

平成 26 年 4 月 25 日  
京都府立医科大学  
京都工芸繊維大学

## 筋萎縮性側索硬化症の新治療法開発につながる分子を同定

### ～医工連携共同研究プロジェクトの成果～

京都府立医科大学分子脳病態解析学(神経内科学併任)の東裕美子(あずま ゆみこ)助教、徳田隆彦(とくだ たかひこ)教授、京都工芸繊維大学応用生物学部門・昆虫バイオメディカル教育研究センターの山口政光(やまぐち まさみつ)教授らは、自らが既に関係していた筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態である運動神経(ニューロン)障害を再現しているモデルショウジョウバエを用いて、その運動障害と運動神経細胞の障害(変性)は、オートファジーおよび核細胞質輸送に関与する蛋白質である VCP の発現量を低下させると悪化し、逆にその発現量を増加させると改善するという関係性を明らかにしました。VCP あるいは、その活性を調節する因子が、これまでにはなかった ALS の根本治療薬となる可能性を示した画期的な成果です。

本研究は、京都府立医科大学と京都工芸繊維大学との研究連携を基盤として、京都府立医科大学大学院医学研究科分子脳病態解析学(神経内科)と京都工芸繊維大学応用生物学部門・昆虫バイオメディカル教育研究センター(山口政光教授)との共同研究によって行われたものです。

#### 【本研究成果のポイント】

- 東・徳田らは、2012 年に ALS 関連遺伝子 *FUS* (注 1) のショウジョウバエ・ホモログ (注 2) *Gaz* をノックダウン (注 3) したモデルショウジョウバエを世界で初めて作成し、それが運動障害と運動ニューロン変性を生ずることを報告していましたが、今回の研究ではそのモデルを用いて、ALS の病態を改善する因子、すなわち治療薬の候補となる分子を探索しました。
- オートファジーおよび核細胞質輸送に関与する蛋白質である VCP (注 4) が、ALS モデルショウジョウバエの運動障害と運動神経細胞の障害(変性)を発現量依存性に修飾することを明らかにしました。
- これまで根本治療薬がない難病であった ALS に対する新しい治療法の開発につながる事が期待されます。
- 本研究成果は、平成 23 年度に京都工芸繊維大学・京都府立医科大学・京都府立大学・京都薬科大学の 4 大学が協定を締結し、各大学の強みを活かした教育研究の連携事業を進めてきたところであり、今回、ショウジョウバエ研究と ALS 研究という異分野間における共同研究を両大学で行った成果を共同でプレスリリースするものです。

## 【ALS について：概要説明】

ALS は、古くはメジャーリーガーのルー・ゲーリックが罹患したことで有名ですが、(米国ではルー・ゲーリック病とも呼ばれます)、最近ではフジテレビの「僕のいた時間」という三浦春馬さん主演のドラマでも取り上げられ、ALS では手足の筋肉や呼吸に必要な筋肉が徐々にやせて力がなくなっていくという内容が放映されました。

ALS は原因不明の運動神経細胞(運動ニューロン)の障害によって全身の筋肉が進行性に萎縮・麻痺していき、一度発病すると常に進行性で、やがては全身の筋肉が侵され呼吸筋も働かなくなって、人工呼吸器を装着しなければ2~5年以内に死の転機を迎えてしまいます。また、人工呼吸器を装着すれば生きていくことは可能ですが、四肢の運動・会話・嚥下などは全く不可能であるにもかかわらず意識や痛覚は保たれているという極めて辛い状態を長期間経験しないとはいけません。このように非常に辛い神経難病であるにも関わらず、現在では進行を止める有効な治療法はなく、その開発が強く求められています。

### 1 研究の背景

近年、ALS の原因遺伝子が相次いで報告されており、その一つである *FUS* は RNA 代謝に関与するとされていますが、その生体内の役割は十分明らかにされておらず、したがってその異常を緩和できる治療法などは発見されていません。

京都府立医科大学分子脳病態解析学(神経内科学併任)の東助教・徳田教授らは、京都工芸繊維大学応用生物学部門・昆虫バイオメディカル教育研究センターとのショウジョウバエを用いた共同研究により、*FUS* のショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウン(KD)したショウジョウバエ・モデルを2012年に世界に先駆けて確立して報告しています。今回の研究では、このモデルショウジョウバエを用いて、その表現型を修飾する因子を幅広く探索することにより、ALS の発症や進行の新たなメカニズムの解明、ならびに効果的な根本治療法の開発につなげたいと考えました。

### 2 研究の内容

#### 1) 複眼原基特異的 *Caz*-KD ショウジョウバエの表現型を変化させる因子の大規模な探索

ショウジョウバエを用いたヒトの疾患モデル研究の常道として、形態変化の観察が容易なショウジョウバエの複眼特異的に変異遺伝子あるいはノックダウン(KD)遺伝子を発現させて、そのショウジョウバエと他の遺伝子に変異を有するショウジョウバエを交配させて、次の世代のショウジョウバエの複眼にどのような変化が生じるかを観察します。この方法により、モデルマウスやヒトを対象とした研究では不可能な迅速かつ大規模な候補遺伝子の探索(スクリーニング)が可能になります。我々も、まずは複眼原基特異的に *Caz*-KD をしたショウジョウバエを作製し、その表現型を指標として、様々な家族性 ALS の原因遺伝子に変異を有するショウジョウバエ系統とを交配し、次世代で観察される複眼の表現型が変化する系統をスクリーニングしました。そのような方法によって、我々は、ヒトの *VCP* という遺伝子のショウジョウバエホモログである *ter94* という遺伝子が、*Caz*-KD をしたショウジョウバエの複眼の形態に大きく影響を与えることを見出しました(図1)。

## 2) 神経特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエに対する *ter94* 遺伝子変異および過剰発現の効果の検討

次に我々は、1) の複眼原基特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエで認められた *VCP* 遺伝子の効果が、神経系とくに運動神経においても認められるか否かを、神経特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエで検討しました。ショウジョウバエの運動能力はハエが透明な実験用チューブの壁を登る能力(クライミング・アッセイ)で評価します。神経特異的 *Caz-KD* モデルでは、クライミング・アッセイで運動能力の低下が認められますが、この運動能力の低下は、*ter94* に変異を有するショウジョウバエとの交配により悪化し、*ter94* を過剰発現させたショウジョウバエとの交配で改善されました。また、後者では、神経特異的 *Caz-KD* モデルで認められた中枢神経系の神経細胞の核内における *Caz* 蛋白の異常な減少が改善されていました(図 2)。

## 3) *ter94* 遺伝子の過剰発現は神経特異的 *Caz-KD* ショウジョウバエの運動ニューロン変性を改善した

我々は、さらに 2) の運動能力低下の原因となっていると考えられる運動ニューロンの形態学的な変化を検討しました。ショウジョウバエでは、神経筋接合部という運動神経の終末とその神経が支配している筋肉が接している部分を観察することで、運動ニューロンの変性(形態学的な異常)の有無を検査することができます。運動神経終末の短縮やシナプス数の減少などの運動ニューロン障害を示す形態異常は、*ter94* 遺伝子の変異系統との交配により悪化し、*ter94* 過剰発現系統との交配で改善されることを明らかにしました(図 3)。

### 3 まとめと今後の展開

今回の研究成果により、オートファジーおよび核細胞質輸送に関与する蛋白質である *VCP* が、ALS モデルショウジョウバエの運動障害と運動ニューロンの変性を発現量依存性に修飾することが明らかになりました。本研究は、ヒトの疾患である ALS に関して実際の臨床データから得られる知識・経験とヒト ALS の最新の分子遺伝学の情報を蓄積している京都府立医科大学分子脳病態解析学講座・神経内科学講座とショウジョウバエの分子遺伝学とヒト疾患研究への応用に多大な実績を有している京都工芸繊維大学応用生物学・昆虫バイオメディカルセンターとの大学・学部の垣根を超えた共同研究の成果であり、まさに本学もそのメンバーである 4 大学連携事業から生まれた研究成果です。また、今回の ALS モデルショウジョウバエは、今後はさらに、他の様々な遺伝子変異を有するショウジョウバエ系統との交配による疾患の病態機序解明のための研究および候補薬剤のスクリーニングなどの応用研究にも使用することが可能ですし、また、このようなショウジョウバエ研究は、さらに、ALS 以外の神経難病の研究でも行うことができます。そのような研究の基盤となる京都府立医科大学分子脳病態解析学講座と京都工芸繊維大学昆虫バイオメディカルセンターとの共同研究の体制(研究のための費用・設備の相互利用や研究員の交流など)は、既にこれまでの共同研究によって確立されています。今回の ALS モデルでは、近い将来の具体的な目標としては、*VCP* 自体およびその活性を調節する因子がこれまでには存在しなかった ALS の根本治療薬の開発につながる可能性が期待できます。

## 【用語解説】

### (注1) FUS

Fused in Sarcoma の略で別名は translated in liposarcoma (TLS)。FUS は RNA の代謝に関与している蛋白質で、2009 年に家族性 ALS の約 4~5% および一部の孤発性 ALS 症例は、FUS の遺伝子変異が原因であることが示された。ショウジョウバエには、ヒトの *FUS* 遺伝子と相同な遺伝子 *Caz* が存在し、我々は世界に先駆けて *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエを作成して、それがヒトの ALS の運動障害と運動ニューロンの変性を再現することを 2012 年に報告している。

### (注2) ショウジョウバエ・ホモログ

ホモログとは、構造が似ているタンパク質、遺伝子を示す用語である。例えば、ヒトの *FUS* 遺伝子と構造が似ている *Caz* という遺伝子がショウジョウバエには存在する。この場合は、「*Caz* は *FUS* のショウジョウバエホモログである」という。

### (注3) ノックダウン

ここでいうノックダウンは遺伝子ノックダウンのことをいう。遺伝子ノックダウンとは、特定の遺伝子の転写量を減少させる操作を指すことが多いが、翻訳を阻害する操作についても用いられる。ノックアウトマウスなどの遺伝子そのものを破壊する遺伝子ノックアウトとは異なり、遺伝子ノックダウンでは遺伝子の機能を大きく減弱させるものの完全には失わせない。

### (注4) VCP

VCP (Valosin-containing protein) は、Valosin と名付けられた蛋白質の前駆体としてクローニングされた蛋白質である。VCP は、二つの特徴的な ATP 結合領域をもつ AAA (ATPase associated with various cellular activities) ファミリーに属する ATP 分解酵素 (ATPase) で、6 量体を形成して ATPase の活性を発揮することが示されている。封入体筋炎および骨 Paget 病に ALS が合併する常染色体性優性遺伝性の多系統タンパク質症という疾患の原因遺伝子として VCP 遺伝子が同定されている。

<参考図>

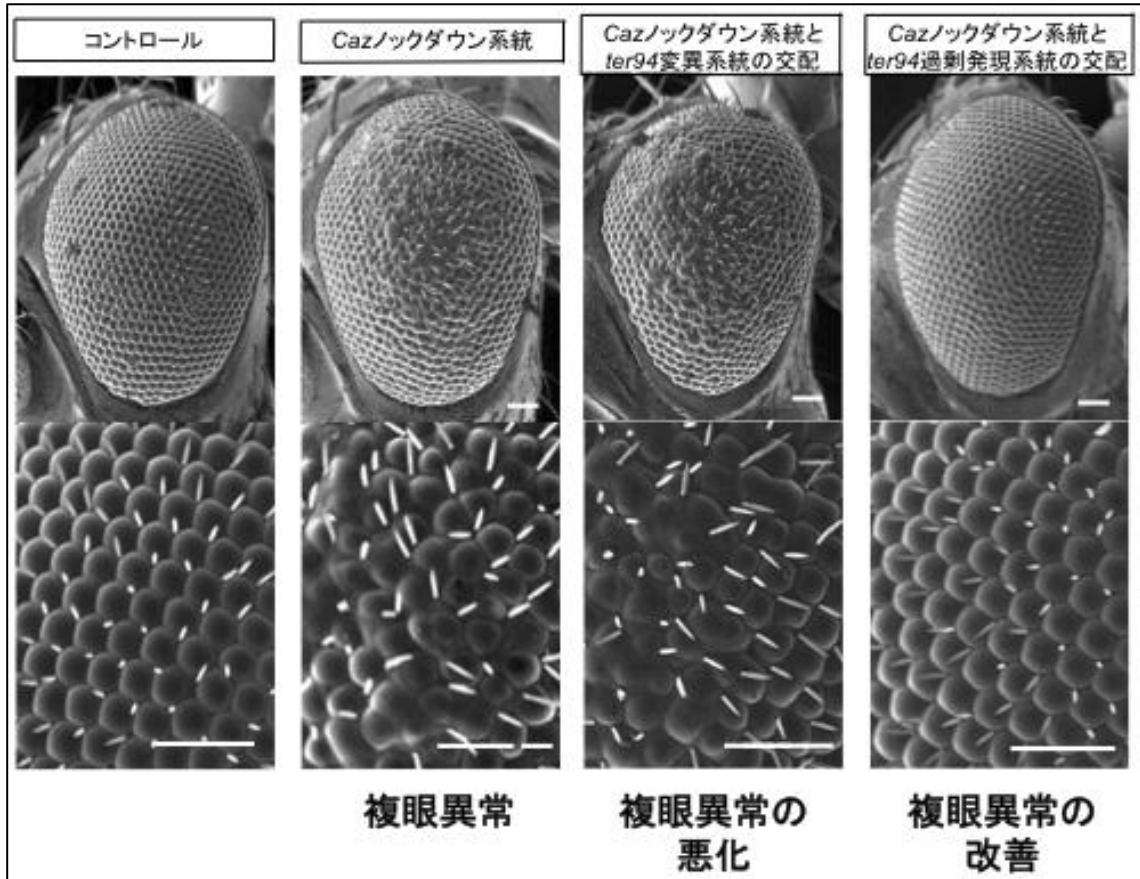


図 1 : *Caz*-KD の複眼形態異常とそれに対する *ter94* 遺伝子の効果

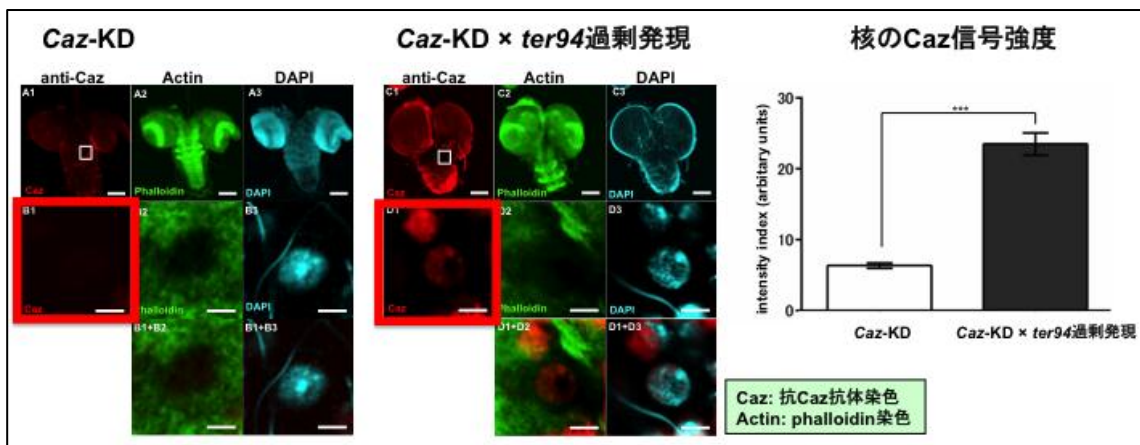


図 2 : *Caz*-KD による神経細胞の核内の *Caz* 染色性の低下とその *ter94* 過剰発現による改善

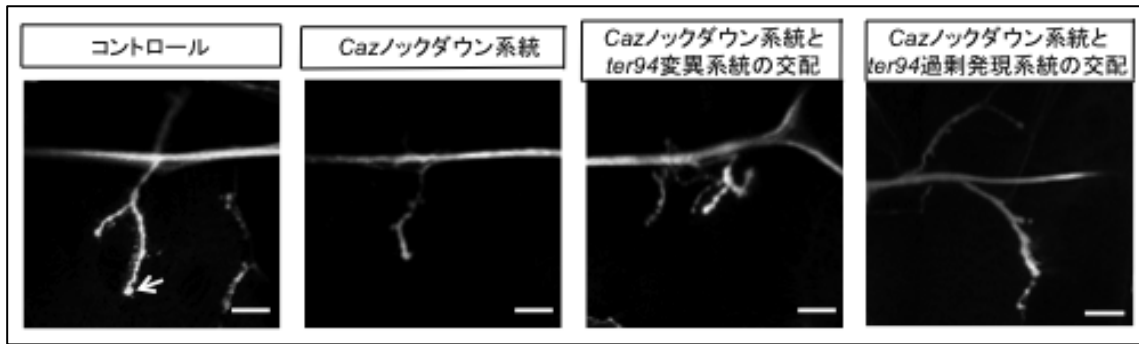


図3 : *Caz*-KDによる運動神経終末の形態とそれに対する *ter94* 遺伝子変異および *ter94* 遺伝子過剰発現の効果

### ○論文名

Identification of *ter94*, *Drosophila VCP*, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila FUS*.

### ○ジャーナル名

Human Molecular Genetics. 2014 Feb 18. [Epub ahead of print]

Impact Factor=7.692

### ○著者

Azuma Y, Tokuda T, Shimamura M, Kyotani A, Sasayama H, Yoshida T, Mizuta I, Mizuno T, Nakagawa M, Fujikake N, Ueyama M, Nagai Y, Yamaguchi M (以上、全員記載)

### 問い合わせ先

#### 【研究について】

○京都府立医科大学 分子脳病態解析学 徳田 隆彦 (とくだ たかひこ)  
075-251-5793

○京都工芸繊維大学 大学院工芸科学研究科  
生命物質科学系応用生物学部門 染色体工学  
昆虫バイオメディカル教育研究センター長 山口 政光 (やまぐち まさみつ)  
075-724-7781

#### 【その他：大学広報部門】

○京都府立医科大学 研究支援課 北村有希子・寺島祐一 075-251-5208

○京都工芸繊維大学 評価・広報課広報室 中道秀久 075-724-7043