

「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

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で認められる dynactin-1 の遺伝子発現低下を再現する線虫モデルの解析を進め、軸索輸送障害と軸索主体の神経変性の直接的証拠を明らかにした。さらに、変性軸索におけるオートファジー異常を見いだした。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は、患者同様の病変選択性と ALS 特異的な TDP-43 病理を認めたことで、有用な孤発性 ALS モデルとしての地位を確立した。一方、TDP-43 をターゲットにした運動ニューロン選択的ノックアウトマウスは、運動ニューロン障害および運動機能障害を呈し、新規モデルとしての可能性を示した。さらに、野生型および変異型 TDP-43 を神経系特異的に発現するマウスを作成し解析をすすめている。また、TDP-43 タンパク質の安定化や酸化ストレスの負荷により、病巣でみられるタンパク質の生化学的性状を再現する細胞モデルを作成した。さらに、FUS/TLS についても doxycyclin による誘導型ノックダウン細胞モデルを構築し、その遺伝子発現解析を推進した。ALS で見られるグリア活性化の意義と分子病態の解明を目指して、孤発性 ALS 患者と変異 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 病態分子群を同定した。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、生存期間短縮を認め、疾患進行に関与する炎症関連分子を一部同定した。

§ 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 (名古屋大学大学院医学系研究科、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 (東京大学大学院医学系研究科、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)理化学研究所脳科学総合研究センター、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

我々は孤発性 ALS の重要な病態を形成する分子イベントとして、病初期から脊髄運動ニューロンにおいて認められる dynactin-1 の発現低下に着目し、その現象を線虫で再現することによって、運動機能障害を呈する新しい疾患モデルの作成と解析を行ってきた。今年度は、dynactin-1 発現低下が運動ニューロンに及ぼす影響について詳細な検討を行った。dynactin-1 ノックダウン線虫では、シナプス小胞関連蛋白の輸送障害と局在異常の存在より、軸索輸送障害が生じていることを確認した。さらに、ventral nerve cord の不整や、変性した軸索を示唆する多数の渦状構造物や空胞形成を電顕上認めたことで、著明な軸索変性が生じていることを明らかにした。一方で、神経細胞数自体はコントロールと比べて優位な減少はなく、また電顕においても核の形態は保たれており、細胞質の変性も軸索に比べて軽微であった。一方、オートファゴソームのマーカである Lgg-1 を共発現した線虫の観察と電顕像から、これらの変性している軸索にはオートファゴソームが異常蓄積していることが明らかとなった。これらのことより、dynactin-1 発現低下がオートファジーシステムの異常を惹起し、軸索変性ひいては運動機能低下を引き起こす可能性が推定された。

(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 編集低下を再現する、ALS の分子病態モデル動物を開発するために、この部位の特異的 RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) 遺伝子⁵⁾を運動ニューロン選択的にノックアウトしたマウス (AR2 マウス) を作成し、病態解析を進めた⁷⁾。ADAR2 が欠失すると様々な pre-mRNA の RNA 編集部位が未編集のままの mRNA が発現するが、運動ニューロン死に関わる RNA 編集部位は GluR2 の Q/R 部位のみであり、未編集型 GluR2 の発現が運動ニューロン死の直接原因であることを、内因性 GluR2 遺伝子を編集型 GluR2 を code する変異遺伝子 GluR-B(R) に置換した変異マウスとの交配により得られた AR2^{res} マウスの解析により明らかにした。また、脳神経核の運動ニューロンにも ADAR2 の欠失に伴う変性脱落がみられたが、外眼筋の脳神経核の運動ニューロン数は保たれるという ALS に見られる病変を再現する結果が得られた。運動ニューロン死の時間経過、選択性等の点から、AR2 マウスは ALS の病態を良く反映し、孤発性 ALS の分子病態モデルマウスとして有用であることを明らかにした⁷⁾。

剖検患者脊髄組織を用いて、運動ニューロンにおける ADAR2 タンパクの発現を免疫組織化学的に検討し、正常対照では全ての運動ニューロンに ADAR2 が発現するのに対し、孤発性 ALS では約半数で ADAR2 免役活性を欠いていた⁴⁾。このことから、ALS 運動ニューロンでは ADAR2 の発現が低下しており、これが未編集型 GluR2 発現の原因になっていることが想定された。AR2 マウスの結果と併せて、孤発性 ALS の運動ニューロン死には ADAR2 発現低下が深く関与していることを示している⁶⁾。さらに、ALS 運動ニューロンに特異的に見出される TDP-43 病理が ADAR2 陰性

運動ニューロンにのみ見られることが明らかになり、両者の間には密接な分子連関が存在し、病因に関わる分子異常であることを明らかにした⁴⁾。AR2 マウスを用いて、ADAR2 活性低下と TDP-43 病理との分子連関を探るために TDP-43 のプロセッシング変化の解析、細胞死のカスケードを検討するために細胞死関連分子の解析を、免疫組織化学、Western blotting を用いて行っている。

(3) TDP-43, FUS/TLS を標的分子とする ALS モデルの開発と解析

TDP-43 は ALS の神経細胞質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た蛋白であり、通常は核に存在するが ALS の運動ニューロンでは消失している。そこで、loss-of-function の立場から、TDP-43 を運動ニューロン特異的にノックアウトした TDP-43 CKO マウス(TDP-43^{flox/flox}/VAcHT-Cre)を作成し、生後 10 週より体重、握力、ロタロッド、生存率を解析し、新たな ALS モデルとしての可能性を検討している。

一方、gain of function の立場から、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、野生型および局在化シグナル変異体発現マウスの系統化とその表現型観察を行った。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、主に核内に局在して核-細胞質間を移動していると考えられる。これまでの暫定的な解析から、動物モデルにおいて TDP-43 毒性発現の場は核内であることを示唆しており、詳細な解析を今後予定している。

TDP-43 は ALS の変性ニューロンにおいて、核から細胞質への局在変化に加え、過剰リン酸化、ユビキチン化、断片化といった翻訳後修飾を受ける。そこで、これらを再現する細胞モデルの構築を行った。家族性 ALS にみられる約 15 種類の疾患変異体および局在変異体を分化誘導した神経系培養細胞 N2A に発現させて、細胞内局在、タンパク質切断、タンパク質の安定性、および RNA 制御能に関して解析を行ったところ、疾患由来のミスセンス変異体の多くにおいて細胞内半減期が延長していることが判明し、現在詳細な検討を行っている。さらにこの知見をもとに、薬剤添加によって野生型 TDP-43 蛋白の細胞内半減期を延長させ、細胞毒性と ALS 病巣で見られるようなリン酸化を伴った蛋白切断が再現できる実験系を構築できた。

一方、NSC34 細胞とマウス大脳皮質初代神経細胞において酸化ストレスを加えると、TDP-43 のリン酸化や不溶化、断片化、細胞質への局在変化が観察された。今回の検討により TDP-43 のリン酸化や不溶化、断片化、細胞質への局在変化は酸化ストレスによって2次的にも生じることが示された。ALS を始めとする TDP-43 の病理学的異常を生じる疾患の病態を理解する上で重要な結果と考えられる。

一方、TDP-43 同様、家族性 ALS の原因遺伝子でありかつ孤発性 ALS への関与が示唆されている分子である FUS について、loss-of-function の立場から運動ニューロンにおける機能解析を行った。NSC34 細胞にレンチウイルスを用いて FUS に対する shRNA を導入し、doxycyclin を培地に加えることで shRNA を誘導できる系を作製した。オートイメージスキャナ(arrayscan)を用いた測定により、FUS の発現抑制による神経突起の動態について観察を行った。そして、affymetrix 社のアレイを用いて、gene expression, alternative splicing についてプロファイル解析を行い、現在、FUS

のターゲット候補因子について解析中である。

(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。ALS 疾患進行因子としてのグリア関連病態の解明を目指して、本年度は、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、遺伝性 ALS モデルとの比較検討を行った。178 遺伝子の発現異常を認め、そのうちの約 60%がグリア細胞であるミクログリアとアストロサイトによく発現する遺伝子であった。また、孤発性 ALS 病巣のグリア細胞において異常発現する遺伝子の約半数(55 遺伝子)は、変異 SOD1 マウスでも発現異常がみられ、これらは自然免疫経路や食食に関与する遺伝子群であった。変異 SOD1 マウスにおけるグリア関連病態の解析は、孤発性 ALS のグリア病態解明にも応用できることを示唆している。

昨年度に続き、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。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 のノックアウトマウスと変異 SOD1 マウスの交配実験を行い、その生存期間や疾患進行速度を検討した。TRIF を欠失した変異 SOD1 マウスでは罹病期間が 50%短縮し、疾患進行の著しい加速と生存期間の短縮がみられた(生存期間、SOD1G93A: 162 日, SOD1G93A/TRIF^{-/-}:138 日)。さらに TRIF を欠失した脊髄病巣では、数種のケモカインの著しい発現低下を認めた。これら分子以外にも、TRIF^{-/-}マウスにおける疾患進行の加速に関わる分子機構をさらに検索している。TRIF 依存性自然免疫経路の賦活とこれら炎症関連分子の発現は、ALS の神経変性に対して保護的作用を有すること示唆している。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, 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)
2. Kato T, Emi M, Sato H, Arawaka S, Wada M, Kawanami T, Katagiri T, Tsuburaya K, Toyoshima I, Tanaka F, Sobue G, Matsubara K. Segmental copy-number gain within the region of isopentenyl diphosphate isomerase genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 402:438-442, 2010 (doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.056)
3. Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Transforming Growth Factor- β Signaling in Motor Neuron Diseases. *Curr Mol Med.* 11:48-56, 2011
4. Hitoshi Aizawa, Jun Sawada, Takuto Hideyama, Takenari Yamashita, Takayuki Katayama, Naoyuki Hasebe, Takashi Kimura, Osamu Yahara, Shin Kwak, "TDP-43

- pathology in sporadic ALS occurs in motor neurons lacking RNA editing enzyme ADAR2” *Acta Neuropathol* vol. 120, No. 1, pp75-84, 2010 (doi:10.1007/s00401-010-0678-x).
5. Takuto Hideyama, Takenari Yamashita, Yoshinori Nishimoto, Takeshi Suzuki and Shin Kwak, “Novel etiologic and therapeutic strategies for neurodegenerative diseases: RNA editing enzyme abnormality in sporadic amyotrophic lateral sclerosis” *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 113, No. 1, pp9-13, 2010. (doi:10.1254/jphs.09R21FM).
 6. Shin Kwak, Takuto Hideyama, Takenari Yamashita and Hitoshi Aizawa, “AMPA receptor-mediated neuronal death in sporadic ALS” *Neuropathology* vol. 30, No. 2, pp182-188, 2010. (doi:10.1111/j.1440-1789.2009.01090.x).
 7. Takuto Hideyama, Takenari Yamashita, Takeshi Suzuki, Shoji Tsuji, Miyoko Higuchi, Peter H Seeburg, Ryosuke Takahashi, Hidemi Misawa, Shin Kwak, “Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2” *J Neurosci* vol 30, No. 36, pp11917-25, 2010. (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2021-10.2010)
- る。
8. Furukawa Y, Kaneko K, Yamanaka K, Nukina N: Mutation-dependent Polymorphism of Cu, Zn-Superoxide Dismutase Aggregates in the Familial Form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Biol Chem*, 285: 22221-22231, 2010. (DOI: 10.1074/jbc.M110.113597)
 9. Israelson A, Arbel N, Da Cruz S, Ilieva H, Yamanaka K, Shoshan-Barmatz V, Cleveland DW. Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a Mouse Model of Inherited ALS. *Neuron* 67: 575-87, 2010. (DOI: 10.1016/j.neuron.2010.07.019)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件、)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0件)