

孤発性 ALS 疾患モデルによる病態解明と治療法開発

田中 章景¹⁾ 和座 雅浩¹⁾ 山本 正彦²⁾ 祖父江 元¹⁾

(臨床神経, 49 : 811—813, 2009)

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, 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へのストラテジーを考える際には, 孤発性 ALS と家族性 ALS の研究を相補的に進めることが重要である. たとえば孤発性 ALS で発見された病態機能分子である TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43)¹⁾²⁾が, 後に家族性 ALS の一部の原因遺伝子であることが明らかになったり³⁾, 逆に, 家族性 ALS の約 20% を占める SOD1 (superoxide dismutase-1) 遺伝子変異をシミュレートする SOD1 モデルマウスで明らかになった知見が SALS の病態機能分子の発見につながったりと, 孤発性 ALS と家族性 ALS の間には共通する分子機構があることは想像に難くない.

治療法開発という点では, これまで SOD1 モデルマウスを中心に研究が進められ, これが ALS の約 90% 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, SOD1 モデルマウスで有効であると確認された 20 種類以上の薬剤は孤発性 ALS の臨床試験ではことごとく無効であるという厳しい現実に直面している⁴⁾. その一因として, 孤発性 ALS と家族性 ALS には共通する分子機構が一部存在するものの, その病態を決して同一視するわけにはいかないという点が挙げられる. また, ALS の疾患モデルとして確立しているのは, 現在のところ家族性 ALS のモデルである SOD1 動物モデルしか存在しないという点も孤発性 ALS の治療法開発にとって大きな障害となっている.

このことから, とくに孤発性 ALS の治療を開発していく上では, 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, 解析していくことが重要と考えられる.

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

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 遺伝子を同定している⁵⁾⁶⁾ (Fig. 1). 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, 神経変性過程の上流で発現変化を来している遺伝子として dynactin-1 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 dynactin-1 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 dynactin-1 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 TDP-43^{1)~3)9)}と類似しており, 興味深い事実である.

dynactin-1 を標的とした孤発性 ALS 疾患モデルの開発

われわれは, dynactin-1 の発現低下という孤発性 ALS における神経変性過程の上流のイベントを線虫において再現することによって疾患モデル開発を試みている. 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. さらに, シナプス小胞に存在するシナプトプレピンを *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, ノックダウン群では, シナプトプレピ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も推定される.

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⁾愛知学院大学心身科学部・健康科学科

(受付日: 2009年5月21日)

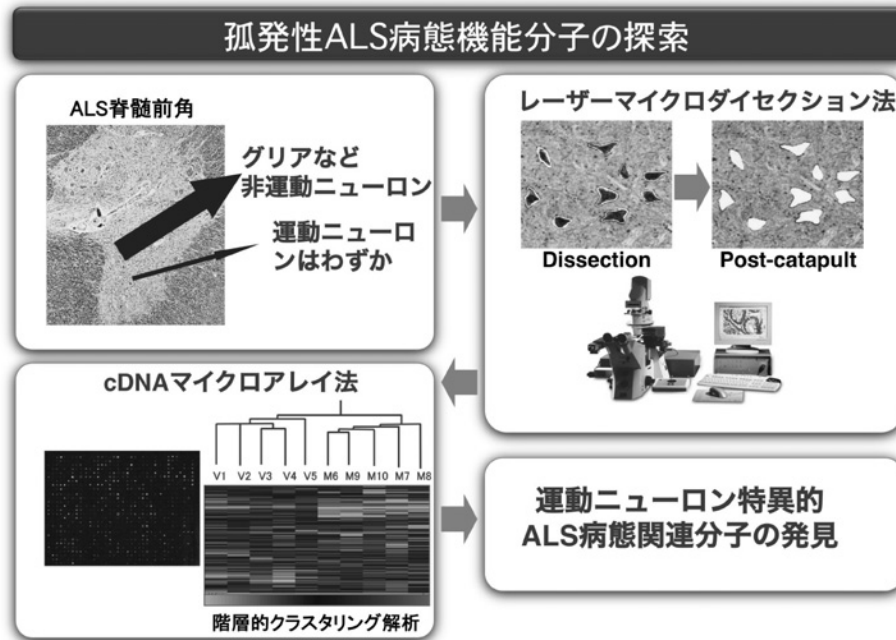


Fig. 1 孤発性 ALS 病態機能分子の探索

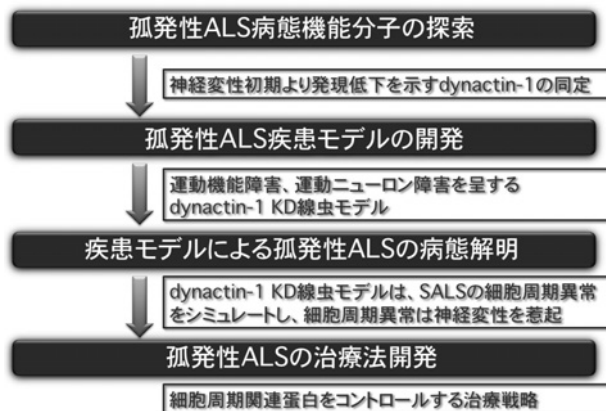


Fig. 2 孤発性 ALS 治療法開発へのストラテジー

孤発性 ALS における dynactin-1 発現低下と 細胞周期異常

本来、神経細胞は分裂しない細胞なので、その細胞周期は静止期 (G0) にとどまっているはずである。ところが、われわれが同定した孤発性 ALS 患者運動ニューロン特異的に発現上昇を示す 52 遺伝子の中には、細胞周期が静止期 (G0) から逸脱していることを示す cyclin C がふくまれていた⁵⁾。そこで孤発性 ALS における細胞周期異常と dynactin-1 発現低下の関係に注目した。

まず、培養細胞 (SH-SY5 細胞) において dynactin1 を siRNA 法によりノックダウンすると細胞死が生じるが、興味深いことに ALS 患者運動ニューロンでみられたのと同様に、

cyclin C の発現が上昇していた。次に孤発性 ALS 疾患モデルとして開発した dnc-1 ノックダウン線虫において、in situ hybridization をもちい検証してみると、同様に cyclin C の顕著な発現増強がみとめられた。すなわち、これらのモデルは、ALS 患者脊髄運動ニューロンにおける dynactin-1 の発現低下と cyclin C の発現増加をシミュレートしており、孤発性 ALS の病態の少なくとも一部を反映していることを意味する。

次に、われわれは、細胞周期促進因子を野生型線虫に高発現させると、dnc-1 ノックダウン線虫と類似した運動ニューロン障害を示唆する表現型を呈すること、dnc-1 ノックダウン線虫において細胞周期抑制因子を共発現すると、表現型が有意に改善することをみいだしつつある。これらのことから、細胞周期関連分子をターゲットとした治療法は将来の孤発性 ALS 治療における一つの選択肢になりうると考えられる (Fig. 2)。

文 献

- 1) Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130—133
- 2) Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, et al: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 602—611
- 3) Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al: TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008; 319: 1668—1672

- 4) Rothstein JD: Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2009; 65 (Suppl): S3—9
- 5) 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
- 6) 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
- 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) Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, et al: TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. *J Biol Chem* 2009; 284: 22059—22066
- 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 and therapy development for ALS employing sporadic disease model

Fumiaki Tanaka, M.D.¹⁾, Masahiro Waza, M.D.¹⁾, Masahiko Yamamoto, M.D.²⁾ and Gen Sobue, M.D.¹⁾

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

²⁾Department of Speech Pathology and Audiology, Aichi Gakuin University School of Health Science

The mechanisms underlying motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) remain poorly understood even now 140 years after the first description of the disease in 1869 by Jean-Martin Charcot. Exploration of pathogenesis of ALS has long been dependent on transgenic animal models with mutations in the copper/zinc superoxide dismutase 1 (SOD1) gene. However, the lack of therapeutic concordance between these animal models and human sporadic ALS patients is troubling. The reasons include that there might exist the differences of pathogenesis between sporadic and familial ALS and/or the disease models for sporadic ALS have not been established. We have been working on screening motor neuron-specific genes critical for pathogenesis of sporadic ALS using cDNA microarray and laser capture microdissection techniques. Many of the resultant genes are of intense interest and may provide a powerful tool for determining the molecular mechanisms of sporadic ALS. In particular, dynactin-1, a major component of dynein/dynactin complex and several cell cycle-related genes are the targets of our research. Development and analysis of new disease models for sporadic ALS based on these genes will open an avenue for novel therapeutics.

(*Clin Neurol*, 49: 811—813, 2009)

Key words: sporadic amyotrophic lateral sclerosis, gene expression analysis, disease model, dynactin-1