

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390244

研究課題名 (和文) 神経変性疾患におけるユビキチンプロテアソーム系の関与の解明

研究課題名 (英文) The analysis of participation in the ubiquitin proteasome system for understanding the mechanisms of neurodegenerative diseases.

研究代表者 高橋 良輔 (TAKAHASHI RYOSUKE)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90216771

研究成果の概要 (和文)：ユビキチンプロテアソームタンパク質分解系 (UPS) を運動ニューロン特異的に欠損する遺伝子改変マウスを樹立した。このマウスは8週齢以降に振戦様の症状と運動能力の低下を認めた。神経病理学所見では、運動ニューロンに ALS 病因たんぱく質 FUS の蓄積や TDP43 の細胞質内封入体形成が認められた。以上より運動ニューロン特異的 UPS 欠損マウスは ALS モデルとしての病態解明への応用が期待できる。

研究成果の概要 (英文)：We have established motor neuron-specific proteasome deficient mice by crossbreeding of floxed mice for Rpt3, a subunit of 26S proteasome with VChT-Cre. Fast mice that displays motor neuron specific Cre expression. The motor neuron specific Rpt3 deficient mice showed tremor starting from 8 weeks of age and slowly progressive motor dysfunction from 12 weeks of age. Pathological findings revealed increased expression of the gene products of familial ALS such as FUS and TDP43, the latter forming cytoplasmic inclusion bodies. These results suggest that motor neuron-specific Rpt3 deficient mice represent a model for sporadic ALS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：神経内科学

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, プロテアソーム, Rpt3, コンディショナルノックアウト

## 1. 研究開始当初の背景

(1)研究開始当初より、神経変性疾患の多くは病的因子の同定が進められていたものの、機序については不明な点が多く、現在に至ってもなお根本的治療が難しい疾患である。同定された病因子にはタンパク分解関連因子や、分解を困難とする性質を示すことが多く見つけたことから、分解経路の関与が示唆さ

れることとなった。

(2)ただ、タンパク分解酵素阻害剤を動物に投与する実験では、安定した結果が得られず、機序解明が困難であった。

## 2. 研究の目的

(1)多くの神経変性疾患の神経病理学的所見では異常タンパク質の蓄積が観察され、病因

にタンパク質分解系の障害の関与が示唆されている。

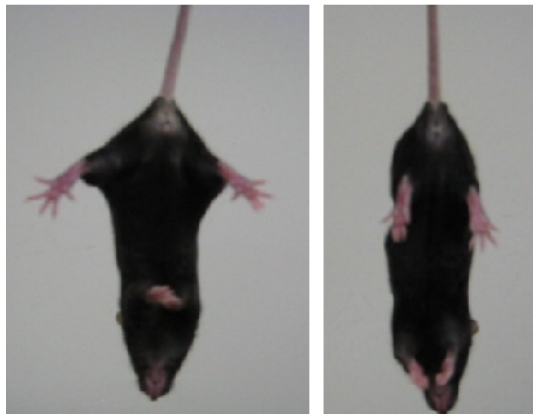
(2)今回の研究で、我々は運動ニューロン特異的にユビキチンプロテアソームタンパク分解系路(UPS)の機能障害マウスを作製し、ALSモデルになりうるかどうか、検討を行うこととした。

### 3. 研究の方法

(1)Cre-lox 部位特異的欠損作製システムを用い、運動ニューロン特異的UPS機能障害マウスの作製を行った。得られたマウスに対して運動機能及び神経病理学的所見を中心に表現型の解析を行った。

### 4. 研究成果

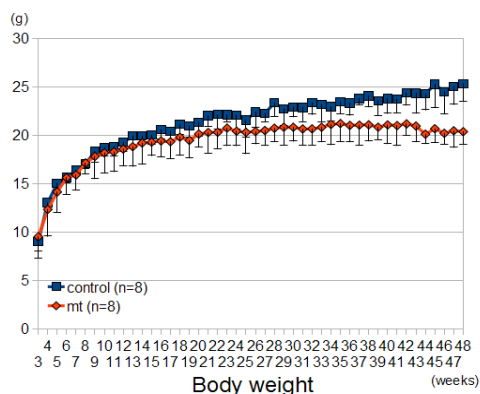
(1) 部位特異的欠損作製システムである Cre-loxP システムを用いて、UPS においてタンパク分解を担っている 26S プロテアソーム構成ユニットの一つである Rpt3 に loxP 配列を導入したマウス (floxed Rpt3 マウス) の系を確立した。運動ニューロン特異的に Cre を発現する VACHT-Cre マウスとの交配を行い、産仔が正常に出生することを確認した。



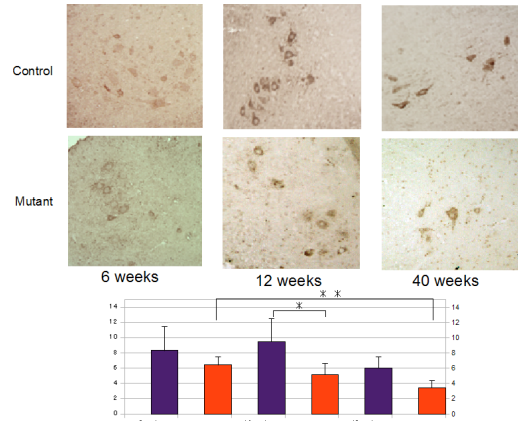
Control  
(Rpt3<sup>Δ/+</sup>;Cre+)

Mutant  
(Rpt3<sup>Δ/lox</sup>;Cre+)

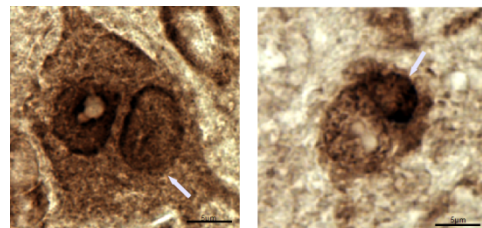
(2)この運動ニューロン特異的 UPS 機能障害マウスは、8 週齢において振戦様の症状を認めた。体重比較を行ったところ、35 週以降に減少傾向を認めた。ロタロッド測定を行ったところ 25 週齢以降に運動機能の低下が生じ、握力測定でも、20 週齢以降から前肢・後肢ともに握力低下が認められ 80%程度に低下していた。



(3)病理学的解析では、6 週齢のマウス脊髄にて、運動ニューロンに相当する ChAT 陽性細胞において、同じ細胞で Rpt3 の発現減少と Ubiquitin の蓄積が認められ、運動ニューロン数が経時的に減少していることを確認した。



(4)また、孤発性・遺伝性 ALS との類似性を検討するため、近年遺伝性 ALS 患者より同定され、孤発性 ALS との関連が示唆されている因子である、TDP43 ならびに FUS を調べたところ、変異型マウスの 12 週齢脊髄の運動ニューロンにて TDP43 の蓄積、また TDP43 陽性封入体を確認され、FUS も同様に蓄積していることが確認された。



## 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 33 件)

1. Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Shimogawa H, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R (2011) Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat ALS. **J Biomol Screen.** in press (査読: 有)
2. Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, Takahashi R. (2011) The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6{alpha}, protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. **J Biol Chem.** 286: 7947-57 (査読: 有)
3. Ando K, Uemura K, Kuzuy A, Kubota M, Maesako M, Asada M, Takahashi R, Kinoshita A (2011) N-cadherin regulates p38MAPK signaling via association with JLP: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. **J Biol Chem.** 286: 7619-28 (査読: 有)
4. Imai Y, Kanao T, Sawada T, Kobayashi Y, Moriwaki Y, Ishida Y, Takeda K, Ichijo H, Lu B, Takahashi R (2010) The loss of PGAM5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of PINK1 in Drosophila. **Plos Genetics.** [Epub Dec 2 ;6(12)] (査読: 有)
5. Matsui H, Ito H, Taniguchi Y, Takeda S, Takahashi R. (2010) Ammonium chloride and tunicamycin are novel toxins for dopaminergic neurons and induced Parkinson's disease-like phenotypes in medaka fish. **J Neurochem.** 115: 1150-60 (査読: 有)
6. Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S. (2010) Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. **J Neurosci.** 30: 11917-25. (査読: 有)
7. Matsui H, Ito H, Inoue H, Taniguchi Y, Takeda S, Takahashi R. (2010) Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson disease. **J Neurochem.** 115: 178-87. (査読: 有)
8. Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R. (2010) Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially

due to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activation in Mice with Chronic Cerebral Hypoperfusion. **Stroke** 41: 1798-806. (査読: 有)

9. Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi Y, Suzuki Y, Ihara M, Kawamata J, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R (2010) HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn from patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis. **Neuropath. Appl. Neurobiol.** 36: 331-44. (査読: 有)
10. Aoyagi N, Uemura K, Kuzuya A, Kihara T, Kawamata J, Shimohama S, Kinoshita A, Takahashi R (2010) PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 391:1240-5. (査読: 有)
11. Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, Takahashi R (2010) Loss of PINK1 in medaka fish (*Oryzias latipes*) causes late-onset decrease in spontaneous movement. **Neurosci Res.** 66: 151-61. (査読: 有)
12. Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S, Sawada H. (2009) Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009 Nov 11. [Epub ahead of print] (査読: 有)
13. Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, Takahashi R, Mizutani T. (2009) Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study. **J Neuropathol Exp Neurol.** 68:1084-91. (査読: 有)
14. Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsuhashi M, Takahashi R, Fukuyama H. (2009) Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. **Clin Neurophysiol.** 120: 1923-6. (査読: 有)
15. Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, Takahashi R (2009) Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: The first report from Asian families. **Epilepsia.** 2009 Sep 22. [Epub

ahead of print] (査読:有)

16. Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, Takahashi R (2009) A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. **Neurosci Res.** 65: 263-71. (査読:有)

17. Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R (2009)

Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA).

**Intern Med.** 48: 1307-9. (査読:有)

18. Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, Takahashi R (2009) Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice.

**Brain Res.** 1294: 202-10. (査読:有)

19. Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T (2009) Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers.

**Int J Cancer.** 125: 2029-35. (査読:有)

20. Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R, Tomimoto H (2009) Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia.

**Neuroreport.** 20: 990-6. (査読:有)

21. Ikeda A, Hirasawa K, Kinoshita M, Hitomi T, Matsumoto R, Mitsueda T, Taki JY, Inouch M, Mikuni N, Hori T, Fukuyama H, Hashimoto N, Shibasaki H, Takahashi R (2009) Negative motor seizure arising from the negative motor area: is it ictal apraxia? **Epilepsia.** 50: 2072-84. (査読:有)

22. Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R, Kawamura T (2009) Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzyl-guanidine scintigraphy in Parkinson disease. **Eur J Neurol.** 16:174-82. (査読:有)

23. Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R (2009) Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach. **Auton Neurosci.** 146: 33-5. (査読:有)

24. Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, Takahashi R, Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A. (2009) N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio. **J. Neurochem.** 108 : 350-60. (査読:有)

25. Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S (2009) Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. **J Neurosci Res.** 87:576-85. (査読:有)

26. Kawamoto Y, Kobayashi Y, Suzuki Y, Inoue H, Tomimoto H, Akiguchi I, Budka H, Martins LM, Downward J, Takahashi R (2008) Accumulation of HtrA2/Omi in neuronal and glial inclusions in brains with alpha-synucleinopathies. **J. Neuropathol Exp Neurol.** 67: 984-93. (査読:有)

27. Takahashi R (2009) Edaravone in ALS. (commentary) **Exp Neurol.** 217: 235-6. (査読:有)

28. Fujiwara M, Marusawa, H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, Takahashi R, Chiba T (2008) Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. **Oncogene.** 27: 6002-11. (査読:有)

29. Wang HQ, Imai Y, Inoue H, Kataoka A, Iita S, Nukina N, Takahashi R (2008) Pael-R transgenic mice crossed with parkin deficient mice displayed progressive and selective catecholaminergic neuronal loss. **J. Neurochem.** 107: 171-85. (査読:有)

30. Imai Y, Gehrke S, Wang HQ, Takahashi R, Hasegawa K, Oota E, Lu B (2008) Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in Drosophila. **EMBO J.** 27: 2432-43. (査読:有)

31. Ogawa M, Mizuguchi K, Ishiguro A, Koyabu Y, Imai Y, Takahashi R, Mikoshina K, Aruga J (2008) Rines/RNF180, a novel RING finger gene-encoded product, is a membrane-bound ubiquitin ligase. **Gene Cells** 13: 397-409 (査読:有)

32. Moriwaki Y, Kim YJ, Ido Y, Misawa H, Kawashima K, Endo S, Takahashi R. (2008) L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependant manner. **Neurosci. Res.** 61: 43-8 (査読:有)

33. Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008 Feb 3) Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. **Nat. Neurosci.** 11: 251-3. (査読：有)

[学会発表] (計 15 件)

1. Tashiro Y, Inoue H, Yamazaki M, Abe M, Ito H, Misawa H, Sakimura K, Takahashi R: The establishment and analysis of 26S proteasome conditional knockout mice for the mechanisms of neurodegenerative diseases. BMB2010、神戸 (2010.12.8)
2. Murakami G, Inoue H, Takahashi R: A high-throughput screening assay for drug discovery in SOD1- mediated ALS targeting the transcription of SOD1 • The 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, U. S. A., (2010. 11. 17.)
3. Murakami G, Inoue H, Takahashi R: A high-throughput screening assay for drug discovery in SOD1- mediated ALS targeting the transcription of SOD1 • The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan. (2010. 9. 3.)
4. Komatsu K, Inoue H, Kondo T, Kitaoka S, Ichisaka T, Takahashi K, Yamanaka S, Takahashi R: Establishment of iPS cells from Amyotrophic lateral sclerosis model mice. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan (2010. 9. 2)
5. 田代善崇、井上治久、山崎真弥、阿部学、伊東秀文、三澤日出巳、崎村建司、高橋良輔、神経変性疾患モデル作製のための 26S プロテアソームコンディショナルノックアウトマウスの確立と解析、第 33 回日本神経科学大会、神戸 (2010. 9. 3)
6. 高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子メカニズム—神経保護治療に向けて—シンポジウム神経変性疾患の分子標的治療への新たな展開」、第 32 回日本神経科学学会、名古屋 (2009. 9. 18)
7. 高橋良輔：パーキンソン病の最新の治療と展望。平成21年度日本内科学会生涯教育講演会、仙台 (2009. 9. 6)
8. 高橋良輔：孤発性パーキンソン病の病因：環境要因とリスク遺伝子。第50回日本神経学会総会、仙台 (2009. 5. 22)
9. Ryosuke Takahashi : The molecular mechanisms underlying parkin-related parkinsonism, BMB2008、シンポジウム「神経変性疾患関連遺伝子探索と機能解析」、神

戸 (2008.12.11)

10. 近藤孝之、井上治久、富本秀和、高橋良輔：自律神経障害の新たな疾患概念；Autoimmune Autonomic Ganglionopathy、第 61 回日本自律神経学会総会、シンポジウム「自律神経学における最近のトピックス」、横浜 (2008.11.7)
11. 高橋良輔：AAN と MDS の取り組み、第 2 回 Movement Disorder Society, Japan 学術集会、オープニングセミナー「パーキンソン病治療ガイドライン update」、京都 (2008.10.2)
12. 井上治久、高橋良輔：パーキンソン病における治療標的としての軸索再生、Neuroscience2008、シンポジウム「中枢神経系疾患に於ける軸索再生/変性のメカニズム」、東京 (2008.7.9)
13. 河本恭裕、小林芳人、高橋良輔、秋口一郎：alpha-synuclein 関連疾患脳内の封入体における Omi/HtrA2 の蓄積第 49 回日本神経学会総会、横浜 (2008.5.15)
14. 北口浩史、富本秀和、猪原匡史、植村健吾、木原武士、浅田めぐみ、木下彩栄、高橋良輔：慢性脳虚血は Aβ 沈着を促進する、第 49 回日本神経学会総会、横浜 (2008.5.15)
15. 高橋良輔：はじめに一神経変性疾患研究の課題、第 49 回日本神経学会総会シンポジウム「神経変性疾患研究の焦点—新たな病的因子の登場と臨床への展望」、横浜 (2008.5.16)

[図書] (計 1 件)

Inoue H, Kondo T, Lin L, Mi S, Isacson O, Takahashi R (2008) Protein Misfolding and Axonal Protection in Neurodegenerative, “Disease Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases” Ovadi, J. and Orosz. F. Springer, Hungary, 97-109

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
なし

○取得状況 (計 0 件)  
なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~neurology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 良輔 (TAKAHASHI RYOSUKE)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90216771

(2)研究分担者

井上 治久 (INOUE HARUHISA) 2008 年度  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号： 7 0 3 3 2 3 2 7

川又 純 (KAWAMATA JUN)  
札幌医科大学・医学部・講師  
(2010年9月30日で研究完了)  
研究者番号： 6 0 3 6 0 8 1 4

三澤 日出巳 (MISAWA HIDEMI)  
慶応義塾大学・薬学部・教授  
研究者番号： 8 0 2 1 9 6 1 7

(3)連携研究者

井上 治久 (INOUE HARUHISA) 2009 年度  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・  
准教授  
研究者番号： 7 0 3 3 2 3 2 7