

脊髄性筋萎縮症における
SMN タンパク質の役割に関する研究

安藤 栞

目次

序論	1 頁
第 1 章 運動ニューロンのライソゾーム機能における SMN タンパク質の役割	6 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 2 章 ミクログリアにおける SMN タンパク質の役割	34 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 3 章 骨格筋分化における SMN タンパク質の役割	57 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料及び方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
総括及び結論	76 頁
謝辞	78 頁
引用文献	79 頁
略語一覧表	87 頁

序論

脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA) は、運動ニューロンの変性及び骨格筋萎縮を主徴とする常染色体劣性遺伝疾患である (1,2)。SMA では筋力低下を起因とした運動障害、関節拘縮、脊柱側弯、摂食・嚥下障害などの進行性の症状が現れ、重症例では呼吸機能障害に至る。SMA は国の難病法が定める「指定難病」のひとつであり、重症度と発症年齢により I 型から IV 型に分類される (Table 1) (3)。

	発症年齢	臨床症状
SMA I型	0～6か月	最重症型であり、重度の筋力低下を認める。治療介入のない場合、生涯坐位を保持することは不可能であるとされる。
SMA II型	7～18か月	未治療の場合生涯起立、歩行は不可能である。
SMA III型	18か月～20歳	軽症型で、一時的に自立歩行を獲得するものの、1歳6か月以降に転倒しやすい、歩行困難といった運動障害が徐々にあらわれる。
SMA IV型	20歳以降	小児期発症例と比較し、進行が緩やかである場合が多い。

Table 1 Clinical classification of SMA (脊髄性筋萎縮症診療マニュアル (4) を改変)

SMA の発症原因は、survival motor neuron (SMN) タンパク質をコードする *SMN1* 遺伝子のホモ接合性欠失または変異に起因する全身性の SMN タンパク質の発現低下である (5)。*SMN1* 遺伝子は第 5 染色体長腕 5q13 に存在し、同領域に同じ SMN タンパク質をコードする相同遺伝子である *SMN2* 遺伝子も存在する (6)。*SMN1* 遺伝子からは完全長の転写物が 100% 産生される一方で、*SMN2* 遺伝子由来の転写産物は 90% がエクソン 7 を欠失しており、不安定な短縮型

SMN タンパク質が翻訳されるため、*SMN1* 遺伝子の変異または欠失を有する SMA 患者では結果として SMN タンパク質の発現量が低下する (Fig. 1) (7, 8)。

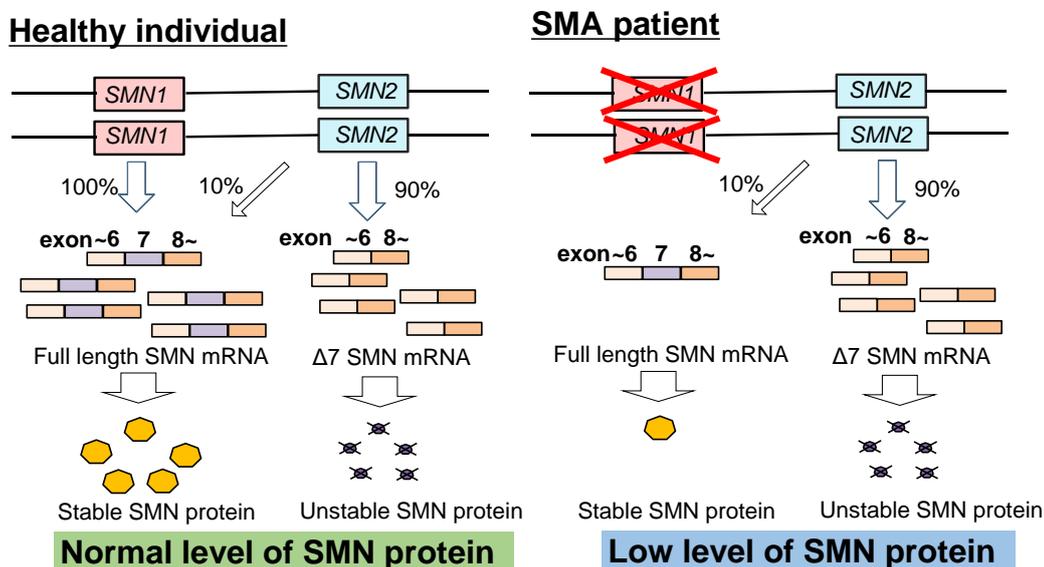


Figure 1 The transcription and translation of *SMN* gene

SMN タンパク質は 294 アミノ残基からなる 38 kDa のタンパク質である。1995 年に *SMN1* 遺伝子が SMA の原因遺伝子として同定された時には、SMN タンパク質は運動ニューロンに特異的なタンパク質であると予想されたが、後に全身の細胞で広く発現することが明らかとなった (9)。SMN タンパク質の機能として最初に解明されたのは、スプライソソームの構成因子である核内低分子 RNA-タンパク質複合体 (small nuclear ribonucleoprotein: snRNP) の合成と輸送を介した RNA スプライシングへの関与である。SMN タンパク質は Gemin タンパク質ファミリーと複合体を形成し細胞質での snRNP の形成に寄与するとともに、引き続き snRNP の核内への輸送を担う (Fig. 2) (10, 11)。その後も SMN タンパク質は様々な細胞活動に関与することが報告され、RNA 代謝 (12)、microRNA 産生 (13)、運動ニューロンにおける β -アクチン mRNA の軸索輸送 (14) などへ関与することが明らかとなっている。一方で、SMA 病態を決定づ

ける SMN タンパク質の機能とその分子基盤については十分に解明されていない。

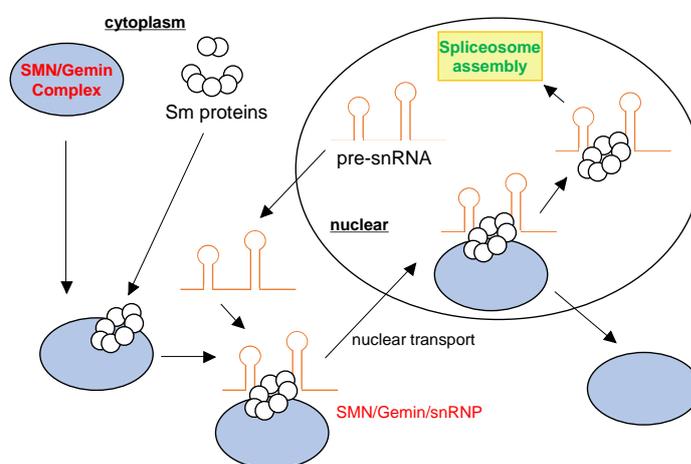


Figure 2 The role of SMN protein in assembly and transport of snRNP

[Workman *et al.*, *Brain Res.* 2012 (15)、及び脊髄性筋萎縮症診療マニュアル (4) を改変]

脊髄性筋萎縮症は 1995 年に原因遺伝子が解明されてからも長年有効な治療薬がなく、リハビリテーションによる機能維持や栄養管理、呼吸管理などが主な治療法とされてきた。2010 年代後半から 2020 年にかけて、ヌシネルセン (Spinraza[®]、バイオジェン)、オナセムノゲンアベパルボベク (Zolgensma[®]、ノバルティスファーマ)、リスジプラム (Evrysdi[®]、ロシュ) という 3 種の新規治療薬が相次いで承認され、薬物療法の選択肢が大きく広がった。これらの治療薬は、いずれも SMN タンパク質の発現量を増加させるという共通点を有する。ヌシネルセンは髄腔内に投与される antisense oligonucleotide (ASO) であり、SMN2 mRNA 前駆体のイントロン 7 に結合し、転写産物へのエクソン 7 の含有を促進することで、機能性の完全長 SMN タンパク質の発現量を増加させる (16)。次いで承認されたオナセムノゲンアベパルボベクはヒト SMN1 遺伝子を組み込んだアデノ随伴ウイルス製剤であり、静脈内に投与されることで患者細胞に SMN1 遺伝子を導入し、完全長 SMN タンパク質の発現量を増加させる (17)。

リスジプラムは 2020 年に FDA により承認された経口投与型の低分子医薬品であり、*SMN2* mRNA 前駆体をターゲットとしたスプライシング修飾作用を有する (18, 19)。これらの治療薬の使用により、多くの患者で運動機能の改善や症状の安定化が認められたが、治療効果が部分的である患者も多く、また副作用に課題もある (20)。したがって健常者と変わらない生活をおくるためには、治療法の改善と最適化が求められている。

以上の背景から SMA 病態の詳細な理解及び治療法のさらなる向上のためには、SMN タンパク質の詳細な機能の解明が必要であると考えられる。過去の検討において、全身の SMN の欠乏を特徴とする *SMNΔ7* マウスが、病態モデルマウスとして SMA 病態の解明のために広く用いられてきた。マウスはヒト *SMN1* 遺伝子に相当するマウス *Smn* 遺伝子を有するが、ヒト *SMN2* 遺伝子に相当する相同遺伝子は有しておらず、マウス *Smn* の欠失は胎生致死を引き起こす。そこで *SMNΔ7* マウスでは、マウス *Smn* 遺伝子を欠失させ、かつヒト *SMN2* 遺伝子及びヒト *SMN2Δ7* cDNA を導入することで、安定的に SMN タンパク質の発現レベルを低下させている (21)。前述の通り SMA 病態において SMN タンパク質の全身性欠乏が認められるが、SMA の主病変部位は脊髄及び骨格筋である。過去の報告において、*SMNΔ7* マウスに対し、ASO を髄腔内投与し、脊髄組織の SMN タンパク質の発現量を増加させた結果、生存期間が延長し、運動機能低下が抑制されたことが報告されている (22)。さらに、Kim らは骨格筋特異的な SMN 欠損マウスが神経筋接合部の障害、骨格筋萎縮を示し、これらの表現型が SMN タンパク質の補充により改善することを報告している (23)。これらの報告は、脊髄及び骨格筋に存在する SMN タンパク質の減少が、SMA の病態形成に大きな影響を及ぼすことを示唆している。したがって、これらの部位における SMN タンパク質の未知の機能を解明することは、医学的意義が

大きいと考えられる。そこで、本研究では SMA の主病変部位である脊髄及び骨格筋における SMN タンパク質の新規機能を明らかにし、治療法開発に貢献することを目的とした。第 1 章では、運動ニューロンにおける SMN タンパク質の欠乏がライソゾームの機能に及ぼす影響について検討した。第 2 章では、脊髄に存在するミクログリアにおける SMN タンパク質の機能について検討した。第 3 章では、SMN タンパク質が骨格筋分化に及ぼす影響について検討をした。

第1章 運動ニューロンのライソゾーム機能における SMN タンパク質の役割

第1節 緒言

ライソゾームは真核生物の細胞内小器官であり、内腔に消化酵素を含み、細胞内に取り込まれた細胞外由来物質や細胞膜表面の受容体などを分解する機能を有する (24, 25)。ライソゾームの構成タンパク質や器官内の酵素をコードする遺伝子は Transcription factor EB (TFEB) という転写因子によりその発現が制御されており、TFEB によって制御されるライソゾーム関連の遺伝子ネットワークは Coordinated Lysosomal Enhancement And Regulation (CLEAR) network と呼ばれている (26)。また、TFEB は成長因子やグルコース、アミノ酸などの細胞内の栄養物質に応答して、細胞増殖や代謝の調節を担っているセリン・スレオニンキナーゼである mammalian/mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR) と協調して、特に飢餓条件下の細胞内代謝の制御、オートファジーの活性化において重要な役割を果たしている (27)。栄養素が豊富でライソゾームにおけるタンパク質の消化が亢進している条件では、ライソゾーム内腔のアミノ酸によって活性化された mTOR 複合体 1 が、下流のシグナルである ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70S6K) や S6 ribosomal protein (S6RP) のリン酸化を介して、タンパク質合成を制御する (28)。

神経変性疾患に共通する特徴として、神経細胞内に異常なタンパク質の蓄積が認められることが挙げられる。正常な神経細胞内では、ライソゾームやオートファジー系が不要なタンパク質や細胞内小器官を処理しており、これらの分解系の異常が病態形成の一因になっていると考えられる。筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) 患者及びアルツハイマー病患者の脳において、TFEB が減少することが報告されており、TFEB シグナル伝達下流のライソゾーム機能の神経変性への関与が示唆されている (29)。さらに、アンドロゲン

受容体遺伝子変異を原因とする球脊髄性筋萎縮症病態で認められるポリグルタミンの異常伸長した変異型アンドロゲン受容体は、TFEB の転写活性を阻害することが報告されており (30)、運動ニューロンの変性においてライソゾームの機能不全の関わり、特に TFEB 転写制御の関与が示唆されている。一方、SMA 病態や運動ニューロン変性におけるライソゾーム機能や TFEB についてはこれまで多くは明らかになっていなかった。

本章では、SMA 病態形成におけるライソゾーム機能の役割について、特に TFEB とそのシグナル伝達経路に焦点を当て、マウス運動ニューロン様細胞 NSC-34 とマウス SMA モデルを用いて、SMN タンパク質の欠乏が TFEB の挙動及びライソゾームの機能に及ぼす影響について検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は以下の通りである。6-amino hexanoic acid、tris hydrochloride、sodium chloride、sodium dodecyl sulfate (SDS)、protease inhibitor cocktail、mouse anti- β -actin、phosphatase inhibitor cocktail II、phosphatase inhibitor cocktail III、Igepal CA-630、ゼラチンは Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)、proteinase K solution は Qiagen (Duesseldorf, Germany)、ペニシリン、ストレプトマイシンは Meiji Seika ファルマ株式会社 (Tokyo, Japan)、2-プロパノール、エタノール、ImmunoStar LD は富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan)、LipofectamineTM RNAiMAX Reagent、*Smn* 標的 RNA オリゴ、*Tfeb* 標的 RNA オリゴ、Opti-MEM、Stealth RNAiTM siRNA Negative Control Med GC Duplex #2、BCA protein assay kit、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat antibody、horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat antibody、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody、Alexa Fluor 488 donkey anti-rat antibody、Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit antibody、ProLong Gold Antifade reagent、DQ-Red BSA、Live Cell Imaging Solution は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、Blocking One-P はナカライテスク (Kyoto, Japan)、bovine serum albumin は Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)、Can Get Signal Solution 1、Can Get Signal Solution 2 は東洋紡 (Osaka, Japan)、mouse anti-SMN antibody は BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)、rabbit anti-TFEB antibody は Proteintech (Rosemont, IL, USA)、rat anti-Lamp1 antibody は Abcam (Cambridge, UK)、goat anti-cathepsin D antibody は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)、rabbit anti-microtubule-associated protein light chain 3 antibody、rabbit anti- β -Tubulin III は

GeneTex (Irvine, CA, USA) 、 rabbit anti-p-mTOR antibody、 rabbit anti-mTOR antibody、 rabbit anti-p-p70S6K antibody、 rabbit anti-p70S6K antibody、 rabbit anti-p-S6RP antibody、 rabbit anti-S6RP antibody は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)、 rabbit anti-green fluorescent protein antibody は MBL Life Science (Aichi, Japan)、 NucleoSpin[®] RNA 、 PrimeScript RT reagent Kit、 TB Green Premix Ex Taq II は Takara (Shiga, Japan)、 スライドガラスは松浪硝子工業 (Osaka, Japan)、 PFA は Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA)、 Hoechst 33342 は株式会社 同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan)、 Phalloidin-iFluor 594 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

マウス *Smn* (mouse SMN: *mSmn*) 遺伝子のヘテロ欠損型マウス (*mSmn*^{+/-}、*SMN2*^{+/+}、*SMNΔ7*^{+/+}) を Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入した。実験には、野生型 (*mSmn*^{+/+}、*SMN2*^{+/+}、*SMNΔ7*^{+/+}; WT マウス) 及び内在性 *mSmn* ホモ欠損マウス (*mSmn*^{-/-}、*SMN2*^{+/+}、*SMNΔ7*^{+/+}; *SMNΔ7* マウス) を使用した。WT 及び *SMNΔ7* マウスは、ヘテロ欠損型マウス同士を交配することによって維持した。ホモ欠損型マウスのみが SMA 病態を表現型として有するマウスであり、以降 *SMNΔ7* マウスと記載する。飼育環境は設定温度: 24°C (許容範囲: 22 ~ 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) に維持し、すべてのマウスは自由給水下に固形飼料を与えて飼育した。すべての実験は、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験申請を行い、許可を受けた上で実施した。また遺伝子改変動物は、岐阜薬科大学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、許可を得て使用し

た。

2-2-2 SMN Δ 7 マウスの遺伝子型解析

野生型マウス、ヘテロ欠損型マウス及び SMN Δ 7 マウスの遺伝子型を解析するために、各マウスの尻尾を先端から 5 mm 切断した。切断した尻尾は Cell lysis solution (25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0、1% SDS) 及び Proteinase K により溶解させ、7.5 M 酢酸アンモニウム溶液により蛋白質を除去し、2-プロパノール、70%エタノールにより DNA を抽出した。その後、以下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。

5'-CTCCGGGATATTGGGATTG -3' (m*Smn* forward),

5'-GGTAACGCCAGGGTTTTCC-3' (m*Smn* Reverse),

5'-TTTCTTCTGGCTGTGCCTTT-3' (lacZ Reverse)

増幅反応は TAKARA PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan) を用いて 35 サイクル行った。1 サイクルの構成は DNA 変性: 94°C 30 秒、アニーリング: 62°C 60 秒、エクステンション: 72°C 60 秒とした。

2-2-3 細胞培養

マウス運動ニューロン様細胞 (NSC-34, Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan) は、10% FBS、100 U/ml penicillin 及び 100 µg/ml streptomycin を添加した DMEM (high glucose)を用いて、37°C、5% CO₂ 中にて培養した。2~3 日おきにトリプシン処置による継代を行った。

2-2-4 RNA 干渉

遺伝子導入は、Lipofectamine[™] RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific)

を用い、添付マニュアルに従って行った。*Smn* 標的 RNA オリゴ (siSMN#1, Cat# Smn1MSS209213; siSMN#2, Cat# Smn1MSS209214) と *Tfeb* 標的 RNA オリゴ (siTFEB#1, Cat# TfebMSS238271; siTFEB#2, Cat# TfebMSS238272) は、それぞれ Thermo Fisher Scientific 社より購入した。NSC-34 細胞は抗生物質不含 10% FBS-DMEM (high glucose) を用いて 96 well plate、もしくは 12 well plate に播種後、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。遺伝子導入用培地 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 中に Lipofectamine 及び Stealth RNAi™ small interfering RNA (siRNA, Thermo Fisher Scientific, Calsbad, CA, USA) の混合溶液を作製し、終濃度が 2 nM Stealth siRNA となるように培地に添加し、一定期間 37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、実験に供した。また、陰性対照として Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Med GC Duplex #2 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2-2-5 ウェスタンブロット解析

2-2-5-1 試料採取

In vivo のサンプリングには protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 2 及び 3 を含む RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] を用いた。マウス腰髄を摘出後、マイクロチューブの中で急速凍結した。サンプルは蛋白質抽出まで -80°C に保存した。蛋白質抽出には上記試薬を脊髄に対して 100 µL 使用し、ホモジナイザー (Physoctron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて 30 秒間破碎、均質化した。その後、20 分間水中に静置させ、12,000 × g、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、蛋白質抽出液とした。

In vitro サンプルは、培地を取り除き、PBS で一回洗浄した後、protease inhibitor

cocktail、phosphatase inhibitor 2 及び 3 を含む RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] の混合液を各 well に 25 μ L ずつ添加し、細胞をピペットの先端でかきとって回収した。15 分間氷中に静置した後、4°C、12,000 \times g で 15 分間遠心分離し、その上清をタンパク質抽出液とした。

2-2-5-2 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA protein assay kit を用いて行った。標準曲線の作製のため、0、25、125、250、500、750、1,000、1,500 μ g/mL の濃度に調製した bovine serum albumin を用いた。それぞれのタンパク質抽出液に Working reagent を添加した後、37°C のインキュベーター中で 30 分間反応させ、その後 532 nm の吸光度を Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。タンパク質濃度に基づいて Sample buffer solution 及び RIPA buffer を用いてタンパク質濃度を均一にしたサンプルを調製し、-80°C に保存した。

2-2-5-3 電気泳動及び転写

タンパク質濃度を均一にしたサンプルを氷上で融解させた。分子量マーカー 2.5 μ L、各サンプル 2 μ g の量を 1 well あたり添加した。サンプルを添加後、ゲル一枚当たり 20 mA で 80 分間電気泳動した。電気泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-amino hexanoic acid) に 15 分間浸漬した。転写膜 Immobilon-P membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) はメタノールに 30 秒間浸漬し、15 分間 MilliQ に浸漬し、anode buffer 2 (25 mM Tris) に 15 分間浸漬した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M Tris) に浸漬したろ紙、anode buffer 2 に浸漬したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の cathode buffer に浸漬したろ紙の順に重ね、転

写膜 1 枚当たり 100 mA で 60 分間転写した。

2-2-5-4 ウェスタンブロッティング

転写後の膜は、0.05 % Tween 20 含有 50 mM Tris-buffered saline (TBS-T: 10 mM Tris, 40 mM Tris hydrochloride, 150 mM NaCl) で洗浄し、Block One-P に浸漬し、10 分間ブロッキングした。その後、TBS-T で洗浄し、Can get signal solution 1 で希釈した一次抗体溶液に浸漬し、4°C で一晩反応させた。その後、TBS-T で洗浄し、Can get signal solution 2 で希釈した二次抗体溶液に浸漬し、室温で 3 時間反応させた。TBS-T で洗浄した後、ImmunoStar LD に 10 分間浸漬し、Amersham Imager 680 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA) 及び the Amersham Imager 680 Analysis Software (GE Healthcare Life Science) を用いてバンドを検出した。

一次抗体には、mouse anti-SMN antibody (1:1,000 dilution; BD Bioscience, Cat#610647)、rabbit anti-TFEB antibody (1:5,000 dilution; Proteintech, Rosemont, IL, USA, Cat# 13372-1-AP)、mouse anti- β -actin antibody (1:100,000 dilution; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Cat# A2228)、rat anti-Lamp1 antibody (1:10,000 dilution; Abcam, Cambridge, UK, Cat# 1b25245)、goat anti-cathepsin D antibody (1:5,000 dilution; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, Cat# AF1029-SP)、rabbit anti-microtubule-associated protein light chain 3 antibody (LC3B, 1:10,000 dilution, GeneTex, Cat# GTX127375)、rabbit anti-p-mTOR antibody (Ser 2448, 1:10,000 dilution, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, Cat# 2971S)、rabbit anti-mTOR antibody (1:10,000 dilution, Cell Signaling Technology, Cat# 2972S)、rabbit anti-p-p70S6K antibody (1:500 dilution, Cell Signaling Technology, Cat# 9234S)、rabbit anti-p70S6K antibody (1:1,000 dilution, Cell Signaling Technology, Cat# 9202S)、

rabbit anti-p-S6RP antibody (1:1,000 dilution, rabbit, Cell Signaling Technology, Cat# 4856S)、rabbit anti-S6RP antibody (1:2,000 dilution, Cell Signaling Technology, Cat# 2317S) 及び rabbit anti-green fluorescent protein antibody (1:50,000 dilution, GFP, MBL Life Science, Aichi, Japan) を用いた。二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1000 dilution; 32460, Invitrogen) 、 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (1:1,000 dilution; 32430, Thermo Fisher Scientific)、 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat antibody (1:1,000 dilution; Invitrogen) 及び horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat antibody (1:1,000 dilution; Invitrogen) を用いた。

2-2-6 リアルタイム RT-PCR

2-2-6-1 RNA 抽出

RNA 抽出には NucleoSpin® RNA (Takara) を用いた。サンプルに 350 μ L の RA1 buffer を加え、タンパク質除去用のシリカメンブランカラムに移し、12,000 $\times g$ で 2 分間遠心した。カラムを取り除き、ろ液に 350 μ L の 70%エタノールを加え、十分に混合した後、RNA 吸着用のシリカメンブランカラムに移し、12,000 $\times g$ で 1 分間遠心した。新しいチューブにカラムを移し、350 μ L の脱塩用溶液 MDB buffer を加え、12,000 $\times g$ で 1 分間遠心した。その後、90 μ L の Reaction buffer と 10 μ L の DNase I 希釈溶液を加え、室温で 15 分間インキュベートした。200 μ L の RA2 wash buffer を加え、12,000 $\times g$ で 1 分間遠心した。回収用チューブを交換し、600 μ L の RA3 wash buffer を加え、12,000 $\times g$ で 1 分間遠心した。さらに、回収用チューブを交換し、250 μ L の RA3 wash buffer を加え、12,000 $\times g$ で 2 分間遠心した。最後に、RNA 溶液回収用のチューブにカラムをセットし、30 μ L の RNase-free H₂O を加え、12,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、total

RNA を抽出した。

2-2-6-2 RNA 逆転写

抽出した total RNA 濃度は NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) を用いて 260 nm 波長の分光測定から求め、RNase-free H₂O を加えて各サンプルの RNA 濃度が等しくなるよう調整した。RNA 逆転写には PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara) を用いた。

6.5 μ L の total RNA に 2 μ L の 5 × PrimeScript Buffer (for Real Time)、0.5 μ L の PrimeScript RT Enzyme Mix I、0.5 μ L の Oligo dT Primer (50 μ M)、0.5 μ L の Random 6 mers (100 μ M) を加え、混合した。その後、Takara PCR Thermal Cycler Dice® Gradient を用いて、72°C で 15 分間の逆転写反応、続いて 85°C で 5 秒間の逆転写酵素失活反応を行い、cDNA を作製した。

2-2-6-3 リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR には TB Green Premix Ex Taq II (Takara) を用いた。10 μ L の SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) に各プライマー (0.2 μ M)、MilliQ、cDNA 溶液をそれぞれ加え、全量を 20 μ L に調製した。その後、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara) を用いて 95°C、30 秒を 1 サイクル、95°C で 5 秒間、60°C で 30 秒間を 35 サイクルの PCR 反応を行った。以下のプライマーをそれぞれ用いた。

Gapdh-forward: 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'

Gapdh-reverse: 5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'

Tfeb- forward: 5'-TCAGAAGCGAGAGCTAACAGAT-3'

Tfeb- reverse: 5'-TGTGATTGTCTTTCTTCTGCCG-3'

Lamp1- forward: 5'- CAGCACTCTTTGAGGTGAAAAAC-3'

Lamp1- reverse: 5'-ACGATCTGAGAACCATTCGCA-3'

Ctsd- forward: 5'- GCTTCCGGTCTTTGACAACCT-3'

Ctsd- reverse: 5'- CACCAAGCATTAGTTCTCCTCC-3'

すべての反応は Gapdh による内部補正を行った後、その平均値を用いた。

2-2-7 細胞免疫染色

NSC-34 細胞は 0.2%ゼラチン (Sigma Aldrich, G2500) を用いてコートした 12-mm スライドガラス (No. 1-S, 松浪硝子工業, Osaka, Japan) 上で培養した。PBS で細胞を洗浄した後、室温で 10 分間、4% PFA (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) で固定し、50 mM NH₄Cl PBS でクエンチングを行った。続いて、0.5% bovine serum albumin (BSA)、0.5% saponin 及び 0.2 mg/ml sodium azide 含有 PBS を用いて 30 分間ブロッキングした。その後一次抗体を 30 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄後、二次抗体及び 8.1 μM Hoechst 33342 を 30 分間反応させた。1 次抗体は rabbit anti-TFEB antibody (1:200 dilution; Proteintech, Rosemont, IL, USA, Cat# 13372-1-AP)、rat anti-Lamp1 antibody (1:400 dilution; Abcam, Cambridge, UK, Cat# 1b25245)、rabbit anti-β-Tubulin III (1:2,000 dilution, GeneTex Inc., Irvine, CA, USA, Cat# GTX130245) を用いた。二次抗体には Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody (dilution, 1:400), Alexa Fluor 488 donkey anti-rat antibody (dilution, 1:400)、Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit antibody (dilution, 1:400) を Thermo Fisher Scientific 社から購入し、使用した。F-actin の染色時には、二次抗体とともに Phalloidin-iFluor 594 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, 1:2,000) を反応させ、ProLong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific)を

用いて封入した。二次抗体以降の作業は遮光条件下で行った。試料は Zeiss LSM700 microscope (Carl Zeiss, Germany) を使用して撮影した。

2-2-8 ライソゾーム活性測定

ライソゾームの活性は The DQ-Red BSA (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。試料となる細胞は、37°C 条件下で 3 時間、10 $\mu\text{g/ml}$ DQ-Red BSA と反応させた。測定の 15 分前に、8.1 μM Hoechst 33342 を添加した。ライブセルイメージングのため、培地を 5.5 mM グルコース及び 1% FBS 含有 Live Cell Imaging Solution (LCIS, Thermo Fisher Scientific) に交換した。画像は Lionheart FX 自動デジタル顕微鏡 (Bio Tek Instruments, Winooski, VT, USA) を用いて撮影し、Gen5 software (Bio Tek Instruments) により解析した。

2-2-9 プラスミド DNA のトランスフェクション

pEGFP-N1-TFEB は Addgene (Watertown, MA, USA, Addgene plasmid# 38119) から、pAcGFP-C1 vector はタカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan, Cat# CLN632470) からそれぞれ購入した。プラスミド DNA の遺伝子導入は LipofectamineTM 2000 を用い、添付マニュアルにそって行った。遺伝子導入用培地 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 100 μL 中に 1.5 μL の Lipofectamine 及び 0.5 μg のプラスミドを含む混合溶液を作製し、室温で 20 分インキュベートした後、細胞を播種した 12 well plate に添加した。その後 37°C、5% CO₂ 条件下で一定期間培養し、実験に供した。

2-2-10 統計解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SEM)で示した。統計学的な比較は、SPSS

(IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's *t*-test により行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

第3節 結果

3-1 マウス運動ニューロン様細胞における SMN のノックダウンによる TFEB の発現への影響

運動ニューロンにおける SMN タンパク質の発現が TFEB に及ぼす影響を検証するため、マウス運動ニューロン様細胞 NSC-34 において siRNA により SMN の発現をノックダウンした。siRNA のトランスフェクションから 24、48、72 時間後のいずれのタイムポイントにおいても、SMN タンパク質の発現量が有意に減少した (Fig. 3A, B)。続いて TFEB の発現量を評価した結果、siRNA のトランスフェクションから 48 時間後及び 72 時間後のタイムポイントにおいて、SMN のノックダウンにより TFEB の発現量が有意に減少した (Fig. 3A, C)。siRNA のトランスフェクションから 48 時間後の *Tfeb* mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により検証したところ、SMN のノックダウンにより *Tfeb* mRNA 量は有意に減少した (Fig. 3D)。定常状態では TFEB は細胞質に局在しており、活性化すると核内へと輸送されライソゾーム関連遺伝子の転写を促進する (26)。抗 TFEB 抗体を用いた免疫染色法により、NSC-34 細胞における TFEB の局在を検証したところ、抗 TFEB 抗体由来の蛍光輝点が細胞質及び核内で確認された (Fig. 3E)。一方、SMN のノックダウンによりこれらの蛍光輝点が減少した (Fig. 3E, F)。これらの結果から、運動ニューロンにおいて SMN タンパク質は TFEB の発現を制御しており、SMA 病態において SMN タンパク質の発現の減少により TFEB の発現が減少することが示唆された。

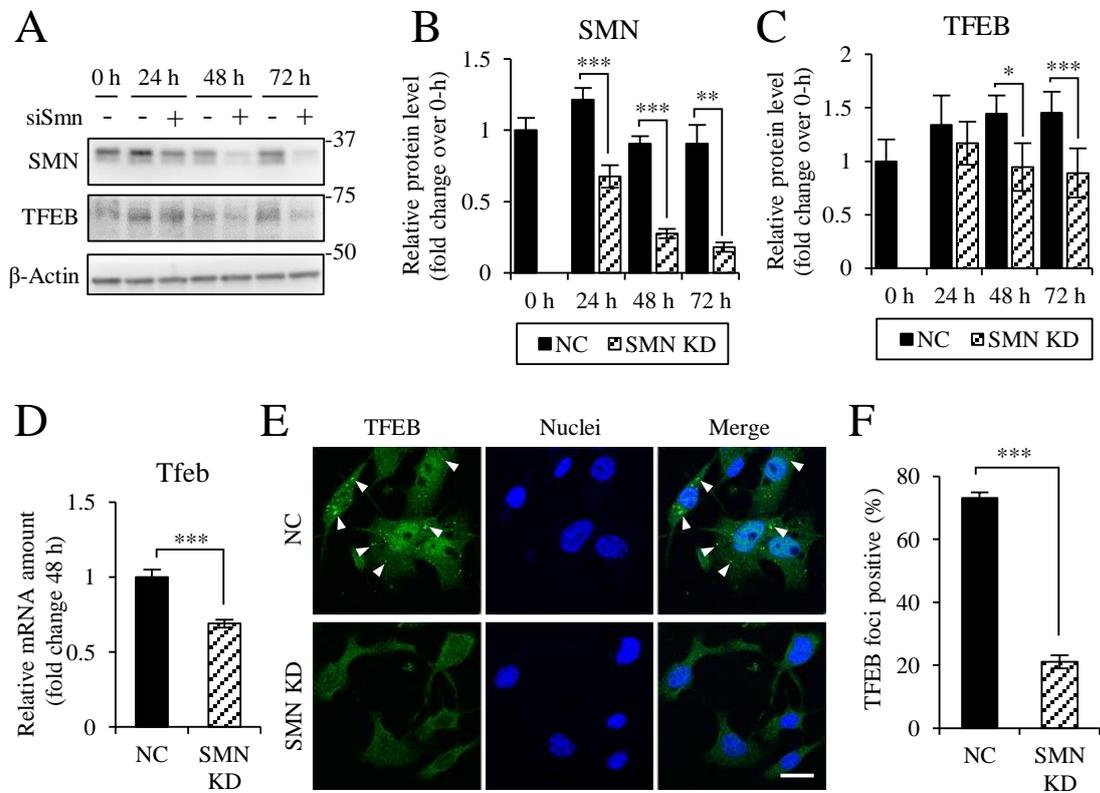


Figure 3 TFEB expression levels decrease in SMN-depleted NSC-34 motoneuron-like cells.

(A-C) Immunoblotting of cell lysates, obtained from NSC-34 cells, transfected with either negative control RNA (- or NC) or siRNA against SMN (siSmn + or SMN KD), for the indicated times. Representative images of the blots are shown in A. The quantitation of SMN (B) and TFEB (C) signals were normalized against β -actin and are shown the fold-change compared with 0 h. (D) The mRNA level of *Tfeb*, at the 48 h time point, normalized against *Gapdh*. (E) Immunostaining for TFEB (green), in SMN KD cells. Nuclei are stained with Hoechst 33342 (blue). Arrowheads represent TFEB-positive foci. Scale Bar = 20 μ m. (F) The ratio of TFEB foci-positive cells, in either NC or SMN KD. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 6). * P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.001 vs. NC (Student's *t*-test).

3-2 分化後のマウス運動ニューロン様細胞におけるライソゾームの分布と形態

TFEB はライソゾームの新生と分布において重要な機能を担うことから、NSC-34 細胞における SMN のノックダウンは、TFEB の発現低下を介して、ライソゾームの分布や形態に影響を及ぼすのではないかと仮説を立てた。NSC-34 細胞は、*all-trans retinoic acid* の存在下で分化し、神経突起を伸長させることが知られている (31)。本検討では、siRNA を用いて SMN をノックダウンさせた後、*all-trans retinoic acid* の添加により NSC-34 細胞を分化させ、その後ライソゾームマーカーである Lamp1 の発現を免疫染色法により評価した (Fig. 4A)。分化させた NSC-34 細胞は神経マーカーである β -tubulin III を発現しており、F-actin によって標識される神経突起を有していた (Fig. 4B-D)。コントロール群では神経突起遠位部において、Lamp1 陽性の顆粒が多数認められた (Fig. 4B)。対照的に SMN ノックダウン群では、神経突起遠位部においてそのような構造体は認められなかった (Fig. 4C)。一方、SMN ノックダウン群の細胞体において、膨張し形態が異常となったライソゾームの蓄積が認められた (Fig. 4C)。さらに TFEB のノックダウンによっても、同様のライソゾームの形態及び分布への影響が認められた (Fig. 4D)。これらの結果から、SMN タンパク質が TFEB の発現制御を介して、ライソゾームの機能を制御することが示唆された。

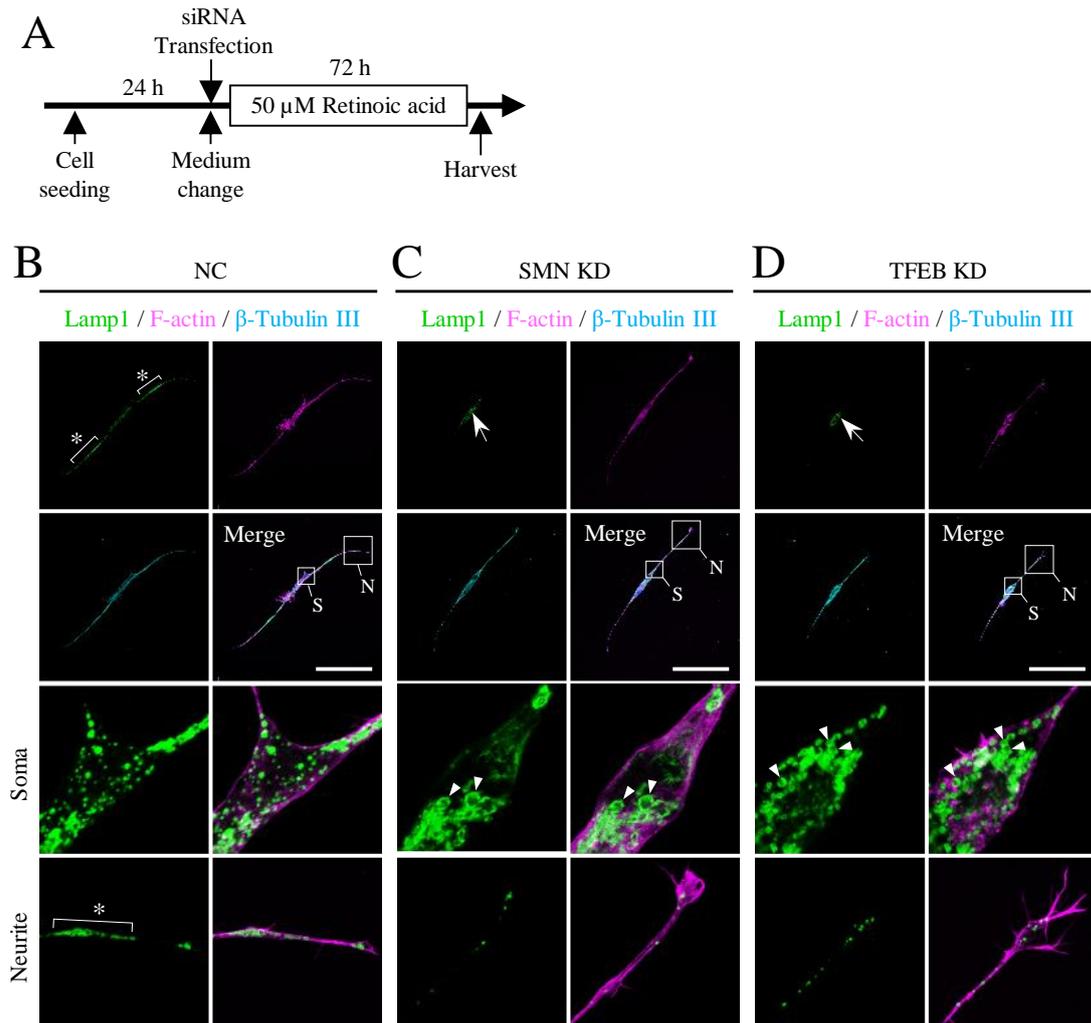


Figure 4 SMN and TFEB KD alter the distribution and morphology of lysosomes in differentiated NSC-34 cells.

(A) A schematic diagram for the timeline of transfection and induction. NSC-34 cells were differentiated by treatment with all-trans retinoic acid, after transfection with siRNA against either SMN or TFEB or negative control RNA (NC). (B-D) Representative images of immunostaining against Lamp1 (green, top left), F-actin (magenta, top right), Tubulin III beta (cyan, second lane left), and Hoechst 33342 (blue). The boxed regions at the soma (S) and neurites (N) are enlarged in the third and bottom rows, respectively. Asterisks and arrows represent lysosomes at the neurites and soma, respectively. Arrowheads indicate the abnormal structures of lysosomes. Scale bars = 100 μ m.

3-3 ライソゾーム関連因子及びライソゾーム活性の評価

本章 3-1 の結果より、SMN をノックダウンさせた NSC-34 細胞では TFEB の発現が減少することを明らかにした。TFEB はライソゾーム関連遺伝子群の発現を制御することが知られているため (26)、本項では NSC-34 細胞で SMN をノックダウンした際のライソゾーム関連因子の発現について検証した。リアルタイム RT-PCR 法の結果、SMN のノックダウンにより、ライソゾーム関連遺伝子である *Lamp1* 及び *Ctsd* の mRNA 発現量がいずれも有意に減少した (Fig. 5A)。またウエスタンブロット法によりタンパク質レベルでの発現量を検証した結果、siRNA のトランスフェクション 72 時間後に、コントロール群と比較し SMN ノックダウン群において *Lamp1* 及び *cathepsin D (CTSD)* の発現量が有意に減少した (Fig. 5B-D)。

TFEB はライソゾーム関連遺伝子に加えオートファジー関連遺伝子の発現を制御し、オートファジーを誘導する (32)。コントロール群と比較し SMN ノックダウン群では LC3-ii/LC3-i 比が増加しており (Fig. 5B, E)、オートファゴソームが蓄積していることが示唆された。続いて、DQ-Red BSA を用いて、ライソゾーム活性を評価した。コントロール群と比較し、SMN ノックダウン群において DQ-Red BSA 由来の蛍光輝度値の有意な減少が認められた (Fig. 5F)。これらの結果から、NSC-34 細胞において SMN タンパク質がライソゾーム関連遺伝子の発現を制御するとともに、一連のオートファジー活性を制御することが示唆された。

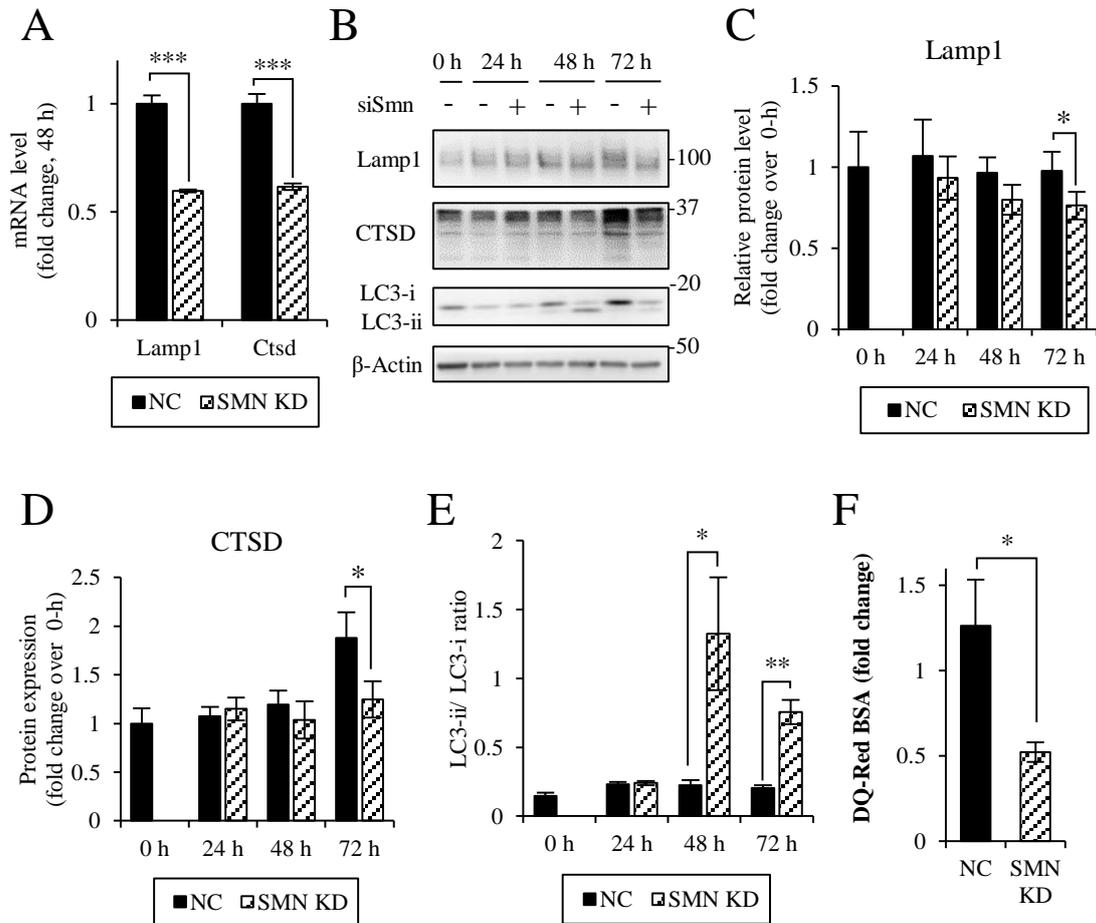


Figure 5 SMN KD affects lysosome-related gene expression, lysosomal degradation, and autophagy flux.

(A) The mRNA levels of Lamp1 and CtSD at the 48 h time point, normalized against Gapdh. (B) Immunoblotting of NSC-34 cell lysates, transfected with either negative RNA (- or NC) or siRNA against SMN (siSmn + or SMN KD), for the indicated time points. (C) The quantification of the signals for Lamp1 in B. (D) The quantification of the signals for CTSD in B. The signals were normalized against that for β -actin and are shown as the fold-change relative to the level at 0 h. (E) The ratio of LC3-ii (lower band) vs LC3-i (upper band). (F) The fluorescent intensity of DQ-Red BSA in NSC-34 cells, transfected with negative control or siSmn, for 72 h, shown as the fold-change vs. non-transfected cells. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 6). * P < 0.05, *** P < 0.001 vs. NC (Student's t -test).

3-4 TFEB の強制発現によるライソゾーム関連因子及び mTOR シグナル関連因子の発現

NSC-34 細胞の SMN ノックダウンによるライソゾーム関連因子の発現低下が、TFEB を介した現象か否かを明らかにするため、SMN ノックダウン条件下でプラスミド DNA のトランスフェクションにより TFEB を発現させた (Fig. 6A, B)。TFEB プラスミド DNA の導入により、SMN ノックダウンによる LC3-ii/LC3-i 比の増加が部分的に抑制されるとともに (Fig. 6B, C)、Lamp1 の発現低下が抑制された (Fig. 6B, D)。一方、SMN ノックダウン条件下で TFEB を発現させても SMN の発現量に変化は認められなかった (Fig. 6B)。これらの結果より、NSC-34 細胞における SMN のノックダウンにより認められたライソゾームの活性低下及びオートファジー障害は、SMN 欠損による直接的な作用ではなく、TFEB の発現減少を介する可能性が高いと考えられる。

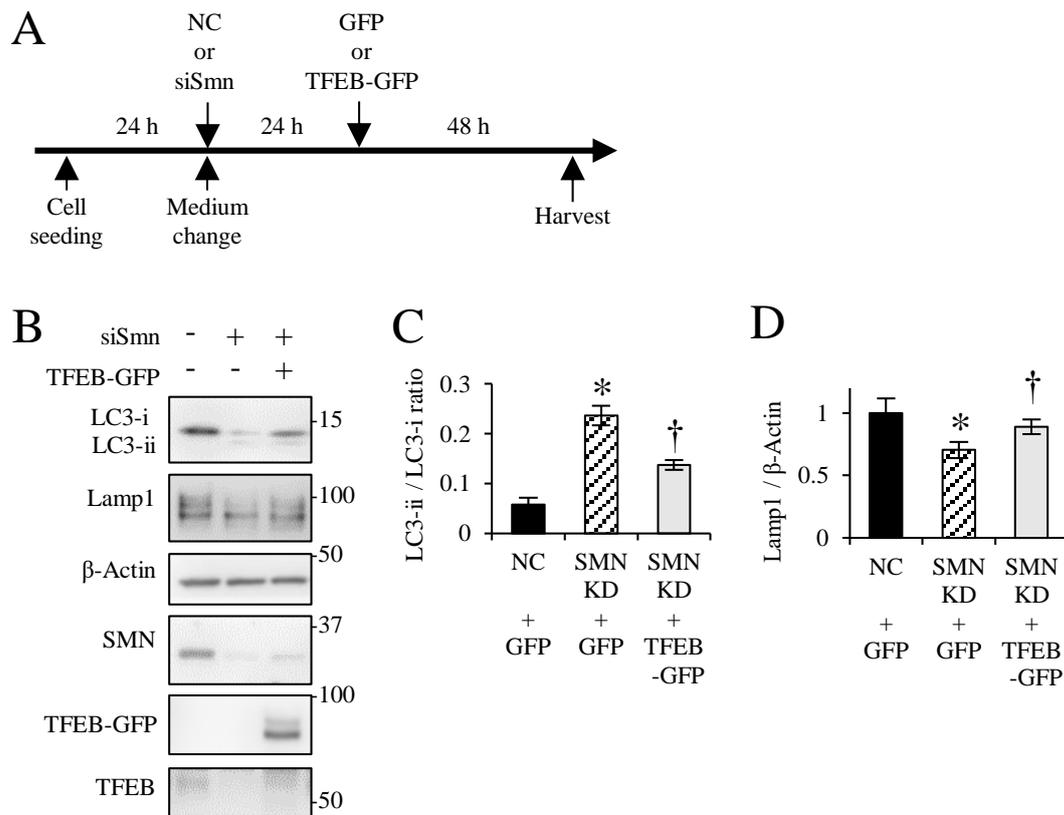


Figure 6 Exogenous expression of TFEB rescues the depletion SMN in NSC-34 cells.

(A) The experimental design for siRNA and plasmid DNA transfection. After 24 h transfection with either negative control (NC) or SMN (siSmn) siRNA, cells were transfected with either TFEB-GFP or GFP and incubated for an additional 48 h. (B-D) The harvested cell lysates were analyzed by immunoblotting. Representative images are shown in B. The ratio of LC3-ii vs LC3-i and the fold increase in Lamp1 levels, normalized against the β -actin level, are shown in C and D, respectively. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 4 or 5). * P < 0.05 vs. NC + GFP (Student's t -test). † P < 0.05 vs. SMN KD + GFP (Student's t -test).

3-5 mTOR シグナル関連因子の発現への影響

本章 3-1、3-2 及び 3-3 の結果から、NSC-34 細胞における SMN のノックダウンにより、ライソゾーム機能が低下することが明らかになった。ライソゾームは mTOR シグナルの伝達において、重要な機能を担うため (27)、SMN ノックダウン条件下の NSC-34 細胞における mTOR シグナル関連因子の発現について検討した。siRNA のトランスフェクションから 48、72 時間後のタイムポイントにおいて、SMN のノックダウンによりリン酸化 mTOR の発現量が有意に減少した (Fig. 7A, B)。さらに同条件下で、mTOR の下流のエフェクター因子である p70S6K 及び S6RP のリン酸化体の発現割合を検討した結果、いずれも有意に減少した (Fig. 7A, C, D)。これらの結果から、運動ニューロンにおける SMN の発現減少により、細胞内 mTOR シグナルが減弱することが示唆された。

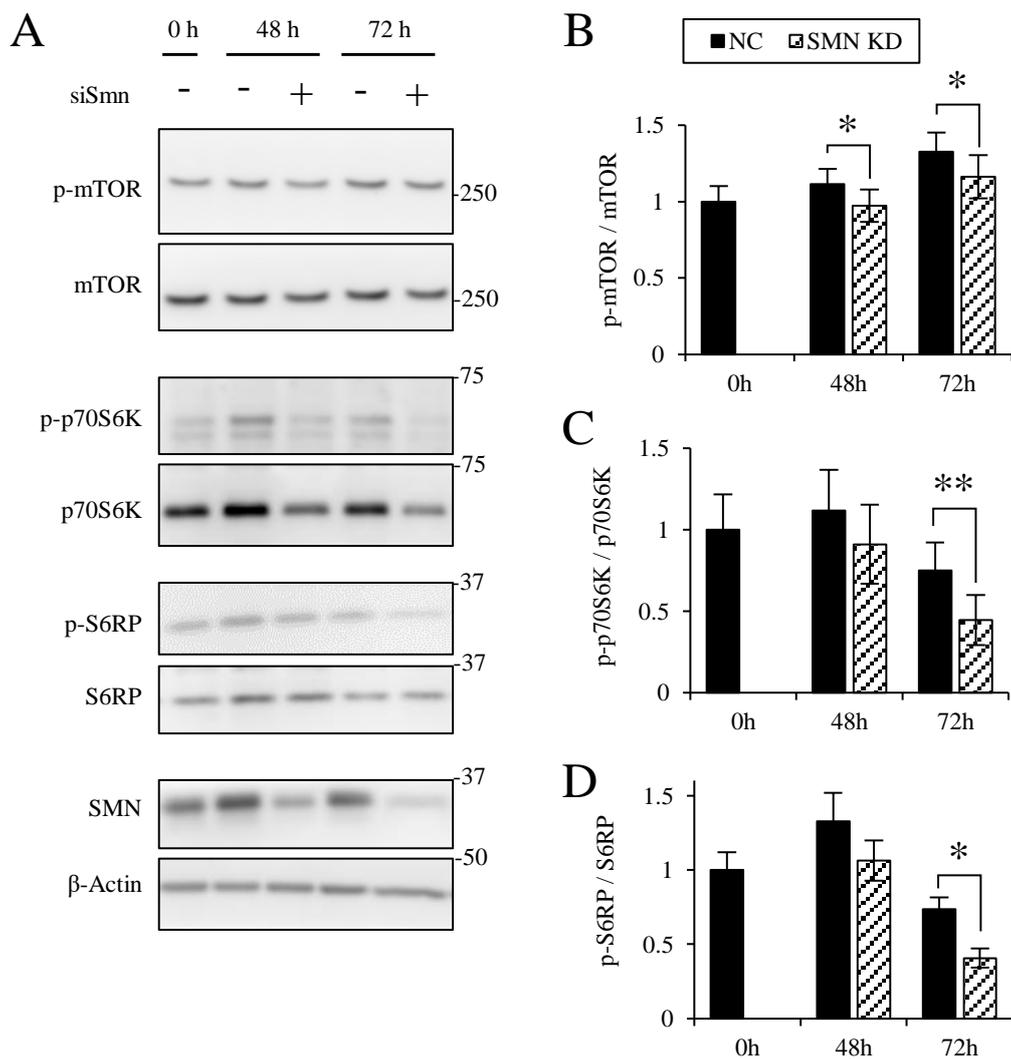


Figure 7 SMN KD suppresses mTOR signaling in NSC-34 cells.

Immunoblotting of cell lysates, obtained from NSC-34 cells, transfected with either negative control (- or NC) or SMN (siSnn + or SMN KD) siRNA, for the indicated times. (A) Representative images of each blot. (B-D) The ratio between the phosphorylated form and the total protein is shown as the fold change relative to the level at 0 h. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n = 5). * P < 0.05, ** P < 0.005 vs. NC (Student's t -test).

3-6 SMA モデルマウス脊髄におけるライソゾーム関連因子及び mTOR シグナル関連因子の発現

これまでの検討により、NSC-34 細胞において SMN が減少することで、ライソゾーム機能が低下し、同時に細胞内 mTOR シグナルが減弱することが明らかとなった。これらの現象が *in vivo* の SMA 病態でも認められるか否かを検証するため、SMA モデルマウスの脊髄組織におけるライソゾーム関連因子及び mTOR シグナル関連因子の発現量を評価した。本検討では全身性の SMN 発現量の低下を特徴とし、SMA の病態モデルマウスとして広く用いられている SMN Δ 7 マウスを使用した (21)。野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウスの脊髄において、TFEB 並びに Lamp1 の発現量が有意に減少した (Fig. 8A-C)。これらの結果より、SMN Δ 7 マウスの脊髄においてライソゾームが減少することが示唆された。続いて mTOR シグナル関連因子の発現について検討した。野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウスの脊髄において、mTOR、S6RP、p70S6K のリン酸化体の発現量はいずれも有意に減少した (Fig. 8D-G)。興味深いことに p70S6K については、リン酸化体のみでなく、総量においても有意な減少が認められた (Fig. 8D, H)。これらの結果から、SMN Δ 7 マウスの脊髄において mTOR シグナルが減弱することが示唆された。

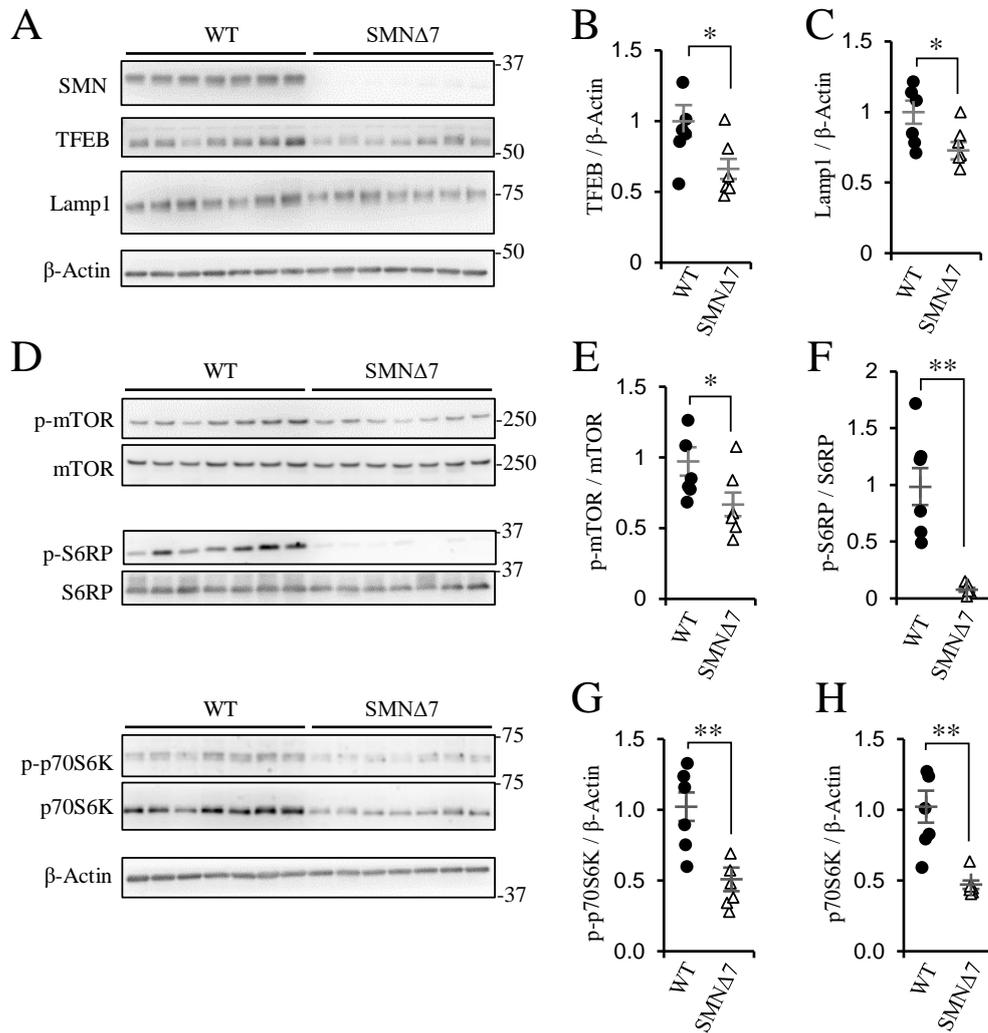


Figure 8 SMA model mice exhibit defects in the TFEB and mTOR pathway, in lumbar spinal cords.

(A) and (D) show immunoblots for lysates obtained from P11 SMNΔ7 (*mSmn*^{-/-}, *SMN2*^{+/+}, *SMNΔ7*^{+/+}) and WT (*mSmn*^{+/+}, *SMN2*^{+/+}, *SMNΔ7*^{+/+}) mice. The quantifications of (A) and (D) are shown in (B)-(C) and (E)-(H), respectively. Data are expressed as mean ± S.E.M. (n = 7). **P* < 0.05, ***P* < 0.005 vs. WT (Student's *t*-test).

第4節 考察

本研究では、運動ニューロンにおける SMN タンパク質と TFEB の機能の関係について検討した。NSC-34 細胞において SMN のノックダウンにより TFEB の発現量が減少したことから、運動ニューロンにおいて SMN タンパク質は TFEB の発現を制御することが示唆された。さらに、SMN をノックダウンさせた NSC-34 細胞においてライソゾーム関連遺伝子の発現低下及びオートファジー活性の低下が認められ、それらは TFEB の強制発現により回復したことから、SMN タンパク質は TFEB の発現の制御を介してライソゾーム機能及びオートファジー活性を制御すると考えられる (Fig. 9)。SMN タンパク質は RNA スプライシングや microRNA 産生に関与することが知られているが (10, 13)、どのような機構で TFEB の発現を制御するのかは今後の検討課題である。

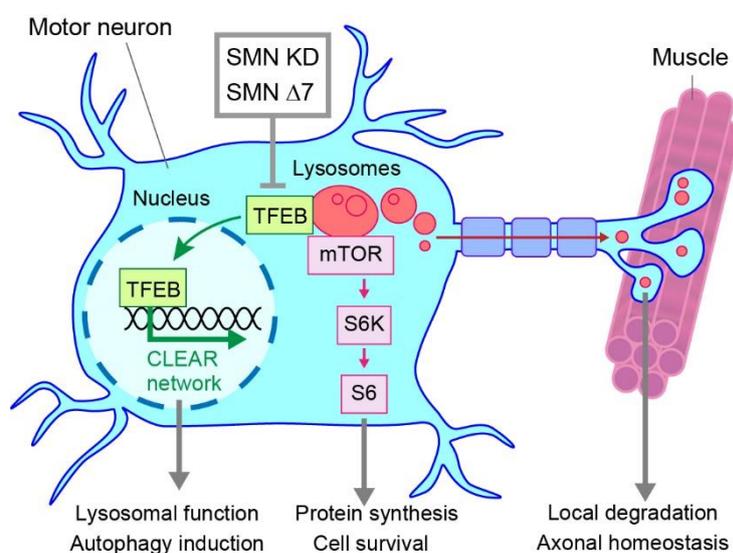


Figure 9 Summary of TFEB actions in SMN deficient motor neurons.

SMN をノックダウンさせた NSC-34 細胞においては、ライソゾームの分布と形態に異常が認められた。エンドサイトーシス経路は神経伝達物質の放出並びにシナプス可塑性の維持に、重要な機能を果たす (33)。軸索伸長の過程にお

いては、軸索中のライソゾームとマクロオートファジーが重要な機能を果たすことが明らかにされており (34, 35)、神経筋接合部の維持においてもライソゾームが重要であることが報告されている (36)。運動ニューロンは長い軸索を有することから、ライソゾームの輸送は運動ニューロンの生存と機能維持に重要である可能性が高いと考えられる。TFEB はライソゾームの輸送を制御することで、その細胞内分布を調整する (37)。以上の事から、軸索内におけるライソゾームの輸送機能の詳細を明らかにすることで、SMN 欠損に対する運動ニューロンの脆弱性の原因の解明につながる可能性があると考えられる。

ライソゾームは細胞内の過酸化脂質のクリアランスを担っている。ALS をはじめとする神経変性疾患において、脊髄組織における過酸化脂質の増加が運動ニューロンの変性に寄与することが示唆されており (38)、SMA 患者の脊髄組織においても、過酸化脂質分解物の 1 種である 4-ヒドロキシ-2-ノネナールが異常蓄積することが報告されている (39)。これらの知見から総合的に考えると、運動ニューロンの SMN タンパク質の欠乏によるライソゾームの機能異常が、過酸化脂質の蓄積を引き起こし、ひいては運動ニューロン変性の一因となっている可能性が考えられる。

本研究では、SMN をノックダウンさせた NSC-34 細胞及び SMN Δ 7 マウスの脊髄において mTOR シグナルが減弱することを明らかにし、p70S6K は発現量そのものが減少した。mTOR シグナルの下流に位置する S6RP は中枢神経系においてニューロンのシナプス機能の維持に寄与することから (27)、mTOR シグナルの活性低下および p70S6K の発現量の減少が SMA 病態における運動ニューロンの表現型に深く関与する可能性があると考えられる。

本章においては、運動ニューロンにおける SMN タンパク質の欠乏が、TFEB の発現制御を介したライソゾームの機能異常及びオートファジーの低下を引

き起こすことを明らかにした。しかしながら、SMA 病態では運動ニューロンのみならず、周辺の脊髄組織を構成する細胞群を含む全身の細胞で SMN タンパク質の発現が低下することが知られている。そこで、第 2 章では運動ニューロン以外の脊髄組織構成細胞、特にミクログリアに着目し、細胞内での SMN タンパク質の機能について検討を行った。

第2章 ミクログリアにおける SMN タンパク質の役割

第1節 緒言

SMN タンパク質の欠乏による運動ニューロン変性は SMA の中心的な病態であると考えられてきたが、期待に反して運動ニューロン特異的な *SMN1* 遺伝子の導入による SMN タンパク質の補充は、SMA モデルマウスの病態を十分に回復させなかった (40)。その理由として運動ニューロン以外における SMN タンパク質欠乏の SMA 病態形成への関与が考えられる。脊髄組織において、運動ニューロンはグリア細胞に囲まれて存在する。ニューロンはグリア細胞により物理的に支持されるとともに、そのグリア細胞により生理学的機能を大きく制御されている。グリア細胞はアストロサイト、ミクログリア及びオリゴデンドロサイトに分類される。アストロサイトは周囲のイオン環境の恒常性維持 (41)、神経伝達物質の取り込み (42) などの機能を有し、オリゴデンドロサイトは神経伝達速度を制御する機能を有する。一方、ミクログリアは中枢神経系における免疫応答を制御する機能を有する (43)。これらのニューロンを取り巻く環境を制御する細胞群の機能の破綻が、神経変性疾患の病態形成・進行の一端を担っており、SMA の病態解明においても運動ニューロン以外の細胞における SMN タンパク質の機能について明らかにすることが重要である。

近年、種々の神経変性疾患において、ミクログリアの活性化による炎症反応の亢進が病態形成に影響を及ぼすことが報告されている。例えば、ALS やアルツハイマー病において、ミクログリアの活性化により炎症反応が亢進し、ニューロンの変性に関与することが報告されている (44, 45)。SMA モデルマウスの脊髄においてもミクログリアの増加が認められており (46, 47)、特に組織障害型 (炎症促進型) の M1 ミクログリアが増加し、組織保護型 (抗炎症型) の M2 ミクログリアが減少することが報告されている (48)。これらの知見をふま

えると、脊髄のミクログリアの活性化による炎症反応の亢進が、SMA の病態形成に関与する可能性が考えられる。しかしながら、ミクログリアにおける SMN タンパク質の役割についてはほとんど研究されていない。

そこで本章では、ミクログリアの SMN タンパク質の欠損が炎症反応を促進するのではないかと仮説をたて、ミクログリアにおける SMN タンパク質の機能について検討を行った。現在、SMA に対する主要な治療薬として、antisense oligonucleotide (ASO) であるヌシネルセン (Spinraza[®], バイオジェン) が用いられている。ヌシネルセンは、SMN2 mRNA 前駆体のイントロン 7 に結合し、転写産物へのエクソン 7 の含有を促進することで、機能性の完全長 SMN タンパク質の発現量を増加させる作用を有している (Fig. 10) (16, 49, 50)。本研究では、ヌシネルセンと同配列、同修飾を有する SMN-ASO を生後 2 日目の SMN Δ 7 マウスに脳室内投与し、病態に及ぼす影響を検討した。

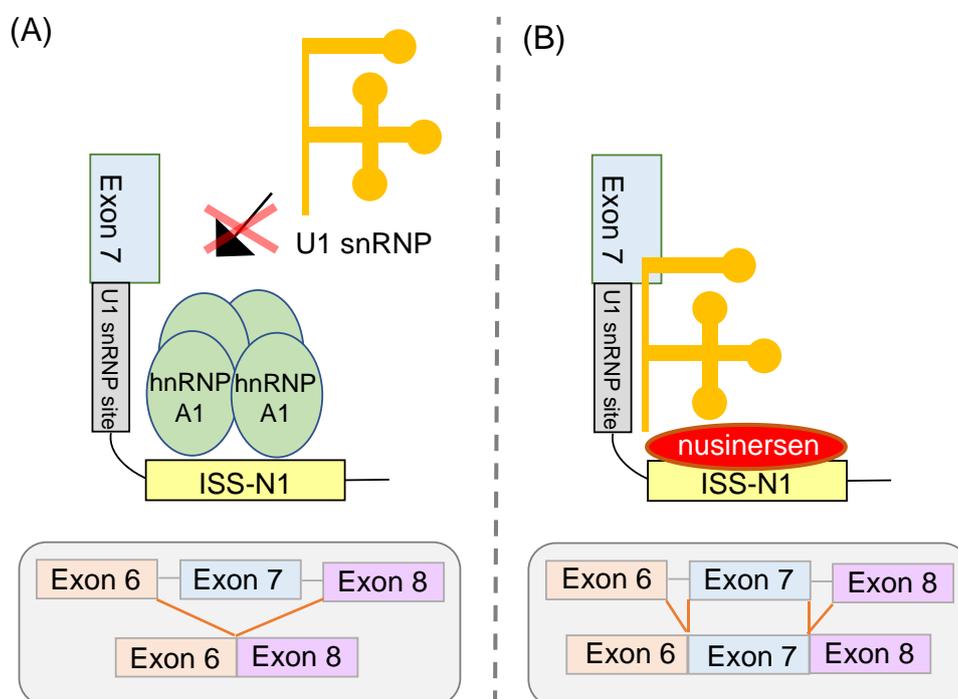


Figure 10 Mechanism of action of nusinersen

(A) Exon7 skipping in SMN2 gene. (B) Exon7 including by nusinersen.

[Talbot *et al.*, *Gene Ther.*, 2017 (49) 及び Singh *et al.*, *Future Med. Chem.*, 2015 (50) を改変]

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本実験に用いた薬剤及び試薬は以下の通りである。Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent、Opti-MEM、Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Med GC Duplex #2、Alexa Fluor®488 donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor®546 donkey anti-mouse IgG、Alexa Fluor®546 goat anti-rat IgG、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody、CM-H₂DCFDA は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、ペニシリン、ストレプトマイシンは Meiji Seika ファルマ株式会社、生理食塩液は大塚製薬株式会社 (Tokyo, Japan)、1 mM Tris-HCl (pH 8.0)、ペントバルビタール (pentobarbital)、2-プロパノールはナカライテスク (Kyoto, Japan)、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogen phosphate: KH₂PO₃)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogen phosphate 12-water: Na₂HPO₃ · 12H₂O)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogen phosphate dehydrate: Na₂HPO₃ · 2H₂O)、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl) は岸田化学株式会社 (Osaka, Japan)、O.C.T. compound はサクラファイン株式会社 (Tokyo, Japan)、スライドガラスは松浪硝子工業 (Tokyo, Japan)、Super PAP pen は大道産業株式会社 (Tokyo, Japan)、Mouse on Mouse (M.O.M.) Blocking Reagent、M.O.M. protein concentrate、normal goat serum、normal horse serum、horse serum は Vector Labs、フルオロマウントは Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、rat anti-CD68 monoclonal antibody は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、mouse anti-SMI-32 monoclonal antibody は BioLegend (Dedham, MA, USA)、mouse anti-GFAP monoclonal antibody、rabbit anti-p-NF-κB monoclonal antibody、rabbit anti-NF-κB monoclonal antibody、rabbit anti-TNF-α monoclonal antibody は Cell Signaling Technology (Danvers, MA,

USA)、 mouse anti-8-OHdG monoclonal antibody、 rabbit anti-p-JNK polyclonal antibody、 rabbit anti-JNK monoclonal antibody は Santa Cruz (Dallas, TX, USA)、 anti-SMN monoclonal antibody は BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)、 rabbit anti-HO-1 polyclonal antibody は Millipore (Billerica, MA, USA)、 mouse anti- β -actin monoclonal antibody は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)、 RAW264.7 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) よりそれぞれ購入した。

Phosphate buffer (PB) は、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を超純水 (MilliQ) に溶解し、調製した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

実験動物は、第 1 章 2-2-1 に記載した野生型マウス並びに SMN Δ 7 マウスを使用した。飼育環境は設定温度: 24°C (許容範囲: 22~26°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) に維持し、すべてのマウスは自由給水下に固形飼料を与えて飼育した。すべての実験は、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験申請を行い、許可を受けた上で実施した。また遺伝子改変動物は、岐阜薬科大学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、許可を得て使用した。

2-2-2 SMN Δ 7 マウスの遺伝子型解析

SMN Δ 7 マウスの遺伝子型解析は第 1 章 2-2-2 に準じて行った。

2-2-3 細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) は、10% FBS、100 U/ml penicillin

及び 100 µg/ml streptomycin を添加した DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ 中にて培養した。2 日ごとに trypsin 処置による継代を行った。

2-2-4 RNA 干渉

RAW264.7 細胞は抗生物質不含 10%FBS DMEM を用いて、96 well plate 及び 24 well plate に播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。LipofectamineTM RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific)、遺伝子導入用培地 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 及び Stealth RNAiTM small interfering RNA (siRNA, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) の混合溶液を作製し、培地に添加して 2 nM Stealth siRNA の導入を行った。使用した Stealth siRNA の配列は以下の通りである。

Smn siRNA : 5'-GGC CAG AGU GAU GAU UCU GAC AUU U -3' (センス鎖),
5'-AAA UGU CAG AAU CAU CAC UCU GGC C -3' (アンチセンス鎖).

また、Stealth RNAiTM siRNA Negative Control Med GC Duplex #2 (Thermo Fisher Scientific) を陰性対照として用いた。遺伝子導入 48 時間後に活性酸諸種の測定、細胞免疫染色及びウエスタンブロッティングに使用した。

2-2-5 新生仔マウスへの ASO の脳室内投与

生後 2 日目の新生仔マウスに対し、34G の投与針を用いて ASO (8 µg、溶媒; 生理食塩液) を脳室内投与した。SMN-ASO 及び陰性対照 ASO (mismatch-ASO:MM-ASO) は下記の配列を有しており、17 のヌクレオチド間結合はすべてホスホロチオエートジエステルである。糖残基すべてが 2'-O-(2-メトキシエチル) で修飾され、シトシン塩基の 5 位がすべてメチル化されている (22)。

SMN-ASO; 5'-TCACTTTCATAATGCTGG-3'

MM-ASO; 5'-TCATTTGCTTCATACAGG-3'

ASO は Gene Design Inc. (Osaka, Japan) にて合成した。野生型マウスには、同量の生理食塩液を投与した。試験中は、SMN Δ 7 マウス及び野生型マウスを母親マウスと共に飼育した。

2-2-6 新生仔マウスの運動機能評価

新生仔マウスの運動機能評価として正向反射試験を行った。正向反射試験の反応時間は、仰向けに置かれてから四肢で着地するまでに要した時間 (最大 60 秒) と定義した。生後 4 日目、生後 8 日目及び生後 11 日目に反応時間を測定した。

2-2-7 マウス脊髄組織の免疫組織染色

2-2-7-1 組織切片作成

マウスにペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg を腹腔内投与し、深麻酔させた。マウスを開胸し、ペリスタポンプ及び 34G の投与針を用いて左心室内に氷冷 PBS を注入し、灌流脱血した。次に 4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を 6 分間注入して灌流固定を行った。腰髄を摘出した後、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。液体窒素を用いて O.C.T. compound により凍結し、薄切するまで -80°C にて保存した。O.C.T. compound によって凍結した腰髄を固定し、クリオスタット (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany) を用いて、-20°C で厚さ 10 μ m の切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (松浪硝子工業, Osaka, Japan) に載せ、-80°C で保存した。

2-2-7-2 免疫組織染色

染色時、-80°C より凍結切片を取り出し、-20°C で2時間放置した後、4°C で1時間放置し、さらに室温で1時間乾燥させた。その後、Super PAP pen (大道産業株式会社, Osaka, Japan) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。マウス由来の1次抗体を用いる際には、M.O.M Blocking Reagent により1時間ブロッキングし、マウス由来以外の場合は、10% horse serum により1時間ブロッキングを行った。5% goat serum により1時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体 (溶媒; M.O.M protein concentrate を PBS で希釈または 10% horse serum) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体 (溶媒; M.O.M protein concentrate を PBS で希釈または 10% horse serum) 及び Hoechst 33342 を1時間反応させた。染色後、フルオロマウント (水溶性封入基材) で封入した。

一次抗体には rabbit anti-Iba1 polyclonal antibody (1:300 dilution; 019-19741, 富士フイルム和光純薬株式会社)、rat anti-CD68 monoclonal antibody (1:200 dilution; MCA1957GA, Bio Rad)、mouse anti-SMI-32 monoclonal antibody (1:500 dilution; 801702, BioLegend)、mouse anti-GFAP monoclonal antibody (1:300 dilution; #3670, Cell Signaling Technology) もしくは mouse anti-8-OHdG monoclonal antibody (1:100 dilution; sc-66036, Santa Cruz) を用いた。二次抗体には Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (1:1,000 dilution; A21206, Invitrogen)、Alexa Fluor 546 donkey anti-mouse IgG (1:1,000 dilution; A10036, Invitrogen) もしくは Alexa Fluor 546 goat anti-rat IgG (1:1,000 dilution; A11081, Life technologies) を用いた。ネガティブコントロールは、一次抗体を除く以外は同様の操作を行った。染色した切片は BZ-9000 HS オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて撮影した。

2-2-8 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は、第1章 2-2-5 に準じて行った。一次抗体には、anti-SMN monoclonal antibody (1:1,000 dilution; 610647, BD)、rabbit anti-HO-1 polyclonal antibody (1:500 dilution; AB1284, Millipore)、rabbit anti-p-NF- κ B monoclonal antibody (1:200 dilution; #3033, Cell Signaling Technology)、rabbit anti-NF- κ B monoclonal antibody (1:1,000 dilution; #8242, Cell Signaling Technology)、mouse anti- β -actin monoclonal antibody (1:2,000 dilution; A2228, Sigma-Aldrich)、rabbit anti-p-JNK polyclonal antibody (1:500 dilution; SC6254, Santa Cruz)、rabbit anti-JNK monoclonal antibody (1:500 dilution; SC571, Santa Cruz) 及び rabbit anti-TNF- α monoclonal antibody (1:1,000 dilution; #11948, Cell Signaling Technology) を用いた。二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1,000 dilution; 32460, invitrogen) 及び horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (1:1,000 dilution; 32430, Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2-2-9 活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の測定

RAW264.7 細胞内における活性酸素種の測定のため、終濃度 10 μ M となるように CM-H₂DCFDA (Thermo Fisher Scientific) を培地中に添加した。添加直後及び 1 時間後にマルチスペクトロマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定波長 488 nm (参考波長 525 nm) の蛍光波長を測定した。

2-2-10 統計学的解析

実験成績は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な比較は、SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's *t*-test または Welch's *t*-test により行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 SMN Δ 7 マウスにおける SMN-ASO の作用

SMN-ASO が SMN Δ 7 マウスに及ぼす影響を検討するため、SMN-ASO を生後2日目の SMN Δ 7 マウスに脳室内投与した (Fig. 11A)。生後11日目に脊髄を摘出し、SMN タンパク質の発現量をウエスタンブロット法により定量した。野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウスの脊髄における SMN タンパク質の発現量は減少しており、SMN-ASO の投与により SMN タンパク質の発現量が有意に増加した (Fig. 11B, C)。

SMN Δ 7 マウスの主な表現型として、生存期間の短縮 (平均生存期間; 13.6 日)、体重減少、運動機能低下などが知られている (21)。SMN-ASO の作用を検証するため、本研究では SMN Δ 7 マウスの体重及び運動機能を評価した。生後10日目以降、SMN-ASO の投与により SMN Δ 7 マウスの体重には増加傾向が認められた (Fig. 11D)。新生仔マウスの運動機能評価のため、正向反射試験 (righting reflex test) を行った。それぞれ病態早期、中期にあたる生後4、8日目では、SMN-ASO 投与群と MM-ASO 投与群の間に正向反射試験の反応時間の差は認められなかった (Fig. 11E)。一方、病態後期にあたる生後11日目では MM-ASO 投与群と比較し、SMN-ASO 投与群において正向反射試験の反応時間の有意な短縮が認められた (Fig. 11E)。これらの結果より、SMN-ASO は SMN Δ 7 マウスの病態後期の運動機能低下を抑制することが示唆された。

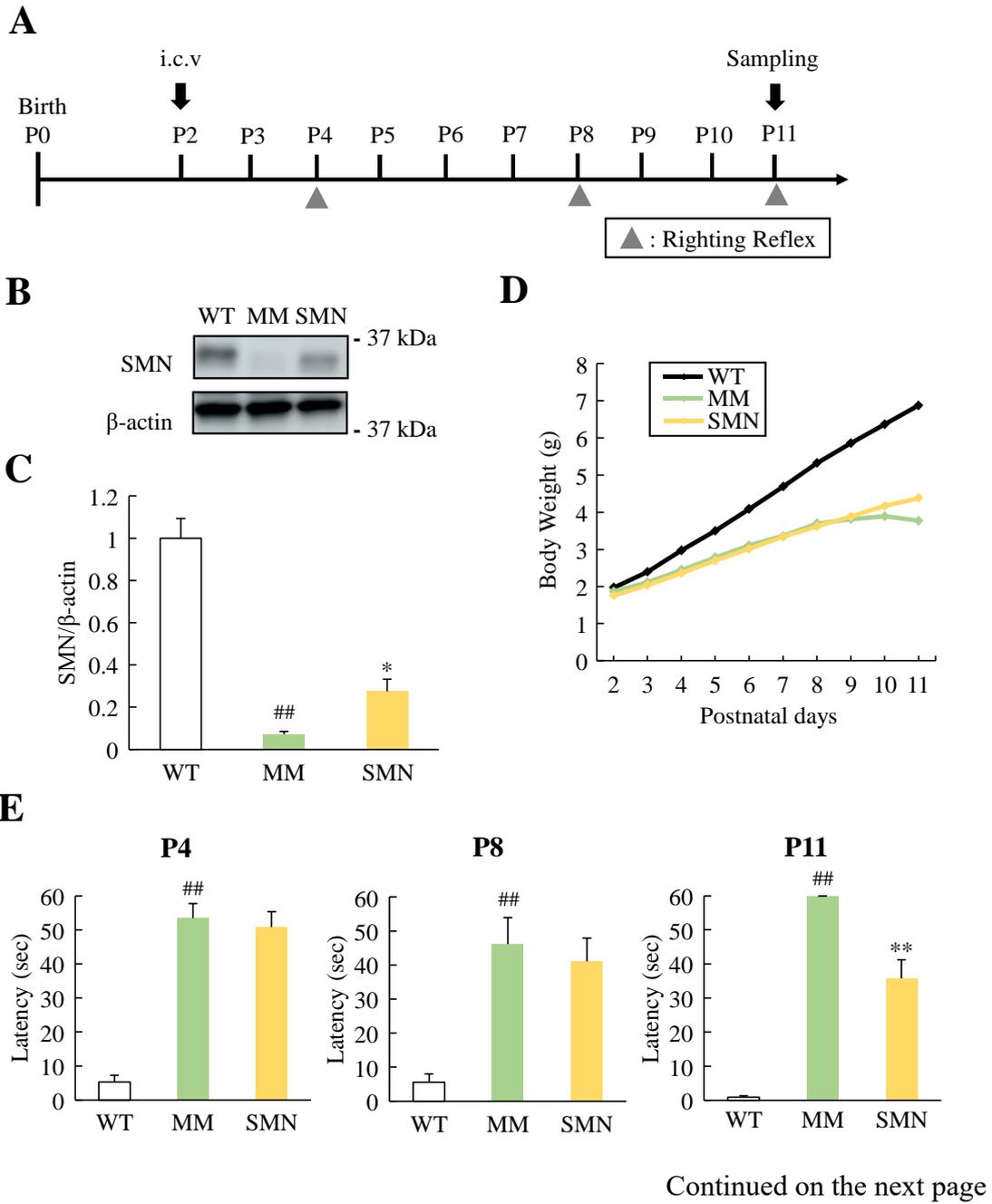


Figure 11 SMN-ASO ameliorated motor function deficits of SMN Δ 7 mice

(A) Scheme for the intracerebroventricular administration of ASO. MM-ASO or SMN-ASO (8 μ g/body) were administrated at P2. The mice were weighed daily. The righting reflex test was performed at P4, P8, and P11. (B) Representative immunoblot images of SMN in the lumbar spinal cord. (C) The quantitative analysis of SMN protein level in the lumbar spinal cord (WT group: n = 8; MM-ASO treated group: n = 7; SMN-ASO treated group n = 7). $^{##}P < 0.01$ vs. WT group (Student's *t*-test). $^{*}P < 0.05$ vs. MM-ASO treated group (Welch's *t*-test). (D) The body mass curve of SMN Δ 7 mice (WT group: n = 8; MM-ASO treated group: n = 7; SMN-ASO treated group n = 7; Student's *t*-test). (E) The latency of the righting reflex tested at P4, P8, and P11. (WT group: n = 8; MM-ASO treated group: n = 7; SMN-ASO treated group: n = 7). $^{##}P < 0.01$ vs. WT group (Welch's *t*-test). $^{**}P < 0.01$ vs. MM-ASO treated group (Welch's *t*-test). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. MM; mismatch-ASO, SMN; SMN-ASO.

3-2 脊髄運動ニューロン及びグリア細胞に対する SMN-ASO の作用

脊髄組織に存在する細胞種がそれぞれどのように SMN-ASO の作用を受けるかを検証するため、ASO 投与後の運動ニューロン、アストロサイト及びミクログリアの数を評価した。病態早期にあたる生後 5 日後の野生型マウス及び SMN Δ 7 マウス腰髄において、SMI-32 陽性運動ニューロンは脊髄前角に分布していた (Fig. 12A, B)。野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウス脊髄において、SMI-32 陽性運動ニューロン数が有意に減少した。しかしながら、SMN-ASO の投与により、SMN Δ 7 マウス脊髄の SMI-32 陽性運動ニューロン数に有意な変化は認められなかった (Fig. 12A, B)。

続いて Iba1 陽性ミクログリア数について検討した。既報と同様に (46, 47) 野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウス脊髄前角において Iba1 陽性ミクログリア数が有意に増加した (Fig. 12C, D)。興味深いことに、SMN-ASO の投与により、SMN Δ 7 マウス脊髄前角の Iba1 陽性ミクログリア数が有意に減少した。一方、脊髄後角に存在する Iba1 陽性ミクログリア数はいずれの群間においても差は認められなかった (Fig. 12C, D)。

つづいて CD68 陽性活性化ミクログリア数を計測した。野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウス脊髄前角において、CD68 陽性活性化ミクログリアが有意に増加した (Fig. 12C, E)。SMN-ASO の投与により、SMN Δ 7 マウス脊髄前角の CD68 陽性活性化ミクログリアが有意に減少した。一方、脊髄後角に存在する CD68 陽性活性化ミクログリアはいずれの群間においても差は認められなかった (Fig. 12C, E)。

最後に、GFAP 陽性アストロサイト数を検討した。過去の報告結果と同様に (51)、野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウス脊髄前角において、GFAP 陽性アストロサイトが有意に増加した (Fig. 12F, G)。SMN-ASO の投与により、SMN Δ 7 マウス脊髄前角の GFAP 陽性アストロサイト数は減少傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった。一方、脊髄後角に存在する GFAP 陽性アストロサイト数はいずれの群間においても差は認められなかった (Fig. 12F, G)。

これらの結果から、SMN-ASO が病態早期の段階で運動ニューロンやアストロサイトに作用しない一方、ミクログリアに作用しその後の運動機能低下抑制作用を示している可能性が示唆された。

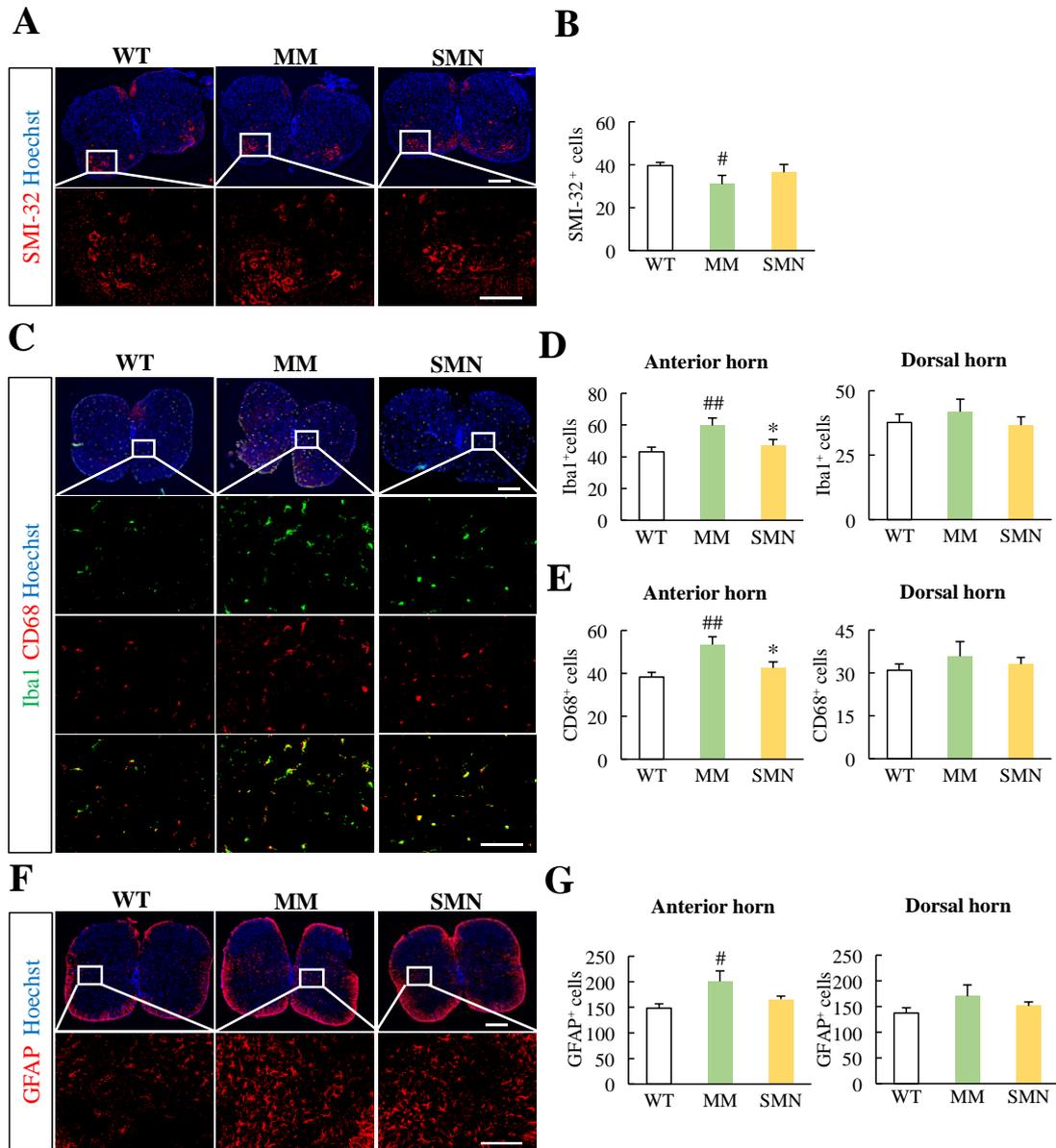


Figure 12 The effect of SMN-ASO on motor neurons and glial cells.

(A) Representative immunoblots of SMI-32. The upper scale bar shows 300 μ m. The lower scale bar shows 100 μ m. (B) The quantitative analysis of SMI-32 positive cells/Hoechst in the spinal cord of SMN Δ 7 mice at P5. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (WT group: n = 11; MM-ASO treated group: n = 7; SMN-ASO treated group n = 8). [#]*P* < 0.05 vs. WT group (Student's *t*-test).

(C) Representative fluorescence image of Iba1 and CD68. The upper scale bar shows 300 μ m. The lower scale bar shows 100 μ m. (D) The quantitative analysis of Iba1 positive cells in the spinal cord of SMN Δ 7 mice at P5. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (WT group: n = 11; MM-ASO treated

Continued on the next page

group: n = 7; SMN-ASO treated group n = 8). $^{##}P < 0.01$ vs WT group (Student's *t*-test). $^{*}P < 0.05$ vs MM-ASO treated group (Student's *t*-test). (E) The quantitative analysis of CD68 positive cells in the spinal cord of SMN Δ 7 mice at P5. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (WT group: n = 11; MM-ASO treated group: n = 7; SMN-ASO treated group n = 8). $^{##}P < 0.01$ vs WT group (Student's *t*-test). $^{*}P < 0.05$ vs MM-ASO treated group (Student's *t*-test). (F) Representative immunoblots of GFAP. The upper scale bar shows 300 μ m. The lower scale bar shows 100 μ m. (G) The quantitative analysis of GFAP positive cells in the spinal cord of SMN Δ 7 mice at P5. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (WT group: n = 11; MM-ASO treated group: n = 7; SMN-ASO treated group n = 8). $^{*}P < 0.05$ vs WT group (Student's *t*-test). MM; mismatch-ASO, SMN; SMN-ASO.

3-3 SMN Δ 7 マウスの脊髄ミクログリアにおける酸化ストレスマーカーの発現

SMN Δ 7 マウスの脊髄ミクログリアの詳細な特徴を明らかにするため、活性酸素による DNA の損傷マーカーである 8-OHdG の発現を検証した。野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウスの脊髄において、8-OHdG 陽性のミクログリアの割合が有意に増加した (Fig. 13A, B)。一方、SMN-ASO の投与により、SMN Δ 7 マウス脊髄における 8-OHdG 陽性のミクログリアの割合が減少した (Fig. 13A, B)。

以上の結果から、SMN Δ 7 マウスの脊髄ミクログリアでは細胞内の酸化ストレスが亢進しており、SMN の補充によりその亢進した酸化ストレスは抑制されることが示唆された。

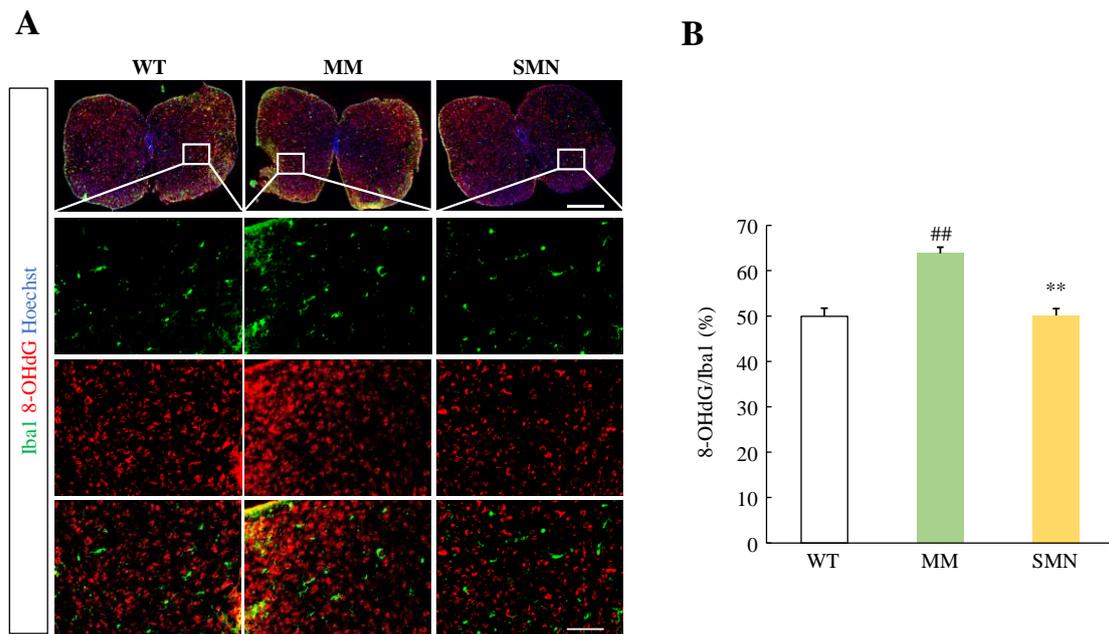


Figure 13 SMN-ASO suppressed oxidative stress in the spinal microglia of SMN Δ 7 mice

(A) Representative fluorescence image of Iba1 and 8-OHdG. The upper-scale bar shows 300 μ m. The lower scale bar shows 100 μ m. (B) The quantitative analysis of 8-OHdG positive cells in Iba1 positive microglia in the spinal cord of SMN Δ 7 mice at P5. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (WT group: n = 11; MM-ASO treated group: n = 7; SMN-ASO treated group n = 8). ^{##} $P < 0.01$ vs. WT group (Student's t -test). ^{**} $P < 0.01$ vs. MM-ASO treated group (Student's t -test). MM; mismatch-ASO, SMN; SMN-ASO.

3-4 RAW264.7 細胞における SMN ノックダウンの作用

これまでの実験結果より、SMN Δ 7 マウス脊髄ではミクログリアが活性化することが示された。さらに、これらの表現型が SMN-ASO により抑制されたことから、SMA 病態におけるミクログリアの SMN タンパク質の欠損が、ミクログリアの活性化を引き起こし、病態増悪に関与する可能性があると考えられる。この仮説について検証するため、マウスマクロファージ細胞 RAW264.7 における SMN タンパク質を、siRNA を用いた RNA 干渉によりノックダウンし、その後の表現型を検討した。

SMN siRNA のトランスフェクション 48 時間後、陰性対照コントロール群と比較し、SMN siRNA トランスフェクション群において有意な SMN タンパク質の減少を確認した (Fig. 14A, B)。続いて、*in vivo* で認められた SMA 病態下のミクログリアの酸化ストレスの亢進に、SMN タンパク質が関与するか否かを直接的に検証するため、SMN をノックダウンした RAW264.7 細胞における酸化ストレス関連因子の発現を評価した。SMN ノックダウンにより RAW264.7 細胞内の活性酸素種は有意に増加した (Fig. 14C, D)。さらに、酸化ストレスにより誘導されるヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase-1: HO-1) の発現も、RAW264.7 細胞における SMN ノックダウンにより有意に増加した (Fig. 14E, F)。これらの結果から、ミクログリアにおける SMN タンパク質の発現減少により細胞内 ROS 産生量が増大し、酸化ストレスが亢進することが示唆された。

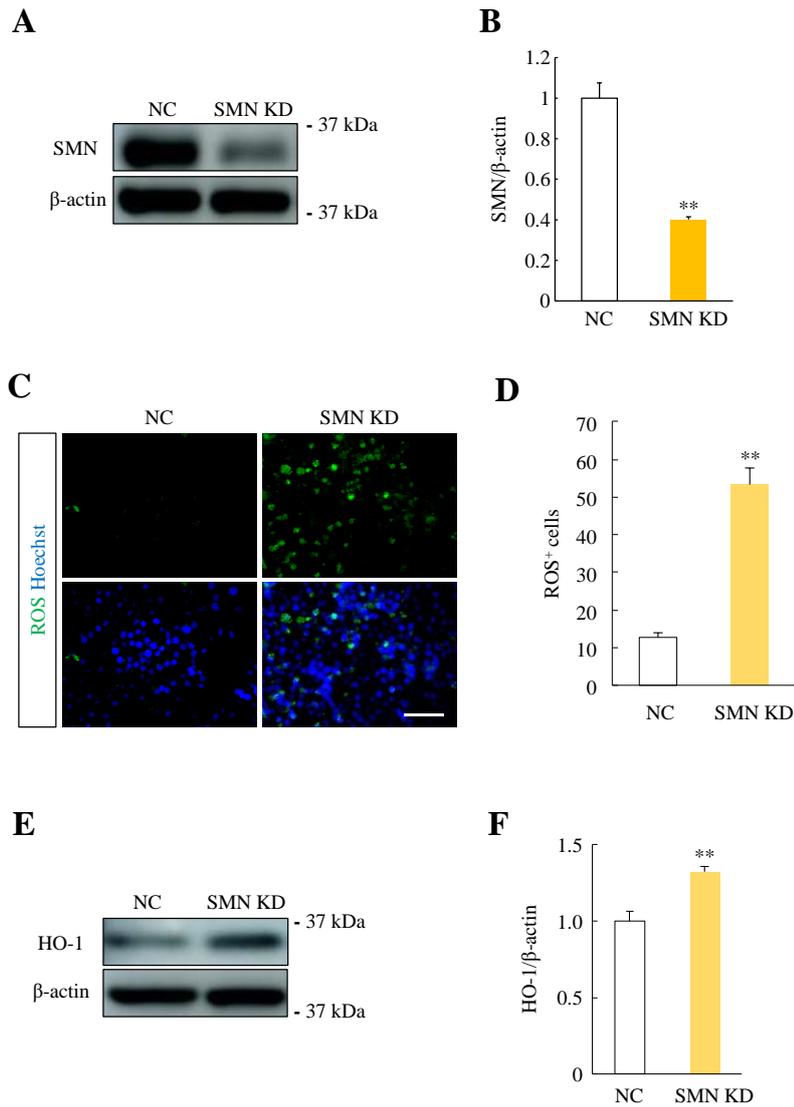


Figure 14 ROS production was increased in SMN-depleted macrophage cells

(A) SMN protein expression was examined by western blot analysis in RAW264.7 cells. (B) Quantitative analysis of the expression level of SMN protein (n = 4). ** $P < 0.01$ vs. NC (Student's *t*-test). (C) Representative fluorescence image of CM-H₂DCFDA. Scale bar shows 50 μm. (D) The quantitative analysis of CM-H₂DCFDA positive cells (n = 6). ** $P < 0.01$ vs. NC (Student's *t*-test). (E) HO-1 protein expression was examined by western blot analysis in RAW264.7 cells. (F) Quantitative analysis of the expression level of HO-1 (n = 4). ** $P < 0.01$ vs. NC (Student's *t*-test). Data are presented as the mean ± S.E.M. NC; Negative Control, SMN KD; SMN knockdown.

3-5 SMN ノックダウン条件下の RAW264.7 細胞における炎症関連因子の発現

ミクログリアは中枢神経系の炎症反応を制御する中心的な細胞であり、ミクログリア内での細胞内酸化ストレスの亢進は JNK や NF- κ B のリン酸化を介して炎症性メディエーターの放出を促進することが知られている (52, 53)。そこで、ミクログリアにおける SMN タンパク質の発現減少により JNK 及び NF- κ B のリン酸化が亢進するか否かを検証するため、SMN ノックダウン条件下の RAW264.7 細胞における JNK 及び NF- κ B のリン酸化体の発現割合を、ウエスタンブロット法により評価した。SMN をノックダウンした RAW264.7 細胞において、JNK 及び NF- κ B のリン酸化体の発現量の割合が有意に増加した (Fig. 15A-C)。続いて炎症メディエーターの 1 種である TNF- α の発現量を評価した。ウエスタンブロット法及び免疫染色法による撮影画像の輝度値を用いた定量的結果、SMN をノックダウンした RAW264.7 細胞において TNF- α の発現量が有意に増加した (Fig. 15A, D-F)。

以上の結果より、RAW264.7 細胞における SMN タンパク質の発現減少により JNK 及び NF- κ B のリン酸化が亢進し、さらに下流の TNF- α の産生量が増大することを明らかにした。

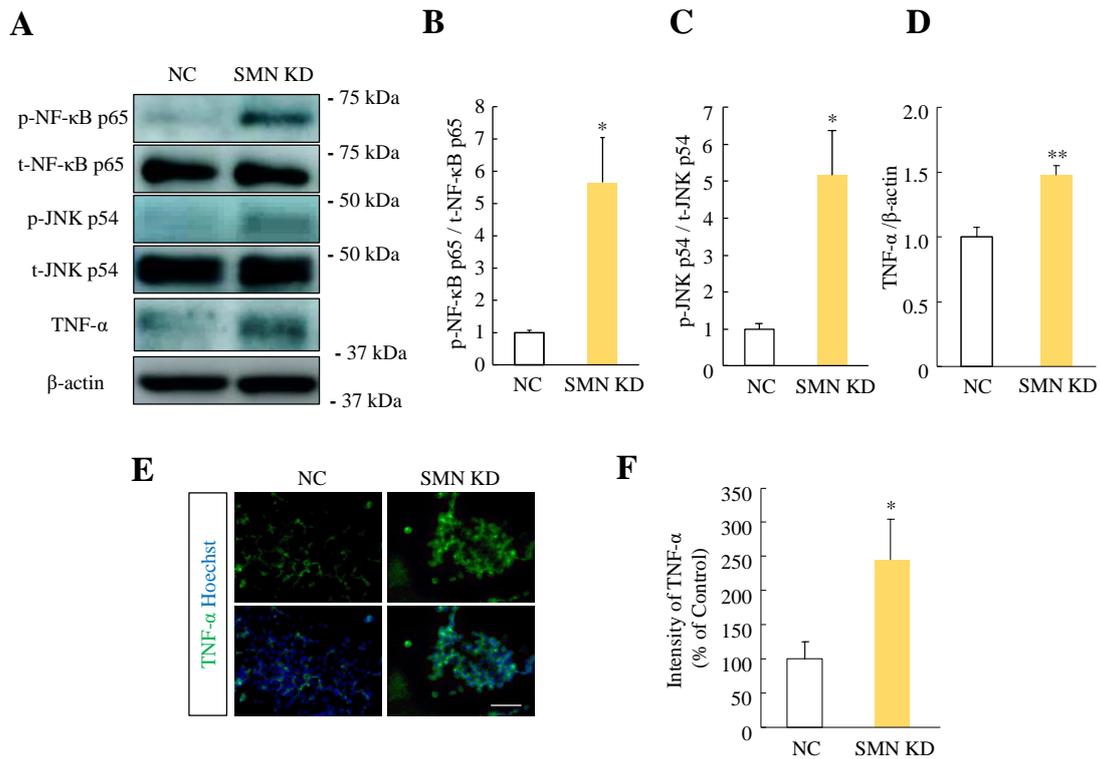


Figure 15 SMN-depleted macrophage cells mediated inflammatory response

(A) p-NFκB, p-JNK, and TNF-α protein expressions were examined by western blot analysis in RAW264.7 cells. (B) Quantitative analysis of the expression level of p-NFκB protein (n = 4). * $P < 0.05$ vs. NC (Welch's t -test). (C) Quantitative analysis of the expression level of p-JNK protein (n = 4). * $P < 0.05$ vs. NC (Student's t -test). (D) Quantitative analysis of the expression level of TNF-α protein (n = 4). ** $P < 0.01$ vs. NC (Student's t -test). (E) Representative fluorescence image of TNF-α. Scale bar shows 50 μm. (F) Quantitative analysis of the fluorescence intensity of TNF-α (n = 6). * $P < 0.05$ vs. NC (Student's t -test). Data are presented as the mean ± S.E.M. NC; Negative Control, SMN KD; SMN knockdown.

第4節 考察

本研究において、SMA モデルマウスの脊髄において増加したミクログリアが、SMN-ASO の投与により減少することが明らかになった。生後5日目の段階では、SMN Δ 7 マウス脊髄において、運動ニューロンの減少及びアストロサイトの増加が認められたものの SMN-ASO の投与による影響はなく、ミクログリア数のみが SMN-ASO の影響を顕著に受けた。過去の検討において、ミクログリア由来の補体 C1q を標的とした抗 C1q 抗体の投与により、SMA マウスの運動機能低下が抑制されたことが報告されており (54)、ミクログリアは SMA 病態の治療標的となることが示唆されている。したがって、本研究で認められた SMN-ASO による SMN Δ 7 マウスの運動機能の改善に、ミクログリアの病態抑制が寄与している可能性が示唆された。

今回の研究により、SMN Δ 7 マウス脊髄のミクログリアでは酸化ストレスが亢進しており、SMN-ASO の投与により増加した酸化ストレスは抑制されることが明らかとなった。さらに、SMN をノックダウンした RAW264.7 細胞において、ROS 産生量の増大及び酸化ストレスにより誘導される HO-1 の発現が増加しており、これらの結果から SMA 病態下では SMN タンパク質の欠乏によってミクログリア内の酸化ストレスが亢進すると考えられる。運動ニューロンにおいても SMN の減少により細胞内の ROS 産生が亢進することが知られており (55, 56)、種々の細胞において SMN タンパク質が酸化ストレスを抑制する機能を有することが予想される。第1章でも述べたとおり、SMN タンパク質は microRNA 産生に関与する (13)。中枢神経系における細胞内酸化ストレスに対し抑制的な機能を有する microRNA の1種として microRNA-375 が知られており (57)、SMA 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンでは microRNA-375 の発現量が減少する (58)。したがって SMN タンパク質の発現量が減少した運動ニュー

ロンやミクログリアでは、microRNA-375 の発現減少を介して細胞内の酸化ストレスが増加する可能性があると考えられる。しかし、SMN タンパク質はスプライシング機構や RNA 代謝などにも関わっており (10-12)、詳細な機構の解明にはさらなる検討が必要である。

ミクログリア内での細胞内酸化ストレスの亢進は、JNK や NF- κ B のリン酸化を介して炎症性メディエーターの放出を促進する (52, 53)。マウスミクログリア細胞 BV2 において SMN のノックダウンによって NF- κ B が活性化することが報告されており (59)、本研究でも SMN をノックダウンした RAW264.7 細胞において JNK 及び NF- κ B のリン酸化が亢進し、SMN タンパク質が NF- κ B の活性を制御しうることが示唆された。E3 ユビキチンリガーゼである TRAF6 は NF- κ B を活性化させる作用を有しており (60)、SMN タンパク質は TRAF6 の機能を抑制することが知られている (59)。TRAF6 は JNK を活性化させる作用も有することから (61)、今回認められた JNK の活性化は、TRAF6 の機能を介している可能性があると考えられる。

本研究において、RAW264.7 細胞における SMN のノックダウンにより TNF- α の発現量が増加することが明らかとなった。この結果は、過去に報告されている BV2 細胞における SMN ノックダウンによる TNF- α の発現量の増加と矛盾しない (59)。これらの結果から、SMN の欠損によりミクログリアの TNF- α の産生量が増大し、運動ニューロンに対し障害的に作用することが示唆される。TNF- α 誘発ニューロン障害に対し、neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) が保護的に作用することが報告されているが (62)、NAIP 遺伝子は I 型 SMA 患者の約 50% で欠失が認められる (63)。ゆえに、このような遺伝子的背景を有する患者では、運動ニューロンの TNF- α に対する感受性がより高くなる可能性があると考えられる。したがって、本研究で明らかにしたミクログリアにおけ

る病態を制御することは、SMA の効果的な治療戦略になりうると考えられる。

本章では、ミクログリアにおける SMN タンパク質が細胞内の酸化ストレス及び炎症性メディエーターの放出を抑制することを明らかにし、1 章と合わせ中枢組織における SMN タンパク質の機能の重要性を示した。次章ではさらに末梢組織での SMN タンパク質の機能を解明するため、SMA の主病変部位の 1 つである骨格筋での SMN タンパク質の生理機能について検証を行った。

第3章 骨格筋分化における SMN タンパク質の役割

第1節 緒言

SMN タンパク質は運動ニューロンの生存及び機能の維持に重要な役割を果たしており、SMA 病態下では SMN タンパク質の欠損により運動ニューロンの障害が生じる (2, 64)。SMA 病態における骨格筋萎縮は、骨格筋を支配する運動ニューロンの脱落に起因する (神経原性萎縮) と長年にわたり考えられてきた。一方、Cifuentes-Diaz らは、マウス骨格筋特異的な SMN の欠損が、顕著な骨格筋組織の萎縮を引き起こすことを明らかにしている (65)。さらに Kim らによって骨格筋特異的な SMN の欠損によりマウスの神経筋接合部の障害と骨格筋萎縮が認められたことが示されたとともに、これらの表現型が SMN タンパク質の補充により改善することが報告された (23)。以上の知見は、SMA 病態において骨格筋そのものに発現する SMN タンパク質の減少が直接的に骨格筋萎縮に影響する可能性があることを示唆している。しかしながら、骨格筋における SMN タンパク質の役割についてはほとんど明らかにされていない。

骨格筋組織には、成体期においても組織中に幹細胞 (筋衛星細胞) が豊富に存在しており、筋線維が損傷した際には周囲の筋衛星細胞が分化し、組織の再生に寄与する (66)。筋衛星細胞は単核細胞であり、周囲の筋線維の障害などにより活性化すると、増殖・分化し筋芽細胞となる。さらに複数の筋芽細胞同士が融合することで、筋管細胞となり、最終的に機能的な骨格筋組織を形成する多核の細胞である筋線維へと分化する (Fig. 16) (66–68)。この筋分化・筋成熟の過程においては、Akt シグナルの活性化を介したタンパク質合成の促進が重要となる (69)。また、筋芽細胞同士の融合による多核化には、caspase-3 の活性化が必須である (70)。

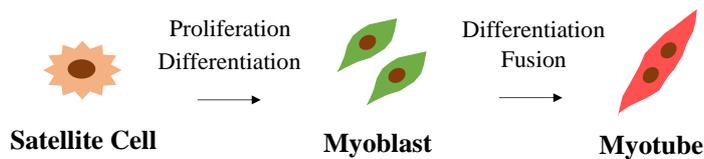


Figure 16 differentiation of muscle stem cells (Satellite cells)

筋衛星細胞の分化は、骨格筋萎縮条件下における筋再生にも寄与していると考えられている。例えば、筋萎縮を主病変とする遺伝性疾患である筋ジストロフィーのモデルマウスにおいて、骨格筋組織中の筋衛星細胞並びに筋芽細胞の分化が阻害されることにより筋萎縮が増悪する (71)。SMA 病態における骨格筋分化については、マウスの骨格筋特異的な SMN タンパク質の欠損により、筋線維の多核化の度合いが低下することが報告されている (23)。さらに筋芽細胞単独培養条件の *in vitro* 実験系においても、SMN の欠損が細胞多核化を抑制することが示されている (72, 73)。したがって、SMA 病態においては運動ニューロンの脱落とは独立して、骨格筋細胞の SMN タンパク質が欠損することにより分化能が低下し、病態形成に寄与する可能性が高いと考えられる。しかしながら、SMN タンパク質がどのように筋分化を制御するのか、その詳細な機構は不明である。そこで、第 3 章では骨格筋細胞の分化における SMN タンパク質の役割について検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

FBS、LipofectamineTM RNAiMAX Reagent、Opti-MEM、Stealth RNAiTM small interfering RNA、Hoechst 33342、Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody、Alexa Fluor 546 donkey anti-mouse IgG は Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)、horse serum、ヘマトキシリン、エオジン、mouse anti- β -actin mouse monoclonal antibody は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)、リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogen phosphate: KH_2PO_3)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogen phosphate 12-water: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogen phosphate dehydrate: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、キシレンはキシダ化学工業株式会社 (Osaka, Japan)、rabbit anti-cleaved caspase3 monoclonal antibody、rabbit anti-p-Akt monoclonal antibody、rabbit anti Akt monoclonal antibody は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)、ペントバルビタール、TritonX-100 はナカライテスク(Kyoto, Japan)、ペニシリン、ストレプトマイシンは Meiji Seika ファルマ株式会社 (Tokyo, Japan)、PFA、エタノール、スクロースは富士フィルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan)、パラフィン、O.C.T. compound はサクラファインテックジャパン株式会社 (Tokyo, Japan)、スライドガラスは松浪硝子工業 (Tokyo, Japan)、super PAP pen は大道産業株式会社 (Tokyo, Japan)、goat serum は Vector Labs (Burlingame, CA, USA)、anti-Ki67 polyclonal antibody は Merk Millipore (Billerica, MA, USA)、mouse anti-myod monoclonal antibody は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)、mouse anti-SMN monoclonal antibody は BD (Franklin Lakes, NJ, USA)、mouse anti-myosin heavy chain monoclonal antibody は

R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)、C2C12 細胞は European Collection of Authenticated Cell Cultures (Salisbury, UK)より購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

SMN Δ 7 マウスは第 1 章 2-2-1 で示した動物を用いた。飼育環境は設定温度: 24°C (許容範囲: 22 ~ 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) に維持し、すべてのマウスは自由給水下に固形飼料を与えて飼育した。すべての実験は、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験申請を行い、許可を受けた上で実施した。また遺伝子改変動物は、岐阜薬科大学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、許可を得て使用した。

2-2-2 マウス遺伝子型判定

遺伝子型判定は第 1 章 2-2-2 に準じて行った。

2-2-3 細胞培養

マウス筋芽細胞株 (C2C12) は 10% FBS、100 U/ml penicillin 及び 100 μ g/ml streptomycin を添加した DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ 中にて培養した。60% コンフルエントに達した段階でトリプシン処置による継代を行った。

2-2-4 RNA 干渉

C2C12 細胞は抗生物質不含 10%FBS DMEM を用いて、96 well plate 及び 24 well plate に播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。Lipofectamine™

RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific)、遺伝子導入用培地 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 及び Stealth RNAi™ small interfering RNA (siRNA, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Calsbad, CA, USA) の混合溶液を作製し、培地に添加して 2 nM Stealth siRNA の導入を行った。Stealth siRNA は第 2 章と同様のものを使用した。

遺伝子導入 48 時間後に抗生物質不含 2% horse serum DMEM に培地を交換し、細胞免疫染色及びウエスタンブロッティングに使用した。

2-2-5 マウス骨格筋の組織学的検討

2-2-5-1 灌流固定

マウスにペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg を腹腔内投与し、深麻酔させた。マウスを開胸し、ペリスタポンプ及び 34G の投与針を用いて左心室内に氷冷 PBS を注入し、灌流脱血した。次に 4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を 8 分間注入して灌流固定を行った。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。

2-2-5-2 組織切片作成

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、5 μm の切片を作製した。スライドガラス (松浪硝子工業) にのせ 37°C にて 1 日乾燥し、室温にて保存した。

2-3-5-3 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、封入を行った。

2-2-5-4 組織評価

腓腹筋の断面積が最大であった位置である末端から3 mmの位置において切片を作製し、解析を行った。染色像はオールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて撮影した。筋線維断面積を評価するため、20倍の倍率で撮影を行った。筋線維断面積はImage J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて評価した。盲検下において単一の測定者が1切片当たり100本の筋線維面積を測定した。

2-2-6 マウス骨格筋の免疫組織染色

2-2-6-1 灌流固定

マウスにペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg を腹腔内投与し、深麻酔させた。マウスを開胸し、ペリスタポンプ及び34Gの投与針を用いて左心室内に氷冷PBSを注入し、灌流脱血した。次に4% PFA含有0.1 M PB (pH 7.4) を8分間注入して灌流固定を行った。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。

2-2-6-2 組織切片作成

液体窒素を用いて O.C.T. compound により凍結し、薄切するまで -80°C にて保存した。O.C.T. compound によって凍結した腓腹筋を固定し、クリオスタット (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany) を用いて、 -20°C で厚さ $10\ \mu\text{m}$ の切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (松浪硝子工業, Osaka, Japan) に載せ、 -80°C で保存した。

2-2-6-3 免疫組織染色

染色時、 -80°C より凍結切片を取り出し、 -20°C で2時間放置した後、 4°C で1時間放置し、さらに室温で1時間乾燥させた。その後、Super PAP pen (大道産業株式会社) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。5% goat serum により1時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、一次抗体 (溶媒; 5% goat serum 含有 PBS) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体 (溶媒; 5% goat serum 含有 PBS) 及び Hoechst 33342 を1時間反応させた。染色後、フルオロマウント (水溶性封入基材) で封入した。

一次抗体には anti-Ki67 polyclonal antibody (1:250 dilution; AB9260, Merk Millipore) 及び mouse anti-myoD monoclonal antibody (1:200 dilution; sc-377460, Santa Cruz)。二次抗体にはそれぞれ Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit IgG (1:1,000 dilution; A11040, Invitrogen)、もしくは Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (1:1,000 dilution; A11018, Invitrogen) を用いた。また、ネガティブコントロールは、一次抗体を除く以外は同様の操作を行った。染色した切片は BZ-9000 HS オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence) を用いて撮影した。撮影範囲に含まれる陽性細胞数を Image J でカウントし定量した。盲検下において単一の測定者が測定した。

2-2-7 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は、第1章 2-2-5 に準じて行った。

一次抗体には、mouse anti-SMN monoclonal antibody (1:1000 dilution; 610647, BD Biosciences)、mouse anti-myosin heavy chain monoclonal antibody (1:250 dilution; MAB4470, R&D Systems)、rabbit anti-cleaved caspase3 monoclonal antibody (1:200 dilution; 9664s, Cell Signaling Technology)、rabbit anti-p-Akt monoclonal antibody (1:1,000 dilution; 9271s, Cell Signaling Technology)、rabbit anti Akt monoclonal antibody (1:1,000 dilution; 9262s, Cell Signaling Technology) 及び mouse anti- β -actin mouse monoclonal antibody (1:2,000 dilution; A2228, Sigma Aldrich) を用いた。二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1,000 dilution; 32460, Invitrogen) 及び horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (1:1,000 dilution; 32430, Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2-2-8 細胞免疫染色

PBS で細胞を洗浄した後、4 °C で 20 分間、4% PFA (ナカライテスク) で固定し、PBS で再度洗浄した。つぎに、細胞を 4 °C、30 分間、5% goat serum 及び 0.1% TritonX-100 (ナカライテスク) 含有 PBS で、室温にて 1 時間ブロッキングした。を用いて、続いて、4 °C で一晩、一次抗体と反応させた。その後、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。1 次抗体は anti-myosin heavy chain monoclonal antibody (1:400 dilution; MAB4470, R&D Systems)を用いた。二次抗体には Alexa Fluor®546 donkey anti-mouse IgG (1:1,000 dilution; A11056, Invitrogen) を用いた。核染色は Hoechst 33342 を用いて行った。二次抗体以降の作業は遮光条件下で行った。最後に PBS で 3 回洗浄した後、HS オールインワン蛍光顕

微鏡 (Keyence) を使用して撮影した。

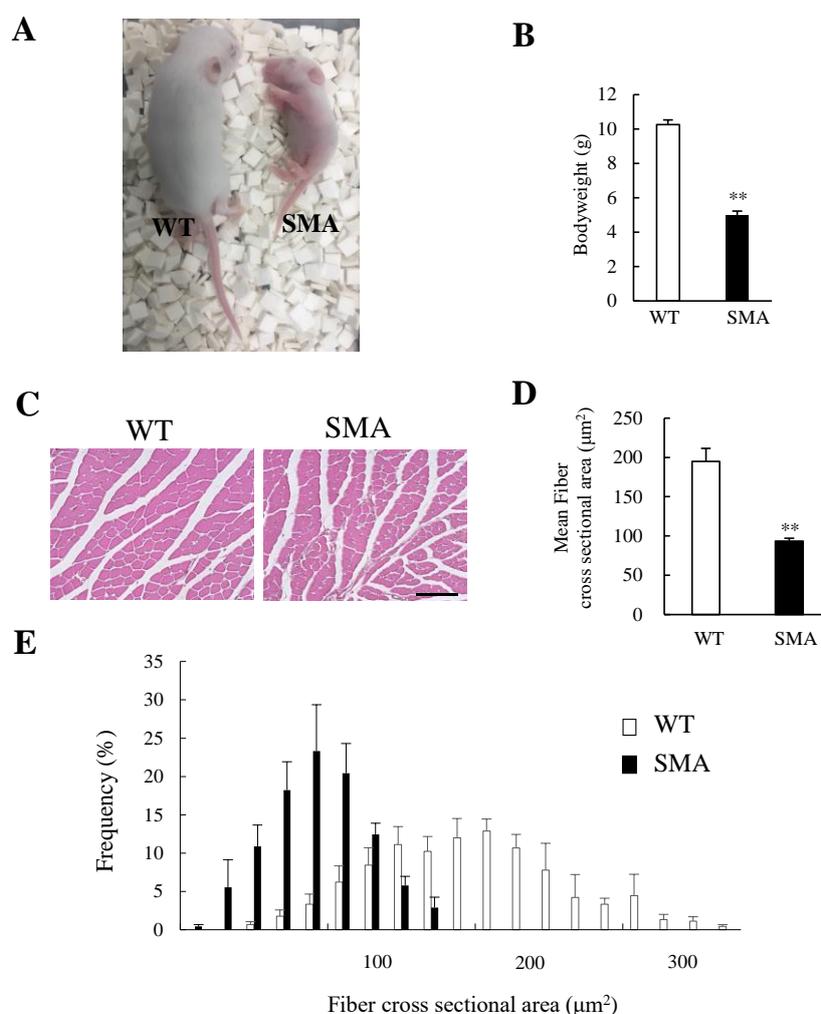
2-2-9 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な比較は、SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's *t*-test または Welch's *t*-test により行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 SMN Δ 7 マウス骨格筋における筋線維断面積の評価

SMN Δ 7 マウスは、全身性の SMN タンパク質の欠損を呈する SMA モデルマウスとして使用されている (21)。SMN Δ 7 マウスの骨格筋萎縮の程度について検証するため、生後 11 日目の SMN Δ 7 マウスの体重及び筋線維断面積を評価した。生後 11 日目において、野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウスの体重は有意に減少した (Fig. 17A, B)。続いて同時期の SMN Δ 7 マウスの腓腹筋の筋線維断面積を計測した結果、野生型マウスと比較し、SMN Δ 7 マウス腓腹筋の平均筋線維断面積は有意に減少した (Fig. 17C-E)。



Continued on the next page

Figure 17 Myofiber atrophy in the gastrocnemius of SMA model mice

(A) The image of wild-type (WT) and SMN Δ 7 mice (SMA) at P11. (B) Body weight of WT and SMN Δ 7 mice at P11. Data are expressed as mean \pm S.E.M (WT group: n = 4; SMN Δ 7 mice: n = 3). ** $P < 0.01$ vs. WT group (Student's t -test). (C) Representative hematoxylin and eosin staining for gastrocnemius muscles of WT and SMN Δ 7 mice at P11. Scale bar = 100 μ m. (D) Mean fiber cross sectional area. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (WT group: n = 4; SMN Δ 7 mice: n = 3). ** $P < 0.01$ vs. WT group (Student's t -test). (E) The distribution of fiber cross sectional area. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (WT group: n = 4; SMN Δ 7 mice: n = 3).

3-2 SMN Δ 7 マウス骨格筋における筋分化関連因子の発現

本章 3-1 の結果より、生後 11 日目の SMN Δ 7 マウス腓腹筋において、筋萎縮が進行していることを明らかにした。そこで SMN Δ 7 マウスの骨格筋萎縮の分子機序を明らかにするため、同時期の SMN Δ 7 マウス骨格筋における筋分化関連因子の発現を評価した。細胞増殖マーカーである Ki67 陽性細胞数の割合は、生後 11 日目において、野生型マウスと比較し SMN Δ 7 マウス腓腹筋で有意に減少した (Fig. 18A, B)。さらに筋芽細胞マーカーである MyoD 陽性細胞数の割合は、野生型マウスと比較し SMN Δ 7 マウス腓腹筋で有意に減少した (Fig. 18C, D)。これらの結果より、SMA 病態下の骨格筋において、筋分化関連因子の発現の低下が病態形成に関与することが示唆された。

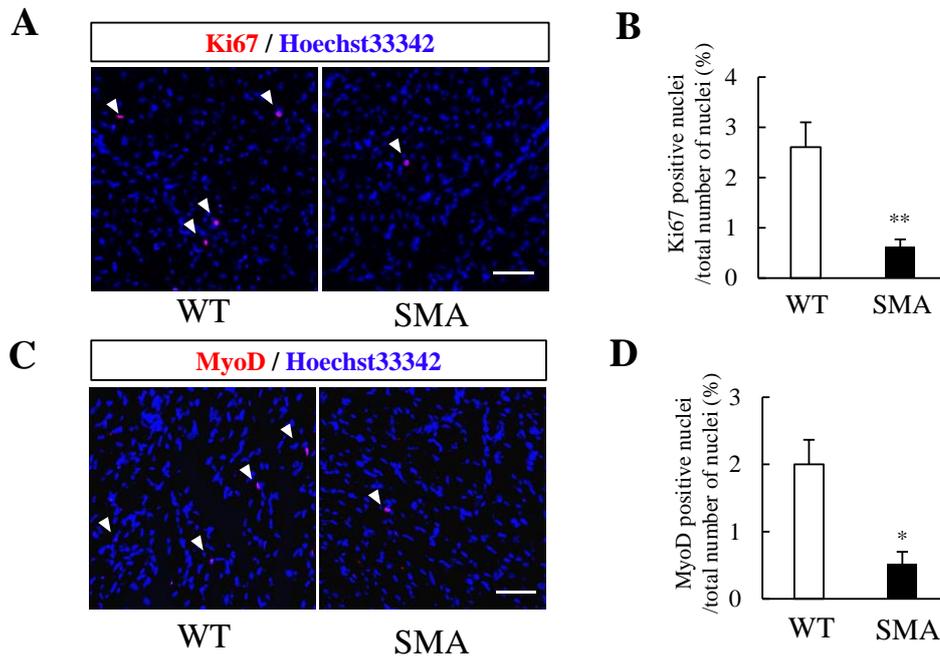


Figure 18 Expression of muscle differentiation related factor in the gastrocnemius of SMA model mice

(A) Representative fluorescence image of Ki67 in gastrocnemius muscles of WT and SMN Δ 7 mice at P11. The scale bar shows 75 μ m. (B) Quantitative analysis of Ki67 positive cells. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (WT group: n = 4; SMN Δ 7 mice: n = 4). ** P < 0.01 vs. WT group (Student's t -test). (C) Representative fluorescence image of MyoD in gastrocnemius muscles of wild-type and SMN Δ 7 mice at P11. The scale bar shows 75 μ m. (D) Quantitative analysis of MyoD positive cells. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (WT group: n = 4; SMN Δ 7 mice: n = 4). * P < 0.05 vs. WT group (Student's t -test).

3-3 マウス筋芽細胞における SMN ノックダウンによる筋分化への影響

本章 3-1 及び 3-2 において、生後 11 日目の SMN Δ 7 マウスの腓腹筋において、筋分化関連因子の発現低下を伴う骨格筋萎縮が認められることを明らかにした。一方、生後 11 日目の SMN Δ 7 マウス腓腹筋ではすでに運動ニューロン支配の脱落が進行していることが報告されており (21)、認められた病態は運動ニューロンの脱落の影響を受けていると考えられる。そこで運動ニューロンの影響を無視できる条件下で、骨格筋細胞内 SMN タンパク質の筋分化への関与を明らかにするため、マウス筋芽細胞 C2C12 において SMN をノックダウンし、その後の筋分化の程度について評価した。分化開始 48 時間後から 96 時間後にかけて、SMN タンパク質の発現はネガティブコントロール siRNA 導入群と比較し、有意に低下した (Fig. 19A, B)。続いて、SMN をノックダウンした筋芽細胞のその後の分化能を検証するため、分化用培地 (2% horse serum 含有 DMEM) で培養後、後期筋分化マーカーであるミオシン重鎖 (myosin heavy chain: MHC) の発現量を評価した。興味深いことに、分化開始 48 時間後、SMN ノックダウン群においてコントロール群と比較し、MHC の発現が有意に増加した (Fig. 19A, C)。一方、分化開始 72 及び 96 時間後においては、コントロール群と SMN ノックダウン群の間で、MHC の発現量に有意な差は認められなかった。

筋芽細胞の分化に伴い隣接する細胞同士が融合し、多核化した筋線維が形成されるため、細胞内の核数の増加は筋分化と正の相関を示す (67, 68)。SMN をノックダウンした骨格筋細胞での多核化の程度を検証するため、1 線維当たりの平均核数を評価した。コントロール群と比較し、SMN ノックダウン群では、1 線維当たりの平均核数が有意に減少した (Fig. 19D, E)。以上の結果から、骨格筋細胞での SMN の発現低下により、筋分化成熟能が障害されることが示唆された。

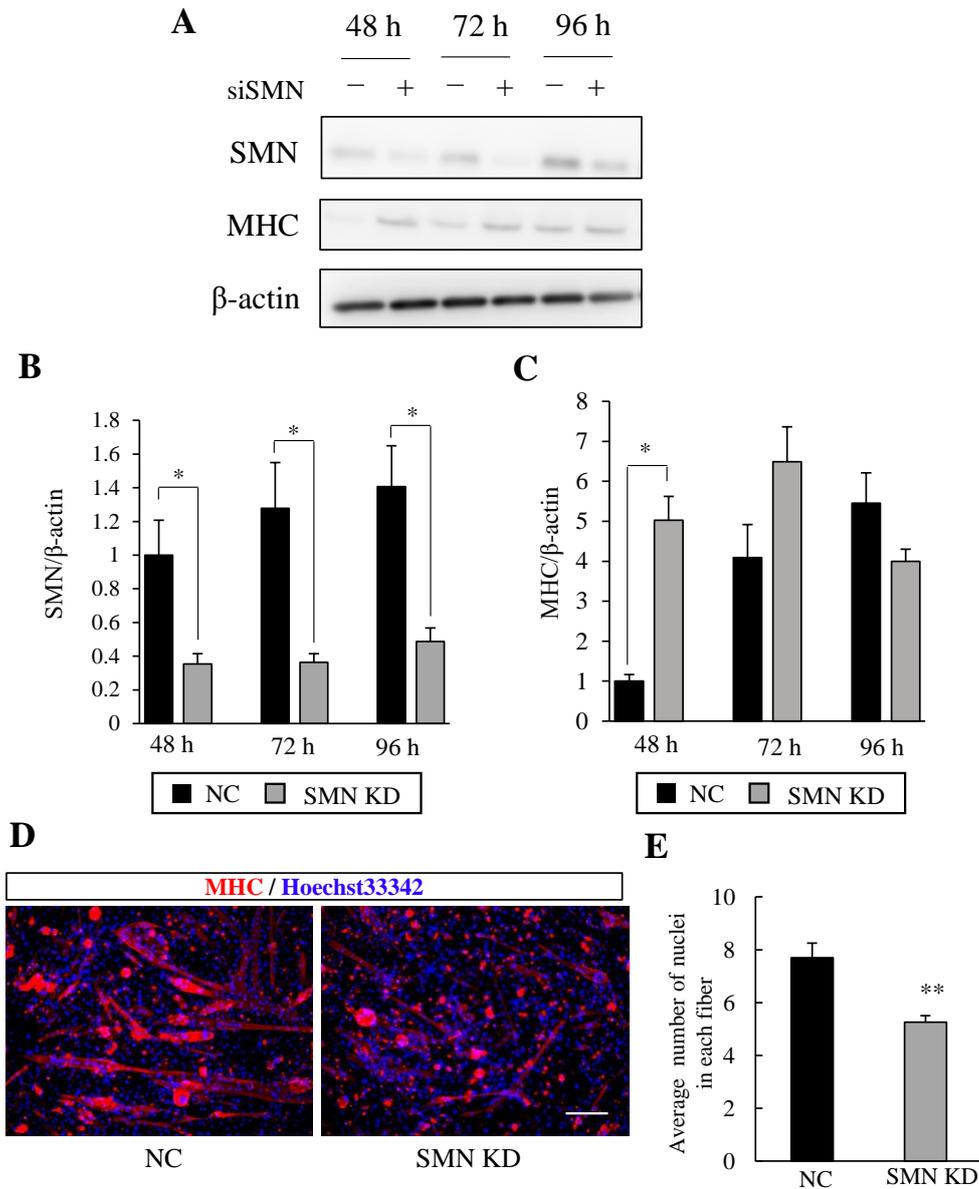


Figure 19 Altered expression of MHC and impaired fusion in SMN-knockdown C2C12

(A) MHC and SMN protein expression were examined by Western blot analysis in C2C12 cells. (B) Quantitative analysis of the expression level of SMN protein. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n = 5$ or 7). * $P < 0.05$ vs. Negative Control siRNA group (Welch's t -test). (C) Quantitative analysis of the expression level of MHC. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n = 5$ or 7). * $P < 0.05$ vs. Negative Control siRNA group (Welch's t -test). (D) Representative fluorescence image of MHC after 6 days differentiation. The scale bar shows $200 \mu\text{m}$. (E) Quantitative analysis of Average number of nuclei in each fiber. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n = 8$). ** $P < 0.01$ vs. Negative Control siRNA group (Student's t -test).

3-4 マウス筋芽細胞における SMN ノックダウンによる cleaved caspase-3 の発現への影響

骨格筋細胞の多核化の過程においては、caspase-3 の活性化が必須であることが知られている (70)。SMN をノックダウンした骨格筋細胞で多核化の程度を低下させた機構を明らかにするため、cleaved caspase-3 のタンパク量を評価した。コントロール群では分化開始から 48、72、96 時間後にかけて、cleaved caspase-3 のタンパク量が時間依存的に減少した (Fig. 20A, B)。SMN ノックダウン群においても同様に時間依存的な cleaved caspase-3 のタンパク量の減少が認められたが、分化開始 72 時間後、コントロール群と比較して有意なタンパク量の減少が認められた (Fig. 20A, B)。

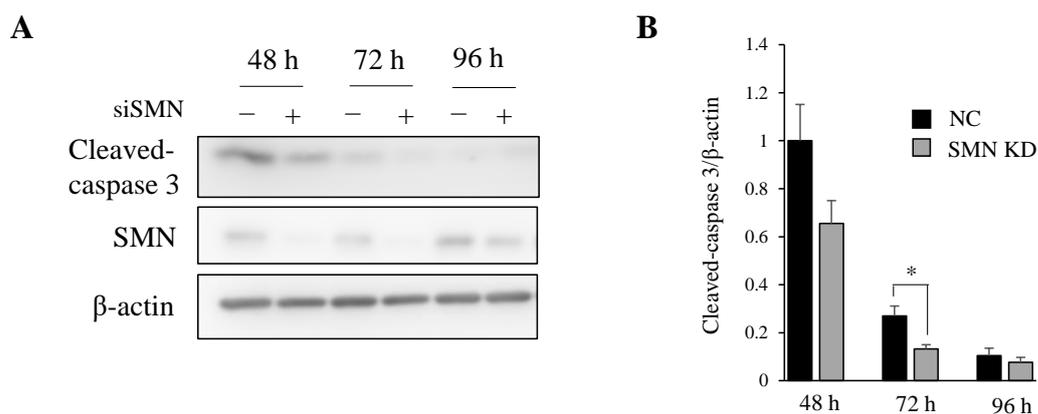


Figure 20 Caspase-3 activation was impaired during differentiation in SMN-knockdown C2C12 cells.

(A) cleaved-caspase3 and SMN protein expression were examined by Western blot analysis in C2C12 cells. (B) Quantitative analysis of the expression level of cleaved-caspase 3. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n = 5$ or 7). * $P < 0.05$ vs. Negative Control siRNA group (Student's t -test).

3-5 マウス筋芽細胞における SMN ノックダウンによるリン酸化 Akt の発現への影響の検討

骨格筋細胞の分化及び筋線維の肥大化の過程において、Akt シグナルが活性化することが知られている (69)。SMN をノックダウンした骨格筋細胞において筋分化に障害が生じさせた機構の詳細を解明するため、リン酸化 Akt の発現量を評価した。分化開始 48 時間後の段階では、コントロール群と SMN ノックダウン群の間で、リン酸化 Akt の発現量に明らかな差は認められなかった (Fig. 21A, B)。分化開始 72 時間後、コントロール群と比較し SMN ノックダウン群において、リン酸化 Akt の発現量が有意に減少した (Fig. 21A, B)。ついで分化開始 96 時間後では、またコントロール群と SMN ノックダウン群の間で、リン酸化 Akt の発現量に明らかな差は認められなかった。

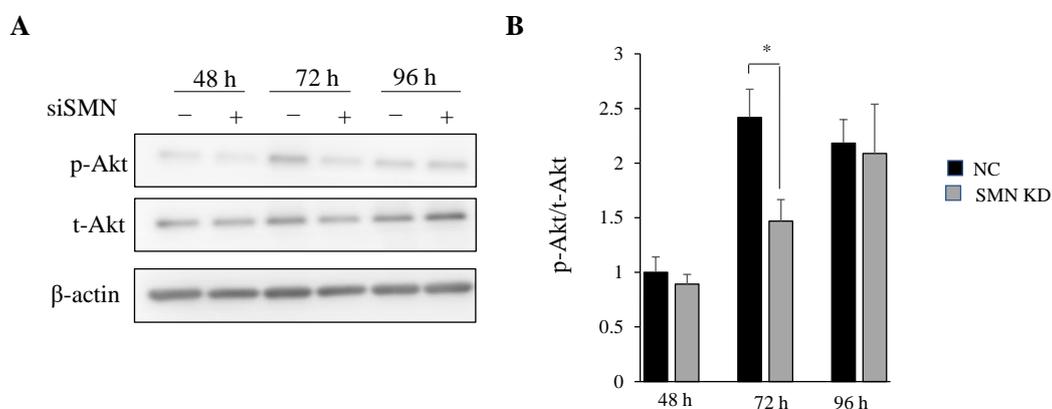


Figure 21 Akt activation was impaired during differentiation in SMN-knockdown C2C12 cells.

(A) p-Akt and total Akt expression were examined by western blot analysis in C2C12 cells. (B) Quantitative analysis of the expression level of p-Akt and total Akt. Data are presented as means \pm S.E.M. (n = 5 or 7). * $P < 0.05$ vs. Negative Control siRNA group (Student's *t*-test).

第4節 考察

本章では、SMN タンパク質の発現が減少した SMA 病態下では骨格筋細胞分化能が低下することを明らかにし、その機構として caspase-3 及び Akt の活性低下が関与することを初めて明らかにした。

初めに、本研究で生後 11 日目の SMN Δ 7 マウス骨格筋組織において、増殖細胞及び筋芽細胞の割合が減少することを明らかにした。生後 11 日目は健常なマウスが筋肥大を伴う運動機能を獲得する発達期であるとともに、平均生存期間が 13.6 日間である SMN Δ 7 マウスにおいては萎縮が進行した病態後期である (21)。したがって、これらの結果は、発達能の低下と萎縮条件下における再生能の低下の二面性を有する表現型であると考えられる。

続いて *in vitro* の実験系を用いて、SMN タンパク質の発現低下によりマウス筋芽細胞の分化後の多核化能が低下することを明らかにした。この結果は shRNA を用いた過去の知見と一致する (72)。筋線維の成熟度と線維内の核の数は相関するため (67, 68)、SMN タンパク質の欠乏による多核化能の低下は、SMA 患者筋線維の機能低下を導いていると考えられる。興味深いことに、筋芽細胞の分化早期の段階では SMN ノックダウンにより MHC の発現が増加するものの、最終的な分化後の MHC の発現量には差は生じなかった。このことは SMN Δ 7 マウス由来の骨格筋細胞が分化成熟マーカーをより早期から発現する知見と一致している (73, 74)。これらの結果より、筋芽細胞における SMN タンパク質の減少により MHC の発現時期と MHC の発現制御後の多核化に障害が生じ、その結果筋成熟に異常が生じる可能性が示唆された。

本研究は、SMN のノックダウンにより筋芽細胞の caspase-3 及び Akt の活性が調整されることを示した最初の報告である。筋芽細胞においては caspase-3 の活性化は正常な細胞質融合、多核化に重要な役割を担うことが報告されており

(70)、SMN ノックダウン筋芽細胞において認められた多核化能の低下は、分化初期の caspase-3 の活性低下によると考えられる。一方、caspase-3 はアポトーシスの過程における典型的なエフェクターとして知られており (75)、実際に運動ニューロンにおける SMN の欠乏は、caspase-3 を活性化させアポトーシスを惹起することが報告されている (76, 77)。よって、SMN タンパク質による caspase-3 活性の制御機構とそのシグナル伝達経路における組織特異的な反応については更なる解析が必要である。

さらに SMN ノックダウンにより分化早期の Akt 活性が低下することが明らかになった。Akt/mTOR シグナルはタンパク質合成を制御し、筋分化及び筋線維肥大を促進するため (69, 78)、Akt 活性低下は、SMA 病態における筋成熟の低下に関与する可能性が高いと考えられる。

第 1 章及び第 2 章で述べた通り、SMN タンパク質は種々の microRNA 産生制御因子と相互作用することで、microRNA 産生に関与する (13)。骨格筋細胞内に存在する種々の microRNA が高度なネットワークを構築し、筋分化を制御することが知られており (79, 80)、SMA マウス骨格筋及び SMA 患者血清中では筋分化を制御する機能を有する microRNA-206 が増加することが報告されている (81)。したがって、SMN タンパク質の減少により筋分化を制御する microRNA ネットワークの均衡が破綻し、下流の caspase-3 及び Akt 活性に影響が及ぶことで最終的に筋分化能が低下する可能性があると考えられ、今後詳細な検討が求められる。

本研究では SMN タンパク質の発現が減少した骨格筋細胞は分化成熟能が低下することを示し、その機構として caspase-3 及び Akt の活性低下が関与することを明らかにした (Fig. 22)。したがって、SMA 病態に対する治療戦略として、中神経系の組織に加え、骨格筋組織の SMN タンパク質を増加させること

が有用な治療になりうると考えられる。

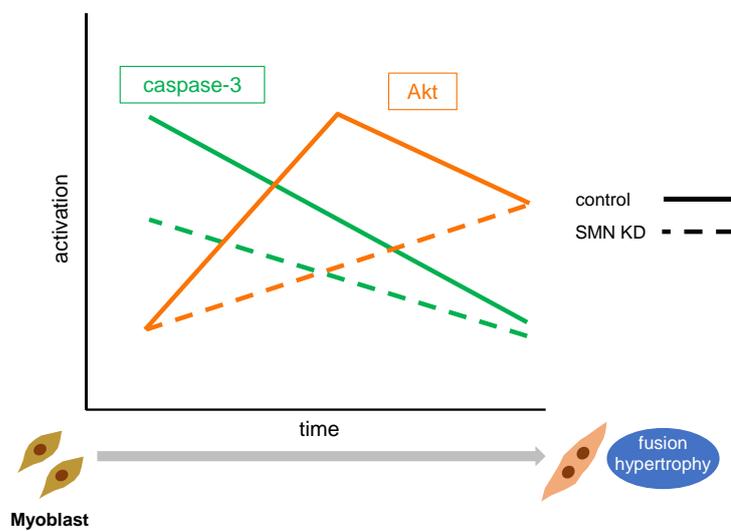


Figure 22 The signaling activation in SMN knockdown C2C12 cells

総括及び結論

SMN タンパク質は、その欠損が SMA 病態形成の原因となることが知られている。しかし、SMN タンパク質の機能は不明な点が多く、なぜ SMN タンパク質の欠損により運動ニューロンの変性や骨格筋萎縮などの SMA 病態が形成されるのかは明らかになっていない。そこで、本研究では SMA の主病変部位である脊髄及び骨格筋における SMN タンパク質の新規機能を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、運動ニューロンにおける SMN タンパク質のライソゾーム機能への関与を検討した。

- 1) NSC-34 細胞における SMN のノックダウンにより、TFEB の発現量が減少した。
- 2) NSC-34 細胞における SMN のノックダウンにより、ライソゾームの形態異常及びライソゾームの細胞内分布の変化が認められた。
- 3) NSC-34 細胞における SMN のノックダウンにより、ライソゾーム関連遺伝子群の発現量が減少し、ライソゾーム活性が低下した。
- 4) NSC-34 細胞における SMN のノックダウンにより、mTOR シグナル関連因子の発現量が減少した。
- 5) SMN Δ 7 マウスの脊髄組織において、野生型マウスと比較し、ライソゾーム関連因子及び mTOR シグナル関連因子の発現量が減少した。

第 2 章では、脊髄組織に存在するミクログリアにおける SMN タンパク質の機能を検討した。

- 1) SMN-ASO の投与により、SMN Δ 7 マウスの脊髄組織における SMN タンパク質の発現量が増加し、運動機能低下が抑制された。
- 2) SMN-ASO の投与により、SMN Δ 7 マウス脊髄組織におけるミクログリア数の増加が抑制された。
- 3) SMN-ASO の投与により、SMN Δ 7 マウス脊髄組織におけるミクログリアの

酸化ストレスマーカーの発現量が減少した。

- 4) SMN をノックダウンした RAW264.7 細胞において、ROS 産生量が増大した。
- 5) SMN をノックダウンした RAW264.7 細胞において、炎症性メディエーターの産生量が増大した。

第3章では、SMN タンパク質の骨格筋分化における役割について検討した。

- 1) SMN Δ 7 マウスの腓腹筋において、筋線維断面積が野生型マウスと比較して減少しており、さらに細胞増殖マーカー及び筋芽細胞マーカー陽性細胞数が減少していた。
- 2) SMN をノックダウンした C2C12 細胞において、多核化の程度が減少し、MHC の経時的発現パターンの変化が認められた。
- 3) SMN をノックダウンした C2C12 細胞において、caspase-3 の活性低下が認められた。
- 4) SMN をノックダウンした C2C12 細胞において、Akt の活性低下が認められた。

本研究において、SMN タンパク質が運動ニューロンにおいて TFEB の発現制御を介しライソゾームの機能維持に寄与することを明らかにした。また、SMN タンパク質はミクログリアの活性化に関与しており、SMA 病態ではミクログリアの SMN タンパク質が減少することにより炎症性サイトカインの産生が増大し、病態形成に関与することが示唆された。さらに、骨格筋においては、SMN タンパク質が caspase-3 及び Akt の活性制御を介して、骨格筋分化を調節することを明らかにした。

以上、本研究では SMA の主病変部位における SMN タンパク質の新規の役割を解明した。これらの機能が総合的に破綻することにより、SMA 病態が形成されると考えられる。

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、御鞭撻を賜りました恩師 岐阜薬科大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指導、御助言を賜りました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士、同講師 中村信介博士並びに岐阜薬科大学バイオメディカルリサーチ寄付講座特任助教 大津航博士に深謝致します。

本論文の審査にあたり有益なる御助言を賜りました岐阜薬科大学医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室教授 足立哲夫博士、岐阜薬科大学生命薬学大講座感染制御学研究室准教授 腰塚哲朗博士並びに岐阜薬科大学実践薬学大講座薬局薬学研究室准教授 井口和弘博士に深謝致します。

本研究に際し、御協力と御助言を頂きました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室諸氏に心から感謝の意を表します。

本研究は、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金の支援を受けて実施したものです。

引用文献

1. Crawford, T. O. and Pardo, C. A. (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* **3**, 97–110
2. Sumner, C. J. (2007) Molecular Mechanisms of Spinal Muscular Atrophy. *Journal Child Neurol.* **22**, 979–989
3. Zerres, K., Wirth, B., and Rudnik-Schöneborn, S. (1997) Spinal Muscular Atrophy--Clinical and Genetic Correlations. *Neuromuscul Disord.* **7**, 202–207
4. (編) SMA診療マニュアル編集委員会. (2012) 脊髄性筋萎縮症診療マニュアル. 金芳堂
5. Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frézal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., and Melki, J. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**, 155–165
6. Hahnen, E., Forkert, R., Marke, C., Rudnik-Schöneborn, S., Schönling, J., Zerres, K., and Wirth, B. (1995) Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 1927–1933
7. Gennarelli, M., Lucarelli, M., Capon, F., Pizzuti, A., Merlini, L., Angelini, C., Novelli, G., and Dallapiccola, B. (1995) Survival Motor-Neuron Gene Transcript Analysis in Muscles from Spinal Muscular-Atrophy Patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 342–348
8. Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., and Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6307–6311
9. Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* **15**, 3555–3565
10. Massenet, S., Pellizzoni, L., Paushkin, S., Mattaj, I. W., and Dreyfuss, G. (2002) The SMN Complex Is Associated with snRNPs throughout Their Cytoplasmic Assembly Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6533–6541
11. Yong, J., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2004) Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes? *Trends Cell Biol.* **14**, 226–232
12. Donlin-Asp, P. G., Bassell, G. J., and Rossoll, W. (2016) A Role for the Survival of Motor Neuron Protein in mRNP Assembly and Transport. *Curr. Opin. Neurobiol.* **39**, 53–61

13. Magri, F., Vanoli, F., and Corti, S. (2017) miRNA in spinal muscular atrophy pathogenesis and therapy. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 755–767
14. Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kröning, A. K., Karle, K., Monani, U. R., and Sendtner, M. (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell Biol.* **163**, 801–812
15. Workman, E., Kolb, S. J., and Battle, D. J. (2012) Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein biogenesis defects and motor neuron selectivity in spinal muscular atrophy. *Brain Res.* **1462**, 93-99
16. Rigo, F., Hua, Y., Chun, S. J., Prakash, T. P., Krainer, A. R., and Bennett, C. F. (2012) Synthetic oligonucleotides recruit ILF2/3 to RNA transcripts to modulate splicing. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 555–561
17. Foust, K. D., Wang, X., McGovern, V. L., Braun, L., Bevan, A. K., Haidet, A. M., Le, T. T., Morales, P. R., Rich, M. M., Burghes, A. H. M., and Kaspar, B. K. (2010) Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat. Biotechnol.* **28**, 271–274
18. Naryshkin, N. A., Weetall, M., Dakka, A., Narasimhan, J., Zhao, X., Feng, Z., Ling, K. K. Y., Karp, G. M., Qi, H., Woll, M. G., Chen, G., Zhang, N., Gabbeta, V., Vazirani, P., Bhattacharyya, A., Furia, B., Risher, N., Sheedy, J., Kong, R., Ma, J., Turpoff, A., Lee, C. S., Zhang, X., Moon, Y. C., Trifillis, P., Welch, E. M., Colacino, J. M., Babiak, J., Almstead, N. G., Peltz, S. W., Eng, L. A., Chen, K. S., Mull, J. L., Lynes, M. S., Rubin, L. L., Fontoura, P., Santarelli, L., Haehnke, D., McCarthy, K. D., Schmucki, R., Ebeling, M., Sivaramakrishnan, M., Ko, C. P., Paushkin, S. V., Ratni, H., Gerlach, I., Ghosh, A., and Metzger, F. (2014) SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science.* **345**, 688–693
19. Ratni, H., Ebeling, M., Baird, J., Bendels, S., Bylund, J., Chen, K. S., Denk, N., Feng, Z., Green, L., Guerard, M., Jablonski, P., Jacobsen, B., Khwaja, O., Kletzl, H., Ko, C. P., Kustermann, S., Marquet, A., Metzger, F., Mueller, B., Naryshkin, N. A., Paushkin, S. V., Pinard, E., Poirier, A., Reutlinger, M., Weetall, M., Zeller, A., Zhao, X., and Mueller, L. (2018) Discovery of Risdiplam, a Selective Survival of Motor Neuron-2 (SMN2) Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *J. Med. Chem.* **61**, 6501–6517
20. Messina, S. and Sframeli, M. (2020) New Treatments in Spinal Muscular Atrophy: Positive Results and New Challenges. *J. Clin. Med.* **9**, 2222
21. Monica, H., Wagner, A. K., Cerletti, M., Wagers, A. J., and Rubin, L. L. (2007)

- Abnormal motor phenotype in the SMNDelta7 mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* **27**, 207–219
22. Passini, M. A., Bu, J., Richards, A. M., Kinnecom, C., Sardi, S. P., Stanek, L. M., Hua, Y., Rigo, F., Matson, J., Hung, G., Kaye, E. M., Shihabuddin, L. S., Krainer, A. R., Bennett, C. F., and Cheng, S. H. (2011) Antisense Oligonucleotides Delivered to the Mouse CNS Ameliorate Symptoms of Severe Spinal Muscular Atrophy. *Sci. Transl. Med.* **3**, 72ra18
 23. Kim, J. K., Jha, N. N., Feng, Z., Faleiro, M. R., Chiriboga, C. A., Wei-Lapierre, L., Dirksen, R. T., Ko, C. P., and Monani, U. R. (2020) Muscle-specific SMN reduction reveals motor neuron-independent disease in spinal muscular atrophy models. *J. Clin. Invest.* **130**, 1271–1287
 24. Luzio, J. P., Pryor, P. R., and Bright, N. A. (2007) Lysosomes: Fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 622–632
 25. Lawrence, R. E. and Zoncu, R. (2019) The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat. Cell Biol.* **21**, 133–142
 26. Sardiello, M., Palmieri, M., Ronza, A. Di, Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R. S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., and Ballabio, A. (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science.* **325**, 473–477.
 27. Liu, G. Y. and Sabatini, D. M. (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 183–203.
 28. Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., and Sabatini, D. M. (2010) Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.* **141**, 290–303
 29. Wang, H., Wang, R., Xu, S., and Lakshmana, M. K. (2016) Transcription Factor EB Is Selectively Reduced in the Nuclear Fractions of Alzheimer’s and Amyotrophic Lateral Sclerosis Brains. *Neurosci. J.* **2016**, 1–8
 30. Cortes, C. J., Miranda, H. C., Frankowski, H., Batlevi, Y., Young, J. E., Le, A., Ivanov, N., Sopher, B. L., Carromeu, C., Muotri, A. R., Garden, G. A., and La Spada, A. R. (2014) Polyglutamine-expanded androgen receptor interferes with TFEB to elicit autophagy defects in SBMA. *Nat. Neurosci.* **17**, 1180–1189
 31. Maier, O., Böhm, J., Dahm, M., Brück, S., Beyer, C., and Johann, S. (2013) Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochem. Int.* **62**, 1029–1038
 32. Napolitano, G. and Ballabio, A. (2016) TFEB at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 2475–2481
 33. Cai, Q. and Sheng, Z. H. (2009) Molecular motors and synaptic assembly.

34. Gonzalez Porras, M. A., Sieck, G. C., and Mantilla, C. B. (2018) Impaired autophagy in motor neurons: A final common mechanism of injury and death. *Physiology* **33**, 211–224
35. Song, J. W., Misgeld, T., Kang, H., Knecht, S., Lu, J., Cao, Y., Cotman, S. L., Bishop, D. L., and Lichtman, J. W. (2008) Lysosomal activity associated with developmental axon pruning. *J. Neurosci.* **28**, 8993–9001
36. Connolly, K. J., O’Hare, M. B., Mohammed, A., Aitchison, K. M., Anthony, N. C., Taylor, M. J., Stewart, B. A., Tuxworth, R. I., and Tear, G. (2019) The neuronal ceroid lipofuscinosis protein Cln7 functions in the postsynaptic cell to regulate synapse development. *Sci. Rep.* **9**, 15592
37. Willett, R., Martina, J. A., Zewe, J. P., Wills, R., Hammond, G. R. V., and Puertollano, R. (2017) TFEB regulates lysosomal positioning by modulating TMEM55B expression and JIP4 recruitment to lysosomes. *Nat. Commun.* **8**, 1580
38. Zarkovic, K. (2003) 4-Hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* **24**, 293–303.
39. Hayashi, M., Araki, S., Arai, N., Kumada, S., Itoh, M., Tamagawa, K., Oda, M., and Morimatsu, Y. (2002) Oxidative stress and disturbed glutamate transport in spinal muscular atrophy. *Brain Dev.* **24**, 770–775
40. Gogliotti, R. G., Quinlan, K. A., Barlow, C. B., Heier, C. R., Heckman, C. J., and DiDonato, C. J. (2012) Motor neuron rescue in spinal muscular atrophy mice demonstrates that sensory-motor defects are a consequence, not a cause, of motor neuron dysfunction. *J. Neurosci.* **32**, 3818–3829
41. Deitmer, J. W. and Rose, C. R. (2010) Ion changes and signalling in perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* **63**, 113–129
42. Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K. Y., Corey, D. P., and Khakh, B. S. (2012) TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat. Neurosci.* **15**, 70–80
43. Jäkel, S., and Dimou, L. (2017) Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci.* **11**, 24
44. Sargsyan, S.A., Monk, P.N., and Shaw, P. J. (2005) Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia.* **51**, 241–253
45. Eikelenboom, P., Bate, C., Van Gool, W. A., Hoozemans, J. J., Rozemuller, J. M., Veerhuis, R., and Williams, A. (2002) Neuroinflammation in Alzheimer’s

- disease and prion disease. *Glia* **40**, 232–239
46. Ling, K. K., Lin, M. Y., Zingg, B., Feng, Z., and Ko, C. P. (2010) Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS One*. **5** e15457
 47. Tarabal, O., Caraballo-Miralles, V., Cardona-Rossinyol, A., Correa, F. J., Olmos, G., Lladó, J., Esquerda, J. E., and Calderó, J. (2014) Mechanisms involved in spinal cord central synapse loss in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **73**, 519–535
 48. Cervero, C., Blasco, A., Tarabal, O., Casanovas, A., Piedrafita, L., Navarro, X., Esquerda, J. E., and Caldero, J. (2018) Glial activation and central synapse loss, but not motoneuron degeneration, are prevented by the sigma-1 receptor agonist pre-084 in the SMN2B/ mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **77**, 577–597
 49. Talbot, K. and Tizzano, E. F. (2017) The clinical landscape for SMA in a new therapeutic era. *Gene Ther.* **24**, 529–533.
 50. Singh, N. N., Lee, B. M., DiDonato, C. J., and Singh, R. N. (2015) Mechanistic principles of antisense targets for the treatment of spinal muscular atrophy. *Future Med. Chem.* **7**, 1793–1808.
 51. Ohuchi, K., Funato, M., Yoshino, Y., Ando, S., Inagaki, S., Sato, A., Kawase, C., Seki, J., Saito, T., Nishio, H., Nakamura, S., Shimazawa, M., Kaneko, H., and Hara, H. (2019) Notch Signaling Mediates Astrocyte Abnormality in Spinal Muscular Atrophy Model Systems. *Sci. Rep.* **9**, 3701
 52. Kopitar-Jerala N. (2015) Innate Immune Response in Brain, NF-Kappa B Signaling and Cystatins. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 73
 53. Kaminska, B., Gozdz, A., Zawadzka, M., Ellert-Miklaszewska, A., and Lipko, M. (2009) MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat. Rec.* **292**, 1902–1913
 54. Vukojcic, A., Delestrée, N., Fletcher, E. V., Pagiazitis, J. G., Sankaranarayanan, S., Yednock, T. A., Barres, B. A. and Mentis, G. Z. (2019) The Classical Complement Pathway Mediates Microglia-Dependent Remodeling of Spinal Motor Circuits during Development and in SMA. *Cell Rep.* **29**, 3087–3100.e7.
 55. Acsadi, G., Lee, I., Li, X., Khaidakov, M., Pecinova, A., Parker, G. C., and Hüttemann, M. (2009) Mitochondrial Dysfunction in a Neural Cell Model of Spinal Muscular Atrophy. *J. Neurosci. Res.* **87**, 2748–2756
 56. Miller, N., Shi, H., Zelikovich, A. S., and Ma, Y. C. (2016) Motor neuron mitochondrial dysfunction in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **25**,

- 3395–3406
57. Cai, L. J., Tu, L., Li, T., Yang, X. L., Ren, Y. P., Gu, R., Zhang, Q., Yao, H., Qu, X., Wang, Q. and Tian, J. Y. (2020) Up-regulation of microRNA-375 ameliorates the damage of dopaminergic neurons, reduces oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease by inhibiting SP1. *Aging* **12**, 672–689
 58. Bhinge, A., Namboori, S. C., Bithell, A., Soldati, C., Buckley, N. J. and Stanton, L. W. (2016) MiR-375 is Essential for Human Spinal Motor Neuron Development and May Be Involved in Motor Neuron Degeneration. *Stem Cells* **34**, 124–134
 59. Kim, E. K. and Choi, E. J. (2017) SMN1 functions as a novel inhibitor for TRAF6-mediated NF- κ B signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1864**, 760–770
 60. Akira, S., and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. immunology* **4**, 499–511
 61. Chen, H., Li, M., Campbell, R. A., Burkhardt, K., Zhu, D., Li, S. G., Lee, H. J., Wang, C., Zeng, Z., Gordon, M. S., Bonavida, B., and Berenson, J. R. (2006) Interference with nuclear factor kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase signaling by TRAF6C small interfering RNA inhibits myeloma cell proliferation and enhances apoptosis. *Oncogene* **25**, 6520–6527
 62. Gotz, R. (2000) The neuronal apoptosis inhibitory protein suppresses neuronal differentiation and apoptosis in PC12 cells. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2479–2489
 63. Roy, N., Mahadevan, M. S., McLean, M., Shutter, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., Salih, M., Aubry, H., Tamai, K., Guan, X., Ioannou, P., Crawford, T. O., de Jong, P. J., Surh, L., Ikeda, J. E., Korneluk, R. G., and MacKenzie, A. (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* **80**, 167–178
 64. Pellizzoni, L., Kataoka, N., Charroux, B., and Dreyfuss, G. (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* **95**, 615–624
 65. Cifuentes-Diaz, C., Frugier, T., Tiziano, F. D., Lacène, E., Roblot, N., Joshi, V., Moreau, M. H., and Melki, J. (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **152**, 1107–1114
 66. Giordani, L., Parisi, A., and Le Grand, F. (2018) Satellite Cell Self-Renewal. *Curr Top Dev Biol.* **126**, 177–203
 67. Rochlin, K., Yu, S., Roy, S., and Baylies, M. K. (2010) Myoblast fusion: When

- it takes more to make one. *Dev. Biol.* **341**, 66–83
68. Abmayr, S. M. and Pavlath, G. K. (2012) Myoblast fusion: Lessons from flies and mice. *Development* **139**, 641–656
 69. Vandromme, M., Rochat, A., Meier, R., Carnac, G., Besser, D., Hemmings, B. A., Fernandez, A., and Lamb, N. J. C. (2001) Protein Kinase B β /Akt2 Plays a Specific Role in Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 8173–8179
 70. Fernando, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R. S., and Megeney, L. A. (2002) Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11025–11030
 71. Gallot, Y. S., Straughn, A. R., Bohnert, K. R., Xiong, G., Hindi, S. M., and Kumar, A. (2018) MyD88 is required for satellite cell-mediated myofiber regeneration in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 3449–3463
 72. Shafey, D., Côté, P. D., and Kothary, R. (2005) Hypomorphic Smn knockdown C2C12 myoblasts reveal intrinsic defects in myoblast fusion and myotube morphology. *Exp. Cell Res.* **311**, 49–61
 73. Bricceno, K. V., Martinez, T., Leikina, E., Duguez, S., Partridge, T. A., Chernomordik, L. V., Fischbeck, K. H., Sumner, C. J., and Burnett, B. G. (2014) Survival motor neuron protein deficiency impairs myotube formation by altering myogenic gene expression and focal adhesion dynamics. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 4745–4757
 74. Hayhurst, M., Wagner, A. K., Cerletti, M., Wagers, A. J., and Rubin, L. L. (2012) A cell-autonomous defect in skeletal muscle satellite cells expressing low levels of survival of motor neuron protein. *Dev. Biol.* **368**, 323–334
 75. Alnemri, E. S. (1997) Mammalian Cell Death Proteases: A Family of Highly Conserved Aspartate Specific Cysteine Proteases. *J Cell Biochem.* **64**, 33–42
 76. Parker, G. C., Li, X., Anguelov, R. A., Toth, G., Cristescu, A., and Acsadi, G. (2008) Survival motor neuron protein regulates apoptosis in an in vitro model of spinal muscular atrophy. *Neurotox. Res.* **13**, 39–48
 77. 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
 78. Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., and Sandri, M. (2013) Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* **280**, 4294–4314

79. Small, E. M., O'Rourke, J. R., Moresi, V., Sutherland, L. B., McAnally, J., Gerard, R. D., Richardson, J. A. and Olson, E. N. (2010) Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 4218–4223
80. Chen, J. F., Callis, T. E. and Wang, D. Z. (2009) microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci*. **122**, 13–20
81. Catapano, F., Zaharieva, I., Scoto, M., Marrosu, E., Morgan, J., Muntoni, F. and Zhou, H. (2016) Altered Levels of MicroRNA-9, -206, and -132 in Spinal Muscular Atrophy and Their Response to Antisense Oligonucleotide Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. **5**, e331

略語一覧表

ALS	:	amyotrophic lateral sclerosis
ASO	:	antisense oligonucleotide
CLEAR	:	coordinated lysosomal enhancement and regulation
CTSD	:	cathepsin D
DMEM	:	Dulbecco's modified eagle medium
FBS	:	fetal bovine serum
GFP	:	green fluorescent protein
HO-1	:	heme oxygenase-1
JNK	:	c-Jun N-terminal kinase
MHC	:	myosin heavy chain
MM-ASO	:	mismatch-antisense oligonucleotide
mTOR	:	mammalian/mechanistic target of rapamycin
NAIP	:	neuronal apoptosis inhibitory protein
PB	:	phosphate buffer
PBS	:	phosphate-buffered saline
PFA	:	paraformaldehyde
p70S6K	:	ribosomal protein S6 kinase beta-1
RIPA	:	radioimmunoprecipitation assay
RT-PCR	:	reverse transcription-polymerase chain reaction
ROS	:	reactive oxygen species
SMA	:	spinal muscular atrophy
SMN	:	survival motor neuron
snRNP	:	small nuclear ribonucleoprotein

shRNA	:	short hairpin RNA
siRNA	:	small interfering RNA
S6RP	:	S6 ribosomal protein
TBS	:	Tris-buffered saline
TFEB	:	transcription factor EB
TNF	:	tumor necrosis factor