

重要性が示唆された<sup>9)</sup>。さらにごく最近、多くの白人 ALS において C9ORF72 遺伝子非翻訳領域内の GGGGCC リピート配列の異常伸長が発見され、変性蛋白質の凝集・蓄積による神経変性メカニズムと異常 RNA の蓄積による神経変性メカニズムとの間にクロストークが存在する可能性が示唆された。

### 3. 神経変性と神経機能障害

神経変性疾患は、元来神経細胞の脱落・変性により発症すると定義されていたが、PolyQ 病モデルマウス脳の詳細な解析から、著明な神経細胞死が観察される以前から神経症状が出現し、さらに異常伸長 PolyQ 蛋白質の発現を遮断すると神経症状が改善することが示され、この神経症状は神経細胞死ではなくむしろ可逆性の神経機能障害に起因すると考えられるようになった。このような変性蛋白質の凝集・蓄積は、神経細胞内の蛋白質分解、転写調節、軸索輸送、ミトコンドリア、シナプスなどに様々な機能障害を惹きおこすことが明らかにされた。一方、PolyQ 病や ALS モデルマウスの神経症状は、個々の神経細胞内での機能障害だけではなく、神経回路内や神経—グリア間の細胞間ネットワークの障害も関与すること、さらに炎症・免疫など非神経細胞による細胞非自律的 (non-cell autonomous) な病態への寄与も示された<sup>10)</sup>。

### 4. 神経変性疾患の治療法確立へ向けて

上述のように、神経変性疾患は元来原因不明であったためこれまで有効な治療薬に乏しかったが、分子遺伝学的解析や細胞生物学、モデル動物をもちいた解析から発症分子メカニズムが明らかにされつつあり、それに基づいた分子標的治療薬開発への道が拓かれた。これまでに解明された神経変性疾患の病態機序に基づいて、変異遺伝子発現抑制、異常蛋白質のミスフォールディング・凝集抑制、異常蛋白質の分解促進、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などによる転写活性化、ミトコンドリア機能障害の改善、神経細胞死抑制、神経栄養因子による神経細胞保護など、様々な治療標的に対して薬剤ハイスクリーンングなどによる治療薬候補の探索研究が進んでいる<sup>2)</sup>。また、RNAi をもちいた変異遺伝子の発現抑制や様々な治療標的に対する遺伝子治療などの研究もおこなわれている。さらに iPS 細胞などをもちいた神経再生の研究も始まっている。

一方で、神経変性疾患は緩徐進行性であるため、これらの研究成果から開発が期待される病態抑止治療法 (disease-modifying therapy) の有効性の評価には、長期間を要すると考えられ、臨床治験を実施するのは容易ではない。したがって、病態抑止を目的とした分子標的治療薬の開発へ向けては、

これまでの神経症状自体に対する対症治療法 (symptomatic therapy) とはことなり、将来の臨床治験において短期間での薬効判定に適した鋭敏な病態バイオマーカーの開発が望まれている<sup>11)</sup>。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

### 文 献

- 1) Ross CA, Poirier MA. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:891-898.
- 2) Nagai Y, Popiel HA. Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: exposed  $\beta$ -sheet hypothesis. *Curr Pharm Des* 2008;14:3267-3279.
- 3) Nagai Y, Inui T, Popiel HA, et al. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:332-340.
- 4) Aguzzi A, Rajendran L. The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 2009;64:783-790.
- 5) Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, et al. Heat shock transcription factor 1-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J Biol Chem* 2008;283:26188-26197.
- 6) Bauer PO, Goswami A, Wong HK, et al. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotechnol* 2010;28:256-263.
- 7) Douglas PM, Dillin A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol* 2010;190:719-729.
- 8) La Spada AR, Taylor JP. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet* 2010;11:247-258.
- 9) Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2010;9:995-1007.
- 10) Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 2009;187:761-772.
- 11) Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Perspectives on molecular targeted therapies and clinical trials for neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:329-335.

**Abstract****Keywords for study of pathological conditions of neurodegenerative diseases**

Yoshitaka Nagai, M.D., Ph.D.

Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry

Molecular genetic analyses revealed that most neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and the polyglutamine diseases share a common molecular pathogenesis, namely protein misfolding and aggregation in the brain. Recently, prion-like transmission of these protein aggregates between cells has been suggested to contribute to the spread of neuropathology. To cope with protein aggregation, organisms have protein quality control systems, consisting of molecular chaperones and protein degradation, and therefore, an imbalance between protein aggregation and these systems would lead to neurodegeneration. Mouse models of neurodegenerative diseases exhibit neurological phenotypes before neuronal death, and these phenotypes are unexpectedly reversible, suggesting that neuronal dysfunction rather than death leads to neurological phenotypes. In addition to dysfunctions inside neurons, dysfunctions of the neuronal and neuro-glial networks also contribute to the pathogenesis in a non-cell autonomous fashion. On the other hand, another class of diseases including several spinocerebellar ataxias has been discovered to be caused by a repeat expansion mutation in untranslated RNA resulting in its accumulation, which is called the RNA repeat diseases. Recent discoveries of RNA-binding protein mutations and a repeat expansion mutation in ALS have highlighted the involvement of abnormal RNA metabolism in its pathogenesis. Recently, various researches on molecular-targeted therapies are in progress, which include high throughput chemical screening, RNAi, and gene therapy, etc. Towards development of a therapy for neurodegenerative diseases, sensitive biomarkers suitable for evaluation of therapeutic efficacy in clinical trials are eagerly anticipated.

(Clin Neurol 2012;52:874-876)

**Key words:** protein aggregation, quality control system, RNA repeat diseases, molecular-targeted therapy, biomarker



## ショウジョウバエなど小動物を用いた筋萎縮性側索硬化症モデル\*

● 藤掛伸宏\*\* / 長野清一\*\*\* / 永井義隆\*\*

**Key Words :** amyotrophic lateral sclerosis (ALS), TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), fused in sarcoma (FUS), superoxide dismutase 1 (SOD1), *Drosophila*, *C. elegans*, zebrafish

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) の多くは孤発性に発症するが、およそ10%は家族性に発症することが知られている。家族性ALS (FALS) の原因遺伝子としては、1993年に一部のFALS家系においてsuperoxide dismutase 1 (SOD1) の遺伝子変異が初めて報告された<sup>1)</sup>。その後の研究から、変異SOD1蛋白質はミスフォールディングを起こして凝集し運動ニューロン内に細胞質封入体として蓄積する過程で毒性を獲得する (gain of function) と考えられるようになった<sup>2)</sup>。このSOD1遺伝子変異はFALSの約20%のみにしか認められない。

一方で、孤発性ALSや大多数のFALS患者の脊髄運動ニューロンで認められる封入体にはSOD1の蓄積は認めず、これらの封入体に凝集・蓄積している蛋白質は長らく不明であった。しかし、2006年に孤発性ALSにおける細胞質封入体の構成成分としてRNA結合蛋白質であるTAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) が同定され<sup>3)</sup>、続いて複数のFALS家系からTDP-43のさまざまな遺伝子変

異が同定された<sup>4)</sup>。そして、病理学的解析からTDP-43が運動ニューロン細胞質内に凝集・蓄積するだけでなく、本来の核内への局在が消失することが明らかとなり、ALSの発症メカニズムとして、TDP-43の凝集・蓄積による毒性獲得 (gain of function) とTDP-43の核内からの消失による機能喪失 (loss of function) のいずれか、もしくは両者がかかわると考えられるようになった<sup>5)</sup>。また、ALS患者で蓄積しているTDP-43は主にC末端側の断片であり、リン酸化修飾を受けていることが明らかにされた。そして、このようなTDP-43の凝集・蓄積および核内からの消失は、Tau蓄積を認めない前頭側頭葉変性症の一部や骨Paget病と前頭側頭葉型認知症を伴う遺伝性封入体筋炎 (inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia : IBMPFD) などにも共通して認められ、これらの疾患はTDP-43プロテインオパチーと総称されている<sup>6)</sup>。

近年、TDP-43と同じRNA結合蛋白質に属するfused in sarcoma (FUS, 別名translocated in liposarcoma : TLS) の遺伝子変異が、SOD1およびTDP-43の遺伝子変異を持たないFALS家系の原因遺伝子として同定された<sup>6)7)</sup>。その病態では、やはり本来核に局在するFUSが細胞質内に凝集して封入体を形成していることから、変異FUSにお

\* Small animal models of amyotrophic lateral sclerosis such as *Drosophila* and *C. elegans* models.

\*\* Nobuhiro FUJIKAKE, Ph.D., \*\*\*Seiichi NAGANO, M.D., Ph.D. & Yoshitaka NAGAI, M.D., Ph.D.: 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第四部, \*\*\*疾病研究第五部 (〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1); Departments of Degenerative Neurological Diseases and \*\*\*Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.

表1 神経変性疾患のモデル化における小動物の特徴

	ショウジョウバエ	線虫	ゼブラフィッシュ	マウス
脊椎/無脊椎動物	無脊椎動物	無脊椎動物	脊椎動物	脊椎動物
寿命	60日	21日	4年	2.5年
世代時間	10日	3日	90日	63日
多産性	250卵/個体	200卵/個体	200卵/産卵	8頭/出産
飼育スペース	バイアル瓶/ インキュベーター	シャーレ/ インキュベーター	水槽	専用ケージ/ 専用施設
ヒト相同遺伝子の保存性	70%	60%	—	99%
遺伝子発現 個体作製法	Tg	Tg	・ mRNA注入 ・ Tg	・ Tg ・ ウイルス感染
遺伝子機能喪失 個体作製法	・ RNAi Tg ・ 変異導入剤曝露 ・ トランスポゾン	・ siRNAの給餌 ・ 変異導入剤曝露	・ AMO注入 ・ 変異導入剤曝露	KO
薬剤スクリーニング	容易	容易	容易	困難
遺伝子スクリーニング	容易	容易	困難	困難

Tg：トランスジェニック，KO：ノックアウト，AMO：アンチセンスモルフォリノ。

いてもTDP-43と同様に凝集・蓄積によるgain of functionと核内からの消失によるloss of functionがALS発症にかかわると考えられている。さらにTauやTDP-43の蓄積を認めない前頭側頭葉変性症の一部でも同様にFUSの凝集・蓄積，核局在消失が生じることから，これらは総称してFUSプロテインパチーと呼ばれている<sup>5)</sup>。

以上のようにALS発症の原因蛋白質として，SOD1やTDP-43，FUSが発見されたが，その発症分子メカニズムを解明するためにはこれらの分子病態に基づいたモデル動物を用いた研究が必須である。しかし，これまで疾患モデル動物としてもっとも汎用されてきたマウスなどのげっ歯類では，モデルの樹立・解析に膨大な時間，労力，設備，費用が必要となる。そのため最近では，ショウジョウバエや線虫，ゼブラフィッシュなどの遺伝子操作がしやすく，個体レベルでの病態解析を行うことができ，狭い飼育スペースで多数の系統の維持が可能でハイスループット解析に適した小動物を用いて神経変性疾患のモデル化を試みる研究が盛んに行われている(表1)。

ショウジョウバエは，世代時間が約10～14日とマウスと比べて非常に短く，遺伝子の約70%はヒトにも相同遺伝子が存在し，さらにヒト疾患遺伝子の約75%がショウジョウバエにも保存されている。また，遺伝学，発生学のモデル生物として長年利用されてきたために遺伝子改変体の作製やその解析技術が蓄積されており，多

数の遺伝子変異体や組換え体系統などがストックセンターに整備されている。したがって，それらを用いて個体レベルでの遺伝学スクリーニングを短期間で効率的に行うことができ，また，比較的少量の薬剤での治療薬スクリーニングにも適している。線虫も世代時間が3日と短く，RNAiによる遺伝子ノックダウンが容易に行えるため，ショウジョウバエと同様にハイスループットな遺伝学的スクリーニングや治療薬スクリーニングに適している。また，体が透明であるため生きたままでの蛍光観察が可能であるという特徴がある。ゼブラフィッシュは脊椎動物でありながらも飼育が容易で多産であり，mRNAやアンチセンスモルフォリノを直接インジェクションすることで遺伝子発現やノックダウンを容易に解析することができる。一方，個体を薬液中で飼育することにより治療薬スクリーニングを行うことも可能である。また，胚が透明であるため線虫と同様に生きたままでの蛍光観察が可能である。

以上のような利点を生かして，実際に，Alzheimer病，Parkinson病，ALSなどさまざまな神経変性疾患の小動物モデルがこれまで樹立され，病態解明・治療法開発研究に多大な貢献を果たしている<sup>8)～10)</sup>。本稿では，これまでに樹立されたALSの動物モデルのうち，特に小動物モデルに焦点を当て，最新の研究成果について概説する。

## TDP-43がかかわる ALSの小動物モデル

### 1. 機能喪失(loss of function)仮説に基づいたモデル

TDP-43は、pre-mRNAのスプライシングやmRNAの輸送、翻訳調節などさまざまなRNA代謝プロセスにかかわるRNA結合蛋白質であり、二つのRNA認識モチーフ(RRM1, RRM2)とC末端側に蛋白質間相互作用にかかわるグリシンリッチドメインを持つ。細胞内では主に核に局在しているが、核移行シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)の両方を持ち、核-細胞質間をシャトルしていると考えられている。FALSにおけるTDP-43遺伝子の変異は、C末端のグリシンリッチドメイン内に集中している。ALS病態では、前述のようにTDP-43の核局在の消失によりloss of functionが生じると考えられている<sup>5)</sup>。

#### a. ショウジョウバエモデル

TDP-43のloss of function仮説に基づいた初めての動物モデルとして、2009年にFeiguinらはトランスポゾン挿入変異体ショウジョウバエからTDP-43遺伝子が欠失したショウジョウバエを作製し、その病態解析結果を報告した<sup>11)</sup>。TDP-43欠失変異体は発生段階で半致死を示し、成虫まで発生した個体でも運動障害、寿命短縮を認めた。病理学的には運動ニューロンの軸索分岐、シナプス前終末ボタンの減少が認められたが、神経細胞死は明らかではない。さらにこのTDP-43欠失変異体のシナプス前終末ボタンで微小管結合蛋白質futsch/MAP1B mRNA, アセチル化微小管が減少していることが最近明らかにされた<sup>12)</sup>。そして、TDP-43の発現によってこれらの表現型が回復するが、RNA結合能を欠くRRM1変異型TDP-43では回復しないことから、ALSはTDP-43のloss of functionにより発症すると考察した。続いてLuらは、化学的な遺伝子変異導入によりTDP-43遺伝子変異体ショウジョウバエを作製し、やはり神経樹状突起の分岐が減少して半致死を示すことから、同様にTDP-43のloss of function仮説を支持する結果を得ている<sup>13)</sup>。

#### b. ゼブラフィッシュモデル

ゼブラフィッシュモデルでは、2010年にKabashi

らはアンチセンスモルフォリノのインジェクションによるTDP-43のノックダウンにより、運動ニューロン軸索の短縮・分岐増加をきたし、運動障害を呈することを明らかにした<sup>14)</sup>。そして、野生型TDP-43 mRNAのインジェクションにより表現型が回復するが、FALS変異型TDP-43(A315T, G348C, A382T)では回復しないことを示した。しかしながら、変異型TDP-43の過剰発現でも同様の表現型を生じることから、TDP-43変異によるloss of functionに加えてgain of functionの両方のメカニズムがALS発症に寄与すると考察した。

一方、Ashらは線虫のTDP-43欠失変異体では明らかな運動障害を認めないことを報告している<sup>15)</sup>。そして、むしろヒト野生型TDP-43の発現により運動障害を示したことから、gain of function仮説を支持する結果を報告している(後述)。

### 2. 毒性獲得(gain of function)仮説に基づいたモデル

#### a. ショウジョウバエモデル

TDP-43のgain of function仮説に基づいたショウジョウバエモデルは、2010年にLiらにより初めて報告された<sup>16)</sup>。彼らは、ヒト野生型TDP-43を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製した。そして、TDP-43を複眼で発現させたところ進行性の変性が生じ、運動ニューロンでの発現では発生段階での半致死を示し、運動障害を呈することを明らかにした。病理学的には運動ニューロン軸索の腫大、軸索分岐の減少、シナプス前終末ボタンの減少を認め、TDP-43は主に核内へ局在したが、一部で細胞質内封入体、細胞死を認めた。また、生化学的にもALS患者と同様のTDP-43 C末端断片の蓄積を認めた。さらに重要なことに、内在性TDP-43のRNAiノックダウンによりこの運動障害が改善することを示し、ALSはTDP-43のloss of functionではなく、gain of functionのメカニズムにより発症すると結論した。

続いてHansonらも、ヒト野生型TDP-43を発現するショウジョウバエにおいて進行性複眼変性、運動障害、寿命短縮をきたすことを示した<sup>17)</sup>。しかし、TDP-43の細胞質封入体は認めず、TDP-43は核局在を示したことから、封入体は神経変性の原因ではなく、TDP-43の核内での機能異常がALSの発症に寄与すると考察した。しかしRitson

らは、TDP-43のNLS変異型およびNES変異型を発現するショウジョウバエを作製し、細胞質に局在するNLS変異型では野生型に比べ重度の複眼変性を示す一方で、核局在するNES変異型では表現型が生じないことを明らかにした<sup>18)</sup>。そして、FALS変異型TDP-43(M337V)も細胞質局在を示して複眼変性を増悪し、さらにIBMPFDの原因である変異型valosin-containing protein(VCP)の共発現により野生型TDP-43の細胞質局在が誘導され複眼変性が増悪することから、TDP-43の異常な細胞質局在がTDP-43プロテインパチーの発症に寄与していると結論した。一方Miguelらは、NES変異型は複眼での発現ではRitsonらと同様に明らかな表現型を示さないが、神経系では野生型、NLS変異型だけでなくNES変異型でも明らかな寿命短縮をきたしたことから、細胞質だけでなく核内TDP-43も神経毒性を持つと結論した<sup>19)</sup>。

FALS変異がTDP-43の神経毒性に与える影響に関しては、Voigtらは多数のFALS変異型TDP-43(G287S, A315T, G348C, A382T, N390D)について検討し、神経系での発現による寿命短縮、運動ニューロンでの発現による運動障害などの表現型の明らかな増悪を認めないことを報告している<sup>20)</sup>。一方Estesらは、運動ニューロンでの発現では野生型と異なりFALS変異型TDP-43(A315T)は半致死、運動障害などの表現型を呈さないが、幼虫期にはむしろFALS変異型の方が重度の運動障害を示すことを報告している<sup>21)</sup>。しかしEldenらは、FALS変異型TDP-43(Q331K)では野生型に比べて運動障害の明らかな増悪効果を見出している<sup>22)</sup>。さらにGuoらによる生化学的解析も含めた詳細な検討では、FALS変異が集積しているTDP-43 C末端のグリシンリッチドメインの配列はプリオン蛋白質と類似しており、実際にFALS変異A315TによりTDP-43の凝集性が增大することが示された。そして、Estesらとは別のプロモーターによる運動ニューロンでの発現では、FALS変異型TDP-43(A315T)により運動障害、運動ニューロン軸索の脱落が増悪することを見出した<sup>23)</sup>。

一方Liらは、ALS病態で認められるTDP-43のリン酸化の意義を明らかにするため、野生型TDP-43のC末断片およびC末断片配列中のセリンをアラニンに置換したリン酸化耐性変異型、アス

パラギン酸に置換したリン酸化模倣変異型を発現するショウジョウバエモデルを作製した<sup>24)</sup>。その結果、野生型およびリン酸化耐性変異型C末断片は細胞質および核内に封入体を形成したが、リン酸化模倣変異型では封入体を認めなかったことから、TDP-43のリン酸化は封入体形成を抑制する防御的な機構であると考察した。しかし、これらショウジョウバエの表現型は解析しておらず、神経変性とTDP-43リン酸化の関連については不明である。

そのほかにVoigtらは前述の論文で、TDP-43のNLS変異あるいはFALS変異による表現型の増悪は明らかではなかったが、注目すべきことに、RNA結合能を欠くRRM1変異型TDP-43ではこれらの表現型が消失もしくは減弱することを明らかにし、TDP-43のRNA結合活性が神経変性にかかわると考察している<sup>20)</sup>。

このように新しく樹立されたALSモデルショウジョウバエを用いて、その利点を生かした遺伝学的解析による病態研究も進んでいる。Estesらは前述の論文で、TDP-43の凝集・蓄積を認めたことから、病態における蛋白質ミスフォールディング・凝集の役割を検討した<sup>21)</sup>。その結果、蛋白質分解の主要経路であるプロテアソームのサブユニットβ2変異体の共発現により複眼変性が増悪し、蛋白質ミスフォールディングを防ぐ分子シャペロンHsp70の共発現により複眼変性が抑制されることを示し、TDP-43のミスフォールディング・凝集がALS発症に重要な役割を果たすことを明らかにした。またEldenらは、脊髄小脳失調症2型の原因遺伝子でありRNA代謝に関与するataxin-2とTDP-43の遺伝学的相互作用を検討したところ、TDP-43発現による複眼変性および寿命短縮はataxin-2の共発現により増悪し、ataxin-2遺伝子欠失により抑制されることを見出した<sup>22)</sup>。さらにALS患者で認められるTDP-43封入体にataxin-2が蓄積していること、そして、もっとも重要なことにataxin-2遺伝子内のCAGリピート長が27~33回である中間伸長型アレルがALS発症の危険因子となることを発見した。

#### b. 線虫モデル

2010年にAshらは、ヒト野生型TDP-43を神経系で発現するトランスジェニック線虫を作製し

たところ運動ニューロン軸索束の脱束化, シナプス数の減少をきたし, 運動障害を生じることを明らかにした<sup>15)</sup>. この線虫モデルではTDP-43の封入体は認めず, TDP-43は核局在を示した. 続いてNLS欠失型, RRM欠失型あるいはスプライシング活性を欠失したC末端欠失型TDP-43の発現では運動障害を認めないことを示し, ALSでは核内TDP-43のRNA代謝活性により神経変性が生じると結論した.

Liachkoらは, FALS変異型TDP-43 (G290A, A315T, M337V)の神経系での発現により野生型に比べ運動障害が増悪し, 運動ニューロンの脱落を生じることを明らかにした<sup>25)</sup>. この時, TDP-43は核に局在し, ALS患者と同様なリン酸化および断片化が生じていた. TDP-43 C末端のセリンをアラニンに置換したリン酸化耐性変異型では, 表現型への影響は認められなかった.

一方Zhangらは, ヒト野生型, FALS変異型TDP-43 (Q371K, M337V)あるいはTDP-43 C末断片 (TDP-C25)を神経系で発現する線虫はいずれも神経症状を呈し, 野生型, FALS変異型TDP-43は凝集していることを生化学的に示し, さらに凝集性の高いTDP-C25では細胞質封入体を形成することを見出した<sup>26)</sup>. そして, 分子シャペロンの発現を誘導する熱ショック転写因子HSF1やdaf-16の機能喪失によりTDP-C25の凝集・蓄積が促進されて運動障害が増悪し, 分子シャペロン発現を負に制御するインスリン/インスリン様成長因子受容体daf-2の変異により不溶性TDP-43が減少して運動障害が改善することを明らかにした. 以上の結果から, TDP-43の神経毒性には蛋白質のミスフォールディング・凝集が関与していると考察している.

#### c. ゼブラフィッシュモデル

Kabashiらは前述の2010年の論文で, ゼブラフィッシュ胞胚へのmRNAインジェクションにより野生型あるいはFALS変異型TDP-43 (A315T, G348C, A382)を一過性に発現させたところ, TDP-43ノックダウンと同様に運動ニューロンの軸索の短縮・分岐増加, 運動障害などをきたしたが, FALS変異型ではその頻度が有意に高いことを明らかにした<sup>14)</sup>. この結果から, 前述のようにgain of functionとloss of functionの両メカニズムの寄

与を提唱している.

## FUSがかかわる ALSの小動物モデル

### 1. 機能喪失(loss of function)仮説に基づいたモデル

FUS/TLSはTDP-43と同様にさまざまなRNA代謝プロセスにかかわるRNA結合蛋白質であり, やはりRNA認識モチーフ(RRM)とN末端側にグリシンリッチドメインを持つ. 神経細胞内では主に核に局在しているが, やはりNLSとNESの両方を持ち核-細胞質間をシャトルしており, 核内ではmRNAの転写, スプライシングに働いているが, 注目すべきことに細胞質では樹状突起スパインへRNAを輸送し, 局所的蛋白質翻訳に関与すると考えられている. ALS病態では, 前述のようにFUSの核局在の消失によりloss of functionが生じると考えられており, FALS変異の多くはC末端のNLS配列内に集積している<sup>5)</sup>.

#### a. ショウジョウバエモデル

FUSのloss of function仮説に基づいたショウジョウバエモデルとして, 2011年にWangらは, 前述のFeiguinらと同様の手法でFUS遺伝子欠失ショウジョウバエを作製した<sup>27)</sup>. このFUS欠失変異体は発生段階で半致死を示し, 成虫まで発生した個体でも運動障害, 寿命短縮を呈した. この表現型はヒト野生型FUSの発現により回復するがFALS変異型FUS (R522G, P525L)では回復しないことを示し, FALS変異によるFUSの機能喪失を明らかにした. 一方, FUS遺伝子欠失による表現型はTDP-43の発現では回復しないが, TDP-43遺伝子欠失による表現型はFUSの発現によって回復することを見出し, 遺伝学的にFUSがTDP-43の下流にあることを明らかにした. さらに免疫共沈降によりFUSとTDP-43とが直接結合することを示し, ALSはTDP-43とFUSの両者がかかわる共通の機能が破綻することにより発症すると考察している.

#### b. ゼブラフィッシュモデル

Kabashiらは, ゼブラフィッシュ胞胚にアンチセンスモルフォリノをインジェクションして, FUSノックダウンゼブラフィッシュを作製した<sup>28)</sup>. その結果, 運動ニューロン軸索の短縮・分岐減



少, 運動障害を呈することを明らかにした. さらにこれらの表現型はヒト野生型FUSの発現により回復するが, FALS変異型FUS(R521C, R521H)では回復しないことを示し, FUSのloss of functionによることを明らかにした. しかしながら, R521H変異型の発現のみでも同様の表現型が認められたことから, R521H変異ではloss of functionに加えてgain of functionの両者がALS発症に寄与すると考察している. さらにTDP-43とFUSの遺伝学的な相互作用についても解析を行い, FUSとTDP-43のダブルノックダウンでは相乗的な増悪効果を認めなかったことから, 両者の関連性が示唆された. そして, FUSノックダウンによる表現型はTDP-43の発現により回復しないが, TDP-43ノックダウンによる表現型はFUSの発現により回復することを明らかにし, 上述のWangらと同様にTDP-43のloss of functionの下流でFUSが関与するというALS発症メカニズムを考察した.

## 2. 毒性獲得(gain of function)仮説に基づいたモデル

### a. ショウジョウバエモデル

FUSのgain of function仮説に基づいたモデルとして, Lansonらはヒト野生型およびFALS変異型FUS(R518K, R521H, R521C)を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製した<sup>29)</sup>. その結果, 複眼での発現では野生型FUSに比べFALS変異型で複眼変性が増悪し, 神経系での発現ではFALS変異型のみで半致死を示し, さらに寿命短縮, 運動障害などの表現型もFALS変異型で増悪した. 病理学的な解析から, 野生型FUSは核局在を示すがFALS変異型では細胞質にも局在することが明らかになった. FUSの封入体形成については記述されていない. そして, FALS変異による増悪効果はNES変異により抑制されたことから, FUS病態における細胞質局在の重要性を指摘した. さらに, FUSとTDP-43との共発現実験により複眼変性が相乗的に増悪し, FUS, TDP-43のいずれかのFALS変異によりさらに増悪することを明らかにし, TDP-43, FUSの両者が協調的に神経変性をひき起こす可能性を考察した.

続いてChenらも, ヒト野生型FUSの複眼での発現により進行性複眼変性を, 運動ニューロンでの発現では神経筋接合部シナプスボタンの減

少, 運動障害をきたし, さらにFALS変異型FUS(R524S, P525L)では表現型が増悪することを明らかにした<sup>30)</sup>. 野生型FUSは主に核局在を示すが, FALS変異型はやはり核と細胞質に局在していた. 一方, FUSのRNAiによるノックダウンでは明らかな表現型が生じなかったことから, ALSはFUSのgain of functionにより発症すると考察した.

Miguelらもヒト野生型FUSを発現するショウジョウバエを作製し, 複眼変性, 寿命短縮が生じることを報告した<sup>31)</sup>. やはりFUSは核に局在し, 細胞質封入体は認めなかったが, 生化学的な解析ではFUSの不溶化を認めた. さらに, 分子シャペロンHsp70の共発現によりFUSが可溶化され寿命短縮が抑制されることを明らかにし, 不溶性FUSの毒性によりALSがひき起こされると結論した.

### b. 線虫モデル

今年に入ってMurakamiらは, ヒト野生型, さまざまなFALS変異型およびNLSを含むC末端の欠失変異型FUSを神経系で発現するトランスジェニック線虫モデルを報告した<sup>32)</sup>. その結果, 野生型および軽症FALS変異型FUS(R514G, R521G)では明らかな表現型を認めなかったが, 中等度変異型(R522G)や重症変異型(P525L), C末欠失変異型では進行性運動障害, 寿命短縮をひき起こした(重症型>中等度型). 野生型, 軽症FALS変異型FUSは核に局在するが, 中等度型や重症変異型, C末欠失変異型では核と細胞質に局在して封入体を形成し, 中等度型より重症型の方が細胞質局在を示す割合が高かった. さらにRFPを付加した野生型FUSとFALS変異型との共発現実験では, 野生型FUSは正常通り核に局在しFALS変異型の封入体には巻き込まれないこと, また, 野生型FUSの共発現により運動障害は回復しないことを明らかにし, FALS変異型は野生型FUSの生理活性とは無関係にgain of functionにより毒性を獲得してALSをひき起こすと考察した.

### c. ゼブラフィッシュモデル

Kabashiらは前述の論文で, 野生型FUSの発現ではゼブラフィッシュに明らかな表現型は生じず, FALS変異型FUS(R521H)では運動ニューロン軸索の短縮・分岐減少, 運動障害をきたすことを明らかにした. さらに野生型FUSの共発現で



は回復しなかったことから、R521H変異ではloss of functionに加えてgain of functionのメカニズムもALS発症に寄与する可能性を示した<sup>28)</sup>。一方、gain of functionが示唆されるFALS変異型FUS R521HとTDP-43 G348Cとの共発現では、Lansonらの結果と異なり相乗的な増悪効果は認められなかった。

### SOD1がかかわる ALSの小動物モデル

SOD1は細胞に有害なスーパーオキシドアニオンO<sub>2</sub><sup>-</sup>を過酸化水素と酸素に変換し、細胞を酸化ストレスから保護する酵素である。SOD1は1993年に初めてのFALSの原因遺伝子として報告されて以来<sup>1)</sup>、その遺伝子変異によりSOD1のloss of functionではなく、gain of functionのメカニズムによりALSをひき起こすと考えられている<sup>2)</sup>。

#### 1. 毒性獲得(gain of function)仮説に基づいたモデル

##### a. ショウジョウバエモデル

SOD1変異によるALSモデルショウジョウバエ作製の試みは1999年に初めて報告された<sup>33)</sup>。Eliaらは、ヒト野生型およびFALS変異型SOD1(G41S)を運動ニューロンで発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製した。しかし、運動ニューロンでのSOD1活性の上昇により寿命が延びることが知られており、SOD1活性を保持しているSOD1 G41Sの過剰発現ではやはり寿命が延長し、運動障害などの症状は認めなかった。

続いて2003年にMockettらは、内在性SOD1遺伝子を欠失しかつヒト野生型およびFALS変異型SOD1(G93C, G37R, A4V, G41D, I113T)を内在性SOD1のプロモーター下で発現するショウジョウバエを作製した<sup>34)</sup>。その結果、変異型SOD1の発現により寿命短縮をきたし、一部の变異型SOD1では進行性の運動障害が認められた。しかし、この寿命短縮は野生型SOD1の共発現により回復したことから、この表現型はSOD1活性の低下によるものであり、ALS病態で想定されているgain of functionによる表現型をモデル化できていないと結論した。

変異SOD1によるALSのショウジョウバエモデルの樹立は、2008年になりようやく成功した<sup>35)</sup>。

Watsonらは、ヒト野生型およびFALS変異型SOD1(A4V, G85R)を運動ニューロンで発現させたところ、Eliaらの結果と異なり寿命延長は認めず、進行性の運動障害を呈することを明らかにした。運動ニューロンの脱落は認めなかったが、電気生理学的解析では運動神経回路における伝達異常が認められた。野生型および変異型SOD1は運動ニューロン細胞質内に封入体様の蓄積を示し、加齢とともに増加した。以上のことから、ショウジョウバエにおいても変異SOD1の神経毒性が示された。

##### b. 線虫モデル

FALS変異型SOD1を発現するトランスジェニック線虫モデルは2001年に初めて作製された<sup>36)</sup>。Oedaらは、ヒト野生型およびFALS変異型SOD1(A4V, G37R, G93A)を全身に発現するトランスジェニック線虫を作製したが、変異型SOD1は分解されやすく明らかな表現型は認めなかった。しかし、酸化ストレス曝露下では変異型SOD1の分解は抑制され、FALS変異型線虫のみで寿命短縮を示した。骨格筋での発現では、やはり酸化ストレス曝露下で変異型SOD1の封入体が検出された。

2009年にWangらは、YFPを付加したヒト野生型およびFALS変異型SOD1(G85R)を神経系に発現するトランスジェニック線虫を報告した<sup>37)</sup>。その結果、野生型SOD1の発現では表現型を認めなかったが、FALS変異型SOD1では運動障害を呈し、不溶性の変異型SOD1が神経細胞内に封入体として蓄積していた。そして特筆すべきことに、このSOD1 G85R-YFP発現線虫が透過性であるため封入体が可視化できるという特性を生かして、大規模なsiRNAライブラリー(16,757種)から封入体形成にかかわる遺伝子の網羅的スクリーニングを行い、分子シャペロンや蛋白質分解、蛋白質の翻訳後修飾にかかわる遺伝子など81遺伝子を同定した。

##### c. ゼブラフィッシュモデル

2007年にLemmensらは、ゼブラフィッシュ胚にヒト野生型およびFALS変異型SOD1(A4V, G37R, G93A)のmRNAをインジェクションして、SOD1発現ゼブラフィッシュモデルを作製した<sup>38)</sup>。その結果、野生型に比べてFALS変異型SOD1の発現では運動ニューロン軸索の短縮をきたした。

そして、血管内皮増殖因子(VEGF)の発現誘導剤GS4012の治療効果を示し、簡便なALSモデルとして薬効評価においても有用であることを示した。

### おわりに

以上に述べたように、世界中でショウジョウバエ、線虫、ゼブラフィッシュなどの小動物を用いたTAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), fused in sarcoma (FUS), superoxide dismutase 1 (SOD1)がかかわるALSモデルが開発され、病態解明、治療法開発を目指した研究が現在進行中である。本稿で紹介したように、TDP-43, FUSの機能類似性から両者の相互関係について遺伝学的解析が行われているが、FALSの新たな原因遺伝子として*Optineurin*, *VCP*, *Ubiquilin-2*, *C9ORF72*などが最近次々と発見されており、マウスモデルでは困難な多数の遺伝子間の相互作用解析を小動物モデルを用いて行い、さまざまな筋萎縮性側索硬化症(ALS)に共通の発症分子メカニズムが解明されることが期待される。また、特定の遺伝子だけではなく、これら小動物モデルの最大の特徴を生かした網羅的な遺伝学的スクリーニングによりALS病態にかかわる遺伝子群を同定して未知の分子機序が明らかになることも期待される。さらに小動物モデルを用いた大規模な治療薬スクリーニングにより治療薬候補を同定することも可能である。今後、小動物モデルを用いたハイスループット解析により、ALSの病態解明、治療法開発研究がますます進展することが期待される。

### 文 献

- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993 ; 362 : 59-62.
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, et al. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 1998 ; 281 : 1851-4.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006 ; 314 : 130-3.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008 ; 319 : 1668-72.
- Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2010 ; 9 : 995-1007.
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 2009 ; 323 : 1208-11.
- Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2009 ; 323 : 1205-8.
- Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011 ; 11 : 274-82.
- Dimitriadi M, Hart AC. Neurodegenerative disorders : insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol Dis* 2010 ; 40 : 4-11.
- Marsh JL, Thompson LM. *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. *Neuron* 2006 ; 52 : 169-78.
- Feiguin F, Godena V, Romano G, et al. Depletion of TDP-43 affects *Drosophila* motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. *FEBS Letters* 2009 ; 583 : 1586-92.
- Godena V, Romano G, Romano M, et al. TDP-43 regulates *Drosophila* neuromuscular junctions growth by modulating Futsch/MAP1B levels and synaptic microtubules organization. *PLoS One* 2011 ; 6 : e17808.
- Lu Y, Ferris J, Gao F-B. Frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis-associated disease protein TDP-43 promotes dendritic branching. *Mol Brain* 2009 ; 2 : 30.
- Kabashi E, Lin L, Tradewell M, et al. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits *in vivo*. *Hum Mol Genet* 2010 ; 19 : 671-83.
- Ash P, Zhang Y-J, Roberts C, et al. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Hum Mol Genet* 2010 ; 19 : 3206-18.
- Li Y, Ray P, Rao E, et al. A *Drosophila* model for TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*

- 2010 ; 107 : 3169-74.
- 17) Hanson K, Kim S, Wassarman D, Tibbetts R. Ubiquilin modifies TDP-43 toxicity in a *Drosophila* model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 11068-72.
  - 18) Ritson G, Custer S, Freibaum B, et al. TDP-43 mediates degeneration in a novel *Drosophila* model of disease caused by mutations in VCP/p97. *J Neurosci* 2010 ; 30 : 7729-39.
  - 19) Miguel L, Frébourg T, Campion D, Lecourtis M. Both cytoplasmic and nuclear accumulations of the protein are neurotoxic in *Drosophila* models of TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis* 2011 ; 41 : 398-406.
  - 20) Voigt A, Herholz D, Fiesel F, et al. TDP-43-mediated neuron loss *in vivo* requires RNA-binding activity. *PLoS One* 2010 ; 5 : e12247.
  - 21) Estes P, Boehringer A, Zwick R, et al. Wild-type and A315T mutant TDP-43 exert differential neurotoxicity in a *Drosophila* model of ALS. *Hum Mol Genet* 2011 ; 20 : 2308-21.
  - 22) Elden A, Kim H-J, Hart M, et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* 2010 ; 466 : 1069-74.
  - 23) Guo W, Chen Y, Zhou X, et al. An ALS-associated mutation affecting TDP-43 enhances protein aggregation, fibril formation and neurotoxicity. *Nat Struct Mol Biol* 2011 ; 18 : 822-30.
  - 24) Li H-Y, Yeh P-A, Chiu H-C, et al. Hyperphosphorylation as a defense mechanism to reduce TDP-43 aggregation. *PLoS One* 2011 ; 6 : e23075.
  - 25) Liachko NF, Guthrie CR, Kraemer BC. Phosphorylation promotes neurotoxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of TDP-43 proteinopathy. *J Neurosci* 2010 ; 30 : 16208-19.
  - 26) Zhang T, Mullane P, Periz G, Wang J. TDP-43 neurotoxicity and protein aggregation modulated by heat shock factor and insulin/IGF-1 signaling. *Hum Mol Genet* 2011 ; 20 : 1952-65.
  - 27) Wang J-W, Brent JR, Tomlinson A, et al. The ALS-associated proteins FUS and TDP-43 function together to affect *Drosophila* locomotion and life span. *J Clin Invest* 2011 ; 121 : 4118-26.
  - 28) Kabashi E, Bercier V, Lissouba A, et al. FUS and TARDBP but not SOD1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet* 2011 ; 7 : e1002214.
  - 29) Lanson N, Maltare A, King H, et al. A *Drosophila* model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Hum Mol Genet* 2011 ; 20 : 2510-23.
  - 30) Chen Y, Yang M, Deng J, et al. Expression of human FUS protein in *Drosophila* leads to progressive neurodegeneration. *Protein Cell* 2011 ; 2 : 477-86.
  - 31) Miguel L, Avequin T, Delarue M, et al. Accumulation of insoluble forms of FUS protein correlates with toxicity in *Drosophila*. *Neurobiol Aging* 2012 ; in press.
  - 32) Murakami T, Yang SP, Xie L, et al. ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Hum Mol Genet* 2012 ; 21 : 1-9.
  - 33) Elia AJ, Parkes TL, Kirby K, et al. Expression of human FALS SOD in motoneurons of *Drosophila*. *Free Radic Biol Med* 1999 ; 26 : 1332-8.
  - 34) Mockett RJ, Radyuk SN, Benes JJ, et al. Phenotypic effects of familial amyotrophic lateral sclerosis mutant Sod alleles in transgenic *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 301-6.
  - 35) Watson MR, Lagow RD, Xu K, et al. A *Drosophila* model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 24972-81.
  - 36) Oeda T, Shimohama S, Kitagawa N, et al. Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 2013-23.
  - 37) Wang J, Farr GW, Hall DH, et al. An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 2009 ; 5 : e1000350.
  - 38) Lemmens R, Van Hoecke A, Hersmus N, et al. Overexpression of mutant superoxide dismutase 1 causes a motor axonopathy in the zebrafish. *Hum Mol Genet* 2007 ; 16 : 2359-65.



