

運動ニューロン変性を伴う新規遺伝性脊髄小脳変性症

Asidan (SCA36) 原因遺伝子 NOP56 による

ALS の運動ニューロン変性分子機構の解明

Investigation on the roles of NOP56, the causative gene of Asidan (SCA36)  
accompany with motor neuron signs,  
in motor neuron degeneration of ALS

岡山大学病院 神経内科

太田康之、山下徹、阿部康二

## 【背景】

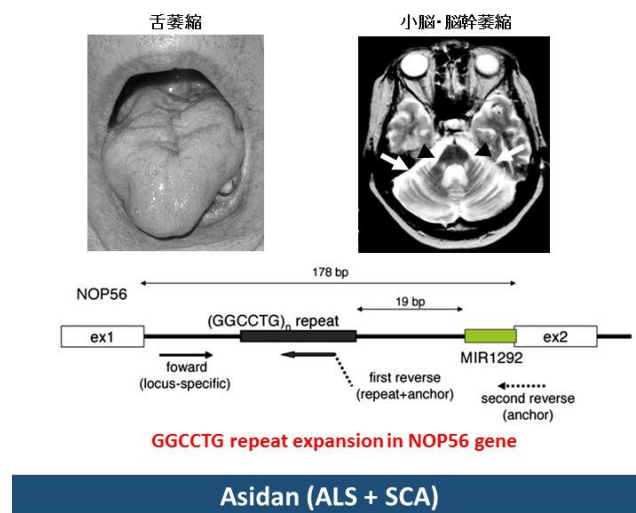
筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis: ALS）は進行性に運動ニューロンが変性する神経難病であり、その運動ニューロン変性の原因として様々な仮説がある。近年、DNA/RNA 結合蛋白である TAR DNA binding protein-43（TDP-43）および fused in sarcoma/translocated in liposarcoma（FUS）において家族性 ALS の原因遺伝子が発見されたことより、ALS 病態に RNA 機能異常が注目され、現在まで ALS における運動ニューロン変性病態に関わることが多数報告されている。

岡山大学神経内科では、太田らが、50 歳以降に小脳失調で発症し、数年後に舌・四肢の筋萎縮、筋力低下、線維束性収縮および四肢深部腱反射亢進などの運動ニューロン徴候を合併する、今まで報告のない新規の遺伝性神経変性疾患の臨床的特徴について報告してきた<sup>1</sup>。この新規遺伝性神経変性は優性遺伝性形式を示し、家系は広島県東部の福山市に流れる芦田川周辺に集積していたことから、阿部らは本遺伝性疾患を芦田川にちなみ'Asidan'と命名した<sup>2</sup>。2011 年、この Asidan 家系の遺伝子解析により、Nucleolar protein (NOP) 56 遺伝子イントロン 1 に存在する GGCCTG 6 塩基繰り返し配列の異常伸長が原因遺伝子であると同定された（Figure 1）<sup>3</sup>。

Asidan 原因遺伝子がコードする NOP56 蛋白も RNA processing に関わる蛋白である。TDP-43 および FUS は RNA splicing と安定性に関与するが、NOP56 はリボソーム RNA processing に関わることが報告されている。

家族性 ALS の原因遺伝子変異で最も頻度が高いのは Cu/Zn-superoxide dimutase 1（SOD1）であるが、SOD1 遺伝子変異病態における TDP-43、FUS の病態については十分に解明されておらず、ALS 病態における NOP56 の役割についても不明である。

Figure 1: Asidan (SCA36) shows the motor neuron degeneration



## 【目的と方法】

ALS における運動ニューロン変性病態への NOP56 の関与を解明するために、ALS モデルマウスである G93A-SOD1 トランスジェニック (Tg) マウスにおいて NOP56、TDP-43、FUS の 3 つの RNA processing 関連蛋白の発現パターンを解析する。

G93A-SOD1 Tg マウスは、下肢運動麻痺出現前 (ALS 発症前) の 10 週齢、下肢運動麻痺出現早期 (ALS 発症早期) の 14 週齢、ALS 発症後期の 18 週齢に中枢神経組織をサンプリングした。対照として 10 週齢の野生型 (WT) マウスの中枢神経組織をサンプリングした。免疫染色用に、腰髄・頸髄・脳幹は 4% PFA 固定を行い、凍結切片を作成した。Western blot 用に、腰髄・頸髄・大脳・小脳は Tris buffer で homogenize し、12,000 g で 10 分間遠心した後の上清を Total protein として解析に使用した。

## 【結果】

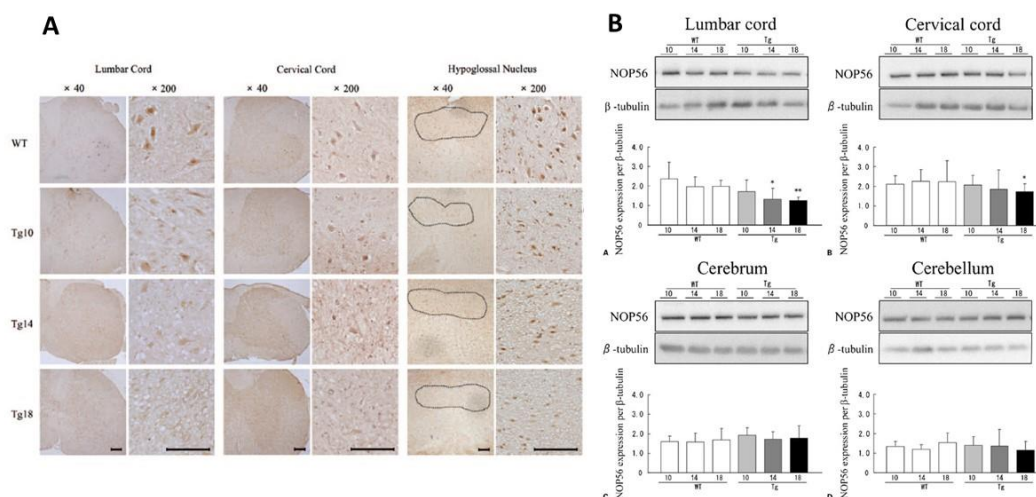
### 免疫染色結果

NOP56 は WT マウスでは腰髄・頸髄・舌下神経核の運動ニューロンの核で主に発現しており、細胞質にも発現していた (Figure 2A)。SOD1 Tg マウスでは 10 週齢から 14 週齢、18 週齢と週齢が増すごとに NOP56 発現は減少傾向となった。SOD1 Tg マウスでは 14 週齢において WT マウスと比較し 48%の腰髄運動ニューロンしか NOP56 を発現しておらず ( $p<0.05$ )、18 週齢では野生型マウスと比較し、32%しか NOP56 を発現していなかった ( $p<0.01$ )。頸髄では WT マウスと比較し 51%の運動ニューロンしか NOP56 を発現していなかった ( $p<0.01$ )。

TDP-43 は WT マウスでは腰髄・頸髄・舌下神経核の運動ニューロンおよび小型ニューロンの核で主に発現しており、細胞質にも発現していた。SOD1 Tg マウスでは 10 週齢から 14 週齢、18 週齢と週齢が増すごとに TDP-43 発現は減少傾向となった。SOD1 Tg マウスでは 18 週齢において WT マウスと比較し 67%の腰髄運動ニューロンが TDP-43 を発現しており ( $p<0.05$ )、頸髄では 74%の運動ニューロンが TDP-43 を発現していた ( $p<0.05$ )。

FUS は WT マウスでは腰髄・頸髄・舌下神経核の運動ニューロン核で主に発現していた。SOD1 Tg マウスでは 18 週齢において FUS 発現は減少していた。SOD1 Tg マウスでは 18 週齢において WT マウスと比較し 49%の腰髄運動ニューロンが FUS を発現しており ( $p<0.05$ )、頸髄では 62%の運動ニューロンが FUS を発現していた ( $p<0.05$ )。

Figure2: NOP56 expression decreases from the early symptomatic stage in ALS mice



## Western blot 結果

NOP56 は WT マウスでは腰髄・頸髄・大脳・小脳とも週齢で発現量に変化はなかった (Figure 2B)。SOD1 Tg マウスでは WT マウスと比較し腰髄にて 14 週齢で 67% ( $p<0.05$ )、18 週齢で 62% ( $p<0.01$ ) 発現量が低下しており、頸髄では 18 週齢で 77% ( $p<0.01$ ) 発現量が低下していた。しかし大脳・小脳では発現量変化は認めなかった。

TDP-43 は WT マウスでは腰髄・頸髄・大脳・小脳とも週齢で発現量に変化はなかった。SOD1 Tg マウスでは WT マウスと比較し腰髄にて 18 週齢で 73% ( $p<0.05$ ) 発現量が低下していた。しかし大脳・小脳では発現量変化は認めなかった。

FUS は WT マウスでは腰髄・頸髄・大脳・小脳とも週齢で発現量に変化はなかった。SOD1 Tg マウスでは WT マウスと比較し腰髄にて 18 週齢で 70% ( $p<0.05$ ) 発現量が低下していた。しかし大脳・小脳では発現量変化は認めなかった。

### 【考察】

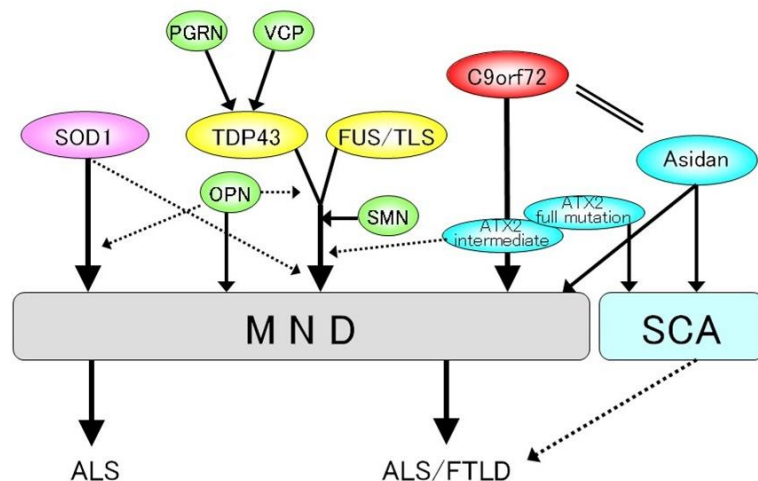
SOD1 Tg マウスの腰髄運動ニューロン核において、TDP-43、FUS とも ALS 発症後期（18 週齢）において発現量低下を認めた。一方、NOP56 は ALS 発症早期（14 週齢）より腰髄主体に脊髓前角の大型運動ニューロン核において発現低下を認めた。しかし NOP56、TDP-43、FUS とも大脳運動野および小脳プルキンエ細胞においては発現量の変化を認めなかった。SOD1 遺伝子変異は特に脊髓前角運動ニューロンの変性を示すことが特徴であることから、以上の結果から NOP56、TDP-43、FUS とも SOD1 遺伝子変異による運動ニューロン変性病態に深く関わっており、特に NOP56 は ALS 発症早期から脊髓運動ニューロンにおいて発現量低下を認めたことから、TDP-43、FUS と比較して ALS 病態に深くかかわっていることが考えられる。

### 【今後の展望】

2012 年、欧米において、ALS と前頭側頭型認知症（FTD）合併の常染色体優性遺伝家系の原因遺伝子が C9orf72 遺伝子変異であると報告され、大変注目を浴びている。C9orf72 遺伝子変異はイントロン 1 の GGGGCC 6 塩基繰り返し配列の異常伸長が原因であり、Asidan 原因遺伝子 NOP56 の遺伝子変異と、イントロン領域の 6 塩基リピート異常伸張という点で類似点が多い。また、大変興味深いことに、C9orf72 遺伝子変異では病理学的に小脳プルキンエ細胞の神経変性を認めるため、

C9orf72 遺伝子変異は運動ニューロン変性と FTD の合併に加え、小脳失調も潜在的に併発することを示唆している。つまり臨床徴候および病理所

Figure3 : Asidan stands at the crossroads of SCA and motor neuron disease



見からも、C9orf72 遺伝子変異と、小脳失調と運動ニューロン変性に軽度前頭葉機能低下を合併する Asidan は類似している (Figure 3)。このことから、Asidan の NOP56 による運動ニューロン死の病態研究から、C9orf72 遺伝子による運動ニューロン死と共通の病態機構が解明される可能性がある。

以上より、Asidan の原因遺伝子 NOP56 の解明は運動ニューロン病としての Asidan の病態解明にとどまらず、ALS における運動ニューロン変性と共通の病態解明に繋がる可能性があり、ALS の運動ニューロン死解明の点からも NOP56 遺伝子変異の病態解明の研究をすすめる予定である。

#### 【文献】

- 1) Ohta Y, Hayashi T, Nagai M et al: Two cases of spinocerebellar ataxia accompanied by involvement of the skeletal motor neuron system and bulbar palsy. Intern Med 46: 751-755, 2007
- 2) Abe K, Ikeda Y, Kurata T et al: Cognitive and affective impairments of a novel SCA/MND crossroad mutation Asidan. Eur J Neurol 19: 1070-1078, 2012
- 3) Kobayashi H, Abe K, Matsuura T et al: Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. Am J Hum Genet 89: 121-130, 2011