

令和元年6月17日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09689

研究課題名(和文) 新規病因遺伝子に基づく筋萎縮性側索硬化症の共通病態解明と治療基盤開発

研究課題名(英文) Establishment of common mechanism and therapeutic base for amyotrophic lateral sclerosis based on a novel causative gene

研究代表者

高橋 祐二 (Takahashi, Yuji)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・病院・部長

研究者番号：00372392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、筋萎縮性側索硬化症の新規病因遺伝子産物ErbB4の機能障害が脊髄運動神経細胞死をもたらすメカニズムを解明することである。Neuro2A細胞において、変異型の細胞内局在異常・細胞生存率低下を確認した。マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞において、核内移行型アイソフォームの軸索伸長効果が、変異型において消失していることを明らかにした。タモキシフェン依存性運動神経細胞特異的ErbB4コンディショナルノックアウトマウスを作成し、ErbB4の発現喪失が運動機能障害・脊髄運動神経細胞死をもたらすことをin vivoで検証した。以上期間内に研究は順調に進捗した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりErbB4の機能喪失というALSの新たな病態メカニズムが明らかになった。さらに、孤発性ALSの病態を反映した新たな動物モデルの作成に成功した。本動物モデルは孤発性ALSの病態解明に活用可能であり、変性過程を前向きに追跡することが可能な有用なモデルである。一方、ErbB4は受容体型チロシンリン酸化酵素であり、創薬ターゲットとしても有用な分子である。ALSの病態抑制治療を目指した創薬シーズの開発に向けて重要な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the mechanism by which dysfunction of the novel causative gene product ErbB4 of amyotrophic lateral sclerosis leads to spinal motor neuron death. In Neuro2A cells, subcellular mislocalization of mutant ErbB4 and resultant decreased cell viability were confirmed. In mouse cerebral cortex neuron-derived primary culture cells, it was revealed that the axonal elongating effect of the nuclear translocation isoform was abolished in the mutant form. A tamoxifen-dependent motor neuron specific ErbB4 conditional knockout mouse was created, and it was confirmed in vivo that loss of expression of ErbB4 leads to motor dysfunction and spinal motor neuron death. Thus, research progressed as intended within the designated period.

研究分野：神経内科学、分子遺伝学、分子生物学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 運動神経細胞死 ErbB4 軸索伸長 コンディショナルノックアウトマウス モデル動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動神経細胞(NMN)の変性により進行性の全身の筋萎縮・筋力低下を来す神経難病である。平均生命予後は2-4年であり、現在に至るまで病態抑制治療は発見されていない。ALSの解明と克服は、現代の医療における喫緊の課題である。

2013年に申請者らは、家族性ALSの新規病因遺伝子として *ERBB4* を同定し、ALS19と命名した(Takahashi, Y. et al. Am J Hum Genet. 2013)。ALS19は典型的なALSの病像を呈する。ErbB4はEGFRサブファミリーに属する受容体型チロシン酸化酵素であり、リガンドであるNeuregulin(NRG)が結合すると、ErbB4自身によるホモ二量体化あるいは他のサブファミリー(EGFR, ErbB2/3)とのヘテロ二量体化を介して自己リン酸化され、PI3-Akt, Ras-MAPK系を代表とする下流のシグナリングを活性化することで、転写制御、シナプス可塑性、軸索伸長、神経筋接合部機能維持といった、MNの機能に重要な役割を果たす。*ErbB4*のホモ接合性ノックアウトマウスは胎生致死であるが、脳幹神経細胞の軸索伸長異常を来す。ヘテロ接合性ノックアウトマウスは生存可能であるが、運動系の機能異常を来す。ErbB4は核内移行・PI3活性化部位の有無に関連して計4種類のスプライシングアイソフォームが形成される。機能解析により、ALS19の病原性変異においては、NRG刺激による自己リン酸化能の低下が認められた。NRG-ErbB4パスウェイの機能低下がALSの根本原因となり得ることが遺伝学的に初めて立証された。

申請者はさらに、ErbB4と孤発性ALS(SALS)の病態との関連を明らかにするために、SALSの剖検脊髄組織を用いた免疫組織化学的検討を行った。正常及び疾患対照脊髄前角においては、ErbB4はMNの細胞質に特異的かつ一様に発現していた。対照的に、SALSにおいては、神経変性の早い段階から、一部のMNにおける著明な発現低下が認められた。TDP-43との二重染色では、TDP-43の細胞質内凝集を有するMNでは例外なくErbB4の染色性は低下していた。ErbB4は孤発性ALSにも関連している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、細胞生物学的研究により、ErbB4の機能障害が運動神経細胞死をもたらす機構を明らかにし、ALSの共通分子病態を解明する。さらに、孤発性ALSの病態に即した疾患モデル動物を構築し、モデル動物としての妥当性を検証する。本研究により、ALSの共通分子病態の解明・治療研究基盤の確立・病態抑制治療シーズ開発につながる分子標的の同定・発症に関連する環境要因の探索指針がもたらされると考えられる。

3. 研究の方法

培養細胞への野生型・変異型 *ERBB4* 遺伝子導入

ErbB4の4種類のアイソフォーム(核移行・細胞質移行型/PI3活性化型・非活性化型)の野生型・変異型発現コンストラクトを構築する。培養細胞に上記発現コンストラクトを導入し、細胞内局在・細胞生存性の差異を件す津する。発現コンストラクトをベースにして、ErbB4各アイソフォーム野生型・変異型発現アデノウイルスベクターを構築する。マウス胎生E13-15から剔出した大脳皮質神経細胞由来初代培養細胞に対して遺伝子導入実験を行う。Myc/Flagタグ抗体で発現を確認する。各アイソフォーム導入における野生型・変異型の細胞形態の差異を検討する。神経突起伸長に与える影響を細胞免疫組織化学的に検討する。

タモキシフェン依存性脊髄運動神経細胞特異的 *ErbB4* コンディショナルノックアウト

マウスの作製

Erb4 のノックアウトマウスは胎生致死であるため、運動神経細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製が必要である。米国 Jackson Laboratory において維持されている *Erb4*^{flox/flox} マウスと 129-Chat^{tm1(cre/ERT)Nat/J} を交配し、*Erb4* のタモキシフェン依存性運動神経細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製する。*Erb4*^{flox/flox} マウスと Cre/+マウスを交配し、Cre/+;flox/wt, wt:flox/wt マウスを作製した後、これらを交配して Cre/+;flox/flox, wt:flox/flox マウスを作製する。バッククロスを行い純系を確立する。成熟個体にタモキシフェンを経口投与し、一週間後の脊髄運動神経細胞における Cre-recombinase の発現を確認する。さらに、Cre-recombinase の発現した細胞において実際に ErbB4 の発現が消失していることを確認する。生存曲線分析、Rota-rod、open-field、treadmill、grip strength などの Test battery を用いて、表現型を検討する。

4 . 研究成果

培養細胞への野生型・変異型 ERBB4 遺伝子導入

ErbB4 の 4 種類のアイソフォーム (核移行・細胞質移行型/PI3 活性型・非活性型) の野生型・変異型発現コンストラクトを作成した。Neuro2A 細胞を用いた一過性発現系により、細胞内局在を検討した。野生型 ErbB4 は細胞膜に主として分布していた一方で、変異型 ErbB4 は細胞質内に凝集し、一部は ER に局在していた。また、変異型を導入した細胞は野生型と比較して有意に生存率が低下していた。変異 ErbB4 が ER ストレスを介して細胞死を惹起している可能性が考えられた。

マウス大脳皮質神経細胞・脊髄運動神経細胞由来初代培養細胞への野生型・変異型 *ERBB4* 遺伝子導入実験を行った。上記発現コンストラクトを用いて、Electroporation 法、Lipofectamine 法による遺伝子導入実験を行ったが、良好な導入効率を得られなかった。そこで、これらの発現コンストラクトをベースにして、野生型・変異型発現アデノウイルスベクターを構築した。マウス胎生 E13-15 から剔出した大脳皮質神経細胞由来初代培養細胞に遺伝子導入実験を行った。Western blotting で発現を確認した。免疫細胞化学により、各アイソフォームの細胞内局在を確認した。核内移行型のアイソフォームを導入した神経細胞では、軸索伸長が促進されている傾向が確認された。また、細胞質移行型のアイソフォームも一部は核内への移行が認められた。一方、変異型の導入においては軸索伸長促進効果が認められず、変異による機能障害が確認された。

タモキシフェン依存性脊髄運動神経細胞特異的 *Erb4* コンディショナルノックアウトマウスの作製

米国 Jackson Laboratory より *Erb4*^{flox/flox} マウスを、MMRRC repository より 129-Chat^{tm1(cre/ERT)Nat/J} マウスを凍結胚で購入した。*Erb4*^{flox/flox}・129-Chat^{tm1(cre/ERT)Nat/J} の掛け合わせにより cKO マウスの作製を行い、F1 世代において予備的な検討を行った。生後 8 週でタモキシフェンを投与し、MN における ErbB4 の発現喪失を免疫組織化学的に確認した。投与後 4 ヶ月後より、Clasping reflex の異常、野生型と比較して体重減少、hunchback posture、後肢の grip strength の低下が認められた。剖検脊髄組織においては脊髄前角における ChAT 陽性細胞の減少を認めた。さらに cKO マウスのコンジェニック化を進め、F8 世代に到達した。cKO マウスの作製により、ErbB4 の喪失が MN 死をもたらす仮説を支持する結果が得られた。

以上期間内に目標は達成した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yuji Takahashi, Akiko Uchino, Ayako Shioya, Terunori Sano, Chihiro Matsumoto, Yurika Numata-Uematsu, Seiichi Nagano, Toshiyuki Araki, Shigeo Murayama, Yuko Saito. Altered immunoreactivity of ErbB4, a causative gene product for ALS19, in the spinal cord of patients with sporadic ALS. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* *In press*.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Yuji Takahashi, Yurika Numata-Uematsu, Seiichi Nagano, Chihiro Matsumoto, Terunori Sano, Miho Murata, Yuko Saito. Immunohistochemical Analysis of ErbB4 in the Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. American Academy of Neurology Annual Meeting 2016 Vancouver, BC, Canada Apr 15-21, 2016

〔図書〕(計 2 件)

1. 【新しい神経疾患遺伝子】筋萎縮性側索硬化症の新規遺伝子 *ERBB4* 高橋 祐二 神経内科 88(2) Page189-196(2018.2) 科学評論社
2. 【新しく発見された神経疾患遺伝子】筋萎縮性側索硬化症(ALS19)の遺伝子 .高橋 祐二 神経内科 87(2) Page149-154 (2017.8) 科学評論社

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：長野 清一

ローマ字氏名： Nagano, Seiichi

研究協力者氏名：伊達 英俊

ローマ字氏名： Date, Hidetoshi

研究協力者氏名：齋藤 祐子

ローマ字氏名： Saito, Yuko

研究協力者氏名：松本 千尋

ローマ字氏名： Matsumoto, Chihiro