



Title	Stabilization of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by coexpressed wild SOD1 protein accelerates the disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice
Author(s)	深田, 慶
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43714">https://hdl.handle.net/11094/43714</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	深田 慶
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16870 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	Stabilization of mutant Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) protein by coexpressed wild SOD1 protein accelerates the disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis mice (G93A/ヒト正常 SOD1ダブルトランスジェニックマウスの臨床的・生化学的検討)
論文審査委員	(主査) 教授 佐古田三郎  (副査) 教授 谷口 直之 教授 中村 敏一

## 論文内容の要旨

## 【目的】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は 3～4 年の経過で呼吸筋麻痺に至る神経難病である。家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の一部は銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 遺伝子の変異が原因であり、変異 SOD1 蛋白が何らかの毒性を獲得し運動神経変性を引き起こすものと考えられている (gain of function)。

変異 SOD1 同士あるいは正常 SOD1 とのダイマーを有効に形成できる安定型変異 SOD1 とダイマー形成が出来ない不安定型変異 SOD1 があることを我々は報告してきた。そして、前者は半減期が長い細胞内を移動して銅イオンを遊離し、結果的に銅イオン関連の酸化的ストレスが細胞内の広い範囲で生じるが、後者は翻訳後すぐに degradation されるため、銅イオンの遊離については銅イオン関連の酸化的ストレスが特定の位置に限局するという仮説を提唱した。

ヒト G85R 変異 SOD1 のトランスジェニックマウス (G85R マウス) やヒト G93A 変異 SOD1 のトランスジェニックマウス (G93A マウス) などが FALS のモデル動物として検討されている。ヒト正常型 SOD1 (hWT-SOD1) のトランスジェニックマウス (hWT マウス) とのかけあわせ実験では、G85R マウスでは臨床経過に変化は見られないが G93A マウスでは臨床経過が増悪するという予想に反した相異なる結果が報告されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では G93A-SOD1 蛋白が、導入された hWT-SOD1 蛋白と安定したヘテロダイマーを形成することによりその毒性が増加する可能性を考え、G93A-SOD1 および hWT-SOD1 のダブルトランスジェニックマウス (G93A/hWT マウス) の G93A-SOD1 濃度とメタロチオネイン (MTs) 濃度を測定し、臨床経過との関係について検討した。

## 【方法ならび成績】

方法：G93A マウスと hWT マウスをかけあわせて G93A/hWT マウスを作成し、臨床経過 (発症、寿命、罹病期間) を観察した。G93A マウスと G93A/hWT マウスの SOD1 濃度は ELISA で測定した。後者では hWT-SOD1 と G93A-SOD1 の濃度比を免疫沈降法・液体クロマトグラフィー/質量分析法にて求め、ELISA で求めた SOD1 濃度を比例配分することにより G93A-SOD1 濃度を求めた。MTs 濃度も ELISA で測定した。

成績：臨床経過は G93A マウスと G93A/hWT マウスで、発症が 206±26 日 vs. 193±19 日、寿命が 248±29 日 vs.

217±21日、罹病期間が40.2±6.5日 vs. 24.0±11.6日であり、後者で罹病期間の有意な短縮を認めた。G93A/hWT マウスでの hWT-SOD1と G93A-SOD1の濃度比は肝臓で3.16±0.36、脊髄で1.70±0.33、脳で1.53±0.05、赤血球で0.15以下であり、蛋白合成が盛んな肝臓で最大、蛋白合成を持たない赤血球で最小であった。これは G93A-SOD1が hWT-SOD1に比べて不安定であるためと考えられる。

脊髄 G93A-SOD1濃度は G93A マウスで1.66±0.89  $\mu\text{g}/\text{mg protein}$  に対し、G93A/hWT マウスでは7.05±1.87  $\mu\text{g}/\text{mg protein}$  と有意に上昇しており、G93A-SOD1が hWT-SOD1の導入により安定化したものと考えられる。脊髄 G93A-SOD1濃度は寿命・罹病期間と相関し（相関係数：0.637および0.804）、G93A-SOD1濃度の上昇が G93A/hWT マウスでの臨床症状の増悪の主因であると考えられる。脊髄 MTs 濃度は hWT マウスで17.6±2.8  $\mu\text{g}/\text{g tissue}$ 、G93A マウスで36.4±7.3  $\mu\text{g}/\text{g tissue}$ 、G93A/hWT マウスで61.0±9.0  $\mu\text{g}/\text{g tissue}$  と G93A マウスおよび G93A/hWT マウスで上昇していた。脊髄 MTs 濃度は G93A-SOD1濃度と相関し（相関係数：0.693）、銅イオン関連の酸化的ストレスが G93A-SOD1濃度に応じて増加していることが示唆された。しかし、脳・腎臓 MTs 濃度は各トランスジェニックマウス間で差を認めなかった。

### 【総括】

G93A/hWT マウスでの臨床症状の増悪は G93A-SOD1濃度の上昇が主因であることを示した。G93A-SOD1が、導入された hWT-SOD1とヘテロダイマーを形成し安定化した可能性が考えられる。一方 G85R-SOD1は hWT-SOD1と混合しても半減期は変化しないことが *in vitro* で報告されており、hWT-SOD1と安定したダイマー形成ができないものと推察される。このため G85R マウスに hWT-SOD1を導入しても G85R-SOD1濃度は上昇せず、臨床経過が変化しなかったものと考えられる。G93A-SOD1と G85R-SOD1のダイマー形成能の違いがかけあわせ実験の相異なる結果の原因と考えられ、このことは目的で述べた仮説の裏付けとなる。

MTs が G93A/hWT マウスの脊髄で増加しているのに対し、脳・腎臓では上昇していなかった。このことは病変の主座である脊髄で銅イオン関連の酸化的ストレスが生じていることを示唆する。

以上より変異 SOD1は各種変異により微妙にその毒性が異なる可能性が示唆される。

## 論文審査の結果の要旨

家族性筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスである G93A 変異 SOD1のトランスジェニックマウスにヒト正常 SOD1 遺伝子を導入すると病状が増悪することが知られているが、本研究ではその主因が、脊髄変異 SOD1蛋白濃度の上昇であることを示している。

G93A 変異 SOD1およびヒト正常 SOD1のダブルトランスジェニックマウスの組織中変異 SOD1濃度の測定は従来の方法では不可能であった。本研究ではオンライン液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いて正常 SOD1蛋白と変異 SOD1蛋白の濃度比を測定し、ELISA 法と組み合わせることによりダブルトランスジェニックマウスの臓器中変異 SOD1濃度の測定を行っている。

本研究で、ダブルトランスジェニックマウスは G93A-SOD1トランスジェニックマウスに比べ臨床症状が増悪し、特に罹病期間が短縮することが確認された。またダブルトランスジェニックマウスでは G93A-SOD1トランスジェニックマウスに比べ、脊髄・脳の G93A-SOD1濃度が上昇していた。脊髄中変異 SOD1濃度の上昇は、寿命および罹病期間の短縮と相関し、病状増悪の主因であると考えられた。また copper-mediated oxidative stress などにより上昇することが知られているメタロチオネインが脊髄のみで G93A-SOD1濃度に相関して上昇しており、病変の主座である脊髄で copper mediated oxidative stress が生じていること考えられた。

この結果は、G93A-SOD1のホモダイマーは不安定なのに対し、ヒト正常 SOD1とのヘテロダイマーは比較的安定なため、ヒト正常 SOD1の導入により G93A-SOD1が安定化され半減期が延長しその毒性が増強した可能性を示唆するものである。この研究は各種変異 SOD1のダイマー形成能の違いがその毒性の違いを生じさせている可能性を示しており、家族性筋萎縮性側索硬化症の病態解明に役立つものであり、博士の学位の授与に値する。