

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390267

研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新たな遺伝子・タンパク・再生療法の開発

研究課題名（英文） Molecular pathomechanisms and gene/protein/regeneration therapy for amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

阿部 康二 (ABE KOJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20212540

研究成果の概要（和文）：

難治性神経疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）における選択的な運動ニューロン死にいたる分子メカニズムを明らかにするため、細胞外マトリックスなどの運動ニューロン周囲の外部環境や neurovascular unit などの血管性因子や糖代謝の関与を検討し、ALS 病態への各々の因子の役割を明らかにした。また、遺伝性 ALS および遺伝性運動ニューロン疾患の原因遺伝子として optineurin と NOP56 を同定し、それぞれ特異的な分子効果を生じていることを明らかにした。本研究による成果は ALS の病態解明と治療法開発へ向けて重要な知見を与えるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the respective roles of environmental factors such as extracellular matrix, neurovascular unit, or glucose metabolism around spinal motor neurons were investigated in a G93A-SOD1 transgenic mouse model for ALS. The novel responsible genes for familial ALS (optineurin) and the hereditary motor neuron disease (NOP56) had been discovered from this study, and the specific molecular effects of mutated proteins/transcripts were clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：神経変性疾患の臨床と研究（筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、脊髄小脳変性症など）、脳卒中の遺伝子治療と再生医療、生活習慣病と脳卒中・認知症
 研究費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症、ALS、SOD1、neurovascular unit、optineurin、Asidan、SCA36、

1. 研究開始当初の背景

ALSは1次および2次運動ニューロンの選択的細胞死により、全身の骨格筋の筋萎縮・筋力低下をもたらす予後が極めて不良な進行性難治性神経疾患であり、その原因病態も充分には解明されていない。ALS患者の5-10%は遺伝性(FALS)で、1993年に細胞質内の活性酸素消去機構であるSOD1遺伝子変異が一部のFALSの原因であることが明らかにされて以降、複数のFALS原因遺伝子が同定され分子病態解析も進展しているが、ALSに対する画期的な治療法は未だ確立されておらず、早期に有効かつ根本的な新規治療法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) ALS発症の分子病態の検討

- ①軸索伸長に関与する因子の検討
- ②細胞外マトリックスの関与の検討
- ③neurovascular unitの関与の検討
- ④脊髄におけるflow-metabolism uncouplingの検討

ALSにおける選択的運動ニューロン死への関与が想定される上記の因子を検討することにより発症に至る分子メカニズムを明らかにする。

(2) ALS原因遺伝子の同定と治療法開発

- ①optineurinの同定
 - ②Asidan (NOP56) の同定
- 遺伝性ALSおよび遺伝性運動ニューロン疾患を生じる原因遺伝子を同定し、選択的運動ニューロン変性に直接的に影響する分子を明らかにし分子病態解明を目指すと共に、再生療法などの新規治療法開発へ資することを目的とする。

3. 研究の方法

ALSの臨床症状を再現するモデル動物であ

る、G93A変異型SOD1遺伝子導入トランスジェニックマウスを用い、運動症状の発症前、発症早期、発症後期のそれぞれの時点においてALS病変の主座である脊髄における種々の分子の量的・質的な変化をウエスタンブロット解析や免疫組織化学などにより検討を行った。

また、遺伝性ALSおよび遺伝性運動ニューロン疾患家系の臨床的解析、また連鎖解析を始めとするポジショナルクローニングにより原因遺伝子および遺伝子変異を同定する。

4. 研究成果

(1) ALS発症の分子病態の検討

①軸索伸長に関与する因子の検討

ALSモデル動物であるG93A変異型SOD1遺伝子導入トランスジェニックマウス(Tgマウス)を用いて、軸索伸長阻害因子Nogo-AおよびそのレセプターであるNgRの時間的空間的な発現様式を解析した。Tgマウスの脊髄前角の運動ニューロンにおけるNogo-A発現は10週齢で一過性に増加し、15-18週齢では進行性に減少した。同様にNgR発現も10週齢で一過性に増加し、15-18週齢では進行性に減少した。対照として解析した脊髄背側部や小脳におけるNogo-A・NgRの発現は病態の進行に応じた変化を認めなかった。以上よりNogo-AおよびNgRの一過性の過剰発現は病的ストレスが加わったALS脊髄において運動ニューロンがより長く生存するために生じた反応である可能性が示唆された。

②細胞外マトリックスの関与の検討

ニューロンを取り囲む細胞外マトリックスの中で、再生促進や阻害に関与するタンパクの発現パターンをTgマウスの脊髄で経時的に観察し、ニューロン周囲の再生環境を評価した。また、シナプス部位で実際に再生が行われているかを検討した。Tgマウスの脊髄前角

では病態の進行と共に再生促進因子 γ 1-Lamininの増加と再生阻害因子Sema3Aの減少がみられ、ニューロン周囲の環境は必ずしも再生にとって不利ではないことが示唆された。一方、シナプス部位では再生部位に発現するタンパクであるGAP43の発現は増加したが、実際のシナプスを反映する synaptotagmin1は減少し、効果的なシナプス再生には至っていないことが示唆された。

③neurovascular unitの関与の検討

ALS 病態と脊髄血管の機能的、構造的異常との関係について、neurovascular unit 構成要素である endothelium、tight junction、basement membrane の主要構成タンパクの、運動機能障害の進行に伴う変化について検討した。Tg マウスの脊髄血管では運動障害を認める前から endothelium タンパクである PCAM-1 陽性の微小血管の径、密度が減少しており進行性に減少した。また、tight junction タンパクである occludin、basement membrane タンパクである collagen IV 陽性の血管構造も減少していった。これらの異常は運動障害を発症する前から認められ、特に脊髄前角で顕著であり、neurovascular unit の外側に位置する構成要素ほど損傷が激しかった。以上より neurovascular unit の異常と ALS 病態との強い関連が示唆された。

④脊髄におけるflow-metabolism uncouplingの検討

ALS 病変の主座である脊髄の局所血流やグルコース代謝の状態を調べることはこれまで技術的に困難であったが、Tg マウスを用いて独自の解析手法により運動障害の各病期毎に検討した。その結果、発症前期の脊髄灰白質において血流低下とグルコース代謝の上昇 (flow-metabolism uncoupling) が生じていることを見出した。ALS 病態における血管因子の関与を示す新たな所見であると

共に、本新知見は ALS における治療ターゲットにもなり得ると考えられた。

(2) ALS原因遺伝子の同定と治療法開発

①optineurinの同定

遺伝性 ALS 家系を対象としてポジショナルクローニングの手法により、遺伝性 ALS の新規遺伝子、optineurin (OPTN) における遺伝子変異を同定した。遺伝子変異型 OPTN を導入した培養細胞モデルを用いた実験からは、OPTN 本来の機能である NF- κ B 抑制機構の障害が明らかにされた。また、OPTN 変異陽性の遺伝性 ALS 患者剖検脊髄組織において、前角細胞に OPTN 陽性の細胞質内封入体を認め、孤発性 ALS 例における封入体についても OPTN 陽性所見を認めた。以上より、OPTN が ALS の病態と深く関わっていることを世界で初めて明らかにした。

②Asidan (NOP56) の同定

ALS と脊髄小脳変性症の臨床的特徴を併せ持つ、新たな遺伝性疾患(Asidan/SCA36)の原因遺伝子 (NOP56) およびその遺伝子変異が GGCTG の6塩基繰り返し配列の異常延長であることをポジショナルクローニングの手法を駆使して発見した。また、Asidan/SCA36 患者リンパ芽球核内に延長した GGCCUG リピート転写産物の凝集体である RNA-foci を認め、さらに RNA-FISH と免疫蛍光法を組み合わせた解析においては、RNA-foci と転写因子 SRSF2 との共局在を認めた。このことから、本疾患の分子メカニズムとして RNA レベルの病態 (RNA gain-of-function) が示唆された。ALS と脊髄小脳変性症の病態解明と治療法開発へ向けて大きな発見となった。

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)

1. Tian F, Morimoto N, Liu W, Ohta Y, Deguchi K, Miyazaki K, Abe K. In vivo optical imaging of motor neuron autophagy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 7, 985-992, 2011, 査読有
2. Liu N, Shang J, Tian FF, Nishi H, Abe K. In vivo optical imaging for evaluating the efficacy of edaravone after transient cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 1397, 66-75, 2011, 査読有
3. Shang J, Deguchi K, Ohta Y, Liu N, Zhang X, Tian F, Yamashita T, Ikeda Y, Matsuura T, Funakoshi H, Nakamura T, Abe K. Strong neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis, and antifibrosis of hepatocyte growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res* 89, 86-95, 2011, 査読有
4. Tanaka N, Ikeda Y, Ohta Y, Deguchi K, Tian F, Shang J, Matsuura T, Abe K. Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1370, 246-253, 2011, 査読有
5. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Yang LW, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes a type of spinocerebellar ataxia (SCA36) accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet* 89, 121-130, 2011, 査読有
6. Kozuki M, Kurata T, Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Ikeda Y, Abe K. Atorvastatin and pitavastatin protect cerebellar Purkinje cells in AD model mice and preserve the cytokines MCP-1 and TNF- α . *Brain Res* 1388, 32-38, 2011, 査読有
7. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Morimoto N, Ohta Y, Ikeda Y, Abe K. Progressive neurovascular disturbances in the cerebral cortex of Alzheimer's disease-model mice: protection by atorvastatin and pitavastatin. *Neuroscience* 197, 358-368, 2011, 査読有
8. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Panin VL, Morimoto N, Ohta Y, Nagai M, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. *Brain Res* 1371, 161-170, 2011, 査読有
9. Miyazaki K, Masamoto K, Morimoto N, Kurata T, Mimoto T, Obata T, Kanno I, Abe K. Early and progressive impairment of spinal blood flow-glucose metabolism coupling in motor neuron degeneration of ALS model mice autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 456-467, 2011, 査読有
10. Miyazaki K, Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 89, 718-728, 2011, 査読有
11. Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, Miyazaki

- K, Kurata T, Morimoto M, Murakami T, Takehisa Y, Ikeda Y, Kamiya T, and Abe K. Correlation of cerebral spinal fluid pH and HCO₃⁻ with disease progression in ALS. *J Neurol Sci* 37, 74-78, 2011, 査読有
12. Tian F, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Morimoto N, Shang J, Zhang X, Liu N, Ikeda Y, Matsuura T, and Abe K. In Vivo Imaging of Autophagy in a Mouse Stroke Model. *Autophagy* 6, 1107-1114, 2010, 査読有
13. Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, Zhang X, Ikeda Y, Matsuura T, and Abe K. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30, 1487-1493, 2010, 査読有
14. Liu N, Deguchi K, Shang J, Zhang X, Tian F, Yamashita T, Ohta Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. In vivo optical imaging of early-stage apoptosis in mouse brain after transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 88, 3488-3497, 2010, 査読有
15. Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Kawakami H, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465, 223-226, 2010, 査読有
16. Morimoto N, Nagai M, Miyazaki K, Ohta Y, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asanuma M and Abe K. Induction of parkinsonism-related proteins in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. *J Neurosci Res* 88, 1804-1811, 2010, 査読有
17. Shang J, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Zhang H, Morimoto N, Liu N, Zhang X, Tian F, Matsuura T, Funakoshi H, Nakamura T and Abe K. Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res* 88, 2197-2206, 2010, 査読有
18. Zhang X, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Shang J, Tian F, Liu N, Panin VL, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Temporal and spatial differences of multiple protein expression in the ischemic penumbra after transient MCAO in rats. *Brain Res* 1343, 143-152, 2010, 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
1. Liu N, Shang J, Tian FF, Nishi H, Abe K. In Vivo Optical Imaging for Evaluating the Efficacy of Edaravone after Transient Cerebral Ischemia in Mice. 第 23 回日本脳循環代謝学会総会. 2011.11.4-5, Tokyo, Japan
2. Kono S, Tian F, Deguchi K, Yamashita T, and Abe K. In vivo imaging of autophagy after cerebral ischemia in mice. The 5th Japanese-Korean Joint Stroke Conference. 2011.10.28-30, Gyeongju, Korea
3. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Morimoto N, Ohta Y, Abe K. Atorvastatin

- and pitavastatin reduce senile plaques and inflammatory responses in model mice with Alzheimer's disease. VASCog 2011, 2011.9.11-14, Lille, France
4. Miyazaki K, Ohta Y, Morimoto N, Kurata T, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Disruption of neurovascular unit relating to oxidative stress and mitochondrial deficit prior to motor neuron degeneration in ALS. The 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia. 2011.8.31-9.4, Kagoshima, Japan
 5. Morimoto N, Miyazaki K, Kurata T, Ide T, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. PROTECTIVE EFFECT OF MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTION FACTOR A OVEREXPRESSION IN ALS MODEL MICE. The 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia. 2011.8.31-9.4, Kagoshima, Japan
 6. Liu N, Deguchi K, Shang J, Zhang X, Tian FF, Yamashita T, Ohta Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. In vivo optical imaging of early stage apoptosis in mice brain after transient cerebral ischemia. 第36回日本脳卒中学会総会. 2011.7.30-8.1, Kyoto, Japan
 7. Morimoto N, Miyazaki K, Kurata T, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Induction of alpha-synuclein, PINK1, DJ-1 in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. 7th Annual Meeting of ASMRM and 10th J-mit. 2010.12.16-18, Fukuoka, Japan
 8. Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, Zhang X, Ikeda Y, Matsuura T, and Abe K. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. The 1st World Forum on Cerebral Blood Flow Metabolism & Function. 2010.10.18-20, Kyoto, Japan
 9. Zhang X, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Shang J, Tian F, Liu N, Panin VL, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Temporal and spatial differences of multiple protein expression in the ischemic penumbra after transient MCAO in rats. The 1st World Forum on Cerebral Blood Flow Metabolism & Function. 2010.10.18-20, Kyoto, Japan
 10. Omote Y, Ohta Y, Fukushima T, Takamatsu K, Ota T, Goto K, and Abe K. Effect of a free radical scavenger, edaravone, on motor palsy of acute lacunar infarction. 6th International Symposium on NEUROPROTECTION AND NEUROREPAIR 2010. 2010.10.1-4, Rostock, Germany
- [その他]
- 岡山大学神経内科ホームページ
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/shinkeinaika>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
 阿部 康二 (ABE KOJI)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：20212540
 - (2) 研究分担者
 池田 佳生 (IKEDA YOSHIO)
 岡山大学・岡山大学病院・講師
 研究者番号：00282400
 - (3) 連携研究者