

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく
診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 20 年度採択研究代表者

平成 21 年度
実績報告

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

孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおいて認められる dynactin-1 の遺伝子発現低下を再現する線虫モデルを作成し、神経変性の証拠を確認するとともに、細胞周期抑制因子の発現による治療効果を明らかにした。今後はマウスモデルでの解析も推進し、細胞周期異常、神経変性に至る経路を解明し、新たな治療戦略を開拓する。

同じく患者で認められる GluR2 サブユニット Q/R 部位の RNA 編集低下を再現する運動ニューロン選択的 ADAR2 ノックアウトマウスを作成し、選択的な細胞死経路に基づき緩徐な運動ニューロン死が生じることを明らかにした。さらに、ADAR2 活性低下と孤発性 ALS の病因分子として注目されている TDP-43 のプロセッシング異常の関連を検討した。

一方、TDP-43をターゲットに、loss of function, gain of function、細胞内局在に基づくモデル開発を行った。loss of function細胞モデルでは、神経障害の経路として、Rho familyの活性低下を明らかにした。さらに、gain of functionの立場から、野生型および変異型TDP-43をユビキタス及び神経特異的に発現するマウスモデルを作成し解析を進めている。また、TDP-43を核および細胞質に局在させる細胞モデルを作成し、その毒性発揮部位が核内であることを明らかにした。

さらに、ALS で見られるグリア活性化の意義と病態解明を進めるために、SOD1 マウスの脊髄病巣の遺伝子発現解析を行い、グリア由来の ALS 病態分子を同定した。この結果に基づき、変異 SOD1 マウスと自然免疫経路を遮断するマウスの交配実験を行い、進行の加速、生存期間短縮を明らかにした。今後の解析を通じ、疾患進行に関与する炎症関連分子の同定を目指す。

§ 2. 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分子標的治療法開発

(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、チームリーダー)
- ② 研究項目: 孤発性 ALS モデルにおけるニューロン・グリア関連の解明と治療標的の同定

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1) dynactin1 を標的分子とする孤発性 ALS モデルの解析と治療法開発

これまでに我々は、孤発性ALS患者運動ニューロンにおいて認められるdynactin-1の遺伝子発現低下を線虫において再現することによって、新しい疾患モデルの作成と解析を行ってきた。このモデルでは、coiler uncと呼ばれるコリン作動性運動ニューロンの障害で見られる表現型を示す一方、患者運動ニューロンでも観察される細胞周期関連因子cyclin Cの顕著な発現増加と核内移行を認めた。今年度は、この線虫モデルにおいて、神経変性の証拠を得るため電子顕微鏡による観察を含む検討を加え、さらに細胞周期抑制因子による治療を行った。

dynactin-1ノックダウン線虫では、ventral cordにおける軸索不整、シナプス小胞に発現するタンパクであるシナプトブレブリンの局在異常が認められ、電頭においては軸索に多数の渦状構造物や空胞が細胞膜近傍に接して観察された。細胞体でも軸索に比して少数ながらこれらの構造物が認められたが、核の形態は保たれていた。これらのことより、この線虫モデルにおける神経変性の直接的証拠が得られ、形態的には軸索主体の変性が生じることが明らかになった。

一方、cyclin Cの顕著な発現増加と核内移行は、神経変性過程において細胞周期が回転する方向に働いていると考えられ、これを抑止することによりdynactin-1ノックダウン線虫の治療を試みたところ、coiler uncの表現型や首振り回数、ventral cordの形態異常の改善を認めた。

dyanctin-1の発現低下から細胞周期異常、神経変性に至る経路の解明は今後の課題であるが、本モデルの解析により孤発性ALSの新たな病態解明と治療法開発が進展している。また、マウスレベルへの展開も進捗しており、dynactin-1のfloxマウスを樹立することに成功した。

さらに、ユビキチンリガーゼDorfinによる治療研究や⁵⁾、将来の臨床応用を見据えた孤発性ALSの自然歴把握、バイオマーカー開発に向けての研究も推進した^{2,3)}。

(2)ADAR2 を標的分子とする孤発性 ALS モデルの解析と治療法開発

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)の活性低下を再現する運動ニューロン選択的 ADAR2 遺伝子のコンディショナルノックアウト(以下 CKO マウス)の解析を進めた。

このマウスでは脊髄運動ニューロンの 40-50%に Cre recombinase が発現しており、その全てで、ADAR2 が欠損し、GluR2 Q/R 部位の RNA 編集が全く行われていないことを明らかにした。ADAR2 を発現しない運動ニューロンは神経細胞死に陥るが、そのスピードは Cre の発現がピークに達する 5 週齢から 8 週齢で最も速く、4 週齢では ADAR2 欠損運動ニューロンの 10%未満の脱落に過ぎないが、8 週齢では 50%以上に達した。他方、12 ヶ月齢でも数%の ADAR2 欠損運動ニューロンが残存し、ADAR2 欠失が細胞死を決定する要因ではあるが、その時期に関しては確率的であることが明らかになった。CKO マウスは 5 週齢以降 6 ヶ月齢まで、週齢と共に運動機能が低下した。病理学的には、運動ニューロン数の減少と共に脊髄前根の変性、神経筋接合部における運動ニューロン終末の変性、除神経骨格筋の増加、電気生理学的な fibrillation、fasciculation 電位の出現が見られ、運動機能低下が運動ニューロンの変性に依ることが明らかになった。

さらに、ADAR2 欠損による RNA 編集活性の低下が神経細胞死を引き起こすメカニズムを解析するために、CKO マウスを、ADAR2 活性無しに編集型 GluR2 を発現する GluR-B^{R/R}マウスとの間での継代掛け合わせにより、CKO/GluR-B^{R/R} マウスを作製した。このマウスは、ADAR2 を欠失しているが、編集型 GluR2 を発現するので、様々な ADAR2 による編集部位の内 GluR2 Q/R 部位を除く部位は未編集のままである。このマウスの運動機能は正常であり、脊髄運動ニューロンでは ADAR2 を欠失した運動ニューロンにも脱落が見られなかった。このことから、ADAR2 欠失による運動ニューロン死は専ら GluR2 Q/R 部位の RNA 編集活性の消失によることが明らかになった。すなわち、孤発性 ALS 運動ニューロンにおける GluR2 Q/R 部位の RNA 編集異常は、運動ニューロン死の直接原因であることを示している^{4,6)}。

また、孤発性 ALS における特異的分子異常として同定されている TDP-43 のプロセッシング異常と ADAR2 活性低下との間に分子連関が有るかどうかを、ALS 剖検脊髄を用いた免疫組織化学により検討した。正常対照群では全ての脊髄運動ニューロンが ADAR2 陽性であったのに対し、孤発性 ALS では ADAR2 陽性細胞と陰性細胞が混在し、約半数で ADAR2 免疫活性を欠いていた。また、蛍光二重染色および隣接切片での検討で全ての ADAR2 陰性運動ニューロ

ンではリン酸化 TDP-43 陽性の細胞質封入体が見られ、逆に ADAR2 陽性運動ニューロンは封入体が見られないことを明らかにした⁷⁾。このことは ADAR2 活性低下と TDP-43 陽性封入体形成との間には分子連関が存在していることを意味している。患者組織に見出された二種類の特異的分子異常の間に分子連関が存在することからは、ADAR2 活性低下が孤発性 ALS の病因に深く関わり、そのメカニズムの解明が ALS の分子病態の解明に役立つと考えられる。今後は、分子連関のメカニズムを、培養細胞、CKO マウスを用いて検討するとともに、CKO マウスを用いて神経細胞死の分子カスケードを解析する。

(3) TDP-43 を標的分子とする ALS モデルの開発と解析

正常では核に存在して機能する TDP-43 が、孤発性 ALS 運動ニューロン内のユビキチン陽性封入体の主要構成蛋白として同定され、また、ミスセンス変異が一部の孤発性 ALS や優性遺伝性 ALS 家系で報告されている。このことより、ALS の病態機序に TDP-43 の loss of function, gain of function、そして細胞内局在が深く関与していると考えられる。そこで、これらに基づく ALS モデルの開発と解析を行った。

まず loss of function の立場から、Neuro-2a 細胞に対して siRNA により TDP-43 のノックダウンを行った。これにより細胞の viability の低下、死細胞数の増加、神経突起伸張の阻害が生じた。軸索伸長に深く関与する Rho family である RhoA, Rac1, Cdc42 に注目し検討したところ、TDP-43 ノックダウンにより RhoA, Rac1, Cdc42 の活性が低下した。その機序として、Rho family の geranylgeranyl 化が著明に抑制され、これらの分子の細胞膜への移行が阻害されていることを明らかにした¹⁾。

一方、gain of function の立場から、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を作成し、その founder の表現型を観察した。約1年を経過した個体において、明らかな運動麻痺は見られていないが、十分な発現量を確保するため、現在ホモ接合体を作成している。さらに、これらの TDP-43 を神経系特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、現在その観察を行い、ALS モデル動物としての樹立を目指している。

TDP-43 は核内移行シグナル(NLS)および核外移行シグナル(NES)を有しており、核-細胞質間をシャトルしていると考えられる。本年度は、培養細胞を用いて TDP-43 の細胞内局在と毒性の関係を検討した。NES、NLS を各々欠く TDP-43 変異体 Δ NES、 Δ NLS を培養細胞に導入したところ、TDP-43 タンパク質の切断が顕著に観察された。また、 Δ NES では核内で顆粒状の凝集体様構造物の蓄積が、 Δ NLS では細胞質に凝集体が観察された。この結果は、自身の切断や凝集体形成を避けるために、核-細胞質間の移動が必要であることを示唆している。さらにこれら TDP-43 局在変異体が毒性を発揮する場合は細胞質よりむしろ核内であることを明らかにした。

(4) 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

孤発性、遺伝性 ALS に共通してみられる病理変化の一つとしてグリア細胞の活性化が挙げら

れる。これまでに、遺伝性モデルを用いて ALS 疾患進行因子としてミクログリア、アストロサイトを同定してきたが、これらグリア関連病態の解明を目指し、疾患進行期の変異型、野生型 SOD1 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。この結果、ミクログリアとアストロサイトに由来する 187 遺伝子を同定したが、樹状細胞に発現する遺伝子が多く、自然免疫経路の活性化が示唆された。

そこで、ALS モデルマウスにおける自然免疫経路の関与についてマウス交配実験により検討した。具体的には、Toll-like 受容体からのシグナル伝達に必須のアダプター蛋白である MyD88, TRIF を欠失した変異 SOD1 マウスでは疾患進行が有意に加速して、生存期間の短縮がみられた。現在、TLR の中で神経変性や神経損傷への関与が示唆されている TLR2、TLR4 の検討もあわせて行っている。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G. TDP-43 Depletion Induces Neuronal Cell Damage through Dysregulation of Rho Family GTPases. *J Biol Chem*. 284: 22059-22066, 2009 (DOI: 10.1074/jbc.M109.012195)
2. Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: a study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph Lateral Scler*. 10: 288-294, 2009 (DOI: 10.3109/17482960802651717)
3. Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G. Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 276: 163-169, 2009 (DOI: 10.1016/j.jns.2008.09.024)
4. Kwak S, Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H. AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS. *Neuropathology* 30:182-188, 2010. (DOI: 10.1111/j.1440-1789.2009.01090.x)
5. Sone J, Niwa JI, Kawai K, Ishigaki S, Yamada SI, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*. 88: 123-135, 2010 (DOI: 10.1002/jnr.22175)
6. Hideyama T, Yamashita Y, Nishimoto Y, Suzuki T, Kwak S: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Sci*, accepted.
7. Aizawa H, Sawada J, Hideyama T, Yamashita T, Katayama T, Hasebe N, Kimura T, Yahara O,

Kwak S: TDP-43 pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking RNA editing enzyme ADAR2. *Acta Neuropathol* accepted.