

＜シンポジウム 35—3＞運動ニューロン疾患の分子病態の解明と治療開発への展望

ALS における軸索輸送の役割 —dynactin-1 を標的とした孤発性 ALS モデルの開発—

田中 章景 池田 建介 祖父江 元

(臨床神経 2011;51:1189-1191)

Key words : 筋萎縮性側索硬化症, 軸索輸送, ダイナクチン-1, 疾患モデル

はじめに

孤発性 ALS の病態仮説には、酸化ストレス、グルタミン酸毒性、軸索輸送障害、ミトコンドリア障害など様々なものが知られている。これらは、おそらく複雑な分子機構を通じてどこかでつながっていると考えられるが、その全貌はまだ解明されていない。このうち軸索輸送障害については、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病においても病態への関与が示唆されており、神経変性にとってきわめて重要な意義を有すると考えられる¹⁾。本稿では ALS の病態における軸索輸送障害について概説し、これに基づく疾患モデルの開発について概説する。

家族性 ALS における軸索輸送障害

家族性 ALS のうちもっとも頻度の高い SOD1 遺伝子変異を有する SOD1 マウスモデルにおいて slow axonal transport の障害はもっとも早期に表れる変化の一つであり²⁾、これにより neurofilament やミトコンドリアなどの膜様構造物が軸索に蓄積する³⁾。SOD1 マウスにおける軸索輸送障害の機序として、変異 SOD1 のミスフォールディングにより、軸索輸送機構に直接的または間接的に障害を与える可能性が指摘されている。すなわち、変異した SOD1 に起因するミトコンドリア障害によって、軸索輸送にかかわるモータータンパクへの ATP 供給が減少することで軸索輸送障害が生じる¹⁾。一方、運動ニューロンに隣接して存在するグリアからの tumor necrosis factor- α (TNF- α) シグナルなどの炎症性シグナルによって、モータータンパクの一つである kinesin がリン酸化され、その機能が阻害されることで軸索輸送に障害をおこすことも報告されている¹⁾。

一方、軸索輸送に直接関与するモータータンパクをコードする遺伝子の変異により、運動ニューロン障害が生じることも明らかになっている。その一つ、cytoplasmic dynein は、微小管に沿った逆行性の輸送を司るもっとも重要な分子モーターであり、小胞体からゴルジ体へのタンパク輸送などにも

かかわっている。cytoplasmic dynein の heavy chain にヘテロで変異を有するマウスは、運動ニューロンの脱落により筋力低下、筋萎縮を呈する⁴⁾。

また、dynein と結合しその機能を活性化させるモータータンパクとして dynactin が知られている。dynactin は真核生物において広範な組織に発現しており、主として逆行性軸索輸送にかかわっているが、順行性輸送においても重要な役割を果たす。dynactin は少なくとも 10 個のサブユニットからなるタンパク複合体であり、p45 (Arlp1), p50 (dynamitin), p150glued といったサブユニットから構成されている。このうち、p150glued は dynactin の中でもっとも重要なコンポーネントであり、このタンパクをコードする遺伝子が dynactin-1 である。この dynactin-1 における 59 番目の glycine が serine に変異した G59S 変異が常染色体優性遺伝性 ALS の原因となることが報告されている⁵⁾。この疾患は、北アメリカの家系で報告され、緩徐進行性の下位運動ニューロン症状が特徴である⁵⁾。dynactin-1 の変異部位は N 末の glycine-rich (CAP-Gly) ドメインに存在するが、その部位は p150glued が微小管と直接結合する場所である。

dynactin-1 変異による家族性 ALS のモデル動物としての p150glued G59S ノックインマウスは、ホモ接合体では胎生致死となるが、ヘテロ接合体では 10 カ月齢で神経筋接合部にシナプス小胞蛋白や細胞骨格タンパクが蓄積し、運動ニューロンの脱落、反応性アストログリオーシスを示す⁶⁾。一方で、ヒト p150glued を発現するトランスジェニックマウスの作成もおこなわれている⁷⁾。このマウスでは運動ニューロン変性が生じるが、小胞輸送の障害、軸索腫大、軸索終末部の変性が生じる⁷⁾。また、このマウスでは神経細胞内への封入体形成もみられている。このように、モータータンパクの変異による運動ニューロン疾患において、軸索輸送障害が生じることは想像に難くない。

孤発性 ALS における軸索輸送障害

一方、孤発性 ALS 運動ニューロンにおいて軸索輸送障害が生じる機序については、これまで明らかにされていない。われ

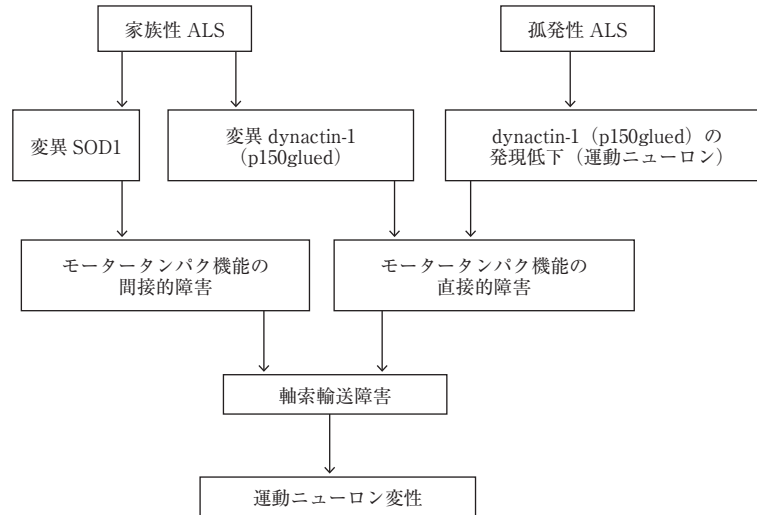


Fig. 1 ALS の軸索輸送障害.

われは、レーザーマイクロダイセクション法と cDNA マイクロアレイ法を組み合わせた網羅的な遺伝子発現解析により、孤発性 ALS 運動ニューロン特異的に発現上昇を示す 52 遺伝子、発現低下を示す 144 遺伝子を同定している⁸⁾⁹⁾。次に、これらの発現動態を様々な病期の孤発性 ALS 脊髄において神経変性マーカーとの関係で詳細に検討したところ、ニューロフィラメントの蓄積などに先立った神経変性過程の上流で発現変化をきたしている遺伝子として dynactin-1 を同定した¹⁰⁾。

そこで、われわれは dynactin-1 の運動ニューロンにおける発現低下を再現することで、孤発性 ALS の病態を反映する動物モデルの開発をおこなっている。コリン作動性運動ニューロン特異的なプロモーターである *acr-2* 支配下に、ヒト dynactin-1 の相同体である *dnc-1* を標的とした shRNA を発現可能なベクターを作成し、野生型線虫にマイクロインジェクションし *dnc-1* ノックダウン線虫を作成した。*dnc-1* ノックダウン群はコントロール群に比して、生存率の短縮、首振り回数の低下、水中でのむち打ち回数の低下がみとめられた。さらに運動機能障害が重篤な個体では *coiler uncoordinated* の表現型がみとめられた。これは、コリン作動性運動ニューロンの VA ニューロンの正常なシナプス形成に必須である *unc-4* 遺伝子の種々の変異体で出現する表現型であり、運動ニューロンの機能障害と変性を示唆する所見である。また、運動ニューロンの軸索には電顕上、渦巻様構造物の形成がみとめられ変性が生じていた。次に軸索輸送についての検討をおこない、シナプス小胞関連蛋白 *synaptobrevin-1* の動きを time-laps imaging で観察したところ輸送障害が明らかとなった。

おわりに

本研究で作成した dynactin-1 ノックダウン線虫の解析により、孤発性 ALS の病態のうち、軸索輸送障害が運動ニュー

ロンにおける dynactin-1 の発現低下に起因することが示唆された (Fig. 1)。今後、dynactin-1 ノックダウンモデルを使って軸索輸送障害から神経変性にいたる機序を解明していくことが重要と考えられる。

文献

- 1) De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, et al. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 2008;31:151-173.
- 2) Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, et al. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:20523-20528.
- 3) Sasaki S, Warita H, Abe K, et al. Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol* 2005;110:48-56.
- 4) Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, et al. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 2003;300:808-812.
- 5) Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 2003;33:455-456.
- 6) Chevalier-Larsen ES, Wallace KE, Pennise CR, et al. Lysosomal proliferation and distal degeneration in motor neurons expressing the G59S mutation in the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet* 2008;17:1946-1955.
- 7) Laird FM, Farah MH, Ackerley S, et al. Motor neuron disease occurring in a mutant dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking. *J Neurosci* 2008;28:1997-2005.
- 8) Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, et al. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2005;57:236-251.

- 9) Tanaka F, Niwa J, Ishigaki S, et al. Gene expression profiling toward understanding of ALS pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1086:1-10.
- 10) Jiang YM, Yamamoto M, Tanaka F, et al. Gene expressions specifically detected in motor neurons (dynactin 1, early growth response 3, acetyl-CoA transporter, death receptor 5, and cyclin C) differentially correlate to pathologic markers in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:617-627.

Abstract

Role of axonal transport in ALS

Fumiaki Tanaka, M.D., Kensuke Ikenaka, M.D. and Gen Sobue, M.D.
Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine

Proposed hypothesis for pathomechanisms of sporadic ALS include oxidative stress, glutamate toxicity, axonal transport defects, mitochondrial impairment and so on. Although these mechanisms may be interrelated mutually, the whole picture has not been clarified. As for axonal transport defect, it is also prominently involved in the pathogenesis of many major human neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease and Parkinson's disease, suggesting a crucial role of axonal transport in maintaining the normal neuronal function. In mutant SOD1 transgenic mice, the most popular disease model of familial ALS, the mutant SOD1 selectively associates with and damages mitochondria, leading to defect of axonal transport because of diminished ATP fuel supply for the molecular motors such as kinesin family or dynein/dynactin complex. Furthermore, the finding that mutations in the dynactin subunit p150Glued cause familial ALS demonstrates a direct role of molecular motor dysfunction and axonal transport defects in ALS. On the other hand, the mechanism of axonal transport impairment in sporadic ALS has been elusive. We have previously demonstrated that gene expression of dynactin subunit p150Glued (dynactin-1) is down-regulated in motor neurons of sporadic ALS patient from the early stage of neurodegeneration. In this article we review the role of axonal transport in the pathogenesis of ALS.

(*Clin Neurol* 2011;51:1189-1191)

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, axonal transport, dynactin-1, disease model
