



2019 年 11 月 20 日

報道関係者各位

慶應義塾大学

孤発性の筋萎縮性側索硬化症において極めて毒性の高い SOD1 タンパク質を発見 —神経難病の治療法開発に向けた新たなターゲットとして期待—

慶應義塾大学理工学部の古川良明准教授、徳田栄一助教（研究当時。現・日本大学薬学部専任講師）は、独立行政法人国立病院機構まつもと医療センター脳神経内科の大原慎司副院長（現・飯田病院神経内科）、岐阜薬科大学薬物治療学の保住功教授、兵庫医科大学学生化学講座の藤原範子教授らとの共同研究で、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）^{*1)}の患者から採取した脳脊髄液^{*2)}に、極めて細胞毒性の高い SOD1 タンパク質^{*3)}が含まれていることを世界で初めて発見しました。SOD1 タンパク質をコードする *SOD1* 遺伝子に変異が生じると ALS が発症することは以前から知られていましたが、遺伝的な背景が明らかでない孤発性の ALS においても SOD1 タンパク質が異常化し、病気の発症に関与していることが示唆されます。ALS 症例の 90～95%が孤発性の ALS であることから、本研究における発見は ALS の発症メカニズムや治療法の開発を考える上で非常に重要です。

これらの研究成果は文部科学省科学研究費助成事業 新学術領域研究「生命金属科学」などの支援のもとに行われたもので、その研究成果は国際科学誌 *Molecular Neurodegeneration* に、2019 年 11 月 19 日にオンライン版で発表されました。

1. 本研究のポイント

- ・神経難病の一つで、原因遺伝子が明らかでない孤発性の筋萎縮性側索硬化症（ALS）において、患者の脳脊髄液では SOD1 と呼ばれるタンパク質の構造が異常化していることを発見しました。
- ・ALS 患者の脳脊髄液は極めて高い細胞毒性を発揮し、その毒性は構造異常型の SOD1 タンパク質に起因することを見出しました。
- ・脳脊髄液から構造異常型の SOD1 タンパク質を除去すると、運動ニューロン様の培養細胞に対する毒性が大幅に軽減しました。
- ・これまでは、ALS の主要な病変部位である脊髄に研究の焦点が置かれてきましたが、本研究は、脳脊髄液における SOD1 タンパク質が ALS の病態に関与している可能性を示すもので、治療法の開発に向けた新たな一歩になることが期待されます。

2. 研究背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、脳や脊髄にある運動ニューロンが変性する成人発症型の神経筋疾患で、日本国内にはおよそ 1 万人の患者がいると報告されています。発症年齢や罹病期間などは患者によって異なりますが、筋力低下・筋萎縮・麻痺などの症状とともに、発症後 3～5 年ほどで呼吸困難となるため、人工呼吸器による補助が必要になります。認可されている ALS 治療薬はリルズールとエダラボンという 2 種類の薬剤しかなく、その効果も限定的であることから、ALS の病理解明と根本的な治療法の早期開発が求められています。

これまで、家族歴が確認される遺伝性 ALS についての研究が精力的に進められ、ALS の病理解明に多大な貢献を果たしてきました。なかでも、病因性の変異が最初に同定された *SOD1* 遺伝子に関する研究は非常に盛んで、マウスやラットなどに変異型の *SOD1* 遺伝子を導入すると、運動ニューロンが

選択的に変性し、ALS の病理学的な特徴が見事に再現されます。また、遺伝子産物である変異型 SOD1 タンパク質が異常な分子構造を形成して（ミスフォールドして）*⁴⁾、運動ニューロン内に蓄積するといった特徴も再現されます。つまり、遺伝子変異に伴うアミノ酸置換によって SOD1 タンパク質の天然構造*⁴⁾が不安定になり、ミスフォールドした SOD1 タンパク質が運動ニューロンに対して毒性を発揮することで、ALS が発症すると推測されています。

一方で、*SOD1* 遺伝子に変異が認められる ALS は全症例のおよそ 1 割を占めるに過ぎません。つまり、ほとんどの ALS 患者が持つ SOD1 はアミノ酸置換のない正常なタンパク質（野生型）です。よって、野生型の SOD1 であっても、何らかの理由でミスフォールドすると ALS の発症に関与しているのではないかと提案されています。実際、精製した野生型の SOD1 タンパク質は、アミノ酸が置換された SOD1 と同じように試験管内でミスフォールドすることが知られています。しかし、遺伝的な要因が明らかでない（少なくとも *SOD1* 遺伝子に変異が認められない）孤発性 ALS の患者に、ミスフォールドした野生型 SOD1 が検出されるのかは見解が明確に分かれており、神経変性疾患を研究する分野における大きな課題の一つとされてきました。ほとんどの ALS 症例では *SOD1* 遺伝子に変異が認められないことから、野生型 SOD1 が疾患の発症に関与しているかどうかを見極めることは非常に重要です。

3. 研究内容・成果

従来の研究では、ALS の主要な病変部位である脊髄において、ミスフォールドした SOD1 タンパク質の有無が論じられてきましたが、その存在についてはコンセンサスが得られていません。そこで本研究では、脳や脊髄における変化をより鋭敏に反映すると考えられる脳脊髄液（CSF）に着目し、孤発性 ALS やその他の患者から採取した CSF に含まれる SOD1 がミスフォールドしているのかを検討しました。SOD1 は細胞内に存在するタンパク質ですが、一部は細胞外に分泌され、ALS の罹患に関わらず、脳・脊髄を取り囲む CSF に SOD1 が検出されることが知られています。また、サンドウィッチ ELISA *⁵⁾と呼ばれる手法を利用し、ミスフォールドした SOD1 を選択的に認識する抗体を用いることで、CSF におけるミスフォールド型 SOD1 の極微量検出を可能にしました。その結果、本研究で扱った 21 例全ての ALS 患者の CSF から、ミスフォールドした SOD1 が検出されました（図 1）。また、パーキンソン病や進行性核上性麻痺といった他の神経変性疾患の患者の一部からもミスフォールドした SOD1 が検出されましたが、神経変性疾患ではない患者の CSF からは全く検出されませんでした（図 1）。

次に、ミスフォールドした SOD1 が神経細胞の変性に関与しているのかを検討するために、その毒性について培養細胞を用いた評価を行いました。ALS 患者から採取した CSF を運動ニューロン様の培養細胞である NSC-34*⁶⁾に添加すると、細胞の生存率がおよそ 40%に低下しましたが、ミスフォールドした SOD1 を免疫沈降法によって CSF から除去すると、生存率は 80%にまで回復しました（図 2）。ウェスタンブロット法を利用することで、CSF に含まれるミスフォールド型 SOD1 の濃度は pmol/L のレベルと概算できたので、その細胞毒性は極めて高いことが分かりました。

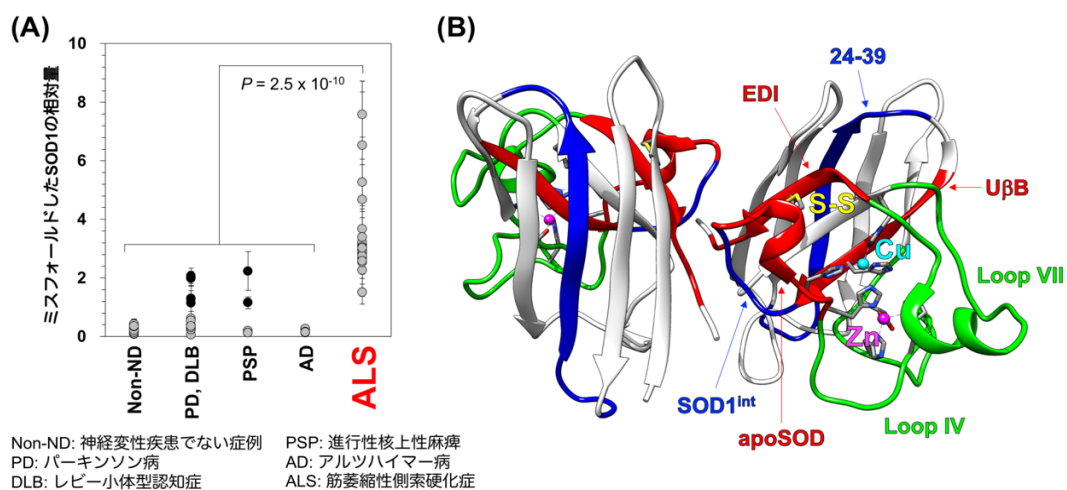


図1 孤発性 ALS 患者の脳脊髄液 (CSF) から検出されたミスフォールド型 SOD1 タンパク質
(A) ミスフォールドした SOD1 を選択的に認識できる抗体 C4F6 を用いたサンドウィッチ ELISA 法による検出結果。ALS 患者の CSF では他の疾患患者に比べて有意に ($P = 2.5 \times 10^{-10}$) 高いシグナルが得られた。PD, PSP の患者の一部からもミスフォールド型 SOD1 が検出された (●)。
(B) SOD1 タンパク質の結晶構造。いくつかの抗体 (EDI, U β B, apoSOD, SOD1^{int}, 24-39) を利用したサンドウィッチ ELISA 法の結果から、ミスフォールドした SOD1 では、緑で示した 2 つのループ部分が大きく揺らぎ、内部に埋もれた赤い部分が外側に露出していると考えられた。

4. 今後の展開

今回の研究で、孤発性 ALS 患者の CSF にはミスフォールドした野生型 SOD1 タンパク質が含まれており、それらは極めて高い細胞毒性を発揮することを初めて明らかにできました。他の神経変性疾患の患者の一部からもミスフォールドした SOD1 が検出されたことから、ミスフォールドした SOD1 は ALS 以外の疾患を理解する上でも重要な物質であることが示唆されます。しかし、ミスフォールドした SOD1 が ALS の発症や症状の悪化に対して直接に関与しているのか、あるいは、病気の結果として生じる産物にすぎないのか、さらなる検証が必要です。また、SOD1 がどこで、どのようにしてミスフォールドするのかについても解明する必要があります。例えば、ALS の主要な病変部位である脊髄の運動ニューロンでミスフォールドした SOD1 が CSF に排出されているのか、あるいは、CSF に排出された SOD1 が CSF においてミスフォールドしているのか、今後、明らかにする必要があります。ミスフォールドした SOD1 が神経細胞に対して毒性を発揮するメカニズムを明らかにできれば、神経難病の最たる例である ALS の治療薬開発に新たな展開が期待されます。

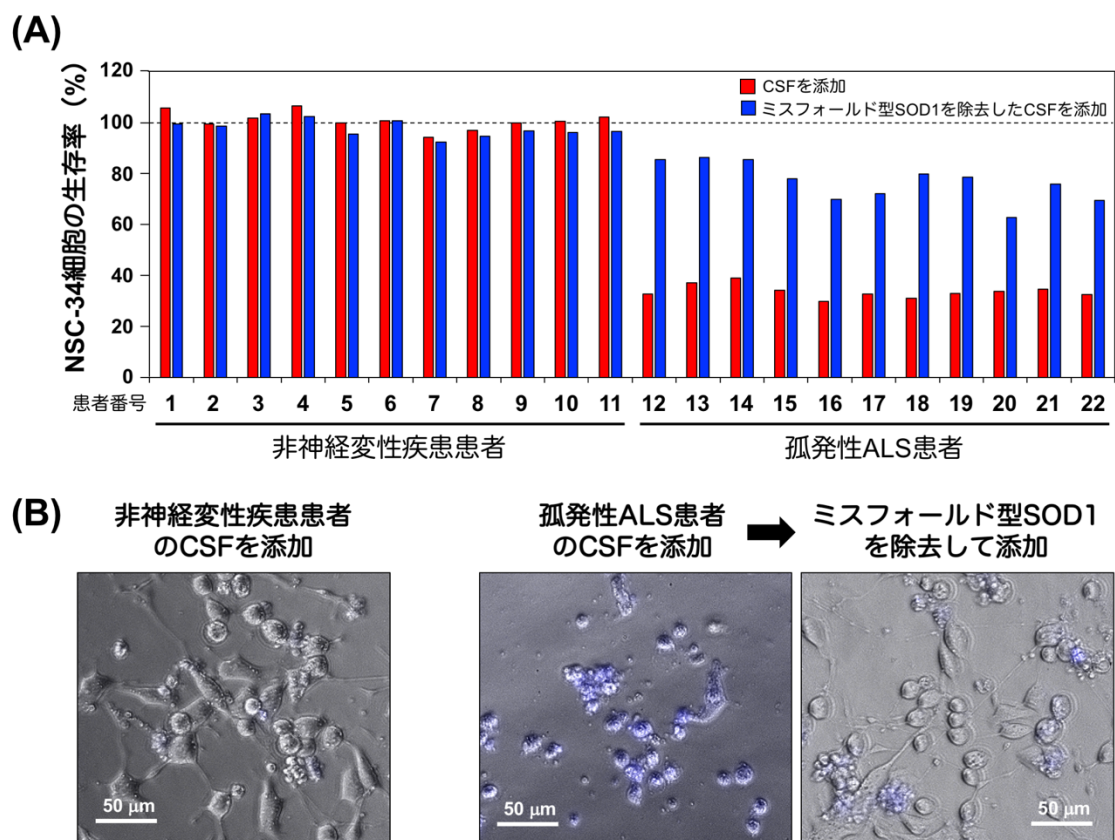


図2 孤発性ALS患者の脳脊髄液(CSF)に含まれるミスフォールド型SOD1の毒性評価

(A) 非神経変性疾患患者および孤発性ALS患者からCSFを採取し、運動ニューロン様のNSC-34細胞に添加して生存率を評価した。赤色はCSFをそのまま添加した場合、青色はCSFからミスフォールド型SOD1を除去してから添加した場合を示す。

(B) CSFを添加して培養したNSC-34細胞の様子。死細胞はDAPIと呼ばれる染色剤(紫色)で染色される。孤発性ALS患者のCSFを添加すると多くの細胞が死んでいるのに対して、ミスフォールド型SOD1を除去すると多くの細胞が生存している。

<原論文情報>

タイトル “Wild-type Cu/Zn-superoxide dismutase is misfolded in cerebrospinal fluid of sporadic amyotrophic lateral sclerosis”

著者 Eiichi Tokuda¹, Yo-ichi Takei², Shinji Ohara^{2,3}, Noriko Fujiwara⁴, Isao Hozumi^{5,6}, and Yoshiaki Furukawa¹

掲載誌 Molecular Neurodegeneration

doi: 10.1186/s13024-019-0341-5

¹慶應義塾大学理工学部、²まつもと医療センター脳神経内科、³飯田病院神経内科、⁴兵庫医科大学学生化学講座、⁵岐阜薬科大学薬物治療学、⁶岐阜大学脳神経内科

<https://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13024-019-0341-5>

<用語説明>

***1) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS)**

脳や脊髄の運動ニューロンが選択的に変性する神経変性疾患です。運動ニューロンは手足や舌の動き、ならびに、呼吸運動を司る神経であるため、それらが変性する ALS では、筋力低下や筋萎縮、嚥下障害、呼吸不全といった症状が現れます。ALS 全症例のうちの 9 割近くは、家族歴が認められない孤発性で、発症の原因は不明です。

***2) 脳脊髄液 (CSF)**

脳や脊髄の周囲を循環する無色透明な液体で、細胞外液の一種です。脈絡叢と呼ばれる脳内の部位から分泌され、脳や脊髄の恒常性を維持するとともに、その水分含有量を調節すると考えられています。脳脊髄液は脳や脊髄から分泌されたタンパク質などを含むことから、神経変性疾患において生じる脳や脊髄での変化を反映すると考えられます。

***3) SOD1 (銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ)**

体内に発生する活性酸素の一種であるスーパーオキシドを消去するタンパク質です。SOD1 タンパク質をコードする *SOD1* 遺伝子に変異が生じると遺伝性 ALS を発症することが 1993 年に報告されて以来、100 種類以上の変異が *SOD1* 遺伝子に確認されています。正常な SOD1 タンパク質は非常に安定な構造を保持していますが、変異に伴ってアミノ酸が置換されると、タンパク質の安定性が低下して、異常な構造をとることが知られています。

***4) ミスフォールド、天然構造**

アミノ酸がつながった高分子であるタンパク質は、それぞれに固有の立体構造をとることで機能を発揮します。機能を発揮する構造のことを「天然構造」と呼び、タンパク質が天然構造を形成することを「フォールドする」と言います。一方で、アミノ酸の置換や環境の変化によって、タンパク質は天然構造と異なる立体構造に「ミス」フォールドすることがあります。ALS だけでなく、アルツハイマー病やパーキンソン病といった様々な神経変性疾患において、ミスフォールドしたタンパク質が脳や脊髄に蓄積していることから、神経を変性させる原因物質ではないかと考えられています。

***5) サンドウィッチ ELISA 法**

ELISA 法とは、試料中に含まれる目的タンパク質を抗体で捕捉し、酵素反応を利用することで定量する方法です。その変法であるサンドウィッチ ELISA 法では、目的タンパク質を捕捉抗体と検出抗体の 2 種類の抗体ではさむ (サンドウィッチ) ことで定量するために、非常に高い特異性と感度で目的タンパク質を検出できるという特徴があります。

***6) NSC-34**

マウスの脊髄から単離した運動ニューロンを神経芽腫細胞と融合させた細胞です。NSC-34 は運動ニューロンに近い性質を保ちつつ、神経芽腫細胞の持つ無限増殖能をも備えた、運動ニューロン様の不死化細胞です。NSC-34 は運動ニューロンのモデル細胞として世界中で広く使用されています。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、各社科学部等に送信させていただいております。

・研究内容についてのお問い合わせ先

慶應義塾大学理工学部化学科 准教授 古川 良明（ふるかわ よしあき）

TEL：045-566-1807 FAX：045-566-1697（化学科共通） E-mail：furukawa@chem.keio.ac.jp

・本リリースの配信元

慶應義塾広報室（村上）

TEL：03-5427-1541 FAX：03-5441-7640

Email：m-pr@adst.keio.ac.jp <https://www.keio.ac.jp/>