

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659428

研究課題名(和文) 球脊髄性筋萎縮症における活動依存性シナプス病態の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of activity-dependent synapse pathology and development of therapy for spinal and bulbar muscular atrophy

研究代表者

勝野 雅央 (KATSUNO, MASAHISA)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50402566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症(SBMA)は成人発症の運動ニューロン疾患であり、アンドロゲン受容体におけるCAG繰り返し配列の異常延長を原因とするポリグルタミン病である。近年、神経変性疾患の初期病態としてシナプス機能障害が注目されている。本研究ではSBMAのマウスモデルにおける神経筋接合部の病理的变化を免疫組織化学とマイクロアレイ解析により解析した。その結果、SBMAマウスの神経筋接合部では神経症状の発症前から脱神経がみられ、イオン結合などの機能を有する分子の発現が低下していた。

研究成果の概要(英文)：Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is an adult-onset motor neuron disease caused by the expansion of a trinucleotide CAG repeat in androgen receptor (AR). Recent studies suggest that synaptic dysfunction is an early molecular event in the pathogenesis of various neurodegenerative disorders. In this study, we investigated the synapse pathology in a mouse model of SBMA using immunohistochemistry and microarray analysis. Our results showed that neuromuscular junctions of SBMA mice are denervated at pre-symptomatic stage of the disease. The gene expression analysis identified down-regulated genes that have functions including ion binding.

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：運動ニューロン疾患 シナプス 神経筋接合部 球脊髄性筋萎縮症 神経変性

1. 研究開始当初の背景

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の CAG 繰り返し配列の異常伸長による神経変性疾患であり、下位運動ニューロンの変性に伴う進行性の筋萎縮・筋力低下を呈する (Katsuno et al. *Nat Med* 2003)。中心的病態は変異 AR のテストステロン依存性核内集積であり、転写障害や軸索輸送障害を介して神経変性が惹起されると考えられている。SBMA の特徴のひとつは運動ニューロン変性ととも骨格筋にもプライマリーな病変が生じていることであり、神経変性における神経・筋クロストークを解析する良いモデルと考えられる。

様々な神経変性疾患において、病態プロセスの最も早期にシナプスが障害されることが示唆されており、SBMA と同様に CAG リピート伸長を原因とするハンチントン病のマウスモデルにおいても発症前に神経筋接合部の過活動が検出されている。SBMA のシナプス病変は明らかでないが、運動ニューロンと骨格筋が同時に障害されることから、神経筋シナプスにおける変化を解明することで初期の病態を明らかにし、治療標的分子を明らかにすることができると考えられる。また、運動ニューロン疾患における神経筋接合部病変の活動依存性変化の分子基盤を明らかにすることにより、薬物や運動療法による治療法の開発を推進できると考えられる。

2. 研究の目的

SBMA マウス神経筋接合部において発症前に生じている分子変化を、形態学的解析および網羅的遺伝子発現解析により明らかにし、その結果を患者検体を用いた解析により検証する。SBMA マウスの神経筋接合部において発症前から発現が変化している分子について、その病態への関与を神経系細胞と筋細胞の共培養システムを用いて解析し、神経筋接合部を標的とする治療法スクリーニング系を確立する。また、発症前および発症後の運動や安静が神経筋接合部の病変に与える影響を生化学的・病理学的に解析する。さらに、スクリーニングで効果が認められた低分子化合物が神経筋接合部の病変に及ぼす効果を生化学的・病理学的に解析するとともに、運動機能や神経病理学的所見に対する効果についても解析する。また、薬物治療と運動の併用が神経筋接合部の形態・機能やシナプス局所の遺伝子発現に与える影響についても同様に解析し、バイオマーカーの開発と臨床試験への展開を図る。

3. 研究の方法

まず SBMA マウスの神経筋接合部を -bungarotoxin および neurofilament H、synaptophysin に対する抗体を用いた免疫組織化学により病理学的に解析する。また、6 週齢の SBMA マウス前脛骨筋の神経筋接合部を acetylthiocholine で染色し、レーザーマイクロダイセクションを用いて神経筋接合部を単離し、Ovation Pico WTA System V2 によりランダムプライマーを用いて増幅し、Agilent (Mouse) SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60K による遺伝子発現解析 (マイクロアレイ) を行い、神経筋接合部における発症前の分子変化を明らかにする。さらに、SBMA マウスに運動負荷を行い、発症前および発症後の運動や安静が神経変性に及ぼす影響を明らかにする。運動負荷は running wheel を用い、5 週齢は週 3 回 (5m/min x 30 min)、6~8 週齢は週 5 回 (5m/min x 60 min) で合計 4 週間施行し、ロータロッド、握力、体重などを解析した。

4. 研究成果

SBMA マウス骨格筋 (前脛骨筋) の神経筋接合部では 6 週齢 (神経症状の発症前) から脱神経がみられ、進行とともに悪化する傾向が得られた (図 1)。

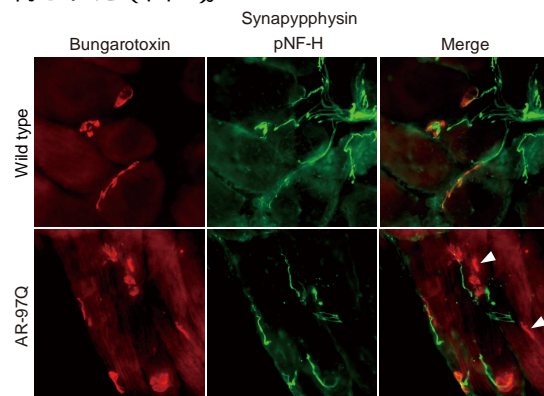


図 1. SBMA のマウスモデル神経筋接合部における脱神経

野生型マウスではほとんど全ての神経筋接合部に運動軸索の終末部が存在するが、SBMA マウスでは脱神経 (矢頭) が認められる。

また、6 週齢の SBMA マウス前脛骨筋の神経筋接合部をレーザーマイクロダイセクションを用いて単離し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った結果、神経筋接合部接合部において特異的に発現が変化している

分子を同定した (図 2)。

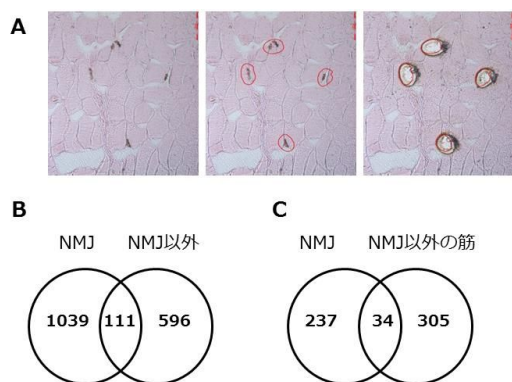


図 2. SBMA のマウスモデル神経筋接合部における遺伝子発現変化

SBMA マウス前脛骨筋の神経筋接合部を acetylthiocholine で染色し、レーザーマイクロダイセクションを用いて神経筋接合部を単離した(A)。マイクロアレイ解析の結果、神経筋接合部接合部において特異的に発現が増加(B)および(減少)している分子が同定された。

Gene ontology 解析により、SBMA マウス神経筋接合部接合部では、神経症状の発症前から TGF-beta receptor, type I/II extracellular region, regulation of insulin-like growth factor receptor signaling pathway などの機能を有する分子の発現が亢進し、calcium ion binding, metal ion binding などの機能を有する分子の発現が低下していた。今後定量 RT-PCR や免疫組織化学を用いたデータのバリデーションや進行期(13週齢)のマウスについても解析が必要であると考えられる。

さらに、活動依存性のシナプス機能変化が病態に与える影響を明らかにすべく、マウスに運動を負荷して、神経症状の変化を解析した。その結果、神経症状の発現前の5週齢から運動負荷を開始したところ SBMA マウスの運動機能に改善が認められたが、発症と同時期の9週齢から運動負荷した場合には運動機能の改善効果は認められなかった。

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 15 件)

1. Araki A, Katsuno M, Suzuki K, Banno H, Suga N, Hashizume A, Mano T, Hijikata Y, Nakatsuji H, Watanabe H, Yamamoto

M, Makiyama T, Ohno S, Fukuyama M, Morimoto S, Horie M, Sobue G. Brugada syndrome in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology* 2014 [in press] doi: 10.1212/WNL.000000000000434. 査読有

2. Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Qiang Q, Ding Y, Watanabe H, Yamamoto M, Ohtsuka K, Sobue G. Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2014 [in press] 査読有
3. Doi H, Adachi H, Katsuno M, Minamiyama M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Qiang Q, Tanaka F, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Sobue G. p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar muscular atrophy mouse model. *J Neurosci.* 33: 7710-7727, 2013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3021-12.2013. 査読有
4. Katsuno M, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Translational research on disease-modifying therapies for neurodegenerative diseases. *Neurology and Clinical Neuroscience* 1: 3-10, 2013. doi: 10.1002/ncn3.7 査読有
5. Qiang Q, Adachi H, Huang Z, Jiang YM, Katsuno M, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Sobue G. Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *J Neurochem.* 126: 122-130, 2013. doi: 10.1111/jnc.12172. 査読有
6. Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, Nakai A, Sobue G. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Nat Commun.* 4:1405, 2013. doi: 10.1038/ncomms2417 査読有
7. Katsuno M, Tanaka F, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Watanabe H, *Sobue G. Pathogenesis and therapy of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Prog Neurobiol.* 99: 246-256, 2012. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.007 査読有
8. Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Cell Tissue Res.* 349: 313-320, 2012. doi: 10.1007/s00441-012-1377-9 査読有

9. Tanaka F, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Adachi H, Sobue G. Current status of treatment of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neural Plast*. 2012;369284, 2012. doi: 10.1155/2012/369284 査読有
10. Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Molecular pathophysiology and disease-Modifying therapies for spinal and bulbar muscular atrophy. *Arch Neurol*. 69: 436-440, 2012. doi: 10.1001/archneurol.2011.2308 査読有
11. Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Perspectives on molecular targeted therapies and clinical trials for neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 329-335, 2012. doi: 10.1136/jnnp-2011-301307 査読有

[学会発表](計 24 件)

1. Katsuno M, Sobue G. Pathogenesis of selective neurodegeneration in polyglutamine-mediated motor neuron disease. International symposium. New Frontier of Molecular Neuropathology 2014, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, Mar 16-17, 2014.
2. 勝野雅央. 運動ニューロン疾患に対する分子標的治療法の開発. 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター, 岡崎市 2013.11.19-20.
3. Adachi H, Qiang Q, Hunag Z, Jinag YM, Katsuno M, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Sobue G. Genistein, a natural product derived from soybeans, ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron disease. Neuroscience 2013, San Diego, USA, Nov 9-13, 2013.
4. Ishigaki S, Fujioka Y, Udagawa T, Honda D, Katsuno M, Sobue G. FUS regulates alternative splicing patterns of Mapt by cooperating with PSF/SFPQ: a novel link between FUS and Tau in the pathogenesis of ALS and FTLD. Neuroscience 2013, San Diego, USA, Nov 9-13, 2013.
5. Fujioka Y, Ishigaki S, Udagawa T, Honda D, Katsuno M, Sobue G. FUS-regulated region- and cell-type-specific transcriptome is associated with cell selectivity in ALS/FTLD. Neuroscience 2013, San Diego, USA, Nov 9-13, 2013.
6. Katsuno M. Neurobiological Study of Postmortem Brain from Brain Bank: for the study of spinal disorders. Neuro2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto City, Japan, Jun 22, 2013.
7. Katsuno M, Adachi H, Kondo N, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Tanaka F, Sobue G. Cell cycle dysregulation in motor neurons of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). 23rd International Symposium on ALS/MND. Chicago, USA, Dec 5-7, 2012.
8. Iguchi Y, Katsuno M, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 results in age-dependent progressive motor impairment and neuropathological alterations, mimicking motor neuron disease. 23rd International Symposium on ALS/MND. Chicago, USA, Dec 5-7, 2012.
9. Hashizume A, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Mano T, Atsuta N, Oe H, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Longitudinal changes of outcome measures in spinal and bulbar muscular atrophy. 23rd International Symposium on ALS/MND. Chicago, USA, Dec 5-7, 2012.
10. Ishigaki S, Fujioka Y, Masuda A, Iguchi Y, Katsuno M, Ohno K, Sobue G. Comparison of Fus-regulating gene expression and alternative splicing profiles among different cell lineages in the central nervous system. Neuroscience 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
11. Adachi H, Doi H, Katsuno M, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Iida M, Tanaka F, Sobue G. p62/SQSTM1 removes toxic mutant androgen receptor in spinal bulbar muscular atrophy model mouse. Neuroscience 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
12. Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Muramatsu SI, Sobue G. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. Neuroscience 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
13. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. Naratriptan ameliorates SBMA pathology by the repression of CGRP1-activated JNK pathway. Neuroscience 2012, New Orleans, USA, Oct 13-17, 2012.
14. Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Doi H, Kondo N, Iida M, Ishigaki S, Fujioka Y, Matsumoto S, Miyazaki Y, Tanaka F, Kurihara H, Sobue G. CGRP1 is the new therapeutic target for SBMA (Spinal and Bulbar Muscular Atrophy). 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, Kobe International Conference Center, Kobe, Japan, Sep 30-Oct 2, 2012.
15. 勝野雅央. 運動ニューロンの老化と変性. 第34回日本生物学的精神医学会シ

ンポジウム『老いを科学する 神経変性の視点から』神戸国際会議場, 神戸市, 2012.9.29.

16. Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Tanaka F, Sobue G. Molecular pathogenesis and therapy of polyglutamine-induced motor neuron degeneration. 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya Congress Center, Nagoya City, Japan, Sep 21, 2012.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

勝野 雅央 (Katsuno Masahisa)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 50402566

(2)研究分担者

足立 弘明 (Adachi Hiroaki)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座
准教授
研究者番号 : 40432257