

キサンチン酸化還元酵素(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 ALS 治療薬と一過性肝細胞組織障害からの回復過程における肝細胞増殖因子(HGF)の寄与

研究協力者：加藤 信介 鳥取大学医学部脳神経医科学講座脳病態医科学分野・准教授
共同研究者：加藤 雅子 鳥取大学医学部基盤病態医学講座分子病理学分野
西野 武士 米国カルフォルニア大学生化学分野
島田(大谷) 若菜 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
船越 洋 大阪大学大学院医学系研究科分子再生医学
中村 敏一 大阪大学先端科学イノベーションセンター

研究要旨：I. **ALS 治療薬研究**に関しては、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 TEI-6720； [2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-5-thiazolecarboxylic acid]を候補薬とし、ALS モデル動物である B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur (G1H-G93A トランスジェニックマウス)に、生後 80 日より 5mg/kg を連日経口投与した。プラセボとしては化合物の溶剤であるメチルセルロースを用いた。臨床症候学的結果については、プラセボより、有意な発症遅延効果、生存期間延長効果、病悩期間延長効果を認めた。運動負荷試験の結果については、伸展反射試験・傾斜面角度試験・フットプリント試験・ロタロッド試験・ビームバランス試験の各試験に関して、プラセボより、有意な運動改善効果を示した。病理組織学的解析結果では、生後 115 日齢においてプラセボに比較して有意な残存神経細胞の存在を認めた。

II. **HGF の研究**に関しては、一過性肝細胞組織障害からの回復過程における HGF の寄与に関しては、肝細胞では血中 HGF のエンドクリン性の一過性供給により組織学的障害から回復していくことが判明した。

I. ALS治療薬に関する研究

A. ALS治療薬に関する研究目的

筋萎縮性側索硬化症（以下、ALS）の新規経口治療薬として、キサンチン酸化還元(XOR)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-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-5-thiazole carboxylic acidが、顕著に優れたALS治療作用を示すことをALS動物モデルにおいて示し、当該化合物を特徴とするALS新規経口治療薬の開発とその基盤研究を研究目的とする。

B. ALS治療薬に関する研究方法

1. 薬剤：

- 1) 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：TEI-6720: 2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-5-thiazole carboxylic acid を帝人ファーマーより供与を受けた。
- 2) 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化合物として、アロプリノールを使用した。
- 3) プラセボとして、上記薬剤の溶剤としてのチルセルロースを使用した。

2. 投与方法：化合物およびアロプリノールをメチルセルロース（溶剤）に溶解させ、5mg/kgを1日1回経口的に投与し、プラセボは、メチルセルロースのみを使用した。

3. 実験動物：雄の B6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur (G1H-G93A)トランスジェニックマウス、JR2726, Jackson Laboratory, Bar Harbor, 米国)と雄の野生型同腹仔マウスを使用した。

4. マウスの薬剤効果評価：

1) 臨床学的評価は、6段階の症候学的ステージ検査(0度＝正常、1度＝不活発性、小刻みなふるえ・尻尾挙上不全・俊敏性の欠如した緩徐歩行・一側性の軽度麻痺のいずれか一つ以上の臨床症状を呈した場合、2度＝一側あるいは両側の後肢不完全麻痺を呈するが、前肢は正常、3度＝両側後肢高度麻痺を呈するが、前肢はほぼ正常、4度＝一側あるいは両側の前肢不完全麻痺を呈し、かつ両側後肢高度麻痺を呈する、5度＝高度四肢麻痺を呈しているか、もしくは瀕死状態)と運動負荷試験(伸展反射試験、傾斜面角度試験、フットプリント試験、ロタロッド試験、ビームバランス試験)にて評価した。

2) 病理組織学的評価は、脊髄(頸髄、胸髄、腰髄)を検索部位として、終末期と生後115日齢において行った。

[倫理面への配慮]

すべての遺伝子操作は本学遺伝子組換え実験指針に従い、動物実験は本学動物実験委員会指針に従った上に、倫理面及び動物愛護面に配慮し、当該実験を実施した。

C. ALS治療薬研究に関する研究結果

1. 臨床学的解析結果

1) 症候学的結果：

プラセボ投与実験群における G1H-G93A マウスの発症日は、 99.9 ± 2.4 日、生存期間は、 119.7 ± 3.3 日、病悩期間 20.8 ± 2.3 日であった。プラセボ投与実験群の正常対照である野生型

同腹仔マウスでは、全例臨床症候学的評価のステージは全経過を通じて0度であった。化合物投与治療実験群は、プラセボ投与実験群より、発症日を有意に遅延させる発症遅延効果、生存期間を有意に延長させる生存期間延長効果、病悩期間を有意に延長させる病悩期間延長効果

($P < 0.05$, Kaplan-Meier log-rank test) を認めた。臨床症候学的には、ステージ1度から4度の各項目においてそれぞれ有意差 ($P < 0.05$, ANOVA with Dunnett's multiple comparison test) を持って延長していた。アロプリノール投与実験群では、プラセボ投与群と比べて臨床症候学的評価の各項目の評価において有意差はなかった。

2) 運動負荷解析結果：

化合物投与治療実験群は、プラセボ投与群に比べて伸展反射試験(105-120日)、傾斜面角度試験(110-130日)、フットプリント試験(105-130日)、ロタロッド試験(105-115日)、ビームバランス試験(105-115日)の各時点の試験で、有意な運動能力の有効性($p < 0.05$, Kruskal-Wallis AVOVA test) が認められた。アロプリノール投与実験群では、プラセボ投与群と比べて5種類すべての運動負荷試験の各試験項目の評価において有意差はなかった。プラセボ投与実験群の正常対照群である野生型同腹仔マウスでは、5種類すべての各運動負荷試験において、それぞれのスコアは全経過を通じて全例スコア＝0であった。

2. 病理組織学的解析結果：

生後115日齢における残存脊髄前角細胞数は、プラセボ投与群及びアルプリノール投与群の二群に比べ、治療群において有意に存在していた。プラセボ投与群とアルプリノール投与群の二群間には有意差を認められなかった。終末期における残存脊髄前角細胞数は、プラセボ投与群、治療薬投与群、アルプリノール投与群の三群において有意差を認められなかった。

D. ALS 治療薬研究に関する考察

ALSは、有効な治療法確立が強く希求されている致死的神経変性疾患の代表であり、現在日本では約4,000から5,000人の患者がいると考えられている。尚かつ、本疾患は働き盛りである中年以降に発症する。従って、ALSの新規治療法の開発は、極めて重要である。歴史的には、ALSは1869年にCharcotとJoffroyにより記載された一つの疾患単位である。主に上位運動ニューロンと下位運動ニューロンの両者が障害される進行性の原因不明の疾患であり呼吸筋麻痺により死亡する運動ニューロン疾患として位置づけられる。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. ALS 治療薬に関する結論

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-cyano-4-isobutoxyphenyl)-4-methyl-5-thiazolecarboxylic acidは、ALSの治療薬になり得る。

II. 肝細胞増殖因子(HGF)に関する研究

A. HGF 研究に関する研究目的

家族性 ALS (FALS) の発症機序の1つにSOD1の遺伝子変異があげられる。このモデル動物の1つとして、ヒトで認められるSOD1の変異遺伝子(G93A-SOD1)を過剰発現するトランスジェニックマウス(G1H-G93A マウス)が知られる。この動物はヒトALS患者と同様に運動ニューロンの持続的・進行性の変性・脱落がおり、運動機能不全による呼吸筋障害により最終的に死亡する。しかし、肝臓では一過性の組織学的障害がおこるが、その後肝臓は組織学的障害から回復する事を報告した(Kato et al., *Histol Histopathol* 2006)。この肝臓の一過性組織学的障害からの回復機構をHGF-c-Met systemの活性化に焦点を当てて明らかにした。

B. HGF 研究に関する研究方法

- (1) ALSモデルトランスジェニックマウス(G1H-G93A マウス)を用い、そのコントロールとして同一年齢の野生型 Littermate を用いた。
- (2) 病理組織学的解析: H & E 染色および免疫染色を施行した。免疫染色には、一次抗体として抗チロシンリン酸化 c-Met/HGF 受容体 (c-Met の活性化を反映する) 抗体、抗MIB-1(Ki67)抗体を用い、ABC法との組合せでDABにて可視化した。
- (3) 定量的 Real-time RT-PCR法を用いて HGF mRNA量を定量した。

(4) HGF タンパク質量を ELISA 法にて定量した。

(5) 抗 HGF 抗体投与: Alzet mini pump を用いて抗 HGF 機能阻害抗体を肝臓の組織学的障害が顕著になる 98 日齢から 112 日齢まで持続的に皮下投与し、HGF-c-Met system の一過性組織学的障害からの回復過程での寄与を評価した。

C. HGF 研究に関する研究結果

(1) 病理組織学的解析結果: G1H-G93A マウスの脊髄運動ニューロンは、経時的に死細胞数が増え、回復することはなかった。それとともに、運動ニューロンの phospho-c-Met の免疫染色性が強くなり、その状態が個体死亡まで持続した。肝細胞においては一過性組織学的障害を示したものの、120 日齢までにその障害から回復した。MIB-1 免疫染色の結果、肝細胞は細胞分裂・増殖をすることなく、これらの組織学的障害から回復していた。生化学的には血中 ALT(GPT)値の上昇を伴わなかった。脊髄と肝臓における c-Met の活性化を反映する phospho-c-Met について解析したところ、脊髄前角細胞では神経症状発症時期の 100 日齢で、phospho-c-Met が発現していたのに対して、肝細胞ではより早期の 90 日齢から phospho-c-Met の発現を認め、肝細胞組織像が正常化する時期から phospho-c-Met の発現が消失していることが明らかとなった。即ち、脊髄前角細胞と異なり、肝細胞ではより早期から HGF が機能するため、肝細胞は組織学的障害から回復している可能性を示唆した。

(2) 組織および血中の HGF mRNA・HGF タンパク質量の定量: 肝臓における HGF mRNA は、病理組織学的障害を示す前後において、認められなかった。一方、血中 HGF 蛋白量に関しては、病理組織障害像からの回復過程で一過性に HGF 蛋白量が血中で高値を示し、回復時期には正常を示していた。

(3) 抗 HGF 抗体投与: 抗 HGF 抗体を 2 週間持続的に皮下投与し、血中 HGF をブロックした結果、肝細胞における組織学的障害像からの回復が遅延した。

D. HGF 研究に関する考察

運動ニューロンが進行性、持続的に変性・脱落していくのに対して、中枢神経系以外の組織である肝臓については組織学的障害が一過性であり、その際 ALT の変動を伴わず、かつ MIB-1 発現も認めなかったことから、肝細胞は肝細胞死を伴わず、細胞分裂・増殖をすることもなく、組織学的障害像より回復していることが判明した。肝細胞では血中の全身性 HGF の一過性供給が病態の比較的早期におこり、その供給により組織学的障害から回復していくが、脊髄前角細胞では血液脳関門の存在により、早期からの血中 HGF の供給が受けられないために回復ができず、細胞死に至る可能性が考えられた。

E. HGF 研究に関する結論

ALS モデルトランスジェニックマウス (G1H-G93A マウス) の肝臓における一過性組織学的障害からの回復には、HGF のエンドクリン性供給が寄与していた。

F. 健康危険情報

特記なし

G. ALS 治療薬及び HGF に関する研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyama Y, Hiratuka T, Matuzaki S, Yamagishi S, Kato S, Katayama Y, Tohyama M: Familial 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):838-8

43,2010.

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).

3) Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T: Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Hum Mol Genet* 18(5): 942-955, 2009.

4) Sumi H, Kato S, Mochimaru Y, Fujimura H, Etoh M, Sakoda S: Nuclear TAR DNA binding protein 43 expression in spinal cord neurons correlates with the clinical course in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(1): 37-47, 2009.

5) Yoshihara D, Fujiwara N, Ookawara T, Kato S, Sakiyama H, Yokoe S, Eguchi H, Suzuki K: Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice. *Free Radical Biology & Medicine* 47(5): 559-567, 2009.

6) Kato S: Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: Similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115(1): 97-114, 2008.

7) 加藤信介: ALS1 の神経病理と発症機序.

Clinical Neuroscience 26(3), 319-322, 2008.

2.学会発表

1) Nishino T, Abe Y, Okamoto K, Kato M, Kato S: New application of xanthine oxidoreductase inhibitors to the remedy for a clinical disease. 16th International Symposium on Flavins and Flavoproteins,

Jaca, Spain, June 8-13, 2008.

2) 西野武士, 加藤信介: 抗痛風薬の1つの利用法を例に本学会を考える. 第41回日本痛風・核酸代謝学会総会, 福井, 2月14-15日, 2008.

3) 加藤雅子, 加藤信介, 堀江 靖, 北村幸郷, 寺田忠史, 林 一彦: マロリー小体形成機序: 最終糖化反応物による修飾. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 5月15-17日, 2008.

4) 隅 寿恵, 加藤信介, 藤村晴俊, 佐古田三郎: ALS1にもTDP43 pathologyは存在する. 第49回日本神経学会総会, 横浜, 5月15日-17日, 2008.

5) 加藤信介, 山岸覚, 小山佳久, 片山泰一, 谷口学, 人見淳一, 松崎伸介, 加藤昌, 青木正志, 糸山泰人, 大浜栄作, 加藤雅子, 平野朝雄, 遠山正彌: *In vitro*系におけるLBHI/Ast-HI形成機序と*In vitro* ALSモデル開発の基盤研究. 第49回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 5月20日-22日, 2008.

6) 隅 寿恵, 新沢康英, 加藤信介, 井岡正人, 松岡洋祐, 岡部 勝, 衛藤昌樹, 辻元賀英, 佐古田三郎: Ca非依存性phospholypase A2βノックアウトマウス神経系における経時的病理学的検討. 第49回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京, 5月20日-22日, 2008.

7) 加藤信介, 山岸覚, 小山佳久, 片山泰一, 谷口学, 人見淳一, 松崎伸介, 加藤昌明, 青木正志, 糸山泰人, 大浜栄作, 加藤雅子, 平野朝雄, 遠山正彌, 中島健二: ヒトFALS・ALSマウスと*In vitro* ALSモデルとの共通点に関する基盤研究. 第84回日本神経学会中国・四国地方会, 米子, 7月5日, 2008.

8) 藤原範子, 中の三弥子, 大河原知水, 吉原大, 横江俊一, 加藤信介, 谷口直之, 鈴木敬

- 一郎: ヒトCu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) のCys¹¹¹の酸化と酸化型SOD1特異抗体の作製. 学術奨励賞受賞. 第61回日本酸化ストレス学会学術集会, 東京都, 6月19-20日, 2008.
- 9) Okamoto M, Kato S, Kato M, Ohama E, Umezumi M: Over expression of midkine retards disease progression and prolong life span under the presence of the ALS stress. 40th Annual Meeting in American Society for Neurochemistry, Charleston, South Carolina, USA, March 7-11, 2009.
- 10) Okamoto M, Kato S, Umezumi M: Midkine over expressed mice retard disease progression and prolong life span under the presence of the ALS stress. 69th International Congress of International Pharmaceutical Federation, Istanbul, Turkey, September 3-8, 2009.
- 11) Okamoto M, Kato S, Umezumi M: Midkine retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. 22nd Biennial Meeting of International Society for Neurochemistry, Busan, Korea, August 23-29, 2009.
- 12) 別宮豪一, 隅 寿恵, 加藤信介, 山寺みさき, 佐古田三郎: ALS1 モデルの神経細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5 月 20-22 日, 2009.
- 13) 隅 寿恵, 加藤信介, 持丸祐子, 藤村晴俊, 衛藤昌樹, 佐古田三郎: 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に関与する. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 5 月 20-22 日, 2009.
- 14) 加藤信介, 加藤雅子, 平野朝雄, 青木正志, 糸山泰人, 大谷若菜, 船越 洋, 中村敏一: ALS マウスにおける肝・腎・心における一過性組織障害からの回復機構: HGF/活性型リン酸化 c-Met (phosphor-c-Met) システムの関与. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6 月 4-6 日, 2009.
- 15) 隅 寿恵, 加藤信介, 持丸祐子, 藤村晴俊, 衛藤昌樹, 佐古田三郎: 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に関与する. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6 月 4-6 日, 2009.
- 16) 別宮豪一, 隅 寿恵, 加藤信介, 山寺みさき, 深田 慶, 佐古田三郎: ALS1 モデルの神経細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6 月 4-6 日, 2009.
- 17) 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: 弧発性筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 陽性グリア封入体. 第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会, 高松, 6 月 4-6 日, 2009.
- 18) 島田(大谷)若菜, 船越 洋, 加藤信介, 加藤雅子, 中村敏一: HGF のエンドクリン性供給は、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスでおこる肝臓病理学的変化からの回復に寄与する. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 10 月 21-24 日, 2009.
- 19) Sumi H, Shinzawa K, Kato S, Tsujimoto Y, Sakoda S: Axonal degeneration associated with degenerated membranes of mitochondria in Group VIA phospholipase A₂ knockout mice. 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, September 11-15, 2010.
- 20) Kusano T, Okamoto K, Nishino T, Kato M, Kato S: Effect of xanthine oxidoreductase inhibitors on the ALS transgenic mouse model. 14th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, PP11, Tokyo, Japan, February 18-21, 2011.

- 21) 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.
- 22) 別宮豪一, 隅 寿恵, 加藤信介, 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.
- 23) 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.
- 24) 隅 寿恵, 加藤信介, 新沢康英, 辻本賀英, 佐古田三郎: Group VIA phospholipase A2B 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

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

孤発性筋萎縮性側索硬化症患者ゲノムの コピー数多型(copy number variation)解析

研究分担者：加藤丈夫¹

研究協力者：江見 充^{1,2}、佐藤秀則^{1,2}、荒若繁樹¹、和田 学¹、川並 透¹、片桐 忠³、
圓谷建治⁴、豊島 至⁵、田中章景⁶、祖父江 元⁶、松原謙一²

¹山形大学医学部第三内科、²DNAチップ研究所、³山形県立河北病院、

⁴国立病院機構山形病院、⁵秋田大学医学部医学教育学、⁶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について検討した。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)。遺伝素因の生物学的基礎としてゲノムの多型がある。最も微小なゲノム多型として一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) がある。一方、最も粗大なゲノムの変化として、光学顕微鏡でも観察可能な染色体異常がある。これらの中間のサイズのゲノムの変化としてコピー数多型 (copy number variation: CNV) がある。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。

培養細胞はヒト神経芽細胞腫由来の細胞株 SH-SY5Y 細胞を用い、免疫細胞化学染色と Western blot を行った。また、ホルマリン固定・パラフィン包埋したヒト剖検脳の各部位および脊髄組織を用いて免疫組織化学染色を行い、さらに新鮮凍結ヒト脳組織 (大脳皮質、大脳白質、尾状核、視床、扁桃核、海馬、小脳、橋) を用いて Western blot を行った。免疫細胞/組織化学染色や Western blot には、マウスモノクロ

ーナル抗ヒト IDI1 抗体 (Santa Cruz Biotech) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は山形大学医学部倫理審査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の増加が確認され、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。

ヒト IDI1 に対する抗体を用いて SH-SY5Y 細胞の免疫細胞化学染色を行うと、核が強く免疫染色された。SH-SY5Y 細胞を細胞分画法により核画分と細胞質画分に分画し Western blot を行うと、抗体に反応するバンドは核画分に認められた。

ヒト脳および脊髄の免疫組織化学染色では、SH-SY5Y 細胞と同様に、神経細胞の核が強く免疫染色された。神経細胞より弱い、グリア細胞の核も免疫染色された。一方、ヒト肝組織の免疫組織化学染色では、細胞質が顆粒状に免疫染色された。

新鮮凍結ヒト脳組織の Western blot では、脳のいずれの部位でも予想された分子量の位置に一本の陽性バンドが認められた。ただし、脳

の部位により量的な差はあった。

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重要なリポ蛋白質の生合成に必須の酵素である。中枢神経系は最も脂質に富む臓器であるので、IDI1 遺伝子の変異の影響を最も受けやすいと推察される。線虫の研究では、IDI1 遺伝子の変異により運動麻痺が起こることが報告されている (Yochem et al, 2005)。さらに、ヒトや動物モデルにおいて、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なされている (ヒトでの報告: Dupuis et al, 2008; Golomb et al, 2009; Zinman et al, 2008; 動物モデルでの報告: Yochem et al, 2005; Niebroj-Dobosz et al, 2007; Andersson et al, 2005; Zhai et al, 2009)。したがって、今後、IDI1/IDI2 遺伝子領域の 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。

IDI1 は細胞質内の小器官ペルオキシゾームに局在することが報告されている。本研究でも、抗 IDI1 抗体を用いてヒト肝組織を免疫組織化学染色すると、肝細胞の細胞質が顆粒状に免疫染色され、IDI1 がペルオキシゾームに局在することに一致する所見であった。しかし、ヒト中枢神経系の神経細胞は核が強く免疫染色された。ヒト神経芽細胞腫由来の株細胞 SH-SY5Y 細胞でも同様の所見であった。これまで、IDI1 の細胞内局在について培養細胞や下等生物での報告はあるが、ヒト脳での細胞内局在についての報告はない。本研究の免疫細胞/組織化学染色の結果は、ヒト神経細胞での IDI1 の細胞内局在について新規の知見なのか、あるいは、用いた抗体の特異性に問題があるのか、今後、検討する必要がある。

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.

加藤丈夫：孤発性 ALS のゲノム解析. 医学のあゆみ. 235 (2010) 215-219.

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

変異型 SOD1 による小胞体ストレスへの関与、及び神経突起制御因子 PRGs 結合タンパク TRIM-EM1/2 の同定と機能解析

研究協力者：佐々木秀直¹⁾

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

¹⁾ 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、²⁾ 北海道大学大学院
医学研究科生化学講座医化学分野、³⁾ 北海道大学大学院医学研究科解剖発生学分野

研究要旨：【課題 1】小胞体関連分解（ERAD）において変異型 SOD1 は小胞体ディスロコン構成分子 Derlin-1 と結合し、異常構造タンパク質の小胞体からサイトゾルへの逆行輸送を阻害するとされている。そこでこの逆行輸送への変異型 SOD1 による影響を検討し、変異型 SOD1 による神経毒性の機序において小胞体ストレスの関与を検討した。【課題 2】神経突起様伸長に関与する lysophosphatidic acid (LPA)・plasticity related gene1 (PRG1)系を制御するタンパク質 TRIM for elongation of neuritis 1 & 2 (TRIMEN1&TRIMEN2)を同定し、その機能解析を行った。TRIM-EN2 は小脳優位に発現し、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が考えられる。

A.研究目的

【課題 1】Derlin-1/VCP によって逆行輸送される T 細胞抗原受容体 α -subunit (TCR α) の小胞体内への蓄積及び細胞質での凝集形成をモデル系として、変異型 SOD1 に起因する小胞体ストレスを検討した。

【課題 2】lysophosphatidic acid (LPA) の機能が注目され、癌の細胞増殖・神経領域神経回路網形成領域で LPA 受容体の同定や機能解析が進んでいる。近年 LPA を制御することで、神経突起様伸長を促進する plasticity related gene1 (PRG1) が同定された。我々は 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 系を制御する分子を同定し (TRIM-EN1/2)、その機能解析を行った。

B.研究方法

【課題 1】TCR α ・GFP 融合タンパク質を恒常的に発現する HeLa 細胞を作製し、そこに SOD1 野生型と変異型 (G93A) をそれぞれ一過性に発現させて蛍光顕微鏡で TCR α の凝集を観察した。ついで、プロテアソーム阻害剤 MG132 の培地添加による薬剤応答性小胞体ストレスの影響、HEK-293T 細胞に共発現させてシクロヘキシミド存在下で TCR α の分解速度を比較した。

【課題 2】Yeast two-hybrid スクリーニングと免疫沈降法により PRG1 と TRIM-EN1/2 の結合を確認した。レトロウイルス発現ベクターを用い N1E115 細胞で TRIM-EN1/2 安定発現株と TRIM-EN2 ノックダウン株を作製した。それらを用いて形態変化及び増殖能への影響・PRG1 への影響を検討した。さらに TRIM-EN2 に対する特異的抗体を作製し、マウス脳での発現分布

を検討した。安定発現株とノックダウン株を用いて活性型 Ras を pull-down により測定することで MAPK 系への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

in vitro 実験系が中心で、動物実験を含んでいないので支障ない。臨床検体を用いる場合は、医の倫理委員会の承認のもとに、試料提供者に予め説明して文書で同意を得た。

C.研究結果

【課題 1】HeLa 細胞に変異型 SOD1 を過剰発現させても TCR α の凝集は認められなかった。しかし MG132 の存在下では TCR α の凝集体が出現し、変異型 SOD1 を発現させると MG132 存在下で TCR α の凝集体を形成する細胞数は減少した。HEK-293T 細胞に野生型 SOD1 を発現させても TCR α の分解に変化なく、変異型 SOD1 を発現させると可溶性成分における TCR α の分解が促進された。

【課題 2】結果の概要は以下の 6 項目である。すなわち、1) PRG1 結合タンパク質として TRIMEN1/2 を同定した; 2) 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、増殖能は低下した; 3) N1E115 細胞を用いたパルスチェイスアッセイでは、TRIM-EN2 は PRG1 の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 が低下した; 5) 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、活性型 Ras も上昇していた; 6) TRIM-EN2 抗体によるイムノプロット法及び免疫蛍光染色法では、TRIM-EN2 はマウス脳組織、特に小脳に高発現していた。

D.考察

【課題 1】結果より、変異型 SOD1 により小胞体からの逆行輸送が阻害されたためにサイトゾルでの TCR α の凝集体形成が抑制されたと推定される。また変異型 SOD1 が可溶性成分の

TCR α の分解を促進したのか、不溶性分画への移行を促進したのか検討を要する。

【課題 2】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 LPA の機能を阻害することで G タンパク共役型受容体である LPA 受容体以下のシグナルを抑制し、結果として RhoA や Ras の活性化を抑制するとされている。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 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。PRG1 ノックアウトマウスではシナプス形成不全があり、けいれん発作をきたす。このように 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段階でも重要な役割を担っている可能性が考えられる。さらに TRIM-EN2 は小脳に強く発現しているため、小脳の形成や機能維持に関与している可能性が考えられる。

E.結論

【課題 1】変異型 SOD1 はタンパクの小胞体関連分解に影響する。

【課題 2】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。TRIM-EN2 は正常小脳に強く発現しており、今後は ALS など神経変性疾患における TRIM-EN2 の意義を検討する必要がある。

F.健康危険情報

該当無し

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuji-Akimoto S, Yabe I, Niino M, et al: Cystatin C in cerebrospinal fluid as a biomarker of ALS. Neurosci Lett 2009;452:52-5.

2.学会発表

- 1) 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.
- 2) Kano T, Sasaki H, Hatakeyama S: The E3 ubiquitin ligase TRIM37 interacts with FIP200, which regulates autophagy with ULKs. The 5th International Symposium on Autophagy: Molecular Mechanism, Cellular and Physiological Functions and Diseases, Sep 24-28, 2009, Otsu, Japan (Autophagy 2009;5(6):919)
- 3) 辻 幸子, 矢部一郎, 菊地誠志, 他: 筋萎縮性側索硬化症患者における髄液シスタチン C の検討. 第 49 回日本神経学会総会, 2008 年 5 月 15 日～17 日, 横浜.

H.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得
 - 2.実用新案登録
 - 3.その他
- 上記、何れも該当無し

筋萎縮性側索硬化症の免疫学的病態の解析

研究協力者 佐古田三郎 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学・教授
現：国立病院機構刀根山病院・院長

研究要旨：筋萎縮性側索硬化症（ALS）の新たな治療法開発にむけて ALS の病態における免疫系の関与を解析した。各種成熟リンパ球が存在しないマウス（T 及び B リンパ球欠損マウス：RAG2^{-/-}マウス、B リンパ球欠損マウス：BAFFR^{-/-}マウス及び IgM^{-/-}マウス）と ALS のモデルマウスである mSOD1 トランスジェニックマウスを交配させ、リンパ球の ALS 病態に及ぼす影響を検討した。mSOD1 マウスにおいて成熟 T リンパ球と B リンパ球を欠損させると、疾患早期にミクログリアが活性化され Ym1 の分泌が増加し、神経保護作用を発揮して神経変性が抑制される可能性が示唆された。また、成熟 B リンパ球のみ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 のシグナルの神経保護作用が確認され、この効果は神経細胞に発現する BAFF receptor を介してもたらされることが示唆された。

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。リンパ球の中枢神経系(CNS)への影響は、一部には CNS の主たる免疫担当細胞であり、組織マクロファージの一つでもあるミクログリアを介した影響が推定される。リンパ球とミクログリアの **interaction** により、ミクログリアは神経保護的にも神経傷害的にも働きうると考えられる。しかし、ALS の中枢神経組織においてリンパ球がどのようにミクログリアに働きかけ、病態や病状の進行にどう影響するかは不明であった。

今回、我々は ALS におけるリンパ球-ミクログリア相互作用の役割を明らかにするために、成熟 T 細胞、B 細胞が存在しない RAG2 遺伝子欠損（RAG2^{-/-}）マウス、成熟 B 細胞のみを欠損している BAFFR 遺伝子欠損（BAFFR^{-/-}）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（mSOD1-Tg）マウスとを交配させ、成熟リンパ球欠損 ALS

モデルマウス（mSOD1/RAG2^{-/-}）及び成熟 B 細胞欠損 ALS モデルマウス（mSOD1/BAFFR^{-/-}）を作成し、その臨床症状や病理組織化学的解析をもとに、ALS におけるリンパ球-ミクログリア相互作用について考察した。

一方で、神経細胞内における ALS の変性機序を明らかにするために、前頭側頭型痴呆と共に疾患に深く関与すると考えられる核蛋白である TAR binding protein 43 (TDP-43)の染色パターンを、弧発型 ALS 症例、ALS1 症例および ALS1 の疾患モデルである mSOD1 マウスを病理学的に解析した。

B. 研究方法

実験動物：RAG2^{-/-}マウス、BAFFR^{-/-}マウス、IgM 遺伝子欠損（IgM^{-/-}）マウスは Jackson Laboratory より購入し、C57BL/6J のバックグラウンドで交配した。G93A 変異を持つ mSOD1 マウスは Jackson Laboratory より購入し、C57BL/6J のバックグラウンドで交配した。

mSOD1-Tg マウスと RAG2^{-/-}マウス、

BAFFR^{-/-}マウス、IgM^{-/-}マウスの交配を行い、mSOD1/RAG2^{-/-}マウス、mSOD1/BAFFR^{-/-}マウス、mSOD1/IgM^{-/-}マウスを作製し、コントロールマウスと比較検討した。

臨床評価：各群のマウスに対して、体重、クリニカルスコア、Hanging wire test を計測し、発症時期と重症度を評価した。クリニカルスコアは、5段階評価（0点～4点）とし、3点以下のスコアとなった時点で発症と定義した。

Hanging wire test は、各回3回計測し、最長記録を記録した。

免疫組織学的解析：マウス脊髄のミクログリアの組織学的評価に関しては、mSOD1/RAG2^{-/-}マウス及びコントロールマウスに対して、70日齢及び150日齢の脊髄標本を作製し、レクチン染色を行った。

RT-PCR：マウス脊髄内の遺伝子発現変化を評価するために、70日齢及び130日齢のmSOD1/RAG2^{+/+}マウス、及びmSOD1/RAG2^{-/-}マウスの脊髄を用い定量的RT-PCRを行った。

神経細胞培養の免疫学的・生化学的解析：

C56BL/6マウス胎仔(E13.5)脳より、神経細胞を調整し、抗BAFFR抗体及び抗BAFF抗体にてBAFF及びBAFFRの発現を確認した。また、BAFFRの発現を半定量的RT-PCRで確認した。

統計：クリニカルスコア、体重変化、PaGE test 記録の2群間の差は、スチューデントのt検定で評価した。発症日、死亡日の2群間の差は一般化ウィルコクソン検定で評価した。

TDP-43に関する病理学的解析：弧発型ALS症例(SALS、n=18)及びALS1症例(n=6)の腰髄についてTDP-43(1:3000, Protein Tech Group)、ユビキチン(1:2000, DAKO)、SMI31(1:10000, Covance)、SOD1(0.5 µg/ml, clone 1G2, MBL)に対する免疫組織学的染色を施行した。

染色写真をデジタルカメラ(Keyence VB-7010, Keyence)に取り込み、径37mm以上の大型神経細胞のTDP-43に対する染色パターンを定量的

に評価し、経過の早い群と遅い群との違いを比較した。

ALS1モデル動物である(B6SJL-TgN [SOD1]-G93A)1Gur^{dl} [G1L]マウス end stage (中央値256日齢(IQR: 232-263))について、免疫組織学的染色を施行した。mSOD1マウスの残存神経細胞核におけるTDP-43の免疫反応性の強弱を4段階で評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、大阪大学微生物病研究所動物施設あるいは大阪大学医学部動物施設でSPF環境下に飼育されたマウスを使用し、大阪大学動物実験規定に基づいて適正に行われた。

C.研究結果

mSOD1/RAG2^{-/-} vs. mSOD1/RAG2^{+/+}マウス

クリニカルスコア、Hanging wire test、体重による評価では、mSOD1/RAG2^{-/-}マウスはコントロール群と比較して症状発症が有意に遅延し、疾患初期において有意に運動機能の悪化や体重減少が抑制された。カプランマイヤーテストで評価した発症日齢も、mSOD1/RAG2^{-/-}マウスで有意に遅延していたが、死亡日齢については両群間で有意差を認めなかった。以上より、mSOD1/RAG2^{-/-}マウスは疾患発症が有意に遅延するが死亡日齢には変化がなく、リンパ球が疾患初期に神経傷害的に作用する可能性が示唆された。

ミクログリア/マクロファージの関与を検討するため、脊髄組織をレクチン染色した。疾患初期では、mSOD1/RAG2^{-/-}マウスの脊髄前角において、レクチン陽性の活性化ミクログリア/マクロファージが多数観察されたが、mSOD1/RAG2^{+/+}マウスの脊髄前角ではほとんど観察されなかった。疾患末期では、両群のレクチン染色では、数、形態ともに明らかな差異は認められなかった。

疾患初期の mSOD1/ RAG2^{-/-}マウスでは、成熟リンパ球の欠損により、神経保護的なマイクログリア/マクロファージが増加しているとの仮説をたて、神経保護因子、毒性因子の脊髄での遺伝子発現を定量的 RT-PCR で評価した。組織修復作用を有する分泌タンパクで、抗炎症作用を持つ Ym1 の発現が 70 日齢の mSOD1/ RAG2^{-/-}マウスで有意に上昇していた。130 日齢でも Ym1 の発現は mSOD1/RAG2^{-/-}マウスで高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。RELM α , GDNF, GLAST や IFN- γ , iNOS の発現には差はみられなかった。

mSOD1/BAFFR^{-/-} vs. mSOD1/BAFFR^{+/+}マウス

クリニカルスコア、Hanign wire test、体重による評価では、mSOD1/BAFFR^{-/-}マウスはコントロール群と比較して 10 週齢から運動機能が有意に悪化し、体重も早期に減少した。 Kaplan-Meier テストで評価した死亡日齢は、mSOD1/BAFFR^{-/-}マウスで有意に短縮した。以上より、mSOD1/BAFFR^{-/-}マウスは発症、進行ともに有意に早期化・加速することが明らかになった。

BAFFR^{-/-}マウスには成熟 B 細胞を欠如するが、BAFFR はマイクログリアにも発現しており、成熟 B 細胞と神経変性の関連をより明確にするため、mSOD1/IgM^{-/-}マウスと mSOD1/IgM^{+/+}マウスの表現型を比較した。しかし、クリニカルスコア、Hanging wire test、体重の比較では両群で有意な差は認めなかった。

BAFFR の CNS での発現を確認するために、マウス初代培養神経細胞を抗 BAFF 抗体、抗 BAFFR 抗体で免疫染色を行うと、BAFF と BAFFR の発現を認め、さらに RT-PCR でも BAFFR の発現を確認した。

TDP-43 に関する病理学的解析

経過の早い SALS 症例では 従来の報告通り、

TDP-43 陽性の細胞質や TDP-43 陽性の細胞質内封入体など TDP の mislocalization を多数認めた。

それに比較して、経過の緩やかな SALS 症例では TDP の mislocalization は有意に数が少なかった。

SOD1 遺伝子異常(C111Y)を有する ALS1 症例では、TDP-43 陽性の細胞質内封入体を多数認め、また SOD1 と TDP-43 が共に局在する像も認められた。

G93A マウスにおいても TDP-43 陽性封入体を認め、SOD1 と TDP-43 が共に局在していた。

また、TDP 強陽性の神経細胞核は大きく円形であり、TDP 弱陽性の核は小さく変形していた。

G93A マウスの残存神経細胞核における TDP 免疫反応性は、その寿命に正の相関を認めた。

D. 考察

今回我々は、各種成熟リンパ球が存在しないマウス (RAG2^{-/-}、BAFFR^{-/-}、IgM^{-/-}) と mSOD1-Tg マウスを交配し、mSOD1/RAG2^{-/-}マウスを作製することにより、獲得免疫系が神経変性にどのような影響を与えるか検討した。その結果 mSOD1/RAG2^{-/-}マウスの発症時期は有意に遅延したが、死亡日齢には有意差が認められなかった。

疾患初期において mSOD1/RAG2^{-/-}マウス脊髄ではマイクログリア/マクロファージの活性化が認められ、また Ym1 の発現が上昇していた。Ym1 は主にマクロファージから分泌される 45kDa の蛋白で、ヘパリン、グルコサミンオリゴマー、ヘパラン硫酸に結合することが報告されており、組織修復に関連した分子である。Ym1 を分泌するマクロファージは M2 マクロファージと呼ばれ、IL-4 と IL-13 の刺激により分化し組織修復的に働くことが知られている。本研究では、早期の mSOD1/RAG2^{-/-}マウス脊髄で Ym1 の高発現を認めたため、発症遅延のメカニズムの一つとして Ym1 による組織修復作用が

関与している可能性が考えられた。

ALS で発現に変化があることが報告されている他の遺伝子についても脊髄定量的 RT-PCR で発現を確認したが、組織修復的な作用を持つ RELM α 、神経保護作用を持つ GDNF, GLAST 及び神経毒性を有する iNOS, IFN- γ の発現については両群間で有意差を認めなかった。

続いて、成熟 B 細胞と神経変性の関連について検討した。mSOD1/IgM-/-マウスはコントロールと比較して神経症状では差を認めず、神経変性に B 細胞が関与しないことが示唆されたが、B 細胞生存促進因子である BAFF のレセプター (BAFFR) をノックアウトした mSOD1/BAFFR-/-マウスではコントロールと比較して神経症状の悪化を認めた。このことは BAFF-BAFFR interaction が 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を示唆するものである。

BAFF は TNF スーパーファミリーに属し、血球系細胞としてはマクロファージ、樹状細胞、好中球、T 細胞から、また、CNS 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。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 のモデルマウスにおいて、成熟 T リンパ球と B リンパ球を欠損させると、疾患早期にミクログリアが活性化され、Ym1 の分泌が増加し、神経保護作用を発揮して神経変性が抑制される可能性が示唆された。また、成熟 B リンパ球のみ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 のシグナルが神経保護的に働い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

1. Shinzawa K, Sumi H, Ikawa M, Matsuoka Y, Okabe M, Sakoda S, Tsujimoto Y. Neuroaxonal dystrophy caused by group VIA phospholipase deficiency in mice: a model of human neurodegenerative disease. *J Neurosci* 28(9): 2212-2220, 2008
2. Eto M, Sumi H, Fujimura H, Yoshikawa H, Sakoda S.: Pioglitazone promotes peripheral nerve remyelination after crush injury through CD36 upregulation. *J Peripheral Nerv Sys* 13:242-248, 2008
3. Nakamori M, Kimura T, Kubota T, Matsumura T, Sumi H, Fujimura H, Takahashi MP, Sakoda S. : Aberrantly spliced alpha-dystrobrevin alters alpha-syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 70(9):677-85, 2008
4. Kinoshita M, Nakatsuji Y, Kimura T, Moriya M, Takata K, Okuno T, Kumanogoh A, Kajiyama K, Yoshikawa H, Sakoda S. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 4;386(4):623-7, 2009
5. Sumi H, Kato S, Mochimaru Y, Fujimura H, Etoh M, Sakoda S.: Nuclear TAR DNA binding protein43 expression in spinal cord neurons correlates with the clinical course in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 68(1):37-47, 2009

6. Tada S. :A role of lymphocytes in an animal model of inherited ALS. *Medical Journal of Osaka University*. 53: 37-49, 2010
7. 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
8. 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* 184(3):1499-506, 2010
9. Takamatsu H, Okuno T, and Kumanogoh A. Regulation of immune cell responses by semaphorins and their receptors. *Cellular & Molecular Immunology* 7(2) 83-88, 2010
10. 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*. 394(1):205-10, 2010
11. Takamatsu H, Takegahara N, Nakagawa Y, Tomura M, Taniguchi M, Friedel RH, Rayburn H, Lavigne MT, Yoshida Y, Okuno T, Mizui M, Kang S, Nojima S, Tsujimura T, Nakatsuji Y, Katayama I, Toyofuku T, Kikutani H, Kumanogoh A Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nature immunology*, 11(7): 594-600, 2010
2. 学会発表
1. 多田智、安居輝人、矢田佳織、丸尾聖爾、菊谷仁. : EBV 感染成立におけるウイルス-宿主間相互作用の網羅的解析法の確立. 第 56 回ウイルス学会学術集会,岡山,2008 年
 2. 隅寿恵、加藤信介、持丸裕子、藤村晴俊、衛藤昌樹、佐古田三郎. : ALS1 にも TDP-43 pathology は存在する 第 49 回日本神経学会総会,横浜,2008 年
 3. 隅寿恵、加藤信介、新沢康英、辻本賀英、佐古田三郎. : Ca 非依存性 phospholipase A2 β ノックアウトマウス神経系における経時的病理学的検討. 第 49 回日本神経病理学会総会,東京,2008 年
 4. 隅寿恵、加藤信介、持丸裕子、藤村晴俊、衛藤昌樹、佐古田三郎 : 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは筋萎縮性側索硬化症の臨床経過に関与する「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」班 平成 19 年度班会議,東京,2008 年
 5. TADA Satoru, YADA Kaori, YASUI Teruhito, KIKUTANI Hitoshi. Novel role of TRAF 3-interacting protein 3 in T lymphopoiesis. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会,京都,2008 年
 6. 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の役割の解析. 第 21 回神経免疫学会学術集会,大阪,2009 年

7. 多田 智、安居輝人、奥野龍禎、中辻裕司、菊谷仁、佐古田三郎. : リンパ球の筋萎縮性側索硬化症病態における役割の解析. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009 年
8. 別宮 豪一、隅 寿恵、加藤信介、山寺みさき、佐古田三郎. : ALS1 モデルの神経細胞核における TDP-43 の発現と形態学的変化. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009 年, 第 50 回日本神経病理学会総会, 香川, 2009 年
9. 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. : 孤発性筋萎縮性側索硬化症における TDP-43 陽性グリア封入体. 第 50 回日本神経病理学会総会, 香川, 2009 年
10. 隅寿恵、加藤信介、持丸裕子、藤村晴俊、衛藤昌樹、佐古田三郎. : 神経細胞核における TDP-43 の発現レベルは ALS の臨床経過に關与する. 第 50 回日本神経病理学会総会, 仙台, 2009 年
11. 隅寿恵、加藤信介、新沢康英、辻本賀英、佐古田三郎. : group VIA phospholipase A₂ β 遺伝子欠損マウスの神経病理学的解析. 日本臨床分子形態学会 シンポジウム, 神戸, 2009 年
12. 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. 「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」班 平成 21 年度班会議、東京、2010 年
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. Tada S, Yasui T, Okuno T, Nakatsuji Y, Kikutani H, Sakoda S. A role of lymphocytes in an animal model of inherited ALS. The 4th International RIMD-CVRDC Joint Symposium, Okayama, Japan, June 2010.
19. Sumi H, Shinzawa K, Kato S, Tsujimoto Y, Sakoda S. Axonal degeneration associated with degenerated membranes of mitochondria in