

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390238

研究課題名（和文） 孤発性ALSの動物モデルの開発

研究課題名（英文） Development of animal model for sporadic ALS

研究代表者

田中 章景 (FUMIAKI TANAKA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30378012

研究成果の概要：

孤発性 ALS 患者脊髄運動ニューロンにおいて、神経変性過程の初期より発現が低下している dynactin1 の発現変化を再現する線虫モデルを作成した。このモデルでは、進行性の運動機能障害、運動ニューロン変性を認め、患者運動ニューロンで観察された cyclin C の発現増加、核への局在変化を再現していた。これらのことより、dynactin1 ノックダウン線虫は孤発性 ALS の病態、特に細胞周期関連因子の異常を反映する重要な疾患モデルであると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：ALS、運動ニューロン、dynactin1、cyclin C、線虫、疾患モデル

## 1. 研究開始当初の背景

ALS は、運動ニューロンが特異的に障害され変性脱落するという特徴を有し、進行性の筋萎縮と筋力低下をきたす極めて予後不良の疾患である。約 10%をしめる遺伝性 ALS の一部のものでは原因遺伝子が同定され、そのトランスジェニック動物モデルの作成を通じ、病態解明および治療法開発が進められて

きている。しかし、ALS 患者のほとんどを占める孤発性 ALS については疾患モデルが確立していないことが主因となり、その病態解明と治療法開発は大きく遅れている。

我々は、孤発性 ALS の病態解明にあたり、まず患者脊髄運動ニューロンにおいて特異的に発現変化をきたしている分子を網羅的に解明すべく、遺伝子発現プロファイルを作

成した。これにより、解析を行った 4845 遺伝子中、コントロール例に比べ有意な発現上昇を示す 52 遺伝子 (1%)、発現低下を示す 144 遺伝子 (3%) を同定することに成功した (Jiang *et al.* *Ann Neurol* 2005)。次に、これら ALS 病態関連遺伝子の経時的発現状況を明らかにするために、様々な病期の多数例の孤発性 ALS 患者脊髄サンプルを用いて、これらの遺伝子とともに各種の神経変性マーカーの運動ニューロンでの発現程度を定量化し解析を行った。この結果、神経変性過程初期から発現低下をきたしている遺伝子の一つとして dynactin の主要なサブユニットである dynactin1 を同定した (Jiang *et al.* *J Neuropathol Exp Neurol* 2007, 平成 17-18 年度基盤研究 (B) 孤発性 ALS の病態関連標的分子の探索と治療法開発 研究代表者 田中章景)。

## 2. 研究の目的

孤発性 ALS の疾患モデル開発にあたっては、神経変性過程初期から神経変性に至るまでのなるべく多くの病態を反映するモデルが理想的と考えられる。そこで我々は、神経変性過程初期から発現低下をきたしていることを明らかにした dynactin1 の遺伝子発現変化を培養細胞、線虫、マウスに展開することによって孤発性 ALS のモデル開発を目指した。まず、dynactin1 の発現抑制により、線虫に孤発性 ALS 患者に類似した表現型と運動ニューロン変性を引き起こし、モデル動物として機能しうるかを検討した。さらに、この線虫モデルにおいて、孤発性 ALS 患者で見られる分子動態、特に細胞周期関連因子の動態が再現されるかどうかを確認することを目的とした。これにより、孤発性 ALS における神経変性の分子メカニズムに迫ることを目指した。

## 3. 研究の方法

dynactin1 の発現減少を再現する線虫モデルの確立のため、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変異体を作成した。コントロール群として、線虫とは無関係な LacZ 遺伝子を標的とした shRNA を発現させた。線虫モデルの表現型の解析は、一定時間内の首振り回数生存率、首振り回数、水中でのむち打ち回数をパラメーターとし、また運動ニューロンの形態変化は蛍光顕微鏡にて評価した。

次に、孤発性 ALS 脊髄運動ニューロン特異的遺伝子発現プロファイリングから得られた分子の中でも、有意な発現増加を来した遺伝子の一つとして、細胞周期関連因子である cyclin C に着目した。患者運動ニューロンでは cyclin C は、その発現を増すとともに、局在が細胞質から核へと変化することを見いだしている。

そこで、neuroblastoma cell 由来の SH-SY5Y 細胞において siRNA による dynactin1 ノックダウン (KD) を行い、cyclin C の発現、局在変化を蛍光免疫染色により評価した。

さらに、*dnc-1* KD 線虫運動ニューロンにおける内因性の *cic-1* (ヒト cyclin C の相同体) の mRNA レベルを whole mount in situ hybridization 法にて評価した。また、*dnc-1* KD による cyclin C の局在変化を検証するため、TagRFP を融合した *cic-1* (TagRFP-*cic-1*) を *acr-2* プロモーター下に *dnc-1* shRNA と共発現した。

さらに、核移行シグナル付き GFP を融合した *cic-1* (NLS-GFP-*cic-1*) を単独で高発現させることにより cyclin C の高発現と核局在

をシミュレートする線虫モデルの作成を行った。

#### 4. 研究成果

##### 【dynactin1 ノックダウン線虫モデル】

dnc-1 ノックダウン線虫群は、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認められた。さらにノックダウン群においては、より運動機能障害が重篤な個体において Coiler uncoordinated の表現型が認められた。この表現型は、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し、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。またノックダウン群においては、ventral cord の形態異常が認められ、運動ニューロンの変性を示唆する所見と考えられた。

##### 【dynactin1 KD 培養細胞モデルにおける cyclin C の解析】

われわれが構築した SH-SY5Y cells における dynactin1 ノックダウンシステムでは、内因性の dynactin1 発現レベルを、タンパク質レベルにおいてコントロール群の 30-40%にまで抑制し、これにより神経細胞死が生じることを確認している。

このモデルにおいて、cyclin C は、その発現量が増加するとともに核成分の顕著な増加が認められ、孤発性 ALS に類似した局在変化を再現することができた。定量 RT-PCR による検証においても、cyclin C の mRNA は dynactin1 KD により増加することが明らかとなった。

##### 【dnc-1 KD 線虫モデルにおける cyclin C の解析】

孤発性 ALS 運動ニューロン、および dynactin1 KD SH-SY5Y 細胞にて再現された

cyclin C の発現変化を dnc-1 KD モデルにおいて in situ hybridization 法で検証した。adult stage のコントロール群 (LacZ KD モデル) の運動ニューロンにおいては、*cic-1* (ヒト cyclin C の相同体) の mRNA の発現は抑制されているが、dnc-1 KD モデルでは、*cic-1* の mRNA は顕著に増加していた。

dnc-1 KD による cyclin C の局在変化を検証するために共発現した TagRFP-*cic-1* は、コントロール群では核外に局在したが、dnc-1 KD モデルでは、一部の運動ニューロンにおいて、核移行が認められた。

さらに、cyclin C の高発現と核局在を線虫で再現するために、NLS-GFP-*cic-1* を単独で高発現させると、dnc-1 KD に類似した coiler UNC の表現型と、進行性の首振り回数の低下が認められた。

##### 【考察】

本研究の最も重要な意義は、dynactin1 KD 培養細胞モデルおよび dnc-1 KD 線虫モデルは、孤発性 ALS 運動ニューロンで認められた cyclin C の発現変化を忠実に再現していたことである。

病変部位の神経細胞において、cyclin 等の細胞周期関連因子の異常発現が認められることは、アルツハイマー病やパーキンソン病など、他の孤発性神経変性疾患においても報告されている。しかし、その病態意義については必ずしも明らかではない。細胞周期の各段階は、種々のサイクリンの発現量の変動することで進行するが、cyclin C の mRNA は G1 期に最大となり、パートナーである CDK3 と協調し、静止期 (G0) からの逸脱に重要な役割を果たすことが知られている。すなわち、孤発性 ALS においては、本来なら終末分化した G0 期の神経細胞において細胞周期の re-entry が誘発されていることが示唆され、dynactin1 ノックダウンモデルは、この現象

を忠実に再現していた。

特に、線虫における *cic-1* (cyclin C) の高発現により、*dnc-1* KD モデルに類似した表現型を示したことから、孤発性 ALS 運動ニューロンで認められた cyclin C の発現量増加や核移行は単なる二次的な分子変化ではなく、運動ニューロン変性の病態にとって重要なイベントであると考えられた。すなわち、*dynaactin1* は神経細胞の分化維持に直接的な役割を果たす分子の一つである可能性があり、その発現低下により細胞周期の deregulation が生じ、神経変性を生じている可能性が推定された。

また、*dynaactin1* ノックダウンにより誘発される細胞周期異常のメカニズムの解明、およびその下流で誘発される分子変化の同定、および Cre-LoxP システムによる *dynaactin1* コンディショナルノックアウトマウスの作成を推進した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件、以下すべて査読有)

1. Katsuno M, Adachi H, Sobue G. The case for cholesterol. *Nature Med.* in press, 2009
2. Senda J, Ito M, Watanabe H, Atsuta N, Kawai Y, Katsuno M, Tanaka F, Naganawa S, Fukatsu H, Sobue G. Correlation between pyramidal tract degeneration and widespread white matter involvement in amyotrophic lateral sclerosis: A study with tractography and diffusion-tensor imaging. *Amyotroph Lateral Scler.* in press, 2009
3. Young JE, Garden GA, Martinez RA, Tanaka F, Sandoval CM, Smith AC, Sopher BL, Lin A, Fischbeck KH, Ellerby LM, Morrison RS, Taylor JP, La Spada AR. Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk. *J Neurosci.* 29: 1987-1997, 2009
4. Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Suga N, Takamori M, Ito M, Nakamura T, Matsuo K, Yamada S, Oki Y, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Atsuta N, Watanabe H, Fujimoto Y, Nakashima T, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Phase 2 trial of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol.* 65: 140-150, 2009
5. Tokui K, Adachi H, Waza M, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Tanaka F, Sobue G. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum Mol Genet.* 18: 898-910, 2009
6. Atsuta N, Watanabe H, Ito M, Tanaka F, Tamakoshi A, Nakano I, Aoki M, Tsuji S, Yuasa T, Takano H, Hayashi H, Kuzuhara S, Sobue G; Research Committee on the Neurodegenerative Diseases of Japan. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 276: 163-169, 2009
7. Takeuchi Y, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Kawashima M, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Walking capacity evaluated by the 6-minute walk test in spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 38: 964-971, 2008
8. Yamamoto M, Tanaka F, Tatsumi H, Sobue G. A strategy for developing effective amyotrophic lateral sclerosis pharmacotherapy: from clinical trials to novel

- pharmacotherapeutic strategies. *Expert Opin Pharmacother.* 9: 1845-1857, 2008
9. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Takeuchi Y, Kawashima M, Tanaka F, Adachi H, Sobue G. Molecular genetics and biomarkers of polyglutamine diseases. *Curr Mol Med.* 8: 221-234, 2008
  10. Suzuki K, Katsuno M, Banno H, Takeuchi Y, Atsuta N, Ito M, Watanabe H, Yamashita F, Hori N, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Sobue G. CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain.* 131: 229-239, 2008
  11. Iijima M, Koike H, Hattori N, Tamakoshi A, Katsuno M, Tanaka F, Yamamoto M, Arimura K, Sobue G; Refractory Peripheral Neuropathy Study Group of Japan. Prevalence and incidence rates of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in the Japanese population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 1040-1043, 2008
  12. Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. 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* 66: 617-627, 2007
  13. Adachi H, Waza M, Tokui K, Katsuno M, Minamiyama M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. *J Neurosci* 27: 5115-5126, 2007
  14. Niwa J, Yamada S, Ishigaki S, Sone J, Takahashi M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Disulfide bond mediates aggregation, toxicity, and ubiquitylation of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1. *J Biol Chem* 282: 28087-28095, 2007
  15. Yang Z, Chang YJ, Yu IC, Yeh S, Wu CC, Miyamoto H, Merry DE, Sobue G, Chen LM, Chang SS, Chang C. ASC-J9 ameliorates spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via degradation of androgen receptor. *Neurosci Lett* 13: 348-353, 2007
  16. Sobue G. Scientific highlights. 17th International Symposium on ALS/MND Yokohama, Japan, November 30, 2006 through December 2, 2006. *Amyotroph Lateral Scler* 8: 121-123, 2007
  17. Adachi H, Waza M, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 135-151, 2007
  18. Ishigaki S, Niwa J, Yamada S, Takahashi M, Ito T, Sone J, Doyu M, Urano F, Sobue G. Dorfin-CHIP chimeric proteins potently ubiquitylate and degrade familial ALS-related mutant SOD1 proteins and reduce their cellular toxicity. *Neurobiol Dis* 25: 331-341, 2007
- [学会発表] (計 3 件)
1. 田中章景、和座雅浩、丹羽淳一、祖父江 元. 孤発性 ALS 病態関連分子の探索と疾患モデルの開発. 第 49 回日本神経学会総会シンポジウム 横浜 2008 年 5 月 17 日

2. 和座雅浩、田中章景、蔣月梅、黄哲、勝野雅央、足立弘明、山本正彦、祖父江元.  
Dynactin-1ノックダウン線虫モデルの作成. 第49回日本神経学会総会 横浜 2008年5月16日

3. 田中章景、黄哲、蔣月梅、松尾幸治、和座雅浩、山本正彦、道勇学、祖父江元.  
孤発性 ALS 疾患モデルの開発：dynactin1ノックダウン細胞の解析. 第48回日本神経学会総会 名古屋 2007年5月16日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 章景 (TANAKA FUMIAKI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：30378012

### (2) 研究分担者

祖父江 元 (SOBUE GEN)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20148315

足立 弘明 (ADACHI HIROAKI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・COE特任講師  
研究者番号：40432257

勝野 雅央 (KATSUNO MASAHISA)  
名古屋大学・高等研究院・特任講師  
研究者番号：50402566

飯島 正博 (IIJIMA MASAHIRO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・COE特任助教  
研究者番号：40437041

### (3) 連携研究者

道勇 学 (DOYU MANABU)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40437041