

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15457

研究課題名（和文）CRMP2の機能解明に基づく神経変性疾患の治療法開発

研究課題名（英文）The development of the treatment of neurodegenerative disorders based on the functional analysis of CRMP2

研究代表者

中村 治子（NAKAMURA, Haruko）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：70806223

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：MSAの免疫染色でリン酸化CRMP1/2はGCIにおいて シヌクレイン、LC3と共局在を示した。凍結脳のtotal lysateはMSAでリン酸化CRMP1/2の低下を認める一方で、不溶分画ではコントロールと差を認めなかった。CRMP2欠損マウスではLC3 / の低下、リソソーム輸送の亢進を認めたことから、CRMP2がオートファジー・リソソーム輸送を修飾し、GCIに蓄積すると考えられた。一方ALSではCRMP1リン酸化上昇を認め、CRMP1の非リン酸化は、ALSモデルマウスの生存率延長、運動機能を改善した。これらの知見からCRMPのリン酸化阻害がALSの治療ターゲットになると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、軸索ガイダンスプロテインであるセマフォリン3Aの下流分子であるCRMPのリン酸化変化が多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症で認められることを発見し、さらにその知見に基づき、CRMP非リン酸化マウスを作製し、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスと掛け合わせることで、CRMPの非リン酸化が筋萎縮性側索硬化症の表現型を改善することを示した。これらの研究を、神経変性疾患におけるCRMPをターゲットとした治療法開発の礎になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Immunostaining of MSA showed that phosphorylated CRMP1/2 colocalized with synuclein and LC3 in GCI. Total lysate in frozen MSA brains showed a decrease in phosphorylated CRMP1/2 in MSA compared to disease control but not in insoluble fraction. In CRMP2-deficient mice, a decrease in LC3II/I and an increase in lysosomal transport were observed, suggesting that CRMP2 modifies autophagy and lysosomal transport and accumulates in GCI. On the other hand, increased CRMP1 phosphorylation was observed in ALS, and the inhibition of CRMP1 phosphorylation prolonged survival and improved motor function in ALS model mouse. Based on these findings, it is thought that inhibition of phosphorylation of CRMP1 is a therapeutic target for ALS.

研究分野：神経内科

キーワード：CRMP 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、Collapsin Response Mediator Protein (CRMP)に注目し、研究を推進してきた。CRMPは1-5のサブタイプが存在する。CRMP2はアルツハイマー病での過剰リン酸化が報告されているが、さらに多様な神経変性疾患でCRMP2の過剰リン酸化が生じていると考えた。我々は、多系統萎縮症(MSA)の剖検脳の橋において、CRMP2のリン酸化亢進を認めることを免疫組織学的手法で示した。また、CRMP2はGlial Cytoplasmic Inclusion (GCI)のシヌクレインと共局在を示した。一方で、筋萎縮性側索硬化症(ALS)において、CRMP1のリン酸化が上昇していることを示した。これらの知見から、MSAではCRMP2の過剰リン酸化が、ALSではCRMP1の過剰リン酸化が病態に関与している可能性が考慮された。これまでCRMP2欠損マウス、CRMP2の522番目セリンのリン酸化を阻害したCRMP2S522Aノックインマウス(CRMP2S522Aマウス)の作製・解析を通じ、CRMP2の機能解明を行っており、CRMP2欠損マウスの大脳皮質神経細胞では、リソソーム系の輸送が亢進していることを見いだした。また、CRMP2S522Aマウスのプロテオミクス解析を行ったところ、KEGGパスウェイ解析でオートファジー関連経路を同定した。これらの知見からCRMP2がオートファジー・リソソーム輸送に関与していると考えられた。そこで、過剰リン酸化CRMP2が神経内輸送・オートファジー・リソソームの機能異常を引き起こし、MSAの病態に関与していると考えた。一方で、ALSに関しては、CRMP1の過剰リン酸化が、ALSの病態を修飾している可能性が考えられ、CRMP1非リン酸化マウスを作製した。CRMP1非リン酸化マウスと、ALSモデルマウスであるSOD1G93Aマウスのバイジェニックマウスを作製し、ALSモデルマウスの表現型にCRMP1の非リン酸化がどう影響を与えるかについて検討を行った。

2. 研究の目的

神経変性疾患におけるCRMPの病態メカニズムを明らかにすることで、CRMPリン酸化阻害を標的とした治療法の開発を行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)免疫組織染色によるCRMP2,リン酸化CRMP1/2の染色性の検討

MSAにおけるCRMP2の病理学的特徴を明らかにするために、total CRMP2,リン酸化CRMP1/2の発現を免疫組織学的手法で明らかにする。また、他の疾患コントロールとの発現の違いを比較検討する。

(2)凍結脳のbrain lysateにおけるCRMP2,リン酸化CRMP1/2の発現の検討

凍結脳(小脳)を図2Aのプロトコールに則り、S1-3,P1-3に分け、それぞれの画分におけるtotal CRMP2,リン酸化CRMP1/2の発現をWestern blottingにてMSAとコントロールで比較した。

(3)CRMP2遺伝子変異マウスにおけるオートファジーマーカーの検討

CRMP2欠損マウス、CRMP2非リン酸化マウス(S522A)の脳におけるオートファジーマーカーLC3の発現をwestern blottingにて検討を行った。

(4)CRMP2欠損マウスにおけるリソソーム輸送の定量化

CM-DiI染色で認識される粒子はリソソーム関連蛋白であるLysosome associated membrane protein1(Lamp1)と共局在を示す。CM-DiI染色の粒子の数をコンピューター解析により定量化する方法を確立しており、この方法を用いてCRMP2遺伝子変異マウス大脳皮質神経細胞におけるリソソームの輸送の定量化を行った。

(5)CRMP1非リン酸化マウス、ALSモデルマウスSOD1G93Aマウスとのバイジェニックマウスの作製、および行動解析

以前作製したCRMP1欠損マウスに加え、CRMP1非リン酸化マウスを作製した。ALSモデルマウスであるSOD1G93Aマウスとかけ合わせ、バイジェニックマウスをそれぞれ作成し、ALSの表現型に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1)免疫組織染色におけるMSAのtotal CRMP2,リン酸化CRMP1/2の発現の検討

頸椎症,進行性核上性麻痺の小脳ではtotal CRMP2,リン酸化CRMP1/2の染色性はほとんど認められず、MSAの小脳では白質を中心に、頸椎症,進行性核上性麻痺と比較し、total CRMP2,リン酸化CRMP1/2の染色性が上昇していた。一方、サルコイドーシス、嗜銀顆粒性認知症ではtotal CRMP2,リン酸化CRMP1/2の発現が小脳に認められたが、MSAと比較し、小脳皮質で特に顕著だった(図1A,B)。

(2)MSAの小脳ではCRMP2はリン酸化シヌクレイン、LC3と共局在を示した

蛍光組織染色では、リン酸化CRMP2とリン酸化シヌクレインが一部共局在を示した(図1C)。

一方オートファジーマーカーである LC3 とリン酸化 CRMP1/2 は共局在を示した(図 1D) .

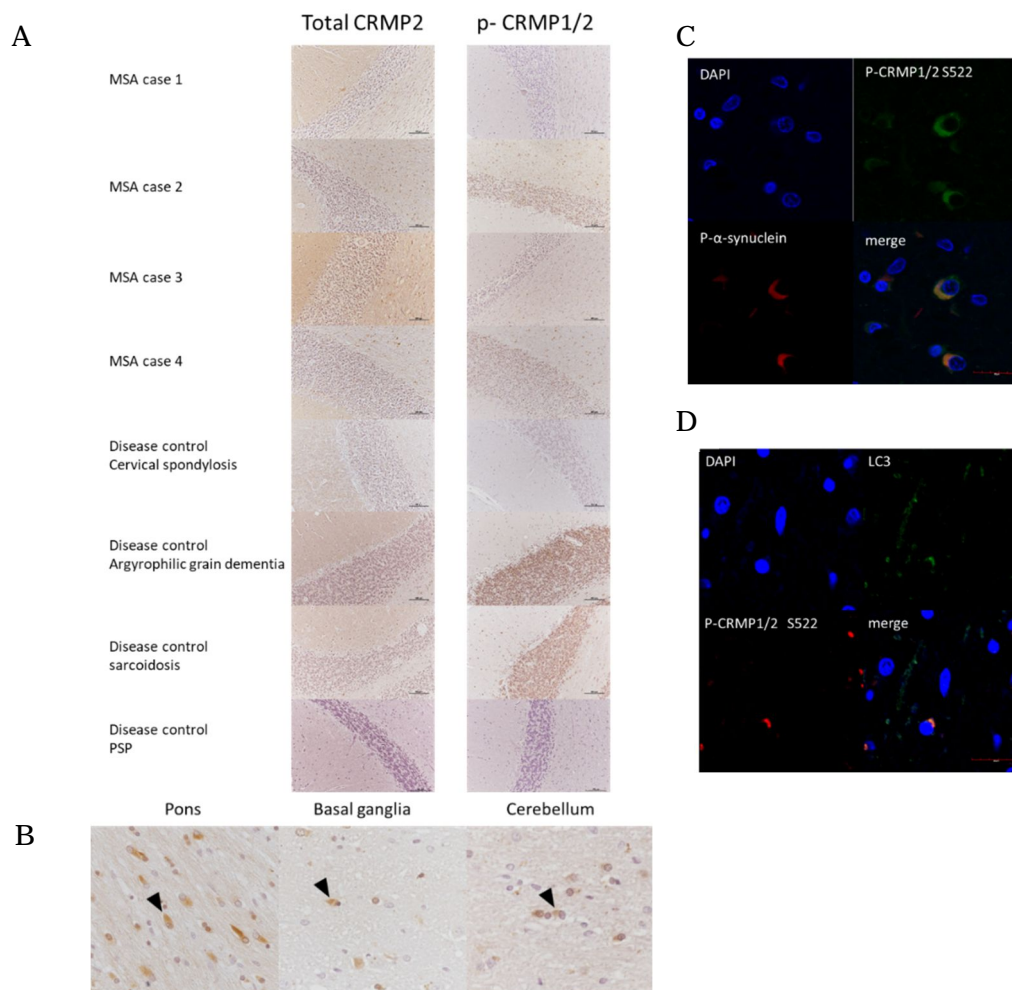


図 1:MSA における CRMP2,リン酸化 CRMP1/2 の免疫組織染色

A:MSA case 1-4, 疾患コントロール (頰椎症, 嗜銀顆粒性認知症, サルコイドーシス,PSP) の小脳の免疫組織染色

B:MSA の橋, 大脳基底核, 小脳の免疫組織染色 (矢頭 : GCI)

MSA の GCI においてリン酸化 CRMP1/2 は, (C)リン酸化 シヌクレイン, (D)LC3 と共局在を示した .

(3)MSA の凍結脳における western blotting による total lysate でリン酸化 CRMP1/2 の検討

疾患コントロール (てんかん, 嗜銀顆粒性認知症, サルコイドーシス) と MSA の小脳皮質, 白質の凍結脳を図 1A のプロトコールに基づいて画分に分けた .P3 ではコントロールと MSA で明らかな発現の差はみられなかった(図 2C) . 一方で, MSA では小脳皮質の S1 画分でリン酸化 CRMP1/2 の発現が著明に低下していた . 小脳白質については, 明らかな差はみられなかった(図 2B) .

(4)CRMP2 欠損マウスでは, LC3 / 比の低下を認めた

CRMP2 欠損マウスでは, オートファジーマーカーである LC3 / の低下が認められた . 一方で, CRMP2 非リン酸化マウスでは野生型と明らかな違いは認められなかった . (図 3A,B)

(5)CRMP2 欠損マウスでは, リソソーム輸送が亢進していた

CRMP2 欠損マウスの大脳皮質神経細胞を培養し，CM-DiI で染色し，live imaging を行ったところ，リソソーム輸送を反映する CM-DiI 陽性の粒子数が逆行性輸送にて増加を認めた．(図 4A,B)

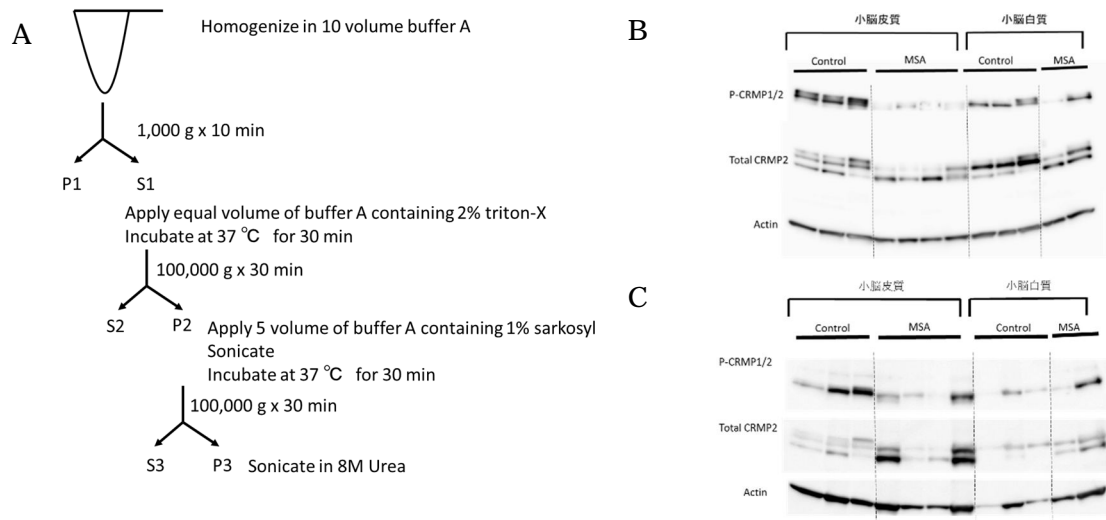


図 2:凍結脳における CRMP2 の発現の検討

(A):凍結脳のサンプル調整

(B)(C): (B)S1,(C)P3 における total CRMP2, リン酸化 CRMP1/2 の発現

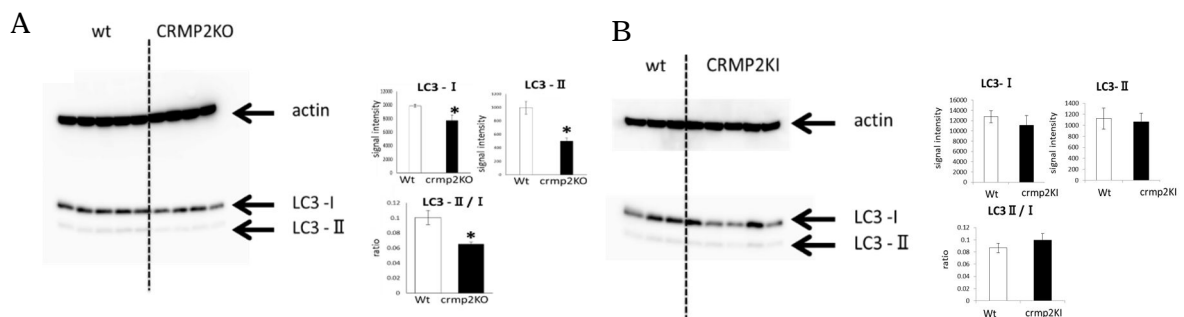


図 3:CRMP2 遺伝子変異マウスにおけるオートファジーマーカーの発現の変化

(A)CRMP2KO マウス (B):CRMP2KI マウスの前頭前野における LC3 の発現

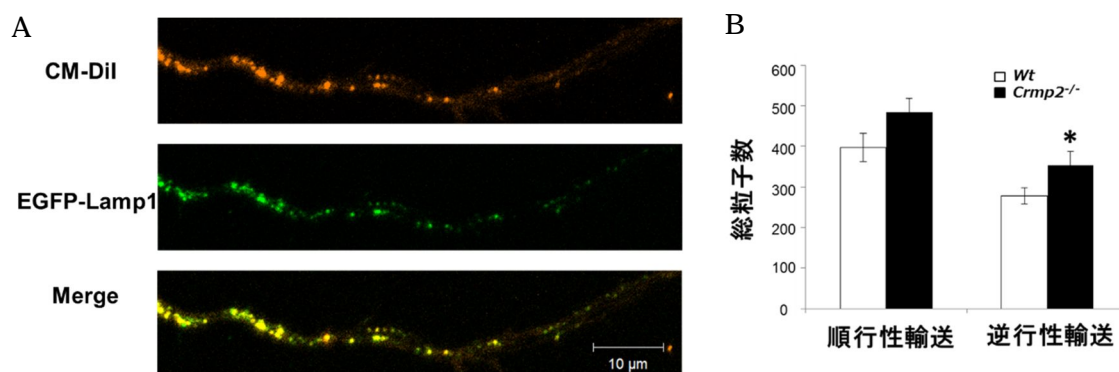


図 4:CRMP2 欠損マウスでは，大脳皮質神経細胞の逆行性輸送が亢進していた

(A):大脳皮質神経細胞に EGFP-Lamp1 を遺伝子導入し，CM-DiI で染色したところ，共局在を示した．(B)CM-DiI の粒子をコンピューター解析で定量化したところ，逆行性輸送が亢進していた．

(6)CRMP1 リン酸化阻害は，ALS モデルマウスの表現型を改善した．

CRMP1 の 522 番目のセリンをアラニンに置換した CRMP1 非リン酸化マウス(*Crmp1^{ki/ki}*)を作製した．また，以前に作製した CRMP1 欠損マウス(*Crmp1^{-/-}*)を ALS モデルマウスである *SOD1^{G93A}* と交配し，バイジェニックマウスを作製した．*Crmp1^{ki/ki}/SOD1^{G93A}* はロータロッド試験において，落下潜時が延長した一方で，*Crmp1^{-/-}/SOD1^{G93A}* マウスは落下潜時が短縮した．生存率に関しては，

Crmp1^{ki/ki}/SOD1^{G93A} で延長を認めた一方で, *Crmp1^{-/-}/SOD1^{G93A}* では影響はみられなかった(図5).

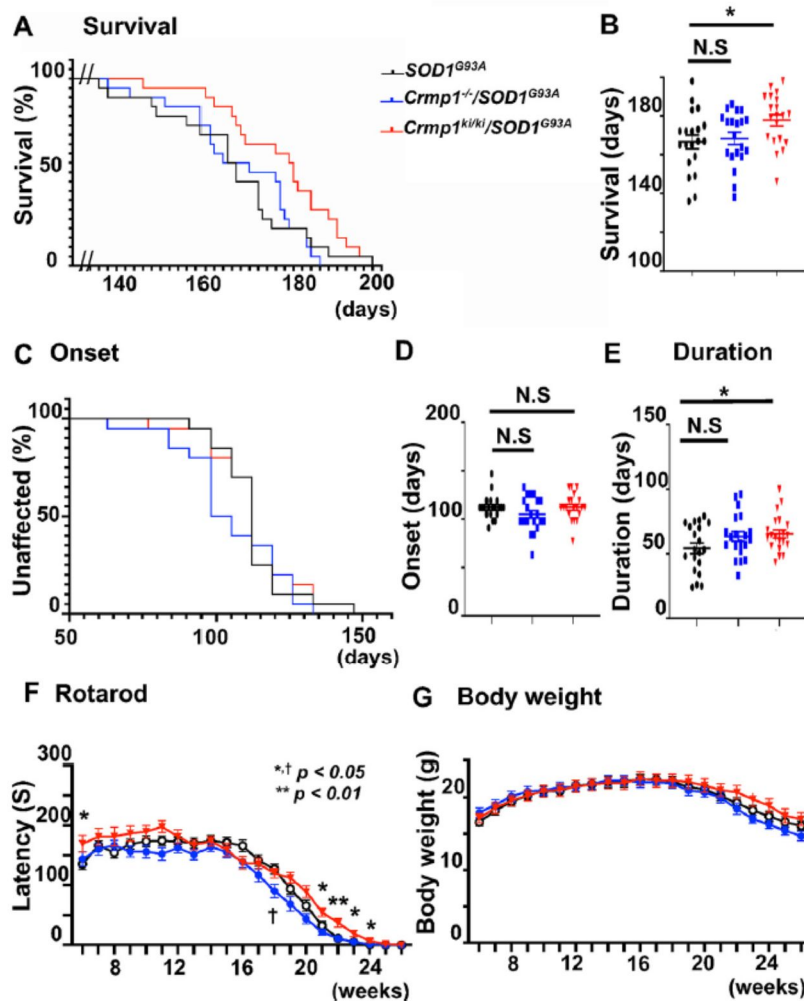


図5:CRMP1 リン酸化阻害は, ALS の表現型を改善した. *Crmp1^{ki/ki}/SOD1^{G93A}* および, *Crmp1^{-/-}/SOD1^{G93A}* マウスの表現型解析(A)(B)生存率, (C)(D)発症時期, (E)罹病期間, (F)ロータロッド試験, (G)体重

【考察】

今回我々は, MSA における CRMP2 の発現について検討を行った. 凍結脳の total brain lysate と考えられる S1 におけるリン酸化 CRMP1/2 は, 小脳皮質で疾患コントロールと比較し, 明らかな低下を認めた. 不溶画分である P3 では, S1 と比較し, MSA でリン酸化 CRMP1/2 の発現がみられており, MSA では不溶画分にリン酸化 CRMP1/2 が蓄積する傾向があると考えられた. 免疫染色において, MSA におけるリン酸化 CRMP1/2 は一部リン酸化 シヌクレインと共局在を示したことから, リン酸化 CRMP1/2 の一部はグリア細胞質封入体(GCI)に存在すると考えられた. CRMP2 遺伝子変異マウスでの検討では, CRMP2 欠損マウスでは, LC3 / が低下し, リソソーム輸送は亢進していた. MSA の小脳において, リン酸化 CRMP2 は LC3 と共局在することから CRMP2 がオートファジー・リソソームの輸送を修飾し, GCI に蓄積する機序が考えられた. MSA における CRMP2 のリン酸化の役割に関しては, 単純なリン酸化上昇というよりは, リン酸化 CRMP2 の局在変化が病態に関与している可能性が示唆された. 一方で, CRMP1 の非リン酸化は, ALS モデルマウスの表現型を改善した. 今後の展望として, CRMP1 のリン酸化をターゲットとした ALS の治療法開発が望まれると考えられた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Asano Tetsuya, Nakamura Haruko, Kawamoto Yuko, Tada Mikiko, Kimura Yayoi, Takano Hiroshi, Yao Ryoji, Saito Hiroya, Ikeda Takuya, Komiya Hiroyasu, Kubota Shun, Hashiguchi Shunta, Takahashi Keita, Kunii Misako, Tanaka Kenichi, Goshima Yoshio, Nakamura Fumio, Takeuchi Hideyuki, Doi Hiroshi, Tanaka Fumiaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibition of Crmp1 Phosphorylation at Ser522 Ameliorates Motor Function and Neuronal Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0133-22.2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawamoto Yuko, Tada Mikiko, Asano Tetsuya, Nakamura Haruko, Jitsuki-Takahashi Aoi, Makihara Hiroko, Kubota Shun, Hashiguchi Shunta, Kunii Misako, Ohshima Toshio, Goshima Yoshio, Takeuchi Hideyuki, Doi Hiroshi, Nakamura Fumio, Tanaka Fumiaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Phosphorylated CRMP1, axon guidance protein, is a component of spheroids and is involved in axonal pathology in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2022.994676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hagihara Hideo, Shoji Hirotaka, Nakamura Haruko, Goshima Yoshio, Sakimura Kenji, Miyakawa Tsuyoshi et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Large-scale animal model study uncovers altered brain pH and lactate levels as a transdiagnostic endophenotype of neuropsychiatric disorders involving cognitive impairment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.89376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅野 徹也, 中村 治子, 川本 裕子, 多田 美紀子, 木村 弥生, 高野 洋志, 八尾 良司, 橋口 俊太, 高橋 慶太, 國井 美紗子, 田中 健一, 五嶋 良郎, 中村 史雄, 竹内 英之, 土井 宏, 田中 章景
2. 発表標題 Ser 522-phosphorylation of CRMP1 modulates the motor function of amyotrophic lateral sclerosis mice
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------