

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 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390175

研究課題名（和文）孤発性 ALS 疾患モデルによる病態解明と治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenesis and therapy development of sporadic ALS by disease model

研究代表者

田中 章景 (TANAKA FUMIAKI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30378012

研究成果の概要（和文）：

孤発性 ALS 患者脊髄運動ニューロンにおいて、神経変性過程の初期より発現が低下している dynactin1 のホモログである DNC-1 の発現を運動ニューロン特異的にノックダウンした線虫モデルを作成した。その結果、軸索および細胞体の神経変性ととも高度な運動障害を呈した。さらに、変性神経細胞では、オートファゴソームの輸送障害と数の増加がみられた。オートファジーを活性化するラパマイシンと軸索輸送を改善するトリコスタチンを投与したところ、この ALS 疾患モデルの運動機能と軸索変性が著明に改善した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we generated a *Caenorhabditis elegans* model in which the expression of DNC-1, the homolog of dynactin 1, is specifically knocked down in motor neurons. This model exhibited severe motor defects together with axonal and neuronal degeneration. We also observed impaired movement and increased number of autophagosomes in the degenerated neurons. Furthermore, the combination of rapamycin, an activator of autophagy, and trichostatin which facilitates axonal transport dramatically ameliorated the motor phenotype and axonal degeneration of this model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：ALS、運動ニューロン、dynactin-1、線虫モデル、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

ALS は、運動ニューロンが特異的に障害され変性脱落するという特徴を有し、進行性の筋萎縮と筋力低下をきたす極めて予後不良の疾患である。約 10%をしめる遺伝性 ALS の一部のものでは原因遺伝子が同定され、そのトランスジェニック動物モデルの作成を通じ、病態解明および治療法開発が進められてきている。しかし、ALS 患者のほとんどを占める孤発性 ALS については疾患モデルが確立していないことが主因となり、その病態解明と治療法開発は大きく遅れている。

我々は、孤発性 ALS の病態解明にあたり、まず患者脊髄運動ニューロンにおいて特異的に発現変化をきたしている分子を網羅的に解明すべく、遺伝子発現プロファイルを作成した。これにより、解析を行った 4845 遺伝子中、コントロール例に比べ有意な発現上昇を示す 52 遺伝子 (1%)、発現低下を示す 144 遺伝子 (3%) を同定することに成功した。次に、これら ALS 病態関連遺伝子の経時的発現状況を明らかにするために、様々な病期の多数例の孤発性 ALS 患者脊髄サンプルを用いて、これらの遺伝子とともに各種の神経変性マーカーの運動ニューロンでの発現程度を定量化し解析を行った。この結果、神経変性過程初期から発現低下をきたしている遺伝子の一つとして *dynactin* の主要なサブユニットである *dynactin1* を同定した。

2. 研究の目的

孤発性 ALS の疾患モデル開発にあたっては、神経変性過程初期から神経変性に至るまでのなるべく多くの病態を反映するモデルが理想的と考えられる。そこで我々は、神経変性過程初期から発現低下をきたしていることを明らかにした *dynactin1* の遺伝子発現変

化を線虫、マウスに展開することによって孤発性 ALS のモデル開発を目指した。まず、*dynactin1* の発現抑制により、線虫に孤発性 ALS 患者に類似した表現型と運動ニューロン変性を引き起こし、モデル動物として機能しうるかを検討した。さらに、この線虫モデルにおける神経変性機序を解明し、治療法開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

dynactin1 の発現減少を再現する線虫モデルの確立のため、コリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターである *acr-2* 支配下に、ヒト *dynactin1* の相同体である *dnc-1* を標的とした shRNA を発現可能なベクターを作成し、野生型線虫にマイクロインジェクションし変異体を作成した。コントロール群として、線虫とは無関係な *LacZ* 遺伝子を標的とした shRNA を発現させた。

線虫モデルの表現型の解析は、一定時間内の首振り回数生存率、首振り回数、水中でのむち打ち回数をパラメーターとし、また運動ニューロンの形態変化は蛍光顕微鏡にて評価した。

また、形態的变化を顕微鏡下に観察し、軸索変性と運動機能の関係を検討した。さらに、オートファジー機能を明らかにするために、オートファゴソームの動態を観察し、その軸索輸送スピードや移動距離の解析を行った。

治療的観点からは、オートファジーを活性化することが知られている rapamycin やチュブリンのアセチル化を促進する trichostatin A の効果を確認した。

4. 研究成果

dnc-1 ノックダウン群はコントロール群に比して、生存率の短縮、首振り回数の低下、

水中でのむち打ち回数の低下など明らかな運動障害が認められた。さらに運動機能障害が重篤な個体では *coiler uncoordinated* の表現型が認められた。これは、コリン作動性運動ニューロンの VA ニューロンの正常なシナプス形成に必須である *unc-4* 遺伝子の種々の変異体で出現する表現型であり、運動ニューロンの機能障害と変性を間接的に示唆する所見である。実際に *dnc-1* ノックダウン線虫における形態学的変化を調べたところ、軸索腫脹やスフェロイドといった軸索障害が早期から観察され、それに引き続き細胞体変性が生じていた。また、軸索変性の程度と運動機能障害の間には相関がみられた。

この *dnc-1* ノックダウン線虫を観察すると、運動ニューロンにおいてオートファゴソームやミトコンドリアの異常集積がみられた。我々は *dnc-1* ノックダウン線虫において観察されるオートファゴソームの異常蓄積は、運動タンパクの発現低下に基づくオートファゴソームの軸索輸送障害に起因すると考えた。実際に、*dnc-1* のノックダウンにより、オートファゴソームの逆行性軸索輸送のスピードと移動距離はおよそ半分に低下していた。そして、*dnc-1* ノックダウン線虫のオートファゴソーム集積と運動障害や軸索変性の間には相関を認めたことより、dynein/dynatin 運動タンパク複合体から *dnc-1/dynactin-1* が減少すると、オートファゴソームの輸送速度と輸送距離が減少することで軸索に集積が起これ、結果的にオートファジーによって異常タンパクやオルガネラを処理できなくなり神経変性が生じるという機序が推定された。このように、オートファジーの障害で神経変性が生じることは、野生型線虫にオートファジーの阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) を投与することで、*dnc-1* ノックダウン線虫と同様の軸索変

性や運動機能障害が生じたことから支持される。

興味深いことに、我々のモデルは shRNA がすでに幼虫でも発現して *dnc-1* の発現が低下しているにも関わらず、運動ニューロン変性は成虫になるまでは生じていなかった。*dynactin-1* 変異を持つ家族性 ALS 患者や孤発性 ALS 患者においても、運動ニューロン変性は成人になってから生じてくることを考えると、発達中の運動ニューロンは *dnc-1/dynactin-1* の障害に抵抗性と考えられ、分化した運動ニューロンでは、軸索のホメオスタシスを維持するためにより効率的な軸索輸送システムを必要としていることが推定される。

次に、このように最終的にはオートファジーの障害に基づく神経変性に対する治療として、オートファジーを活性化することが有効な治療につながるのかということが大きな課題となる。特に *dynactin-1* の発現が低下している孤発性 ALS 患者や、*dnc-1* ノックダウン線虫のようなオートファゴソームの輸送障害が存在する場合はなおさらである。

実際、オートファゴソームの形成を誘導しオートファジーを活性化することが知られている rapamycin の投与は *dnc-1* 線虫の運動機能をわずかに改善させるに過ぎなかった。一方、*dnc-1* ノックダウン線虫に対して rapamycin に加えてチュブリンのアセチル化を促進する trichostatin A (TSA) を加えたところ、運動機能、神経変性は劇的に改善した。チュブリンのアセチル化は軸索輸送を促進することが知られており、rapamycin と TSA の混合治療がオートファゴソームの形成と軸索輸送を促進し、神経変性と運動機能を改善したと考えられた。

軸索輸送で運ばれるのは、オートファゴソームだけではないので、ミトコンドリアのような他のオルガネラや各種のタンパクの輸送障害が、運動ニューロン変性に係わっている

可能性は否定できない。しかし、オートファジーの阻害剤である3-MAとTSAをdnc-1ノックダウン線虫に投与したところ、シナプス蛋白であるsynaptobrevinの輸送は促進されたにも係わらず、3-MAの影響でオートファゴソームの輸送障害の改善はないために、結果的に治療効果が全くなかった。このことは、軸索輸送障害と神経変性の関係を考える上で、オートファゴソーム輸送の重要性を示している。

程度の差はあれ、オートファゴソームの集積と軸索輸送障害は多くの神経変性疾患において共通の現象であるということを考えてみると、rapamycinとTSAの混合治療、すなわち、オートファジーの活性化と軸索輸送の促進という治療戦略はALSに限らず、他の神経変性疾患にも応用可能であると考えられた。

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9件)

1. Iguchi Y, Katsuno M, Niwa JI, Takagi S, Ishigaki S, Ikenaka K, Kawai K, Watanabe H, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, Sasaki S, Tanaka F, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. *Brain* 136: 1371-1382, 2013 (査読有)
2. Ikenaka K, Kawai K, Katsuno M, Huang Z, Jiang YM, Iguchi Y, Kobayashi K, Kimata T, Waza M, Tanaka F, Mori I, Sobue G. dnc-1/dynactin 1 knockdown disrupts transport of autophagosomes and induces motor neuron degeneration. *PLoS One*. 8: e54511, 2013 (査読有)
3. Katsumata R, Ishigaki S, Katsuno M, Kawai K, Sone J, Huang Z, Adachi H, Tanaka F, Urano F, Sobue G. c-Abl inhibition delays motor neuron degeneration in the G93A mouse, an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 7: e46185, 2012 (査読有)
4. Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa J, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis*. 45: 862-870, 2012 (査読有)
5. Tanaka F, Ikenaka K, Yamamoto M, Sobue G. Neuropathology and omics in motor neuron diseases. *Neuropathology*. 32: 458-462, 2012 (査読有)
6. Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci*. 13: 1225-1238, 2012 (査読有)
7. Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases. *Curr Mol Med*. 11: 48-56, 2011 (査読有)
8. Kato T, Emi M, Sato H, Arawaka S, Wada M, Kawanami T, Katagiri T, Tsuburaya K, Toyoshima I, Tanaka F, Sobue G, Matsubara K. Segmental copy-number gain within the region of isopentenyl diphosphate isomerase genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 402(2):438-442, 2010 (査読有)

9. Sone J, Niwa J, Kawai K, Ishigaki S, Yamada S, Adachi H, Katsuno M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. *Dorfin ameliorates phenotypes in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. *J Neurosci Res*. 88: 123-135, 2010 (査読有)

[学会発表] (計9件)

1. 河合 香里, 池中建介, 勝又 竜, 井口洋平, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江元. *dynactin-1ノックアウトによる孤発性ALSモデルマウスの作成と病態解析*. 第53回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム (東京都) 2012. 5. 22-25
2. 勝又 竜, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江元. *筋萎縮性側索硬化症、及びそのモデルマウスの腰髄におけるリン酸化Cofilinの評価*. 第53回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム (東京都) 2012. 5. 22-25
3. 井口洋平, 勝野雅央, 丹羽淳一, 高木伸之介, 田中章景, 祖父江元. *運動ニューロン特異的TDP-43ノックアウトマウスの病態解析*. 第53回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム (東京都) 2012. 5. 22-25
4. 田中章景, 池中建介, 祖父江元. *Dynactin-1を標的とした孤発性ALSモデルの開発*. 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋国際会議場 (愛知県) 2011. 5. 18-20
5. 田中章景, 祖父江元. *神経変性疾患の病態抑止治療への展望*. 第6回臨床ストレス応答学会大会. 名古屋大学医学部 (愛知県) 2011. 11. 4-5
6. 池中建介, 河合香里, 蔣月梅, 黄哲, 勝野雅央, 田中章景, 祖父江元. *dynactin-1ノックダウン線虫を用いた孤発性ALS (SALS) 軸索輸送障害モデルの作*

成. 第54回日本神経化学大会. 山代温泉 瑠璃光 (石川県) 2011. 9. 26-28

7. 池中建介, 勝野雅央, 河合香里, 黄哲, 蔣月梅, 田中章景, 祖父江元. *dynactin-1ノックダウンによる孤発性ALS線虫モデルの作成と病態解析*. 第34回日本神経科学大会. パシフィコ横浜 (神奈川県) 2011. 9. 14-17
8. 池中建介, 蔣月梅, 田中章景, 勝又竜, 河合香里, 黄哲, 勝野雅央, 山本正彦, 祖父江元. *神経変性疾患におけるdynactin-1と細胞周期関連分子の発現解析*. 第51回日本神経学会総会. 東京国際フォーラム (東京都) 2010. 5. 20-22
9. 田中章景, 黄哲, 勝又竜, 池中建介, 河合香里, 蔣月梅, 和座雅浩, 勝野雅央, 祖父江元. *Dynactin-1ノックダウン線虫における神経変性*. 第51回日本神経学会総会. 東京国際フォーラム (東京都) 2010. 5. 20-22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 章景 (TANAKA FUMIAKI)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：30378012

(2) 研究分担者

祖父江 元 (SOBUE GEN)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20148315
勝野 雅央 (KATSUNO MASAHIKA)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50402566
飯島 正博 (IIJIMA MASAHIRO)
名古屋大学・医学系研究科・特任助教
研究者番号：40437041