

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08245

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症運動神経細胞でのBTBD10発現低下と病態発症・進行との関連性

研究課題名(英文) Relationship between reduction of BTBD10 expression in motor neuron and pathogenesis and progression of amyotrophic lateral sclerosis.

研究代表者

名和 幹朗 (Nawa, Mikiro)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10398620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに神経細胞死抑制因子BTBD10が筋萎縮性側索硬化症(ALS)運動神経細胞において減少することを見出した。本研究ではBTBD10トランスジェニック(-Tg)マウス及びノックアウト(-KO)マウスを用い、運動神経細胞におけるBTBD10発現低下とALS病態発症と進行との関連性を検討した。BTBD10-Tgマウスと、ALSモデルマウスであるG93A-SOD1-Tgマウスを交配した結果、G93A-SOD1-Tgマウスで見られるALS症状は改善されなかった。一方、BTBD10-KOマウスは6ヶ月齢時点で運動失調の測定を行った結果、ロータロッドテストの成績低下傾向が観察された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the expression level of BTBD10 was reduced in motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patient. In this study, we generated BTBD10 transgenic (-Tg) mouse and knockout (-KO) mouse to research the relationship between reduction of BTBD10 expression in motor neuron and ALS pathogenesis and disease progression. First, we mated BTBD10-Tg mouse and G93A-SOD1-Tg mouse, an ALS model mouse, to observe the effect of expression of BTBD10 on progression of ALS pathology. The onset and the life span of double-Tg mouse were almost same as G93A-SOD1-Tg mouse. Next, we generated BTBD10-KO mouse and observed motor function with rotarod test. The latency to fall from a rotating rod of the 6-month-old BTBD10-KO mouse tend to be shorter than that of wild type mouse.

研究分野：分子病態薬理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 BTBD10

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症は上位・下位運動神経細胞が変性・脱落する難病である。我々はこれまでに ALS 関連運動神経細胞死が Rac1/PI3K/Akt3 経路を介して抑制可能であることを見出した(Kanekura et al., J. Biol. Chem., 2005)。また、この経路で BTBD10 が Akt3 のリン酸化増強を行うことで ALS 関連細胞死を抑制することを明らかとした(Nawa et al., Cell. Signal., 2008)。さらに、BTBD10 の発現低下が神経細胞死を誘導することならびに ALS 患者や ALS モデルマウスである G93A-SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄運動細胞において、BTBD10 の発現量が低下していることを見出した(Nawa et al., Cell Death Differ., 2012)。

BTBD10 と他の BTBD タンパク質とではアミノ酸配列の相同性は極めて低いが、我々は KCTD20 が BTBD10 相同分子であり、BTBD10 同様に Akt 活性化作用を有することを見出した。さらに、G93A-SOD1 トランスジェニックマウス脊髄前角運動神経細胞における KCTD20 の発現量は BTBD10 とは異なり、ALS 症状が進行しても減少しないという知見を得た(Nawa et al., BMC Biochem., 2013)。これらのことから、運動神経細胞における BTBD10 発現量低下は ALS 病態と密接な関係にあることが考えられた。

ALS 関連運動神経細胞死の原因や経路がこれまでに複数同定されている。また近年 ALS 原因遺伝子も数多く同定され、ALS 病態の複雑さを痛感させられる。現在までに BTBD10 が家族性 ALS 原因遺伝子であるという報告はないが、我々の研究結果から BTBD10 は家族性、孤発性両 ALS 病態に関与していることが考えられた。これまでの ALS 病態解明研究は主に家族性 ALS 関連変異タンパク質を発現するモデルマウスを用いている。実際に変異 SOD1 過剰発現マウスを用いた動物実験で有効とされた治療薬シードでも、臨床試験ではことごとく失敗に終わっており、普遍的な ALS 病態を呈するモデルマウスの開発は今後の ALS 研究の飛躍的な発展につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では BTBD10 トランスジェニック (BTBD10-Tg) マウスならびに BTBD10 ノックアウト (BTBD10-KO) マウスを作製し、運動神経細胞における BTBD10 発現量低下と ALS 発症、進行との関連性を検討した。また、BTBD10-KO マウスが新規 ALS モデルマウスとして有用か検討した。また、マウスを用いた実験に加え、線虫にヒト BTBD10 を過剰発現させ、G93A-SOD1 過剰発現線虫における運動機能異

常が回復可能か検討した。

3. 研究の方法

(1) SOD1 過剰発現線虫の作製

Snb-1 プロモーターを利用し、赤色蛍光タンパク質を融合したヒト野生型 *SOD1* 遺伝子あるいは、ALS 関連変異 *SOD1* (*G93A-SOD1*) 遺伝子を線虫にマイクロインジェクションした。続いて、TMP/UV 法により染色体外 DNA アレイを染色体に組み込んだ。同様に *Rgef-1* プロモーターを利用し、GFP タンパク質を融合したヒト *BTBD10* 遺伝子をマイクロインジェクションして BTBD10 発現線虫を作製した。さらに、SOD1 発現線虫と BTBD10 発現線虫を交配し、ダブルトランスジェニック線虫を作製した。

作製した遺伝子改変動物を用いて、運動機能試験を行い、BTBD10 が SOD1 により惹起される運動機能異常を改善するか検討した。

(2) BTBD10/G93A-SOD1 ダブル Tg マウスの作製と表現型解析

BTBD10-Tg マウスを作製し、G93A-SOD1-Tg マウスと交配した。野生型マウス、BTBD10-Tg マウス、G93A-SOD1-Tg マウス、ならびに BTBD10/G93A-SOD1 ダブル Tg マウスを長期飼育し、体重変化の観察、握力の計測、さらに ALS 症状が観察され始める時期をロータロッド試験で評価するとともに、これらのマウスの寿命を観察した。

(3) BTBD10-KO マウスの作製と表現型解析

Cre-loxP システムを用い、全身性にマウス *BTBD10* 遺伝子をノックアウトした。6ヶ月齢マウスを用い行動試験 (オープンフィールドテスト、ロータロッドテスト) を行いどのような表現型が観察されるか検討した。

4. 研究成果

以前に我々は G93A-SOD1-Tg マウス脊髄運動神経細胞における BTBD10 発現量は ALS 症状進行依存的に減少することを見出している。そこで、BTBD10 発現量を補充することで G93A-SOD1 を発現する線虫やマウスにおける運動機能低下の抑制や、寿命が延長することを期待し以下の実験を行った。

まず初めに、生活環の短い線虫の ALS モデルを用いて上記の仮説を検証した。BTBD10 過剰発現線虫と野生型 SOD1 (wt-SOD1) もしくは、G93A-SOD1 過剰発現線虫を交配し、得られたシングルトランスジェニック線虫、ダブルトランスジェニック線虫ならびに野生型コントロール線虫を M9 バッファー中に入れ、1 分間に頭を振る回数を計測した。その結果、wt-SOD1 発現線虫ならびに G93A-SOD1 発現線

虫では野生型線虫と比較してバッファで頭を振る回数が優位に減少した。しかし、wt-SOD1 発現線虫や G93A-SOD1 発現線虫で見られた運動機能異常は、BTBD10 を共発現させた wt-SOD1/BTBD10 発現線虫や G93A-SOD1/BTBD10 発現線虫で抑制されなかった。また、BTBD10 発現線虫の運動機能は野生型線虫のそれと変化なかった。

次に BTBD10-Tg マウスを作製し、G93A-SOD1-Tg マウスと交配した。G93A-SOD1-Tg マウスは約 90 日で ALS 様症状が現れ、約 140 日で寿命を迎える。

体重の変化に関して、BTBD10-Tg マウスと野生型で差は観察されなかった。G93A-SOD1-Tg マウスは、9 週齢までは野生型と同様に体重が増加したが、その後は体重の増加は見られなかった。BTBD10/G93A-SOD1 ダブル Tg マウスの体重変化は G93A-SOD1-Tg マウスのそれと同様であった。また、握力試験の結果においても、G93A-SOD1-Tg マウスと BTBD10/G93A-SOD1 ダブル Tg マウスとでは差がなかった。さらに、BTBD10/G93A-SOD1 ダブル Tg の ALS 症状開始時期ならびに寿命は G93A-SOD1-Tg と優位な差は観察されなかった。これらのことから、G93A-SOD1 によって引き起こされる ALS 病態は BTBD10 の発現補充によっては抑制できないことが考えられた。

続いて、BTBD10 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、表現型解析を行った。BTBD10-KO マウスは Cre-loxP システムによってコンディショナルノックアウトが可能な設計になっている。初めに、全身性に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを用い、マウス BTBD10 遺伝子の第 6 エクソンを欠損させた。BTBD10-KO マウスは両アレルが欠損しても胎生致死になることはなく、体重増加スピードも野生型との差は観察されなかった。

次に、BTBD10-KO マウスで中枢神経系の発達に変化がないか、nissl 染色や免疫染色法によって検討した。3 か月齢では脳の大きさに野生型とノックアウトマウスで差は見られなかった。また、大脳皮質における層構造の異常や神経細胞数に関しても野生型とノックアウトマウスで顕著な差は観察されなかった。

最後に、6 か月齢の BTBD10-KO マウスを用い、オープンフィールドテストならびにロータロッドテストを行い、活動量、不安様行動ならびに運動機能を評価した。オープンフィールドテストはフィールド内にマウスを入れ、10 分間の活動を計測した。その結果、BTBD10-KO マウスはフィールド内を動く速さや距離は野生型と差がなかった。一方、BTBD10-KO マウスはフィールドの中心にいる時間が、優位差はつかないものの、野生型と

比較して減少し、フィールドの四隅にいる時間が野生型より、延長する傾向にあった。

また、ロータロッドテストは、ロッドの回転数を 0 rpm から 40 rpm まで 300 秒かけて加速する設定で、1 日 2 回、3 日間連続で行った。その結果、野生型マウスと BTBD10 ヘテロノックアウトマウスでは日を追う毎に、ローターから落下するまでの時間が延長するのに対し、BTBD10 ホモノックアウトマウスではローターから落下するまでの時間は、試験の回数を重ねても延長しない傾向にあった。これらのことから、BTBD10 ホモノックアウトマウスでは、協調運動異常あるいは、運動学習能に異常がある可能性が示唆された。

今後は使用する動物数を増やし同様の試験を行う予定である。また、BTBD10-KO マウスをさらに長期飼育し運動神経細胞死が観察されるか、また、運動機能が悪化するか検討しておく予定である。

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 2 件)(すべて査読あり)

Kusakari S, Nawa M, Sudo K, Matsuoka M

Calmodulin-like skin protein protects against spatial learning impairment in a mouse model of Alzheimer disease.

J. Neurochem. 144(2): pp218-233, 2018
doi: 10.1111/jnc.14258

Hashimoto Y, Toyama Y, Kusakari S, Nawa M, Matsuoka M

An Alzheimer Disease-linked Rare Mutation Potentiates Netrin Receptor Uncoordinated-5C-induced Signaling That Merges with Amyloid β Precursor Protein Signaling.

J Biol. Chem. 291(23): pp12282-12293, 2016
doi: 10.1074/jbc.M115.698092.

[学会発表](計 3 件)

草苺 伸也、名和 幹朗、須藤 カツ子、松岡 正明

Calmodulin-like skin protein はアルツハイマー病モデルマウスの空間学習障害を抑制する

2017 年 3 月 15 日(長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール、長崎)

Kusakari S, Nawa M, Sudo K, Matsuoka M
Calmodulin-like skin protein prevents
spatial learning impairment of
Alzheimer's disease model mice.
Society for Neuroscience annual meeting
2016年11月16日(サンディエゴ、米国)

名和 幹朗、松岡 正明
Analysis of relationship between
BTBD10 and TBK1 in ALS-related neuronal
cell death.
第177回東京医科大学医学会総会
2016年6月4日(東京医科大学病院、東京)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tokyo-med.ac.jp/pharmacol/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名和 幹朗 (Mikiro Nawa)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：10398620