

令和元年6月12日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13060

研究課題名(和文) SOD1凝集体を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたALS病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of ALS pathophysiology using monoclonal antibodies that specifically recognizes SOD1 aggregates

研究代表者

藤原 範子 (FUJIWARA, Noriko)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10368532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすSOD1は条件によって凝集体やアミロイド線維を形成するが、ALS発症機構は未だ不明である。ミスフォールドしたSOD1を特異的に認識するモノクローナル抗体(mAb)は、ALS病態解明に役立つだけでなくALS免疫療法の開発にもつながる。本研究では線維化SOD1への反応性が異なるmAbやALS病変部位を特異的に染色できるmAbを開発した。また高濃度のSOD1は線維化条件でゲル状に固まることを見出した。分子間相互作用定量水晶振動子マイクロバランス(QCM)を用いた解析から、SOD1の線維化には自己会合前における水分子結合が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動神経細胞が特異的に障害される難病である。Cu,Zn-スーパーオキシドディスムターゼ(SOD1)の変異が家族性ALSを引き起こすことが明らかになっているが、未だ発症機構の解明がなされておらず、有効な治療法も見つかっていない。孤発性ALSでも野生型SOD1タンパク質の凝集や線維化がALS病態に関与していることが報告されつつある。今回開発したモノクローナル抗体はALS病変部位を特異的に免疫組織染色することができた。また線維化SOD1に反応しやすい抗体も見つかった。これらの抗体はALS診断マーカーや抗体医薬の開発にもつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) is one of causes of Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the mechanism responsible for ALS remains unclear. SOD1 is prone to make aggregates or amyloid like fibrils under some conditions. Monoclonal antibodies (mAbs) that recognize misfolded SOD1 would help understand ALS pathophysiology and develop a new ALS immunotherapy. In this study, we made new various mAbs having different reactivities for SOD1 fibrils and detecting inclusions in the spinal cord of ALS model mice. In addition, we found that SOD1 undergoes hydrogelation with the formation of amyloid-like fibrils and that these conversions are pH-dependent. Monitoring by a quartz crystal microbalance with admittance analysis (QCM-A) showed that water-rich state before intermolecular assembling is required for fibrillation and hydrogelation in the case of SOD1.

研究分野：生化学

キーワード：SOD1 ALS タンパク質凝集 QCM アミロイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動ニューロンが選択的に障害される致死性の神経変性疾患である。生体にとって有害なスーパーオキシドを消去する Cu,Zn-スーパーオキシドジスムターゼ（以下 SOD1）の遺伝子変異が家族性 ALS の原因になることが明らかになっているが、その発症機構は未だ解明されておらず、有効な治療法も見つかっていない。ALS を引き起こす変異 SOD1 は立体構造が不安定で凝集体を形成しやすいことが数多く報告されている。最近では孤発性 ALS においても野生型 SOD1 が関与しているとの報告が多くなっている。さらに、ヒト野生型 SOD1 を高発現させたマウスが ALS 様の症状を示すことも報告されていることから、変異型だけでなく野生型 SOD1 も凝集しやすい性質を有することが示唆される。

SOD1 が凝集する前には必ず構造変化が起こっていると予想される。しかし、「どのような構造変化がきっかけで凝集化を引き起こすのか？」という本質的な疑問は未解決のままである。これまで代表者は、SOD1 のループ VI（102-115 番目のアミノ酸残基）を認識するモノクローナル抗体（mAb-N6）に対し、変異型 SOD1 と野生型 SOD1 で反応性が異なることを報告している[Fujiwara N et al, J. Biol. Chem. 2005]。これは、モノクローナル抗体を用いることで SOD1 がミスフォールディングした微小な構造の違いを検出できることを示している。また凝集しやすい形になったミスフォールディング SOD1 を特異的に認識する抗体は、ALS 病態解明に役立つだけでなく、凝集体形成を阻害する可能性があり、ALS 免疫治療における利用価値が高いと考えられる。

一方、SOD1 を EDTA で Cu と Zn をキレートし、サブユニット内 S-S 結合を DTT で切断するとアミロイド様線維や凝集化が起こる。今回、高濃度の SOD1 を用いてアミロイド線維化条件にするとゲル状に固まることを見出し、そのメカニズムについての研究を行った。変性 SOD1 のタンパク質化学的検討は ALS 病態を理解する上で重要な検討課題と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では SOD1 の構造変化の微小な違いを解析する目的に、これまで作製してきたマウスモノクローナル抗体の他にラットモノクローナル抗体の作製を行い、線維化 SOD1 に反応しやすいのか、ALS 病変部位を特異的に染色するのかどうかについて検討した。さらに、SOD1 凝集の一形態であるアミロイド化と線維ゲルの物性解析および変性状態における物性変化について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 変異 SOD1 と野生型 SOD1 を大腸菌で発現させ、精製したタンパク質を抗原としてラットモノクローナル抗体を作製した。野生型 SOD1 と変異型 SOD1 を用いた ELISA でハイブリドーマの選別を行った。選別したハイブリドーマを RPMI 培地で培養し、その培養液からモノクローナル抗体をプロテイン G カラムクロマトグラフィにて精製した。

(2) 精製モノクローナル抗体の反応性を野生型 SOD1 と変異型 SOD1 を用いた ELISA、ウェスタンブロッティング、ALS モデルマウスである G93A トランスジェニックマウスの脊髄切片を用いた免疫組織染色で解析した。

(3) チオフラビン T の蛍光強度をアミロイド化の指標とし、各 pH の条件で野生型 SOD1 の線維化実験を行った。

(4) 高濃度の SOD1 を線維化条件でインキュベートすることで線維ゲルを形成させた。線維が形成されたかどうかは透過型電子顕微鏡による観察を行った。

(5) 線維ゲル化および凝集化が起こる条件における SOD1 の変性中の物性変化については、分子間相互作用定量水晶振動子マイクロバランス（QCM-A）による解析を行った。

(6) 線維化条件で変性させた SOD1 を ELISA プレートに固定し、各 mAb に対する反応性を測定した。

4. 研究成果

(1) モノクローナル抗体の作製と反応性について

新規に開発した SOD1 に対するモノクローナル抗体の中に ALS モデルマウスである G93A トランスジェニックマウスの脊髄切片の病変部位を特異的に染色するものが 2 種類見つかった。一つはマウス IgG₁ で、イムノブロッティングでは SOD1 に反応しない構造認識型の抗体であった。もう一つはイムノブロッティングで反応するラット IgG2a で、抗原認識部位の決定を行っているところである。今後は ALS 患者および他の神経変性疾患患者の組織標本を用いて免疫組織染色を行っていく予定である。また、線維化や凝集化条件で変性させた SOD1 に対する抗体の反応性が各モノクローナル抗体によって異なることを見いだしており、詳細な検討を行っているところである。

(2) SOD1 の線維化とゲル化

野性型SOD1を種々のpHでEDTAとDTTを添加し、37°Cで攪拌したところ、pH が3.0と4.0ではチオフラビンTの蛍光強度が顕著に増大したが、pH5.0以上ではあまり増大していない。(図1)。つまり、酸性条件の方がSOD1はアミロイド様に線維化しやすいことが示唆された。

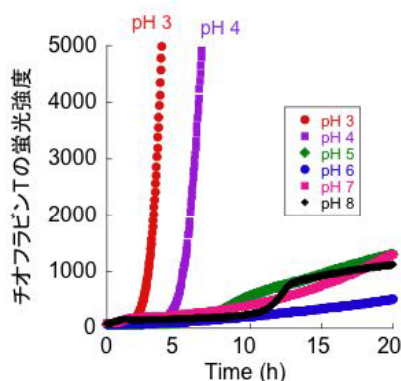


図1 各pHにおけるSOD1のアミロイド線維化

次に、アミロイド化と同じ線維化条件で攪拌するかわりに高濃度の SOD1 を 37°Cで保温したところ、pH が 3.0 と 4.0 ではゲル状に固まり、バイアル瓶を逆さにしても落ちないことを見いだした。このゲル中にはアミロイド様の線維が見いだされた(図3)。一方、pH が 5.0 の条件では凝集して沈殿し(図2)、pH6.0 以上の条件では溶液のままであった (data not shown)。

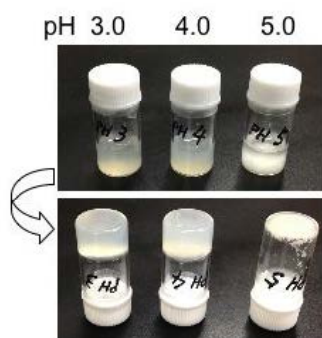


図2 SOD1のゲル化

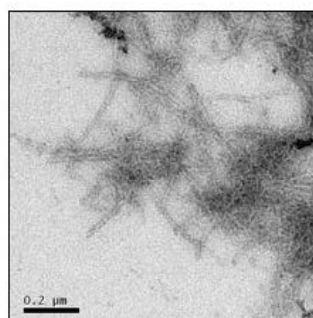


図3 ゲル中のアミロイド様線維

(3) QCM-A 解析

ゼラチン(コラーゲンを煮て水溶性にしたタンパク質)からできたゼリーやアガロースゲルと同様に、上記の SOD1 線維ゲルにおいても網の目の中に水分子が閉じ込められた状態であると考えられる。しかし、いつどのように水分子が入るのかは不明である。そこで、QCM-A センサー上に SOD1 を固定した後、線維化が起こる緩衝液 (pH 3.0, 4.0, 5.0) に置換し、37°C中で周波数変化を観測した(図4)。

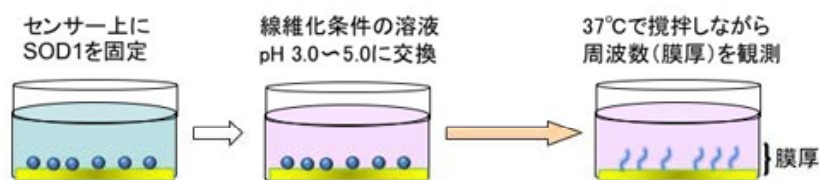


図4 QCM-Aによる変性SOD1の解析方法

その結果、pH3.0 と pH4.0 の条件では質量の増大を示す周波数変化が観測され、この質量と密度から算出される SOD1 タンパク質層の膜厚を図5に示す。変性前は 3 nm だった SOD1 層が変性 15 時間後には、pH3.0 で 50~60 nm、pH 4.0 では 100 nm にまで増大した。置換後の溶液中には SOD1 が含まれないことから、質量の増大は変性 SOD1 に水分子が結合したことによると考えられる。一方、pH 5.0 では 10 nm 程度にしか増大せず、水分子の結合は少ないことが示唆された。線維状タンパク質であるゼラチン(コラーゲンを熱変性して水溶性にしたもの)の膜厚が 120 nm である(図6)ことから、変性 SOD1 がゼラチンと同程度の水分子を結合して

いと予想される。ゼラチン水溶液は熱をかけた後に冷却するとゲルになるタンパク質であることから、変性 SOD1 のゲル化との類似性が興味深いところである。なお、球状タンパク質の IgG (免疫グロブリン) や BSA(牛血清アルブミン)は、変性前の SOD1 と同様、数 nm の膜厚であった。

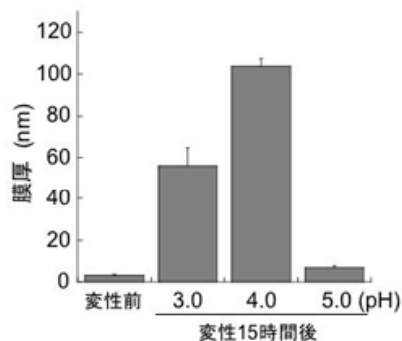


図5 各pHにおける変性SOD1の膜厚

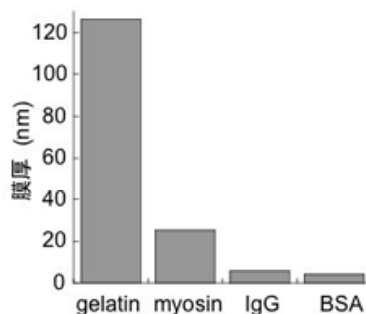


図6 他のタンパク質の膜厚

SOD1 は 153 個のアミノ酸から構成されているホモダイマーで、各サブユニットが変性して伸びたとしても最大 50 nm 程度にしかならない。しかし、pH4.0 の場合、変性 SOD1 の膜厚が 100 nm に達している (図 5)。この矛盾は、QCM-A で測定した膜厚がタンパク質層そのものではなく、タンパク質層に結合した水の層を表している可能性が高い。つまり、QCM-A センサーはタンパク質に結合した水の層をバルクの水とは区別して感知できるといえる。

以上の結果をまとめると、pH 3.0 や 4.0 の変性条件では、SOD1 は水分子を結合しタンパク質層が 50~100 nm にまで増大することがわかった。この条件で SOD1 が自己会合するとアミロイド線維やゲルになりやすい。一方、pH 5.0 の変性条件では SOD1 に水分子があまり結合せず、自己会合するとアミロイドにならず凝集してしまうと考えられる。SOD1 の変性状態における水の存在がアミロイド形成に重要な役割をしていることが示唆された[Fujiwara N et al, *PLoS One* 2018]。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. [Fujiwara N*](#), [Wagatsuma M](#), [Oba N](#), [Yoshihara D](#), [Tokuda E](#), [Sakiyama H](#), [Eguchi H](#), [Ichihashi M](#), [Furukawa Y](#), [Inoue T](#), [Suzuki K](#): Cu/Zn-superoxide dismutase forms fibrillar hydrogels in a pH-dependent manner via a water-rich extended intermediate state, *PLoS One* 13, e0205090 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0205090 (査読有)
2. 藤原範子、筋萎縮性側索硬化症に關与する Cu,Zn-スーパーオキシドディスムターゼの研究、兵医大医会誌、第 42 卷 2 号、11-16、2018 (査読無)
3. [Yoshihara D](#), [Fujiwara N*](#), [Kitanaka N](#), [Kitanaka J](#), [Sakiyama H](#), [Eguchi H](#), [Suzuki K](#): The absence of the SOD1 gene causes abnormal monoaminergic neurotransmission and motivational impairment-like behavior in mice, *Free Rad. Res.* 50, 1245-1256, 2016, DOI 10.1080/10715762.2016.1234048 (査読有)
4. [Fujiwara N*](#), [Yoshihara D](#), [Sakiyama H](#), [Eguchi H](#), [Suzuki K](#): Solution oxygen-17 NMR application for observing a peroxidized cysteine residue in oxidized human SOD1, *Hyperfine Interact.* (2016) 237:114, DOI 10.1007/s10751-016-1320-7 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. Yoshiaki Furukawa, Eiichi Tokuda, Shinji Ohara, [Noriko Fujiwara](#): Wild-type SOD1 is misfolded in cerebrospinal fluid of sporadic ALS, 29th International symposium on ALS/MND, 2018
2. [Noriko Fujiwara](#), Michiru Wagatsuma, Naoto Oba, [Daisaku Yoshihara](#), Eiichi Tokuda, Haruhiko Sakiyama, Hironobu Eguchi, Motoko Ichihashi, Yoshiaki Furukawa, Tadashi Inoue, Keiichiro Suzuki: Cu/Zn-Superoxide Dismutase Forms hydrogels composed of amyloid fibrils in a pH-Dependent Manner, APPS2018

3. Noriko Fujiwara, Michiru Wagatsuma, Naoto Oba, Daisaku Yoshihara, Eiichi Tokuda, Hironobu Eguchi, Haruhiko Sakiyama, Tadashi Inoue, Yoshiaki Furukawa, Keiichiro Suzuki: **FIBRILLAR HYDROGEL FORMATION AND ITS PHYSICAL PROPERTY OF ALS-CAUSATIVE SOD1**
第 91 回日本生化学会大会 (2018)
4. 藤原範子: ALS 原因タンパク質である SOD1 の変性と凝集: 第 18 回日本蛋白質科学会年会 (2018)
5. 藤原範子、我妻美千留、大場矢登、吉原大作、徳田 栄一、江口裕伸、崎山晴彦、井上正志、古川良明、鈴木敬一郎: ALS 原因タンパク質である SOD1 の線維ゲル形成とその物性, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017)
6. 藤原範子: タンパク質の線維ゲル形成に伴う物性変化, 第 89 回日本生化学会大会シンポジウム, タンパク質の構造破綻とその関連疾患～物性化学から臨床まで～(オーガナイザー: 八谷如美、藤原範子) (2016) (招待講演)
7. Fujiwara Noriko, Yoshihara Daisaku, Sakiyama Haruhiko, Eguchi Hironobu, Suzuki Keiichiro: Solution oxygen17-NMR application for observing a peroxidized cysteine residue in oxidized copper/zinc-superoxide dismutase, Huperfine2016, Leuven, 2016
8. 吉原大作, 藤原範子, 崎山 晴彦, 江口 裕伸, 鈴木 敬一郎: SOD1 欠損はモチベーション低下を引き起こす, 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 仙台, 8 30-31 (2016)

〔産業財産権〕

○ 取得状況 (計 2 件)

名称: TDP-43 の凝集体が蓄積する疾患の発症リスクを予測する方法、診断薬及び治療薬

発明者: 漆谷 真、藤原 範子、伊東 秀文

権利者: 国立大学法人滋賀医科大学、学校法人兵庫医科大学、国立大学法人京都大学

種類: 特許

番号: 特許第 5971966 号

出願年: 平成 24 年 (2012 年)

取得年: 平成 28 年 (2016 年)

国内外の別: 国内

名称: TDP-43 の凝集体が蓄積する疾患を治療及び/又は予防するための化合物スクリーニング方法

発明者: 漆谷 真、北原 亮、藤原 範子、伊東 秀文

権利者: 国立大学法人滋賀医科大学、学校法人立命館、学校法人兵庫医科大学

種類: 特許

番号: 特許第 6332723 号

出願年: 平成 25 年 (2013 年)

取得年: 平成 30 年 (2018 年)

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 吉原 大作

ローマ字氏名: YOSHIHARA, daisaku

所属研究機関名: 兵庫医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 00567266

(2) 研究協力者

我妻 美千留 (WAGATSUMA, michiru) 江口 裕伸 (EGUCHI, hironobu) 崎山 晴彦 (SAKIYAMA, haruhiko) 鈴木 敬一郎 (SUZUKI, keiichiro) 古川 良明 (FURUKAWA, yoshiaki) 徳田 栄一 (TOKUDA, eiichi) 立花 太朗 (TACHIBANA, taro) 加藤 信介 (KATO, shinsuke) 漆谷 真 (URUSHITANI, makoto)

※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。