

—総説—

膜貫通糖タンパク質 GPNMB の ALS 病態に対する 神経保護因子としての可能性

田中彦孝, 鶴間一寛, 嶋澤雅光, 原英彰*

要約: 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は上位および下位運動ニューロンが選択的かつ進行性に変性、脱落する重篤な指定神経難病である。長年、ALS に対する精力的な研究が行われてきたが、現時点で ALS 病態の原因は不明である。本試験において、変異 Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1^{G93A}) 発現 ALS モデルマウスを用いた DNA マイクロアレイ解析を実施したところ、glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) が新規 ALS 病態関連因子として同定された。ALS 患者および ALS モデルマウス脊髄において病態の進行に伴う GPNMB の顕著な増加が認められた。また、GPNMB の発現は、運動ニューロンおよびアストロサイトにおいて認められた。さらに、運動ニューロン様細胞である NSC34 細胞株を用いた検討により、SOD1^{G93A} が GPNMB と結合し GPNMB の糖鎖修飾を阻害することで運動ニューロンの脆弱性が亢進した。一方、活性化したアストロサイトでは、GPNMB 細胞外断片の分泌が認められ、その結果運動ニューロンに対する SOD1^{G93A} 毒性を減弱させた。さらに、ALS 患者血清中の GPNMB 量は、コントロール群および他の中枢神経変性疾患群に比べ高値を示した。以上より、GPNMB は、ALS の有用な治療標的となる可能性が示唆された。

索引用語: 筋萎縮性側索硬化症、膜貫通糖タンパク質 GPNMB、運動ニューロン死

The Potential of GPNMB as a Novel Neuroprotective Factor in Amyotrophic Lateral Sclerosis

Hirotaka TANAKA, Kazuhiro TSURUMA, Masamitsu SHIMAZAWA, Hideaki HARA*

Abstract: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable and fatal neurodegenerative disease characterized by the loss of motor neurons. Despite substantial research, the causes of ALS remain unclear. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) was identified as an ALS-related factor using DNA microarray analysis with mutant superoxide dismutase (SOD1^{G93A}) mice. GPNMB was greatly induced in the spinal cords of ALS patients and a mouse model as the disease progressed. It was especially expressed in motor neurons and astrocytes. In a NSC34 cell line, glycosylation of GPNMB was inhibited by interaction with SOD1^{G93A}, increasing motor neuron vulnerability, whereas extracellular fragments of GPNMB secreted from activated astrocytes attenuated the neurotoxicity of SOD1^{G93A} in neural cells. Furthermore, GPNMB expression was more substantial in the sera of sporadic ALS patients than in other diseased patients. This study suggests that GPNMB can be a target for therapeutic intervention for suppressing motor neuron degeneration in ALS.

Key phrases: amyotrophic lateral sclerosis, glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, motor neuron death

1. 緒言

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis:

ALS) は、1869 年にフランスの神経学の祖であるシャルコー医師により初めて報告された、極めて重篤な進行性の神経変性疾患の一つである。ALS は、上位および下位運

動ニューロンの選択的かつ進行性的変性・脱落を特徴としており、呼吸筋を含めた全身の筋肉の萎縮および脱力を呈する。その結果、人工呼吸器の装着および寝たきりが余儀なくされ、最終的に ALS 患者の半数ほどが発症後平均 3~5 年の間に死亡する。一方、脳の高次機能は正常であり、また感覚神経や自律神経は障害されないため知覚や痛覚といった感覚は保たれるのに対し、筋肉の萎縮・脱力のため本人の意思による動作および意思表示ができない本疾患は、非常に悲惨かつ残酷な疾患と言える。ALS 病態では、眼球運動障害、膀胱直腸障害および褥瘡も認められないことから、感覚機能の保持と併せて四大陰性徴候と呼ばれている。ALS の有病率は、人口 10 万人あたり 2~7 人とされており、現在我が国において約 9,000 人が本疾患に罹患している (2011 年厚生省特定疾患医療受給者証交付件数調べ)。

Fig. 1 に示すように、ALS 患者の大半は孤発例であるが、約 10% が遺伝性に発症すると考えられている。遺伝性 ALS の多くの症例は、家族歴を除けば臨床・病理学的には孤発性 ALS と非常に類似しているため、遺伝性および孤発性 ALS 間における共通の発症機序の存在が推測される。近年の分子遺伝学の進歩により遺伝性 ALS の遺伝子座が次々と同定され、その多くは常染色体優性遺伝形式を示すが、中には劣性遺伝形式を示す家系も報告されている¹⁻²⁾。なかでも優性遺伝性 ALS の原因遺伝子として *Cu/Zn superoxide dismutase-1* (SOD1) 遺伝子のミスセンス変異が 1993 年に初めて報告され³⁾、さらに翌年には Gurney らにより変異ヒト SOD1 (93 番グリシン→アラニン) 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウス (SOD1^{G93A} マウス) が作製された⁴⁾。本マウスは脊髄前角の運動ニューロンが選択的に変性することにより筋麻痺を生じるため、ALS の臨床像を非常によく再現しているモデルとして世界中で使用され、ALS 研究は発展してきた。

SOD1 は、スーパーオキシドラジカルを無毒化する 153 アミノ酸からなる酵素であり、全細胞質タンパク質の約 1% を占めるユビキタスに発現した抗酸化タンパク質の一種である。活性型 SOD1 はホモ 2 量体としておもに細胞質

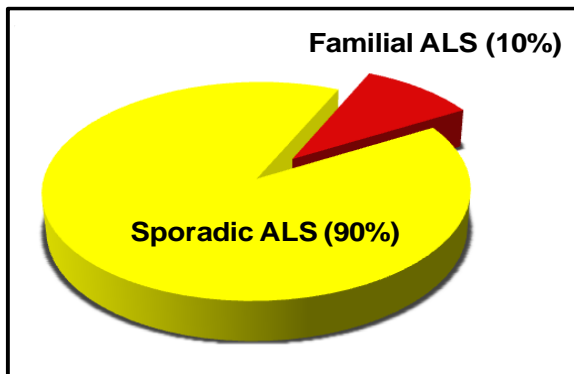


Fig. 1 The rate of sporadic an familial ALS

に存在し、各サブユニットには活性中心である銅イオンおよび構造の安定性に寄与する亜鉛イオンをそれぞれ有している⁵⁾。SOD1 の遺伝子変異は、遺伝性 ALS の約 20% に、孤発性 ALS の約 3% に認められる。これまでに報告された遺伝性 ALS を惹起する SOD1 変異には 150 以上の異なる点変異や C 末端の欠失変異が同定されているが⁶⁾、必ずしも SOD1 活性の低下を伴わないこと、そして SOD1^{G93A} マウスが運動ニューロン症状を示すのに対し、SOD1 ノックアウトマウスでは示さないことから⁷⁾、変異 SOD1 は本来の酵素活性とは関係のない “gain of toxic function” によって ALS を発症させると考えられている。変異 SOD1 が運動ニューロン内で毒性を示す機序としては、2 量体を形成して安定化している野生型 SOD1 タンパク質と比較して、変異 SOD1 はタンパク質の構造変化により不溶性・不安定化し凝集能を獲得することに起因すると考えられている。実際、変異 SOD1 による遺伝性 ALS 患者の罹病期間は、変異 SOD1 タンパク質の安定性と相関することが示されている⁸⁾。これまでに提唱されている変異 SOD1 による運動ニューロン死の分子機構としては、プロテアソームによるタンパク質分解経路の異常、ミトコンドリアの機能異常、酸化ストレス、小胞体ストレス、グルタミン酸興奮毒性および軸索輸送の異常等が挙げられるが¹⁾、いずれも決定的な原因には至らない。

上記の様な現状の中、ALS の新たな治療ターゲットを同定するために、様々な ALS モデル動物⁹⁻¹⁰⁾、ALS モデル細胞株¹¹⁾ および ALS 患者の神経組織¹²⁾ を用いて DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイルの解析が積極的に行われてきた。その結果、ALS 病態には炎症因子およびアポトーシス関連因子が大きく関与すること¹⁰⁾ が解明されてきた一方で、これらの研究により ALS 研究における網羅的遺伝子発現解析の問題点が少しずつ浮き彫りとなってきた。その例を以下に示す。

- 1) ヒトおよび動物モデル間の相違性
- 2) 発症形態の違い (遺伝性または孤発性) による遺伝子発現の変化
- 3) 組織サンプルの摘出時期の違いによる病態進行度依存的な差異
- 4) 細胞特異性の違い (運動ニューロン、アストロサイトおよびミクログリア等)

結果として、網羅的遺伝子発現解析はその再現性の低さ故に ALS の治療に向けた科学的かつ合理的なアプローチ法の開発にまでは至っていない。事実、これまで実施されてきた ALS ゲノム研究に関して、試験間における結果の相同性はわずか 5% であることが報告されている¹³⁾。したがって、ALS の病因解明には単一モデルのみを用いた検討ではなく、ALS モデル動物および細胞株から臨床サンプルに至るまで、様々な視点から包括的に標的因子を検討していくことが必要となっている。

一方、マイクロアレイ技術は近年大幅に飛躍し、検出感度向上やゲノムのカバー率の向上によりこれまで検出できなかった因子の同定が可能となっている。本研究では新規 ALS 病態関連因子を探索するために、DNA マイクロアレイ法により ALS 発症後 14 週齢 SOD1^{G93A} マウス脊髄における遺伝子発現解析を行ったところ、新規 ALS 病態関連候補因子として膜貫通糖タンパク質 nmb (glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B: GPNMB) の同定に成功した。GPNMB は、560 または 572 アミノ酸からなる一回膜貫通型の糖タンパク質であり、メラニン細胞特有のタンパク質である melanocyte protein 17 precursor (PMEL17) 前駆体に対し高い相同性を示す¹⁴⁾。GPNMB のマウスおよびラットのオルソログとして、それぞれ dendritic cell-associated heparin sulfate proteoglycan-dependent integrin ligand (DC-HIL) およびオステオアクチビン (osteostatin) が存在している¹⁴⁾。1995 年に低転移性メラノーマ細胞株および異種移植片において GPNMB が高発現していることが報告され、GPNMB はがん細胞の増殖性および転移性に関係があると考えられている¹⁴⁾。実際に、GPNMB の発現異常は、乳がん¹⁵⁾ やグリオーマ¹⁶⁾、肝細胞がん¹⁷⁾ など様々ながん疾患で認められている。また、がん細胞以外にも骨や皮膚といった様々な組織に幅広く分布していることが知られており、1) 骨芽細胞や破骨細胞の分化促進¹⁸⁾、2) T 細胞活性の減弱¹⁹⁾ および 3) 筋組織の再生²⁰⁾ などの様々な機能を有することが近年報告されてきた。さらに、2002 年に DBA/2J マウスにおける色素性緑内障の原因遺伝子として GPNMBR150X 変異が報告されており、視神経における発現も確認されている²¹⁾。これらの報告から、GPNMB は様々な疾患に関与することが推測されるが、神経変性疾患への関与はこれまで一切検討されていない。そこで本総説では、運動ニューロン変性を制御する新規病態関連因子の探索を行い、同定された GPNMB の ALS 病態への関与について検討した結果について述べる²²⁾。

2. 新規病態関連タンパク質 GPNMB の同定

2.1. 遺伝子発現プロファイリング: 新規 ALS 病態関連因子を探索するために、DNA マイクロアレイ法を用いて 14 週齢 SOD1^{G93A} マウス脊髄における遺伝子発現解析を行った。脊髄組織より TRIzol reagent および Qiagen RNeasy Mini Kit を用いて抽出・精製した全 RNA は、Agilent Quick Amp Labeling Kit を用いて増幅し、Cyanine 3 (Cy3) でラベルした。つづいて、500 ng テンプレート RNA および濃度・純度既知のコントロール RNA を 65°C、10 分間熱変性させた後、dT-T7 プロモータープライマーを用いて 40°C、2 時間反応させ、二本鎖 cDNA に逆転写した。逆転写酵素は 65°C、15 分間の反応により不活性化させた。さらに、生成

した cDNA を T7 RNA polymerase および Cy3 labeled-CTP 含有 transcription master mix と混合し、40°C で 2 時間反応させることにより蛍光標識された cRNA (labeled cRNA) を生成した。Labeled cRNA は Qiagen's RNeasy mini spin columns (Qiagen) を用いて精製し、30 μL の nuclease-free water に溶出した。cRNA の濃度および純度は、Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。DNA マイクロアレイは、Agilent Mouse GE 4x44K v1 Microarray (Design ID: 014868; Agilent Technologies) を用いて行った。DNA マイクロアレイの実験結果をスキャッタープロット法にて解析し、WT および SOD1^{G93A} マウス間における遺伝子発現量の変化を評価した (Fig. 2a)。アレイ上の 41,000 遺伝子の内 27,000 以上の遺伝子を検出した。ALS 病態において、2 倍以上かつ有意 ($P < 0.01$) に発現増加した遺伝子が 934 個、2 倍以上かつ有意 ($P < 0.01$) に発現低下した遺伝子が 196 個検出された。発現増加した遺伝子群に着目し、上位 5 遺伝子を table 1 に示した。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、GPNMB 遺伝子が SOD1^{G93A} マウスにおいて最も発現増加していた。リアルタイム RT-PCR 法は、SYBR Premix Ex Taq™ II および Thermal Cycler Dice® Real Time System を用いて増幅し、それぞれの DNA の定量を行った。その結果、WT マウスと比較して SOD1^{G93A} マウスにおいて GPNMB mRNA 量が有意 ($P < 0.01$) に増加していた (Fig. 2b)。

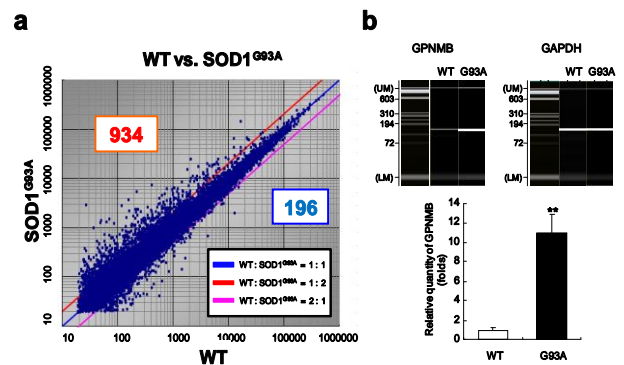


Fig. 2 GPNMB mRNA expression in spinal cords of WT and SOD1^{G93A} mice.

(a) Representative scatter plot comparison of gene expression with DNA microarray between WT and SOD1^{G93A} mice. (b) Quantitative real-time polymerase chain reaction. ** $P < 0.01$ versus WT mice (Student's *t*-test). UM, upper marker; LM, lower marker. These results were cited from ref 22.

No.	Gene name	Log2Ratio (ALS/WT)
1	glycoprotein (transmembrane) nmb	6.8
2	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	4.8
3	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	4.8
4	chemokine (C-C motif) ligand 4	4.8
5	chemokine (C-C motif) ligand 5	4.6

Table 1. Upregulated gene expression in the spinal cords of SOD1^{G93A} mice (Top 5).

The result was cited from ref 22.

2. 2. ALS 病態進行度依存的な GPNMB の発現変化：SOD1^{G93A} マウス脊髄組織における GPNMB タンパク質の発現変化を免疫染色法を用いて評価した。雄性 SOD1^{G93A} マウスおよび WT マウスにネブタール 20 mg/kg を腹腔内投与して深麻酔させ、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) を左心室内に注入して灌流固定 (灌流圧 130 cm H₂O) した後、脊髄組織を摘出した。その後、O.C.T. compound にて脊髄を包埋し、速やかに液体窒素で凍結しクリオスタット (CM1850; Leica, Tokyo, Japan) を用いて、薄切組織切片を作製した。組織切片は 0.3% H₂O₂ 含有メタノールで 30 分間反応させた後、10% normal goat serum で 2 時間ブロッキングした。ブロッキング後、Can Get Signal immunostain solution A にて希釈した goat anti-GPNMB polyclonal antibody (×1/50) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、biotinylated anti-mouse IgG (×1/1,000) にて 2 時間反応させ、Vectastain Elite ABC kit および DAB peroxidase substrate kit を用いて染色した。EUKITT 試薬を用いてカバーガラスで封入した後顕微鏡 (BX50; Olympus, Tokyo, Japan) 下で観察し、デジタルカメラ (COOLPIX 4500; Nikon, Tokyo, Japan) を用いて記録した。免疫染色後の脊髄の輝度値を定量した結果、SOD1^{G93A} マウス脊髄において、10 週齢より ALS 病態の進行に伴い GPNMB タンパク質の発現量は有意 ($P < 0.01$) に増加した (Fig. 3a)。一方、WT マウスにおける GPNMB タンパク質の発現量は軽微であり、また加齢による GPNMB の発現量の変化は認められなかった (Fig. 3a)。GPNMB は、a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10 や ADAM12 などのプロテアーゼにより ectodomain shedding と呼ばれる切断を受け、分子量 90 kDa の細胞外ドメインが放出されることが知られている²³⁻²⁴。Liu らの報告によると、変異 SOD1 を発現したミクログリアは、ADAM10 または ADAM17 の活性化を介して細胞傷害性サイトカインを放出することから²⁵、GPNMB は ALS 病態下において酵素的切断を受けることが予想される。したがって、各週齢の SOD1^{G93A} マウス脊髄における、GPNMB タンパク質の発現量をウェスタンブロット法にて評価した。脊髄組織中のタンパク質抽出は、RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Igepal CA-630, 1/100 protease inhibitor cocktail, 1/100 phosphatase inhibitor cocktail II および 1/100 phosphatase inhibitor cocktail III 含有) 100 μ L を組織の入ったマイクロチューブに添加し、ホモジナイザー (Physcotron, Microtec, Chiba, Japan) によりホモジネート処理を行った。その後、10,000 \times g, 4°C, 20 分間遠心分離し、その上清をタンパク質抽出液とした。BCA 法によりタンパク質濃度を定量後、RIPA buffer および等量の sample buffer solution (2ME+) (×1/4) を添加し、各サンプルのタンパク質濃度を 5 または 2 μ g/mL とした。調製したサンプルを、5-20% のポリアクリルアミ

ドゲル (SuperSepTM; Wako) を用いて電気泳動により展開した。転写後、PVDF 膜を Blocking One-P によってブロッキングした後、Can Get Signal 1 で希釈した goat anti-GPNMB polyclonal antibody (×1/1,000) と 4°C で一晩反応させた。二次抗体には Can Get Signal 2 で希釈した HRP-conjugated anti-goat antibody (×1/100,000) を用いた。ImmunoStar LD に 20 秒間振盪した後、Luminescent image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) で撮影した。14 週齢より 90 kDa の GPNMB 細胞外断片が生じ、さらに 100 kDa のグリコシル化 GPNMB、65 kDa の非グリコシル化 GPNMB および C 末端断片と思われる約 25 および 15 kDa の GPNMB タンパク質の増加が、20 週齢において認められた (Fig. 3b)。

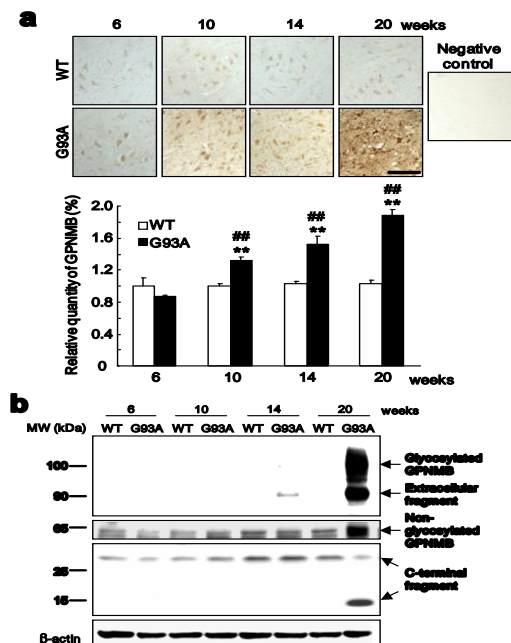


Fig. 3 GPNMB expression in spinal cords of WT and SOD1^{G93A} mice.

(a) Time-dependent increase in GPNMB in the lumbar spinal cords of SOD1^{G93A} mice. Bar = 50 μ m. ** $P < 0.01$ versus WT mice (Student's *t*-test). ** $P < 0.01$ versus 6-week-old SOD1^{G93A} mice (Dunnett's test). (b) Cleavage and up-regulation of GPNMB during disease progression in SOD1^{G93A} mice. These results were cited from ref 22.

2. 3. SOD1^{G93A} マウス脊髄における GPNMB の局在：GPNMB 陽性細胞を同定するために、14 週齢 SOD1^{G93A} マウス脊髄を用いて蛍光免疫二重染色を行った。一次抗体は、goat anti-GPNMB polyclonal antibody (×1/50)、mouse anti-NeuN monoclonal antibody (×1/250)、mouse anti-GFAP monoclonal antibody (×1/1,000)、rabbit anti-Iba-1 antibody (×1/1,000) を用いた。二次抗体は、Alexa 488-conjugate rabbit anti-mouse IgG (×1/1,000)、Alexa 546-conjugate rabbit anti-goat IgG (×1/1,000)、Alexa 488-conjugate donkey anti-goat IgG (×1/1,000)、Alexa 546-conjugate donkey anti-rabbit IgG (×1/1,000) を用いた。SOD1^{G93A} マウス脊髄

灰白質 (gray matter) における運動ニューロンに相当する NeuN 陽性細胞、GFAP 陽性星状アストロサイトおよび白質 (white matter) における GFAP 陽性繊維状アストロサイトにおいて GPNMB タンパク質の発現が認められた (Figs. 4a, b)。一方、Iba-1 陽性活性化ミクログリアにおける発現は認められなかった (Figs. 4a, b)。WT マウス脊髄では、NeuN 陽性運動ニューロンにおける GPNMB の発現が認められたが、アストロサイトおよびミクログリアでの発現は認められなかった (Figs. 4a, b)。

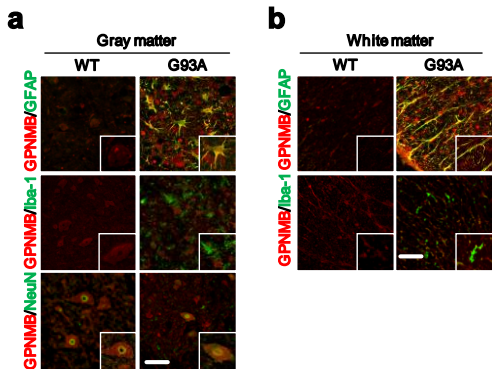


Fig. 4 GPNMB expressing cells in the spinal cord. Enhanced GPNMB immunoreactivity in NeuN-positive motor neurons and GFAP-positive astrocytes, but not in Iba-1-positive microglia in the spinal cord gray (a) or white (b) matter of 14-week-old SOD1^{G93A} mice. Bar = 50 μm. These results were cited from ref 22.

3. GPNMB の薬理学的作用

3.1. GPNMB に対する SOD1^{G93A} の影響：運動ニューロンにおける GPNMB の発現が、SOD1^{G93A} によりどのような影響を受けるかを検討した。今回試験に用いた NSC-34 細胞は、Cellmatrix Type I-C を用いてコーティングを行った 96 穴プレート中に 7,000 細胞/well、24 穴プレート中に 35,000 細胞/well または 6 穴プレート中に 200,000 細胞/well になるように抗生物質不含有の培地を用いて播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で一晩培養した。翌日各穴 50 μL の Opti-MEM、0.2 μg の SOD1^{WT} または SOD1^{G93A} 発現プラスミドおよび 0.5 μL の Lipofectamine 2000 Reagent を混合・添加し、遺伝子導入を行った。遺伝子導入 6 時間後に抗生物質含有培地に交換した後、各時間において細胞を回収し試験に用いた。なお、12 および 24 穴プレートを用いた場合の細胞、DNA および各試薬の量は、それぞれ 96 穴プレートの 5 および 10 倍量とした。遺伝子導入 6 時間後に抗生物質含有培地に交換し、遺伝子導入 2.5 日後に一度培地交換を行った後、5 日後に試験に用いた。遺伝子導入により、NSC-34 細胞へ SOD1^{WT} および SOD1^{G93A} を発現させた結果、SOD1^{WT} と比較して SOD1^{G93A} を発現させた細胞では、成熟したグリコシル化 GPNMB タンパク質の発現量が有意 ($P < 0.05$) に低下した (Figs. 5a, b)。一方、

未成熟な非グリコシル化 GPNMB の発現量は変化しなかった (Figs. 5a, c)。また、NucleoSpin RNA II を用いて全 RNA を抽出し、PrimeScript RT Master Mix を用いて cDNA を作製した後、リアルタイム RT-PCR を実施したところ、SOD1^{G93A} は GPNMB mRNA の発現には影響を及ぼさなかった (Fig. 5d)。本結果より、SOD1^{G93A} は GPNMB の翻訳後の成熟過程に影響を与え、その結果グリコシル化 GPNMB タンパク質の低下につながることを推測された。変異 SOD1 は、translocon-associated protein、heat shock protein 25 (Hsp25)、Hsp/heat shock cognate 70 (Hsp/Hsc70) および degradation in endoplasmic reticulum protein 1 (Derlin-1) などの様々なタンパク質と相互作用することが知られている²⁶⁻²⁷。したがって、GPNMB および SOD1^{G93A} 間の相互作用を免疫沈降法により検討した。本試験は Pierce Classic IP kit を用いて実施した。Myc 標識 SOD1^{G93A} を導入した NSC-34 細胞では、SOD1^{G93A} と GPNMB の共沈降が認められ、さらにポリユビキチン化された GPNMB の存在が確認された (Fig. 5e)。一方、SOD1^{WT} 発現細胞では、上記所見は認められなかった (Fig. 5e)。免疫蛍光染色による可視化により、ポリユビキチン化された GPNMB は細胞質に凝集体を形成していることが明らかになった (Fig. 5f)。つづいて、GPNMB siRNA を用いて、GPNMB の発現低下に伴う SOD1^{G93A} 毒性に対する抵抗性の変化を検討した。GPNMB タンパク質の発現低下により、SOD1^{G93A} による死細胞数の増加 (Fig. 5g) および細胞生存率の低下が認められた (Fig. 5h)。

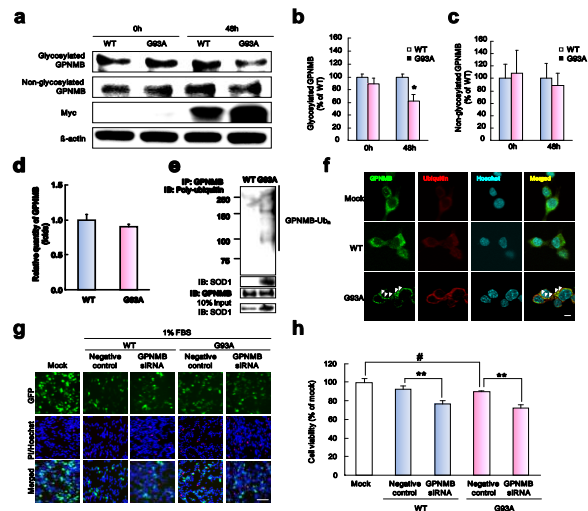


Fig. 5 Downregulation of glycosylated GPNMB through interaction with SOD1^{G93A}, leading to motor neuron death. (a-c) Expression of GPNMB. * $P < 0.05$ versus SOD1^{WT} (Student's *t*-test). (d) RT-PCR. (e) Immunoprecipitation with an antibody to GPNMB (IP: GPNMB) and analyzed using immunoblotting with antibodies to ubiquitin, GPNMB, and Myc. (f) Confocal photomicrographs; GPNMB (green), ubiquitin (red), and Hoechst 33342 (blue). GPNMB are partly colocalized with ubiquitin (arrowheads). Bar = 5 μm. (g, h) NSC34 cells were cotransfected with small interfering RNA (siRNA) against GPNMB or a nonspecific sequence (negative control) and EGFP-tagged mock, SOD1^{WT}, or SOD1^{G93A} for 48

h. Representative fluorescence microscopy showing nuclear staining for Hoechst 33342 (blue) and propidium iodide (red) (g). FBS, fetal bovine serum. The cell viability was reduced 48 h after the cotransfection of siRNA and SOD1^{G93A} (h). #*P* < 0.05 versus mock (Student's *t*-test). ***P* < 0.01 versus each negative control (Tukey's test). Bar = 100 μm. These results were cited from ref 22.

3.2. GPNMB の神経保護作用：本章 2.2. では、GPNMB タンパク質は ALS 病態下で ectodomain shedding を受け細胞外へ放出される可能性を示した。本結果に基づき、つづいて SOD1^{G93A} による細胞障害に対するリコンビナント細胞外 GPNMB 断片の作用を検討した。NSC-34 細胞に mock、SOD1^{WT} または SOD1^{G93A} 発現プラスミドを導入した後、48 時間後に FBS を含まない培地に置換し、GPNMB (0.025, 0.25, 2.5 μg/mL) を添加し、さらに 24 時間培養した。SOD1^{G93A} 発現プラスミドを導入した NSC-34 細胞に血清除去処置を行うことにより、対照群と比較して PI 陽性細胞数が有意 (*P* < 0.05) に増加した (Fig. 6a)。リコンビナント GPNMB は、SOD1^{G93A} および血清除去により誘発された PI 陽性細胞数の増加を濃度依存的かつ 0.25 および 2.5 μg/ml の濃度で有意 (*P* < 0.05 または 0.01) に抑制した (Fig. 6a)。また、過去に GPNMB 細胞外断片による刺激により生存シグナルに関与する ERK1/2 のリン酸化が促進されることが報告されており²³⁾、さらに GPNMB 細胞外断片は SOD1^{G93A} による細胞死を抑制したことから、つづいてリコンビナント GPNMB による ERK1/2 および細胞生存シグナルに関与する Akt のリン酸化レベルの変化を検討した。リコンビナント GPNMB 処置により、ERK1/2 および Akt タンパク質のリン酸化が有意 (*P* < 0.05 または 0.01) に亢進した (Fig. 6b)。また、ホスホイノシチド 3 キナーゼ (phosphoinositide 3-kinase: PI3K) 阻害剤である LY294002 (20 μM) または分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated protein kinase kinase: MEK) 阻害剤である U0126 (5 μM) を GPNMB と同時に添加することによりリコンビナント GPNMB の細胞保護作用は有意 (*P* < 0.01) に抑制された (Figs. 6c, d)。

これまでの結果を総合的に判断すると一つの矛盾が生じる。In vivo における検討では、SOD1^{G93A} マウス脊髄において、病態進行に伴う GPNMB タンパク質の発現増加が認められたが (Fig. 3)、NSC-34 細胞を用いた in vitro 試験では、SOD1^{G93A} の影響により運動ニューロンにおける GPNMB タンパク質の発現量は減少した (Fig. 5)。そこで、SOD1^{G93A} マウス脊髄において運動ニューロン同様 GPNMB タンパク質を発現していたアストロサイトに注目した。Normal human astrocytes (NHAs) は growth medium を添加した Astrocyte Basal Medium (ABM) を用いて 37°C、5% CO₂ 中で培養した。96 穴プレート中に 10,000 細胞/well または 12 穴プレート中に 40,000 細胞/well になるように抗生物質不含有 ABM を用いて播種した NHAs に myc

標識 mock、SOD1^{WT} または SOD1^{G93A} 発現プラスミドを導入後 5 日間培養し、その培養上清を回収した。さらに human Osteoactivin/GPNMB DuoSet を用いて ELISA を実施し、培養上清中に含まれる GPNMB タンパク質量を定量した。Mock および SOD1^{WT} 発現細胞両群間では培養上清中の GPNMB 含有量に差が認められなかったが、SOD1^{G93A} 発現細胞では他の二群に比べ有意 (*P* < 0.01) に増加していた (Fig. 6e)。さらに、培地中の GPNMB 量増加に伴い、有意 (*P* < 0.05) な MMP3 タンパク質の活性化 (active-MMP3) および MMP9 (pro-MMP9) タンパク質の発現量の増加が認められた (Fig. 6f)。さらに、分泌された GPNMB の SOD1^{G93A} 誘発細胞障害に対する作用を検討した。NHAs に myc 標識 SOD1^{G93A} 発現プラスミドを導入後 5 日間培養し、その培養上清 (conditioned media: CM) を回収した。つづいて、rabbit anti-GPNMB polyclonal antibody を用いた免疫沈降により培養上清中の GPNMB を除去した (IP: GPNMB)。対照群には normal rabbit IgG を用いた (IP: C)。SOD1^{G93A} を導入した NSC-34 細胞は、免疫沈降を実施していないアストロサイト培養上清 (ABM-CM)、IP: GPNMB 培養上清および IP: C 培養上清にそれぞれ置換した。IP: GPNMB 培養上清の添加により、ABM-CM 群または対照群と比較して有意 (*P* < 0.01) に PI 陽性細胞数が増加した (Fig. 6g)。

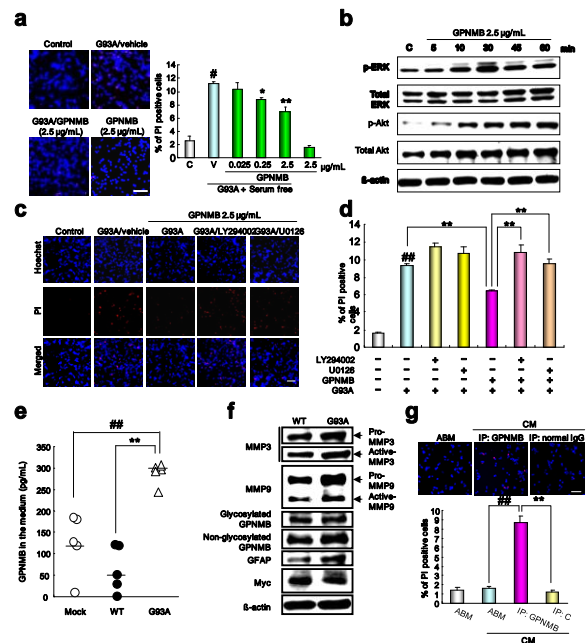


Fig. 6 The extracellular fragments of GPNMB attenuated the neurotoxicity of SOD1^{G93A}.

(a) The recombinant GPNMB at 0.25–2.5 μg/mL demonstrated a protective effect against SOD1^{G93A}-induced cell death. #*P* < 0.05 versus control (Student's *t*-test). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 versus vehicle (Dunnett's test). Bar = 100 μm. (b) Phosphorylated ERK1/2 and phosphorylated Akt level after GPNMB treatment. (c, d) The effect of GPNMB against SOD1^{G93A}-induced cell death was eliminated by LY294002 at 20 μM or by U0126 at 5 μM. ***P* < 0.01 versus control (Student's *t*-test), ***P* < 0.01 versus SOD1^{G93A} alone or

SOD1^{G93A} treated with GPNMB (Tukey's test). Bar = 100 μm. (e) Quantitative analysis of GPNMB in the conditioned media (CM). ^{##}*P* < 0.01 versus mock, ^{**}*P* < 0.01 vs. SOD1^{WT} (Tukey's test). (f) Expressions of GPNMB, MMP3, MMP9, and GFAP in NHA transfected with Myc-tagged SOD1^{WT} or SOD1^{G93A}. (g) CM from NHA transfected with SOD1^{G93A} were immunoprecipitated with an antibody to GPNMB (IP: GPNMB) or control nonimmune antibody (IP: C) and added to NSC34 cells. ^{##}*P* < 0.01 versus astrocyte basal medium, ^{**}*P* < 0.01 versus IP: C (Student's *t*-test). Bar = 100 μm. These results were cited from ref 22.

3. 3. ALS 病態に対する GPNMB の作用 : ALS 病態に対する GPNMB の作用を検討するために、SOD1^{G93A}/GPNMB ダブルトランスジェニックマウス (G93A/GPNMB マウス) を作製した (Fig. 7a)。SOD1^{G93A} マウス [B6SJL-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J] および WT マウスは、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した。GPNMB 過剰発現マウス (BDF1) は徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野 二川 健教授から譲与された。実験を行うにあたっては、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子組み換え動物は、岐阜薬科大学生命倫理・バイオセーフティー委員会に遺伝子組み換え実験申請を行い、許可を得て使用した。V5 標識 GPNMB タンパク質は、G93A/GPNMB マウス脊髄中で顕著に増加していた (Fig. 7b)。運動機能保持能力評価は小動物用ロータールード装置を用いて実施した。5 rpm で回転させたロッド上を 5 分間歩行させ、それを一週間繰り返し行った (訓練歩行)。測定試行は、5 rpm で回転させたロッド上を歩行させ、マウスがローター上から落下するまでの滞在時間を測定した (最大 10 分間)。一回の試行につき 3 回行い、最も滞在時間が長いものを記録した。本試験は週 2 回行い、装置から落下した時点を ALS の発症と定義した。また、マウスの正向反射が 15 秒間消失した時点を死亡とした。GPNMB の過剰発現により、ロータールードの保持時間および発症の有意 (*P* < 0.01) な遅延が認められた (Figs. 7c, d, f)。発症から死亡までの平均罹病期間は、G93A/- および G93A/GPNMB マウス間で差は認められなかったが (Fig. 7g)、G93A/GPNMB マウスにおける生存期間は、G93A/- マウスと比較して 8.2% 延長した (Fig. 7e)。各群の平均生存期間は、[G93A/GPNMB (n = 10), 128.9 ± 2.0 日 (mean ± SEM); G93A/- (n = 10), 119.1 ± 2.4 日 (mean ± SEM)] であった。さらに、15 週齢 G93A/GPNMB マウス脊髄における GPNMB の運動ニューロン保護作用について検討した。運動ニューロンはクレシルバイオレットを用いて染色した。凍結切片を 0.01 M phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) に浸して O.C.T. compound を洗浄した後、0.1% クレシルバイオレット液に 10 分間浸して染色後、蒸留水で 2 分間 2 回洗浄し、70%、95%、99%、無水エタノールの順に 3 分間ずつ浸し脱水した。キシレンに 5 分間

2 回浸し透徹した後、EUKITT 試薬にて封入した。G93A/- マウスで認められた運動ニューロン数の有意 (*P* < 0.01) な減少は、GPNMB の過剰発現により有意 (*P* < 0.01) に抑制された (Fig. 7h)。

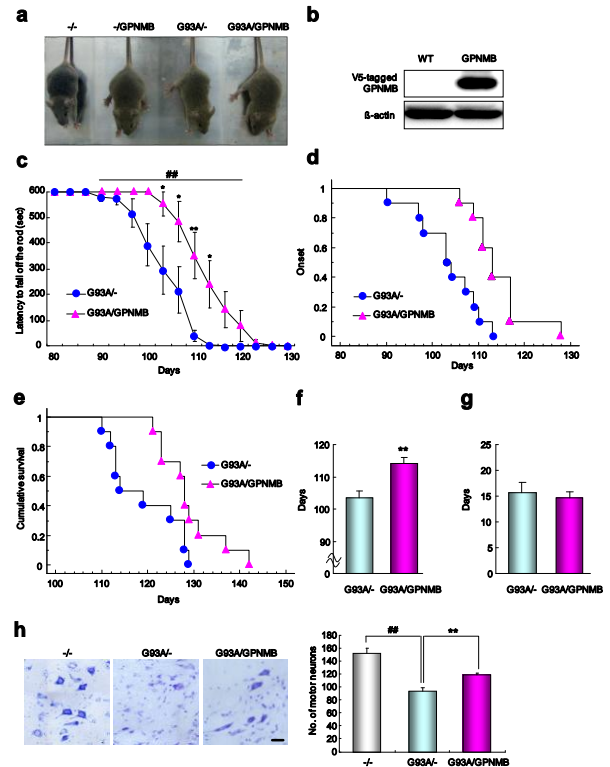


Fig. 7 Regulation of ALS pathogenesis by GPNMB. (a) Non-transgenic (-/-), GPNMB (-/GPNMB), SOD1^{G93A} (G93A/-), and SOD1^{G93A}/GPNMB double-transgenic (G93A/GPNMB) mice at approximately 5 weeks old. (b) The protein expression levels of V5-tagged GPNMB. (c) Motor performance assessed using the rotarod test for G93A/- and G93A/GPNMB mice. ^{##}*P* < 0.01 versus G93A/- mice (two-way repeated measure ANOVA). ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 versus G93A/- mice (Student's *t*-test). (d) Age of disease onset. *P* < 0.01 (log-rank test). (e) Survival curve. *P* < 0.05 (log-rank test). (f, g) Mean onset (f) and mean duration of disease progression (from onset to end stage; g). ^{**}*P* < 0.01 versus G93A/- mice (Student's *t*-test). (h) Cresyl violet staining. ^{##}*P* < 0.01 versus non-transgenic (-/-) mice, ^{**}*P* < 0.01 versus SOD1^{G93A} (G93A/-) mice. Bar = 25 μm. These results were cited from ref 22.

3. 4. ALS 患者脊髄、脳脊髄液および血清における GPNMB の発現 : ELISA を用いて孤発性 ALS 患者 (SALS) 脳脊髄液 (CSF) および血清中に含まれる GPNMB 量を検討した。対照患者群と比較して ALS 患者群において CSF 中の GPNMB 量の有意 (*P* < 0.01) な増加が認められた (Fig. 8a)。同様に ALS 患者血清中の GPNMB 量を定量した結果、対照患者群、アルツハイマー病患者群およびパーキンソン病患者群と比較して GPNMB の有意 (*P* < 0.01) な増加が認められた (Fig. 8b)。また、脊髄組織における GPNMB の発現を免疫組織学的に検討した。GPNMB は対照患者および ALS 患者脊髄の両方において発現していたが、GPNMB の凝集体が ALS 患者脊髄において観察され、そ

の有意 ($P < 0.01$) な増加が認められた (Fig. 8c)。一方、この凝集体は対照患者群においては観察されなかった (Fig. 8c)。

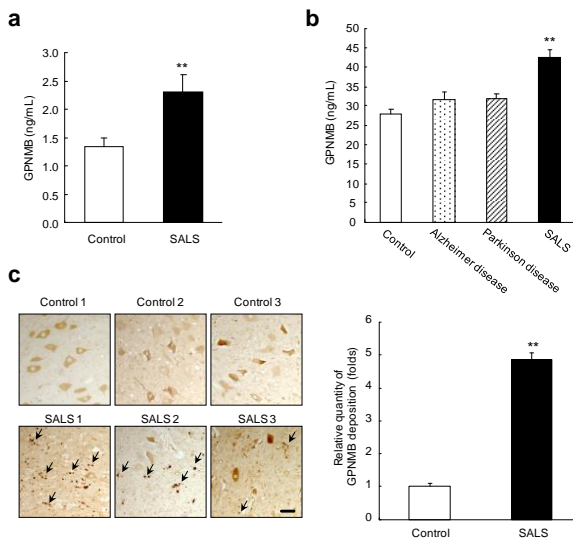


Fig. 8 Representation of GPNMB protein in cerebrospinal fluid (CSF), sera, and lumbar spinal cord tissues of sporadic ALS (SALS) patients. (a, b) The amount of GPNMB secreted into CSF (a) or sera (b). Values are mean \pm SEM ($n = 10$ to 28). ** $P < 0.01$ versus control (Mann-Whitney U -test; CSF samples). ** $P < 0.01$ versus controls and patients with Alzheimer and Parkinson diseases (Tukey's test; sera samples). (c) Representative photographs are shown for the lumbar spinal cords in the control and SALS patients. Extracellular deposition of GPNMB is observed in the lumbar spinal cords of SALS (arrows). Scale bar = 100 μ m. Values are mean \pm SEM ($n = 3$). ** $P < 0.01$ versus controls (Student's t -test). These results were cited from ref 22.

4. 考察

本検討により、新規 ALS 病態関連因子を同定する目的で、SOD1^{G93A} マウスを用いて DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を実施した。同定された GPNMB は、ALS 病態に深く関与し、神経保護作用を有することが明らかになった。

タンパク質の合成の過程で生じる不良タンパク質は、細胞の恒常性を維持するために最終的に分解除去されるが、その主体となる真核細胞における大規模なタンパク質分解系の一つに『ユビキチン・プロテアソーム系』がある。ユビキチン・プロテアソーム系において、多数のユビキチン分子が枝状につながったポリユビキチン鎖に標識されたタンパク質はプロテアソームに運ばれ加水分解を受ける。ALS の病理学的特徴の一つとしてユビキチン陽性封入体の存在が報告され²⁸⁾、病理学的診断上における重要な所見となっていることから、ALS 病態を考える上でユビキチン・プロテアソーム系は非常に重要である。本試験において、GPNMB タンパク質は SOD1^{G93A} と結合し、さらにポリユビキチン化を受け細胞質内に凝集体を形成していることが明らかとなった (Fig. 5)。したがって、

SOD1^{G93A} の発現による細胞内 GPNMB 量の減少およびそれに伴う細胞脆弱性の亢進 (Fig. 5) は、ユビキチン・プロテアソーム系による GPNMB の分解に起因するものと推測される。また、変異 SOD1 自身も Dorfin などのユビキチンリガーゼや Hsp/Hsc70-CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) 複合体との結合により、ポリユビキチン化されプロテアソームで分解されることから²⁷⁻²⁹⁾、変異 SOD1 の分解への関与が示唆された。

GPNMB の特徴として、細胞外ドメインが ADAM10 や ADAM12 などのプロテアーゼにより ectodomain shedding と呼ばれる切断を受け、細胞外に放出される²⁴⁾。本試験において細胞外フラグメントである 90 kDa GPNMB の 14 および 20 週齢の SOD1^{G93A} マウス脊髄における増加が認められたことから (Fig. 3)、ALS 病態において GPNMB の細胞外断片が切断され、病態の進行に影響を及ぼしている可能性が考えられる。実際に、*in vitro* 試験において GPNMB 細胞外断片は神経細胞の生存に関与する ERK1/2 および Akt の活性化を介して、SOD1^{G93A} の誘発神経細胞死に対する保護作用を示した (Fig. 6)。Rose らの報告によると、GPNMB はアポトーシスの抑制および血管新生の促進によりがん細胞の増殖能を亢進させる²⁴⁾。反対に、GPNMB 特異的抗体である CDX-011 は、GPNMB 高発現乳がん細胞のアポトーシスを促進させることで抗がん作用を示す³⁰⁾。さらに、線維芽細胞への GPNMB 細胞外断片添加により ERK1/2 のリン酸化が促進されることから²³⁾、細胞外に放出された GPNMB は、MEK/ERK および PI3K/Akt 経路を介して神経細胞の生存シグナルを活性化させることが示唆された。

In vitro 試験における SOD1^{G93A} を導入した NSC-34 細胞では、GPNMB タンパク質量が低下した (Fig. 5)。一方、SOD1^{G93A} マウス脊髄において GPNMB は増加しており一見矛盾しているように考えられる。しかしながら、免疫組織学検討により GPNMB は運動ニューロン以外に活性化アストロサイトに発現していることが明らかになった (Fig. 4)。したがって、運動ニューロンでは SOD1^{G93A} タンパク質が発現することにより GPNMB が発現低下する一方で、活性化アストロサイトにおいて発現増加したことが推測される。実際に、SOD1^{G93A} を導入した NHA 系では、非グリコシル化 GPNMB の発現上昇傾向が認められた (Fig. 6)。

本試験の結果を踏まえて治療的観点から考察すると、GPNMB 特異的な切断酵素を同定し、さらにこれらの酵素群を活性化することにより、可能な限り早期に GPNMB の ectodomain shedding を促すことが ALS の治療戦略につながると考えられる。第一章でも述べたように、近年アストロサイトとミクログリアなどの非神経細胞が ALS 病態に深く関与していることが報告されており、ALS の運動ニューロン死は「非細胞自律性運動神経細胞死」と見なさ

れている³¹⁾。本試験により、活性化アストロサイトに発現している GPNMB は ectodomain shedding を受け細胞外へ放出されることが明らかになった (Fig. 6)。アストロサイトは、神経栄養因子の放出などの神経細胞の恒常性維持に働く多くの重要な機能を有することが知られている³²⁾。GPNMB のグリコシル化は、SOD1^{G93A} との相互作用により抑制され、結果として運動ニューロンの脆弱性を増加させた (Fig. 5)。さらに、活性化アストロサイトは GPNMB の細胞外断片を分泌することで運動ニューロンにおける SOD1^{G93A} の神経毒性を減弱させた (Fig. 6)。これらの結果より、運動ニューロンのような周辺細胞の恒常性を維持するために、活性化アストロサイトからの GPNMB の分泌が促進されていることが示唆される。In vivo 試験では、GPNMB を過剰発現した SOD1^{G93A} マウスは有意に発症を遅らせ生存期間を延長させたが (Fig. 7)、その効果は当初予想していたよりも微弱であった。その理由の一つとして、運動ニューロン変性および活性化アストロサイトからの GPNMB の分泌が生じる病態時期の違いが考えられる。過去の検討により、SOD1^{G93A} マウスの運動ニューロンの脱落は発症前の 10 週齢より生じることを認めているが、切断型 90 kDa GPNMB の増大は 14 週齢以降でしか認められなかった (Fig. 3)。GPNMB 細胞外断片は SOD1^{G93A} 誘発神経細胞死を抑制する作用を有するにも関わらず、その分泌が促進される時期が比較的病態後期であるため、本来の効力を十分に示すことができなかつた可能性が考えられる。したがって、ALS 病態の比較的早い段階において GPNMB の ectodomain shedding を促進することが重要であると考えられる。

上記の結果および考察を踏まえて、ALS 病態における GPNMB の修飾過程を Fig. 9 に示した。運動ニューロンにおいて、GPNMB は SOD1^{G93A} タンパク質と相互作用しポリユビキチン化を受けることで、細胞内のグリコシル化成熟 GPNMB タンパク質が減少する。その結果、細胞自身の脆弱性が充進し運動ニューロン死へと至る。一方、活性化アストロサイトでは、運動ニューロン死を抑制するために、GPNMB は切断を受け積極的に細胞外に放出される。このように GPNMB は発現する細胞の違いにより異なった修飾過程を経て ALS 病態に関与していることが推測される。

さらに、臨床サンプルを用いた試験により、ALS 患者脊髄における GPNMB の凝集体が観察された (Fig. 8)。疾患部位における凝集体形成は、多くの神経変性疾患において確認されており、例えばアルツハイマー病におけるアミロイド β³³⁾、ハンチントン病におけるポリグルタミンタンパク質³⁴⁾、プリオン病におけるプリオン³⁵⁾などが知られている³⁶⁾。近年、ALS においても新規 ALS 関連異常タンパク質として TDP-43 の蓄積が報告された³⁷⁾。これらの異常タンパク質は神経細胞内に封入体を形成し、神経細

胞に対して毒性を示すと考えられている。今回脊髄内において凝集体が観察された GPNMB はメラニン細胞特有のタンパク質である PMEL17 との相同性が高い。この PMEL17 は前アミロイドオリゴマーであり、アミロイド線維を形成することが報告されている³⁸⁾。ALS 病態において GPNMB の発現量が増加し、細胞外フラグメントが切断されることで GPNMB も同様にアミロイド線維を形成して凝集する可能性が考えられる。アミロイド線維は一般的に不溶性のクロス β シート構造の集合体であり、アミロイドの凝集体のなかにはアミロイド β のように毒性を示すと考えられているものも存在する³³⁾。しかし、この PMEL17 はメラニンを形成するタンパク質でありアミロイド線維を形成することで、紫外線ストレスおよび酸化ストレスを軽減することが知られている³⁹⁾。したがって、ALS 患者脊髄において観察された GPNMB の凝集体も ALS 病態において生じる酸化ストレスに対して保護作用を示している可能性が考えられる。また、本試験では脊髄組織だけでなく ALS 患者 CSF および血清中において GPNMB 量が増加していることが明らかになった。GPNMB は前述した通り、ADAM10 により切断される膜タンパク質である。本試験において、運動ニューロン変性を抑制するために、脊髄における GPNMB 細胞外断片が増加した結果、CSF および血中への移行量が増加した可能性が示唆された。したがって、GPNMB は ALS のバイオマーカーとして有用なツールとなることが考えられる。

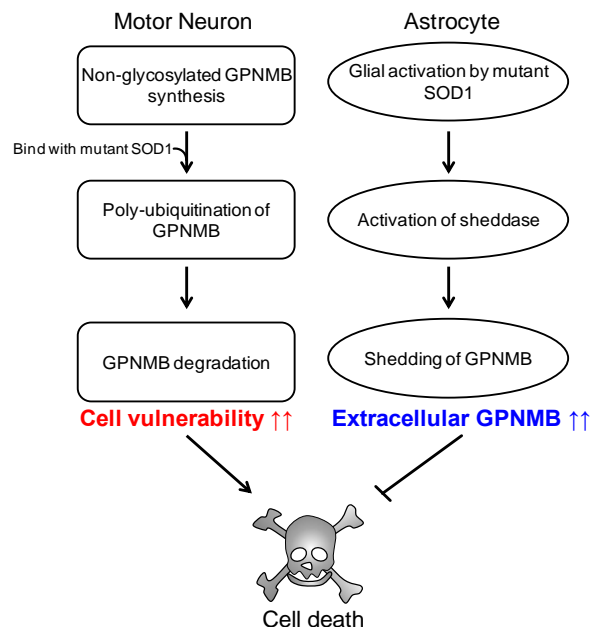


Fig. 9 Hypothesized mechanisms for GPNMB regulation of motor neuron degeneration in ALS.

In motor neurons, glycosylation of GPNMB is inhibited by the interaction with SOD1^{G93A} and GPNMB polyubiquitination. The downregulation of glycosylated GPNMB increases motor neuron vulnerability, ultimately triggering motor neuron death. Activated astrocytes secrete the extracellular fragments of GPNMB. The secretion of GPNMB is mediated by metalloproteinases such as a disintegrin and metalloproteinases

and the fragments attenuate the neurotoxicity of SOD1^{G93A} in motor neurons. Promoting the release of GPNMB extracellular fragments may rescue the motor neurons. The image was cited from ref 22.

以上、本研究では *in vivo* および *in vitro* ALS モデルおよび ALS 患者サンプルを用いて、新規 ALS 病態関連因子 GPNMB が ALS 病態に深く関与していることを初めて示した。GPNMB は運動ニューロン変性を抑制することで、運動ニューロンの恒常性維持に重要な役割を果たしている。さらにヒト ALS 患者 CSF、血清および脊髄中における GPNMB の発現量の増加が認められたことから、GPNMB は、有用な ALS の新規治療標的およびバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

5. 結論

新規 ALS 病態関連因子 GPNMB が運動ニューロン変性を抑制し、運動ニューロンの恒常性維持に寄与することで ALS 病態に深く関与していることが初めて示された。動物モデルのみならずヒト ALS 患者 CSF、血清および脊髄中における GPNMB の発現量の増加が認められたことから、GPNMB は有用な ALS の新規治療標的およびバイオマーカーとなる可能性が示唆された。以上より、GPNMB が ALS 病態に対して重要な役割を果たしていることが示唆され、ALS の病態機序解明、新規治療法並びに治療薬の開発への糸口となる可能性が期待できる。

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、御指導、御支援並びに実験材料の御提供を賜りました岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野教授 犬塚 貴博士、名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学教授 祖父江 元博士並びに井口 洋平博士、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野教授 二川 健博士、独立行政法人国立病院機構さいがた病院臨床研究部長 山田 光則博士、新潟大学脳研究所病理学分野教授 高橋 均博士、愛知医科大学脳卒中センター准教授 丹羽 淳一博士、岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物治療学研究室教授 保住 功博士に心からの感謝の意を表します。

7. 参考文献

- 1) L. C. Wijesekera and P. N. Leigh, *Orphanet J Rare Dis.* **4**, 3 (2009).
- 2) C. Vande Velde, P. A. Dion and G. A. Rouleau, *FL1000 Biol Rep.* **3**, 18 (2011).
- 3) D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P.

- Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Regan, H. X. Deng and et al., *Nature.* **362**, 59-62 (1993).
- 4) M. E. Gurney, H. Pu, A. Y. Chiu, M. C. Dal Canto, C. Y. Polchow, D. D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y. W. Kwon, H. X. Deng and et al., *Science.* **264**, 1772-5 (1994).
- 5) J. M. McCord and I. Fridovich, *J Biol Chem.* **244**, 6049-55 (1969)-F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, M. Martinelli, Y. Furukawa and T. V. O'Halloran, *J Biol Chem.* **279**, 47998-8003 (2004).
- 6) P. M. Andersen, *Curr Neurol Neurosci Rep.* **6**, 37-46 (2006).
- 7) A. G. Reaume, J. L. Elliott, E. K. Hoffman, N. W. Kowall, R. J. Ferrante, D. F. Siwek, H. M. Wilcox, D. G. Flood, M. F. Beal, R. H. Brown, Jr., R. W. Scott and W. D. Snider, *Nat Genet.* **13**, 43-7 (1996).
- 8) T. Sato, T. Nakanishi, Y. Yamamoto, P. M. Andersen, Y. Ogawa, K. Fukada, Z. Zhou, F. Aoike, F. Sugai, S. Nagano, S. Hirata, M. Ogawa, R. Nakano, T. Ohi, T. Kato, M. Nakagawa, T. Hamasaki, A. Shimizu and S. Sakoda, *Neurology.* **65**, 1954-7 (2005).
- 9) L. Ferraiuolo, P. R. Heath, H. Holden, P. Kasher, J. Kirby and P. J. Shaw, *J Neurosci.* **27**, 9201-19 (2007)-M. K. Olsen, S. L. Roberds, B. R. Ellerbrock, T. J. Fleck, D. K. McKinley and M. E. Gurney, *Ann Neurol.* **50**, 730-40 (2001)-C. S. Lobsiger, S. Boillee and D. W. Cleveland, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 7319-26 (2007).
- 10) T. Yoshihara, S. Ishigaki, M. Yamamoto, Y. Liang, J. Niwa, H. Takeuchi, M. Doyu and G. Sobue, *J Neurochem.* **80**, 158-67 (2002).
- 11) M. R. Vargas, M. Pehar, P. J. Diaz-Amarilla, J. S. Beckman and L. Barbeito, *J Neurosci Res.* **86**, 3515-25 (2008).
- 12) F. Dangond, D. Hwang, S. Camelo, P. Pasinelli, M. P. Frosch, G. Stephanopoulos, R. H. Brown, Jr. and S. R. Gullans, *Physiol Genomics.* **16**, 229-39 (2004)-S. Ishigaki, J. Niwa, Y. Ando, T. Yoshihara, K. Sawada, M. Doyu, M. Yamamoto, K. Kato, Y. Yotsumoto and G. Sobue, *FEBS Lett.* **531**, 354-8 (2002)-Y. M. Jiang, M. Yamamoto, Y. Kobayashi, T. Yoshihara, Y. Liang, S. Terao, H. Takeuchi, S. Ishigaki, M. Katsuno, H. Adachi, J. Niwa, F. Tanaka, M. Doyu, M. Yoshida, Y. Hashizume and G. Sobue, *Ann Neurol.* **57**, 236-51 (2005)-A. Malaspina, N. Kaushik and J. de Belleruche, *J Neurochem.* **77**, 132-45 (2001)-D. Offen, Y. Barhum, E. Melamed, N. Embacher, C. Schindler and G. Ransmayr, *J Mol Neurosci.* **38**, 85-93 (2009)-X. S. Wang, Z. Simmons, W. Liu, P. J. Boyer and J. R. Connor, *Amyotroph Lateral Scler.* **7**, 201-10 (2006).
- 13) L. C. Kudo, L. Parfenova, N. Vi, K. Lau, J. Pomakian, P. Valdmanis, G. A. Rouleau, H. V. Vinters, M. Wiedau-Pazos and S. L. Karsten, *Hum Mol Genet.* **19**, 3233-53 (2010).
- 14) M. A. Weterman, N. Ajubi, I. M. van Dinter, W. G. Degen, G. N. van Muijen, D. J. Rutter and H. P. Bloemers, *Int J Cancer.* **60**, 73-81 (1995).
- 15) A. A. Rose, F. Pepin, C. Russo, J. E. Abou Khalil, M. Hallett and P. M. Siegel, *Mol Cancer Res.* **5**, 1001-14 (2007).
- 16) C. T. Kuan, K. Wakiya, J. M. Dowell, J. E. Herndon, 2nd,

- D. A. Reardon, M. W. Graner, G. J. Riggins, C. J. Wikstrand and D. D. Bigner, *Clin Cancer Res.* **12**, 1970-82 (2006)-J. N. Rich, Q. Shi, M. Hjelmeland, T. J. Cummings, C. T. Kuan, D. D. Bigner, C. M. Counter and X. F. Wang, *J Biol Chem.* **278**, 15951-7 (2003).
- 17) M. Onaga, A. Ido, S. Hasuike, H. Uto, A. Moriuchi, K. Nagata, T. Hori, K. Hayash and H. Tsubouchi, *J Hepatol.* **39**, 779-85 (2003).
- 18) V. M. Ripoll, N. A. Meadows, L. J. Raggatt, M. K. Chang, A. R. Pettit, A. I. Cassady and D. A. Hume, *Gene.* **413**, 32-41 (2008)-S. M. Abdelmagid, M. F. Barbe, M. C. Rico, S. Salihoglu, I. Arango-Hisijara, A. H. Selim, M. G. Anderson, T. A. Owen, S. N. Popoff and F. F. Safadi, *Exp Cell Res.* **314**, 2334-51 (2008).
- 19) J. S. Chung, I. Dougherty, P. D. Cruz, Jr. and K. Ariizumi, *J Immunol.* **179**, 5778-84 (2007).
- 20) T. Ogawa, T. Nikawa, H. Furochi, M. Kosyogi, K. Hirasaka, N. Suzue, K. Sairyu, S. Nakano, T. Yamaoka, M. Itakura, K. Kishi and N. Yasui, *Am J Physiol Cell Physiol.* **289**, C697-707 (2005).
- 21) M. G. Anderson, R. S. Smith, N. L. Hawes, A. Zabaleta, B. Chang, J. L. Wiggs and S. W. John, *Nat Genet.* **30**, 81-5 (2002).
- 22) H. Tanaka, M. Shimazawa, M. Kimura, M. Takata, K. Tsuruma, M. Yamada, H. Takahashi, I. Hozumi, J. Niwa, Y. Iguchi, T. Nikawa, G. Sobue, T. Inuzuka and H. Hara, *Sci Rep.* **2**, 573 (2012).
- 23) H. Furochi, S. Tamura, M. Mameoka, C. Yamada, T. Ogawa, K. Hirasaka, Y. Okumura, T. Imagawa, S. Oguri, K. Ishidoh, K. Kishi, S. Higashiyama and T. Nikawa, *FEBS Lett.* **581**, 5743-50 (2007).
- 24) A. A. Rose, M. G. Annis, Z. Dong, F. Pepin, M. Hallett, M. Park and P. M. Siegel, *PLoS One.* **5**, e12093 (2010).
- 25) Y. Liu, W. Hao, A. Dawson, S. Liu and K. Fassbender, *J Biol Chem.* **284**, 3691-9 (2009).
- 26) G. A. Shinder, M. C. Lacourse, S. Minotti and H. D. Durham, *J Biol Chem.* **276**, 12791-6 (2001)-J. Wang, H. Slunt, V. Gonzales, D. Fromholt, M. Coonfield, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and D. R. Borchelt, *Hum Mol Genet.* **12**, 2753-64 (2003)-C. B. Kunst, E. Mezey, M. J. Brownstein and D. Patterson, *Nat Genet.* **15**, 91-4 (1997).
- 27) M. Urushitani, J. Kurisu, M. Tateno, S. Hatakeyama, K. Nakayama, S. Kato and R. Takahashi, *J Neurochem.* **90**, 231-44 (2004).
- 28) A. Migheli, L. Autilio-Gambetti, P. Gambetti, C. Moccellini, M. C. Vigliani and D. Schiffer, *Neurosci Lett.* **114**, 5-10 (1990)-P. N. Leigh, H. Whitwell, O. Garofalo, J. Buller, M. Swash, J. E. Martin, J. M. Gallo, R. O. Weller and B. H. Anderton, *Brain.* **114** (Pt 2), 775-88 (1991).
- 29) J. Niwa, S. Ishigaki, N. Hishikawa, M. Yamamoto, M. Doyu, S. Murata, K. Tanaka, N. Taniguchi and G. Sobue, *J Biol Chem.* **277**, 36793-8 (2002).
- 30) A. A. Rose, A. A. Grosset, Z. Dong, C. Russo, P. A. Macdonald, N. R. Bertos, Y. St-Pierre, R. Simantov, M. Hallett, M. Park, L. Gaboury and P. M. Siegel, *Clin Cancer Res.* **16**, 2147-56 (2010).
- 31) J. Lasiene and K. Yamanaka, *Neurol Res Int.* **2011**, 718987 (2011)-K. Yamanaka, S. J. Chun, S. Boillee, N. Fujimori-Tonou, H. Yamashita, D. H. Gutmann, R. Takahashi, H. Misawa and D. W. Cleveland, *Nat Neurosci.* **11**, 251-3 (2008)-H. Ilieva, M. Polymenidou and D. W. Cleveland, *J Cell Biol.* **187**, 761-72 (2009).
- 32) E. Ekester, *Neurodegener Dis.* **1**, 88-100 (2004)-M. Dewil, D. Lambrechts, R. Sciote, P. J. Shaw, P. G. Ince, W. Robberecht and L. Van den Bosch, *Neuropathol Appl Neurobiol.* **33**, 499-509 (2007).
- 33) R. E. Tanzi, J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit and R. L. Neve, *Science.* **235**, 880-4 (1987).
- 34) D. C. Rubinsztein and J. Carmichael, *Expert Rev Mol Med.* **5**, 1-21 (2003).
- 35) S. B. Prusiner, *Science.* **216**, 136-44 (1982).
- 36) C. A. Ross and M. A. Poirier, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**, 891-8 (2005).
- 37) M. Neumann, D. M. Sampathu, L. K. Kwong, A. C. Truax, M. C. Micsenyi, T. T. Chou, J. Bruce, T. Schuck, M. Grossman, C. M. Clark, L. F. McCluskey, B. L. Miller, E. Masliah, I. R. Mackenzie, H. Feldman, W. Feiden, H. A. Kretzschmar, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee, *Science.* **314**, 130-3 (2006).
- 38) R. P. McGlinchey, F. Shewmaker, P. McPhie, B. Monterroso, K. Thurber and R. B. Wickner, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 13731-6 (2009).
- 39) D. M. Fowler, A. V. Koulov, C. Alory-Jost, M. S. Marks, W. E. Balch and J. W. Kelly, *PLoS Biol.* **4**, e6 (2006).

8. 特記事項

本総説は岐阜薬科大学博士論文（甲第 144 号）の内容を中心にまとめたものである。