

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3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790992

研究課題名（和文） 第4の細胞死 TRIAD に注目した筋萎縮性側索硬化症治療法の開発

研究課題名（英文） Progressive Decrease in the Level of YAPdeltaCs, Prosurvival Isoforms of YAP, in the Spinal Cord of Transgenic Mouse Carrying a Mutant SOD1 Gene

研究代表者

森本 展年 (MORIMOTO NOBUTOSHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：60598556

研究成果の概要（和文）：第4の細胞死である TRIAD では細胞死抑制シグナルである YAPdeltaC と細胞死誘導シグナルであるリン酸化 p73 の発現が拮抗しながらゆっくりとした細胞死が起こることが報告されている。我々は ALS モデルマウスの脊髄全角細胞において細胞死を抑制しているタンパク質である YAPdeltaC の発現が低下し、かつ p73 のリン酸化の割合が相対的に上昇していることを発見した。このことから ALS モデルマウスの運動ニューロン死に YAPdeltaC の早期からの減少と p73 リン酸化増加が関係している可能性が示唆された。細胞死抑制と誘導のシグナルバランスの調節を標的とした新たな ALS 治療法の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Although amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive and fatal disease, the mechanism underlying motor neuron death has not yet been fully clarified. Recently, it was found that general transcriptional repression induces slowly progressive atypical cell death associated with the shift of balance between YAPdeltaCs as prosurvival factors and activated p73 promoting apoptosis. This type of neuronal death was named transcriptional repression-induced atypical death (TRIAD). Therefore, to investigate possible relationships between the mechanism of motor neuron death in ALS and TRIAD, G93ASOD1 transgenic mice (Tg) were examined as an ALS model. The levels of YAPdeltaCs in the spinal cords of Tg mice decreased with disease progression. Also, the ratio of phosphorylated p73 to total p73 increased during the late symptomatic stage in Tg mice. These results suggest that the progressive decrease in the levels of YAPdeltaCs and the relative increase in phosphorylation of p73 over the time course are correlated with disease progression in ALS model animals.

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 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |

研究分野：医歯薬学

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, 筋萎縮性側索硬化症, TRIAD, 第4の細胞死, YAPdeltaC, リン酸化 p73

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は選択的運動ニューロン死によって起こる進行性・致死性の疾患で、約5-10%の患者は遺伝性の形式をとり、家族性ALS (FALS) として知られている。FALS

の約20%でsuper oxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子に変異を持つことが示されている。変異SOD1遺伝子を持つ遺伝子導入マウスが作成され、これまでの研究で運動ニューロン死のプロセスはSOD1機能の喪失によってではなく、

新たに毒性を獲得することによって起こると考えられるようになった。しかしながら多くの孤発性ALSはもちろんのこと、変異SOD1をもつFALSの病態においてさえも、運動ニューロン死の詳細なメカニズムは不明である。現在でも根本的治療法のない神経難病の代表的疾患の一つであり、多くの患者が一日も早い病態解明と治療法の開発を待ち望んでいる状態が続いている。近年は、TDP43/FUSやoptinurinなどFALSの原因となる新しい遺伝子変異が我が国の研究グループから次々と発見されており(Arai et al., 2006; Maruyama, Morimoto et al.), ALSの研究領域では我が国の研究が世界をリードし、発展が期待されている分野である。今後はこれらのFALSと90%以上を占める孤発性ALSとに共通する運動ニューロン死のメカニズムを解明することでALSの治療法開発につながるものと考えられる。

一般的に細胞死にはネクローシス、アポトーシス、オートファジー性細胞死の3つのタイプが知られている(表)。最近の報告ではカスペアーゼ1、3の活性化やシトクロームCのミトコンドリアから細胞質への放出などがALS患者やモデル動物で観察されたというアポトーシスのエビデンスが積み上がってきているが(Li et al., 2000; Sathasivam et al., 2001)、アポトーシス小体そのものがALSの病変部位で観察されたことはない(Migheli et al., 1999; Yamazaki et al., 2005)。実際、抗アポトーシス物質(Bcl-2やZVAD-FMK)の投与はALSモデルマウスで限局的な効果しか見られていない(Azzouz et al., 2000; Li et al., 2000; Vukosavic et al., 2000)ため、ALSの運動ニューロン死の形態はアポトーシスのみには合致しないという認識となっている。近年は培養細胞においてアポトーシス阻害によりオートファジー性細胞死が起こることが報告され、注目されている(Shimizu et al.,

2004; Yu et al., 2004)。我々も先行論文でG93A変異SOD1遺伝子導入マウスではオートファジーが亢進している可能性を報告している(図1)(Morimoto et al., 2007)。しかしながら、オートファジー誘導物質であるラパマイシンやリチウムがALSモデルマウスや培養細胞でのニューロン死を抑制したという結果から(Fornai et al., 2008; Kabuta et al., 2006)、我々は神経変性疾患においてはオートファジー性細胞死ということよりも、変異SOD1などの異常蛋白の蓄積に対するオートファジーの神経保護的な役割が重要と考えている。

星野らは転写障害が緩徐進行性の特異な細胞死を起こし、その中でyes-associated protein (YAP)と新規アイソフォームで神経細胞死を抑制する働きをもつYAPdeltaC、およびアポトーシス促進因子であるp73の間でのバランス変化をともなっていることを報告した。このようなタイプの細胞死をtranscriptional repression-induced atypical cell death (TRIAD)と呼び、神経細胞のTRIADは生物学的、形態学的に他の細胞死(すなわちアポトーシス、ネクローシス、オートファジー性細胞死)と区別でき、それらの細胞死に比べずっと緩徐な細胞死であることが分かった。さらにp73とYAPdeltaCの解析からハンチントン病の病理にTRIADが関係している可能性が示唆された。(Hoshino et al., 2006)。近年、マイクロアレイ解析でALS患者やALSモデル動物においても転写障害が起こっていることが明らかにされていることから、本研究ではp73とYAPおよびYAPdeltaC発現の分析など通じてALSにおける運動ニューロン死とTRIAD関係に注目するに至った。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は選択的運動

ニューロン死を引き起こす進行性・致死性の疾患であり、原因の詳細はいまだ不明である。原因に対する研究は盛んであり様々な成果をあげつつあるが、細胞死実行のメカニズムについてはあまり知られていない。一般的に細胞死にはネクローシス、アポトーシス、オートファジー性細胞死の3つのタイプが知られているが、ALSの運動ニューロン死はそのいずれにも完全には当てはまらなると考えられている。今回我々は、転写障害が引き起こす極めてゆっくりとした細胞死であるTRIAD(第4の細胞死)に注目し、ALSの病態との関連を検討し、さらには細胞死の調節を通じた治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

【動物モデル】 G93A 変異 SOD1 を発現する遺伝子導入マウ[B6SJL-TGN(SOD1G93A)1GURd1](Jackson Laboratory) オスと C57BL/6 メスと交配によって得られた遺伝子導入マウス(Tg)を12週齢(発症前)、17週齢(発症早期)、19週齢(発症後期)にわけ、各々n=5とし、同数の週齢を一致させた野生型マウス(WT)を使用した。動物の使用は岡山大学の動物使用に関するガイドラインに準拠して行った。

【組織学的検討】 動物は深麻酔後にヘパリン加生理食塩水で脱血後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で灌流固定し、腰髄L4-5範囲を採取し、10 μ m厚の凍結切片を作成した。抗p73、抗リン酸化p73抗体は1:100、抗full-length(FL)-YAP、抗YAPdeltaC抗体は1:50で1次抗体として使用した。Vectastain avidin:biotinylated enzyme complex (ABC) kit (Vector Laboratories)あるいは通常の各種蛍光抗体を用いて観察した。リン酸化p73抗体についてはHRP結合抗ウサギIgG抗体(1:400; Amersham Biosciences)と

tetramethylrhodamine-tyramide (1:200; PerkinElmer) で蛍光染色を行っている。

【運動ニューロンのカウント】 染色陽性運動ニューロンの比率を評価計算するためにL4腰髄の運動ニューロン残存数をカウントした。我々の先行論文の方法に従い、ニッスル染色をおこなったL4腰髄の横断スライスを各動物につき5スライスずつカウントした。中心管から側方に引いたラインより腹側にある長径が20 μ m以上あり明瞭な核小体が見えている細胞を運動ニューロンとしてカウントした。個々の動物につきカウントした5スライスの平均値をそれぞれの残存運動ニューロン数とした。

【Western-blot】 各群n=5マウス脊髄から前半部分を分離採取し、TNE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1% NP-40, glycerol, 0.15M NaCl, 1 mM EDTA, 10 μ g/mL aprotinin, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF]を加え、氷冷しつつ超音波破碎後、12000 \times gで遠心分離し、上層液抽出しSDS-PAGEで泳動分離、Western-blotに使用した。Western-blotでは抗p73、抗リン酸化p73抗体、抗FL-YAP、抗YAPdeltaC抗体は1:500で、抗 β -tubulin抗体は1:1000の濃度で1次抗体として使用した。

【RT-PCR】 TRIzol reagent (Invitrogen, CA)内でTg、WTの脊髄組織をホモジナイズし抽出したRNAでRT-PCRを行った。PCRのプライマーはF(50-ggagcaagccatgactcaggatggagaag-30)とR(50-ggaagtcgtcgggtccgaggatgct-30)を使用した。

4. 研究成果

G93A 変異 SOD1 遺伝子導入マウスの脊髄運動ニューロンでのYAPdeltaCの発現を調べる

ために YAPdeltaC 特異抗体を使用した。蛍光免疫染色法により 17 週齢の Tg および WT のニューロンに YAPdeltaC が発現していることがわかった。抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体との二重染色では YAPdeltaC は Tg のアストロサイトにも発現していることが示された。免疫組織化学では 17 週齢の Tg マウス脊髄では YAPdeltaC 免疫反応陽性のニューロンと非陽性ニューロンが存在することが示された。RT-PCR では配列に挿入を持つ YAP のアイソフォームである YAPdeltaC の mRNA が脊髄組織に実際に含まれていることが確かめられた。

FL-YAP と YAPdeltaC の発現量を評価するために 12 週齢 (発症前)、17 週齢 (発症早期)、19 週齢 (発症後期) の WT、Tg マウス腰髄において免疫組織化学で評価をおこなった。FL-YAP 陽性ニューロンは Tg で週齢にしたがって減少していた。YAPdeltaC 陽性ニューロン数は Tg では週齢にしたがってさらに著明に減少していた。しかしながらニッスル染色では 17 週齢と 19 週齢の Tg において残存運動ニューロン数が減少していた。したがって、FL-YAP 陽性運動ニューロンの残存運動ニューロンに対する比が週齢に従って減少しないことに対して、YAPdeltaC のそれは、発症前から Tg で WT よりも有意に減少しており、週齢にしたがってさらに減少していた。17 週齢のサンプルについては Western-blot で半定量的に評価し、FL-YAP では WT と Tg で差がなかったのに対して YAPdeltaC では Tg で WT に比べ発現低下を認めた。

p73 は YAPdeltaC の上流にあたり、TRIAD の過程で活性化していることが報告されている。免疫組織化学では p73 はグリアを含む多くの脊髄細胞に発現しているが、Tg では、そのシグナルは週齢にしたがって低下していた。一方でリン酸化 p73 のシグナルは WT

と 12 週齢 Tg では 17 週齢 Tg と 19 週齢 Tg と比べると淡くなっていた。P73 とリン酸化 p73 の Western blot では Tg において p73 の発現が週齢に従って低下していたのに対して、リン酸化 p73 では各週齢において WT と Tg にほとんど差がなかった。したがってリン酸化 p73 の p73 に対する比をとると 17 週齢と 19 週齢で WT に比べ Tg でリン酸化 p73 の割合が有意に増加していた。

17 週齢のサンプルを用いて YAPdeltaC とリン酸化 p73 の蛍光免疫染色を行った。YAPdeltaC がほとんどの脊髄ニューロンで陽性なのに対して、WT ではリン酸化 p73 は YAPdeltaC 陽性細胞では陰性であった。一方で Tg では YAPdeltaC はわずかなニューロンで陽性を示すのみで、リン酸化 p73 も同様であった。特記すべきこととして、リン酸化 p73 は 17 週齢の Tg 脊髄において部分的に YAPdeltaC と共陽性であることが分かった。p73 とリン酸化 p73 の蛍光免疫染色では p73 が WT でも Tg でもほとんどのニューロンで陽性であったが、リン酸化 p73 は WT でほとんどのニューロンで陰性であるのに対して、Tg で p73 陽性ニューロンの一部がリン酸化 p73 陽性になっていた。

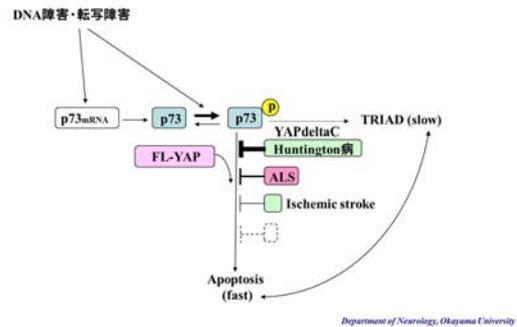
TRIAD では YAPdeltaC の発現が維持されることによりアポトーシスを抑制し、結果的に非常に緩徐な神経細胞死を引き起こしていると考えられている。我々の研究では YAPdeltaCs は WT と Tg マウスの脊髄ニューロンと Tg マウスの GFAP 陽性アストロサイトに広く発現していた。加えて、WT と Tg マウス脊髄で YAPdeltaC の存在を RT-PCR を用いて確認できた。ハンチントン病のモデル動物である変異 Htt 遺伝子導入マウス (R6/2) の線条体ニューロンでは WT に比べて YAPdeltaC のシグナルが強かったと報告されているが、我々の G93A 変異 SOD1 マウスでは脊髄運動ニ

ニューロンで発症前の時期から YAPdeltaC の発現が減少し始め、病気の進行とともにさらに減少が加速していた。これは ALS モデル動物での YAPdeltaC 減少についての初めての報告である。また、G93A 変異 SOD1 遺伝子導入マウスにおいて FL-YAP の発現が保たれている中で、YAPdeltaC の早期からの減少がみられたということは、ハンチントン病に比べ ALS の進行が早いことの原因になりうるかもしれない。そして、YAPdeltaC を動物モデルに投与することによって ALS の発症と進行を妨げることができるかもしれない。

p73 は p53 ファミリーの蛋白であり、p73 の転写は DNA 障害に反応して促進され、かつ p73 は c-Abl と p38MAPK カスケードによってリン酸化され活性化型となる。TRIAD では活性化型 p73 を介する細胞死は YAPdeltaC により抑制されると考えられている。ハンチントン病患者や動物モデルでは p73 活性化が起こっていることがすでに示されている。いくつかの文献はアルツハイマー病や脊髄小脳変性症、ALS などの神経変性疾患に p73 が関与していることを示唆している。我々の研究では Western-blot でリン酸化 p73 の p73 に対する比をとると 17 週齢と 19 週齢で WT に比べ Tg でリン酸化 p73 の割合が有意に増加していたが、この結果は免疫組織化学の結果とも一致している。我々は p73 の転写とリン酸化は異なる経路で調節されているため、p73 の発現量減少している中でリン酸化 p73 の比率が増えるということは起こりうると思った。また、近年 p73 活性化因子である p38MAPK が変異 SOD1 遺伝子導入マウスの脊髄で増加し、活性化していることが報告されている。今回の結果ではリン酸化 p73 と YAPdeltaC は WT の脊髄ニューロンでは共存しているものはなかったが、Tg では一部共局在がみられた。さらに WT ではほとんどの脊髄ニューロンが

YAPdeltaC のみ陽性であったことに対して、Tg ではリン酸化 p73 のみ陽性の細胞を認めた。この結果は pro-survival factor としての YAPdeltaC とアポトーシス誘導因子である活性化 p73 のバランス変化が ALS モデル動物における運動ニューロン死における役割を持っている可能性を示唆していると考えた。

G93A SOD1-Tgマウス脊髄におけるTRIAD関連分子の動態



我々は今回の研究を通じて細胞死抑制と誘導のシグナルバランスの調節を標的とした新たな ALS 治療法の可能性を示した。

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]

1) Morimoto N, Kurata T, Sato K, Ikeda Y, Sato S, Abe K.

Frontal dysfunctions of ALS-PBP patients in relation to their bulbar symptoms and rCBF decline. J Neurol Sci. 査読有 2012 Aug 15;319(1-2):96-101

DOI: 10.1016/j.jns.2012.04.020

2) Morimoto N, Miyazaki K, Kurata T, Ikeda Y, Matsuura T, Kang D, Ide T, Abe K.

Effect of Mitochondrial Transcription Factor A Overexpression on Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Mice. J Neurosci Res. 査読有 2012 Jun;90(6):1200-8. DOI:10.1002/jnr.23000.

3) Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, Miyazaki K,

Kurata T, Morimoto M, Murakami T, Takehisa Y, Ikeda Y, Kamiya T, and Abe K. Correlation of cerebral spinal fluid pH and HC03⁻ with disease progression in ALS. J Neurol Sci. 査読有 37(1-2) (2011) 74-78. DOI:10.1016/j.jns.2011.05.013

〔学会発表〕

1) 2012. 5. 22-25

第 53 回神経学会総会 (東京)

森本展年、佐藤恒太、宮崎一徳、池田佳生、松浦 徹、阿部康二

新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan (SCA36) の嚙下障害

2) 2011. 11. 11-12

第 30 回日本認知症学会学術集会 (東京)

森本展年、佐藤恒太、倉田智子、池田佳生、松浦 徹、阿部康二

タッチパネル式簡易認知症スクリーニング検査を用いた ALS 患者認知機能の検討.

3) 2011. 8. 20

第 2 回日本血管性認知障害研究会 VAS-COG Japan (東京)

森本展年、佐藤恒太、倉田智子、池田佳生、松浦 徹、阿部康二

岡山大学病院 ALS 患者における認知機能、メタボリックシンドロームの検討.

4) 2011. 5. 18-20

第 52 回神経学会総会 (名古屋)

森本展年 宮崎一徳 倉田智子 池田佳生 松浦 徹 阿部康二

ALS モデルマウスの脊髄運動ニューロンにおける α -synuclein、PINK1、DJ-1 の発現について.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 展年 (MORIMOTO NOBUTOSHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：60598556

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者