

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2012 年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：秦野 伸二
所属機関名：東海大学 医学部
所属部署名：分子生命科学 職名：教授
所在地：神奈川県伊勢原市下糟屋 143
電話：0463-93-1121 内線：2568



1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

筋萎縮性側索硬化症の発症分子メカニズムに関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：秦野 伸二

職名：教授

所属機関名：東海大学

部署名：医学部

中国側研究者氏名：商 慧芳

職名：教授

所属機関名：四川大学

部署名：华西医院

4. 当該研究における発表論文等

Pan L, Yoshii Y, Otomo A, Ogawa H, Iwasaki Y, Shang HF, Hadano S:

Different human copper-zinc superoxide dismutase mutants, SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R}, exert distinct

harmful effects on gross phenotype in mice. PLoS ONE, in press, 2012.

5. 成果の概要

- ・4種類の正常及び変異型 cDNA クローンの構築 (TARDBP^{WT}、TARDBP^{A382T}、FUS^{WT}、FUS^{R495X})。
- ・上記 cDNA を PITT 用ターゲティングベクターに組み込み、ベクターを構築した。
- ・作製した全てのコンストラクトが目的とする遺伝子産物を発現することを確認。
- ・完成した4種類のコンストラクトをマウス受精卵に顕微注入した。
- ・TARDBP^{A382T} 遺伝子を導入した TG マウス (ファウンダー) の作出に成功した。
- ・遺伝的背景の違いが ALS マウスモデル疾患発症に影響することを確認した。
- ・中国人 ALS 患者における新たな遺伝子変異及び多型の存在を明らかにした。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

- ・中国国内における ALS 患者の DNA サンプル並びに臨床情報を収集。
- ・患者から採取した血液からのゲノム DNA 抽出。
- ・遺伝子配列の決定及び解析。
- ・変異 SOD1 マウスの表現型に関する解析。
- ・中国人 ALS 患者における新たな遺伝子変異及び多型の存在を明らかにした。
- ・遺伝的背景の違いが ALS マウスモデル疾患発症に影響することを確認した。

筋萎縮性側索硬化症の発症分子メカニズムに関する研究

日本研究者氏名	秦野 伸二
日本所属機関	東海大学医学部 教授
共同研究者名	大塚正人, 潘雷, 大友麻子
中国研究者氏名	商 慧芳
中国所属機関	四川大学华西医院 教授

要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) をはじめとする多くの神経変性疾患の病因は未だ不明であり、その有効な治療法及び治療薬はない。疾患の発症機構の解明と治療法・治療薬の開発には、優れた疾患動物モデルの利用が必須である。これまで、家族性 ALS 原因遺伝子 *SOD1* の変異型遺伝子 (*SOD1*^{G93A}) を導入したトランスジェニック (TG) マウスが世界的に広く利用されてきた。しかし、*SOD1*^{G93A}-TG マウスで治療効果のある薬がヒト患者では全く効果が見られていないという問題が明らかとなっている。本研究では、ゲノム特定部位に目的とする遺伝子を単一コピーで効率良く導入する独自のトランスジェニックマウス作製法を用いて、新規の ALS マウスモデルを作出することを目的とした。具体的には、特定ゲノム部位に単一コピーの変異或いは野生型 *TARDBP* 並びに *FUS* 遺伝子を挿入した TG マウス系統の樹立を試みた。さらに、中国人患者を対象とした ALS 発症原因の解析を行うとともに、これまでに開発されている ALS 疾患モデル動物 (変異 *SOD1*-TG マウス) を用いて、遺伝学的背景の違いが疾患発症に及ぼす影響について併せて解析した。その結果、新規の ALS マウスモデル (*TARDBP*^{A382T}) マウスの作出に成功した。また、遺伝的背景の違いが変異 *SOD1*-TG マウス ALS モデルの疾患発症に影響することを明らかにするとともに、中国人 ALS 患者における ALS 原因遺伝子の新たな変異及び遺伝子多型の存在を明らかにした。

Key Words 筋萎縮性側索硬化症, 動物モデル, 遺伝的背景, *TARDBP* 遺伝子, *SOD1* 遺伝子

緒言:

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) をはじめとする多くの神経変性疾患の病因は未だ不明であり、その有効な治療法及び治療薬はない。ALS 患者の中には前頭側頭葉型認知症 (FTLD) を併発する患者群が存在し、現在 ALS/FTLD として位置づけられている。近年、ALS 及び ALS/FTLD の共通の原因として *TARDBP*、*FUS*、*UBQLN2*、*C9ORF72* 等の遺伝子が同定され、ALS と FTLD は同一あるいは類似の分子機構により発症する疾患群であると考えられるようになった。特に、*TARDBP* と *FUS* の遺伝子産物である TDP-43 及び *FUS* は、孤発性 ALS 患者のみならず、FTLD、アルツハイマー病患者脳においてもその凝集体蓄積が見られることから、疾患発症との関連が注目されている。

疾患の発症機構の解明と治療法・治療薬の開発には、優れた疾患動物モデルの利用が必須である。これまで、家族性 ALS 原因遺伝子 *SOD1* の変異型遺伝子 (*SOD1*^{G93A}) を導入したトランスジェニック (TG) マウスが世界的に広く利用されてきた。しかし、*SOD1*^{G93A}-TG マウスで治療効果のある薬がヒト患者では全く効果が見られていないという問題が明らかとなっている。さらに、最近、ALS 原因遺伝子 (*TARDBP*) 過剰発現 TG マウスあるいはラットが作出されているが、野生型遺伝子の TG マウスでも神経症状を発症するなど多くの問題が未解決である。これらは、薬の開発が特定の限局した動物モデルに依存していることに加え、従来の TG マウス作製法では、導入遺伝子が挿入されるゲノム部位並びに挿入コピー数がランダムとなり、場合によっては遺伝子挿入による他の遺

伝子破壊が起こるためであると推定される。本研究では、ゲノム特定部位に目的とする遺伝子を単一コピーで効率良く導入する独自のトランスジェニックマウス作製法（Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis ; PITT） [1]を用いて、新規の ALS マウスモデルを作出することを目指す。具体的には、特定ゲノム部位に単一コピーの変異或いは野生型 *TARDBP* 並びに *FUS* 遺伝子を挿入した TG マウス系統を樹立することを第一の目標とする。

一方、ALS の発症頻度については、人種差は無いとされるが、実際にはこれまでの ALS に関する研究は欧米主導であり、従ってその解析も Caucasian（白人）を対象としたものが主流であった。本研究は、日中共同研究により、アジア人、特に中国人を対象とした ALS 発症原因の解析を行うとともに、これまでに開発されている ALS 疾患モデル動物（変異 *SOD1*-TG マウス）を用いて、遺伝学的背景の違いが疾患発症に及ぼす影響について併せて解析する。

対象と方法:

(1) 新規 ALS マウスモデルの作出

本研究では、共同研究者の大塚らが独自に開発した TG マウス作製法 [1] を用いて、新規の ALS マウスモデルを作出する。目的とする遺伝子を着実に全身で発現させるため、プロモーターとして CAG プロモーターを使用する。PITT 法は、Cre-loxP システムに基づいた RMCE 法を TG 作製に応用したものである（図 1 参照）。本実験では、マウス *Rosa26* 遺伝子座に loxP カセットを有するノックインマウス（作製済）を用いる。PITT 法を用いることにより、同一遺伝子座に単一コピーの異なった遺伝子

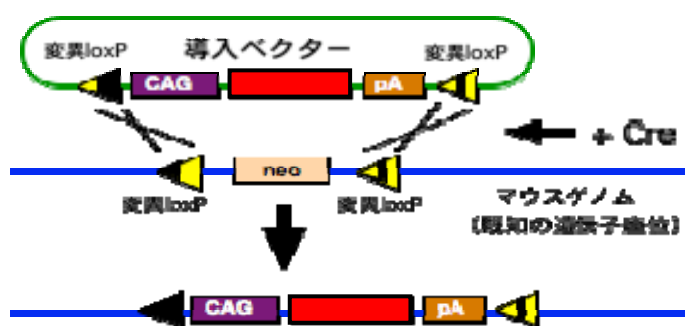


図 1) RMCE法の経路
(PITT法ではこれを受精卵で行う)

(変異) の挿入が可能となり、これまで不可能であった遺伝子型-疾患表現型相関の個体レベルでの検証が可能となる。本実験で導入する遺伝子は、*TARDBP* 及び *FUS* の 2 種類であり、変異体としては *TARDBP*^{A382T} 及び *FUS*^{R495X} を作製し、正常型のクローンも含め合計で 4 種類のターゲティングコンストラクトを作製する。具体的には、各遺伝子の翻訳領域全長 cDNA 配列を PITT 法用のターゲティングベクターに組み込み、正常型の各遺伝子コンストラクトを構築する。そして、PCR を用いた点突然変異導入法により、目的とする遺伝子内に疾患遺伝子変異を導入したベクターを構築する。完成した各ターゲティングコンストラクトを、Cre 発現ベクターと同時に変異型 loxP を持つノックインマウスの交配で得られた受精卵に顕微注入し、マウスを産出する。得られた仔マウスの遺伝子タイピングを行ない、正確に目的とする位置に遺伝子が挿入されたマウスを選抜する。

(2) 遺伝的背景、性差、及び遺伝子変異の違いが *SOD1*-TG マウスの疾患表現型に及ぼす影響の解析

近年、遺伝的背景等の違いがマウスにおける症候表現型に大きく影響し、そのことが実験結果の解釈を誤った方向へと導いていると指摘されている。本研究ではそのことを踏まえ、既存の ALS マウスモデルにおける疾患表現型が系統等により影響されるか否かについて精緻に検証した。神経病理学的症候の異なる 2 種類の ALS マウスモデル (*SOD1*^{H46R}、*SOD1*^{G93A}-TG マウス) を、夫々 2 種類の系統 (*C57BL/6N* 及び *FVB/N*) へとコンジュニック化 (10 世代以上の戻し交配による遺伝的背景の均一化) し、さらにそれらの変異 *SOD1*-TG マウスにおける体重の変動及び疾患進行による死亡日齢 (寿命) を解析した。

(3) 中国人 ALS 患者における疾患関連遺伝子配列の解析

中国国内、特に四川省を中心とした地域における家族性並びに孤発性 ALS 患者の DNA サンプル並びに臨床情報

を収集し、研究リソースバンクの構築を継続的に行った。患者から採取した血液からゲノム DNA を抽出した。そして、遺伝子増幅 (polymerase chain reaction; PCR) 法により、*TARDBP* 遺伝子の各エクソンを増幅し、それらの塩基配列を決定した。さらに、*ATXN2* 遺伝子内の CAG 反復配列の増幅を行い、リピート数を解析した。決定した遺伝子配列を、データベース上の正常者のものと比較し、患者特異的変異の有無、並びにアジア人に特異的遺伝子変異の同定を試みた。

結果:

(1) 新規 ALS マウスモデルの作出

始めに、変異遺伝子コンストラクトの作製を行った。具体的には、ヒトの *TARDBP* 及び *FUS* 遺伝子について、各遺伝子の翻訳領域全長 (ORF) の cDNA 配列をヒト RNA より RT-PCR により増幅し、クローン化することにより正常型の各遺伝子コンストラクトを構築した。次に、PCR を用いた点突然変異導入法により目的とする遺伝子内に疾患遺伝子変異を導入し、最終的に 4 種類の正常及び変異型 cDNA クローンを得た (*TARDBP*^{WT}、*TARDBP*^{A382T}、*FUS*^{WT}、*FUS*^{R495X})。さらに、それらの cDNA を PITT 用ターゲットングベクターに組み込み、各 PITT コンストラクトを完成させた。作製したコンストラクトが正しく目的とする遺伝子並びにタンパク質を発現することを確認するため、作製したコンストラクトを COS-7 細胞にトランスフェクションし、発現タンパク質をウェスタンブロット法にて解析した。その結果、作製した全てのコンストラクトが目的とする遺伝子産物を発現することが確認された。次に、完成した 4 種類のコンストラクト (*TARDBP*^{WT}、*TARDBP*^{A382T}、*FUS*^{WT}、*FUS*^{R495X}) を、各々 300~500 個の受精卵に Cre 発現ベクターと同時に顕微注入することにより TG マウスの作出を試みた。現在、*TARDBP*^{A382T} 遺伝子を導入した TG マウス (ファウンダー; F0) の作出に成功している。今後、得られた仔マウスの遺伝子タイピングを行ない、4 種類の新規トランスジェニックマウス (*TARDBP*^{WT}、*TARDBP*^{A382T}、*FUS*^{WT}、*FUS*^{R495X}) の系統樹立を目指す計画である。

(2) 遺伝的背景、性差、及び遺伝子変異の違いが SOD1-TG マウスの疾患表現型に及ぼす影響の解析

本研究では、遺伝的背景の違いが ALS マウスモデルの表現型にどのように影響について解析するため、2 種類の遺伝的背景 (C57BL/6N 及び FVB/N) を有する 2 種類の変異 SOD1 発現マウス (*SOD1*^{H46R}、*SOD1*^{G93A}-TG マウス) を作出し、体重及び寿命の解析を行った。その結果、*SOD1*^{G93A}-TG マウスは *SOD1*^{H46R}-TG マウスよりも重症化すること、さらにその重症度は C57BL/6N より FVB/V 系統で顕著であること、さらに FVB/V 系統の *SOD1*^{G93A}-TG マウスでは性差が見られ、雄が雌より早期に発症し、死に至ることが判明した。従って、変異 SOD1 に起因した運動ニューロン変性は、複数の他の遺伝的要因により調節されていると考えられた [2]。

(3) 中国人 ALS 患者における疾患関連遺伝子配列の解析

中国人における ALS 原因遺伝子 (*TARDBP*) の変異及び遺伝子配列多型について解析した。合計 165 名の ALS 患者のゲノム DNA を用いて *TARDBP* 遺伝子配列を解析した結果、新たなミスセンス変異 (N378S 変異) を見出すとともに、数種類の多型配列の検出に成功した [3]。しかし、*TARDBP* 遺伝子変異の頻度は 0.61% であり、既に報告されている欧米人 ALS 患者における変異の頻度より有意に低いものであった [3]。本研究ではさらに、近年見出された新たな ALS 関連遺伝子である *ATXN2* (Ataxin-2) 遺伝子について、345 名の中国人 ALS 患者における遺伝子内ポリグルタミン反復配列長について解析した。欧米人における先行研究では 22-33 リピートの反復配列が ALS 発症リスクをあげることが報告されているが、本研究では 27 リピート以上の反復配列が ALS 発症に若干関連している可能性が示された [4]。

考察:

多くの神経変性疾患は、欧米のみならず日本、中国を含めたアジア地域においても、各国国民の高齢化に伴ってその罹患率は上昇の一途を辿っている。特に神経変性疾患の中でも最も過酷とされている神経難病 ALS 及び認知症の治療法・治療薬の開発は喫緊の課題である。しかし、そのような状況にも関わらず、現在、国内外での治

療研究や臨床試験の結果に希望の持てるものは極めて少ない。一方、近年の遺伝子組換え技術の著しい進歩により数多くの神経変性疾患モデル動物が作出されつつあるが、未だ有用なモデル動物の開発は十分ではない。実際、前臨床動物試験で使用されている疾患モデル系は極めて限られているのが現状である。本研究は、これまでにない独自の手法により、新規の ALS 及び ALS/FTLD マウスモデルを作出しようとする独創的・挑戦的研究である。本研究の遂行により、これまでの疾患モデル系統からは得ることができないような新たな知見を得ることが強く期待される。さらに、本研究で用いる新規 TG マウス作製法、ならびにその手法により作出される新規 ALS/FTLD マウスモデルは、共通の研究技術・リソースとして当該研究関連領域において広く利用され、その結果 ALS 及び FTLD の発症機構の解明と治療研究の飛躍的な発展に貢献できる。さらに、神経変性疾患の治療法の開発は、高齢化が進む日本及び中国国民の医療および福祉の向上と医療費削減に直接結びつくものであり、期待される社会的貢献度は極めて大きいと考えられる。

参考文献:

- [1] Ohtsuka M, Ogiwara S, Miura H, Mizutani A, Warita T, Sato M, Imai K, Hozumi K, Sato T, Tanaka M, Kimura M, Inoko H: Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res* 38: e198, 2010.
- [2] Pan L, Yoshii Y, Otomo A, Ogawa H, Iwasaki Y, Shang HF, Hadano S: Different human copper-zinc superoxide dismutase mutants, SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R}, exert distinct harmful effects on gross phenotype in mice. *PLoS ONE*, in press, 2012.
- [3] Huang R, Fang DF, Ma MY, Guo XY, Zhao B, Zeng Y, Zhou D, Yang Y, Shang HF: TARDBP gene mutations among Chinese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2010.
- [4] Chen Y, Huang R, Yang Y, Chen K, Song W, Pan P, Li J, Shang HF: Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine: a possible risk factor for Chinese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 32: e1921-1925, 2011.

注：本共同研究の成果の一部は、2012年3月に下記の論文に掲載された。

Pan L, Yoshii Y, Otomo A, Ogawa H, Iwasaki Y, Shang HF, Hadano S: Different human copper-zinc superoxide dismutase mutants, SOD1^{G93A} and SOD1^{H46R}, exert distinct harmful effects on gross phenotype in mice. *PLoS ONE*, in press, 2012.

作成日：2012年3月9日