

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の細胞死を引き起こすメカニズムを更に解明 —活性化カルパインが核膜孔複合体構成因子を切断し、核—細胞質輸送を障害—

1. 発表者：

郭 伸 (国際医療福祉大学 臨床医学研究センター 特任教授/
東京大学大学院医学系研究科 客員研究員)
山下 雄也 (東京大学大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経病理学分野 特任研究員)

2. 発表のポイント：

- ◆死に至る難病であり、有効な治療法がなかった筋萎縮性側索硬化症 (ALS、注1) の発症原因の一部を明らかにし、細胞死に繋がるカスケードを解明した。
- ◆核膜孔複合体構成因子がタンパク分解酵素カルパインにより分解され、機能しなくなることで、核と細胞質輸送が障害され、細胞死を引き起こすメカニズム (図1) を明らかにした。
- ◆治療法のない死に至る神経難病である ALS の病因メカニズムを更に解明し、特異的治療法の標的となる候補分子の可能性を広げた。

3. 発表概要：

国際医療福祉大学臨床医学研究センター 郭伸特任教授 (東京大学大学院医学系研究科 客員研究員)、東京大学大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経病理学分野 山下雄也特任研究員らの研究グループは、東京医科大学 相澤仁志教授との共同研究で、カルパイン (注2) というカルシウム依存性プロテアーゼの活性化が核膜孔複合体 (NPC、注3) の構成因子であるヌクレオポリンを異常に切断し、核—細胞質輸送を障害することが筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因メカニズムであることを、分子生物学的手法により世界に先駆けて明らかにしました。

本研究グループは、ALS の病因解明研究を進めるなかで、異常なカルシウム透過性 AMPA 受容体 (注4) が発現していることが病因に関わる疾患特異的分子異常であり、細胞内カルシウム濃度の異常な上昇がカルパインの活性化を通じて ALS 運動ニューロンに特異的に観られる TDP-43 病理を引き起こすことを既に明らかにしていました。今回、カルパインの活性化が NPC の構成因子であるヌクレオポリンを異常に切断することで、核—細胞質輸送を障害することを解明しました。この障害は運動ニューロンでの必要な遺伝子発現を抑えるので、細胞の生理活動が阻害され細胞死に陥ることが考えられます。

ALS 患者の大多数を占める孤発性 ALS の病因を説明するメカニズムである点に研究の特色があり、治療へ向け一歩前進したといえます。また最近一部の家族性 ALS の病因にも核—細胞質輸送障害が生じていることが報告され、共通のカスケードが関係していることから一部の家族性 ALS をも含めた治療法開発につながる可能性のある成果です。

以上の成果は、「Scientific Reports」(2017年1月3日オンライン版)に掲載されました。なお、本研究は一般財団法人日本 ALS 協会の ALS 研究奨励金、および公益信託「生命の彩」ALS 研究助成基金、日本学術振興会 (JSPS) の科研費の支援を受けて行われました。

4. 発表内容：

【研究の背景】

本研究グループは、これまでの研究の積み重ねにより、ALS では神経伝達に関わるグルタミン酸受容体の一種である AMPA 受容体の異常が運動ニューロン死の原因であることを突き止めていました[1]。具体的には、AMPA 受容体のカルシウム透過性を規定するサブユニットである GluA2 に本来生ずべき RNA 編集（転写後の一塩基置換、注5）が起こらず、未編集型 GluA2（注6）が発現するためカルシウム透過性が異常に高い AMPA 受容体が運動ニューロンに発現していること、加えて、GluA2 が未編集となるのは RNA 編集酵素である ADAR2（注7）酵素の発現低下のためであることを確かめていました[2]。さらに、ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス（AR2 マウス、注8）の解析から、ADAR2 酵素の発現低下は、異常なカルシウム透過性 AMPA 受容体の発現を通じて運動ニューロン死を引き起こす直接の原因であること[3]、孤発性 ALS の運動ニューロンで特異的に起きる TDP-43 の局在異常（TDP-43 病理、注9）の原因であること[4]を証明し、その疾患特異性からこの分子異常が孤発性 ALS に病因的意義を持つことを示してきました。

ALS には有効な治療法がなく、死に至る難病であるため、根本的な治療法が切望されていますが、運動ニューロンが細胞死に至るカスケードは、これまでほとんど未解明でした。本発表は、ADAR2 発現低下が引き起こす未編集型 GluA2 を介したカルシウム透過性の増加により、カルパインが活性化し、ヌクレオポリンを異常に切断し、核-細胞質輸送を障害するカスケードを明らかにしたもので、運動ニューロンの遺伝子発現に大きな影響を及ぼす分子異常であることから病因理解を一步進める成果です。

【研究内容】

本研究グループが開発した孤発性 ALS の病態を示す AR2 マウスをすでに開発しており、このマウスを用いて、運動ニューロンが変性・脱落するカスケードの検討を行いました。すでにこのマウスモデルの行動変化が現れる以前から運動ニューロンの核に異常が現れることを見出していたので、マウスモデルを用いて核近傍に起きる変化を探索していました。核と細胞質輸送に重要である NPC の形態異常を見出し、NPC の構成因子であるヌクレオポリンが存在する核膜に形態異常や喪失を見出しました。この異常はカルシウム依存性のプロテアーゼであるカルパインの異常な活性化によりヌクレオポリンが切断されることで引き起こされることを明らかにし、さらに核-細胞質輸送因子も障害されていることをマウスモデルさらには ALS 患者剖検組織でも見出しました。NPC の障害された運動ニューロンでは必要な遺伝子発現が低下していることも示されたことから、これらの障害を通じて、細胞の正常な生理活動が阻害され細胞死に陥ることが示唆されました。

【社会的意義・今後の予定】

本研究グループが解明してきた孤発性 ALS の運動ニューロンの細胞死カスケードの更の下流を解明することに成功しました。この変化は、これまで開発してきた治療法（アデノ随伴ウイルス AAV を用いた ADAR2 の遺伝子治療（注10）[5]、AMPA 受容体アンタゴニストであるペランパネルによる薬剤療法（注11）[6]）が標的とした分子異常から引き起こされる変化ですので、これらの治療法により正常化することが示唆されます。また NPC の変化は孤発性 ALS のみならず一部の家族性 ALS でも報告されているので、我々の開発している治療法が幅広く ALS 患者に適用できる可能性があります。さらに、NPC の異常は、ALS 以外の神経変性疾患にも報告されているので、神経変性疾患の分子病態を解明する上で重要な発見です。

し、連続したカルシウム流入により引き起こされる細胞死のカスケードを明らかにした点でも ALS 以外の疾患や基礎的な研究の理解を進める大きな成果であると考えられます。

今後は、明らかになった分子異常を標的とした治療研究を進めるとともに、分子カスケードの上流下流を更に検索していく予定です。

[1] Nature 2004; Journal of Neuroscience 2010、[2] Neurobiology of the Disease 2012、
[3] Journal of Neuroscience 2010、[4] Nature Communications 2012、
[5] EMBO Molecular Medicine 2013、[6] Scientific Reports 2016

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Scientific Reports」（2017年1月3日オンライン版）

論文タイトル：Calpain-dependent disruption of nucleo-cytoplasmic transport in ALS motor neurons.

著者：Takenari Yamashita, Hitoshi Aizawa, Sayaka Teramoto, Megumi Akamatsu and Shin Kwak

DOI 番号：10.1038/srep39994

アブストラクト URL：<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28045133>

6. 問い合わせ先：

国際医療福祉大学 臨床医学研究センター 特任教授／

東京大学大学院医学系研究科 客員研究員

郭 伸 (かく しん)

電話/Fax：03-5841-3566

e-mail：izumi@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

(注1) 筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis ; ALS)：

運動ニューロン (大脳皮質運動野の上位運動ニューロンと脳幹脳神経核や脊髄前角の下位運動ニューロン) が変性、脱落することで起こる進行性の筋力低下や筋萎縮を特徴とする神経変性疾患である。主に中高年に発症し、有効な治療法はなく数年の内に呼吸筋麻痺により死に至る神経難病で、大多数は遺伝性のない孤発性 ALS である。本研究では孤発性 ALS を対象としている。

(注2) カルパイン：

細胞に広く発現しているカルシウムにより活性化するタンパク分解酵素で、様々なアイソフォーム (構造は異なるが同じ機能をもつタンパク質) がある。ニューロンではカルパイン I 及びカルパイン II が発現している。カルパインの適度な活性化は細胞の生理的機能にとり必須だが、過剰な活性化は細胞死の原因となる。

(注3) 核膜孔複合体 (Nuclear Pore Complex ; NPC)：

NPC は核膜を貫通する構造体で、その構成成分は約 30 種類の Nucleoporin(NUP)タンパクであり、RNA やタンパク質が核と細胞質の間で輸送される通路である。核内、細胞質内の分子反応は異なるので核膜が分子の拡散を制限しているが、分子によっては選択的に核—細胞質間

で輸送されることも必要なので、この機能が障害されると細胞機能に支障が出ること、などが知られている。

(注4) AMPA 受容体 :

ヒト・哺乳類の脳・脊髄で興奮性神経伝達を司る神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体のサブタイプの一つで、イオンチャネルの開閉を通して神経の興奮を制御している。ほとんどのニューロンが AMPA 受容体を発現し、その大多数はカルシウムイオンを透過しない。孤発性 ALS では異常にカルシウム透過性が亢進した AMPA 受容体が発現している。

(注5) RNA 編集 (転写後の一塩基置換) :

遺伝子の DNA が RNA に転写されたあと、RNA 塩基に変化が起こることを総称して RNA 編集と呼び、この場合はアデノシンがイノシンに変換する脱アミノ基の反応 (A-I 置換) を指す。

(注6) 未編集型 GluA2 :

RNA 上のイノシンは翻訳時にグアノシンと認識されるので、ゲノム上のグルタミン (Q) コドン (CAG) が RNA 上で CIG に置換されアルギニン (R) コドン (CGG) として翻訳されるためにタンパクレベルでアミノ酸置換が起こる。GluA2 の Q/R 部位はイオンチャネルポアの内腔に面しており、陽性電荷の R はカルシウムイオンの流入を妨げるが中性電荷の Q は妨げないので、GluA2 は RNA 編集によりカルシウムを制御する特性を獲得する。AMPA 受容体は大多数 GluA2 を含み、GluA2 は全て編集型なので、GluA2 を含む AMPA 受容体はカルシウム非透過性である。

(注7) ADAR2 :

Adenosine deaminase acting on RNA 2。二重鎖 RNA のアデノシンに働く脱アミノ基酵素で、GluA2 Q/R 部位の A-I 置換を特異的に触媒する。この酵素がないと未編集型 GluA2 が発現し、AMPA 受容体はカルシウム透過性になる。

(注8) コンディショナルノックアウトマウス (AR2 マウス) :

ADAR2 遺伝子の活性基部分を二個の Flox 配列ではさみ、運動ニューロン特異的に発現させた Cre により ADAR2 を運動ニューロンでノックアウトした (二個の Flox で挟まれた遺伝子部分は切り取られるため) マウスで、運動ニューロンでは未編集型 GluA2 が発現し、ゆるやかな運動ニューロン死による進行性運動麻痺を呈する、孤発性 ALS の表現型を再現する唯一の分子病態モデルマウスである[7]。

(注9) 孤発性 ALS の運動ニューロンで特異的に起きる TDP-43 の局在異常 (TAR DNA binding protein of 43 kDa ; TDP-43) :

TDP-43 は、RNA 結合タンパクで ALS の運動ニューロンに異常な物質の集積により形成される構造体 (封入体) の構成要素であることが 2006 年に明らかにされた[8]。孤発性 ALS の大多数の症例やある種の家族性 ALS ではこの封入体と同時に正常な局在部位である核から TDP-43 の喪失が運動ニューロンに観察されるため (TDP-43 病理)、これは ALS の病理学的指標になっている。ADAR2 の発現低下は、カルシウム透過性 AMPA 受容体の異常な発現、カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインの活性化により TDP-43 病理の原因となるた

め[9]、運動ニューロンで TDP-43 病理が消失し、TDP-43 の正常な核内局在を取り戻すことは治療効果の指標になる。

(注 1 0) アデノ随伴ウイルス AAV を用いた ADAR2 の遺伝子治療：

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター。アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus) は、AAV と略称される病原性を持たない線状一本鎖の DNA ウイルス。DNA 組換え技術により、目的 (治療) 遺伝子を AAV ゲノムの両端に存在するヘアピン構造の間に挿入して、特定の細胞や組織で目的タンパク質を発現させるベクターとして利用されている。国内外の遺伝子治療の臨床研究に使用され、いったん組織や細胞に導入されれば、最低でも 5 年間以上は安定的に発現する。ウイルスベクターも物理的な安定性が高い。

(注 1 1) AMPA 受容体アンタゴニストであるペランパネルによる薬剤療法：

フィコンパ (一般名：ペランパネル水和物)、抗てんかん剤 (エーザイ株式会社)。てんかん発作は、神経伝達物質であるグルタミン酸により誘発されることが報告されており、ペランパネルはグルタミン酸によるシナプス後 AMPA 受容体の活性化を阻害し、神経の過興奮を抑制する高選択、非競合 AMPA 受容体拮抗剤である。

<http://www.eisai.co.jp/news/news201635pdf.pdf>

[7] Hideyama et al., J Neurosci 2010、[8] Arai et al, BBRC 2006; Neumann et al, Science 2006、[9] Yamashita et al, Nat Commun 2012

8. 添付資料：

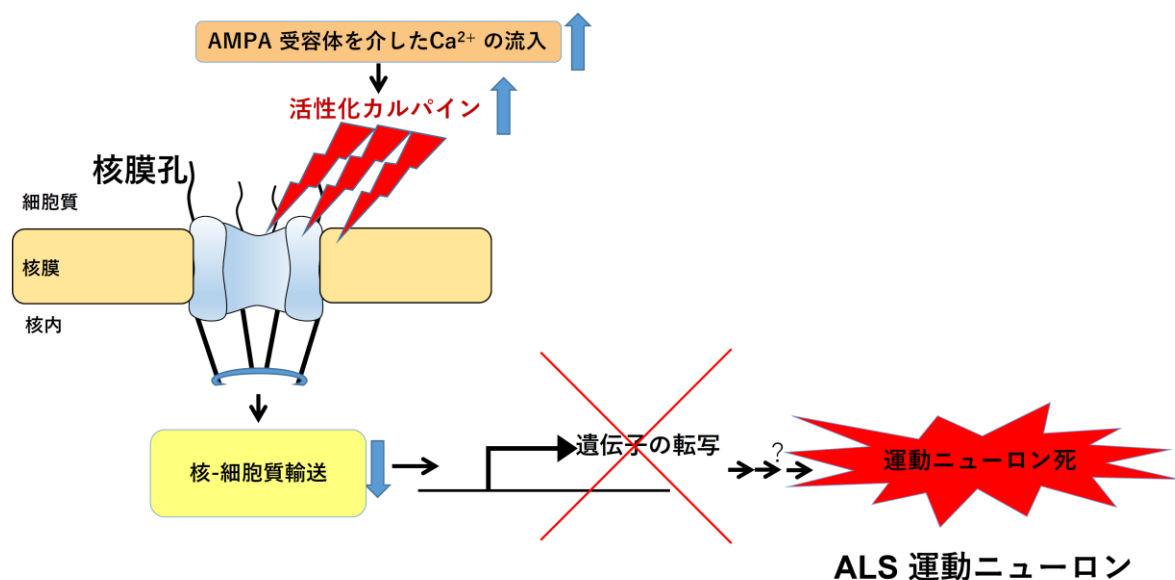


図 1： ALS 運動ニューロンで起こる核膜孔複合体を介した細胞死カスケード。

孤発性 ALS の病態を示すモデルマウスの脊髄運動ニューロンでは、活性化されたカルパインが核膜孔複合体 (NPC) の構成因子 (Nucleoporin) を切断し、核-細胞質輸送を障害する。その障害により細胞の遺伝子発現が抑えられ、生理機能が阻害され細胞死に陥ることが示唆される。

【図の入手方法】

ホームページ：<http://square.umin.ac.jp/teamkwak/>

URL：<http://square.umin.ac.jp/teamkwak/yama/internal.html>

より、「**Internal only**」から、「報道関係者の方へ（2016年12月分）」をご覧ください。

※ ID: teamkwak Password: ALS2016