

位置づけられる。この疾患が初めて記載されて以来、約140年経過した現在尚、その真に有効な治療法は確立していない。治療剤として神経栄養因子、神経保護効果、カスパーゼ抑制、銅キレート作用、グルタミン酸抑制作用、抗酸化剤等に基づいた薬剤の効果についての検討がなされ、一定の効果は認められている。しかし、現在、ALS治療薬として販売されているのは、グルタミン酸受容体のアゴニストとしてグルタミン酸抑制作用のあるリルゾールのみである。しかし、リルゾールのALSに対する治療効果は十分とはいえず、さらに新たなALS治療薬の開発が望まれている。かかる実状において、我々は、ALSの新規経口治療薬として、XOR阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物において、顕著に優れたALS治療作用を示すことを、ALS動物モデルを用いた実験の結果から示した。一方、XOR阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質となるアロプリノールにはALS治療作用を認めなかった。即ち、XOR阻害作用を有した上で、プリンサルベージ回路の基質とならない化合物はALS治療薬となり、プリンサルベージ回路の基質となる化合物：アロプリノールは痛風薬にとどまる事実は、当該化合物がALSの治療薬になり得ることを意味する。

## E. 結論

キサントニン酸化還元酵素阻害作用を有しかつプリンサルベージ回路の基質とならない化合物:TEI-6720: 2-(3-シアノ-4-イソブトキシフェニル)-4-メチル-5-チアゾールカルボン酸、2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-5-thiazolocarboxylic acid は、ALS の治療薬になり得る。

## F. 健康危険情報

特記なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koyama Y, Hiratuka T, Matuzaki S, Yamagishi S, Kato S, Katayama Y, Tohyama M: Familiar amyotrophic lateral sclerosis (FALS)-linked SOD1 mutation accelerates neuronal cell death by activating cleavage of caspase-4 under ER stress in an *in vitro* model of FALS. *Neurochemistry International*. 57(7): 838-843, 2010.
  - 2) Strong MJ, Hortobágyi T, Okamoto K, Kato S: Amyotrophic lateral sclerosis, primary lateral sclerosis and spinal muscular atrophy. In: *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. Dickson D (ed), ISN Neuropath Press, Basel, 2010 (in press).
- ### 2. 学会発表
- 1) Sumi H, Shinzawa K, Kato S, Tsujimoto Y, Sakoda S: Axonal degeneration associated with degenerated membranes of mitochondria in Group VIA phospholipase A<sub>2</sub> knockout mice. 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, September 11-15, 2010.
  - 2) 加藤信介、島田一大谷若菜、船越 洋、中村敏一、加藤雅子、平野朝雄: 肝細胞増殖因子のエンドクライン性供給はGIH-G93A ALS マウスで惹起する肝病理学的変化からの回復に寄与する. 第51回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 4月23-25日, 2010.
  - 3) 別宮豪、隅 寿、加藤信、山寺みさき、藤村晴俊、佐古田三郎: 弧発性 ALS 症例の腰髄前角細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化. 第51回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 4月23-25日, 2010.
  - 4) 山寺みさき、隅 寿恵、別宮豪一、藤村晴俊、加藤信介、佐古田三郎: 弧発性 ALS 一次運動野における TDP-43 陽性細胞質内封入体の形成に伴う細胞への影響. 第51回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 4月23-25日, 2010.
  - 5) 隅 寿恵、加藤信介、新沢康英、辻本賀

英、佐古田三郎: Group VIA phospholipase A2 $\beta$  遺伝子欠損マウスにおけるミトコンドリア異常と neuroaxonal dystrophy. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 4 月 23-25 日, 2010.

日本医科大学  
出願国: US (米国)  
出願番号: 12/374,187  
2009/10/7 出願  
公開番号: US-2010-0010054-A1  
2010/1/14 公開

#### H.知的財産権の出願・登録状況

##### 1.特許取得 (出願中)

- 1). 発明の名称: 筋萎縮性側索硬化症治療薬  
発明者: 加藤信介、西野武士、阿部靖子  
出願人: 国立大学法人鳥取大学、学校法人日本医科大学  
出願国: 日本  
出願番号: 特願 2008-525784  
2010/4/22 出願  
基礎出願: 特願 2006-196343  
2006/7/19 出願
- 2) 発明の名称: THERAPEUTIC AGENT FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS  
発明者: 加藤信介、西野武士、阿部靖子  
出願人: 国立大学法人鳥取大学、学校法人日本医科大学  
出願国: PCT  
出願番号: PCT/JP2007/000765  
2007/7/13 出願  
公開番号 PCT/WO2008/010315  
2008/1/24 公開
- 3) 発明の名称: THERAPEUTIC AGENT FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS  
発明者: 加藤信介、西野武士、阿部靖子  
出願人: 国立大学法人鳥取大学、学校法人

- 4) 発明の名称: THERAPEUTIC AGENT FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS  
発明者: 加藤信介、西野武士、阿部靖子  
出願人: 国立大学法人鳥取大学、学校法人日本医科大学  
出願国: EPC  
出願番号: 07790261.7  
2009/1/19 出願  
公開番号: EP2050467  
2009/4/22 公開
  - 5) 発明の名称: THERAPEUTIC AGENT FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS  
発明者: 加藤信介、西野武士、阿部靖子  
出願人: 国立大学法人鳥取大学、学校法人日本医科大学  
出願国: カナダ  
出願番号: 2658342  
2009/1/19 出願  
公開番号: CA2658342  
2008/1/24 公開 (PCT 公開日に準ずる)
- 2.実用新案登録 なし  
3.その他 なし

## 孤発性 ALS における isopentenyl diphosphate isomerase 遺伝子領域の コピー数変化

研究協力者：加藤丈夫<sup>1</sup>

共同研究者：江見 充<sup>1,2</sup>、佐藤秀則<sup>1,2</sup>、荒若繁樹<sup>1</sup>、和田 学<sup>1</sup>、川並 透<sup>1</sup>、片桐 忠<sup>3</sup>、  
圓谷建治<sup>4</sup>、豊島 至<sup>5</sup>、田中章景<sup>6</sup>、祖父江 元<sup>6</sup>、松原謙一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山形大学医学部第三内科、<sup>2</sup>DNAチップ研究所、<sup>3</sup>山形県立河北病院、

<sup>4</sup>国立病院機構山形病院、<sup>5</sup>秋田大学医学部医学教育学、<sup>6</sup>名古屋大学医学部神経内科

### 研究要旨

孤発性 ALS の病因に遺伝素因が関与している可能性が示唆されている。そこで本研究では、コピー数多型が孤発性 ALS のリスクとなるか否か検討した。deCODE/Illumina CNV370K chip、real-time quantitative polymerase chain reaction(qPCR)および region-targeted high-density oligonucleotide tiling microarray (Agilent)による解析の結果、多くの孤発性 ALS 患者で 10p15.3 領域に種々のパターンの segmental copy number gain が認められた。この領域には 2 つの遺伝子 isopentenyl diphosphate isomerase 1 (IDI1) と IDI2 が存在し、これらの遺伝子を含む segmental copy number gain が孤発性 ALS の病因・病態に関与している可能性が示唆された。

### A.研究目的

双生児研究の結果から、孤発性 ALS の病因に遺伝素因が関与している可能性が示唆されている (Graham et al,1997; Lichtenstein, et al,2002; Wijesekera et al,2009; Al-Chalabi et al, 2010)。本研究では、コピー数多型が孤発性 ALS のリスクとなる可能性について検討した。

### B.研究方法

孤発性 ALS 患者および健常者の末梢血より DNA を抽出し、deCODE/Illumina CNV370K chip、real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR)、および region-targeted high-density oligonucleotide tiling microarray (Agilent)にて解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究は山形大学医学部倫理委員会の承認を得てから実施し、研究対象者からは文書で同意を得た。

### C.研究結果

deCODE/Illumina CNV370K chip による解析では、多くの孤発性 ALS 患者の 10 番染色体短腕のサブテロメア領域(10p15.3)にコピー数の増加を認めた。この領域には相同性のある 2 つの遺伝子 isopentenyl diphosphate isomerase 1 (IDI1) と IDI2 が存在した。qPCR 解析では、孤発性 ALS 患者 83 例中 46 例、健常対照例 99 例中 10 例に、この領域のコピー数の増加を認めた( $p = 4.86 \times 10^{-11}$ , Odds Ratio 10.8)。Region-targeted high-density oligonucleotide tiling microarray によ

る解析でも、孤発性 ALS 患者にこの領域のコピー数増加が確認され、40 kb に亘る領域に種々のパターンの segmental copy number gain が認められた。

#### D. 考察

IDI1 はメバロン酸経路に存在する重要な酵素であり、コレステロールを始めとし、膜蛋白質を含む多くのリポ蛋白質の生合成に必須の酵素である。これまで孤発性 ALS の病態に脂質代謝やメバロン酸経路が関与することを示唆する報告がヒト (Dupuis et al, 2008; Golomb et al, 2009; Zinman et al, 2008) および動物モデル (Yochem et al, 2005; Niebroj-Dobosz et al, 2007; Andersson et al, 2005; Zhai et al, 2009) でなされている。したがって、今後、IDIs 領域の segmental copy number gain が、どのようなメカニズムで運動ニューロン死を惹起するのかを明らかにする必要がある。

#### E. 結論

IDI1/IDI2 領域の segmental copy number gain は孤発性 ALS の病因・病態に関与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kato T, Emi M, Sato H, Arawaka S, Wada M, Kawanami T, Katagiri T, Tsuburaya K, Toyoshima I, Tanaka F, Sobue G, Matsubara K: Segmental copy-number gain within the region of isopentenyl diphosphate isomerase genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402 (2010) 438-442.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

米国特許仮出願 (出願人: 加藤丈夫、江見 充、佐藤秀則、出願日: 2010 年 10 月 15 日、仮出願番号: 61/393,733)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 神経突起様伸長及び増殖を制御する TRIM-EN1/2 の機能解析

研究協力者：佐々木秀直<sup>1)</sup>

共同研究者：矢口裕章<sup>1,2)</sup>、奥村文彦<sup>2)</sup>、加納崇裕<sup>1,2)</sup>、渡部昌<sup>2)</sup>、内ヶ島基政<sup>3)</sup>、渡邊雅彦<sup>3)</sup>、  
畠山鎮次<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野、<sup>2)</sup> 北海道大学大学院  
医学研究科生化学講座医化学分野、<sup>3)</sup> 北海道大学大学院医学研究科解剖発生学分野

### 研究要旨

【目的】 リゾフォスファチジン酸（LPA）の機能が近年注目され神経細胞にも影響を及ぼすことが示されている。近年神経細胞の突起伸長にかかわる膜タンパク質として *plasticity related gene1*(PRG1)が同定され、その機能は LPA に関与するとされている。LPA と PRG1 に注目し、その神経突起様伸長に関わる機能を ALS の治療に応用することを目標として、LPA・PRG1 を制御するタンパク質、TRIM-EN1/2 の機能を検討した。【方法】 Yeast two-hybrid スクリーニング・HEK293T 細胞での過剰発現による免疫沈降法・パルスチェイスアッセイ・安定発現株細胞・ノックダウン細胞での生化学的検討とマウス組織での生化学的検討と免疫蛍光染色。【結果】 PRG1 と TRIM-EN1/2 が結合し、TRIM-EN2 安定発現株では細胞増殖能の低下と神経突起様伸長が見られ Ras の活性が抑制されていた。また PRG1 は同安定発現株で安定化を認めた。さらに TRIM-EN2 は生化学的にも免疫染色よりも小脳優位に発現していた。【考察】 TRIM-EN1/2 は PRG1 と MAPK 系に関与することでニューロン新生・シナプス形成など発生の段階でも重要な役割を果たしている可能性が考えられる。TRIM-EN2 は小脳への発現が強いことから、特に小脳の形成や機能維持に影響している可能性なども考えられ、今後のさらなる研究が必要と思われる。【結論】 TRIM-EN2 は生理的に神経細胞形成に重要なタンパク質である可能性があり、ALS を始めとした神経変性疾患との関与を含めた今後の検討が必要である。

### A.研究目的

リゾフォスファチジン酸（LPA）の機能が近年注目され癌の細胞増殖・神経領域神経回路網形成領域で LPA レセプターの同定や機能解析が進んでいる。LPA はリン酸—グリセオール—脂肪酸という単純な構造をもつリン脂質であり、従来脂質代謝の中間産物としてのみとらえられていたがその機能は細胞の遊走や形態変化・血管収縮・平滑筋収縮効果におよび、神経

細胞に関しては神経細胞およびグリア細胞の前駆細胞である神経幹細胞に影響を及ぼすことが報告され、創薬の対象としても注目されている。さらに ALS の治療として近年 Hepatocyte growth factor (HGF) 投与療法が期待されているが、LPA は C-Met の複合体形成を誘導することにより HGF からの C-Met へのシグナル伝達を抑制する可能性もある。近年 LPA を分解もしくはその機能に拮抗する可能性があり、その結果

神経突起様伸長を促進するとされる *plasticity related gene1*(PRG1)が同定された。PRG1 は脳梗塞モデルマウスなどのニューロン新生が亢進する状況で遺伝子発現が上昇し、そのノックアウトマウスではシナプス形成に異常をきたすことが報告されている。LPA と PRG1 に注目し、その神経突起様伸長に関わる機能を ALS の治療に応用することを目標として、LPA・PRG1 を制御するタンパク質、TRIM-EN1/2 の機能を検討した。

## B.研究方法

Yeast two-hybrid スクリーニングを用いて PRGs と結合するタンパク質の同定を行い、HEK293T 細胞に PRG1/2 と同定タンパク質を一過性に過剰発現させ、免疫沈降法によりそれらの結合を確認した。さらに TRIM-EN2 の機能解析のために、レトロウイルス発現ベクターを用いて N1E115 細胞に TRIM-EN1/2 を安定発現させ、形態変化及び増殖能への影響を検討した。これらの安定発現細胞株を用いたパルスチエイスアッセイにより TRIM-EN2 による PRG1 への影響を生化学的に検討した。また TRIM-EN2 に対する特異的抗体を作製し、マウス脳における発現分布を検討した。また pull-down により活性型 Ras を測定することで MAPK 系への影響を検討した。さらには過剰発現系に加え、レトロウイルス発現ベクターを用いて N1E115 細胞において TRIM-EN2 ノックダウン株も作製し、MAPK 系への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

in vitro の実験系とモデル動物作製に関しては、関係する指針や法律に準拠して行った。

## C.研究結果

Yeast two-hybrid スクリーニングで PRG1 と TRIMEN1/2 が結合することを示し、免疫沈降法により PRG1 と TRIMEN1/2 の結合を認めた。

- ① TRIM-EN1/2 の安定発現により、N1E115 細胞において神経突起様伸長が増強された。
- ② TRIM-EN1/2 の安定発現により N1E115 細胞

での増殖能低下が認められた。

- ③ N1E115 細胞を用いてパルスチエイスアッセイを行った結果、TRIM-EN2 による *plasticity related gene1* (PRG1) の分解亢進を認めず、安定化に働いていた。
- ④ TRIM-EN2 の安定発現により N1E115 細胞では活性型 Ras が低下していた。
- ⑤ N1E115 細胞を用いてパルスチエイスアッセイを行った結果、TRIM-EN2 は Ras・Grab2 の安定化に働いていた。
- ⑥ N1E115 細胞の TRIM-EN2 ノックダウン株では増殖能が上昇し、神経突起様伸長は阻害されていた。
- ⑦ N1E115 細胞の TRIM-EN2 ノックダウン株では活性型 Ras が上昇していた
- ⑧ TRIM-EN2 抗体を用いたイムノブロット法及び免疫蛍光染色法により、TRIM-EN2 がマウスで脳組織、特に小脳に高発現していることが判明した。

## D.考察

TRIM-EN2 の安定発現により、N1E115 細胞において神経突起様伸長が増強され、細胞増殖能の低下が認められた。PRG1 は lysophosphatidic acid (LPA) の機能を阻害することで G タンパク共役型レセプターである LPA レセプター以下のシグナルを抑制し、その結果として RhoA や Ras の活性化を抑制することが報告されている。今回 TRIM-EN2 過剰発現系では Ras の活性が低下し、ノックダウン細胞株では Ras の活性が増強していることが示された。そのため TRIM-EN2 は *plasticity related gene1* (PRG1) の安定化に働くことで、MAPK 系に抑制的に働く可能性が考えられる。また PRG1 ノックアウトマウスでは、シナプス形成不全により、けいれん発作がおこることが報告されており、TRIM-EN1/2 は PRG1 と MAPK 系に関与することでニューロン新生・シナプス形成など発生の段階でも重要な役割を果たしている可能性が考えられる。さらに TRIM-EN2 は小脳への発現が強いことから、特に小脳の形成や機能

維持に影響している可能性なども考えられ、今後のさらなる研究が必要と思われる。

### E. 結論

本研究により、TRIM-EN2 が神経突起様伸長と細胞増殖を制御する酵素であることが示唆された。生化学的にも免疫組織化学的にも TRIM-EN2 の発現は正常小脳に強く発現しており、今後は神経変性疾患における TRIM-EN2 の発現を検討することが重要となる。また現在、TRIM-EN のノックマウスを作製中であり (TRIM-EN1 は樹立済、TRIM-EN2 は作製中)、今後はノックアウトマウスの解析と、モデルマウスなどを用いて ALS を始めとする神経変性疾患への関与を検討していく予定である。

### F. 健康危険情報

特記すべき事項無し

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

該当なし

#### 2. 学会発表

加納崇裕, 畠山鎮次, 佐々木秀直: FIP200 結合性 E3 ユビキチンリガーゼ MUL によるオートファジー制御とアルツハイマー病. 第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 20 日～22 日、東京。

### H. 知的所有権の所得状況

未申請

#### TRIM-EN1/2はN1E115細胞で神経突起様伸長を増強する

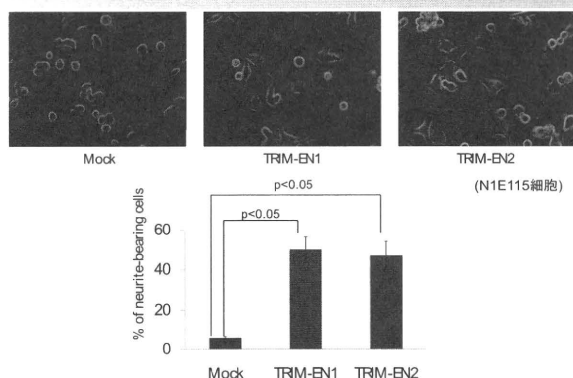


図 1. TRIM-EN1/2 安定発現株による N1E115 細胞形態の変化

#### TRIM-EN2はN1E115細胞の増殖能を抑制する

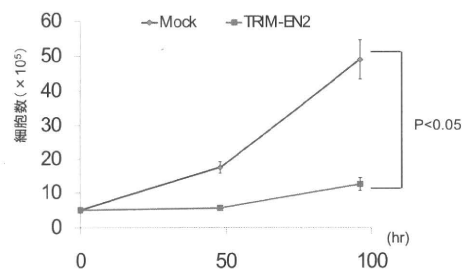


図 2. TRIM-EN2 安定発現株と Mock との細胞増殖能の比較

#### TRIM-EN2はN1E115細胞で活性型Rasを抑制する

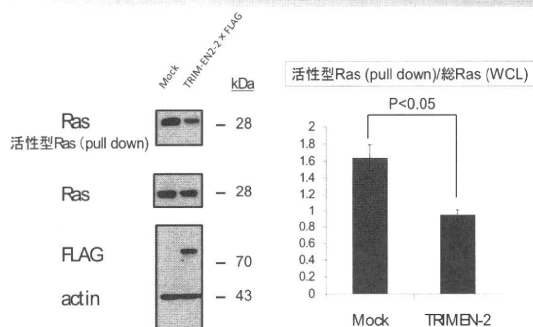


図 3 TRIM-EN2 安定発現株と Mock との活性型 Ras の比較

#### マウスにおけるTRIM-EN2の発現

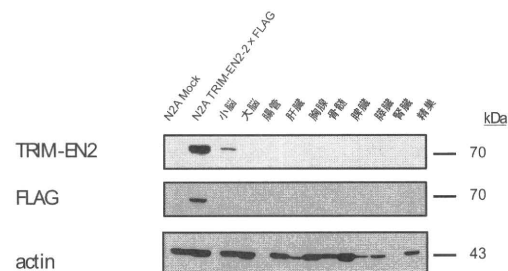


図 4 TRIM-EN2 のマウスでの発現部位

## B 細胞刺激因子（BAFF）は ALS モデル動物の神経変性を抑制する

研究協力者 佐古田三郎 国立病院機構刀根山病院・院長

### 研究要旨

B リンパ球が存在しない BAFFR<sup>-/-</sup>及び IgM<sup>-/-</sup>マウスと、筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスである変異 SOD1-トランスジェニックマウスを交配させ、ALS の病態における B リンパ球の関与を検討した。成熟 B リンパ球のみを欠損した mSOD1/IgM<sup>-/-</sup>マウスは、コントロール群と比較して麻痺症状の進行や寿命に差を認めず、B 細胞の存在は神経変性に影響しない可能性が示唆された。同様に成熟 B リンパ球を欠損する BAFFR<sup>-/-</sup>マウスと mSOD1 マウスを交配させた mSOD1/BAFFR<sup>-/-</sup>マウスでは、症状の悪化と寿命の短縮を認めた。以上より、B リンパ球の分化生存促進因子である BAFF のシグナルが遮断されると神経保護作用が消失し、この神経保護作用は、神経に発現している BAFF receptor を介してもたらされる可能性が示唆された。

### A.研究目的

近年、神経変性疾患の病態に免疫系が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。しかし筋萎縮性側索硬化症(ALS)病態における B リンパ球の関与は不明であった。

今回、我々は ALS における B リンパ球の役割を明らかにするために、成熟 B 細胞が存在しない BAFFR 遺伝子欠損マウス (BAFFR<sup>-/-</sup>マウス) 及び IgM 遺伝子欠損マウス (IgM<sup>-/-</sup>マウス) と、家族性 ALS のモデルである G93A ヒト変異 SOD1 トランスジェニックマウス (mSOD1 マウス) とを交配させ、成熟 B 細胞欠損 ALS モデルマウス ( mSOD1/BAFFR<sup>-/-</sup> マウス、 mSOD1/IgM<sup>-/-</sup>マウス) を作成し、その表現型の解析を行った。

### B.研究方法

mSOD1/BAFFR<sup>-/-</sup>マウス、mSOD1/IgM<sup>-/-</sup>マウス及びそれぞれのコントロール mSOD1/BAFFR<sup>+/+</sup>マウス、mSOD1/IgM<sup>+/+</sup>マウス

スに対し、体重測定と Hanging wire test (HWT) を週 2 回実施し、発症時期と重症度を評価した。両群の寿命は、 Kaplan-Meier 曲線によって比較した。

C56BL/6 マウス胎仔(E13.5)脳より、初代培養神経細胞を調整し、抗 BAFFR 抗体及び抗 BAFF 抗体にて培養神経細胞を染色して神経細胞における BAFF 及び BAFFR の発現を検討した。また、初代培養神経細胞における BAFFR の発現を半定量的 RT-PCR で検討した。

### C.研究結果

mSOD1/BAFFR<sup>-/-</sup>マウスは、コントロール群と比較して、 Kaplan-Meier 曲線で評価した生存期間が有意に短縮した。17 週齢以降で mSOD1/BAFFR<sup>-/-</sup>マウスの体重は有意に減少し、HWT では mSOD1/BAFFR<sup>-/-</sup>マウスのスコアが低成績を示した。このことより、ALS モデルマウスにおいて、BAFF シグナルは神経保護作用をもたらす可能性が示唆された。

BAFFR<sup>-/-</sup>マウスは成熟 B 細胞がほとんど存在しない免疫不全マウスであるが、BAFFR はマ



クロファージやミクログリアにも発現しているため、B細胞単独の神経変性に対する影響を検討するために、B細胞のみが欠損するIgM<sup>-/-</sup>マウスを用いて交配実験を行った。mSOD1/IgM<sup>-/-</sup>マウスとコントロールマウスを比較したところ、体重変化、HWT 結果、生存期間に有意差は認められなかった。

以上より mSOD1/BAFFR<sup>-/-</sup>マウスで見られたBAFF シグナルによる神経保護作用は、B細胞非依存的にもたらされていることが明らかとなった。

BAFFR の中枢神経系での発現を確認するために、マウス初代培養神経細胞の免疫組織化学的解析より、神経細胞においてBAFF とBAFFR の発現を認め、さらに培養神経細胞より抽出したRNAによる半定量的RT-PCRでもBAFFR の発現を確認した。

#### D.考察

今回、我々はBリンパ球が存在しないマウス(BAFFR<sup>-/-</sup>マウス、IgM<sup>-/-</sup>マウス)とmSOD1マウスを交配させることにより、B細胞が神経変性にどのような影響を与えるか検討した。

mSOD1/IgM<sup>-/-</sup>マウスは、コントロールマウスと比較して神経症状の上では差を認めず、神経変性にB細胞は無関係であることが示唆された。

しかし、BAFFR をノックアウトしたmSOD1/BAFFR<sup>-/-</sup>マウスでは、コントロールマウスと比較して神経症状の悪化を認めたことより、BAFF-BAFFR interaction はB細胞非依存的に神経保護効果をもたらしている可能性が示唆された。

BAFFはTNFスーパーファミリーに属する分子で、血球系細胞としてはマクロファージ、DC、好中球、T細胞から、また、中枢神経系細胞としてはアストロサイトによって生成され、未熟B細胞などに発現するBAFFRに作用して、その分化と生存を促進する分子である。

BAFFRは未熟B細胞の他、ミクログリア・マクロファージに発現しているという報告が

あるため、ミクログリア、マクロファージ、アストロサイト、ニューロンなど、中枢神経系細胞を用い半定量的RT-PCRを施行したが、神経細胞のみからBAFFRの発現が確認できた。

免疫組織化学的検討でも、培養神経細胞において、BAFFRの発現が確認され、神経細胞に発現しているBAFFRにBAFFが直接作用する事により、神経保護作用が発揮されている可能性が示唆された。

#### E.結論

ALSモデル動物において、成熟Bリンパ球を欠損させても神経変性には影響がなかったが、Bリンパ球の分化生存促進因子であるBAFFのシグナルが遮断されると神経保護作用が消失し、この神経保護作用は神経に発現しているBAFF receptorを介してもたらされる可能性が示唆された。

#### F.健康危険情報

なし

#### G.研究発表

##### 論文発表

1. Tada S: A role of lymphocytes in an animal model of inherited ALS. Medical Journal of Osaka University. 2010 53: 37-49
2. Yamadera M. :The influence of the TDP-43 positive cytoplasmic inclusions upon cells in primary motor area of SALS cases. Medical Journal of Osaka University. 53: 1-4, 2010
3. Okuno T, Nakatsuji Y, Moriya M, Takamatsu H, Nojima S, Takegahara N, Toyofuku T, Nakagawa Y, Kang S, Friedel RH, Sakoda S, Kikutani H, Kumanogoh A :Roles of Sema4D-Plexin-B1 Interactions in the Central Nervous System for Pathogenesis of Experimental Autoimmune

Encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 2010 Feb 1;184(3):1499-506.

4. Takamatsu H, Okuno T, and Kumanogoh A. Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors. *Cellular & Molecular Immunology* 2010 7(2) 83-88.
5. Kinoshita M, Nakatsuji Y, Kimura T, Moriya M, Takata K, Okuno T, Kumanogoh A, Kajiyama K, Yoshikawa H, Sakoda S.: Anti-aquaporin-4 antibody induces astrocytic cytotoxicity in the absence of CNS antigen-specific T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 26;394(1):205-10.

#### 学会発表

1. 多田 智、安居輝人、奥野龍禎、中辻裕司、菊谷仁、佐古田三郎. : 筋萎縮性側索硬化症の病態におけるリンパ球-ミクログリア間相互作用の解析. 第22回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 2010年
2. 多田 智、安居輝人、奥野龍禎、中辻裕司、菊谷仁、佐古田三郎. : 遺伝性 ALS のモデル動物におけるリンパ球の役割. 第51回日本神経学会総会, 東京, 2010年
3. 別宮 豪一、隅 寿恵、加藤信介、山寺みさき、佐古田三郎 : 孤発性 ALS 症例の腰髄前角細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化. 第51回日本神経学会総会, 東京, 2010年, 第51回日本神経病理学会総会, 東京, 2010年
4. 山寺みさき、隅寿恵、別宮豪一、藤村晴俊、加藤信介、佐古田三郎. : 孤発性 ALS 一

次運動野における TDP-43 陽性細胞質内封入体の形成に伴う細胞への影響. 第51回日本神経学会総会, 東京, 2010年, 第51回日本神経病理学会総会, 東京, 2010年

5. 隅寿恵、加藤信介、新沢康英、辻本賀英、佐古田三郎. : Group VIA phospholipase A2 遺伝子欠損マウスにおけるミトコンドリア変性. 第51回日本神経学会総会, 東京, 2010年5月
6. Satoru Tada, Teruhito Yasui, Tatsusada Okuno, Yuji Nakatsuji, Hitoshi Kikutani, Saburo Sakoda. : A role of lymphocytes in an animal model of inherited ALS. The 4th International RIMD-CVRDC Joint Symposium, Okayama, Japan, June 2010.
7. Sumi H, Shinzawa K, Kato S, Tsujimoto Y, Sakoda S. : Axonal degeneration associated with degenerated membranes of mitochondria in Group VIA phospholipase A<sub>2</sub> knockout mice. XVIIth International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, Sep 11-15, 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

## 酸化修飾の標的である Cys111 を 2ME で還元し安定化させた SOD1 の構造解析

研究協力者：谷口直之 大阪大学産業科学研究所疾患糖鎖学<sup>1</sup>・教授  
共同研究者：藤原範子・兵庫医科大学生化学、松本紋子<sup>1</sup>

### 研究要旨

Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ（以下SOD1）は生体にとって有害なスーパーオキシドを酸素と過酸化水素に変換する酵素で、酸化ストレスから生体を守る役割を果たしている。その生成物である過酸化水素でSOD1自身が酸化されて凝集化が起こること、野性型SOD1でも酸化されると変異SOD1と同じような毒性を持つようになることが示唆されてきた。SOD1分子の外側にあるCys111は非常に反応性が高く、スルホン酸(SO<sub>3</sub>H)にまで過酸化されることを質量解析で同定してきた。一方、Cys111のSHを2-メルカプトエタノール(2ME)で特異的に保護された2ME-SOD1は高濃度で10年間液体保存しても安定なままである。そこで、安定な2ME-SOD1とCys111を酸化させた酸化型SOD1の結晶X線構造解析を行った。2ME-SOD1の結晶構造はこれまで報告されているSOD1の構造とほぼ同様であったが、SOD1のダイマー形成部位に2MEを介した水素結合やファンデルワールス相互作用の存在を見出すことができた。これらの分子間力がSOD1ダイマーの安定性を増大させている可能性があると考えられる。ALSをはじめとする多くの神経変性疾患がタンパク質のコンフォメーション変化と深い関わりを有している。変異や酸化修飾、その他の翻訳後修飾によって、どの部分の構造がどのように変化するのかを解明することは、コンフォメーション病を引き起こすタンパク質の毒性を理解するためにも重要な知見となり、ALSの治療法開発にもつながると考えている。

### A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子がSOD1であることが報告されて以来、現在まで100以上の変異が報告されている。変異SOD1が毒性を有することは様々な実験で明らかにされているが、その毒性の本体、さらにはいかなるメカニズムで運動神経を障害するかは全く不明である。また、FALS患者や変異SOD1トランスジェニックマウス、および弧発性のALS患者ではSOD1免疫陽性の封入体が観察されており、特に変異SOD1は生体内で構造変化を起こし、凝集化を起こしやすいことが示唆さ

れている。SOD1の生成物である過酸化水素により、SOD1自身が酸化されて凝集化が起こること、野性型SOD1でも酸化されると変異SOD1と同じような毒性を持つようになることが報告されてきた。SOD1には菌類から哺乳類まで1つのジスルフィド結合が保存されているが、フリーのシステイン残基は保存されていない。ヒトではフリーのシステイン残基が2つ存在（Cys6とCys111）するが、Cys111のみ反応性が高くスルホン酸にまで容易に酸化されることを報告してきた。タンパク質が凝集化を起こす前には微小な構造変化が起こっている可

能性が高いが、酸化修飾がどのような構造変化をもたらすかは全くわかっていない。宇部興産製 SOD1 では、Cys111 の側鎖にのみ 2-メルカプトエタノール(2-ME)がジスルフィド結合しており、酸化に強い耐性を有する。ALS への酸化ストレスの関与およびシステイン残基の酸化との関連性を検討するために、2ME-SOD1 および酸化型 SOD1 の構造を結晶構造解析にて検討した。さらに、2ME-SOD1、野性型 SOD1 および酸化型 SOD1 の熱安定性を検討した。

## B. 研究方法

2ME を導入した 2ME-SOD1 タンパク質は宇部興産から供与された。まず、Cys111 にのみ 2-ME が結合していること、他の Cys 残基には 2ME が結合していないことを MALDI-TOF-MS 解析で確認した。さらに、Cys111 の 2ME をはずして野性型に戻した SOD1 を空気酸化させ、酸化型 SOD1 を MonoQ カラムにて精製した。2ME-SOD1 と酸化型 SOD1 の結晶化を行い、ビームライン PF BL-5A にて X 線構造解析を行った。

2-ME-SOD1、野性型 SOD1 および酸化型 SOD1 の熱安定性は、5.0 M の塩酸グアニジン存在下で、円偏光二色性解析 (CD 解析) を行った。

## C. 研究結果

2ME-SOD1 と酸化型 SOD1 の結晶化条件を決定し、結晶を得ることに成功した。しかし、酸化型 SOD1 の構造解析では酸素原子を見つけることができず、酸化型 SOD1 の構造を解明するに至っていない。一方、2ME-SOD1 の結晶構造は、1.8 オングストロームの分解能で解析することができた。

結晶構造解析の結果、2ME-SOD1 は 2ME で修飾されていない野性型 SOD1 と同じくホモ二量体を形成しており、二量体の間隙に存在する

2 つの Cys111 に結合した 2ME 同士が近距離で向かい合っていることがわかった。特に、A 鎖の 2ME の硫黄原子と B 鎖の 2ME の酸素原子間の距離が 3.2 オングストロームであることから、2ME の硫黄原子と 2ME の OH 基の水素原子が水素結合をしていることが明らかになった。さらに、A 鎖の 2ME の 2 個の炭素原子が B 鎖の 2ME の硫黄原子とファンデルワールス接触 (4.2 オングストローム) をしていることが示唆された。

2ME-SOD1 では 2ME 間に水素結合が見られたことからダイマーの安定性が示唆されたが、野性型 SOD1 および酸化型 SOD1 と熱安定性はほとんど同程度であった。

## D. 考察

2ME-SOD1 の X 線結晶構造解析の結果、2ME-SOD1 の 2ME 同士間に水素結合が見られたことからダイマーの安定性が示唆された。なお、CD 解析による熱安定性の増大は認められなかったが、Cys111 の 2ME による保護は SOD1 自体の酸化を抑制するのに非常に有効である。変異 SOD1 の Cys111 の SH を特異的に保護する薬剤を開発すれば FALS の治療にもつながる可能性があると考えられる。タンパク質が凝集化を起こす前には微小な構造変化が起こっている可能性が高いと考えられるが、酸化修飾がどのような構造変化をもたらすかは全くわかっていない。我々は酸化型 SOD1 の NMR 解析も行っており、タンパク質の酸化と構造変化について検討を続けている。

## E. 結論

2ME-SOD1 の X 線結晶構造解析の結果、2ME-SOD1 の 2ME 同士間に水素結合やファンデルワールス接触が見られた。これらの相互作用は、2ME-SOD1 ダイマーの安定性に寄与すると考えられる。

謝辞：X線結晶構造解析は高エネルギー加速器研究機構の伊原健太郎先生、若槻壮市先生との共同研究で行いました。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

(1) Shirato K, Nakajima K, Korekane H, Takamatsu S, Gao C, Angata T, Ohtsubo K, Taniguchi N. **J Clin Biochem Nutr**, 48, 20-5, 2011

(2) Kitazume S, Tachida Y, Kato M, Yamaguchi Y, Honda T, Hashimoto Y, Wada Y, Saito T, Iwata N, Saido T, Taniguchi N. **J Biol Chem**, 17, 40097-103, 2010

(3) Takeuchi S., Fujiwara N., Ido A., Ono M., Takeuchi Y., Tateno M., Suzuki K., Takahashi R., Tooyama I., Taniguchi N., Julien JP, Urushitani M. **J Neuropathol Exp Neurol**, 69, 1044-1056, 2010

(4) Akasaka-Manyu K, Manyu H, Sakurai Y, Wojczyk BS, Kozutsumi Y, Saito Y, Taniguchi N, Murayama S, Spitalnik SL, Endo T. **Glycobiology**, 20, 99-106-, 2010

(5) Kitazume S, Imamaki R, Ogawa K, Komi Y, Futakawa S, Kojima S, Hashimoto Y, Marth JD, Paulson JC, Taniguchi N. **J Biol Chem**, 285, 6515-21, 2010

(6) Takamatsu S, Antonopoulos A, Ohtsubo K, Ditto D, Chiba Y, Le DT, Morris HR, Haslam SM, Dell A, Marth JD, Taniguchi N. **Glycobiology**, 20, 485-97, 2010

### 2.学会発表

(1) 藤原範子、伊原健太郎、鳥越秀峰、小笹哲夫、金田薫、佐々木澄美、若槻壮市、谷口直之、鈴木敬一郎 (2010) 2-メルカプトエタノール修飾型 Cu,Zn-SOD の構造解析と安定性について、第33回日本分子生物学会第83回日本生化学会

大会合同大会(BMB2010)、12.7-10、神戸

(2) 松本紋子、松本明郎、谷口直之 (2010) 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の凝集体形成におけるトランスグルタミナーゼの関与、トランスグルタミナーゼ研究会、12.8、神戸

(3) 松本紋子、松本明郎、谷口直之 (2010) Improved analysis for the oligomeric SOD1s of familial amyotrophic lateral sclerosis and their SOD activities by high resolution clear native electrophoresis、第33回日本分子生物学会第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010)、12.8、神戸

## H. 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。

## 運動神経細胞で HGF を発現するポリオウイルスベクターの開発

研究協力者：野本明男<sup>1)6)</sup>

共同研究者：千葉妃織<sup>1)</sup>、端川勉<sup>2)</sup>、五十嵐博子<sup>1)</sup>、大岡静衣<sup>1)3)</sup>、  
大谷若葉<sup>4)</sup>、船越洋<sup>4)</sup>、中村敏一<sup>5)</sup>、野本明男<sup>1)6)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学大学院医学系研究科微生物学講座、<sup>2)</sup>理化学研究所研究基盤センター脳形態解析支援ユニット、<sup>3)</sup>国立がん研究センター研究所がん幹細胞研究分野、<sup>4)</sup>大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学、<sup>5)</sup>大阪大学先端イノベーションセンター、<sup>6)</sup>(財)微生物化学研究会・微生物化学研究所

### 研究要旨

ポリオウイルス (PV) は、運動神経向性ウイルスである。ALS も運動神経疾患であることから、PV を発現ベクターとして使うことにより、効率的に運動神経細胞に抗 ALS 蛋白質を作用させる事ができると考えられる。PV には自己複製能を持たず、1 回限りの感染が成立する欠陥干渉粒子 (DI: defective interfering particle) が存在するので、ALS の病態進行の遅延に有効な分泌蛋白質である肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) の mRNA を PV DI に導入し、これを、骨格筋に接種することにより、運動神経細胞に HGF を発現する PV ベクターを開発することを目指した。その結果、骨格筋に接種した PV DI ベクターは、中枢神経系で HGF を発現させることに成功した。しかしながら、発現量の関係からか ALS のモデルマウスでは、病態を改善させることは出来なかった。

### A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経細胞の異常により発症する疾患である。そこで、ALS 治療・発症遅延・病態進行遅延ベクターとして、運動神経細胞に向性を持つポリオウイルス (PV) に着目した。

これまでに、神経細胞は PV の 1 回感染に対し抵抗性を示すこと、細胞変性効果の中心的役割を持つ PV 特異的蛋白質 2A プロテアーゼの単独発現にも抵抗性を示すことなどを明らかにしてきた。

そこで、1 回感染のみで終わる PV 欠損株を用い外来 mRNA として HGF mRNA をゲノム欠損部位 (ウイルスキャプシド蛋白質領域) に挿入することとした。

ただし分泌蛋白質は PV ベクターでは発現しないという報告もあったので、外来 mRNA は PV ゲノム本体からは独立させ、別のシストロンで発現させ、実際に分泌蛋白質を PV ベクターで発現させることに成功した。

今年度は、このベクターを骨格筋に接種し、確かに中枢神経系で発現するか、またその HGF を ALS モデルマウスで発現させることにより、ALS の治療・発症遅延・病態進行遅延を起こさせることが出来るかを検討した。

### B.研究方法

PV 構造蛋白質コード領域を分泌蛋白質である、ヒト HGF のシグナル配列付き mRNA に置換し、この HGF コード領域を PV internal

ribosome entry site (IRES) で、PV の RNA 複製用蛋白質コード領域を encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES で発現させるよう設計したジシストロニック型 PV DI プラスミド pDI(HGF)d を作製し、これに由来するウイルス粒子 DI(HGF)d 株を得た。PV 感受性のヒト PV 受容体発現トランスジェニックマウス (hPVR-Tg) に DI(HGF)d 株を筋肉内接種し、経時的に脊髄を採取し、PV 抗原および HGF 抗原を免疫組織染色法により観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験および組換え生物実験に関しては、東京大学の指針に従って行った。

### C. 研究結果

DI(HGF)d 株を筋肉内接種 16 時間後から脊髄前角の  $\alpha$  運動神経細胞で PV 抗原ならびに HGF 抗原が検出された。DI(HGF)d 株の親株である PV OM 株または光感受性 PV OM 株を筋肉内接種 16 時間後から脊髄内で PV 力価の上昇が検出され始めることを、我々は既に明らかにしている。DI(HGF)d 株が筋肉内接種 16 時間後から脊髄内で PV ベクターから発現した HGF 抗原が観察されることは、これまでの事実と一致している。

### D. 考察

$\alpha$  運動神経細胞は、筋肉へ直接軸索を伸ばしているものもあることから、DI(HGF)d 株の筋肉内接種 16 時間後に  $\alpha$  運動神経細胞で見られた PV ベクターからの HGF 抗原は、接種された DI(HGF)d 粒子が感染した運動神経細胞の細胞体で複製した結果であると考えられる。

### E. 結論

PV 感受性マウスへ DI(HGF)d 株を筋肉内接種すると、脊髄内  $\alpha$  運動神経細胞で HGF を発現

することが明らかになった。PV DI ベクターの筋肉内接種による、脊髄内運動神経細胞での外来分泌蛋白質発現の可能性を示した。

### F. 健康危険情報

とくになし。

### 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

2A protease is not a prerequisite for poliovirus replication. Igarashi H, Yoshino Y, Miyazawa M, Horie H, Ohka S, Nomoto A. *J. Virol.*, 84(12): 5947-5957, 2010.

Poliomyelitis. Koike S, Nomoto A. *The Picornaviruses*, Chapter 21: 339-351, 2010.

#### 2. 学会発表

感染研究の中の真菌。野本明男。第 31 回関東医真菌懇話会、7 月 3 日、東京。

Molecular mechanisms of poliovirus dissemination pathways. Akio Nomoto. BIT's 1<sup>st</sup> World Congress of Virus and Infections-2010, July 31-August 3, Busan, South Korea.

ワクチンの新たな展開。野本明男。フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー、9 月 9-10 日、東京。

ポリオウイルスの血液脳関門透過機構。二瓶浩一、野本明男。第 58 回日本ウイルス学会、11 月 7-9 日、徳島。

運動神経初代培養細胞の分離培養系におけるポリオウイルス感染。大岡静衣、金田祥平、藤井輝夫、五十嵐博子、野本明男。第 58 回日本ウイルス学会、11 月 7-9 日、徳島。

脂肪酸合成酵素を介したパルミチン酸による C 型肝炎ウイルスの複製制御。棟方翼、

野本明男、小原道法。第 58 回日本ウイルス  
学会、11 月 7-9 日、徳島。

**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。



## TDP-43 過剰発現による ALS ラットモデル動物の作製

研究協力者：水澤 英洋<sup>1)</sup>

共同研究者：大久保卓也<sup>1)</sup> 内田 あずさ<sup>1)</sup> 田尻美緒<sup>1)</sup> 佐野達彦<sup>1)</sup> 内原俊記<sup>3)</sup> 横田 隆徳<sup>1)</sup>

1) 東京医科歯科大学大学院 脳神経病態学

2) 医薬基盤研究所 霊長類医科学センター

3) 東京都神経科学総合研究所 神経内科

### 研究要旨

Tar DNA-binding protein-43 (TDP-43) は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における神経細胞内のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として同定された。本研究では、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割を明らかにすることを目的とし、野生型 TDP-43 過剰発現による孤発性 ALS モデルラット作製を試みた。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いてラットの頸髄前角細胞にヒト野生型 TDP-43 を過剰発現させ、その神経症状及び神経病理学的所見を観察した。頸髄前角細胞での TDP-43 過剰発現により、進行性の前肢筋力低下、頸髄前根の大径線維の脱落を示した。しかし、神経病理学的に脊髄前角細胞において TDP-43 の発現は核に局限しており、同様に作製したカニクイザルの結果とは異なり、TDP-43 の病態には霊長類とげっ歯類で種差が存在することが明らかになった。

### A. 研究目的

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD-U) の神経細胞内のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として同定された。ALS 症例の剖検脳において TDP-43 による細胞質内封入体が存在する神経細胞では、核蛋白である TDP-43 の核内染色性が著明に低下していることが報告されている。さらに、孤発性 ALS および家族性 ALS において、TDP-43 遺伝子の点変異が次々と報告され、変異 TDP-43 遺伝子が ALS の原因遺伝子であることが判明しつつある。しかし、孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割は明らかになっていない。

孤発性 ALS の病態における野生型 TDP-43 の役割を明らかにすることを目的とし、昨年我々は AAV ベクターを用いてのカニクイザルの頸

髄前角細胞にヒト野生型 TDP-43 を過剰発現させ、その神経病理学的に TDP-43 の細胞質への異常局在の所見を観察した。今回、フィッシャーラットで同様の実験を試みた。

### B. 研究方法

#### <AAV プラスミドベクター作製>

human TDP-43 発現ベクタープラスミド (Invitrogen), パッケージングプラスミド, アデノヘルパープラスミドの3種類のプラスミドを HEK293 細胞にリン酸カルシウム法によってトランスフェクションし, 48 時間後に細胞を回収, 凍結・融解法によってベクター粒子を含む細胞溶解液を調整した。そこから塩析さらに iodexanol を用いた密度勾配超遠心法によって AAV ベクターを分離・精製した。ウイルス力価は, AAV ベクターより DNA を抽出し, TaqMan

PCR 法にとりベクター粒子数を決定した。

作製した AAV プラスミドベクターはウェスタンブロッティングにて発現を確認した。抗 TDP-43 抗体 (Protein Tech) (1 : 2000)、抗 Flag 抗体 (Sigma) (1 : 500) を用いて検出した (Fig. 1-B)。  
すべての DNA 組換え実験は東京医科歯科大学遺伝子組換え倫理委員会の承認 (承認番号 2008-27) を得て行った。

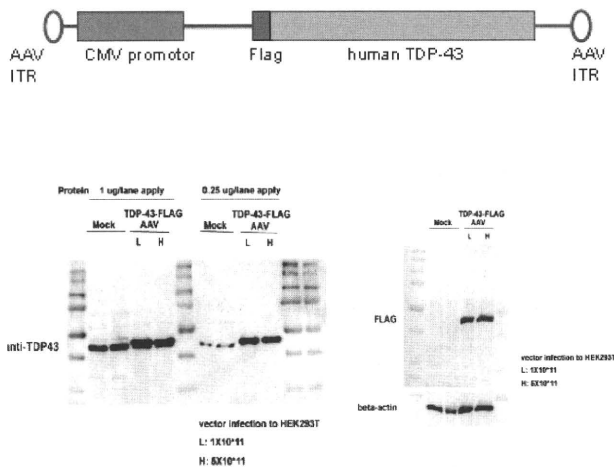


Fig. 1 野生型 TDP-43 発現 AAV プラスミドベクター作製

(A)野生型 TDP-43 発現プラスミドベクターのコンストラクト模式図。(B)ウェスタンブロッティングによる AAV プラスミドベクター発現確認。HEK293 細胞において野生型 TDP-43 が過剰発現している。

### <AAV プラスミドベクター注入>

フィッシャーラット (10週齢) に対して抱水クロラル 3.0 ml/kg、ケタミン 0.5 ml/kg にて腹腔麻酔後、第3~6頸椎に対し椎弓切除術を行った。第4、6頸髓正中より横径の1/6左側、深さ1mm の位置よりプレーを用いて前角付近に AAV ベクター溶液を 1.5  $\mu$ l ずつ注入した。濃度は  $3.0 \times 10^{12}$  vg/ml で行った。各群の個体数 Flag-hTDP-HD (n=5)、AAV-only (n=3) である。

すべての動物実験は東京医科歯科大学動物実験倫理委員会の承認 (承認番号 81165) を得て行った。

### <神経症状評価>

各個体に対し、4週間状態観察 (毎日)、体重測定 (毎週)、及び握力計 (MK380CM/F MUROMACHI KIKAI) による筋力測定 (週3回) を行った。測定は室温 26°C、21:00 以降という条件下で行った。片側ずつ 5  $\times$  4 セット (rest 20sec) 行ない最大値を記録した。統計学的有意差は Student の *t* 検定により評価した。

### <神経生理評価>

術後約4週の個体に対し前腕筋電屈筋の針筋電図は同心円針を用いた筋電計 (日本光電) で記録した。

### <神経病理評価>

脊髄は 10% 緩衝ホルマリンまたはザンボーニ液 (4% paraformaldehyde) 固定後パラフィン包埋し、HE 染色、ニッスル染色および免疫染色を行った。

一次抗体は抗 TDP-43 抗体 (Protein Tech) (1 : 3000)、抗 Flag 抗体 (Sigma) (1 : 500)、抗ユビキチン抗体 (Dako) (1:3000)、抗リン酸化 TDP 抗体 (Cosmo Bio) (1 : 1500)、二次抗体は抗 rabbit IgG ヤギ抗体、抗 mouse IgG ウマ抗体 (VECTOR) (1 : 1000) を用いた。

前根は 2% グルタルで固定後エポン包埋し、トルイジンブルー染色を行った。

## C. 研究結果

### <神経症状の出現>

術後約2週間の時点で、正常群では左手 DIP 関節が着地時に背屈位をとるが、Flag-hTDP-43 群ではむしろ屈曲位をとる姿勢異常から始まり近位に向かって徐々に進行し、最終的に屈曲拘縮となる運動麻痺が認められた。左前肢において、左手不使用  $\rightarrow$  左手指屈曲位  $\rightarrow$  左手関節屈曲拘縮  $\rightarrow$  左上腕屈曲位という遠位から近位への進行性の神経症状の出現がみられた。解剖時には左側前肢全体の筋萎縮、拘縮が見られた。GFP 群および AAV-only 群ではこれらの神経症

状、筋萎縮は認められなかった。また、全群において体重の著明な減少は見られなかった。

握力計においては術後第2週から右側に対する左側の有意な筋力低下が認められた。筋力低下は術後第4週まで回復することはなかった。

#### <神経生理学的評価>

Flag-hTDP-43 群の術後第6週の左前肢屈筋の針筋電図において fibrillation、positive sharp wave の脱神経所見が記録された。

#### <神経病理学的評価>

Flag-hTDP-43 術後注入群の脊髄 Flag 染色においてはほぼ注入側で、核に局限する発現が見られた (Fig2)。Nissl 染色において前角細胞数は非手術対照との差は見られなかった。

Flag-hTDP-43 術後注入群の前根では大径線維の著明な脱落と多数のミエリン球が見られた。

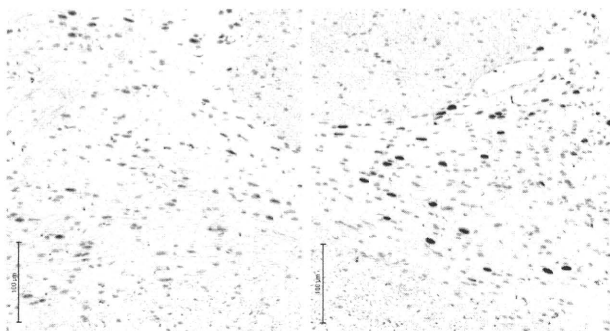


Fig. 2 神経病理学的所見

Flag-hTDP-43 個体の脊髄 TDP-43 染色像。Flag 染色で陽性となる範囲と一致した濃染が見られる。

#### D.考察

本研究では、ラットの頸髄前角細胞に野生型 hTDP-43 を過剰発現させることにより、ALS 症例類似の進行性の運動麻痺、筋力低下及び筋萎縮という神経症状および、筋電図における脱神経所見が再現された。一方で、病理像は ALS 症例で見られるような、TDP-43 の核から細胞質への異常局在、ユビキチン陽性の凝集体形成やリン酸化といった異常所見は著明ではな

かった。このことから、孤発性 ALS 症例における TDP-43 の役割について、一次的に核内での過剰発現が起こり、その段階で脊髄前角細胞に障害をもたらす (nuclear gain of toxic function) という仮説が得られる。最近、マウス、ショウジョウバエ、線虫の野生型 TDP-43 過剰発現モデルが相次いで報告されており、過剰発現により細胞種選択的な核での hTDP-43 の細胞毒性が引き起こされることが示されている。今回の我々の結果は上記の報告と同様に野生型 TDP-43 の核での過剰発現での毒性が示された。昨年我々は AAV ベクターを用いてのカニクイザルの頸髄前角細胞にヒト野生型 TDP-43 を過剰発現させ、進行性の運動麻痺と筋萎縮、電気生理学的な脱神経所見を認め、さらに神経病理学的に TDP-43 の細胞質への異常局在の所見を観察した。今回はカニクイザルとラットへのベクターは血清型、濃度、位置もまったく同一の AAV であり、過剰発現 TDP-43 の細胞内の局在に明瞭な種差があることが示された。

#### E.結論

野生型 TDP-43 をフィッシャーラット頸髄前角細胞に過剰発現させることにより、運動麻痺は生じたが、TDP-43 の核から細胞質への異常局在は認めず、サルモデルとは異なり種差を認めた。

#### F.健康危険情報

なし

#### G.研究発表

##### 1.論文発表

1. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Ono F, Sakaue F, Hirai T, Tajiri M, Kanai K, Ohkubo T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Ueno T, Sunaga F, Ikeda S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Kusano K, Enomoto M, Yokota S, Hirai Y,

Yasutomi Y, Uchihara T, Kuwabara S, Mizusawa H and Yokota T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of wild-type TDP-43 (in submission)

## 2.学会発表

1. 内田あずさ, 佐野達彦, 大久保卓哉, 金井教明, 澁谷和幹, 笹栗弘貴, 久保寺隆行, 平井高志, 草野和正, 榎本光宏, 内原俊記, 桑原 聡, 水澤英洋, 横田隆徳. 孤発性筋萎縮性側索硬化症のモデルラット作製孤発性筋萎縮性側索硬化症のモデルラット作製. 第 51 回日本神経学会総会, 2010.5.20-22, 東京
2. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Sakaue F, Uchihara T, Kuwabara S, Mizusawa H and Yokota T. Overexpression of wild type TDP-43 in motoneuron of non-human primate recapitulates ALS. International Conference of Alzheimer Disease 2010.7.10, Honolulu, USA

## 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