

75. 新規病因遺伝子 *ERBB4* を基軸とする ALS の分子病態解明

高橋 祐二

国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科

Key words : 筋萎縮性側索硬化症 (ALS), *ERBB4*, 定常発現細胞, 神経細胞由来初代培養細胞, 軸索伸長

緒言

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、運動神経細胞の進行性脱落により全身の筋力低下・筋萎縮を呈し、平均 2-4 年で呼吸筋を含めた全身の運動機能を喪失する、予後不良の神経変性疾患である。現在に至るまで根本的治療法は確立していない。

研究者は稀な家族性 ALS (ALS19) の病因遺伝子として *ERBB4* を同定した¹⁾。*ERBB4* は、Neuregulin (NRG) をリガンドとする受容体型チロシンリン酸化酵素を司っている。遺伝子産物 ErbB4 は、NRG の結合により二量体化し、細胞内ドメインの自己リン酸化を介して、PI3-Akt、Ras-MAPK などの下流のシグナリングの活性化をもたらす。ALS19 における *ERBB4* の病原性変異はチロシンリン酸化酵素部位 (p.R927Q) あるいは ICD (p.R1275W) に存在し、ErbB4 の自己リン酸化能の低下をもたらす。さらに、孤発性 ALS の脊髄運動神経細胞において ErbB4 の発現低下・局在異常が認められている。

NRG-ErbB シグナリングは、シナプス可塑性、遺伝子転写活性化、軸索伸長など神経細胞において本質的な機能に関連している。特に、運動神経細胞においては神経筋接合部の形成に重要な役割を果たしている。ErbB4 は膜貫通部位と細胞内ドメイン (Intracellular domain: ICD) の 2 カ所におけるスプライシングアイソフォームが存在する (図 1A)。膜貫通部位のスプライシングにより、切断されて ICD が核内に移行するアイソフォームと、切断されずに細胞質に取り込まれるアイソフォームが生成される。ICD ドメインにおけるスプライシングにより、PI3-Akt シグナリング活性化部位を有するアイソフォームと、活性化部位を有さないアイソフォームが生成される。

本研究の目的は、ErbB4 の病原性変異による運動神経細胞死のメカニズムを明らかにして、ALS の病態解明と病態抑制治療に向けた分子標的を同定することである。

方法および結果

1. 野生型及び変異型 ErbB4 定常発現細胞系の構築

ErbB4 には膜貫通部位と C 末の 2 カ所のスプライシングの組み合わせによる 4 種類のアイソフォームが存在する (図 1A)。それぞれ Ea、Eb、Ba、Bb と命名する (図 1B)。

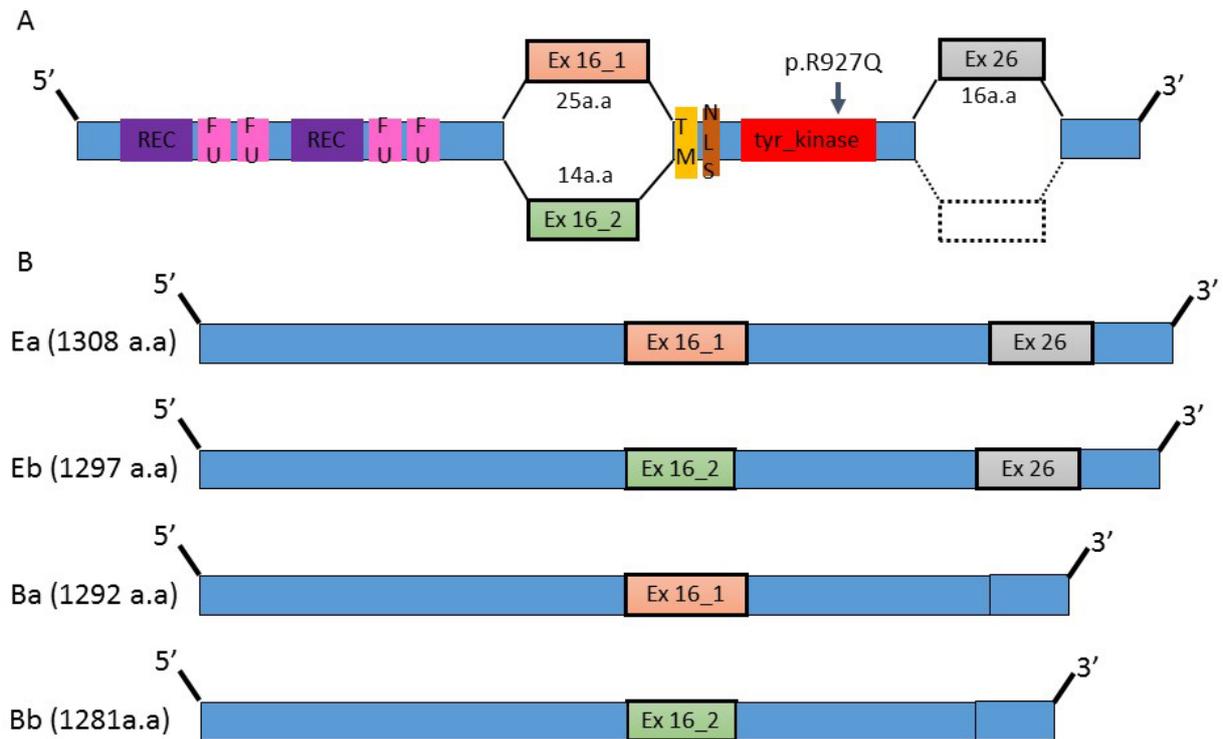


図1. ErbB4 蛋白質の構造

A) ErbB4 蛋白質のスプライシングアイソフォーム及び変異の位置。

ErbB4 は膜貫通部位近辺と細胞内ドメインの二カ所におけるスプライシングアイソフォームが存在する。膜貫通部位近辺のスプライシングにより、核内移行型 (a) / 細胞質移行型 (b) のアイソフォームが、細胞内ドメインのスプライシングにより PI3-Akt 活性化型 (E) / 非活性化型アイソフォーム (B) が生成される。ALS19 の病原性変異はチロシンリン酸化酵素ドメインに存在する。FU: Furin-like cysteine rich region. REC: cheY-homologous receiver domain. TM: Transmembrane domain. NLS: nuclear localization signal. Tyr_kinase: tyrosine kinase domain. a.a: amino acids. Ex: exon.

B) 各アイソフォームの構造。

各アイソフォームにおいて、pcDNA5/FRT/TO のマルチクローニングサイトに *Bam*HI-2xMyc-*Eco*RV-3xFLAG-*Not*I を挿入し、*Eco*RV で切ったあと、それぞれの cDNA を In-Fusion で挿入して N 末端側に myc、C 末端側に FLAG を付加した野生型及び ALS19 で同定された変異 (p.R927Q) を有する変異型発現ベクターを構築した。ErbB4 の各アイソフォームに対する発現ベクターを HEK293 細胞に導入し、免疫細胞化学的に発現を確認した (図2 A~D)。

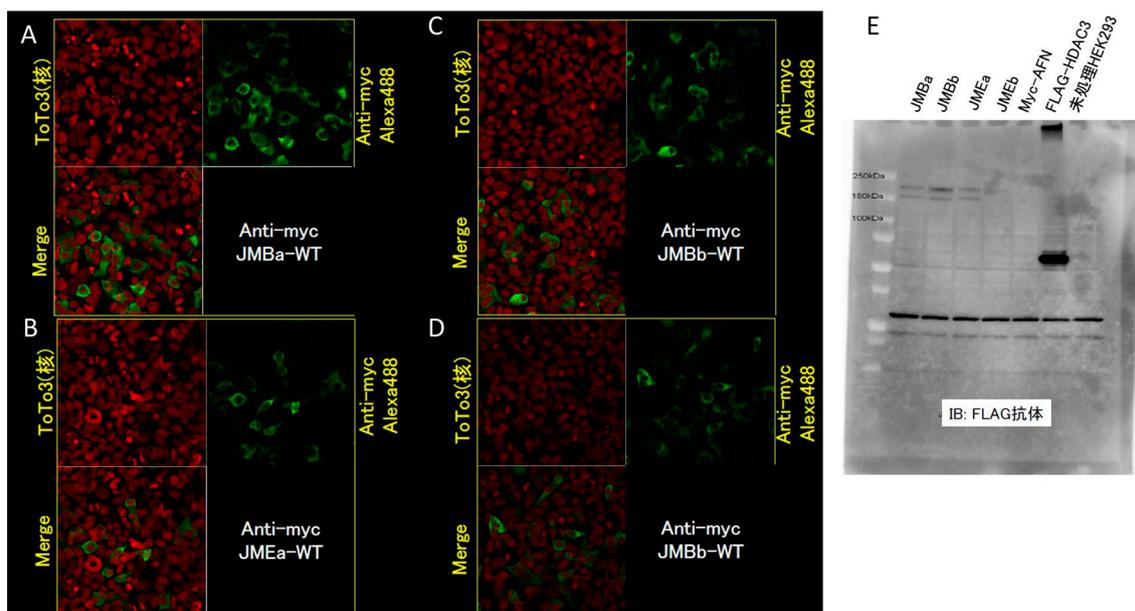


図2. 野生型 ErbB4 各アイソフォームの HEK293 細胞における発現

A~D) 一過性発現系による野生型 ErbB4 の細胞内発現。A: Ea B: Eb C: Ba D: Bb. ErbB4 の発現は N 末端側に付加した myc タグで認識している。いずれも細胞質にびまん性染色が認められる。

E) 定常発現細胞系における発現確認。ErbB4 の発現は C 末端側の FLAG タグで検出している。予測サイズ 180 kDa の近辺に、Ba、Bb、Ea においては二本のバンドが、Eb においては一本のバンドが認められる。

次に、作製した発現ベクターを Flip-In システムを用いて HEK293 細胞に導入して、Tet-On システムによるテトラサイクリン誘導性野生型・変異型遺伝子導入定常発現細胞系を構築した。Doxycycline を用いて発現誘導を行い、Western blot により発現を確認した (図 2E)。Ba、Bb、Ea は目的とする 180 kDa 付近に 2 本バンドが見られており、posttranscriptional modification の可能性が考えられた。

2. 野生型及び変異型 ErbB4 発現アデノウイルスベクターによる大脳皮質神経細胞由来初代培養細胞への遺伝子導入

1 で作製した発現ベクターを活用して、ErbB4 の野生型及び変異型発現アデノウイルスベクターを構築した。E14 マウス大脳皮質神経細胞由来初代培養細胞に導入し、発現を確認するとともに、細胞内局在・細胞形態に対する影響を分析した。アイソフォーム毎の細胞に対する影響及び野生型・変異型の差異を比較検討した。

変異型 Ea アイソフォームを導入した細胞においては、軸索伸長が不良である傾向が認められた。変異型 Eb アイソフォームを導入した神経細胞においては、軸索伸長が高度に障害されていた。

また、長期培養により、変異型を導入した神経細胞の方が、細胞の生存が不良である傾向が認められた。

考 察

本研究では、ALS19 の原因遺伝子 *ERBB4* の神経細胞における機能と変異による影響を検討した。NRG-ErbB4 シグナリングの障害による下流のパスウェイの影響を分析するための定常発現細胞の構築を行った。さらに、マウス大脳神経細胞由来初代培養細胞に対する遺伝子導入実験系を確立し、特に軸索伸長という観点から、病原性変異による神経機能障害の検証を行った。

これまで神経系における NRG-ErbB4 パスウェイに関しては、統合失調症との関連で研究が進んでおり²⁾、神経変性疾患に関連した研究は少ない。しかしながら、近年、ALS の運動神経細胞死において、NRG-ErbB4 パスウェイの機能異常が関連している可能性を示唆する知見が得られ始めている³⁻⁵⁾。

興味深いことに、自験例の剖検組織における分析では、正常の脊髄運動神経細胞では、ErbB4の染色性は基本的に細胞質に認められるのに対し、ALSにおいては、一部の細胞において細胞質と核両方に強い染色性が認められていた。核染色性が認められる細胞は比較的神経細胞体の大きさも保たれており、他の萎縮傾向にある運動神経細胞とは異なった形態を呈していた（未発表データ）。従って、従来は細胞質移行型のアイソフォームの発現が中心であった脊髄運動神経細胞において、核移行型のアイソフォームへのスイッチが起こっている可能性が示唆される。このような細胞においては、ErbB4のアイソフォームスイッチにより軸索伸長が促進されている可能性が考えられる。ALSにおいては、脱神経を来した筋肉細胞に対して、神経再支配が起こっている現象が認められる。ErbB4の核染色性陽性の神経細胞は、このような神経再支配に関わっている可能性が想定される。

さらに、ALS19において認められた病原性変異を導入することにより、軸索伸長機能障害、神経細胞死の惹起傾向が認められた。これまでALS19の病原性変異については、COS7細胞における一過性発現系で、NRG刺激による自己リン酸化能の低下を認めてはいるが、細胞生物学的な解析はこれまでにない。今回特に、軸索伸長・細胞生存の程度に明らかな差が見られたことから、ERBB4変異によるNRG-ErbB4パスウェイの障害が、軸索伸長の障害を介して運動神経細胞変性の機構に関与している可能性が示唆される。

今後は、Explant cultureを用いた脊髄運動神経細胞への遺伝子導入実験を行い、ErbB4の各アイソフォーム及び変異による影響を直接解析すると共に、定常発現細胞を活用したNRG-ErbB4シグナリングの解明、ErbB4依存性の軸索伸長の分子機構の解明を通じて、ALSの病態にさらに迫る研究を推進する。その為の研究基盤が確立できたと考えている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学医学部附属病院の伊達英俊、国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病大5部の荒木敏之、松本千尋、大阪大学神経内科の長野清一である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, et al. ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *Am J Hum Genet.* 2013;93(5):900-5. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.09.008. PubMed PMID: 24119685; PubMed Central PMCID: PMC3824132.
- 2) Mei L, Nave KA. Neuregulin-ERBB signaling in the nervous system and neuropsychiatric diseases. *Neuron.* 2014;83(1):27-49. doi: 10.1016/j.neuron.2014.06.007. PubMed PMID: 24991953; PubMed Central PMCID: PMC4189115.
- 3) Song F, Chiang P, Wang J, Ravits J, Loeb JA. Aberrant Neuregulin 1 Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2012;71(2):104-15
- 4) Lasiene J, Komine O, Fujimori-Tonou N, Powers B, Endo F, Watanabe S, et al. Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons. *Acta neuropathologica communications.* 2016;4(1):15. doi: 10.1186/s40478-016-0286-7. PubMed PMID: 26891847; PubMed Central PMCID: PMC4758105.
- 5) Casanovas A, Salvany S, Lahoz V, Tarabal O, Piedrafita L, Sabater R, et al. Neuregulin 1-ErbB module in C-bouton synapses on somatic motor neurons: molecular compartmentation and response to peripheral nerve injury. *Scientific reports.* 2017;7:40155. doi: 10.1038/srep40155. PubMed PMID: 28065942; PubMed Central PMCID: PMC5220293.