

## 研究課題別中間評価結果

1. 研究課題名： 孤発性 ALS のモデル動物作成を通じた分子標的治療開発

2. 研究代表者： 祖父江 元（名古屋大学大学院医学系研究科 教授）

### 3. 研究概要

これまでの ALS 研究は、90%以上を占める孤発性 ALS ではなく、遺伝子変異が明らかになったごく稀な家族性 ALS の原因遺伝子、中でも SOD1 遺伝子を中心に疾患モデルが作成され展開されてきた。本研究では、3 つの研究グループが孤発性 ALS の病態を直接反映するような疾患モデルを開発し、各々の連携の下、効率的な研究を推進した。

祖父江グループは、孤発性 ALS 患者脊髄における運動ニューロン特異的な網羅的遺伝子発現解析の結果に基づき、運動ニューロン特異的に dynactin-1 の発現を抑制するノックダウン線虫を作出した。このモデルにおいて、運動機能障害、軸索輸送障害、軸索から始まる神経変性所見、オートファゴソームの軸索内輸送障害に起因するオートファジーの障害、オートファジーの修飾によるレスキュー効果を明らかにした。また、山中グループとの連携により、運動ニューロン特異的 dynactin-1 ノックアウトマウスを作成した。

郭グループでは、孤発性 ALS 運動ニューロン特異的に観察されるグルタミン酸受容体サブタイプ AMPA 受容体のサブユニットである GluR2 の RNA 編集異常に基づき、RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2)を運動ニューロン特異的にノックアウトする AR2 マウスを開発した。このマウスは孤発性 ALS 患者の症状、病理所見の選択性を再現していた。さらに、AR2 マウスは ALS の病理学的特徴である TDP-43 の局在異常を再現することより、両者の分子連関研究への展開を導いた。

一方、TDP-43 に関しては、核における TDP-43 の機能喪失(loss of function)(祖父江グループ)、TDP-43 の毒性獲得(gain of function)(山中グループ)の立場から疾患モデルの作成を行なった。

祖父江グループは、TDP-43 ノックダウン細胞の神経変性機序としてゲラニルゲラニル化が障害されることによる Rho family GTPase の活性低下を明らかにした。また、運動ニューロン特異的 TDP-43 ノックアウトマウスを作成し、運動ニューロンの萎縮、体重減少、筋力低下といった病理変化、表現型を示すことを見いだした。

山中グループは TDP-43 野生型、核外移行シグナル変異、N 末端欠失変異を発現するトランスジェニックマウスを作成した。この結果、TDP-43 毒性発現の場が核内であることを示唆する結果を得た。さらに、TDP-43 はスプライソソーム構成成分であり、U snRNA の発現を制御すること、孤発性 ALS 病巣において U snRNA の発現量が増加することを見いだした。すなわち、ALS 病態におけるスプライシング異常の機序に関してこのスプライソソーム異常が関与している可能性を明らかにした。

また、祖父江グループでは TDP-43 と並び孤発性 ALS の病態への関与が示唆されている FUS について、遺伝子発現を抑制する細胞モデルを作成した。FUS ノックダウンにより、運動ニューロンの神経突起の長さ、分岐数が減少することを見だし、さらに選択的 splicing 解析を行ったところ、蛋白の isoform 変化を引き起こす遺伝子のスプライシング異常を見いだした。

山中グループでは、祖父江グループと共同して孤発性 ALS 患者の脊髄病巣における遺伝子発現の異常を cDNA マイクロアレイにより網羅的に解析し、自然免疫経路や食食、NFκB 経路に関わる遺伝子発現の亢進を明らかにした。自然免疫経路の関与については、MyD88、TRIF のノックアウトマウスと SOD1G93A マウスの3重交配実験を行ったところ、TRIF を欠失した変異 SOD1 マウスでは罹病期間の短縮、疾患進行の著

しい加速、生存期間の短縮がみられた。この原因として、TRIF 欠失によりグリア細胞でのケモカイン発現異常やタンパク質分解機構の不調が惹起されることを明らかにした。

#### 4. 中間評価結果

##### 4-1. 研究の進捗状況及び研究成果の現状

###### (1) 研究の進捗状況

- ① 孤発性 ALS モデル動物の作成が、現時点での重要マイルストーンであり、実際に複数のモデル作成に成功し、これらモデルの病態再現も得られている。
- ② Dynactin-1 のノックアウトマウスの作成が予定より遅れたものの、優れたモデルを開発し、研究全体は計画通り、順調に進展しており、目標も達成できていると判断する。
- ③ これまでの ALS モデルは遺伝性 ALS の病態を反映するものであり、孤発性 ALS の病態を反映するとは言えなかった。本研究では孤発性 ALS の患者組織において見出された dynactin-1 の発現低下、AMPA 受容体サブユニット GluR2 の RNA 編集異常を再現するモデルを確立することに成功した。このことは孤発性 ALS の病態解析、治療法の開発にとって必要な分子標的を特定し、治療効果を評価できるツールを得た点でインパクトは大きい。また、孤発性 ALS の病態に深く関与する TDP-43, FUS についても loss of function, gain of function 両面から新規動物モデルを作成した点も評価される。
- ④ 治療法の全くない、しかも ALS の大多数を占める孤発性 ALS の発症につながる分子異常を特定し、その分子メカニズムを再現するモデル動物を開発したことは、今後、病態の解明、治療法の開発に展望をもたらしたという意味で社会的にも大いに評価されて然るべきである。

###### (2) 研究実施体制

異なるモデル動物の解析から ALS としての分子病態理解を達成すべく、リーダーシップを発揮している。モデルの性格上、当面は各グループがそれぞれのモデルについて検討を重ねることになるが、研究の進展如何で final common pathway の同定に至る可能性もあり、その際にはさらにリーダーシップが求められるであろう。

##### 4-2. 今後の研究に向けて

Dynactin-1 発現抑制モデルマウスを用いて、その分子カスケードを明らかにする、ADAR2 ノックアウトマウスの解析、TDP-43 ノックアウトマウスの解析、FUS機能喪失モデルの解析、ALS におけるグリア病態の解析に取り組むとしている。

異常、病態に関連する分子をモデルマウスを解析することで明らかにするという戦略は十分評価するが、一方では、3つのグループがそれぞれのモデルを用いて独立した研究を行っているため、今後は研究の焦点化、治療法の開発への橋渡しを意識して分散から集中へと切り替える、あるいは、得られた関連分子の相互作用を明らかにすることを目指してほしい。このような観点からは、FUS モデル解析の追加が妥当であるかについて十分に検討して進めて欲しい。

ALS の病態解明と治療法の開発が当初の目標であるので、ターゲット分子を特定し、治療法への糸口を見出すところへ持って行ってほしい。ALS 分子病態の理解を一步進めることは確実であり、現在作りあげている研究基盤に効果的に研究資源を集中することで課題解決に近づくことが期待できる。

##### 4-3. 総合的評価

研究計画は順調に進展している。

モデルマウスの作成とその解析の成果がえられつつあり、ALS の病態に関連する分子の解明が期待できる。ターゲット分子が特定されれば、当然のことながら、治療法の開発へと進展できることから、決定的な治療法のない ALS の治療に大いなる貢献が期待される。

研究者間で異なるモデルを開発し、解析しているために、やや焦点の分散化が見られるので、最終的には有力な仮説に収束させることが望まれる。