

ALS に対する免疫療法の開発研究

研究分担者：漆谷 真¹⁾

研究協力者：大野美樹^{1,2)}、竹内成子¹⁾、井戸明美¹⁾、藤原範子³⁾、館野美成子⁴⁾、
太田康之⁵⁾、阿部康二⁵⁾、谷口直之⁶⁾、高橋良輔²⁾

- 1) 滋賀医科大学・分子神経科学研究センター、2) 京都大学 神経内科、
3) 兵庫医科大学 生化学、4) 国立精神神経センター・神経研究所
5) 岡山大学 神経内科、6) 大阪大学 産業科学研究所

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因や病態は未だ不明であるが、家族性 ALS の 20% で同定されたスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) の突然変異による *in vitro*, *in vivo* ALS モデルの解析により、変異 SOD1 のミスフォールディングを分子基盤とした細胞外放出が病態に関与することが明らかになった。我々は、以前細胞外 SOD1 を標的としたワクチン療法に成功したが本研究班では、より汎用性と効果が高いワクチン療法の開発に加え、変異 SOD1 特異認識モノクローナル抗体を用いた他動免疫療法の開発研究を行い、以下の成果が得られた。(1) 野生型アポ SOD1 ワクチンによって変異型 SOD1 ワクチン以上の寿命延長効果が得られた。ワクチンの効果には中枢系と末梢循環系の両者における Th2 系の獲得免疫の誘導が関与していた。(2) 変異 SOD1 を特異的に認識する 2 種類のマウスモノクローナル抗体の開発に成功し、G93A を認識する C4F6 抗体の髄腔内持続注入療法に成功した。この効果には抗体の Fc 受容体が必要でありミクログリア等の免疫細胞の保護的機能が関与していることが想定された。(3) 抗体療法を細胞内標的にも拡充するため、細胞内移行シグナルである HIV-TAT 配列を IgG に付加し、細胞移行性の改善と細胞内変異 SOD1 との反応を確認した。今後は、細胞内外の病原タンパクの分子内標的の同定法と Th2 系誘導を伴うワクチン療法とモノクローナル抗体開発の組み合わせが重要な治療戦略となる。

A. 研究目的

家族性 ALS の 20% を占めるスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) は多彩なカスケードを介して、運動ニューロン変性を引き起こすと考えられているが、その多くは孤発性 ALS においても認められている。我々は、神経分泌タンパク質であるクロモグラニンが変異 SOD1 特異的に結合することによって独自の細胞外分泌を促進することを明らかにし、細胞外変異 SOD1 を標的としたワクチン療法に成功した。しかし高発現型 SOD1 Tg マウスではワクチン効果は無効であり、その作用機序も不明であった。

SOD1 は 140 種類以上に及び、タンパクミスフォールディングを分子基盤とする多彩なカスケードを経て、運動ニューロン変性を引き起こすが、近年ミスフォールドした野生型 SOD1 は多くの変異 SOD1 と類似の異常な化学物性を示すことが明らかとなっている。我々はさらに汎用性や有効性の高いワクチン療法と、変異 SOD1 をはじめとする病原タンパク質に対する抗体療法の開発を目的として以下の研究を行った。

- (1) 野生型アポ SOD1 ワクチンによる免疫療法
(2) 変異 SOD1 特異認識マウスモノクローナル

抗体を用いた他動免疫療法。

- (3) 抗体の分子改変による細胞内への透過性改善や、細胞内小器官へのアクセシビリティの調節。

B.研究方法

(1) 低発現型 G93A SOD1 トランスジェニックマウス (G93AGur^{dl}) に対し、アポ型野生型 (WT-*apo*) SOD1 と G93A SOD1 ワクチンを免疫し、発症時期を体重減少と rotarod、寿命に対する効果を調べた。さらに生後 120 日、210 日における血清、脾臓、脊髄組織を採取し、抗 G93A SOD1 抗体 IgG サブクラスの解析と real-time PCR による脾臓、脊髄組織の Tumor necrosis factor alpha (TNF α), Interferon-gamma (IFN γ)(以上 Th1), transforming growth factor beta1 (TGF β 1; Th3), Interleukin-4 (IL4; Th2), FoxP3 (Treg), ROR γ t (Th17)発現解析、さらに脊髄の免疫組織化学的解析を行った。また治療経過中の末梢血の IgG サブクラスの抗体価を ELISA 法で、tumor necrosis factor (TNF), interferon gamma (IFN γ), interleukin 4 の測定を microbeads 法で行い、脊髄の免疫関連分子の発現について real time PCR と免疫組織科学的解析を行った。次に IFN γ の末梢循環と中枢神経系での作用を調べるため、Alzet ポンプを用いて IFN γ の腹腔内と髄腔内持続投与を行った。

(2) G93A SOD1 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 (C4F6) とヒト野生型も認識する同抗体 (D3H5) を用いて、微量浸透圧ポンプ (Alzet pump 2006) に 1.5 mg/ml で 200 μ L 充填し、岡山大学神経内科より技術供与を受けたマウス髄腔内カニューレーション法を用い、L4 椎弓より 6 週間持続注入を行った。コントロールとして生理食塩水を注入した。C4F6 抗体はパパイン処理によって可変領域 (Fab) 化し、全長抗体との効果を比較した。(3) C4F6 IgG の糖鎖に HIV-TAT ペプチド配列を付加し、

SHSY-5Y 細胞内への移行性と細胞内で発現する変異 SOD1 との反応性を蛍光細胞染色によって検討した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、プロトコールを滋賀医科大学・動物実験委員会の審査をうけ承認された物である。ヒト変異遺伝子を用いているが、特定の個人を同定できる物ではなく、また遺伝子組換え実験のプロトコールは倫理委員会の審査を受け承認されている。

C.研究結果

(自動免疫療法)

野生型、変異型 SOD1 ワクチンとも発症時期を有意に遅延させたが、寿命延長効果はむしろ野生型ワクチンで有意差が認められた。SOD1 ワクチン接種群では運動ニューロン周囲に IgG と結合体を形成する C1q の沈着が増強しており、残存運動ニューロン数が生食対照群に比較し優位に高かった。末梢血の解析では、G93A SOD1 ワクチンでは TNF α と IFN γ のタンパク量が野生型 SOD1 ワクチンに比し有意に高く、Th2/Th1 比を示す IgG1/IgG2c 比でも野生型 SOD1 は変異 SOD1 に比し有意に低く、野生型 SOD1 ワクチンでは変異型に比しより Th2 環境が誘導されやすいことが分かった。さらに real-time PCR 解析により脊髄の IL4/TNF α 比と IL4/IFN γ 比がワクチン群で未治療群に比し有意に上昇していた。さらに IFN γ の腹腔内持続投与によって、発症促進の傾向が認められた。210 日齢の脊髄の解析では残存運動ニューロン数の増加と活性化ミクログリアの減少を認めた。一方で IFN γ の転写因子である STAT4 は活性化ミクログリアに高発現しており、ミクログリアが IFN γ の発生源となることが判明した。

(他動免疫療法)

発症後の 210 日齢に抗体を髄腔内投与したところ C4F6 投与群は約 3 週間の進行抑制効果が

認められたが、Fab 断片は無効であった。一方他のエピトープを有する D3H5 抗体は C4F6 ほどの有効性を認めなかった。Fab 抗体の髄腔内投与は効果を認めず、抗体療法の作用は Fc を介していると考えられた。さらに効果は投与量よりも投与期間に依存し、投与終了後も進行の抑制傾向が見られた。

(抗体改変)

TAT を付加した C4F6 は SHSY-5Y 細胞内に良好に取り込まれた。さらに EGFP タグを付加した SOD1 を過剰発現させた SHSY-5Y 細胞の細胞内で G93A 型変異 SOD1 とのみ反応し、TAT-IgG が細胞内抗体として作用することを確認した。

D. 考察

野生型アポ SOD1 は変異 SOD1 トランスジェニックマウスに対して発症を遅延することによって、寿命を有意に延長した。中枢神経系における抗体産生と Th2 有意の保護的免疫は野生型、変異型 SOD1 ワクチンの両方で認めたが、末梢循環系の TNF α や IFN γ の産生量は変異型で有意に高く、末梢における獲得免疫系の反応がワクチンの効果に影響することが判明した。今後、抗原部位の適切な同定とアジュバントスイッチなどによる Th2 系の誘導を念頭においたワクチン戦略が必要である。また TAT-付加抗体治療は、細胞内タンパク質への抗体療法の可能性を有しており、今後適切な抗体のスクリーニング戦略や低分子化、シグナル付加によりより効果的な治療オプションと成り得る。さらに現在我々は IgG の低分子化を目指し、ハイブリドーマから IgG 可変領域の長鎖と短鎖の cDNA をクローニングし、さらに TAT と FLAG タグを付加した short chain of Fragment variance (scFv) のコンストラクションを行った。今後組換えタンパク質を精製し、抗体活性を確認するが、この治療法は細胞内外の病原タンパク質を標的

に出来る有望な方法であり、SOD1 以外の病原タンパク質に対しても利用可能と考えられる。

E. 結論

変異 SOD1 関連の家族性 ALS 患者において野生型 SOD1 を用いた免疫療法は有望であり、今後の抗原やアジュバントの改良により有効性を高める必要がある。さらに抗体療法は様々な分子改変技術を駆使することで、多くの病原タンパク質を標的にしうるため、今後の治療として有望である

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeuchi S, Fujiwara N, Ido A, Oono M, Takeuchi Y, Tateno M, Suzuki K, Takahashi R, Tooyama I, Taniguchi N, Julien JP, Urushitani M. Induction of protective immunity by vaccination with wild-type apo SOD1 in the mutant SOD1 transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010, 69, 1044-1056
2. Ezzi SA, Larivière R, Urushitani M, Julien JP. Neuronal overexpression of chromogranin A accelerates disease onset in a mouse model of ALS. *J Neurochem* 2010, 115:1102-1111
3. Urushitani M, Sato T, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I. Synergistic effect between proteasome and autophagosome in the clearance of poly-ubiquitinated TDP-43. *J Neurosci Res* 2010, 88:784-797.
4. Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel SH. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 2010, 58, 231-43.
5. Yanagisawa D, Shirai N, Amatsubo T, Taguchi H, Hirao K, Urushitani M, Morikawa S, Inubushi T,

- Kato M, Kato F, Morino K, Kimura H, Nakano I, Yoshida C, Okada T, Sano M, Wada Y, Wada KN, Yamamoto A, Tooyama I. Relationship between the tautomeric structures of curcumin derivatives and their Abeta-binding activities in the context of therapies for Alzheimer's disease. *Biomaterials*. 2010, 31:4179-4185
6. 漆谷 真. 免疫療法によるALSの分子標的治療. 医学のあゆみ「ALS Update」 2010, 235; 255-260
 7. 漆谷 真. TDP-43の異所性局在機構. 最新医学「神経変性疾患におけるTDP-43」 2010, 65; 1588-1596
 8. 漆谷 真. 家族性ALSマウスモデルの免疫療法. 実験医学増刊号「脳神経系の情報伝達と疾患」 2010, 28, 799-807
 9. Sato T, Takeuchi S, Saito A, Ding W, Matsuura H, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal ligation induces transient nuclear exclusion of TDP-43 in brainstem motor neurons. *Neuroscience* 2009, 164, 1565-1578.
 10. Gros-Louis F, Andersen PM, Dupre N, Urushitani M, Dion P, Souchon F, D'Amour M, Camu W, Meininger V, Bouchard JP, Rouleau GA, Julien JP. Chromogranin B P413L variant as risk factor and modifier of disease onset for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106, 21777-21782.
 11. Amatsubo T, Morikawa S, Matsuda K, Inubushi T, Urushitani M, Taguchi H, Shirai N, Hirao K, Kato M, Morino K, Kimura H, Nakano I, Yoshida C, Okada T, Sano M, Tooyama I. Interaction of the brain tissues with trifluoromethoxy-benzylated ligands for amyloid detection using ¹⁹F magnetic resonance imaging.. *Neurosci Res* 2009 63, 76-81, 2009
 12. 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症に対するワクチン・抗体療法の展望. 難病とケア 2009, 15: 35-39
 13. Gros-Louis F, Kriz J, Kabashi E, McDearmid J, Millicamps S, Urushitani M, Lin L, Dion P, Zhu Q, Drapeau P, Julien J-P, Rouleau GA. Als2 mRNA splicing variants detected in KO mice rescue severe motor dysfunction phenotype in Als2 knock down zebrafish. *Hum Mol Genet* 2008 17:2691-702
 14. Urushitani M, Ezzi SA, Matsuo A, Tooyama I, Julien JP. The endoplasmic reticulum-Golgi pathway is a major target for translocation and aggregation of mutant superoxide dismutase linked to ALS. *FASEB J* 2008, 22: 2476-2487.
 15. 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症. *Modern Physician* 2008, 28,1737-1744
 16. 漆谷 真. ALSモデルマウスの免疫療法と今後の展望. *Brain and Nerve* 2008, 60, 643-651
- ## 2. 学会発表
1. 第107回関西実験動物研究会；難病克服への実験動物を用いたアプローチ 招待講演「筋萎縮性側索硬化症研究におけるモデル動物のインパクト」2010年9月 大津
 2. Neuro2010 (第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会 合同大会) 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「ALSの免疫療法」2010年9月 神戸
 3. 漆谷 真、佐藤尚志. TDP-43の異所性局在とALSの病理現象との関連について」第51回日本神経学会総会 2010年5月 東京
 4. 第22回日本神経免疫学会 シンポジウム；神経と免疫のクロストーク 「筋萎縮性側索硬化症の免疫療法について」2010年3月 東京
 5. 第31回神経組織培養研究会シンポジウム；筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病態生理におけるTDP-43/FUS研究 「TDP-43の異所性局在と凝集体形成の病的意義について」2010年3

- 月 東京
- 6.第 1 回 熊本 ALS フォーラム 特別講演
「ALS 治療標的の解明現状について」
2010 年 3 月 熊本
- 7.Abou Ezzi S, Urushitani M, Larivière R, Julien JP.
Neuronal overexpression of chromogranin A
accelerates motor neuron degeneration in a mouse
model of ALS. 20th International Symposium on
ALS/MND, 8-10 December 2009, Berlin
- 8.Abou Ezzi S, Urushitani M, Larivière R, Julien JP.
Neuronal overexpression of chromogranin A
accelerates motor neuron degeneration in a mouse
model of amyotrophic lateral sclerosis. 5e
symposium de la Fondation André-Delambre sur
la sclérose latérale amyotrophique, 25 & 26
September 2009, Québec
- 9.Yanagisawa D, Shirai N, Amatsubo T, Taguchi H,
Hirao K, Urushitani M, Morikawa S, Inubushi T,
Kato M, Morino K, Kimura H, Nakano I, Yoshida
C, Okada T, Sano M, Tooyama I. Binding form of
curcumin derivatives to β -amyloid aggregates.
International Conference on Alzheimer's Disease,
ICAD2009. July, Wien
- 10.漆谷 真。「神経変性疾患克服に向けた多面的
アプローチの現状」立命館大学 難治性疾
患・統合創薬プロジェクト 第 1 回セミナー
2009 年 9 月 草津
- 11.漆谷 真。「免疫療法による ALS の治療戦略」
第 50 回 日本神経学会総会 シンポジウム
2009 年 5 月 仙台
- 12.漆谷 真。「異常タンパク病としての筋萎縮性
側索硬化症～治療を志向した研究動向～」
第 10 回 大阪神経治療研究会 教育講演
2009 年 4 月 大阪
- 13.Satoh T, Takeuchi S, Saitoh A, Hisa Y, Tooyama
I,Urushitani M. Axonal strangulation induced
peripheral accumulation and nuclear reduction of
TDP43 in brainstem motor neurons. Annual
Meeting of Neuroscience. 2008, November,
Washington D.C.
- 14.Dupre N, Gros-Louis F, Andersen P, Urushitani
M, Meininger V, Salachas F, Camu W, Bouchard
JP, Rouleau G, Julien JP. Genetic screening study
of CHGA and CHGB variants in a cohort of
patients with amyotrophic lateral sclerosis.
Annual meeting of American Academy of
Neurology, 2008 April, Chicago
- H.知的所有権の取得状況（予定を含む）**
- 1.特許取得
「ケト・エノール互変異性を利用した診断薬」
遠山育夫、漆谷 真、田口弘康、白井伸明、平尾
浩一、加藤雅也、柳沢大治郎。2009/2/27 特願
2009-45531
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

TDP-43 の分子病態解明と凝集体形成細胞モデルの構築

研究分担者：長谷川成人（東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム）
研究協力者：野中 隆¹⁾，山下万貴子¹⁾，亀谷富由樹¹⁾，新井哲明²⁾，細川雅人²⁾，
秋山治彦²⁾

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム

²⁾ 東京都精神医学総合研究所 老年期精神疾患研究チーム

研究要旨

TDP-43 は、孤発性 ALS の特徴病理を構成するタンパク質である。家族性及び孤発性 ALS 患者に発症と連鎖する遺伝子変異も同定され、TDP-43 の異常と ALS の発症、進行との関係が遺伝学的にも証明された。患者組織に蓄積する TDP-43 を詳細に調べることにより、その病変を再現する細胞モデルを構築することに成功した。このモデルを用いて細胞の変性機構を解明すると共に、TDP-43 の蓄積を抑制する薬剤の探索を行い、治療薬の開発につなげたい。

A.研究目的

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) や前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTL)患者の脳、脊髄に出現するタウ陰性ユビキチン陽性封入体の主要構成成分として 2006 年に同定された。TDP-43 は不均一核リボヌクレオタンパク質 (hnRNP) の一種であり、核に局在し、転写制御などに関与することが知られている。2008 年、家族性及び孤発性 ALS 患者において発症と連鎖する TDP-43 の遺伝子変異が多数発見されたことから、ALS における神経変性の実行犯が TDP-43 であることが確実となった。アルツハイマー病におけるタウ、パーキンソン病における α シヌクレインと同様、TDP-43 の細胞内異常蓄積が ALS における神経変性と密接に関わっていることが示唆される。したがって TDP-43 の細胞内蓄積のメカニズムを解明し、その蓄積を制御することができれば、ALS の根本治療につながると考えられる。そこで我々は、はじめに ALS や FTL 患者における TDP-43 の異常を詳細に解析した。続いて、患者組織に蓄積する

異常凝集を培養細胞内で再現するモデルを構築することを試みた。孤発性および家族性 ALS 患者の遺伝子解析により、TDP-43 遺伝子にミスセンス変異が同定されていることから、遺伝子変異の影響についても解析した。また、凝集体の形成と細胞機能の障害、変性の関係についても検討を加えた。さらに細胞モデルを用いて、いくつかの低分子化合物の凝集抑制効果の検討を行った。

B.研究方法

患者脳脊髄に蓄積する TDP-43 に異常リン酸化が示唆されたため、そのリン酸化部位の同定を試みた。質量分析による同定は困難が予想されたことから、リン酸化候補部位の抗体を作製し、得られた抗体が封入体を染めるかどうかを検討するという戦略をとった。結果的に 36 カ所の Ser/Thr に対する抗体を作製し、免疫組織染色を行った。また、TDP-43 の核移行配列および類似配列の欠損変異体を発現する細胞モデル、TDP-43C 末断片—GFP 融合タンパク質を発現する細胞モデルを用いていくつかの低分子

化合物の評価を行った。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は当研究所の専門委員会に遺伝子組換え生物等の使用等に関わる申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C.研究結果

TDP-43 の 36 カ所の Ser/Thr に対する抗体を作製し、5 カ所の Ser のリン酸化ペプチドに対する抗体が患者組織の TDP-43 封入体を染色した。中でも最 C 末端の Ser409, Ser410 のリン酸化ペプチドに対する正常の TDP-43 とは反応せず、患者組織に蓄積する封入体を強く染色した。この抗体を用いて不溶画分をイムノブロット解析した結果、対照脳では全く検出されない異常（リン酸化された 45kDa の全長 TDP-43, 18~28kDa の C 末端断片バンド、レーン全体がスメア状に染まる分子量不定の C 末端断片分子）が ALS、FTLD 患者に強く検出された。18~28kDa の C 末端断片バンドは ALS と FTLD で異なるバンドパターンを示した。

TDP-43 の異常を再現するモデルは TDP-43 を標的とする ALS 治療薬の探索に有用と考えられることから、細胞モデルの構築を行った。家族性、孤発性 ALS 患者に認められた変異を含む様々な改変 TDP-43 を神経系培養細胞に発現させ、TDP-43 のリン酸化、ユビキチン化、凝集、局在の変化などを観察した。その結果、野生型 TDP-43 はその多くが核に局在し、それだけでは凝集体を形成しなかったが、核移行配列欠損を含む部分欠損 TDP-43(ΔNLS&187-192)、および GFP タグを付加した C 末端断片を発現した細胞で、リン酸化、ユビキチン化された TDP-43 の蓄積を観察した。また、凝集体を形成する C 末断片と核に局在する全長 TDP-43 を同時に発現すると、本来核に局在する全長 TDP-43 が細胞質に蓄積し、核への局在が減少することも確

認した。

また、この凝集体を形成する細胞において、BrdU の取り込みがほぼ完全に阻害されていることを見いだした。すなわち、凝集体形成細胞では細胞増殖が著しく抑制されていることが示された。これらの細胞では、遺伝子の転写制御に関与する RNA ポリメラーゼ II やその他いくつもの基本転写因子が凝集体に局在することが観察され、凝集体形成時にそれらが巻き込まれる可能性が示唆された。

続いて、これら TDP-43 蓄積細胞モデルを用いて、治療薬候補化合物の評価を行った。早期の認可・適用が望まれることから、現在治療薬として認可されている薬剤や臨床試験中の化合物にターゲットを絞り、アルツハイマー病の第 2 相臨床試験において病状を改善する効果が報告された 2 剤(メチレンブルーとディメボン)の評価を行った。メチレンブルーは *in vitro* において Aβ やタウの凝集を抑制するフェノチアジン系化合物であり、ディメボンは過去にロシアでアレルギーなどの治療に使われていた薬剤である。その結果、二つの化合物はそれぞれ単独で TDP-43 の凝集抑制作用を示すと共に、併用した場合には低濃度で強い効果を示すことが観察された。

D.考察

ALS 患者の脳、脊髄に蓄積する TDP-43 はその C 末端が異常にリン酸化され、全長および C 末断片が、線維化して蓄積していることを明らかにした。さらに TDP-43 の C 末端断片、あるいは部分欠損変異体を SH-SY5Y 細胞に発現すると、患者組織に蓄積する TDP-43 と同様のリン酸化やユビキチン化が再現されること、その細胞では BrdU の取り込みがみられないことを明らかにした。さらに TDP-43 蓄積細胞モデルを用いて、メチレンブルーとディメボンの二つの薬剤が TDP-43 の凝集抑制効果を有すること

を明らかにした。凝集を抑制するメカニズムについてはまだ不明な点も多いが、メチレンブルーはタウやAβの凝集抑制と同じように構造が変化した異常分子に直接作用するものと考えられる。今後、動物モデルを用いたさらなる解析が必要と思われる。

E. 結論

ALS患者脳脊髄に蓄積するTDP-43の異常を明らかにし、培養細胞内においてその異常を再現することに成功した。このモデルを用いて、TDP-43の凝集、蓄積を抑制する薬剤の探索をはじめ、メチレンブルーとディメボンに細胞内TDP-43凝集体形成を抑制効果があること、両薬剤を併用するとさらに高い効果が観察されることを見いだした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H, Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 64: 60-70, 2008.
- 2). Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hisanaga SI, Hasegawa M, Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTL-D and ALS. *FEBS Lett* 582: 2899-2904, 2008.
- 3). Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 583: 394-400, 2009.
- 4). Arai T, Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T,

Niizato K, Tsuchiya K, Iritani S, Onaya M, Akiyama H, Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies *Acta Neuropathol*. Online Jan 13, 2009.

- 5). Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 117: 151-158, 2009.
- 6). Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 405-9, 2009.
- 7). Nonaka T, Hasegawa M. A Cellular Model To Monitor Proteasome Dysfunction by alpha-Synuclein. *Biochemistry* 48: 8014-22, 2009.
- 8). Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Lett* 583: 2419-24, 2009.
- 9). Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* 18: 3353-3364, 2009.
- 10). Davidson Y, Amin H, Kelley T, Shi J, Tian J, Kumaran R, Lashley T, Lees AJ, Duplessis D, Neary D, Snowden J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Bandopadhyay R, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. TDP-43 in ubiquitinated inclusions in the inferior olives in frontotemporal lobar degeneration and in other neurodegenerative diseases: a degenerative process distinct from normal ageing. *Acta Neuropathol* 118: 359-69, 2009.
- 11). Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga SI, Hasegawa M. Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem* 284: 7940-7950, 2009.

12). Masuda M, Hasegawa M#, Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M. Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies. *FEBS Lett* 583:787-791, 2009.

13). Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem.* 285: 34885-98, 2010.

14). Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I. Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010.

15). Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Effect of topographical distribution of alpha-synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010.

16). Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120: 55-66, 2010.

17). Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H. TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Intern Med* 49: 331-4, 2010.

18). Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J Mol Biol* 395: 445-56, 2010.

19). Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K,

Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaya M, Fujishiro H, Akiyama H. Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181, 2010.

2.学会発表

1). 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Thomas Beach, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) FTDにおけるTDP-43蓄積の意義. 第49回日本神経学会総会, 横浜 [2008/05/17]

2). 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Beach T, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) FTLN、ALSに蓄積する異常TDP-43の解析. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/11]

3). 犬飼有紀, 野中隆, 新井哲明, 吉田眞理, 橋詰良夫, 秋山治彦, 久永眞市, 長谷川成人 (2008) TDP-43におけるSer409/410の異常リン酸化. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]

4). 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人 (2008) TDP-43断片の発現による細胞内凝集体の形成. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]

5). 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人 (2008) TDP-43の細胞内封入体モデルの作製. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/11]

6). 新井哲明, 長谷川成人, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Beach T, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) TDP-43の蓄積を中心とした神経病理. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]

7). Nonaka T, Arai T, Akiyama H, Buratti E, Baralle F E, and Hasegawa M (2008) Intracellular aggregation of phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 in SH-SY5Y cells. International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA [2008/07/27]

8). Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Ikeda K, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F,

Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H (2008) Accumulation of phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA [2008/07/28]

9). 新井哲明, 長谷川成人, 西原真杉, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Thomas G Beach, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) 遺伝子変異と FTD: Progranulin 遺伝子を含めて. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜 [2008/05/17]

10). 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 亀谷富由樹, 池田研二, 近藤ひろみ, 下村洋子, 羽賀千恵, 上谷邦秋, 吉田眞理, 橋詰良夫, 新里和弘, 大島健一, 森田光哉, 中野今治 (2008) 神経変性疾患におけるリン酸化 TDP-43 の蓄積. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京 [2008/05/20]

11). Nonaka T, Arai T, Akiyama H, Buratti E, Baralle F E, and Hasegawa M (2008) Intracellular aggregation of phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 in SH-SY5Y cells. International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA [2008/07/27]

12). Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Ikeda K, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H (2008) Accumulation of phosphorylated TDP-43 in neurodegenerative disorders. International Conference on Alzheimer's Disease 2008, Chicago, USA [2008/07/28]

13). 長谷川成人 (2009) TDP-43 蓄積症の概念と病態解明への展望. 第 50 回日本神経学会総会, 教育講演, 仙台 [2009/05/22]

14). Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M (2009) Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease 2009, Vienna, Austria [2009/07/12]

15). Arai T, Mackenzie IRA, Hasegawa M, Fujishiro H, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Iritani S, Onaya M, Akiyama H (2009) Phosphorylated TDP-43 in

neurodegenerative disorders. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease 2009, Vienna, Austria [2009/07/15]

16). Hasegawa M. Therapeutic approaches targeting tau protein for neurodegenerative diseases. International Seminar Aging, Tau Protein and Dementias at French Embassy, Tokyo [2010/10/20]

17). Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H. Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA[2010/10/06]

18). Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H. Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/04]

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

1). 特願 2008-101899. 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人: TDP-43 蓄積細胞モデル. 出願人: 財団法人東京都医学研究機構, 出願日: 平成 20 年 4 月 9 日

2). 特願 2008-095035. 糸川昌成, 新井誠, 長谷川成人, 野中隆, 秋山治彦, 新井哲明: 遺伝子変異を用いた筋萎縮性側索硬化症の予測法. 出願人: 財団法人東京都医学研究機構, 出願日: 平成 20 年 4 月 1 日

3). 特願 2007-178583. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 秋山治彦: TDP-43 凝集物に特異的に結合する抗体. 出願人: 財団法人東京都医学研究機構, 出願日: 平成 19 年 7 月 6 日

2.実用新案登録 特になし

3.その他 特になし

ALS のグリア細胞における分子病態の解明

研究分担者：山中 宏二（理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー）

研究協力者：山下 博史^{1,2)}、渡辺 祥司¹⁾、藤森 典子¹⁾、井口 洋平³⁾、熱田 直樹³⁾、
田中 章景³⁾、祖父江 元³⁾

1) 理化学研究所脳科学総合研究センター・運動ニューロン変性研究チーム

2) 京都大学医学部神経内科、3) 名古屋大学医学部神経内科

研究要旨：本研究では、ALS のグリア細胞における分子病態解明を目指して、変異 SOD1 マウス病巣、孤発性 ALS 脊髄における遺伝子変動の網羅的解析を行った。グリア細胞では、遺伝性モデルと孤発性 ALS に共通した分子病態が存在することを明らかにした。さらに、共通した異常がみられたシグナル経路のうち自然免疫経路に焦点を絞り、モデルマウスを用いた検討を行った。自然免疫経路のシグナル伝達に必須の分子である MyD88、TRIF ノックアウトマウスと SOD1^{G93A} マウスとの交配実験を行い、TRIF 依存性のシグナル経路抑制により疾患進行の加速がみられ、マウスの生存期間が著しく短縮した。疾患進行の加速はケモカインの発現抑制とよく関連していた。ALS モデルにおいて自然免疫経路の破綻はその疾患進行を加速すると考えられる。

A.研究目的

我々は、変異 SOD1 発現による ALS モデルマウスを用いた研究でグリア細胞における病的変化が疾患進行を加速していることをこれまで明らかにしてきた。本研究では、その知見に立脚して、変異 SOD1 を発現した ALS モデルマウスおよび孤発性 ALS 患者病巣におけるグリア細胞の分子病態を解明するとともに、ALS モデルマウスを用いた自然免疫経路の関与について研究を行った。自然免疫は病原体の侵入などに対して初期に発動される生体応答であり、マクロファージや樹状細胞に発現する Toll-like 受容体(TLR)を介して病原体の構成成分を認識し、炎症反応や免疫反応が応答される。神経系ではおもにミクログリアに TLR の発現がみられ、感染防御機構に重要な役割を果たしている。神経変性疾患では、アルツハイマー病の病巣において自然免疫系の関与が報告されている。さらに、変異 SOD1 マウスの病巣で感染とは関係なく疾患の進行に伴って TLR2

の発現亢進が報告され、ALS 病態における自然免疫経路の関与が示唆されている。

B.研究方法

まず、変異 SOD1 マウスの疾患進行期の腰髄試料および孤発性 ALS の凍結頸髄試料を用いた DNA マイクロアレイによる網羅的解析からグリア関連分子の発現異常を検討した。

さらに ALS モデルである SOD1^{G93A} マウスと Toll-like 受容体を介したシグナル伝達に必須の分子である MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein 88), TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN β) ノックアウトマウスとの 3 重交配実験を行い、疾患の進行速度や生存期間延長の効果を検討した。MyD88、TRIF のノックアウトマウスとの交配により、すべての TLR シグナル伝達を特異的に抑制することが可能である。

(倫理面への配慮) 本研究におけるヒト由来試料の使用は、名古屋大学および理化学研究所研

究倫理委員会において承認されている。

C. 研究結果

変異 SOD1 マウスおよび孤発性 ALS 脊髄病巣における mRNA の網羅的解析を行った。これらは、すべての細胞群における遺伝子発現の総和であるため、細胞群特異的な遺伝子発現の変化を解析するため、マウス細胞群特異的トランスクリプトームを樹立して解析に用いた。2 種の変異 SOD1 マウス(SOD1^{G37R}、SOD1^{G85R})の疾患進行期の脊髄で共通して変動している 225 遺伝子 (対照群に比べて 2 倍以上変動しているもの) を抽出し、細胞群別に分類したところ約 70%の遺伝子はミクログリア由来と考えられた。次に、孤発性 ALS 患者脊髄で変動している 178 個の遺伝子 (対照群に比べ 1.8 倍以上変動しているもの) を抽出し、主に発現している細胞群別に分類した。その結果、約 60%の遺伝子がグリア細胞由来と考えられ、発現上昇遺伝子には Iba-1 などのミクログリアマーカーに加えて、自然免疫に関与する Toll-like 受容体 TLR1、2、7、CD14 や補体 C1q などの上昇がみられ、自然免疫経路の関与が認められた。グリア細胞由来と考えられる遺伝子のうち、約 50%が変異 SOD1 マウスにおいても共通した発現異常を認めた。

さらに、MyD88^{-/-}、TRIF^{-/-}と SOD1^{G93A} マウスとの 3 重交配実験を 2 通り行った。SOD1^{G93A} マウスと比較して、SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-} / TRIF^{-/-}および SOD1^{G93A}/ TRIF^{-/-}において罹病期間が約 50%短縮し、疾患進行の著しい加速と生存期間の有意な短縮が見られた。(平均生存期間、SOD1^{G93A}: 162 日; SOD1^{G93A}/TRIF^{-/-}: 137 日; SOD1^{G93A}/MyD88^{-/-} / TRIF^{-/-}: 137 日)。また、SOD1^{G93A}TRIF^{-/-}および TRIF^{+/-}の状況下で、MyD88 のコピー数は生存期間に影響しないことを確認した。さらに、TRIF を欠失した脊髄病巣ではケモカイン(CCL5、CXCL10)の著

しい発現低下を認めた。

D. 考察

SOD1 変異による遺伝性モデル、孤発性 ALS 病巣のグリア細胞の分子病態には相当数共通なものが認められ、その中で自然免疫経路に関わる遺伝子群の発現亢進を認めた。自然免疫経路の動物モデルにおける解析では、MyD88 は 10 種類以上ある TLR のうち TLR3 以外のシグナル伝達に関与するが、TRIF は TLR3、4 を介したシグナル伝達に関与する。MyD88 よりむしろ TRIF 依存性経路が ALS モデルの疾患進行の制御因子の一つである可能性が示唆された。

E. 結論

遺伝性 ALS モデルマウスに加えて、孤発性 ALS 病巣のグリア細胞においても、自然免疫経路の賦活が起こっていることが示唆された。また、共通したグリア細胞の分子病態についてさらに検討を行い、統合的な理解を進める必要がある。さらに、ALS モデルにおいて自然免疫経路の破綻はその疾患進行を加速すると考えられる。今後、これらのマウスの脊髄病巣におけるグリア細胞の活性化の検討や、TRIF 欠損とケモカイン発現低下により疾患進行が加速する分子メカニズムの詳細な検討を行い、その分子病態を明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LSB: Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice.

Proc Natl Acad Sci USA 105: 7594-7599, 2008.

2) Ilieva H, Yamanaka K, Malkmus S,

Kakinohana O, Yaksh T, Marsala M, Cleveland DW: Mutant dynein (Loa) triggers proprioceptive axon loss that extends survival only in the SOD1 ALS model with highest motor neuron death. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 12599-12604, 2008.

3) Furukawa Y, Kaneko K, Yamanaka K, O'Halloran, TV, Nukina N: Complete loss of post-translational modifications triggers fibrillar aggregation of SOD1 in familial form of ALS.

J Biol Chem 283: 24167-24176, 2008.

4) Cleveland DW, Yamanaka K, Bomont P: Gigaxonin controls vimentin organization through tubulin chaperone-independent pathway. *Hum Mol Genet.* 18: 1384-1394, 2009.

5) Lobsiger CS, Boillee S, McAlonis-Downes M, Khan AM, Feltri ML, Yamanaka K, Cleveland DW: Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 4465-4470, 2009.

6) Furukawa Y, Kaneko K, Yamanaka K, Nukina N: Mutation-dependent Polymorphism of Cu, Zn-Superoxide Dismutase Aggregates in the Familial Form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem*, 285: 22221-22231, 2010.

7) Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW: Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a Mouse Model of Inherited ALS. *Neuron*, 67: 575-87, 2010.

8) Lasiene J, Yamanaka K. Glial cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Res Int in press*

9) 山中宏二、筋萎縮性側索硬化症とグリア細胞 *Medical Science Digest* 35:262-263,2009.

10) 山中宏二. ALS の今後の研究方向と可能性は *Medical Rehabilitation* 113:13-18, 2009.

11) 山中宏二: 神経変性疾患における細胞

死研究のパラダイムシフト *実験医学増刊* 28: 1188-94, 2010.

12) 山中宏二、遠藤史人: ALS の病態—非細胞自律性の神経細胞死 *医学のあゆみ* 235: 241-245, 2010.

2.学会発表

1) Yamanaka K: Astrocytes and microglia determine disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Cold Spring Harbor 2008 Meeting on Glia in Health & Disease*, USA. (2008. 7)

2) Yamanaka K: Glial cells as central contributors to non-cell autonomous neurodegeneration in ALS. *BMB2008* (第 81 回日本生化学会、第 31 回日本分子生物学会合同大会) 神戸. (2008. 12)

3) 山中宏二ら 第 49 回日本神経学会総会、横浜, (2008. 5)

4) 山中宏二ら 第 31 回日本神経科学大会、東京, (2008. 7)

5) Yamanaka K: Glial cells as central contributors to non-cell autonomous neurodegeneration in ALS. *The 3rd Korea-Japan Neuroscience Symposium*, Busan, Korea (2009.8)

6) Yamanaka K: Controlling neuroinflammation through glial cells are viable target for the therapy to slow neurodegeneration in ALS.

第 32 回日本神経科学学会大会、名古屋 (2009.9)

7) Watanabe S, Yamanaka K: 20th international meeting for MND/ALS, Berlin (2009.12).

8) 山下博史ら 第 50 回日本神経学会総会、仙台 (2009.5)

9) 渡辺祥司ら 第 82 回日本生化学会大会、神戸 (2009.10)

10) 山中宏二: 筋萎縮症側索硬化症と封入体 第 99 回日本病理学会、東京(2010.4)

11) Yamanaka, K: Protein degradation in neurodegenerative diseases. *The 87th Japan Physiology Meeting*, Morioka (2010. 5)

- 12) Yamanaka, K: The role of glial cells in ALS. *Neuro 2010*, Kobe (2010. 9)
- 13) Yamanaka, K: Active roles of glial cells in neurodegenerative disease. *International Conference on Systems in Medicine and Biology*, Kharagpur, India (2010. 12) invited lecture
- 14) 山中宏二: 神経変性疾患における非細胞自律性の神経細胞死. *BMB2010* (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会) 神戸 (2010. 12)
- 15) 山下博史ら 第51回日本神経学会総会、東京 (2010. 5)
- 16) 築地仁美ら *RNA フロンティアミーティング2010*、静岡 (2010. 9)
- 17) 渡辺祥司ら *BMB2010*、神戸 (2010.12)

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

Ⅲ. 研究報告(研究協力者)

ALS モデルマウスにおける TAT-FNK 蛋白髄腔内投与による蛋白治療、 および骨髄移植と顆粒球コロニー刺激因子投与併用治療

研究協力者 阿部 康二 岡山大学医学部神経内科 教授

研究要旨 平成 20 年から 21 年度は ALS モデルマウスに TAT-FNK の持続髄腔内投与にて、ALS の発症、生存期間を延長し、clinical score を改善することを証明した。また平成 22 年度は ALS モデルマウスに野生型マウスの骨髄移植と GCSF 投与を併用し、骨髄移植+GCSF 併用療法では vehicle 投与群に比べ運動機能低下を有意に遅延し、生存期間を有意に延長することを証明した。

A.研究目的

筋萎縮性側索硬化症は運動ニューロンが選択的に変性し、このため筋萎縮・脱力を来し数年の経過で死に至る神経変性疾患である。しかし病態の解明は十分でなく、いまだ有効な治療法はなく、新規治療法の開発が強く求められる。

近年、HIV1 の転写活性化蛋白質である transcriptional activator protein (TAT) 由来の protein transduction domain (PTD) に結合した蛋白質が、細胞膜や血液脳関門を通過し、神経を含む、さまざまな組織、細胞に取り込まれることが判明した。これを利用し、蛋白治療として、TAT の PTD と結合させた蛋白質を細胞内に導入することで、さまざまな疾患への治療応用が期待されている。そして、抗アポトーシス作用をもつ Bcl-X_L 蛋白の 3 つのアミノ酸を置換した FNK 蛋白に TAT を結合した TAT-FNK が、脳梗塞モデルマウスにて良好な治療成績を挙げた。また、抗アポトーシス作用をもつ Bcl2 の overexpression とアデノウイルスを用いた Bcl2 遺伝子導入は、ALS モデルマウスに対し良好な治療成績を挙げている。

そこで本研究では、ALS モデルマウスである、SOD1 (G93A) Tg マウスに、TAT-FNK を用いた蛋白治療を試みた。投与方法は、より効率的に

脊髄運動ニューロンに TAT 蛋白を導入するため、osmotic minipump を用いた持続髄腔内投与法を試みた。(平成 20 年度)

また、TAT-FNK の SOD1 (G93A) Tg マウスに対する治療効果につき、さらに組織学的に検討した。(平成 21 年度)

さらに、ALS モデルマウスへの野生型マウスの骨髄移植単独療法、あるいは顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)単独投与は、わずかながらそれぞれ神経保護効果があることが示されている。また、これまで ALS 患者への GCSF 投与も行われているが治療効果は明らかではなかった。今回我々は、ALS モデルマウスに野生型マウス由来骨髄の移植と GCSF 投与を併用した場合の治療効果を検討した。(平成 22 年度)

B.研究方法

TAT-FNK 蛋白が持続髄腔内投与の間に抗アポトーシス効果が失活しないかを確認するため、STS を投与することでアポトーシスを誘発した SH-SY5Y 細胞に、37°C で 28 日間 incubate した TAT-FNK と incubate していない TAT-FNK を投与し、抗アポトーシス効果を比較した。

TAT 蛋白が持続髄腔内投与にて、脊髄運動ニューロンに取り込まれるかを確認するため、91

日齢の Wt マウスに 7 日間、osmotic minipump を用いて TAT-GFP ($3.5 \times 10^2 \text{nmol}$ または $3.5 \times 10^1 \text{nmol}$) または TAT-FNK ($3.5 \times 10^1 \text{nmol}$) を持続髄腔内投与し、その 7 日後に L4 腰髄を灌流固定し、切片にして、抗 GFP 抗体、ニューロフィラメントに反応する SMI32 抗体、抗 Bcl-X_L 抗体で免疫染色を行った。

TAT-FNK 持続髄腔内投与の治療効果を確認するため、91 日齢の SOD1 (G93A) Tg マウスに、28 日間、osmotic minipump を用いて人工髄液または TAT-GFP (1.4nmol)、TAT-FNK (1.4nmol) の持続髄腔内投与を行い、発症日、生存期間、clinical score (Rotarod test、wheel running、体重変化) を記録した。(平成 20 年度)

91 日齢の SOD1 (G93A) Tg マウスに、28 日間、osmotic minipump を用いて人工髄液または TAT-GFP (1.4nmol)、TAT-FNK (1.4nmol) の持続髄腔内投与を行い、133 日齢で各群 6 匹ずつ L4 腰髄を灌流固定し、切片にした。まず Nissl 染色にて L4 腰髄前角の運動ニューロン数を計測した。そして cleaved caspase 9, 3 抗体による免疫染色および terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色を行い、cleaved caspase 9, 3 抗体とニューロンに対する neuron-specific nuclear protein (NeuN) 抗体、またはアストロサイトに対する glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体との二重免疫染色を行った。(平成 21 年度)

G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウス(ALS モデルマウス)を、vehicle 投与群、GFP マウスの骨髄移植単独治療群、GCSF 単独投与群、GFP マウスの骨髄移植+GCSF 投与群の 4 群に分けて治療を行った。骨髄移植は ALS 発症直後である 91 日齢の ALS モデルマウスに行い、ALS モデルマウスに合計 10Gy の放射線照射を行った後に GFP マウスから採取した野生型 SOD1 骨髄細胞をに静注した。

GCSF は骨髄移植翌日より 0.6mg/kg を隔日で 10 回投与した。クリニカルデータとして生存期間と Rotarod test を評価し、組織学検討のため各群 130 日齢に L4 腰髄をサンプリングした(n=5-6)。(平成 22 年度)

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は本学 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、動物愛護面に配慮し、利用動物数を極力減らすように努めた。

C.研究結果

STS を投与しアポトーシスを誘発した SH-SY5Y 細胞に対し、37°C で 28 日間 incubate した TAT-FNK と incubate していない TAT-FNK では、抗アポトーシス効果に差は認めなかった。

抗 GFP 抗体での L4 腰髄免疫染色の結果、TAT-GFP は 7 日間の持続髄腔内投与にて、脊髓前角の 20 μm 以上の大型細胞に取り込まれ、抗 GFP 抗体と SMI32 抗体との二重染色の結果、GFP 陽性細胞は SMI32 陽性であり、TAT-GFP は脊髓運動ニューロンに取り込まれたことが判明した。抗 Bcl-X_L 抗体での L4 腰髄免疫染色の結果、TAT-FNK は 7 日間の持続髄腔内投与にて、TAT-GFP と同様に脊髓前角の大型細胞に取り込まれており、脊髓運動ニューロンに取り込まれたことが判明した。28 日間の TAT-FNK の持続髄腔内投与により、人工髄液や TAT-GFP と比較して、Tg マウスの発症日 (人工髄液 98.9 ± 3.0 日、TAT-GFP 98.3 ± 4.4 日、TAT-FNK 107.8 ± 7.3 日)、生存期間 (人工髄液 130.8 ± 7.0 日、TAT-GFP 129.8 ± 10.0 日、TAT-FNK 143.7 ± 9.3 日) は有意に延長し、clinical score は有意に改善した。(平成 20 年度)

L4 腰髄の運動ニューロン数は人工髄液、TAT-GFP 投与群に比べ、TAT-FNK 投与群で優位

に増加していた。また、L4 腰髄において、アポトーシス促進作用のある cleaved caspase 9, 3 が陽性である細胞数、またアポトーシスのマーカーである TUNEL 陽性細胞数は、人工髄液、TAT-GFP 投与群に比べ、TAT-FNK 投与群で優位に減少していた。cleaved caspase 9, 3 と NeuN、GFAP との二重免疫染色では、cleaved caspase 9, 3 と NeuN と merge し、GFAP とは merge しなかった。(平成 21 年度)

ALS モデルマウスへの骨髄移植あるいは GCSF 投与単独療法では vehicle 投与群に比べ生存期間が延長する傾向にあるものの統計学的には至らなかった。一方、骨髄移植+GCSF 併用療法では vehicle 投与群に比べ運動機能低下を有意に遅延し、生存期間を有意に延長した。また、組織学的検討では、骨髄移植+GCSF 併用療法群では vehicle 投与群に比べ脊髄前角の運動ニューロン減少が有意に抑制されていた。移植された GFP 陽性の骨髄細胞は脊髄組織において Iba-1 陽性や PSA-NCAM 陽性細胞として検出された。GCSF 併用群の方が骨髄移植単独群に比べて移植細胞由来と考えられる GFP 陽性細胞数が有意に増加していた。(平成 22 年度)

D. 考察

37°C で 28 日間 incubate した TAT-FNK の抗アポトーシス効果は失活しておらず、28 日間の持続髄腔内投与の間に TAT-FNK の抗アポトーシス効果は失活しない可能性が高いと考えた。

3.5×10^2 nmol の TAT-GFP が 7 日間の持続髄腔内投与で脊髄運動ニューロンに取り込まれたが、今までニューロンに関して報告されている TAT 蛋白投与量の中では最少の投与量であり、osmotic minipump を用いた持続髄腔内投与法は、より効率的に脊髄運動ニューロンに TAT 蛋白を導入する方法であると考えられた。また

TAT-GFP に限らず、TAT-FNK も持続髄腔内投与法にて良好に脊髄運動ニューロンに取り込まれることが判明した。ALS 発症前から、Bcl2 発現が減少傾向となり、アポトーシスを促進する BAX の発現が増加傾向となるため、ALS 発症直前の 91 日齢から 28 日間、TAT-FNK を持続髄腔内投与することにした。それにより、ALS モデルマウスの発症、生存期間は有意に延長し、clinical score が有意に改善したことより、TAT-FNK による蛋白治療は ALS に対する有効な治療法になりえると考えられた。また将来的に、他の治療効果を持つ蛋白質も TAT を結合させることで、ALS 治療に応用することが期待できると考えられた。(平成 20 年度)

人工髄液、TAT-GFP 投与群に比べ、TAT-FNK 投与群で L4 腰髄運動ニューロン数が優位に増加していたことから、28 日間の TAT-FNK 持続髄腔内投与が、ALS による運動ニューロン減少を抑制したことが判明した。また、L4 腰髄の cleaved caspase 9, 3、TUNEL 陽性細胞数は人工髄液、TAT-GFP 投与群に比べ、TAT-FNK 投与群で優位に減少していたことから、TAT-FNK の抗アポトーシス効果が ALS 脊髄で十分に発揮されたことが判明した。cleaved caspase 9, 3 が NeuN と merge したことより、ニューロンが cleaved caspase 9, 3 を発現しており、そのニューロンに TAT-FNK が作用したことが示唆された。以上より、TAT-FNK 持続髄腔内投与による ALS モデルマウスへの治療効果は組織学的にも証明された。TAT-FNK による蛋白治療は ALS に対する有効な治療法になりえると考えられ、また将来的に、他の治療効果を持つ蛋白質も TAT を結合させることで、ALS 治療に応用することが期待できると考えられた。(平成 21 年度)

骨髄移植と GCSF 投与の併用は、ALS モデルマウスの運動障害進行を遅延し、生存期間を延長した。

GCSF 併用により脊髄組織において移植細胞由来と考えられる GFP 陽性細胞数が増加していることが、治療効果発現に関連していることが示唆された。
(平成 22 年度)

E. 結論

Osmotic minipump を用いた持続髄腔内投与法は、TAT 蛋白をマウスの脊髄運動ニューロンに導入する有効な手段であり、ALS モデルマウスへの TAT-FNK 持続髄腔内投与は、有効な治療方法である。(平成 20 年度)

TAT-FNK 持続髄腔内投与による、ALS モデルマウスへの著明な治療効果は、組織学的検討においても確認できた。(平成 21 年度)

骨髄移植と GCSF 投与の併用は、ALS モデルマウスの運動障害進行を遅延し、生存期間を延長した。
(平成 22 年度)

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究報告

1. 論文発表

Ohta Y, Kamiya T, Nagai M, Nagata T, Morimoto N, Miyazaki K, Murakami T, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Asoh S, Ohta S, Abe K: Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 86: 3028-3037, 2008

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* 2010, 465, 223-226.

Morimoto N, Nagai M, Miyazaki K, Ohta Y, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asanuma M & Abe K: Induction of parkinsonism-related proteins in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. *J Neurosci Res* 2010, 88, 1804-1811.

2. 学会発表

太田康之、永井真貴子、永田哲也、森本展年、宮崎一徳、武久康、倉田智子、池田佳生、麻生貞光、太田成男、阿部康二. TAT 蛋白髄腔内投与による ALS モデルマウスへの蛋白治療. 第 50 回日本神経学会総会、5 月 20-22 日、2009、仙台、日本

Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Miyazaki K, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asoh S, Ohta S, Abe K. Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. 134th Annual Meeting of the American Neurological Association, Oct 11-14, 2009, Baltimore, USA.

Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Miyazaki K, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asoh S, Ohta S, Abe K. Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 2009, Oct 17-21, 2009, Chicago, USA.

Nobutoshi Morimoto, Kazunori Miyazaki, Tomoko Kurata, Yoshio Ikeda, Tohru Matsuura, Koji Abe Induction of alpha-synuclein, PINK1, DJ-1 in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a

mutant SOD1 gene. 7th Annual Meeting of ASMRM
and 10th J-mit (Fukuoka, Japan)

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