

ALS 運動ニューロンにおける RNA 編集異常と TDP-43 病理

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

研究協力者：山下雄也、日出山拓人、寺本さやか、八賀康祐

所属：東京大学大学院 医学系研究科 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 局在異常は孤発性 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明らかになっている。本研究では、TDP-43 の変化が ADAR2 活性低下の下流である可能性について、コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) を用い、脊髄における TDP-43 病理を免疫組織化学的に検討した。AR2 マウスで ADAR2 免疫染色性のない脊髄運動ニューロンにおいて TDP-43 の局在異常が観察された。ADAR2 陰性の運動ニューロンは細胞死に陥ることから、孤発性 ALS 運動ニューロンでおきている ADAR2 活性低下は、細胞死を引き起こすと同時に TDP-43 の局在異常を引き起こすことが示唆される。

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^{1,2}。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^{3,4}。ADAR2 による GluR2 の RNA 編集異常の生物学的重要性は、ノックアウトマウスがけいれん重積で死亡することから明らかだが⁵、さらに、運動ニューロンにとっては細胞死を決定する因子であることがコンディショナルノックアウトマウスにより最近示され、ALS の運動ニ

ューロン死との病因的関連を示唆する知見が加わった⁶。同様に、TDP-43 遺伝子変異が ALS 発症の責任遺伝子異常の一つであり^{7,8}、TDP-43 のプロセッシング異常が神経変性に関わることが動物実験から明らかにされている。このように、GluR2 の RNA 編集異常、TDP-43 蛋白のプロセッシング異常は、疾患特異性が高く、神経細胞死に深く関連する分子変化であることから、孤発性 ALS の病因と深く関連すると考えられる。更なる両者の共通点として、SOD1 関連家族性 ALS の運動ニューロンには見出されないこと^{9,10}、孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 活性低下と TDP-43 病理は同一のニューロンに見られること¹¹、も示されており、両者の分子連関を探ることは ALS の病因解明にとり重要であるといえる。

昨年度は TDP-43 の変化が ADAR2 活性に及ぼす影響を、培養細胞系で TDP-43 をノックダウンおよび過剰発現 (Full length, Fragment, mutation) することで検討したが GluR2 Q/R 部位 RNA 編集率に有意な変化は見られなかった。そのため、本年度は TDP-43 の変化が RNA 編集異常の下流の変化である可能性を探る検討を行った。

B. 研究方法

様々な週齢のコンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス (AR2)、ヘテロ接合体 AR2 マウス、野生型マウスを還流固定し、蔗糖浸潤した脊髄の凍結切片を作成し、抗 TDP-43 抗体 (Protein-Tech Group, Inc.)、抗 ADAR2 抗体 (RED1, Exalpha Biologicals, Watertown, MA) を用いて、免疫組織化学を行った。核染色を TO-PRO3 で行い、局在を観察した。

(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

野生型マウスでは全ての大径前角細胞の核が TDP-43 陽性であったが、ホモ接合体 AR2 マウス、ヘテロ接合体 AR2 マウスでは脊髄前角領域において、核の TDP-43 免疫陰性の運動ニューロンが観察された。ADAR2 との二重染色では全ての TDP-43 陽性細胞は核が ADAR2 陽性であったが、AR2 マウスの TDP-43 陰性細胞の核は ADAR2 にも陰性であった。

経時的に AR2 マウス脊髄を ADAR2 と TDP-43 の二重染色を行うと、ADAR2 と TDP-43 免疫活性は共在するか、共に欠損しているかのいずれかであり、ADAR2 陽性/TDP-43 陰性、ADAR2 陰性/TDP-43 陽性細胞は全くみられなかった。

ヘテロ接合体 AR2 マウスで観察すると、核の ADAR2 の染色性が減少した運動ニューロンに

おいて、TDP-43 の局在異常が観察され、核・細胞質両者とも TDP-43 陰性の細胞の他、細胞質に TDP-43 免疫活性を持つ運動ニューロン、核の TDP-43 免疫活性を失った運動ニューロンが観察された。

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、疾患特異性が高い分子変化である。両者は同一の運動ニューロンに共在し、何れかを正常に発現する運動ニューロンにはもう一方の分子異常は生じていないことが患者脊髄の解析から明らかになり、両者には強い分子連関があることがわかった¹¹。

本報告の結果から、ADAR2 活性低下は TDP-43 局在異常を引き起こすことがわかった。また、ヘテロ接合体 AR2 マウスではより軽度な変化が認められたことから、TDP-43 の局在異常の強さは ADAR2 活性に依存することが示唆される。

マウスにおける TDP-43 の局在異常は、ヒト野生型 TDP-43 ないし変異型 TDP-43 のトランスジェニック動物により報告されているが、遺伝子発現変化、遺伝子変異を伴わない場合でもストレス (脳虚血、軸索損傷、外傷など) 下で生じることが報告されている。ただし、その場合には、一過性の変化であり可逆的で、必ずしも神経細胞死を伴わない¹²⁻¹⁵。AR2 マウスの結果は、細胞死に陥る ADAR2 陰性ニューロンのみに TDP-43 の局在異常が観察されることを示しており、TDP-43 の局在異常が運動ニューロン死と関連する病理変化である可能性を示している。しかし、一方では TDP-43 の局在異常が存在しても、運動ニューロンは長期間 (1 年前後) 生存できることも示しており、TDP-43 の局在異常のみでは細胞死に陥らない可能性をも示唆している。ただ、AR2 マウスで観察さ

れた TDP-43 の局在異常は、核からの喪失と一次的な細胞質局在であり、ALS 患者脊髄に観察される封入体は形成されていないことが、マウスにおける特殊性を意味しているかもしれない。

種差を考慮に入れつつ、AR2 マウスを用いて ADAR2 活性低下が TDP-43 局在異常を伴い神経細胞死に至るカスケードを解析することが、孤発性 ALS の病因解明に結びつくと考えられる。

E. 結論

孤発性 ALS 運動ニューロンにおける ADAR2 活性低下は、TDP-43 局在異常を引き起こす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. 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): 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. *J Neurosci* **30**, 11917-11925 (2010).
 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. Aizawa, H., et al. *Acta Neuropathol.* **120**, 75-84 (2010).
 12. Moisse, K., et al. *Brain Res.* **1249**, 202-211 (2009).
 13. Sato, T., et al. *Neuroscience* **164**, 1595-1578 (2009).
 14. Kanazawa, M., et al. *J. Neurochem.*, in press (2010)
 15. Lee, E.B., et al. *Acta Neuropathol.* **115**, 305-311 (2008).

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

研究分担者：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

下川 浩輝 京都大学物質-細胞統合システム拠点・助教

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。SOD1の発現量を濃度依存的及び特異的に減少させる化合物を同定しNrf2のリン酸化を抑制することを見出した。また構造解析よりSOD1の発現を低下させる既存薬を細胞実験及びALSモデルマウスで同定した。

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

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。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、内因性 SOD1 蛋白の実際の発現低下を ELISA で確認した。その中で最も効果の高いヒット化合物を見出し、ウェスタン・ブロッティングで SOD1 蛋白が実際に減少していることを確認した。さらなる解析によりヒット化合物は SOD1 の主要な転写活性化因子の 1 つである NF-E2 DNA binding protein (Nrf2) のリン酸化を抑制することを見出した。さらに他のヒット化合物の構造解析から既存薬 X を同定した。既存薬 X でもレポーターシステム、ELISA、ウェスタンブロッティングで SOD1 蛋白発現を抑制することを確認した。既存薬 X を ALS モデルマウスである変異 SOD1G93A トランスジェニックマウスに 4 週間経口投与し、その脊髄内 SOD1 mRNA レベルの低下を確認し、*in vivo* でも効果を有することを見出した。

D.考察および E.結論

我々の確立した FALS 標的分子 SOD1 の発現モニタリングシステムを用いて、SOD1 転写を抑制する低分子化合物及び既存薬 X を同定した。さらに既存薬 X は ALS モデルマウス投与実験から *in vivo* でも効果を有することを見出した。ヒット化合物が SOD1 の転写を抑制するメカニズムをさらに検討するとともに、今後このシステムが、FALS 治療薬開発に寄与するかどうか、変異 SOD1 マウス等を用いた治療実験と共に、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

K Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S. (2010) Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci*, 30:11917-25.

Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Shimogawa H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R (2011) Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat ALS, *J Biomol Screen* in press

2. 学会発表

村上 学・転写を標的とした家族性筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発・The 51st Annual Meeting of the Japan Society of Neurology, Tokyo, Japan (2010. 5. 22.)

村上 学・転写を標的とした家族性筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発・The 28th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurological Therapeutics, Yokohama, Japan, (2010. 7. 16.)

田代善崇、井上治久、山崎真弥、阿部学、伊東秀文、三澤日出巳、崎村建司、高橋良輔、神経変性疾患モデル作製のための 26S プロテアソームコンディショナルノックアウトマウスの確立と解析、第 33 回日本神経科学大会、神戸 (2010.9.3)

Murakami G, Inoue H, Takahashi R, A high-throughput screening assay for drug discovery in SOD1-mediated ALS targeting the transcription of SOD1・The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan. (2010. 9. 3.)

Murakami G, Inoue H, Takahashi R, A high-throughput screening assay for drug discovery in SOD1-mediated ALS targeting the transcription of SOD1 • The 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, U.S.A., (2010. 11. 17.)

Tashiro Y, Inoue H, Yamazaki M, Abe M, Ito H, Misawa H, Sakimura K, Takahashi R, The establishment and analysis of 26S proteasome conditional knockout mice for the mechanisms of neurodegenerative diseases. BMB2010、神戸 (2010.12.8)

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

本年、神経細胞死と密接に関係するミトコンドリアの品質管理に関する研究を中心に研究を行った。その結果、オートファジーによる不良ミトコンドリアの新しい品質管理機構を見出した。若年性でパーキンソン病を発症させる原因遺伝子として同定され活発に研究されてきたParkin（ユビキチンリガーゼをコード）とPINK1（タンパク質リン酸化酵素をコード）の遺伝子産物がオートファジーによるミトコンドリアのクリアランスを指導させる必須因子として作用することを明らかにした。その成果を箇条書きにすると、（1）PINK1は通常（ミトコンドリアが健康である場合）恒常的に分解されていて検出できないが、脱共役剤‘uncoupler’であるCCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)処理によってミトコンドリアの膜電位を低下させると、損傷ミトコンドリアの外膜に蓄積すること、（2）この蓄積したPINK1が細胞質のParkinを損傷ミトコンドリアに移行させる“リクルート因子”として作用すること、（3）選択的オートファジーの仲介因子として同定されていたp62が損傷ミトコンドリアの凝集・細胞内移動因子であること、等である。これらの結果から、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。ミトコンドリアの品質管理機構の破綻は、神経細胞における病態発症の主要原因と考えられており、本研究は、今後、筋萎縮性側索硬化症（ALS：amyotrophic lateral sclerosis）を含む神経変性疾患に対する新しい治療薬開発の有力なヒントを与えることが期待される。

A.研究目的

Parkin や PINK1 は常染色体劣性若年性パーキンソン病の責任遺伝子として発見された遺伝子であるが、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）やアルツハイマー病などを多くの神経変性疾患の発症に間接的に（しかし重要に）関与していると考えられている。しかし、これらがユビキチンリガーゼ（Parkin）やセリン/スレオニン型タンパク質リン酸化酵素（PINK1）と分子機能は、その一次構造から判明したが、細胞内での機能は、全く不明であった。

ところが、これらがミトコンドリアの品質管

理、即ち不良ミトコンドリアのオートファジー（自食作用）によるクリアランス（選択的浄化）に関与する働きが提案されるに及んで、事態は一変した。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・報告されてきた。事実、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。一方、われわれが作製した中枢神経系特異的オートファジー欠損マウスでは、神経変性疾患のモデルマウスと同じような行動異常を引き起こし、多くの神経変性（ニューロン死）が脳で広範囲に起きていることが判明した。そして詳細な解析

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。

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、解析すると共にこのオルガネラの選択的オートファジー（Mitophagy）の作用機序についても併せて検討した。

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 μ M CCCP and MEFs with 30 μ 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 MgCl₂, 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 μ M CCCP and 50 μ 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 μ 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), anti-p62.

遺伝子欠損MEFs

MEFs (mouse embryonic fibroblasts): Parkin-欠損MEFs, PINK1-欠損MEFs, p62-欠損MEFs。

(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] Mitophagy (オートファジーによる選択的なミトコンドリア分解)における Parkin の機能解析。

内在性のパーキンが存在しない (Parkin 遺伝子が欠損) 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 mM) してミトコンドリア内膜の電子伝達系を破壊し、膜電位 (プロトン“H⁺”勾配) をほぼ完全に低下させた。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 と共染色すると、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/局在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。そのユビキチン修飾は、K63-型ポリユビキチン鎖が主であるが、K48-型ポリユビキチン鎖も観察された。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判明した。

[結果2] Mitophagy における PINK1 の機能解析。

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 mM, 3 時間)を行った。その結果、野生型 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。

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が、この領域を GFP に連結して細胞内に発現させるとその融合タンパク質は恒常的にミトコンドリアに局在するので、ミトコンドリア局在化シグナルとして機能的である) 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⁽⁴⁾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(触媒領域の 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。

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。

[結果 3] Mitophagy における p62 の機能解析。

p62 は、異常タンパク質の選択的オートファジーを仲介する分子として、近年、俄に脚光を浴びている分子である。そして最近、この p62 が PINK1・Parkin 系の作用でユビキチン化された不良ミトコンドリアをオートファジーでの分解を仲介する役割が報告された。しかし我々は、次のような実験結果から、この仮説が正しくないことを明らかにした。(1) p62 は CCCP 処理によって損傷したミトコンドリアに移行した。(2) この p62 の損傷ミトコンドリアへの移行は、PINK1 と Parkin 依存的であった。このとき p62 の C 末端の UBA ドメインは必須であったが、LC3 との相互作用領域 LRS(LCS-recognition sequence/LIR=LC3-interaction region)は不必要であ

った。(3) p62-欠損 MEFs では、損傷ミトコンドリアの凝集と核近傍への microtubules 依存的な移動は、ほぼ完全に抑制されたが、損傷ミトコンドリアの分解 (mitophagy) は全く阻害されなかった。この損傷ミトコンドリアの凝集には、p62 の N-末端領域の PB1(self-oligomerization)ドメインが必須であった。

D. 考察

本年度の研究により、PINK1 と Parkin によるミトコンドリアの品質管理の分子機構が明確になった。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推定された。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 (またこの ROS はミトコンドリアが障害されると、大量に発生する)。その結果、ミトコンドリアの DNA (酸化修飾)・タンパク質 (酸化修飾)・脂質 (peroxidation) は、絶えず ROS による酸化障害の危機に曝されている。したがって、健康なニューロンの維持には、損傷ミトコンドリアの品質管理 (クリアランス) が、重要な役割を果たしていることが近年、判明してきた。不良ミトコンドリアがオートファジー経路でクリアランスされると健康なミトコンドリアは自立的に増殖して細胞は健康を回復することが出来る。従って、mitophagy で異常ミトコンドリアを適切に処理することは、神経変性から健康なニューロンを守るために極めて重要であることが示唆された。

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。p62 は、不良ミトコンドリアの mitophagy は仲介しないが、その凝集／封入体の形成に重要な役割を果たしている分子である。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

(1) Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito, Y., 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 inactivation of Keap1. **Nat. Cell Biol.** 12, 213-223.

(2) Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, CA, Sou, Y., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., and Tanaka, K. (2010) PINK1 stabilized by depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. **J Cell Biol.** 189, 211-221.

(3) Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., Tanaka, K., and Matsuda, N. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. **Genes Cells** 15, 887-900.

(4) Riley, B.E., Kaiser, S.E., Shaler, T.A., Ng, A.C.Y., Hara, T., Hipp, M.S., Lage, K., Xavier, R. J., Ryu, K-Y., Taguchi, K., Yamamoto, M., Tanaka, K., Mizushima, N., Komatsu, M., and Kopito, R.R. (2010) Ubiquitin accumulation in autophagy-deficient mice is dependent on the Nrf2-mediated stress

response pathway: a potential role for protein aggregation in autophagic substrate selection. **J. Cell Biol.** 191, 537-552.

(5) 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.

(6) Kimura, Y. and Tanaka, K. (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. **J. Biochem.** 147, 793-798.

(7) Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, I. (2011) Sharpin is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin chain assembly complex. **Nature** in press.

(8) Tatsumi, K., Yamamoto-Mukai, H., Shimizu, R., Waguri, S., Sou, Y-S., Sakamoto, A., Taya, C., Shitara, H., Hara, T., Chung, C.H., Keiji, T., Yamamoto, M., and Komatsu, M. (2011) The Ufm1-activating enzyme Uba5 is indispensable for erythroid differentiation in mice. **Nat. Commun.** in press.

2. 学会発表

(1) Keiji Tanaka: "The Role of the PINK1/Parkin Pathway on the Autophagic Clearance of Damaged Mitochondria" in "The 2010 Rappaport Research Institute Ubiquitin Day", Cancer Center, Rappaport Research Institute and Faculty of Medicine, Technion -Israel Institute of Technology, Haifa, March 11, 2010 (Israel)

(2) Keiji Tanaka: "Autophagic Control of Mitochondrial Homeostasis and Neurodegeneration" [Mechanism underlying the cause of Parkinson's Disease: The functions of Parkin/PINK1] in "Proteolysis and Neurodegeneration: 5th INPROTEOLYSIS meeting", EMBO Workshop, Madrid, 4-7th, May 2010 (Spain)

(3) Keiji Tanaka: "Impairment of proteolytic

homeostasis as cause of neurodegeneration”in S1
JOINT SYMPOSIUM [Key Mechanisms in
Neurodegeneration] PRION & ICN Congress in
Salzburg 8th September till 15th September 2010
(Austria)

(4) Keiji Tanaka: “Autophagy and Parkinson’s
Disease”in “1st Sino-Japan Autophagy Symposium”,
Xi’an, 15th October till 17th October 2010 (China)

(5) Keiji Tanaka: “The PINK1/Parkin pathway controls
mitochondrial homeostasis whose impairment causes
Parkinson’s disease” in “Global COE International
Symposium / Retreat 2010”, Awaji Island, November
5th – 6th, 2010 (Japan)

(6) Keiji Tanaka: “Parkinson’s disease: a quality
control disease of depolarized mitochondria” in
“The 1st small Korea/Japan symposium”, Seoul,
January 27th - 29th, 2011 (Korea)

(7) 田中啓二 : The Structure and Biological
Functions of Proteasomes (+ The Role of
PINK1/Parkin in Mitophagy and Parkinson’s
Disease). 第62回日本細胞生物学会大会 (The 62nd
Annual Meeting of the Japanese Society of Cell
Biology) ・特別講演 May 20th (Osaka)

(8) 田中啓二、松田憲之、尾勝圭 : パーキンソン
病の分子病態機序のブレイクスルー :
Parkin/PINK1 の機能“パーキンソン病の分子病
態機序”、新世代の神経学—Breakthrough to the
NEXT STAGE—、第 51 回日本神経学会総会 平
成 2 2 年 5 月 2 1 日 (東京)

H. 知的所有権の取得状況

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 ベクターによる乏突起膠細胞への遺伝子導入

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）

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

¹自治医科大学 神経内科学部門、²同 神経脳生理学部門

研究要旨

血管内投与により広範な脳領域の乏突起膠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、乏突起膠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、脳の広範な領域の乏突起膠細胞で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への応用を目標として、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの血管内投与により治療用の遺伝子を乏突起膠細胞へ導入する方法を開発する。

B. 研究方法

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを利用した。3型AAVのゲノム両端のITR配列の間に新規開発のミエリン塩基性蛋白質(MBP)プロモーター、蛍光蛋白質GFPのcDNA、SV40 poly(A)配列からなる発現カセットを搭載した。野生型の1、2、8、9型AAVを基本として、それらの外被蛋白のアミノ酸配列を改変した数種類の変異型pseudotypeベクターを作製した。6週齢のC57BL/6Jマウスの血管内に投与し4週間後に脳組織を免疫組織化学により解析した。

C. 研究結果

特定の変異型AAVベクターを投与したマウスでは、大脳皮質・線条体を含む広範な領域

において、抗MBP抗体あるいは抗Olig2抗体に反応する乏突起膠細胞にGFPの発現が認められた。明らかな炎症反応や組織障害は認められなかった。

D. 考察

これまで、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。カプシドと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、血管内投与により広範な脳領域の乏突起膠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。SOD1トランスジェニックマウスにおけるNG2細胞の増加など、ALSにおいても乏突起膠細胞の関与が推察されており、今後、病態解析と遺伝子治療に応用したい。

E. 結論

広範な脳領域の乏突起膠細胞へ容易に遺伝子導入可能な血管内投与型 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, Asari S, Fujimoto K, Ozawa K, Nakano I: Gene therapy for Parkinson's disease. Strategies for the local production dopamine. Gene Therapy & Regulation 5:1-9, 2010.

2. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Mizukami H, Asari S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K, Nakano I: A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. Mol Ther, 18(9):1731-1735, 2010.

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: AADC gene therapy for Parkinson's disease: A phase I study. The Japan society of gene therapy's 16th annual meeting. Utsunomiya, July 1, 2010. (abstract p55)

H. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

なし

血管新生因子による ALS モデルラット神経保護の試み

研究分担者 青木正志 東北大学大学院医学系研究科神経内科学
研究協力者 割田 仁¹⁾, 水野秀紀¹⁾, 鈴木直輝¹⁾, 糸山泰人²⁾, 船越 洋³⁾, 中村敏一⁴⁾
¹⁾ 東北大学神経内科, ²⁾ 国立精神・神経医療研究センター病院,
³⁾ 大阪大学分子再生医学, ⁴⁾ 大阪大学先端科学イノベーションセンター

研究要旨 本研究は ALS の画期的治療となり得る血管新生・保護因子による神経保護療法開発の可能性を探るために計画された。変異 *SOD1* 遺伝子導入ラット ALS モデルでは、運動ニューロン変性部位である脊髄前角で発症早期から有意に微小血管新生増加が認められる。そこへ 3 種の異なる血管新生・保護因子をそれぞれ発症後に髄腔内持続投与すると、いずれの因子も血管新生促進・保護効果を示すとともに脊髄前角細胞の脱落を有意に抑制した。微小血管内皮細胞あるいは周皮細胞が ALS 病態の新たな治療標的となる可能性が示唆される。

A. 研究目的

脳・脳幹・脊髄にいたる系統的運動ニューロン変性を特徴とする筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は主として成人発症の進行性神経変性疾患であり、ALS 全体の約 2% (家族性 ALS の約 20%) に Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*) 遺伝子変異が見出されている。また、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor, *VEGF*) の低酸素応答性が低いハプロタイプが ALS 発症と関連する報告や、血管新生因子 angiogenin (*ANG*) 遺伝子変異が新たな ALS (ALS9) の原因遺伝子として発見されている。

本研究班において我々はラットの ALS モデル (Nagai, *et al.* J Neurosci 2001) を用い、脊髄に内在する新生細胞の解析を行ってきた。ALS ラット脊髄では発症前より新生細胞が有意に増加し、その多くはグリア新生に与っている中で、微小血管内皮細胞にも新生が認められることを見出し本研究班で報告してきた。この微小血管新生増加は発症後に有意となり、そのピークは発症早期にみられることが分かっている。一方、近年、変異 *SOD1* 遺伝子導入モデル脊髄微小血管の血液-脊髄関門

障害が早期病態として複数報告されている。

そこで今回、ALS 病態における微小血管新生の意義を明らかにするため、外来性の血管新生・保護因子を投与し、神経保護の可能性を検討した。

B. 研究方法

発症1週後 (25-26 週齢)、筋萎縮と運動麻痺が両後肢に生じ始めた His46Arg 変異 *SOD1* 遺伝子導入 (Tg) ラット脊髄腔内に血管新生・保護因子を 2 週間、皮下浸透圧ポンプを用い持続投与した。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を最初の 7 日間持続投与して新生細胞を標識し、血管新生・保護因子投与終了時の腰髄灌流固定凍結切片で各種選択的マーカーによる多重蛍光免疫組織化学の定量的解析を共焦点レーザー顕微鏡下に行った。

溶媒 (PBS) 投与群を対照とし、3 種の血管新生・保護因子、すなわち血管内皮細胞を標的とした線維芽細胞増殖因子 2 型 (fibroblast growth factor-2, FGF-2)、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、および周皮細胞を標的とした血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor-B, PDGF-B) を各々投与した 3 群、合わせて 4 群間で微小血管新生と病理学的変化を比較し、統計学

的解析を加えた(各群 n=4-5)。

〔倫理面への配慮〕すべての遺伝子操作は東北大学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で動物愛護面に十分配慮しかつ利用動物数を極力減らすように努めた。

C. 研究結果

〔血管新生への効果〕 対照群に比して血管新生・保護因子 (FGF-2, HGF, PDGF-B) 投与群の腰髄前角では、血管内皮細胞マーカー (Reca-1) 陽性微小血管密度が有意に増加していた ($P<0.0001$)。さらに、単位面積あたりの新生血管内皮細胞数 (Reca-1/laminin/BrdU 三重陽性細胞) が血管新生・保護因子投与群ではいずれも増加傾向にあり、なかでも HGF 投与群では有意な増加促進を認めた ($P<0.0001$)。この HGF 投与群では血管内皮バリア抗原 (endothelial barrier antigen) 陽性像も有意に保持されていた ($P<0.001$)。

〔神経変性抑制効果〕 発症後も進行性に脱落する腰髄前角細胞を評価すると、対照に比して FGF-2, HGF, PDGF-B いずれの血管新生・保護因子投与群でも Hu C/D 陽性ニューロンが有意に多く残存しており ($P<0.0001$)、本 ALS モデル腰髄の進行性神経変性に対する抑制効果が認められた。

〔グリア増生への効果〕 腰髄前角の ionized calcium-binding adapter molecule-1 (Iba-1) 陽性ミクログリアと glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性アストロサイト増生を検討した。対照群に比し、HGF 投与群でのみミクログリア増生が有意に抑制されていた ($P<0.0001$)。他の血管新生・保護因子 (FGF-2, PDGF-BB) 投与群ではミクログリア増生抑制傾向はみられても有意ではなかった。一方、アストロサイト増生については 4 群で有意差は認められなかった。

D. 考察

本研究結果より、発症後の ALS モデル脊髄前

角において血管新生・保護因子の持続投与が微小血管新生を促進するとともに、神経保護効果を示すことが明らかとなった。この結果は、昨年度までに本研究班で報告してきた発症後・早期にピークをもつ微小血管新生現象が、微小血管障害に対する内因性代償(再生)機転である可能性をより支持する。

FGF-2, HGF, PDGF-B はいずれも血管新生・保護効果だけでなく、血液-脊髄関門のバリア機能改善による血管安定化能をもつことが報告されている。前 2 者 (FGF-2 と HGF) はこれらに加えて運動ニューロン自体に対する神経保護作用も報告されていることから、神経変性抑制効果には血管新生・保護作用を介さない直接的な運動ニューロン保護作用も想定される。実際、我々は大型の脊髄前角細胞(運動ニューロン)に FGF-2 受容体 (FGFR1) や HGF 受容体 (c-Met) の発現を確認している。

これに対して、対運動ニューロン直接保護作用が報告されていない血管新生・保護因子 PDGF-B 投与によってもまた神経保護効果が得られたことは興味深い。最近、血管周皮細胞 (pericytes) を部分的に欠損するマウスが血液-脳関門のバリア機能障害や微小循環障害、血管内から実質への神経毒性物質の漏出をきたし、神経炎症ひいては進行性の神経変性を生じさせることが報告された (Bell, *et al.* Neuron 2010)。このことは中枢神経系における微小血管の機能維持に周皮細胞が重要であることだけでなく、微小血管障害が直接神経変性を引き起こすことを示しており、細胞外微小環境・ホメオスタシス破綻と神経変性の密接な関連を示すものとして注目されている。

こうした報告と本研究結果をふまえると、少なくとも本 ALS モデルのような変異 SOD1 関連神経変性においては、神経保護戦略として微小血管内皮細胞および周皮細胞が新たな標的となる可能性が示唆される。今後、微小血管新生・保護と神経変性抑制の分子連関をより詳細に検索する必要がある。

E. 結論

本 ALS モデル変性脊髄では、微小血管障害に対する代償(再生)機転として微小血管新生が生じていることが示唆された。本病態では微小血管内皮細胞あるいは周皮細胞を標的とした血管新生・保護が神経変性の抑制に有効な可能性があり、新たな治療戦略の開発に寄与するものとして期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki N, Aoki M, Warita H, Kato M, Mizuno H, Shimakura N, Akiyama T, Furuya H, Hokonohara T, Iwaki A, Togashi S, Konno H, Itoyama Y. ALS with FUS mutation in Japan, with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. **J Hum Genet**, 2010; 55(4): 252-254.
- 2) Suzuki N, Mizuno H, Warita H, Takeda S, Itoyama Y, Aoki M. Neuronal NOS is dislocated during muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Sci**, 2010; 291(1-2): 95-101.
- 3) Hadano S, Otomo A, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Akatsuka A, Koike M, Aoki M, Uchiyama Y, Itoyama Y, Ikeda JE. Loss of ALS2/Alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1-expressing mouse ALS model by disturbing endolysosomal trafficking. **PLoS One**, 2010; 5(3): 9805.
- 4) Sanagi T, Yuasa S, Nakamura Y, Suzuki E, Aoki M, Warita H, Itoyama Y, Uchino S, Kohsaka S, Ohsawa K. Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurosci Res**, 2010; 88(12): 2736-2746.
- 5) 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; 293(1-2): 6-11.

- 6) Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Morita M, Nakano I, Kanai K, Ito S, Ishikawa K, Mizusawa H, Yamamoto T, Tsuji S, Hasegawa K, Shimohata T, Nishizawa M, Miyajima H, Kanda F, Watanabe Y, Nakashima K, Tsujino A, Yamashita T, Uchino M, Fujimoto Y, Tanaka F, Sobue G; Japan SBMA Interventional Trial for TAP-144-SR (JASMITT) study group. Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet Neurol**, 2010; 9(9): 875-884.
 - 7) Shimazawa M, Tanaka H, Ito Y, Morimoto N, Tsuruma K, Kadokura M, Tamura S, Inoue T, Yamada M, Takahashi H, Warita H, Aoki M, Hara H. An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. **PLoS One**, 2010; 5(12): e15307.
 - 8) Aoki M, Warita H, Mizuno H, Suzuki N, Yuki S, Itoyama Y. Feasibility study for functional test battery of SOD transgenic rat (H46R) and evaluation of edaravone, a free radical scavenger. **Brain Res**, 2011; Jan 25 [Epub ahead of print].
- ### 2. 学会発表
- 1) Warita H, Aoki M, Mizuno H, Suzuki N, and Itoyama Y. Angiogenesis in the spinal cord of transgenic rats with motor neuron degeneration. July 17-22, 2010. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy.
 - 2) Aoki M, Suzuki N, Warita H, Kato M, Mizuno

H, Shimakura N, Akiyama T, Furuya H, Hokonohara T, Iwaki A, Togashi S, Konno H, and Itoyama Y. FALS with FUS mutation in Japan with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. July 17-22, 2010. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy.

- 3) Warita H, Aoki M, Mizuno H, Suzuki N, and Itoyama Y. Myogenesis in skeletal muscles with slowly progressive denervation in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. October 12-16, 2010. 15th International Congress of the World Muscle Society, Kumamoto, Japan.
- 4) 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀, 鈴木直輝, 船越 洋, 中村敏一, 糸山泰人. 筋萎縮性側索硬化症モデルラット脊髄における微小血管新生. 2010年3月18-19日 第9回日本再生医療学会(広島)
- 5) 割田 仁, 青木正志, 水野秀紀, 鈴木直輝, 船越 洋, 中村敏一, 糸山泰人. 微小血管新生促進による ALS モデルラット神経保護の試み. 2010年5月20-22日 第51回日本神経学会総会(東京)
- 6) 佐柳友規, 大澤圭子, 中村泰子, 鈴木恵里, 青木正志, 割田 仁, 糸山泰人, 内野茂夫, 高坂新一. Involvement of phagocytic microglia in increased vulnerability of motoneurons after facial nerve avulsion in presymptomatic ALS model rats. 2010年9月2-4日 Neuro2010[第33回日本神経科学大会, 第53回日本神経化学会大会, 第20回日本神経回路学会大会](神戸)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許登録

ラットを用いた ALS モデル(出願済)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ALS 治療に向けた HGF 供給法の検討—遺伝子治療法の可能性について

研究分担者 准教授・船越 洋¹⁾

¹⁾大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学／分子再生医学
(現旭川医科大学脳機能医工学研究センター)

研究協力者 准教授・角山 圭一^{1),2)}、特任研究員・島田 (大谷) 若菜^{1),3)}、特任教授・
中村 敏一³⁾、講師・青木 正志⁴⁾、病院長・糸山 泰人⁵⁾、准教授・宮
武 伸一⁶⁾、Coffin RS⁷⁾、講師・水上 浩明⁸⁾、教授・小澤 敬也⁸⁾

¹⁾大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学／分子再生医学

²⁾姫路獨協大学 薬学部

³⁾大阪大学先端科学イノベーションセンター

⁴⁾東北大学 神経内科

⁵⁾国立精神神経医療センター病院

⁶⁾大阪医科大学 脳神経外科

⁷⁾ロンドン大学

⁸⁾自治医科大学 分子病態治療研究センター

研究要旨

ALS は運動ニューロンが特異的に変性する致死性変性疾患で、現時点で有効な治療法がない。私達は肝細胞増殖因子 (HGF) が ALS の運動ニューロンに対して直接神経細胞保護作用を示すことに加えて、グリオシスを抑制することで寿命延長治療効果を示すことを報告してきた。しかし、用いた HGF 供給法としてのトランスジェニックマウスのアプローチを直接ヒト ALS 患者に適用することはできない。そこで、HGF 遺伝子をラット神経系に効率に誘導できるかどうか各種遺伝子治療ベクター (単純ヘルペスウイルスベクター: HSV1 およびアデノ随伴ウイルスベクター: AAV2, AAV4, AAV5) について解析した。方法としては、脳脊髄定位手術器具を用いて各ベクターを脊髄に直接供給した場合と、脳脊髄液中に供給した場合を比較検討した。特にウイルスベクターの投与量依存性についても解析した。脳、脊髄 (頸髄、胸髄、腰髄)、脳脊髄液中における発現を解析した結果、今回用いた供給条件で脊髄については比較的供給できていた。但し、発現期間は HSV1 では長期間とは言えなかった。他の組織領域に於ける発現は不十分であった。以上から、現時点において ALS への HGF 供給法としては、ウイルスベクター投与法に比較して蛋白質の髄腔内持続供給法 (Ishigaki, Aoki *et al.*, 2007) が優れていると言える。ヒトリコンビナント HGF 蛋白質髄腔内投与の霊長類における安全性試験と薬物動態試験が順調に進んだことから、ALS 治療の現時点での最適な HGF 供給法は髄腔内投与法といえた。これらの結果を踏まえ、H23 年度には東北大学で ALS 患者への HGF 蛋白質髄腔内投与法の Phase I study が予定されている。現時点での最善の方法として日本発信の新しい ALS 治療法となることが期待される。一方、ウイルスベクターの供給については、改良が必要であることが明らかとなった。今後、広範囲運動ニューロンに長期間持続供給可能なウイルスベクターとその供給法の検討が必要である。