

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26461269

研究課題名（和文）dynactin-1ノックアウトマウスを用いた孤発性ALSの病態解明と治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenesis of sporadic ALS using motor neuron specific-dynactin-1 knockout mice

研究代表者

河合 香里（KAWAI, Kaori）

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：80398007

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：運動ニューロン特異的dynactin-1ノックアウトマウスを用いて、孤発性ALSの病態解明を目的とし、脊髄前角運動ニューロン中に観察されたユビキチン陽性封入体内のユビキチン化タンパク質の同定とグリア細胞活性化によるALS病態の増悪機序について検討した。

ユビキチン化タンパク質は同定に至ることができず、ユビキチン化タンパク質の回収方法を改善する必要がある。病期とグリアの活性化時期についての検討では、グリアの活性化が振戦、運動機能低下などの神経症候よりも早い段階で既に起こっていることが明らかとなった。今後、細胞障害性サイトカイン放出と病態進行との関連についての検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathogenesis of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS), we generated motor neuron-specific dynactin-1 knockout mice. In this study, we could not identify ubiquitinated protein included in the ubiquitin-positive aggregates in motor neurons of the spinal anterior horn because of less amount of targeted proteins. There was a need to improve the method for recovering ubiquitinated protein. In the dynactin-1 knockout mice, glial activation detected before appearance of neurodegenerative symptoms, such as tremor and reduction in motor function.

研究分野：神経内科学

キーワード：ALS dynactin-1 ノックアウトマウス 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は未だ有効な治療法がない神経変性疾患の一つである。現在 ALS モデルとして汎用されている SOD1 (superoxide dismutase type-1) 変異マウスは家族性 ALS のモデルであり、この変異マウスによる研究結果は現在までのところ良好な臨床試験結果に結びついていない。ALS の約 90% が孤発性であり、孤発性 ALS の病態の本質を明らかにすることが、ALS の根本的治療法を開発する上で重要であると我々は考えている。ゆえに孤発性 ALS に特異的な病態をとらえるため、マイクロアレイ解析を行い、孤発性 ALS 患者の運動ニューロンにおいて特異的に発現変動が見られるいくつかの遺伝子を同定した。なかでも病早期から患者の広汎にわたり発現低下が認められる遺伝子として dynactin-1 (細胞内物質輸送に関わるモータータンパク質である dynein/dynactin 複合体を形成するサブユニットの一つ) を同定した。実際に dynactin-1 の発現低下が ALS 様症状を惹起するか否かについて検討するため、コリン作動性 (運動) ニューロン特異的な *dnc-1* (dynactin-1 の線虫相同体) をノックダウンした線虫を作成したところ、運動ニューロン変性、運動機能障害、軸索輸送の低下などの ALS 病態と共通する症状を示した。線虫は世代交代が非常に早く、飼育も容易であることから短期間に大量のスクリーニングなどを行う場合に非常に効果的であるが、病理学的検討などを詳細に行うには不向きであることから、Cre-LoxP システムを用いて運動ニューロン特異的 dynactin-1 ノックアウト (CKO) マウスを作成した。

2. 研究の目的

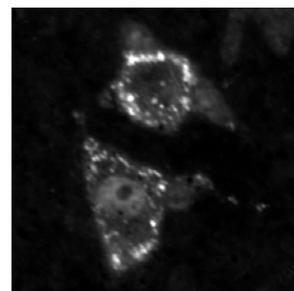
本研究は孤発性 ALS 患者の運動ニューロンで遺伝子発現低下が認められた dynactin-1 に着目し、孤発性 ALS の病態解明および新規治療法を開発することを目的としている。

我々の作成した運動ニューロン特異的 dynactin-1 CKO マウスは、運動機能障害、脊髄前角運動ニューロンの脱落、リン酸化ニューロフィラメントの蓄積、ユビキチン化封入体の形成など、ALS に特徴的な表現型および病理像を示す。本研究では運動ニューロン特異的 dynactin-1 のノックアウトによって生じるユビキチン化封入体を構成するタンパク質の同定、およびグリア細胞による ALS 病態の増悪機序の解明に焦点を置いた。

3. 研究の方法

(1) ユビキチン化封入体を構成するタンパク質の同定

神経変性疾患ではユビキチン化タンパク質がニューロン内に封入体を形成することが明らかとなっている。本研究で用いた dynactin-1 CKO マウスにおいても、脊髄前角運動ニューロン内にユビキチン化封入体の蓄積が見られた (図 1)。



(図 1) dynactin-1 CKO マウス脊髄前角運動ニューロン内に蓄積するユビキチン陽性封入体 (白色ドット状)

抗ユビキチン抗体カラムを用いて、マウス脊髄中のユビキチン化タンパク質を回収した後、LC-MS/MS を用いた質量分析を行い、dynactin-1 の発現低下によってユビキチン化を受けるタンパク質の同定を計画した。

(2) グリア細胞による ALS 病態の増悪機序の解明

グリアのマーカーである GFAP (アストロサイト)、Iba-1 (total ミクログリア)、CD86 (炎症誘発性 M1 ミクログリア)、Arginase (抗炎症性 M2 ミクログリア) に対する抗体を用いてマウス脊髄の免疫染色を行い、アストロサイト、ミクログリアの活性化の有無、ならびに活性化と病態進行との関連について検討する。さらに GFAP、Iba-1 のタンパク質発現量についてもウェスタンブロット法を用いて定量的および経時的に解析した。

グリア細胞の活性化に伴って細胞障害性サイトカインが放出されることが推測されるため、サイトカインアレイによってさまざまなサイトカインのタンパク質レベルでの発現変動についても検討を加えた。

(3) すべての実験はヘルシンキ宣言に基づき実施し、動物実験にあたっては、名古屋大学動物実験指針に基づき、名古屋大学動物実験委員会の承認のもとで行った。

4. 研究成果

(1) ユビキチン化封入体を構成するタンパク質の同定

15 週齢の dynactin-1 CKO マウス (DCTN1^{flox/flox}/VChT-Cre)、および対照マウス (DCTN1^{flox/flox}) の脊髄を Lysis バッファーにてホモゲナイズしたのち、超音波破碎した。抽出液を抗ユビキチン化抗体カラムにアプライし、4℃で1時間吸着させた後、溶出バッファーにて溶出し、ユビキチン化タンパク質の回収を行った。回収した溶出液を SDS-PAGE で分離し、銀染色で確認したが、LC-MS/MS を行うには回収量が不十分であった。ユビキチン化封入体を濃縮してカラムにアプライできるよう、レーザーマイクロダイセクションを用いて封入体を含む運動ニューロンの単離を行うなどの必要があると考えられたが、本研究では後述するグリア細胞の研究においても脊髄を使用するため、必要量のサンプリングを行うことができなかった。

(2) グリア細胞による ALS 病態の増悪機序の解明

dynactin-1 CKO マウスの病態進行とグリア細胞活性化の機序を検討するため、15 週齢 (早期: 体重減少、運動機能障害なし)、30 週齢 (中期: 体重減少、運動機能障害はないが振戦が認められる)、60 週齢 (終期: 対照群と比較して有意な体重減少、運動機能障害あり。dynactin-1 CKO 群のみで病態の進行により死亡した個体も存在した) の dynactin-1 CKO マウスおよび対照マウスの脊髄前角を対象として、GFAP (アストロサイト)、Iba1 (total ミクログリア)、CD86 (炎症誘発性 M1 ミクログリア)、Arginase (抗炎症性 M2 ミクログリア) に対する抗体を用いた免疫染色を行った。CD86、Arginase に関しては、CKO マウスと対照マウスで明らかな差は認められなかったものの、GFAP (図 2 A、B)、Iba-1 (図 2 C、D) は ALS 症候が現れる以前の 15 週齢ですでに活性化していた。

さらに定量的な解析を行うため、マウス脊髄前角を RIPA バッファーでホモゲナイズし、超音波破碎後、12,000 x g にて遠心を行った。遠心上清中の GFAP、Iba-1 のタンパク質発現をウェスタンブロット法にて検出し、得られたバンドを ImageJ にて定量化した。対照群に比べて dynactin-1 CKO 群では GFAP が約 2 倍、Iba1 が約 3 倍となっており、ともに有意なタンパク質レベルでの発現上昇が認められた。よって、グリア細胞の活性化は振戦、運動機能障害などの ALS 症候が現れるよりも

早い段階ですでに起こっていることが明らかとなった。

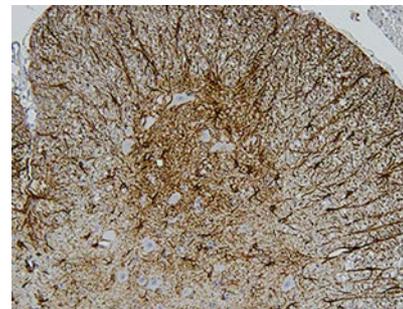
次にグリア細胞の活性化に伴うサイトカインの放出について検討するため、上記のウェスタンブロット法と同様の方法で脊髄を処理し、遠心上清を得た。サイトカインアレイを用いて、この遠心上清中の様々なサイトカインのタンパク質発現レベルについて網羅的な検出を試みたが、対照群に比べて有意に発現レベルの上昇を認めるサイトカインを検出することができなかった。本研究期間ではサイトカインアレイを用いた検討しか行うことができなかったが、今後、個々の細胞障害性サイトカインについて、より高感度に検出できる ELISA 法を用いて検討を加える必要があると考えている。

(図 2)

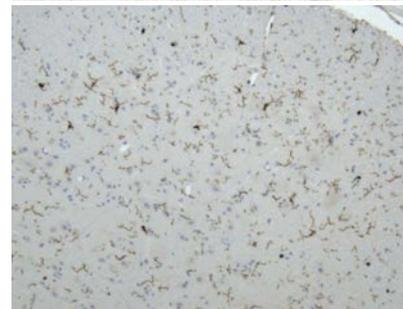
2 A
GFAP
対照群



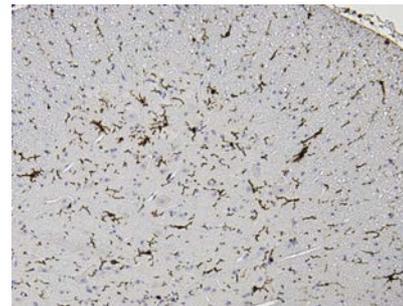
2 B
GFAP
CKO 群



2 C
Iba-1
対照群



2 D
Iba-1
CKO 群



(図2) 15週齢の脊髄前角におけるGFAP(アストロサイトマーカー; 2A, 2B)とIba-1(ミクログリアマーカー; 2C, 2D)の免疫染色像。

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5件)

① Yamada S, Hashizume A, Inagaki T, Suzuki K, Kondo N, Kawai K, Noda S, Nakanishi H, Banno H, Hirakawa A, Koike H, Halievski K, Jordan CI, Katsuno M, Sobue G. Decreased peak expiratory flow associated with muscle fiber-type switching in spinal and bulbar muscular atrophy. *PLoS One*. 査読有 2016. 11:e0168846. DOI:10.1371/journal.pone.0168846

② Iguchi Y, Eid L, Parent M, Soucy G, Bareil C, Riku Y, Kawai K, Takagi S, Yoshida M, Sobue G, Julien JP. Exome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. *Brain*. 査読有 139: 3187-3201, 2016. DOI:10.1093/brain/aww237

③ Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, Mimuro M, Iwasaki Y, Masuda M, Ishigaki S, Katsuno M, Sobue G. Marked involvement of the striatal efferent system in TAR DNA-Binding Protein 43 kDa-related frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 査読有 75: 801-811, 2016. DOI: 10.1093/jnen/nlw053

④ Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, Ibi D, Nagai T, Yamada K, Watanabe H, Katsuno M, Inada T, Ohno K, Sokabe M, Okado H, Ishigaki S, Sobue G. FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat Commun*. 査読有 6:7098, 2015. DOI: 10.1038/ncomms8098.

⑤ Riku Y, Atsuta N, Yoshida M, Tatsumi S, Iwasaki Y, Mimuro M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Nakamura R, Koike H, Sobue G. Differential motor neuron involvement in progressive muscular atrophy: a comparative study with amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open*. 査読有 4(5): e005213, 2014 DOI: 10.1136/bmjopen-2014-005213.

[学会発表] (計8件)

① Kaori Kawai, Masahisa Katsuno, Kensuke Ikenaka, Yohei Iguchi, Ryu Katsumata, Kunihiko Araki, Fumiaki Tanaka, Gen Sobue. Motor neuron-specific dynactin-1 knockout

mice exhibit ALS-like neurodegeneration. 第57回日本神経学会学術大会 2016. 5. 18-21 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

② 祖父江元. Perspectives on therapeutic research for ALS. ALS病治療戦略国際シンポジウム招待講演 2016. 2. 19 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)

③ 河合香里, 池中建介, 勝野雅央, 井口洋平, 荒木邦彦, 田中章景, 祖父江元. dynactin-1ノックアウトマウスにおける進行性運動機能障害. 第33回日本神経治療学会総会 2015. 11. 26-28 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋)

④ 祖父江元. 神経変性疾患の disease-modifying therapy 開発を目指して. 日本脳神経外科学会第74回学術総会招待講演 2015. 10. 14-16 ロイトン札幌 (北海道札幌市)

⑤ 河合香里, 池中建介, 勝野雅央, 井口洋平, 勝又竜, 田中章景, 祖父江元. Pathogenesis of neurodegeneration in motor neuron-specific dynactin-1 knockout mice. 第38回日本神経科学大会 2015. 7. 28-31 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

⑥ 河合香里, 池中建介, 勝野雅央, 井口洋平, 勝又竜, 田中章景, 祖父江元. dynactin-1ノックアウトマウスを用いた孤発性ALSの病態解析. 第56回日本神経学会学術大会 2015. 5. 20-23 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

⑦ 祖父江元. 神経変性疾患の disease-modifying therapy への展望. 第104回日本病理学会総会招待講演 2015. 4. 30-5. 2 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋)

⑧ 祖父江元. 神経変性疾患の disease-modifying therapy 開発をめざして. 第88回日本薬理学会年会招待講演 2015. 3. 18 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 香里 (KAWAI, Kaori)
名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員
研究者番号: 80398007

(2) 研究分担者

祖父江 元 (SOBUE, Gen)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号: 20148315

(3) 連携研究者

勝野 雅央 (KATSUNO, Masahisa)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50402566