

平成21年5月11日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590997  
 研究課題名（和文） ALSの運動ニューロンにおける小胞体ストレス惹起蛋白の解明と治療法の開発  
 研究課題名（英文） Clarify the abnormal protein causing ER stress in ALS and therapeutic approach  
 研究代表者  
 菊池 仁志（KIKUCHI HITOSHI）  
 九州大学・大学病院・特任講師  
 研究者番号：60322765

## 研究成果の概要：

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動ニューロンの選択的変性に加え、運動ニューロン胞体内での神経細胞内封入体の出現を特徴とし、蛋白分解系の異常ならびに細胞骨格異常による神経細胞死が注目されている。本研究より、ALSでは、小胞体内で蓄積した異常変性蛋白が細胞死を誘導し、封入体を形成することが考えられた。さらにALSではカルパインの活性化が病態形成に関与し、カテプシンBが運動ニューロン死に対して神経防御的に作用していることが考えられた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：神経病態生化学，筋萎縮性側索硬化症，小胞体ストレス，プロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）は運動ニューロンの選択的変性所見に加え、運動ニューロン胞体内に変性蛋白質の蓄積による神経細胞内封入体の出現を特徴とすることから、蛋白分解系の異常ならびに細胞骨格異常による神経細胞死が注目されている。これまで申請者らは、ALSの運動ニューロンにおける異常蛋白質の蓄積と細胞骨格異常、さらには小胞体ストレス

に注目し様々な研究を行ってきた。これまで変異 SOD1<sup>G93A</sup> 遺伝子導入マウスにおいて、病状の進行に伴い変異型 SOD1 蛋白質が特異的に脊髄運動ニューロンの小胞体内で凝集し、小胞体ストレスを引き起こすことで、細胞死が誘導されることを証明した。さらに変異 SOD1 の凝集に伴う ER-associated degradation (ERAD) によりユビキチン-プロテアソーム系への蛋白分解経路が誘導されることを報告してきた。さらに、フォー

ルディングが不良な異常蛋白質の細胞質内での蓄積に関する研究として研究者らは、aggresome形成とmicrotubule organizing center (MTOC)での封入体形成に着目してきた。

## 2. 研究の目的

ALSの運動ニューロンにおける異常変性蛋白質の蓄積に伴う神経細胞死を解明し、関連するプロテアーゼによりALSの治療法を開発する。異常変性蛋白質の蓄積に関しては、(1)ヒトALSおよびALSモデルマウスにおける、小胞体内および細胞質内でのミスフォールディング蛋白の解析ならびに(2)ミスフォールディング蛋白の代謝過程でERADに関連するカルネキシンサイクルの機能解析を進める。治療的アプローチとしては、(3)カテプシンおよびカルパインなどの異常変性蛋白質の分解に関与するプロテアーゼの発現解析を行い、運動ニューロンに対するその生物学的作用を検証する。(4)プロテアーゼもしくはプロテアーゼ阻害剤のALSモデルマウスへの治療効果を検証することでALSの治療薬としての可能性を探る。

## 3. 研究の方法

材料：ヒトALS剖検脊髄ならびにALSモデルマウスである変異SOD1<sup>G93A</sup>遺伝子導入マウスの脊髄標本、ならびにin vitroの研究として、運動ニューロンの培養細胞系であるNSC34細胞を使用した。

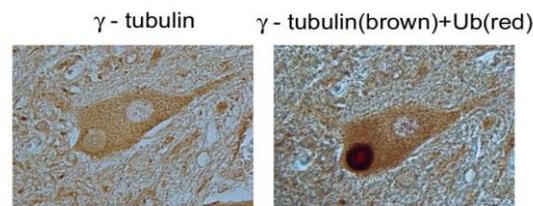
方法：ヒトALS剖検脊髄ならびにALSモデルマウスの研究では主に、免疫組織化学並びにウエスタンブロット法による蛋白質の解析、RT-PCT法による遺伝子発現の解析を行った。(1)ヒトALSおよびALSモデルマウスにおける脊髄運動ニューロン小胞体内および細胞質内でのミスフォールディング蛋白の解析として、 $\gamma$ -tubulin、PericentrinなどのMicrotubule Organizing Center (MTOC)関連蛋白質に関する免疫組織化学を用いて、異常蛋白質の凝集を検索。(2)ミスフォールディング蛋白の代謝過程でERADに関連するカルネキシンサイクルの機能解析に関連して、カルネキシン、カルレティクリンなどのカルネキシンサイクル関連蛋白質の発現を検証。(3)プロテアーゼによる異常変性蛋白質の分解に関しては、カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインのmRNA発現亢進並びに活性型カルパインの検証。さらにカルシウム関連受容体であるIP3受容体、リアノジン受容体(RyR)などの発現に関して検討を行った。(4)プロテアーゼもしくはプロテアーゼ阻害剤の治療効果への試みとして、in vitroの研究を行い、酸化ストレス状態下でNSC34細胞を用い、無血清状態下でカルパイン阻害剤(MDL-28170)、カテプシンB阻害剤

(CA-074me)などのプロテアーゼ阻害剤を添加してその細胞死に対する作用を解析した。

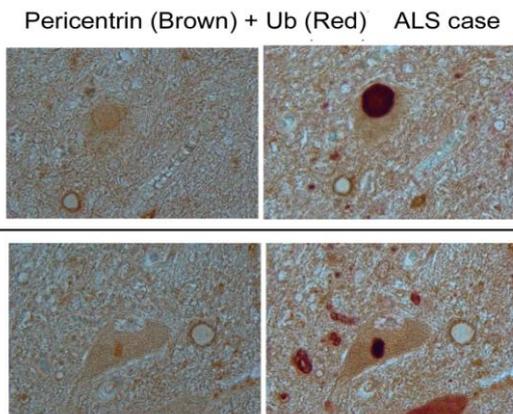
## 4. 研究成果

(1)ヒトALSおよびALSモデルマウスにおける、小胞体内および細胞質内でのミスフォールディング蛋白の解析では、免疫組織化学的にALSモデルマウスの運動ニューロンでは、 $\gamma$ -tubulinが、病状の進行に従い運動ニューロン細胞質に凝集する傾向があり、さらに、ヒトALS脊髄運動ニューロンの細胞質内封入体では、 $\gamma$ チューブリンおよびpericentrinの集積像が見られた(図1, 2)。

(図1)抗 $\gamma$ -tubulin抗体と抗Ubiquitin抗体による免疫組織化学。両者の局在は一致する。



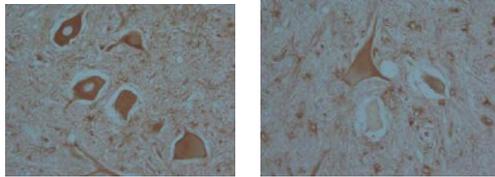
(図2)抗pericentrin抗体と抗Ubiquitin抗体による免疫組織化学。両者の局在は一致する。



以上の結果より、ALSの運動ニューロン内での異常蛋白質の集積は、モーター蛋白であるダイニン等によるMTOCへの誘導によるものと考えられた。一方、(2)ミスフォールディング蛋白の代謝過程でERADに関連するカルネキシンサイクルの機能解析では、これまでALSモデルマウスでEDEMのmRNAの発現亢進を確認し、カルネキシンサイクルの異常が考えていた。さらに今回の検討では、ヒトALS剖検脊髄の運動ニューロンではカルネキシン、カルレティクリンの免疫染色性は低下しており、カルネキシンサイクルの機能低下が

考えられた。(図3)

(図3) 抗カルネキシン抗体による免疫組織化学.

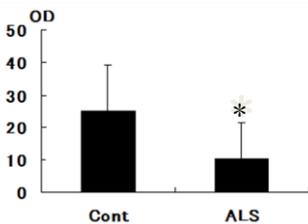


Control

ALS

\*ALS の運動ニューロンの染色性は有意に低下

\* Optical density

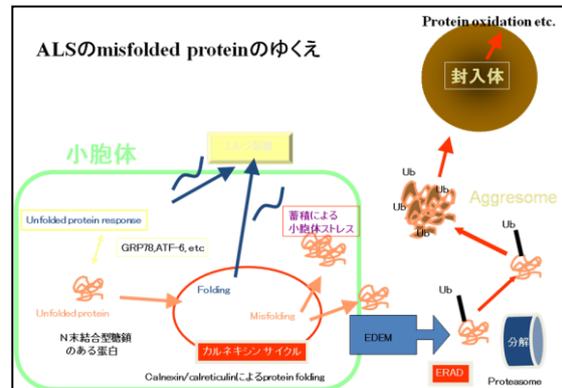


Control 16例 ALS 6例 \*P<0.05

また、特に神経細胞内封入体部のカルネキシンの免疫染色性は著しく低下していた。(3)カテプシンおよびカルパインなどの異常変性蛋白質の分解に関与するプロテアーゼの発現解析では、ヒト ALS、ALS モデルマウスの脊髄ではカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインの mRNA 発現亢進を認め、さらにウエスタンブロット法で、活性型カルパインの有意な発現亢進が見られた。また、IP3 受容体、リアノジン受容体 (RyR) の発現に関しては、ヒト ALS 剖検脊髄の運動ニューロンで、小胞体におけるカルシウム放出に関与する RyR の亢進を確認した。これらの結果は、小胞体に関連した  $Ca^{2+}$  流入異常の ALS の病態への関与を示唆している。また、(4)プロテアーゼもしくはプロテアーゼ阻害剤の治療効果への試みとして、In vitro の治療的研究では、これまで、変異 SOD1<sup>G93A</sup> 遺伝子導入マウスを用いた検討で、発病期にカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインファミリーの活性化を確認している。本研究では、無血清状態でカルパイン阻害剤により神経細胞死が抑制され、カテプシン B 阻害剤の添加により、細胞死が促進されるという結果を得た。

本研究より、ALS では、小胞体内で蓄積したミスフォールディング蛋白質が、細胞死を誘

導し、さらに細胞質内ではミスフォールディング蛋白質が MTOC に凝集し封入体を形成することが考えられた。さらに ALS ではカルパインの活性化が病態形成に関与し、カテプシン B が、運動ニューロン死に対して神経防御的に作用していることが考えられた。



## 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7件)

1. Takase K, Shigeto H, Suzuki SO, Kikuchi H, Ohyagi Y, Kira J. Cortical kindling in a focal freeze lesion rat model. *J Clin Neurosci* 16:94-98, 2009
2. Matsushita T, Matsuoka T, Ishizu T, Kikuchi H 他5名. Anterior periventricular linear lesions in optic-spinal multiple sclerosis: a combined neuroimaging and neuropathological study. *Multiple Sclerosis* 14:343-353, 2008.
3. Takase K, Shigeto H, Suzuki SO, Kikuchi H, Ohyagi Y, Kira J. Prenatal freeze lesioning produces epileptogenic focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 49:997-1010, 2008
4. Shi N, Kawano Y, Tateishi T, Kikuchi H 他3名. Increased IL-13-producing T cells in ALS: positive correlations with disease severity and progression rate. *J Neuroimmunol.* 182 : 232-235, 2007
5. Ohyagi Y, Tsuruta Y, Motomura K, Miyoshi K, Kikuchi H 他3名. Intraneuronal amyloid beta42 enhanced by heating but counteracted by formic acid. *J Neurosci Methods.* 134-138, 2007
6. Matsuoka T, Matsushita T, Kawano Y, Osoegawa M, Ochi H, Ishizu T, Minohara. M, Kikuchi H 他3名. Heterogeneity of

- aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. Brain 130:1206-1223, 2007.
7. Kawano Y, Nagara Y, Murai H, Kikuchi H, Ohyagi Y, Kira J. Slowly progressive distal muscular atrophy of the bilateral upper limbs (O'Sullivan-McLeod syndrome) partially alleviated by intravenous immunoglobulin therapy. Intern Med 46:515-518, 2007.

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 山崎 亮, 福永 真実, 立石 貴久, 田中 正人, 菊池 仁志, 大八木 保政, 吉良 潤一. 変異 SOD1 トランスジェニックマウスにおけるミクログリア機能障害, 第21回日本神経免疫学会学術集会, 平成21年3月12日-13日, 大阪
2. 山崎 亮, 田中 正人, 立石 貴久, 菊池 仁志, 吉良 潤一. 変異 SOD1-Tg マウスにおける神経細胞脆弱性とミクログリア機能障害. 日本神経学会総会. 平成20年5月15日-17日 横浜
3. 立石 貴久, 田中正人, 山崎亮, 菊池仁志, 吉良潤一. mSOD1 G93A マウスにおける, VEGF と HIF-1 $\alpha$  の発現の解析. 日本神経学会総会. 平成20年5月15日-17日 横浜
4. 菊池仁志, 田代博文, 大久保正一, 久米徹. ALS 患者における NIPPV 下での経皮内視鏡的胃ろう造設術の検討. 日本神経学会総会. 平成20年5月15日-17日 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菊池 仁志 (KIKUCHI HITOSHI)  
九州大学・大学病院・特任講師  
研究者番号：60322765

### (2) 研究分担者

立石 貴久 (TATEISHI TAKAHISA)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：60322765

河村 信利 (KAWAMURA NOBUTOSHI)  
九州大学・大学病院・非常勤助教  
研究者番号：00432930

### (3) 連携研究者

なし