

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430014

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症発症機序におけるイノシトール6リン酸キナーゼの役割

研究課題名(英文)The role of inositol hexakisphosphate kinases for the onset mechanism of amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

永田 栄一郎(NAGATA, Eiichiro)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：00255457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：変異型SOD1マウス脊髄のイノシトール6リン酸キナーゼ2(IP6K2)の発現状況の検討より、発症前よりIP6K2の発現が上昇していることを発見した。よって、IP6K2が、ALS発症前の診断マーカーになり得ることを見出した。また、ALS患者剖検脊髄においてもIP6K2が、他のサブタイプであるIP6K1、IP6K3に比べても明らかに発現量が多く、特にALS剖検脊髄で有意に発現が上昇していた。この結果よりIP6K2がALS発症の病態に深く関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To address the role of IP6K2 in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), we investigated the expression level of IP6K2, employing G93A mutant human superoxide dismutase-1 over-expressing transgenic mice (Tg mice) as ALS. The specimens of spinal cords were obtained from Tg mice and week age-matched wild-type mice. We investigated the expression levels of IP6K2 on the genes and proteins in Tg and wild-type mice. The gene expression level of IP6K2 in Tg mice at postnatal 17 weeks around the onset of ALS symptoms was lower compared to that of wild-type mice, while at postnatal 12 weeks before the symptoms of ALS it was significantly higher compared to wild-type mice. In the immunohistochemistry against IP6K2, it was stained in the cytoplasm in Tg mice during each week-old. These findings suggest that IP6K2 might be activated in Tg mice before the onset of ALS. IP6K2 might be a pre-symptomatic biomarker for ALS.

研究分野：神経内科

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 イノシトール6リン酸キナーゼ2 脊髄前角細胞

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、現代においても不治の病として、神経難病の中でも最も予後が悪く、未だに発症原因が明らかになっていない進行性の運動ニューロン疾患である。特に中枢神経 (上位) および末梢神経 (下位) の運動ニューロンが選択的に障害される疾患である。その発症原因としては、酸化ストレス、グルタミンなどによる神経細胞毒性、アポトーシス、ミトコンドリア異常、ER ストレス、RNA 動態異常、グリア細胞の異常や神経細胞内凝集体 (TDP-43 など) 異常などが報告されているが、病態の本質は不明である。我々は、以前よりイノシトール 6 リン酸キナーゼ (IP6K) の研究を行っており、この IP6K が中枢神経系に多く存在し、細胞死を促進することを明らかとした。また、神経変性疾患においてもハンチントン病において IP6K が活性化されており、ハンチントン病細胞死の原因であることを突き止めた (Nagata E, et al.: J Biol Chem, 2011)。イノシトールリン酸は、グルコースの構造に類似した六角形のイノシトール環にリン酸基が結合し、生物活性を示す分子で、代表的には、リン酸基が 3 分子結合したイノシトール 3 リン酸 (IP3) がセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウム動態と深く関連し、様々な生命現象を引き起こすことが報告されている。このイノシトール環は 6 つのヒドロキシ基を有し、6 分子のリン酸が結合することができる (IP6)。IP6 は構造的に安定化しているが、更にリン酸が結合する場合にはリン酸にリン酸基が結合する形をとる (これを pyrophosphate と呼んでいる) (IP7 (PP-IP5))。IP7 は余分にリン酸が一つ結合することにより、非常に高エネルギーを含有した分子で、IP7 のリン酸が ADP と結合することにより ATP 生成を行うことができる (脱リン酸反応)。この

ように IP7 は、生体内の各種の反応のエネルギー源として重要な役割を果たす分子と想定されるが、現在までに IP6、IP7 に関しての生物学的意義については、ほとんど明らかにされていない。また、イノシトールリン酸の中でも植物界を含め、生物界において生体内に一番多量に存在しているのは IP6 であり、特に哺乳類では中枢神経系に多く分布していることが明らかとなっている (Saiardi A, et al. Curr Biol, 1999)。我々は、IP6 をリン酸化し、IP7 にする酵素 (イノシトール 6 リン酸キナーゼ (IP6K)) を過剰に発現させた細胞系で、アポトーシスが誘導されるということを明らかとした (Nagata E, et al.: J Biol Chem, 2005)。この IP6K は、我々が報告したように哺乳類では 3 つのサブタイプ (IP6K1, IP6K2, IP6K3) が存在する (Saiardi A, et al.: Curr Biol, 1999; J Biol Chem, 2001)。IP6K1 と IP6K3 は脳内の大脳皮質、海馬、線条体、小脳プルキンエ細胞に分布し、IP6K2 は、海馬、線条体、小脳プルキンエ細胞、更には脊髄前角細胞 (運動ニューロン) に多く分布している。細胞内局在としては、IP6K1 と IP6K3 は核内、細胞質に均一に存在し、IP6K2 は主に核内に存在する。しかし、ストレス負荷が細胞にかかる時、IP6K2 は活性化され、核内より細胞質にトランスロケートすることを明らかにした。更に、培養細胞で IP6K を過剰に発現させるとオートファゴゾームが誘導されると同時に細胞死も促進されることを明らかとした (オートファジー) (Nagata E, et al.: Intern J Biochem Cell Biol, 2010)。従来よりオートファジーは、細胞死に対して保護的に働くと考えられていたが、この結果より細胞死誘導にも関与していることが明らかとなった。また、その原因として細胞内の Akt 不活化が原因であることを突き止めた。つまり、IP6K が活性化されると IP7 産生と Akt

不活化が起こり、細胞死が誘導されるものと考えられる。既に我々は、IP7 と Akt が結合することを報告している (Luo HR, et al: Cell, 2003)

更に我々は、ALS の原因として注目されている hnRNP の一つである TDP-43 が異常リン酸化され、細胞内凝集体を形成し、IP6K2 と免疫沈降法により共沈殿してくることを報告した (2009 SFN meeting)。また、この凝集体を形成したのみでは細胞死が誘導させず、IP6K、特に IP6K2 が活性化されると細胞死が急激に増加することを見出した (2010 SFN meeting)。これらの結果より、ALS で IP6K2 が活性化され、細胞死を誘導していることが示唆される。

2. 研究の目的

ALS の原因究明のために、我々は、IP6K2 が ALS の原因の一つといわれている TDP-43 に結合し、IP6K2 が活性化され細胞内局在を変化させ、細胞死を促進することを発見した。これらの結果より、IP6K2 が、ALS 発症とどのようにかかわっているかを ALS モデルマウス (変異型 SOD1 トランスジェニック・マウス) や ALS 剖検検体を用いて検討する。

3. 研究の方法

1. 変異型 SOD1 トランスジェニック・マウス (mSOD1 Tg) における IP6K 活性の経時的変化の検討

mSOD1 Tg マウスおよび週齢をマッチさせた野生型マウスで、生後6週齢より、12週齢、17週齢、22週齢において、脊髄を採取した。採取し検体に関して、IP6K2 の免疫組織化学的検討では、我々が作成したラビット IP6K2 ポリクローナル抗体を用いて、ABC法で行った。また、遺伝子発現に関しては、脊髄の一部を Trizol にてホモジェネートして、total RNA を抽出し、Superscript III

(Invitrogen, USA) で cDNA を合成し、マウス IP6K2 の2種類の Taqman プローブを用いて、リアルタイム PCR (qPCR) を施行した。

2. IP6K2 コンディショナル・トランスジェニックマウスにおける運動ニューロン疾患との関連についての解析

遺伝子改変技術により、既に我々は、IP6K2 遺伝子 loxP マウスの作製に成功している。運動ニューロンに特異的に Cre を発現しているマウス (VACh-T.Cre) と交配して、IP6K2 コンディショナル・トランスジェニックマウスを作成した。このマウスに関して、生後よりの行動観察、IP6K2 の脳や脊髄の免疫組織学的検討、遺伝子発現、タンパク質発現に関して検討した。

3. ALS 患者 IP6K の検討

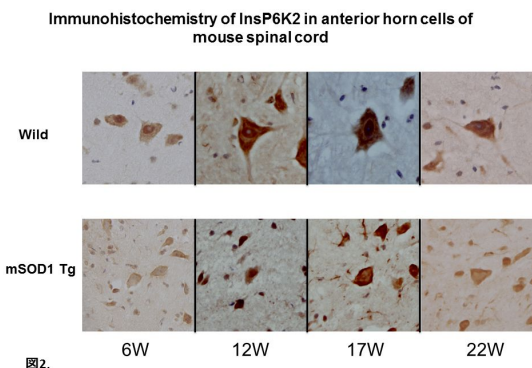
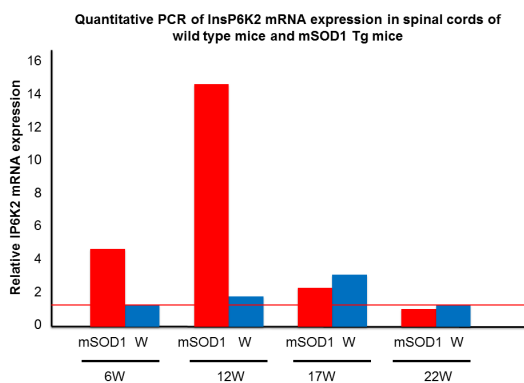
包括型脳科学研究推進支援ネットワークおよび当院患者からの剖検脊髄凍結ブロックを用いて、コントロール (神経変性疾患以外) 5例、および ALS 10例において、この検体を用い、マイクロダイセクション法により脊髄前角細胞のみを抽出した。マイクロダイセクション法には、PALM Robot-Microbeam system (P.A.L.M. Mikrolaser Technology AG, Bernried, Germany) を用いて脊髄前角細胞のみを抽出した。抽出したサンプルを WT-Ovation System キット (Takara バイオ) で cDNA 増幅を行い、RNeasy キット (Qiagen) で精製した。その後、2種類のヒト IP6K2 の Taqman プローブを用いて、Real time PCR を施行した。本研究は当大学倫理委員会承認済みである (承認番号: 10R-010号)。

4. 研究成果

1. 脊髄における IP6K2 発現上昇は、mSOD1 Tg マウスの症状発症前に上昇する (図 1)。

ALS 症状発症前の生後 6 週齢、12 週齢と症状発症後の 17 週齢、22 週齢の mSOD1 Tg マウスにおいて、脊髄における IP6K2 発現を週齢マッチした野生型マウスと比較検討した。その結果、6、12 週齢では、IP6K2 発現が野生型マウスと比較して上昇していることが分かった。ALS 症状発現後の 17 週齢、22 週齢では、むしろ IP6K2 発現が野生型マウスと比較して減少していた。さらに脊髄前角細胞においては、mSOD1 Tg マウスで、IP6K2 染色が、野生型マウスと比較して核より細胞質に強く染まる傾向があった（図 2）。また、脊髄前角細胞数は、mSOD1 Tg マウスで、野生型と比較して明らかに減少していた（未発表データ）。

これらの結果より、mSOD1 Tg マウスでは、症状の発症前より IP6K2 発現が上昇しており、また、細胞質に IP6K2 が強く染まることより、IP6K2 が活性化されていると考えられた。17 週齢、22 週齢で IP6K2 発現が、野生型と比較して減少傾向にあるのは、おそらく脊髄前角細胞数が mSOD1 Tg マウスで



減少していることが原因と考えられた。

以上より、IP6K2 は ALS 発症前に上昇している可能性があり、ALS 早期診断のバイオマーカーとなり得ると考えられる。

2. 選択的 IP6K2 過剰発現マウス (IP6K2 コンディショナル・トランスジェニックマウス) では、早期に明らかな臨床症状は示さなかった。

同週齢の野生型マウスと選択的 IP6K2 過剰発現マウスの行動様式を、今回は 20 週齢まで観察できたが、この時点では、症状に明らかな差異は認められなかった。選択的 IP6K2 過剰発現マウスの脳、脊髄、肝臓、腎臓において IP6K2 の遺伝子発現を検討したところ、脳、脊髄においてのみ、野生型マウスと比較して、ごくわずかではあるが、発現が上昇していた。また、IP6K2 の免疫染色でも、脊髄前角細胞において選択的 IP6K2 過剰発現マウスで、IP6K2 が細胞質に強く染色された (IP6K2 活性化されている)。今回作成したマウスは、遺伝子解析の結果、IP6K2 遺伝子のコピー数が少なく、これにより、目的の部位に強く IP6K2 発現が見られなかったことと、老齢マウス (20 週齢以降) についての検討は今後の課題となる。

3. ALS 患者脊髄前角細胞で、特異的に IP6K2 発現が上昇している。

ALS 患者 10 例と神経疾患以外で死亡した 5 例 (コントロール) の剖検脊髄凍結検体の前角細胞において、有意に IP6K2 発現が上昇していた。一方、IP6K のサブタイプである IP6K1 や IP6K3 はほとんどヒトでは、発現がなく、さらに ALS 患者とコントロールで差異はなかった (図 3)。

以上の結果より、ALS において IP6K2 は、IP6K の中でも特異的に上昇しており、ALS 発症前のバイオマーカーとなり得る可能性があるのと、IP6K2 が活性化されることに

より、神経細胞死が誘導される (Nagata E, et al. JBC, 2005) ことより、ALS 発症の病態に深く関与していることが明らかとなった。

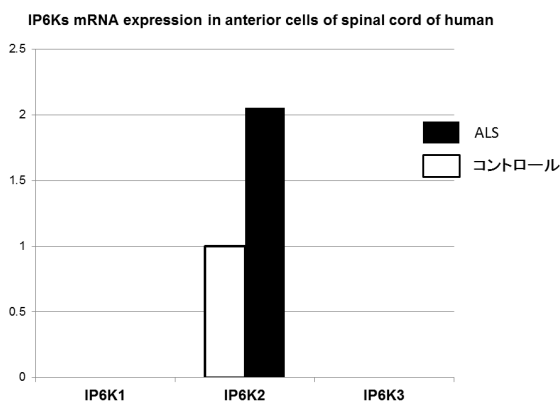


図3.

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1件)

1. Nagata E, Nonaka T, Moriya Y, Fujii N, Okada Y, Tsukamoto H, Itoh J, Okada C, Satoh T, Arai T, Hasegawa M, Takizawa S.
Inositol hexakisphosphate kinase 2 promotes cell death in cells with cytoplasmic TDP-43 aggregation. *Mol Neurobiol* 2015; Epub.

[学会発表](計4件)

1. Nagata E, Moriya Y, Fujii N, Kohara S, Satoh T, Takao M, Lei P, Ogawa H, Hadano S, Mihara B, Takizawa S.
Inositol hexakisphosphate kinase 2 is one of the candidate molecules as diagnostic marker for amyotrophic lateral sclerosis.
Neuro2013 2013年6月15日 京都国際会議場
2. 永田栄一郎、森谷祐介、藤井奈津子、

小原さおり、佐藤忠之、高尾昌樹、吉井文均、美原盤、瀧澤俊也

イノシトール6リン酸キナーゼ2は筋萎縮性側索硬化症患者脊髄において細胞死を促進する

第54回日本神経学会学術大会 2013年5月23日 名古屋国際会議場

3. 森谷祐介、永田栄一郎、潘雷、佐藤忠之、小川温子、秦野伸二、瀧澤俊也
ALSモデルマウスにおけるイノシトール6リン酸キナーゼ2(IP6K2)の病態への関連性について(第2報)
第54回日本神経学会学術大会 2013年5月23日 名古屋国際会議場

4. Nagata E, Moriya Y, Fujii N, Kohara S, Satoh T, Takao M, Yoshii F, Mihara B, Takizawa S. Inositol hexakisphosphate kinase 2 promotes cell death in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients.
Neuroscience2012 2012年11月10日 ニューオーリンズコンベンションセンター、米国

[図書](計1件)

1. 永田栄一郎 イノシトールリン酸代謝と脳機能 小川純人編 認知機能とカルシウム—基礎と臨床、pp47-59、医薬ジャーナル社、東京、2015年

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

永田 栄一郎 (NAGATA, Eiichiro)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：255457

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし