

## 小胞体とミトコンドリアの接触部の崩壊が 神経難病 ALS 発症の鍵となる

名古屋大学環境医学研究所（所長：山中宏二）の渡邊 征爾（わたなべせいじ）助教、山中 宏二（やまなかこうじ）教授らの国際共同研究グループは、神経細胞の維持に重要な役割を担う小胞体とミトコンドリアの接触部（MAM）が崩壊することが神経難病 ALS（筋萎縮性側索硬化症）の発症に重要であることを発見しました。

ALS は、大脳や脊髄にある運動神経細胞に原因不明の細胞死がおこり、全身の筋肉の麻痺や萎縮を生じる神経難病で、一部は遺伝性に発症します。研究グループは、ALS の発症機序を解明するため、若年性 ALS の原因遺伝子 *SIGMAR1* に着目して研究を行いました。その結果、患者の *SIGMAR1* 遺伝子は、その機能を失うことにより、神経細胞の MAM が壊れることを見出しました。また、別の ALS 原因遺伝子である *SOD1* 遺伝子異常をもつ ALS モデルマウスでも、疾患の進行に伴って MAM が崩壊することを見出しました。さらに、*SIGMAR1* 遺伝子を除去した ALS モデルマウスでは、発症時期が著しく早くなることが判明しました。その機序として、MAM に存在するイノシトール三リン酸受容体 3 型 (IP<sub>3</sub>R3) が MAM の崩壊により、機能異常を来すことを見出しました。IP<sub>3</sub>R3 は、運動神経細胞に豊富に存在していたことから、この機能異常が、ALS でみられる運動神経細胞死の一因であることが示唆されました。

本研究成果は、MAM の崩壊が運動神経細胞を傷害して ALS を発症させる重要なメカニズムであることを明らかにしたものです。異なる 2 つの ALS モデルで共通して MAM の崩壊が観察されたことから、MAM の崩壊は、ALS の大部分を占める孤発性 ALS の病態にも深く関与していることが考えられます。今後、MAM の崩壊を防止し、神経細胞を保護する治療法の開発につながることを期待されます。

本研究成果は、平成 28 年 11 月 7 日（日本時間）に欧州医学誌『EMBO molecular medicine』オンライン版に掲載されました。

\* 本研究は、文部科学省科学研究費、日本医療開発機構(AMED)、上原記念生命科学財団、内藤記念科学振興財団、日本 ALS 協会、堀科学芸術振興財団より研究助成を受けて行われ、名古屋大学医学系研究科、ジョンス・ホプキンス大学、テキサス大学ヒューストン校との国際共同研究による成果です。

### 【ポイント】

- *SIGMAR1* 遺伝子に若年性 ALS の原因となる新しい変異を同定
- 患者の *SIGMAR1* 遺伝子は本来の機能を全く発揮せず、機能の喪失(loss-of-function)によって若年性 ALS を発症する
- *SIGMAR1* 遺伝子、*SOD1* 遺伝子の、どちらの遺伝子の変異による ALS においても、MAM の崩壊が共通した病態メカニズムである
- MAM の崩壊による選択的な運動神経細胞への傷害には、運動神経細胞に豊富に存在するイノシトール三リン酸受容体 3 型 (IP<sub>3</sub>R3) の機能異常が関与している

## 【概要】

名古屋大学環境医学研究所の渡邊征爾助教、山中宏二教授、医学系研究科の玉田宏美研究員、木山博資教授らの国際共同研究グループは、神経細胞の維持に重要な役割を担う小胞体とミトコンドリアの接触部 (MAM) が崩壊することが神経難病 ALS (筋萎縮性側索硬化症) の発症に重要であることを発見しました。本研究成果は、平成 28 年 11 月 7 日 (日本時間) に欧州医学誌『EMBO molecular medicine』オンライン版に掲載されます。

ALS は、大脳や脊髄にある運動神経細胞に原因不明の細胞死がおこり、全身の筋肉の麻痺や萎縮を生じる神経難病で、一部は遺伝性に発症します。研究グループは ALS の発症機序を解明するため、若年性 ALS の原因遺伝子 *SIGMAR1* に着目して研究を行いました。その結果、患者の *SIGMAR1* 遺伝子は、その機能を失うことにより、神経細胞の MAM が壊れることを見出しました。また、別の ALS 原因遺伝子である *SOD1* 遺伝子異常をもつ ALS モデルマウスでも、疾患の進行に伴って MAM が崩壊することを見出しました。さらに、*SIGMAR1* 遺伝子を除去した ALS モデルマウスでは、発症時期が著しく早くなることが判明しました。その機序として、MAM に存在するイノシトール三リン酸受容体 3 型 (IP<sub>3</sub>R3) が MAM の崩壊により、機能異常を来たすことを見出しました。IP<sub>3</sub>R3 は運動神経細胞に豊富に存在していたことから、この機能異常が ALS でみられる運動神経細胞死の一因であることが示唆されました。

本研究成果は、MAM の崩壊が運動神経細胞を傷害して ALS を発症させる重要なメカニズムであることを明らかにしたものです。異なる 2 つの ALS モデルで共通して MAM の崩壊が観察されたことから、MAM の崩壊は ALS の大部分を占める孤発性 ALS の病態にも深く関与していることが考えられます。今後、MAM の崩壊を防止し、神経細胞を保護する治療法の開発につながることを期待されます。

## 【背景】

ALS は、大脳と脊髄の運動神経細胞が徐々に傷害されて死に至る原因不明の神経難病であり、本邦では、約 9,000 人の ALS 患者さんが闘病しています。思考や認知に関わる能力は保たれたまま、全身の筋肉の麻痺や萎縮が進行し、多くの患者さんは数年以内には人工呼吸器なしには生存できなくなるため、発症原因の解明と治療法の開発が強く期待されている重篤な疾患です。

ALS の約 1 割を占める遺伝性 ALS では、原因遺伝子を手がかりにモデル動物を作製するなどの遺伝子工学的手法を利用して研究することが可能なため、遺伝性 ALS の原因遺伝子の機能を解析することを通じて、ALS の病態解明に向けた研究が行われています。遺伝学の発展に伴い、近年、多くの遺伝性 ALS の原因遺伝子が発見され、現在では 20 種類以上にのぼります。しかしながら、これら遺伝性 ALS の疾患メカニズムのなかで広く ALS で共通する機序は何か、という点は依然として不明なままでした。

## 【研究の内容】

ALS16 は、2012 年に Al-saif らによって初めて報告された *SIGMAR1* 遺伝子上の劣性変異を原因とする若年性遺伝性 ALS です。ALS16 の患者さんは、生後数年のうちから運動機能の異常を示しますが、進行は緩やかです。本研究では、ジョーンズ・ホプキンス大学

およびテキサス大学との共同研究により *SIGMAR1* 遺伝子上、283 番目のコドンでシトシンが重複し、遺伝子の読み枠がずれて不完全で異常なタンパク質が作られる（フレームシフト変異; p.L95fs/c.283dupC）という、ALS16 の原因となる新たな変異を同定しました（図 1）。これら ALS 患者由来の変異を持つ *SIGMAR1* 遺伝子を培養細胞に導入したところ、作られるタンパク質は極めて不安定で本来の機能を発揮できないことが判りました（図 1B）。このタンパク質は、正常では、小胞体とミトコンドリアの接触部分（小胞体・ミトコンドリア膜間領域; mitochondria-associated membrane; MAM）にあります。そこで、*SIGMAR1* 遺伝子を欠損したマウス（ノックアウトマウス）の運動神経細胞における MAM の構造を電子顕微鏡や免疫蛍光染色法で観察したところ、*SIGMAR1* 遺伝子が欠損すると MAM の構造が壊れることが明らかになりました（図 1C, 2B）。

では、これらの結果は、*SIGMAR1* 遺伝子に異常があるときに特有のものなのでしょうか？この問題に答えるため、私達は ALS モデルとして広く使われている ALS1 の原因遺伝子 *SOD1* に着目しました。ALS 患者由来の変異を持つ *SOD1* 遺伝子を導入した ALS モデルマウスや培養細胞では、MAM に変異 *SOD1* タンパク質が蓄積し、その蓄積に伴って MAM の壊れていく様子が観察されました（図 2A, B）。

興味深いことに、*SIGMAR1* 遺伝子を除去した ALS モデルマウスを作製したところ、発症時期が約 20%以上、顕著に早くなることが判りました（図 3A）。このメカニズムを探索したところ、MAM の崩壊に伴ってイノシトール三リン酸受容体 3 型 ( $IP_3R3$ ) の機能異常が起こることが明らかになりました。本来、 $IP_3R3$  は MAM に存在し、小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオンの運搬を担う分子です。しかし、MAM が崩壊することで、 $IP_3R3$  は小胞体内のカルシウムイオンを細胞質へ無秩序に放出していました。また、同時にミトコンドリアへのカルシウムイオンの供給が不足し、細胞のエネルギー産生が減少していました。 $IP_3R3$  は中枢神経系では運動神経細胞に豊富に存在しており、運動神経細胞が MAM の崩壊によるダメージを受けやすい理由であると考えられます（図 3）。

以上の結果から、MAM の崩壊は *SIGMAR1* 遺伝子、*SOD1* 遺伝子の変異による ALS に共通した病態メカニズムであることが明らかとなりました。

### 【成果の意義】

これまで、複数のグループにより ALS16 の疾患メカニズムの解析が行われてきましたが、MAM の構造的な破綻を明らかにし、さらに MAM の破綻が *SOD1* 遺伝子と *SIGMAR1* 遺伝子という異なる 2 つの遺伝性 ALS の間にある共通の疾患メカニズムであることを示した研究は本研究が初めてです。海外のグループによって、孤発性 ALS でも *SIGMAR1* 遺伝子の産物に異常が報告されていることから、MAM の崩壊は孤発性 ALS も含めた ALS で共通の疾患メカニズムであると考えられます。今後、MAM の機能維持に焦点をあてることで、ALS に広く共通した治療法の開発が可能になると期待されます。

### 【用語説明】

#### 小胞体・ミトコンドリア膜間領域 (MAM)

細胞内小器官であり、タンパク質の合成や品質管理を行う小胞体とエネルギー産生に関わるミトコンドリアの膜が接触する部分であり、細胞の機能維持に重要なタンパク質が多数

集合している。最近の研究で、ミトコンドリアでのエネルギー産生や脂質合成、オートファジー（自食作用）の膜形成など、多彩な機能をもつことが明らかにされつつある。

### **SOD1 遺伝子(スーパーオキシドジスムターゼ 1 遺伝子)**

細胞内で発生する有害な活性酸素であるスーパーオキシドを解毒する反応系を触媒する酵素をコードする遺伝子。遺伝型の ALS では、この遺伝子に変異があり、SOD1 タンパク質の性状が変化して凝集しやすくなった結果、神経細胞に異常に蓄積し、神経傷害性を発揮することが知られている。

### **SIGMAR1 遺伝子 (シグマ 1 受容体遺伝子)**

MAM に存在するタンパク質で IP<sub>3</sub>R3 などの MAM にある他のタンパク質と結合して、安定化すると考えられている（シャペロン様タンパク質と呼ばれる）。活性化すると神経突起の伸長作用や認知機能の改善などが見られることから、うつ病や認知症においても治療標的分子として重要と考えられている。ALS16 だけでなく、遠位遺伝性運動ニューロパチー（体幹から遠い部分の筋肉が萎縮する遺伝性疾患）の原因遺伝子でもある。

### **イノシトール三リン酸受容体 3 型 (IP<sub>3</sub>R3)**

イノシトール三リン酸が結合することで、カルシウムイオンを小胞体から放出するタンパク質の一種。ミトコンドリアへ素早くカルシウムイオンを受け渡すことによって、エネルギー産生を円滑に行えるようにする働きがあると考えられている。

### **ALS モデルマウス**

遺伝性 ALS の原因遺伝子 SOD1 に ALS 患者由来の変異を導入した変異ヒト SOD1 遺伝子をマウスに導入したモデルマウスであり、ALS の特徴である運動神経細胞死、筋麻痺を再現し、広く研究に使用されている。

### **【論文名】**

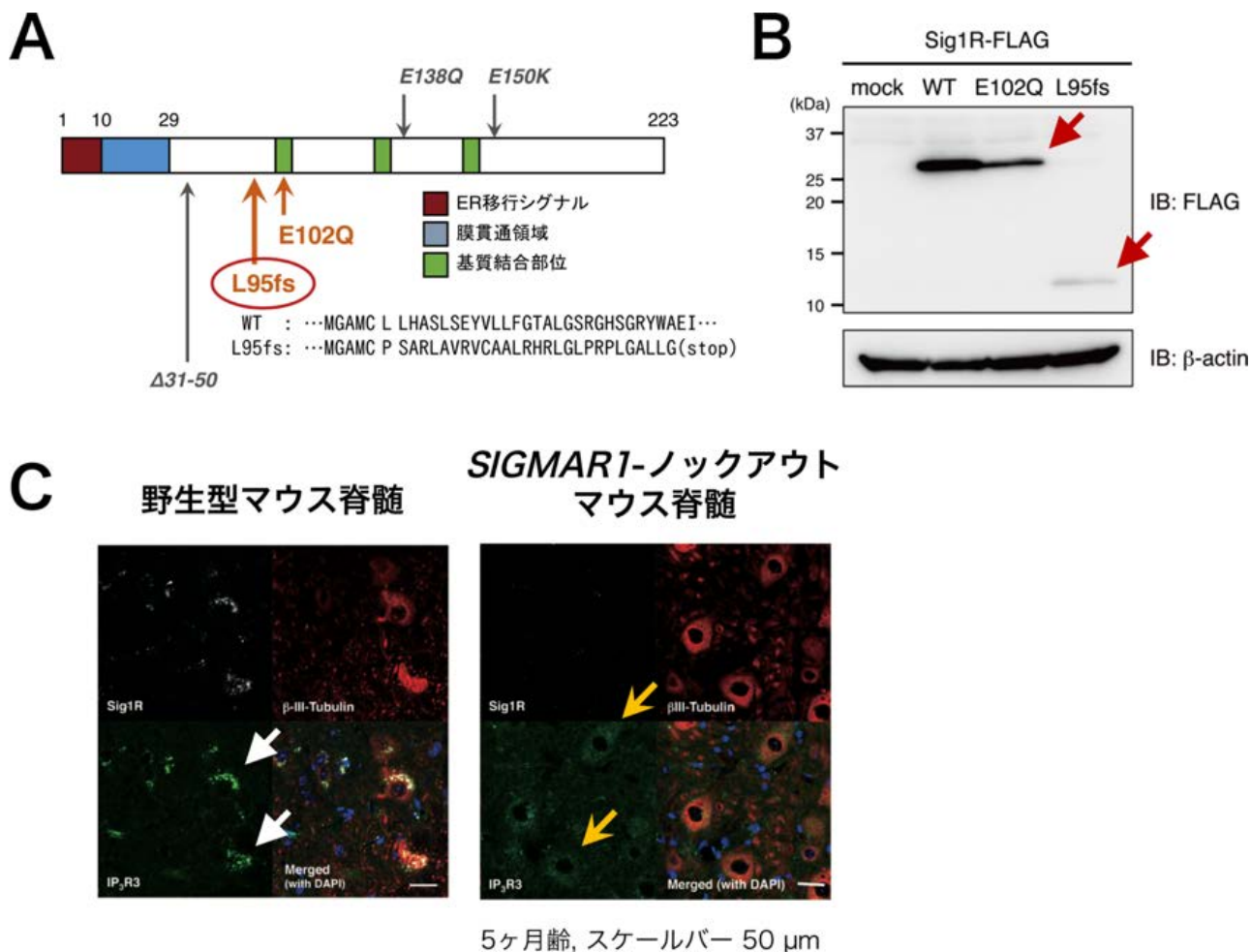
“Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS”

(小胞体・ミトコンドリア膜間領域の崩壊が SIGMAR1 遺伝子および SOD1 遺伝子の変異に伴う筋萎縮性側索硬化症に共通した病態機序である)

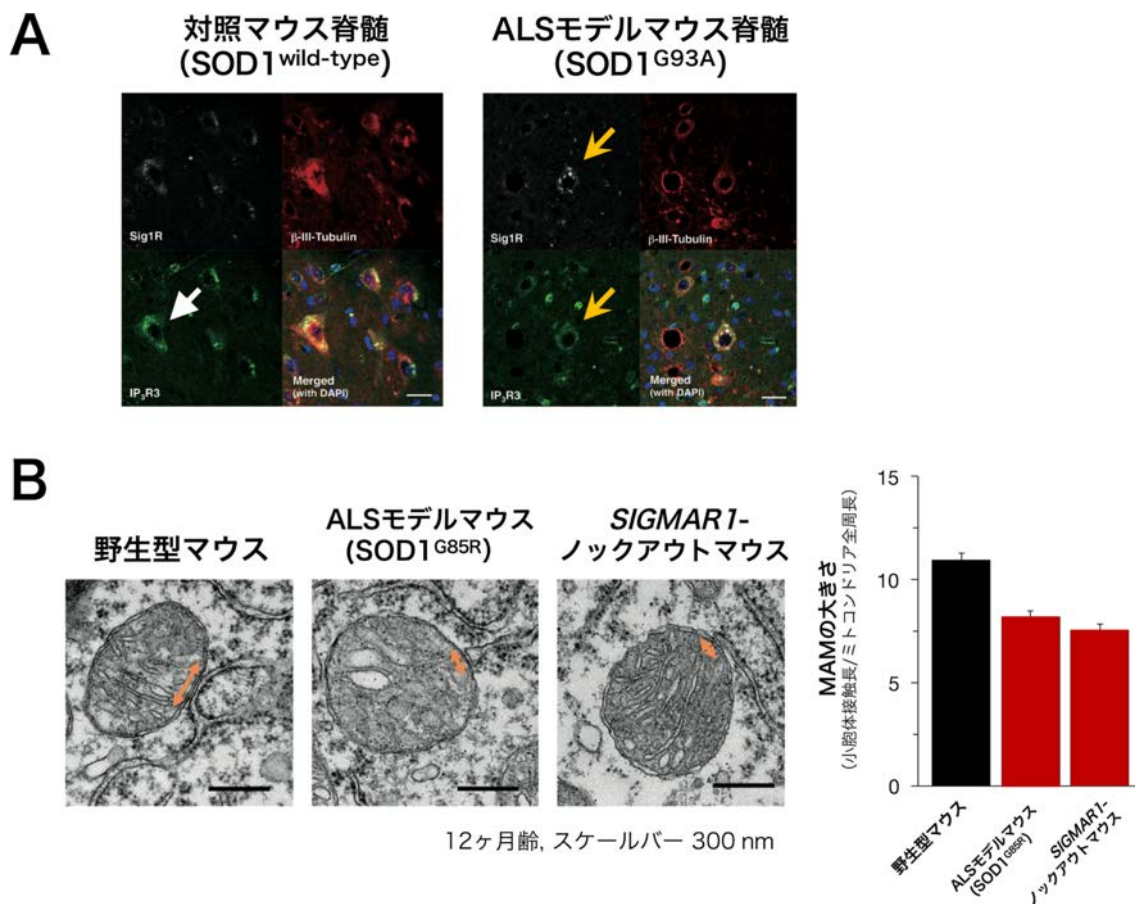
Seiji Watanabe, Hristelina Ilieva, Hiromi Tamada, Hanae Nomura, Okiru Komine, Fumito Endo, Shijie Jin, Pedro Mancias, Hiroshi Kiyama and Koji Yamanaka

(渡邊征爾, Hristelina Ilieva, 玉田宏美, 野村花江, 小峯起, 遠藤史人, 金世杰, Pedro Mancias, 木山博資, 山中宏二)

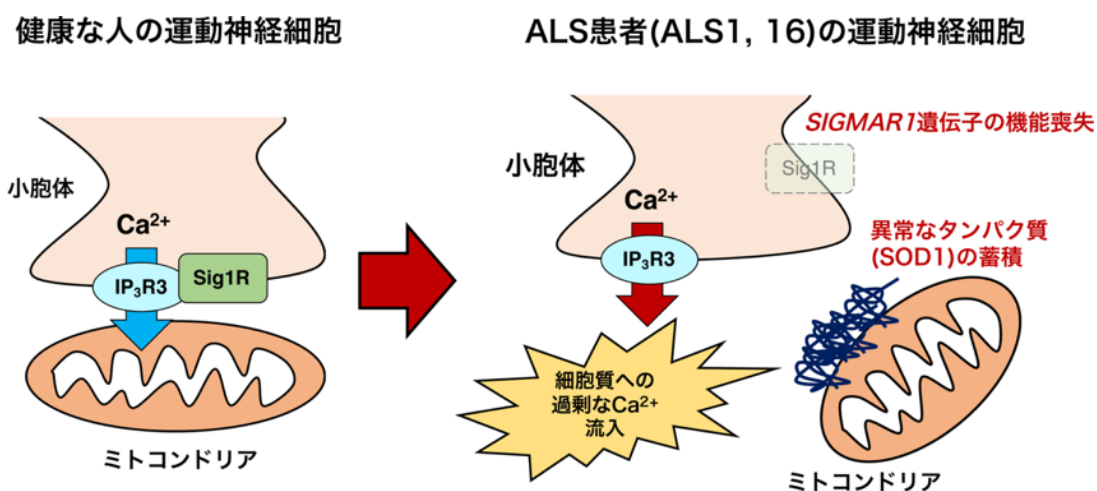
## 【参考図】



(図 1) 本研究では、新たに *SIGMAR1* 遺伝子上で ALS の原因となる変異を同定しました (L95fs) (A 赤丸). ALS16 患者由来の *SIGMAR1* 遺伝子産物(シグマ 1 受容体; Sig1R) は、野生型と比較して細胞内で極めて不安定でした (B) . そこで、*SIGMAR1* 遺伝子を人為的に欠損させたマウス (*SIGMAR1*-ノックアウトマウス) の脊髄を観察したところ、MAM に局在するはずの IP<sub>3</sub>R3 が細胞全体に広がって分布するという異常が見られました.



(図 2) IP<sub>3</sub>R3 の異常は SIGMAR1-ノックアウトマウスだけでなく、ALS モデルマウスである SOD1<sup>G93A</sup> マウスでも観察されました (A) . ALS モデルマウスでは、Sig1R の凝集化も同時に見られ、Sig1R の機能も同時に喪失していることが示唆されます. また、直接的に MAM の崩壊を観察するために電子顕微鏡像を撮像したところ、野生型と比較して、MAM の大きさが顕著に減少していることを見出しました (B) .



(図 3) MAM の崩壊に伴う運動神経細胞への傷害メカニズムの模式図. 本研究の結果から、ALS では MAM が崩壊して IP<sub>3</sub>R3 の機能異常が生じることで 1) 細胞質への過剰なカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) 流入、2) ミトコンドリアへの Ca<sup>2+</sup>供給不足によるエネルギー産生量の低下 が引き起こされて、運動神経細胞が傷害されると考えられます。