

2. 研究経過及び成果

1. 遺伝子解析および遺伝子異常による機能解析の結果

最近発見された *MATR3*, *ERBB4*, *CHCHD10* 遺伝子について、孤発性 ALS 患者で解析した結果、*ERBB4* 遺伝子に新規の 3 変異を同定した。*ERBB4* はがん関連遺伝子でもあり、リン酸化を受けて、シグナル伝達の役割を担う。変異蛋白をコードするプラスミドを構築し、神経様の SH-SY5Y 細胞にトランスフェクションにより発現させた結果、3 つの変異とも自己リン酸化を受けることが判明した。しかし、このうち一つの変異では、蛋白発現量が低下していた。すなわち孤発性 ALS の分子機構として、少なくとも一部には *ERBB4* の機能低下が示唆された。一方、他の 2 変異では、あきらかな蛋白発現量の低下はなかった。

線維芽細胞を提供した患者を中心として、既知遺伝子の解析を行った。その結果、1 例で *FUS* 遺伝子の変異を同定した。また、ALS として新規の遺伝子に 3 例の変異を同定し、報告した (Neurology Genetics 2018 in press)。

2. iPS 細胞を用いた ALS 細胞モデル解析

p62 の変異を有する ALS 患者の iPS 細胞を神経細胞に分化し、ヒト細胞の疾患モデルを構築した。蛋白分解機構や細胞内シグナリング解析を行い、ユビキチンプロテアソームまたはオートファジーの促進・抑制剤、さらに酸化ストレスや抗酸化剤などにより細胞の形態・機能障害、p62 や VCP その他関連蛋白の凝集観察を検討した。オートファジー促進作用のあるラパマイシン、その他判明しているオートファジーの促進剤 (amiodarone, valproate,) などを用いて、ALS 患者の iPS 細胞由来神経細胞における細胞障害 (Hoechst/PI アッセイ)、神経突起伸長への影響や p62, ubiquilin2, その他蓄積蛋白の発現量 (免疫染色) を検討した。その結果、一部のオートファジー促進薬と抗酸化剤により、p62 の蓄積・凝集は減少した。ただし、valproate では細胞障害が強く評価が困難であった。また、より低濃度では p62 凝集の改善は見られなかった。細胞のシグナル解析であるが、p62 と ubiquilin2 の共凝集は観察されなかった。

ALS は運動ニューロン変性を主病変とする。認知症や自律神経症状も出現することがあり、一般的な神経への分化による実験結果は重要な知見ではある。しかし、運動ニューロンへ分化を行うことで、より中心的な病態への解析モデルとなる。そこで正常対照者由来の iPS 細胞から運動ニューロンへの分化を行い、成功した。細胞は、運動ニューロンのマーカー蛋白であるコリンアセチルトランスフェラーゼが陽性となった。患者細胞でも誘導が可能であったが、細胞の維持が困難であった。

3. 病理組織の解析

VCP 遺伝子異常を有する ALS 患者の剖検神経組織に対して、ALS の原因蛋白に対する抗体を用いて凝集蛋白の解析を行った。その結果、原因蛋白の一つである TDP43 に対する抗体を用いた免疫染色にて、ALS の病理マーカーである Skein-like inclusion が観察された。細胞質のみならず、核内への凝集が観察された。また、脊髄神経および脳幹神経にも同様の所見が観察された。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

2018 年度からは、運動ニューロンに iPS 細胞を分化誘導し、運動ニューロンの分化に成功しており、それを用いて p62 変異関連 ALS あるいは VCP 関連 ALS について、病態の解明と治療薬剤の探索を行っている。また、新規に発見した ALS の原因遺伝子異常を有する患者の iPS 細胞は樹立されており、そちらに対しても同様の解析を行う。また、それら異なる原因による ALS における共通した治療薬の開発も目指す。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日 (予定を含む)
Neurol Genet	雑誌	2018 年予定
Cerebellum	雑誌	2018 年 6 月 19 日
Eur Neurol	雑誌	2017 年 7 月 24 日

Neurol Clin Neurosci	雑誌	2017年8月7日