

## 30-5 神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究

荒木 敏之

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 疾病研究第五部

### 研究目的

多くの神経変性疾患においては、シナプス～軸索の変性が細胞体の死に先んじて見られ、軸索変性は神経細胞全体に及ぶ変性の初期変化であるとも考えられる。本研究課題は、神経保護的疾患治療の実現を目指し、研究代表者らが研究対象としてきたシナプス～軸索の変性をはじめとする神経疾患の初期過程における最適な治療標的の同定と治療モデル作出を目的とする。

研究代表者グループは、軸索構造の安定性維持・軸索変性の進行を司る細胞内反応機序に関して研究を進め、①NAD代謝に着目した強力な神経保護法の開発、②神経変性の最初期反応の同定、③神経突起形態制御メカニズムの神経発達障害・神経変性疾患における意義に関する検討を行う。センター内参加者は、膜透過型オートファジー依存的核酸・蛋白分解系の関与(株田)、Eomes陽性ヘルパーT細胞(Eomes+Th細胞)の病態への寄与(大木)デュシェンヌ型筋ジストロフィー原因分子であるジストロフィンの中枢神経系における機能(青木)などそれぞれの側面から神経変性疾患の病態メカニズムの解明に基づく変性抑制による治療法開発を目指す。外部研究機関研究者(大野)は3D超微細構造観察に高い技術を有しており、共同研究・技術支援による研究開発の加速を図る。

### 研究組織

#### 主任研究者

荒木 敏之 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第五部 部長

#### 分担研究者

青木 吉嗣 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 部長

大木 伸司 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部(免疫研究部) 室長

株田 智弘 (国研) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部 室長

大野 伸彦 自治医科大学医学部解剖学講座 教授

### 研究成果

本研究班では、班会議のほか、研究代表者を中心に研究に関する議論・情報交換を相互に頻繁に行い、研究の推進に努めた。特に、株田・荒木はオートファジー・細胞内蛋白分解系に関する研究についての技術的課題克服に関して、青木・荒木はモデル動物の発達障害フェノタイプの解析技術とメカニズム解析戦略について協力を行った。大木・荒木は、発達過程のシナプス数調節における炎症・免疫機序の関与・Th細胞の機能の研究における神経変性疾患モデル動物の利用に関して相互に協力を行った。大野は本研究班における形態的解析のサポートを行った。これらの協力によって実施された研究の主要な成果は以下の通りである。

研究代表者グループは、NAD代謝に着目した強力な神経保護法の開発課題について、AMED橋渡し研究(シーズA)に続いて、抗がん剤によって惹起される神経原性疼痛の予防的治療を対象とする「慢性の痛み解明研究事業」の研究課題としても採択された。ベンチャー企業・東京薬科大共同研究者とも協力し、薬剤候補となるニコチンアミド

類縁化合物 130 以上の合成・神経保護活性測定を行った結果、毒性が低く十分な有効性を示す化合物の中からリード化合物候補として、構造的特徴の異なる 5 化合物を選定し、マウスへの抗がん剤投与による神経変性および神経原性疼痛に対する治療効果の検討を開始した。これまでに、培養細胞モデルにおいて最も有力と考えられた 1 化合物に関して、疼痛関連行動と痛覚伝導路での Erk リン酸化・c-Fos 発現抑制効果を観察し、有効性が示唆された。また、化合物の作用機序に関する検討を行い、投与化合物が細胞内の NAD 合成反応系により代謝されることによって、SARM1 (神経変性開始に伴って NAD を分解し、神経変性を促進する酵素) を阻害する分子に変換されて有効性を発揮しているものと考えられた。

また研究代表者グループは、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換体である NHE5 の欠損マウスが自閉症 (ASD) 様社会性行動異常を示し、NHE5KO 神経細胞が細胞レベルでも他の ASD モデルやヒト ASD 患者で観察される未熟な樹状突起形態を認めることを示した。NHE5 機能低下と ASD 様フェノタイプを関連付けるメカニズムに関し、神経細胞の Endosome/Lysosome に発現する NHE5 が、シナプス関連分解を行うオートファジーの活性を制御しており、その異常によってシナプスの過剰残存による神経活動の興奮性・抑制性 (E/I) バランス異常が惹起されることが明らかとなった。さらに、妊娠マウスでのアンギオテンシン高値が、胎仔での NHE5 の分解による活性低下を誘発して ASD 様フェノタイプに繋がることを示したが、このメカニズムが、妊娠時高血圧が発達障害のリスク因子となる機序を説明する可能性がある。NHE5 遺伝子が存在する 16q22 の欠損は発達障害を示すことが知られているため、NCNP バイオバンク検体を用いて発達障害患者における NHE5 遺伝子変異の検索を行ったが、疾患と関連すると考えらえる変異の同定には至らなかった。

大木らは、多発性硬化症 (MS) のサブタイプである二次進行型 MS (SPMS) をプロトタイプとし、神経細胞障害性の Eomes 陽性 Th 細胞の神経変性病態への寄与を検討した。まず第一に、ヒト解析の結果から、患者末梢血中の Eomes+Th 細胞頻度が、SPMS 病態の進行度と連動してダイナミック

に変化することを明らかにした (論文投稿中)。MS 患者の末梢血中の Eomes+Th 細胞頻度と、他の複数の血中因子を組み合わせた統合データを用いて機械学習による MS サブタイプの判別を試みたところ、90%を超える精度で RRMS、安定期 SPMS、進行期 SPMS の判別が達成できることが明らかとなり、MS 補助診断プログラムの新規開発の可能性が示された。

また、Eomes+Th 細胞の生成に関わる中枢神経系の慢性炎症環境の解析から、Th 細胞とともに CNS 内に浸潤した B 細胞やその他の MHC class II 陽性細胞などの抗原提示細胞によって、慢性炎症環境下で産生する異所性プロラクチン (PRL) が、Th 細胞の Eomes 発現を誘導することを見出した (PNAS 2019)。一連の成果は、幅広い治療選択肢がある RRMS から、治療薬に乏しい SPMS への移行を抑制することで患者の QOL の確保を目指す予防法の開発に役立つ知見と考えられた。

更に、I 型 IFN (IFN-I) が、抗原提示細胞の異所性 PRL 産生を誘導することを見出し、慢性炎症環境下における IFN-I 産生細胞としてのミクログリアの重要性を明らかにした。Eomes+Th 細胞による神経細胞障害には、活性化に伴う細胞障害性プロテアーゼの放出が必要であるが、同細胞が認識する抗原の詳細は不明である。慢性炎症環境下で MHC class II 発現が顕著に亢進するミクログリアによる抗原提示を想定し、神経細胞やミクログリアが慢性炎症環境下で発現する未知タンパク質が、CNS 内の Th 細胞を活性化することを示した。さらにレトロトランスポソン LINE-1 がコードするタンパク質を、プロトタイプ抗原として同定した (論文投稿準備中)。

株田らは、膜透過型オートファジー機構の神経変性疾患の分子メカニズムや病態との関連を示した。リソソーム膜蛋白である SIDT2 は、核酸・蛋白をリソソーム内に取り込むトランスポータとして機能し、取り込まれた分子はオートファジー分解が誘導される。SIDT2 は G が連続する配列と結合しやすい。神経変性疾患のリピート病の多くがリピート RNA に G を含むことから、例えば CAG リピートの伸長したハンチンチン mRNA は野生型分子より分解されやすい傾向を示した。更に、SIDT2 は alphas-synuclein などの蛋白分解にも寄与

していることを示した。SIDT2KO マウスの脳内では  $\alpha$ -synuclein タンパク質量の上昇が観察された。SIDT2 は、恐らく「シャペロン介在型オートファジー」を担う新たな分子であるものと考えられる。

青木らは、DMD モデルマウスである mdx52 マウス (Dp427 欠損、Dp140 欠損)、mdx マウス (Dp427 欠損)、野生型マウスの比較解析を行い、mdx52 マウスでのみ ASD 様の社会性行動異常を認めた。mdx52 マウスの扁桃体基底外側核では、錐体神経細胞の mEPSC 頻度は低下すること、ペアパルス比の低下と mEPSC 異常を認めること、扁桃体 BLA シナプス前終末におけるグルタミン酸放出低下を認めることがわかり、ASD 様フェノタイプとの関連が示唆された。更にこれらの変化は、モルフォリノ核酸の脳室内反復投与によりエクソン 53 スキップを誘導することで改善することを示した。

大野らは、得意とするマイクローム組み込み式走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) による 3 次元超微形態解析技術や分子標識、光遺伝学などを組み合わせ、脱髄を含む髄鞘疾患を中心とする神経疾患モデルの微細構造観察から新たな軸索変性の治療および予防戦略へとつなげることを目指した研究を行った。具体的には、PLP4e<sup>-</sup>マウス (ミエリン蛋白である PLP4e のヘテロマウス) で見られる慢性脱髄において、脱髄の進行に伴って一過性のミトコンドリア数増加・サイズ減少、その後数の減少・サイズ増大が起こり、Mfn2 の発現増加によると思われるミトコンドリアと小胞体の接触部 (MAM) の密度 (ミトコンドリアの単位表面積あたりの MAM 面積) の顕著な増加が認められた。またこの際の Mfn2 の発現調節にはユビキチンリガーゼである MITOL が関与していることが明らかとなった。脱髄とは別の軸索変性モデルとして、光照射により活性化される非選択的陽イオンチャネルを発現させた神経細胞の軸索に光照射を行うことにより刺激領域を中心とした軸索変性を誘導できることを示し、このモデルを用いた観察を行ったところ、ミトコンドリア分裂蛋白である Drp1 の活性化を伴うミトコンドリアの断片化と、これによると思われる軸索内 Ca<sup>2+</sup> イオン濃度の一過性上昇を認め、この Ca<sup>2+</sup> イオン濃度上昇が軸索変性誘導

に寄与していた。

これらの観察に基づき、大脳皮質神経細胞に Drp1 のドミナントネガティブ変異蛋白を誘導性に発現させることができるモデルマウスを作成し、内包にリゾレシチンによる脱髄を惹起することによる軸索変性を誘導し、in vivo モデルにおけるミトコンドリア分裂の軸索変性進行における意義を検討している。これまでの短期間の観察結果では軸索の Swelling の有意な改善が示唆された。以上の結果は神経細胞における Drp1 の機能調節とミトコンドリアの分裂抑制が、脱髄に伴う運動機能障害や軸索変性の軽減に寄与すると考えられた。

## 分担研究報告書

(課題名) 神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究

(所属) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第五部

(氏名) 荒木 敏之

### 緒言

筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患においては、シナプス～軸索の変性が細胞体の死に先んじて見られ、軸索変性は神経変性の初期変化であるとも考えられる。我々はこれまでに軸索構造の安定性を維持する細胞内機構と、軸索変性を進行させる細胞内反応機序に関して研究を行ってきた。また一方で、NAD 代謝に着目し、製薬化学者との共同で Nicotinamide 類縁化合物を用いた強力な神経保護法の開発を進めている。本研究では、神経保護的疾患治療のための最適な治療標的の明確化を目的として、これまでにやってきた、軸索構造の安定性維持・軸索変性の進行を司る細胞内反応機序に関して研究を進め、①NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)代謝に着目した強力な神経保護法の開発、②神経変性の最初期反応の同定、③神経突起形態制御メカニズムの神経発達障害・神経変性疾患における意義に関する検討を行う。またこれまでに見出してきた神経保護化合物の最適化を進め、神経変性疾患のマウスモデルなど動物モデルにおける検証を行うことを目的とする。

### 方法

① Nicotinamide 類縁化合物による神経保護を目指した研究においては、東京薬科大学の共同研究者が合成した化合物の神経保護効果と NAD 分解酵素に対する阻害効果の検討をおこなった。

② Na-H 交換体蛋白ファミリーの一員である NHE5 の欠損モデルを用いて神経細胞内オートファジー制御を介した自閉症類縁疾患発

症における意義を検討した。

### 結果

① 今年度は、知財取得可能・低毒性・高活性などの観点から 5 種類の化合物を選定し、マウスを用いた in vivo CINP モデルにおける化合物の効果検証実験を実施した。検証は、組織学的検討(痛覚伝導経路に沿った c-Fos やリン酸化 Erk の発現亢進、軸索変性による皮神経の消失)、と、神経原性疼痛の行動試験として用いられる疼痛過敏試験を用いた。

化合物の作用機序評価に関しては、NAD 合成代謝反応系によるニコチンアミド類縁化合物の代謝の影響の評価を行った。培養細胞にニコチンアミド類縁化合物を投与することで得られる代謝物を分離・精製し、SARM1 の NAD 分解活性阻害効果を検討した結果、神経細胞内に取り込まれた化合物が生理的代謝経路によって代謝を受けて生じる反応産物が、神経保護に関与する可能性を示した

② NHE5 機能低下と ASD 様フェノタイプを関連付けるメカニズムに関し、神経細胞の Endosome/Lysosome に発現する NHE5 が、シナプス関連分解を行うオートファジーの活性を制御しており、その異常によってシナプスの過剰残存による神経活動の興奮性・抑制性

(E/I) バランス異常が惹起されることが明らかとなった。さらに、妊娠マウスでのアンギオテンシン高値が、胎仔での NHE5 の分解による活性低下を誘発して ASD 様フェノタイプに繋がることを示したが、このメカニズムが、妊娠時高血圧が発達障害のリスク因子となる機序を説明する可能性がある。NHE5 遺伝子が存在する 16q22 の欠損は発達障害を示すことが知られているため、NCNP バイオバンク検体を用いて発達障害患者における NHE5 遺伝子変異の検索を行ったが、疾患と関連すると考えられる変異の同定には至らなかった。

## 考察

① 神経保護的疾患化合物開発研究に関しては、引き続きモデル動物における保護効果の検討を進め、その結果を踏まえて化合物の最適化を継続することにより、開発と知財化を進める。

② Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換体である NHE5 の神経発達障害発症機序における意義に関しては、マウスモデルを中心に検討してきた「妊娠時高血圧が、NHE5 の発現低下を介して子どもの発達障害を惹起する」という機序がヒトにおいても成立しているのかを検討する。また、発達障害を惹起する興奮性・抑制シナプスのバランス異常が、オートファジーといういわば非特異的な細胞内分解系の異常からどのように起こるのかは、膜透過型オートファジー機構と疾患との関連にも通じる問題で、疾患発症機序の理解の上で非常に重要である。現在、オートファジー関連蛋白である LC3 が興奮性シナプス関連蛋白に選択的に結合して分解を誘導する、という可能性を検討している。

## 参考文献 (業績)

Klionsky DJ, et al.  
Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (4th edition)  
Autophagy 17(1) 1-382, 2021.

Wakatsuki S, Takahashi Y, Shibata M, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Araki T.  
Small non-coding vault RNA modulates synapse formation by amplifying MAPK signaling.  
Journal of Cell Biology. 220(2) e201911078, 2021.

Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H, Kurosawa T, Yoshimoto Y, Nakatani M,

Hitachi K, Yamaguchi H, Wakatsuki S, Araki T, Morita M, Yamada H, Toyoda M, Kanazawa N, Nakazawa N, Hino J, Fukada S, Tsuchida K.

Mesenchymally expressed Bmp3b maintains skeletal muscle integrity and reduction of its expression contributes to sarcopenia.

Journal of Clinical Investigation. 131(1) e139617, 2021.

Nagano S, Jinno J, Abdelhamid RF, Jin Y, Shibata M, Watanabe S, Hirokawa S, Nishizawa M, Sakimura K, Onodera O, Okada H, Okada T, Saito Y, Takahashi-Fujigasaki J, Murayama S, Wakatsuki S, Mochizuki H, Araki T.  
TDP-43 transports ribosomal protein mRNA to regulate axonal local translation in neuronal axons. Acta Neuropathol. (2020) 140: 695-713. doi: 10.1007/s00401-020-02205-y

## 神経・筋疾患の中樞神経障害に対する遺伝子 治療法開発

国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部  
青木 吉嗣

### 緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、DMD 遺伝子の変異により筋細胞膜から完全長ジストロフィン (Dp427) が欠損し、進行性の筋萎縮・筋力低下をきたす X 連鎖性の希少難病である。DMD 遺伝子からは、Dp427 やジストロフィン・アイソフォームの Dp140 が翻訳され、両者はいずれも脳に発現する。ゲノムワイド関連解析から、DMD は恐怖応答遺伝子としても知られる。特に Dp427 に加えて Dp140 が欠損した DMD 患者は自閉症スペクトラムを有意に伴い<sup>1</sup>、Dp140 は神経発達障害の遺伝子と関わる<sup>2</sup>ことから、DMD は自閉スペクトラム症の原因遺伝子候補と考えられる。これまで、DMD モデルマウスの行動や生理学実験では、Dp427 欠損の mdx マウスが主に解析されてきた。mdx マウスで認める恐怖・不安反応の増強や社会性行動異常は、扁桃体における錐体神経細胞 postsynaptic の Dp427 欠損が原因と考えられている<sup>3, 4</sup>。しかし、Dp140 の欠損により、認知・情動機能の異常が生じる神経生理基盤の詳細は未だ明らかではない。

本研究では、DMD モデルの mdx および mdx52 マウスを用いる。mdx マウス脳は Dp427 のみを欠損し、mdx52 マウス脳は Dp427 および Dp140 を欠損することから、両者を比較する事で、Dp140 の分子機能が明らかになると期

待される。

### 方法

1. DMD モデルの mdx および mdx52 マウス、野生型 C57BL/6J マウスを用いる。
2. 前述のマウスを対象に、恐怖・不安や社会性を対象とした行動解析を実施する。
3. 前述マウスの扁桃体を対象に、Dp140 の発現解析を実施する。
4. 前述マウスを対象に、社会性に重要な神経核である扁桃体・基底外側核における錐体神経細胞での電気生理学的解析および分子生物学的解析を実施する。

### 結果

1. 社会性行動試験では、mdx52 マウスは、初めて出会うマウスに迫り寄る時間が mdx と比べて有意に増加し、社会的コミュニケーション障害が示唆された。
2. Dp140 は、野生型と mdx23 マウスの扁桃体では発現し、mdx52 マウスの扁桃体では発現しないことをウエスタンブロットにより確認した。
3. 扁桃体・基底外側核における錐体神経細胞を対象に、whole-cell パッチクランプを実施したところ、mdx52 マウスでは、mdx マウスあるいは野生型と比べて、錐体神経細胞における神経活動の興奮性・抑制性シナプス後電流の振幅の比 (E/I バランス) が有意に低下し、mEPSC の頻度異常を認めた。
4. mdx52 マウス扁桃体では、シナプス前終末に局在する小胞型グルタミン酸トラ

ンスポーター発現レベルが有意に低下していた。

5. mdx52 マウスでは、mdx マウスあるいは野生型と比べて、扁桃体・基底外側核における paired-pulse ratio と微小興奮性シナプス電流の発火頻度が有意に低下していた。
6. モルフォリノ・アンチセンス核酸医薬を mdx52 マウスの脳室内に反復投与すると、扁桃体でエクソン 53 スキップ誘導により Dp140 が発現回復し、社会性行動異常と E/I バランス異常が改善した。

3. Sekiguchi M et al, Brain. 2009

4. Ralph Adolphs, Nature Reviews Neuroscience. 2003

## 考察

DMD で認める自閉スペクトラム症は、Dp427 および Dp140 の欠損に伴う扁桃体のシナプス異常が原因であること、Dp140 を扁桃体に発現回復することで自閉スペクトラム症を治療し得ることが示唆された。成果は論文投稿中である。

## 結論

Dp140 は、マウス扁桃体・基底外側核の錐体神経細胞シナプス前終末におけるグルタミン酸放出を制御することで、シナプスの興奮性バランスを保ち、社会的コミュニケーション能力の保持に関与すること、さらに前述の異常所見は Dp140 の発現回復により正常化することが示唆された。

## 参考文献

1. Felisari G et al, Neurology. 2000
2. Doorenweerd et al, Sci Rep. 2017

## 神経変性病態の形成過程における免疫細胞の動態研究

分担研究者 大木 伸司

国立精神・神経センター神経研究所  
疾病研究第六部

### 緒言

神経変性疾患の病態解明はいまだに不十分であり、各神経変性病態の異同すら不明である。我々は、神経変性を伴う二次進行型多発性硬化症（SPMS）の病態形成における神経細胞障害性の Eomes 陽性ヘルパーT 細胞（Eomes+Th 細胞）の関与を見出した。本研究では、慢性炎症環境下の中樞神経系（CNS）における Eomes+Th 細胞の生成機序、ヒト SPMS における同細胞依存性の病態機序の確認、および種々の神経変性疾患における同細胞の関与、を明らかにすることを目的とする。プロテインパッチ中心の神経変性病態の研究とは一線を画し、より根本的な病態機序解明を通じて、全く新しい疾患の理解につながる画期的な成果の取得を目指す。

### 方法

・慢性炎症環境下の CNS における Eomes+Th 細胞の生成機序；MS では、先行する自己免疫性病態が、繰り返す慢性炎症を誘導し、これが CNS 内の Eomes+Th 細胞の生成には必須である。病態下に CNS に浸潤する抗原提示細胞の相互作用を通じた、Th 細胞の Eomes 発現誘導機序を、SPMS モデルマウスを用いて解析し、神経変性病態を誘導する慢性炎症環境の分子基盤を明らかにする。

・SPMS の神経変性病態における Eomes+Th 細胞の病原性の検証；神経変性病態を伴う SPMS 患者の末梢血や死後脳を対象に、Eomes+Th 細胞の体内動態を詳細に解析し、動物モデルのデータとの相関を調べるとともに、臨床情報を参照して神経変性病態との相関を明らかにする。

・Eomes+Th 細胞依存性の神経変性病態の分子機序の解明：SPMS モデルマウスを対象として、Eomes+Th 細胞の体内動態、およびグランザイム B 放出を導く同細胞の活性化プロセスの分子機序解明を行う。とくに同細胞を活性化するプロトタイプ抗原の同定と性状解析を行い、同経路の抑制により神経変性病態の改善効果が得られるかどうかを、動物モデルを用いて検証する。

（倫理面への配慮）

ヒト試料を用いた研究は、被験者より書面による説明と同意確認（インフォームドコンセント）を取り、NCNP 内の倫理委員会の承認を得た上で、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に沿って進めた。動物実験にあたっては、NCNP 内の動物実験倫理問題検討委員会の承認を得て実施した。

### 結果

・慢性炎症環境下の CNS における Eomes+Th 細胞の生成機序；慢性炎症環境下の CNS に浸潤した B 細胞等の抗原提示細胞が異所性に産生するプロラクチンが、Th 細胞の Eomes 遺伝子を発現誘導することを見出し、同経路の阻害剤投与により、SPMS モデルマウスの神経変性病態が有意に改善することを明らかにした



(PNAS 2019)。

・SPMS の神経変性病態における Eomes+Th 細胞の病原性の検証；末梢血 Eomes+Th 細胞頻度は SPMS 患者のみで高値を示し、この Eomes 頻度が患者の神経変性病態の進行度と有意に相関することを明らかにした。SPMS 患者の死後脳解析から、Eomes+Th 細胞が CNS 内の広範囲に高頻度に分布することが示された (PNAS 2021)。

・Eomes+Th 細胞依存性の神経変性病態の分子機序の解明：活性化抗原プロトタイプの探索を進めた結果、慢性炎症環境下で異所性に発現するレトロトランスポゾン LINE-1 由来 ORF1 タンパク質の関与を見出した。同分子への曝露により CNS 由来 Th 細胞が活性化すること、LINE-1 活性化を阻害する薬剤の投与により、神経変性病態が改善することが示された (論文投稿準備中)。

## 考察

本研究の結果から、慢性炎症環境下の CNS における、異所性プロラクチン依存性の Eomes+Th 細胞生成、SPMS の神経変性病態と同細胞による神経細胞障害の正の相関、CNS 浸潤 Th 細胞の活性化抗原としての LINE-1 由来 ORF1 タンパク質の役割が明らかとなった。神経変性病態の全容解明につながる本質的な分子機序が示された。

## 結論

SPMS の神経変性病態の一連の形成過程に関わる分子および細胞の詳細な体内動態を詳細に明らかにした。今後、より一般的な神経変性

疾患の免疫依存性病態機序の全容解明に向かう上で、必要十分な成果を得た。

## 参考文献

- 1) Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4+ T cells in secondary progressive multiple sclerosis., Ben J. E. Raveney, Wakiro Sato, Daiki Takewaki, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 118(11) e2021818118 (2021)
- 2) Eomes-expressing T-helper cells as potential target of therapy in chronic neuroinflammation., Shinji Oki, Neurochem. Int. 130 104348, 1-8 (2019)
- 3) Extrapituitary prolactin promotes generation of Eomes-positive helper T cells mediating neuroinflammation., Chenyang Zhang, Ben J. E. Raveney, Hirohiko Hohjoh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 116(42) 21131-21139 (2019)

## 分担研究報告書

(課題名) 膜透過型オートファジー機構に基づく神経変性疾患の病態解明

(所属) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第四部

(氏名) 株田 智弘

## 緒言

多くの神経変性疾患においては、タンパク質や RNA の細胞内への蓄積が神経変性を引き起こすことから、病態解明や治療法開発のために細胞内分解の理解は極めて重要である。リソソームによる細胞内分解機構であるオートファジーのうち、RNautophagy は我々が以前新たに見出した膜透過型オートファジー経路であり、RNA が直接的にリソソームに取り込まれ分解される。SIDT2 はリソソーム膜タンパク質であり、RNA のリソソーム内への輸送において重要な分子である。SIDT2 は、RNA transporter として知られる線虫 SID-1 の脊椎動物オルソログであることから、RNautophagy において RNA transporter として機能すると考えられる。本研究では RNautophagy と神経変性疾患の分子メカニズムや病態との関連性を明らかにすることを目的とする。さらに、タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解されるという新規のオートファジー経路も見出しつつあり、これについても同様に解析を進める。

## 方法

(RNA 分解について)

RNautophagy の際に SIDT2 と基質核酸が結合するかどうかについては不明であったため、プルダウンアッセイにより結合性の解析を行なった。また結合が確認された疾患関連 RNA についてその分解とタンパク質量への SIDT2 過剰発現の影響を解析した。

(タンパク質分解について)

培養細胞としては、Mouse embryonic fibroblast および Neuro2a 細胞を用いた。リソソーム膜に存在するタンパク質トランスポーター候補分子 SIDT2 について、過剰発現および siRNA によるノックダウンを行なった。それぞれの細胞について、パルス・チェイス・アッセイや Tet-off システムを用いて単位時間におけるタンパク質の分解を追跡した。リソソームへのタンパク質の直接取り込みに関しては、上記細胞から調製した単離リソソ

ームを用いて実験を行なった。

## 結果

(RNA 分解について)

SIDT2 の細胞質領域 (CD) を介して SIDT2 が RNA と直接結合すること、ハンチントン病の原因である *HTT* の mRNA が結合することを見いだした。また、この結合は CAG リピート依存的であった。細胞レベルの実験では、*HTT* mRNA の分解が SIDT2 過剰発現により促進され、*HTT* mRNA は RNautophagy の基質となり分解された。さらに、SIDT2 の過剰発現により細胞内の変異型 *HTT* タンパク質の量を低減できることを明らかにし、その低減効果には SIDT2 と *HTT* mRNA の結合が重要であることを示した。

(タンパク質分解について)

単離リソソームを用いた実験の結果、ATP 依存的にタンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解され、新規のオートファジー経路を発見した。SIDT2 の過剰発現およびノックダウンにより、細胞内におけるタンパク質分解や単離リソソームにおけるタンパク質分解が、それぞれ増加、減少した。また、SIDT2 を介した分解は、マクロオートファジーやシャペロン介在性オートファジーなど、既知の分解経路とは異なることを確認した。これらの結果から、SIDT2 が新規経路に重要であることが判明した。また、パーキンソン病などの原因として知られる  $\alpha$ -synuclein タンパク質は新規経路の基質となることを見いだした。

## 考察・結論

SIDT2 の細胞質側ドメインは核酸結合能をもち、この結合を介して核酸をリソソーム内へ取り込む。

タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解されるという新規のオートファジー経路を発見した。この経路に重要なリソソーム膜タンパク質 SIDT2 を同定した。

膜透過型オートファジーの活性化は、新たな神経変性疾患の治療法となる可能性がある。

## 参考文献 (業績)

1. Hirayama K, Fujiwara Y, Terada T, Shimizu K, Wada K, \*Kabuta T. Virtual screening identification of novel chemical inhibitors for aberrant interactions between pathogenic mutant SOD1 and tubulin. *Neurochem Int.* 2019;

- 126: 19–26.
2. Hase K, Contu VR, Kabuta C, Sakai R, Takahashi M, Kataoka N, Hakuno F, Takahashi SI, Fujiwara Y, Wada K, \*Kabuta T. Cytosolic domain of SIDT2 carries an arginine-rich motif that binds to RNA/DNA and is important for the direct transport of nucleic acids into lysosomes. *Autophagy*. 2020; 16(11): 1974–1988.
  3. Klionsky DJ..., Kabuta T, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*. 2021; 17(1): 1–382.

## 軸索変性に伴うオルガネラ相互作用の変化 とその制御機構の解明

自治医科大学医学部  
解剖学講座組織学部門  
大野 伸彦

### 緒言

軸索変性にミトコンドリアをはじめとするオルガネラの動態と機能が重要な役割を果たしている。しかしその動態の制御メカニズムや、機能維持を担うオルガネラ間の相互作用の軸索における生理的な分布と構造的な特性、そして軸索変性を伴う病態下における変化は、不明な点が多く残されている。本研究では、特にミトコンドリアと小胞体、そしてそれらの間の相互作用 (Mitochondria associated membranes, MAM) に焦点を絞り、マイクローム組み込み式走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) による 3 次元超微形態解析技術や分子標識、光遺伝学などを組み合わせ、脱髄を含む髄鞘疾患を中心として、病態における個々のオルガネラと相互作用の超微細構造変化とそれらの関連分子による制御機構を明らかにする。

### 方法

昨年度までの結果をふまえ、生体内においてミトコンドリアの分裂を細胞特異的かつ可逆的に抑制することが可能なマウスを使った研究を継続した。特に、大脳皮質および海馬の興奮性神経細胞においてミトコンドリア分裂を抑制可能な系統のマウスの作出・解析を行った。その過程でまず、脱髄に伴う神経障害とその回復過程における影響を調べるため

に有用なモデルの確立を目指した。この目的で、従来から一過性の脱髄を惹起することが知られているリゾレシチンを運動野からの神経伝導路が通過する内包に注射することで、内包の脱髄と運動機能障害を惹起するモデルの確立を目指した。

また、神経特異的ミトコンドリア分裂抑制マウスにおけるミトコンドリアの体積増加が、ミトコンドリアと ER の接触面積に及ぼす影響を解析した。この目的で、大脳皮質興奮性神経細胞の軸索が多く投射する脳梁を対象として、ミトコンドリアと ER の接触面積を測定・比較した。

### 結果

内包注射モデルでは、リゾレシチン注射後 5~10 日前後で Wire hanging test において運動機能の障害が認められ、同時期の脳組織の解析では髄鞘の破壊と軸索障害マーカーの発現も認められた。そして、注射後 2~3 週かけて再髄鞘化と運動機能回復が認められた。[参考文献 1]。

神経特異的ミトコンドリア分裂抑制マウスの神経細胞では対照群に比較して大きなミトコンドリアが多く観察されるが、脳梁における軸索のミトコンドリアと ER の接触面積には有意な増加を認められていない。

### 考察

リゾレシチンの内包注射による脱髄モデルは 10 日程度かけて脱髄と運動機能障害を惹起でき、さらにこれらの回復が明瞭に観察できることから、脱髄に伴う神経障害および病

理学的変化と、その後の回復過程を調べる上で、有用なモデルになると考えられた。また、神経細胞保護や髄鞘再形成を促進する薬剤の投与による運動機能維持・回復を評価することで、薬剤開発にも用いることが可能と考えられた。

本研究のこれまでの成果では、軸索におけるミトコンドリアと小胞体の接着面積の増強は、ミトコンドリアの体積の増大と相関していた。しかし、神経細胞のミトコンドリア分裂抑制によっても接着面積の増加が見られなかったという結果は、ミトコンドリアの分裂・融合による体積変化は接着に直接的な影響を及ぼさない可能性を示唆している。そして、この結果はミトコンドリアと小胞体の接着に関わる *Mfn2* の発現と活性が、軸索のミトコンドリアと ER の接着に重要であるという、これまでの本研究の成果を支持するものと考えられた。

この3年間の研究で得られた生体内での細胞・時期特異的なミトコンドリア分裂の制御系と新規脱髄モデルを用いた結果から、神経細胞におけるミトコンドリア分裂の抑制が脱髄に伴う神経症状と軸索障害の軽減に有効であることが考えられる。実際、高脂肪食に伴う肥満・高血糖モデルの研究においても、腸管神経叢の生存神経細胞ではミトコンドリアの融合が観察された(参考文献2)。今後は培養モデルなども併用しながら、ミトコンドリア分裂の制御がもつ軸索保護的なメカニズムの解明を目指すとともに、ミトコンドリアの動態や機能を修飾する薬剤の投与による神経軸索保護作用の有無について、検討を進めたい

と考える。また、同時にミトコンドリア分裂の制御系を他の神経変性疾患モデルに応用することで、分裂制御のもつ役割について、多面的な評価を進めたい。

## 結論

今年度はリゾレシチンの内包注射による脱髄に伴う運動機能評価モデルを開発し、神経細胞におけるミトコンドリア分裂抑制が脱髄に伴う運動機能障害と軸索変性に及ぼす影響を評価する基礎を構築した。また、神経細胞のミトコンドリアと ER の接着の増強には、*Mfn2* の発現と活性が重要であることを支持する所見を得た。今後、ミトコンドリア分裂の制御がもつ神経保護的なメカニズムの解明を目指すとともに、他の神経変性疾患モデルにおける分裂制御のもつ役割についても評価を進めたいと考える。

## 参考文献

1. Yamazaki R, Ohno N, Huang JK. Acute motor deficit and subsequent remyelination-associated recovery following internal capsule demyelination in mice. *J Neurochem* (2020) In press. doi: 10.1111/jnc.15142. (査読あり)
2. Shimo S, Saitoh S, Nguyen HB, Thai TQ, Ikutomo M, Muramatsu K, Ohno N. Sodium-glucose co-transporter (SGLT) inhibitor restores lost axonal varicosities of the myenteric plexus in a mouse model of high-fat diet-induced obesity. *Sci Rep* (2020) 10:12372. doi: 10.1038/s41598-020-69256-9. (査読あり)

Research for developing neuroprotective therapy against neurodegenerative diseases via elucidation of pathogenetic mechanism.

Toshiyuki Araki

Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry

### **Aims**

In many neurodegenerative diseases, synaptic and axonal degenerations are observed prior to the death of the cell bodies, and therefore axonal degeneration is considered as an early phenomenon in the entire mechanism of neuronal degeneration. This study aims to identify the optimal therapeutic target in the initial process of neurodegeneration including degeneration of synapses and axons, and to create a therapeutic model using model animals to combat against neurodegenerative disorders. The research leader's group has been conducting research on the subcellular signaling mechanism that governs the maintenance of axonal structural integrity and progression of axonal degeneration. They aim to 1) develop a neuroprotective method focusing on NAD metabolism, 2) to identify initial neuronal changes in the pathogenesis of neurodegeneration, and 3) to examine the role of neurite morphogenesis / fate determination mechanism in neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. Participants from NCNP aim to develop therapy against neurodegeneration by analysis of a novel type of autophagy to degrade nucleic acid (Kabuta), by analyzing contribution of Eomes-positive helper T cells (Eomes + Th cells) to the pathogenesis (Oki), and by analyzing the roles of dystrophin in the central nervous system neurons via phenotype analysis of mdx mice. A researcher from outside research institutes has high technology in 3D ultrastructural observation (Ohno), and aims to accelerate research and development through joint research and technical support.

### **Research Team**

-Leader

Toshiyuki Araki: Director, Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (leader of this team)

-Participants

Yoshitsugu Aoki: Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience,

National Center of Neurology and Psychiatry

Shinji Oki: Section chief, Department of Immunology, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry

Tomohiro Kabuta: Section Chief, Department of Degenerative Neurological Diseases,  
National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

Nobuhiko Ohno: Professor, Department of Anatomy, Jichi Medical University