平成 25 年度新潟大学脳研究所 「脳神経病理標本資源活用の先端的共同研究拠点」 共同利用・共同研究報告書

ヒト ALS における亜鉛トランスポーターに起因する 小胞体ストレスと治療法開発

研究代表者 金子 雅幸 1)

研究分担者 柿田 明美 $^{2)}$, 豊島 靖子 $^{3)}$, 高橋 均 $^{3)}$, 山田 光則 $^{4)}$, 神戸 大朋 $^{5)}$, 原 英彰 $^{6)}$, 位田 雅俊 $^{1)}$, 保住 功 $^{1)}$

- 1) 岐阜薬科大学薬物治療学 2) 新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野
- 3) 新潟大学脳研究所病理学分野 4) 国立病院機構さいがた医療センター臨床研究部
- ⁵⁾京都大学大学院生命科学研究科生体情報応答学 ⁶⁾ 岐阜薬科大学薬効解析学

研究要旨

これまでの我々の研究より、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症・病態において、Zn 恒常性の重要性が示唆されたことから、今回、ALS と Zn トランスポーターZnT ファミリーとの関係について検討した。正常ヒト組織における ZnT ファミリー(ZnT1〜ZnT10)の mRNA の発現分布を調べた結果、ZnT1, 3, 4, 5, 6, 7 が脊髄に発現していた。ALS 群 10 例、コントロール群 14 例のヒトの脊髄におけるそれらの ZnT タンパク質の発現量を比較した結果、ZnT3 と ZnT6 が ALS 群の脊髄において有意に低下していた。また、ZnT の脊髄における局在を解析したところ、いずれの ZnT も GFAP や CNPase とは一致せず、 β IIIーtubul in や ChAT と一致したことから、運動神経を含む神経細胞に選択的に発現していることが明らかとなった。さらに、ALS モデルマウスの脊髄において、ZnT3 と ZnT6 のタンパク質量に変化は認められなかった。以上より、ALS における ZnT3 と ZnT6 の減少は、運動神経の脱落によるものではなく、ALS の発症・病態の進行に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

神経変性疾患の病態に重金属の動態が深く関与していることが知られている。これまでに我々は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の脳脊髄液中の重金属に関して、Zn(亜鉛)、Cu、Mg、Feが複合的に増加していることを報告した。また、ALS 脊髄組織を調べ、Znが唯一、特異的に増加していることを見出している。生体内では Zn の恒常性維持を担うタンパク質として Zn トランスポーターが知られており、ALS の発症・病態において、Zn トランスポーター機能異常による Zn の恒常性破綻の関与が考えられる。そこで、今回我々は、ALS 患者脊髄および ALS モデルマウスにおいて、

Znトランスポーターの一種である ZnT ファミリー (*SLC30*) の発現量変化について検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所病理学分野において剖検ならびに検体検索の承諾が得られている症例で、岐阜大学倫理委員会の承認を得た後、剖検にて ALS の確定診断がついた症例の脊髄 (10 例) および脊髄に病変を認めない症例 (14 例) をコントロールとして用いて検索した。

始めに、正常のヒト脊髄・大脳皮質・海馬・小脳・肝臓・腎臓・肺・膵臓における ZnT ファミリー (ZnT1~ZnT10)の mRNA の発現分布を real-time

PCR 法により調べた。

mRNAの発現が脊髄に認められた ZnT ファミリーに関して、ALS 群 10 例、コントロール群 14 例のヒト脊髄におけるタンパク質の発現量をウエスタンブロット法により比較検討した。

つぎに、コントロール群に比べて ALS 群で発現 量の有意な低下が認められた ZnT について、正常 および ALS のヒト脊髄における発現を免疫染色法 にて解析した。

さらに、脊髄に発現していた ZnT について、 β III-tubulin、GFAP、CNPase、ChAT 抗体を用いて、それぞれ蛍光免疫染色法により、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、運動神経との発現分布を比較した。

また、ALS モデルマスを用いた解析は、SOD1 (G93A) 変異体を発現するトランスジェニックマウスを用いて、発症前 (10週)、発症後 (14週) およびエンドポイントの各時点において、ZnT の発現量を野生型マウスと比較した。

統計学的解析は、ALS 群とコントロール群で Student の t 検定を行った。

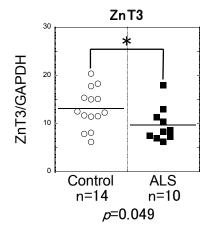


図 1. ALS 患者脊髄における ZnT3 の低下

C. 研究結果

mRNA が脊髄に発現していた ZnT ファミリー (ZnT1〜ZnT10) は、ZnT1、ZnT3、ZnT4、ZnT5、ZnT6、ZnT7 であった。この中で特に ZnT3 は、中枢組織特異的に発現していることが判明した。

これらの中で、ALS 群とコントロール群で ZnT タンパク質の発現量を比較検討したところ、ALS 群で ZnT3 と ZnT6 の有意な発現量低下が認められた (図 1)。また、ZnT5 は有意差が認められないものの、発現量が低下する傾向があった。一方、ZnT1 と ZnT7 の発現量には、有意な変化は認めら

れず、ZnT4 と ZnT10 は、脊髄において検出可能な 抗体が入手できなかったため、その変化は不明で あった。

さらに、ZnT3 に関して、ALS 患者とコントロールの脊髄における発現を免疫染色を用いて検討したところ、ALS 患者の腰髄、胸髄、頚髄いずれにおいても、ZnT 反応性の細胞は明らかに減少していた。

最後に、SOD1トランスジェニックマウスの脊髄における ZnT3と ZnT6のタンパク質量は、発症前(10週)、発症後(14週)、エンドポイントの三点いずれにおいても、有意な差は認められなかった(図2)。

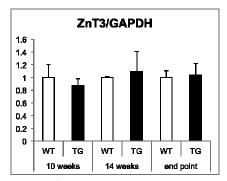


図 2. ALS モデルマウスにおける ZnT3 の変化

D. 考察

ALS 患者の脊髄において ZnT3 と ZnT6 が減少していたが、ALS において運動神経細胞が減少した結果、ZnT タンパク質量が低下したか、もしくは、ZnT が低下した結果、神経細胞が減少したかは不明であった。この点に関して、SOD1 トランスジェニックマウスにおける脊髄運動神経の変性・脱落の影響を検討した結果、ZnT3 と ZnT6 の有意な減少は認められなかった。このことから、ALS における運動神経細胞の変性・脱落のみでは、ZnT3 や ZnT6 の有意な減少は引き起こされないことが証明された。また、ZnT3 や ZnT6 以外にも、ALS 患

者脊髄で有意な変化が認められなかった ZnT1 や ZnT7 も、運動神経に発現していたことから、ZnT3 や ZnT6 が特異的に減少する機構が存在することが示唆される。

さらに、細胞外および細胞内小器官に Zn を運搬する ZnT (*SLC30*) ファミリー以外にも、細胞質向きに Zn を運搬する ZIP (*SLC39*) や、Zn 結合タンパク質メタロチオネインに関しても ALS 患者の脊髄における発現量変化について検討する必要がある。

ZnT の発現低下は、小胞体ストレスを惹起することが報告されている。逆に、小胞体ストレスによって ZnT の発現が誘導されることが報告されている。また、細胞内 Zn 濃度の低下が、家族性 ALS の原因タンパク質 SOD1 と小胞体タンパク質 Derlin-1 の結合を促進し、小胞体ストレスを惹起することも報告されている。ALS 患者において減少が認められた ZnT3 や ZnT6 のノックダウンによって、小胞体ストレスが惹起されるか、また、SOD1 と Derlin-1 の結合が促進されるかについても今後検討する予定である。

E. 結論

今回の結果より、ZnT3 と ZnT6 は運動神経に発現していたことから、ZnT3 と ZnT6 の発現低下は ALS の発症・病態に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1)M. Kaneko, T. Noguchi, S. Ikegami, T. Sakurai, A. Kakita, Y. Toyoshima, T. Kambe, M. Yamada, M. Inden, H. Hara, H. Takahashi, and I. Hozumi, Zinc transporters (ZnT3 and ZnT6) are diminished in the spinal cords of the patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS), 投稿準備中.

2. 学会発表

- 1)第 59 回日本薬学会東海支部総会・大会,筋 萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者脊髄における 亜鉛トランスポーターZnT3 の発現量低下
- ○野口貴生,金子雅幸,池上沙織,位田雅俊, 柿田明美,豊島靖子,山田光則,高橋 均, 保住 功

日時:平成25年7月6日 場所:名城大学薬学部

- 2) メタルバイオサイエンス研究会 2013, 筋萎縮 性側索硬化症 (ALS) 患者脊髄における亜鉛 トランスポーターZnT の発現量低下
- 〇池上沙織,金子雅幸,野口貴生,位田雅俊, 柿田明美,豊島靖子,山田光則,高橋 均, 保住 功

日時: 平成 25 年 9 月 27 日

場所:静岡県立大学

- 3)第134回日本薬学会年会,筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者脊髄における亜鉛トランスポーターZnTの発現量低下
- 〇金子雅幸,野口貴生,池上沙織,櫻井丈之,位 田雅俊,神戸大朋,柿田明美,豊島靖子,山田 光則,原 英彰,高橋 均,保住 功

日時: 平成 26 年 3 月 30 日

場所:熊本大学

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

- 1. 特許取得 特になし
- 2. 実用新案登録 特になし
- 3. その他