

respectively [3]. Immunostaining for α -synuclein, FUS, and SOD1 revealed no pathologies. Additional genetic analysis of Patients III-2 and III-3 revealed no mutations in their *TARDBP*, *GRN* or *VCP* genes.

Discussion

Motor symptoms of our patients were indistinguishable from those of SALS. However, the rate of deterioration was noticeably slow in both of the genetically proven patients, suggesting that slow progression might be a feature of patients with a heterozygous E478G *OPTN* mutation. Progression was faster for their elder sister, whose DNA was unavailable, showed, implying intrafamilial variability. All the patients developed personality and mood changes, and neuroimaging showed medial temporal lobe atrophy. These features are consistent with those of AGD [5], which was confirmed neuropathologically for Patient III-2. In SALS, concomitant AGD is reported in 7.7–22% of cases [14, 20]. Whether FALS with mutated *OPTN* would be prone to coincide with AGD awaits clarification. Furthermore, finger deformity was observed in our patients. This feature might be a consequence either of dystonia or of chronic arthritis induced by disinhibited NF- κ B because of the *OPTN* mutation [15]. The parkinsonian tremor observed in Patient III-3 could be a manifestation of the E478G mutation or simply coincidental.

Neuropathologically, neuronal intracytoplasmic inclusions immuno-positive for TDP-43, ubiquitin, and p62 were unequivocally identified in the spinal and medullary motoneurons. They were morphologically indistinguishable from those observed in SALS. However, *OPTN* was noticeably not co-localized within the inclusions, in contrast with those of SALS [15]. Although negative immunohistochemical results inherently warrant further investigation, this finding suggests that not only the mutated but also the wild-type *OPTN* would be impaired in its association with TDP-43. The molecular link between *OPTN* and TDP-43 is unknown. *OPTN* might function in TDP-43 transportation for degradation, and hence, dysfunctional *OPTN* could cause TDP-43 mislocalization, resulting in neurodegeneration.

TDP-43 pathology associated with FALS (ALS-TDP) and/or frontotemporal lobar degeneration (FTLD-TDP) has been reported [13] in patients with mutations in genes encoding TDP-43 (*TARDBP*), progranulin (*GRN*), and valosin-containing protein (*VCP*), and in one case with a mutation in *ANG* encoding angiogenin, who manifested atypical clinicopathological features [21]. TDP-43 pathology indistinguishable from that of SALS and/or FTLD was observed for mutations in *TARDBP* [13], through both gains and losses of function [22]. Patients with *GRN* mutations manifest FTLD, and TDP-pathology develops principally in the neocortex [12], through a haploinsufficiency mechanism

[2, 4]. *VCP* mutations were originally identified in patients with inclusion body myopathy associated with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia (IBMPFD) [23]. Identification of TDP-43, but not *VCP*, within ubiquitinated inclusions in these cases implies that *VCP* mutations lead to a dominant-negative loss of *VCP* function, with degradation of TDP-43 [16]. More recently, *VCP* mutations were also shown to cause autosomal dominantly inherited FALS [11]. One autopsy case revealed motor neuron degeneration with intracytoplasmic TDP-43-positive inclusions and Bunina bodies in the remaining cells. Our patients showed no mutation of their *TARDBP*, *GRN*, or *VCP* gene. However, the association of *OPTN* with Paget's disease, found by a recent genome-wide association study [1], and the similar biological function of *OPTN* and *VCP* warrant further investigation.

The presence of TDP-43 pathology has been reported in 60% of AGD cases [6]. In those cases, TDP-43-positive structures were mainly observed in the limbic regions and lateral occipitotemporal cortex [6]. The difference between the distribution of TDP-43 pathology of our patient and that of AGD cases implies that the pathomechanism of TDP-43 pathology in optineuropathy would be distinct from that in AGD.

GA fragmentation in our Patient III-2 is plausible, because *OPTN* plays an important role in maintaining the GA [19]. The number of AHCs with GA fragmentation for our case (72.8%) was notably higher than that reported for SALS (8.3–52.6%, mean 29.6%) [8]. However, because this percentage varies markedly in SALS patients, it remains to be elucidated whether the ratio of GA fragmentation in AHCs of *OPTN*-FALS patients would be generally higher than that of SALS patients. Moreover, the presence of AHCs with preserved nuclear TDP-43 and showing fragmented GA, unrecognizable in SALS [7], indicates that patients with the E478G *OPTN* mutation would manifest GA fragmentation before loss of nuclear TDP-43. The relevance of GA fragmentation and TDP-43 nuclear staining to ALS awaits further clarification. In contrast, consistently preserved GA of non-motor cells implies that unrecognized GA-maintaining systems other than the *OPTN* system are operating in those neurons, affording them less vulnerability to dysfunctional *OPTN*.

The mutations of the *OPTN* gene causing FALS are unique in that recessive and dominant traits have similar symptoms. The mechanisms of neurodegeneration in the homozygous deletion of exon 5 and the homozygous Q398X nonsense mutation are conceivably speculated to be a loss function resulting from nonsense-mediated mRNA decay of the transcript. In contrast, the pathomechanisms operating in the case of the heterozygous E478G mutation remain unknown. The mechanism of dominant mutations causing a disease is assumed to be toxic gain-of-function, loss of function because of haploinsufficiency, or a dominant-

negative loss of OPTN function. Among these, a gain-of-function mechanism would be implausible because diseases caused by such a mechanism are usually associated with the presence of distinct inclusion bodies consisting of mutant proteins. However, the thorough neuropathologic investigations performed in this work demonstrated that OPTN-positive inclusion bodies, if any, were not prominent in our patient. A haploinsufficiency mechanism would be also unlikely, because individuals with the heterozygous exon 5 deletion or Q398X mutation, in whom half of the amount of OPTN is abolished by nonsense-mediated mRNA decay, manifest no motor neuron signs although the number of such subjects examined thus far is small. In contrast, a dominant-negative loss-of-function mechanism would be a possibility; being similar to that for patients with *VCP* mutations who manifest FTLN [16]; ubiquitinated inclusions identified in the AHCs of our patient demonstrated immunoreactivity for TDP-43, but not for OPTN. OPTN is reported to form homohexamers [24] and, thus, mutant OPTN could conceivably impair the formation of properly functioning hexamers, thus having a dominant-negative effect. This notion is consistent with the fact that the four patients with proved heterozygous E478G *OPTN* mutation [15] had later onset and longer disease duration (55.0 ± 6.7 years, longer than 7.6 ± 5.5 years (1 patient is still alive), respectively) than those with homozygous *OPTN* null mutations (41.3 ± 8.5 years and 4.0 ± 3.6 years, respectively).

For determination of the clinicopathologic features and pathomechanism of FALS with mutated *OPTN*, further studies with additional cases are needed.

Acknowledgments This work was supported in part by grants-in-aid for scientific research from the Japan Society for the Promotion of Science (no. 21500336) and from the Japan Science and Technology Agency (AS2211173G). We thank Professor Yoshifumi Yokota (Department of Biochemistry and Bioinformative Sciences, University of Fukui) for his helpful advice, Drs Makio Takahashi, Kengo Uemura, and Hirofumi Yamashita (Department of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine) for valuable discussions, Dr Masaya Hashimoto (Takao Hospital) for providing clinical information on Patient III-3, and Miss Hitomi Nakabayashi for her excellent technical assistance.

Conflict of interest The authors declare they have no conflict of interest.

References

- Albagha OM, Visconti MR, Alonso N et al (2010) Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet* 42:520–524
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM et al (2006) Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442:916–919
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259
- Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J et al (2006) Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 442:920–924
- Ferrer I, Santpere G, van Leeuwen FW (2008) Argyrophilic grain disease. *Brain* 131:1416–1432
- Fujishiro H, Uchikado H, Arai T et al (2009) Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 117:151–158
- Fujita Y, Mizuno Y, Takatama M, Okamoto K (2008) Anterior horn cells with abnormal TDP-43 immunoreactivities show fragmentation of the Golgi apparatus in ALS. *J Neurol Sci* 269:30–34
- Gonatas NK, Stieber A, Mourelatos Z et al (1992) Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 140:731–737
- Hortobágyi T, Troakes C, Nishimura AL et al (2011) Optineurin inclusions occur in a minority of TDP-43 positive ALS and FTLN-TDP cases and are rarely observed in other neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 121:519–527
- Ito H, Fujita K, Nakamura M et al (2011) Optineurin is colocalized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol* 121:555–557
- Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M et al (2010) Exome sequencing reveals *VCP* mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68:857–864
- Josephs KA, Ahmed Z, Katsuse O et al (2007) Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with progranulin gene (*PGRN*) mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:142–151
- Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M (2010) TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9:995–1007
- Martinez-Lage P, Munoz DG (1997) Prevalence and disease associations of argyrophilic grains of Braak. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:157–164
- Maruyama H, Morino H, Ito H et al (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465:223–226
- Neumann M, Mackenzie IR, Cairns NJ et al (2007) TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with *VCP* gene mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:152–157
- Osawa T, Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K (2011) Optineurin in neurodegenerative diseases. *Neuropathology*. doi:10.1111/j.1440-1789.2011.01199.x
- Rezaie T, Child A, Hitchings R et al (2002) Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 295:1077–1079
- Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD et al (2005) Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 169:285–295
- Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M et al (2004) Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:911–918
- Seilhean D, Cazeneuve C, Thuriès V et al (2009) Accumulation of TDP-43 and alpha-actin in an amyotrophic lateral sclerosis patient with the K17I ANG mutation. *Acta Neuropathol* 118:561–573
- Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM et al (2008) TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *Lancet Neurol* 7:409–416
- Watts GD, Wymer J, Kovach MJ et al (2004) Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet* 36:377–381
- Ying H, Shen X, Park B, Yue BY (2010) Posttranslational modifications, localization, and protein interactions of optineurin, the product of a glaucoma gene. *PLoS One* 5:e9168

Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with *FUS* mutation and in basophilic inclusion body disease

Hidefumi Ito · Kengo Fujita · Masataka Nakamura · Reika Wate · Satoshi Kaneko · Shoichi Sasaki · Kiyomi Yamane · Naoki Suzuki · Masashi Aoki · Noriyuki Shibata · Shinji Togashi · Akihiro Kawata · Yoko Mochizuki · Toshio Mizutani · Hirofumi Maruyama · Asao Hirano · Ryosuke Takahashi · Hideshi Kawakami · Hirofumi Kusaka

Received: 15 December 2010 / Revised: 5 February 2011 / Accepted: 5 February 2011 / Published online: 17 February 2011
© Springer-Verlag 2011

We recently reported that mutations in the gene encoding optineurin (OPTN) cause amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [2]. In that report, we demonstrated the co-localization of OPTN with TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) or Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) in the pathognomonic inclusions of sporadic (SALS) or familial ALS (FALS) with mutated SOD1, respectively [2].

Fused in sarcoma (FUS) is another causative gene of ALS [1, 7]. FUS-immunoreactivity is identifiable in basophilic inclusions (BIs) from patients with sporadic basophilic inclusion body disease (BIBD) [4] and in those from ‘FALS with FUS mutation’ patients. The fact that

both FUS and OPTN cause ALS when mutated prompted us to investigate the correlation between these proteins.

We analyzed postmortem material from three patients with sporadic BIBD and from three with FALS with FUS mutation. All the patients manifested upper and lower motor neuron signs, but no cognitive impairment was noted. Their demographic and clinical features are given in Online Resource 1. The ‘FALS with FUS mutation’ patients had missense mutations R514S, R521C, and P525L in their respective FUS gene. Genetic analysis of the sporadic BIBD patients for FUS and OPTN was unsuccessful, probably because of deterioration of the genomic DNA in the formalin-fixed material. No frozen tissue was available.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00401-011-0809-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. Ito · K. Fujita · M. Nakamura · R. Wate · S. Kaneko · H. Kusaka
Department of Neurology,
Kansai Medical University, Osaka, Japan

H. Ito (✉) · R. Takahashi
Department of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan
e-mail: itohid@kuhp.kyoto-u.ac.jp

S. Sasaki
Department of Neurology, Tokyo Women’s Medical University,
Tokyo, Japan

K. Yamane
Department of Neurology, Ohta-Atami Hospital,
Koriyama, Japan

N. Suzuki · M. Aoki
Department of Neurology,
Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

N. Shibata
Department of Pathology,
Tokyo Women’s Medical University, Tokyo, Japan

S. Togashi
Department of Neurology, Kofu City Hospital, Kofu, Japan

A. Kawata · Y. Mochizuki · T. Mizutani
Department of Neurology and Pathology,
Tokyo Metropolitan Neurological Hospital, Tokyo, Japan

H. Maruyama · H. Kawakami
Department of Epidemiology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

A. Hirano
Division of Neuropathology,
Montefiore Medical Center, New York, NY, USA

Paraffin-embedded lumbar cord, frontal cortex, and brainstem were uniformly investigated immunohistochemically (Online Resource 2). The primary antibodies used are listed in Online Resource 3. To confirm the co-localization of OPTN and FUS, we employed a staining procedure on consecutive sections and double immunofluorescence staining (Online Resource 2).

In the sections from controls, the OPTN and myosin VI immunoreactivities were faintly recognizable in the neuronal cytoplasm; and the anti-FUS antibodies showed essentially no immunoreactivity when they were titrated in a way that did not recognize physiologic FUS (data not shown).

In the BIBD and 'FALS with FUS mutation' cases, H&E staining invariably demonstrated neuronal intracytoplasmic BIs in all the regions examined. Immunohistochemically, virtually all the BIs were positive for OPTN, FUS, and myosin VI (Fig. 1a–c, respectively). In contrast, the antibodies against TDP-43 and SOD1 did not react with the BIs (Fig. 1d, e, respectively). Noticeably, staining of the consecutive sections by H&E and immunohistochemistry for FUS and OPTN, as well as the double immunofluorescence staining for FUS and OPTN, evidently demonstrated that the distribution of OPTN immunoreactivity faithfully matched that of FUS within the BIs (Fig. 1f–l). OPTN immunoreactivity in FUS-positive glial inclusions was

indiscernible. Further studies are warranted to clarify whether or not OPTN would co-localize with FUS within structures other than the BIs.

We recently showed that OPTN is co-localized with TDP-43 or SOD1 [2]. However, as shown here, the BIs in the above patients showed no immunoreactivity for TDP-43 or SOD1, but were positive for FUS as well as OPTN. Therefore, our present and earlier results provide evidence that OPTN associates with each of 3 major ALS-related proteins, i.e., TDP-43, SOD1, and FUS.

The pathomechanism of involvement of OPTN in the BIs and that of neurodegeneration in BIBD and 'FALS with FUS mutation' patients remain to be elucidated. Since OPTN and FUS share roles in intracellular trafficking in collaboration with myosin VI, it is likely, at least under pathologic conditions, that these proteins would encounter each other when delivering cargos, and could conceivably form a complex through myosin VI within the BIs. Thereby, OPTN and FUS would be sequestered from the cytoplasm.

FUS is known to act as a co-activator of NF- κ B [6]. On the contrary, OPTN negatively regulates NF- κ B activation [2]. Therefore, it is plausible that sequestration of both OPTN and FUS would induce dysregulation of NF- κ B activation, leading to neurodegeneration.

Another promising hypothesis concerns a dysfunctional Golgi apparatus. OPTN and myosin VI play a role in the

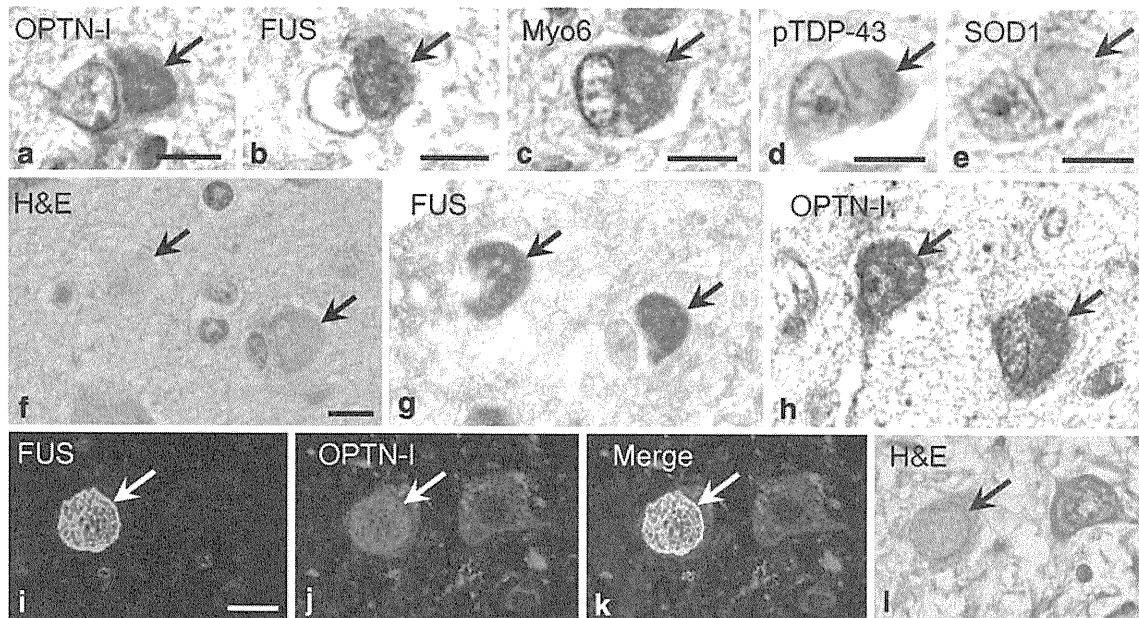


Fig. 1 Representative photomicrographs of basophilic inclusions (BIs). **a–e** BIs (*arrows*) within cortical neurons from BIBD patients are evidently immunopositive for OPTN (**a**), FUS (**b**), and myosin VI (**c**) throughout their entire structure. In contrast, no immunoreactivity indicating pTDP-43 (**d**) or SOD1 (**e**) is recognizable within the BIs (*arrows*). **f–h** Three consecutive sections from BIBD patient No. 1, stained with H&E (**f**) or subjected to immunohistochemistry for FUS

(**g**) and OPTN (**h**), demonstrate that the 2 cortical BIs (*arrows*) seen are noticeably immunopositive for both FUS and OPTN. **i–l** Double immunofluorescence staining of neurons in the lateral cuneate nucleus in the medulla oblongata of 'FALS with FUS mutation' patient No. 1 evidently demonstrates that FUS (**i**; *green*) and OPTN (**j**; *red*) are faithfully co-localized (**k**; *merge*) in the BI (**l**; H&E). Scale bars 10 μ m

maintenance of Golgi organization [5]. When OPTN is depleted from cells via RNA interference, the Golgi becomes fragmented [6]. This observation is noteworthy because Golgi fragmentation has been observed in the anterior horn cells in ALS [3]. Further investigations are warranted to determine whether dysfunctional OPTN could be essential for the underlying pathomechanism at play in ALS.

Acknowledgments This work was supported in part by grants-in-aid for scientific research from the Japan Society for the Promotion of Science (No. 21500336) and from the Japan Science and Technology Agency (AS2211173G). We thank Dr. Toshio Oyama (Yamanashi Prefectural Central Hospital) for providing materials from ‘FALS with FUS mutation’ patient No. 1, and Drs. Makoto Arai and Haruhiko Akiyama (Tokyo Institute of Psychiatry) for genetic analysis of ‘FALS with FUS mutation’ patient No. 3.

Conflict of interest The authors report no conflicts of interest.

References

1. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323:1205–1208
2. 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 (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465:223–226
3. Mourelatos Z, Adler H, Hirano A, Donnenfeld H, Gonatas JO, Gonatas NK (1990) Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis revealed by organelle-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4393–4395
4. Munoz DG, Neumann M, Kusaka H, Yokota O, Ishihara K, Terada S, Kuroda S, Mackenzie IR (2009) FUS pathology in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathol* 118:617–627
5. Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F (2005) Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 169:285–295
6. Uranishi H, Tetsuka T, Yamashita M, Asamitsu K, Shimizu M, Itoh M, Okamoto T (2001) Involvement of the pro-oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor-kappa B p65-mediated transcription as a coactivator. *J Biol Chem* 276:13395–13401
7. Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323:1208–1211

ファルマシア

別刷

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略

村上 学

Gaku MURAKAMI

京都大学大学院医学研究科
臨床神経学大学院生

井上治久

Haruhisa INOUE

京都大学物質-細胞統合システム拠点
iPS 細胞研究センター准教授

高橋良輔

Ryosuke TAKAHASHI

京都大学大学院医学研究科
臨床神経学教授

1 はじめに

神経変性疾患は、特定の神経系が選択的に変性・細胞死を生じる疾患の総称である。神経変性疾患の神経病理学的な特徴は、神経細胞及び非神経細胞の内外に認められる脳内のタンパク質凝集物(封入体)である。そのうち筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位及び下位運動ニューロンが選択的に変性していく疾患である。40~70歳代で発症し、平均発症年齢は約65歳である。通常発症後四肢及び球麻痺が進行性の経過をたどり、3~5年で呼吸不全などで死亡することが多い。ALSの約90%は孤発性、約10%は家族性である。¹⁾ 高次脳機能など、その他の神経系には目立った症状を認めず、運動神経が選択的に侵され、患者の苦痛が大きいこと、症状の重篤さにも関わらず有効な治療がないことより、治療方法の開発が精力的に行われてきた。

1993年に、家族性ALSの一部はCu/Zn superoxide dismutase(SOD 1)の変異による¹⁾ことが発見された。その後の研究で、家族性ALSの約20%がSOD 1変異によるとされたが、最近の学会報告では日本では家族性ALSの50%前後がSOD 1変異による。また、孤発性ALSの数%がSOD 1変異によることも明らかになった。²⁾ 変異SOD 1は活性を残存しているものもあり、その活性低下と臨床経過とは相関せず、変異SOD 1タンパク質の毒性による運動神経変性と考えられる。

さらに最近になって、ALS患者剖検脳脊髄運動神経細胞のタンパク質凝集物の主要構成成分がtransactivation responsive element(TAR) DNA-binding protein of 43 kDa(TDP-43)であることが判明した。^{3,4)} 驚くべきことに、その後の遺伝学的解析によって、家族性及びごく一部の孤発性にみえるALSが、TDP-43遺伝子の変異によって発症す

ることも次々と報告された。⁵⁾

本稿では、SOD 1及びTDP-43の関与するALSの治療戦略について概説する。

2 ALSの病態仮説

SOD 1関連ALS

ALSの病態モデルとして、変異SOD 1トランスジェニックマウスによる研究が精力的に行われ、様々な病態仮説が提唱されている。酸化ストレス、グルタミン酸による興奮毒性、炎症性機序、ミトコンドリア異常、軸索輸送障害、小胞体ストレス、ユビキチン・プロテアソームシステムやオートファジーなどのタンパク質品質管理機構の破綻、凝集タンパク質による細胞毒性などである。

また変異SOD 1トランスジェニックマウスモデルの解析により、変異SOD 1が神経細胞に対して毒性を発揮するだけでなく(自律性神経細胞毒性)、アストロサイトやミクログリアといった非ニューロン細胞内の変異SOD 1タンパク質発現が、ニューロンの変性を促進するという、非自律性神経細胞毒性機序も報告されている。^{6,7)}

しかし変異SOD 1患者及びモデルマウスでは、一部報告⁸⁾を除いて細胞内TDP-43タンパク質凝集がみられず、核移行性の変化も原則的にはみられない⁹⁾ため、孤発性ALSのモデルとしては問題点が指摘されている。

TDP-43関連ALS

近年発表されたTDP-43の病態仮説については、さらに他の機序が提唱されている。ALS患者剖検組織においてはTDP-43のリン酸化、^{3,10)} カスパーゼによる切断¹¹⁾がみられ、TDP-43に対する免疫組織染色では核の染色性が失われ細胞質に移行する。^{3,4)} TDP-43はRNA結合ドメインを持ち、種々のRNA及びタンパク質に結合して、核内において

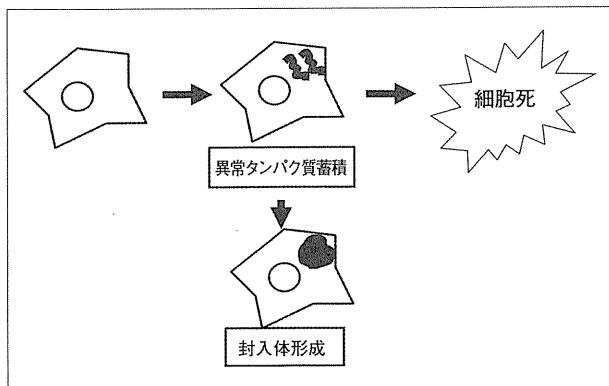


図1 異常タンパク質による細胞毒性

異常タンパク質が蓄積すると、それを分解するだけでなく、封入体に凝集して無毒化する。しかし、細胞の処理能力を超えるタンパク質が蓄積すると、細胞死を引き起こす。

mRNA のスプライシングなどを行っている。¹²⁾ そのため、細胞内の修飾された TDP-43 の核移行が低下することにより核内の TDP-43 の機能低下を来とし、毒性を発揮するという機能喪失モデルも提唱されている。

他の神経変性疾患同様、変異タンパク質が毒性を獲得して神経細胞障害、細胞死を起こす可能性も考えられる (gain of toxic function モデル) (図1)。細胞内では、異常タンパク質を分解したり、無毒な封入体に凝集させることで対応していくと考えられるが、その防御機構を超えて異常タンパク質が蓄積すると細胞毒性を発揮して細胞死を引き起こすものと考えられる。

3 ALS 治療開発の現状

先述のように、ALS では変異 SOD1 トランスジェニックマウスが家族性 ALS の病態モデルとして確立しており、その動物モデルによる治療法開発が行われている。例えば、酸化ストレスに対し抗酸化剤であるビタミン E や、ミトコンドリア機能改善目的にコエンザイム Q₁₀ で運動神経症状の進行を遅延し生存期間を延長し、有効性が認められた。¹³⁾ また、シクロオキシゲナーゼを抑制し抗炎症作用を有するミノサイクリンなども有効性が認められた。¹³⁾

また、アストロサイトのグルタミン酸トランス

ポーター 1 の発現を上昇させる既存薬剤のハイスクリーン・スクリーニングを行い、第3世代セフェム系抗生物質であるセフトリアキソンが発見され、¹⁴⁾ ヒトへの臨床試験も行われている。

他に、神経栄養因子による神経保護を目指した治療も検討されている。インスリン様増殖因子 (IGF-1) などが有効性を認めた。¹³⁾

そのほか様々な治療アプローチがなされてきたが、いずれの薬剤も臨床試験で明らかな有効性を証明できず、現在 ALS に対し有効性が証明された薬剤はグルタミン酸遊離阻害や興奮性アミノ酸受容体との非競合的阻害、電位依存性 Na⁺ チャンネル阻害等の作用を有するリルゾールのみである。しかしリルゾールによる延命効果は約3か月に留まり、筋力・運動機能の改善は望めず、その効果は限定的である。¹⁵⁾

4 SOD1 タンパク質量制御による家族性 ALS の治療法

変異 SOD1 トランスジェニックマウスでは、トランスジーンのコピー数が多いほど表現型が重篤である。¹⁶⁾ また、変異 SOD1 トランスジェニックラットでは、トランスジーンのコピー数の多いラットのみが ALS を発症し、コピー数の少ないラットでは発症しない。¹⁷⁾ したがって、変異 SOD1 に関連した ALS では、変異 SOD1 の量を減らすことが治療につながる可能性がある。

実際の実験治療として、RNA 干渉や antisense oligonucleotide を用いてタンパク質発現量を低下させることで病態を改善した、という報告がある。RNA 干渉を用いた実験¹⁸⁾ では、変異 SOD1 mRNA に相補的な siRNA を変異 SOD1 マウスにかけ合わせたダブルトランスジェニックマウスで、その生存期間が著明に延長したという報告がある。また、antisense oligonucleotide を脳室内に投与し、変異 SOD1 タンパク質の細胞内産生抑制を行ったマウスでも表現型の改善が見られる。¹⁹⁾

さらに、lox 配列で変異 SOD1 遺伝子を挟み SOD1 本来のプロモーターで変異 SOD1 を発現して、通常の変異 SOD1 マウスと同様に ALS を発症するトランスジェニックマウスを組織特異的 Cre

発現マウスとかけ合わせることによって、運動ニューロンでのみ変異 SOD1 発現を低下させると ALS の発症が遅延し、ミクログリアでのみ変異 SOD1 発現を低下させると疾患の進行を遅らせたという報告がある。⁶⁾ 同様の手法で、アストロサイト内変異 SOD1 発現低下により疾患の進行を遅らせたという報告もある。⁷⁾

他の神経変性疾患モデルでも、原因タンパク質発現量を減少させることで治療につながる可能性が示唆されている。ハンチントン病はハンチンチン(Htt)というタンパク質のポリグルタミン(polyQ)が異常に増えることで、そのタンパク質の凝集、神経細胞変性が認められる疾患であり、polyQ Htt を過剰発現するトランスジェニックマウスはハンチントン病のモデルとして知られている。そのマウスの polyQ 発現量を、Tet-Off システムを用いて後天的に減少させると、発症を抑えられたという報告がある。²⁰⁾ また、アルツハイマー病モデルである変異タウトランスジェニックマウスでも、同様のシステムで発現量を抑えることで、記憶機能の改善及び神経細胞変性の抑制が観察されている。²¹⁾

以上から、我々は SOD1 の転写を抑制して SOD1 タンパク質量を減少する低分子を、低分子化合物・既存薬ライブラリのハイスループット・スクリーニング・システム(図2)を構築して、家族性 ALS 治療薬スクリーニングを行っている。我々は SOD1 の本来のプロモーターの支配下にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現するコンストラクトを構築した。

化合物がプロモーターに作用し転写を抑制すれば、ルシフェラーゼの発現量が低下しルシフェラーゼの基質から産生される蛍光物質の量が低下する。アストロサイトが非自律性神経細胞死、疾患の進行に関連することから、ヒトアストロサイト由来の細胞株を使用している。また、ルシフェラーゼ反応基質を 96-ウェル・プレート上で自動分注後吸光度を測定する装置を用いて測定している。このような方法でこれまでに 9,600 種類の化合物をスクリーニングし、蛍光物質の産生を減少させる、すなわち SOD1 の転写を抑制する化合物を 177 種類見いだしており、これからさらに ALS モデル細胞や ALS

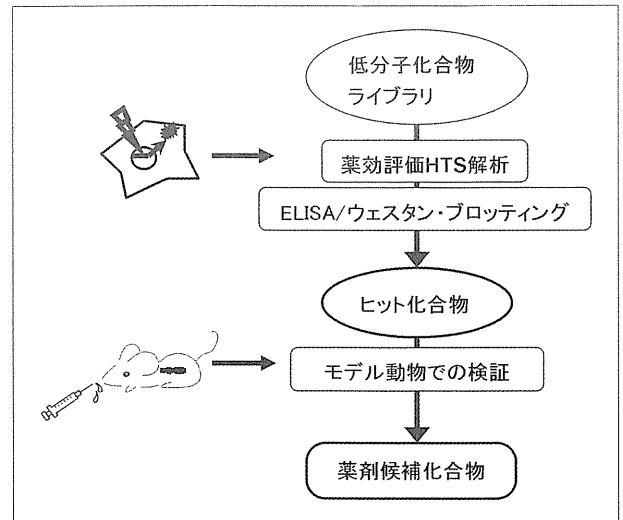


図2 我々の ALS 治療開発戦略の概要

SOD1 プロモータ下にルシフェラーゼを発現するコンストラクトを導入した、ヒトアストロサイト由来細胞株を用いて、SOD1 転写を抑制する化合物をスクリーニングする。ELISA やウェスタン・ブロッティングで SOD1 タンパク質量を特異的に減少する化合物を抽出する。変異 SOD1 トランスジェニックマウスでその効果を確認する。

モデル動物での効果を確認して、臨床的に有用な化合物を絞り込んでいく予定である。低分子化合物は、大量生産が可能であり、安価で安定した供給を行うことが可能となる。また、既存薬を用いればヒトへの使用における安全性も既に確認されており、速やかな臨床への応用も可能となる。我々の開発した方法は、ALS 治療開発における新たなアプローチの 1 つとなるものと考えている。

5 SOD1 タンパク質を減少させることによる問題点

SOD1 は細胞内に発生した superoxide radicals を過酸化水素に分解する酵素であり、抗酸化ストレス酵素の 1 つに挙げられる。したがって、SOD1 を減少させることは、酸化ストレス反応に対する脆弱性を来す可能性がある。

SOD1 ノックアウトマウスの解析によると、脊髄運動神経軸索を切断した後の神経細胞死が SOD1 非ノックアウトマウスに比して多く見られる。²²⁾ ほかにも、神経筋接合部の形成不全や軸索変性が、高齢の SOD1 ノックアウトマウスで見られるという報告もある。²³⁾ したがって、SOD1 を大きく低下させることは脊髄運動神経変性を来す可能性

がある。

ただし、SOD1ノックアウトマウスの寿命は非ノックアウトマウスに比べ著変が見られない。²⁴⁾ さらに、SOD1ヘテロノックアウトマウスはノックアウトマウスに比して軸索切断による神経細胞死の程度が軽度である。²⁴⁾ また、他のアンチオキシダントによる代償も期待できるため、SOD1を特異的的部分的に減少させることが、重篤な副作用を来たさずに、治療効果を得るために重要である。

さらに、コピー数が多い野生型 *SOD1* 遺伝子のトランスジェニックマウスでも軸索変性やミトコンドリアの変性、脊髄運動ニューロンの減少が、高齢になれば出現することが報告されている。²⁴⁾ 変異型 *SOD1* と野生型 *SOD1* のダブルトランスジェニックマウスは、野生型 *SOD1* 量に応じて進行が速くなるとの報告²⁴⁾ もあり、野生型 *SOD1* 細胞内産生も制御する試みは相乗的に有効である可能性がある。

先述のように、他のアプローチで明らかな有効性を認めた治療がほとんどないこともあり、原因となる異常タンパク質を直接減少させるアプローチが有望と考えられることから、*SOD1* タンパク質量を減少させる有用性は、部分的特異的に行うことができれば、そのリスクよりも大きく、根本的な治療につながると考えられる。

6 孤発性 ALS に対する治療的アプローチ

先述のように、孤発性 ALS では *TDP-43* タンパクの細胞質内封入体を認め、核における染色性が失われている。核移行シグナルを欠損させた *TDP-43* 遺伝子ないし、易凝集性の高い C 末端 *TDP-43* 遺伝子に GFP を付して導入した *TDP-43* 凝集細胞モデルを用いて、タンパク質凝集を抑制させる薬剤が

報告されている。²⁵⁾

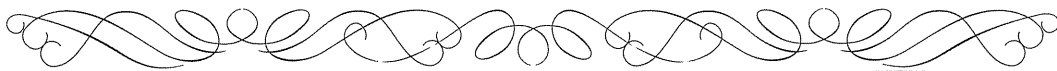
ただし、*TDP-43* に関連した ALS の病態生理はまだ未解明の部分が多く、今後 *TDP-43* の生理的機能及び変異 *TDP-43* の神経細胞に対する影響の詳細な解析がまたれる。

7 おわりに

ALS, 特に変異 *SOD1* 関連 ALS の病態に沿った治療戦略について概説した。精力的な研究がなされてはいるが、未だ病勢を決定的に改善する薬剤は開発されていない。この難病に対する治療法が早く発見され、多くの患者が治療される日が来ることを望む。

文 献

- 1) Rosen D. R. *et al.*, *Nature*, 362, 59-62 (1993).
- 2) Andersen P. M. *et al.*, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 6, 37-46 (2006).
- 3) Arai T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 602-611 (2006).
- 4) Neumann M. *et al.*, *Science*, 314, 130-133 (2006).
- 5) Lagier-Tourenne C. *et al.*, *Cell*, 136, 1001-1004 (2009).
- 6) Boilee S. *et al.*, *Science*, 312, 1389-1392 (2006).
- 7) Yamanaka K. *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 11, 251-253 (2008).
- 8) Shan X. *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 458, 70-74 (2009).
- 9) Mackenzie I. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 61, 427-434 (2007).
- 10) Hasegawa M. *et al.*, *Ann. Neurol.*, 64, 60-70 (2008).
- 11) Zhang Y. J. *et al.*, *J. Neurosci.*, 27, 10530-10534 (2007).
- 12) Buratti E. *et al.*, *Front. Biosci.*, 13, 867-878 (2008).
- 13) Bruijn L. *et al.*, *Expert. Rev. Neurother.*, 6, 417-428 (2006).
- 14) Rothstein J. D. *et al.*, *Nature*, 433, 73-77 (2005).
- 15) Miller R. G. *et al.*, *Cochrane Database Syst Rev.*, (1), CD 001447 (2007).
- 16) Dal Canto M. *et al.*, *Brain Res.*, 676, 25-40 (1995).
- 17) Nagai M. *et al.*, *J. Neurosci.*, 21, 9246-9254 (2001).
- 18) Saito Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280, 42826-42830 (2005).
- 19) Smith R. A. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 116, 2290-2296 (2006).
- 20) Yamamoto A. *et al.*, *Cell*, 101, 57-66 (2000).
- 21) SantaCruz K. *et al.*, *Science*, 309, 476-481 (2006).
- 22) Reasume A. *et al.*, *Nat. Genet.*, 13, 43-47 (1996).
- 23) Flood D. G. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 155, 663-672 (1999).
- 24) Jaarsma D. *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, 7, 623-643 (2000).
- 25) Yamashita M. *et al.*, *FEBS Lett.*, 583, 2419-2424 (2009).



日本臨牀 67 卷 増刊号 4 (2009 年 6 月 28 日発行) 別刷

パーキンソン病

—基礎・臨床研究のアップデート—

II. 病 因

その他の因子

タンパク分解異常

田代善崇 高橋良輔

II. 病 因

その他の因子

タンパク分解異常

Abnormal degradation of proteins

田代善崇 高橋良輔

Key words : タンパク分解異常, オートファジー, ユビキチン-プロテアソーム系

はじめに

タンパク分解異常が多くの神経変性疾患の病因・病態に関与していることが報告されている。細胞は常にタンパク産生を行っており、タンパク質にはそれぞれ寿命が存在する。不要となったタンパク質はタンパク分解経路によりアミノ酸に分解され、新たなタンパク産生の材料となる。タンパク質は産生されたアミノ酸鎖の必ずしもすべてが正常型に折りたたまれるわけではなく、誤った折りたたみで生み出された異常型タンパク質、すなわちミスフォールドタンパク質も寿命を迎えたタンパク質と同じくタンパク分解経路で処理されると考えられている。これらの機構が正常に作動しなくなることにより、タンパク分解異常が生じる。分解異常により正常状態が維持できなくなると細胞は死を迎え、これらの細胞死が特定の細胞群に起こることで、神経変性疾患の特徴である、特異的な神経細胞死が起こると考えられている。

本稿では、主要なタンパク分解経路を紹介し、タンパク分解異常とパーキンソン病との関連を議論する。

1. タンパク分解経路

タンパク分解を行うことは、タンパク質を産

生することと同様に非常に重要な細胞の仕事である。タンパク分解経路には主要な経路が2つ存在する。1つはオートファジー、もう1つはユビキチン-プロテアソーム系である。この主要経路以外にも、カルパイン経路なども重要なタンパク分解経路であるが、いまだ解明されていない部分も多く、今回は上記の主要2経路のみを説明する。

a. オートファジー

オートファジー(図1-a)はリソソームを介した細胞内成分の分解経路である¹⁾。細胞がアミノ酸飢餓状態になった際などオートファジーの誘導が起きると、二重膜型の隔離膜が形成・伸長し、直径1 μ m程度の小胞を形成する。これがオートファゴソームである。

オートファゴソームはリソソームと融合することでオートリソソームとなり、内部を分解する。オートファゴソーム内にはミトコンドリアなど細胞内器官がみられることが報告されており、飢餓応答としてオルガネラなどの非選択的分解を行うことにより、細胞維持に必要なエネルギーを得ていると考えられている。ただし、後述するオートファジーの神経特異的欠損マウスの研究から、p62-LC3複合体を介し、ユビキチン化タンパク質を選択的に分解処理する機構があることが示された²⁾。このようにオートフ

Yoshitaka Tashiro, Ryosuke Takahashi: Department of Neurology, Kyoto University Graduate School of Medicine
京都大学大学院医学研究科 臨床神経学

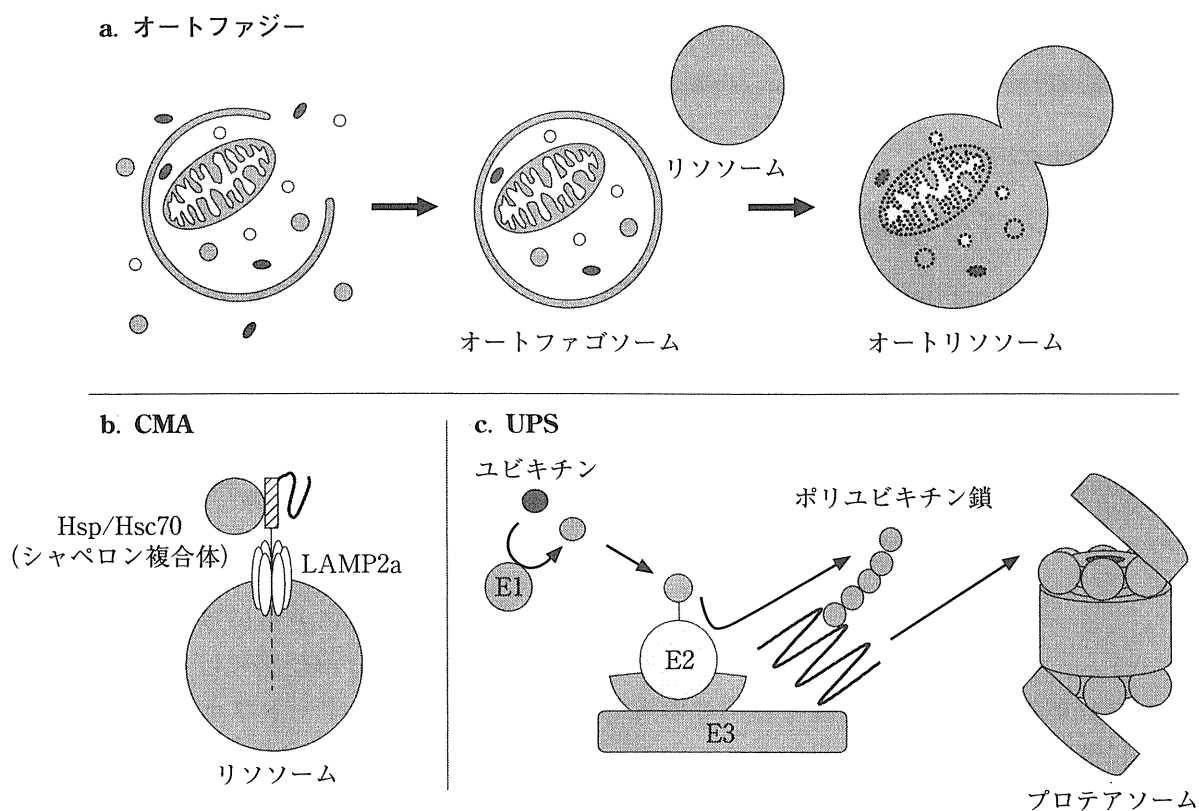


図1 タンパク分解経路

ァジーの一部には選択的分解の機構があると考えられる。また、特有のモチーフを介して Hsp/Hsc70 に結合するタンパク質が LAMP2a を介してリソソームに取り込まれるシャペロン介在性オートファジー(chaperone-mediated autophagy: CMA) (図1-b)の存在も報告されており、これは原則的に基質特異性をもつオートファジーと考えられる³⁾。

b. ユビキチン-プロテアソーム系

ユビキチン-プロテアソーム系(UPS) (図1-c)は基質選択性を持ち、ミスフォールドタンパク質をはじめとする短寿命のタンパク質の主要な分解経路である。ユビキチン-プロテアソーム系にはユビキチン、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)、プロテアソームが関与する。E2、E3が基質選択性をもっており、これによって、オートファジーとは異なり、個別にタンパク分解を行う。

UPSは小胞体においてはタンパク品質管理機構の一つとして機能していると考えられている。小胞体はタンパクの高次構造形成を行う器

官であるが、環境要因のストレス因子などにより正常な高次構造形成を行うことができない、遺伝的変異により異常タンパクの増加が起きる、また、小胞体機能が正常であっても過剰なタンパク発現により処理が追いつかなくなった場合、小胞体にミスフォールド化した膜タンパク質や分泌タンパク質が異常に蓄積した状態、すなわち小胞体ストレスが起こる。これに対応して細胞は、小胞体シャペロン転写誘導による高次構造形成の強化、全般的なタンパク質の翻訳抑制、そしてUPSを通じた異常タンパクの分解を行う。この分解機構を小胞体関連分解と呼び、ミスフォールド化した分泌系タンパク質が小胞体内腔から細胞質内に逆輸送され、UPSにより分解が実行される。以上のような小胞体ストレス応答によってもストレスが改善しない場合、最終手段として周辺組織に悪影響を与えないように細胞死を起こす⁴⁾。

2. 封入体形成

神経変性疾患では多くの場合、異常タンパク蓄積が認められ、パーキンソン病においても同

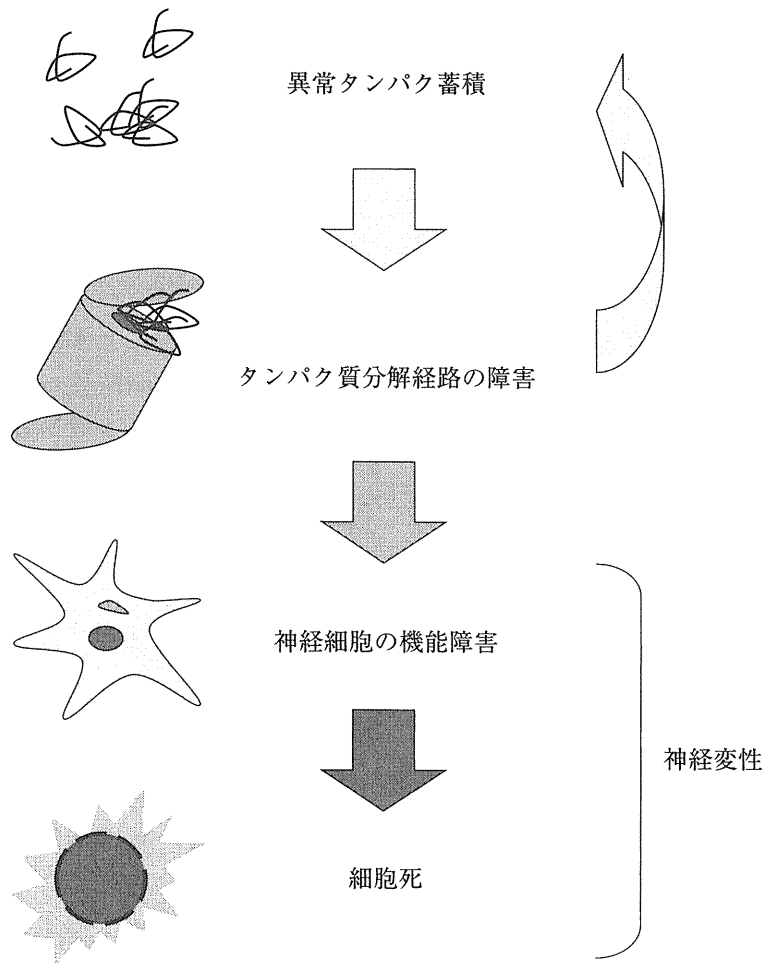


図2 タンパク分解経路阻害による神経変性メカニズム仮説

様に α -シヌクレインなどの異常タンパク蓄積が報告されている。これらの蓄積に関連した疾患の多くは、細胞内凝集体を形成することが知られており、パーキンソン病に特徴的な封入体はLewy小体と呼ばれる。

α -シヌクレインを主成分とするLewy小体の内部には多くのミスフォールドタンパク質が存在している。これらは通常UPSで分解されるが、何らかの原因による分解経路の阻害により、ミスフォールドタンパク質が蓄積し、Lewy小体のような封入体が形成されると考えられる。ただし、封入体形成が直接的に病因であるかどうかはわかっていない。Lewy小体は電子顕微鏡下でアミロイドフィブリルと呼ばれる線維構造を示すが、この構造を形成するまでの中間体が細胞毒性をもつ可能性もある⁵⁾。この場合、Lewy小体は細胞内の防御機構応答として、中間体が存在しないように封入体を形成している

とも考えられる。Lewy小体もプロトフィブリルもUPSの活性阻害の可能性が示唆されており、現在のところ結論が得られていない。

3. タンパク分解異常と神経変性

変異や環境の変化によって生じたミスフォールドタンパク質は、分解経路を様々な形で阻害し、ミスフォールドタンパク質の蓄積を増大する悪循環が起こることで、封入体の形成、引いては神経細胞死が起こるのではないかと考えられる(図2)。この仮説を支持するものとして、異常伸長ポリグルタミンとプロテアソームで分解されるよう設計された短寿命のgreen fluorescent protein(GFP)を細胞に過剰発現させることにより、通常はすぐに分解されるGFPが細胞内に蓄積し、細胞が蛍光を放つようになったことが証明された⁶⁾。これは、ミスフォールドタンパク質であるポリグルタミンの蓄積が

UPS を阻害することを示すものである。

また、分解経路の異常により神経変性が起こることを証明するものとして、オートファジーと UPS それぞれに部位特異的に経路に必須な遺伝子を欠損したマウスが作製された。水島ら⁷⁾、小松ら⁸⁾によって作製されたオートファジー神経特異的欠損マウスでは、ユビキチン陽性の封入体の形成が確認され、神経変性が認められた。また、同様に近年 Mayer ら⁹⁾によって作製された 26S プロテアソームのサブユニットを TH 陽性細胞特異的に欠損させたマウスでは、神経脱落とともに神経細胞内に Lewy 小体様の封入体を確認された。これらの結果により、タンパク分解経路の阻害で、異常タンパク蓄積による封入体の形成、また神経細胞死が起こることが証明された。著者らの研究室においても、UPS を部位特異的に欠損させることのできるマウスを作製しており、現在、神経変性疾患のモデル作製や疾患特異的に変性する細胞群で欠損させることで、どのような変化が起こっているのか、解析を進めている。

4. タンパク分解経路を基点とした治療戦略

最近の知見として、酸感受性イオンチャネル阻害剤であるアミロライドや上皮細胞ナトリウムチャネル阻害剤であるベンザミルがプロテアソーム活性を上昇させることにより、Hunting-

ton 病因物質である異常伸長ポリグルタミンタンパク質の凝集を減少させたとの報告がある¹⁰⁾。この報告は上記の薬剤が治療に役立つだけでなく、UPS 機能の亢進によって凝集体形成を減少させることを示した。また、Huntington 病患者脳でオートファゴソームが増加していたとの報告があり、変異型ハンチンチンがオートファジーの基質となることが報告された。リチウムとラパマイシンの同時投与によって mTOR 経路、非経路両方のオートファジーの亢進が起きることが報告されており¹¹⁾、この亢進が病態改善に有効となることが考えられている。このようにタンパク分解経路の亢進によって、異常タンパク蓄積の減少や凝集体形成を抑えることで新たな治療戦略が生まれてきている。

おわりに

タンパク分解異常に伴う疾患発症のメカニズムに関しては、病因遺伝子との関連を含め、多くの研究が進められてきた。現在、病因遺伝子に対してのワクチン療法や凝集体をアンフォールドする化合物や酵素なども多く開発されており、タンパク分解異常の観点から神経変性疾患を治療する戦略が注目されている。今後、解明されていく新たな知見とともに神経難病が根絶される治療法の出現を切に願って、この稿を終えることにする。

■ 文 献

- 1) Kionsky DJ, Ohsumi Y: Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 1-32, 1999.
- 2) Ichimura Y, et al: Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem* 283(33): 22847-22857, 2008.
- 3) Cuervo AM: Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263(1-2): 55-72, 2004.
- 4) 吉田秀郎: 小胞体ストレス応答の分子生物学. *生化学* 76: 617-630, 2004.
- 5) Goldberg MS, Lansbury PT Jr: Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2(7): E115-119, 2000.
- 6) Jana NR, et al: Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 10(10): 1049-1059, 2001.
- 7) Hara T, et al: Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441(7095): 885-889, 2006.
- 8) Komatsu M, et al: Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in

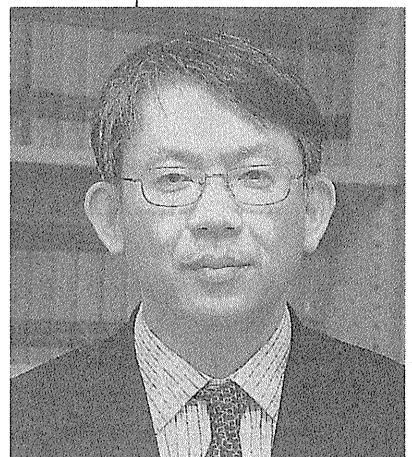
- mice. *Nature* 441(7095): 880–884, 2006.
- 9) Bedford L, et al: Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *J Neurosci* 28(33): 8189–8198, 2008.
 - 10) Wong HK, et al: Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington's disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism. *Hum Mol Genet* 17(20): 3223–3235, 2008.
 - 11) Sarkar S, et al: A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* 17(2): 170–178, 2008.

病因解明と治療法の開発が

現実に期待できる

京大院教授（脳病態生理学）

高橋良輔氏



たかはし りょうすけ:1983年京大卒。理研脳科学総合研究センターチームリーダーなどを経て2005年より現職。専門はALSとパーキンソン病の分子機構の解明と新規治療法開発。

パーキンソン病の研究は近年急速に進んでいると聞くが。

家族性パーキンソン病の病因遺伝子がこの10年間で次々に明らかになってきた。家族性パーキンソン病はパーキンソン病全体の5〜10%を占めるにすぎないが、その遺伝子を基にした基礎的な研究から、一般の孤発性パーキンソン病の発症につながる重要な手がかりがつかめてきた。

iPS細胞で病因解明に道

病因論に関する一番大きな進歩は、 α -synucleinという蛋白質が脳内に異常蓄積し、レビー小体を

形成していることが分かったことだ。また、蛋白質分解やミトコンドリアの機能異常が家族性パーキンソン病の原因になっていることが分かってきた。このことから、蛋白質分解やミトコンドリアの機能異常をきっかけにして、 α -synucleinが異常に蓄積してパーキンソン病になるのではないかというところが、一つの仮説として言われるようになった。

そのメカニズムを実証する方法の一つとして注目されているのがiPS細胞だ。今までは、亡くなられた患者の病理組織を調べても、ドーパミンニューロンはほとんど消失してしまっている状態だった。

それがiPS細胞の技術を使うと、患者の皮膚からドーパミンニューロンが培養できる。こうして病態モデルをつくることができれば、正常な人の組織とどう違うのか、 α -synucleinがどう蓄積してくるのかの謎を解くことができるかもしれない。さらに、 α -synucleinの産生量を抑えたり分解を早めるといった薬剤を、その細胞を使って開発できるかもしれない。

パーキンソン病だけでなく、アルツハイマー病やALSなどの神経変性疾患についても、同じようなストラテジーで解析することが現実に期待できる段階にきたと言えるのではないか。

治療法は今後どのように進んでいくのか。

パーキンソン病治療の第一の革命は1960年に阪大の佐野 勇が初めて試みたL-DOPA治療の有効性が67年に示されたこと。劇的に症状を改善するが、問題は長期に投与しているとwearing-offやジスキネジアといった運動合併症が出てくることだ。

このため、運動合併症を起こしにくいドーパミンアゴニストをうまく組み合わせ使用することが現在の主流となっている。

ただし、ドーパミンアゴニストのうち麦角系は肺線維症や弁膜症の副作用が報告されており、量を

10年後にはここまで進む？

- ◆ iPS細胞で病態モデルをつくり、病因の解明が進む
- ◆ 薬物療法、深部脳刺激、遺伝子治療で具体的な成果が出つつある
- ◆ 非神経細胞の移植も可能性としてあり得る



使わずに済むことが重要だ。非麦角系を最初に使い、その副作用に耐えられない場合に麦角系を使うのが現在の推奨となる。

LiDOPAで運動合併症が起きるのは、血中半減期が短いためであると言われている。逆に言えば、血中濃度を安定させれば運動合併症は起こりにくい可能性があり、現在、LiDOPAと分解阻害剤エンタカポンを最初から併用する大規模臨床試験が行われている。今年にも結果が出るとされ、

LiDOPAを中心にした治療法が変わりつつある。

深部脳刺激、遺伝子治療で成果

パーキンソン病治療の第二の革命は90年代に登場した深部脳刺激だ。特に薬物療法が限界にきた若い患者に実施すると、ほとんど運動合併症がなくなるほどになることもある。効果が持続する期間は少なくとも5年以上とされている。

深部脳刺激の今後の見通しとしては、すでに効果が実証されている振戦、固縮、無動といったパーキンソン病の一般的な症状に加え、歩行障害、転びやすさなどの症状にも応用できるのではないかと期待されている。海外では脚橋被蓋核(PPN)を電気刺激することによる成功事例が報告されており、有効性が確認できれば日本でも2〜3年のうちに実施できるのではないかと。

パーキンソン病は運動症状だけでなく、最近是非運動症状も必発であると注目されている。深部脳刺激は、非運動症状のうち特にうつに関して期待が持てるのではと

思っている。

最近の話題としては、自治医大でも行われている遺伝子治療がいくつかのところにきていようだ。ドーパミン合成の時に重要な役割を果たす芳香族アミノ酸脱炭素酵素(AADC)をアデノ関連ウイルスにコードさせたものを患者の両側被殻に注入し、基底核の中でAADCを発現させる方法だ。外からLiDOPAを与えると、ドーパミンを効率的に産生し、1年以上でもよい状態を保っている。

これから期待されるものとしては、神経栄養因子GDNFを基底核に発現させ、ドーパミンニューロンの死を防ぐ治療法がある。米国で実施され、まだうまくいっていないが、ある遺伝子を基底核で発現させるという方法は成功している段階なので、あとは工夫によって画期的な治療法が生まれる可能性がある。

逆転の発想で非神経細胞移植も

最後に移植医療。欧米ではかつて、胎児の黒質のドーパミンニューロンを移植する治療が行われて

いたが、効果が不十分で副作用もあるため、今は行われていない。

しかし、移植を受けて亡くなられた患者の病理組織から驚くべき発見が2008年に論文として発表された。移植した胎児の健康なドーパミンニューロンの中にも、何とレビー小体ができていたというものだ。全く予想もしないことで、大きな話題となった。

これは、パーキンソン病がどうして発症するのかという点から大変面白い発見だ。私が可能性が高いと思っているのは、パーキンソン病はニューロンが死ぬので神経の病気ととらえがちだが、神経の周りのアストロサイト、ミクログリアのような非神経細胞も大きな役割を持っているのではないかと期待している。そうすると、逆転の発想で、非神経細胞を植えることでパーキンソン病の治療が可能になってくるかもしれない。

パーキンソン病に限らず、他の神経変性疾患もいろいろな角度から研究が進んでいる。10年後は今までよりいい治療法ができてくると思うし、我々もそれに向けて努力していきたい。

再生医療と iPS 細胞

近藤 孝之 高橋 良輔 井上 治久

はじめに

難治性の神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) に対して本邦で唯一認可されているリゾールは、神経変性を遅延させることを目標として開発された。一方で、失われた神経細胞とその機能を補完する目的の細胞移植による再生医療研究は、後述する様々な課題を有している。

2006 年に人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) の作製技術が開発された。この革新的技術を用いることによって、患者自身の体細胞から多能性幹細胞を樹立し、さらに中枢神経系組織を含めた疾患標的細胞に分化させることが可能になり、これまでにない全く新たな医療開発が始まっている。

本稿では、既存の幹細胞を用いた ALS の再生医療研究と、近年始まりつつある神経疾患に対する胚性幹細胞

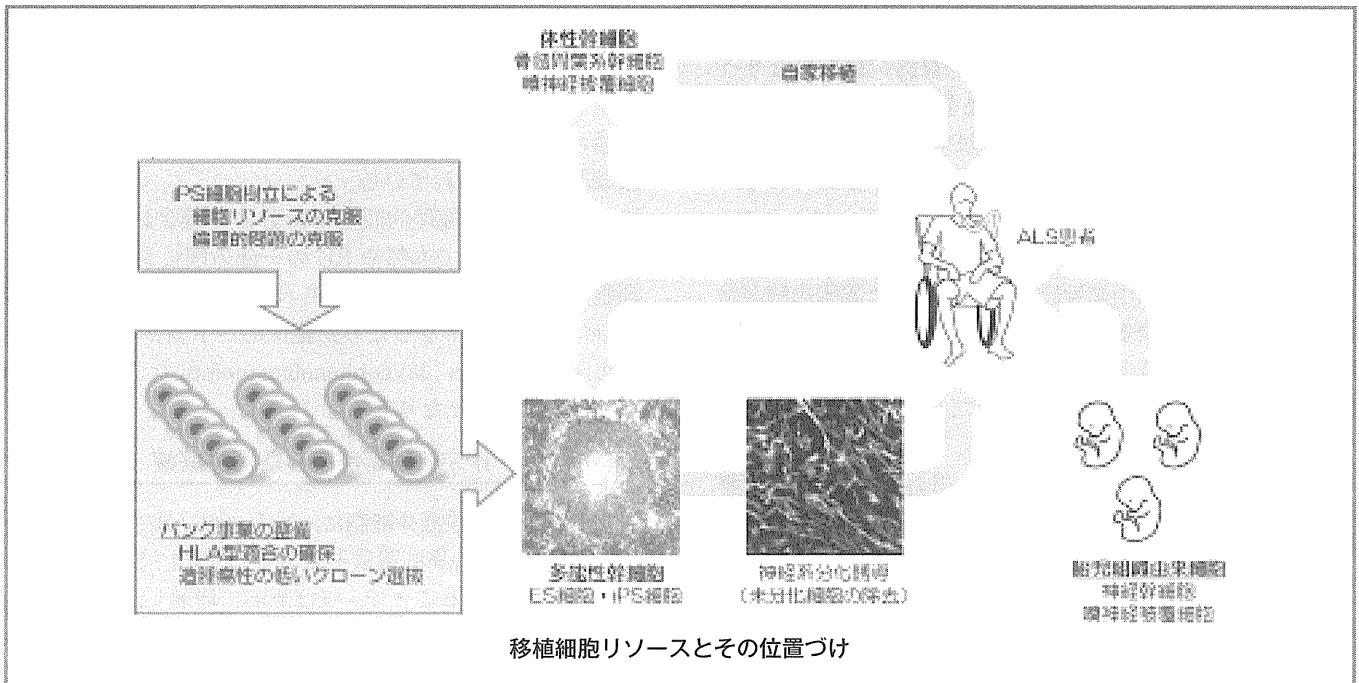
(embryonic stem cells : ES 細胞) を用いた細胞移植臨床治療研究を紹介する。さらには、今後期待される iPS 細胞を用いた再生医療の展望と、予測される課題点を克服する試みについて述べる。

ALS における既存の移植治療細胞リソース

ALS における細胞移植治療研究は、ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞の使用以前には、体性幹細胞を用いた治療研究が先行していた。この体性幹細胞リソースとしては、顆粒球コロニー刺激因子刺激により得られた末梢血幹細胞を用いた自家移植治療¹⁾や、造血幹細胞の他家移植治療が最も早くから行われたが、安全性が確保しやすい反面有効性も示されなかった²⁾。

次に、骨髄由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSC) の応用が先行している。通常 MSC は、骨髄の中で造血系細胞の働きに適した環境を提供する役割が知られているが、Notch 遺伝子導入と線維芽細胞増殖因子・フォルスコリン (細胞内 cAMP 上昇作用) の併用により、胚葉分化を超えて 90~96% という高効率で神経前駆細胞に誘導が

こんどう たかゆき 京都大学 iPS 細胞研究所, 京都大学大学院/医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学
たかはし りょうすけ 京都大学大学院教授/医学研究科脳病態生理学講座臨床神経学
いのうえ はるひさ 京都大学 iPS 細胞研究所准教授



可能であることが示されている³⁾。そしていくつかの研究でマウス ALS モデルにヒト MSC を移植し、生存期間延長など有効性が示唆されている⁴⁾。実際すでに、臨床治験として MSC を脊髄内注入する自家移植がイタリア⁵⁾・イスラエル⁶⁾などから報告されており、少数例の第 1 相治験では安全性と、一部の症例で ALS 臨床スコア悪化の改善を認めている。しかし、継時的な脊髄 MRI では移植部の膨隆が認められるなど長期的な観察を必要としている。米国立衛生研究所提供の登録型臨床試験データベース (<http://clinicaltrials.gov/>) では、スペイン (NCT01254539) とイスラエル (NCT01051882) でも同様の臨床試験が進行中である。

次に、汎用される細胞リソースとしては、嗅神経被覆細胞 (olfactory ensheathing cells : OEC) があげられる。成体でも常に増殖再生している嗅神経粘膜から採取が可能であり、Schwann 細胞のように神経の髄鞘化を行っている。OEC の特徴として、末梢神経のみならず中枢神経系においても髄鞘形成・軸索再生に働くことがラット頸髄損傷モデルで示されている⁷⁾。中国では、胎児嗅球由来の OEC を両側放線冠に移植したオープンラベル試験⁸⁾・二重盲検治験⁹⁾で安全性と症状の改善が報告された。しかし、上記中国の施設で OEC 移植治療を受けたオランダ人の追跡調査研究では、有効性に乏しく重篤な副作用例 (急速な呼吸不全の進行と深部静脈血栓症) もあり、臨床的な有用性はないとしている¹⁰⁾。この一連の臨床研究では、深部白質の局所のみ注射するという移植細胞のデリバリー手法に問題があった可能性もある。ALS では全脊髄が病変になりうるが、広範な病変に対する治療効果を有し侵襲性を低く抑える目的で、ALS マウスモデルに対する OEC の第四脳室内投与が試みられ、限定的ながら有効性も示されており、今後の発展が期待される¹¹⁾。

最近になり、米国では Emory 大学と Neuralstem 社が中心となり胎児脊髄由来神経幹細胞を用いた臨床治験が始まっている。この脊髄由来神経幹細胞は ALS の中心的な障害部位である下位運動ニューロンを含むという点で、神経再生を最終目標とした場合優れているものの、細胞リソースを極めて限られる問題が残る。

MSC や OEC などの体性幹細胞を用いた ALS 細胞治療は、自家移植が可能であるという利点を持つが、神経組織の効率よい再生という観点からは治療効果が不十分となる限界も予測される。一方で、多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞など) からの、運動神経を含めた高効率の神経分化誘導法が急速に発展しており¹²⁾、臨床応用への取り組みが活発

化している。

ES 細胞を用いた神経疾患治療

ヒト由来の代表的な多能性幹細胞であるヒト ES 細胞は 1998 年に初めて樹立され¹³⁾、本邦では 2003 年に初めて樹立されて以来現在までに 5 クローンが樹立された。ヒト ES 細胞はその未分化状態を保ったまま、ほぼ無限に増殖を繰り返すことが可能であり、心筋細胞・肝細胞・神経細胞などへの *in vitro* における分化誘導法研究が進められてきた。

ES 細胞が有する多能性は再生医療への応用が期待されていたが、倫理的側面・安全性の確保・異種動物由来因子除去を中心として超えるべきハードルが高かった。しかし、2010 年に米国食品医薬品局 (US Food and Drug Administration : FDA) が 2 社 3 案件の申請を承認、Geron 社による ES 細胞由来のオリゴデンドロ前駆細胞を用いた亜急性脊髄損傷治療¹⁴⁾と、ACT 社による ES 細胞由来の網膜色素上皮細胞を用いた Stargardt 病・加齢性黄斑変性治療¹⁵⁾が、それぞれ第 1 相臨床治験として開始された。また、California Stem Cell 社が脊髄性筋萎縮症 I 型に対する ES 細胞由来の運動神経を用いた移植治療を FDA 申請中だが、2011 年 4 月現在保留中である。

ES 細胞の臨床応用における問題点

ES 細胞の樹立には体外受精に用いた余剰胚を用いるため、一個体の源を滅失する点において大きな倫理的問題が指摘されてきた。この点を克服するべく、single cell biopsy によるヒト胚を滅失しない ES 細胞樹立法も報告され¹⁶⁾、前述の ACT 社臨床治験にはこの技術を用いて樹立された ES 細胞が使用されている。

しかしながら倫理的問題は十分に配慮される必要があり、2011 年時点で本邦や EU の一部の国においては、ES 細胞の臨床応用が法的に認められていない。さらに、患者投与は他家移植となるため拒絶反応が予測され、Basiliximab・Tacrolimus・Mycophenolate mofetil などの免疫抑制薬の投与が必須となりうる。

iPS 細胞を使用した再生医療

ヒト成人皮膚線維芽細胞に、レトロウィルスベクターを用いて ES 細胞特異的遺伝子である Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc を導入することで、ほぼ無限に増殖し、内・中・外胚葉それぞれへの分化能力を有するヒト iPS 細胞が誕生した。その後も、より効率的な iPS 細胞の樹立法研究の展開