

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790264

研究課題名(和文)細胞死抑制因子BTBD10の発現量はなぜALS脊髄運動神経細胞で減少するのか？

研究課題名(英文)Why is the expression level of BTBD10 in the ALS motor neuron declined?

## 研究代表者

名和 幹朗(Nawa, Mikiro)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：10398620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は進行性に上位・下位運動神経細胞が変性脱落する神経難病である。本研究では、我々が以前に同定したALS関連運動神経細胞死抑制因子であるBTBD10発現量が、ALS患者並びに、ALSモデルマウス脊髄運動神経細胞において低下する事を明らかとした。また、培養運動神経細胞株、線虫を用いた実験系で、内在性BTBD10発現量を抑制することによって、運動神経細胞死が惹起される事を明らかとした。これらのことから、運動神経細胞におけるBTBD10発現量低下がALS病態発症並びに進行の一因となる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis(ALS) is a fatal neurodegenerative disease with both upper and lower motor neuronal death. We previously reported that BTBD10, an Akt activator, suppressed ALS-related neuronal cell death. In this study, we focused on the role of BTBD10 in ALS and observed that reduction of expression level of BTBD10 using siRNA leads to caspase dependent cell death in motor neuronal cell line. We also observed neuronal cell death and a locomotive defect in *C. elegans* lacking BTBD10 gene. Compared with wild type littermates, the expression level of BTBD10 in the surviving motor neurons in spinal anterior horn was declined in G93A-superoxide dismutase 1 transgenic mice. We compared the number of BTBD10-positive motor neurons in spinal cord between sporadic ALS(SALS) patient and non-ALS control. We also observed the number of BTBD10-positive motor neuron was significantly decreased in the surviving motor neurons in the lamina 9 of SALS cases.

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(ALS)は1869年にフランスの医師 Charcot によって初めて報告されて以来、現在まで発症原因解明はなされておらず、症状進行を止める治療薬も存在しない神経難病である。これまでの ALS 研究の多くは家族性 ALS(FALS)原因タンパク質の1つである superoxide dismutase 1 (SOD1)に着目し、変異 SOD1 の機能解析を中心に進められて来たが、ALS に対する理解は深まったものの、未だ完全な病態解明には至っていない。近年、ALS 研究は TDP-43、FUS/TLS など FALS、孤発性 ALS(SALS)共通して、タンパク質アミノ酸変異が発見された分子に着目して研究が進められている。我々は2005年にALS関連神経細胞死が Rac1/PI3K/Akt3 経路を介して抑制出来ることを報告し(参考文献1)、さらにこの経路に寄与する分子同定を目的として Akt 結合分子の探索を行い、BTBD10 を新規 Akt 結合分子として同定した(参考文献2)。また、BTBD10 が Akt の脱リン酸化抑制により FALS 関連変異 SOD1(G93A-SOD1)誘導性細胞死を抑制することも明らかとした(参考文献2)。さらに、G93A-SOD1 トランスジェニック(Tg)マウスの脊髄運動神経細胞において、BTBD10 の発現量が ALS 症状依存的に減少するという知見を得ていたが、BTBD10 の ALS 病態への直接的な関与を示唆する知見は得られていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、BTBD10 発現低下により運動神経細胞に与える影響を明らかとすること、並びに、ALS モデルマウス同様に ALS 患者脊髄運動神経細胞においても BTBD10 発現量が低下しているか検討し、BTBD10 発現量低下と ALS 病態との関連性を明らかとする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 細胞培養と遺伝子導入

運動神経細胞株である NSC34 細胞、HeLa 細胞は、10% 牛胎児血清添加 Dulbecco-modified Eagle's medium (D-MEM) 培地(Wako)を用い、神経前駆細胞である NTERA2(NT2)細胞は D-MEM/Ham's F-12 medium 培地(Wako)を用い、37 °C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。BTBD10 に対する siRNA をコードするプラスミド DNA を構築し、LipofectAmine (Invitrogen)と PLUS 試薬(Invitrogen)を用いトランスフェクションにより NSC34 細胞に発現させ、72 時間後細胞を回収しウエスタンブロット法および、FACS 解析を行った。また、野生型 FUS をコードする組み換えアデノウイルス発現ベクターを構築し、これらのベクターを用いて HeLa 細胞あるいは、NT2 細胞に FUS を発現させた。

### 定量的 PCR

FUS をコードする組み換えアデノウイルス発現ベクターを用いて HeLa 細胞に FUS を発現させ、48 時間後細胞を回収し、ISOGEN(ニッポンジーン)を用い RNA を精製した。PrimeScript High Fidelity RT-PCR キット(Takara)により逆転写 PCR を行い、cDNA を作製し、目的遺伝子に対するプライマーセットを用いリアルタイム PCR (Applied Biosystems)を行い、各遺伝子の発現レベルを定量した。遺伝子定量のコントロールとしては G3PDH 遺伝子を用いた。

### 組織染色

SALS 患者(n=6)あるいは非 ALS 対照例(n=6)の腰椎あるいは胸椎の切片(各症例 3~5 切片)を抗 BTBD10 抗体を用いて免疫染色し、ABC 法を用いて増感した後 DAB により発色を行った。染色後、脊髄前角運動神経細胞のうち、周囲のバックグラウンドより細胞体の染色強度が強いものを抗 BTBD10 抗体陽性細胞とし、各切片の BTBD10 陽性運動神経細胞数を計測し、その割合を算出した。また、G93A-SOD1-Tg マウスあるいは同腹野生型マウス脊髄切片は 1 次抗体として抗 BTBD10 抗体を、2 次抗体として FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて免疫染色を行った。

### 線虫

本研究では、N2 Bristol 系野生株を用いた。また、TMP/UV 法により線虫 *btbd-10* 遺伝子、*akt-1* 遺伝子、*akt-2* 遺伝子を欠損させた株を構築し、touch-receptor neuron(*bzIs8*)あるいは運動神経細胞(*evIs82*)で GFP タンパク質が発現するような線虫と交配し、GFP が発現している神経細胞が1つ以上減少している線虫の割合を算出した。また、線虫の運動機能評価は、35 mm 寒天培地に M9 バッファーを 1 ml 加え、バッファー中に線虫を入れ 1 分待ち、その後 1 分間に線虫がバッファー中で頭を左右に振る回数を計測した。尚、頭を振る回数は片側に振り反対側に戻って 1 回とした。

### 4. 研究成果

#### 1) BTBD10 発現量低下によって Caspase-3 活性化および細胞死が惹起される

NSC34 細胞に BTBD10 に対する siRNA を発現させ、72 時間後細胞を回収しウエスタンブロット法により各種タンパク質の発現量を検討した結果、BTBD10 に対する siRNA により内在性 BTBD10 の発現量が低下する事で、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP の発現量が上昇する事を明らかとした。また、これらの細胞を用いて FACS 解析を行った結果、細胞死の指標となる SubG1 に属する細胞の割合が siBTBD10 発現細胞で上昇している事を明らかとした。これらのことから BTBD10 が細胞死の最終段階であ

る Caspase-3 を抑制することで細胞死に対して抑制的に働く事が示唆された。

## 2) *btbd-10* 遺伝子欠損線虫では touch-receptor neuron 細胞死が誘導される

*BTBD10* 遺伝子は哺乳類から線虫まで保存されている。本研究では TMP/UV 法により作製した *btbd-10* 遺伝子欠損線虫 (*tm3335*, *tm3607*) を用いてその表現型を解析した。*btbd-10* 欠損線虫は外見的には発生、成長に野生型と比較して目立った異常は観察されなかった。初めに、線虫の神経細胞で *BTBD10* 発現量を低下させた際に細胞死が惹起されるか観察するため、比較的数え易い6つの touch-receptor neuron で GFP タンパク質が発現する *bzIs8* 株を用いた。また、線虫において *BTBD10* タンパク質は touch-receptor neuron を含む神経細胞に発現している事を確認した。*bzIs8* 株と *btbd-10* 欠損株を交配し、4日齢の線虫で touch-receptor neuron の数を計測し、touch-receptor neuron が1つ以上欠損している線虫の割合を算出した結果、*btbd-10* 欠損により約 10% の線虫で touch-receptor neuron が1つ以上欠損している事を明らかとした。また、この touch-receptor neuron の欠損は、ヒト *BTBD10* 遺伝子あるいは線虫の *btbd-10* 遺伝子を導入し発現させる事によって完全にレスキューされる事を明らかとした。さらに、*btbd-10* 欠損による touch-receptor neuron 減少は、線虫の Caspase ホモログである *ced-3* 欠損株との交配により抑制された。このことから、線虫においても *BTBD10* は Caspase を介した細胞死を抑制している事が示唆された。

## 3) 線虫においても *BTBD10* は Akt 上流因子として細胞死抑制的に働く

我々は以前 ALS 関連運動神経細胞死抑制に Akt ファミリータンパク質のうち Akt3 が重要である事を報告しており(参考文献 1)、さらに *BTBD10* が Akt の脱リン酸化を抑制する事でリン酸化を増強する事を明らかとした(参考文献 2)。また、ヒトやマウスでは Akt には3つのアイソフォームが存在するが、線虫では2つの Akt アイソフォームが存在する。そこで、我々は線虫の *akt-1*, *akt-2* 遺伝子欠損株と *bzIs8* とを交配し、touch-receptor neuron が1つ以上欠損している線虫の割合を算出した。その結果、*akt-1* 並びに *akt-2* 遺伝子欠損により *btbd-10* 欠損株同様に touch-receptor neuron の数が減少する事を明らかとした。また、*akt-1* あるいは *akt-2* と *btbd-10* を同時に欠損させても touch-receptor neuron を欠損している線虫の割合が *akt* 遺伝子欠損線虫と比較して増加しないことを明らかとした。さらに、恒常活性化型ヒト Akt1 を *akt-1*, *akt-2*, *btbd-10*

欠損株に発現させる事により、touch-receptor neuron 数の減少は抑制された。これらの事から線虫においても *BTBD10* は Akt の上流で細胞死に対して抑制的に働く事が考えられた。

## 4) *btbd-10* 遺伝子欠損線虫では運動神経細胞数が減少する

次に我々は、アセチルコリン作動性運動神経である14個の DA, DB 神経細胞で GFP を発現する *evIs82* 株と *btbd-10* 欠損株を交配し、GFP 発現神経細胞数に与える影響を観察した。その結果、運動神経細胞が脱落する線虫の割合が親株の *evIs82* では0%であるのに対して、2つの *btbd-10* 欠損株では約 7%に増加する事を明らかとした。さらに驚くべき事に、*btbd-10* 欠損により DA, DB 運動神経細胞の数には変化が無いものの、その位置に異常が見られる線虫の割合が増加する事も明らかとした。これらの事から *BTBD10* は線虫において運動神経細胞の生存並び発生過程における神経細胞の配置に関与していることが考えられた。

## 5) *btbd-10* 遺伝子欠損により線虫の運動機能異常が惹起される

*btbd-10* 欠損により運動神経細胞脱落が観察された事から、次に我々は *btbd-10* 欠損線虫で運動機能異常が観察されるか検討した。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結果、野生型と比較して *btbd-10* 欠損株では優位にバッファー中で1分間に頭を振る回数が減少する事を明らかとした。さらにこの運動機能異常は、線虫 *btbd-10* 遺伝子を導入し発現させることにより完全にレスキューされる事を明らかとした。これらの事から、線虫において *BTBD10* の発現低下により運動神経細胞死並びに運動機能異常が惹起される事が示唆された。

## 6) SALS 患者や ALS モデルマウス脊髄運動神経細胞では、*BTBD10* 発現量が低下する

我々は以前、NSC34 細胞を用いた実験系で G93A-SOD1 誘導性細胞死は *BTBD10* の高発現で抑制可能である事を見いだした(参考文献 2)。さらに本研究で、培養細胞や線虫を用いた実験結果から、運動神経細胞での *BTBD10* の発現量低下が神経細胞死に繋がる事が十分に示唆された。次に我々は、*BTBD10* が ALS 病態に関与することの直接的な証明を目指し、SALS 患者、非 ALS 対照例それぞれ6症例の脊髄組織切片を用い免疫染色を行い、運動神経細胞における *BTBD10* の発現に ALS と非 ALS 対照例で差があるか否か検討した。その結果、非 ALS 対照例と比較して、SALS 患者の脊髄前角における残存運動神経細胞では抗 *BTBD10* 抗体による染色性の高

い細胞の数が優位に減少している事を明らかとした。また、ALS モデルマウスの1つである G93A-SOD1-Tg マウスは約 90 日齢で ALS 症状が現れ始め、寿命は約 150 日であるが、我々は以前に、脊髄前角運動神経細胞における BTBD10 発現量は、60 日齢では同腹野生型マウスと差は見られなかったが、120 日齢、140 日齢と ALS 症状が進行するにつれ G93A-SOD1-Tg マウスでは、残存運動神経細胞における BTBD10 発現量が低下する事を明らかとしており、本研究で得られた結果と合わせ考えると、SALS、FALS に共通して脊髄運動神経細胞における BTBD10 発現量低下が ALS 症状進行に寄与している事が示唆された。

#### 7) FUS は BTBD10 発現量低下の一因である

FUS は DNA、RNA の代謝に関わる分子で、FALS、SALS 共通してタンパク質のアミノ酸配列変異が報告されており、ALS 発症に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、我々は ALS 脊髄運動神経細胞での BTBD10 発現減少に FUS が関与するか検討した。HeLa 細胞に野生型 FUS をコードする組み換えアデノウイルス発現ベクターを用いて wt-FUS を発現させた。ウイルス感染 48 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロットにより BTBD10 の発現量を検討した結果、wt-FUS により BTBD10 のタンパク質発現レベルが低下する事を明らかにした。また、同時に細胞から RNA を回収し、リアルタイム PCR により BTBD10 の mRNA レベルを定量した結果、FUS は BTBD10 の発現量を転写レベルで減少させる事を明らかとした。さらに、NT2 細胞に同様に組み換えアデノウイルス発現ベクターを用いて wt-FUS を発現させた際にも BTBD10 タンパク質発現量は低下し、リン酸化 Akt レベルの低下も観察された。これらの事から FUS は ALS 運動神経細胞における BTBD10 発現量低下に寄与する一要因である事が示唆された。

これまでに同定されている ALS 原因遺伝子は 20 種類を超えており、ALS 病態の複雑さは増すばかりである。BTBD10 はこれまでの知見から家族性のみならず孤発性の ALS における運動神経細胞死に関与している事が考えられ、今後更に、BTBD10 発現調節機構の詳細な検討を行うことで ALS 関連運動神経細胞死機構の解明に繋がる事が予測される。また我々は BTBD10 トランスジェニックマウスを作製済みであり、今後は BTBD10 トランスジェニックマウスと ALS モデルマウスを交配し、ALS 症状が緩和されるか検討することで、ALS 治療ターゲットとしての BTBD10 の有用性を探る。さらに、現在作製中である BTBD10 ノックアウトマウスが ALS 様症状を呈するか観察し、BTBD10 ノ

ックアウトマウスが新規 ALS モデルマウスとなるか検討する予定である。

#### <参考文献>

① Kanekura K, Hashimoto Y, Kita Y, Sasabe J, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. A Rac1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt3 anti-apoptotic pathway, triggered by AlsinLF, the product of the ALS2 gene, antagonizes Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) mutant-induced motoneuronal cell death. *J. Biol. Chem.*, 280 (6), 2005, pp 4532-4543

② Nawa M, Kanekura K, Hashimoto Y, Aiso S, Matsuoka M. A novel Akt/PKB-interacting protein promotes cell adhesion and inhibits familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1-induced neuronal death via inhibition of PP2A-mediated dephosphorylation of Akt/PKB. *Cell. Signal.*, 20 (3), 2008, pp 493-505

#### 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) (全て査読有り)

① Nawa M, Matsuoka M. KCTD20, a relative of BTBD10, is a positive regulator of Akt. *BMC Biochem.* 2013, 14:27. DOI: 10.1186/1471-2091-14-27

② Nawa M, Kage-Nakadai E, Aiso S, Okamoto K, Mitani S, Matsuoka M. Reduced expression of BTBD10, a Akt activator, leads to motor neuron death. *Cell Death Differ.*, 2012, 19 (8), pp 1398-1407. DOI: 10.1038/cdd.2012.19

他主要な物以外の論文 2 件

[学会発表] (計 5 件)

① 名和 幹朗、松岡 正明 KCTD20, an isoform of BTBD10, is a novel Akt activator. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 20 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

② 名和 幹朗 Reduced expression of BTBD10, an Akt activator, leads to motor neuron death. 第 3 回メトロポリタン脳の老化・認知症フォーラム, 2013 年 11 月 26 日, 東京医科大学病院(東京都新宿区)

③ Mikiro Nawa, Masaaki Matsuoka. Decreased expression of BTBD10 in ALS motor neurons may contribute to the ALS pathogenesis. 2012 Society for Neuroscience annual meeting, 2012 年 10

月 17 日, ニューオリンズ(米国)

④名和 幹朗、中台 枝里子、三谷 昌平、松岡 正明 運動神経細胞における細胞死抑制因子 BTBD10 発現低下は ALS の一因である。第 169 回東京医科大学医学会総会, 2012 年 6 月 2 日, 東京医科大学病院(東京都新宿区)

⑤名和 幹朗 新規 ALS 関連分子 BTBD10 の同定と機能解析—ALS 運動神経細胞死機構解明を目指して, 東京地区線虫勉強会, 2012 年 4 月 21 日, 東京大学(東京都文京区)

[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・助教

研究者番号：10398620