

筋萎縮性側索硬化症における
膜貫通糖タンパク質 GPNMB に関する研究

長原 悠樹

目次

序論	1 頁
第 1 章 ALS 患者脊髄における GPNMB 凝集体の局在	11 頁
第 1 節 諸言	11 頁
第 2 節 実験材料および方法	12 頁
第 3 節 実験成績	17 頁
第 4 節 考察	29 頁
第 2 章 変異 TDP-43 誘発運動ニューロン死に対する GPNMB の作用	33 頁
第 1 節 諸言	33 頁
第 2 節 実験材料および方法	34 頁
第 3 節 実験成績	43 頁
第 4 節 考察	49 頁
第 3 章 ALS モデルマウス骨格筋に対する GPNMB の作用	52 頁
第 1 節 諸言	52 頁
第 2 節 実験材料および方法	55 頁
第 3 節 実験成績	65 頁
第 4 節 考察	82 頁
総括および結論	88 頁
謝辞	91 頁
引用文献	93 頁
略語一覧表	110 頁

序論

神経変性疾患は中枢神経の特定のニューロン（神経細胞）群が進行性に変性・脱落する結果、様々な神経・精神症状を呈する一群の疾患である。神経変性疾患には、筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis; ALS）や脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy; SMA）、球脊髄性筋萎縮症（spinal-bulbar muscular atrophy; SBMA）など筋力が低下する疾患、パーキンソン病や多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、脊髄小脳変性症、ハンチントン病など体のバランスがとりづらくなったりスムーズな運動ができなくなったりする疾患、アルツハイマー病や前頭側頭葉変性症（frontotemporal lobar degeneration; FTLD）など認知機能が障害される疾患などが含まれる（1-3）。

ALS は 1986 年にフランスの脳神経内科医のシャルコー（Jean Martin Charcot, 1825-1893）によって初めて報告された疾患であり、ヨーロッパではシャルコー病と呼ばれることもある（4,5）。また、アメリカ合衆国のメジャーリーグ（major league baseball; MLB）のプロ野球選手であり、1939 年に当時史上最年少で殿堂入りも果たしたルー・ゲーリック（Lou Gehrig, 1903-1941）が本疾患に罹患したことから広く一般にも知れ渡ることになり、主にアメリカ合衆国ではルー・ゲーリック病とも呼ばれる（6）。

ALS は運動ニューロンが選択的かつ進行性に変性・脱落し、筋肉の萎縮や筋力低下、脱力を呈する進行性の神経変性疾患である（3）。運動神経系は、大脳皮質運動野から皮質脊髄路（錐体路）を經由して脊髄前角の運動ニューロンへ運動の指令を伝える上位運動ニューロンと、運動ニューロンから筋肉の神経筋接合部（neuromuscular junction; NMJ）を介して筋肉に信号を伝える下位運動ニューロンによって制御されている。ALS では上位運動ニューロンと下位運動ニューロンの両者が障害されることにより、痙縮、深部反射亢進、病的反射の出現な

どの上位運動ニューロン徴候（錐体路徴候）や筋線維束性収縮、筋萎縮、筋力低下などの下位運動ニューロン徴候（前角細胞徴候）が生じる (3)。一方、ALS には、感覚機能障害、眼球運動障害、膀胱直腸障害、褥瘡が認められないという特徴があり、四大陰性徴候と呼ばれている。ALS 患者は全身の筋肉の萎縮・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くなる反面、脳の高次機能や感覚神経など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。意識が鮮明なまま運動機能が衰えていくため精神的苦痛が大きく、非常に悲惨かつ残酷な疾患と言える。症状が進行すると、コミュニケーションには文字盤の使用やセンサーによって体や眼球のわずかな動きを察知する方法が余儀なくされる。最終的には意識や聴覚、思考力はあるにもかかわらず、目も開けられず、暗闇の中で完全に閉じ込められた状態になる。これは「完全な閉じ込め状態」(totally locked-in state; TLS) と呼ばれており、生活の質 (quality of life; QOL) が極度に低下した状態になる。ALS 患者は最終的には呼吸筋の麻痺により自発呼吸もできず、人工呼吸による 24 時間態勢の介護が必要になるため、介護に当たる家族の負担も大きい。ALS 患者の約半数は、発症後 3-5 年以内に死亡または人工呼吸器が必要な状態になるとされ、厚生労働省が指定する特定疾患 (難病) に該当する。本疾患は神経変性疾患の中では最も患者数が多く、有病率は 10 万人あたり 2-7 人であり (3)、現在、全世界で 15-50 万人、日本では約 9,200 人の ALS 患者がいると推定されている (平成 25 年度厚生労働省特定疾患医療受給者証交付件数調べ)。幅広い年齢で発症がみられるが、特に 50-75 歳での発症が多く、高齢化の進行とともに患者数が増加していると考えられる。患者数は男性が女性の 1.2-1.5 倍であり、ALS の病態にホルモンが関与しているとの説がある (7, 8)。また、近年その傾向は減少しているものの、日本の紀伊半島南部、アメリカ合衆国のグアム島、インドネシアの西ニューギニアにおいて ALS の有病率が著しく高いことが知られている (9, 10)。したがって、ALS の発症に環境要因や食

生活などが関与している可能性も指摘されている。

現在 ALS の確定診断法は存在せず、厚生労働省特定疾患神経変性疾患調査研究班の ALS 診断基準や世界神経学会の改訂 El Escorial ALS 基準に基づいた他の疾患との鑑別による除外診断が主流となっている (11)。生化学的診断マーカーの候補化合物がいくつか報告され (12-14)、岐阜薬科大学薬効解析学研究室 (以下、薬効解析学研究室) でも glutathione peroxidase 3 (Gpx3) や inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (ITIH4)、glycoprotein transmembrane non metastatic melanoma B (GPNMB) などを報告している (15-17)。しかしながら現時点で、臨床応用されている診断マーカーは存在せず、電気生理学的検査や神経画像などの補助検査所見と臨床所見を総合して診断されるため、診断が難しい。それ故、治療介入が遅れるだけではなく、患者や家族の精神的、経済的負担が大きい。

ALS 患者の約 90%が原因不明で発症する孤発性 ALS (sporadic ALS) であり、残りの約 10%が特定の遺伝子変異が背景となって発症する家族性 ALS (familial ALS) である (18) (Fig. 1)。家族性 ALS の約 20%、孤発性 ALS の約 3%を占めるとされているのが、1993 年に同定された Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子の変異である (19)。SOD1 は、スーパーオキシドラジカルを解毒化する 153 アミノ酸からなる抗酸化酵素である。活性型 SOD1 はホモ 2 量体として主に細胞質に存在し、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 (20, 21)。1994 年には、この SOD1 遺伝子の第 93 アミノ酸であるグリシンをアラニンに変異させた SOD1^{G93A} 遺伝子を過剰発現させ

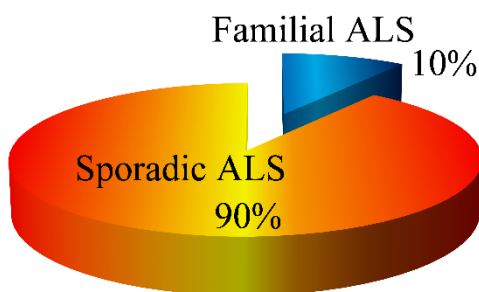


Figure 1 The rate of sporadic and familial ALS. Approximately 10% of ALS cases are genetically inherited (familial ALS), whereas the remaining 90% have no clear genetic cause (sporadic ALS).

たトランスジェニックマウス (SOD1^{G93A} マウス) が作製された (22)。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おり、ALS のモデル動物として世界中で汎用されている。遺伝性 ALS を惹起する SOD1 変異には、SOD1^{G93A} 以外にも SOD1^{G37R} (第 37 アミノ酸のグリシンがアルギニンに変異)、SOD1^{H46R} (第 46 アミノ酸のヒスチジンがアルギニンに変異)、SOD1^{A4V} (第 4 アミノ酸のアラニンがバリンに変異) など、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、SOD1 活性自体は低下しない場合が多い (23)。さらに SOD1 ノックアウトマウスでは運動ニューロン症状を呈さないことから (24)、変異によって酵素の機能低下が生じる (loss of function) というよりは、新たに細胞毒性が付与されること (gain of toxic function) が運動ニューロン変性の原因になると考えられている。

孤発性 ALS の原因は不明であるが、いくつかの説がある。小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) ストレスは、小胞体内に折りたたみ不全タンパク質 (unfolded protein) などの異常タンパク質が蓄積した状態のことである (25-27)。神経変性疾患を初め、多くの疾患に関与することが知られており、薬効解析学研究室では ALS の他、パーキンソン病や緑内障、加齢黄斑変性症など、様々な疾患との関連を報告している (28-33)。ALS 患者やモデルマウスで小胞体ストレスが亢進していることや、小胞体ストレスを抑えることで生存期間が延長することなども報告されている (28, 34-36)。酸化ストレスは、過酸化物質やフリーラジカルなどの活性酸素によって細胞内器官が障害されることである。ALS との関連も多く指摘されており、ALS 患者やモデルマウスで酸化ストレスが亢進していることなどが報告されている (37)。その他、グルタミン酸興奮毒性や受容体異常、軸索輸送の異常、ユビキチン・プロテアソーム系の異常、オートファジーの異常、神経栄養因子の欠乏、グリア細胞の異常、TDP-43 [transactive response (TAR)-DNA-

binding protein 43] や FUS/TLS (fused in sarcoma / translated in liposarcoma) の変異や細胞質における異常な蓄積など、孤発性 ALS の原因は諸説あるが (3)、未だ十分に解明されていない。

TDP-43 は 414 のアミノ酸からなる 43 kDa の核タンパク質であり、1995 年にヒト免疫不全ウイルス-1 (human immunodeficiency virus-1; HIV-1) 遺伝子の末端反復配列内の TAR 領域に結合し、転写を抑制する因子として同定された (38)。多くの組織、細胞で恒常的に発現する RNA 結合タンパク質であり、核内移行シグナル (nuclear localization signal; NLS) と核外移行シグナル (predicted nuclear export signal; NES) を持ち、核と細胞質を行き来する。また、RNA 結合領域 (RNA-recognition motif; RRM) やグリシンリッチ領域をもつ (39, 40) (Fig. 2)。TDP-43 は不均一核内リボ核酸タンパク質 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; hnRNP) の一種であり、他の hnRNP 分子などと複合体を形成し、スプライシング調節や翻訳制御などを行う (41)。2006 年に ALS や FTLD で認められるユビキチン陽性の細胞質内封入体の構成タンパク質が TDP-43 であることが報告され (42)、2008

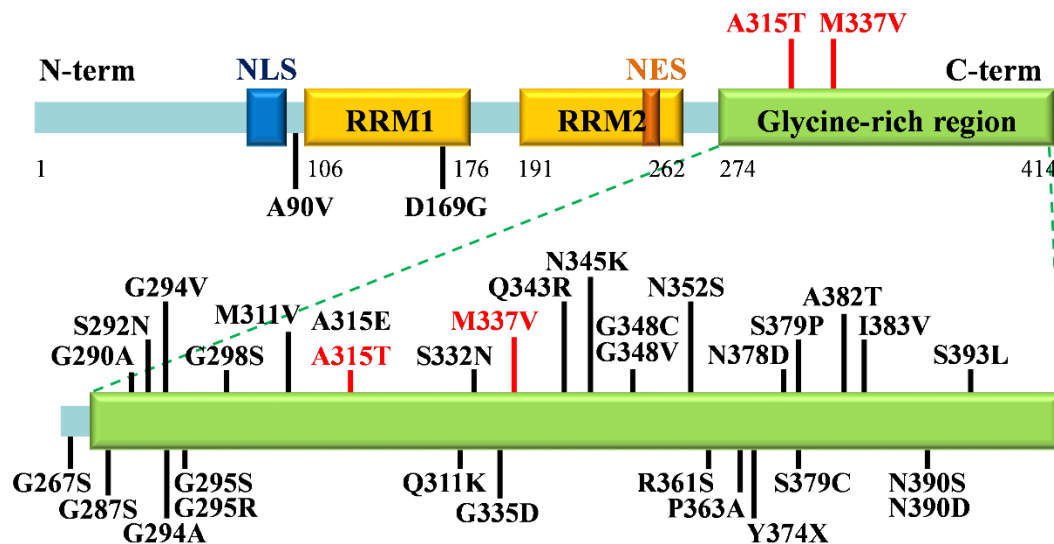


Figure 2 The structure of TDP-43, and the mutation of TDP-43 in the ALS patients.

TDP-43 has nuclear localization signal (NLS) and predicted nuclear export signal (NES). There are two RNA-recognition motif (RRM1, RRM2) and glycine-rich domain. Many types of mutation are found in the ALS patients.

年には ALS の発症や進行に TDP-43 が関与していることが報告された (43-45)。また、TDP-43 の変異や細胞質における異常な凝集体、異常なリン酸化、断片化などが家族性 ALS と孤発性 ALS のいずれにおいても認められることが報告された (39, 46, 47)。ALS 患者で認められる TDP-43 の変異は、C 末端のグリシンリッチ領域 (274-414 アミノ酸) に集中しており、TDP-43^{A315T} (第 315 アミノ酸のアラニンがスレオニンに変異)、TDP-43^{M337V} (第 337 アミノ酸のメチオニンがバリンに変異)、TDP-43^{G298S} (第 298 アミノ酸のグリシンがセリンに変異) などは比較的患者数が多い (39, 40)。

ALS に対する根本的な治療法はなく、対症療法が基本である。ALS の進行抑制薬として、グルタミン酸遊離阻害薬のリルゾール (リルテック[®]) がある。ALS における運動ニューロン障害の原因の一つとして神経伝達物質であるグルタミン酸の過剰産生があり、リルゾールは神経終末におけるグルタミン酸の遊離阻害作用を示し、運動ニューロン保護作用を示すと考えられている。しかしながら治療満足度は低く、生存期間を約3ヶ月延長するのみである (3, 48, 49)。2015年、2種類目の ALS 進行抑制薬として日本でエダラボン (ラジカット[®]) が承認され、2016年には米国においても承認申請された。エダラボンは2001年に、発症後24時間以内の急性期脳梗塞患者を対象に承認されたフリーラジカル消去剤である。重症度スケールを用いた評価で、ALS の進行がある程度抑制されることが示されたが、生存期間を延長するのかなどについては明らかにされていない (50-52)。したがって、どちらの薬剤も患者にとっては効果の実感がほとんどないのが現状である。

日本ではメコバラミンの大量筋注療法の実験が実施され、ALS の発症が遅延し ALS 機能評価スコアの低下が抑制されることが示され、2015年に承認申請された。しかしながら、これは ALS 発症後12カ月以内に治療を開始した場合に限られ、生存期間についても明らかになっていない (53, 54)。また、肝細胞栄

養因子 (hepatocyte growth factor; HGF) の髄腔内投与による臨床試験も行われている (55)。その他、セフトリアキソン (56)、ミノサイクリン (57)、メマンチン (58)、サリドマイド (59)、コエンザイム Q10 (60)、セレコキシブ (61)、ロフェコキシブ (61)、プラミペキソール (62) などが ALS モデル動物に対して生存期間を延長することが報告され、一部は臨床試験まで実施されたが ALS 病態に対する有効性は明らかになっていない。

GPNMB (SWISS-PROT accession number; Q14956) は、560 または 572 アミノ酸からなる細胞膜 1 回貫通型糖タンパク質であり (63, 64) 骨格筋や網膜など幅広い組織や臓器に発現している。GPNMB は 1995 年に悪性黒色腫細胞から発見され、オステオアクチビン (Osteoactivin)、dendritic cell-associated heparin sulfate proteoglycan-dependent integrin ligand (DC-HIL)、hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 (HGFIN) とも呼ばれている (64)。骨吸収 (65, 66) および骨形成 (67, 68) を制御していることや、T 細胞活性化を制御していること (69, 70)、肝細胞癌、膠芽腫、悪性黒色腫、乳癌など、種々の癌や肉腫に関与することが報告されている (71-76)。薬効解析学研究室では、乳癌のヒト上皮成長因子受容体 2 (human epidermal growth factor receptor-2; HER-2) 陽性のサブタイプにおいて GPNMB の発現が有意に高いことを報告しており、HER-2 シグナル経路とのクロストークが考えられる (77)。

GPNMB は糖鎖修飾を受け、glycosylated GPNMB となり、様々な作用を示すことが知られている (78)。細胞膜上の GPNMB は、ディスインテグリンや ADAM10 (a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10)、ADAM12 などのマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) によってエクトドメインシェディング (ectodomain shedding) と呼ばれる切断を受ける (79-81)。シェディングによって形成された C 末端断片は、プレ mRNA スプライシングの調節などに関与する (82)。細胞外フラグメントは、fibroblast growth factors

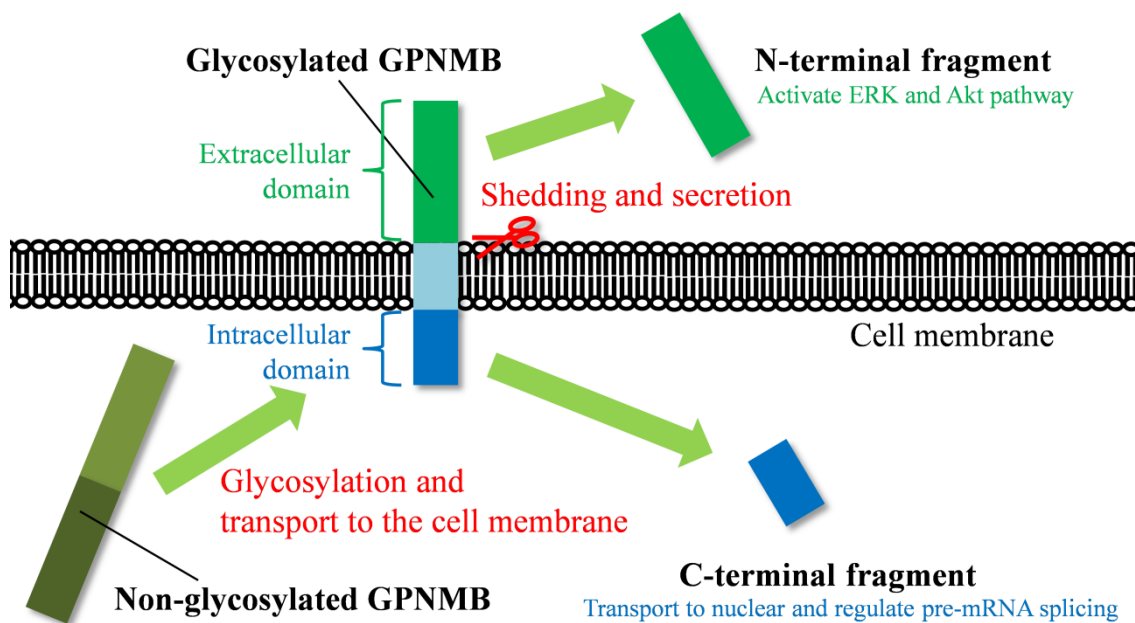


Figure 3 Relationships among glycosylated GPNMB, non-glycosylated GPNMB, and the C-terminal fragment of GPNMB.

Non-glycosylated GPNMB is glycosylated and transport to the cell membrane. Glycosylated GPNMB is mature isoform, and cleaved by some kinds of matrix metalloproteinase (MMP). Cleaved N-terminal fragment is known to activate ERK1/2 and Akt pathway.

(FGF) 受容体などを介して extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) 経路や v-akt murine thymoma viral oncogene/protein kinase B (Akt/PKB) 経路を活性化する (83, 84)。また、薬効解析学研究室では Na^+/K^+ -ATP アーゼに作用することを報告している (85) (Fig. 3)。

薬効解析学研究室では GPNMB が中枢神経系の疾患に対しても保護作用を示すことを報告した。例えば、モリス水迷路試験や新規物質探索試験などにより、GPNMB の脳室内投与は、海馬の alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体サブユニットである glutamate receptor 1 (GluR1) の発現を増加させ、記憶や学習能力を改善させた (84)。したがって、GPNMB は高次脳機能研究の標的になると考えられる。また、栓子による中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion) の後に栓子を除去する方法で惹起され

た脳虚血再灌流障害において、GPNMB の発現が増加することが明らかになった (86)。さらに、GPNMB の過剰発現は、ERK1/2 経路や Akt 経路の活性化を介して脳神経細胞死を抑制し、脳虚血再灌流障害による梗塞体積を減少させることを明らかにした (86)。

薬効解析学研究室で、野生型マウスと ALS モデルである SOD1^{G93A} マウス脊髄の DNA マイクロアレイを行ったところ、SOD1^{G93A} マウスでは GPNMB の発現が最も増加していることが明らかになった (87)。また、神経変性疾患でない患者やアルツハイマー病、パーキンソン病患者と比較して、ALS 患者の血清や脳脊髄液で、GPNMB の発現が増加することを報告しており、GPNMB が ALS 病態と何らかの関係があることが示唆された (16)。さらに、GPNMB の過剰発現によって SOD1^{G93A} マウスの生存期間が延長することやローターロッド試験における運動機能が改善すること、GPNMB が ALS の *in vitro* モデルである SOD1^{G93A} 誘発運動ニューロン死を抑制することも報告した (16)。したがって、GPNMB には ALS の発症や進行を抑制する作用があるのではないかと推察される。また、薬効解析学研究室では、ALS 患者の腰髄灰白質で GPNMB の異常な凝集体が認められることを明らかにした (16)。しかしながら GPNMB 凝集体がどこに局在するか、どのような物質と結合しているかなどは明らかになっていない。また、GPNMB と TDP-43 の関連についても、これまで検討されていない。

ALS などの神経変性疾患は、脊髄における運動ニューロンの変性・脱落によって筋肉の萎縮が生じると考えられており、これまで脊髄運動ニューロンに対する保護作用の研究が主流であった。しかしながら近年、筋肉の障害が脊髄における運動ニューロン障害より前に生じることが報告された (88)。筋肉の障害を改善することは患者の QOL を改善するばかりでなく、疾患の発症や進行の抑制につながると思われることから、脊髄だけでなく神経筋接合部や筋肉など末梢を標的にした研究を行うことは、有益だと考えられる。

本研究では、病態解明と治療薬の開発を目的として、第1章でALS患者脊髄におけるGPNMB凝集体が、腰髄、胸髄、頸髄のどこに認められるか検討した。また、ニューロンやアストロサイトなど、どの細胞に局在しているのかを検討した。さらに、GPNMB凝集体がTDP-43と関連があるか検討するため、GPNMBとTDP-43の二重免疫染色を行った。第2章では、変異TDP-43誘発運動ニューロン死に対するGPNMBの作用の検討を行った。また、ウエスタンブロット法などを用いてGPNMBの作用機序の解明を行った。第3章では、SOD1^{G93A}マウスとGPNMB過剰発現マウスのダブルトランスジェニックマウスを作製し、SOD1^{G93A}マウスの骨格筋萎縮に対するGPNMBの作用の検討を行った。また、GPNMBプラスミドDNAを骨格筋に投与する方法を用い、GPNMBが骨格筋に直接作用するか否か検討した。

第1章 ALS患者脊髄における GPNMB 凝集体の局在

第1節 諸言

TDP-43 は、ALS や FTLD などの疾患との関連が指摘されているタンパク質である。TDP-43 は正常なニューロンでは主に核に存在しているが、ALS などの疾患では細胞質中に凝集・蓄積し、核から消失することが知られており、ALS の発症や病態の進行と密接な関係があると考えられている (39, 42, 46, 47, 89)。

現在、ALS のモデルとしては、変異 SOD1 や変異 TDP-43 を運動ニューロンに遺伝子導入した *in vitro* モデルや、ラットやマウスなどのげっ歯類に遺伝子導入した *in vivo* モデルが汎用されている (16, 17, 31, 87, 90)。また、遺伝子導入が容易であるなどの利点から、ゼブラフィッシュに変異 SOD1 や変異 TDP-43 を遺伝子導入した *in vivo* モデルも使用されている (91)。変性性脊髄症 (degenerative myelopathy; DM) は、1973 年に報告されたイヌの疾患で、脊髄の変性により後肢の麻痺が生じ、最終的には呼吸困難や嚥下困難に至る進行性の疾患である (92)。ALS の症状との類似性が多い他、2009 年には DM を発症したイヌの多くに SOD1 変異がみられることが報告され、ALS のモデルとして有用である可能性が指摘されている (93, 94)。また、2012 年にはカニクイザルに変異 TDP-43 を遺伝子導入した *in vivo* モデルが報告された (95)。本モデルでは、従来 *in vivo* モデルでは確認されていなかった、ニューロンにおける TDP-43 の異常な凝集体が認められた。このように、ALS 病態により近いモデルが模索されてきたが、ヒトの ALS 病態を完全に再現することは難しく、未だ病因の解明や治療薬の開発には至っていない。したがって患者サンプルを用いた研究を行う必要がある。

序論で述べたように、薬効解析学研究室では GPNMB が ALS 患者の脊髄や血清、脳脊髄液で発現上昇すること、GPNMB の過剰発現によって SOD1^{G93A} マウスの生存期間が延長することなどを報告した (16)。また、ALS 患者の脊髄 (腰

髄灰白質) で、GPNMB の異常な凝集体が見られることを明らかにした (16)。しかしながら GPNMB 凝集体がどこに局在するか、どのような物質と結合しているかなどは明らかにされていない。

そこで本章では、ALS 患者脊髄のサンプルを使用して、GPNMB 凝集体が腰髄、胸髄、頸髄、また灰白質、白質のどこに多く生じるかを検討した。また、ALS 患者脊髄において GPNMB 凝集体がどのような細胞に局在しているかを明らかにするために、GPNMB が GFAP (glial fibrillary acidic protein) 陽性アストロサイト、Iba1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1) 陽性ミクログリア、MAP-2 (microtubule-associated protein-2) 陽性ニューロン、SMI-32 (Neurofilament H non-phosphorylated) 陽性ニューロンに局在するか検討した。さらに GPNMB が ALS 病態において TDP-43 と関連があるかを明らかにするために、GPNMB が TDP-43 と共局在するかを検討した。

第 2 節 実験材料および方法

2-1 実験材料

エタノール (ethanol)、クエン酸 (citric acid)、クエン酸ナトリウム (sodium citrate)、rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba1) polyclonal antibody (#019-19741, Lot: JNK4031, RRID AB_839504) は Wako (Osaka, Japan)、キシレン (xylene)、塩化カリウム (potassium chloride; KCl)、塩化ナトリウム (sodium chloride; NaCl) は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate; KH_2PO_4)、リン酸水素二ナトリウム・十二水 (sodium hydrogenphosphate 12-water; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、Horse serum (#S-2000, Lot: ZA0414) は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)、goat anti-human GPNMB polyclonal antibody (#AF2550, Lot: UYK0211021, RRID AB_416615) は R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA)、Alexa Fluor 546-

conjugated donkey anti-goat IgG antibody (#A11056, Lot: 1495803, RRID AB_2534103)、Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (#A21204, Lot: 1366500, RRID AB_1500750)、Alexa Fluor 488-conjugated chicken anti-rabbit IgG antibody (#A21441, Lot: 1512053, RRID AB_2535859)、Hoechst 33342 (#H3570, Lot: 35598A) は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、mouse anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody (#MAB360, Lot: LV1718394, RRID AB_2109815)、mouse anti-neurofilament H non-phosphorylated monoclonal antibody (SMI-32) (#NE1023, Lot: D00168792, RRID AB_2043449) は Millipore Corporation (Bedford, MA, USA)、mouse anti-microtubule-associated protein 2 (MAP-2) monoclonal antibody (#ab11267; Lot: GR47700-9, RRID AB_297885) は Abcam (Cambridge, UK)、rabbit anti-TDP-43 polyclonal antibody (#10782-2-AP, Lot: 5, RRID AB_615042) は Proteintech (Rosemont, IL, USA)、DAPI(#40043, Lot: 10D1005-69115) は Biotium (Hayward, CA, USA)、フルオロマウント (fluoromount) は Diagnostic BioSystems (Pleasanton, CA, USA) よりそれぞれ購入した。

PBS (phosphate buffered saline) は、KCl、KH₂PO₄、NaCl、Na₂HPO₄ · 12H₂O を超純水 (MiliQ) に溶解し、調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 生命倫理

本試験はヘルシンキ宣言 (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>) を遵守して実施した。本研究は新潟大学脳研究所で「病理解剖ならびに病理検体保存とその使用に関する承諾」が得られている症例を用い、新潟大学医学部倫理委員会の承認 (承認番号: 2428) および岐阜薬科大学生命倫理委員会の承認 (承認番号: 岐阜市薬会第 353-1 号) を得た上で行った。患者に本試験の目的を説明し、書面による同意 (インフォームドコンセント) を得た。患者自身が

同意することができない場合は家族または親族からの同意を得た。本検討で使用したのは、すべて剖検サンプルである。脊髄組織を摘出および切片の作製は新潟大学脳研究所において行った。

2-2-2 ALS 患者および対照患者の脊髄パラフィン組織切片作製

改訂版 El Escorial 診断基準 (11) を満たした孤発性 ALS 患者 10 名 (年齢: 71.0 ± 2.4 歳) および対照非神経変性疾患患者 10 名 (年齢: 69.8 ± 4.1 歳) について検討を行った (Table 1)。死後 6 時間以内に脊髄を摘出し、約 4 週間、20%緩衝ホルマリンに浸した。腰髄、胸髄、頸髄に切断した上でパラフィン包埋処理を行い、切片作成までの間、新潟大学脳研究所において保管した。新潟大学脳研究所で、厚さ 4 μm の冠状断面切片を作製し、MAS コーティング (親水性剥離防止コーティング) されたスライドガラス (Matsunami Glass Ind. Ltd., Osaka, Japan) に載せた。作製した切片は、新潟大学脳研究所から岐阜薬科大学薬効解析学研究室に輸送した後、免疫染色を行った。

Table 1 Background of the patients with sporadic ALS and other diseases.

Characteristic	Control	Sporadic ALS
Patients (n)	10	10
Male patients (n)	7	9
Female patients (n)	3	1
Age (years)	69.8 ± 4.1	71.0 ± 2.4

Age data are presented as mean \pm S.E.M.

Spinal cord samples were acquired from 10 patients with sporadic ALS and 10 patients with other diseases.

2-2-3 患者脊髄の免疫染色

パラフィン切片をキシレン (15 分、3 回)、無水エタノール (10 秒、2 回)、99% エタノール (10 秒、2 回)、90% エタノール (10 秒、1 回)、70% エタノール (10 秒、1 回)、蒸留水 (10 秒) に浸すことで、脱パラフィンを行った。切片を pH 6.2 のクエン酸緩衝液 (クエン酸およびクエン酸ナトリウムを超純水に溶かして作製) に浸して、120°C で 15 分オートクレーブを行うことで賦活化した。室温に戻し、PBS で洗淨 (5 分、2 回) した。反応液の流出を防ぐために Super PAP pen (Daido sangyo, Saitama, Japan) にて切片の周囲を囲んだ。PBS で洗淨 (5 分、1 回) した後、10% Horse serum (室温、1 時間) を反応させることにより、ブロッキングを行った。PBS で洗淨 (5 分、2 回) した後、一次抗体として goat anti-human GPNMB polyclonal antibody (1/20、4°C、一晚) を反応させた。PBS で洗淨 (5 分、2 回) した後、二次抗体として Alexa Fluor 546-conjugated donkey anti-goat IgG antibody (1/1,000、室温、1 時間) を反応させた。PBS で洗淨 (5 分、3 回) した後、一次抗体として mouse anti-GFAP monoclonal antibody (1/1,000、室温、1 時間) または rabbit anti-Iba1 polyclonal antibody (1/500、室温、1 時間) または anti-MAP-2 monoclonal antibody (1/500、室温、1 時間) または mouse anti-SMI-32 monoclonal antibody (1/1,000、室温、1 時間) または rabbit anti-TDP-43 polyclonal antibody (1/100、室温、1 時間) を反応させた。PBS で洗淨 (5 分、2 回) した後、二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (1/1,000、室温、1 時間) または Alexa Fluor 488-conjugated chicken anti-rabbit IgG antibody (1/1,000、室温、1 時間) を反応させた。PBS で洗淨 (5 分、3 回) した後、DAPI (1/1,000、室温、30 分) または Hoechst33342 (1/5,000、室温、30 分) を反応させることで核を染色した。PBS で洗淨 (5 分、3 回) した後、フルオロマウントで封入した。すべての手順を遮光条件下にて行った。撮影は主に IX50 倒立顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) と高感度冷却 charge coupled device (CCD) カメラ (DP30BW, Olympus) を

用いて行った。Iba1 の検討では BZ-X700 fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan) を用いて撮影した。脊髄前角および後角それぞれにおいて、腰髄、胸髄、頸髄の灰白質と白質を撮影した。

2-2-4 GPNMB 凝集体数の定量

ALS 患者および対照疾患患者の腰髄、胸髄、頸髄それぞれにおいて、Fig. 4 の赤い四角で示した部位 (前角および後角の灰白質と白質) を IX50 倒立顕微鏡 (Olympus) および高感度冷却カメラ (DP30BW, Olympus) を用いて 200 倍の倍率で撮影した。解析ソフト Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて、盲検下で GPNMB 凝集体数を数えた。ニューロンの細胞体に存在するもの (Fig. 5 の矢印)、ニューロンの細胞体外に存在するもの (Fig. 5 の矢じり)、それらの合計について定量を行った。各患者について 2 枚の画像を定量し、それらの平均を算出した。

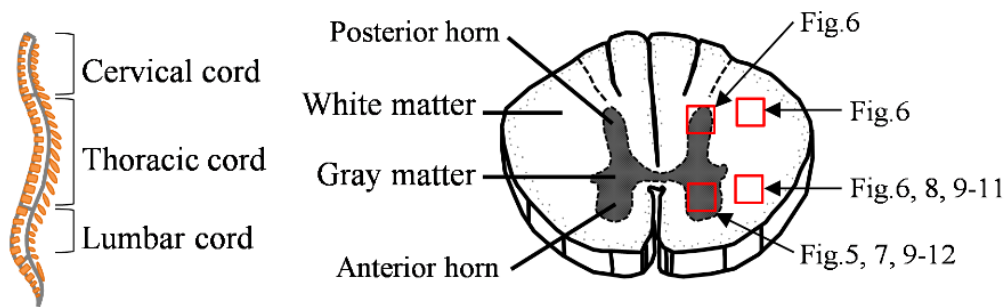


Figure 4 Illustration of the position we evaluated in this study.

Left is an illustration of the spinal cord. We evaluated the lumbar, thoracic, and cervical spinal cord. Right is a sectional view, and red squares show the analyzed regions. Anterior horn of the gray matter and the white matter were mainly evaluated.

2-2-5 GPNMB 凝集体数が MAP-2 と共局在した割合の定量

MAP-2 抗体で染色されたニューロン (緑色) と GPNMB 凝集体 (赤色) とがマージした (黄色) 割合を、解析ソフト Image J を用いて盲検下で定量した。各患者について 2 枚の画像を定量し、それらの平均を算出した。

2-2-6 統計学的解析

実験成績は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。統計学的な比較は、Student's *t*-test (JSTAT for windows; Vector, Tokyo, Japan) により行った。危険率が 5%未満の場合を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 ALS 患者脊髄における GPNMB 凝集体の局在の検討

ALS 患者脊髄において GPNMB 凝集体が増加するか否か、また増加する場合、脊髄のどの部位において GPNMB 凝集体が増加するのかを明らかにするために、腰髄、胸髄、頸髄それぞれの前角および後角の灰白質と白質において、GPNMB 抗体を用いて免疫染色を行った。ニューロンの細胞体内に存在する比較的大きな GPNMB 凝集体 (矢印) は、対照患者と比較して ALS 患者の腰髄、胸髄、頸髄の前角の灰白質において有意に増加していた ($n = 10$; ALS lumbar $p = 0.023$, ALS thoracic $p = 0.049$, ALS cervical $p = 0.007$, versus control)。ALS 患者の腰髄、頸髄前角の灰白質において、ニューロンの細胞体外に存在する比較的小きな GPNMB 凝集体 (矢じり) が有意に増加していた ($n = 10$; ALS lumbar $p = 0.009$, ALS thoracic $p = 0.051$, ALS cervical $p = 0.009$, versus control)。全 GPNMB 凝集体は、ALS 患者の腰髄、胸髄、頸髄の前角の灰白質において有意に増加していた ($n = 10$; ALS lumbar $p = 0.006$, ALS thoracic $p = 0.045$, ALS cervical $p = 0.005$, versus control) (Fig. 5)。GPNMB 凝集体数は、腰髄、胸髄、頸髄それぞれにおいて、後角の灰白質 ($n = 10$; ALS lumbar $p = 0.001$, ALS thoracic $p < 0.001$, ALS cervical $p < 0.001$, versus control)、前角の灰白質 ($n = 10$; ALS lumbar $p = 0.045$, ALS thoracic $p = 0.013$, ALS cervical $p = 0.136$, versus control)、後角の白質 ($n = 10$; ALS lumbar $p = 0.044$, ALS thoracic $p = 0.002$, ALS cervical $p = 0.019$, versus control) で有意に増加していた (Fig. 6)。GPNMB 凝集体数は白質と比較して灰白質で多かった。

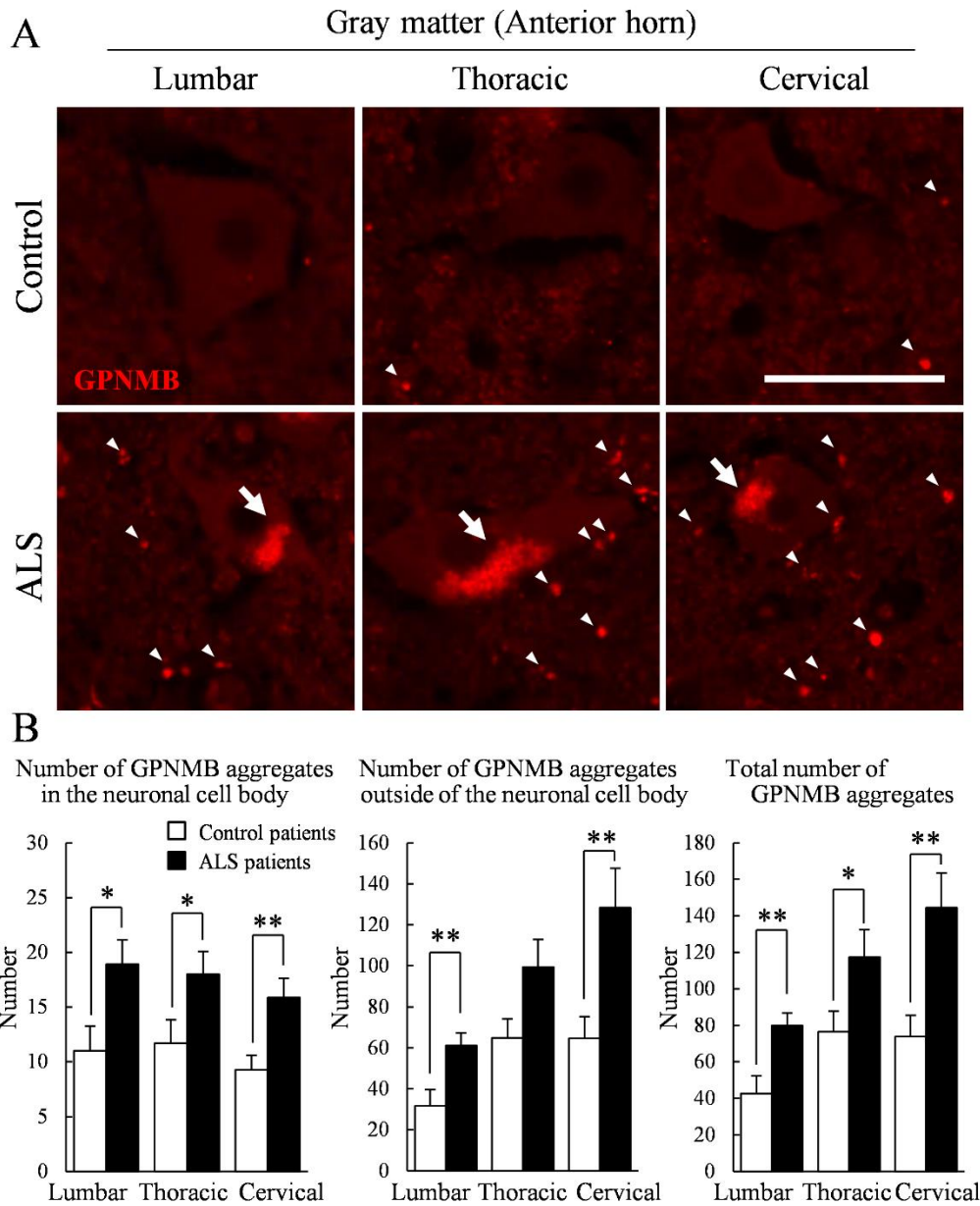


Figure 5 GPNMB aggregates in anterior horn of the gray matter of the spinal cord of ALS patients.

(A) Representative images of immunostaining using anti-human GPNMB antibody. The upper images represent the results of control patients and the lower images represent the results of sporadic ALS patients in the gray matter of anterior horn in the lumbar, thoracic, and cervical spinal cord. Arrows show the GPNMB aggregates in the neuronal cell body, and arrowheads show the GPNMB aggregates outside of the neuronal cell body. Scale bar = 50 μ m. (B) Quantitative data of the number of GPNMB aggregates in anterior horn of the gray matter of the spinal cord. From the left, quantitative data of the number of GPNMB aggregates in the neuronal cell body, outside of the neuronal cell body, and total. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 10). * p < 0.05, ** p < 0.01 versus control patients group (Student's t -test).

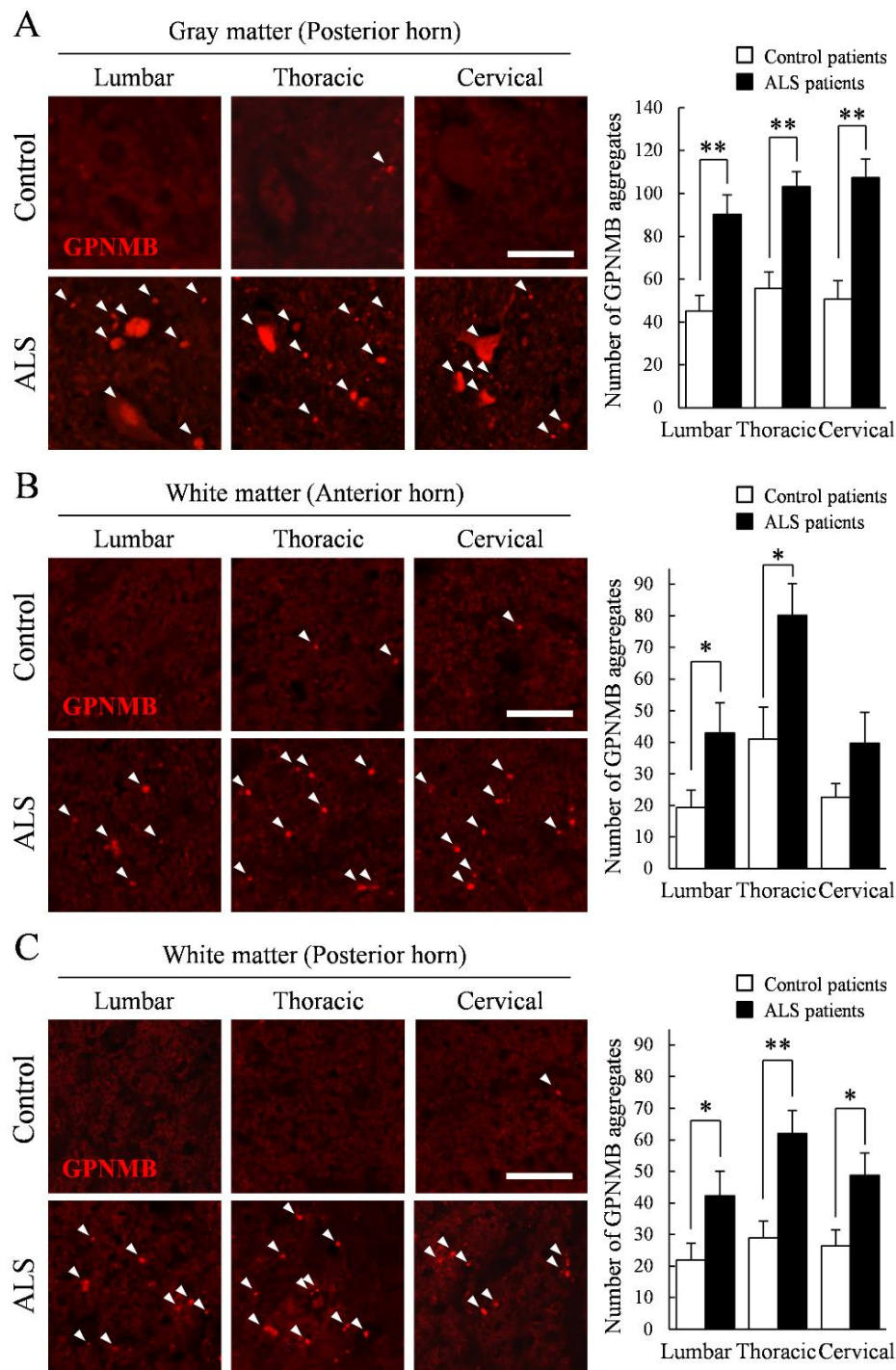


Figure 6 GPNMB aggregates in the spinal cord of ALS patients.

(A-C) Left shows the representative images of immunostaining of GPNMB in the lumbar, thoracic, and cervical spinal cord. Right shows the quantitative data of the number of GPNMB aggregates. Arrowheads show the GPNMB aggregates. The number of GPNMB aggregates in posterior horn of the gray matter (A), anterior horn of the white matter (B), and posterior horn of the white matter (C) were evaluated. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 10). * p < 0.05, ** p < 0.01 versus control patients group (Student's t -test).

3-2 ALS 患者脊髄における GPNMB と GFAP の共局在の検討

GFAP はアストロサイトにおいて高発現するタンパク質であり、ALS の脊髄では増加することが知られている (96-98)。本検討でも対照患者脊髄と比較して ALS 患者で GFAP 陽性アストロサイトの増加が確認された (Fig. 7, 8)。ALS 患者脊髄で増加した GPNMB 凝集体が GFAP 陽性アストロサイトに局在しているかを検討するために、二重免疫染色を行った。GPNMB 凝集体は灰白質 (Fig. 7) と白質 (Fig. 8) のいずれにおいても GFAP 陽性アストロサイトには局在していなかった。

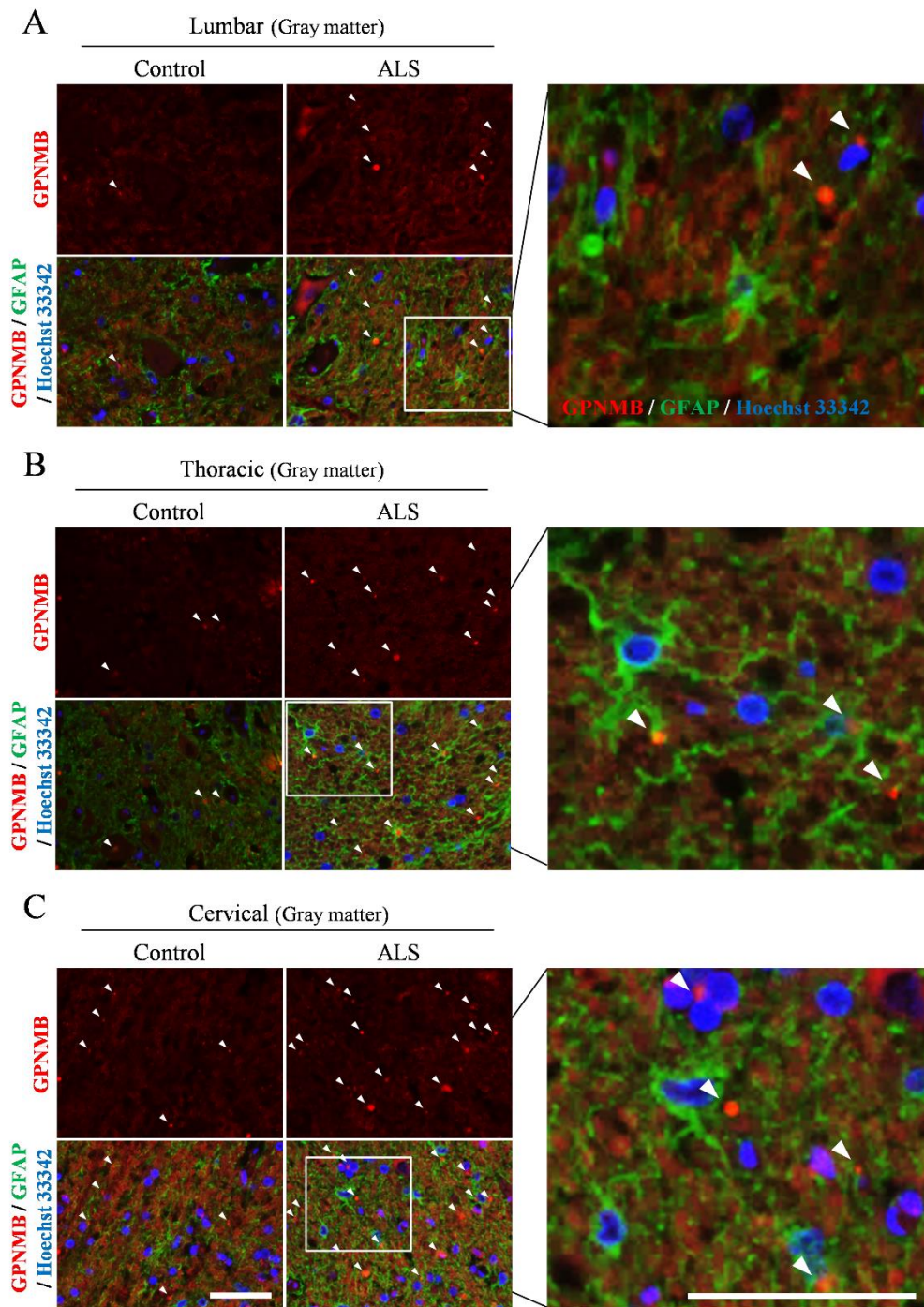


Figure 7 Double-immunostaining of GPNMB and GFAP in gray matter of the spinal cord of ALS patients.

(A-C) Representative images of double-immunostaining using anti-human GPNMB antibody (red), anti-GFAP antibody (green), and Hoechst 33342 (blue) in the gray matter of the spinal cord. (A) The lumbar cord, (B) thoracic cord, and (C) the cervical cord were evaluated, respectively. Right images are magnified images of each square of the ALS patients. Arrowheads represent GPNMB aggregates. Scale bar = 50 μ m.

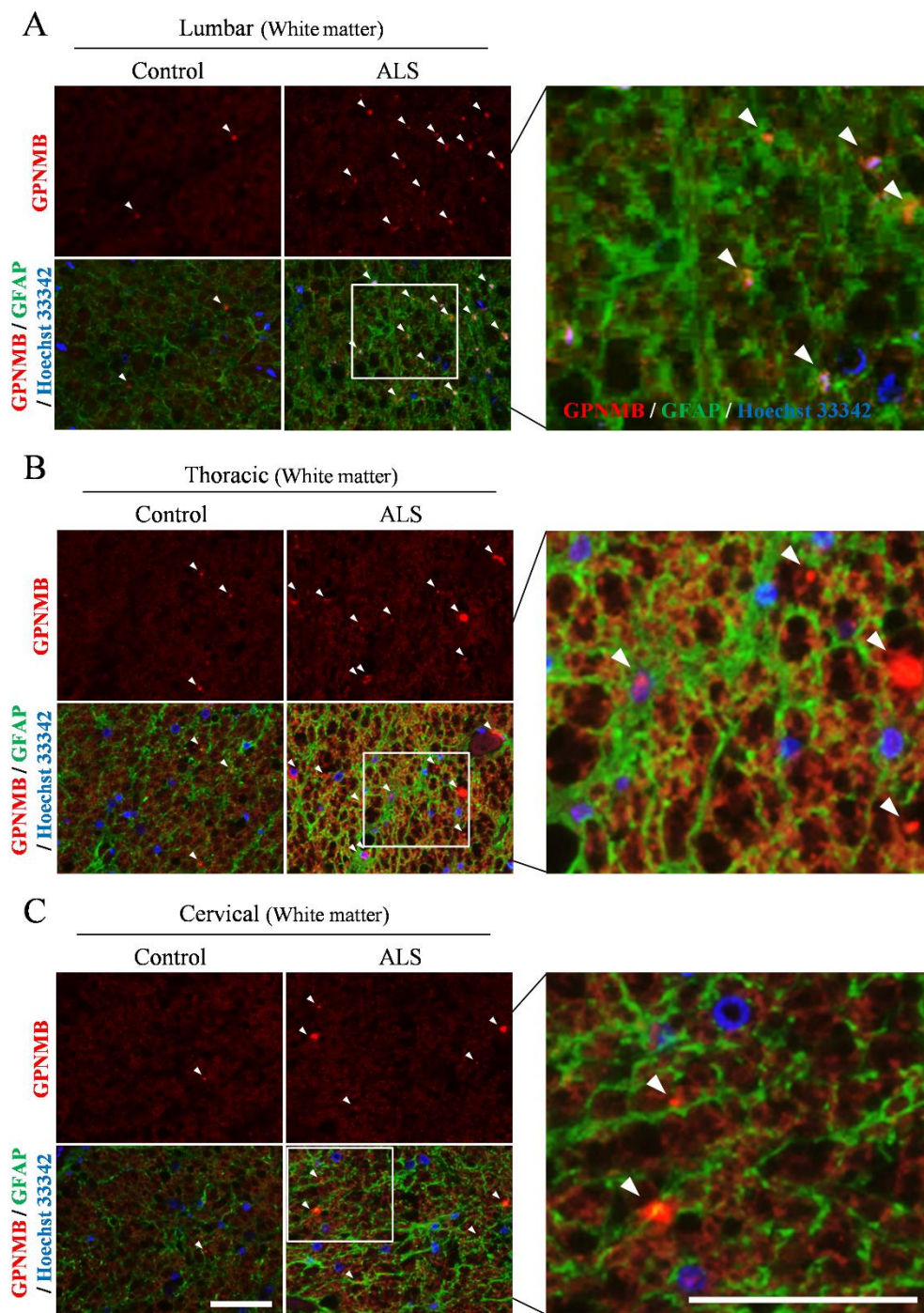


Figure 8 Double-immunostaining of GPNMB and GFAP in white matter of the spinal cord of ALS patients.

(A-C) Representative images of double-immunostaining using anti-human GPNMB antibody (red), anti-GFAP antibody (green), and Hoechst 33342 (blue) in the white matter of the spinal cord. (A) The lumbar cord, (B) thoracic cord, and (C) cervical cord were evaluated, respectively. Right images are magnified images of each square of the ALS patients. Arrowheads represent GPNMB aggregates. Scale bar = 50 μ m.

3-3 ALS 患者脊髄における GPNMB と Iba1 の共局在の検討

Iba1 抗体はミクログリアやマクロファージに対して反応性を示す。腰髄、胸髄、頸髄において、Iba1 抗体と GPNMB 抗体を用いた二重免疫染色を行った。GPNMB 凝集体は灰白質 (Fig. 9A)、白質 (Fig. 9B) のいずれにおいても Iba1 陽性ミクログリアには局在していなかった。

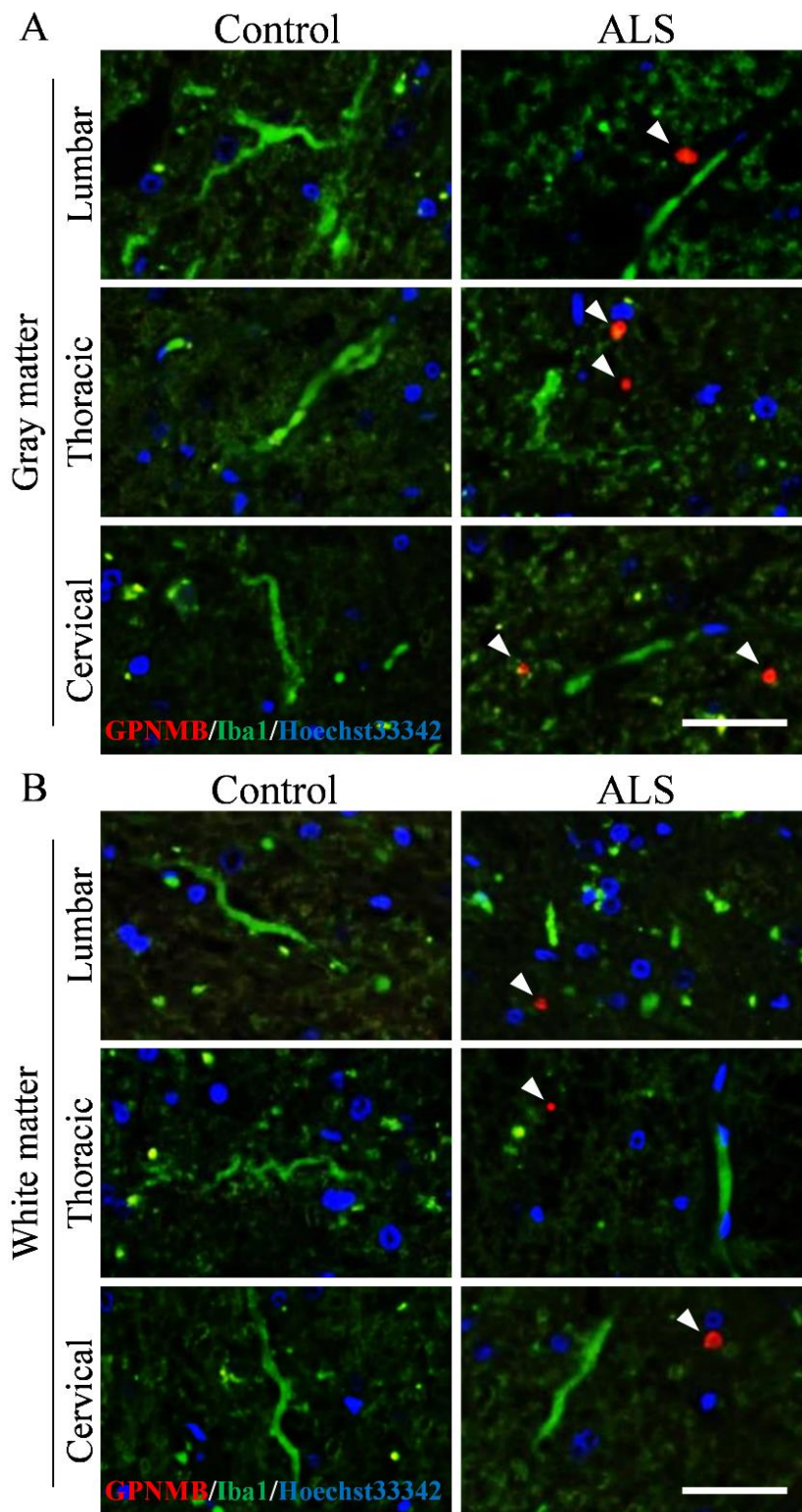


Figure 9 Double-immunostaining of GPNMB and Iba1 in the spinal cord of ALS patients. (A-C) Representative images of double-immunostaining using anti-human GPNMB antibody (red), anti-Iba1 antibody (green), and Hoechst 33342 (blue), in the gray matter (A) and the white matter (B) of the spinal cord. Arrowheads represent GPNMB aggregates. Scale bar = 50 μ m.

3-4 ALS 患者脊髄における GPNMB と MAP-2 および SMI-32 の共局在の検討

GPNMB がニューロンに局在するかを検討するために、ニューロンのマーカーである MAP-2 および SMI-32 と GPNMB の二重免疫染色を行った。MAP-2 はニューロンの細胞体や樹状突起に発現する。大部分の GPNMB 凝集体は腰髄、胸髄、頸髄の灰白質において MAP-2 と共局在していた (Fig. 10A-D)。SMI-32 はニューロンの細胞体や樹状突起、また一部の軸索に発現する。大部分の GPNMB 凝集体は腰髄、胸髄、頸髄の灰白質において SMI-32 と共局在していた (Fig. 11A)。GPNMB 凝集体は細胞体だけでなく、SMI-32 陽性ニューロンの軸索 (矢印) においても局在していた (Fig. 11A)。形態やその大きさからして、GPNMB 凝集体は運動ニューロンを含むニューロンに局在していた。MAP-2 や SMI-32 は脊髄白質では検出されなかった (Fig. 10E, 11B)。

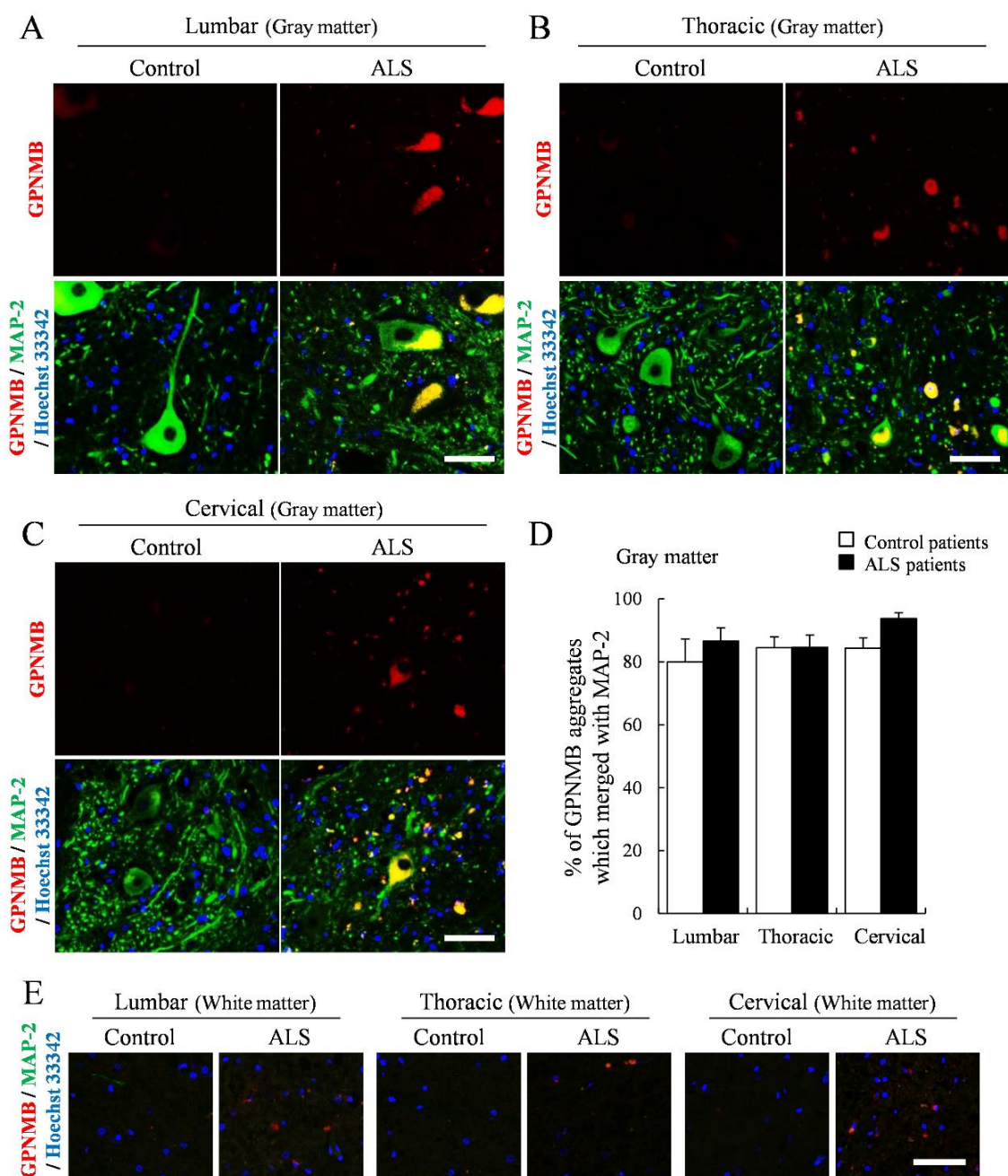


Figure 10 Double-immunostaining of GPNMB and MAP-2 in the spinal cord of ALS patients. (A-C) Representative images of double-immunostaining using anti-human GPNMB antibody (red), anti-MAP-2 antibody (green), and Hoechst 33342 (blue) in the gray matter of the spinal cord. (A) Gray matter of the lumbar cord, (B) thoracic cord, and (C) cervical cord were evaluated, respectively. (D) Quantitative data of the percentage of GPNMB aggregates which were co-localized with MAP-2. (E) Representative images of double-immunostaining in the white matter of the spinal cord. Scale bar = 50 μ m. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 10).

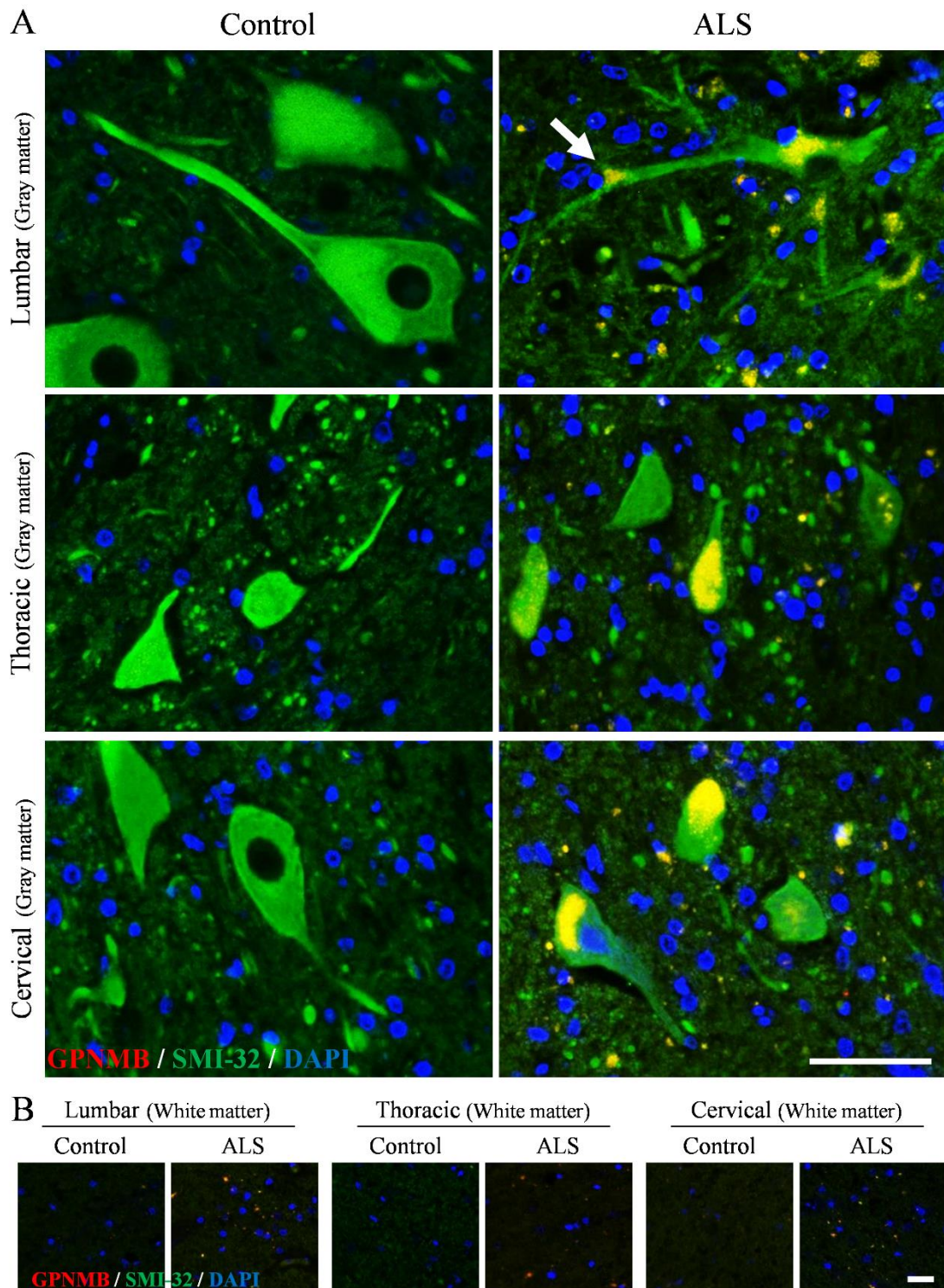


Figure 11 Double-immunostaining of GPNMB and SMI-32 in the spinal cord of ALS patients. (A) Representative images of double-immunostaining using anti-human GPNMB antibody (red), anti-SMI-32 antibody (green), and DAPI (blue) in the gray matter, and (B) in the white matter of the spinal cord, respectively. The arrow represents GPNMB aggregates observed in axon of motor neuron in ALS patients. Scale bar = 50 μ m.

3-5 ALS 患者脊髄における GPNMB と TDP-43 の共局在の検討

TDP-43 は正常なニューロンでは主に核に局在しているが、ALS や FTLD などの疾患で変性したニューロンでは TDP-43 が細胞質において凝集体を形成し、核から消失することが知られている。GPNMB 凝集体がニューロンに局在していたことから (Fig. 10, 11)、GPNMB 凝集体は TDP-43 との関連性を検討するために、GPNMB と TDP-43 の二重免疫染色を行った。細胞の形態や大きさから判断して、TDP-43 は運動ニューロンに局在していた (Fig. 12)。対照疾患患者の腰髄灰白質で TDP-43 はニューロンの核に局在していたが、ALS 患者では核から消失し、細胞質において凝集体を形成していた。また、TDP-43 陽性凝集体は、GPNMB と共局在していた (Fig. 12)。ALS の病理組織的な特徴として、ブニナ小体 (好酸性の小さな細胞質内封入体)、ユビキチン陽性封入体、スケイン様封入体 (線維状の細胞質内封入体) などがある。矢印で示すように、GPNMB が高発現した運動ニューロンにおいて、スケイン様封入体が観察された (Fig. 12)。

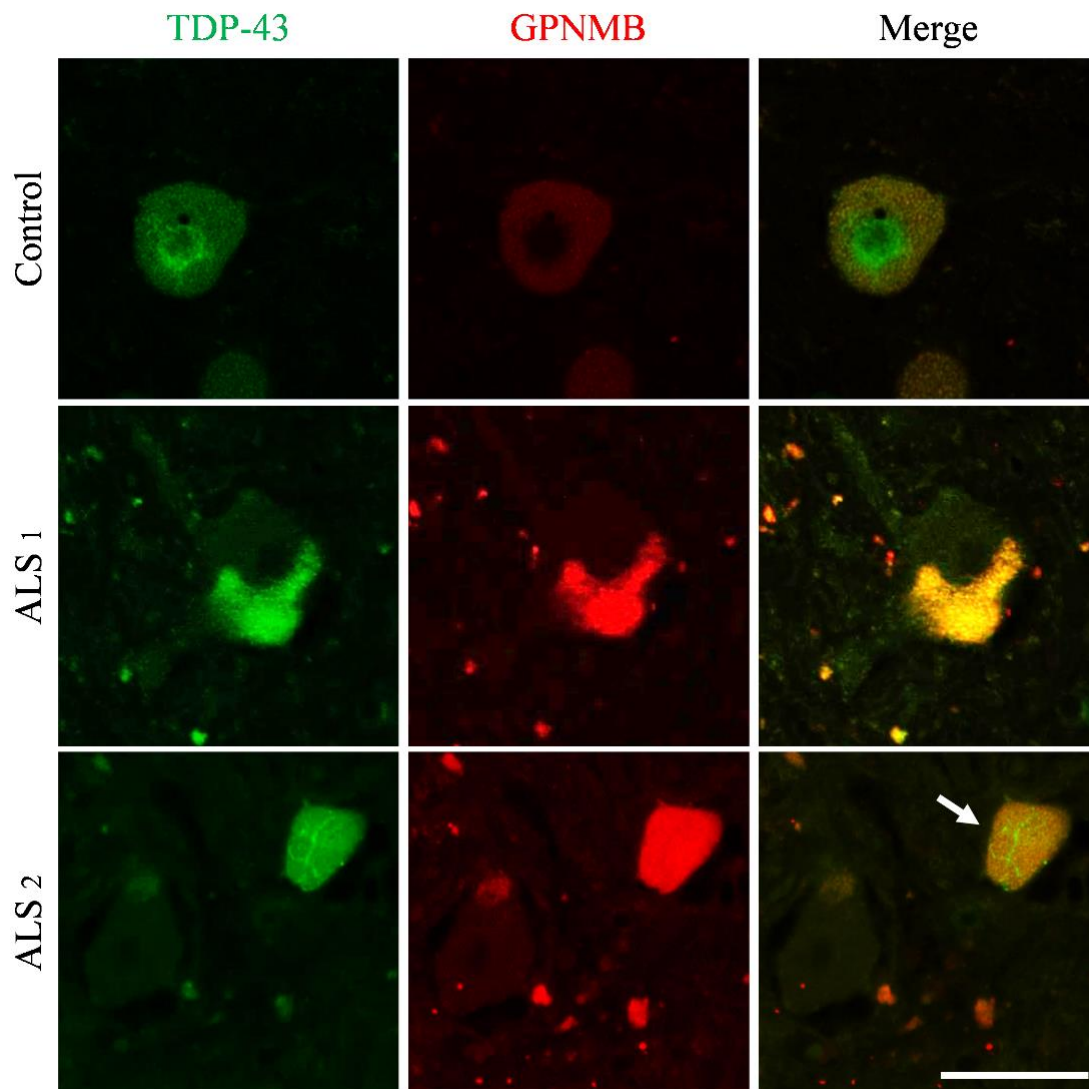


Figure 12 Double-immunostaining of GPNMB and TDP-43 in the spinal cord of ALS patients. Representative images of double-immunostaining using anti-human GPNMB antibody (red), and anti-TDP-43 antibody (green) in anterior horn of the gray matter of the lumbar spinal cord. The upper image represents results of control patient, and the middle and lower images represent results of sporadic ALS patients. The arrow represents skein-like inclusion observed in ALS patients. Scale bar = 50 μ m.

第4節 考察

対照患者と比較して、ALS 患者の腰髄、胸髄および頸髄において GPNMB 凝集体が増加していた。また GPNMB 凝集体の増加は前角、後角のいずれにおい

ても、また灰白質、白質のいずれにおいても認められた (Fig. 5, 6)。したがって、GPNMB 凝集体は、ALS 患者脊髄の全体で広範に増加していることが示された。

薬効解析学研究室では、SOD1^{G93A} マウスの脊髄において増加した GPNMB は Neu-N 陽性ニューロンや GFAP 陽性アストロサイトに局在しているが、Iba1 陽性ミクログリアには局在しないことを明らかにしている (16)。ALS 患者脊髄における GPNMB 凝集体は GFAP 陽性アストロサイトや Iba1 陽性ミクログリアには局在していなかった (Fig. 7-9)。GPNMB 凝集体は MAP-2 陽性ニューロンに局在していた (Fig. 10)。SMI-32 は脊髄の切片や培養した脊髄ニューロンにおいて運動ニューロンを染めるとの報告がある (99, 100)。GPNMB 凝集体は SMI-32 陽性運動ニューロンに局在していた。また、GPNMB 凝集体は SMI-32 陽性ニューロンの細胞体だけではなく軸索にも局在していた (Fig. 11)。したがって、ALS 患者脊髄における GPNMB 凝集体は、アストロサイトやミクログリアには局在せず、運動ニューロンをはじめとしたニューロンの細胞体や軸索に局在していることが示された。

GPNMB 凝集体は灰白質だけではなく白質でも増加していた (Fig. 6)。灰白質同様、GFAP 陽性アストロサイトや Iba1 陽性ミクログリアとは共局在していなかった (Fig. 7-9)。GPNMB は一回膜貫通型糖タンパク質であるが、ADAM10 や ADAM12 などによってシェディングを受けることが知られている (79-81)。薬効解析学研究室では ALS 患者の血清や脳脊髄液中においても GPNMB の発現が増加することを報告している (16)。したがって切断を受け、分泌された GPNMB の断片が凝集体を形成している可能性もある。いずれにせよ、白質における GPNMB の局在については本検討では明らかになっていない。

GPNMB は SOD1^{G93A} マウス脊髄では GFAP と共局在していたが (16)、ALS 患者脊髄では共局在していなかった (Fig. 7, 8)。GPNMB の発現様式も孤発性 ALS 患者と SOD1^{G93A} マウスでは異なっており、ALS 患者脊髄で認められたような

GPNMB の凝集体は SOD1^{G93A} マウスでは認められていない (16)。その理由として、まずヒトとマウス間の種差が考えられる。2つ目の理由としては、家族性 ALS と孤発性 ALS の違いが考えられる。SOD1^{G93A} マウスではニューロンの進行性的な変性や脱落が認められ、ALS の病態をよく再現していることから家族性 ALS の *in vivo* モデルとして汎用されている (16)。孤発性 ALS では TDP-43 の異常が関与する可能性が指摘されているが (43-45)、SOD1 関連家族性 ALS 患者の脊髄では TDP-43 の異常が認められないことが報告されている (101)。変異 SOD1 過剰発現マウスで TDP-43 の異常が認められたとする報告もあるが (102)、SOD1^{G93A} マウスや SOD1^{G37R} マウス、SOD1^{G85R} マウスの脊髄では TDP-43 の異常が認められないとの報告もあり (103)、見解が分かれている。

GPNMB はタンパク質との結合サイトがあることが知られている (104-106)。シェディングによって生じた GPNMB の C 末端断片は、RNA 結合蛋白質 hnRNP1 に結合することが報告されている (82)。また、hnRNP1 は本来核に局在し、その一部は TDP-43 と結合しているが、ALS では細胞質に移行して蓄積することが知られている (107, 108)。TDP-43 は ALS や FTLD などの変性したニューロンでは核から消失し、細胞質や軸索において凝集体を形成することが知られている (39, 47, 89, 109)。GPNMB 凝集体が ALS 患者脊髄のニューロンの細胞体や軸索に局在していたことから (Fig. 10, 11)、GPNMB は TDP-43 と関連があるのではないかと仮説を立てた。二重免疫染色を行ったところ、ALS 患者腰髄において GPNMB は TDP-43 と共局在していた (Fig. 12)。ALS の病理組織的な特徴として、ブニナ小体、ユビキチン陽性封入体、スケイン様封入体などがある (3, 110)。ALS 患者腰髄における GPNMB が高発現した運動ニューロンで、スケイン様封入体が認められた (Fig. 12)。したがって、GPNMB と TDP-43 との間には何らかの関連があることが示唆された。

薬効解析学研究室では GPNMB が SOD1^{G93A} マウスの生存期間を延長し、

SOD1^{G93A} 誘発運動ニューロン死を抑制することを明らかにしている (16)。したがって、GPNMB は TDP-43 による細胞毒性を抑制するために、TDP-43 陽性の細胞質内封入体と結合した可能性がある (Fig. 13)。

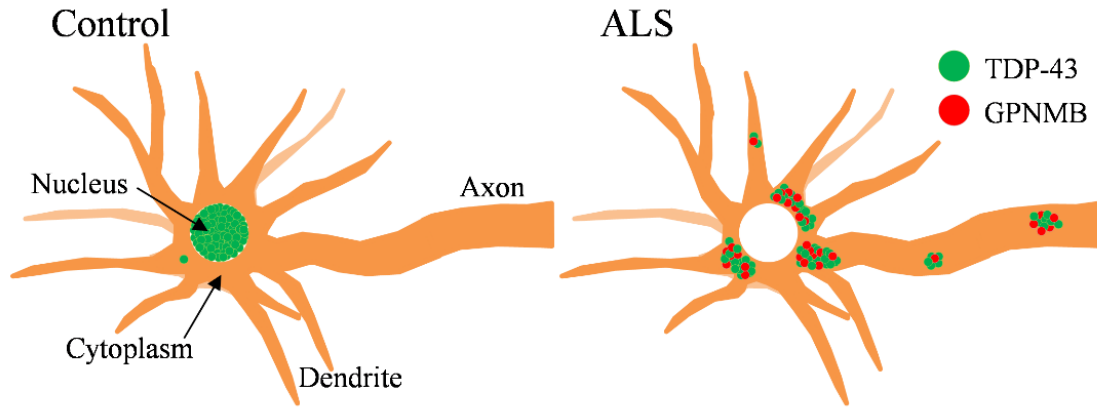


Figure 13 Illustration of the phenomenon in the neurons of ALS patients.

Green dots represent TDP-43 and red dots represent GPNMB. TDP-43 is mainly located in the nucleus in normal neurons. In degenerated neurons in ALS, TDP-43 aggregates are observed in the cytosol and axon, and is no longer apparent in the nucleus. TDP-43 aggregates in cytosol are co-localized with GPNMB.

以上、本章では ALS 患者の腰髄、胸髄、頸髄において GPNMB 凝集体が増加することが明らかになった。また、GPNMB 凝集体は GFAP 陽性アストロサイトや Iba1 陽性ミクログリアには局在せず、MAP-2 陽性ニューロンや SMI-32 陽性ニューロンに局在することが明らかになった。さらに、ALS 患者における GPNMB 凝集体は TDP-43 と関連があることが示唆された。

第2章 変異 TDP-43 誘発運動ニューロン死に対する GPNMB の作用

第1節 諸言

前述のように、TDP-43 は ALS 患者において変異が見られることが知られており、核から消失して細胞質に凝集体を形成することが知られている (39, 47)。第1章において、ALS 患者脊髄において、GPNMB が TDP-43 と共局在することを明らかにし、ALS 病態において GPNMB と TDP-43 には関連があることが示唆された。また、薬効解析学研究室では、GPNMB が変異 SOD1 過剰発現マウスや *in vitro* モデルにおいて、保護作用を示すことを報告しており (16)、GPNMB は変異 TDP-43 誘発の運動ニューロン障害に対しても保護作用を示すのではないかと仮説を立てた。

変異 SOD1 を過剰発現させた細胞やげっ歯類は、ALS 病態と類似した症状を示すため、ALS のモデルとして広く用いられているが (16, 17, 31, 87, 90)、ALS 患者で認められる TDP-43 陽性封入体やブニナ小体が認められないなど、その病態は孤発性 ALS と必ずしも一致しない。また、孤発性 ALS 患者や変異 SOD1 を伴わない家族性 ALS 患者では TDP-43 陽性封入体が認められた反面、変異 SOD1 を有する家族性 ALS 患者では TDP-43 陽性封入体が認められなかったとする報告もあり (101)、SOD1 遺伝子の変異がすべての ALS 病態を反映しているとはいえない。また、SOD1 遺伝子の変異が起こるのは、家族性 ALS 患者のおよそ 20% (ALS 患者全体の 2-3%) にすぎない。したがって、変異 TDP-43 誘発 ALS モデルに対しても、GPNMB の保護作用を示すことが明らかになれば、家族性 ALS だけでなく孤発性 ALS に対しても有効であることが示され、ALS 治療に対する GPNMB の有用性の幅が広がると考えられる。

In vitro における ALS 病態モデルとして、最も広く使われているものに ALS モ

デルマウス脊髄由来初代培養運動ニューロン細胞がある。生体内における細胞の機能を多く保持しているため、細胞機能を再現できる実験系である。しかし、運動ニューロンに分化するまでに数日間かかる点や、連続的に継代を行うことができないという欠点がある。これらの問題を解決するために作製されたのが、マウス胎児脊髄運動ニューロンと神経芽細胞腫のハイブリッド細胞である neuroblastoma-spinal cord-34 (NSC-34) 細胞である (Fig. 14)。この細胞はコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase) を発現している点やアセチルコリン (acetylcholine) を合成、貯蔵できるなど運動ニューロンとしての特徴を持っており、現在 ALS 研究において広く用いられている (111, 112)。

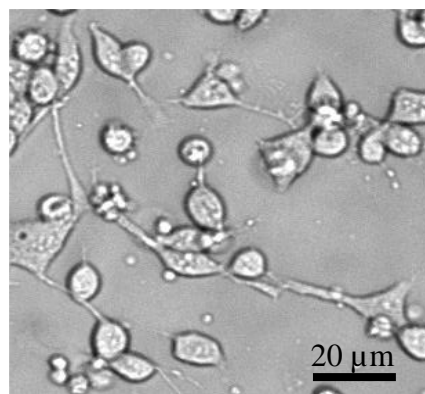


Figure 14 NSC-34 cells.
Bright field image of NSC-34 cells taken by IX70 fluorescence microscope.

NSC-34 細胞における TDP-43 の人為的な過剰発現が 2010 年に初めて報告され、その後も何報か報告された (113-117)。TDP-43 を過剰発現させた NSC-34 細胞では、細胞質における TDP-43 の異常な凝集体が認められる

(113, 118)。NSC-34 細胞では、マウス由来ニューロンである Neuro2a 細胞やヒト線維芽細胞である HEK293T 細胞などと比較して、変異 TDP-43 を過剰発現させた場合のアポトーシス細胞死が有意に多いことが報告されている (116)。

そこで本章では、NSC-34 細胞に変異 TDP-43 を遺伝子導入し、変異 TDP-43 誘発運動ニューロン死に対する GPNMB の作用を検討した。また、ウエスタンブロット法を用いて作用機序の検討を行った。

第 2 節 実験材料および方法

2-1 実験材料

コンピテントセル (ECOS™ Competent *E. coli* DH5α) は Nippon Gene (Tokyo, Japan)、Pure Yield™ Plasmid Midiprep System は Promega (Madison, WI, USA)、アンピシリン (Ampicillin)、Lysogeny broth (LB) 培地、2-プロパノール (2-propanol)、エタノール (ethanol)、塩酸 (hydrogen chloride; HCl)、デオキシコール酸ナトリウム (Sodium deoxycholate)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel]、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、2-メルカプトエタノール含有 4× sample buffer solution、ImmunoStar® LD、メタノール (methanol)、6-アミノヘキサノ酸 (6-aminohexanoic acid) は Wako、Lipofectamine 2000 Reagent、Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Opti-MEM)、propidium iodide (PI; #P3566, Lot: 1126449)、Hoechst 33342 (#H3570, Lot: 35598A) は Invitrogen、ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS) は Valeant (Costa Mesa, CA, USA)、ペニシリン (penicillin)、ストレプトマイシン (streptomycin) は Meiji Seika (Tokyo, Japan)、Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) high glucose、トリプシン (trypsin)、Tris-HCl (pH 8.0)、Igepal CA-630、protease inhibitor cocktail (#P8340)、phosphatase inhibitor cocktail II (#P2850)、phosphatase inhibitor cocktail III (#P5726)、は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Cellmatrix Type III は Nitta Gelatin (Osaka, Japan)、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate; KH_2PO_4)、リン酸水素二ナトリウム・十二水 (sodium hydrogenphosphate 12-water; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) は Nacalai Tesque、塩化カリウム (potassium chloride; KCl)、塩化ナトリウム (sodium chloride; NaCl) は Kishida Chemical、Blocking One-P、グリシン (glycine)、Can Get Signal 1、Can Get Signal 2 は Toyobo (Osaka, Japan)、Tween 20 Solution (Tween)、トリス (Tris)、Precision Plus Protein™ Standards は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、goat anti-mouse GPNMB polyclonal antibody (#AF2330, Lot ULH0211101, RRID AB_2112934) は R&D Systems Inc.、rabbit anti-GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) monoclonal antibody (#2118S, Lot 8,

RRID AB_10698756)、rabbit anti-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) polyclonal antibody (#9102S, Lot 23, RRID AB_10695746), rabbit anti-p-ERK1/2 monoclonal antibody (#4377S, Lot 10, RRID AB_331775), rabbit anti-protein kinase B (Akt) polyclonal antibody (#9272S, Lot 24, RRID AB_10699016), rabbit anti-p-Akt (S473) monoclonal antibody (#4058S, Lot 30, RRID AB_331168) は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)、rabbit anti-goat IgGs conjugated to horseradish peroxidase (HRP) antibody (Cat# 31402, Lot IK1099845, RRID AB_228395)、goat anti-rabbit IgGs conjugated to HRP antibody (Cat# 32460, Lot OB183336, RRID AB_1185567) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、マウス脊髄ニューロン由来細胞株 (NSC-34 細胞) は Cellutions (Tront, ON, Canada) よりそれぞれ購入した。

PBS (phosphate buffered saline) は、KCl、KH₂PO₄、NaCl、Na₂HPO₄ · 12H₂O を超純水 (MiliQ) に溶解し、調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 TDP-43 発現プラスミド DNA

空ベクター (Mock)、マウス TDP-43^{WT} プラスミド、マウス TDP-43^{M337V} プラスミド、マウス TDP-43^{A315T} プラスミドは、元 名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 祖父江元 教授 (現 名古屋大学大学院医学系研究科 神経変性・認知症制御研究部 特任教授) より恵与されたものを使用した。TDP-43 cDNA を PCR 法にて増幅し、Gateway LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen) を用いて pcDNA6.2/N-EmGFP-DEST ベクターに組み込んでおり、Enhanced green fluorescent protein (GFP) を発現する (113)。各プラスミドを用いた大腸菌 DH5α 株の形質転換や培養、NSC-34 細胞への遺伝子導入などは、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、承認 (承認番号: 平 24-

3) を得た上で行った。

2-2-1 TDP-43 プラスミド DNA の増幅

コンピテントセル (ECOSTM Competent *E. coli* DH5 α) へのプラスミド DNA の導入には、高効率迅速形質転換法を用いた。氷上でコンピテントセルを融解した後、直ちにプラスミド DNA を添加し、1 秒間ボルテックスで攪拌した。氷上で 5 分間インキュベートした後、アルミニウムブロックバスを用いて、42°C で 45 秒間インキュベートし、直ちにボルテックスで 1 秒間攪拌した。その後、全量をアンピシリン 100 mg/mL を含む LB 培地 (寒天培地) に均一に塗布した。37°C で 12-16 時間インキュベートした後、形成されたコロニーの 1 つをピックアップし、15 mL チューブに入れた 5 mL の液体 LB 培地 (アンピシリン 100 mg/mL 含有) に入れ、37°C で一晩振とう培養した。これを 1 mL とり、三角フラスコに入れた 40 mL の液体 LB 培地 (アンピシリン含有) に添加して、37°C で一晩振とう培養し、十分に増殖させた。

2-2-2 TDP-43 プラスミド DNA の抽出

プラスミド DNA 抽出キット (Pure YieldTM Plasmid Midiprep System) を用いて抽出を行った。2-2-1 の方法で作製した大腸菌の培養液を 10,000 \times g、10 分間遠心し、菌体を沈殿させた。上清を捨てた後、Cell Resuspension Solution を 3 mL 添加し、大腸菌を懸濁した。その後、Cell Lysis Solution を 3 mL 添加し、転倒混和後、室温で 3 分間インキュベートした。Neutralization Solution を 5 mL 添加し、室温で 3 分間インキュベートした。これを、Pure YieldTM Clearing Column を挿入した 50 mL チューブに注ぎ、2 分間インキュベートした後、1,500 \times g、5 分間遠心した。ろ液を Pure YieldTM Binding Column を挿入した 50 mL チューブに注ぎ、1,500 \times g、3 分間遠心した。2-プロパノールを添加した Endotoxin Removal Wash

を 5 mL 注ぎ、1,500 × g、3 分間遠心した。さらに、エタノールを添加した Column Wash Solution を 20 mL 注ぎ、1,500 × g、5 分間遠心した。Pure Yield™ Binding Column を新しい 50 mL チューブに付け替え、600 μL の Nuclease-Free Water を加え、1,500 × g、5 分間遠心した。溶出したプラスミド DNA の濃度は、NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) で分光測定し求めた。PBS で適切な濃度に希釈し使用した。

2-2-3 NSC-34 細胞の培養

NSC-34 細胞は、10% FBS、100 U/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM high glucose を用いて、37°C、5% CO₂ 中にて培養した。また、3-4 日ごとにトリプシン処理による継代を行った。

2-2-4 NSC-34 細胞への変異 TDP-43 遺伝子導入

Cellmatrix Type III に 10 倍量の pH 3 の塩酸溶液を加えて調製した液を、96 well プレートでは 100 μL/well、12 well プレートでは 1 mL/well ずつ添加した後に吸い出し、30 分程度乾燥させた後、PBS で洗浄することで、プレートのコラーゲンコーティングを行った。NSC-34 細胞は、96 well プレートでは 7,000 細胞/well (100 μL)、12 well プレートでは 70,000 細胞/well (1 mL) になるように、抗生物質不含有の 10% FBS 含有 DMEM high glucose を用いて播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。96 well プレートでは、各 well 0.2 μg の Mock、TDP-43^{WT}、TDP-43^{A315T}、または TDP-43^{M337V} ベクターを Opti-MEM に溶かしたものと、各 well 0.5 μL の Lipofectamine 2000 Reagent を Opti-MEM に溶かしたものを混合して各 well 50 μL になるように調製し、添加した。12 well プレートでは、各 well 1.6 μg のベクターを Opti-MEM に溶かしたものと、各 well 4 μL の Lipofectamine 2000 Reagent を Opti-MEM に溶かしたものを混合して各 well 200

μLになるように調製し、添加した。遺伝子導入の6時間後に抗生物質含有培地に交換し、42時間後(遺伝子導入の48時間後)に各試験に用いた。

2-2-5 遺伝子導入の確認

2-2-4に記載した手順で、12 well プレートに播種した NSC-34 細胞に、EGFP 標識された Mock、TDP-43^{WT}、TDP-43^{A315T}、TDP-43^{M337V} を遺伝子導入した48時間後に、BZ-9000 HS オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いてEGFPの蛍光を観察することで、遺伝子導入されていることを確認した (Fig. 15)。遺伝子導入を行わなかった細胞を Negative control とした。

2-2-6 ウェスタンブロット解析

2-2-6-1 タンパク質抽出

2-2-4に記載した手順で、12 well プレートに播種した NSC-34 細胞に遺伝子導入した48時間後に、PBS で1回洗浄した。その直後、または48時間後に、RIPA buffer (50 mM tris-HCl、150 mM NaCl、0.5% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、1% Igepal CA-630) に protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II および III をそれぞれ 100:1 の割合で混合した液を、各 well 50 μL 添加し、細胞をピペットの先端でかきとって 1.5 mL チューブに入れ、ボルテックス (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) にて攪拌した。

2-2-6-2 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。標準曲線の作製のためのサンプルとして、0、25、125、250、500、750、1,000、1,500 および 2,000 μg/mL の濃度に調製した牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) を用いた。それぞれのタンパク質抽出液は、RIPA buffer

で 10 倍希釈して、96 well プレートに 10 μ L ずつ入れた。Thermo Pierce BCA protein Assay Reagent A 液と B 液を 50:1 で混合して作製した Working reagent を各 well 200 μ L ずつ添加し、37°C に温めたアルミニウムブロックバス (Scinics Co. Ltd., Tokyo, Japan) 上で 30 分間反応させた。その後、マルチスペクトロマイクロープレートリーダー (Varioskan Flash; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定波長 570 nm (参照波長 660 nm) の吸光度を測定した。タンパク質濃度は、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II および III をそれぞれ 100:1 の割合で混合した RIPA buffer および 20% 2-メルカプトエタノール含有 4 \times sample buffer solution を用いて 5 μ g/10 μ L とした。調製後のサンプルは、電気泳動まで -80°C に保存した。

2-2-6-3 電気泳動および転写

サンプルを -80°C から取り出し、室温に戻した。100°C の熱湯で 5 分間煮沸した後、室温にて 16,000 \times g、3 分間遠心した。SDS polyacrylamide gel (Super Sep 5-20%) を泳動装置にセットし、容器に running buffer (25 mM tris、192 mM glycine、0.1% SDS) を入れ、ゲルを取り付けた泳動装置を浸した。泳動装置の中にも running buffer を入れた。サンプルは各 well 10 μ L ずつアプライした。分子量マーカー (Precision Plus Protein™ Standards) は、サンプルの両端に 4 μ L または 2 μ L アプライした。その後、ゲル 1 枚当たり 20 mA で 120 分間泳動した。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM tris、40 mM 6-aminohexanoic acid、20% methanol) に 10 分間浸した。転写膜 (Immobilon P, Millipore, Billerica, MA, USA) は、メタノールに 30 秒間浸し、milliQ に 15 分間浸した。その後、anode buffer 2 (25 mM tris、20% methanol) に 15 分間以上浸した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M tris、20% methanol) に浸したろ紙、anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、cathode buffer に浸したろ紙 (2 枚) の順に組み、膜 1 枚当たり 100 mA で 45 分間転写した。

2-2-6-4 免疫反応

転写後、0.05% Tween 20 含有 50 mM TBS (Tris buffered saline) (T-TBS; 10 mM tris、40 mM tris -HCl、15 mM NaCl) で洗浄し、転写膜を Blocking One-P で 20 分間ブロッキングした。その後 T-TBS で洗浄し、Can Get Signal 1 で希釈した一次抗体 (goat anti-mouse GPNMB antibody、rabbit anti-GAPDH antibody、rabbit anti Halo-Tag antibody、rabbit anti-ERK1/2 antibody、rabbit anti-p-ERK1/2 antibody、rabbit anti-Akt antibody、rabbit anti-p-Akt antibody) を、4 °C で一晩反応させた。T-TBS で洗浄後、Can Get Signal 2 で希釈した二次抗体 (rabbit anti-goat IgGs conjugates to HRP antibody、goat anti rabbit IgGs conjugates to HRP antibody) を室温で 1 時間反応させた。T-TBS で洗浄した後、ImmunoStar[®] LD の A 液と B 液を混合し、メンブランを 30 秒間浸した。その後、Luminescent image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

2-2-6-5 タンパク質の発現解析

タンパク質の発現は、Multi Gauge Ver 3.0 (Fujifilm) を用いて解析した。バンドの強度を数値化し、GAPDH に対する比として個々の値を求めた。各群で平均値を算出し、対照群の発現強度を 1 として発現量を比較した。

2-2-7 GPNMB の発現量の定量

NSC-34 細胞を 70,000 cells/well になるようにコラーゲンコーティングした 12 well プレートに播種し、各プラスミド DNA を遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後、ウエスタンブロット解析を行った (Fig. 15)。Glycosylated GPNMB が修飾型のアイソフォームであり (78)、glycosylated GPNMB には 90 kDa と 100 kDa の 2 つのアイソフォームが知られている (79, 81)。本検討では両者を合わせた全

glycosylated GPNMB の発現量を定量した。

2-2-8 死細胞率の評価

2-2-4 に記載した手順で、96 well プレートに播種した NSC-34 細胞に、EGFP 標識された Mock、TDP-43^{WT} プラスミド、TDP-43^{M337V} プラスミド、TDP-43^{A315T} プラスミドを用いて遺伝子導入した 48 時間後に、Mock 添加群 (Control) は培地を 1% FBS 含有 DMEM high glucose に交換し、他の群は培地を FBS 不含 DMEM high glucose に交換し、血清除去ストレスを与えた。続いてリコンビナント GPNMB を各 well 終濃度 0.025、0.25、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。27 時間後、Hoechst 33342 (終濃度 8 μM) および PI (終濃度 1.5 μM) を添加することで細胞の核染色を行い、その 15 分後に IX70 蛍光顕微鏡 (Olympus)、高感度冷却 charge coupled device (CCD) カメラ (DP30BW, Olympus) を用いて撮影した (Fig. 15)。盲検下で解析ソフト Image J を用いて PI 陽性細胞数 (死細胞) および Hoechst 33342 陽性細胞数 (全細胞) を数えた。各 well について 2 枚の画像を解析し、平均を算出した。PI 陽性細胞数 (死細胞) を Hoechst 33342 陽性細胞数 (生細胞+死細胞) で除すことにより死細胞率を算出した。

2-2-9 pERK1/2 および pAkt の発現量の定量

NSC-34 細胞を 70,000 cells/well になるようにコラーゲンコーティングした 12 well プレートに播種し、各プラスミド DNA を遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後、血清を含まない培地に交換した。リコンビナント GPNMB を終濃度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、24 時間後にウエスタンブロット法を行った (Fig. 15)。ERK1/2 は 44 kDa の ERK1 および 42 kDa の ERK2 から構成されるが、本検討では両者を合わせた ERK1/2 の発現量を定量した。リン酸化 ERK1/2 (pERK1/2) およびリン酸化 Akt (pAkt) の値を求め、それぞれ total ERK1/2 および total Akt に

対する比として個々の値を求めた。

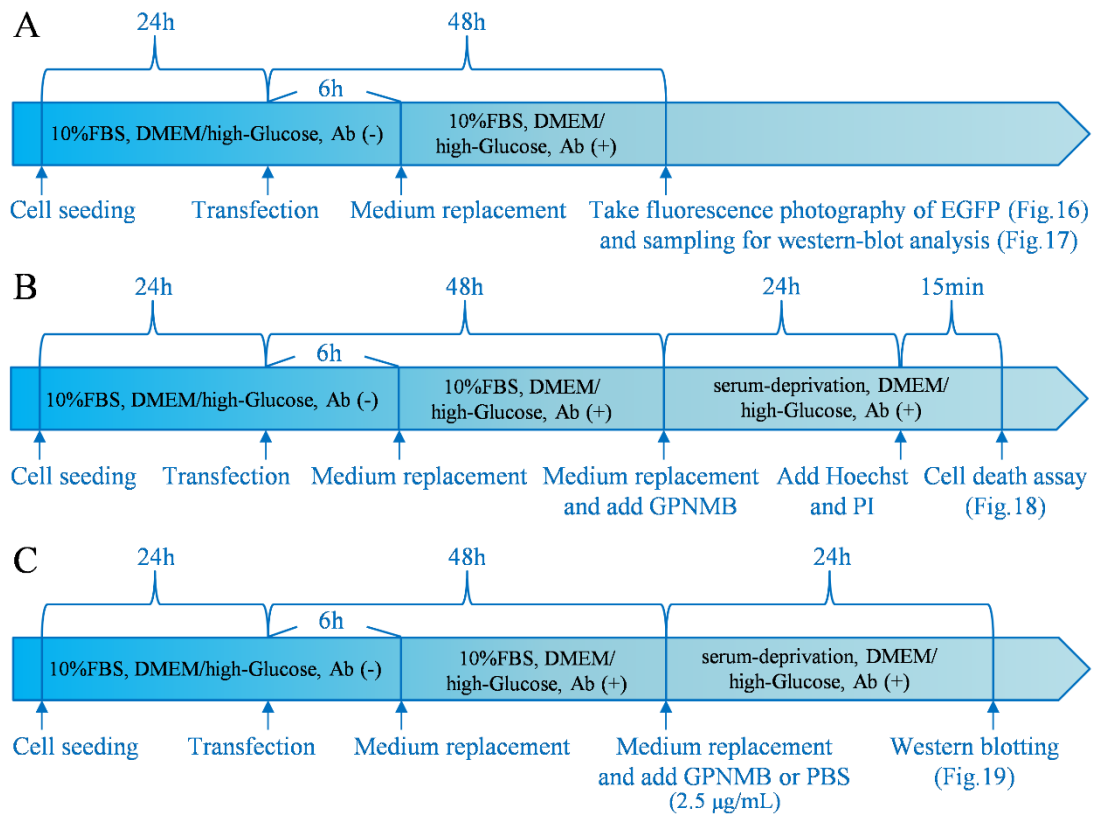


Figure 15 Experimental designs.

(A) Experimental protocol of transfection to confirm transfections were carried out efficiently, and of western blotting to evaluate the level of GPNMB after TDP-43 was overexpressed. (B) Experimental protocol of cell death assay. (C) Experimental protocol of western blotting to evaluate the level of phosphorylated Akt (pAkt) and phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) after addition of human recombinant GPNMB.

2-2-10 統計学的解析

実験成績は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。統計学的な比較は、Student's *t*-test または Dunnett's test following a one-way analysis of variance (ANOVA) (JSTAT for windows) により行った。危険率が 5%未満の場合を有意差有りとした。

第 3 節 実験成績

3-1 遺伝子導入の確認

Mock、マウス TDP-43^{WT} プラスミド、マウス TDP-43^{M337V} プラスミド、マウス TDP-43^{A315T} プラスミドを NSC-34 細胞に遺伝子導入した。TDP-43 が過剰発現していることを確認するために、遺伝子導入 48 時間後に BZ-9000 HS オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて EGFP の蛍光を観察した。上段が NSC-34 細胞の明視野画像、下段は EGFP の画像である。EGFP で標識された TDP-43 は少なくとも遺伝子導入 48 時間後までは過剰発現していることが確認された。EGFP の蛍光が観察された細胞の割合は、群間で差がなかった。(Fig. 16)。

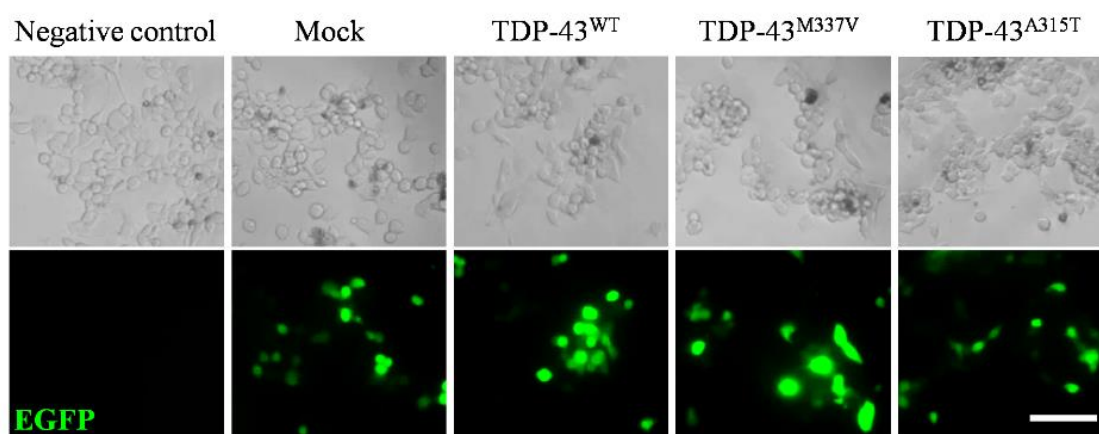


Figure 16 Pictures of NSC-34 cells 48 hours after transfections.

Upper figures display bright field pictures of NSC-34 cells. Lower figures display fluorescence photography of EGFP to confirm transfections were carried out efficiently, at the same position as the bright field pictures. Scale bar = 100 μ m.

3-2 変異 TDP-43 過剰発現後の GPNMB 発現量の検討

遺伝子導入 48 時間後の NSC-34 細胞における GPNMB の発現量をウェスタンブロット法により定量した。GPNMB の発現量は TDP-43^{WT} の過剰発現では増加しなかった。一方、TDP-43^{M337V} および TDP-43^{A315T} の過剰発現で有意に増加した ($n = 4$; $F = 19.84$, $p < 0.001$) (Fig. 17)。変異 TDP-43 遺伝子導入により、C 末端断片など GPNMB の他のフラグメントに関しても発現が増加した (data not shown)。

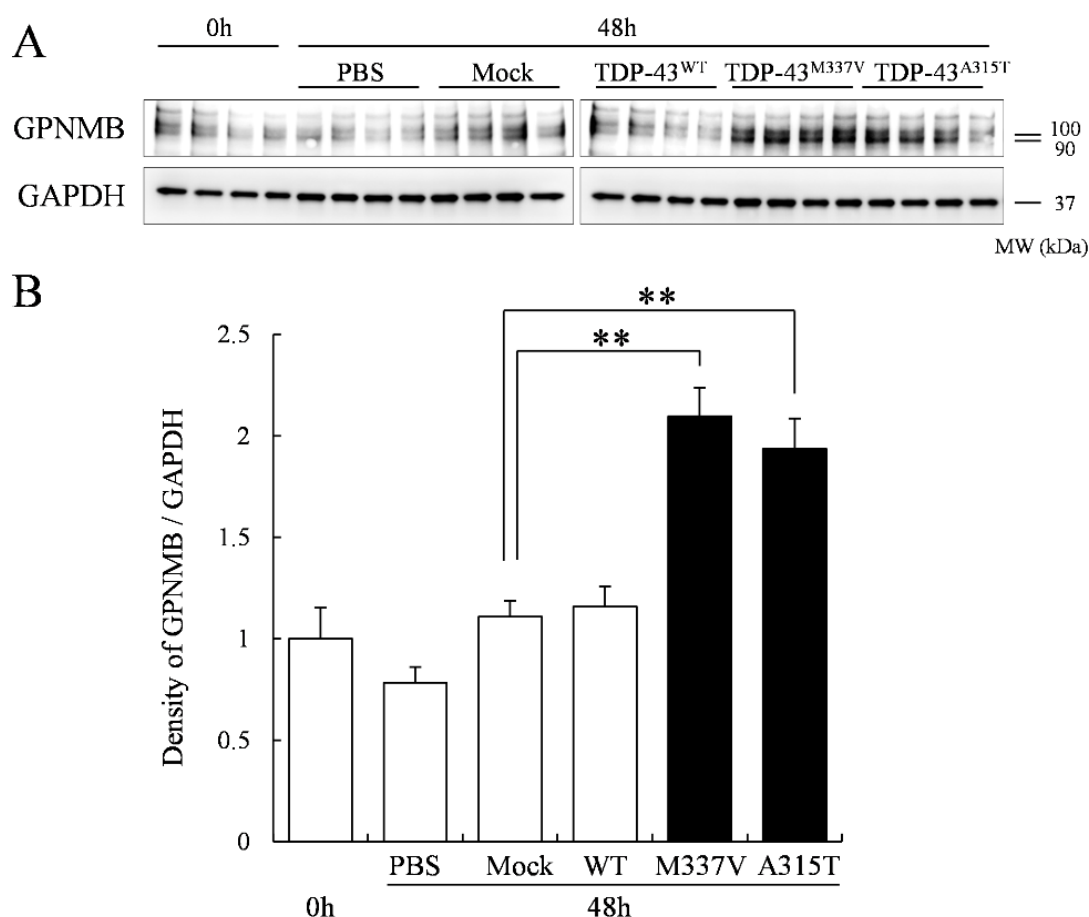


Figure 17 Expression levels of GPNMB after over expression of mutant TDP-43.

(A) Result of western blot analysis 2 days after transfection of Mock, TDP-43^{WT} (WT), TDP-43^{M337V} (M337V), and TDP-43^{A315T} (A315T). (B) GPNMB was quantified relative to the GAPDH level. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 4). ** $p < 0.01$ versus Mock transfected group (Dunnett's test following a one-way ANOVA).

3-3 血清除去および変異 TDP-43 過剰発現誘発運動ニューロン死に対する GPNMB の保護作用

Mock、TDP-43^{WT} プラスミド、TDP-43^{M337V} プラスミド、TDP-43^{A315T} プラスミドを NSC-34 細胞に遺伝子導入した。48 時間後に血清除去培地に交換し、その直後に PBS または終濃度 0.025、0.25、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにリコンビナント GPNMB を添加した。変異 TDP-43 過剰発現および血清除去ストレスによって運動ニューロン死が有意に増加した (n = 6; TDP-43^{WT} $p = 0.118$, TDP-43^{M337V} $p <$

0.001, and TDP-43^{A315T} $p < 0.001$, versus Mock group)。一方、リコンビナント GPNMB の添加によって死細胞率が濃度依存的に減少した (n = 6; GPNMB added TDP-43^{M337V} $F = 5.28$ $p = 0.013$, and GPNMB added TDP-43^{A315T} $F = 7.62$ $p = 0.003$ versus vehicle group) (Fig. 18)。

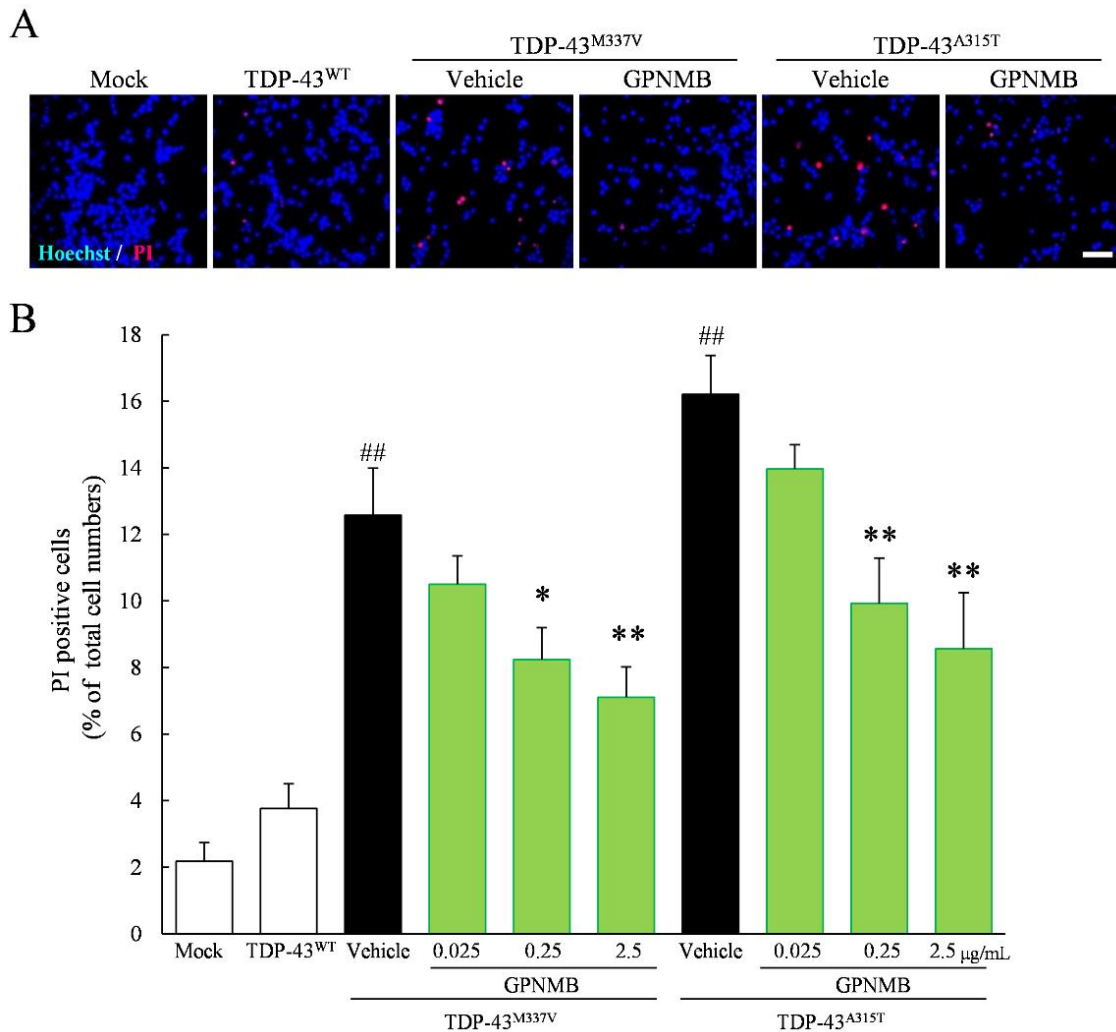


Figure 18 Effect of GPNMB against mutant TDP-43 and serum-free-induced motor neuron cell death.

(A) Representative fluorescence microscopic images of Hoechst 33342 (blue) and propidium iodide (PI) (red) staining after 24-hour serum-deprivation in NSC-34 cells transfected with Mock, TDP-43^{WT}, TDP-43^{M337V}, and TDP-43^{A315T}. Scale bar = 100 μ m. (B) Quantitative analysis of PI positive dead cells per Hoechst 33342 positive total cells. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 6). ## $p < 0.01$ versus Mock transfected group (Student's t -test), * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ versus mutant TDP-43 transfected vehicle group (Dunnett's test following a one-way ANOVA).

3-4 変異 TDP-43 過剰発現後および GPNMB 添加後の pERK1/2 および pAkt の発現量

変異 SOD1 誘発運動ニューロン死に対する GPNMB の保護作用は ERK1/2 経路や Akt 経路を介していることを薬効解析学研究室で報告している。したがって変異 TDP-43 毒性に対する GPNMB の保護作用にも ERK1/2 経路や Akt 経路の関与が示唆されたため、pERK1/2 および pAkt の発現量を検討した。TDP-43^{M337V} および TDP-43^{A315T} の過剰発現によって、pERK1/2 の発現量が有意に減少したが (n = 8; TDP-43^{M337V} $p < 0.001$, and TDP-43^{A315T} $p = 0.043$, versus Mock group)、リコンビナント GPNMB の添加によって有意に改善した (n = 8; GPNMB added TDP-43^{M337V} $p < 0.001$, and GPNMB added TDP-43^{A315T} $p = 0.005$, versus vehicle group)。また、TDP-43^{M337V} および TDP-43^{A315T} の過剰発現によって、pAkt の発現量が有意に減少したが (n = 8; TDP-43^{M337V} $p < 0.001$, and TDP-43^{A315T} $p = 0.025$, versus Mock group)、リコンビナント GPNMB の添加によって有意に改善した (n = 8; GPNMB added TDP-43^{M337V} $p = 0.010$, and GPNMB added TDP-43^{A315T} $p < 0.001$, versus vehicle group) (Fig. 19)。

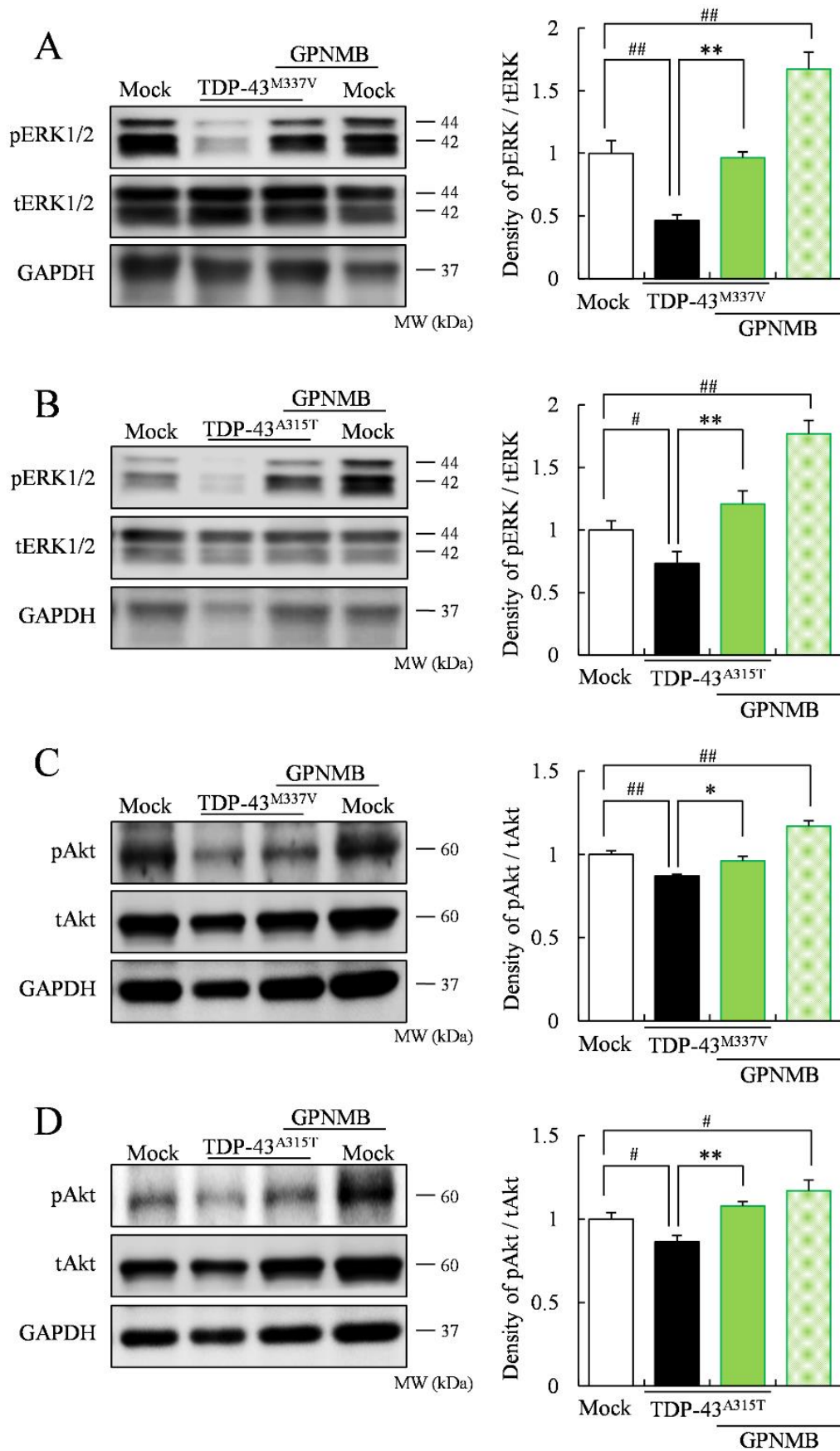


Figure 19 Phosphorylation levels of ERK1/2 and Akt.

(A) Two days after Mock or TDP-43^{M337V} was used to transfect NSC-34 cells, the medium was changed to serum-free DMEM and immediately recombinant human GPNMB (2.5 µg/mL) was added. Twenty-four hours later, expression levels of phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) / total ERK1/2 (tERK1/2) were evaluated. (B) Mock or TDP-43^{A315T} was transfected, and recombinant human GPNMB were added. Expression levels of pERK1/2 / tERK1/2 were evaluated. (C) Mock or TDP-43^{M337V} was transfected, and recombinant human GPNMB was added. Expression levels of phosphorylated Akt (pAkt) / total Akt (tAkt) were evaluated. (D) Mock or TDP-43^{A315T} was transfected, and recombinant human GPNMB was added. Expression levels of pAkt / tAkt were evaluated. Values represent the mean ± S.E.M. (n = 8). #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 versus Mock transfected and not added GPNMB group. * *p* < 0.05, ***p* < 0.01 versus mutant TDP-43 transfected and not added GPNMB group (Student's *t*-test).

第4節 考察

EGFP タグが付いた Mock、TDP-43^{WT}、TDP-43^{M337V}、TDP-43^{A315T} プラスミド DNA を NSC-34 細胞に遺伝子導入したところ、EGFP の蛍光が観察され、その割合は群間で差がなかった。少なくとも遺伝子導入 48 時間後には TDP-43 が過剰発現していることが確認された (Fig. 16)。

GPNMB が変異 SOD1 誘発運動ニューロン死を抑制することや (16)、第 1 章で ALS 患者脊髄において GPNMB と TDP-43 が共局在していたことから、GPNMB は変異 TDP-43 誘発の運動ニューロン障害に対しても保護作用を示すことが示唆された。TDP-43^{M337V} や TDP-43^{A315T} の過剰発現および血清除去によって死細胞率が有意に増加したが、ヒトリコンビナント GPNMB の添加によって、濃度依存的に死細胞率が減少した (Fig. 18)。したがって、GPNMB は変異 TDP-43 による毒性も抑制することが示唆された。

pAkt は、ALS 動物モデルの脊髄運動ニューロンで減少することや (119, 120)、ALS 患者の骨格筋で減少することが報告されている (121)。変異 SOD1 によって誘導される運動ニューロン死は Akt 経路の活性化によって抑制される (122, 123)。

GPNMB は FGF (fibroblast growth factor) 受容体の活性化を介して ERK1/2 経路を活性化する (79, 83)。薬効解析学研究室では、GPNMB が Na^+/K^+ -ATPase を介して ERK1/2 経路や Akt 経路を活性化することを示した (85)。さらに、GPNMB は変異 SOD1 毒性に対して、ERK1/2 経路や Akt 経路の活性化を介して保護作用を示すことを報告している (16)。したがって、変異 TDP-43 による毒性に対する GPNMB の保護作用にも、ERK1/2 経路や Akt 経路の関与が示唆された。pERK1/2 と pAkt の発現は、TDP-43^{M337V} や TDP-43^{A315T} の過剰発現によっていずれも減少した。一方、ヒトリコンビナント GPNMB の添加によって、pERK1/2 と pAkt の発現は、それぞれ有意に増加した (Fig. 19)。したがって、変異 TDP-43 毒性に対する GPNMB の保護作用は、ERK1/2 経路や Akt 経路の活性化を介していることが示唆された。

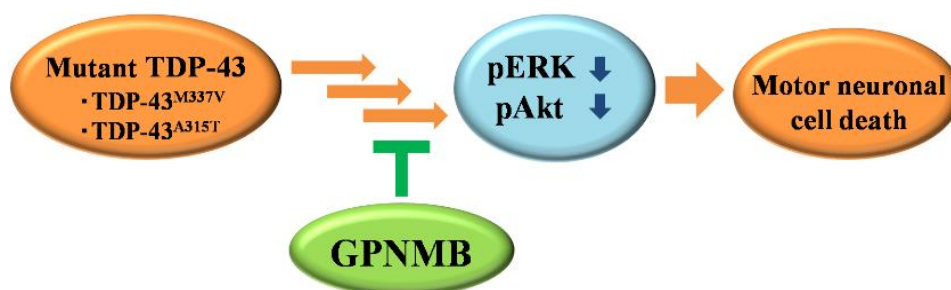


Figure 20 Hypothesized mechanisms of GPNMB against mutant TDP-43 toxicity.

Expression levels of pERK1/2 and pAkt are decreased by overexpression of mutant TDP-43, and motorneuronal cell death are induced. GPNMB prevent motorneuronal cell death by activating pERK1/2 and pAkt pathway.

TDP-43^{WT} を過剰発現させても GPNMB の発現量に変化がなかったが、変異 TDP-43 の過剰発現で GPNMB の発現量が増加した (Fig. 17)。GPNMB の発現が増加した理由は不明ではあるが、リコンビナント GPNMB の添加によって運動ニューロン死が抑制されたことから、TDP-43 によるストレスを抑制するために GPNMB の発現が増加した可能性が考えられる。また、変異 TDP-43 の過剰発現

で GPNMB の発現が誘導されたが、その発現量が障害を抑制するには十分ではなかった可能性も考えられる。修飾型の GPNMB (glycosylated GPNMB) だけではなく、GPNMB の C 末端断片 (25 kDa) など、シェディングによって断片化された GPNMB の発現も増加していた。したがって、運動ニューロンにおいて GPNMB の発現自体は増加したものの、その機能が障害されていた可能性もある。

以上本章では、変異 TDP-43 の過剰発現で運動ニューロンにおける GPNMB の発現量が増加することが明らかになった。また、変異 TDP-43 および血清除去誘発運動ニューロン死に対して GPNMB が保護作用を示すことや、その保護作用は ERK1/2 経路や Akt 経路の活性化を介していることが示唆された。

第3章 ALS モデルマウス骨格筋に対する GPNMB の作用

第1節 諸言

ALS などの神経変性疾患は、脊髄における運動ニューロンの変性・脱落によって筋肉の萎縮が生じると考えられており、これまで脊髄運動ニューロンに対する保護作用の研究が主流であった。しかしながら近年、筋肉の障害が脊髄における運動ニューロン障害より前に生じることが報告された (88)。また、筋肉の機能不全は、運動ニューロン変性だけではなく筋肉に対する直接的な障害の結果生じることが報告された (124, 125)。また、筋肉選択的に変異 SOD1 を過剰発現させた場合においても、ALS 病態がよく再現されることや (34, 126, 127)、ALS においては、まず筋肉の障害が生じ、その結果神経変性が生じることが報告された (127)。さらに、ALS 患者や動物モデルにおいて、神経筋接合部、前根、脊髄などを複数の時期において解析した結果、障害はまず末梢から生じ、脊髄運動ニューロン障害へと逆行性に進行する (dying back pattern) ことが報告された (91, 128-136)。シナプス周囲のシュワン細胞機能の障害により神経筋接合部の機能不全が生じ、ALS の発症に寄与することや (128)、シナプス結合の選択的な欠如が発症より前に生じることが報告された (131)。また、SOD1^{G93A} 過剰発現ゼブラフィッシュにおいて、神経筋接合部の脱神経が 20 週齢、その後の神経支配パターンの変化が 30 週齢、そして運動ニューロンの減少は 40 週齢にみられることが報告された (91)。また、磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging; MRI) を用いた検討によって、SOD1^{G93A} マウスの筋肉量の減少は、発症より 4 週前である 8 週齢において始まっていた一方、脳における神経変性は 10-18 週齢まで認められなかったと報告された (136)。SOD1^{G93A} マウスの骨格筋においては小胞体ストレスやオートファジー経路、ユビキチン-プロテアソーム経路などが活性化している (34, 36, 137-140)。骨格筋におけるミトコンドリア機能障害は、ALS の早期

に生じており、ALS の発症および進行に寄与することが報告されており (141, 142)、これらが ALS における骨格筋障害の一因かもしれない。小児の神経変性疾患である SMA においても、筋肉における DNA 障害が筋肉の障害につながり、それが発症の引き金になるという報告がある (143)。また、SBMA においても、筋肉において insulin-like growth factor 1 (IGF-1) を過剰発現させるとことで、筋肉の障害が改善されるだけでなく、運動ニューロン死が抑制され、生存期間が延長することが報告されている (144)。

ALS の骨格筋を標的にした治療薬開発を試みた研究は過去にもいくつかある (132, 145-148)。例えば SOD1^{G37R} マウス骨格筋に対する peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α) の作用を MCK-PGC-1 α (muscle creatine kinase PGC-1 α) マウスを用いて、筋肉特異的に PGC-1 α を過剰発現させることによって検討した結果、筋萎縮や筋肉の持久力などが改善したことが報告されている (145)。また、heat shock protein 70 (HSP70) を SOD1^{G93A} マウスに腹腔内投与したところ、HSP70 は中枢神経系では検出されず骨格筋に局在していたが、運動機能が保存され、運動ニューロン死が減少し、生存期間が延長することが明らかになった (132, 147)。また、Myo-GDNF (myogenin-gial cell line-derived neurotrophic factor) マウスを使用して、SOD1^{G93A} マウスの骨格筋特異的に GDNF を過剰発現させたところ、大幅に疾患の発症が遅延し、生存期間が延長した (148)。一方、GFAP-GDNF (glial fibrillary acidic protein-GDNF) マウスを用いて中枢のアストロサイト特異的に GDNF を過剰発現させた場合には、神経保護作用は認められず、骨格筋における GDNF 過剰発現が重要であることが明らかになった (148, 149)。さらに、GDNF を分泌するように操作したヒト間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells; hMSCs) を SOD1^{G93A} ラットの筋肉内に移植すると、運動ニューロンの生存が増加し、その機能が改善した (150)。IGF-1 の筋肉特異的発現は、SOD1^{G93A} マウスにおいて筋萎縮を抑制し、神経筋接合部を

安定化し、運動ニューロンを保護し、発症が遅延した (146)。このように、筋肉の障害を改善することは患者の QOL を改善するばかりでなく、疾患の発症や進行の抑制につながると考えられることから、脊髄だけでなく神経筋接合部や筋肉など末梢を標的にした研究を行うことは、有益だと考えられる。

薬効解析学研究室では ALS 患者や ALS モデル動物の脊髄において、疾患が進行するにつれて GPNMB の発現が上昇すること (16)、また ALS 患者の血清や脳脊髄液において、GPNMB が発現上昇することを報告している (16)。さらに GPNMB を過剰発現させることにより SOD1^{G93A} マウスの生存期間が延長することや、GPNMB が SOD1^{G93A} 誘発の運動ニューロン死を抑制することも明らかにした (16)。また、第 2 章において、GPNMB が変異 TDP-43 誘発運動ニューロン死を抑制することも明らかにした。

宇宙は無重力であり宇宙遊泳により廃用性筋萎縮が生じることが知られているが、スペースシャトルコロンビア号に乗せて 16 日間宇宙へ連れて行ったラットの骨格筋において GPNMB の発現が上昇することが報告されている (151)。したがって、GPNMB は骨格筋萎縮と何らかの関連があることが推察される。また、脊髄損傷のモデルマウスの腓腹筋 (ふくらはぎの筋肉) において、GPNMB の発現量が上昇することが報告されている (152)。GPNMB は、坐骨神経の大腿領域を物理的に障害することによって誘発させた筋萎縮に対して保護作用を示す (153)。坐骨神経切断術を行ったマウス、マウス胚性線維芽細胞株 (NIH-3T3)、マウス筋芽細胞株 (C2C12) を用いた検討により、GPNMB は除神経を受けた骨格筋の線維芽細胞の浸潤に関与することや、GPNMB が MMP-3 や MMP-9 を活性化することによって除神経後の線維症から筋肉を保護することが指摘されている (152)。GPNMB は仮骨延長法による筋肉の線維化を減少させる (154)。また、遺伝性の心不全モデルであるデスミン欠損心筋細胞において、筋肉の再生を制御する (155)。これらのことから、GPNMB は ALS における筋萎縮も抑制するこ

とが考えられた。

そこで本章では ALS の骨格筋萎縮に対する GPNMB の作用を検討した。

第 2 節 実験材料および方法

2-1 実験動物

SOD1^{G93A} マウス [B6SJL-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J] および野生型マウス (wild-type) は、The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した。実験には雄性 SOD1^{G93A} マウスおよび雌性野生型マウスとの交配により生まれた SOD1^{G93A} マウスを用いた。mouse 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教授 二川健博士より譲渡された。GPNMB 過剰発現マウスは 5 代にわたりバッククロスを重ねた。実験には雄性 GPNMB 過剰発現マウスと雌性 BDF1 マウスを交配させることで得た GPNMB 過剰発現マウスを用いた。全ての実験は、同腹子 (リッターメイト) 間での比較である。また、性別による影響を除外するため、全ての実験において雄性マウスを使用した。

SOD1^{G93A} マウスに対する GPNMB の作用を明らかにするために、雄性 SOD1^{G93A} マウスと雌性 GPNMB 過剰発現マウスを交配させ SOD1^{G93A}/GPNMB ダブルトランスジェニックマウスを作製した。薬効解析学研究室の過去の報告より、SOD1^{G93A} マウスは 14-18 週齢で発症し 17-21 週齢で死亡することが明らかになっている (16, 31, 87, 90)。さらに、ローターロッド装置を用いた運動機能解析の結果、15 週齢のマウスにおいて GPNMB による運動機能の改善作用が最も顕著であった (16)。そこで本検討では 15 週齢のマウスに着目し、腓腹筋をサンプリングし評価を行った。

本試験に用いた全てのマウスは、設定温度:23°C (許容範囲:20-26°C)、設定湿度:55% (許容範囲:40-70%)、明暗各 12 時間 (照明:午前 8:00-午後 8:00) に維持

された岐阜薬科大学の動物飼育舎にて、プラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を用い、自由給水下に固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) にて飼育した。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、承認 (承認番号: 2012-107、2012-378) を得た上で実施した。また、遺伝子改変動物の使用にあたっては、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、承認 (承認番号: 平 21-60A、平 22-25A) を得た上で使用した。

2-2 薬物および試薬

Tris-HCl (pH 8.0)、トリプシン (trypsin)、ヘマトキシリン液 (hematoxylin solution)、エオジン液 (eosin solution)、Igepal CA-630、protease inhibitor cocktail (#P8340)、phosphatase inhibitor cocktail II (#P2850)、phosphatase inhibitor cocktail III (#P5726)、mouse anti- β -actin monoclonal antibody は Sigma-Aldrich、proteinase K solution は Qiagen (Duesseldorf, Germany)、スクロース (sucrose)、塩化カリウム (potassium chloride; KCl)、エタノール (ethanol)、2-プロパノール (2-propanol)、メタノール (methanol)、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde; PFA)、2-メルカプトエタノール含有 4×sample buffer solution、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel]、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、ImmunoStar[®] LD、アンピシリン (ampicillin)、LB 培地、6-アミノヘキサン酸 (6-aminohexanoic acid) は Wako、ペントバルビタールナトリウム (pentobarbital sodium salt)、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate; KH_2PO_4)、リン酸水素二ナトリウム・十二水 (sodium hydrogenphosphate 12-water; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、Blocking One-P、グリシン (glycine)、Triton X-100 は

Nacalai Tesque、Can Get Signal 1、Can Get Signal 2、Can Get Signal immunostain A は Toyobo、Tween 20 Solution (Tween)、トリス (Tris)、Precision Plus Protein™ Standards は Bio-Rad Laboratories、キシレン (xylene)、塩化ナトリウム (sodium chloride; NaCl) は Kishida Chemical、Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (#A21204, Lot: 1366500, RRID AB_1500750)、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、tetramethylrhodamine conjugated α -ブンガロトキシシン (α -bungarotoxin; α -BTX) (#T1175, Lot: 1005936, RRID AB_2313931) は Invitrogen、mouse anti-synaptophysin (SYP) monoclonal antibody (#sc-17750, Lot: G0904, RRID AB_628311) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)、goat anti-mouse GPNMB polyclonal antibody (#AF2330, Lot: ULH0211101, RRID AB_2112943)、goat anti-human GPNMB polyclonal antibody (#AF2550, Lot: UYK0211021, RRID AB_416615) は R&D Systems Inc.、rabbit anti-GAPDH monoclonal antibody (#2118S, Lot: 8, RRID AB_10698756) は Cell Signaling Technology、rabbit anti-Halo-Tag polyclonal antibody (#G9281, Lot: 5301, RRID AB_713650) は Promega、rabbit anti-goat HRP-conjugated antibody (#31402, Lot: IK1099845, RRID AB_228395)、goat anti-rabbit HRP-conjugated antibody (#32460, Lot: OB183336, AB_1185567) は Thermo Fisher Scientific、パラフィン (paraffin)、O. C. T. compound は Sakura Finetek Japan (Tokyo, Japan)、M.O.M. blocking reagent は Vector Laboratories、オイキット (EUKITT) は O. Kindler (Freiburg, Germany)、フルオロマウント (fluoromount) は Diagnostic Bio Systems、イソフルラン (isoflurane) は Mylan (Tokyo, Japan)、笑気ガス (N_2O) は Showa Denko (Tokyo, Japan)、酸素ガス (O_2) は Taiyo nissan (Tokyo, Japan) よりそれぞれ購入した。

Phosphate buffered saline (PBS) は、KCl、 KH_2PO_4 、NaCl、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ を超純水に溶解し、調製した。Phosphate buffer (PB) は、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ を超純水に溶解し、調製した。

2-3 実験方法

2-3-1 ジェノタイピング

生後 4-6 週齢のマウスの尻尾を先端から 5 mm 切り、Cell Lysis Solution (25 mM tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0、1% SDS) および Proteinase K により溶解した。その後 7.5 M 酢酸アンモニウム溶液によりタンパク質を除去し、2-プロパノール、70%エタノールにより DNA を抽出し、以下の配列のプライマーを用いて PCR を行い、マウス遺伝子型を同定した。

SOD1^{G93A} マウス

- Forward: 5'-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3'
- Reverse: 5'-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3'

GPNMB 過剰発現マウス

- Forward: 5'-AGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTA-3'
- Reverse: 5'-GAACATGGTTAGCAGAGGCTCTAGAG-3'

増幅反応は TAKARA PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan) を用いて、SOD1^{G93A} マウスは 25 サイクル、GPNMB 過剰発現マウスは 35 サイクル行った。1 サイクルの構成は DNA 変性: 95°C を 30 秒、アニーリング: 60°C を 30 秒、エクステンション: 72°C を 45 秒にて行った。

2-3-2 腓腹筋および脊髄の摘出

15 週齢マウスにペントバルビタールナトリウム 80 mg/kg を腹腔内投与し、深麻酔させた。マウスを開胸し、ペリスタポンプ (Atto, Tokyo, Japan) および 26G の投与針 (TERUMO, Tokyo, Japan) を用いて左心室内に氷冷 PBS を注入し、灌流脱血した (灌流圧 130 cm H₂O)。次に 4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を 10 分間注入して灌流固定を行った (ウエスタンブロット解析用のサンプルは灌流固

定を行わない)。その後腓腹筋および脊髄を摘出した。

2-3-3 ウェスタンブロット解析

2-3-2 に記述した方法にしたがって腓腹筋および脊髄を摘出した後、ただちに氷冷した 1.5 mL チューブに入れ、液体窒素を用いて急速凍結した。サンプルはタンパク質抽出まで -80°C に保存した。まず、RIPA buffer (50 mM tris-HCl、150 mM NaCl、0.5% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、1% Igepal CA-630) に protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II および III をそれぞれ 1/100 の割合で混合した。これをサンプルの入った 1.5 mL チューブに 400 μL ずつ入れ、ボルテックス (Scientific Industries) を用いて軽く攪拌した。その後、ホモジナイザー (Physcotron, Microtec, Chiba, Japan) を用いて氷中で 10 秒間、3 回ホモジナイズした後、小型巡回ミキサー (愛くる) (Scinics Co. Ltd.) を用いて 4°C 、2 時間巡回攪拌した。その後、遠心分離機 (KUBOTA, Tokyo, Japan) を用いて、 $12,000 \times g$ 、 4°C 、20 分間遠心し、上清を回収してタンパク質抽出液とした。その後、第 2 章 2-2-6 の方法に準じて、タンパク質定量、電気泳動および転写、免疫反応、タンパク質の発現解析を行った。一次抗体としては、goat anti-mouse GPNMB polyclonal antibody、goat anti-human GPNMB polyclonal antibody、rabbit anti-Halo-Tag polyclonal antibody、rabbit anti-GAPDH monoclonal antibody を使用した。二次抗体としては、rabbit anti-goat HRP-conjugated antibody、goat anti-rabbit HRP-conjugated antibody を使用した。

2-3-4 腓腹筋重量の評価

2-3-2 に記述した方法に従って腓腹筋を摘出した後、電子天秤 (Mettler-Toledo, Tokyo, Japan) を用いて筋重量を測定した。腓腹筋の写真は顕微鏡 (Olympus) 下で Cool Pix 4500 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

2-3-5 腓腹筋の組織学的解析

2-3-5-1 パラフィン切片の作製

2-3-2 に記述した方法にしたがって腓腹筋を摘出した後、4% PFA 含有 0.1 M PB にて 4°C で 24 時間静置し、ついで 25% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 4°C で 24 時間静置した。その後 70%エタノール 2 時間、90%エタノール 2 時間、95%エタノール 2 時間、99%エタノール 12 時間、無水エタノール 2 時間×2 回、キシレン 2 時間×2 回、キシレン 12 時間、融解パラフィン 2 時間×2 回、融解パラフィン 12 時間の順に浸透させた。パラフィンにて腓腹筋を包埋し、ミクロトーム (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、20 μm の切片を作製した。スライドガラス (#S2215; Matsunami, Osaka, Japan) にのせ 37°C にて 1 日乾燥し、室温にて保存した。

2-3-5-2 ヘマトキシリン・エオジン染色

パラフィン切片をキシレンに浸し、パラフィンを洗浄した。続いて段階的にアルコール濃度を下げた溶液に浸し、蒸留水に浸透した後、ヘマトキシリン液に 5 分間、エオジン液に 5 分間浸して染色した。その後、段階的にアルコール濃度を上げた溶液に浸して脱水し、キシレンで透徹した後、オイキットを用いて封入を行った。乾燥させた後 BZ-9000 HS オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) で撮影した。

2-3-5-3 腓腹筋断面積の定量

腓腹筋の末端から 500 μm 間隔でパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。過去の報告 (8) に基づき、解析ソフト Image J を用いて腓腹筋の断面積を測定した。測定は盲検下で単一の測定者が行った。各位置にお

いて2サンプルずつ断面積の定量を行い、その平均値を算出した。

2-3-5-4 筋線維数および筋線維断面積の定量

腓腹筋の断面積が最も大きかった位置である末端から4 mmの位置において、それぞれ2つずつの切片を作製し、解析を行った。筋線維数は、腓腹筋の断面に含まれる総筋線維数を計測し、その平均値を算出することにより求めた。筋線維の断面積は過去の報告(8)に基づき、Image Jを用いて行った。末端から4 mmの位置における腓腹筋の切片において、切片の中心部の写真を20倍の倍率で撮影し、盲検下において単一の測定者が測定した。その後、過去の報告(8, 156-158)に従い、筋線維の断面積の分布を求めた。

2-3-6 神経筋接合部の評価

2-3-6-1 凍結切片の作製

2-3-2に記述した方法にしたがって腓腹筋を摘出した後、4% PFA含有0.1 M PBにて4°Cで24時間静置し、ついで25%スクロース含有0.1 M PB (pH 7.4)液にて4°Cで24時間静置した。その後、液体窒素を用いてO.C.T. compound中に凍結包埋し、クライオスタット(Leica)を用いて、-25°Cで厚さ30 µmの切片を作製し、MASコーティングされたスライドガラス(#S9441; Matsunami)に貼付して、-80°Cで保存した。

2-3-6-2 神経筋接合部の免疫染色

作製した凍結切片を室温に戻し、PBSに浸してO.C.T. compoundを洗浄した。反応液の流出を防ぐためにSuper PAP pen(Daido sangyo, Saitama, Japan)にて切片の周囲を囲んだ。その後Triton X-100を37°Cで1時間、0.1%トリプシンを37°Cで30分反応させることにより賦活化を行った。PBSで洗浄した後、M.O.M.

blocking reagent を室温で 1 時間反応させることにより、ブロッキングを行った。シナプス前運動ニューロンを染色するために、一次抗体として mouse anti-synaptophysin (SYP) 抗体 (Can Get Signal A で 1/50 に希釈) を 4°C で二晩反応させた。二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody (1/1,000 に希釈) を室温で 1 時間反応させた。シナプス後アセチルコリン受容体の染色には、テトラメチルローダミンで標識された α -ブンガロトキシン (α -BTX; 5 μ g/mL) を使用した。 α -BTX は、運動神経や筋肉に普遍的に分布するニコチン性アセチルコリン受容体に特異的に結合して筋肉の動きを停止させる非常に強力なペプチド毒 (人の致死量はわずか 2-3 mg) で、アマガサヘビ (*Bungarus multicinctus*) などが有している。この α -BTX を室温で 1 時間反応させ、PBS で洗浄した後、フルオロマウントで封入した。すべての手順を遮光条件下にて行った。撮影は BZ9000 HS オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) にて行った。

2-3-6-3 脱神経の評価

過去の報告 (127, 132, 147, 159, 160) に倣い、シナプス前運動ニューロン (SYP 陽性: 緑色) とシナプス後アセチルコリン受容体 (α -BTX 陽性: 赤色) がマージしている場合 (黄色) を神経支配されているもの、マージしていない場合を脱神経が生じたものとして脱神経の定量を行った。切片に含まれるすべての神経筋接合部において評価を行い、神経支配を受けている神経筋接合部の割合を算出した。盲検下において単一の測定者が測定を行った。

2-3-7 腓腹筋特異的な GPNMB の過剰発現

2-3-7-1 GPNMB プラスミド DNA の増幅および抽出

ヒト GPNMB プラスミド DNA (pFN21AB9985) は株式会社かずさ DNA 研究所より購入した。ベクターには Flexi HaloTag (pFN21 Halo-Tag CMV Flexi; kazusa

DNA Res. Inst., Chiba, Japan) を使用しており、HaloTag を発現する他、アンピシリン耐性遺伝子を有する。プラスミド DNA の増幅は第 2 章 2-2-1、プラスミド DNA の抽出は第 2 章 2-2-2 の方法に準じて行った。GPNMB プラスミドに関しては、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、承認 (承認番号: 平 24-3) を得た上で使用した。

2-3-7-2 GPNMB プラスミド DNA の筋肉内投与

過去の報告 (161-163) にしたがって、GPNMB プラスミド DNA を筋肉内に投与することで、腓腹筋に GPNMB を過剰発現させた。13 週齢 (発症する少し前) のマウスを使用し、小動物用麻酔器 (Soft Lander; Sin-ei Industry Co. Ltd., Saitama, Japan) を用いて N₂O 70%、O₂ 30%中のイソフルランによって麻酔をした。麻酔導入時にはイソフルラン 3.0%を、麻酔維持時にはイソフルラン 1.5%を使用した。後肢の体毛を刈り取ったうえで 1 mL シリンジ (TERUMO)、27G の投与針 (TERUMO) を用いて GPNMB プラスミド DNA (200 µg/100µL) を右肢の腓腹筋に 3ヶ所に分けて筋肉内投与し、腓腹筋特異的に GPNMB を過剰発現させた。対照として対側 (左肢) には Mock を投与した。過去に、プラスミド DNA を腓腹筋に投与した 1 週間後および 2 週間後において、タンパクの発現量が有意に上昇することが報告されており (162)、本検討においてはプラスミド DNA を投与した 2 週間後 [15 週齢 (SOD1^{G93A}/GPNMB マウスの評価を行ったのと同じ週齢)] に腓腹筋を摘出し、評価を行った。プラスミド DNA の筋肉内投与に関しては、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、承認 (承認番号: 2013-034) を得た上で実施した。また、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、承認 (承認番号: 平 24-38A) を得た上で行った。

2-3-8 生命倫理

本試験はヘルシンキ宣言を遵守して実施した。名古屋大学医学部生命倫理審査委員会の承認（承認番号：902）および岐阜薬科大学生命倫理委員会の承認（平成25年10月23日承認、承認番号なし）を得た上で行った。患者に本試験の目的を説明し、書面による同意（インフォームドコンセント）を得た。患者自身が同意することができない場合は家族または親族からの同意を得た。本検討で使用したのは、すべて剖検サンプルである。患者からの骨格筋の採取は名古屋大学医学部附属病院内にて行った。

2-3-9 ALS 患者および対照患者の骨格筋におけるウエスタンブロット解析

本試験では、改訂版 El Escorial 診断基準 (11) を満たした孤発性 ALS 患者 10 名 (男性 5 名、女性 5 名) および対照疾患患者 10 名 (男性 5 名、女性 5 名) の剖検サンプルを使用した (Table 2)。対照疾患患者には、大脳皮質基底核変性症 (1 名)、家族性アミロイドポリニューロパチー (1 名)、HTLV1 (human T-lymphotropic virus) 関連脊髄症 (1 名)、肥大性硬膜炎 (2 名)、多系統萎縮症 (2 名)、パーキンソン病 (1 名)、進行性核上性麻痺 (2 名) が含まれていた。対照疾患患者、孤発性 ALS 患者それぞれの群の平均年齢は、それぞれ 67.9 ± 1.9 歳、 69.0 ± 2.4 歳であった。摘出した骨格筋は凍結され、名古屋大学医学部から岐阜薬科大学薬効解析学研究室に輸送した後、2-3-3 に記述した方法に従ってウエスタンブロット解析を行った。

Table 2 Skeletal muscle samples from patients with sporadic ALS or other diseases.

Characteristic	Control	Sporadic ALS
Patients (n)	10	10
Male patients (n)	5	5
Female patients (n)	5	5
Age (years)	67.9 ± 1.9	69.0 ± 2.4

Age data are presented as mean ± S.E.M.

Skeletal muscle samples were acquired from 10 patients with sporadic ALS and 10 patients with other diseases (see Methods). Other diseases are as follows: corticobasal degeneration (n = 1), familial amyloid polyneuropathy (n = 1), HTLV (Human T-lymphotropic Virus) 1-associated myelopathy (n = 1), hypertrophic pachymeningitis (n = 2), multiple system atrophy (n = 2), Parkinson disease (n = 1), and progressive supranuclear palsy (n = 2).

2-3-10 統計学的解析

実験成績は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。統計学的な比較は、Student's *t*-test (JSTAT for windows) により行った。危険率が 5%未満の場合を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 SOD1^{G93A} マウス骨格筋における GPNMB の発現量

15 週齢の野生型マウス (WT) および SOD1^{G93A} (G93A) マウスの腓腹筋を摘出し、ウエスタンブロット法を用いて GPNMB の発現量を検討した (Fig. 21A)。

野生型マウスに比べて SOD1^{G93A} マウスでは、修飾型 GPNMB である glycosylated GPNMB の発現量が約 1.2 倍増加した (n = 7, *p* = 0.0365) (Fig. 21B)。また、ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 10 や ADAM12 などのプロテアーゼによる切断 (shedding) (74, 81, 82) によって生じる GPNMB C-末端断片の発現量が約 1.4 倍増加した (n = 7, *p* = 0.0068) (Fig. 21D)。一方、non-glycosylated GPNMB の発現量は約 0.8 倍に減少した (n = 7, *p* = 0.0022) (Fig. 21C)。

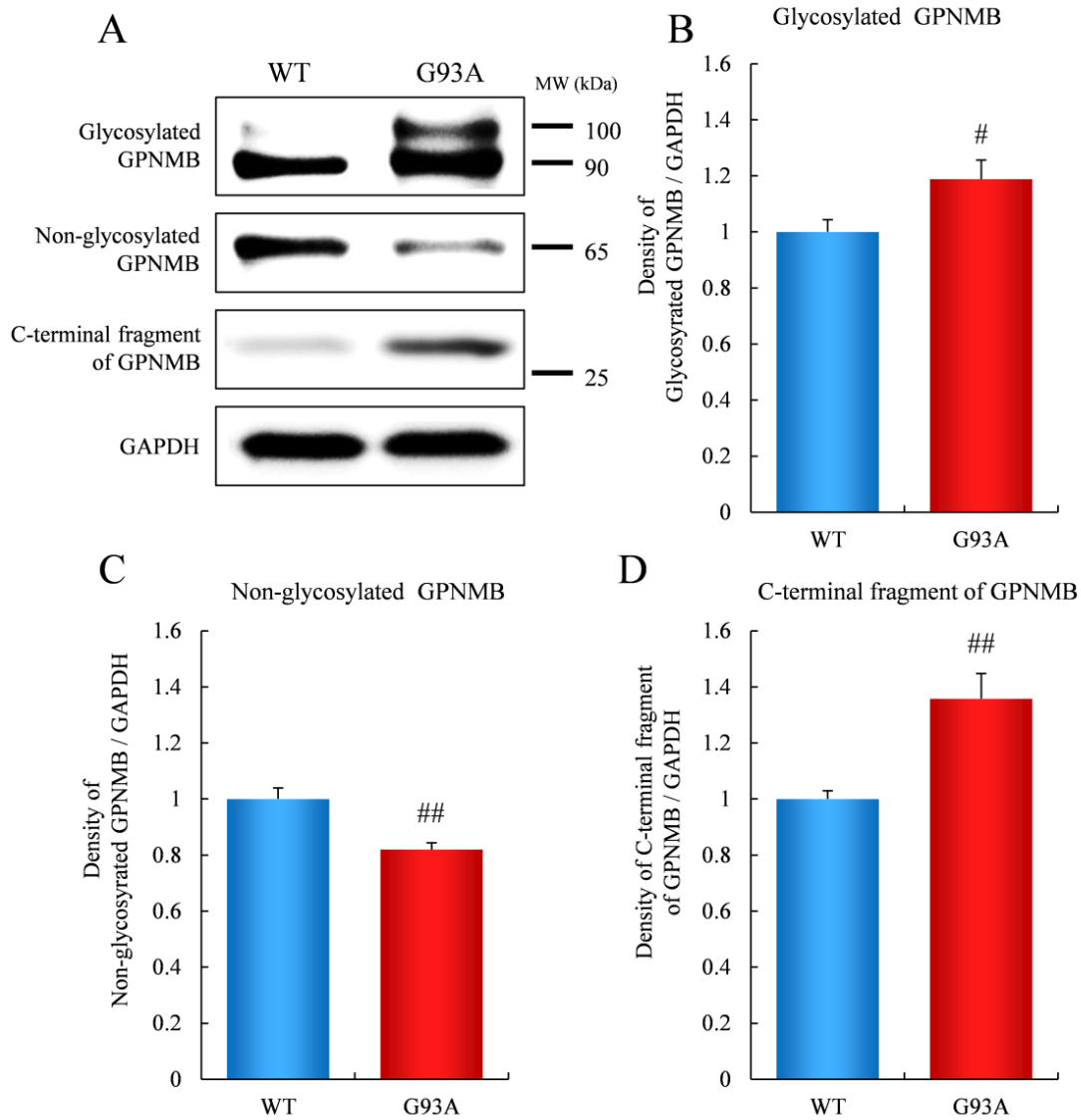


Figure 21 Levels of GPNMB in the gastrocnemius muscle of SOD1^{G93A} mice.

(A) Representative western blot analysis. Levels of GPNMB in the gastrocnemius muscles of wild-type (WT) and SOD1^{G93A} (G93A) mice at 15 weeks of age. GPNMB was quantified relative to the GAPDH level. (B) Levels of glycosylated GPNMB increased in SOD1^{G93A} mice than in wild-type mice. (C) Levels of non-glycosylated GPNMB decreased in SOD1^{G93A} mice. (D) Levels of the C-terminal fragment of GPNMB increased in SOD1^{G93A} mice. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 7). # p < 0.05, ## p < 0.01 versus wild-type mice (Student's t -test).

3-2 SOD1^{G93A} マウス骨格筋萎縮に対する GPNMB の作用

15 週齢の雄性野生型マウス (WT)、SOD1^{G93A} マウス (G93A)、SOD1^{G93A}/GPNMB (G93A/GPNMB) マウスの腓腹筋を摘出し、評価を行った。ジェノタイピングを行った上で、同腹子のマウスを検討に用いた。野生型マウスと比較して SOD1^{G93A} マウスでは筋萎縮が生じたが、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは、筋萎縮が劇的に改善した (Fig. 22A)。また、野生型マウスと比べて SOD1^{G93A} マウスでは筋重量が約 1/2 に減少したが (n=8、左肢 $p < 0.0001$ 、右肢 $p < 0.0001$)、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは、約 1.2 倍増加した (n=8、左肢 $p = 0.0473$ 、右肢 $p = 0.0484$)。また、左右で筋重量に有意な差は認められなかった (Fig. 22B)。

さらに、腓腹筋のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。野生型マウスと比べて SOD1^{G93A} マウスでは腓腹筋の断面積が減少していた他、筋線維の間隙 (エオジンで赤く染色されていない部分) も増加していた。一方、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは、それらが改善した (Fig. 22C)。腓腹筋の断面積を定量したところ、野生型マウスと比べて SOD1^{G93A} マウスでは腓腹筋の断面積が有意に減少したが (n=4; 腱から 2.0 mm $p = 0.0013$ 、2.5 mm $p = 0.0002$ 、3.0 mm $p = 0.0001$ 、3.5 mm $p = 0.0006$ 、4.0 mm $p = 0.0011$ 、4.5 mm $p = 0.0009$ 、5.0 mm $p = 0.0023$ 、5.5 mm $p = 0.0035$ 、6.0 mm $p = 0.0035$ 、6.5 mm $p = 0.0020$ 、7.0 mm $p = 0.0025$ 、7.5 mm $p = 0.0014$)、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは有意に改善した (n=4; 腱から 2.0 mm $p = 0.0158$ 、2.5 mm $p = 0.0234$ 、3.0 mm $p = 0.0336$ 、3.5 mm $p = 0.0929$ 、4.0 mm $p = 0.0438$ 、4.5 mm $p = 0.0405$ 、5.0 mm $p = 0.0834$ 、5.5 mm $p = 0.1276$ 、6.0 mm $p = 0.0753$ 、6.5 mm $p = 0.0480$ 、7.0 mm $p = 0.0295$ 、7.5 mm $p = 0.0190$) (Fig. 22D)。

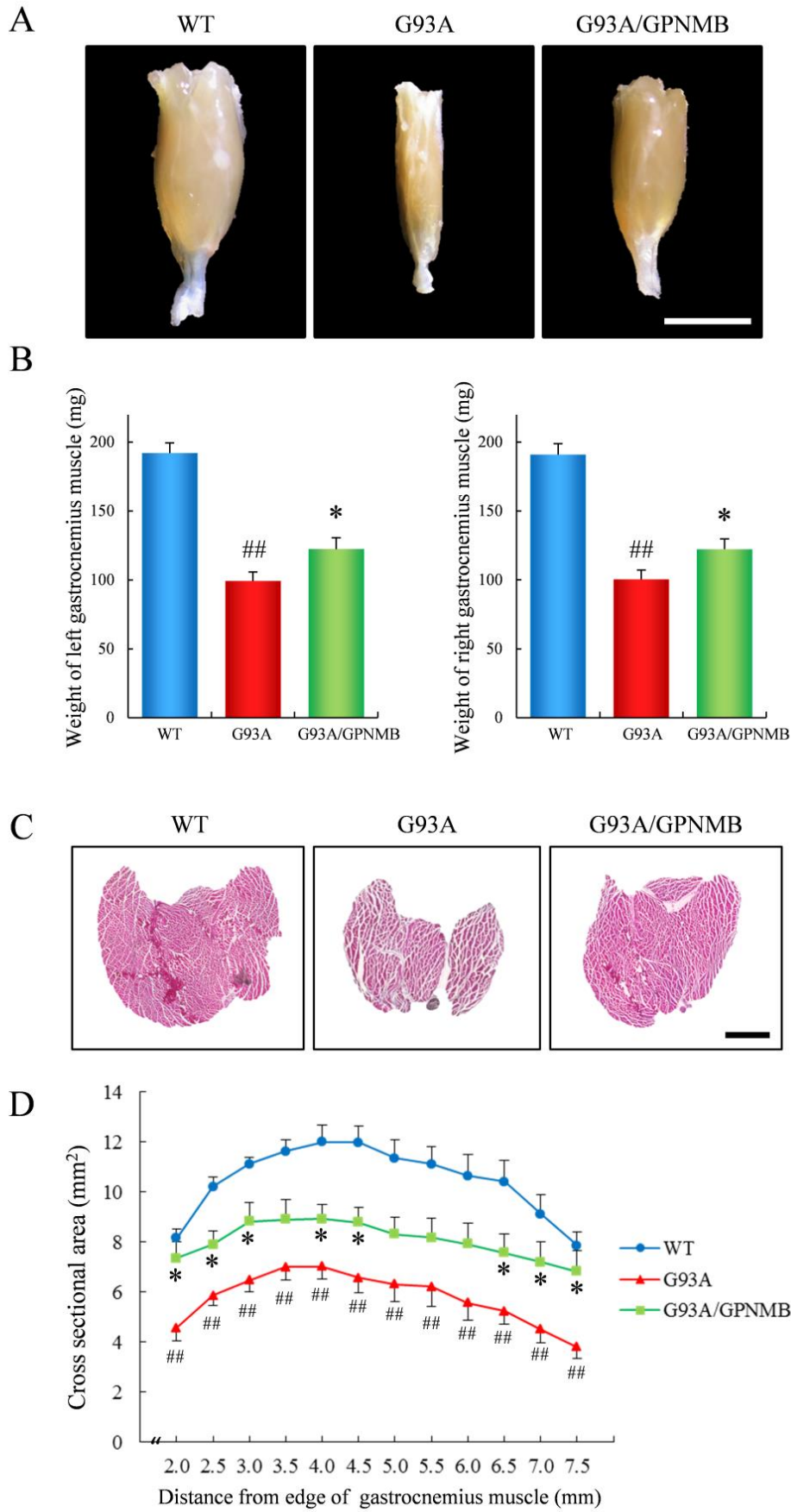


Figure 22 Effect of GPNMB of muscle atrophy in SOD1^{G93A} mice.

(A) Representative gastrocnemius muscles of wild-type (WT), SOD1^{G93A} (G93A), and SOD1^{G93A}/GPNMB (G93A/GPNMB) mice at 15 weeks of age. Scale bar = 5 mm. (B) Weights of the left and right gastrocnemius muscles. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 8). ^{##}*p* < 0.01 versus wild-type mice, **p* < 0.05 versus SOD1^{G93A} mice (Student's *t*-test). (C) Representative hematoxylin and eosin-stained gastrocnemius muscles of wild-type, SOD1^{G93A}, and SOD1^{G93A}/GPNMB mice (age of the mice, 15 weeks). Scale bar = 1 mm. (D) Cross-sectional areas of hematoxylin and eosin-stained gastrocnemius muscles. The cross-sectional area was measured at intervals of 0.5 mm. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 4). ^{##}*p* < 0.01 versus wild-type mice, **p* < 0.05 versus SOD1^{G93A} mice (Student's *t*-test).

3-3 SOD1^{G93A} マウス筋線維組織障害に対する GPNMB の作用

骨格筋は、多核細胞である筋線維 (筋細胞) が集まって構成された筋束が、さらに集まって構成されている。よって SOD1^{G93A} マウス骨格筋萎縮に対する GPNMB の作用をより詳細に検討するために、筋線維の組織障害の評価を行った。

15 週齢の雄性野生型マウス (WT)、SOD1^{G93A} マウス (G93A)、SOD1^{G93A}/GPNMB (G93A/GPNMB) マウスの腓腹筋のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った上で、撮影を行った。脊髓前角細胞の軸索は筋肉に入ると何本かに枝分かれして筋線維にシナプス結合するが、ALS では前角細胞が脱落することで、軸索が分布する筋線維の集団ごとに筋線維が萎縮する (164)。これは群性萎縮 (神経原性萎縮) と呼ばれ、SOD1^{G93A} マウスにおいては矢印で示したように群性萎縮が見られたのに対し、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは改善した (Fig. 23A)。

腓腹筋の末端から 4 mm の位置で作製した切片に含まれる、総筋線維数を定量した。野生型マウスと比べて SOD1^{G93A} マウスでは総筋線維数が約 0.4 倍に減少したが (n = 4; *p* < 0.0001)、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは約 1.7 倍増加した (n = 4; *p* = 0.0019) (Fig. 23B)。

また、20 倍の倍率で撮影した切片中心部の画像に含まれる筋線維の断面積を

Image J で測定し、 $200\ \mu\text{m}^2$ 間隔で集計してグラフ化した。野生型マウスでは、ほとんどの筋線維の断面積が $400\text{-}800\ \mu\text{m}^2$ であったのに対し、 $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ マウスでは $200\ \mu\text{m}^2$ 以下の小さな筋線維が増加した ($n = 4$; WT vs. $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ $< 200\ \mu\text{m}$ $p = 0.0004$ 、 $200\text{-}400\ \mu\text{m}$ $p = 0.0888$ 、 $400\text{-}600\ \mu\text{m}$ $p = 0.0006$ 、 $600\text{-}800\ \mu\text{m}$ $p = 0.0003$ 、 $800\text{-}1,000\ \mu\text{m}$ $p = 0.0641$ 、 $> 1,000\ \mu\text{m}$ $p = 0.0890$)。それに対し $\text{SOD1}^{\text{G93A}}/\text{GPNMB}$ マウスでは $400\text{-}600\ \mu\text{m}^2$ の筋線維が最も多く、野生型マウスの分布に近づいた ($n = 4$; $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$ vs. $\text{SOD1}^{\text{G93A}}/\text{GPNMB}$ $< 200\ \mu\text{m}$ $p = 0.0063$ 、 $200\text{-}400\ \mu\text{m}$ $p = 1.0000$ 、 $400\text{-}600\ \mu\text{m}$ $p = 0.0033$ 、 $600\text{-}800\ \mu\text{m}$ $p = 0.0370$ 、 $800\text{-}1,000\ \mu\text{m}$ $p = 0.1812$ 、 $> 1,000\ \mu\text{m}$ $p = 0.1987$) (Fig. 23C)。

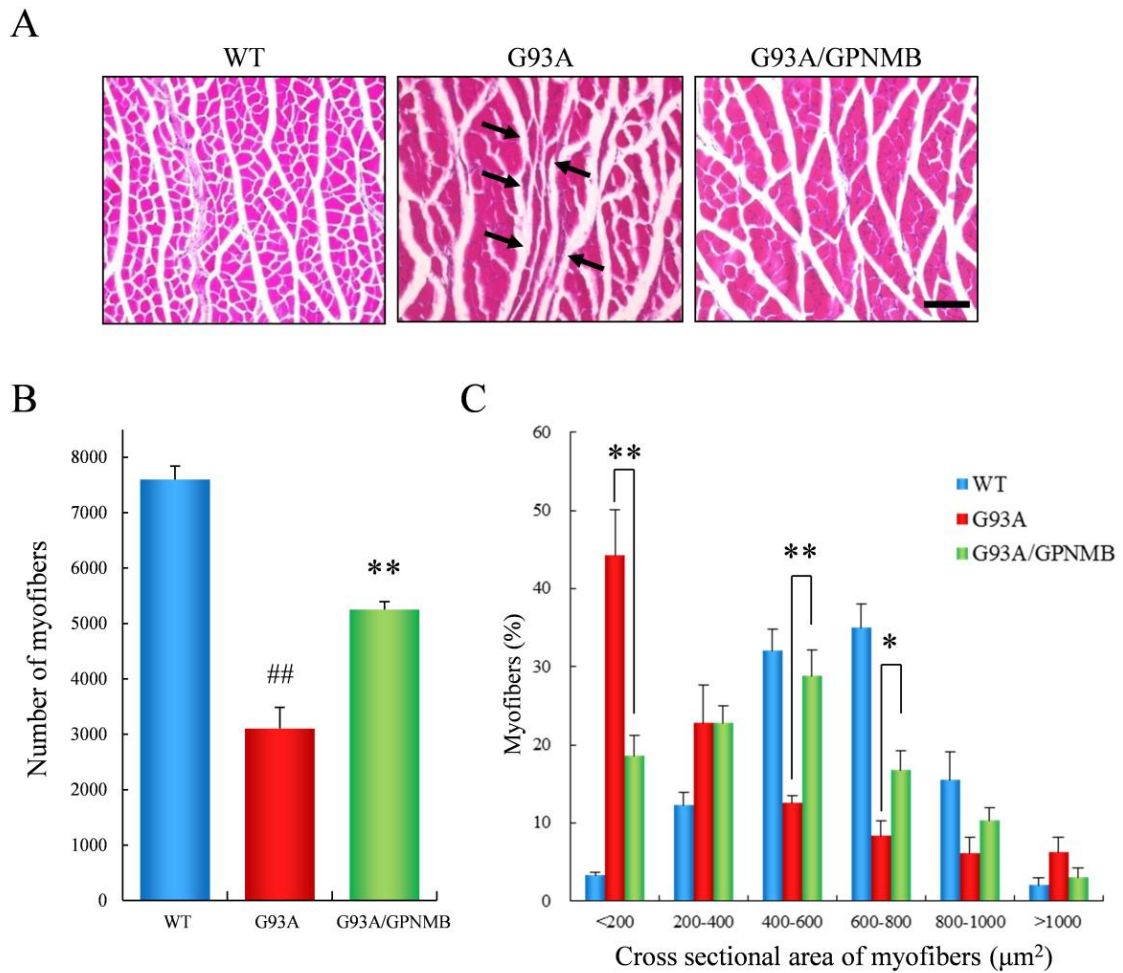


Figure 23 Effects of GPNMB on the numbers of myofibers and myofiber atrophy of SOD1^{G93A} mice.

(A) Representative hematoxylin and eosin-stained gastrocnemius muscles of wild-type (WT), SOD1^{G93A} (G93A), and SOD1^{G93A}/GPNMB (G93A/GPNMB) mice at 15 weeks of age. Myofiber atrophy was observed in SOD1^{G93A} mice (arrows). Scale bar = 100 μm. (B) Number of myofibers included in the cross section. Values represent the mean ± S.E.M. (n = 4). ##*p* < 0.01 versus wild-type mice, ***p* < 0.01 versus SOD1^{G93A} mice (Student's *t*-test). (C) Cross-sectional areas of 100 myofibers of each mouse. Distribution of myofibers of wild-type, SOD1^{G93A}, and SOD1^{G93A}/GPNMB mice has been indicated. Values represent the mean ± S.E.M. (n = 4). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 versus SOD1^{G93A} mice (Student's *t*-test).

3-4 SOD1^{G93A} マウス神経筋接合部脱神経に対する GPNMB の作用

神経筋接合部とは、脊髄運動ニューロンからのシグナルが骨格筋に伝えられる部位であり、神経終末から分泌されたアセチルコリンが筋線維膜上のアセチルコリン受容体に作用して活動電位を発生させる。ALS においては神経筋接合部の脱神経が生じることが知られており、過去の報告にしたがって (127, 132, 147, 159, 160)、SOD1^{G93A} マウス神経筋接合部脱神経に対する GPNMB の作用検討を行った。シナプス前運動ニューロンをシナプトフィジン (SYP) 抗体を用いて免疫染色し、シナプス後アセチルコリン受容体をテトラメチルローダミンで標識された α -BTX を用いて染色した。シナプス前運動ニューロン (SYP 陽性: 緑色) とシナプス後アセチルコリン受容体 (α -BTX 陽性: 赤色) がマージしている場合 (黄色) を神経支配されているもの (innervated)、マージしていない場合を脱神経が生じたもの (denervated) とした (Fig. 24A)。

神経支配を受けている神経筋接合部の割合を算出し、脱神経の評価を行った。野生型マウスでは、ほとんどの神経筋接合部が神経支配されていたが、SOD1^{G93A} マウスでは脱神経が亢進し、神経支配されている神経筋接合部の割合が野生型マウスの約 0.4 倍に減少した ($n=8; p<0.0001$)。その一方で、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは約 1.5 倍増加した ($n=8; p=0.0029$) (Fig. 24B, 24C)。

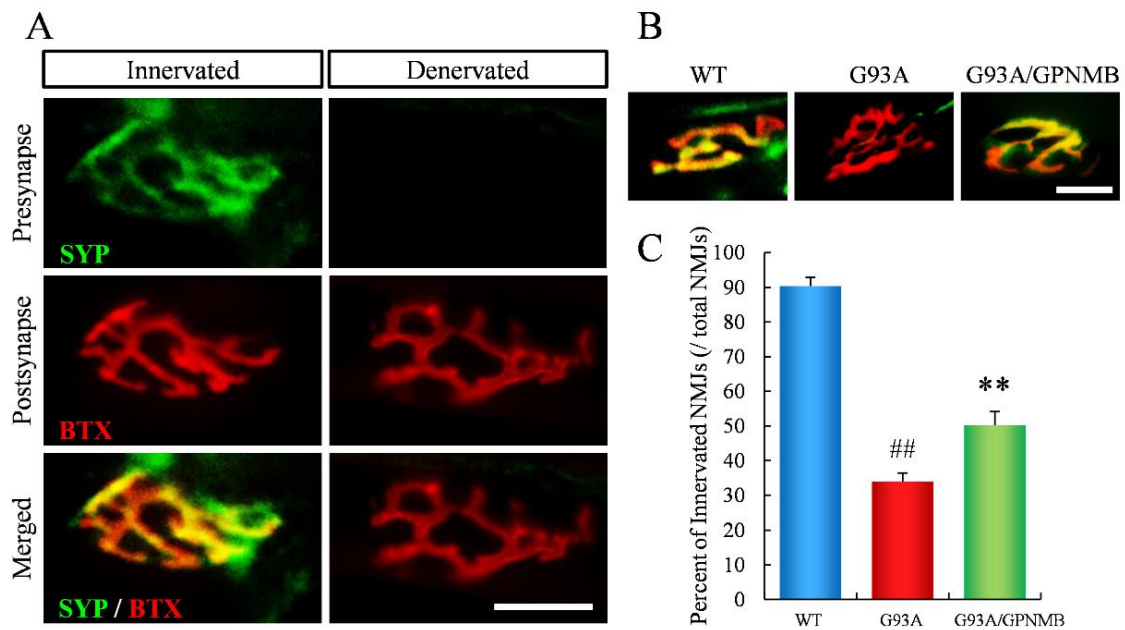


Figure 24 Effects of GPNMB on the denervation of the neuromuscular junction of $SOD1^{G93A}$ mice.

(A) Representative fluorescence microscopy images showing innervated and denervated neuromuscular junctions. The presynaptic nerve was stained with a mouse anti-SYP antibody (green), and the postsynaptic acetylcholine receptor was stained with α -BTX (red). The neuromuscular junctions with colocalization of SYP and α -BTX (yellow) were defined as innervated and as denervated when the presynaptic compartment was absent. Scale bar = 20 μ m. (B) Representative neuromuscular junction of wild-type (WT), $SOD1^{G93A}$ (G93A), and $SOD1^{G93A}/GPNMB$ (G93A/GPNMB) mice. Scale bar = 20 μ m. (C) Percentage of innervated neuromuscular junctions ($n \geq 500$). Values represent the mean \pm S.E.M. ($n = 4$). $##p < 0.01$ versus wild-type mice, $**p < 0.01$ versus $SOD1^{G93A}$ mice (Student's t -test).

3-5 マウス骨格筋への GPNMB プラスミド投与による GPNMB 過剰発現の 確認

GPNMB が SOD1^{G93A} マウスの筋萎縮や筋線維の障害、神経筋接合部の脱神経を改善することが明らかになった。また、脱神経誘発の骨格筋萎縮を GPNMB が抑制したという報告 (153) から、GPNMB が SOD1^{G93A} マウス骨格筋に直接作用している可能性もあると推察される。そこで、GPNMB プラスミドをマウス腓腹筋に投与する方法を用いて骨格筋選択的に GPNMB を過剰発現させ、GPNMB が骨格筋に直接作用するか検討しようと考えた。3-5 ではその前段階として、マウス骨格筋への GPNMB プラスミド投与によって GPNMB がどの程度過剰発現するかをウエスタンブロット法により検討した。

過去の報告 (161-163) にしたがって、イソフルラン吸入麻酔下で 13 週齢野生型マウスの右肢の腓腹筋に Halo-tag が付いたヒト GPNMB プラスミド DNA (200 µg/100µL)、対照として対側 (左肢) の腓腹筋に Mock を投与し、その 2 週間後 (15 週齢) に腓腹筋および脊髄を摘出し、ウエスタンブロット法を行った (Fig. 25A)。

抗 Halo-tag 抗体を用いたウエスタンブロット法では、Mock を投与した左肢の腓腹筋と脊髄では全く検出されない反面、GPNMB プラスミドを投与した右肢の腓腹筋では濃いバンドが検出された (Fig. 25B)。

未投与の野生型マウス、未投与の SOD1^{G93A} マウス、未投与の SOD1^{G93A}/GPNMB マウス、GPNMB プラスミドを投与した野生型マウス、Mock を投与した野生型マウスの腓腹筋において、マウス GPNMB 抗体およびヒト GPNMB 抗体を用いたウエスタンブロット法を行い、GPNMB の発現量を比較した (Fig. 25C)。

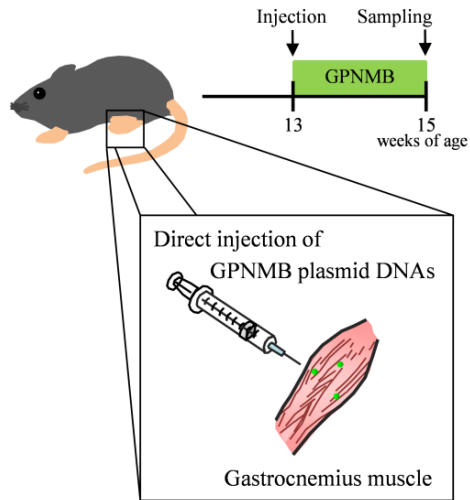
マウス GPNMB 抗体を用いたウエスタンブロット法では、Fig. 21 で示した結果と同様に、野生型マウスと比較して SOD1^{G93A} マウスにおいて glycosylated GPNMB および GPNMB の C-末端断片の発現が増加し、non-glycosylated GPNMB

の発現が減少する傾向がみられた。SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは、glycosylated GPNMB および GPNMB の C-末端断片の発現が非常に多かったが、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスにおけるこれらの発現増加は、野生型マウスと比較した SOD1^{G93A} マウスにおけるこれらの発現増加を大きく凌ぐものであった。Mock を投与した野生型マウスと比較して、GPNMB プラスミドを投与した野生型マウスでは 90 kDa の glycosylated GPNMB の発現が増加していた。未投与の野生型マウスや SOD1^{G93A} マウスと比較しても、GPNMB プラスミド投与群では glycosylated GPNMB の発現は多かったが、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスにおける glycosylated GPNMB の発現よりは格段に少なかった (Fig. 25C)。

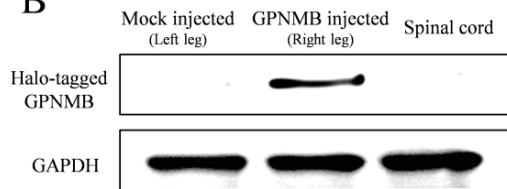
ヒト GPNMB 抗体を用いたウエスタンブロット法では、GPNMB プラスミド投与群においてのみ 90 kDa の glycosylated GPNMB のバンドが検出された (Fig. 25C)。

以上より、GPNMB プラスミドの筋肉内投与によって、GPNMB が腓腹筋において過剰発現される一方で、脊髄では過剰発現されないことが明らかになった。

A

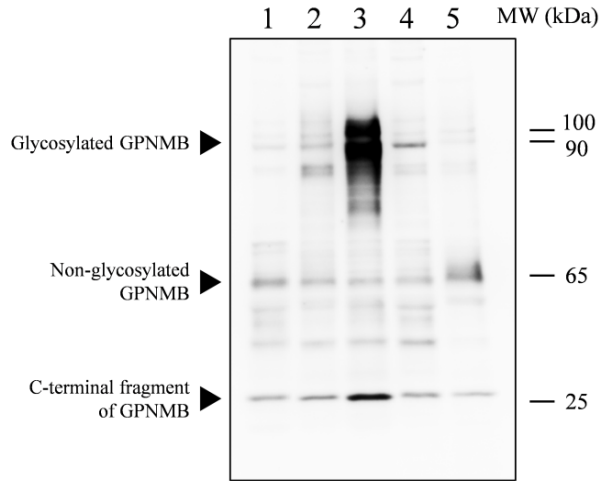


B

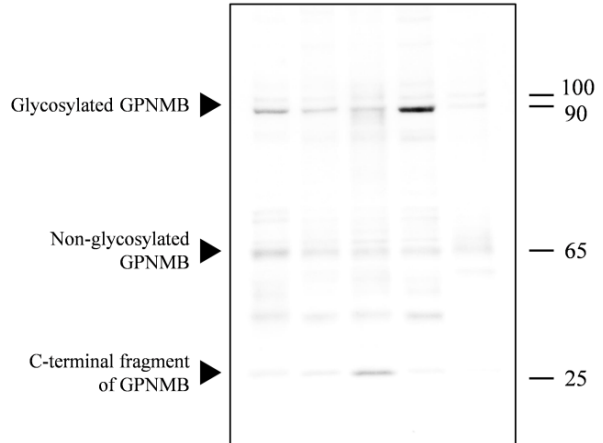


1. WT
2. G93A
3. G93A/GPNMB
4. GPNMB plasmid DNAs injected
5. Mock injected

C Mouse-GPNMB antibody



Human-GPNMB antibody



GAPDH antibody

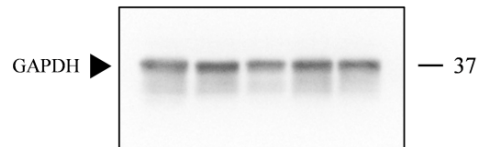


Figure 25 Overexpression of GPNMB in the gastrocnemius muscle by direct injection of GPNMB plasmid DNAs.

(A) Experimental method of direct injection of GPNMB plasmid DNAs into gastrocnemius muscles. (B) Halo-tagged GPNMB and empty vector plasmid DNAs (200 µg/100 µL each) were directly injected into the right gastrocnemius muscle and left gastrocnemius muscles, respectively of wild-type (WT) mice at 13 weeks of age. Two weeks later, western blot analysis was performed using an antibody against the Halo-tag. Halo-tagged GPNMB was overexpressed in the right gastrocnemius muscle that injected GPNMB plasmid DNAs. (C) Representative western blot analysis of skeletal muscle of 15 weeks of age mice, using goat anti-mouse GPNMB antibody, goat anti-human-GPNMB antibody, and anti-GAPDH antibody. From the left, WT mice, SOD1^{G93A} (G93A) mice, SOD1^{G93A}/GPNMB (G93A/GPNMB) mice, GPNMB plasmid DNAs injected WT mice, and mock injected WT mice.

3-6 筋萎縮および脱神経に対する骨格筋選択的 GPNMB 過剰発現の作用

13 週齢野生型マウスの腓腹筋に Halo-Tag 標識された GPNMB プラスミド DNA を筋肉内投与することにより GPNMB を腓腹筋選択的に過剰発現させ、その 2 週間後に腓腹筋を摘出し、腓腹筋の筋重量、腓腹筋の断面積の定量を行った。しかしながら、Mock 投与群と GPNMB プラスミド DNA 投与群で、明らかな差は認められなかった (n = 8) (Fig. 26A-D)。

また、神経筋接合部の脱神経の評価を行ったが、Mock 投与群と GPNMB プラスミド DNA 投与群で、明らかな差は認められなかった (n = 8) (Fig. 26E)。

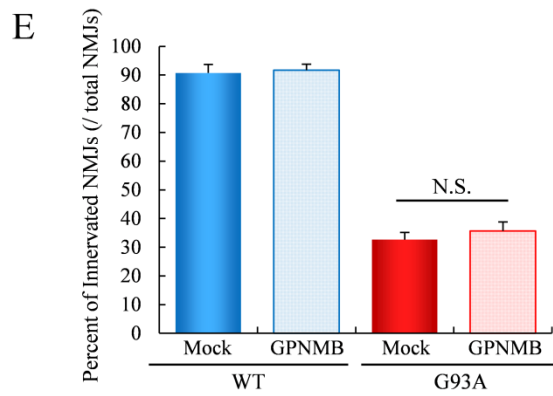
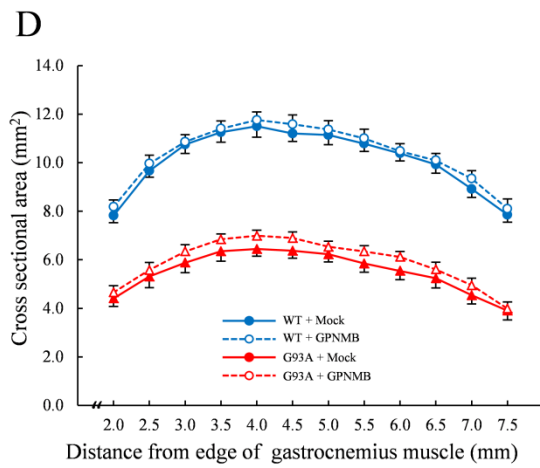
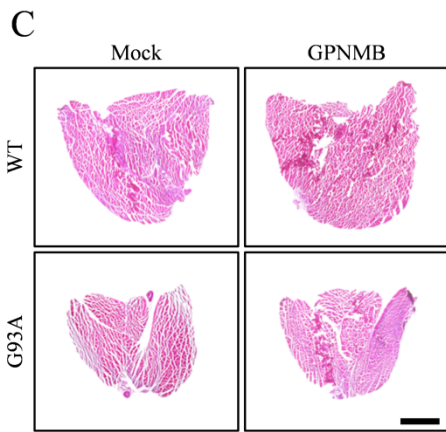
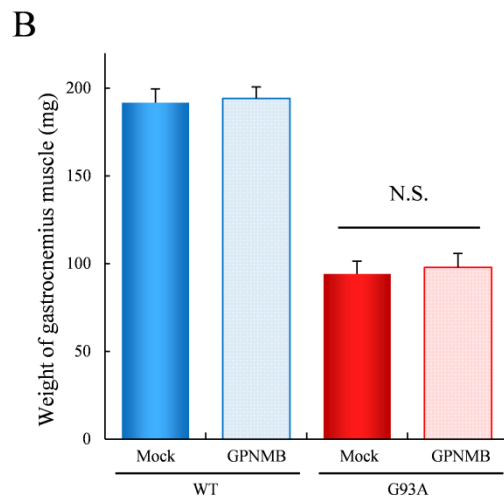
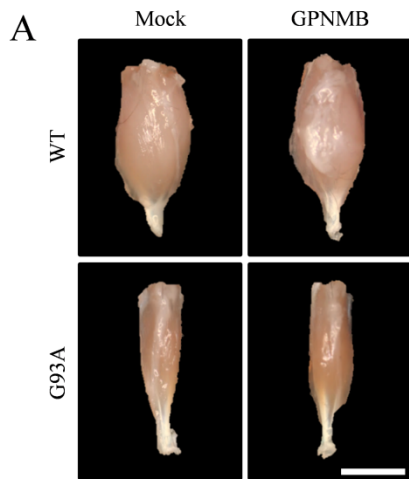


Figure 26 Effects of injected GPNMB plasmid on muscle weight, cross-sectional areas of muscles, and denervation of the neuromuscular junction of SOD1^{G93A} mice.

(A) Representative gastrocnemius muscles of wild-type (WT) and SOD1^{G93A} (G93A) mice at 15 weeks of age. GPNMB and Mock plasmids were injected directly into the left and right gastrocnemius muscles, respectively. Scale bar = 5 mm. (B) Weights of the gastrocnemius muscles. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 8). (C) Representative hematoxylin and eosin-stained gastrocnemius muscles of wild-type and SOD1^{G93A} mice at 15 weeks of age. Scale bar = 1 mm. (D) Quantitation of cross-sectional areas of hematoxylin and eosin-stained gastrocnemius muscles. The cross-sectional area of each muscle was measured at intervals of 0.5 mm. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 8). (E) Percentage of innervated neuromuscular junctions (n \geq 500).

3-7 筋線維障害に対する骨格筋選択的 GPNMB 過剰発現の作用

GPNMB プラスミド DNA を筋肉内投与することにより GPNMB を腓腹筋選択的に過剰発現させ、SOD1^{G93A} マウス筋線維の組織障害に対する作用を検討した。

ヘマトキシリン・エオジン染色を行った上で筋線維の組織評価を行った (Fig. 27A)。切片に含まれる総筋線維数を定量したところ、野生型マウスでは Mock 投与群と GPNMB プラスミド DNA 投与群において、明らかな差は認められなかった (n = 8)。野生型マウスと比べ、SOD1^{G93A} マウスでは総筋線維数が減少したが、Mock 投与群と比べて GPNMB プラスミド DNA 投与群では、有意に改善した (n = 8; $p = 0.0488$) (Fig. 27B)。

また、野生型マウスと比べ、SOD1^{G93A} マウスでは断面積の小さな筋線維が増加したが、Mock 投与群と比べて GPNMB プラスミド DNA 投与群では、有意に改善した (n = 4; SOD1^{G93A} + Mock injected vs. SOD1^{G93A} + GPNMB plasmid injected < 200 μm $p = 0.0101$ 、200–400 μm $p = 0.3918$ 、400–600 μm $p = 0.0133$ 、600–800 μm $p = 0.0296$ 、800–1,000 μm $p = 0.8851$ 、> 1,000 μm $p = 0.0671$) (Fig. 27C)。

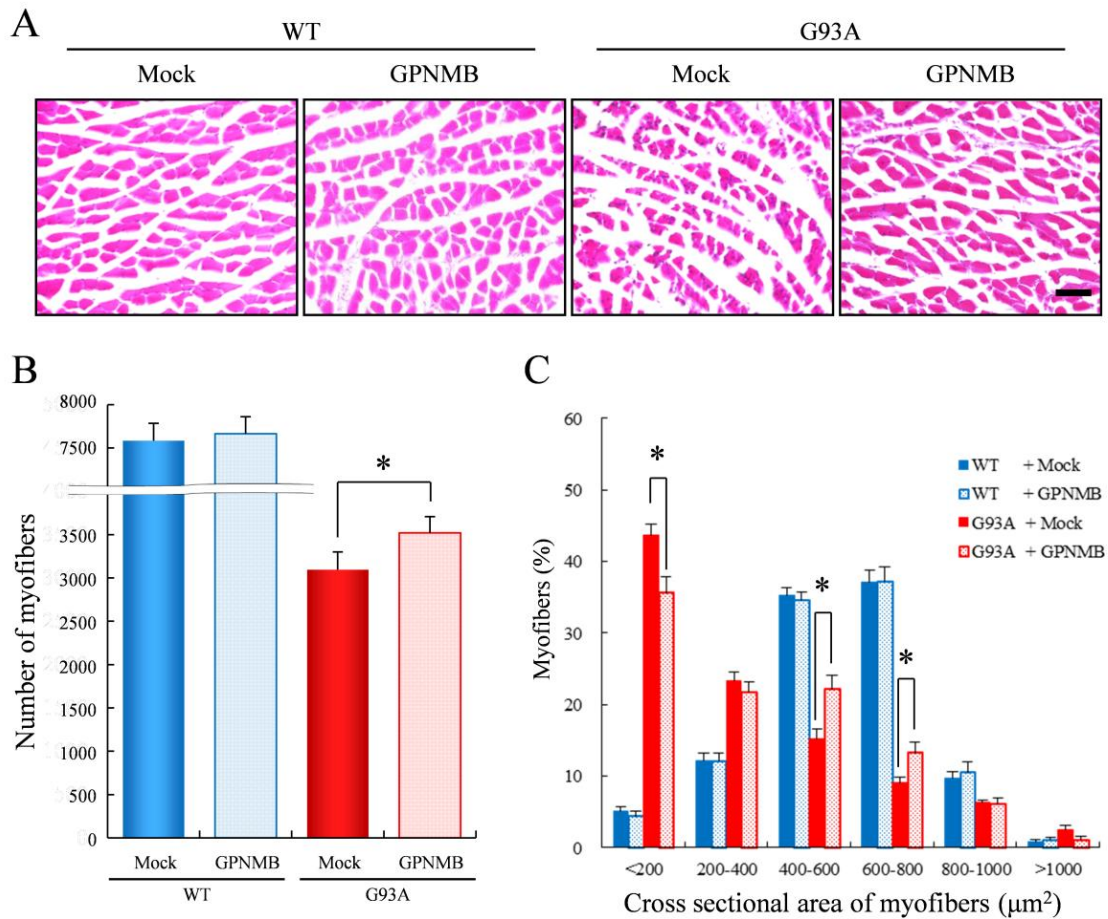


Figure 27 Effects of GPNMB on the number of myofibers and myofiber atrophy in the gastrocnemius muscle of $SOD1^{G93A}$ mice.

(A) Representative hematoxylin and eosin staining of plasmid-injected gastrocnemius muscles of wild-type (WT) and $SOD1^{G93A}$ (G93A) mice at 15 weeks of age. Scale bar = 100 μ m. (B) Numbers of myofibers included in the cross sections. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 8). * p < 0.05 versus Mock-injected $SOD1^{G93A}$ mice (Student's *t*-test). (C) Cross-sectional area of 100 myofibers and distribution of fibers in plasmid-injected wild-type and $SOD1^{G93A}$ mice. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 8). * p < 0.05 versus Mock-injected $SOD1^{G93A}$ mice (Student's *t*-test).

3-8 ALS 患者骨格筋における GPNMB の発現量

対照疾患患者 10 名および孤発性 ALS 患者 10 名の骨格筋の剖検サンプルについて、ウエスタンブロット法により GPNMB の発現量を検討した (Fig. 28A)。対照疾患患者と比較して孤発性 ALS 患者では、glycosylated GPNMB の発現が増加する傾向がみられたが、有意な変化は認められなかった ($n = 10; p = 0.2212$) (Fig. 28B)。non-glycosylated GPNMB の発現についても、有意な変化は認められなかった ($n = 10; p = 0.9704$) (Fig. 28C)。一方、GPNMB の C 末端断片の発現は、孤発性 ALS 患者で約 1.3 倍増加していた ($n = 10; p = 0.0191$) (Fig. 28D)。

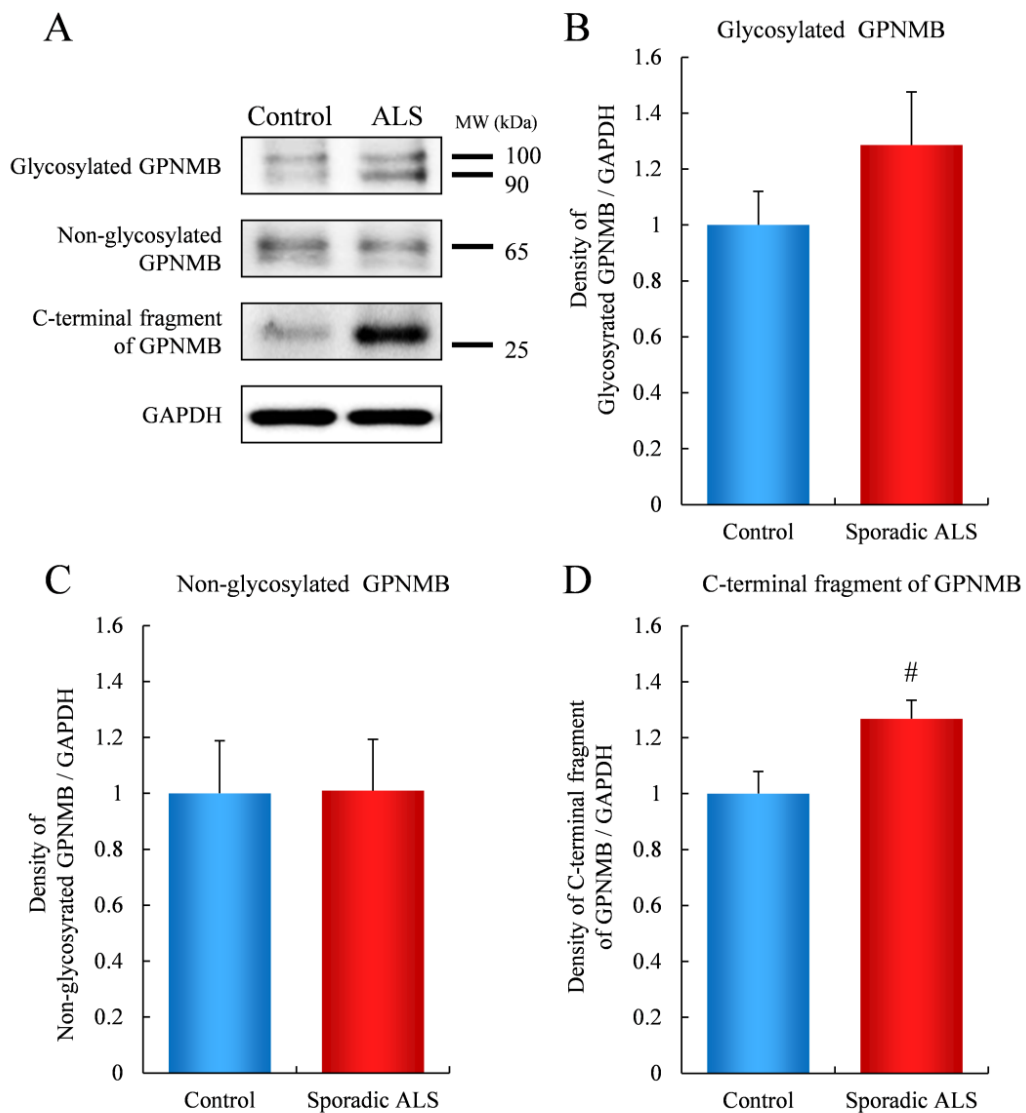


Figure 28 Levels of GPNMB in the skeletal muscle of patients with sporadic ALS.

(A) Representative western blot analysis. Levels of GPNMB in the skeletal muscles of sporadic ALS patients and other disease patients. GPNMB was quantified relative to the GAPDH level. (B) Levels of glycosylated GPNMB, (C) non-glycosylated GPNMB, and (D) C-terminal fragment of GPNMB. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 7). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus wild-type mice (Student's *t*-test).

第4節 考察

筋萎縮は ALS における主要な症状であり、筋萎縮を改善することができれば、ALS 患者の生活の質 QOL は大いに向上する。そこで本章では、ALS の骨格筋萎縮に対する GPNMB の作用を検討した。

腓腹筋における GPNMB の発現量は、脊髄損傷などの疾患で増加することが知られている (151-153)。また、薬効解析学研究室では、ALS 患者の脊髄や血清において、疾患が進行するにつれて GPNMB の発現量が増加することを報告している (16)。そこで、ウエスタンブロット法を用いて SOD1^{G93A} マウス腓腹筋における GPNMB の発現量を検討した。野生型マウスと比べて SOD1^{G93A} マウスでは、修飾型 GPNMB である glycosylated GPNMB の発現量や GPNMB C-末端断片の発現量が有意に増加していた (Fig. 21B, D)。また、孤発性 ALS 患者骨格筋において、GPNMB C-末端断片の発現量が有意に増加していた (Fig. 28)。これまでに、脱神経誘発の筋萎縮が生じると腓腹筋における GPNMB の発現量が増加することや (152)、GPNMB の発現が減少すると SOD1^{G93A} 誘発運動ニューロン死が亢進することが報告されている (16)。これらの報告から、SOD1^{G93A} マウス骨格筋において GPNMB の発現量が増加したのは、筋萎縮を抑制するためではないかと推察される。

そこで、GPNMB によって SOD1^{G93A} マウス骨格筋萎縮が改善するか否かを検討するために、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスを作製し、検討を行った。SOD1^{G93A} マウスと比べて SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは、腓腹筋の筋重量、断面積、筋線維

数、筋線維の断面積が、それぞれ有意に改善していた (Fig. 22, 23)。よって、GPNMB は SOD1^{G93A} マウス筋線維の組織障害を改善し、その結果、後肢の骨格筋萎縮が抑制されたのではないかと考えられる。骨格筋萎縮を改善することは対症療法に過ぎないかもしれないが、ALS 患者の QOL を大きく向上させることができ、介護する家族の負担も減弱させることができる。

SOD1^{G93A} マウスでは、神経筋接合部における脱神経が多く観察された一方、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスでは、それが有意に改善していた (Fig. 24)。神経筋接合部はシナプスの一種であり、脊髄運動ニューロンは神経筋接合部を介して骨格筋の収縮を制御している (157)。運動ニューロンの変性・脱落は疾患が比較的進行してから生じる一方、神経筋接合部における脱神経は疾患の早期から生じる。これは、ALS における運動ニューロン死の dying-back 機構とも呼ばれている (91, 130-132)。つまり、神経筋接合部の脱神経を抑制することによって、筋肉の障害を抑え、機能をより長く維持させるだけではなく、疾患の発症を遅らせることにつながる可能性もあると考えられる。

薬効解析学研究室では、GPNMB が SOD1^{G93A} 誘発運動ニューロン死を抑制することなどを報告しており (16)、中枢神経系 (脊髄) への作用が示唆されている。その一方で、脱神経を受けたマウスの骨格筋や宇宙遊泳後のラットの骨格筋で GPNMB の発現量が増加するという報告など、GPNMB と骨格筋萎縮には何らかの関連があることが示唆されている (79, 151-153)。よって、GPNMB は中枢に作用するだけではなく、骨格筋に直接作用する可能性があると考えた。そこで、GPNMB プラスミド DNA を用いて、SOD1^{G93A} マウス腓腹筋特異的に GPNMB を過剰発現させた。その結果、Mock 投与群と比較して GPNMB プラスミド DNA 投与群では、腓腹筋における筋線維数が有意に改善し、筋線維の断面積も有意に改善していた (Fig. 25)。

プラスミド DNA の筋肉内投与による遺伝子治療はウイルスベクターを用い

た遺伝子治療と比べて安全性が高く、近年注目を集めている (161-163, 165-171)。例えば、vascular endothelial growth factor (VEGF) プラスミド DNA や、human HGF プラスミド DNA の筋肉内投与の遺伝子治療の研究が盛んにおこなわれており、HGF プラスミド DNA の腓腹筋への投与によって重症下肢虚血や閉塞性血栓性血管炎が抑制されること (165, 168, 169) や、心筋内への投与によって心筋梗塞や心不全の進行が抑制されること (167, 170) が報告されている。さらに、下肢虚血に対しては日本人 10 人を対象とした臨床試験 (168) や、12 人の患者を対象とした Phase I 試験 (165) などが実施されており、その安全性や有効性が確認されている。

GPNMB が SOD1^{G93A} マウス骨格筋に対して直接作用することが明らかになったが、GPNMB プラスミド DNA 投与による作用は SOD1^{G93A}/GPNMB マウスの検討結果と比べると弱かった (Fig. 22-24, 26, 27)。これは、GPNMB を過剰発現させた期間の違いや過剰発現している量の違いが影響していると考えられる。実際、GPNMB プラスミド DNA 投与による GPNMB の発現増加と比べ、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスにおける GPNMB の発現増加は顕著であった (Fig. 25)。また、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスの場合は GPNMB が筋肉だけではなく脊髄を含む全身に過剰発現していることも関与していると考えられる。以上のことより、GPNMB は SOD1^{G93A} マウスに対し、脊髄に対する作用と骨格筋に対する直接的な作用という 2 種類の作用点を併せ持っていることが示唆された。

ALS の研究においては、脊髄を標的にしたものが多いが、骨格筋を標的とした研究も精力的に行われており、筋萎縮を抑制する薬剤がいくつか報告されている。例えばジヒドロテストステロン (8) や、PGC1- α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1- α) (145)、熱ショックタンパク質 70 (heat shock protein 70) (132, 147) は、いずれも、SOD1^{G93A} マウスの骨格筋に直接作用することにより、筋萎縮を改善させることが報告されている。GPNMB には本章

で明らかになった骨格筋に対する直接的な作用だけではなく、中枢に対する作用もあるため、ALS の治療標的として非常に有用であると考えられる。

現在、GPNMB が SOD1^{G93A} マウスの骨格筋萎縮を改善する機序は明らかになっていない。推察されるいくつかの作用機序の中で、ここでは 7 つの仮説を紹介する。1 つ目の仮説は、「細胞増殖や分化などに関与することが知られている ERK1/2 経路の活性化を介して細胞保護作用が示され、筋萎縮が抑制される。」ことである。薬効解析学研究室では、GPNMB が脳虚血再灌流障害に対して ERK1/2 経路の活性化を介して神経保護作用を示すことや (86)、GPNMB が SOD1^{G93A} 誘発運動ニューロン死に対して、ERK1/2 経路の活性化を介して保護作用を示すことを明らかにしている (16)。また、第 2 章において、GPNMB が血清除去および変異 TDP-43 誘発運動ニューロン死に対して、ERK1/2 経路の活性化を介して保護作用を示すことを明らかにした。GPNMB の細胞外フラグメントは筋芽細胞株 (mouse myoblast cell line; C2C12 細胞) においてリン酸化 ERK1/2 の発現を増加させる (79)。また、GPNMB は human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) において fibroblast growth factors (FGF) 受容体を介してリン酸化 ERK1/2 の発現を増加させる (83)。これらのことから、SOD1^{G93A} マウスの骨格筋においても GPNMB が ERK1/2 経路を活性化する可能性が考えられる。2 つ目の仮説は、「細胞生存やアポトーシスの制御に関与する Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene; protein kinase B) 経路 (172) の活性化を介して、筋萎縮を抑制する。」ことである。脳虚血再灌流障害や *in vitro* ALS モデルにおいて、GPNMB が Akt 経路を活性化することでニューロン保護作用を示すことが明らかになっている (16, 86)。興味深いことに、ALS 患者の骨格筋では、リン酸化 Akt の発現量が減少することが報告されており (121)、骨格筋における Akt 経路の活性低下が、ALS 病態の形成に寄与していることも考えられる。したがって、GPNMB が SOD1^{G93A} マウスの骨格筋において Akt 経路を活性化することによって、筋保護作用が示され

た可能性がある。3 つ目の仮説は、「GPNMB が小胞体ストレスを抑制することによって、筋保護作用を示す。」ことである。小胞体ストレスは、折り畳み不全の不良タンパク質が小胞体の内腔に蓄積するもので、ALS の発症や進行に重要な役割を果たす (35)。薬効解析学研究室でも、アポトーシスメディエーターの CAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) が孤発性 ALS の病態形成に関与することを報告している (28)。近年の研究で ALS モデル動物の骨格筋で小胞体ストレスが亢進していることも明らかにされた (34, 36)。したがって、GPNMB が SOD1^{G93A} マウスの骨格筋においても、小胞体ストレスを抑制することで筋保護作用を示した可能性がある。4 つ目の仮説は、「GPNMB が MMP-3 や MMP-9 の活性化を介して骨格筋の障害を抑制する。」ことである。これらは、脊髄損傷後の線維症から筋肉を保護することや (153)、仮骨延長に起因した筋肉の線維化を抑制することが知られている (154)。5 つ目の仮説は、「シェディングによって産生された GPNMB の C 末端断片が、関与している。」ことである。GPNMB の C 末端断片はプレ mRNA スプライシングに関与する (82)。また、GPNMB の C 末端断片は、hnRNP1 に結合することが知られているが (82)、hnRNP1 の変異が ALS の原因の一つであるとの報告がある (173)。実際、SOD1^{G93A} マウスの骨格筋では GPNMB の C 末端断片の発現が上昇していた (Fig. 21)。また、ALS 患者骨格筋では GPNMB の C 末端断片の発現が上昇していた (Fig. 28)。GPNMB の過剰発現によって修飾型のアイソフォームである glycosylated GPNMB が増え、それに伴って相対的に SOD1^{G93A} マウス骨格筋における GPNMB の切断や C 末端断片の産生による影響が減弱した可能性も考えられる。確かに SOD1^{G93A} マウスでは glycosylated GPNMB の発現が増加したが (Fig. 21)、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスや GPNMB プラスミド DNA を投与した場合と比べるとはるかに少なかった (Fig. 25)。したがって、SOD1^{G93A} マウスでは、その増加量が筋障害を抑えるには十分ではなかったことが推論できる。6 つ目の仮説は、「カルシウムシグナ

ルに関係する。」ことである。GPNMB は骨吸収や骨形成を制御することが知られているが (65-68)、近年、ALS において筋肉と骨とのクロストークが重要であることが報告された (174)。さらに、カルシウムシグナル経路の変化が ALS における筋萎縮を引き起こすことが報告されている (175, 176)。最後の仮説は、「GPNMB がオートファジーとユビキチン-プロテアソーム系の異常を改善させる。」ことである。これらの経路は疾患の進行期に SOD1^{G93A} マウスの骨格筋で活性化されることが知られている (138)。また、SOD1^{G93A} を過剰発現させた NSC-34 細胞でポリユビキチン化された GPNMB が増加することが報告されている (16)。したがって、GPNMB はこれらの経路に関与しているかもしれない。

SOD1^{G93A} マウス骨格筋萎縮に対する GPNMB の保護作用の機序については、さらに詳細な検討が必要である。また、GPNMB のどのフラグメントが実際に作用しているかや、より長期的に骨格筋特異的に GPNMB を過剰発現させた場合に、生存期間、発症までの期間、運動機能などが改善されるかなどを検討する必要がある。また、今後は SMA や SBMA など、ALS 以外の神経筋疾患についても、筋萎縮を改善する作用があるか検討が必要である。

今後の検討課題も多いが、GPNMB が骨格筋に直接作用し、SOD1^{G93A} マウス骨格筋萎縮を抑制することが明らかになった。今後、ALS に対する GPNMB の作用がより詳細に検討され、治療薬の開発につながることを期待される。

総括および結論

ALS は進行性に運動ニューロン変性や筋萎縮が生じる致死性の神経変性疾患である。現在承認されている治療薬の効果は十分ではなく、病態の解明や新規治療薬の開発が求められている。ALS の約 10%は特定の遺伝子変異が原因となる家族性 ALS であり、残りの約 90%は原因不明で発症する孤発性 ALS である。TDP-43 は孤発性、家族性いずれの ALS にも関与することが知られている。薬効解析学研究室では変異 SOD1 誘発家族性 ALS モデルに対して GPNMB が保護作用を示すことを明らかにしている。本研究では、孤発性 ALS 患者脊髄における GPNMB の局在の検討や、変異 TDP-43 誘発運動ニューロン死に対する GPNMB の保護作用の検討を行った。また、GPNMB が脊髄損傷における筋萎縮を抑制することが報告されていることから、ALS モデルマウス骨格筋に対する GPNMB の作用を検討した。

第 1 章では、孤発性 ALS 患者脊髄において増加する GPNMB 凝集体が脊髄のどの部位に多く存在するかを検討した。また、ALS 患者脊髄において、GPNMB 凝集体がニューロンやアストロサイトなど、どの細胞に局在するかを検討した。さらに TDP-43 との関連の有無について検討した。

1. 対照疾患患者と比較して孤発性 ALS 患者の腰髄、胸髄、頸髄で、GPNMB 凝集体の発現が有意に増加した。
2. 孤発性 ALS 患者脊髄の GPNMB 凝集体は、GFAP 陽性アストロサイトや Iba1 陽性ミクログリアには局在しなかった。
3. 孤発性 ALS 患者脊髄の GPNMB 凝集体は、MAP-2 陽性ニューロンや SMI-32 陽性ニューロンに局在した。
4. 孤発性 ALS 患者脊髄の GPNMB 凝集体は TDP-43 と共局在した。

第2章では、変異 TDP-43 誘発運動ニューロン死に対する GPNMB の作用について検討を行った。また、ERK1/2 経路や Akt 経路の活性化の有無を検討した。

1. 変異 TDP-43 遺伝子導入で、運動ニューロンにおける GPNMB の発現が増加した。
2. 変異 TDP-43 遺伝子導入および血清除去によって運動ニューロン死が惹起されたが、リコンビナント GPNMB によって濃度依存的に改善した。
3. 変異 TDP-43 遺伝子導入および血清除去によって pERK1/2 および pAkt の発現が減少したが、リコンビナント GPNMB によっていずれも増加した。

第3章では、SOD1^{G93A} マウス骨格筋萎縮に対する GPNMB の作用を検討するために、SOD1^{G93A}/GPNMB マウスを作製し、腓腹筋の組織評価や神経筋接合部における脱神経の評価を行った。また、GPNMB が骨格筋に直接作用するか否かを検討するために、GPNMB プラスミドを筋肉内投与し、組織評価などを行った。

1. 野生型マウスと比べて SOD1^{G93A} マウス骨格筋では、glycosylated GPNMB および GPNMB の C-末端断片の発現が有意に増加した。
2. SOD1^{G93A}/GPNMB マウスは、SOD1^{G93A} マウスで認められた筋萎縮が有意に改善した。
3. SOD1^{G93A}/GPNMB マウスは、SOD1^{G93A} マウスで認められた筋線維の組織障害が有意に改善した。
4. SOD1^{G93A}/GPNMB マウスは、SOD1^{G93A} マウスで認められた神経筋接合部の脱神経が有意に改善した。
5. 腓腹筋選択的な GPNMB の過剰発現により、筋線維の組織障害が有意に改善した。
6. 対照疾患患者と比較して孤発性 ALS 患者の骨格筋では、GPNMB の C-末端断片の発現が有意に増加した。

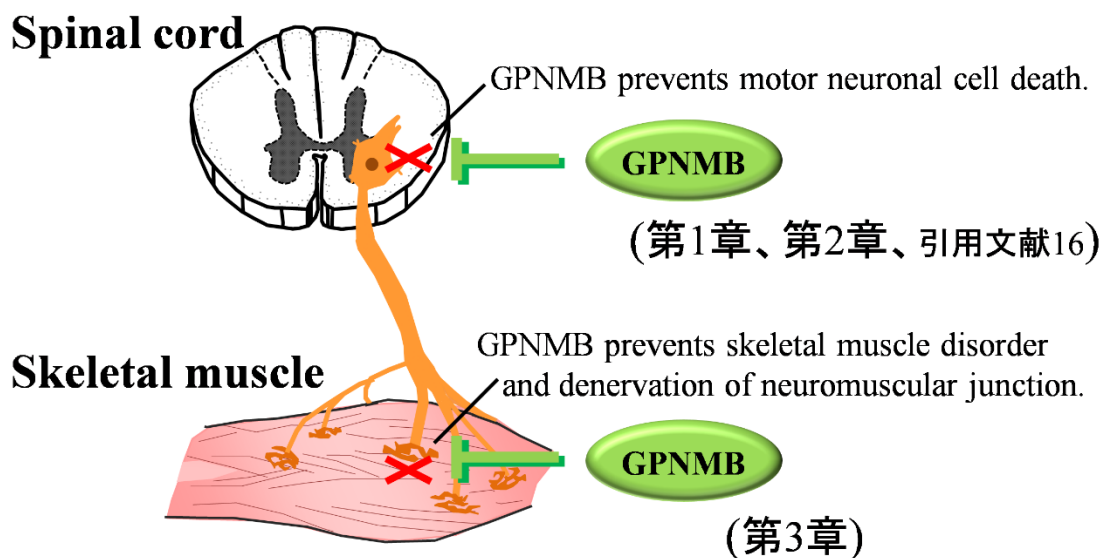


Figure 29 Summary of the effects of GPNMB against ALS pathology.

GPNMB prevents motor neuronal cell death in the central nervous system of ALS models, both mutant SOD1 induced and mutant TDP-43 induced toxicity. GPNMB also prevents skeletal muscle disorder and denervation of neuromuscular junction by protecting against skeletal muscle injuries in ALS models. GPNMB may act on dual sites: the central nervous system and skeletal muscle.

本研究より、孤発性 ALS 患者脊髄で増加した GPNMB 凝集体はアストロサイトやミクログリアには局在せず、ニューロンに局在していることを明らかにした。孤発性 ALS 患者脊髄における GPNMB 凝集体は TDP-43 と関連があることが示唆された。また、GPNMB は変異 TDP-43 誘発運動ニューロン死を ERK1/2 経路や Akt 経路の活性化を介して抑制することが示唆された。さらに、GPNMB は SOD1^{G93A} マウスの筋萎縮や脱神経を改善した。また、GPNMB は中枢だけではなく骨格筋に対しても直接作用し、組織障害を改善した (Fig. 29)。

以上の結果より、GPNMB は変異 SOD1 が関連する家族性 ALS だけではなく、孤発性 ALS に対しても有用である可能性がある。また、GPNMB は脊髄と骨格筋という、ALS の病態において重要な異なる 2 つの組織において作用し、保護作用を示すことが示唆された。GPNMB が ALS の治療薬開発の治療ターゲットとなることが期待できる。

謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました恩師 岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原 英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御助言を賜りました薬効解析学研究室准教授 嶋澤 雅光博士および講師 鶴間 一寛博士に深謝致します。また、諸種のご協力をいただきました薬効解析学研究室諸氏に心から感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なご助言を賜りました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、岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室教授 稲垣 直樹博士並びに岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座分子生物学研究室教授 福光 秀文博士に深謝致します。

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新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野教授 柿田 朋美博士、新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学分野教授 高橋 均博士、元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学教授 (現 名古屋大学大学院医学系研究科神経変性・認知症制御研究部特任教授) 祖父江 元博士、元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学准教授 (現 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学教授) 勝野 雅央博士、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 健博士に心から感謝の意を表します。

本研究の一部は文部科学省基盤研究 (C) の助成 (25460103)、文部科学省若手研究 (B) の助成 (25870605)、新潟大学脳所共同研究費補助金の助成 (2014-2617,

2015-2617) および平成28年度 理科研生命科学研究助成によって行われました。
本研究において開示すべき利益相反 (conflict of interest; COI) はありません。

最後に、本研究の趣旨に賛同しご協力下さいました ALS 患者様および御家族
の皆様に深く感謝致します。

引用文献

1. Ohuchi, K., Funato, M., Kato, Z., Seki, J., Kawase, C., Tamai, Y., Ono, Y., Nagahara, Y., Noda, Y., Kameyama, T., Ando, S., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara, H., and Kaneko, H. (2016) Established Stem Cell Model of Spinal Muscular Atrophy Is Applicable in the Evaluation of the Efficacy of Thyrotropin-Releasing Hormone Analog. *Stem Cells Transl Med* **5**, 152-163
2. Veldink, J. H., Van den Berg, L. H., and Wokke, J. H. (2004) The future of motor neuron disease: the challenge is in the genes. *J Neurol* **251**, 491-500
3. Wijesekera, L. C., and Leigh, P. N. (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* **4**, 3
4. Charcot, J. M. (1874) Amyotrophies spinales deuteropathiques sclérose latérale amyotrophique & Sclérose latérale amyotrophique. *Bureaux du Progrès Médical*. **2**, 234-266
5. Charcot, J. M., and Joffroy, A. (1869) Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-latéraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Neurol Pathol* **2**, 744-754
6. Brennan, F. (2012) The 70th anniversary of the death of Lou Gehrig. *Am J Hosp Palliat Care* **29**, 512-514
7. Blasco, H., Guennoc, A. M., Veyrat-Durebex, C., Gordon, P. H., Andres, C. R., Camu, W., and Corcia, P. (2012) Amyotrophic lateral sclerosis: a hormonal condition? *Amyotroph Lateral Scler* **13**, 585-588
8. Yoo, Y. E., and Ko, C. P. (2012) Dihydrotestosterone ameliorates degeneration in muscle, axons and motoneurons and improves motor function in amyotrophic lateral sclerosis model mice. *PLOS ONE* **7**, e37258
9. Kuzuhara, S. (2007) Revisit to Kii ALS--the innovated concept of ALS-Parkinsonism-dementia complex, clinicopathological features, epidemiology and etiology. *Brain Nerve* **59**, 1065-1074
10. Oyanagi, K., and Hashimoto, T. (2007) Essential feature of the neuropathological findings in ALS of Guam. *Brain Nerve* **59**, 1075-1082
11. Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., and Munsat, T. L. (2000) El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **1**, 293-299
12. Bowser, R., Turner, M. R., and Shefner, J. (2006) Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: opportunities and limitations. *Nat Rev Neurol* **7**, 631-638
13. Ryberg, H., and Bowser, R. (2008) Protein biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Proteomics* **5**, 249-262

14. Wagner, K. R. (2009) The need for biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis drug development. *Neurology* **72**, 11-12
15. Tanaka, H., and Hara, H. (2014) Aiming to overcome ALS - the biomarkers for ALS. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **143**, 313
16. Tanaka, H., Shimazawa, M., Kimura, M., Takata, M., Tsuruma, K., Yamada, M., Takahashi, H., Hozumi, I., Niwa, J., Iguchi, Y., Nikawa, T., Sobue, G., Inuzuka, T., and Hara, H. (2012) The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific reports* **2**, 573
17. Tanaka, H., Shimazawa, M., Takata, M., Kaneko, H., Tsuruma, K., Ikeda, T., Warita, H., Aoki, M., Yamada, M., Takahashi, H., Hozumi, I., Minatsu, H., Inuzuka, T., and Hara, H. (2013) ITIH4 and Gpx3 are potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* **260**, 1782-1797
18. Dion, P. A., Daoud, H., and Rouleau, G. A. (2009) Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nat Rev Genet* **10**, 769-782
19. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., and et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62
20. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Martinelli, M., Furukawa, Y., and O'Halloran, T. V. (2004) The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status. *J Biol Chem* **279**, 47998-48003
21. McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**, 6049-6055
22. Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., and et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-1775
23. Andersen, P. M. (2006) Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* **6**, 37-46
24. Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H., Jr., Scott, R. W., and Snider, W. D. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* **13**, 43-47
25. Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1997) Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor

- Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Mol Biol Cell* **8**, 1845-1862
26. Mori, K. (2009) Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem* **146**, 743-750
 27. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891
 28. Ito, Y., Yamada, M., Tanaka, H., Aida, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., Inuzuka, T., Takahashi, H., and Hara, H. (2009) Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol Dis* **36**, 470-476
 29. Nakanishi, T., Shimazawa, M., Sugitani, S., Kudo, T., Imai, S., Inokuchi, Y., Tsuruma, K., and Hara, H. (2013) Role of endoplasmic reticulum stress in light-induced photoreceptor degeneration in mice. *J Neurochem* **125**, 111-124
 30. Ojino, K., Shimazawa, M., Izawa, H., Nakano, Y., Tsuruma, K., and Hara, H. (2015) Involvement of endoplasmic reticulum stress in optic nerve degeneration after chronic high intraocular pressure in DBA/2J mice. *J Neurosci Res* **93**, 1675-1683
 31. Ono, Y., Tanaka, H., Takata, M., Nagahara, Y., Noda, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., and Hara, H. (2014) SA4503, a sigma-1 receptor agonist, suppresses motor neuron damage in in vitro and in vivo amyotrophic lateral sclerosis models. *Neuroscience letters* **559**, 174-178
 32. Ono, Y., Tanaka, H., Tsuruma, K., Shimazawa, M., and Hara, H. (2013) A sigma-1 receptor antagonist (NE-100) prevents tunicamycin-induced cell death via GRP78 induction in hippocampal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **434**, 904-909
 33. Tsujii, S., Ishisaka, M., and Hara, H. (2015) Modulation of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* **765**, 154-156
 34. Chen, D., Wang, Y., and Chin, E. R. (2015) Activation of the endoplasmic reticulum stress response in skeletal muscle of G93A*SOD1 amyotrophic lateral sclerosis mice. *Front Cell Neurosci* **9**, 170
 35. Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., and Ichijo, H. (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* **22**, 1451-1464
 36. Oliván, S., Martínez-Beamonte, R., Calvo, A. C., Surra, J. C., Manzano, R., Arnal, C., Osta, R., and Osada, J. (2014) Extra virgin olive oil intake delays the

- development of amyotrophic lateral sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1G93A mice. *J Nutr Biochem* **25**, 885-892
37. Carri, M. T., Valle, C., Bozzo, F., and Cozzolino, M. (2015) Oxidative stress and mitochondrial damage: importance in non-SOD1 ALS. *Front Cell Neurosci* **9**, 41
 38. Ou, S. H., Wu, F., Harrich, D., Garcia-Martinez, L. F., and Gaynor, R. B. (1995) Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol* **69**, 3584-3596
 39. Lagier-Tourenne, C., and Cleveland, D. W. (2009) Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell* **136**, 1001-1004
 40. Watanabe, S., Kaneko, K., and Yamanaka, K. (2012) Accelerated disease onset with stabilized familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked mutant TDP-43 proteins. *J Biol Chem* **288**, 3641-3654
 41. Buratti, E., Dork, T., Zuccato, E., Pagani, F., Romano, M., and Baralle, F. E. (2001) Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *Embo J* **20**, 1774-1784
 42. Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **314**, 130-133
 43. Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Vande Velde, C., Bouchard, J. P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P. F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., and Rouleau, G. A. (2008) TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* **40**, 572-574
 44. Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J. C., Williams, K. L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J. D., Leigh, P. N., Al-Chalabi, A., Miller, C. C., Nicholson, G., and Shaw, C. E. (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **319**, 1668-1672
 45. Yokoseki, A., Shiga, A., Tan, C. F., Tagawa, A., Kaneko, H., Koyama, A., Eguchi, H., Tsujino, A., Ikeuchi, T., Kakita, A., Okamoto, K., Nishizawa, M., Takahashi, H., and Onodera, O. (2008) TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **63**, 538-542
 46. Chen-Plotkin, A. S., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2010) TAR DNA-binding

- protein 43 in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **6**, 211-220
47. Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., and Cleveland, D. W. (2010) TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* **19**, R46-64
 48. Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* **330**, 585-591
 49. Cheah, B. C., Vucic, S., Krishnan, A. V., and Kiernan, M. C. (2010) Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Med Chem* **17**, 1942-1199
 50. Abe, K., Itoyama, Y., Sobue, G., Tsuji, S., Aoki, M., Doyu, M., Hamada, C., Kondo, K., Yoneoka, T., Akimoto, M., and Yoshino, H. (2014) Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **15**, 610-617
 51. Ito, H., Wate, R., Zhang, J., Ohnishi, S., Kaneko, S., Ito, H., Nakano, S., and Kusaka, H. (2008) Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Exp Neurol* **213**, 448-455
 52. Yoshino, H., and Kimura, A. (2006) Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study). *Amyotroph Lateral Scler* **7**, 241-245
 53. Ikeda, K., Iwasaki, Y., and Kaji, R. (2015) Neuroprotective effect of ultra-high dose methylcobalamin in wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **354**, 70-74
 54. Izumi, Y., and Kaji, R. (2007) Clinical trials of ultra-high-dose methylcobalamin in ALS. *Brain Nerve* **59**, 1141-1147
 55. Warita, H., Kato, M., Suzuki, N., Itoyama, Y., and Aoki, M. (2012) Clinical translation of hepatocyte growth factor for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurology* **52**, 1214-1217
 56. van den Berg, L. H. (2014) Therapy of amyotrophic lateral sclerosis remains a challenge. *Lancet Neurol* **13**, 1062-1063
 57. Zhu, S., Stavrovskaya, I. G., Drozda, M., Kim, B. Y., Ona, V., Li, M., Sarang, S., Liu, A. S., Hartley, D. M., Wu, D. C., Gullans, S., Ferrante, R. J., Przedborski, S., Kristal, B. S., and Friedlander, R. M. (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* **417**, 74-78
 58. Joo, I. S., Hwang, D. H., Seok, J. I., Shin, S. K., and Kim, S. U. (2007) Oral

- administration of memantine prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Neurol* **3**, 181-186
59. Kiaei, M., Petri, S., Kipiani, K., Gardian, G., Choi, D. K., Chen, J., Calingasan, N. Y., Schafer, P., Muller, G. W., Stewart, C., Hensley, K., and Beal, M. F. (2006) Thalidomide and lenalidomide extend survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **26**, 2467-2473
 60. Matthews, R. T., Yang, L., Browne, S., Baik, M., and Beal, M. F. (1998) Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8892-8897
 61. Klivenyi, P., Kiaei, M., Gardian, G., Calingasan, N. Y., and Beal, M. F. (2004) Additive neuroprotective effects of creatine and cyclooxygenase 2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **88**, 576-582
 62. Bozik, M. E., Mitsumoto, H., Brooks, B. R., Rudnicki, S. A., Moore, D. H., Zhang, B., Ludolph, A., Cudkovicz, M. E., van den Berg, L. H., Mather, J., Petzinger, T., Jr., and Archibald, D. (2014) A post hoc analysis of subgroup outcomes and creatinine in the phase III clinical trial (EMPOWER) of dextramipexole in ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **15**, 406-413
 63. Selim, A. A. (2009) Osteoactivin bioinformatic analysis: prediction of novel functions, structural features, and modes of action. *Med Sci Monit* **15**, MT19-33
 64. Weterman, M. A., Ajubi, N., van Dinter, I. M., Degen, W. G., van Muijen, G. N., Rutter, D. J., and Bloemers, H. P. (1995) nmb, a novel gene, is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts. *Int J Cancer* **60**, 73-81
 65. Abdelmagid, S. M., Barbe, M. F., Rico, M. C., Salihoglu, S., Arango-Hisijara, I., Selim, A. H., Anderson, M. G., Owen, T. A., Popoff, S. N., and Safadi, F. F. (2008) Osteoactivin, an anabolic factor that regulates osteoblast differentiation and function. *Exp Cell Res* **314**, 2334-2351
 66. Selim, A. A., Abdelmagid, S. M., Kanaan, R. A., Smock, S. L., Owen, T. A., Popoff, S. N., and Safadi, F. F. (2003) Anti-osteoactivin antibody inhibits osteoblast differentiation and function in vitro. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **13**, 265-275
 67. Ripoll, V. M., Meadows, N. A., Raggatt, L. J., Chang, M. K., Pettit, A. R., Cassady, A. I., and Hume, D. A. (2008) Microphthalmia transcription factor regulates the expression of the novel osteoclast factor GPNMB. *Gene* **413**, 32-41
 68. Sheng, M. H., Wergedal, J. E., Mohan, S., and Lau, K. H. (2008) Osteoactivin is a novel osteoclastic protein and plays a key role in osteoclast differentiation and

- activity. *FEBS Lett* **582**, 1451-1458
69. Chung, J. S., Bonkobara, M., Tomihari, M., Cruz, P. D., Jr., and Ariizumi, K. (2009) The DC-HIL/syndecan-4 pathway inhibits human allogeneic T-cell responses. *Eur J Immunol* **39**, 965-974
 70. Chung, J. S., Dougherty, I., Cruz, P. D., Jr., and Ariizumi, K. (2007) Syndecan-4 mediates the coinhibitory function of DC-HIL on T cell activation. *J Immunol* **179**, 5778-5784
 71. Kuan, C. T., Wakiya, K., Dowell, J. M., Herndon, J. E., 2nd, Reardon, D. A., Graner, M. W., Riggins, G. J., Wikstrand, C. J., and Bigner, D. D. (2006) Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, a potential molecular therapeutic target in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* **12**, 1970-1982
 72. Onaga, M., Ido, A., Hasuike, S., Uto, H., Moriuchi, A., Nagata, K., Hori, T., Hayash, K., and Tsubouchi, H. (2003) Osteoactivin expressed during cirrhosis development in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet, accelerates motility of hepatoma cells. *J Hepatol* **39**, 779-785
 73. Rich, J. N., Shi, Q., Hjelmeland, M., Cummings, T. J., Kuan, C. T., Bigner, D. D., Counter, C. M., and Wang, X. F. (2003) Bone-related genes expressed in advanced malignancies induce invasion and metastasis in a genetically defined human cancer model. *J Biol Chem* **278**, 15951-15957
 74. Rose, A. A., Pepin, F., Russo, C., Abou Khalil, J. E., Hallett, M., and Siegel, P. M. (2007) Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. *Mol Cancer Res* **5**, 1001-1014
 75. Tse, K. F., Jeffers, M., Pollack, V. A., McCabe, D. A., Shadish, M. L., Khramtsov, N. V., Hackett, C. S., Shenoy, S. G., Kuang, B., Boldog, F. L., MacDougall, J. R., Rastelli, L., Herrmann, J., Gallo, M., Gazit-Bornstein, G., Senter, P. D., Meyer, D. L., Lichenstein, H. S., and LaRochelle, W. J. (2006) CR011, a fully human monoclonal antibody-auristatin E conjugate, for the treatment of melanoma. *Clin Cancer Res* **12**, 1373-1382
 76. Williams, M. D., Esmaeli, B., Soheili, A., Simantov, R., Gombos, D. S., Bedikian, A. Y., and Hwu, P. (2010) GPNMB expression in uveal melanoma: a potential for targeted therapy. *Melanoma Res* **20**, 184-190
 77. Kanematsu, M., Futamura, M., Takata, M., Gaowa, S., Yamada, A., Morimitsu, K., Morikawa, A., Mori, R., Hara, H., and Yoshida, K. (2015) Clinical significance of glycoprotein nonmetastatic B and its association with HER2 in breast cancer. *Cancer Med* **4**, 1344-1355
 78. Hoashi, T., Sato, S., Yamaguchi, Y., Passeron, T., Tamaki, K., and Hearing, V. J.

- (2010) Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein b, a melanocytic cell marker, is a melanosome-specific and proteolytically released protein. *Faseb J* **24**, 1616-1629
79. Furochi, H., Tamura, S., Mameoka, M., Yamada, C., Ogawa, T., Hirasaka, K., Okumura, Y., Imagawa, T., Oguri, S., Ishidoh, K., Kishi, K., Higashiyama, S., and Nikawa, T. (2007) Osteoactivin fragments produced by ectodomain shedding induce MMP-3 expression via ERK pathway in mouse NIH-3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* **581**, 5743-5750
 80. Rose, A. A., Annis, M. G., Dong, Z., Pepin, F., Hallett, M., Park, M., and Siegel, P. M. (2010) ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/Osteoactivin extracellular domain with angiogenic properties. *PLOS ONE* **5**, e12093
 81. Singh, M., Del Carpio-Cano, F., Belcher, J. Y., Crawford, K., Frara, N., Owen, T. A., Popoff, S. N., and Safadi, F. F. (2010) Functional roles of osteoactivin in normal and disease processes. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **20**, 341-357
 82. Utsunomiya, K., Owaki, K., Okumura, Y., Yano, M., Oto, T., Suzuki, E., Tamura, S., Abe, T., Kohno, S., Ohno, A., Hirasaka, K., Teshima-Kondoh, S., and Nikawa, T. (2012) An intracellular fragment of osteoactivin formed by ectodomain shedding translocated to the nucleoplasm and bound to RNA binding proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 2225-2229
 83. Hu, X., Zhang, P., Xu, Z., Chen, H., and Xie, X. (2013) GPNMB enhances bone regeneration by promoting angiogenesis and osteogenesis: potential role for tissue engineering bone. *J Cell Biochem* **114**, 2729-2737
 84. Murata, K., Yoshino, Y., Tsuruma, K., Moriguchi, S., Oyagi, A., Tanaka, H., Ishisaka, M., Shimazawa, M., Fukunaga, K., and Hara, H. (2014) The extracellular fragment of GPNMB (Glycoprotein nonmelanosoma protein B, osteoactivin) improves memory and increases hippocampal GluA1 levels in mice. *J Neurochem* **132**, 583-594
 85. Ono, Y., Tsuruma, K., Takata, M., Shimazawa, M., and Hara, H. (2016) Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B extracellular fragment shows neuroprotective effects and activates the PI3K/Akt and MEK/ERK pathways via the Na⁺/K⁺-ATPase. *Scientific reports* **6**, 23241
 86. Nakano, Y., Suzuki, Y., Takagi, T., Kitashoji, A., Ono, Y., Tsuruma, K., Yoshimura, S., Shimazawa, M., Iwama, T., and Hara, H. (2014) Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) as a novel neuroprotective factor in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neuroscience* **277**, 123-131
 87. Shimazawa, M., Tanaka, H., Ito, Y., Morimoto, N., Tsuruma, K., Kadokura, M.,

- Tamura, S., Inoue, T., Yamada, M., Takahashi, H., Warita, H., Aoki, M., and Hara, H. (2010) An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS. *PLOS ONE* **5**, e15307
88. Boyer, J. G., Ferrier, A., and Kothary, R. (2013) More than a bystander: the contributions of intrinsic skeletal muscle defects in motor neuron diseases. *Front Physiol* **4**, 356
89. Li, Q., Yokoshi, M., Okada, H., and Kawahara, Y. (2015) The cleavage pattern of TDP-43 determines its rate of clearance and cytotoxicity. *Nat Commun* **6**, 6183
90. Takata, M., Tanaka, H., Kimura, M., Nagahara, Y., Tanaka, K., Kawasaki, K., Seto, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., and Hara, H. (2013) Fasudil, a rho kinase inhibitor, limits motor neuron loss in experimental amyotrophic lateral sclerosis models. *Br J Pharmacol* **170**, 341-351
91. Sakowski, S. A., Lunn, J. S., Busta, A. S., Oh, S. S., Zamora-Berridi, G., Palmer, M., Rosenberg, A. A., Philip, S. G., Dowling, J. J., and Feldman, E. L. (2012) Neuromuscular effects of G93A-SOD1 expression in zebrafish. *Mol Neurodegener* **7**, 44
92. Averill, D. R., Jr. (1973) Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *J Am Vet Med Assoc* **162**, 1045-1051
93. Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P. A., Olby, N. J., Shelton, G. D., Khan, S., O'Brien, D. P., Lindblad-Toh, K., and Coates, J. R. (2009) Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2794-2799
94. Nakamae, S., Kobatake, Y., Suzuki, R., Tsukui, T., Kato, S., Yamato, O., Sakai, H., Urushitani, M., Maeda, S., and Kamishina, H. (2015) Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience* **303**, 229-240
95. Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T., Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M., Yamamoto, M., Yokota, S., Kubodera, T., Tomori, M., Sakaki, K., Enomoto, M., Hirai, Y., Kumagai, J., Yasutomi, Y., Mochizuki, H., Kuwabara, S., Uchihara, T., Mizusawa, H., and Yokota, T. (2012) Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* **135**, 833-846
96. Fujita, K., Kato, T., Yamauchi, M., Ando, M., Honda, M., and Nagata, Y. (1998)

- Increases in fragmented glial fibrillary acidic protein levels in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res* **23**, 169-174
97. Levine, J. B., Kong, J., Nadler, M., and Xu, Z. (1999) Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* **28**, 215-224
 98. Vargas, M. R., and Johnson, J. A. (2013) Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics* **7**, 471-481
 99. Carriedo, S. G., Yin, H. Z., Lamberta, R., and Weiss, J. H. (1995) In vitro kainate injury to large, SMI-32(+) spinal neurons is Ca²⁺ dependent. *Neuroreport* **6**, 945-948
 100. Carriedo, S. G., Yin, H. Z., and Weiss, J. H. (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci* **16**, 4069-4079
 101. Mackenzie, I. R., Bigio, E. H., Ince, P. G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N. J., Kwong, L. K., Forman, M. S., Ravits, J., Stewart, H., Eisen, A., McClusky, L., Kretzschmar, H. A., Monoranu, C. M., Highley, J. R., Kirby, J., Siddique, T., Shaw, P. J., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2007) Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* **61**, 427-434
 102. Robertson, J., Sanelli, T., Xiao, S., Yang, W., Horne, P., Hammond, R., Pioro, E. P., and Strong, M. J. (2007) Lack of TDP-43 abnormalities in mutant SOD1 transgenic mice shows disparity with ALS. *Neuroscience letters* **420**, 128-132
 103. Cai, M., Lee, K. W., Choi, S. M., and Yang, E. J. (2015) TDP-43 modification in the hSOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neurological research* **37**, 253-262
 104. Li, B., Castano, A. P., Hudson, T. E., Nowlin, B. T., Lin, S. L., Bonventre, J. V., Swanson, K. D., and Duffield, J. S. (2010) The melanoma-associated transmembrane glycoprotein Gpnmb controls trafficking of cellular debris for degradation and is essential for tissue repair. *Faseb J* **24**, 4767-4781
 105. Shikano, S., Bonkobara, M., Zukas, P. K., and Ariizumi, K. (2001) Molecular cloning of a dendritic cell-associated transmembrane protein, DC-HIL, that promotes RGD-dependent adhesion of endothelial cells through recognition of heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **276**, 8125-8134
 106. Zhang, P., Liu, W., Yuan, X., Li, D., Gu, W., and Gao, T. (2013) Endothelin-1 enhances the melanogenesis via MITF-GPNMB pathway. *BMB Rep* **46**, 364-369
 107. Kawahara, Y. (2010) Implications of microRNA dysfunction in the pathogenesis

- of ALS. *Clinical neurology* **50**, 979-981
108. Kawahara, Y., and Mieda-Sato, A. (2012) TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 3347-3352
 109. Fallini, C., Bassell, G. J., and Rossoll, W. (2012) The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth. *Hum Mol Genet* **21**, 3703-3718
 110. Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., and Oda, T. (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 602-611
 111. Cashman, N. R., Durham, H. D., Blusztajn, J. K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I. T., Dahrouge, S., and Antel, J. P. (1992) Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn* **194**, 209-221
 112. Matusica, D., Fenech, M. P., Rogers, M. L., and Rush, R. A. (2008) Characterization and use of the NSC-34 cell line for study of neurotrophin receptor trafficking. *J Neurosci Res* **86**, 553-565
 113. Iguchi, Y., Katsuno, M., Takagi, S., Ishigaki, S., Niwa, J., Hasegawa, M., Tanaka, F., and Sobue, G. (2012) Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis* **45**, 862-870
 114. Lu, J., Duan, W., Guo, Y., Jiang, H., Li, Z., Huang, J., Hong, K., and Li, C. (2012) Mitochondrial dysfunction in human TDP-43 transfected NSC34 cell lines and the protective effect of dimethoxy curcumin. *Brain Res Bull* **89**, 185-190
 115. Suzuki, H., Lee, K., and Matsuoka, M. (2011) TDP-43-induced death is associated with altered regulation of BIM and Bcl-xL and attenuated by caspase-mediated TDP-43 cleavage. *J Biol Chem* **286**, 13171-13183
 116. Wu, L. S., Cheng, W. C., and Shen, C. K. (2013) Similar dose-dependence of motor neuron cell death caused by wild type human TDP-43 and mutants with ALS-associated amino acid substitutions. *J Biomed Sci* **20**, 33
 117. Yang, C., Tan, W., Whittle, C., Qiu, L., Cao, L., Akbarian, S., and Xu, Z. (2010) The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism. *PLOS ONE* **5**, e15878
 118. Farrarwell, N. E., Lambert-Smith, I. A., Warraich, S. T., Blair, I. P., Saunders, D. N., Hatters, D. M., and Yerbury, J. J. (2015) Distinct partitioning of ALS associated TDP-43, FUS and SOD1 mutants into cellular inclusions. *Scientific*

reports **5**, 13416

119. Nagano, I., Murakami, T., Manabe, Y., and Abe, K. (2002) Early decrease of survival factors and DNA repair enzyme in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice that express a mutant SOD1 gene. *Life Sci* **72**, 541-548
120. Warita, H., Manabe, Y., Murakami, T., Shiro, Y., Nagano, I., and Abe, K. (2001) Early decrease of survival signal-related proteins in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene. *Apoptosis* **6**, 345-352
121. Leger, B., Vergani, L., Soraru, G., Hespel, P., Derave, W., Gobelet, C., D'Ascenzio, C., Angelini, C., and Russell, A. P. (2006) Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogin-1. *Faseb J* **20**, 583-585
122. Dewil, M., Lambrechts, D., Sciot, R., Shaw, P. J., Ince, P. G., Robberecht, W., and Van den Bosch, L. (2007) Vascular endothelial growth factor counteracts the loss of phospho-Akt preceding motor neurone degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* **33**, 499-509
123. Li, B., Xu, W., Luo, C., Gozal, D., and Liu, R. (2003) VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death. *Brain Res Mol Brain Res* **111**, 155-164
124. Galbiati, M., Crippa, V., Rusmini, P., Cristofani, R., Cicardi, M. E., Giorgetti, E., Onesto, E., Messi, E., and Poletti, A. (2014) ALS-related misfolded protein management in motor neurons and muscle cells. *Neurochem Int* **79**, 70-78
125. Pansarasa, O., Rossi, D., Berardinelli, A., and Cereda, C. (2014) Amyotrophic lateral sclerosis and skeletal muscle: an update. *Mol Neurobiol* **49**, 984-990
126. Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., Belia, S., Wannenes, F., Nicoletti, C., Del Prete, Z., Rosenthal, N., Molinaro, M., Protasi, F., Fano, G., Sandri, M., and Musaro, A. (2008) Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab* **8**, 425-436
127. Wong, M., and Martin, L. J. (2010) Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet* **19**, 2284-2302
128. Arbour, D., Tremblay, E., Martineau, E., Julien, J. P., and Robitaille, R. (2015) Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *J Neurosci* **35**, 688-706
129. Capitanio, D., Vasso, M., Ratti, A., Grignaschi, G., Volta, M., Moriggi, M., Daleno, C., Bendotti, C., Silani, V., and Gelfi, C. (2012) Molecular signatures of

- amyotrophic lateral sclerosis disease progression in hind and forelimb muscles of an SOD1(G93A) mouse model. *Antioxid Redox Signal* **17**, 1333-1350
130. Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M. A., and Glass, J. D. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* **185**, 232-240
 131. Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W., and Caroni, P. (2000) Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* **20**, 2534-2542
 132. Gifondorwa, D. J., Jimenez-Moreno, R., Hayes, C. D., Rouhani, H., Robinson, M. B., Strupe, J. L., Caress, J., and Milligan, C. (2012) Administration of Recombinant Heat Shock Protein 70 Delays Peripheral Muscle Denervation in the SOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Res Int* **2012**, 170426
 133. Hegedus, J., Putman, C. T., and Gordon, T. (2007) Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **28**, 154-164
 134. Krakora, D., Macrander, C., and Suzuki, M. (2012) Neuromuscular junction protection for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int* **2012**, 379657
 135. Moloney, E. B., de Winter, F., and Verhaagen, J. (2014) ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front Neurosci* **8**, 252
 136. Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-Moreno, R., Del Gaizo Moore, V., Yoshikawa, M., Hampton, T. G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R. W., and Milligan, C. (2013) Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav* **3**, 431-457
 137. Crippa, V., Boncoraglio, A., Galbiati, M., Aggarwal, T., Rusmini, P., Giorgetti, E., Cristofani, R., Carra, S., Pennuto, M., and Poletti, A. (2013) Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Front Cell Neurosci* **7**, 234
 138. Oliven, S., Calvo, A. C., Gasco, S., Munoz, M. J., Zaragoza, P., and Osta, R. (2015) Time-Point Dependent Activation of Autophagy and the UPS in SOD1G93A Mice Skeletal Muscle. *PLOS ONE* **10**, e0134830
 139. Onesto, E., Rusmini, P., Crippa, V., Ferri, N., Zito, A., Galbiati, M., and Poletti, A. (2011) Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **118**, 266-280

140. Xiao, Y., Ma, C., Yi, J., Wu, S., Luo, G., Xu, X., Lin, P. H., Sun, J., and Zhou, J. (2015) Suppressed autophagy flux in skeletal muscle of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model during disease progression. *Physiol Rep* **3**
141. Artuso, L., Zoccolella, S., Favia, P., Amati, A., Capozzo, R., Logroscino, G., Serlenga, L., Simone, I., Gasparre, G., and Petruzzella, V. (2012) Mitochondrial genome aberrations in skeletal muscle of patients with motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **14**, 261-266
142. Luo, G., Yi, J., Ma, C., Xiao, Y., Yi, F., Yu, T., and Zhou, J. (2013) Defective mitochondrial dynamics is an early event in skeletal muscle of an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *PLOS ONE* **8**, e82112
143. Fayzullina, S., and Martin, L. J. (2014) Skeletal muscle DNA damage precedes spinal motor neuron DNA damage in a mouse model of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *PLOS ONE* **9**, e93329
144. Palazzolo, I., Stack, C., Kong, L., Musaro, A., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Taylor, J. P., Sumner, C. J., Fischbeck, K. H., and Pennuto, M. (2009) Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* **63**, 316-328
145. Da Cruz, S., Parone, P. A., Lopes, V. S., Lillo, C., McAlonis-Downes, M., Lee, S. K., Vetto, A. P., Petrosyan, S., Marsala, M., Murphy, A. N., Williams, D. S., Spiegelman, B. M., and Cleveland, D. W. (2012) Elevated PGC-1alpha activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS. *Cell Metab* **15**, 778-786
146. Dobrowolny, G., Giacinti, C., Pelosi, L., Nicoletti, C., Winn, N., Barberi, L., Molinaro, M., Rosenthal, N., and Musaro, A. (2005) Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *J Cell Biol* **168**, 193-199
147. Gifondorwa, D. J., Robinson, M. B., Hayes, C. D., Taylor, A. R., Pevette, D. M., Oppenheim, R. W., Caress, J., and Milligan, C. E. (2007) Exogenous delivery of heat shock protein 70 increases lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* **27**, 13173-13180
148. Li, W., Brakefield, D., Pan, Y., Hunter, D., Myckatyn, T. M., and Parsadanian, A. (2007) Muscle-derived but not centrally derived transgene GDNF is neuroprotective in G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp Neurol* **203**, 457-471
149. Nguyen, Q. T., Parsadanian, A. S., Snider, W. D., and Lichtman, J. W. (1998) Hyperinnervation of neuromuscular junctions caused by GDNF overexpression in muscle. *Science* **279**, 1725-1729
150. Suzuki, M., McHugh, J., Tork, C., Shelley, B., Hayes, A., Bellantuono, I.,

- Aebischer, P., and Svendsen, C. N. (2008) Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol Ther* **16**, 2002-2010
151. Nikawa, T., Ishidoh, K., Hirasaka, K., Ishihara, I., Ikemoto, M., Kano, M., Kominami, E., Nonaka, I., Ogawa, T., Adams, G. R., Baldwin, K. M., Yasui, N., Kishi, K., and Takeda, S. (2004) Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *Faseb J* **18**, 522-524
 152. Ogawa, T., Nikawa, T., Furochi, H., Kosyoji, M., Hirasaka, K., Suzue, N., Sairyo, K., Nakano, S., Yamaoka, T., Itakura, M., Kishi, K., and Yasui, N. (2005) Osteoactivin upregulates expression of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts infiltrated into denervated skeletal muscle in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C697-707
 153. Furochi, H., Tamura, S., Takeshima, K., Hirasaka, K., Nakao, R., Kishi, K., and Nikawa, T. (2007) Overexpression of osteoactivin protects skeletal muscle from severe degeneration caused by long-term denervation in mice. *J Med Invest* **54**, 248-254
 154. Tonogai, I., Takahashi, M., Yukata, K., Sato, R., Nikawa, T., Yasui, N., and Sairyo, K. (2015) Osteoactivin attenuates skeletal muscle fibrosis after distraction osteogenesis by promoting extracellular matrix degradation/remodeling. *J Pediatr Orthop B* **24**, 162-169
 155. Psarras, S., Mavroidis, M., Sanoudou, D., Davos, C. H., Xanthou, G., Varela, A. E., Panoutsakopoulou, V., and Capetanaki, Y. (2012) Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model. *Eur Heart J* **33**, 1954-1963
 156. Ahmadi, M., Liu, J. X., Brannstrom, T., Andersen, P. M., Stal, P., and Pedrosa-Domellof, F. (2010) Human extraocular muscles in ALS. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 3494-3501
 157. Audouard, E., Schakman, O., Rene, F., Huettl, R. E., Huber, A. B., Loeffler, J. P., Gailly, P., and Clotman, F. (2012) The Onecut transcription factor HNF-6 regulates in motor neurons the formation of the neuromuscular junctions. *PLOS ONE* **7**, e50509
 158. Huang, C., Tong, J., Bi, F., Zhou, H., and Xia, X. G. (2012) Mutant TDP-43 in motor neurons promotes the onset and progression of ALS in rats. *J Clin Invest* **122**, 107-118
 159. Sunyach, C., Michaud, M., Arnoux, T., Bernard-Marissal, N., Aebischer, J., Latyszenok, V., Gouarne, C., Raoul, C., Pruss, R. M., Bordet, T., and Pettmann, B. (2012) Olesoxime delays muscle denervation, astrogliosis, microglial

- activation and motoneuron death in an ALS mouse model. *Neuropharmacology* **62**, 2346-2352
160. Wootz, H., Enjin, A., Wallen-Mackenzie, A., Lindholm, D., and Kullander, K. (2010) Reduced VGLUT2 expression increases motor neuron viability in Sod1(G93A) mice. *Neurobiol Dis* **37**, 58-66
 161. Kim, J. M., Jeong, J. G., Ho, S. H., Hahn, W., Park, E. J., Kim, S., Yu, S. S., Lee, Y. W., and Kim, S. (2003) Protection against collagen-induced arthritis by intramuscular gene therapy with an expression plasmid for the interleukin-1 receptor antagonist. *Gene Ther* **10**, 1543-1550
 162. Lu, Q., Yao, Y., Yao, Y., Liu, S., Huang, Y., Lu, S., Bai, Y., Zhou, B., Xu, Y., Li, L., Wang, N., Wang, L., Zhang, J., Cheng, X., Qin, G., Ma, W., Xu, C., Tu, X., and Wang, Q. (2012) Angiogenic factor AGGF1 promotes therapeutic angiogenesis in a mouse limb ischemia model. *PLOS ONE* **7**, e46998
 163. Osawa, K., Okubo, Y., Nakao, K., Koyama, N., and Bessho, K. (2010) Osteoinduction by repeat plasmid injection of human bone morphogenetic protein-2. *J Gene Med* **12**, 937-944
 164. Warita, H., Abe, K., Setoguchi, Y., and Itoyama, Y. (1998) Expression of adenovirus-mediated E. coli lacZ gene in skeletal muscles and spinal motor neurons of transgenic mice with a mutant superoxide dismutase gene. *Neuroscience letters* **246**, 153-156
 165. Henry, T. D., Hirsch, A. T., Goldman, J., Wang, Y. L., Lips, D. L., McMillan, W. D., Duval, S., Biggs, T. A., and Keo, H. H. (2011) Safety of a non-viral plasmid-encoding dual isoforms of hepatocyte growth factor in critical limb ischemia patients: a phase I study. *Gene Ther* **18**, 788-794
 166. Matsuki, A., Yamamoto, S., Nakagami, H., Aoki, M., Tamai, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y., and Morishita, R. (2004) No influence of tumor growth by intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid DNA: safety evaluation of therapeutic angiogenesis gene therapy in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 59-65
 167. Rastogi, S., Guerrero, M., Wang, M., Ilsar, I., Sabbah, M. S., Gupta, R. C., and Sabbah, H. N. (2011) Myocardial transfection with naked DNA plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents the progression of heart failure in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H1501-1509
 168. Shigematsu, H., Yasuda, K., Sasajima, T., Takano, T., Miyata, T., Ohta, T., Tanemoto, K., Obitsu, Y., Iwai, T., Ozaki, S., Ogihara, T., and Morishita, R. (2011) Transfection of human HGF plasmid DNA improves limb salvage in Buerger's disease patients with critical limb ischemia. *Int Angiol* **30**, 140-149

169. Taniyama, Y., Morishita, R., Aoki, M., Nakagami, H., Yamamoto, K., Yamazaki, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., and Ogihara, T. (2001) Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther* **8**, 181-189
170. Yuan, Q. Y., Huang, J., Chu, B. C., Li, X. J., Li, X. S., and Si, L. Y. (2012) A targeted high-efficiency angiogenesis strategy as therapy for myocardial infarction. *Life Sci* **90**, 695-702
171. Zhang, Q., Li, Y., and Wu, Z. (2006) Research advance of gene therapy for peripheral arterial disease using hepatocyte growth factor. *Chinese journal of reparative and reconstructive surgery* **20**, 1147-1150
172. Franke, T. F., Kaplan, D. R., and Cantley, L. C. (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**, 435-437
173. Kim, H. J., Kim, N. C., Wang, Y. D., Scarborough, E. A., Moore, J., Diaz, Z., MacLea, K. S., Freibaum, B., Li, S., Molliex, A., Kanagaraj, A. P., Carter, R., Boylan, K. B., Wojtas, A. M., Rademakers, R., Pinkus, J. L., Greenberg, S. A., Trojanowski, J. Q., Traynor, B. J., Smith, B. N., Topp, S., Gkazi, A. S., Miller, J., Shaw, C. E., Kottlors, M., Kirschner, J., Pestronk, A., Li, Y. R., Ford, A. F., Gitler, A. D., Benatar, M., King, O. D., Kimonis, V. E., Ross, E. D., Weihl, C. C., Shorter, J., and Taylor, J. P. (2013) Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* **495**, 467-473
174. Zhou, J., Yi, J., and Bonewald, L. (2015) Muscle-Bone Crosstalk in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Osteoporos Rep* **13**, 274-279
175. Yi, J., Ma, C., Li, Y., Weisleder, N., Rios, E., Ma, J., and Zhou, J. (2011) Mitochondrial calcium uptake regulates rapid calcium transients in skeletal muscle during excitation-contraction (E-C) coupling. *J Biol Chem* **286**, 32436-32443
176. Zhou, J., Yi, J., Fu, R., Liu, E., Siddique, T., Rios, E., and Deng, H. X. (2010) Hyperactive intracellular calcium signaling associated with localized mitochondrial defects in skeletal muscle of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* **285**, 705-712

略語一覽表

α -BTX	α -bungarotoxin
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene; protein kinase B
ALS	amyotrophic lateral sclerosis
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FTLD	frontotemporal lobar degeneration
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GPNMB	glycoprotein transmembrane non metastatic melanoma B
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
MAP-2	microtubule-associated protein-2
MMP	matrix metalloproteinase
NSC-34	neuroblastoma-spinal cord-34
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
SBMA	spinal-bulbar muscular atrophy
SDS	sodium dodecyl sulfate
SMA	spinal muscular atrophy
SMI-32	neurofilament H non-phosphorylated
SOD1	superoxide dismutase 1

SYP	synaptophysin
TBS	tris buffered saline
TDP-43	transactive response (TAR)-DNA-binding protein-43 kDa
T-TBS	tween 20 contained TBS
QOL	quality of life