

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月7日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790997

研究課題名（和文）FUS 遺伝子変異を伴う家族性 ALS における転写因子核移行障害の解明

研究課題名（英文）A pathological study of impaired cytoplasmic-nuclear transport impairment in familial ALS patients harboring FUS mutation.

研究代表者

立石 貴久 (Tateishi Takahisa)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50423546

研究成果の概要（和文）：

家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) (FUS 遺伝子 R521C 変異) と孤発性 ALS の剖検例を用いた免疫組織学的検討により、脊髄運動ニューロンにおいて核蛋白や転写因子の局在変化が生じ、核細胞質輸送蛋白の発現が障害されていることを明らかにした。さらに動物モデルを用いて経時的な変化を解析した結果、これら病理変化は臨床症状の発現前から生じている早期の変性所見であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We first showed that in the spinal motor neurons of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients, cytoplasmic-nuclear transport of transcriptional mediators were impaired. We analyzed on this issue using SOD1-transgenic mouse, and revealed that these pathological findings were detectable prior to motor neuron degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症、FUS、神経化学、サイトカイン、ケモカイン、神経病理学

1. 研究開始当初の背景

私たちは FUS 遺伝子変異を伴う家族性 ALS の臨床・病理学的特徴を以前報告した (Tateishi T et al. Acta Neuropathol, 2010)。さらに ALS 患者の脳脊髄液 (CSF) 中のサイトカイン解析を行った結果、CSF 中の vascular endothelial growth factor (VEGF) 濃度の低下が、ALS の臨床的重症度 (ALSFRS-R) と相関

関係を有することも明らかにした (Tateishi T, et al. J Neuroimmunol, 2010)。FUS は TDP-43 や Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1 α) と同様に核内転写因子であり、遺伝子の転写や選択的スプライシングの調節に関与している。以上の知見から TDP-43、HIF-1 α 、FUS 等の核内転写因子が、共通して細胞質から核内へ移行する過程が

障害されることによって、ALS を発症するという仮説を立てた。これを証明するために、本研究では FUS 遺伝子変異を有する ALS 患者と孤発性 ALS 患者の剖検標本を用いて免疫病理学的解析を行う。さらには、転写因子の核内以降を調節することによる、新たな治療法の開発を目指す足がかりとする。

2. 研究の目的

FUS 遺伝子変異を伴う ALS 患者 (FASL)、孤発性 ALS 患者 (SALS)、動物モデルの脊髄運動ニューロンにおける転写因子の核細胞質間輸送障害について解析し明らかにする。

3. 研究の方法

(1) FALS、SALS 患者剖検標本に免疫染色を施行し、転写因子、核細胞質輸送蛋白、核膜蛋白の発現変化を解析した。

(2) ALS 動物モデル (SOD1G93A 変異遺伝子導入マウス) を用いて発症前、発症早期、発症後期における、核内転写因子とその輸送蛋白の経時的な発現変化を検討した。

(3) 剖検材料を使用する研究であるため、患者本人への苦痛、負担はない。本研究は九州大学での倫理委員会の承認後に行われ、遺族からの承諾を書面で得ている。動物を使用する研究は、動物愛護の観点より当施設の動物実験に関する指針・マニュアルを遵守した。

4. 研究成果

(1) FALS 患者剖検例の平均発症年齢は 40.6 ± 13.8 歳と若年で、全ての患者は上肢近位筋から発症し、11.7 ± 7.3 ヶ月で死亡または人工呼吸器管理となった。遺伝子検査を多なつた 4 名の患者全員で FUS 遺伝子のエクソン 15 に R521C のミスセンス変異を認めた。発症から 17 年が経過した剖検例は、肉眼的に前頭

葉、脳幹、小脳など多系統に亘り変性を認めた。残存神経細胞やグリアに多数の嗜銀性、好塩基性の細胞内封入体を認め、FUS、GRP78/BiP、p62 およびユビキチン抗体で陽性だった。細胞質内に封入体を形成する神経細胞では核内の FUS の染色性が低下していた。FUS 陽性の神経細胞内およびグリア細胞内封入体は、好塩基性封入体よりも広い範囲で中枢神経系にびまん性に認められた。以上より、FUS 遺伝子変異 (R521C) により核蛋白である FUS の核への移行障害が生じ、その異所性局在により細胞質内に封入体を形成すること、長期間の経過により中枢神経系に多系統変性と神経細胞内に好塩基性封入体を伴うことが示唆された。

(2) 孤発性 ALS 剖検例の検討では、前角細胞において核内 VEGF および VEGF 受容体の染色性が対照症例と比較して低下していた。一方で、HIF-1 α は細胞質内で染色性の増加を認めた。半定量評価では、何れも統計学的に有意な差を認めた。次に Tg マウスを用いて HIF-1 α の細胞質核輸送経路に着目して検討した。この結果、KAB と HIF-1 α は、non-Tg マウスでは核内で共局在するのに対して、mSOD1-Tg マウスにおいては核内のみでなく、細胞質内でも共局在した。KAB と競合的に結合する TIP30、Heat shock protein family との共局在は認めなかった。更に mSOD1-Tg マウス前角細胞においては、non-Tg マウスと比較して KAB の核内染色性は発症前より有意に低下し、病期の進行に従い更に有意な低下を示した。また KAB は Nup62 と共局在した。以上から、HIF-1 α の細胞質核間輸送障害は、複合体形成の阻害によるのではなく、核膜において障害機序が存在する可能性が示唆された。次に、細胞質核輸送障害を反映する Nup62 の核膜上での不連続性を検討した結果、mSOD1-Tg マウスの病期の進行とともに

に有意に増加した。

以上の結果から、ALS および mSOD1-Tg マウスの脊髄前角細胞における HIF-1 α の細胞質核輸送障害の存在が臨床症状発現前から存在する事が新たに示唆された。今回の検討において、HIF-1 α と VEGF の細胞内での発現の乖離、および HIF-1 α とその細胞質核輸送担体である KAP1 の発症前期からの核内染色性の低下より、VEGF 作用不全の機序として従来指摘されていた前角細胞における VEGF 受容体の発現低下のみでなく、細胞質核輸送障害の関与が考えられた。細胞質内 HIF-1 α 増加の機序として、一般的には低酸素、pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , TNF- α , EGF, IGF, FGF2 など)や変異 SOD1 蛋白等による prolyl hydroxylase (HIF-1 α の水酸化分解酵素)の活性阻害が報告されている。しかし今回の結果から、HIF-1 α の細胞質から核への輸送障害により細胞質内に蓄積する機序も考えられた。

細胞質核輸送障害は、TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)、fused in sarcoma/translocated in liposarcoma (FUS) 変異を有する家族性 ALS においても指摘されている。また triple A syndrome では、Nup62 遺伝子変異による KAP1 依存性の細胞質核輸送障害が下位運動ニューロン変性に寄与する事が報告されている。以上の知見より、HIF-1 α などの転写因子、mRNA の輸送障害は細胞の生存に必要な蛋白合成抑制を引き起こし、運動ニューロン死を招く一つの機序として考慮される。

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 5 件)

- (1). Impaired Cytoplasmic-Nuclear Transport of Hypoxia-inducible Factor-1 α in Amyotrophic Lateral Sclerosis.
Nagara Y, Tateishi T, Yamasaki R, Hayashi S, Kawamura M, Kikuchi H, Iinuma KM, Tanaka M, Iwaki T, Matsushita T, Ohyagi Y, Kira JI. Brain Pathol. 2013 Jan 31. doi: 10.1111/bpa.12040. (査読有)
- (2). Fukunaga Kawamura M, Yamasaki R, Kawamura N, Tateishi T, Nagara Y, Matsushita T, Ohyagi Y, Kira J: Impaired recruitment of neuroprotective microglia and T cells during acute neuronal injury coincides with increased neuronal vulnerability in an amyotrophic lateral sclerosis model. Exp Neurol 234: 437-445, 2012. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.01.015. (査読有)
- (3). Yonekawa T, Doi H, Tateishi T, Tanaka K, Iura T, Ohyagi Y, Kira J. Migraine with aura and recurrent vertigo attacks in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. Rinsho Shinkeigaku. 2012;52(7):499-502. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22849993>. (査読有)
- (4). Inflammatory radiculopathy in an ALS4 patient with a novel SETX mutation. Saiga T, Tateishi T, Torii T, Kawamura N, Nagara Y, Shigeto H, Hashiguchi A, Takashima H, Honda H, Ohyagi Y, Kira J. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012 Jul;83(7):763-4. doi:10.1136/jnnp-2012-302281. (査読有)
- (5). A case of chronic inflammatory

demyelinating polyradiculopathy concomitant with acquired von Willbrand syndrome. Ueda M, Kawamura N, Tateishi T, Shigeto H, Ohyagi Y, Kira J. Rinsho Shinkeigaku. 2011;51(5):334-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21706830> (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

- (1) Cui YW, Masaki K, Hayashi S, Tateishi T, Nagara Y, Kawamura FM, Yamasaki R, Ohyagi Y, **Kira J**: Connexin gap junction pathology in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. 第 53 回日本神経学会学術大会 2012. 5. 22~25 東京.
- (2) Cui YW, Masaki K, Yamasaki R, Tateishi T, Matsushita T, Shi N, Ohyagi Y, **Kira J**: Dysregulation of surface marker expressions on peripheral monocytes in multiple sclerosis. PACTRIMS 2012. 9. 13~15 北京.
- (3) 今村友裕、本田裕之、立石貴久、吉村怜、大八木保政、岩城徹、吉良潤一: 脱力、CK 上昇とともに軽度だった抗 SRP 抗体陽性筋炎の一例. 第 199 回日本神経学会九州地方会 2012. 9. 8 福岡.
- (4) 岩木三保、中井三智子、立石貴久、林信太郎、村井弘之、吉良潤一: ケアの継続性 (Continuity of Care) の視点による難病コーディネーターの役割分析. 希少性難治性疾患患者に関する医療の向上及び患者支援のあり方に関する研究班 分科会 1 2012. 12. 12 東京.
- (5) 河村真実、河村信利、立石貴久、山崎亮、長柄祐子、大八木保政、吉良潤一: mSOD1-Tg マウスの急性神経傷害時の成熟に伴うミクログリアと T 細胞の反応性低

下. 第 53 回日本神経学会学術大会 2012. 5. 22~25 東京.

- (6) 白石渉、園田和隆、吉村怜、立石貴久、本田裕之、下田信治、大八木保政、岩城徹、吉良潤一: 原発性胆汁性肝硬変に免疫介在性 myopathy を合併した 1 例. 日本内科学会第 298 回九州地方会 2012. 8. 25 福岡.
- (7) 白石渉、吉村怜、立石貴久、大八木保政、吉良潤一: 視神経脊髄炎にミトコンドリア遺伝子変異を合併した 1 例. 第 199 回日本神経学会九州地方会 2012. 9. 8 福岡.
- (8) 白石渉、林信太郎、鎌田崇嗣、立石貴久、吉村怜、大八木保政、吉良潤一: 多発性脳塞栓症と鑑別を要する病変を呈した Churg-Strauss 症候群の 1 例. 第 300 回日本内科学会九州地方会 2013. 1. 12 福岡.
- (9) 立石貴久、吉良潤一: FOSMN 症候群における TDP43 proteinopathy の意義と免疫療法. 第 3 回 ALS フォーラム 2012. 7. 28 東京.
- (10) 長柄祐子、立石貴久、田中正人、山崎亮、河村真実、菊池仁志、飯沼今日子、林信太郎、大八木保政、吉良潤一: ALS 及び mSOD1G93A ALS モデルマウスにおける脊髄前角細胞での hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の核細胞質間輸送の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会 2012. 5. 22~25 東京.
- (11) Tateishi T, Saiga T, Kawamura N, Nagara Y, Hashiguchi T, Takashima H, Honda H, Ohyagi Y, Kira J: A case of ALS4 with a novel senataxin gene R2136C mutation partially improved weakness and sensory disturbance of limbs by immunotherapy. 22th International

Symposium on ALS/MND 2011. 11. 27～12. 2, Australia.

42-47, 2012.

- (12) 立石貴久、吉良潤一：筋萎縮側索硬化症におけるサイトカイン・ケモカインプロフィールとグリア炎症との関わり. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 2011. 9. 15～17, 東京.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

- (13) 長柄祐子、立石貴久、福永真美、山崎亮、菊池仁志、吉良潤一：mSODG93A ALS モデルマウスにおける脊髄前角細胞での核細胞質間輸送系-核蛋白の検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011. 5. 18～20、名古屋.

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

- (14) 福永真美、山崎亮、河村信利、立石貴久、大八木保政、吉良潤一：進行期 mSOD-Tg マウスにおける急性神経細胞障害に対するミクログリアの反応性低下. 第 52 回日本神経学会総会 2011. 5. 18～20、名古屋.

○取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[図書] (計 4 件)

- (1). 立石貴久、岩木美保、吉良潤一：難病医療ネットワークと地域ケアの実際を知る. 新 ALS ケアブック・第二版. 日本 ALS 協会 第 9 章 pp. 245-254, 2013.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/ikyokusyukai.html>

- (2). 立石貴久、吉良潤一：ALS のバイオマーカー. シリーズ (アクチュアル脳・神経疾患の臨床). すべてがわかる筋萎縮性側索硬化症・運動ニューロン病. 辻省次 (総編集). 祖父江元 (責任編集). 中山書店 (印刷中).

6. 研究組織

- (3). 岩木美保、立石貴久、吉良潤一：難病医療ネットワークの支援を知る. ALS ケアブック. ALS 協会 (印刷中)

(1) 研究代表者

立石貴久 (Takahisa Tateishi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50423546

- (4). 立石貴久、岩木美保、吉良潤一：神経難病の在宅療養支援のポイント. 神経難病のリハビリテーション症例を通して学ぶ. CLINICAL REHABILITATION 別冊

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：