaori Kawai,¹ Shinsuke Ishigaki,¹ Shin-ichi Yamada,¹ Hiroaki Adachi,¹ Masahisa Katsuno,¹ Fumiaki Tanaka,¹ Manabu Doyu,^{1,2} and Gen Sobue^{1*}

¹Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

²Department of Neurology and Stroke Center, Aichi Medical University, Aichi, Japan

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease that is characterized by progressive motor neuron degeneration and leads to death within a few years of diagnosis. One of the pathogenic mechanisms of ALS is proposed to be a dysfunction in the protein quality-control machinery. Dorfin has been identified as a ubiquitin ligase (E3) that recognizes and ubiquitinates mutant SOD1 proteins, thereby accelerating their degradation and reducing their cellular toxicity. We examined the effects of human Dorfin overexpression in G93A mutant SOD1 transgenic mice, a mouse model of familial ALS. In addition to causing a decrease in the amount of mutant SOD1 protein in the spinal cord, Dorfin overexpression ameliorated neurological phenotypes and motor neuron degeneration. Our results indicate that Dorfin overexpression or the activation or induction of E3 may be a therapeutic avenue for mutant SOD1-associated ALS. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Dorfin; ALS; G93A mutant SOD1; ubiquitin ligase; neurodegeneration

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive and fatal neurodegenerative disease characterized by progressive muscle atrophy, paralysis, and death within a few years of diagnosis (Rowland and Shneider, 2001). Several hypotheses for the pathogenesis of ALS have been proposed, including protein quality-control dysfunction, mitochondrial damage, oxidative stress, glutamate receptor abnormality, inflammation, neurotrophic factor deficiency, and activation of apoptosis (Julien, 2001; Boillee et al., 2006; Kabashi and Durham, 2006; Cassina et al., 2008). However, the pathogenic mechanism has not been clarified, and no effective therapy has been developed. Approximately 90% of ALS cases are sporadic (nonhereditary; SALS) and 10% are familial ALS (hereditary; FALS). About 20% of cases of FALS are due to mutations in Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1; Rosen et al., 1993; Hirano, 1996; Martin et al., 2007). Mutant SOD1 protein is thought to induce motor neuron degeneration by a gain of toxic function

rather than a loss of dismutase function (Bruijn et al., 1998; Boillee et al., 2006; Martin et al., 2007).

Sporadic and familial ALS present inclusion bodies composed of aberrant protein aggregates in the cytoplasm of residual motor neurons (Shibata et al., 1996; Ross and Poirier, 2004; Strong et al., 2005). Inclusions containing mutant SOD1 are found in the motor neurons of mutant SOD1-related FALS patients and mutant SOD1 transgenic (Tg) mice (Gurney et al., 1994; Shibata et al., 1996; Watanabe et al., 2001). Aberrant proteins such as mutant SOD1 are ubiquitinated (Alves-Rodrigues et al., 1998; Ardley and Robinson, 2004) and are thought to be degraded by the ubiquitin-proteasome system (Niwa et al., 2002; Urushitani et al., 2002; Goldberg, 2003; Kabuta et al., 2006; Cheroni et al., 2009). However, when the production of aberrant proteins exceeds the cellular degradation capacity, these proteins often form aggregates before they are degraded (Sherman and Goldberg, 2001; Goldberg, 2003).

The ubiquitin-proteasome system mediates post-translational modification and degradation of proteins and is essential for many fundamental cellular functions, including cell cycling, DNA repair, cell signaling, gene transcription, and apoptosis (Ardley and Robinson, 2004; Kabashi and Durham, 2006). Protein ubiquitination is an ATP-dependent process during which ubiquitin is sequentially activated by ubiquitin-activating enzymes (E1), transferred to ubiquitin-conjugating enzymes (E2),

Contract grant sponsor: 21st Century Center of Excellence (COE) grant and global COE grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; Contract grant sponsor: Ministry of Health, Welfare and Labor of Japan; Contract grant sponsor: Core Research for Evolutional Science and Technology.

*Correspondence to: Gen Sobue, MD, Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan. E-mail: sobueg@med.nagoya-u.ac.jp

Received 22 January 2009; Revised 20 May 2009; Accepted 24 May 2009

Published online 16 July 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.22175

and ligated to protein substrates by ubiquitin ligases (E3). Polyubiquitinated proteins are degraded by the 26S proteasome (Goldberg, 2003; Ciechanover, 2005). E3s are of particular importance insofar as they determine the targeting specificity of the ubiquitin-proteasome system (Ardley and Robinson, 2004).

Previously, we identified Dorfin as the product of a gene expressed in the anterior horn of the human spinal cord (Niwa et al., 2001). Dorfin contains a RING-finger/in-between-RING domain and functions as an E3. Dorfin is the first E3 reported to recognize mutant SOD1 proteins and to accelerate their degradation, thereby reducing their cellular toxicity in vitro (Niwa et al., 2002; Takeuchi et al., 2004). We have also shown that Dorfin is located in the inclusions found in spinal cord sections from SALS, FALS, and other neurodegenerative disease patients (Niwa et al., 2002; Hishikawa et al., 2003; Ito et al., 2003). These results suggest that Dorfin is involved in the protein quality-control system that addresses abnormal proteins related to neuronal degeneration. In particular, the results suggest that Dorfin acts in vivo as an E3, which reduces the level of mutant SOD1 aggregates and toxicity.

In this study, we demonstrate that transgenic overexpression of Dorfin ameliorated phenotypic expression in G93A mutant SOD1 transgenic mice and reduced the accumulation of mutant SOD1 in the spinal cord. These results suggest that Dorfin overexpression may be an effective treatment for mutant SOD1-related FALS.

MATERIALS AND METHODS

Generation and Maintenance of Tg Mice and Genotyping

Full-length human Dorfin cDNA (GenBank accession No. AB029316) tagged with the FLAG epitope was amplified by PCR and inserted into a pCMV-Tag2 vector (Stratagene, La Jolla, CA). FLAG-Dorfin was excised from the vector and inserted downstream of the chicken β -actin promoter in the pCAGGS vector (see Fig. 1A). We generated Dorfin Tg mice by microinjection of pCAGGS carrying FLAG-Dorfin into BDF1 fertilized eggs and obtained 20 founders. These founder mice were back-crossed to C57BL/6 mice. We screened mouse tail DNA by PCR for the presence of the Dorfin transgene using the primers 5-TTGATTTATATTTTGGC GATGC-3 and 5-ACCAGCCACCACCTTCTGATAG-3. The Dorfin transgene copy number in each line was determined by densitometric comparison of the Southern blot hybridization intensity of the DNA with known standards or quantitative real-time RT-PCR using the iCycler system (Bio-Rad, Hercules, CA) as previously described (Ishigaki et al., 2002). Transgenic mice overexpressing human SOD1 carrying a Gly93Ala mutation were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Transgenic progeny were identified by PCR using primers specific for human SOD1 (Gurney et al., 1994). Genotyping of mice was performed by PCR using mouse tail DNA. G93A mutant SOD1 Tg mice were maintained by crossing to F1 of C57BL/6 and SJL. We performed real-time quantitative PCR with mouse tail DNA

to estimate the mutant SOD1 copy number in each mouse. We calculated the ratio of mutant SOD1 relative to apolipoprotein B, an internal reference, and compared these results with those of founder mouse tail DNA known to have 25 copies of mutant SOD1 (Dal Canto et al., 1996) using the primer set 5'-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3' and 5'-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3' for mutant SOD1 and using the primer set 5'-GGCAAACACTTACGGGTCAT-3' and 5'-TTGGCTGTTAGAATGCTGGA-3' for apolipoprotein B. We excluded mice with a low copy number of mutant SOD1. We analyzed the Dorfin transgenic lines 513 and 526 of this mouse model in the present study.

To determine the potential neuroprotective role of Dorfin in ALS, we crossed hemizygous Dorfin Tg mice with hemizygous G93A mutant SOD1 Tg mice. This mating resulted in the generation of four groups of mice: 1) wild type, 2) Dorfin single transgenic mice (Dorfin Tg), 3) G93A single transgenic mice (G93A SOD1 Tg), and 4) Dorfin and G93A SOD1 double transgenic mice (Dorfin/G93A SOD1 double Tg). We compared littermates of G93A SOD1 Tg mice and Dorfin/G93A SOD1 double Tg mice using the following examinations, and we excluded the mice that died of symptoms unrelated to ALS such as injury by fighting each other, difficulty with the water feeding device, and trauma. The mice had ad libitum access to food and water on the bottoms of their cages during the light phase of the 12-hr light/12-hr dark cycle, as described previously (Adachi et al., 2001; Katsuno et al., 2003). All animal experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the care and use of laboratory animals* and were approved by the Nagoya University Animal Experiment Committee. All animal experiments were performed with the investigator blinded to genotype.

Assessment of Neurological Phenotype

We assessed the life span of the mice in each group. The end point of survival dates was defined as when an animal could not stand up within 30 sec after it was put on a flat board on both the right and the left sides. Rotarod performance was assessed by using an Economex Rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH). Three trials were performed at 5 rpm, and the longest duration that each mouse remained on the rod was recorded. The timer was stopped when the mouse fell from the rod or after an arbitrary limit of 300 sec.

The footprints of mice were collected as they walked on a straight line. Their front paws were painted with red ink and the hind paws with blue ink. Stride was measured within the area showing regular walking. The longest three strides of both hind paws were measured. Strides of mice that could not walk were measured as zero. Motor activity was analyzed at 10 weeks (presymptomatic stage), 14 weeks (early stage), and 18 weeks (end stage) of age.

Immunohistochemistry

Mice were exsanguinated under ketamine-xylazine anesthesia and transcardially perfused with 20 ml of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). Tissues were post-fixed overnight in 10% phosphate-buffered formalin and proc-