

## 分担研究報告書

# FUS の AMPA 受容体機能調節を介した ALS/FTLD 症候発現機序の解明

研究分担者：祖父江 元<sup>1)</sup>

研究協力者：本田大祐<sup>1)</sup>，宇田川 剛<sup>1,2)</sup>，藤岡祐介<sup>1)</sup>，横井 聡<sup>1)</sup>，石垣診祐<sup>1)</sup>，  
池中建介<sup>1)</sup>，河合香里<sup>1)</sup>，渡辺宏久<sup>1)</sup>，勝野雅央<sup>1)</sup>

- 1) 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学
- 2) 東北大学大学院薬学研究科遺伝子制御薬学分野

### 研究要旨

新規 FUS 標的として AMPA 受容体サブユニット GluA1 を同定し、FUS が GluA1 mRNA のポリ(A) 鎖の長さの調節を介して、mRNA の安定性を制御することを明らかにした。FUS ノックダウンマウスにおいてシナプス成熟の異常、シナプス伝達の異常、及び、多動、脱抑制、社会性行動の異常が見られた。このことから FUS の機能喪失が AMPA 受容体機能を介して ALS/FTLD の症候発現に関係することが示された。

### A. 研究目的

前頭側頭葉変性症(FTLD)は、前頭葉及び側頭葉に病変の首座を有する変性性認知症である。近年、ALS と FTLD はその病理像や起因遺伝子変異が共通することから、両疾患は ALS/FTLD として一連の疾患スペクトラムとして捉えられるようになった。FUS は正常神経細胞では主に核内に局在するが、ALS/FTLD の病的神経細胞における核からの消失や細胞質封入体の蓄積という病理所見から、FUS の生理的な機能喪失が ALS/FTLD の病態形成に関与する可能性が想定される。我々は、FUS ノックダウン神経細胞及びノックダウンマウスモデルを作成し、シナプスにおけるタンパク質発現の変化やシナプス機能・形態、及び高次行動に及ぼす影響を解析し、FUS 機能喪失の ALS/FTLD の病態への寄与を検討した。

### B. 研究方法

マウス FUS 遺伝子に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクター及び、AAV ベクターを作成した。マウス初代培養神経細胞に対してレンチウイルスを感染させ、FUS ノックダウン神経細胞モデルを作成した。また、6 週齢マウス両側海馬への AAV ベクターの定位注入により、FUS ノックダウンマウスモデルを作成した。それぞれのモデルに対し、生化学的、電気生理学的、細胞生物

学的解析をおこなった。またマウスモデルに関しては 12 週齢以降に高次行動解析を行った。

（倫理面への配慮）

動物を利用する研究については、動物愛護の観点より当施設の動物実験に関する指針・マニュアルを遵守した。

### C. 研究結果

FUS ノックダウンマウスの高次機能解析の結果、Elevated plus maze (高架式十字試験) において open arm への滞在時間、滞在回数の増加がみられた。また open field test において移動距離の増加、novel object recognition test において探索時間の延長、social interaction test において fighting 減少の増加や、interaction の増加といった異常所見がみられた。これらの脱抑制、多動、社会性行動の異常といった高次機能障害は ALS/FTLD の症候を一部再現するものと考えられた。

高次機能解析の結果から、FUS ノックダウンモデルにおけるシナプス機能の異常の存在が推定されたため、シナプス関連タンパク質の発現の変化を解析した。培養神経細胞、およびノックダウンマウス海馬検体において、免疫染色及びウエスタンブロットで AMPA 受容体サブユニットである GluA1 の発現量の低下が示された。シナプス機能

関連分子の mRNA の安定性を評価すると、FUS ノックダウンにより GluA1 に特異的に mRNA の安定性が低下した。RNA-IP 実験において FUS タンパクと GluA1 mRNA の結合が示され、GluA1 mRNA 3'末端配列に設計したビオチン化プローブを用いた RNA プルダウンアッセイにより、同部位への FUS の結合が確認された。免疫沈降実験の結果から、FUS は細胞質において CPSF6、PAN2、PABP といった 3'末端のプロセッシングに関わる既知の諸因子と複合体を形成していることが明らかとなり、FUS ノックダウンにより PABP と PAN2、CPSF6 の結合性が低下し複合体が不安定化していることが示された。ポリ(A)鎖長を評価するポリアデニレーションアッセイにおいて、FUS ノックダウン神経細胞の細胞質分画では、GluA1 mRNA ポリ(A)鎖長の短縮がみられた。この結果から、FUS ノックダウンによる複合体の不安定化により GluA1 mRNA ポリ(A)鎖が短縮し、mRNA が不安定化する機序が明らかとなった。

培養神経細胞を用いた電気生理学的実験では、FUS ノックダウンにより mEPSC の振幅低下が見られ、ポストシナプス機能の低下が示唆された。

Golgi-Cox 染色を用いた形態学的検討では、FUS ノックダウンマウスにおいて、スパイン密度に変化は見られず、成熟スパインの減少がみられた。

mEPSC の振幅低下及び成熟シナプス減少の所見は、GluA1 の強制発現により改善された。また FUS ノックダウンマウスにおける elevated plus maze における open arm への滞在時間及び進入回数の増加は GluA1 強制発現により改善が確認された。

#### D. 考察

FUS ノックダウンマウスは脱抑制、多動、社会性行動の異常といった高次機能障害を示し、これは ALS/FTLD の症候を一部再現するモデルとして有用であると考えられた。

我々は FUS ノックダウンモデル神経細胞、ノックダウンマウスを用い、FUS の新規の標的分子として GluA1 を同定し、神経細胞樹状突起スパインにおいて FUS がポリ(A)鎖の長さの調節を介

して GluA1 の mRNA の安定性を制御することを示した。

FUS ノックダウンによって生じるシナプス成熟の減少や行動異常は GluA1 の発現によって改善されることから、FUS による GluA1 の発現制御は ALS/FTLD の病態において重要な役割を担うことが示唆された。

#### E. 結論

ALS/FTLD モデルマウスの高次機能障害の一部を再現する有用なモデルとして FUS ノックダウンマウスを確立した。

FUS は GluA1 mRNA の安定性の調節を介してポストシナプス機能を制御し、ALS/FTLD の症候発現に重要な役割を担うと考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Factors affecting longitudinal functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis patients. Watanabe H, Atsuta N, Nakamura R, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Tomiyama H, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Aoki M, Tsuji S, Nakano I, Kaji R, Sobue G. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2014 Dec 30;1. [Epub ahead of print]
2. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Nakamura R, Koike H, Sobue G. BMJ Open. 2014 May 14; 4(5): e005213. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005213.

3. Lower motor neuron involvement in TAR DNA-binding protein of 43 kDa-related frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, Tatsumi S, Mimuro M, Iwasaki Y, Katsuno M, Iguchi Y, Masuda M, Senda J, Ishigaki S, Udagawa T, Sobue G. *JAMA Neurol.* 2014 Feb; 71(2): 172-9. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5489.
4. The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons. Honda D, Ishigaki S, Iguchi Y, Fujioka Y, Udagawa T, Masuda A, Ohno K, Katsuno M, Sobue G. *FEBS Open Bio.* 2013 Nov 20; 4: 1-10. doi: 10.1016/j.fob.2013.11.001. eCollection 2013.
5. Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. *Hum Mol Genet.* 2015 Jan 15; 24(2): 314-29. doi: 10.1093/hmg/ddu445.

## 2. 学会発表

1. FUS regulates AMPA receptor function and ALS/FTLD-associated behaviors via GluR1 mRNA stabilization  
Tsuyoshi Udagawa, Yusuke Fujioka, Motoki Tanaka, Daiyu Honda, Satoshi Yokoi, Taku Nagai, Kiyofumi Yamada, Masahisa Katsuno, Masahiro Sokabe, Haruo Okado, Shinsuke Ishigaki, Gen Sobue. Cold Spring Harbor meeting on Translational Control, 2014 September 2-6
2. FUS は GluA1 mRNA 安定性の調節を介してシナプス機能及びFTLD様行動を制御する  
渡辺宏久、宇田川剛、藤岡祐介、本田大祐、横井聡、石垣診佑、田中基樹、曾我部正博、永井拓、山田清文、岡戸晴生、大野欽司、勝

野雅央、祖父江元 第33回日本認知症学会  
2014.11.29-12.1

3. The involvement of glial cells in FUS-related ALS/FTLD pathophysiology -FUS knock-down glial cells have a neuro-protective effect. \*Y. FUJIOKA, S. ISHIGAKI, T. SHIROMIZU, T. UDAGAWA, D. HONDA, S. YOKOI, K. IKENAKA, M. KATSUNO, T. TOMONAGA, G. SOBUE; Neuroscience 2014, Nov 15-19, Washington, DC, USA

## H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

## 分担研究報告書

# ES/iPS 細胞から運動神経細胞の分化誘導を促進する低分子化合物のスクリーニング

研究分担者：高橋良輔<sup>1)</sup>

研究協力者：後藤和也<sup>1,2)</sup>，今村恵子<sup>2,3)</sup>，三谷幸之介<sup>4)</sup>，饗庭一博<sup>5)</sup>，中辻憲夫<sup>5)</sup>，  
山下博史<sup>1)</sup>，井上治久<sup>2,3)</sup>

- 1) 京都大学神経内科
- 2) 京都大学 iPS 細胞研究所
- 3) CREST
- 4) 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター
- 5) 京都大学物質・細胞統合システム拠点

### 研究要旨

ALS の病態解明、新規治療薬開発のために iPS 細胞から高効率で脊髄運動神経細胞を入手する必要がある。そこで iPS 細胞から運動神経細胞への分化誘導効率を上昇させる低分子化合物を同定するための化合物スクリーニングの実験系を確立した。今後、スクリーニングアッセイを行い、化合物を同定する。

### A. 研究目的

ALS の病態解明や新規治療薬の開発において、患者と同じ遺伝情報を持つ運動神経細胞を作製できる iPS 細胞は有用なマテリアルとして期待されている。しかし、iPS 細胞から脊髄運動神経細胞への分化効率は高くはない（Dimos *et al.* 2008, Ebert *et al.* 2009, Karumbayaram *et al.* 2009, Amoroso *et al.* 2013）という解決すべき課題がある。そこで iPS 細胞から運動ニューロンへの分化効率を上昇させる低分子化合物を同定するための化合物スクリーニングの実験系を確立した。

### B. 研究方法

健常者由来の iPS 細胞に対して神経系以外への分化を阻害するため、SMAD pathway を抑制する化合物を加えて神経幹細胞へと誘導する。その後、96 well plate へ播種し、化合物を投与してハイスループットスクリーニング(HTS)を行う。運動神経細胞の検出方法としては運動神経細胞の早期マーカーである HB9 の遺伝子座に GFP をノックインした iPS 細胞を用いる。GFP 陽性細胞を

フローサイトメトリーで測定することにより分化誘導効率を上昇させる低分子化合物を同定する。（倫理面への配慮）

本研究については、京都大学の倫理委員会の承認を得た上で、検体を提供頂く方に説明の上、同意を得ている。

### C. 研究結果

iPS 細胞から 80%以上の効率で神経幹細胞へと分化させることができることを確認した。また、陽性コントロールとして用いることが可能な化合物を同定した。

### D. 考察

今後、スクリーニングアッセイを行い得られたヒット化合物に対して濃度依存性や機序解明のための実験も行っていく必要がある。

### E. 結論

HTS システムを確立した。今後、スクリーニングアッセイを行っていく予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

後藤和也, Chemical library screening to identify a small compound that promotes motor neurons differentiation from iPSCs/ESCs, 第37回神経科学大会, 横浜、2014年9月11日～9月13日

後藤和也, Chemical library screening to identify a small compound that promotes motor neurons differentiation from iPSCs/ESCs, Cold Spring Harbor Asia meeting on Disease Modeling and Drug Discovery, Sucho, 2014年8月25日～8月29日

## H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

## 分担研究報告書

# Parkin による不良ミトコンドリア処理の分子機構

研究分担者：田中啓二<sup>1)</sup>

研究協力者：松田憲之<sup>1)</sup>

公益財団法人東京都医学総合研究所

### 研究要旨

ミトコンドリアは、細胞内のエネルギー産生工場である。ミトコンドリアの呼吸鎖（電子伝達系）で生じた膜電位（プロトン勾配）を原動力として ATP を合成するとき、electron（電子）の漏出が必然的におきるため ROS（reactive oxygen species）の発生は不可避である。膜電位が低下した（ATP 合成が減弱した）不良ミトコンドリアは、DNA、タンパク質、脂質などを傷害して機能不全を引き起こす ROS の産生を亢進させるため迅速に浄化（分解除去）する必要がある。この不良ミトコンドリアを処理するため、ミトコンドリアは自律的に分裂（不良品の隔離）と融合（健康なミトコンドリアの維持）を繰り返し、結果として細胞の恒常性を維持している。細胞増殖によって不良ミトコンドリアを処理できないニューロンなどの非分裂細胞では、損傷ミトコンドリアの細胞内浄化は、細胞の生存に必須である。我々は、近年、PINK1（タンパク質リン酸化酵素）と Parkin（ユビキチンリガーゼ）のミトコンドリアの品質管理における役割を集中的に解析してきた。これまでに膜電位の低下に連動した PINK1 の量的（分解抑制）・質的（自己リン酸化による活性化）制御機構を明らかにし、不良ミトコンドリアの監視機構を解明してきたが、本年は、長い間不明であった PINK1 に依存した細胞質 Parkin の活性化機構と不良ミトコンドリアへのリクルート機構の解明に成功した。その結果、不良ミトコンドリアはユビキチン化された後に選択的にクリアランス（浄化）され、残存した健康なミトコンドリアは自律的に増殖し、細胞内のミトコンドリアは正常に維持される。このミトコンドリアの品質管理機構の破綻は、神経細胞における病態発症（ニューロン死・神経変性）の主因と考えられており、本研究は、今後、筋萎縮性側索硬化症（ALS：amyotrophic lateral sclerosis）を含む各種神経変性疾患に対する新しい治療薬開発のヒントになることが期待できる。

### A. 研究目的

最近、神経変性を引き起こす損傷ミトコンドリアの細胞内浄化（クリアランス）に関する研究が、国内外で激しく競合している。とくに若年性にパーキンソン病を発症させる原因遺伝子として同定された二つの遺伝子 *PINK1*（タンパク質リン酸化酵素をコード）と *Parkin*（ユビキチンリガーゼをコード）の遺伝子産物のミトコンドリアの品質管理における役割の解明が急速に進展している。

これまでに我々は（1）*PINK1* はミトコンドリアが正常である場合、恒常的に分解されていて検出できないが、脱共役剤(uncoupler)、例えば CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone)処理によってミトコンドリアの膜電位を低下させると、この損傷ミトコ

ンドリアの外膜に *PINK1* が蓄積すること、（2）そして蓄積した *PINK1* が細胞質の *Parkin* を損傷ミトコンドリアに移行させる“リクルート作用”を発揮すること、（3）細胞質（サイトゾル）から損傷ミトコンドリアに移行した *Parkin* は潜在型から活性型に転換すること、（4）損傷ミトコンドリア上で活性化した *Parkin* は、多数の外膜タンパク質をユビキチン化すること、（5）外膜タンパク質のユビキチン化は、K48 リンク型と K63 リンク型のポリマーが混在すること、（6）損傷ミトコンドリアには、26S プロテアソームと p97ATPase/VCP/CDC48 が同時に細胞質から移行すること、（7）ユビキチン化した損傷ミトコンドリアの外膜タンパク質は、26S プロテアソー

ムによるランダムに消化を受けること、(8) 最終的に大部分の損傷ミトコンドリアは、p62 依存的に封入体として隔離されるか選択的オートファジー (Mitophagy) によって分解除去されること、等の知見を報告してきた。これらの結果から、PINK1-Parkin 経路がミトコンドリアの異常を感知/監視して、(膜電位が低下して ATP が合成できない) 損傷ミトコンドリアをプロテアソームとオートファジーの連携作用でクリアランスするかあるいは有害性を発揮しないように封入体として隔離していることを提案してきた。

しかしながら PINK1 と Parkin は、細胞内でその活性が厳格に制御されているが、その分子機構は殆ど不明であった。我々は昨年までに、PINK1 の量的 (分解抑制) 制御機構と質的 (自己リン酸化による活性化) 制御機構を解明し、不良ミトコンドリアの監視機構を分子レベルで明らかにしてきた。しかし、ミトコンドリア処理に關与する Parkin の制御機構は、不明であった。我々は、本年、長い間不明であった PINK1 に依存した細胞質 Parkin の活性化機構と不良ミトコンドリアへのリクルート機構の解明に成功した。

## B. 研究方法

**Cells, plasmids, and transfections:** HeLa cells and MEFs were cultured at 32 - 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) containing 1x nonessential amino acids (Gibco), 1x sodium pyruvate (Gibco), and 10% fetal bovine serum (Gibco). *PINK1*<sup>-/-</sup> MEFs stably expressing WT or mutant PINK1 were established as reported previously. To generate HeLa cells stably expressing PINK1-3xFlag, HeLa cells transiently expressing mCAT1 were infected with recombinant retroviruses harboring PINK1-3xFlag. Recombinant retrovirus was made using PLAT-E cells as reported previously. Plasmids for expressing WT or various mutants of Parkin and ubiquitin were described previously or were newly constructed by conventional methods. Plasmid transfections were performed using the

transfection reagent FuGene6 (Roche) for HeLa cells and polyethylenimine (Polyscience) for *PINK1*<sup>-/-</sup> MEFs. To depolarize the mitochondria, cells were treated with 15 -30 μM CCCP (Wako) for 2 - 3 h unless otherwise specified.

**Phos-tag assay:** To detect phosphorylated proteins via SDS-PAGE, 12.5-15 % polyacrylamide gels containing 50μM phos-tag acrylamide (Wako chemicals) and 100 μM MnCl<sub>2</sub> were used. After electrophoresis, phos-tag acrylamide gels were washed with gentle shaking in transfer buffer containing 0.01 % SDS and 1 mM EDTA for 10 min and then incubated in transfer buffer containing 0.01 % SDS without EDTA for 10 min according to the manufacturer's protocol. Proteins were transferred to PVDF membranes and analyzed by conventional immunoblotting as follows.

## Immunoblotting (IB) and Immunofluorescence (IF):

To observe autoubiquitylation of GFP-Parkin (an indicator for the re-establishment of the latent E3 activity of Parkin) in IB, lysates of HeLa cells or MEFs were collected in TNE-N<sup>+</sup> buffer [150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA and 1 % NP-40] in the presence of 10 mM NEM, which protects ubiquitylated proteins from deubiquitylase activity. For phosphorylation analysis in IB, lysates from MEFs and HeLa cells were collected in the presence of PhosSTOP (Roche) to inhibit phosphatase activity. To detect various proteins via IB, the anti-ubiquitin antibody P4D1 (Santa Cruz, 1:1,000), Z0458 (DAKO, 1:500), anti-SUMO-1 (GMP-1) antibody 21C7 (ZYMED, 1:500), anti-Parkin antibody PRK8 (Sigma, 1:2,000), CS2132 (MBL, 1:1,000), anti-Flag antibody 2H8 (Transgenic, 1:500), anti-Mfn2 antibody ab56889 (Abcam, 1:500), anti-PINK1 antibody BC100-494 (Novus, 1:1,000), anti-GFP antibody ab6556 (Abcam, 1:500), anti-VDAC1 antibody ab2 (Calbiochem, 1:1,000), and anti-FoF1 antibody (gift from Dr. T. Ueno,

1:1,000) were used. To investigate the requirement of diglycine motif of phosphomimetic ubiquitin, we replaced the C-terminal diglycine motif with either Val or Ala (G75V/G76V and G75A/G76A) and coexpressed with GFP-Parkin(S65E) or GFP-Parkin(W403A). Note that auto-ubiquitylation bands of GFP-Parkin are slightly shifted upward by conjugation of exogenous Flag-ubiquitin(S65D) when Flag-ubiquitin(S65D) was coexpressed. In contrast, auto-ubiquitylation bands of GFP-Parkin are downward when phosphomimetic ubiquitin with the C-terminal diglycine motif mutation were coexpressed, because only endogenous ubiquitin can conjugate. For IF experiments, HeLa cells were fixed with 4 % paraformaldehyde, permeabilized with 50 µg/mL digitonin, and stained with a primary antibody [anti-GFP antibody ab6556 (Abcam, 1:500), anti-Flag antibody 2H8 (Transgenic, 1:500), anti-Tom20 antibody FL-145 (Santa Crus Biotech., 1:3,000)] and a 1:2,000 dilution of the secondary antibody [Alexa Fluor 488- or 568-conjugated anti-mouse or -rabbit IgG antibody, (Invitrogen)]. Cells were imaged using a laser-scanning microscope (LSM510; Carl Zeiss, Inc.) and image brightness was adjusted in Photoshop (Adobe). For statistical analysis, subcellular localization of Parkin and ubiquitin were analyzed in 100 cells across three experiments, and statistical significance was calculated using a one-tailed Student's t-test. When mitochondrial localization of phosphorylation-deficient ubiquitin(S65A) was examined by IF, HeLa cells were treated with CCCP for 3 h to reach a plateau because overproduction of S65A delayed Parkin activation. To detect the autoubiquitylation of GFP-Parkin in IB, the cell lysate of HeLa cells or MEFs was collected in the presence of 10 mM *N*-ethylmaleimide to protect ubiquitylated Parkin from deubiquitylation. For IF experiments, cells were fixed with 4%

paraformaldehyde, permeabilized with 50 µg/ml digitonin, and stained with primary antibodies described below and the following secondary antibodies: mouse and/or rabbit Alexa Fluor 488, 568, and 647 (Invitrogen). Cells were imaged using a laser-scanning microscope (LSM510; Carl Zeiss, Inc.). Image contrast and brightness were adjusted in Photoshop (Adobe).

**LC-MS/MS analysis of ubiquitin:** Mass spectrometric analysis was performed as previously reported with some modification. To identify endogenous S65 phosphorylation ubiquitin with a K63-GlyGly branch, whole cell lysates of intact PINK1-expressing HeLa cells ± CCCP treatment were subjected to SDS-PAGE, stained with CBB, and in-gel trypsin digestion was carried out. Gels were extensively washed with MilliQ water (Millipore), the low (<14k)-, middle (14-55k)-, or high (>55k)-molecular weight fractions of gels were excised, cut into 1-2 mm pieces, and destained with 1 ml of 50 mM ammonium bicarbonate (AMBC) buffer containing 50% acetonitrile (ACN) with agitation for 1 h. A final 100% ACN wash was performed to ensure complete gel dehydration. In-gel digestion was prepared by diluting modified sequencing grade trypsin (Promega) and lysyl endopeptidase (Wako) with 50 mM AMBC buffer, pH8.0, containing 5% ACN. The digestion solution was added to the gel pieces and incubated overnight at 37°C. Digests were quenched and extracted by addition of 50 µl of 50% ACN containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solution for 1 h by shaking. The digested peptides were recovered into fresh Protein LoBind tubes and an additional extraction was performed with 70% ACN containing 0.1% TFA solution for 30 min. The extracted peptides were concentrated to 20 µl by speed-vac. The concentrated peptides were prepared in 0.1% TFA. The resultant peptides were analyzed on a nanoflow UHPLC instrument (Easy nLC 1000, Q-Exactive MS and nano electrospray ion



source; Thermo Fisher Scientific) with the raw data processed using Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). MS spectra were analyzed using Protein Discoverer software version 1.3 (Thermo Fisher Scientific). The fragmentation spectra were 26 searched against the UniProt database with the MASCOT search engine. Data were prepared with PinPoint software version 1.3 (Thermo Fisher Scientific).

**LC-MS/MS analysis of immunoprecipitated K48-linked polyubiquitin chains:** Lysates of HeLa cells stably expressing PINK1-3×Flag were incubated with Apu2 (a rabbit mAb for the K48-linked polyubiquitin chain) or anti-SAMM50 (a rabbit mAb serving as a control IgG) coupled to 10 µl of Protein G-Sepharose 4FF for 2 h at 4°C. The beads were washed three times with TNE-N<sup>+</sup> buffer and boiled in Laemmli's sample buffer. Immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE and stained with CBB. The high-molecular-weight fractions (> 60 k) in the gel were excised, and in-gel digestion using trypsin and lysyl endopeptidase (Wako) was carried out as described previously. The resultant peptides were analyzed on a UHPLC system coupled to a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific). To generate extracted ion chromatograms, the raw data were processed using Xcalibur software (Thermo Scientific) and directly analyzed against the SwissProt database using Proteome Discoverer (Thermo Scientific) with the Mascot search engine (Matrix Science).

### C. 研究結果

#### ① 不活性型 Parkin の活性化機構 (Nature 2014)

膜電位が低下した不良ミトコンドリアの外膜上に蓄積し、活性型に転換した PINK1 (Okatsu et al., Nat Commun 2012 and J Cell Sci. 2015) が Parkin を活性化する仕組みについては、タンパク質リン酸化酵素である PINK1 が Parkin をリン酸化して活性化するというモデルが最も考え易い。そこでこの可能性を検討すると、Parkin の N-末

端側の UBL (Ubiquitin-like) ドメインの 65 番目の Ser 残基がリン酸化されることを見出した (Iguchi et al., J Biol Chem. 2013)。そこで、この部位に変異を入れてリン酸化型模倣体を作製したが、Parkin は殆ど活性型に変換しなかった。このことは、Parkin の活性化に必要な PINK1 の標的分子が別に存在することを示唆している。

そこで Parkin の UBL ドメインが、ユビキチンと立体構造的に類似していることを念頭に、ユビキチンが Parkin で活性化されることを推定した。実際、細胞を脱共役剤(uncoupler)である CCCP で処理すると、Parkin のみならずユビキチンも Ser<sup>65</sup> がリン酸化されることを突き止めた。加えてリン酸化模倣型 Parkin にリン酸化模倣型ユビキチンを加えると、不活性型 Parkin は、PINK1 非依存的に活性型に転換された (Koyano et al, Nature 2014)。この結果、Parkin の活性化 (二重の阻害機構の解除) 機構が分子レベルで解明された。

#### ② 細胞質 Parkin の不良ミトコンドリアへのリクルート機構 (J Cell Biol 2015)

細胞を CCCP で処理すると、PINK1 の蓄積に依存して細胞質の Parkin は、不良ミトコンドリアへリクルートされる。これまでに、Parkin の基質として同定された複数のミトコンドリア外膜タンパク質が Parkin の受容体であることを示す論文が報告されていた。しかし一方、特異的な膜局在化シグナルを融合した PINK1 を細胞内のオルガネラに異所的に発現させると、PINK1 が存在するミトコンドリア以外のオルガネラに Parkin がリクルートされる。この結果から、PINK1 が Parkin の受容体である可能性も示唆されたが、僅かな PINK1 が大量の Parkin を不良ミトコンドリアにリクルートできることや、安定な相互作用が観察できないことから、この仮説も説明し難いものであった。

一方、Tony Hunter のグループは、リン酸化 Parkin がポリユビキチン鎖と相互作用することからポリユビキチン鎖が Parkin の受容体である可能性を示唆した。しかし、我々の検証では、この相互作用は、非常に弱く再現性の乏しい結果と

なった。我々は、ユビキチンがリン酸化されることを明らかにしたので、リン酸化型ポリユビキチン鎖とリン酸化模倣型 Parkin の相互作用を調べると、インビボ及びインビトロで強い相互作用が確認された。この結果、リン酸化型ポリユビキチン鎖が Parkin の受容体であることが明らかとなった (Okatsu et al., J Cell Biol 2015)。

#### D. 考察

本研究で示したように、PINK1 による Parkin とユビキチンのリン酸化修飾という予想もしなかったことの発見により Parkin の活性化機構が解明された。翻訳後修飾分子として多彩な役割を担っているユビキチンがリン酸化修飾されて機能変換することの発見は、国内外の研究者たちを驚かせた。またリン酸化ポリユビキチン鎖が Parkin のリセプターであることの発見も、常識外の受容体の概念であり、関係者たちを喫驚させた。このしくみによって、膜電位が低下した不良ミトコンドリア上で PINK1 が蓄積・活性化されると、Parkin が活性化され、ミトコンドリアにリクルートする。この活性化された Parkin はさらにユビキチン化反応を促進し、生成されたリン酸化ポリユビキチン鎖は、また活性化に転換した Parkin を受け取り、この Positive-feedback システムの作動によって、少量の PINK1 の蓄積によって大量の Parkin が不良ミトコンドリアにリクルートされる優れた機構が合理的に説明できた。

本研究の結果、PINK1-Parkin 経路の活性制御機構が分子レベルで明らかとなり、ミトコンドリアの品質管理機構の全貌が解明された。今後は、PINK1-Parkin によるミトコンドリアのユビキチン化が Mitochondrial Clearance (選択的オートファジーによるミトコンドリアのクリアランス) を如何に誘導するか機構解明が、残された主題となる。またこの PINK1-Parkin によるミトコンドリアの品質管理の破綻が孤発型パーキンソン病やその他 ALS を含む他の多くの神経変性疾患の発症にどのように関わるかが大きな課題となっている。

#### E. 結論

不良ミトコンドリアを適切に処分するためには、膜電位が低下したミトコンドリアを的確に識別する機構が存在する。その中心分子が PINK1 であり、PINK1 はミトコンドリアの膜電位が低下すると、分解から免れて蓄積するとともに分子間相互作用による二カ所での自己リン酸化によって活性型に転換される。これが不良ミトコンドリアをモニターし、不良品として処理する初反応である。不良ミトコンドリアは、PINK1 の量的 (quantity control) 及び質的 (quality control) 制御によって識別されている。この成果に加えて、本年、我々は、不活性型 Parkin の活性化機構と細胞質 Parkin のサイトゾルからミトコンドリアへのリクルート機構の解明に成功した。これらの結果から、PINK1-Parkin 系によるミトコンドリアの品質管理機構の基本的な動作原理が確立した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Kei Okatsu, Fumika Koyano, Mayumi Kimura, Hidetaka Kosako, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka\* and Noriyuki Matsuda\* (2015) Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. (\*cocorrespondences) J Cell Biol in press.
- (2) Morimoto D, Walinda E, Fukada H, Sou YS, Kageyama S, Hoshino M, Fujii T, Tsuchiya H, Saeki Y, Arita K, Ariyoshi M, Tochio H, Iwai K, Namba K, Komatsu M, Tanaka K, Shirakawa M. (2015) The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. Nat Commun. 2015 Jan 20;6:6116. doi: 10.1038/ncomms7116.
- (3) Okatsu K, Kimura M, Oka T, Tanaka K, Matsuda N. (2015) Unconventional PINK1 localization mechanism to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. J Cell Sci. in press.

- (4) Pack, Chan-Gi., Yukii, H., Toh-e, A., Kudo, T., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Sakata, E., Murata, S., Yokosawa, H., Sako, Y., Baumeister, W., Tanaka, K., and Saeki, Y. (2014) Quantitative live-cell imaging reveals molecular dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. *Nat Commun.* 2014, doi:10.1038/ncomm4396
- (5) Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E.A., Trempe, J.F., Saeki, Y., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510,162-166.
- (6) Kageyama, S., Sou, Y.S., Uemura, T., Kametaka, S., Saito, T., Ishimura, R., Kouno, T., Bedford, L., Mayer, R.J., Lee, M.S., Yamamoto, M., Waguri, S., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2014) Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway. *J Biol Chem.* 289, 24944-24955.

## 2. 学会発表

- (1) Keiji Tanaka : Oxidative Stress and Autophagy. "Symposium 17" 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRRI 2014) Kyoto International Conference Center, KYOTO JAPAN (March 26<sup>th</sup> 2014)
- (2) Keiji Tanaka : The PINK1-Parkin System Controls Mitochondrial Homeostasis to Suppress The Cause of Parkinson's Disease. The KSU International Symposium on Cutting-Edge of Life Sciences. Musubiwaza-hall at Mibu Campus of KSU in Kyoto (May 30<sup>th</sup> -31<sup>th</sup> 2014)
- (3) Keiji Tanaka : Basic Mechanisms and Physiopathological Roles of Eukaryotic Proteasomes. Nobel Forum Lecture at

Karolinska Institute (September 18<sup>th</sup> 2014) Stockholm, SWEDEN.

- (4) Keiji Tanaka : Surveillance of Mitochondrial Homeostasis by the PINK1-Parkin System. EMBO Conference Ubiquitin & Ubiquitin-like Proteins: At the crossroads from chromatin to protein. 19 – 24 October 2014 Buenos Aires, Argentina.

## H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし

## 分担研究報告書

# TDP-43 の神経細胞毒性

研究分担者：長谷川成人<sup>1)</sup>

研究協力者：山下万貴子<sup>1)</sup>、野中 隆<sup>1)</sup>、新井哲明<sup>2)</sup>、細川雅人<sup>1)</sup>、秋山治彦<sup>1)</sup>

1) 東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野

2) 筑波大学 医学医療系

### 研究要旨

TDP-43 は ALS や FTLD の特徴的異常構造物の主要構成蛋白質である。しかしながら、TDP-43 がどのような機序で細胞毒性を示すかについては未だ明らかではない。我々は培養細胞モデルを用いて、全長 TDP-43 と TDP-43 の C 末端断片が別の機序により神経毒性を発揮することを明らかにした。全長 TDP-43 は過剰発現すると核に局在したが、カスパーゼの活性化、G2/M 期の停止を伴う強い細胞死を誘導した。一方、C 末端断片を発現した細胞においては、TDP-43 断片は凝集したが、全長 TDP-43 の場合のような細胞死は確認できなかった。共焦点顕微鏡による観察から RNA polymerase II と、specificity protein 1 (Sp1) や cAMP-response-element-binding protein (CREB) などの転写因子が凝集体と共局在していることが判明し、FTLD の患者脳切片の免疫組織染色により、RNA polymerase II が TDP-43 凝集体に局在していることを確認した。また患者脳の解析から、TDP-43 蓄積組織において、アポトーシスを示唆する証拠は得られなかった。これらの結果は、患者脳で TDP-43 は凝集体形成を介して神経変性がおこっていることを示唆する。

### A. 研究目的

TDP-43 は筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、および前頭側頭葉変性症 (FTLD) などの神経変性疾患において出現するユビキチン陽性細胞内凝集体の主要構成成分であり、その病変の分布や広がりや臨床像に強い関係があることが示されている。

TDP-43 の凝集と神経変性の機序を明らかにし、その凝集を抑制することができれば ALS や FTLD などの難治性疾患の治療につながることを期待される。本研究では、TDP-43 の全長分子、あるいは部分欠損変異体を培養細胞内に発現させることにより、TDP-43 凝集体形成や細胞変性を観察し、TDP-43 凝集体形成と神経変性の関係や細胞変性のメカニズムについて検討することを目的とした。

### B. 研究方法

ヒト神経細胞株 SH-SY5Y に、全長ヒト TDP-43、あるいは患者脳においてその蓄積が確認されている TDP-43 の C 末断片を発現するコンストラクトを導入し、細胞の増殖、細胞内における TDP-43

の蓄積などについて検討した。遺伝子導入から 3 日後の細胞において、BrdU 取り込み能を測定することにより細胞増殖能を評価し、また共焦点レーザー生物顕微鏡にて凝集体と共局在する因子の検索を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換えは遺伝子組換え実験計画書を研究所の委員会に提出して承認を得た。剖検脳の解析は、当研究所の倫理委員会に研究の申請を提出して承認を受け、実験指針に従って行った。

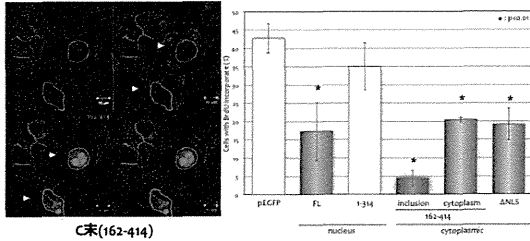
### C. 研究結果

#### 1. TDP-43 凝集による増殖阻害

本研究では BrdU の取り込みを指標に細胞増殖を検討した。これは従来のチミジン取り込みによる増殖測定法に代わるもので、増殖細胞では DNA 合成の際に BrdU を取り込むことを利用し、増殖細胞と非増殖細胞を区別する方法である。C 末断片を発現させた細胞を見ると、凝集体形成細胞は染色されない(つまり増殖していない)ことが判明

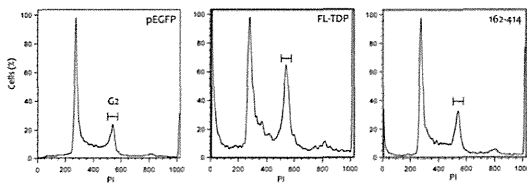
した。定量の結果、凝集体を形成している細胞ではほぼ完全に BrdU の取り込みが阻害されており、つまり、増殖が停止していることが判明した。一方で、全長 TDP を発現した細胞でも、BrdU を取り込んでいる細胞の割合が半分以下まで低下しており、増殖抑制が起こっていることが示された。

各種 TDP-43 発現細胞における細胞増殖活性 (BrdU 取り込み)  
The proliferation of cells with TDP-43 aggregates was strongly suppressed



そこで、ここで見られた増殖停止・あるいは抑制についてさらに検討するために、細胞周期解析を行った。その結果、全長 TDP-43 発現細胞において、G2/M 期細胞の増加が観察され、細胞周期に異常がおきていることが観察された。一方、C 末端断片を発現させた細胞においては、細胞周期の異常はあまりみられず、凝集体形成による神経細胞毒性は全長 TDP-43 とは異なるメカニズムにより誘導されることが示唆された。

各種 TDP-43 発現細胞における細胞周期解析

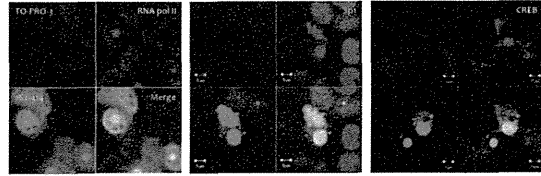


## 2. C 末端断片の凝集と毒性

凝集体形成と細胞変性との関連についてポリグルタミン病において転写制御の異常が疾患の発症あるいは進行に重要であることが報告されている。そこで TDP-43 の C 末端断片凝集と細胞毒性の関係について、転写制御機構に着目して解析した。転写活性本体である RAN pol II や、転写複合体を形成する基本転写因子 Sp1 や CREB などについて検討した。その結果、いずれの分子も TDP-43 の C 末端断片凝集体と共局在することが示された。

また、RNA pol II に関して免疫沈降を行ったところ、C 末端断片を発現した細胞で、RNA pol II が TDP-43 とより多く共沈することが示された。

RNAポリメラーゼおよび各種基本転写因子の免疫染色



## 3. 患者脳における解析

実際の患者脳の細胞で同様の現象が起こっているかを確認するため、FTLD 患者脳の切片を免疫組織染色することにより検討した。その結果、リン酸化 TDP 陽性の dystrophic neurites が RAN pol II でも陽性であり、実際の患者さん脳内においても両者が共局在していることが示された。

さらに患者組織から可溶性、不溶性画分を調製し、アポトーシスの基質である PARP の断片化について解析した。その結果、異常 TDP-43 が蓄積する組織においても PARP のカスパーゼ断片の増加は検出されず、患者脳においてもアポトーシスとは異なるメカニズムで変性が起こっていることが示唆された。

## D. 考察

TDP-43 が ALS や FTLD の特徴的異常構造物の構成蛋白質であり、家族性 ALS の遺伝学的解析からもその異常が神経変性を誘導し、ALS を発症させることは明らかであるが、どのような機序で毒性を発揮するかについては、様々な議論があるところである。我々は、培養細胞にヒト TDP-43 の全長、あるいは様々な断片を発現させ、その凝集体形成能や細胞毒性について検討してきたが、今回の解析から、全長 TDP-43 は過剰発現させるだけで、細胞周期の異常を引き起こし、アポトーシスを強く誘導することが明らかとなった。これまで、野生型ヒト TDP-43 や発症と連鎖する変異を導入した変異 TDP-43 を過剰発現するトランスジェニックマウスが多数系統作製され、ALS 様の運動失調を呈することが報告されているが、これらの過剰発現マウスにおいても、類似の機序で細胞変性が起こっており、その結果として、細胞死や運動障害の症状が出ている可能性が考えられる。

一方、TDP-43 の C 末端断片を発現させた細胞では明らかなアポトーシスや強い細胞死は検出されなかったが、C 末端が凝集体を形成している細

胞においては、ほぼ 100%の割合で BrdU の取り込み阻害が観察されており、凝集体形成による細胞増殖抑制が認められた。また凝集体には転写の中心的役割を果たす RAN pol II や、転写複合体を形成する基本転写因子(Sp1, CREB など)が凝集体にとりこまれており、それらが機能異常を引き起こして増殖抑制につながっていることが強く示唆された。

実際の患者剖検脳の解析からも、凝集体形成と転写因子の関わりが示されると共に、患者脳ではトランスジェニックマウスで示されているようなカスパーゼの活性化やアポトーシスは検出されなかった。

## E. 結論

以上の結果などから、ALS や FTLD では、TDP-43 が凝集体を形成し、その結果、転写障害などが引き起こされて徐々に変性が進行することが強く示唆される。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamashita M, Nonaka T, Hirai S, Miwa A, Okado H, Arai T, Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M. Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions. *Hum Mol Genet* 23:4345-56, 2014.
2. Hasegawa M, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DM, Saito Y, Murayama S. 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 127:303-305, 2014.
3. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimosawa A, Akiyama H, Hasegawa M. Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol Commun.* 2:88, 2014.
4. Kawakami I, Hasegawa M, Arai T, Ikeda K, Oshima K, Niizato K, Aoki N, Omi K, Higashi S, Hosokawa M, Hirayasu Y, Akiyama H. Tau accumulation in the

nucleus accumbens in tangle-predominant dementia. *Acta Neuropathol Commun.* 2:40, 2014.

5. Baborie A, Griffiths TD, Jaros E, Perry R, McKeith IG, Burn DJ, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Rollinson S, Pickering-Brown S, Robinson AC, Davidson YS, Mann DM. Accumulation of dipeptide repeat proteins predates that of TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration associated with hexanucleotide repeat expansions in C9ORF72 gene. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014 in press.
6. Davidson YS, Barker H, Robinson AC, Thompson JC, Harris J, Troakes C, Smith B, Al-Saraj S, Shaw C, Rollinson S, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Pickering-Brown S, Snowden JS, Mann DM. Brain distribution of dipeptide repeat proteins in frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathol Commun* 2:70, 2014.
7. Konno T, Tada M, Shiga A, Tsujino A, Eguchi H, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Nishizawa M, Onodera O, Kakita K, Takahashi H. C9ORF72 repeat-associated non-ATG-translated polypeptides are distributed independently of TDP-43 in a Japanese patient with c9ALS. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40, 783-788, 2014.
8. Asada A, Yamazaki R, Kino Y, Saito T, Kimura T, Miyake M, Hasegawa M, Nukina N, Hisanaga S. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates and induces the degradation of ataxin-2. *Neurosci Lett.* 563:112-7, 2014.

### 2. 学会発表

1. Hasegawa M: Prion-like features in alpha-synucleinopathies. XVIIIth International Congress of Neuropathology 2014. W3: Prion-like mechanisms in neurodegenerative disorders. Rio de Janeiro, Brazil [2014,9. 15.] (招待講演)

2. Hasegawa M: Pathological alpha-synuclein spreading explain the disease progression. Neuroscience 2014. Joint Symposium of the Japan Neuroscience Society and the Korean Society of Brain and Neuroscience: Molecular Mechanisms underlying Parkinson Disease. Yokohama, Japan [2014,9. 12.] (招待講演)

3. Hasegawa M: Prion-like propagation of pathological proteins in neurodegenerative diseases. 2014 Yonsei BK21 PLUS - Igakuken Joint Symposium, Seoul, Korea [2014, 6. 19.] (招待講演)

4. Hasegawa M, Dan A, Watanabe S, Kondo H, Akiyama H, Mann DM, Saito Y, Murayama S; 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014"; 2014. 3. 17. Tokyo, Japan.

#### H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

##### 1. 特許申請

1) 特願 2013-72977 フルベストラントを含む神経変性疾患の治療又は予防のための医薬組成物

2) 特願 2013-72983 アモジアキンを含む神経変性疾患の治療又は予防のための医薬組成物

3) 特願 2013-72989 ミトタンを含む神経変性疾患の治療又は予防のための医薬組成物

4) 特願 2013-74065 ニフェジピン等を含む神経変性疾患の治療及び／又は予防用医薬組成物

5) 特願 2013-74114 レチノイン酸等を含む神経変性疾患の治療及び／又は予防用医薬組成物

6) 特願 2013-74155 ブロムヘキシン塩酸塩等を含む神経変性疾患の治療及び／又は予防用医薬組成物

##### 2. 実用新案登録

該当なし

## 分担研究報告書

# Tg-SOD1G93A の血液中変動分子の質量分析計を用いた網羅的解析

研究分担者：船越 洋<sup>1)</sup>

研究協力者：島田（大谷）若菜<sup>1)</sup>，阿久津弘明<sup>1)</sup>，永井一真<sup>1)</sup>，稲村美子<sup>1)</sup>，  
寺林博之<sup>1)</sup>，日野千紘<sup>1)</sup>，加藤信介<sup>2)</sup>，加藤雅子<sup>2)</sup>，青木正志<sup>3)</sup>

1) 旭川医科大学教育研究推進センター

2) 鳥取大学脳研病理

3) 東北大学神経内科

### 研究要旨

私たちは、筋萎縮性側索硬化症（ALS）への治療戦略を考える上で、神経系の病態に基づき研究を進めてきた。そして肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor: HGF）が病態の進行抑制作用、運動機能改善作用、さらに寿命延長効果があることを動物モデルで示してきた。さらにその分子機序解析も進めてきた。東北大学青木正志教授らのグループにより ALS モデル Tg ラットへ発症時からの rhHGF タンパク質の持続的髄腔内注射により病態の改善、寿命延長効果が示された。現在 HGF の髄腔内投与の治験（臨床相 I 相）が進み、臨床相 II 相の準備が進められている。本研究では、HGF の治療効果の至適化を目指し研究を進めることを目的としている。私たちが注目したのは、ALS の原因遺伝子の報告が続く中、いずれも神経系に発現が限定していないにもかかわらず、病態発現が神経系に集中している点である。この理由が、血液脳関門閉鎖の存在である。この存在により循環血液中にその誘導されてくる種々の因子の恩恵を神経系が享受できないためと仮定し、研究をスタートさせた。本年度は、その解析条件の検討を行った。Tg-SOD1G93A マウスの血液中の変動因子を継時的に質量分析計で解析し、野生-littermate と比較解析した結果、種々の因子が変動することを見出した。今後、これらの変動因子の解析をさらに進め、その中から HGF と協調して病態進行を抑制、あるいは reverse する因子の組み合わせを明らかにしていきたい。

### A. 研究目的

ALS は原因遺伝子がいくつも同定された。いずれも神経系に限定して発現していないにもかかわらず、病態のメインは神経系に主に局限しており、回復することなく進行し死に至る難病である。神経以外のヒトでの病態の報告は少なく、これは一方で、ALS の原因遺伝子の 1 つ SOD1G93A を過剰発現するマウス (Tg-SOD1G93A) においては、脊髄の病理変化に先行して肝臓で病理変化が起こるが、神経系の病態の進行変化と異なり、回復していく現象が報告されている。本研究では、この相違の分子機序の解明を最終ゴールとし、その解明により HGF による ALS 治療効果をさらに向上

させる（病態の reverse）の基盤確立を目指している。

### B. 研究方法

Tg-SOD1G93A マウスの病態の Time Course にしたがって、血液、脳脊髄液と脊髄を採取し、対照動物としてその WT-littermate と比較し、変動分子を質量分析計で網羅的に解析する。

（倫理面への配慮）

本研究は旭川医科大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の承認のもと、動物愛護に勤めて研究を進めた。



## C. 研究結果

WT littermateと比較し、種々の分子が変動することが明らかとなってきた。その変動は、病態の進行で変化した。

## D. 考察

ALSを含め多くの神経変性疾患は治療法のない難病である。1日も早い治療法開発が望まれている。最近多数の原因遺伝子が次々と報告されているが、いずれも神経系に局限した発現をしていないにもかかわらず、主に神経系に病態が発現する。この理由は未だに明らかになっていない。私たちは、ALSのモデルトランスジェニックマウスにおいては、肝臓に一旦病理変化がおこるが、神経系に症状がでる前に回復する現象が報告され、私たちはこの点に注目し研究をすすめている。HGFがALSに加えて、昨年脊髄小脳変性症7型(SCA7)モデルノックイン動物に対して疾患進行遅延効果があることを明らかにした。この作用機序としては、神経細胞に対する直接的神経栄養作用に加えて、小脳のグリア細胞であるバグマングリア細胞におけるグルタミン酸トランスポーター

(EAAT2/GLT-1およびGLAST)の発現低下を抑制する効果を見出した。これらの結果は、異なる原因遺伝子によって惹起される疾患に対する共通の分子機序に焦点をあてた治療戦略の可能性を示している。このように病態進行の抑制、運動機能の改善や寿命の延長効果は種々の疾患において明らかとなってきた。私たちはこの観点で、他の神経変性への効果を展開している。一方で、いずれの疾患でも病態進行をよく抑制し、機能の改善効果があるが、完全な病態のreverseには成功していない。

私たちは、この原因として血液脳関門の存在に着目した。すなわち、神経系は体循環系とは血液脳関門を介して独立している。一方で、他の臓器は体循環系を介して種々の因子の再生効果を楽しむことができるために病態発症が抑制される、あるいはreverseされるという仮説である。実際、ヒトALS患者における肝臓の病理変化の報告があるが、同様にTg-SOD1G93Aマウスにおいても同様の病理変化を認めることがと鳥取大学の加藤信介らによ

り報告された。最も興味深い点は、その病理変化は神経系の病態が顕著になる前に、回復していく現象である。私たちは、まさにこの点に注目して解析を進めた。その結果、この病理変化の時期に一致して循環血液中にHGFが誘導されること、さらにHGFの中和抗体のミニポンプにより持続注射により、その回復が抑制されることが明らかになった(島田若菜、船越洋他、unpublished results)。私たちは、この回復抑制効果が部分的であることから、肝臓の病理変化の回復現象がHGFに依存すること、ただしその効果は他の因子との協調作用を必要としていると考えた。この協調因子の同定により、その因子を神経系にHGFと同時に投与できたら、神経系に対する夢のreverse治療が可能になると期待している。1日も早いALSへの治療法を患者に届けるために、HGFの髄空内投与が最も期待される。さらにreverseを可能とする次世代療法を想定して、今後さらなる解析をすすめ、ALS患者そして他の神経変性患者の福音となる夢のreverse療法確立を目指したい。

## E. 結論

本研究がすすめば、神経系と神経系以外での病態の回復の相違を担う分子の同定が可能になると期待できる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Matsumoto K, Funakoshi H, Takahashi H, and Sakai K: HGF-Met Pathway in Regeneration and Drug Discovery. *Biomedicines* 2, 275-300, 2014.
2. Molnarfi N, et al., Hepatocyte growth factor: a regulator of inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, in press.
3. Benkhoucha M, et al., Hepatocyte growth factor limits autoimmune neuroinflammation via GILZ expression in

- dendritic cells. **J. Immunol**, 193(6):2743-52, 2014.
4. Kitamura K, et al., Recombinant human hepatocyte growth factor promotes functional recovery after spinal cord injury. **Neuroprotection and Regeneration of the spinal cord**, 147-167, 2014. (Springer)
  5. Bessede A, et al., Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. **Nature** 511, 184-190, 2014.
  6. Maeta A, et al., Contributions of Tryptophan 2,3-dioxygenase and Indoleamine 2,3-dioxygenase to the Conversion of D-Tryptophan to Nicotinamide Analyzed by using Tryptophan 2,3-dioxygenase -Knockout Mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 78(5), 878-881, 2014.
  7. Too LK, et al., The kynurenine pathway contributes to long-term neuropsychological changes in experimental pneumococcal meningitis. **Behavioural Brain Research**, 270,179-195, 2014.
  8. Imai K, et al., Metachronous Pancreatic Cancer Originating From Disseminated Founder Pancreatic Intraductal Neoplasias (PanINs): Study using human specimen to reconsider mode of pancreatic cancer progression and recurrence. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, in press.
  9. 清水範彦, 島田 (大谷) 若菜, 角山圭一, 早川寿行, 千葉博信, Sun Woong, 中村敏一, 船越 洋: 神経特異的HGF遺伝子発現はALSモデルTg マウスの運動神経変性とグリオシスを抑制し寿命を延長する. 日本実験動物技術者協会北海道支部会誌 (印刷中)

## 2. 学会発表

該当なし

## H. 知的財産権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

## 2. 実用新案登録

該当なし

## 分担研究報告書

# ALS における新規の内在性神経保護因子の同定

研究分担者：山中宏二<sup>1)</sup>

研究協力者：渡邊征爾<sup>1)</sup>、小峯 起<sup>1)</sup>、遠藤史人<sup>1)</sup>、木下 専<sup>2)</sup>、宮川 剛<sup>3)</sup>、若杉桂輔<sup>4)</sup>

1) 名古屋大学 環境医学研究所 病態神経科学分野

2) 同 理学研究科

3) 藤田保健衛生大学

4) 東京大学 総合文化研究科

### 研究要旨

ALS における新規の内在性神経保護因子として、ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 およびシステインプロテアーゼ阻害因子 シスタチン C (CysC) の保護効果を検討した。SIRT1 を中枢神経系で過剰発現する変異 SOD1 マウスでは、生存期間の有意な延長が見られ、熱ショックタンパク質 HSP70i の発現誘導と SOD1 凝集体の減少が生じていた。SIRT1 の過剰発現に伴って、熱ショック因子 HSF-1 の脱アセチル化が顕著に亢進していたことから、SIRT1 が HSF-1 の脱アセチル化を介して HSP70i の発現を誘導し、毒性の高い SOD1 凝集体を減少させて神経保護効果を示したと考えられた。一方、CysC は培地へ添加することで神経系培養細胞 Neuro2a および初代培養運動神経細胞に対して、変異 SOD1 由来の毒性に伴う神経細胞死を抑制した。CysC による神経細胞保護には、AMP 活性化プロテインキナーゼを介したオートファジーの賦活化とカテプシン B の阻害効果が協調的に発揮されることが必要であることも判明した。さらに、CysC はリソソームから酸化ストレス依存的に細胞質中へ漏出して凝集したことから、CysC による神経保護効果と ALS 特異的封入体であるプニナ小体の形成との間に関連性があることが示唆された。以上の結果から、SIRT1 および CysC は ALS における新規の内在性神経保護因子であり、ALS の治療標的として有望であることが示唆された。

### A. 研究目的

ALS をはじめとした神経変性疾患において、神経細胞の変性をいかに食い止めるかは重要な課題である。特に、ミスフォールドした異常タンパク質の蓄積は神経細胞に対する毒性の発揮に重要であると考えられており、異常タンパク質に由来する毒性から神経細胞を保護できる因子の開発が求められている。このような神経保護因子の候補分子として、我々は SIRT1 と CysC に着目した。SIRT1 は、長寿関連遺伝子として知られる酵母 Sir2 の哺乳類におけるホモログであり、ヒストン脱アセチル化酵素として機能する。多くの先行研究から、SIRT1 は代謝や細胞周期、タンパク質品質管理機構を制御することによって、各種ストレスから細胞を保護することが報告されている。最

近、SIRT1 の基質である熱ショック因子 HSF-1 を活性化することが熱ショックタンパク質の発現誘導を介して  $\alpha$ -synuclein など他の神経変性疾患の病因タンパク質に対して保護効果をもつことが明らかとなり、SIRT1 の活性化が神経保護に有効であることが示唆された。また、シスタチン C (CysC) は内在性のシステインプロテアーゼ阻害因子であり、ALS では疾患特異的な封入体であるプニナ小体の主要な構成タンパク質として知られている。先行研究から、脳脊髄液中の CysC 濃度が高い ALS 患者は低い ALS 患者と比較して生存期間が長いことや CysC に飢餓ストレスなどからの保護効果があることが報告されており、ALS においても CysC が神経細胞保護的に機能する可能性が示唆された。

そこで、本研究では SIRT1 および CysC を ALS における新たな内在性神経保護因子の候補として、神経保護効果の検討とその分子機序の解明を目的として研究を行った。

## B. 研究方法

マウスプリオンプロモーターの制御下で SIRT1 を過剰発現するマウス (PrP-SIRT1) を作製した (木下専 教授との共同研究)。中枢神経系での SIRT1 過剰発現の影響を明らかにするため、PrP-SIRT1 マウスの生存期間の評価および行動解析を実施した (宮川剛 教授との共同研究)。次に、この PrP-SIRT1 マウスを 2 系統の SOD1G93A マウス (高発現系統: SOD1G93A-H, 低発現系統: SOD1G93A-L) と交配してダブルトランスジェニックマウス (SOD1G93A-H/PrP-SIRT1, SOD1G93A-L/PrP-SIRT1) を作製し、発症時期および生存期間に変化が生じるか検討した。各疾患時期におけるマウス腰髄を摘出して、SIRT1, HSP70i, SOD1 の発現量を比較した。また、疾患末期のマウス腰髄を Triton X-100 で可溶化した際の不溶性成分を SDS で可溶化し、含まれる SOD1 凝集体の量を比較した。

ヒト CysC は、大腸菌で組換え体として発現、精製した (若杉桂輔 准教授との共同研究)。得られた CysC を神経系培養細胞 Neuro2a の培地に添加し、生存細胞数を顕微鏡下での観察またはミトコンドリアの還元活性を指標とする MTS 法により評価した。また、運動神経細胞に対する CysC の保護効果を検討するため、Hb9 プロモーターの制御下で運動神経細胞特異的に GFP を発現するマウス (Hb9-GFP マウス) と SOD1G85R マウスを交配して得られる二重陽性の胎児脊髄からニューロン・グリアの初代混合培養系を樹立し、培地に CysC を加えた場合に GFP 陽性細胞の数に変化が生じるのか検討をした。CysC の細胞保護機構を明らかにするため、CysC 処理した Neuro2a 細胞を用いて LC3-II の量および AMP 活性化キナーゼ (AMPK) のリン酸化から、AMPK を介したオートファジー経路の活性化を評価した。また、各種の阻害剤および変異 CysC を用いて、オートファジー誘導能とプロテアーゼ阻害能が

CysC の細胞保護効果に及ぼす影響を MTS 法による細胞生存率の変化から評価した。更に、CysC をフルオルセインイソチオシアネート (FITC) で蛍光標識して培地に添加し、CysC の細胞内局在と変異 SOD1 の発現に伴う局在変化を蛍光顕微鏡により検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験計画は名古屋大学において承認されており、同大学の研究倫理指針に則って本研究を実施した。

## C. 研究結果

PrP-SIRT1 マウスは、野生型と同程度の寿命を示し、神経学的または行動学的な変化は認められなかった。また、PrP-SIRT1 マウスの脳および脊髄では、SIRT1 が野生型の約 3 倍量で発現しており、それに伴って HSF-1 の脱アセチル化が亢進し、HSP70i の発現量が増加していた (図 1A)。SOD1G93A-L/PrP-Sirt1 マウスは、SOD1G93A-L マウスと比較して約 15 日間、生存期間が延長した (図 1B)。一方、SOD1G93A-H/PrP-Sirt1 マウスでは、生存期間の延長は全く見られなかった。また、いずれのマウスでも発症時期には変化は見られなかった。疾患末期の SOD1G93A-L/PrP-Sirt1 のマウス腰髄では Triton X-100 不溶性の SOD1 凝集体が顕著に減少しており (図 1C)、毒性の高い SOD1 凝集体の分解が生存期間の延長に関与していることが示唆された。

培地に添加した CysC は変異 SOD1 を発現する Neuro2a 細胞および初代培養運動神経細胞を保護した (図 2A, B)。CysC 処理した細胞では、オートファジーの指標である LC3-II の量が AMPK の活性増加に依存して増加しており、CysC が AMPK を介してオートファジーを賦活化していることが判明した。オートファジーの阻害により CysC の神経保護効果が失われたことから、オートファジーの誘導は神経保護に必須であると考えられたが、AMPK のアゴニストであるアカデシンでは細胞を保護できず、オートファジーのみでは細胞保護に十分ではないことも明らかとなった。そこで、別の機構を探索するため、FITC 標識した CysC を用いて細胞内局在を調べたところ、CysC は通常、