

「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

H24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 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
- ・Dynactin 1 KO 線虫・マウスの作製と解析
- ・TDP-43 KO マウスの作製と解析

### (2)「郭」グループ

① 主たる共同研究者: 郭 伸 (東京大学医学系研究科、客員研究員)

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 (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**

Dynactin-1 については、孤発性 ALS 患者脊髄前角細胞において発現が低下していることに着目し、孤発性 ALS の病態を反映する動物モデルの作成を試みた。コリン作動性ニューロン(運動ニューロン)特異的に dnc-1 (dynactin-1 の線虫相同体)の発現を抑えるベクターを用い、dnc-1 コンディショナルノックダウン線虫を作成したところ、著明な運動機能障害と寿命の短縮を呈し、孤発性 ALS 患者で早期より見られる運動ニューロンの軸索の変性(軸索腫大)を認めるとともに、軸索内や細胞体へのオートファゴソームの異常蓄積が認められた。その分子基盤として、dnc-1 ノックダウン線虫ではオートファゴソームの軸索輸送の著明な低下が認められ、飢餓やオートファジー活性化作用を有する rapamycin 投与により著明な表現型の改善がみられた。しかし、飢餓と rapamycin では運動機能の改善効果に差がみられたことから、両者の作用機序の相違を検討したところ、飢餓ではチューブリンのアセチル化が促進されるが、rapamycin ではこうした作用がないことが明らかとなった。そこでチューブリンのアセチル化を促進することが知られている HDAC6 阻害剤である trichostatin A を dnc-1 コンディショナルノックダウン線虫に投与したところ、飢餓と同様に強い治療効果が認められたが、その効果はオートファジー阻害剤である 3-Methyladenine (3-MA) によって相殺されたことから、trichostatin A による神経変性抑制作用にはオートファジーの輸送促進が寄与していると考えられた<sup>1)</sup>。(祖父江)

### **(2) ADAR2 を標的分子とする孤発性 ALS モデル**

多数例の孤発性 ALS 患者剖検組織の解析から、運動ニューロン選択的に、RNA 編集酵素である ADAR2 の発現低下による、正常には発現しない Q/R 部位が未編集の GluA2 の発現が孤発性 ALS に広く生じている疾患特異的分子異常であることが証明された<sup>2)</sup>。さらに、この分子病態を反映するコンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス(AR2)の解析から、ADAR2 欠損による未編集型 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、孤発性 ALS に病因的意義を持つことが示された。ADAR2 活性低下と TDP-43 の局在異常との分子連関を検討したところ、TDP-43 発現量の増減や変異は ADAR2 活性に影響しないが<sup>3)</sup>、AR2 マウス運動ニューロンでは TDP-43 の局在異常が見られることから<sup>4)</sup>、ADAR2 活性低下が TDP-43 病理を引き起こすメカニズムを詳細に検討した。GluA2 の RNA 編集活性は GluA2 pre-mRNA に対する ADAR2 の発現比に依存するため<sup>5)</sup>、ADAR2 発現低下は未編集型 GluA2 発現を引き起こす。その結果 Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体が発現し、それによる細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増加により活性化した Ca<sup>2+</sup>依存性プロテアーゼであるカルパインが、TDP-43 を凝集性の高い断片に切断する<sup>4)</sup>。また、運動ニューロンにおける ADAR2 の発現が加齢と共に低下することから、ALS の発症頻度が加齢と共に高まり、また発症後の進行速度が加齢と共に速まる分子基盤に関与している可能性が示された<sup>6)</sup>。(郭)

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

孤発性 ALS の運動ニューロンにおいて TDP-43 は核から細胞質へ局在を変え凝集体として存在している。孤発性 ALS 運動ニューロンにおいて TDP-43 の機能喪失が想定されるため、運動ニューロン特異的 TDP-43 ノックアウト(TDP-43 CKO)マウスを作成し、その運動機能解析や病理学的検討を行った。TDP-43 CKO マウスは 50 週頃より体重減少や運動機能障害が現れ始め、100 週齢ではコントロールに比し有意な体重減少、歩幅や rotarod における有意な成績低下が観察された。病理学的には脊髄運動ニューロンの萎縮、腰髄前根の軸索変性像や有髄神経の小径化、腓腹筋に群集萎縮が認められた。脳神経核の検討では三叉神経運動核や顔面神経核、舌下神経核には萎縮を認めたが、動眼神経核や外転神経核は保たれていた。また、免疫染色にて脊髄前角にアストロサイトの増生がみられ、萎縮した脊髄運動ニューロン内にリン酸化ニューロフィラメ

ントやオートファゴソームの蓄積が観察された。TDP-43 CKO マウスは長期にわたる経過で運動ニューロン変性を引き起こし、病理学的にも孤発性 ALS に類似した特徴を有していた。本研究により TDP-43 が哺乳類の運動ニューロンの機能維持に必要不可欠であることが明らかとなった<sup>7)</sup>。(祖父江)

TDP-43 の生理機能を明らかにするため、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 snRNP の構成に重要な SMN 蛋白質が集積する Gem をはじめとした核内小体に集積することが判明した。また、TDP-43 は Gem において、ALS 病因タンパク質の FUS、小児運動神経変性疾患である脊髄性筋萎縮症 (SMA) の原因タンパク質 SMN と複合体を形成していることが判明した。TDP-43 や FUS を欠失した細胞では Gem が消失し、TDP-43 の異常がみられる孤発性 ALS 運動神経においても Gem の減少が認められた。TDP-43 の発現抑制により Gem が消失することから、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 snRNA (small nuclear RNA) の発現異常が起こることが判明した。さらに、孤発性 ALS 凍結脊髄においても広範な snRNA の発現異常が認められ、免疫組織学的検討では、ALS の運動神経核に著明な snRNA の異常蓄積を認めた。本研究結果からは、運動神経細胞はスプライソソーム異常に脆弱であることが考えられる<sup>8)</sup>。(山中・祖父江)

TDP-43 変異による ALS の臨床データと変異タンパク質の生化学的特徴の相関を検討した。家族性 ALS 由来の TDP-43 の変異タンパクの細胞内半減期が延長し ( $t=1/2$ , WT: 12 hour, mutant 16-50 hour)、さらに半減期の長い変異を有する患者の平均発症時期が早くなり、両者の間には負の相関が認められた。さらに、薬剤添加によって野生型 TDP-43 を誘導的に蓄積させることにより、自己 mRNA 制御能が低下し、細胞毒性を惹起した<sup>9)</sup>。(山中)

#### **(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 172 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% (81 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、自然免疫経路や食欲、NF $\kappa$ B 経路に関わる遺伝子発現の亢進が示された。(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、ケモカイン CCL5、CXCL10 の著しい発現低下と脊髄への免疫系細胞の浸潤低下を認め、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恒常性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)

#### **(5) 動物モデルを用いた ALS の治療法探索**

我々は以前の解析により、孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンでは c-Abl の発現とリン酸化の亢進が見られることを明らかにした。ALS のモデルとして確立されている G93A 変異 SOD1 マウスの脊髄ではコントロールに対して発症早期から c-Abl の蛋白量が増加し、リン酸化も亢進していた。G93A マウス n に中枢移行性のある c-abl 阻害薬である dasatinib を投与したところ、生存期間の延長効果、体重減少及び運動機能低下の改善効果がみられ、脊髄運動ニューロン数の増加、神

経筋接合部における脱神経の抑制も認められた。以上から、c-Abl は ALS の治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された<sup>10)</sup>。(祖父江)

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Kensuke Ikenaka, kaori Kawai, Masahisa Katsuno, Zhe Huang, Yue-Mei Jiang, Yohei Iguchi, Kyogo Kobayashi, Tsubasa Kimata, Masahiro Waza, Fumiaki Tanaka, Ikue Mori, Gen Sobue. dnc-1/dynactin 1 knockdown disrupts transport of autophagosomes and induces motor neuron degeneration. *PLoS One*, vol. 8, e54511, 2013. (DOI: 10.1371/journal.pone.0054511)
2. Takuto Hideyama, Takenari Yamashita, Hitoshi Aizawa, Shoji Tsuji, Akiyoshi Kakita, Hitoshi Takahashi, Shin Kwak, “Profound downregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in ALS spinal motor neurons”, *Neurobiol Dis*, vol. 45, No. 3, 1121-28, 2012. (DOI:10.1016/j.nbd.2011.12.033)
3. Takenari Yamashita, Takuto Hideyama, Sayaka Teramoto, Shin Kwak, “Abnormal processing of TDP-43 does not regulate ADAR2 activity in cultured cell lines”, *Neurosci Res*, vol. 73, No. 2, 153-160, 2012. (DOI:10.1016/j.neures.2012.02.015)
4. Takenari Yamashita, Takuto Hideyama, Kosuke Hachiga, Sayaka Teramoto, Jiro Takano, Nobuhisa Iwata, Takeomi Saido, Shin Kwak, “A role for calpain-dependent cleavage of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis pathology”, *Nat Commun*, vol. 3, 1307, 2012. (DOI:10.1038/ncomms2303)
5. Takenari Yamashita, Chieko Tadami, Yoshinori Nishimoto, Takuto Hideyama, Daisuke Kimura, Takeshi Suzuki, Shin Kwak, “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*, vol. 73, No. 1, 42-48, 2012. (DOI:10.1016/j.neures.2012.02.002)
6. Takuto Hideyama, Sayaka Teramoto, Kosuke Hachiga, Takenari Yamashita, Shin Kwak, “Co-occurrence of TDP-43 mislocalization with reduced RNA editing enzyme, ADAR2, in aged mouse motor neurons: implications for age-related acceleration of ALS”, *PLoS One*, vol. 7, No. 8, e43469, 2012. (DOI:10.1371/journal.pone.0043469)
7. Yohei Iguchi, Masahisa Katsuno, Jun-ichi Niwa, Shinnosuke Takagi, Shinsuke Ishigaki, Kensuke Ikenaka, Kaori Kawai, Koji Yamanaka, Ryosuke Takahashi, Hidemi Misawa, Shoichi Sasaki, Fumiaki Tanaka, Gen Sobue. “Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration”, *Brain*, Epub on Feb

28, 2013. (DOI: 10.1093/brain/awt029)

8. Hitomi Tsuiji, Yohei Iguchi, Asako Furuya, Ayane Kataoka, Hiroyuki Hatsuta, Naoki Atsuta, Fumiaki Tanaka, Yoshio Hashizume, Hiroyasu Akatsu, Shigeo Murayama, Gen Sobue, Koji Yamanaka. “Spliceosome Integrity is defective in Motor Neuron Diseases, ALS and SMA”, *EMBO Mol Med*, Epub on December 19, 2012. (DOI: 10.1002/emmm.201202303)
9. Shoji Watanabe, Kumi Kaneko, Koji Yamanaka. Accelerated disease onset with stabilized familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked TDP-43 mutations. *J Biol Chem*, Epub on December 12, 2012. (DOI: 10.1074/jbc.M112.433615)
10. Ryu Katsumata, Shinsuke Ishigaki, Masahisa Katsuno, Kaori Kawai , Jun Sone , Zhe Huang, Hiroaki Adachi, Fumiaki Tanaka, Fumihiko Urano, Gen Sobue. “c-Abl inhibition delays motor neuron degeneration in the G93A mouse, an animal model of amyotrophic lateral sclerosis”, *PLoS One* vol. 7, No. 8, e46185, 2012. (doi: 10.1371/journal.pone.0046185)