

遺伝性運動ニューロン病の鍵を握るタンパク質を発見 — 球脊髄性筋萎縮症の病態に MID1 が関わることを解明 —

名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学の勝野 雅央 教授、佐橋 健太郎 講師、飯田 円 助教、蛭薙 智紀 医員、小椋 陽介 医学部生（筆頭研究者）らの研究グループは、文部科学省科学研究費補助金（MEXT）の支援を受け、名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物学の宮田 卓樹 教授との共同研究により、運動ニューロン^{*1}で特異的に発現する MID1^{*2}が、異常なアンドロゲン受容体^{*3}の産生を増加させることによって軸索障害を生じうることを明らかにしました。

球脊髄性筋萎縮症は、脳幹や脊髄の運動ニューロンが障害される遺伝性疾患であり、患者数は日本国内で 2,000 人程度です。治療薬としてリユプロレリン酢酸塩が承認されていますが、その効果は十分ではありません。球脊髄性筋萎縮症の原因は、アンドロゲン受容体遺伝子の第一エクソンに存在する CAG リピート^{*4}の異常延長であり、アンドロゲンに依存して病気がおこるため、通常は男性のみで発症します。CAG リピートはアミノ酸の一種であるグルタミンの繰り返し配列であるポリグルタミンへと翻訳され、異常に延長したポリグルタミンをもつアンドロゲン受容体タンパク質は、アンドロゲンの存在下で細胞に障害を与え、運動ニューロンを細胞死に至らせることが分かっています。しかし、様々な細胞の中で特に運動ニューロンが障害されやすい「脆弱性^{*5}」のメカニズムは十分に理解されていませんでした。今回本研究グループは、網羅的な遺伝子発現解析を通じて、運動ニューロンで特異的に発現する MID1 が異常に延長したポリグルタミンを有するアンドロゲン受容体タンパク質の産生を促進することを見出しました。さらに、マウス脊髄の培養系での解析を通して、MID1 がアンドロゲンの存在下で運動ニューロンの軸索障害を増悪させることを明らかにしました。

本研究は、球脊髄性筋萎縮症において、運動ニューロンで特異的に発現する MID1 が異常なアンドロゲン受容体の産生を増加させることによって軸索障害をもたらすという、運動ニューロンの脆弱性の鍵となるメカニズムを解明しました。研究成果は Nature Research の科学雑誌「Cell Death & Disease」（英国時間 2022 年 7 月 13 日電子版）に掲載されました。

ポイント

- 球脊髄性筋萎縮症における運動ニューロンの脆弱性のメカニズムは未解明である。
- モデルマウスの脊髄において発現異常を示す遺伝子として MID1 を特定し、運動ニューロンで特異的に発現していることを明らかにした。
- MID1 が異常なアンドロゲン受容体タンパク質の産生を増加させることを明らかにした。
- マウス脊髄の培養系での解析を通して、MID1 がアンドロゲンの存在下で運動ニューロンの軸索障害を増悪させることを明らかにした。

1. 背景

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)は、発語や嚥下の際に使用される筋や舌、四肢、体幹の筋の萎縮に伴い、進行性の運動障害をきたす疾患です。SBMA は、脳幹や脊髄の運動ニューロンが障害を受けて、細胞死^{*6}を起こして失われる運動ニューロン疾患^{*7}に含まれる遺伝性の指定難病です。患者数は世界的に 10 万人あたり 2 人程度で、日本国内では 2,000 人程度の SBMA 患者が推定されています。日本では治療薬としてリユプロレリン酢酸塩が承認されていますが、その効果は十分であり

ません。SBMA はアンドロゲン受容体遺伝子の第一エクソンに存在する CAG リピートの異常延長を原因とし、通常成人男性に発症します。CAG リピートはアミノ酸の一種であるグルタミンの繰り返し配列であるポリグルタミンに翻訳されます。このため、球脊髄性筋萎縮症の患者さんの体内では異常に延長したポリグルタミンをもつアンドロゲン受容体タンパク質が産生され、アンドロゲンの存在下で細胞の核内で不溶性の凝集体を形成することで、運動ニューロンを細胞死に至らせると考えられています。勝野教授らは、以前の研究において、異常延長した CAG リピートをもつヒトアンドロゲン受容体の遺伝子組み換えマウス (SBMA モデルマウス^{※8}) を作製しました。SBMA モデルマウスのオスでは、アンドロゲン依存的な運動障害が再現されています。アンドロゲン受容体タンパク質の発現は運動ニューロンに限らず様々な細胞で見られますが、SBMA においてとくに運動ニューロンに障害が生じやすいメカニズムは十分に理解されていませんでした。今回の研究グループは、SBMA モデルマウスを利用し、運動ニューロン脆弱性のメカニズムを明らかにすることを旨として研究を開始しました。

2. 研究成果

本研究では初めに、SBMA モデルマウスの脊髄で発現異常を示す遺伝子の中から、運動ニューロンのうち特異的な発現を示す遺伝子を探索し、運動障害の発症早期から発現上昇を示す MID1 に注目しました。MID1 は、マウスおよびヒトの脊髄において、運動ニューロンで特異的に発現していることが免疫組織化学染色^{※9}によって確認されました (図 1)。

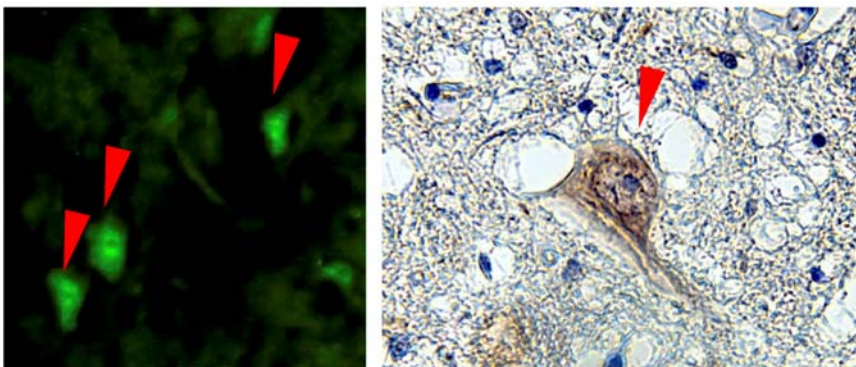


図1 SBMA モデルマウス(左)および SBMA 患者(右)の脊髄の免疫染色
脊髄運動ニューロン(矢じり)での MID1 タンパク質の発現を、左図では蛍光抗体法により緑色の蛍光として、右図では酵素抗体法によって茶色の染色として捉えています。スケールバーは 50 μm。

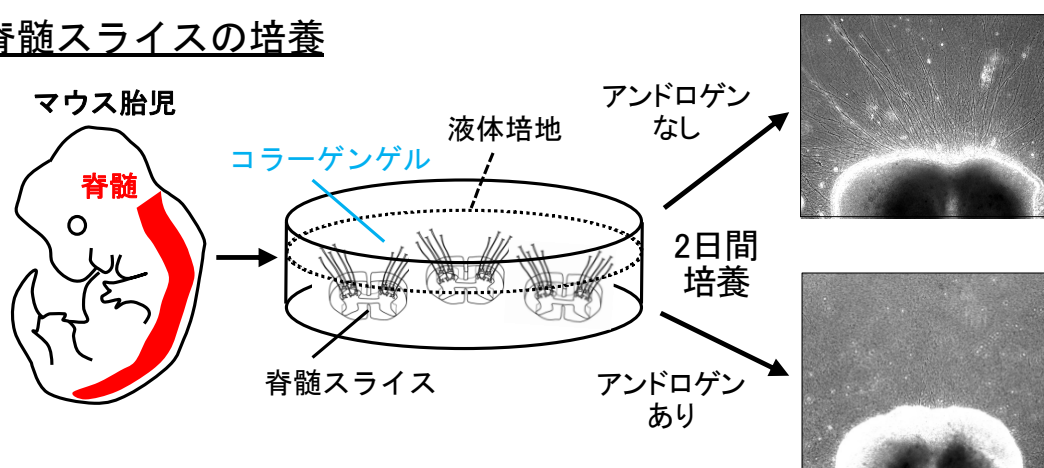
MID1 はアンドロゲン受容体遺伝子などの CAG リピートをもつ遺伝子の mRNA^{※10} 群に結合し、それらがタンパク質へ翻訳される反応を促進することが知られています。私たちが運動ニューロンのモデル培養細胞^{※11} を用いた実験においても、MID1 は異常なアンドロゲン受容体のタンパク質レベルをアンドロゲンの存在下で著明に増加させました (図 2)。一方、同様なタンパク質レベルの増加は CAG のリピート数が正常なアンドロゲン受容体では認められませんでした。



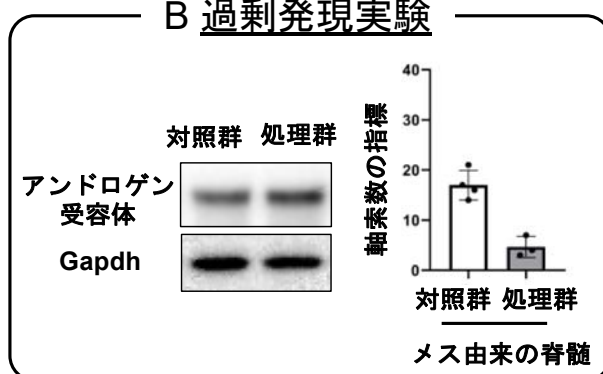
図2 MID1 の過剰発現はアンドロゲンの存在下で異常なアンドロゲン受容体タンパク質を増加させる
運動ニューロン様の培養細胞 (NSC-34) において免疫ブロットによりアンドロゲン受容体タンパク質を検出したところ、MID1 をアンドロゲン存在下で発現させた場合に (右端のレーン)、最も高いアンドロゲン受容体タンパク質レベルが得られました。コントロールには Gapdh を用いました。

ヒトおよびマウスでは MID1 の発現は胎児期から既に始まっていることが知られており、今回の研究で行ったマウスでの解析から、運動ニューロンでの MID1 発現も胎児期から見られることが明らかとなりました。そこで、SBMA における運動ニューロン障害への MID1 の関与を評価するために、マウス胎児の脊髄を培養する実験を考案し、軸索の伸長への影響を調べました。SBMA モデルマウスに由来する脊髄のスライス切片を培養すると、アンドロゲンを添加しない条件下では運動ニューロンから伸長した軸索が多数観察されましたが、アンドロゲンを添加すると軸索の伸長がほとんど観察されないことが見出されました (図 3A)。また、メス由来の脊髄の培養では、オス由来の脊髄と比較してアンドロゲン添加による軸索伸長の抑制の程度が弱いことが分かりました。そこでメス由来の脊髄を利用しアンドロゲン添加下で培養し、MID1 を過剰発現させるレンチウイルス^{※12} を添加したところ、異常なアンドロゲン受容体タンパク質が増加するとともに軸索伸長がさらに抑制されました (図 3B)。一方、オス由来の脊髄をアンドロゲン添加下で培養し、MID1 の発現を抑える shRNA^{※13} を発現させるレンチウイルスを添加したところ、異常なアンドロゲン受容体タンパク質が減少して軸索伸長が回復されました (図 3C)。これらの結果から、MID1 はアンドロゲン存在下において、アンドロゲン受容体を増やすことで SBMA における運動ニューロンの軸索伸長障害を悪化させていることが明らかになりました。

A 脊髄スライスの培養



B 過剰発現実験



C ノックダウン実験

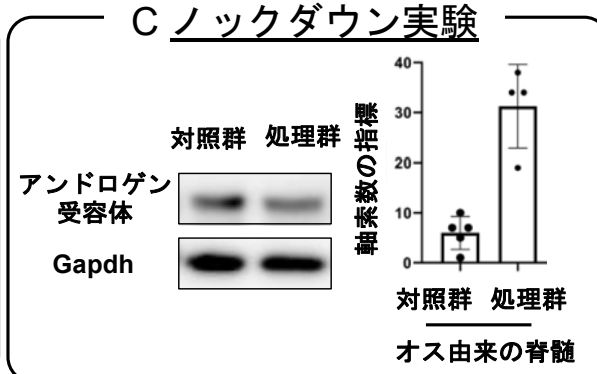


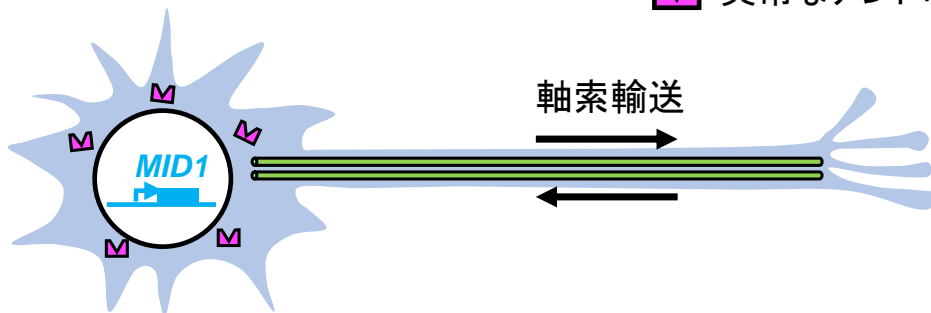
図3 MID1 は異常なアンドロゲン受容体のタンパク質レベルの増加と軸索伸長の阻害に関する

A) SBMA モデルマウスに由来する脊髄のスライス切片の培養。アンドロゲン添加下で、B) レンチウイルスによる MID1 の過剰発現は異常なアンドロゲン受容体のタンパク質レベルを増加させ、軸索の数を減少させ、C) レンチウイルスによる MID1 のノックダウンは異常なアンドロゲン受容体のタンパク質レベルを減少させ、軸索の数を増加(回復)させました。対照群の脊髄スライスではコントロールのレンチウイルスによる処理を行いました。

3. 今後の展開

本研究により、運動ニューロンに本来発現するタンパク質である MID1 の発現上昇が、SBMA でみられる運動ニューロンの脆弱性に関与することが示されました。また、そのメカニズムとして、MID1 が異常なアンドロゲン受容体タンパク質を増加させることにより生じる軸索障害が重要と考えられました（図 4）。SBMA モデルマウスを用いた先行研究からは、異常なアンドロゲン受容体による軸索輸送の障害が示唆されています。MID1 は軸索に存在する微小管への結合能も有しているため、異常なアンドロゲン受容体により軸索の形成や維持に重要な軸索輸送が障害されている可能性があります。今後の展開として、MID1 が異常な AR に依存して軸索障害をもたらすメカニズムを解明し、MID1 や MID1 と相互作用するタンパク質を標的とした治療薬の開発につなげていきたいと考えています。

低アンドロゲンレベル



高アンドロゲンレベル

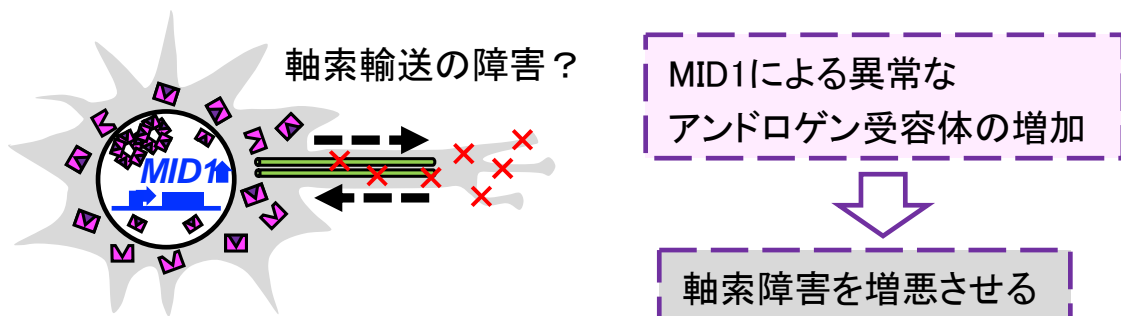


図 4

4. 用語説明

※1 運動ニューロン：

骨格筋を支配する神経細胞のことで、細胞体は主に脳幹・脊髄と大脳皮質の運動野に存在する。

※2 MID1：

Midline-1 の略である。対応するマウスのタンパク質は Mid1 と呼ばれるが、本文章では MID1 で統一した。

※3 アンドロゲン受容体：

テストステロンなどの男性ホルモン（アンドロゲンと総称）の受容体であり、アンドロゲンと結合すると細胞質から核内へ移行して遺伝子の発現を調節する。

※4 CAG リピート：

シトシン（C）、アデニン（A）、グアニン（G）の三塩基の繰り返し配列である CAG リピートの

数は、健常者では 36 以下であるが、SBMA では 38 以上に延長している。

※5 脆弱性：

パーキンソン病におけるドパミンニューロンやアルツハイマー病における海馬ニューロンなど、神経疾患において特定の神経細胞が弱りやすいことを指す。

※6 細胞死：

細胞が細胞膜や核などの破綻により不可逆的に機能を果たさなくなる現象。

※7 運動ニューロン疾患：

運動ニューロンが進行性に変性する疾患群のこと。SBMA の他に筋萎縮性側索硬化症(ALS)、脊髄性筋萎縮症(SMA)などがある。

※8 モデルマウス：

遺伝子改変によって作製されたヒトの疾患と類似の病態を呈するマウス。

※9 免疫組織化学染色：

抗原と抗体の反応を利用して、組織中のタンパク質の発現を可視化する技術。

※10 mRNA：

細胞がタンパク質を合成する際に鋳型となるメッセンジャー（伝令）RNA。

※11 培養細胞：

不死化した細胞であり、継代培養が可能な細胞。

※12 レンチウイルス：

目的の遺伝子を細胞や組織に導入するために用いられる人工的なウイルスの一種。

※13 shRNA (short hairpin RNA)：

RNA 干渉と呼ばれる現象を介して細胞内の標的遺伝子の発現を低下させる効果をもつ。

5. 発表雑誌

掲雑誌名：Cell Death & Disease

論文タイトル：Mid1 is associated with androgen-dependent axonal vulnerability of motor neurons in spinal and bulbar muscular atrophy

著者：Yosuke Ogura¹, Kentaro Sahashi¹, Tomoki Hirunagi¹, Madoka Iida¹, Takaki Miyata² and Masahisa Katsuno^{1,3}

所属名：

¹Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

²Department of Anatomy and Cell Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

³Department of Clinical Research Education, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

DOI：10.1038/s41419-022-05001-6

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Cel_220713en.pdf