

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19006

研究課題名(和文) ALS治療を目的とした糖鎖によるミクログリア形質転換機構の解明

研究課題名(英文) Study of microglial transformation mechanism for ALS therapy

研究代表者

小林 和克 (Kazuyoshi, Kobayashi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00706294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ケラタン硫酸(以下KSPG)がALS発病に関わるメカニズムの解明を行った。発病時におけるKSPG欠損型マウス群では、塩基性ヘパリン結合性の分泌タンパク一群であるケモカイン(CCL2, CCL3, CCL4, CC5, CCL7, CCL12)の発現増加が認められた。またGAG bindingに関連するリガンド・レセプターのアップレギュレーションが同定された。ケモカインは、Gタンパク質共役受容体を介してその作用を発現する塩基性タンパク質であり、白血球などの遊走を引き起こし炎症の形成に関与する。KSPG存在によるGAG bindingが、脊髄変性の発病に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the mechanism of keratan sulfate involvement in ALS pathogenesis. Increased expression of chemokines (CCL 2, CCL 3, CCL 4, CC 5, CCL 7, CCL 12) was observed in the KSPG deficient mouse group. In addition, upregulation of ligand / receptor related to GAG binding was identified. Chemokines are basic proteins that exert their effects through G protein-coupled receptors. Then, chemokines cause migration such as white blood cells and are involved in the formation of inflammation. In summary, GAG binding due to the presence of KSPG was thought to be involved in the onset of spinal degeneration.

研究分野：脊椎外科

キーワード：脊髄損傷 ミクログリア ケラタン硫酸 ALS 脊髄変性疾患 形質転換

### 1. 研究開始当初の背景

難治性筋萎縮性疾患の一つ筋萎縮性側索硬化症(以下 ALS)患者は、四肢を含め全身の筋力低下を引き起こし、多くの場合5年以内に呼吸筋麻痺で死亡する難病である。著名人での罹患としては、ルー・ゲーリッグ(メジャーリーガー)、毛沢東、スティーブン・ホーキング博士があげられる。一方で、見つかったから2世紀が経ち様々な研究により遺伝的変異が報告されてきたものの、現在でも根本的な疾患原因が分かっておらず根治療法はなく一刻も早い治療法の解明が待たれる疾患である。

これまでに米国の Kristina A. Kigerl らはマウス脊髄損傷に関して、また米国の Shweta Mandrekar-Colucci らはアルツハイマーモデルに関して、これら M1/M2 ミクログリアが脊損後時期を異にしてそれぞれ発現することを報告した(Journal of Neurosci.29 13435-13444,2009, Journal of Neurosci.32.10117-10128,2012)。

一方申請者は、2種類の活性化ミクログリア(M1、M2)が、ALS発病時期を異にしてそれぞれ発現することを報告し、その結果ケラタン硫酸(KS)と呼ばれる糖鎖を用いることで、早期病態形成に関わる2種類の活性化ミクログリア(M1、M2)を明確に差別化することを可能とした。さらに活性型ミクログリアの抑制作用を有する薬剤：ミノサイクリンの早期投与により進行期のM1ミクログリア増加を抑制し、さらにマウスの生存率を向上させることを明らかにしてきた。そしてこの理由はミノサイクリンがもつM1ミクログリア誘導への転写因子 NFκB の発現量を強く抑制する作用の為である事を明らかにした(Cell Death Dis. 2013)。また申請者らは、ALSの発症早期にミクログリア上で発現し始めるケラタン硫酸と呼ばれる特徴的な糖鎖がM2ミクログリアの増加に貢献しており、ケラタン硫酸の欠損によって生存率が低下することを明らかにした(Plos One. 2013)。このように、ミクログリアがALS病態形成の極めて早い段階で明確に差別化できる様になっており、両者が病態形成に重要であることを示した。

### 2. 研究の目的

近年、本疾患の病態形成には運動ニューロン自体の変性のみならず、ミクログリアやアストログリアの様な周辺グリア細胞の活性化が極めて重要であると言われている。特にミクログリアのうち活性化ミクログリアには炎症性サブタイプ(M1)と抗炎症性サブタイプ(M2)の2種類があり、発症早期にはM2ミクログリアが一過性に増加し、進行期にはM1ミクログリアが急速に増加する。本

研究では、細胞内シグナル伝達分子や転写因子の発現量変化に焦点を当て、未だ解明されていない炎症性ミクログリア(M1)、抗炎症性ミクログリア(M2)の選択的な誘導メカニズムを明らかにすることを目的とする。これを明らかにできれば、病期進行の解明に寄与するのみならず、ミクログリア形質転換による新たな治療に大きく貢献できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 運動機能評価の検討

現在、ALSマウスとしてJAX社から購入したB6.Cg-Tg(SOD1-G93A1Gur/J)マウス(S群)を使用しており、同時に、ケラタン硫酸(KS)合成酵素であるGlcNAc6ST-1遺伝子を欠損させたKS欠損型ALSマウス(SG群)も利用している。雄個体を主に継代維持に使用することで、(SGヘテロ、Gヘテロ)を作製し、S群およびSG群マウスを用いて運動機能評価(Rota-rod使用)を検討した。

#### (2) 発現遺伝子解析

ALSマウス(S群)とALS KSPG K/Oマウス(SG群)の脊髄を一塊として摘出し、RNA抽出した後に、DNA microarrayにて遺伝子発現を網羅的に解析した。

#### (3) マイクロアレイの結果に基づいたM2遺伝子発現遺伝子群の同定

候補遺伝子に対する特異的プライマーを用いて、脊髄組織を用いた定量PCRを行い、M2ミクログリア遺伝子の発現制御に関わると予測される遺伝子群を絞り込む。

### 4. 研究成果

#### (1) 運動機能評価：

S群(n=60)とSG群(n=65)との比較では、SG群においてLifespanは有意に短縮を認められた。Rota-rodを用いた運動機能評価では、15rpm・20rpmともに両群間で、罹病期間(疾患進行度)に差は無く、Lifespanの差は疾患onsetの差によるものであった。(図1、2)

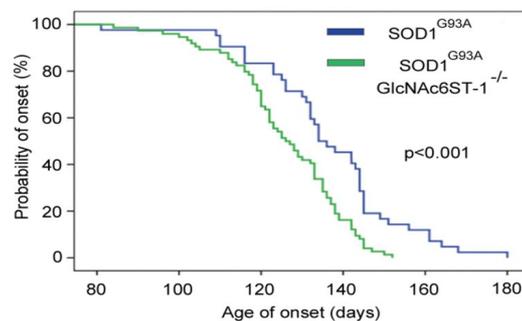


図1：S群、SG群の生存曲線 (Onset：発病)

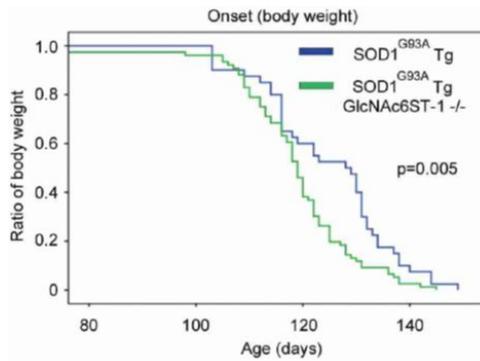


図 2: S 群、SG 群の生存曲線 (Rot a rod 15rpm)

(2) 主要ケモカイン 24 種の発現変化を図 3 に示す。Ratio>1.5 となりえた候補遺伝子は、10 種にみとめた。

マイクロアレイ			主要ケモカイン(24種)の発現変化		
Symbol	別名	Ratio SG群/S群	Symbol	別名	Ratio SG群/S群
Ccl1	TCA-3	0.89	Cxcl1	GRO1	2.19
Ccl2	MCP1	1.84	Cxcl2	GRO2	0.83
Ccl3	MCP3	1.92	Cxcl4	PF-4	0.95
Ccl4	TRAC	1.81	Cxcl5	ENA-78	0.99
Ccl5	Rantes	1.94	Cxcl9	MIG	1.52
Ccr6	C10	0.89	Cxcl10	IP-10	1.54
Ccl7	MARC	1.87	Cxcl11	I-TAC	0.76
Ccl8	MCP-2	1.38	Cxcl12	SDF-1	1.24
Ccl9	MRP-2	1.10	Cxcl13	BLC	1.57
Ccl11	Eotaxin	0.94	Cxcl15	WECHHE	1.08
Ccl12	MCP5	1.63	Cxcl16	SRPSOX	1.38
Ccl17	TARC	0.91	Cx3cl1	Fractalkine	1.11

図 3 : マイクロアレイによる主要ケモカイン (24 種) 発現変化

(3) 上記候補遺伝子について、S 群と SG 群の脊髄細胞における発現を、各種特異的プライマーを用いて検討した (RT-PCR)。その結果 KSPG 発現に関して、Ccl5 (別名: Rantes) の関与が示された (図 4,5)。

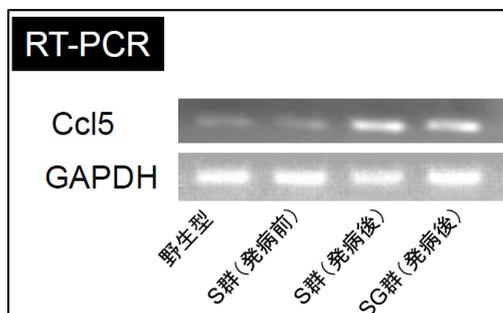


図 4 : KSPG 発現に関して、Ccl5 (別名: Rantes) の関与が示された。

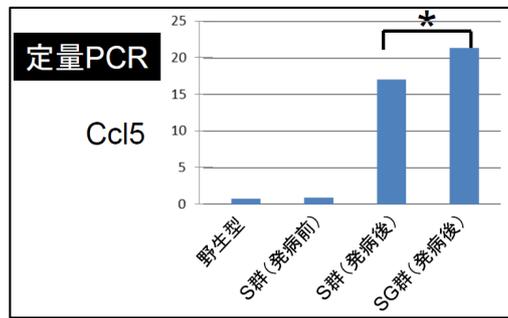
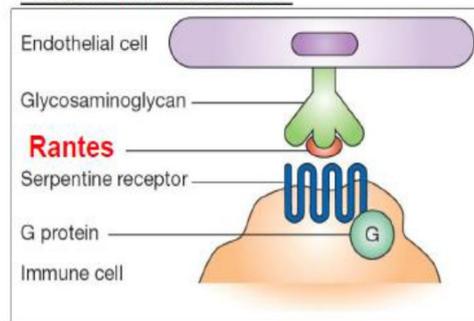


図 5 PCR 発現の定量結果: KSPG 発現に関して、Ccl5 (別名: Rantes) の関与が示された。

#### 4. 研究成果

ケモカインは、低分子量のタンパク質であり、標的細胞上のレセプターを介してシグナル伝達を誘起し、走化性などに関することが知られている。ケモカインレセプターはいずれも 7 階膜貫通型受容体で有り、G 蛋白質共役型受容体に属する。

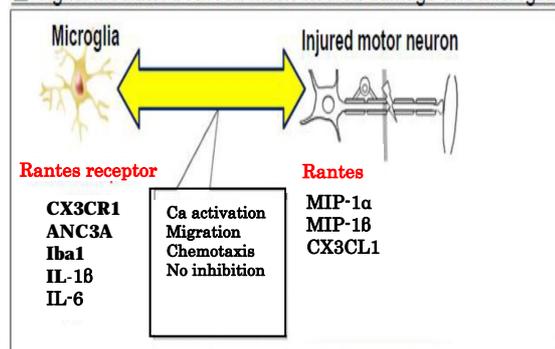
#### ■ GAG bind RANTES



Nat Clin Pract Nephrol. 2007

図 6 GAG 鎖と Rantes 結合

#### ■ Signal mediator between motor neuron damage and microglia



JNS 2008

図 7 Microglia と Motor neuron 損傷の Signal Mediator

ケモカインファミリーは、現在のところ 50 種類以上同定されており、G タンパク質受容体を介してその作用を発現する塩基性タンパク質で、白血球遊走を引き起こし、炎症に関与するといわれている。ケモカインは、低分子量のタンパク質であり、

標的細胞上のレセプターを介してシグナル伝達を誘起し、走化性などに関することが知られている。ケモカインレセプターはいずれも7階膜貫通型受容体で有り、G蛋白質共役型受容体に属する。

これまでの報告で、CCR5はミクログリア上に発現しており、RANTESはMotor neuronの損傷においてup-regulatedされること、さらにCCR5とそのレセプターであるCCL5でのアポトーシスがglycosaminoglycan bindingに関与していることが報告されている。(図6: Nat Clin Pract Nephrol 2007, 図7: JNS 2006)

本研究から、新たに、KSPG存在によるGAG bindingに関して、Rantes(CCL5)が、ALSの発病に関与していると考えられた。プロテオグリカン的一种KSPGはALSの生命予後に関与し、その一因としてケモカインRantes(CCL5)によるGAG bindingの関与が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

Kobayashi K, Imagama S, Ando K, Nishida Y, Ishiguro N. Acute non-traumatic idiopathic spinal subdural hematoma: radiographic findings and surgical results with a literature review. Eur Spine J. In press, 2017 (査読あり)

Kobayashi K, Imagama S, Ando K, et al. (45名、1番目) Complications associated with spine surgery in patients aged 80 years or older. Global Spine J. In press, 2017 (査読あり)

Kobayashi K, Imagama S, Ando K, et al. (46名、1番目) Risk factors for delirium after spine surgery in extremely elderly patients aged 80 years or older and review of the literature. Global Spine J. In press, 2017 (査読あり)

Kobayashi K, Imagama S, Sato K, et al. (10名、1番目) Postoperative complications associated with spine surgery in patients over 90 years old: A multicenter retrospective study. Global Spine J. In press, 2017 (査読あり)

Kobayashi K, Imagama S, Kato D, Ando K, Hida T, Ito K, Tsushima M, Matsumoto A, Morozumi M, Tanaka S, Yagi T, Nishida Y, Ishiguro N. Collaboration with an infection control team for patients with infection after spine surgery. Am J Infect Control. 6553(17)30035-4. 2017 (査読あり)

Kobayashi K, Imagama S, Ando K, Hida T, Ito K, Tsushima M, Ishikawa Y, Matsumoto

A, Morozumi M, Nishida Y, Nagao Y, Ishiguro N. Analysis of Incident and Accident Reports and Risk Management in Spine Surgery. Spine. in press 2017 (査読あり)

Kobayashi K, Imagama S, Ito Z, Ando K, Hida T, Ishiguro N. Prevention of spinal cord injury using brain-evoked muscle-action potential (Br(E)-MsEP) monitoring in cervical spinal screw fixation. Eur Spine J. in press 2017 (査読あり)

Kobayashi K, Imagama S, Ito Z, Ando K, Hida T, Ito K, Tsushima M, Ishikawa Y, Matsumoto A, Nishida Y, Ishiguro N. Transcranial motor evoked potential waveform changes in corrective fusion for adolescent idiopathic scoliosis. J Neurosurg Pediatr. 2017;19(1):108-115. (査読あり)

Kobayashi K, Imagama S, Ando K, Hida T, Ito K, Tsushima M, Ishikawa Y, Matsumoto A, Morozumi M, Tanaka S, Ishiguro N. Contrast MRI Findings for Spinal Schwannoma as Predictors of Tumor Proliferation and Motor Status. Spine. 2017;42(3):E150-E155. (査読あり)

Kobayashi K, Imagama S, Ito Z, Ando K, Yagi H, Shinjo R, Hida T, Ito K, Ishikawa Y, Matsuyama Y, Ishiguro N. Tuberculous meningitis with dementia as the presenting symptom after intramedullary spinal cord tumor resection. Nagoya J. Med. Sci. 77(4):653-7. 2015 (査読あり)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等: なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 和克 (Kobayashi Kazuyoshi)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教  
研究者番号: 00706294

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし