

論文の内容の要旨

論文題目 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける
神経変性の Nfil3 による抑止

(Nfil3-mediated protection against neurodegeneration
in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis)

氏名 玉井 総一

神経変性疾患とは、神経細胞の変性および脱落が徐々に進行し、様々な神経症状を呈する神経疾患である。代表的な神経変性疾患には、大脳皮質や海馬の神経細胞が脱落するアルツハイマー病、運動ニューロンが選択的に変性し全身の麻痺を呈する筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、黒質ドーパミン神経の選択的変性により運動障害を誘発するパーキンソン病などが挙げられる。神経細胞が変性し神経細胞死に至るメカニズムは未だ解明されておらず、これらの疾患には根治的な治療法が存在しない。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、大脳皮質運動野や脳幹から脊髄に至る上位運動ニューロン、および脊髄前角から末梢神経に至る下位運動ニューロンが選択的に変性し脱落する神経変性疾患である。これら運動ニューロンの脱落に伴って、その投射先の筋肉が萎縮 (神経原性筋萎縮) するため、筋萎縮や筋力低下などの症状を呈する。1 年間に人口 10 万人あたり約 2 人が発症し、人工呼吸器を装着しない場合、症例の約半数が発症後約 2-3 年で呼吸筋麻痺により死亡する極めて重篤な疾患である。

神経細胞には、神経変性を誘発する条件下で発動する自己保護システムが内在し、注目すべきことに近年、このシステムを活性化することによって神経変性疾患の発症を遅延・抑制できる可能性が示され始めている。このような役割を担う分子を同定することは、神経細胞の保護機構の理解を進めるのみならず、神経変性疾患に対する新たな治療戦略の創出につながる。

Nfil3 は、インターロイキン 3 (IL-3) のプロモーター領域に結合する bZIP 型転写因子として同定された。近年の研究により、Nfil3 は種々の免疫系細胞の維持・分化および抗体・サイトカインの産生など、免疫応答の様々なステップを制御していることが明らかになりつつある。他方、神経系組織においても、Nfil3 は発生期のアポトーシスや概日時計機構を制御しており、多彩な生理的役割を担うことが知られている。本研究において私は、Nfil3 が種々の神経毒 (高濃度グルタミン酸、過酸化水素水、イオノマイシンおよびアミロイドβ) によって発現亢進することを見出した (図 1)。神経細胞における Nfil3 の発現上昇がどのような役割を果たしているのか解析するため、培養神経細胞において Nfil3 を強制発現させたところ、グルタミン酸刺激依存的な神経変性が顕著に抑制された。一方、Nfil3 を発現抑制すると、同様の刺激による神経変性に対して神経細胞は脆弱になった (図 2)。これらの結果から、Nfil3 は神経毒依存的な神経変性を抑制し、神経細胞の保護を担う因子であることが明らかになった。

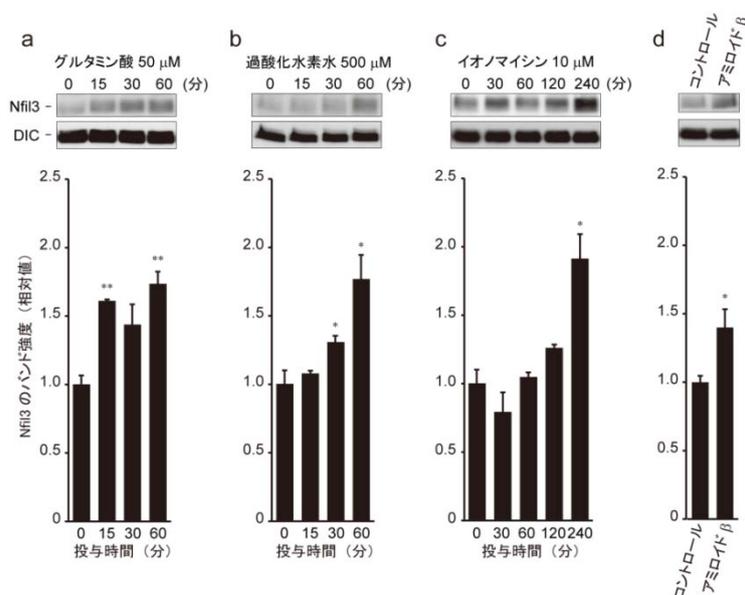


図 1: 種々の神経毒による Nfil3 の発現上昇 培養神経細胞に種々の神経毒を投与し、細胞懸濁液に対して抗 Nfil3 抗体 (上パネル) および抗 dynein intermediate chain (DIC) 抗体 (下パネル、ローディングコントロール) を用いてウェスタンブロット解析した。神経毒として、(a) グルタミン酸、(b) 過酸化水素水、(c) イオノマイシン、および (d) アミロイドβ (投与時間: 72 時間) を投与した。* P < 0.05, ** P < 0.01 (t 検定)。

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) の多くは孤発性であるが、約 10% は家族性である。この家族性 ALS の中で SOD1 (superoxide dismutase) 遺伝子の優性変異は最も頻度が高く、家族性 ALS 患者において約 100 種類以上の遺伝子変異が報告されている。変異 SOD1 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスは運動ニューロンの変性、筋萎縮および四肢麻痺など ALS 患者に特徴的な病態を呈することから、ALS モデルマウスとして多数の研究に用いられている。また変異 SOD1 は、培

養神経細胞に発現させると神経変性を誘発することが知られている。変異 SOD1 を発現させた神経細胞を用いた解析の結果、Nfil3 の強制発現は変異 SOD1 依存的な神経変性を抑制する一方、Nfil3 を発現抑制すると神経細胞は変異 SOD1 に対して脆弱になった。これらの結果から、Nfil3 は神経細胞保護を担う分子であり、Nfil3 の発現が変異 SOD1 依存的な神経変性を抑制することが判明した。

Nfil3 は神経細胞の保護を担うことから、Nfil3 を神経細胞内で強制発現させることによって神経変性疾患の発症を遅延・抑止できる可能性が考えられた。そこで、神経系特異的に Nfil3 を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスを ALS モデルマウスである変異 SOD1 トランスジェニックマウスと交配し、二重変異マウ

図 2: Nfil3 は神経細胞の保護を担う 培養神経細胞にコントロールベクター、Nfil3 発現ベクター、Nfil3 shRNA (2 種類)、もしくは shRNA + mutNfil3 (shRNA に よってノックダウンされない Nfil3) 発現ベクターを遺伝子導入し、グルタミン酸 (50 μ M, 30 分間) を投与した。神経細胞を免疫染色に供し、変性した神経細胞の数を計数し、全体に占める割合を算出した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (t 検定)。

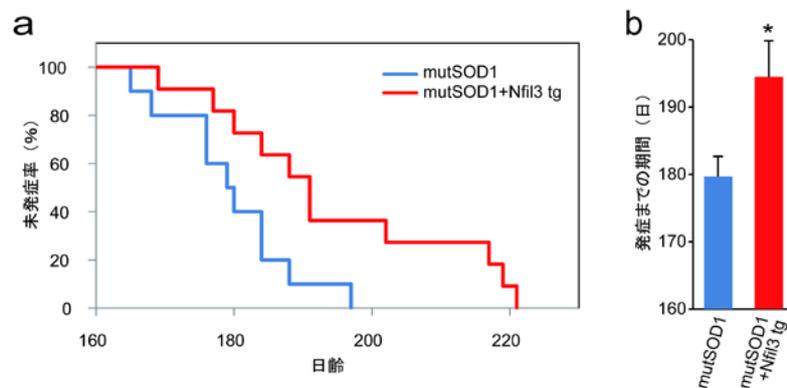
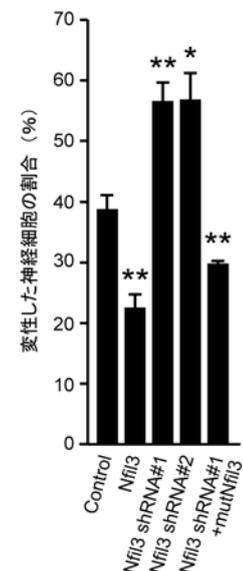


図 3: Nfil3 の発現は ALS の発症を遅延する 変異 SOD1 トランスジェニックマウス (mutSOD1, n = 10) および二重変異マウス (mutSOD1 + Nfil3 tg, n = 11) の各個体について、発症期を精査した。(a) 二重変異マウスは疾患の発症が顕著に遅延する ($P < 0.05$, log-rank 検定)。(b) 発症までの期間の平均値 (* $P < 0.05$, t 検定)。

スを作製した。二重変異マウスと変異 SOD1 トランスジェニックマウスの各個体について発症期や疾患ステージを精査した結果、二重変異マウスは疾患の発症が顕著に遅延した (図 3a)。二重変異マウスと変異 SOD1 マウスの両群について誕生日から発症期までの期間を比較すると、発症期の平均値は約 15 日延長した (図 3b)。すなわち、Nfi3 の生体における発現は ALS の発症を遅延することを見出した。

以上の知見から、Nfil3 は神経細胞保護を担い、その発現は神経変性疾患の抑止に寄与することが明らかになった (図 4)。本研究は、「神経細胞に内在する自己保護システムを活性化することで神経変性疾患を遅延・抑止する」という治療戦略が有効であることを強く支持する。このような戦略は、疾患の発症機序に依存しないという点に加え、様々な神経変性疾患に対して効果を示すという点において、極めて重要性が高いと考えられる。さらに、本研究が見出した Nfil3 を介した神経保護システムについて、その活性化経路や下流遺伝子群の解析が進展すれば、このようなシステムを人為的に活性化する薬剤・手法の開発につながる可能性がある。すなわち、神経細胞に内在する神経保護システムを解析することは、神経変性疾患に対する新たな治療戦略の指針を提供するという意義において極めて重要である。

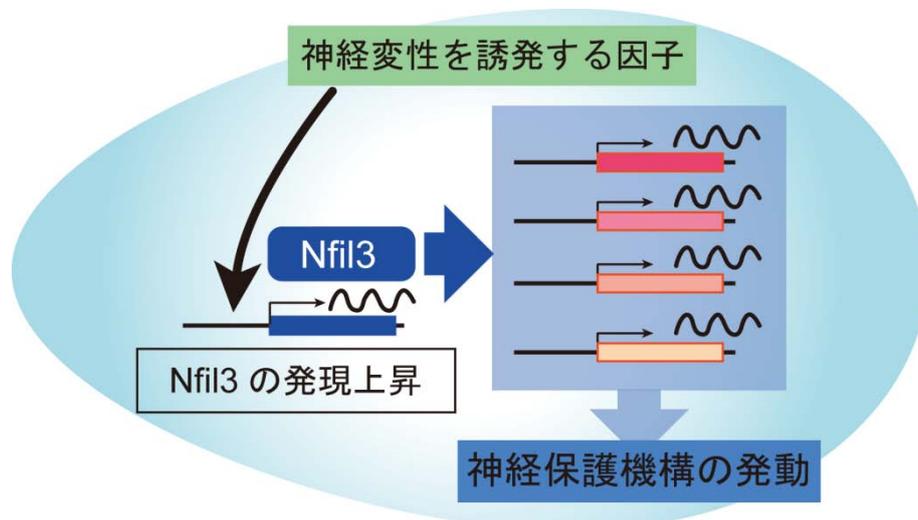


図 4: Nfil3 を介した神経保護機構モデル 神経細胞が神経変性を誘発する刺激あるいは条件下に曝されると、Nfil3 が発現上昇し、おそらく下流遺伝子群の転写調節を介して、神経保護機構が発動すると考えられる。