

<シンポジウム 7-2> ALS の研究・治療はどこまでできたか

孤発性 ALS 病態関連分子の探索と疾患モデルの開発

田中 章景¹⁾ 和座 雅浩¹⁾ 丹羽 淳一²⁾ 山本 正彦³⁾ 祖父江 元¹⁾

(臨床神経, 48 : 970—972, 2008)

Key words : 孤発性筋萎縮性側索硬化症, 遺伝子発現解析, 疾患モデル, ドルフィン, ダイナクチン1

はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) の病態解明と治療法開発は, これまで遺伝性 ALS を中心に多くの知見が積み重ねられてきた。この理由として, 遺伝性のばあい, とくに SOD1 (superoxide dismutase-1) 遺伝子変異を組み込んだ疾患モデル (培養細胞, マウス, ラットなど) が存在するという点が挙げられる。このモデルにおいて有効であった一部の治療法は, ALS の大多数を占める孤発性 ALS の臨床試験へと展開されてきた。しかし, これまでの臨床試験の結果は必ずしも芳しいものとはいえず, その一因として孤発性と遺伝性では ALS の病態がことなっている可能性も指摘されている。このことから, 孤発性 ALS の治療を開発していく上では, 孤発性 ALS の病態機能分子を発見し, これを基に孤発性 ALS 独自の疾患モデルを開発し病態解明を進めていくことが重要と考えられる。

新規 E3 ユビキチンリガーゼ dorfin

われわれは, これまで孤発性 ALS 患者脊髄を出発点とした網羅的な遺伝子発現解析を通じて孤発性独自の病態機能分子の探索を進めてきた^{1)~4)}。このうち新規遺伝子のクローニングが可能な分子インデックス法をもちいた研究により, 孤発性 ALS 患者脊髄において発現上昇をきたしている新規 E3 ユビキチンリガーゼを発見し, 2つの RING-finger ドメインを持つことより dorfin (double ring-finger protein) と名付けた¹⁾。dorfin の発現を孤発性 ALS 運動ニューロンで観察すると, 実際に細胞質内ユビキチン陽性封入体に局在していることが明らかとなった⁵⁾⁶⁾。変性, 酸化ストレス, 遺伝子変異などにより異常蛋白が形成されると, ユビキチンリガーゼはその基質にユビキチンを付加しプロテアソームにより分解する。dorfin が標的とする基質を探索する過程で, dorfin は家族性 ALS においてもユビキチン陽性封入体, さらに変異 SOD1 と共局在を示すことをみいだした⁵⁾。

dorfin は孤発性 ALS の病態機能分子の探索過程で発見し

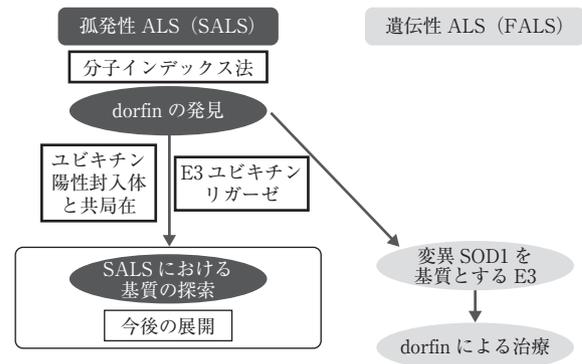


Fig. 1 dorfin の孤発性 ALS および家族性 ALS への展開

た分子であるが, 変異 SOD1 をその基質の 1 つとしていることから家族性 ALS の病態にも深く関わっていると考えられ, dorfin をもちいた治療法開発へと展開した⁵⁾ (Fig. 1)。培養細胞レベルにおいて dorfin 過剰発現による変異 SOD1 の分解と神経毒性抑制効果を確認した後⁵⁾, マウスレベルでの検討を行った。dorfin 過剰発現マウスと G93A SOD1 マウスを掛け合わせた double トランスジェニックマウスでは, 歩幅の改善, 生存期間の延長, ローターロッドにおける運動機能の改善, 変異 SOD1 の蓄積の減少, ユビキチン陽性封入体の減少が観察された。今後は, 孤発性 ALS のユビキチン陽性封入体における dorfin の基質を探索していくことが重要であると考えられる (Fig. 1)。

孤発性 ALS 運動ニューロン特異的病態関連分子の探索と解析

一方, レーザーマイクロダイセクション法と cDNA マイクロアレイ法を組み合わせた網羅的な解析により, われわれは孤発性 ALS 運動ニューロン特異的に発現上昇を示す 52 遺伝子, 発現低下を示す 144 遺伝子を同定した³⁾。次に, これらの発現動態を様々な病期の孤発性 ALS 脊髄において神経変性マーカーとの関係で詳細に検討したところ, 神経変性過程の

¹⁾名古屋大学大学院医学系研究科・神経内科学〔〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65〕

²⁾愛知医科大学・神経内科

³⁾愛知学院大学心身科学部健康学科

(受付日: 2008 年 5 月 17 日)

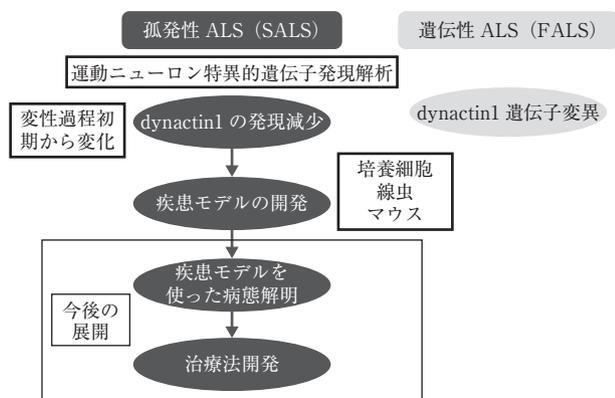


Fig. 2 dynactin1 を標的とした孤発性 ALS 疾患モデルの開発

上流で発現変化をきたしている遺伝子として dynactin1 を同定した⁷⁾. dynein, dynactin は逆行性軸索輸送を制御するモーター蛋白質であり, dynein 変異によりマウスに, dynactin のサブユニットの一つ dynactin1 の変異によりヒトに運動ニューロン障害をおこすことが知られている⁸⁾. 最初に遺伝性 ALS において, その変異が明らかにされていた dynactin1 が孤発性 ALS 患者運動ニューロンにおいても重要な病態機能分子として見つかったことは, 遺伝性, 孤発性の両者に関わる dorfin や TDP-43⁹⁾ と類似しており, 興味深い事実である (Fig. 2).

dynactin1 を標的とした孤発性 ALS 疾患モデルの開発

われわれは, dynactin1 の発現低下という神経変性過程の上流のイベントを培養細胞, さらに線虫において再現することによって孤発性 ALS の疾患モデル開発を試みた (Fig. 2). まず, 培養細胞レベルでは, siRNA 法により SH-SY5Y 細胞において dynactin1 の発現を患者運動ニューロンでの観察と同程度にノックダウンし, その影響を検討した. MTT assay, PI staining の結果, 時間依存性に細胞死が生じることを確認したが, 各種アッセイの結果, アポトーシスは観察されなかった. また, autophagosome 形成のマーカーである LC3 に対する抗体をもちいたウェスタンブロット, 蛍光免疫染色, 免疫電顕の結果, dynactin1 ノックダウンにより autophagosome 形成が亢進することが示された. さらに, lysosome のマーカーである lgp85 と LC3 の共発現状態をしらべたところ, autophagosome-lysosome の癒合障害が示唆され, 最終的にオートファジー機能は障害されているものと推定された. また, ALS 患者運動ニューロンにおいても LC3 の発現上昇を確認したことより, この培養細胞モデルは孤発性 ALS の重要な病態の一部を反映していると考えられた.

一方, 線虫ではコリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターである *acr-2* 支配下に, ヒト dynactin1 の相同体である *dnc-1* を標的とした shRNA を発現可能なベクターを作成し, 野生型線虫にマイクロインジェクションし *dnc-1* ノック

ダウン線虫を作成した. *dnc-1* ノックダウン群はコントロール群に比して, 生存率の短縮, 首振り回数の低下, 水中でのむち打ち回数の低下がみとめられた. さらに運動機能障害が重篤な個体では *coiler uncoordinated* の表現型がみとめられた. これは, コリン作動性運動ニューロンの VA ニューロンの正常なシナプス形成に必須である *unc-4* 遺伝子の種々の変異体で出現する表現型であり, 運動ニューロンの機能障害と変性を示唆する所見である¹⁰⁾. また ventral cord の形態異常からも, 運動ニューロンの変性が示唆された. また, シナプス小胞に存在するシナプトプレビンに *acr-2* プロモーター支配下に共発現させ, *dnc-1* ノックダウンによる局在の変化を観察したところ, *dnc-1* ノックダウン群では, シナプトプレビンの局在異常がみとめられた. このことより, *dnc-1* ノックダウンにより軸索輸送の機能低下が生じ運動ニューロン変性の一因となっている可能性が推定された.

このように, 孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンにおいて神経変性過程の上流に位置する dynactin1 遺伝子発現レベルの低下を再現した *in vitro* (培養細胞) および *in vivo* (線虫) 双方のモデルにおいて, 神経細胞の機能障害および変性を誘発したことより, これらは孤発性 ALS の重要な病態を反映する疾患モデルとして機能することが期待される (Fig. 2).

文 献

- 1) Ishigaki S, Niwa J, Ando Y, et al: Differentially expressed genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis spinal cords—screening by molecular indexing and subsequent cDNA microarray analysis. FEBS Lett 2002; 531: 354—358
- 2) Niwa J, Ishigaki S, Doyu M, et al: A novel centrosomal ring-finger protein, dorfin, mediates ubiquitin ligase activity. Biochem Biophys Res Commun 2001; 281: 706—713
- 3) Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, et al: Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 2005; 57: 236—251
- 4) Tanaka F, Niwa J, Ishigaki S, et al: Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. Ann N Y Acad Sci 2006; 1086: 1—10
- 5) Niwa J, Ishigaki S, Hishikawa N, et al: Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. J Biol Chem 2002; 277: 36793—36798
- 6) Hishikawa N, Niwa J, Doyu M, et al: Dorfin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis. Am J Pathol 2003; 163: 609—619
- 7) Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, et al: Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death

- receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 617—627
- 8) Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, et al: Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 2003; 33: 455—456
- 9) Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al: TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008; 319: 1668—1672
- 10) White JG, Southgate E, Thomson JN: Mutations in the *Caenorhabditis elegans unc-4* gene alter the synaptic input to ventral cord motor neurons. *Nature* 1992; 355: 838—841

Abstract

Exploration of pathogenesis-associated molecules and development of disease models for sporadic ALS

Fumiaki Tanaka, M.D.¹⁾, Masahiro Waza, M.D.¹⁾, Jun-ichi Niwa, M.D.²⁾,
Masahiko Yamamoto, M.D.³⁾ and Gen Sobue, M.D.¹⁾

¹⁾Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine

²⁾Department of Neurology, Aichi Medical University

³⁾Department of Speech Pathology and Audiology, Aichi Gakuin University School of Health Science

The mechanism underlying the characteristic selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) has remained elusive. Modest advances in this research field have been achieved by the identification of copper/zinc superoxide dismutase 1 (SOD1) as one of the causative genes for rare familial ALS and by the development and analysis of mutant SOD1 transgenic animal models. However, in sporadic ALS (SALS) with many more patients, causative or critical genes situated upstream of the disease pathway have not yet been elucidated and no available disease models have been established. We have been working on screening these genes employing and combining several new technologies such as cDNA microarray, molecular indexing, and laser capture microdissection. Many of the resultant genes are of intense interest and may provide a powerful tool for determining the molecular mechanisms of SALS. Of these, in this paper, we will focus on Dorfin, a RING finger-type E3 ubiquitin ligase and dynactin1, a major component of dynein/dynactin complex that is important for retrograde axonal transport. We are now challenging creation of the disease models by simulating the gene expression changes specifically observed in SALS patients.

(*Clin Neurol*, 48: 970—972, 2008)

Key words: sporadic amyotrophic lateral sclerosis, gene expression analysis, disease model, dorfin, dynactin1