

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890163

研究課題名（和文） 神経筋疾患に対する遺伝子治療

研究課題名（英文） Gene therapy for neuromuscular disease

研究代表者

森 麗 (MORI AKIRA)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70608877

研究成果の概要（和文）：我々は、神経筋疾患に対する遺伝子治療、特に、筋萎縮性側索硬化症への遺伝子治療の開発を目指している。当初、以前より用いている、Neuroblastoma 由来の NB2a 細胞を用いる予定であったが、より病態を反映すると考えられる、筋萎縮性側索硬化症患者皮膚からの induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞の樹立に成功した。そのため、それらを用いて、まずは小胞体ストレスの関与を検証する実験を継続している。しかし、技術的な問題で iPS 細胞の維持培養が困難であり、現在、その問題を検索・改善し続けているところである。問題解決すれば、多くの結果が得られると期待している。

研究成果の概要（英文）：We are intended to develop the gene therapy for neuromuscular disease, especially about amyotrophic lateralsclerosis. At the beginning, We considered to use NB2a cells, originated from neuroblastoma, previously we have used, but we succeeded to establish induced Pluripotent Stem (iPS) cells derived from amyotrophic lateralsclerosis patient skins, and these are considered to reflect pathology much more than NB2a cells. Therefore, we started using these cells, and were continuing experiments to prove the participation of endoplasmic reticulum stress. However, maintenance cultivation of an iPS cells is difficult from some technical problems, so we are seeking and solving these problems. If we resolve these problems, we expect that many results are obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：神経内科学分野

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：筋萎縮性側索硬化症、小胞体ストレス、Derlin-1、変異 SOD1、神経細胞死、アデノ随伴ウイルス、induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞

1. 研究開始当初の背景

ALS の発症は、多因子によって規定されていると考えられており、その病因論的機序として神経栄養因子の枯渇あるいはカルシウム代謝障害、神経炎症、細胞骨格の変化、酸化ストレスなどの関与が推測されている。最近の報告では、小胞体ストレスが家族性 ALS の発症に関わっている可能性が示唆されてきた。小胞体ストレスとは、種々の特異的なシグナル伝達を含む複合的な反応であるが、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる反応を介して、小胞体における蛋白の折りたたみ容量が破綻しないように機能している。しかしながら小胞体ストレスが遷延すると、ついにはミトコンドリア依存的もしくは非依存的に細胞死に至る。代表研究者は、2007 年から 2010 年度において、熊本大学大学院医学教育部神経内科学分野に大学院生として所属しており、2011 年度から熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野に所属を変更し、研究を継続している。大学院での成果としていくつかの結果を下記に示す。

小胞体膜蛋白 Derlin-1 は、近年 ERAD の中心的役割を担うことが明らかにされているが、野生型もしくは変異型 SOD1 を Derlin-1 と共発現させた培養神経細胞では、共焦点顕微鏡での観察で、変異 SOD1 において、凝集塊が有意に増加がみられ、また、Derlin-1 過剰発現により、それらの凝集塊が有意に減少し、野生型や、特に変異型 SOD1 に Derlin-1 が colocalize することを明らかにし、野生型および変異型 SOD1 と Derlin-1 の interaction が示唆された。さらに運動ニューロン内において Derlin-1 が運動ニューロンの生死を左右する因子として重要であり、Derlin-1 の過剰発現は、アポトーシスを軽減し、細胞活性を亢進させることを明らかにし、

その機序としては、変異 SOD1 蛋白の小胞体関連分解 (ERAD) を促進し、変異 SOD1 蛋白の小胞体内蓄積を軽減することによる可能性を示唆する結果を示した。

変異 SOD1 蛋白の小胞体内蓄積は、変異 SOD1 による家族性 ALS の発症以前から確認されており、疾患発症のトリガーとして重要であると推測される。そこで応募者は変異 SOD1 の小胞体内蓄積を軽減させることが運動ニューロン変性の抑制に寄与するものとの仮説を立てた。変異 SOD1 の小胞体内蓄積を軽減させる手段として、予備実験において変異 SOD1 蛋白の ERAD を促進すると予想される小胞体シャペロン BiP および小胞体膜蛋白 Derlin-1 を運動ニューロン内小胞体に過剰発現させることを考えている。

これらの治療用タンパク質を効率よく運動ニューロンさらには周囲の非運動ニューロン細胞 (マイクログリアやアストロサイトなど) に導入することが、ALS の遺伝子治療の実現にも重要であると考えられる。

アデノ随伴ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターと同様に、骨格筋内の注入により逆行性軸索輸送によって、脊髄前角細胞の運動ニューロン内に遺伝子導入が可能であることは既に明らかになっている³⁾。さらにアデノ随伴ウイルスベクターは、経静脈的投与によって全身の骨格筋内に遺伝子導入が可能であることも報告されている。そこで応募者は遺伝子治療の分野で世界的に先駆的な Chamberlain Lab, University of Washington School of Medicine, Seattle, USA との共同研究により、アデノ随伴ウイルス 6 型を用いた遺伝子導入を行う予定である。変異 SOD1 による家族性 ALS において、変異 SOD1 蛋白が運動ニューロンの小胞体内に蓄積し小胞体ストレスを誘導することで、

最終的に運動ニューロンがアポトーシスを来すことは、共同研究者の Yamashita S. が留学先である Przedborski Lab に在籍中に解明した。Derlin-1 の過剰発現が変異 SOD1 蛋白の ERAD を促進し、変異 SOD1 蛋白の小胞体内蓄積を軽減することはこれまで明らかでなく、以上の点において本研究は独創的であると考えられる。

運動ニューロン変性における小胞体ストレスの関与は、家族性 ALS のみならず、大部分を占める弧発性 ALS においても示唆されてきている。現時点で弧発性 ALS において小胞体ストレスが誘導される原因については不明であるが、Derlin-1 の過剰発現による misfolded proteins の小胞体内蓄積軽減は、小胞体ストレスを緩和し、最終的な弧発性 ALS の運動ニューロン変性を抑制することが期待される。代表研究者は臨床医学（神経内科学）をバックグラウンドとしており、最終的には弧発性 ALS に対する遺伝子治療の臨床応用に向けた研究へと展開したいと考えている。

2. 研究の目的

我々は、致死的な進行性神経難病である筋萎縮性側索硬化症（ALS）の遺伝子治療法の開発を目指している。ALS は大脳運動皮質、脳幹部および脊髄前角細胞の運動ニューロンの選択的変性をきたし、今日まで有効な治療法はなく、大部分の患者は呼吸筋麻痺のため 3～5 年で死に至る。その原因は未だ解明されていないが、神経細胞死の最終経路としてアポトーシスの関与が示唆され、その機序の一つとして、変異 SOD1 による家族性 ALS モデルにおいて、変異 SOD1 蛋白が運動ニューロンの小胞体内に蓄積し小胞体ストレスを誘導することで、最終的にアポトーシスを来すことが明らかとなっている。有効な治療法

開発のため、変異 SOD1 の小胞体内蓄積をターゲットとし、アデノ随伴ウイルスベクターを利用して、変異 SOD1 蛋白のリフォールディングおよび小胞体関連分解 (ERAD) を促進することによって、運動ニューロン変性を抑制する方法の可能性について検討する。

3. 研究の方法

ALS 患者由来の iPS 細胞を用いて検討を行う予定である。

また、今回は、新規の deletion/frameshift 変異である p. G492EfsX527 (c. 1475del1G) と p. R514S 変異 (c. 1542G>T) を運動神経様細胞である NSC-34 細胞へ発現させ、免疫染色を行い、さらに各種の小胞体ストレス・アポトーシスの検討を行った。

4. 研究成果

当初、以前より用いている、Neuroblastoma 由来の NB2a 細胞を用いる予定であったが、より病態を反映すると考えられる、筋萎縮性側索硬化症患者皮膚からの induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞の樹立に成功した。それらを用いて、まずは小胞体ストレスの関与を検証する実験を行っていたが、技術的な問題で iPS 細胞の維持培養が困難であり、現在、その問題を検索・改善の継続を行っており、問題解決すれば、多くの結果が得られると期待している。

iPS 細胞による検討が現時点では難しいため、ALS の病態において、より小胞体ストレスが普遍的であることを証明するために、近年、運動ニューロン変性を引き起こす詳細な機序は未解明ではあるが ALS の発症メカニズムにより関与しているといわれている、FUS/TLS 遺伝子変異（約 3%の家族性 ALS および 1%以下の弧発性 ALS 患者に見いだされている。）における検討を行うことを考えた。

我々は、症候は一側上肢および頸部の筋力低下から発症し、比較的短期間に球麻痺および呼吸筋麻痺へと進展した、FUS/TLS 変異を有する弧発性若年性 ALS 2 症例について報告している (*J. Neurol.* 259, 1039-1044, 2012)。本症例において見出された変異 FUS/TLS 蛋白が神経変性をもたらす機序を明らかにするため、本症例において見出された新規の deletion/frameshift 変異である p. G492EfsX527 (c. 1475delG) と p. R514S 変異 (c. 1542G>T) を運動神経様細胞である NSC-34 細胞へ発現させたところ、とくに deletion/frameshift 変異である p. G492EfsX527 は、有意に細胞質への局在を認めた。

そこで遺伝子変異が神経細胞死に及ぼす影響を明らかにするため、野生型および各種変異型 FUS/TLS 導入細胞における 7-AAD および Annexin V の発現を、フローサイトメトリー法を用いて検出することにより、アポトーシス細胞比率を比較した。野生型と各種変異型 FUS/TLS 導入細胞の間に、アポトーシス陽性細胞比率に有意な差はなく、FUS/TLS 遺伝子変異単独では細胞死に影響しない可能性が示された。また神経細胞死において注目されている小胞体ストレス関連蛋白 (ATF-6 および BiP, GRP94, Calnexin, Caspase-12, Chop) の発現に及ぼす影響をウェスタンブロット法により比較したが、野生型と各種変異型 FUS/TLS 導入細胞の間に有意な変化は確認できなかった。

次に ALS 患者の脊髄前角細胞に蓄積し、凝集を形成することが神経変性に関与すると報告されている TDP-43 発現への影響を検討した。野生型および各種変異型 FUS/TLS 導入細胞において内在性 TDP-43 の発現に差異は見られなかったが、野生型にせよ変異型にせよ FUS/TLS を過剰発現すると、有意にリン酸

化型 TDP-43 の発現が上昇していた。免疫細胞化学により野生型および各種変異型 FUS/TLS 導入細胞における内在性 TDP-43 発現分布を比較すると、とくに G492EfsX527 変異では TDP-43 の核内および細胞質内凝集をもたらし、FUS/TLS と共局在を示した。TDP-43 と FUS/TLS の相互作用を明らかにするために、FUS/TLS の標識 Tag である FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、TDP-43 抗体によりウェスタンブロットを行ったところ、変異型 FUS/TLS 導入細胞ではリン酸化 TDP-43 が検出されたことから、変異型 FUS/TLS は特異的にリン酸化 TDP-43 と相互作用を示すことが明らかとなった。

今回発見された変異 FUS/TLS とリン酸化 TDP-43 の相互作用が直接的な作用であるのか、あるいは他分子を介した作用であるのかを解明する手段の一つとして、現在、野生型および各種変異型 FUS/TLS 導入細胞溶解液から FLAG 抗体によって共沈する蛋白について、LC-MS/MS 法を用いてプロテオーム解析を行っているところである。

さらに、FUS/TLS に G492EfsX527 変異をもつ患者の iPS 細胞が樹立予定であり、今後は疾患の微小環境における検討も行える可能性がある。

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 4 件)

1. Muscle biopsy findings predictive of malignancy in rare infiltrative dermatomyositis.

Makoto Uchino, Satoshi Yamashita, Katshhisa Uchino, Akira Mori, Akio Hara, Tomohiro Suga, Tomoo Hirahara, Tatsuya Koide, En Kimura, Taro Yamashita, Akihiko Ueda, Reiichi Kurisaki, Junko Suzuki,

Shoji Honda, Yasushi Maeda, Teruyuki Hirano, Yukio Ando. Clin Neurol Neurosurg, 査読有, 115, 603-606, 2012

2. Significant CMAP decrement by repetitive nerve stimulation is more frequent in median than ulnar nerves of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Satoshi Yamashita, Hideya Sakaguchi, Akira Mori, En Kimura, Maeda Yasushi, Hirano Teruyuki, Uchino Makoto. Muscle Nerve, 査読有, 45(3), 426-8, 2012

3. Sporadic juvenile amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant FUS/TLS: possible association of mental retardation with this mutation. Satoshi Yamashita, Akira Mori, Hideya Sakaguchi, Tomohiro Suga, Daijiro Ishihara, Akihiko Ueda, Taro Yamashita, Yasushi Maeda, Makoto Uchino, Teruyuki Hirano. Journal of Neurology, 査読有, 259(6), 1039-44, 2011

4. Derlin-1 overexpression ameliorates mutant SOD1-induced endoplasmic reticulum stress by reducing mutant SOD1 accumulation. Akira Mori, Satoshi Yamashita, Katsuhisa Uchino, Tomohiro Suga, Tokunori Ikeda, Koutaro Takamatsu, Masatoshi Ishizaki, Tatsuya Koide, En Kimura, Shuji Mita, Yasushi Maeda, Teruyuki Hirano and Makoto Uchino. Neurochemistry International, 査読有, 58(3), 344-53, 2011

[学会発表] (計1件)

1. Mori A, Yamashita S, Sakaguchi H, Kimura E, Maeda Y, Hirano T, Uchino M, Ando Y. Significant CMAP decrement by repetitive nerve stimulation is more frequent in median than ulnar nerves of patients with amyotrophic lateral sclerosis. 23th international Symposium on ALS/MND, Dec 5-7, 2012, Chicago, IL, USA

6. 研究組織
(1) 研究代表者

森 麗 (MORI AKIRA)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 70608877