

祖父江 元

名古屋大学大学院医学系研究科・教授

## 孤発性 ALS のモデル動物作成を通じた分子標的治療開発

### 1. 研究実施の概要

今年度は、まず、我々が作成した孤発性 ALS の 2 つの疾患モデルの解析により、これらが病態を反映する優れたモデルとして機能しうることを示した。孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおいて発現が低下している dynactin1 の発現変化を再現する線虫モデルでは、進行性の運動機能障害、運動ニューロン変性を認めるとともに、患者で観察された cyclin C の発現増加、核への局在変化を再現していた。この線虫は孤発性 ALS の病態における細胞周期関連因子の関与を検証する重要なモデルになりうると考えられた。一方、患者脊髄運動ニューロンで観察される RNA 編集酵素活性の低下を反映する ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウスは、ALS 病変の選択性を再現していた。さらに、患者における ADAR2 mRNA の低下の程度は、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常を引き起こすに充分であり、運動ニューロン死の直接原因となることを明らかにした。もう一つの重要なモデルとして、ALS におけるミスセンス変異が報告されている TDP-43 の野生型および変異型を発現するマウスの作成を行い、表現型の観察を開始した。また、ALS の疾患進行因子としてのグリア細胞の機能を解明するため、変異型および野生型 SOD1 マウスの脊髄の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイで解析し、ミクログリアとアストロサイトに由来する 182 遺伝子を同定した。さらに、変異型 SOD1 を発現するシュワン細胞も ALS 疾患進行に関与することを明らかにした。

### 2. 研究実施内容 (文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

#### dynactin1 を標的分子とする孤発性 ALS モデルの作成

我々は、レーザーマイクロダイセクション法による孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者脊髄からのサンプリングによって、運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイルを作成し、多くの ALS 病態関連分子を同定してきた。これらのうち、dynactin1 の遺伝子発現低下を RNAi 法により線虫に展開することにより、運動ニューロンの機能障害と変性、及びそれに基づく表現型を呈示することを示した。

一方、孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンでは、dynactin1 の発現低下とともに、細胞周期関連因

子である cyclin C の顕著な発現増加と核内移行が認められる。そこで、dynactin1 ノックダウン培養細胞や線虫においてこの現象が再現されるかどうかを検証した。この結果、cyclin C は、その発現量が増加するとともに核成分の顕著な増加が認められ、孤発性 ALS に類似した局在変化を再現することができた。次に、cyclin C の発現変化を dnc-1 (ヒト dynactin1 の相同体)KD 線虫モデルにおいて in situ hybridization 法で検証したところ、やはりコントロールに比べて cic-1 の mRNA は顕著に増加していた。さらに、局在変化を検証するために共発現した TagRFP-cic-1 は、コントロール群では核外に局在したが、dnc-1 KD モデルでは、一部の運動ニューロンにおいて、核移行が認められた。

さらに、cyclin C の高発現と核局在をシミュレートする線虫モデルの作成に取り組み、NLS-GFP-cic-1 を単独で高発現させると、dnc-1 KD に類似した運動ニューロン障害を示唆する表現型を得た。これらのことより、孤発性 ALS における dynactin1 遺伝子発現レベルの低下による神経変性機序のひとつとして、細胞周期の deregulation が関与していることが示唆され、dynactin1 ノックダウン線虫は孤発性 ALS の病態、特に細胞周期関連因子の異常を反映する重要な疾患モデルであると考えられた。

#### ADAR2コンディショナルノックアウトマウスを用いた孤発性ALSの病態解析及び治療法開発基盤の確立

孤発性 ALS 運動ニューロンに、疾患特異的、部位選択的に生じている、AMPA 受容体 GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集低下、およびこの部位の特異的 RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2)の活性低下が、運動ニューロン死に関わる分子異常であることを、Cre/LoxP 系により運動ニューロン選択的なADAR2 遺伝子のコンディショナルノックアウト ADAR2<sup>fllox/fllox</sup>/VACHT-Cre マウス(以下 CKO マウス)を開発し、明らかにした。CKO マウスでは、脊髄運動ニューロンの他、脳神経核(VII, XII など)の運動ニューロン死が生じていたが、ALS では変性しにくい外眼筋支配神経核(III,IV,VI)では、ADAR2 活性が低下し GluR2 Q/R 部位の RNA 編集率が同程度に低下したにもかかわらず、神経脱落がみられず、ALS 病変の選択性を再現していた。

さらに、ADAR2 に依らず編集型 GluR2 (GluR-B<sup>R</sup>)を発現する変異マウスとの交配により、GluR2 Q/R 部位以外の RNA 編集異常は、ADAR2 欠失に伴う脊髄運動ニューロン死に関与しないことを明らかにした。また、ヘテロ接合体 CKO マウスにおける解析から、未編集型 GluR2 の発現は少量であっても脊髄運動ニューロンの生存を脅かす分子異常であること、ADAR2 活性が半減することによりこの分子異常が引き起こされること、を明らかにした。

以上の結果は、孤発性 ALS 運動ニューロンに見られる ADAR2 mRNA の低下の程度は、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常を引き起こすに充分であり、運動ニューロン死の直接原因となることを示している。患者組織に見出された分子異常により、運動ニューロン死が引き起こされ、病変の選択性が類似していることから、この CKO マウスは孤発性 ALS の病態を再現するモデルであり、病態解明、治療法開発研究への有用性が期待できる。

#### TDP-43 の gain of function を再現する ALS モデル:

TDP-43 のミスセンス変異が一部の孤発性 ALS や優性遺伝 ALS 家系にみられることが最近相次いで報告されている。その病態の発症機序として、変異型 TDP-43 が本来のタンパク機能と関係のない獲得毒性を発揮することで、変異 SOD1 マウスのように運動神経変性を来す可能性を検

討する。本年度は、野生型および変異型 TDP-43 をユビキタスに発現するトランスジェニックマウスの作成を開始した。現時点で、野生型および患者由来の変異 TDP-43 を発現するマウスを合計4種類作成し、その founder における遺伝子発現を確認し、次世代のマウスを得ることができた。今後、発現量の高いものを交配し、系統を樹立することを目指すとともに、founder の表現型を長期観察する。

#### ALS におけるグリア関連病態の解明と標的分子の探索・同定:

これまでに我々は、グリア細胞における病的変化が ALS モデルの疾患進行を加速することを明らかにしてきた。そこで、ALS の疾患進行因子としてのグリア細胞の機能を解明するため、疾患進行期の変異 SOD1 マウスと野生型 SOD1 を発現したマウスの脊髄病巣から RNA を抽出し、遺伝子発現の異常を cDNA マイクロアレイで網羅的に解析した。生存期間がほぼ同じ SOD1<sup>G37R</sup>, SOD1<sup>G85R</sup> の疾患進行期(約11ヶ月齢)の脊髄病巣に共通して異常発現する 225 の遺伝子をこれまでに同定した。本年度は、細胞群特異的なトランスクリプトームを用いてその遺伝子群がどの細胞種に由来しているかを分類、検討した。その結果、ミクログリアとアストロサイトに由来するものが約 80 パーセントを占め、182 遺伝子であった。現在、これらの遺伝子群のうちミクログリアの遊走や浸潤に関わる遺伝子の病態への関与を検証する交配実験を行っている。

また、末梢神経のミエリン鞘の構成に重要なグリア細胞であるシュワン細胞の ALS への関与を、共同研究により検討した。細胞群特異的に変異 SOD1 を除去できる *LoxSOD1<sup>G37R</sup>* マウスとシュワン細胞に特異的に Cre タンパクを発現する P0-Cre マウスを交配した。シュワン細胞において変異 SOD1 (酵素活性を有する)を除去すると疾患進行はより加速し、それはシュワン細胞における神経栄養因子 IGF-1 の産生低下を伴っていた。この実験から、シュワン細胞においては変異 SOD1 による毒性よりも、活性型 SOD1 による活性酸素の除去が運動神経に保護的であることが示唆され、シュワン細胞も ALS 疾患進行に関与することが明らかとなった (1)。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「祖父江」グループ

- ① 研究分担グループ長:祖父江 元 (名古屋大学、教授)
- ② 研究項目  
孤発性 ALS のモデル動物作成を通じた子標的治療法開発

#### (2)「郭」グループ

- ① 研究分担グループ長:郭 伸(東京大学、准教授)
- ② 研究項目  
ADAR2 コンディショナルノックアウトマウスを用いた孤発性 ALS の病態解析および治療法開発基盤の確立

#### (3)「山中」グループ

- ①研究分担グループ長:山中 宏二((独)理化学研究所、ユニットリーダー)
- ②研究項目

孤発性 ALS モデルにおけるニューロン・グリア連関の解明と治療標的の同定

#### 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

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

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)