

optineurin 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症

研究分担者 梶 龍児¹⁾

研究協力者 和泉唯信²⁾、鎌田正紀²⁾、伊東秀文³⁾、丸山博文⁴⁾、川上秀史⁴⁾、JaCALS

1) 徳島大学臨床神経科学, 2) 徳島大学病院神経内科, 3) 京都大学神経内科,
4) 広島大学原爆放射線医科学研究所分子疫学

研究要旨

optineurin (OPTN) 遺伝子の Q398X ホモ接合体変異を認めた筋萎縮性側索硬化症の 2 例を経験した。臨床型は球型と四肢型（下肢発症）で同一遺伝子変異でありながら全く異なる臨床像であった。球型の方は剖検を得たが ALS に矛盾しない所見に加え線条体の変性を認めた。また Bunina 小体を認めない点が孤発性のものと異なる所見であった。JaCALS 提供の 267 例（254 例は孤発性）で OPTN 遺伝子を解析したが、すべての例において既報告の変異は認めなかった。

A. 研究目的

optineurin 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の 2 例を症例提示する。また、JaCALS から提供していただいた検体を用い OPTN 変異の頻度を検討した。

B. 研究方法

既に optineurin (OPTN) 遺伝子の exon12 に Q398X ホモ接合体変異を確認している筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の臨床像を比較する。

さらに ALS における OPTN 変異の頻度を検討する目的で JaCALS から提供していただいた 267 例（254 例は孤発性、そのうち 3 例は両親が血族結婚、13 例は家族性）を解析した。

（倫理面への配慮）遺伝子解析にあたっては文書を用いて説明を行い書面による同意を得た。

C. 研究結果

症例 1: 61 歳女性。既往歴は高血圧、緑内障（点眼薬にて治療中）。家族歴は両親がいとこ結婚、家系に ALS はいない。2001 年 3 月頃（51 歳時）からしゃべりにくさが出現し徐々に進行。52 歳時の神経学的所見では、発語は緩徐、脳神経系では舌に萎縮と fasciculation あり、運動系では筋力低下なし、下顎反射亢進、四肢深部反射亢進、Babinski 徴候陰性。経過：球型 ALS と診断し外来通院していた。2003 年 8 月頃には構音不能になった。さらに左上下肢の痙性麻痺が進行、遅れて右上下肢の痙性麻痺も進行した。強制笑い、強制泣きが著しい。認知症についてはその時期までは明らかに認めなかった。以後は評価が困難であったがコミュニケーションしている家族は末期まで「ぼけていない」と断言していた。2010 年 6 月呼吸不全で死亡し病理解剖を施行した。胸腹部では、肺の右中葉に出血を認める程度で死因は呼吸不全と考えられた。眼球は軽度の乳頭陥

凹を認めるが開放隅角緑内障に特徴的な病理学的変化を呈していなかった。脳重は 840g（身長 147cm）で肉眼的に中心前回の萎縮が著明であったが前頭葉萎縮は軽度であった。神経病理学的所見では、1) 細胞脱落と gliosis（高度：大脳皮質運動野、被殻；中等度：脊髄前角・舌下神経核・顔面神経核、淡蒼球；軽度：黒質）、2) 錐体路変性、3) 大脳皮質へのミクログリアの浸潤、4) 脊髄前角細胞細胞質内へのリン酸化 neurofilament の蓄積、5) 扁桃体・迂回回における grain と ballooned neuron、6) Braak tangle stage III を認めた。

症例 2: 44 歳女性。既往歴は脱腸、貧血。家族歴は両親に血族結婚なし、家系内に ALS はいない。2005 年 3 月頃に足を引きずるようになり近医で腰椎椎間板ヘルニアと診断された。さらに歩行障害が進行し某病院を受診し ALS と診断された。当院初診時の神経学的所見では、脳神経系は著変なし、運動系では、上下肢ともに左優位に中等度の筋力低下あり、下顎反射（±）、深部反射は上肢および膝蓋腱正常、アキレス腱反射亢進、病的反射なし。歩行は介助にてかろうじて可能。経過：2006 年年末に痰を詰まらせ入院した。2007 年 7 月の段階で NIP を 10 時間以上施行していた。2009 年 1 月に呼吸不全で死亡した。病理解剖は行われなかった。

上記 2 例とも OPTN 遺伝子の exon12 に Q398X ホモ接合体変異を認めた。

遺伝子解析は 267 例すべてで原著にて報告した変異は認められなかった。

D. 考察

OPTN 遺伝子の同一ホモ接合体変異を示した 2 例を経験したが、表現型は異なるもので共通点は認めなかった。これらの臨床像は孤発性のものと区別できず特徴的な所見も認めない。

OPTN 遺伝子は最初、開放隅角緑内障の原因遺伝子

として同定されたが (Rezaie T, et al. Science 2002)、ALS の原因遺伝子であることも判明した (Maruyama H, et al. Nature 2010)。症例 1 は緑内障を合併していたが病理所見からは開放隅角を示唆せずこの変異は緑内障の原因になっていないことを裏付けた。また症例 1 では診察上は判定が困難であったが、家族の話しからは認知症の合併が明らかでなかった。病理所見でも明白な認知症は呈していなかったと考えられた。

267 例の ALS において OPTN 遺伝子の既知変異は認めなかった。少なくとも孤発例における頻度は高くないと考えられた。

E. 結論

OPTN 遺伝子による ALS の臨床像は孤発性のものと区別できない。また、OPTN 遺伝子の ALS を疑わせる特徴的な臨床所見も認めない。神経病理所見は ALS の所見を認めるが孤発性のものとは異なる。OPTN 遺伝子変異は少なくとも孤発性 ALS においてはその頻度は高くない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H: Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature 465: 223-226, 2010.

2) Shibuta Y, Nodera H, Nodera A, Okita T, Asanuma K, Izumi Y, Kaji R: Utility of recovery cycle with two conditioning pulses for detection of impaired axonal slow potassium current in ALS. Clin Neurophysiol 121: 2117-2120, 2010.

2. 学会発表

寺澤由佳, 高松直子, 島谷佳光, 渋谷佳子, 浅沼光太郎, 和泉唯信, 梶龍兒: ALS 患者の線維束性収縮検出における超音波検査の有用性. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 2010 年 5 月.

H. 知的財産権の出願・登録情報 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

水疱性類天疱瘡を合併した筋萎縮性側索硬化症の5例

研究分担者 梶 龍兒¹⁾

研究協力者 和泉唯信¹⁾，浅沼光太郎²⁾，織田雅也³⁾，中根俊成⁴⁾，松尾秀徳⁴⁾

1) 徳島大学病院神経内科，2) 徳島大学臨床神経科学分野，

3) ビハーラ花の里病院神経内科，4) 長崎川棚医療センター・西九州脳神経センター

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の経過中に水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid: BP）を合併した5例を報告した。男性が3例，女性が2例，年齢は61～76歳で，ALSの罹病期間は3～10年であった。5例とも病期が進み日常生活動作が低下した状態でBPの合併を認め，2例は気管切開下陽圧換気（TPPV）の状態であった。リルゾールとの関連については，リルゾール開始後早期からBPを発症した例や，リルゾール長期内服中の合併でリルゾール中止により軽快し再開後に再燃した例などがみられたが，リルゾール投与歴のない2症例にもBP合併が認められた。ALSにおいてBPの合併率が高いという既報告もあり，ALSの病態そのものがBP合併に寄与している可能性があるが，その機序は未解明であり，今後の症例の蓄積が望まれる。

A. 研究目的

これまでに神経疾患と水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid: BP）との関連性について，両者の合併率が高いという報告がいくつかなされている。今回，筋萎縮性側索硬化症（ALS）にBPを合併した5例を報告する。

B. 研究方法

ALS経過中にBPの合併が見られた，3施設5症例の臨床像についてまとめた。

C. 研究結果

〔症例1〕61歳女性。58歳時に下肢の筋けいれん，筋力低下でALSを発症。61歳時，リルゾール内服開始後から手と前腕に皮疹が出現。リルゾールを1ヶ月で内服中止した後も皮疹（紅斑，緊満性水疱，びらんが散在）が遷延し，プレドニゾロン内服により軽快した。

血液検査では好酸球11.8%，IgE 2003.5mg/dL，抗BP180抗体54倍。病理組織所見では表皮真皮境界部に液状変性，表皮直下から真皮上層にリンパ球，好酸球の浸潤を認めた。蛍光抗体直接法で表皮基底膜部にIgG，C3の線状沈着を認めた。

〔症例2〕76歳男性。72歳時に両下肢遠位の筋力低下でALSを発症。73歳時よりリルゾール内服を開始。76歳時，両側手掌に紅斑を伴う水疱が出現し，新生を繰り返した。ステロイド治療により皮疹は軽減したが，合併症のため死亡した。

血液検査では好酸球12.0%，IgE 1646.2mg/dL，抗BP180抗体260倍。病理組織所見では表皮基底層に液状変性，表皮直下から真皮上層に好酸球の浸潤を認めた。蛍光抗体直接法で表皮基底膜部にIgG，C3

の線状沈着を認めた。

〔症例3〕72歳女性。69歳時に下肢筋力低下でALS発症。71歳の時点でリルゾール100mg/日内服中で，前胸部・下腹部に皮膚乾燥・褐色調変化が慢性的に認められ外用治療がなされていた。72歳時に，右足背・大腿後面に硬貨大の水疱が出現，外用で消退するが，様々な部位に繰り返し出現した。

水疱性湿疹発生から3ヶ月後に患者希望によりリルゾールを中止したところ，3週間には皮疹が軽快した。リルゾール中止後より筋けいれんが増え，希望によりリルゾールを再開した後から，再び両下肢の複数部位に水疱形成の出現と消退を反復した。

〔症例4〕64歳男性。54歳時に左下肢筋力低下でALSを発症。58歳時から気管切開下陽圧換気（TPPV）開始。64歳時，下腹部に中央は痂皮化し一部は膿瘍形成も認める毛細血管拡張性丘疹が多発し，ステロイド使用で改善するも再燃を繰り返した。リルゾール投与歴はなかった。

病理組織所見では，水疱内貯留物はなく好酸球の出現は軽度で，リンパ球を主とした血管周囲性の炎症細胞の出現を認めた。

〔症例5〕63歳男性。56歳時に左上肢筋力低下，構音障害でALSを発症。61歳時からTPPV開始。63歳時に四肢を中心に水疱形成と自壊を繰り返す皮疹が出現した。ステロイド使用で改善するも，頻回に反復した。リルゾール投与歴はなかった。

血液検査では抗BP180/230 IgG抗体陰性。病理組織所見では，表皮表層部に痂皮あり，水疱内貯留物を認め，好酸球浸潤が著明であった。真皮上層には血管周囲性にリンパ球，好中球，好酸球など炎症細胞の出現を認めた。

表 5 症例のまとめ

症例	年齢	性別	発症年齢	罹病期間	初発症状	リルゾール	状態
1	61	女	58	3	下肢	+	車椅子
2	76	男	72	4	下肢	+	寝たきり
3	72	女	69	3	下肢	+	寝たきり
4	64	男	54	10	下肢	-	TPPV
5	63	男	56	7	上肢・球	-	TPPV

D. 考察

BP は自己免疫性の水疱性湿疹であるが、最近では神経疾患において合併率が高いという報告が見られる (Taghipour K et al, Arch Dermatol 2010).

一部の BP は薬剤誘発性に出現する。ペニシラミン、フロセミド、抗けいれん薬などが誘因薬剤として比較的高頻度であるが、リルゾールの副作用としての BP の報告はない。今回の症例の中には、リルゾール開始後早期から BP を発症した例、リルゾール長期間服用中の合併でリルゾール中止により軽快し再開後に再燃した例などがみられ、一部の BP 合併にリルゾールの関与が否定できないケースが存在することが示唆された。

ALS と BP との合併頻度に関しては、フランスで行われたリルゾールの治験に際して、ALS 患者 168 例中 3 例 (実薬 1 例, プラセボ 2 例) で BP 発症を認め、その罹患率 1.8% は、同国における BP の有病率 7 人 / 100 万人と比較して非常に高率であったという報告がある (Chosidow O, Arch Dermatol, 2000).

BP における標的抗原である BP230, 180 は上皮以外に脳にも存在する。マウス脳抽出液を用いた免疫ブロット法を用いて BP230, 180 等の陽性率を調べた研究においては、BP と神経疾患を合併した患者では、神経疾患のみの患者、BP のみの患者、健常者に比べて有意に陽性率が高かったことが示されている。その機序は未解明であるが、神経系の変性により、同種抗原が存在する皮膚にも免疫学的反応が起こり、BP 合併に寄与する可能性が推測される。

E. 結論

経過中に BP を合併した ALS の 5 例を報告した。BP 合併にリルゾールの関与が示唆された例と、リルゾールの関与なく合併した例とがみられた。ALS の病態そのものが、BP 合併に寄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

和泉唯信, 宮城愛, 山本伸昭, 浅沼光太郎, 梶龍児: Riluzole 内服中に水疱性類天疱瘡を生じた ALS の 2 例. 第 28 回日本神経治療学会総会, 横浜, 2010 年 7 月.

H. 知的財産権の出願・登録情報 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

DJ-1 は変異 SOD1 と相互作用し、神経毒性を軽減する

研究分担者 内野 誠

研究協力者 山下 賢，森 麗，木村 円，前田 寧，平野照之
熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野

研究要旨

SOD1遺伝子変異は、蛋白ミスフォールディング、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害により、家族性筋萎縮性側索硬化症（ALS）を発症する。一方、家族性パーキンソン病PARK7の原因遺伝子であるDJ-1は抗酸化ストレス作用を有する。我々は変異SOD1マウス運動神経で全経過を通して、DJ-1蛋白レベルが亢進していることを示した。DJ-1は変異SOD1と全細胞溶解液中で複合体を形成し、DJ-1の過剰発現は、変異SOD1発現神経細胞においてアポトーシス抑制と酸化ストレス軽減により、細胞活性を増加し、毒性を軽減した。弧発性ALSおよび疾患対照患者由来の髄液中DJ-1レベルは、弧発性ALS患者において有意に高値を呈した。これらの結果はDJ-1が、弧発性および家族性ALS病態に共通して関与する可能性を示す。すなわち変異SOD1毒性に及ぼすDJ-1の影響を検討することは、ALSの運動神経変性に対する治療法開発に有用である。

A. 研究目的

ALS 全体の約 5-10% を占める家族性 ALS の一部は Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子の点変異によって発症することが明らかとなっているが、その発症メカニズムとして蛋白のミスフォールディングや酸化ストレス、ミトコンドリア機能異常などによる毒性獲得が推測されている。一方、家族性パーキンソン病 PARK7 の原因遺伝子である DJ-1 は、抗酸化ストレス作用や抗アポトーシス作用などを介して神経保護効果を有する。最近、この DJ-1 のホモ接合性のミスセンス変異 (E163K) を有する患者がパーキンソニズム、認知機能障害に加えて ALS 様の表現系を呈することが報告された。そこで我々は家族性および弧発性 ALS の病態における DJ-1 の関与について検討した。

B. 研究方法

変異 SOD1 マウスの脊髄運動神経における DJ-1 発現を免疫染色により経時的に評価した。野生型および変異型 SOD1 発現神経細胞において、DJ-1 と変異 SOD1 蛋白の相互作用および細胞の生存性を観察した。弧発性 ALS 患者髄液中の DJ-1 を疾患対照患者と比較した。

1) DJ-1 は変異SOD1 (G93A) マウス脊髄運動神経において発現亢進している。

変異SOD1 (G93A) マウスと正常対照 (NTG) マウスの脊髄運動神経におけるDJ-1発現の差異について検討した。DJ-1は、choline acetyltransferase (ChAT) 陽性脊髄運動神経に検出された。G93AマウスとNTGマウスの経時的なDJ-1発現レベルの変化を調査するために、無症候期 (AS、~2ヶ月齢)、症候早期 (BS、~4ヶ月齢) および末期 (ES、~5ヶ月齢) の各ステージを評価した。細胞当たりの平均シグナル強度による観察では、DJ-1レベルは無症候期のG93Aマウスにおいてすでに増加しており、症候期になるにつれて次第に増加した (図1)。DJ-1は酸化ストレス下に、よりミトコンドリアに移行することが報告されている (Canet-Aviles et al. 2004)。近年、変異SOD1は変異SOD1マウスの罹患脊髄においてミトコンドリアに移行することも明らかとなっている (Liu et al. 2004, Vande Velde et al. 2008)。そ

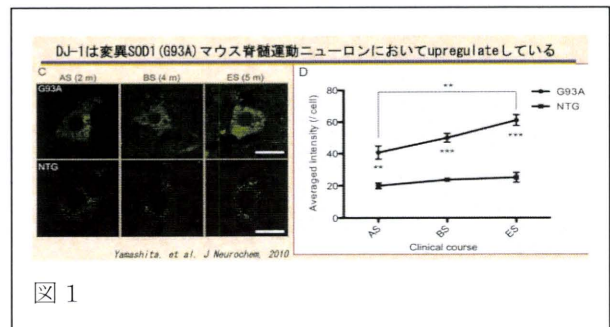


図 1

ここで変異SOD1とDJ-1が、G93Aマウスの脊髄運動神経において共局在をとるかどうかが検討した。DJ-1と変異SOD1の共局在は、G93Aマウスの脊髄運動神経においてより顕著であった。

2) 変異 SOD1 は DJ-1 と複合体を形成する。

DJ-1 と SOD1 の関連性を証明するために、野生型もしくは変異型 (G93A、G85R) SOD1 を発現する Neuro2a 細胞に対して SOD1 と DJ-1 の免疫染色を行った。G93A および G85R 変異 SOD1 は、内在性 DJ-1 と共局在を示した。免疫沈降実験では G93A および G85R 変異 SOD1 は、全細胞溶解液中で DJ-1 と複合体を形成した。この結果を確認するために *in vitro* GST プルダウンアッセイを行ったところ、GST-DJ-1 は G93A および G85R 変異 SOD1 を共沈した (図 2)。

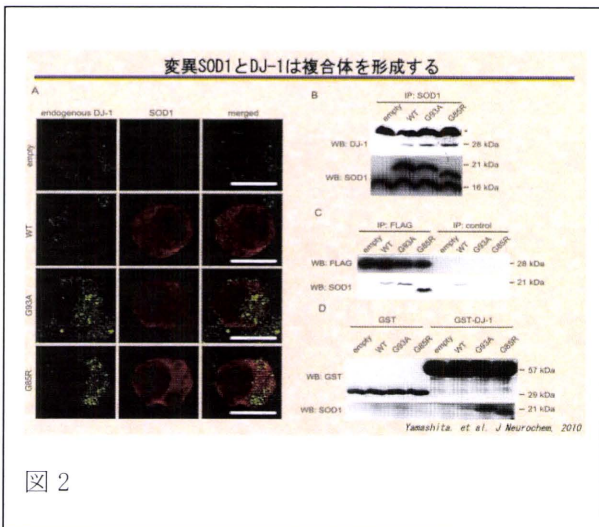


図 2

3) DJ-1 過剰発現は運動神経細胞死を軽減する。

DJ-1 過剰発現が、運動神経における変異 SOD1 による神経毒性を軽減する可能性を確認するために、野生型および変異型 (G93A、G85R) SOD1 を安定発現する細胞株を樹立した。これらの細胞を用いて、細胞活性を評価するために MTT アッセイを、またアポトーシスに陥った核を評価するために DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) 染色を行った。G93A および G85R 変異 SOD1 を発現する細胞では、野生型 SOD1 を発現する細胞に比較して、細胞活性の低下 ($P < 0.001$ by two-way ANOVA) とアポトーシスの増加 ($P < 0.001$ by two-way ANOVA) を認めた (図 3)。これらの各種 SOD1 発現細胞に DJ-1 もしくはコントロール

ベクターを発現し、細胞活性と細胞死を評価した。DJ-1 を過剰発現すると、MTT アッセイで変異 SOD1 による細胞活性の低下に対して保護効果が確認された (図 3)。DJ-1 の発現は DAPI 染色による観察において、G93A および G85R 変異 SOD1 を発現する細胞中のアポトーシスに陥った細胞の比率を低下させた (図 3)。

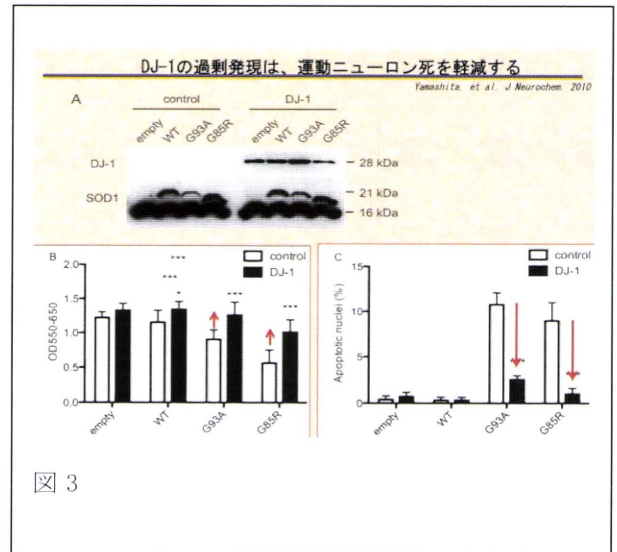


図 3

4) DJ-1 過剰発現は、変異 SOD1 発現細胞においてアポトーシスと酸化ストレスを軽減する。

DJ-1 は、Akt のリン酸化により PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) 機能を抑制することによって、細胞生存を促進することが報告されている (Sitaram *et al.* 2009)。そこで、DJ-1 が細胞内酸化ストレスを軽減すると共に、アポトーシス経路の活性化を改善することによって、変異 SOD1 による神経変性を保護する可能性を検討した。まず DJ-1 存在/非存在下の各種 SOD1 安定発現細胞における Bax (proapoptotic member of the bcl-2 family) レベルを定量した。DJ-1 存在下で、Bax レベルは有意に減少していた (図 4)。一方 Bcl-2 (antiapoptotic member of the bcl-2 family) レベルは、DJ-1 発現細胞において有意に増加していた。変異 SOD1 G85R 発現細胞では、Bcl-2 発現レベルは低い傾向にあった (図 4)。さらに DJ-1 は変異 SOD1 発現細胞においても内在性 Akt のリン酸化を促進した (図 4)。

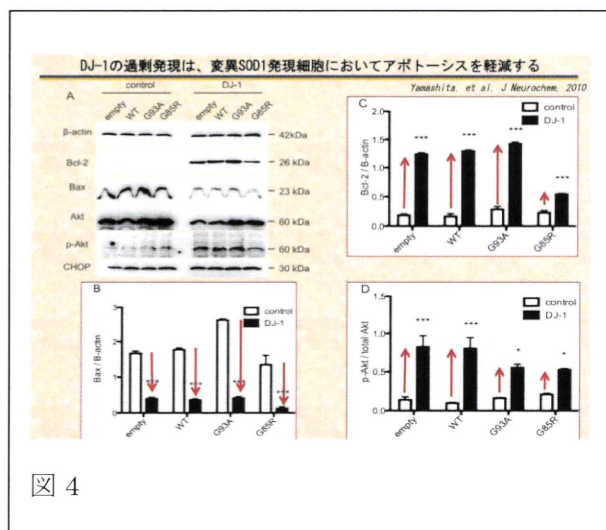


図 4

次に古典的な酸化ダメージの指標であるカルボニル化蛋白の検出を行った。変異 SOD1 (G93A および G85R) 発現細胞では、野生型 SOD1 やコントロール細胞と比較して高レベルのカルボニル化蛋白が検出された(図 5)。DJ-1 を過剰発現すると、これらのカルボニル化蛋白の増加は軽減された(図 5)。これらの所見は、変異 SOD1 による神経毒性に対して、DJ-1 が細胞内酸化ダメージを阻害することによって保護的に作用することを示唆する。

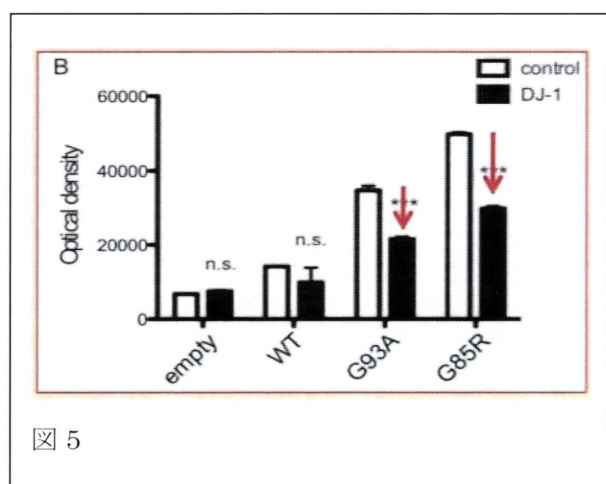


図 5

5) 髄液中 DJ-1 は、疾患対照患者と比較して弧発性 ALS 患者において増加している。

酸化ストレスは変異 SOD1 による家族性 ALS のみならず弧発性 ALS の病態においても、重要な関与が示唆されているため、弧発性 ALS 患者の髄液中でも DJ-1 レベルが変化している可能性が疑われる。この仮説を証明するために、弧発性 ALS (30 例) および非

ALS 疾患対照患者 (9 例) より脳脊髄液を採取し、ELISA 法によって DJ-1 レベルを定量した。弧発性 ALS 患者髄液中の DJ-1 レベルは 14.51 ± 0.76 ng/ml であり、対照患者髄液中の DJ-1 レベルは 9.62 ± 0.96 ng/ml であった。すなわち弧発性 ALS 患者髄液中 DJ-1 レベルは、対照患者に比して有意に増加していた ($P = 0.0022$) (図 6)。

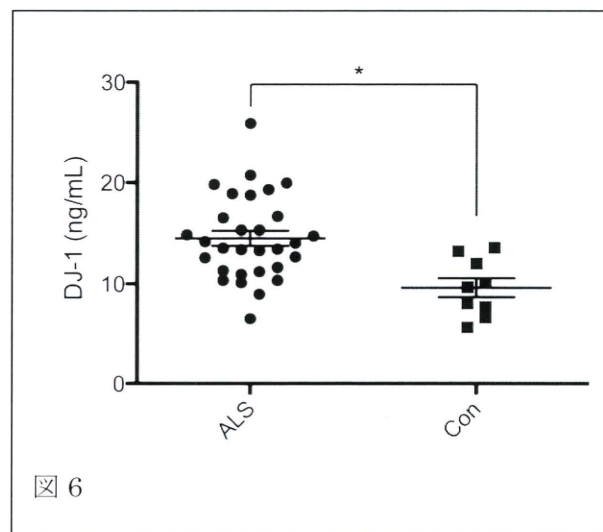


図 6

D. 考察

我々は、FALSマウスの脊髄運動神経において、全経過を通して DJ-1 蛋白レベルが増加していることを示した。生化学的手法により変異 SOD1 は、細胞内溶液中で DJ-1 と複合体を形成することを明らかにした。さらに、アポトーシス経路の改善と酸化ストレスの軽減によって、外来性 DJ-1 は変異 SOD1 発現神経細胞における細胞活性の増加と細胞毒性の軽減をもたらした。弧発性 ALS 患者髄液中の DJ-1 蛋白レベルは、疾患対照患者に比して有意に増加していた。

DJ-1 は Hsp31 に対する構造的類似性から、蛋白凝集を抑制するシャペロン機能を有することが報告されている (Lee *et al.* 2003, Wilson *et al.* 2004)。Zhou らは、酸化型 DJ-1 が有意に抗凝集作用を有することを示した (Zhou *et al.* 2006)。変異 SOD1 が DJ-1 と複合体を形成するという結果は、DJ-1 が酸化ストレスによって誘導される、変異 SOD1 の凝集を阻害するシャペロンとして機能する可能性を示唆するかも知れない。

Bandopadhyayらは、DJ-1の免疫反応性はヒト脳ではとくにアストロサイトとその突起に顕著であり、一方神経細胞ではDJ-1反応性はわずかであると報告している(Bandopadhyay et al. 2004)。最近の研究では、マクロファージ/ミクログリア内の変異SOD1は疾患の進行を促進することが示されている(Clement et al. 2003, Boillee et al. 2006, Yamanaka et al. 2008)。ALS患者髄液中のDJ-1レベルの増加は、グリア細胞における細胞毒性を反映しているかも知れない。髄液中DJ-1は脱髄性疾患やパーキンソン病患者においても検出されるため、髄液中DJ-1発現はALSの診断的マーカーにはなり得ない(Waragai et al. 2006, Hirotsu et al. 2008, Lev et al. 2006)。しかしALSにおける酸化ストレスや、新たな治療的アプローチの有効性を評価する指標となりうる。本研究では、孤発性および家族性ALSの病態において、DJ-1が保護的に作用している可能性が示唆された。

3. その他：なし

E. 結論

変異 SOD1 毒性に及ぼす DJ-1 の影響を検討することは、運動神経変性に対する治療法開発に有用である。

F. 健康危険情報 特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 : Yamashita S, et al. DJ-1 forms complexes with mutant SOD1 and ameliorates its toxicity. J Neurochem 113: 860-870, 2010.

2. 学会発表 : Yamashita S, et al. DJ-1 forms complexes with mutant SOD1 and ameliorates its toxicity. Neuro 2010, Kobe, Japan (September 2, 2010)

Yamashita S, et al. DJ-1 forms complexes with mutant SOD1 and ameliorates its toxicity. Society for Neuroscience 2010, 462.13, San Diego, USA (November 15, 2010)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

Derlin-1 は変異 SOD1 の小胞体内蓄積と小胞体ストレスを軽減する

研究分担者 内野 誠

研究協力者 森 麗, 山下 賢, 木村 円, 前田 寧, 平野 照之

熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野

研究要旨

小胞体 (ER) ストレス・アポトーシス関連分子の活性化をもたらす UPR (unfolded protein response) は、変異 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) が関与する家族性 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) モデルや弧発性 ALS に関与している。我々は、Derlin-1 過剰発現が ER ストレスの抑制により、変異 SOD1 による細胞毒性の軽減や細胞活性の促進をもたらすことを示した。さらに外因性 Derlin-1 は、遺伝子導入した培養細胞の総細胞成分およびマイクロソーム分画における野生型および変異 SOD1 の蛋白発現を減少させた。Derlin-1 はプロテアソームやオートファジーによって SOD1 の分解を促進する一方、SOD1 の mRNA レベルには影響しなかった。変異 SOD1 に及ぼす Derlin-1 の影響を検討することは、ALS における運動ニューロン変性に対する治療法開発に有用である。

A. 研究目的

近年 unfolded protein response (UPR) は、Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 変異による家族性 ALS のみならず、弧発性 ALS の病態においてもその関与が示唆されている。変異 SOD1 が選択的に UPR を誘導する可能性を支持する所見として、Nishitoh らは変異 SOD1 が、Der1p の哺乳類のホモログ遺伝子である Derlin-1 の C 末端細胞質領域と選択的に相互作用し、小胞体関連分解 (ERAD) の基質が小胞体から細胞質へ逆行性輸送されることの障害によって小胞体 (ER) ストレスを惹起することを明らかにした。そこで我々は Derlin-1 の過剰発現が、変異 SOD1 によって誘発される蛋白のミスフォールディングを制御する可能性について検討した。

B. 研究方法

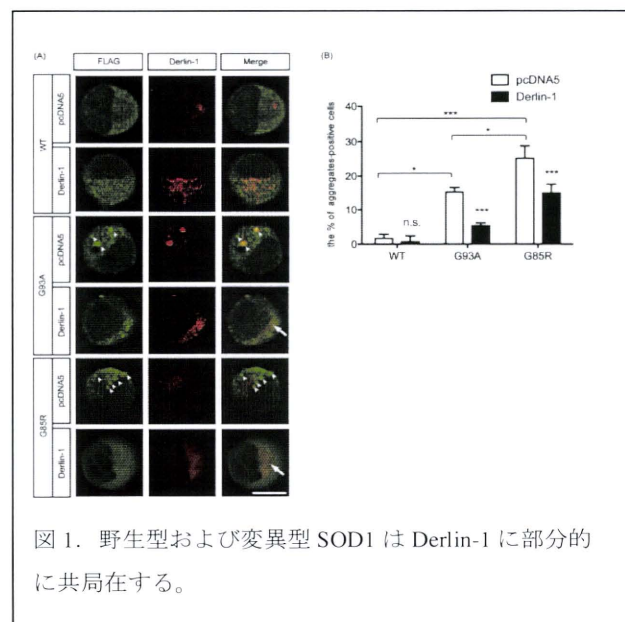
野生型および変異型 SOD1 発現神経細胞において、Derlin-1 の過剰発現、もしくは siRNA による発現抑制によって、細胞内凝集形成、細胞毒性、細胞生存性、ER ストレス関連ファクターの発現、および細胞内 SOD1 含量に及ぼす影響を評価した。

C. 研究結果

1) 野生型および変異型 SOD1 は、Derlin-1 に部分的に共局在する。

Derlin-1 の過剰発現が、免疫蛍光染色において

SOD1 と共局在を示すかどうか検討した。neuro2a 細胞に FLAG 標識された各種 SOD1 (野生型、変異型 G93A および G85R) と、Derlin-1 もしくは pcDNA5 を共発現した。抗 FLAG 抗体および抗 Derlin-1 抗体による二重染色では、野生型、変異型 G93A および G85R が内在性および外因性 Derlin-1 と部分的に共局在を示した (図 1A)。さらに変異型 SOD1 (G93A、G85R) を発現する細胞は、Oh ら (2008) の報告と同様、野生型と比較して、有意に多くの凝集塊が観察された。Derlin-1 の過剰発現は、変異型 SOD1 (G93A、G85R) 発現細胞において、凝集塊陽性細胞の割合を有意に減少させた (図 1B)。



2) Derlin-1 過剰発現は、変異 SOD1 による細胞毒性を軽減し、細胞活性を改善した。

各種 SOD1 安定発現細胞において、細胞死を評価するために propidium iodide (PI) 染色し、flow cytometry を用いて検出した。過去の報告と同様 (Rizzardini et al. 2005)、変異 SOD1 (G93A、G85R) 安定発現細胞では、コントロールあるいは野生型 SOD1 安定発現細胞に比して、アポトーシス細胞の割合が多かった(図 2A)。Annexin V による検討でも同様の結果を得た(図 2B)。

次に Derlin-1 過剰発現が変異 SOD1 による細胞死に及ぼす影響について検討した。Derlin-1 過剰発現は、transfection の 48、72 h 後における変異 SOD1 (G93A)発現細胞におけるアポトーシス核の割合を有意に減少させた (図 2D)。変異 SOD1(G85R)発現細胞では Derlin-1 発現は、24 h 後における変異 SOD1(G85R)細胞におけるアポトーシス核の割合を有意に減少させ、48、72 h 後も減少傾向を呈した(図 2E)。対照的に Derlin-1 は野生型 SOD1 発現細胞に影響しなかった(図 2C)。MTT assay による細胞活性の評価でも野生型、変異型(G93A、G85R) SOD1 安定発現細胞では Derlin-1 過剰発現時に細胞活性増加がみられた(図 2F)。

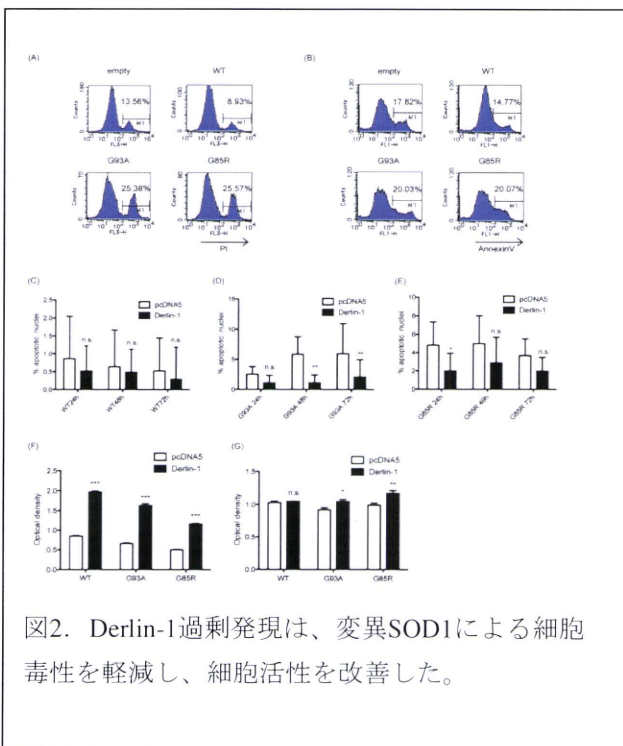


図2. Derlin-1過剰発現は、変異SOD1による細胞毒性を軽減し、細胞活性を改善した。

3) Derlin-1 は、変異 SOD1 によって引き起こされた ER ストレス経路の活性化を軽減する。

Derlin-1 過剰発現が、変異 SOD1 による ER ストレス経路による細胞毒性を軽減するかどうか検討した。Derlin-1 の存在/非存在下の各種 SOD1 安定発現細胞からのマイクロゾーム分画において、GRP94、BiP、Derlin-1 の発現レベルを検討したところ、Derlin-1 過剰発現時の変異 SOD1 (G93A、G85R) 発現細胞でのマイクロゾーム分画では、BiP は有意に減少していたが、野生型 SOD1 発現細胞では有意差はみられなかった(図 3A、B)。さらにサイトゾール分画における ATF6 p50、CHOP の発現に及ぼす Derlin-1 の影響を検討したところ、Derlin-1 過剰発現時に ATF6 p50 の発現レベルは、変異 SOD1(G93A)細胞において有意に減少し、野生型や 変異 SOD1(G85R)細胞でも減少がみられた (図 3D)。また Derlin-1 過剰発現は、変異 SOD1(G93A、G85R)細胞において、有意に CHOP の発現レベルを低下させ、野生型 SOD1 細胞においても低下させた (図 3E)。

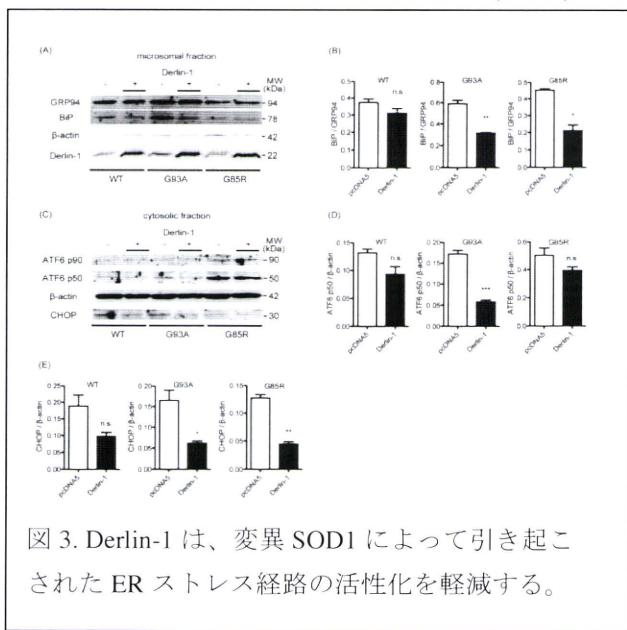


図3. Derlin-1 は、変異 SOD1 によって引き起こされた ER ストレス経路の活性化を軽減する。

4) Derlin-1 は、野生型および変異型 SOD1 蛋白を減少させる。

変異SOD1は、ERADメカニズムによってERから排除されるべき異常な蛋白であることから、SOD1 発現に及ぼす外因性Derlin-1の影響を検討した。各種SOD1(野生型および変異型G93A、G85R)ベクターとDerlin-1あるいはpcDNA5を一過性に共発現し、

western blotで細胞内SOD1蛋白含量を定量化した(図4A)。Derlin-1過剰発現は、変異SOD1(G93A、G85R)蛋白レベルを有意に減少した(G93A 37.0%、G85R 52.7%)。一方、野生型SOD1蛋白レベルに有意差はみられなかった(図4B)。各種SOD1安定発現細胞においてもSOD1蛋白の定量化を行ったところ、Derlin-1過剰発現により、変異SOD1(G93A、G85R)蛋白レベルは有意に減少した(G93A 61.9%、G85R 52.2%)(図4E)。一方、一過性発現時と異なり、野生型SOD1細胞内におけるSOD1蛋白レベルはDerlin-1過剰発現により有意に減少がみられた(43.6%)。野生型SOD1分解における相違は、それぞれの実験におけるDerlin-1の発現レベルの違いによると考えられた。そのため、transfectionにおけるDerlin-1プラスミド量を変化させたところ、野生型および変異SOD1(G93A、G85R)両者において、Derlin-1の発現レベルが強ければ強い程、SOD1発現レベルが減少した。すなわちDerlin-1過剰発現は用量依存性に細胞内SOD1レベルを減少させた。他方Derlin-1のsiRNAによる発現抑制が、SOD1

蛋白分解に及ぼす影響を検討した。細胞内SOD1含量は野生型および変異SOD1(G93A、G85R)細胞すべてにおいて有意に増加した(図4H)。

5) Derlin-1過剰発現は、マイクロゾーム分画におけるSOD1蛋白を減少させた。

次に、Derlin-1過剰発現がERに含まれるマイクロゾーム分画においてSOD1蛋白を減少させるかどうかを検討した。Derlin-1過剰発現は、変異(G93A、G85R)および野生型SOD1安定発現細胞のマイクロゾーム分画において、SOD1蛋白減少をもたらした(図5B)。さらにDerlin-1過剰発現は、野生型および変異型SOD1(G93A)をサイトゾール分画においても有意に減少させたが、変異型SOD1(G85R)に関しての有意差はみられなかった(図5C、D)。

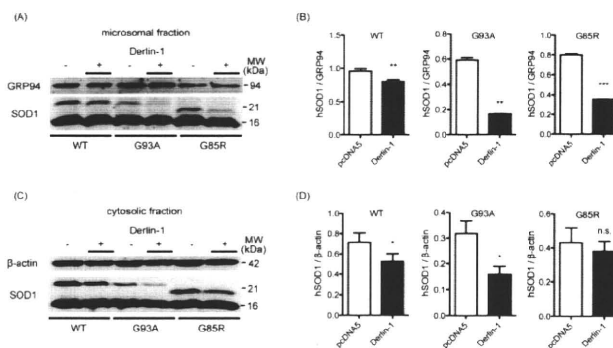


図5. Derlin-1過剰発現は、マイクロゾーム分画におけるSOD1蛋白を減少させ、サイトゾール分画におけるSOD1蛋白も減少させる傾向がみられた。

6) Derlin-1によるSOD1蛋白減少は、SOD1 mRNAレベルの低下ではなく、SOD1蛋白の分解促進による。

各種SOD1におけるmRNAレベルを定量化するため、fluorescence-based real-time reverse transcription PCR法を用いた。全てのSOD1安定発現細胞において、Derlin-1過剰発現による影響はみられなかった(図6A)。そのためDerlin-1過剰発現によるSOD1発現低下は、SOD1分解促進によるものであると推測した。Derlin-1によるSOD1蛋白分解のメカニズムを解明するために、Derlin-1存在下におけるプロテアソーム阻害剤(MG132 50 μM)およびオートファジー阻害剤(3-MA 5 mM)の影響を検討した。プロテアソーム阻害剤、オートファジー阻害剤はいずれ

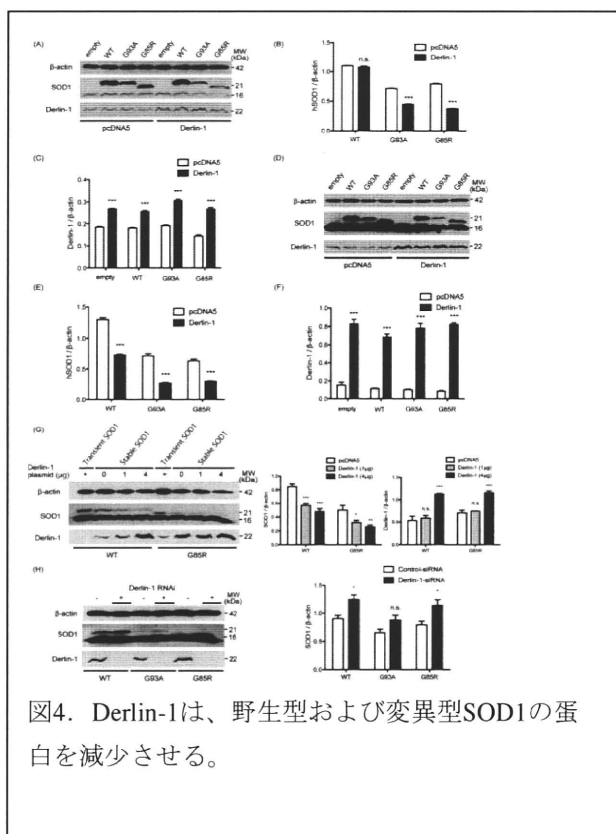


図4. Derlin-1は、野生型および変異型SOD1の蛋白を減少させる。

れも Derlin-1 によって減少していた変異 SOD1 (G93AG85R) 含量の低下を回復させた (図 6B)。

これにより、Derlin-1 による変異 SOD1 蛋白減少は、プロテアソームとマクロオートファジー両者が関与する可能性が示唆された。Derlin-1 が直接的にプロテアソーム活性を促進する可能性を除外するために、erlin-1 の存在/非存在下で、プロテアソーム活性測定を行った。Derlin-1 過剰発現は、プロテアソーム活性に影響しないと考えられた (図 6C)。

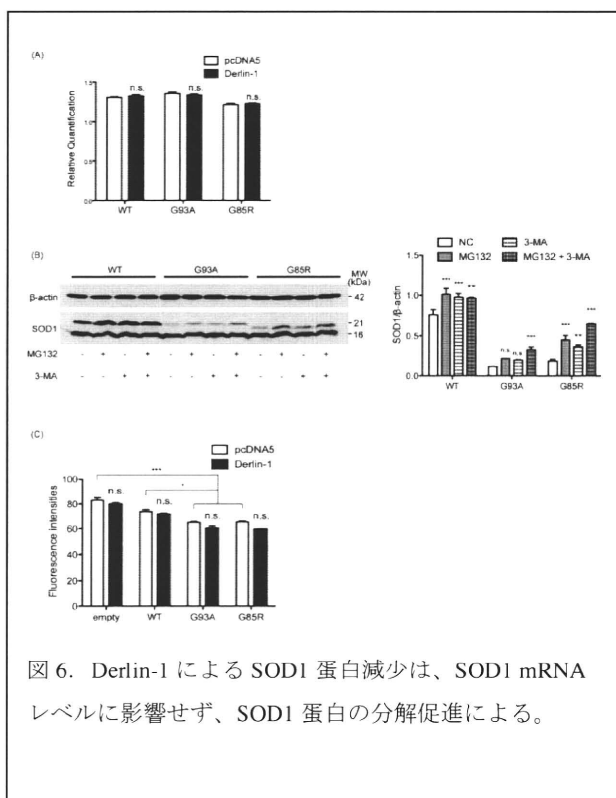


図 6. Derlin-1 による SOD1 蛋白減少は、SOD1 mRNA レベルに影響せず、SOD1 蛋白の分解促進による。

D. 考察

近年の報告において、ERストレスはFALSとSALSに共通して関与することが示唆されている (Kikuchi et al. 2006, Ilieva et al. 2007, Atkin et al. 2008)。これらは、ERストレスが運動ニューロン死の全体的な病態において重要な役割を果たしていることを示しているが、ミスフォールディング蛋白の小胞体内蓄積がトリガーなのか、運動ニューロン変性の結果なのかは未だ明らかではない。変異SOD1が特異的にUPRを誘発するという説を支持する概念として、Nishitohら(2008)は変異SOD1が特異的にDerlin-1の細胞質側のC末端に結合し、ERADの基質の逆行性輸

送を減弱させることによりERストレスを引き起こすと報告した。我々は、外因性Derlin-1がERAD機能を修復することによりERストレスを減弱し、細胞活性を促進することも見出した。Sunら(2006)は、外因性Derlin-1が小胞体内のCFTRと共局在し、疾患に関連する変異CFTR蛋白を効果的に分解することを報告している。我々の知見は、Derlin-1過剰発現が変異SOD1によるERAD機能障害を打開することを示唆するかもしれない。

Immunoblot解析では、Derlin-1発現レベルはG93Aマウスと正常対照マウスの脳や脊髄において同様であった。すなわち Derlin-1 を用いた治療的アプローチが、運動ニューロン死に対する有効な治療手段となる可能性を示唆している。変異 SOD1 マウスに対する Derlin-1 の in vivo 治療実験を現在研究中である。

E. 結論

外因性 Derlin-1 発現は、変異 SOD1 蛋白の mRNA レベルに影響せず、プロテアソームやオートファジーによる分解を促進させることによって、変異 SOD1 蛋白制御に関与することが示唆された。変異 SOD1 に及ぼす Derlin-1 の影響を検討することは、ALS における運動ニューロン変性に対する治療法開発に有用である。

F.健康危険情報 特記事項なし。

G.研究発表

- 1.論文発表：Mori A, et al. Derlin-1 overexpression ameliorates mutant SOD1-induced endoplasmic reticulum stress by reducing mutant SOD1 accumulation. *Neurochem Int.* 2010 (in press).
- 2.学会発表：Mori A, et al. Society for Neuroscience 2010, 462.11, San Diego, USA (November 15, 2010)

H.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし
- 3.その他：なし

孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 活性と GluR2 RNA 編集異常の病因的意義

研究分担者 郭 伸¹⁾

研究協力者 日出山拓人^{1) 2)}, 山下雄也¹⁾, 相澤仁志³⁾, 辻 省次¹⁾, 柿田明美⁴⁾, 高橋 均⁴⁾

1) 東京大学神経内科, 2) 現 同保健・健康推進本部,

3) 国立病院機構東京病院, 4) 新潟大学脳研究所神経病理

研究要旨

孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンでは、Q/R 部位未編集型の GluR2（AMPA 受容体サブユニット）が発現しており、これは疾患特異的かつ細胞選択的な変化である¹⁻⁴⁾。GluR2 Q/R 部位の A-I 編集は、RNA 編集酵素 ADAR2（adenosine deaminase acting on RNA 2）により特異的に触媒されるので、孤発性 ALS の運動ニューロンでは ADAR2 活性が低下していると考えられる²⁾。また、ADAR2 活性欠失が未編集型 GluR2 の発現を通じて運動ニューロン死を引き起こすことが動物実験により示され⁵⁾、この分子異常が運動ニューロン死と直結する分子異常であることが明らかになった。本研究では、ALS 患者の運動ニューロンで GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常が存在することを多数例での検討で示し、従来明らかでなかった ALS 患者運動ニューロンで ADAR2 の発現レベルが低下し、ADAR2 活性が特異的に低下していることを明らかにした。特に、編集型 GluR2 のみを発現する、正常に機能している運動ニューロンにも ADAR2 発現レベルの低下がみられたことより、孤発性 ALS では、前臨床状態に RNA 編集酵素 ADAR2 活性の低下が存在することが明らかになった。ADAR2 活性低下は運動ニューロン死を引き起こす分子変化であり、ALS の病因に密接に関連する分子異常であることが示された。

A. 研究目的

孤発性 ALS 運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体である AMPA 受容体のサブユニット GluR2 の RNA 編集異常が疾患特異的かつ部位選択的に生じていることが明らかにされている。(1-3)。また、この分子異常は細胞死に伴う非特異的なものではなく、変異 SOD1 関連家族性 ALS を含めた他の神経変性疾患の変性ニューロンには生じない高い疾患特異性をもつ (4)。この部位の RNA 編集は adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) により特異的に触媒され、ADAR2 活性欠失が未編集型 GluR2 の発現を通じて運動ニューロン死を引き起こすことが、ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスにより明らかにされている (5)。したがって、孤発性 ALS に見出されている GluR2

の RNA 編集異常は神経細胞死の直接原因であり、ADAR2 活性低下が病因的意義を持っている可能性が高い。今回、この分子異常が孤発性 ALS の病因に果たす意義を明かにするために、多発例の孤発性 ALS において、運動ニューロンにおける未編集型 GluR2 の発現、ADAR2 の発現レベル及び活性の変化を検討した。

B. 研究方法

孤発性 ALS 29 例（古典型 18 例：年齢 65.2 ± 12.7 歳，平均 ± SD，以下同；進行性球麻痺 8 例：年齢 69.5 ± 17.0 歳；ALS 痴呆 2 例：年齢 68.5 歳；Basophilic inclusion body のみられる ALS 1 例：年齢 23 歳），正常対照 6 例（年齢 52.4 ± 18.0 歳），疾患対照（多系統萎縮症）5 例（年齢 71.6

± 5.5 歳) の凍結脊髄剖検組織を用いた。

脊髄前角及び運動ニューロンをレーザーダイセクターで切り出し、回収した前角組織及び単一脊髄運動ニューロンより総 RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を得た。得られた cDNA を用いて RNA 編集酵素 ADAR1, ADAR2, ADAR3 の mRNA を定量し、各 ADARs により特異的に触媒される RNA 編集部位の編集率を算定し、孤発性 ALS 群, 正常群, 疾患対照群の 3 群間で比較した。

ADARs mRNA 定量については、real-time PCR 法 (Roche Lightcycler 480) にて行った。内部標準として β -アクトチンおよび GluR2 mRNA を用いた (6)。

RNA 編集率は、特異的プライマーを作成し、各サンプル中の RNA 編集部位を含む断片を PCR で増幅し、mRNA の編集率を制限酵素断片の定量 (バイオアナライザー: アジレント社) により算出した (1)。ADAR2 の特異的な基質である 1) GluR2 mRNA および pre-mRNA の Q/R 部位, 2) cytoplasmic fragile X mental retardation protein interacting protein 2 (CYFIP2) K/E 部位 (7)、ADAR1 の特異的な基質である 3) GluR2 R/G 部位, 4) bladder cancer associated protein (BLCAP) Y/C 部位 (7) の編集率を算出した。

さらに、ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 活性を検討するために、孤発性 ALS において編集型 GluR2 のみを発現する運動ニューロン、未編集型 GluR2 を発現する運動ニューロンを別々に回収し、ADAR1, ADAR2 の mRNA 発現レベルを定量し、正常対照運動ニューロン、多系統萎縮症の運動ニューロンにおけるものと比較した。

(倫理面への配慮)

研究の方法について、本学の研究倫理委員会の承認を得ている

C. 研究結果

正常及び疾患対照脊髄前角組織の GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率はほぼ 100%であったが、孤発性

ALS では 100%未満に低下していた (Mann-Whitney U-test, $p < 0.001$)。運動ニューロン組織の検討では、正常及び疾患対照群、検索した全ての運動ニューロンにおいて GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率は例外なく 100%であったが、ALS 群の全例で、未編集型 GluR2 を発現する運動ニューロンが検出された。

また、RNA 編集酵素 ADAR2 の GluR2 Q/R 部位以外の特異的な基質である CYFIP2 K/E 部位における編集率は、ALS 群の前角組織 ($p < 0.03$) 及び運動ニューロン ($p < 0.005$) で有意に低下しており、GluR2 pre-mRNA Q/R 部位の編集率も ALS 群の前角組織で有意に低下していた ($p < 0.01$)。

ADAR2 mRNA の発現レベルは、ALS の後角及び白質では、正常対照と同レベルであったが、前角組織では正常対照の 1/3 に低下していた ($p < 0.05$)。

運動ニューロンにおける ADAR2 mRNA の発現レベルは、正常対照群と疾患対照群との間には有意差がなかったが、孤発性 ALS の編集型 GluR2 のみを発現する運動ニューロンにおいても有意な活性低下がみられた ($p < 0.02$)。ALS 群の未編集型を発現する運動ニューロンでは、編集型のみを発現する運動ニューロンに比してもさらに著減していた。

ADAR2 の isozyme である ADAR1 は活性レベル (GluR2 R/G 部位編集率, BLCAP Y/C 部位編集率) および mRNA 発現とも、編集型 GluR2 のみを発現する運動ニューロンにおいても ALS 群での変化はなかった。さらに、ADAR3 mRNA 発現量についても正常対照群と有意差は無かった。

D. 考察

RNA 編集酵素 ADAR2 は核内蛋白であり、pre-mRNA に形成される二重鎖におけるアデノシンをイノシンに変換する RNA 編集 (A-to-I 変換) を触媒している。ADAR2 の活性が低下すると AMPA 受容体サブユニットである GluR2 の Q/R 部位における A-to-I 変換が行われなくなり、未編集型の GluR2 が発現する。未編集型 GluR2 をサブユニッ

トに持つ AMPA 受容体はカルシウム透過性が高く、生理的にはニューロンには発現していない。そのため、未編集型 GluR2 の発現は神経細胞死を引き起こす分子変化であることが動物実験から示されている (5, 8, 9)。これらのことから、孤発性 ALS 運動ニューロンで ADAR2 活性が低下し GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が不完全であることが病因と密接に関連した分子変化であると想定される (2)。

我々は、孤発性 ALS 運動ニューロンに疾患特異的に GluR2 Q/R 部位の編集異常が生じていることを示してきたが、その検討は 10 例内外の少数例のものであった (1, 3)。今回の多数例での一致した結果から、この分子異常が、孤発性 ALS に共通する分子異常であることが判明した。さらに、その原因が、運動ニューロンにおける GluR2 Q/R 部位を触媒する ADAR2 活性低下によることが ADAR2 の特異基質における RNA 編集率の低下と ADAR2 mRNA 発現量の低下から明らかになった。孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 発現レベルの低下は、免疫組織化学的に確かめられた ADAR2 タンパクの発現低下 (10) とも符合する。今回の結果は、ADAR2 活性低下が ADAR2 発現の低下によりもたらされ、タンパク分解の亢進によるものではないことを示している。

コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスにおける検討から ADAR2 活性の欠失にともなう GluR2Q/R 部位の RNA 編集異常が運動ニューロン死の直接原因であることが証明され (5)、ADAR2 活性低下が孤発性 ALS の病因に関与している可能性が高い。さらに、ALS の特異的分子異常として近年見出された TDP-43 タンパクの局在異常が、例外なく ADAR2 発現の低下した運動ニューロンに出現することからも (10)、細胞死に直結した分子異常であることが示唆される。

ADAR2 のアイソザイムである ADAR1, ADAR3 の過剰発現系では、競合的 inhibitor になり得る報告があったが (11, 12)、今回の検討から、ADAR2 の活性低下が発現低下によるものであり、ADAR1 や ADAR3 との相互作用による影響は関与していない

といえる。

編集型 GluR2 のみを発現している ALS 運動ニューロンでも ADAR2 活性が低下していたことは、孤発性 ALS では ADAR2 mRNA 発現レベルが進行性に低下していること、その低下が GluR2 の全てを編集型に維持するために必要なレベル以下にまで達すると未編集型 GluR2 を発現し、細胞死のカスケードに順次組み入れられることが想定される。すなわち、ALS 運動ニューロンは ADAR2 活性が低下していても、その活性が全ての GluR2 Q/R 部位の RNA 編集に必要な閾値に達するまでは、ほぼ正常な機能を保つことが出来るが、この閾値を超えて低下した時点で発症することを示唆している。この閾値は、ヒト剖検脳における検討では ADAR2 mRNA 発現レベルとして GluR2 mRNA 比で 2×10^{-2} である (6)。

E. 結論

本研究により、孤発性 ALS の病因として ADAR2 活性低下が前臨床段階から生じていることが明らかになり、孤発性 ALS の発症前診断、病因解明、治療法開発のために有用な知見が得られたと考えられる。

<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. Takuma H, et al. *Ann Neurol* **46**, 806-815 (1999).
4. Kawahara Y, et al. *Neurosci Res* **54**, 11-14 (2006).
5. Hideyama T, et al. *J Neurosci* **30**, 11917-11925 (2010).
6. Kawahara Y, et al. *Eur J Neurosci* **18**, 23-33 (2003).
7. Nishimoto Y, et al. *Neurosci Res* **61**, 201-206 (2008).
8. Brusa R, et al, *Science* **270**, 1677-1680 (1995).
9. Higuchi M, et al. *Nature* **406**, 78-81 (2000).
10. Aizawa H, et al. *Acta Neuropathol*.

- 120, 75-84 (2010) .
11. Cenci G, et al. *J Biol Chem* **283**, 7251-60 (2008) .
12. Chen CX, et al. *RNA* **6**, 755-7674 (2000) .

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

- 1) Aizawa H, et al. TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking the RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol.* 120(1): 75-84, 2010.
- 2) Hideyama T, et al: Induced Loss of ADAR2 Engenders Slow Death of Motor Neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci* 30(36):11917-25, 2010.
- 3) Hideyama T, et al: Novel etiological and therapeutic strategies for neurodegenerative diseases: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci.* 113(1): 9-13, 2010.
- 4) Kwak S, et al: AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology* 30(2): 182-8, 2010.
- 5) 日出山拓人, 郭 伸: 孤発性 ALS 患者運動ニューロンに見出された分子病態 RNA editing 異常に基づいたモデルマウスの開発, *医学のあゆみ*, 235(3) : 246-250, 2010.
- 6) 日出山拓人, 山下雄也, 郭 伸: グルタミン酸受容体と運動ニューロン変性, *実験医学*, 28 : 745-753, 2010.

2. 学会発表

- 1) 郭 伸: Inefficient A-to-I RNA editing and ALS/ALS における RNA editing 異常の病因的意義. シンポジウム「Neurodegenerative

diseases and RNA/神経疾患と RNA」第 51 回日本神経学会総会 東京 May 22, 2010.

- 2) 日出山拓人ら: 孤発性筋萎縮性側索硬化症と RNA 編集異常, 第 51 回神経学会総会, 東京 May 22, 2010.
- 3) 山下雄也ら: GluR2 RNA 編集異常と TDP-43 蛋白のプロセッシング異常の分子連関. Analysis for the molecular link between abnormal GluR2 RNA editing and TDP-43 protein processing. 第 33 回神経科学大会、neuro2010、神戸 September 2-4, 2010.
- 4) Hideyama T, et al: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. ミニシンポジウム「若手研究者が展開する筋萎縮性側索硬化症研究の将来展望」第 33 回神経科学大会 neuro2010、神戸 September 2-4, 2010.
- 5) Hideyama T, et al: Absence of GluR2 RNA editing induces slow death of motor neurons in conditional ADAR2 knockout mice. *40th Annual Meeting Society for Neuroscience*, San Diego, 13-17 November 2010.
- 6) 郭 伸: Inefficient GluA2 RNA editing as a cause of slow death of motor neurons. First BRI International Symposium 2010「Current understandings and future directions for ALS」新潟 November 22-23, 2010
- 7) Aizawa H, et al: Close association of TDP-43 pathology with loss of RNA editing enzyme ADAR2 in motor neurons in sporadic ALS. *The 21st International Symposium on MND/ALS*, Orland, 11-13 Dec, 2010.

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

神経変性疾患の遺伝子治療：

HDL をベクターとした中枢神経系への siRNA デリバリー

研究分担者 水澤英洋¹⁾

1) 東京医科歯科大学 脳神経病態学講座

研究要旨

我々はすでに、ビタミン E (α -tocopherol) を short-interfering RNA (siRNA) に結合させることにより生体肝への siRNA デリバリーに成功している。今回我々は、 α -tocopherol の生化学的特性に着目し脳への siRNA デリバリーへの応用を試みた。中枢神経内での α -tocopherol のキャリアーとして HDL を α -tocopherol 結合型 siRNA (Toc-siRNA) とさらに結合させることにより、神経細胞への siRNA の取り込みが大幅に促進された。マウス第 3 脳室内に Toc-siRNA/HDL を 7 日間持続投与することにより標的遺伝子である β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) の発現を mRNA およびタンパク質レベルで特異的かつ広範に抑制した。評価を行った海馬および頭頂葉皮質において標的 mRNA レベルを最大で 70% 程度まで抑制した。これはアンチセンス DNA や非結合型 siRNA を直接脳室内に投与した先行報告と比較すると 1000 倍近い効率であり、HDL によるレセプター介在性エンドサイトーシスによって促進されたものと考えられた。LDL レセプターを強制発現させた培養細胞系の実験では HDL の取り込みが強く増強され、LDL レセプターノックアウトマウスを用いた実験では Toc-siRNA/HDL の取り込みが大幅に減弱した。この結果は、現在有効な治療法の確立されていない神経変性疾患への siRNA を用いた治療可能性を示すものである。

A. 研究目的

強力な遺伝子発現抑制法である RNA 干渉は遺伝子治療の一方法として期待されている。しかし、中枢神経への siRNA のデリバリーは確立されていない。 α -tocopherol 結合 siRNA を内因性の HDL に取り込んだ新規ベクターを開発し、これをマウス第 3 脳室内に持続投与することにより、中枢神経細胞への siRNA デリバリーを試みた。

B. 研究方法

ターゲット遺伝子はアルツハイマー病治療のターゲット分子の一つとして考えられている BACE1 とした。まず、in vitro で BACE1 に対する有効な siRNA 配列をデザインした。さらにこの配列を用いて α -tocopherol の結合および Cy3 による蛍光標識が siRNA 効果を阻害しないことを確認

した。つぎに、マウス血清より HDL を超遠心法で採取し Cy3 標識 Toc-siRNA との結合をゲルシフトアッセイで確認した。

以上の確認実験後、マウスを用いた生体実験を行った。Cy3 標識 Toc-siRNA/HDL を浸透圧ポンプに充填し、マウス第 3 脳室に 2 mg/kg (総量 57 μ g/body) を流量 0.5 μ l/hr で 7 日間かけて持続投与した。投与終了後に脳を摘出して、蛍光顕微鏡で脳組織内での Cy3 標識 Toc-siRNA の分布を観察するとともに、シグナル陽性部位をレーザーマイクロダイセクションでサンプリングし、ターゲット遺伝子の抑制効果を定量的 RT-PCR、ウェスタンブロットおよび免疫組織染色で検討した。

レセプターを介した取り込みを証明するため、LDL レセプターノックアウトマウスを用いての脳室内投与実験および、培養細胞系での LDL レセプター過剰発現系を用いた HDL 取り込み実験

を行った。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は、東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

Neuro2a を用いた siRNA トランスフェクション実験により BACE1 mRNA をコントロールに対して約 90%抑制する配列のデザインに成功した。

つぎに脂溶性ビタミンであるトコフェロールの結合により siRNA が HDL と結合することをゲルシフトアッセイで確認した。精製したマウス HDL をトコフェロール非結合およびトコフェロール結合 siRNA と混合しアガロースゲルで電気泳動するとトコフェロール結合 siRNA のみ著しく泳動度が低下を示し、トコフェロールを介した HDL との結合が確認された (Figure 1)。

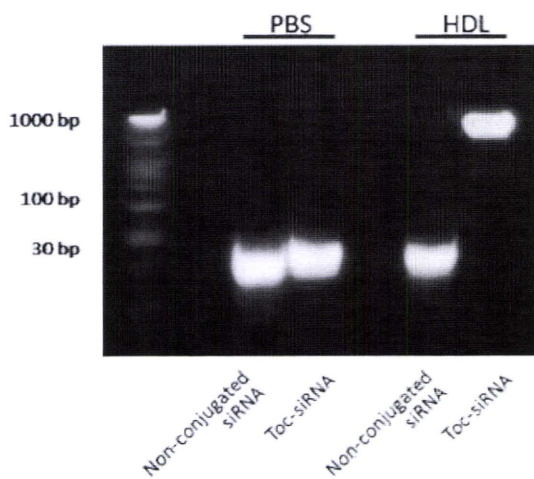


Figure 1 Binding assay for Toc-siRNA and HDL. (a) The 100 pmol non-conjugated siRNA or Toc-siRNA was added to 10 μ l of PBS or the HDL-fraction, and then samples were incubated at 37°C for 30min. When incubated with PBS, Toc-siRNA showed slightly smaller mobility than non-conjugated siRNA on non-denaturing 2% agarose. It was assumed that the size and net charge of the molecule affected the migration change. When incubated with the HDL-fraction, Toc-siRNA showed much smaller mobility than that with PBS, indicating the binding between Toc-siRNA and HDL.

次に Toc-siRNA と HDL の混合比率を変えて最適な混合比率の検討を行った。Toc-siRNA 100pmol に対して 2.67 μ l 以上の HDL を結合させると free の Toc-siRNA が 10%以下になることから以降の *in vivo* の実験ではこの結合比率を用いた。

次いで我々はマウス第3脳室内に Toc-siRNA 単独または HDL と結合させた Toc-siRNA を直接投与する実験を行った。核酸量として siRNA 2 mg/kg、溶液総量 100 μ l を 0.5 μ l/hr の速度で浸透圧ポンプによりマウス頭蓋に接着したポートより第3脳室に7日間持続投与した。投与終了後に屠殺を行い、灌流固定したサンプルを免疫組織観察、また凍結サンプルからレーザーダイセクションにより局所サンプリングを行い RT-PCR および W.B. を行った。マウス海馬の蛍光組織染色像を示す。

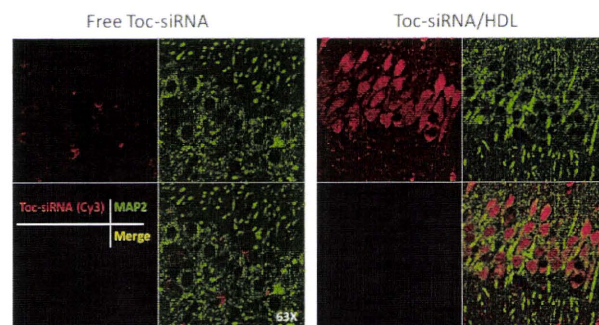


Figure 2 Laser confocal microscopic images of MAP2-labeled hippocampus CA3 neurons infused with either free Toc-siBACE or Toc-siBACE/HDL.

Toc-siRNA 単独投与では一部の神経細胞内に Cy3 で標識された Toc-siRNA のわずかな取り込みが見られるのみだが、Toc-siRNA を HDL と結合させることにより海馬神経細胞に広範かつ著明な siRNA の取り込みが認められた (Figure 2)。

RNAi 効果確認のため、シグナル陽性部位をレーザーマイクロダイセクションにより直接サンプリングし、mRNA 精製を行い GAPDH を内在性コントロールとして RT-PCR を行った。HDL をベクターとして用いることにより海馬および大脳皮質においてターゲット遺伝子である BACE1 mRNA レベルを最大で 36%まで抑制することに成功した (各々、海馬 control vs. free Toc-siRNA or Toc-siRNA/HDL; 94, 64%, 大脳皮質 control vs. free Toc-siRNA, Toc-siRNA/HDL; 87, 36%)。

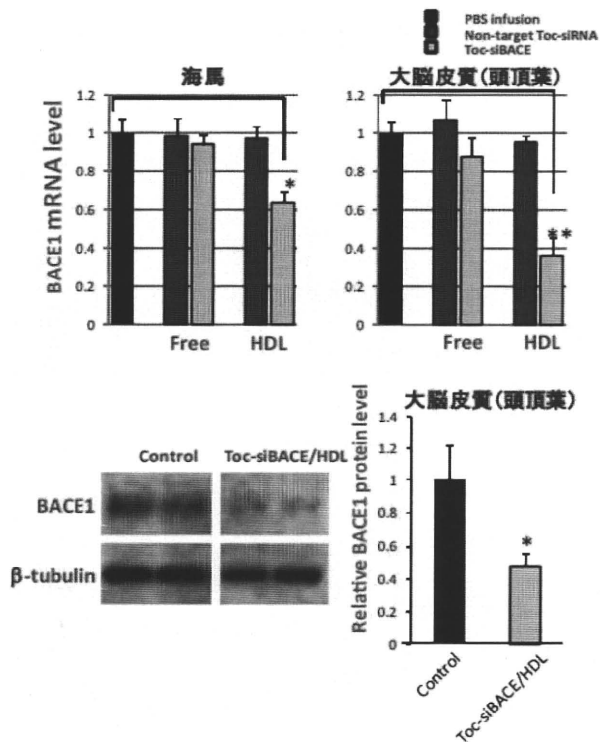


Figure 3 *In vivo* analyses of RNAi activity of free Toc-siBACE and Toc-siBACE/HDL. (a) For qRT-PCR analyses, mRNA was purified from laser dissected samples of the same square measure from each brain region of control brains (PBS infusion), free Toc-siRNA-infused or Toc-siRNA/HDL-infused brains. ($n = 3$, Data are shown as mean values \pm SEM. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparisons, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.) (b) For Western blot, total lysates of laser dissected samples of the same square measure from the parietal cortex region were immunoblotted with anti-BACE1 antibody and reprobed with anti- β -tubulin antibody as a loading control. (c) Bar graph shows BACE1/tubulin ratios from densitometry of bands in b. Values represent mean \pm SEM. $P = 0.092$, Student's t test.

同様に、シグナル陽性部位をレーザーマイクロダイセクションにより直接サンプリングし、タンパク質を精製。 β -tubulin をローディングコントロールとして Western Blot を行い得られたバンドシグナルをデンストメトリーにより定量評価した。タンパク質レベルでもコントロールの 48%まで発現レベルを抑制できていることが確認できた (Figure 3)。

BACE1 に対する免疫組織染色では HDL 結合 Toc-siBACE 投与個体で嗅内野皮質、頭頂葉、海馬におよぶ広範な BACE1 に対する染色性の低下が得られた。同様の実験を LDLR knockout マウスに行ったところ、Wild type と比べて Toc-siRNA の取り込みが大幅に減弱した。これにより vivo において Toc-siRNA は HDL をベクターとして LDL レセプターを介して取り込みが行われていることが示された。

LDL レセプターによる HDL の取り込みは vitro でさらに確認を行った。HEK293T 細胞に LDL レセプタープラスミドをトランスフェクションし LDL レセプターを強制発現させ、BODIPY で標識した HDL を培養液に加えインキュベートを行った。LDL レセプター発現細胞では著明な標識 HDL の取り込みが見られ LDL レセプターを介した HDL の取り込みが証明された。

D. 考察

マウス脳において mRNA とタンパク質レベルで siRNA による遺伝子抑制効果を確認した。この遺伝子抑制効率は非結合型 siRNA やアンチセンス DNA オリゴヌクレオチドを直接投与した先行研究と比較して 1000 倍の効率を達成した。また、ノックアウトマウスや培養細胞による実験から今回得られた効率的な siRNA デリバリーは、末梢血 HDL ベクターによる LDL レセプターを介したものと考えられた。しかし、効果発現期間の評価を行っておらず、今後の臨床応用に向けて更なる検討が必要である。

E. 結論

Toc-siRNA/HDL の脳室内持続投与により、生体において中枢神経系における神経細胞の標的遺伝子の抑制が確認され、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病などの中枢神経疾患の遺伝子治療に応用できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uno Y, Piao W, Nishina K, Miyata K, Mizusawa H and Yokota T. HDL Facilitates *In vivo* delivery of alpha-tocopherol-conjugated siRNA to the brain. Hum Gene Ther (in press)
2. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O,

Watabiki S, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Pseudopolyneuritic form of ALS revisited: clinical and pathological heterogeneity. *Neuropathology* 2010; 30: 372-380.

3. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Yokota O, Yoshida M, Shimomura Y, Kondo H, Haga C, Asaoka T, Onaya M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Clinicopathological characteristics of FTLT-DTP showing corticospinal tract degeneration but lacking lower motor neuron loss. *J Neurol Sci.* 2010; 298(1-2): 70-7.

4. Kuwahara H, Tsuchiya K, Saito Y, Kobayashi Z, Miyazaki H, Izumuyama Y, Akiyama H, Arai T, Mizusawa H. Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease showing severe and circumscribed atrophy of anterior temporal lobes. *J Neurol Sci.* 2010; 297: 92-96.

5. Ishibashi K, Ishii K, Oda K, Mizusawa H, Ishiwata K. Competition between 11C-raclopride and endogenous dopamine in Parkinson's disease. *Nucl Med Commun.* 2010; 31: 159-66.

6. Ishibashi K, Saito Y, Murayama S, Kanemaru K, Oda K, Ishiwata K, Mizusawa H, Ishii K. Validation of cardiac (123)I-MIBG scintigraphy in patients with Parkinson's disease who were diagnosed with dopamine PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010; 37: 3-11.

7. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Arai T, Aoki M, Hasegawa M, Ishizu H, Akiyama H, Mizusawa H. Occurrence of basophilic inclusions and FUS-immunoreactive neuronal and glial inclusions in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2010 15; 293: 6-11.

8. Kobayashi Z, Tsuchiya K, Takahashi M, Yokota O, Taki K, Ishizu H, Arai T, Akiyama H, Mizusawa H. Morel's laminar sclerosis showing apraxia of speech: distribution of cortical lesions in an autopsy case. *Neuropathology.* 2010; 30: 76-83.

2.学会発表

1. 朴文英、宇野佳孝、仁科一隆、水澤英洋、

横田隆徳. 神経細胞への siRNA の in vivo デリバリー方法の開発. 第 51 回日本神経学会 A-02-1011 東京. 2010.5.20-22

2. 笹栗弘貴、渡邊あずさ、西本美香、久保寺隆行、内原俊記、水澤英洋、横田隆徳. AAV ベクターを用いた野生型 TDP-43 過剰発現による筋萎縮性側索硬化症サルモデルの作製. 第 51 回日本神経学会 A-12-1070 東京. 2010.5.20-22

3. 桑原宏哉、仁科一隆、吉田規恵、宇野佳孝、朴文英、水澤英洋、横田隆徳. リポ蛋白ベクターを用いた脳血管内皮細胞への siRNA の in vivo デリバリー法の開発. 第 51 回日本神経学会 B-004-1327 東京. 2010.5.20-22

4. 久保寺隆行、水澤英洋、横田隆徳. siRNA 発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いた FAP の遺伝子治療ーカニクイザルでの検討. 第 51 回日本神経学会 B-033-1559 東京. 2010.5.20-22

5. 宇野佳孝、朴文英、仁科一隆、宮田完二郎、水澤英洋、横田隆徳. HDL Facilitates In Vivo Delivery of a-Tocopherol-Conjugated siRNA to the Brain. 第 20 回アンチセンスシンポジウム. 神戸. 2010.12.2-3.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし