

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09705

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子ERBB4を介する発症機序解明と抗がん剤の効果検証

研究課題名(英文)Clarification of pathomechanism via amyotrophic lateral sclerosis-causing ERBB4 and effectiveness of anti-cancer medicine.

研究代表者

平野 牧人(HIRANO, Makito)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：50347548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はERBB4を介する筋萎縮性側索硬化症(ALS)発症機序解明と抗がん剤の標的であるリン酸化カスケードを、ALS患者人工多能性幹(iPS)細胞由来神経細胞や神経様培養細胞で検討する事を目的とした。神経系細胞を用いた発現実験の結果、野生型と4種の変異型ERBB4の細胞内分布には大差がなかった。変異蛋白のほとんどは不安定であったが、リン酸化能は様々であった。抗がん剤は、ERBB4のリン酸化は抑制したが細胞障害性が強かった。患者iPS細胞由来通常神経細胞は、その維持が困難であったが、ラパマイシンやレチノイン酸が一部細胞死を抑制した。運動ニューロンへの分化でも、患者由来細胞は細胞死が誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異ERBB4蛋白の性質、すなわち、不安定性あるいはリン酸化低下が示され、機能低下が示唆された。一方、強制発現により、細胞が酸化ストレスへ脆弱となる傾向が判明した。別のALS原因蛋白SOD1のように機能低下と毒性獲得の両面から研究を進める必要があると考えられる。今回用いた抗がん剤は、リン酸化を抑制することから、いくつかの変異には逆効果である可能性がある。iPS細胞を用いた結果からは、ラパマイシンやレチノイン酸による部分的細胞死抑制効果が認められ、ERBB4自身のリン酸化カスケードそのものでなく、別の機序も考える必要がある。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to clarify the pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) via an ERBB4-related kinase pathway and the effectiveness of anti-cancer kinase inhibitors, using ALS-patient-derived induced pluripotent stem (iPS) cells and cultured neuronal SH-SY5Y cells. In SH-SY5Y cells expressing wild-type (WT) and mutant ERBB4, subcellular localization did not differ between WT and mutant proteins. Most mutants were unstable, but kinase activities varied considerably between mutants. Anti-cancer drugs reduced phosphorylation of ERBB4, but exhibited cellular toxicity. The maintenance of regular neurons induced from patient-derived iPS cells were difficult, but rapamycin and retinoic acid reduced cell death. Motor neurons from patient-derived iPS cells were unstable during motor neuron induction.

研究分野：臨床神経遺伝学

キーワード：リン酸化阻害剤 筋萎縮性側索硬化症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2013年に本邦にて常染色体性優性または孤発性 ALS の原因遺伝子として、*ERBB4*(蛋白 ErbB4)が同定された(Am J hum Genet 2013)。この遺伝子はメラノーマ、乳がん、肺がん細胞の体細胞変異が発見されていた。Family 蛋白の ERBB1,2,3 を含め、膜蛋白で、リン酸化を行うドメインを有し、がん治療の標的分子とされている。しかし、それら異なる病態がどのように関連しているか、特に ALS における ERBB4 およびそのリガンド NRG1 刺激系との関連は不明であった。

2. 研究の目的

ERBB4 遺伝子による ALS に至る病態機序の解明と、ERBB4 蛋白のリン酸化阻害剤あるいは、その他の薬剤による細胞保護作用の評価を行う。本研究の予備実験で、孤発性 ALS の 90 例中の 3 例に新規の遺伝子異常を見出し、1 例では、がんの既往があった(未発表)。ALS の原因変異は、リン酸化が障害されていると報告されていたが、自験例では、亢進している場合があった。まず、野生型と変異型 ERBB4 蛋白の性質や、毒性を検証し、その結果を踏まえて、治療薬として、リン酸化阻害剤投与を中心として、その他の薬剤の効果を検証した。

さらに、患者由来人工多能性幹(iPS)細胞を神経に誘導し、その形態、その形態変化を改善させる薬剤を探索した。当初の計画にはなかったが、一般的な神経への誘導のみならず、ALS の病態をみるのに最適な運動ニューロンへの分化を行い同様の検証を行った。

3. 研究の方法

野生型、変異型蛋白を神経系 SH-SY5Y 細胞に発現させ、それを用いて、ERBB4 の動向を観察、変異 ERBB4 導入細胞を観察して、細胞死が生じるか、あるいは生じない場合には、酸化ストレスをかけたのちに、リン酸化阻害剤などによる、細胞死抑制効果があるかを検討した。神経変性疾患は酸化ストレスに関連していることは広く知られており、日本では、活性酸素除去剤エダラボンが ALS 治療の保険適応となっている。また、患者由来 iPS 細胞を用いて、神経への誘導、さらに、運動ニューロンへの誘導を行い、神経細胞の生死や神経線維の進展を検討し、さらに薬剤による介入を行った。

4. 研究成果

ERBB4 変異導入神経芽腫 SH-SY5Y 細胞の解析と ERBB4 のリガンド刺激による局在変化：ERBB4 遺伝子の野生型と新規 3 変異および既報告 1 変異を C 端 GFP ERBB4 としてプラスミドを作製、神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に導入し、発現解析をおこなった。共焦点レーザー顕微鏡では、野生型と変異型ともに細胞質での発現が確認された。一部は、細胞膜に局在していた。リン酸化促進薬 NRG1 添加後数時間での細胞内局在は大きく変化がないようであった。N 端-GFP-ERBB4 も作製し、SH-SY5Y 細胞での N 端-GFP-ERBB4 の発現実験を行ったが、蛍光顕微鏡およびウエスタンブロットともに発現を確認できなかった。C 端にはシグナルペプチドがあり、GFP 融合シグナルペプチドは速やかに分解されたと考えられた。以上から、以後の研究は C 端 GFP ERBB4 を用いて実験を行うことにした。

野生型、変異型蛋白の性質：野生型と変異型蛋白の安定性を検討する目的で、上記 C 端 GFP ERBB4 を SH-SY5Y 細胞に発現させ、シクロヘキサミドを用いたウエスタンブロットにより検討した。ALS に関連する多くの変異蛋白はその半減期は野生型よりも優位に短くなっていた。しかし、一部では、わずかに低下している程度であった。酸化ストレスによる影響：上記の野生型・変異型 ERBB4 発現 SH-SY5Y 細胞に酸化ストレスとして H2O2 や BSO を負荷すると、少なくとも一部で ERBB4 のリン酸化が促進された。また、酸化ストレスにより、野生型よりも変異型発現細胞の方が、優位に細胞死が誘導された。

抗がん剤の神経系細胞に対する毒性の検証：抗がん剤は一般に正常細胞への影響が懸念されているが、ERBB4 発現-神経様 SH-SY5Y 細胞を用いて、抗がん作用のあるリン酸化阻害薬の薬剤負荷を行った。ラパチニブは ERBB1,2 の、アフアチニブは、ERBB1-3 の阻害剤であるが、ともに ERBB4 への作用も報告されている(Sci. Signal., 2014;7:ra116;

Structure. 2008;16: 460)。抗リン酸化ERBB4抗体によるウエスタンブロットを行った結果、ラバチニブではリン酸化蛋白の低下はなかったが、ERBB4の生理的切断は阻害されていると考えられた。一方、アフアチニブではリン酸化ERBB4が著減していた。ただし、細胞障害性が観察されたので、容量の調節を行った。残念ながら、酸化ストレスによる細胞死に関しては、薬剤の細胞毒性を上回る、細胞死抑制効果は見られなかった。一方、一部の抗酸化剤では、細胞死抑制効果は観察された。

ERBB4変異を有するALS患者iPS細胞の確立および神経への分化誘導：ERBB4変異を有するALS患者の線維芽細胞由来のiPS細胞は2種の変異について確立できた。神経に分化させたが、形態学的に正常細胞と似通っていたが、変異陽性と陰性のALS患者細胞では、細胞の維持が困難であった。抗酸化作用のあるレチノイン酸は一部そういった細胞死を抑制できたが十分ではなかった。また、オートファジー促進作用のあるラバマイシンも同様の効果が軽度認められた。細胞内に様々な封入体に陽性となる、p62陽性の凝集などは認められなかった。次に、近年比較的に速やかに正常対照のiPS細胞から運動ニューロンへ分化誘導する方法が開発されたが(Molecular Brain 2015;8:79)、同様の方法にて自験正常細胞も運動ニューロンへの分化を試みた。分化のマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼの発現を確認した。一方、患者細胞で同様に分化誘導を行ったが、運動ニューロンへ誘導される際に、細胞死が生じた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Yoshikawa K, Kuwahara M, Saigoh K, Ishiura H, Yamagishi Y, Hamano Y, Samukawa M, Suzuki H, Hirano M, Mitsui Y, Tsuji S, Kusunoki S. The novel de novo mutation of KIF1A gene as the cause for Spastic paraplegia 30 in a Japanese case. *eNeurologicalSci* 査読有、2019;14 34-37.
2. Samukawa M, Hirano M, Saigoh K, Kawai S, Hamada Y, Takahashi D, Nakamura Y, Kusunoki S. PSP-Phenotype in SCA8: Case Report and Systemic Review. *Cerebellum* 査読有、2019;18 (1):76-84.
3. Yamagishi Y, Saigoh K, Saito Y, Ogawa I, Mitsui Y, Hamada Y, Samukawa M, Suzuki H, Kuwahara M, Hirano M, Noguchi N, Kusunoki S. Diagnosis of Parkinson's disease and the level of oxidized DJ-1 protein. *Neurosci Res* 査読有、2018;128 58-62.
4. Inoue K, Fujimura H, Toyooka K, Hirano M, Nakamura Y, Sakoda S. An autopsy case of familial amyotrophic lateral sclerosis and dementia with p.R487H VCP gene mutation. *Cogent Med* 査読有、2018;5 (1):1434925
5. Hirano M, Samukawa M, Isono C, Saigoh K, Nakamura Y, Kusunoki S. Noncoding repeat expansions for ALS in Japan are associated with the *ATXN80S* gene. *Neurol Genet* 査読有、2018;4 (4):e252.
6. Yoshino H, Hirano M, Stoessl AJ, Imamichi Y, Ikeda A, Li Y, Funayama M, Yamada I, Nakamura Y, Sossi V, Farrer MJ, Nishioka K, Hattori N. Homozygous alpha-synuclein p.A53V in familial Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 査読有、2017;57 248 e247-248 e212.
7. Okazaki M, Suzuki H, Takahashi Y, Ishiura H, Goto J, Hirano M, Saigoh K, Nakamura Y, Naruse H, Mitsui J, Tsuji S, Kusunoki S. Novel mutation in the SOD1 gene in a patient with early-onset, rapidly progressive amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin Neurosci* 査読有、2017;5 (6):189-191.
8. Isono C, Hirano M, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S, Nakamura Y. Progression of Dysphagia in Spinocerebellar Ataxia Type 6. *Dysphagia* 査読有、2017;32 (3):420-426.
9. Hirano M, Yamagishi Y, Yanagimoto S, Saigoh K, Nakamura Y, Kusunoki S. Time Course of Radiological Imaging and Variable Interindividual Symptoms in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Associated with p.Arg487His Mutation in the VCP Gene. *Eur Neurol* 査読有、2017;78 (1-2):78-83.
10. Hirano M, Matsumura R, Nakamura Y, Saigoh K, Sakamoto H, Ueno S, Inoue H, Kusunoki S. Unexpectedly mild phenotype in an ataxic family with a two-base deletion in

the APTX gene. *J Neurol Sci* 査読有 2017;378 75-79.

11. Samukawa M, Kuwahara M, Morikawa M, Ueno R, Hamada Y, Takada K, Hirano M, Mitsui Y, Sonoo M, Kusunoki S. Electrophysiological assessment of Guillain-Barre syndrome with both Gal-C and ganglioside antibodies; tendency for demyelinating type. *J Neuroimmunol* 査読有 2016;301 61-64.
12. Saigoh K, Yoshimura S, Izumikawa T, Miyata S, Tabara Y, Matsushita T, Miki T, Miyamoto K, Hirano M, Kitagawa H, Kira J, Kusunoki S. Chondroitin sulfate beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (ChGn-1) polymorphism: Association with progression of multiple sclerosis. *Neurosci Res* 査読有 2016;108 55-59.
13. Okazaki M, Hirano M, Iwatsu T, Yamana M, Suzuki H, Satou T, Kusunoki S. Treatable Leukoencephalopathy in a Patient with Hypophosphatemia. *Case Rep Neurol* 査読有 2016;8 (3):264-271.
14. Hirano M, Oka N, Hashiguchi A, Ueno S, Sakamoto H, Takashima H, Higuchi Y, Kusunoki S, Nakamura Y. Histopathological features of a patient with Charcot-Marie-Tooth disease type 2U/AD-CMTax-MARS. *J Peripher Nerv Syst* 査読有 2016;21 (4):370-374.
15. Hirano M, Nakamura Y, Kusunoki S. Valosin-containing protein-related amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Rinsho Shinkeigaku* 査読有 2016;56 (4):285-286.

〔学会発表〕(計 22 件)

1. Hirano M, Samukawa M, Clsono C, Saigoh K, Nakamura Y, Kusunoki S. Non-coding repeats in the *ATXN8OS* gene are expanded in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. e-poster, 2019 American Academy of Neurology Annual Meeting 2019 May4-10, 米国 Philadelphia
2. 平野牧人. 嚥下造影にて咽頭期の障害を証明した CADASIL の 1 例. 第 44 回日本脳卒中学会学術集会. (2019 年 3 月 21 日~23 日, 横浜)
3. 竹原俊幸、平野牧人、寺村岳士、小野寺勇太、楠 進、江良沢実、福田寛二、p62 変異型筋萎縮性側索硬化症 iPS 細胞を用いた疾患機序解明の試み 第 18 回再生医療学会総会 (2019 年 3 月 21 日~23 日, 神戸)
4. 平野牧人、磯野千春、西郷和真、中村雄作、楠 進. 遺伝子変異を有する筋萎縮性側索硬化症に対する嚥下造影検査を用いた摂食嚥下機能評価、第 24 回日本摂食嚥下リハビリテーション学会学術大会 (2018 年 9 月 8 日 9 日, 仙台)
5. 平野牧人、寒川 真、磯野千春、西郷和真、中村雄作、楠 進. 筋萎縮性側索硬化症の非翻訳リピート解析による *ATXN8OS* 遺伝子変異の同定. 日本人類遺伝学会第 63 回大会 (2018 年 10 月 10 日~13 日, 横浜)
6. Samukawa M, Hirano M, Saigoh K, Kawai K, Hamada Y, Takahashi D, Nakamura Y, Kusunoki S. Expanded repeat sizes in spinocerebellar ataxia type 8 are associated with age at onset and phenotype. 日本人類遺伝学会第 63 回大会 (2018 年 10 月 10 日~13 日, 横浜)
7. Samukawa M, Hirano M, Saigoh K, Kawai S, Hamada Y, Takahashi D, Nakamura Y, Kusunoki S. Importance of SCA type 8. 143rd Annual Meeting of the American Neurological Association, Atlanta, USA, Oct 21-23, 2018
8. Hirano M, Samukawa M, Isono C, Saigoh K, Nakamura Y, Kusunoki S. Analysis of non-coding repeat expansions in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis reveals mutations in the *Atxn8os* gene. 143rd Annual Meeting of the American Neurological Association, Atlanta, USA, Oct 21-23, 2018
9. Isono C, Hirano M, Fukuda K, Samukawa M, Saigoh K, Nakamura Y, Kusunoki S. Characteristics and progression of dysphagia in amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic mutations. 143rd Annual Meeting of the American Neurological Association, Atlanta, USA, Oct 21-23, 2018
10. Hirano M, Isono C, Nakamura Y, Kusunoki S. Treatment of dysphagia in patients with Parkinson's disease, L-DOPA vs. rotigotine. 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, Sapporo, Japan, May 23-26, 2018
11. 磯野千春, 平野牧人, 上野周一, 濱田征宏, 楠 進, 中村雄作. 嚥下造影検査を用いた遺伝子変異を有する筋萎縮性側索硬化症の摂食嚥下機能. 第 59 回日本神経学会

学術大会 (2018年5月23日~26日, 札幌)

12. Saigoh K, Saito Y, Ogawa I, Mitsui Y, Hamada Y, Samukawa M, Suzuki H, Kuwahara M, Hirano M, Noguchi N, Kusunoki S. The level of oxidized DJ-1 protein in Parkinson's disease and other parkinsonism syndromes. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, Sept 16-21, 2017
13. Samukawa M, Hirano M, Saigoh K, Kusunoki S. Clinical differences between late-onset ataxia with intermediate CTA/CTG repeats and patients with Spinocerebellar ataxia type 8. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, Sept 16-21, 2017
14. Samukawa M, Hirano M, Saigoh K, Kusunoki S. Comparison of clinical features of a patient with intermediate CTA/CTG repeats with those of patients with typically expanded CTA/CTG repeats in spinocerebellar ataxia type 8. 142nd Annual Meeting of the American Neurological Association, San Diego, USA, Oct 15-17, 2017
15. Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, Samukawa M, Kusunoki S. Mutations in the COQ2 gene in atypical phenotypes of neurodegenerative diseases and supplementation of coenzyme Q10. 142nd Annual Meeting of the American Neurological Association, San Diego, USA, Oct 15-17, 2017
16. Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, Samukawa M, Kusunoki S. COQ2 gene analyses in multiple system atrophy and other neurodegenerative diseases and treatment of patients' cells with coenzyme Q10. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, Sept 16-21, 2017
17. Sakamoto H, Hirano M, Ueno S, Isono C, Nishida M, Saigoh K, Nakamura Y, Kusunoki S. A novel mutation in the VCP gene identified by analysis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Japan. Neuroscience Meeting 2016. San Diego, USA
18. Hirano M, Nakamura Y, Saigoh K, Sakamoto H, Ueno S, Suzuki H, Kusunoki S. Genetic analyses and counselling of sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Japan. 141st Annual meeting of American Neurological Association, 2016. Baltimore, USA
19. Hirano M, Isono C, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S, Nakamura Y. Comparison of improvement in swallowing functions between patients with Parkinson's disease treated with rotigotine and those with levodopa. 141st Annual meeting of American Neurological Association, 2016. Baltimore, USA
20. Isono C, Hirano M, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S, Nakamura Y. Progression of dysphagia in spinocerebellar ataxia type 6. 141st Annual meeting of American Neurological Association, 2016. Baltimore, USA
21. Hirano M, Satake W, Ihara K, Tsuge I, Suzuki Y, Nakamura Y, Kusunoki S, Toda T. The first Japanese patients with genetically definite Bardet-Biedl syndrome. 13th International Congress of Human Genetics, 2016. Kyoto
22. Isono C, Hirano M, Sakamoto H, Ueno S, Kusunoki S, Nakamura Y. Application of the test program for attention deficit disorders "MOGRAZ" in health adults with examinations of age-related changes. 10th ICME International Conference on Complex Medical Engineering, 2016. Tochigi

〔図書〕(計 3 件)

1. 平野牧人、パーキンソン病、病院と在宅をつなぐ脳神経内科の摂食嚥下障害 病態理解と専門職の視点 全日本病院出版会 pp18 - 22 2018 (総ページ数 155)
2. 平野牧人、ビデオによる嚥下障害の解析、Annual Review 神経、中外医学社 pp1 - 5 2018 (総ページ数 281)
3. 平野牧人、楠 進、末梢神経障害、ポケット版 カラー版 内科学 西村書店 pp1672 - 1681, 2016 (総ページ数 1929)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

総説

平野牧人：日本人におけるBardet-Biedl syndrome遺伝子解析、腎臓内科・泌尿器科
2017;5199-5202

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西郷 和真
ローマ字氏名：SAIGOH kazumasa
所属研究機関名：近畿大学
部局名：理工学部

職名：准教授
研究者番号（8桁）：50319688

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。