

「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

H23 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. 研究実施体制

(1)「祖父江」グループ

① 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）

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(研究機関別)

① 主たる共同研究者： 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 の病態解析及び治療法開発基盤の確立

(3)「山中」グループ

① 主たる共同研究者： 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
- ・孤発性 ALS における RNA 代謝異常の解明

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)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

孤発性 ALS の病初期から認められる脊髄運動ニューロンにおける dynactin1 の発現低下⁴⁾を再現する運動ニューロン特異的 dynactin1 ノックダウン線虫では、運動ニューロンの軸索、細胞体にオートファゴソームの集積部位が存在し、患者病態を反映していることを昨年度までに明らかにした。今年度は、このオートファジーの障害に至る原因を検討し治療介入を行なった。オートファゴソーム集積の要因として、軸索内におけるオートファゴソームの輸送障害が生じている可能性を考え、線虫初代培養運動ニューロンを使った time-laps image 解析を行った。その結果、コントロールでは、オートファゴソームが順行性および逆行性に活発に軸索内を動き回っているのに対して、dynactin-1 ノックダウンでは、順行性、逆行性ともオートファゴソームの輸送が遅く、特に逆行性輸送において速度、移動距離の低下が顕著であった。次に、このような状況下においてオートファジーを修飾することで、表現型に及ぼす影響を検討した。オートファジーを活性化させることにより dynactin-1 ノックダウン線虫の運動機能および病理所見が有意に改善した。(論文投稿中)。運動ニューロン特異的 dynactin1 ノックアウトマウスについては、運動障害、筋力低下、筋萎縮が出現しており、孤発性 ALS 患者の病態を再現する疾患モデルとしての確立が期待される。(祖父江)

(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

RNA 編集酵素 ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス(AR2)の解析から、ADAR2 欠損に依る未編集型 GluA2 の発現が運動ニューロン死の直接原因であることが明らかになり、この分子異常の孤発性 ALS における病因的意義およびそのメカニズムの解析を行った。多数例の孤発性 ALS 患者剖検組織における単一運動ニューロンでの解析の結果、全例で未編集型 GluA2 の発現を確認した⁵⁾。更に、RNA 編集酵素 ADAR ファミリーの内 ADAR2 のみに、mRNA の発現レベル、特異的 RNA 編集部位における活性の著明な低下がみられ、編集型 GluA2 のみを発現する運動ニューロンでも ADAR2 発現が低下していた⁵⁾。ADAR2 の活性制御機構は細胞に依り異なるが、同一細胞種では GluA2 mRNA (より正確には pre-mRNA) に対する ADAR2 の発現レベルが GluA2 Q/R 部位における RNA 編集活性を反映することが、様々な培養細胞における検討から明らかになった⁶⁾。さらに、ヘテロ接合体のコンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスの解析から、ADAR2 活性低下に依る未編集型 GluA2 の発現そのものが、発現量の多寡にかかわらず、細胞死を引き起こすことが明らかになった²⁾。患者剖検脊髄における結果と併せ、孤発性 ALS では、前臨床段階から ADAR2 の発現が特異的に低下し、未編集型の GluA2 を発現するレベルに達すると同時に神経細胞死のカスケードに入ることが予想された。昨年度、ADAR2 活性低下と TDP-43 の局在異常との間に密接な分子連関があることを明らかにしたが、分子連関の可能性の内、後者が前者に及ぼす影響を培養細胞系で検討した。TDP-43 発現量の増減や変異は ADAR2 活性に影響しないことが明らかになった⁷⁾。ADAR2 活性低下が TDP-43 病理を引き起こす可能性が高いと考えられるため、その分子メカニズムの検討を進めている。未編集型 GluA2 発現による神経細胞死は経

過が緩徐なため、未編集型 GluA2 を発現しながら脱落に至るまでの間に TDP-43 の局在変化 (TDP-43 病理)が生ずると考えられる。ADAR2 の発現低下に依る未編集型 GluA2 の発現が孤発性 ALS の病因である可能性を支持する結果を得た。細胞死に至る分子カスケードの解析から孤発性 ALS の病因の理解が進み、治療標的の同定が可能になると考えられる。(郭)

(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 の変性ニューロンにおいて、本来存在する核から消失し細胞質内に凝集体として存在し、さらに過剰にリン酸化、ユビキチン化、断片化している。本年度、我々は酸化ストレスがこれらの TDP-43 修飾に与える影響を検討した。NSC34 細胞とマウス大脳皮質初代神経細胞において GSH 阻害剤であるエタクリン酸(EA)や過酸化水素負荷を行ったところ、TDP-43 のリン酸化、不溶化、断片化や細胞質への移行が確認された⁶⁾。これらの現象は抗酸化剤である NAC により相殺されることから酸化ストレス負荷による影響と考えられ、ALS における TDP-43 の病的修飾が酸化ストレスによって二次的にも生じることが示された。これは ALS 変性過程において強い酸化ストレス負荷が生じていることを間接的に示唆する結果であり ALS 病態を理解する上で重要と考えられる。また、TDP-43 リン酸化修飾の病的意義を検討するために C 末端の 403/404/409/410 の Ser を Ala に変換したリン酸化抵抗性変異 TDP-43 を発現させた細胞に酸化ストレスを加えたところ、野生型と同様に不溶化し細胞質への局在変化が確認されたことより、リン酸化と不溶化、細胞局在はそれぞれ独立した現象である可能性が示唆された³⁾。(祖父江)

さらに、TDP-43タンパク質凝集体の形成メカニズムを解明する目的で、試験管内で変性させた TDP-43 タンパク質を培養細胞内に少量導入したところ、細胞質に界面活性剤に不溶で、ALS 病巣と生化学的性質が似た TDP-43 タンパク質の異常凝集体の形成が加速することを見いだした¹⁾。つまり、ALS病巣で見られる TDP-43の異常蓄積は少量の凝集体が”seed“として存在すると、その凝集過程が加速するという”seeding-reaction”によって起こり、凝集体のコアはタンパク質の C 末端であることを見いだした。この”seeding reaction”は、アルツハイマー病におけるアミロイドβの凝集過程と共通した、神経変性疾患の異常タンパク質凝集に共通したメカニズムである¹⁾。(山中)

一方、培養細胞を用いて、TDP-43の詳細な核内分布を調べたところ、TDP-43は核質での分布に加え、スプライソソーム構成因子U snRNPの構成に重要なSMN蛋白質が集積するGem、スプライシング制御因子の集積する核スペckル、long mRNAの集積するパラスペckルに強く集積することが判明した。そこでTDP-43の発現抑制によりスプライシング関連の変化が観察されるか検討したところ、スプライソソームのRNA成分であるU snRNAs (small nuclear RNA)の発現異常が起こることが判明した。更にTDP-43結合蛋白質を単離同定したところ、スプライソソームの構成成分が含まれていた。さらに、孤発性ALS凍結脊髄においても広範なU snRNAの発現異常が認められた。最近、ALS病態におけるスプライシング異常が報告され、その機序に関しては今回我々が明らかにしたスプライソソーム異常が関与している可能性が高いと考えられる(投稿中)。(山中・祖父江)

一方、FUSを対象とした研究では、NSC34 細胞から核抽出を行い、グリセロール密度勾配と超遠心分離により分画を作成し、マウス内在性FUSの核内高分子複合体の存在を確認した。ALS変異FUSではこの複合体の割合が低下し、ALS病態との関連が推定されたため、LC/MSを用いて複

合体の構成成分を解析した。その結果、選択的スプライシングに関与するタンパク質を同定したことから、ALSにおいてFUSが選択的スプライシングを介して病態に関与していることを示唆しているものと思われた。さらに、昨年度に確立した初代運動ニューロンにレンチウイルスを用いて shRNAを導入し、FUS発現抑制運動ニューロンモデルを樹立した。Exonarrayを用い、このモデルにおける遺伝子発現及び選択的スプライシングのプロファイルを作成したところ、FUSは多くの神経機能維持に関連する遺伝子の選択的スプライシング制御に関わっていることが判明した。そのうち、一部のものについては前述のFUS高分子複合体と結合することを確認した。(祖父江)

(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

ALSにおけるグリア関連病態の解明と疾患進行を制御する標的分子の探索を目指し、cDNAマイクロアレイを用いた網羅的解析を行い、遺伝性ALSマウス脊髄では225遺伝子、孤発性ALS患者脊髄では176遺伝子の発現異常を明らかにした。トランスクリプトーム解析により、そのうちの約50%(80遺伝子)がグリア細胞であるミクログリアとアストロサイトに多く発現する遺伝子であると推測された。さらに、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(42遺伝子)は、変異SOD1マウスにおいても発現異常がみられた。パスウェイ解析から、自然免疫経路や貪食、NFκB経路に関わる遺伝子発現の亢進が示された。現在、病態に関与すると考えられる候補遺伝子についてモデルマウスを用いた免疫組織染色による検証を行っている。(山中・祖父江)

また、自然免疫経路の代表的な受容体群であるToll-like受容体からのシグナル伝達に必須であるアダプター蛋白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、MyD88欠失による生存期間への影響はみられなかったが、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)。また、TRIFを欠失した脊髄病巣では、CCL5(RANTES)、CXCL10(IP-10)のケモカインの著しい発現低下を認め、疾患進行の加速と相関していた。TRIF依存性の自然免疫経路の賦活は、ケモカインなどの炎症関連分子の発現やグリア細胞におけるタンパク質分解機構の維持などを通じてALSの神経変性に対して非細胞自律性の保護作用を有することを示唆している。(山中)

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Furukawa Y, Kaneko K, Watanabe S, Yamanaka K, Nukina N. A seeding reaction recapitulates intracellular formation of Sarkosyl-insoluble transactivation response element (TAR) DNA-binding protein-43 inclusions. *J Biol Chem.* 286: 18664-18672, 2011 (DOI:10.1074/jbc.M111.231209)
2. Hideyama T, Kwak S. When Does ALS Start? ADAR2-GluA2 Hypothesis for the Etiology of Sporadic ALS. *Front Mol Neurosci.* 4: 33, 2011 (DOI: 10.3389/fnmol.2011.00033)
3. Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa JI, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis.* 45: 862-870, 2012 (DOI: 10.1016/j.nbd.2011.12.002)
4. Tanaka F, Ikenaka K, Yamamoto M, Sobue G. Neuropathology and omics in motor neuron diseases. *Neuropathology.* in press (DOI: 10.1111/j.1440-1789.2011.01281.x.)
5. Hideyama T, Yamashita T, Aizawa H, Tsuji S, Kakita A, Takahashi H, Kwak S. Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons. *Neurobiol Dis.* 45: 1121-28, 2012. (DOI: 10.1016/j.nbd.2011.12.033)
6. Yamashita T, Tadami C, Nishimoto Y, Hideyama T, Kimura D, Suzuki T, Kwak S: RNA editing of the Q/R site of GluA2 in different cultured cell lines that constitutively express different levels of RNA editing enzyme ADAR2. *Neurosci Res* 73:42-48, 2012. (DOI:10.1016/j.neures.2012.02.002)
7. Yamashita T, Hideyama T, Teramoto S, Kwak S: Abnormal processing of TDP-43 does not regulate ADAR2 activity in cultured cell lines. *Neurosci Res* in press. (DOI:10.1016/j.neures.2012.02.015)