

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293202

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の分子病態解明と新たな治療法開発研究

研究課題名(英文)Molecular Mechanisms and Therapeutic Target of ALS/Asidan

研究代表者

阿部 康二(Abe, Koji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20212540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：ALSは運動ニューロンの選択的細胞死がおこる予後不良な難治性神経疾患である。またAsidanは小脳障害に加えALSに類似した運動ニューロン障害を呈する新たな遺伝性神経変性疾患である。ALSモデルマウス脊髄の検討ではTDP43、FUSはともに発病期で減少したが、Asidan関連遺伝子であるNOP56は病初期から減少していた。またAsidan患者剖検組織の検討では、ユビキチン陽性、p62陽性の封入体が存在すること、巨大なRNA foci(伸長GGCCUGリピート転写産物の凝集体)が存在することが明らかになり、伸長リピートの転写産物が他のRNA機能を阻害し毒性を生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed expression and distribution patterns of three RNA processing related proteins, nucleolar protein (NOP) 56 (identified as causative gene for Asidan), TDP-43, and FUS in lumbar and cervical cords of transgenic (Tg) SOD1 G93A ALS model mice. Tg mice showed progressive reduction of NOP56 levels in the large motor neurons from the early-symptomatic stage. TDP-43 and FUS protein levels showed a later decrease in the nucleus of large motor neuron at the end stage of the disease. We also analyzed an autopsy sample from an Asidan patient. We found ubiquitin- and p62-positive inclusions in the cytoplasm of the inferior olivary nucleus of the Asidan patient, (GGCCUG)_n RNA foci in neuronal nuclei of the cerebellum, inferior olive, spinal cord. Of interest is that the giant RNA foci, nearly 10 μm in diameter, that were detected in Purkinje cells, spinal motor neurons and most frequently in the inferior olivary nucleus, may be responsible for pivotal clinical symptoms of Asidan.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 Asidan 運動ニューロン病 NOP56 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

ALS は、1 次および 2 次運動ニューロンの選択的細胞死により全身の骨格筋の筋萎縮・筋力低下をもたらす予後が極めて不良な進行性難治性神経疾患であるが、有効な治療法は未だ確立しておらず、その病態も不明な点が多い。ALS 病態研究については全 ALS 患者の 5-10% を占める家族性 ALS (FALS) における原因遺伝子同定により明らかにされたことが多い。1993 年に細胞質内の活性酸素消去機構である SOD1 遺伝子変異が一部の FALS の原因であることが米国のグループや阿部らのグループにより解明された (Rosen ら; Deng ら; Aoki ら)。これにより ALS の症状や病理所見を再現するモデル動物として変異型 SOD1 遺伝子を導入したモデルマウスが作成され、ALS の病態に関する研究は大きな進展を見せている。近年では、阿部らは G93A-SOD1 遺伝子変異を導入した ALS モデルマウスの脊髄において運動障害を認める前から neurovascular unit 構成タンパクの減少を報告し、選択的運動ニューロン死との関連が強く示唆された (Miyazaki ら、2011)。また、ALS モデルマウスにおけるオートファジー・イメージングを実現し、ALS 病態におけるオートファジーの関与を明らかにしている (Tian ら、2011; Morimoto ら、2007)。また、ヒト ALS 患者の臨床検体を用いた研究では、阿部らは ALS 患者脳脊髄液におけるガス・酸性度分析を行い、ALS 患者脳脊髄液 pH が ALS の重症度、罹病期間と相関することを明らかにし、臨床的に有用なバイオマーカーとなり得ることを報告した (Morimoto ら、2011)。

また、阿部らは小脳失調症に加えて舌や全身の筋萎縮や線維束性収縮など運動ニューロン疾患の臨床的特徴を併せ持つ、これまでに報告のない新しい常染色体優性遺伝性変性疾患 Asidan (spinocerebellar ataxia type 36: SCA36) の原因遺伝子変異として nucleolar protein 56 (NOP56) 遺伝子のイントロン 1 における GGCCTG リピートの異常伸張を発見した (Kobayashi, Abe ら、2011)。最近、常染色体優性遺伝性 ALS-FTD 家系から C9ORF72 遺伝子の GGGGCC リピートの異常伸張が起こっていることが複数の機関から報告された (Renton ら、2011、DeJesus-Hernandez ら、2011)。上記 2 疾患はイントロン領域の 6 塩基リピート異常伸張という点で類似点が多く、運動神経細胞死を引き起こす共通の病態メカニズムが発見される可能性があり、非常に注目を集めている。

治療に関して、阿部らは我が国で初めてヒト ALS 患者において神経栄養因子 (insulin-like growth factor; IGF) の脊髄腔内持続注入療法の臨床試験を行い、高濃度群で症状増悪遅延を確認した (Nagano ら、2005)。これらの結果より神経栄養因子は ALS の有効な治療候補となり得ることが示された。

2. 研究の目的

本研究課題では、ALS の特徴である選択的運動ニューロン死の分子メカニズムを明らかにし、病態に則した新規の有効な治療法を確立することを目的とする。分子メカニズムに関する検討としては、新規の ALS 関連分子として我々が同定した NOP56 の ALS 病態への関与について、ALS モデルマウスおよびヒト ALS 剖検例を用いて検討を行う。また Asidan 患者の剖検例の切片を用いて、更なる病態解析を行う。さらに、ALS の臨床分野での研究として、また、ALS 患者頸髄領域の拡散テンソル (diffusion tensor) に特異的異常があるのかどうかについても MRI を用いて検討を行う。また近年注目されている、ALS や Asidan における認知機能障害の有無および特異的異常について検討を行う。ALS の根本的治療法開発へ向けた研究としては、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) やダイレクトリプログラム技術を用いた再生治療の可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

まず運動ニューロン変性を伴う新規遺伝性変性疾患 Asidan (SCA36) の原因遺伝子 NOP56 の ALS 病態への関与を検討した。ALS モデルマウスの脊髄運動ニューロンにおける NOP56 蛋白の発現を TDP43、FUS 蛋白と比較検討するため、ALS マウス 10 週齢を運動障害発症前、14 週齢を発症初期、18 週齢を発症末期のモデルとし、免疫染色ならびにウェスタンブロット法で TDP-43、FUS、NOP56 の蛋白発現をそれぞれ検討した。

Asidan 患者の剖検脳組織を HE 染色、免疫組織学的検討ならびに FISH 法を用いて詳細に検討を行った。

ALS 患者と対照群である健常の者頸髄領域の拡散テンソル (diffusion tensor) 解析を行い特異的異常があるのかどうかについて MRI を用いて検討を行う。

患者由来の iPS 細胞株による病態解析を行うためには相当数の異なった患者由来の iPS 細胞株が必要となることから、引き続き FALS や Asidan 患者の新規家系症例の追加ならびに不死化リンパ芽細胞の収集を並行して行った。

4. 研究成果

ALS モデルマウスの脊髄運動ニューロンにおける NOP56、TDP43、FUS の蛋白レベルの発現比較では、TDP43、FUS はともに 18 週齢になってはじめて頸髄の残存運動ニューロンで有意な減少を認めただけに対し、NOP56 は発病早期 14 週齢の時点から、明らかな蛋白発現の減少を認めた。この研究から ALS モデルマウスの脊髄では Asidan 関連遺伝子である NOP56 は病初期から発現量が減少してきており、NOP56 が ALS 病態に関与していることが示唆された。

Asidan 患者の剖検組織の検討の結果、結果として、(i) ユビキチン陽性、p62 陽性の

封入体が Asidan 患者剖検脳の下オリブ核に存在すること。(ii)10um の直径をもつ巨大な RNA foci (伸長 GGCCUG リピート転写産物の凝集体)が小脳プルキンエ細胞、脊髄運動ニューロン、下オリブ核に存在することが明らかになった。GGCCUG と結合しやすいとコンピューター上で推定された転写因子 SRSF 2 は、患者リンパ芽球で GGCCUG RNA foci と共局在すること、また GGCCUG リピート近傍に存在する MIR1292 の発現も低下することも我々は報告している。以上の結果から、高度に伸長した GGCCUG リピートの転写産物が、他の RNA や miRNA の機能を障害し細胞毒性を生じる RNA gain of function の可能性が示唆された。

ALS 患者頸髄領域の拡散テンソル (diffusion tensor)解析の結果、異方性の強さの指標としての fractional anisotropy (FA)値が高い ALS 患者では、ALS 機能評価スケール (ALSFRS-R) の低下が早い患者であることが明らかになった。この結果から、この FA 値が ALS 患者の病勢を示すバイオマーカーとして使える可能性が示された。

Asidan だけでも 3 つの新規家系 (6 名の新規患者) を追加し、臨床所見や画像所見をこれまでの報告例と比較検討したが、患者進行性の小脳失調症を主症状とし、舌や四肢・体幹の筋萎縮や線維束性収縮などの運動ニューロン徴候を高率に合併する臨床像は各家系間で共通しており、Asidan (SCA36) は非常に類似した臨床像を呈すると考えられた。

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 15 件)

- 1) Sun Z, Ohta Y, Yamashita T, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Abe K.
New susceptible variant of COQ2 gene in Japanese patients with sporadic multiple system atrophy (査読有り).
Neurol Genet. 2016 Mar 3;2(2):e54.
- 2) Fukui Y, Hishikawa N, Sato K, Kono S, Matsuzono K, Nakano Y, Ohta Y, Yamashita T, Deguchi K, Abe K.
Dynamic Cerebrospinal Fluid Flow on MRI in Cortical Cerebellar Atrophy and Multiple System Atrophy-cerebellar Type (査読有り).
Intern Med. 54 (2015) 1717-1723.
- 3) Fukui Y, Hishikawa N, Sato K, Yunoki T, Kono S, Matsuzono K, Nakano Y, Ohta Y, Yamashita T, Deguchi K, Abe K.
Differentiating progressive supranuclear palsy from Parkinson's disease by MRI-based dynamic cerebrospinal fluid flow (査読有り).

J Neurol Sci. 357 (2015) 178-182.

- 4) Fukui Y, Hishikawa N, Sato K, Yunoki T, Nakano Y, Morihara R, Ohta Y, Yamashita T, Abe K.
Characteristic diffusion tensor tractography in multiple system atrophy with predominant cerebellar ataxia and cortical cerebellar atrophy (査読有り).
J Neurol. 2015 Jan;263(1):61-7.
- 5) Liu W, Ikeda Y, Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Abe K.
Characteristic RNA foci of the abnormal hexanucleotide GGCCUG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 36 (Asidan) (査読有り).
Eur J Neurol. 2014 Nov;21(11):1377-86.
- 6) Yamashita T, Abe K.
Direct reprogrammed neuronal cells as a novel resource for cell transplantation therapy (査読有り).
Cell Transplant. 2014;23(4-5):435-9
- 7) Sun M, Yamashita T, Shang J, Liu N, Deguchi K, Liu W, Ikeda Y, Feng J, Abe K.
Acceleration of TDP43 and FUS/TLS protein expressions in the preconditioned hippocampus following repeated transient ischemia (査読有り).
J Neurosci Res. 2014 Jan;92(1):54-63.
- 8) Early and selective reduction of NOP56 (Asidan) and RNA processing proteins in the motor neuron of ALS model mice.
Miyazaki K, Yamashita T, Morimoto N, Sato K, Mimoto T, Kurata T, Ikeda Y, Abe K (査読有り).
Neurol Res. 2013 Sep;35(7):744-54.
- 9) Liu W, Yamashita T, Tian F, Morimoto N, Ikeda Y, Deguchi K, Abe K.
Mitochondrial fusion and fission proteins expression dynamically change in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis (査読有り).
Curr Neurovasc Res. 2013 Aug;10:222-30.
- 10) Matsuzono K, Ikeda Y, Liu W, Kurata T, Deguchi S, Deguchi K, Abe K.
A novel familial prion disease causing pan-autonomic-sensory neuropathy and cognitive impairment (査読有り).
Eur J Neurol. 2013 May;20(5):e67-9
- 11) Morimoto N, Yamashita T, Sato K, Kurata T, Ikeda Y, Kusuhashi T, Murata N, Abe K.

Assessment of swallowing in motor neuron disease and Asidan/SCA36 patients with new methods (査読有り).

J Neurol Sci. 2013 Jan 15;324:149-55.

〔学会発表〕(計 16 件)

1) 2015.9.10-11

第 58 回日本神経化学会大会(大宮)シンポジウム

山下 徹、池田佳生、阿部康二

A Novel ALS/SCA Crossroad Mutation Asidan

2) 2015.9.3-5

The 3rd Asian Clinical Conference (ACC3) (Tokyo, Japan)

Fukui Y, Hishikawa N, Sato K, Nakano Y, Ohta Y, Yamashita T, Deguchi K, Abe K

Dynamic CSF flow study on MRI in CCA and OPCA

3) 2015.9.16-19

The 7th World Congress of the International Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders (Vas-Cog World 2015) (Tokyo, Japan)

Hishikawa N, Fukui Y, Sato K, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Abe K

Cognitive and affective functions in diabetic patients associated with diabetes-related factors, white matter abnormality, and aging.

4) 2013.6.26-27

The 20th IAGG World Congress of the International Association of Gerontology and Geriatrics (Soeul, Korea)

Matsuzono K, Ikeda Y, Deguchi S, Kurata T, Yamashita T, Deguchi K, Satoh K, Kitamoto T, and Abe K

A novel familial prion disease causing cognitive impairment, polyneuropathy and pan-autonomic involvement.

5) 2013.11.6-7

International Symposium on Mitochondria 2013 (Tokyo, Japan)

Liu W, Yamashita T, Deguchi K, and Abe K

Dynamic changes of mitochondrial fusion and fission proteins in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis.

6) 2013.4.13-15

The 6th Pan Pacific Symposium on Stem Cell and Cancer Research (Hsinchu, Taiwan)

Yamashita T, Abeliovich A, and Abe K

iN cell models of Alzheimer`s disease.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 康二 (Koji Abe)

岡山大学大学院医歯薬総合研究科

脳神経内科学 教授

研究者番号: 20212540

(2) 研究分担者

山下 徹 (Toru Yamashita)

岡山大学大学院医歯薬総合研究科

脳神経内科学 講師

研究者番号: 60644408

池田 佳生* (Yoshio Ikeda)

岡山大学大学院医歯薬総合研究科

脳神経内科学 講師

研究者番号: 00282400

*平成 25 年度のみ参画し、その後群馬大学に転出